

Metody molekulární biologie

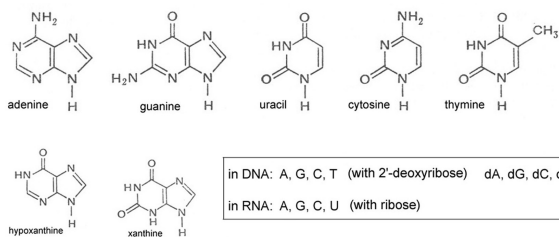
1. Manipulace s DNA

- mutace, delece,
- genomová DNA x cDNA
- restriční endonukleasy a enzymy modifikující DNA
- DNA a RNA polymerasy
- syntetické oligonukleotidy (primery pro polymerasy,...)
- metody manipulace s DNA (klonování DNA molekul v plasmidech, sekvenování, polymerasová řetězová reakce = PCR, mutagenese)
- genové knihovny (cDNA knihovny a genomové knihovny)
- počítačové metody pro analýzu sekvencí DNA/RNA

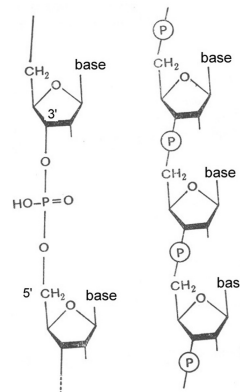
2. Analytické metody detekce lézí v DNA (detekcí mutací,...)

3. Analytické metody detekce exprese genů a studium transkripce

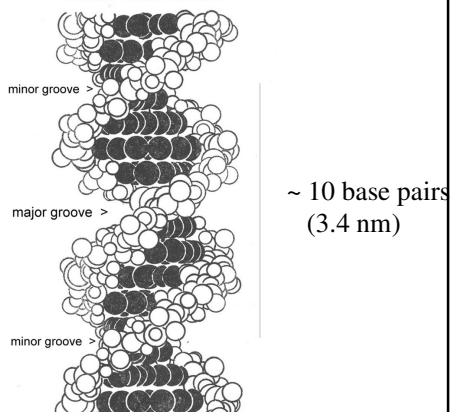
- detekce hladin mRNA
- studium interakce DNA-protein (protein-protein)
- detekce stavu modifikace chromatinu (police nukleosomů, stav acetylace histonu – v oblasti promotoru)
- cDNA microarrays



DNA structure: phosphodiester bonds



Double helix of DNA



DNA

RNAs

STRUKTURA:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| 2'-deoxyribosa | ribosa |
| - thymin | - uracil |
| - dvoušroubovice+vyšší struktury v jádře | - jeden řetězec, sekundární struktura |

FUNKCE:

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| - uchování genetické informace | - úloha v expresi genetické informace |
|--------------------------------|---------------------------------------|

Základní procesy kterých se účastní:

- | | |
|--|--------------------------|
| - replikace, transkripce (ssDNA as template) | - transkripce, translace |
|--|--------------------------|

Lokalizace v buňce:

- | | |
|-------------------------|------------------------------------|
| - jádro, (mitochondrie) | - jádro, cytoplasma (mitochondria) |
|-------------------------|------------------------------------|

Tvorba hybridů:

- DNA x DNA
DNA x RNA
RNA x RNA

Klonování inzertů DNA v plasmidech:

Plasmid: cirkulární DNA, replikuje se v bakteriích, nutný je počátek replikace a resistance na antibiotikum

Insert: fragment ds DNA

Důležité jsou konce insertu a plasmidového pozadí: ligace lepivých a tupých konců

MANIPULACE S DNA:

- DNA klonování v plasmidech (restriční endonukleasy)
- sekvenování DNA
- Polymerase Chain Reaction (PCR)

ISOLACE DNA, RNA:

- Fenolová extrakce
- Ethanolová precipitace

KONVERZE mRNA DO cDNA (complementary DNA)

Reverzní transkriptasa

Isolace čistých nukleových kyselin – DNA a/nebo RNA

Buněčný extract ~ Desintegrace buněčných struktur

↓
+ dodecylsírán sodný ~ denaturace proteinů

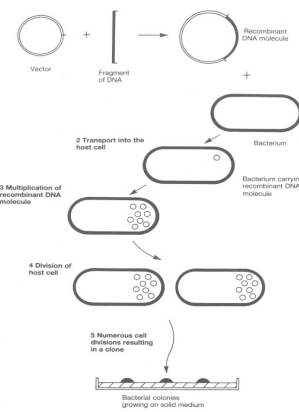
↓
+ fenol/chloroform ~ separace fází

↓
DNA a RNA zůstávají ve vodné fázi, denaturované proteiny přecházejí do fenolové fáze

↓
Ethanolová precipitace (DNA i RNA precipitují v 70% etanolu za přítomnosti solí)

Tato metoda je účinná v širokém rozmezí koncentrace nukleových kyselin a jejich molekulové hmotnosti).

CLOWING IN PLASMIDS - CONSTRUCTION OF RECOMBINANT DNA MOLECULE



Cleavage by restriction endonucleases

Eco RI: 5' extension

5'NNNNNNNN G A A T T C NNNNNNNN 3'
3'NNNNNNNN C T T A A G NNNNNNNN 5'

5'NNNNNNNN G 3',..... 5' A A T T C NNNNNNNN 3'
3'NNNNNNNN C T T A A 5',..... 3' G NNNNNNNN 5'

Pst I: 3' extension

5'NNNNNNNN C T G C A G NNNNNNNN 3'
3'NNNNNNNN G A C G T C NNNNNNNN 5'

5'NNNNNNNN C T G C A 3',..... 5' G NNNNNNNN 3'
3'NNNNNNNN G 5',..... 3' A C G T C NNNNNNNN 5'

Dra I: blunt end

5'NNNNNNNN T T T A A A NNNNNNNN 3'
3'NNNNNNNN A A A T T T NNNNNNNN 5'

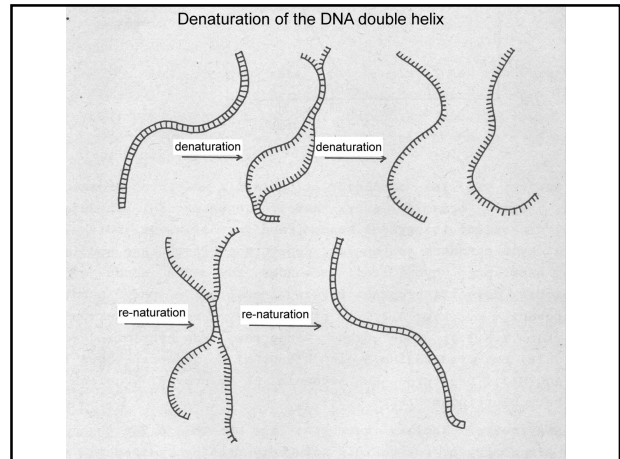
5'NNNNNNNN T T T 3',..... 5' A A A NNNNNNNN 3'
3'NNNNNNNN A A A 5',..... 3' T T T NNNNNNNN 5'

Detekce nukleových kyselin:

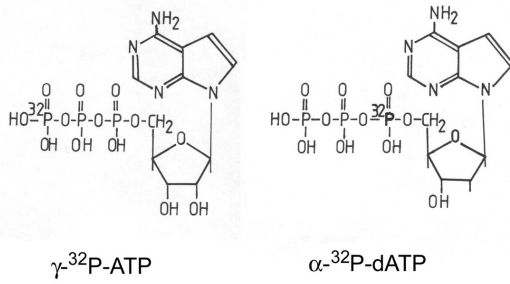
Hybridizace,
"próbování",
PCR

Q: Může RNA tvořit duplex?

Q: Jaký je rozdíl ve stabilitě čisté DNA a RNA?



Radioactive phosphates in NTP/dNTP

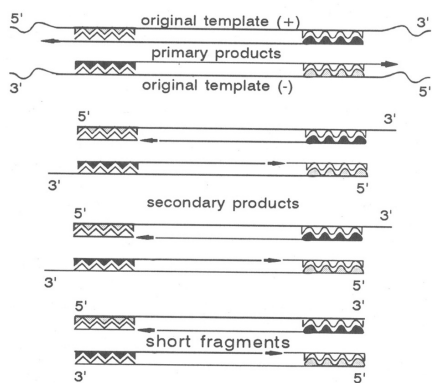


Polymerase chain reaction (PCR)

(~ "klonování" bez bakterií, ve zkumavce)

Použití: DNA diagnostika, soudní lékařství, výzkum

Principle of PCR



Buněčné kultury.

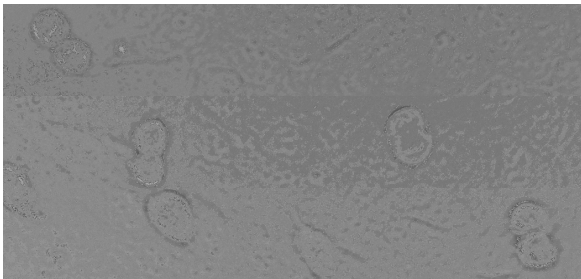
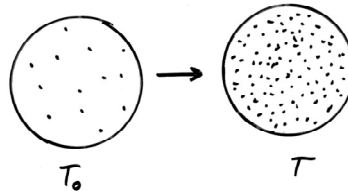
Buněčné kultury: buňky primární x již založené (established)
 Konfluentní buňky. Saturační hustota.
 Pasážování buněčné linie.
 Účinnost přichycení.
 Generační čas buňky.
 Čas zdvojení buněčné populace.
 Buňky normální x imortalizované x nádorově transformované
 Diploidní x aneuploidní.

buňky v buněčné kultuře:

čas zdvojení (doubling time): časový interval, ve kterém se počet buněk zdvojnásobí.

$$\text{Počet zdvojení} = \log N/N_0 \times 3,33$$

N_0počet buněk v čase T_0
 Npočet buněk v čase T



Průtoková cytometrie

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Použití: imunologie, buněčná biologie

Buňky rychle protékají kapilárou, kterou prochází jeden nebo více laserových paprsků. Od buněk se paprsek odráží a rozptyluje, nebo excituje záření označeného antigenu (struktury apod.) a emitující záření je rovněž detegováno.

Rozptýlené, odražené, nebo emitované světlo je převáděno fotonásobiči na elektrické signály . Vznikají 3 typy dat:

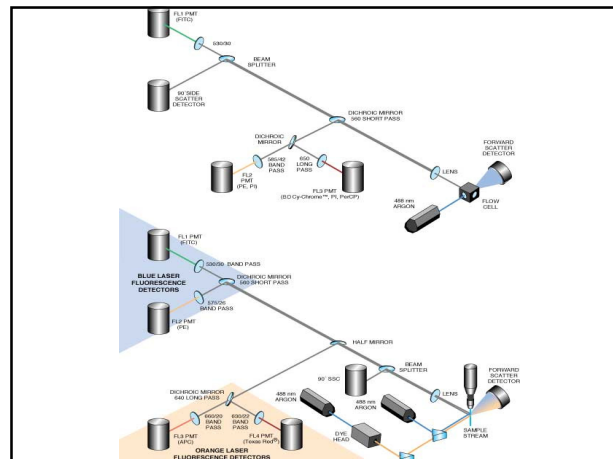
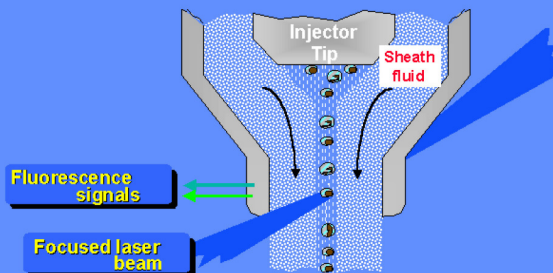
Forward Scatter (FSc) ~ rozptýlené světlo
 Přibližná velikost buněk

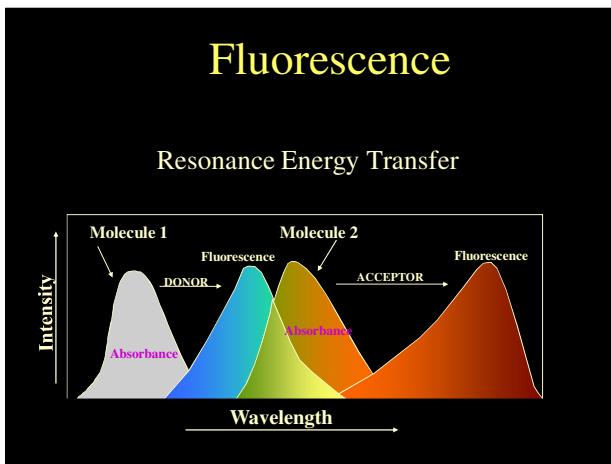
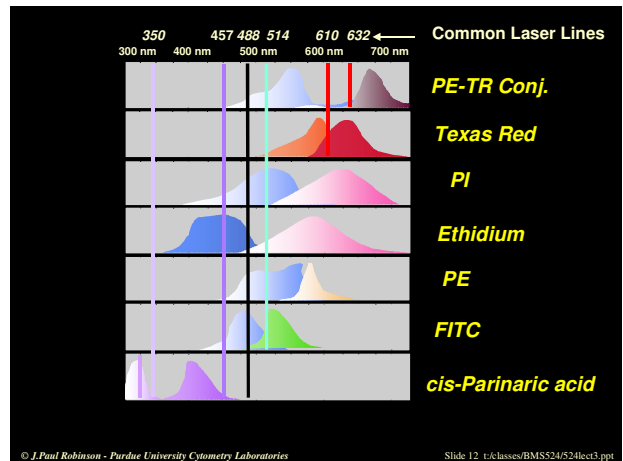
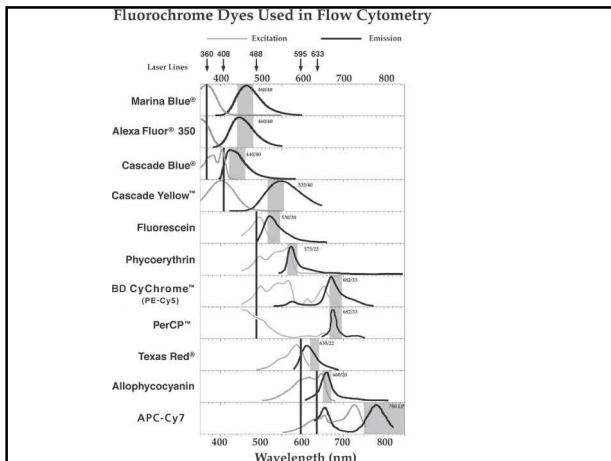
Side (Orthogonal) Scatter (SSc) ~ odražené světlo
 Buněčný povrch, kvalita, granularita

Fluorescent Labeling ~ emitované světlo
 Značení antigenů na buněčné membráně, v cytoplasmě , i v jádře

Průtoková cytometrie umožňuje „sortování“ buněk, tj preparativní oddělování buněk s jednotlivými parametry pro další použití.

Flow Cell



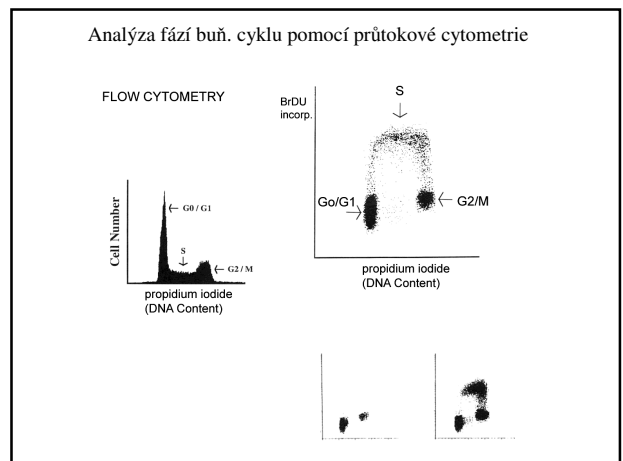


Probes for Nucleic Acids

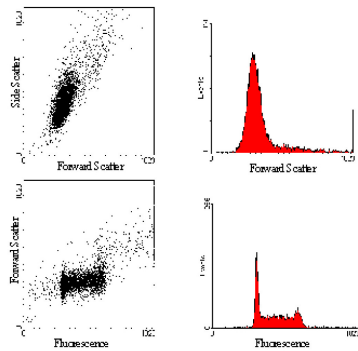
• Hoechst 33342 (AT rich) (uv)	346		460
• DAPI (uv)	359		461
• POPO-1	434		456
• YOYO-1	491		509
• Acridine Orange (RNA)	460		650
• Acridine Orange (DNA)	502		536
• Thiazole Orange (vis)	509		525
• TOTO-1	514		533
• Ethidium Bromide	526		604
• PI (uv/vis)	536		620
• 7-Aminoactinomycin D (7AAD)	555		655

Probes for Proteins

Probe	Excitation	Emission
FITC	488	525
PE	488	575
APC	630	650
PerCP™	488	680
Cascade Blue	360	450
Coumerin-phalloidin	350	450
Texas Red™	610	630
Tetramethylrhodamine-amines	550	575
CY3 (indotrimethinecyanines)	540	575
CY5 (indopentamethinecyanines)	640	670



DNA Analysis

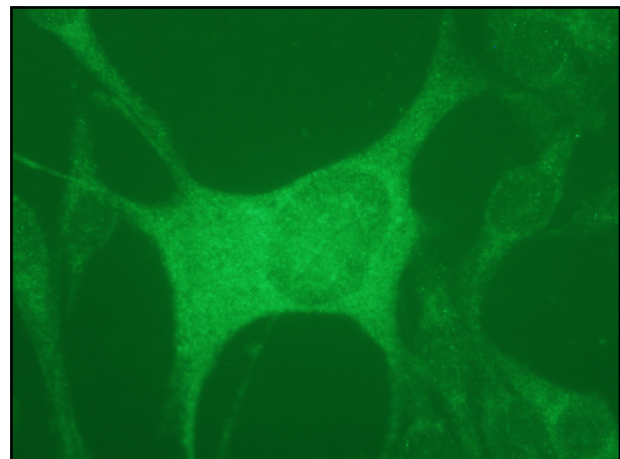
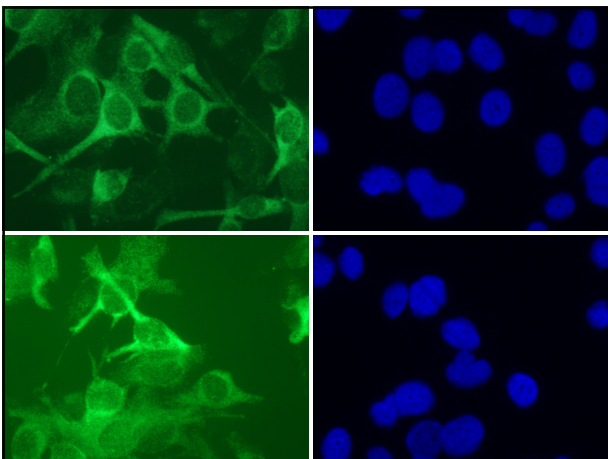
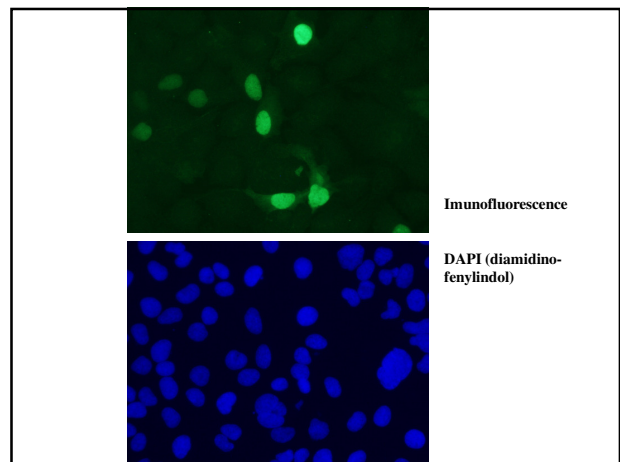
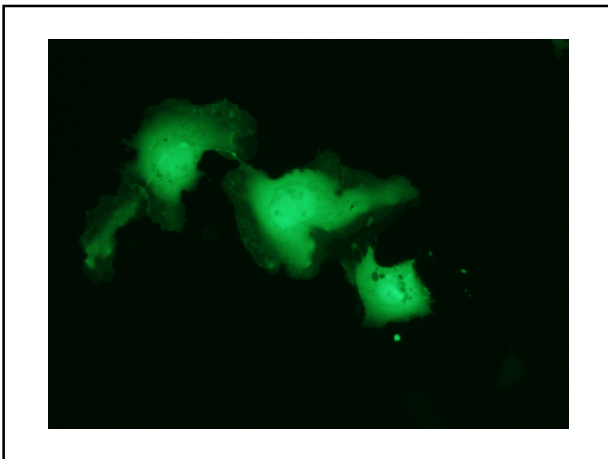


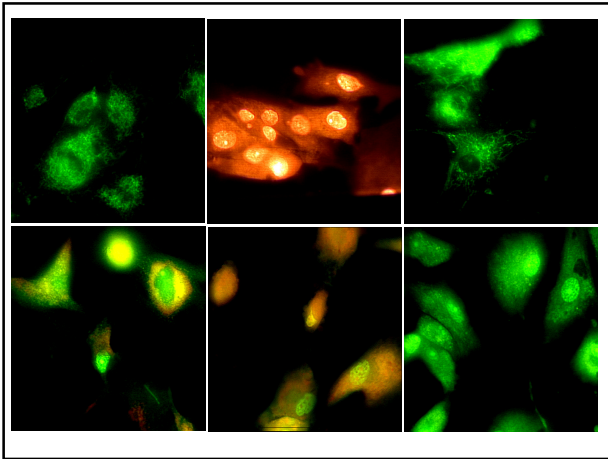
Fluorescenční mikroskopie

- vizualizace „svítících proteinů“ (GFP, RedFP, YFP)
- barvení DNA v jádře
- enzymová aktivita „in situ“

Imunofluorescence:

- intracelulární lokalizace proteinů
- určování proliferační aktivity buněk





CENTRIFUGACE:

1. diferenciální centrifugace

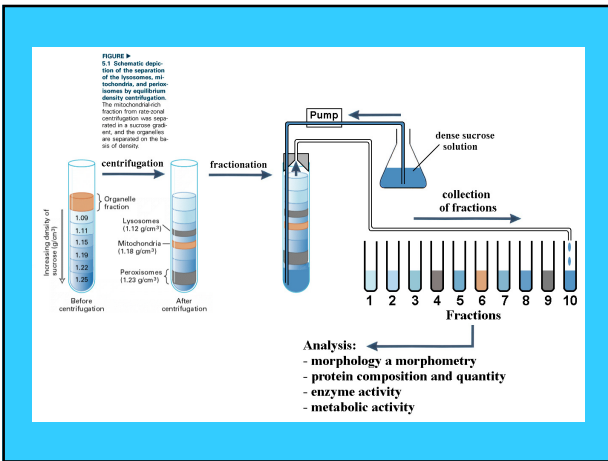
- a) nízkoobrátková (2-5 tis. g) - sediment: buňky, jádra
- b) středněobrátková (10-30 tis. g) - sediment: větší subcelulární struktury (lysosomy, mitochondrie)
- c) ultracentrifugace (nad 100 tis. g) - sediment: jemné subcelulární struktury (ER)

2. gradientová centrifugace

Hustotní gradienty: sacharosa, cesium chlorid.
Je možné oddělování malých částic i větších molekul (DNA).

TYPY centrifugačních rotorů:

- Úhlový (angle)
- Výkyvný (swing-out)
- Vertikální (vertical, „near-vertical“)



$$RCF_{\max} = 1.12 r_{\max} \left(\frac{\text{rpm}}{1000} \right)^2 \quad \text{rpm} = 10^3 \sqrt{\frac{RCF}{1.12 r_{\max}}}$$

