

# C5720 Biochemie

18b-Metody studia nukleových kyselin

# Obsah

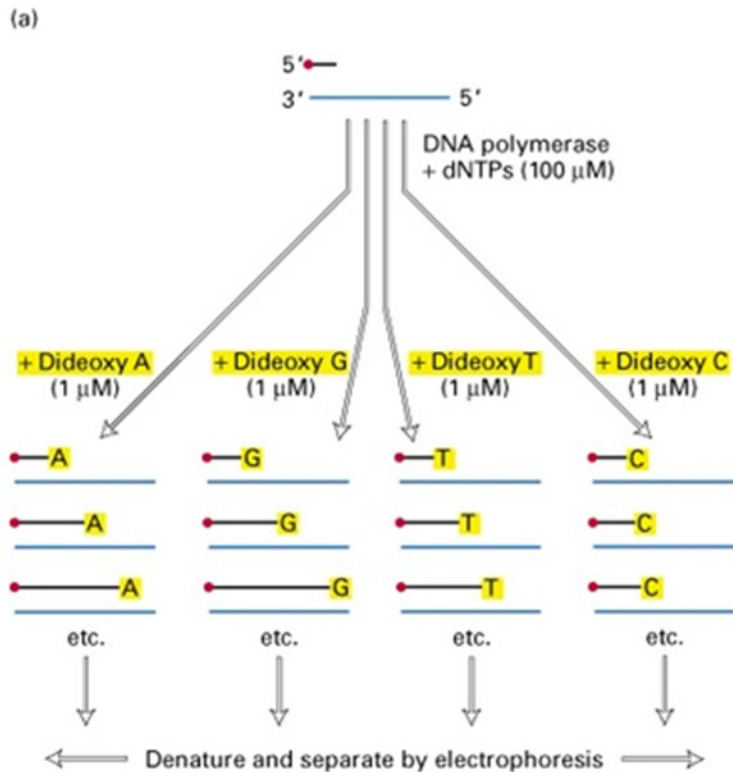
- Metody studia nukleových kyselin
- Sekvenace
- PCR

# Určení sekvence DNA

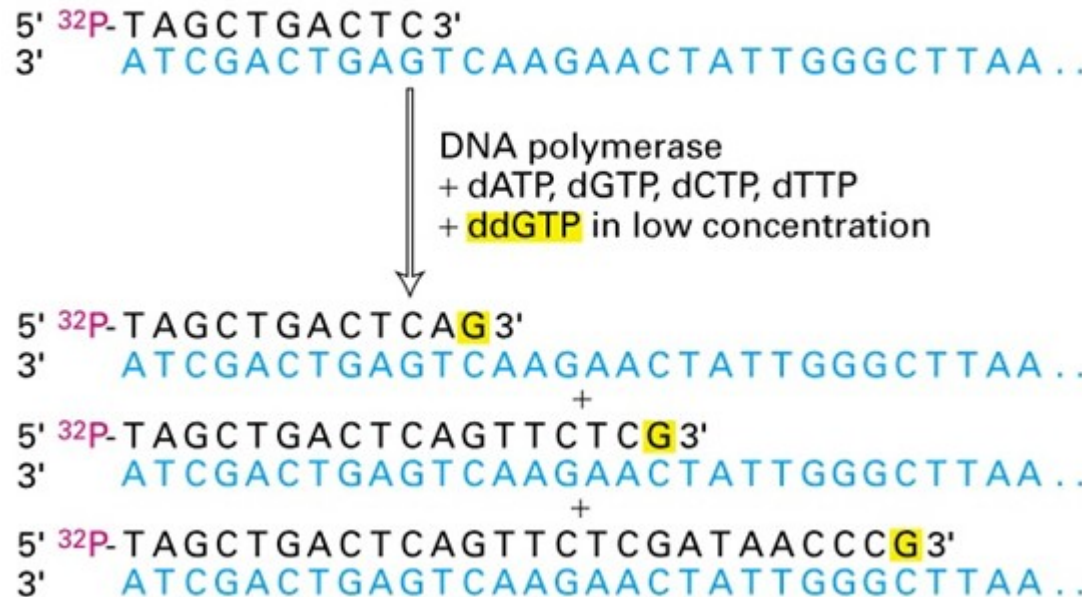
- Sekvence DNA, základní principy
  - chemická (selektivní štěpení – Maxam-Gilbert)
  - biochemická (syntéza, dideoxy metoda - Sanger)
- Postupná sekvenace štěpů
- Kombinace oligonukleotidů
- Další zdokonalování metod, modifikace
- Vícekanálová zařízení
- Hybridizační sondy
  - FISH (fluorescence *in situ* hybridization)
- DNA čipy

# Určení sekvence DNA

- Dideoxy sekvenace – nápodoba replikace
  - Značené primery (+ dNTP, DNA polymerasa, templát - ssDNA)
  - Dideoxy (dd)NTP – 4 nádoby (a)
  - Produkty končí danou bází = (b)

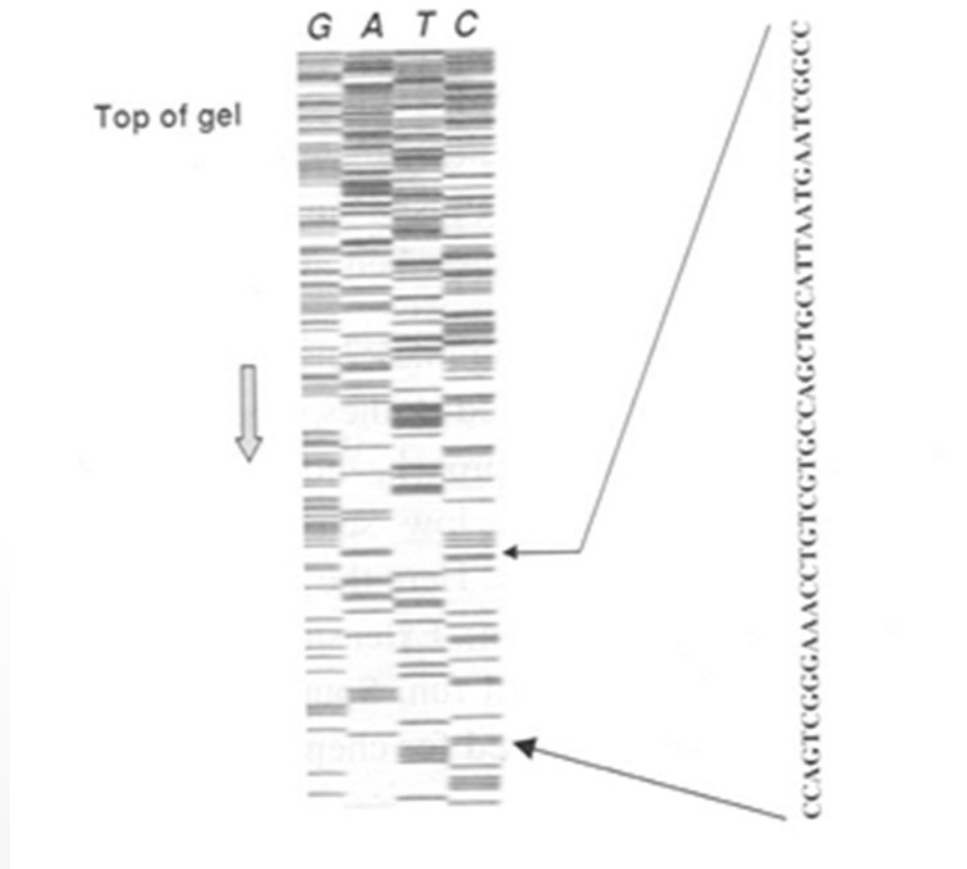


(b)



# Určení sekvence DNA

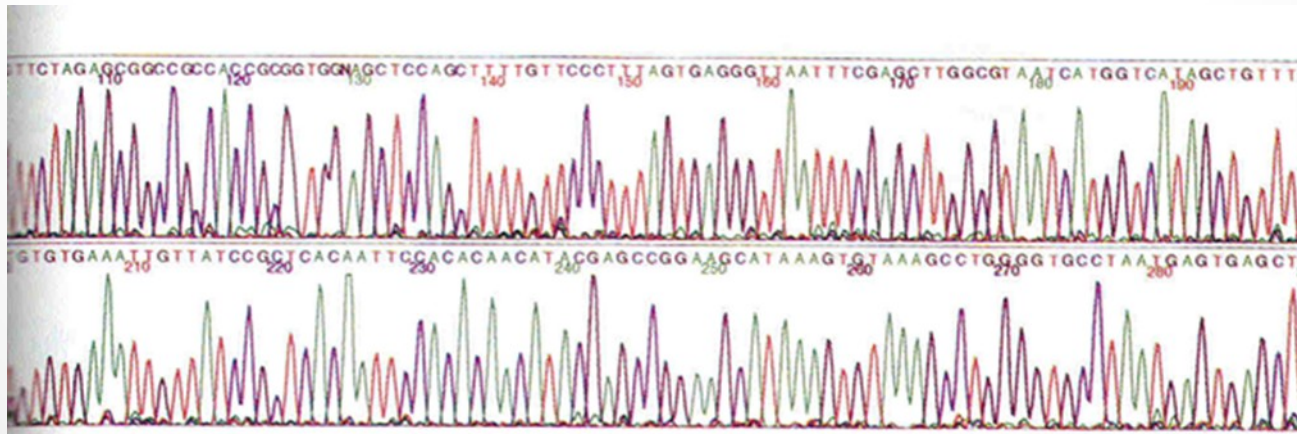
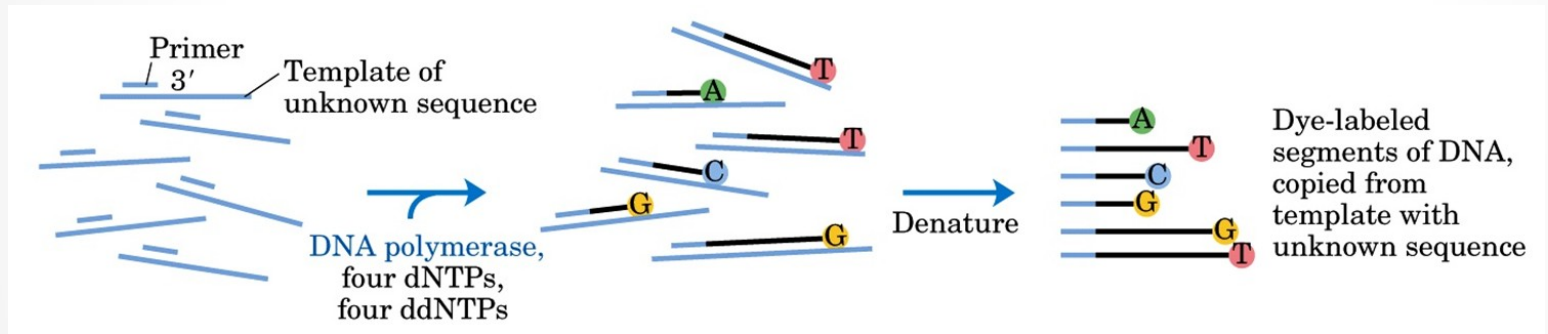
- Dideoxy sekvenace
  - Elektroforesa – autoradiografie – 4 dráhy



# Určení sekvence DNA

- Dideoxy sekvenace

- Fluorescenční značení – odlišné pro každý ddNTP
- Dideoxy (dd)NTP – 1 nádobka
- Produkty končí danou bází - odlišně fluoreskující
- CZE v 1 vzorku – automatizace, vícekanálové analýzy

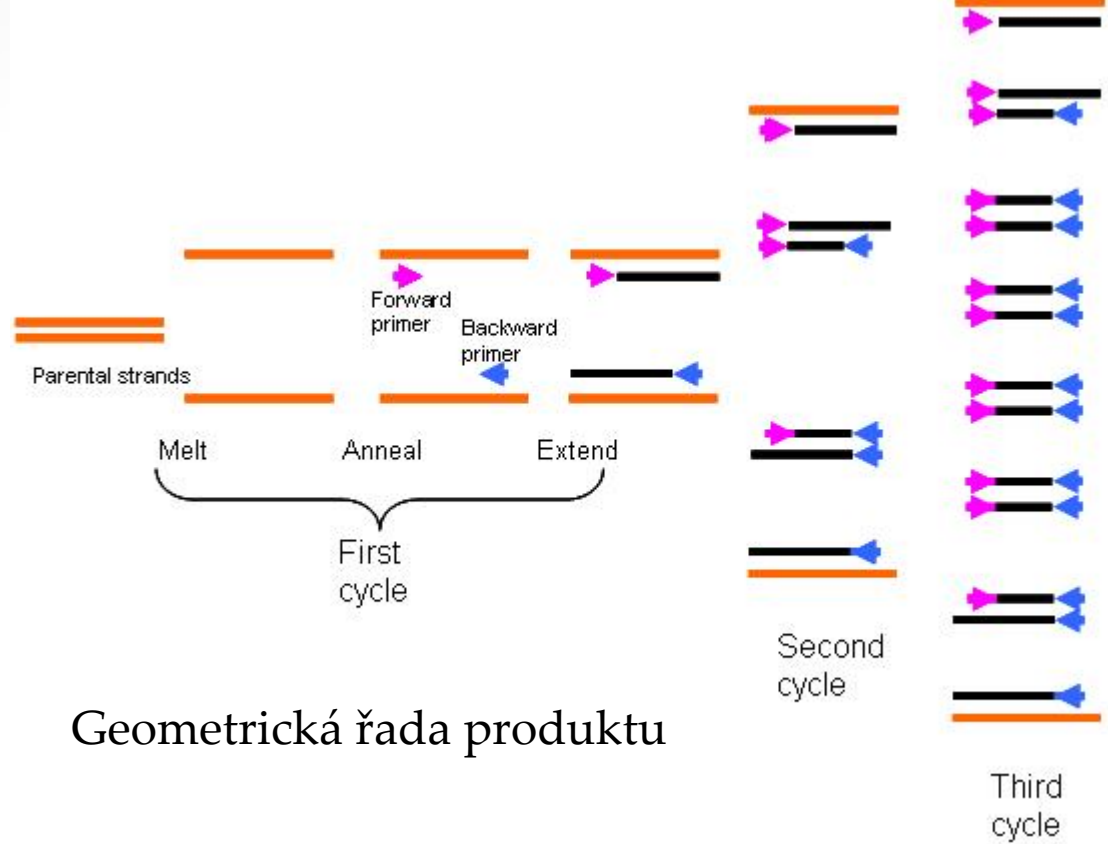


# PCR

- Polymerázová řetězová reakce
  - Opakování replikace zkoumaného úseku
  - Cyklická změna T
- Komponenty
  - Taq polymeráza, dNTP, primery, vzorek-templát
  - Termocycler
  - Potřeba primerů
- Kvantitativní PCR
  - RT PCR
- Význam
  - analytický – diagnostika, forenzní analýza,
  - preparativní - pomnožení materiálu, cílené mutace, umělé geny atd.

# PCR

- Schema
- Nadbytek reaktantů
- Střídání T – cykly
  - dNTP, primery
- Střídání T – cykly
  - Denaturace – ca 95
  - Hybridizace – ca 50
  - Polymerace – ca 65
- Geometrická řada
  - Analýza produktů
- Variace
  - Hybridizace – vliv T

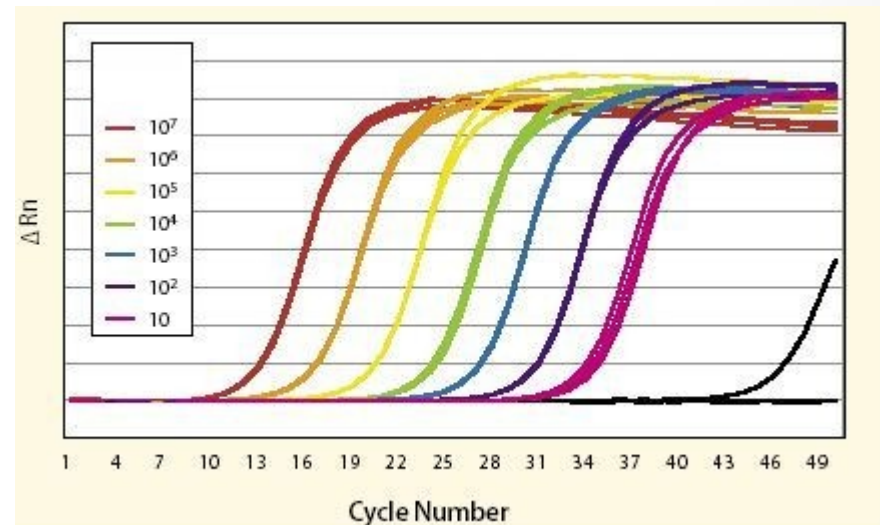
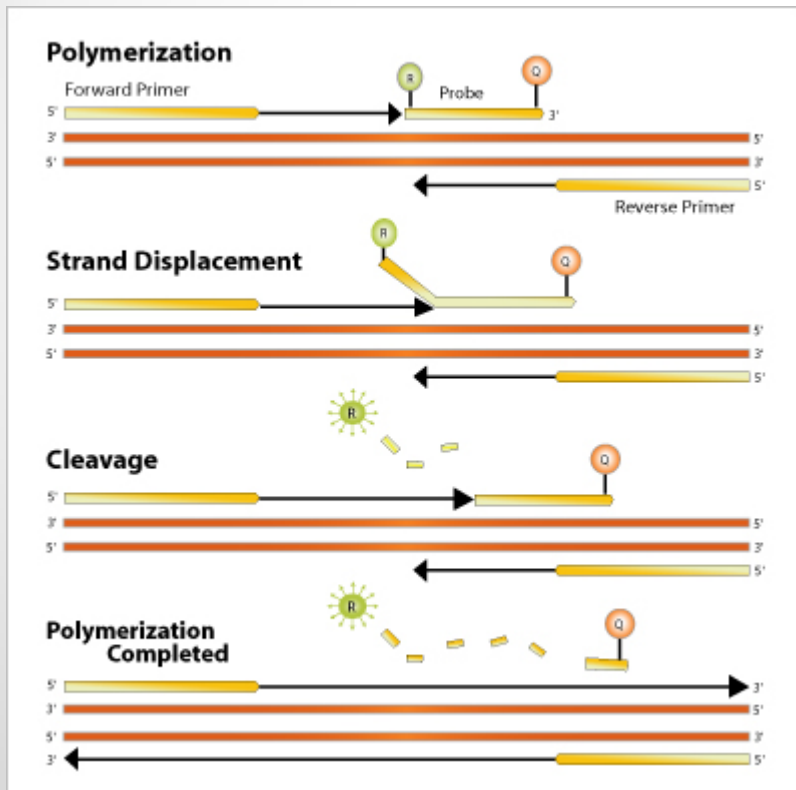




# Kvantitativní PCR

- Schéma RT PCR

- Sledování fluorescencí, kvantifikace
- Využití fluorescence, 3'-exonukleasové aktivity Taq polymerasy



# Modifikace PCR

- Využití reverzní transkriptázy
- Syntéza cDNA

