



Metody molekulární biologie v genetice



Molekulární biologie: vědní disciplína zabývající se studiem buněčných struktur a biologických procesů na jejich molekulární úrovni.

V oblasti genetiky nás nejvíce zajímají:

- skladba DNA / RNA
- procesy spojené s přenosem a realizací (expresí) genů (genetické informace) – replikace, transkripce, translace

Abychom mohli výše uvedené informace získat, musíme využít moderní laboratorní techniky (metody) a přístroje, které:

- umožňují DNA/RNA z buněk získat (izolovat)
- dále s ním pracovat a určit např. požadovanou velikost určitých fragmentů, identifikovat polymorfismy v nukleotidové sekvenci nebo sekvenci příslušného úseku (či celého genomu) kompletně přečíst.



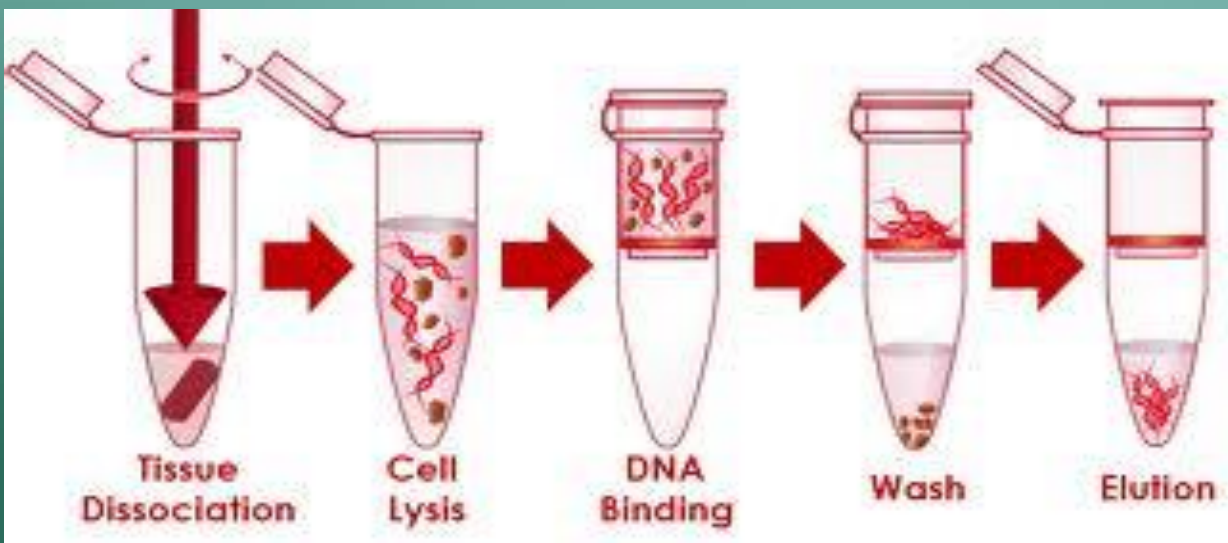
- Proces při kterém získáváme veškerou DNA z buněk (genom)
 - Genom prokaryot tvoří:
 - ✓ hlavní (vlastní) DNA buňky – kruhová
 - ✓ plazmid – menší kruhová DNA nesoucí jen několik málo genů
 - Genom eukaryot tvoří:
 - ✓ jaderná DNA
 - ✓ mitochondriální DNA (mtDNA)
 - ✓ plastidová DNA
- Metod izolace DNA je velké množství ale všechny mají základní rysy společné
- Dnes se převážně používají komerčně dodávané soupravy (tzv. kity), které (dle typu tkání) zkracují izolaci DNA řádově na hodiny.

Izolace DNA



Základními kroky izolace jsou:

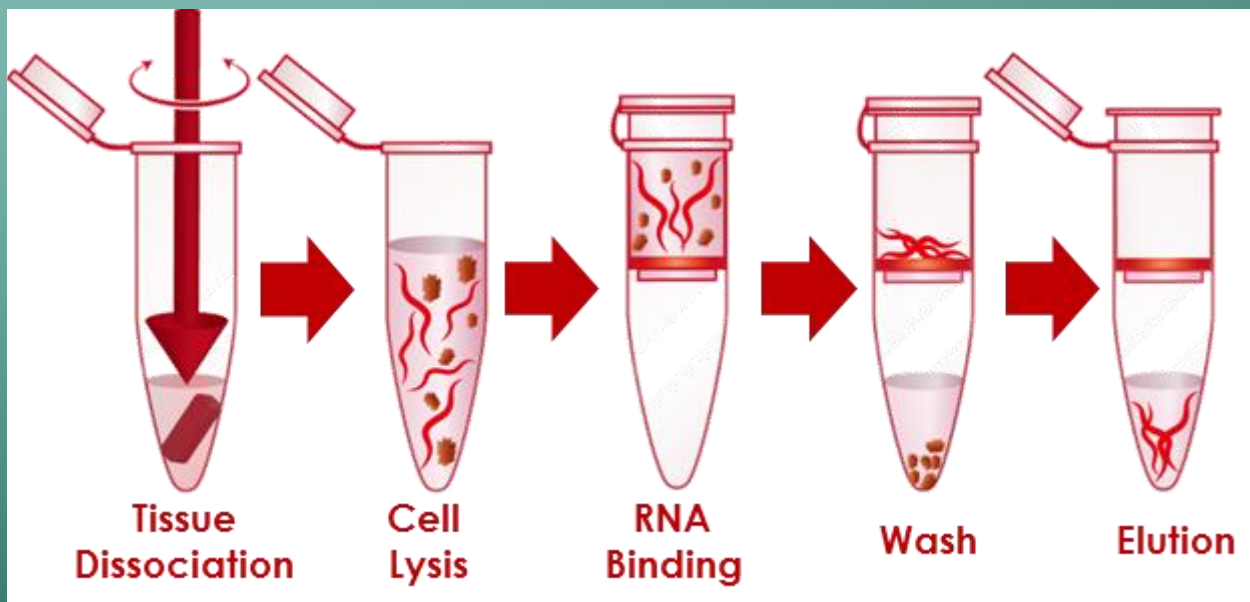
1. Lyze buněk či tkání
 - dostupnost vstupního materiálu (postačuje desítky mg tkáně)
 - narušuje a rozpouští buněčné membrány
 - nenarušuje DNA
2. Odstranění proteinů a ostatních buněčných složek
3. Srážení (navázání) DNA a její čištění
4. Rozpuštění izolované DNA



Izolace RNA



- Izolujeme veškerou RNA buněk (mRNA, rRNA, tRNA)
- Založeno na podobném principu jako izolace DNA
- Používají se jiné chemikálie a specifické kolonky pro navázání RNA



- Interaktivní postup izolace DNA je možno shlédnout na:
<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/>



Rozdíly ve skladování a ošetřování tkání před izolací:

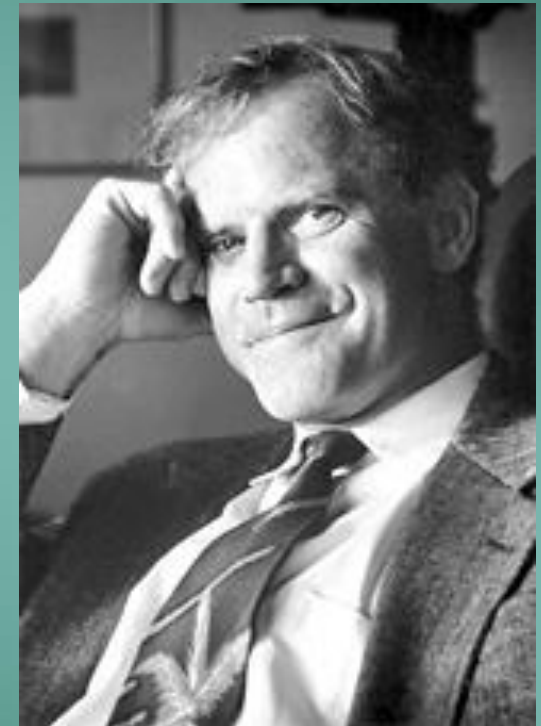
- DNA je poměrně stabilní, odebrané tkáně je možno fixovat v 96 % ethanolu a skladovat při pokojové teplotě po velmi dlouhou dobu
- X
- RNA v odebrané tkáni podléhá velmi rychle degradaci (díky Rneázám, které jsou téměř všudypřítomné). Tkáně je po odběru nutno urychleně zamrazit a uchovávat při teplotách kolem -80°C. V prvních krocích izolace nutno tkáň uchovávat při nízké teplotě a pracovat velmi rychle do doby deaktivace RNeáz).
- DNA je stejná ve všech buňkách – stačí odebrat jakoukoliv tkáň. RNA je obsažena v každé tkáni v jiném množství a v různých tkáních je obsažena RNA různých genů

Polymerázová řetězová reakce (PCR)



- PCR z anglického Polymerase Chain Reaction
- Objevena v r. 1983
- Publikována v r. 1985
- Patentována v r. 1987
- 1993 udělena Nobelova cena

Kary B. Mullis



Polymerázová řetězová reakce



- Od Cetusu za tento nápad obdržel bonus ve výši 10 000 dolarů, přičemž firma technologii později prodala firmě Roche za 300 milionů dolarů.
- V podstatě se jedná o in vitro mnohonásobnou replikaci
- Slouží k namnožení námi zvoleného úseku DNA a je základní metodou pro další aplikace v různých odvětvích genetiky

Proč?

Zajišťuje nám získání dostatečného množství příslušného úseku DNA, bez čehož bychom nebyli schopni dále pracovat a DNA vizualizovat

- PCR se využívá nejenom k vědeckým potřebám, ale například i ke kontrole potravin, pro zjišťování GMO a geneticky modifikovaných složek, nebo při identifikaci osob, určování rodičovství apod.



- Při PCR jde v podstatě o biochemickou reakci, jež funguje za určitých podmínek – složení reakční směsi a reakční podmínky

Složení reakční PCR reakční směsi

- DNA
- DNA polymeráza
- Stavební kameny nového řetězce DNA (dNTPs)
- Primery (**F** – forward a **R** – reverse)
- Složky upravující reakční prostředí

Polymerázová řetězová reakce



DNA polymeráza

- Pro PCR nutná termostabilní polymeráza (enzym), která je schopná zůstat funkční i poté, co byla vystavena teplotám přes 90°C , a to opakovaně.
- Používá se taq-polymeráza izolované z mikroorganismu *Thermus aquaticus*



Polymerázová řetězová reakce



dNTPs

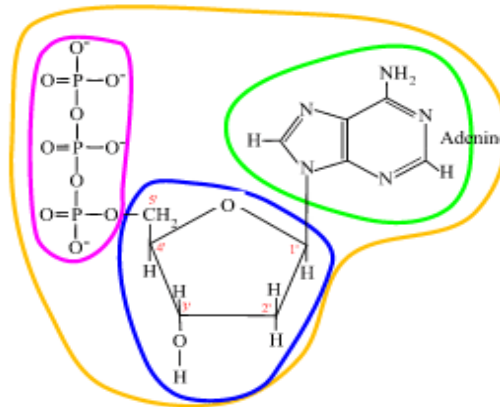
- dATP
- dGTP
- dCTP
- dTTP

The components of nucleotides

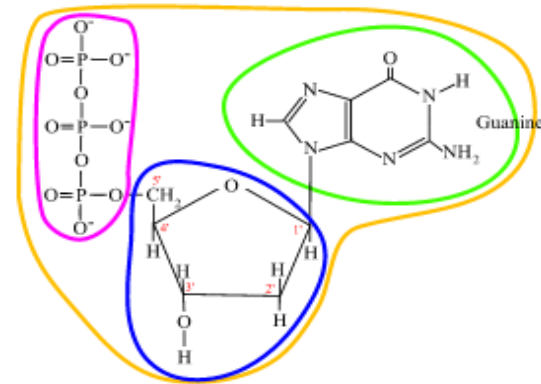
Nucleotide = base + sugar + phosphate

4 different dNTP's (deoxynucleoside triphosphate) :

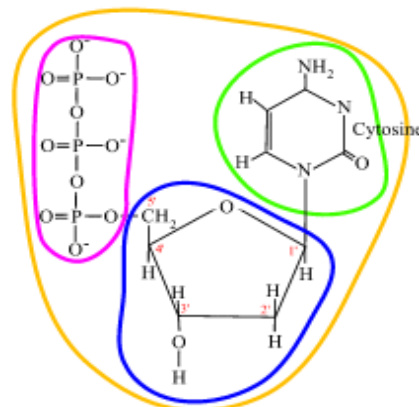
deoxyadenosine triphosphate = dATP



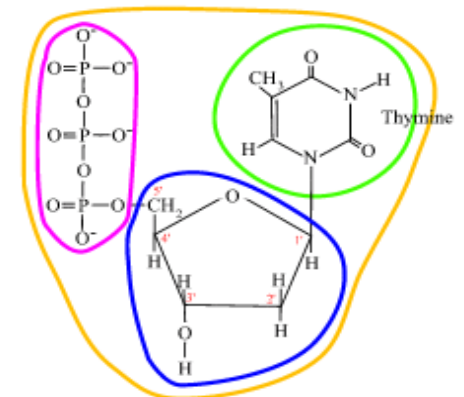
deoxyguanosine triphosphate = dGTP



deoxycytidine triphosphate = dCTP



deoxythymidine triphosphate = dTTP

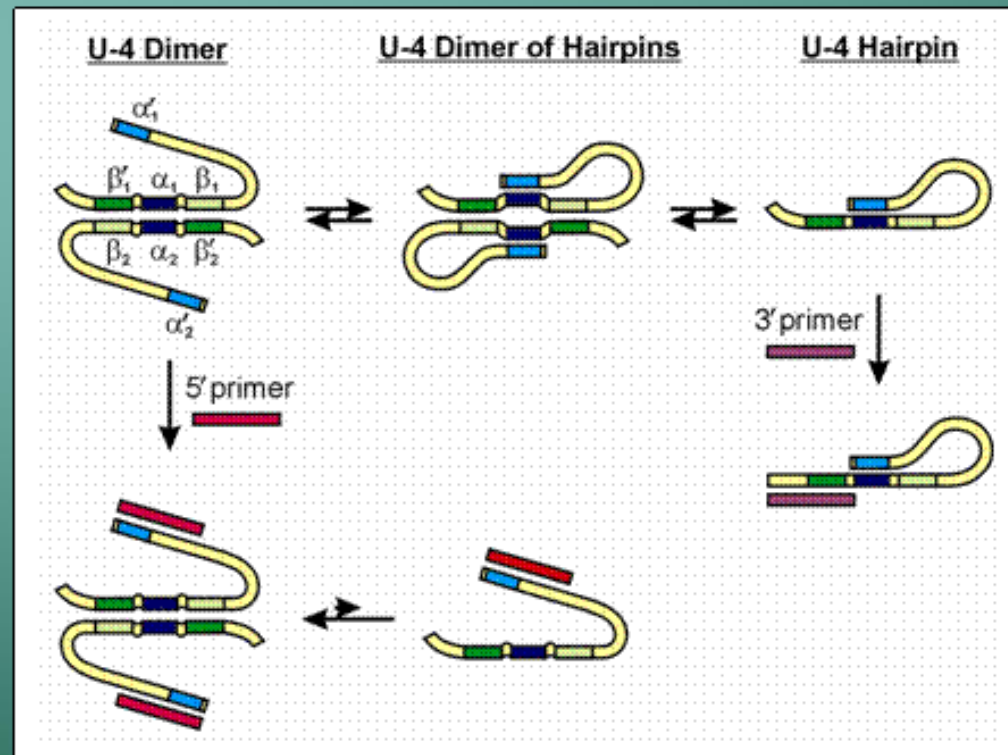


Polymerázová řetězová reakce



Primery

- Krátké oligonukleotidové sekvence (20-30 bází)
- Unikátní sekvence pro zvolený fragment
- Primery se objednávají u příslušných firem, jsou připravovány synteticky dle přání zákazníka
- Primery musí být konstruovány tak, aby:
 - ✓ při PCR nevytvářely různé sekundární sktruktury (dimery, cross-dimery, herpiny apod.),
 - ✓ měly podobnou teplotu tání a anealingu, určitou hodnotu ΔG , poměr GC bází, neobsahovaly moc po sobě se opakujících bází či dvojic bází apod.



Polymerázová řetězová reakce



Složky upravující reakční prostředí

- Jedná se především o různé pufrы stabilizující pH, a další soli podporující aktivitu DNA polymerázy (horčík)

Reakční podmínky při PCR

- Cyklické opakování kroků:
 - ✓ Denaturace (90°C - 95°C)
 - ✓ Annealing (48°C - 65°C)
 - ✓ Elongace (72°C)
- Opakování cyklů 30-40x

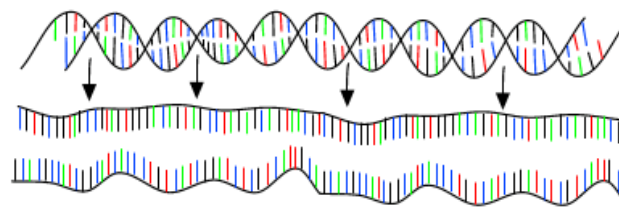


PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

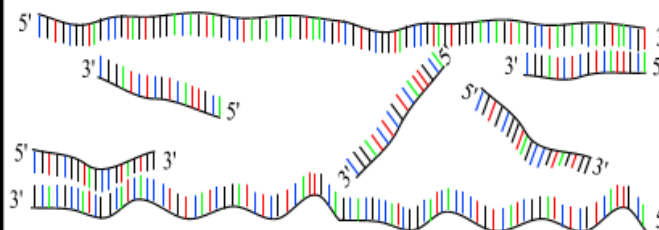
1 minut 94°C



Step 2 : annealing

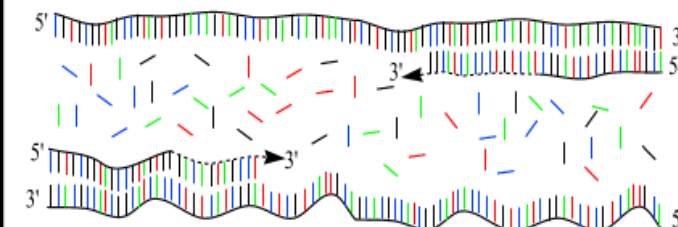
45 seconds 54°C

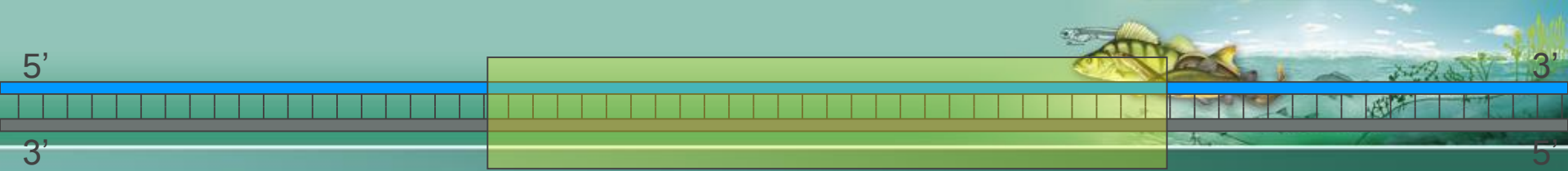
forward and reverse primers !!!



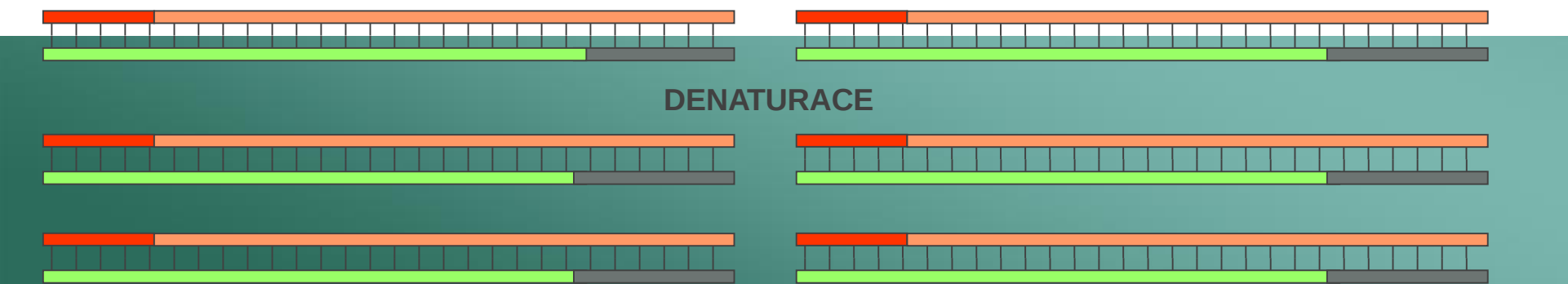
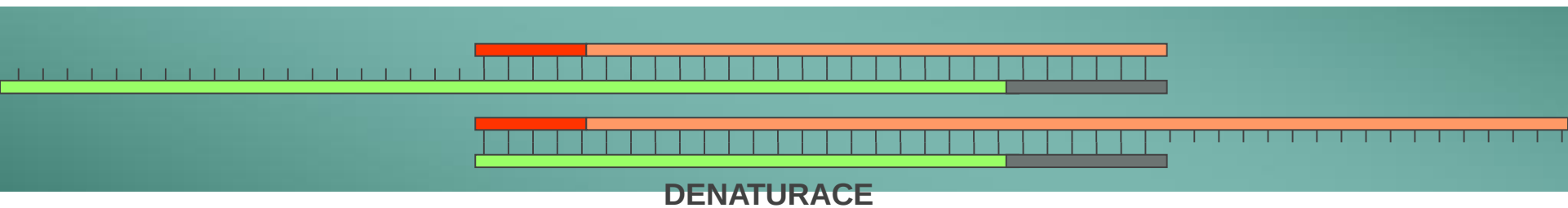
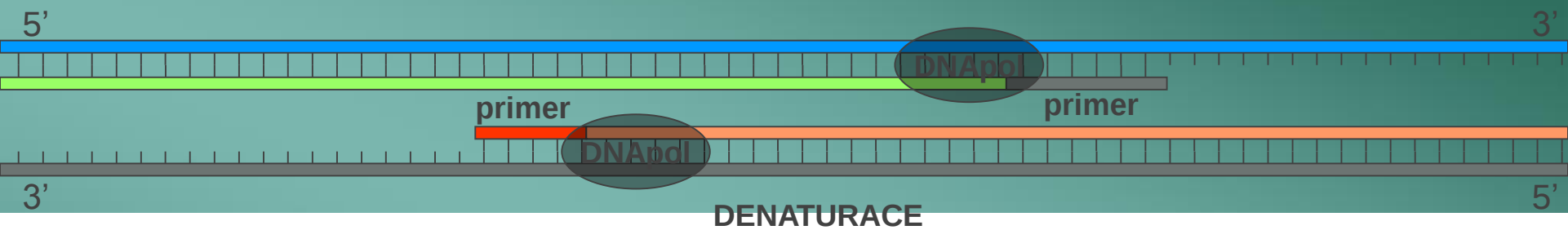
Step 3 : extension

2 minutes 72°C
only dNTP's





↓ DENATURACE DNA při 94°C



Polymerázová řetězová reakce



- Interaktivní postup PCR je možno si vyzkoušet na:
<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>

Reverzní transkripce



- Pro další práci s RNA je nutno provést její reverzní transkripci na cDNA
- Při reverzní transkripci vzniká z jednovláknenné RNA dvouvláknenná DNA. Přepisuje se pouze mRNA
- Principem transkripce je použití enzymu reverzní transkriptázy – izolována z RNA virů
- Jako primer se používá tzv. poly A-tail, což je zakončení každé molekuly mRNA
- Reverzní transkripce se provádí v těchto krocích:
 - ✓ denaturace RNA a anealing
 - ✓ přidání reakční směsi (poly A-tail, reverzní transkriptáza, dNTPs, složky upravující reakční prostředí)
 - ✓ elongace (tvorba cDNA)
- Na rozdíl od PCR zde nedochází k cyklování jednotlivých kroků

The structure of a typical human protein coding mRNA including the untranslated regions (UTRs)



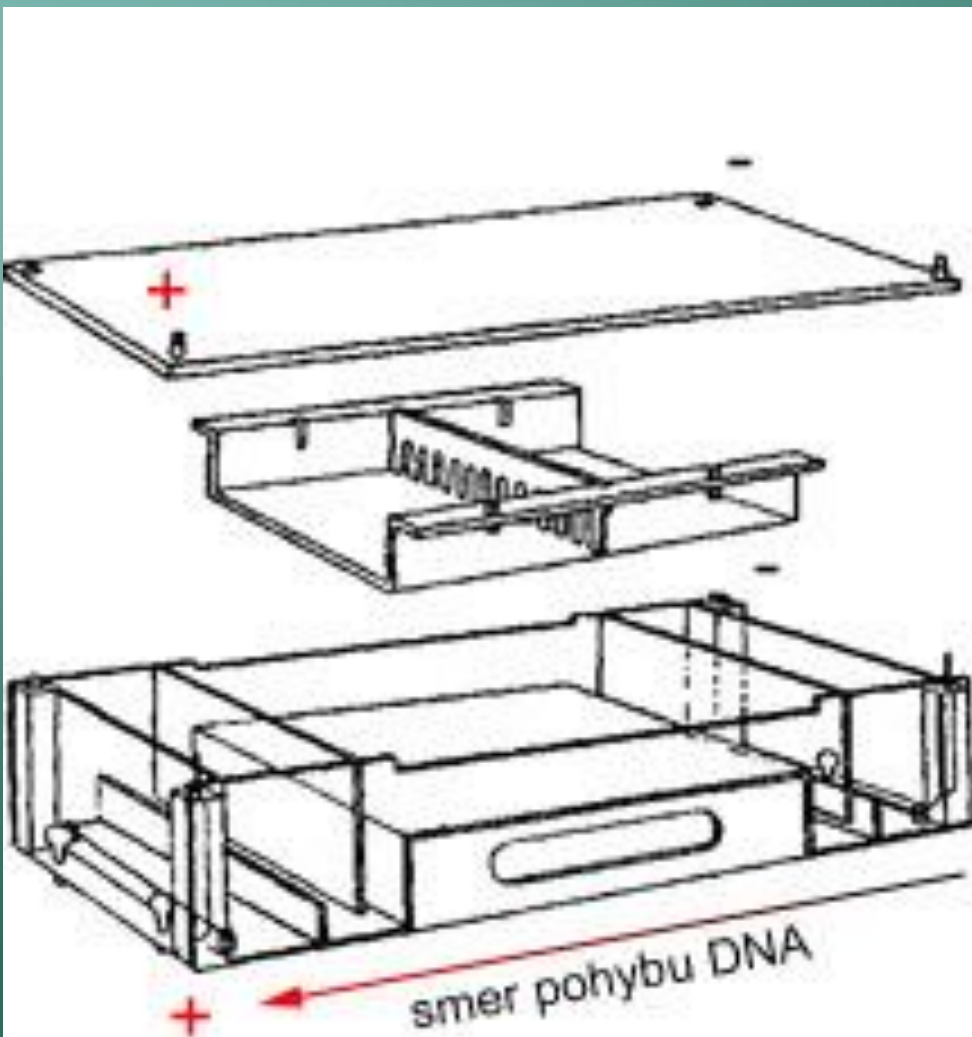


- Soubor separačních metod, které využívají k rozdělávání směsi molekul jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli
- Slouží pro kontrolu výsledků z izolace DNA, reverzní transkripce a PCR než přistoupíme k dalším krokům
- Lze také použít pro zobrazování finálních výsledků (např. RFLP, sekvenování, analýza proteinů, měření integrity DNA/RNA)

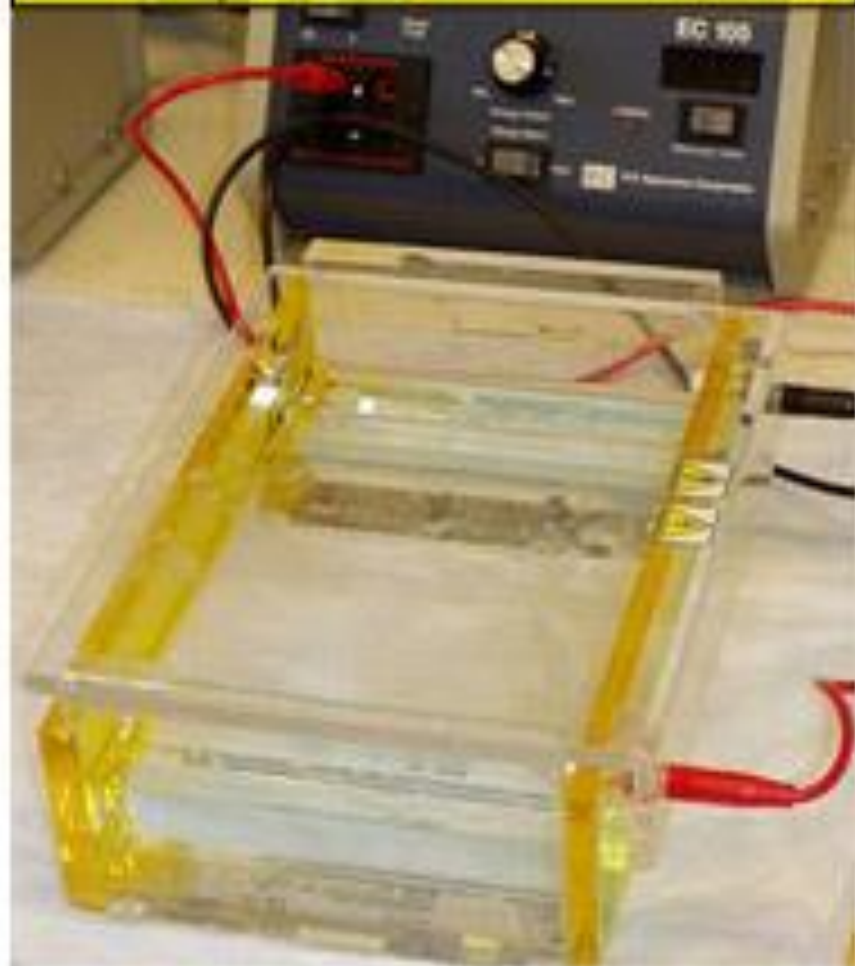
Princip

- DNA má záporný náboj
- V elektrickém poli migruje od katody (-) k anodě (+)
- Separace molekul DNA se děje v gelovém prostředí
- Kratší molekula migruje rychleji než delší
- Pro vizualizaci fragmentů je nutné barvení DNA

Gelová elektroforéza



zdroj: http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis
autor: Jeffrey M. Vinocur



Gelová elektroforéza

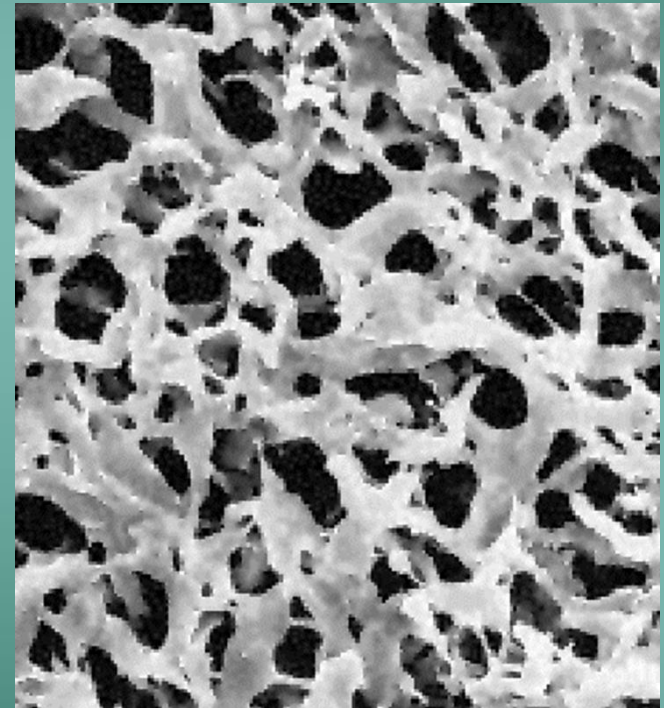


Agarózový gel

- Polysacharid tvořený D-galaktosou a anhydro-L-galaktosou, který produkují některé mořské řasy
- Využití pro delší fragmenty DNA 100bp – 50kb
- Požívají se gely o koncentraci od 0,5% do 4%
- Čím vyšší koncentrace, tím lepší rozlišení
- Barví se ethydiumbromiden, SYBER Green, Gold View atd.

Polyakrylamidový gel

- Vzniká polymerací akrilamidu v anaerobním prostředí za přítomnosti TEMEDu
- Molekulové síto polyakrylamidového gelu je poměrně husté, hodí se proto pro rozdělávání kratších fragmentů (10bp – 1000bp)
- Fragmenty DNA lze kromě metod používaných v agarosovém gelu obarvit i dalšími technikami





Reakční prostředí

- Je tvořeno pufry
- Pufry zajišťují vodivost, stálost prostředí a chlazení
 - ✓ TBE pufr = Tris + k. boritá + EDTA
 - ✓ TAE pufr = Tris + k octová + EDTA
- Používají se jako „Running buffer“ i pro přípravu gelů

Elektrický proud

- Používá se stejnosměrný el. proud
- Napětí od 20V do 150V
- Čím je proud menší a gel delší, tím pomaleji elfo probíhá ale výsledek je kvalitnější

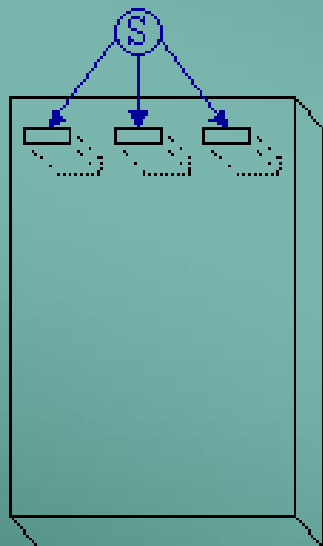
Vizualizace výsledků

- Díky barvení je možno vizualizovat separované molekuly např. pod UV světlem
- K vizualizaci se používají různé dokumentační systémy

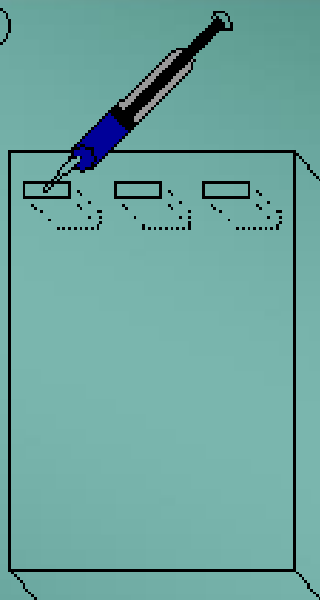
Gelová elektroforéza



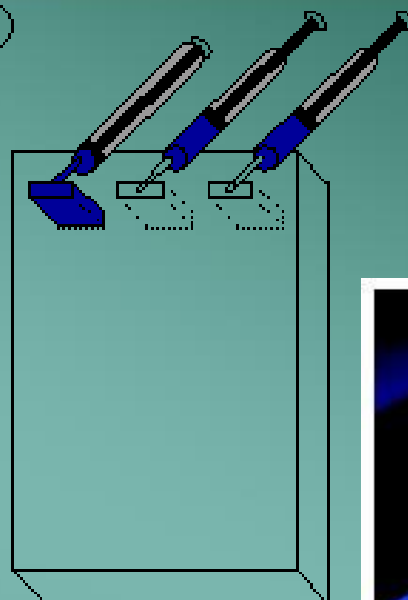
①



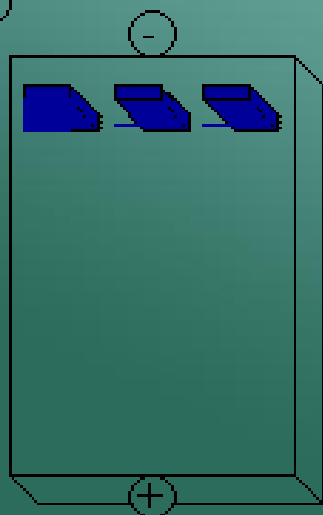
②



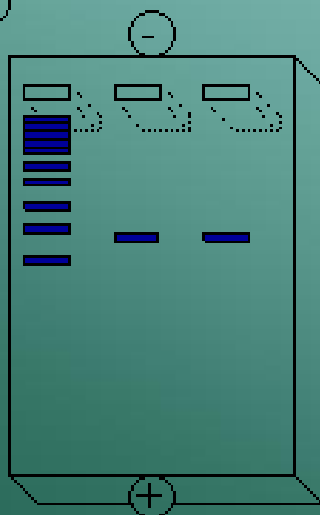
③



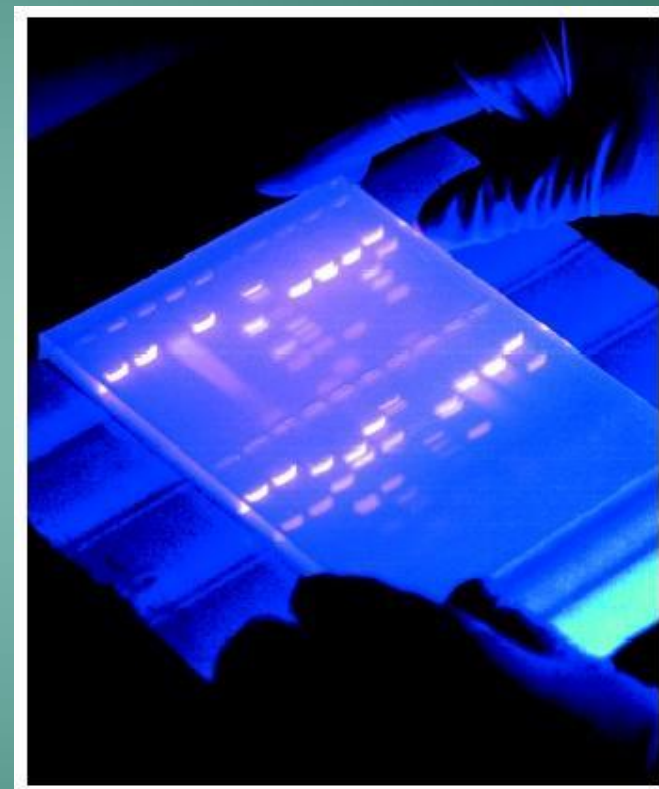
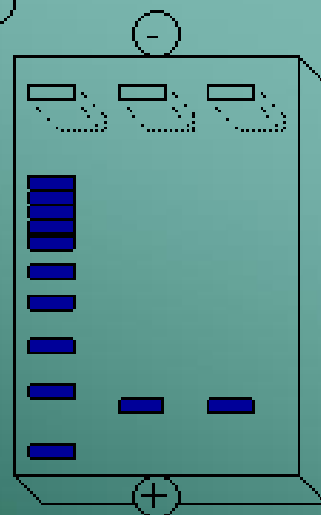
④



⑤



⑥



Gelová elektroforéza



- Interaktivní postup průběhu elektroforézy je možno shlédnout na: <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

Klonování DNA



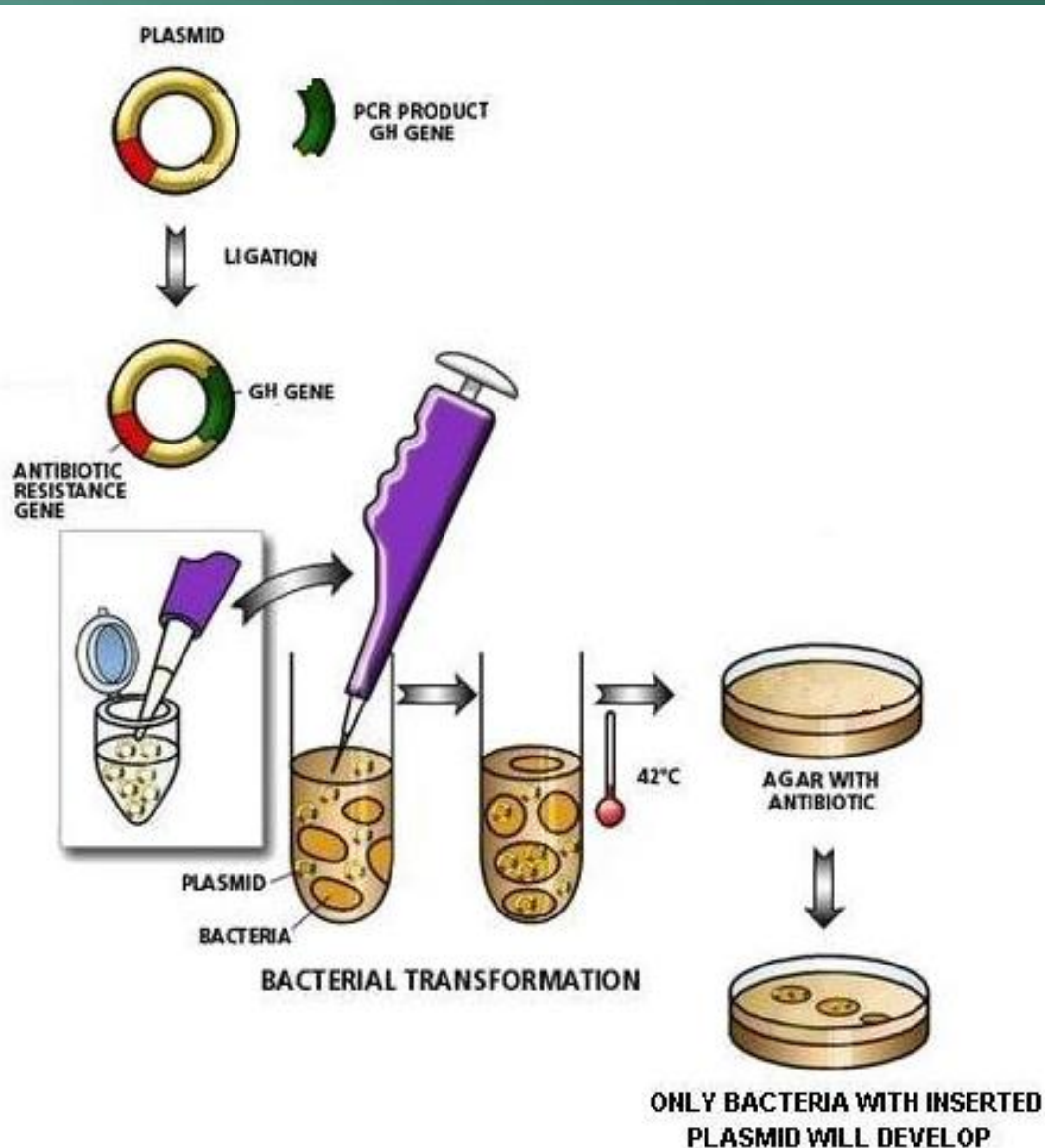
- Nejedná se o klonování celých organizmů
- Klonování (množení) úseků DNA pomocí organizmů (bakterií, kvasinek) zpravidla za účelem jejich sekvenace (sekvenace z genomové DNA nejde vždy provádět – heterozygotní organismy)
- Využívá se enzymatického systému organismu k tvorbě identických klonů DNA
- Do tohoto organismu je nutné „vložit“ námi zvolený úsek DNA
- Pro přenos námi zvoleného úseku DNA se používá "**tzv. klonovací vektor**"
- Námi zvolený úsek cizorodé DNA, který se liguje do vektoru se nazývá „**inzert**“
- Klonování je možno dnes provádět pomocí tzv. klonovacích kitů.
- **Pozor při klonování se jedná o práci s GMO** – nutno splňovat určitá kritéria (mít povolení na práci s GMO) a dodržovat bezpečnostní opatření

Klonování DNA



Postup klonování

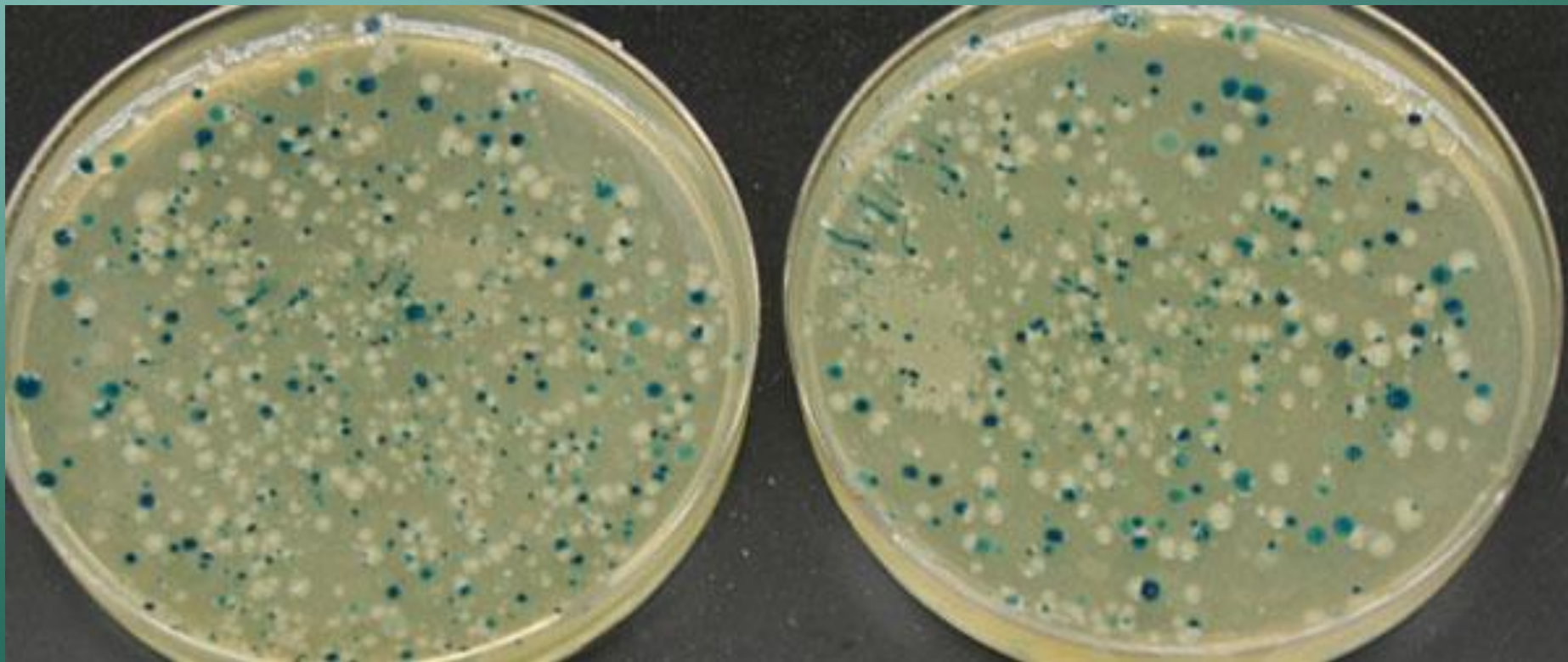
1. Pomocí PCR se „namnoží“ zvolený úsek DNA (inzert)
2. Ligace inzertu do vektoru
3. Transformace vektoru do hostitelského organismu
4. Vyšetří a kultivace hostitelského organismu
5. Odběr pozitivních kolonií a izolace DNA
6. Sekvenace



Klonování DNA



Jiný způsob identifikace kolonií s vloženým cílovým
inzertem – změna barvy



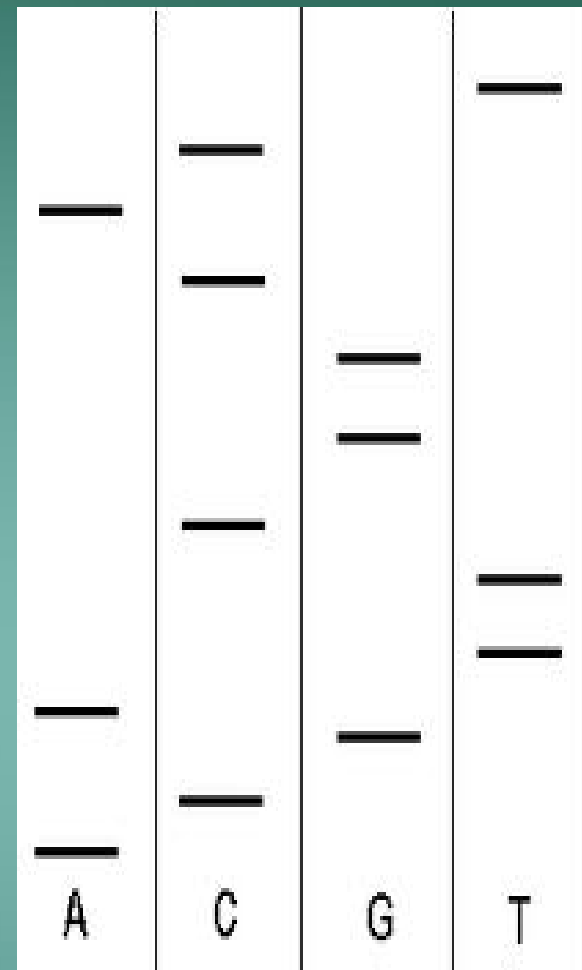


- Určení sekvence (pořadí) nukleotidů (resp. bází) v jednom z řetězců DNA
- Klasický způsob sekvenování je založen na **tzv. Sangerově metodě**
- Princip metody spočívá v biochemické reakci, při níž dochází k PCR, ale pouze jednostrannému
- V reakční směsi jsou vedle klasických deoxynukleotidtrifosfátů i dideoxynukleotidtrifosfáty v poměru 100 : 1 (např. 100 dATP : 1 ddATP).
- Při reakci se náhodně do syntetizovaných vláken začleňují ddNTPs, které vedou k ukončení reakce, neboť za nimi nemůže být již další nukleotid připojen.
- Během cyklování pak vznikají různě dlouhé řetězce podle toho, kdy byl do řetězce příslušný ddNTP začleněn.
- Původně byl v každé reakci pouze jeden z nukleotidů ve formě ddNTP

Sekvenování



- Jednotlivé řetězce byly pak elektroforeticky odděleny a dle délky jednotlivých fragmentů byla postupně složena sekvence DNA.
- Dnes je proces elektroforézy a čtení sekvencí plně automatizován díky přístrojům nazývaným kapilární sekvenátory.
- Díky možnostem fluorescenčního značení nukleotidů může sekvenační PCR reakce před vlastní elektroforézou probíhat se všemi ddNTPs v jedné reakci.
- Takovéto přístroje umožňují čtení úseků DNA dlouhých 400 – 900 nukleotidů.





Sekvenování

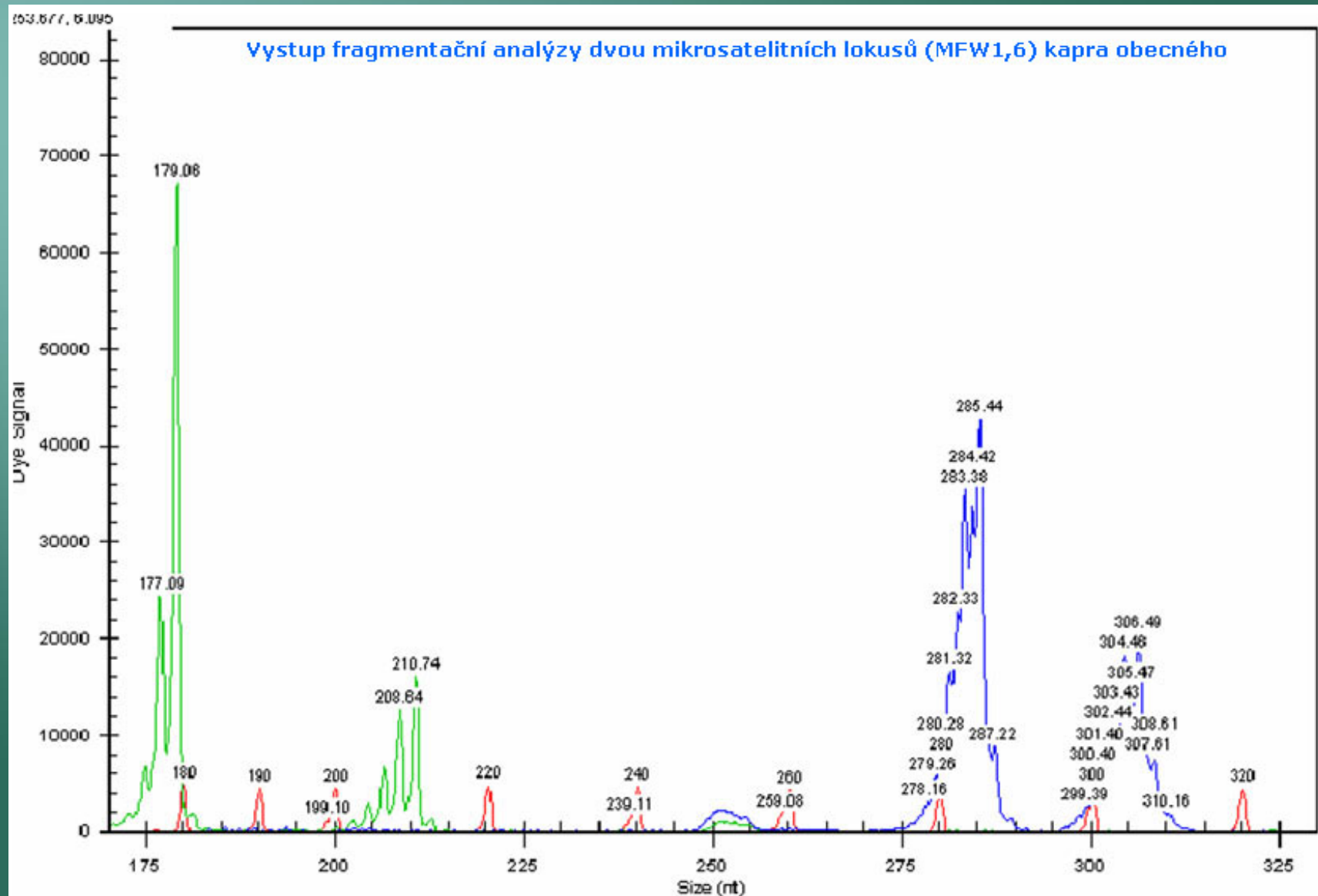


- Výhodou sekvenátorů založených na principu kapilární elektroforézy je i možnost určování délky fragmentů – **fragmentační analýza**.
- Při fragmentační analýze neurčujeme jednotlivé pořadí nukleotidů, ale pouze délku syntetizovaného fragmentu
- Fragmentační analýza je využívána pro stanovení délky mikrosatelitní DNA (opakujících se di až tetra nukleotidů).

Nejmodernější způsoby sekvenování

- De novo sekvenování (sekvenování nově generace)
- Umožňují poměrně rychle sekvenovat velké objemy DNA
- Sekvenují se kratší úseky, ale v jednom běhu je možné osekvenovat několik desítek až stovek miliónů bází a s pomocí vhodného software je možné získat spolehlivě úseky dlouhé několik desítek až stovek tisíc bází
- Díky těmto metodám je sekvenování genomu lidské DNA možno zkrátit z měsíců (roků) na dny (hodiny)

Sekvenování





RFLP – Restriction fragment length polymorphism

(česky polymorfismus délek restrikčních fragmentů)

- Restrikční analýza DNA pomocí jejího štěpení restrikčními endonukleázami (RE) ve specifických restrikčních místech
- Pokud sekvenční difference (polymorfizmus – indel, SNP) vytváří nebo ruší specifické místo pro RE vznikají po restrikci fragmenty odlišných velikostí
- **Princip:**
 - ✓ výchozí DNA (genomická DNA, PCR produkt)
 - ✓ štěpení restrikčním enzymem na fragmenty různých velikostí
 - ✓ elektroforetická separace fragmentů
- Známo asi 2100 bakteriálních RE. RE rozpoznávají různě krátké sekvence nukleotidů (4,6,8), v kterých pak štěpí kovalentní fosfodiesterové vazby

Další metody - AFLP



AFLP – Amplified fragment length polymorphism

(česky polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů)

- Metoda na bázi DNA fingerprintingu
- Multilokusová analýza AFLP má vysokou schopnost rozlišení polymorfismu alel a je velmi vhodnou technikou pro studium genetické variability na úrovni druhů či populací u široké škálu organismů
- Umožňuje rychle vygenerovat velké množství polymorfních markerů i u druhů, o nichž nemáme jedinou předchozí genetickou informaci
- AFLP kombinuje výhody osvědčeného principu PCR a štěpení restriční endonukleázou pro získání specifických selektovaných restričních fragmentů celkové DNA jakéhokoli jedince, tedy napříč genomem, za vysoké míry opakovatelnosti pokusu.
- **nevýhody:** finančně dražší metoda, komplikovanější protokol, vyžaduje hlubší znalosti principů molekulární biologie

Další metody - RAPD



RAPD – Random amplified polymorphic DNA

(česky náhodná polymerázová řetězová reakce)

- Zvláštním případem PCR fingerprintingu
- K provedení metody potřebujeme pouze základní vybavení (termocykler, obyčejnou horizontální elektroforetickou aparaturu, transiluminátor a fotoaparát).
- Největší výhodou je jednoduchost, jakákoliv znalost sekvencí studovaného organismu není nutná.
- RAPD metodika používá pouze jediný primer (nikoliv dva různé jako je tomu u klasické PCR), dlouhý deset nukleotidů. Teplota nasednutí primerů je nižší, dovoluje méně specifickou reakci. Počet replikačních cyklů je naopak vyšší než u klasické PCR. Výsledkem takového postupu je, že některé fragmenty DNA zreplikujeme téměř u jakéhokoliv studovaného organismu – získané fragmenty můžeme pak snadno klonovat a sekvenovat.
- Nevýhodou metody je nízká míra reprodukovatelnosti, a to i v téže laboratoři.

Další metody – RT-qPCR



RT-qPCR – Reverse transkription quantitative PCR

- Velmi důležitá metoda s ohledem ke kvantifikaci míry exprese (transkripce) jednotlivých genů – pracuje se s cDNA
- Technika je založena na použití fluorescenčních barviv vážících se na DNA a detekčního systému, který je schopen měřit intenzitu fluorescence v průběhu PCR.
- Intenzita fluorescence je úměrná množství PCR produktu a pomocí kalibrační křivky sestrojené za použití známých množství cílové DNA je možné přesně kvantifikovat množství cílové DNA v biologickém vzorku.
- **Výhodou** metody je její relativní nenáročnost provedení, vysoká reprodukovatelnost a možnost analyzování velkého množství vzorků najednou.
- **Nevýhodou** je vysoká pořizovací cena potřebných zařízení a reagensů