

Genové inženýrství

- **genom** = veškerá DNA buňky; struktura primární, sekundární a vyšší, její funkce, regulace, interakce vnitřní i s dalšími molekulami a strukturami atd.
- **transkriptom** = veškerá přepisovaná RNA organismu; genom + úroveň exprese (diferenciální exprese)
- **proteom** = proteiny organismu – produkty translace (transkriptom + tvorba, modifikace a interakce se složkami metabolitomu a vytváření vnitřního prostředí v buňce, respektive organismu)
- **metabolom** = veškeré nízkomolekulární látky – produkty metabolismu
- nové obory – genomika a další omiky, bioinformatika – Rozvoj nastartován sekvenčními programy a dán spolu srovnáním techniky sekvenování i rozvojem informatiky v i mimo obor.

Analýza transkriptomu – analýza na čipu

- zastaralá metoda, teď už se v laboratořích nepoužívá (přeskočena sekvenčními metodami)
- byly vyvinuty čipy, na které byly nakapány kapky oligonukleotidových sond (průb) specifických ke konkrétní mRNA -> hybridizace těchto mRNA k sondám -> detekce konkrétní RNA (nebo cDNA – její kopie)
- kvantifikace signálu -> známo množství dané mRNA
- cDNA se značila fluorescenční sondou; porovnávání dvou stavů buňky (např. senescentní x rakovinná, pod vlivem nějakého hormonu x bez něj), pokud byla cDNA pokaždé označena různým fluoroforem, mohlo být pozorováno, jak se liší intenzita fluorescence
- dnes je výhodnější RNA sekvenovat

Elektroforéza

- elektroforéza existuje pro NK i pro bílkoviny!
- využívá dělení NK na molekulovém sítu (agarózový gel pro NK, polyakrylamidový gel pro látky s vyšší molekulovou hmotností, jiný gel), dělí se v elektrickém poli (podle velikosti a podle tvaru – topologie)
- elektroforéza se provádí při pH cca 7,5
- do nádoby se vloží napětí -> pohyb díky jednotkovému zápornému náboji směrem k anodě; náboj je jednotkový -> možnost dělit podle molekulové hmotnosti a topologie
- po provedení elektroforézy je nutné nukleovou kys. vizualizovat – obarvení *interkalačním činidlem* (např. *ethidium bromid* – díky SP2 hybridizaci na aromatických kruzích má molekula planární tvar a dokáže se vmezeřit – *interkalovat* – do DNA)
 - nebo přenos na membránu -> in situ hybridizace – tzn. přidá se komplementární úsek DNA, který je nějak značený (třeba fluorescenčně) a ten se naváže na specifickou hledanou sekvenci nukleotidů => *Southern blot*
 - *Northern blot* – na membránu přenáším RNA a tu pak vizualizuji
 - *Western blot* – na membránu přenáším bílkoviny a ty pak nejčastěji vizualizuji pomocí protilátek
- u bílkovin to není tak jednoduché – v daném pH má každý AK zbytek jiný náboj -> abychom je mohli dělit elektroforézou, vyvinuly se metody na vložení jednotkového náboje na bílkovinu (buď kladný nebo záporný); nejčastěji se bílkovina obalí detergentem (*sodium-dodecyl-sulfátem* – *SDS*) -> bílkovině je udělen záporný náboj -> podobné jako elektroforéza NK
 - jak dělit bílkoviny podle náboje? Isoelektrická fokusace: vytvořím si na gelu gradient pH, bílkovina se pak zastaví v tom bodě, ve kterém se pH gelu rovná pI (isoelektrický bod) bílkoviny

- jak dělit bílkoviny podle molekulové hmotnosti? Potřebuju bílkovinám udělit jednotkový záporný náboj – navázání *SDS (sodium dodecyl sulfate)*: SDS působí jako povrchově aktivní činidlo, které při zahřátí unfolduje protein a pokryje vlastní náboj proteinu v takovém měřítku, že proteinu poskytne velmi podobné poměry náboje ku hmotnosti. Protein obalený SDS má negativní náboj a migruje během elektroforézy ke kladně nabitým elektrodám.
- vzorek se zahřeje; bílkovina denaturuje, nesráží se – obalena detergentem (má hydrofobní část a sulfátovou hlavičku – váže se na odhalené hydrofobní zbytky a obalí bílkovinu sulfátovými hlavičkami, navíc v teple pomáhá bílkovinu rozbalovat)
- -> nanesení vzorku na polyakrylamidový gel -> proplétání bílkovin gelem; větší se proplétají pomaleji než menší (na gelu je kladný náboj, díky kterému jsou jednotkově záporně nabité bílkoviny taženy dolů) -> dělení podle molekulové hmotnosti

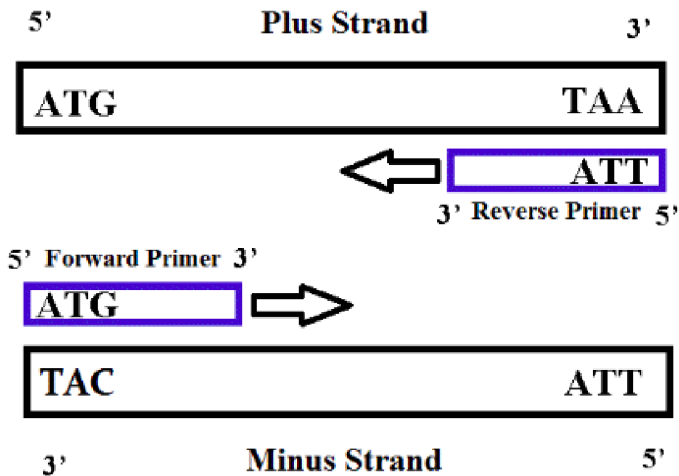
Vizualizace bílkovin jinak než barvením gelu elektroforézy

- eukaryotní buňka – desítky tisíc bílkovin
- potřeba detekovat konkrétní bílkovinu, kvantifikovat množství v jedné/více kulturách po působení nějaké látky/stresoru
- -> použití protilátek
- antigen musí být pro barvení protilátkou zpřístupněn
- všechny bílkoviny z gelu se přenášejí na membránu -> zachycení bílkovin -> specifická detekce protilátkou (ta může být označena přímo barvičkou, nebo může být signál amplifikován – na protilátku může být navázán enzym, který pomocí substrátu vizualizuje určitý proužek – barevně nebo luminiscenční substrát; enzym opakovaně použije substrát v místě, kde je daná bílkovina -> amplifikace signálu)
- využití enzymů/jiných prostředků pro amplifikaci se využívá, když máme slabý signál nebo hledáme nějakou molekulu, které je ve vzorku malé množství
- princip přenosu na membránu se dá využít i pro vzorek DNA

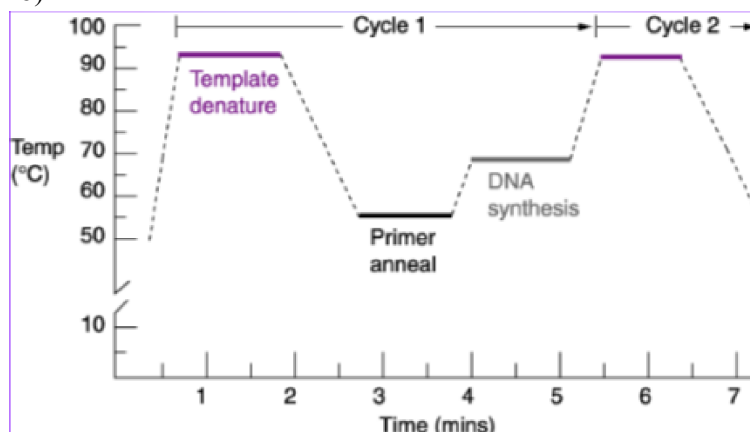
PCR = polymerase chain reaction

- obrovské namnožení určitého úseku DNA
- izolace DNA Pol z termotolerantního organismu *Thermus aquaticus* (Taq polymeráza – byla první, dnes už se používají i další termotolerantní DNA Pol)
 - 1969 – v Yellowstone nalezen organismus *Thermus aquaticus*
 - 1976 – izolace termotolerantní DNA Pol
 - 1985 – návrh molekuly v PCR (Kary Mullis – 1993 Nobelova cena)
 - 1989 – tato polymeráza byla označena jako molekula roku
- složení PCR směsi
 - templatová DNA
 - primer „reverse“
 - primer „forward“
 - (-> vymezení oblasti, kterou chceme množit)
 - dNTPs (deoxynukleosidtrifosfáty)
 - pufr (-> vhodné prostředí)
 - Mg^{2+} (pro polymerázu)
 - polymeráza
- směs se dá do zkumavky
- zahřátí -> denaturace DNA (-> rozdělení dsDNA na ssDNA) (kolem 95 °C)
- nadbytek primerů – místo toho, aby řetězce reasociovaly k sobě, zůstanou ještě nějakou chvíli odděleny; kinetika reasociace je taková, že nejdéle trvá nalezení komplementárních

sekvencí, pak už rychlé (jako zip); nadbytek komplementárních sekvencí -> na začátek a konec kóžené sekvence se navážou primery -> ohraničení oblasti



- *Annealing*: snížení teploty (cca 60°C) -> nasednutí oligonukleotidů (primerů) na speciální místo v DNA, který jsme si vybrali pro polymeraci
- > 3'-OH očko může fungovat jako primer pro Taq polymerázu -> prodloužení primeru -> mírné zvýšení teploty na teplotu optimální pro DNA Pol (72 °C); běží i mimo příslušný úsek!
- > další cyklus: denaturace, řetězce jsou odděleny, reasociace primerů (reasociují i s novými úseky) -> polymerace
- > vznikají pořád delší molekuly, ale už vzniká molekula obsahující obě cílová místa pro primery a má přesnou délku cílové sekvence
- > další cyklus -> reasociace -> kromě dlouhých molekul, jejichž množení probíhá lineárně, získáváme první 2 cílové molekuly (i ty se dále množí, probíhá množení i na původních molekulách)
- > exponenciální množení cílových molekul (po 30 cyklech cca 60 dlouhých molekul a cca miliarda cílových sekvencí)
- > pro namnožení určité oblasti nemusíme znát, co je uvnitř, ale musíme znát její kraje, zároveň musí být dlouhé max. několik kb (v některých případech – speciální PCR – až 40 kb)



- kolik dostanu molekul DNA po ukončení PCR? 2^n , kde n = počet cyklů
- zpočátku se lahvička se vzorkem dávala z lázně s určitou teplotou do lázně s jinou teplotou do lázně s třetí teplotou (3 teploty – teplota denaturace, teplota reasociace a začátku polymerace a teplota polymerace)
- polymerázy používané při PCR mají různé vlastnosti

Enzyme	Relative efficiency ^a	Error rate ^b	Processivity ^c	Extension rate ^d	3' to 5' exo	5' to 3' exo
<i>Taq</i> Pol	88	2×10^{-4}	55	75	no	yes
<i>Tli</i> Pol (Vent)	70	4×10^{-5}	7	67	yes	no
<i>Pfu</i> Pol	60	7×10^{-7}	n.d.	n.d.	yes	no
<i>rTth</i>	n.d.	n.d.	30	60	no	yes

^a Percent conversion of template to product per cycle.
^b Frequency of errors per base pairs incorporated.
^c Average number of nucleotides added before dissociation.
^d Average number of nucleotides added per second.
n.d. = not determined.

- řada polymeráz je chybná, protože nemají proofreading aktivitu (Taq patří mezi hodně chybné)
- využití
 - Diagnostika
 - detekce patogenů
 - hledání mutací v genech
 - genotypování pomocí STR markerů
 - náchylnost k chorobám (CF, AD)
 - Forezní praxe
 - Jeffreys (RFLP, 1985)
 - multiplex PCR STR oblastí (velmi polymorfní, stabilně děděné)
 - Laboratoř
 - klonování namnoženého úseku DNA
 - mutageneze
 - RT PCR (reverzní transkripce)
 - sekvenování
 - příprava sond
- kvalitativní metoda – ukazuje, zda něco někde je nebo není (*end point analýza* – data sbíráme, když je reakce ukončena)
- metoda, jak sledovat PCR uprostřed exponenciální fáze (v nějakém konkrétním cyklu se podívát, jak to vypadá, podívat se, kdy která z paralelně sledovaných reakcí dosáhne určitého bodu; pokud budou reakce stejně účinné a v určitém momentu naměříme někde templátové molekuly více, tam jí bylo ve vzorku více na začátku)
 - pokud vyrobíme kalibrační křivku, umožňuje nám zjistit *kvantitativní analýzu* toho, kolik vzorku jsme měli na počátku
- RT-PCR
 - abychom mohli detekovat RNA pomocí PCR, je nutno ji převést na DNA za účasti reversní transkriptázy (ta má dvě aktivity: RNA dependentní polymerázovou aktivitu a aktivitu RNázy H – odbourává primery)
- denaturační křivky
 - pro řadu pokusů je potřeba znát teplotu tání NK
 - pokud detekci neděláme sondou, ale detekujeme nově vznikající dvouřetězce, máme spoustu nových dvouřetězců, které produkují fluorescenci
 - -> takovýto vzorek po jednom stupni zahřívání a monitorovat fluorescenci, sledovat její ubývání -> *denaturační křivky*
 - denaturační křivky se liší podle sekvence
 - na denaturační křivce je možno vidět změny v jednom nukleotidu -> použití v diagnostice (změny u různých pacientů)

Sekvenování

- určení nukleotidového složení

Sanger – terminace transkripce

- využívá DNA polymerázy (často Taq)
- princip: na templátovou DNA nasedá očko (-> musíme znát aspoň kus sekvence), které má 3'-OH konec, příslušná polymeráza prodlužuje
- použijeme 1 primer, 4 dNTPs a malé množství 4 ddNTPs (dideoxynukleosidtrifosfát – chybí 3'-OH -> nemůže být prodlužován -> terminace)
- -> náhodně je zařazován dideoxynukleosid -> vznikají náhodně dlouhé úseky
- -> vizualizace – řada proužků, kde známe poslední nukleotid
- -> na elektroforéze se to dá dohromady
- elektroforéza musí být speciální – musí být schopna dělit i docela dlouhé fragmenty, které se liší právě o jeden nukleotid; musíme zajistit, že fragmenty budou denaturovány (elektroforéza běží v denaturačním prostředí, například za vyšší koncentrace močoviny, a za vyšší teploty)
- odkud kam se čte? – nejrychleji se pohybují malé fragmenty -> co doběhlo nejdál (nejblíží anodě), to je začátek
- jednotlivé ddNTPs se dnes označují fluorescenčními barvičkami, dávají se do počítače
- metoda, kterou se sekvenovalo až do r. 2005 (včetně programu HUGO); dnes už se na sekvenování genomů nepoužívá (jen na malé sekvenování)
- popis z genetiky:
 - dideoxy – DNA polymeráze se kromě normálních deoxynukleosidů daly i dideoxynukleosidtrifosfáty (liší se tím, že na 3' konci uhlíku mají místo -OH skupiny jen vodík -> syntéza na něm končí, protože se další nukleotid zařadit nemůže)
 - templátová DNA -> denaturace (-> jednořetězcová templátová vlákna)
 - primer pro sekvenační reakci – poskytuje -OH konec
 - do reakční směsi dáme normální DNA polymerázu, dáme jí k dispozici normální nukleosidtrifosfáty a malé množství dideoxynukleosidtrifosfátů
 - (když to Sanger vymyslel, měl 4 zkumavky, do každé dal jiný dideoxynukleosid; dnes se dávají všechny najednou a značí se každý jinou fluorescenční barvičkou)
 - proběhne syntéza nového vlákna – DNA polymeráza se naváže na primer a jede podle templátového vlákna; probíhá podle velké spousty amplifikovaných vláken
 - náhodně se stane, že se na různá místa do nově syntetizovaného řetězce zařadí dideoxynukleosid – zde syntéza končí
 - -> směs fragmentů, kde syntéza končí na různých místech
 - -> denaturace, odstranění templátových řetězců
 - zbyde spousta jednořetězcových nově syntetizovaných vláken, která vždy končí dideoxynukleosidem
 - pak se pustí na elektroforézu – fragmenty se rozdělují podle délky (citlivá elektroforéza – schopná rozlišit i velikost jednoho nukleotidu) -> vzor fragmentů (zviditelnění radioaktivitou) různě dlouhých – nejkratší doputovaly na gelu nejdál, nejdelší zůstávaly; odečítání, jak jde sekvence v nově nasyntetizovaném vlákně, podle toho, jak daleko fragmenty doputovaly (vidíme vždy poslední nukleotid – pro Sangerův případ; když jsou všechny a svítí se na to, aby se vybudila fluorescence, a čte to počítač)

Pyrosekvenování

- směs DNA (např. izolovaný genom) – můžeme sekvenovat jen určité úseky
- -> vezmeme DNA, rozdělíme na spoustu úseků, osekvenujeme, poskládáme (díky překryvům)
- potřeba amplifikovat signál pomocí *emulzní PCR*
 - velký nafragmentovaný genom

- chceme fragmenty osekvenovat zároveň, ale číst je chceme separátně
- vezmou se speciální kuličky – na povrchu mají jednořetězcové oligonukleotidy DNA a jsou komplementární k adaptérovým sekvencím na koncích fragmentů, které jsme si předem připojili
- směs kuliček + fragmentů -> tvorba emulze (vodný pufrovací roztok + olej) – v emulzi se vytvoří bubliny (do každé bubliny se dostane jen jedna kulička s adaptéry, fragmenty mají na koncích komplementární sekvence -> fragmenty se mohou přichytit na kuličku; pokud je správně nařaděno, na každou kuličku se naváže jeden fragment a každá kulička s fragmentem se dostane do své separátní bubliny)
- necháme probíhat PCR – separátně v bublinách (-> v 1 bublině se množí vždy jen 1 fragment) -> množí se současně spousta fragmentů, ale možno je číst separátně
- na kuličku se zachytí jen 1 fragment, adaptér slouží jako primer pro syntézu -> tvorba komplementárního vlákna pevně navázaného na kuličku; původní vlákno se během PCR (během denaturace) oddělí a chytí se na jiný adaptér na téže kuličce -> pořád dokola, kulička je obklopena spoustou kopií svého fragmentu
- kuličky pak necháme zapadnout do komůrek ve speciální destičce, kde probíhá vlastní sekvenační reakce
- vlastní sekvenační reakce – záleží na používané technologii – sekvenování syntézou nebo sekvenování ligací
- sekvenování syntézou – pyrosekvenování, polovodičové sekvenování
- ligace – SoLiD
- tyto tři technologie se liší způsobem detekce – pyrosekvenování – detekce luminiscence; polovodičové sekvenování – detekce změn pH, SoLiD – fluorescenční detekce)
- 1. technologie 2. generace
- dlouhou dobu velmi populární (x měla mouchy)
- před 4 lety byl ohlášeno konec podpory pro přístroje, které sekvenují tímto způsobem
- namnožené templátové vlákno na kuličkách (připravené z emulzní PCR) v komůrkách -> přidáme směs, aby mohla podle templátových vláken proběhnout syntéza DNA (-> přidáme DNA polymerázu a její substráty – nukleotidtrifosfáty + primer + ATP sulfurylázu)
- když DNA polymeráza přidá za –OH skupinu na primeru nukleotid – uvolní se pyrofosfát, na druhé straně se uvolní vodík (nepodstatné); pyrofosfát je schopen reagovat – při reakci pyrofosfátu katalyzované ATP-sulfurylázou se uvolňuje ATP; jiný enzym – luciferáza – využívá uvolněné ATP k přeměně luciferinu na oxoluciferin -> luminiscence -> detekce kamerou
- při každém zařazení nukleotidu na nově vznikající vlákno vznikne luminiscence
- snímací systémy detekující, v jaké komůrce k záření došlo
- jednotlivé typy deoxynukleotidtrifosfátů jsou puštěny postupně – např. první deoxyC – jen na fragmentech, kde by na prvním místě za –OH skupinách měly G, se deoxyC zařadí a zasvítí to; na ostatní se nezařadí; odmytí předbytečných deoxyC -> puštění A, T G, neustálé opakování; prodlužování nově syntetizovaného řetězce; v některých komůrkách zasvítí a v jiných ne
- pokud jsou za sebou např. 3 A, zasvítí v dané komůrce 3x silněji

Illumina

- dnes nejčastější
- amplifikace pomocí *můstkové PCR*
- *amplifikace pomocí můstků*
 - speciální destička, na jejím povrchu zachycené krátké oligonukleotidy komplementární ke koncovým adaptérům (levému i pravému)

- pustíme na ni dostatečně naředěný vzorek DNA (aby se fragmenty dostaly na dostatečně vzdálená místa na destičce)
- -> PCR (fragment přichycen k adaptéru na určitém místě -> ohne se -> druhým adaptérovým koncem páruje k vedlejšímu oligonukleotidu, ten zároveň slouží jako primer pro amplifikační syntetickou PCR reakci – volná –OH skupina)
- -> denaturace – „můstek“ se narovná
- původní zachycený fragment zmizí
- nově nasyntetizovaný fragment zůstává – je pokračováním primeru
- mnoho opakování
- vznikají shluky fragmentů, kde každý původní fragment reprezentuje jinou část genomu a ve shlucích je mnoho kopií fragmentu
- sekvenační reakce je trochu podobná dideoxy
- používají se modifikované deoxynukleotidtrifosfáty – mají 3'-OH skupinu blokovanou (navázáním jiné chemické skupiny nebo na adaptér, který je napojen na bázi, je napojeno něco velkého, co 3'-OH skupinu zablokuje); tato vazba není nezvratná (x dideoxy je) – blok se dá chemickou reakcí odstranit
 - *cyklické reverzibilní terminátory* = takto speciálně upravené nukleotidy, každý typ je značen svojí fluorescenční barvou, ta bývá napojena na bázi
- přidáme cyklické reverzibilní terminátory k fragmentům + DNA polymeráza + primer (komplementární k adaptérům)
- DNA polymeráza zařadí reverzibilní terminátor -> zasvítí příslušnou barvou -> zastavení (syntéza nemůže pokračovat) -> odečteme -> pustíme chemické činidlo, které odstraní blokující látku -> syntéza může pokračovat dál
- -> pokračování, dokud není nasyntetizováno celé můstkové vlákno

SoLiD systém

- nové vlákno se nesyntetizuje podle templátu nukleosidtrifosfátů
- připravených 16 oktaoligonukleotidů (8 nukleotidů), každý začíná určitou dvojpísmennou kombinací; zbytek oligonukleotidu jsou báze schopné párovat s čímkoliv (degenerované = univerzální báze); na druhém konci oligonukleotidu fluorescenční značka – 4 barvy, vždy 1 barva pro 4 kombinace
- templátové vlákno, na něj primer (x nejedná se o primer pro vlastní syntézu – rozdíl oproti předchozím); přidání 16 oktaoligonukleotidů, k templátovému vláknu pořádně hybridizoval jen ten oligonukleotid, který měl první dvě písmenka komplementární k sekvenci, kterou jsme chtěli číst – jen ten vydržel hybridizovat tak dlouho, aby mohl enzym sligovat s „primerem“
- -> odštěpení 3 nukleotidů z oktaoligonukleotidu (jeho konce) -> odstranění fluorescenční značky -> může nasednout nový oktaoligonukleotid -> ligáza spojuje -> další odštěpení
- detekuje se, jaký fragment nasedl (jakou barvou zasvítilo) -> možno odečítat vždy 2 písmenka (víme, že to je jedna ze 4 možných kombinací) -> 3 písmenka nevíme -> 2 písmenka jsou jedna ze 4 možných kombinací na základě barvy, kterou zasvítilo -> atd.
- -> denaturace -> opakování procesu („primer“ o jeden nukleotid delší -> počátek odečítání se posunul o nukleotid -> odečítáme zase dvojpísmenné kombinace, první písmeno se teď překrývá s druhým z předchozího cyklu)
- -> mnoho takovýchto cyklů s posouváním počátku
- -> z výsledků se dá určit, jaké písmenko je kde -> templátové vlákno
- tento způsob se moc neujal, dnes už není podporováno

IonTorrent

- biologicky stejný princip jako pyrosekvenování
- detekce není na základě luminiscence, ale je založena na tom, že detekujeme vodík, který se uvolnil při zařazení nového nukleotidu (na jedné straně se uvolňuje pyrofosfát, na druhé

vodík) -> změna vodíku = změna pH -> nejcitlivějších pH metr na světě – detekuje změnu spojenou s uvolněním jednoho jediného protonu

- při zařazení nukleotidu detekujeme reakci
- opět přidáváme nukleotidy postupně, pokud jich je více za sebou stejných, detekujeme větší změnu

Sekvenování pomocí metody nanopore

- je čteno templátové vlákno (nevzniká žádné nové vlákno)
- speciální membrána, do ní jsou zanořeny nanopóry (tvořeny proteinovými komplexy) s dírou dostatečně velkou, aby jí mohla procházet DNA
- nahoře zachycen motorový protein, který bude DNA posouvat do póru -> DNA prochází skrz membránu
- v rámci póru se mění vlastnosti – detekce změny napětí na membráně
- každý typ nukleotidu, který v daném okamžiku prochází, mění proud trošičku jiným způsobem -> detekce, který nukleotid zrovna prochází
- templát je zacyklen -> probíhá v několika opakováních -> eliminace chyb
- není potřeba DNA amplifikovat, možnost čtení velmi dlouhých úseků