

MODULARIZACE VÝUKY EVOLUČNÍ A EKOLOGICKÉ BIOLOGIE

CZ.1.07/2.2.00/15.0204



Metodologie molekulární fylogeneze a taxonomie hmyzu

Bi7770

Andrea Tóthová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Metody

Molekulární znaky mají oproti klasickým řadu výhod:

Je jich libovolné množství

Jsou vzájemně distinktní, kvalitativní

Umožňují srovnávat i nepříbuzné organizmy

Jsou selekčně neutrální

Kde se molekulární biologie využívá?

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

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

Základné metody

- Štěpení NK
- **Polymerase chain reaction**
- Proby, hybridizace
- Vektory, molekulární klonování
- Microarrays
- **DNA sequencing**
- **Elektroforetická separace NK**

- Detekce genů:
 - *DNA: Southern blotting; inSitu hybridization; FISH
Technique
 - *RNA: Northern blotting
 - *Protein: Western blotting, immunohistochemistry

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

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



Výběr použité techniky závisí pouze na nás...

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

Všeobecný postup extrakce:

1. Digesce tkáně / lyze buněk
2. „chelátování“ (zbavujem se divalentních kationů, zastavujem fungování mnoha enzymů) a proteinázová fáze (štěpíme a inaktivujeme proteiny a enzymy)
3. Separace NK a proteinů
4. Pročištění

Digestce tkání/ lyze buněk

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

Příklady metod:

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

QIAGEN DNeasy B&T kit

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

E.Z.N.A. (Omega Bio-tek)

1. Lyze: Buffer TL
 - hypertonický solný roztok
2. Použití Proteinase K
 - rozkládá proteiny a inhibuje nukleázy
3. Vysrážení DNA s EtOH
4. Spin column - DNA se naváže na silica-membránu
5. Aplikace HBC bufferu (guanidinium chloride)
6. Promytí (wash buffer) 2x
7. Eluce 1 (příp. 2), s teplým bufferem EB (Tris-EDTA) při 70°C

Jak to bylo s PCR?

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



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

Život není fair!

PCR: Amplifikace DNA

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

Co potřebuje PCR?

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

...anebo co nám kdo předmíchal

- DNA vzorku
- HiFi polymeráza
- Buffer
- Primery
- Voda

Všeobecné PCR podmínky

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

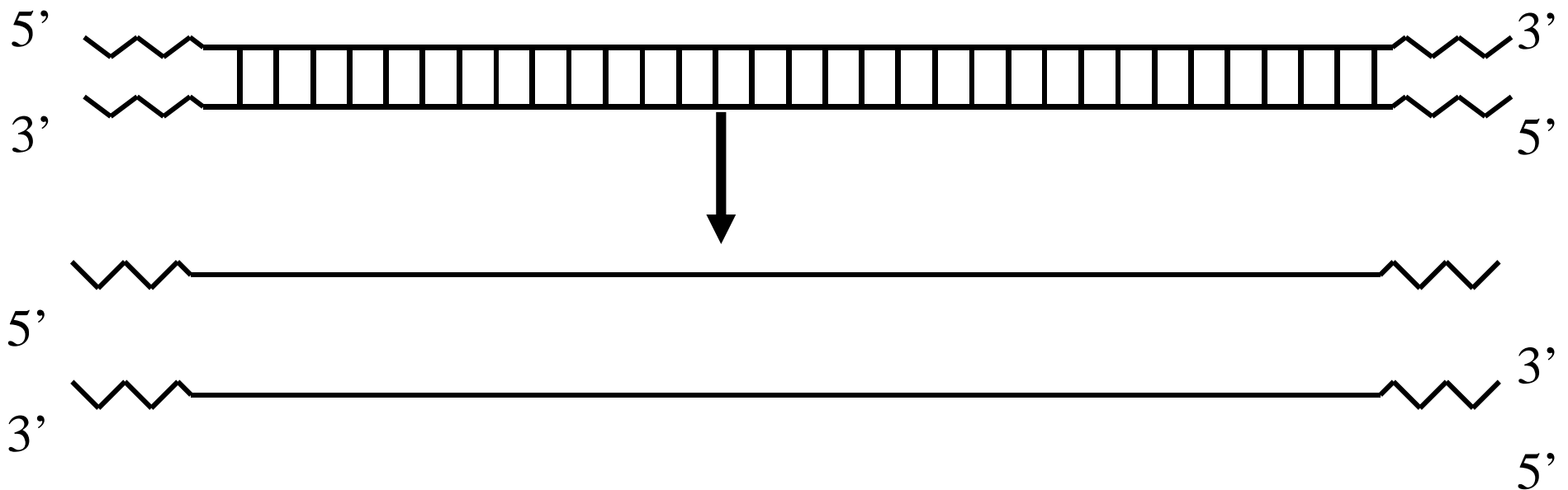
Jak tedy probíhá PCR?

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

Denaturace

Denaturace je první krok, kde se DNA rozpojí vlivem tepla

Vodíkové můstky se přeruší a obě vlákna se oddělí

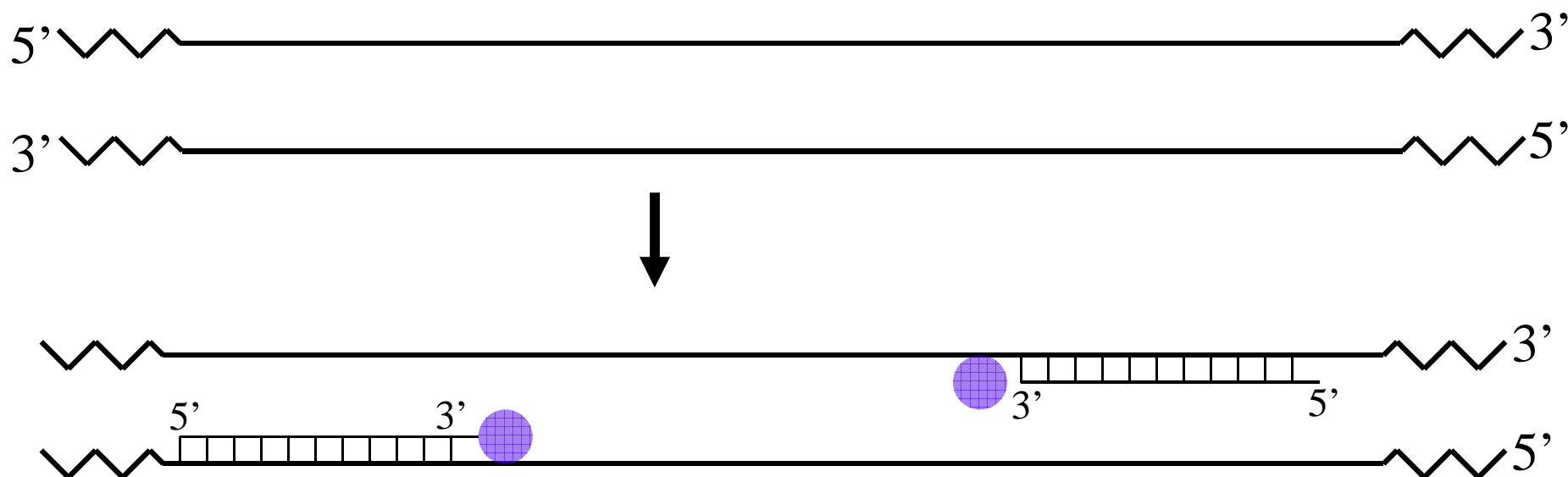


Annealing

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

Probíhá při zchlazení na 55°C nebo jinou annealingovou teplotu.

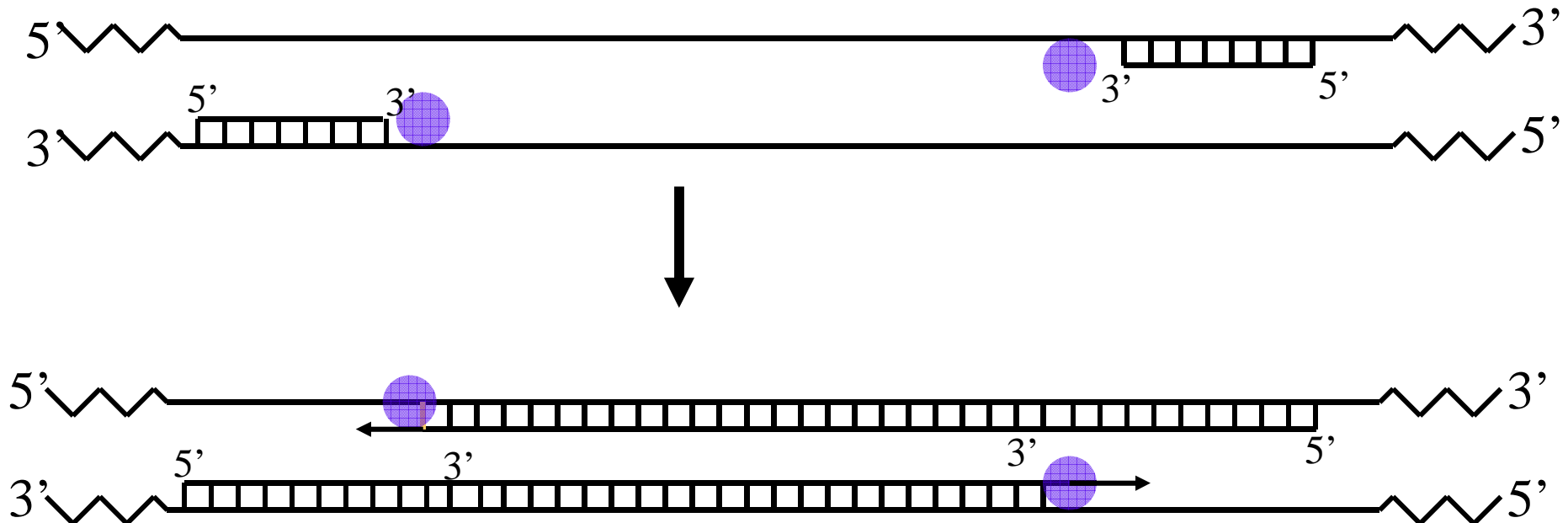
Čas potřebný k tvorbě nového vlákna je ca. 45 sekund (pro 1kb)



Elongace

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

Probíhá to u 72°C jako optimální teplotě pro TAQ



PCR Review

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

PCR Primery

Primer je úsek NK, který slouží jako startovací místo replikace

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

Design PCR primerů

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

Problémy s primery

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

5'-ACCGGTAGCCACGAATTCGT-3'

|||||||

3'-

TGCTTAAGCACCGATGGCCA-5'

Primery, co tvoří hairpiny

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

5'-GTTGACTTGATA

|||| T

3'-GAACTCT

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

PCR Taq DNA Polymeráza

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

Nevýhody Taq Pol

- Taq Pol nemá 3' to 5' exonucleázovou aktivitu přítomnou u jiných polymeráz, tudíž nedochází k „proofreadingu“
- Taq špatně zařadí 1 bázi v 10^4
- Situaci může řešit přidání další polymerázy s exonukl.aktivitou (sama ovšem způsobuje degradaci primerů)

Jak předejít problémům?

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

Limitace PCR

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

Chybovost při DNA replikaci

Taq Pol – 1 nt /4000-5000bp

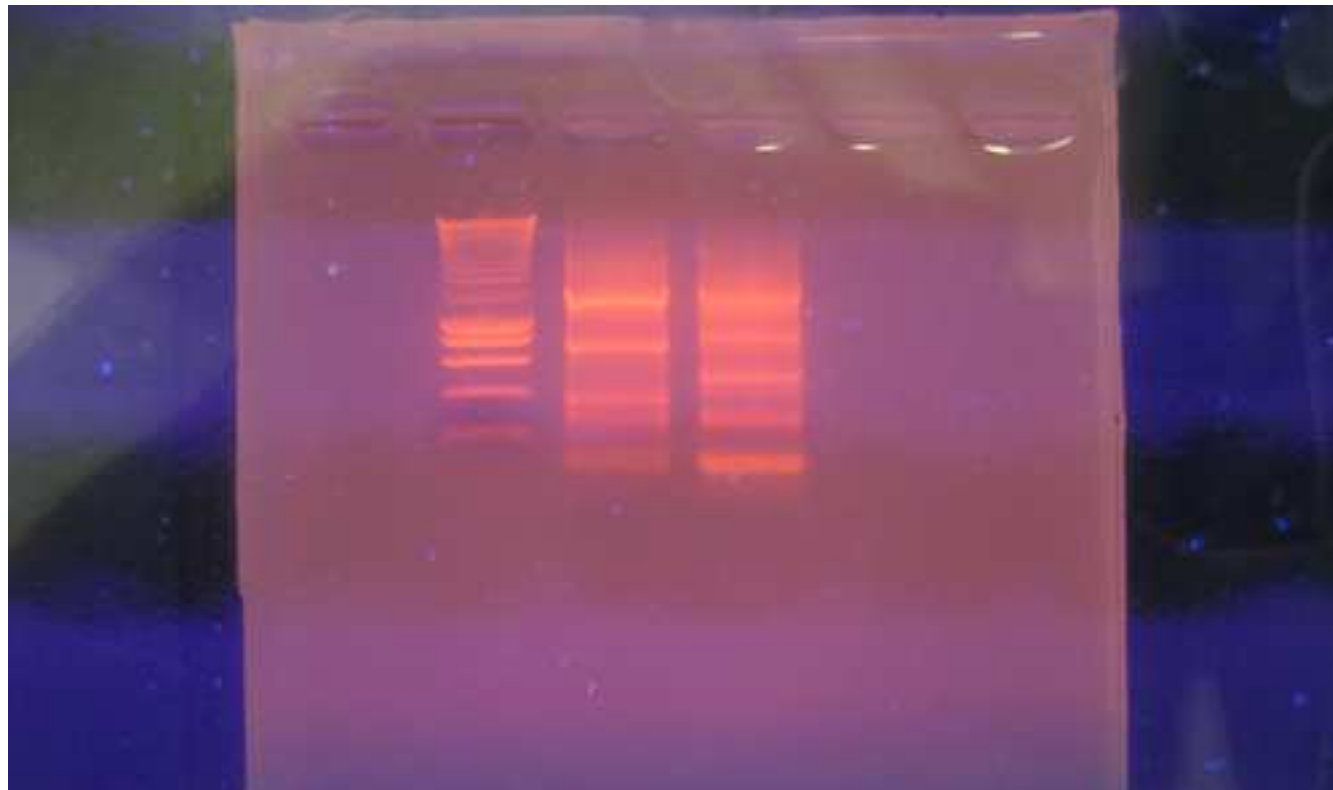
- Krátka délka a omezené množství produktu
do 5kb je lehký amplifikovatelný produkt .
do 40kb je amplifikace s modifikacema možná
nelze amplifikovat geny >100kb

Výhody PCR

- Rychlost
- Snadné použití
- Citlivost
- Robustnost

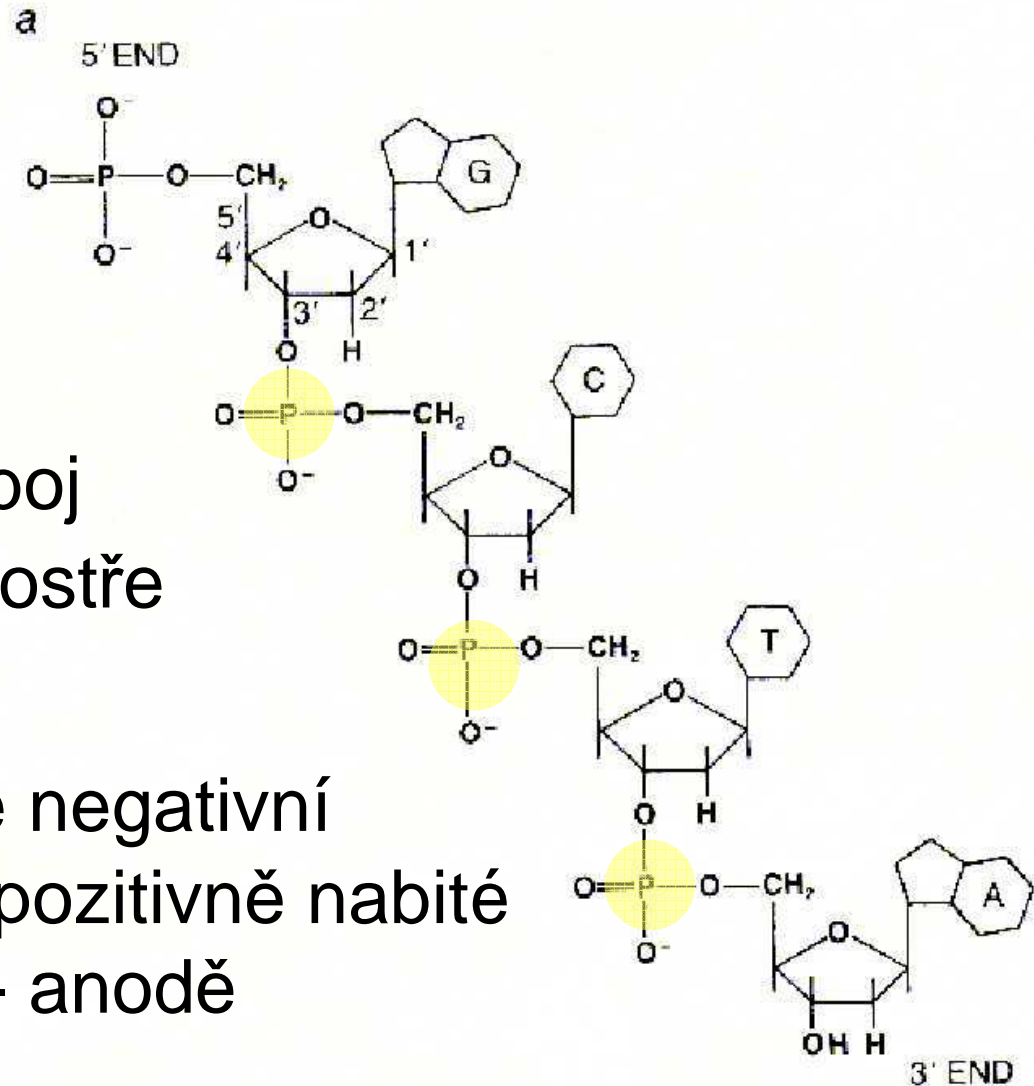
Agarózová gelová elektroforeze

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

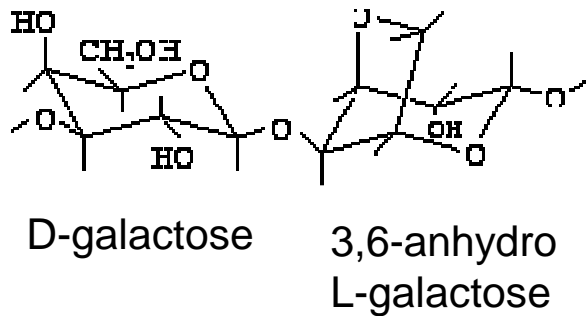


DNA má negativní náboj
díky cukrofosfátové kostře

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

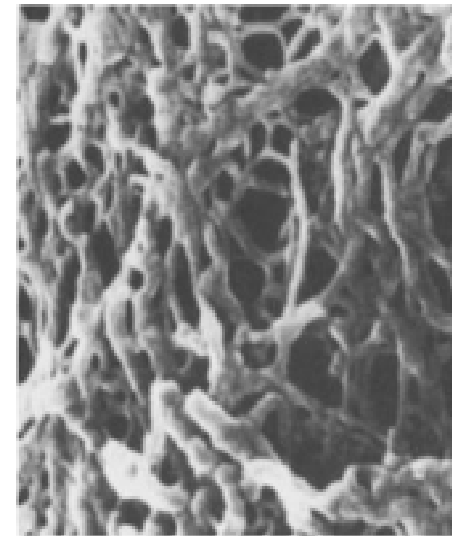


Agaróza



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

Krátké DNA fragmenty prochází gelem rychleji než dlouhé



SEM agarózy

Agarózový gel se připraví smícháním a prášku a pufru

TBE Buffer

Erlenka k přípravě

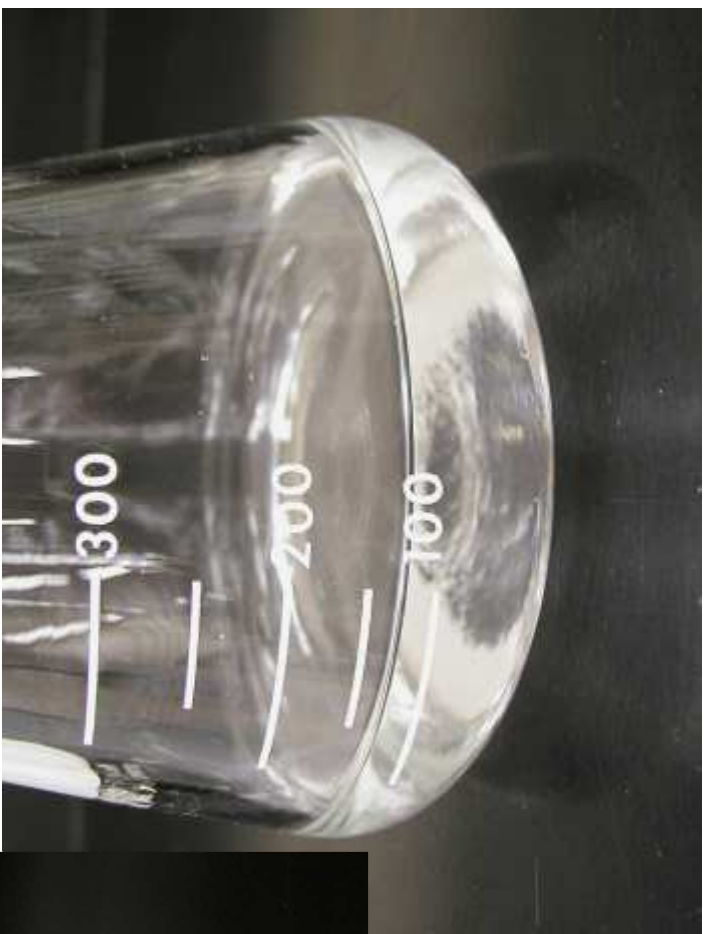
Agaróza



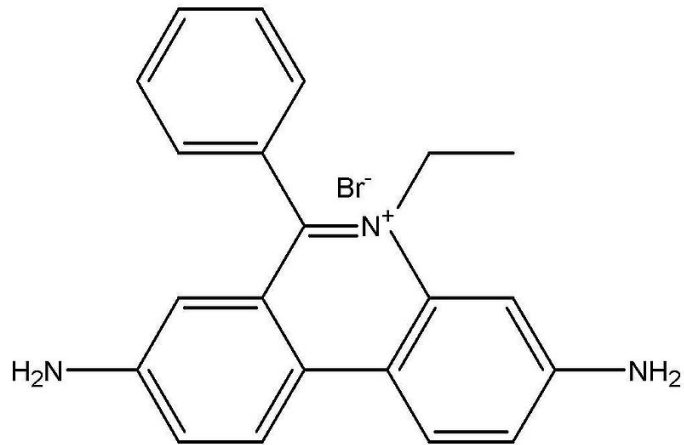




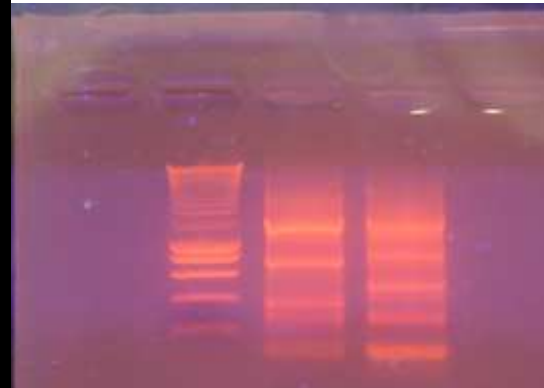




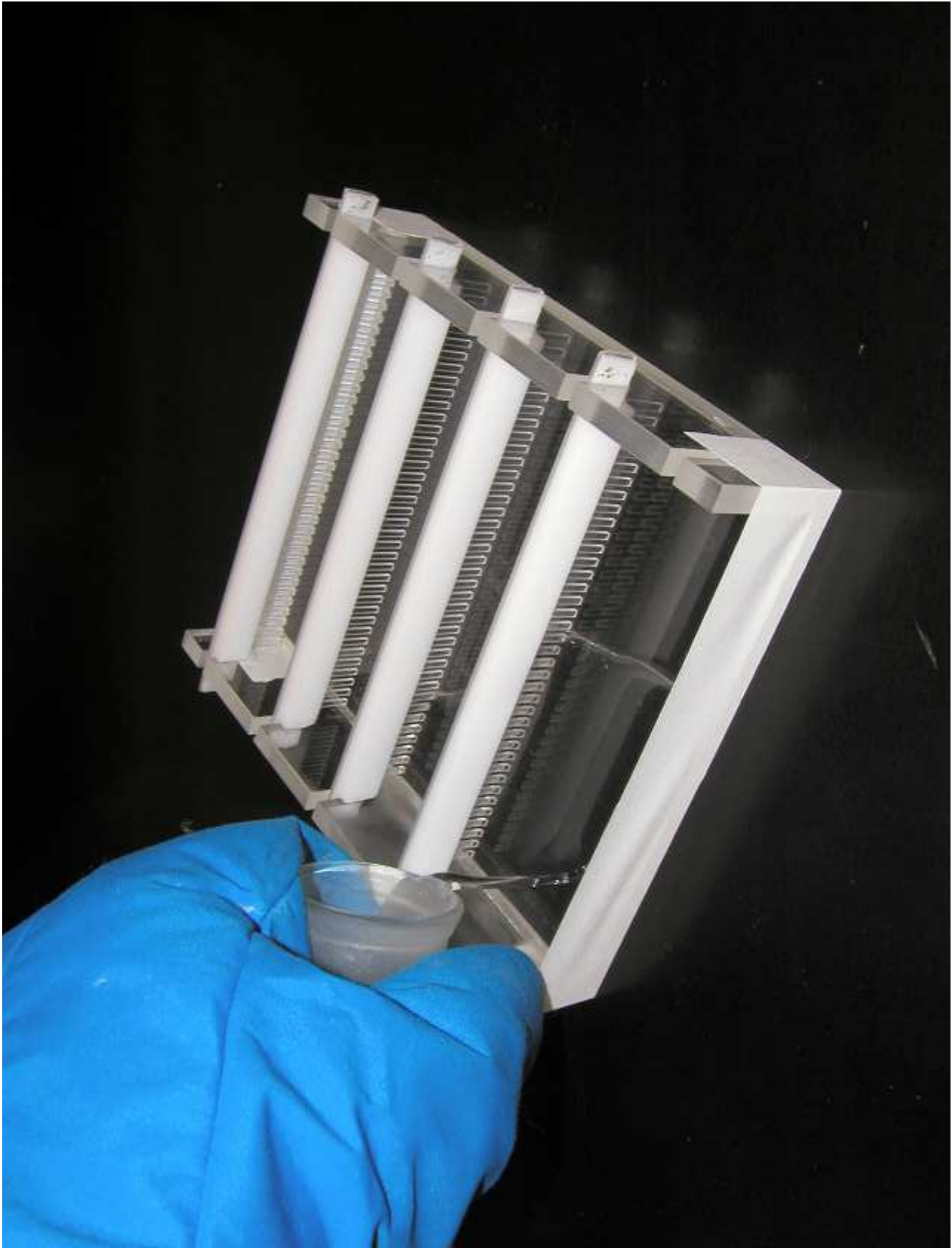
Ethidium Bromide



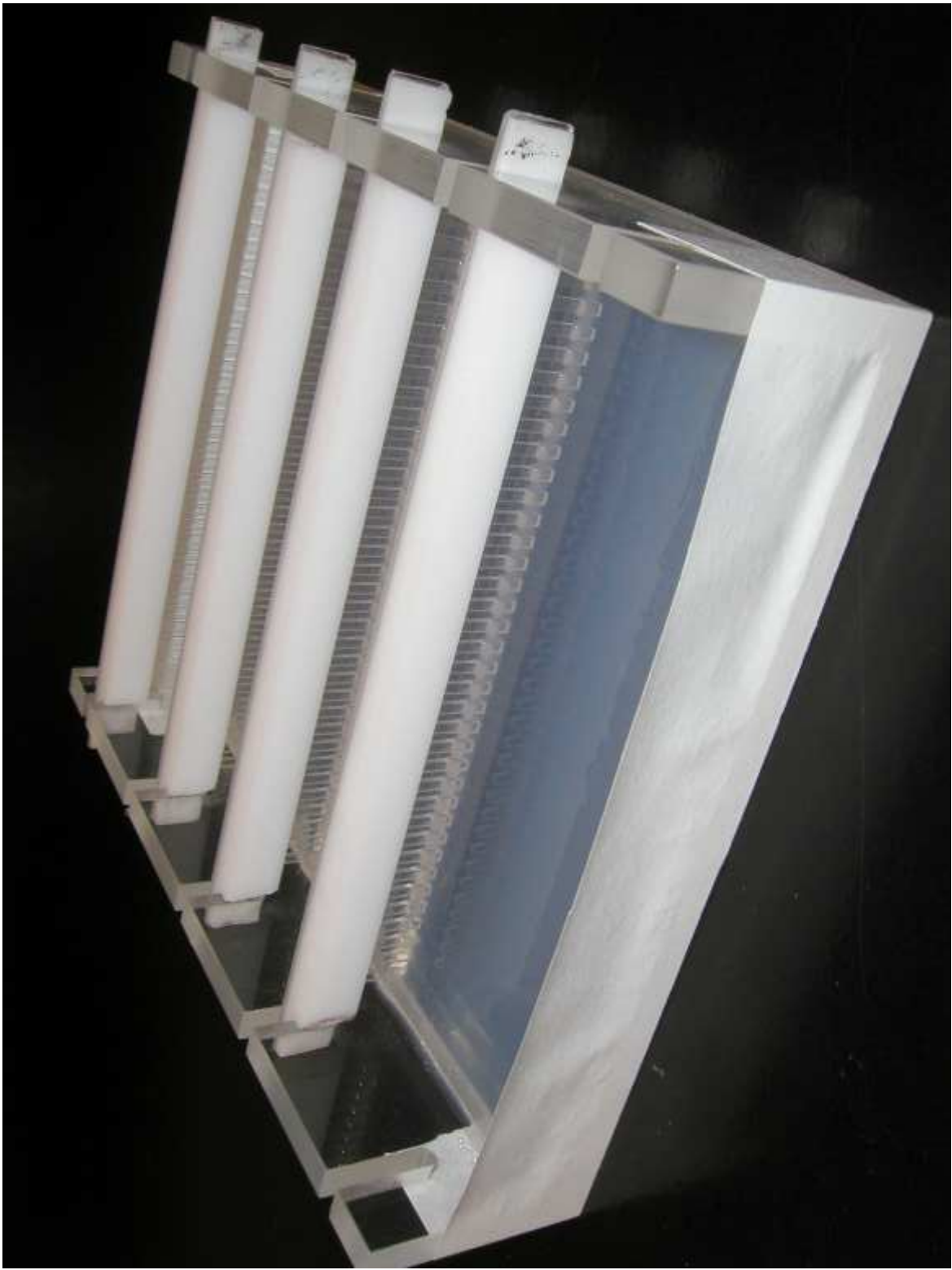
Interkaluje se do
NK a emituje
světlo po
ozáření UV
světlem



Mutagen!

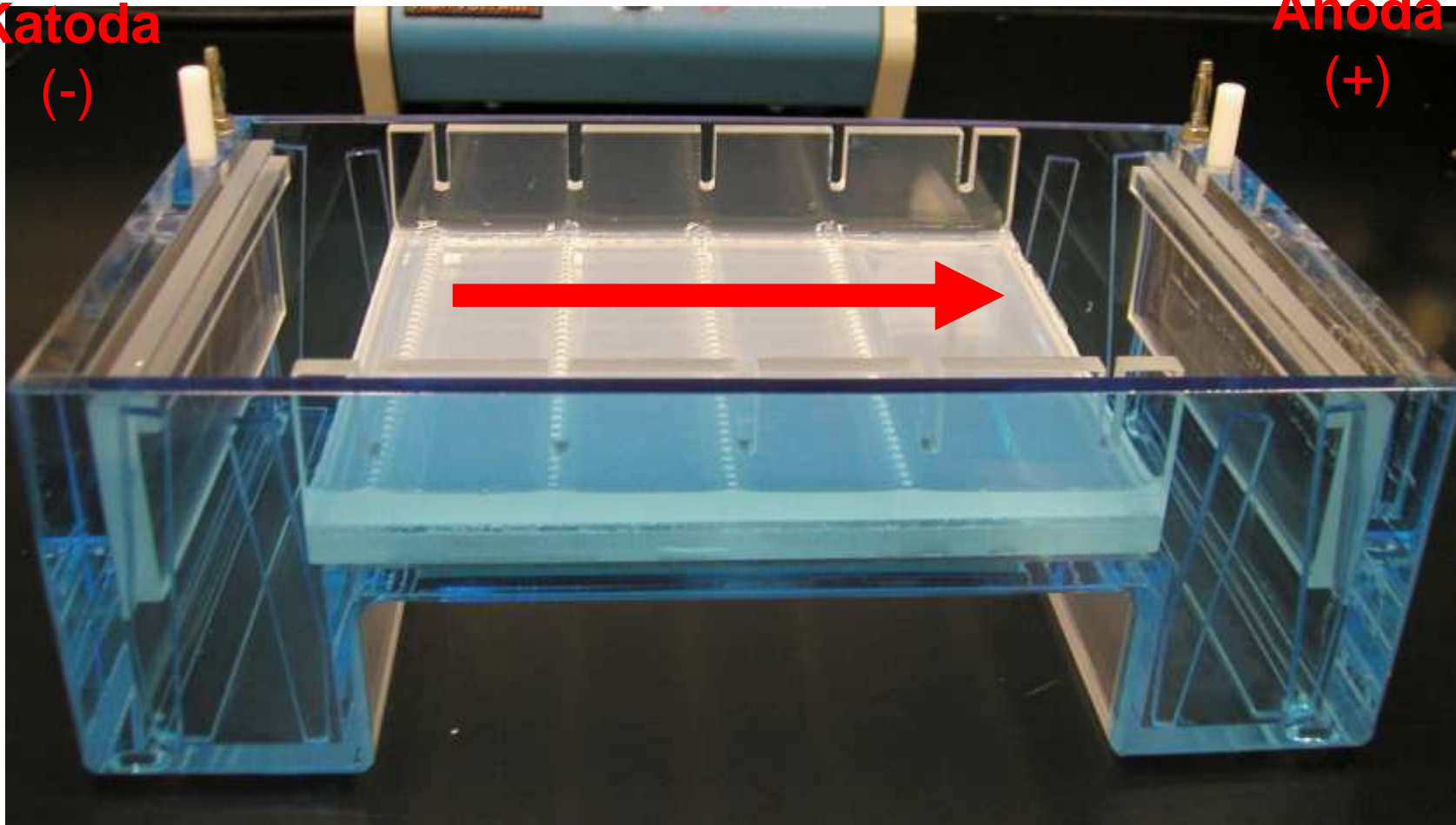






Katoda
(-)

Anoda
(+)





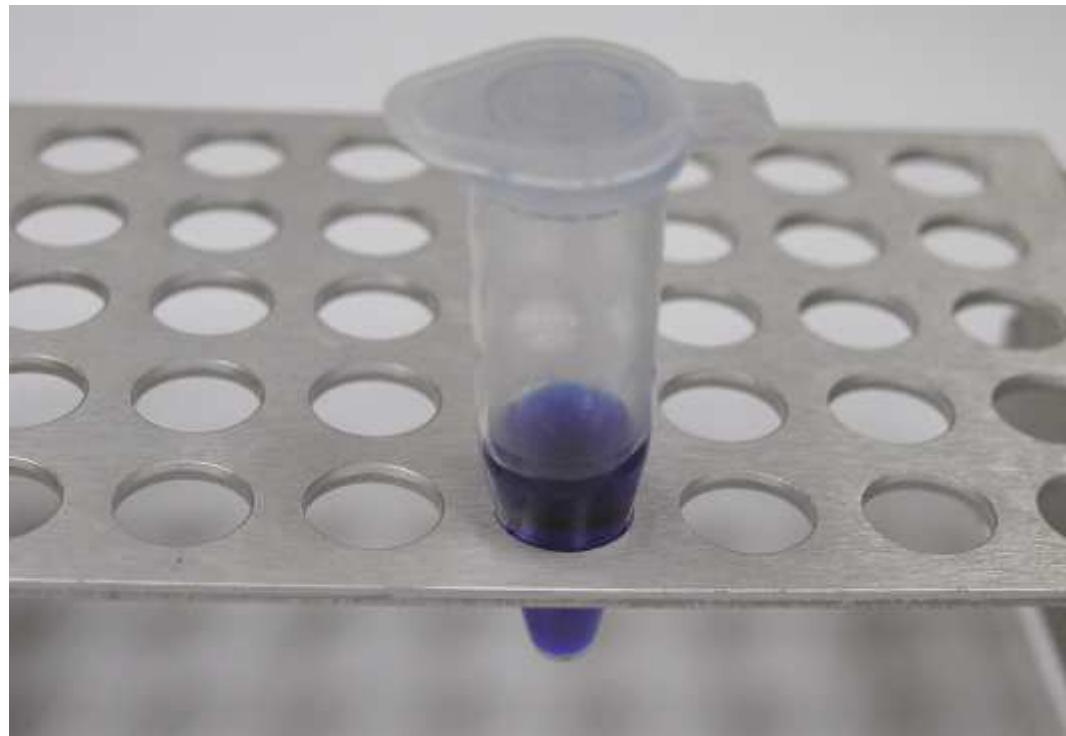
TBE buffer ->

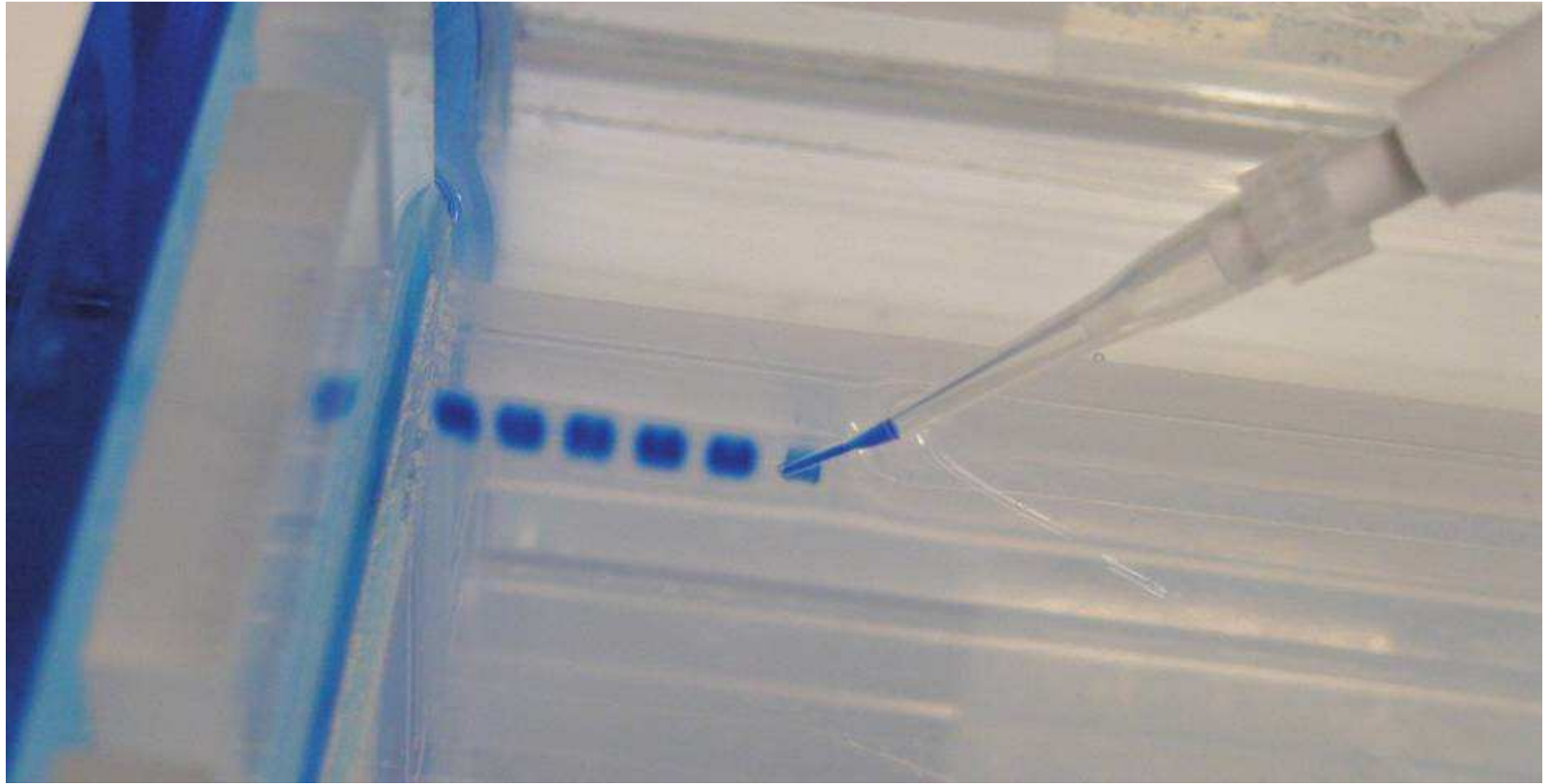
Nanášení vzorků

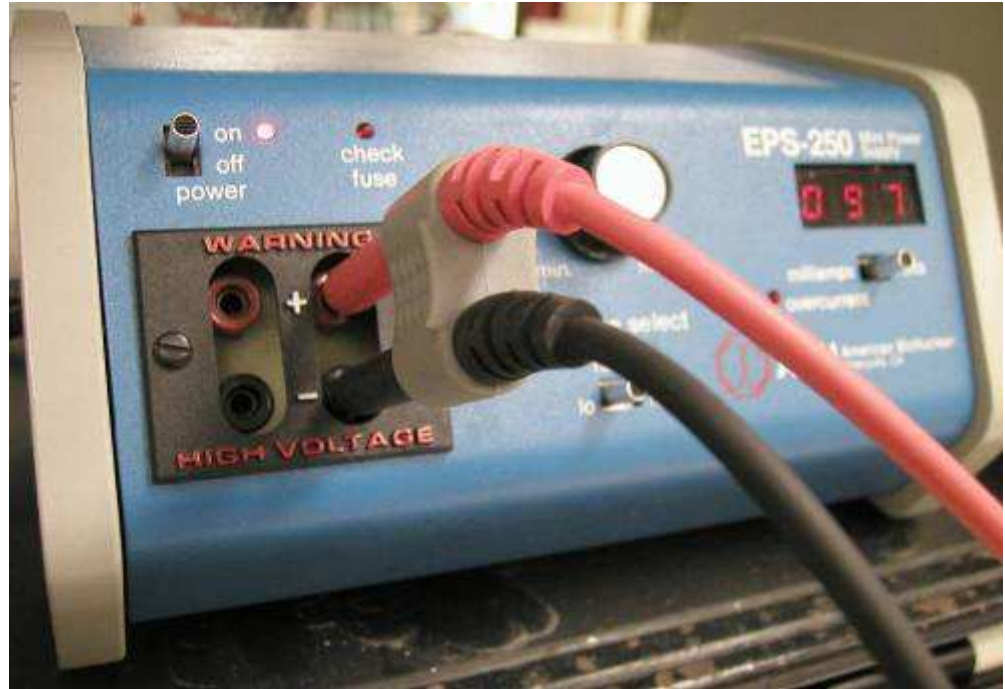
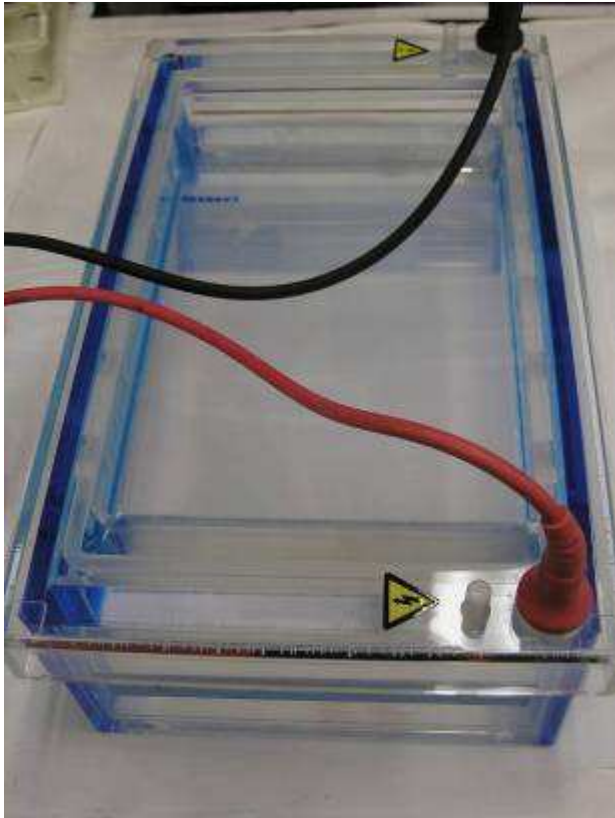
PCR produkty se smíchají s nanášecím pufrem – obarví je a zvýší denzitu – zabrání vyplavení vzorku z jamky

6X Loading Buffer:

- Bromfenolová modrá
- Glycerol



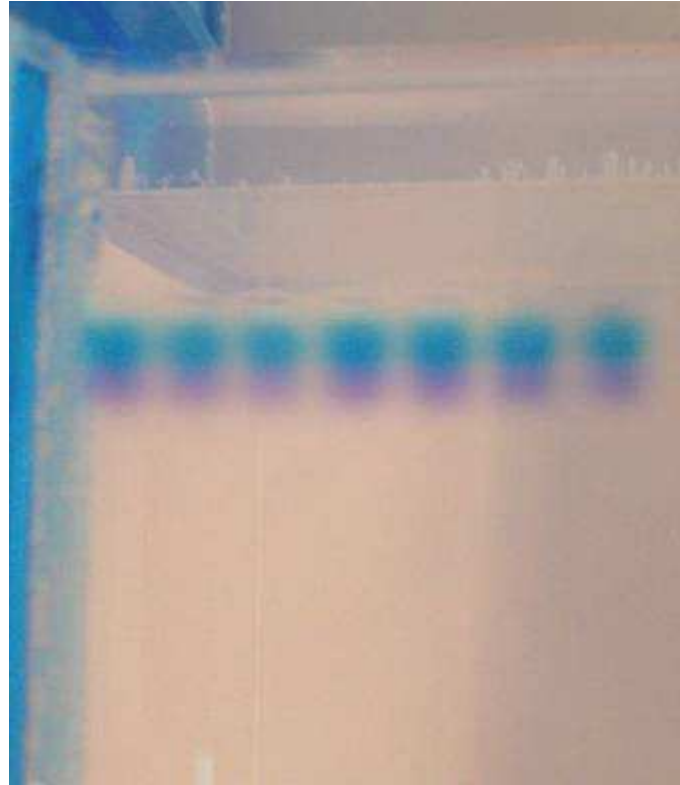




katoda
(-)

DNA
(-)
↓

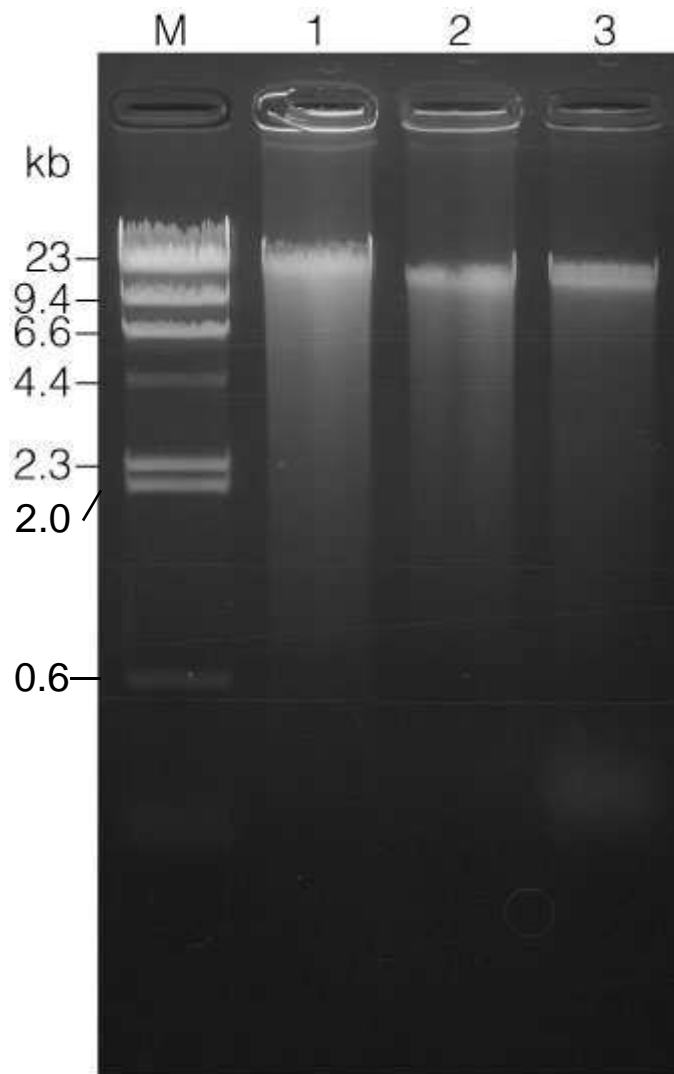
anoda
(+)



← jamky

← Bromfenolová modř

...a pod UV světlem



‘Nikdy nevyhazujte
vzorky před
koncem
experimentu.’

Hledání v odpadu
není nic moc!



Zdroj: www.flickr.com/photos/50262392@N00/45684291