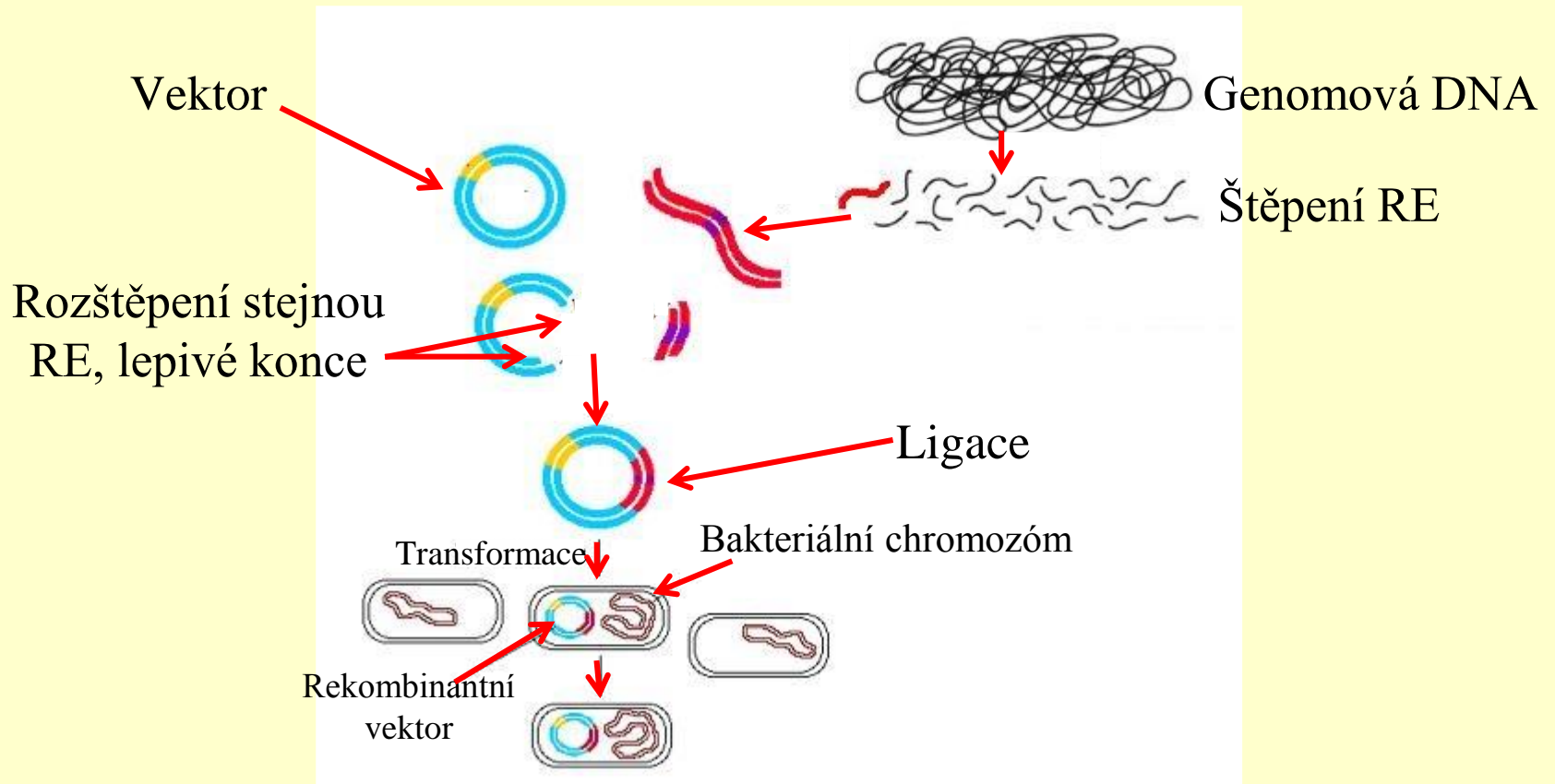
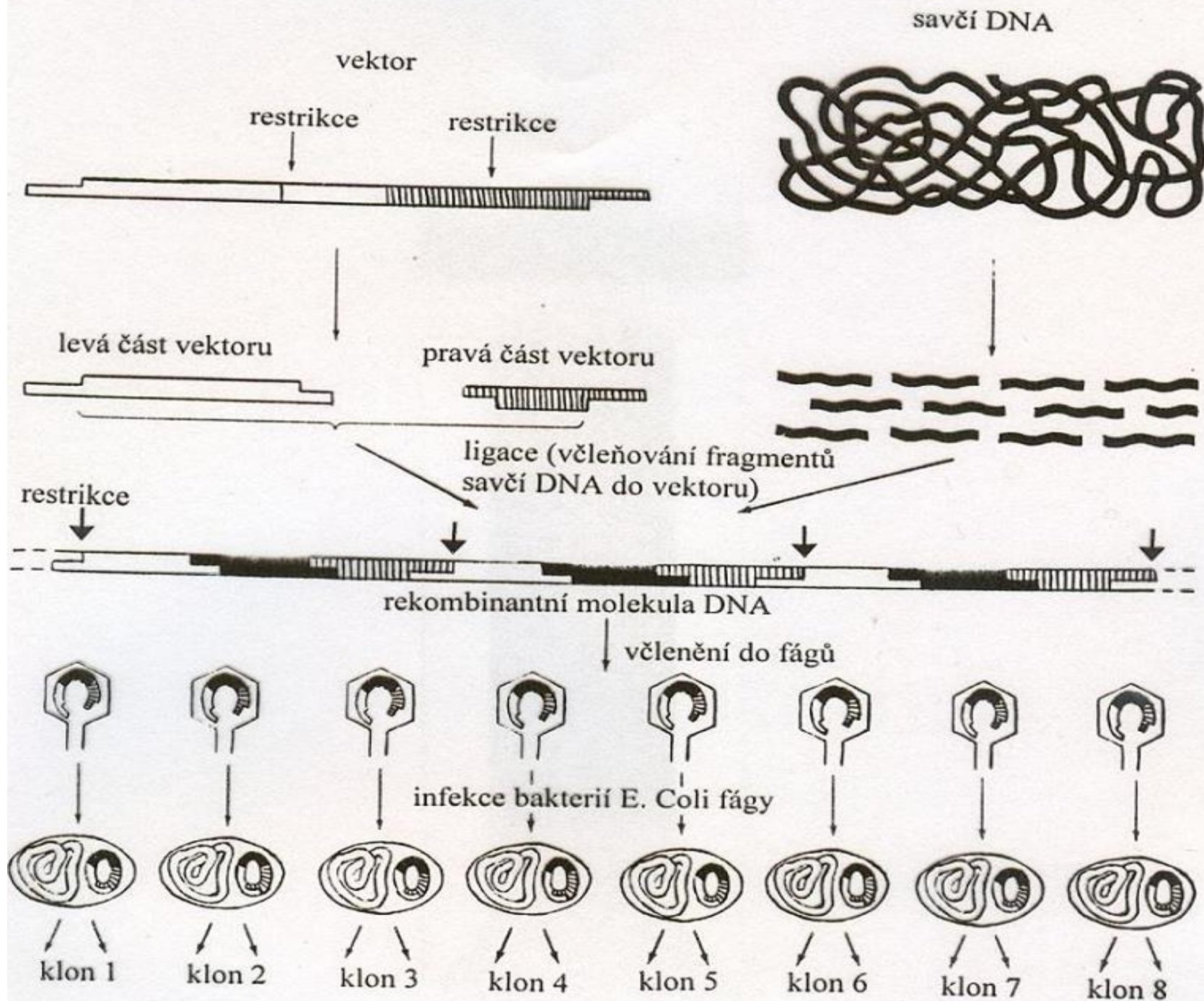


Molekulární genetik

Genetické inženýrství

Technologie rekombinantní DNA





Vektory

Plazmidy

Fágy

Syntetické vektory

YAC, BAC

Nyní velmi používané pro transgenózi u lidí,
zvířat - lentiviry

Polymerázová řetězová reakce

PCR

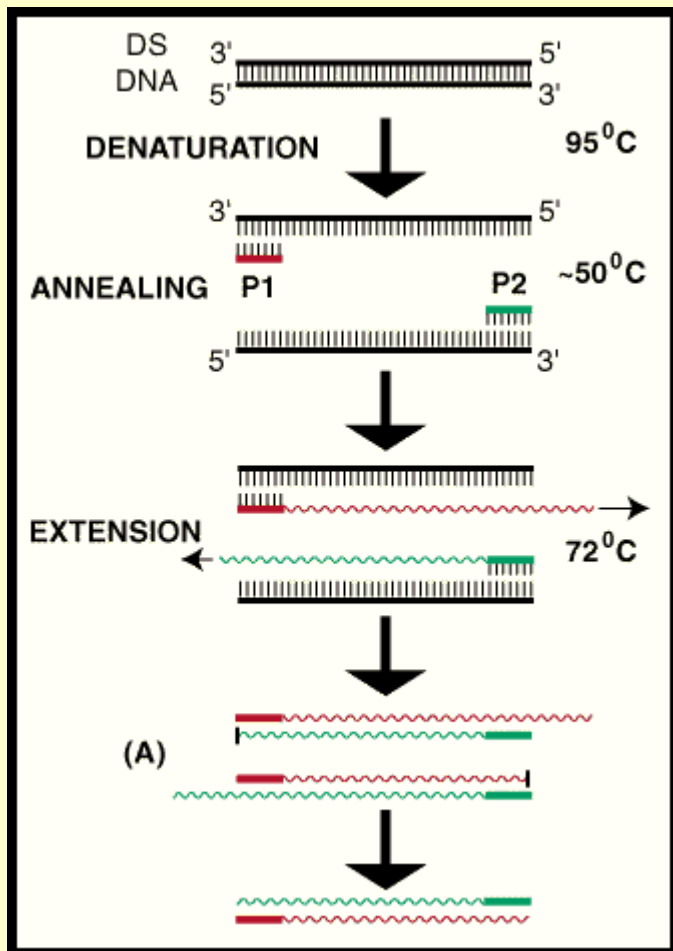
PCR

polymerázová řetězová reakce
Polymerase **C**hain **R**eaction

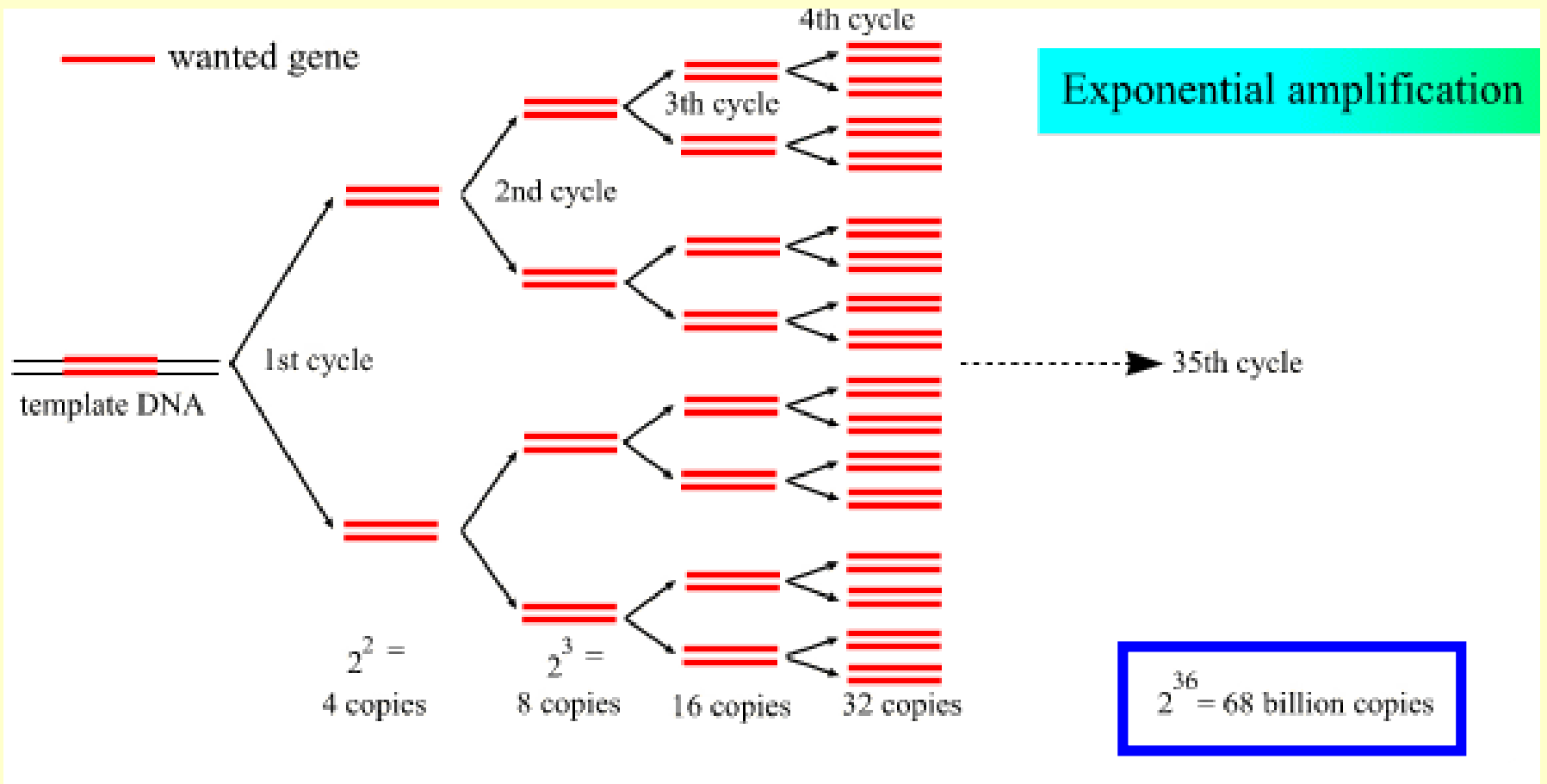
obrovské namnožení určitého úseku DNA (např. genu)
izolace DNA polymerázy z termotolerantního organismu *Thermus aquaticus*



Great Fountain Geyser



Bilance PCR



Ve skutečnosti je účinnost ca 70 – 80 %.

Vybrané termostabilní DNA dependentní DNA polymerasy

Taq polymerasa původně izolována z termofilní eubakterie *Thermus aquaticus*. Dnes se získává jako rekombinantní enzym z *E. coli*. Je to vysoce procesivní polymerasa (průměrně zařadí 50 nukleotidů než se odpojí od templátového řetězce), má 5' → 3' exonukleasovou aktivitu, nemá 3' → 5' exonukleasovou aktivitu. Inkorporuje dUTP a dUTP, modifikované např. digoxigeninem, biotinem či fluoresceinem.

Výhody a nevýhody použití: Vysoké výtěžky do 2 Kbp, prosadí se v kompetici s dalšími polymerasami, má značnou frekvenci chyb ($10^{-5}/\text{bp}$), která se ještě zvyšuje při vyšší koncentraci dNTP, Mg^{++} a v přítomnosti Mn^{++} , produkuje A přesahy (vhodné pro TA klonování, nevhodné pro spojování natupo), nemůže pokračovat v polymeraci, když zařadí některé nekomplementární nukleotidy, používá se pro standardní PCR, značení a v kombinaci s dalšími polymerasami pro PCR dlouhých úseků až do 35 Kbp.

Pwo polymerasa původně z termofilní bakterie *Pyrococcus woesei*, nyní rekombinantní enzym z *E. coli*, nemá 5' → 3' exonukleasovou aktivitu, má 3' → 5' exonukleasovou aktivitu. Používá se v kombinaci s ostatními polymerasami pro PCR dlouhých úseků.

„Hot Start“ Taq polymerasa je modifikovaná rekombinantní Taq polymerasa, která je neaktivní do 75°C, je aktivovatelná při 95°C, je vhodná pro techniky horkého startu. Jinak vlastnosti obdobné Taq polymerase.

Techniky „horkého“ startu (angl. Hot start)

Velké nebezpečí nespecifické reasociace primerů s templátem hrozí zejména během prvního vyhřívání vzorku z pokojové teploty na teplotu denaturační. Při nižší teplotě mohou reasociovat primery nespecificky, vázat se kratšími úseky a tak vytvářet 3' OH konce vhodné pro zahájení syntézy.

Taq polymerasa sice syntetizuje DNA při nižší teplotě pomaleji, ale několik připojených nukleotidů stačí na to, aby se nespecifický komplex stabilizoval, a po zvýšení na 72°C syntéza pokračuje rychle a kopírována je sekvence, o kterou nemáme zájem.

Tomuto jevu lze předejít tím, že zabráníme syntéze DNA při náběhové teplotě, a to např. přidáním aktivátoru až po zvýšení teploty nad 70°C, separací komponent voskovou bariérou, která roztaje nebo použitím teplotně labilních protilátek proti polymerase.

Techniky „horkého“ startu (angl. Hot start)

Nejjednodušší je však použití speciální polymerasy chemicky modifikované tak, že k odstranění blokujících termolabilních skupin dojde asi po 2 až 4 min při 95°C, což polymerasu aktivuje.

Kromě modifikované polymerasy jsou i speciální oligonukleotidové inhibitory, které se váží na polymerasu a oddisociují až při vysoké teplotě.

Použití PCR

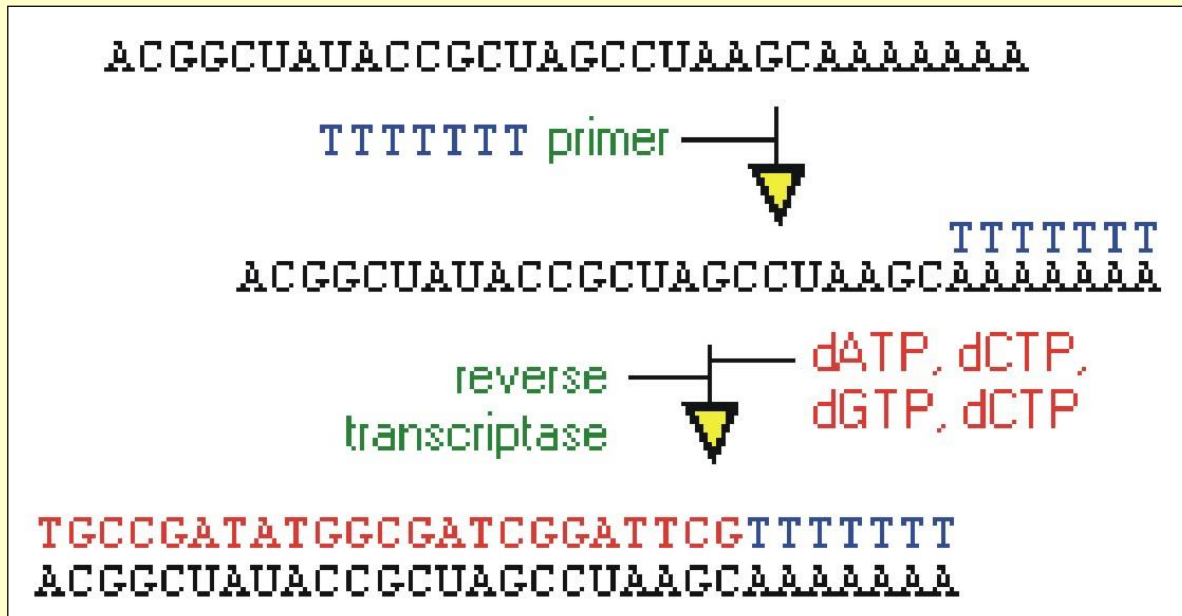
Základní výzkum	Aplikovaný genetický výzkum	Klinické disciplíny	Ostatní
<ul style="list-style-type: none">• izolace genů nebo jejich částí• sekvencování DNA• mutageneza in vitro, modifikace konců DNA• analýza klonů z genových knihoven• příprava značených sond	<ul style="list-style-type: none">• prenatální diagnostika dědičných chorob• detekce mutací v genech• studium polymorfizmu genů• populační genetika	<ul style="list-style-type: none">• detekce patogenních bakterií, virů, prvoků a hub• typizace patogenních mikroorganismů• identifikace onkogenů• typizace nádorů• stanovení pohlaví	<ul style="list-style-type: none">• archeologie• soudnictví• kriminalistika

RT-PCR (reverse transcription-PCR)

RNA dependentní-DNA-polymerázy (reverzní transkriptázy)
kódovány retroviry

2 aktivity – DNA polymeráza

- RNáza H (degradace RNA v hybridu DNA:RNA)



Reverzní transkripce

Při reverzní transkripci se obvykle vychází z **mRNA**, podle které se připravuje 1. řetězec **cDNA** (komplementární DNA) pomocí RNA dependentních DNA polymeras, čímž vzniká hybridní DNA:RNA molekula.

Primerem pro syntézu DNA řetězce bývá oligo dT o délce 12-18 nukleotidů, který je komplementární k poly dA konci mRNA. Pokud mRNA takovýto konec nemá, je třeba náhodných primerů.

V případě potřeby lze RNA oddělit od DNA denaturací při zvýšené teplotě. Specifickou degradaci RNA v hybridu DNA:RNA zajišťuje RNasa H nebo zvýšená koncentrace NaOH.

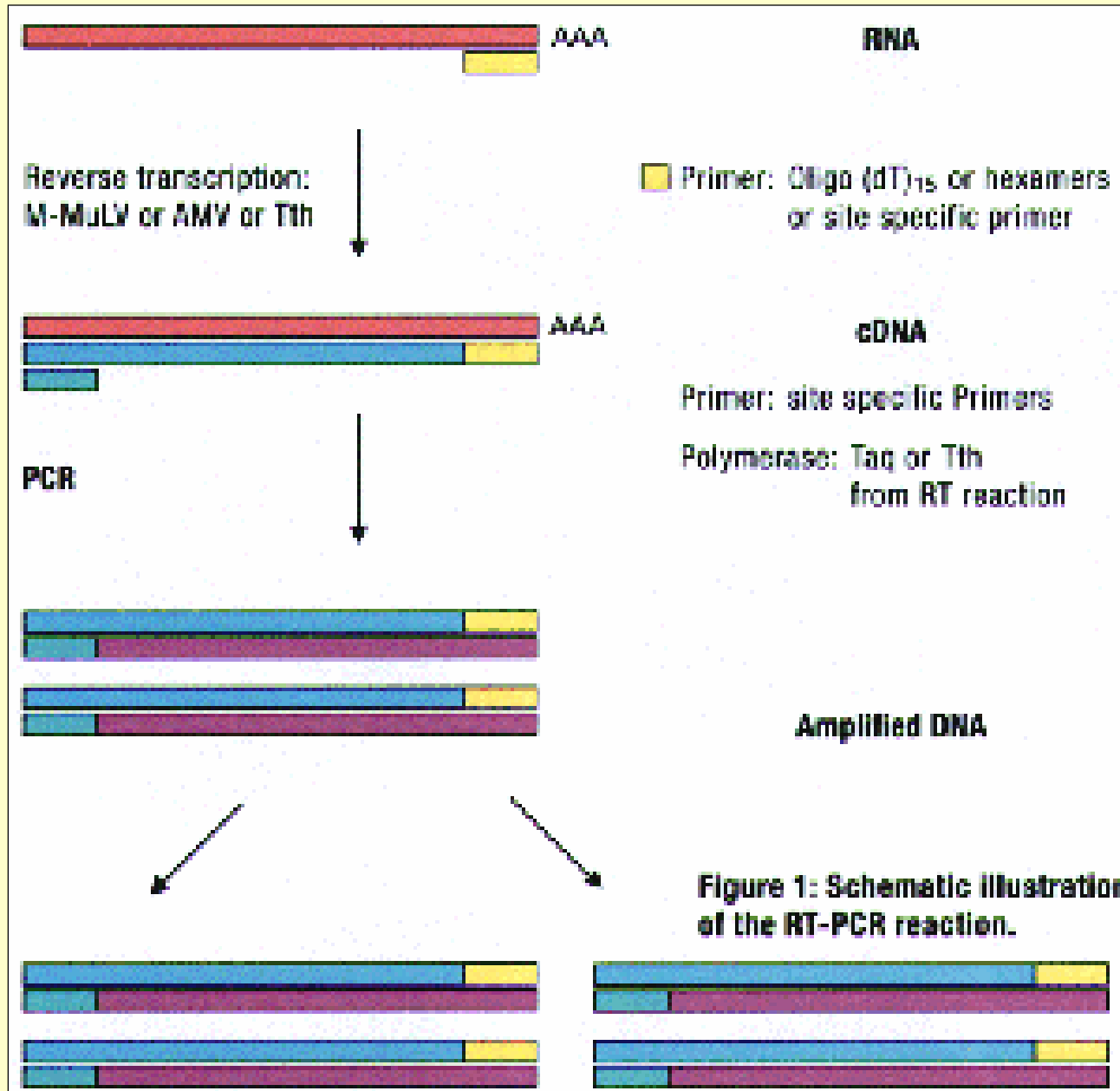
Reverse Transcription (RT) PCR

Pokud je cDNA malé množství, lze ji dále amplifikovat pomocí PCR.

Technika kombinující přímo oba postupy: reverzní transkripci (RT) a PCR.

Kombinovaná technika, tzv. **RT PCR**, je vhodná pro amplifikaci cDNA kopií vzácných mRNA, studium exprese, sekvencování RNA, diagnostiku infekčních onemocnění a genetických poruch.

RT-PCR

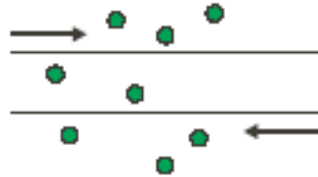


Kvantitativní PCR v reálném čase

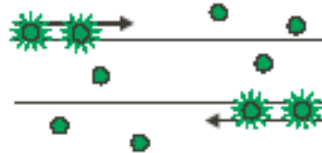
Založena na použití fluorescenčně značených sond a detekčního systému, který je schopen měřit intenzitu fluorescence. Intenzita fluorescence je tak úměrná množství PCR produktu a pomocí kalibrační křivky sestavené za použití známých množství cílové DNA je možné přesně kvantifikovat množství cílové DNA v biologickém vzorku.

a SYBR Green I

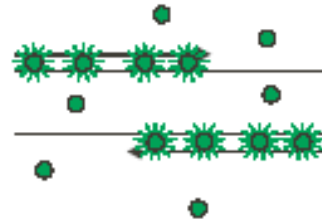
Annealing phase



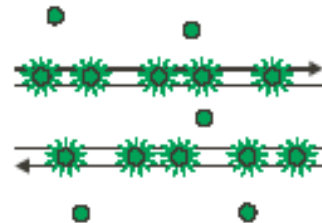
Extension phase (I)



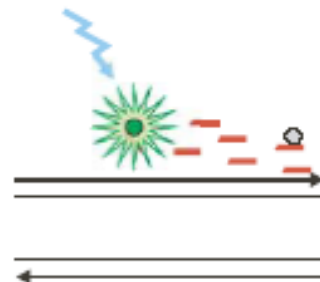
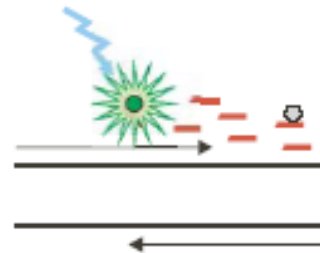
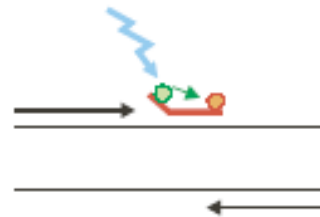
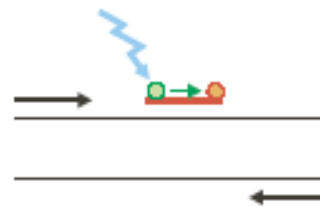
Extension phase (II)



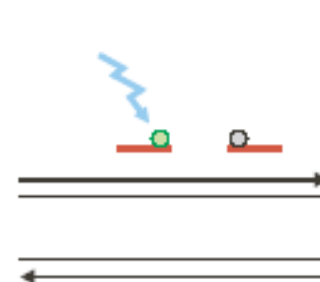
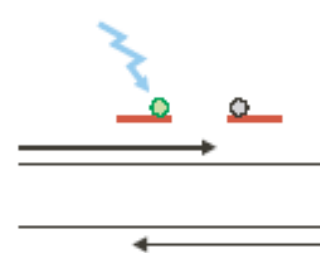
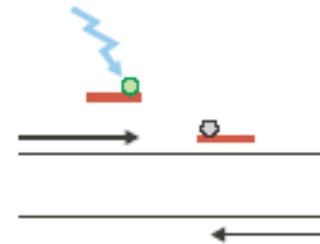
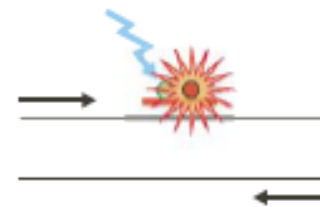
End of PCR cycle



b Hydrolysis probe



c Hybridization probes



Kvantitativní PCR v reálném čase

Interkalační barvivo (SYBR Green, SYBR Gold, EvaGreen, SYTO, BEBO atd.)

Emitují velmi silný fluorescenční signál, citlivost, snadná použitelnost, dostupnost a nízká cena.

Ale: nespecifita vazby, následně nespecifický fluorescenční signál, nemožnost odlišit fluorescenci specifickou od nespecifické.
Výsledky mohou být zkreslené.

RT-PCR se specificky fluorescenčně značenými sondami

Krátký oligonukleotidový řetězec, který se komplementárně hybridizuje k PCR amplikonu. Syntéza speciálně pro každou real-time PCR analýzu s ohledem na sekvenci templátové DNA.

Fluorescenčně značená sonda obsahuje speciální molekuly (tzn. je duálně značená)

reportér (fluorofor – F, R)

zhášec (quencher – Q)

RT-PCR se specificky fluorescenčně značenými sondami

Fluorofor

emituje světlo určité vlnové délky

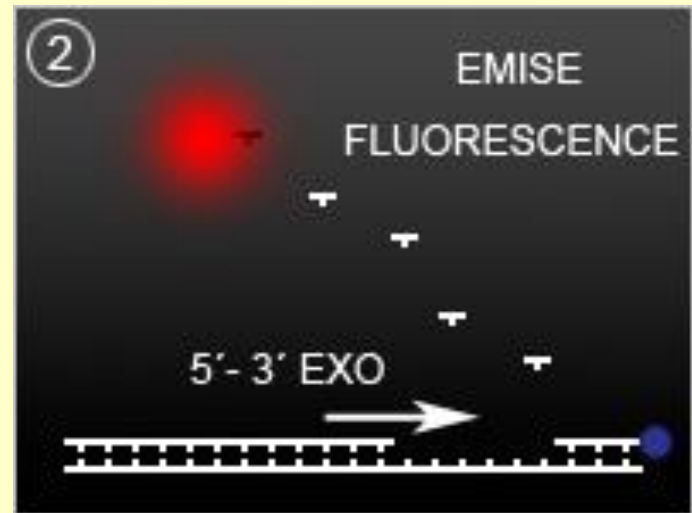
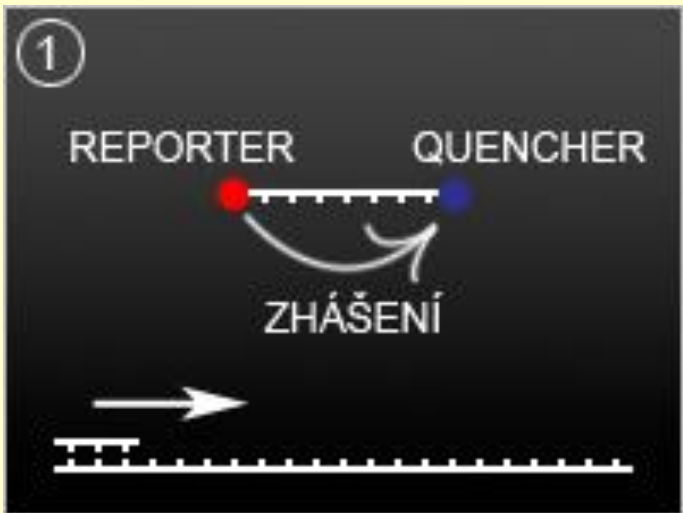
Zhášeč

Přijímá energii z fluoroforu ve formě světla a způsobuje její rozptýlení ve formě světla s vyšší vlnovou délkou či tepla, fluorescence je nízká.

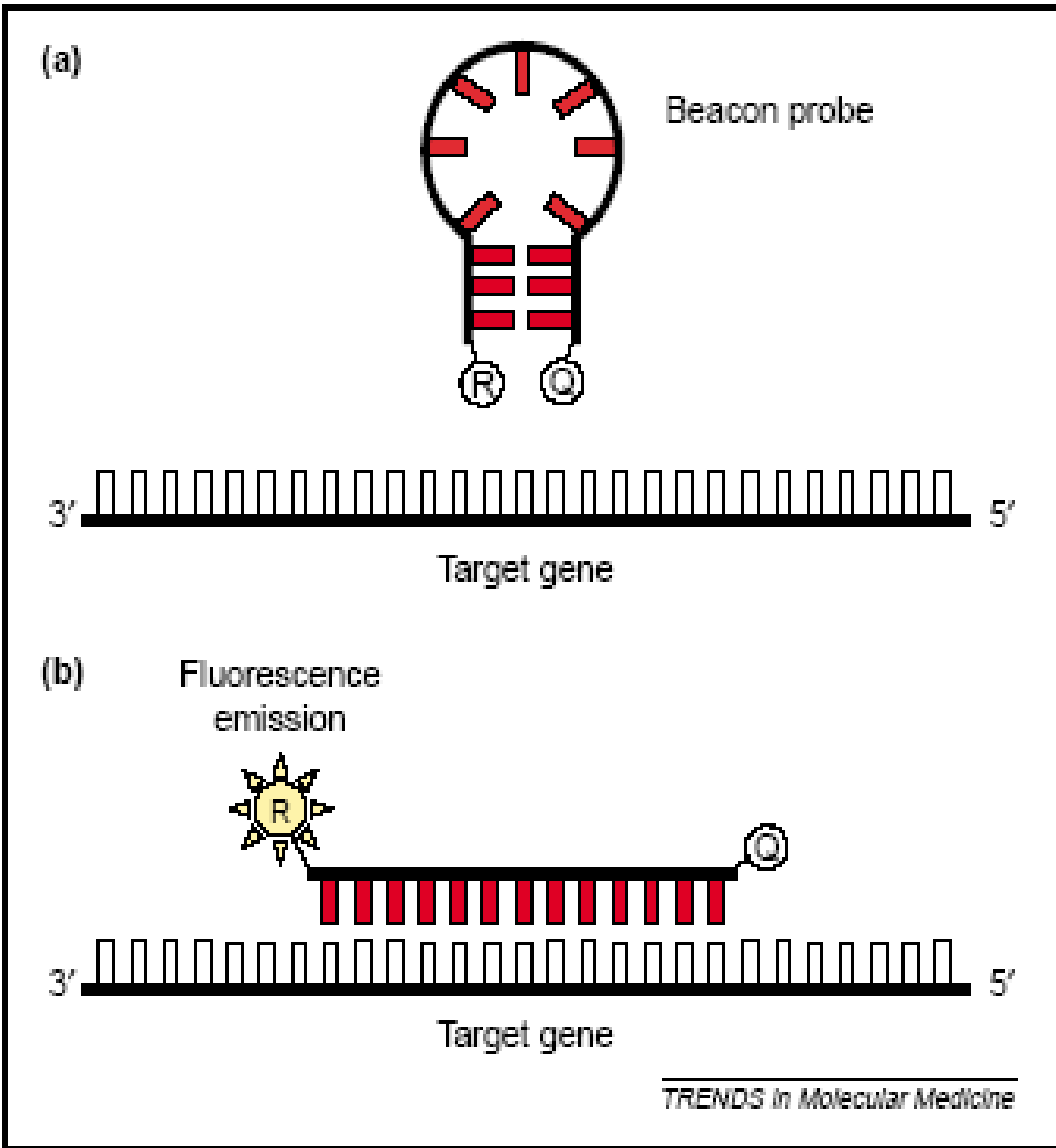
Nárůst fluorescenční aktivity zvýšením vzdálenosti mezi molekulou fluoroforu a zhášeče po degradaci (rozštěpení) navázané sondy polymerázou či změně prostorového uspořádání sondy.

Sondy **TaqMan**, Molecular Beacons, Scorpions, atd.

Nejnovější modifikací jsou sondy Gemini. Reportér je na 5' konci, zhášeč uvnitř sekvence, proto mají velmi nízké fluorescenční pozadí.



Molecular Beacons



Jednoduše značené hybridizační sondy

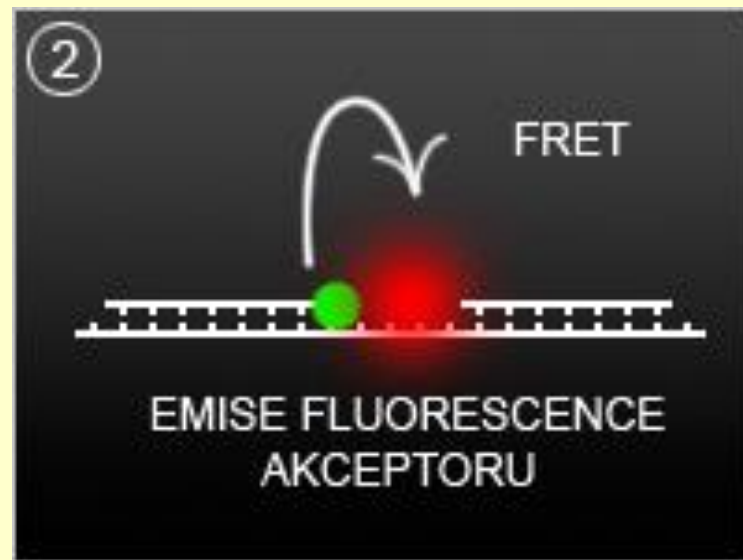
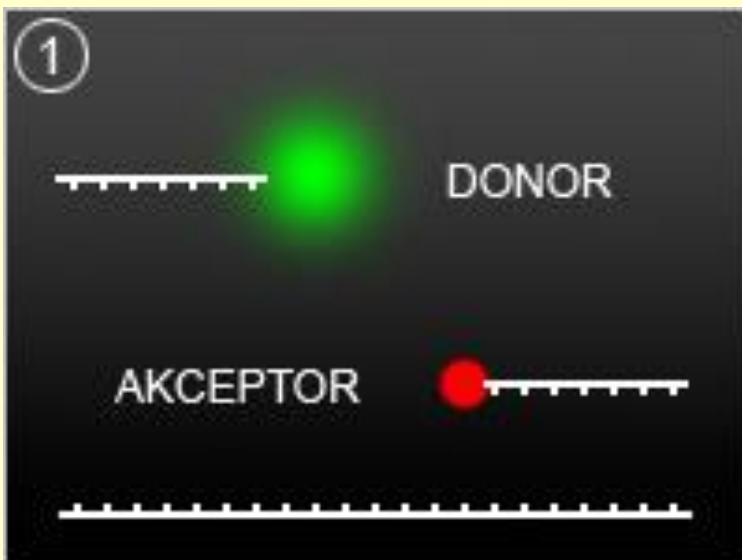
FRET sondy, Fluorescence Resonance Energy Transfer

2 oligonukleotidy, jeden je značen na 3' konci donorovým a druhý na 5' konci akceptorovým fluoroforem.

Sondy mají takovou specifickou sekvenci, aby hybridizovaly vedle sebe na produkt PCR.

Pokud se emisní spektrum donorového fluoroforu překrývá s absorpčním spektrem fluoroforu akceptorového, dochází k poklesu intenzity fluorescence donorové molekuly a vyzáření energie zachycené akceptorovou molekulou v podobě fluorescenčního záření o delší vlnové délce.

To znamená, že pokud se sondy připojí na amplifikát vedle sebe, dojde k přenosu energie a zvýšení fluorescence.



Sekvenování nukleových kyselin

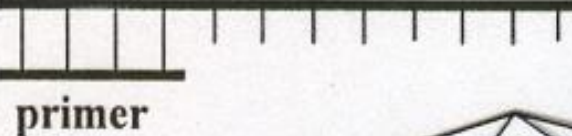
**Určení sekvence (pořadí) nukleotidů v úseku DNA
nebo RNA**

Nejčastěji se používá

„dideoxy“ terminační

Sangerovy metody

3' **A G A T C** 5' DNA - matrice + DNA polymeráza



1. část

+
nukleotidy + ddG

↓
TCTAddG

2. část

+
nukleotidy + ddC

↓
TddC

3. část

+
nukleotidy + ddA

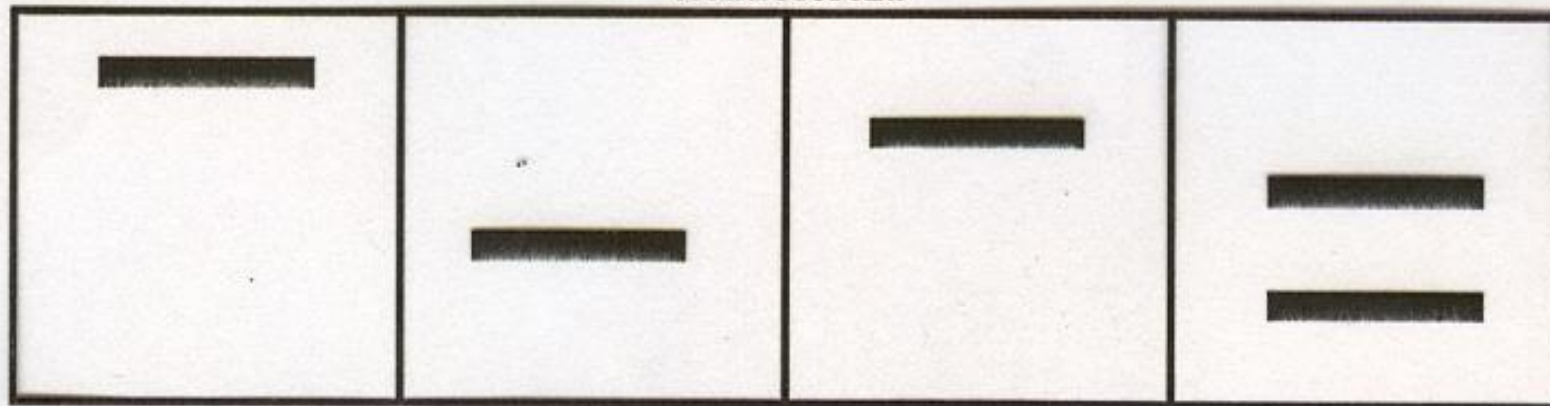
↓
TCTdda

4. část

+
nukleotidy + ddT

↓
ddT
TCddT

elektroforéza



3' 5'
G C
A T
T A
C G
T A

Sangerova metoda

(dideoxynukleotidová, ddNTP reakce)

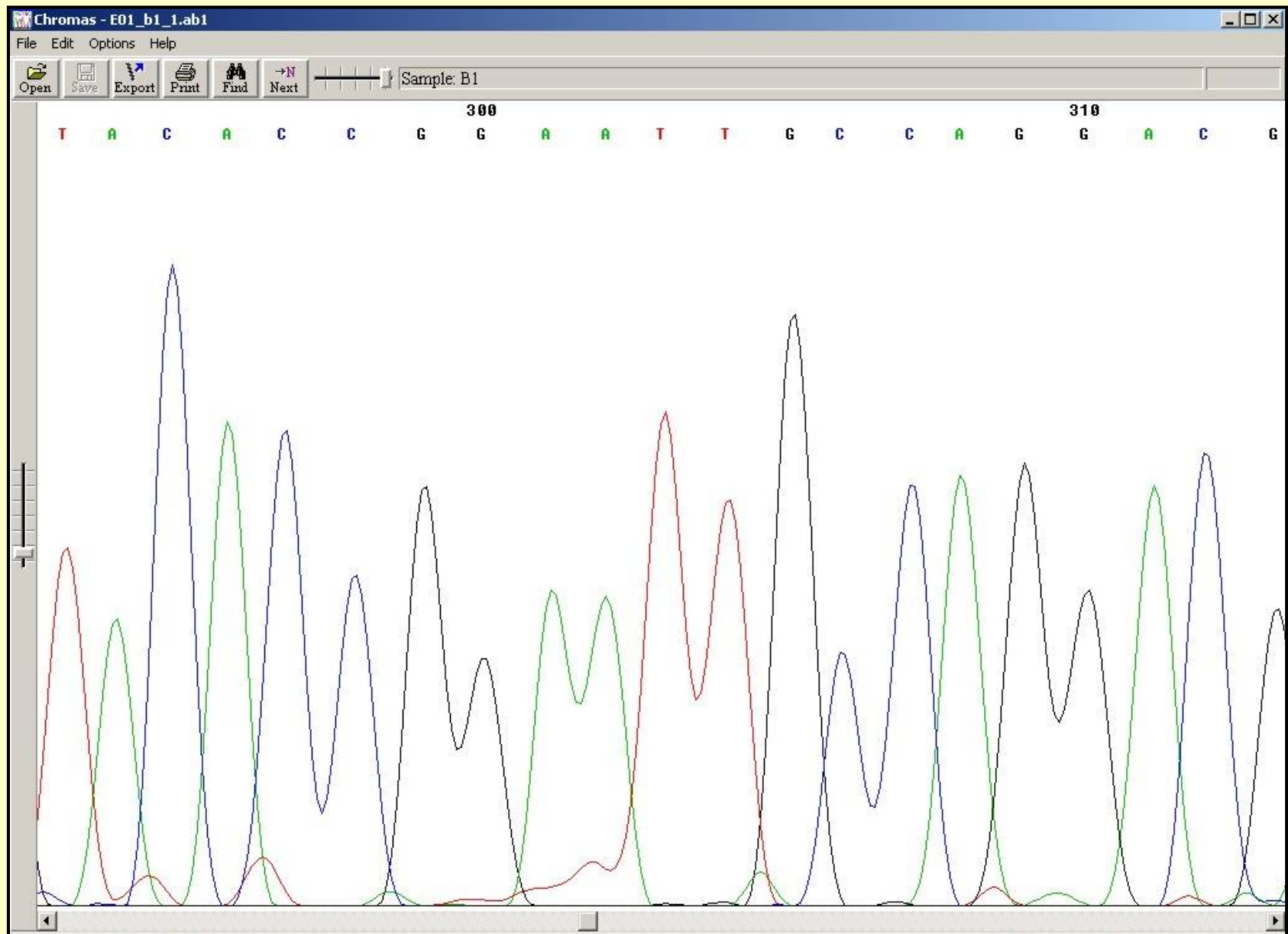
Označené produkty sekvenační reakce se rozdělí a detekují na sekvenačním gelu elektroforézou. Původní metoda vyžadovala 4 samostatné sekvenační reakce a také samostatné dělení při elektroforéze pro každý jednotlivý nukleotid.

Metoda má čtyři fáze: přiložení primeru k analyzovanému fragmentu DNA, označení primeru, prodlužování primeru o další komplementární baze syntézou pomocí T7 DNA polymerasy, ukončení reakce inkorporací dideoxynukleotidu.

Značení primerů se provádělo pomocí radioizotopů. Sekvenační 5% polyakrylamidový gel je denaturační.

Moderní sekvenování je plně automatizováno. Místo radioaktivního značení se používá značení fluoresceinem, místo značení primerů se používá značení terminátorů reakce (ddNTP), reakce se provádí na termocykleru pomocí Taq DNA polymerasy, všechny čtyři reakce je možno provést v jedné zkumavce a elektroforetické dělení je také z jednoho vzorku. Laserová detekce emise čtyř různých fluorescenčních barev se provádí pomocí fotonásobiče a velmi citlivého detektoru přímo z gelu.

Výsledná data z automatického sekvenačního analyzátoru



Přehled metod sekvenování

Základní metody

- Maxam-Gilbert
- Chain-termination metody

Pokročilé metody a *de novo* sekvenování

- Shotgun sekvenování
- Bridge PCR

NGS Next Generation Sequencing

- Massively parallel signature sequencing MPSS
- Pyrosekvenování
- 454 pyrosekvenování
- Illumina (Solexa) sekvenování
- SOLiD sekvenování
- Ion Torrent semiconductor sekvenování
- DNA nanoball sekvenování
- Heliscope single molecule sekv.
- Single molecule real time sekv. (SMRT)

Metody ve vývoji

- Nanopore DNA sekv.
- Tunnelling currents DNA sekv.
- Sekv. hybridizací
- Sekv. hmotnostní spektrometrií
- Microfluidic Sanger sekv.
- Metody na principu mikroskopie
- RNAP sekv.
- *In vitro* virus vysoce kapacitní sekv.