

C5720 Biochemie

18b-Metody studia nukleových kyselin

Obsah

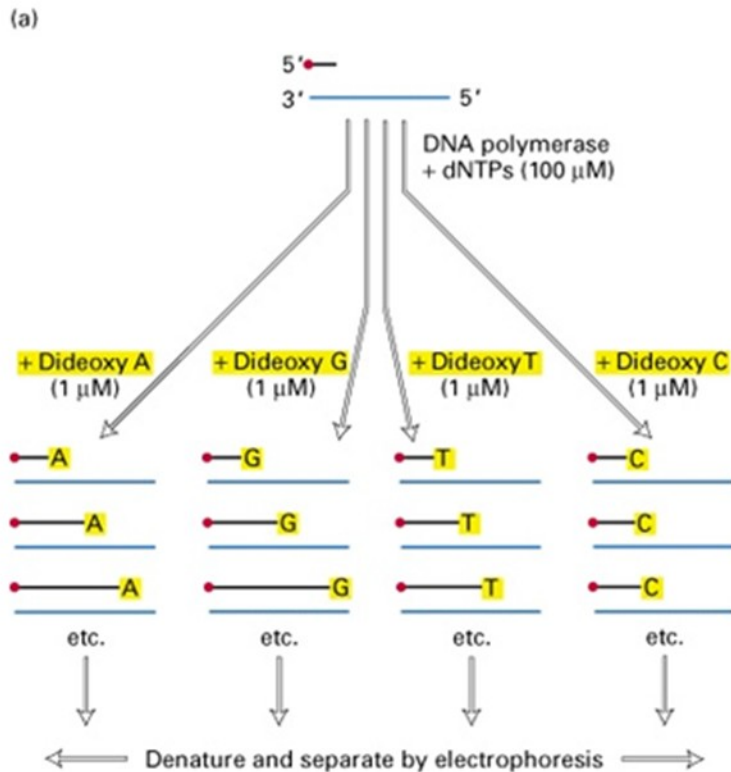
- Metody studia nukleových kyselin
- Sekvenace
- PCR

Určení sekvence DNA

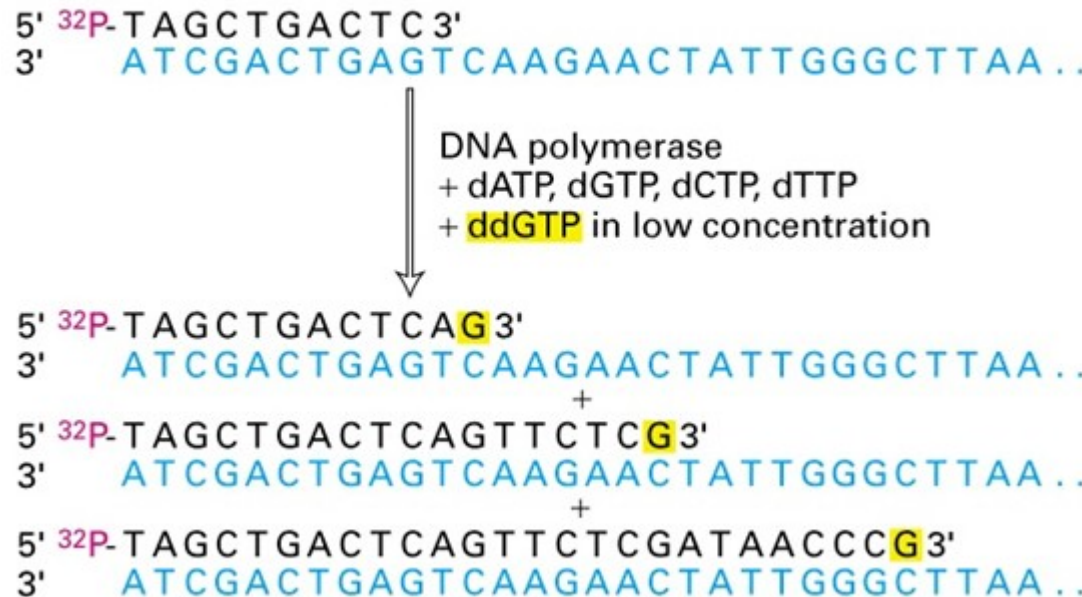
- Sekvence DNA, základní principy
 - chemická (selektivní štěpení – Maxam-Gilbert)
 - biochemická (syntéza, dideoxy metoda - Sanger)
- Postupná sekvenace štěpů
- Kombinace oligonukleotidů
- Další zdokonalování metod, modifikace
- Vícekanálová zařízení
- Hybridizační sondy
 - FISH (fluorescence *in situ*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

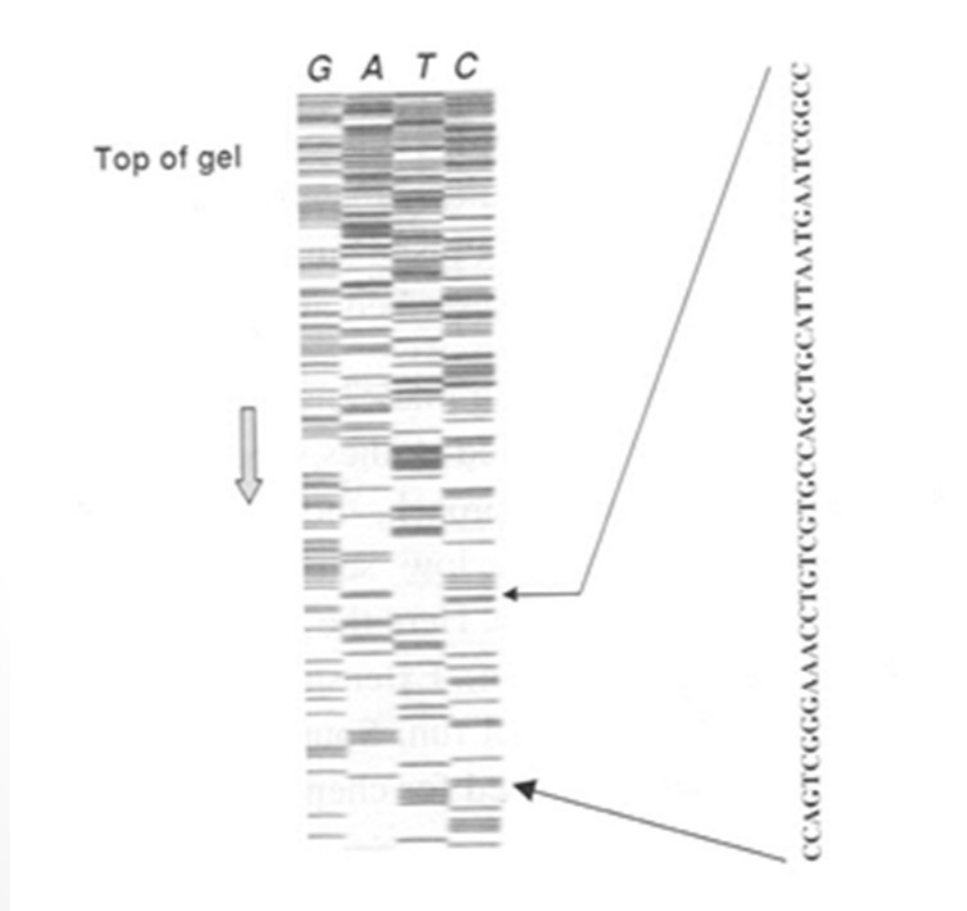


(b)



Určení sekvence DNA

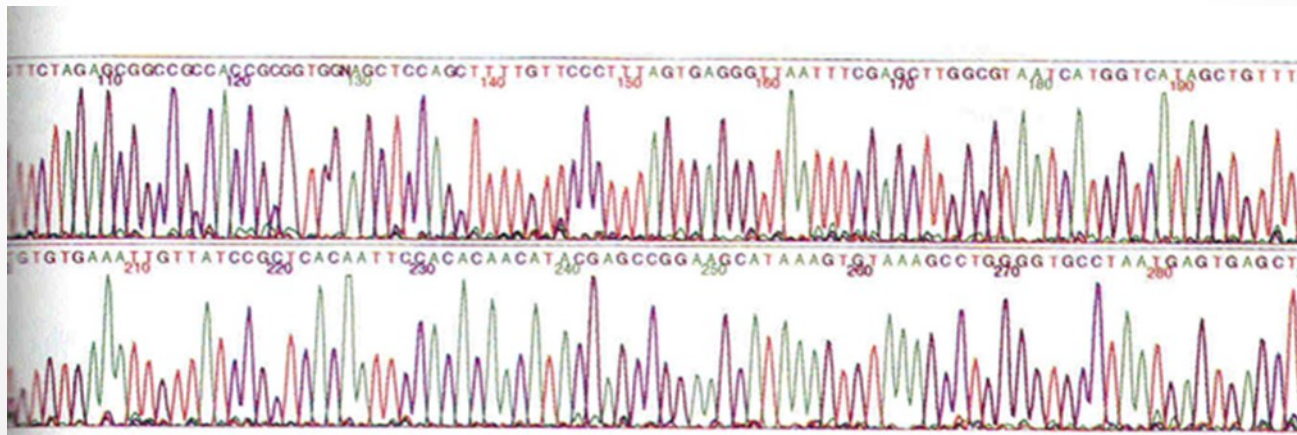
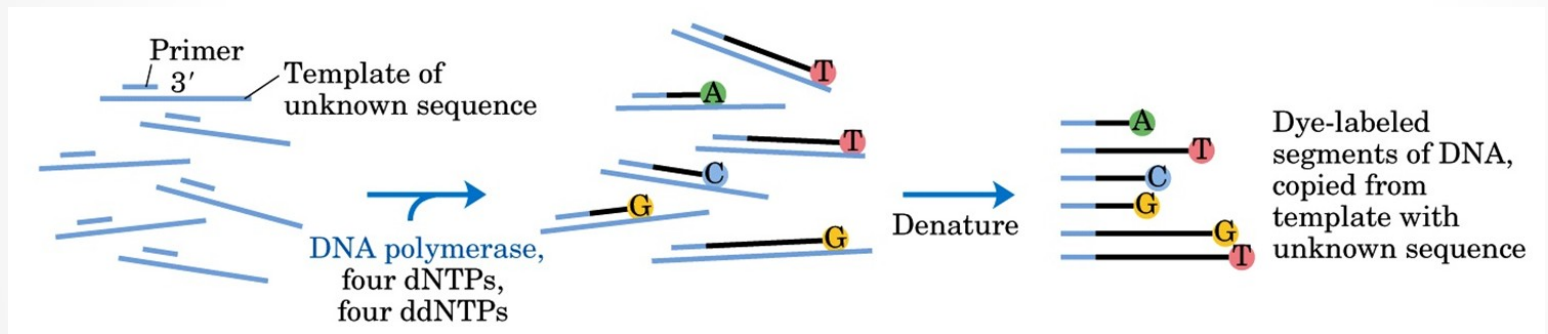
- Dideoxy sekvenace
 - Elektroforesa – autoradiografie – 4 dráhy



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

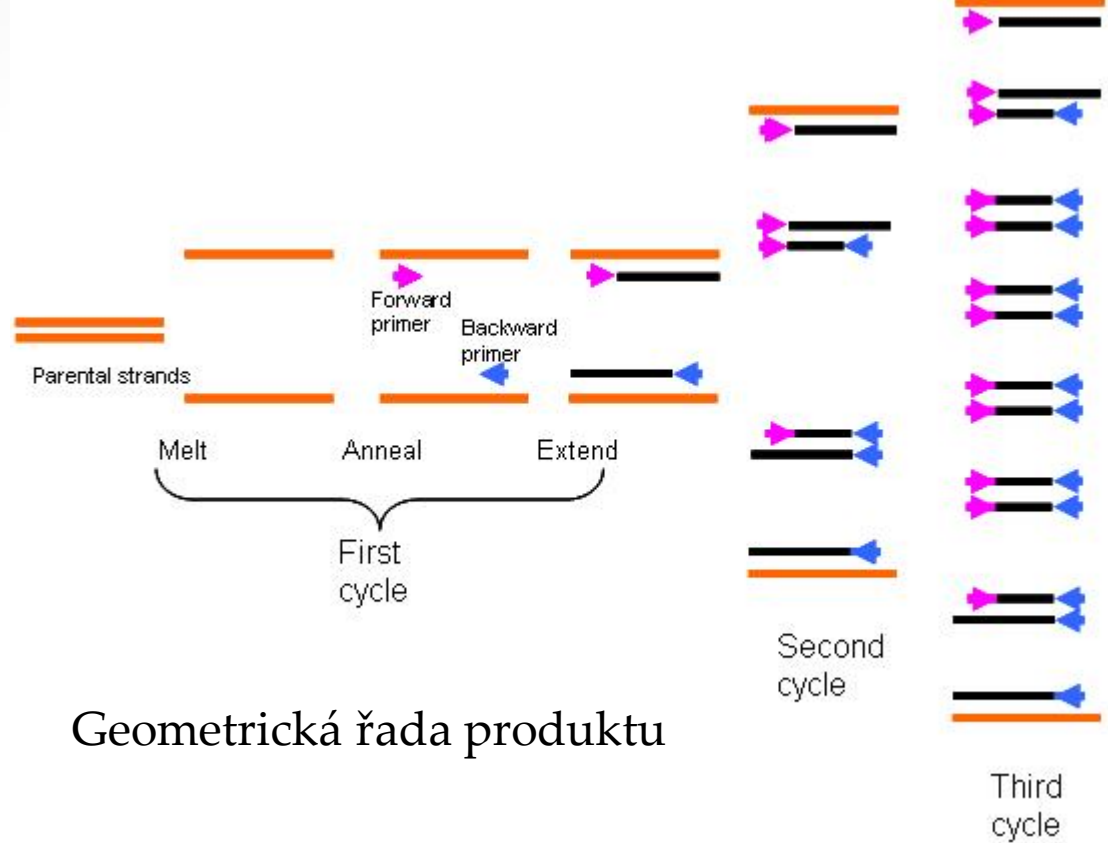


PCR

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



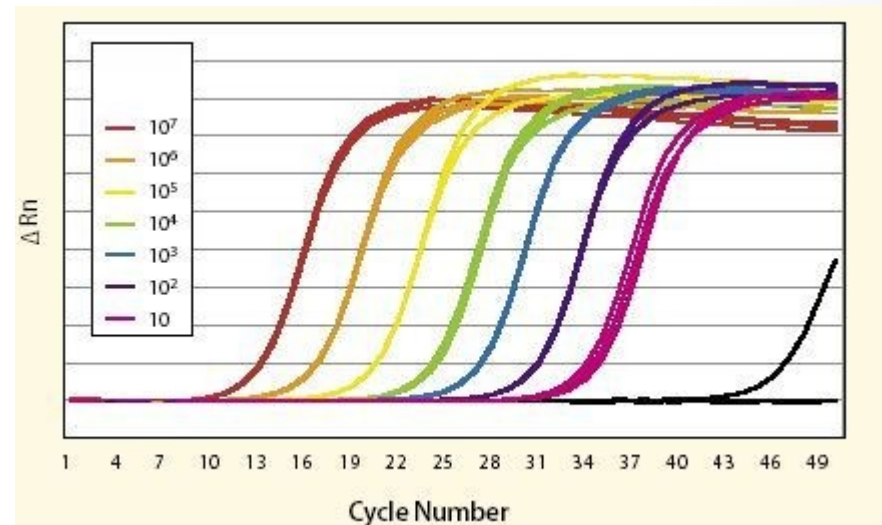
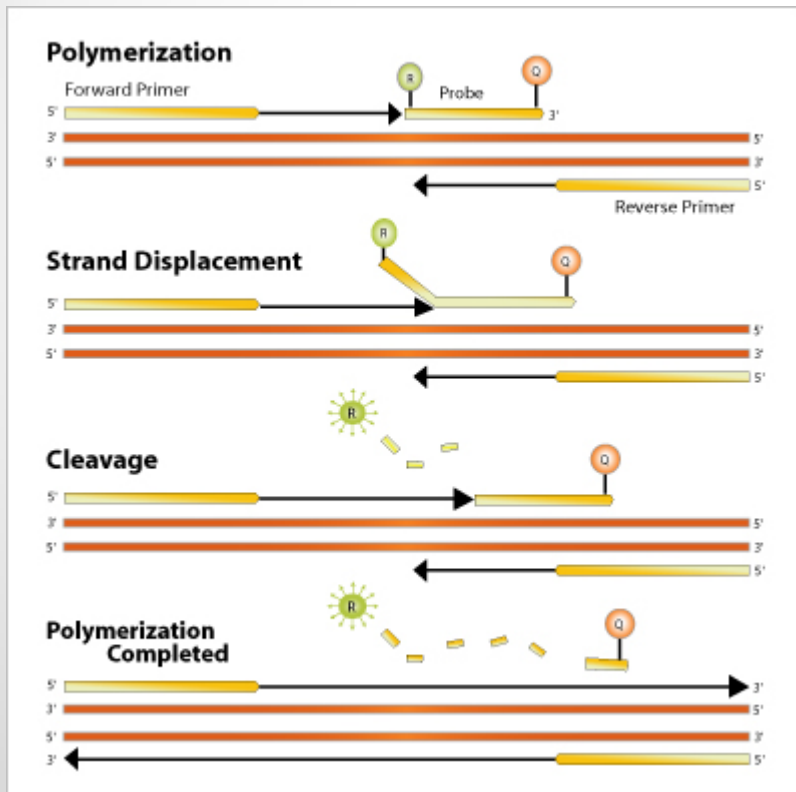
Geometrická řada produktu



Kvantitativní PCR

- Schéma RT PCR

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



Modifikace PCR

- Využití reverzní transkriptázy
- Syntéza cDNA

