



Research centre
for toxic compounds
in the environment

Bi5596

Moderní metody v ekotoxikologii

STUDIUM RNA & DNA II.

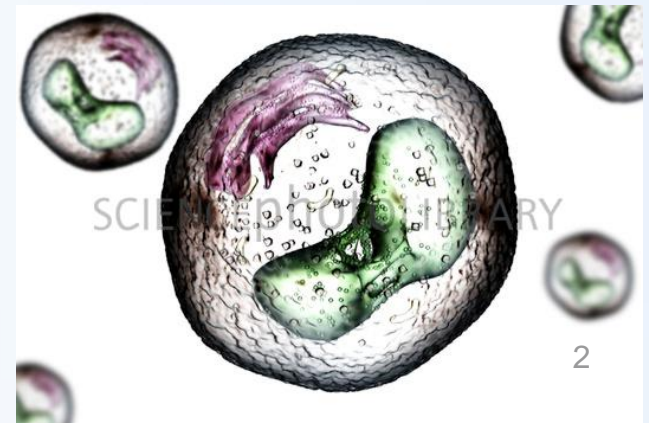
Co nás zajímá a jak to zjistíme

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

podzim 2016

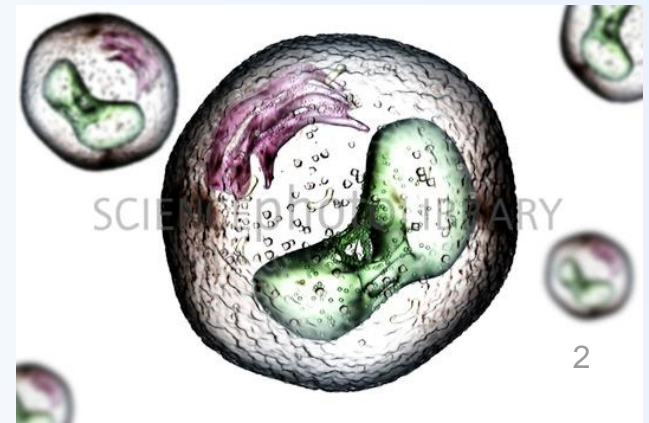
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ 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



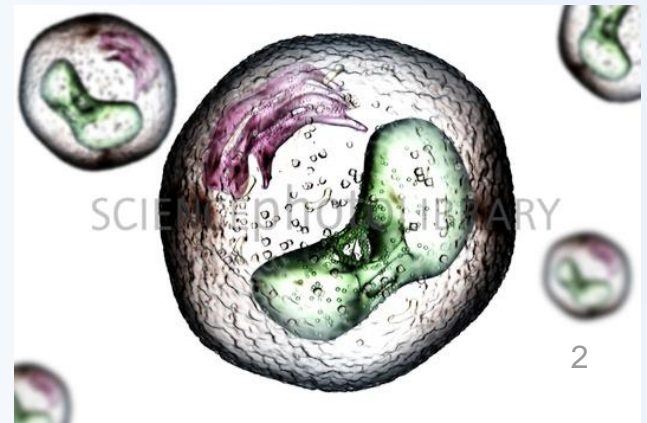
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ **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



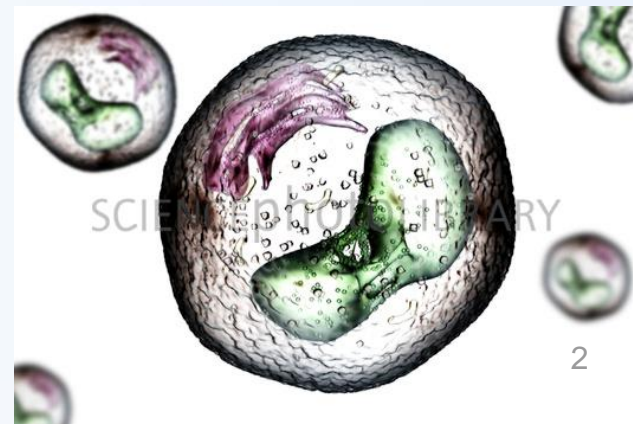
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ **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



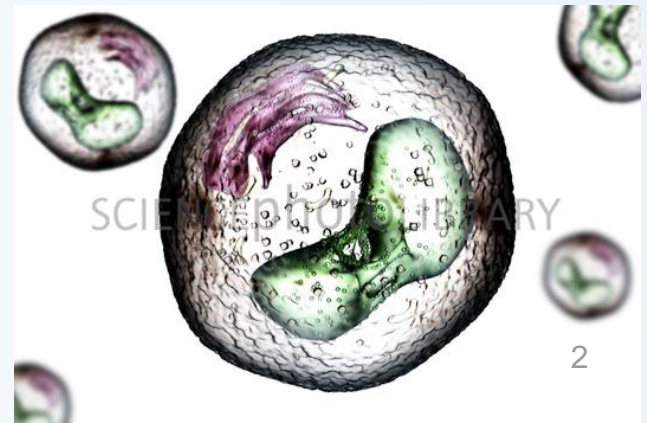
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ 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



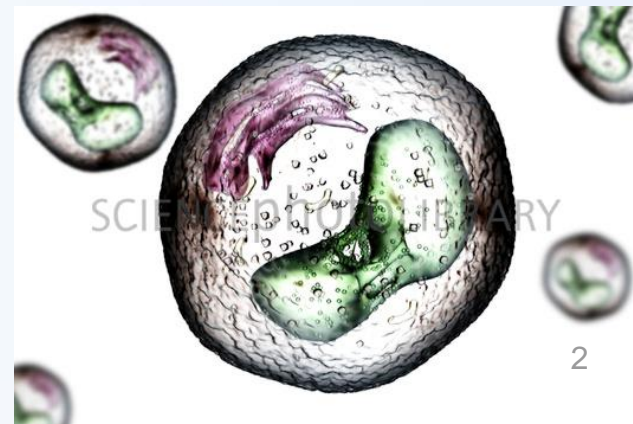
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ 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



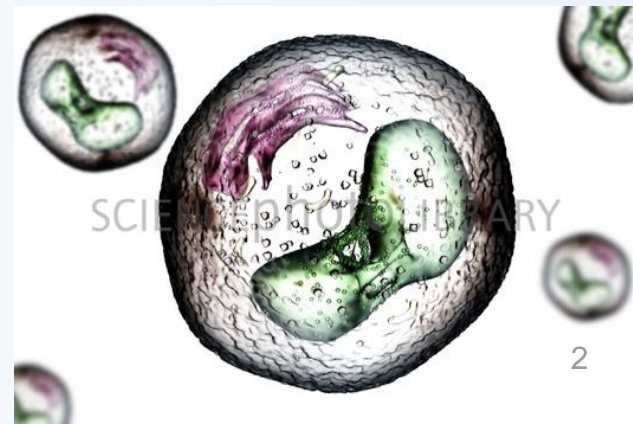
CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ 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

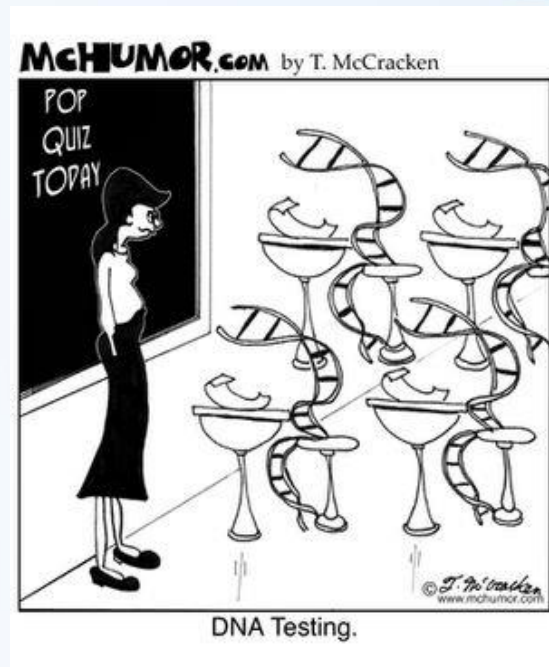
- ✓ Jak namnožit NK
- ✓ Jak zjistit sekvenci NK
- ✓ Co to je transkriptom a k čemu nám je
- ✓ Co to je (eko)toxigenomika
- ✓ Jak zapnout či vypnout gen
- ✓ Jak zkoumat genotoxicitu



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



Research centre
for toxic compounds
in the environment



NK: PROČ ZKOU MÁME?

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



NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- METYLOVÝ OTISK
- STRUKTURA MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- GENOMOVÝ PROFIL
- GENOVÁ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- REPARACE DNA



NK: PROČ ZKOUMÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- METYLAČNÍ OTISK
- GENOMIKA MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- GENOMIKA VÝŽIVY
- GENOMIKA ŽIVOTNÍHO CYKLU
- GENOMIKA EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- REPARACE DNA



NK: PROČ ZKOU MÁME?

- NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE ⇒ analýza variací
- POLYMORFISMUS DNA ⇒ bodový nebo repetitivní
- GENETICKÝ OTISK
- EKOTOXIKOLOGICKÉ MONITOROVÁNÍ MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA
- GENOMIKA
- GENOVÁ EXPRESE, REGULACE A FUNKCE
- REPARACE 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
- REPARACE 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
- STRUKTURA 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





**BORN TO
PCR**

PCR aneb JAK NAMNOŽIT NE/SPECIFICKÝ ÚSEK NK?



PCR: „KOPÍRKA“ 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. atd. atd.



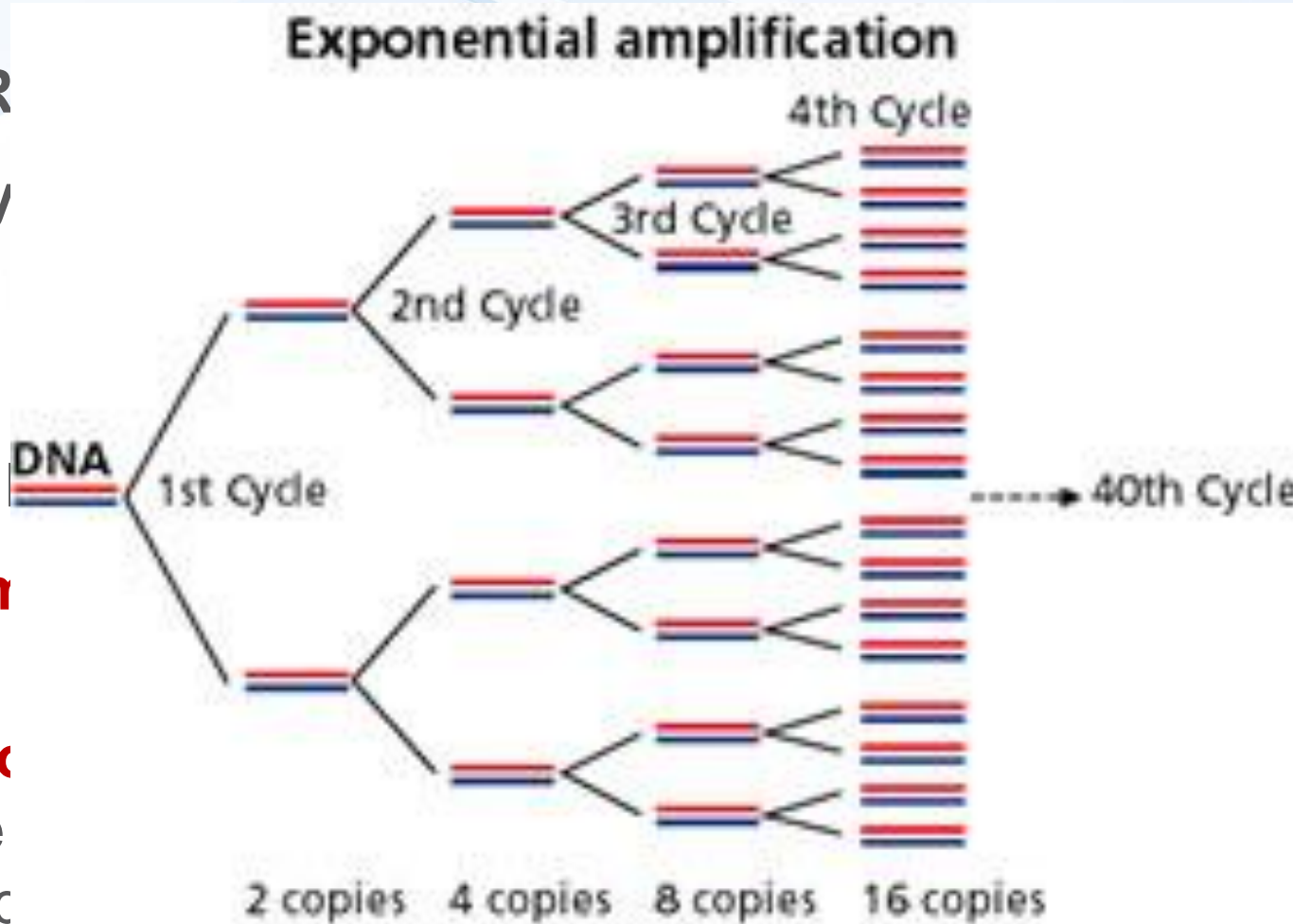
PCR: „KOPÍRKA“ PRO DNA

☐ PCR

☐ Poly

„polyn
vitro

„řetěz
reakce
atd. atc



kulární

ace in

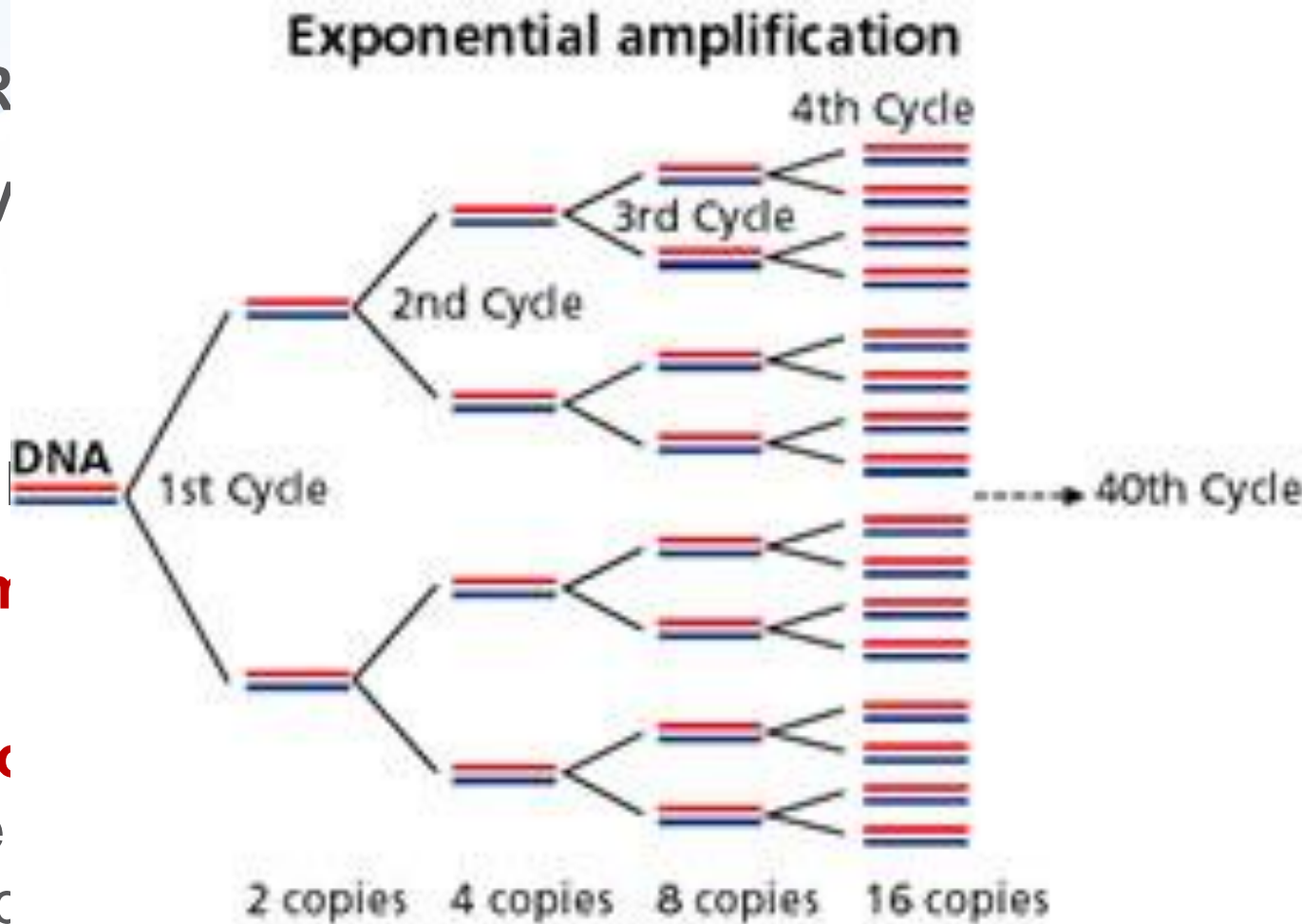
: první
d. atd.



PCR: „KOPÍRKA“ PRO DNA

- PCR
- Poly

„polyn
vitro
„řetěz
reakce
atd. atc



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

kulární

ace in

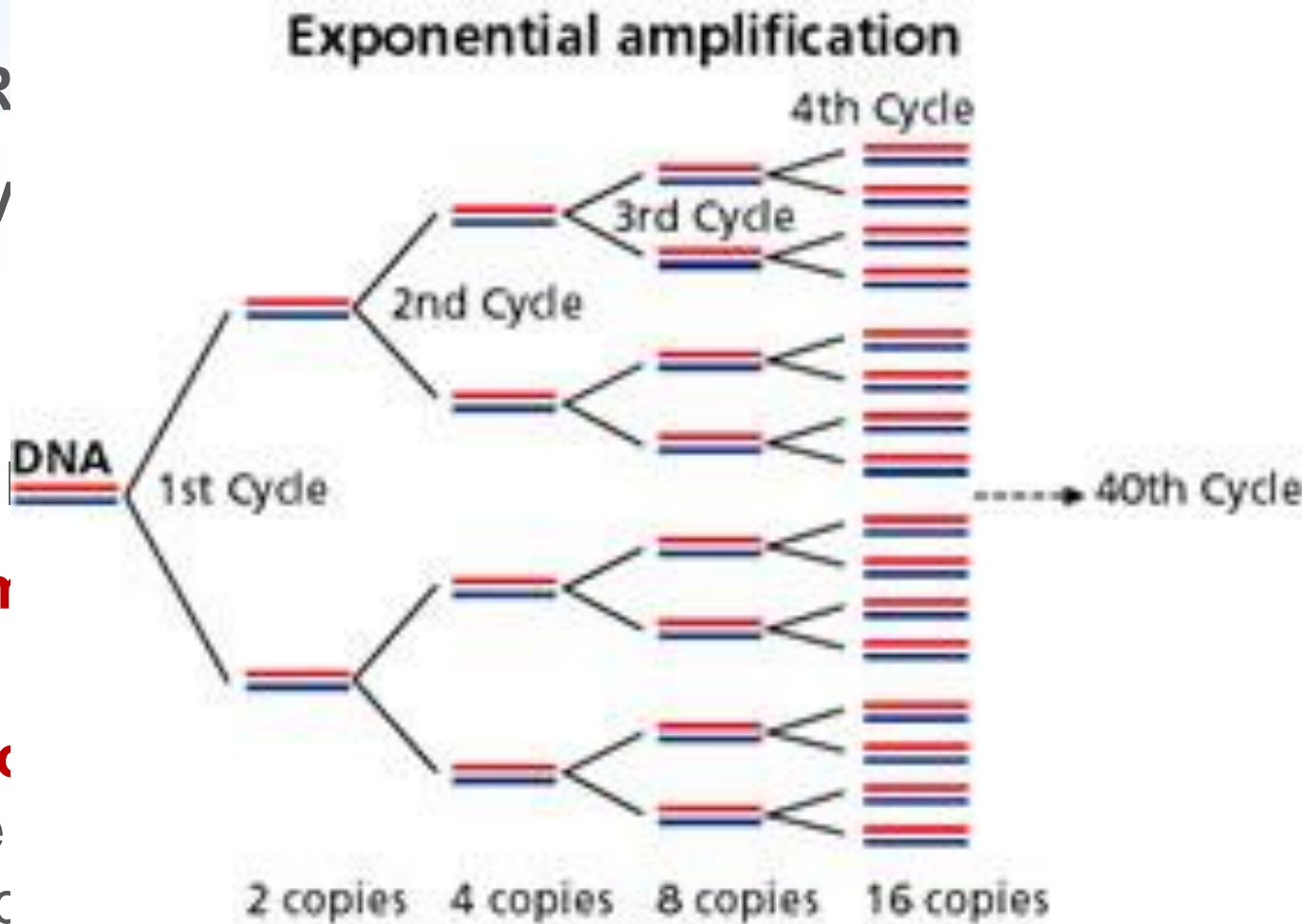
: první
d. atd.



PCR: „KOPÍRKA“ PRO DNA

- PCR
- Poly

„polyn
vitro
„řetěz
reakce
atd. atc



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

kulární

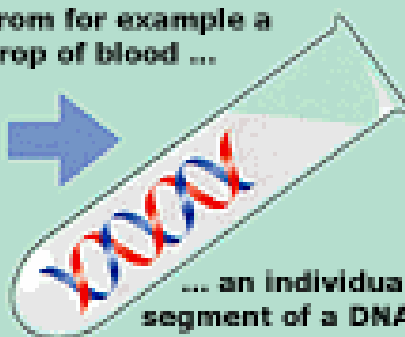
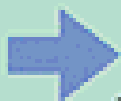
ace in

: první
d. atd.

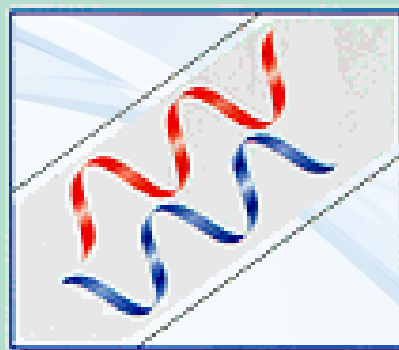




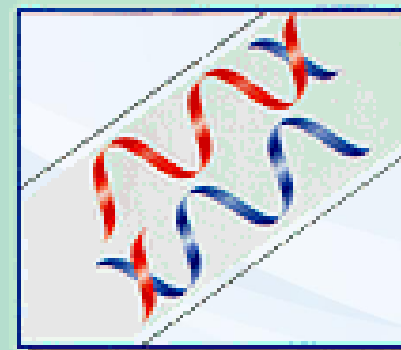
From for example a drop of blood ...



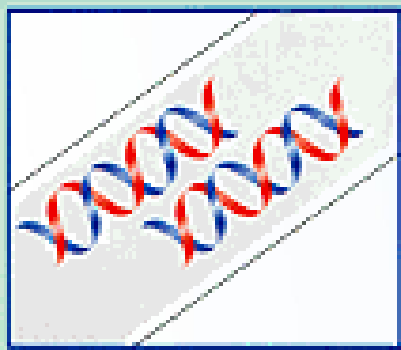
... an individual segment of a DNA molecule is extracted



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

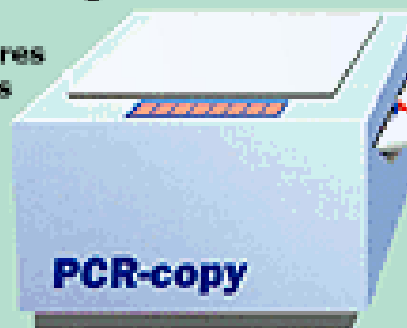


The temperature is lowered about 55°C and synthetic DNA fragments are added. These bind to the strands at the correct positions.

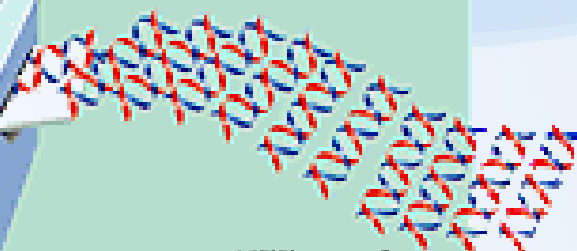


The temperature is now raised to about 70°C and the enzyme DNA polymerase which is added builds up two new complete copies of the DNA strands.

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 rRNA)

⇒ Nespecifické



PCR: CO POTŘEBUJEME? I.

1. TEM
DNA

2. PRIM

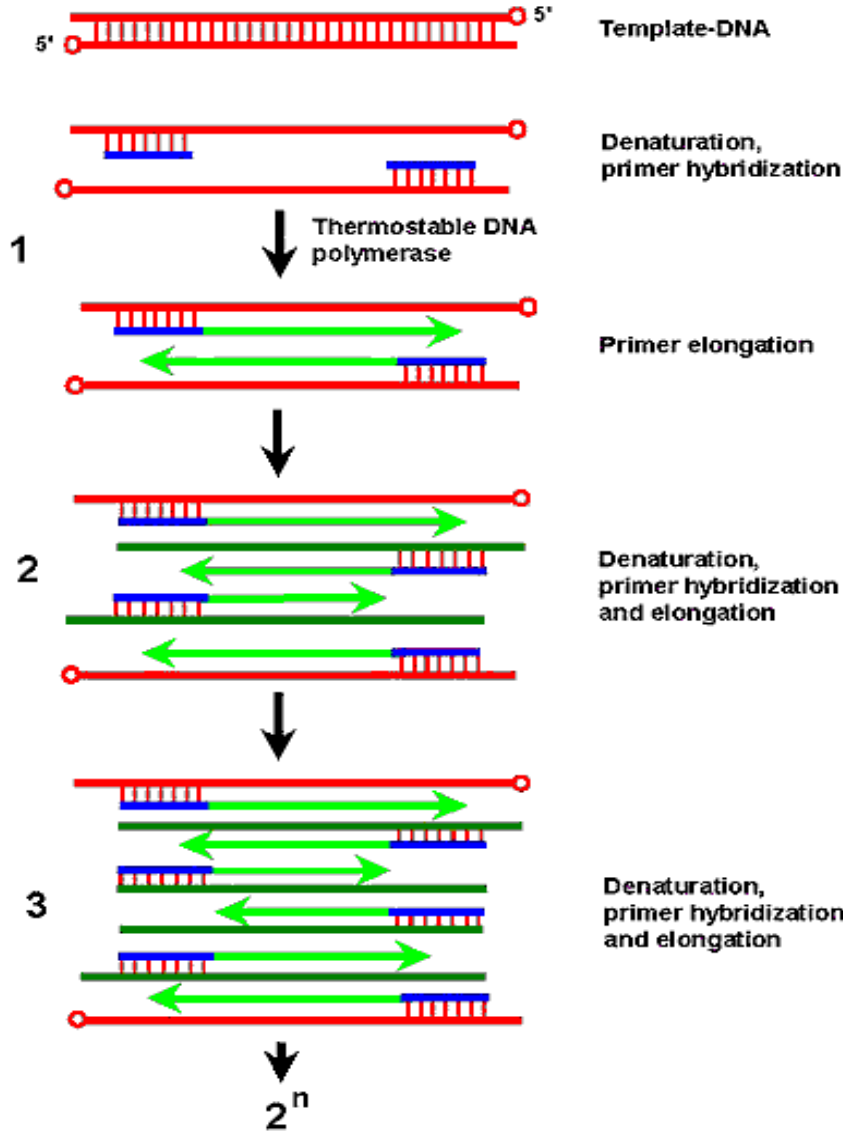
⇒ Sp

- g

- k

⇒ Ne

Polymerase chain reaction (PCR)



otidy DNA

řenašeč atd.)



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'

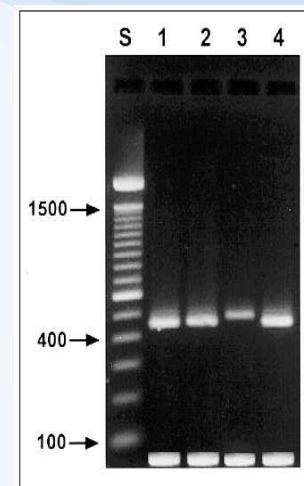


Primer 1

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
termocyklieru



Techne TC-PLUS (2010)



Biometra T1 (1999)



Eppendorf
Mastercycler EP
(2003)



G-STORM GS4 (2006)



Biometra Topical
(2012)



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:



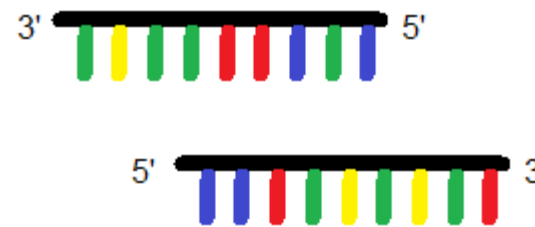
Pufr



Hořčík



ddH₂O

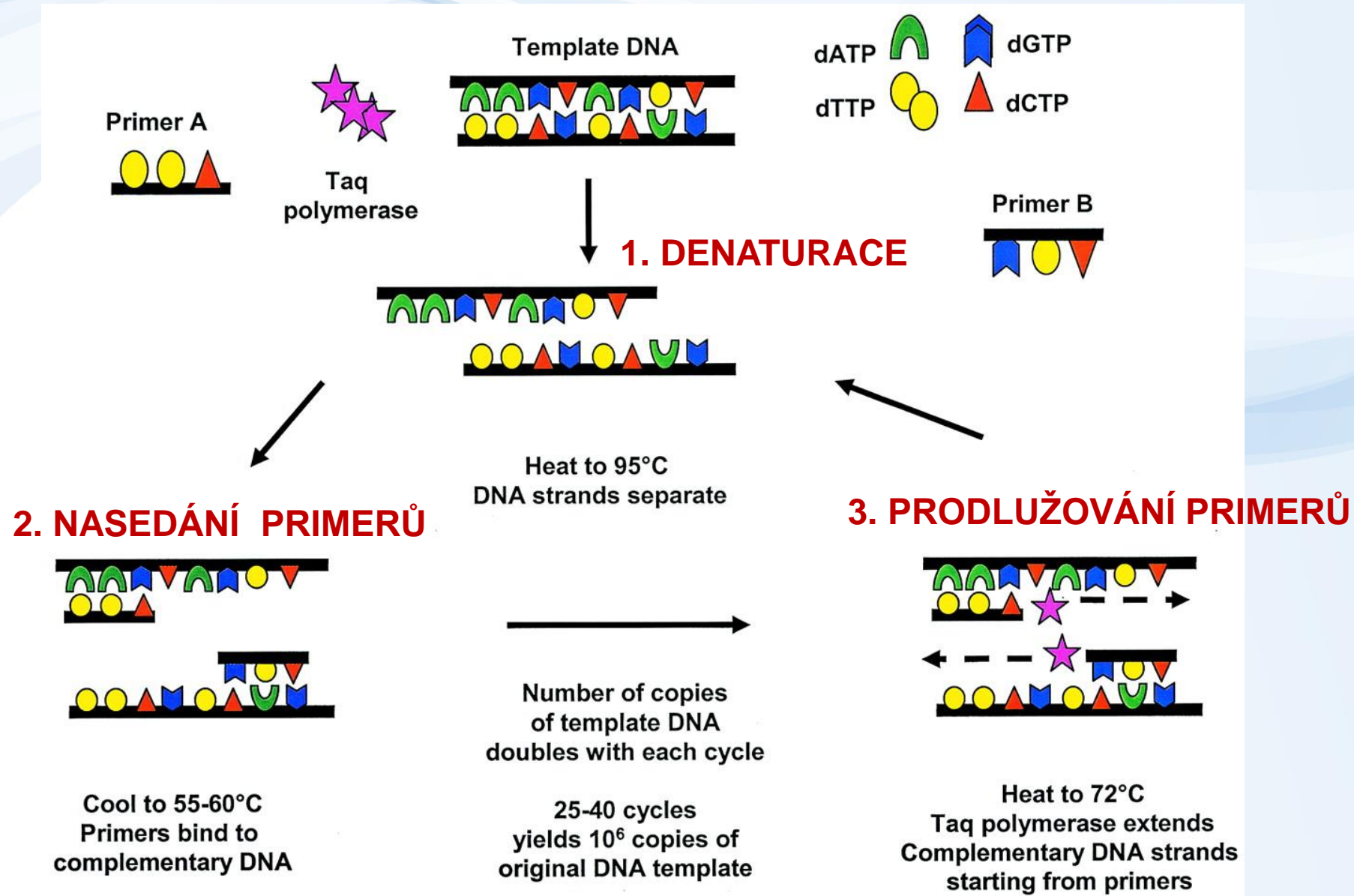


Primery




VIDEO

⇒ <http://www.dnalc.org/view/15475-The-cycles-of-the-polymerase-chain-reaction-PCR-3D-animation.html>



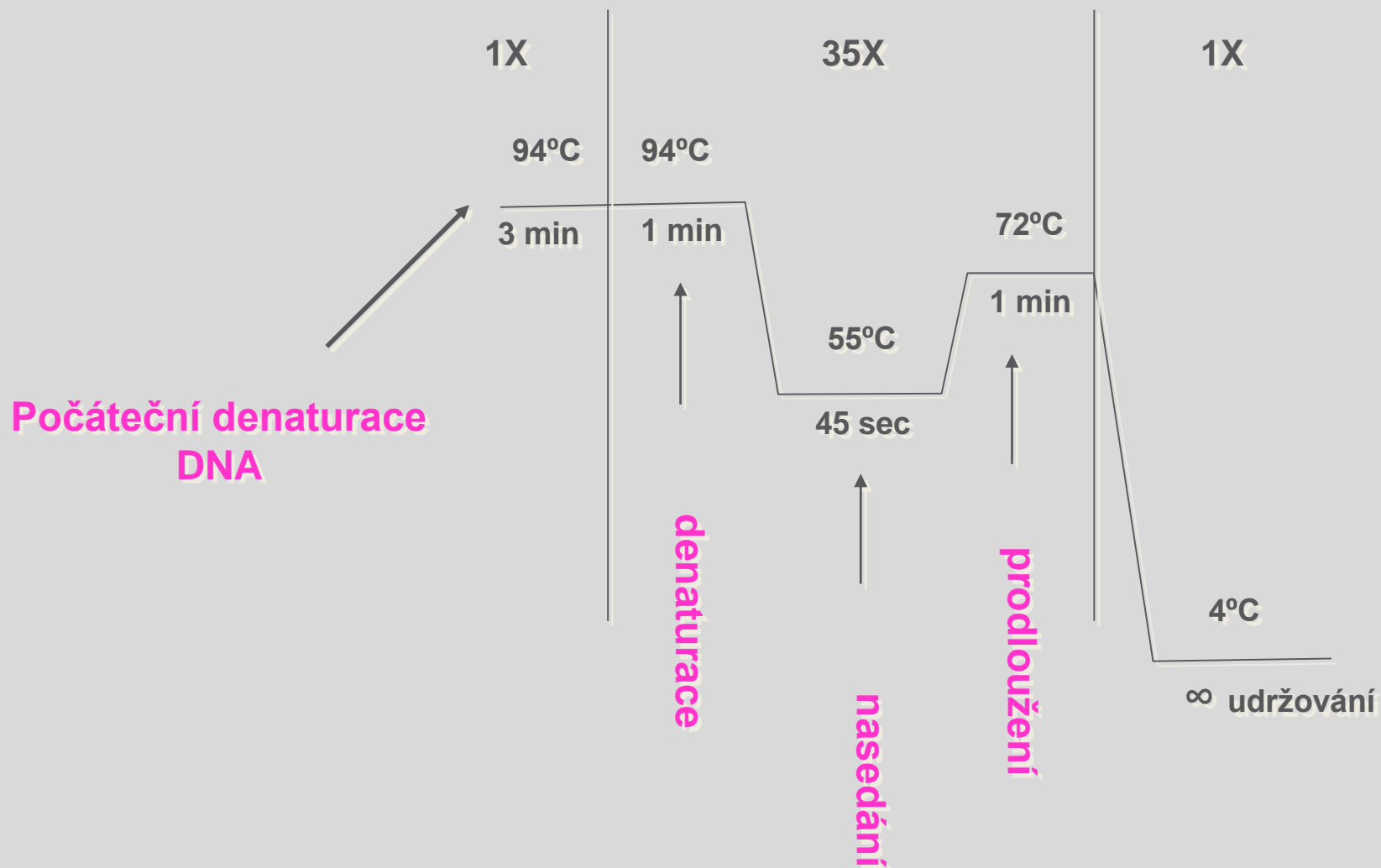
Research centre for toxic compounds in the environment

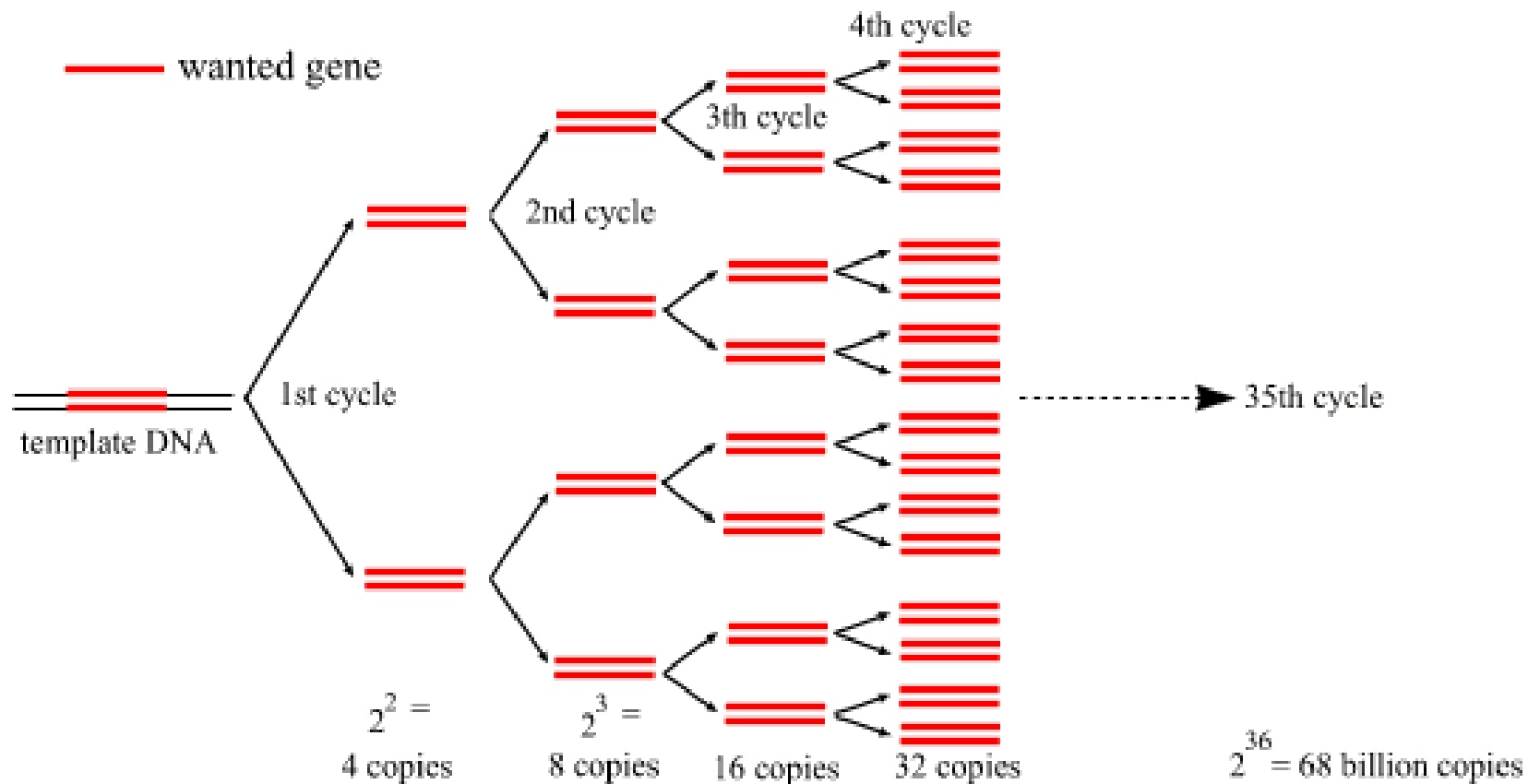
Obvyklé teploty & časy PCR

Počáteční denaturace	90° – 95° C	1 – 3 min	 20 – 40 cyklů
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		



Obvyklé teploty & časy PCR





po n-tém cyklu => 2^n molekul DNA

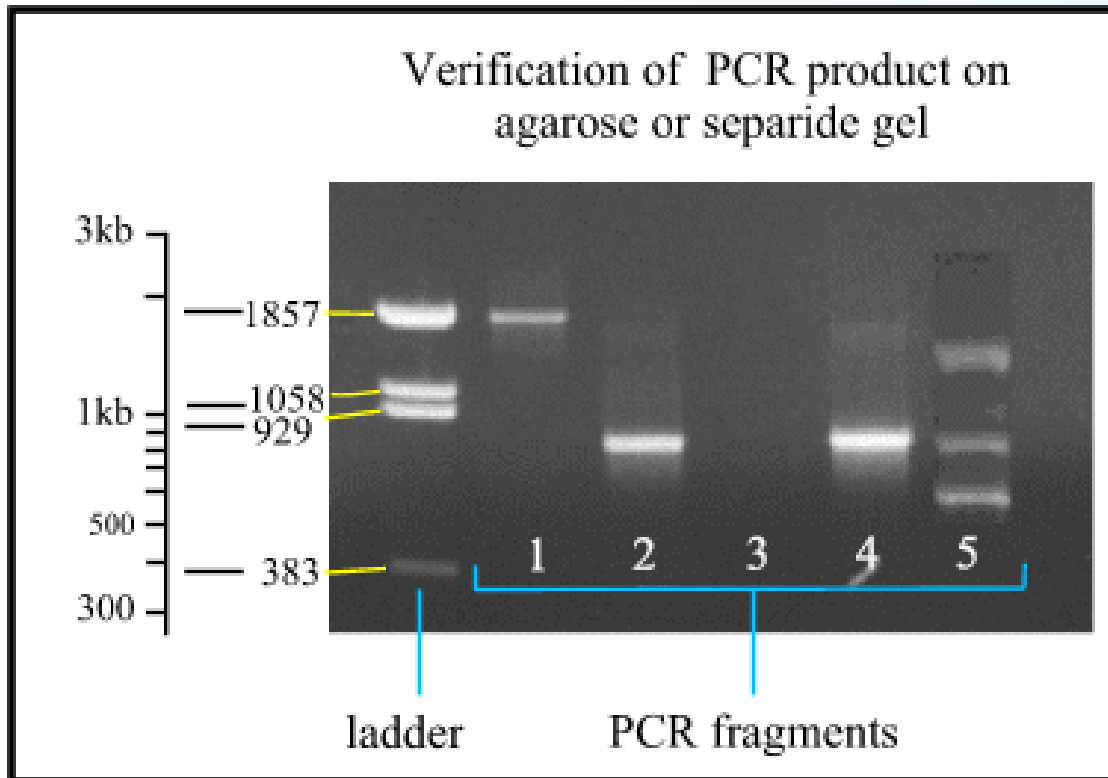
(Andy Vierstraete 1999)



PCR: JAK DETEKUJEME NAMNOŽENÉ KOPIE DNA?

□ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

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



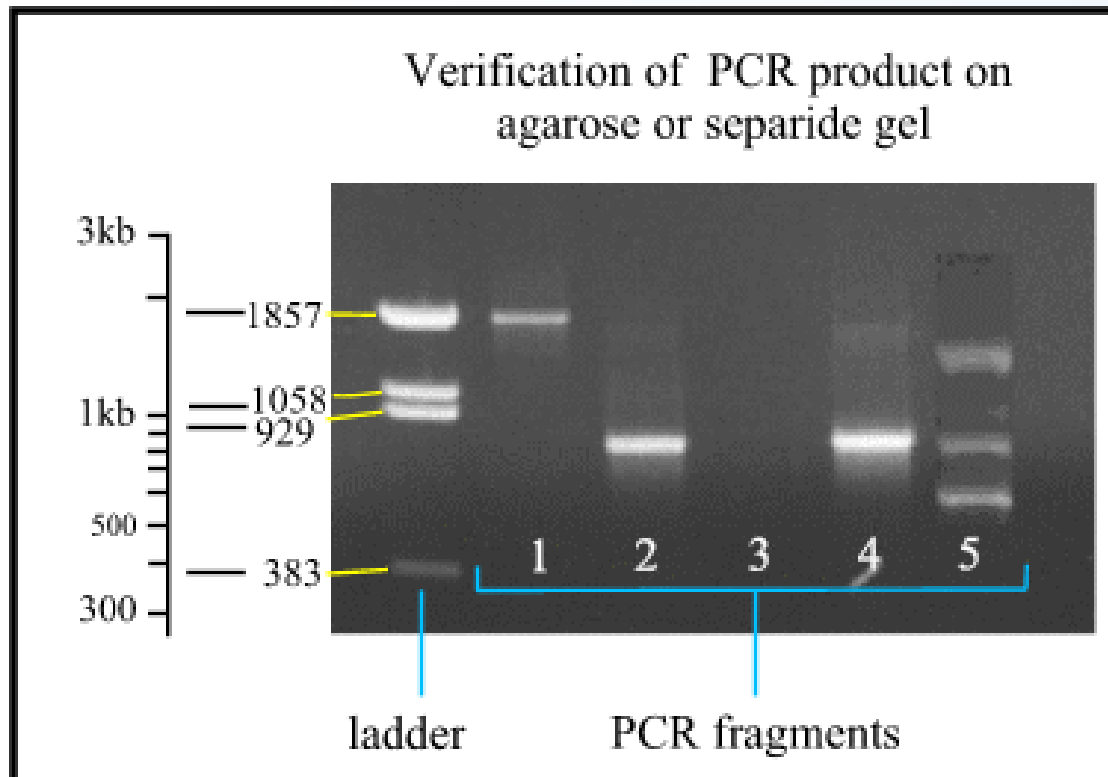
- potvrzení specificity fragmentu sekvenačními metodami



PCR: JAK DETEKUJEME NAMNOŽENÉ KOPIE DNA?

□ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

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



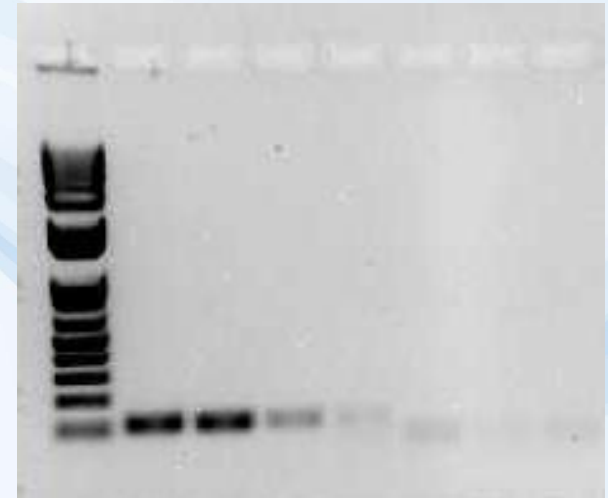
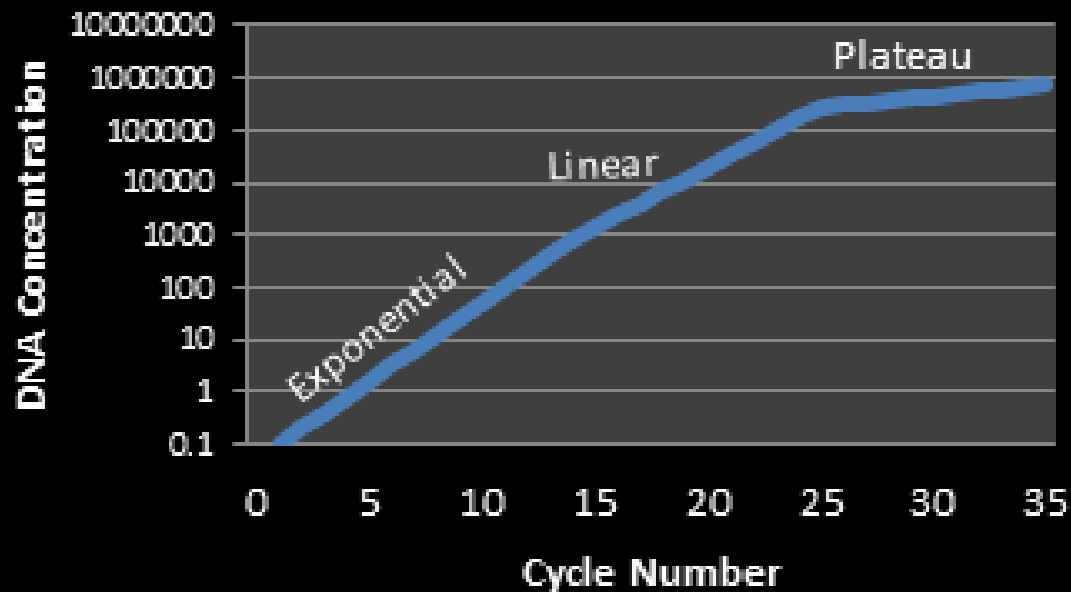
□ potvrzení specificity fragmentu sekvenačními metodami

⇒ **KONVENČNÍ PCR**
(„end-point“ PCR)



KONVENČNÍ PCR: LIMITACE

Phases of a PCR reaction



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



Research centre
for toxic compounds
in the environment

KONVENČNÍ PCR: LIMITACE

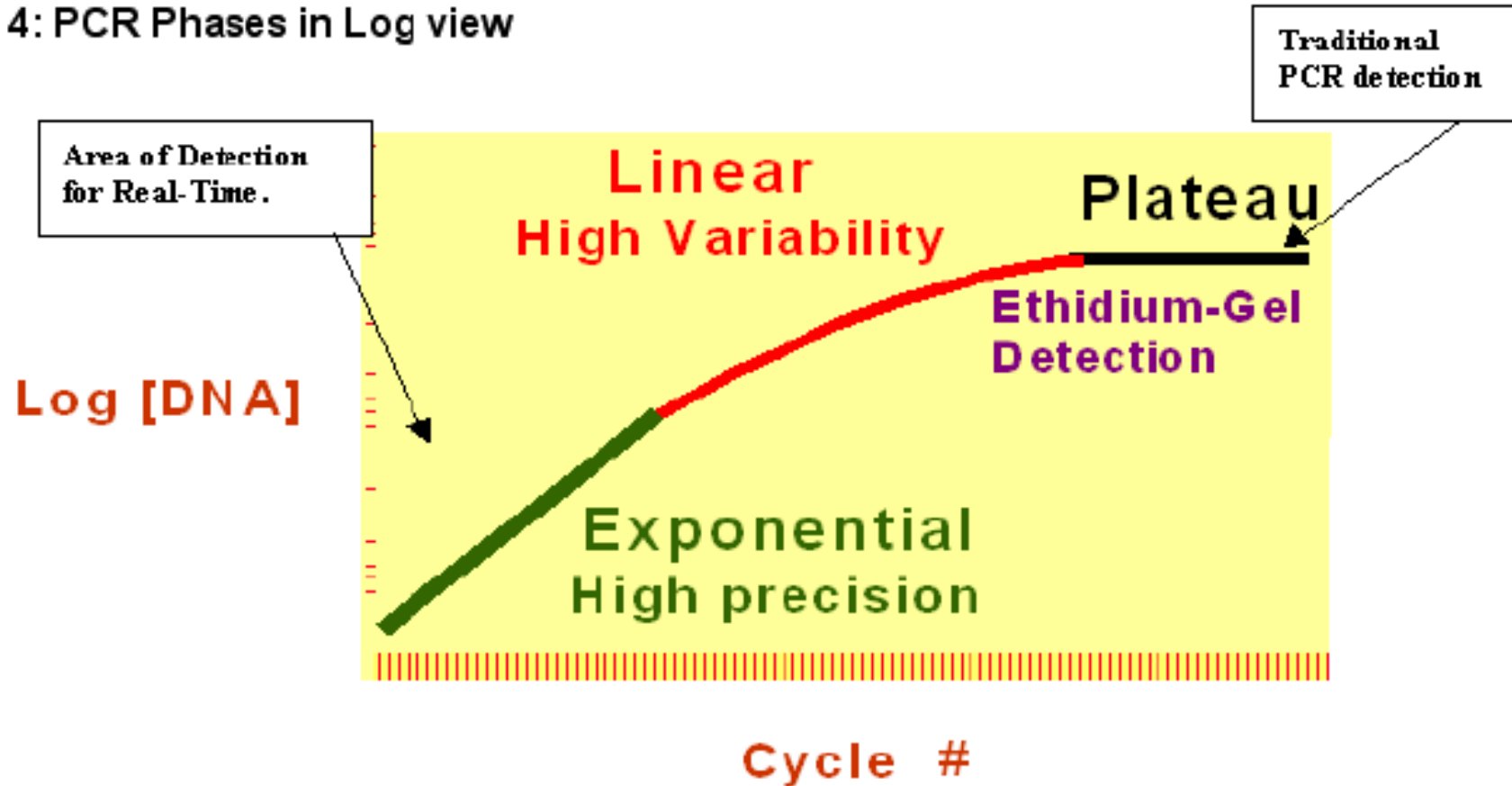
- ↓ citlivost
- ↓ rozlišení
- ↓ dynamický rozsah $< 2 \text{ logs}$
- neautomatizovatelná
- pouze rozlišení velikosti
- ethidium bromid je spíše pro semikvantitativní barvení



qPCR: DETEKCE V REÁLNÉM ČASE

kvantitativní PCR

Figure 4: PCR Phases in Log view

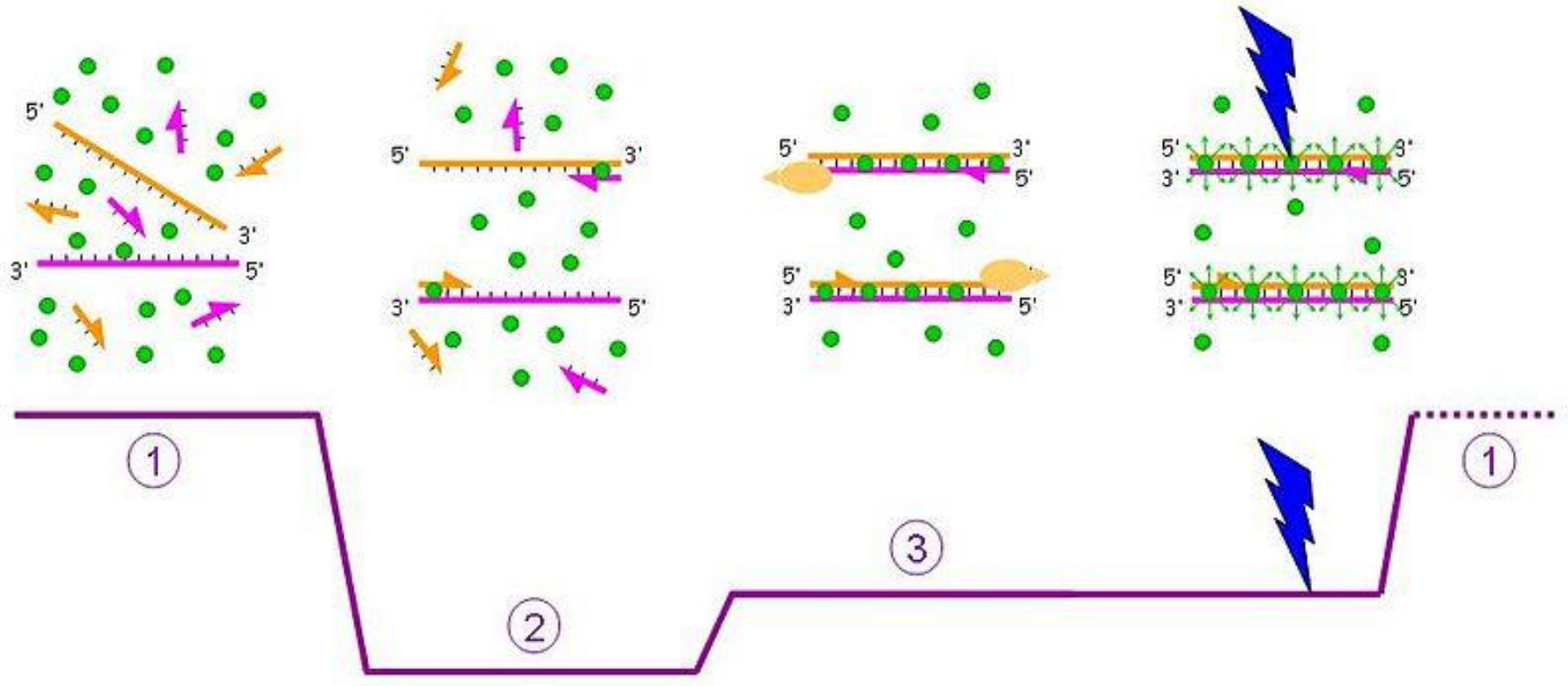


<http://www.gene-quantification.de/block.html>



qPCR: SYBR GREEN I

⇒ fluorescenční barva vázající se na dsDNA

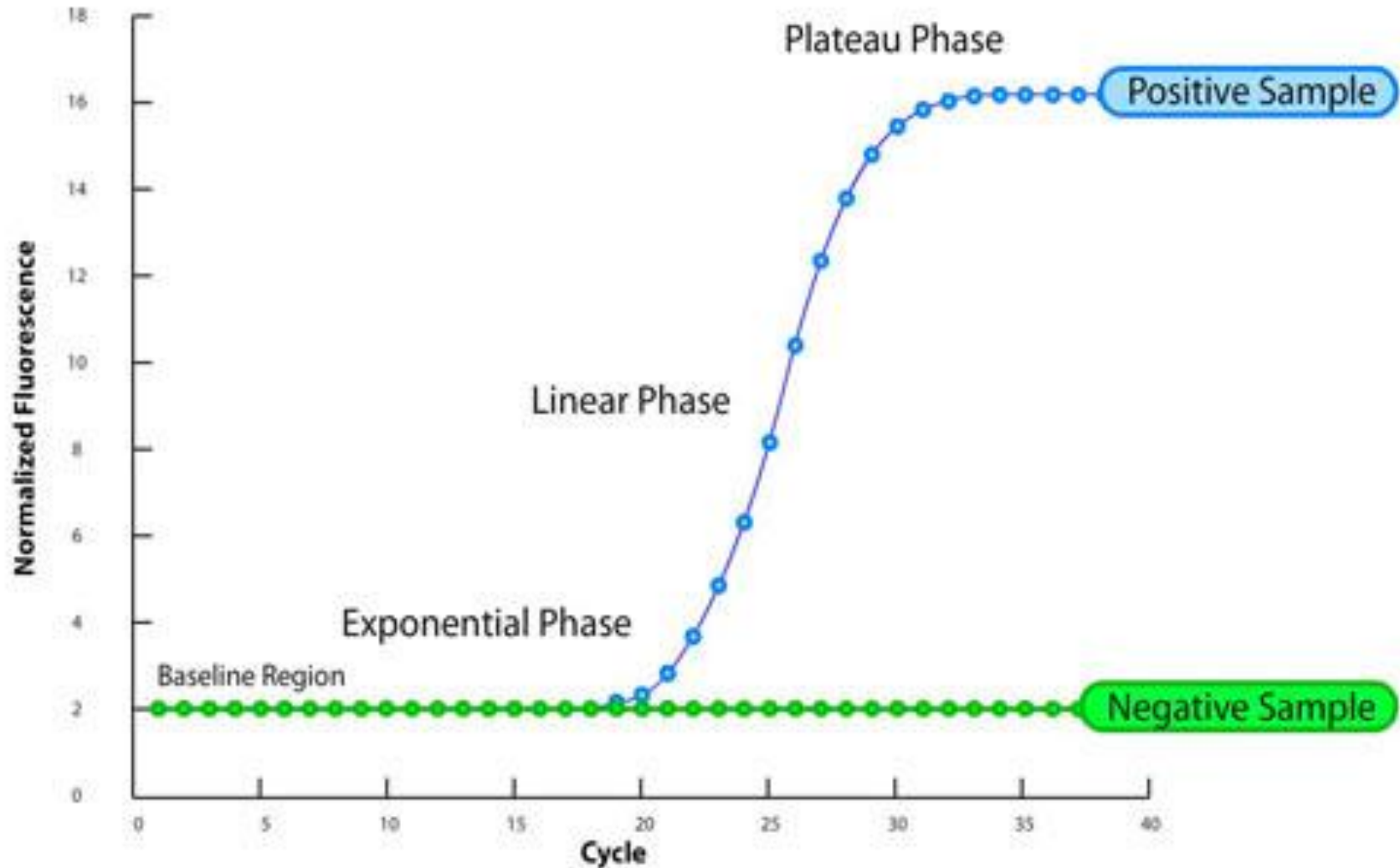


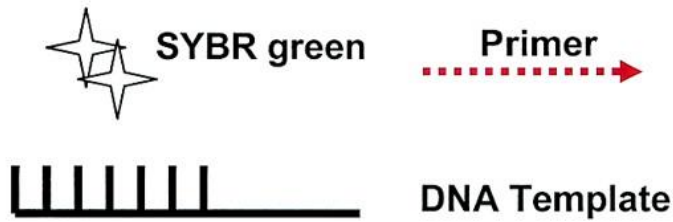
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/sybr-green-based-qpcr/syber-green-animation.html>



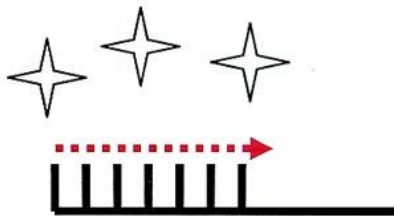
qPCR: SYBR GREEN I

⇒ fluorescenční barva vázající se na dsDNA

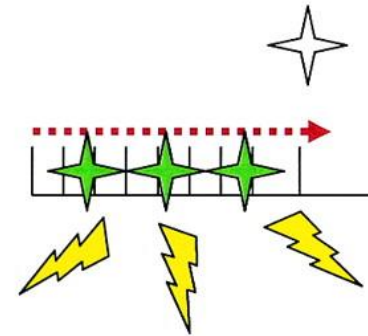




Primer Annealing



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



As PCR progresses, double stranded DNA is produced

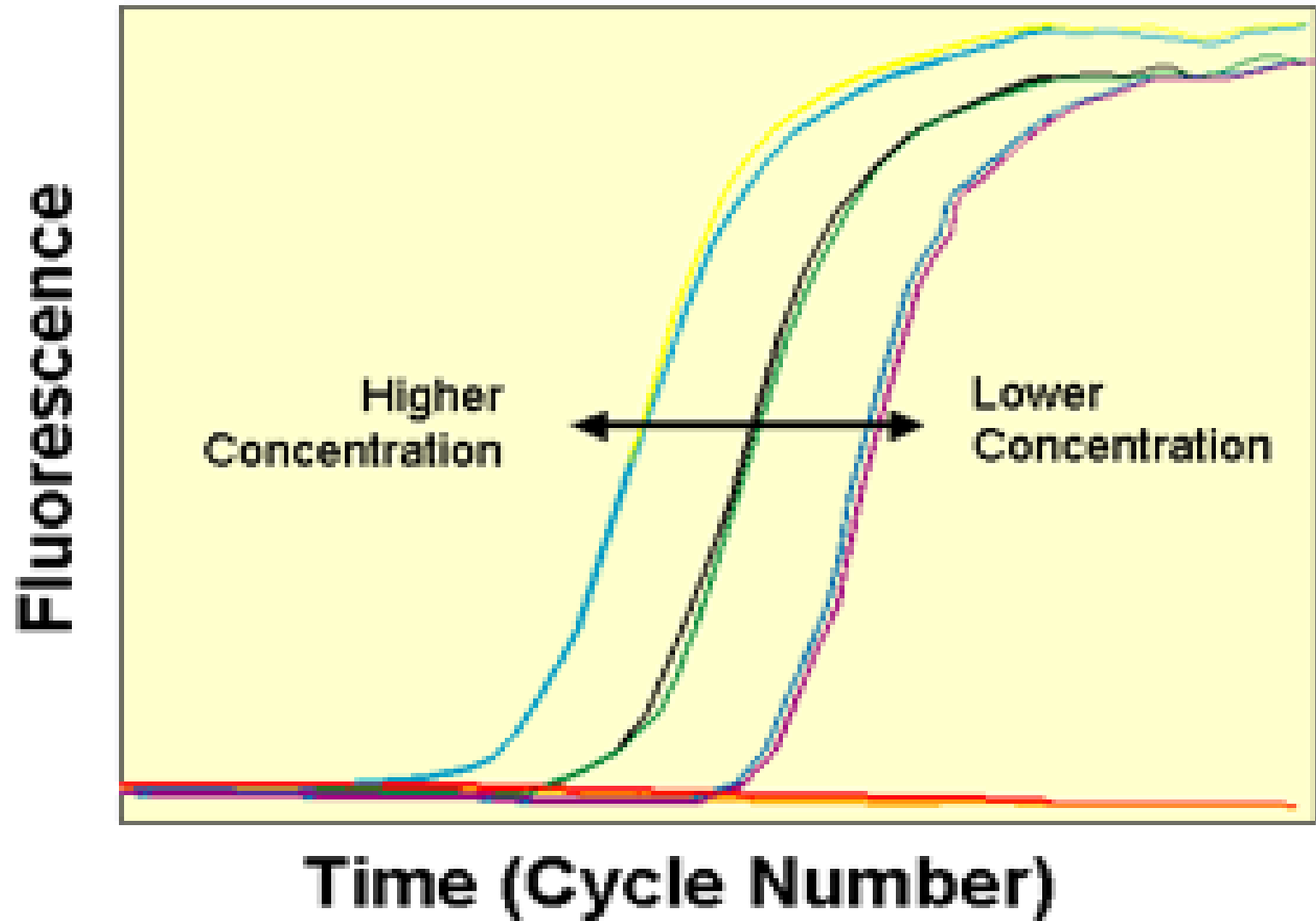
SYBR green intercalates into double stranded DNA products and fluoresces

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

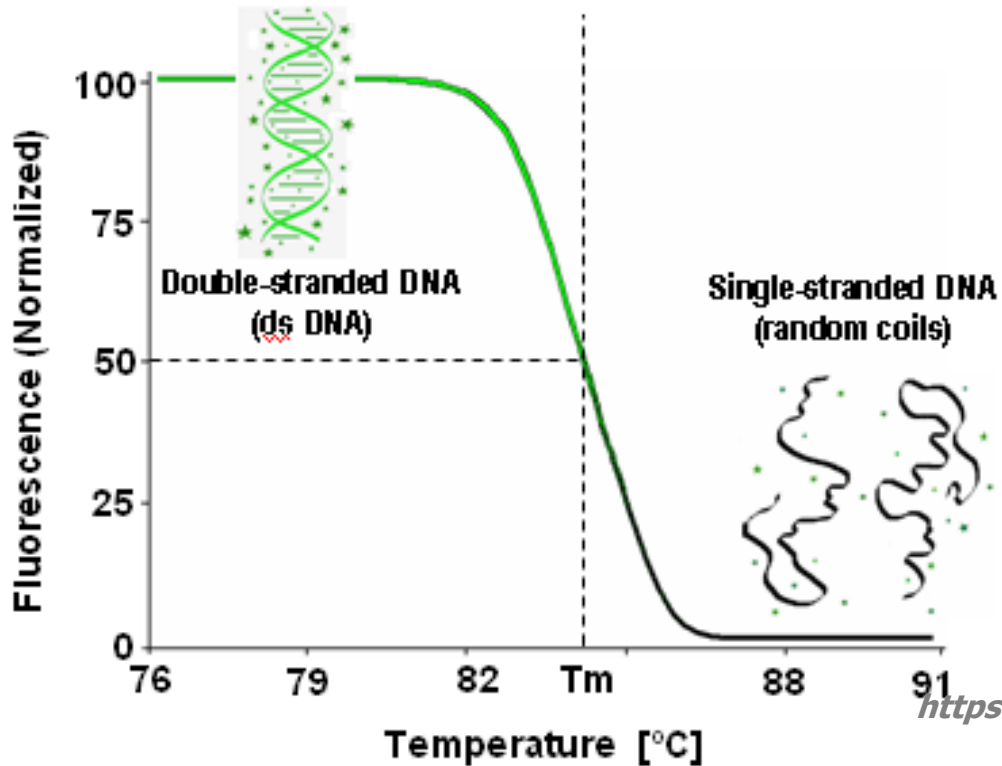


Real-Time Monitoring of PCR

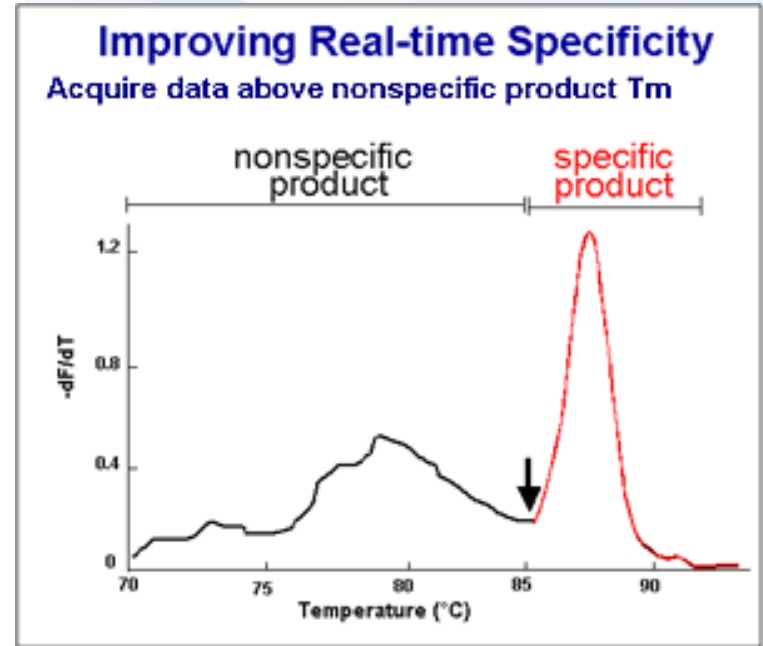


⇒ limitace ⇒ SYBR GREEN se váže nespecificky na jakoukoliv dsDNA (“primer-dimer”, nespecifický produkt atd.)

B. Normalized Melting Curves



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



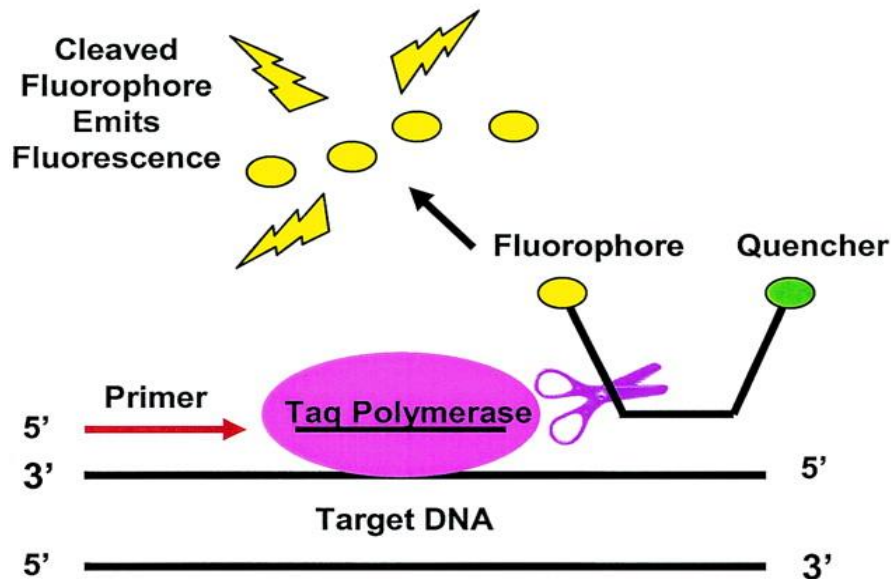
https://dna.utah.edu/LightCycler/Top_LightCycler.html



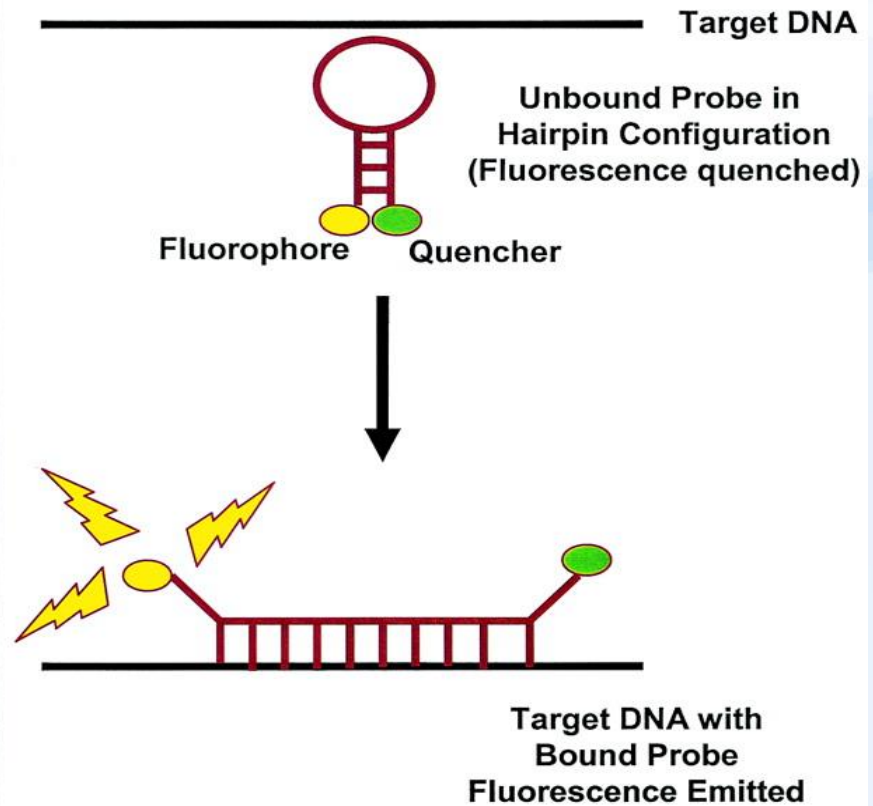
qPCR: PRŮBY

□ Fluorescenčně značené próby vázající se specificky na cílový produkt PCR

5'Nuclease Oligoprobe (Taqman)

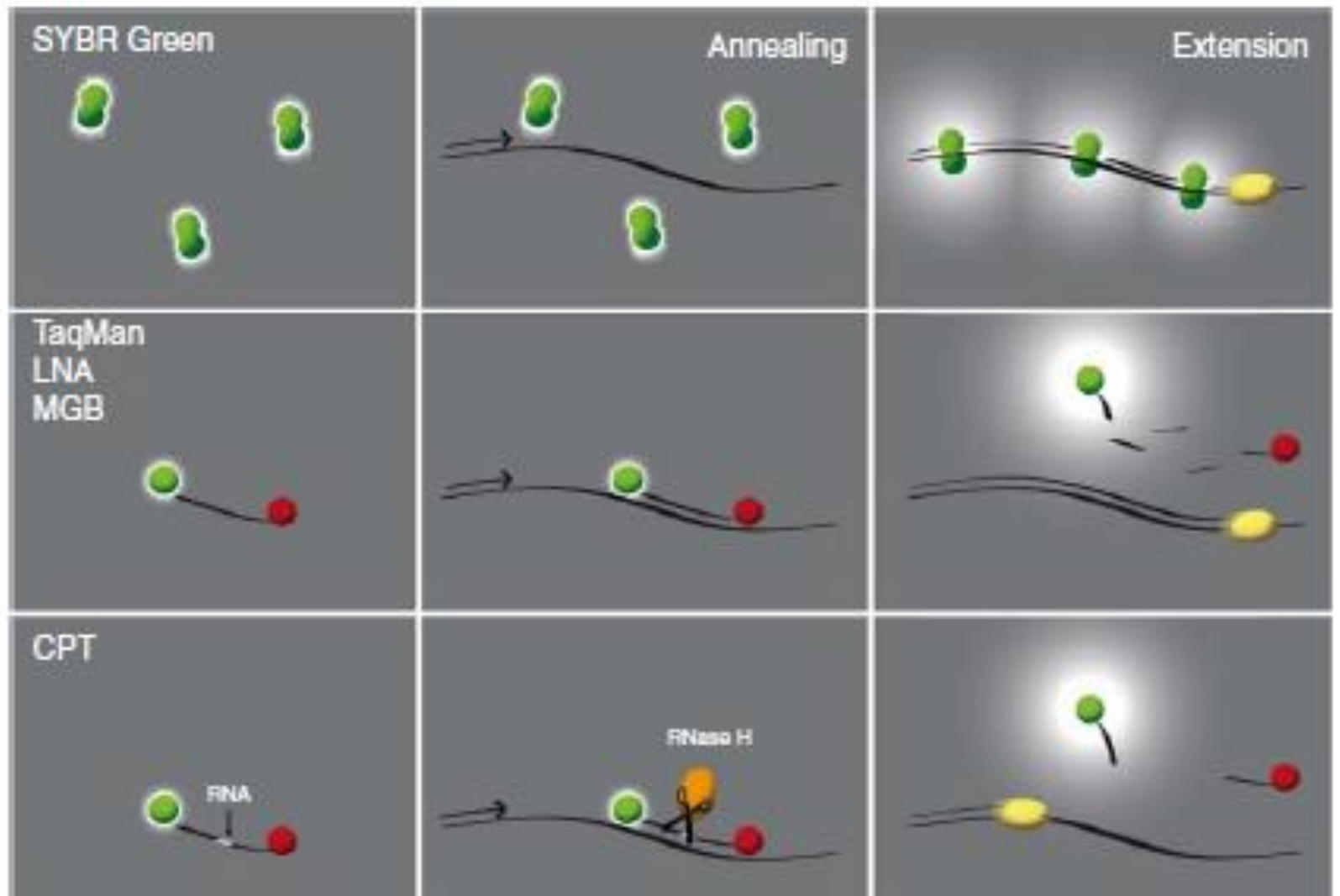


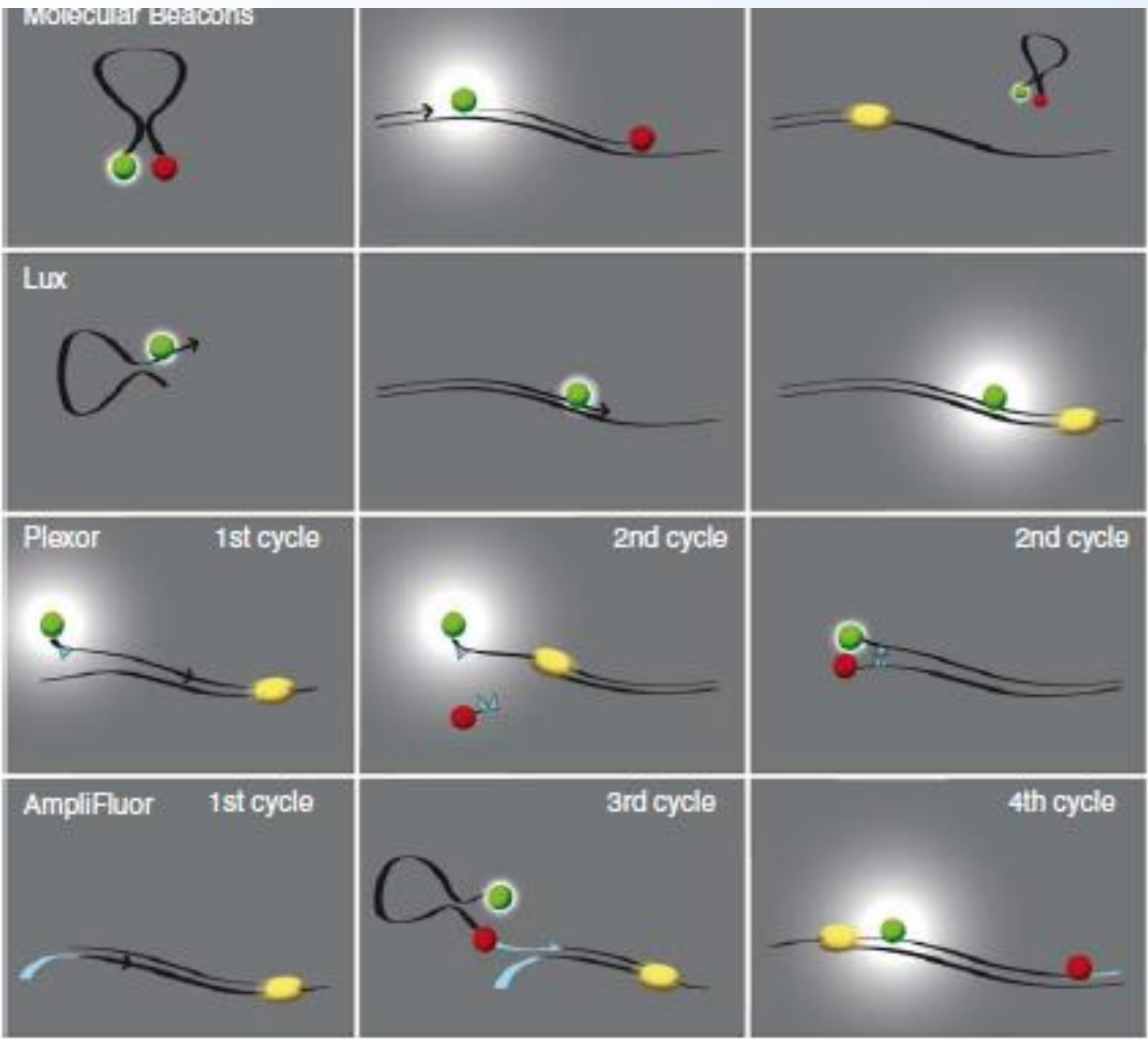
Molecular Beacon Probe



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

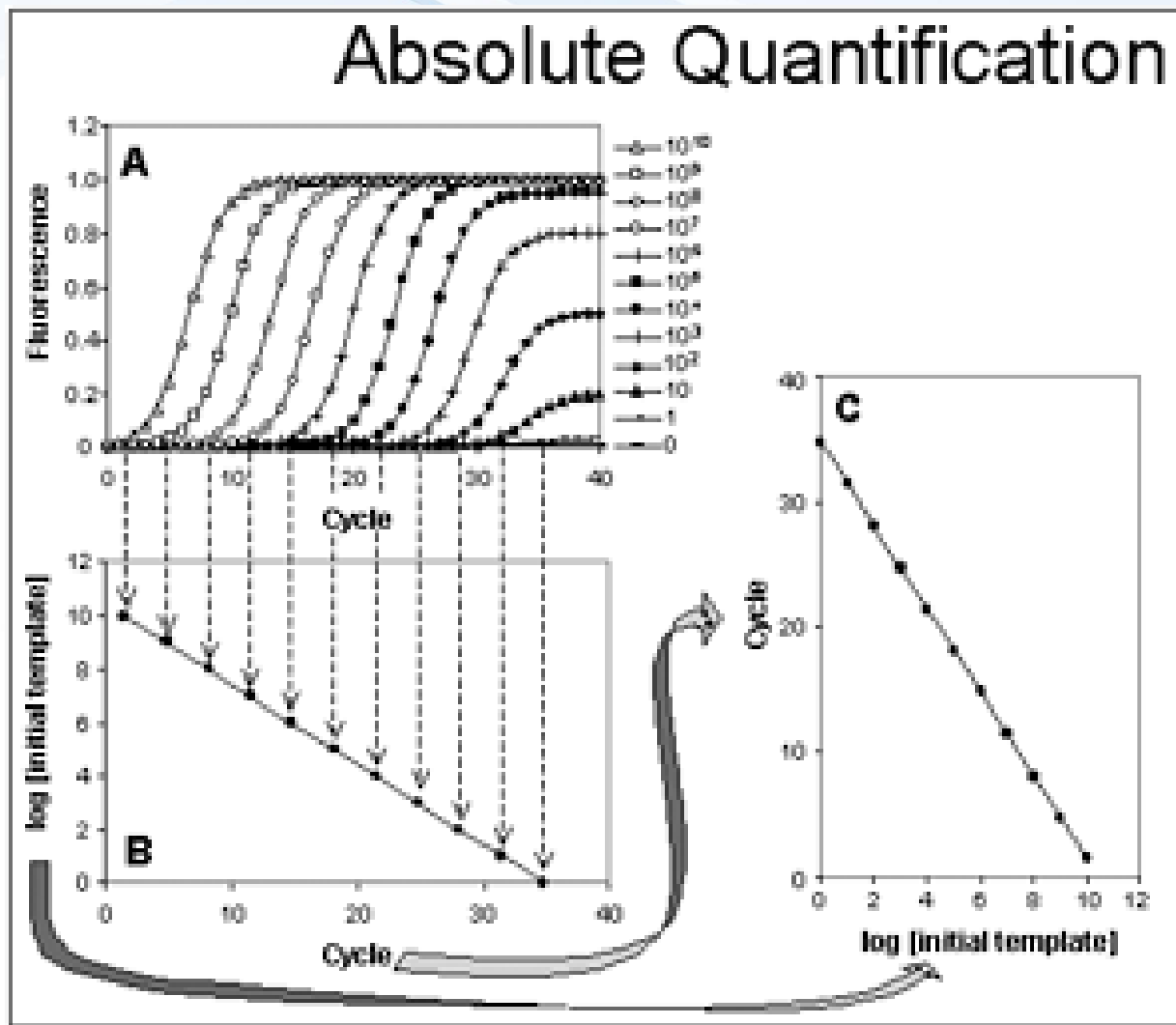
Clinical Microbiology Reviews





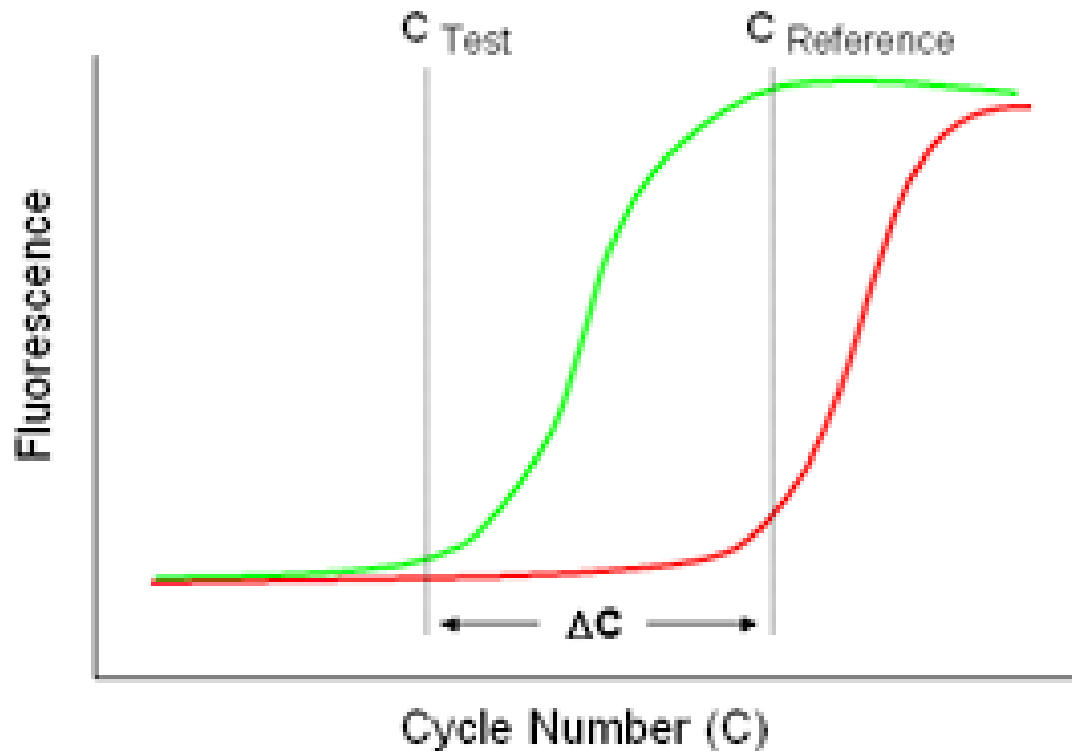
qPCR: KVANTIFIKACE

Absolute Quantification



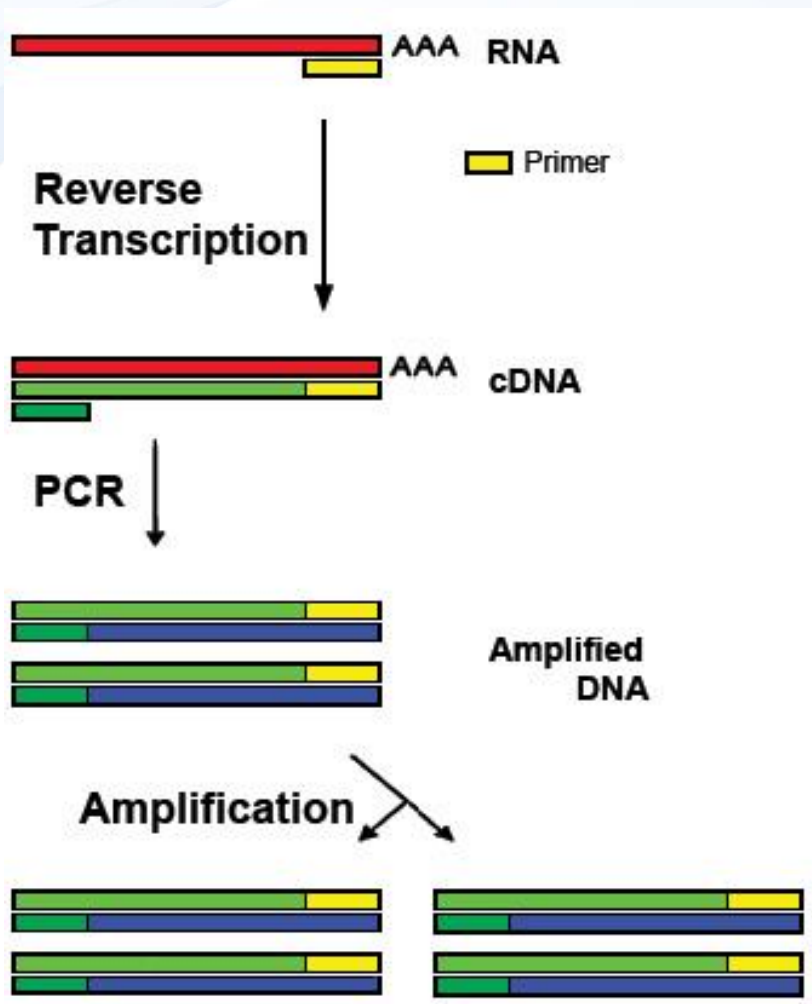
Relative Quantification

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



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>

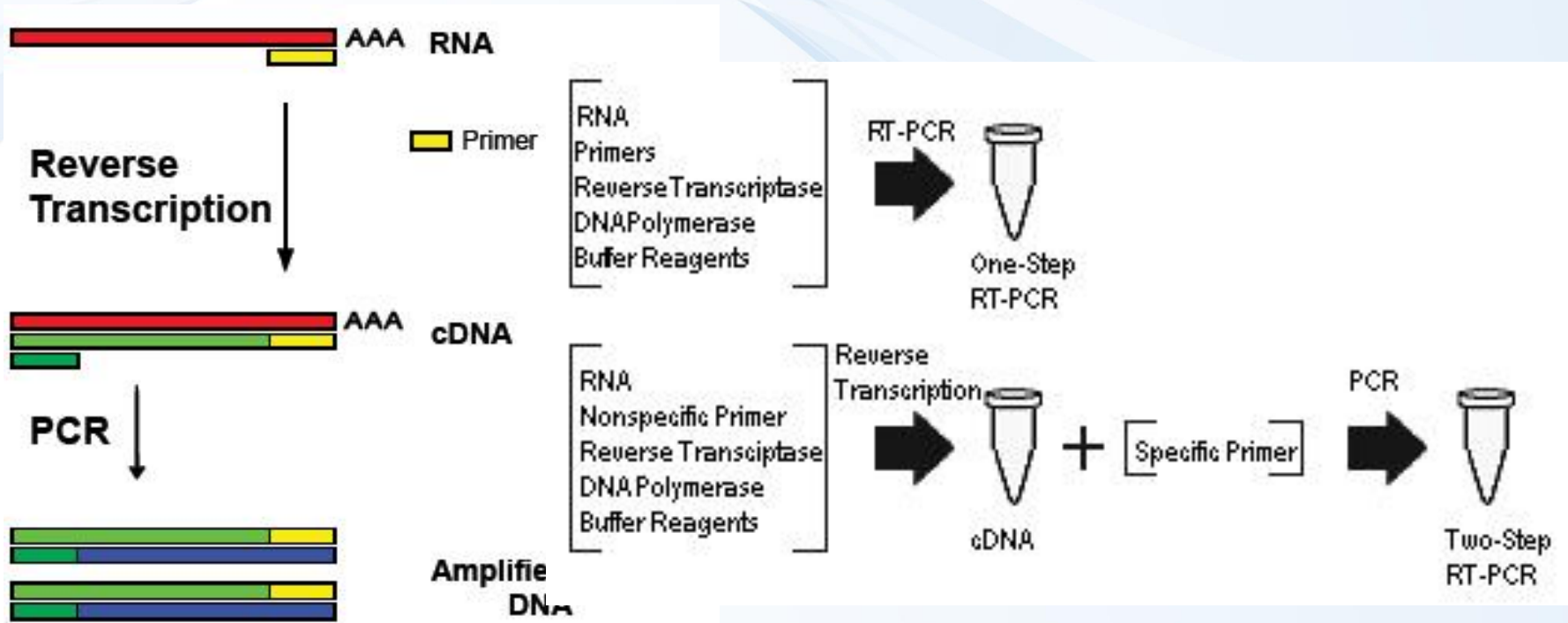
http://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction



Research centre
for toxic compounds
in the environment

RT-(q)PCR: PCR PRO RNA

□ “Reverse transcription polymerase chain reaction”



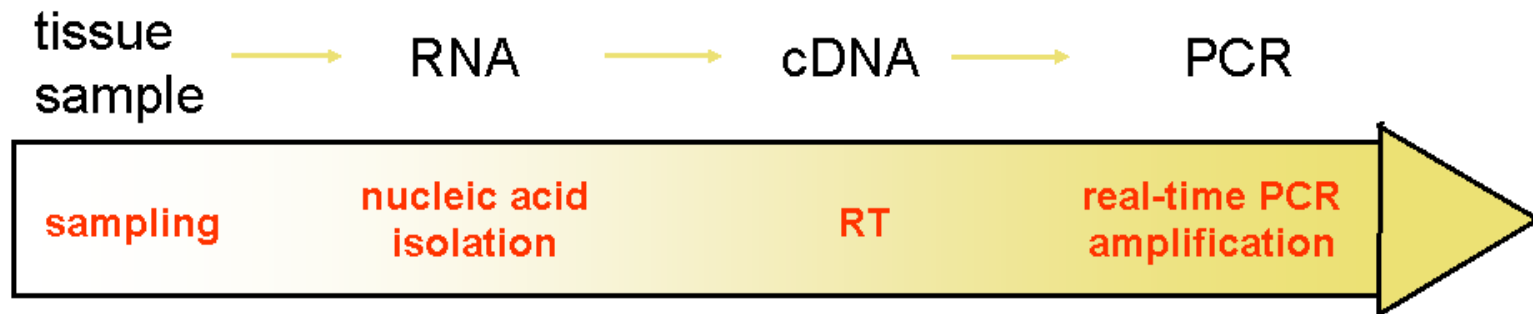
VIDEO ⇒

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

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

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

RT-(q)PCR: KRITÉRIA ÚSPĚŠNOSTI

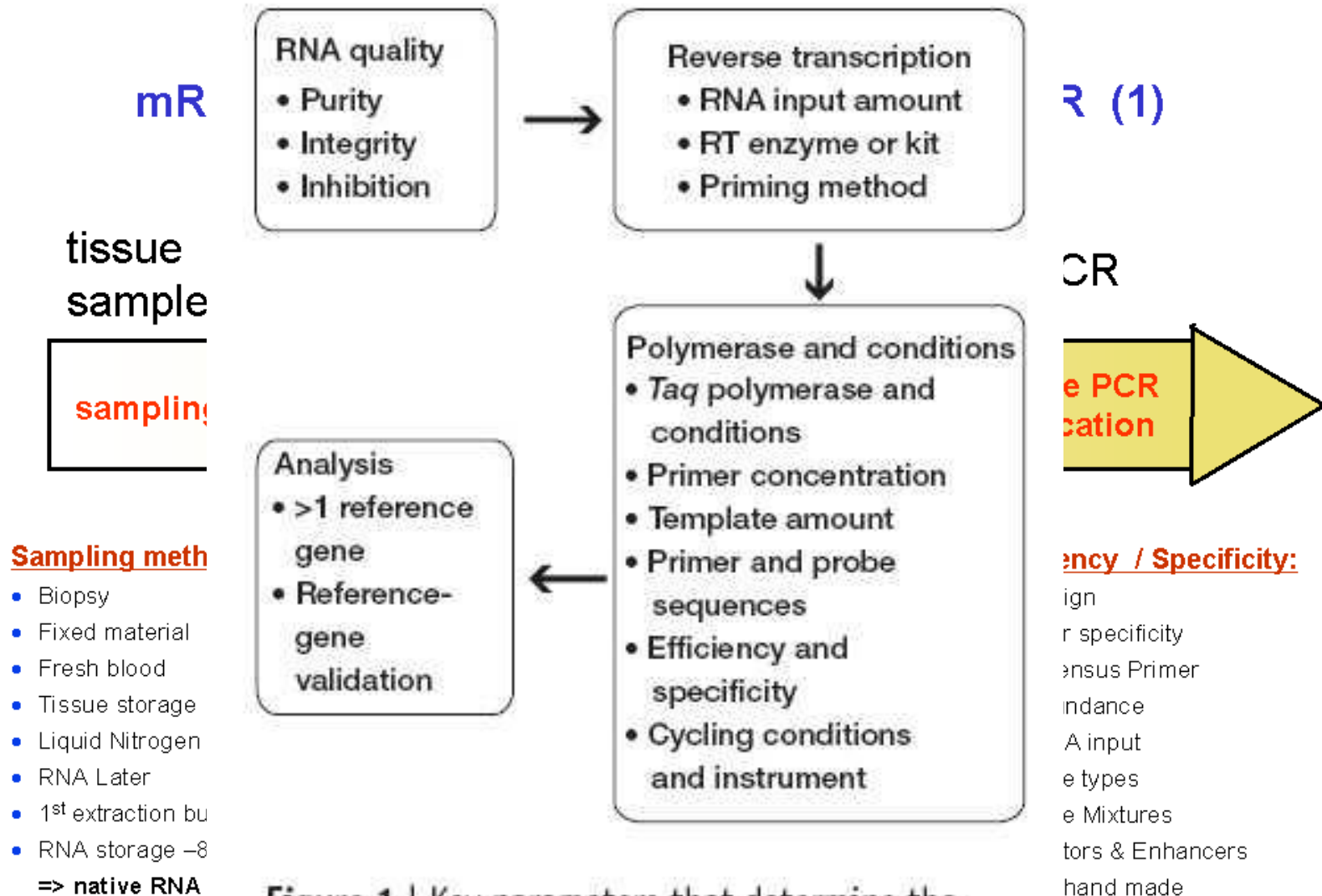


Figure 1 | Key parameters that determine the quality of qPCR data.

© 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**

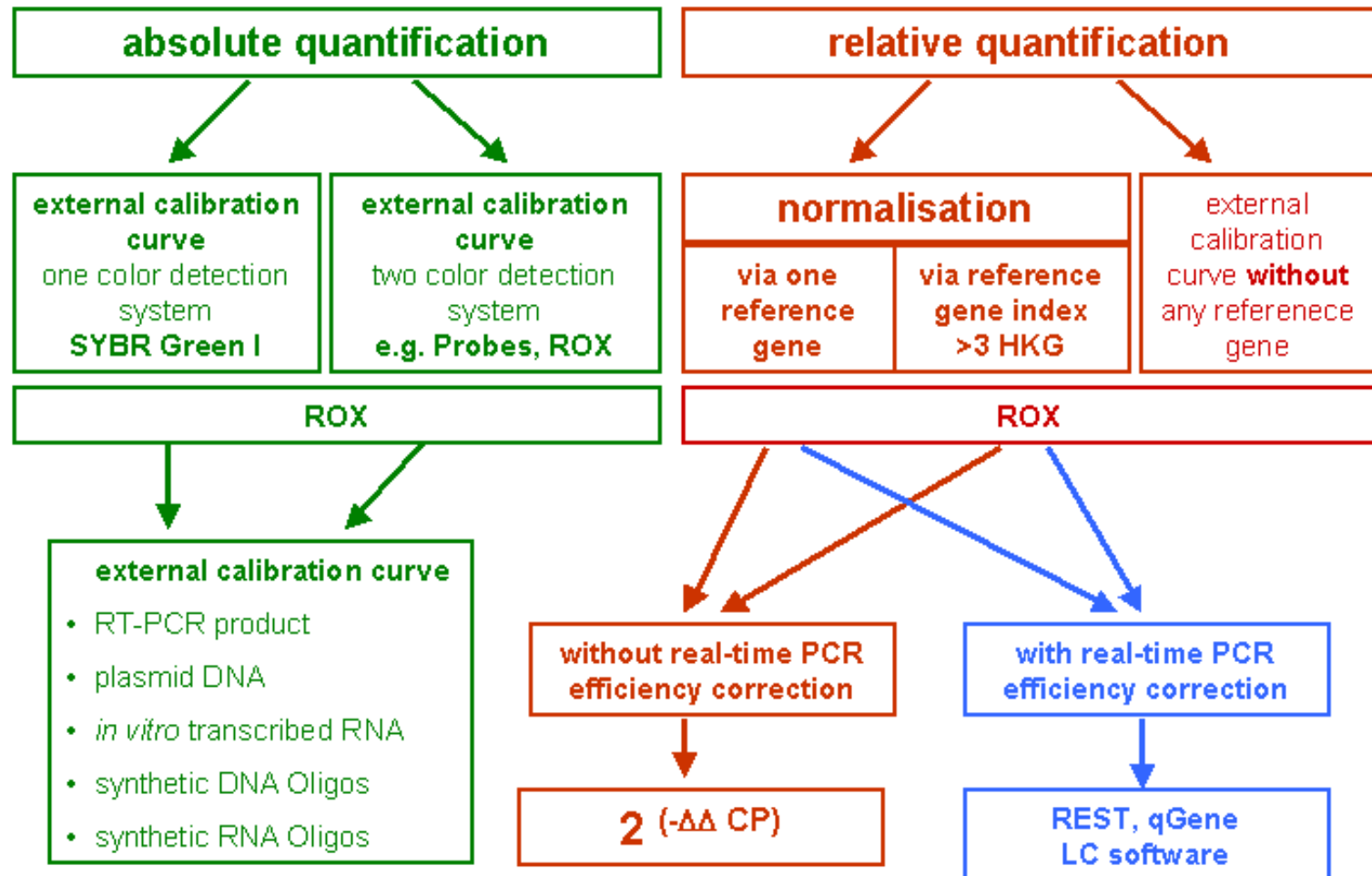
<http://bitesizebio.com/4074/the-pcr-controls-you-must-use>



RT-(q)PCR: KVANTIFIKACE

Quantification Strategies in real time qRT-PCR

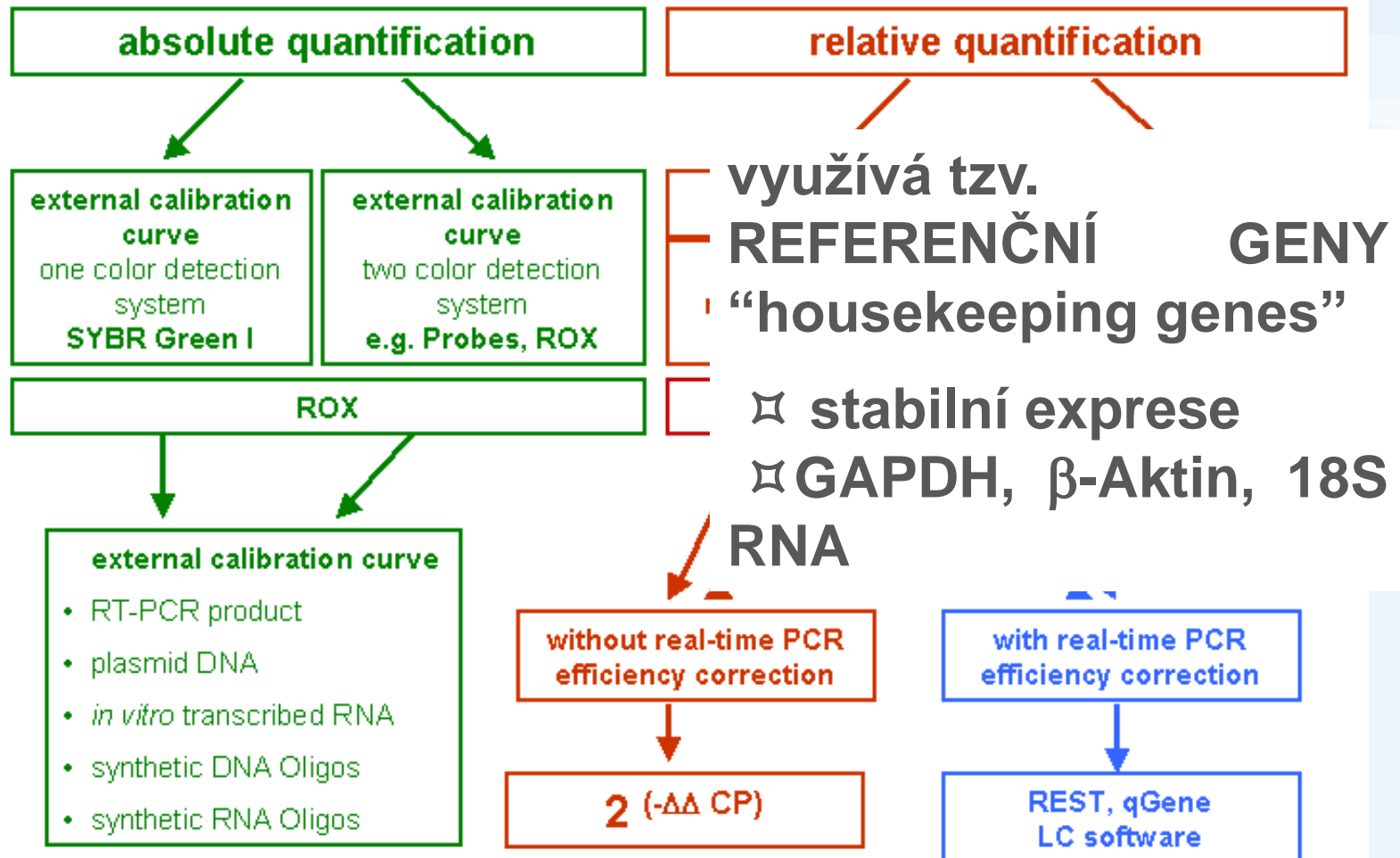
M. W. Pfaffl, *BioSpektrum* 2004 (Sonderausgabe PCR)



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

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

P = pipette
C = cry
R = report

Publication of

BIOLOGY FEATURE	
put	209
	209
	211
	212
genetic variation	208

py

s must be careful

qPCR: qui

Monya Baker

Gene profiling using
in gathering their



(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)



Inactivation of PK
(95°C 10 min)

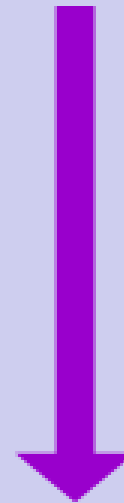


Obtaining of DNA pellet
using chemicals



PCR
(with purified DNA)

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

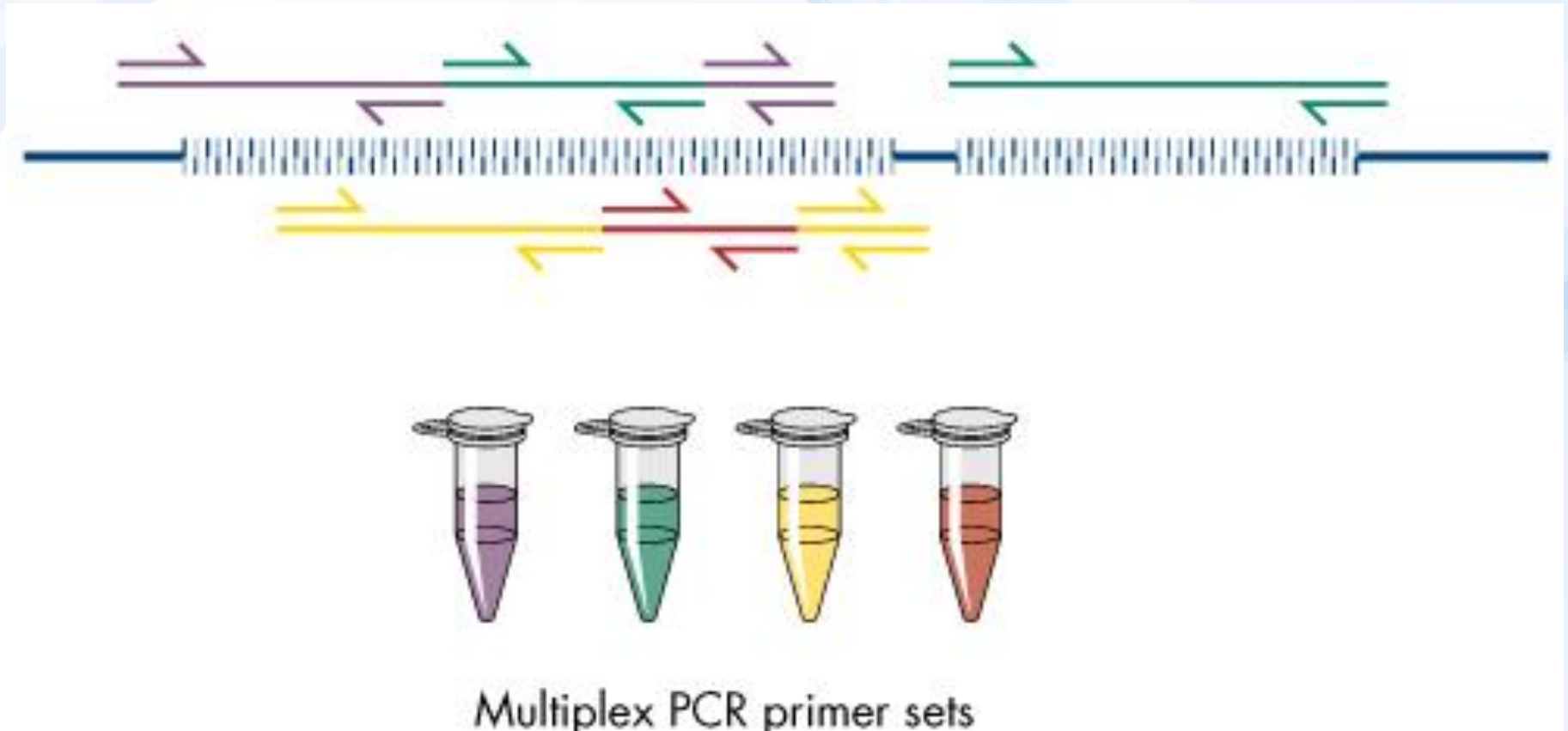


PCR
(with 1ul of supernatant of lysate)



□ 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 ARR

- více sad pr
- exprese až
- stanovuje s
- referenční q
- biologické stres, apoptó

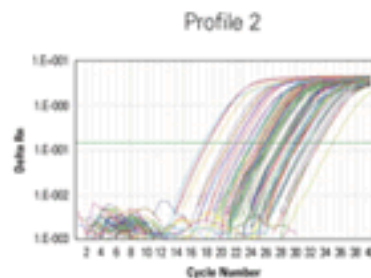
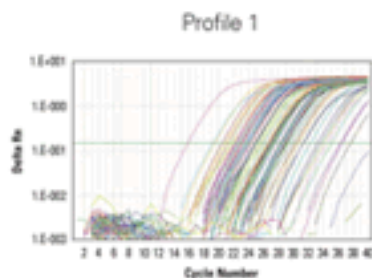
1. Convert Total RNA to cDNA.



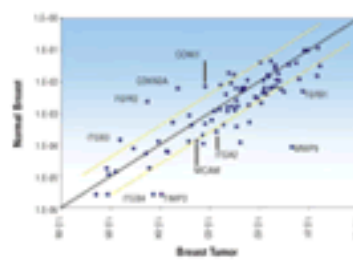
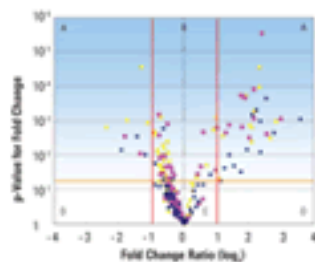
2. Add cDNA to RT² qPCR Master Mix & Aliquot Mixture Across PCR Array.



3. Run in Your Real-Time PCR Instrument.



4. Data Analysis.



kách desky

cyklus, oxidativní
td.



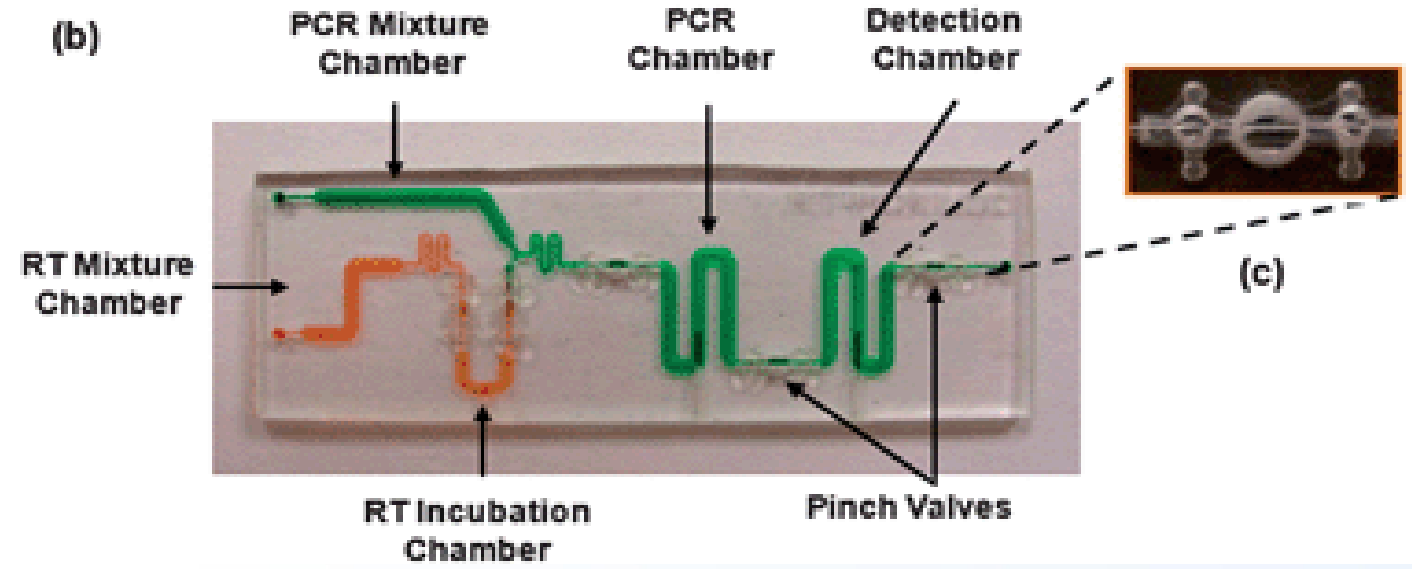
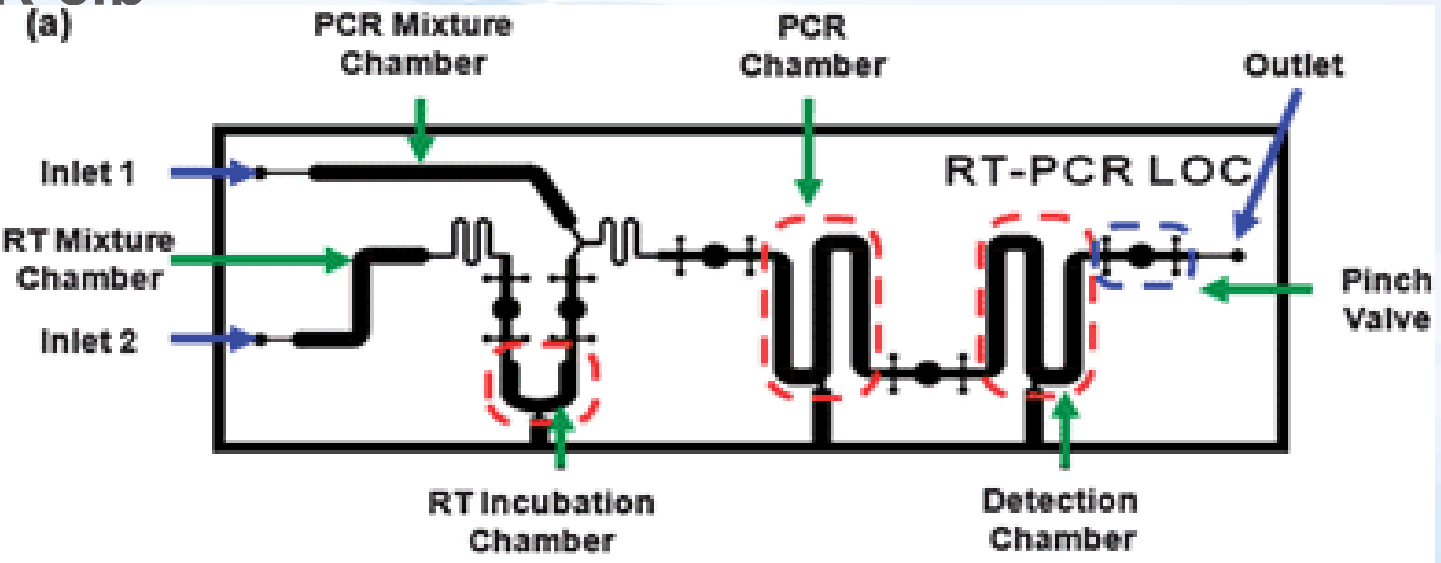
❑ PCR čip

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



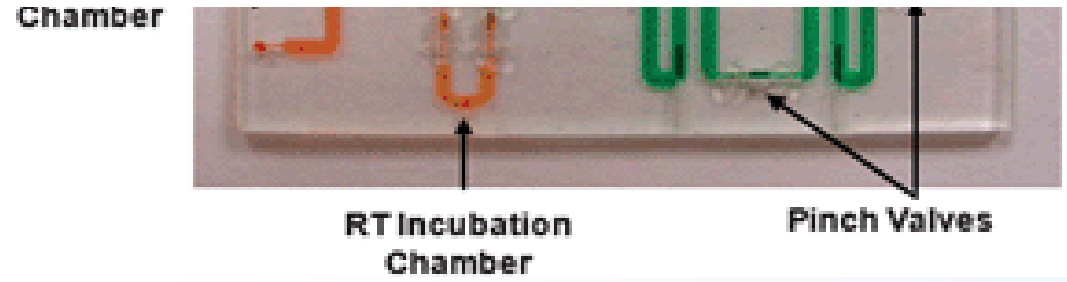
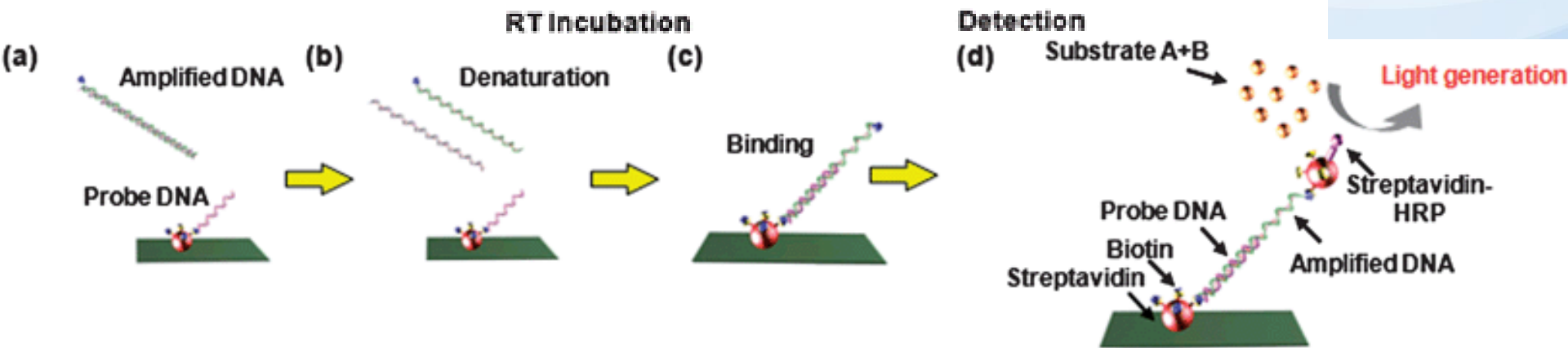
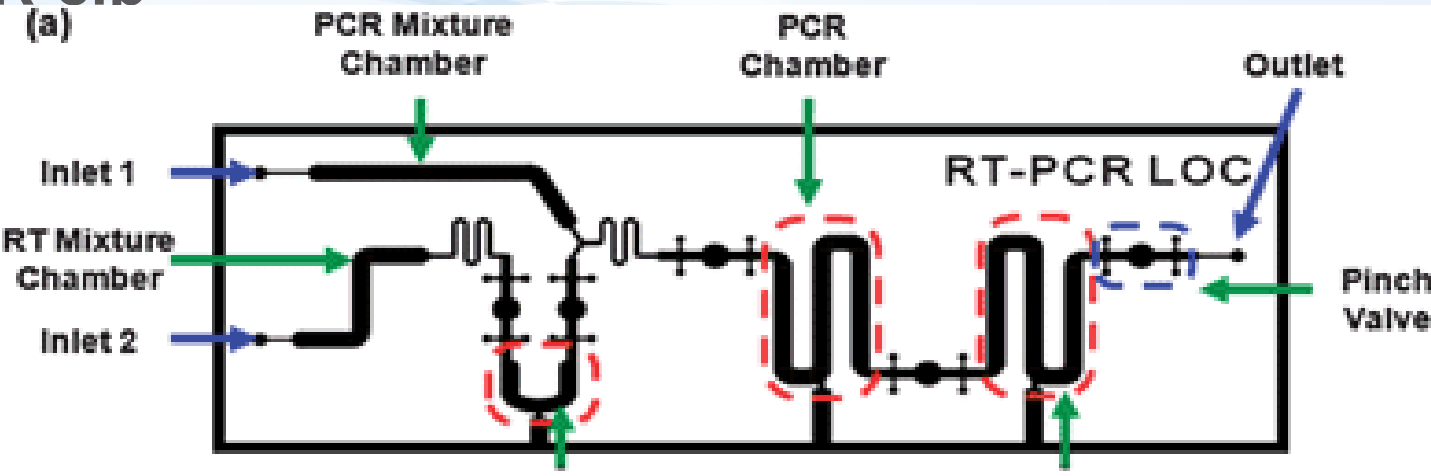
PCR chip

- mikro
- rychl
- není
- vyso



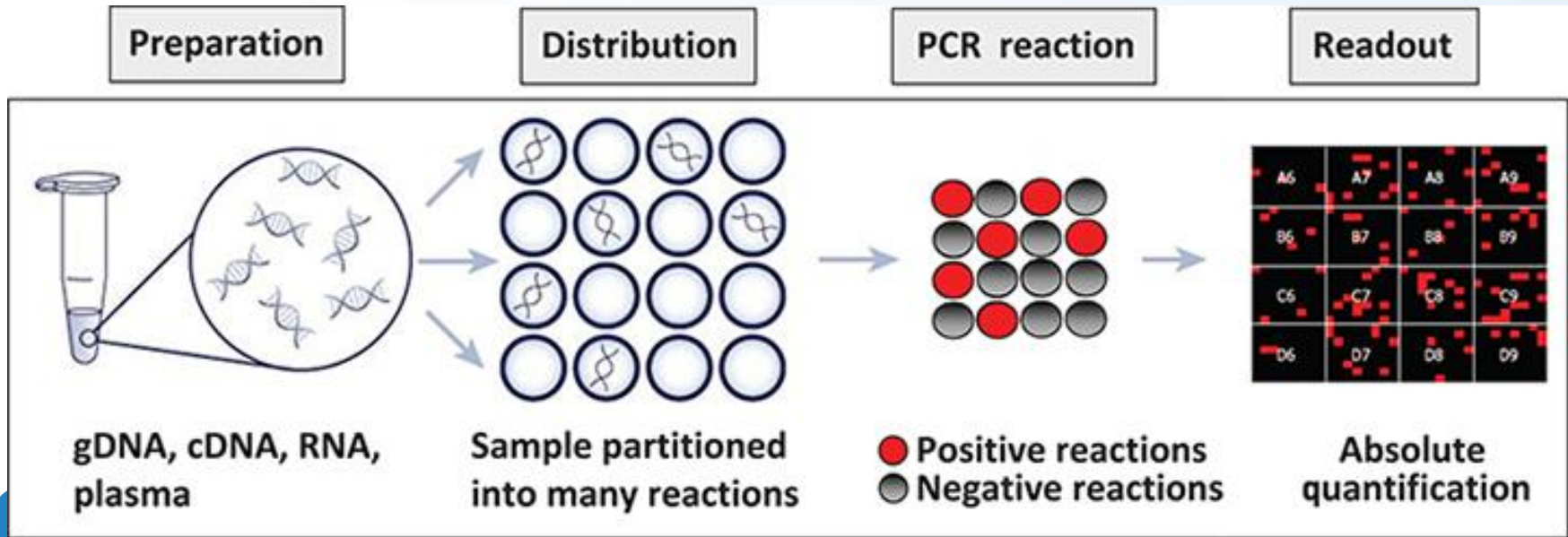
PCR chip

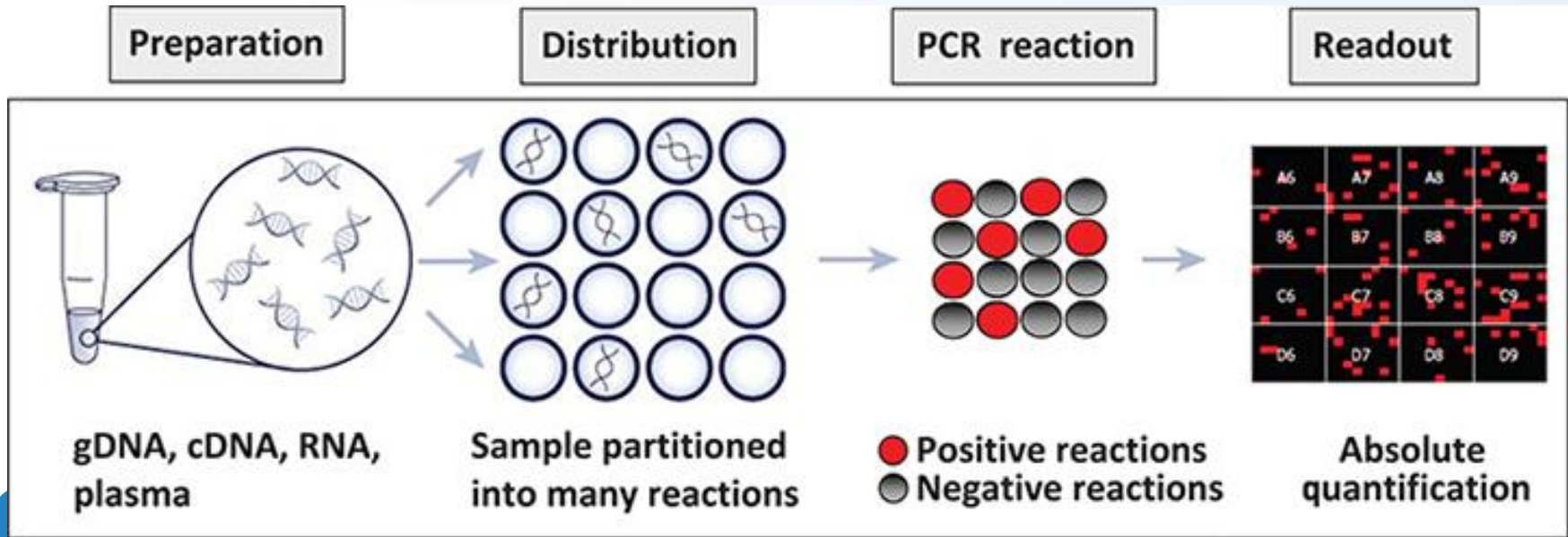
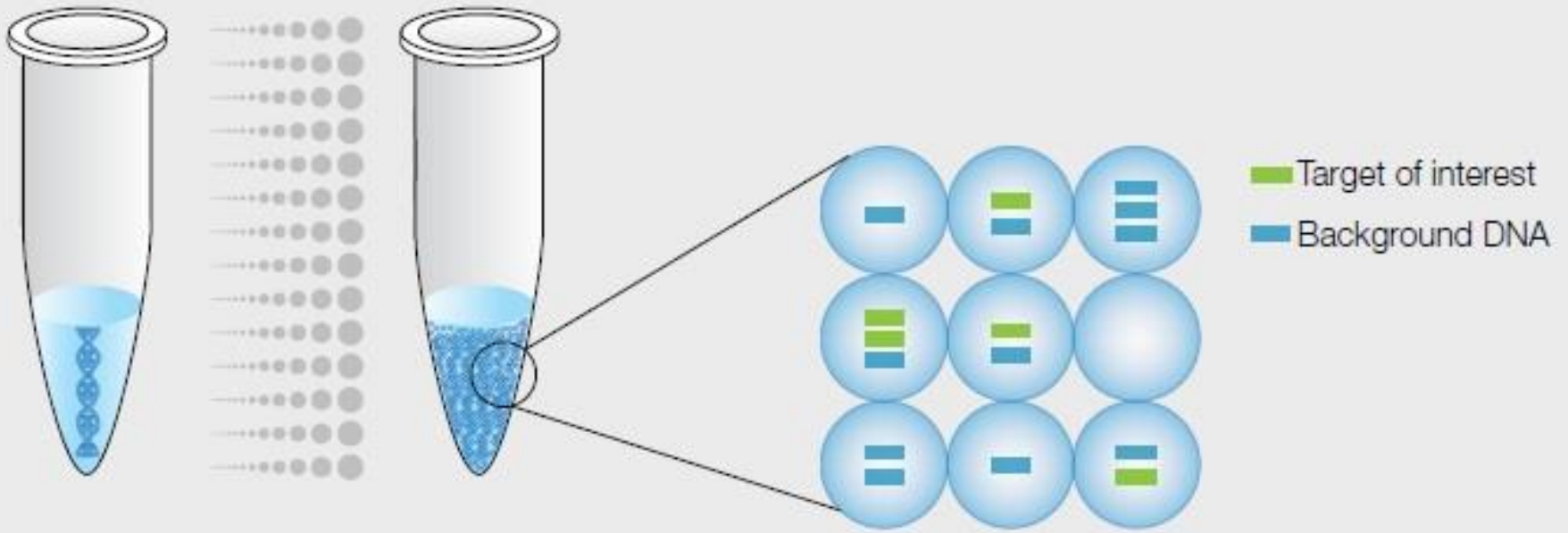
- mikro
- rychl
- není
- vyso

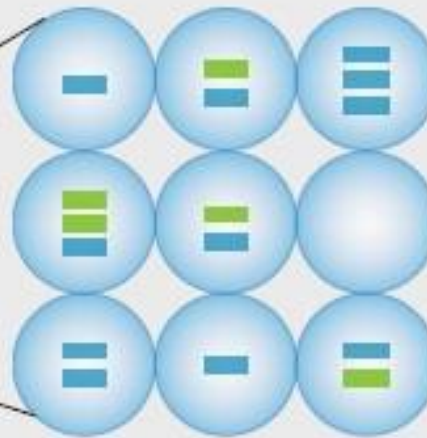
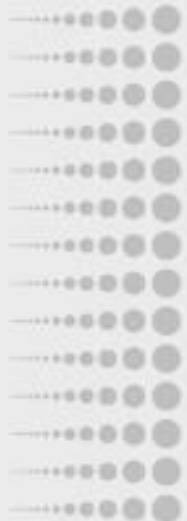


□ dPCR („digital PCR“) a ddPCR („droplet digital PCR“)

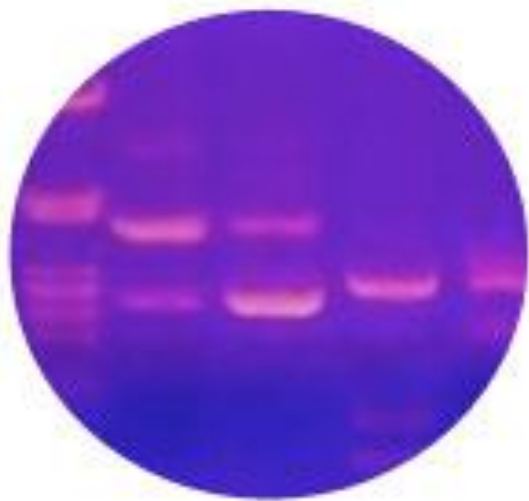
- alternativní metoda ke konvenční qPCR využívaná např. pro detekci vzácných alel a sekvencí a při analýze 1 buňky
- mnoho individuálních, paralelních PCR reakcí
- absolutní kvantifikace
- kombinace nanofluidního čipu, microarray či točící se mikrofluidní disk a TaqMan® prób



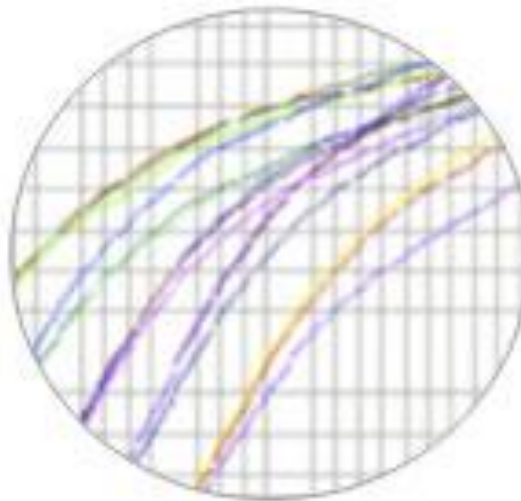




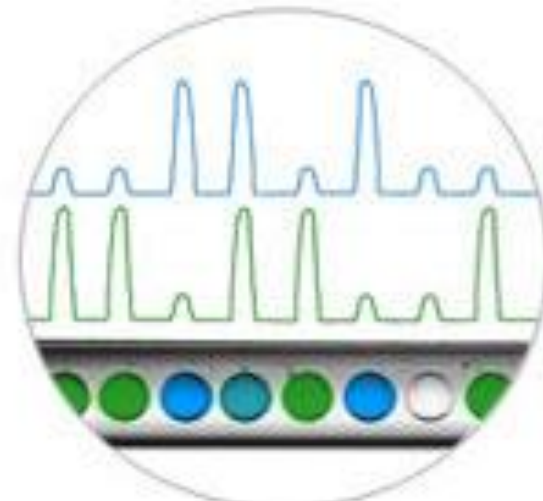
■ Target of interest
■ Background DNA



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



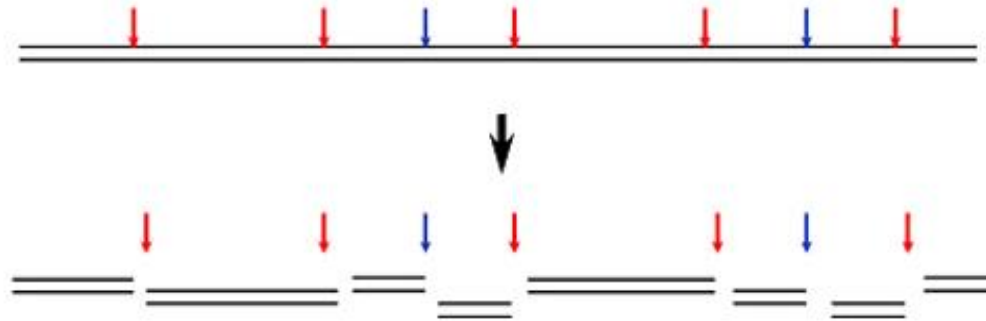
(q)PCR: VYUŽITÍ

Total genomic DNA

orfismus

□ A
délky

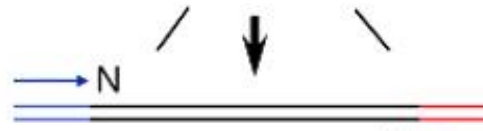
(1) Restriction digestion



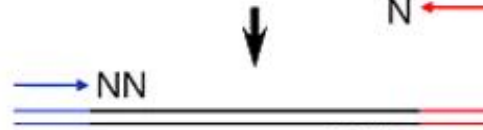
(2) Adapter ligation



(3) Preamplification



(4) Selective amplification



(5) Gel electrophoresis



Princ

• met

• sele

• vizu

Využ

• poly

• gen

• fylo



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



PCR

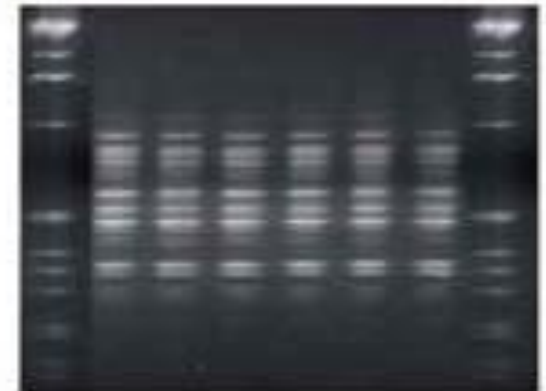
Polymerase Chain Reaction



1 Primer only

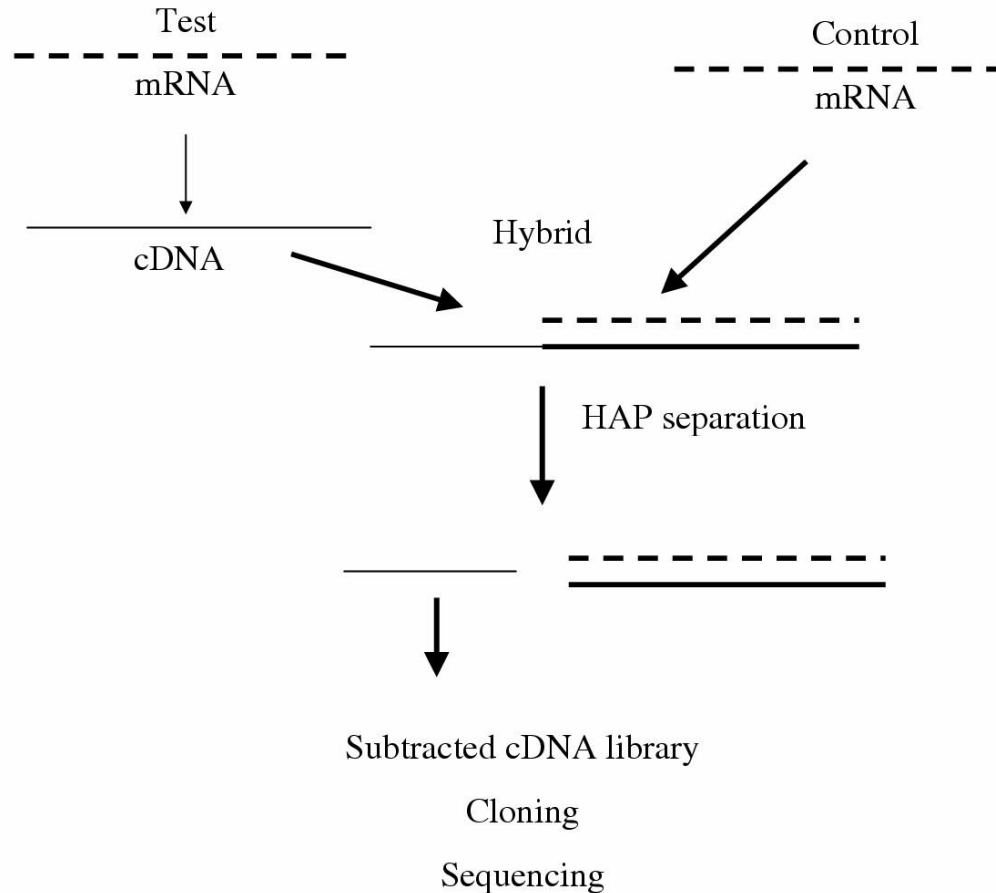
RAPD type

Purified genomic DNA



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

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



(q)PCR: APLIKACE

- **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)

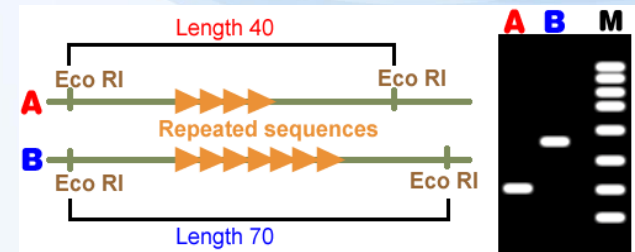
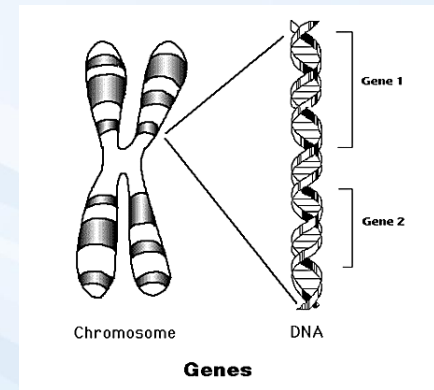
- repetitivní sekvence

⇒ *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

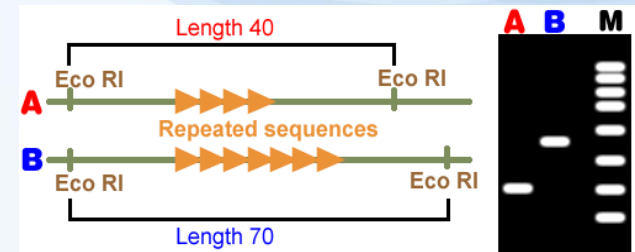
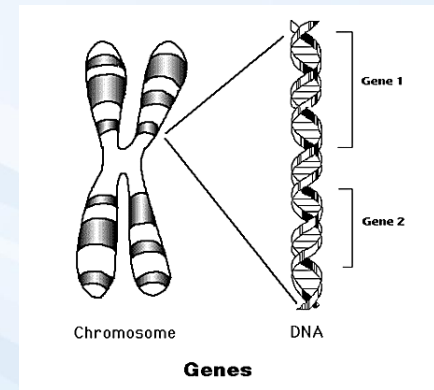
□ Typy sekvencí DNA

- 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/uplo ads/tx_naksciimages/dalya8_vntr_diagram.gif

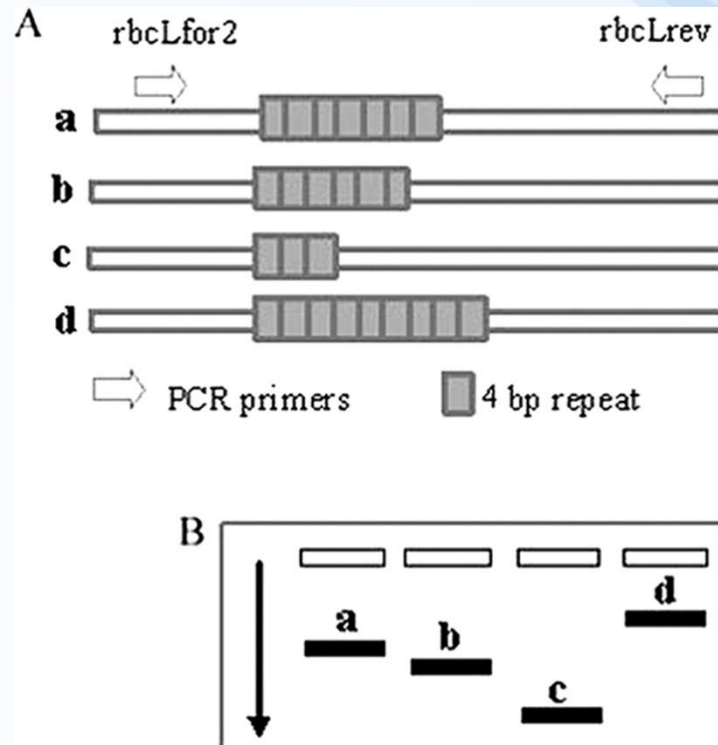
⇒ *rozptýlené*

- 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://bio-rad.cnpg.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

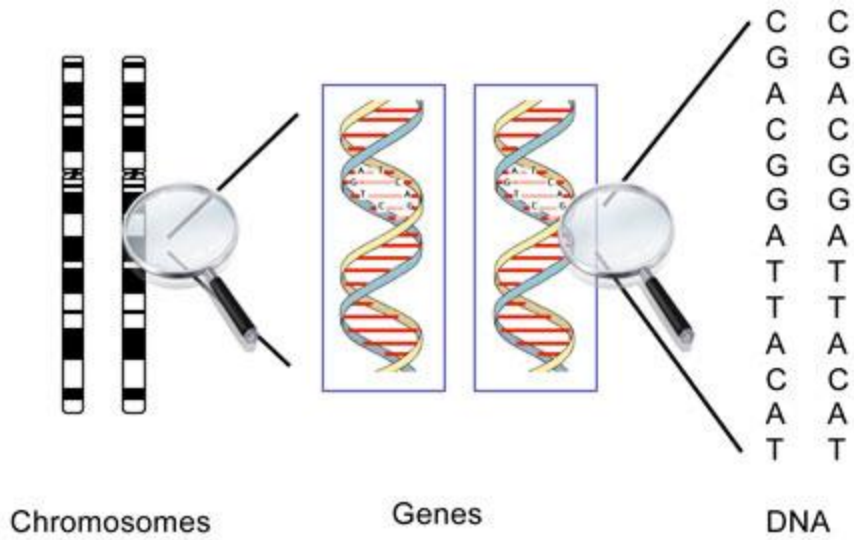
www.biotechnologyforums.com

www.biology-online.org



Research centre
for toxic compounds
in the environment





JAK ZJISTÍME SEKVENCI NK?

DNA CRIME LAB!
 who stole the necklace?
 ATCCAGGCCTTTGG
 TAGGTCCGGAAACC
 Be the one to solve the case!



- 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**



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

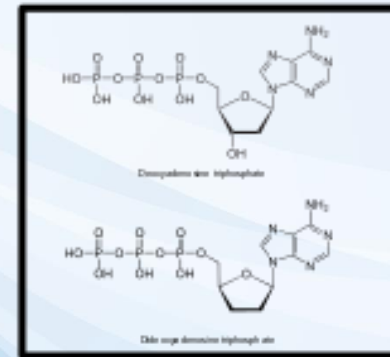


<https://www.youtube.com/watch?v=oYpIbl0qF8>

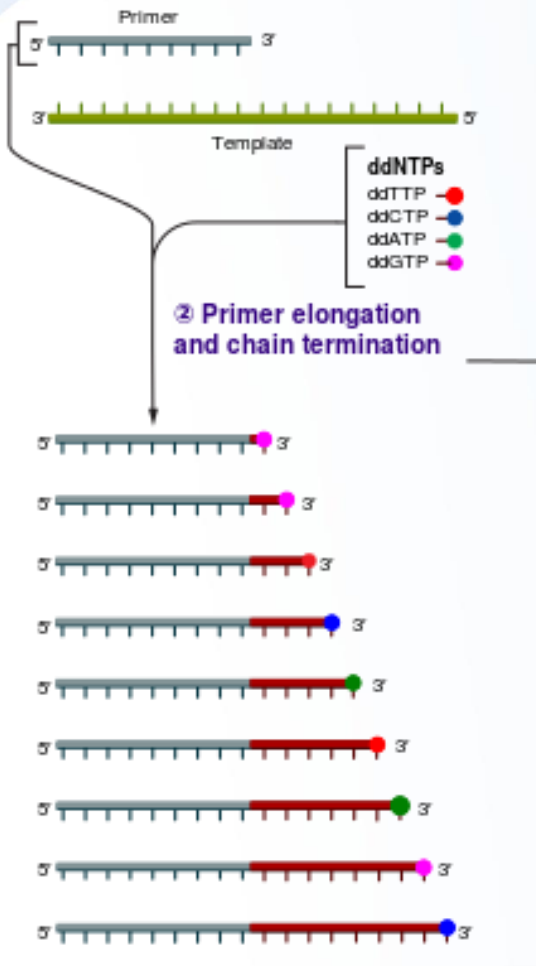
<http://biologie.upol.cz/metody/Sekvenovani%20DNA.htm>

① Reaction mixture

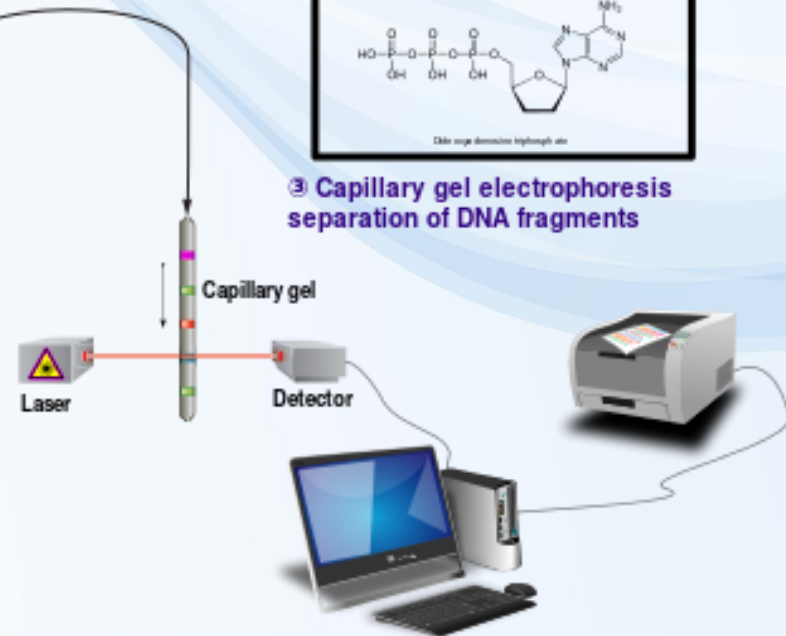
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



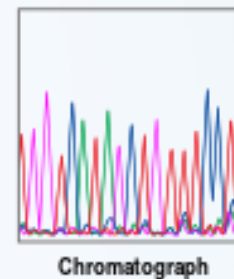
② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

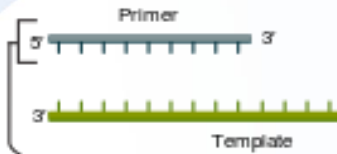


④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis

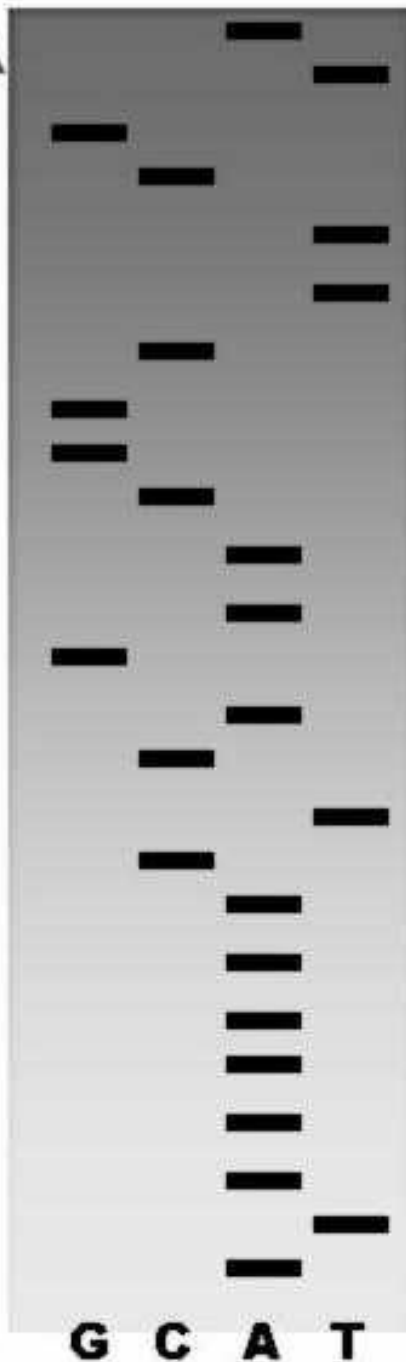
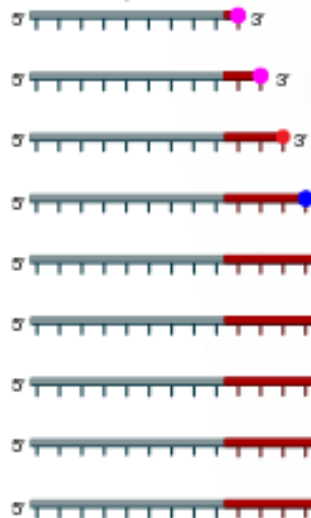


<https://www.yourbiology.com>
<http://biologie.u>

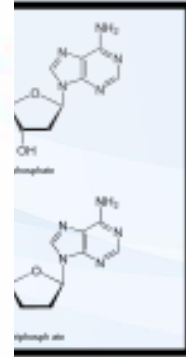
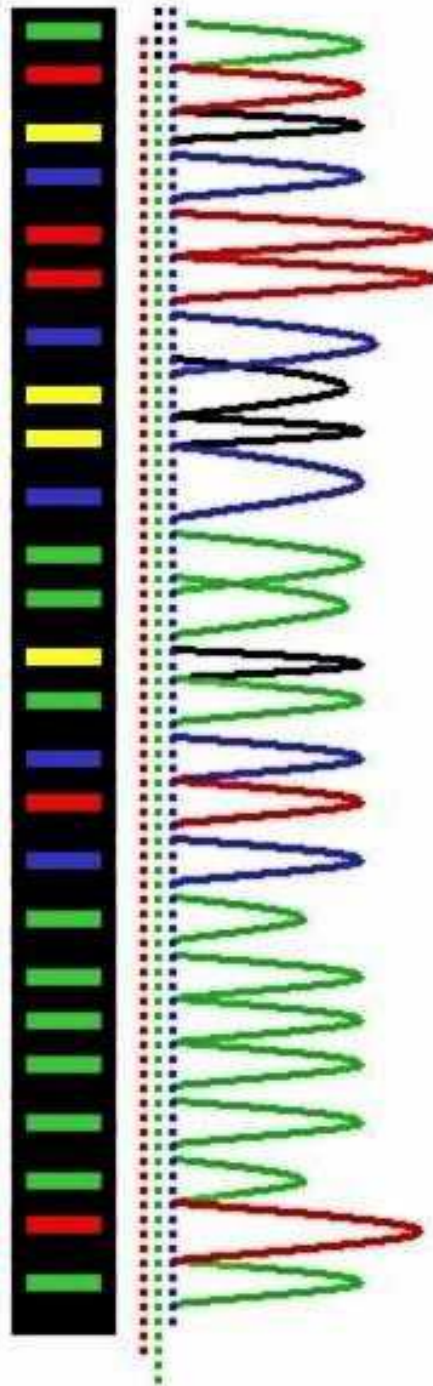
- ① Reaction mixture
- ▶ Primer and DNA template
 - ▶ ddNTPs with flouochrom



② Primer elongation and chain termination



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



Electrophoresis fragments



Detection of flouochromes
 Additional sequence analysis



Research centre
 for toxic compounds
 in the environment

SEKVENOVÁNÍ: DATABÁZE DNA

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

The image shows the NCBI homepage with two callout boxes. The top box, pointing to the 'Popular Resources' section, contains the text 'Mám sekvenci a neznám organismus, gen'. The bottom box, pointing to the 'Get Started' section, contains the text 'hledám sekvenci organismu, genu'.

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
Variation

Welcome to NCBI
The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.
[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [Research](#) | [RSS Feeds](#)

Get Started

- Tools: Analyze data using NCBI software
- Downloads: Get NCBI data or software
- How-To's: Learn how to accomplish specific tasks at NCBI
- Submissions: Submit data to GenBank or other NCBI databases

Education Resources
Central point of access for help documents, teaching materials, news outlets, and other educational resources.

Popular Resources
BLAST
Bookshelf
Gene
Genome
Nucleotide
OMIM
Protein
PubChem
PubMed
PubMed Central
SNP

NCBI News
New NCBI Newsletter
Information on the new Genome Site, a new 100 BLAST database, updates to Sequin, 01 Dec 2011

NCBI will continue to operate SRA
Subsequent to an announcement in February 2011 that NCBI was planning to phase out the 11 Oct 2011

[More...](#)

GETTING STARTED
NCBI Education
NCBI Help Manual
NCBI Handbook
Training & Tutorials

RESOURCES
Chemicals & Bioassays
Data & Software
DNA & RNA
Domains & Structures
Genes & Expression
Genetics & Medicine

POPULAR
PubMed
Nucleotide
BLAST
PubMed Central
Gene
Bookshelf

FEATURED
GenBank
Reference Sequences
Map Viewer
Genome Projects
Human Genome
Mouse Genome

NCBI INFORMATION [Write to the Help Desk](#)
About NCBI
Research at NCBI
NCBI Newsletter
NCBI FTP Site
NCBI on Facebook
NCBI on Twitter



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:

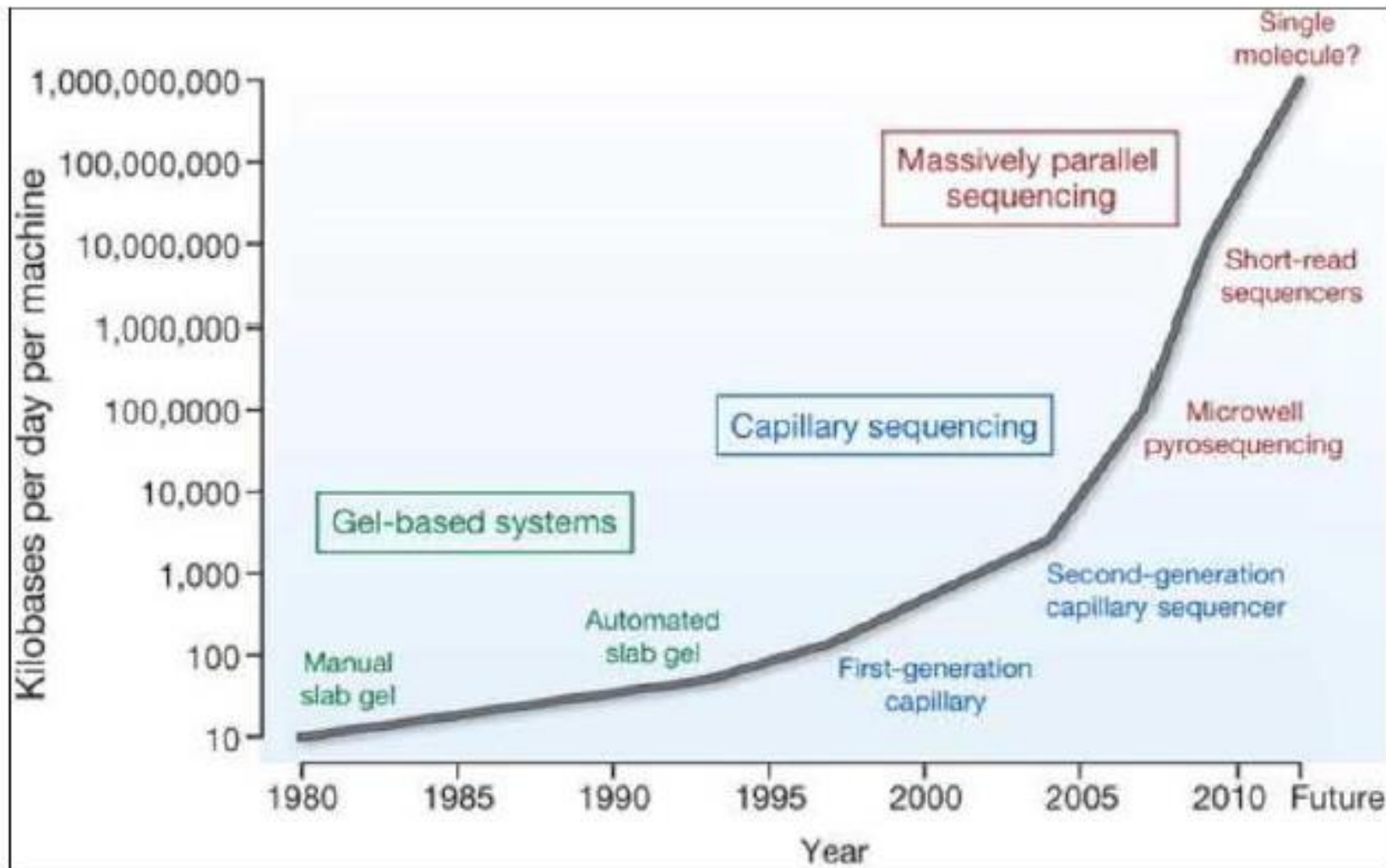
1. templátová DNA fragmentovaná na úseky několika set bází dlouhé
 2. konce získaných fragmentů jsou enzymatickou reakcí zatupeny a napojeny k oligonukleotidům určité sekvence (tzv. adaptéry)
 3. jednotlivé fragmenty jsou odděleně amplifikovány PCR reakcí (u některých technologiích tento krok chybí) 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“)

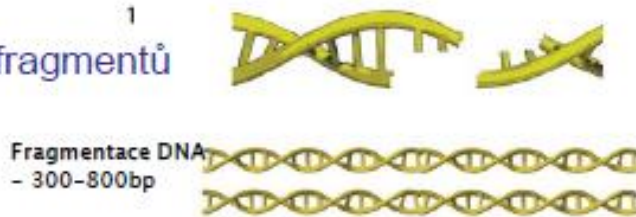


SEKVENOVÁNÍ: PCR v emulzi (emPCR)

454 sekvenování

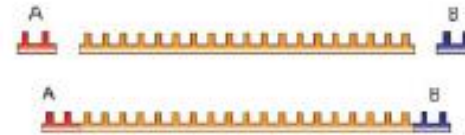
úseky 300 bp

- čteno 400 tisíc fragmentů najednou



Ligace adaptorů

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

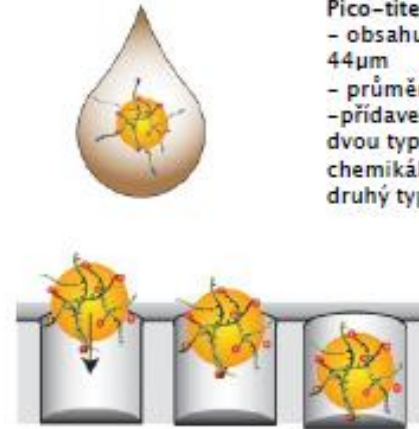


Emulzní PCR

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

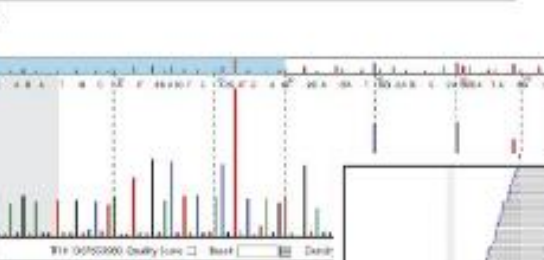


Pico-titer plate (sekvenační čip
- obsahuje 1,6 mil jamek širokých 44μm
- průměr DNA kuličky je 26 μm
- přidavek menších kuliček dvou typů - jeden obsahuje chemikálie pro pyrosekvenaci, druhý typ fixuje kuličky s DNA



Sekvenační 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

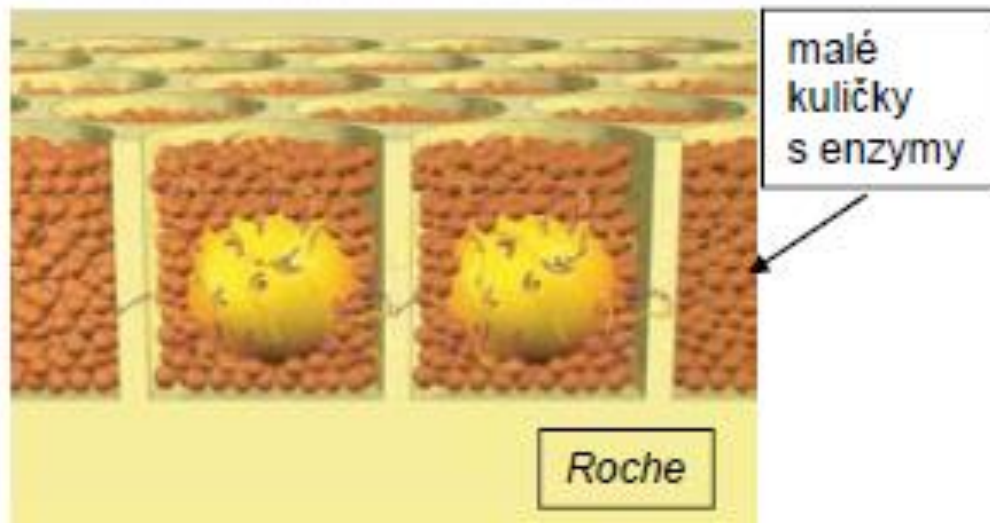
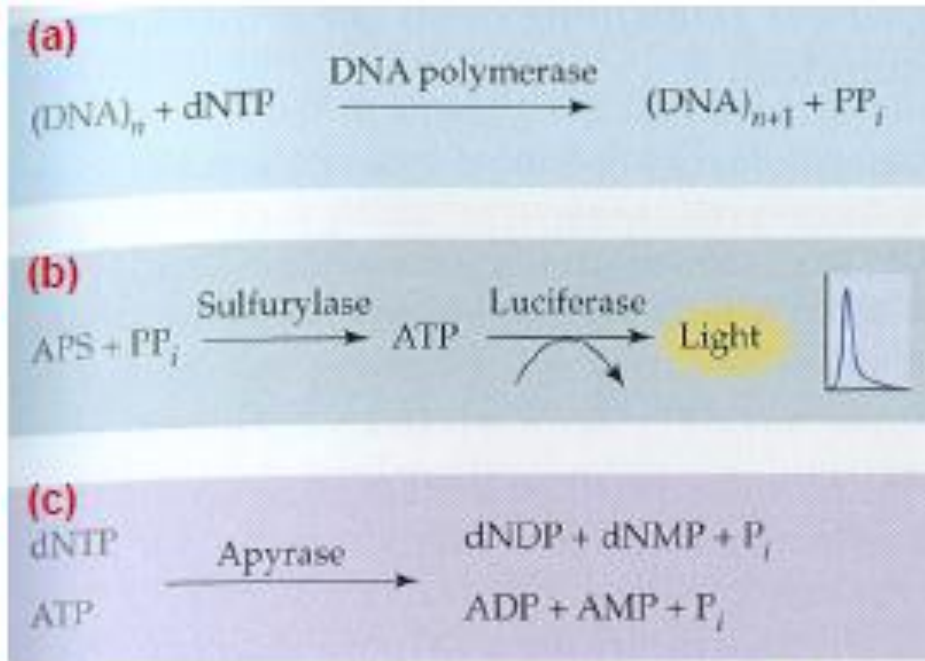
⇒ před dalším cyklem - degradace neinkorporovaného nukleotidu.



SEKVENOVÁNÍ: PYROSEKVENOVÁNÍ

http://inovac..._simkova/sel

Pyrosekvenování
⇒ založeno na (... a uvolnění specifické...)
⇒ následně viditelného...
⇒ před danou nukleotidu



d/genomika_-

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

vede k emisi

ovaného



Research
for toxic compounds
in the environment

RNA-seq

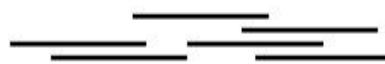
(RNA Sequencing), "Whole Transcriptome Shotgun Sequencing" ("WTSS")

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

**Multiplexed
Sample
Preparation:**



**Library
Preparation:**



-rRNA Depletion
or PolyA
Enrichment

-Fragmentation,
Linker Ligation
& cDNA
Synthesis

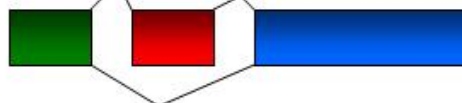
-Adaptor
Ligation &
Barcoding

**Cluster
Generation,
Sequencing &
Data Analysis:**

SNP Detection



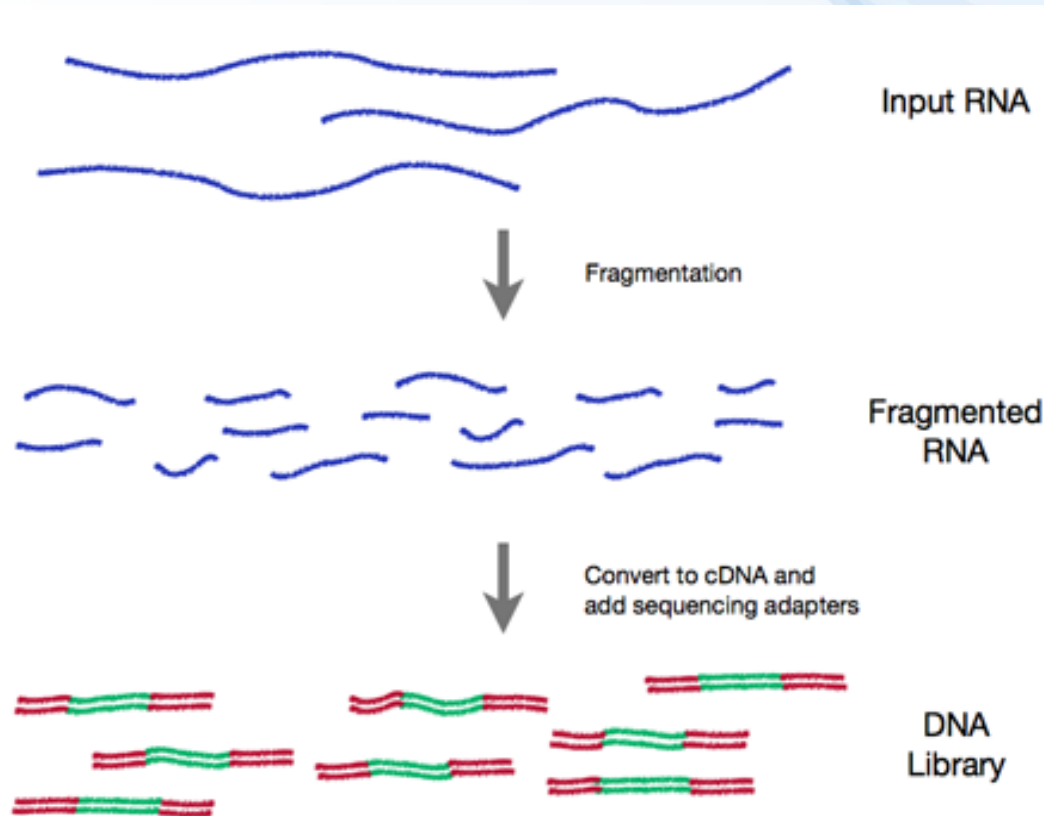
Splice Junction Analysis



Transcript Quantification



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



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



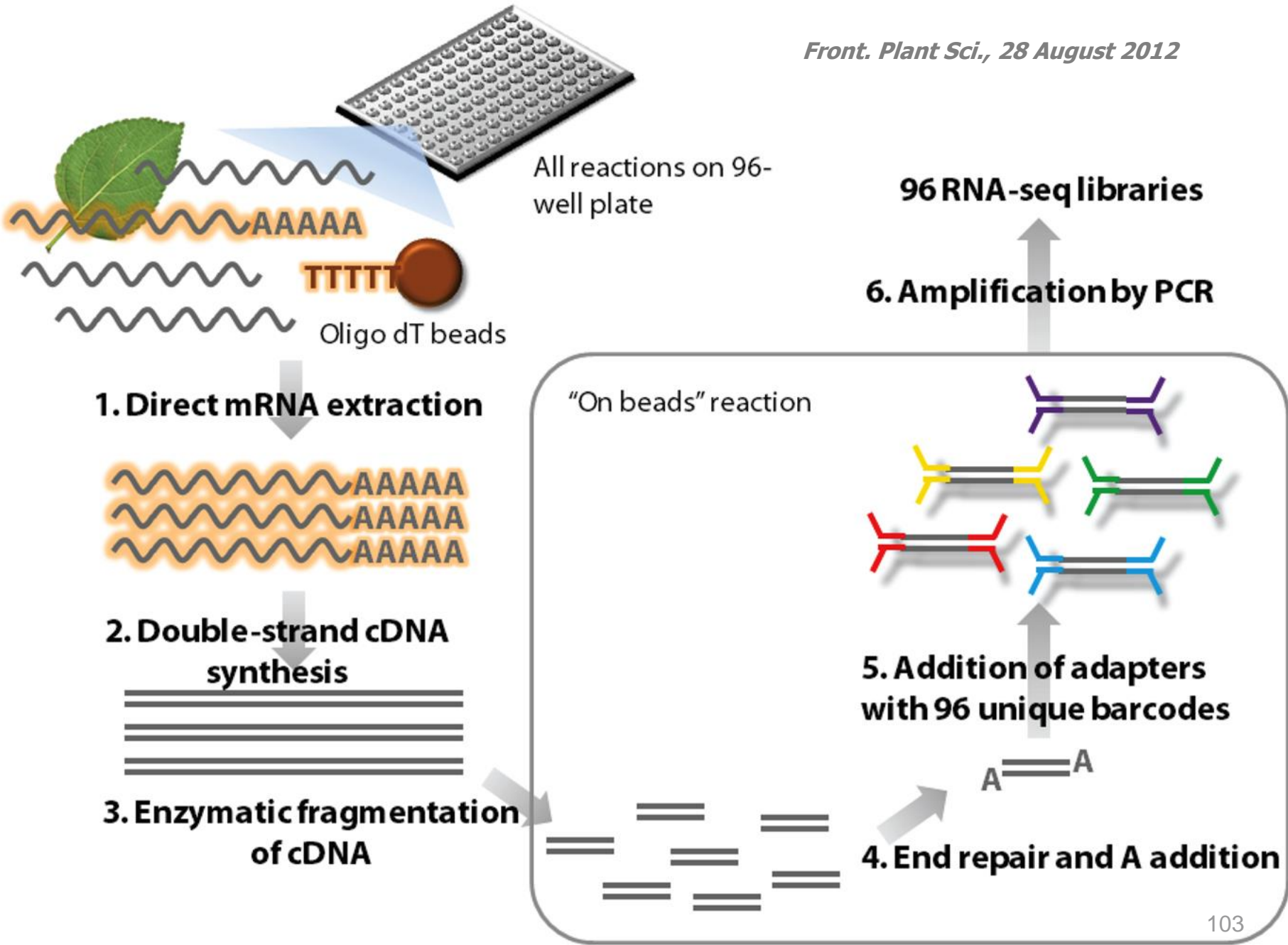


Table 1 Advantages and disadvantages of RT-PCR and RNAseq

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?



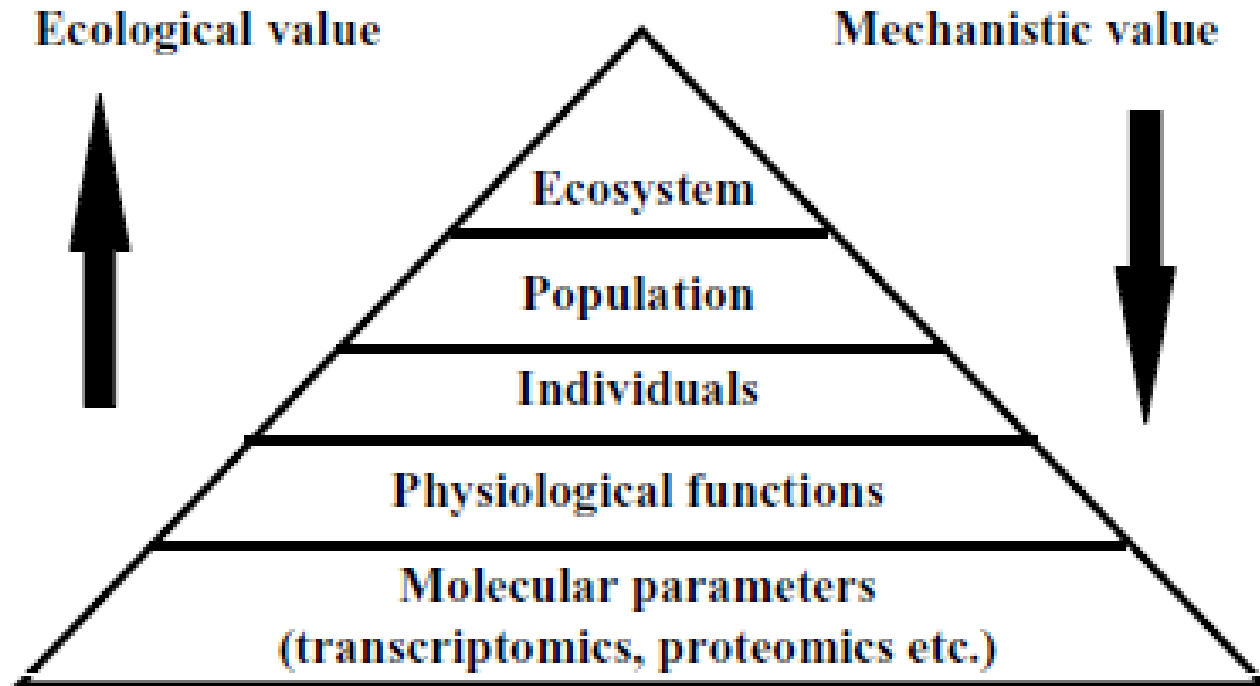
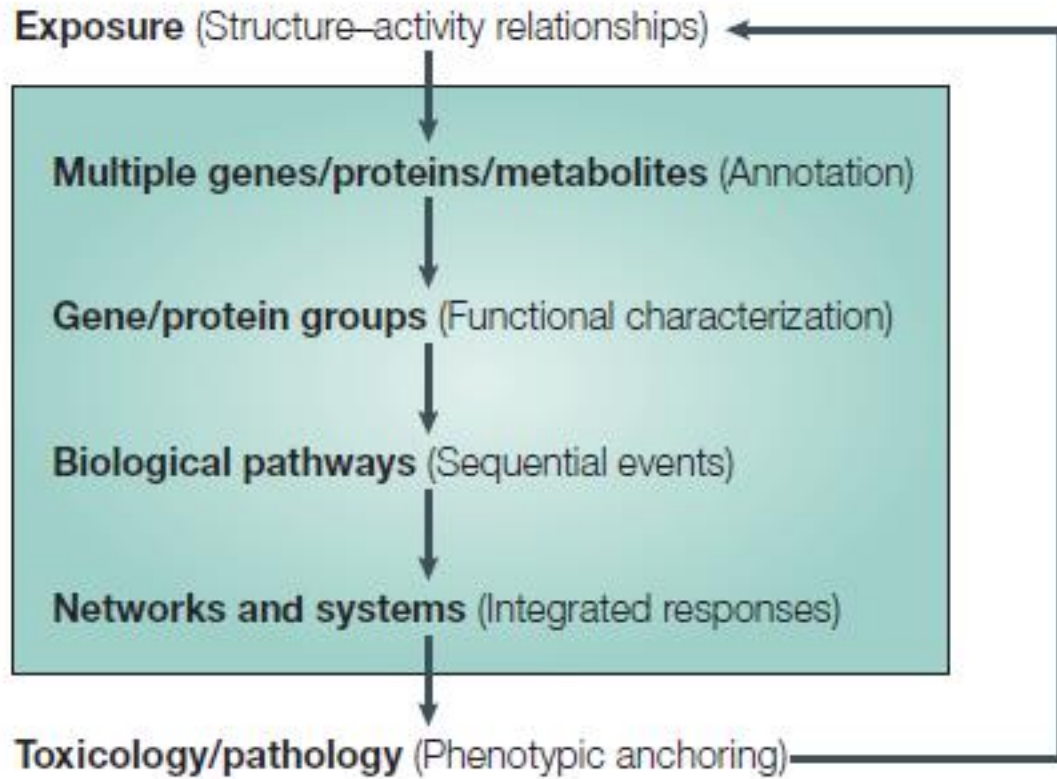
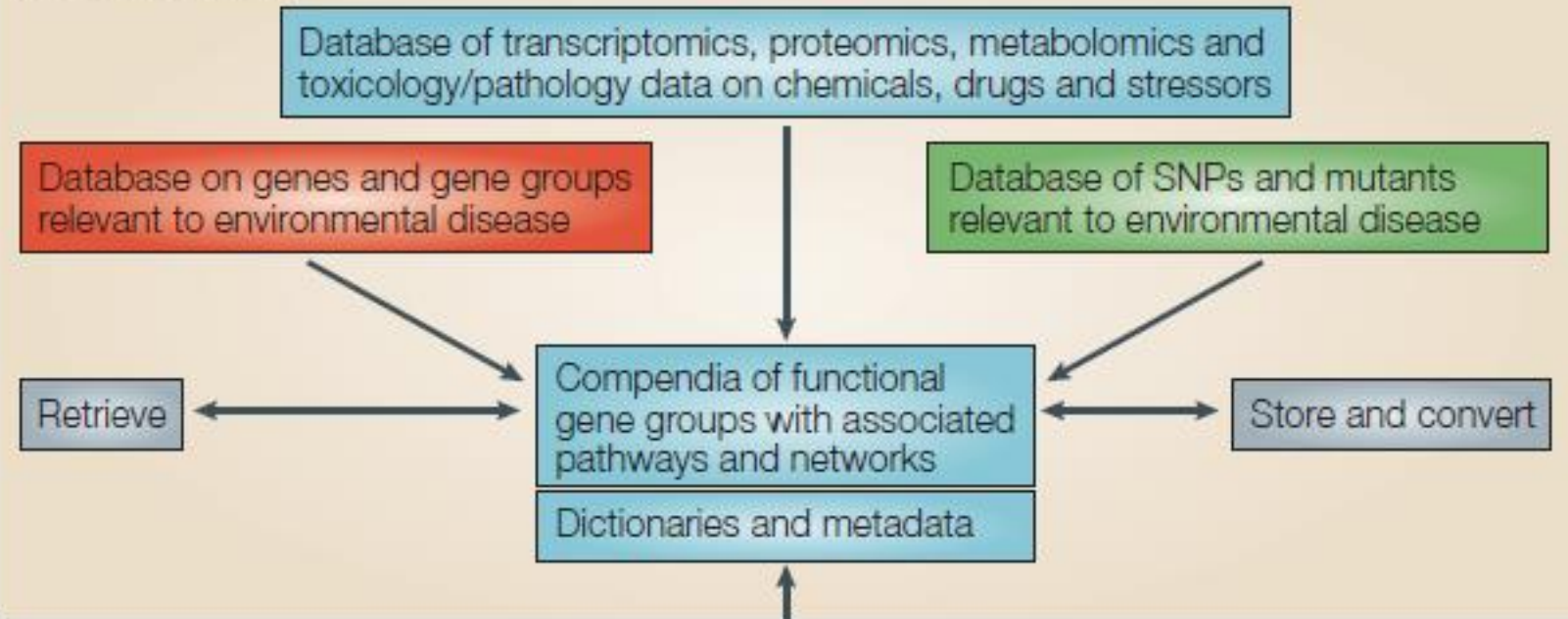


Fig. 3. Conceptual framework for ecotoxicogenomics.

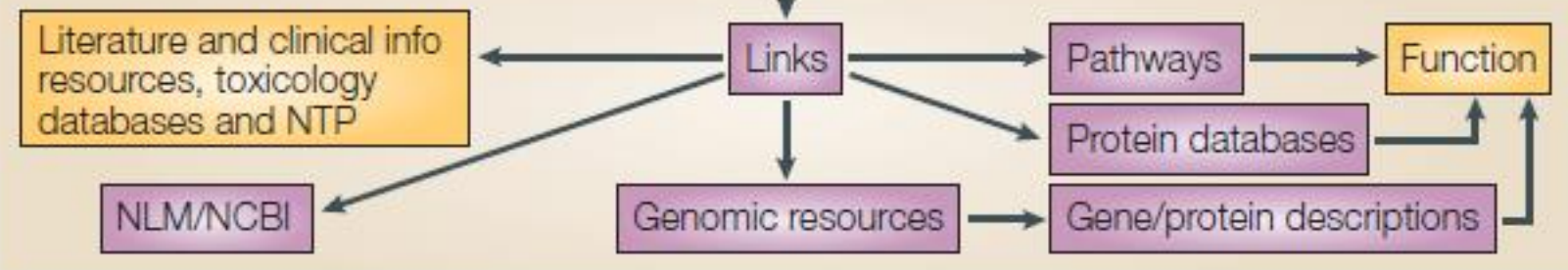
Aquatic Toxicology 67 (2004) 143–154



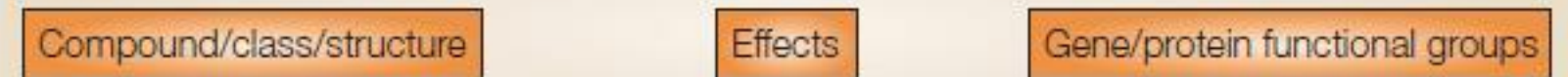
Associated data



External links



Query



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

□ METODY

⇒ **RT-qPCR/RT-PCR-array**

⇒ **RNA-seq**

⇒ **microarray**



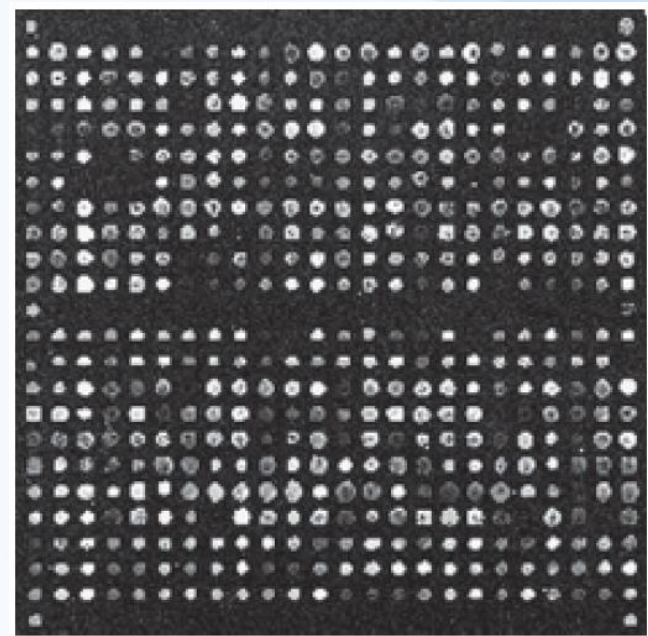
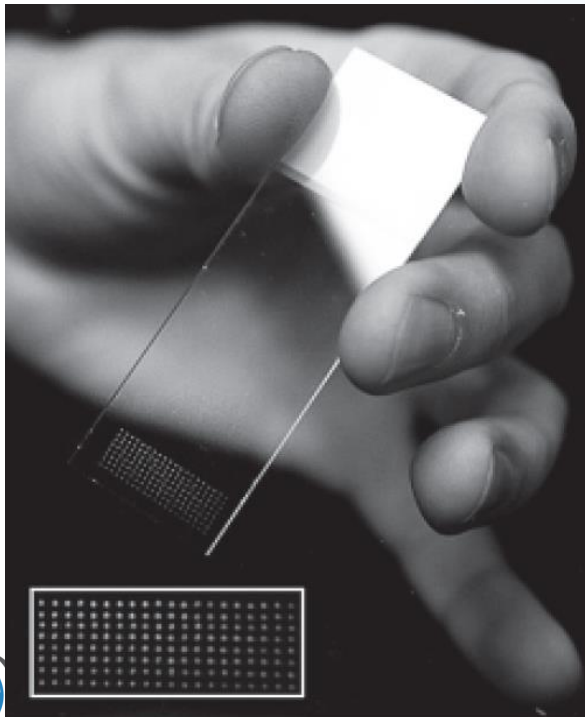
□ DNA ARRAY a čipy

- 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/cDNA 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

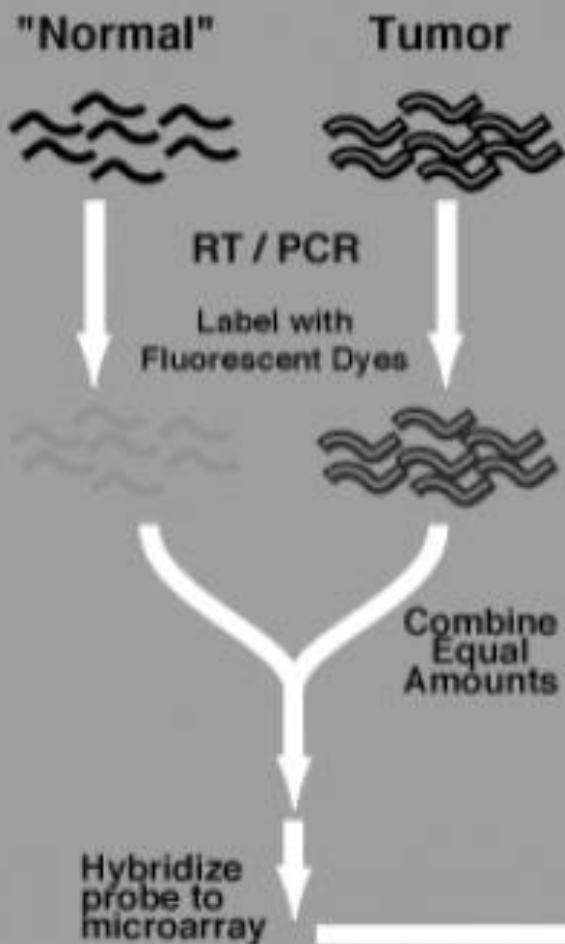
- ✧ Vícekanálový skener

6. Zpracování výsledků

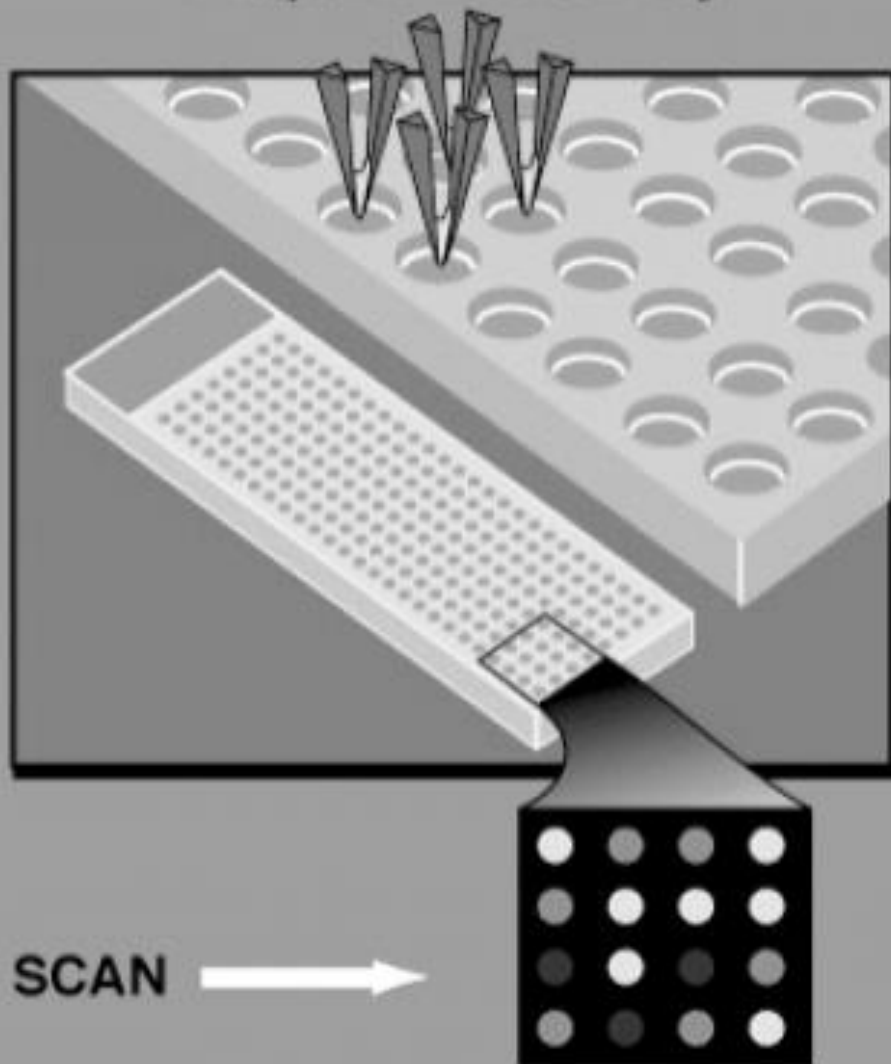
- ✧ podle intenzity vyzářeného světla lze určit množství komplementárních molekul přítomných ve vzorku



Prepare cDNA Probe



Prepare Microarray



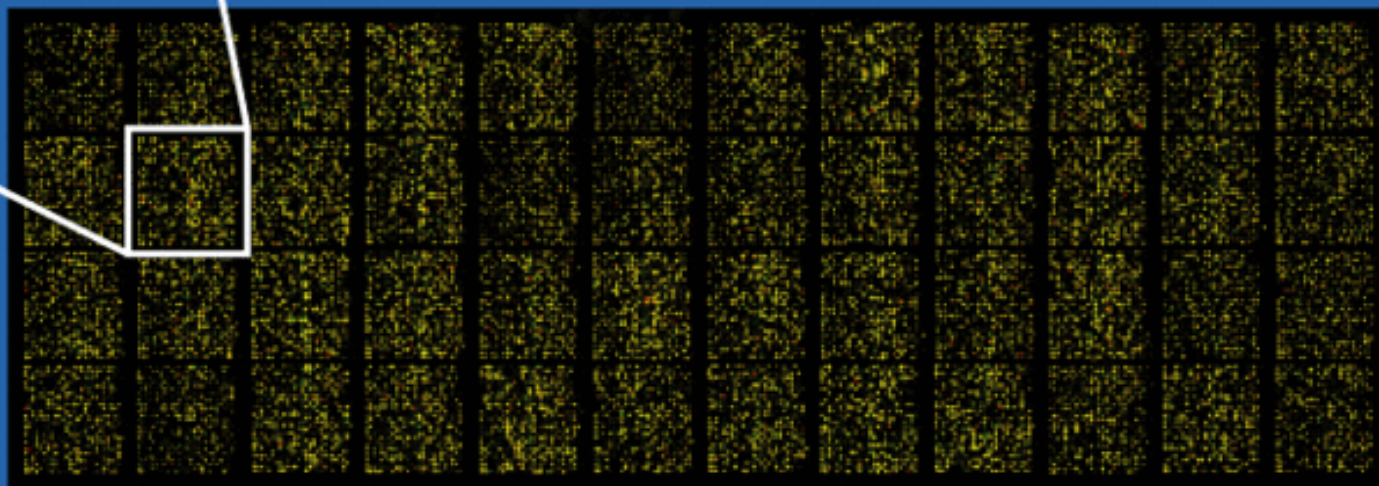
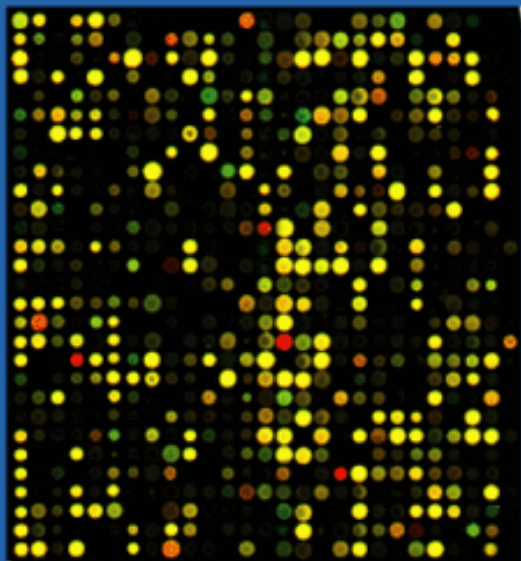
Microarray Technology

Komplementární molekuli přítomných ve vzduchu



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>

Microarray

Hybridization.
Scanning images.
Quantification.

Raw intensities

Preprocessing:
Background correction,
Normalization,
Summarization.

Expression levels of
Transcripts (continuous)

Statistical analysis

Cellular
functional/pathway
analysis

RNA-Seq

Sequencing.
Base call.

Short reads

Aligned to
reference genome,
known isoform & exon-
junction sequences.

Expression levels of
Transcripts (counts)

Novel
transcripts

Statistical analysis

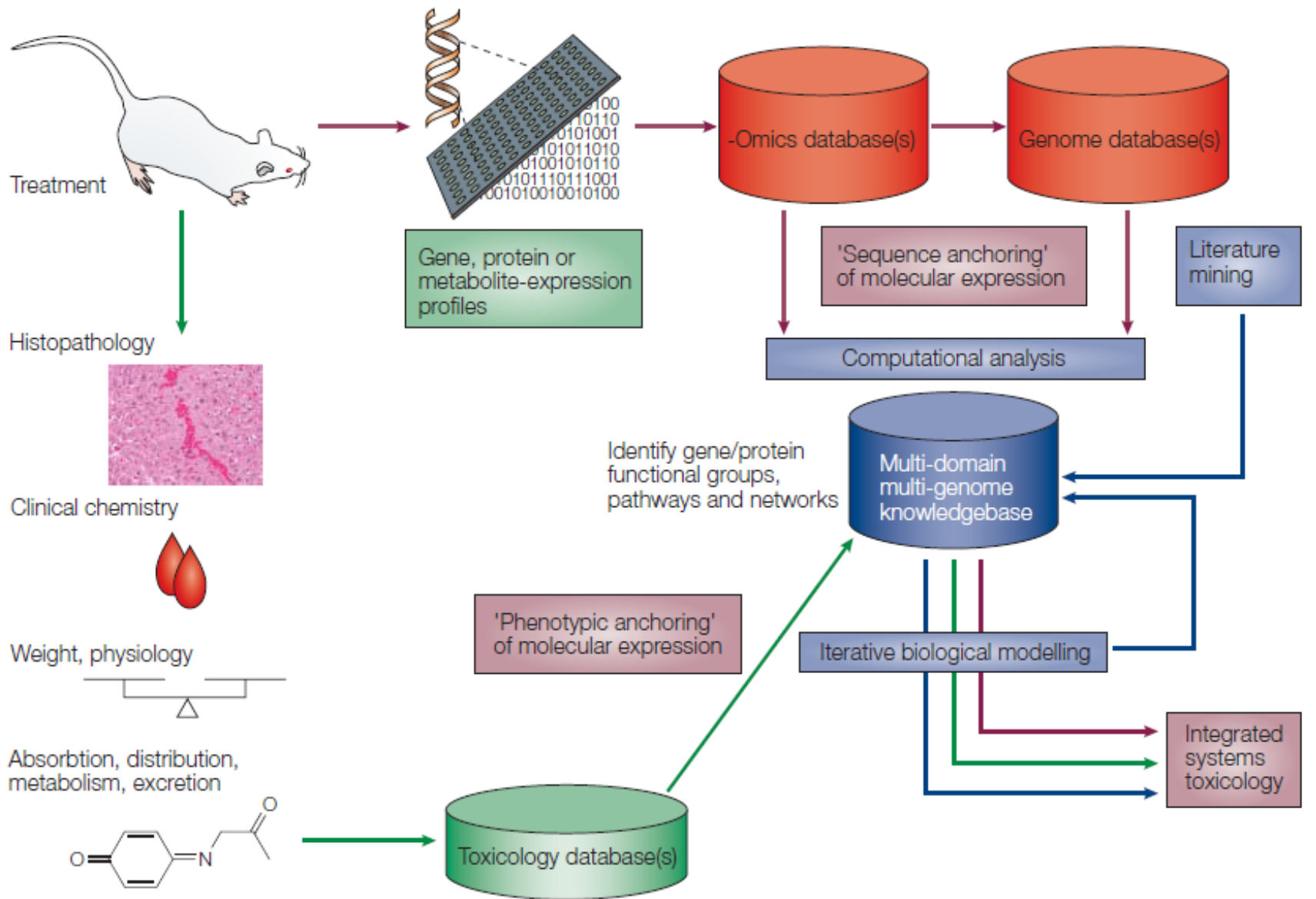
Differentially
expressed
transcripts

GO

...

KEGG

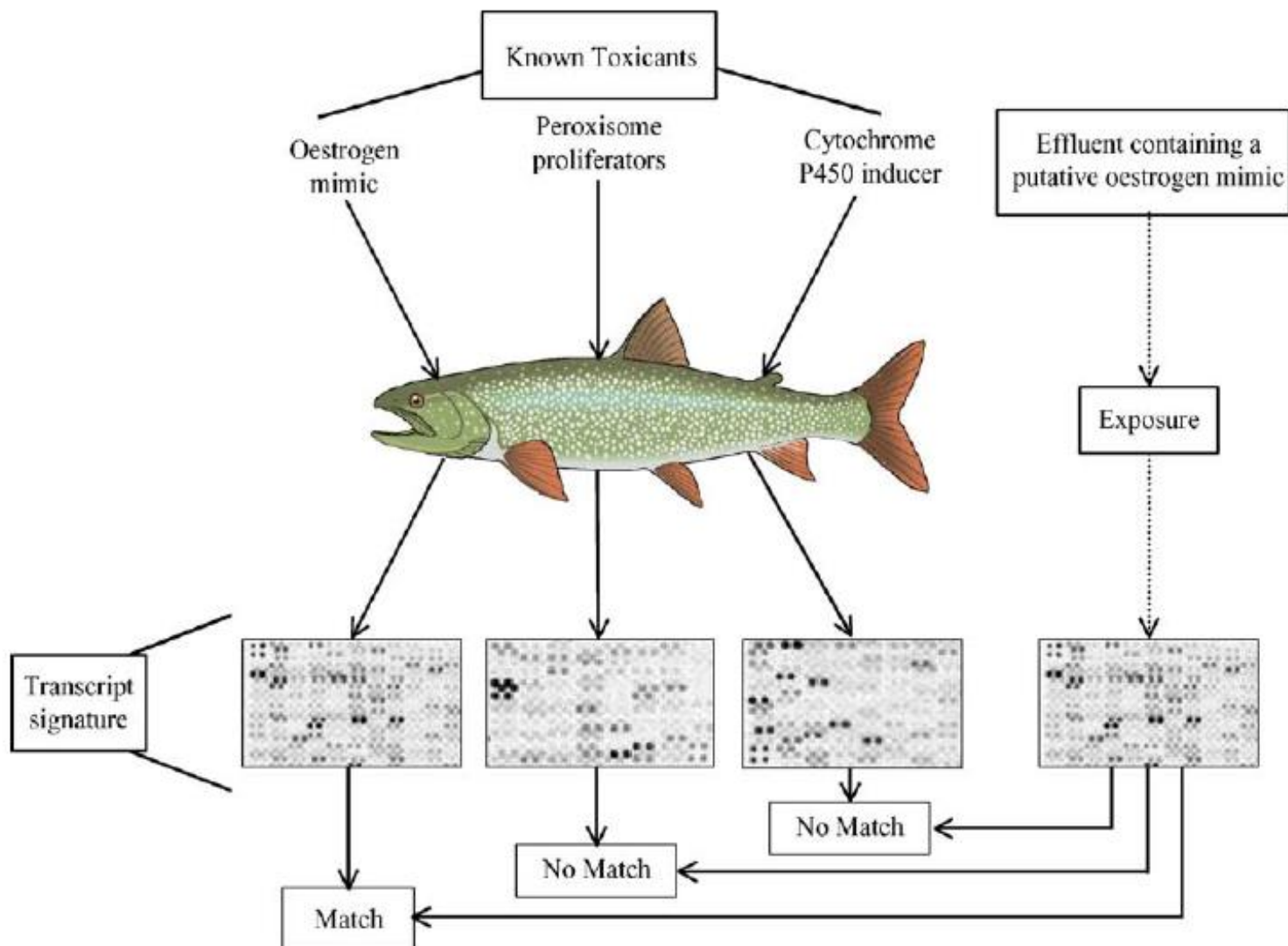




NATURE REVIEWS | GENETICS VOLUME 5 | DECEMBER 2004 | 937

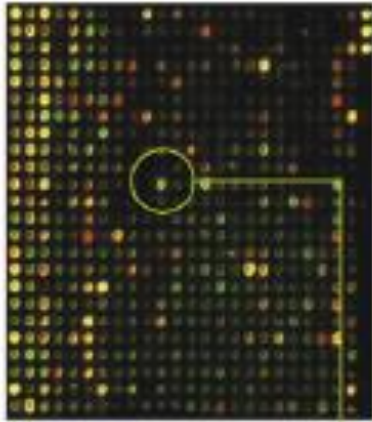


Research centre
for toxic compounds
in the environment

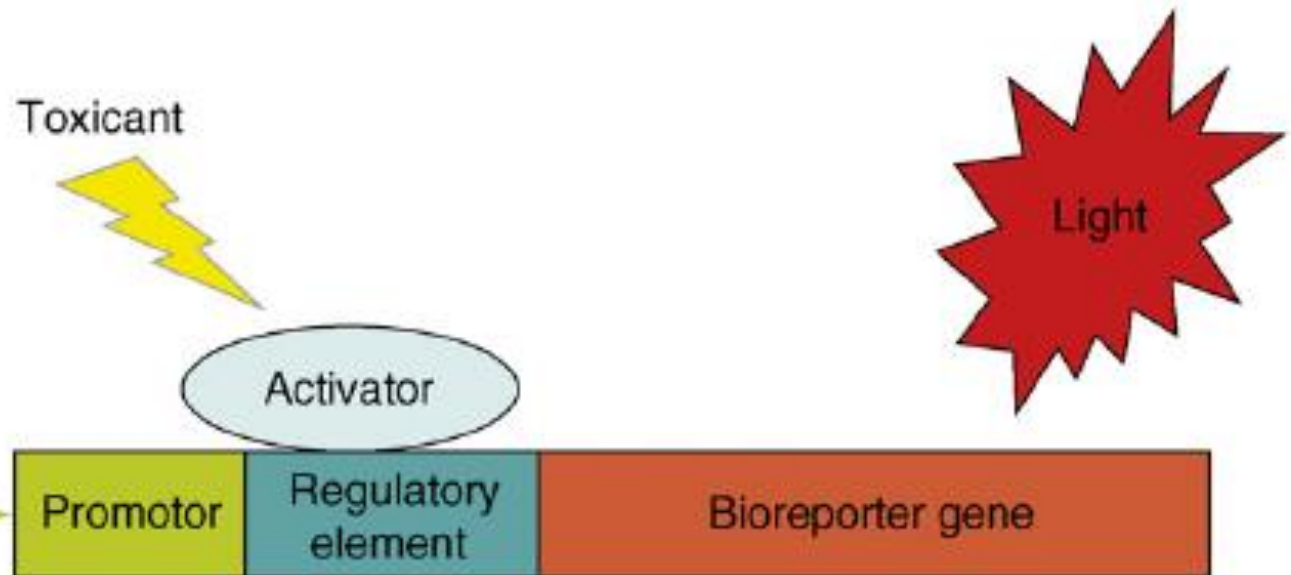


Aquatic Toxicology 67 (2004) 143–154





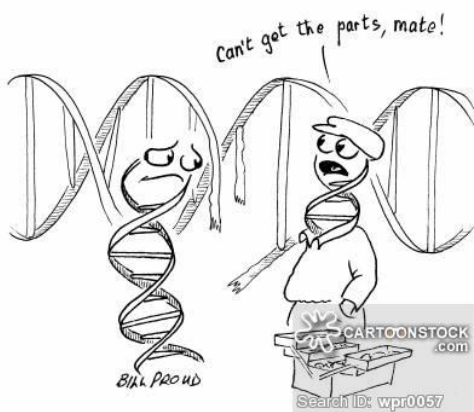
(a) Identification of toxicant specific key genes



(b) Development of a toxicant specific reporter

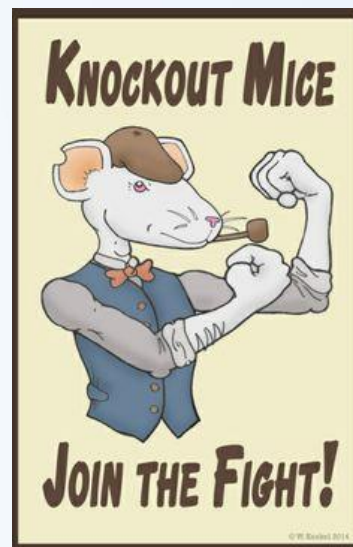
TRENDS in Biotechnology





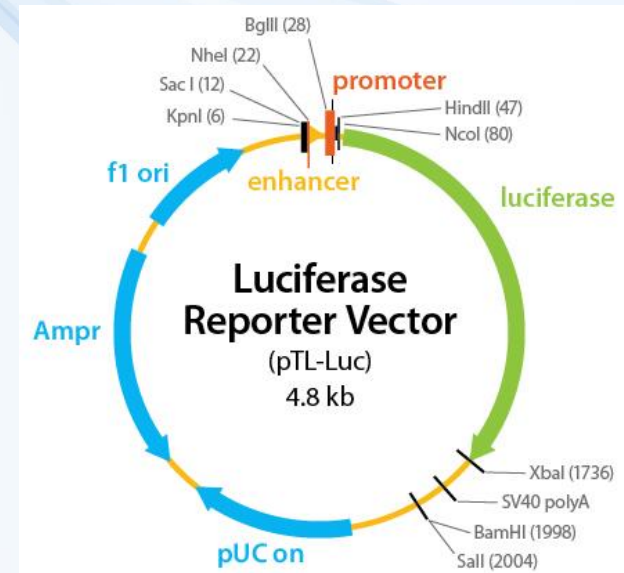
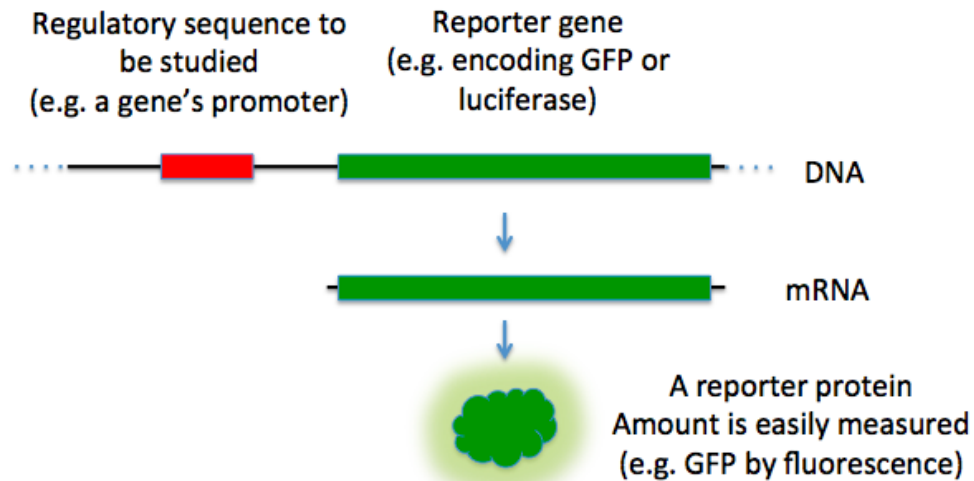
Genetic Engineer.

JAK VYTVOŘIT REKOMBINANTNÍ MODEL PRO (EKO)TOXIKOLOGII?



REKOMBINACE DNA: REPORTÉROVÉ MODELY

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

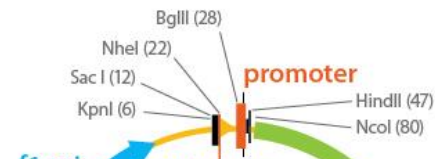


REKOMBINACE DNA: REPORTÉROVÉ MODELY

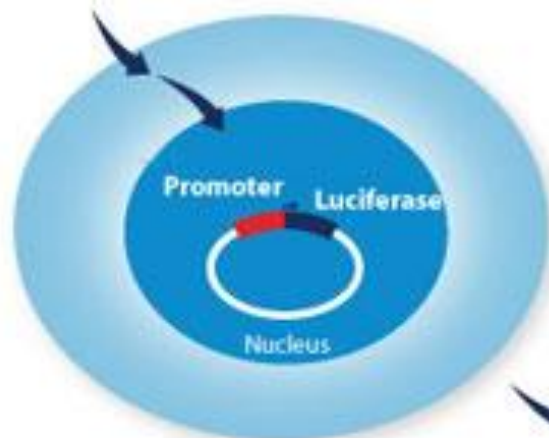
<http://worldwide.promega.com/resources/multimedia/reporter-assays-and-transfection/introduction-to-reporter-gene-assays/>

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

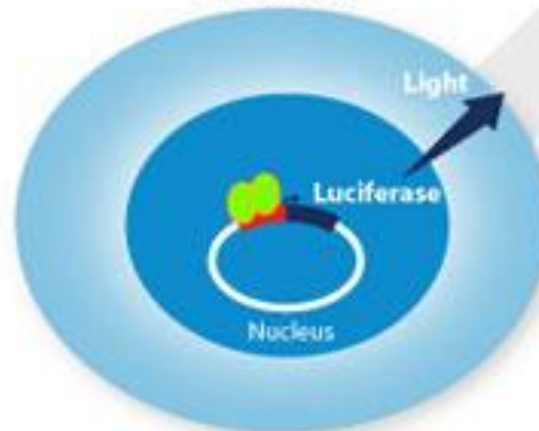
Reporter gene (e.g. encoding GFP or luciferase)



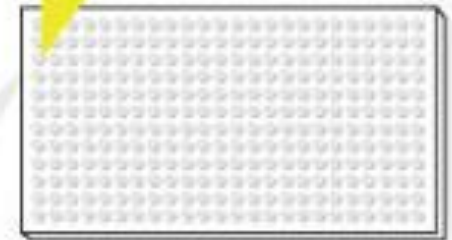
Apply Stimulus

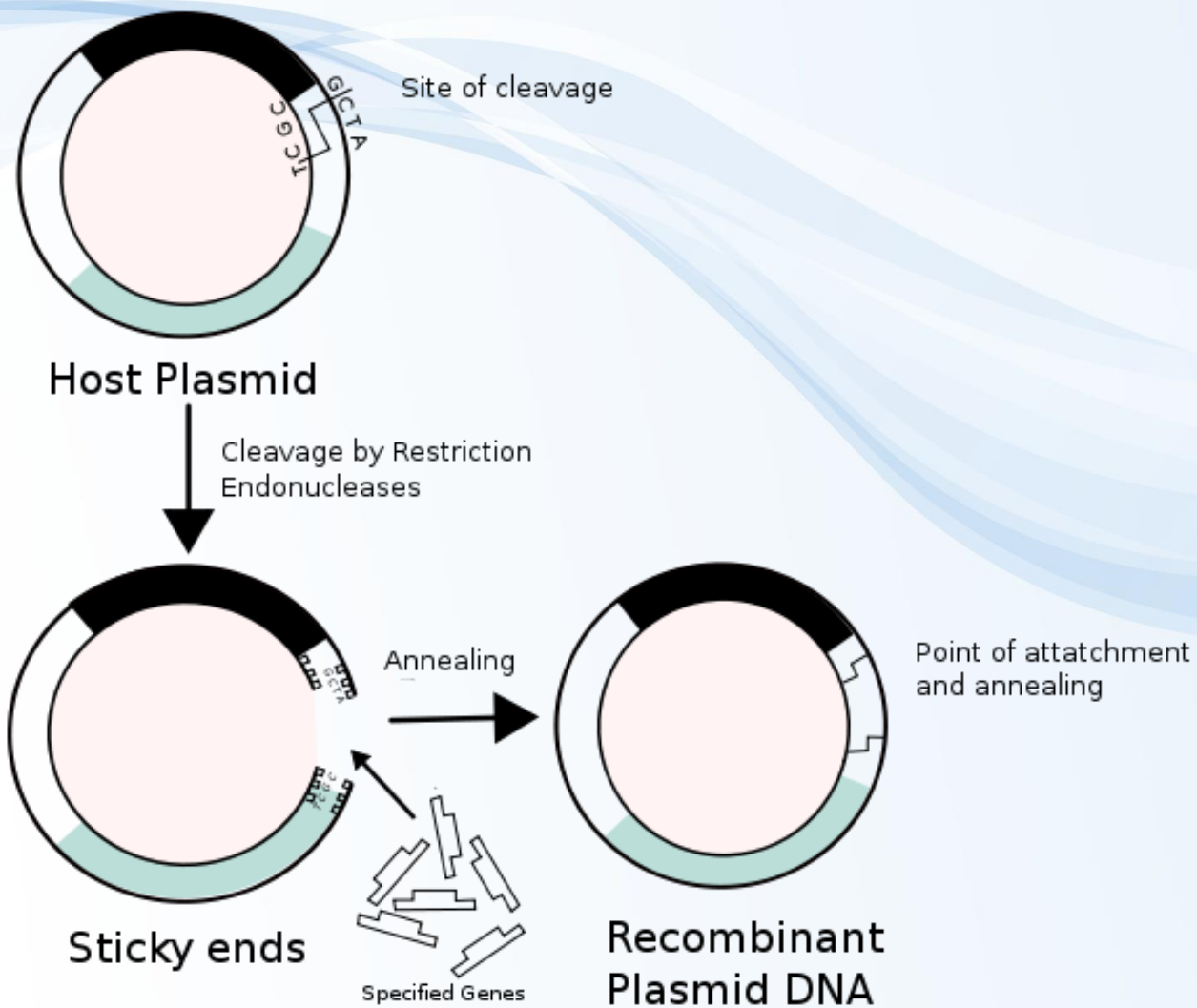


Transcription factors are activated and bind to promoter



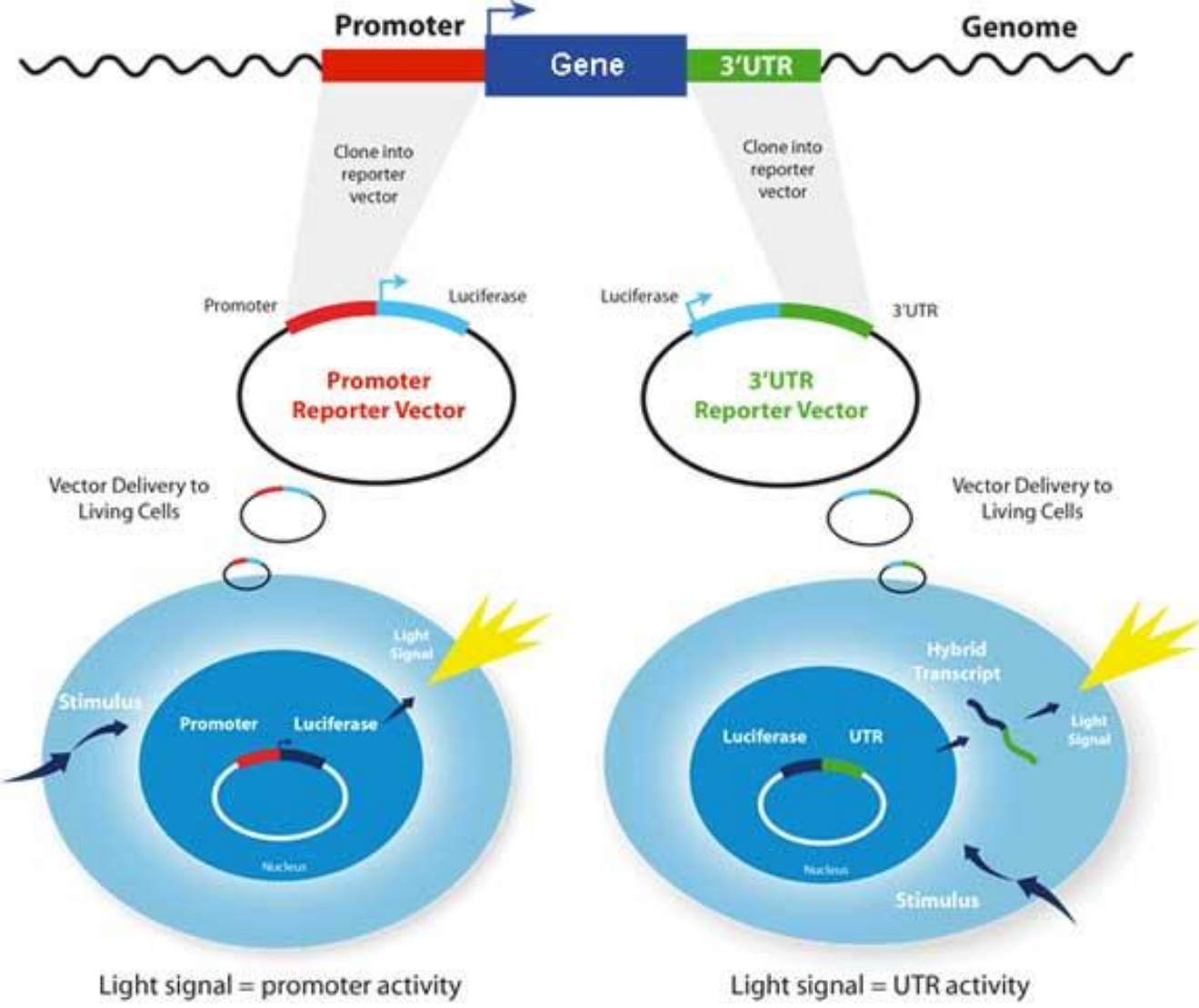
Measure luciferase activity





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

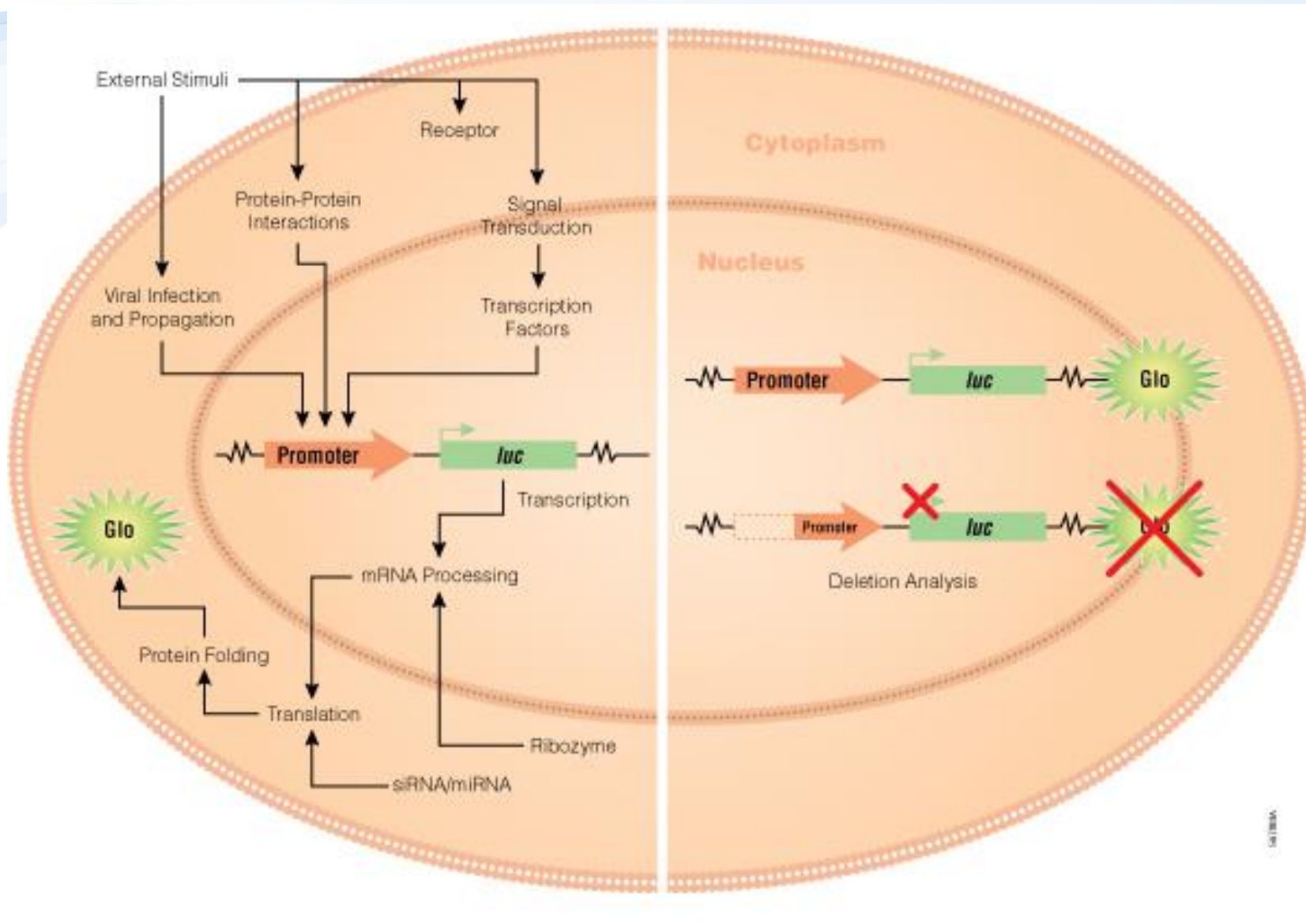




1. Promoter nebo 3'UTR responzivního elementu
2. Tvorba plazmidu a jeho namnožení (restrikční enzymy, klonování, selekce a izolace plazmidů)
3. Přenesení konstruktu (plazmidu) do buněk = transfekce

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

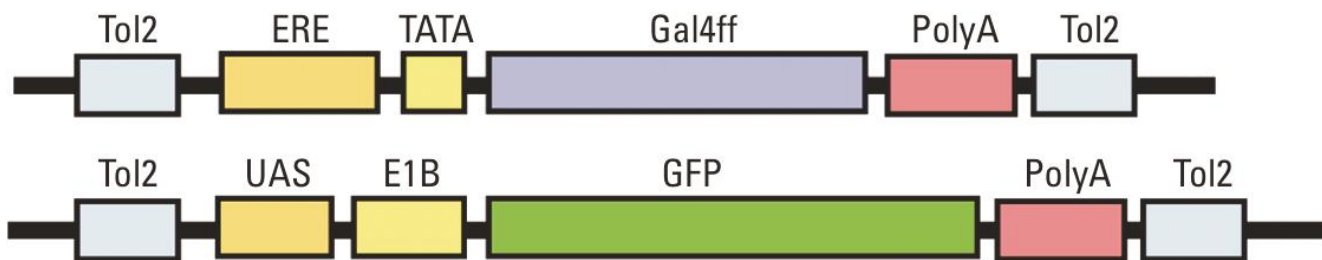
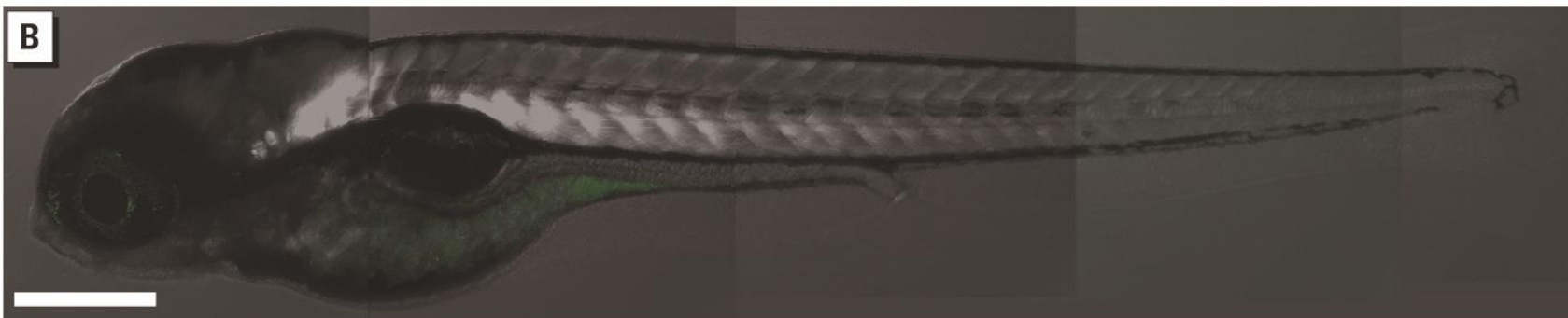
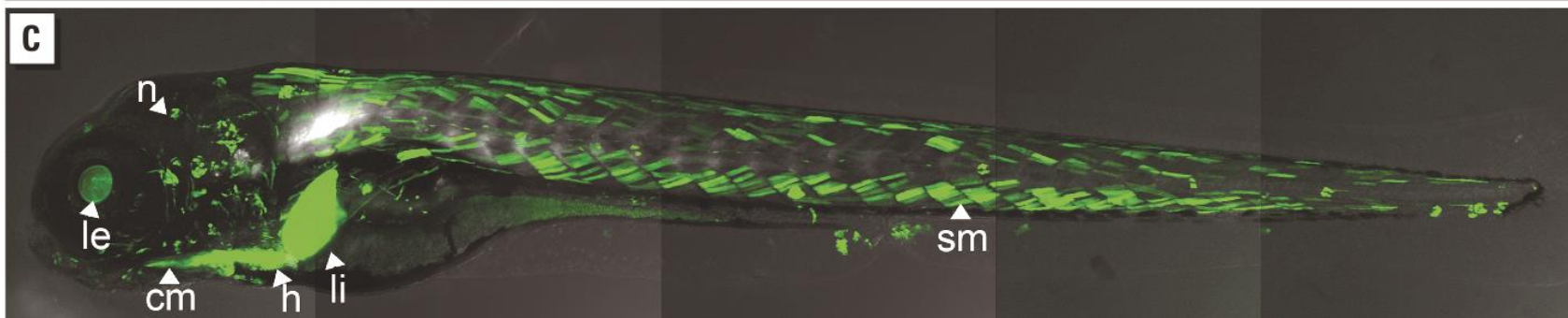




<http://worldwide.promega.com>



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

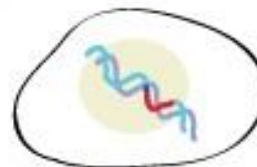
- 1 Generate master TARGATT™ Cells with attP sites (6 months)



- 3 Transfection



- 4 TARGATT™ Cell Lines Expressing Gene of Interest



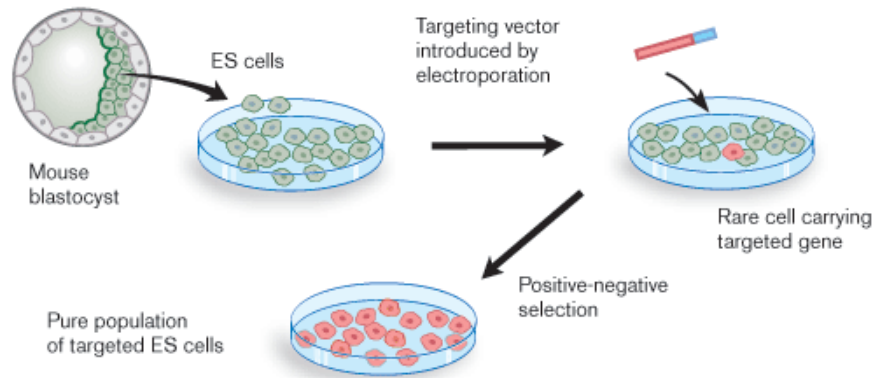
Knock-in Cell Line
within 1 - 3 months

Applications

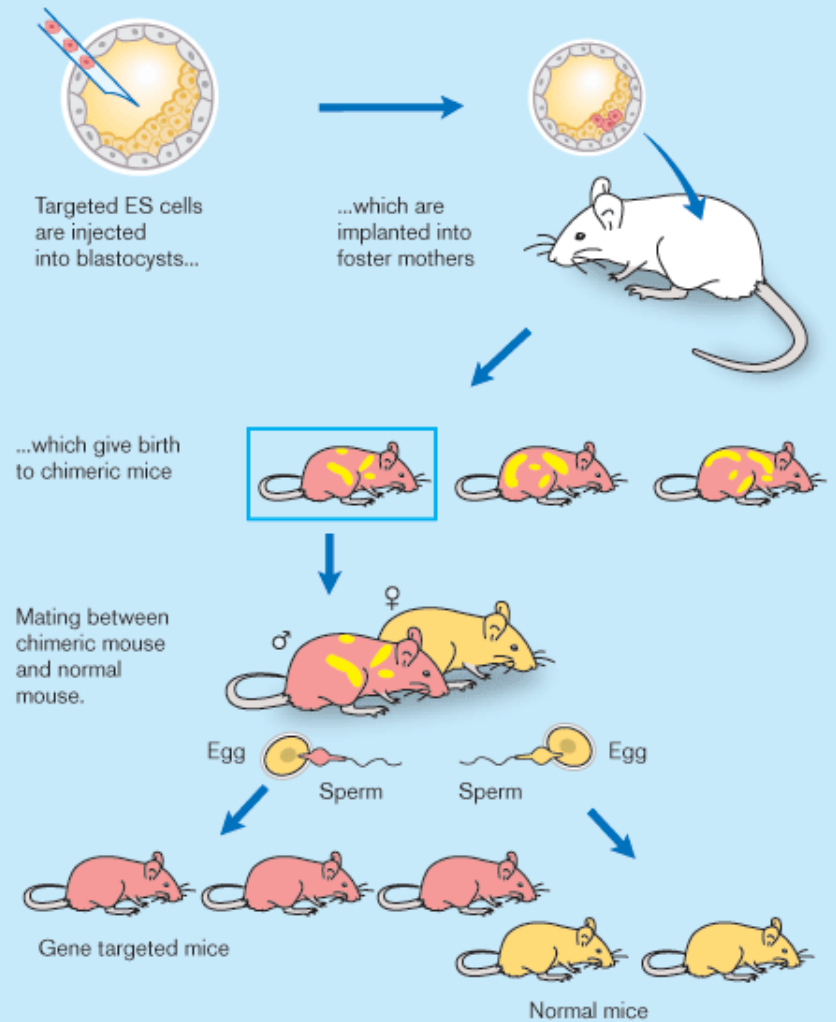
in vitro screenings
Drug discovery
Study drug interactions
Toxicity Study
Personalized medicine



A. Gene targeting of embryonic stem cells



B. Generation of gene targeted mice

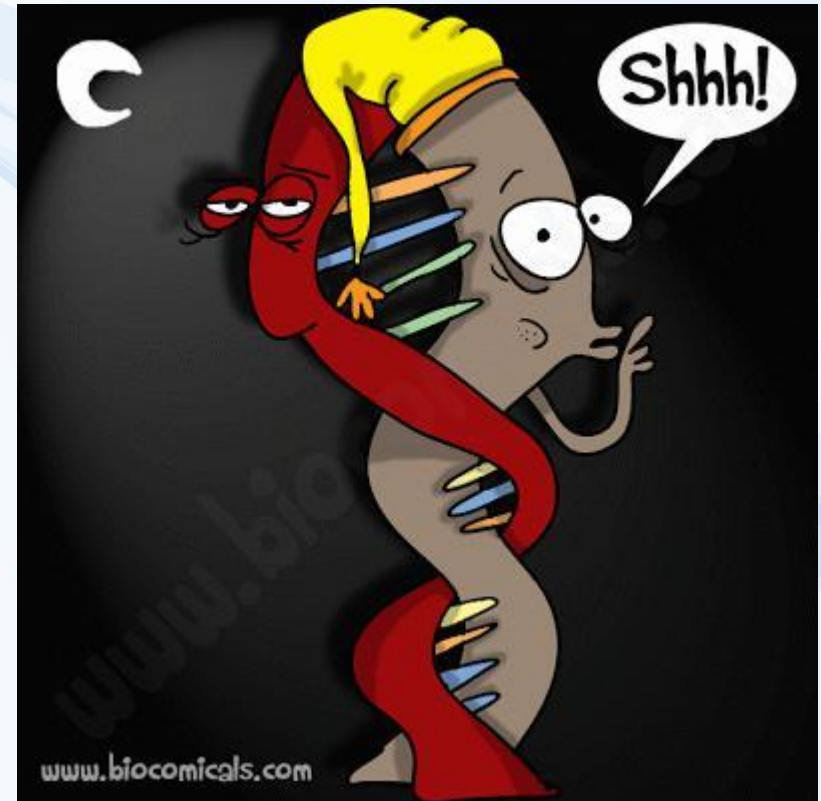
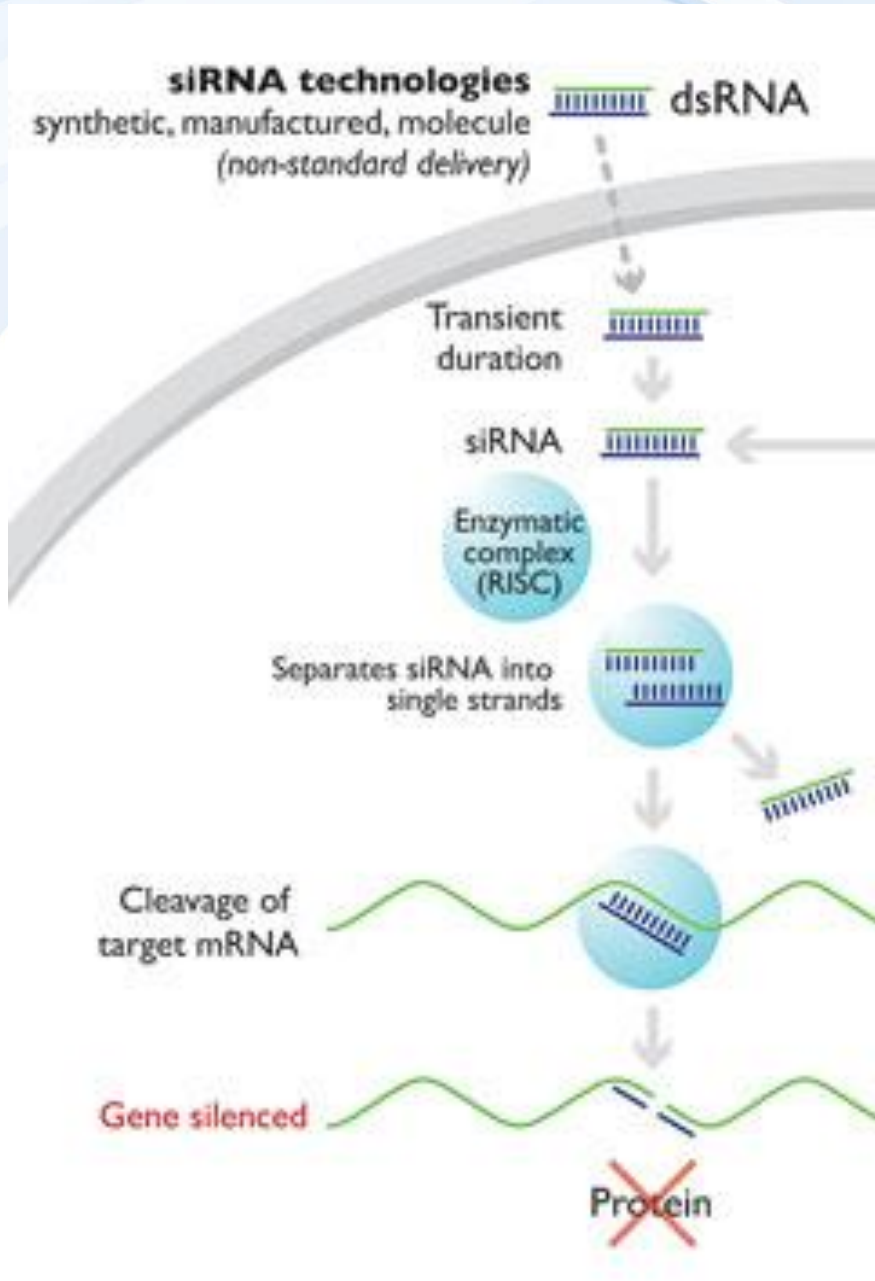


ANNIKA RÖHL

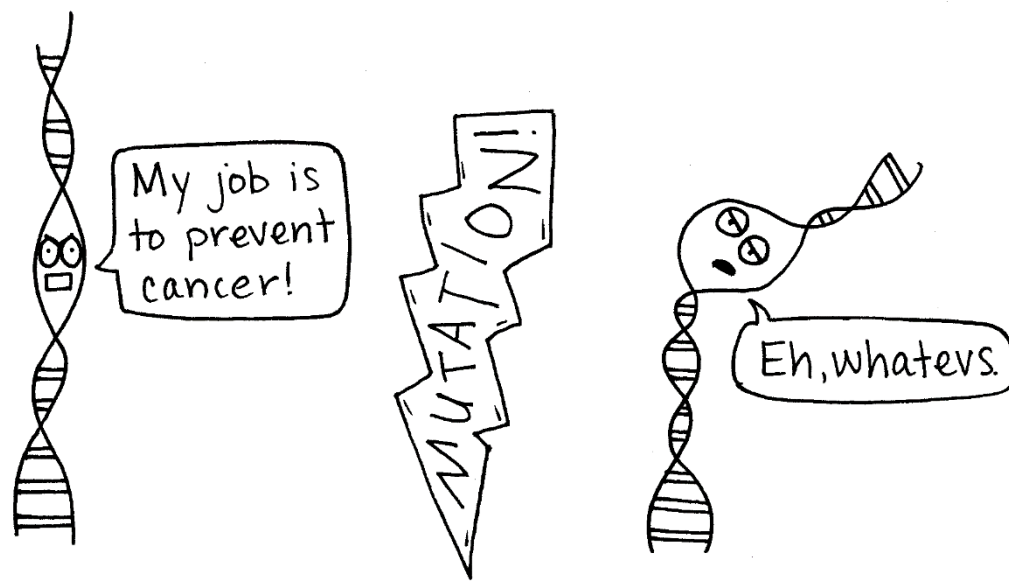
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/advanced.html



□ “siRNA”, ribozymy,

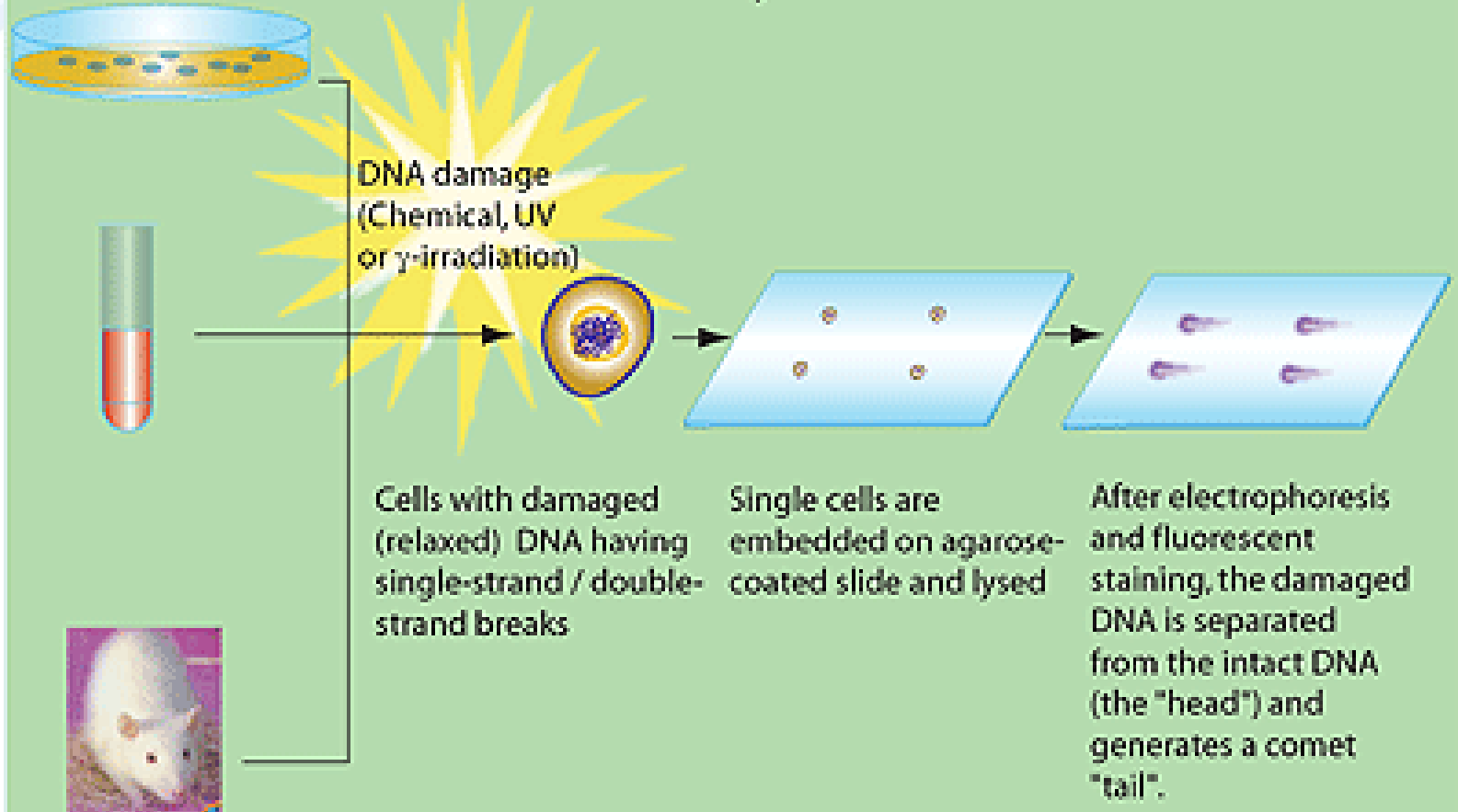


JAK STUDUJEME GENO(EKO)TOXICITU?



GENOTOXICITA: COMET ASSAY

Comet Assay Overview



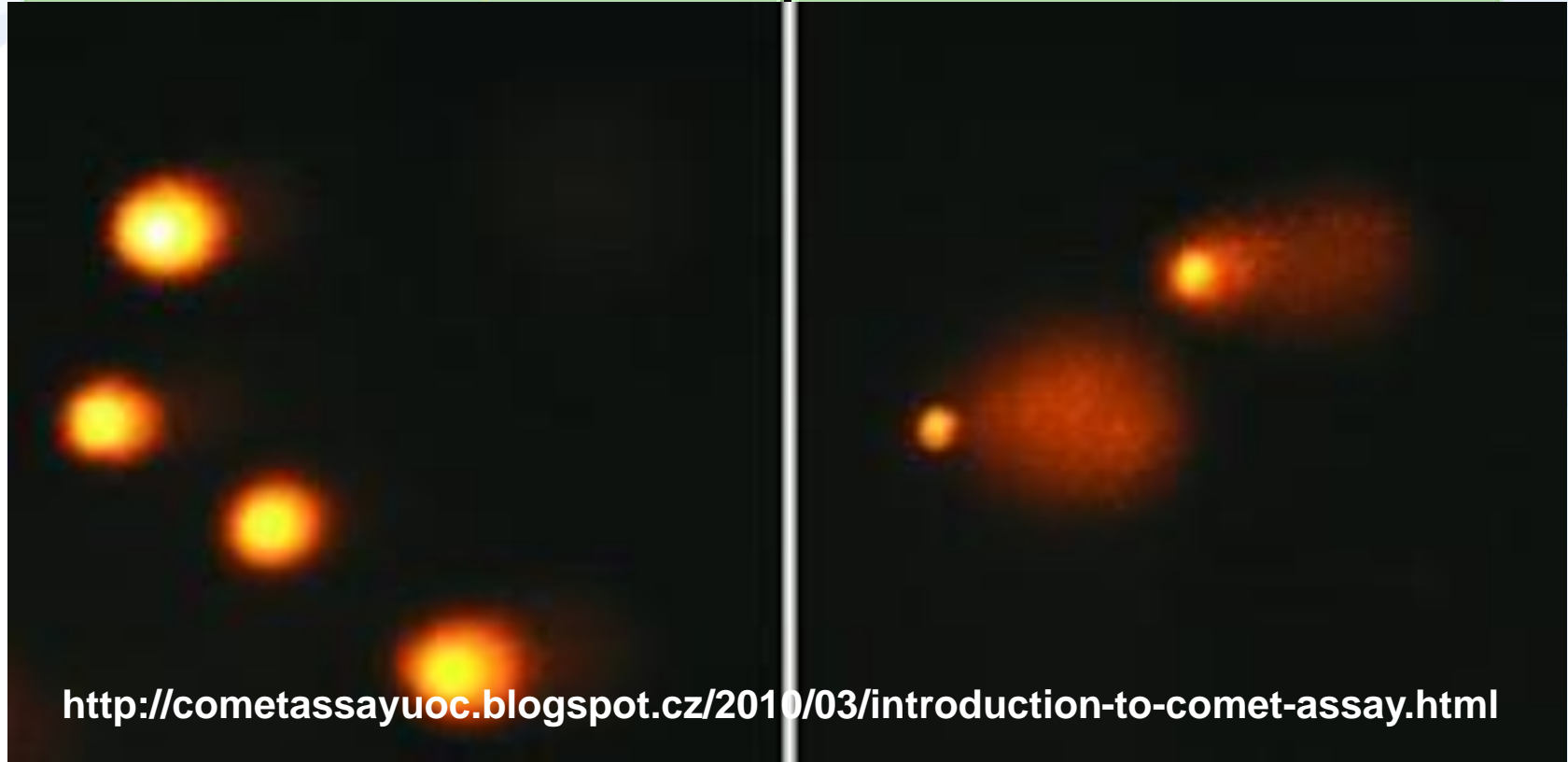
Living cells from
culture media,
blood, or tissue

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



GENOTOXICITA: COMET ASSAY

Comet Assay Overview



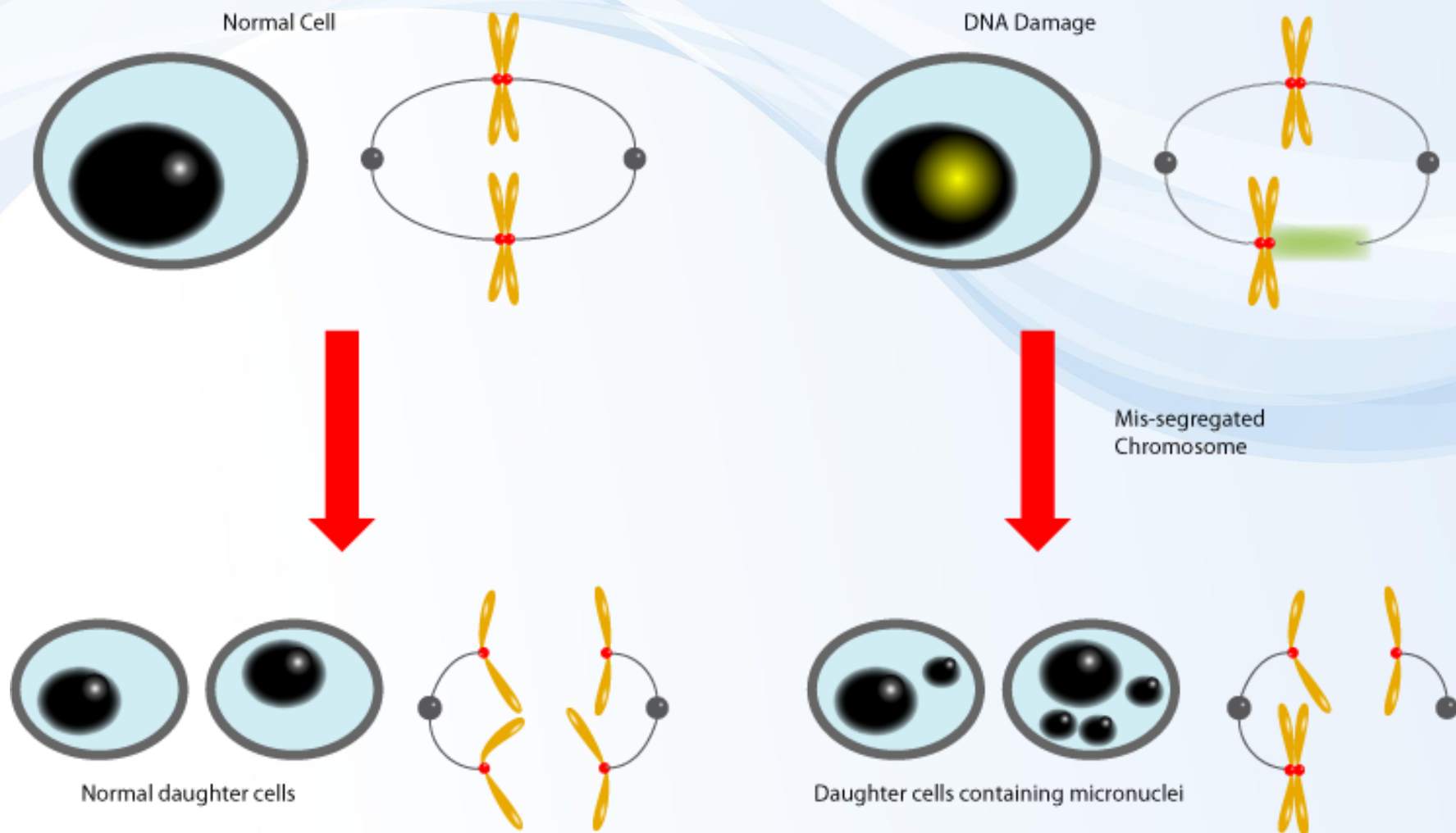
Living cells from
culture media,
blood, or tissue

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

generates a comet
"tail".



GENOTOXICITA: MIKROJÁDROVÝ TEST



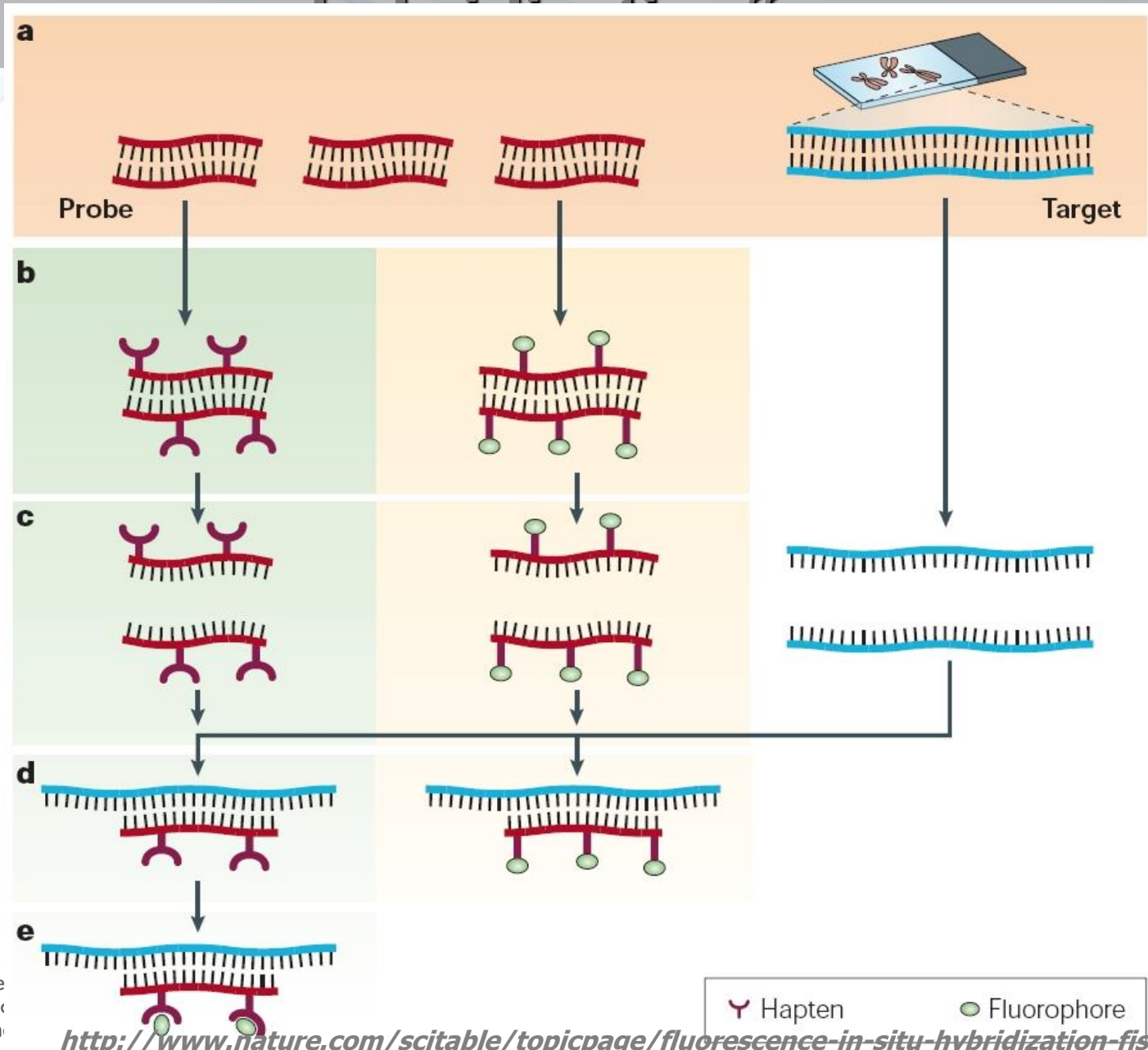
<http://www.gentronix.co.uk/product/micro-nucleus-test/>



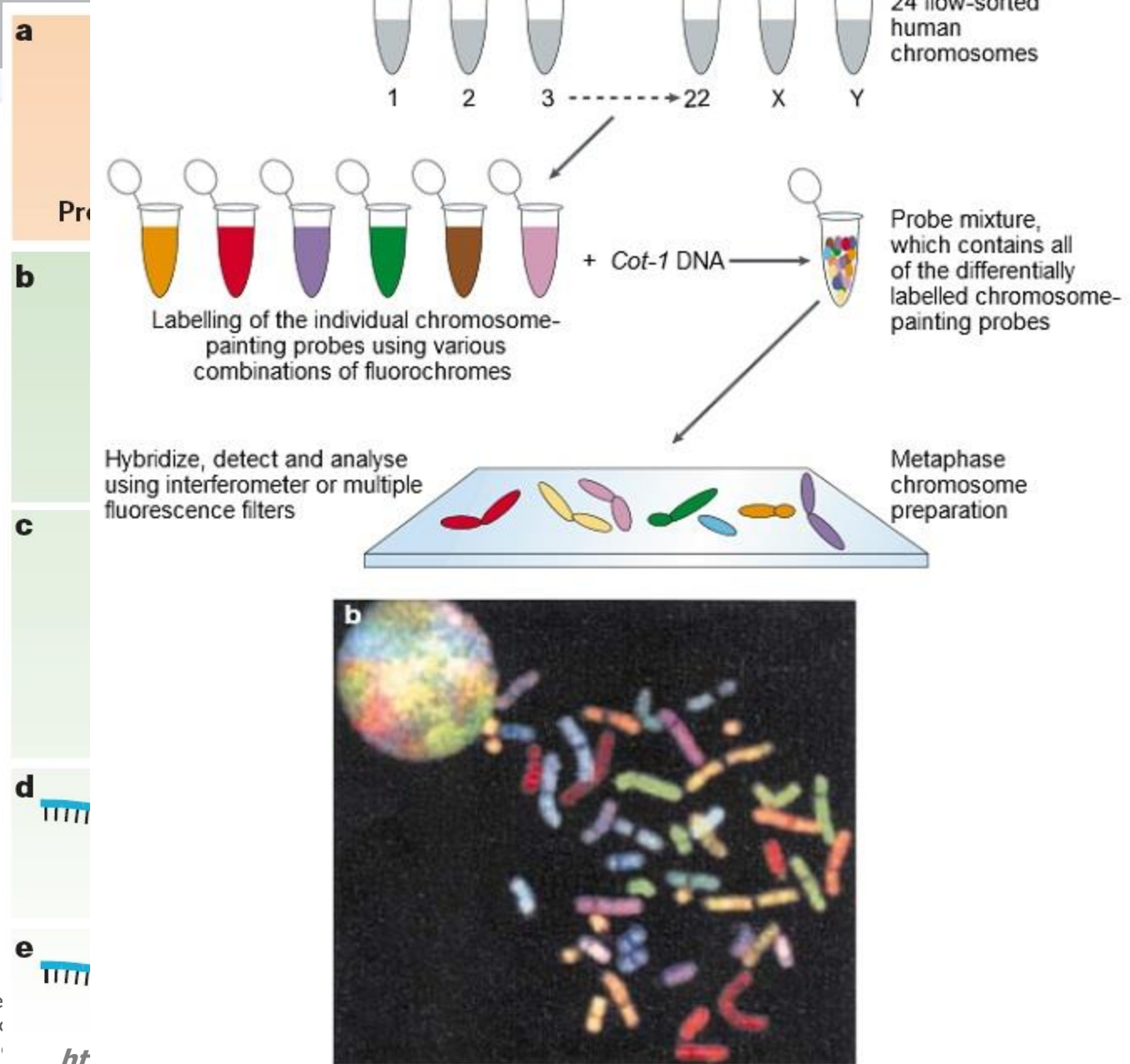
GENOTOXICITA: FISH – „Fluorescence in situ hybridization“



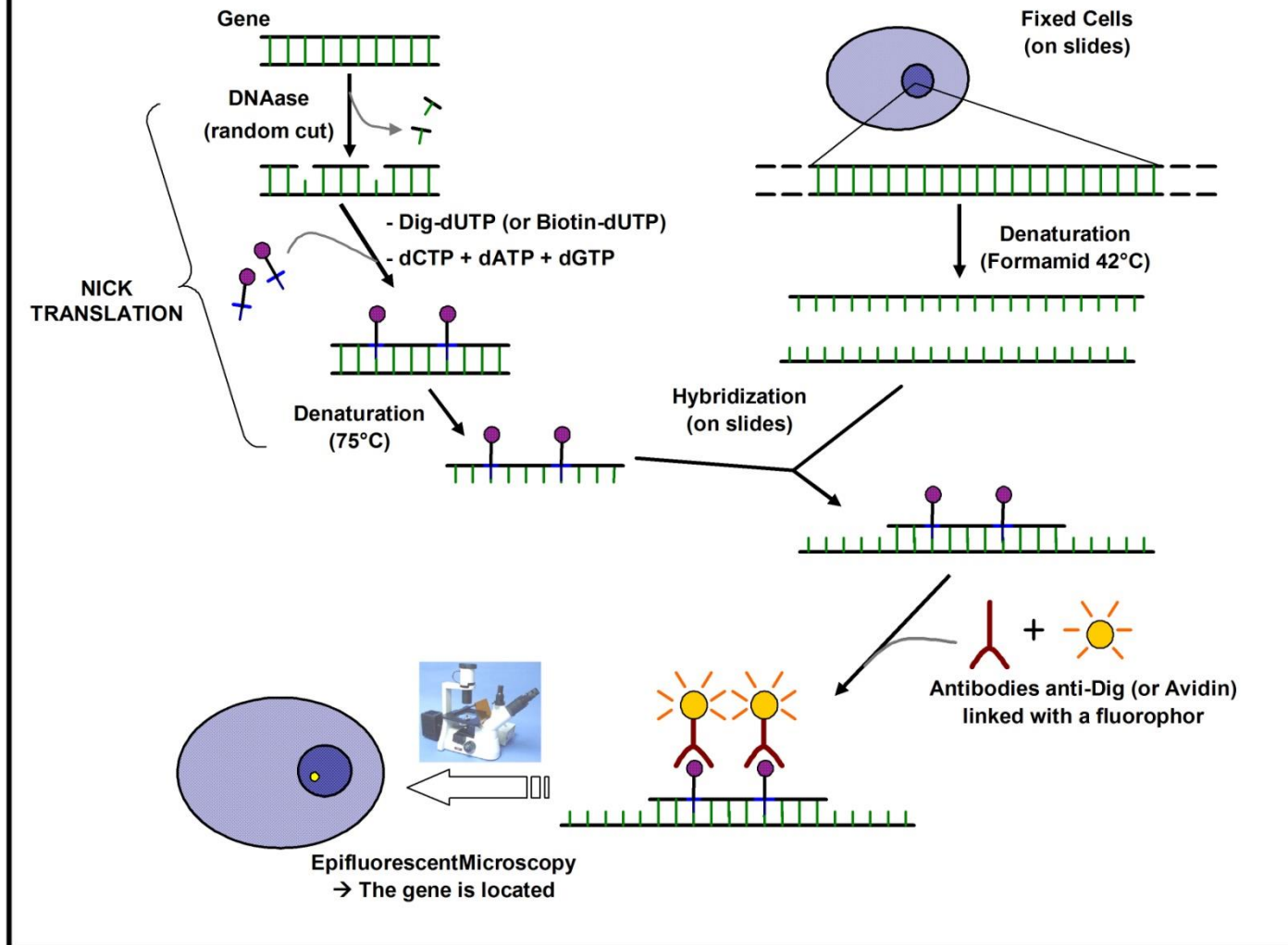
GENOTOXICITA: FISH – „Fluorescence in situ



Rese
for t
in th



FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



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



