

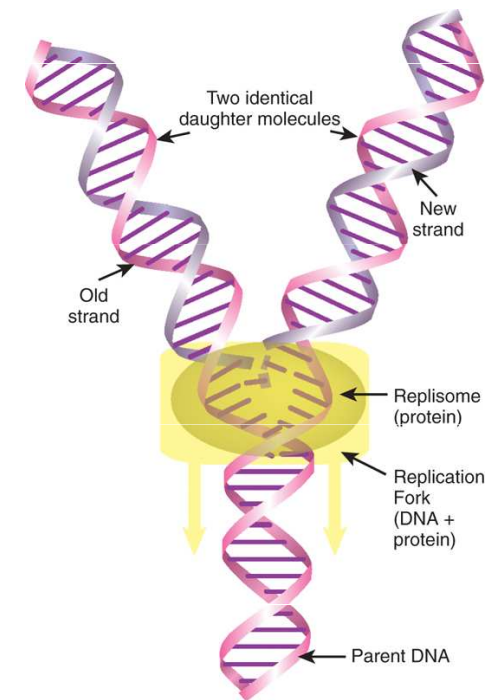
# GENOVÉ TECHNOLOGIE

## **Replikace a syntéza DNA:**

Replikace DNA u eukaryot a prokaryot, opravné procesy, in-vitro syntéza DNA (PCR, reverzní transkripce).

# Replikace DNA

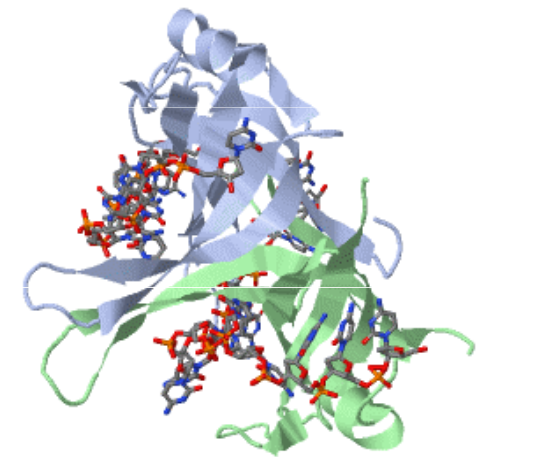
- Zachování integrity organismu vyžaduje kompletní identickou replikaci genomu
- Rozvinutí dvoušroubovice, tvorba Y-replikační vidlice
- Začíná na chromosomu ve specifickém místě označovaném ori (origin of replication)
- ori místo obvykle obsahuje vysoký podíl AT bazí
- Komplementární řetězec je syntetizován komplexem faktorů a enzymů nazývaných replizom
- DNA polymeráza syntetizuje pouze ve směru 5' → 3'
  - vedoucí vlákno se syntetizuje kontinuálně
  - spoždující se vlákno pomocí Okazakiho fragmentů
  - jednotlivé fragmenty na opožďujícím se vlákně jsou spojovány DNA ligázou
- Tento způsob replikace nazýván **semikonzervativní replikace**



Clark and Pazdernik, 2016

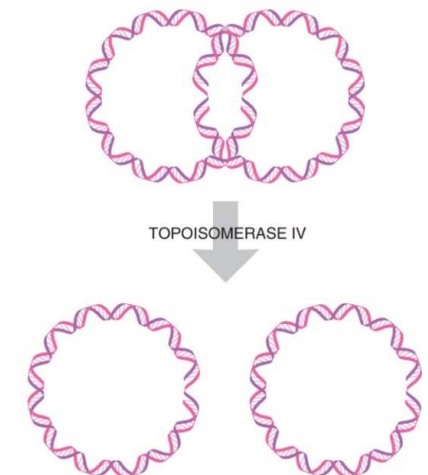
# Replikace DNA

- DNA má nad šroubovicové vinutí
- Nutnost relaxace (gyráza) a rozvinutí dvoušroubovice DNA (helikáza)
- Rozvinuté řetězce udržovány pomocí single-stranded binding proteins (SSB)
- Pohyb DNA polymerázy – více pozitivního nad šroubovicového vinutí
- Po replikaci cca. 5% bakteriálního genomu nutno odstraňovat pomocí gyrázy
- V rámci replikace kruhových chromozómu může dojít ke katenaci sesterských kopií



UNTANGLING CHROMOSOMES

'mol

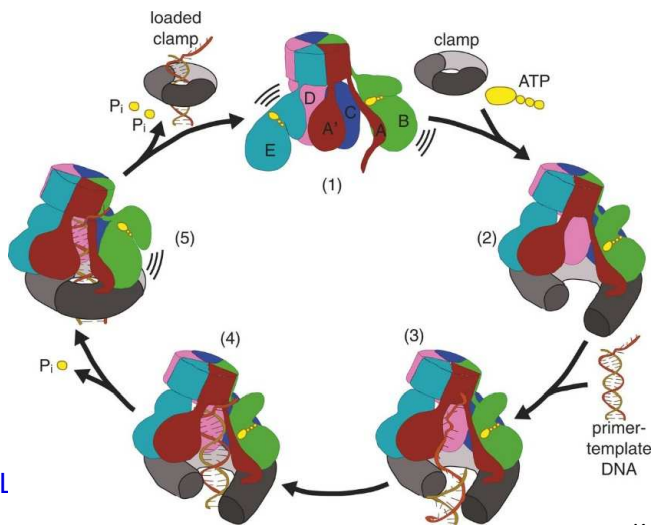


Clark and Pazdernik, 2016

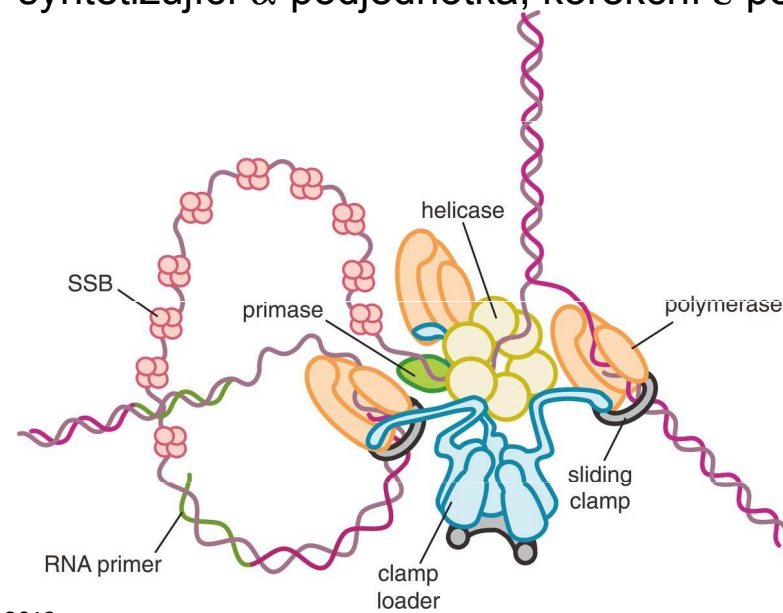
MUNI  
SCI

# Replikace DNA

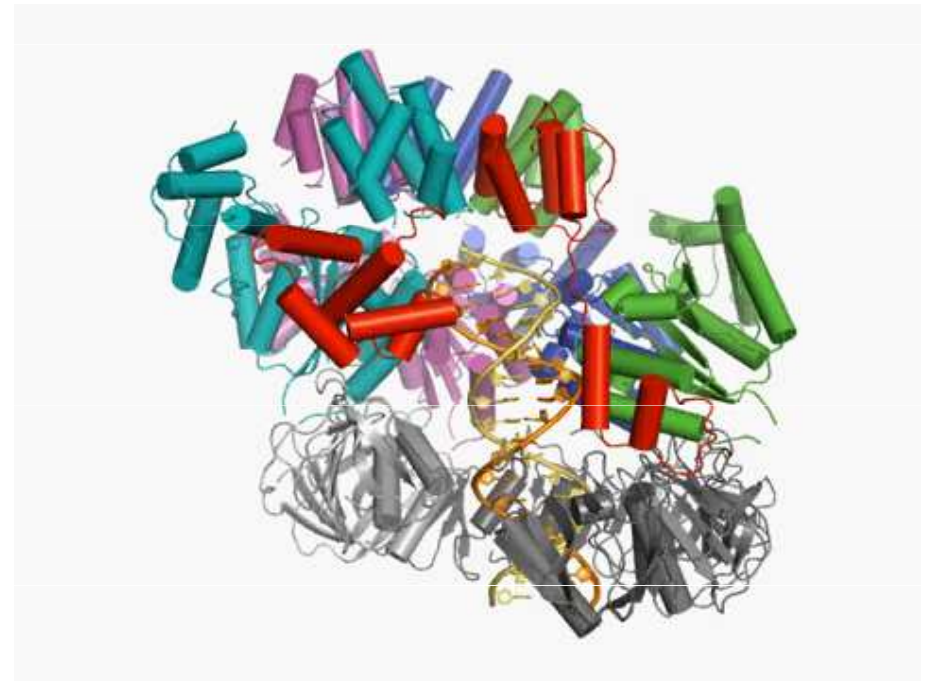
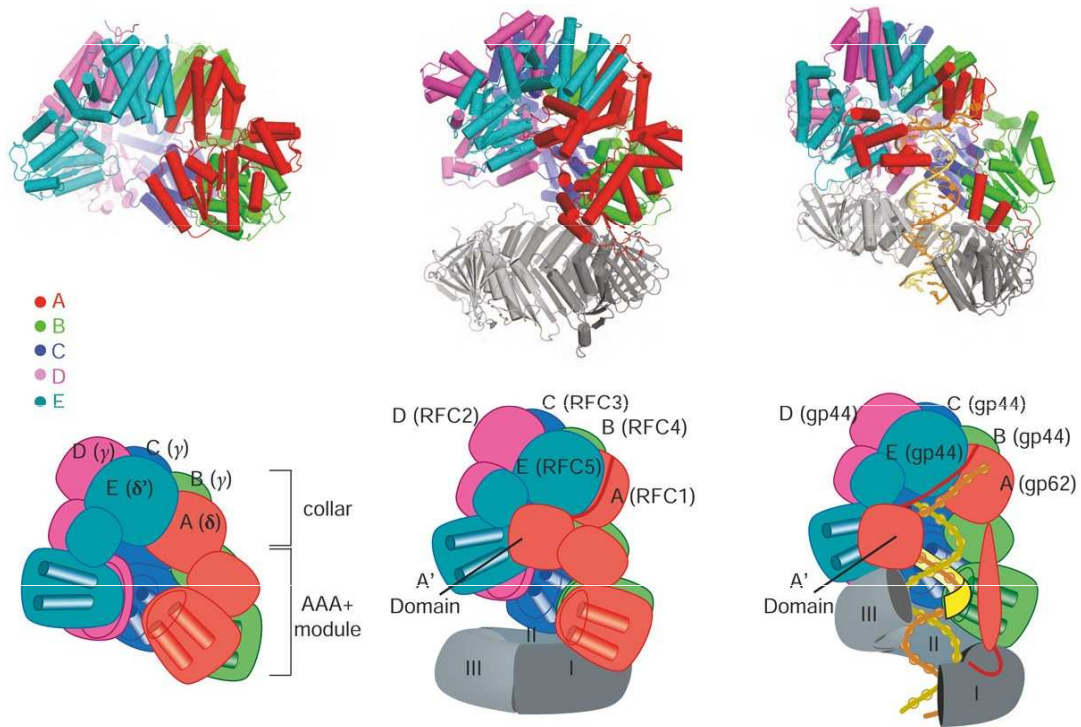
- Na počátku replikace RNA polymeráza nazývaná primáza nahrazuje SSB proteiny a syntetizuje krátké RNA primery (11-12 b)
- Bakteriální chromozom je replikován převážně pomocí DNA polymerázy III
- DNA je uzamčena do posuvné svorky pomocí vkládacího komplexu
- Následně svorky váží hlavní enzymy pro replikaci – syntetizující  $\alpha$ -podjednotka, korekční  $\epsilon$ -podjednotka a stabilizační  $\theta$ -podjednotka



Kelch et al, 2012



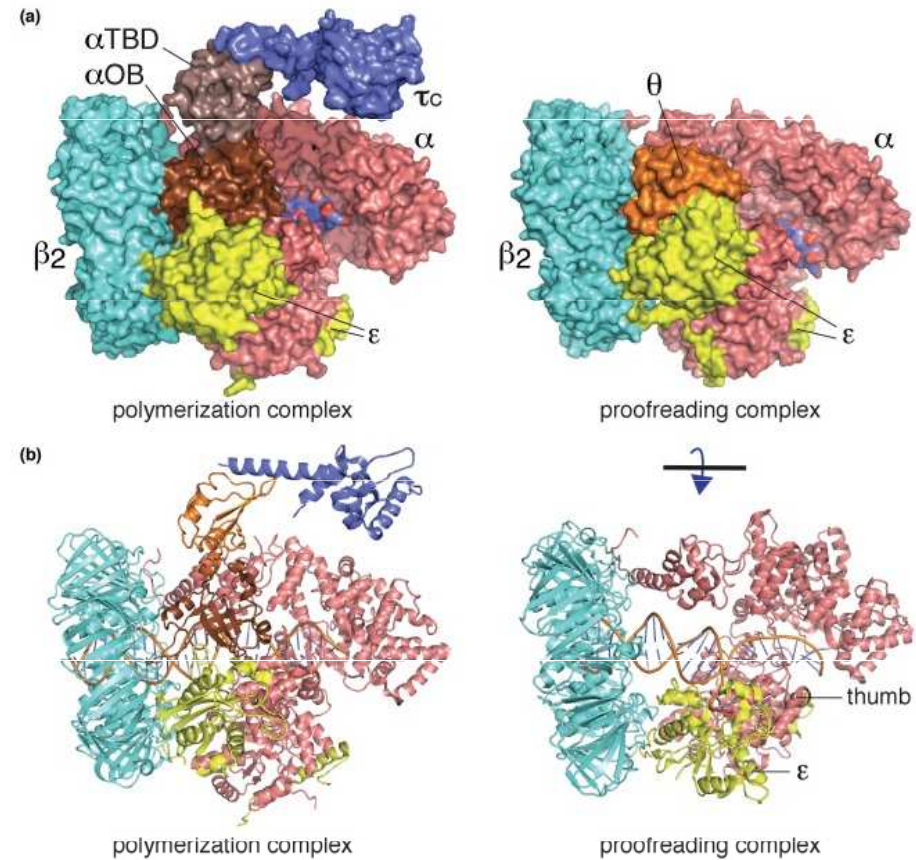
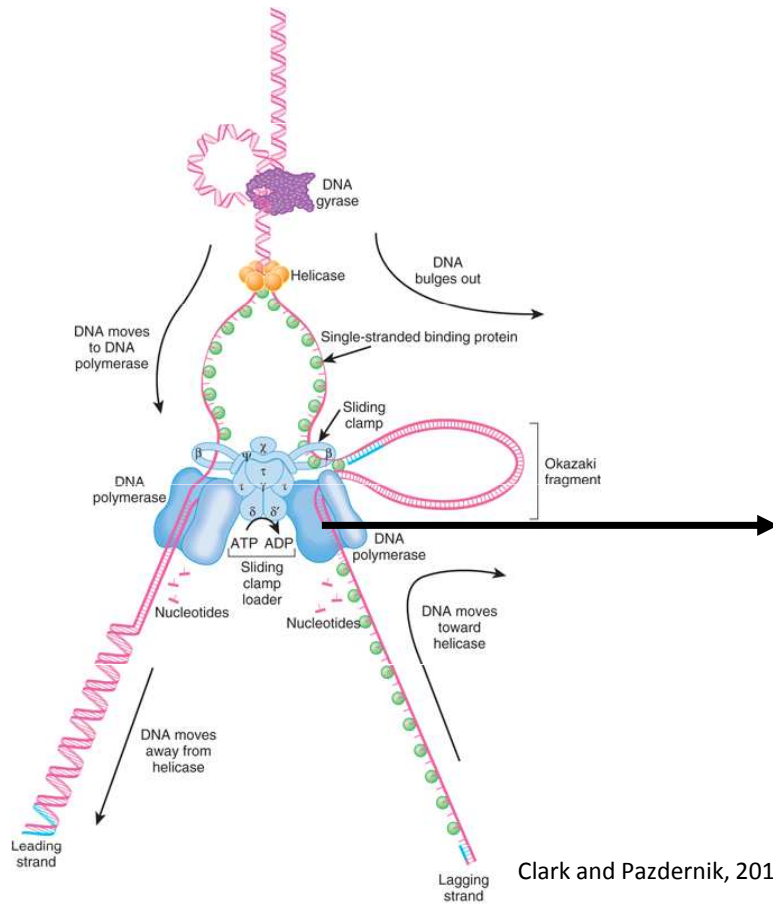
# Clamp loader ATPase



Kelch et al, 2012

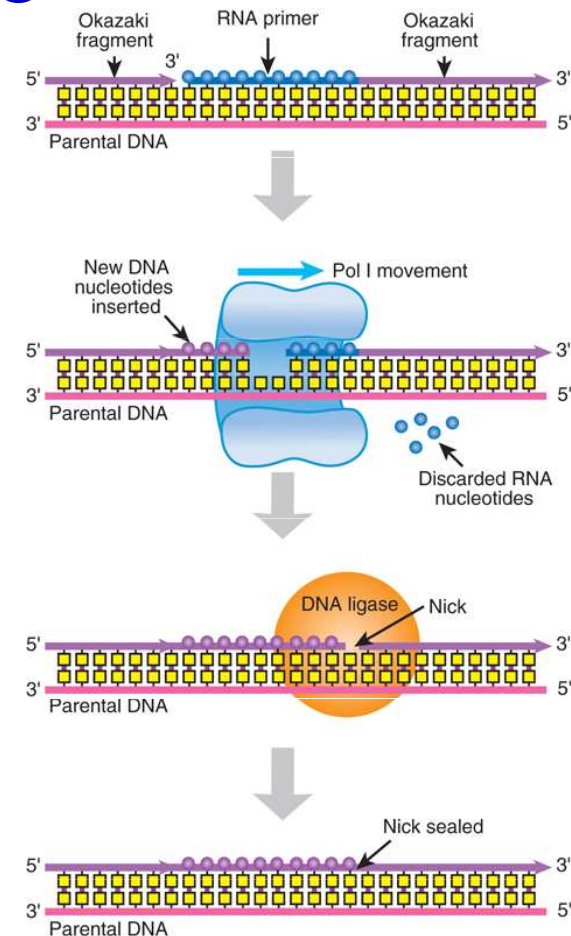


# Core enzyme complex



# Syntéza opožďujícího řetězce

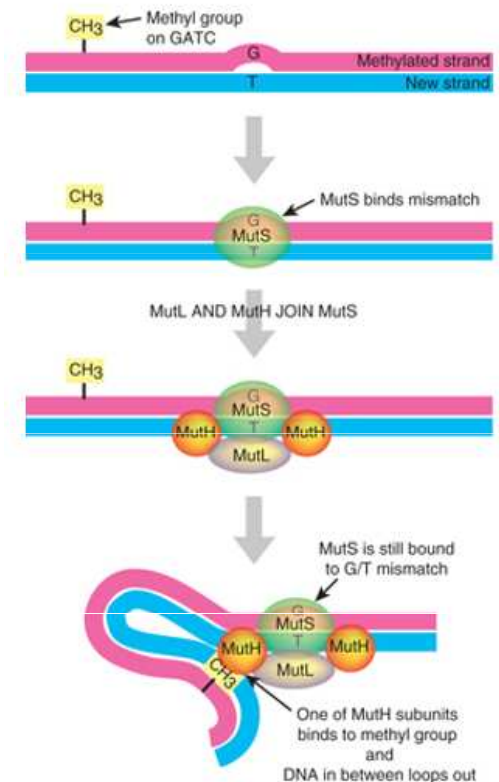
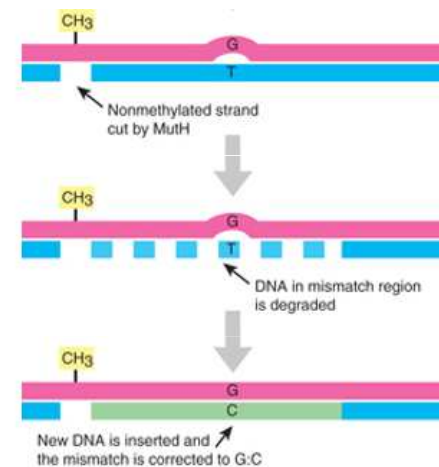
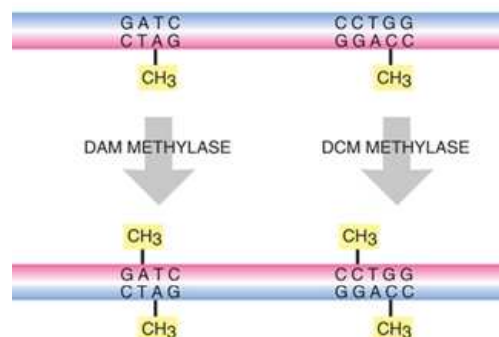
- Nese celou řadu zlomů, segmentů s RNA nebo mezer
- DNA polymeráza I odstraňuje RNA a dosyntetizovává řetězec
- RNA může být rovněž odstraněna RNasou H (odstraňuje RNA z heteroduplexu)
- Výsledné fragmenty jsou spojeny DNA ligázou



Clark and Pazdernik, 2016

# Oprava chyb po replikace

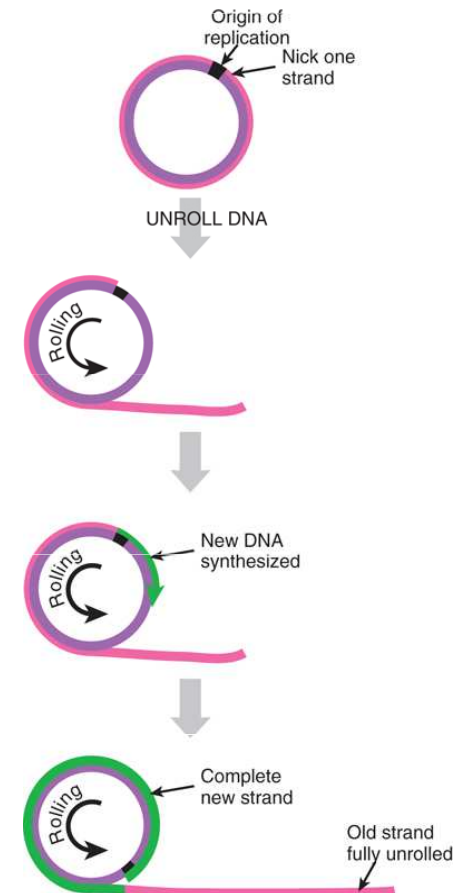
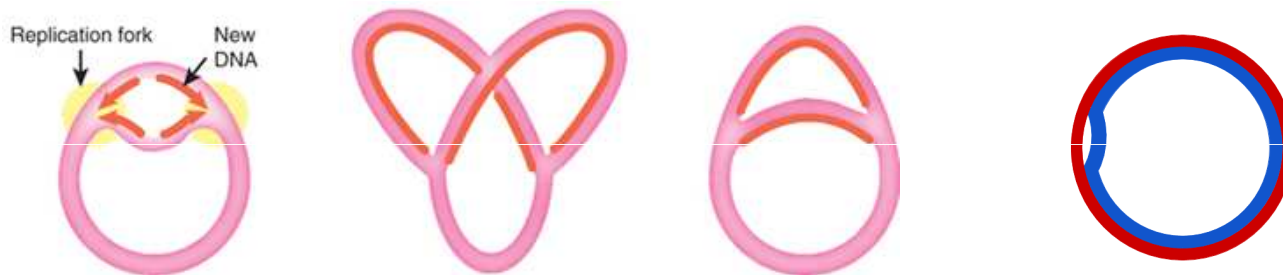
- Po dokončení replikace opravný systém opraví chyby (u *E. coli* MutSHL systém)
- Při začlenění špatné báze vzniká ve dvoušroubovici výduť
- Buňka předpokládá, že parentální báze je správná, kdy originální vlákno je identifikováno pomocí metylace
- Po replikaci DNA je nové vlákno pomalu dometylován pomocí DNA Adenosin (Dam) a cytosin (Dcm) methyláz





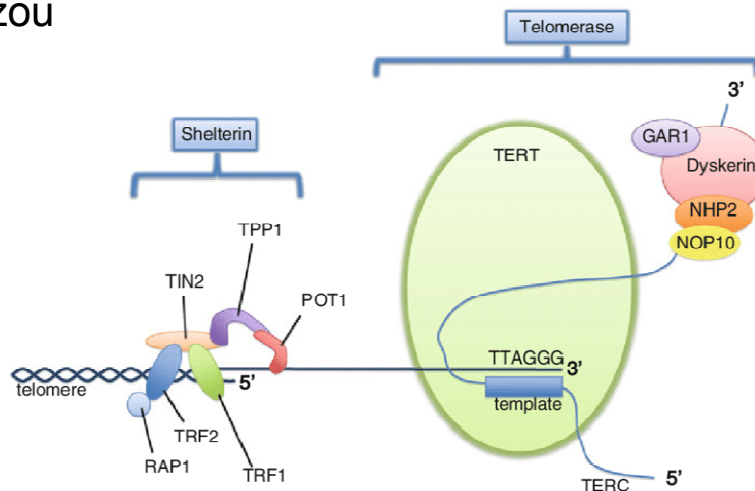
# Srovnání replikace - prokaryota

- DNA replikace probíhá běžně dvousměrně – replikační vidlice postupují v opačných směrech
- U bakterií proces replikace nazýváme tzv. theta replikací
- Některé plazmidy a viry replikují genom procesem nazývaným replikace valivou kružnicí

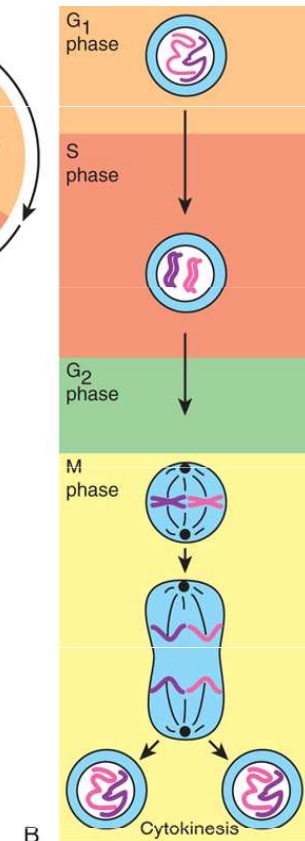
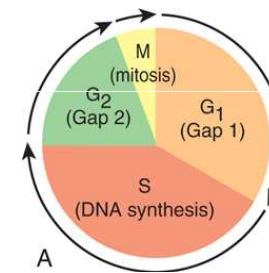


# Srovnání replikace - eukaryota

- Eukaryota nemají ekvivalent DNA polymerázy I mající duální aktivitu (exonukleázová a polymerázová)
- Objevuje se problém se zkracování konců lineárních chromozómů
- No koncích chromozómů telomery (TTAGGG opakování u člověka) syntetizované na základě RNA templátu enzymem telomerázou



- telomerase transcriptase (TERT)
- RNA component (TERC)
- dyskerin protein complex (dyskerin, NOP10, NHP2, GAR1)
- shelterin complex (TRF1, TRF2, RAP1, POT1, TPP1 a TIN2)



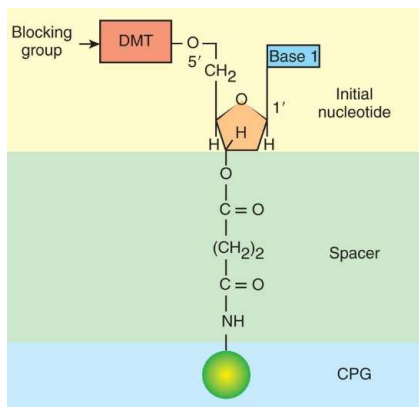
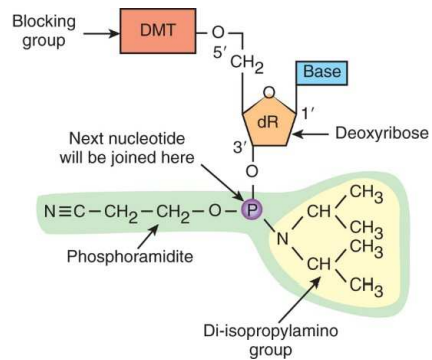
# Chemická syntéza DNA

- H. Gobind Khorana syntetizoval první aktivní tRNA molekulu o 72 nukleotidech (1970)
- Arteficiální syntéza DNA je ve směru 3' → 5'
  - přichycení první báze na CPG (controlled pore glass)
  - 5' konec je zablokován pomocí DMT (dimethoxytrityl)
  - DMT skupina je odstraněna pomocí slabé kyseliny (TCA)
  - další nukleotid je přidán ve formě tzv. phosphoramiditu aktivovaného tetrazolem
  - 5'-OH konce nezreagovaných nukleotidů jsou acetylovány pomocí anhydridu k. octové
  - opakování procesu

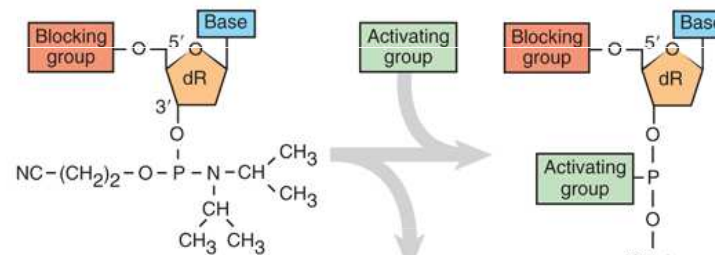


(zleva) Har Gobind Khorana, Robert W Holley, Luis W Alvarez, Marshall W Nirenberg, Lars Onsager and Yasunari Kawabata při udílení Nobelovy ceny v roce 1968.

# Chemická syntéza DNA

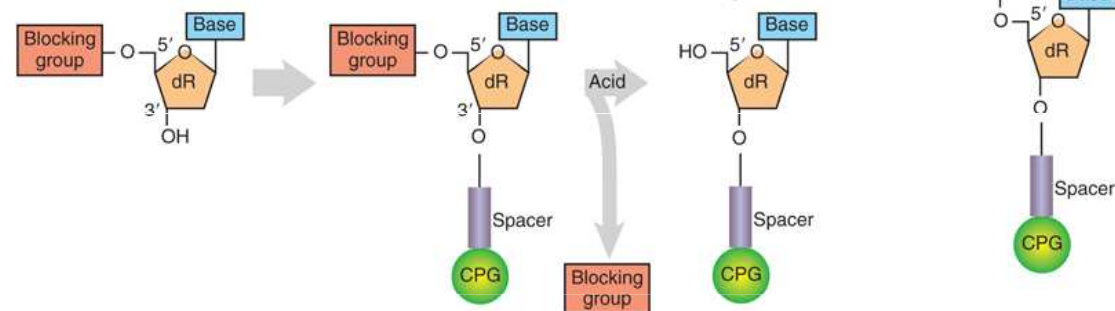


## PHOSPHoramidite NUCLEOTIDE ACTIVATION

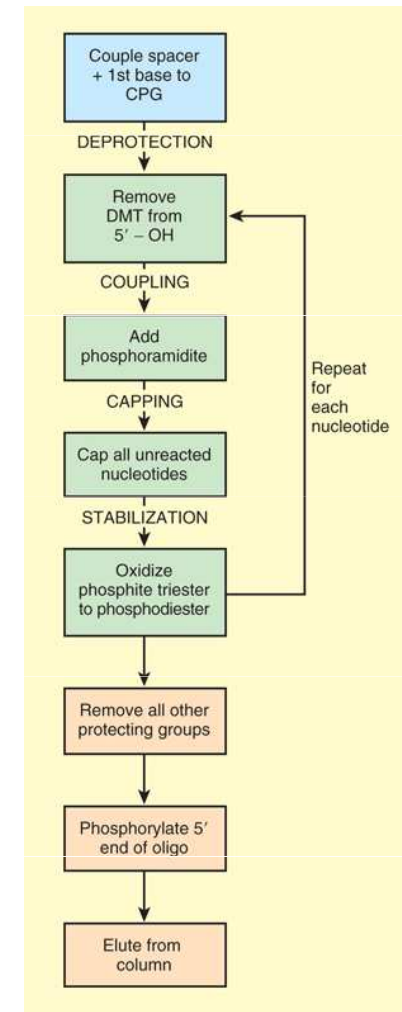
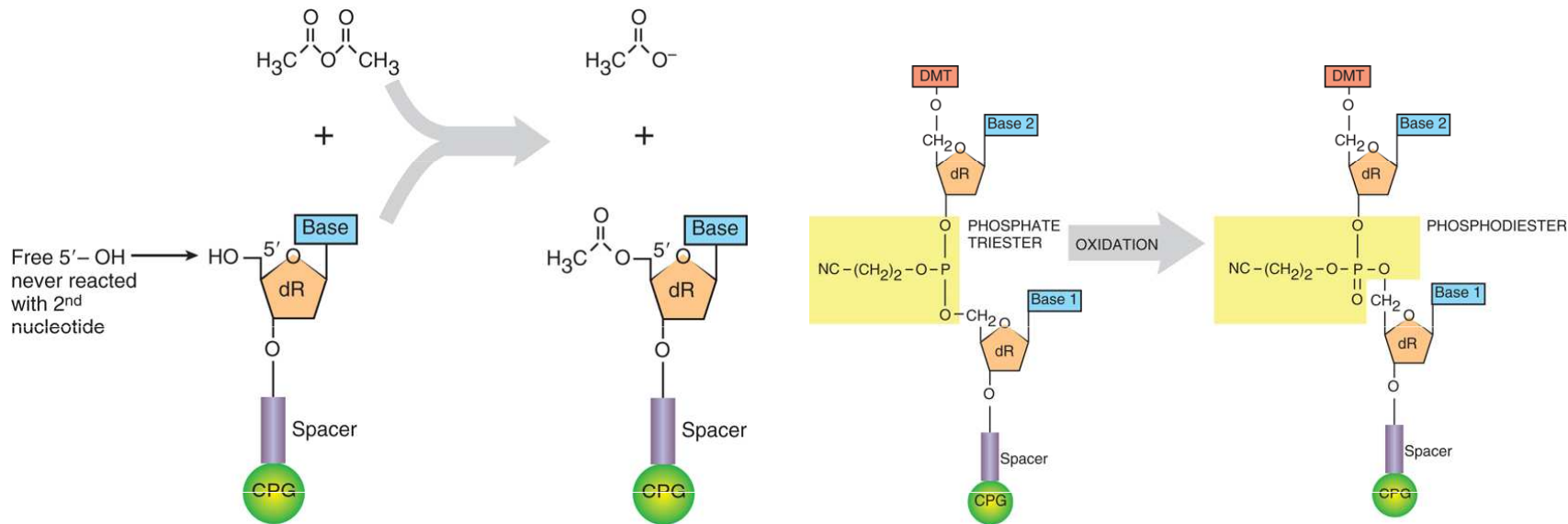


## COUPLING

### COUPLE 1ST NUCLEOTIDE TO CPG



# Chemická syntéza DNA



# Polymerázová řetězová reakce

**K Mullis**, F Faloona, S Scharf, R Saiki, G Horn, H Erlich.  
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.  
Cold Spring Harb Symp Quant Biol; **1986**;51

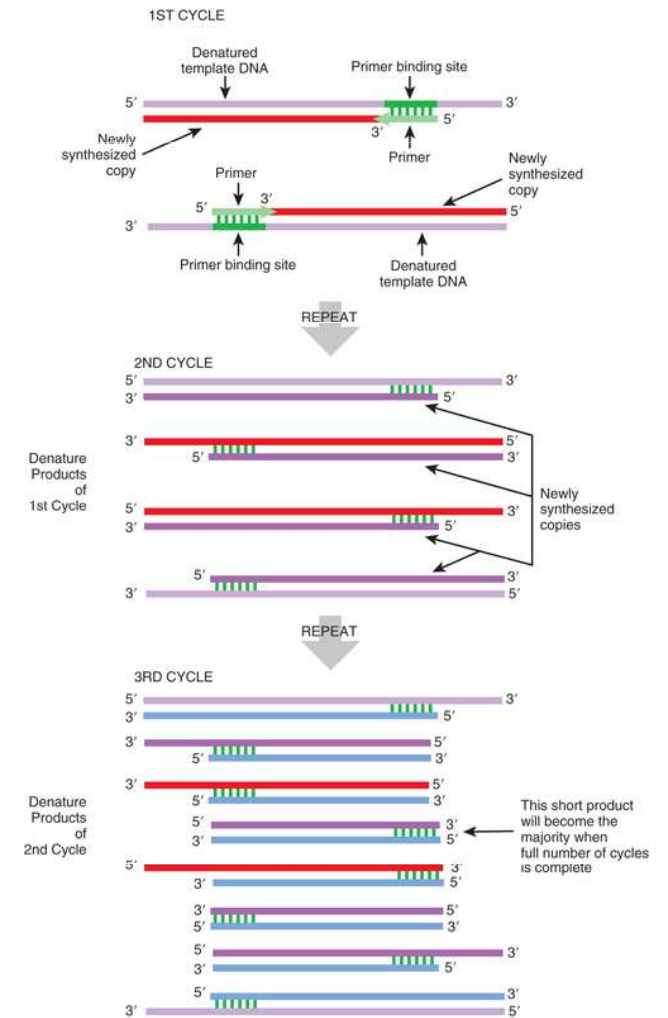
..the idea of PCR came to him  
while driving with his girlfriend  
on a highway..

*"It was quiet and something  
just went, Click!"*

**KARY B MULLIS**

1944 - 2019

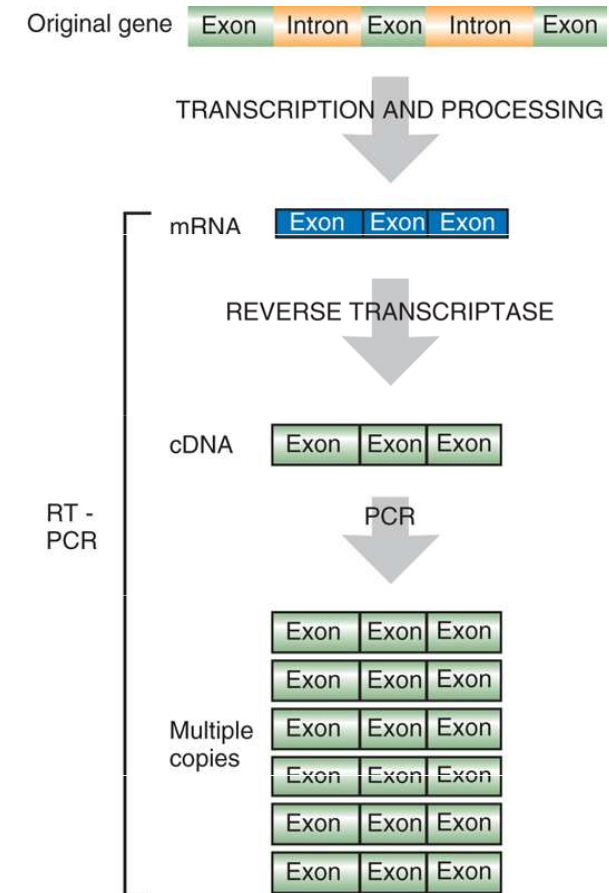
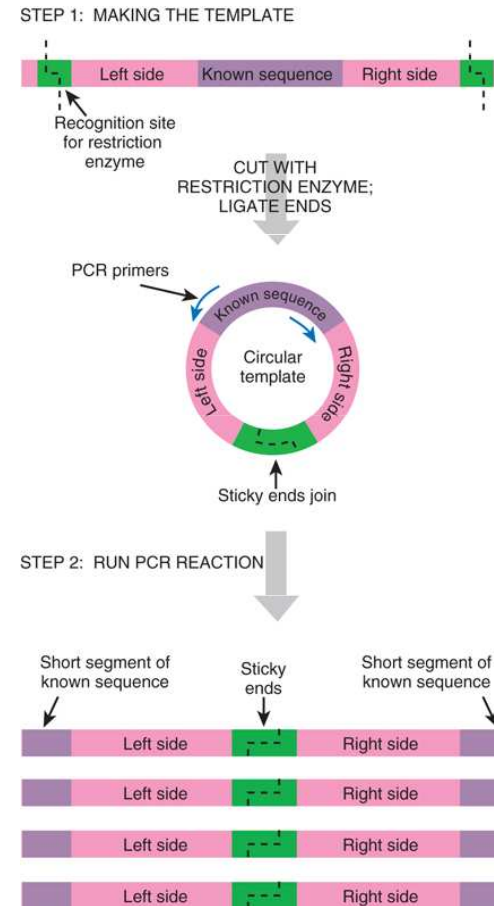
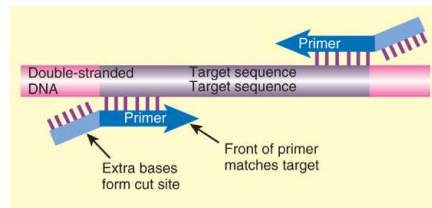
Inventor of PCR Technique



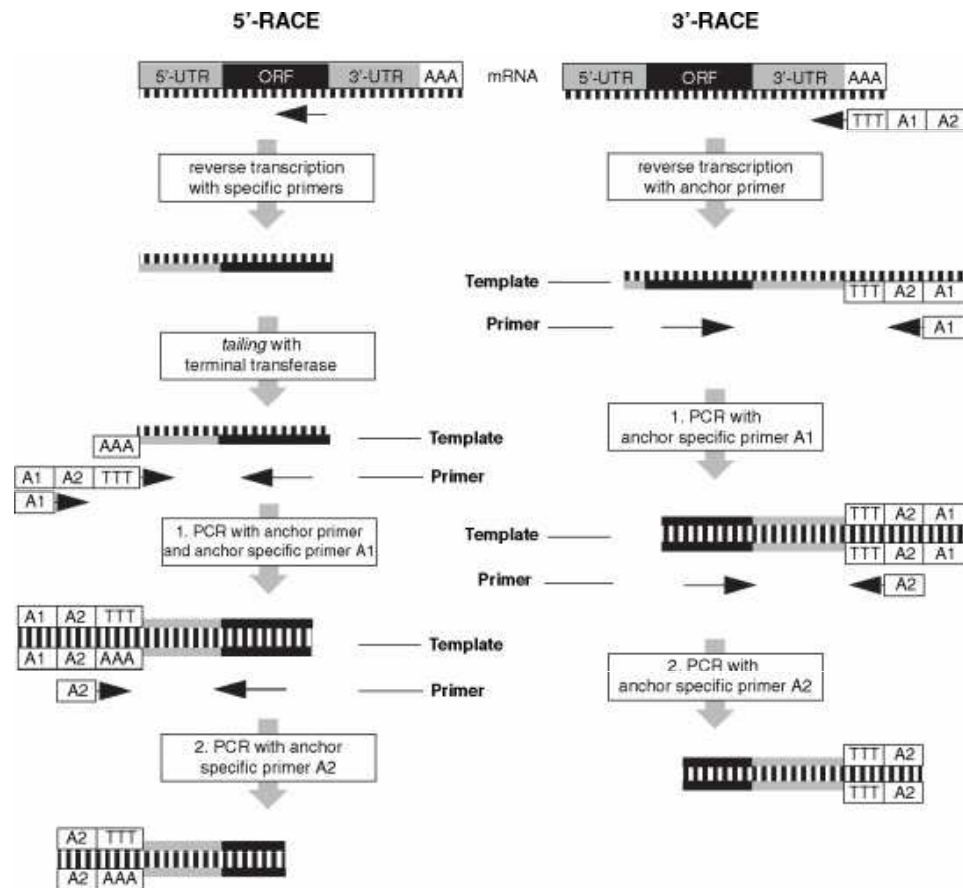


# Modifikace PCR

- Inverzní PCR
- Použití degenerovaných bazí, zavedení restričních míst
- Reverzně-transkripční PCR (RT-PCR)
  - 5'RACE, 3'RACE
- PCR cílená mutageneze
- Emulzní PCR
- Droplet Digital PCR
- LAMP



# RACE PCR



Rapid Amplification of cDNA Ends

# PCR cílená mutageneze

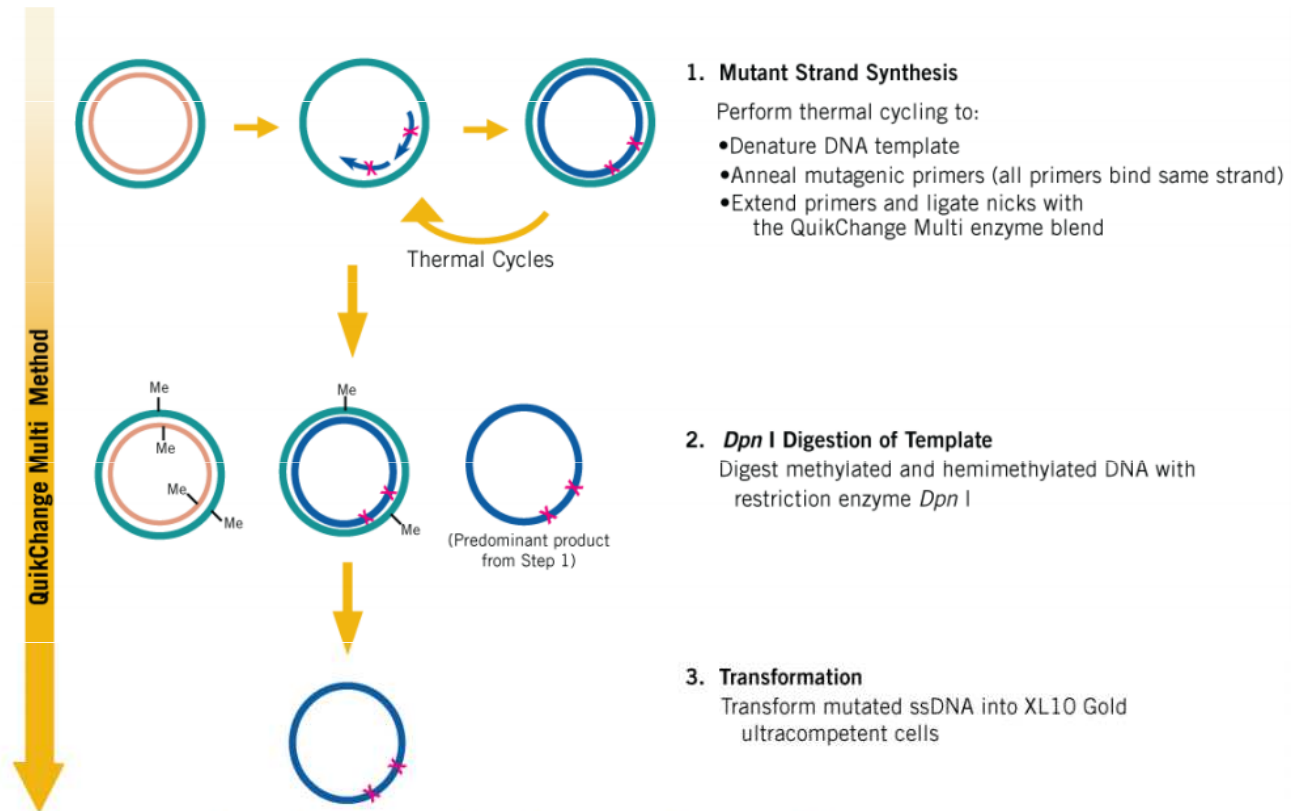
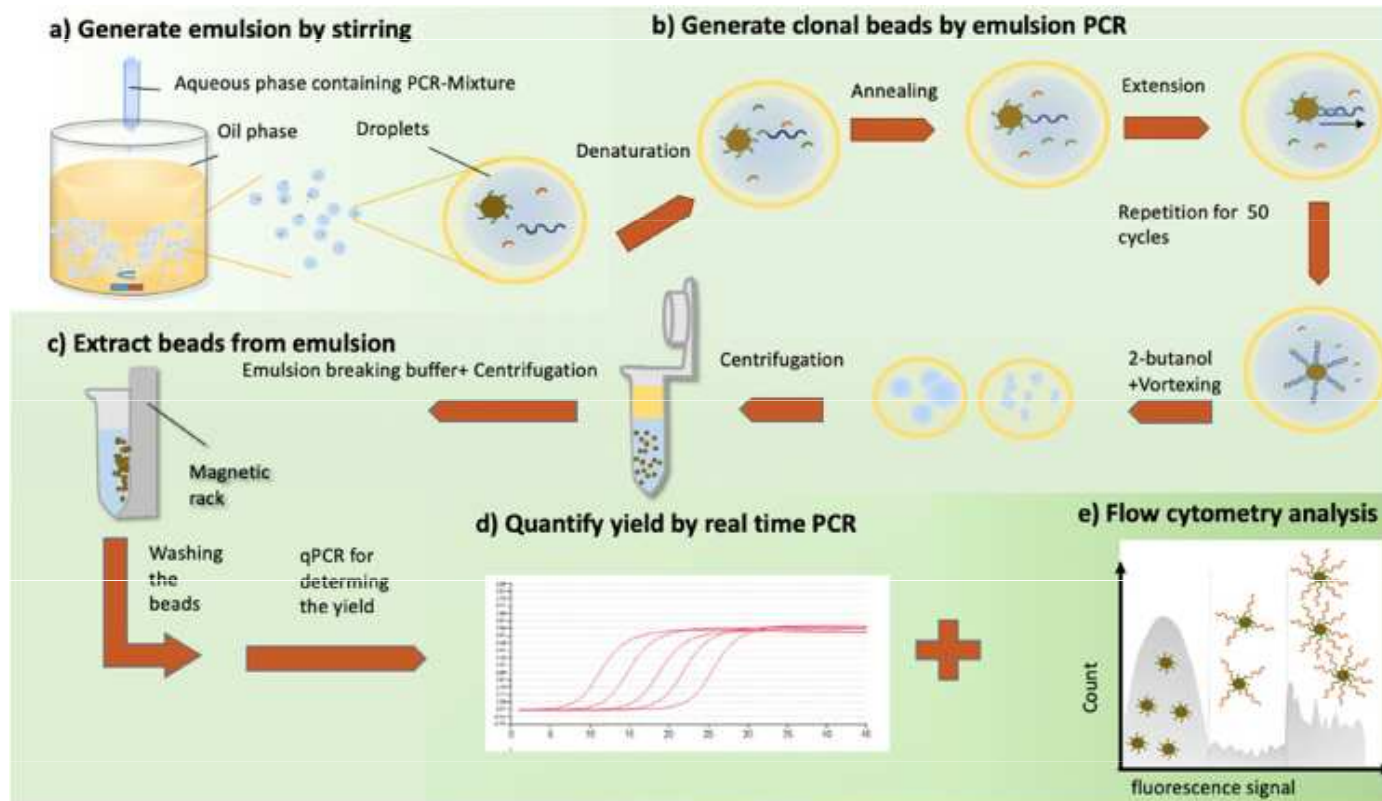


FIGURE 1 Overview of the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis method.

# Emulzní PCR

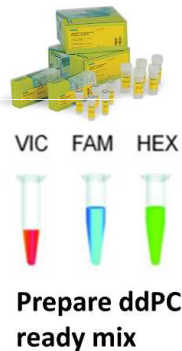
Použito při NGS technologii (454, ion torrent)



# Droplet digital pcr



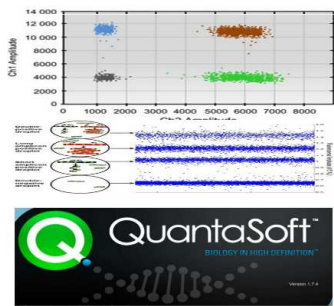
DNA  
isolation



Load mix and sample  
into a plate



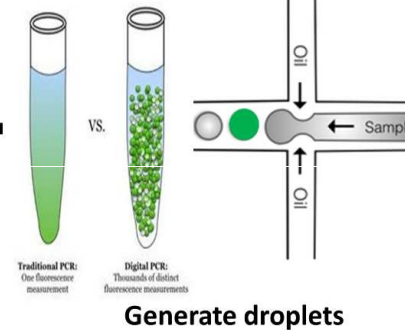
Place plate in a  
droplet generator



Read and analyze  
results

Place amplified droplets  
in a droplet reader

Amplify targets in  
droplets by PCR



# Loop-Mediated Isothermal Amplification

- Použití *Bst* polymerázy (Bacillus stearothermophilus DNA Polymerase I)
- Probíhá isotermálně
- Amplifikační faktor až  $10E09$  srovnatelný s 30 cykly PCR
- Detekce v rámci 10-30 minut, fluorescence, kolorimetricky, turbidimetricky
- Méně náchylná na inhibice – možno provádět přímo ze vzorku

