



# Metodologie molekulární fylogeneze a taxonomie hmyzu

## Bi7770

Andrea Tóthová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Metody

Molekulární znaky mají oproti klasickým řadu výhod:

Je jich libovolné množství

Jsou vzájemně distinktní, kvalitativní

Umožňují srovnávat i nepříbuzné organizmy

Jsou selekčně neutrální

# **Kde se molekulární biologie využívá?**

**Recentně aplikované technologie –  
genetické inženýrství, DNA finger-printing v  
sociální a forenzní sféře, pre a postnatální  
diagnostika dědičných nemocí, genová  
terapie, „ drug Design“ ...**

**Detekce infekčních nemocí, monitoring  
populací, záchrana ohrožených druhů,  
příbuzenské vztahy...**

# Základné metody

- Štěpení NK
- Polymerase chain reaction
- Proby, hybridizace
- Vektory, molekulární klonování
- Microarrays
- DNA sequencing
- Elektroforetická separace NK
  
- Detekce genů:
  - \*DNA: Southern blotting; inSitu hybridization; FISH  
Technique
  - \*RNA: Northern blotting
  - \*Protein: Western blotting, immunohistochemistry

K purifikaci (extrakci) nukleových kyselin může být jako vstupní materiál použit:

- krev
- tkáň
- bakterie
- houby
- živočišné buňky
- rostliné buňky
- exkrementy, vývržky
- agarózové gely



# Výběr použité techniky závisí pouze na nás...

- typ vstupného materiálu
- očekávaný výtěžek
- věk vzorků
- čas
- finance
- požadovaná kvalita

# Všeobecný postup extrakce:

1. Digesce tkáně / lyze buněk
2. „chelátování“ a proteinázová fáze
3. Separace NK a proteinů
4. Pročištění

# Digestce tkání/ lyze buněk

- narušit buňky nebo tkáně
- vyhnout se metodám, které narušují DNA
- zvolená metoda závisí na typu buněk

## Příklady metod:

- enzyme-based lyzozýmy
- ultrazvuk
- tekutý dusík
- SDS-based narušení membrány



# QIAGEN DNeasy B&T kit

1. Použití Proteinase K
  - rozkládá proteiny a inhibuje nukleázy
2. Lyze: Buffer AL (guanidium-HCl)
  - hypertonický solný roztok
3. Vysrážení DNA s EtOH
4. Spin column - DNA se naváže na silica-membránu
5. Promytí
6. Eluce 1 (příp. 2), s teplým Bufferem AE (Tris-EDTA)

# Je život fair?

- 1983 - Kary Mullis, vědec pracující pro Cetus Corporation řídil podél US Route 101 v severní Californii, když ho napadla myšlenka polymerázové řetězové reakce
- 1985 - metoda PCR byla představena vědecké komunitě na kongresu

- Cetus odměnil Karyho Mullise \$10,000 bonusem za jeho nápad
- později, počas korporátní reorganizace Cetus prodává patent na PCR farmaceutické firmě Hoffmann-LaRoche za \$300 millionů

**Život není fair!**

# PCR: Amplifikace DNA

- Často je k dispozici jen malé množství DNA
  - kapka krve
  - Vzácný typ buněk
- V současnosti existují dvě metody pro amplifikaci DNA nebo tvorbu kopií
  - Klonování—trvá dlouho, než dostatek klonů dosáhne požadovaného stupně kvality
  - PCR—funguje dokonce i na jediné buňce hned

# Co potřebuje PCR?

- Templát (DNA, kterou testujeme)
- Specifické primery pro studovanou oblast, forward a reverz
- Polymeráza
- Nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Magnesium chloride (enzyme cofactor)
- Buffer
- Enhancer
- Vysoce kvalitní DNA-free voda, minerální olej

# Všeobecné PCR podmínky

- Magnesium chloride: 0.5-2.5mM
- Buffer: pH 8.3-8.8
- dNTPs: 20-200 $\mu$ M
- Primery: 0.1-0.5 $\mu$ M
- DNA Polymeráza: 1-2.5 units
- Templátová DNA:  $\leq 1 \mu\text{g}$

# Kroky PCR

- Denaturation      93 to 95 C      1min
- Annealing          50 to 55 C      45sec
- Elongation          70 to 75 C      1-2min

# Jak tedy probíhá PCR?

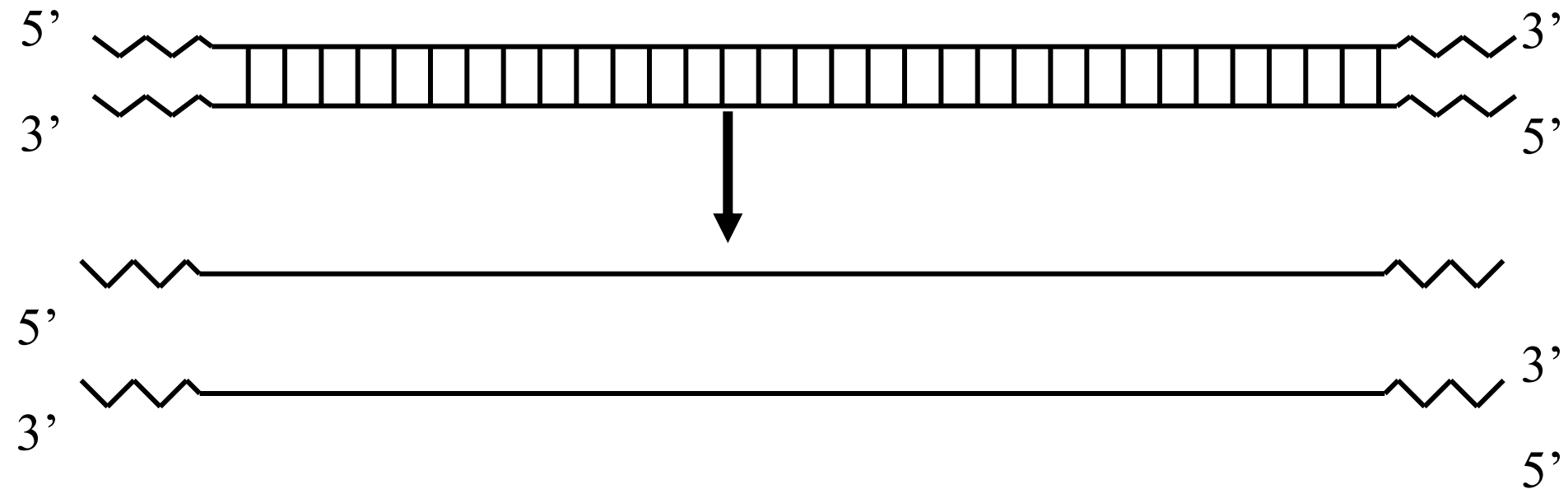
- Horko (94°C) k denaturaci DNA dvouvláken
- Zchlazení (54°C) k přisednutí primerů k templátu
- Teplo (72°C) k aktivaci *Taq* Polymerázy, která prodlužuje primery a replikuje DNA
- Opakování cyklu



# Denaturace

Denaturace je první krok, kde se DNA rozpojí vlivem tepla

Vodíkové můstky se přeruší a obě vlákna se oddělí

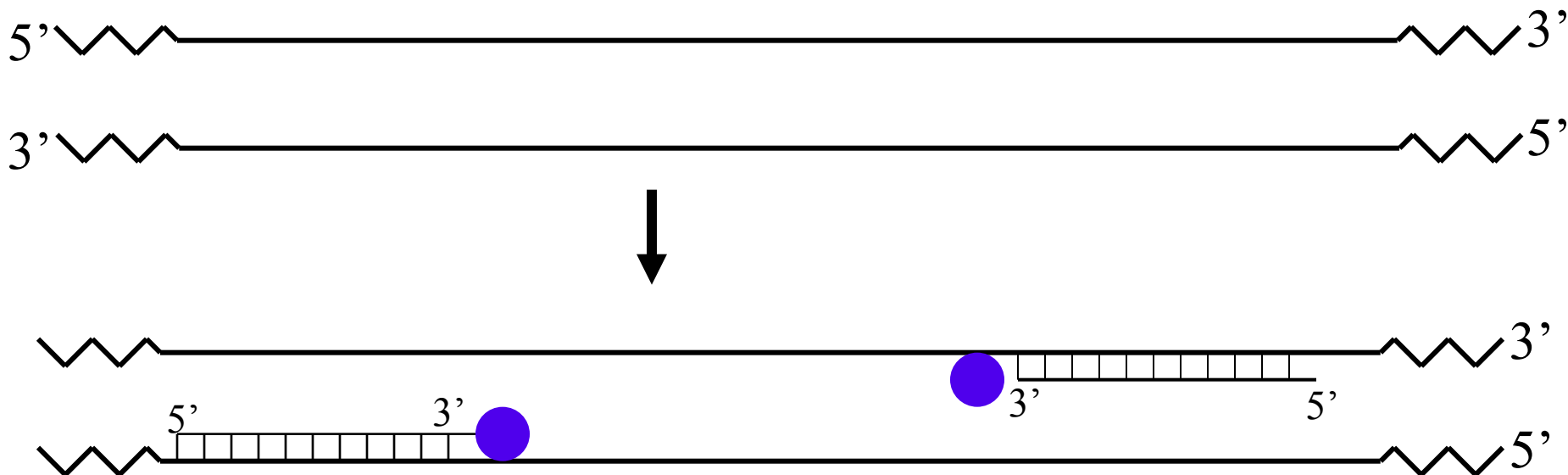


# Annealing

Annealing je proces vytváření vodíkových vazeb, kdy nasednou specifické primery na komplementární místo templátu

Probíhá při zchlazení na 55 C.

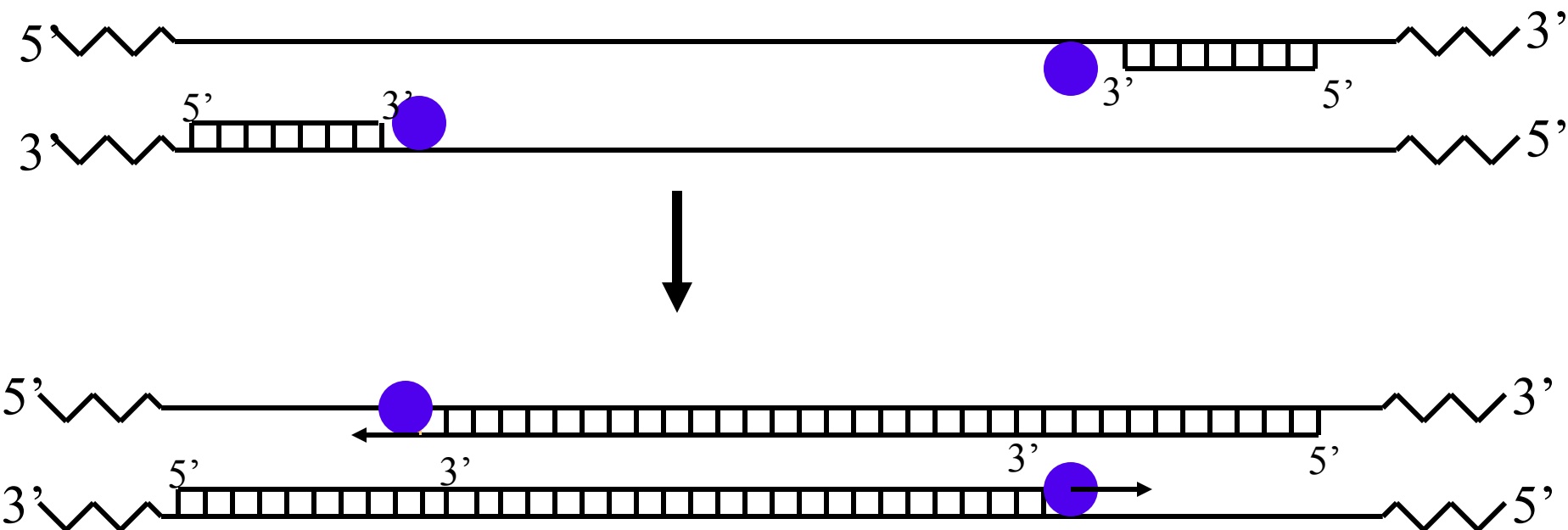
Čas potřebný k tvorbě nového vlákna je ca. 45 sekund (pro 1kb)



# Elongace

Taq polymeráza se váže k templátu a začne připojovat volné nukleotidy komplementární k původnímu řetězci

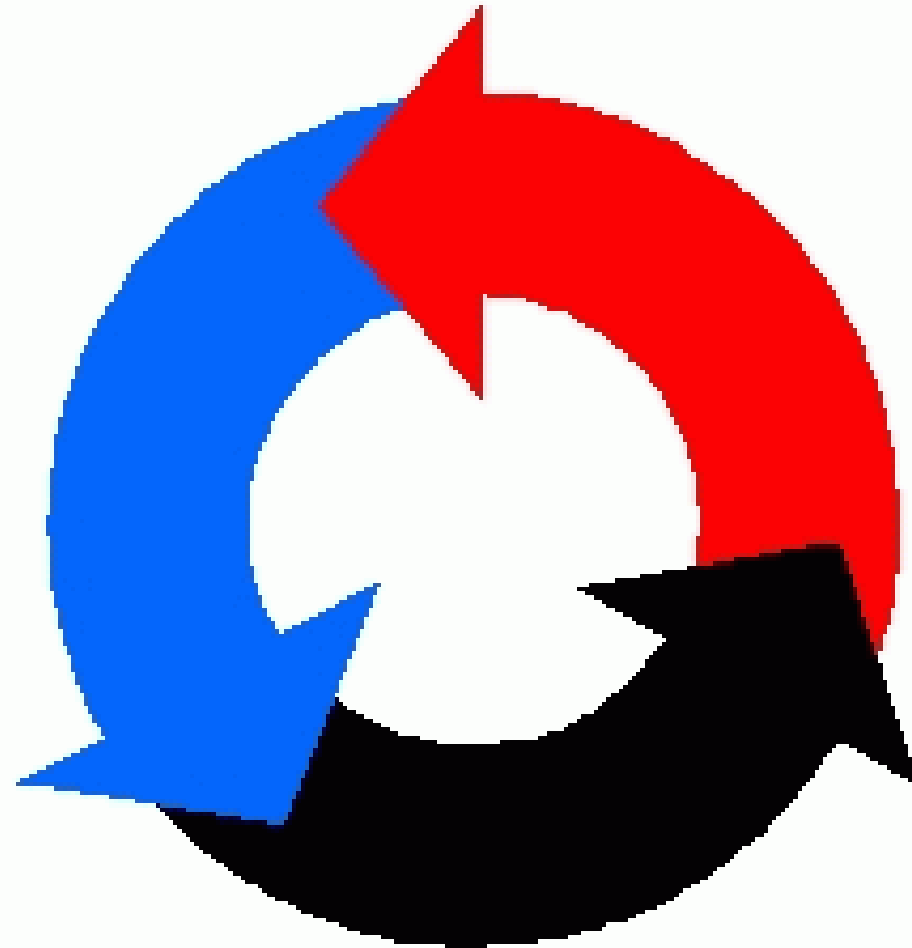
Probíhá to u 72 C jako optimální teplotě pro TAQ



# PCR Review

- Denaturace: 94 - 95 C
- Primer Annealing: 40 - 65 C
- Elongace DNA: 72
- Počet cyklů: 25-40
- Žádný cílový produkt se netvoří do 3. kroku
- Po 30 cyklech je v roztoku 1,073,741,764 cílových kopií ( $\sim 1 \cdot 10^9$ ).

**BIND**  
55 C



**HEAT**  
94 C

**COPY**  
72 C

# PCR Primery

Primer je úsek NK, který slouží jako startovací místo replikace

Je potřeba mít jak forwardní, tak reverzní primer, aby byla cílová sekvence tvořena simultánně v obou směrech

# Problémy s primery

- Primery by měly ohraničovat cílovou část DNA sekvenci
- Primery, které jsou komplementární k více místům, budou tvořit víc produktů
- Primer může tvořit dimér se sebou nebo s druhým primerem

**5 -ACCGGTAGCCACGAATTCGT-3**

**|||||||**

**3 -**

**TGCTTAAGCACCGATGGCCA-5**

# Primery, co tvoří hairpiny

- Primery můžou mít komplementární oblasti v rámci sebe , tudíž budou tvořit tzv. hairpin

**5 -GTTGACTTGATA**

**|||| T**

**3 -GAACTCT**

- 3 konec primeru se bude párovat uvnitř primeru a nebude reagovat s templátem



# PCR Taq DNA Polymeráza

- Taq je odvozen z *Thermus aquaticus*, organismu nalezeného v 176 F (80 C) horkých pramenech v Yellow Stone National Forest.
- Taq DNA Polymerase (Taq Pol) je stabilní při vysokých teplotách a k činnosti potřebuje správnou koncentraci Mg
- Optimum pro její fungování je 72 C

# Nevýhody Taq Pol

- Taq Pol nemá 3' to 5' exonucleázovou aktivitu přítomnou u jiných polymeráz
- Taq špatně zařadí 1 bázi v  $10^4$ .
- u 400 bp cílové sekvence bude chybovost v 33% molekul po 20 cyklech

# Jak předejít problémům?

- Pfu DNA Polymeráza z *Pyrococcus furiosus* má 3' to 5' exonucleázovou aktivitu
- Chybovost je pouze 3.5% po 20 cyklech
- Po přidání většího množství primeru lze předejít dimérům
- Pro neznámé geny lze použít primery příbuzných druhů

# Limitace PCR

- Jsou potřebné informace o cílové sekvenci design primerů pro neznámé známé hraničné oblasti

Chybovost při DNA replikaci

Taq Pol – Error 40% po 20 cyklech

- Krátka délka a omezené množství produktu  
do 5kb je lehký amplifikovatelný produkt .  
do 40kb je amplifikace s modifikacema možná  
nelze amplifikovat geny >100kb  
nelze použít v projektech sekvenování genomu

# Design PCR primerů

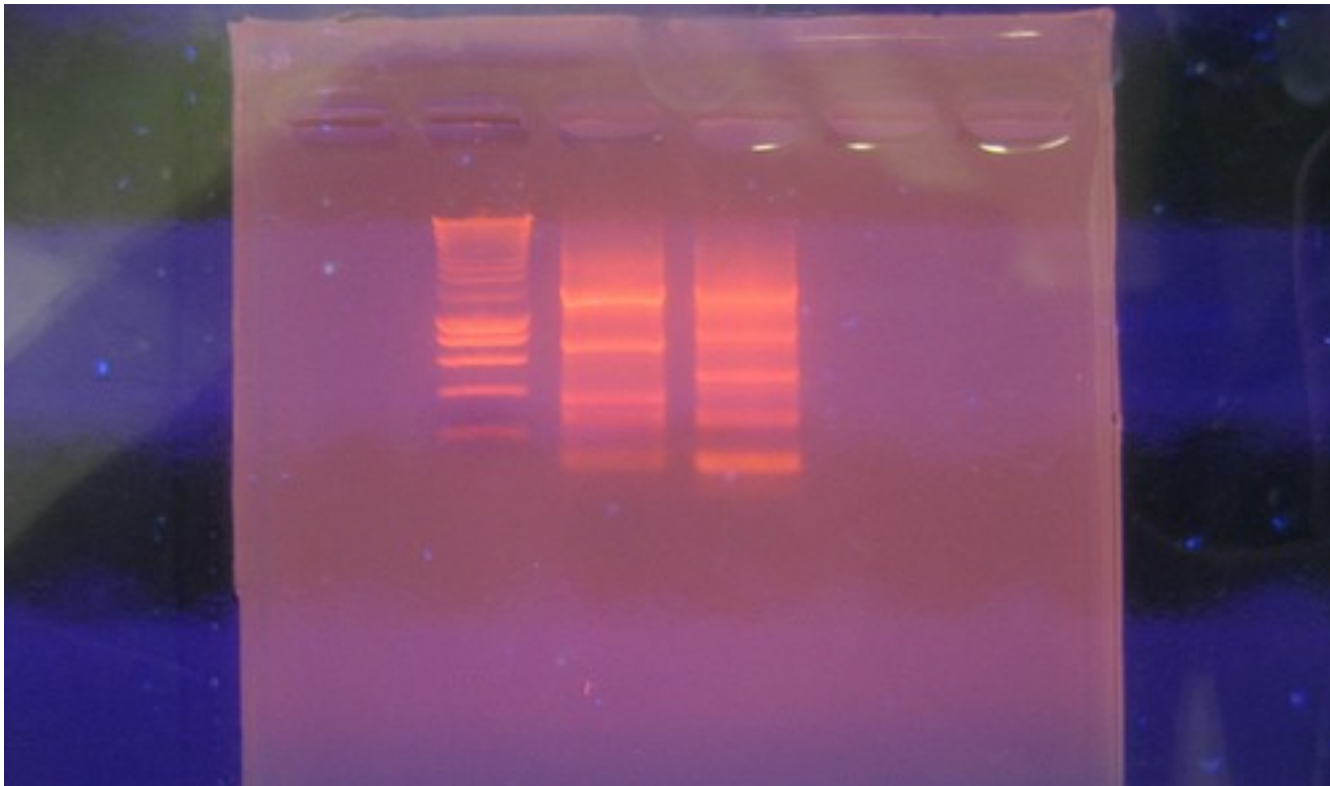
- Sekvence primerů by měly být unikátní
- Sekvence primerů by měly být ~20 bází dlouhé
- Obsah G/C by měl být 45–55%.
- Annealingová teplota by měla být podobná
- Na 3 -konci by měly být G nebo C.
- Nesmí mít self-komplementární oblasti nebo vytvářet hairpiny
- Nesmí mít repetitivní oblasti

# Výhody PCR

- Rychlost
- Snadné použití
- Citlivost
- Robustnost

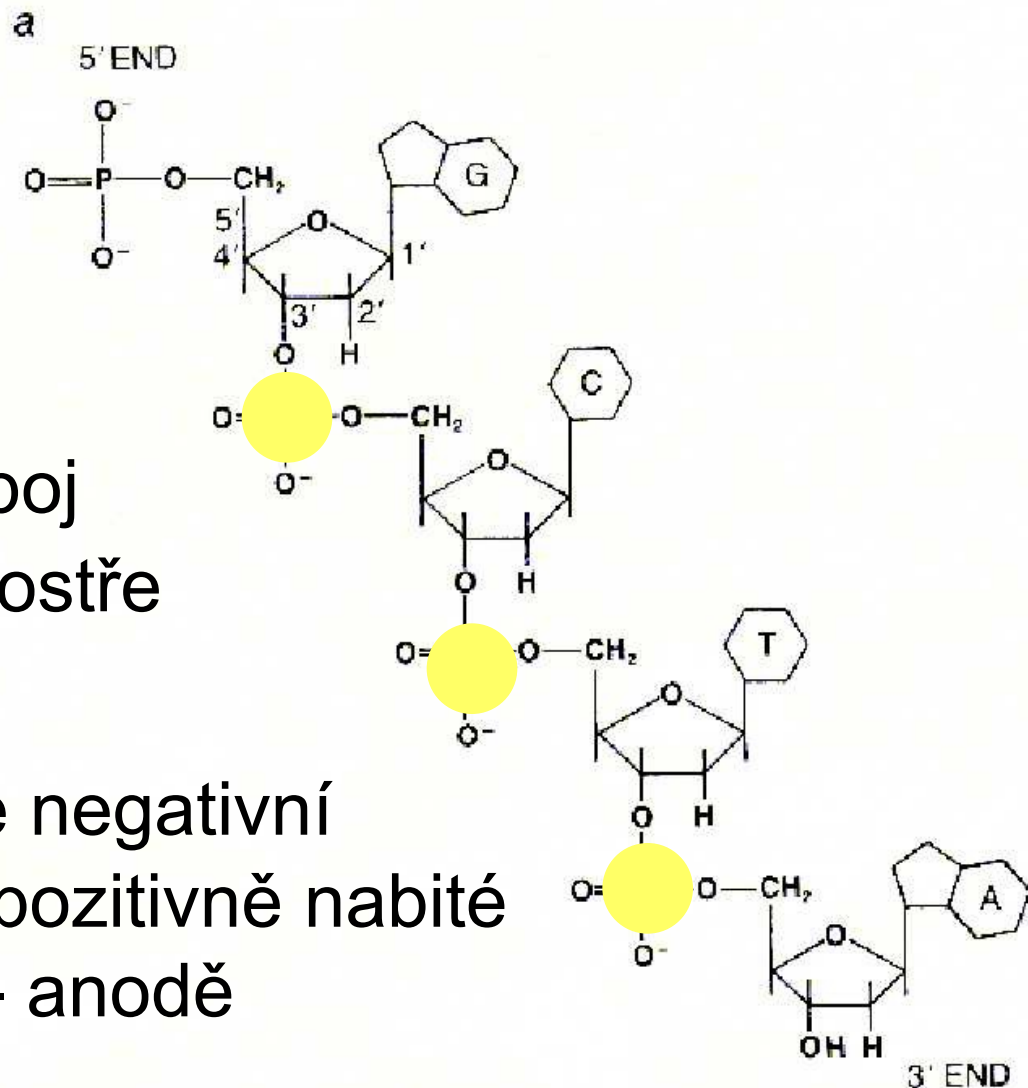
# Agarózová gelová elektroforéze

Elektroforeze je způsob separování molekul na základě rychlosti jejich pohybu v gelu v elektrickém poli



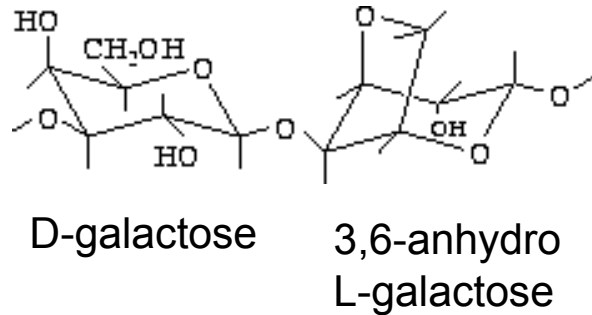
DNA má negativní náboj  
díky cukrofosfátové kostře

DNA putuje od černé negativní  
elektrody (katody) k pozitivně nabitě  
elektrodě (červená) - anodě



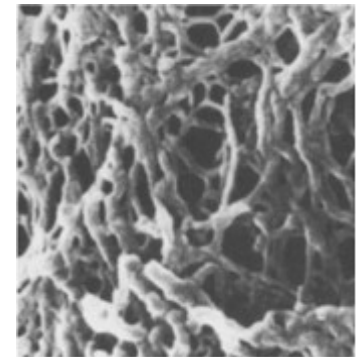


# Agaróza



Polymerizací vytvoří pevný gel, který je pórovitý a umožňuje pohyb DNA

Krátke DNA fragmenty prochází gelem rychleji než dlouhé



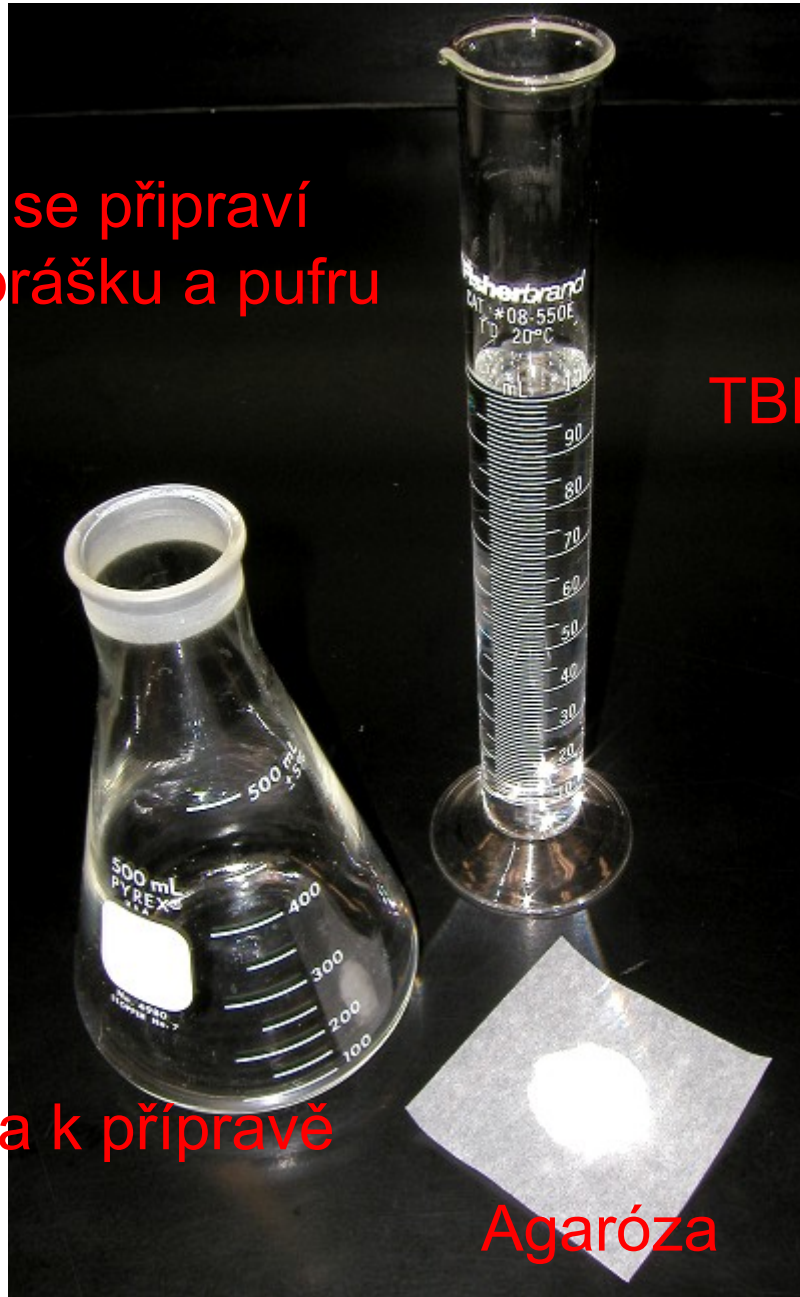
SEM agarózy

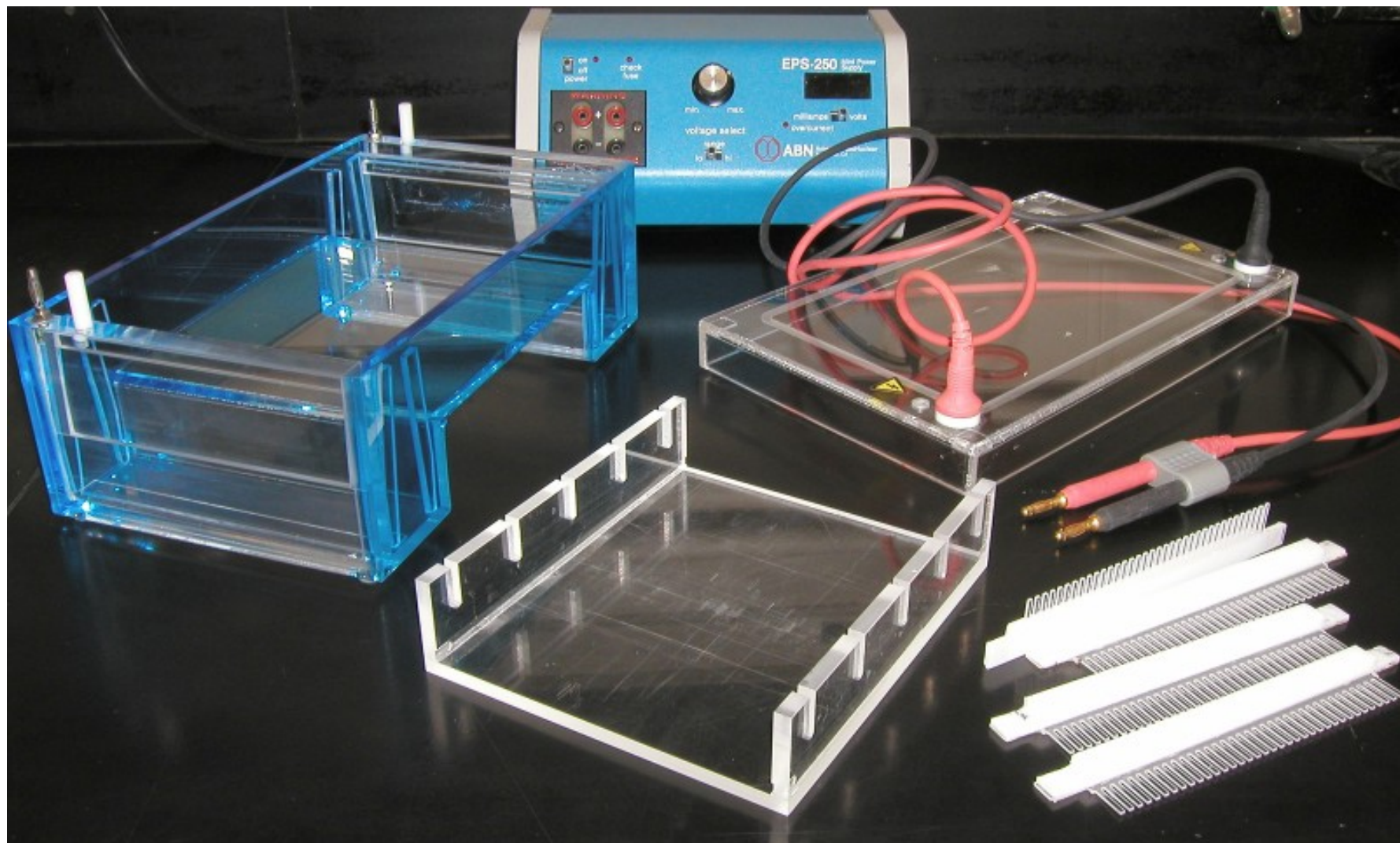
Agarózový gel se připraví smícháním a prášku a pufu

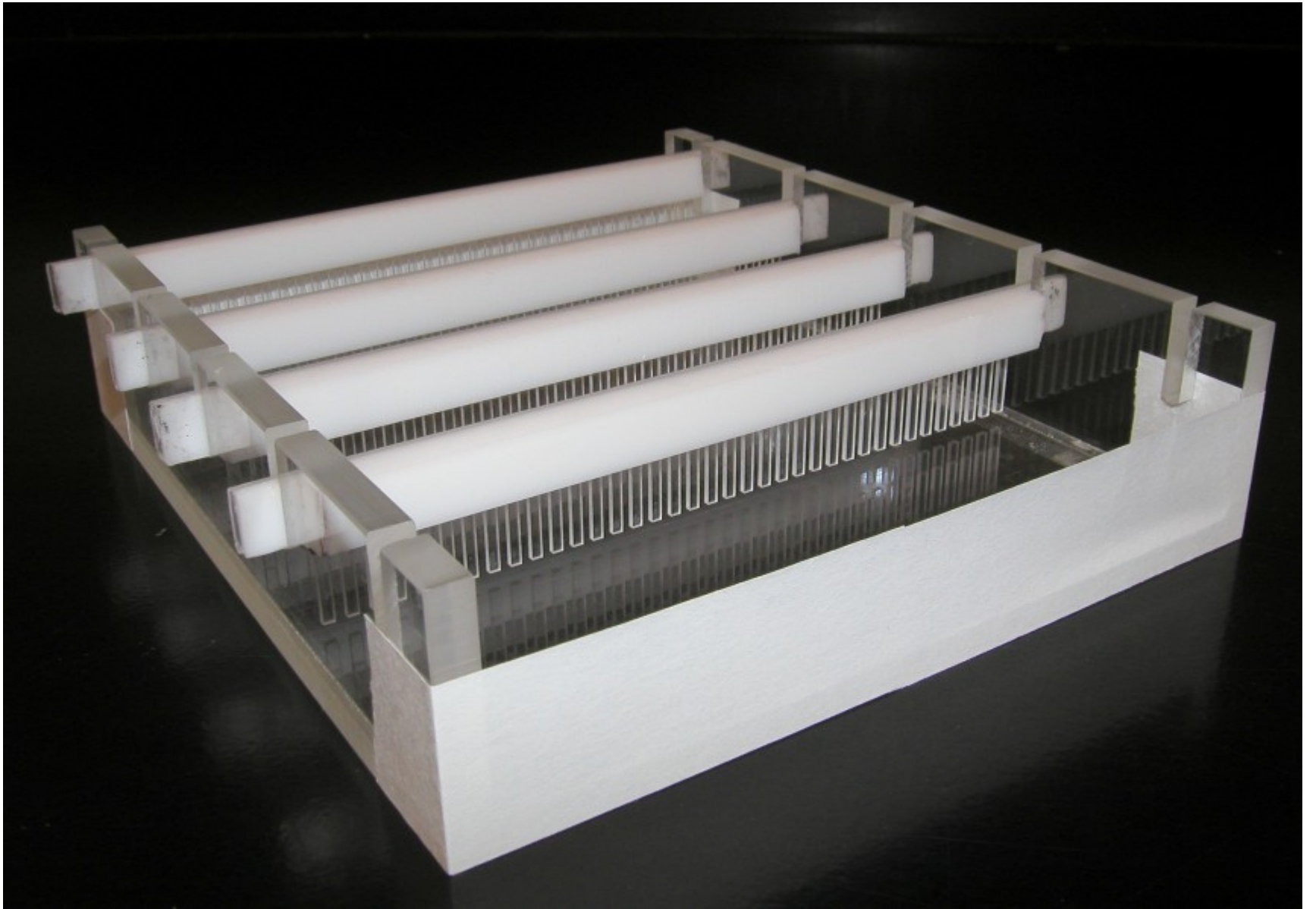
TBE Buffer

Erlenka k přípravě

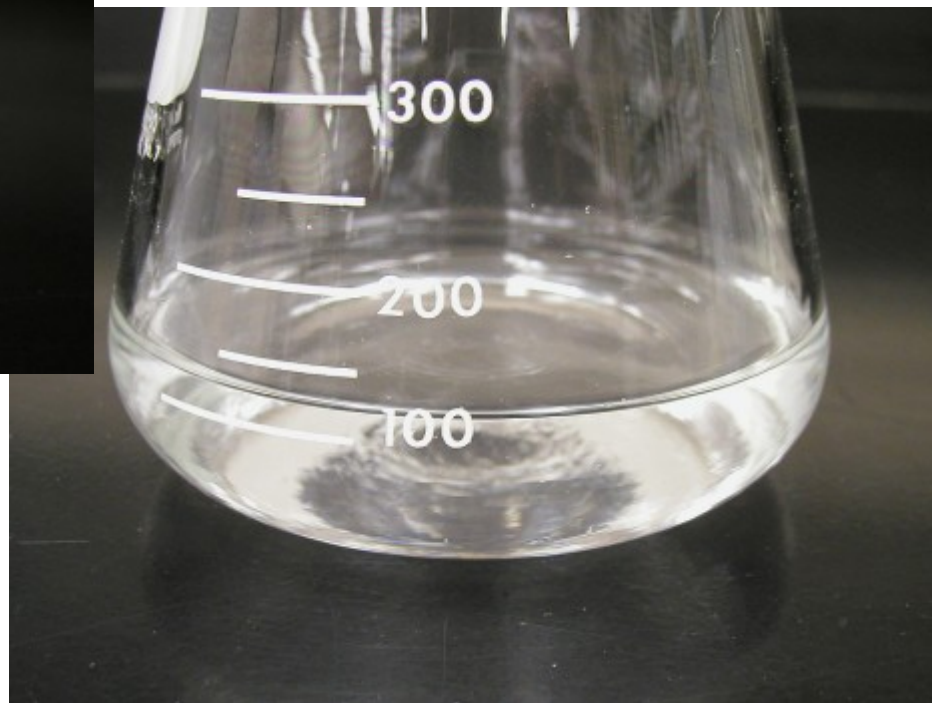
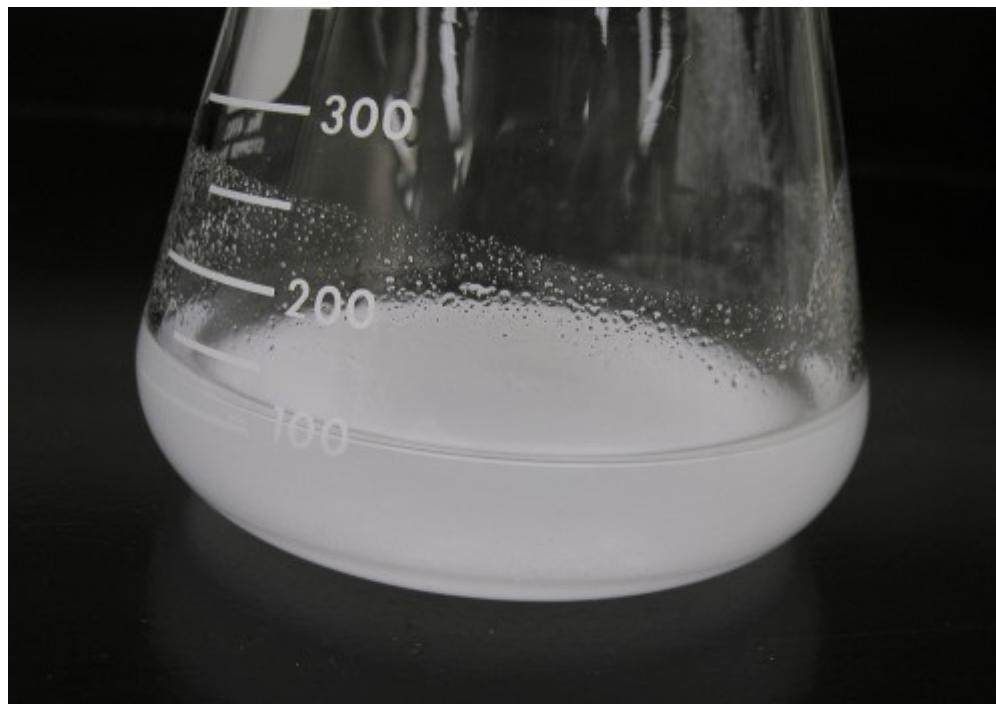
Agaróza



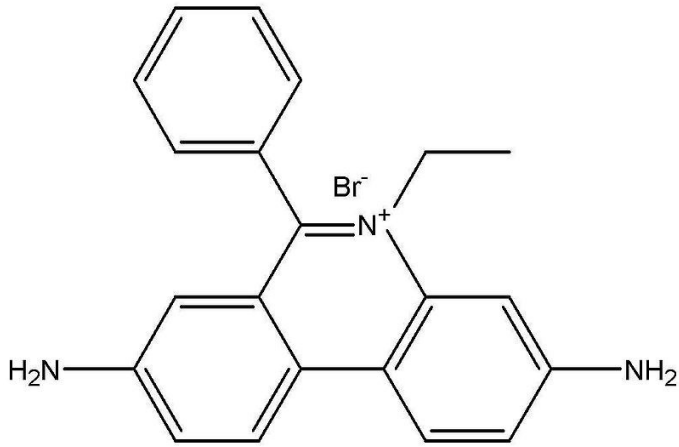




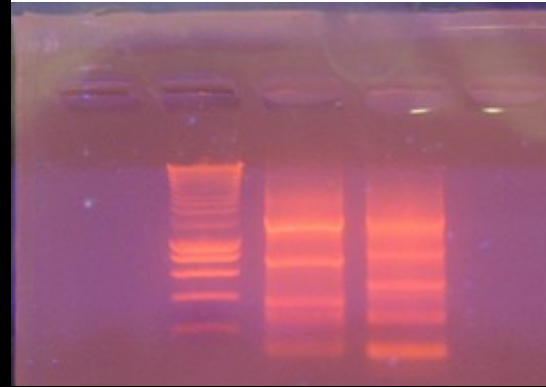




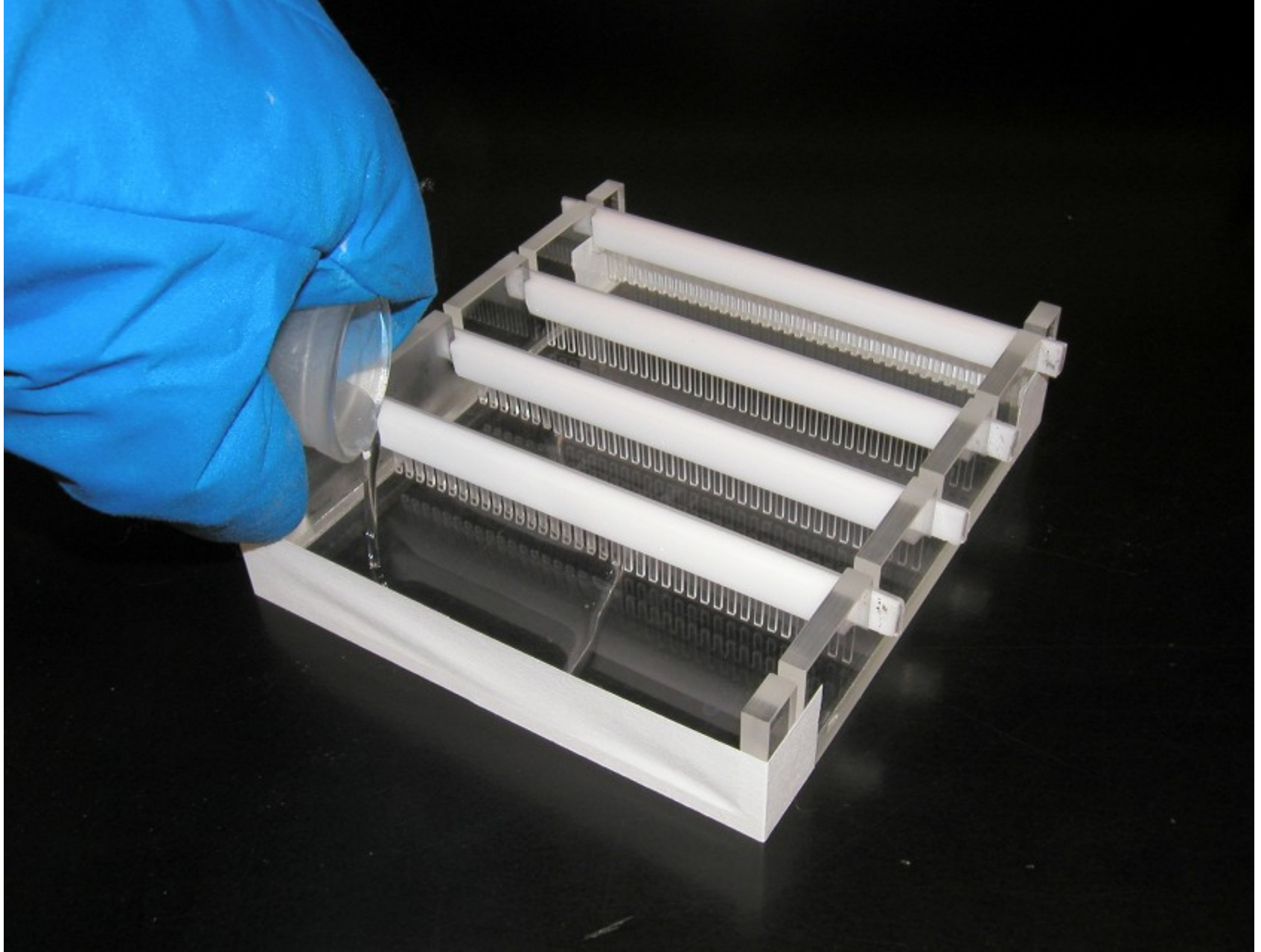
# Ethidium Bromide



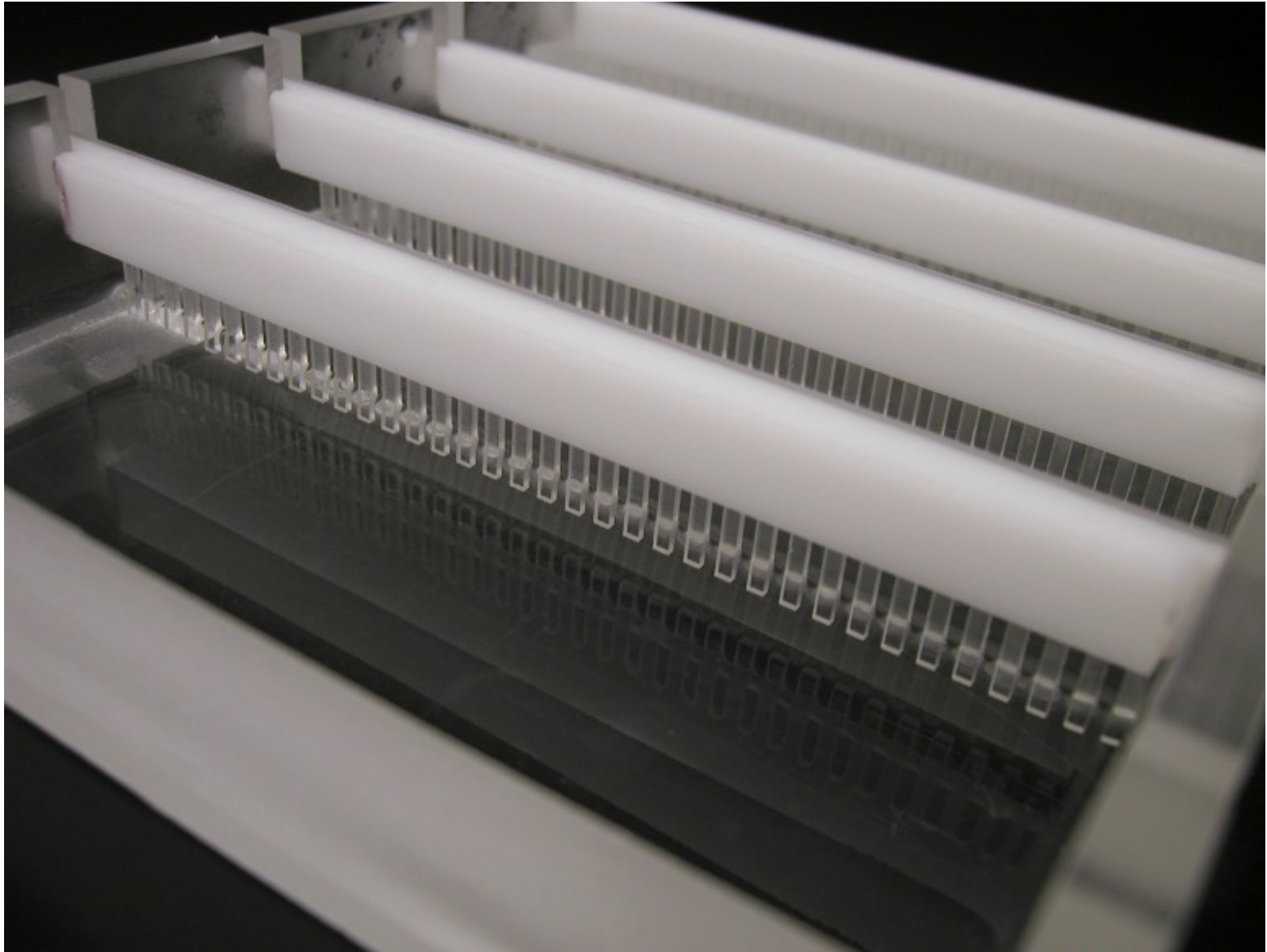
Interkaluje se do  
NK a emituje  
světlo po  
ozáření UV  
světlem

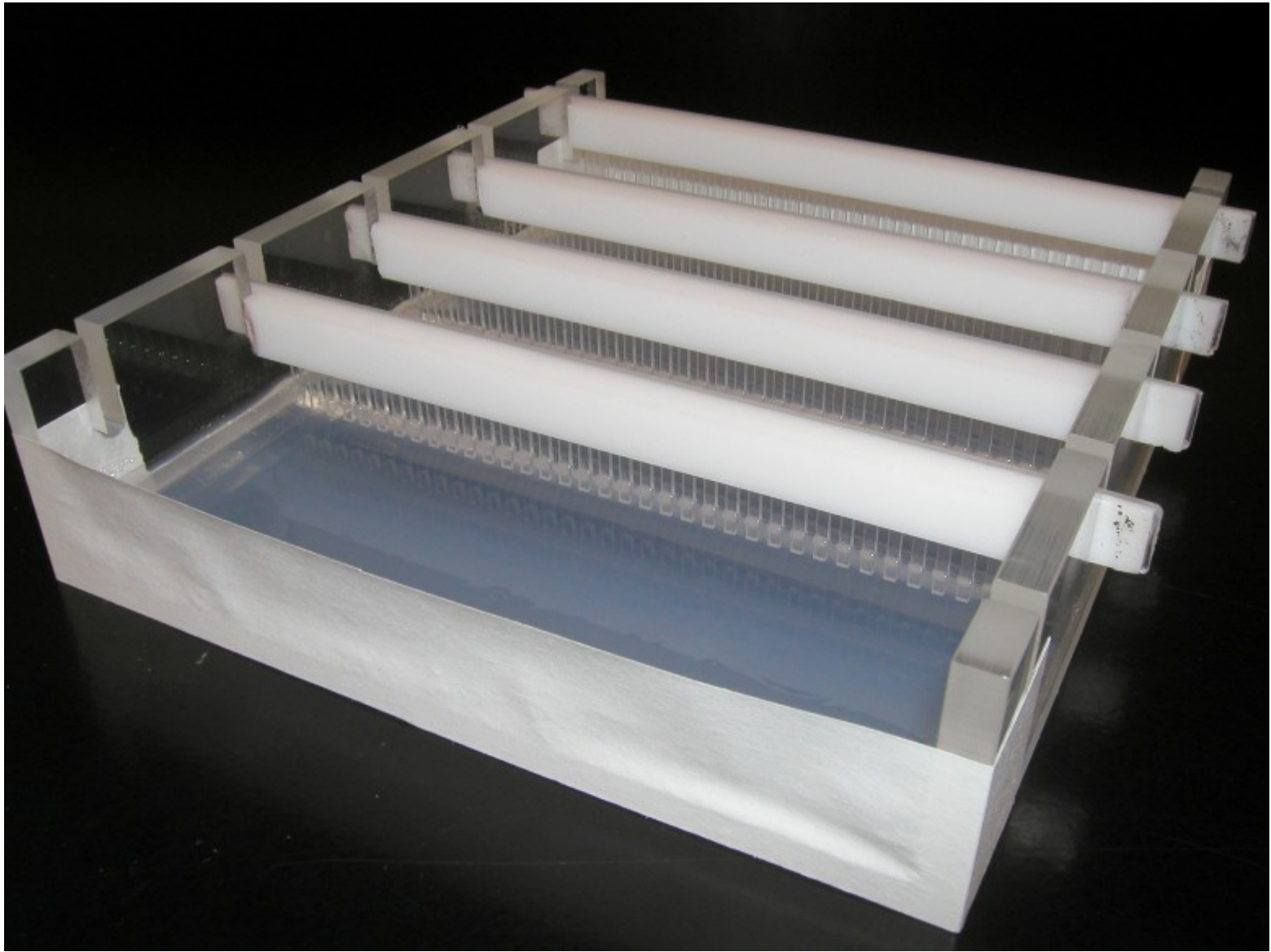


# Mutagen!



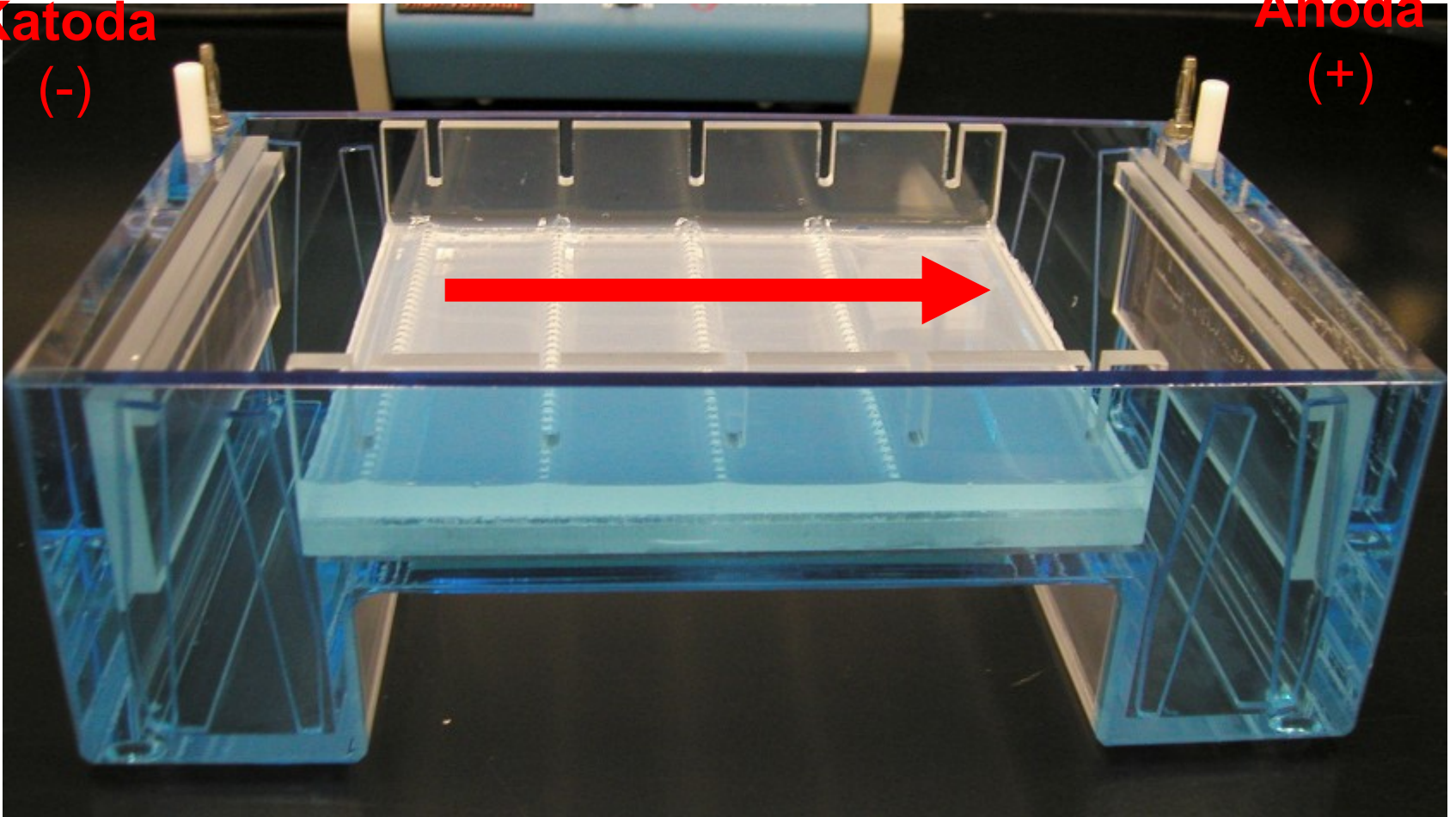






**Katoda**  
**(-)**

**Anoda**  
**(+)**



TBE buffer →

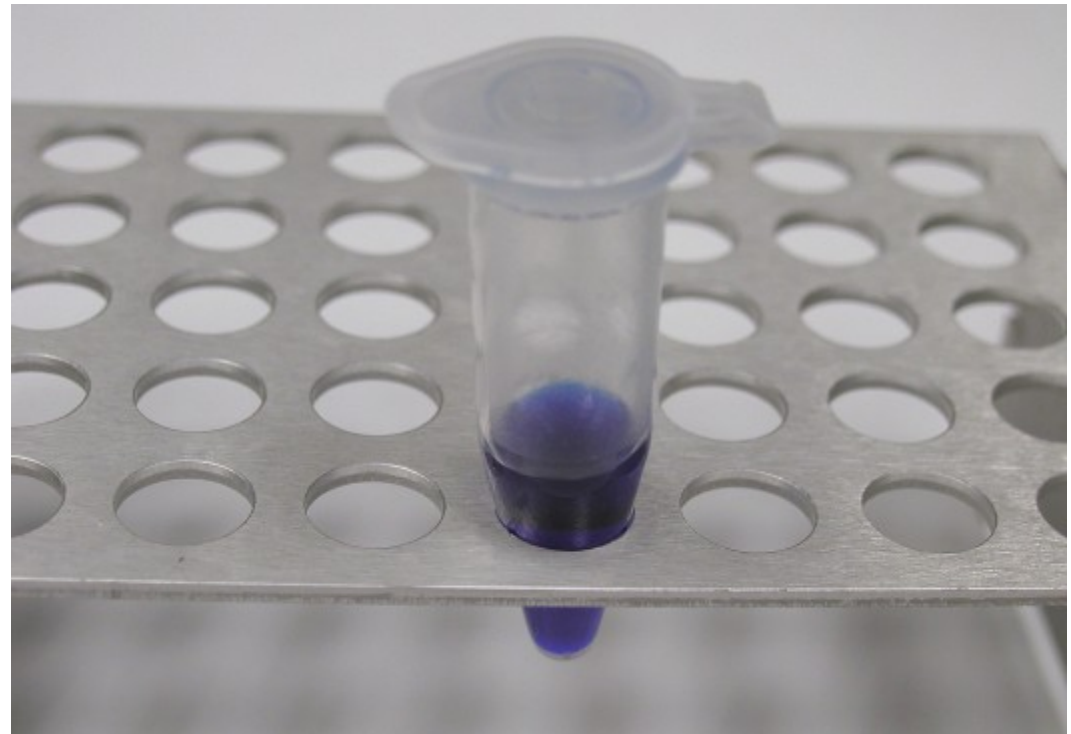


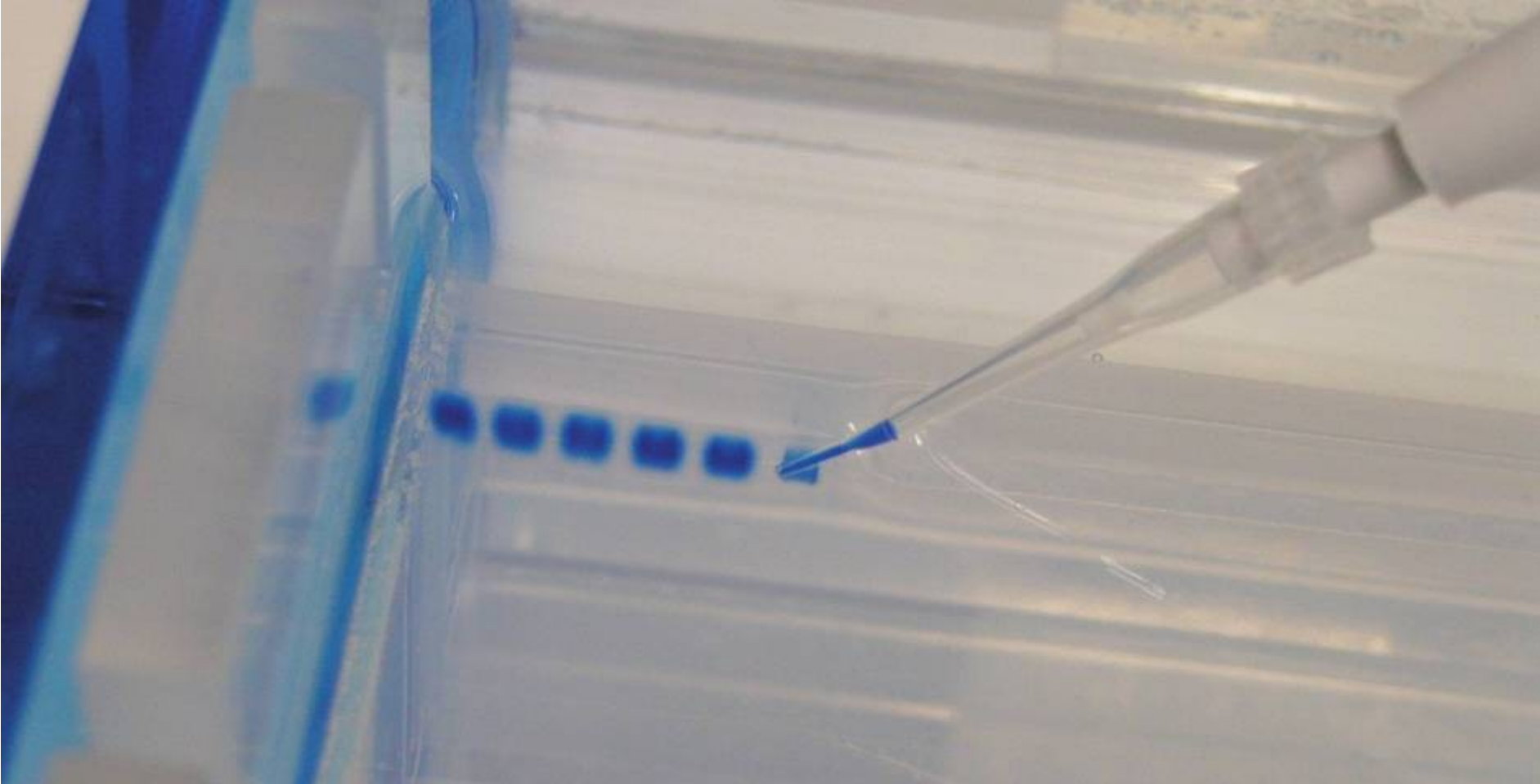
# Nanášení vzorků

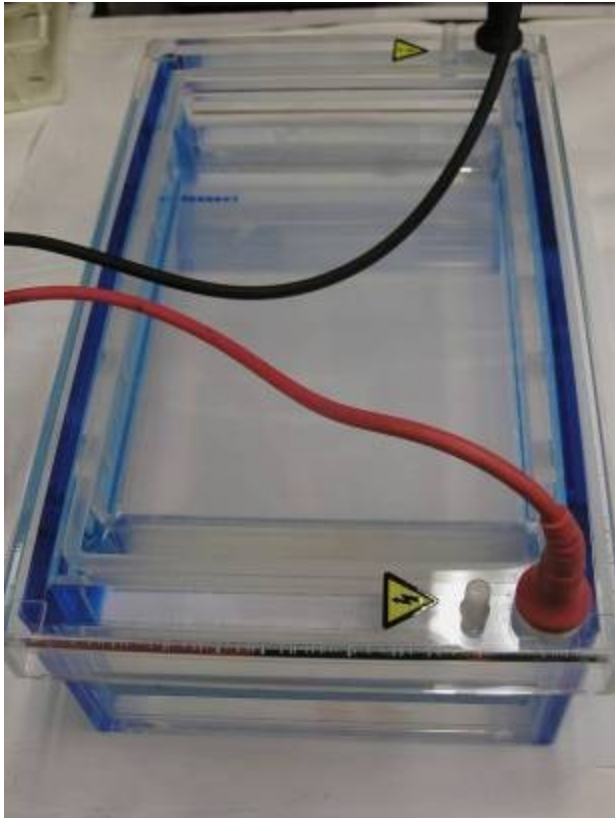
PCR produkty se smíchají s nanášecím pufrem – obarví je a zvýší denzitu – zabrání vyplavení vzorku z jamky

## 6X Loading Buffer:

- Bromfenolová modrá
- Glycerol



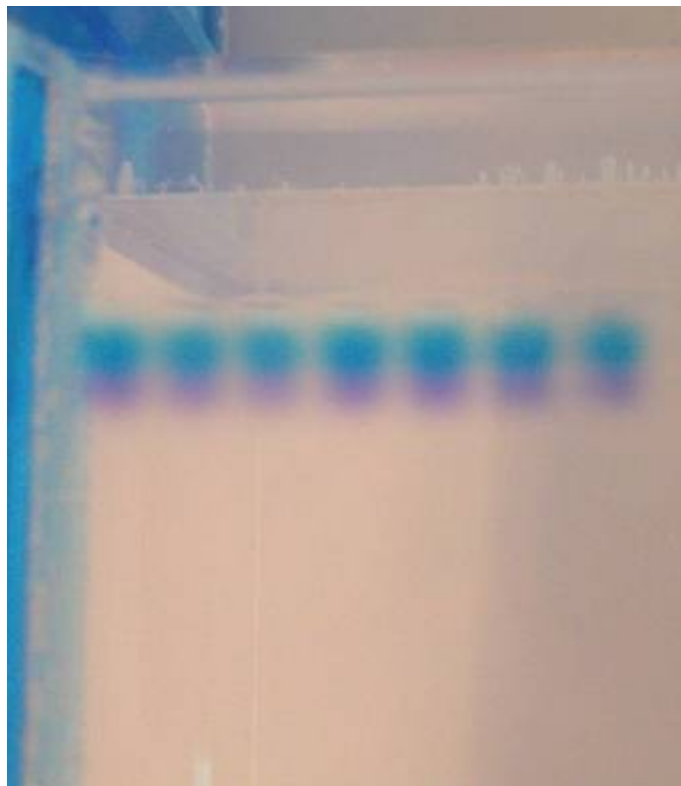




katoda  
(-)

**DNA**  
(-)  
↓

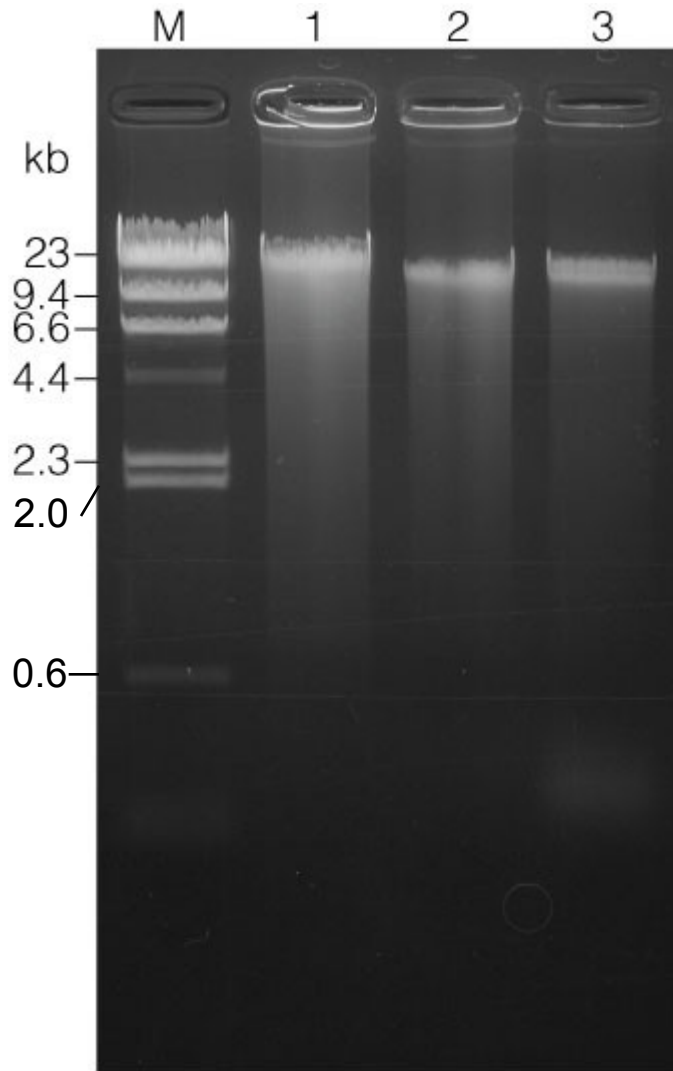
anoda  
(+)



← jamky  
← Bromfenolová modř



# ...a pod UV světlem



‘Nikdy nevyhazujte  
vzorky před  
koncem  
experimentu.’



Hledání v odpadu  
není nic moc!

Zdroj: [www.flickr.com/photos/50262392@N00/45684291](http://www.flickr.com/photos/50262392@N00/45684291)

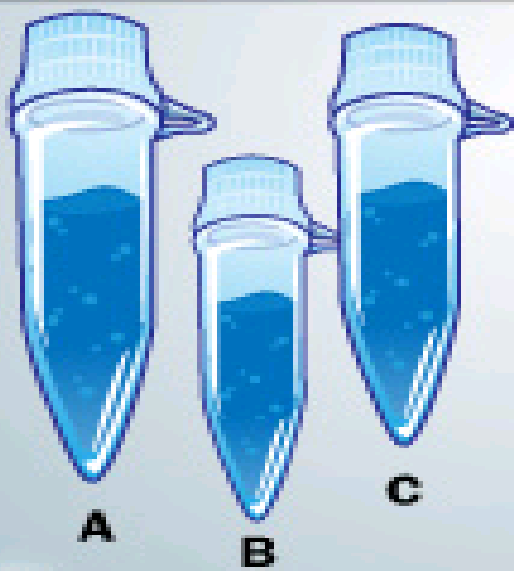


# RFLP

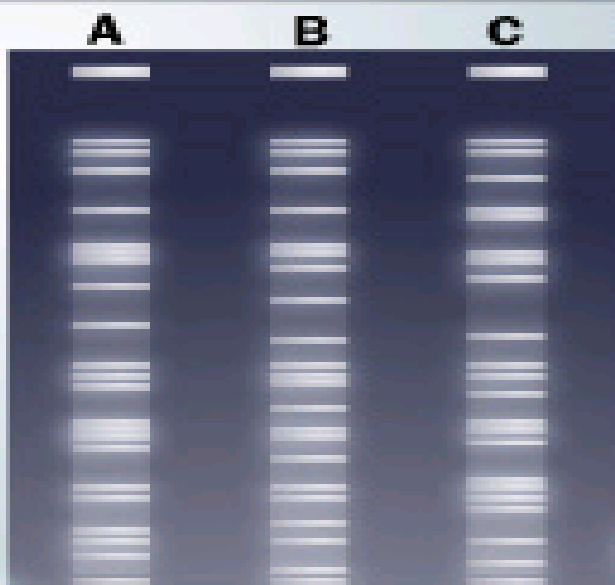
- Základním způsobem detekce RFLP je fragmentace DNA restriktivními enzymy, které rozpoznají specifické místo na DNA. Výsledné DNA fragmenty jsou pak separovány dle délky pomocí elektroforézy a přeneseny na membránu technikou Southern blot

# How the RFLP Process Works

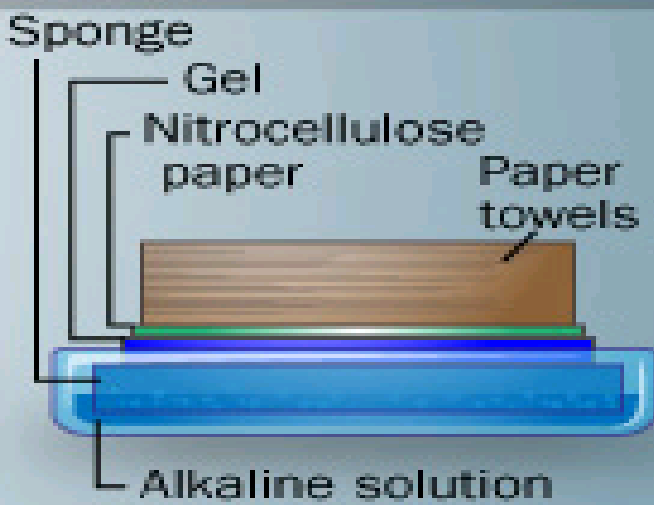
©2008 HowStuffWorks



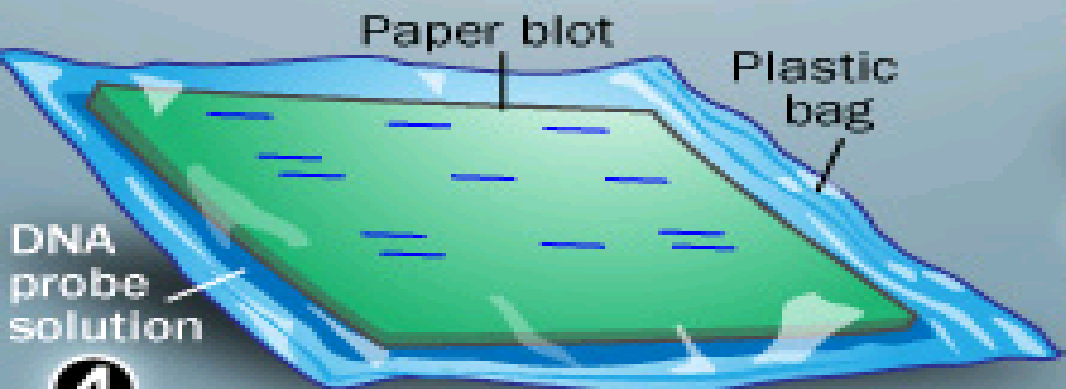
**1** DNA Samples with added restriction enzymes produce restriction fragments.



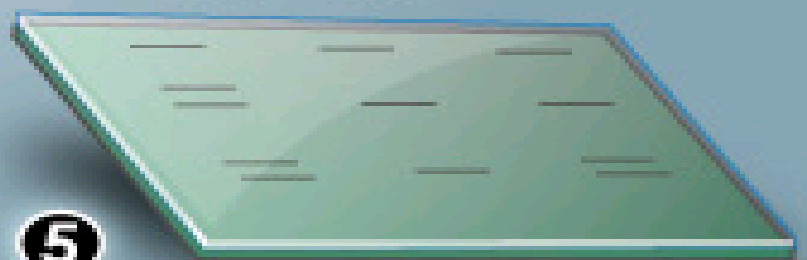
**2** Electrophoresis separates the restriction fragments. Each sample forms a characteristic pattern of bands.



**3** Alkaline solution is pulled upward through the gel to a sheet of nitrocellulose laid on the top of it, transferring the DNA to the paper.

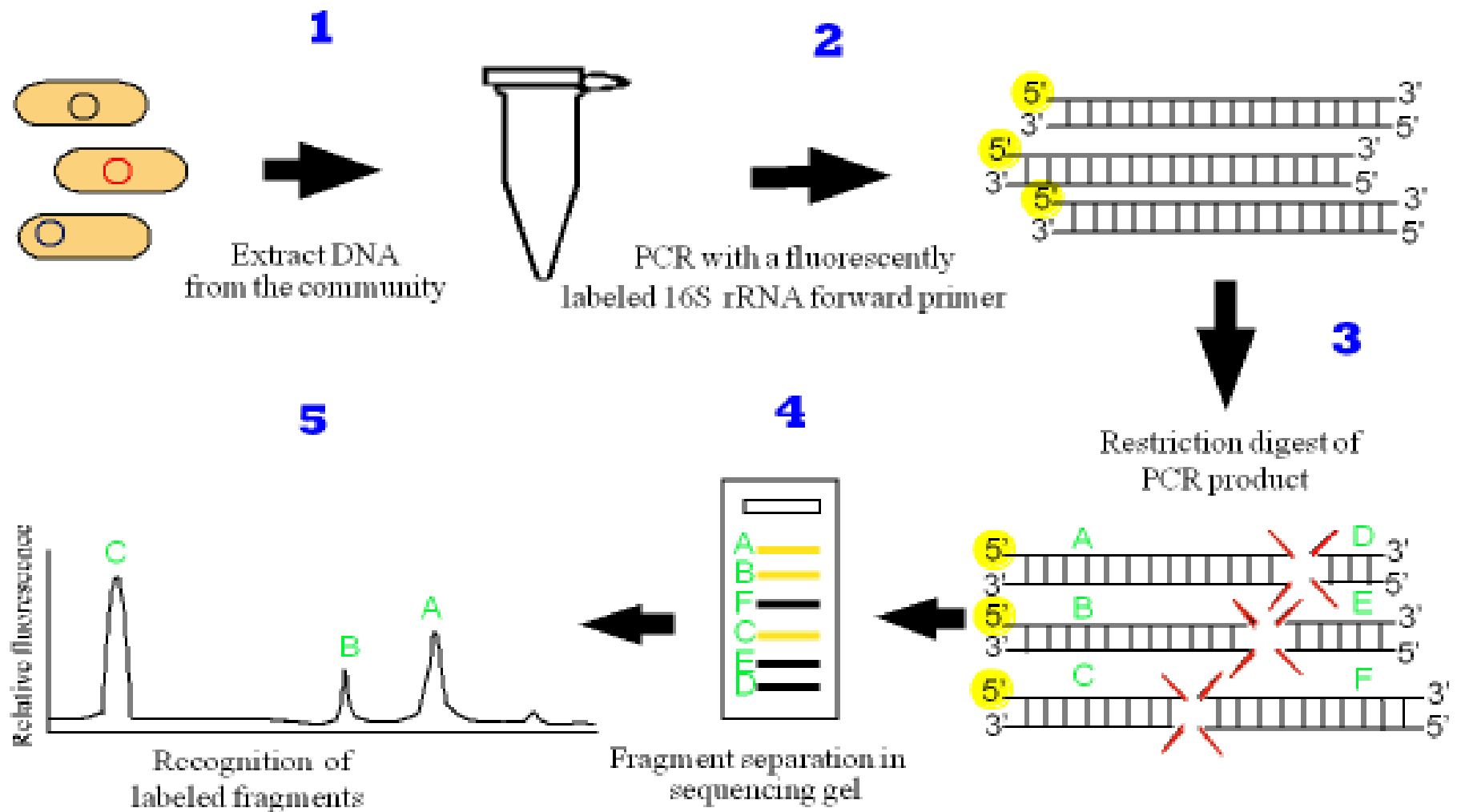


**4** The paper is exposed to a solution containing radioactively-labeled probe.



**5** A photographic film laid on top of the paper is exposed by the radioactivity in the bound probe to form an image corresponding to the DNA bands.

# Tvorba fragmentů



# Arber, Nathans and Smith – Nobelova cena (1978)

- Restrikční endonukleázy jsou základem molekulární genetiky, genetického inženýrství a rekombinantních DNA technologií
- Několik typů – nejčastější Eco R I HIND III

# Co je blotting?

- **Bloty jsou technikou přenosu DNA (Southern), RNA (Northern) nebo proteinů (Western) na nosiče, aby mohly být separovány pomocí elektroforézy**
- **Hybridizace radioaktivní sondy na filtraci navázané NK je nejinformativnějším experimentem v molekulární genetice**



# TYPY BLOTTING TECHNIK

Blotting technique

```
graph TD; A[Blotting technique] --> B[Southern Blot]; A --> C[Northern Blot]; A --> D[Western blot]; B --- B_desc[K detekci DNA]; C --- C_desc[K detekci RNA]; D --- D_desc[K detekci proteinů];
```

**Southern Blot**

K detekci DNA

**Northern Blot**

K detekci RNA

**Western blot**

K detekci proteinů



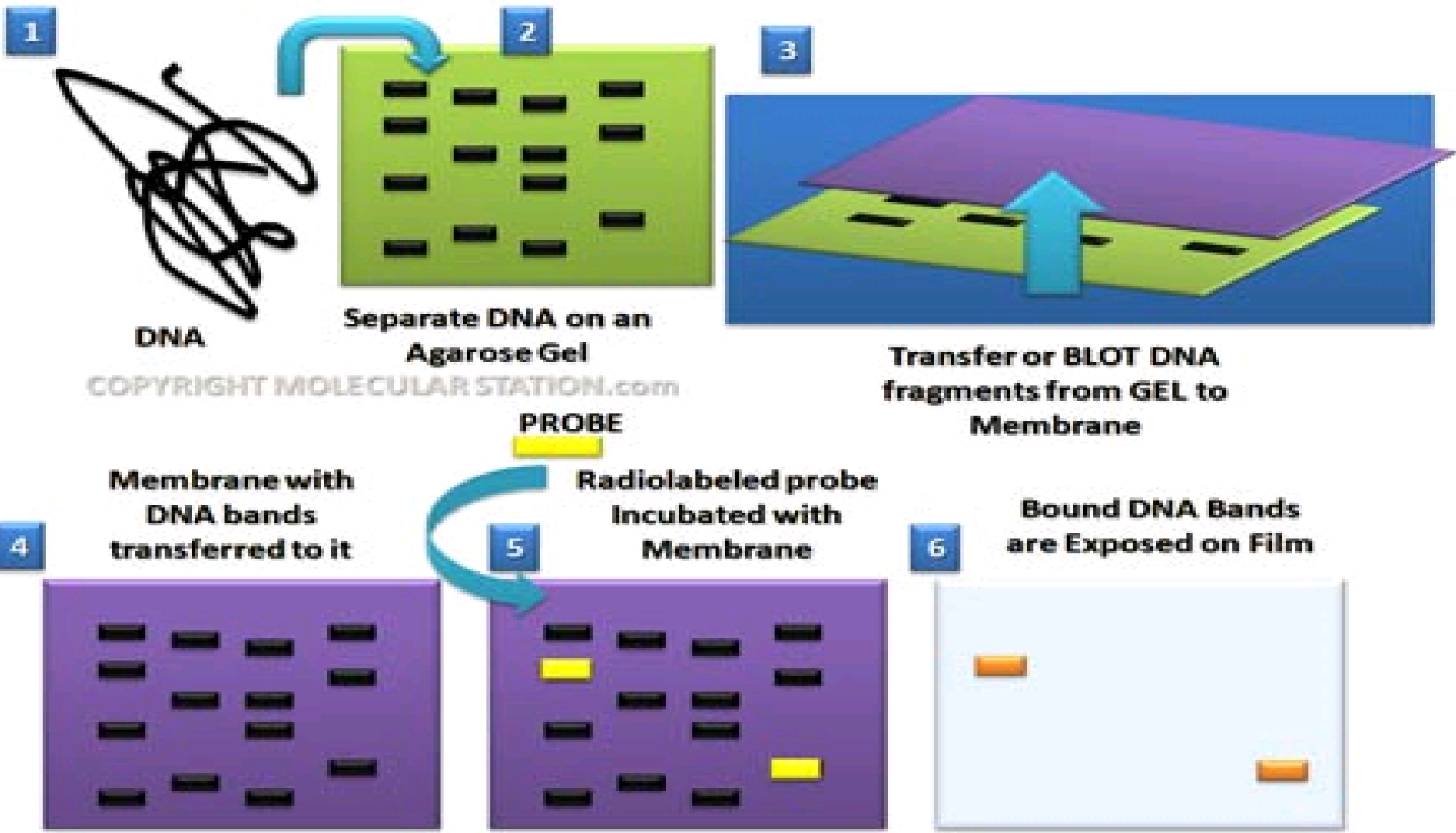
Sir Edwin Southern,  
Profesor  
Biochemie

- Vyvinul svou metodiku r. 1975.

Profesor Sir Edwin Southern

# Southern Blot

*working protocol*



# Využití Southern blottingu

- Objevování a mapování genů, evoluční a vývinové studie, diagnostika a forenzní studie
- Definitivní potvrzení u GMO o úspěšné inkorporaci inzertu do hostitelského genomu
- Předpovědi rakoviny v prenatální diagnostice genetických onemocnění