

Náhled do genového inženýrství



=

soubor postupů a metod, jimiž se cíleně
ovlivňuje genetická výbava buněk

Trocha historie nikoho nezabije...

1869 - **Miescher** z lidských bílých krvinek poprvé izoloval DNA.

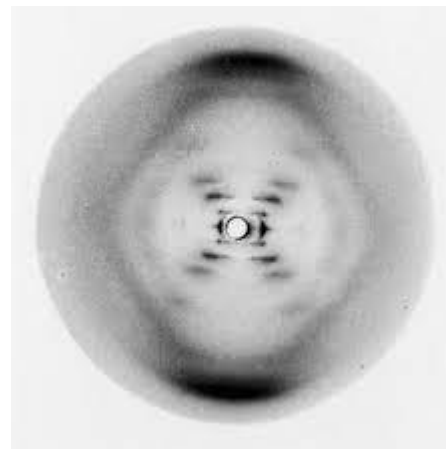
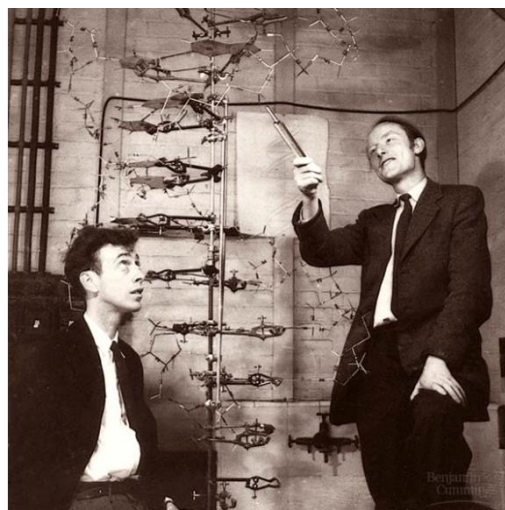
1944 - **Avery** ukázal, že genetická informace je uchovávána pravděpodobně molekulou DNA a nikoli proteiny, jak se do té doby věřilo.

1953 - **Watson** a **Crick** na základě dat **Franklinové, Wilkinse a Paulinga** poprvé postulovali model sekundární struktury molekuly DNA - model dvoušroubovice DNA.



Snímek 51

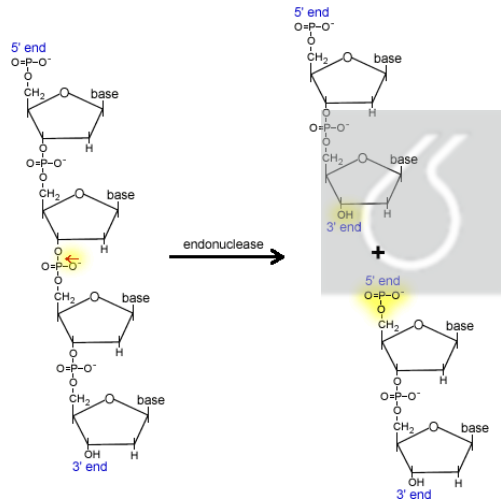
nejdůležitější snímek všech dob...



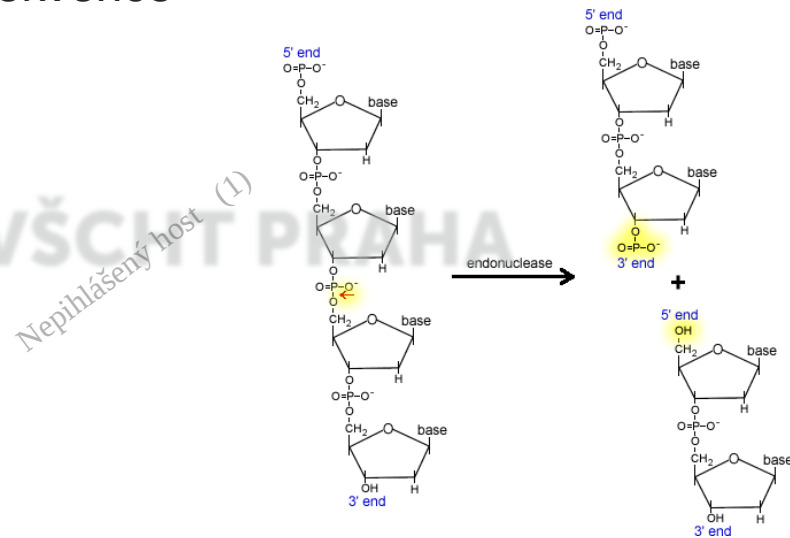
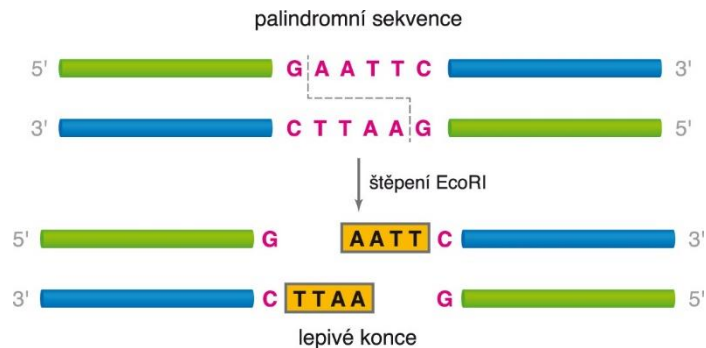
1962 - **Arber** přinesl první důkazy o existenci DNA restrikčních endonukleas (štěpí v přesně definovaných místech molekulu DNA na fragmenty)

Restrikční endonukleasy

- **Endonucleasy** - štěpí fosfodiesterovou vazbu v polynukleotidovém řetězci
- Velmi specifické – palindromní sekvence



EcoRI – kohezivní konce



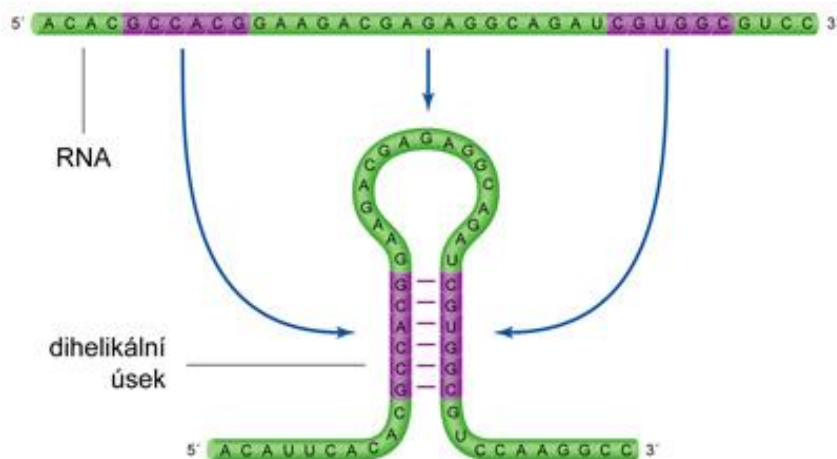
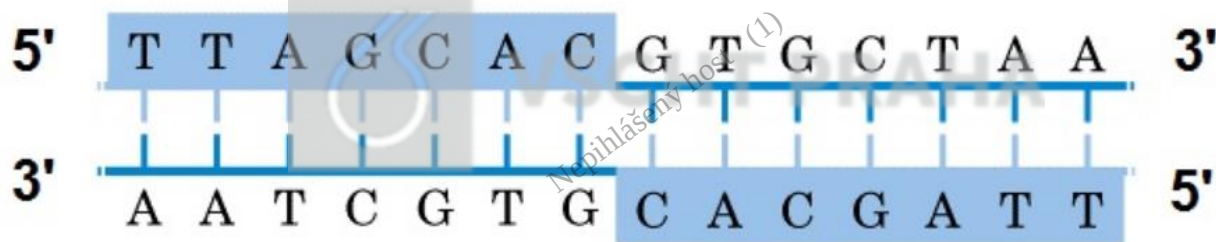
SmaI – tupé konce



Palindrom - je slovo, věta, číslo nebo melodie (obecně jakákoliv sekvence symbolů, např. sekvence DNA), která má tu vlastnost, že ji lze číst v libovolném směru (zprava doleva nebo zleva doprava) a má vždy stejný význam.

Jelenovi pivo nelej

Palindrom je v genetice sekvence nukleové kyseliny (DNA nebo RNA, která je stejná, pokud se čte od 5' konce k 3' konci jednoho vlákna a od 5' konce k 3' konci na komplementárním vlákně



NEW ENGLAND
BioLabs Inc.

Cut Smarter with
NEB Restriction Enzymes

- >200 restriction enzymes are supplied with a single buffer, CutSmart® Buffer
- The largest selection of enzyme specificities
- More recombinant enzymes than any other supplier
- Over 185 Time-Saver® qualified enzymes digest DNA in 5-15 minutes and can also be safely used overnight with no loss of sample
- High Fidelity (HF®) enzymes have been engineered for reduced star activity and are 100% active in CutSmart Buffer
- Purple loading dye is included with all HF enzymes, for sharper bands and no UV shadow

Chart Legend

W Supplied with its own unique reaction buffer that is different from the four standard NEBuffers. Compatibility with the four standard NEBuffers is indicated by the chart.

SAM Supplied with a separate vial of S-adenosylmethionine (SAM). To obtain 100% activity, SAM should be added to the TX reaction mix as specified on the product data card.

- R** Recombinant
- T** Time-Saver qualified
- E** Engineered for maximum performance
- S** 5m methylation sensitivity
- S** 5m methylation sensitivity
- C** CpG methylation sensitivity (applies to eukaryotic genomic DNA only)
- M** RE-Max® Master Mix version of this enzyme available

NEBuffer Compositions (1X)

- NEBuffer 1.1:**
10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA (pH 7.3 @ 25°C)
- NEBuffer 2:**
50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA (pH 7.3 @ 25°C)
- NEBuffer 3.1:**
100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA (pH 7.3 @ 25°C)
- CutSmart Buffer:**
10 mM Potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium acetate, 100 µg/ml BSA (pH 7.3 @ 25°C)

Buffers should be thawed completely and mixed thoroughly before using.

Note: The values listed in this table are approximate. They were obtained using sequence-specific unit assay substrate DNA.

- Notes**
- a. Ligation is $< 10\%$.
 - b. Ligation is $25\% - 75\%$.
 - c. Resulting after ligation is $< 5\%$.
 - d. Resulting after ligation is $50\% - 75\%$.
 - e. Ligation and resulting after ligation is not applicable since the enzyme is either a nicking enzyme, is affected by methylation, or the recognition sequence contains variable sequences.

1. Star activity may result from extended digestion, high enzyme concentration or a glycerol concentration of > 5%.
2. Star activity may result from extended digestion.
3. Star activity may result from a glycerol concentration of > 5%.

A selection of DNA-modifying enzymes were assayed in CutSmart Buffer, in the absence of their supplied buffers. Functional activity was compared to the activity in its supplied buffer plus required supplements. Reactions were set up according to the recommended reaction conditions, with CutSmart Buffer replacing the supplied buffer.

[illegible]

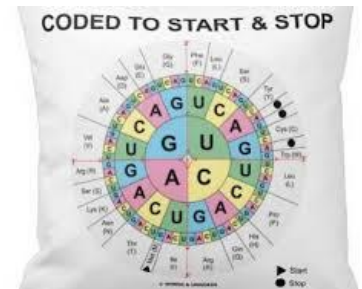
United Kingdom
New England Biolabs (UK) Ltd.
call free 0800 315485

© Printed in the USA on recycled paper (50% FSC)



Genetický kód

- složen z tripletů
- degenerovaný
- téměř univerzální



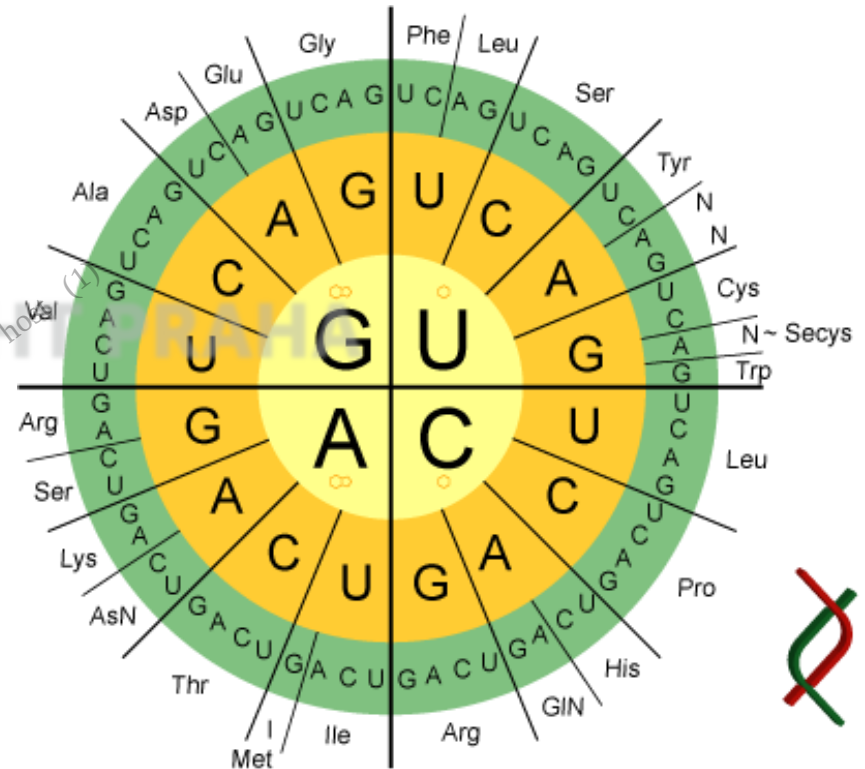
Otevřený čtecí rámec

TTGACCTGTACAAT

TTGACCTGTACAAT
 L T C T
 TGACCTGTACAAT
 stop P V Q
 GACCTGTACAAT
 D L Y N

3 různé čtecí rámce → 3 různé polypeptidové řetězce

Čtení kodonů závisí na tom, kde určíme začátek čtecího rámce



umfgz.af.mendelu.cz

© Tomáš Urban 2013

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES¹

	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	C
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	A
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Tyr (Y)	1.4	1.00	G
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	C
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	A
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	G
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	C
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	A
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	G
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	C
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	A
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	G
	U				C				A				G				

¹ The data shown in this table is from the Arabidopsis Research Companion on the World Wide Web (<http://weeds/mgh.harvard.edu>). Codon frequencies for many other bacteria can be found at <http://morgan.angis.su.oz.au/Angis/Tables.html>.

² The letter in parenthesis represents the one-letter code for the amino acid.

³ % represents the average frequency this codon is used per 100 codons.

⁴ Ratio represents the abundance of that codon relative to all of the codons for that particular amino acid.

1962 - **Arber** přinesl první důkazy o existenci DNA restrikčních endonukleas (štěpí v přesně definovaných místech molekulu DNA na fragmenty).

1966 - **Nirenberg, Ochoa, Matthaei** a **Khorana** rozluštili genetický kód.

1967 - **Gellert** objevil DNA ligasu.

1972 - **1973** - V laboratořích **Boyera, Cohena, Berga** a jejich kolegů byla vyvinuta technika klonování DNA.

1975 - **Southern** vyvinul DNA hybridizační metodiku na bázi gelové elektroforézy pro identifikaci molekul DNA o specifické sekvenci (Southern blot).

1975 - 1977 - **Sanger s Barrellem** a **Maxam s Gilbertem** vyvinuli techniky sekvenování DNA

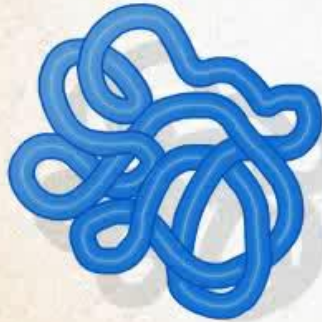
1978 – 1980 – první rekombinantní protein

1981 - 1982 - **Palmiter** a **Brinster** přivedl na svět

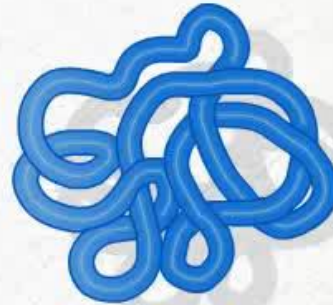
první transgenní myš a **Sprandling** s **Rubinem** první transgenní octomilku.

1985 - **Mullis** spolu s kolegy vynalezl PCR

Organism A



Organism B



Organism C



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)



McGraw-Hill Animations

43 100 odběratelů

Maxam-Gilbertova metoda - „chemické sekvenování“



↓ 1. denturace

5' -ATTGACTTAGCC-3'

↓ 2. přidání radioaktivní značky na 5' konec

³²P-ATTGACTTAGCC

3. čtyři reakce

G

DMS, piperidin

³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTA
³²P-ATT

A, G

DMS, piperidin
v HCOOH

³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTA
³²P-ATTGACTT
³²P-ATTG
³²P-ATT

T, C

hydrazin, piperidin

³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTAGC
³²P-ATTGACTTAG
³²P-ATTGACT
³²P-ATTGAC
³²P-ATTGA
³²P-AT
³²P-A

C

hydrazin, piperidin
v 1,5 M NaCl

³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTAGC
³²P-ATTGACTTAG
³²P-ATTGA

³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTA
³²P-ATT

³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTA
³²P-ATTGACTT
³²P-ATTG
³²P-ATT

³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTAGC
³²P-ATTGACTTAG
³²P-ATTGACT
³²P-ATTGAC
³²P-ATTGA
³²P-AT
³²P-A

³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTAGC
³²P-ATTGACTTAG
³²P-ATTGA



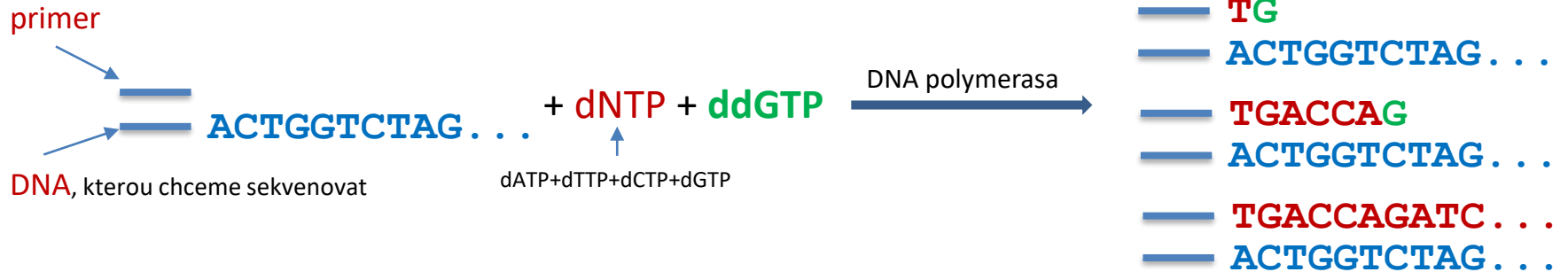
5. elektroforéza, detekce radioaktivity



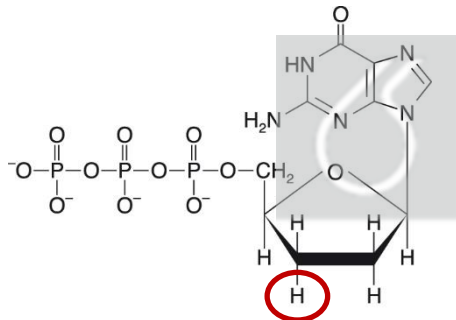
6. přečtení sekvence

?TTGACTTAGCC

Sangerova metoda - „dideoxy sekvenování“



ddGTP

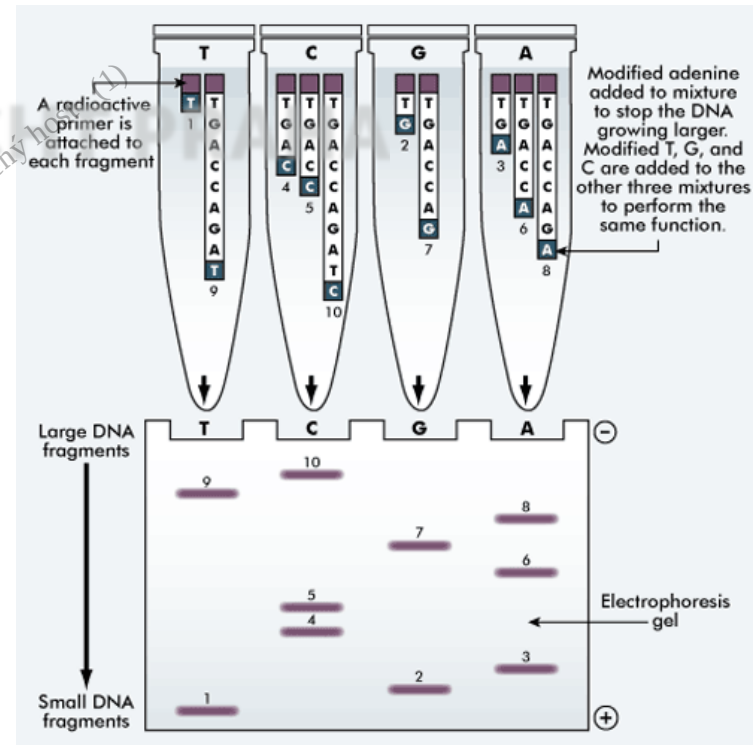


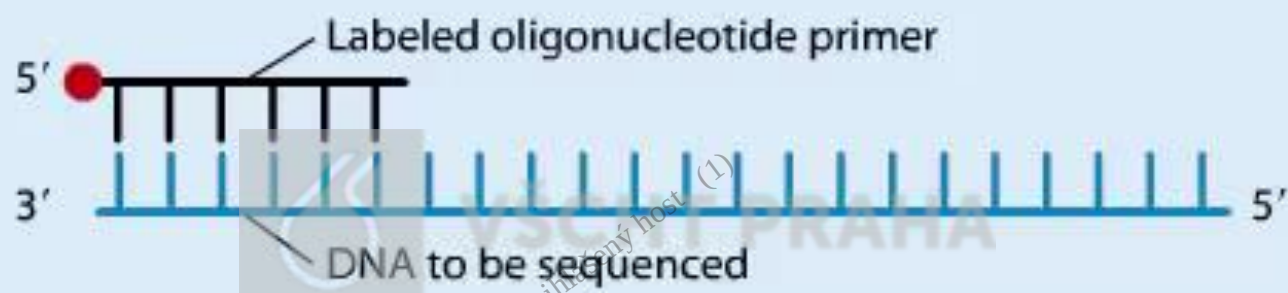
ddTTP

dideoxyguanosintrifosfát, ddGTP

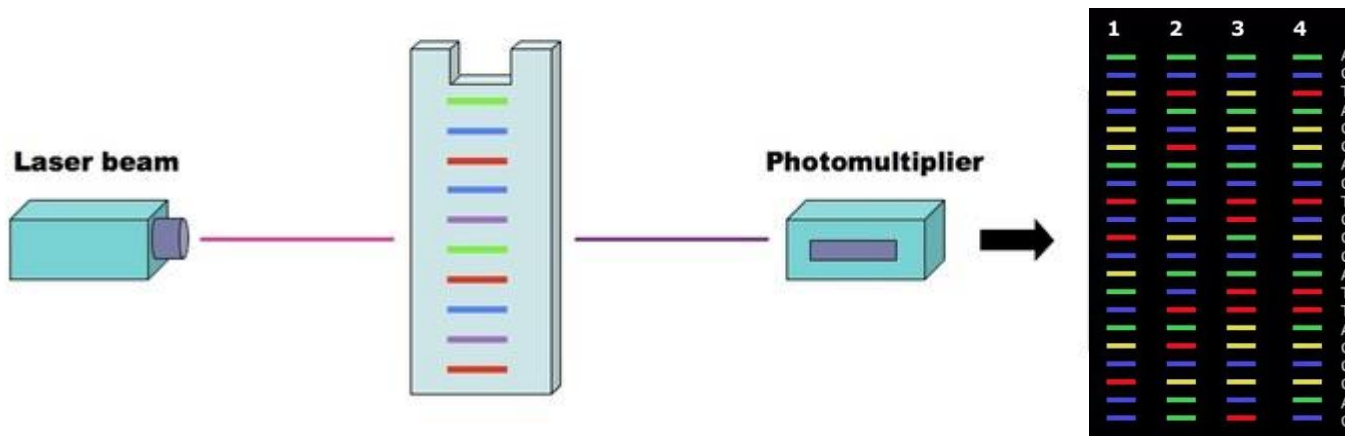
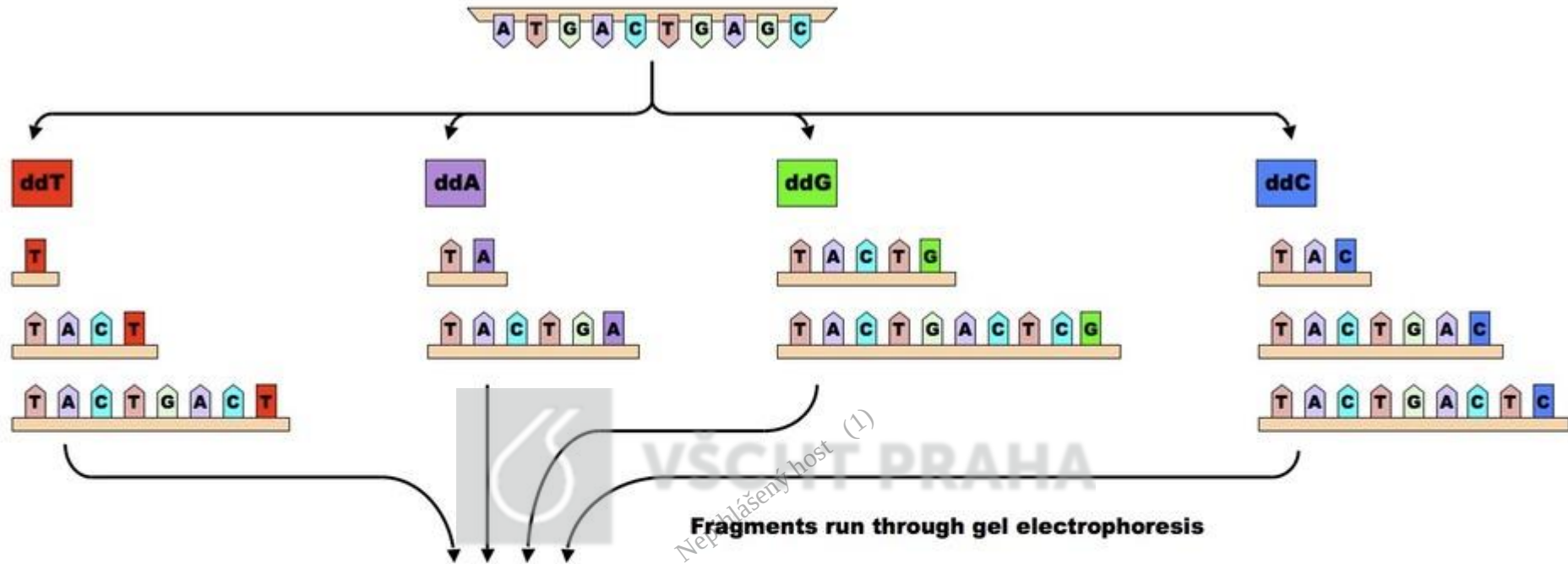
ddATP

ddCTP



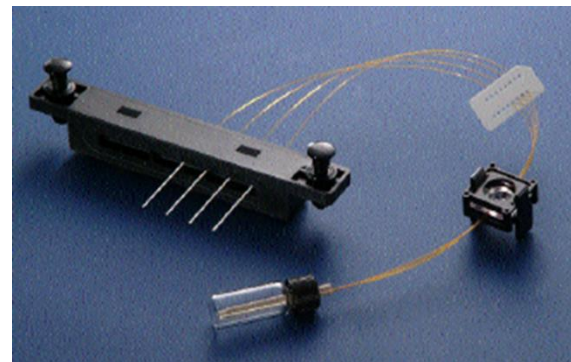
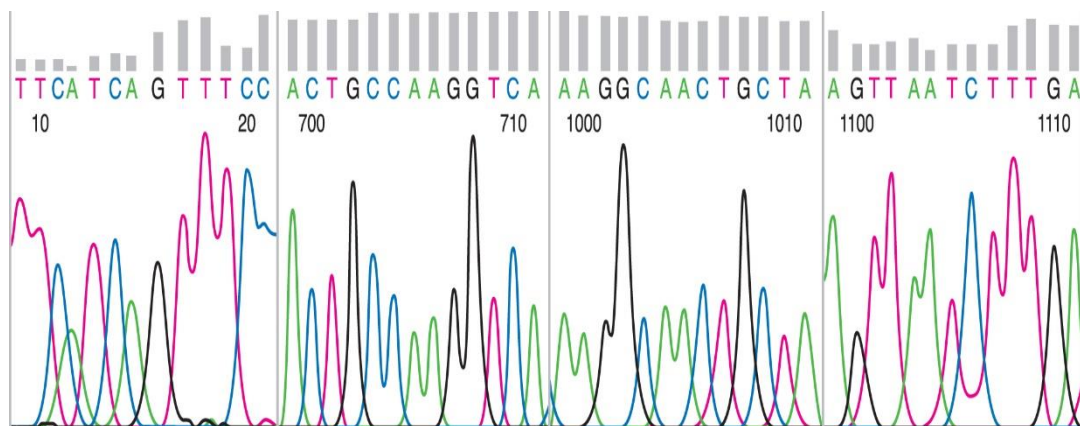
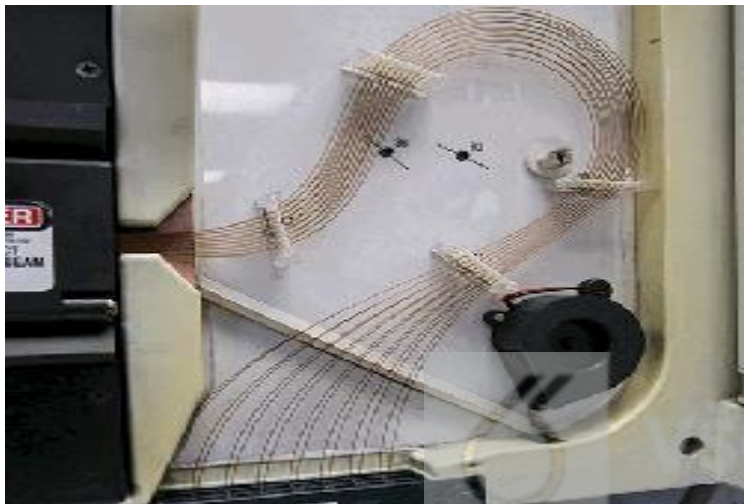


PCR in presence of fluorescent, chain-terminating nucleotides



Fluorescent fragments detected by laser and represented on a chromatogram

- kapilární elektroforesa



1962 - Arber přinesl první důkazy o existenci DNA restrikčních endonukleas (štěpí v přesně definovaných místech molekulu DNA na fragmenty).

1966 - Nirenberg, Ochoa a Khorana rozluštili genetický kód.

1967 - Gellert objevil DNA ligasu.

1972 - 1973 - V laboratořích **Boyera, Cohena, Berga** a jejich kolegů byla vyvinuta technika klonování DNA.

1975 - Southern vyvinul DNA hybridizační metodiku na bázi gelové elektroforézy pro identifikaci molekul DNA o specifické sekvenci (Southern blot).

1975 - 1977 - Sanger s Barrellem a Maxam s Gilbertem vyvinuli techniky sekvenování DNA

1978 – 1980 – první rekombinantní protein

1981 - 1982 - Palmiter a Brinster přivedl na svět

první transgenní myš a **Sprandling s Rubinem** první transgenní octomilku.

1985 - Mullis spolu s kolegy vynalezl PCR

Inzulin



HUMAN
GREAT APES
MACAQUE (CYNOMOLGUS)
RABBIT
CANINE
EQUINE
PORCINE
HAMSTER
RAT II
MOUSE II
FELINE
RAT I
MOUSE I
BOVINE
OVINE

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**S**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**A**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**A**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**A**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**S**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP**MS**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP**MS**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**A**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**S**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**S**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**S**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**A**
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**A**

Insulin B-chain

CPHPC1



RR EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ
RR EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ
RR EAED**P**VGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ
RR **EVE**ELQVGQ**A**ELGGGPGAG**G**LQPS**A**LE**L**ALQ
RR **EVE**DLQV**RD**VEL**AG****A**PG**E**GG**L**QPLALE**G**ALQ
XX EAED**P**QVG**E**VELGGGPG**L**GG**L**QPLALE**AG**PQ
RR EA**NP**Q**AG**AVELGGG**L**GG**-**-LQALALEG**PP**Q
RR **G**VED**P**QV**A**QLELGGGPG**ADD**LQTLALE**VA**Q
RR **EVE**D**P**QV**A**QLELGGGPG**ADD**LQTLALE**VA**Q
RR **EVE**D**P**QV**A**QLELGGGPG**ADD**LQTLALE**VA**Q
RR EAEDLQ**GG**DAELGE**A**PGAG**G**LQPS**A**LE**A**PLQ
RR **EVE**D**P**QV**P**QLELGGG**E**AG**DL**QTLALE**VA**RQ
RR **EVE**D**P**QV**E**QLELGG**SP**--GDLQTLALE**VA**RQ
RR **EVE**GPQV**GA**LELAGGPG-- --**AG**GLEG**PP**Q
RR **EVE**GPQV**GA**LELAGGPG-- --**AG**GLEG**PP**Q

C-peptide



KR GIVEQCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIVEQCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIVEQCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIVEQCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIVEQCCT**G**ICSLYQLENYCN
KR GIVEQCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIV**D**QCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIV**D**QCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIVEQCC**AS**VCSLYQLE**H**YCN
KR GIV**D**QCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIV**D**QCCTSLCSLYQLENYCN
KR GIVEQCC**AS**VCSLYQLENYCN
KR GIVEQCC**AGV**CSLYQLENYCN

Insulin A-chain



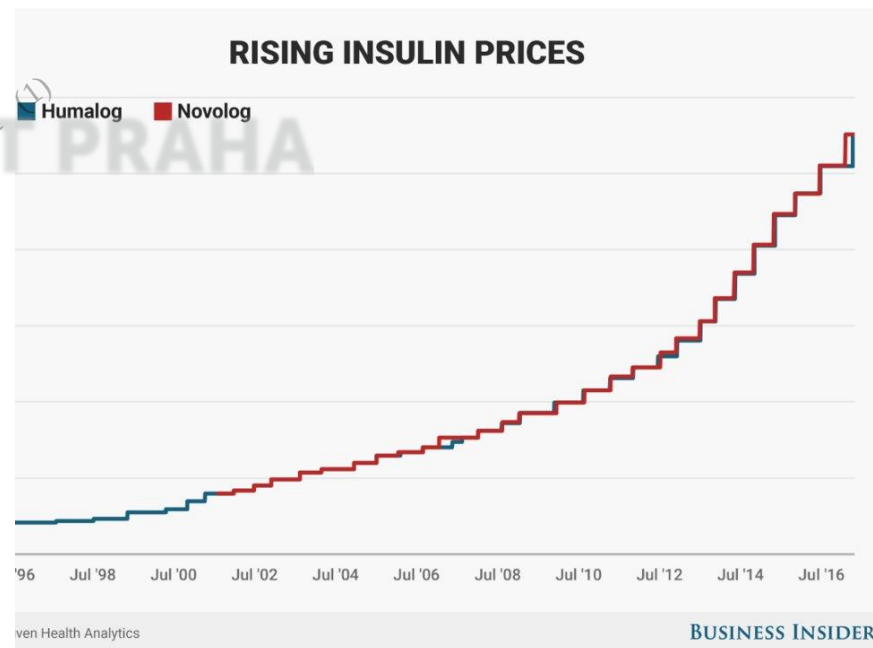
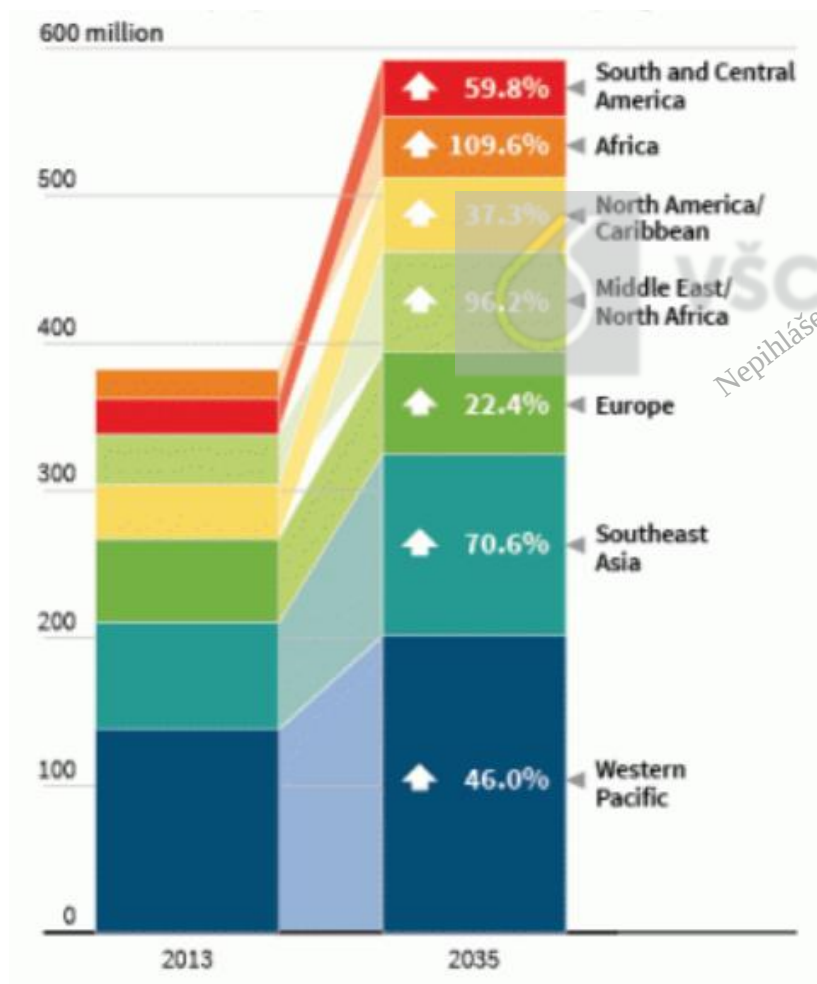
Lilly

SANOFI



výroba od roku 1923

léčba 1 pacienta s diabetes 2. typu - 900 dolarů za měsíc



DRUHY INZULINU	Nástup účinku	Maximální efekt	Trvání účinku	Prodejní název
Velmi krátce působící	5-20 minut	1-3 hodiny	3-5 hodin	NovoRapid, Humalog, Apidra
Krátce působící	30 minut	1-3 hodiny	8 hodin	Actrapid, Humulin R, Insuman Rapid
Mixované humanní Mixované analoga	30 minut 10-20 minut	2-8 hodin 1-4 hodiny	24 hodin 24 hodin	Mixtard 30 Humulin M3, Insuman Combi, Novomix 30, Humalog 30
Středně a dlouhodobě působící	1-1,5 hodiny	4-12 hodin	24 hodin	Insulatard, Humulin N, Insuman Basal
Dlouze až ultradlouze působící	1 hodinu	Udržování bazální hladiny	24-48 hodin	Levemir, Lantus, Tresiba (ve schvalovacím řízení)

1962 - **Arber** přinesl první důkazy o existenci DNA restrikčních endonukleas (štěpí v přesně definovaných místech molekulu DNA na fragmenty).

1966 - **Nirenberg, Ochoa** a **Khorana** rozluštili genetický kód.

1967 - **Gellert** objevil DNA ligasu.

1972 - **1973** - V laboratořích **Boyera, Cohena, Berga** a jejich kolegů byla vyvinuta technika klonování DNA.

1975 - **Southern** vyvinul DNA hybridizační metodiku na bázi gelové elektroforézy pro identifikaci molekul DNA o specifické sekvenci (Southern blot).

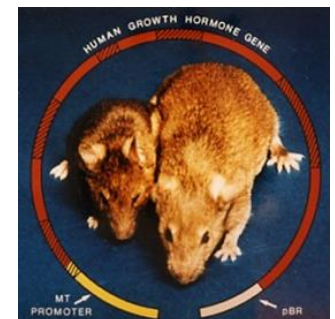
1975 - 1977 - **Sanger** s **Barrellem** a **Maxam** s **Gilbertem** vyvinuli techniky sekvenování DNA

1978 – 1980 – první rekombinantní protein

1981 - 1982 - **Palmiter** a **Brinster** přivedl na svět

první transgenní myš a **Sprandling** s **Rubinem** první transgenní octomilku.

1985 - **Mullis** spolu s kolegy vynalezl PCR



1990 - Lipmann spolu s kolegy vytvořil aplikaci BLAST, algoritmus používaný pro vypočítání podobnosti sekvencí a následné dohledávání genů, sekvencí DNA a proteinů na základě vzájemné homologie.

1990 - odstartován Human Genome Project (HUGO).

1995 - Venter a jeho tým - první kompletní genom - bakterie *Haemophilus influenzae* (1,8 Mbp)

1998 - byla založena soukromá společnost **Celera Genomics, Inc. (J. Craig Venter)** - rival veřejného HUGO projektu

2001 - publikováno 90 % genomu



NATURE | VOL 409 | 15 FEBRUARY 2001 | www.nature.com

articles

Initial sequencing and analysis of the human genome

International Human Genome Sequencing Consortium*

*A partial list of authors appears on the opposite page. Affiliations are listed at the end of the paper.

The human genome holds an extraordinary trove of information about human development, physiology, medicine and evolution. Here we report the results of an international collaboration to produce and make freely available a draft sequence of the human genome. We also present an initial analysis of the data, describing some of the insights that can be gleaned from the sequence.



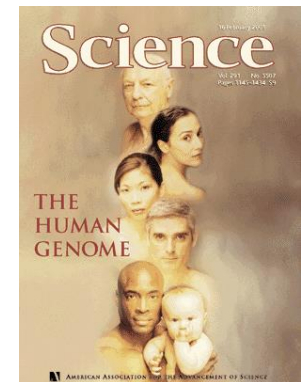
The Sequence of the Human Genome

J. Craig Venter*, Mark D. Adams*, Eugene W. Myers*, Peter W. Li*, Richard J. Harte*, George C. Sutton*, Jonathan D. Smith*, Frank Yeakley*, Cheryl A. Brown*, Robert A. Hark*, Jennifer Bowne-Winter*, Qing Zhang*, Christopher D. Scriver*, Elizabeth D. Zhang*, Lin Chen*, Robert Shogren*, Christopher H. Johnson*, Paul D. Thomas*, Jingping Zhang*, George L. Cohen*, Michael J. Beaudet*, Andrew C. Clark*, Jay Hudson*, Peter A. Crook*, Bruce J. Goldstein*, Arnold J. Levine*, Richard A. Roberts*, Paul Brown*, Geraldine Kaye*, Michael Hunkeler*, Ronald Kohn*, Arthur D'Onofrio*, Lin Dan*, David Finkle*, Michael Rong*, Liqun Xue*, Aaron Hogen*, Richard H. Smith*, Samuel Lutz*, Clark Miskary*, David Rabin*, Karin Romberg*, Jose Abu-Thabrah*, Ellen Rosdahl*, Sandra Balda*, Victor Bonaldi*, Shadia Boudreau*, Verónica Cargill*, Shihua Chao*, Thomas L. Claret*, Kabin Chaturvedi*, Jiaoping Deng*, Valeria Di Francesco*, Patrick Dunn*, Karen Elisei*, Carlos Evangelista*, Andrew J. Galloway*, Wanda Gu*, Wenguan Gu*, Guangming Gu*, Hong Gu*, Peng Gu*, Thomas J. Hansen*, Maurice E. Higgins*, Bo-Bu Ji*, Zhong Ke*, Karen A. Ketchum*, Zhongjun Lai*, Yaling Lai*, Sheng Li*, Jie Li*, Yong Liang*, Xiang Li*, Fu Li*, Gerald V. Huetten*, Natalia Hukhria*, Helen H. Huo*, Ashraf Hussain*, W. H. Hui*, Vahideh A. Huseini*, Tamas Husari*, Deborah Husari*, Douglas B. Husari*, Tamas Laskov*, Wei Shan*, Rong Shan*, Jiguo Sun*, Zhen Yuan Wang*, Aihui Wang*, Xin Wang*, Jian Wang*, Hong-Mei Wei*, Eric White*, Claudio Xiao*, Chuan-Yi Yao*, Adam Yao*, Jun Xu*, Peng Zhao*, Weiqing Zhang*, Hong Zhang*, Qi Zhao*, Lianzhong Zhang*, Hai Zhang*, Wenpan Zhang*, Binping C. Shi*, Shuying Shi*, Francisco J. Sison*, Louise Sison*, Lina Sison*, Christine Carter*, Andrei Grevich*, Fraser Woodgate*, Ferris Ali*, Huijin An*, Adenike Ayo*, David Balaban*, Andy Baker*, Perry Barstead*, Ian Barrett*, Karen Beeson*, Dina Berman*, Amy Carver*, Angela Carter*, Ming Lai Cheng*, Li Cui*, Steve Danesh*, Lionel Dawkins*, Raymond Doolittle*, Suzanne Durr*, Kristine Dunham*, Lisa Ellegren*, Steven Eickholt*, Haila Gong*, Andrei Gurevich*, Bill Hart*, Jason Hayes*, Charles Higgins*, Cheryl Hume*, Barbara Hume*, Simon Hume*, James Hunt*, Timothy Hunkeler*, Christopher Johnson*, Jeffery Johnson*, Robert Kahn*, Leroy Kohn*, Robert Kohn*, Amy Kohn*, David Kohn*, David Kohn*, Steven McCarty*, Tina McIntosh*, Jay McMillan*, Hua Mei*, Linda Mei*, Brian Murphy*, Robert Nelson*, Cynthia Peterson*, Eric Petro*, John Peterson*, John Peterson*, Robert Rabinovich*, Fajana Rabinovich*, Deanna Rabinovich*, Bob Rabinovich*, Richard Scott*, Cynthia Sitter*, Nicholas Stransky*, John Stransky*, Renee Strong*, Ellen Tach*, Richard Thomas*, Li Wei*, Sakuya Tan*, Claire Tish*, Gary Wang*, Jeremy Wrenner*, Sherrie Williams*, Francis Williams*, Sandra Wilson*, Emily White*, Karoline Wolf*, Jayne Zou*, Karen Zou*, Joseph F. Aitken*, Andrew Aitken*, Michael J. Campbell*, Emma V. Spillner*, Brian Karkis*, Anita Rajchman*, Tsung-Hsiang Yang*, Kelly Leeper*, Thomas Lutz*, Agnes Henschen*, Karen Henschen*, Amy Henschen*, Hui Guo*, Shihui Kato*, Vincent Rabin*, Sarah Rabin*, Ross Lippert*, Russell Schwartz*, Felix Scharf*, Shihua Scharf*, David Scharf*, Agnes Scharf*, Louis Bick*, Marcella Candelieri*, John Carver*, Eric Clark*, Fannie Ching*, My Egan*, Carl Eubank*, Anne Gustafson*, Mark Gustafson*, Michael Gustafson*, Tina Gu*, John Hargrave*, Carl Foster*, David Gao*, Stephen Glavinski*, Kenneth Glavin*, Anne Glavin*, Mark Glavin*, Ben Glavin*, Barry Glavin*, Michael Harris*, Jeremy Hunt*, Scott Henderson*, Jeffrey Hogen*, Donald Jennings*, Catherine Jordan*, James Jordan*, John Kohn*, David Kohn*, Cheryl Kraft*, Alexander Leberling*, Frank Liang*, Sheng Liang*, John Lopez*, David M. Williams*, William Myers*, Joe McInnis*, Sean Murphy*, Matthew Newman*, Frank Nguyen*, Roger Nguyen*, Peter Nishikawa*, Joe Pan*, Jim Pan*, Michael Peterson*, William Brown*, Robert Smith*, John Smith*, Michael Simpson*, Thomas Smith*, Adam Sargent*, Timothy Stransky*, Richard Stransky*, Ed Venter*, Mei Wang*, Wenguan Wei*, David Wu*, Mitchell Wu*, Andy Xu*, Bill Zou*, Jianzhong Zhu.

1004

15 FEBRUARY 2001 VOL 291 SCIENCE www.sciencemag.org

16 FEBRUARY 2001 VOL 291 SCIENCE



2007 - James Watson, Craig Venter - zveřejnění svého genomu - sekvenace trvala několik měsíců současnost - analýza genomu 50 hodin

RESEARCH ARTICLE

Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

Daniel G. Gibson¹, John I. Glass¹, Carole Lartigue¹, Vladimir N. Noskov¹, Ray-Yuan Chuang¹, Mikkel A. Algire¹, Gwynedd A. Benders², Michael G. Montague¹, Li Ma¹, Monzia M. Moodie¹, Chuck Merryman¹, Sanjay Vashee¹, Radha Krishnakumar¹, Nacyra Assad-Garcia¹, Cynthia Andrews-Pfannkoch¹, Evgeniya A. Denisova¹, Lei Young¹, Zhi-Qing Qi¹, Thomas H. Segall-Shapiro¹, Christopher H. Calvey¹, Prashanth P. Parmar¹, Clyde A. Hutchison III², Hamilton O. Smith², J. Craig Venter^{1,2,*}

+ Author Affiliations

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: jcventer@jcv.org

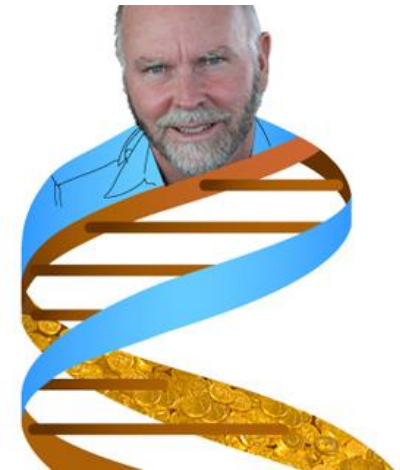
Science 02 Jul 2010:
Vol. 329, Issue 5987, pp. 52-56
DOI: 10.1126/science.1190719



Mycoplasma mycoides → *Mycoplasma capricolum*



Synthia



Design and synthesis of a minimal bacterial genome

Clyde A. Hutchison III^{1,*†}, Ray-Yuan Chuang^{1,†‡}, Vladimir N. Noskov¹, Nacyra Assad-Garcia¹, Thomas J. Deerinck², Mark H. Ellisman², John Gill³, Krishna Kannan³, Bogumil J. Karas¹, Li Ma¹, James F. Pelletier^{4,§}, Zhi-Qing Qi³, R. Alexander Richter¹, Elizabeth A. Strychalski⁴, Lijie Sun^{1,||}, Yo Suzuki¹, Billyana Tsvetanova³, Kim S. Wise¹, Hamilton O. Smith^{1,3}, John I. Glass¹, Chuck Merryman¹, Daniel G. Gibson^{1,3}, J. Craig Venter^{1,3,*}

+ Author Affiliations

*Corresponding author. E-mail: chutchis@jcvj.org (C.A.H.); jcventer@jcvj.org (J.C.V.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ Present address: American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, USA.

§ Present address: Center for Bits and Atoms, Massachusetts Institute of Technology, Room E15-401, 20 Ames Street, Cambridge, MA 02139, USA.

|| Present address: CBRITE, 11575 Sorrento Valley Road, Suite 204, San Diego, CA 92121, USA.

Science 25 Mar 2016:
Vol. 351, Issue 6280,
DOI: 10.1126/science.aad6253



Peer Reviewed
← see details

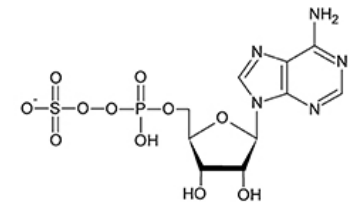
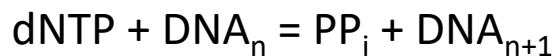
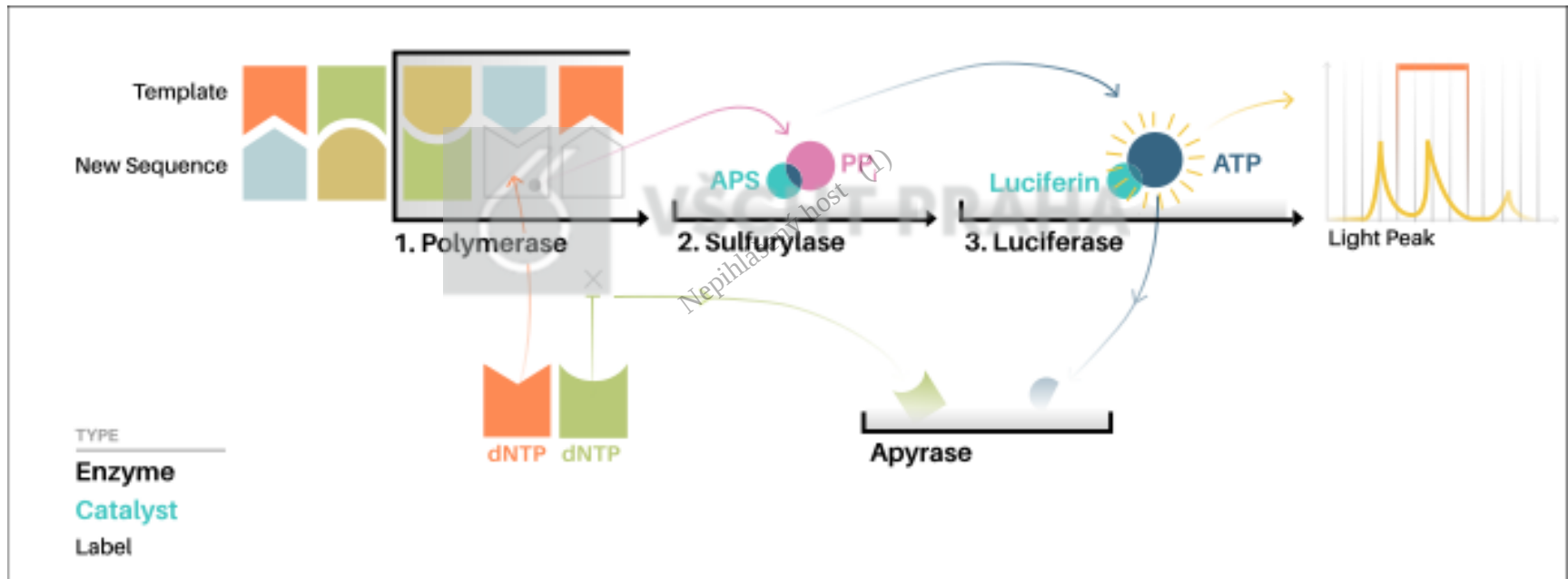


zastavili se na: 531 kbp ~ 473 genů (149 s neznámou funkcí)

Next-generation DNA sequencing (NGC)

Pyrosekvenování - „pyrosequencing“

- Sekvenování v průběhu syntézy komplementárního vlákna
- Postupně se přidávají nukleotid trifosfáty a sleduje se, který nukleotid se naváže.



Adenosine 5'-phosphosulfate

Next-generation DNA sequencing

Sekvenace syntézou - Illumina Sequencing



<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>

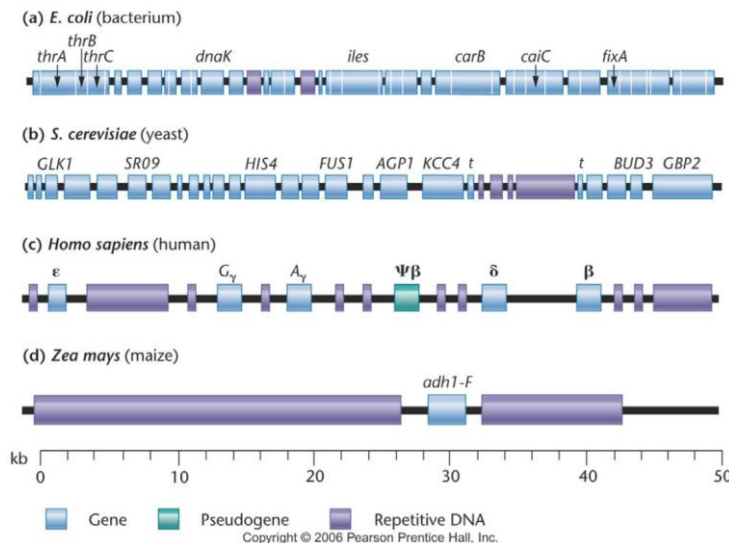
Srovnání genomů prokaryot/eukaryot

Prokaryota:

- Malé, kompaktní genomy, téměř samé geny
- Vyjímečně introny (*Salmonella typhimurium*)
- Translace přímo navazuje na transkripci
- 1 replikační počátek/genom
- Haploidní genom

Eukaryota:

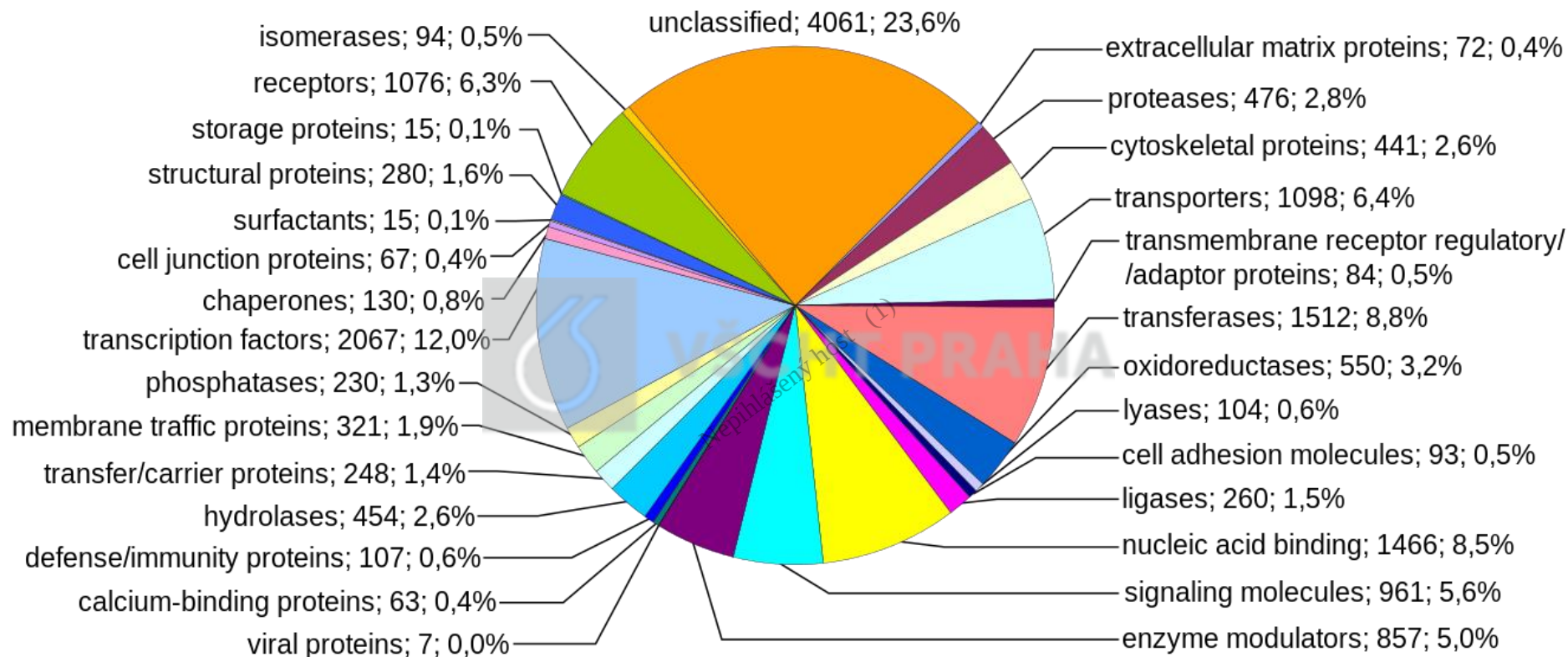
- Větší genomy, nižší hustota genů (klastry genů a genové pouště)
- Velké procento genu tvoří introny (kombinace exonů, rekombinace, snížení rizika mutací)
- Více replikačních počátků/genom
- Diploidní/polyploidní genom



Velikost genomu

Organismus	Velikost (bp)
bakteriofág MS2	3 569
bakteriofág ΦX-174	5 386
bakterie <i>Haemophilus influenzae</i>	1,83 .10 ⁶
kvasinka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12,1 .10 ⁶
hlístice <i>Caenorhabditis elegans</i>	98 .10 ⁶
rostlina <i>Arabidopsis thaliana</i>	157 .10 ⁶
člověk <i>Homo sapiens sapiens</i>	3 200 .10 ⁶
Polychaos dubium sladkovodní měňavka	670 000.10⁶

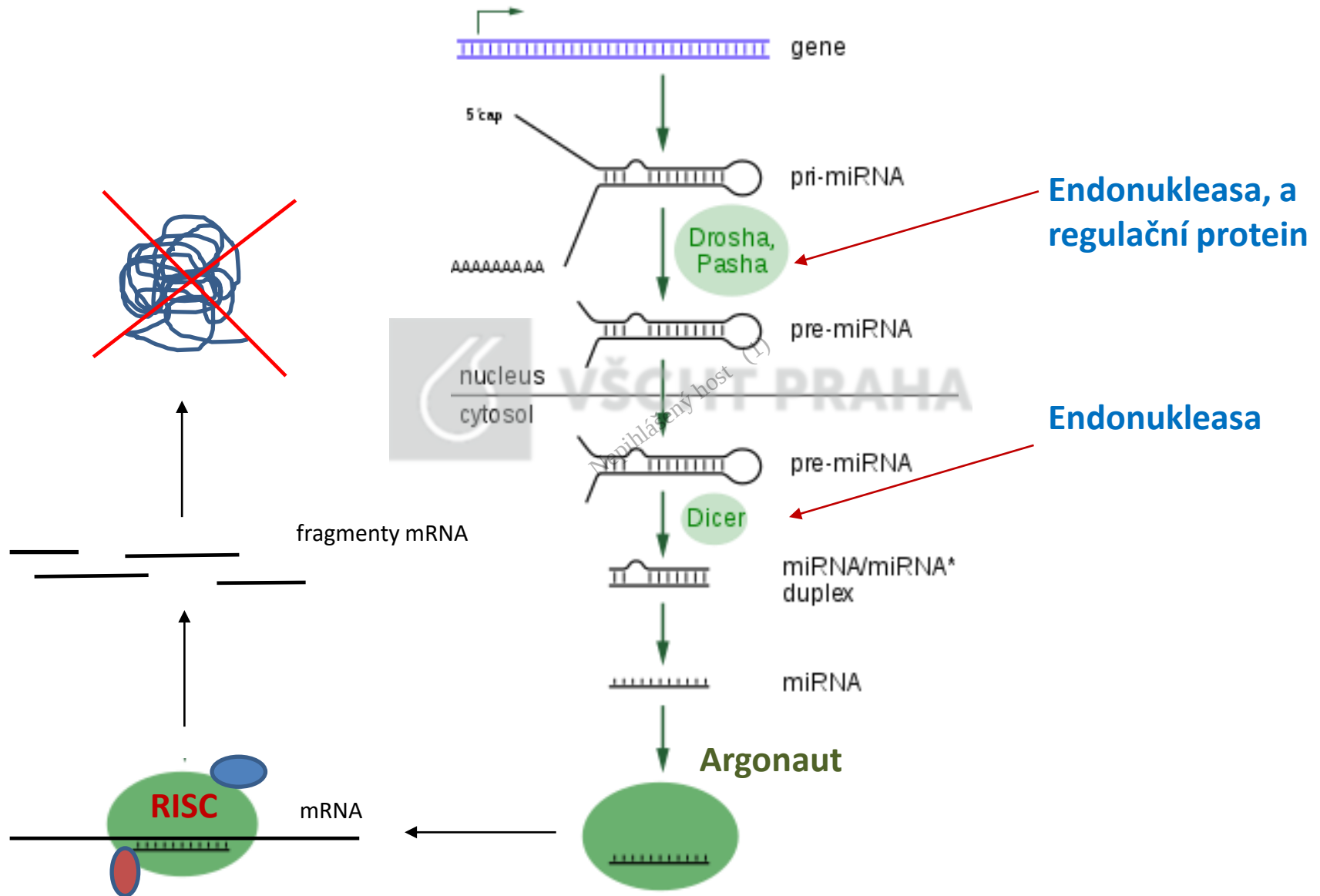
Lidský genom – cca 20–25 tisíc genů (1,5% genomu kóduje proteiny)



DNA nekódující proteiny

- tRNA a rRNA
- regulační elementy v DNA (promotory, trans-elementy)
- repetitivní DNA (např. mikrosatelity tvořící centromery), transpozony a virové elementy
- pseudogeny - nefunkční geny, poškozené
- telomery chránící konce chromozomů
- regulační RNA (miRNA - RNA interferenci)
 - reguluje až 30 % všech genů

RNA interference



RISC = RNA-induced silencing complex



https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1_ELE

Co nám přináší znalost lidského genomu?

- ☐ poznání sama sebe

evoluce: od šimpanze se lišíme jen 1,5 % - 4 %,

rozdíly mezi rasami nejsou statisticky významné (ale přesto jsou)

- ☐ genetické poradenství (identifikace vadných recesivních genů)
- ☐ 2% lidských onemocnění je způsobeno mutacemi přímo (tzv. silné geny), další (alergie, srdeční onemocnění, většina nádorů) - kombinace slabých genů a vnějších vlivů
- ☐ cílená terapie (odhad citlivosti vůči určitému typu chemoterapie)
- ☐ identifikace jedince (kriminalistika, paternitní spory, výběr vhodných dárců orgánů)

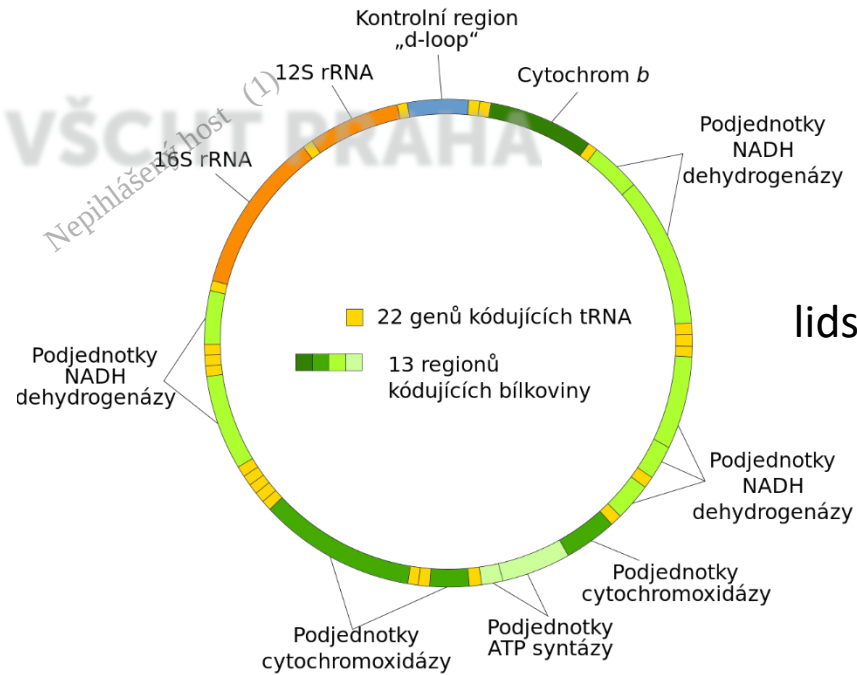
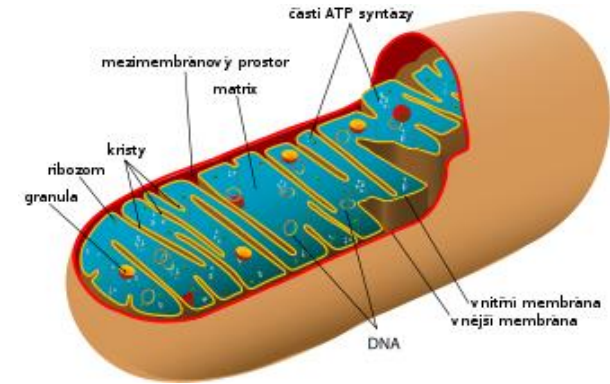
Etické problémy:

- Kyperští Řekové: k žádosti o sňatek předložit potvrzení o testu na β -talasemii
- arabští beduini - přítomnost recesivního genu pro leucínosu → ženy se nevďají
- UNESCO: Všeobecnou deklaraci o lidském genomu a lidských právech (1997)
 - nikdo nesmí být diskriminován kvůli svému genotypu
 - nikdo nesmí být proti své vůli testován
 - práva jednotlivce jsou prvotní
 - bez jeho souhlasu příbuzní ani společnost nemají právo znát výsledky genetických testů, ani je po něm nemohou vyžadovat

Mitochondriální DNA

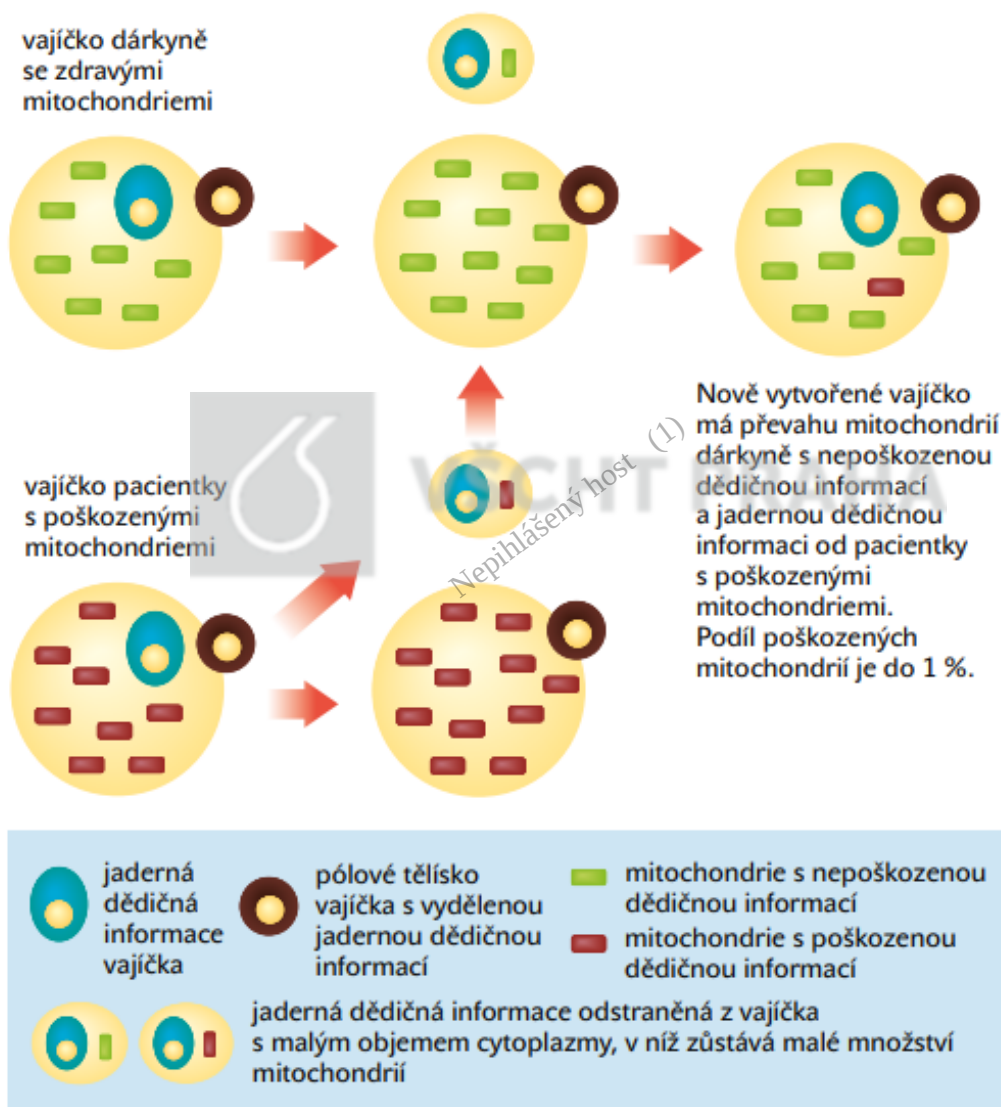
mtDNA

- každá mitochondrie několik kopií mtDNA (až tisíce)
- lidská mtDNA 16 569 bp
 - 37 genů
 - 13 proteinů
 - rRNA, tRNA
 - 4 jiné kodóny



lidská mtDNA

Děti tří rodičů



Healthy mice with two mothers have been born for the first time in a study that pushes the boundaries of reproductive science.

Mice with two fathers were also born, but only survived a couple of days, the Chinese team behind the work reported. There is no imminent prospect of the techniques being used clinically in people, but the findings demonstrate that the biological barriers to same-sex reproduction can, technically, be overcome.



„Genomický imprinting“

pouze maternální nebo paternální alela daného genu je exprimována, kdežto druhá je utlumena.

Cell Stem Cell
Previews



Mice from Same-Sex Parents: CRISPRing Out the Barriers for Unisexual Reproduction

Ido Sagi,^{1,2} Shiran Bar,^{1,2} and Nissim Benvenisty^{1,*}

¹The Azrieli Center for Stem Cells and Genetic Research, Department of Genetics, Silberman Institute of Life Sciences, The Hebrew University, Jerusalem 91904, Israel

²These authors contributed equally

*Correspondence: nissimb@mail.huji.ac.il

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.012>

Genomic imprinting results in the molecular and functional inequality of maternal and paternal alleles, precluding mammalian unisexual development. In this issue of *Cell Stem Cell*, Li et al. (2018) employ sophisticated manipulations of gametes and engineered haploid embryonic stem cells to successfully generate both all-maternal and all-paternal mice, effectively overcoming the roadblocks of imprinting.