

Regulacija ekspresije gena u prokariota

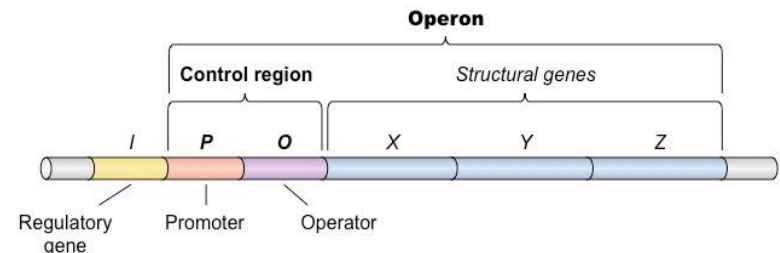
Ekspresija gena je proces u kojem se nasljedna informacija (gen) prevodi u funkcionalni genski produkt, protein ili RNA

- U eukariota bi bez kontrolirane ekspresije gena sve stanice bile identične, s istim genskim produktima
- Bez kontrolirane ekspresije gena npr. u bakterije *E. coli* svi bi se proteini stalno sintetizirali i bili bi prisutni u velikoj količini
- Regulacija ekspresije gena je stanična kontrola količine i vremena pojavljivanja produkta nekog gena
- Regulacija ekspresije gena je temelj za diferencijaciju stanica, morfogenezu, raznolikost te prilagodljivost bilo kojeg organizma na signale iz okoliša

- Regulacija ekspresije gena odvija se na razini:
- 1. Transkripcije
- 2. Translacije
- 3. Funkcije proteina

Ekspresija gena - osnovni pojmovi

- **Operon** – nekoliko strukturnih gena pod zajedničkom transkripcijskom kontrolom **istog** promotora i **operatora**
 - Glavni dijelovi:
 - **Promotor** – dio DNA gdje se veže RNA polimeraza
 - **Operator** – kontrolira aktivnost transkripcije (*cis* element)
 - on - off prekidač
 - Nalazi se između promotora i gena za proteine (strukturne gene), **vezno mjesto za represor**
 - Gen regulator (regulatorni gen) – kodira za **represor** koji blokira vezanje RNA polimeraze (*trans* element)
 - Strukturni geni – kodiraju za proteine
-
- Regulacija transkripcije gena može biti:
 - **Negativna** – sprječavanje ekspresije gena REPRESOROM
 - **Pozitivna** – poticanje ekspresije gena AKTIVATOROM



Inducibilni i represibilni geni

- Uz aktivatore i represore važnu ulogu u transkripcijskoj regulaciji imaju i male efektorske molekule koje svoj učinak postižu **vezanjem na aktivator ili represor**
- Vezanje efektorskih molekula uzrokuje **konformacijske promjene** u regulatornom proteinu što onda utječe da li će se protein moći ili neće moći vezati na DNA
- **Induktor** – male efektorske molekule koje **povećavaju** transkripciju (ili inhibiraju represor ili aktiviraju aktivator da se veže na DNA)
 - Geni koji se reguliraju na ovaj način se zovu **inducibilni**
- **Korepresori** – male efektorske molekule koje **smanjuju** transkripciju vezanjem na **represor** koji se onda veže na DNA
- **Inhibitori** - male efektorske molekule koje **smanjuju** transkripciju - vezanjem na **aktivator** sprječavaju njegovo vezanje na DNA
 - Geni koji se reguliraju na ovaj način se zovu **represibilni**

Aktivnost gena (transkripcija) ...

Regulacija

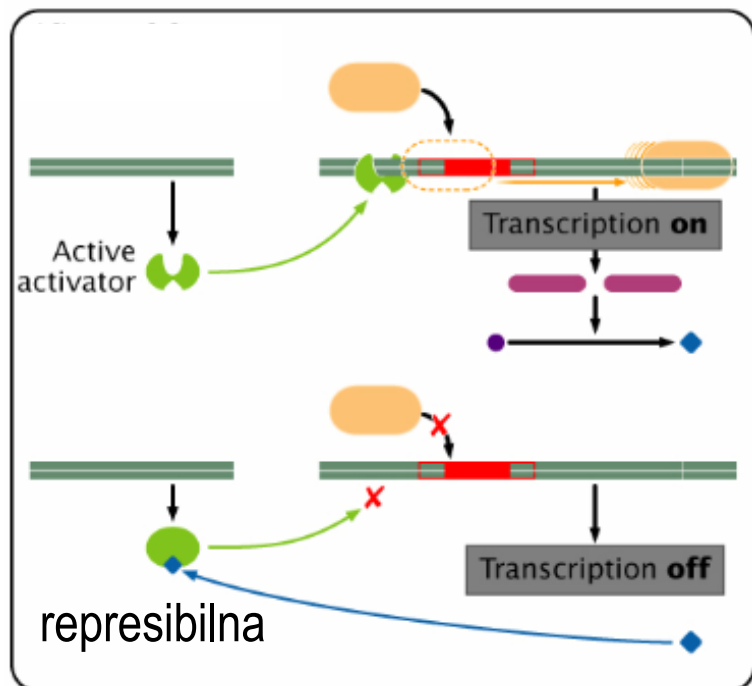
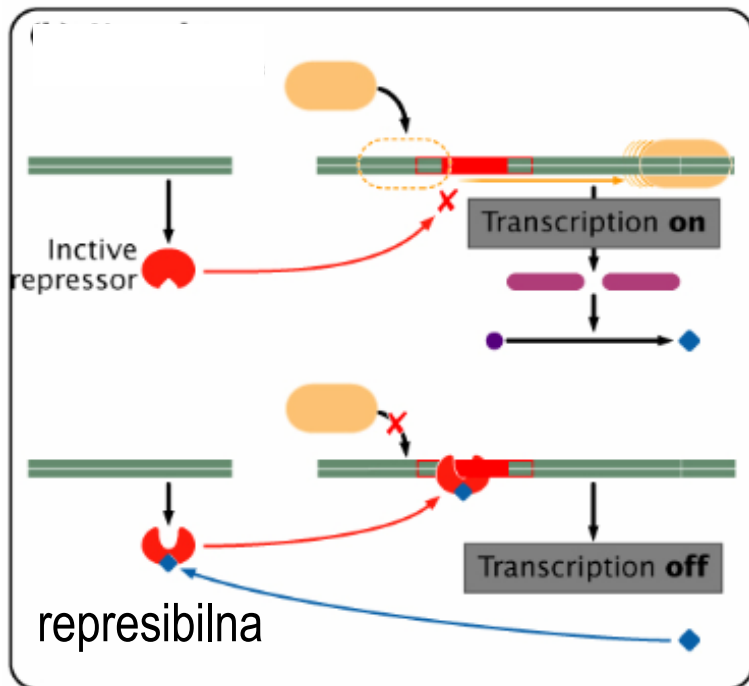
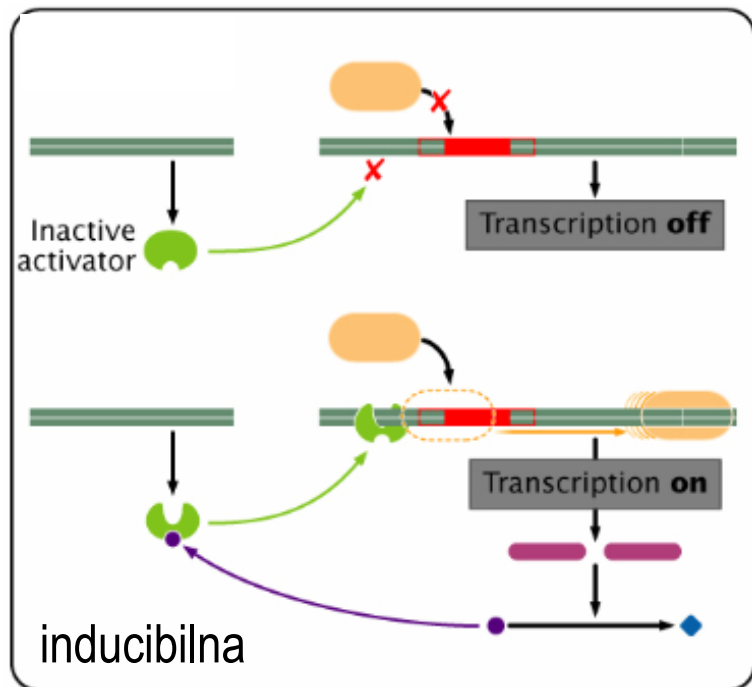
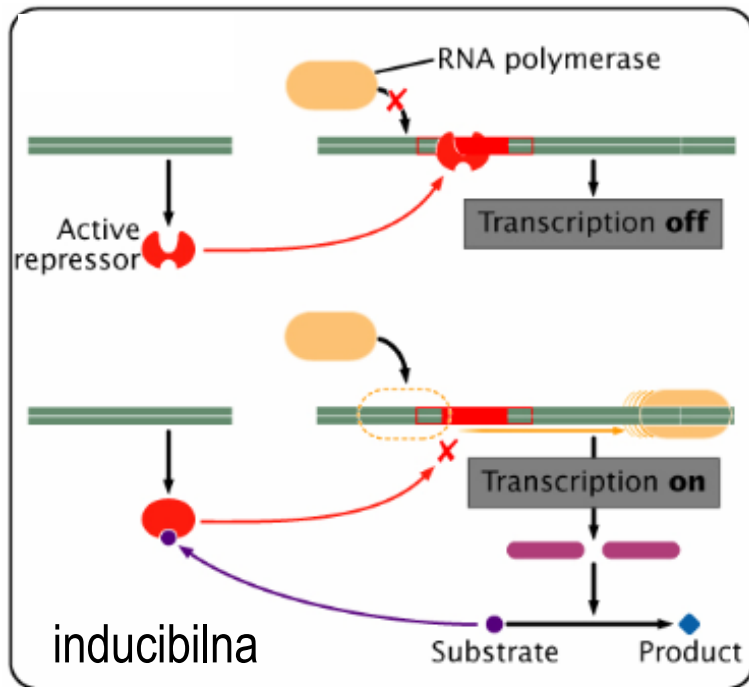
1) ~~Konstitutivna~~ - ~~gen je aktivan bez obzira na uvjete u kojima stanica živi~~

2) Inducibilna - gen se aktivira tek kada se za to pokaže potreba



3) Represibilna - gen je aktivan tako dugo dok je njegov produkt potreban.

negative

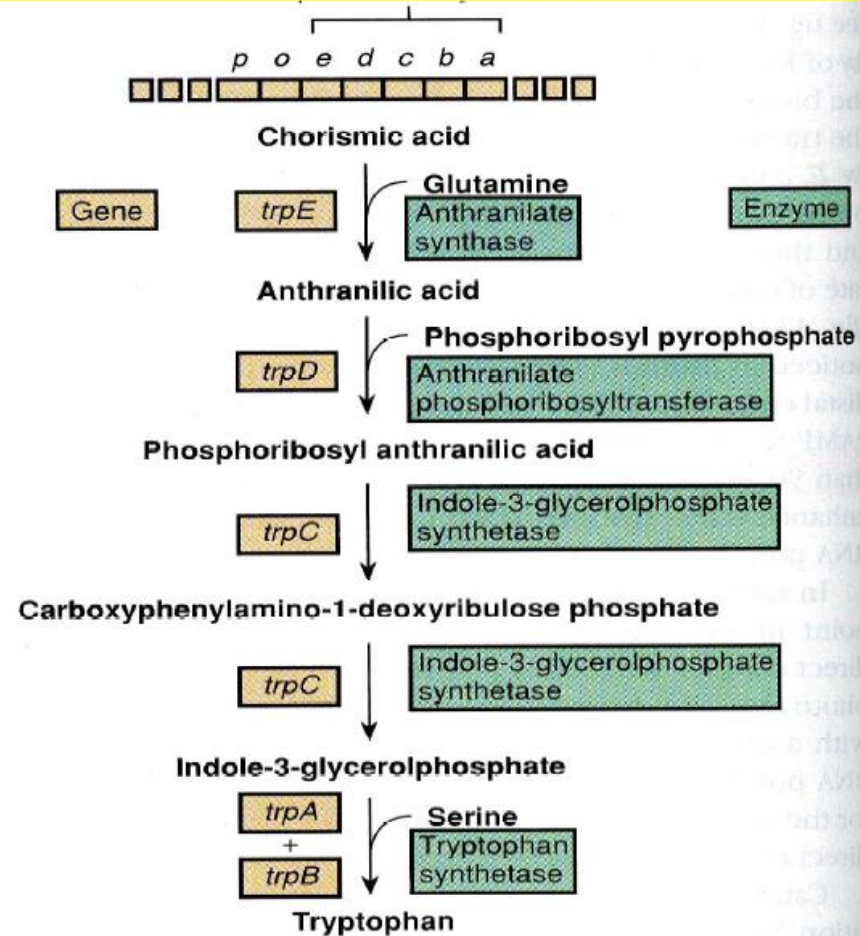


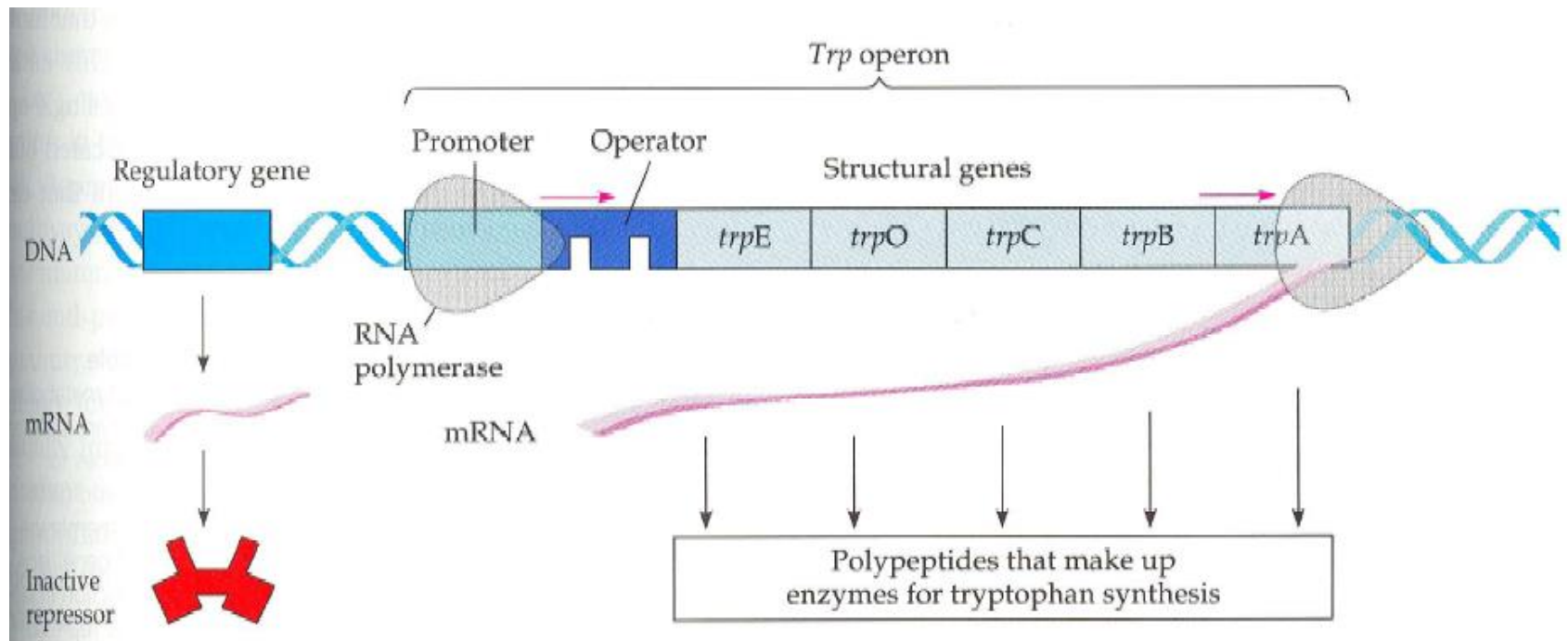
positive

REPRESIVNI SUSTAV REGULACIJE (*TRP* OPERON)

- Primjer NEGATIVNE REGULACIJE
- Ovaj tip kontrole imaju operoni za sintezu aminokiselina (npr. Lys i His operoni) tzv. **biosintetski enzimi**

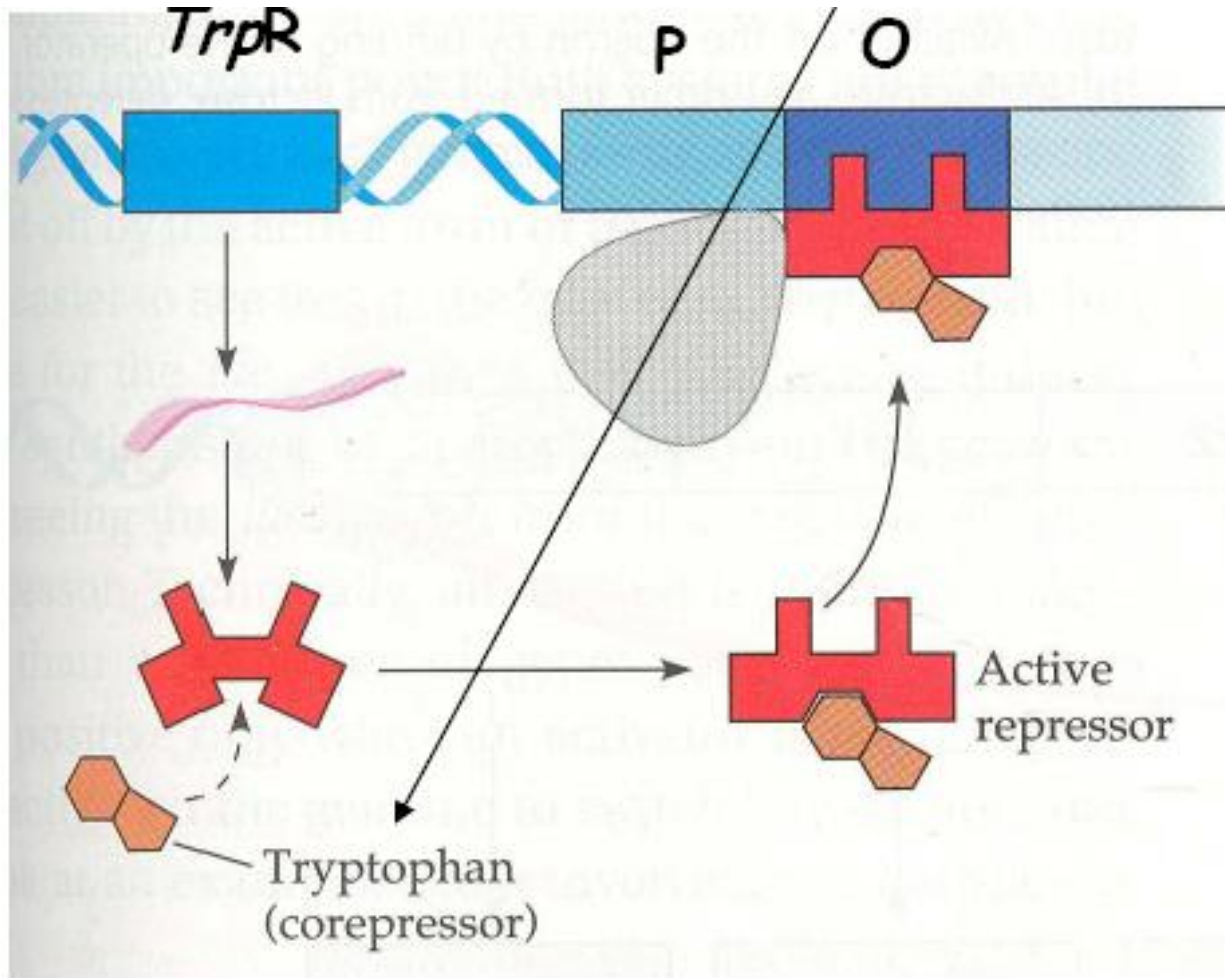
Strukturni geni potrebni za sintezu triptofana





Sam represor se ne može samostalno vezati za operator. Tada se strukturni geni eksprimiraju u onoj količini koja je određena jačinom promotora.

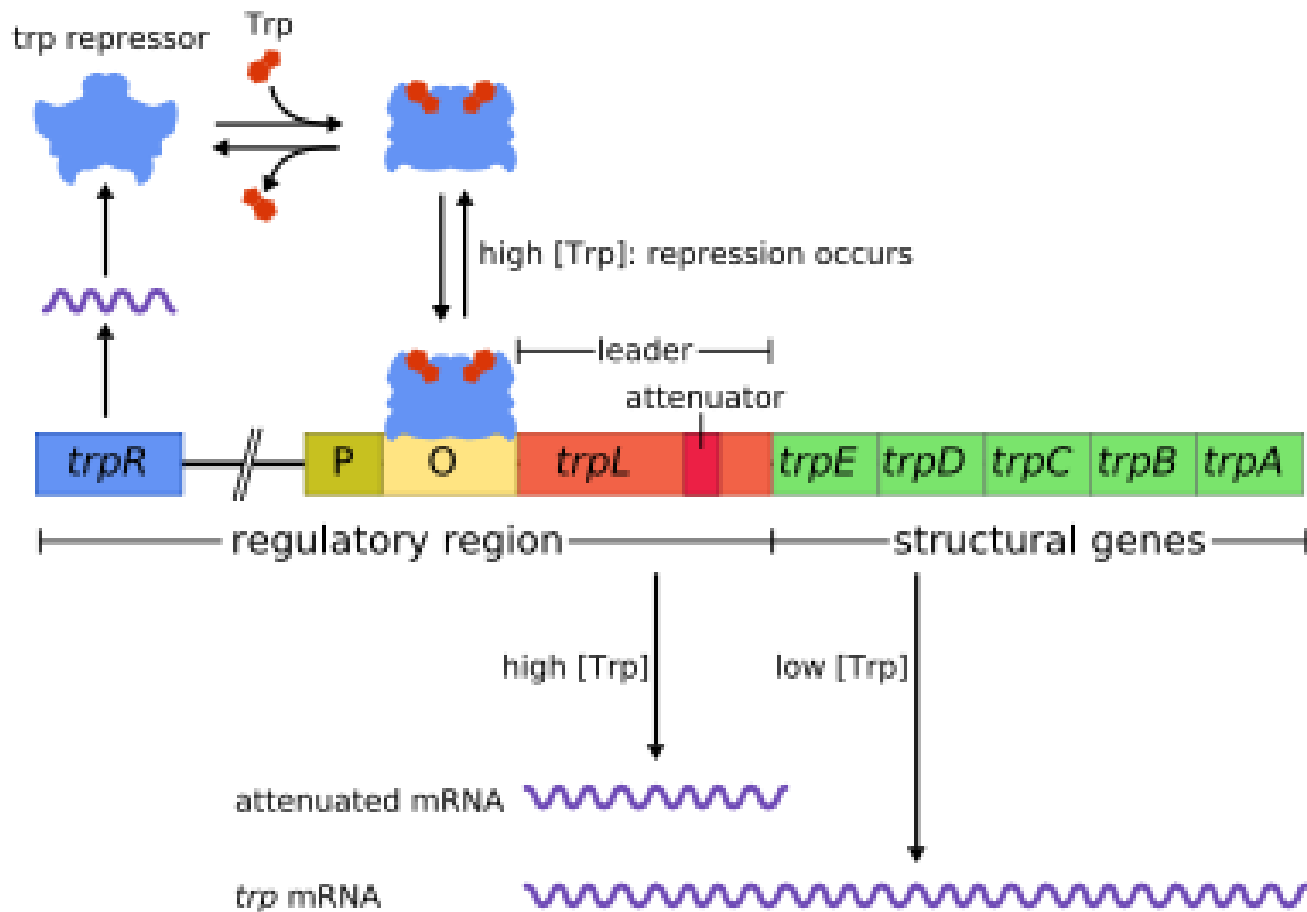
triptofan u suvišku → veže se za represor, mijenja mu konformaciju i aktivira → aktivni represor veže se za operatorsku regiju i inhibira transkripciju *Trp* operona



Trp je KOREPRESOR

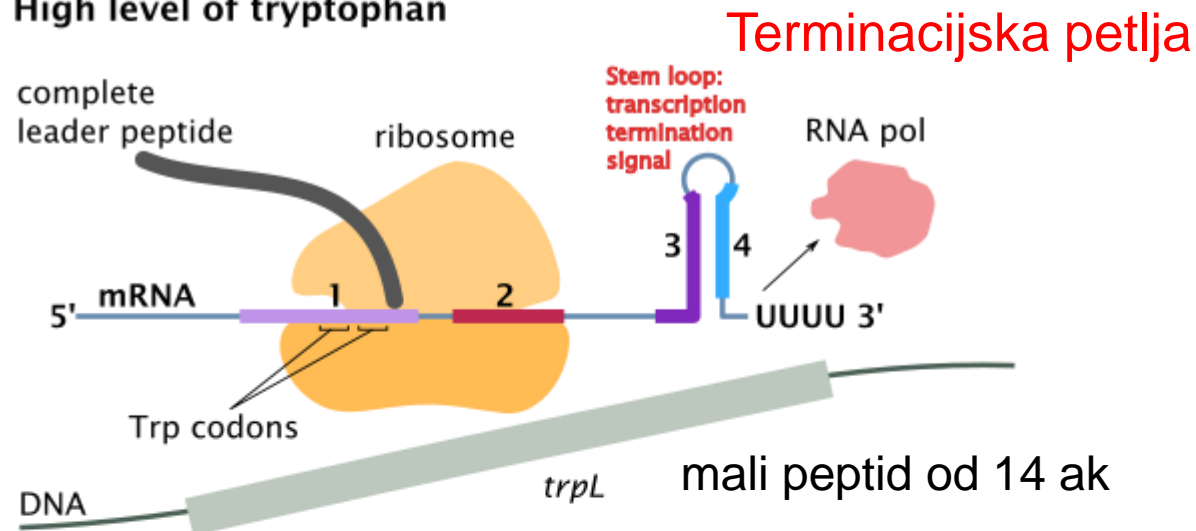
Kontrola terminacije transkripcije

Utišavači (atenuator) – najpoznatiji kod *Trp* operona

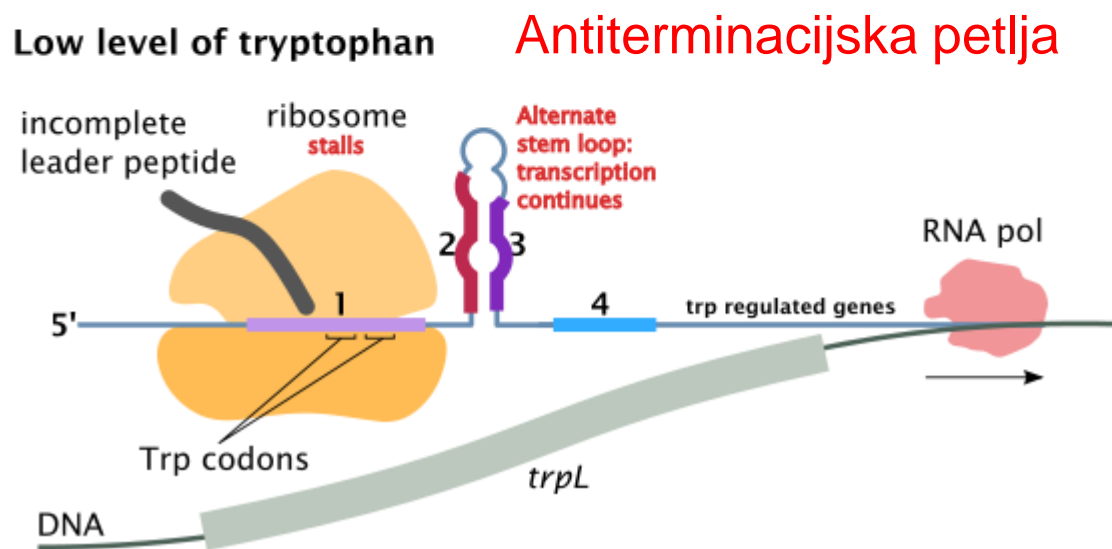


Utišavanje

High level of tryptophan

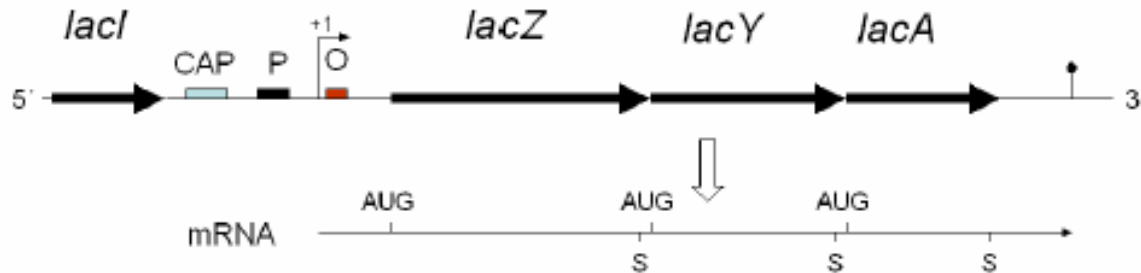


Low level of tryptophan



Lac OPERON

- Primjer POZITIVNE i NEGATIVNE regulacije transkripcije

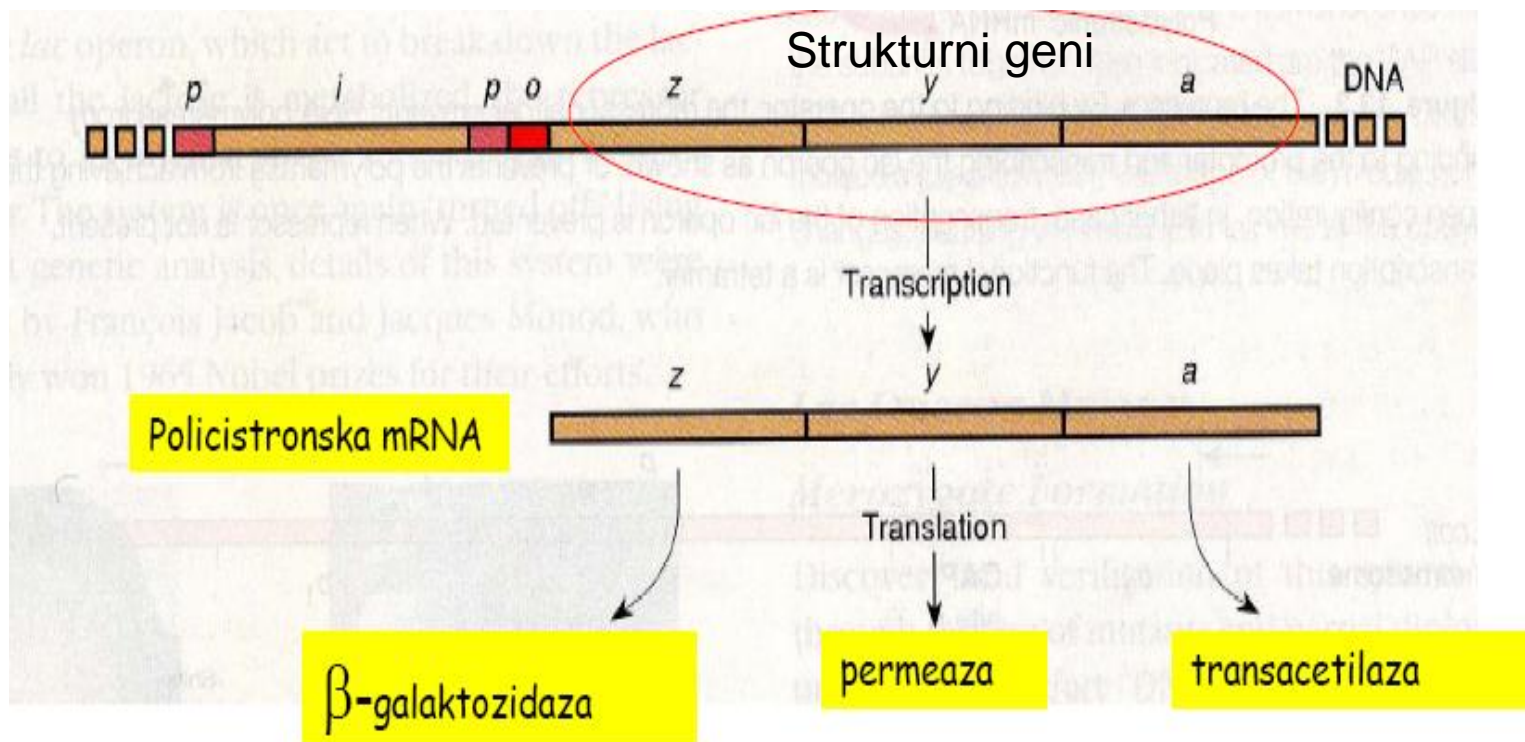


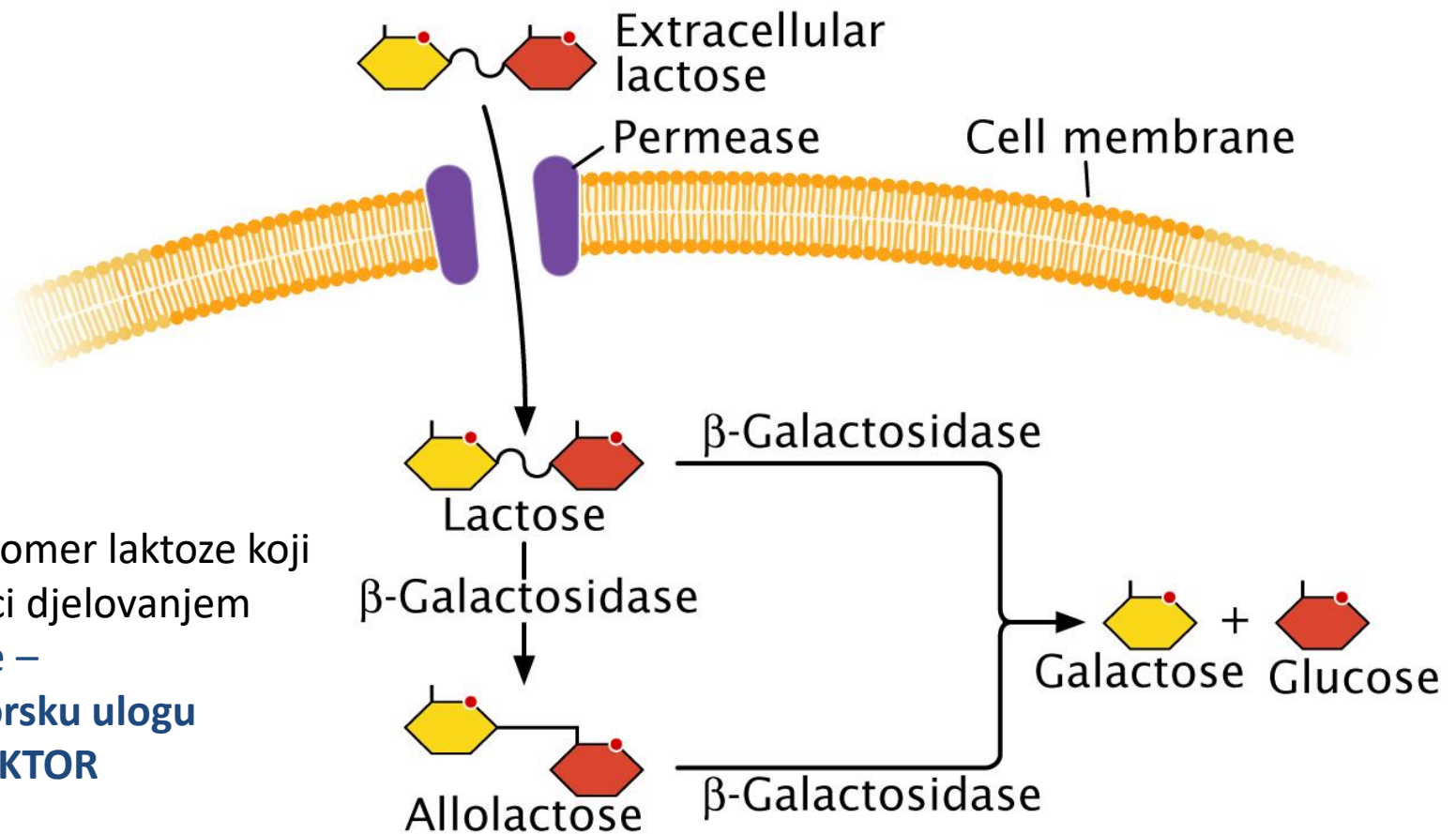
- Ovaj tip kontrole imaju operoni za razgradnju disaharida (npr. L-arabinozni i L-maltozni) tzv. **metabolički** enzimi
- Lac* operon predstavlja INDUCIBILNI SUSTAV - stanica proizvodi enzime za razgradnju laktoze samo ako je taj izvor ugljika **prisutan** u okolišu (štednja energije), a NEMA glukoze (npr. u laboratoriju podloga bez glukoze, s laktozom)

Gen *lacZ* kodira za enzim β -galaktozidazu (LacZ) koji cijepa laktozu na glukozu i galaktozu

Gen *lacY* kodira za permeazu (LacY), membranski transportni protein koji prenosi laktozu u stanicu

Gen *lacA* kodira za transacetilazu (LacA), enzim koji prenosi acetilnu grupu s acetil-CoA na β -galaktozide

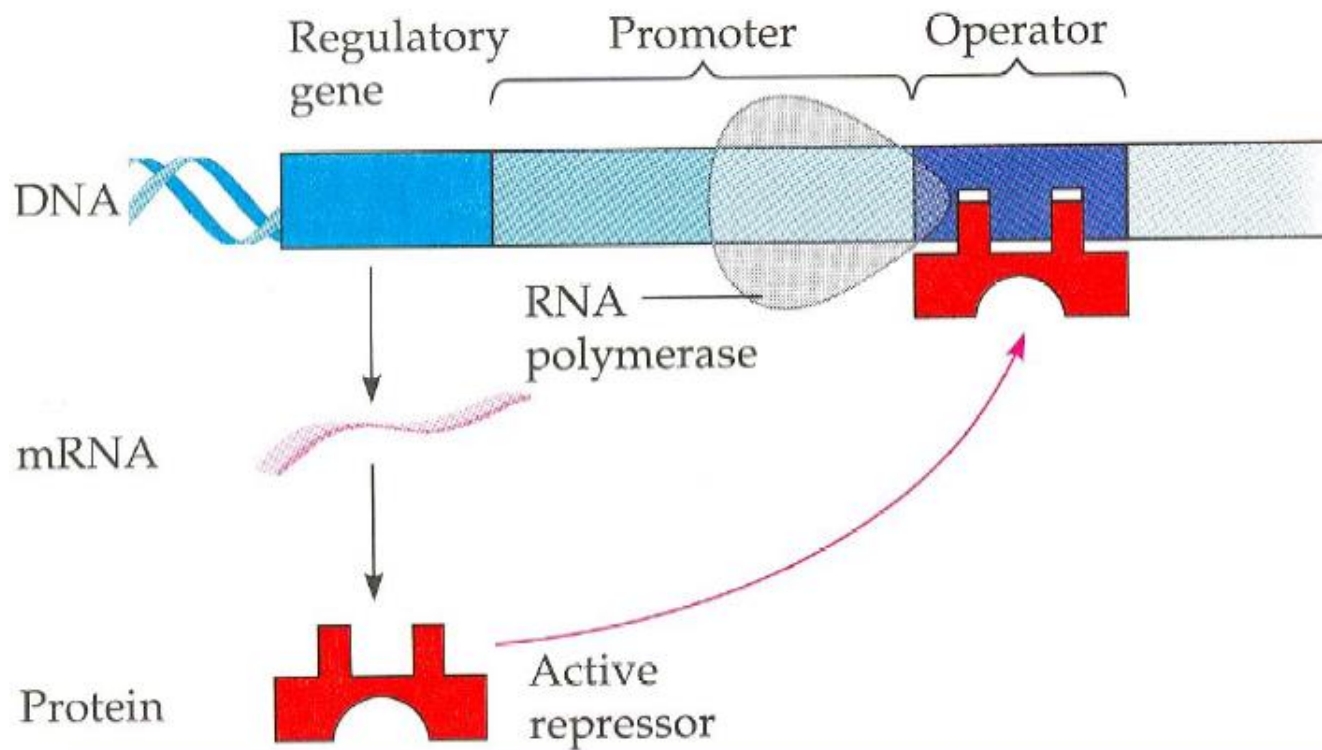




Alolaktoza je izomer laktoze koji nastaje u stanici djelovanjem β -galaktozidaze – ona ima efektorsku ulogu tj. ona je **INDUKTOR**

Fig_16-07 *Genetics, Second Edition* © 2005 W.H. Freeman and Company

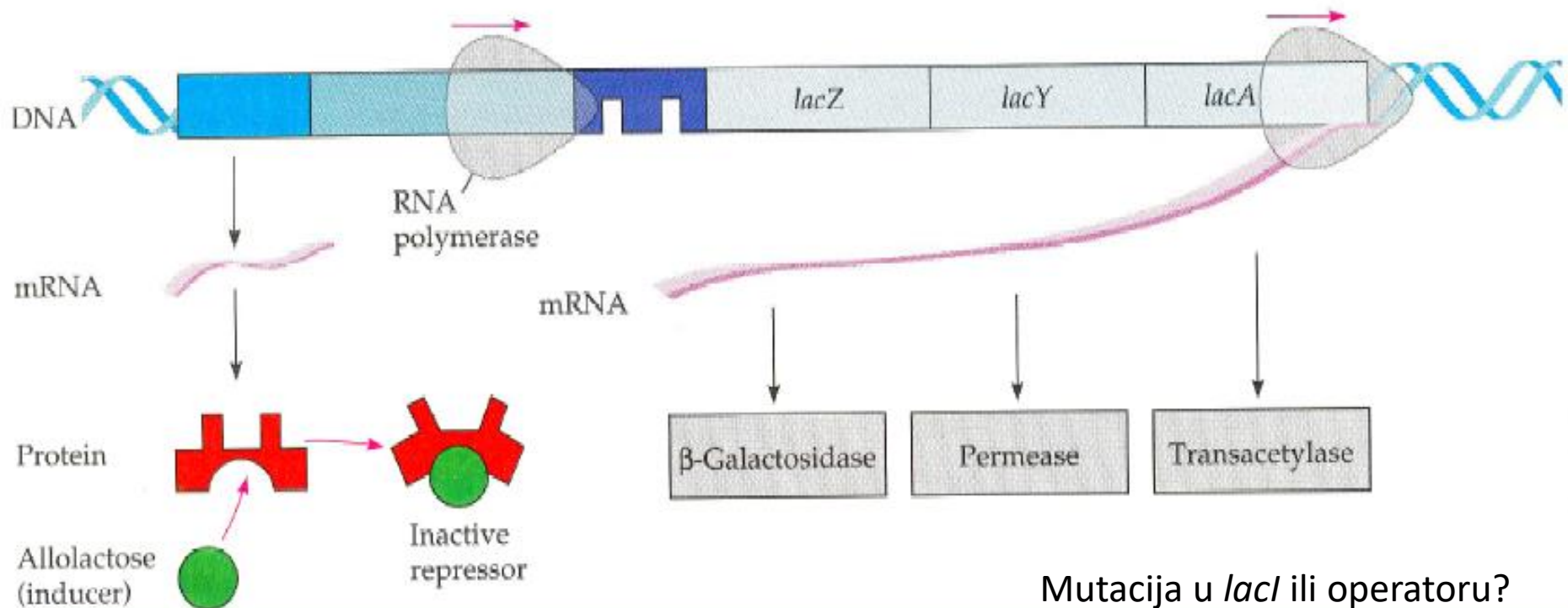
- Gen regulator *lacI* kodira za sintezu proteina represora LacI (oko 10 molekula, aktivan u obliku tetramera)
- Represor se veže za operatorsko mjesto (palindrom od 26 pb) koje se **preklapa** s genom *lacZ* i promotorom ako u stanici NEMA LAKTOZE. Tada se RNA polimeraza ne može vezati za promotor - NEGATIVNA REGULACIJA



(a) Laktoze nema u mediju, represor vezan za operator, operon "isključen" (nema sinteze enzima)

LAKTOZA JE **INDUKTOR** LAKTOZNOG OPERONA

- Indukcija *Lac* operona postiže se **inaktiviranjem** represora
- Kad stanice rastu u mediju s laktozom, laktozni izomer zvan alolaktoza (**INDUKTOR**), veže se za represor uzrokujući njegovu strukturnu promjenu (alosterički protein). Tako promijenjen represor ima smanjeni afinitet za operatorsku regiju DNA oko 1000 puta

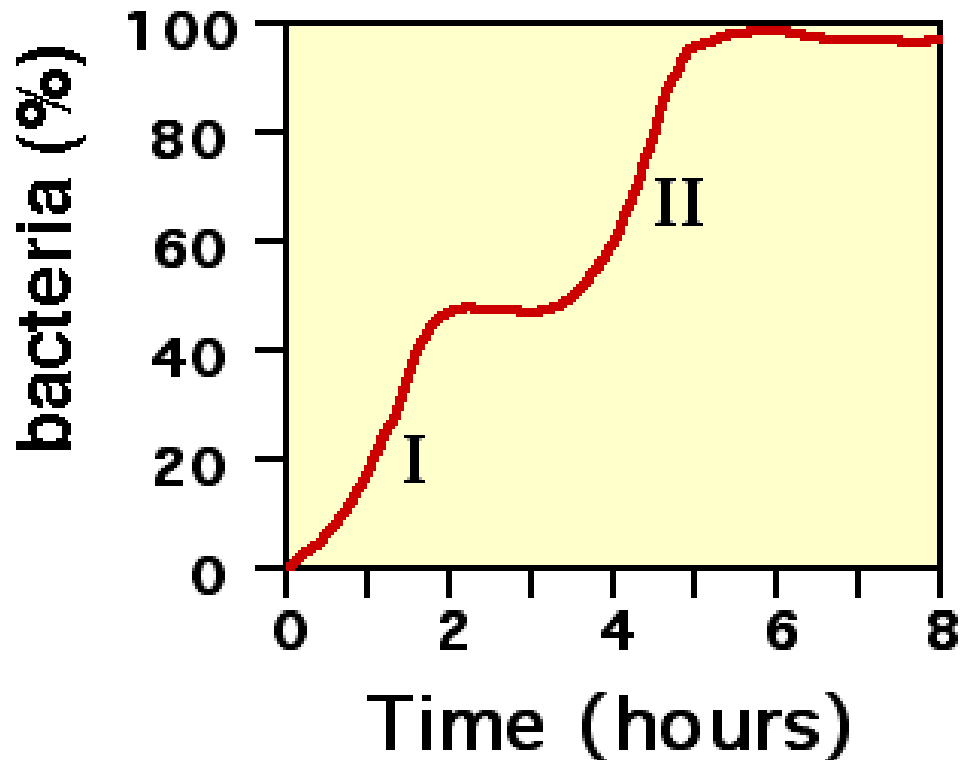


Mutacija u *lacI* ili operatoru?

(b) Laktoza prisutna u mediju, represor inaktivan, operon "uključen" (sinteza enzima)

Pozitivna regulacija *Lac* operona – represija katabolitom

- J. Monod je u svojim pokusima na bakterijama primijetio da bakterije koje rastu u prisustvu 2 različita šećera pokazuju 2 faze rasta
- Npr. ako su bakterije rasle u prisustvu glukoze i laktoze, prvo se trošila glukoza (faza rasta I), a tek zatim laktoza (faza rasta II)
- – EFEKT GLUKOZE



Ciklički AMP (gen *cya*) i CAP (katabolički aktivatorski protein) su dva dodatna regulatora *Lac* operona

CAP - Catabolite Activator Protein

CRP – cAMP Receptor Protein

Aktivator: **protein CRP**

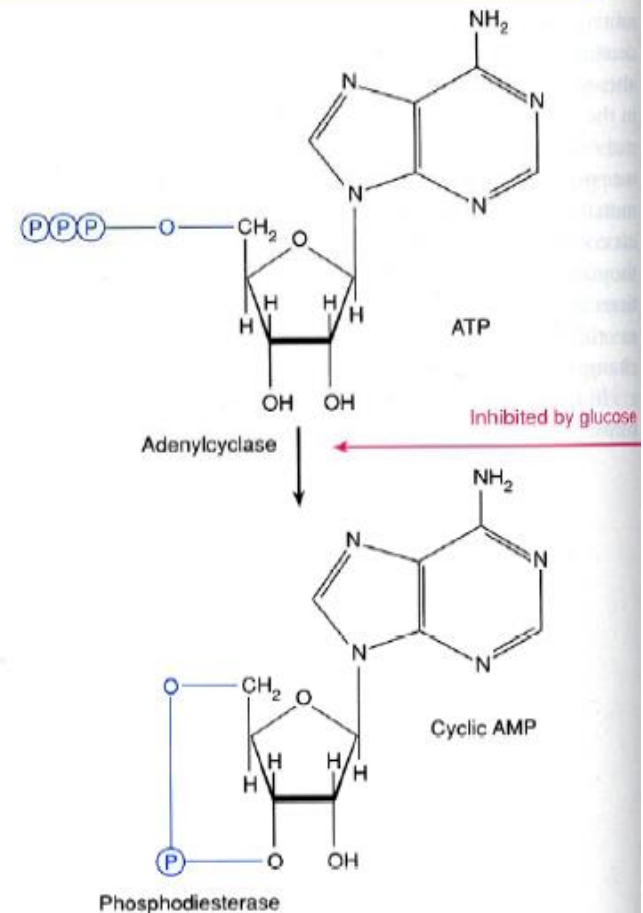
Induktor aktivatora: **cAMP**

Kada nema cAMP, ekspresija *Lac* operona je 10 puta slabija i u prisustvu laktoze!

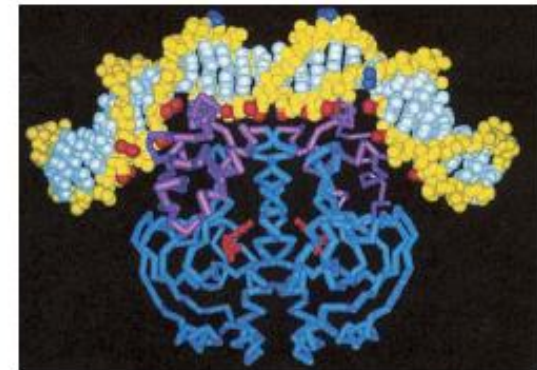
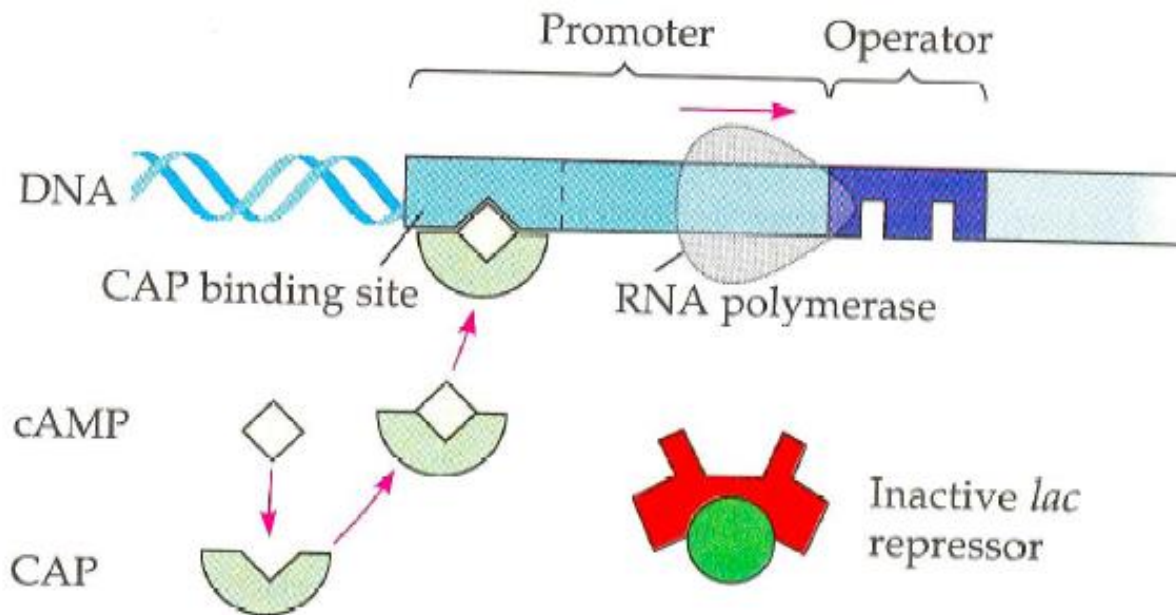
Količina cAMP je obrnuto proporcionalna količini glukoze

PUNO GLUKOZE = MALO cAMP

Glukoza inhibira enzim adenil-ciklazu koja pretvara ATP u cAMP

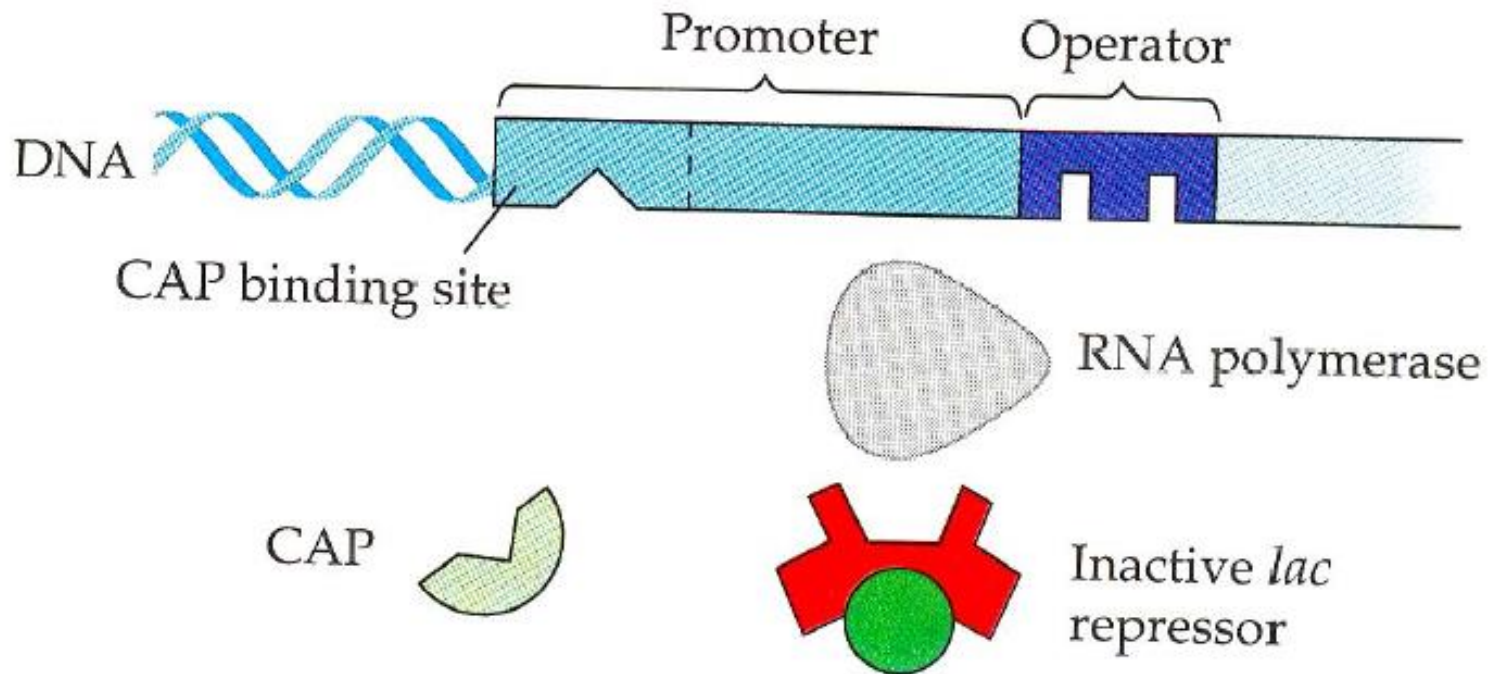


- U odsustvu glukoze (puno cAMP-a!) cAMP-CAP kompleks se veže za CAP mjesto u *Lac* promotoru (CAP mjesto ~ 22 pb) te se pri tome značajno povećava za CAP mjesto pojačava se zakrivljenost molekule DNA čime ona postaje bolje dostupna za vezanje RNA polimeraze – POZITIVNA kontrola



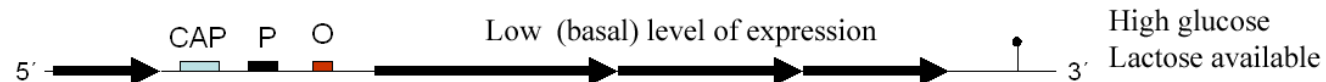
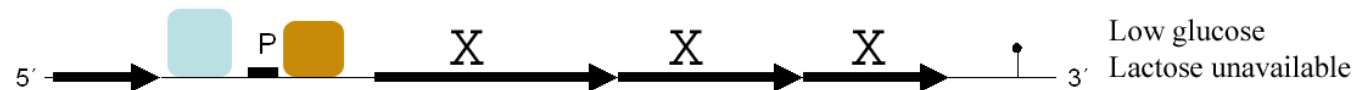
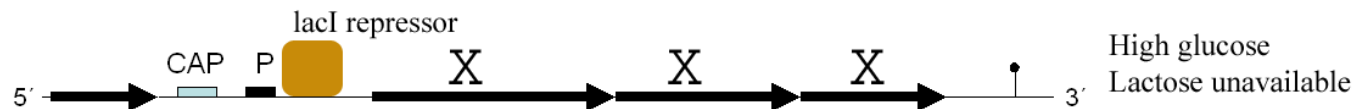
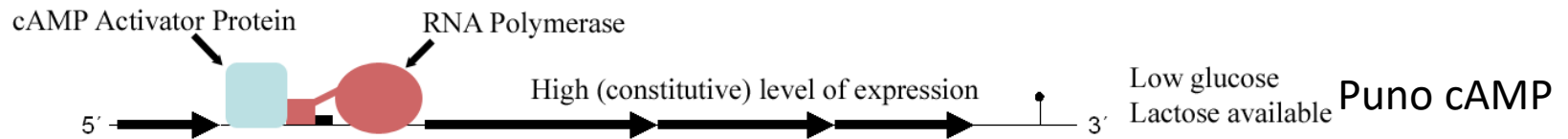
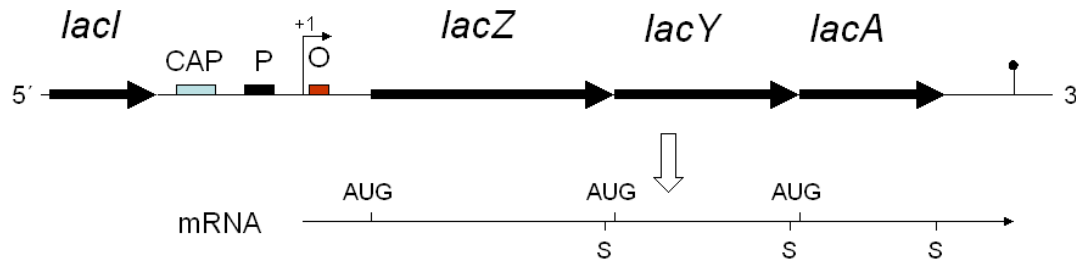
CAP-DNA
interakcija

- U prisustvu glukoze i laktoze ne stvara se cAMP-CAP kompleks te je transkripcija *Lac* operona značajno smanjena
- Sintetizira se mala količina proteina *Lac* operona (tzv. **bazalna ekspresija gena**).

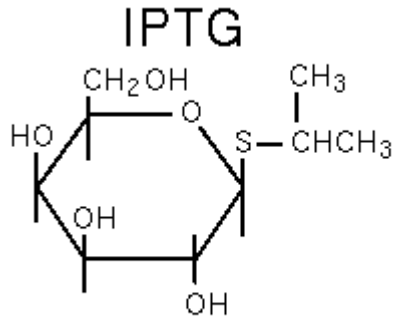


SUMARNO regulacija *Lac* operona

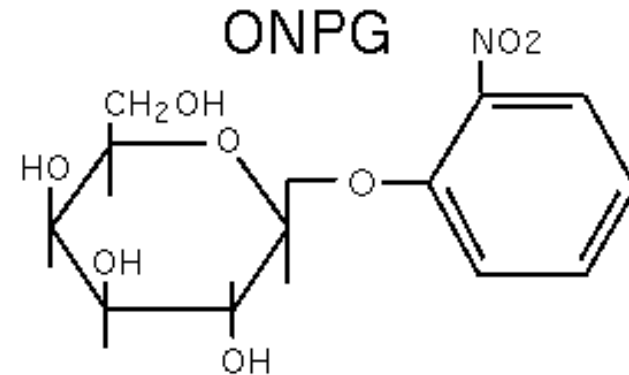
The *lac* Operon and its Control Elements



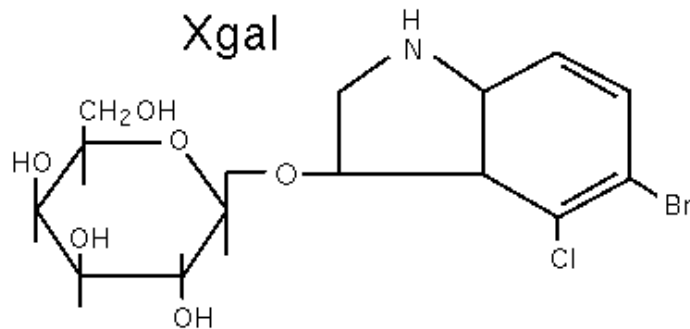
Analози laktoze i njihova primjena



Izopropil β-D-tio-galaktozid –
Inaktivira represor ali nije supstrat za β-gal.
Koristi se **induktor** *lac* operona.



O-nitrofenol β-galaktozid se koristi kao
supstrat za određivanje aktivnosti β-gal.
Cijepanjem nastaje ortonitrofenol **žute**
boje.



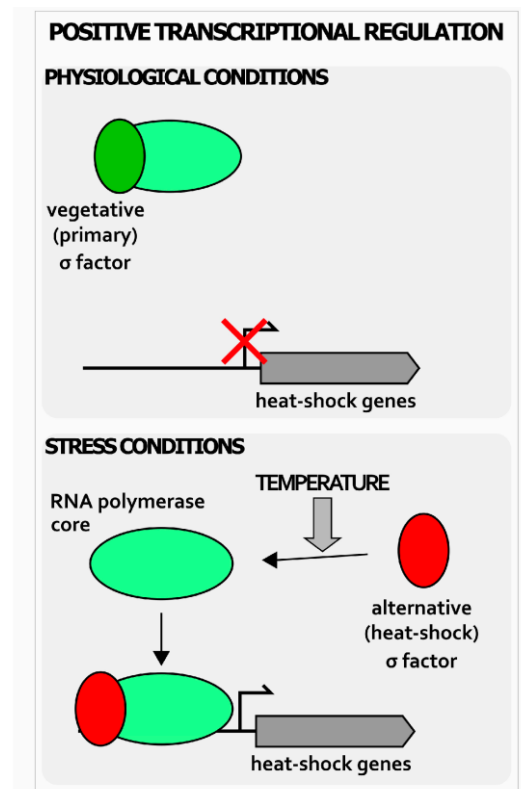
5-bromo-4-kloro-3-indolil- β-D-galaktozid
se koristi kao **supstrat** za određivanje
aktivnosti β-gal. Cijepanjem nastaje spoj
plave boje.

Regulacija ekspresije na nekoliko razina

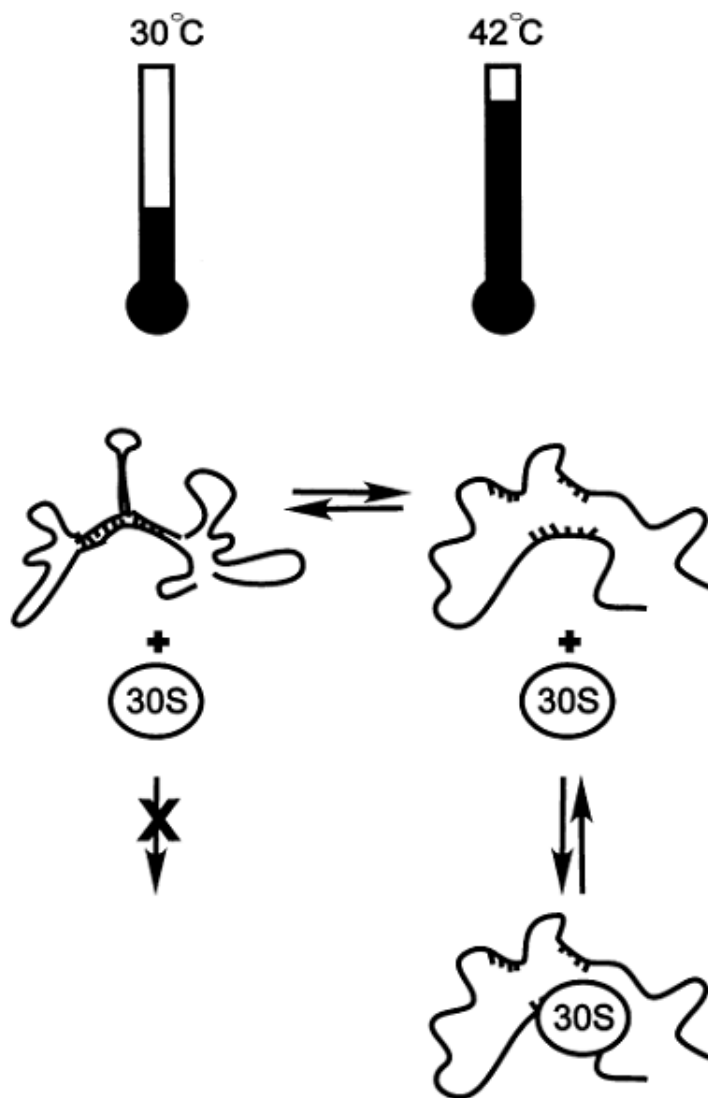
- Geni *hsp* (heat-shock proteini) – proteini toplinskog šoka
- Geni ***hsp*** sačinjavaju **REGULON** – različiti geni ili operoni pod regulacijom **jednog regulatornog proteina** ili specifičnog signala
- σ^{32} (alternativni sigma faktor) kontrolira ekspresiju *hsp* gena
- σ^{32} prisutan na svim temperaturama, ali produkti regulona *hsp* NISU
- U bakterijama postoji nekoliko različitih alternativnih sigma faktora
- Gen za σ^{32} zove se *rpoH*

Table 1. Consensus sequences for selected promoters and operators involved in transcriptional control of heat shock genes

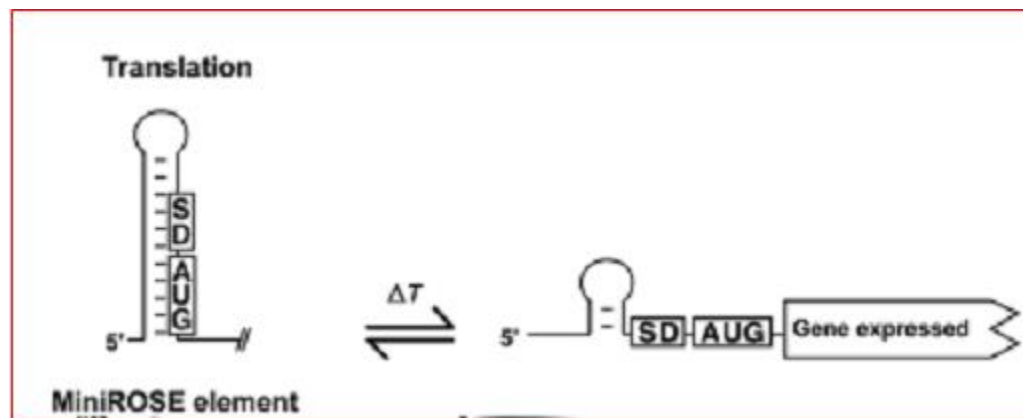
Promoter or operator	Sequence		References
Promoter			
(<i>E. coli</i>)	-35	-10	
σ^{70}	TTGACA (16–18 bp)	TATAAT	
σ^{32}	CTTGAA (13–17 bp)	CCCCAT-T	18, 38, 127
σ^E	GAAGTT (16 bp)	TCTGA	20, 74
Operator			
CIRCE	TTAGCACTC (N9)	GAGTGCTAA	85, 101, 131



Regulacija ekspresije gena *rpoH* na razini translacije strukturuom mRNA (termostat)

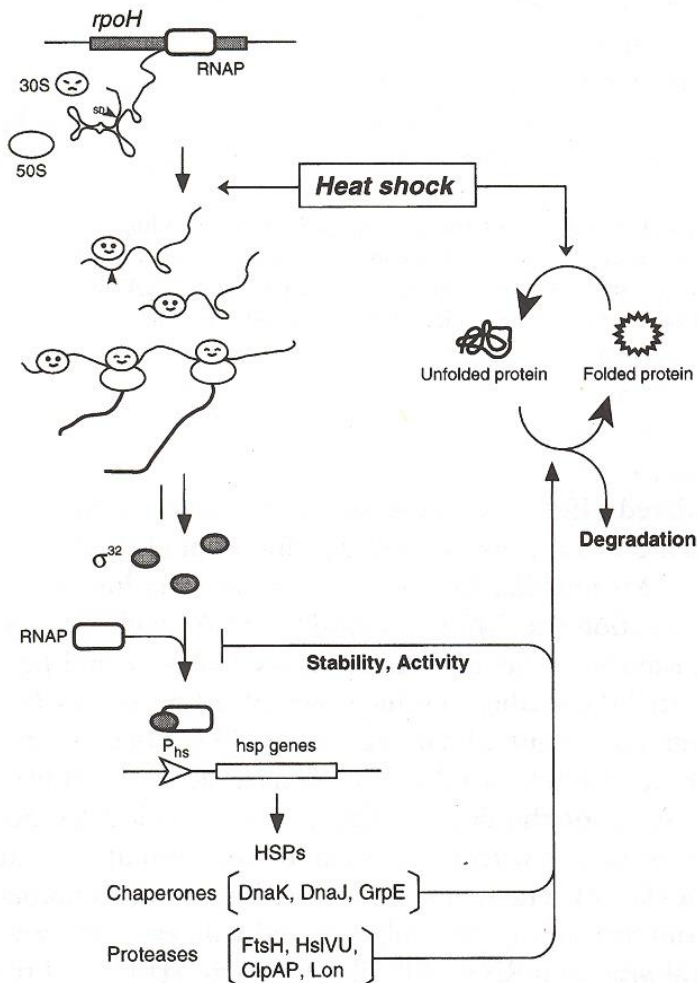


- Na nižim temperaturama, mRNA od *rpoH* je stabilno smotana i ne dozvoljava vezanje 30S ribosoma. Na višim temperaturama mRNA se dovoljno razmota da se 30S može vezati i započeti translaciju.



Regulacija ekspresije gena na razini posttranslacije

Regulacija stabilnosti sigma faktora σ^{32}



Šaperoni i proteaze degradiraju i inaktiviraju σ^{32} na niskim temperaturama!

Na povišenoj temperaturi, šaperoni i proteaze pomažu u smatanju i degradiranju oštećenih proteina. σ^{32} je stabilna i stupa u interakciju s RNA polimerazom

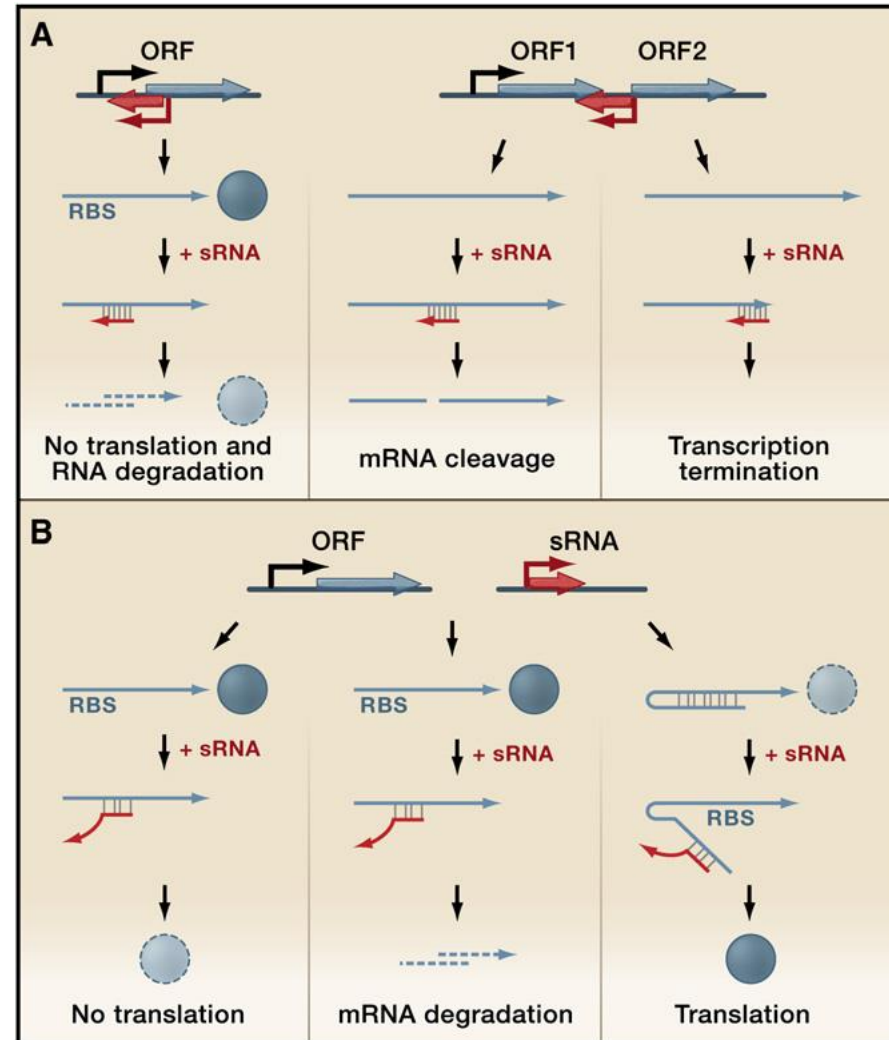
Figure 1. Hypothetical regulatory circuits of the σ^{32} regulon in *E. coli*. See text for explanation. RNAP, RNA polymerase core; P_{hs} , heat shock promoter.

Regulacija ekspresije gena na razini posttranskripcije

Regulatorne sRNA kod prokariota

A) *Cis* kodirajuće RNA – kodirane sa suprotnog lanca (**ANTISENSE**)

- velika homologija s ciljnom RNA
- Mogu spriječiti translaciju, izazvati cijepanje mRNA ili prekinuti prepisivanje



B) *Trans* kodirajuće RNA

Kodirane na mjestima udaljenim od ciljne RNA

- Parcijalna homologija s ciljnom RNA
- Mogu potaknuti translaciju, degradirati mRNA, inhibirati translaciju



Change Current Database

Current Database: *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 reference genome (EcoCyc)

Search in Current Database:



gene	polypeptide
rpoH	RNA polymerase sigma factor RpoH
Escherichia coli K-12 substr. MG1655	
Synonyms	fam; hin; htpR; sigma H factor; sigma H; sigma 32; sigma 32 factor; σ 32; RNA polymerase, sigma 32 (sigma H) factor
Accession IDs	EG10897 (EcoCyc) b3461 ECK3445 P0AGB3 (UniProt)
Length	855 bp / 284 aa
Map Position	[3,599,929 <- 3,600,783] (77.56 centisomes, 279°) View in Genome Browser
Locations	cytosol , inner membrane
Evidence	Inferred from direct assay [Yamamori82] Inferred from expression pattern [Yamamori82] Inferred from mutant phenotype [Yura84, Tobe84] Assay of protein purified to homogeneity from its native host [Grossman84, Liberek92]

[Add to SmartTable](#)[Provide Feedback](#)

OPERATIONS

Sequences

- Get Protein Sequence
- Get Nucleotide Sequence
- BLAST the Nucleotide Sequence
- BLAST the Protein Sequence
- Save Nucleotide Sequence to File
- Save Protein Sequence to File

Functional Linkage

- Genome Context Analysis

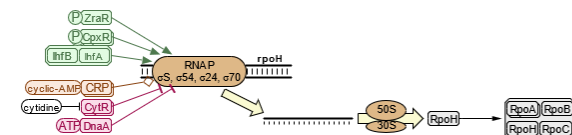
Comparison Operations

- Change Organisms/Databases for Future Comparison Operations
- Show This Gene in Another Database
- Search for This Gene in Multiple Databases
- Show Orthologs (with Operon Diagrams) in Multiple Databases
- Align in Multi-Genome Browser
- Align Gene Nucleotide Sequence with Orthologs
- Align Gene Product Amino Acid Sequence with Orthologs

Summary

[GO Terms \(21\)](#)[Essentiality](#)[Regulon](#)[Protein Features](#)[Operons](#)[Modeling](#)[References](#)[Show All](#)

Summary of Regulatory Influences on rpoH



Summary

rpoH encodes σ^{32} , the primary sigma factor controlling the heat shock response during log-phase growth. It is subject to tight control via a multivalent regulatory system that responds to temperature and the abundance of misfolded proteins within the cell.

σ^{32} levels rise, plateau and then drop following a heat shock, causing a similar induction in expression in heat shock genes [Zhao05, Zhou88, Straus87, Tobe84, Grossman84, Yura84, Yamamori82]. At elevated temperatures, formation of $\text{Eo}^{\sigma^{32}}$ is favoured over that of $\text{Eo}^{\sigma^{70}}$, σ^{32} has greater affinity for RNA polymerase core enzyme than σ^{70} at high temperatures [Blaszczak95]. Large-scale identification of $\text{Eo}^{\sigma^{32}}$ transcriptional targets has been carried out [Zhao05, Nonaka06]. The consensus promoter for $\text{Eo}^{\sigma^{32}}$ initiation is TNCNCcCTTGAA at -35 and CCCCATTta at -10, where lowercase letters indicate a tendency toward, but not an absolute requirement for, a certain nucleotide at that location [Cowing85, Koo09]. Notably, recent work indicates that $\text{Eo}^{\sigma^{32}}$ may only be involved in the heat shock response that occurs during log-phase, aerobic growth, with entirely different systems accounting for heat shock responses during stationary phase and anaerobic growth [DiazAcosta06].

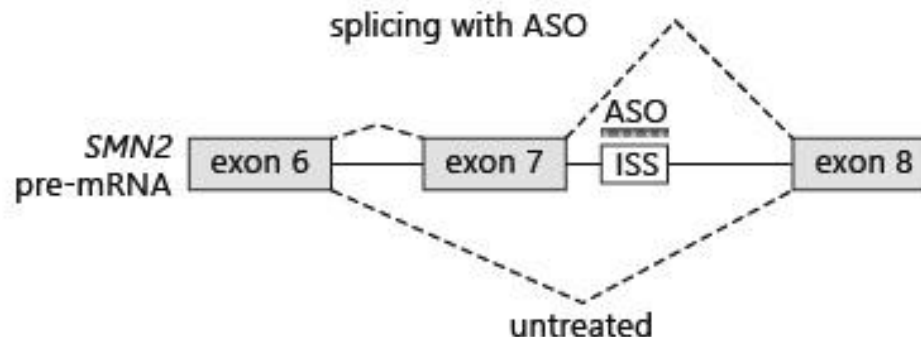
Unification Links

AlphaFold	P0AGB3
ASAP	ABE-0011303
CGSC	618
DIP	DIP-46203N
EchoBASE	EB0890
EcoliWiki	b3461
Mint	P0AGB3
ModBase	P0AGB3

zanimljivost

- Antisense RNA se mogu koristiti kao terapija za liječenje bolesti kod ljudi
- „antisense oligonucleotide (ASO) drugs” mogu mijenjati način ekspresije i prekrajanje ciljanih gena i mogli bi biti lijek za neke rijetke genetske bolesti (bolesti razvoja mozga, mišićne atrofije, epilepsije i slično)
- liječenje spinalne muskularne atrofije (SMA) lijekom **nusinersen** pokazalo uspješnim

a SMA, exon inclusion



Pitanja

1. Ako nema glukoze a laktoza je prisutna, *lac* operon će biti:

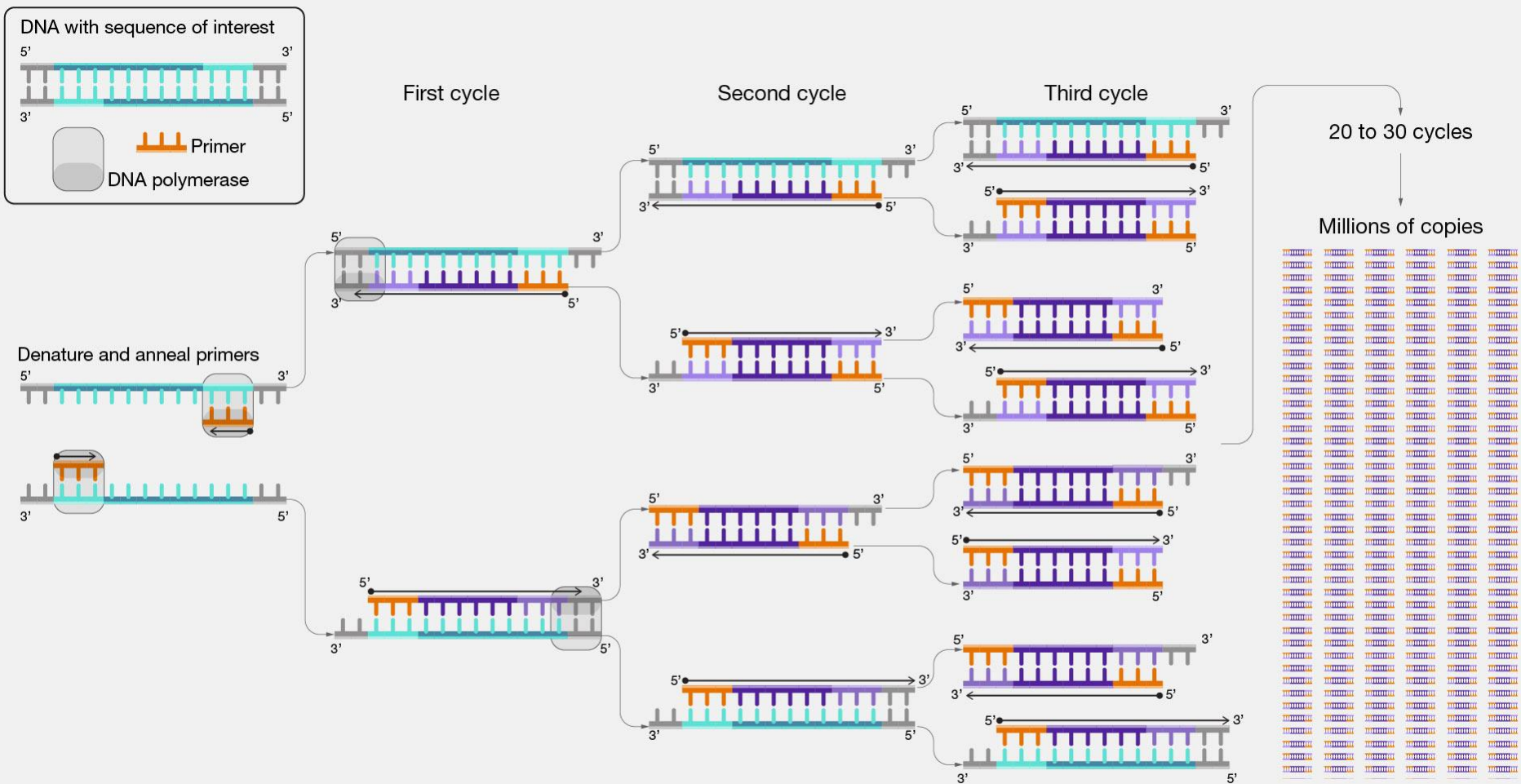
- aktiviran
- inhibiran
- djelomično aktiviran
- mutiran

2. Što će se dogoditi ako sekvenca operatora za *lac* operon sadrži mutaciju koja sprječava vezanje represora na operator?

- Kad ima laktoze, *lac* operon se neće prepisati
- Kad nema laktoze, *lac* operon će se prepisati
- Kompleks cAMP-CAP neće povećati sintezu RNA
- RNA polimeraza se neće vezati na promotor

3. Kad se unese u stanicu, vezat će se na represor i spriječiti vezanje represora:

- Operon
- Induktor
- Promotor
- Represor
- korepresor



PAUZA

PCR

(engl. Polymerase chain reaction)

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM

PCR - karakteristike

Tehnika kojom se u kratkom vremenu (nekoliko sati) može proizvesti milijarde kopija određenog fragmenta dvolančane molekule DNA bez kloniranja.

(Zapravo replikacija DNA u epruveti, *in vitro*)

Razvijena 1980tih, Kary Mullis (Nobelova nagrada 1993)

Jako osjetljiva metoda - dovoljna je DNA iz čak samo jedne stanice

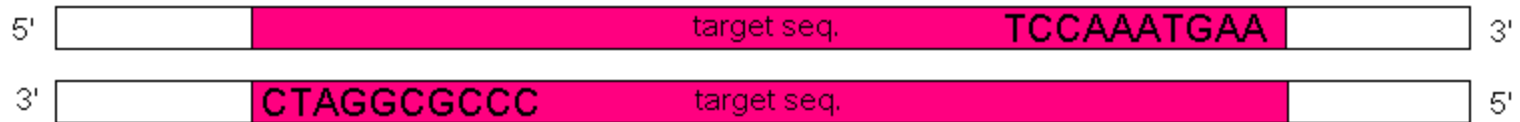
Velika primjena u istraživanjima i biotehnologiji

Što sve trebamo znati za uspješan PCR

- Trebamo znati što tražimo, odnosno slijed nukleotida DNA (sekvencu) našeg (dio) gena = **ciljna sekvenca**
- Trebamo imati uzorke ciljne DNA koji će poslužiti kao **KALUP** u reakciji umnožavanja
- Trebamo imati **DNA polimerazu**, **dNTP**-ove i **početnice** (DNA **helikaza?**), i pufer
- *Početnice dizajnira istraživač i naruči!
- Trebamo imati uređaj za izvođenje reakcije!



ds-DNA uзорak, ciljna sekvenca



začetnice



začetnice su komplementarne suprotnim krajevima ciljne sekvence



Ciklus PCR-a

- Napravi se smjesa svih potrebnih sastojaka u epruveti
- Smjesa se grije 1-2 min. na **95°C** (trebamo razdvojiti lance da bi se vezale začetnice!) **Kakva treba biti DNA polimeraza da "preživi" visoku temperaturu?**
- Temperatura se spušta na **40-60°C** da bi se vezale začetnice s komplementarnom DNA
- Temperature se podiže na **68-72°C** kroz 1-5 minuta da DNA polimeraza može sintetizirati nove lance
- **Opaska:** koristi se **Taq DNA polimeraza** iz organizma *Thermus aquaticus*, bakterije koja živi u toplim izvorima



1. Denaturacija (95°C, 30'')



(prekidanje vodikovih veza)



2. Vezanje začetnica (40-60°C, 30'')



3. Sinteza (72°C, 1000 nt/min)



GTCATAGCATTATTATTATTATTTCAGGACTA
CAGTATCGTAATAATAATAATAAGTCCTGAT

A template sequence with 5 ATT repeats.

<http://sites.sinauer.com/cooper7e/animation0409.html>

<http://www.youtube.com/watch?v=DkT6XHWne6E>

Ciklusi se ponavljaju 25-35 puta

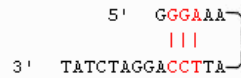
Količina DNA se po ciklusu povećava
eskponencijalno - 2^n

Važne napomene o PCR

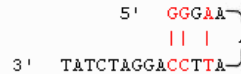
- **Odabir početnica je jako bitan.** Trebaju biti duge oko 20 pb da bi bile dovoljno specifične
- Treba paziti na nema komplementarnih sljedova unutar iste početnice (zašto?)
- Početnice međusobno ne smiju biti komplementarne! (zašto?)
- Udio GC i AT parova unutar jedne početnice trebao bi biti podjednak (50%)

Hairpin

Oligo, 3 bp (Loop=4), delta G = -0.1 kcal/mol

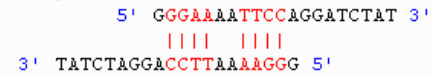


Oligo, 2 bp (Loop=3), delta G = 2.1 kcal/mol

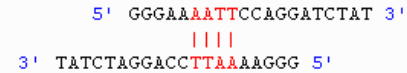


Self-Dimer

4 bp, delta G = -6.6 kcal/mol (bad!) (worst= -36.6)



4 bp, delta G = -5.4 kcal/mol (bad!) (worst= -36.6)



Primer-BLAST

A tool for finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template | **Primers common for a group of sequences**

Retrieve recent results | Publication | Tips for finding specific primers

Save search parameters | Reset page

PCR Template

Enter accessions, FASTA sequences or a Gene ID (A refseq record is preferred) [Clear](#)

Range [Clear](#)

Forward primer From To

Reverse primer

Or upload FASTA file No file selected.

Query exclusion ☐ Exclude predicted transcripts (XM, accessions) [?](#)

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size

Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min Opt Max Max T_m difference [?](#)

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [?](#)

Exon junction span [?](#)

Exon junction match

Min 5' match Min 3' match Max 3' match

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [?](#)

☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [?](#)

Intron inclusion

Intron length range

Min Max [?](#)

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check ☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template [?](#)

<https://hgvsina.biovit.hr/creation/customer/account/login/> [?](#)

Home | **PrimerSelect** | About

PrimerSelect

PrimerSelect predicts optimal primer sets for RT-Seq technology. Paste target genes into Input Sequence Form in order to get primer pair predictions. Computation might take a short moment, while page is not responsive.

Input Sequences

Predefined primers

BLAST database Max. BLAST hits

Važne napomene o PCR

- **T_m** (melting temperature) je temperatura koja se računa za svaku pojedinačnu početnicu da bi se odredila optimalna temperatura za vezanje
- Formula: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T) ^\circ C$.
- Paziti da T_m početnica budu slične
- Produkti PCR reakcije se analiziraju tehnikom agarozne gel elektroforeze

Search All ▾

Search by catalog number, product name, keyword, application



[Home](#) > [Brands](#) > [Thermo Scientific](#) > [Molecular Biology](#) > [Molecular Biology Resource Library](#) > [Thermo Scientific Web Tools](#) > T_m Calculator


T_m Calculator



This tool calculates the T_m of primers and estimates an appropriate annealing temperature when using different DNA polymerases. [How to use this calculator](#) >

Quickly find the right annealing temperature for [Platinum SuperFi DNA polymerase](#) (also works for [SuperScript IV One-Step RT-PCR Kit](#)), [Phusion](#) and [Phire](#) DNA polymerases.

Important note: If the PCR primer contains desired mismatches, e.g., for creating a mutation or a restriction site, make sure to calculate the T_m only for the correctly matched sequence

 The T_m calculator is **not required** for [Platinum II Taq DNA Polymerase](#), [Platinum SuperFi II DNA Polymerase](#), and [Platinum Direct PCR Universal Master Mix](#), and [Phusion Plus DNA Polymerase](#) due to their buffers specially formulated for a universal annealing temperature of 60°C for primers.

1. Select your DNA polymerase

- ☒ Platinum SuperFi DNA polymerase
(Also select this option if using the SuperScript IV One-Step RT-PCR Kit)
- ☐ Phusion or Phire DNA polymerase
- ☐ DreamTaq DNA polymerase or other Taq-based DNA polymerase

2. Select input method

- ☒ Single pair
- ☐ Batch

3. Type or paste your sequence

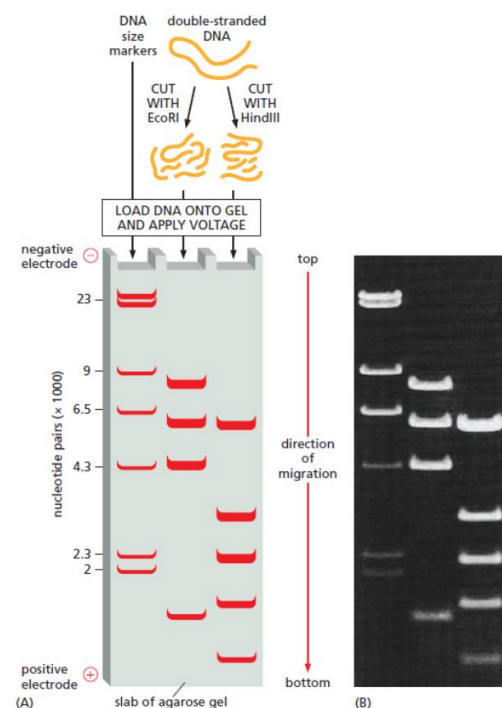
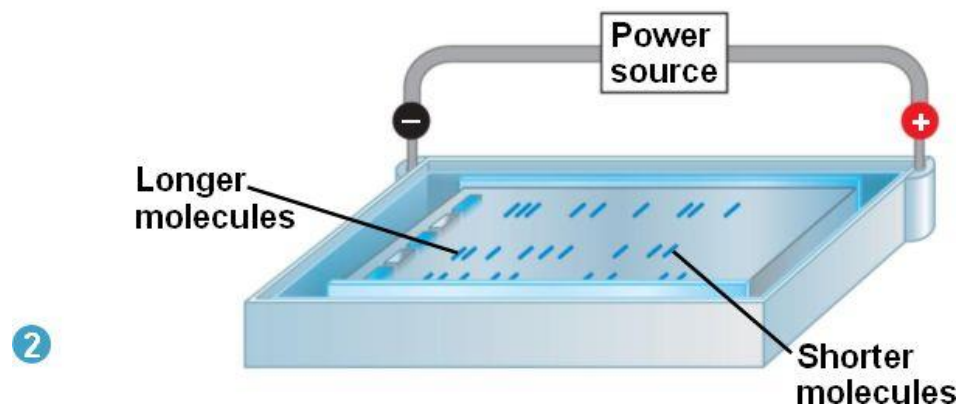
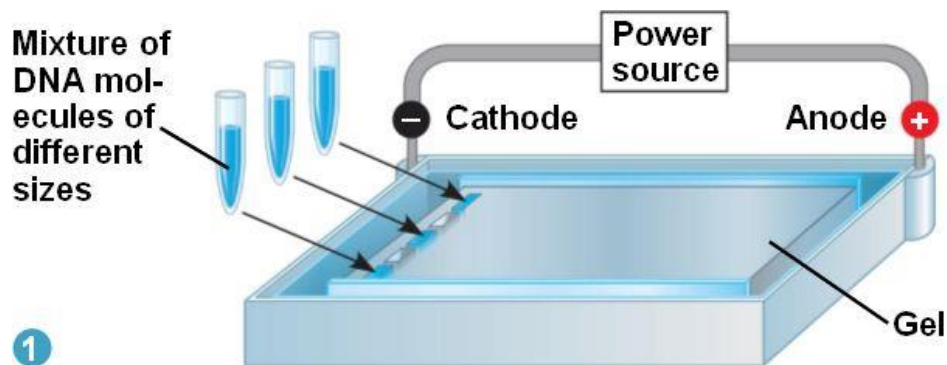
Primer#1: 5'-



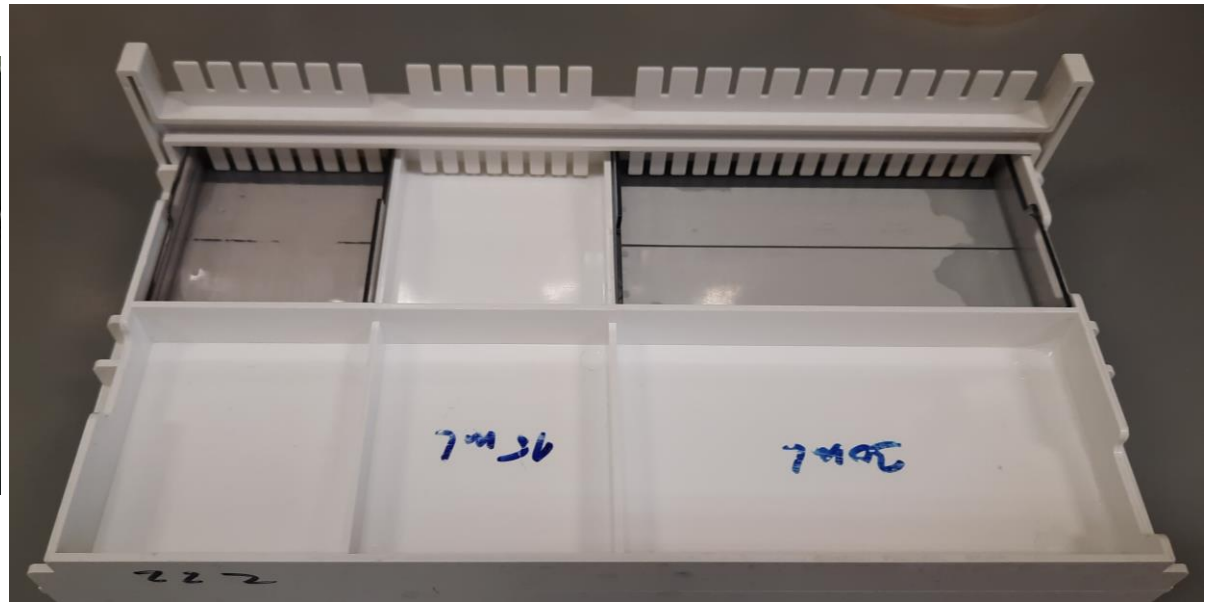
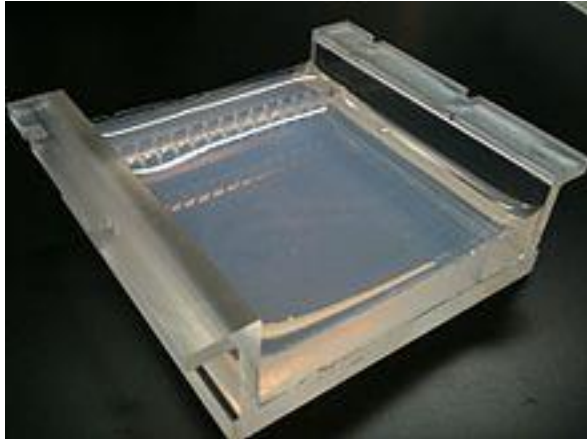
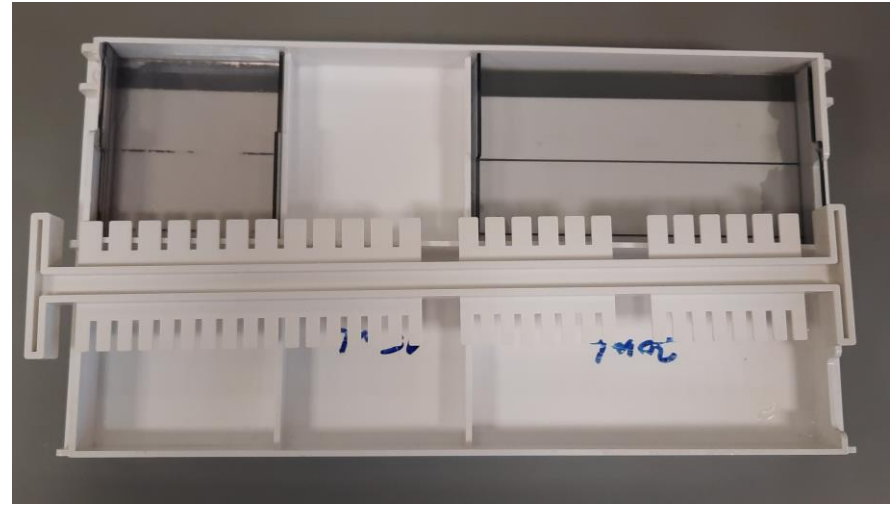
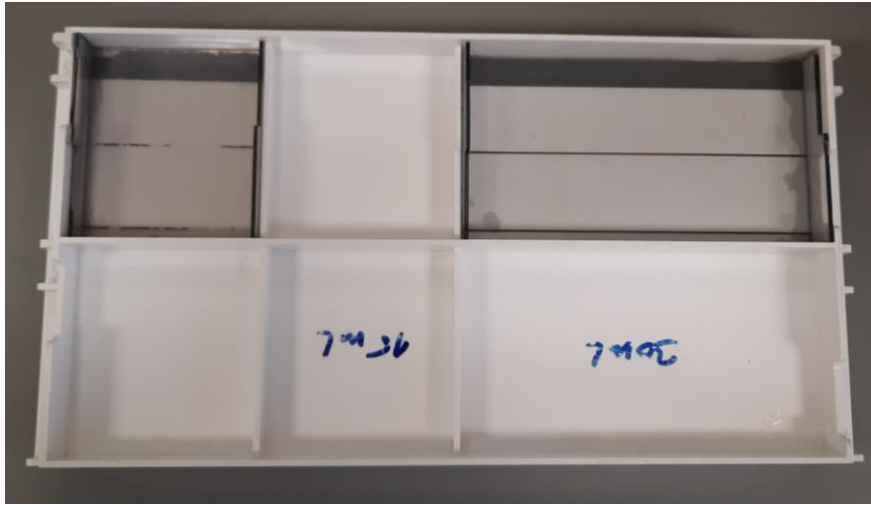
Agarozna gel elektroforeza

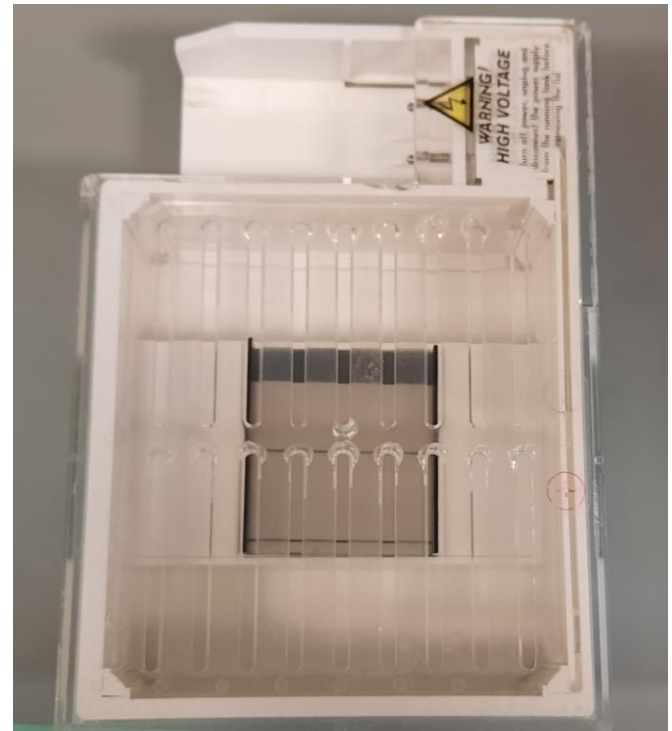
Služi za razdvajanje molekula DNA ili RNA prema veličini (kraće molekule)

Molekule se razdvajaju u gelu od **agaroze** (polisaharid iz morskih algi), koji sadrži male pore, pomoću električnog polja

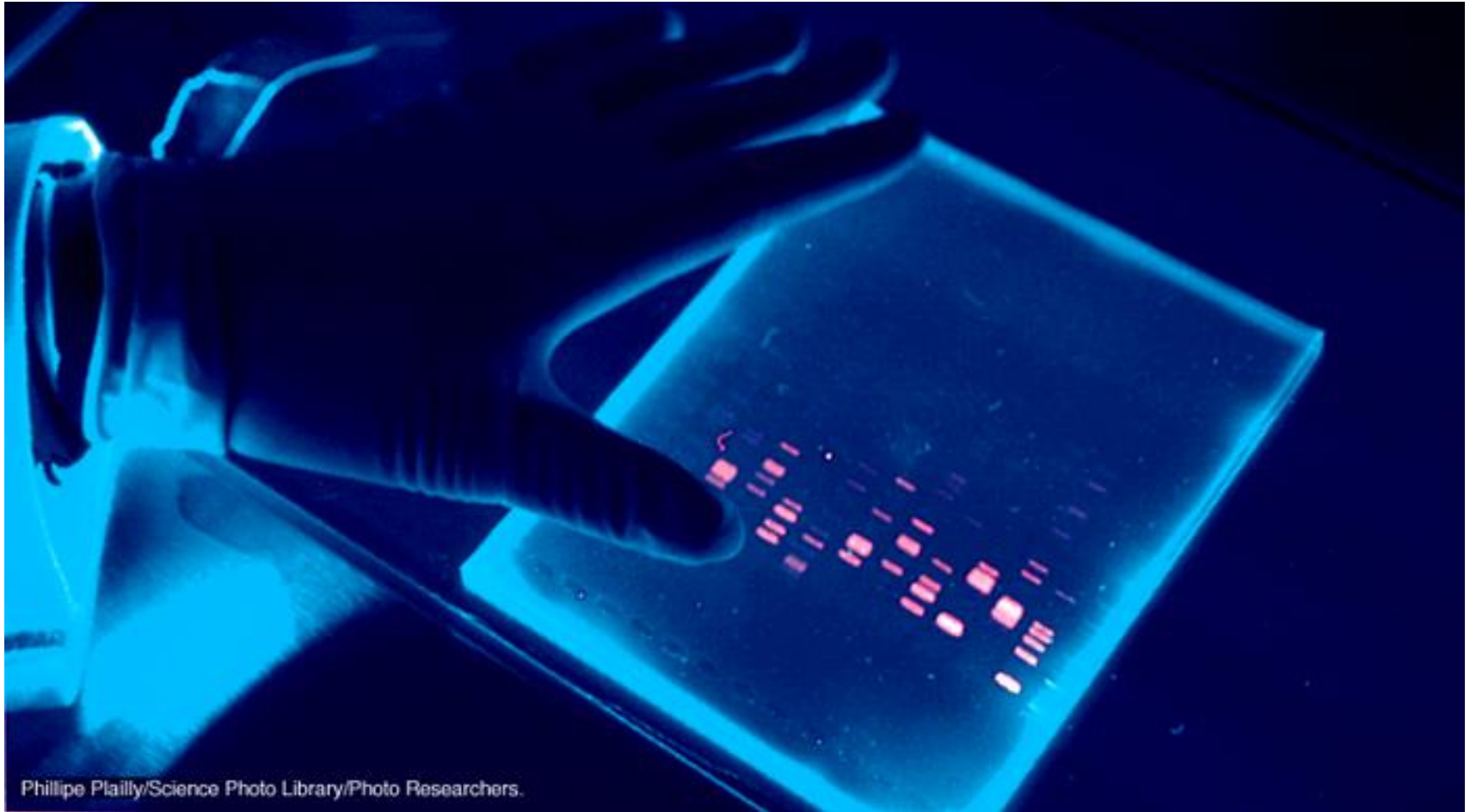


Priprema agaroznih gelova





DNA/RNA se vizualizira bojanjem gela etidij bromidom koji se interkalira u DNA i fluorescira pod UV svjetlom. Danas postoje i druge boje koje se mogu koristiti u istu svrhu i smatraju se sigurnijim za upotrebu (Sybr green).



transiluminator

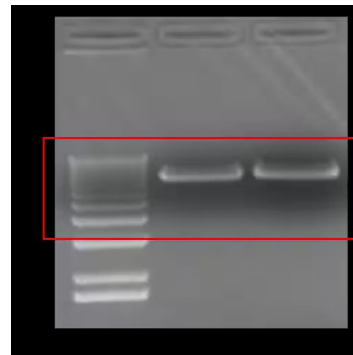
DNA polimeraze

- Različiti tipovi DNA polimeraza od različitih proizvođača, brzina
- Sve bolje, brže, preciznije, mogu raditi u raznim „uvjetima“
- Postoje DNA polimeraze koje **imaju** lektorirajuću aktivnost (za kloniranje)
- Postoje DNA polimeraze koje **nemaju** lektorirajuću aktivnost (za umnažanje)
- Danas proizvođači nude tzv. **2x master mix** (dodane sve komponente i boja osim početnica i kalupa)
- Prije nanošenja na gel, u uzorak se mora dodati boja (**Gel Loading Dye**) ako nije dio master mix smjese



Boje za nanošenje uzorka na gel

- Ima raznih, dođu najčešće 6 x koncentrirane
- U boju je dodan glicerol („oteža, ugusti“ uzorak, da ostane u jažici)
- Tijekom elektroforeze boja „putuje“ i prema položaju boje se odredi kad treba prekinuti elektroforezu (očekivani fragmenti DNA)



Dyes	Sizes
- Xylene Cyanol FF	7,000-6,000 bp
- Cresol Red	900-700 bp
- Bromophenol Blue	300-500 bp
- Orange G	50-100 bp

Kontrole

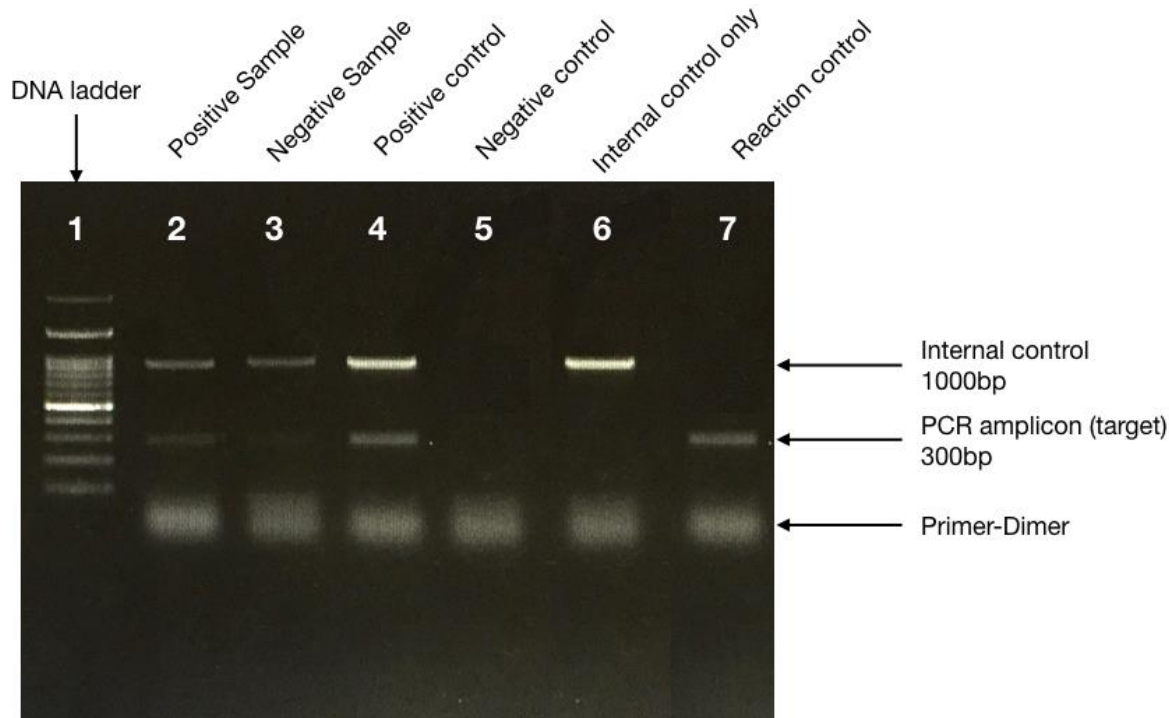
Pozitivna i **negativna** (bez kalupa, DNA)

Pozitivna kontrola još može biti prava **pozitivna** (kalup za očekivani produkt - pokazuje „rade li sve komponente“),

Interna (za neki drugi gen na istom uzorku, druge početnice isti kalup)

Standardna (na gel se nanosi već postojeći umnoženi produkt)

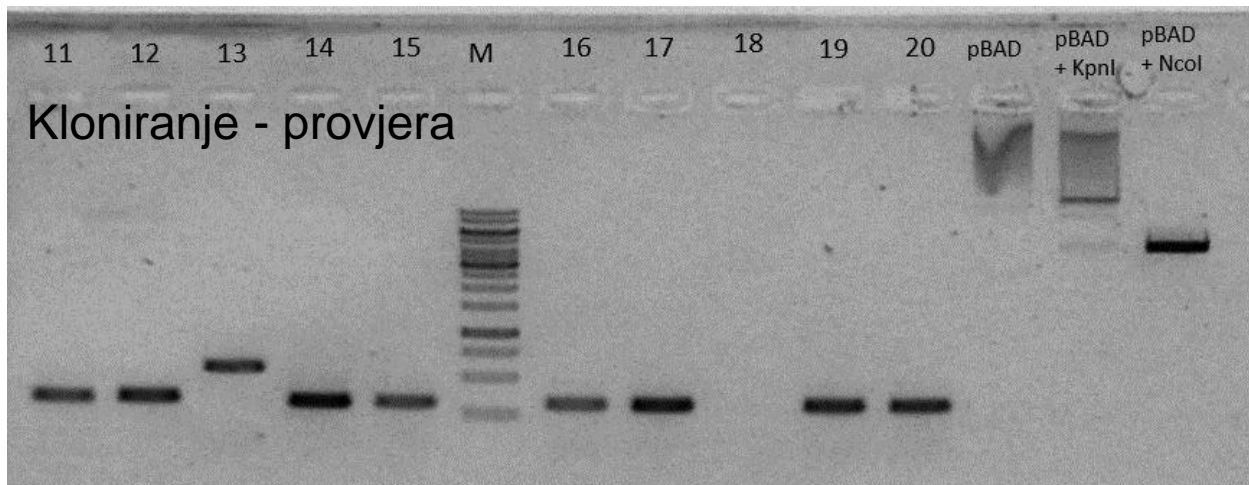
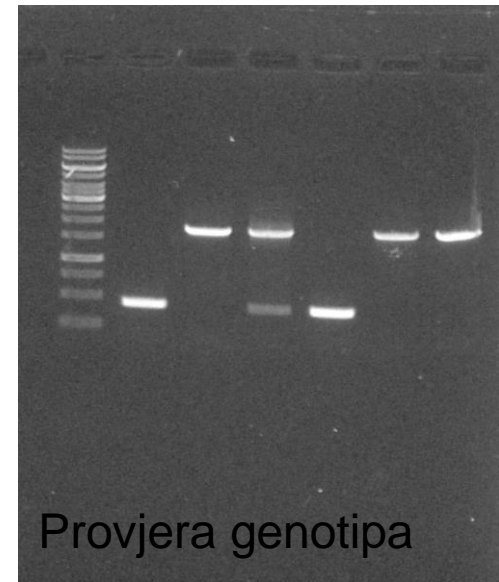
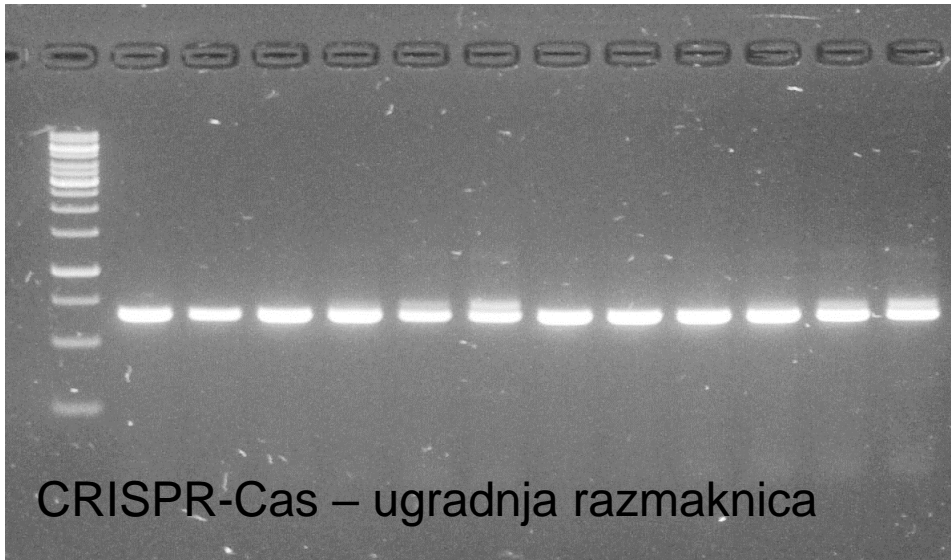
Vanjska (paralelna amplifikacija, pozitivna ili negativna)



Primjena PCR

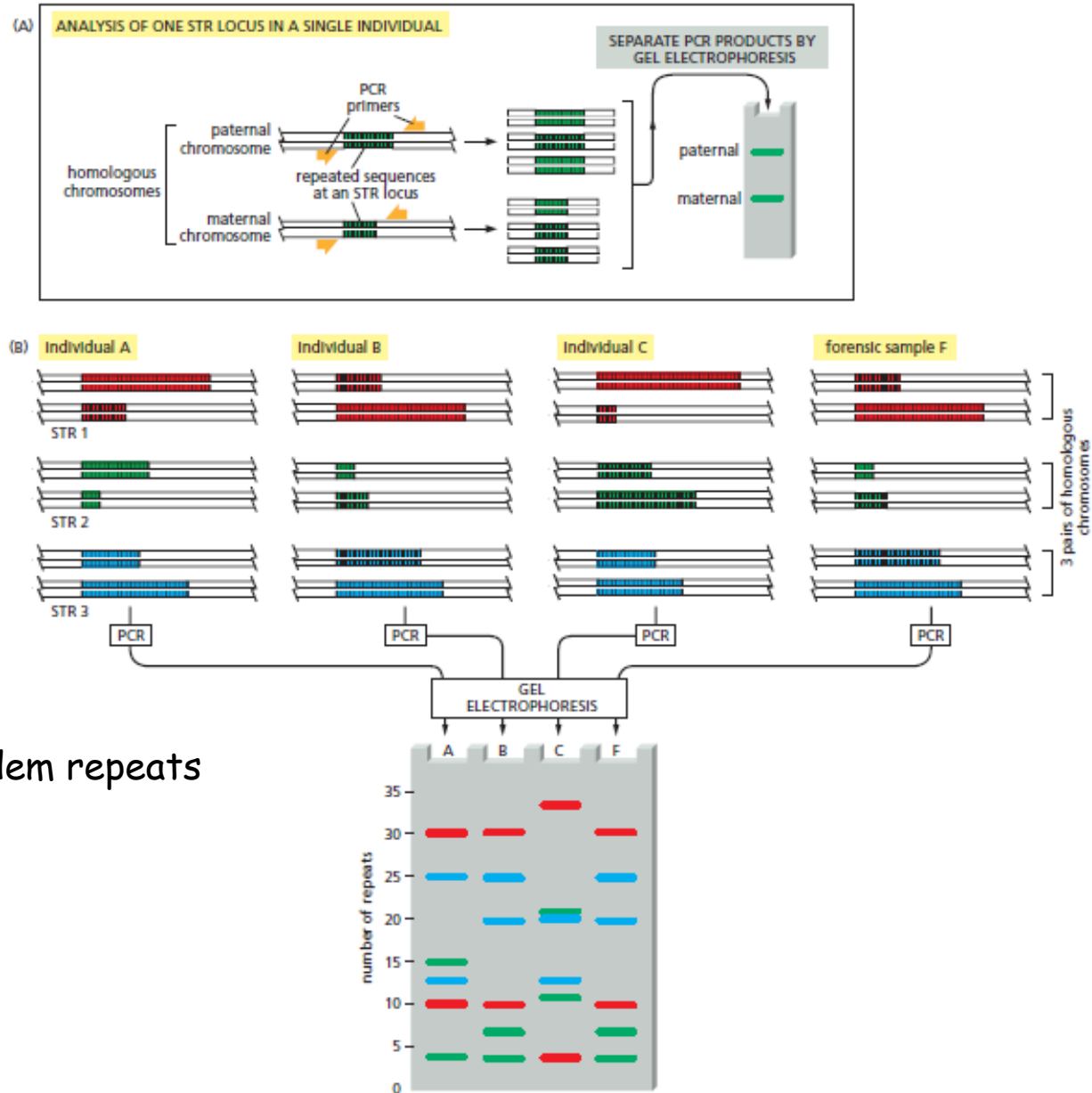
- Analiza stare DNA (izumrle životinje, mumije i slično)
- Medicinska dijagnostika: otkrivanje virusa (npr. HIV, hepatitis, HPV i slično prije pojave simptoma)
- Otkrivanje raka (otkrivanje mutacija u genima odgovornim za nastanak raka)
- U forenzici (analiza DNA iz krvi na mjestu zločina)
- U laboratorijima: za kloniranje gena, otkrivanje mutacija, uvođenje ciljanih mutacija, priprema za sekvenciranje, provjere genotipa itd.

Primjena - primjeri



Koji uzorak
ima insert?

Razlikovanje pojedinaca



Real-time PCR (RT-PCR) ili PCR u stvarnom vremenu

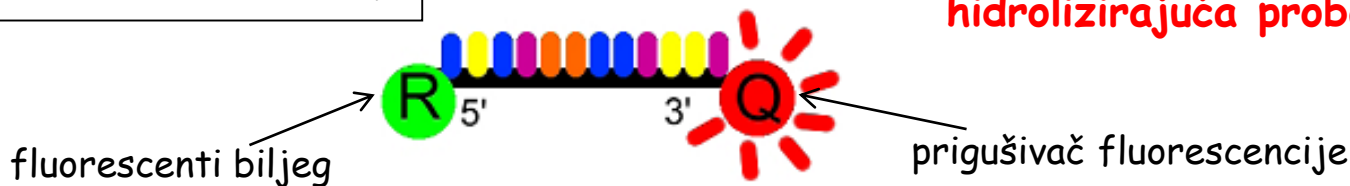
(Quantitative PCR = Q-PCR ili qPCR)

Primjena:

- Određivanje početnog broja molekula DNA koji služi kao kalup, npr. u istraživanjima za određivanje transkripcije gena
- Velika primjena u dijagnostici (jako pomogla u **dijagnostici infektivnih bolesti**)
- Određivanje udjela *GMO* (0.9%)

Naviše se koristi metoda TaqMan (proba, sonda)

Amplikon 50-150 pb
Proba 20 -26 pb
T_m probe > 8-10 ° od anneal.



Sparuje se unutar regije koja se umnaža

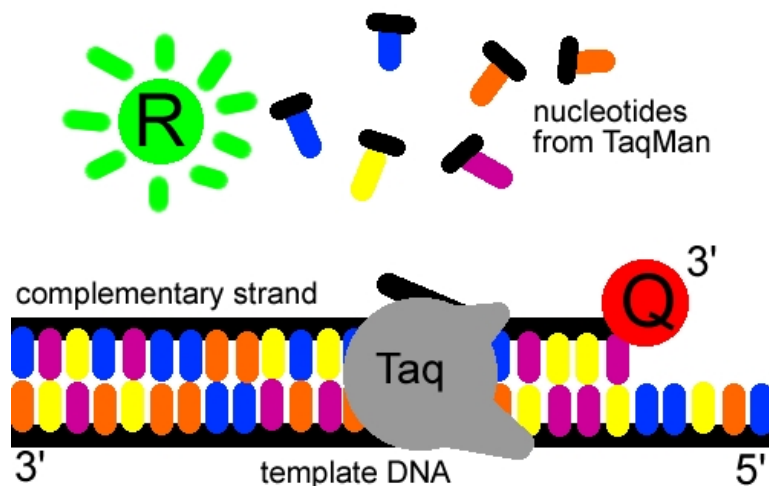
Ova proba je dizajnirana da poveća **osjetljivost** qPCR. To je **unutarnja, hidrolizirajuća proba**

Real-time PCR (RT-PCR) ili PCR u stvarnom vremenu

(Quantitative PCR = Q-PCR ili qPCR)

Prilikom sinteze DNA 5'→3' egzonukleazna aktivnost Taq polimeraze uklanja 5' kraj unutarnje probe - fluorescentni biljeg se fizički odvaja od prigušivača

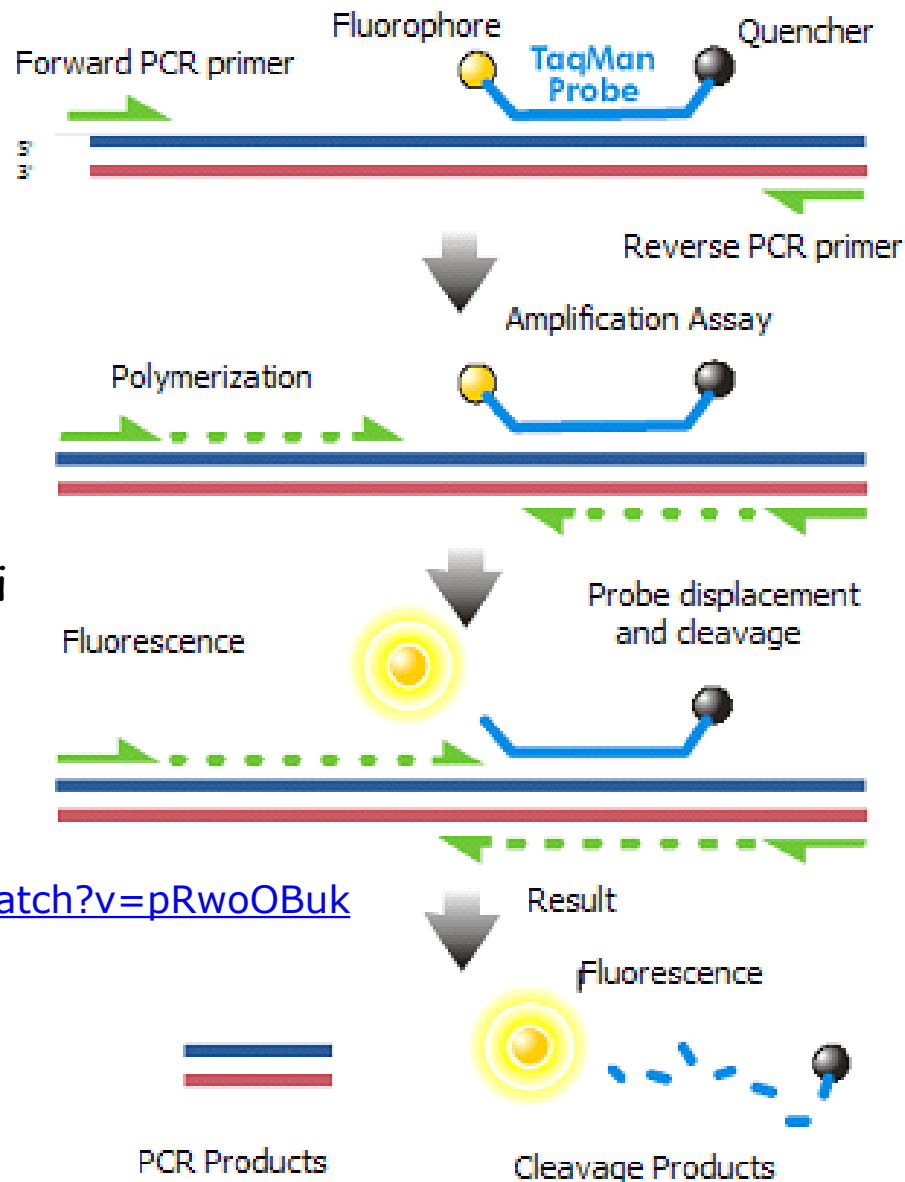
Pojačava se fluorescencija probe što se detektira ekscitacijom pomoću lasera



Unutarnje probe mogu biti obilježene s različitim biljezima što je pogodno za multipleks analize

Povećanje količine DNA u stvarnom vremenu prati **povećanje fluorescencije**

Princip rada Taqman probe



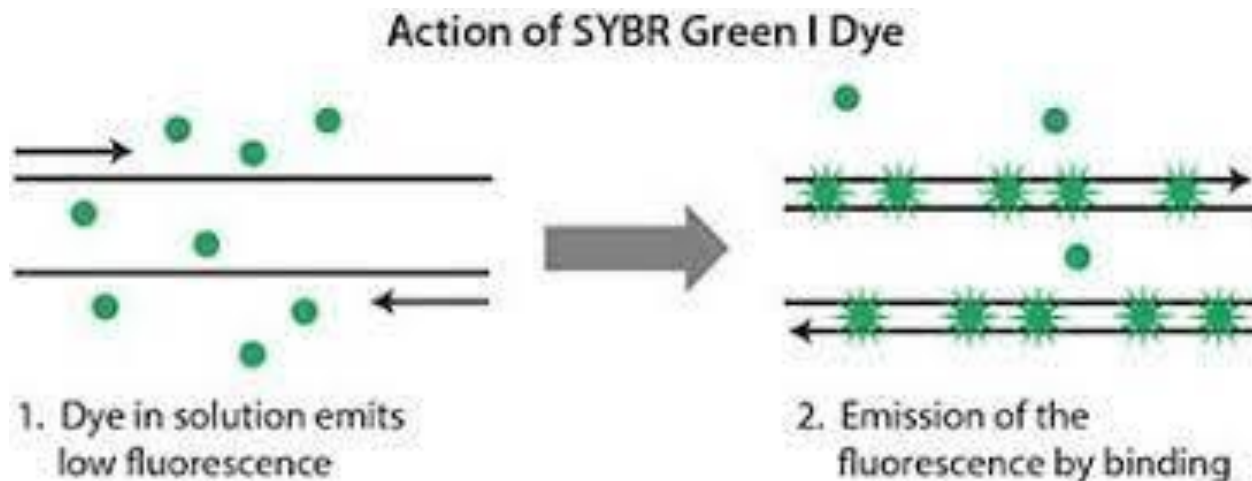
Povećanje količine DNA
u stvarnom vremenu prati
povećanje fluorescencije

Specifično!

<https://www.youtube.com/watch?v=pRwoOBuk00c>

Drugi način

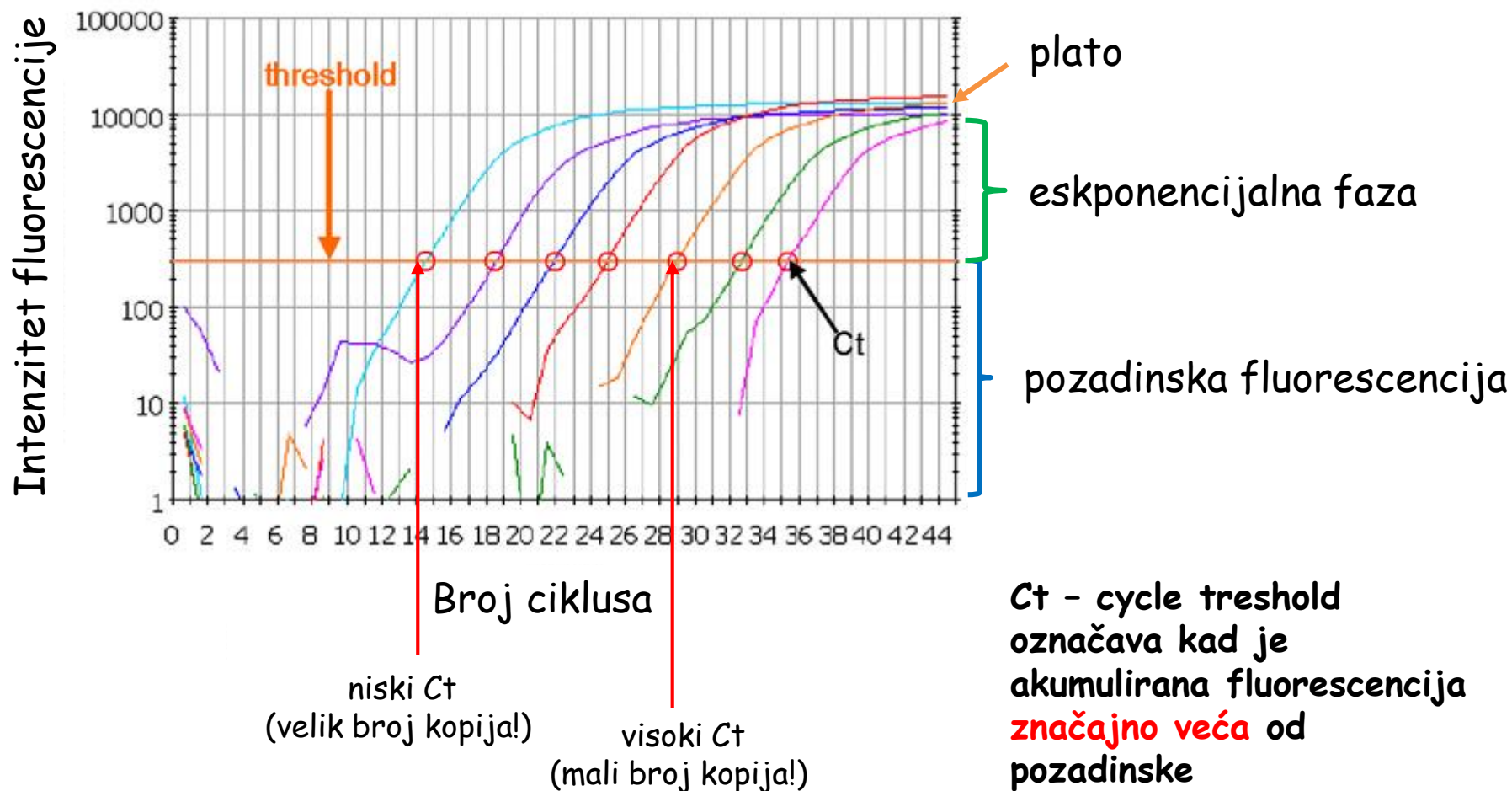
- Koriste se nespecifične fluorescentne boje koje se ugrađuju u dvolančanu DNA
- Jeftinije i manje specifično mjerenje
- više umnožene DNA → jača fluorescencija
- Ne treba Taqman proba
- Najpoznatija boja je **SYBR Green**
- U analizi količine ekspresije nekog gena koristi se **kontrolni gen** čija ekspresija bi uvijek trebala biti ista („housekeeping gene“) i u odnosu na njega se računa porast/pad ekspresije



Real-time PCR ili PCR u stvarnom vremenu

(Quantitative PCR = Q-PCR ili qPCR)

Ne koristi se agarozna gel elektroforeza za analizi rezultata! (može, za provjeru)



qPCR uređaj + računalo

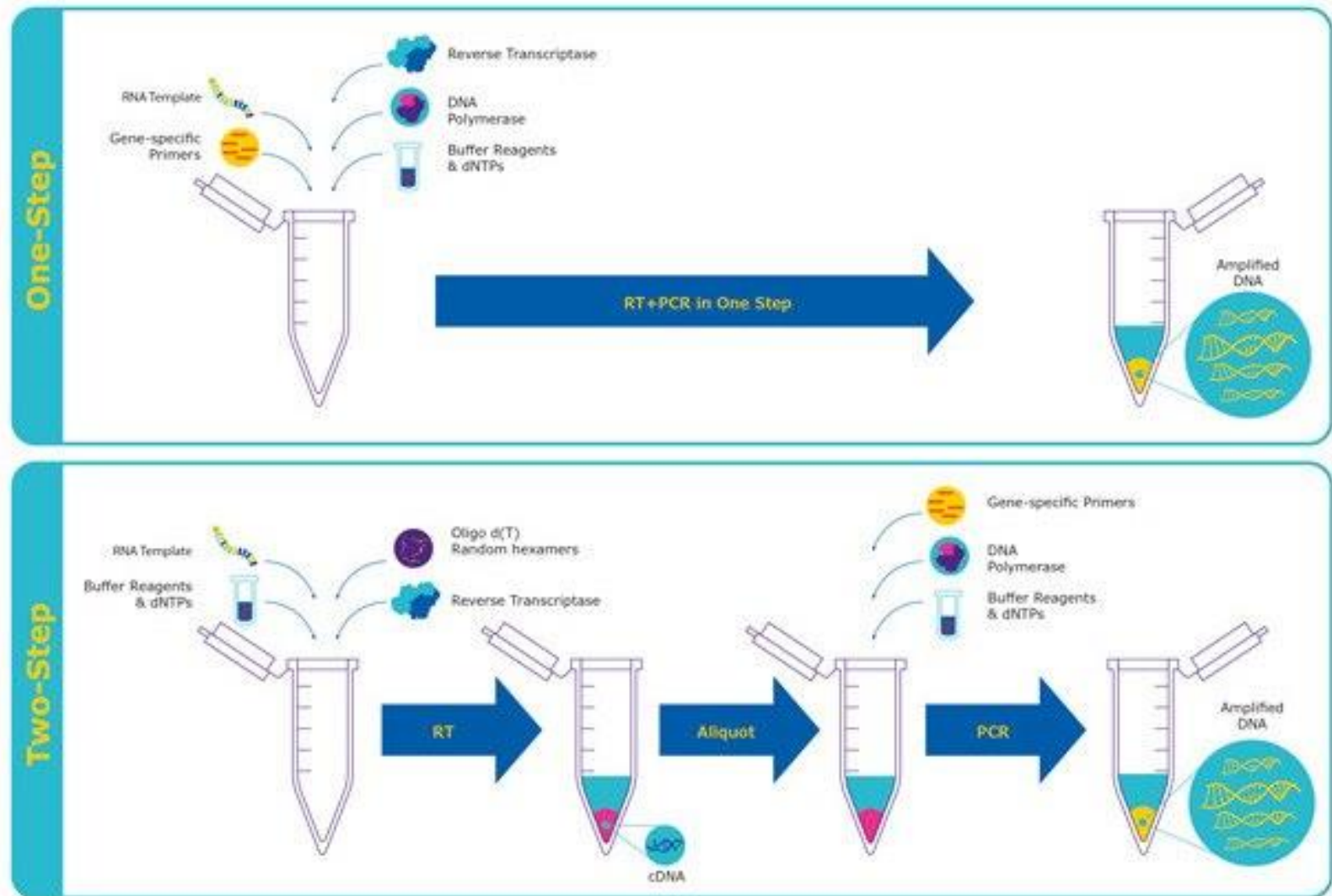


U uređaju se još nalazi optika za ekscitaciju i mjerenje emisije fluorescencije i software za prikupljanje i analizu podataka

RT-qPCR - Quantitative Reverse Transcription PCR (kvantitativni reverzno prepisani PCR)

- Služi za otkrivanje i kvantifikaciju **RNA** molekula
- Metoda se sastoji od kombinacije **reverzne transkripcije** i **kvantitativnog qPCR** za umnažanje specifičnih sekvenci (gena)
- Ukupna ili mRNA mora se reverznom transkripcijom prevesti u cDNA i onda cDNA umnožiti i kvantificirati
- mogu se koristiti Taqman probe ili boja SYBR Green
- Analiza rezultata je potom ista kao za qPCR
- **Primjena:**
 - Odrediti nivo ekspresije gena
 - Otkriti patogene (**viruse u dijagnozi zaraznih bolesti**)
 - Otkriti *GMO* organizme

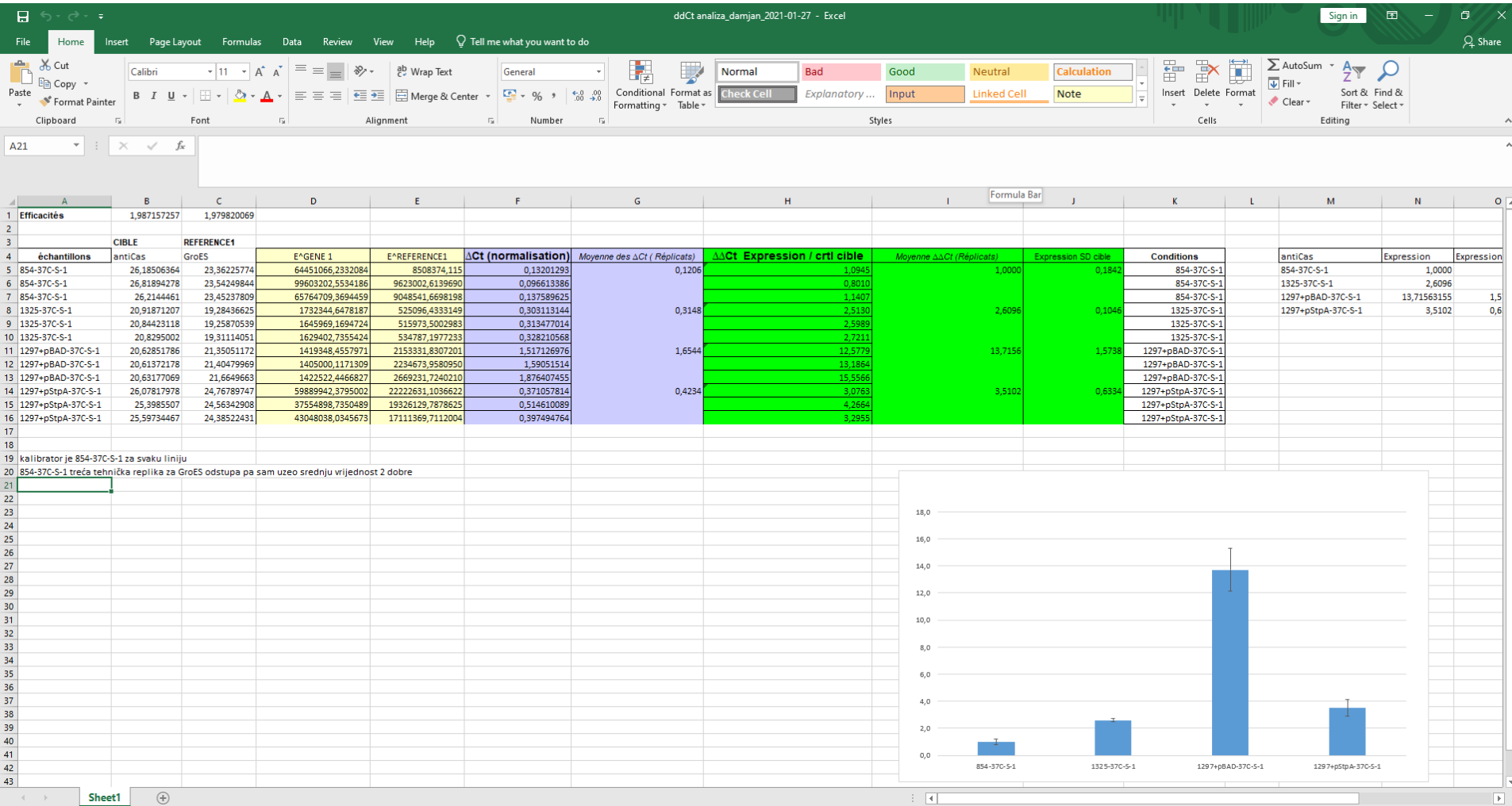
RT-qPCR se može izvesti u jednom ili dva koraka ovisno o potrebama pokusa (cijena, brzina, primjena, specifičnost...)



Računanje

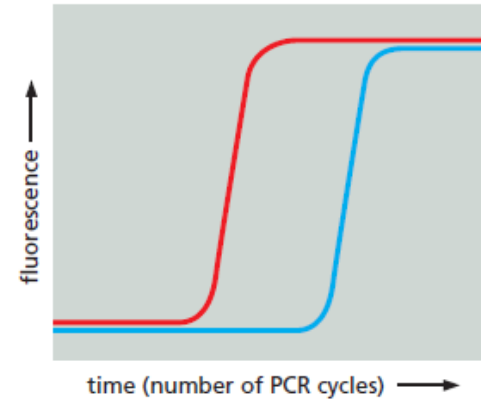
- Najčešće se računa se relativna količina ekspresije
- Metoda $\Delta\Delta C_t$ ili $2^{-\Delta\Delta C_t}$
- Prvo se izračuna mean C_t za ciljni i mean C_t za **referentni** gen (neki „housekeeping“ gen)
- Zatim se izračuna ΔC_t za ciljni (istraživani) gen = ($C_{t\text{mean}}$ ciljnog gena - C_t mean referentnog gena)
- Onda se izračuna $\Delta\Delta C_t$ oduzimanjem ΔC_t ciljnog gena - ΔC_t **kontrolnog gena**/uvjeta (prema kojem se uspoređuju rezultati)
- Onda se te $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti uvrste u formulu $2^{-\Delta\Delta C_t}$ i dobije se količina promjene
- (to sve software izračuna, ali možete i sami)
- <https://www.youtube.com/watch?v=Kkle8T7aXjk>

Primjer iz laba



Pitanja

1. Više RNA ima u crvenom ili plavom uzorku?



2. Ukratko objasnite koji je razlog zagrijavanja smjese za PCR na 94 - 96°C?

3. Što mislite što se dogodilo s ovom amplifikacijom?

