

# Vybrané technológie molekulárnej biológie a ich využitie v praxi

Matej Pribiš

2. lekařská fakulta  
Univerzity Karlovy v Praze

7.3.2016

# Osnova

- Úvod
- HGP
- Metódy M.B. a ich využitie
  - ▶ Ako množiť DNA?
  - ▶ Ako identifikovať páchatela?
  - ▶ Ako čítať život?
  - ▶ Nové metódy sekvenácie - Diskusia v prípade záujmu
- Now the fun begins (Analýza dát) - Diskusia v prípade záujmu
- Diskusia

# Úvod

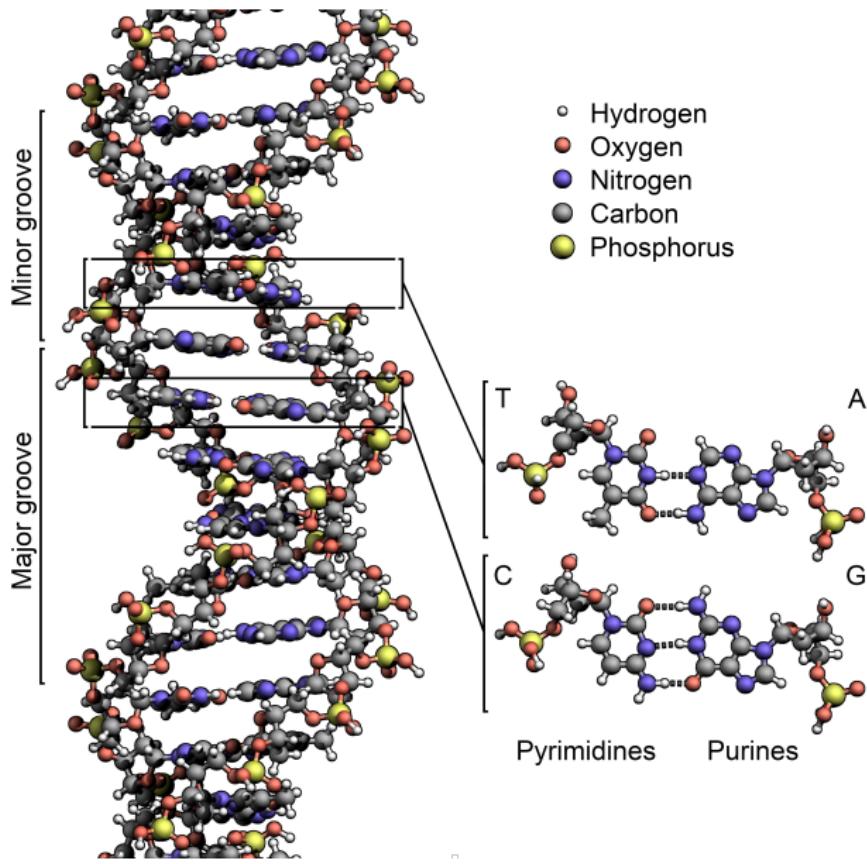
Niečo o mne.

Matej Pribiš

[\[\[matejpribis@gmail.com\]\]](mailto:matejpribis@gmail.com)  
[pribism.github.com](https://pribism.github.com)

A čo vy?

# Štruktúra DNA - 1953 Watson a Crick



# Pokroky v genetike

## Human Genome Project

- 1990
- 2000 (2003) - oznámenie výsledkov

# Pokroky v genetike

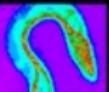
## Human Genome Project

- 1990
- 2000 (2003) - oznámenie výsledkov

## Dôsledky

- doteraz umožnilo objav viac ako 1800 génov asociovaných s chorobami a viac ako 2000 testov
- pomáha vedcom objavovať nové korelácie medzi génmi a chorobami
- snaha dosiahnuť sekvenáciu 1 genómu pod 1000

# Veľkosť genómu

	Organism	Number of genes in the genome
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	517
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,275
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	~ 20,000
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	19,099
	<i>Haemophilus influenzae</i>	1,743
	<i>Drosophila melanogaster</i>	13,601
	<i>Neisseria meningitidis</i>	2,158
	<i>Homo sapiens</i>	20,000-25,000



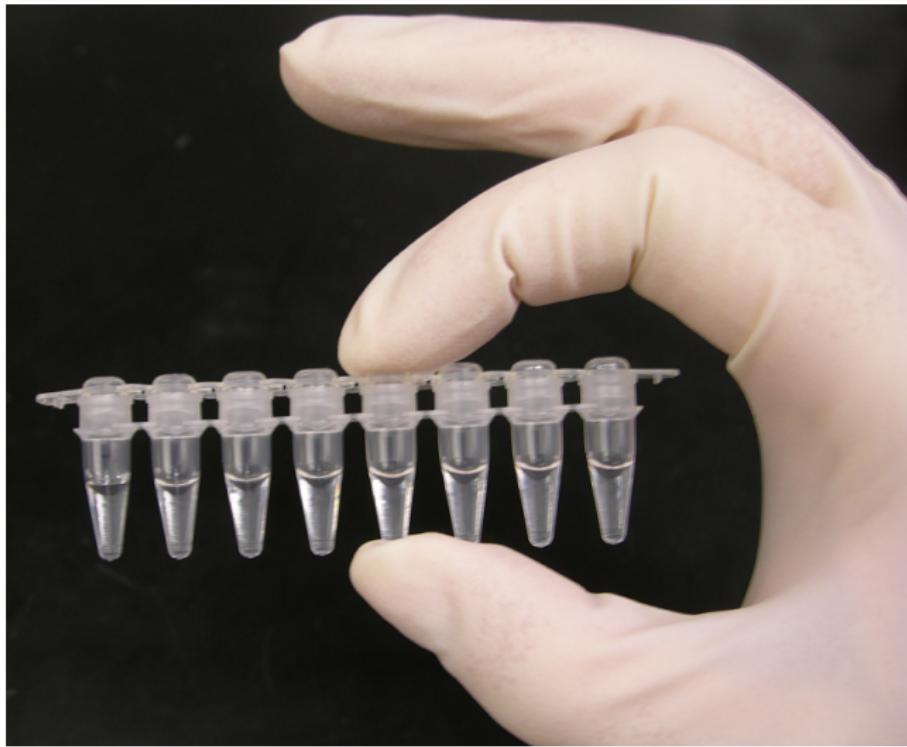


# Metódy molekulárnej biológie

## Načrtnutie základov



# Ako zmnožiť malé množstvo DNA?



# PCR



## Základné info

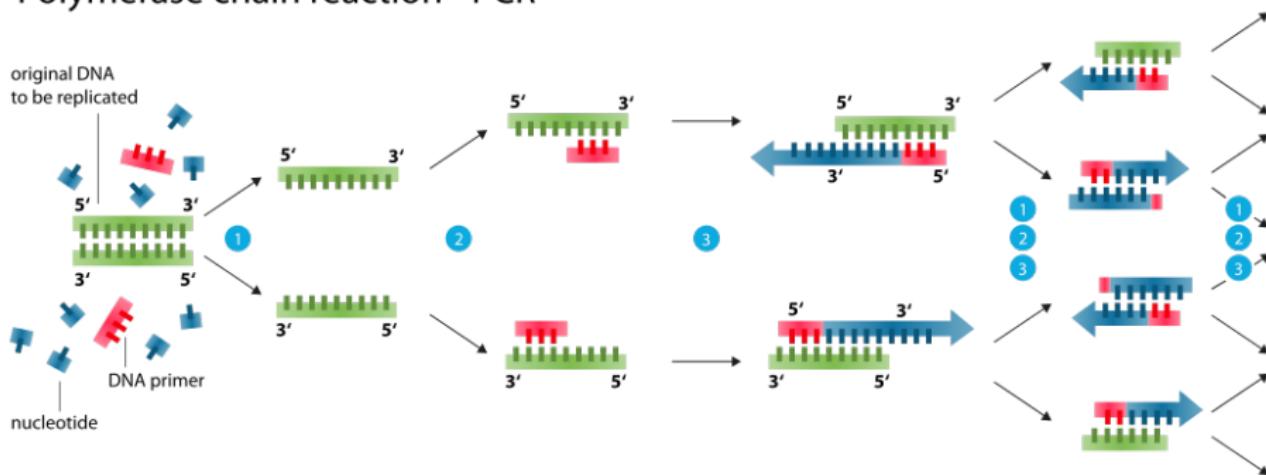
- Polymerase chain reaction
- Amplifikácia sekvencí DNA

## Princíp

- podobné replikácií DNA
- dochádza k mnohonásobnému zmnoženiu úseku medzi (DNA) primermi



# Polymerase chain reaction - PCR



- 1 Denaturation at 94-96°C
- 2 Annealing at ~68°C
- 3 Elongation at ca. 72 °C



## Problémy PCR - mindgames

- typ polymerázy - vysoká teplota - ako vyriešiť?





## Problémy PCR - mindgames

- typ polymerázy - vysoká teplota - ako vyriešiť?
- chybovosť - prečo nie v replikácií?





## Problémy PCR - mindgames

- typ polymerázy - vysoká teplota - ako vyriešiť?
- chybovosť - prečo nie v replikácií?
- obmedzená dĺžka fragmentu?





## Problémy PCR - mindgames

- typ polymerázy - vysoká teplota - ako vyriešiť?
- chybovosť - prečo nie v replikácií?
- obmedzená dĺžka fragmentu?
- aký je teoretický výťažok reakcie po N cykloch?



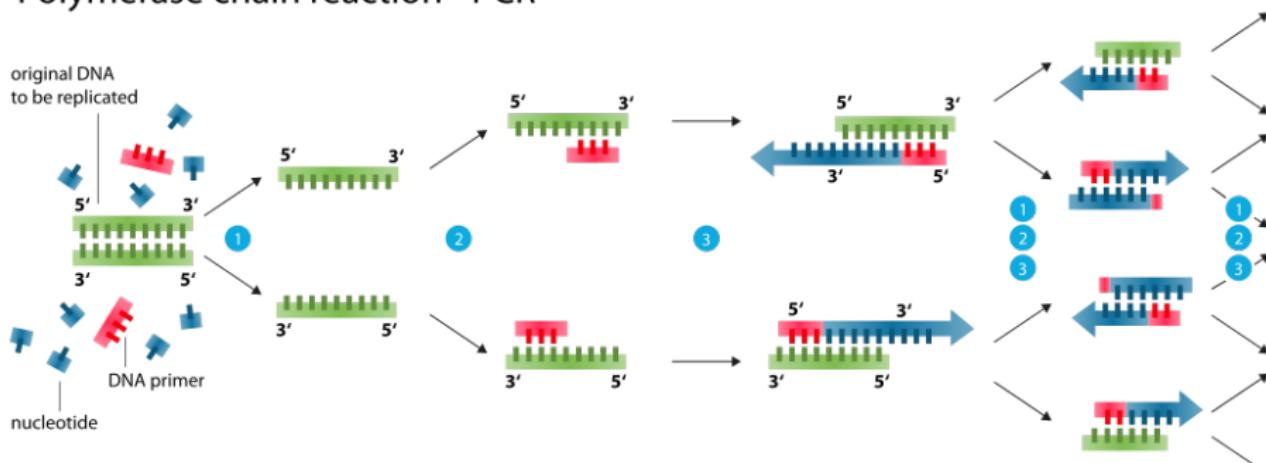


## Problémy PCR - mindgames

- typ polymerázy - vysoká teplota - ako vyriešiť?
- chybovosť - prečo nie v replikácií?
- obmedzená dĺžka fragmentu?
- aký je teoretický výťažok reakcie po N cykloch?
- prečo sa replikuje len úsek medzi primermi? - Diskusia na záver



# Polymerase chain reaction - PCR



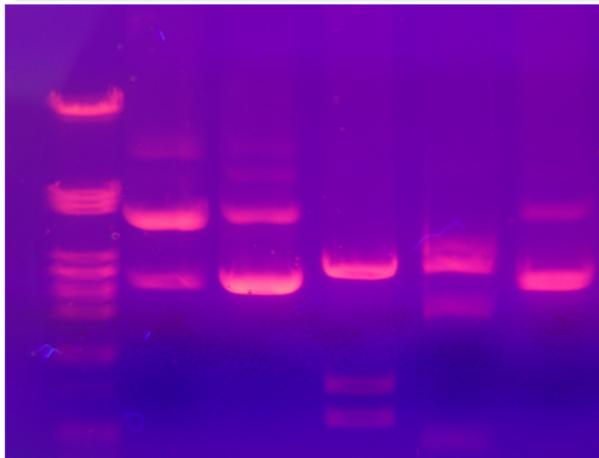
- 1 Denaturation at 94-96°C
- 2 Annealing at ~68°C
- 3 Elongation at ca. 72 °C

## Príklady využitia PCR

- namnoženie sekvencie DNA - súčasťou mnohých metód



# Ako identifikovať páchateľa na základe DNA?



# Elektroforéza

## Definícia

Metóda rozdelenia (rozličných) látok v elektrickom poli na základe ich rozličných interakcií s médiom, v ktorom sa pohybujú

# Elektroforéza

## Definícia

Metóda rozdelenia (rozličných) látok v elektrickom poli na základe ich rozličných interakcií s médiom, v ktorom sa pohybujú

## Gelová elektroforéza

- princíp molekulového sita - kladie odpor pohybu
- aký náboj má DNA?

# Elektroforéza



## Definícia

Metóda rozdelenia (rozličných) látok v elektrickom poli na základe ich rozličných interakcií s médiom, v ktorom sa pohybujú



## Gelová elektroforéza

- princíp molekulového sita - kladie odpor pohybu
- aký náboj má DNA?
- väčšie molekuly



# Elektroforéza



## Definícia

Metóda rozdelenia (rozličných) látok v elektrickom poli na základe ich rozličných interakcií s médiom, v ktorom sa pohybujú



## Gelová elektroforéza

- princíp molekulového sita - kladie odpor pohybu
- aký náboj má DNA?
- väčšie molekuly
  - ▶ väčší odpor



# Elektroforéza



## Definícia

Metóda rozdelenia (rozličných) látok v elektrickom poli na základe ich rozličných interakcií s médiom, v ktorom sa pohybujú



## Gelová elektroforéza

- princíp molekulového sita - kladie odpor pohybu
- aký náboj má DNA?
- väčšie molekuly
  - ▶ väčší odpor
  - ▶ zostanú bližšie pri štarte



# Elektroforéza



## Definícia

Metóda rozdelenia (rozličných) látok v elektrickom poli na základe ich rozličných interakcií s médiom, v ktorom sa pohybujú



## Gelová elektroforéza

- princíp molekulového sita - kladie odpor pohybu
- aký náboj má DNA?
- väčšie molekuly
  - ▶ väčší odpor
  - ▶ zostanú bližšie pri štarte
- menšie molekuly



# Elektroforéza



## Definícia

Metóda rozdelenia (rozličných) látok v elektrickom poli na základe ich rozličných interakcií s médiom, v ktorom sa pohybujú



## Gelová elektroforéza

- princíp molekulového sita - kladie odpor pohybu
- aký náboj má DNA?
- väčšie molekuly
  - ▶ väčší odpor
  - ▶ zostanú bližšie pri štarte
- menšie molekuly
  - ▶ menší odpor voči pohybu



# Elektroforéza



## Definícia

Metóda rozdelenia (rozličných) látok v elektrickom poli na základe ich rozličných interakcií s médiom, v ktorom sa pohybujú



## Gelová elektroforéza

- princíp molekulového sita - kladie odpor pohybu
- aký náboj má DNA?
- väčšie molekuly
  - ▶ väčší odpor
  - ▶ zostanú bližšie pri štarte
- menšie molekuly
  - ▶ menší odpor voči pohybu
  - ▶ zájdu ďalej





## Využitie

- restrikčné enzymy - definícia, VNTR





## Využitie

- restrikčné enzymy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov





## Využitie

- restrikčné enzymy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
  - ▶ forenzná





## Využitie

- restrikčné enzymy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
  - ▶ forenzná
  - ▶ genetické stanovenie príbuznosti





## Využitie

- restrikčné enzymy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
  - ▶ forenzná
  - ▶ genetické stanovenie príbuznosti
- diagnostika - prítomnosť baktérie





## Využitie

- restrikčné enzymy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
  - ▶ forenzná
  - ▶ genetické stanovenie príbuznosti
- diagnostika - prítomnosť baktérie
- spätné overenie správnosti a kvality PCR





## Využitie

- restrikčné enzymy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
  - ▶ forenzná
  - ▶ genetické stanovenie príbuznosti
- diagnostika - prítomnosť baktérie
- spätné overenie správnosti a kvality PCR
- diagnostika vrozených mutácií

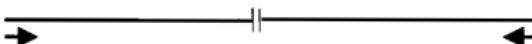


5      6      7      8  
CCT GAG GAG AAG  
Pro Glu Glu Lys

alela  $\beta^A$  - normální sekvence genu pro beta globin  
(Kodony 5 - 8)

sekvence je štěpena enzymem Mst II (**CCTGAGG**)

produkt PCR je štěpen na dva fragmenty (na gelu 2 proužky)



▼  
CCT GTG GAG AAG  
Pro Val Glu Lys

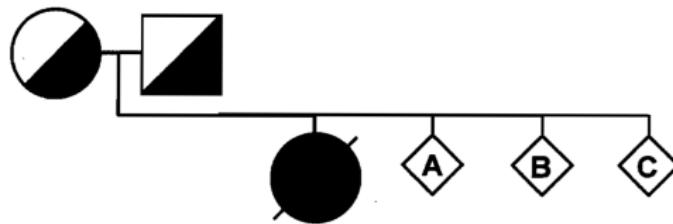
alela  $\beta^S$  - substituce typu missense v kodonu 6  
(Kyselina glutamová je nahrazena valinem)

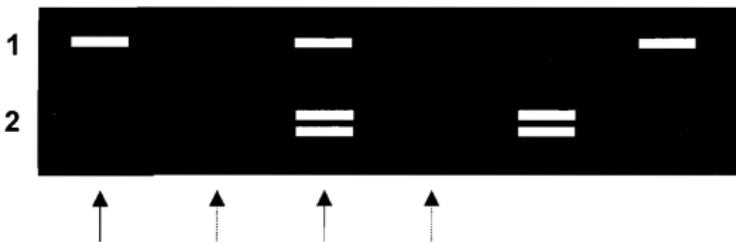
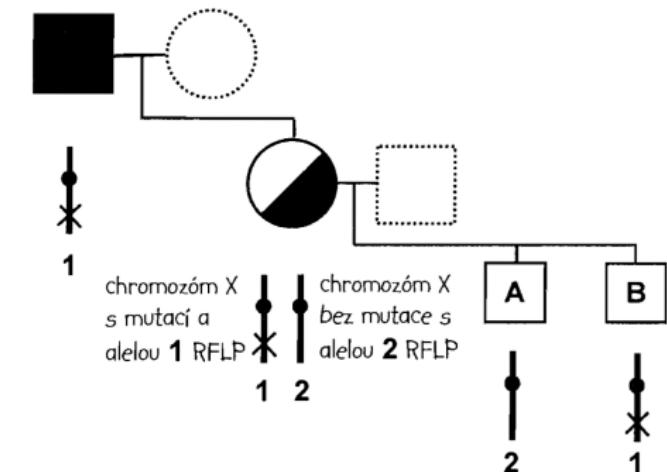
sekvence není štěpena enzymem Mst II

(rozpoznávací místo je mutací zrušeno)

produkt PCR není štěpen (na gelu jeden proužek)







informativní RFLP  
prenatální diagnostika  
hemofilie A u mužských plodů  
je možná  
(50%) **A** - nepostižený plod  
(50%) **B** - postižený plod

# Ako čítať DNA?



# Sekvenácia



## Princíp

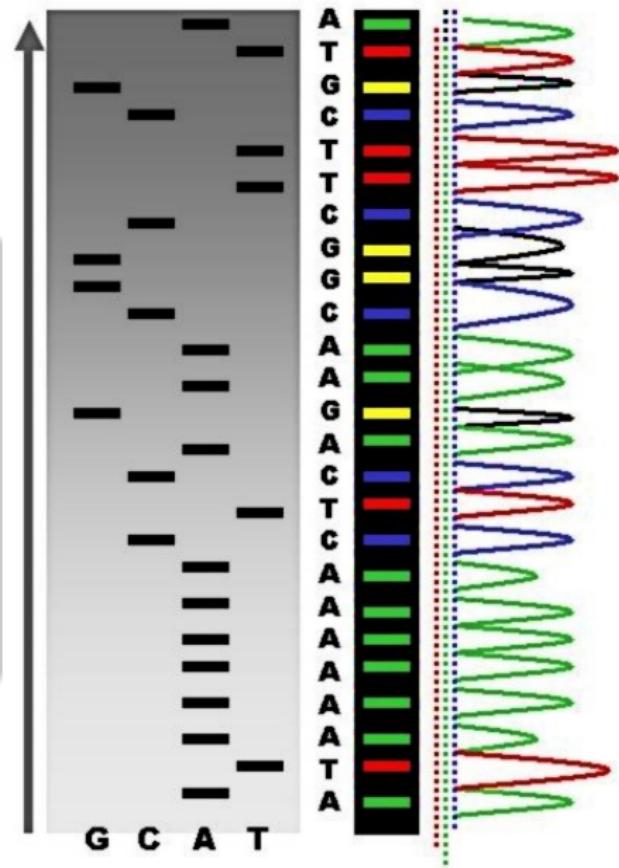
- využíva princípy replikácie DNA a elektroforetického rozdelenia fragmentov
- chem. štruktúra DNA vid' vyšsie
- $ddNTP \div dNTP = 1 \div 100$
- tvorba rôzne dlhých fragmentov, ukončených ddNTP



# Sekvenácia

## Princíp

- označenie ddNTP
  - rádioaktívne
  - fluorescenčne
  - rovnako - 4 dráhy
  - rozlične - 1 dráha
- elektroforéza v kapiláre (viď. gélová elektroforéza)



# Sekvenácia

## Využitie sekvenácie

- Zistenie sekvencie DNA (cDNA)



# Sekvenácia



## Využitie sekvenácie

- Zistenie sekvencie DNA (cDNA)
- Diagnostika určitých genetických ochorení





## Využitie sekvenácie

- Zistenie sekvencie DNA (cDNA)
- Diagnostika určitých genetických ochorení
- Diagnostika bakteriálnych ochorení



# Sekvenácia



## Využitie sekvenácie

- Zistenie sekvencie DNA (cDNA)
- Diagnostika určitých genetických ochorení
- Diagnostika bakteriálnych ochorení
- Zisťovanie príbuznosti druhov, taxonómia





## Využitie sekvenácie

- Zistenie sekvencie DNA (cDNA)
- Diagnostika určitých genetických ochorení
- Diagnostika bakteriálnych ochorení
- Zisťovanie príbuznosti druhov, taxonómia
- ...



# Diskusia

A čo Vy?

Podľa záujmu

- Bioinformatika
- Nové metódy sekvenovania
- Štúdium na VŠ
- Štúdium medicíny

## Pre infochtivých

- PCR
- INTRODUCTION to genomic data science



Koniec

# Ďakujem za pozornosť!

[[[matejprabis@gmail.com](mailto:matejprabis@gmail.com)]]

[pribism.github.com](http://pribism.github.com)

# Zdroje I

- ① SNUSTAD, D a Michael J SIMMONS, RELICOVÁ, Jiřina (ed.). Genetika. Vyd. 1. Překlad Anna Matalová. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
- ② GOETZ, Petr. Vybrané kapitoly z lékařské biologie II. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0320-9.
- ③ YAMAMOTO, Y. : Detection of Bacteria in Cerebrospinal Fluids. Clinical and Vaccine Immunology [online]. 2002, 9(3) [cit. 2016-03-06]. ISSN 1556-6811. Dostupné z: <http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CDLI.9.3.508-514.2002>
- ④ Human Genome Project. In: National Institutes of Health [online]. 2010 [cit. 2016-03-03]. Dostupné z: <https://report.nih.gov/NIHfactsheets/ViewFactSheet.aspx?csid=45&key=H#H>
- ⑤ By Enzoklop - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32003643>

## Zdroje II

- ⑥ By Ygonaar - Own work, CC BY-SA 3.0 ,  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR\\_basic\\_principle1.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_basic_principle1.jpg)
- ⑦ [http://www.biologyreference.com/images/biol\\_02\\_img0140.jpg](http://www.biologyreference.com/images/biol_02_img0140.jpg)
- ⑧ [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3d/Radioactive\\_Fluorescent\\_Seq.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3d/Radioactive_Fluorescent_Seq.jpg)
- ⑨ <http://stanford.edu/~dsull/images/dideoxyribose.png>
- ⑩ By Zephyris - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15027555>
- ⑪ [http://openwetware.org/wiki/CH391L/S12/PCR\\_and\\_advanced\\_PCR\\_techniques](http://openwetware.org/wiki/CH391L/S12/PCR_and_advanced_PCR_techniques)
- ⑫ By Karl Mumm - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=16828886>

## Zdroje III

- ⑬ [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/PCR\\_tubes.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/PCR_tubes.png)
- ⑭ <https://static-secure.guim.co.uk/sys-images/Guardian/Pix/pictures/2012/5/17/1337250200245/DNA-sequence-008.jpg>

Prezentácia môže byť použitá len na výukové účely.