

Molekulární genetik a zvířat 2

Antonín Stratil

Česká zemědělská univerzita v Praze

1. Metody studia DNA a RNA

- izolace DNA
- izolace RNA
- zjišťování koncentrace
- uchovávání DNA a RNA
- elektroforéza (agarózový gel; polyakrylamidový gel)
- vizualizace: přímé barvení v gelu; nepřímé barvení (Southernova hybridizace, radioaktivní značení, neradioaktivní značení)

2. Restriční enzymy

3. Klonování

- ve vektorech (plazmidy, cosmidy, lambda fágy, BAC, PAC, YAC)
- pomocí PCR
- příprava knihoven (genomické, cDNA)

4. PCR

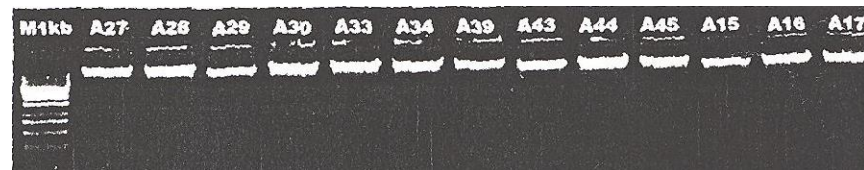
- princip
- denaturace, annealing, elongace
- elektroforéza
- využití

5. Sekvenování

- chemická metoda
- enzymová metoda: princip, metodické přístupy, aplikace
- analýza sekvencí, databáze
- sekvenování genomů

Fakta bez teorie jsou chaos, teorie bez fakt je fantazie

Izolovaná genomická DNA z krve (prasete) – elektroforetická separace



Izolovaná RNA – elektroforetická separace

130

7 Quality Control for RNA Preparations

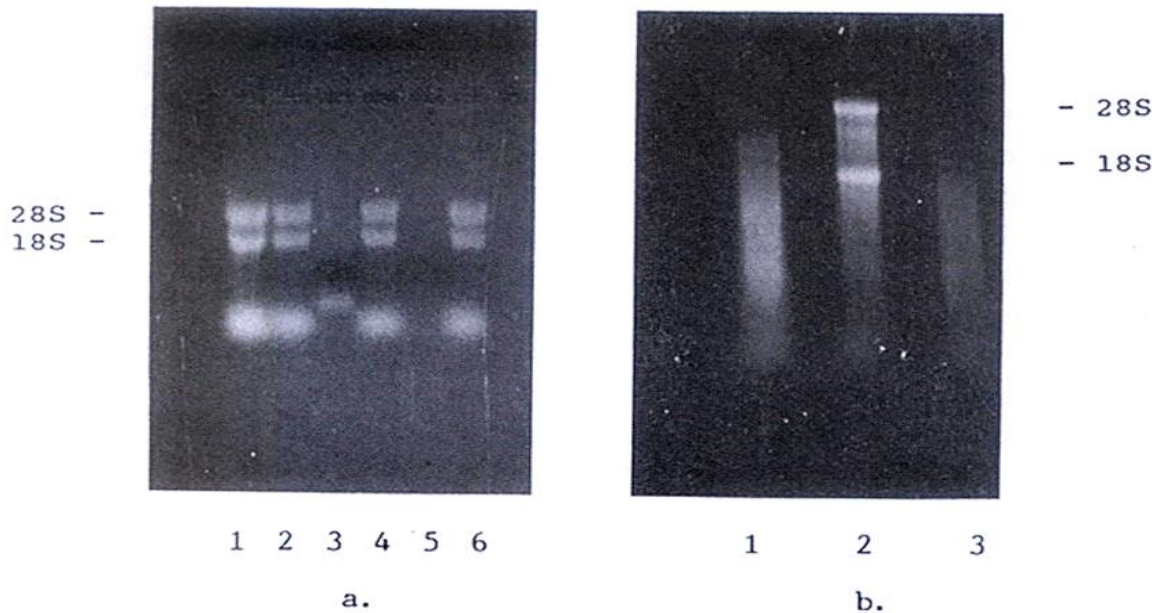


FIGURE 1

Assessment of the integrity of RNA samples. (a) Minigel (7 × 8 cm) electrophoresis of RNA isolated from exponential culture of *Saccharomyces uvarum*. Total RNA (5 μg) was prepared from a log-phase culture, using the yeast RNA isolation protocol found in Chapter 5. Purified yeast RNA was then electrophoresed in a 1% agarose–formaldehyde gel. The clear definition of the ribosomal 28S and 18S rRNA species in lanes 1, 2, 4, and 6 demonstrates the integrity of the sample. RNA Ladder (3 μg; Gibco BRL) was loaded into lane 3 to provide size standards. Lane 5 was left empty. (b) Medium-size gel (12 × 14 cm) electrophoresis of RNA. Samples were formaldehyde denatured and electrophoresed in a 1% agarose gel for 4 h at 50 V. Samples in lanes 1 and 3 are degraded, most likely due to RNase contamination. The sample in lane 2 is high-quality RNA, with minimum smearing above, between, and below the 28S and 18S rRNAs.

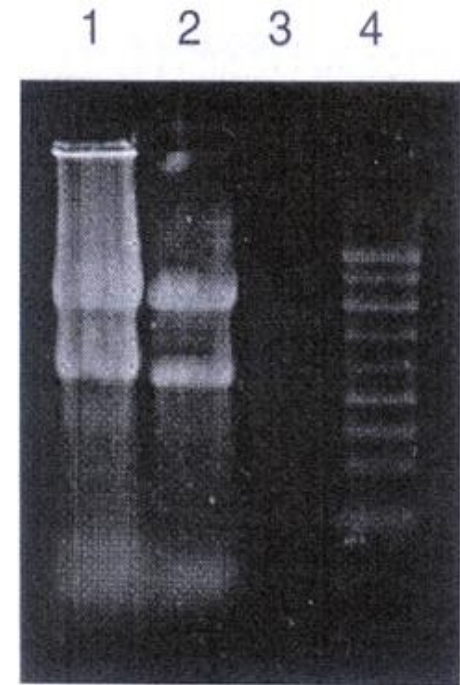


FIGURE 2

SYBR Green II staining of RNA samples. Fluorescence confined to a well into which a sample was loaded strongly suggests genomic DNA contamination.

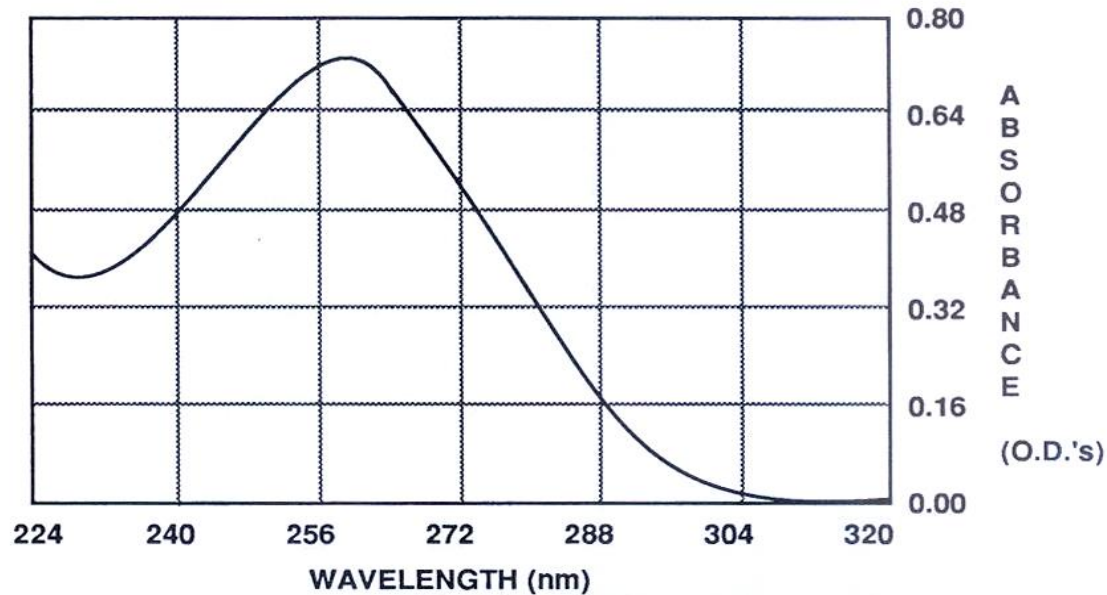


FIGURE 8

Typical UV absorbance spectrum of purified RNA. The spectrophotometric profile for purified DNA is similar. Note the positive slope of the curve below 260 nm and the negative slope above 260 nm.

dsDNA - $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$; ss DNA a RNA - $A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$

dsDNA - poměr $A_{260}/A_{280} = 1,8$; RNA - poměr $A_{260}/A_{280} = 2,0$

Určení koncentrace DNA

a) Spektrofotometricky: měření absorbance při 260 nm

$$A_{260} \times 50 = \mu\text{g/ml}$$

(ředění 5 μl v 1000 μl ; A = 0,049): konc. DNA = 200x0,049x50 = 490 $\mu\text{g/ml}$

b) Fluorometricky

c) Srovnáním z agarózového gelu se standardem (podle intenzity proužku)

d) Kvantitativní real-time PCR

a) Separační metody - elfo

Elektroforéza - separace NK dle mobility v agarózových nebo polyakrylamidových gelech působením stejnosměrného elektrického pole

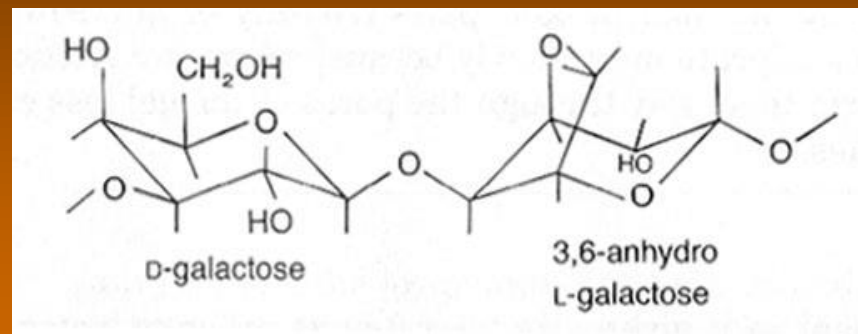
DNA (– náboj) migruje k anodě (+ náboj)

Pufry: TBE, TAE

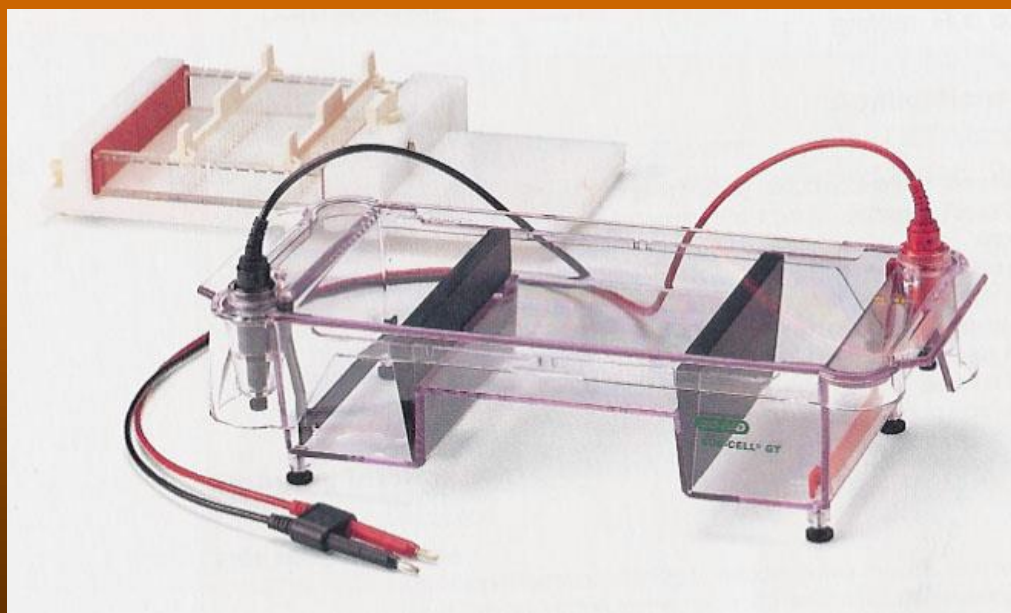
- Agarózová elektroforéza

Gel: agaróza

Umístění: horizontální

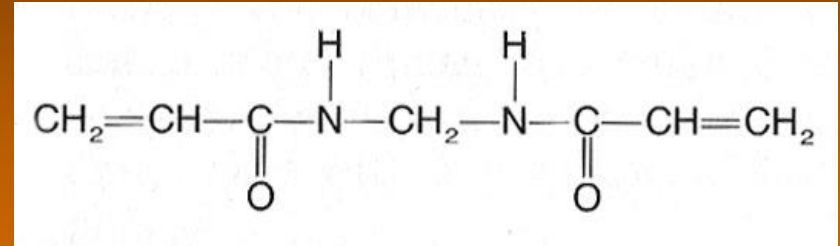
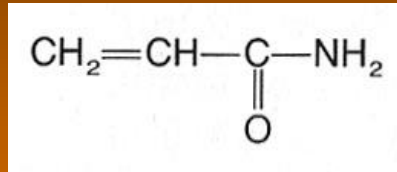


Povaření roztoku 0,5 - 6% agarózy v pufru, ztuhnutí - gel



Akrylamidová elektroforéza

chemická reakce: akrylamid + N,N'-metylenbisakrylamid,
29:1



koncentrace AA: 3,5-20%

**katalyzátor: persíran amonný, stabilizátor
TEMED (N,N,N',N'-
tetramethylethyldiamin)**

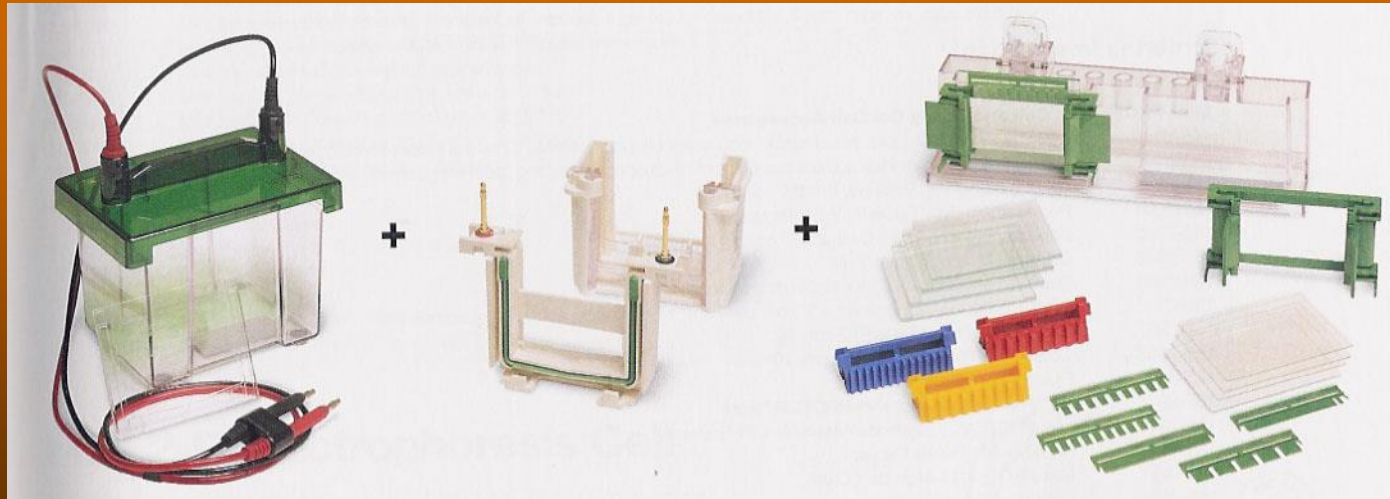
Typy gelů:

- nedenačovací
- denačovací: přidavek denaturantů

Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)

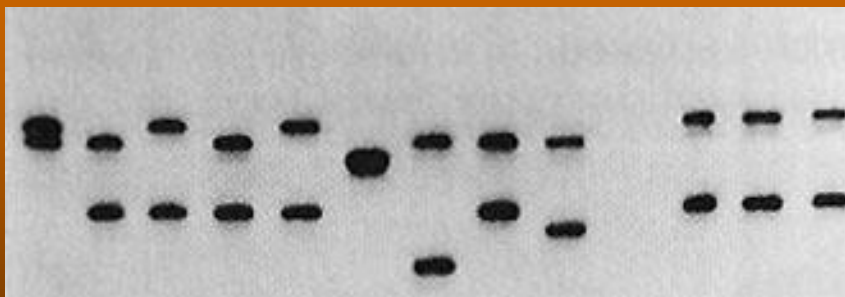
Gel: polyakrylamid

Umístění: vertikální

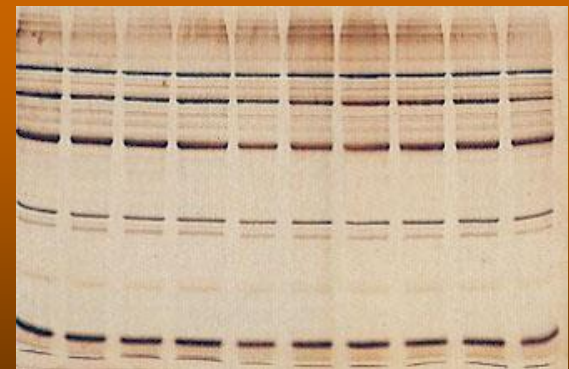


Barvení DNA - vizualizace

- fluorescenčně – UV (312nm) : EtBr, Sybr green, GoldStar aj.
- ABI (FAM, HEX, NED, TED, ROX)
- chemiluminiscence
- autoradiografie (radioizotopy, rentgenový film)
- barvení stříbrem aj.



PAGE mikrosatelitu (autoradiografie)



PAGE- barvení stříbrem

Hybridizace

Hybridizace: Proces spojování částečně nebo úplně komplementárních DNA řetězců NK různého původu

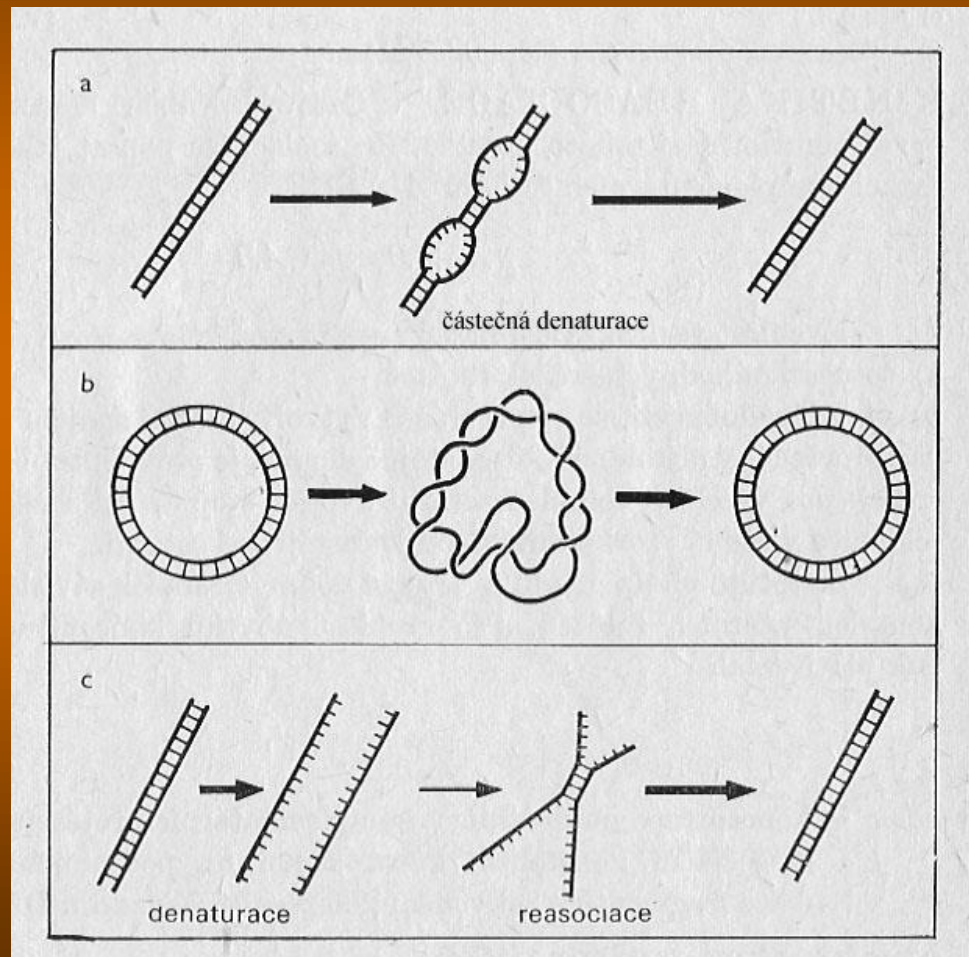
testovaná(é) molekul(y) x sonda

Sonda: značená sekvence NK používaná k vyhledávání nukleové kyseliny s komplementární sekvencí

značení: radioaktivně, chemiluminiscencí, fluorescencí

Reasociace

Reasociace: pomalý pochod, při kterém se úplně denaturované molekuly spojují zpět do dvouřetězců



Metody hybridizace

- kapková hybridizace
- přenos Southernův (Southern blot) - DNA
- přenos northernový (Northern blot) - RNA

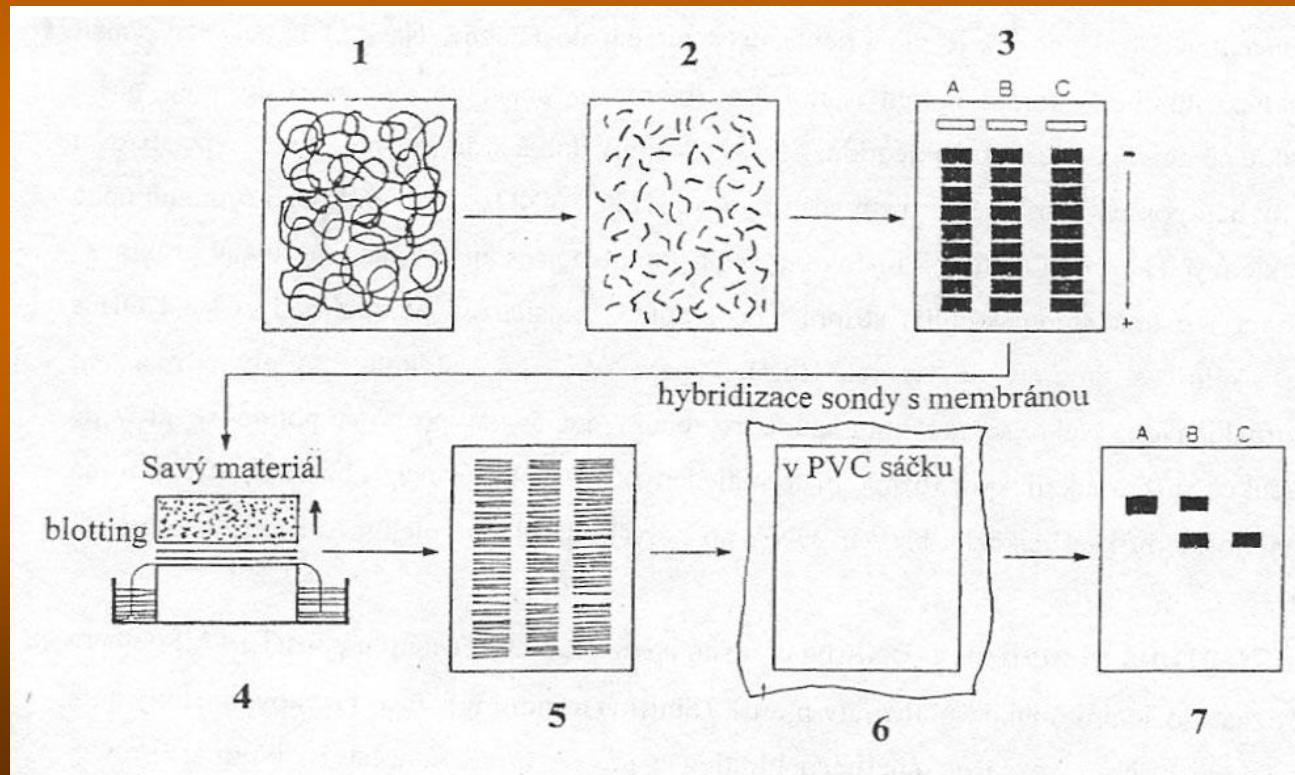
Princip:

DNA se štěpí a po štěpení a jeho separaci se fragmenty DNA přenesou na membránu, kde se denaturují a hybridizují se sondou. Po odmytí nehybridizované sondy se provede vizualizace sond, které zůstanou hybridizovány a tak označí DNA s komplementární sekvencí

(Western blot – přenos proteinu)

Schéma hybridizace

1- genomová DNA, 2- štěpení restriktázami, 3 - elektro separace, 4 – Southernův přenos, 5-ukotvení na membránu, 6-hybridizace se značenou sondou, promývání, 7-vizualizace – označení molekul s komplementární sekvencí k sondě



Southernův blotting

Z WikiSkript

Southernův blotting a jeho využití, odvozené metody

- výkonným nástrojem pro rozdělování makromolekul s různou velikostí a nábojem je gelová elektroforéza
- molekuly DNA mají v podstatě stejný náboj na jednotku hmotnosti, takže se dělí na agarózových nebo polyakrylamidových gelech téměř výhradně na základě své velikosti nebo konformace
- agarózové a polyakrylamidové gely působí jako molekulární síta, která zpomalují průchod velkých molekul více než malých
- agarózové gely jsou vhodnější síta pro velké molekuly (nad několik set nukleotidů), zatímco polyakrylamidové gely jsou lepší pro rozdělování malých molekul DNA

Analýza DNA pomocí Southernova blottingu

- v roce 1975 publikoval E. M. Southern důležitý nový pracovní postup, který umožnil zjistit umístění genů a jiných sekvencí v restričních fragmentech separovaných gelovou elektroforézou
- základním rysem této metody je přenos molekul DNA separovaných gelovou elektroforézou na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu
- takový přenos DNA je nazýván Southernův přenos
- DNA je buď před, nebo během přenosu denaturována tím, že je gel umístěn do zásaditého roztoku
- po přenosu je DNA imobilizována na membráně vysušením nebo ozářením UV světlem a hybridizována s radioaktivní DNA-sondou obsahující studovanou sekvenci
- sonda bude hybridizovat pouze s molekulami DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci komplementární k sekvenci sondy
- nehybridizované sondy jsou pak vymyty z povrchu membrány a takto upravená membrána je exponována na rentgenový film, aby mohla být detekována přítomnost radioaktivity
- po vyvolání filmu ukazují tmavé proužky pozici sekvencí DNA, které se sondou hybridizovaly
- schopnost přenosu molekul DNA separovaných gelovou elektroforézou na nylonové membrány za účelem hybridizačních studií a jiných druhů analýz se ukázala jako neobyčejně užitečná
- lze ji například využít při detekci genu cystické fibrózy atd.

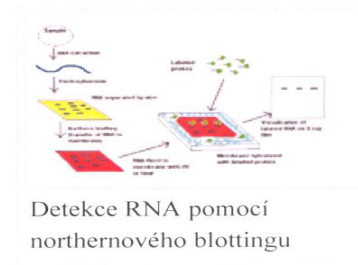
Analýza RNA pomocí northernového blottingu

- jedná se o přenos molekul RNA po jejich separaci elektroforézou
- tento přenos se nazývá northernový přenos

Obsah

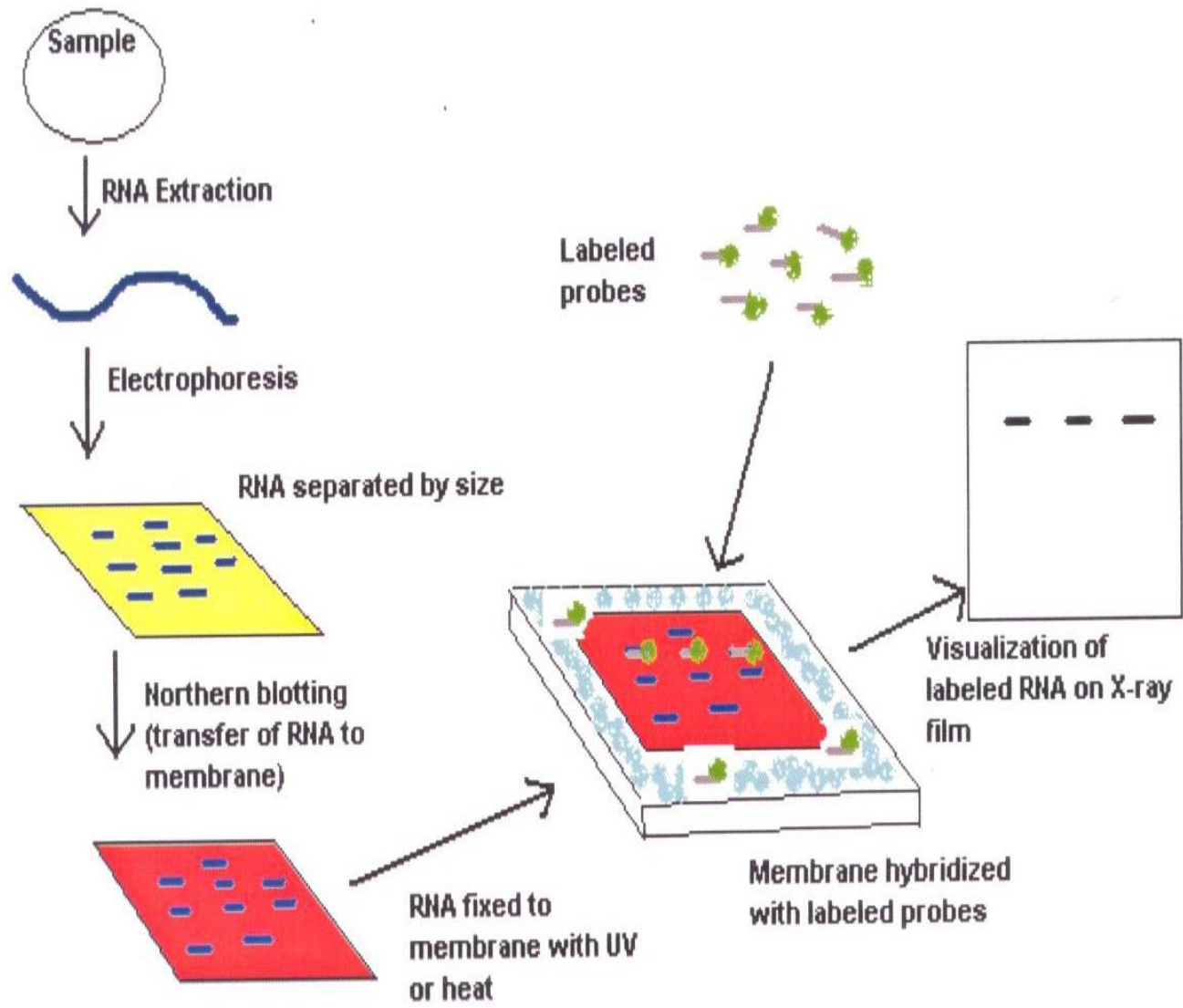
- 1 Southernův blotting a jeho využití, odvozené metody
 - 1.1 Analýza DNA pomocí Southernova blottingu
 - 1.2 Analýza RNA pomocí northernového blottingu
 - 1.3 Analýza proteinů westernovým přenosem
- 2 Odkazy
 - 2.1 Související články
 - 2.2 Použitá literatura

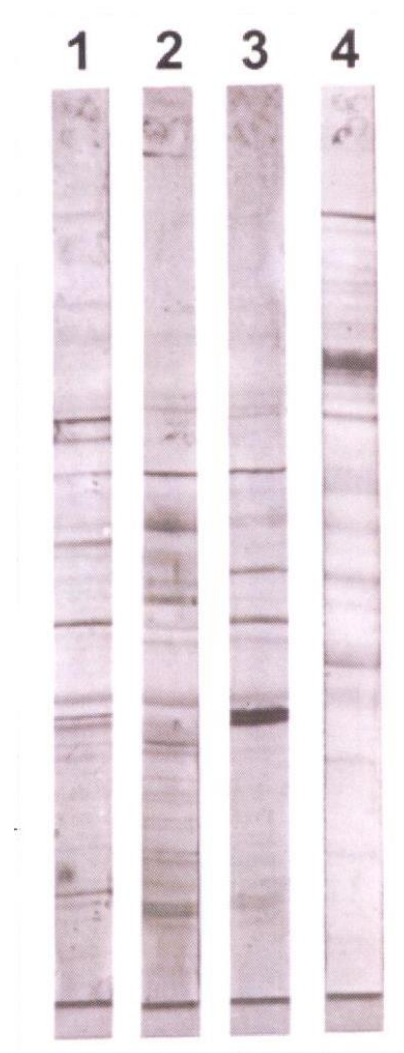
- jediný rozdíl od Southernova přenosu je, že se na membránu přenášejí molekuly RNA
- metoda northernového přenosu je prakticky identická se Southernovým přenosem
- molekuly RNA jsou však velmi citlivé na degradaci RNázami, a proto musí být zabráněno kontaminaci materiálu tímto extrémně stabilním enzymem
- kromě toho, většina molekul RNA obsahuje sekundární strukturu a musí proto zůstat během elektroforézy denaturovaná, aby byla zajištěna separace na základě velikosti
- denaturace dosáhneme přidáním formaldehydu nebo některého denaturačního činidla do pufru používaného při elektroforéze
- po přenosu na membránu RNA hybridizuje buď s DNA, nebo RNA-sondami, stejně jako je to u Southernova přenosu
- northernová hybridizace je nesmírně užitečná při studiích genové exprese
- může se použít k určení, kdy a kde se jednotlivé geny exprimují
- nicméně northernová hybridizace stanovuje pouze míru akumulace RNA-transkriptů a neposkytuje žádnou informaci o tom, proč k akumulaci došlo
- změny akumulace transkriptů mohou být způsobeny změnami rychlosti transkripce nebo naopak rychlosti degradace transkriptů



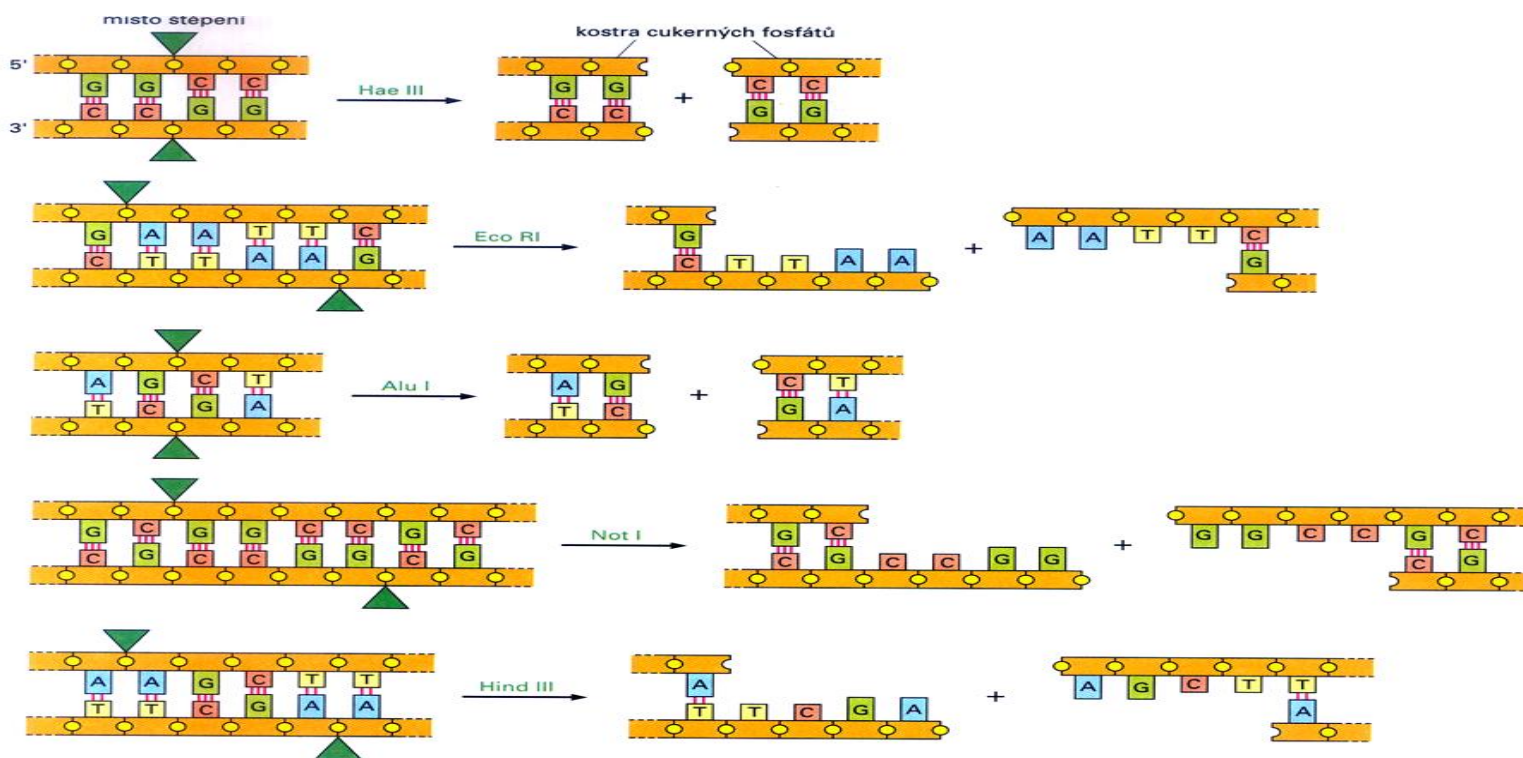
Analýza proteinů westernovým přenosem

- někdy označován také jako *imunoblot*
- protože je mnoho funkčních proteinů složeno ze dvou nebo více podjednotek, jsou jednotlivé polypeptidy separovány v přítomnosti detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS), který denaturuje proteiny
- po proběhnutí elektroforézy se proteiny detekují barvením Coomassie modří nebo značením stříbrem
- rozdělené polypeptidy lze ale také přenést z gelu na nitrocelulózovou membránu a jednotlivé proteiny detekovat pomocí protilátek
- přenos se označuje jako westernový přenos a uskutečňuje se pomocí elektrického proudu
- po tomto přenosu se specifický protein identifikuje tak, že se membrána s imobilizovanými proteiny umístí do roztoku obsahujícím protilátku k tomuto proteinu
- následně se nenavázané protilátky z membrány odstraní vymytím
- přítomnost první (primární) protilátky se detekuje inkubací se sekundární protilátkou
- tato sekundární protilátka obecně reaguje s imunoglobuliny
- sekundární protilátka je spojena (konjugována) buď s radioaktivním izotopem nebo enzymem





Western blot analýza proteinů
separovaných pomocí SDS-
PAGE



Restriční endonukleázy používané v molekulární genetice pocházejí převážně z bakterií, a protože jsou jimi rozpoznávaná místa na DNA krátká (obvykle 4-8 nukleotidových párů), je vysoká pravděpodobnost, že se tato místa náhodně vyskytnou v každé delší molekule DNA. Proto mohou být tyto enzymy využity pro analýzu DNA z jakéhokoliv zdroje. Restriční endonukleázy se staly běžným předmětem obchodu a v dnešní době jsou rozesílány poštou; typický katalog firem zabývajících se dodáváním těchto enzymů obsahuje více než stovku restričních endonukleáz, přičemž každá rozpoznává jinou sekvenci DNA. Několik příkladů je na obr. 10-2.

Schopnost štěpit DNA ve specifických sekvencích učinily z restričních endonukleáz nepostradatelný nástroj moderní technologie DNA, neboť štěpí danou molekulu DNA vždy ve stejných místech. Pokud tedy opakovaně štěpíme například DNA z lidské tkáně určitou restriční endonukleázou, dostaneme vždy stejnou sadu fragmentů.

Frekvence štěpení DNA daným restričním enzymem se liší podle délky jím rozpoznávaného místa. Jak bylo ukázáno na obr. 10-2, enzym *HaeIII* štěpí sekvenci tvořenou čtyřmi specifickými

Obrázek 10-2 Rozpoznávané a štěpené nukleotidové sekvence pěti často používaných restričních endonukleáz. Jak je zde ukázáno, cílová místa, která jsou těmito enzymy štěpena, se liší nukleotidovou sekvencí i její délkou podle druhu enzymu. Cílové sekvence jsou často palindromické (symetrické podle centrálního bodu). V nakreslených příkladech jsou oba řetězce štěpeny ve specifických místech uvnitř rozpoznávané sekvence. Některé enzymy, jako jsou *HaeIII* a *AluI*, štěpí oba řetězce DNA proti sobě, takže obě výsledné molekuly mají zarovnané neboli tupé konce; štěpením ostatními restričními endonukleázami, jako například *EcoRI*, *NotI* a *HindIII*, vznikají na jednom z řetězců přesahující jednovláknové úseky. Restriční endonukleázy jsou obvykle získávány z bakterií a v jejich názvech se odráží jejich původ: například enzym *EcoRI* pochází z *Escherichia coli*.

PstI



5'...C T G C A ↓ G...3'
 3'...G ↑ A C G T C...5'

#ER0611 3000 u
Supplied with:
 10X Buffer O 2x1 ml
 10X Buffer Tango™ 1 ml

#ER0615 10000 u
Supplied with:
 10X Buffer O 4x1 ml
 10X Buffer Tango™ 1 ml

#ER0612 5x3000 u
Supplied with:
 10X Buffer O 2x1 ml
 10X Buffer Tango™ 1 ml

Also available as
FastDigest® PstI

Concentration
 10 u/μl

Conditions for 100% Activity
 1X Buffer O at 37°C.

Storage Buffer
 PstI is supplied in:
 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 200 mM NaCl,
 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.15% Triton X-100,
 0.2 mg/ml BSA and 50% (v/v) glycerol.

Ligation and Recleavage
 After 50-fold overdigestion with PstI, more than
 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

Methylation Effects
 Dam, Dcm, CpG, EcoKI, EcoBI – no effect.

Activity in Five Buffer System, %

B	G	O	R	Tango	2X Tango
50-100	50-100	100	100	50-100	50-100

Digestion of Agarose-embedded DNA
 Minimum 5 units of the enzyme are required for
 complete digestion of 1 μg of agarose-embed-
 ded λ DNA in 16 hours.

Note

- Conditions of high pH, low salt, high glycerol, 8% DMSO can cause star activity (Malyguine, E., et al., Gene, 8, 163-177, 1980).
- Surrounding sequences: the presence of adjacent runs of G-C base pairs confers significant resistance to cleavage (Armstrong, K. and Bauer, W.R., NAR, 10, 993-1007, 1982).
- 100% dUTP incorporation at the recognition site reduces PstI cleavage to 25% (Glenn, T.C., et al., Biotechniques, 17, 1086-1090, 1994).
- PstI will not cut AGCTGCAG when methylated by AluI methyltransferase.

PsuI (BstYI)



5'...R ↓ G A T C Y...3'
 3'...Y C T A G ↑ R...5'

#ER1551 500 u
Supplied with:
 10X Buffer B 1 ml
 10X Buffer Tango™ 1 ml

Also available as
FastDigest® PsuI

Concentration
 10 u/μl

Conditions for 100% Activity
 1X Buffer B at 37°C.

Storage Buffer
 PsuI is supplied in:
 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 100 mM KCl,
 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA and
 50% (v/v) glycerol.

Activity in Five Buffer System, %

B	G	O	R	Tango	2X Tango
100	20-50	0-20	0-20	50-100	0-20

Ligation and Recleavage
 After 50-fold overdigestion with PsuI, more than
 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

Methylation Effects
 Dam, Dcm, CpG, EcoKI – no effect.
 EcoBI: may overlap – effect not determined.

Note

High glycerol (>5%) concentrations, pH >8.0 or a
 large excess of enzyme may result in star activity.

PsyI (Tth111I)



5'...G A C N ↓ N N G T C...3'
 3'...C T G N N ↑ N C A G...5'

#ER1331 1000 u
Supplied with:
 10X Buffer B 1 ml
 10X Buffer Tango™ 1 ml

Also available as
FastDigest® PsyI

Concentration
 10 u/μl

Conditions for 100% Activity
 1X Buffer B at 37°C.

Storage Buffer
 PsyI is supplied in:
 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 50 mM NaCl,
 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA and
 50% (v/v) glycerol.

Activity in Five Buffer System, %

B	G	O	R	Tango	2X Tango
100	50-100	0-20	0-20	50-100	0-20

Ligation and Recleavage
 After 50-fold overdigestion with PsyI, more than
 60% of the DNA fragments can be ligated and
 more than 95% of these can be recut.

Methylation Effects
 Dam, Dcm, CpG, EcoKI – no effect.
 EcoBI: may overlap – effect not determined.

Digestion of Agarose-embedded DNA
 Minimum 5 units of the enzyme are required for
 complete digestion of 1 μg of agarose-embed-
 ded λ DNA in 16 hours.

Restriction Enzyme Cut Positions

Enzyme Name	Pattern	Bases	Kind of Cut	# of Cuts	Positions
AatI	agg!cct	6	blunt-cut	0	-
AatII	gacgt!c	6	3'-extended	0	-
AauI	t!gtaca	6	5'-extended	3	451 504 1111
AccI13I	agt!act	6	blunt-cut	0	-
Acc16I	tgc!gca	6	blunt-cut	0	-
Acc65I	g!gtacc	6	5'-extended	0	-
AccB1I	g!gyrec	6	5'-extended	0	-
AccBSI	ccg!ctc/ gag!cgg	6	blunt-cut	0	-
AccI	gt!mkac	6	5'-extended	1	1323
AccII	cg!cg	4	blunt-cut	1	705
AccIII	t!ccgga	6	5'-extended	0	-
Acil	c!cgc/ g!cgg	4	5'-extended	3	369 705 792
AcII	aa!cggt	6	5'-extended	0	-
AcsI	r!aatty	6	5'-extended	4	65 205 285 1384
AcvI	cac!gtg	6	blunt-cut	0	-
Acyl	gr!cgyc	6	5'-extended	0	-
AfaI	gt!ac	4	blunt-cut	4	453 506 1029 1113
AfeI	agc!gct	6	blunt-cut	0	-
AflI	g!gwcc	5	5'-extended	2	158 783
AflII	c!ttaag	6	5'-extended	0	-
AflIII	a!crygt	6	5'-extended	1	126
AgeI	a!ccggt	6	5'-extended	0	-
AhlI	a!ctagt	6	5'-extended	0	-
AluI	ag!ct	4	blunt-cut	4	267 669 740 1015
Alw21I	gwgw!c	6	3'-extended	0	-
Alw44I	g!tgcac	6	5'-extended	0	-
Ama87I	c!ycgrg	6	5'-extended	0	-
AocI	cc!tnagg	7	5'-extended	2	364 799
Aor51HI	agc!gct	6	blunt-cut	0	-
ApaI	gggcc!c	6	3'-extended	0	-
ApalI	g!tgcac	6	5'-extended	0	-
Apol	r!aatty	6	5'-extended	4	65 205 285 1384
AseI	at!taat	6	5'-extended	2	231 482
AsiAI	a!ccggt	6	5'-extended	0	-
AsnI	at!taat	6	5'-extended	2	231 482
Asp718I	g!gtacc	6	5'-extended	0	-
AspHI	gwgw!c	6	3'-extended	0	-
AspLEI	gcg!c	4	3'-extended	1	833
AspS9I	g!gncc	5	5'-extended	2	158 783
AsuC2I	cc!sgg	5	5'-extended	0	-
AsuI	tt!cgaa	6	5'-extended	0	-
AsuNHI	g!ctagc	6	5'-extended	0	-
Aval	c!ycgrg	6	5'-extended	0	-
Avall	g!gwcc	5	5'-extended	2	158 783
AvilI	tgc!gca	6	blunt-cut	0	-
AvrII	c!ctagg	6	5'-extended	1	683
AxyI	cc!tnagg	7	5'-extended	2	364 799
Ball	tgg!cca	6	blunt-cut	0	-
BamHI	g!gatcc	6	5'-extended	2	708 755
BanI	g!gyrec	6	5'-extended	0	-
BanII	grgcy!c	6	3'-extended	0	-
BanIII	at!cgat	6	5'-extended	0	-
Bbel	ggcgc!c	6	3'-extended	0	-
BbrPI	cac!gtg	6	blunt-cut	0	-
Bbul	gcatg!c	6	3'-extended	0	-
Bbv12I	gwgw!c	6	3'-extended	0	-

KLONOVÁNÍ

Klonování – produkce geneticky identických jednotek:

- organismů (vegetativní množení rostlin)
- buněk (explantátové kultury rostlin, nádorově změněné buňky, hybridomové buňky, obecně – buňky tkáňových kultur)
- jádra (klonování živočichů z jádra somatických buněk)
- **na molekulární úrovni (klonování DNA)**

KLONOVÁNÍ DNA

- Množení neboli amplifikace již známých sekvencí (kódujících i nekódujících) (pro diagnostické účely, pro mapování genomu, pro další analýzy, přenosy jiným organismům apod.).
- Klonování genů *de novo* – prolíná se s identifikací nového genu, jeho namnožením, izolací) a další charakterizací.
- Klonování genů s cílem vyjádření polypeptidového produktu – uskutečnění exprese genu (viz genové inženýrství – transformace prokaryontů, transfekce do eukaryontních buněk, transgenóza u dvouděložných rostlin).

Molekulární klonování – namnožení libovolného množství identických kopií.

Dva způsoby: - ve vektorech (in vivo)

- v bezbuněčném systému (in vitro; např. PCR)

Klonování ve vektorech

vektor – lat. přenašeč

Plazmidy

Bakteriofágy

Kosmidy (plazmido-bakteriofágové vektory)

Umělé konstrukce chromozómů (YAC, PAC, BAC)

Vektory

Plazmidy - v *E. coli* – velikost inzertu do 10 kb

Table 3.3 Maximum DNA insert possible with different cloning vectors.

Vector	Host	Insert size
λ phage	<i>E. coli</i>	5–25 kb
λ cosmids	<i>E. coli</i>	35–45 kb
P1 phage	<i>E. coli</i>	70–100 kb
PACs	<i>E. coli</i>	100–300 kb
BACs	<i>E. coli</i>	≤ 300 kb
YACs	<i>S. cerevisiae</i>	200–2000 kb

a) Plazmidy

- dvouřetězcová cirkulární molekula DNA v bakteriích (nejdou však nezbytnou součástí bakterií)
- mají schopnost autonomní replikace (ale jen v bakteriích)
- nesou rezistenci k antibiotikům (např. ampicilin, tetracyklin)
- musí mít sekvenci *ori* (origin) – místo, kde začíná replikace
- nejsou to původní přirozené formy – jsou to umělé konstrukce připravené odštěpením nebo přidáním určitých segmentů
- charakteristickou součástí je **polyklonovací místo** (restrikční místa pro větší počet restrikáz, které se využívají pro klonování)

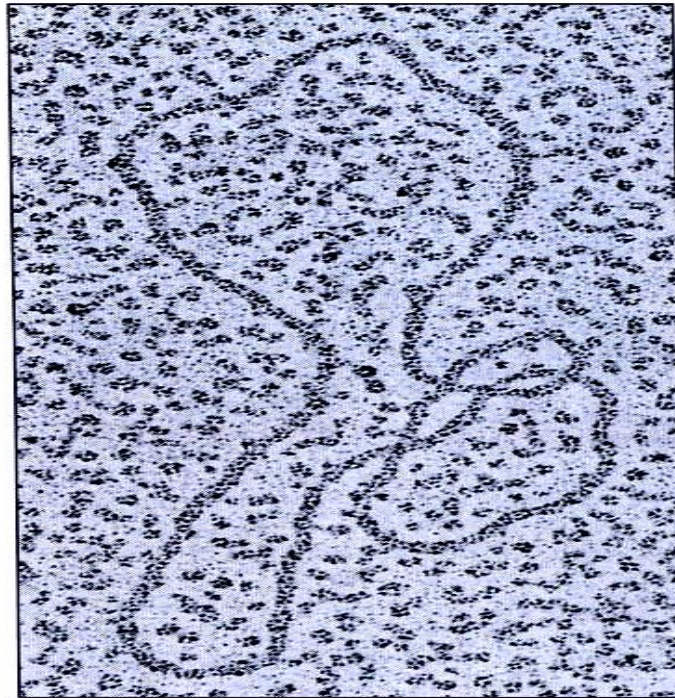
Příklady: pBR322 (4,36 kb)(rezistence k ampicilinu a tetracyklinu)

pUC18, pUC19 (2,69 kb) (rezistence k ampicilinu)

pBluescript II KS (2,96 kb) (fagemid – část z fágu, část z plazmidu)(rezistence k ampicilinu)

Princip klonování v plazmidech

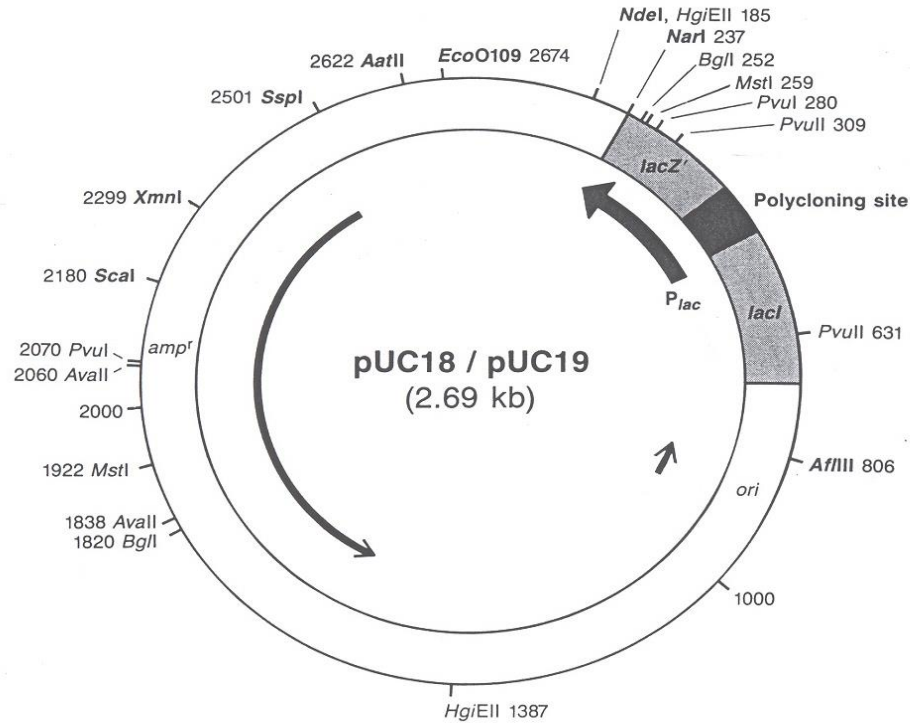
- rozštěpení studované DNA vybraným restrikčním enzymem
- rozštěpení plazmidu stejným restrikčním enzymem (linearizace); defosforylace plazmidové DNA)
- smíchání obou vzorků a zabudování studovaného fragmentu DNA a opětovné uzavření plazmidu pomocí DNA ligázy (ligace)
- vsunutí plazmidu do bakterie (transformace)
- kultivace bakterií na tuhém médiu (na petriho miskách) s přidavkem antibiotika
- přenesení vybraných kolonií do kyvet s tekutým médiem, kultivace
- izolace plazmidové DNA
- kontrolní elektroforéza v agarózovém gelu
- výběr vhodných vzorků DNA pro restrikci a vyštěpení zabudované cizí DNA vhodným restrikčním enzymem
- elektroforéza v agarózovém gelu – srovnání, zdali vyštěpený fragment odpovídá velikostí fragmentu, který jsme chtěli klonovat
- výběr vhodných vzorků a uložení bakteriálních kultur s přidavkem glycerolu na -70°C (pro pozdější použití)



100 nm

Obrázek 10-13 Bakteriální plasmid je běžně používán jako klonovací vektor (fotografie z elektronového mikroskopu). Tato kruhová dvouřetězcová molekula DNA je tvořena několika tisíci nukleotidových párů. Pro vizualizaci DNA v elektronovém mikroskopu je nutné ji nejprve obarvit, proto se DNA jeví širší, než ve skutečnosti je.

Plazmid pUC18/pUC19



Polycloning Sites pUC18

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	7	8	
Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCG	AGC	TCG	GTA	CCC	GGG	GAT	CCT	CTA	GAG	TCG	ACC	TGC	AGG	CAT	GCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC
				EcoRI		SacI		KpnI		SmaI XmaI		BamHI		XbaI		SalI AccI HincII		PstI		SphI		HindIII				

pUC19

1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	5	6	7	8	
Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGG	TCG	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CGG	GTA	CCG	AGC	TCG	AAT	TCA	CTG	GCC
				HindIII		SphI		PstI		SalI AccI HincII		XbaI		BamHI		SmaI XmaI		KpnI		SacI		EcoRI				

In pUC18, the *EcoRI* site lies immediately downstream from *P_{lac}*.
 In pUC19, the *HindIII* site lies immediately downstream from *P_{lac}*.

Typy konců vektorů a inzertů DNA při klonování

Vektor	Inzert	Řešení
5' přečnivá	5' lepidivý	defosforylace vektoru; ligace
3' přečnivá	3' lepidivý	defosforylace vektoru; ligace
tupý konec	tupý konec	defosforylace vektoru; ligace
linearizace dvěma enzymy	štěpení dvěma enzymy (stejně jako vektor)	ligace
tupý konec	PCR fragment (na 3' konci přesahující A)	odštěpení přesahujícího A; fosforylace PCR fragmentu; defosforylace vektoru; ligace

Rozlišení rekombinantních a nerekombinantních kolonií pomocí X-gal a IPTG:

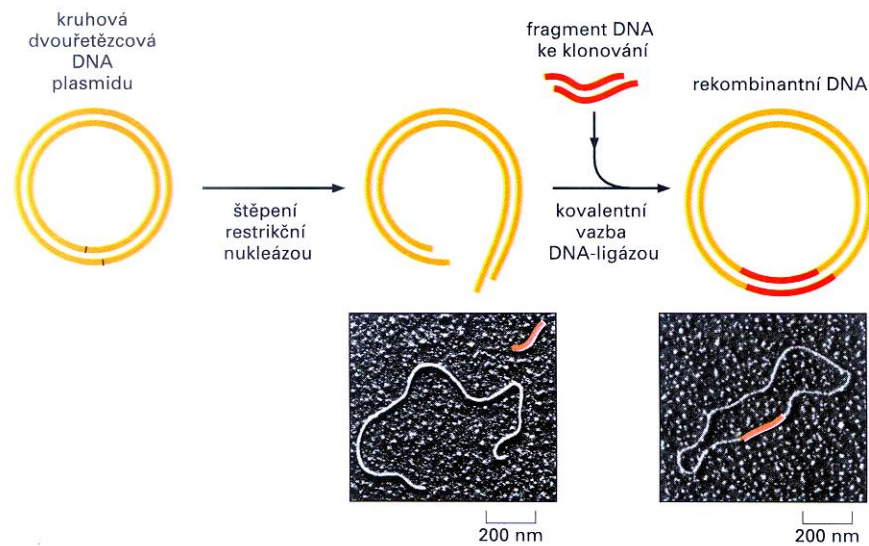
- rekombinantní světlé
- nerekombinantní modré

Použití rekombinantní plazmidové DNA

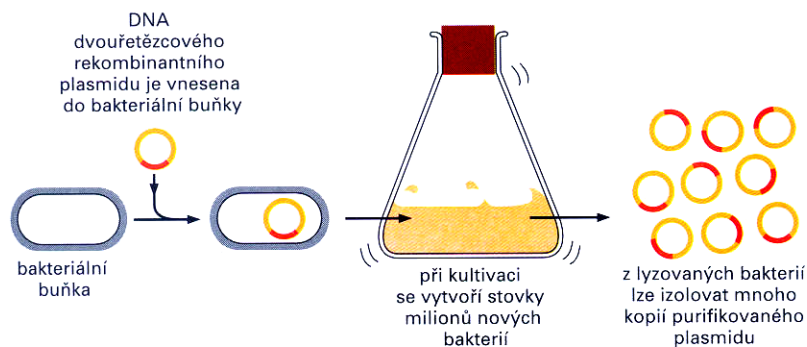
Inzerty v plazmidech - max. do 10 kb. Plazmidy nejsou vhodné pro přípravu cDNA nebo genomických knihoven (příliš krátké fragmenty).

Jsou vhodné pro:

- subklonování
- přípravu sond (pro hybridizace)
- sekvenování



Obrázek 10-14 Inserce fragmentu DNA do bakteriálního vektoru pomocí DNA-ligázy. Kruhá molekula plasmidu se otevře restrikční endonukleázou (v tomto případě takovou, která vytváří přesahující konce) a smíchá se fragmentem DNA, který má být naklonován (a který byl připraven štěpením stejnou nukleázou). K reakci jsou přidány ještě DNA-ligáza a ATP. Navzájem kohezivní konce obou molekul, vektoru a insertu, se spárují a zlomy v řetězci jsou uzavřeny DNA-ligázou, čímž vznikne kruhá rekombinantní molekula DNA.



Obrázek 10-15 Klonování fragmentu DNA. Pokud potřebujeme získat mnoho kopií určitého fragmentu DNA, je nutné ho nejprve naklonovat do vektoru, jak je ukázáno na obr. 10-14. Vzniklý rekombinantní plasmid je pak zaveden do bakterie, kde může být mnohamilionkrát replikován, jak se bakterie množí.

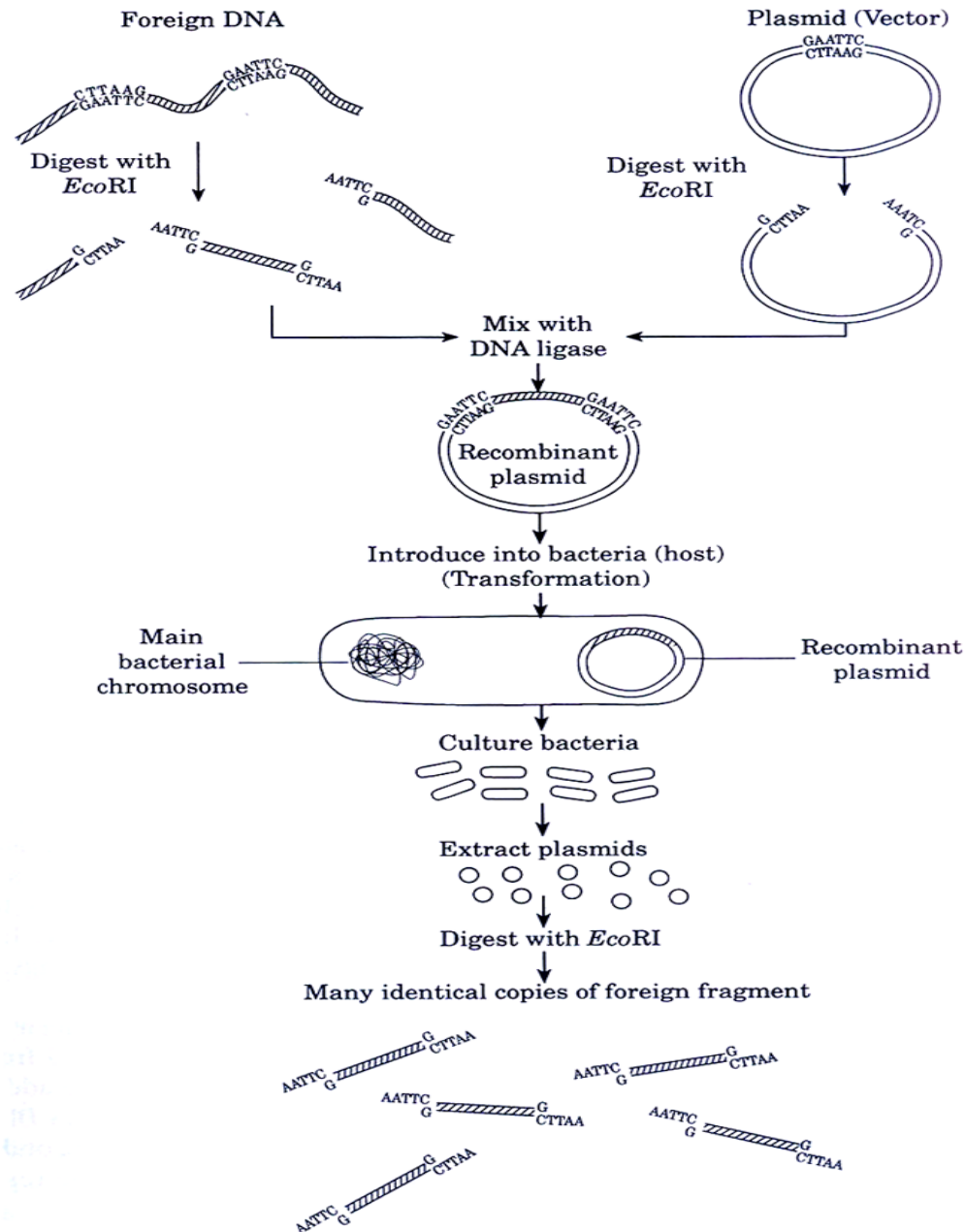
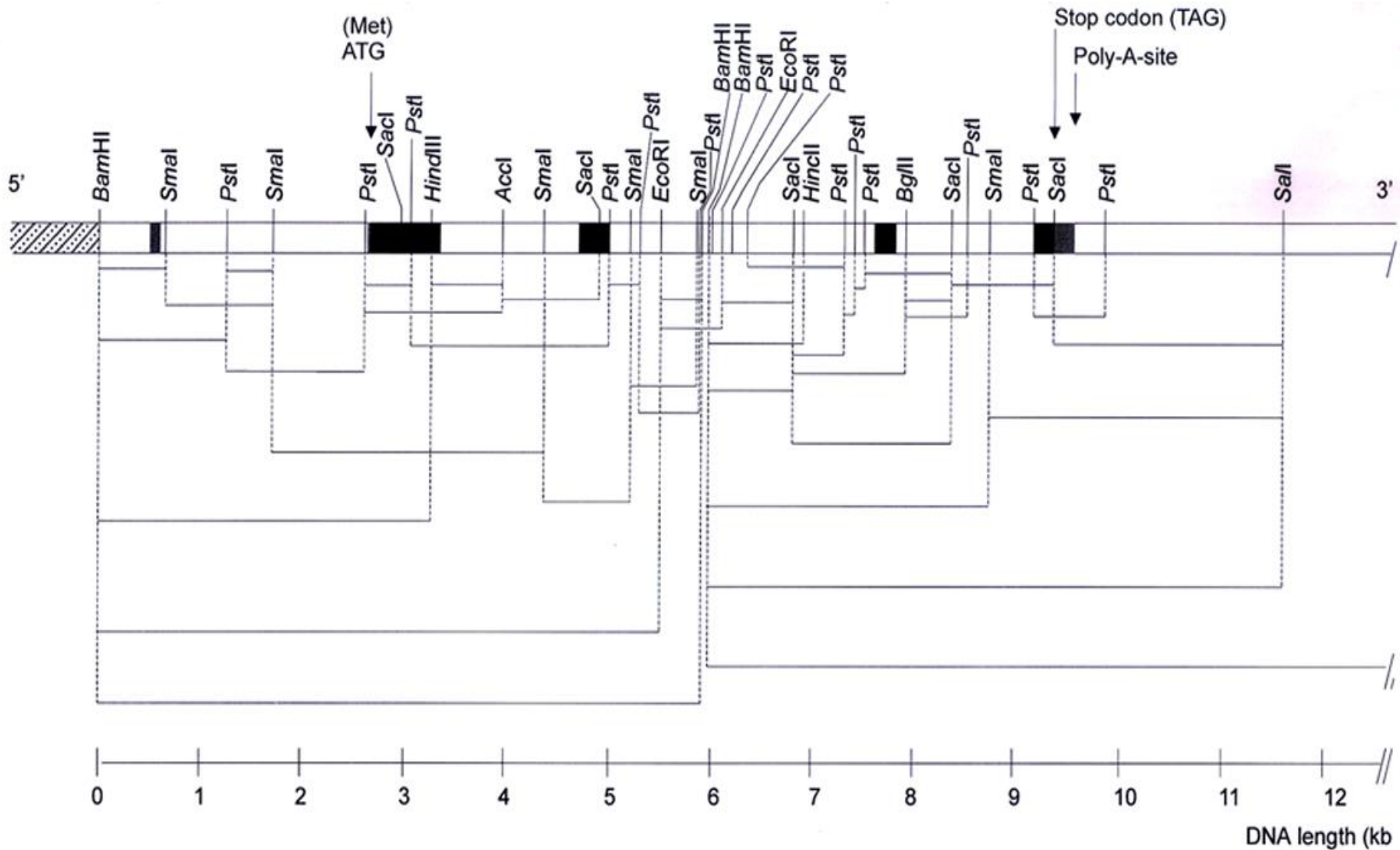


Fig. 2.2 Cloning an *Eco*RI fragment of DNA in a plasmid.

Příklad klonování a subklonování genu (SERPINA3-2) prasete



b) Bakteriofágy

Podle druhu fága – DNA jednovláknová nebo dvouvláknová, lineární nebo cirkulární

Fágy pro klonování – nejčastěji fág lambda (λ).

Různé typy: λ gt10, λ gt11, EMBL3, EMBL4, Charon4A ... atd

Příklad organizace fága EMBL3: velikost 42 000 bp

Sestává ze tří částí: levé raménko (20 kb)

střední část (13 kb)

pravé raménko (9 kb)

Střední část je postradatelná – dá se vyštěpit restrikcními enzymy Eco RI, Bam HI a Sal I .

Defosforylace izolovaných ramének a nahrazení střední části inzertem (až do 20 kb)

Klonování v lambda fágu: inserce (λ gt10, λ gt11) - inzert 0-7 kb

substituce (EMBL3, EMBL4) - inzert 7-20 kb

substituce nebo inserce (Charon 4A) - subst. 7-20 kb

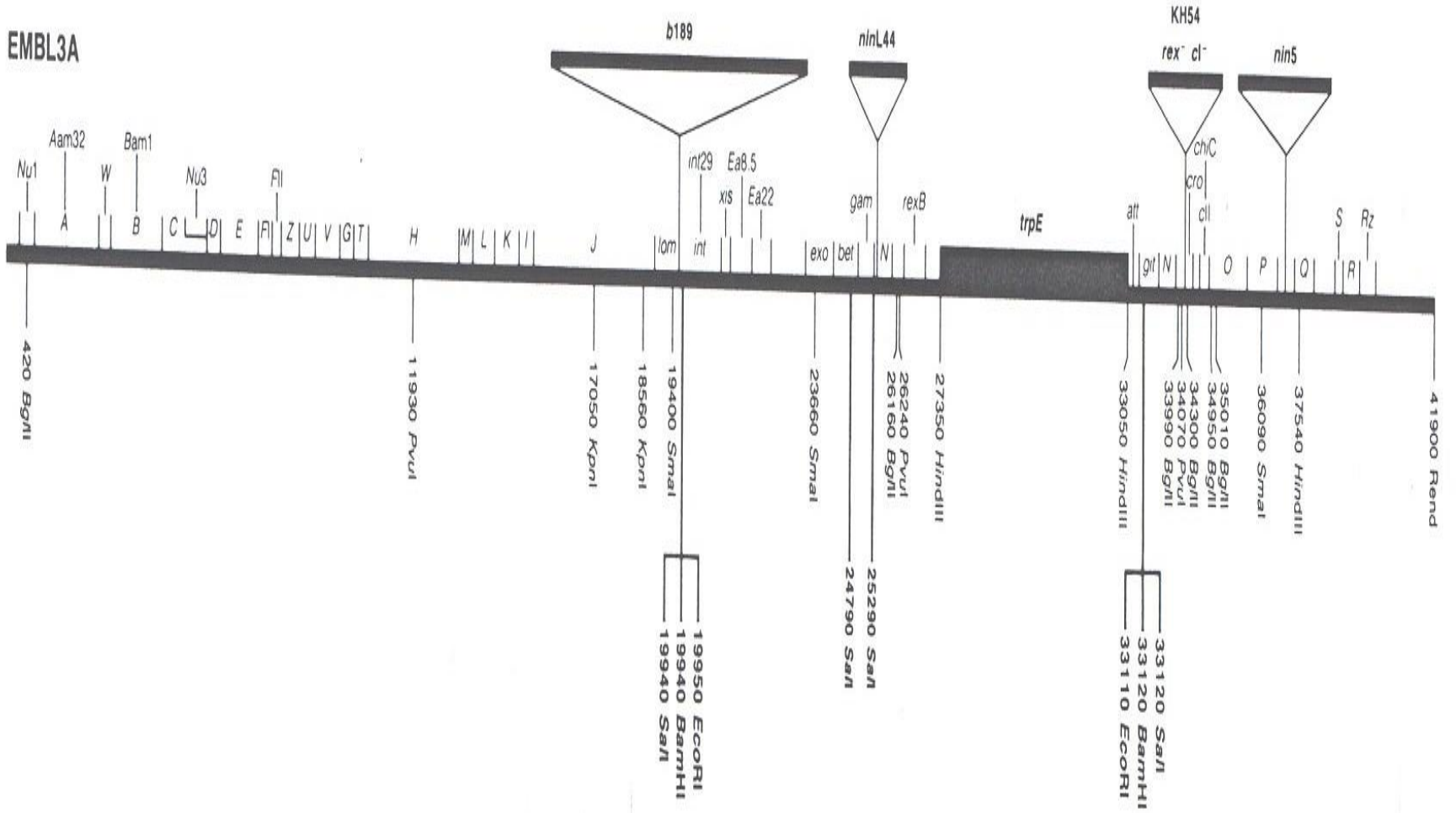
inzer. 0-6 kb

(restr. místo pro inzerci je ve střední části)

Fágy nejsou schopny samostatné existence – jejich množení je možné jen v baktériích (*Escherichia coli*). Na živné půdě kolonie s fágem vytvářejí prosvětlená místa – plaky.

Lambda fág EMBL3A

EMBL3A



Klonování ve fágových vektorech

Většinou se využívá pro konstrukci cDNA a genomových knihoven.

Vyhledávání klonu s genem nebo DNA segmentem, který chceme studovat:

- musíme mít k dispozici vhodnou sondu cDNA nebo genomickou DNA, kterou označíme buď radioaktivně (^{32}P) nebo neradioaktivně (digoxigeninem)
- připravíme petriho misky s *E. coli* plus lambda fágová cDNA nebo genomická knihovna
- po inkubaci uděláme otisky z misek na nylonové membrány a hybridizujeme s připravenou značenou sondou
- po exponování identifikujeme a vyřízneme z misky pozitivní plak a eluujeme lambda fágové částice
- postup opakujeme tak dlouho (nejméně 2x), až máme jistotu, že máme jen jeden pozitivní plak
- uděláme preparativní kultivaci a z namnožených fágů izolujeme DNA
- DNA použijeme na další studium (restrikční analýzy, subklonování v plazmidech, sekvenování a j.)
- Roztok s fágovými částicemi můžeme uchovávat v ledničce, po přidání malého množství chloroformu, nebo při -70°C po přidání DMSO (dimethylsulfoxid).

c) Kosmidy

Umělé spojení částí plazmidů a fágů – využívá se výhodných dílčích vlastností každého původního vektoru.

Jsou schopné pojmout fragmenty až 45 kb.

Pracuje se s nimi jako s plazmidy.

Vhodné pro konstrukci genomových knihoven.

d) Umělé chromozómové vektory

Využití – klonování DNA fragmentů dlouhých až 1 mil. párů bazí.

Vhodné k tvorbě genomových knihoven.

Patří sem: YAC (z angl. Yeast Artificial Chromosome) - lineární

(je vytvořen ze segmentů kvasinky, nálevníka a plazmidů)

Replikace probíhá v kvasinkách.

Nevýhody: nízká účinnost konstrukce, stabilizace a spolehlivé replikace.

PAC (prokaryotic artificial chromosome)

Hlavní části z fága P1 (sbalovací sekvence *pac* a epizómové částice

F z *E. coli*.)

BAC (bakteriální umělý chromozóm) – cirkulární

Pojme 100 – 300 kb.

e) Expresní vektory

Nejen amplifikují segment DNA (gen), ale současně umožňují transkripci a translaci vloženého genu. Vytváří se funkční **polypeptidový produkt**.

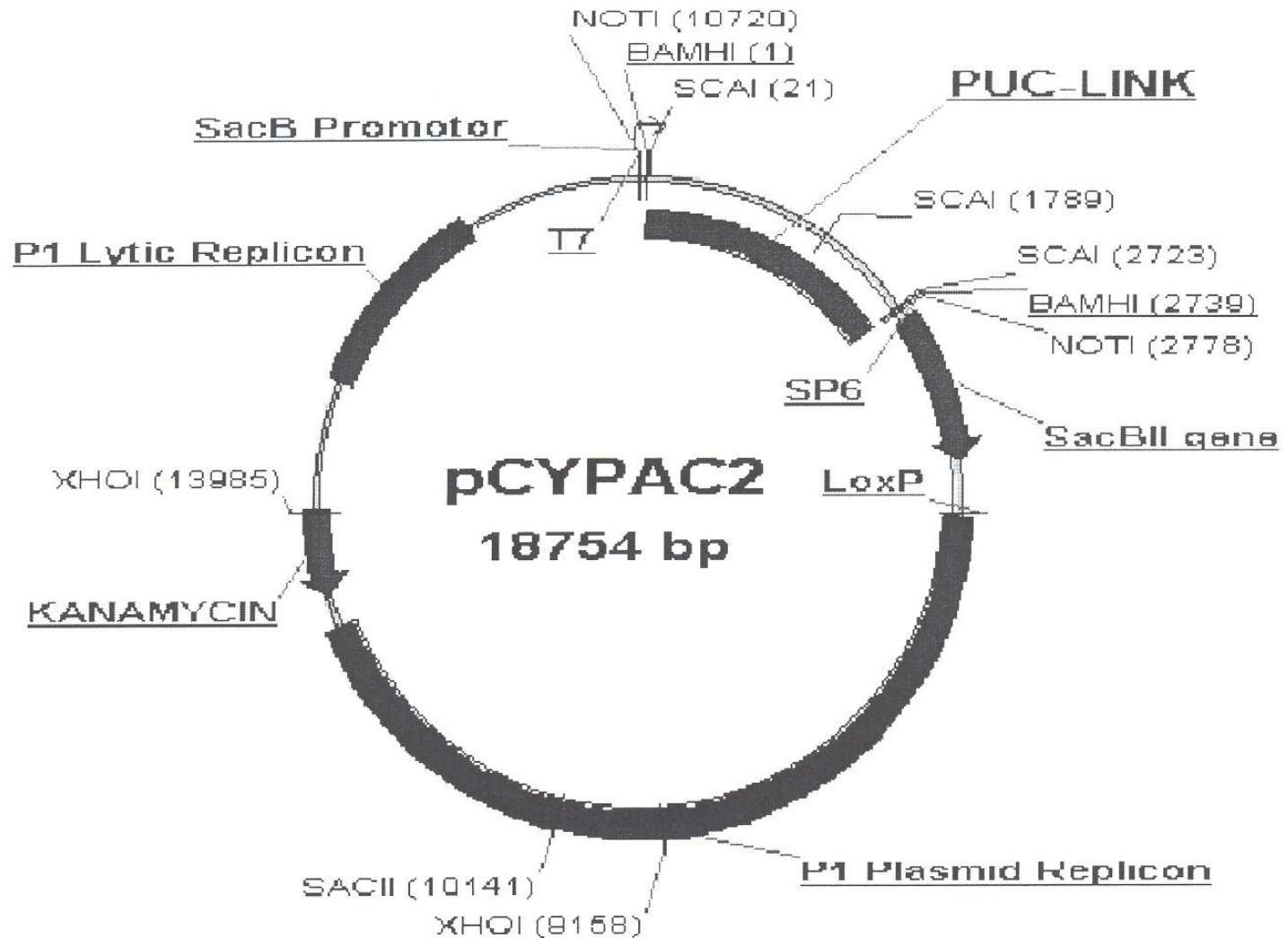
Příklad: **Expres v E. coli** (snadná manipulace, rychlý růst)

Strategie: inserce genu do plazmidu:

- selekční marker (odolnost k antibiotiku)
- transkripční promotor (např. *lac*, *trp* nebo *tac*)
- translační kontrolní sekvence (správně umístěné místo vazby na ribozóm a iniciátor ATG).
- polylinker umožňující správnou orientaci ve vektoru

Plazmidy se transformují do bakterií. Více viz Genové inženýrství.

Vektor PAC (pCYPAC2)



PUC-Link is stuffer fragment, being replaced by insert DNA during cloning.
Vector fragment does not contain sites for *AscI*, *SnaBI*, *SacI* & *SfiI*.

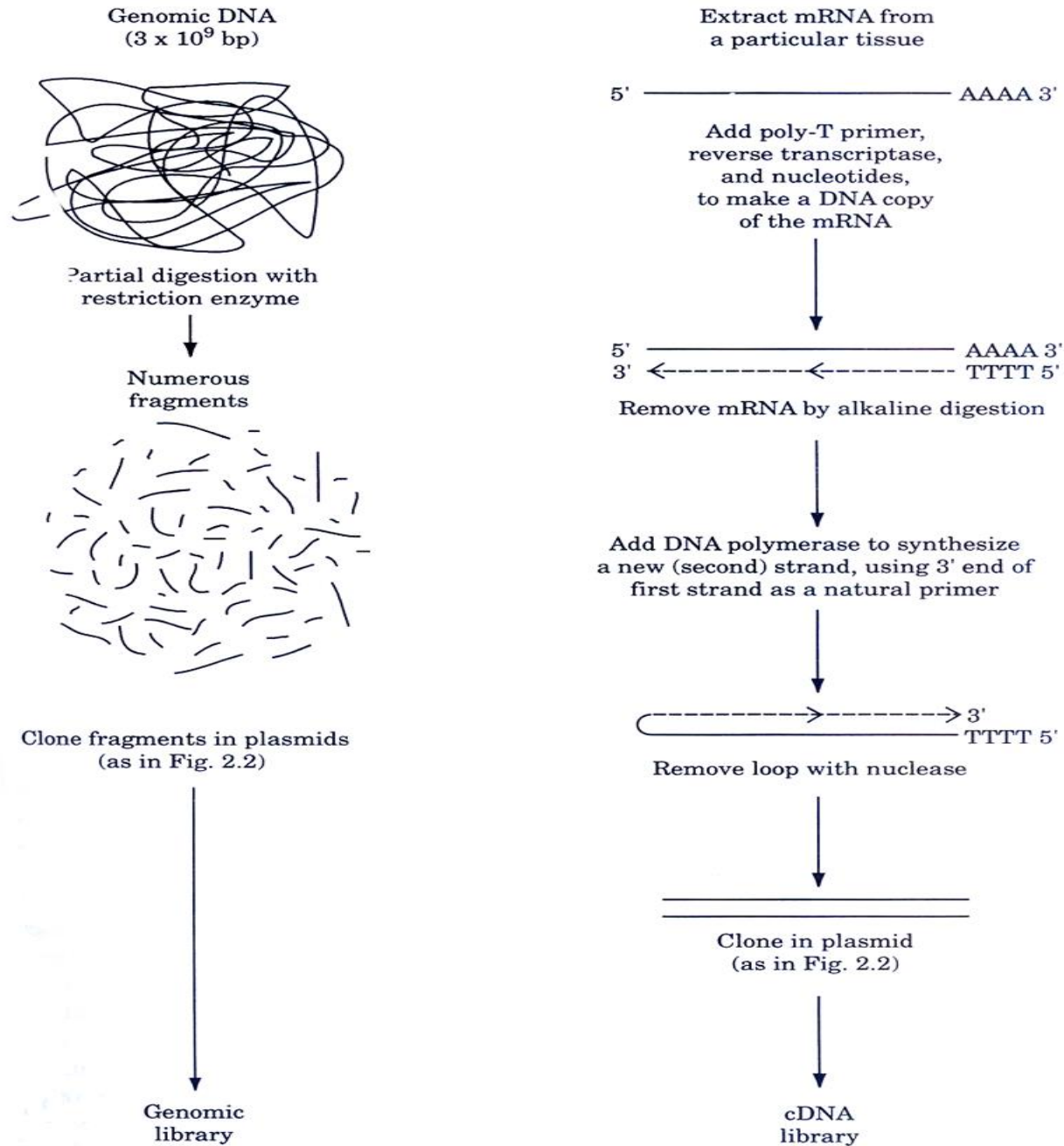


Fig. 2.3 Construction of genomic and cDNA plasmid libraries.

Genomová knihovna; cDNA knihovna

Genomová knihovna je množina klonů, které obsahují fragmenty genomové DNA určitého organismu. (Genomová DNA se rozštěpí na fragmenty, např. vhodným restriktivním enzymem, a tyto fragmenty se ligují do vhodného vektoru, např. BAC vektoru. BAC se vloží /transformují/ do *E. coli*, pak se v tekuté kultuře namnoží, a tato namnožená kultura je genomová knihovna.)

cDNA knihovna je množina klonů cDNA. cDNA se získá reverzní transkripcí mRNA izolované z určité tkáně určitého organismu a v určitém ontogenetickém období /např. po narození nebo v dospělosti/, případně v určitém fyziologickém stavu. cDNA se liguje do vhodných vektorů (buď lambda fágů nebo plazmidů). K namnožení klonů se opět využije *E. coli*. Namnožená kultura rekombinantních klonů je cDNA knihovna.

PCR



PCR (polymerázová řetězová reakce, 1985 – K. Mullis)

- slouží k získání dostatečného množství specifických kopií DNA (tzv. **amplifikace**) pro další analýzy
- nebo i přímo k identifikaci polymorfismů (AS-PCR)
- založena na cyklickém opakování (25-40x)

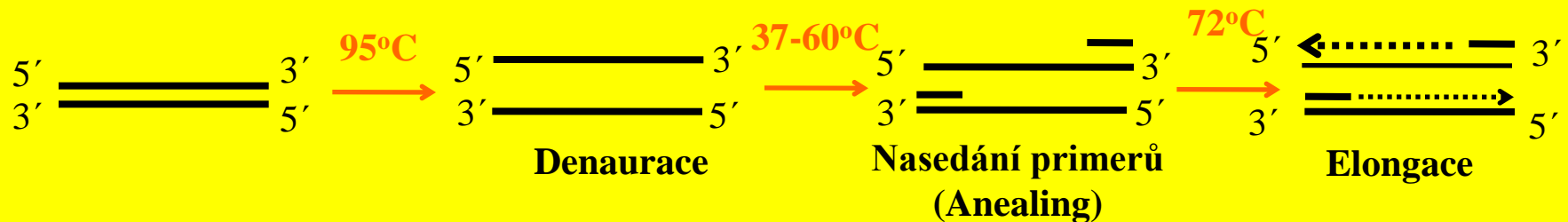
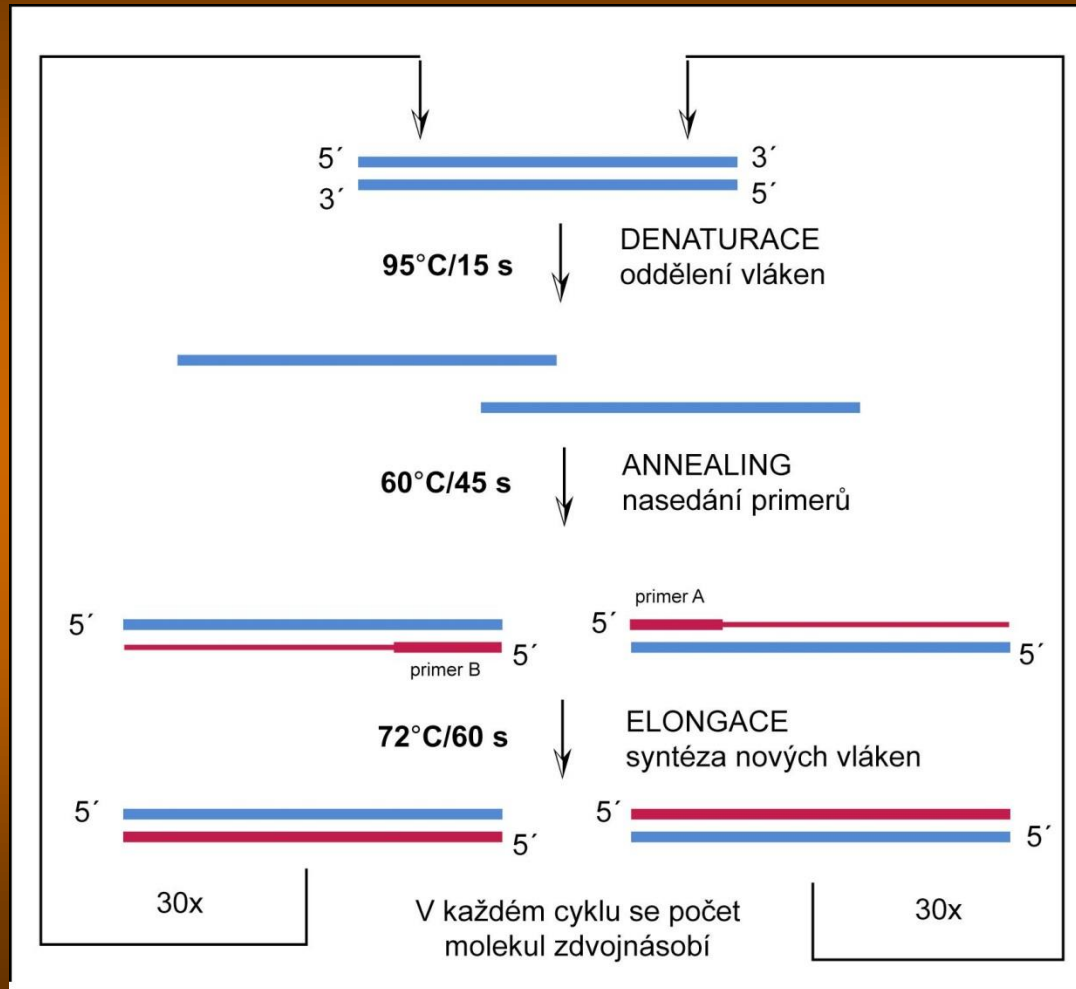


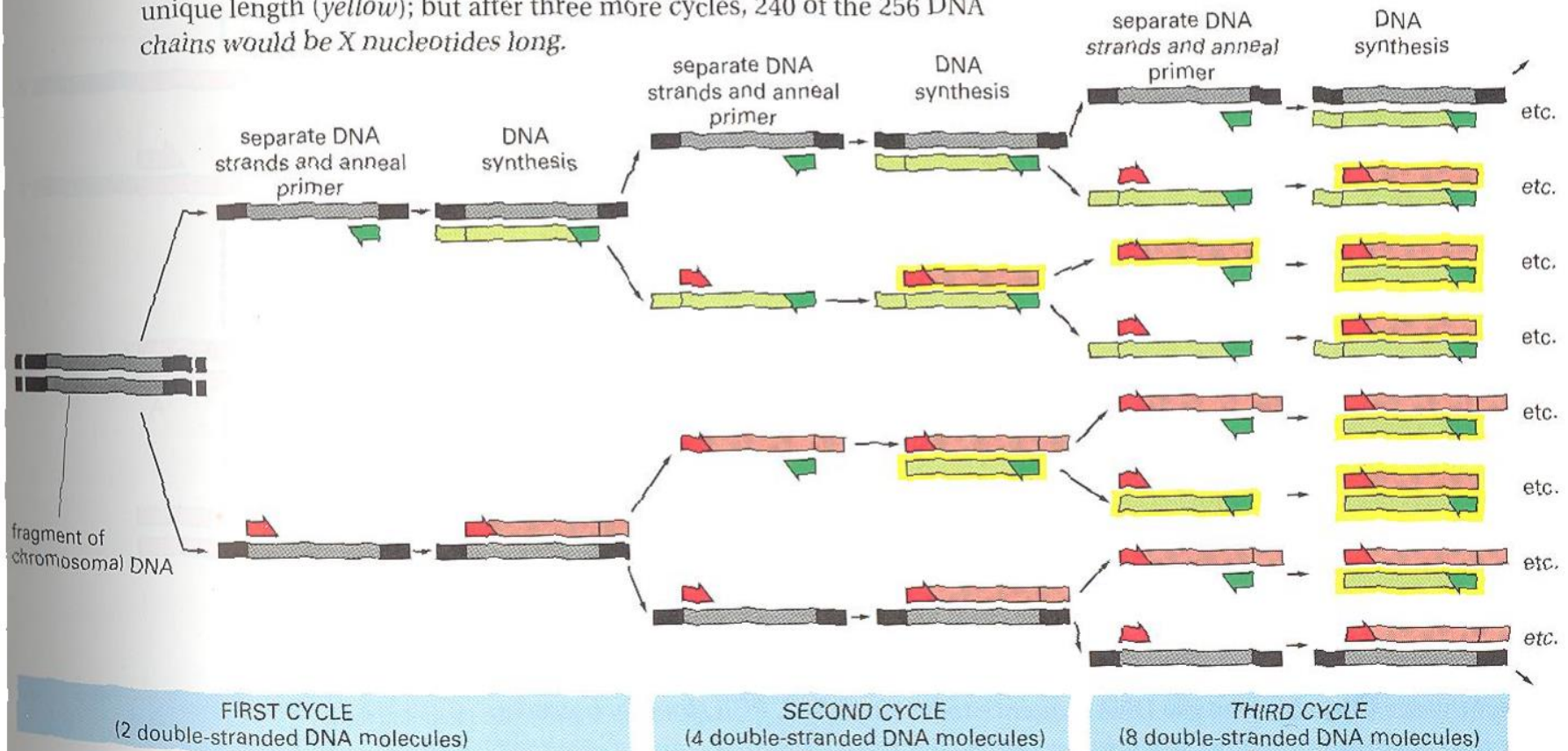
Schéma PCR



PCR amplifikace

Figure 7-32 PCR amplification. PCR produces an amount of DNA that doubles in each cycle of DNA synthesis and includes a uniquely sized DNA species. Three steps constitute each cycle, as described in the text. After many cycles of reaction, the population of DNA molecules becomes dominated by a single DNA fragment, X nucleotides long, provided that the original DNA sample contains the DNA sequence that was anticipated when the two oligonucleotides were designed. In the example illustrated, three cycles of reaction produce 16 DNA chains, 8 of which have this unique length (yellow); but after three more cycles, 240 of the 256 DNA chains would be X nucleotides long.

Celkem 25-40 cyklů



Složení reakční směsi

- a) destil. H₂O
- b) pufr
- c) deoxynukleosidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- d) Mg²⁺
- e) primery (přímý, zpětný)
- f) *Taq* polymeráza
- g) DNA (genomická; cDNA; plazmidová; aj.)

Termostabilní DNA polymerázy s korekční aktivitou

Table 2.1 Sources of thermostable DNA polymerases with proofreading (3'–5' exonuclease) activity.

DNA polymerase	Source
<i>Tma</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Deep Vent™	<i>Pyrococcus</i> sp.
<i>Tli</i>	<i>Thermococcus litoralis</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>

PRIMERY

PPrimery:

- uměle syntetizované oligonukleotidy o velikosti 16-25 nukleotidů
- k- krátká jednořetězcová DNA
- **T_m**: teplota tání dvouřetězce primer : templátové vlákno
oodvozuje se od ní T_a – teplota anealingu při PCR

APA2 2 A (*144H5) 23.07.200:


21-mer
5'- TGG CAA GGA CCT GAT GGA GAA -3'

výtěžek: 29,08 nmol = 7,26 OD = 190,1 μg (scale: 40 nmol)

purifikace: Sephadex G-25 stanovení kvality: UV spektrum

extinkční koef. ε: 249,7 ml/μmol GC: 52,4% MW: 6537 T_m(A): 47,8°C T_m(B): 49,2°C
T_m(A)= 81,5+16,6x(log[konc.iontů])+0,41x(%GC)-(600/délka)-0,63x(%formamidu),
kde konc. iontů (koncentrace všech iontů, tj. včetně Na⁺) = 60mM; 10% formamidu
T_m(B)=81,5+16,6x(log[konc.K⁺])+0,41x(%GC)-(675/délka), kde konc.K⁺ = 50 mM
(Hodnoty T_m jsou vypočteny jen pro 14 - 70 -mery)

Rozpuštění na koncentraci 100 pmol/μl (0,1mM roztok):
přidat 291 μl vody (pufru)

 <http://www.generi-biotech.com>
049 5056314 · 049 5056316 (FAX)

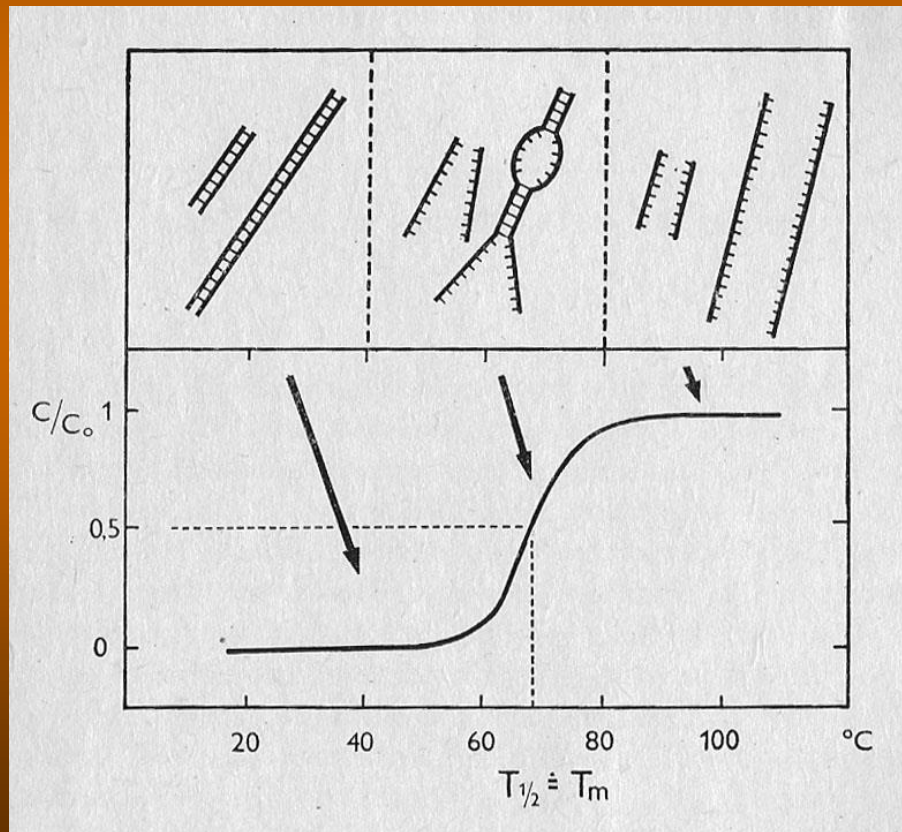
převodní vztahy pro oligonukleotid:

1 OD = 4005 pmol = 26,2 μg
1 nmol = 0,250 OD = 6,54 μg
1 μg = 153,0 pmol = 0,0382 OD

$$T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$$

b) Denaturace

Denaturace: přechod dvoušroubovicových molekul na jednořetězcové



Průběh teplotní denaturace DNA:

C – koncentrace denaturovaných NT

C_0 – celková koncentrace NT

T_m – teplota tání

T_m – závisí: obsah GC, pH, složení roztoku

Příklady využití PCR

A. Badatelský výzkum (základní)

- izolace genů, sekvenování DNA, mutageneze, analýza klonů, exprese genů (RT-PCR), příprava značených sond aj.

B. Cílený výzkum (aplikovaný) v zemědělství

- přímá detekce mutací a polymorfismů, pro další analýzy polymorfismů (RFLP, DGGE, SSCP aj.), detekce markerů pro selekci, sexování embryí, určování paternity

C. Klinické disciplíny

- prenatální diagnostika, detekce patogenů (původců chorob-bakterie, viry), identifikace onkogenů, typizace nádorů, typizace HLA při transplantacích aj.

D. Soudní lékařství - určování identity jedince a paternity

E. Archeologie

2.2 PCR

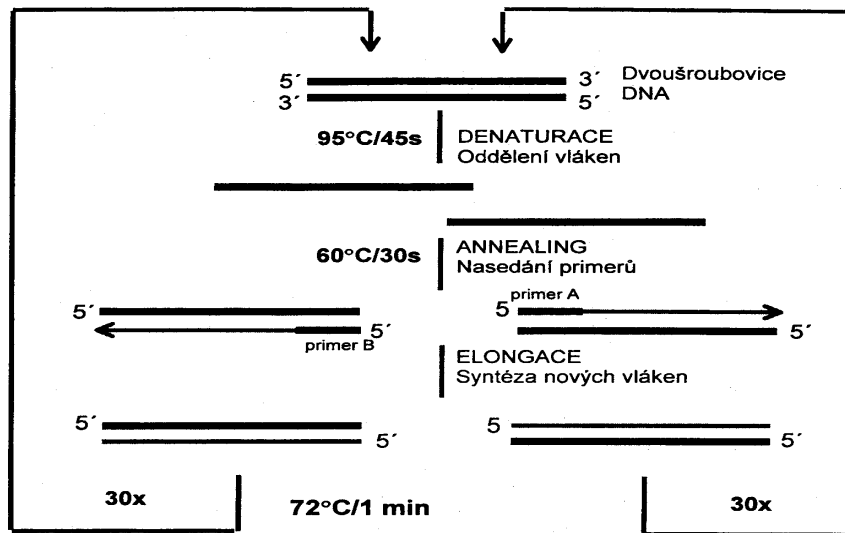
Za základní molekulárně-gentickou metodu lze považovat polymerázovou řetězovou reakci (PCR), která slouží k získání dostatečného množství specifické DNA pro další analýzy a může v některých svých modifikacích sloužit i přímo k identifikaci polymorfizmů. Metoda byla poprvé popsána v roce 1985 (Saiki *et al.*, 1985).

2.2.1 Princip metody

PCR je založena na extenzi primerů a geometrické amplifikaci (namnožení) molekul DNA za cyklického opakování tří kroků lišících se pouze teplotními podmínkami. Syntézu DNA řízenou templátem (matricovou DNA) katalyzuje teplotně rezistentní DNA polymeráza (např. *Taq*). PCR umožňuje současnou syntézu obou komplementárních vláken extenzí (prodlužováním) dvou primerů (jednořetězových oligonukleotidů) připojených ke komplementárním řetězcům na protilehlých koncích templátu. Umístění obou primerů tak ohraničuje amplifikovaný úsek DNA.

Každý cyklus PCR zahrnuje teplotní denaturaci DNA, připojení primerů (annealing) a syntézu DNA (elongace) (Obr. 2.). V každém cyklu se množství DNA zdvojnásobí a tím se zdvojnásobí množství templátu pro následující cyklus.

V důsledku toho dochází k exponenciální amplifikaci, tj. z každé molekuly původního templátu bude vytvořeno 2^n kopií, kde n je počet cyklů. Například po 30 cyklech by mělo dojít zhruba k 10^{10} násobnému namnožení DNA. V praxi je však amplifikace limitována koncentrací substrátů a aktivitou enzymu. Obecně $10^5 - 10^6$ násobné amplifikace může být dosaženo v 30 až 50 cyklech. Účinnost amplifikace je odhadována mezi 60 a 85%, ale může být snížena přítomností většího množství templátu. Zvyšuje se totiž pravděpodobnost hybridizace templátu s komplementárním řetězcem DNA, místo s primerem. Na účinnost amplifikace má také vliv nespecifická hybridizace primerů s jinými sekvencemi na cílové DNA. Za optimálních podmínek však mohou být detekovány PCR amplifikacemi i genomové sekvence o jedné kopii i viry.



V každém cyklu se počet molekul DNA zdvojnásobí

Obr. 2. Jeden cyklus polymerázové řetězové reakce.

2.2.2 Optimalizace PCR

Jako optimalizace PCR je označován proces výběru a testování nejvhodnějších parametrů, které reakci ovlivňují, tj. složení reakční směsi a teplotní a časový průběh reakce. Optimalizaci je třeba provádět nejen při sestavování nové PCR, ale i při zavádění metodiky převzaté z literatury, neboť konkrétní podmínky laboratoří se mohou lišit.

2.2.3 Složení reakční směsi

Kromě DNA, která bude amplifikována, obsahuje reakční směs pufr pro DNA polymerázu, směs nukleotidů (dNTP), pár primerů specifických pro cílovou sekvenci, termostabilní DNA polymerázu (většinou *Taq*) a různá aditiva zvyšující účinnost nebo specifitu reakce.

Pufr pro PCR většinou obsahuje 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.4), a 100 µg /ml želatiny. Koncentrace KCl i Tris mohou být sníženy bez většího efektu. Doporučuje se používat pufr dodávaný výrobcem polymerázy.

Koncentrace volného hořčíku (Mg^{2+}) může ovlivňovat účinnost a specifitu připojování primerů, teplotu disociace vláken templátové DNA i DNA produktu PCR, vznik primerových dimerů a aktivitu a přesnost enzymu. *Taq* DNA polymeráza potřebuje volný hořčík pro vazbu na templátovou DNA, primery a dNTP. Optimální hladina se mění v závislosti na sekvenci, která bude amplifikována a na povaze primerů. Ve většině případů byly získány nejlepší výsledky s genomovou DNA v pufru obsahujícím 0,5-1,5 mM volný hořčík. Protože dNTP kvantitativně váží Mg^{2+} , množství volného Mg^{2+} pro *Taq* polymerázu je koncentrace $MgCl_2$ snižená o koncentraci dNTP. EDTA nebo jiné chelatory přítomné v roztoku DNA vzorků mohou snížit koncentraci hořčíku. Obecně platí, že jeho nedostatek způsobuje snížení výtěžku reakce, nadbytek snížení její specifity. Koncentraci Mg^{2+} je proto nutné testovat zvlášť pro každou reakci.

Deoxyribonukleozid trifosfáty (dNTP) patrně neovlivňují specifitu, ale bylo zjištěno, že jejich nižší koncentrace může významně zvýšit přesnost *Taq* polymerázy. Koncentrace 200 µM pro každý nukleotid je dostatečná a obecně představuje dobrý kompromis mezi výtěžkem a přesností. Všechny čtyři dNTP se dávají v ekvivalentním množství.

Koncentrace PCR primerů má své optimum v závislosti na jejich sekvenci a složení nukleotidů cílové DNA. Pro většinu genomové DNA dává nejlepší výsledky koncentrace primerů v rozmezí 0,1-1,0 µM. Vyšší hladina primerů snižuje specifitu a zvyšuje pravděpodobnost vzniku primerových dimerů. Protože primerový dimer má krátkou délku, může se rychle stát převládajícím produktem reakce.

Aktivita Taq DNA polymerázy obvykle užívaná při PCR je 1-2,5 jednotky/100 µl reakční směsi. Pro amplifikaci delších fragmentů DNA je možno koncentraci zvýšit. Nadbytečné množství enzymu má obvykle za následek nespecifickou PCR a snižuje výnos amplifikovaných fragmentů.

Templátová DNA by měla být intaktní (neporušená) v amplifikovaném úseku. Je důležité, aby vzorek s DNA neobsahoval inhibitory reakce (např. detergenty, EDTA, stopy fenolu). Obvykle se jí dává do PCR 0,1-1 µg. Je nezbytné zajistit před začátkem PCR úplnou denaturaci templátové DNA (obvykle zahříváním při

93-95 °C). *Taq* DNA polymeráza by měla být přidávána až po tomto kroku, protože by dlouhým zahříváním ztratila svou aktivitu. Tímto tzv. „hot startem“ se také zvyšují specifita reakce.

Aditiva v PCR směsi: Specifitu nebo výtěžek mohou zvyšovat různá aditiva, jako DMSO (1-10%), PEG-6000 (5-15%), glycerol (5-20%), formamid (1,25-10%) a BSA. Některé reakce dokonce mohou probíhat pouze s některými z těchto aditiv. DMSO (dimethylsulfoxid) nebo formamid mohou zvyšovat specifitu tím, že snižují teplotu tání a separace a tím zlepšují nasedání primerů. Želatina, BSA a neionogenní detergenty (Tween 20 aj.) pomáhají stabilizovat enzym.

2.2.4 Teplotní a časový průběh reakce

PCR probíhá inkubací vzorků při třech teplotách odpovídajících třem krokům v amplifikačním cyklu: denuraci, annealing a elongaci. Obvykle je dvouvláknová DNA denaturována krátkým zahřátím vzorku na 90-95 °C, primery jsou schopny nasedání na své komplementární sekvence při krátkém ochlazení na 40-60 °C (annealing) a následuje zahřátí na 72 °C, kdy se prodlužují připojené primery pomocí *Taq* polymerázy (elongace).

Teplota potřebná k úplné denuraci templátu je závislá na jeho délce a obsahu GC. Delší vystavení vysoké teplotě má za následek snižování aktivity *Taq* polymerázy.

Teplota, při které dochází k připojování primerů (teplota annealingu, T_A), je závislá na teplotě tání primerů a většinou se pohybuje mezi 50-65 °C. Díky přebytku primerů obsažených v reakční směsi je hybridizace většinou okamžitá, a proto se dlouhá inkubace při annealační teplotě nedoporučuje. Vede ke vzniku nespecifických produktů.

Extenze primerů při 72 °C je velmi blízká k teplotě, při které má *Taq* polymeráza maximální aktivitu. Doba inkubace při této teplotě závisí na velikosti fragmentu DNA, který má být amplifikován. Odpovídající je 1 minuta na 1000 bp syntetizované DNA. Stejně jako při annealingu, nadměrná doba inkubace vede obvykle k produkci nespecifických amplifikačních produktů.

Většina teplotních profilů, které poskytují dobré výsledky je složena z denurace při 93-95 °C 15-30 sekund, annealing při 55-65 °C 15-30 sekund a extenze při 72 °C po dobu 30-60 sekund.

Díky komplexu interakcí mezi jednotlivými složkami v PCR směsi (hlavně mezi primery a vzorky DNA) a široké různorodosti využití této techniky, je nemožné specifikovat jednu sadu reakčních podmínek, které by byly optimální ve všech situacích, ale je nutno optimalizovat každou PCR reakci zvlášť. Důvodem je rovněž skutečnost, že teplotní údaje na termálních cyklerech nemusí odpovídat skutečným hodnotám uvnitř reakční směsi vzorku. Velkou roli hraje také množství směsi, ve které reakce probíhají, kvalita chemikálií atd.

2.2.5 *Taq* DNA polymeráza

Základem pro rozvoj PCR byl objev termostabilní DNA polymerázy izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (*Taq*). Tato DNA polymeráza může být opakovaně vystavena vyšší teplotě (94-95 °C) potřebné pro oddělení řetězců DNA a proto není nutné přidávat enzym v každém cyklu. Uvádí se, že v závislosti na povaze templátové DNA má jedna molekula enzymu v rozsahu od 75 do 80 °C specifickou aktivitu 150 nukleotidů za sekundu. Při teplotě 70°C zařazuje za sekundu > 60 nukleotidů. Přestože má *Taq* DNA polymeráza velmi omezenou aktivitu nad 90°C, je relativně rezistentní k denaturaci za vyšší teploty.

Přesnost Taq polymerázy: Přesnost enzymatické amplifikace DNA závisí, obdobně jako její výtěžnost, na různých reakčních podmínkách. Na frekvenci nesprávného začleňování nukleotidů má vliv kvalita a koncentrace deoxynukleotidů, dvojmocných kationtů a templátu. Uvádí se frekvence chyby $1,3 \times 10^{-5}$. Chyba v počátečních cyklech PCR má za následek akumulaci velkého množství amplifikovaných molekul DNA obsahujících chybu.

Kromě *Taq* polymerázy se používají další teplotně rezistentní polymerázy (*Pwul*, *Tth*, *Tbr*) a jiné komerčně dodávané modifikované enzymy a jejich směsi, které vykazují nižší % tvorby chyb (*Tgo* polymeráza pouze $4,9 \times 10^{-7}$).

2.2.6 PCR primery a hlediska pro jejich výběr

Hlavním předpokladem úspěšné PCR je dobře zvolený pár primerů. Na jeho kvalitě silně závisí specifita i výtěžek reakce. Mezi základní parametry, ke kterým je třeba při designu primerů přihlížet, patří: velikost primeru, teplota tání (T_m) a obsah G+C, stabilita na 3'konci primeru, vnitřní komplementarita, komplementarita mezi dvěma primery a unikátnost (specifita) sekvence na 3'konci. Při designu

primerů je nutné vždy volit kompromis mezi dvěma základními parametry, které jsou většinou v protikladu - specifitou a výtěžkem reakce.

Velikost primeru významně ovlivňuje specifitu reakce. Dostatečně specifické jsou obvykle oligonukleotidy v rozmezí 18-24 bází. Kratší oligonukleotidy dobře hybridizují s templátem, ale mají menší specifitu (vyšší tendenci k nesespecifickému nasedání na templát). Delší primery naopak mají tendenci tvořit vlásenky a nesespecificky se párovat s dalším primerem (tzv. primer-dimer struktury), ale nesespecifické nasedání na templát je nízké. U amplifikace dlouhých fragmentů se používají delší primery (21-34 bází), protože specifita nasedání na templát je zde velmi důležitým parametrem.

Teplota tání DNA (T_m) je teplota, při které je 50% molekuly DNA ve stavu dvoušroubovice. Oba primery by měly mít T_m stejnou, nebo co nejvíce podobnou. T_m souvisí hlavně s délkou a obsahem G+C, který ji zvyšuje. Obvykle je v rozsahu 55-75 °C. Při použití primerů o vyšší teplotě tání je reakce víc specifická, což je nutné hlavně u amplifikace delších fragmentů.

Stabilita na 3'konci primeru: Pro činnost DNA polymerázy je třeba, aby několik nukleotidů na 3'konci primeru plně hybridizovalo s templátovou DNA. Je-li 3'konec stabilní (volná energie duplexu primer-templát je vysoká), stačí k pevné vazbě na templát jen několik komplementárních nukleotidů na 3'konci a polymeráza tak zahajuje syntézu DNA z nesespecifického místa. Málo stabilní 3'konec primeru (pod -8kcal/mol) naopak vyžaduje přesně komplementární sekvenci na templátu, aby vznikl stabilní duplex nutný pro zahájení elongace. Reakce je pak vysoce specifická. Umístění energeticky silného páru GC na 3'konci (GC svorka) není vhodné, protože se snižuje specifita reakce.

Vnitřní komplementarita jednoho primeru má za následek vznik vlásenkových struktur, které znemožňují nasedání primeru na templát (Obr. 3.A).

Komplementarita mezi primery se může týkat molekul stejného primeru nebo obou primerů (případně více). Pokud je stabilně hybridizován 3'konec, může docházet k nesespecifické elongaci DNA (např. vznik dimerů primerů). Silně komplementární primery se mohou navzájem blokovat a snižovat tak výtěžek. Příklady možných komplementarit znázorňuje Obr. 3.B, C.



Obr. 3. Komplementarita primerů.

A - Vlášenková struktura primeru, B - Komplementarita na 3'konci primeru mající za následek vznik nespecifického produktu (dimery primerů), C - Komplementarita uvnitř dvou primerů (zde stejných) mající za následek blokování primerů.

Komplementarita primeru s nespecifickými místy na templátu (na 3'konci) je kritická pro specifitu reakce. Pokud se vyskytují na templátové DNA sekvence komplementární s 3'koncem primeru může dojít k začátku syntézy DNA z tohoto nespecifického místa. Proto pro návrhy primerů je nutné volit co možná nejunikátnější sekvence genů.

Výpočet teploty tání (T_m) primerů

a) Jednoduchý a orientační výpočet vychází z konkrétních počtů jednotlivých bází a je dán rovnicí (Suggs *et al.*, 1981):

$$T_m = 2x(A+T) + 4x(G+C)$$

Platí pro 14-23 nukleotidů primeru.

b) Přesnější rovnici, která zohledňuje i koncentraci iontů, zavedl Sambrook (1989):

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+] + 0,41 (\%G+C) - 600/nNT - 0,63 (\%FA),$$

kde nNT je počet nukleotidů primeru a %FA procentický obsah formamidu.

Platí pro 14-70 nukleotidů primeru.

c) Podobně lze použít i rovnici dle Baldino *et al.* (1989):

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+] + 0,41 (\%G+C) - 675/nNT$$

d) Zatím nejpresnější výpočet vychází z teplotní stability helixu a je založen na termodynamických parametrech nejbližších sousedů. Vyžaduje však počítačové zpracování. Rovnici sestavili Rychlik *et al.* (1990):

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \times \ln(c/4)} - 273,15 + 16,6 \log [K^{\circ}],$$

kde ΔH a ΔS jsou enthalpie a entropie helixu DNA, R je univerzální plynová konstanta, c je koncentrace templátové DNA.

Konkrétní hodnoty vypočítané pomocí různých rovnic se mohou navzájem lišit, slouží hlavně ke srovnání dvojice primerů. Stanovení optimální teploty annealingu na základě empirického zjištění popisují Rychlík *et al.* (1990), skutečnou teplotu je však třeba určit experimentálně.

Pro ulehčení výběru primerů se používají počítačové programy, např. Primer ver. 0.5 (Lincoln *et al.*, 1991), Oligo (Rychlík a Rhoads, 1989) aj., některé jsou dostupné i na internetu.

2.2.7 Degenerované primery

V případě, že není známa přesná sekvence templátové DNA, např. když jsou tvořeny primery na základě aminokyselinové sekvence nebo homologií s jiným druhem, je vhodné použít degenerované primery. Jsou to oligonukleotidy, kde jeden nebo více nukleotidů jsou degenerované, tj. schopné vazby s několika různými bázemi. Čím více jsou primery degenerované, tím větší je pravděpodobnost nespecifického párování s templátem. Degenerované nukleotidy by neměly být umísťovány na 3' konec primeru. Jako degenerovaný primer se používá buď směs primerů, které se odlišují bázemi na určité pozici oligonukleotidu, nebo jeden primer obsahující nestandardní bázi schopnou párovat se s několika bázemi. Často používaný je 2'-deoxyinosin, což je báze, která je schopná párování s jakýmkoliv nukleotidem. Firmy zabývající se syntézou oligonukleotidů dnes nabízejí i řadu nových degenerovaných bází (např. nitropyrrol, nitroindol aj.)

2.2.8 Využití PCR pro detekci mutací

Ve specifických případech může být pomocí PCR přímo stanoven polymorfismus DNA (různá délka amplifikovaného produktu vlivem delecí). Bylo vyvinuto mnoho modifikací PCR, které umožňují detailní studium sekvencí DNA. Např. alelově specifická PCR (AS-PCR) probíhá pouze s primerem o sekvenci unikátní pro

příslušnou variantu genu. Speciální varianty PCR, jako AFLP a RAPD jsou popsány níže.

Pro další analýzy mutací, případně polymorfizmů (a to buď v celé genomové DNA, nebo jen v získaném PCR fragmentu) je možné využít další metody, jako např. PCR-RFLP, SSCP, DGGE (+ odvozené metody CDGE, TTGE, TGGE) a sekvencování.

2.3 AFLP

Metoda AFLP (amplified fragment length polymorphisms) je založena na detekci DNA restrikčních fragmentů pomocí PCR amplifikace. Amplifikace restrikčních fragmentů je založena na ligaci ds adaptorových sekvencí na konec restrikčního místa, což slouží jako „univerzální“ vazebné místo pro primery při PCR.

Adaptor: syntetizovaný fragment ds DNA, obsahuje úsek pro vazbu AFLP primeru a část restrikčního místa (tzv. „half – site“)

AFLP primer: obsahuje sekvenci pro vazbu na adaptor, restrikční místo a 1-3 selektivní báze na 3'konci. Počet selektivních bází udává počet amplifikovaných fragmentů.

Selektivní báze: báze nukleotidů, jsou různé u fragmentů. Amplifikují se jen ty fragmenty, co mají tyto báze komplementární k bázím v primeru (selektce fragmentů)

Postup analýzy

1. Štěpení genomové DNA restrikční endonukleázou
2. Ligace adaptorů ke koncům štěpů (připojení pomocí DNA ligázy)
3. PCR (selektivní)
4. Analýza fragmentů na gelu (PAGE)

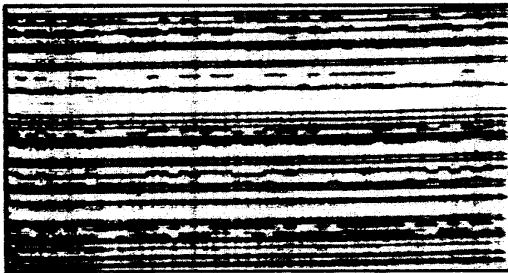
Pomocí metody se detekuje polymorfismus v délce fragmentů, v restrikčním místě nebo v místě selektivních bází. Typický AFLP fingerprint obsahuje 50-100 amplifikovaných restrikčních fragmentů, z čehož až 80% lze využít jako markery.

U velkých, hodně komplexních genomů (savci) se používají 2 různé restriktázy (hojně štěpící + vzácně štěpící) a preamplifikace (PCR) s neselektivními primery (bez selektivních bází), která slouží k prvnímu namnožení DNA před následnou selektivní PCR.

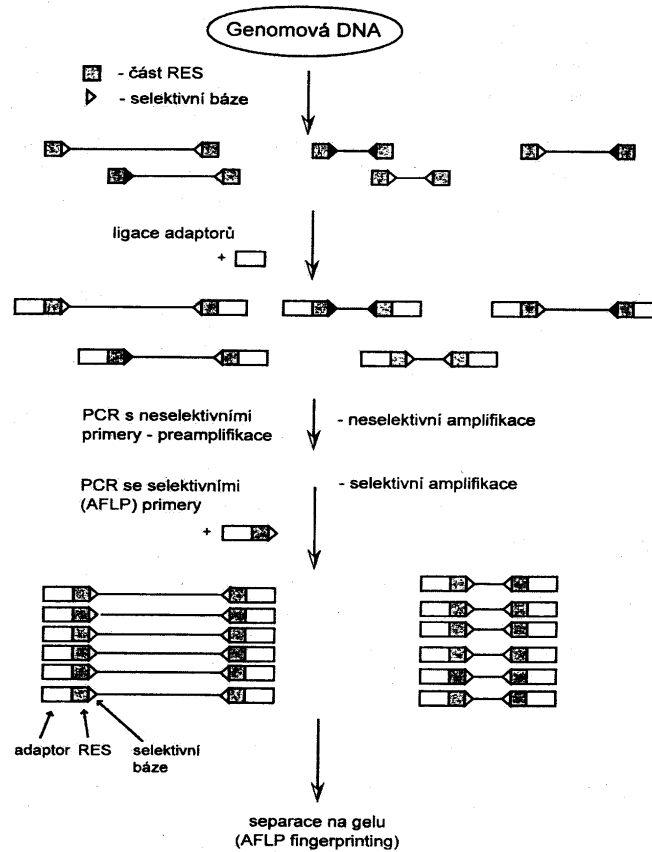
Výhody a využití AFLP:

- a) Není nutné znát sekvenci zkoumané DNA. To je vhodné při studiu biodiverzity a genetických vzdáleností.
- b) AFLP lze odečítat kodominantně, proto se hodí na genetické mapování
- c) Vykazuje vysokou hustotu markerů, vhodné pro poziční klonování
- d) Pomocí AFLP markerů lze provádět zároveň srovnání celkové genomové DNA i klonů genomové DNA včetně tvorby „transkripčních profilů“ při expresní analýze.

Využití metody je především při studiu rostlinných genomů.



Obr. 9. Ukázka fingerprintingu pomocí AFLP.



Obr. 10. Schéma AFLP analýzy.

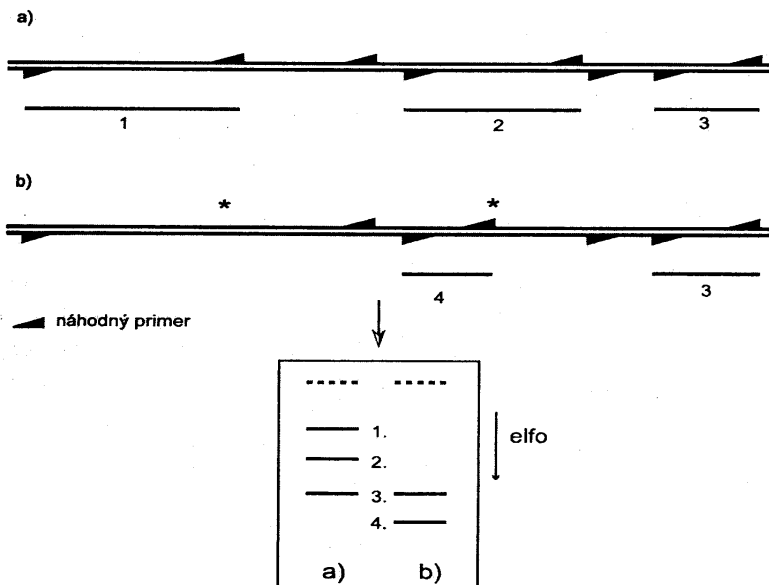
2.4 RAPD

Metoda RAPD (random amplified polymorphic DNA - náhodně amplifikovaná polymorfní DNA), stejně jako podobná metoda označovaná AP-PCR (arbitrarily primed PCR), je metoda pro tvorbu genomového fingerprintu u druhů, kde je málo známo o sekvenci, kterou budeme amplifikovat. K zahájení PCR se používá krátký málo specifický oligonukleotid (obvykle 10NT), který se váže na příslušná místa amplifikované DNA.

V některých modifikacích se první dva cykly provádějí s jedním krátkým náhodným primerem za nízké stringence a další cykly se specifickými primery za vyšší stringence. Vzniká řada PCR fragmentů, které jsou separovány agarózovou gelovou elektroforézou a vizualizovány ethidiumbromidem. Jednotliví jedinci (populace) se odlišují přítomností jednotlivých fragmentů, podle toho, kde na DNA primer našel homologní místa, což je právě důsledek polymorfizmu DNA.

Pro získání reprodukovatelných výsledků jsou kritické především tyto faktory: přesná optimalizace koncentrace DNA, reprodukovatelnosti cyklu, kvalita a koncentrace primerů, koncentrace Mg^{2+} , výběr DNA polymerázy a přesnost pipetování.

RAPD vykazují vysoký stupeň polymorfizmu, a proto mohou být genetickými markery pro tvorbu genetických map, mapování QTL, fingerprinting, měření genetických vzdáleností mezi populacemi atp. RAPD mají dominantní charakter, a proto nelze odlišit hetero- a homozygotní genotyp. Hlavní výhodou metody jsou nízké náklady a malá pracnost.



Obr. 11. Schéma RAPD: Rozdílné nasedání primeru u dvou jedinců a) nepřítomnost amplifikace fragmentu 1, b) amplifikace fragmentů o rozdílné velikosti (2. – 4.). Výsledek je zřetelný z agarózové gelové elektroforézy.

2.5 PCR v reálném čase (real-time PCR)

Moderní metoda umožňující sledování průběhu PCR v reálném čase na základě sledování intenzity fluorescenčního signálu.

Použití:

1. Kvantitativní PCR v reálném čase: pro kvantifikaci genomové DNA (např. viry, GMO) nebo mRNA (studium exprese).
2. Analýza bodu tání produktu (melting analysis) – pro ověření identity a kvality produktu (amplifikátu)
3. Genotypizace: přímé stanovení genotypu (pomocí analýzy bodu tání nebo hybridizačního systému)

Používá se řada metod pro detekci:

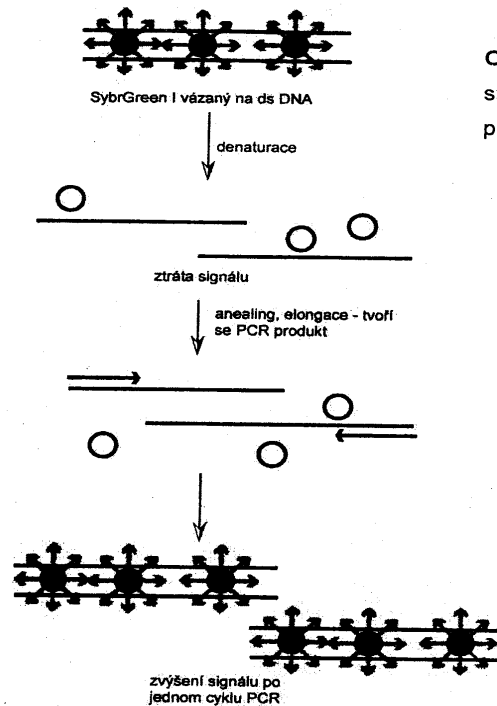
a) SybrGreen I: detekuje jen dsDNA, není sekvenčně specifické a neumožňuje multiplex. Umožňuje kvantifikaci templátu a identifikaci produktů (analýza bodu tání produktu). Principem je to, že SybrGreen I dává fluorescenční signál pouze ve spojení s dsDNA, a proto v průběhu nárůstu množství PCR produktu (dsDNA) dochází i k růstu signálu.

d) hybridizační sondy: používají se 2 sekvenčně specifické sondy umístěné těsně vedle sebe tak, že na svých přilehlých koncích mají fluorescenční značky, které v případě, že jsou ve své blízkosti, vytváří signál detekovatelný přístrojem. Čím více je specifického PCR produktu, tím vyšší je tento signál.

b) hydrolyzační sondy TaqMan: V systému je přítomna sonda značená dvěma molekulami: *reporterem*, který vydává fluorescenční záření a *zhášečem* (quencher), který je schopen zhášet záření vydávané reporterem, je-li v jeho blízkosti. V průběhu PCR dochází vlivem exonukleázové aktivity *Taq* polymerázy k odbourávání navázané sondy, a tím odstranění blokace reporteru zhášečem – výsledkem je růst signálu v závislosti na růstu množství PCR produktu.

c) molecular beacons , FRET a další.

Na provádění real-time PCR je třeba speciální typ cykleru, který kromě cyklování umí odečítat intenzitu fluorescence ve vzorku a obsahuje řídicí i vyhodnocovací jednotku (počítač): nejpoužívanější značky jsou LightCycler, řada ABI PRISM a iCycler.

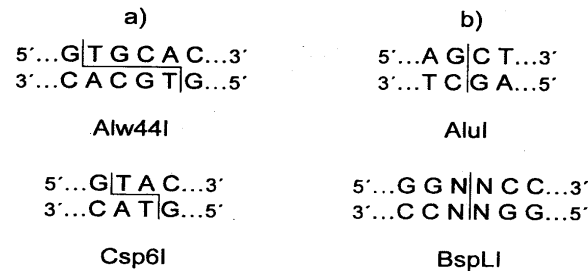


Obr. 12. Zvýšení fluorescenčního signálu po jednom cyklu PCR při použití systému chemie SybrGreen I.

2.6 RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

Pomocí polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP - restriction fragment length polymorphism) se identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického restrikčního místa. Genomová DNA je štěpena příslušnou restrikční endonukleázou, separována elektroforézou na agarózovém gelu a přenesena (blotována) na pevnou membránu pomocí tzv. Southernova přenosu (Southern, 1975). Po hybridizaci se značenou sondou a vizualizací lze zjistit polymorfismus ve velikosti vzniklých restrikčních fragmentů DNA. Velkou výhodou metody RFLP je, že je schopna identifikovat polymorfismus i uvnitř markerů typu I, když je jako sonda použita komplementární DNA (cDNA). Metoda je vhodná pro vazbové i komparativní mapování a odhalení variability v kandidátních genech pro ekonomicky významné znaky. Vzhledem k relativní pracnosti metody se dnes dává přednost její modifikaci vzniklé spojením s PCR (PCR-RFLP).

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které se specificky vážou na DNA a štěpí ji ve specifických místech nacházejících se uvnitř, nebo blízko rozpoznávací sekvence. Tyto enzymy jsou rozděleny do tří skupin: endonukleázy typu I, II a III. Endonukleázy typu I a III nemají přesnou polohu štěpení vzhledem k rozpoznávací sekvenci a proto se běžně nepoužívají. V molekulární genetice se používají endonukleázy typu II, které štěpí vždy ve stejném místě, které se nachází v rozpoznávací sekvenci a nebo v její těsné blízkosti. Rozpoznávací sekvence jsou dlouhé čtyři, pět, nebo šest nukleotidů a jsou oboustranně symetrické (palindrom). Je jich známo kolem 3000 a tvoří 250 různých restrikčních míst. Některé restrikční endonukleázy mohou mít i delší nebo degenerované rozpoznávací sekvence (rozpoznávají více různých nukleotidů). Restrikční enzymy štěpí DNA dvěma způsoby: rozštěpí obě vlákna ve stejném místě (tvoří tzv. tupé konce, obr. 4b), a nebo štěpí každé vlákno v jiné poloze (tvoří tzv. kohezní konce, obr 4a).

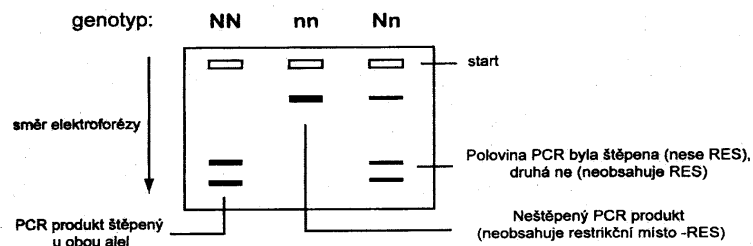


Obr. 4. Příklad rozpoznávacích sekvencí a místa štěpení restrikčních endonukleáz a) vznik kohezních konců u sekvence palindromu (*Alw44I*, *Csp6I*) b) vznik tupých konců u sekvence palindromu (*AluI*, *BspLI*),

2.7 PCR-RFLP

Pomocí PCR se na základě genomové DNA amplifikuje specifická sekvence (např. úsek genu). Tento fragment DNA se štěpí panelem restrikčních endonukleáz. V případě bodové mutace v restrikčním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém gelu. Vizualizace DNA se provádí pomocí ethidiumbromidu (příp. méně toxickým SYBR Green®). Výhodou metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že

pravděpodobnost detekce mutace (polymorfizmu) je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů. Metoda je vhodná pro geny s větším polymorfizmem nebo nekódující sekvence (analýzy intronů). Vysoké účinnosti lze dosáhnout kombinací se sekvenováním daného PCR produktu a následným vyhledáním vhodného restrikčního enzymu pro rutinní testování v populaci zvířat. Pomocí tohoto postupu lze určit i přesnou lokalizaci polymorfního místa a jeho případný vliv na záměnu aminokyseliny v polypeptidu.



Obr. 5. Schéma elektroforézy při PCR-RFLP analýze genu *RYR1* pomocí restrikční endonukleázy *HhaI*.

2.8 SSCP (konformační polymorfismus jednořetězcové DNA)

Metoda založená na konformačním polymorfizmu jednotlivých řetězců DNA (SSCP - single strand conformation polymorphism) byla popsána v roce 1989. Vzorek (produkt PCR) se nanáší po denaturaci na nedenační polyakrylamidový gel. Jednořetězcová DNA v tomto prostředí získává v závislosti na složení nukleotidů určitou specifickou konformaci, která ovlivňuje mobilitu DNA v gelu. To umožňuje separaci vláken DNA lišících se jedním nebo více nukleotidy. Konformační stav molekuly DNA je silně závislý na podmínkách elektroforézy, k nimž patří hlavně teplota gelu (3-30°C), koncentrace elektroforetického pufru a jeho pH, koncentrace některých činidel v gelu, jako je glycerol (0-10%) a mnoho dalších. Výhodou je jednoduchost a mnohostrannost metody. Po optimalizaci je schopna detekovat mutaci s 90% spolehlivostí, v případě, že tato neleží v okrajových částech (cca 50bp) fragmentu. Nevýhodou je možnost využití jen pro kratší fragmenty, asi 100-200bp a nutnost přesné optimalizace podmínek elektroforézy. Vizualizace fragmentů se provádí nejčastěji autoradiograficky nebo barvením stříbrem.

Při analýze dlouhých fragmentů DNA (až 9kb) je nutno nejdříve PCR produkt štěpit jednou nebo několika restrikčními endonukleázami, a potom analyzovat směs fragmentů pomocí SSCP (např. REF - restriction endonuclease fingerprinting). Toto je velmi účinná technika na vyhledávání polymorfizmů i vzácných mutací.

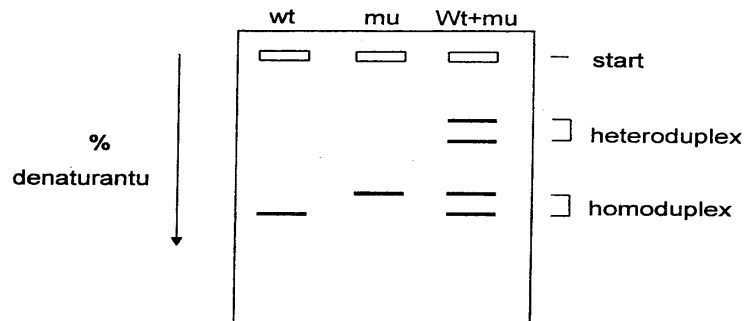
2.9 DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza)

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE - denaturing gradient gel electrophoresis) je metoda pro detekci jednonukleotidových záměn v DNA. Základem je polyakrylamidový gel s lineárním gradientem denaturačních činidel (obvykle močovina + formamid), např. 30-70%. Na gel se nanáší PCR produkt o velikosti 150-1000bp v nedenaturovaném stavu. Separace fragmentů je založena na rozdílné mobilitě fragmentů při různém stupni denaturace dvoušroubovice DNA za konstantní teploty gelu (50-65°C). Molekula s obsahem páru bází o nižší energii je dříve částečně denaturována a tím se i pohybuje v gelu pomaleji než DNA se stabilnějším párem bází. Proto tato metoda umožňuje detekovat i záměny jednoho páru báze (bodové mutace). Vlivem spontánní tvorby heteroduplexů během PCR se heterozygoti vyznačují přítomností fragmentů, které se při elektroforéze silně zpožďují. Zvýšení citlivosti metody lze dosáhnout přidáním G,C konce k jednomu z primerů.

Využívá se dvou typů gradientových gelů:

Perpendikulární gradient: Vzorky putují v gelu kolmo na směr gradientu denaturantu. Výsledkem elektroforézy je sinusoida DNA znázorňující denaturační profil, z kterého lze odečíst koncentraci denaturantu, při které dochází k účinné separaci polymorfních fragmentů DNA. Slouží k vyhledávání nových polymorfizmů a stanovení optimálních podmínek pro separaci na paralelních gelech nebo k přesnému určení koncentrace denaturantu pro CDGE (elektroforéza při konstantní koncentraci denaturantu).

Paralelní gradient: Vzorky v gelu putují po směru gradientu denaturantu, v určitém místě se dostanou do prostředí, ve kterém dojde ke změně mobility fragmentů a jejich rozdělení. Slouží k vyhledávání polymorfizmů i rutinnímu testování.



Obr. 6. Schéma separace v paralelním gradientu DGGE. Standardní alela (wt), mutantní alela (mut) a heterozygot pro tyto alely (wt+mut). Heteroduplexní molekuly vykazují sníženou mobilitu.

Výhodou metody je relativně vysoká pravděpodobnost detekce mutace, možnost vizualizace ethidiumbromidem a to, že řetězce nejsou plně denaturovány, takže je lze po elektroforéze DNA izolovat a podrobit dalším analýzám (sekvenace apod.). Nevýhodou je vyšší pracnost přípravy gelů a náročnost na zařízení udržující konstantní teplotu gelu.

CC CC AB AC AA AB CC AC AC AA AC



Obr. 7. Příklad analýzy genotypů genu *MYOD1* pomocí paralelní DGGE. Heteroduplexy viditelné u heterozygotů AB a AC

2.10 CDGE

Gelová elektroforéza při konstantní koncentraci denaturantu (CDGE - constant denaturant gel electrophoresis) je metoda odvozená od DGGE. K separaci dochází při optimální konstantní koncentraci denaturantů. Tento postup je vhodný pro rutinní testování polymorfizmu, protože není nutné vrstvit gradientový gel.

2.11 Metody založené na teplotním gradientu (TGGE, TTGE)

Kromě denaturačních činidel lze částečné nebo úplné denaturace molekuly DNA dosáhnout teplotou. Při elektroforéze v teplotním gradientu je koncentrace denaturantu konstantní v celém gelu, ale mění se stupňovitě teplota - vzniká lineární teplotní gradient. Podobně jako u DGGE, při určité teplotě gelu dojde k částečné sekvenčně specifické denuraci domén DNA a tím k oddělení polymorfních fragmentů. Výhodou je, že není nutno vrstvit gradient denaturantů.

Podle způsobu zajištění teplotního gradientu lze rozlišit dvě metody:

a/ **TTGE** - temporal temperature gradient electrophoresis - teplota se postupně mění v průběhu elektroforézy v celém gelu

b/ **TGGE** - thermal gradient gel electrophoresis - teplotní gradient je tvořen přímo pomocí stupňovitě zahříváné plotny, na které gel leží.

2.12 Heteroduplexní analýza

Heteroduplexní analýza (HA) využívá konformačních změn v dsDNA. Heteroduplexní molekuly jsou složeny ze dvou rozdílných řetězců a jsou detekovatelné na polyakrylamidovém gelu díky své výrazně nižší mobilitě. Heteroduplexy se mohou tvořit a) během PCR u vzorku heterozygota, b) smícháním obou homozygotů před PCR, nebo c) záměrně smícháním obou typů po PCR a jejich denurací a následnou renaturací. Citlivost detekce 80-90% u malých fragmentů (<300 pb) může být zvýšena ve spojení s SSCP. Byly také vyvinuty polyakrylamidové analogy (MDETM, DEMTM) pro zvýšení citlivosti oproti klasickým PAGE gelům.

Variantou HA je **CSGE** (conformation sensitive gel electrophoresis), kde se zvyšuje citlivost detekce jednoho nesprávně spárovaného páru nukleotidů. Používá se 6-10% polyakrylamid (PAA) (99:1), tris-aurinový pufr, 10% ethylenglykol a 15% formamid. Pro zvětšení poréznosti gelu se přidává bis (akryloyl) piperazin (BAP) nebo piperazin-diakrylamid (PDE) místo bis-akrylamidu. V takovém gelu lze detekovat mutace ve fragmentu 300-800bp. Existují další úpravy ve složení gelu pro zvýšení citlivosti.

2.13 Sekvencování

Sekvencování je metoda, při které se stanovuje přímo sekvence nukleotidů DNA. Chemická metoda založená na degradaci řetězce chemickými činidly (Maxam a Gilbert, 1977), které odbourají řetězec po specifický nukleotid, se dnes provádí již výjimečně. Většina sekvenačních metod je založena na enzymatické reakci (Sanger *et al.*, 1977). Do sekvenační reakce se dává směs normálních nukleotidů s modifikovanými nukleotidy - dideoxynukleotidy ddNTP (odděleně ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP), které nemají OH skupinu nutnou pro navázání dalšího nukleotidu. Jejich zařazením do řetězce DNA se reakce zastaví. Tak jsou získány fragmenty různé délky končící vždy příslušným ddNTP. Posloupnost bází se vyhodnocuje po separaci na polyakrylamidovém gelu nebo kapilární elektroforézou.

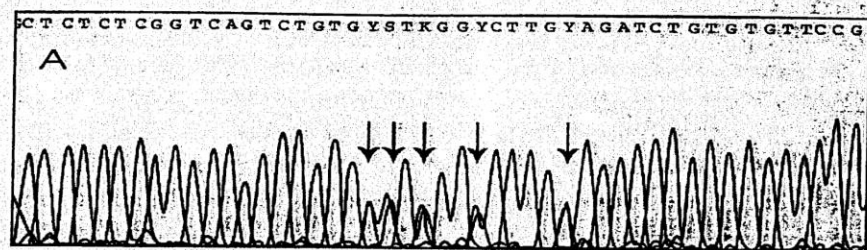
Reakce může probíhat buď klasickou cestou pomocí T7 DNA polymerázy nebo Klenowova fragmentu, nebo dnes především termální cyklickou metodou, při které se využívá teplotně stabilních polymeráz.

Značení při sekvenační reakci se provádí radioaktivně, stříbrem, chemiluminiscencí nebo fluorescenčně (pro autosekvencování) a to několika způsoby:

a) značení primeru od kterého se odvíjí sekvencovaná DNA, b) přímé značení sekvencovaných nukleotidů, c) přímé značení koncových nukleotidů. Při fluorescenčním značení je výhodné použít čtyři barvy (na každý ddNTP jinou), a tak je možné provádět jen jednu společnou sekvenační reakci.

Pro sekvencování se využívá (polo)automatických sekvenátorů vycházejících z klasické nebo termální cyklické reakce a založených na gelové nebo kapilární elektroforéze.

Sekvencování je dnes rutinní záležitostí a lze postupovat podle manuálů výrobců jednotlivých zařízení. Pro rutinní testování polymorfizmů je důležité zavedení metod pro sekvencování přímo na základě genomové DNA nebo PCR produktu (neklonovaného), kdy lze na základě jedné sekvenační reakce poznat i heterozygotní genotyp.



Obr. 8. Část výstupu z automatického sekvenátoru s označením potenciálně heterozygotních míst (jednotlivé nukleotidy jsou odlišeny barevně)

2.14 DNA array (DNA chips, biochips atp.)

DNA arrays jsou nejnovější biotechnologické techniky využívající dvou základních strukturních vlastností dvoušroubovicové DNA: sekvenční komplementarity a složení ze dvou řetězců. Základem je hybridizace značeného vzorku DNA k DNA o známé sekvenci. Výhodou přístupu je to, že lze zároveň provádět tuto hybridizaci na stovky až tisíce různých známých DNA a testovat tak velké množství genů obsažených ve vzorku.

Využití:

- pro studium exprese genů
- detekci SNP
- genotypování

Postup analýzy:

1. Izolace DNA nebo RNA
2. Značení – tvorba specifických sond
3. Hybridizace. Je kritickým místem metody, neboť podmínky hybridizace musí být optimální a reprodukovatelné, což může být při velkém počtu hybridizačních spotů obtížné. U komerčních sad výrobce homogenitu a konzistence teploty tání (T_m) zaručuje.
4. Sběr dat (CCD kamera)
5. Analýza software

DNA arrays se podle použití a metody odlišují na macroarray a microarray. Macroarray se provádějí na speciálních foliích velikosti např. 5 x 7, 8 x 12, 22x22 cm aj., využívají se pro screening knihoven. Značení se provádí fluorescenčně, chemiluminiscenčně i radiografií. Výhodou je, že není třeba speciální zařízení na odečet.

U microarrays se používají speciálně upravená sklička (např. na bázi silikonu) velikosti 2,5 x 7,6 cm a fluorescenční značení. Lze provádět větší počet analýz a přitom spotřeba vzorku i ostatních chemikálií je výrazně nižší než u macroarrays. Nákladné je však zařízení na odečítání (např. konfokální mikroskop s laserem). Konkrétní technologie se liší podle výrobců zařízení.

K vyhodnocení získaných dat je třeba použít speciální software dodávaný výrobcem zařízení. Na jednom čipu je již dnes dostatek místa pro všechny lidské geny. Vzhledem k množství získaných výsledků jsou možnosti hodnocení objektem studia bioinformatiky.

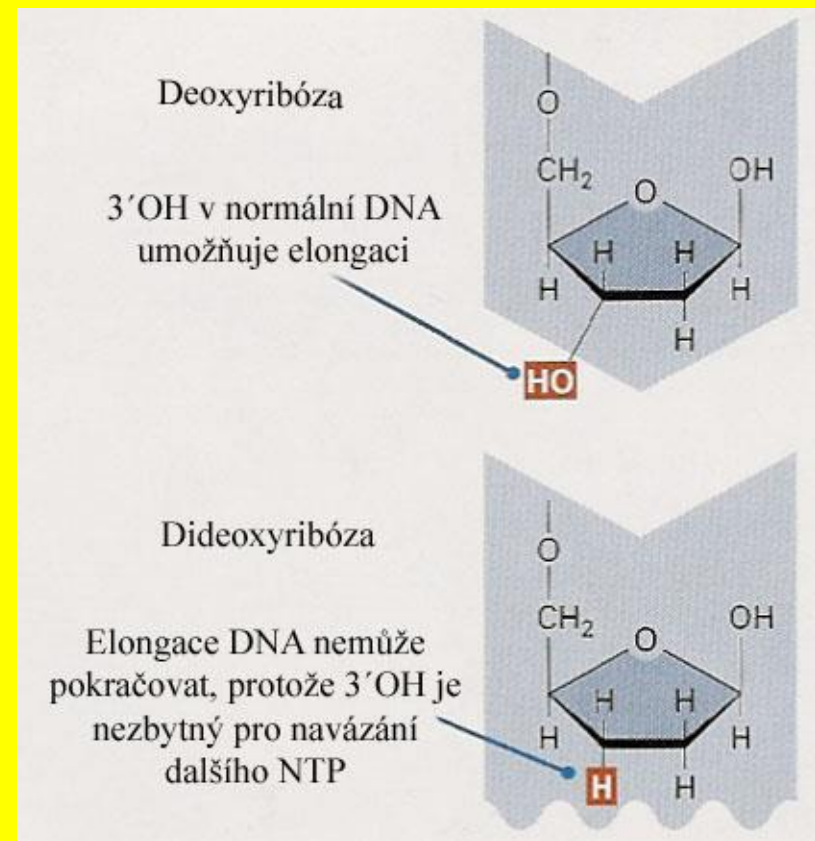
Pro tvorbu (tisk) arrays se používají více či méně automatizované přístroje. Hybridizační tečky (spoty) se tvoří nakapáváním sond, tj. jednotlivých cDNA nebo PCR produktů z cDNA knihovny nebo přímo syntézou oligonukleotidů (35-90 NT).

Aktivní biočipy:

Zvláštním typem DNA array jsou aktivní biočipy. Každá pracovní ploška přístroje je vodivě spojena se zdrojem napětí a tím lze ovládat jednak polaritu a výši napětí, ale i snímat jeho změny. To umožňuje lépe řídit hybridizaci. Počet testovaných míst pracovních plošek je zatím omezen (99), ale bude jistě v blízké budoucnosti narůstat (fa Nanogen). Výhodou je, že čip je opakovaně použitelný, tj. vložení záporného napětí lze molekuly vzorku odstranit, a to, že se snížila doba hybridizace na několik sekund.

Koncové terminátory

ddNTP - dideoxynukleosidtrifosfáty

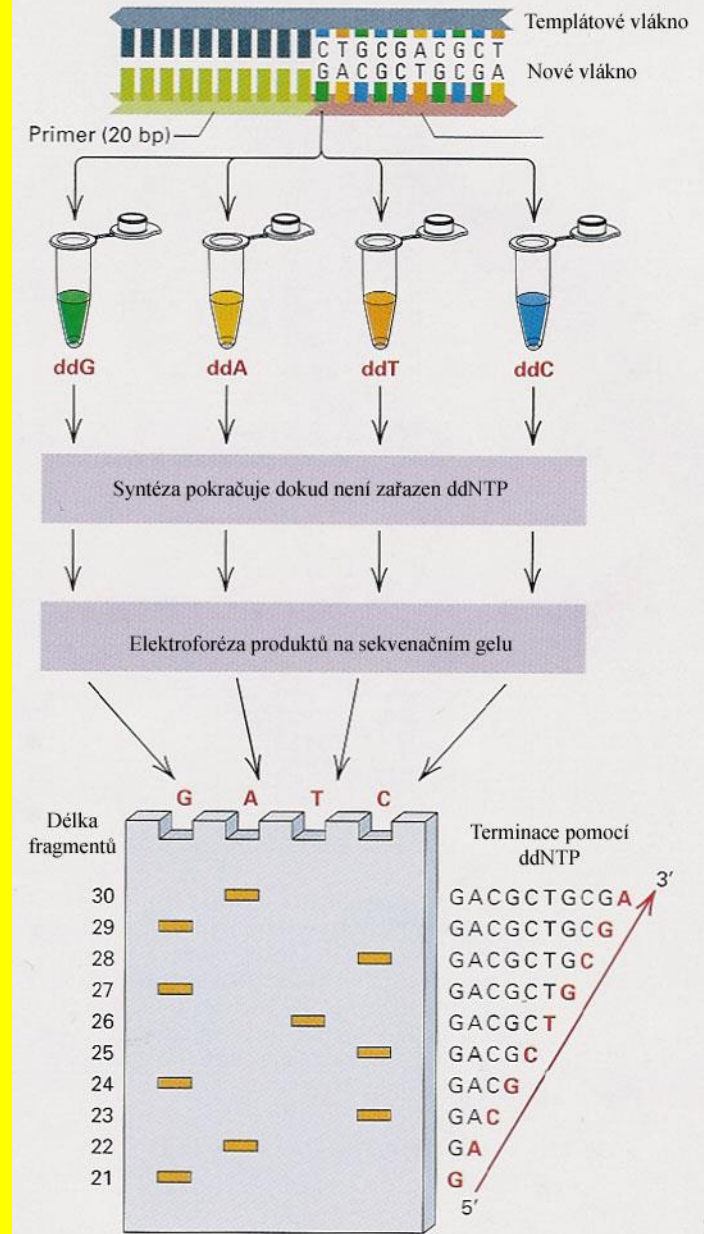
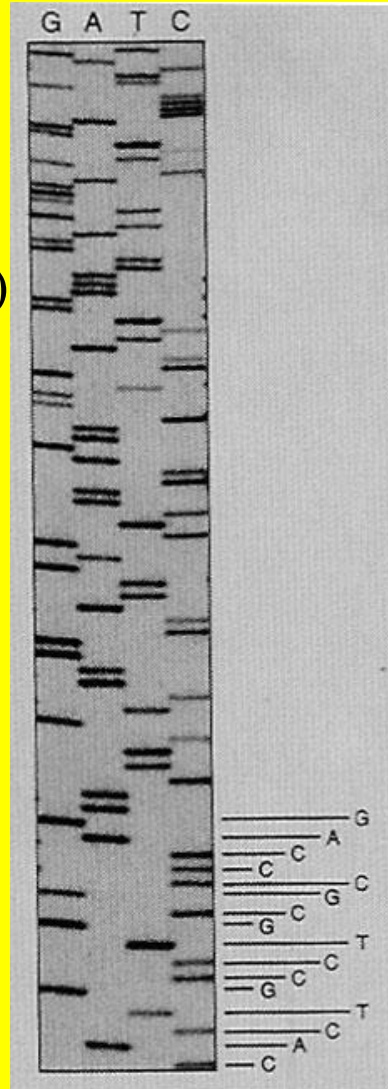


Terminátorové sekvenování jednobarevné

Značení jednobarevná
fluorescence (automatické sekv.)

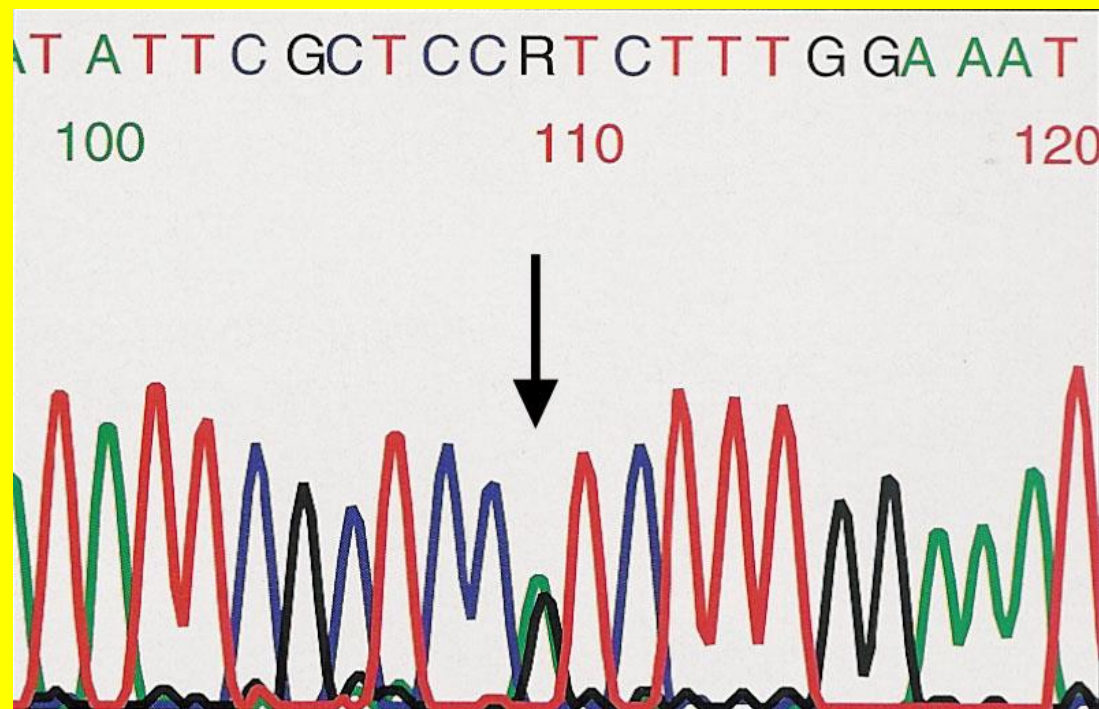
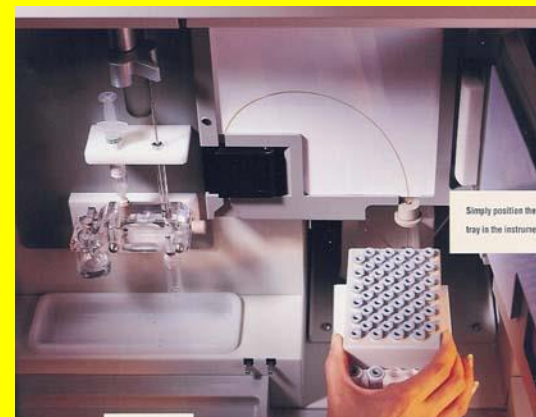
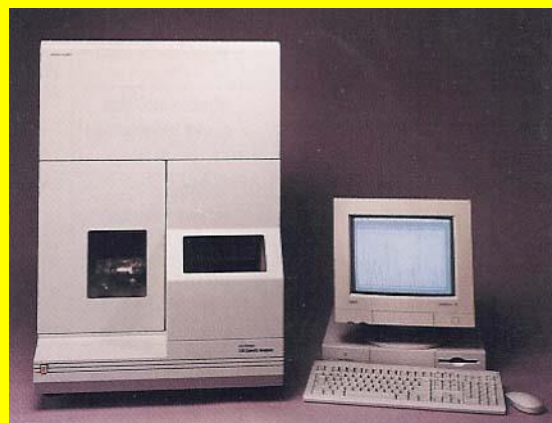
(manuální sekvenátory -
autoradiografie)

Vertikální polyakrylamidové
sekvenační gely



Terminátorové sekvenování - vícebarevné

- automatické
sekvenátory -
čtyřbarevná
fluorescence



- cyklická
sekvenační
reakce

- kapilární gelová
elektroforéza

Postup sekvenování

1. Příprava vzorku:

a) klonovaná DNA (vektor+zkoumaná DNA-inzert)

b) PCR produkt

1.1. Čištění vzorku (izolace z gelu)

1.2. Stanovení koncentrace DNA templátu

2. Sekvenační reakce - cyklická

primer (z vektoru n. PCR), polymeráza (Taq DNA FS,

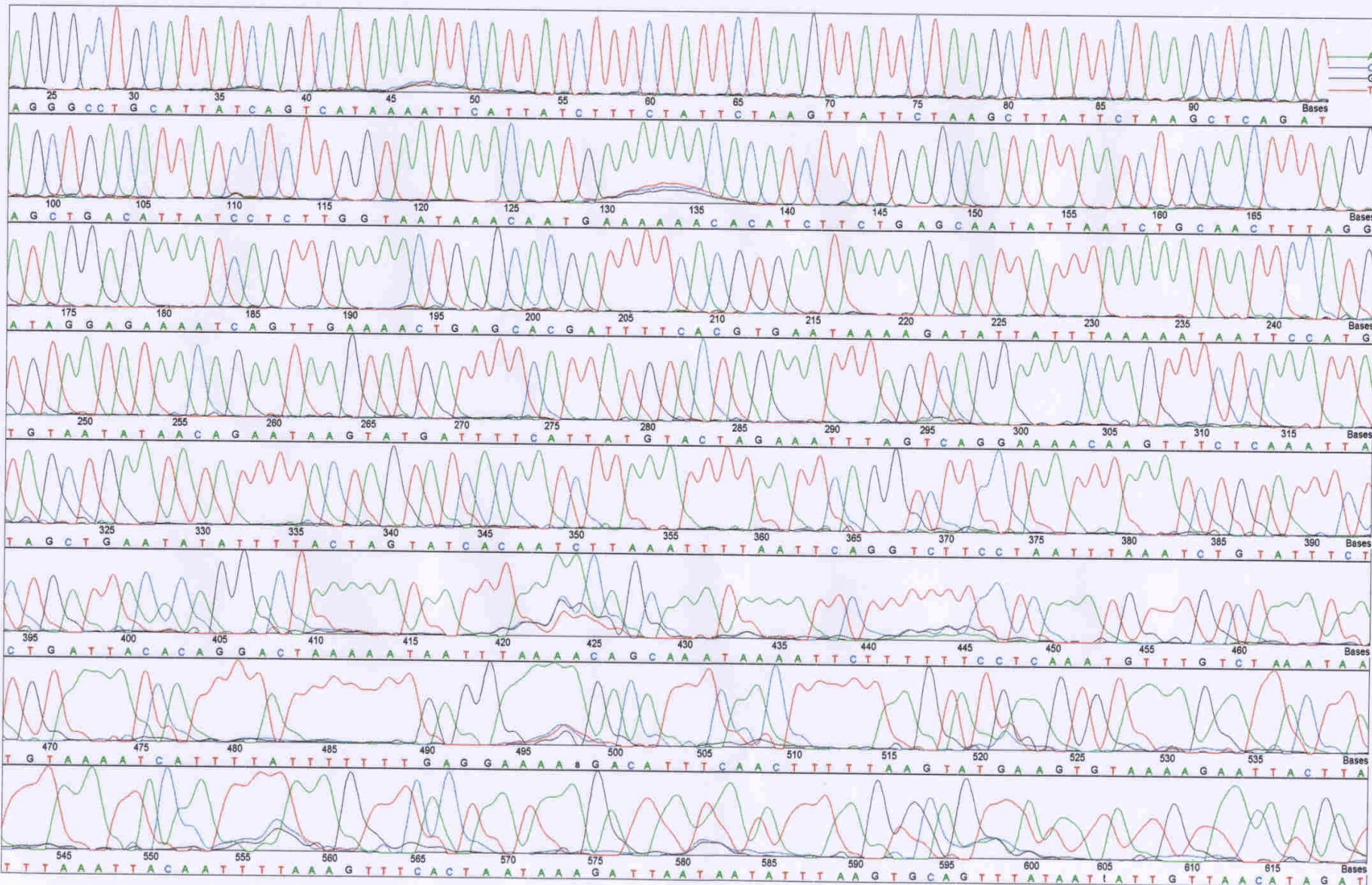
nemá 5'→3' exonukleázovou aktivitu), dNTP, značené ddNTP, pufr (+Mg²⁺)

3. Přechištění sekvenační směsi (EtOH+NaAc, kolony)

4. Elektroforéza na sekvenátoru

5. (Automatické) vyhodnocení - určení sekvence

File name	Current user	Current date	Page
MSTP-K2-R#06.alx	stratll	May 24, 2000 11:59	1
Clone name	Clone comment	Curve type	Time
Clone01-MSTP-K2-R		Proc/sep	01:27 - 08:44 [h:m]



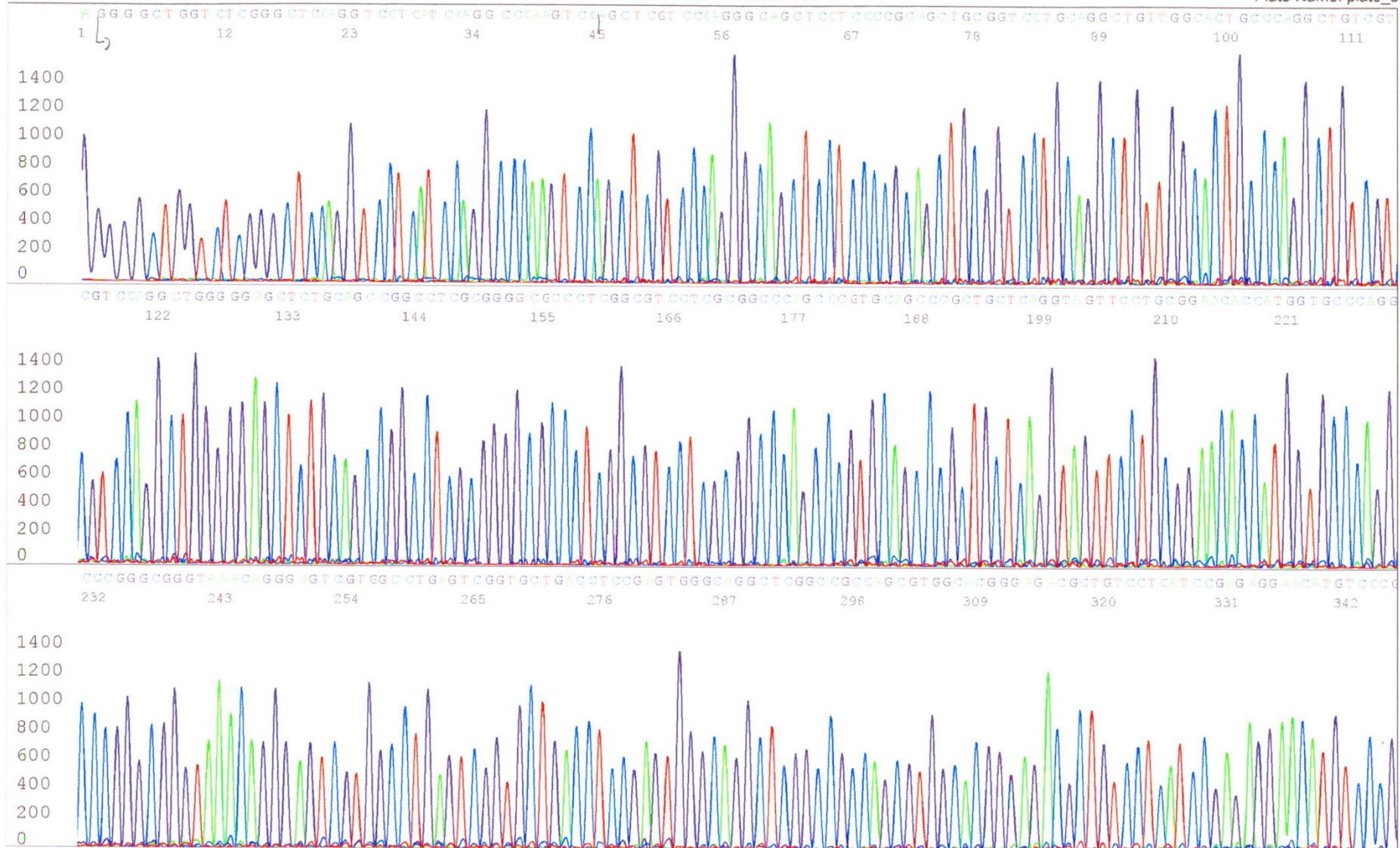
S/N G:109 A:65 T:108 C:116

KB.bcp

KB 1.1 Cap:2

3/CCX

40

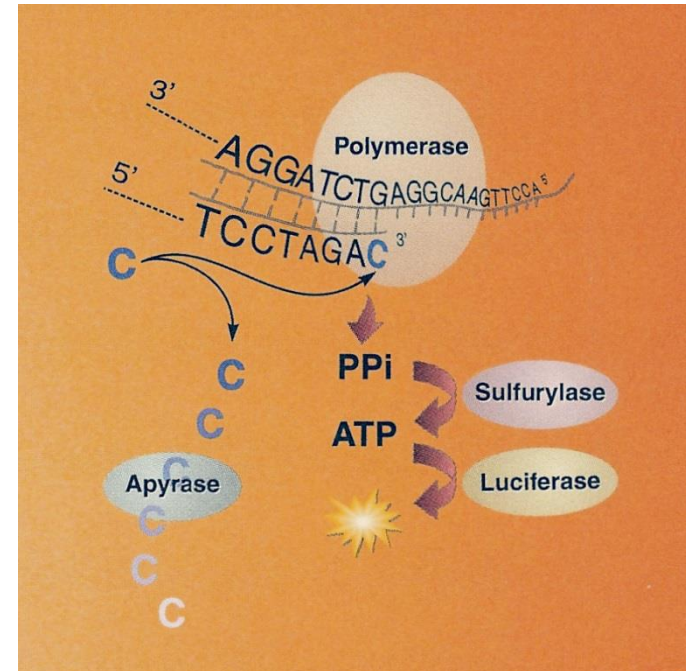
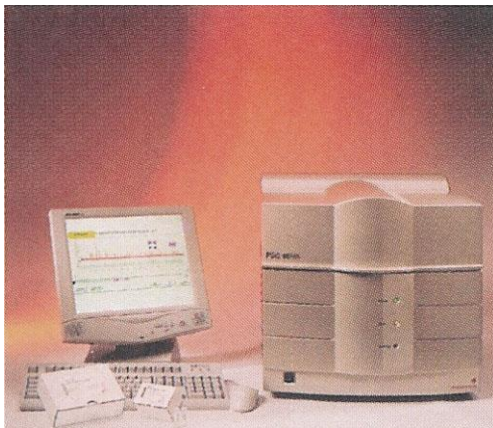


holes

k) Pyrosekvenování

(sekvenování při syntéze)

- sekvenování v reálném čase, bez nutnosti použití gelové elektroforézy
- probíhá paralelně (96 vzorků současně)
- využití:
 - detekce mutací (SNP)
 - kvantitativní stanovení (odhad frekvence alel)



Pyrosekvenování

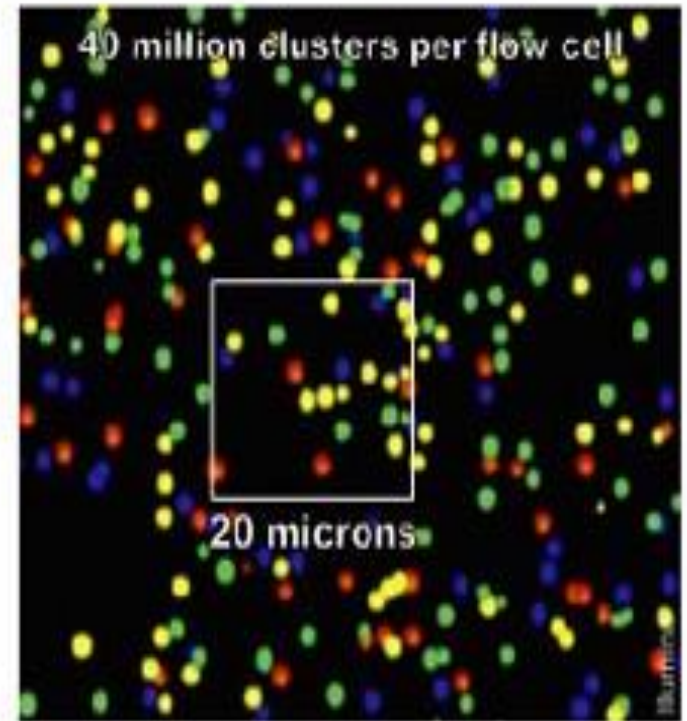
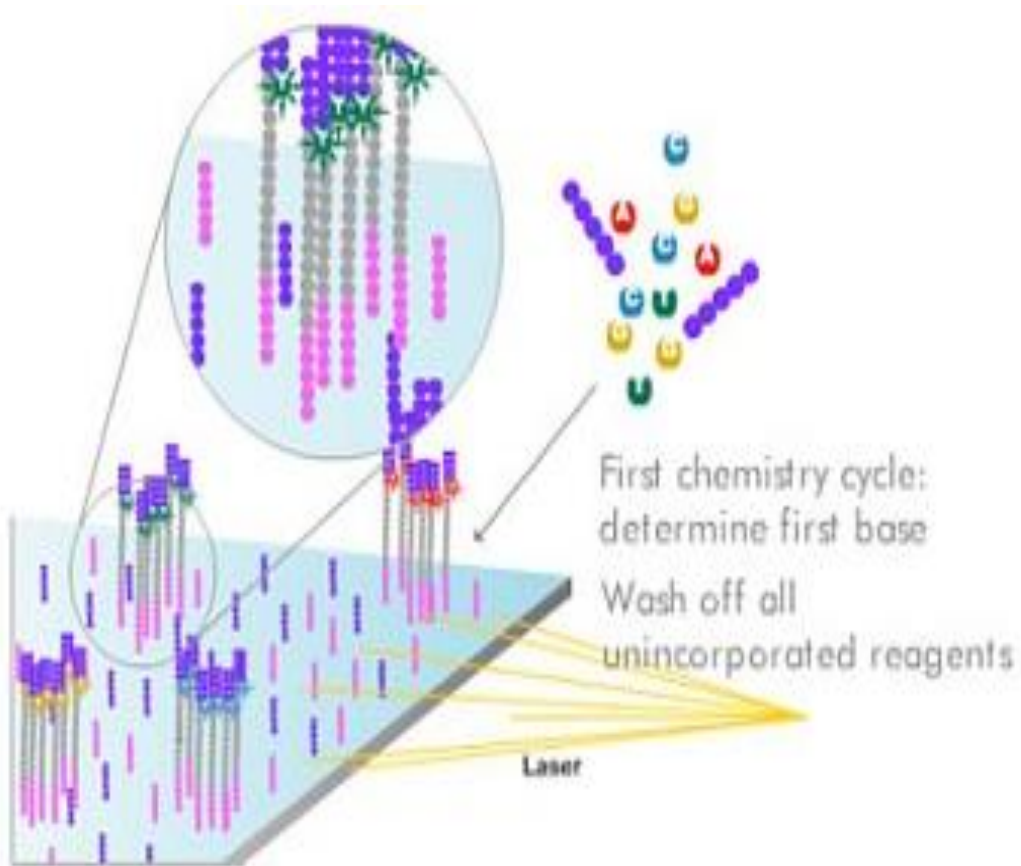
Pyrosekvenování (angl. *pyrosequencing*) je jedna z novějších metod sekvenování DNA. Je sice (podobně jako Sangerova metoda) založena také na syntéze nových sekvencí DNA, ale liší se způsobem, jak je detekováno začlenění daného nukleotidu (nevyžaduje elektroforézu). Pyrosekvenování vyvinul v roce 1996 ve Stockholmu profesor Pal Nyrén se svým studentem Mostafou Ronaghi.

Ve směsi pro pyrosekvenování musí být přítomno velké množství enzymů, mimo DNA polymerázy ještě **ATP sulfuryláza**, **luciferáza** a **apyráza**; ze substrátů pak **adenosinfosfosulfát** a **luciferin**. Do této směsi jsou postupně vkládány nukleotidy různých typů (**dATP**, **dGTP**, **dCTP**, **dTTP**). Když se po přidání jednoho z nich uvolní světelné záření, znamená to, že se do vznikajícího řetězce začlenil jeden nebo více nukleotidů tohoto typu. Toto světlo zde vzniká v důsledku enzymatické reakce, na jejímž začátku je uvolnění **pyrofosfátu** z nově začleněného nukleotidu a na jejímž konci je spotřeba vzniklého **ATP luciferázou** k oxidaci **luciferinu**.

NEXT GENERATION SEQUENCING - sekvenování nové generace

Principem, který umožňuje během jediné sekvenační reakce přečíst až stovky miliónů bazí, je ukotvení miliónů sekvenačních reakcí na čip (ne větší než několik cm) a simultánní detekce každé jednotlivé reakce pomocí velmi citlivých metod s obrovským rozlišením (zachycení miliónů signálů na ploše několika-centimetrového čipu). Na obrázku níže je příklad jednoho z přístupů, který zvolila firma Illumina - nejprve uchytí na skleněnou destičku - čip- milióny krátkých fragmentů DNA, kterou chce osekvenovat. Uchycení a tudíž rozmístění jednotlivých fragmentů je zcela náhodné. Každý fragment je na svém místě namnožen, což zvýší signál pro detekci, a poté je čip promýván fluorescenčně značenými nukleotidy, které jsou chemicky modifikovány tak, že se na komplementární DNA fragment naváže vždy jen jeden nukleotid (syntéza nepokračuje, dokud v dalším kroku nedojde k modifikaci, umožňující navázání dalšího nukleotidu). Po navázání nukleotidů citlivý detektor sejme obrázek jako je ten dole (malinký výřez, ve skutečnosti jsou tam milióny takových bodů), takže počítač ví, jaký konkrétní nukleotid ze 4 možných byl v kterém konkrétním místě v 1. kroku navázán. Pak pokračuje syntéza a po každém kroku je sejmut obraz. Počítač pak z těchto obrazů poskládá sekvenci každého jednotlivého fragmentu v daném místě, tudíž získá najednou sekvence miliónů fragmentů z jednoho malého čipu. Na základě překryvů (DNA je nafragmentována náhodně na malé kousky) ji pak poskládá do víceméně souvislé DNA (pokud původně šlo o souvislou DNA).

Next generation sequencing (sekvenování nové generace)



http://www.ebi.ac.uk/htbin/emblfetch - Microsoft Internet Explorer

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené Nástroje Nápověda Adresa http://www.ebi.ac.uk/htbin/emblfetch

Zpět Vpřed Zastavit Obnovit Domů Hledat Oblíbené Historie Pošta Tisk Upravit Diskuse

ID SSC297654 standard; DNA; MAM; 9843 BP.
XX
AC AJ297654;
XX
SV AJ297654.1
XX
DT 29-AUG-2000 (Rel. 64, Created)
DT 31-AUG-2000 (Rel. 64, Last updated, Version 2)
XX
DE Sus scrofa AACT2 gene for alpha-1-antichymotrypsin 2, exons 1-5
XX
KW AACT2 gene; alpha-1-antichymotrypsin 2; protease inhibitor.
XX
OS Sus scrofa (pig)
OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia;
OC Eutheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae; Sus.
XX
RN [1]
RP 1-9843
RA Stratil A.;
RT ;
RL Submitted (25-AUG-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Stratil A., Inst. Anim. Physiol. Genet, Acad. Sci. of the Czech Republ.,
RL Libechov, 277 21, CZECH REPUBLIC.
XX
RN [2]
RA Stratil A., Peelman L., Mattheeuws M.;
RT "The porcine alpha-1-antichymotrypsin 2 (AACT2) gene: nucleotide sequence,
RT genomic organization and polymorphism";
RL Unpublished.
yy

http://www.ebi.ac.uk/htbin/emblfetch - Microsoft Internet Explorer

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené Nástroje Nápoředa Adresa http://www.ebi.ac.uk/htbin/emblfetch

Zpět Vpřed Zastavit Obnovit Domů Hledat Oblíbené Historie Pošta Tisk Upravit Diskuse

Sequence 9843 BP; 2044 A; 2917 C; 2818 G; 2063 T; 1 other;

ggatccttaa	ccctctgagc	aaggctgggg	attgaaccgg	tgctctcatg	gatactagtc	60
gagttcgta	accactgaac	cacgacagga	actccctgga	gaatattttt	aaatagtcce	120
ctttccattg	gttgggtttc	tacatgatcc	tactgagga	taagataaac	aggcacaaaa	180
actaagagtc	tgttgctttt	tttttttttt	tttttttaaa	gaacaatagt	cagagccta	240
tttcagtgtc	tcttttgtat	attctgggtc	tctcggtgtt	cctcaatggg	ttttcataa	300
tcaaaagaaa	actctagcag	gaaaaagagt	ttgttagct	gtttccataa	ctatgttgtt	360
ccagtagata	taataaatgc	tgttaccaga	gatggtcatt	ggtcaggctc	agtctgaggt	420
cagaacactg	tgttgtcacc	acaacattt	cgcaagcagg	gaggggacct	ttgcagggat	480
aatgggcag	cggtcctgg	aaagcccagc	attgcccggc	ggcggcggt	ctgggtccac	540
tcagcgcac	ctgctctgcg	aggcaggtaa	gcctgatgc	tcccactcgg	ggacacaggg	600
gcccctttgc	tggaggttct	aggccttggc	ccggggccag	tggcacatgg	gcaggagggg	660
ggcaggagga	cctgtgtctg	atgctgggat	ggctctgtgc	cctctgagga	cctgtcctat	720
ctctggggct	cagttttcat	cctgcaaagg	gagggagctg	ccccagggct	ccgggtccc	780
ttcaggctct	gcctctgtgg	gattctgatt	tgagccagct	gtgtccccc	cgcagctgtg	840
cgccccctcc	cctgccaggg	ccagacctct	gagagggcca	cgaggtaggc	tccctacttg	900
gtacacggtg	atactcttgg	ggggccaagg	gaccagaatg	agggcaccag	gtccttctgg	960
gcaaagcccg	tggggtctcc	aggggcttcc	ctgggctcca	ctgtccctcc	agggctctgg	1020
gccaagcaga	gaggcagggtg	catctgtcca	gcaactgaaa	ggacagacc	tcagaaccac	1080
agccagcccc	ccaacctggc	ctaactggcca	cgggctattt	ctccaggaaa	aatgtggggg	1140
gaaaactctt	ttccaaagaa	atggttgcaa	cagccctgag	taactaaca	gttgggggag	1200
gagatcacct	ctgcctcag	cttatccaaa	ggcctttcca	ctggcctctg	caggagactc	1260
ggctccccctg	cctccccctc	ccctcccgcc	ctttttctc	ccctccccctc	ccctccccctc	1320
ccaccatcca	agcagccctt	tgctctctga	actctgagag	gagtgggcag	aggctgaagg	1380
ccaatggctc	tgtttgetga	ggtcaccagc	tctgacctca	gcctctcgca	ggttttcatg	1440
cagtagctct	gtccccgtt	cccaggaatc	agagtcttgt	cctgtcccag	aggtggagcc	1500
taggtggccc	tgctaggggt	tggaggaaa	tcccaggagg	ctagagtgtt	ctttccagcc	1560
cctgccaggt	gcccacatgg	tgggtgtccc	caccataagc	ctggaagggc	ctccaggtca	1620
gggggaagta	gctggctgca	ttctgaggg	tctgccttcc	agttgctgga	cagacgcacc	1680
tgctgtctg	cttggcccgg	ggtggcacat	ggaagaggtg	gcacatgaaa	ctcttcttac	1740
aaaccaggcg	ccctcatcat	ttctcctgtc	attcagcttg	ttggacagag	cggacacgtg	1800

Čtecí rámce genetického kódu

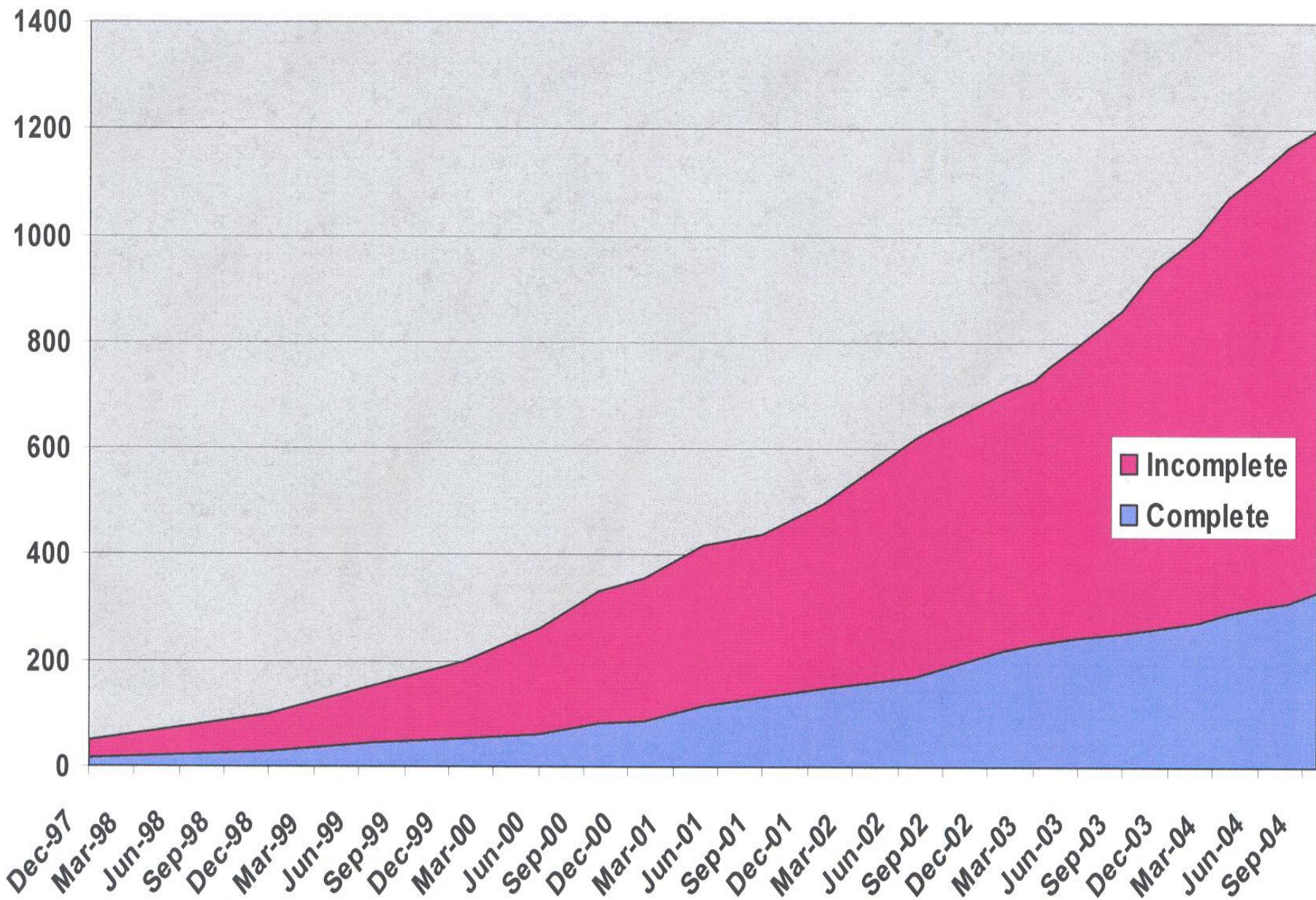
Untitled001	Sequence	GACTGAGGCC GTCCTGGTGA ATTACATTTA CTTTAAAGCC CAGTGGATGA CACACTTTGA
	Translate	D * E A R P G E L H L L * S P V D D T L * L R P S V * I T F T L K P S G * H T L I
Untitled001	Sequence	TCCCAACCTC ACTACGGAGG CAGATTTCTA CATGACCAAG AACAGGACCG TGAGCGTGCC
	Translate	S C P H Y G E R F L H E C E C D G E G A P N L T T E A D F Y M S K N R T V * R V P P T S L R R C I S T * A R T G R * G C P
Untitled001	Sequence	CATGATGGGC ATTAAGAACC TGACCGTGCC ATACTTCCGG GACGAGGAGC TGGCCTGCAC
	Translate	H D G H * E P D R A I L P G R E A G L H M N G I K N L T V P Y F R D E E L A C T * V' A L R T * P C H T S G T R S V' P A R
Untitled001	Sequence	GGTGGTGGAG CTCOCGTACA CCAGCAATGA CAGCACGCTT TTCATCCTCC CTGACGACGG
	Translate	G G G A P V H C C * C H A F H P P * R R V V E L P Y T S N D S T L F I L P D D G V' V' S S R T P A M T A R F S S S L T T A
Untitled001	Sequence	CAGGATGGCG GCCGTGAAG CCAAGCTGCT CCCCAGAGAG CTGAGAAGCT GGAGAGACTC
	Translate	C D G G R G S C A A P G D A E K V E R L R N A A V E A K L L P E T L R R W R D S G V' R P V' K P S C S R R R * E G G E T P
Untitled001	Sequence	CCTGCAGCCC ACGCGGATAG AAGCCCTCCA CCTGCCACGG TTTTCCATCT CCACCGACTA
	Translate	P A A Q A D R S P P P A T V F F H L C R L L C P R R I E A L H L P R F S I S S D Y C S P G G * K P S T C H G F P S P A T I
Untitled001	Sequence	TAAACTGCAG GAGATCCTTC CCCCCTCGG CATCCAGAAA ATCTTCACTG AGGACCTGA
	Translate	* T A G D P S P A G H P E N L C * G E * K L C E I L P R L G I C K I F S E E A D N C R R S F P G V' A S R K S S V R R L T
Untitled001	Sequence	CCTGTCAGGA ATCACAGATA CAACACCCCTT GTGTGTTTCC CAGGTGGTCC ACACCCCCCT
	Translate	P V R N H R Y N T L V C F P G G P C R R L S G I T D T T P L C V S C V V H S A V C C E S C I C H P C V F P R V' S T A P C

Historie sekvenování genomu

Table 1.1 Increases in sizes of genomes sequenced.

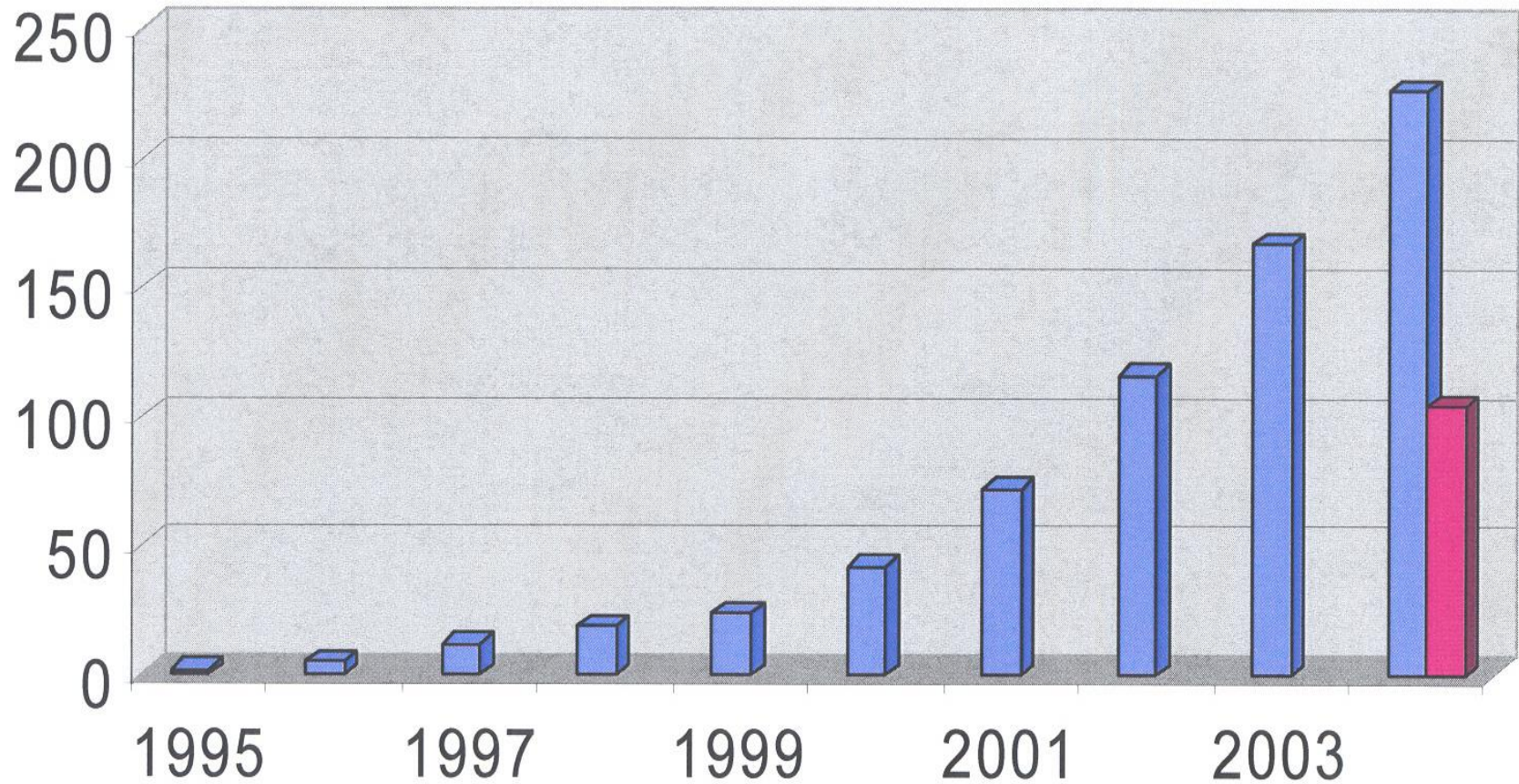
Genome sequenced	Year	Genome size	Comment
Bacteriophage ϕ X174	1977	5.38 kb	First genome sequenced
Plasmid pBR322	1979	4.3 kb	First plasmid sequenced
Bacteriophage λ	1982	48.5 kb	
Epstein-Barr virus	1984	172 kb	
Yeast chromosome III	1992	315 kb	First chromosome sequenced
<i>Haemophilus influenzae</i>	1995	1.8 Mb	First genome of cellular organism to be sequenced
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1996	12 Mb	First eukaryotic genome to be sequenced
<i>Ceanorhabditis elegans</i>	1998	97 Mb	First genome of multicellular organism to be sequenced
<i>Drosophila melanogaster</i>	2000	165 Mb	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2000	125 Mb	First plant genome to be sequenced
<i>Homo sapiens</i>	2001	3000 Mb	First mammalian genome to be sequenced
Rice (<i>Oryza sativa</i>)	2002	430 Mb	First crop plant to be sequenced
Pufferfish (<i>Fugu rubripes</i>)	2002	400 Mb	Smallest known vertebrate genome
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	2002/3	2700 Mb	Closest model organism to man

Genome Sequencing Projects on GOLD ©



Completely sequenced Genomes ©

October 2004

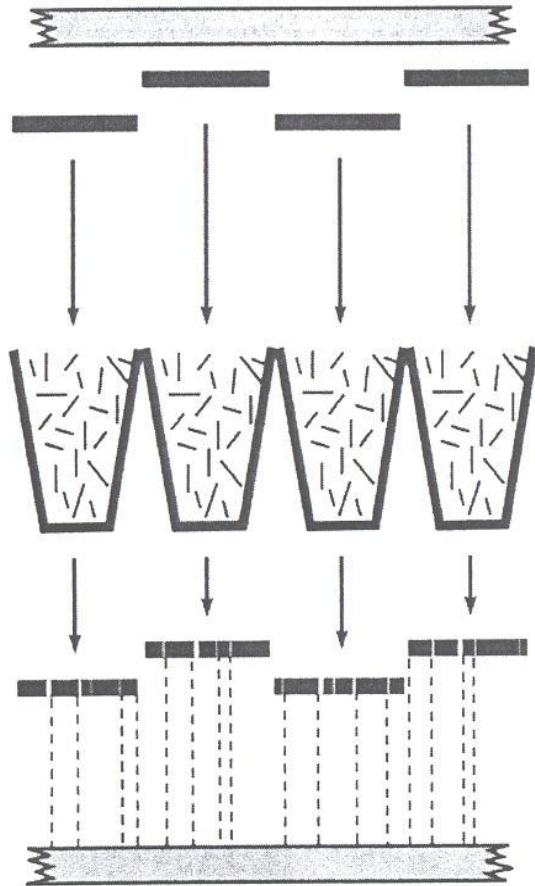


published unpublished

Strategie sekvenování genomů

Hierarchický „shotgun“

HIERARCHICAL SHOTGUN



Genome

Random Reads

Assembly

Anchoring

Genome Assembly

Celogenomový „shotgun“

WHOLE-GENOME SHOTGUN

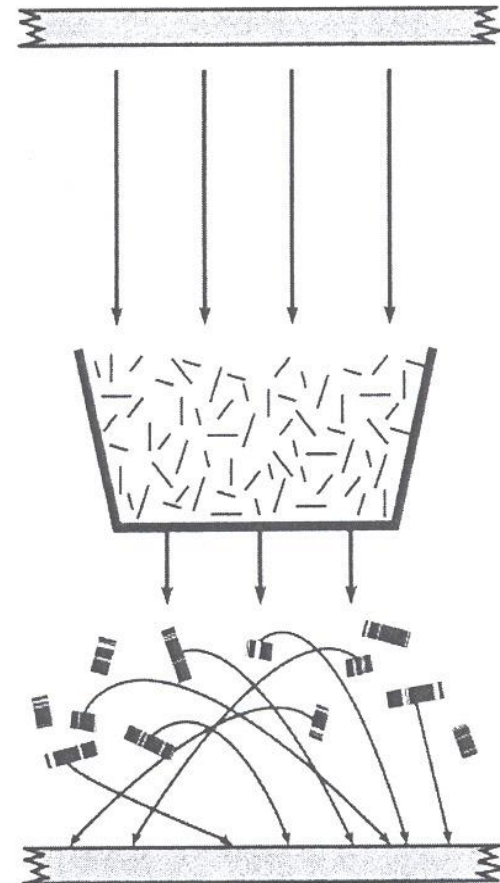


Fig. 1. Sequencing strategies. (Left) The hierarchical shotgun (HS) strategy involves decomposing the genome into a tiling path of overlapping BAC clones, performing shotgun sequencing on and reassembling each BAC, and then merging the sequences of adjacent clones. The method has the advantage that all sequence contigs and scaffolds derived from a BAC belong to a single compartment with respect to anchoring to the genome. (Right) Whole-genome shotgun (WGS) strategy involves performing shotgun sequencing on the entire genome and attempting to reassemble the entire collection. With the WGS method, each contig and scaffold is an independent component that must be anchored to the genome. In general, many scaffolds may not be anchored without directed efforts. (Contigs are contiguous blocks of sequence; scaffolds are sets of contigs joined by paired reads from both ends of a plasmid insert.)

Random versus perfect spacing in 100 kb

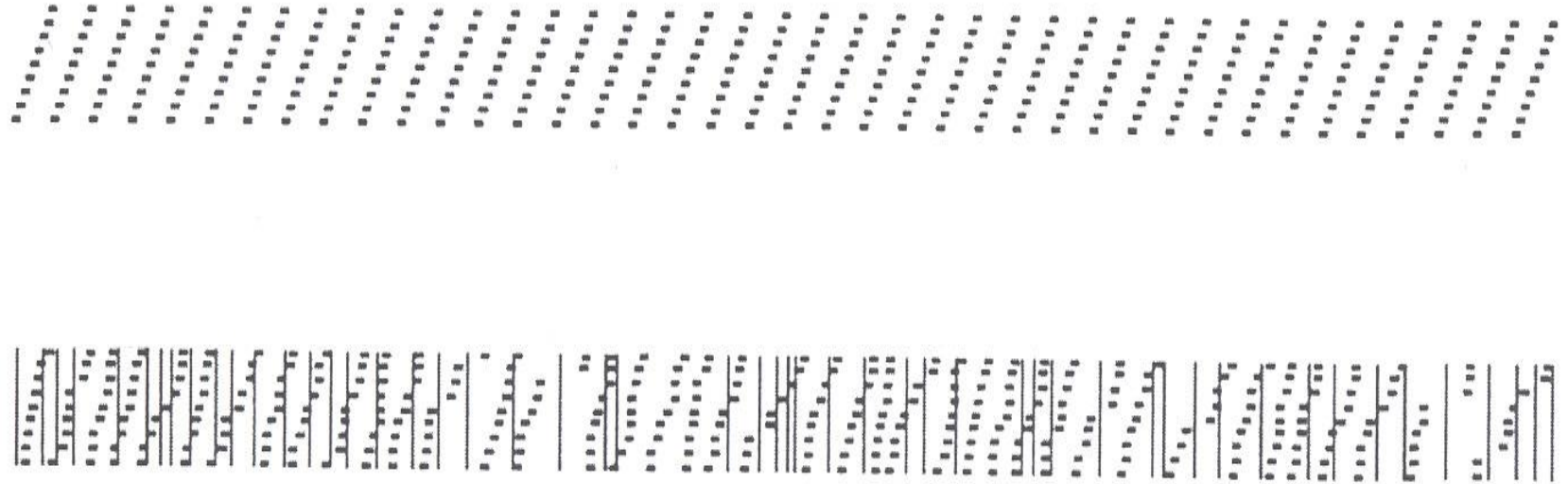


Fig. 2. Random vs. perfect spacing in 100 kb. (*Upper*) Two-fold coverage in perfectly spaced reads. (*Lower*) Two-fold coverage in randomly selected reads. There are frequent regions in which the adjacent reads either fail to overlap or the overlap is too small to allow reliable detection (< 40 bp). These breaks in continuity are indicated by vertical lines.

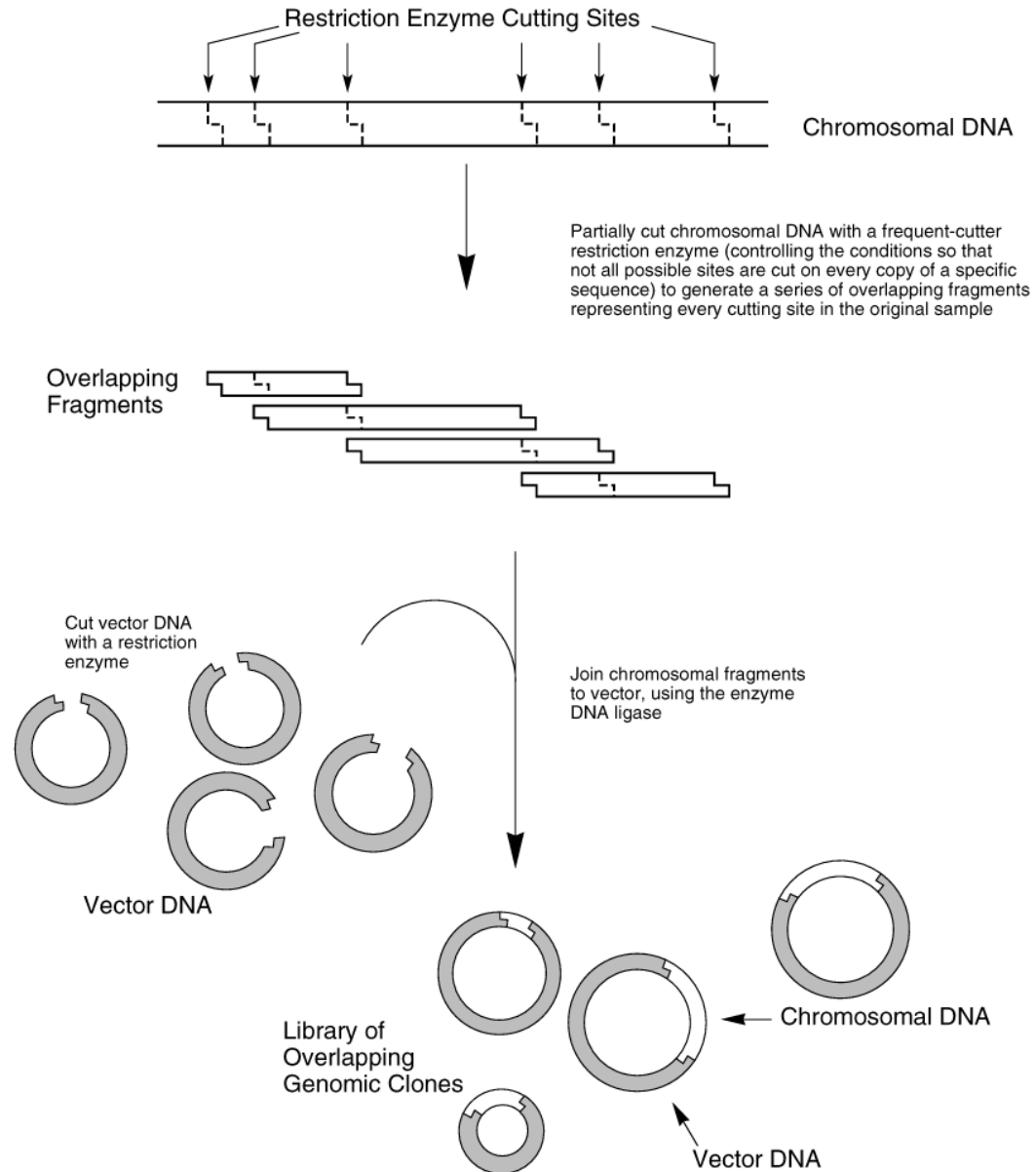
Východiska a strategie sekvenování genomů při využití hierarchického „shotgun“ sekvenování

- genetické (vazbové) mapování
(polymorfismus – geny, mikrosatelity aj.)
- cytogenetické mapování
- komparativní mapování
- mapování na radiačním hybridním panelu
- mapování EST (expressed sequence tags)
- využití STS (sequence tagged sites)
(PCR; hybridizace)
- BAC (PAC) knihovny
- BAC „fingerprinting“
- sekvenování konců BAC klonů

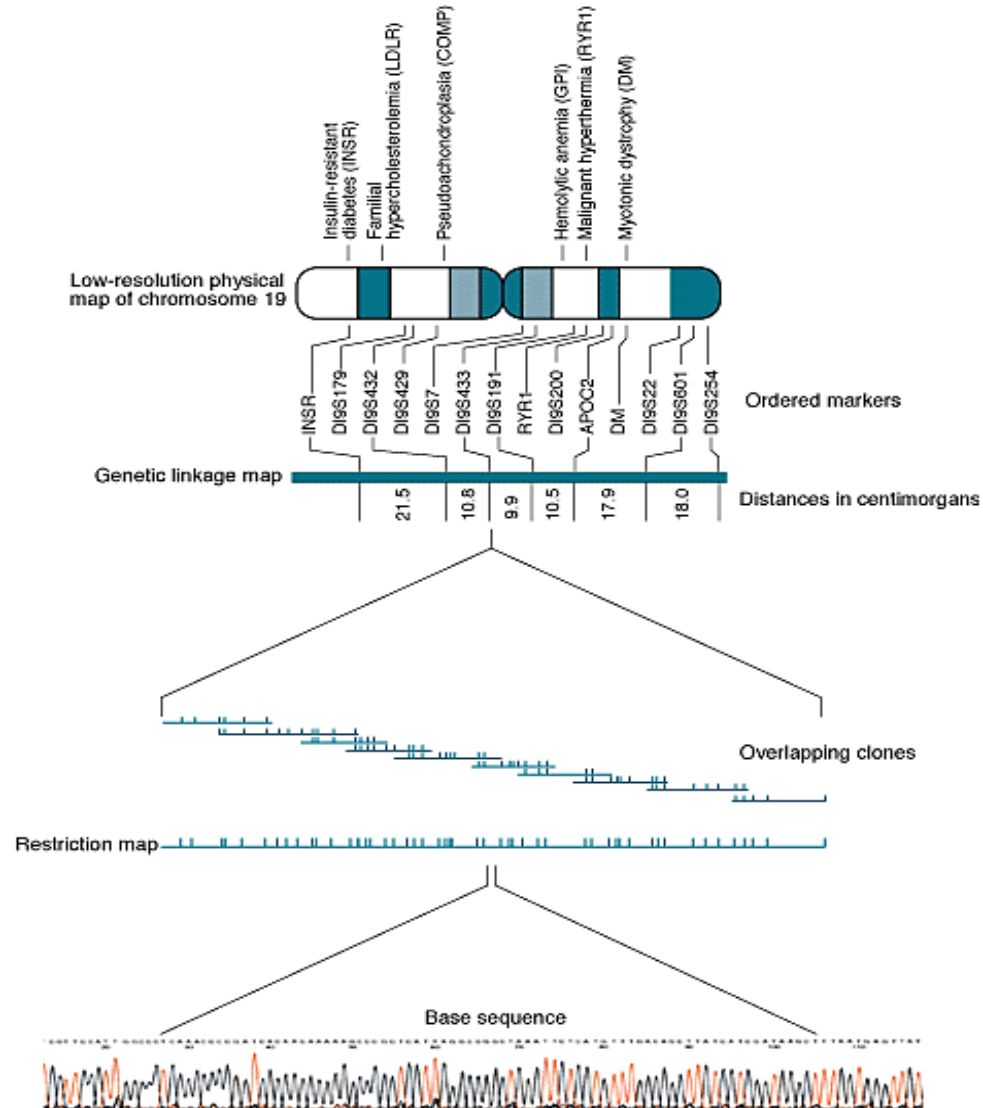
- vytvoření mapy BAC klonů (kontigy)
- výběr klonů pro sekvenování s minimálním překrytím
- rozštěpení BAC klonů na menší fragmenty (mechanické; restrikcními enzymy)
- klonování těchto fragmentů v plazmidech
- sekvenování rekombinantních plazmidů
- sestavení sekvence jednotlivých BAC klonů
- doplnění chybějících sekvencí (překrytí mezer)
(„primer walking“, PCR amplifikace a klonování chybějících fragmentů, hybridizace se sondami připravenými z koncových sekvencí klonů, aj.)

Konstrukce genomické knihovny

ORNL-DWG 92M-6650



Konstrukce kontigů pomocí restričního mapování klonů



Integrovaná mapa

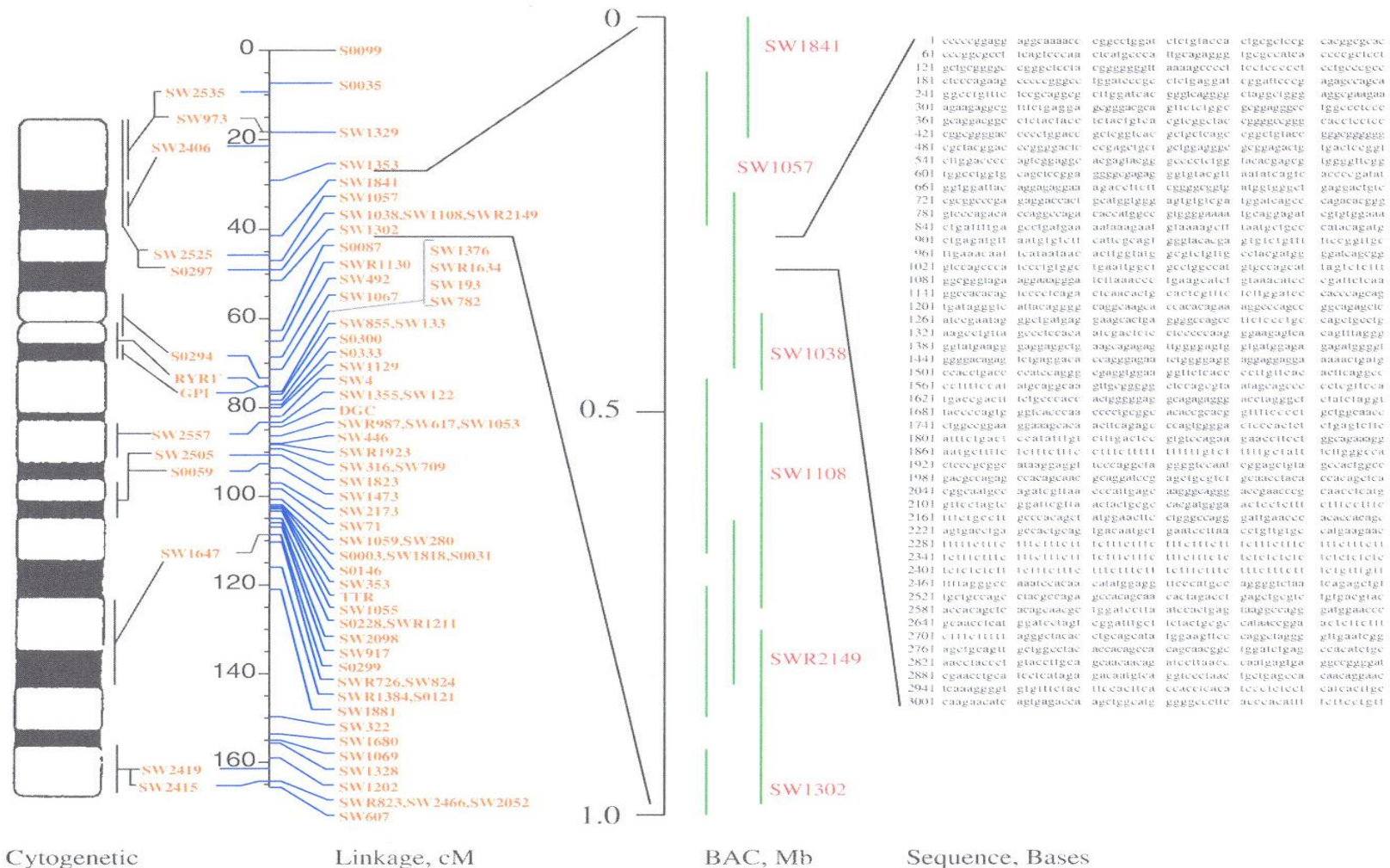


Fig. 1. The diagram represents the four major types of chromosome maps. Above the cytogenetic map is an image of a G-banded metaphase spread of pig chromosome 6. Cytogenetic assignments to specific chromosomal bands based on *in situ* hybridisation are indicated to the right of the chromosome. The genetic linkage map shows the linear alignment of genetic markers and the distances between markers are relative to the amount of recombination between these markers during meiosis (cM). The linkage map and cytogenetic maps are integrated based on markers assigned to both maps (markers between maps). The bacterial artificial chromosome (BAC) map contains a set of BAC clones (indicated by vertical lines to the left of the scale) that overlap each other and distances are usually measured in either kilobases (kb) or megabases (Mb) of nucleotides. The BAC map is integrated with the other maps by determining which BACs contain specific DNA segments (marker names to the right of the BAC clones). Finally, the actual sequence of DNA nucleotides can be determined by sequencing the BAC clones. The BAC map and sequence data presented are hypothetical.

Sekvenování lidského genomu

I. International Human Genome Sequencing Consortium

Human Genome Project (HGP) – zahájen 1990

- Hierarchické „shotgun“ sekvenování
- „Draft“ sekvence – publikovaná v únoru 2001
 - osekvenováno asi 90% euchromatického genomu
 - 150 000 mezer
 - u mnoha segmentů neurčeno uspořádání a orientace
- *
 - 6 států (USA, Velká Británie, Japonsko, Čína, Německo, Irsko)
 - 20 sekvenačních středisek
 - tisíce pracovníků
 - 1999 – nové sekvenátory
 - * 1000 nukleotidů za sekundu
 - * 24 hodin denně
 - * 7 dní v týdnu

- 29 298 překrývajících se BAC klonů (1246 „fingerprint“ kontigů)

- průměr 4,5 násobné sekvenování

*

Říjen 2004

- úplná sekvence euchromatického genomu (**asi 99%**)

- přerušena 341 mezerami

- **198 Mb** je heterochromatin (nesekvenován)

- euchromatický genom je **2,88 Gb**

II. Celera Genomics (J. Craig Venter)

Whole genome shotgun sequencing („shotgun“
sekvenování celého genomu)

- mechanické rozbití genomické DNA
- frakcionace fragmentů – 2 kbp, 10 kbp, 50 kbp
- klonování v plazmidech
- sekvenování
- sestavení sekvence
- (využití informací z HGP)

Pohled do sekvenačního centra



Ukázka z databáze Ensembl

Stránka č. 1 z 5

Home ▶ Human ▲ What's New ▲ TextSearch ▲ BlastSearch ▲ MartSearch ▲ Export Data ▲ Download ▲ Disease Browser ▲ Docs ▲

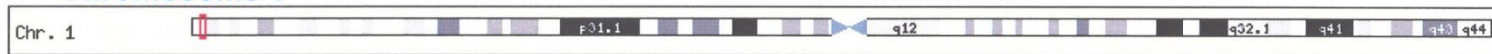
Find AffyProbe

Lookup

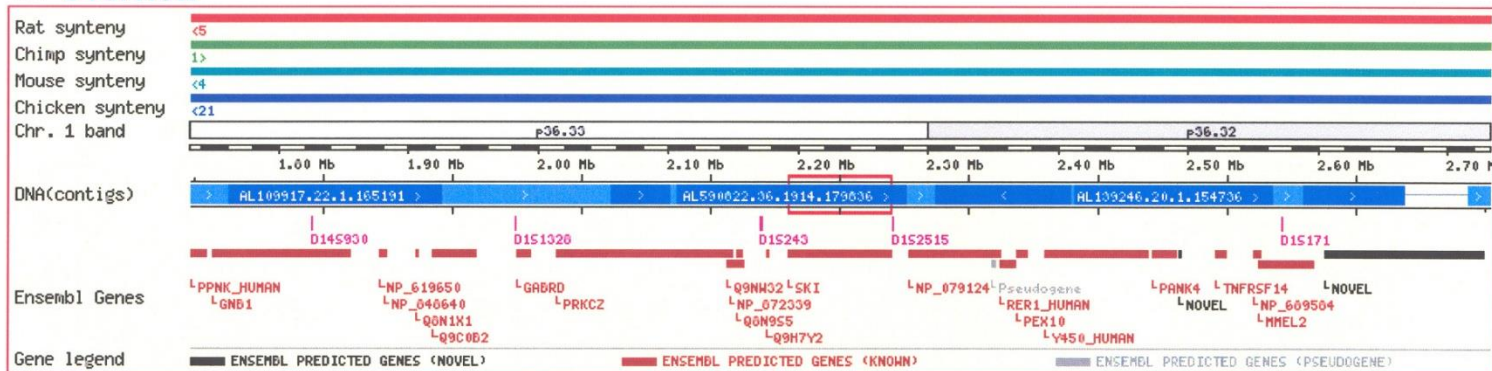
[e.g. AL591480.8.1.91419, AC005253.1.1.39760]

Help

Chromosome 1



Overview



Detailed view

Jump to region: 1 bp 2192296 to 2271618

Refresh



Features ▼ Compara ▼ DAS Sources ▼ Repeats ▼ Decorations ▼ Export ▼ Jump to ▼ Image size ▼

Help ▼

Sekvenování myšního genomu (2002)

Mouse Genome Sequencing Consortium

Strategie:

1. Vytvoření fyzické mapy myšního genomu na základě „fingerprintingu“ a koncového sekvenování klonů BAC knihovny
2. Celogenomové „shotgun“ sekvenování (WGS) asi 7 násobného pokrytí a sestavení hrubé sekvence
3. Hierarchické „shotgun“ sekvenování BAC klonů kombinovaného s celogenomovým „shotgun“ sekvenováním (hybridní WGS-BAC sestavení)
4. Sestavení kompletní sekvence použitím BAC klonů jako templátu pro doplnění chybějících úseků

41,4 milionu čtení sekvencí z obou konců inzertů různých typů

klonů (2-200 kb) – plazmidy, fosmidy, BAC

224 713 sekvenčních kontigů

7 418 superkontigů, nejméně 2kb dlouhé

37 125 menších superkontigů

Superkontigy lokalizovány na chromozómy na základě

- dostupných sekvencí

- myší RH mapy

- BAC mapy

Osekvenováno asi **96%** euchromatické části myšího genomu, která se odhaduje na **2,5 Gb**.

Současný stav sekvenování genomů domácích a hospodářských zvířat

Září 2003 – publikována sekvence psa (*Canis familiaris*) – asi **2,4 Gb**,
miliony mezer

Březen 2004 – sekvence klonů kura bankinského (*Gallus gallus*)
uloženy v databázích (neúplné) **Sekvenuje se:**

- prase (*Sus scrofa*):

BAC fingerprinting

sekvenování BAC konců

sestavení BAC kontigů a výběr BAC klonů s minimálním

překrytím (bude sekvenováno asi 25 000 BAC klonů, 1-2x překrytí)

celogenomové shotgun sekvenování 3 kb, 10 kb a 50 kb knihoven

(4–5x překrytí)

Předpokládané náklady – 50 milionů dolarů

Současný stav sekvenování genomů domácích a hospodářských zvířat

Druh	Druh	Celková délka sekvence	Celková délka mezer	Počet kódujících genů
Člověk	<i>Homo sapiens</i>	3,1 Gb	161,4 Mb	20 296
Prase	<i>Sus scrofa</i>	2,8 Gb	289,4 Mb	21 630
Skot	<i>Bos taurus</i>	2,7 Gb	20,7 Mb	19 994
Ovce	<i>Ovis aries</i>	2,6 Gb	84,7 Mb	20 921
Kůň	<i>Equus caballus</i>	2,5 Gb	46,1 Mb	20 449
Pes	<i>Canis familiaris</i>	2,4 Gb	18,3 Mb	19 856
Kočka	<i>Felis catus</i>	2,5 Gb	91,2 Mb	19 493
Králík	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2,7 Gb	133,5 Mb	19 293
Kur	<i>Gallus gallus</i>	1,05 Gb	14,1 Mb	15 508
Krocan	<i>Melleagris gallopavo</i>	1,1 Gb	125,9 Mb	14 123
Kachna	<i>Anas platyrhynchos</i>	1,1 Gb	35,1 Mb	15 634

[Sus scrofa](#)

Physical Mapping Project

- [clone mapping overview](#)
- [end sequencing overview](#)
- [pig map in Pre-Ensembl](#)

Genome Sequencing Project

- [clone sequencing overview](#)
- [pig sequence in Pre-Ensembl](#)

Current Sequencing Status

18-Oct-2009

[Sus scrofa](#)

Unfinished

2,858,859,167

Finished

114,353,475

Total

2,973,212,642

04-Nov-2010

2,844,828,531

169,359,384

3,014,187,915

Assembly:	Sscrofa9, Apr 2009
Database version:	59.9c
Base Pairs:	2,389,078,169
Golden Path Length:	2,262,596,414
Genebuild by:	Ensembl
Genebuild method:	Full genebuild
Genebuild started:	Apr 2009
Genebuild released:	Sep 2009
Genebuild last updated/patched:	May 2010
Known protein-coding genes:	635
Projected protein-coding genes:	11,868
Novel protein-coding genes:	4,990
Pseudogenes:	520
RNA genes:	2,447
Gene exons:	159,872
Gene transcripts:	22,013
Genscan gene predictions:	45,937
SNPs:	5,964

Frekuensi alel

$$q^A = \frac{2 \cdot AA + AB}{2n}$$

$$A = 457$$

$$AB = 526$$

$$B = 135$$

$$n = 1118$$

$$q^A = \frac{2 \times 457 + 526}{2 \times 1118} = \frac{1440}{2236} = \underline{\underline{0,644}}$$

$$q^B = \frac{2 \times 135 + 526}{2 \times 1118} = \frac{796}{2236} = \underline{\underline{0,356}}$$

$$\sum q^A + q^B = 0,644 + 0,356 = \underline{\underline{1,000}}$$

Rovnováha populace

$$p^A = p$$

$$q^B = q$$

Pravděpodobnost výskytu genotypů je dána součinem frekvencí:

♂ \ ♀	A p	B q
A p	AA p^2	AB pq
B q	AB pq	BB q^2

platí: $AA + 2AB + BB = n$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Hardy-Weinbergův zákon

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Výpočet

	Genotypové frekvence	%	Vypočítané (m)	Skutečné (a)
$p^2 (AA)^2 = 0,644^2$	0,4147	41,47	464	457
$2pq (2 \times AB) = 2 \times 0,644 \times 0,356$	0,4585	45,85	512	526
$q^2 (BB)^2 = 0,356^2$	0,1267	12,67	142	135
	0,9999	99,99	1118	1118

χ^2 test (neke použít, když hodnota m u některé třídy klesne na hodnotu nižší než 5)

pozorované (a)	457	526	135
vypočítané (m)	464	512	142

$$(d) \quad -7 \quad +14 \quad -7$$

$$(d^2) \quad 49 \quad 196 \quad 49$$

$$\frac{d^2}{m} \quad 0,1056 \quad 0,3828 \quad 0,3451$$

$$\sum \frac{d^2}{m} = 0,1056 + 0,3826 + 0,3451 = 0,8335$$

$$\chi^2_{(N)} = 0,83$$

$$\chi^2_{(1)} = 0,83$$

$$P > 0,30$$

Populace je
v H.-W. rovnováze

Počet stupňů volnosti: $N = \text{počet fenotyp. tříd} - 1 - \text{počet nezávislých.}$ (Počet nezáv. = počet alél-1)

CVIČENÍ – TÉMATA

1. Charakterizujte elektroforézu, používané typy a nosiče pro analýzu DNA, RNA a proteinů.
2. Jaké typy nosičů (médií) se používají pro přípravu gelů a jaké jsou separační vlastnosti těchto nosičů.
3. Jaký elektrický náboj mají fragmenty DNA, co je příčinou náboje a ke které elektrodě migrují v mírně alkalickém pufru.
4. Uveďte základní metody vizualizace nebo detekce DNA (RNA) po elektroforetické separaci v gelu.
5. Jak zjišťujeme koncentraci DNA (RNA) v izolovaném vzorku.
6. Při jaké vlnové délce má DNA (RNA) maximální absorpenci a při jaké proteiny.
7. Jaká je koncentrace DNA, když hodnota absorbance (A_{260}) je rovna 1.
8. Co udává hodnota 260/280 nm (při měření DNA).
9. Jmenujte základní metody pro studium polymorfismu DNA a některé metody další.
10. Popište princip PCR.
11. Charakterizujte vlastnosti a použití *Taq* polymerázy.
12. Charakterizujte denaturační teplotu, anelační teplotu a teplotu elongace (při PCR).
13. Jaké je složení reakční směsi pro PCR.
14. Co je teplota tání (T_m) co anelační teplota (T_a).
15. Co je 3'-5' korekční aktivita a kde se s tímto pojmem setkáme (uveďte některé enzymy).
16. Co jsou to primery pro PCR a jejich základní charakteristiky.
17. Co je to reverzní transkripce; příprava cDNA.
18. Restrikční enzymy a jejich využití; restrikční místo (rozpoznávací sekvence).
19. Podle čeho se vytváří nomenklatura restrikčních enzymů.
20. Co jsou lepivé a tupé konce (restrikčních enzymů).
21. Co je palindrom a izoschizomer.
22. Charakterizujte metodu PCR-RFLP.

- 23. Charakterizujte hybridizaci DNA.**
- 24. Princip klasické RFLP.**
- 25. Popište Southernův blotting, northern blotting a western blotting.**
- 26. Co jsou sondy a k čemu se používají.**
- 27. Charakterizujte základní typy klonování DNA. Proč DNA klonujeme.**
- 28. Které vektory se používají ke klonování a na základě čeho je volíme.**
- 29. Charakterizujte plazmidové vektory.**
- 30. Co je polyklonovací místo (v plazmidech).**
- 31. Co je T-A klonování a jakou strukturu musí mít DNA fragment.**
- 32. Popište stručně postup klonování DNA v plazmidech.**
- 33. Co je to ligace a transformace.**
- 34. Popište princip sekvenování Sangerovou dideoxy metodou.**
- 35. Charakterizujte ribózu, deoxyribózu a dideoxyribózu.**
- 36. Čím se odlišuje sekvenování rekombinantní plazmidové DNA od sekvenování PCR fragmentů.**
- 37. Vysvětlete princip „primer walking“.**
- 38. Vysvětlete princip sekvenování „shotgun“ metodou.**
- 39. Charakterizujte genomové knihovny a cDNA knihovny.**
- 40. Co jsou čipy.**
- 41. Vypočítejte frekvence alel:**
- 42. Vypočítejte, zda je populace v Hardy-Weinbergově rovnováze:**