



Research centre
for toxic compounds
in the environment

Bi5596

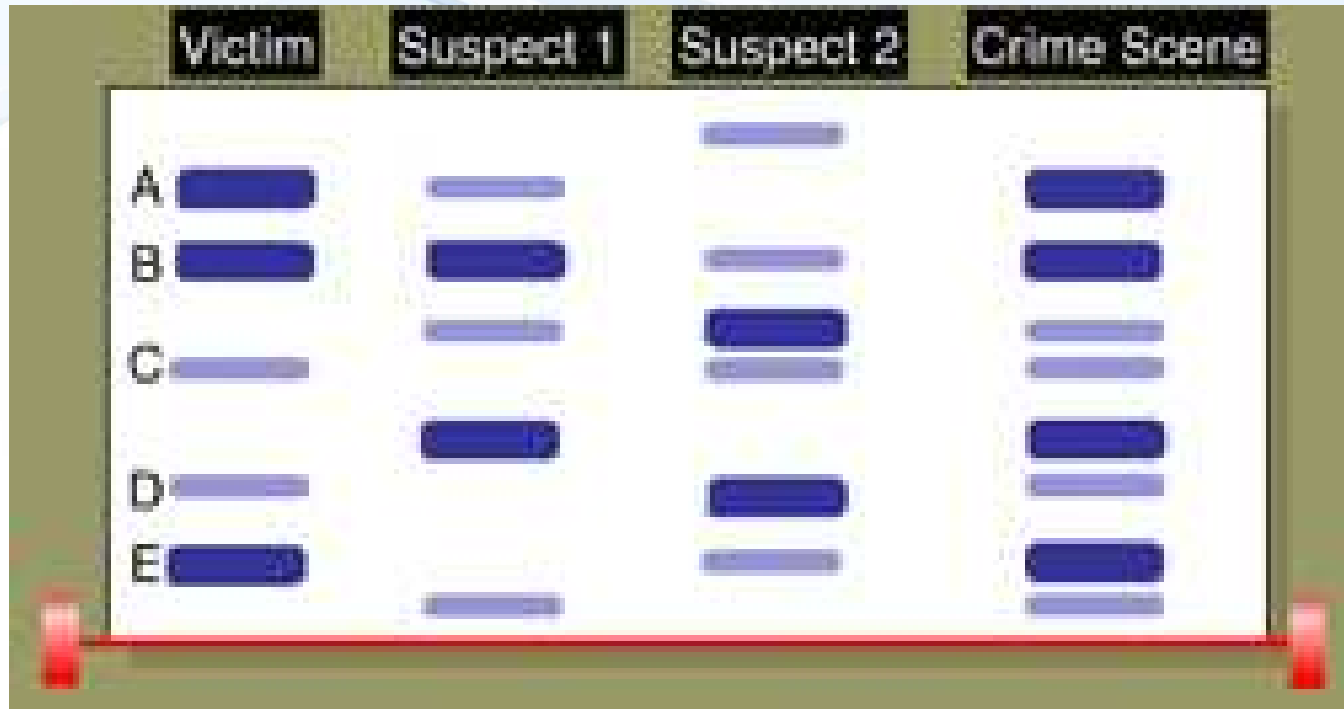
Moderní metody v ekotoxikologii

STUDIUM RNA & DNA II.

Co nás zajímá a jak to zjistíme

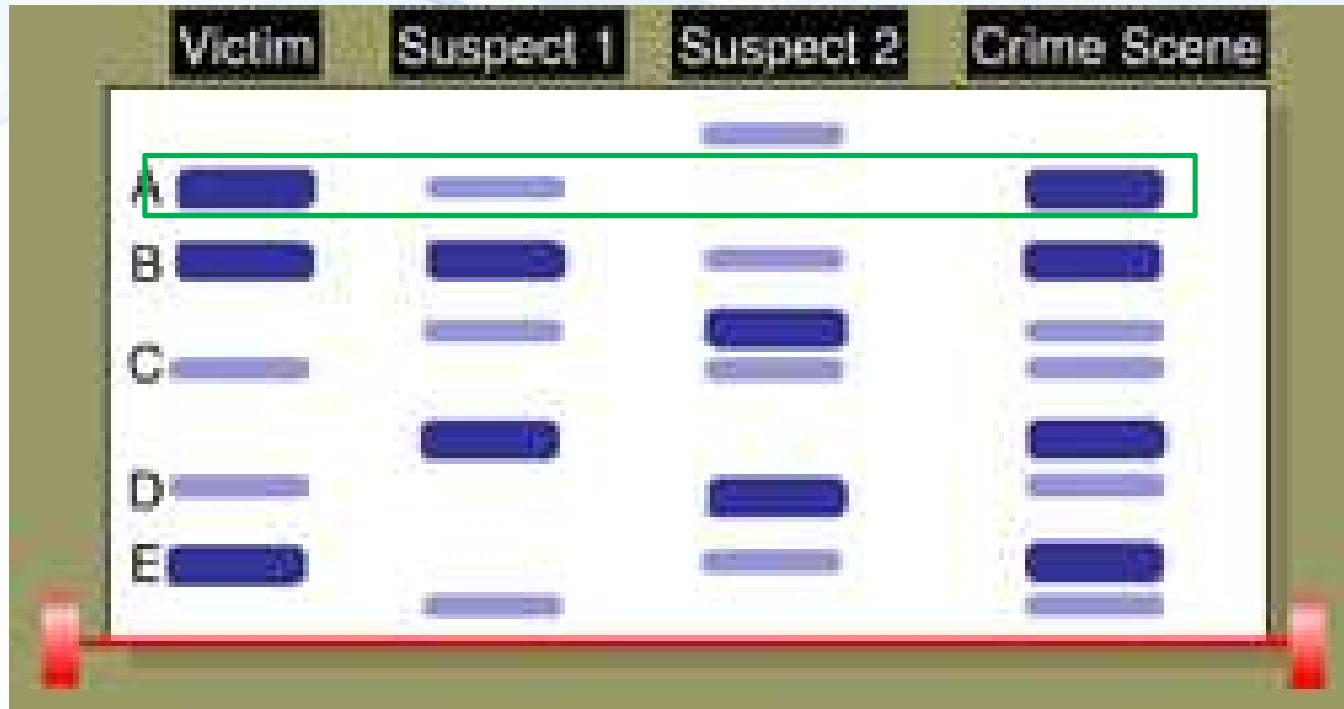
**RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.
sovadinova@recetox.muni.cz**

podzim 2015

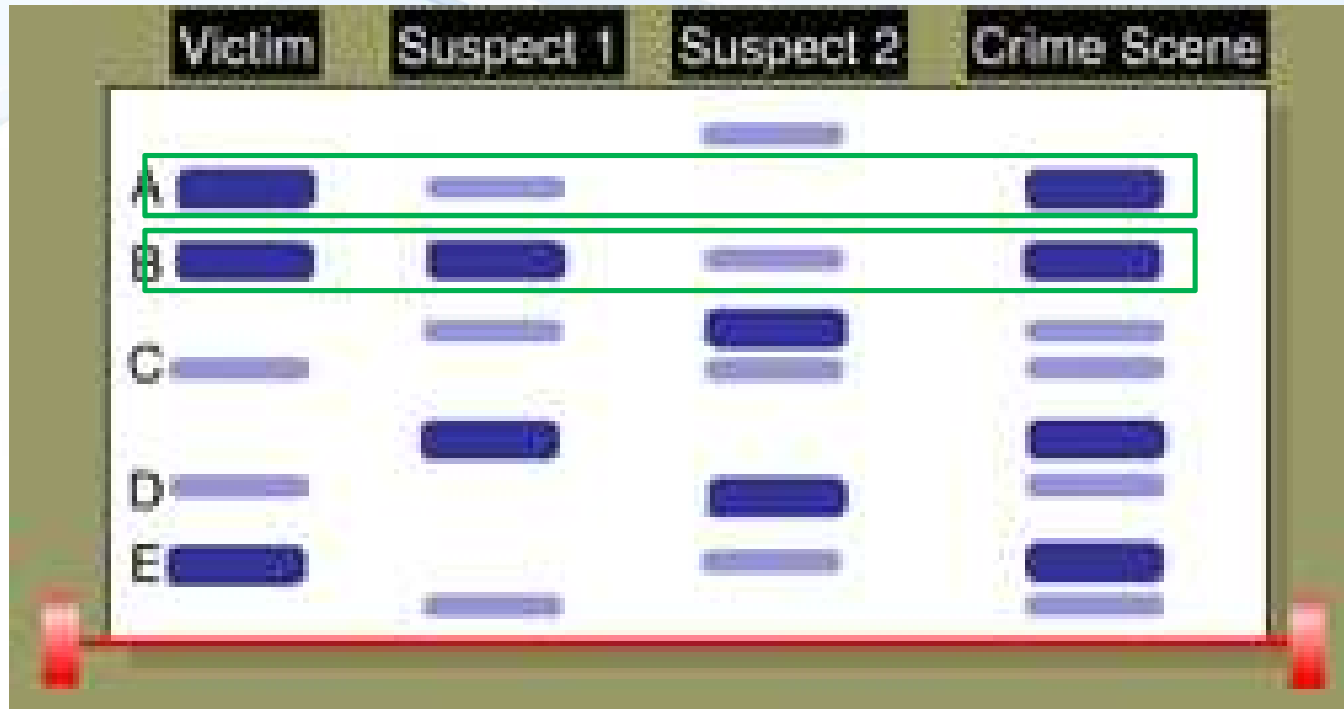


<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>

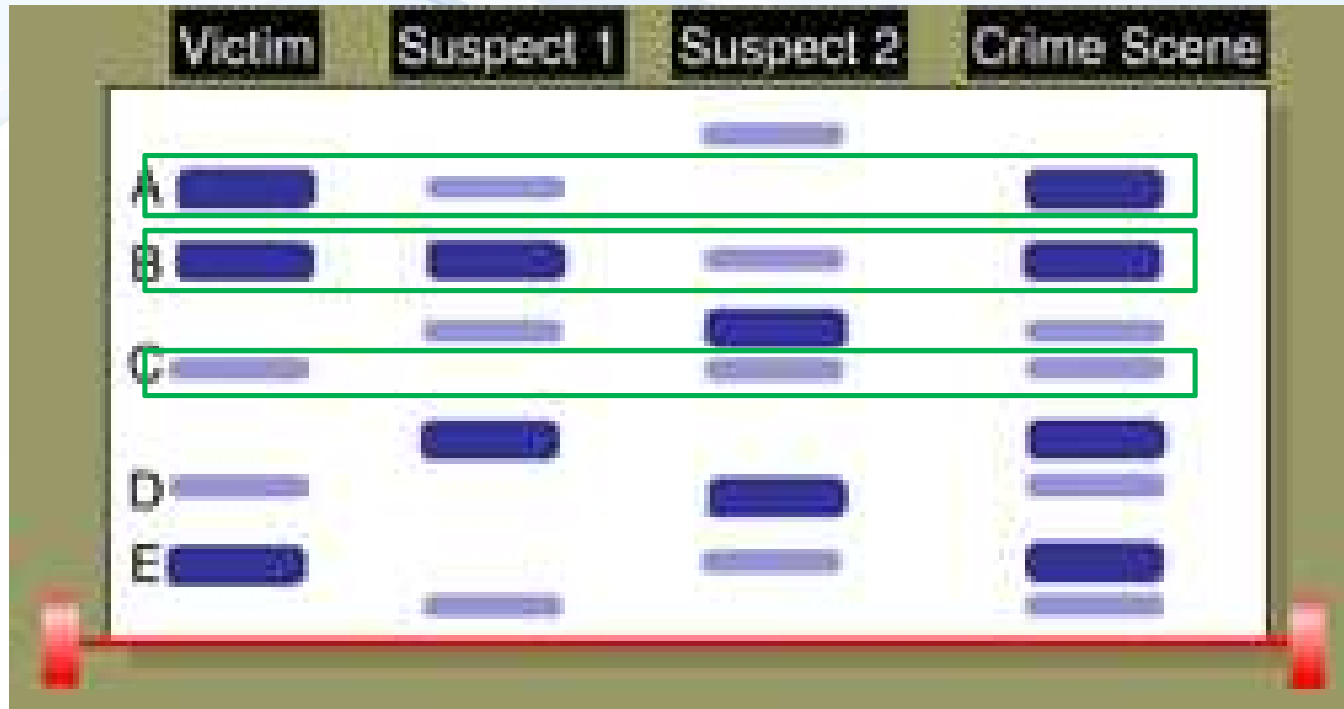




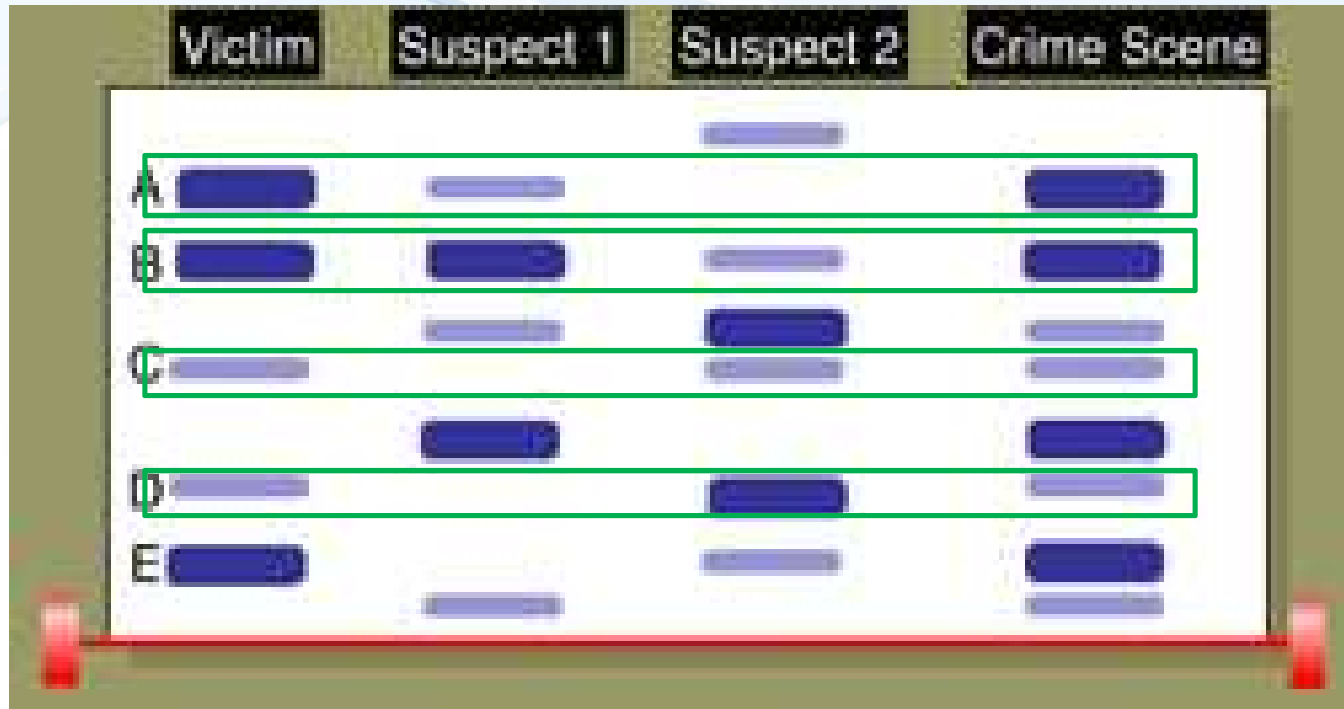
<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>



<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>

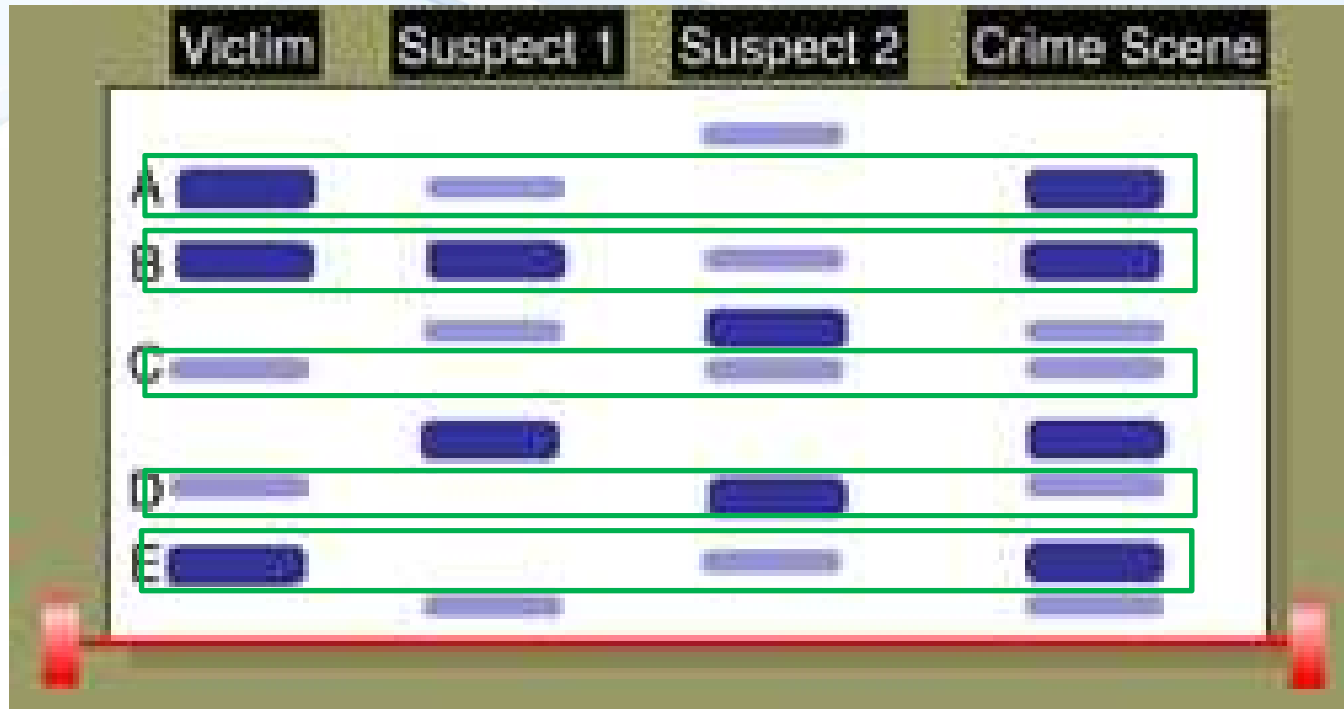


<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>



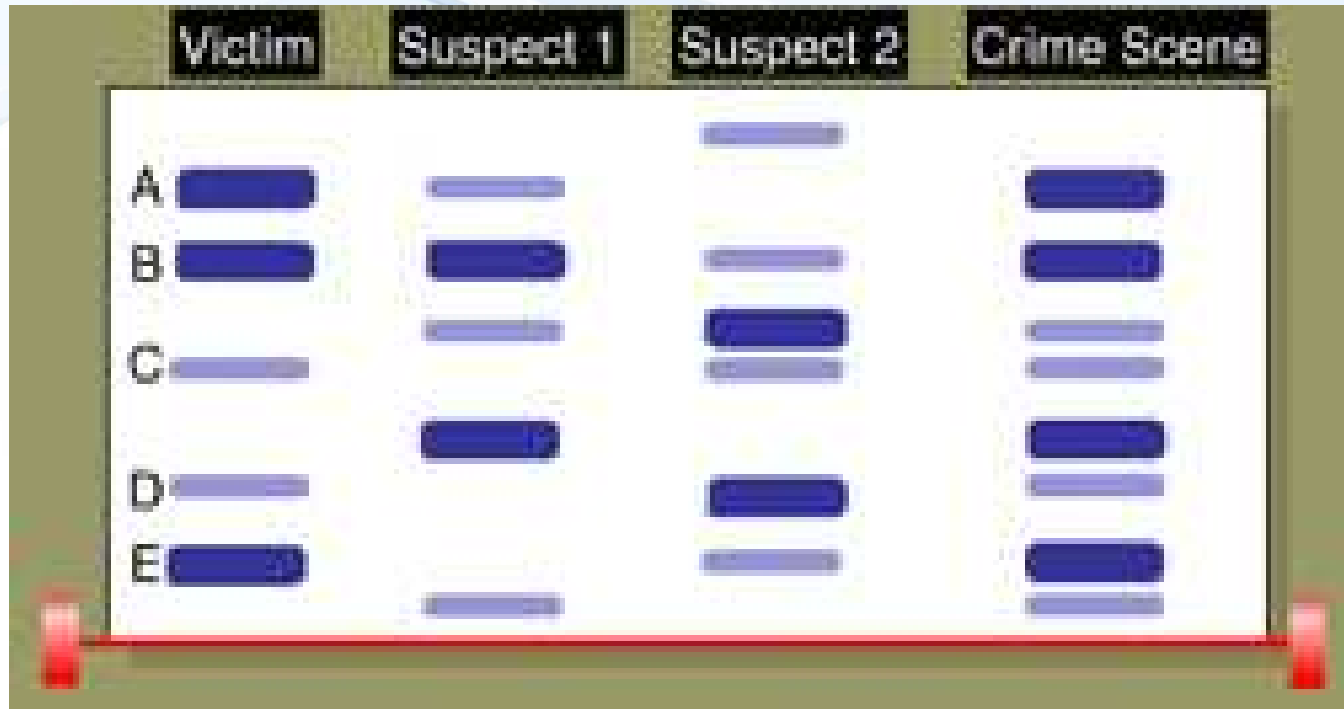
<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>





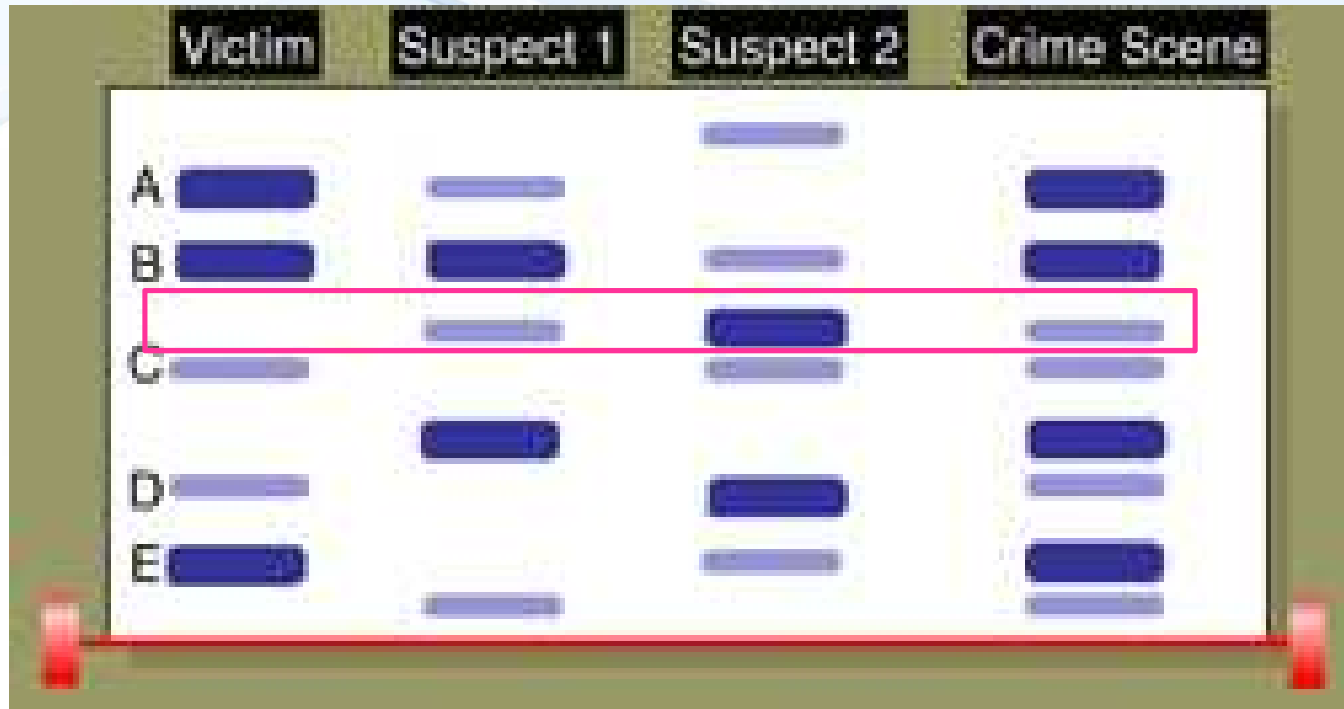
<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>





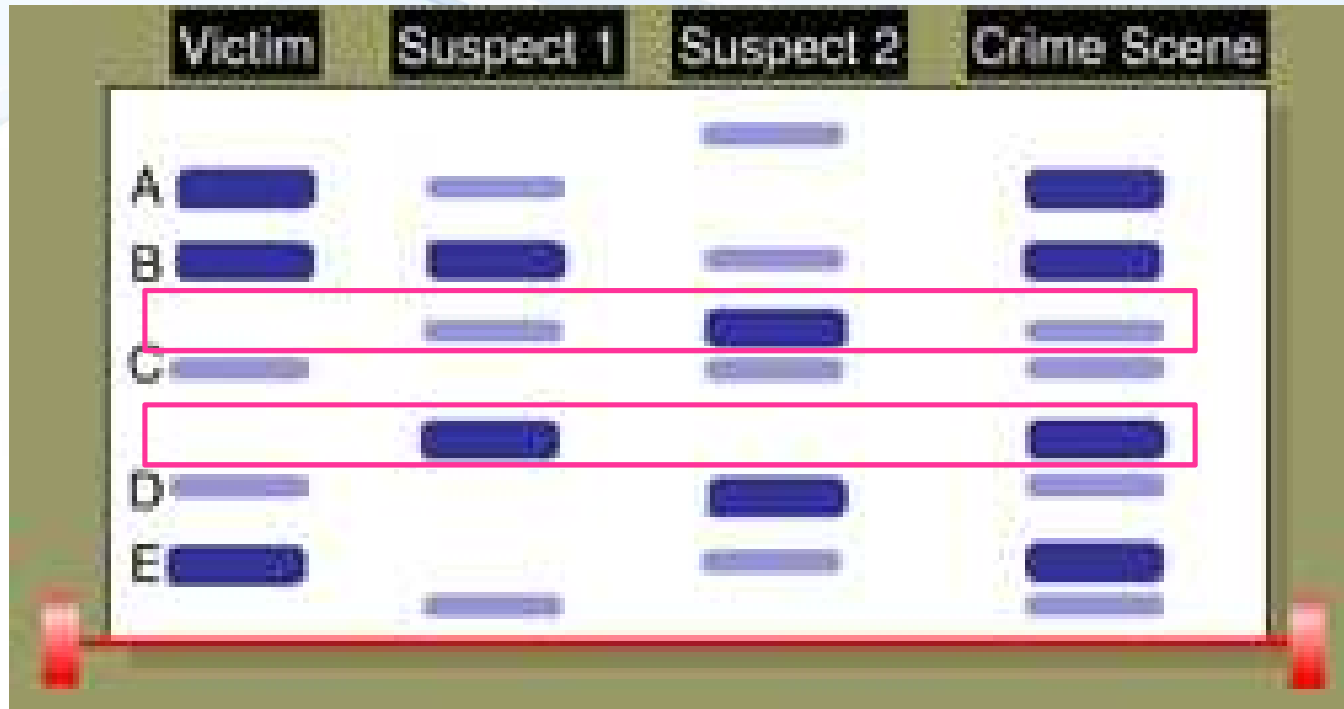
<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>





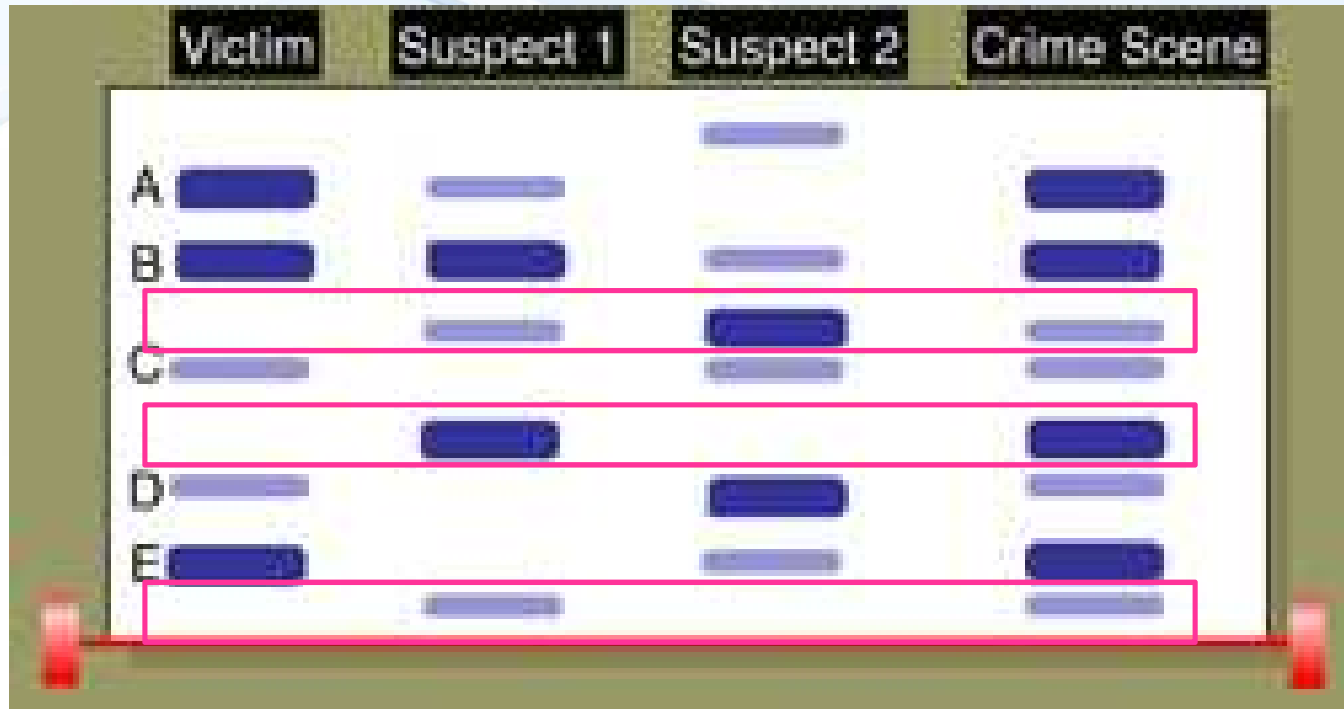
<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>





<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>



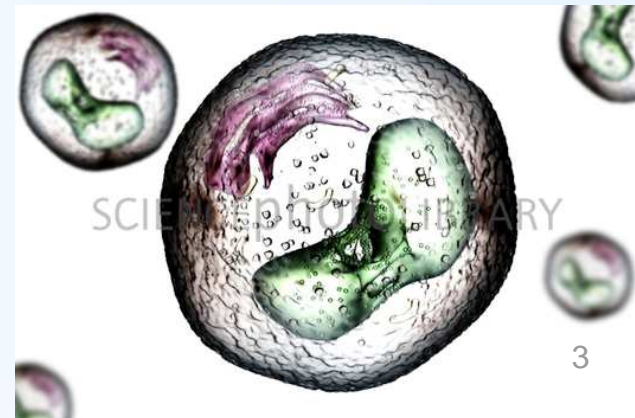


<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>



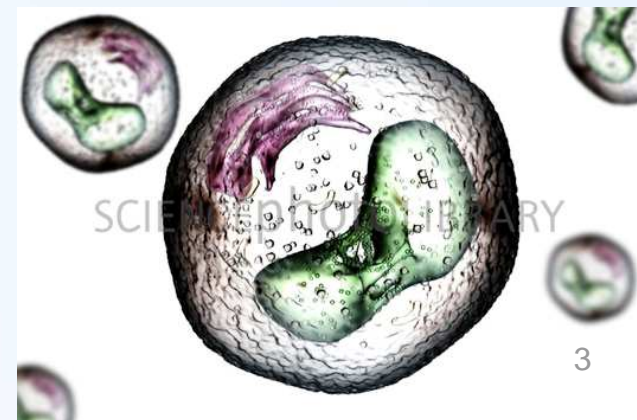
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ Jak namnožit NK
- ✓ Jak zjistit sekvenci NK
- ✓ Co to je transkriptom a k čemu nám je
- ✓ Co to je (eko)toxigenomika
- ✓ Jak zapnout či vypnout gen
- ✓ Jak zkoumat genotoxicitu



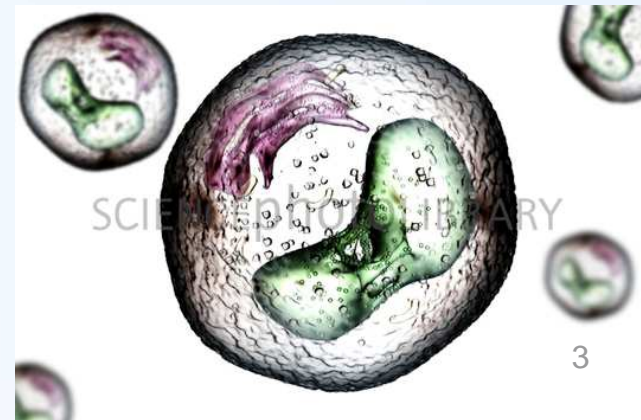
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ **Jak namnožit NK**
- ✓ Jak zjistit sekvenci NK
- ✓ Co to je transkriptom a k čemu nám je
- ✓ Co to je (eko)toxigenomika
- ✓ Jak zapnout či vypnout gen
- ✓ Jak zkoumat genotoxicitu



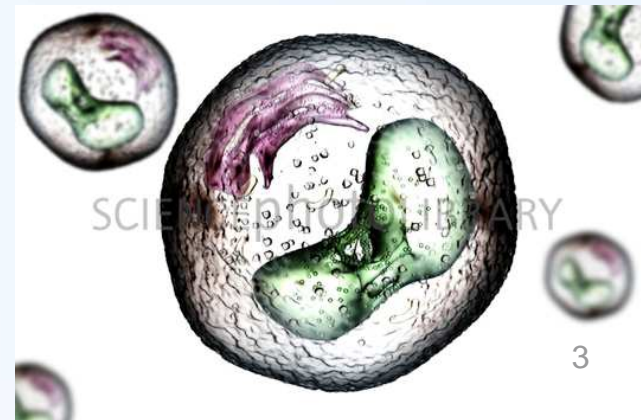
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ **Jak namnožit NK**
- ✓ **Jak zjistit sekvenci NK**
- ✓ Co to je transkriptom a k čemu nám je
- ✓ Co to je (eko)toxigenomika
- ✓ Jak zapnout či vypnout gen
- ✓ Jak zkoumat genotoxicitu



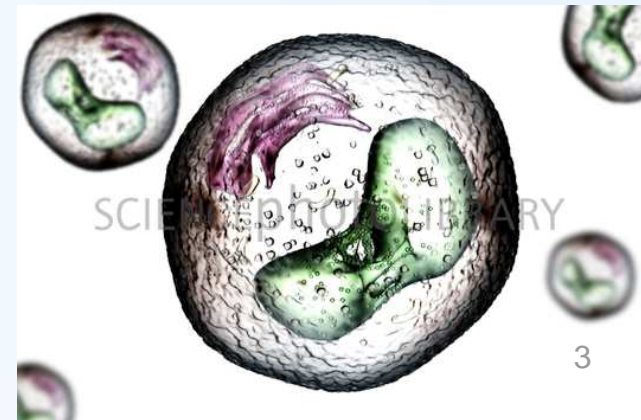
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ Jak namnožit NK
- ✓ Jak zjistit sekvenci NK
- ✓ Co to je transkriptom a k čemu nám je
- ✓ Co to je (eko)toxigenomika
- ✓ Jak zapnout či vypnout gen
- ✓ Jak zkoumat genotoxicitu



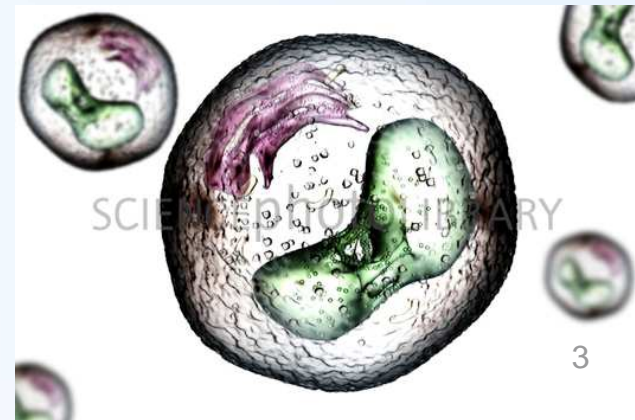
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ Jak namnožit NK
- ✓ Jak zjistit sekvenci NK
- ✓ Co to je transkriptom a k čemu nám je
- ✓ Co to je (eko)toxigenomika
- ✓ Jak zapnout či vypnout gen
- ✓ Jak zkoumat genotoxicitu



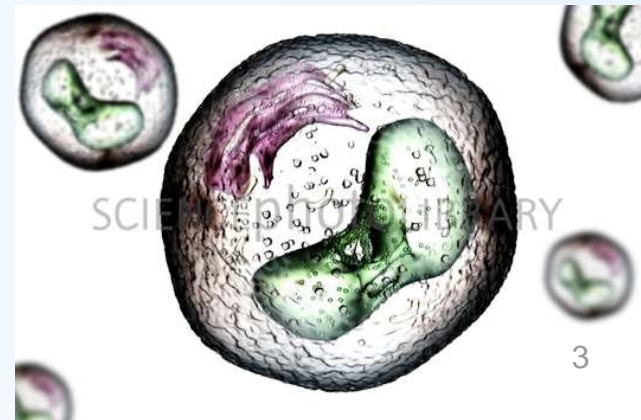
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ Jak namnožit NK
- ✓ Jak zjistit sekvenci NK
- ✓ Co to je transkriptom a k čemu nám je
- ✓ Co to je (eko)toxigenomika
- ✓ Jak zapnout či vypnout gen
- ✓ Jak zkoumat genotoxicitu



CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ Jak namnožit NK
- ✓ Jak zjistit sekvenci NK
- ✓ Co to je transkriptom a k čemu nám je
- ✓ Co to je (eko)toxigenomika
- ✓ Jak zapnout či vypnout gen
- ✓ Jak zkoumat genotoxicitu



CO NÁS, (EKO)TOXIKOLOGY, ZAJÍMÁ PŘI STUDIU NUKLEOVÝCH KYSELIN?



NK: PROČ ZKOU MÁME?

- ❑ NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- ❑ POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- ❑ GENETICKÝ OTISK
- ❑ ANALÝZA MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- ❑ TOXICITA
- ❑ GENOVÁ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- ❑ REKOMBINACE DNA



NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLY-MORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- GENETICKÝ OTISK
- ANALÝZA MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- GENOMIKA
- TRANSKRIPČNÍ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- REKOMBINACE DNA



NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- FENOTYPICKÝ OTISK
- ANALÝZA MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- GENOMIKA
- GENOVÁ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- REKOMBINACE DNA



NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- GENETICKÝ OTISK
- ANALÝZA MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- GENOMIKA
- TRANSKRIPČNÍ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- METYLACE DNA



NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- GENETICKÝ OTISK
- OTISK MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
-
- GENOVÁ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- METYLACE DNA

NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- GENETICKÝ OTISK
- OTISK MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- MUTACE
- GENOVÁ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- REKOMBINACE DNA

NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- GENETICKÝ OTISK
- OTISK MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- MUTACE
- GENOVÁ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- REKOMBINACE DNA



NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- GENETICKÝ OTISK
- OTISK MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- MUTACE
- GENOVÁ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- REKOMBINACE DNA



PCR aneb JAK NAMNOŽIT SPECIFICKÝ ÚSEK NK?



PCR: „KOPIRKA“ PRO DNA

□ PCR = „Polymerase Chain Reaction“

□ Polymerázová řetězová reakce

✧ objevena v roce 1983 ⇒ Kary Mullis

✧ Nobelova cen 1993

✧ **ústřední metoda v biochemii a molekulární biologii**

„polymerázová“ – využití DNA polymerázy ⇒ replikace *in vitro*

„řetězová reakce“ – více reakcí za sebou, produkt první reakce se stává „šablonou“ v další reakci atd. atd. atd. atd.



PCR: „KOPIRKA“ PRO DNA

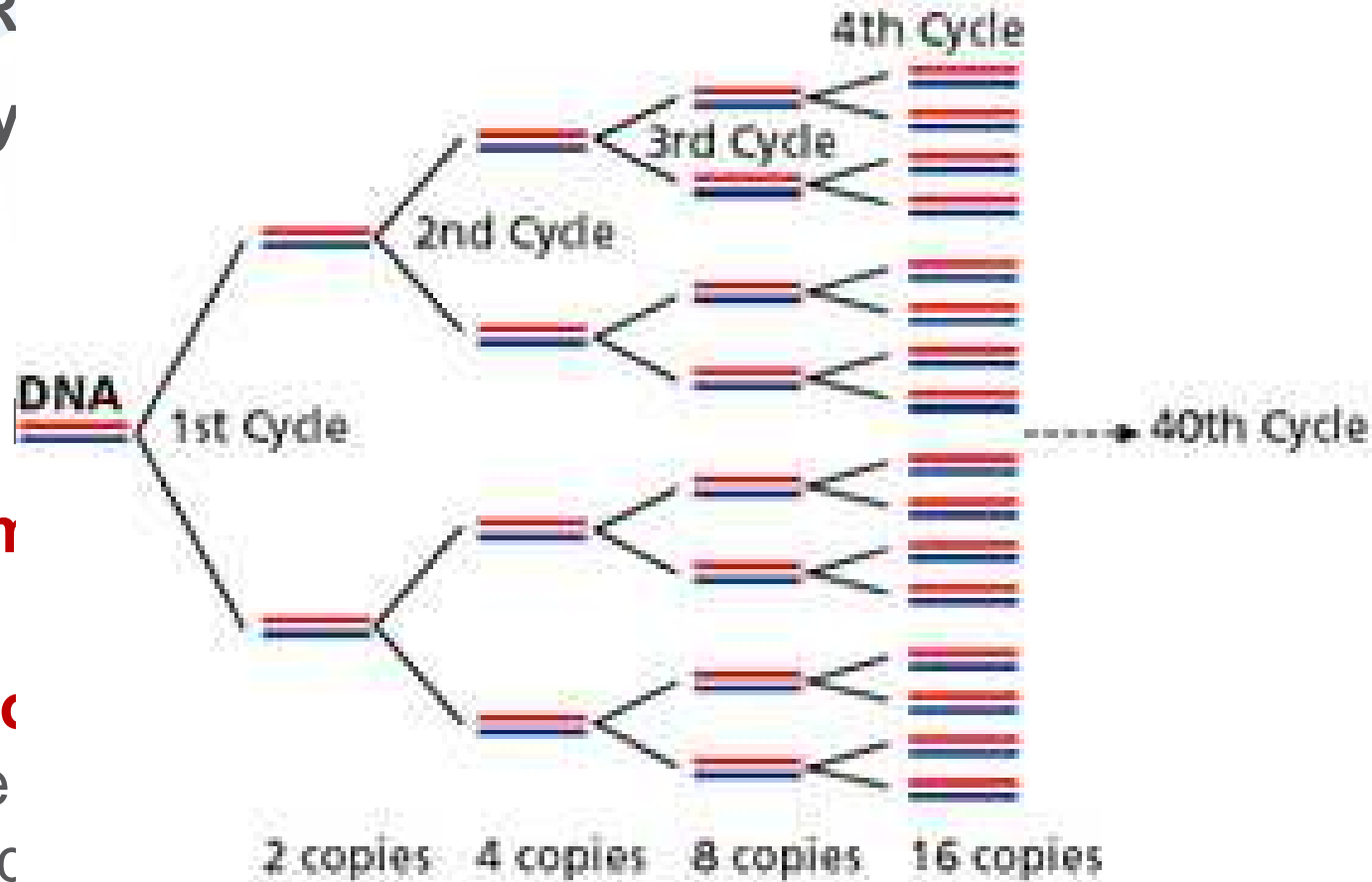
□ PCR

□ Poly

„polyn
vitro

„řetěz
reakce
atd. atc

Exponential amplification



kulární

ace in

: první
d. atd.



PCR: „KOPIRKA“ PRO DNA

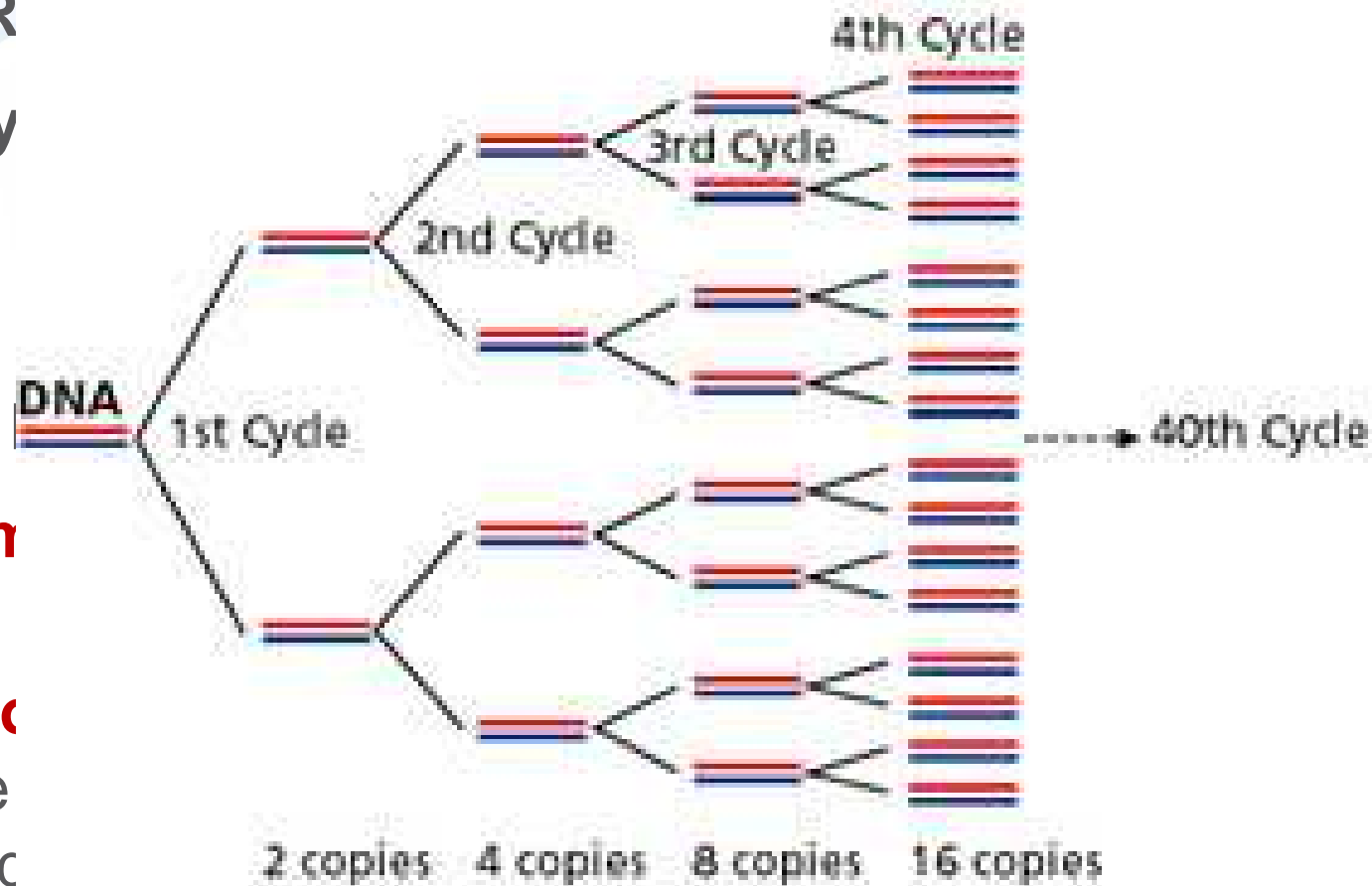
□ PCR

□ Poly

„polyn
vitro

„řetěz
reakce
atd. atc

Exponential amplification



$$2^{40} = 1\,099\,511\,627\,776 \text{ kopií}$$

kulární

ace in

: první
d. atd.



PCR: „KOPIRKA“ PRO DNA

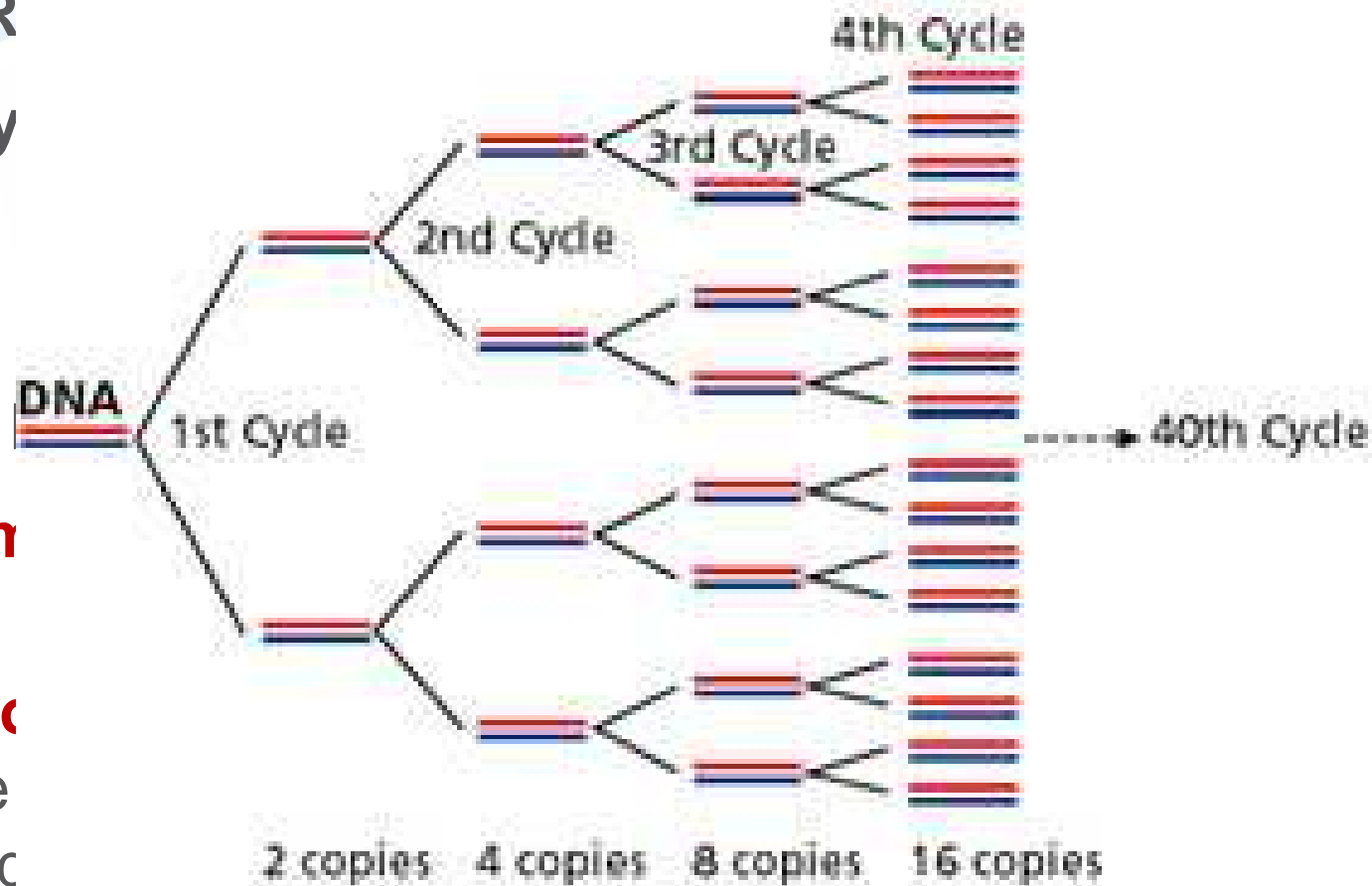
□ PCR

□ Poly

„polyn
vitro

„řetěz
reakce
atd. atc

Exponential amplification



$$2^{40} = 1\,099\,511\,627\,776 \text{ kopií}$$

kulární

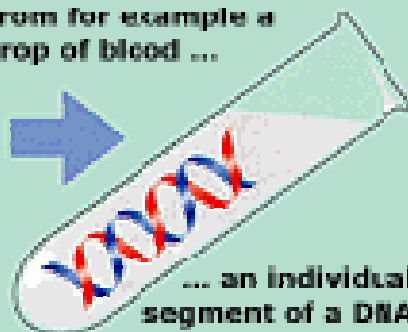
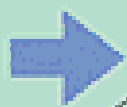
ace in

: první
d. atd.

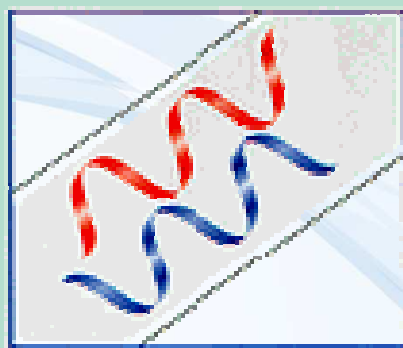




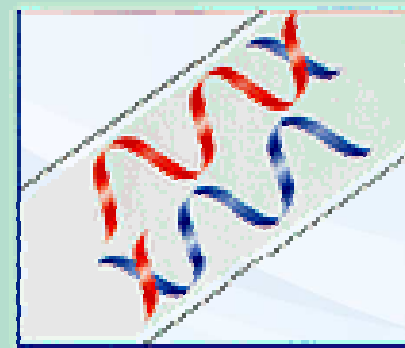
From for example a drop of blood ...



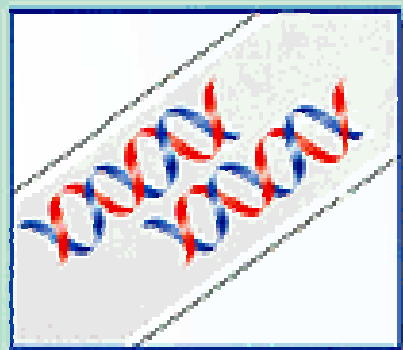
... an individual segment of a DNA molecule is extracted



By raising the temperature to about 90°C the strands are separated.

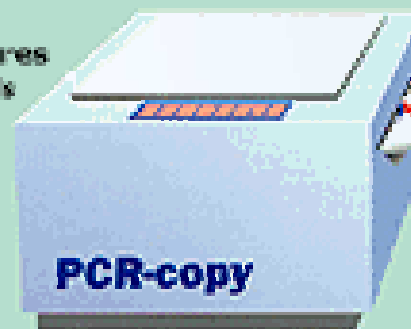


The temperature is lowered about 55°C and synthetic DNA fragments are added. These bind to the strands at the correct positions.

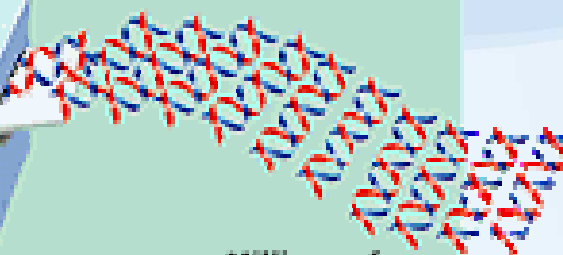


The temperature is now raised to about 70°C and the enzyme DNA polymerase which is added builds up two new complete copies of the DNA strands.

By cycling through the three temperatures the strands are separated and built up again.



The whole process works like a copying machine.



Millions of copies an hour ...

1. TEMPLÁT DNA

2. PRIMERY ⇒ krátké oligonukleotidy DNA

⇒ Specifické pro např.

- gen (receptor, enzym, membránový přenašeč atd.)
- kmen bakterií (16S RNA)

⇒ Nespecifické

PCR: CO POTŘEBUJEME? I.

Polymerase chain reaction (PCR)

1. TEMPL
DNA

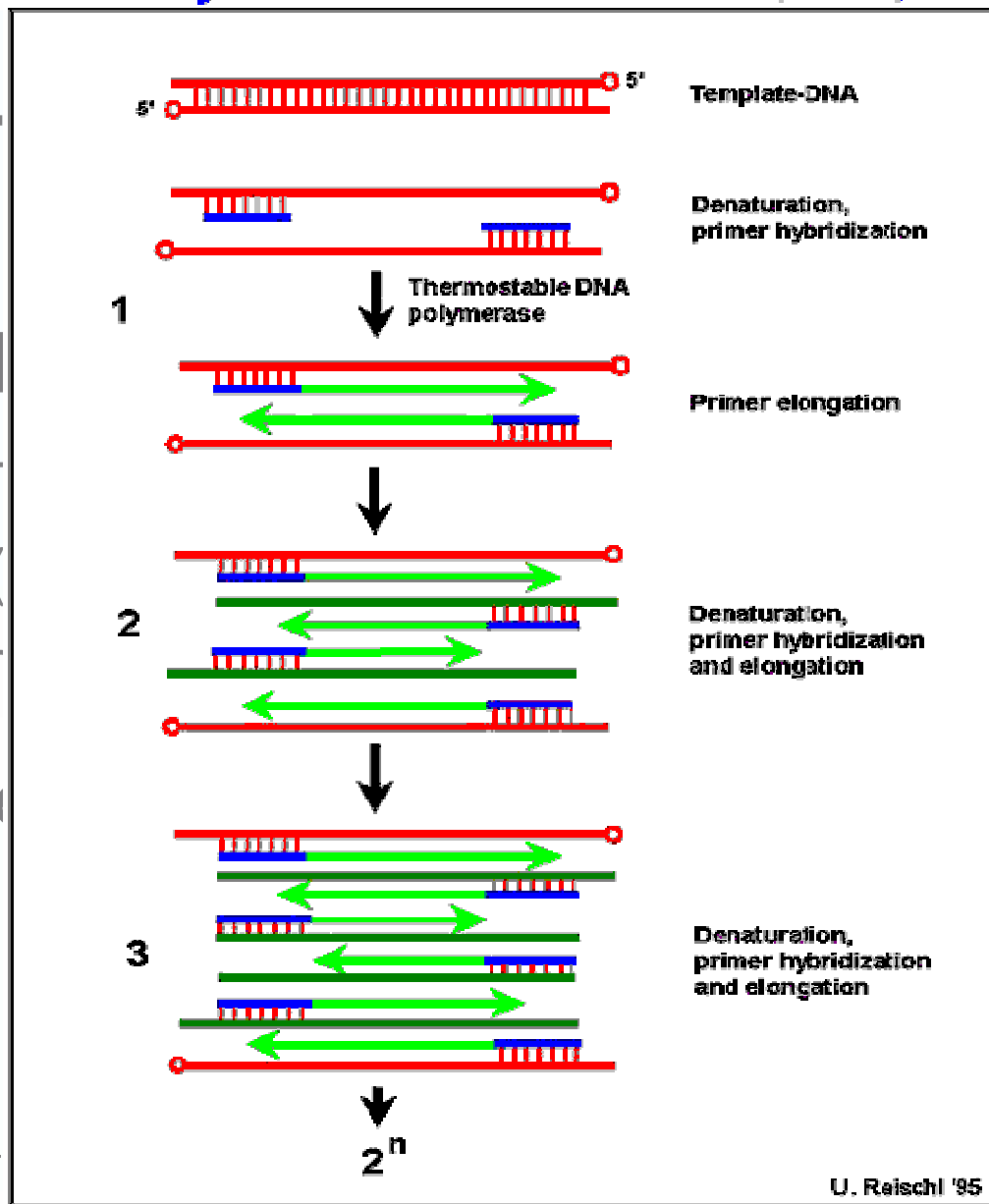
2. PRIMEI

⇒ Speci

– gen (

– kmer

⇒ Nespo



dy DNA

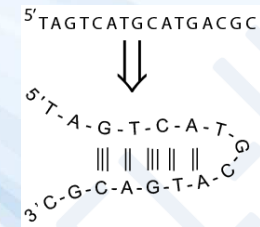
(šič atd.)



Research centre
for toxic compounds
in the environment

PCR: (NE)SPECIFICKÉ PRIMERY

- ✓ 20 až 30 bází
- ✓ Teplota nasedání závislá na sekvenci primerů (~ 50% obsahu GC)
- ✓ Neměl by tvořit sekundární struktury, zejména na 3' konci
- ✓ Neměly by tvořit tzv. dimery ⇒ komplementarita sekvencí primerů



5'-ACGGATACGTTACG**CTGAT**-3'

3'-**GACTATTCCATGTAGACCT**-5'

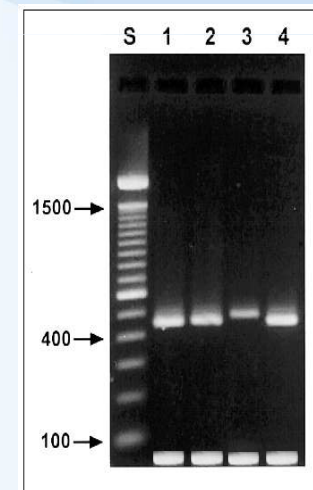


Primer 1

5'-ACGGATACGTTACG**CTGAT**AAGGTACATCTGGA-3'

3'-TGCCTATGCAATGC**GACTATTCCATGTAGACCT**-5'

Primer 2



- ✓ Sekvence primerů by měla končit GC ⇒ silnější vazba na

PCR: PROGRAMY PRO DESIGNOVÁNÍ PRIMERŮ

OLIGO

www.oligo.ne

PRIMER3

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi

PrimerQuest

<http://www.idtdna.com/primerquest/home/index>



3. PŘÍSTROJ

umožňující rychlé a precísni střídaní teplot

- 95 °C** ⇒ denaturace DNA
- 50-60 °C** ⇒ nasednutí primerů
- 72 °C** ⇒ prodloužení vlákna



Průběh PCR před vynalezením thermocykleru



95° C
5 min



55° C
3 min



72° C
5 min



35 cyklů

8 **NUDNÝCH** hodin !!!



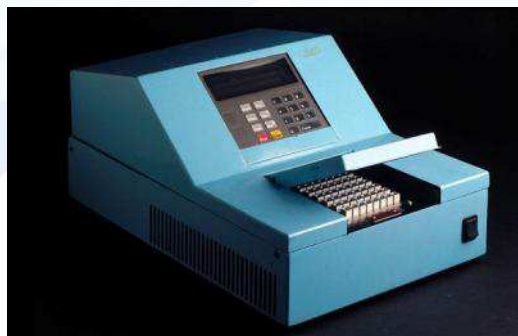
Průběh PCR



We couldn't afford one of those cool PCR robots, so we just got an undergrad and a cardboard box.



AUTOMATIZACE



„Baby Blue“ (1986)



Starší prototyp termocyklu



Techne TC-PLUS (2010)



Biometra T1 (1999)



Eppendorf Mastercycler EP (2003)



G-STORM GS4 (2006)



Biometra Topical (2012)



Research centre for toxic compounds in the environment

5. REAKČNÍ SMĚS VE ZKUMAVCE

Vzorek DNA

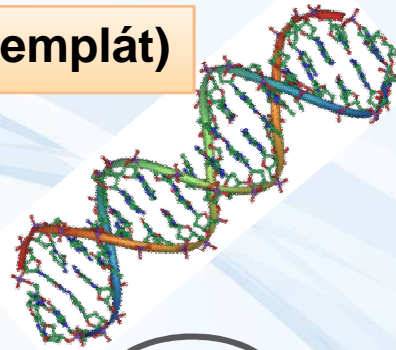
Primery pro (ne)specifickou detekci

Nukleotidy

Enzym – termostabilní DNA polymeráza



DNA (templát)



T C G A

Volné deoxynukleotidy

Taq

Termostabilní
DNA polymeráza
(Taq polymeráza)

Složky PCR:



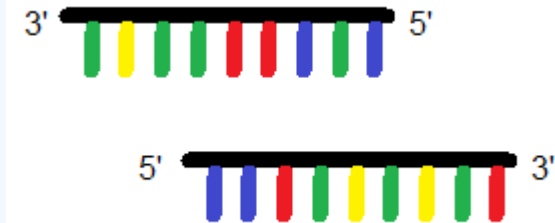
Pufř



Hořčík



ddH₂O



Primery

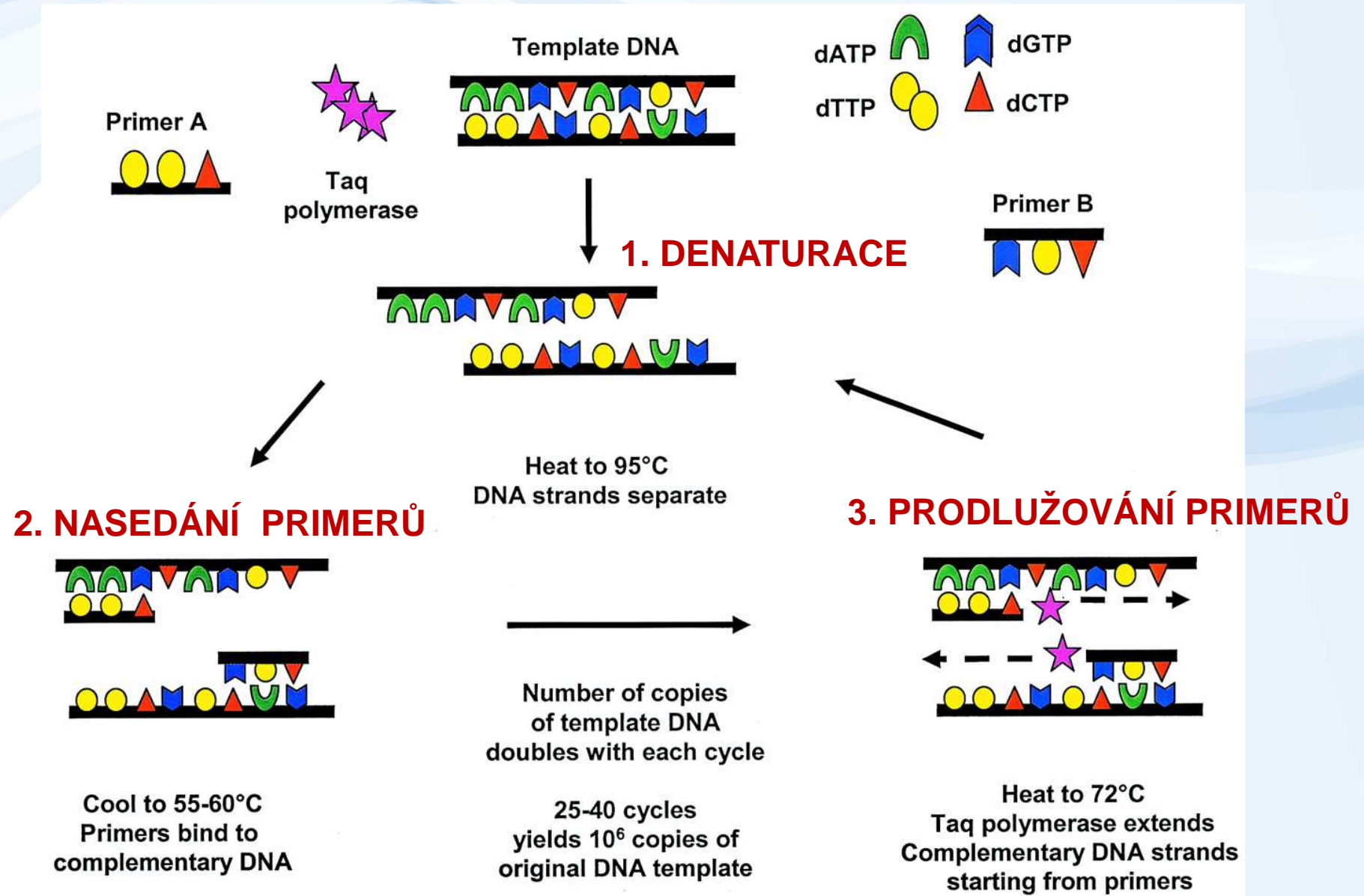


Research centre
for toxic compounds
in the environment

www.zivaveda.ivb.cz

Polymerázová řetězová reakce aneb Děkujeme,
pane Mullis!, Mgr. Tereza Králová

43



Obvyklé teploty & časy PCR

Počáteční
denaturace

90° – 95° C

1 – 3
min

Denaturace

90° – 95° C

0.5 – 1
min

Nasedání
primerů

45° – 65° C

0.5 – 1
min

Prodlužování
primerů

70° – 75° C

0.5 – 2
min

Konečné
prodlužování


70° – 75° C

5 – 10
min

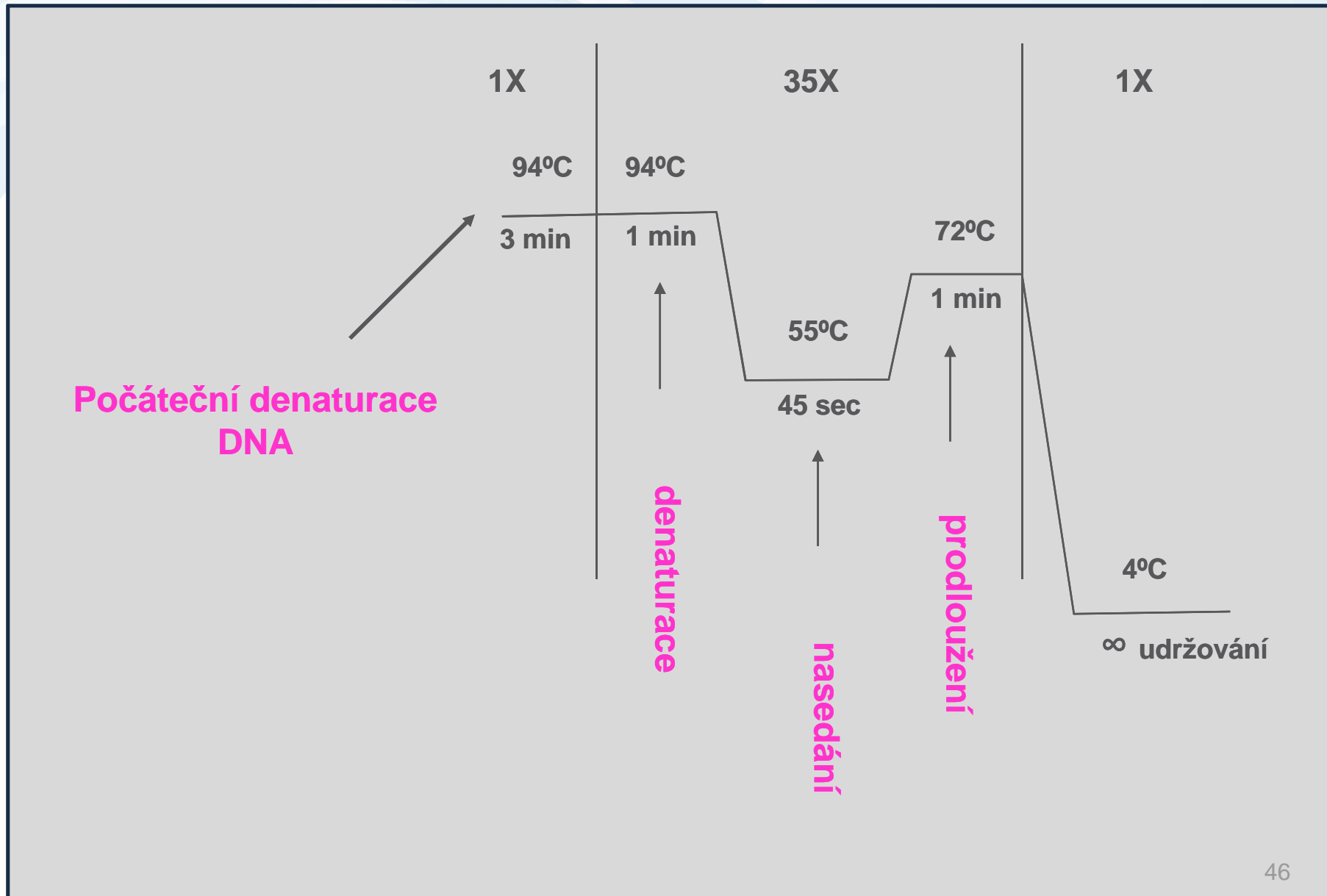
Ukončení
reakce

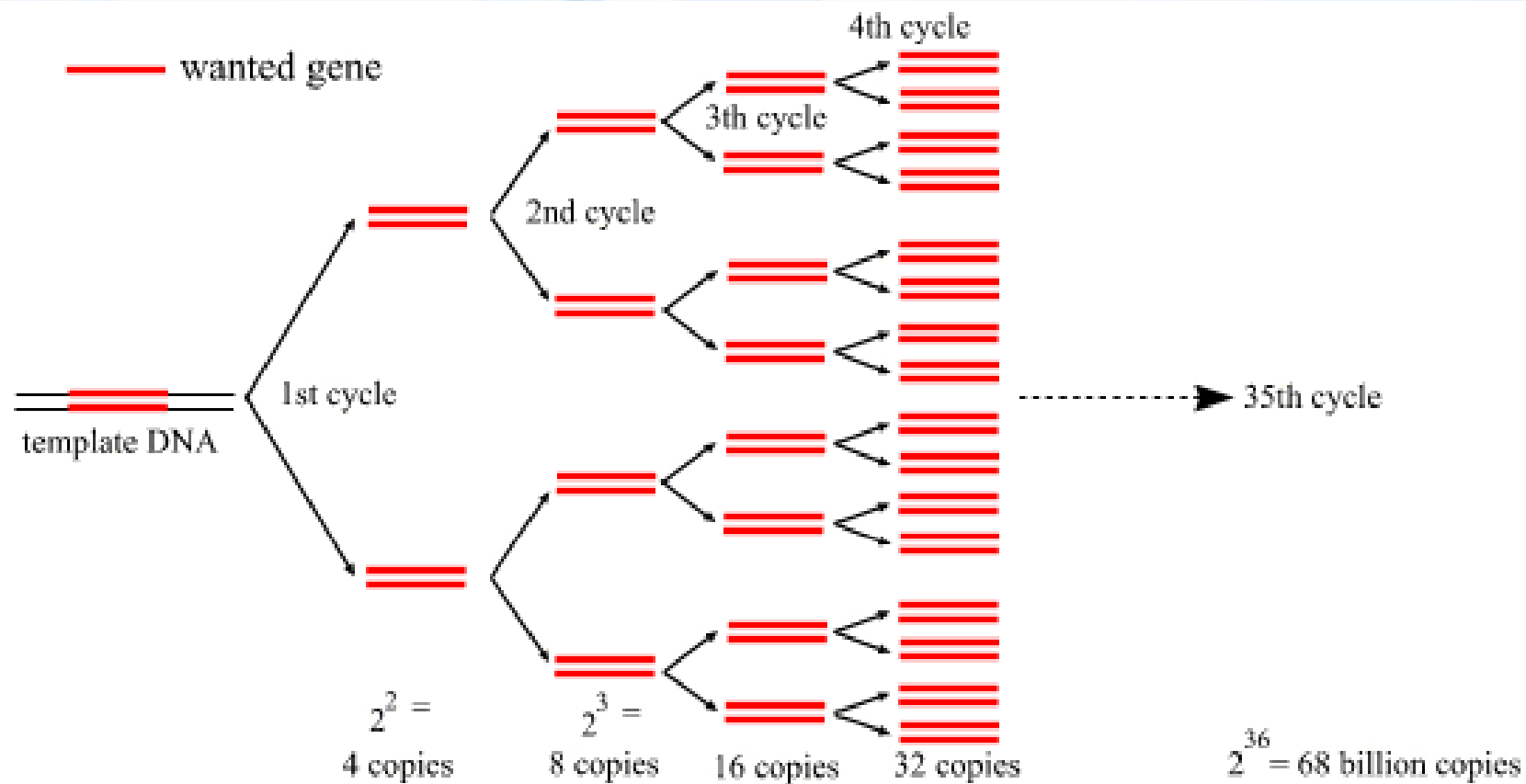
4° C

20 – 40
cyklů



Obvyklé teploty & časy PCR





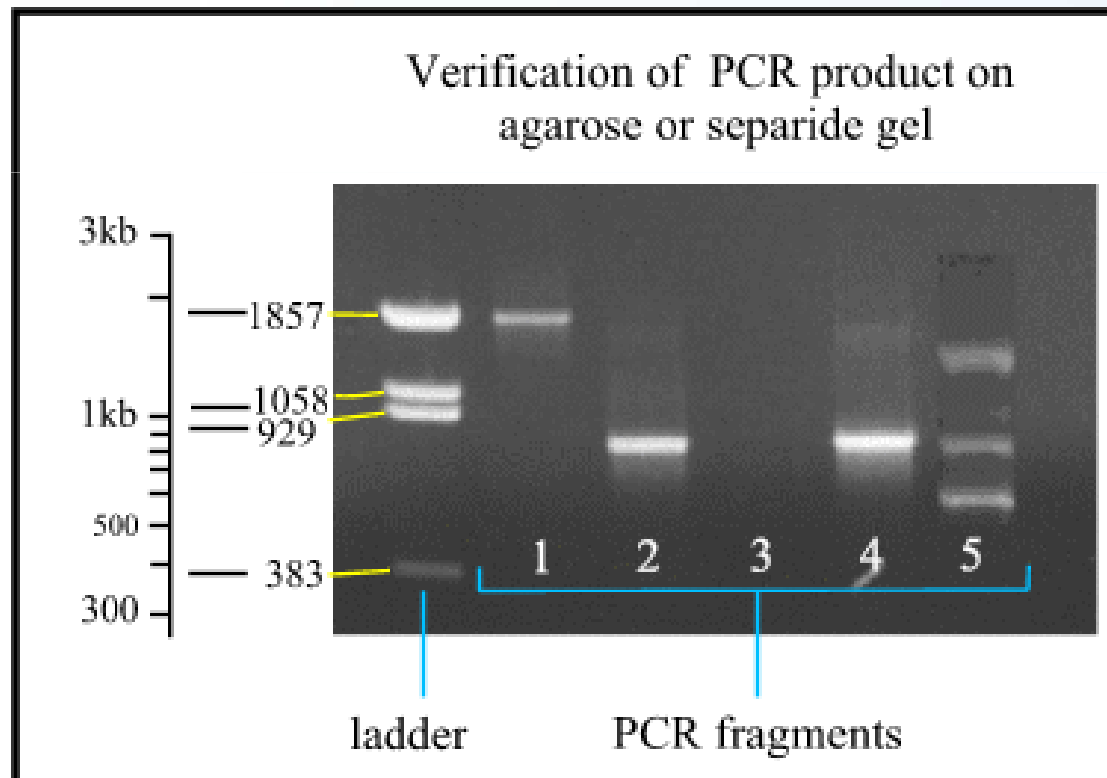
po n-tém cyklu => 2^n molekul DNA

(Andy Vierstraete 1999)

PCR: JAK DETEKUJEME NAMNOŽENÉ KOPIE DNA?

□ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

- horizontální elektroforéza na agarózovém gelu
- DNA fragmenty: 100 až 500 pb



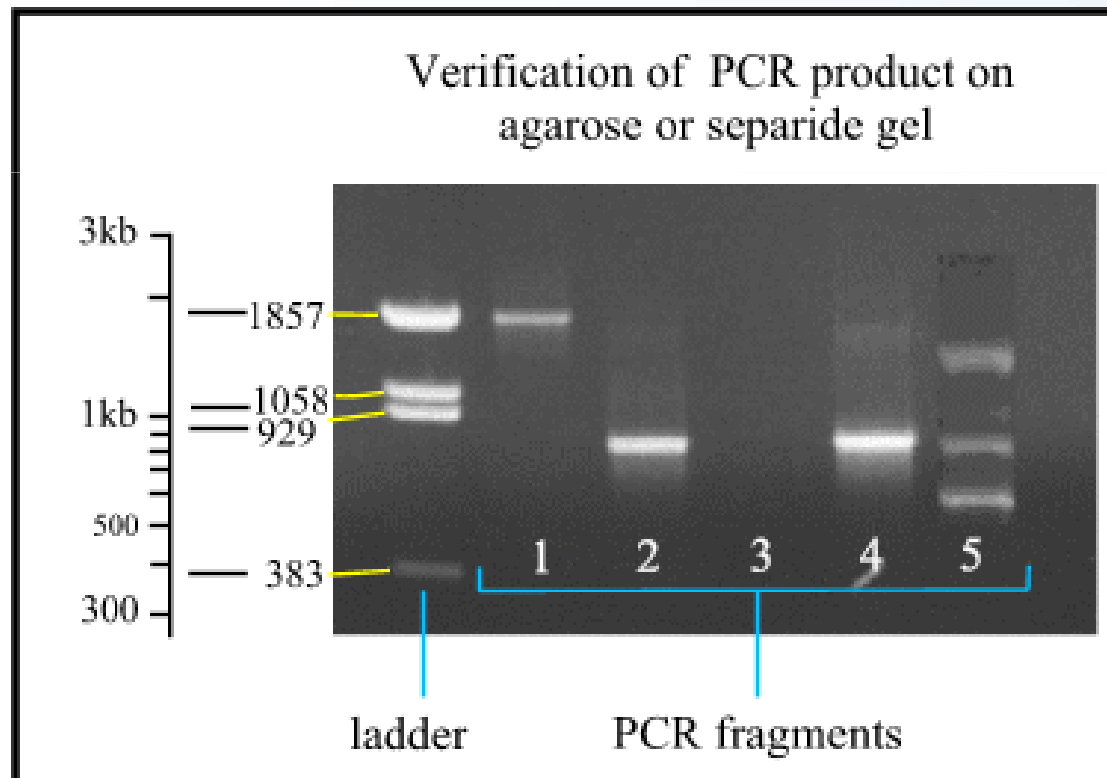
- potvrzení specificity fragmentu sekvenačními metodami



PCR: JAK DETEKUJEME NAMNOŽENÉ KOPIE DNA?

□ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

- horizontální elektroforéza na agarózovém gelu
- DNA fragmenty: 100 až 500 pb

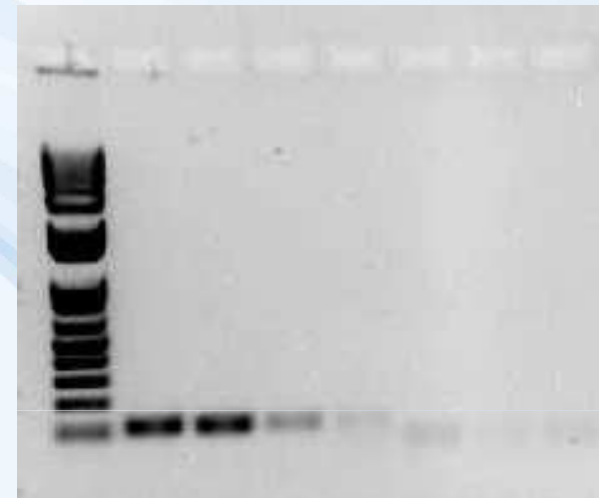
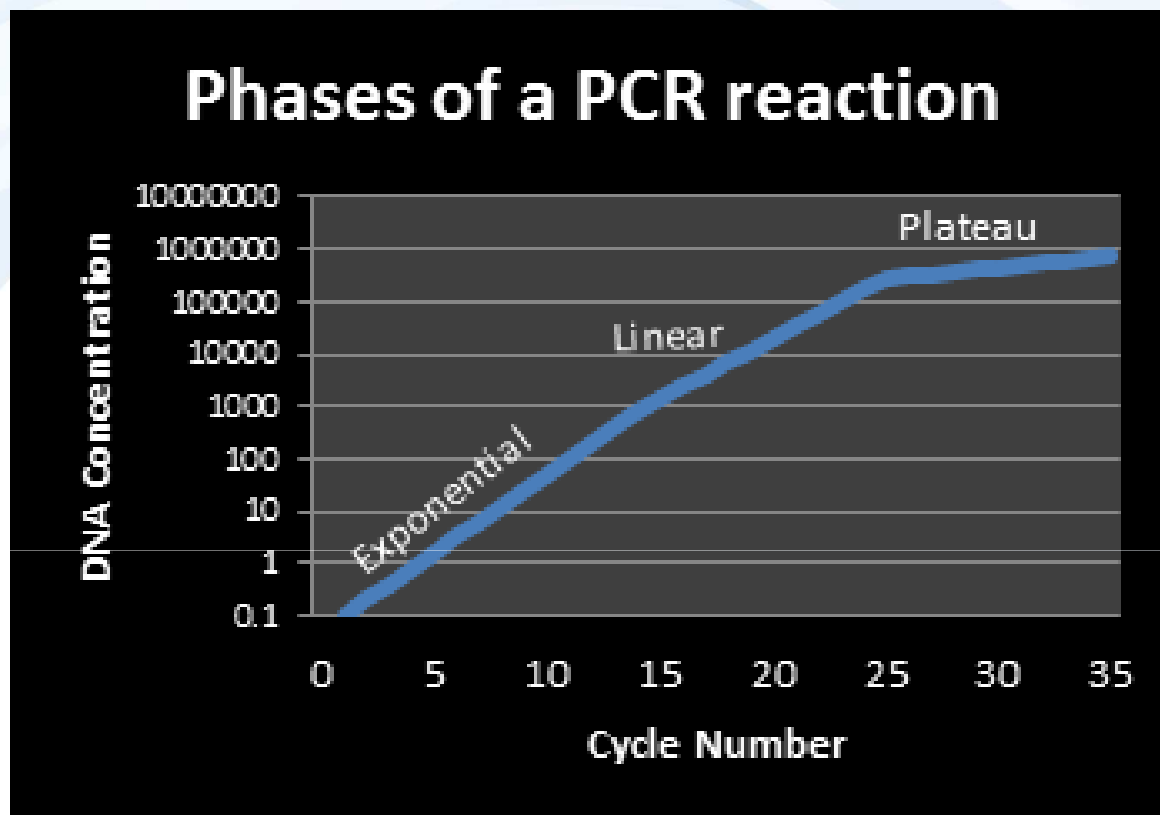


□ potvrzení specificity fragmentu sekvenačními metodami

⇒ **KONVENČNÍ PCR**
(„end-point“ PCR)



KONVENČNÍ PCR: LIMITACE



<http://www.labome.com/method/Current-PCR-Methods.html>



Research centre
for toxic compounds
in the environment

KONVENČNÍ PCR: LIMITACE

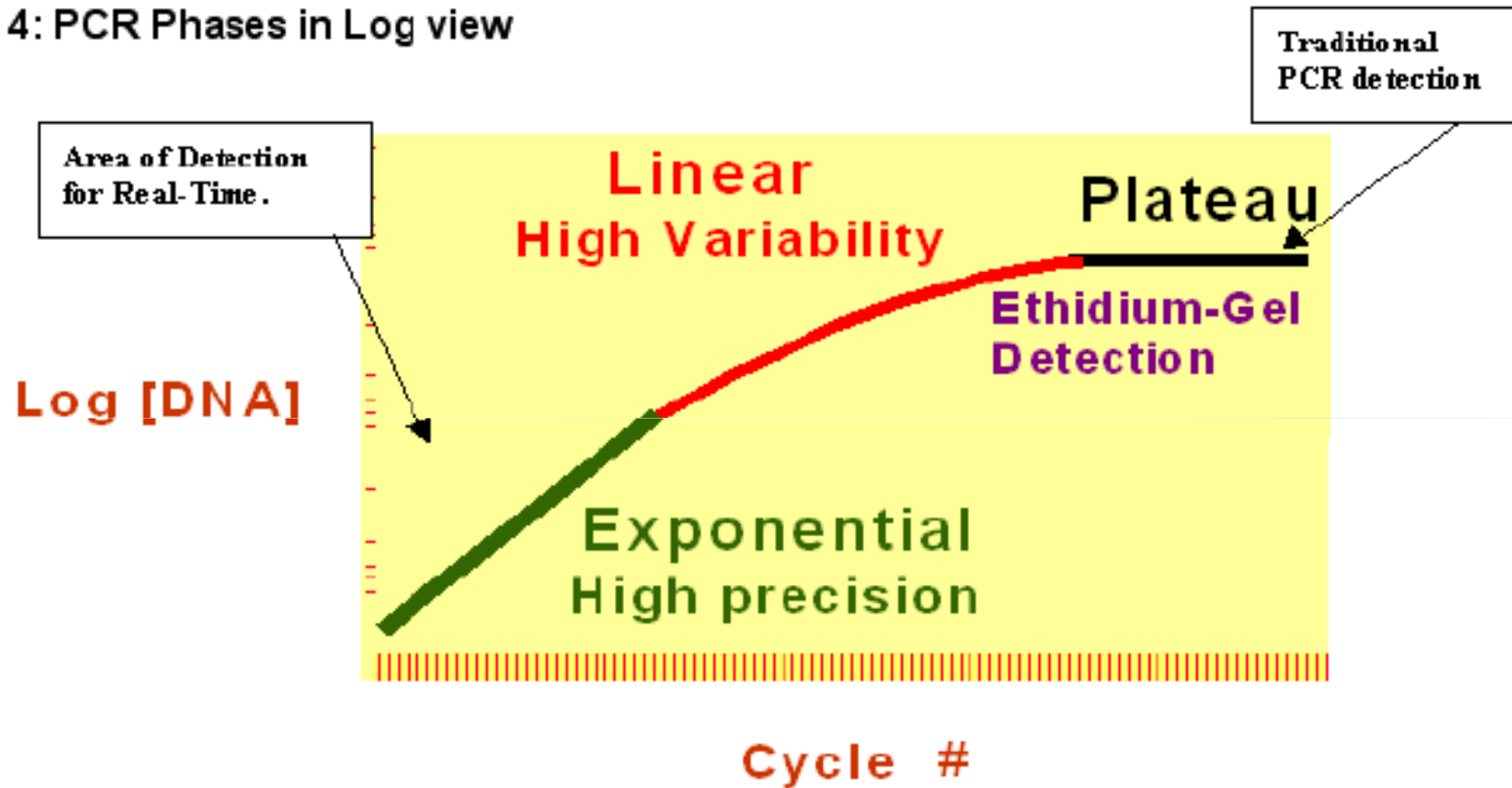
- ↓ citlivost
- ↓ rozlišení
- ↓ dynamický rozsah < 2 logs
- neautomatizovatelná
- pouze rozlišení velikosti
- ethidium bromid je spíše pro semikvantitativní barvení



qPCR: DETEKCE V REÁLNÉM ČASE

kvantitativní PCR

Figure 4: PCR Phases in Log view

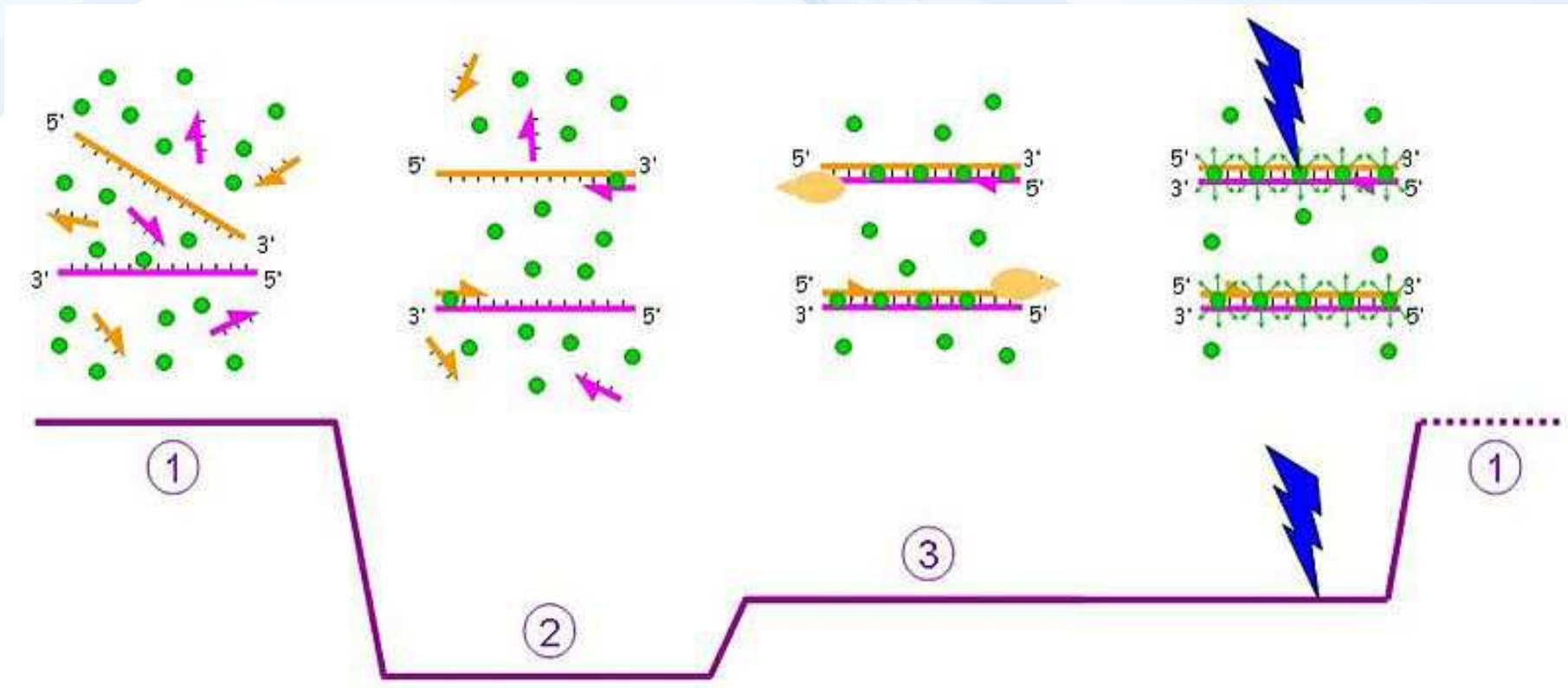


<http://www.gene-quantification.de/block.html>



qPCR: SYBR GREEN I

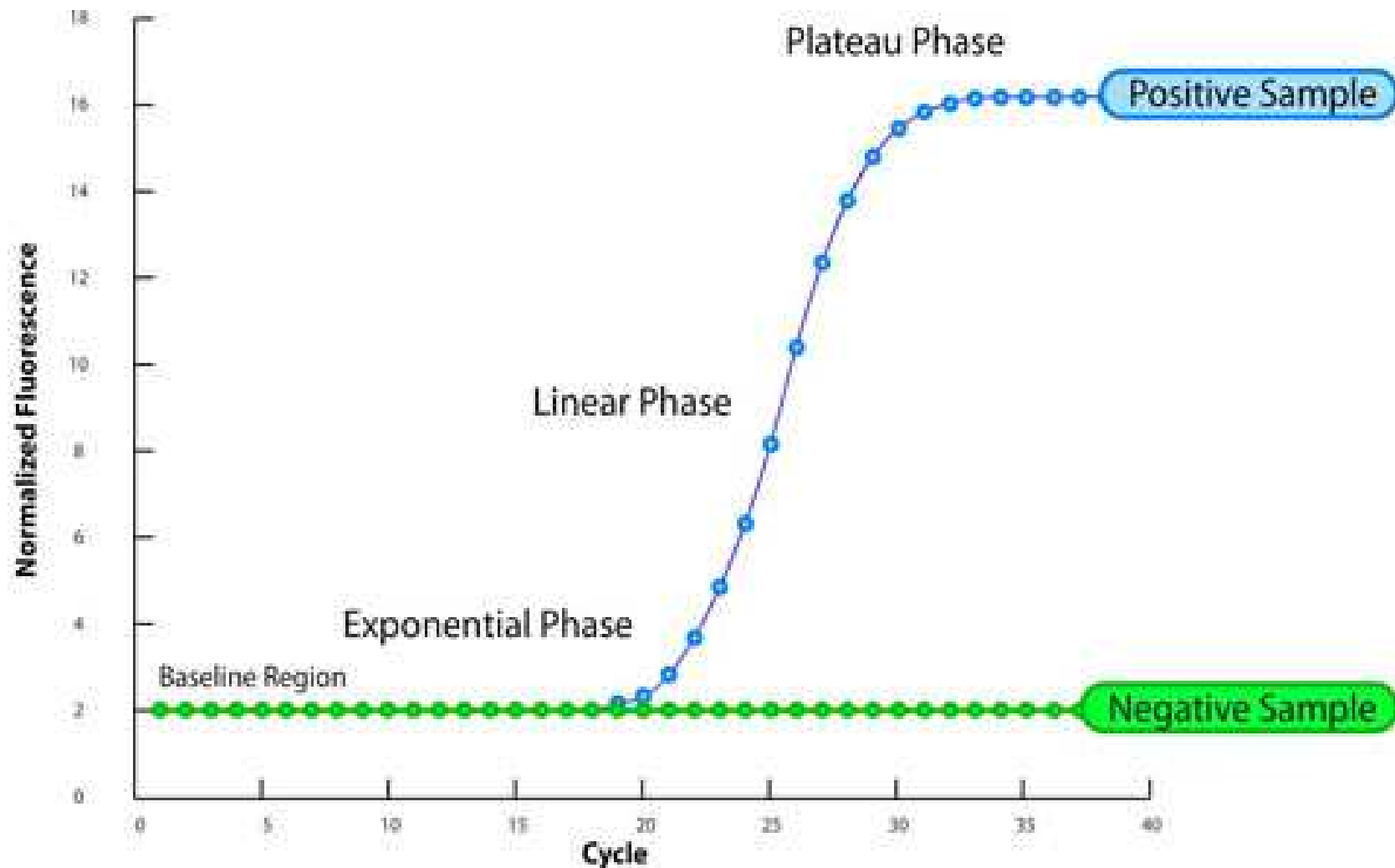
⇒ fluorescenční barva vázající se na dsDNA



<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/sybr-green-based-qpcr/syber-green-animation.html>

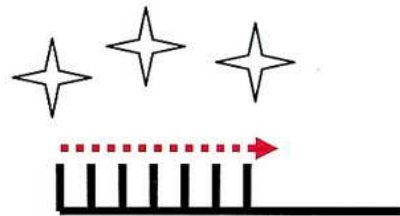
qPCR: SYBR GREEN I

⇒ fluorescenční barva vázající se na dsDNA

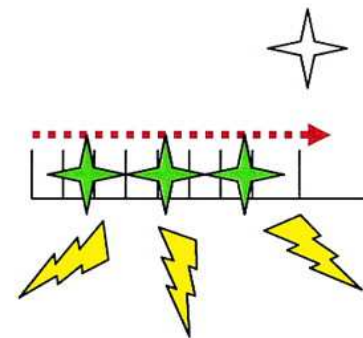




Primer Annealing



SYBR green has minimal fluorescence in the presence of single stranded DNA



As PCR progresses, double stranded DNA is produced

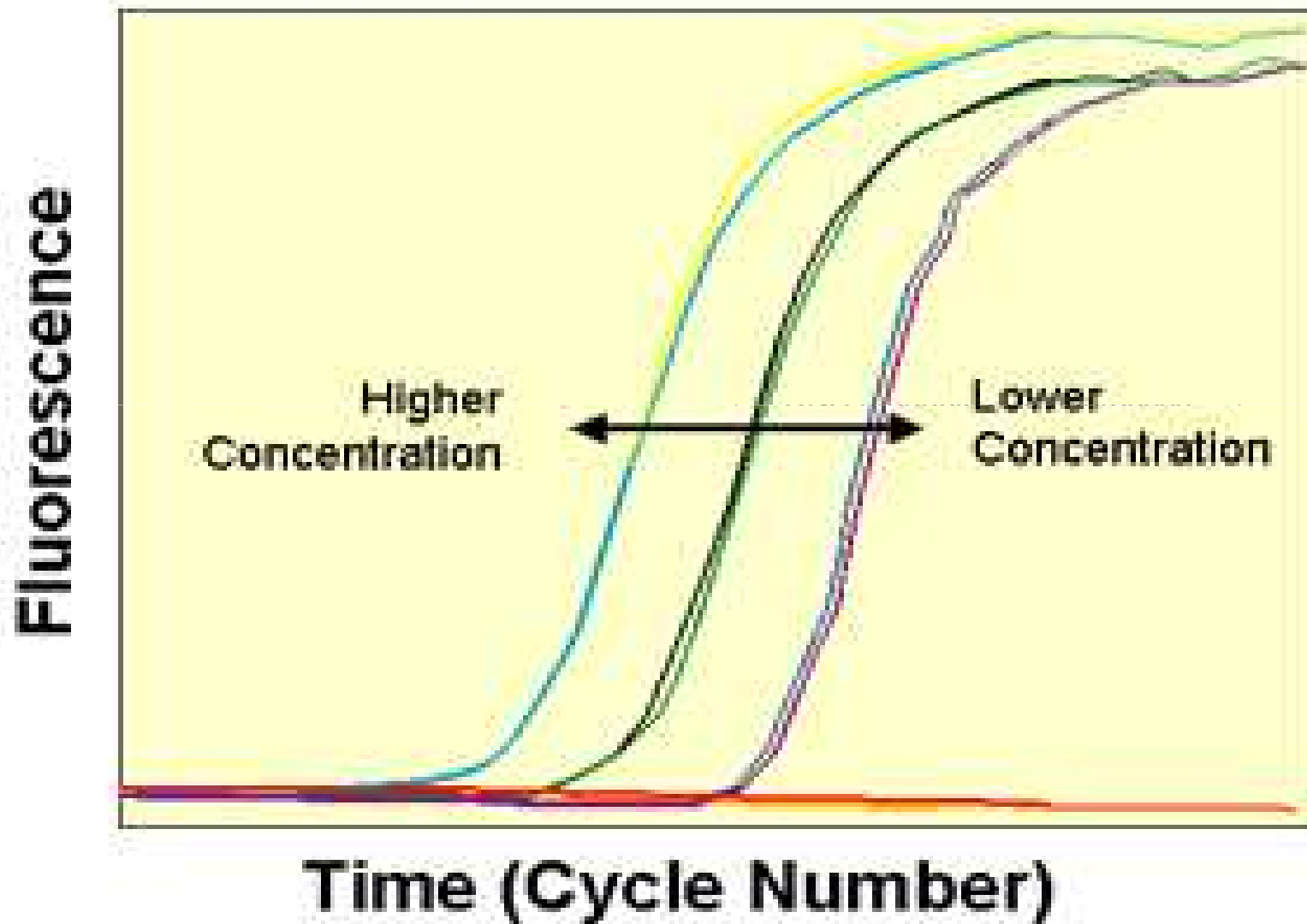
SYBR green intercalates into double stranded DNA products and fluoresces

After multiple cycles, fluorescence rises above background (threshold cycle) and this is used to quantify amount of DNA template present in the original sample

DeBiasi R L , and Tyler K L Clin. Microbiol. Rev. 2004;17:903-925

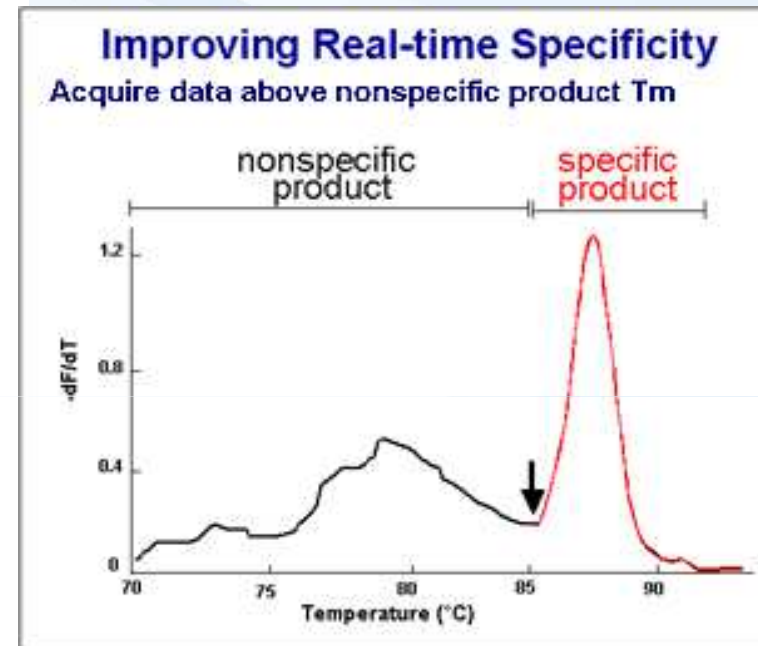
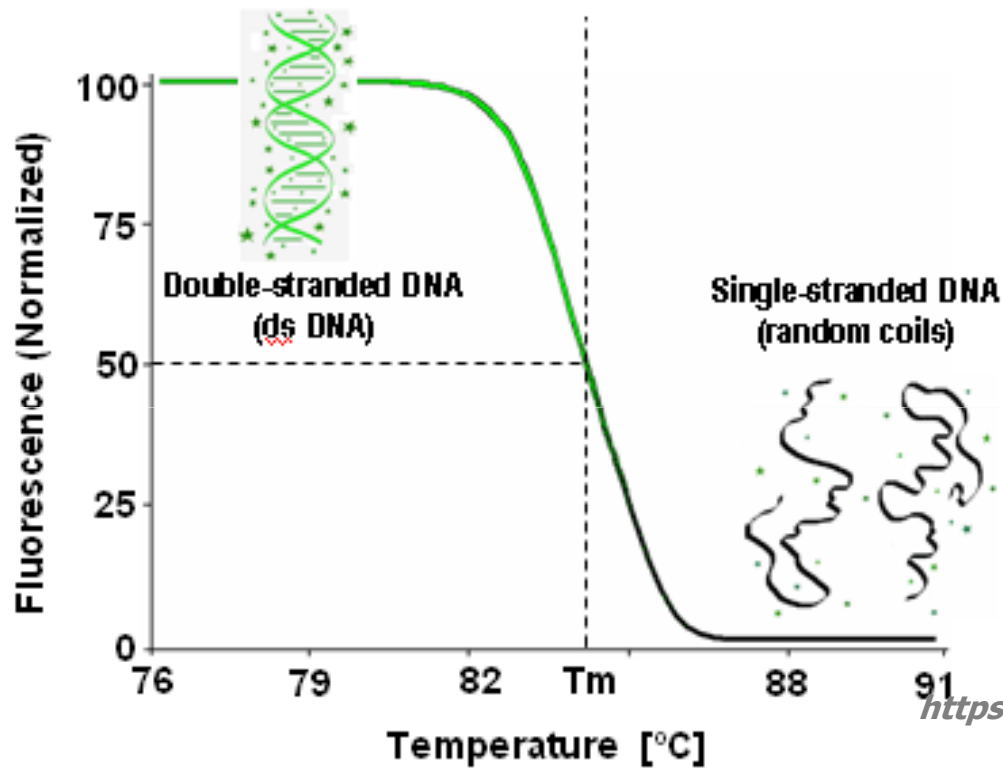


Real-Time Monitoring of PCR



⇒ limitace ⇒ SYBR GREEN se váže nespecificky na jakoukoliv dsDNA (“primer-dimer”, nespecifický produkt atd.)

B. Normalized Melting Curves



https://dna.utah.edu/LightCycler/Top_LightCycler.html

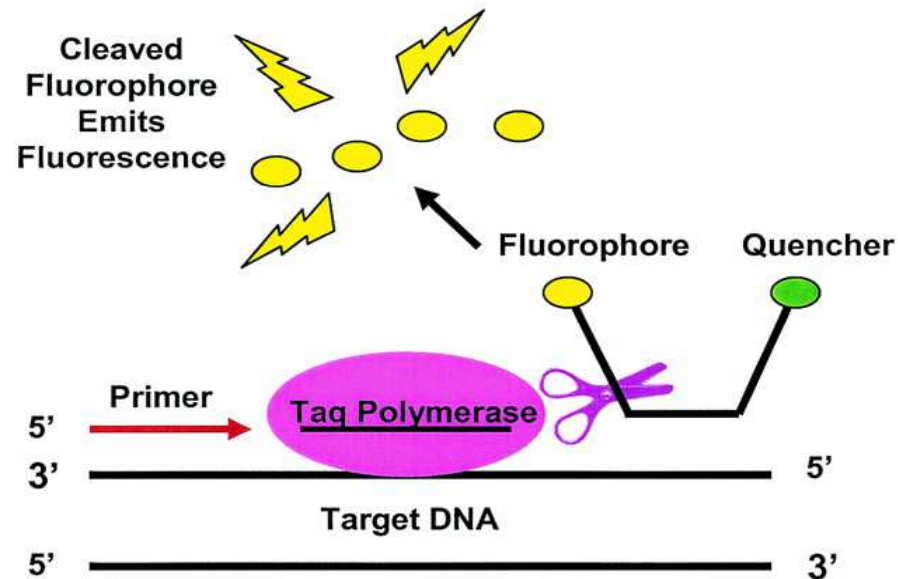
<http://hrm-dyes.gene-quantification.info/>



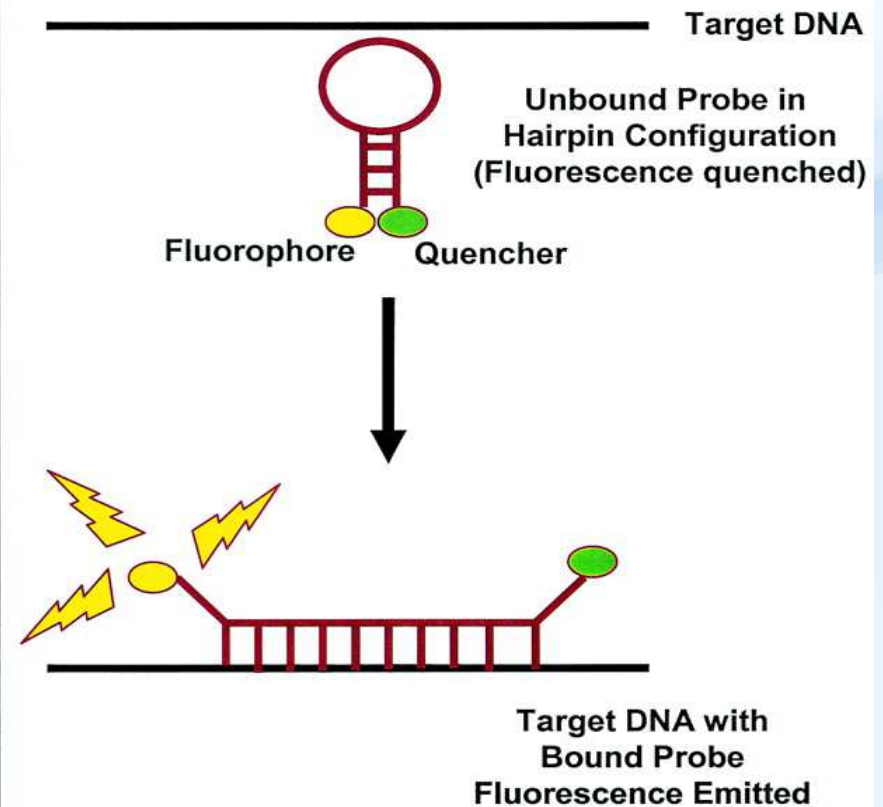
qPCR PRÓBY

- Fluorescenčně značené próby vázající se specificky na cílový produkt PCR

5'Nuclease Oligoprobe (Taqman)

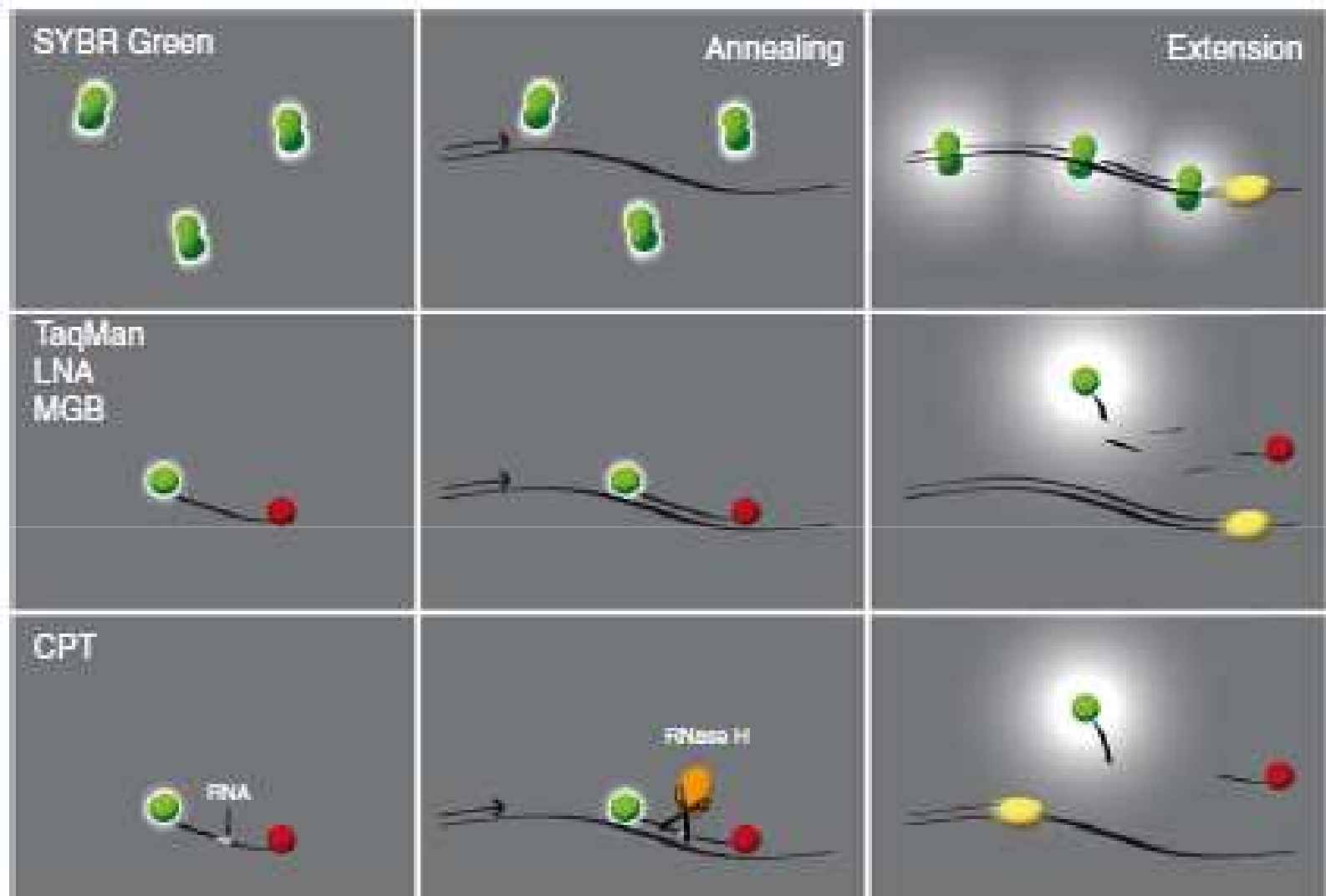


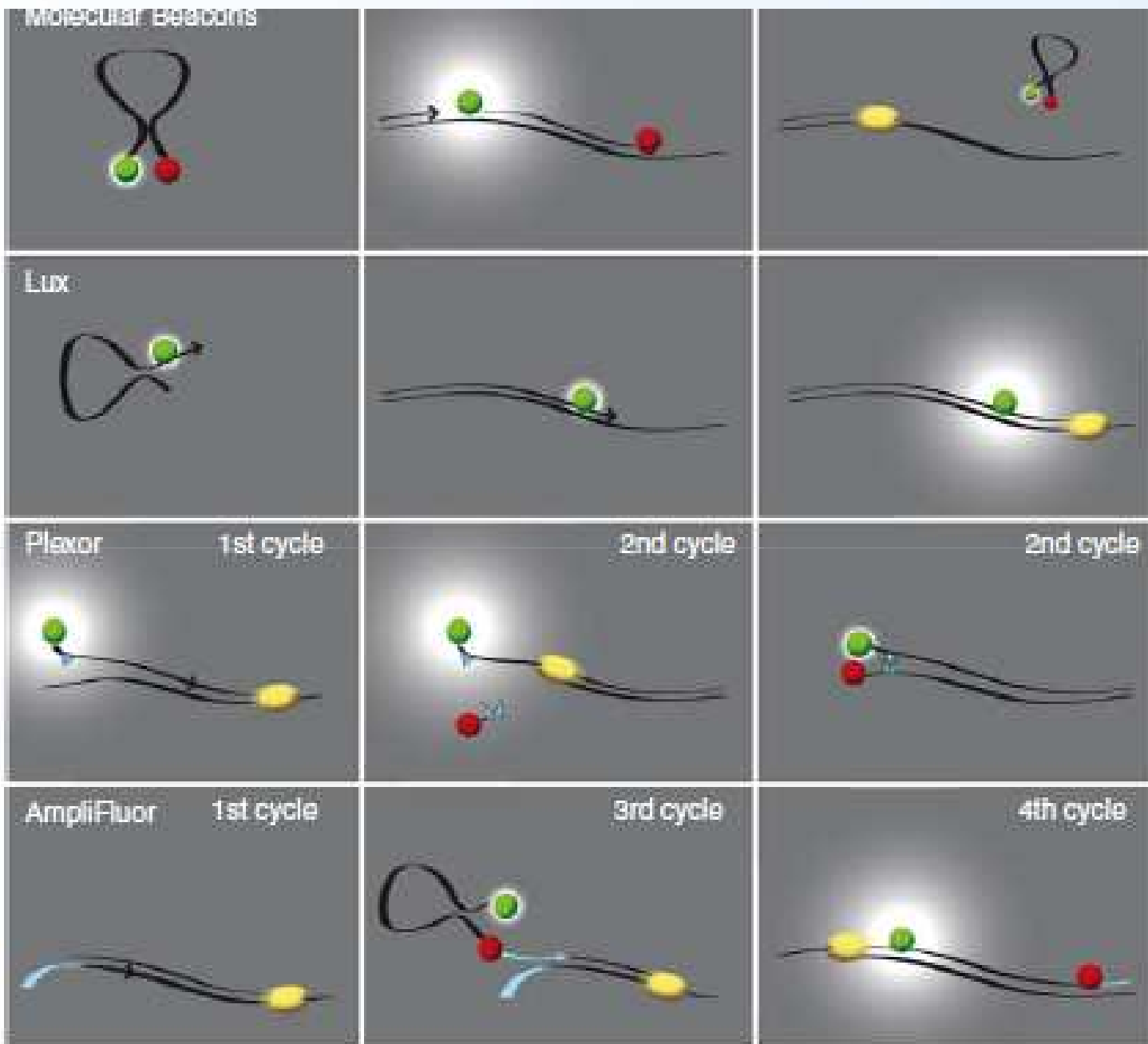
Molecular Beacon Probe



DeBiasi R L , and Tyler K L Clin. Microbiol. Rev. 2004;17:903-925

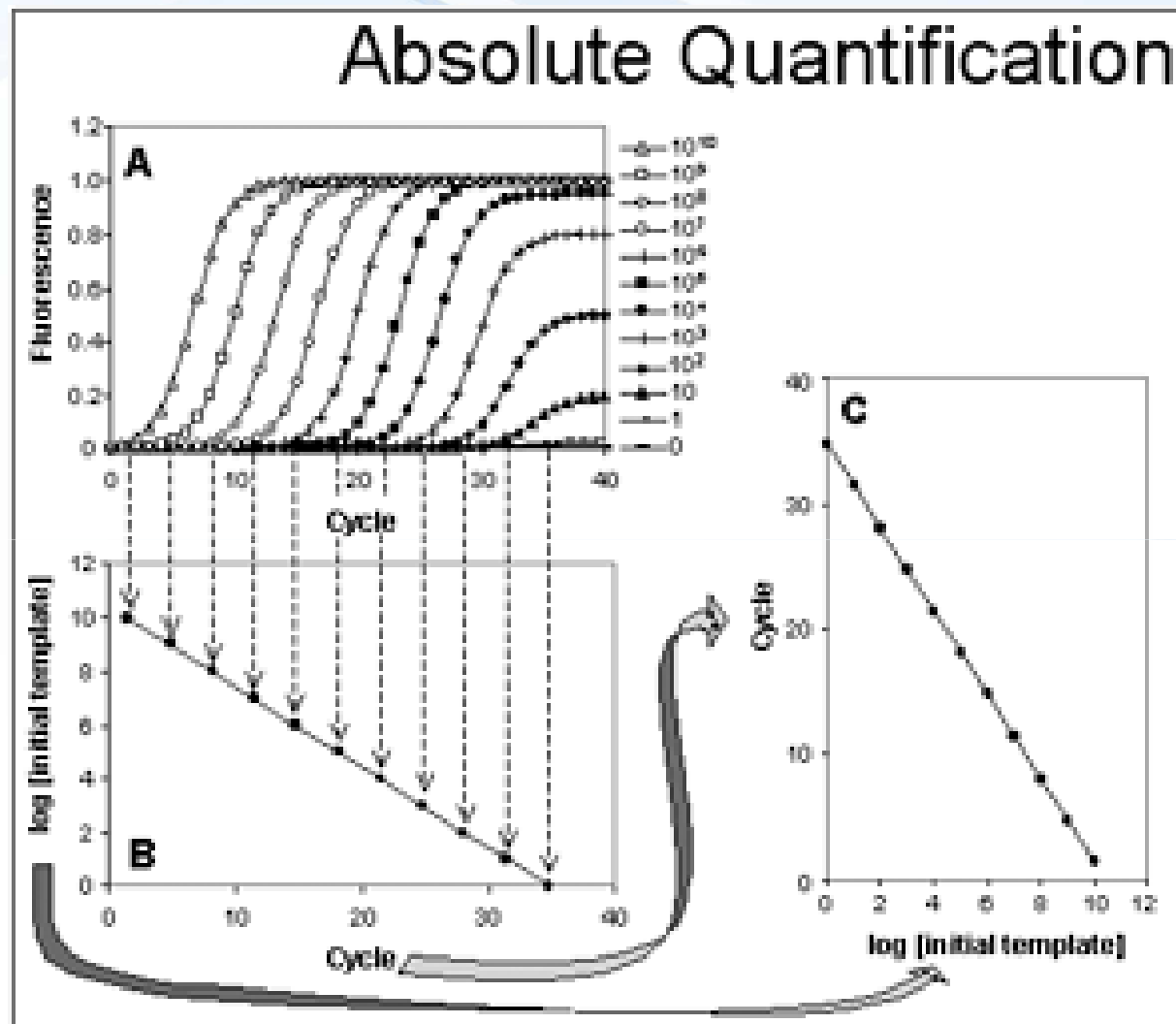
Clinical Microbiology Reviews





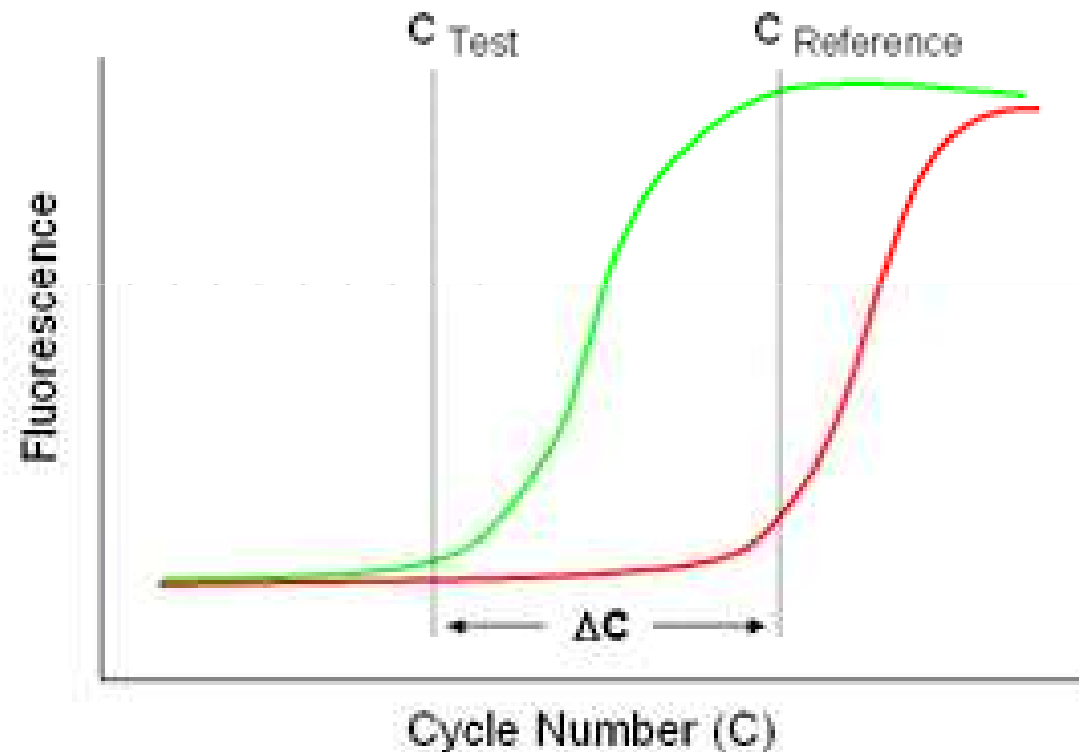
for toxic compounds
in the environment

qPCR: KVANTIFIKACE



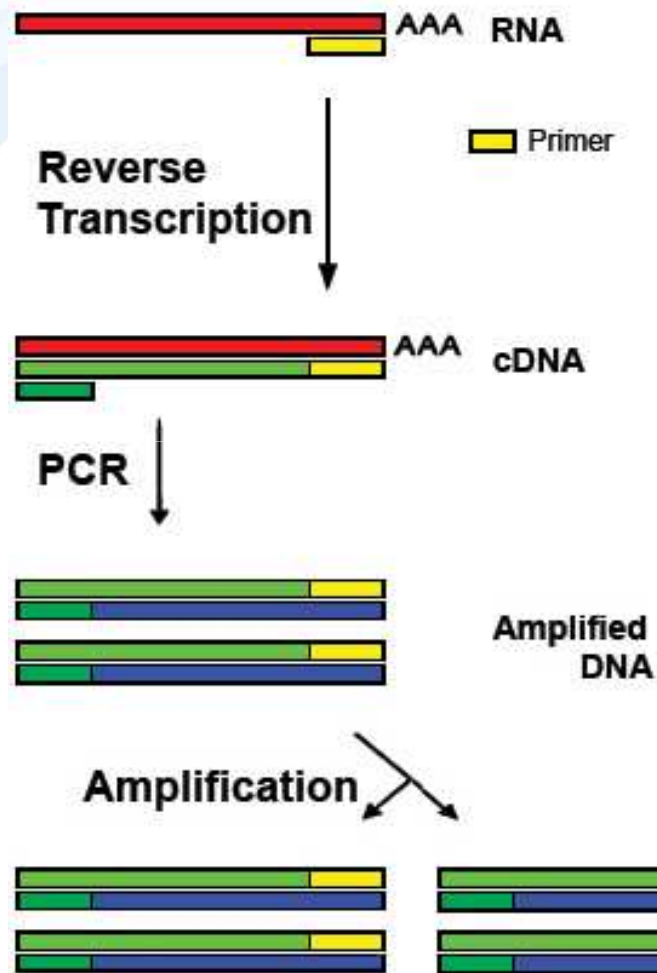
Relative Quantification

$$\text{Relative Copy Number} = \text{eff}^{\Delta C} \sim 2^{\Delta C}$$



RT-(q)PCR: PCR PRO RNA

□ “Reverse transcription polymerase chain reaction“



- RNA
(total, mRNA, miRNA)
- Reverzní transkriptáza
- Primery pro RT:
 - ✧ oligodT
 - ✧ specifický primer
 - ✧ náhodný primer

VIDEO ⇒

<https://www.youtube.com/watch?v=0MJlbrS4fbQ>

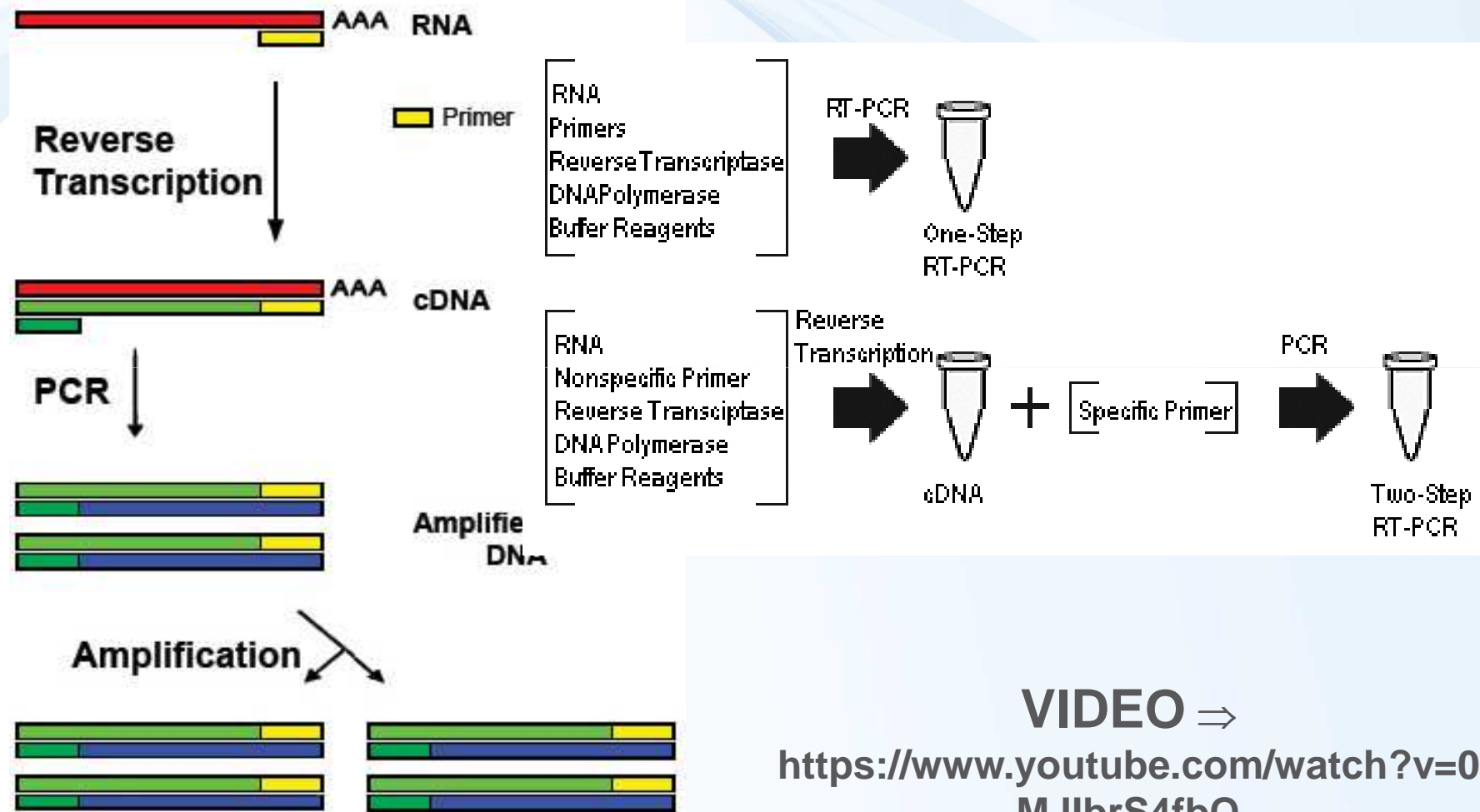
[tp://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction)



Research centre
for toxic compounds
in the environment

RT-(q)PCR: PCR PRO RNA

□ “Reverse transcription polymerase chain reaction”



VIDEO ⇒

<https://www.youtube.com/watch?v=0MJlbrS4fbQ>

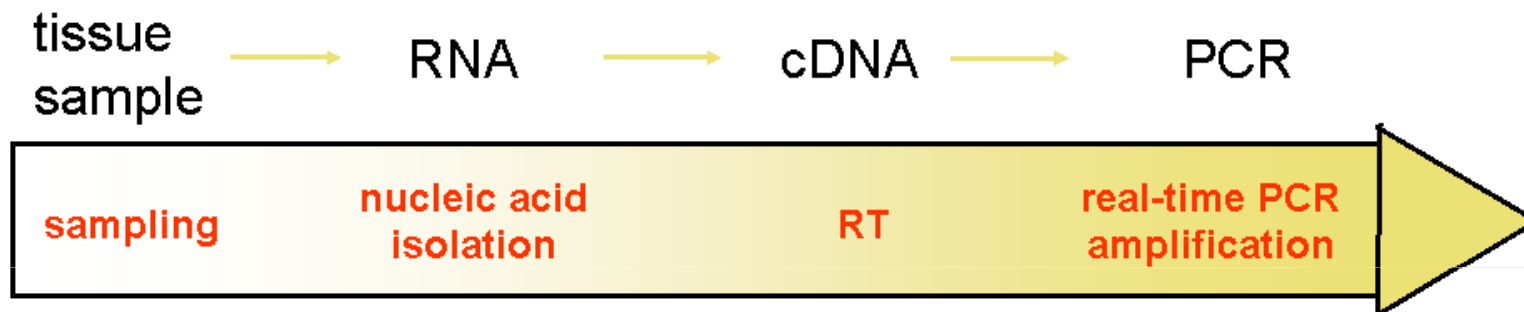
[tp://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction)



Research centre
for toxic compounds
in the environment

RT-(q)PCR: KRITÉRIA ÚSPĚŠNOSTI

Steps and variables of a successful mRNA quantification using real-time RT-PCR (1)



Sampling method:

- Biopsy
 - Fixed material
 - Fresh blood
 - Tissue storage
 - Liquid Nitrogen
 - RNA Later
 - 1st extraction buffer
 - RNA storage -80°C
- ⇒ **native RNA**

Extraction method:

- total RNA
 - mRNA
 - microRNA
- liquid-liquid
- columns
- Robot vs. hand made
- **RNA integrity:**
 - Bioanalyzer 2100
 - Experion
 - Nano-Drop
 - mFold algorithm

Efficiency of RT:

- RT enzyme type
- RT temperature
- **Primers:**
 - poly-T Primer
 - Random-hexamers
 - Specific primer
 - Primer mixtures
- **one-step qRT-PCR**
- **two-step RT-qPCR**

PCR Efficiency / Specificity:

- Primer design
 - Primer specificity
 - Consensus Primer
- mRNA abundance
- RNA / cDNA input
- Polymerase types
- Polymerase Mixtures
- PCR Inhibitors & Enhancers
- Robot vs. hand made

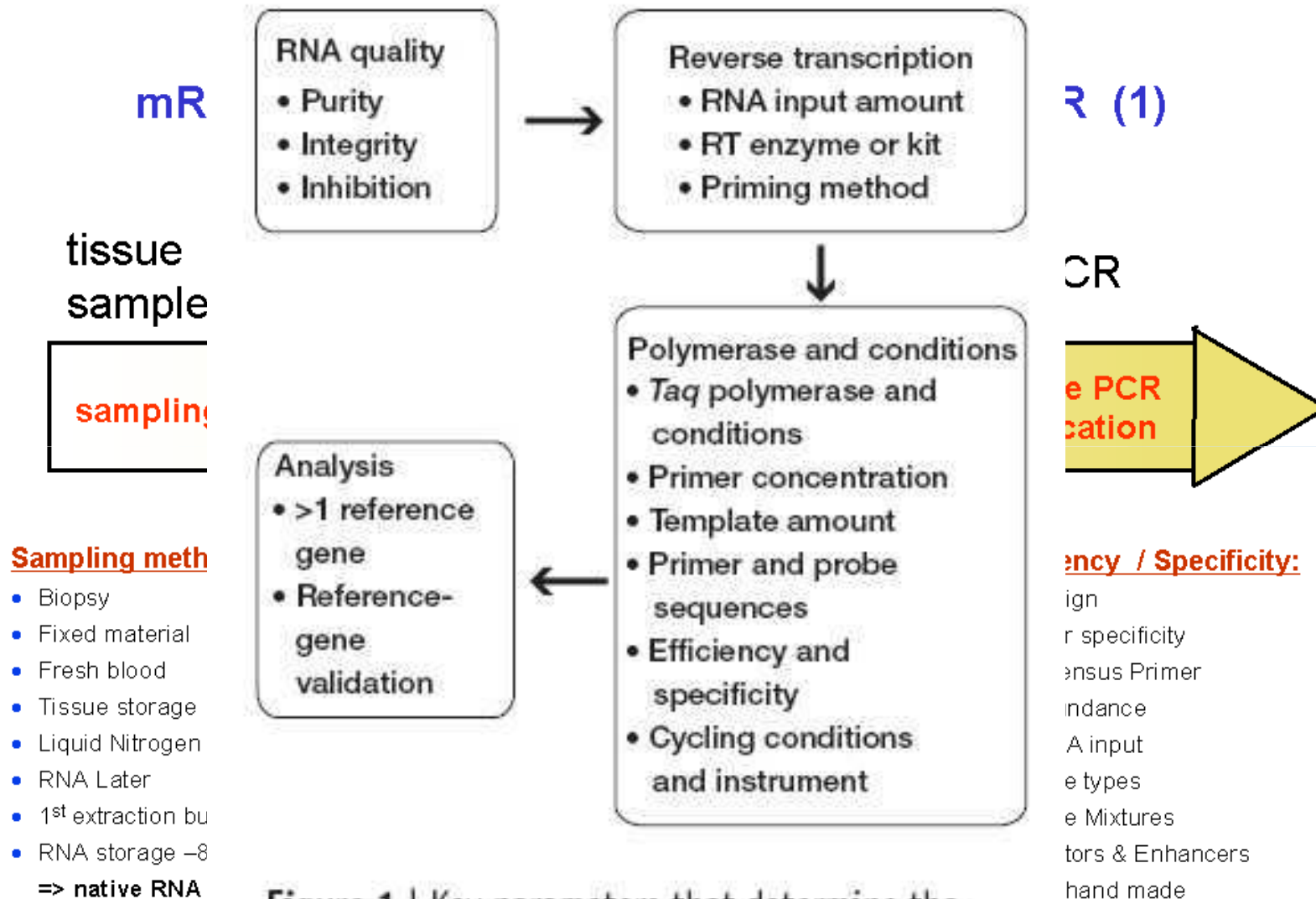
<http://www.gene-quantification.de/optimization2.html#overview>

© M.W. Pfaffl 2008



for toxic compounds
in the environment

RT-(q)PCR: KRITÉRIA ÚSPĚŠNOSTI



Sampling methods

- Biopsy
- Fixed material
- Fresh blood
- Tissue storage
- Liquid Nitrogen
- RNA Later
- 1st extraction bu
- RNA storage -8
- ⇒ native RNA

Figure 1 | Key parameters that determine the quality of qPCR data.

© M.W. Pfaffl 2008

(RT)-(q)PCR: KONTROLY

- ❑ **KONTROLA „no-RT“ ⇒ bez reverzní transkriptázy**
 - kontaminace genomovou DNA (využití primerů vázajících se na introny)
 - kontaminace DNA

- ❑ **PCR KONTROLA „NTC“ ⇒ bez DNA templátu (DNA, cDNA)**
 - kontaminace DNA
 - nespecifické produkty

- ❑ **POZITIVNÍ KONTROLY**

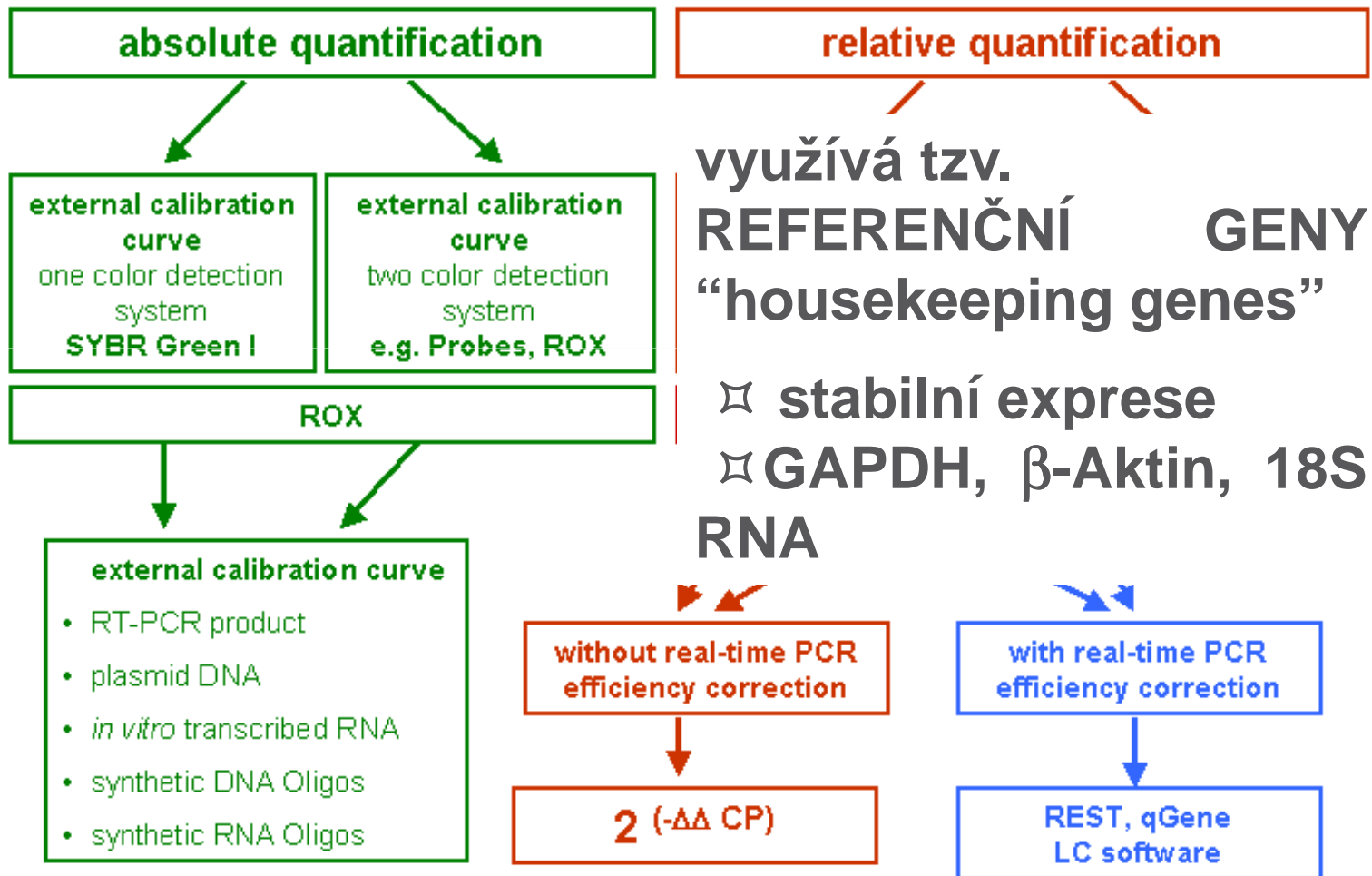
<http://bitesizebio.com/4074/the-pcr-controls-you-must-use/>



RT-(q)PCR: KVANTIFIKACE

Quantification Strategies in real time qRT-PCR

M. W. Pfaffl, *BioSpektrum* 2004 (Sonderausgabe PCR)



The MIQE Guidelines - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Clinical Chemistry 2009, 55(4): 611-622

<http://miqe.gene-quantification.info/>

http://www.rdml.org/MIQE_checklist.pdf

TECHNOLOGY FEATURE

Setting up for higher throughput	209
Physical limitations	209
Cycling	211
Data standards	212
Box 1: Melting shifts show genetic variation	208

qPCR: quicker and easier but don't be sloppy

Monya Baker

Gene profiling using quantitative PCR is becoming higher throughput, but researchers must be careful in gathering their data.



RT-(q)PCR: PUBLIKOVATELNOST DAT

The MIQE Guide Quantitative Real-time PCR

Clinical Chemistry 2009, 55(10)
<http://miqe.gene-quantification.com/>
http://www.rdml.org/MIQE_criteria/

P = pipette
C = cry
R = report

Publication of

qPCR: quick

Monya Baker

Gene profiling using
in gathering their

TOLOGY FEATURE

put	209
	209
	211
	212
netic variation	208

py

rs must be careful



Research centre
for toxic compounds
in the environment

(RT)-(q)PCR: Modifikace

□ „direct“ PCR

- PCR bez přečištěné DNA nebo RNA

PCR with mouse tail Conventional method vs. Direct PCR method

Lysis of mouse tail 6mm
(55~65°C overnight)

Lysis of mouse tail 1-2mm
(60°C 10 min)

Inactivation of PK
(95°C 10 min)

Obtaining of DNA pellet
using chemicals

PCR

(with purified DNA)

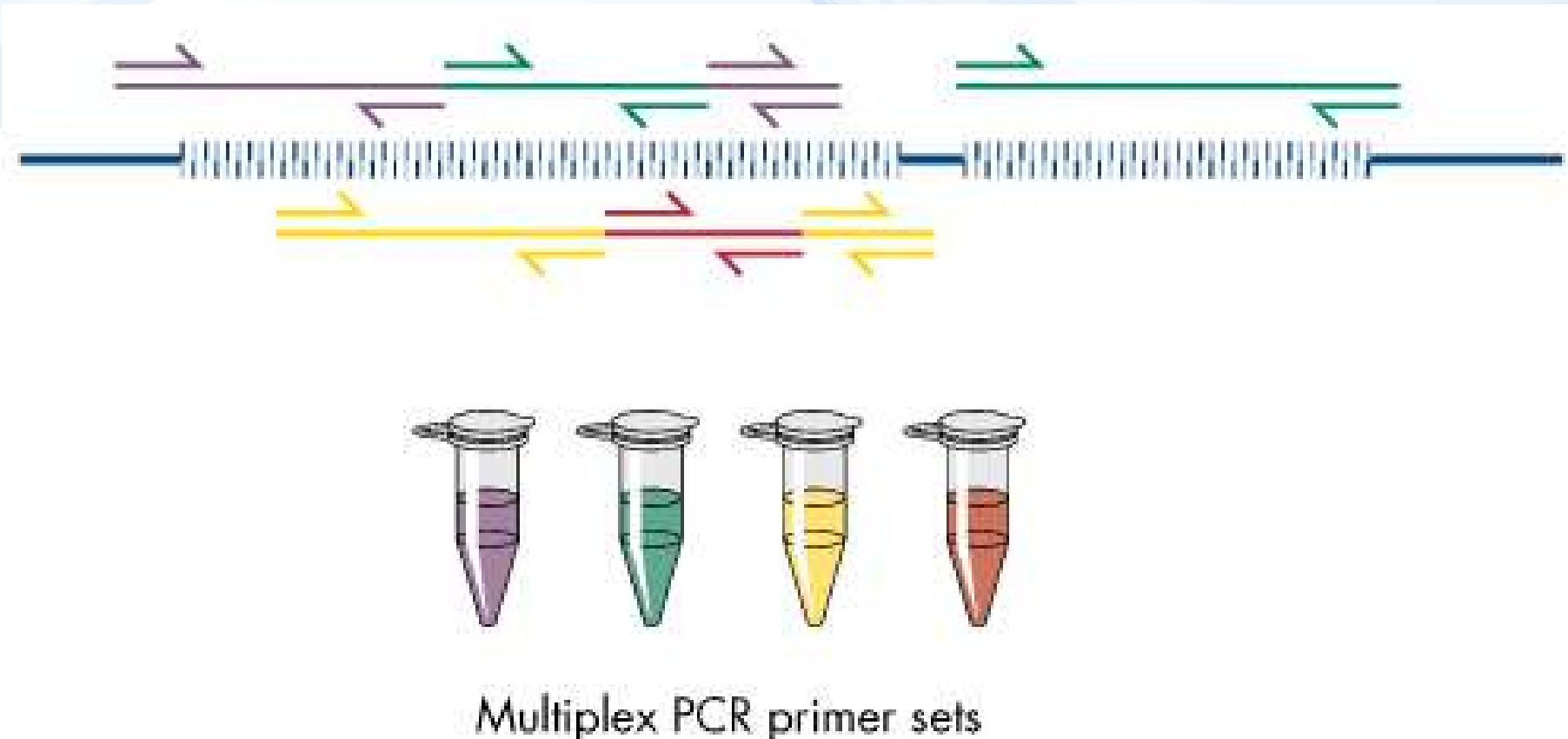
PCR

(with 1ul of supernatant of lysate)



□ multiplex PCR

- v jedné PCR směsi vícero primerových párů/prób



❑ PCR ARRAY

- více sad primerů ve 96j nebo 384j desce
- exprese až 88 genů (96j deska)
- stanovuje specifické produkty v jednotlivých jamkách desky
- referenční geny
- biologické dráhy \Rightarrow oprava DNA, buněčný cyklus, oxidativní stres, apoptóza, cytokiny & zánět, signální dráhy atd.

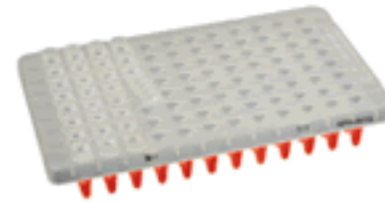
❑ PCR ARRAYS

- více sad pro
- exprese až
- stanovuje s
- referenční g
- biologické stres, apoptó

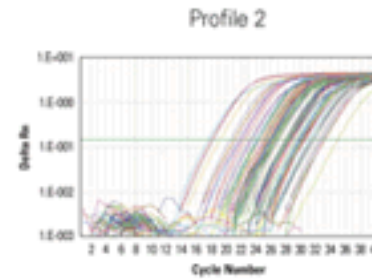
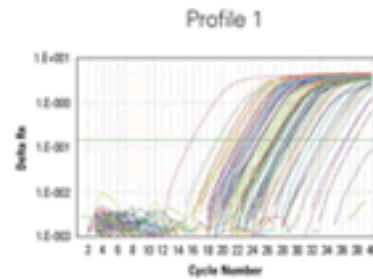
1. Convert Total RNA to cDNA.



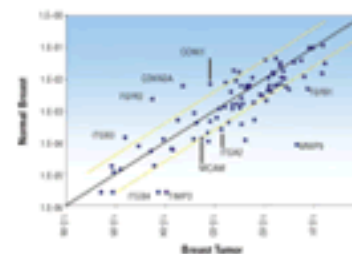
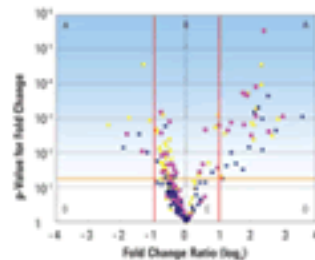
2. Add cDNA to RT² qPCR Master Mix & Aliquot Mixture Across PCR Array.



3. Run in Your Real-Time PCR Instrument.



4. Data Analysis.



kách desky

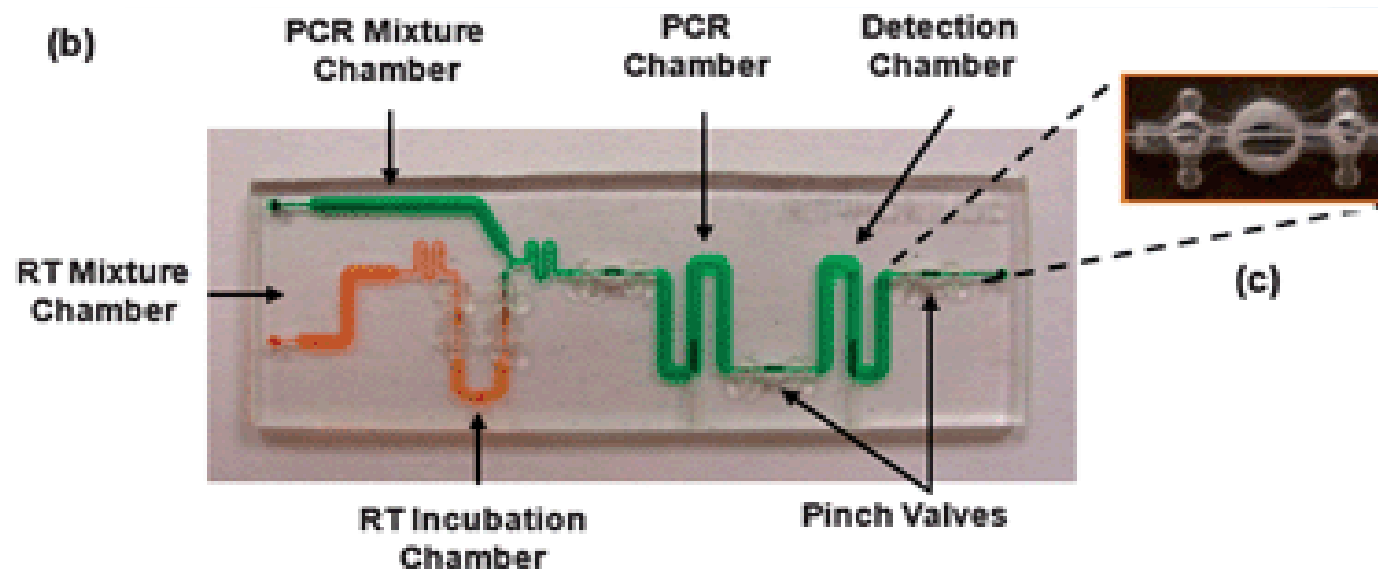
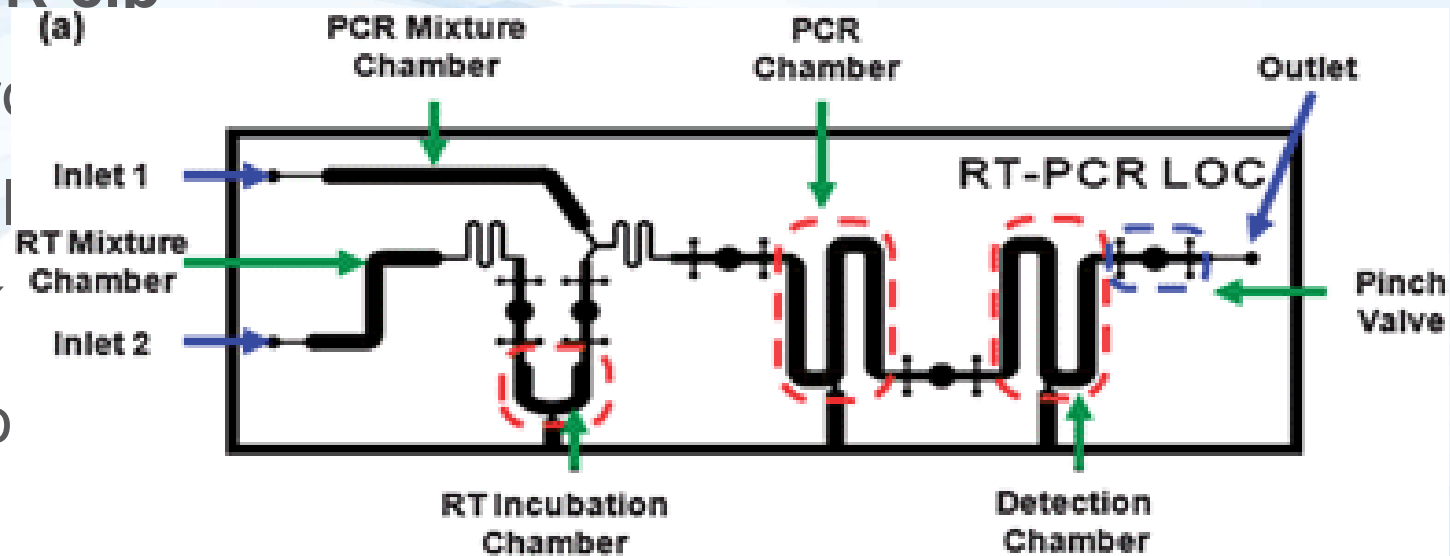
cyklus, oxidativní
šláklad.

□ PCR čip

- mikrofluidní čip
- rychlejší
- není nutná standardní křivka při absolutní kvantifikaci
- vysoká citlivost

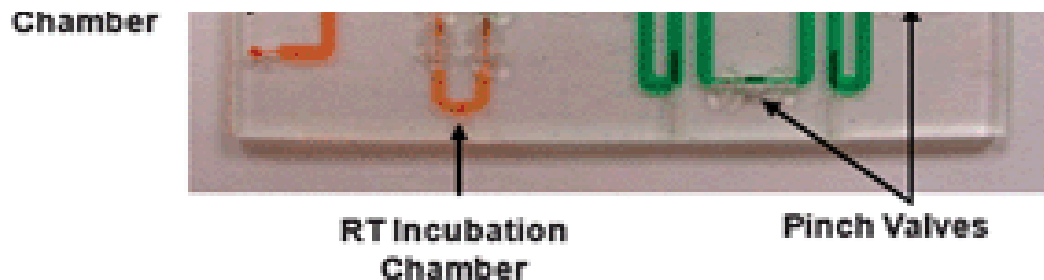
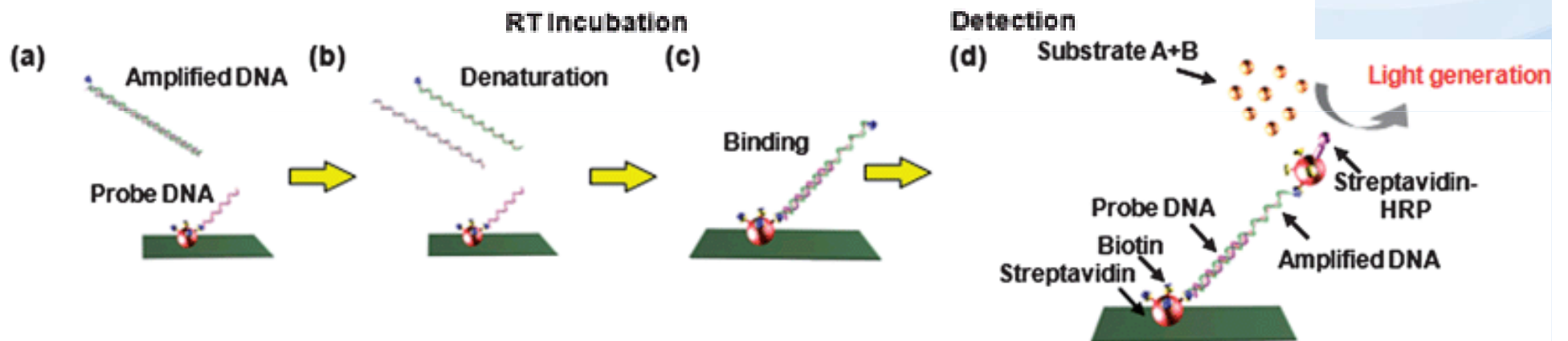
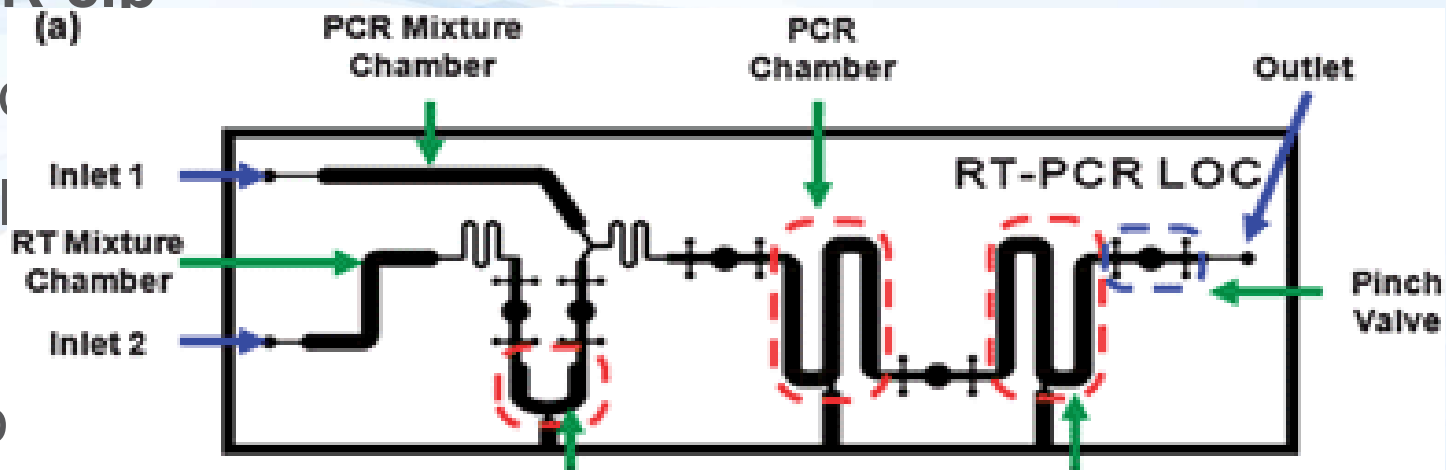
□ PCR čip

- mikro
- rychl
- není
- vyso



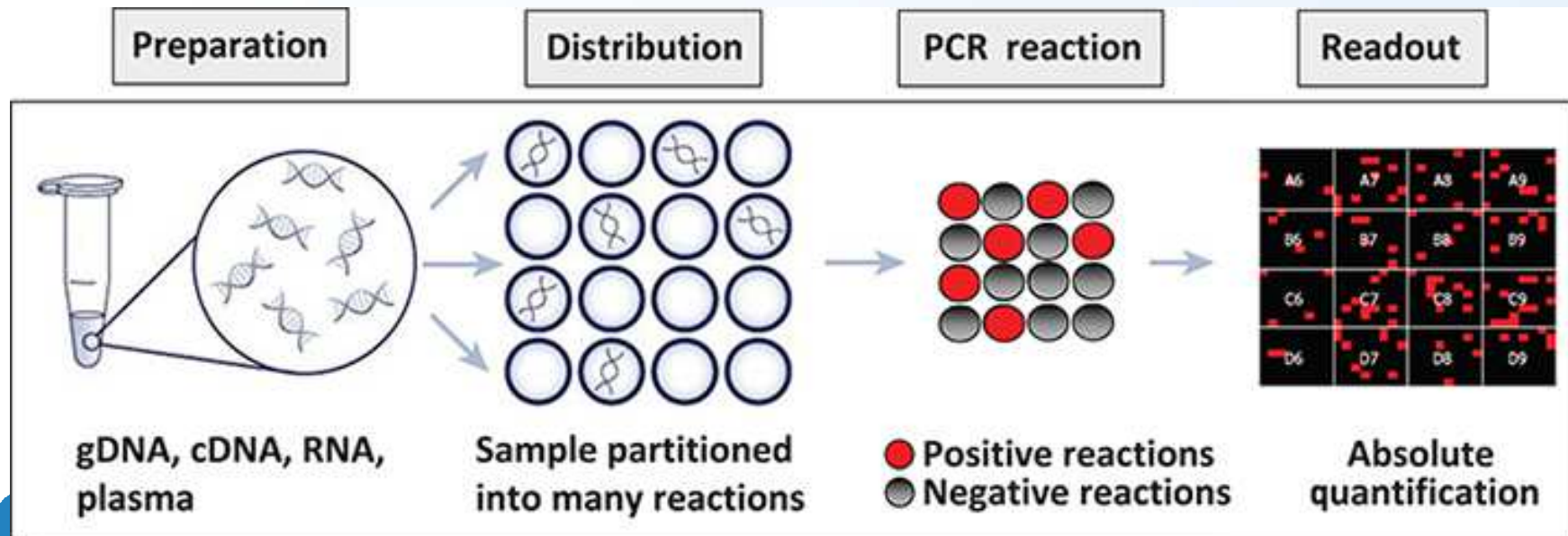
□ PCR čip

- mikro
- rychl
- není
- vyso

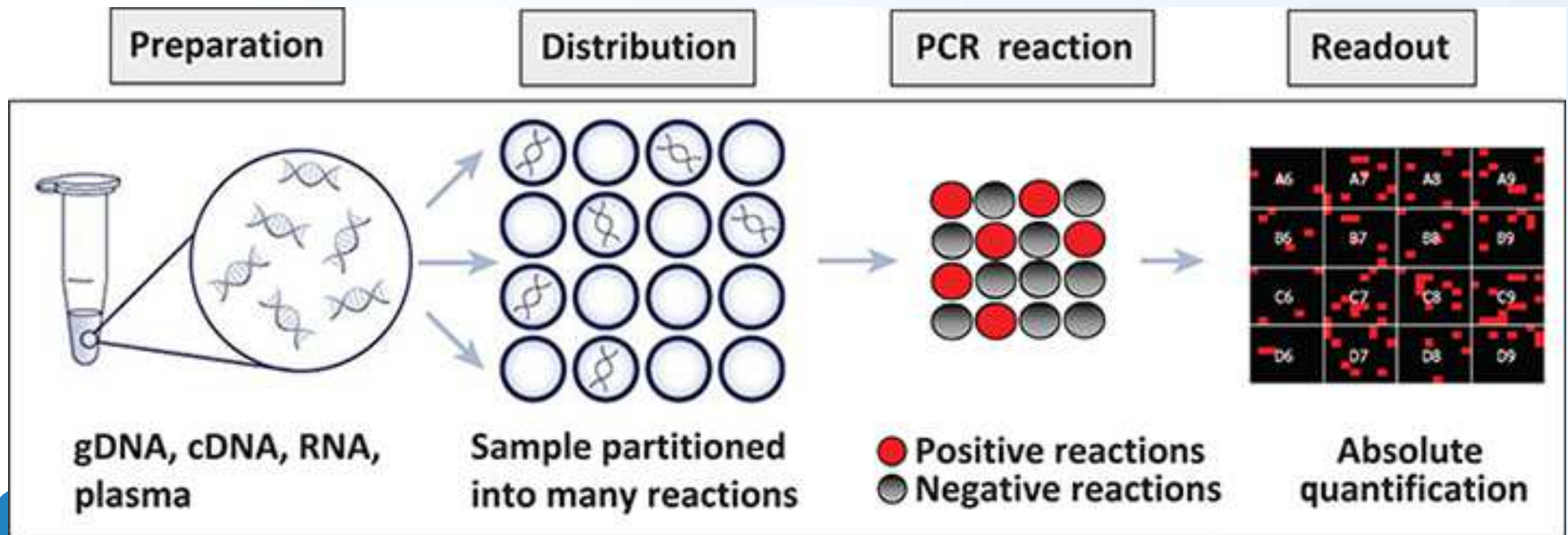
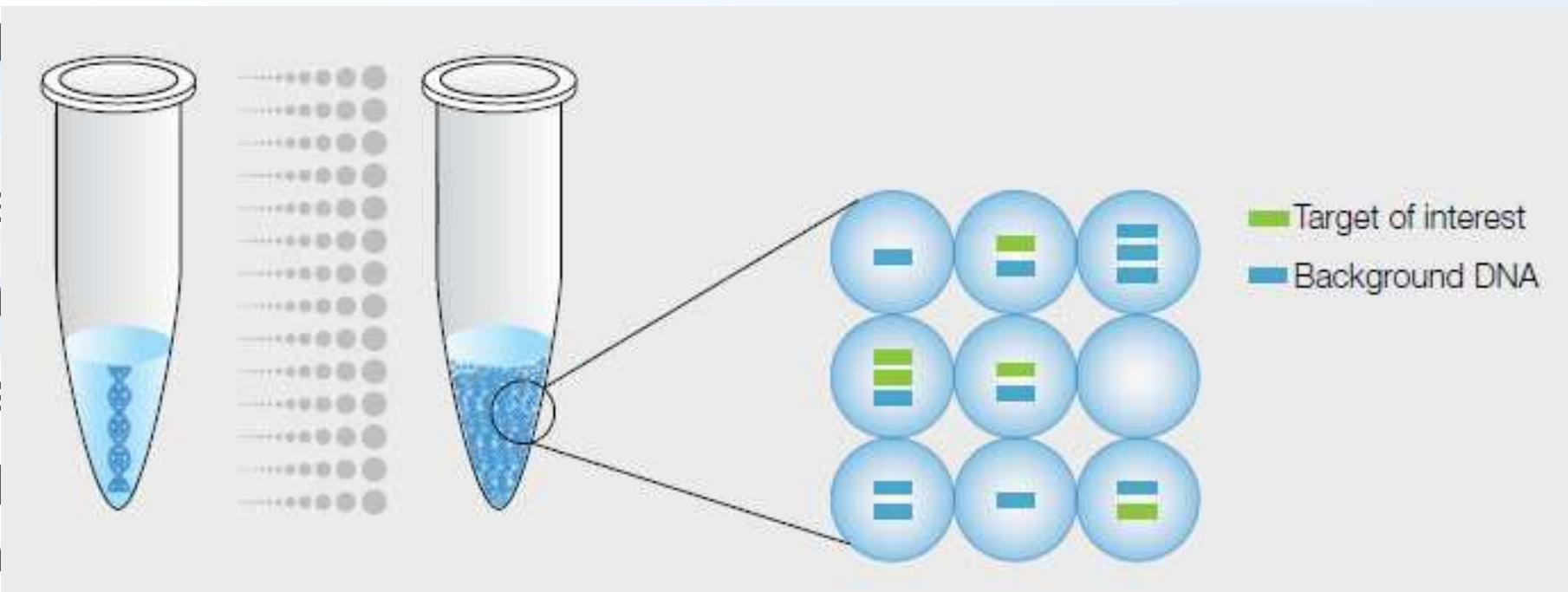


□ dPCR („digital PCR“) a ddPCR („droplet digital PCR“)

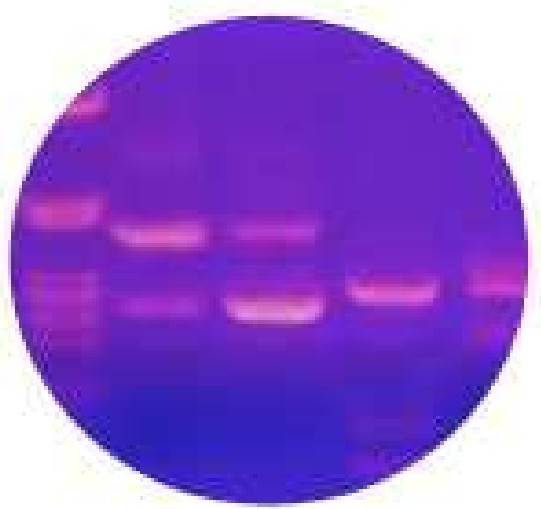
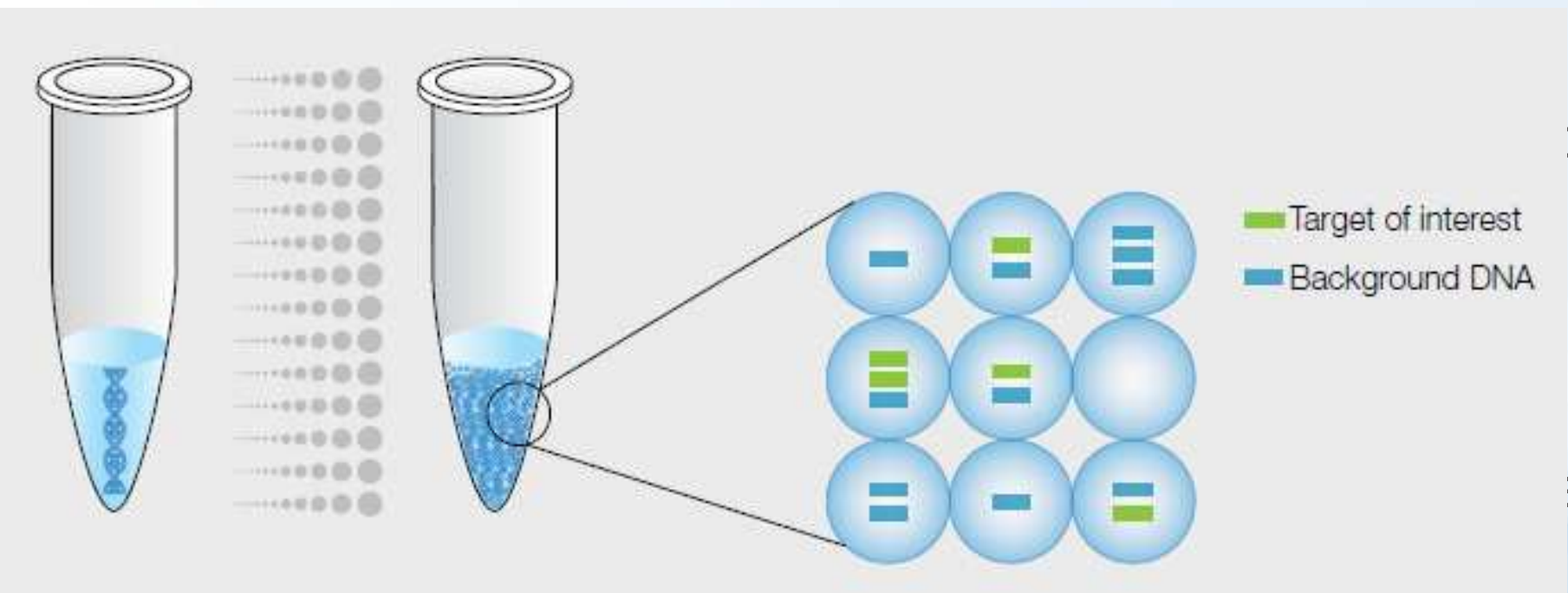
- alternativní metoda ke konvenční qPCR využívaná např. pro detekci vzácných alel a sekvencí a při analýze 1 buňky
- mnoho individuálních, paralelních PCR reakcí
- absolutní kvantifikace
- kombinace nanofluidního čipu, microarray či točící se mikrofluidní disk a TaqMan® prób



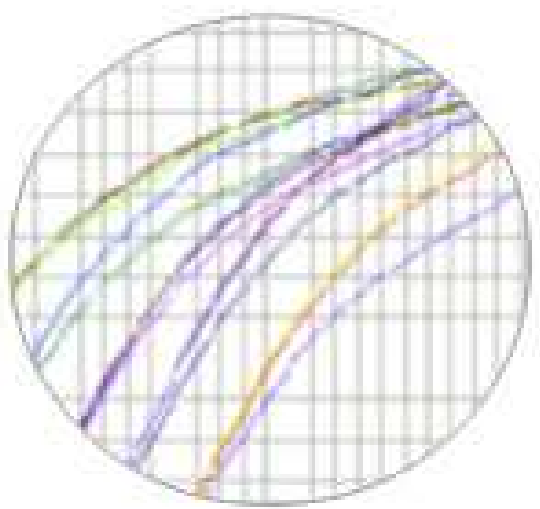
□
 •
 de
 •
 •
 •
 •
 m



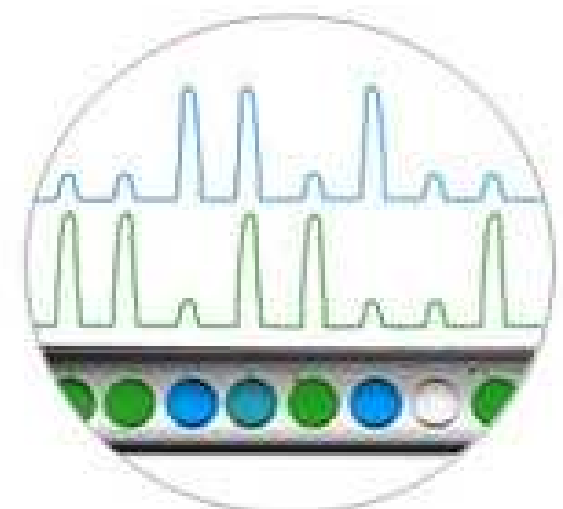
□
•
de
•
•
•
•
m



PCR
Qualitative



Real-Time PCR
Relative Quantitation



Droplet Digital PCR
Absolute Quantitation

Experimental needs	PCR method	Advantages	Limitations
determine if a target NA sequence is present or absent in a few samples	standard or conventional	<ul style="list-style-type: none"> •easy access to equipment •minimal cost 	<ul style="list-style-type: none"> •qualitative results only •post reaction handling
determine quantities of target NA in many samples	real-time	<ul style="list-style-type: none"> •can generate quantitative results •can be sequence specific 	<ul style="list-style-type: none"> •more expensive than conventional •PCR speed is mid-level
determine quantities of many target NA for a few samples	PCR arrays	<ul style="list-style-type: none"> •up to 88 genes can be measured per sample at a time 	<ul style="list-style-type: none"> •one array is needed per sample •costly for many samples
detect target NA in the field	microfluidic chip	<ul style="list-style-type: none"> •fast results •small size •portable 	<ul style="list-style-type: none"> •specialized equipment •costly
detect very low abundance NA targets or need extremely accurate quantitation	digital and drop digital	<ul style="list-style-type: none"> •very precise absolute quantitation 	<ul style="list-style-type: none"> •specialized equipment •costly



□ **AFLP** („Amplified fragment length polymorphism“) ⇒ Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů

Princip

- metoda založená na restrikci DNA dvěma enzymy
- selektivní namnožení jen některých proužků
- vizualizace proužků na gelu

Využití

- polymorfismus DNA
- genetická variabilita
- fylogenetické studie

(q)PCR: VYUŽITÍ

Total genomic DNA

□ A

délk

Princ

• met

• sele

• vizu

Využ

• poly

• gen

• fylo

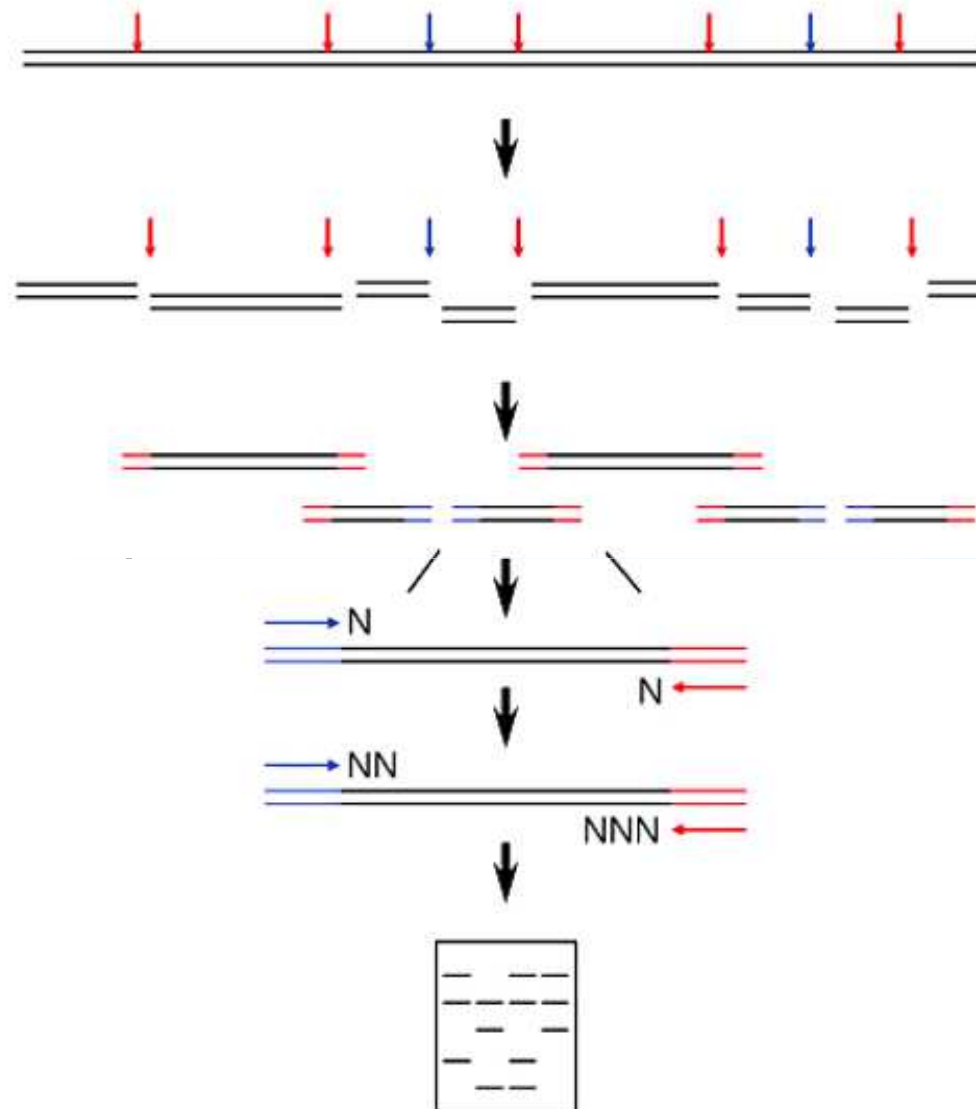
(1) Restriction digestion

(2) Adapter ligation

(3) Preamplification

(4) Selective amplification

(5) Gel electrophoresis



orfismus



Research centre
for toxic compounds
in the environment

<http://www.nature.com/scitable/content/outline-of-the-aflp-procedure-41047>

https://botany.natur.cuni.cz/dna/index.php?option=com_content&view=article&id=47:aflp-princip&catid=35:aflp&Itemid=55

□ RAPD („Random Amplified Polymorphic“ DNA)

- krátké nespecifické primery (8–12 nukleotidů)
- není potřeba znát sekvenci celé genomové DNA nebo studovaného úseku

• VYUŽITÍ

- ✧ fylogeneze
- ✧ DNA polymorfismus
- ✧ genetický otisk
- ✧ otisk mikrobiální komunity

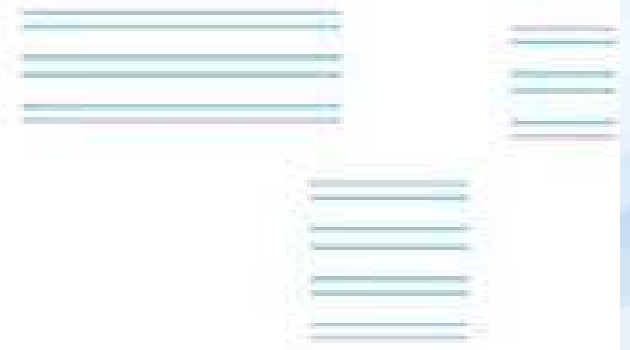
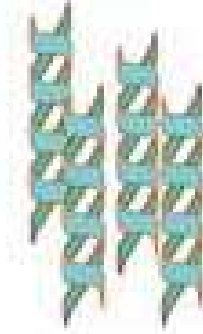
RAPD

-
-
-
- St
-



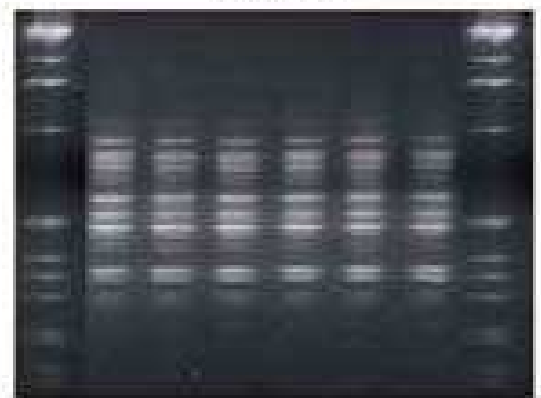
PCR

Polymerase Chain Reaction

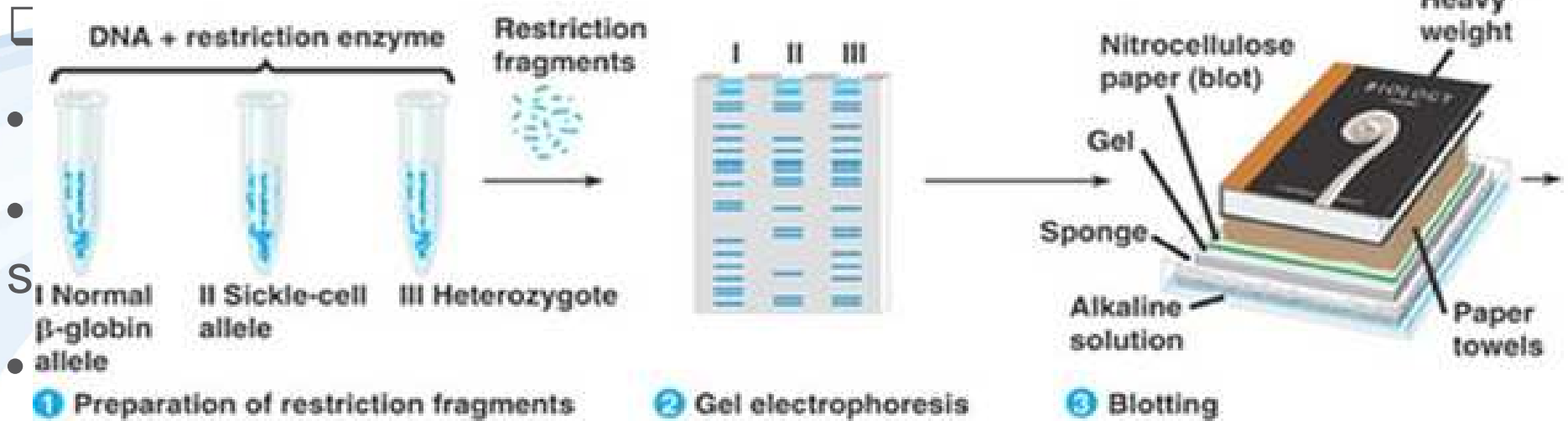


RAPD type

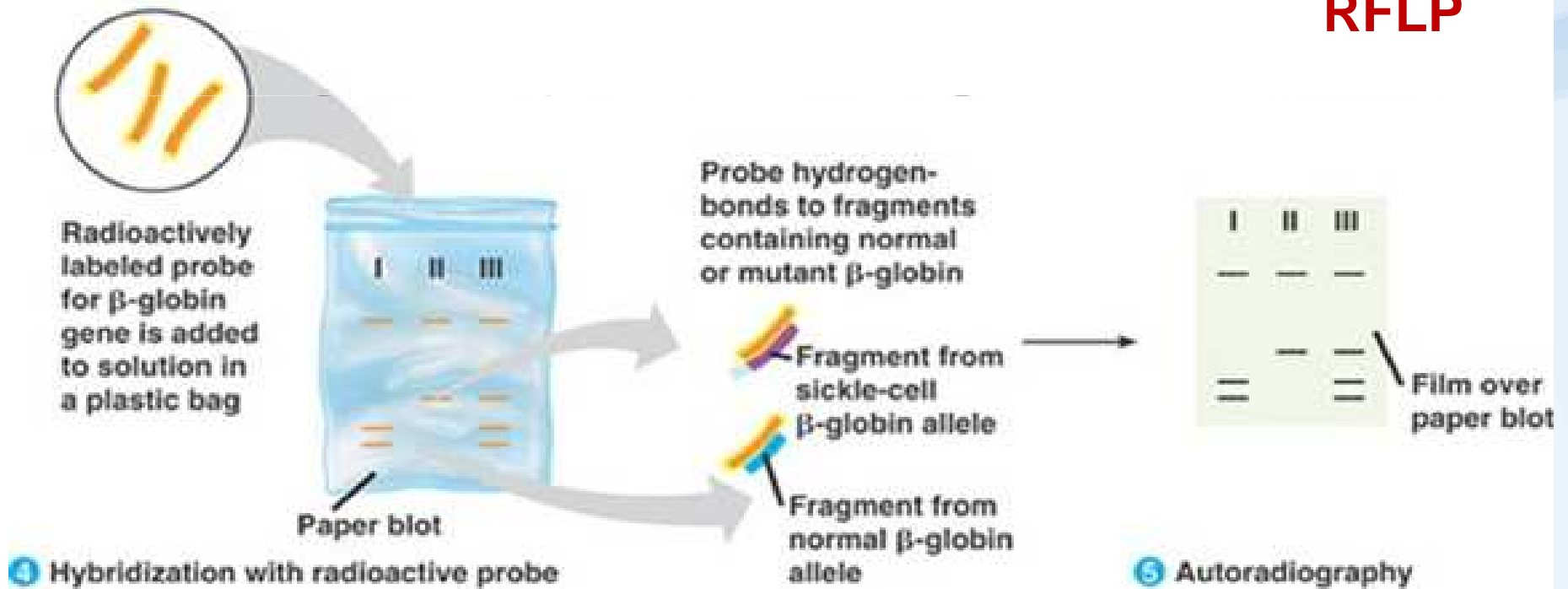
Purified genomic DNA



RAPD

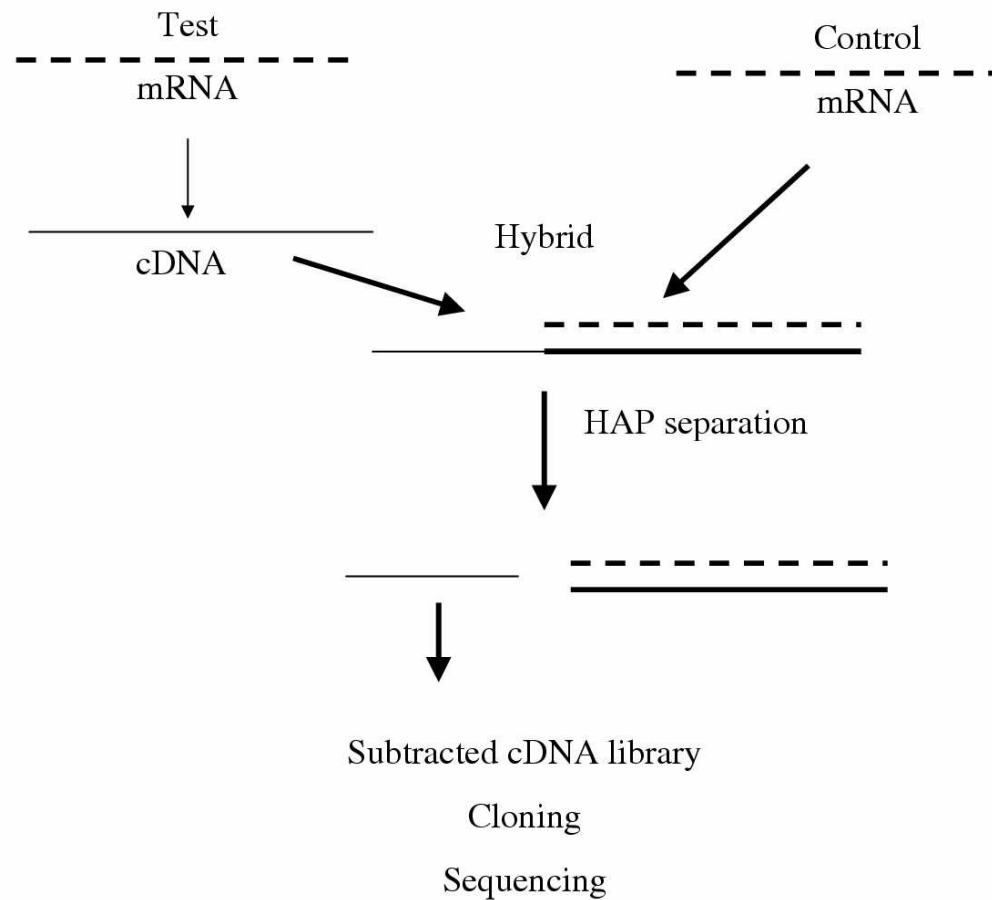


RFLP



□ SSH-PCR („Suppression subtractive hybridization“ PCR)

- dovoluje namnožit pouze cDNA fragmenty, které se liší mezi kontrolou („driver“) a experimentální skupinou („test“)



- **klonování DNA**
- **sekvenace DNA**
- **fylogenetické analýzy založené na DNA**
- **genetická diverzita**
- **genetický otisk**
- **detekce genu**
- **exprese genu a jejich funkce**
- **mutace**



(c) PCR: POLYMORFISMUS DNA

□ Typy sekvencí DNA

- jedinečné sekvence
⇒ geny (člověk – 80-100 000)

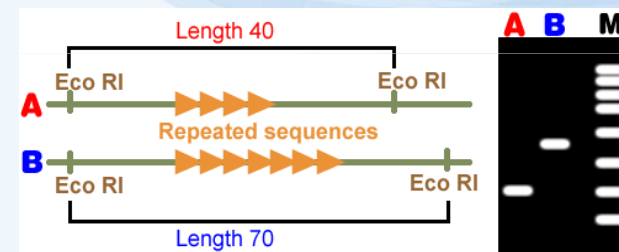
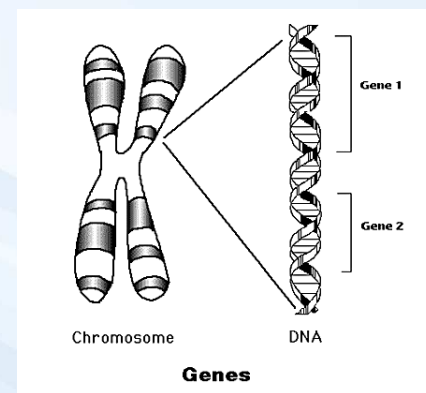
- repetitivní sekvence

⇒ *tandemové* - bloky opakujících se repetitivních sekvencí uspořádaných za sebou

- satelitní DNA
- minisatelitní DNA
- mikrosatelitní DNA

⇒ *rozptýlené*

- SINE – krátké rozptýlené repetice
- LINE – dlouhé rozptýlené repetice



VNTR – variabilní počet tandemových repetitivních sekvencí

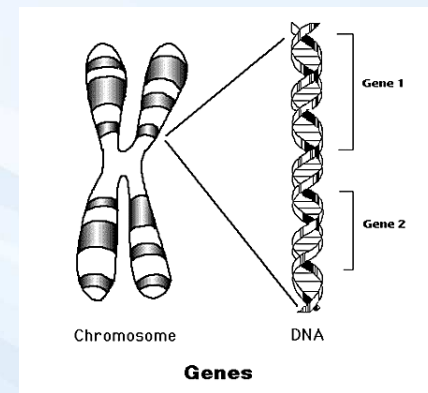
http://www.thenakedscientists.com/HTML/uploads/tx_naksciimages/dalya8_vntr_diagram.gif



(c) PCR: POLYMORFISMUS DNA

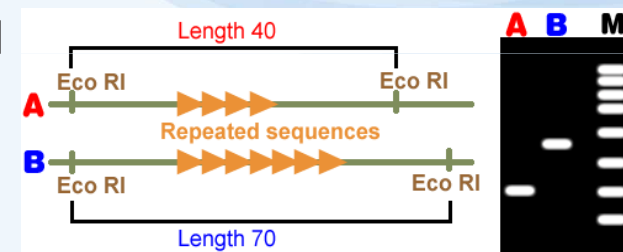
□ Typy sekvencí DNA

- jedinečné sekvence
⇒ geny (člověk – 80-100 000)
- repetitivní sekvence



⇒ *tandemové* - bloky opakujících se repetitivních sekvencí uspořádaných za sebou

- satelitní DNA
- minisatelitní DNA
- mikrosatelitní DNA



VNTR – variabilní počet tandemových repetitivních sekvencí

http://www.thenakedscientists.com/HTML/uploads/tx_naksciimages/dalya8_vntr_diagram.gif

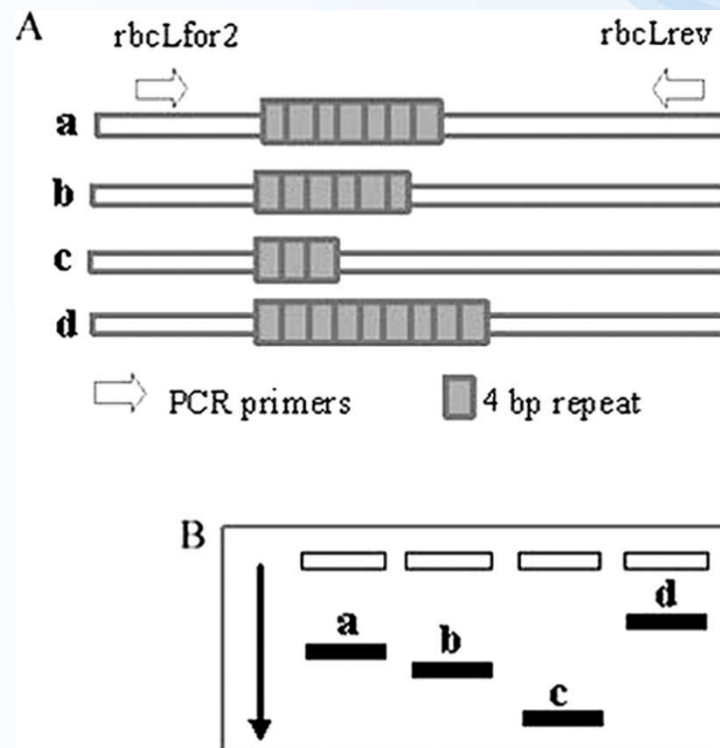
⇒ *rozptýlené*

- SINE – krátké rozptýlené repetice
- LINE – dlouhé rozptýlené repetice



□ Mikrosatelity

- krátké tandemové repetice STR („short tandem repeats“)
- repetice jednoduchých sekvencí SSR („simple sequence repeats“)
- kódující i nekódující oblasti
- hlavní zdroj vysoké proměnlivosti – sklouznutí nukleotidového řetězce během replikace („replication slippage“)
- alely se liší délkou



PCR: UŽITEČNÉ ODKAZY I.

Osobní stránky K. Mullise, obsahují popis objevu a principu PCR (vč. videa)

<http://www.karymullis.com/pcr.shtml>

Video o průběhu PCR

<http://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIwoZKU>

PCR song, povedená píseň firmy BioRad

<http://www.youtube.com/watch?v=x5yPkxCLads>

PCR song, text

http://biorad.cnpng.com/lsc/videos/ScientistsForBetterPCR/assets/BioRad_PCRsong_Lyrics.pdf



The PCR Song

There was a time when to amplify DNA,
You had to grow tons and tons of tiny cells.

Then along came a guy named Dr. Kary Mullis,
Said you can amplify in vitro just as well.

Just mix your template with a buffer and some primers,
Nucleotides and polymerases, too.

Denaturing, annealing, and extending.
Well it's amazing what heating and cooling and heating will do.

PCR, when you need to detect mutations.
PCR, when you need to recombine.
PCR, when you need to find out who the daddy is.
PCR, when you need to solve a crime.

(repeat chorus)



PCR: UŽITEČNÉ ODKAZY II.

Kvantifikace qPCR

<http://www.gene-quantification.de>

Fóra, diskusní skupiny

<http://www.researchgate.net/topics>

<http://www.bio.net/>

www.molecularstation.com

www.protocol-online.org

molecularbiology.forums.biotechniques.com

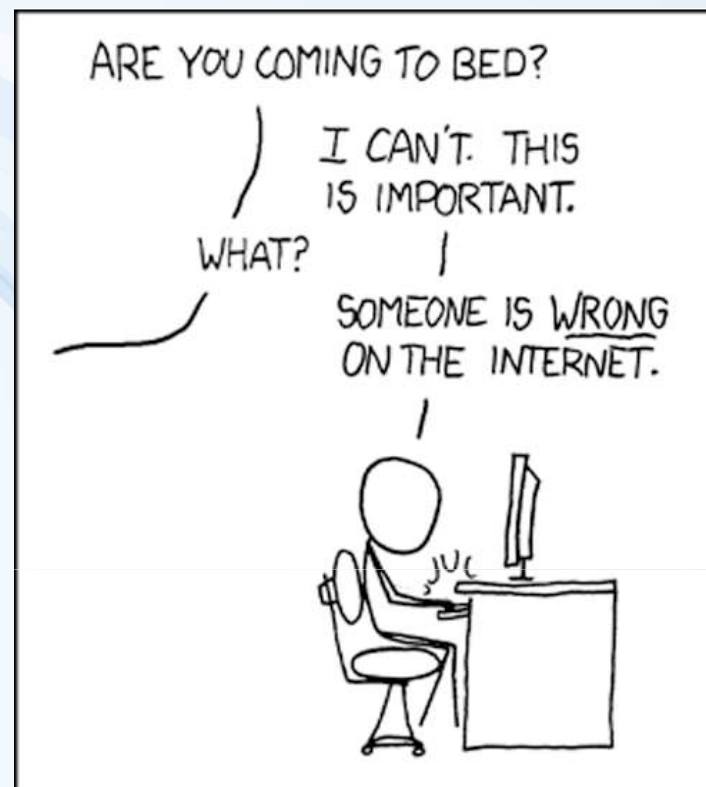
www.scienceforums.net

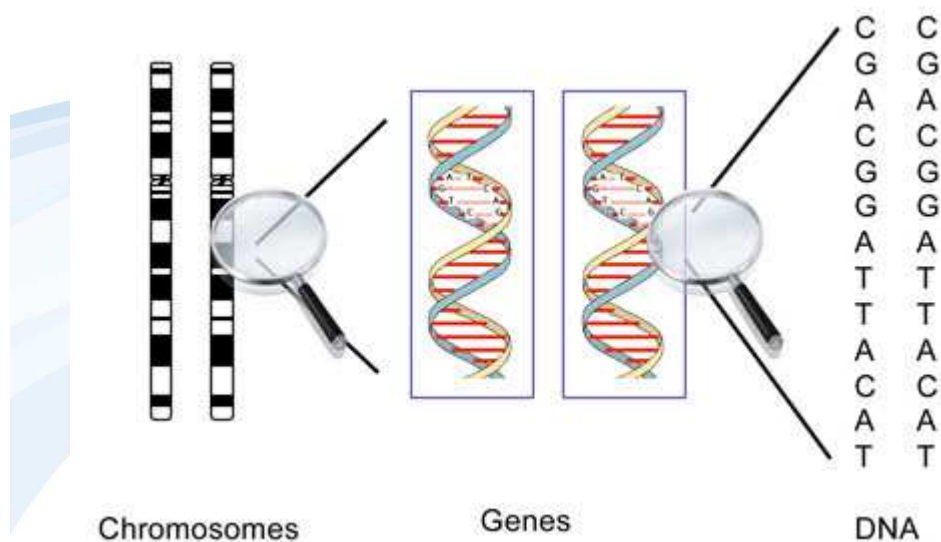
www.biotechnologyforums.com

www.biology-online.org



Research centre
for toxic compounds
in the environment





JAK ZJISTÍME SEKVENCII NK?

DNA CRIME LAB!

Who stole the necklace?

A T C C A G G C C T T T G G
T A G G T C C G G A A A C C

Be the one to solve the case!



Research centre
for toxic compounds
in the environment

NK: SEKVENOVÁNÍ – „klasika“

- 1) **Předstupeň: PCR s použitím dvojice primerů**
 - namnožení studovaného úseku DNA
- 2) **Sekvenační reakce**
 - použití pouze jednoho primeru
 - produkce fragmentů lišících se přesně o 1 bázi
- 3) **Elektroforetická separace fragmentů na gelu**



SEKVENOVÁNÍ: SANGEROVA METODA

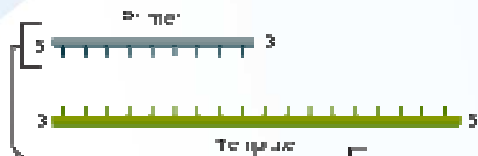
Sangerova metoda terminace řetězce

- založena na terminaci replikace nového řetězce podle matrice zkoumané sekvence dideoxynukleozidtrifosfátem (ddNTP)
- na 3'-uhlíku deoxyribózy chybí OH - skupina a proto k nim DNA polymeráza nemůže navázat další nukleotid
- pokud během replikace dojde k náhodné inkorporaci dideoxynukleotidu (ddA, ddC, ddG, ddT), replikace se zde zastaví

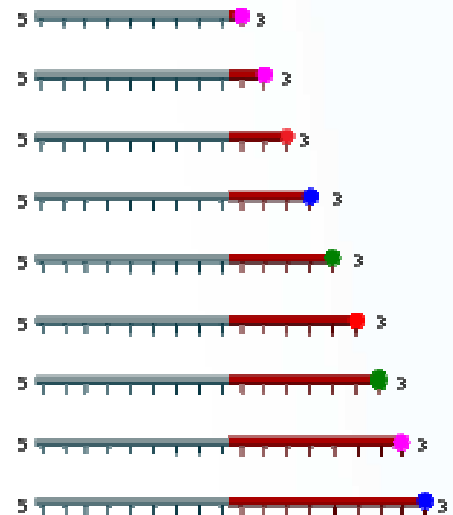


<https://www.youtube.com/watch?v=oYpI1bl0qF8>
<http://biologie.upol.cz/metody/Sekvenovani%20DNA.htm>

- 1 Reaction mixture
 - Primer and DNA template
 - DNA polymerase
 - ddNTPs with flourcchromes
 - dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



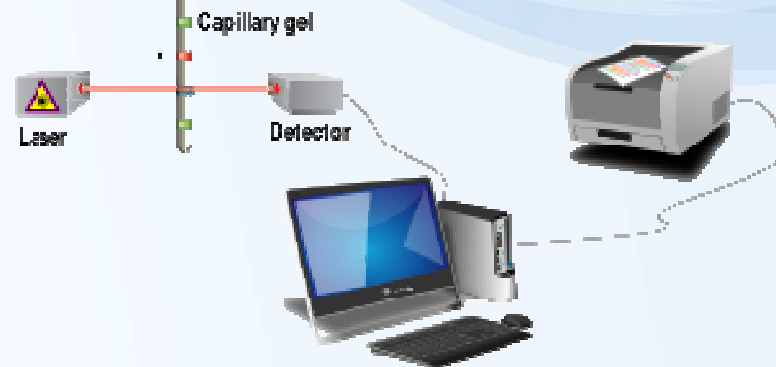
2 Primer elongation and chain termination



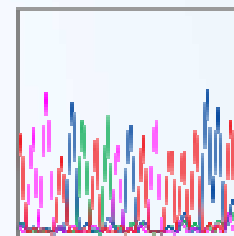
- ddNTPs
- ddT^{3'} = ●
- ddC^{3'} = ●
- ddA^{3'} = ●
- ddG^{3'} = ●



3 Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



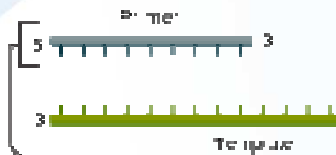
4 Laser detection of flourcchromes and computational sequence analysis



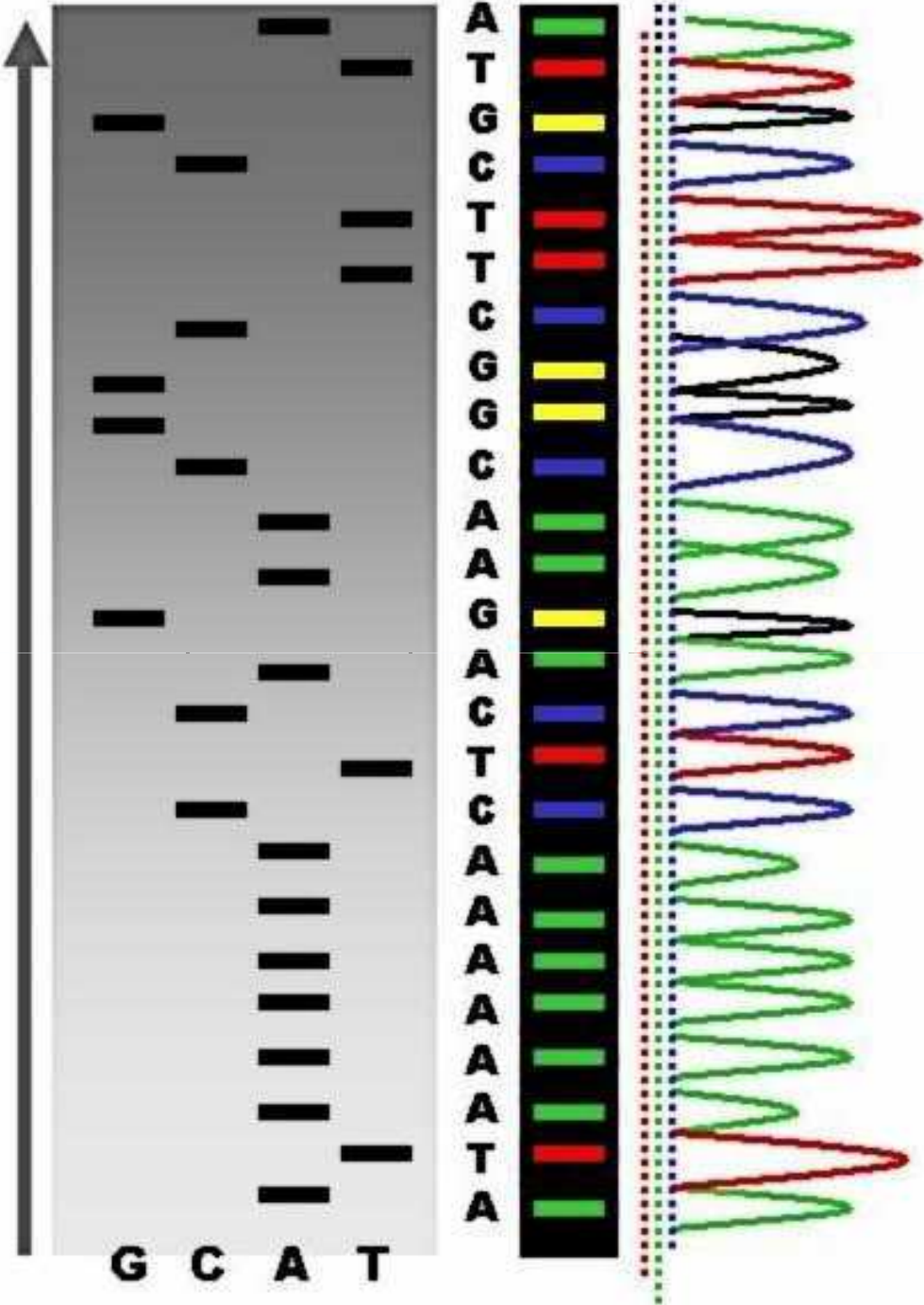
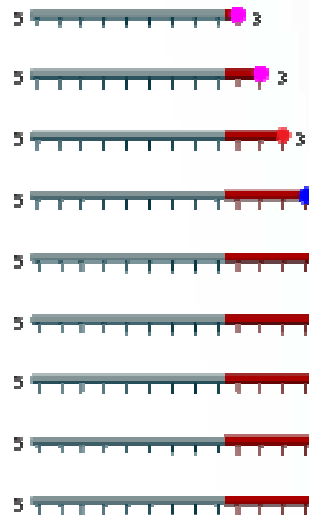
Chromatograph

<https://www.yourbiology.com>
<http://biologie.u>

- 1 Reaction mixture
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ ddNTPs with fluorochrome



2 Primer elongation and chain termination



Electrophoresis fragments



Detection of fluorochromes for positional sequence analysis

SEKVENOVANÍ DATABÁZE DNA

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

The screenshot shows the NCBI homepage with a search bar at the top containing "All Databases". A left sidebar lists various categories like "NCBI Home", "Site Map (A-Z)", "All Resources", "Chemicals & Bioassays", "Data & Software", "DNA & RNA", "Domains & Structures", "Genes & Expression", "Genetics & Medicine", "Genomes & Maps", "Homology", "Literature", "Proteins", "Sequence Analysis", "Taxonomy", "Training & Tutorials", and "Visualize". The main content area includes a "Welcome to NCBI" message, "Get Started" links, "Education Resources", "Popular Resources" (with BLAST and Nucleotide highlighted), "NCBI News", and a footer with navigation links.

Mám sekvenci a neznám organismus, gen

hledám sekvenci organismu, genu



NK: Kde najít či porovnat sekvenci?

Entrez:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Original8Hour/Entrez/>

- prohledává všechny databáze asociované s NCBI („National Center for Biotechnology Information“) – např. databáze „**Nucleotide**“, „**Gene**“, „**Genome**“

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

- název místa, délka sekvence, typ molekuly (DNA/RNA), nukleotidová sekvence

EMBL: <http://www.embl.de/>

- databáze Evropského bioinformačního institutu

<http://molbiol-tools.ca/>

- sekvence a jejich analýza

SEKVENOVÁNÍ SANGEROVA METODA - limitace

Sangerova metoda – limitace:

- nutná PCR amplifikace či klonování jednotlivých DNA fragmentů
- sekvenace jednotlivých DNA fragmentů (v 1 sekvenačním běhu \Rightarrow max. 96 vzorků - 96 kapilárové sekvenátory)
- délka získané sekvence cca 650 bp
- max. sekvenační výtěžek jednoho sekvenačního běhu cca 60 kb

SEKVENOVÁNÍ SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE

„Next generation sequencing“:

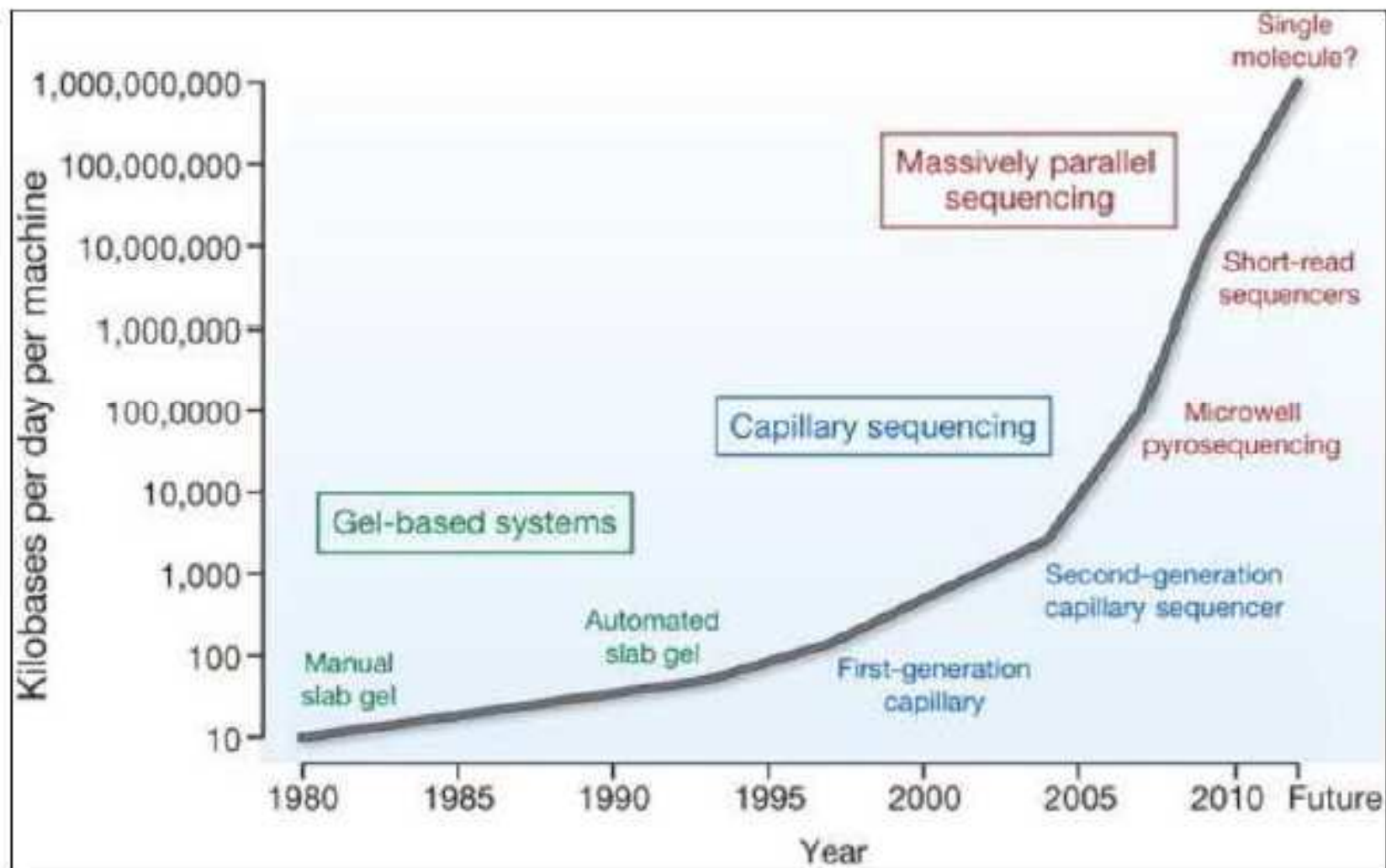
Paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně:

1. templátová DNA fragmentovaná na úseky několika set bází dlouhé
 2. konce získaných fragmentů jsou enzymatickou reakcí zatupeny a napojeny k oligonukleotidům určité sekvence (tzv. adaptéry)
 3. jednotlivé fragmenty jsou odděleně amplifikovány PCR reakcí (u některých technologiích tento krok chybí) a pak v jednom kroku paralelně sekvenovány. Při tomto paralelním sekvenování se sekvenují milióny sekvencí najednou.
- Délka získaných sekvencí je cca 20-700 bp. Sekvenační výtěžek jednoho běhu sekvenátoru může být až několik tisíc Gb, přičemž cena sekvenování za 1 b je až o dva řády nižší než by byla u kapilárního sekvenování Sangerovou metodou.

SEKVENOVÁNÍ SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE - Využití

- celogenomové sekvenování, tzn. de novo sekvenování neznámých genomů
- sekvenování jednotlivých chromosomů, plazmidů či mitochondrií
- studium genetické variability, mutační analýzu, kvantifikaci jednotlivých alel
- transkriptomovou analýzu („RNA-sequencing“) – analýza exprese kódující i nekódující RNA v genomu
- studium DNA-proteinových interakcí („ChIP-sequencing“)
- metagenomika (analýza biologické diverzity) – např. pro genotypizaci bakterií

Vývoj sekvenačních metod za posledních 30 let



Stratton et al. 2009 Nature 458:719-724

SEKVENOVÁNÍ SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE - Platformy

	Platforma		
	454 (Roche)	Solexa (Illumina)	SOLiD (ABI)
Sekvenační princip	Pyrosekvenování	Polymerase-based sequencing by synthesis	Sekvenování založené na ligaci
Způsob amplifikace	PCR v emulzi	„Můstková“ amplifikace	PCR v emulzi
Pár. konce/vzdálenost Mb/běh	(Ano)/3 kb 500 Mb	Ano/200 bp 1300 Mb (2 600 Mb)	Ano/600 bp -10 kb 30 Gb (120 Gb)
Čas/běh (pár. konce)	7,5 hod (10 hod)	4 dny	5 dnů
Délka čtené sekvence	400 bp (1000 bp)	35 bp (70 bp)	50 bp (100 bp)
Náklady na 1 Mb	84,39 \$ (250 bp)	5,97 \$ (35 bp)	5,81 \$ (35 bp)

Sangerovo sekvenování (ABI) – 1700 \$ /1Mb

— perspektiva

Upraveno podle Mardis E. (Cell, 2008)

SEKVENOVÁNÍ: PCR v emulzi (emPCR)

http://inovace-mbb.upol.cz/files/vyukovy-portal/portal-old/genomika_-_simkova/sekvenovani-web.pdf

PCR v emulzi (emPCR)

- fyzické oddělení jednotlivých fragmentů NK

Čtení sekvence

- sekvenování syntézou („sequencing by synthesis“)
- sekvenování založeném na ligaci („ligation based sequencing“)



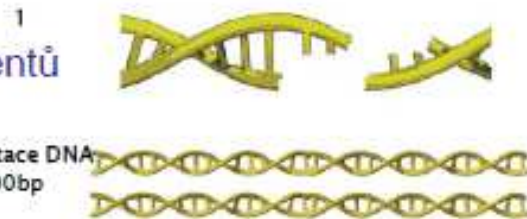
SEKVENOVÁNÍ PCR v emulzi (emPCR)

454 sekvenování

úseky 300 bp

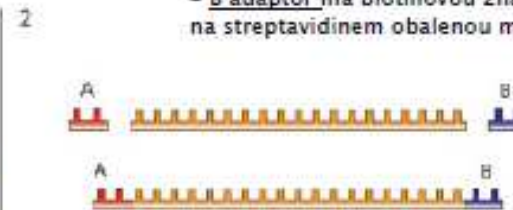
- čteno 400 tisíc fragmentů najednou

Fragmentace DNA
- 300-800bp



Ligace adaptorů

- **B adaptor** má biotinovou značku pro přichycení na streptavidinem obalenou magnetickou kuličku



Emulzní PCR

- DNA kuličky do roztoku oleje a vody
- Protřepání = vznik mikroreaktoru okolo kuličky

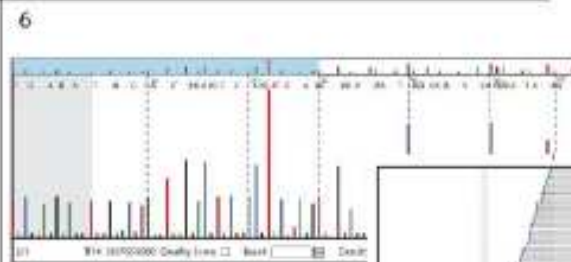


Pico-titer plate (sekvenční čip)
- obsahuje 1,6 mil jamek širokých 44µm
- průměr DNA kuličky je 26 µm
- přidavek menších kuliček dvou typů - jeden obsahuje chemikálie pro pyrosekvenaci, druhý typ fixuje kuličky s DNA

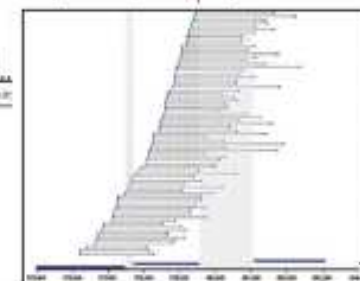


Sekvenční reakce

- Na destičku se cyklicky nanáší roztok polymerázy a vždy jednoho nukleotidu... viz. pyrosekvenace



Záznam a zpracování dat



SEKVENOVÁNÍ: PYROSEKVENOVÁNÍ

http://inovace-mbb.upol.cz/files/vyukovy-portal/portal-old/genomika_-_simkova/sekvenovani-web.pdf

Pyrosekvenování

⇒ založeno na cyklických reakcích (přidávání T, A, G, C, T, A, ...) a uvolnění pyrofosfátu v případě, že se inkorporovala specifická báze

⇒ následuje kaskáda reakcí, která na konci vede k emisi viditelného světla

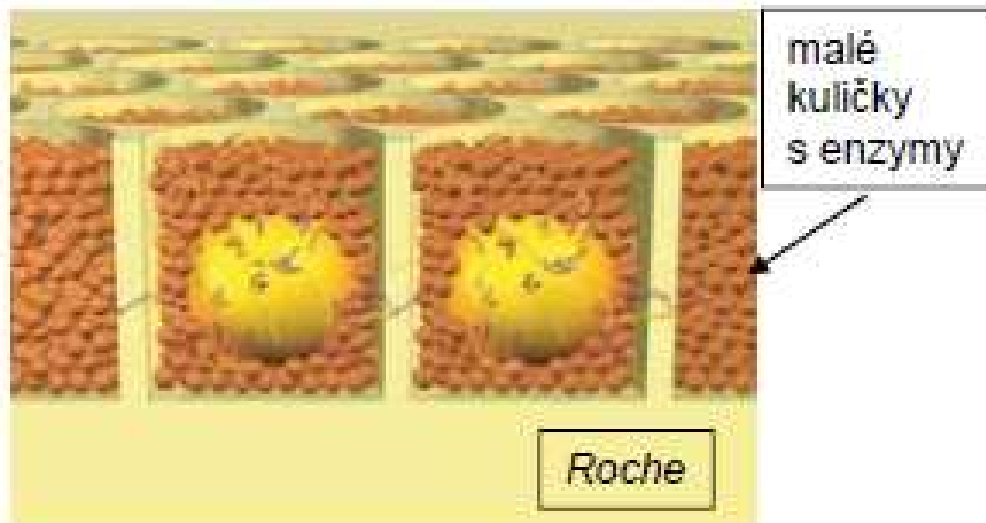
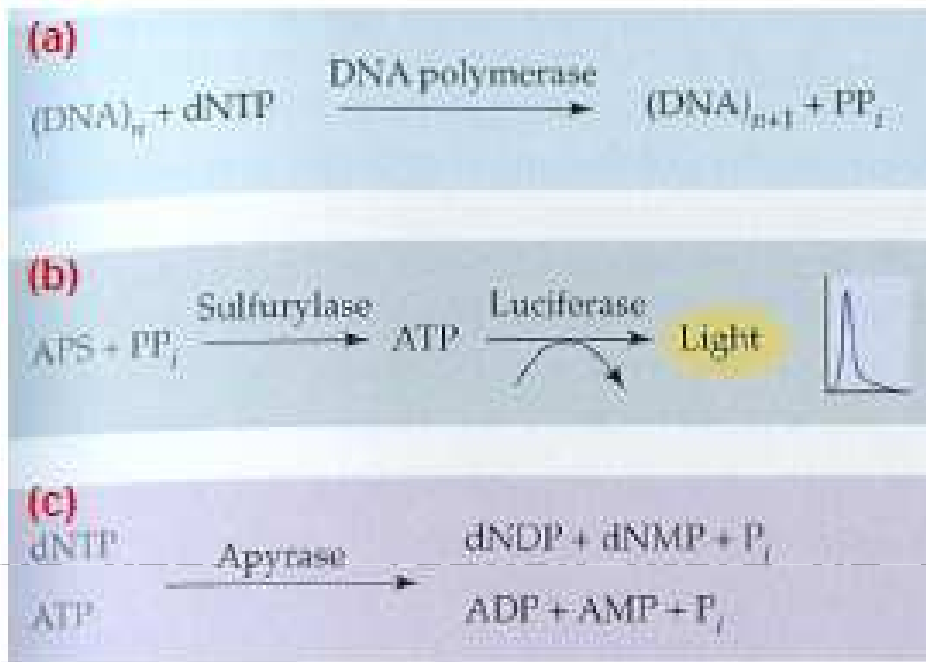
⇒ před dalším cyklem - degradace neinkorporovaného nukleotidu.



SEKVENOVÁNÍ: PYROSEKVENOVÁNÍ

[http://inovace_simkova/sek](http://inovace.simkova/sek)

Pyrosekvenování
 ⇒ založeno na (A, G, C, T, A, ...)
 ⇒ a uvolňuje specifická
 ⇒ následně viditelné
 ⇒ před danou nukleotidu



d/genomika_-

; A, G, C, T, A,
inkorporovala

vede k emisi

ovaného

RNA-seq

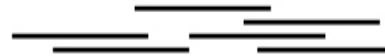
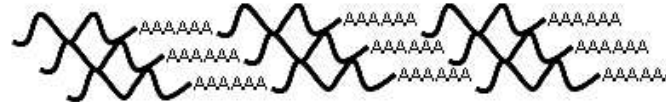
(RNA Sequencing), "Whole Transcriptome Shotgun Sequencing" ("WTSS")

- sekvenování RNA (total, mRNA, siRNA, miRNA atd.)

Multiplexed
Sample
Preparation:



Library
Preparation:



-rRNA Depletion
or PolyA
Enrichment

-Fragmentation,
Linker Ligation
& cDNA
Synthesis

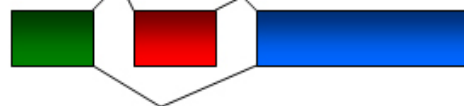
-Adaptor
Ligation &
Barcoding

Cluster
Generation,
Sequencing &
Data Analysis:

SNP Detection



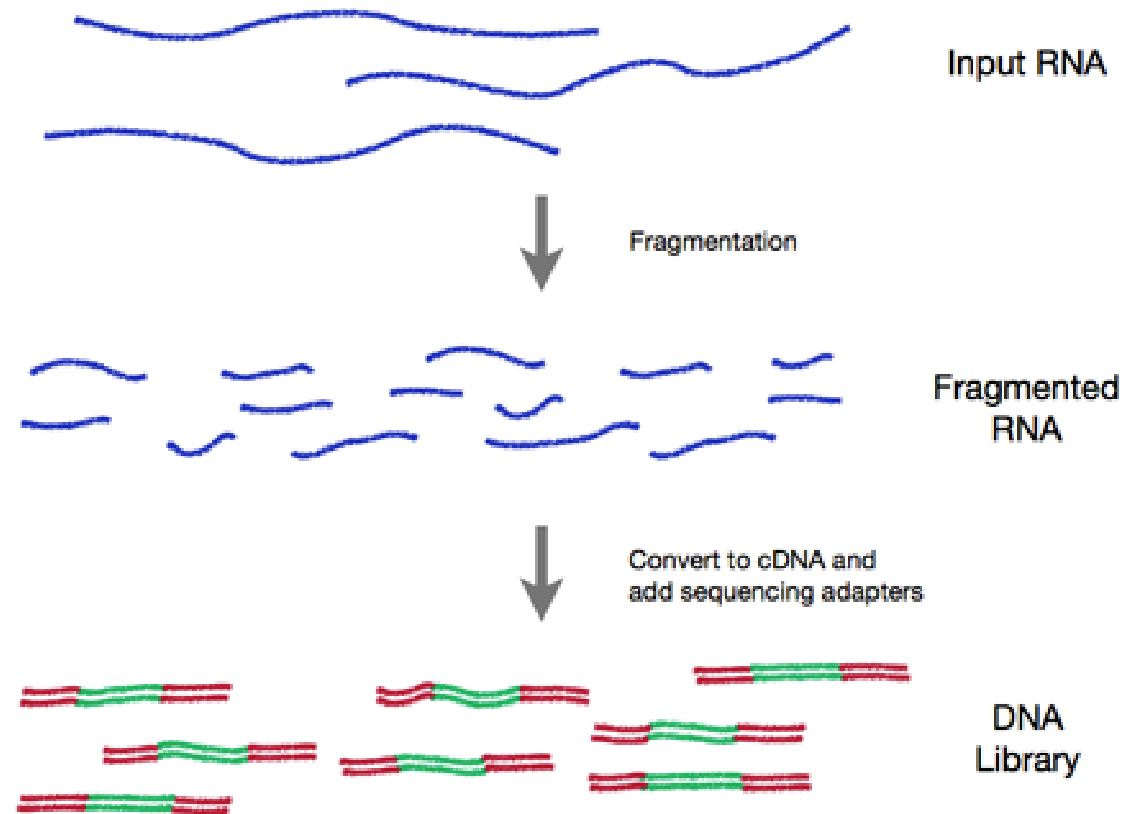
Splice Junction Analysis



Transcript Quantification



- Stanovení genové exprese
- Objevení a popsání všech transkriptů
- Charakterizace alternativního sestřihu (hranice exon-intron) a polyadenylace



<http://rnaseq.uoregon.edu/>



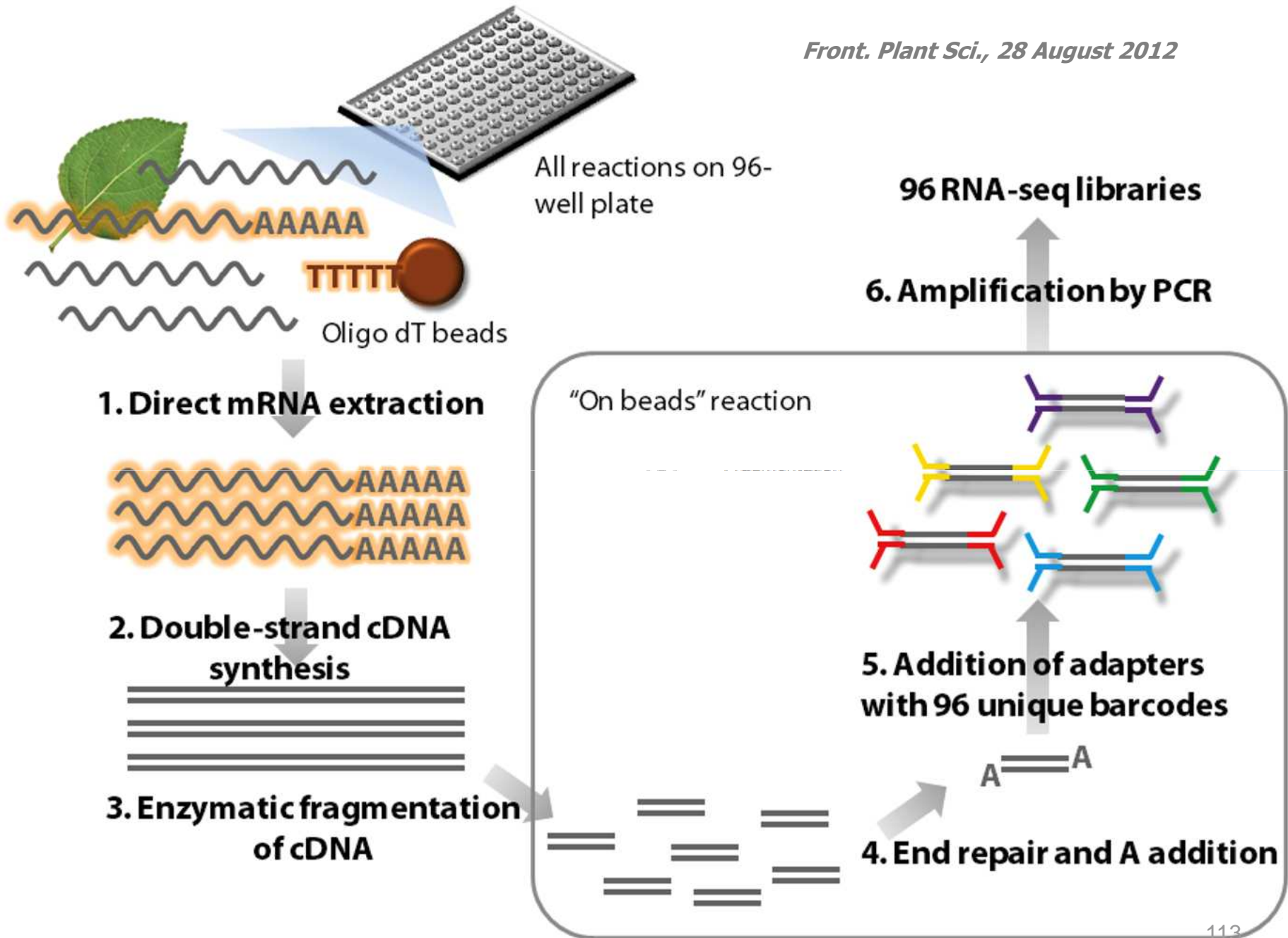


Table 1 Advantages and disadvantages of RT-PCR and RNAseq

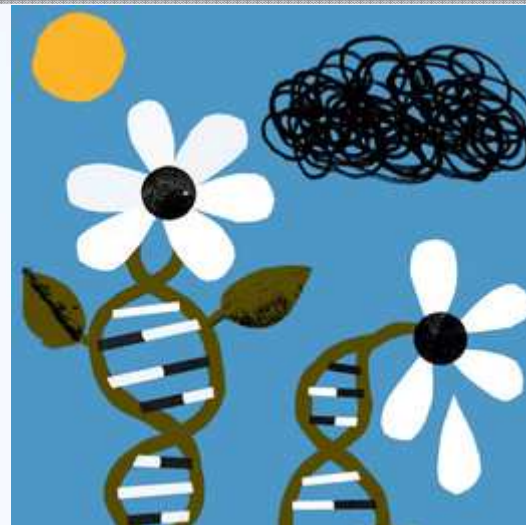
Technique	Advantages	Disadvantages
RT-PCR	<ul style="list-style-type: none">➤ High sensitivity➤ High sequence-specific	<ul style="list-style-type: none">➤ Time consumed➤ Analyze one gene each time➤ Variability of the results depending the laboratory➤ Necessary to know the gene sequence➤ Require many amount of RNA
RNA-seq	<ul style="list-style-type: none">➤ A single experiment can provide information about all the genes (translocation, ...)➤ High reproducibility➤ Require low amount of RNA	<ul style="list-style-type: none">➤ Needs a bioinformatician for the analysis of the results➤ High cost for one analysis

Transl Lung Cancer Res 2013;2(2):87-91





JAK STUDUJEME INTERAKCE GENŮ A PROSTŘEDÍ?



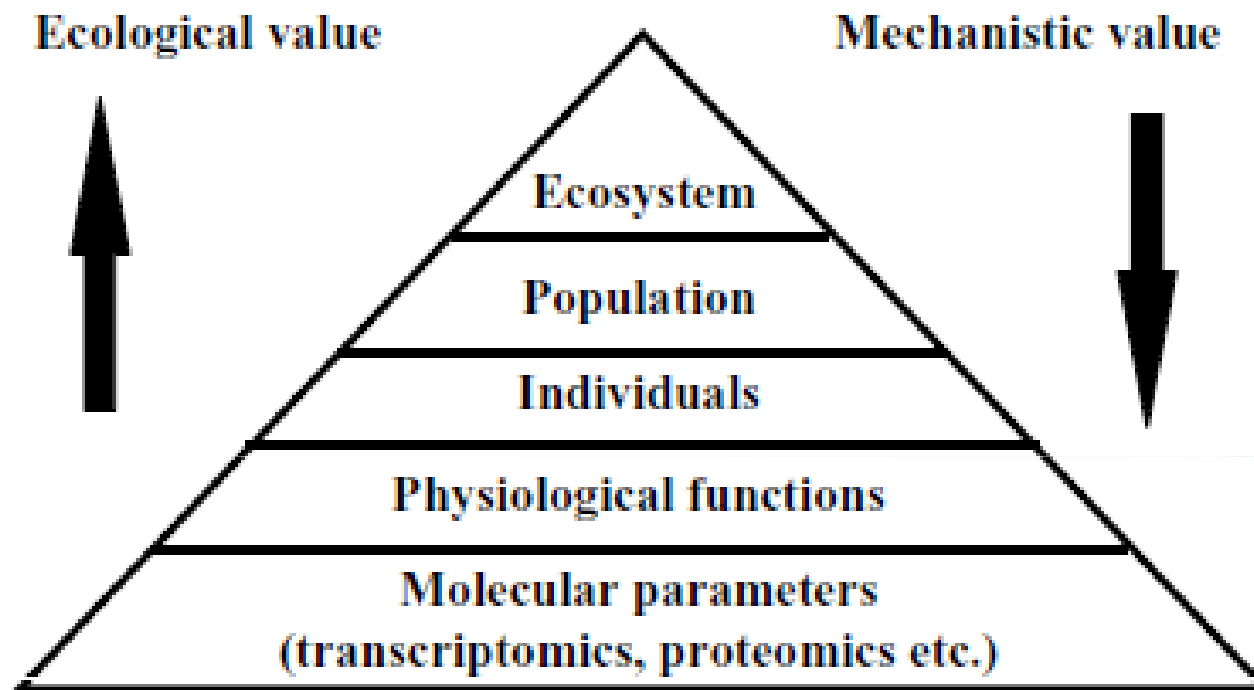
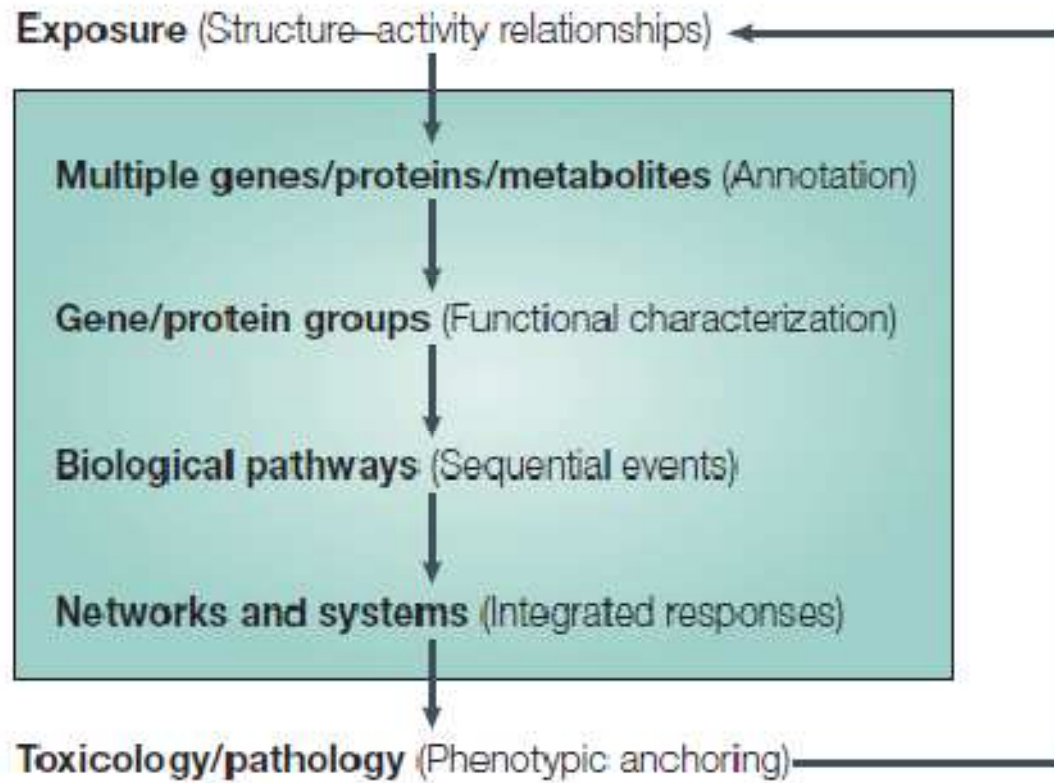
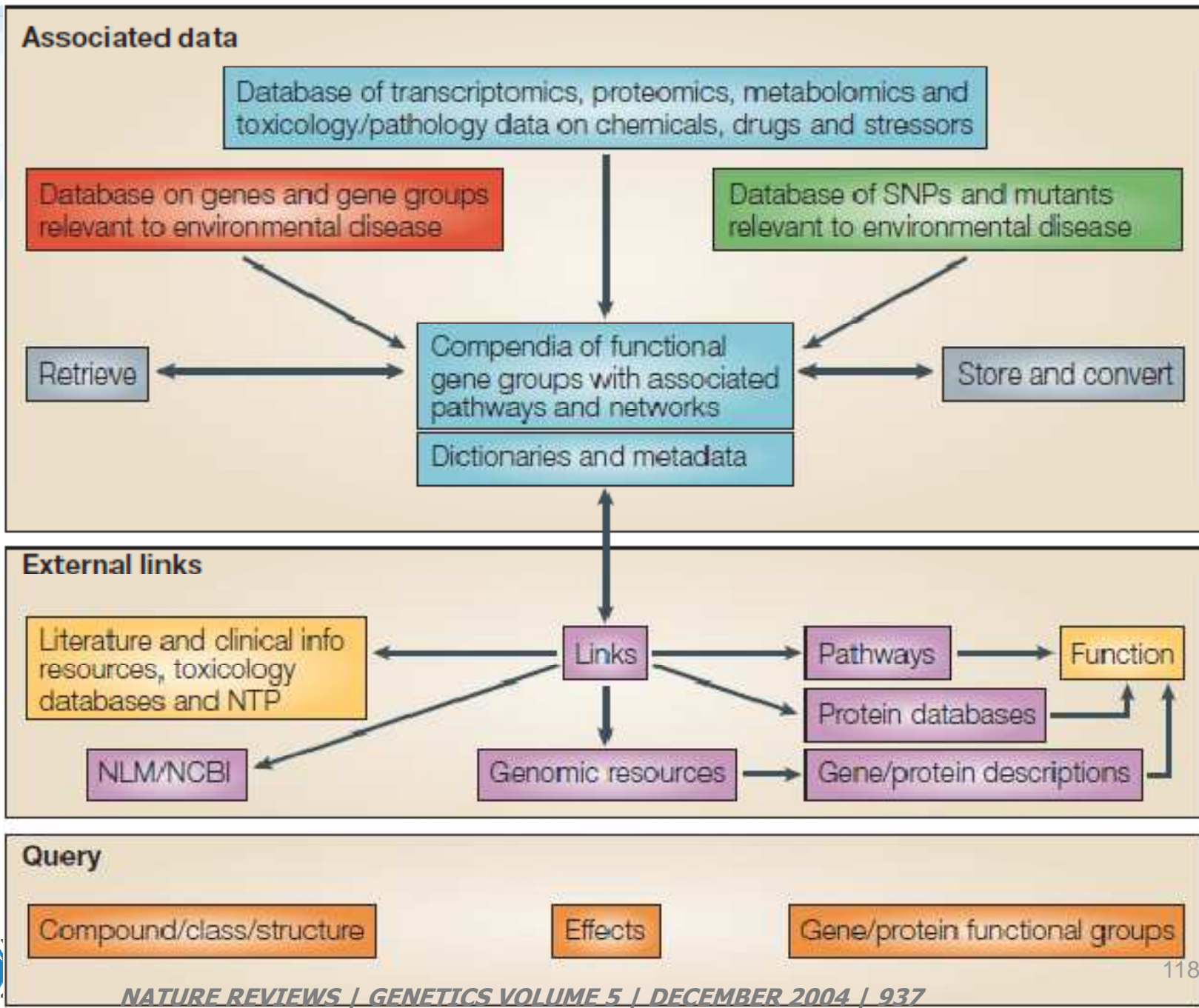


Fig. 3. Conceptual framework for ecotoxicogenomics.

Aquatic Toxicology 67 (2004) 143–154







TRANSKRIPČNÍ METODY ⇒ výčet a kvantifikace RNA v buňce, tkáni nebo organismu (mRNA, microRNA, siRNA, dlouhá nekódující RNA)

□ METODY

⇒ **RT-qPCR**

⇒ **RNA-seq**

⇒ **microarray**

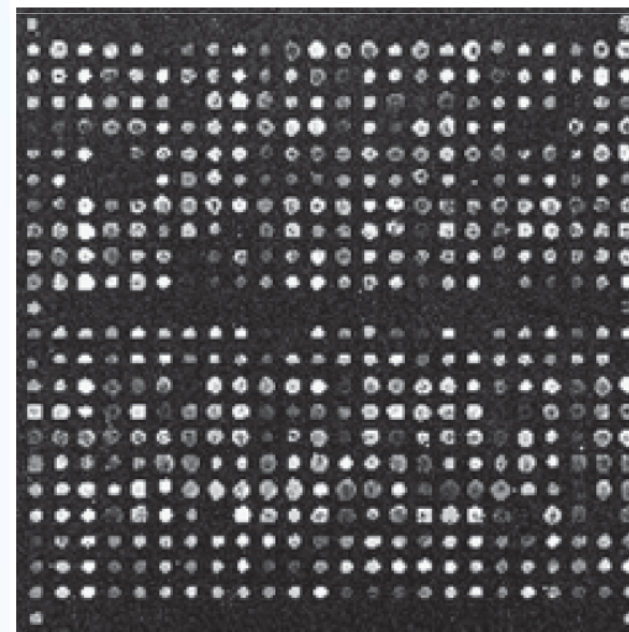
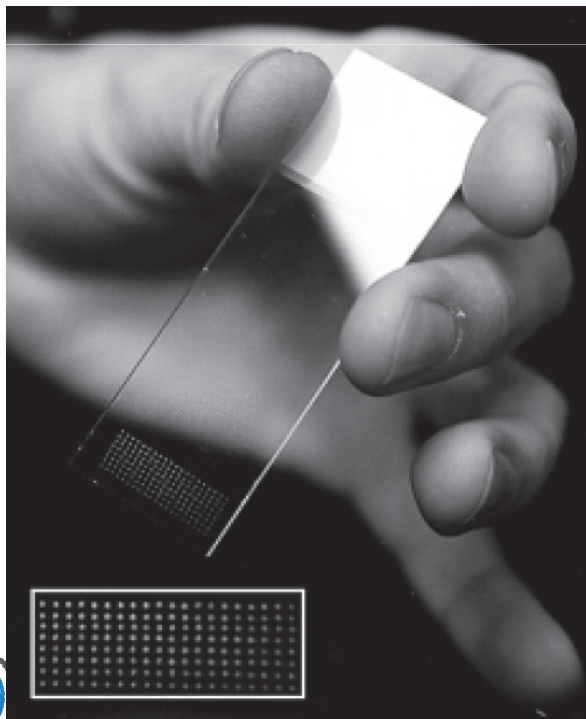


□ DNA ARRAY a čipy

- dvouřetězcové úseky molekul cDNA (komplementární DNA) vzniklé reverzní transkripcí mRNA
- oligonukleotidové sondy sekvenčně specifické pro každý gen z genomu
- hybridizační technika
- vychází z tzv. Northern blotu \Rightarrow imobilizována mRNA se hybridizuje se značenou probou reprezentující jeden gen
- geny nebo fragmenty genů (cDNA, EST – „expressed sequence tag“) jsou roboticky v přesně daných souřadnicích umístěny na mikroskopické sklo (plast)

□ PRINCIP

- funguje na principu specifické hybridizace \Rightarrow na principu párování komplementárních bází nukleotidů (spojení vodíkovými můstky)
- destička (skleněná nebo silikonová) s mnoha (běžně desetitisíce, statisíce, výjimečně až miliony) vzorky jednořetězcových DNA oligonukleotidů



POSTUP:

1. Vytvoření DNA čipu

- ✧ Navázáním oligonukleotidu (sondy) kovalentní vazbou na destičku

2. Příprava vzorku (cDNA)

- ✧ nezbytný krok označení molekul (fluorescentní, radioaktivní) a denaturace

3. Hybridizace vzorku s čipem

- ✧ nanesení vzorku na čip

4. Omytí čipu

- ✧ sondy pevně přichycené kovalentní vazbou k povrchu čipu a molekuly vzorku přichycené dostatečně pevně na sondách.

5. Skenování čipu

- ✧ Vícekanálový skener

6. Zpracování výsledků

- ✧ podle intenzity vyzářeného světla lze určit množství komplementárních molekul přítomných ve vzorku



Prepare cDNA Probe

"Normal"



Tumor



RT / PCR

Label with
Fluorescent Dyes

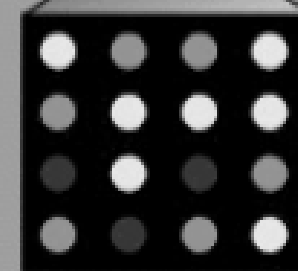
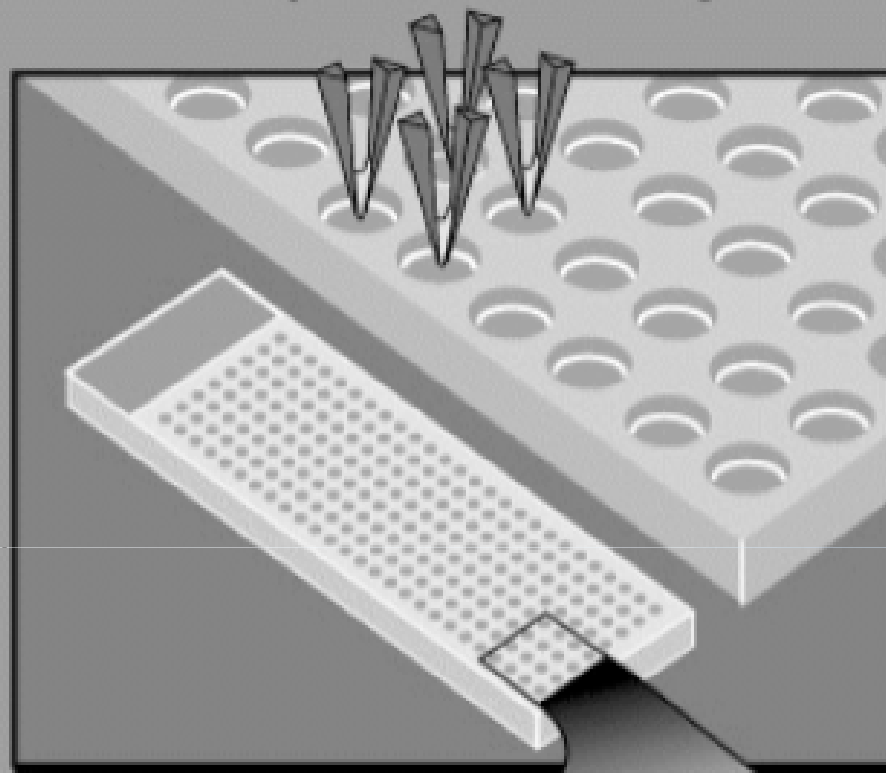


Combine
Equal
Amounts

Hybridize
probe to
microarray

SCAN

Prepare Microarray



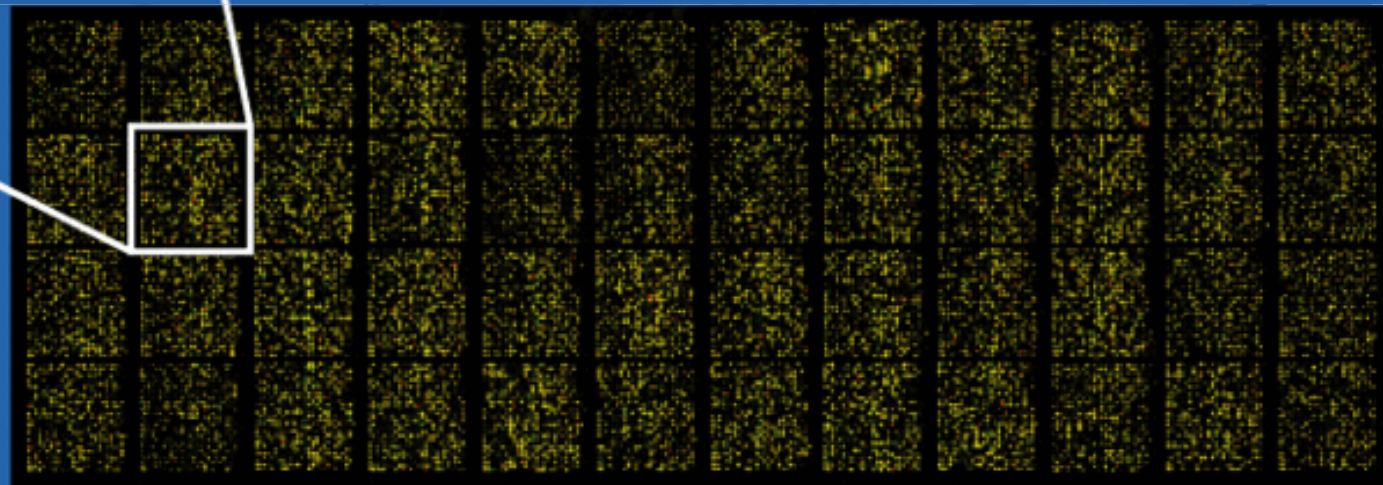
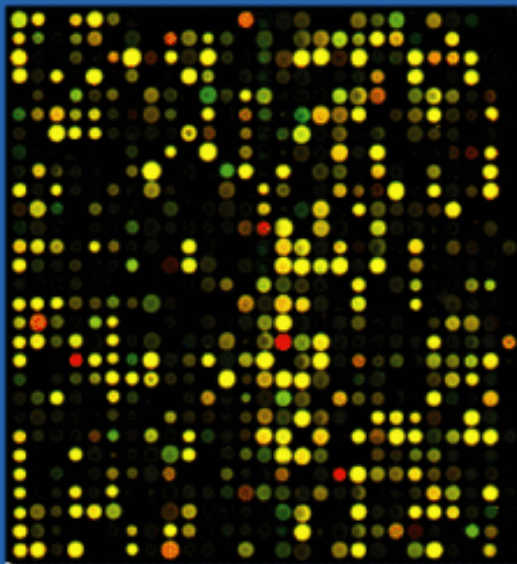
Microarray Technology

komplementární molekuli přítomných ve vzorku



Research centre
for toxic compounds
in the environment

<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/5.pdf>



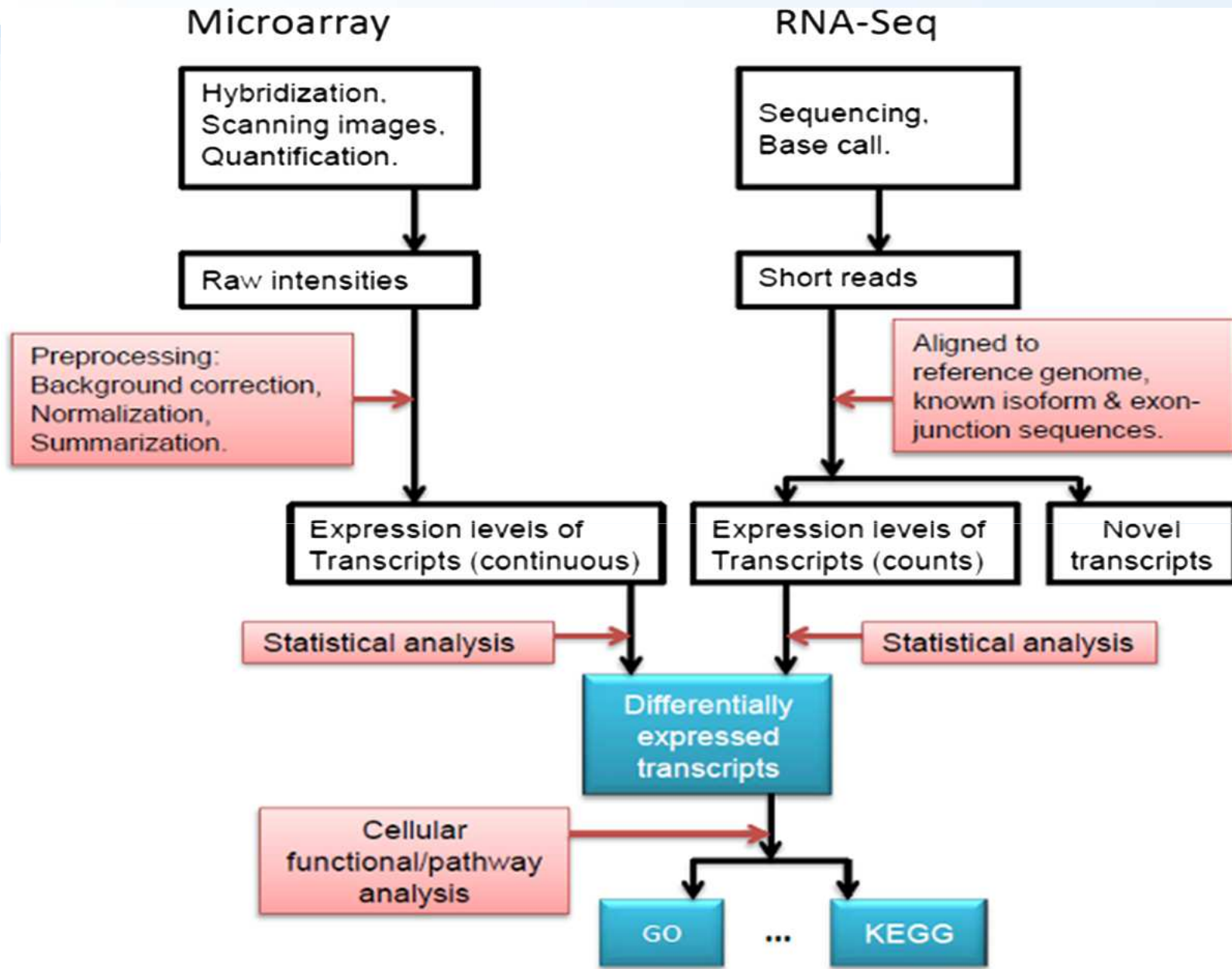
Microarray Technology

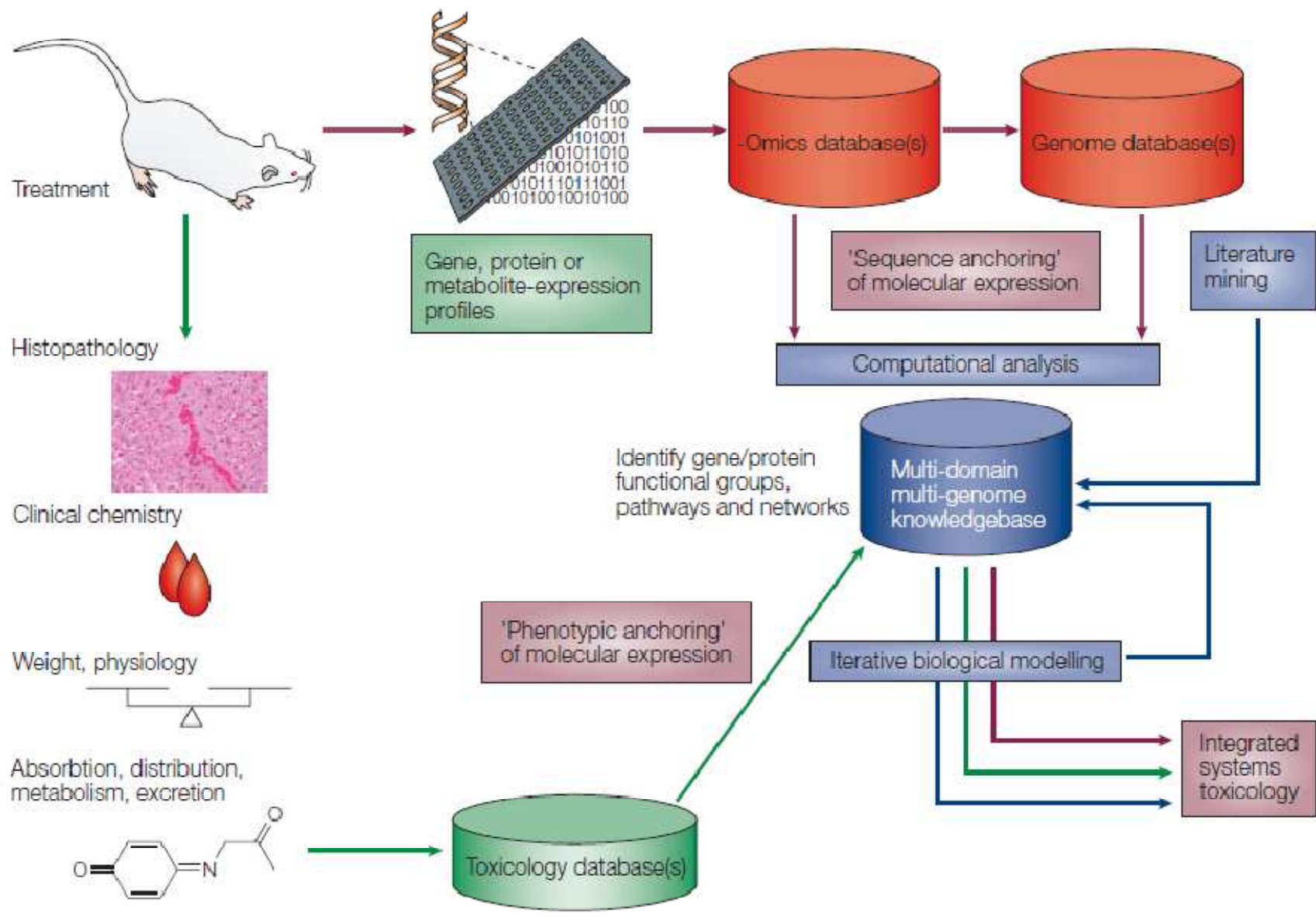
komplementární molekuli přítomných ve vzorku



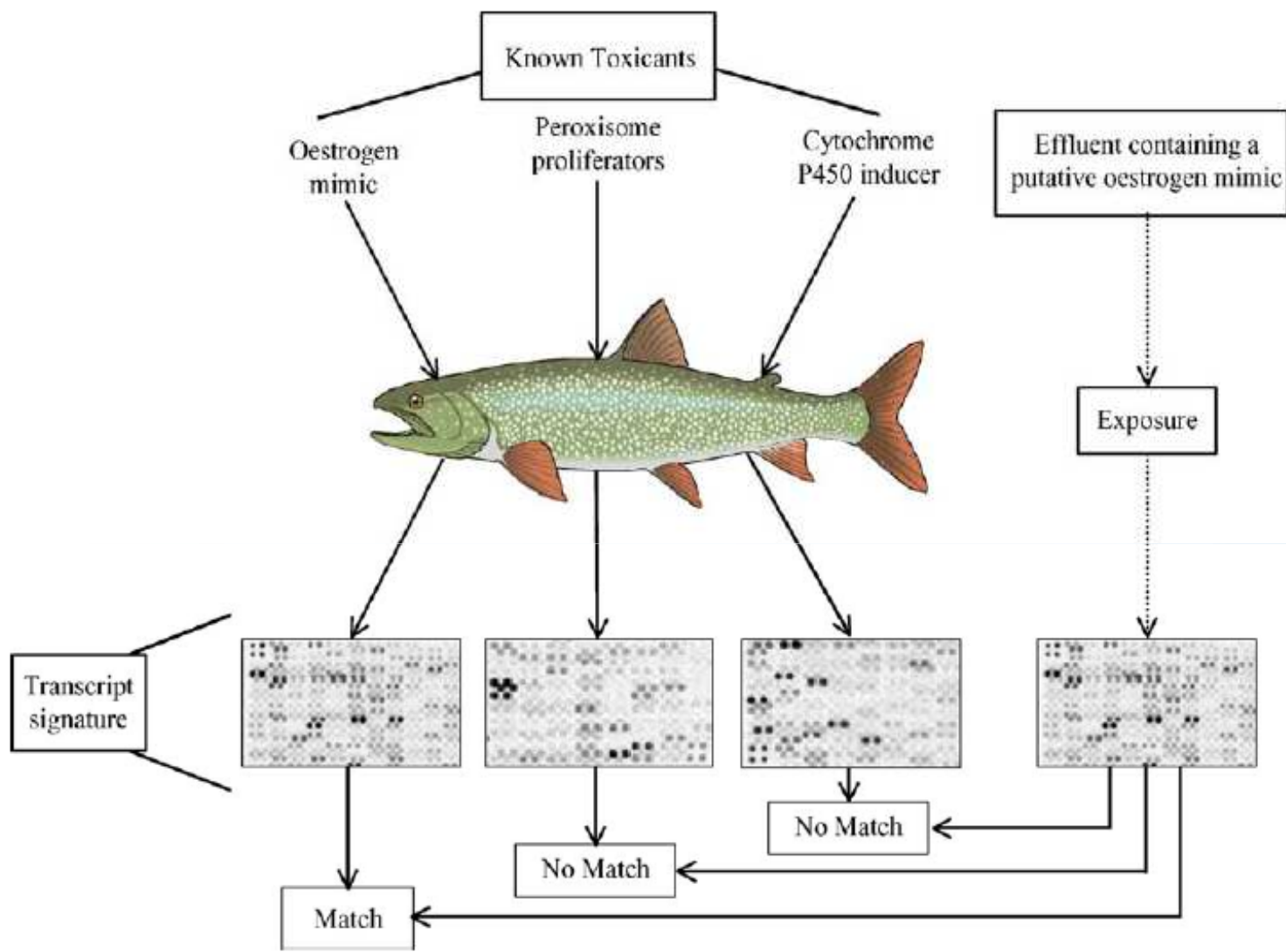
Research centre
for toxic compounds
in the environment

<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/5.pdf>



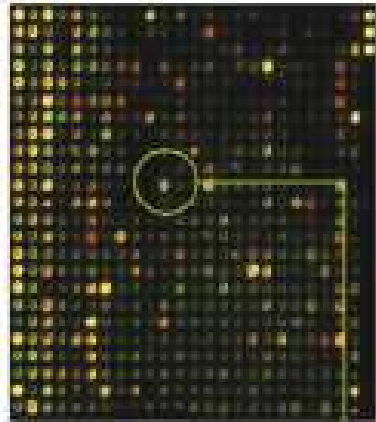


NATURE REVIEWS | GENETICS VOLUME 5 | DECEMBER 2004 | 937

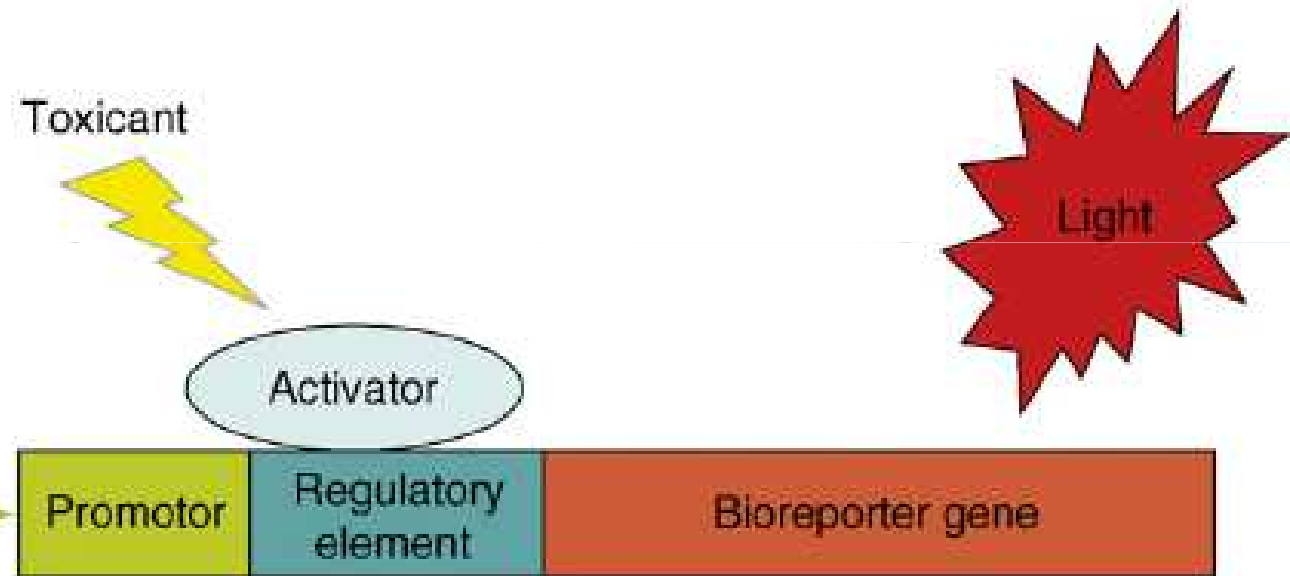


Aquatic Toxicology 67 (2004) 143–154





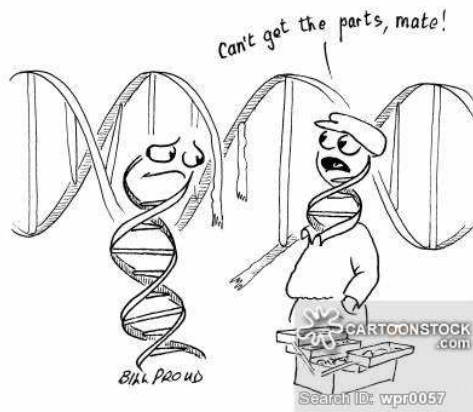
(a) Identification of toxicant specific key genes



(b) Development of a toxicant specific reporter

TRENDS in Biotechnology





Genetic Engineer.

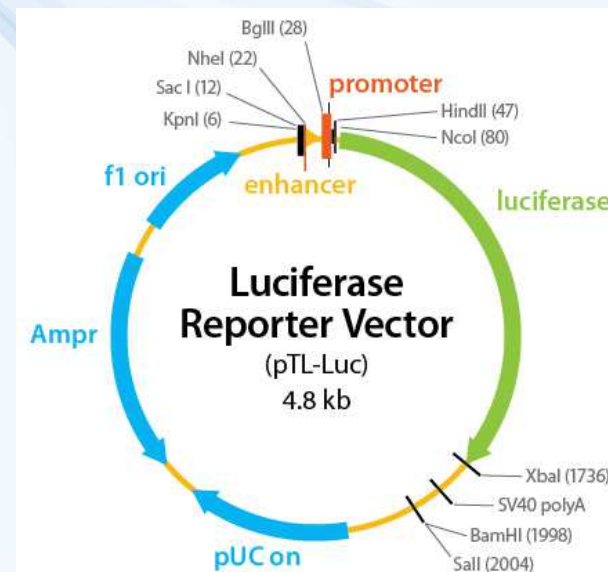
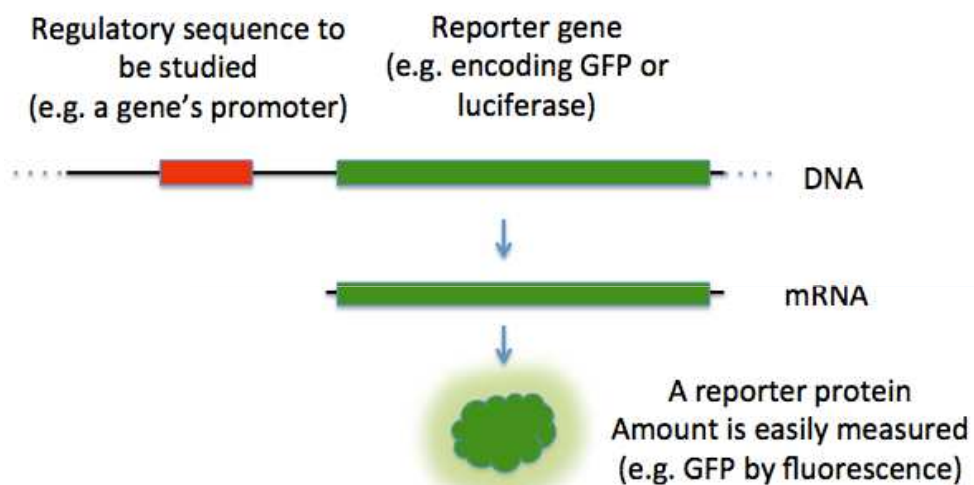
JAK VYTVOŘIT REKOMBINANTNÍ MODEL PRO (EKO)TOXIKOLOGII?



Research centre
for toxic compounds
in the environment

REKOMBINACEDNA: REPORTÉROVÉ MODELY

<http://worldwide.promega.com/resources/multimedia/reporter-assays-and-transfection/introduction-to-reporter-gene-assays/>

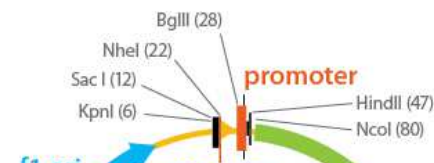


REKOMBINACE DNA: REPORTÉROVÉ MODELY

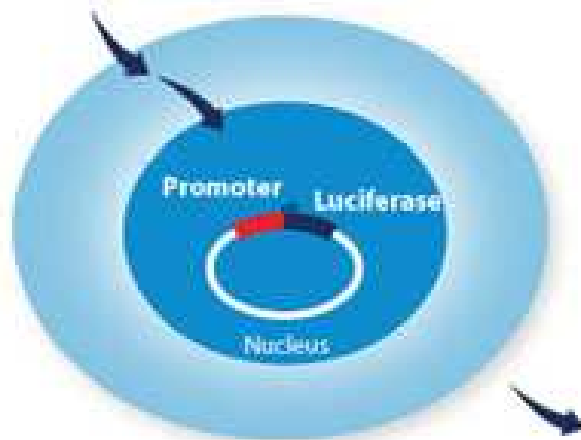
<http://worldwide.promega.com/resources/multimedia/reporter-assays-and-transfection/introduction-to-reporter-gene-assays/>

Regulatory sequence to be studied (e.g. a gene's promoter)

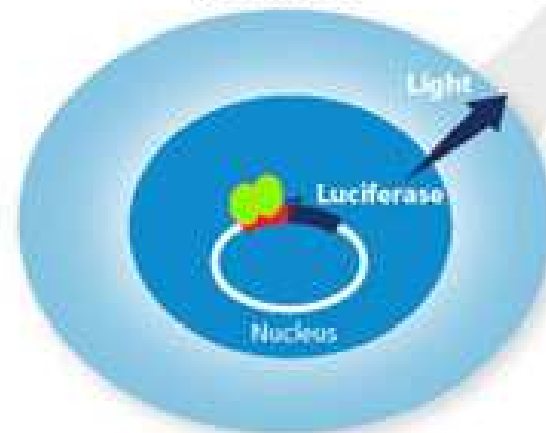
Reporter gene (e.g. encoding GFP or luciferase)



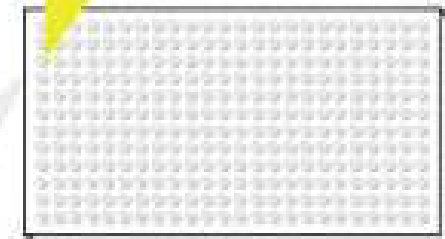
Apply Stimulus

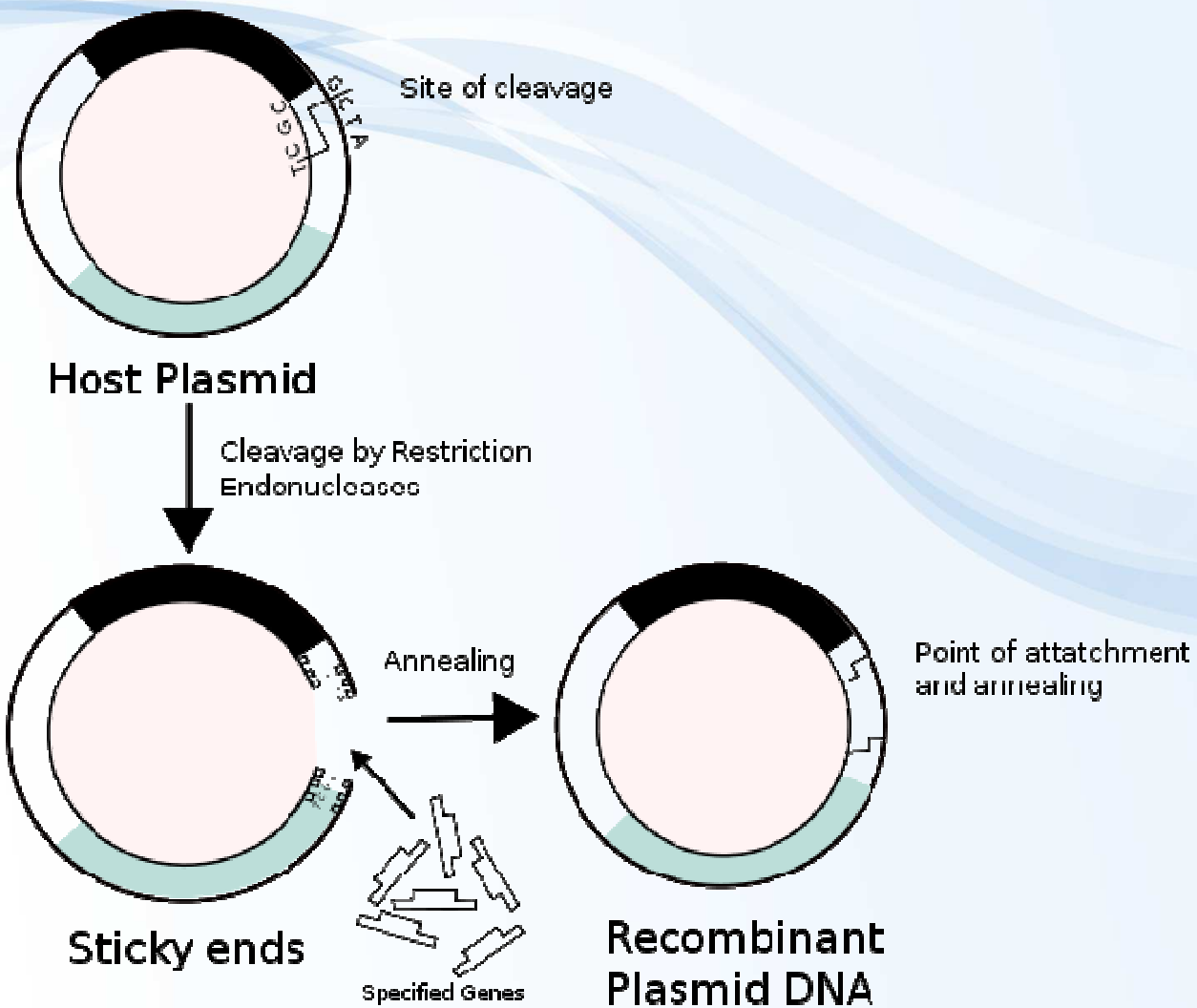


Transcription factors are activated and bind to promoter



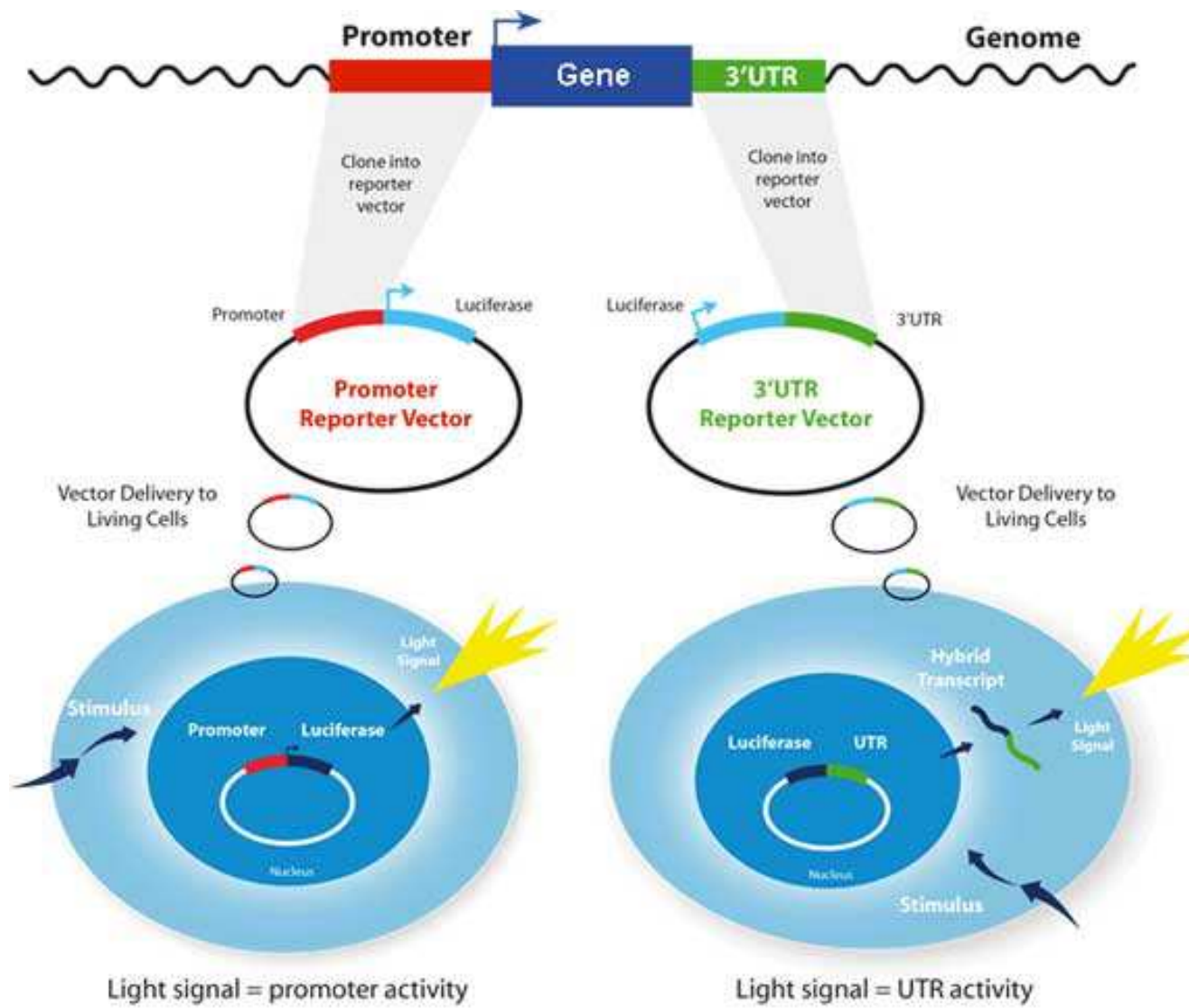
Measure luciferase activity





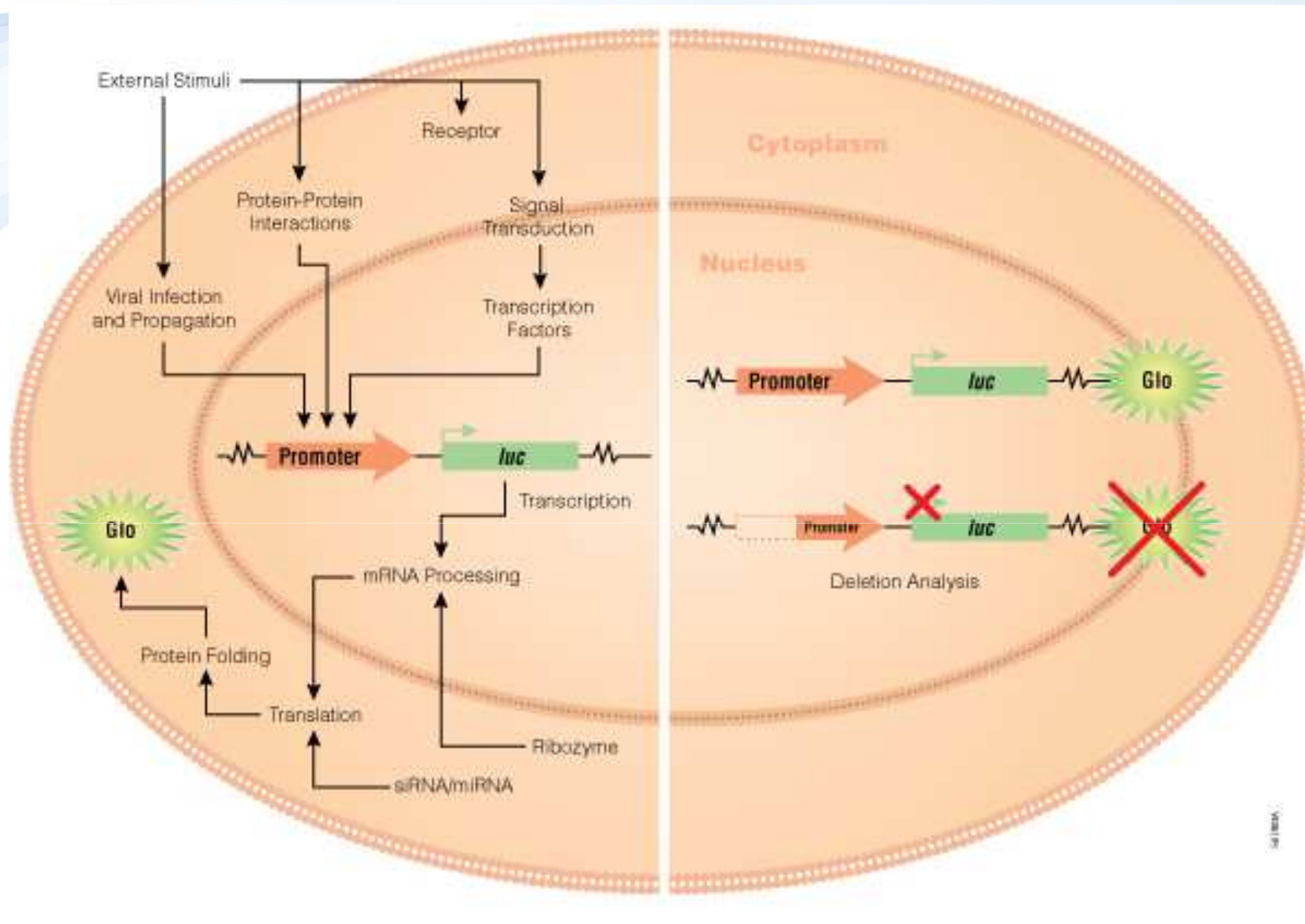
http://en.wikipedia.org/wiki/Biomolecular_engineering





1. Promoter nebo 3'UTR responzivního elementu
2. Tvorba plazmidu a jeho namnožení (restrikční enzymy, klonování, selekce a izolace plazmidů)
3. Přenesení konstruktů (plazmidů) do buněk = transfekce

<http://www.activemotif.com/catalog/900/lightswitch-luciferase-assay-system>

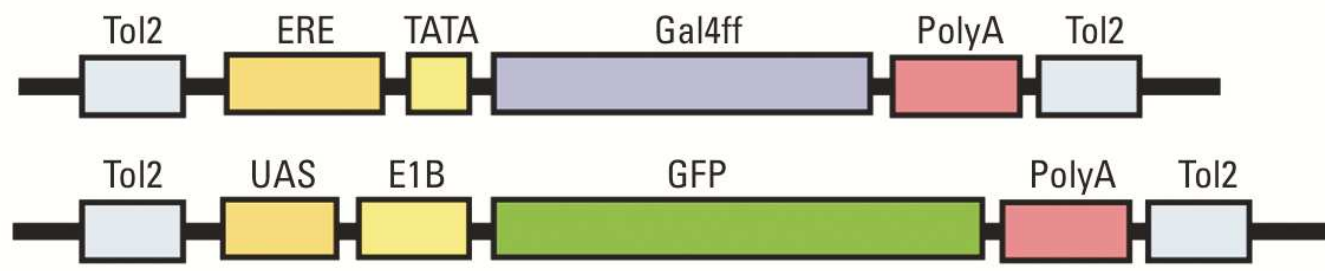


<http://worldwide.promega.com>

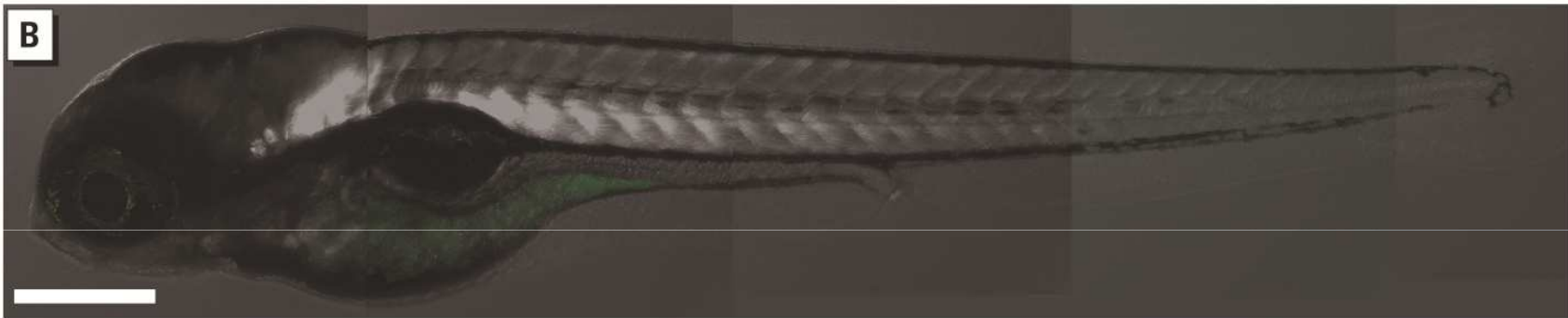


Research centre
for toxic compounds
in the environment

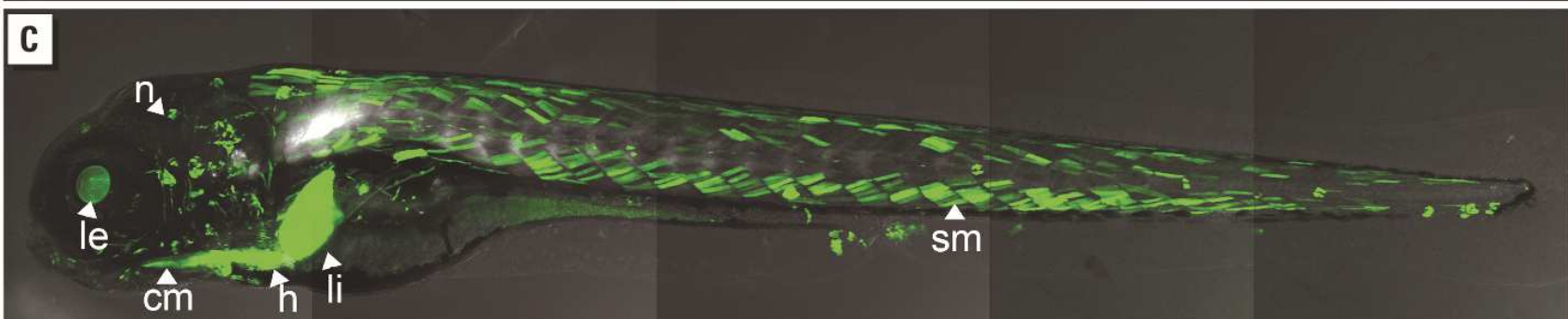
A



B



C



EHP 120 (2012): 990

REKOMBINACE DNA: JAK VYPNOUT/ZAPNOUT GEN?

□ “**GENE KNOCK OUT**”

⇒ kombinace technik vede k vyřazení genu z provozu

⇒ DNA konstrukt přenesen do buněčné kultury

⇒ u zvířat jsou embryonální kmenové buňky geneticky upraveny a vneseny do ranního stádia embrya

□ „**GENE KNOCK-IN**“ jedná se o nahrazení genu, ne o jeho vymazání

□ „**GENE KNOCK-DOWN**“ jedná se o snížení či inhibici genové exprese



REKOMBINACE DNA: JAK VYPNOUT/ZAPNOUT GEN?

► "GENE KNOCK OUT"



How it works:

in vivo Model

Knock-in Mouse Generation

- 1 Embryos with attp sites are collected from TARGATT™ mouse.



- 2 TARGATT™ Vector with Gene of interest (eg. GFP)



- 3 Pronuclear injection into TARGATT™ embryos.



- 4 Screening pups for site-specific gene integration



Knock-in Mouse
within 3 months

Applications

in vivo screenings
Generation of humanized models
Generation of disease models
Generation of drug / genome interaction models

in vitro Model

Stable Cell Line Generation

- 1 Generate master TARGATT™ Cells with attp sites (6 months)



- 3 Transfection



- 4 TARGATT™ Cell Lines - Expressing Gene of Interest



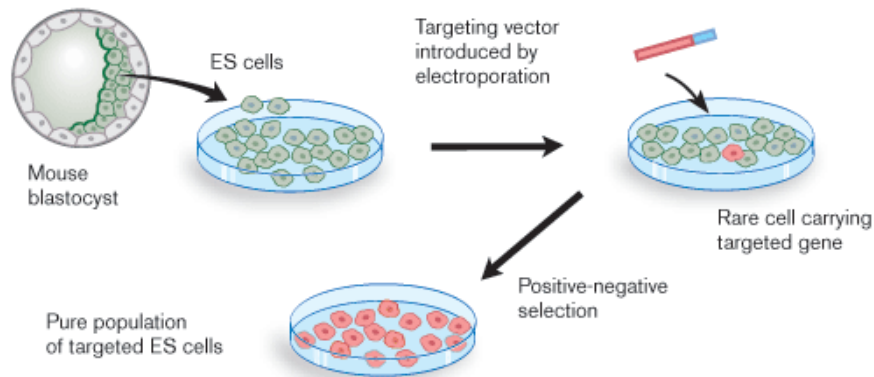
Knock-in Cell Line
within 1 - 3 months

Applications

in vitro screenings
Drug discovery
Study drug interactions
Toxicity Study
Personalized medicine

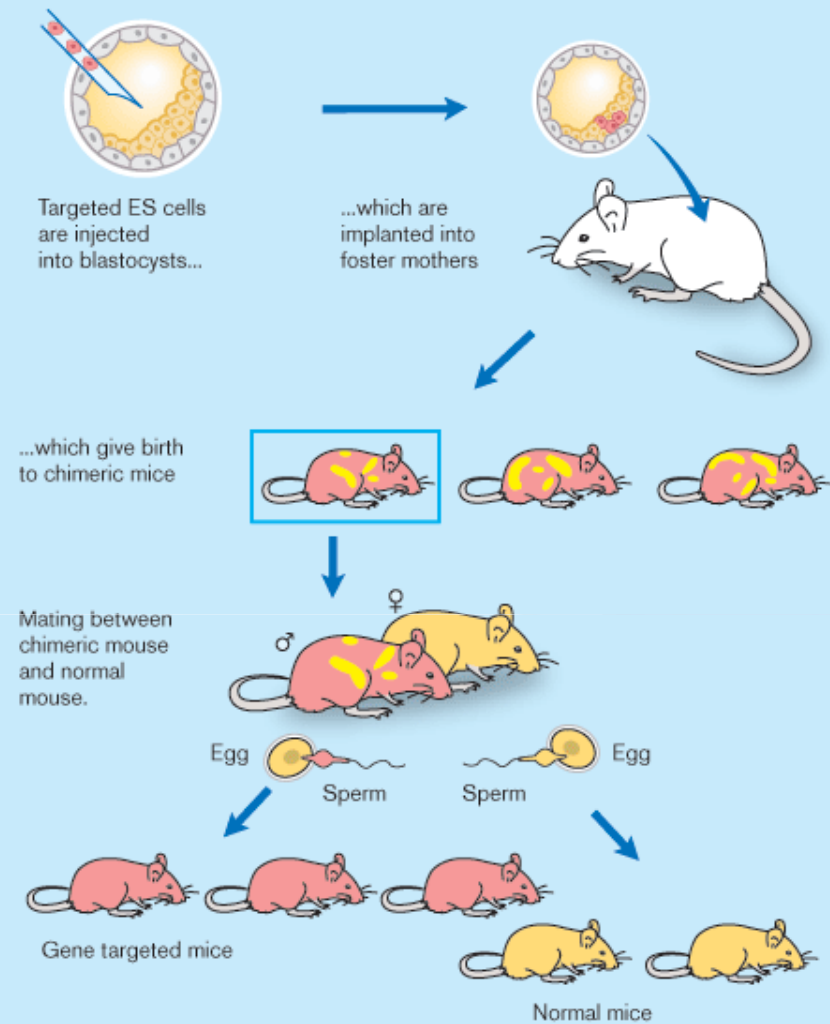


A. Gene targeting of embryonic stem cells



http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/advanced.html

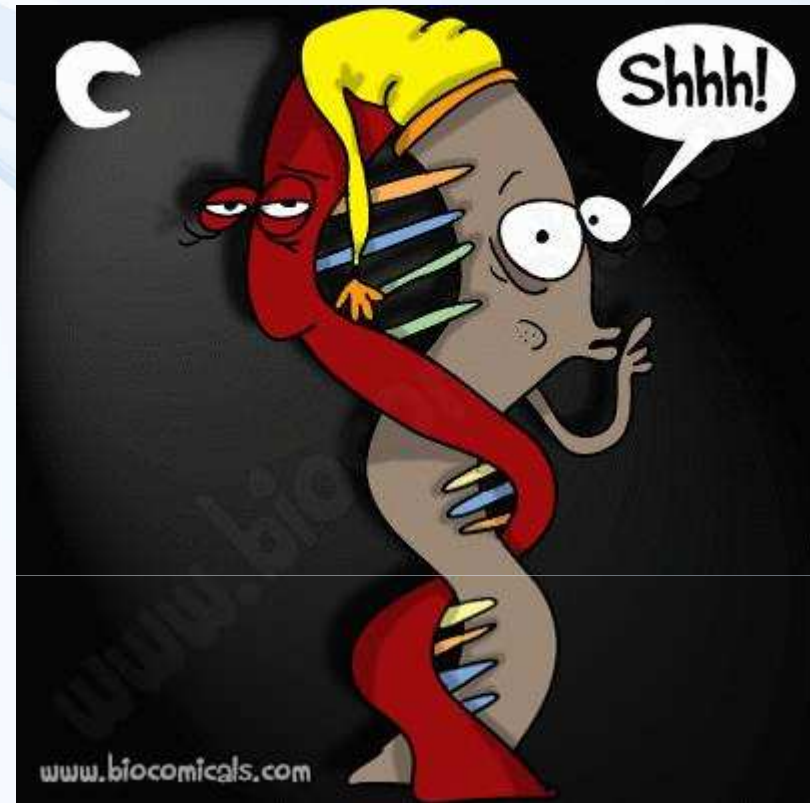
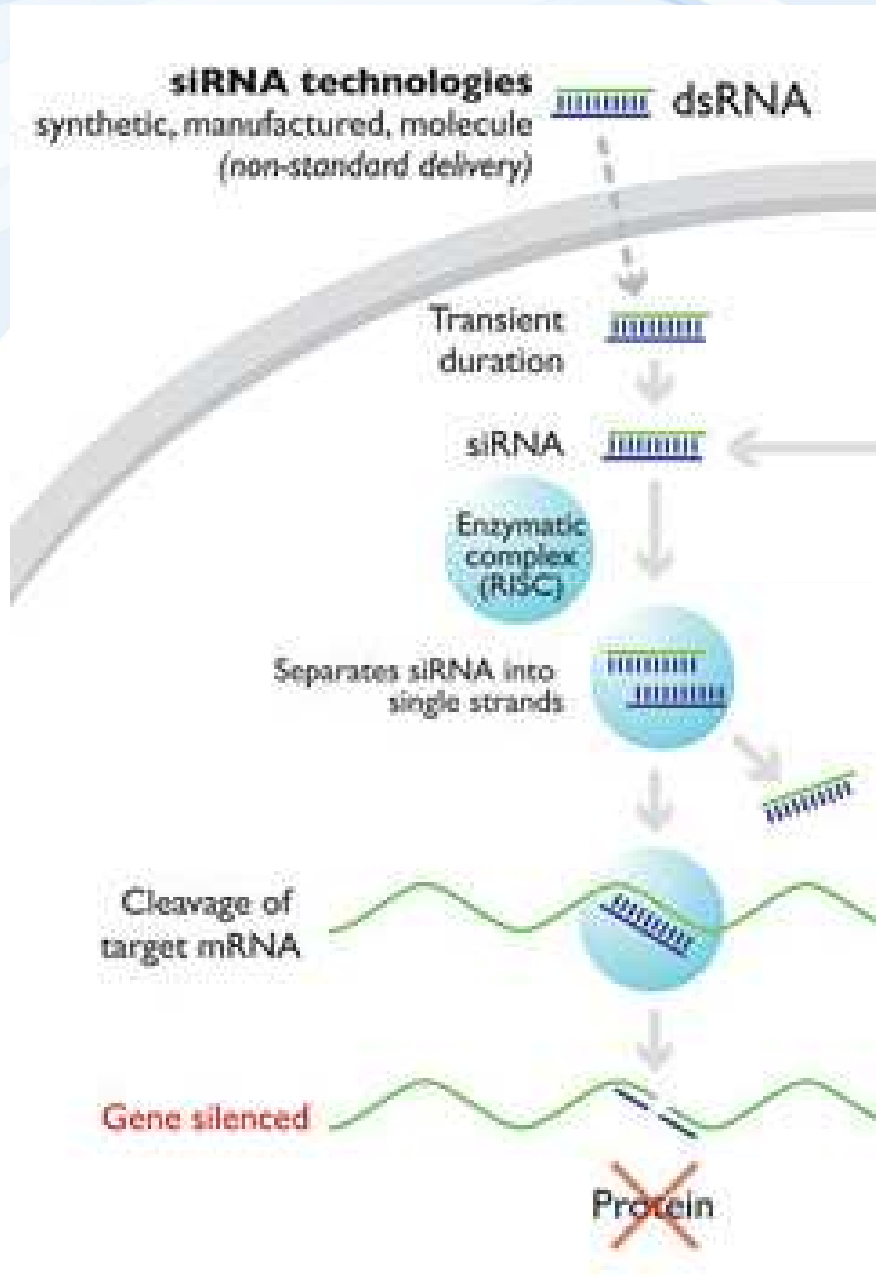
B. Generation of gene targeted mice



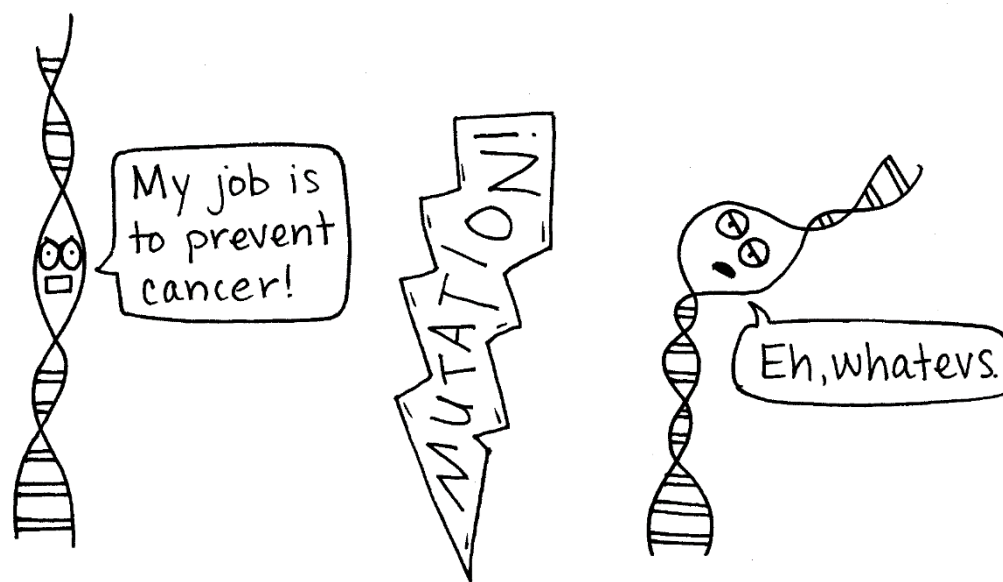
ANNIKA RÖHL



□ “siRNA”, ribozymy,

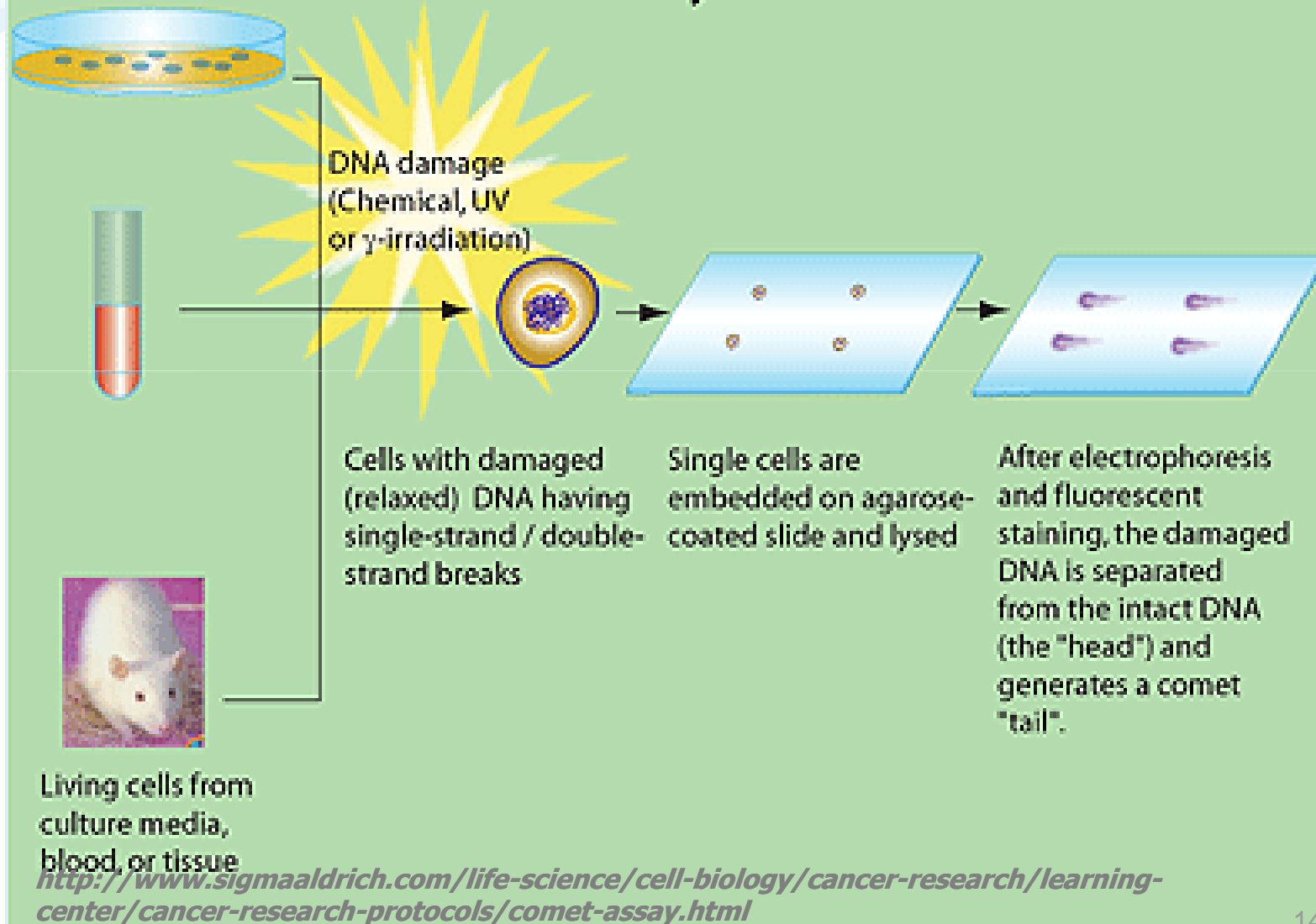


JAK STUDUJEME GENO(EKO)TOXICITU?



GENOTOXICITA: COMET ASSAY

Comet Assay Overview



Comet Assay Overview



<http://cometassayuoc.blogspot.cz/2010/03/introduction-to-comet-assay.html>

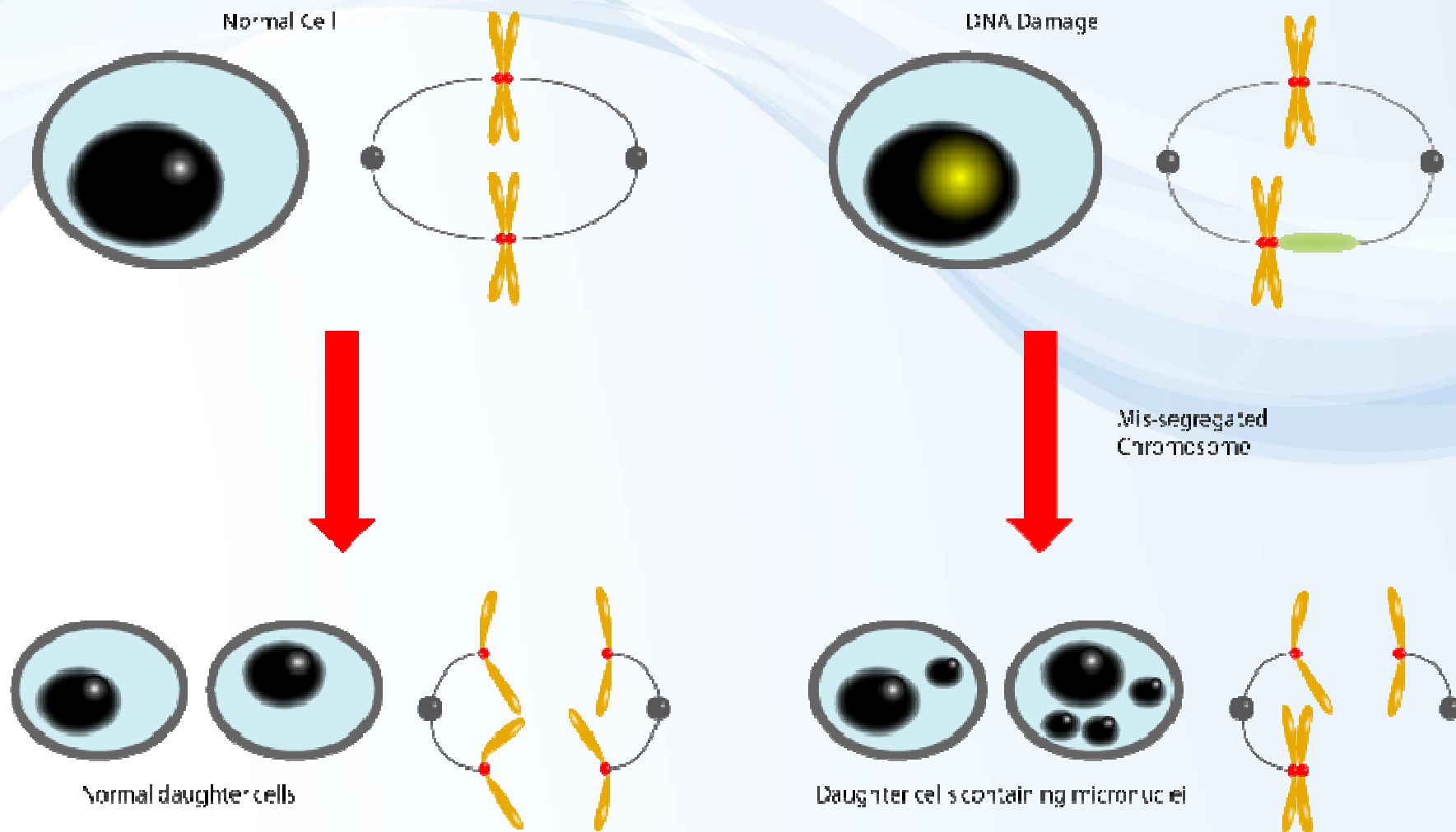


Living cells from
culture media,
blood, or tissue

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cancer-research/learning-center/cancer-research-protocols/comet-assay.html>



GENOTOXICITA: MIKROJÁDROVÝ TEST



<http://www.gentronix.co.uk/product/micro-nucleus-test/>

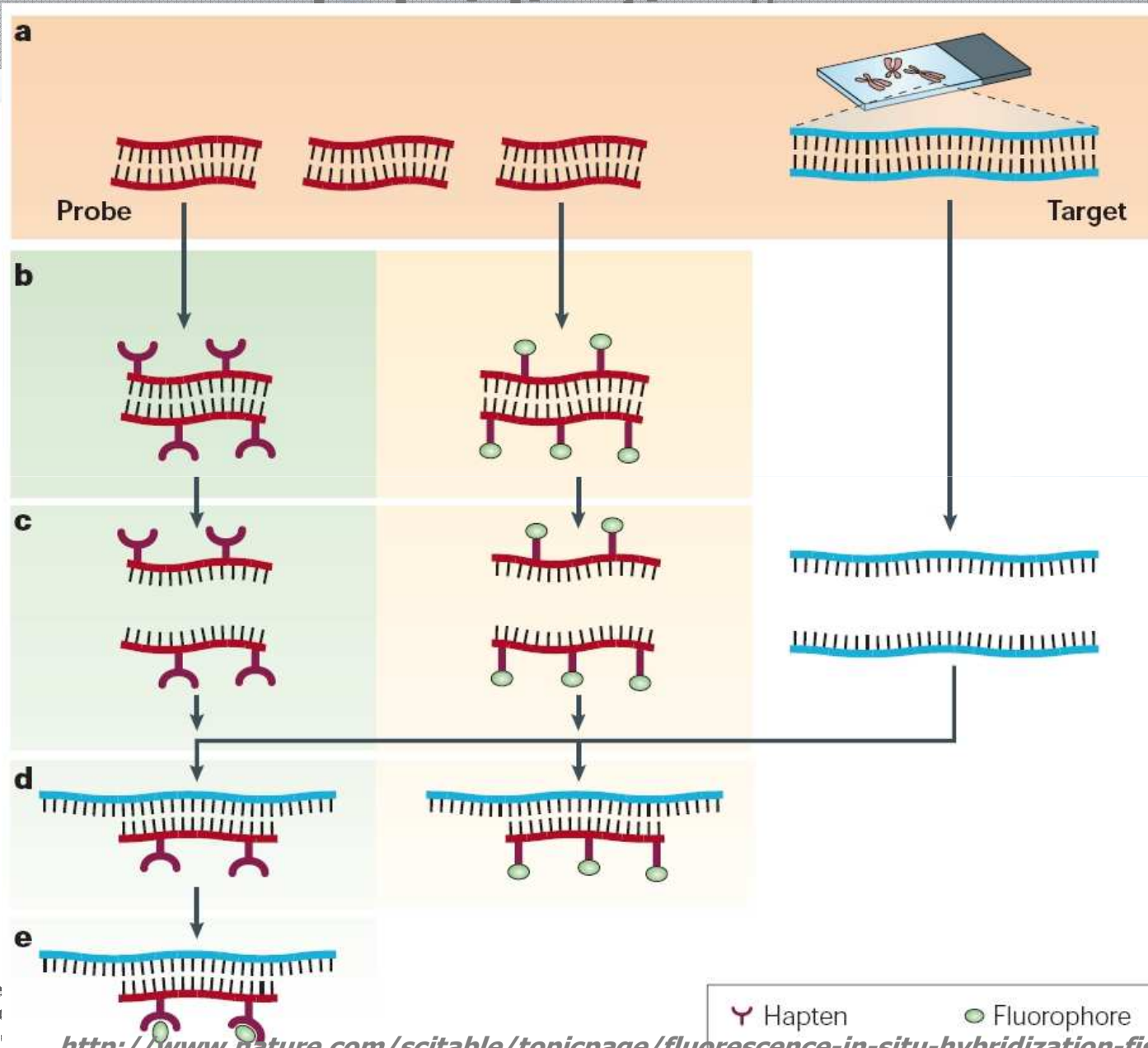


Research centre
for toxic compounds
in the environment

GENOTOXICITA: FISH – „Fluorescence in situ hybridization“



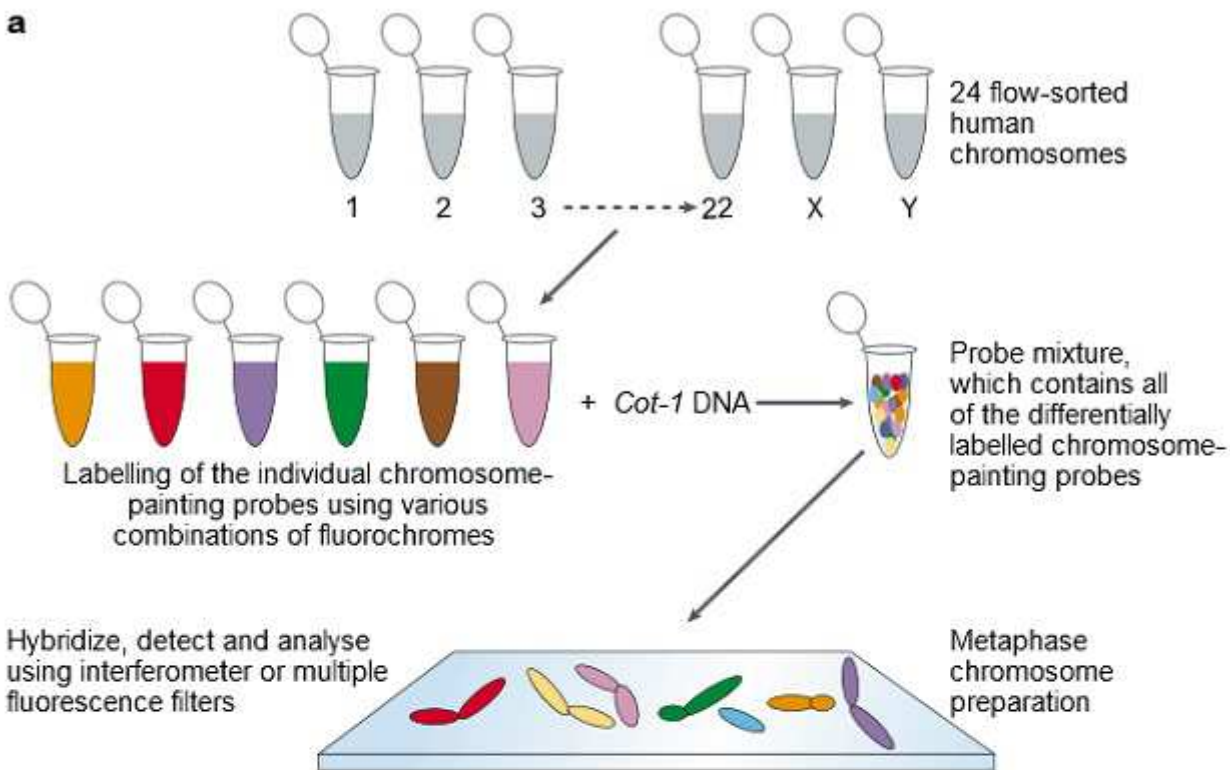
GENOTOXICITA: FISH – „Fluorescence in situ



Rese
for tr
in th

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327#>

a



b

c

d

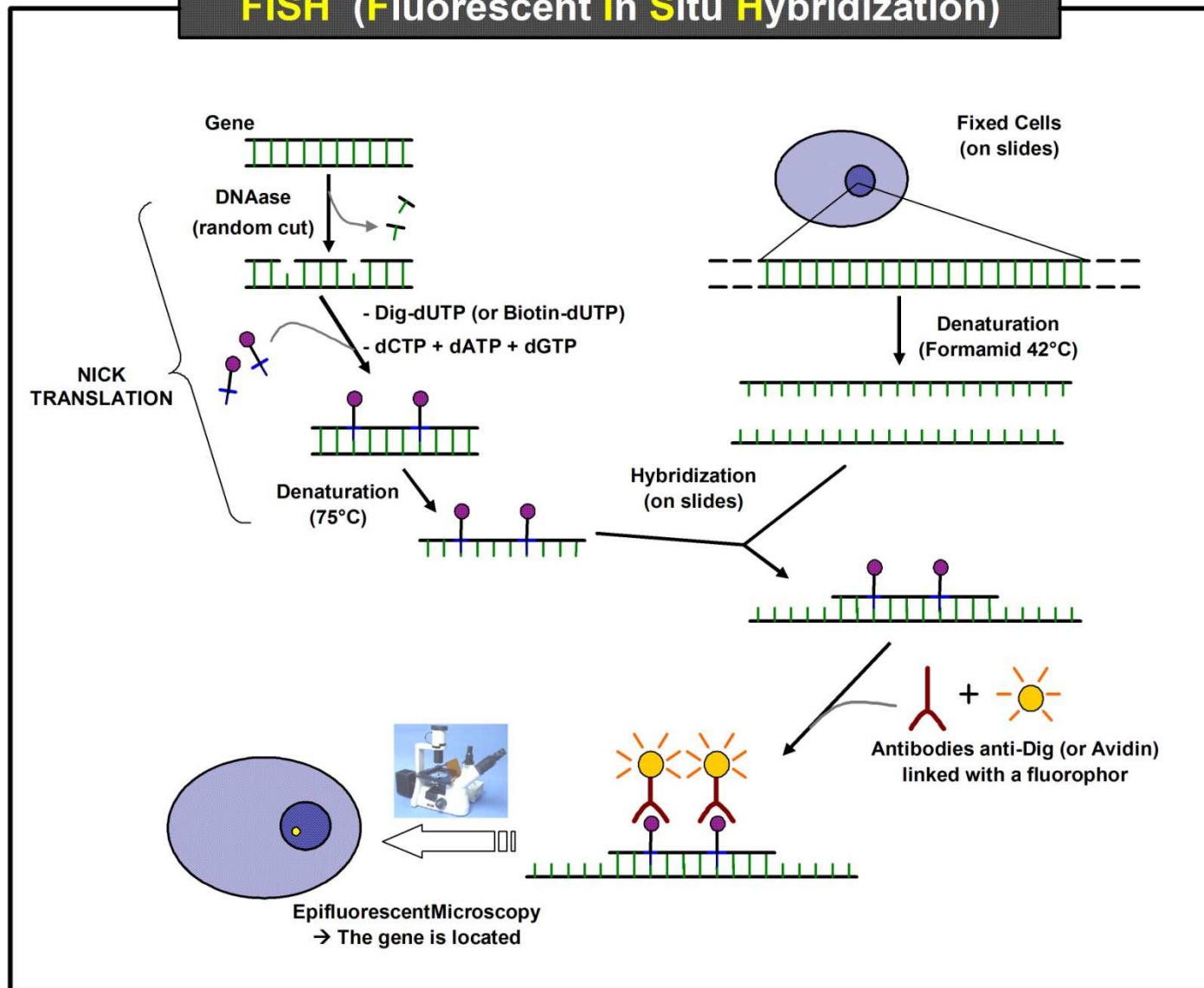
e



Research
for the
prevention
of cancer

ht

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FISH_%28Fluorescent_In_Situ_Hybridization%29.jpg



