



Nástroje molekulární biologie



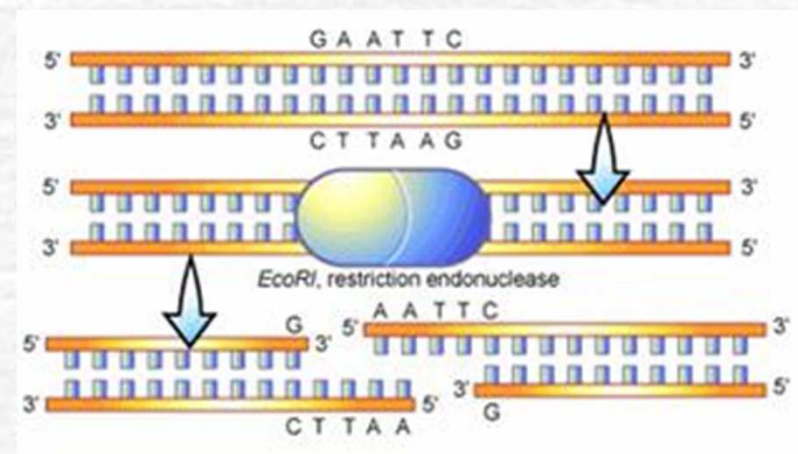
Obsah

- ✓ Analýza DNA
- ✓ Analýza sekvence proteinů
- ✓ Analýza struktury proteinů

Analýza DNA

■ Molekula DNA může být rozštěpena pomocí restričních endonukleáz

- štěpí DNA ve specifických místech
- rozpoznávaná sekvence má obvykle délku 4 – 8 nukleotidových párů
- výsledkem štěpení je sada DNA fragmentů
- délka specifické sekvence předurčuje velikost fragmentů
- pravděpodobnost výskytu delších sekvencí je menší než pravděpodobnost výskytu kratších sekvencí

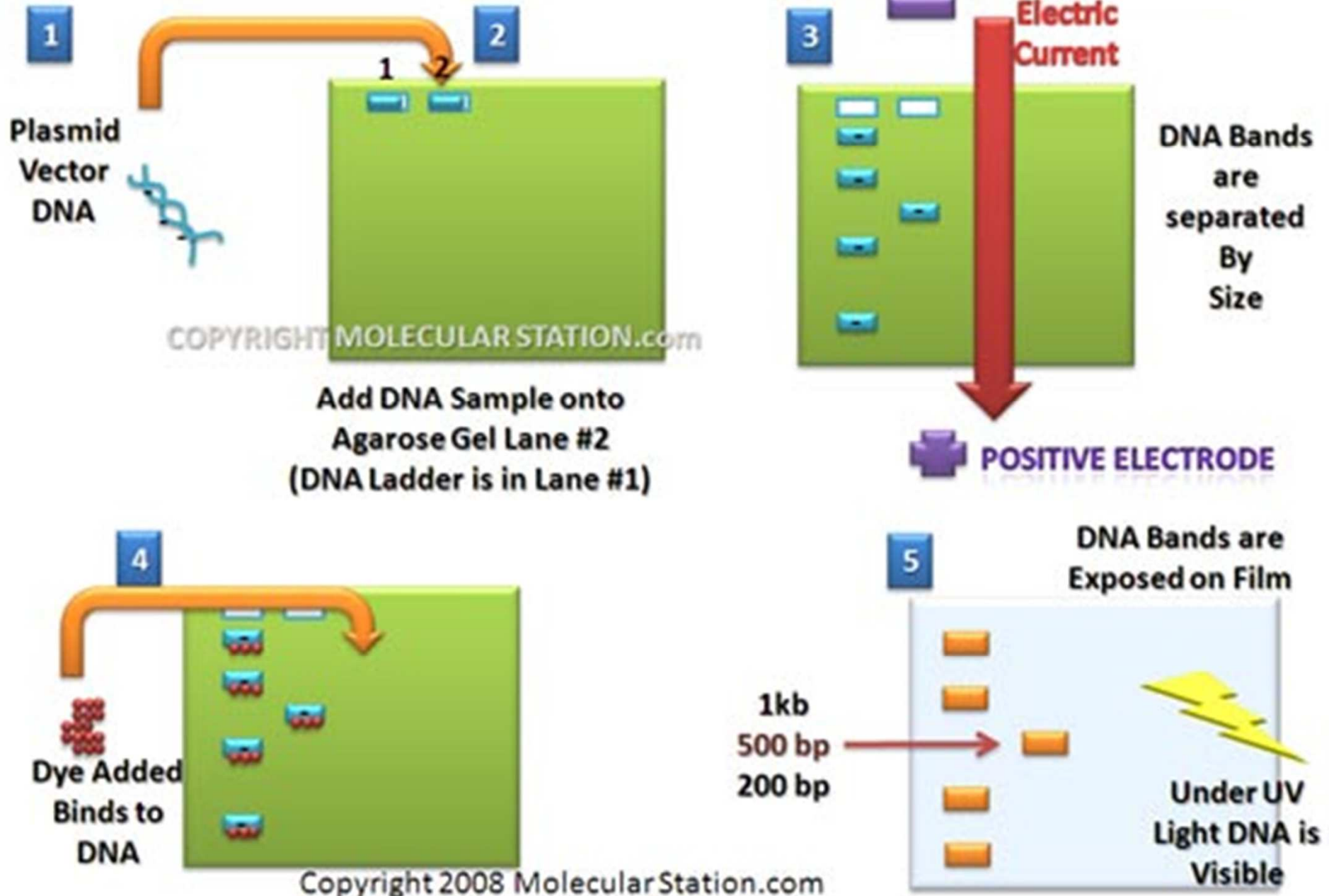


Analýza DNA

Gelová elektroforéza:

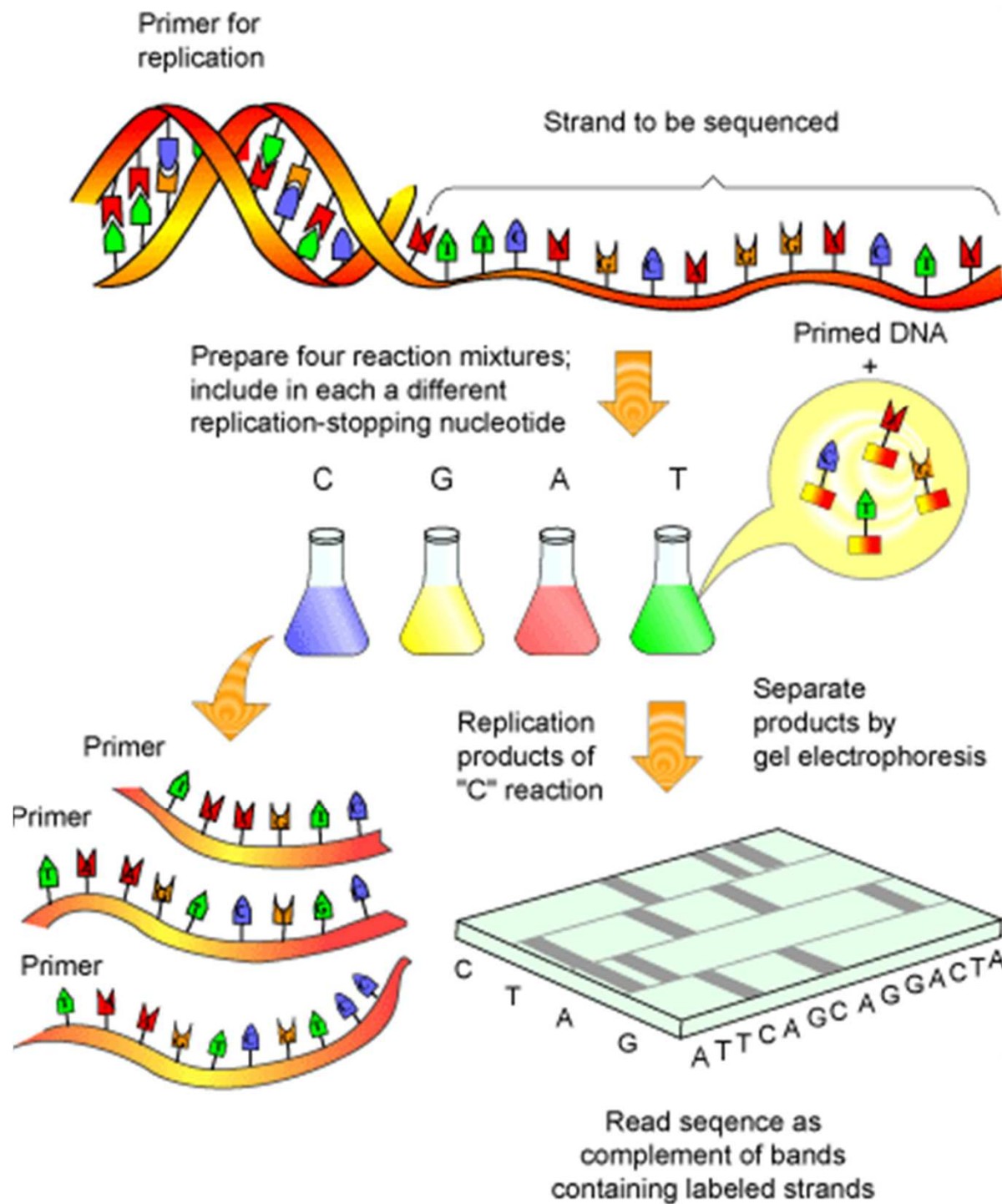
- umožňuje oddělit jednotlivé fragmenty DNA podle velikosti
- směs fragmentů se nanese do žlábků v horní části tenkého gelu
- gel – mikroskopická síť pórů, umístěna do elektrického pole
- fragmenty DNA se pohybují ke kladné elektrodě
- dlouhé úseky se pohybují pomaleji
- fragmenty se rozdělí podle velikosti
- z výsledků lze vytvořit restrikční mapy (charakterizují DNA pozicemi různých značek)

AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS METHOD



Sekvenování DNA

- Stanovení sekvence nukleotidů v DNA
- Založeno na syntéze částečných kopií sekvenovaného fragmentu
 - uměle je prováděna syntéza komplementárních řetězců ke zkoumané DNA (DNA-polymeráza)
 - ve 4 oddělených reakcích se produkují různě dlouhé částečné kopie sekvenovaného fragmentu, které končí daným nukleotidem
 - seřazením částečných kopií podle délky lze stanovit pořadí bází sekvenovaného fragmentu.



Hybridizace nukleových kyselin

Řetězce DNA

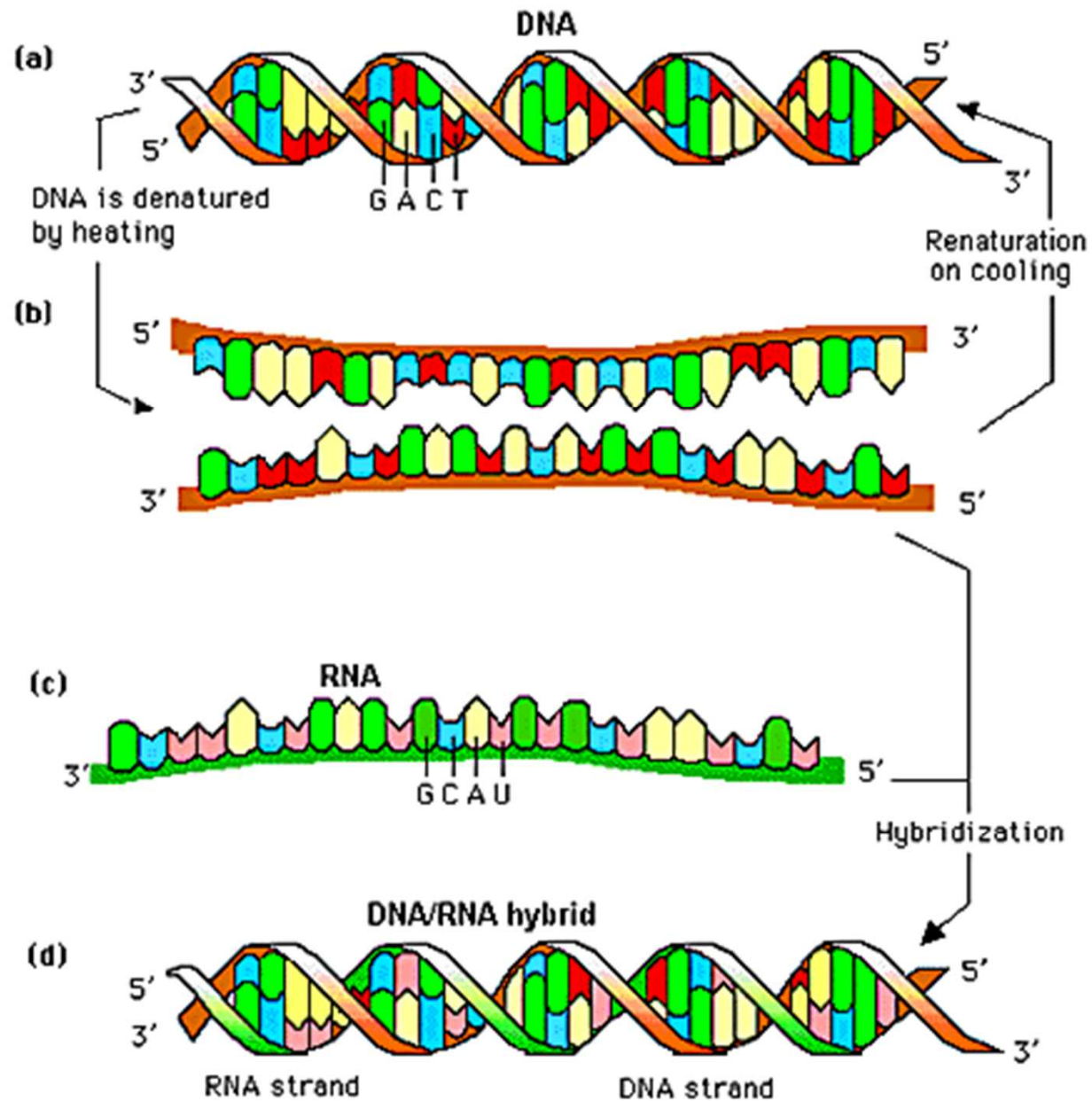
- vysoce selektivně se párují se svými komplementárními řetězci
- řetězce drží pohromadě díky vodíkovým můstkům

Vodíkové vazby mohou být přerušeny – **denaturace**

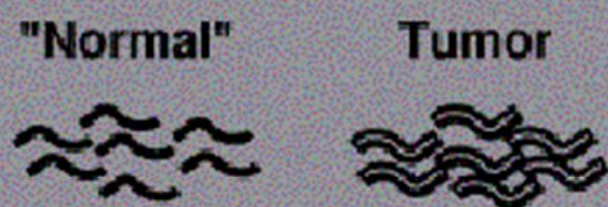
- zahřáním DNA na 90° stupňů
- vystavením DNA extrémním hodnotám pH

Hybridizace

- proces obnovení vodíkových můstků mezi komplementárními řetězci
- dochází k ní pokud jsou příčiny denaturace pomalu odstraňovány
- DNA/DNA, RNA/RNA, RNA/DNA
- umožňuje detekci specifických nukleotidových sekvencí (pozice genu na chromozomu, dochází k transkripci daného genu?, došlo k mutaci v daném genu?)



Prepare cDNA Probe



RT / PCR

Label with
Fluorescent Dyes



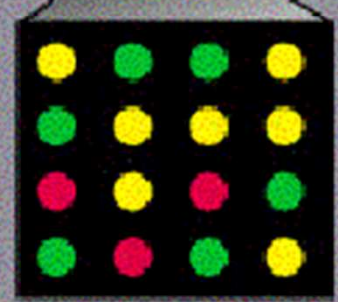
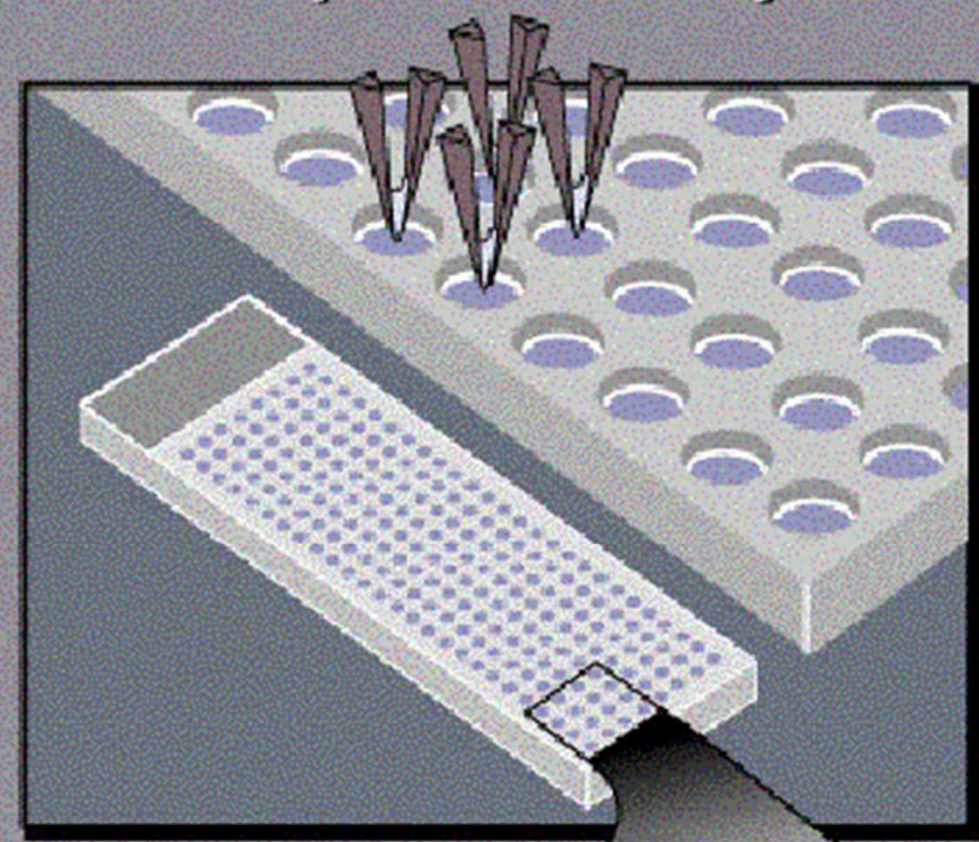
Combine
Equal
Amounts

Hybridize
probe to
microarray

SCAN

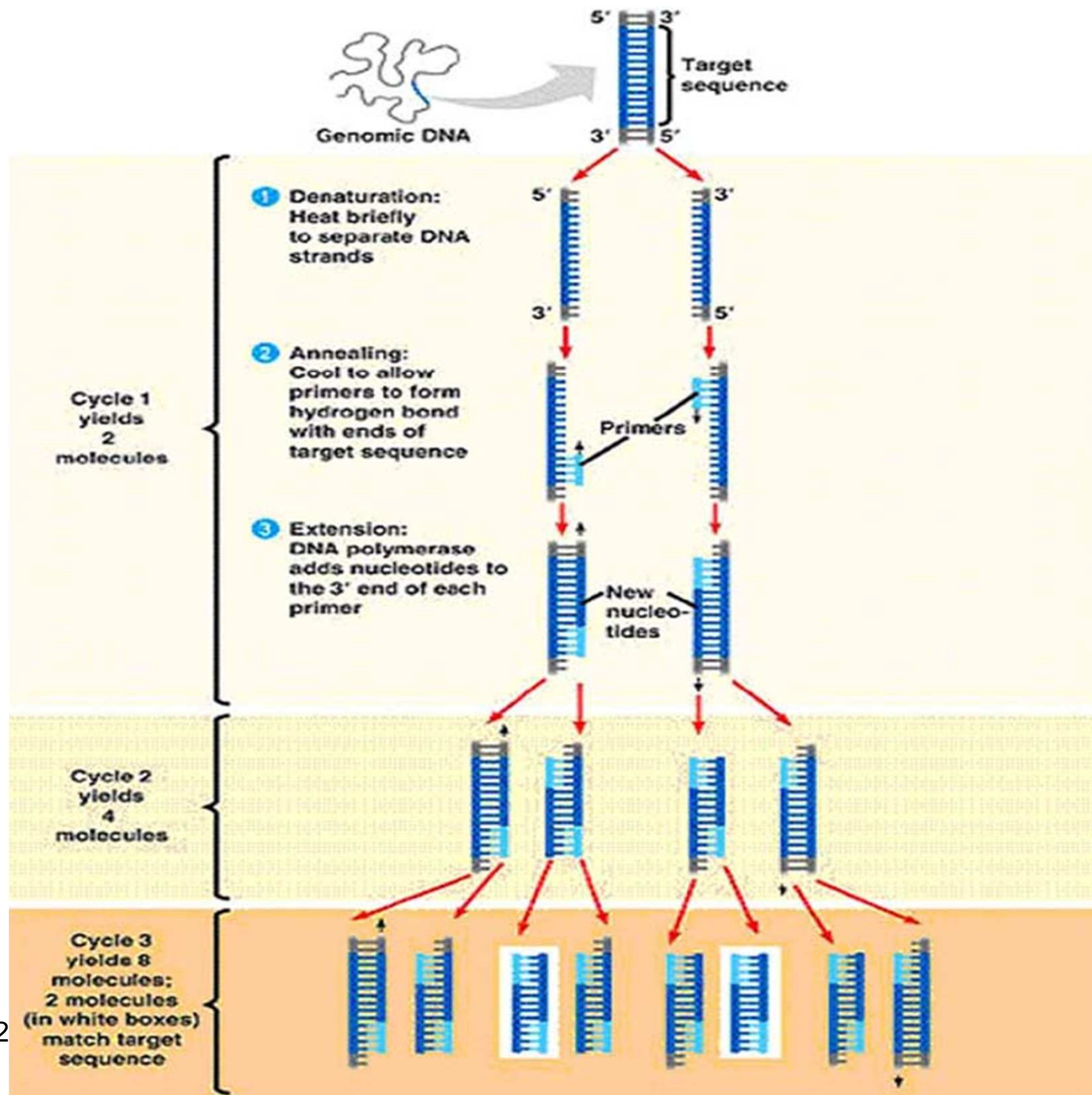
Microarray Technology

Prepare Microarray



PCR

- ✓ Polymerase chain reaction
- ✓ Umožňuje rychle namnožit konkrétní nukleotidovou sekvenci
- ✓ Opakované kopírování templátové molekuly DNA
- ✓ Řízena **primery** – krátké oligonukleotidy, párují se s templátovou DNA na počátku a na konci amplifikovaného fragmentu
- ✓ Využití denaturace a hybridizace
- ✓ Diagnostika genetických chorob

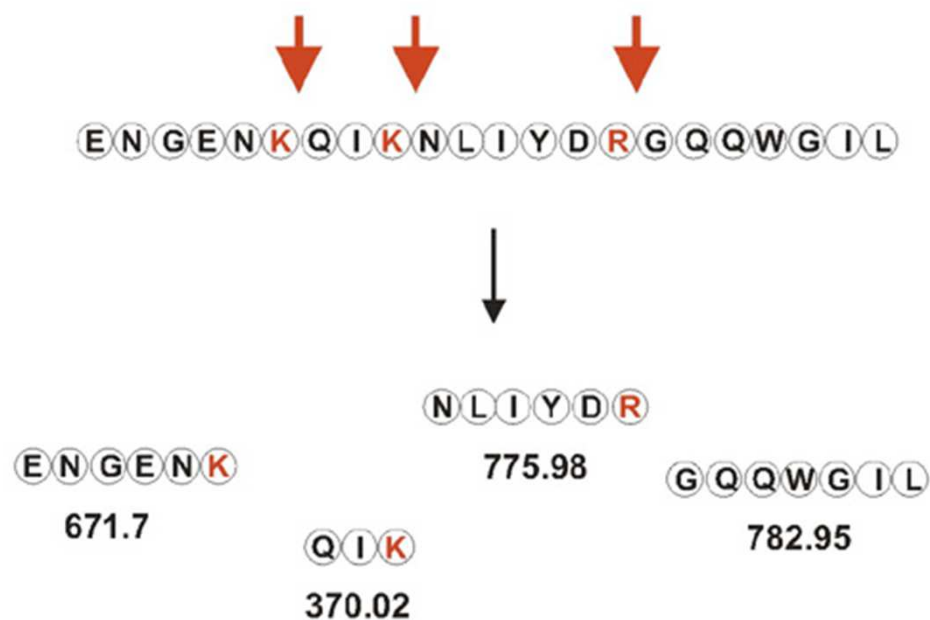


Obsah

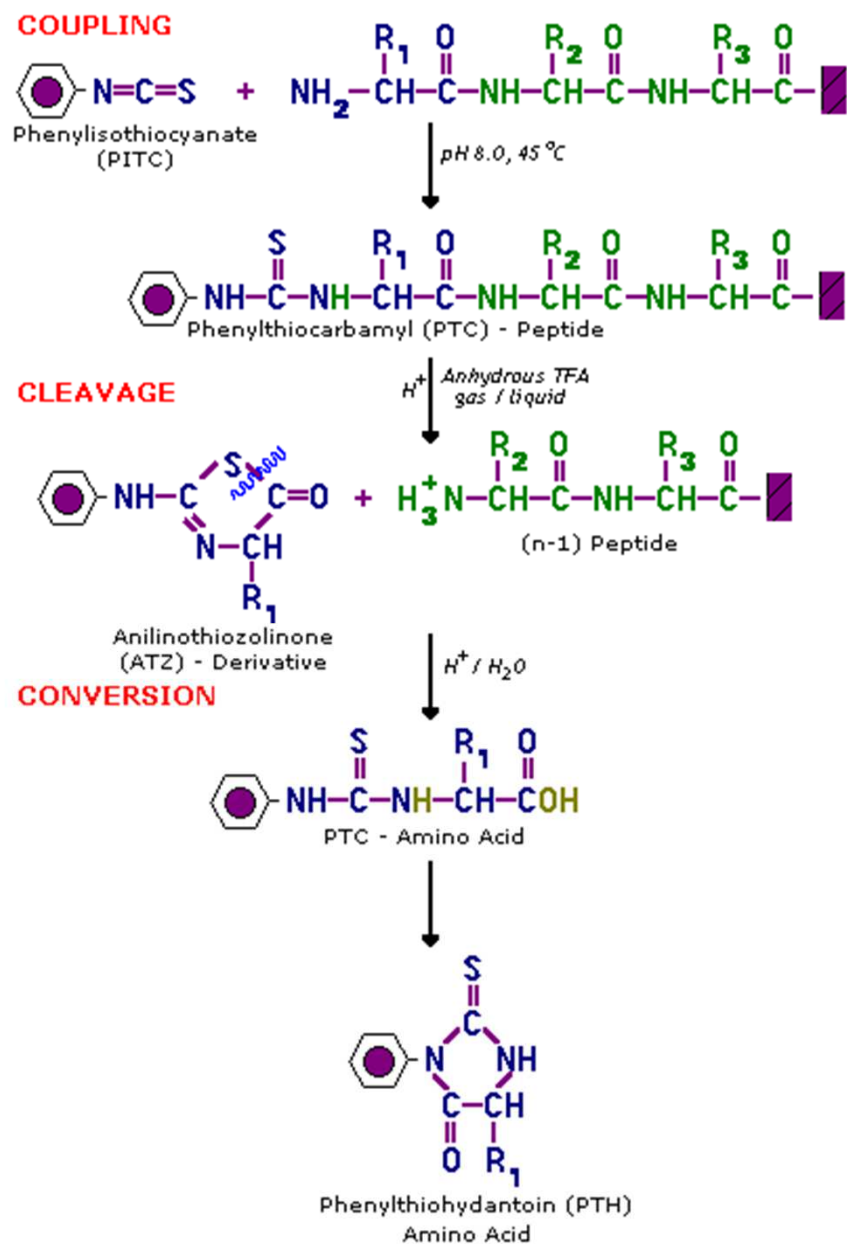
- ✓ Analýza DNA
- ✓ Analýza sekvence proteinů
- ✓ Analýza struktury proteinů

Analýza sekvence proteinů

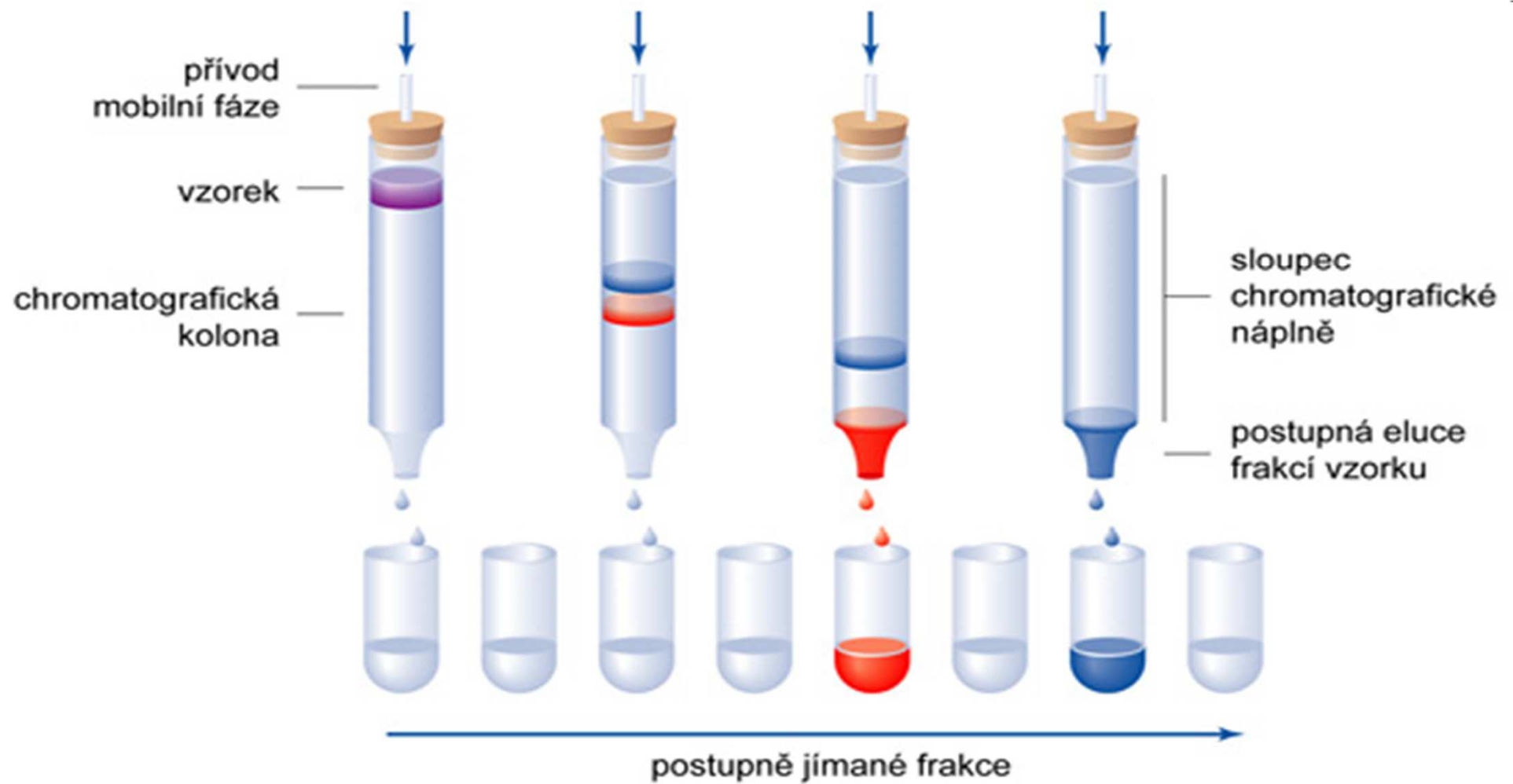
- ✓ **Selektivní štěpení proteinu** – určité enzymy a chemická činidla dovolují štěpit protein mezi specifickými aminokyselinami
- ✓ Peptidové fragmenty lze oddělit **sloupcovou chromatografií** nebo **gelovou elektroforézou**
- ✓ Primární strukturu krátkých peptidů lze zjistit opakovaným odštěpováním **N-koncové aminokyseliny**
- ✓ Peptidové fragmenty získané různými technikami se mohou překrývat – můžeme určit sekvenci celého proteinu
- ✓ Známe-li sekvenci 20 AK – můžeme sestavit odpovídající DNA a můžeme nalézt odpovídající gen. Sekvence AK se potom nepřímo odvodí ze sekvence nukleotidů.

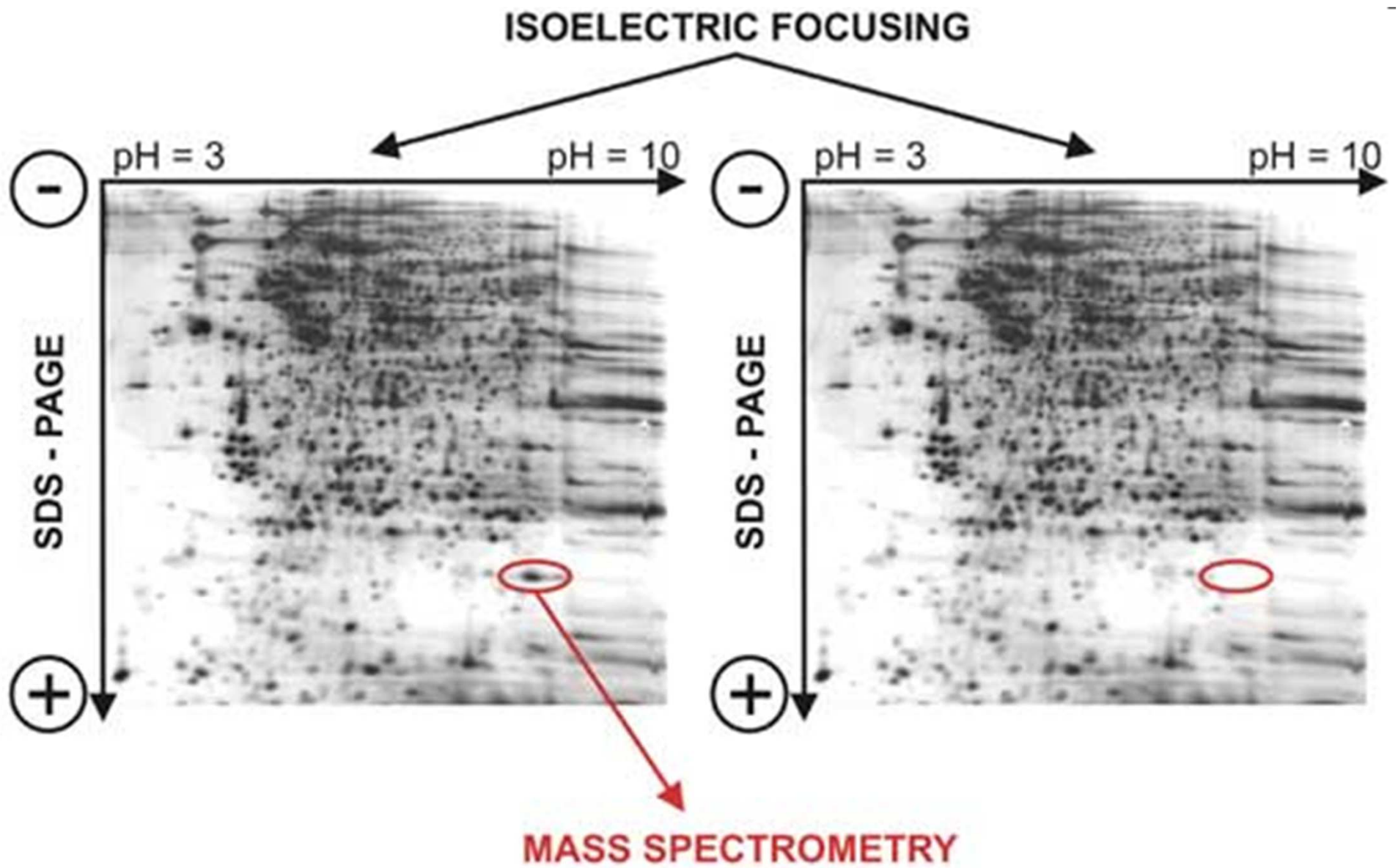


17. 2. 2009



BIF





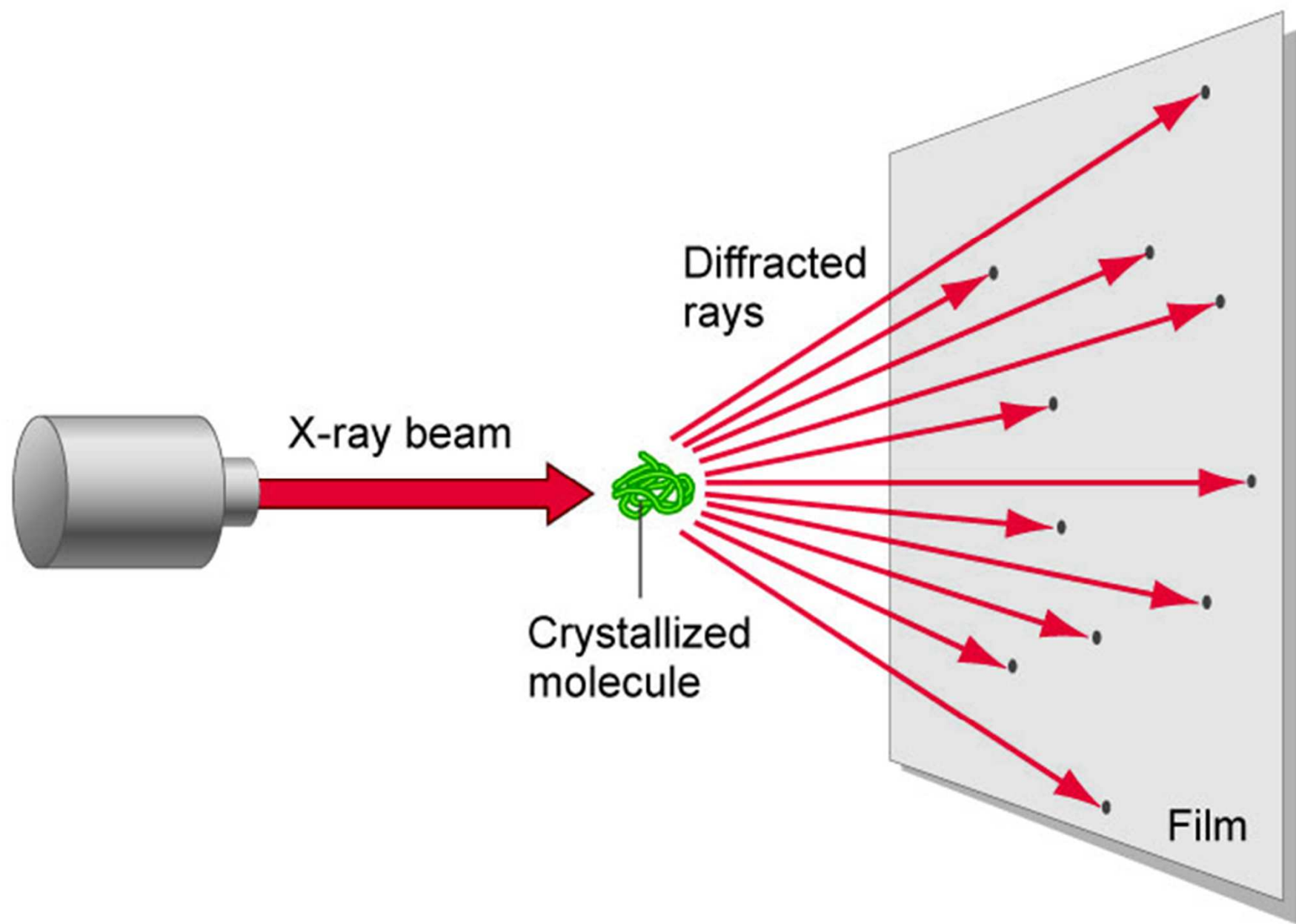
Obsah

- Analýza DNA
- Analýza sekvence proteinů
- Analýza struktury proteinů

Analýza struktury proteinů

Rentgenová krystalografie

- krystal čistého proteinu se vloží do svazku paralelních rentgenových paprsků
- atomy v krystalu způsobí rozptýlení některých paprsků určitým způsobem
- rozptýlené paprsky se budou zesilovat v určitých bodech a vytvoří obrazec difrakčních skvrn na detektoru
- poloha a intenzita skvrn – informace o poloze atomů v krystalu proteinu
- lze vytvořit 3D mapu hustoty elektronů a ze znalosti sekvence lze vytvořit atomový model
- potřebujeme krystal proteinu



Analýza struktury proteinů

■ NMR-spektroskopie

- (nuclear magnetic resonance)
- roztok proteinu se umístí do silného magnetického pole a je vystaven pulzům rádiové frekvence
- jádra atomů vodíků začnou vibrovat
- blízké atomy vodíků se navzájem ovlivňují
- lze identifikovat signály z atomů vodíků a určit vzdálenost interagujících párů – vzdálenost mezi různými částmi proteinové molekuly
- stanovení struktury malých proteinů nebo jejich domén (nutná znalost sekvence)

Literatura

Knihy:

- Dan K. Krane, Michael L. Raymer: *Fundamental Concepts of Bioinformatics*
- Eduard Kočárek: *Genetika*
- Alberts a kol.: *Základy buněčné biologie*