

Vybrané technológie molekulárnej biológie a ich využitie v praxi

Matej Pribiš

2. lékařská 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

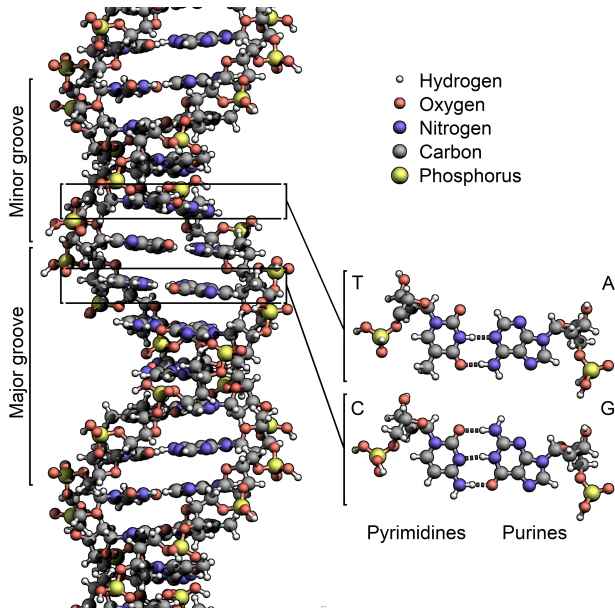
Niečo o mne.

Matej Pribiš

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

A čo vy?

Štruktúra DNA - 1953 Watson a Crick



Human Genome Project

- 1990
- 2000 (2003) - oznámenie výsledkov

Pokroky v genetike



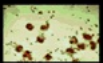
Human Genome Project

- 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

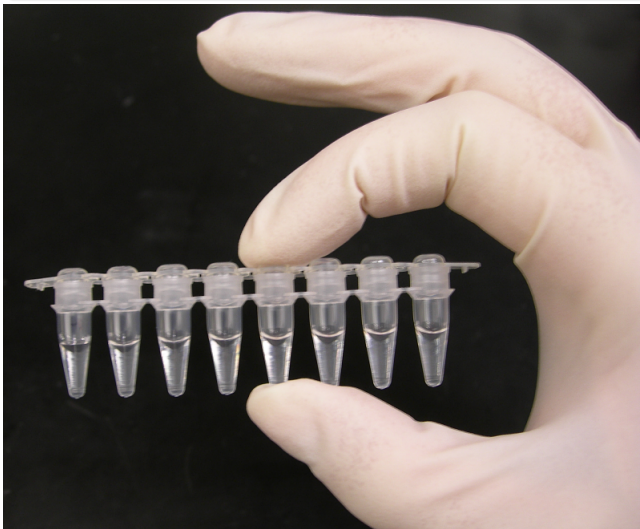




Metódy molekulárnej biológie

Načrtnutie základov

Ako zmnožiť malé množstvo DNA?



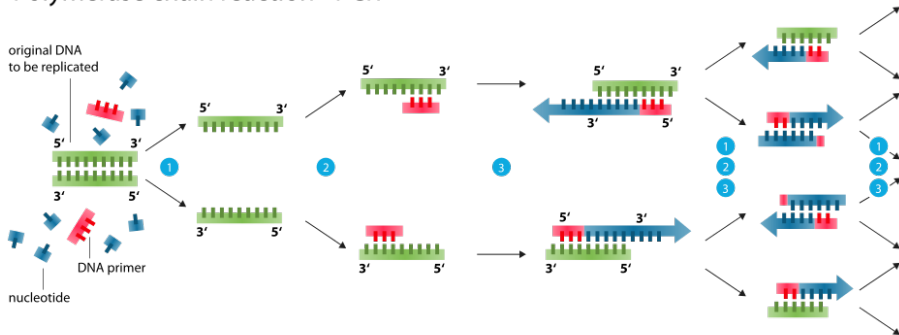
Základné info

- Polymerase chain reaction
- Amplifikácia sekvencií DNA

Princíp

- podobné replikácii 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

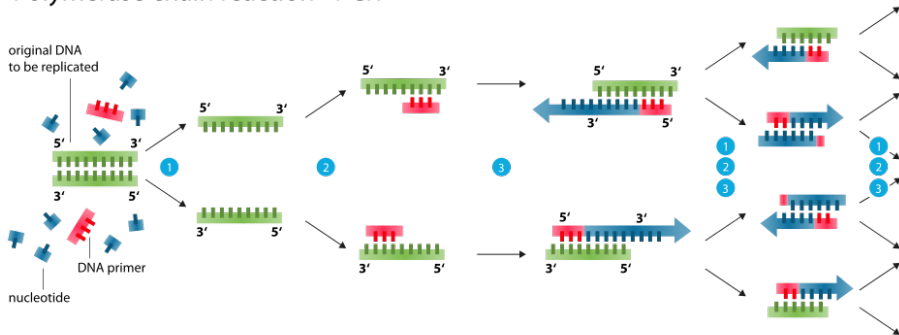
- typ polymerázy - vysoká teplota - ako vyriešiť?
- chybovosť - prečo nie v replikácií?
- obmedzená dĺžka fragmentu?
- aký je teoretický výťažok reakcie po N cykloch?



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



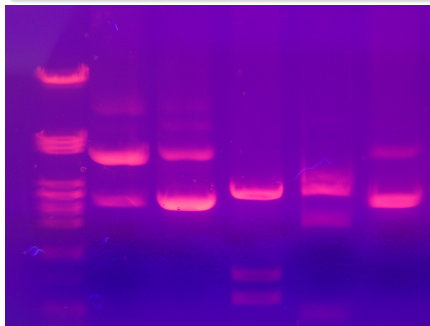
- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

Príklady využitia PCR

- namnoženie sekvencie DNA - súčasťou mnohých metód



Ako identifikovať páchatel'a 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
 - ▶ zídu ďalej

Využitie

- restrikčné enzýmy - definícia, VNTR

Využitie

- restriktčné enzýmy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov

Využitie

- restriktčné enzýmy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
 - ▶ forenzná

Využitie

- restriktčné enzýmy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
 - ▶ forezná
 - ▶ genetické stanovenie príbuznosti

Využitie

- restriktčné enzýmy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
 - ▶ forenzná
 - ▶ genetické stanovenie príbuznosti
- diagnostika - prítomnosť baktérie

Využitie

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



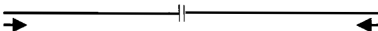
Využitie

- restriktčné enzýmy - definícia, VNTR
- odchylky - identifikácia jedincov
 - ▶ forenzná
 - ▶ genetické stanovenie príbuznosti
- diagnostika - prítomnosť baktérie
- spätné overenie správnosti a kvality PCR
- diagnostika vrodených mutácií



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

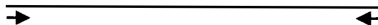
alela β^A - normální sekvence genu pro beta globin
 (kodony 5 - 8)
 sekvence je štěpena enzymem Mst II (**CCTGAGG**)
 produkt PCR je štěpen na dva fragmenty (na gelu 2 proužky)

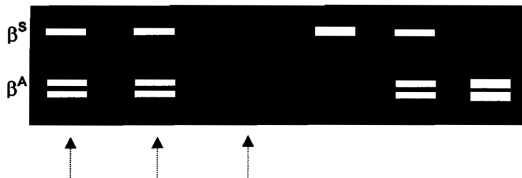
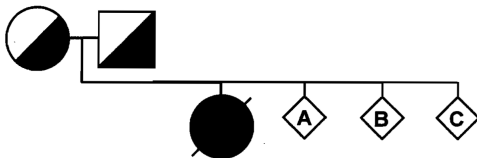


▼

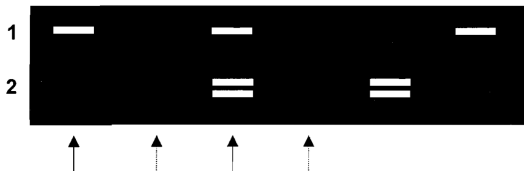
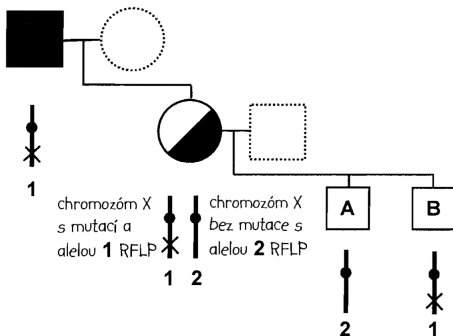
CCT	GTG	GAG	AAG
Pro	Val	Glu	Lys

alela β^S - substituce typu missense v Kodonu 6
 (kyselina glutamová je nahrazena valínem)
 sekvence není štěpena enzymem Mst II
 (ropoznávací místo je mutací zrušeno)
 produkt PCR není štěpen (na gelu jeden proužek)





prenatální diagnostika
 (25%) **A** - postižený
 (50%) **B** - nosič jedné mutace
 (25%) **C** - bez mutace



informativní RFLP
 prenatalní diagnostika
 hemofilie A u mužských plodů
 je možná
 (50%) A - nepostížený plod
 (50%) B - postižený plod

Ako čítať DNA?



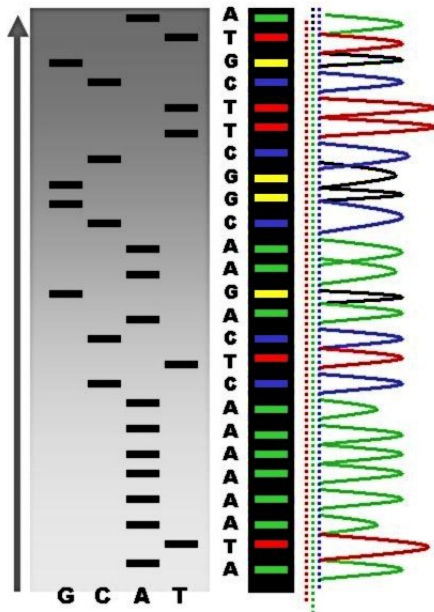
Princíp

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

Sekvenácia

Princíp

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



Sekvenácia

Využitie sekvenácie

- Zistenie sekvencie DNA (cDNA)

Sekvenácia

Využitie sekvenácie

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

Sekvenácia

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

Sekvenácia

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!

[[matejpribis@gmail.com]]
pribism.github.com

Zdroje I

- ① SNUSTAD, D a Michael J SIMMONS, RELICHOVÁ, 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
- ⑦ http://www.biologyreference.com/images/biol_02_img0140.jpg
- ⑧ 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
- 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
- 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.