

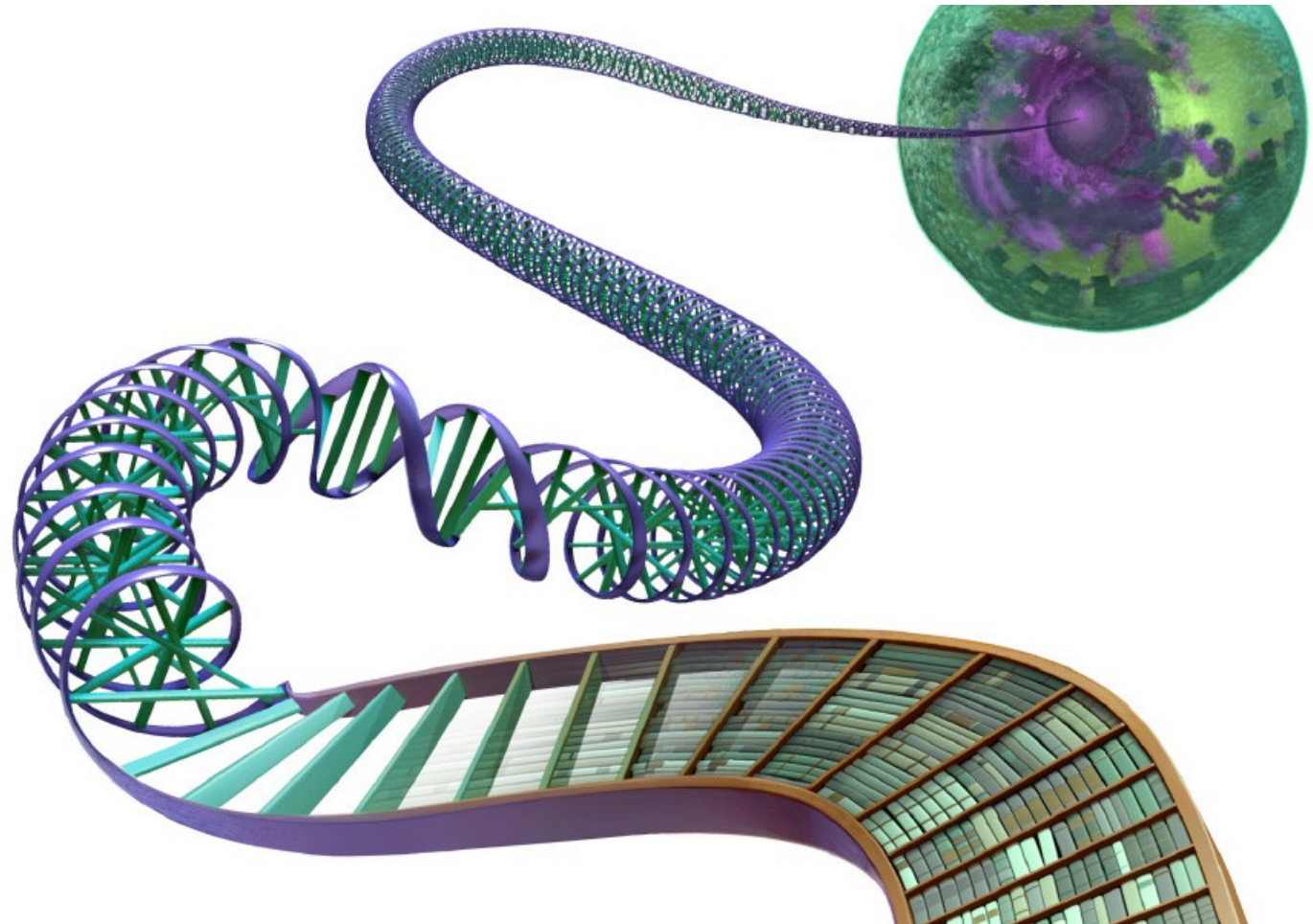


Bi6589

Laboratorní a bioinformatické metody rostlinné biosystematiky

Metody molekulární biologie

Analýzy
DNA

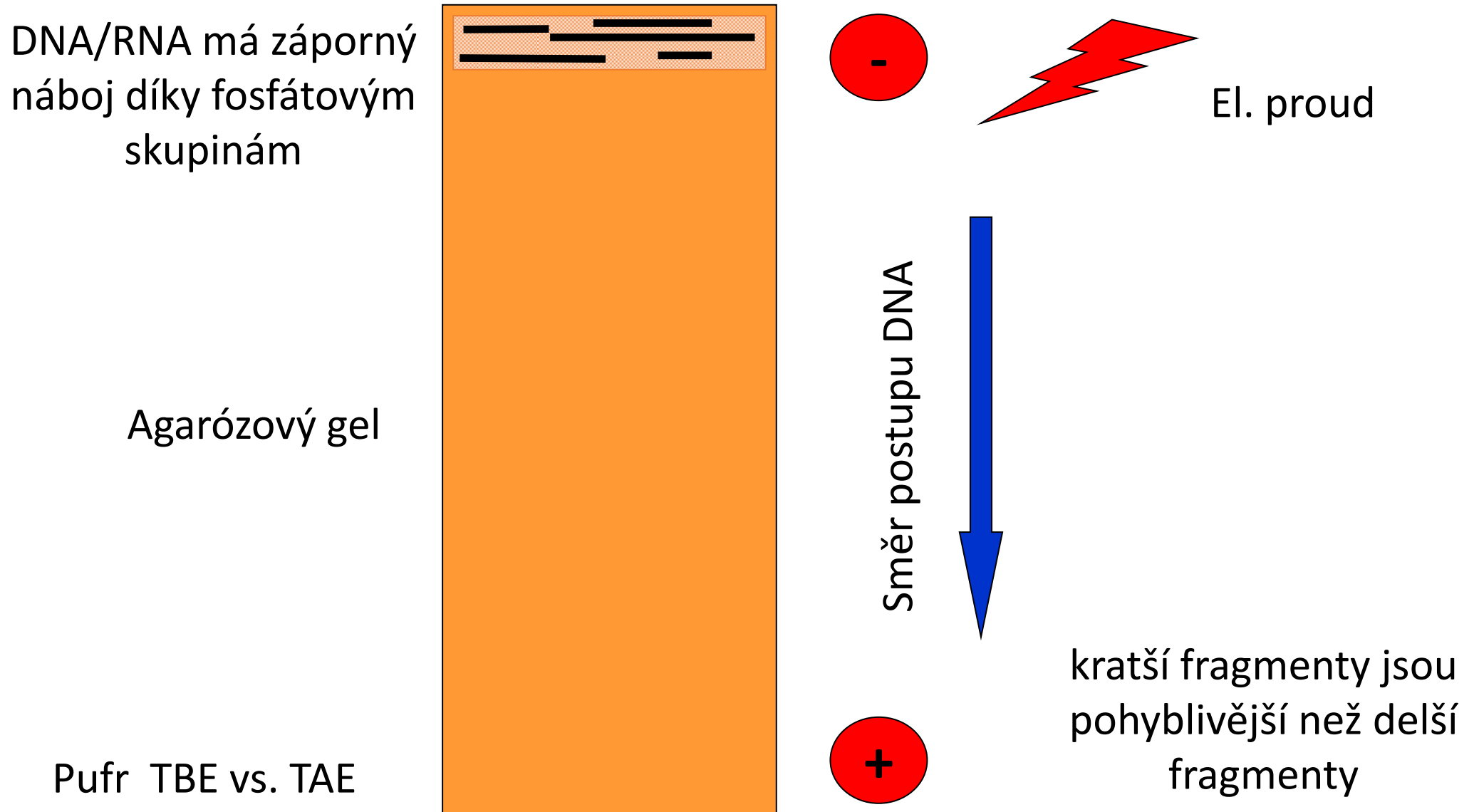


Metody molekulární biologie

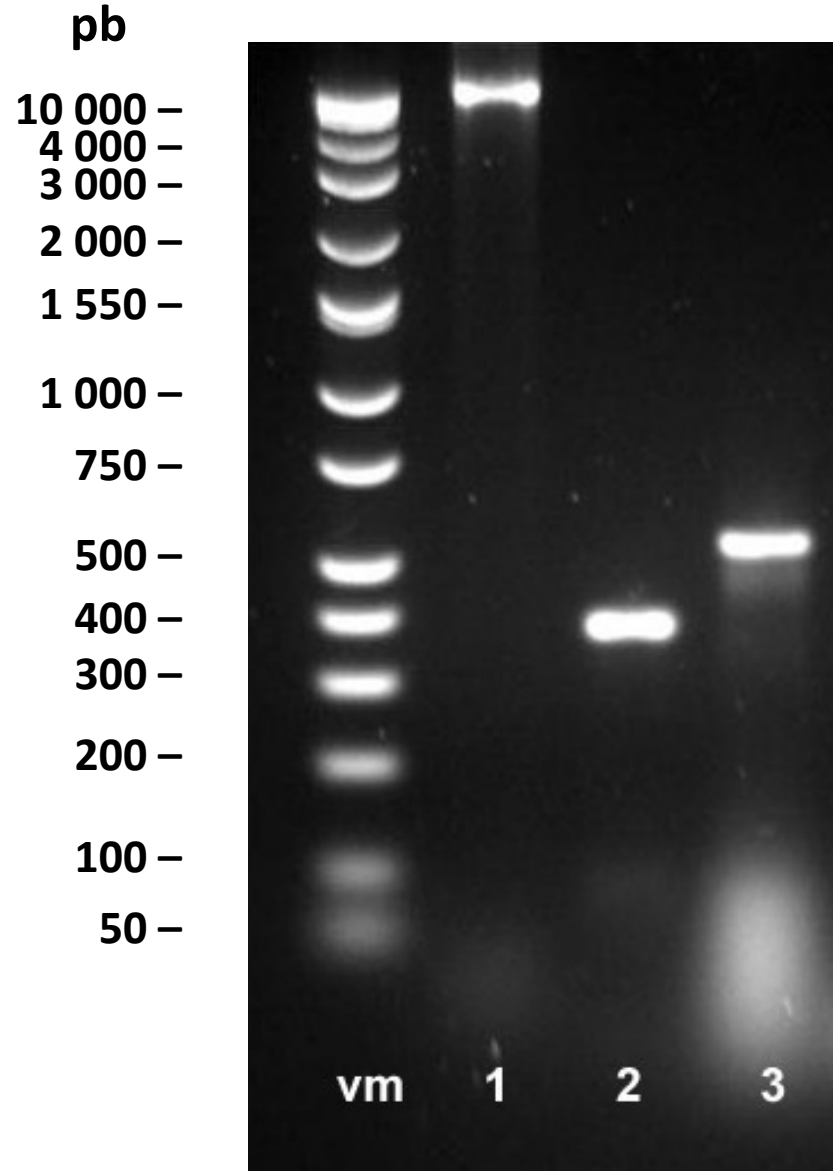
Elektroforéza



Elektroforéza – princip separace nukleových kyselin



Elektroforéza – elektroforetogram



VM – velikostní marker

1 – genomová DNA

2, 3 – DNA fragmenty

Vizualizace DNA:

na DNA se naváže fluorescenční barvivo, které po osvětlení UV zářením fluoreskuje.

Metody molekulární biologie

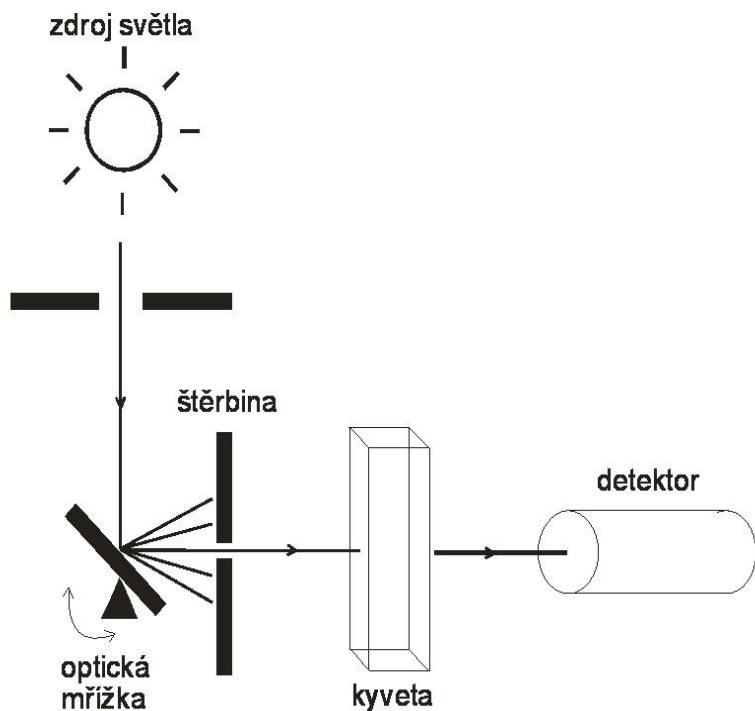
Kvantifikace
nukleových kyselin



Kvantifikace nukleových kyselin

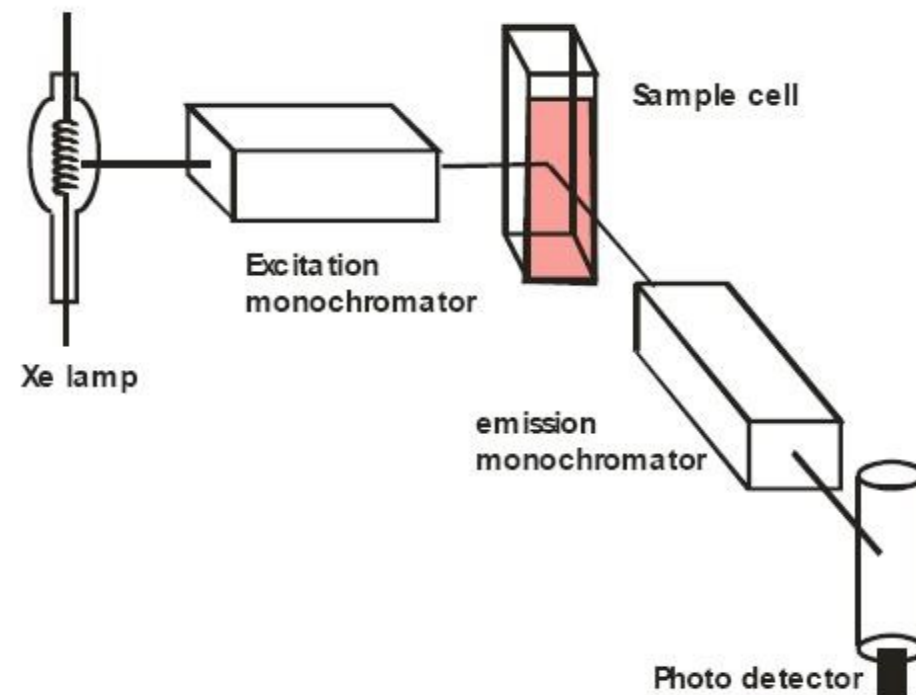
(spektro)fotometr

měří: absorpenci, tedy kolik světla bylo pohlceno vzorkem



(spectro)fluorometr

měří: intenzitu fluorescenčního záření emitovaného vzorkem



Stanovení koncentrace DNA měřením absorbance při 260 nm

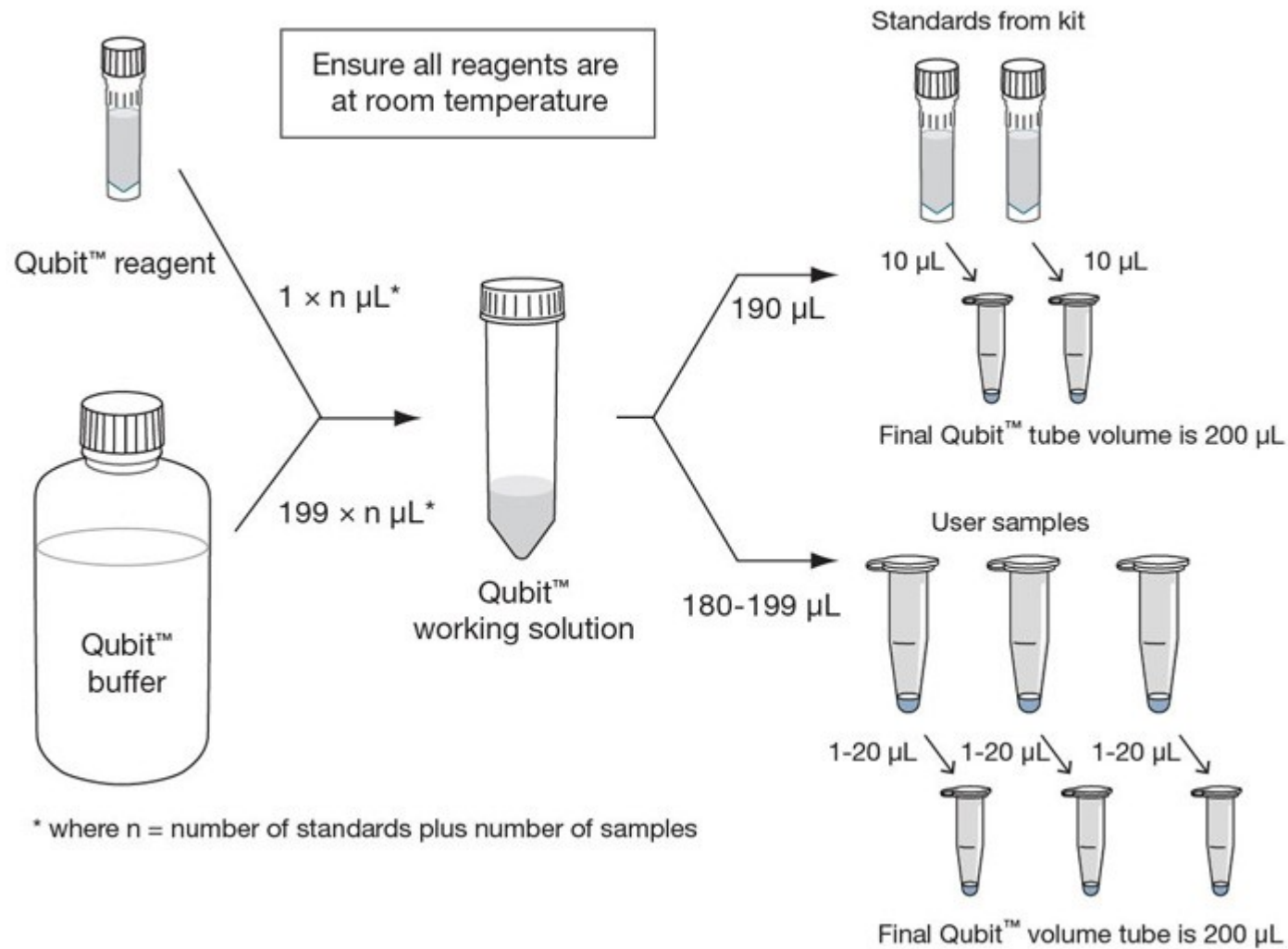
- 1) vlož do kyvety 114 μl destilované vody
- 2) proved' kalibraci spektrofotometru (nastavení nulové hodnoty)
- 3) přidej do kyvety 6 μl vzorku;
- 4) promíchej obsah kyvety pipetou
- 5) změř absorbanci při 260 nm (A_{260})
- 6) odečti naměřenou hodnotou
- 7) proved' výpočet koncentrace DNA dle vzorce

Nukleová kyselina	Extinkční koeficient $A_{260} = 1$
ds DNA	50 $\mu\text{g/ml}$
ss DNA	33 $\mu\text{g/ml}$
RNA	40 $\mu\text{g/ml}$

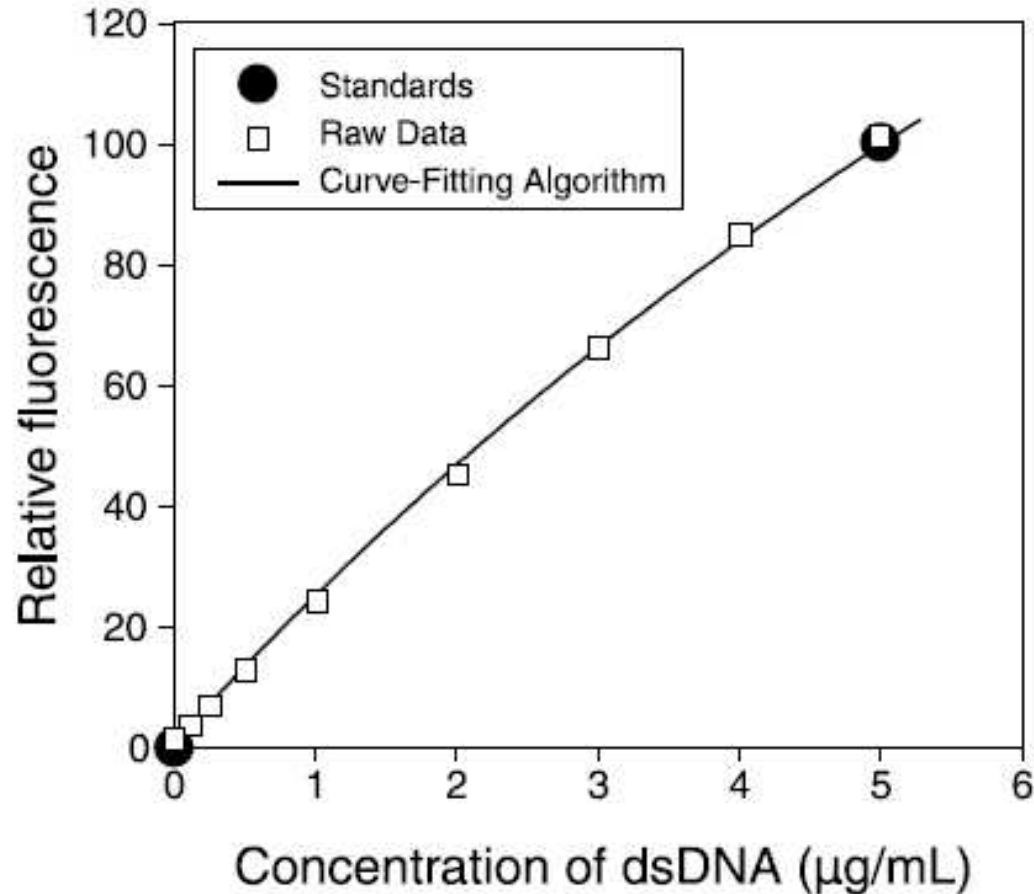


Koncentrace nukleové kyseliny = A_{260} x extinkční koeficient x diluční faktor

Stanovení koncentrace DNA měřením fluorescence



Stanovení koncentrace DNA měřením fluorescence



Metody molekulární biologie



Polymerázová řetězová reakce
Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Důmyslná metoda pro zmnožení (amplifikaci) známé sekvence.

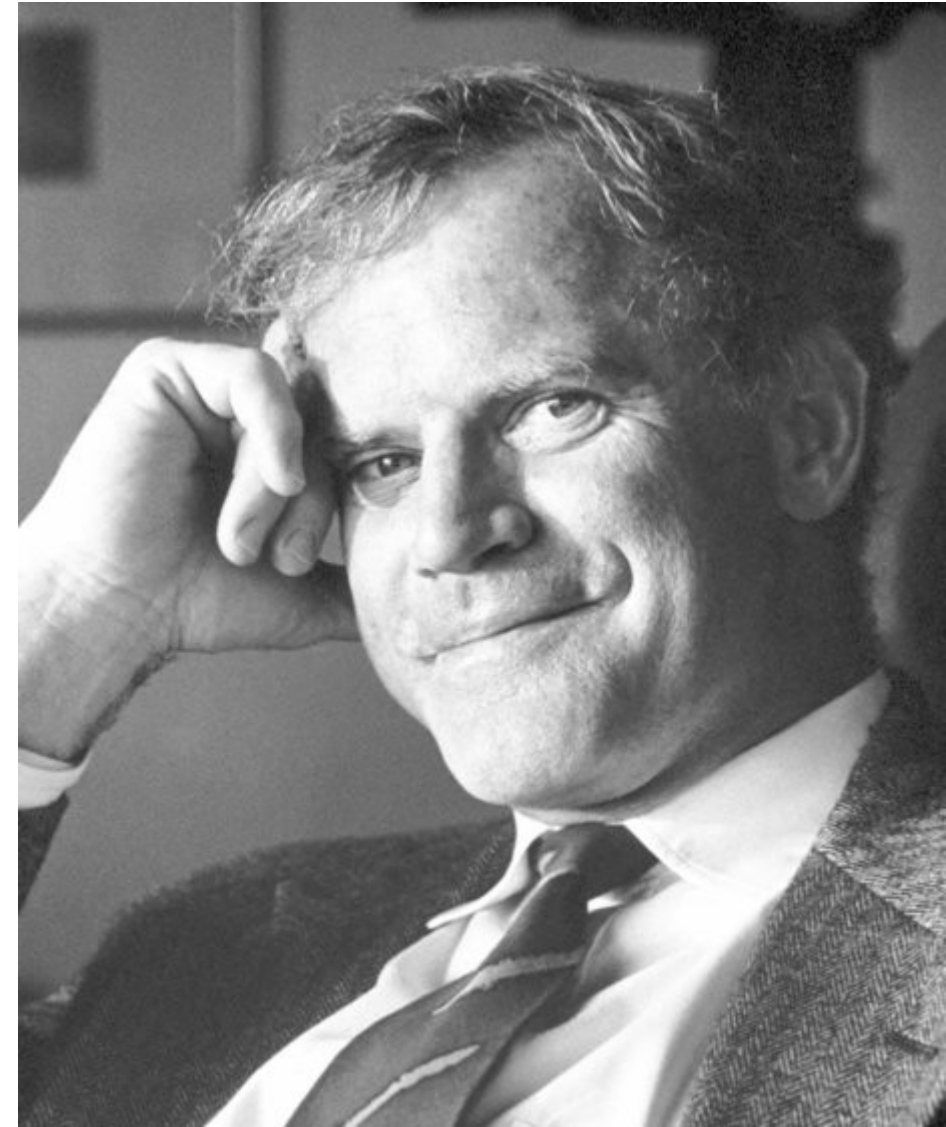
Trocha historie

1979 – Kary B. Mullis objevil principy PCR

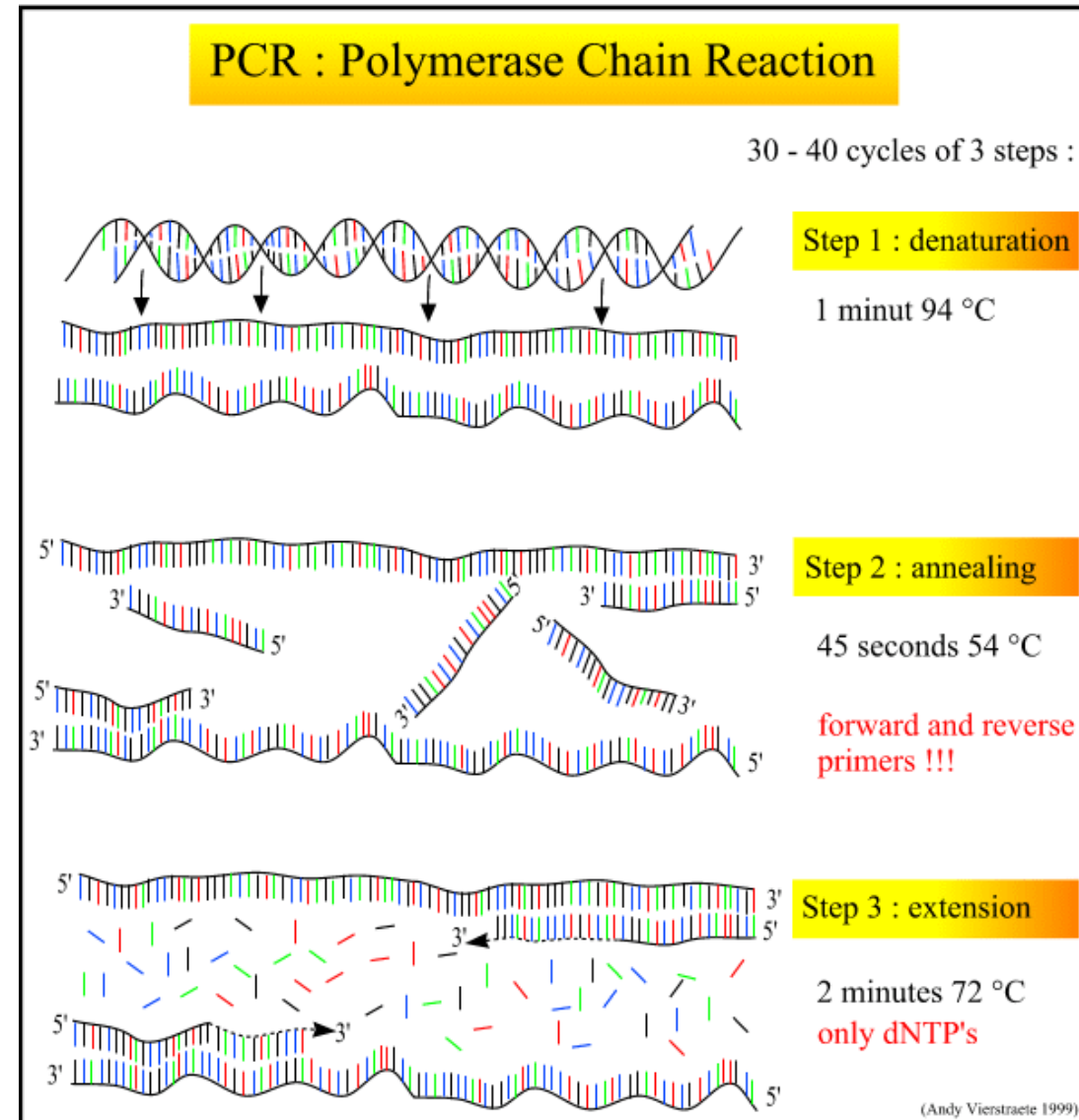
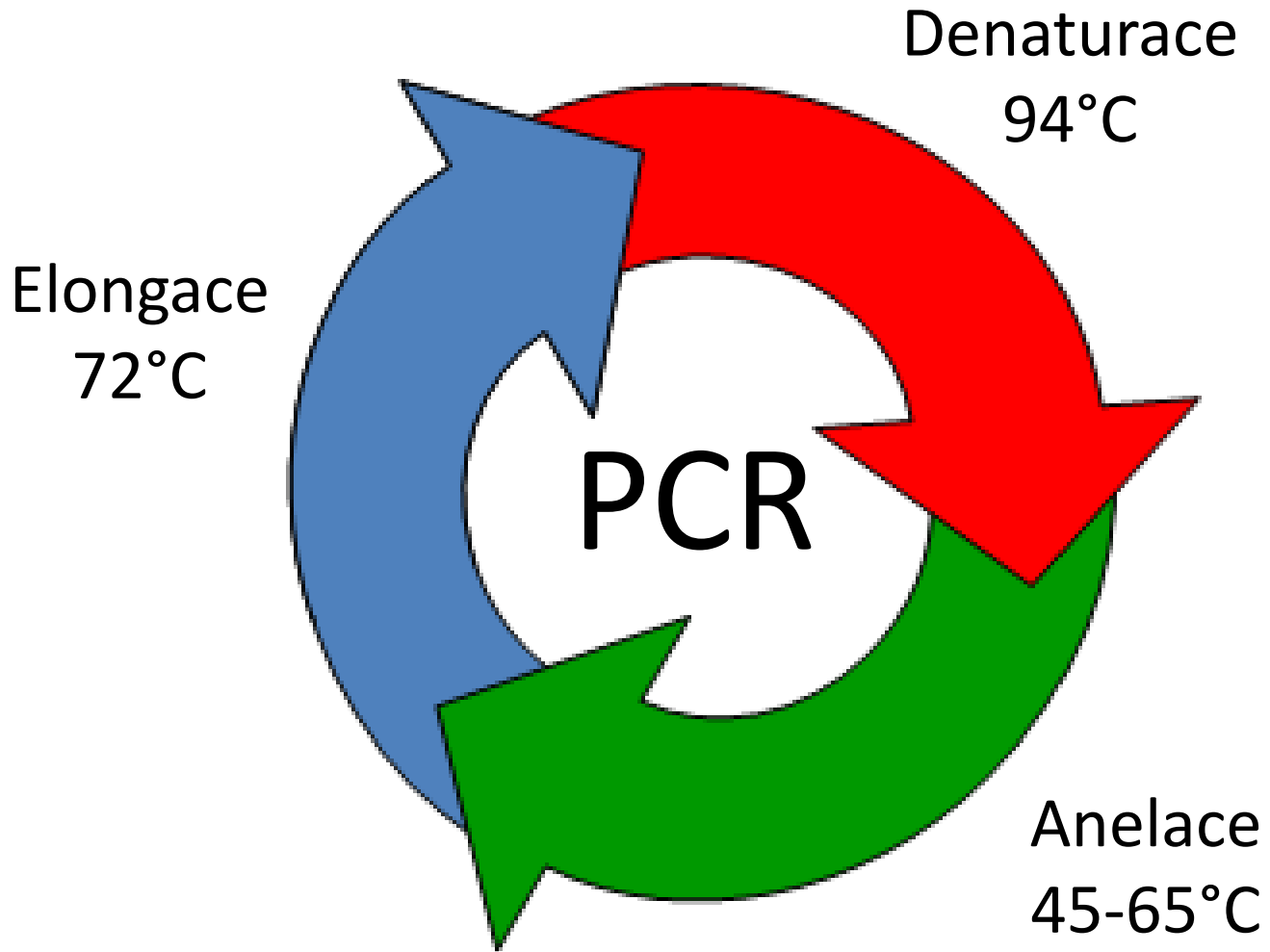
1985 – popsána samotná PCR

1993 – Nobelova cena za chemii

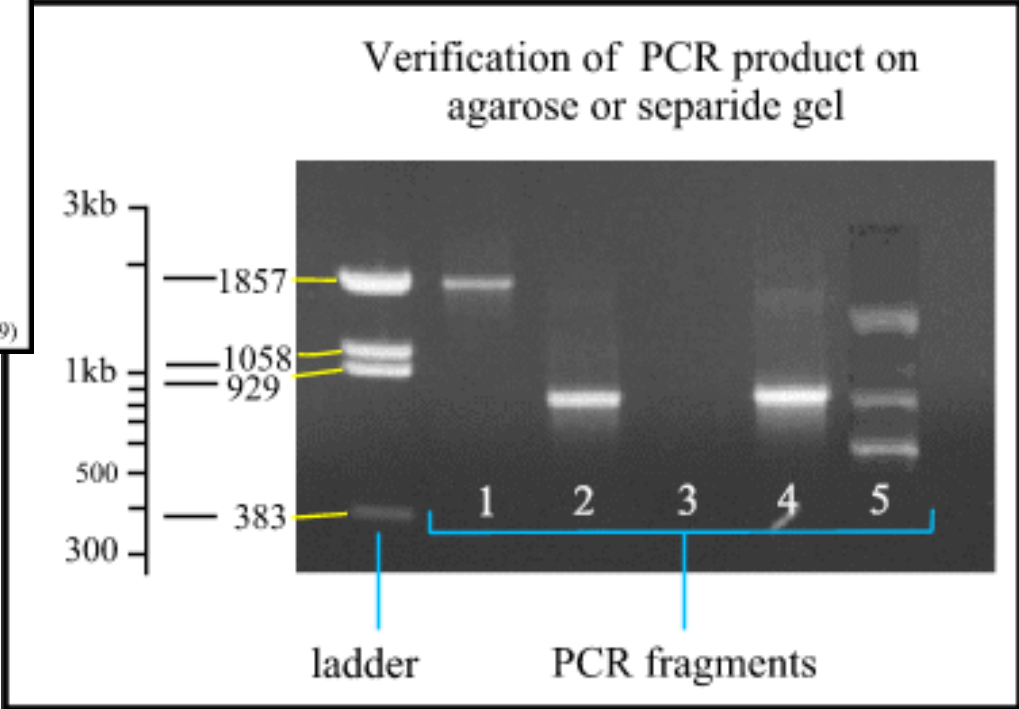
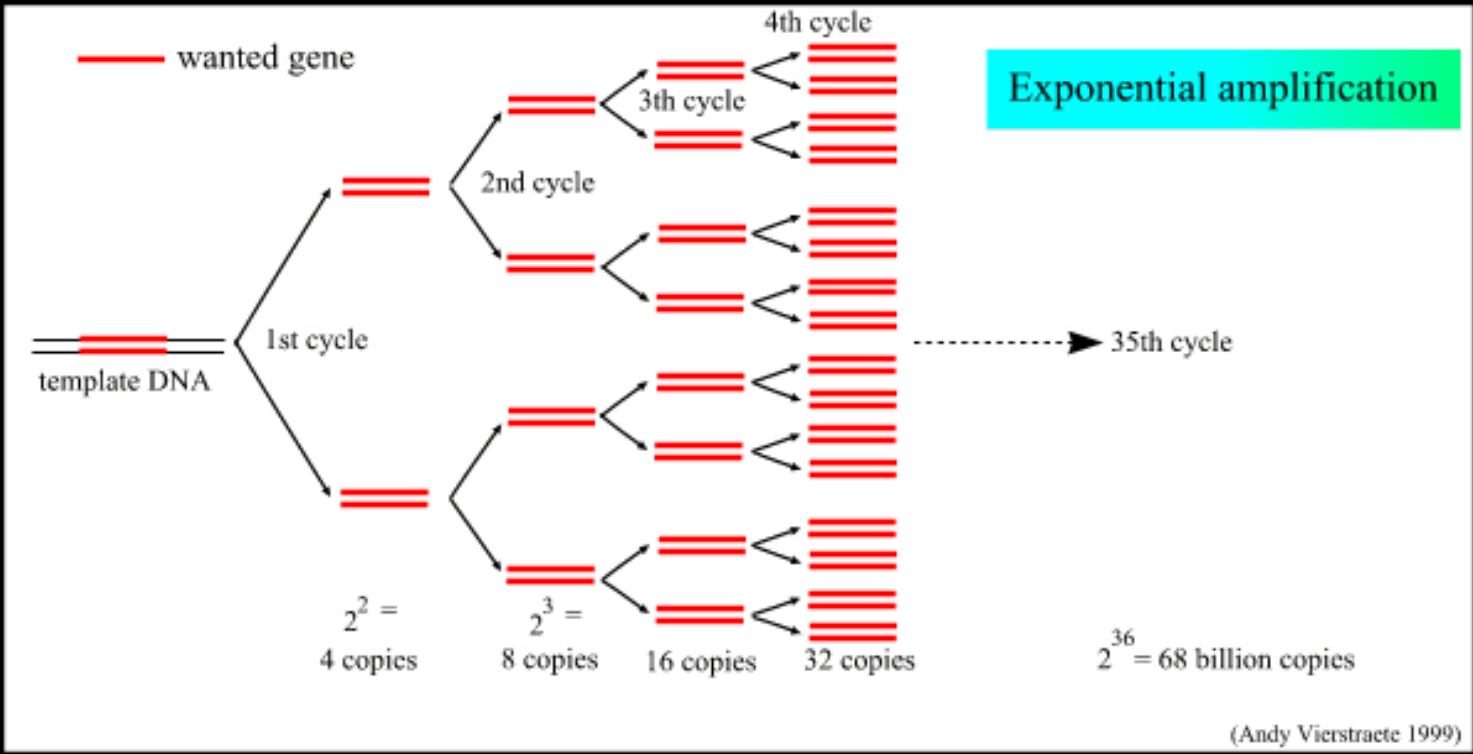
Paradox: 1971 - Dr. K. Kleppe a H.G. Khorana publikovali principy na kterých stojí PCR; jejich nápad však zapadl



PCR - princip



PCR - princip

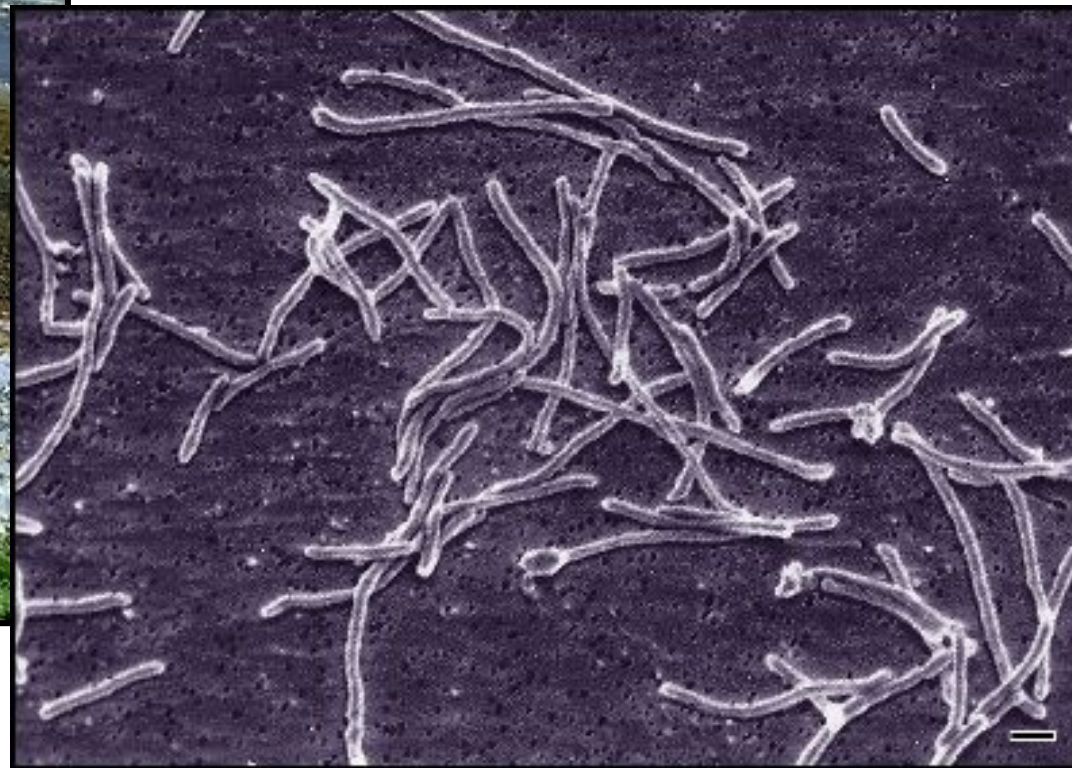


PCR - princip



Národní park Yellowstone (USA)

Thermus aquaticus



PCR - protokol

Komponenta	Pipetovaný objem	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace
DNA	1 μ l	?	50 - 100 ng
Taq polymerase	1 μ l	1U/ 1 μ l	1U/ reakce
Primer F	1 μ l	5 μ M	250 nM
Primer R	1 μ l	5 μ M	250 nM
dNTP	0,3 μ l	10 mM (each)	150 nM
Pufr (15 mM MgCl ₂)	2 μ l	10 x	1 x
PCR voda	13,7 μ l		Doplnit do 20 μ l
suma	20 μ l		

PCR program

1x 94°C 2 min
30x 94°C 30 sek
56°C 30 sek
72°C 30 sek
4°C forever

PCR - shrnutí

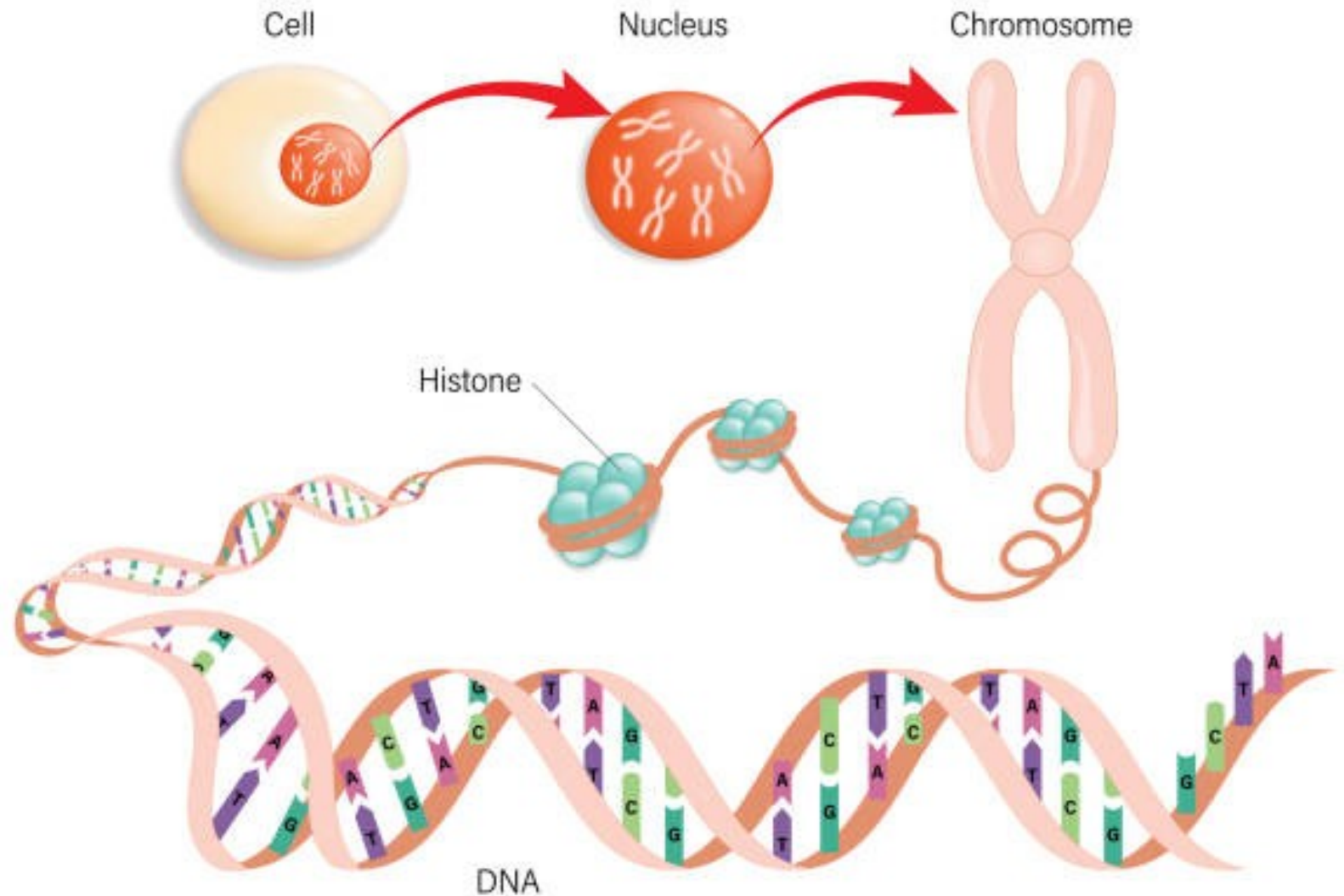
Výhody

- jednoduchost
- rychlost
- velká možnost modifikací základního postupu
- návaznost na další metody
- možnost automatizace
- potřeba 50 –100 ng DNA (v ideálním případě je tedy možné pomnožit DNA úsek z několika buněk)
- v některých případech stačí hrubý extrakt DNA

Nevýhody

- omezená délka amplifikovaného fragmentu (3-15 tis. pb)
- chybovost polymerázy
- obecně nutná znalost cílové sekvence (některé modifikace standardní PCR tuto znalost nevyžadují)
- u rostlinných pletiv častý výskyt inhibitorů PCR
- nespecificita PCR (primerů)

Metody molekulární biologie



Sekvenování

Sekvenování

Starší metody

- Sangerova metoda
- Maxam–Gilbertova metoda
- Pyrosekvenování

Nové metody

454, Solexa, Solid, Ion Torrent, Oxford Nanopore, ... „Black box“

Liší se

- Délkou sekvenovaného fragmentu
- Finanční náročností
- Časovými nároky
- Chybovostí

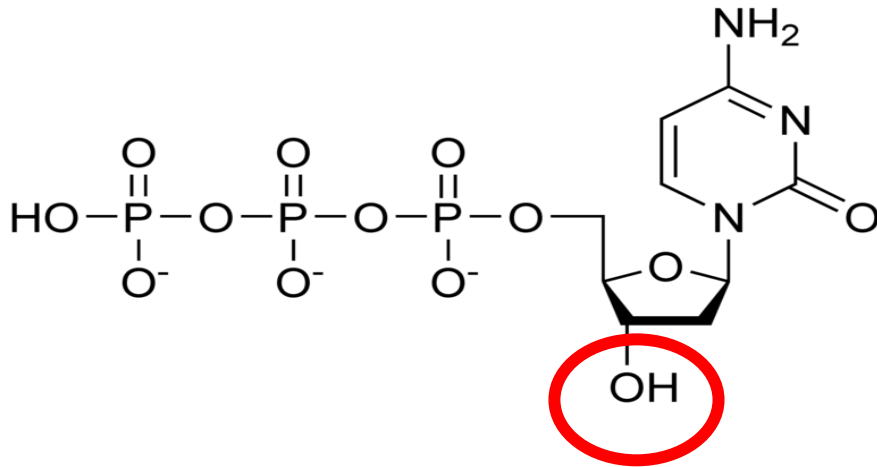
Vztah k našemu problému:

**Organelové markery
Jaderné markery**

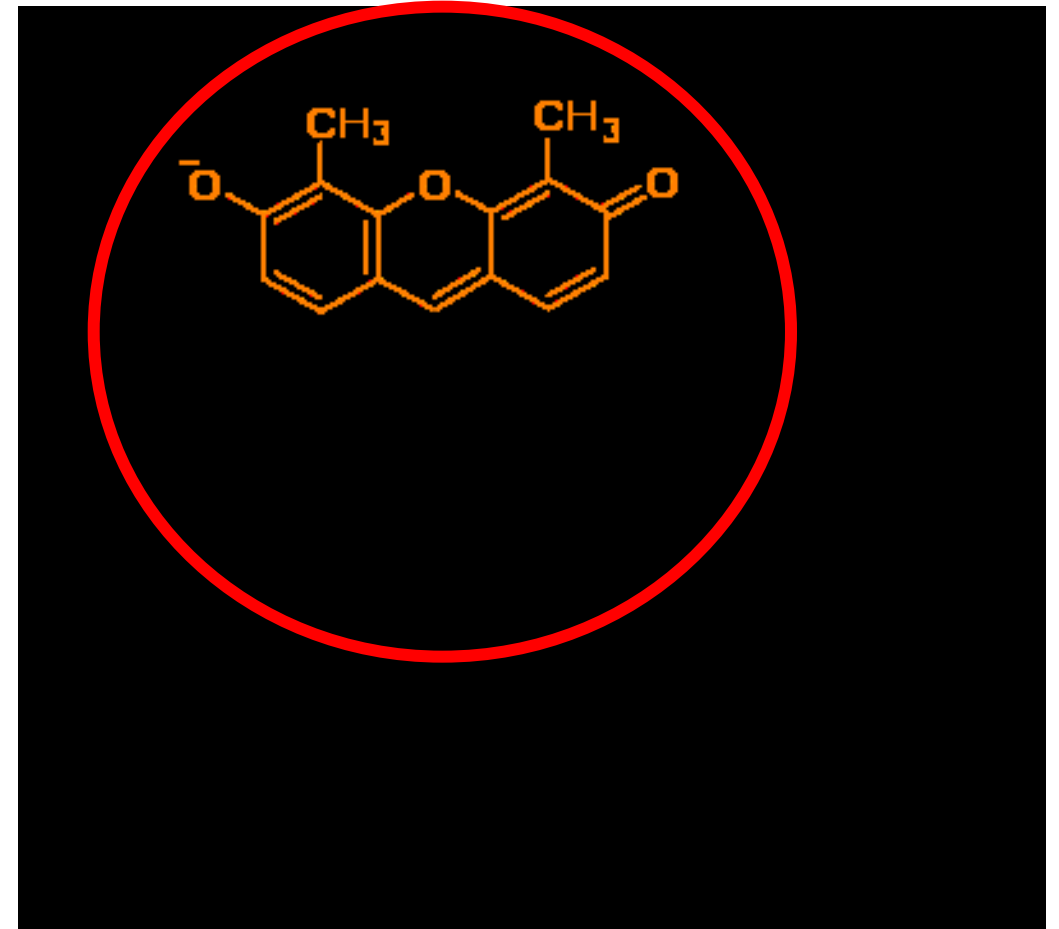
Sangerova metoda - princip

Principy: 1977

Komerční využití: 1986



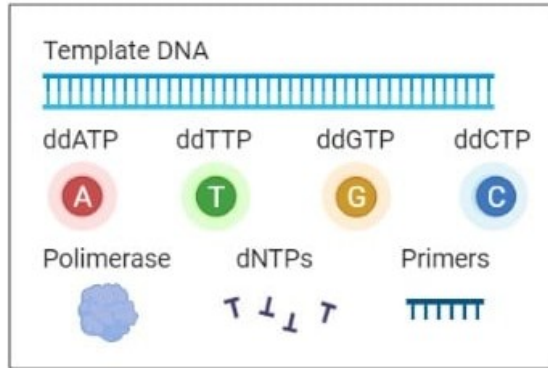
deoxycytozin (dCTP)



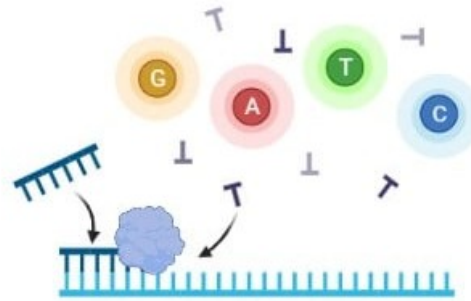
dideoxycytozin (ddCTP)

Sangerova metoda - princip

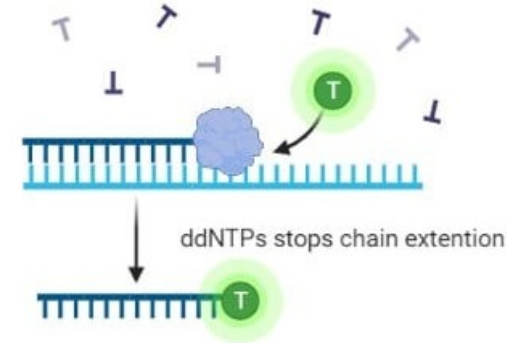
Reagents



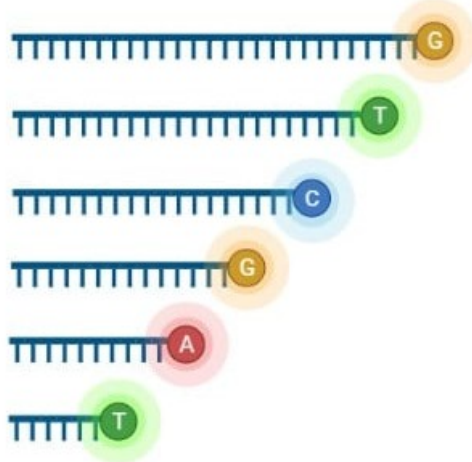
① Primer annealing and chain extension



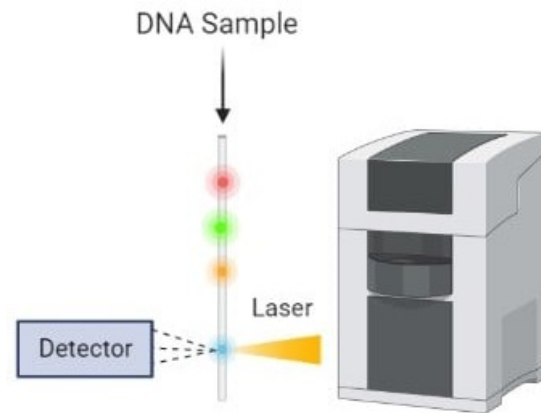
② ddNTP binding and chain termination



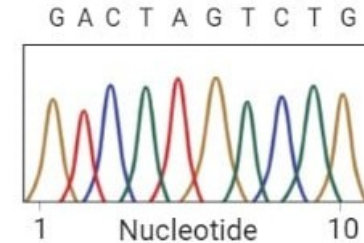
③ Fluorescently labelled DNA sample



④ Capillary gel electrophoresis and fluorescence detection



⑤ Sequence analysis and reconstruction



Po přiřazení ddNTP se zastaví prodlužování řetězce. Inkorporace ddNTP je náhodná, vznikají tedy fragmenty různých délek.

Sangerova metoda - shrnutí

Výhody

- nízká koncentrace templátu (10-100 ng)
- vysoká opakovatelnost
- známé vlastnosti, funkce a evoluční význam studovaných fragmentů
- možnost automatizace (zavedený pracovní postup)
- rychlé a cenově výhodné při malém počtu vzorků
- jednoduchá analýza dat
- délka čtení (500-700 pb)

Nevýhody

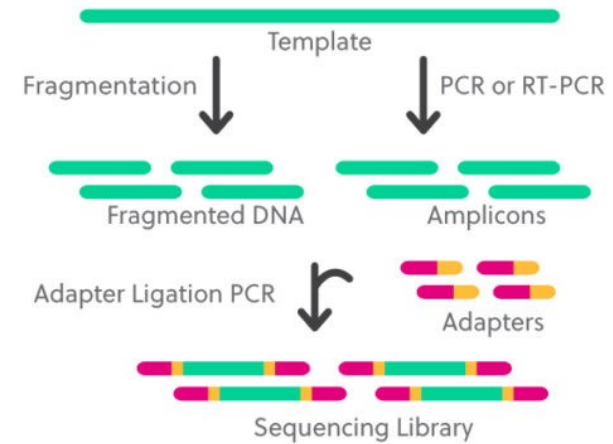
- pracná technika a náročná na technické vybavení (lze řešit jako službu)
- problémy při kontaminaci vzorku cizorodou DNA (v případě, kdy se používá univerzální primer)
- drahý, časově náročný vývoj univerzálních primerů (omezená možnost použitelnosti)
- nízké pokrytí genomu
- nízký stupeň variace v taxonomických jednotkách menších než druh

Next Generation Sequencing (NGS) - princip

STEP 1: Extraction



STEP 2: Library Prep



STEP 3: Sequencing

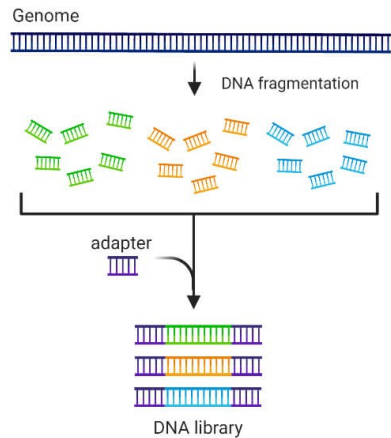


STEP 4: Analysis

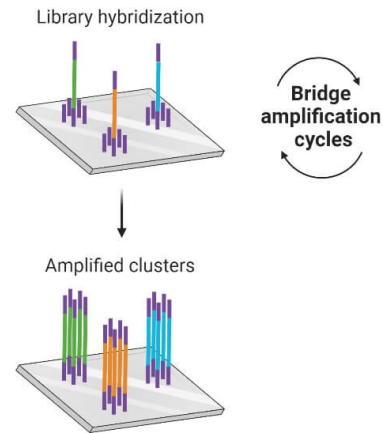


Next Generation Sequencing (NGS) - princip

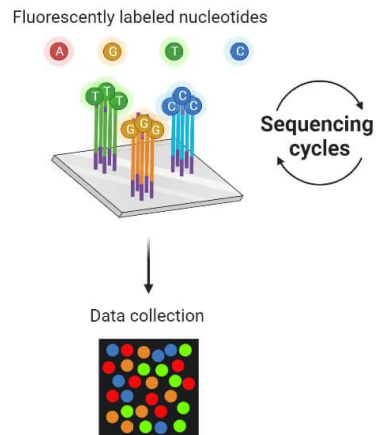
① Library preparation



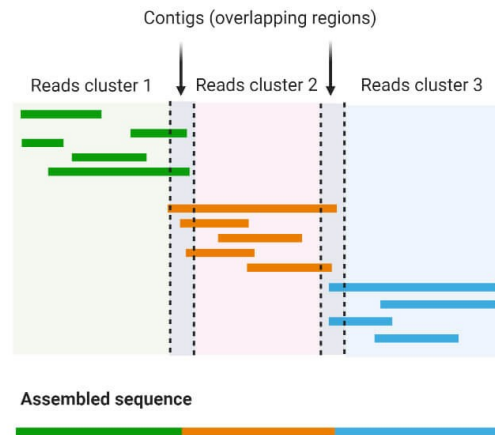
② DNA library bridge amplification



③ DNA library sequencing



④ Alignment and data analysis



Sekvenování Illumina

- Založena na barvivových terminátorech.
- Při této metodě jsou molekuly DNA nejprve připojeny k primerům na sklíčku a amplifikovány (tzv. můstkové zesílení).
- Při elongaci, může být DNA prodloužena vždy pouze o jeden fluorescenčně značený nukleotid.
- Kamera pořídí snímky fluorescenčních zánčků.
- Poté je barvivo spolu s koncovým 3' blokátorem chemicky odstraněno z DNA a je zahájen další cyklus.

Next generation sequencing (NGS) - shrnutí

Výhody

- pokrytí téměř celého genomu (alternativně náhodný výběr sekvencí z celého genomu)
- velké množství informací z malého množství DNA
- velký stupeň variability v sekvencích v různých taxonomických úrovních
- opakovatelnost

Nevýhody

- pracná technika a náročná na technické vybavení (lze řešit jako službu)
- finančně nevýhodné pro malý počet vzorků (do cca 20 vzorků)
- časově neefektivní/nevýhodné pro malý počet vzorků (do cca 20)
- krátké čtení (150-300 bps) např. od Illumina
- obvykle analyzujeme anonymní fragmenty (neznáme jejich vlastnosti, funkci a evoluční význam)
- problematické odstraňování paralogů a ortologů
- složitá analýza dat