

# Metódy molekulárnej genetiky

Predmet: Genetika 1

Prednášajúci: Katarína Gaplovská PhD.

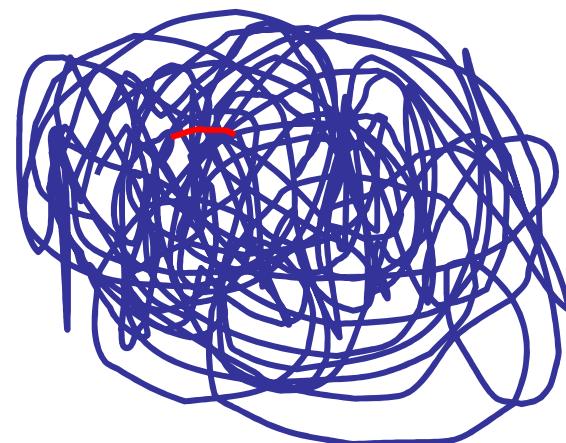
**priemerný ľudský gén**

$3 \times 10^3$  bp



**ľudský genómu**

$3 \times 10^9$  bp



**= hľadanie 1/ 1 000 000 sekvencii !**

# **Prehľad dnešnej prednášky:**

1. Základné metódy používané pri identifikácii génov
2. Príprava DNA knižníc
3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov
4. Molekulárna analýza génov a chromozómov

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

1.1. Štiepenie DNA = restrikčné endonukleázy



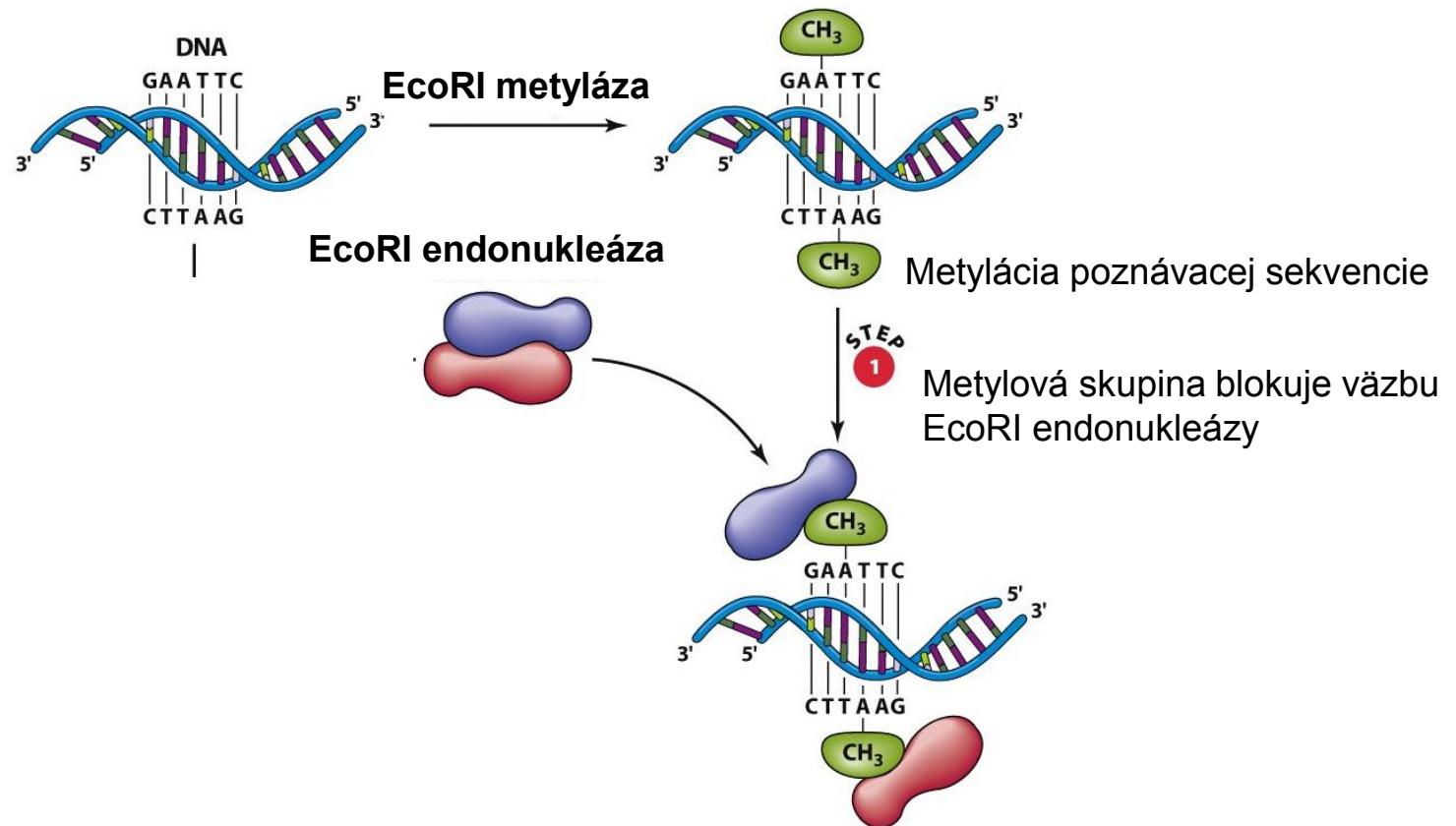
1.2. Amplifikácia = namnoženie DNA/ génu *in vivo*

1.3. Klonovanie v klonovacích vektoroch

1.4. Polymerázová reťazová reakcia = PCR

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### Na čo sú restrikčné endonukleázy v bakteriálnych bunkách?

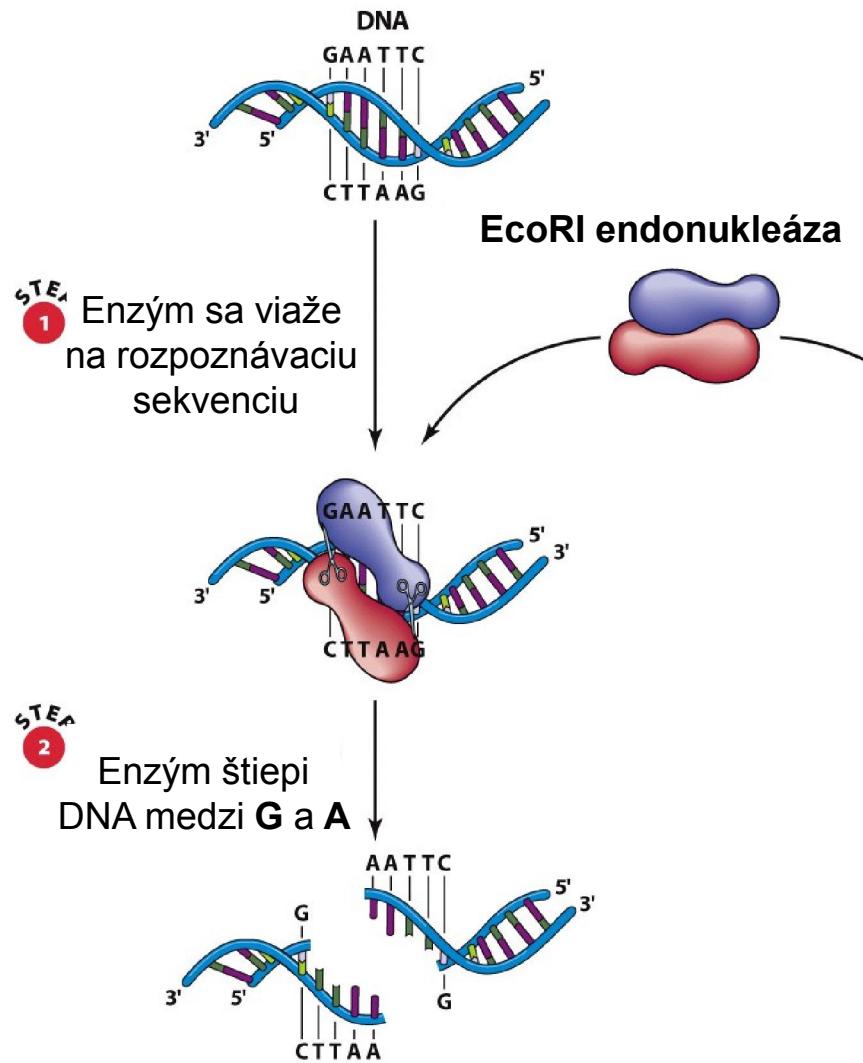


**Historia objavu restrikčných endonukleáz:**

v kapitole 15, strana 448, Genetika, Snustad & Simmons 2009

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

# Restrikčné endonukleázy- ochrana pred cudzorodou DNA



## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### 1.1. Restrikčné endonukleázy

- NEB uvádza 4 triedy (I-IV + IIG, IIP, IIS)

napríklad:

Trieda I

AAC(N<sub>6</sub>)GTGC(N<sub>>400</sub>)/  
TTG(N<sub>6</sub>)CACG(N<sub>>400</sub>)/

EcoK

Štiepia na  
náhodných  
miestach

= > spoznávacie miesto ≠ štiepne miesto

Pri experimentoch sa najčastejšie využívajú  
restrikčné endonukleázy triedy II !

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### 1.1. Restrikčné endonukleázy

5'.... **GAATTC**....3'  
3'.... C**TTAAAG**....5'

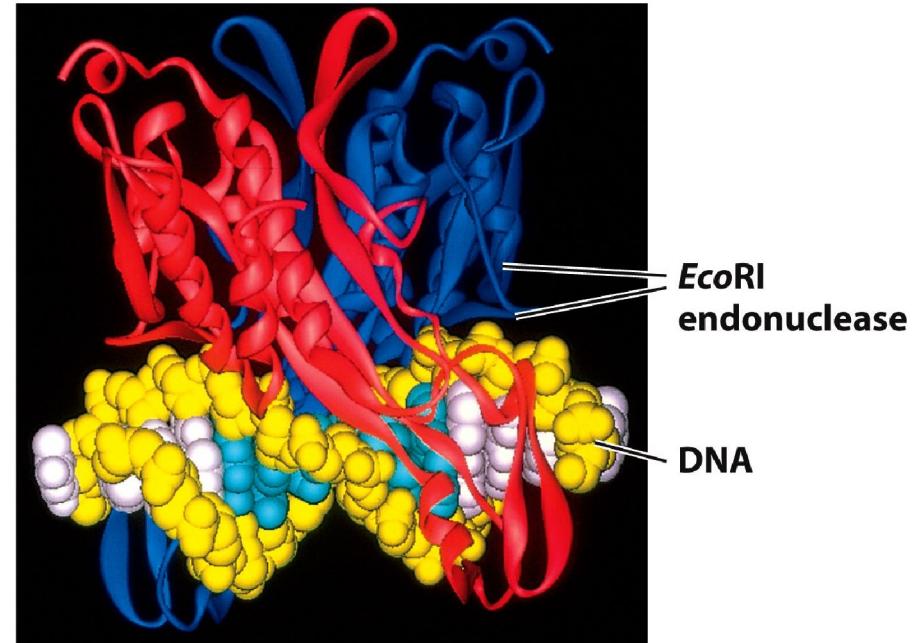
**EcoRI**

5'.... **ACCWGGT**....3'  
3'.... T**GGWCCA**....5'

**Sex AI**

5'.... **CTGCAG**....3'  
3'.... G**ACGTC**....5'

**PstI**



5'.... CCC**GGG**....3'  
3'.... G**GGGCC**....5'

**Smal**

**W = A alebo T**

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### Ako často restrikčná endonukleáza BsuRI DNA molekuly?

5' .... GG**C**C....3'  
3' .... CCG**G**....5'

**BsuRI**

Spoznáva 4 bázy ->  $4^4$   
= 256 možností  
usporiadania tohto úseku

=> teoreticky BsuRI štiepi 1x každých 256 bp

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### Ako často restrikčná endonukleáza EcoRI DNA molekuly?

5' .... **G|AATTC**....3'

3' .... CTTAA**G**....5'

**EcoRI**

Spoznáva 4 bázy ->  $4^6$   
= 4096 možností  
usporiadania tohto  
úseku

=> teoreticky EcoRI štiepi 1x každých 4096 bp

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### Ako často restrikčná endonukleáza NotI DNA molekuly?

5'.... GC|GGGCCGC....3'

3'.... CGCCGGG|CG....5'

**NotI**

Spoznáva 4 bázy ->  $4^8$   
= 65536 možností  
usporiadania tohto  
úseku

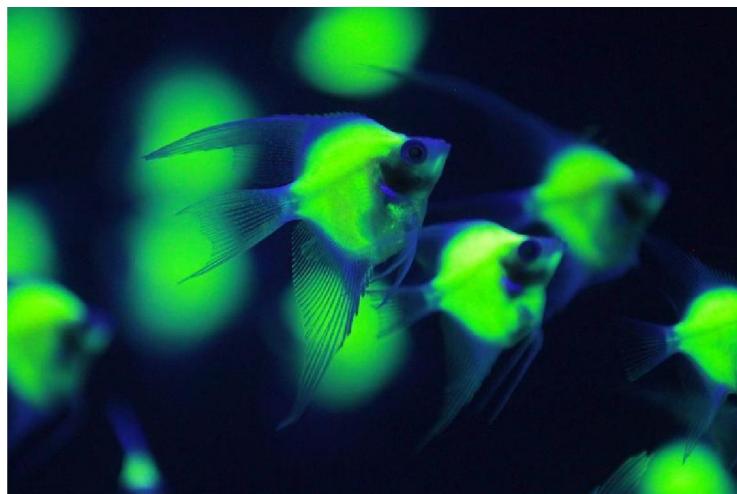
=> teoreticky NotI štiepi 1x každých 65536 bp

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

- **klonovanie génu**

=> izolácia a namnoženie génu – *in vivo/in vitro*

**DNA1 + DNA2 + DNA3 = REKOMBINANTNÁ DNA**  
**DNA Ligáza**



**GMO**



## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### 1.2. Namnoženie DNA fragmentov

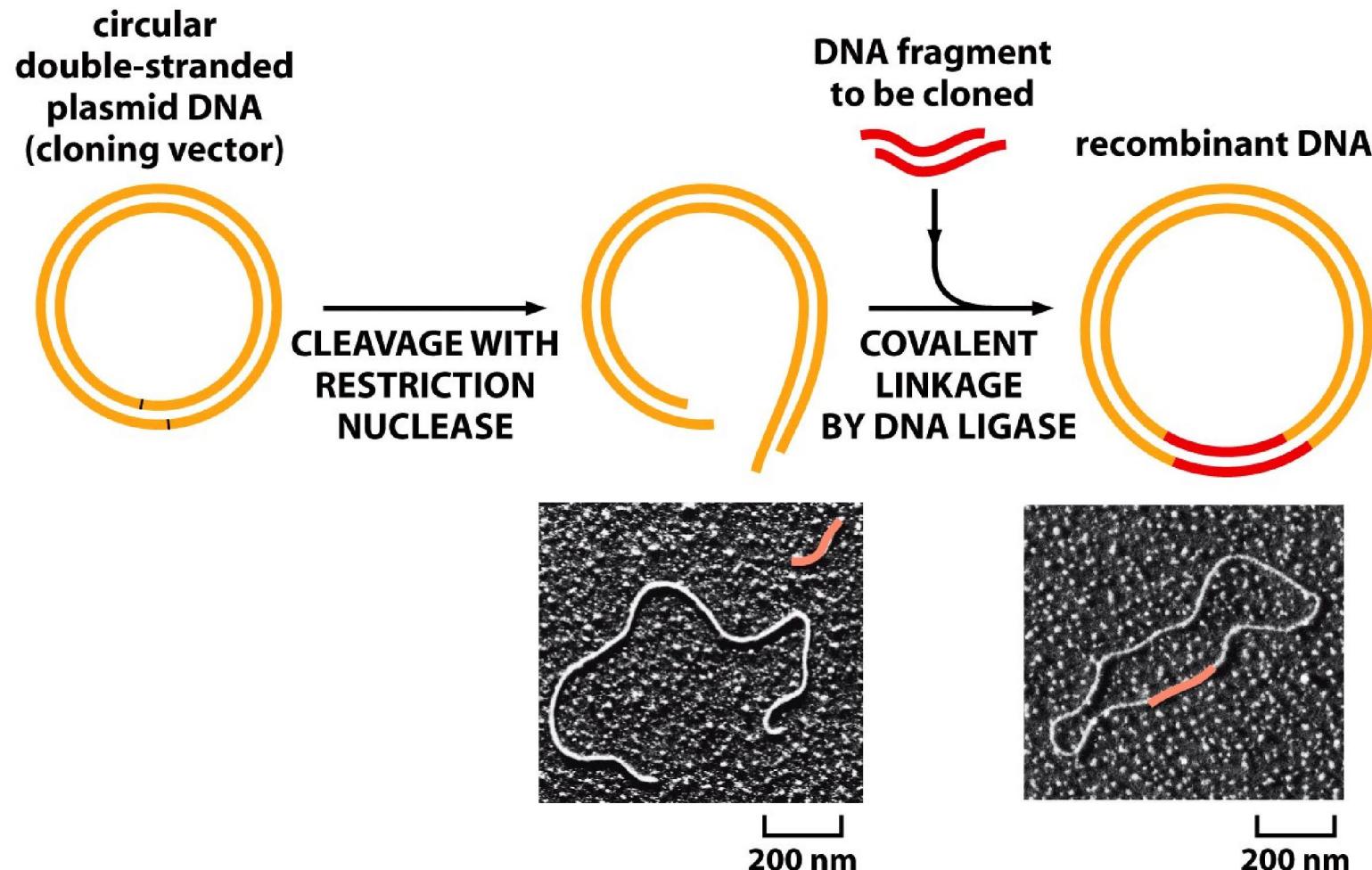


Figure 8-39 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

# Namnoženie DNA fragmentov

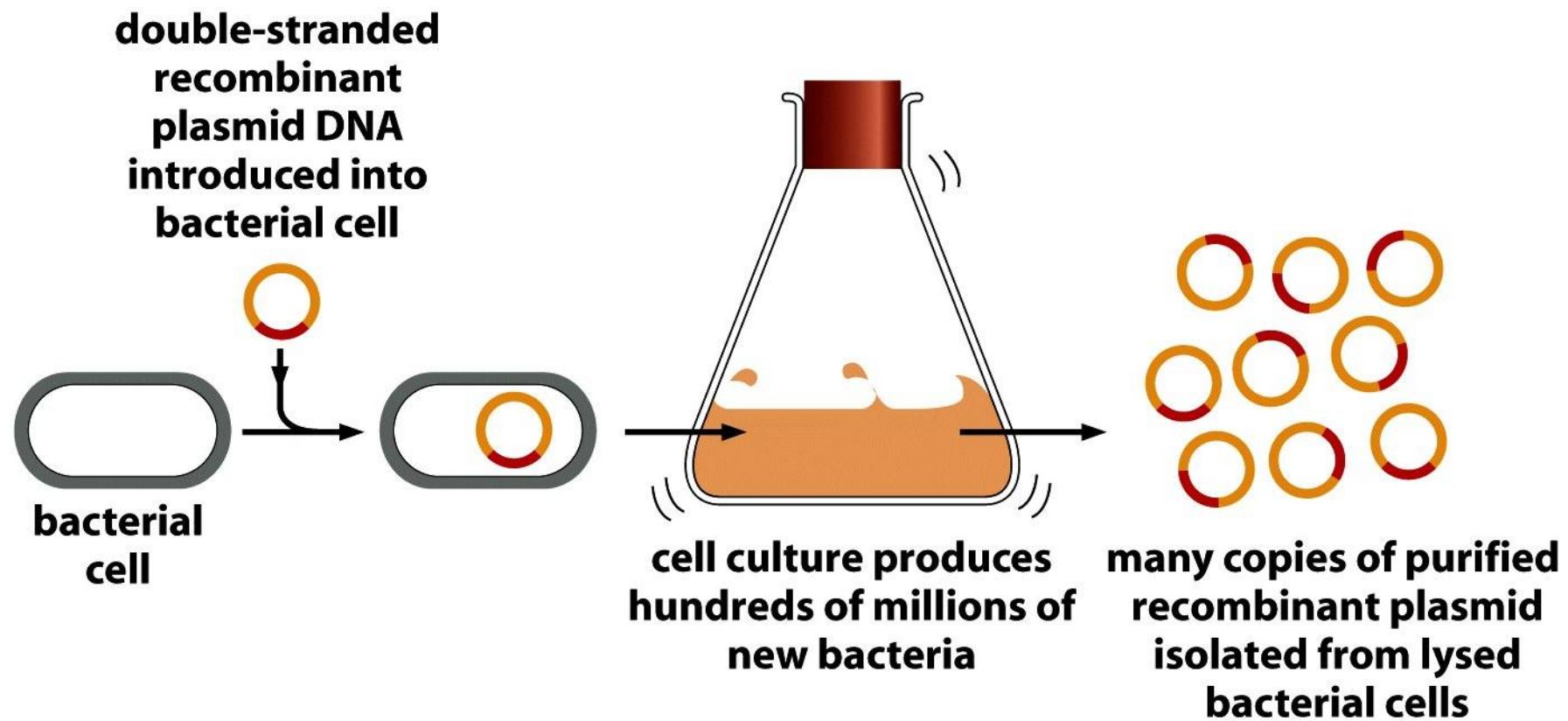
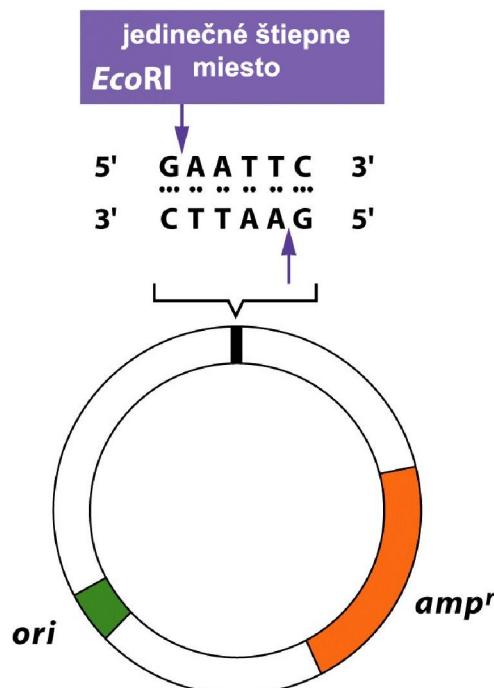


Figure 8-40 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### 1.3. Klonovacie vektor

#### Čo musí obsahovať:



- **ori** (počiatok replikácie)
  - nevyhnutný na replikáciu v hostiteľských bunkách
- **selekčný marker**
  - zvyčajne gén nesúci rezistenciu na antibiotikum
- **jedinečné štiepne miesta**
  - = multiklonovacie miesto
  - = polylinker

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### Typy klonovacích vektorov

		inzerty
a)	plazmidové vektory	< 10 kb
b)	bakteriofágové vektory	10-15 kb
c)	kosmidové vektory	35-45 kb
d)	fagemidové vektory	
e)	eukaryotické, kyvadlové vektory	
f)	umelé chromozómy	BAC 75-300 kb YAC 200-500 kb

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

Chcem študovať gén X a potrebujem si ho naklonovať'



Genóm organizmu, z ktorého chceme študovať gén X je osekvenovaný, v **Genebank** si najdem jeho sekvenciu

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

TGGCTCTGAACACATGATGCCCACTAAGACATAACTCTCAA  
GTTGGCATCTGTCCAGCGGTTGGAGCGAGGTAGGAAGGA  
GGGCAATCCCCCTTTCCCTCCCAAGGGCTGACGGTGG



Gén X si v skúmavke namnožíme pomocou polymerázovej reťazovej reakcie - **PCR**

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### 1.4. Polymerázová ret'azová reakcia

=> Kary B. Mullis - 1983 objav PCR

- 1993 Nobelova cena za chémiu

**Čo na PCR potrebné:**

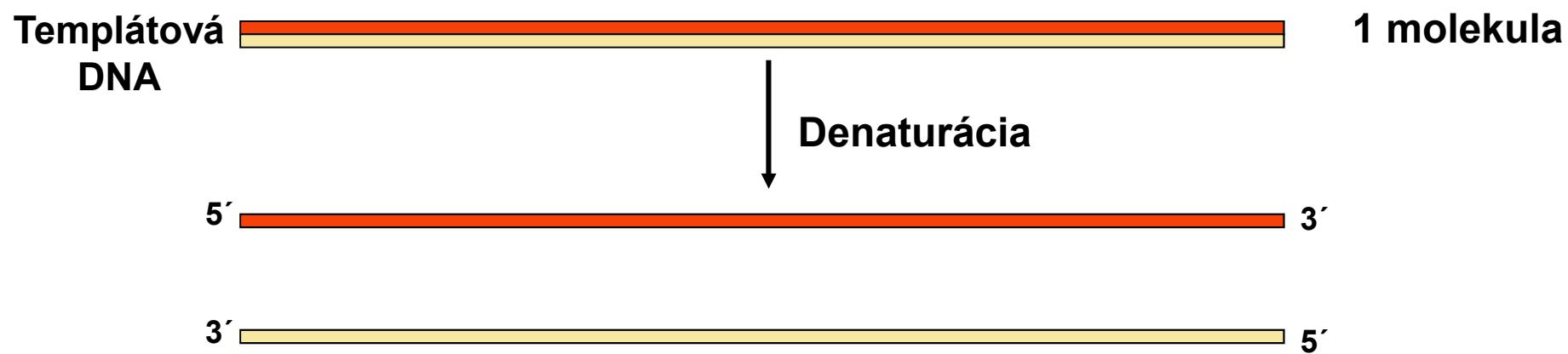
1. DNA templát
2. Primery – syntetické oligonukleotidy komplementárne k známej sekvencii ohraničujúcej gen X
3. Nukleotidy – **A**TP, **G**TP, **C**TP, **T**TP
4. Taq polymeráza – teplotne stabilná DNA polymeráza

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### PCR

- 3 opakujúce sa kroky v jednom cykle:

#### 1. Denaturácia genomickej DNA (92-95°C)

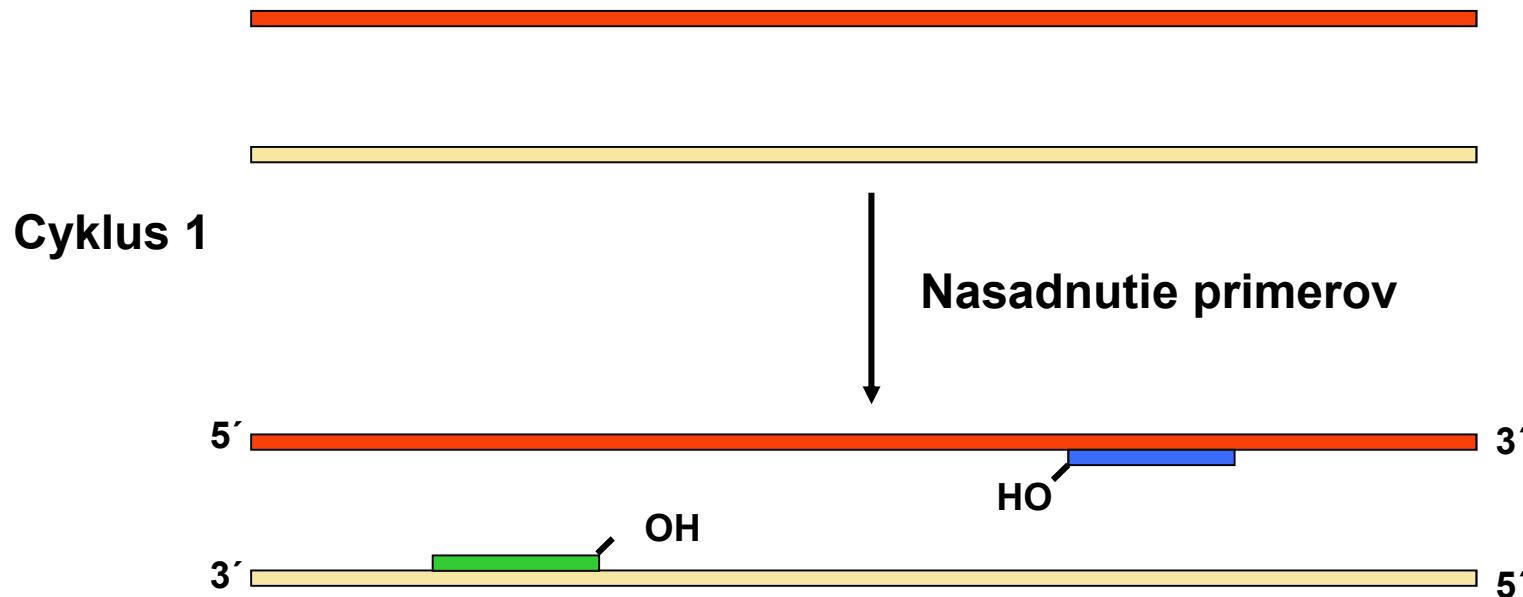


Cyklus 1

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

# PCR

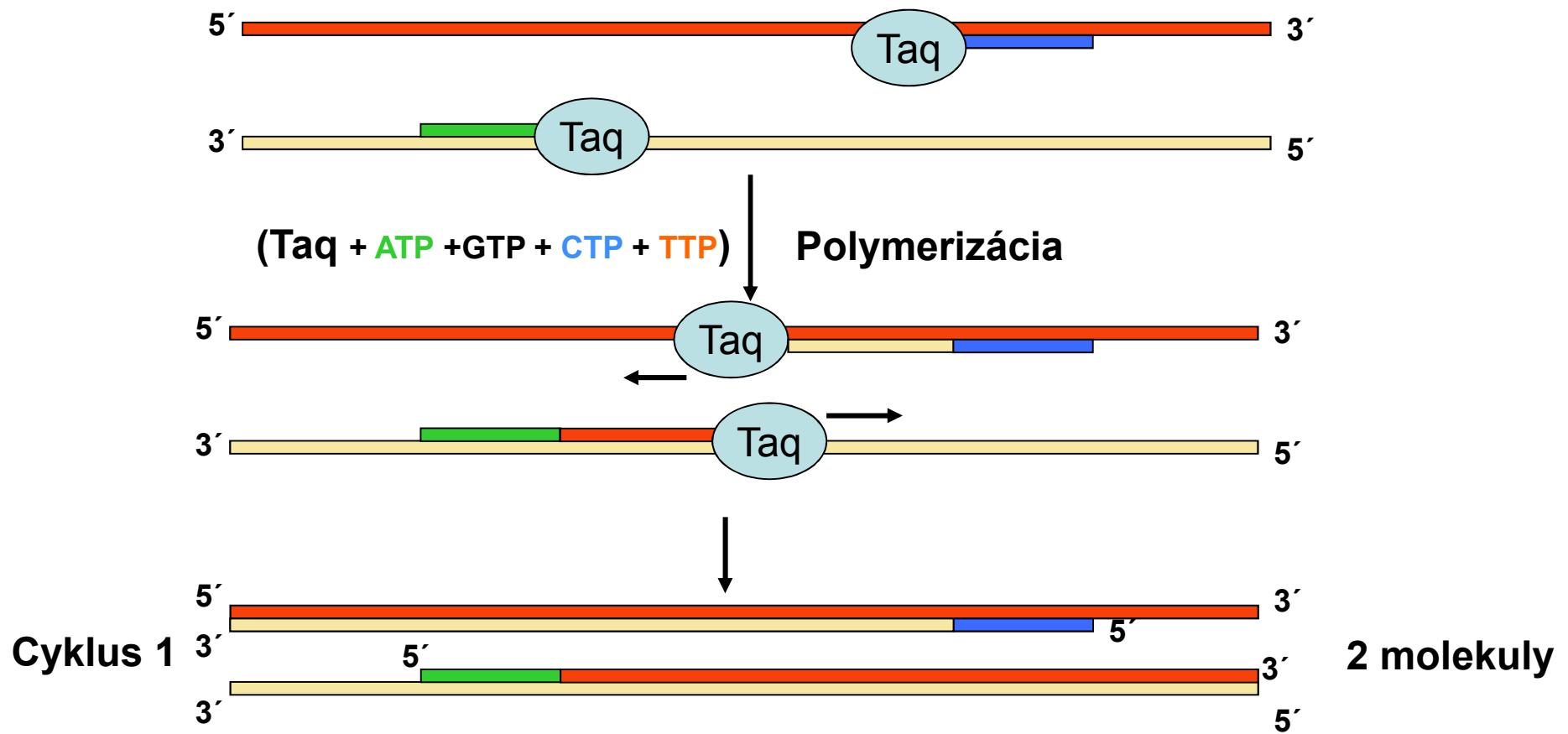
## 2. Anelácia primerov k denaturovanej DNA (50-60°C)



# 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

## PCR

### 3. Polymerizácia DNA fragmentu medzi miestami komplementárnymi k primerom ( $70-72^{\circ}\text{C}$ )



## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### PCR

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

**Koľko kópií cielových DNA molekúl vznikne po 30 cykloch PCR?**

$$= 2^n - 2^n = 2^{30} - 2 \times 30 =$$

**1 073 741 764 molekúl DNA**

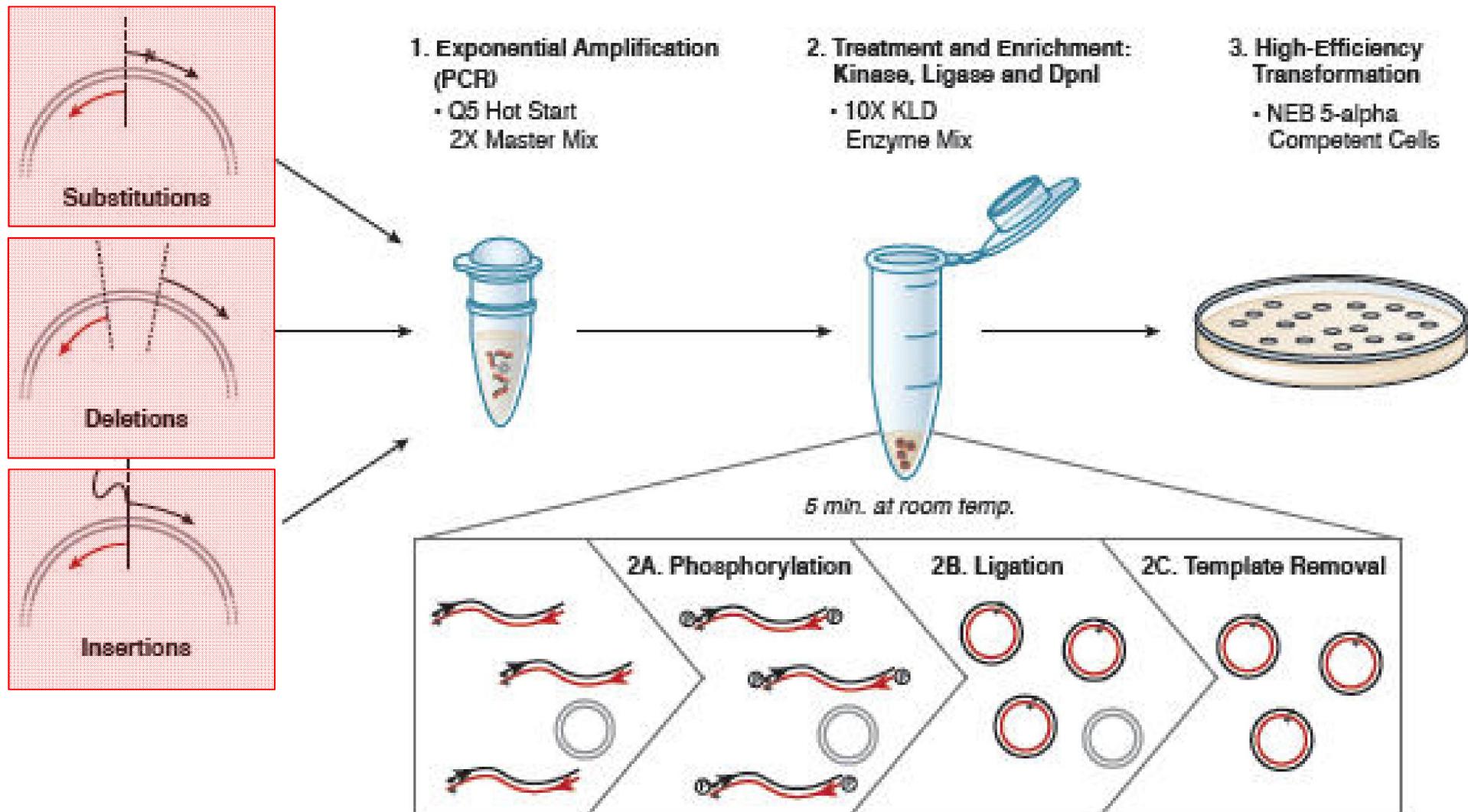
## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

### Využitie PCR :

- Genetické testovanie - prenatálna aj postnatálna diagnostika
- Typizácia tkanív- transplantácie
- Diagnostika infekčných ochorení - mykoplasmy
- Kriminalistika – genetické „odtlačky prstov“, určenie otcovstva
- Výskum – **Miestne špecifická mutagenéza**
- Ale aj detekcia konského mäsa v saláme a iné....

## 1. Základné metódy používané pri identifikácii génov

# Miestne špecifická mutagenéza



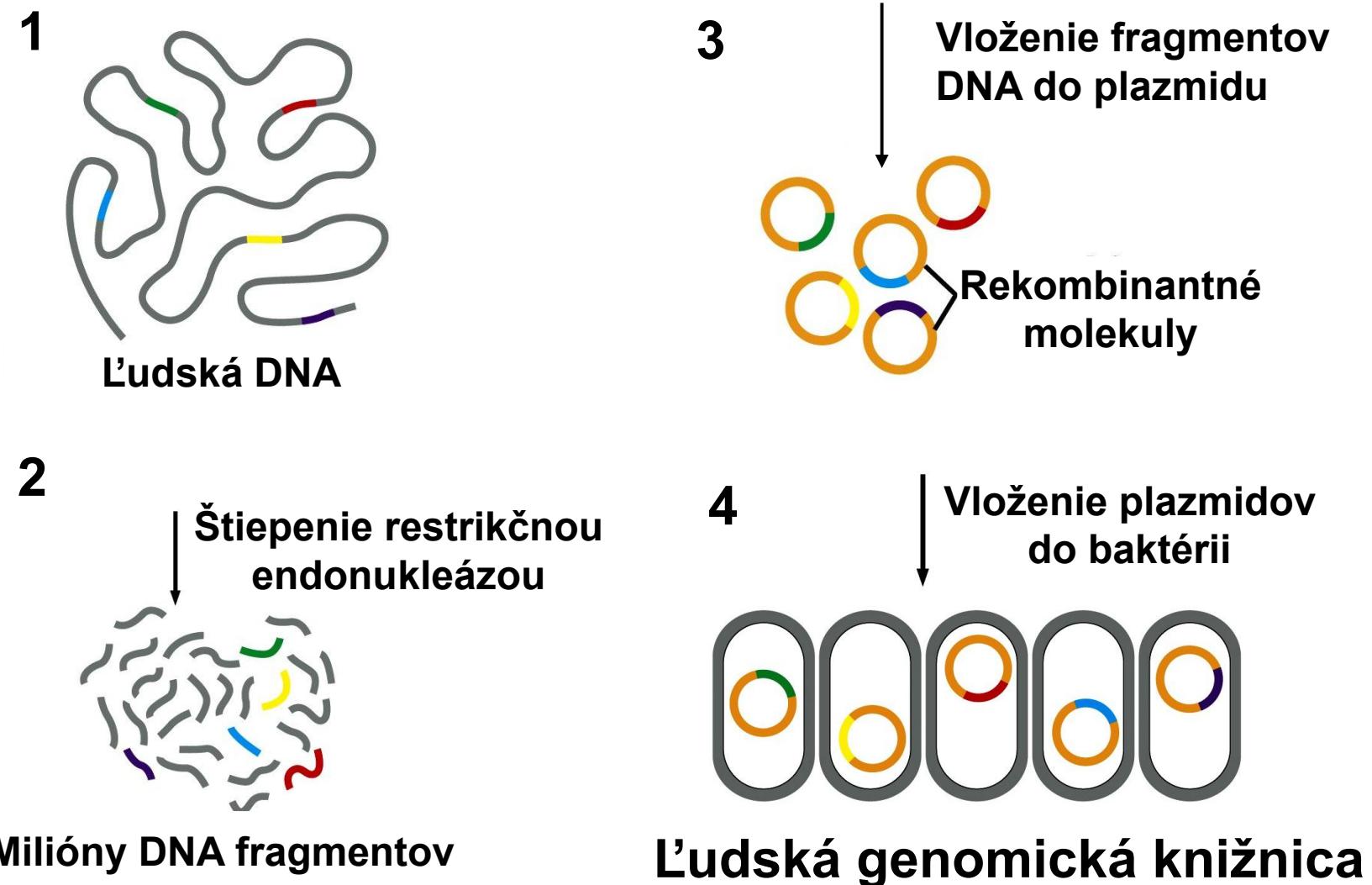
## 2. Príprava DNA knižníc

# DNA knižnice

- **Genomická knižnica**
  - => sada DNA klonov obsahujúca celý genóm jedného organizmu
- **Chromozómovo špecifická knižnica**
  - => pripravuje sa z vyizolovaných jednotlivých chromozómov, uľahčuje izoláciu génov so známou lokalizáciou
- **cDNA knižnica**
  - => obsahuje kódujúce oblasti exprimovaných génov jedného organizmu
  - => pripravuje sa z komplementárnej DNA (cDNA) nasyntetizovanej z RNA pomocou reverznej transkripcie

## 2. Príprava DNA knižníc

# Príprava genomickej knižnice



## 2. Príprava DNA knižníc

# DNA knižnice

- **Genomická knižnica**  
=> sada DNA klonov obsahujúca celý genóm jedného organizmu
- **Chromozómovo špecifická knižnica**  
=> pripravuje sa z vyizolovaných jednotlivých chromozómov, uľahčuje izoláciu génov so známou lokalizáciou
- **cDNA knižnica**  
=> obsahuje kódujúce oblasti exprimovaných génov jedného organizmu  
=> pripravuje sa z komplementárnej DNA (cDNA) nasyntetizovanej z RNA pomocou reverznej transkripcie

## 2. Príprava DNA knižníc

# Príprava cDNA knižnice

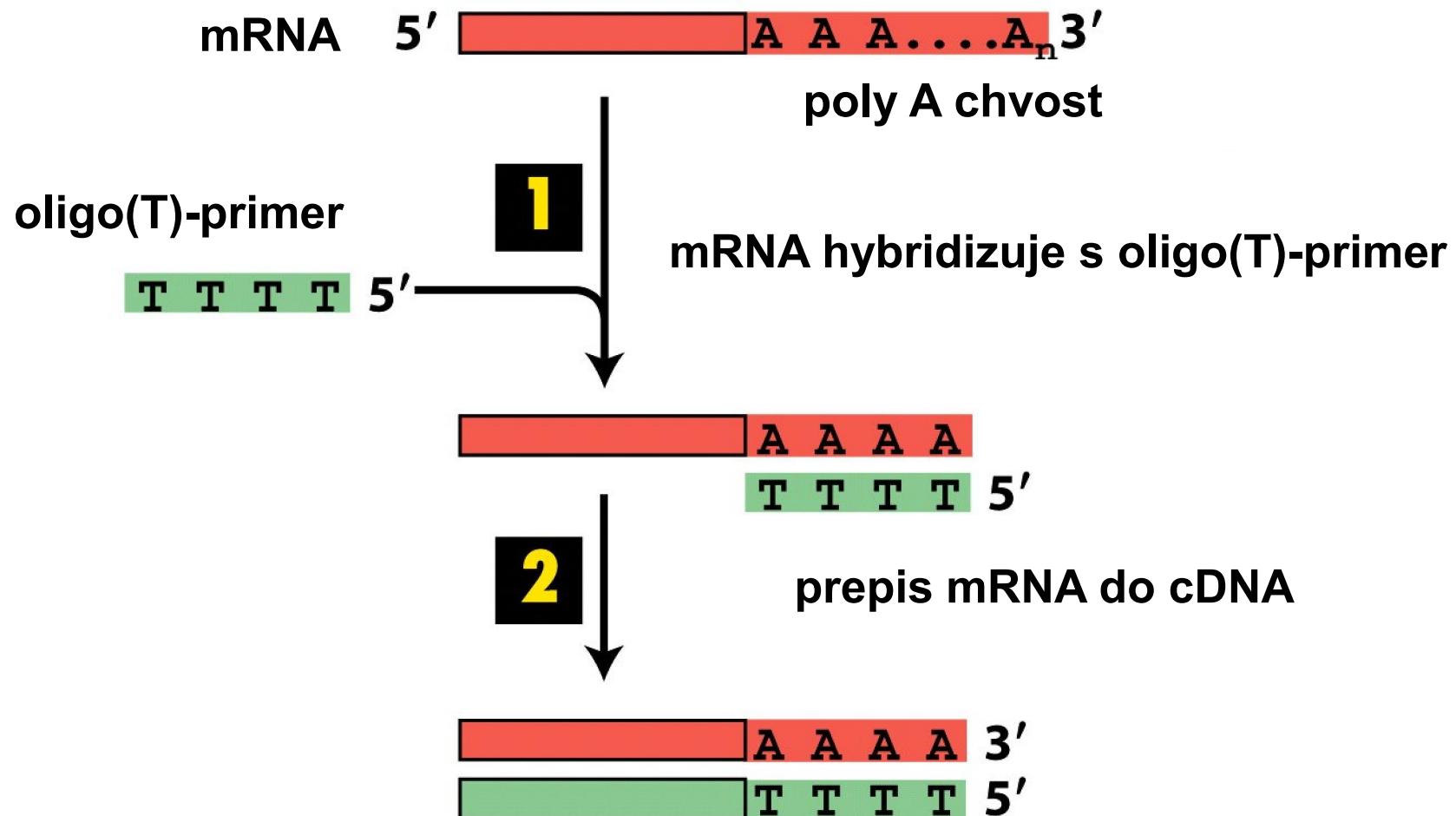


Figure 5-15 part 1  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## 2. Príprava DNA knižníc

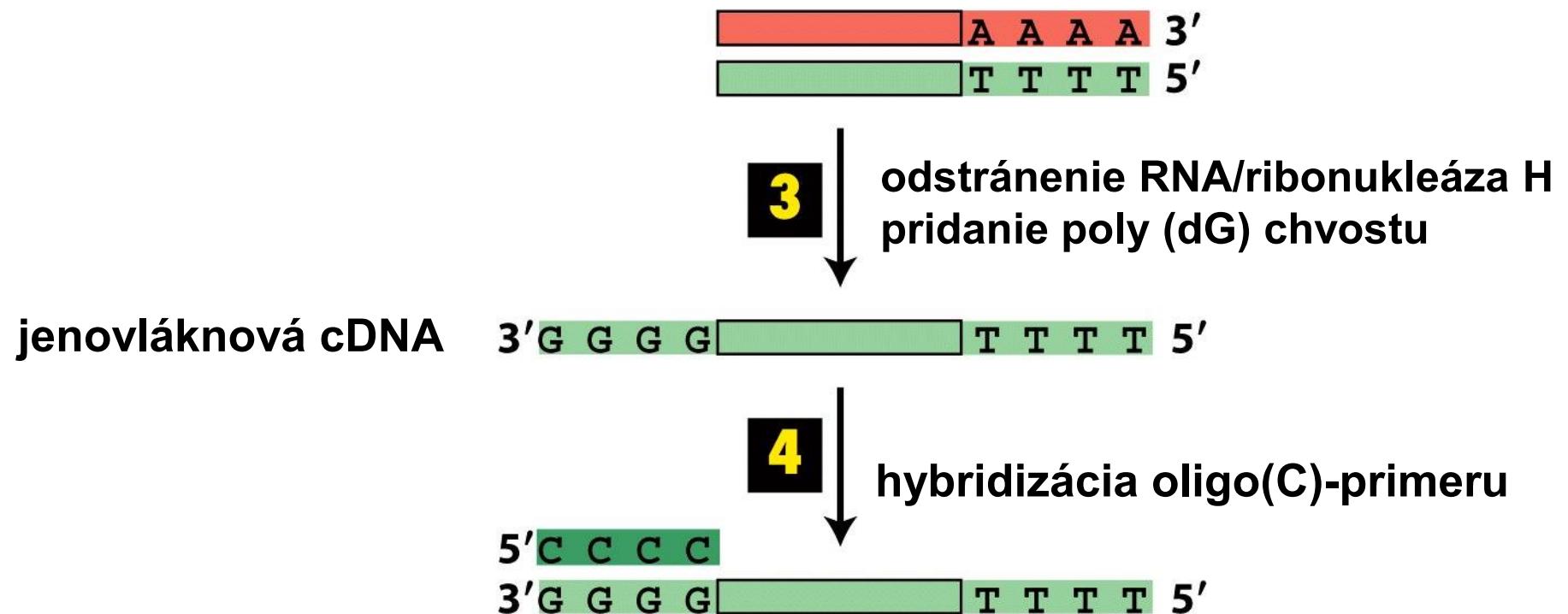


Figure 5-15 part 2  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## 2. Príprava DNA knižníc

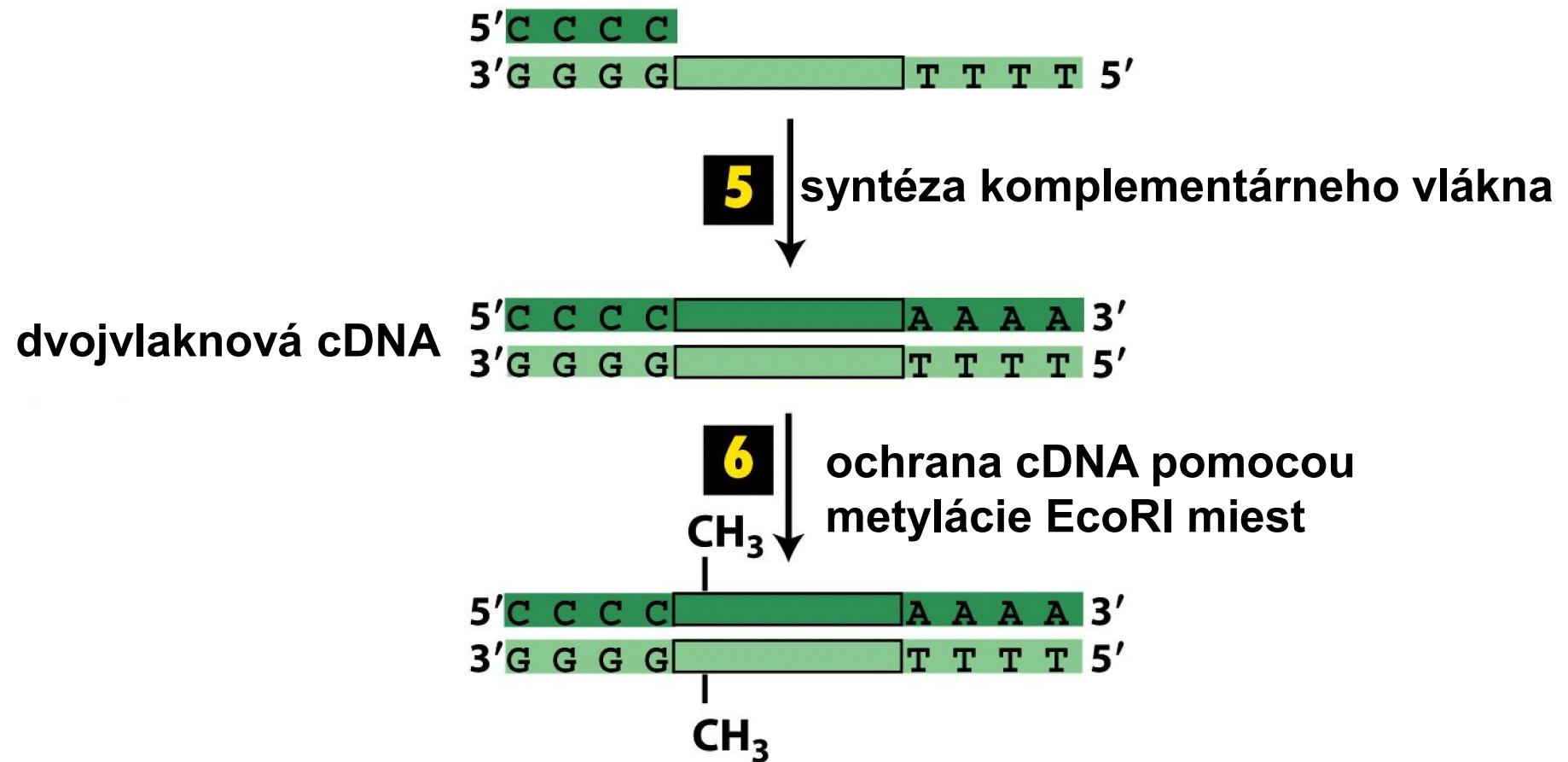
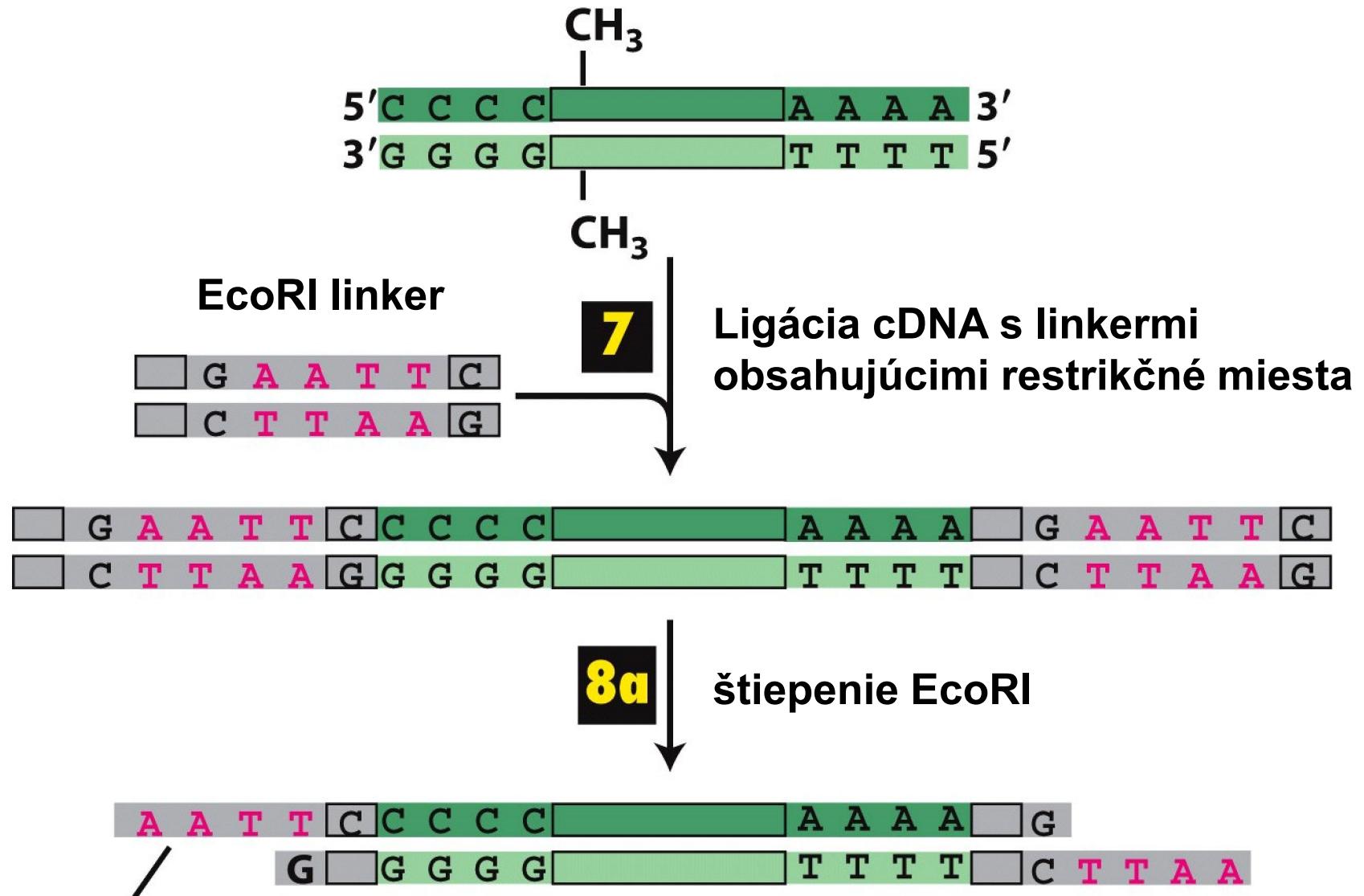


Figure 5-15 part 3  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## 2. Príprava DNA knižníc



prečnievajúci koniec

## 2. Príprava DNA knižníc

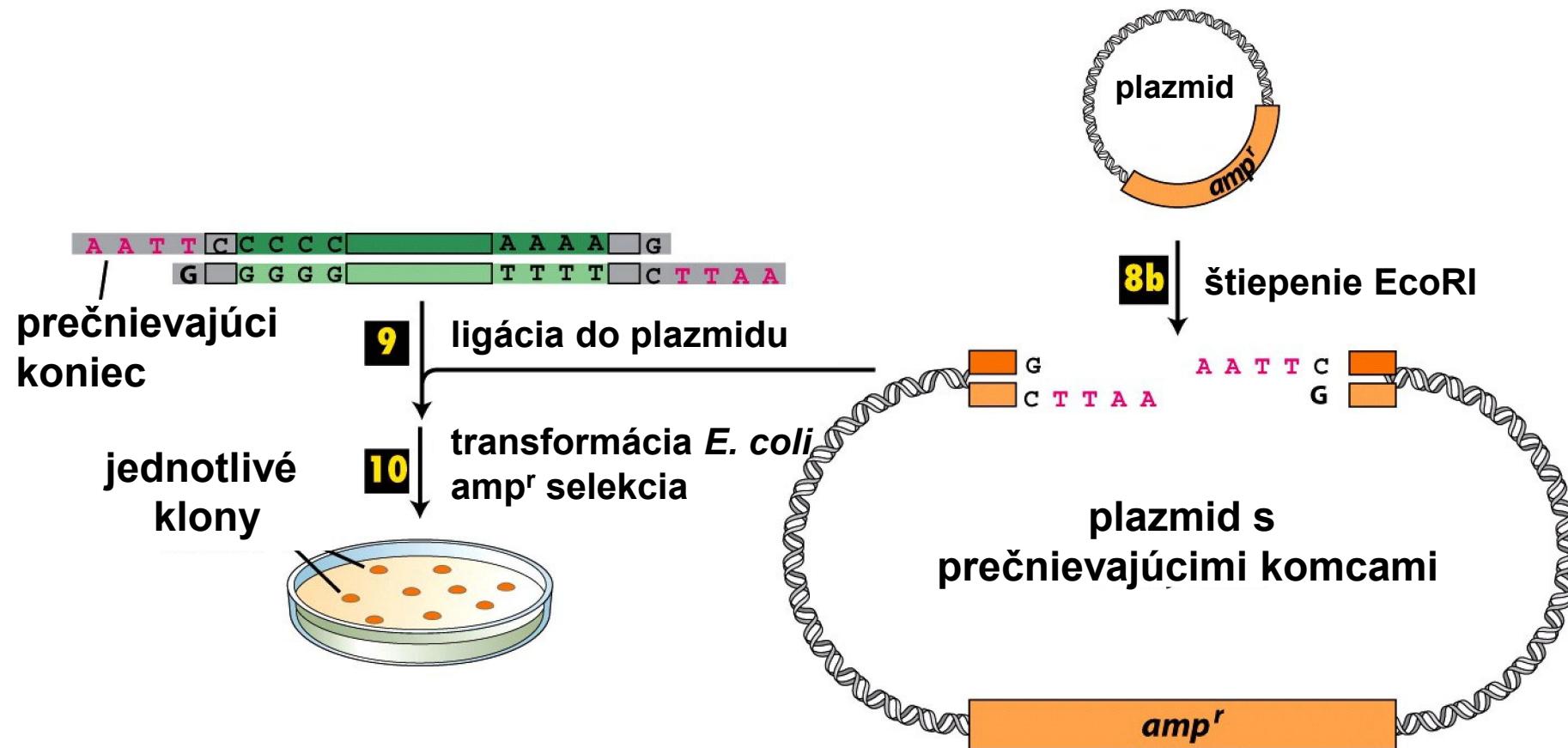


Figure 5-15 part 5  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## 2. Príprava DNA knižníc

# Porovnanie genomickej a cDNA knižnice

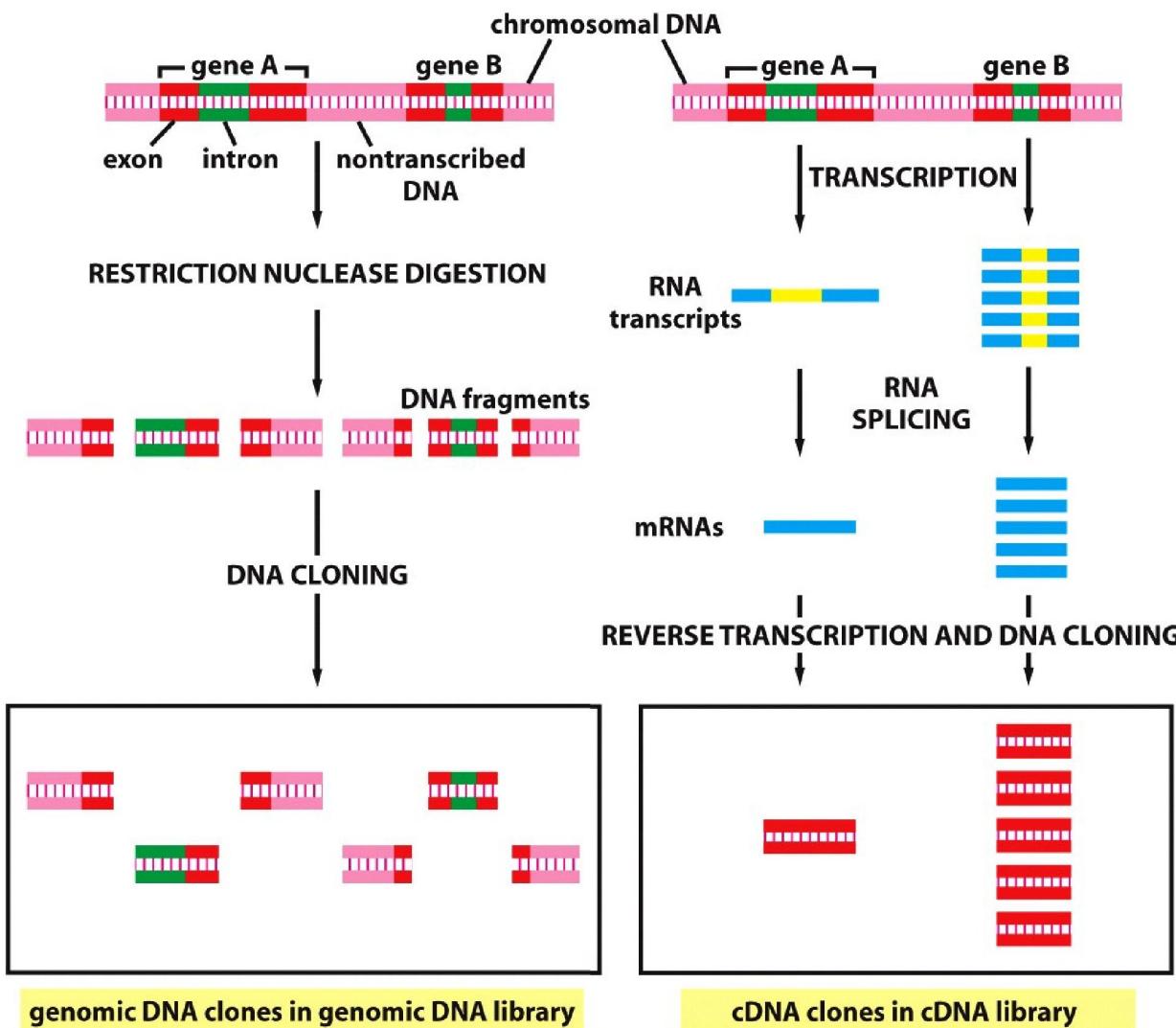


Figure 8-44 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

## 2. Príprava DNA knižníc

# Skríning DNA knižníc za účelom nájdenia konkrétneho génu

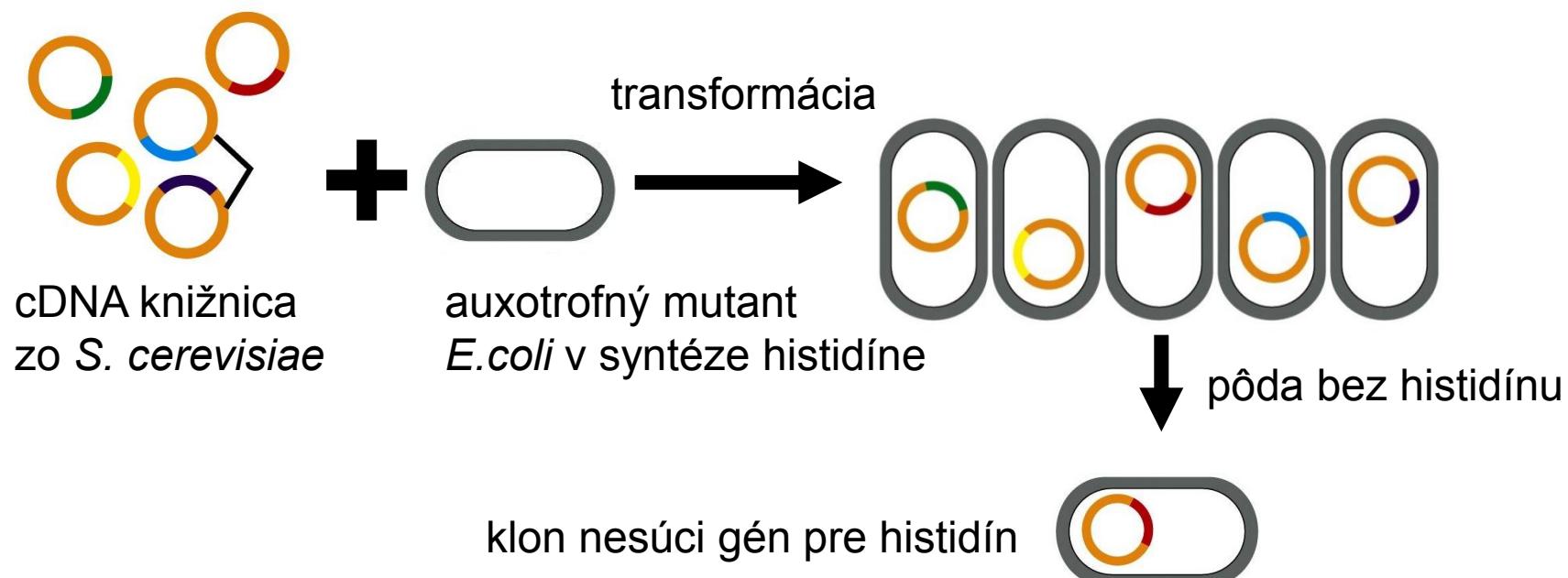
- **Genetická selekcia**  
vystavenie buniek/organizmu podmienkam, ktoré možu prežiť len keď nesú určitý gén/genetický element
- **Molekulárna hybridizácia**  
metóda založená na hybridizácii podobných DNA sekvencii, **kolóniová hybridizácia *in situ***

## 2. Príprava a skríning DNA knižníc

# Genetická selekcia Komplementačný skríning

- najjednoduchšia metóda identifikácie génov

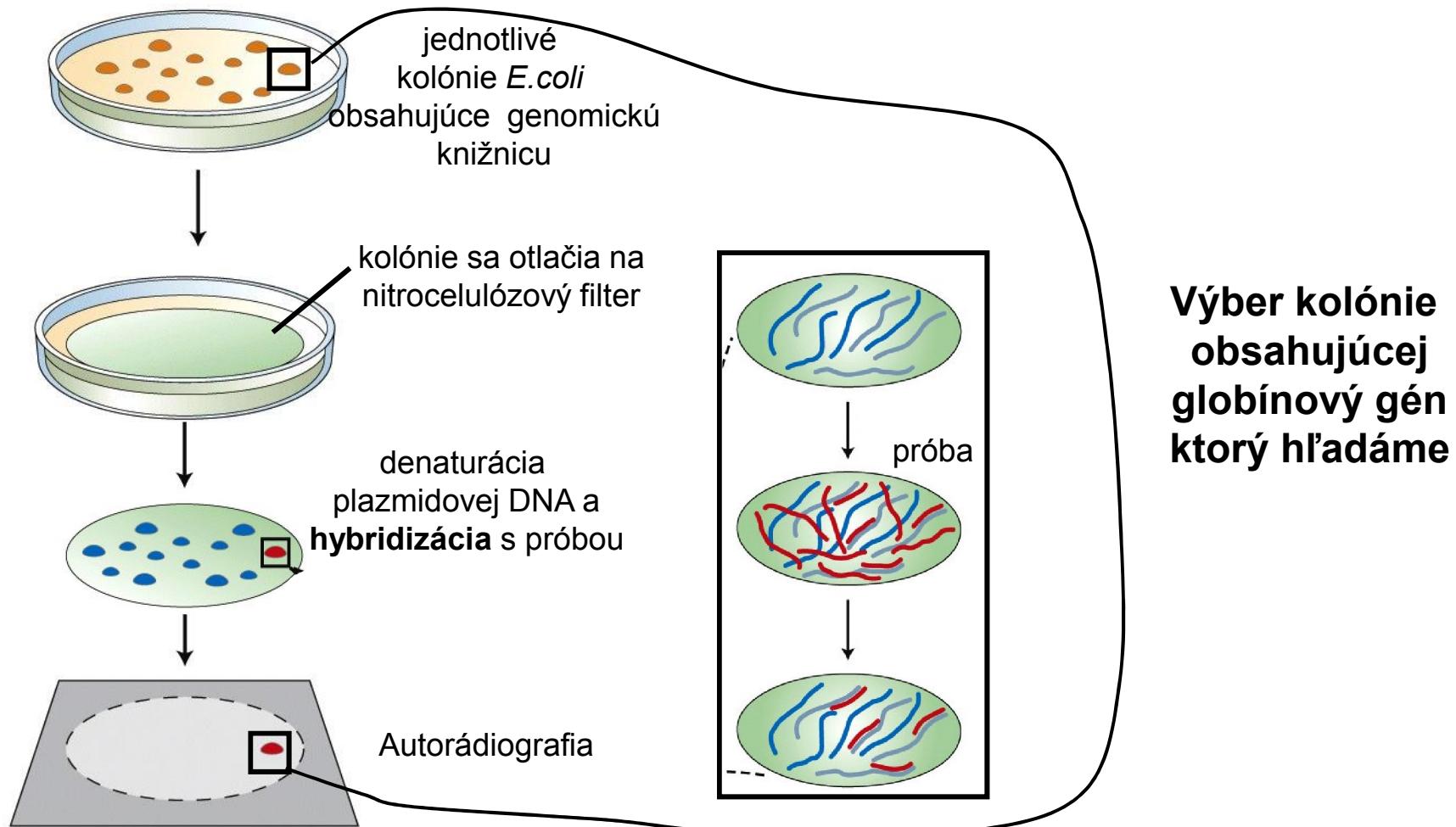
**Príklad:** hľadáme gén na biosyntézu histidínu zo *S. cerevisiae*



## 2. Príprava DNA knižníc

# Molekulárna hybridizácia

## Skríning DNA knižnice - kolóniová hybridizácia *in situ*



### **3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov**

## **3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov:**

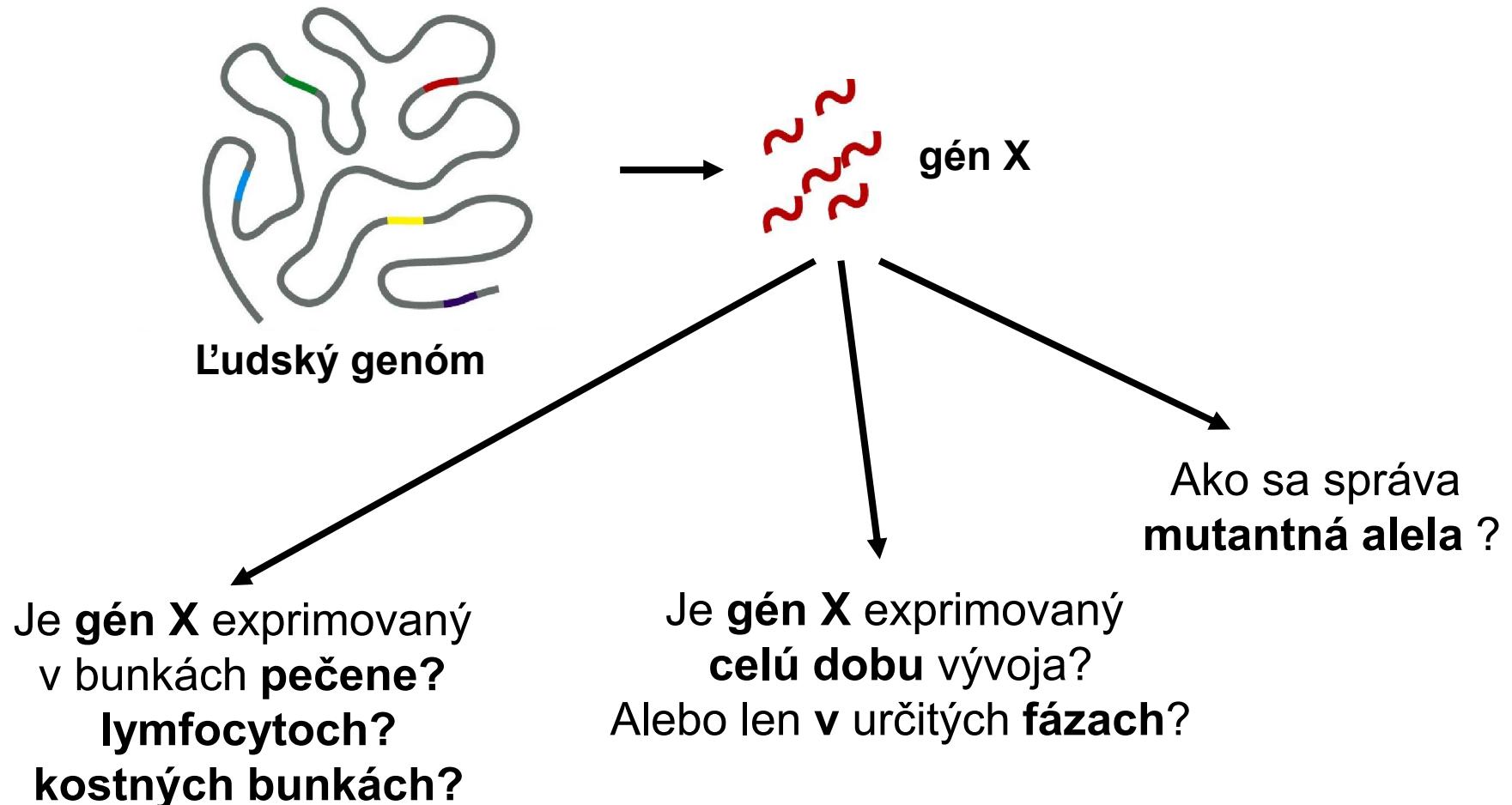
**3.1. DNA - Southern blot**

**3.2. RNA - Northern blot**

**3.3. Proteíny - Western blot**

### 3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov

teoreticky každý gén je možné naklonovať..



### **3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov**

#### **3.1. DNA - Southern blot**

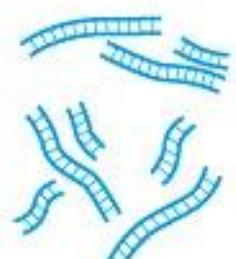
- 1975 Edwin Southern objavil metódu prenosu DNA a následného značenia pomocou prób

**=> 1 x možná identifikácia jednotlivého génu**

1. **elektroforéza** (agarázová alebo akrylamidová)  
- rozdelenie DNA fragmentov podľa veľkosti
2. **prenos** DNA z gélu na membránu
3. **hybridizácia** DNA na membráne s próbami

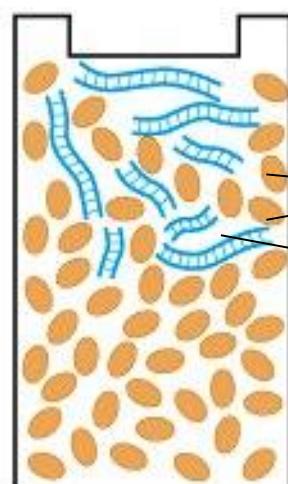
### 3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov

## 1. elektroforéza



DNA fragmenty

Nanesú sa do jamiek na gél



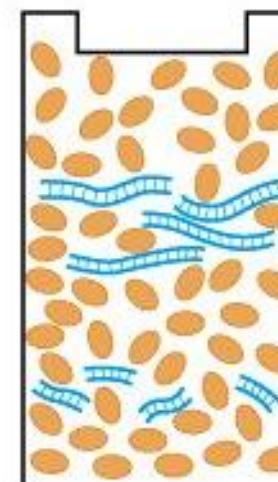
(-) elektróda  
katóda

gélové častice

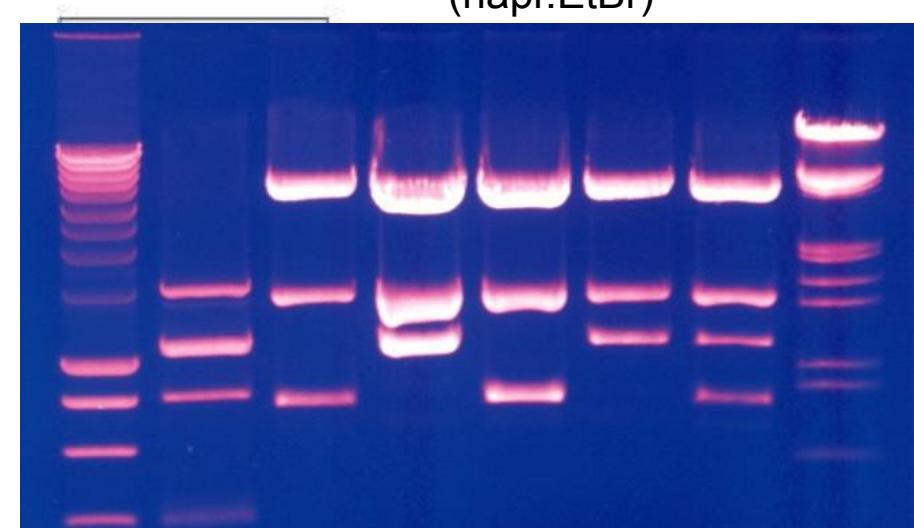
pory

(+) elektróda  
anóda

DNA fragmenty putujú  
cez póry gélu  
v závislosti od veľkosti

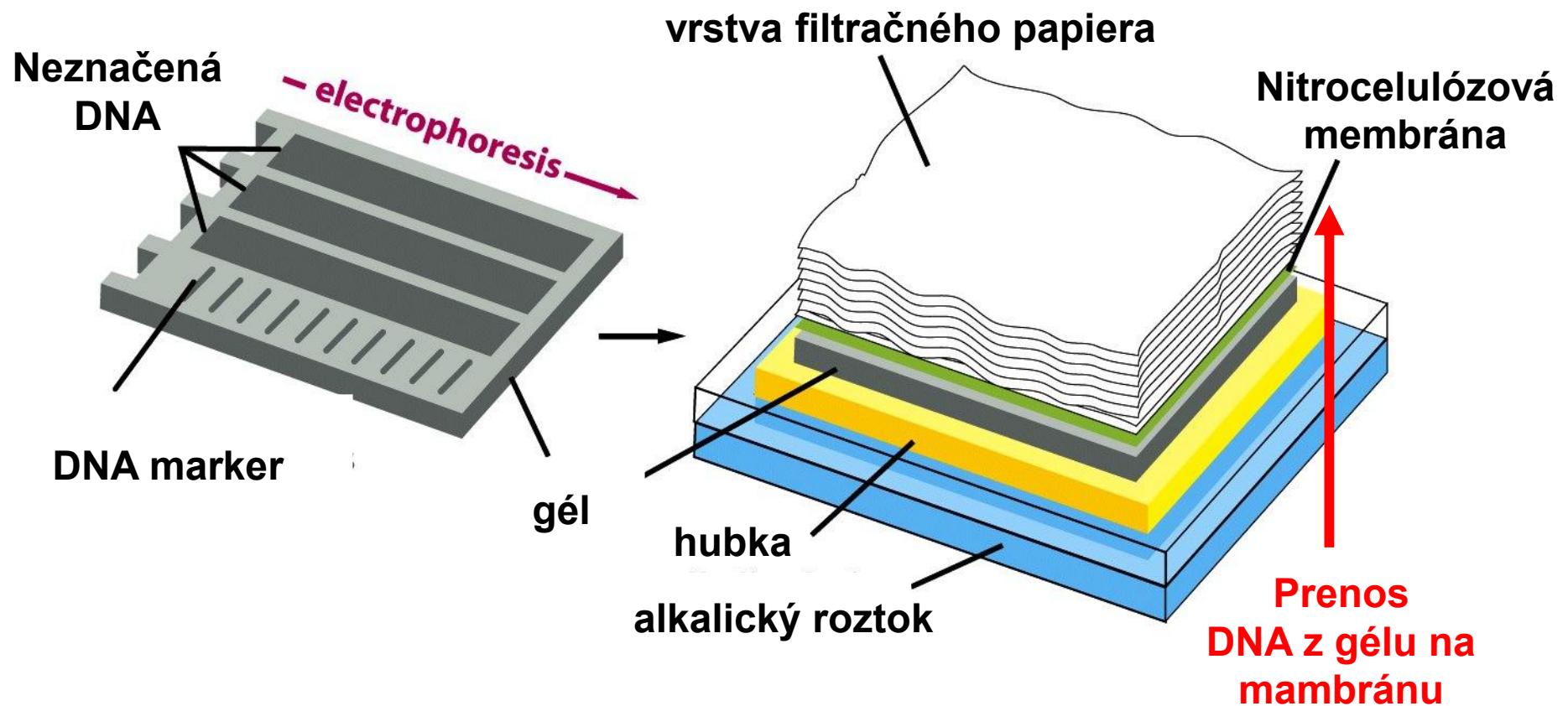


inkubácia s farbičkou  
(napr. EtBr)



### 3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov

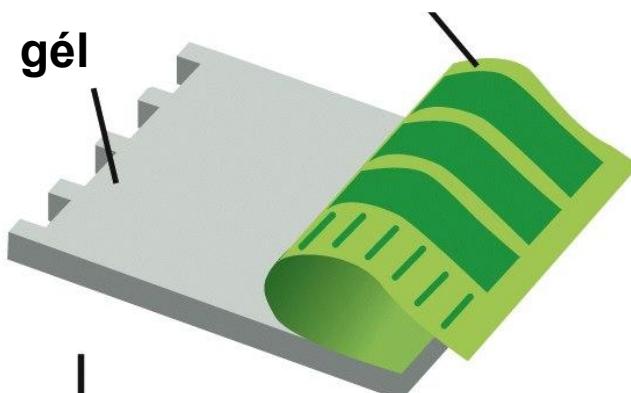
## 2. prenos DNA z gélu na membránu



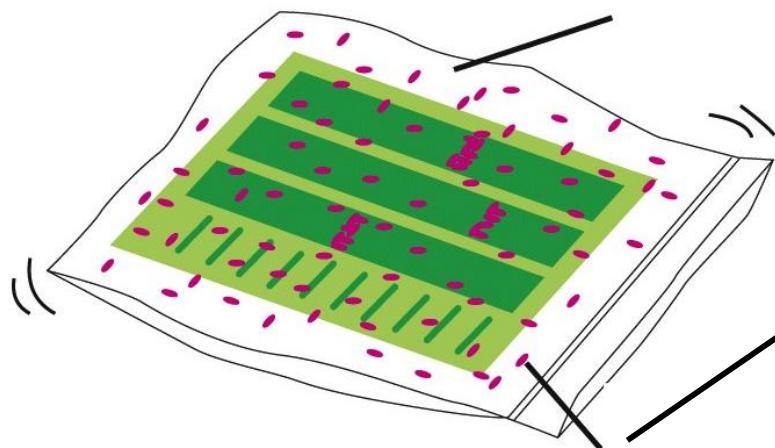
### 3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov

## 3. hybridizácia DNA na membráne s próbami

Nitrocelulózová membrána s naviazanou DNA

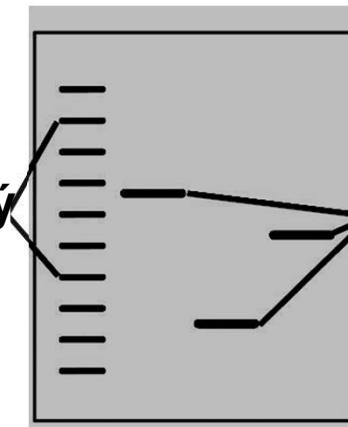


Rádioaktívne značená  
próba hybridizuje k DNA na membráne



rentgenový film

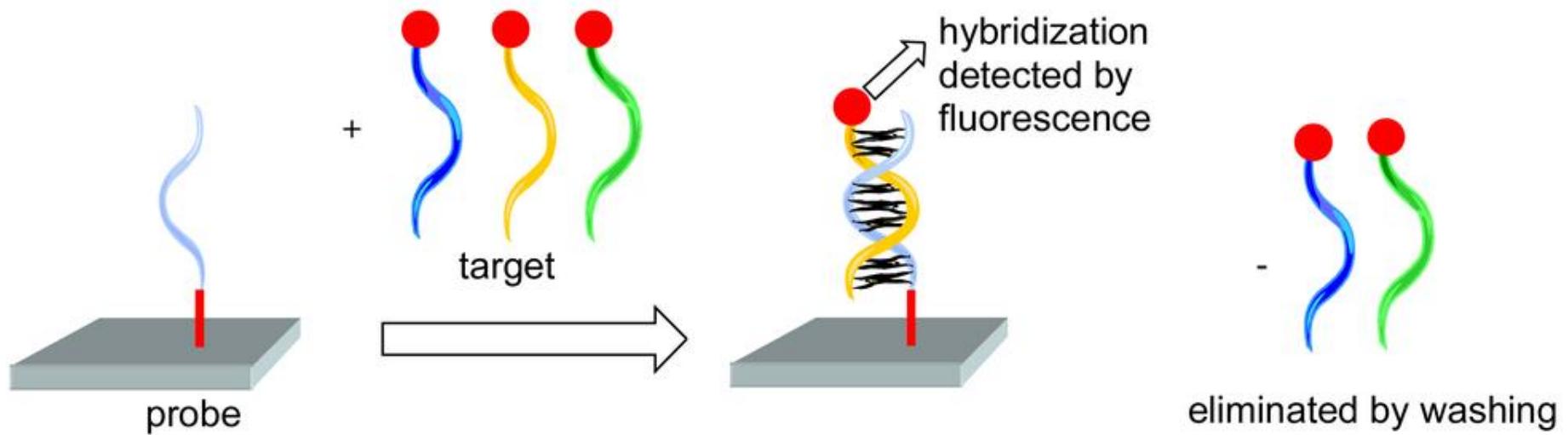
Značený  
marker



Označené  
bandy

### 3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov

## Vyžitie Southernovej hybridizácie pri DNA microarrays



<https://www.youtube.com/watch?v=ePFE7yg7LvM&feature=related>

### **3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov**

#### **3.2. RNA – Nothern blot**

- podobný postup ako pri Southern blot-e ale:

=> RNA je veľmi citlivá na RNázy

- problém s kontamináciou

=> RNA - veľa sekundárnych štruktúr

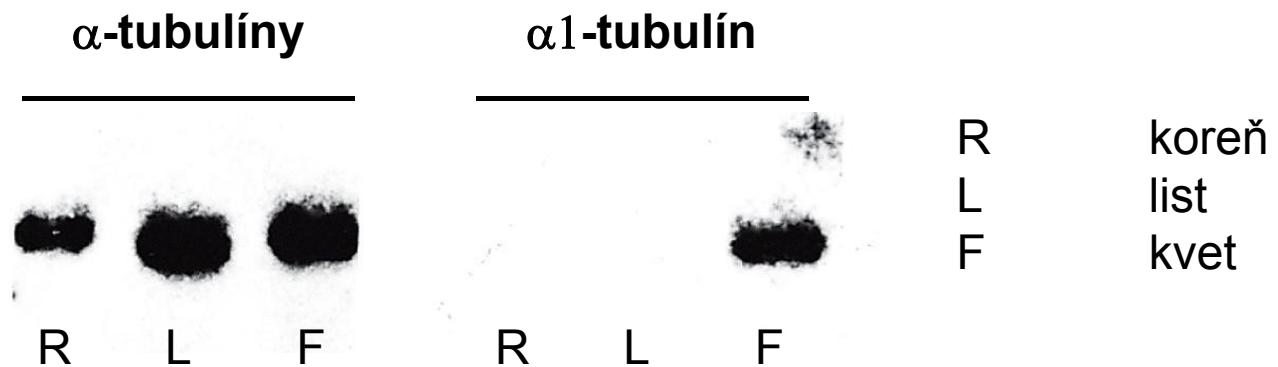
- elektroforéza musí prebehnúť za denaturačných podmienok

**= Štúdium gébovej expresie**

### 3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov

## Nothern blot

Príklad: Expresia  $\alpha$ -tubulínu u *Arabidopsis thaliana*



### **3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov**

## **3.2. Proteíny – Western blot**

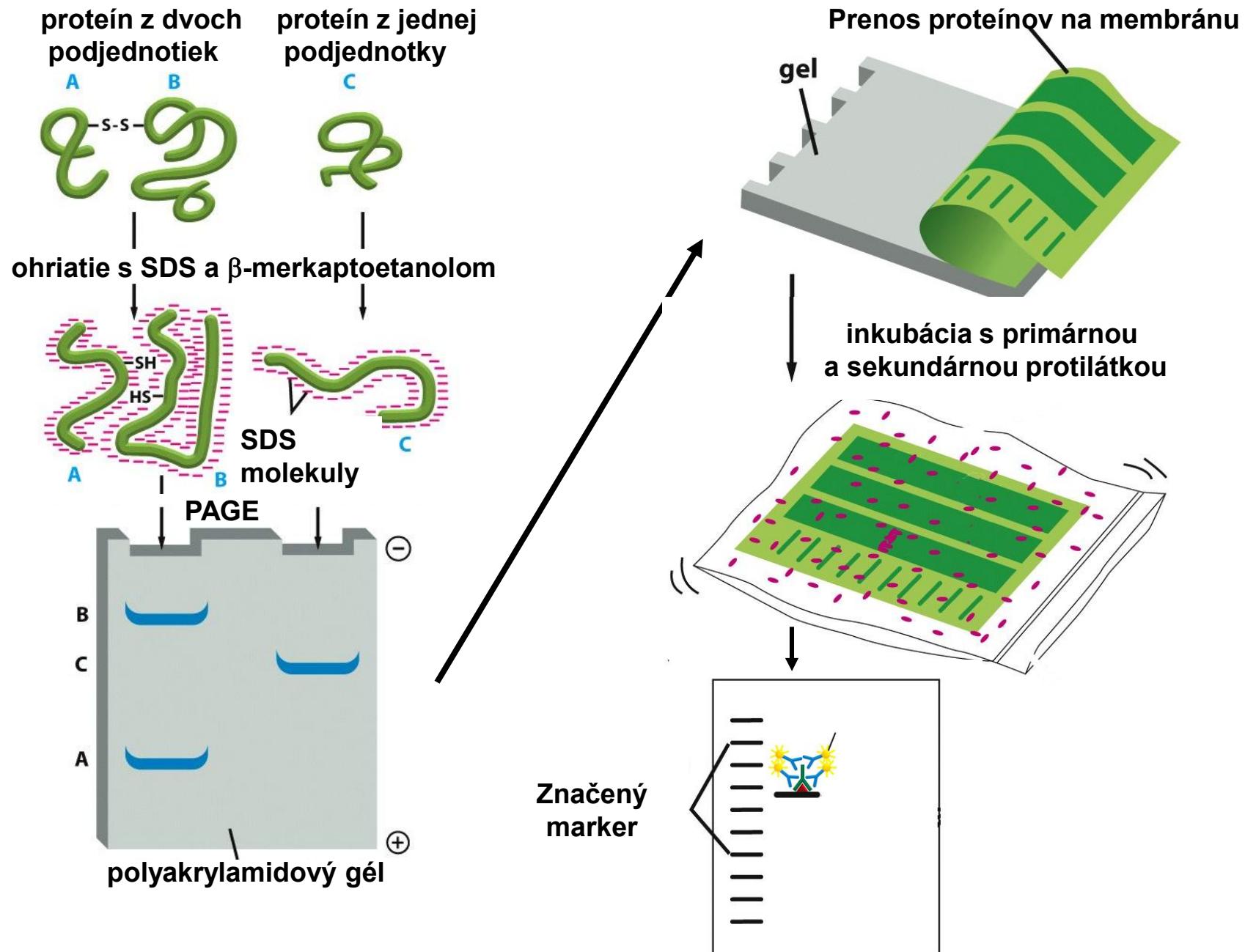
### **Polyakrylamidová gélová elektroforéza (PAGE)**

=> proteíny sa delia na géli za denaturačných podmienok - SDS

### **Western blot**

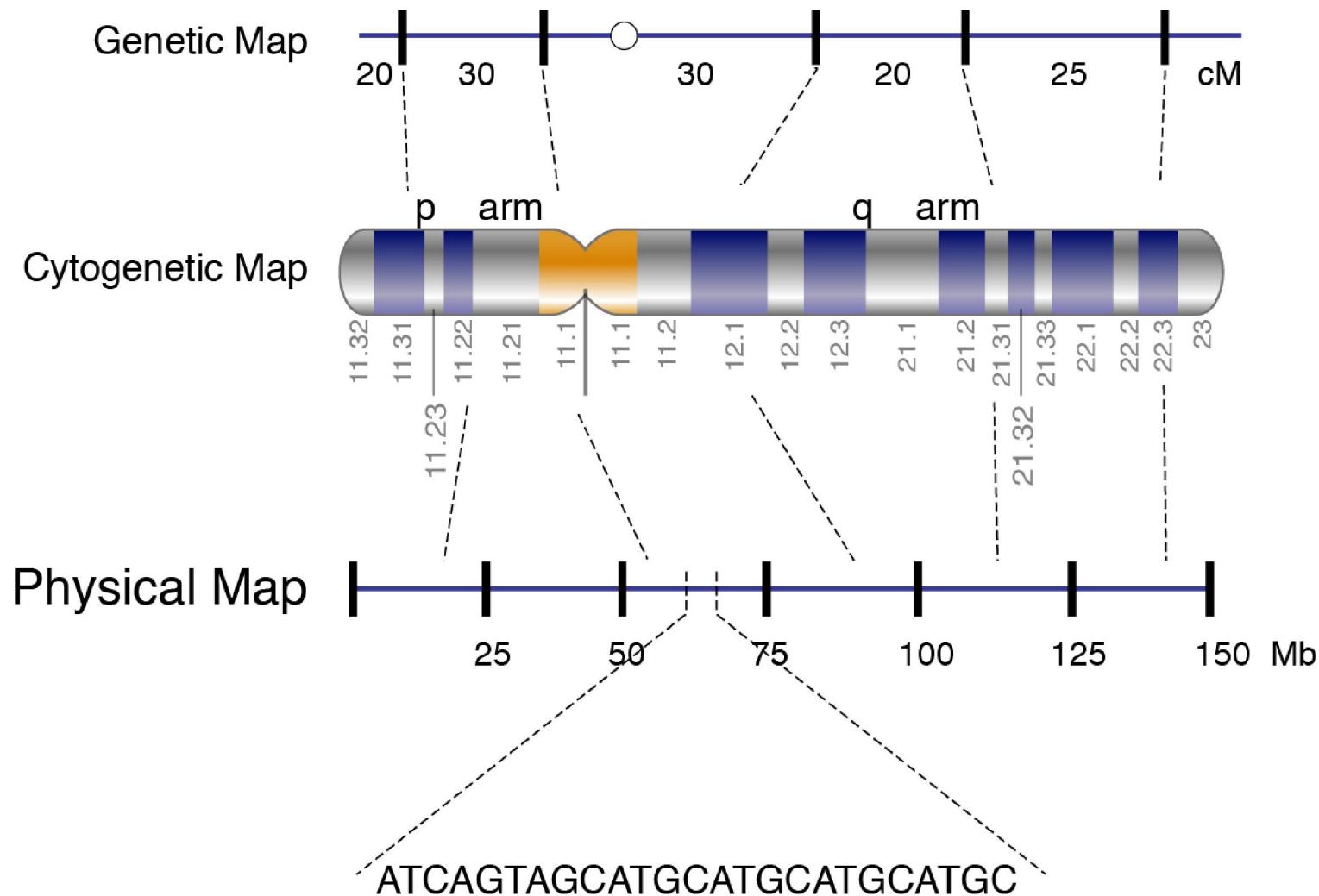
- => prenos proteínov na nitrocelulózovú membránu
- => detekcia individuálnych proteínov pomocou protilátok

### 3. Molekulárna analýza DNA, RNA a proteínov



## 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov

# 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov



#### **4. Molekulárna analýza génov a chromozómov**

## **4. Molekulárna analýza génov a chromozómov**

**4.1. Restrikčné mapovanie**

**4.2. Sekvenovanie**

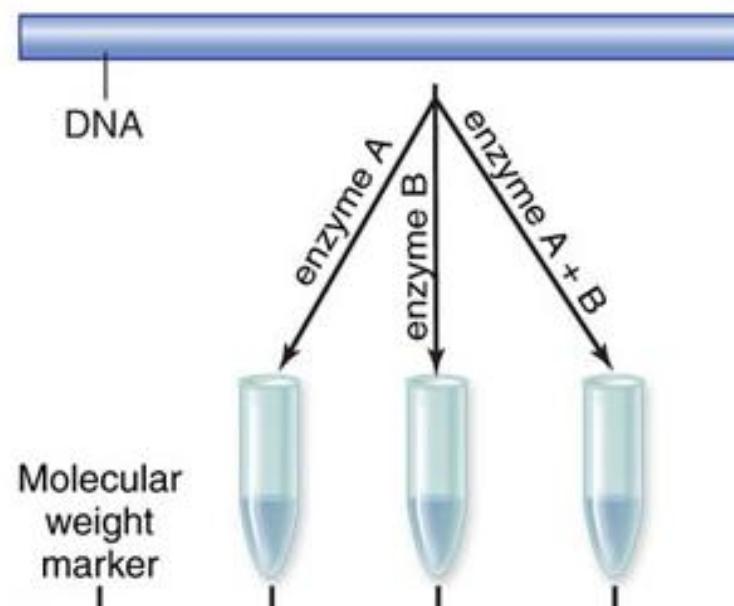
## 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov

### 4.1. Restrikčné mapovanie

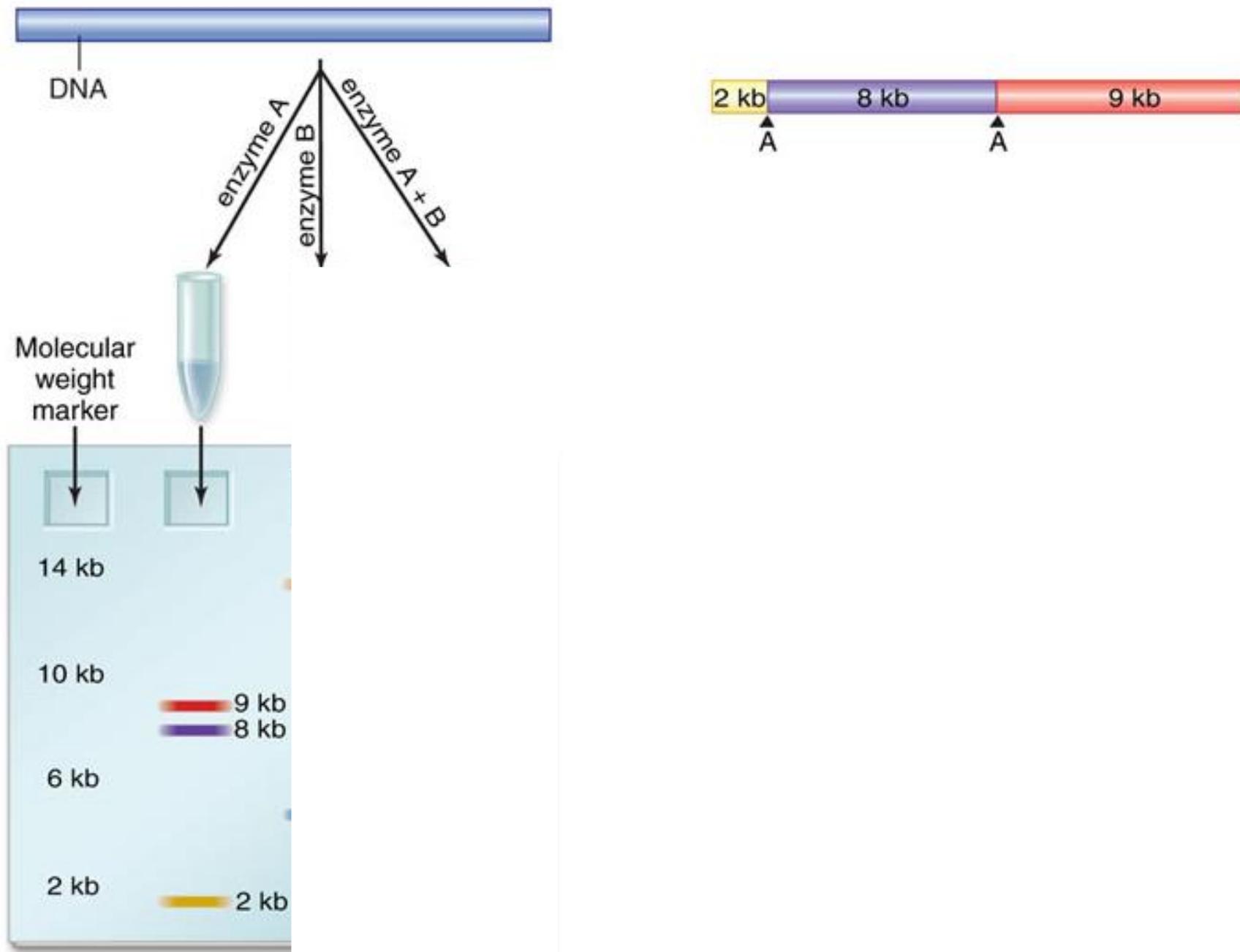
Gén/chromozóm + restrikčná endonukleáza/-y



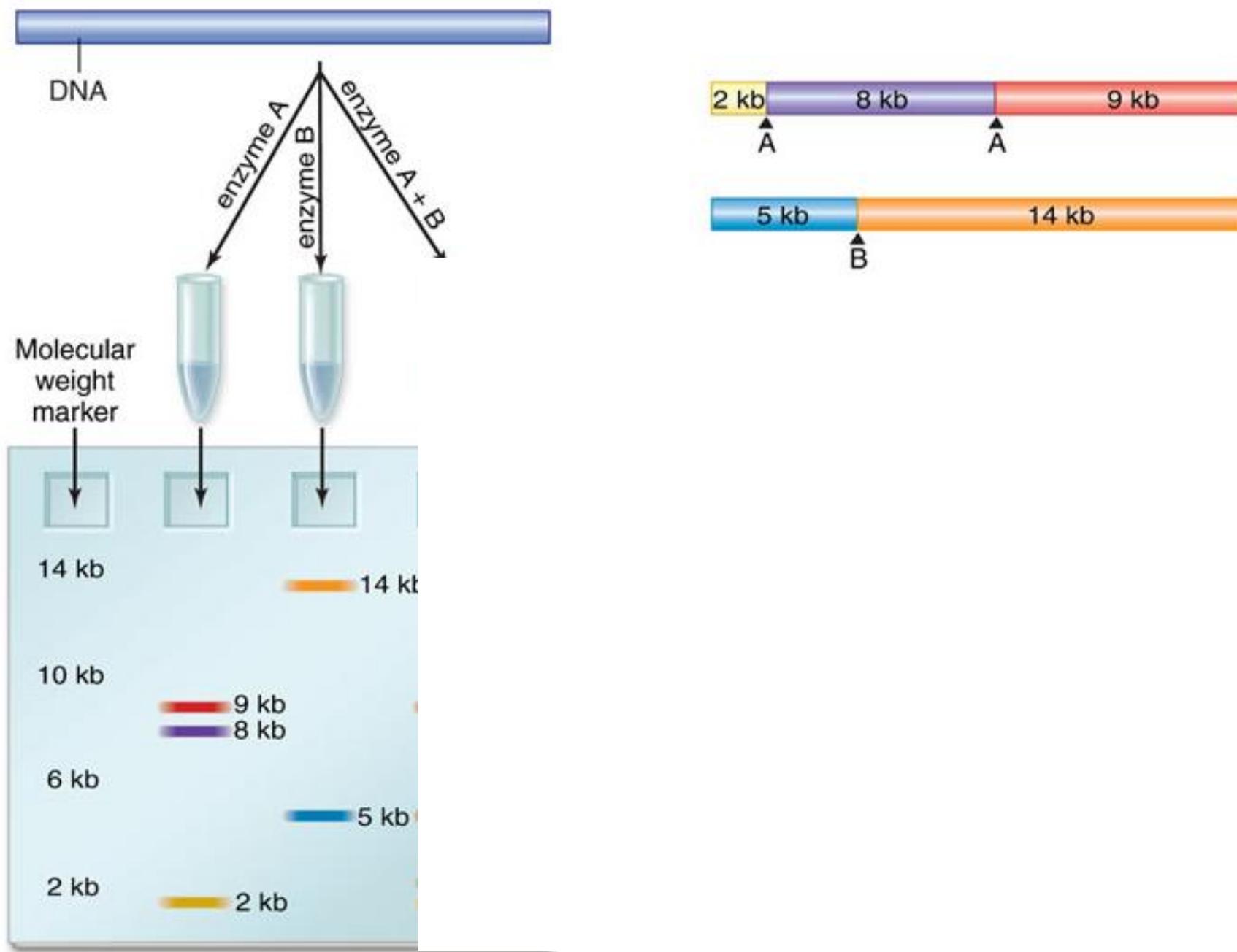
restrikčné fragmenty



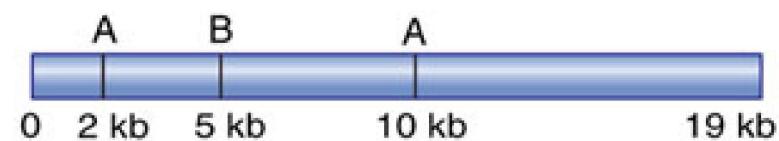
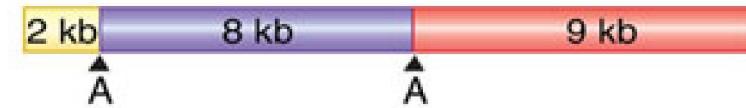
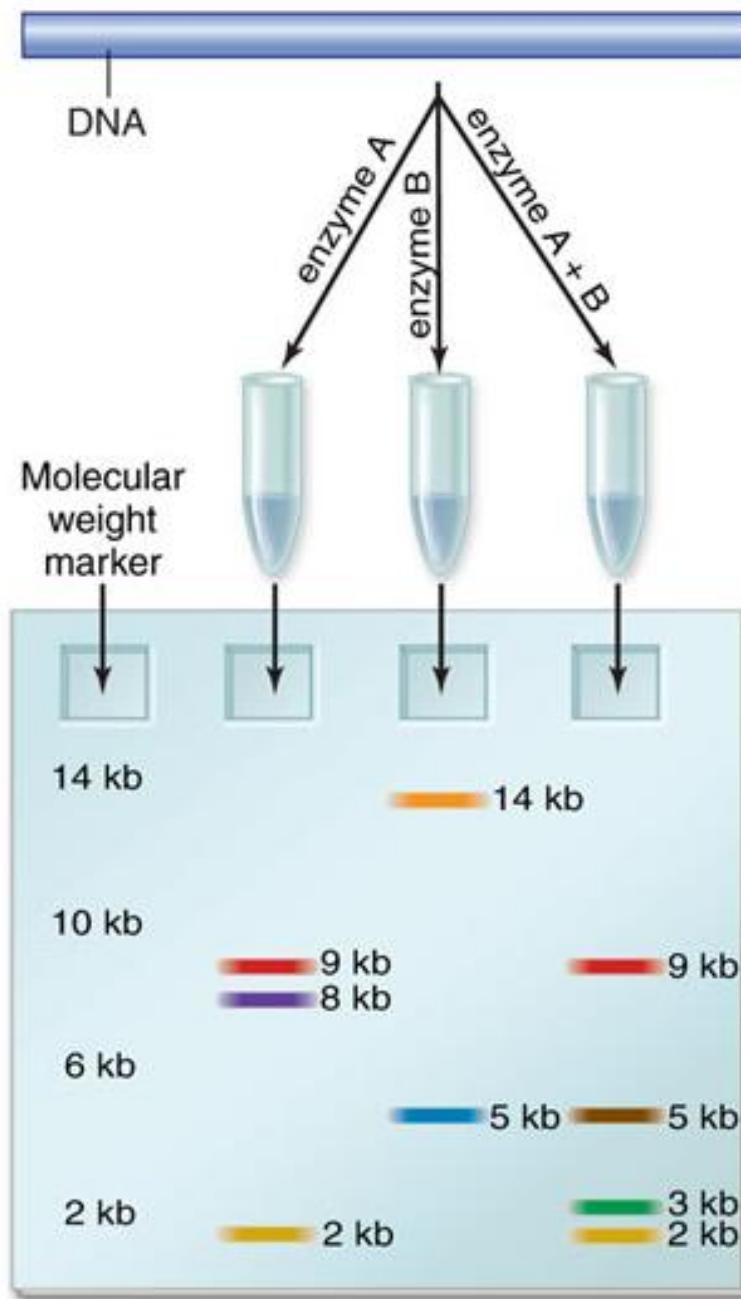
## 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov



## 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov



## 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov



**FYZICKÁ mapa génu**

## 4.2. Sekvenovanie

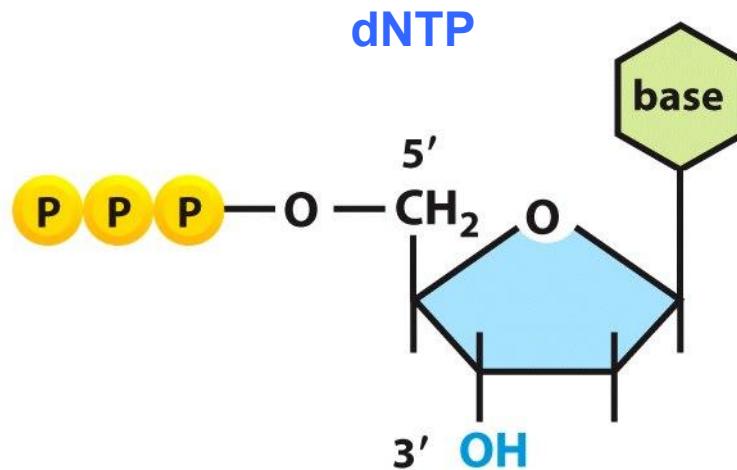
- = určenie **nukleotidovej sekvencie** fragmentu DNA, génu..
  - 1980 – **Nobelová cena za chémiu** pre W.Gilbert a F. Sanger za ich podiel' pri objavení sekvenovania
  - **Maxamová-Gilbertová metóda**
    - využíva 4 rôzne chemické reakcie na **štiepenie** reťazcov DNA v mieste **A, G, C alebo C+T** (už sa nepoužíva)
  - **Sangerová metóda**
  - **Pyrosekvenovanie**
  - Next generation metódy

#### 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov

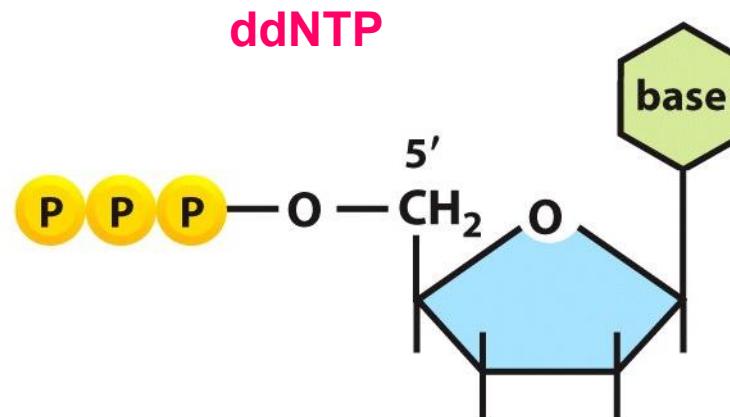
## Sangerova metóda sekvenovania

- DNA polymeráza potrebuje na predĺžovanie reťazca **voľnú 3'OH skupinu**

2'-deoxyribonukleotidtrifosfát



2'3'-dideoxyribonukleotidtrifosfát



## 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov

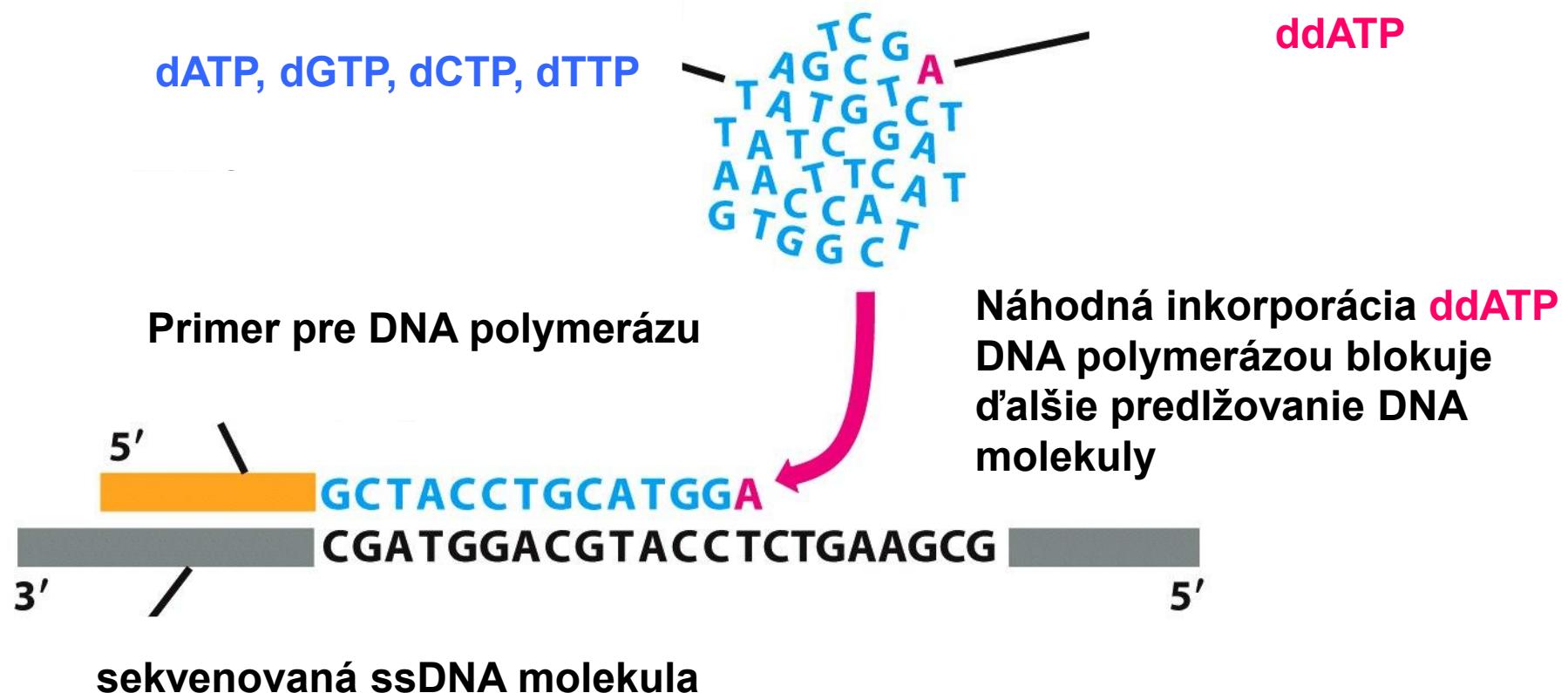
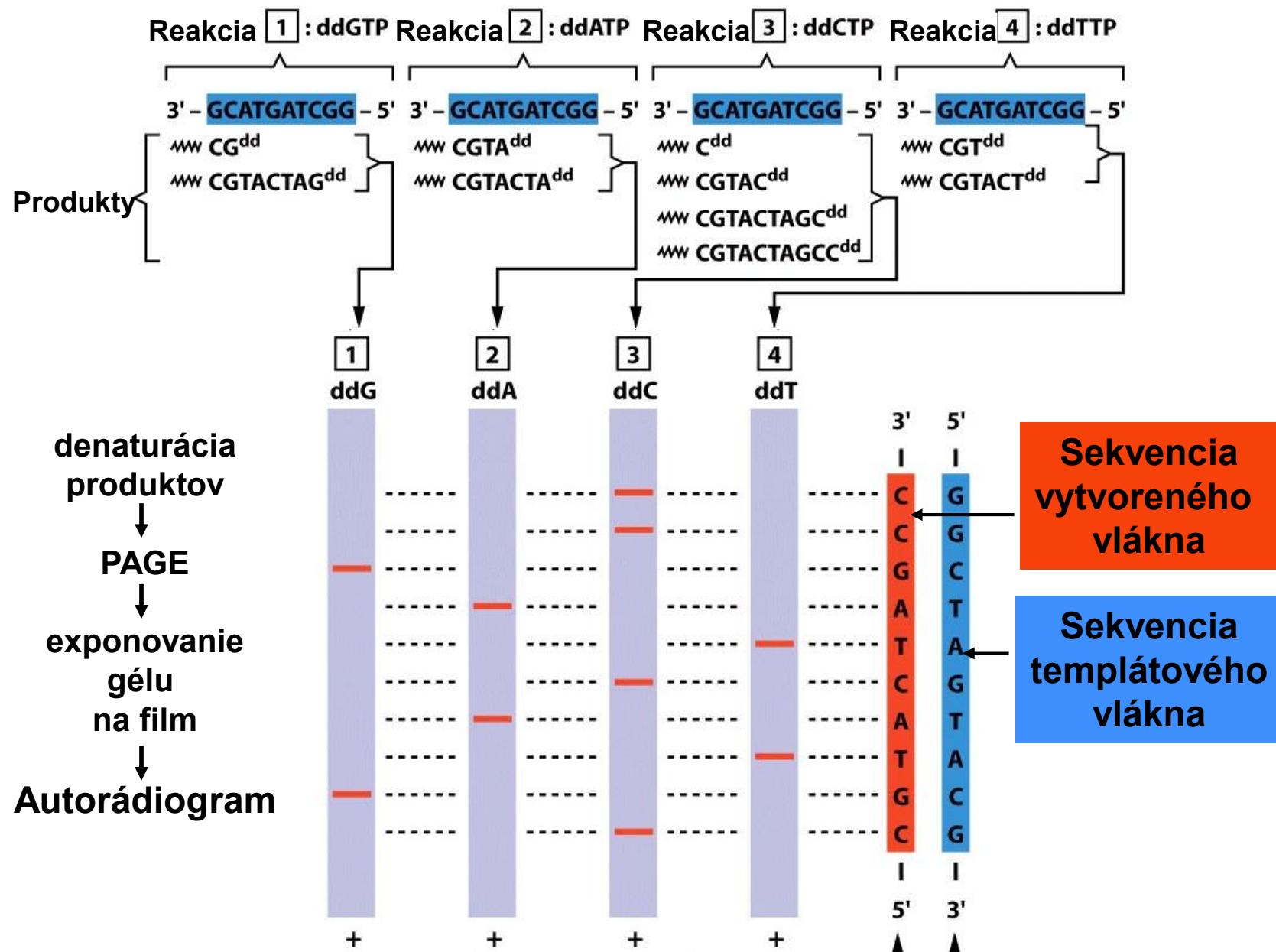


Figure 8-50b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

## 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov



## **4. Molekulárna analýza génov a chromozómov**

Sekvenovanie video:

[http://bcs.whfreeman.com/lodish7e/default.asp?s=&n=&i=&v=&o=&ns=0&uid=0&rau=0#800911\\_812048\\_/](http://bcs.whfreeman.com/lodish7e/default.asp?s=&n=&i=&v=&o=&ns=0&uid=0&rau=0#800911_812048_/)

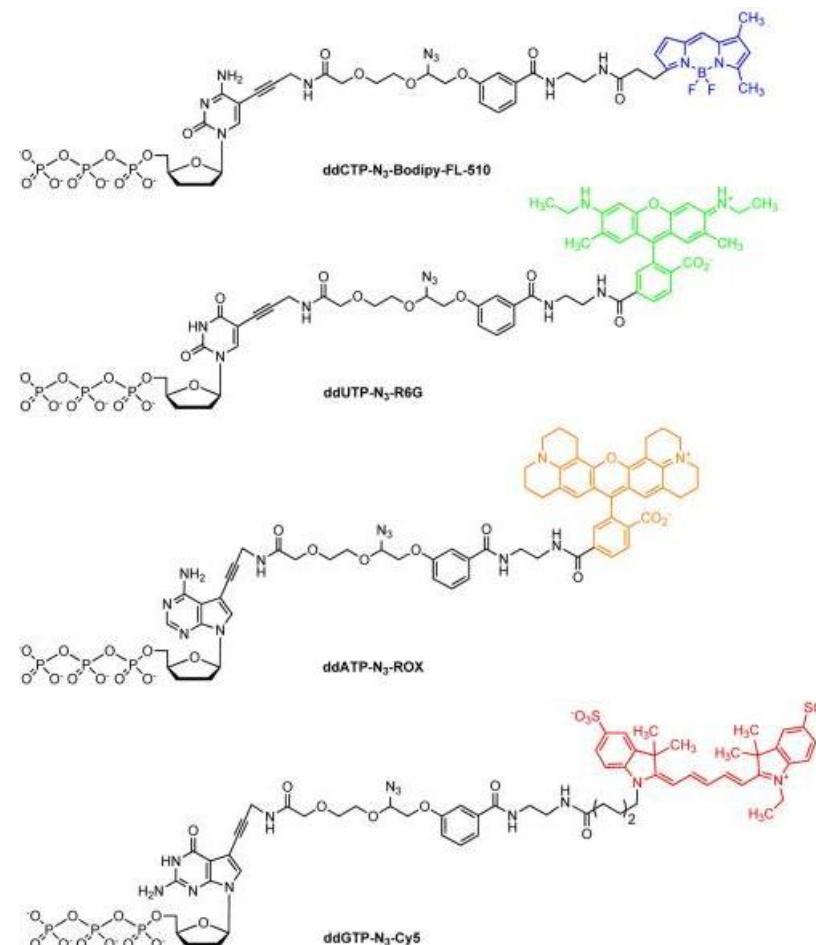
#### 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov

## Automatické DNA sekvenovanie

1. použitie **fluorescenčných farbičiek** namiesto rádioaktívnych izotopov na detekciu reťazcov DNA
2. **elektroforetická separácia** všetkých štyroch ddNTP reakcii v jednej dráhe gélu, alebo **kapiláre**
3. **detekcia** fluorescenčných farbičiek pri ich prechode géлом/kapilárou
4. priamy **prenos výstupu** z fotobunky do **počítača**, **automatická analýza** výsledkov

## 4. Molekulárna analýza génov a chromozómov

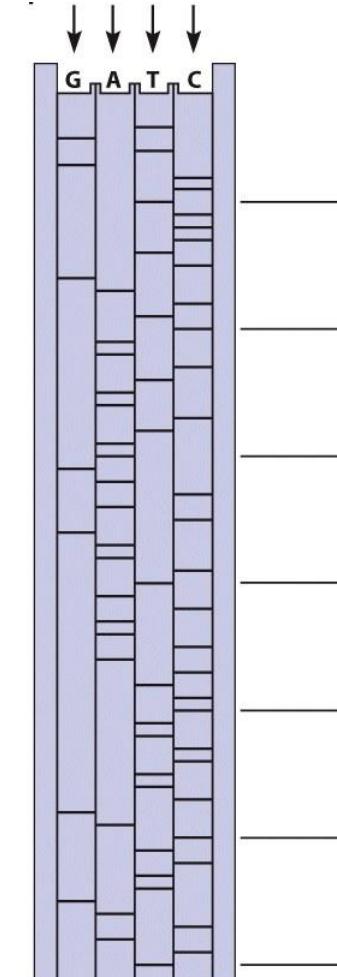
### 1. Fluorescenčné značené ddNTP



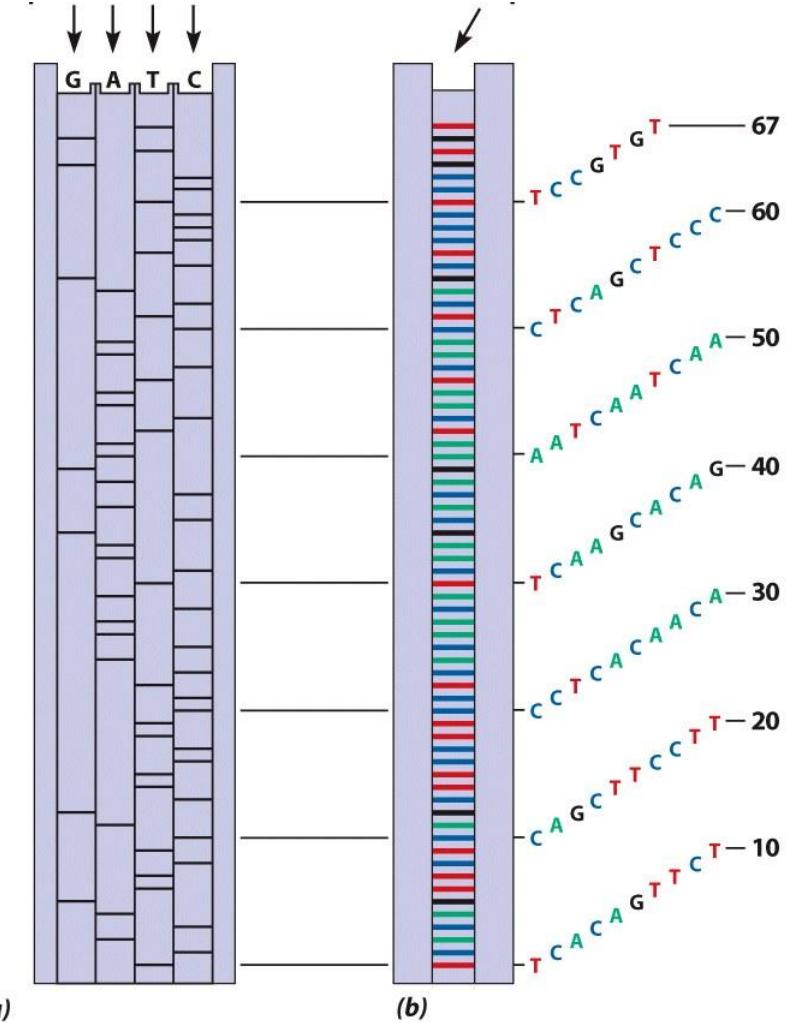
### 2. Kapilárna elektroforéza

#### PAGE

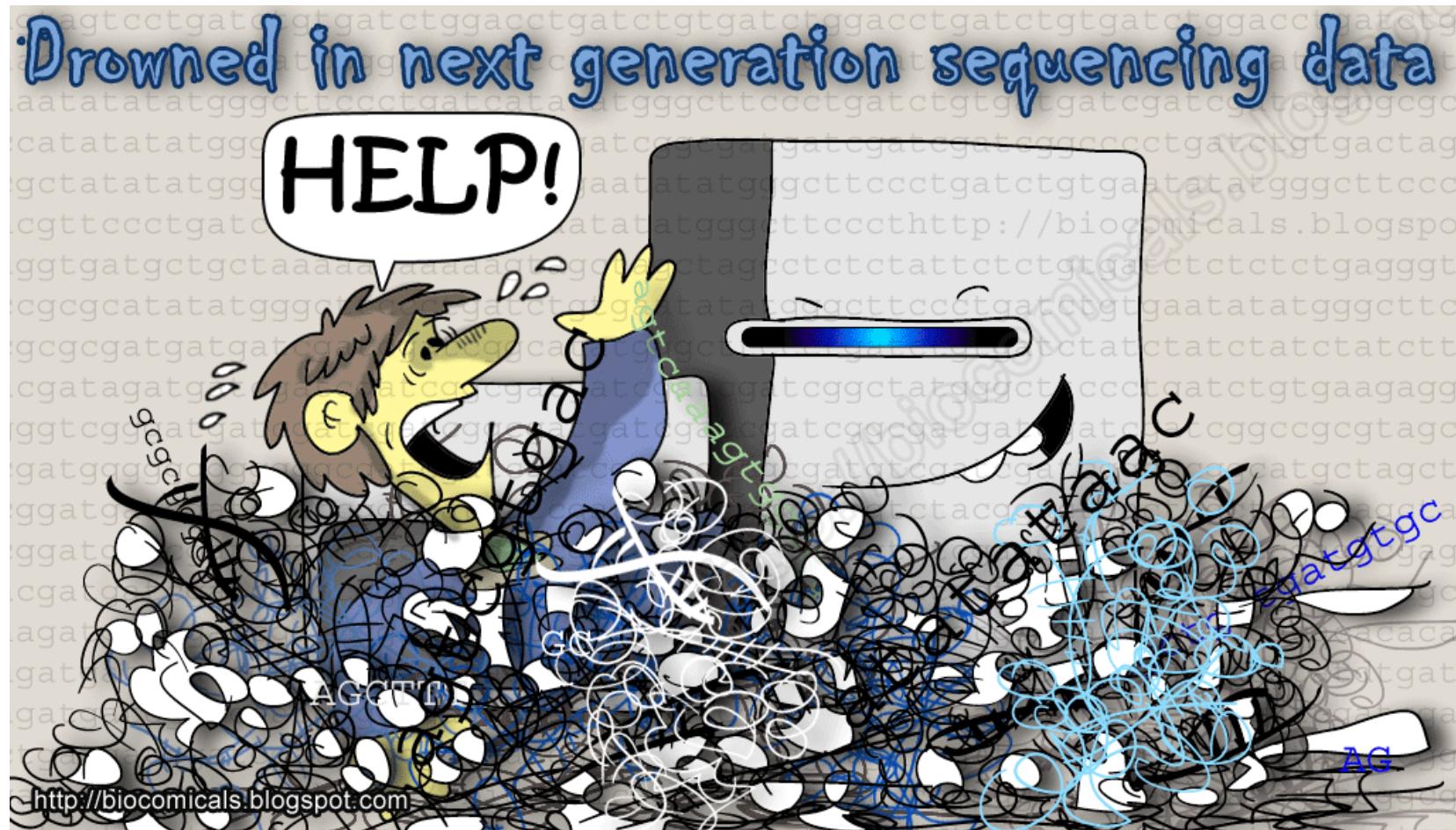
každá ddNTP reakcia  
je v jednej dráhe



Kapilárna elektroforéza  
všetky ddNTP reakcie  
v jednej dráhe



# Sekvenovanie budúcej generácie



# **Zaujmové stránky:**

## **Restrikčné endonukleázy**

[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1978/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/)

## **PCR**

<http://www.nobelprize.org/educational/chemistry/pcr/game/index.html>

[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/)

## **Sekvenovanie**

[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/)

<http://www.pbs.org/wgbh/nova/body/sequence-DNA-for-yourself.html>

