

# Genom psa



2,8 miliard bp , 19 000 genů, 38 párů chromosomů, identifikováno 127 000 polymorfismů

Genetická variace mezi plemeny psů 27,5 %, u člověka 5,4 %

Gen pro: myostatin, HAS2 - hyaluronan synthasa, inzulinový růstový faktor-1, .....

U psa je fyzický vzhled řízen jen malým počtem genů – asi 2 %.

- ☐ dominantní geny - krátká černá srst, povislé ucho, kubický tvar hlavy
- ☐ recesivní geny - dlouhá srst, vzpřímené ucho, pálení

CaniLine zjišťuje 1877 znaků v genomu psa. Tyto znaky jsou pak srovnány s databází více než 200 různých plemen psů, obsahujících přes 12 000 vzorků.

Seznam ras - celkem pro 273 různých ras. [Zobrazit všechny rasy](#)

Obvyklá doba vyšetření: 25 pracovních dnů

Cena za 1 test: 2700 Kč s DPH

[CZK / EUR / USD](#)

[Objednat vyšetření](#)

<https://www.americanscientist.org/article/genetics-and-the-shape-of-dogs>



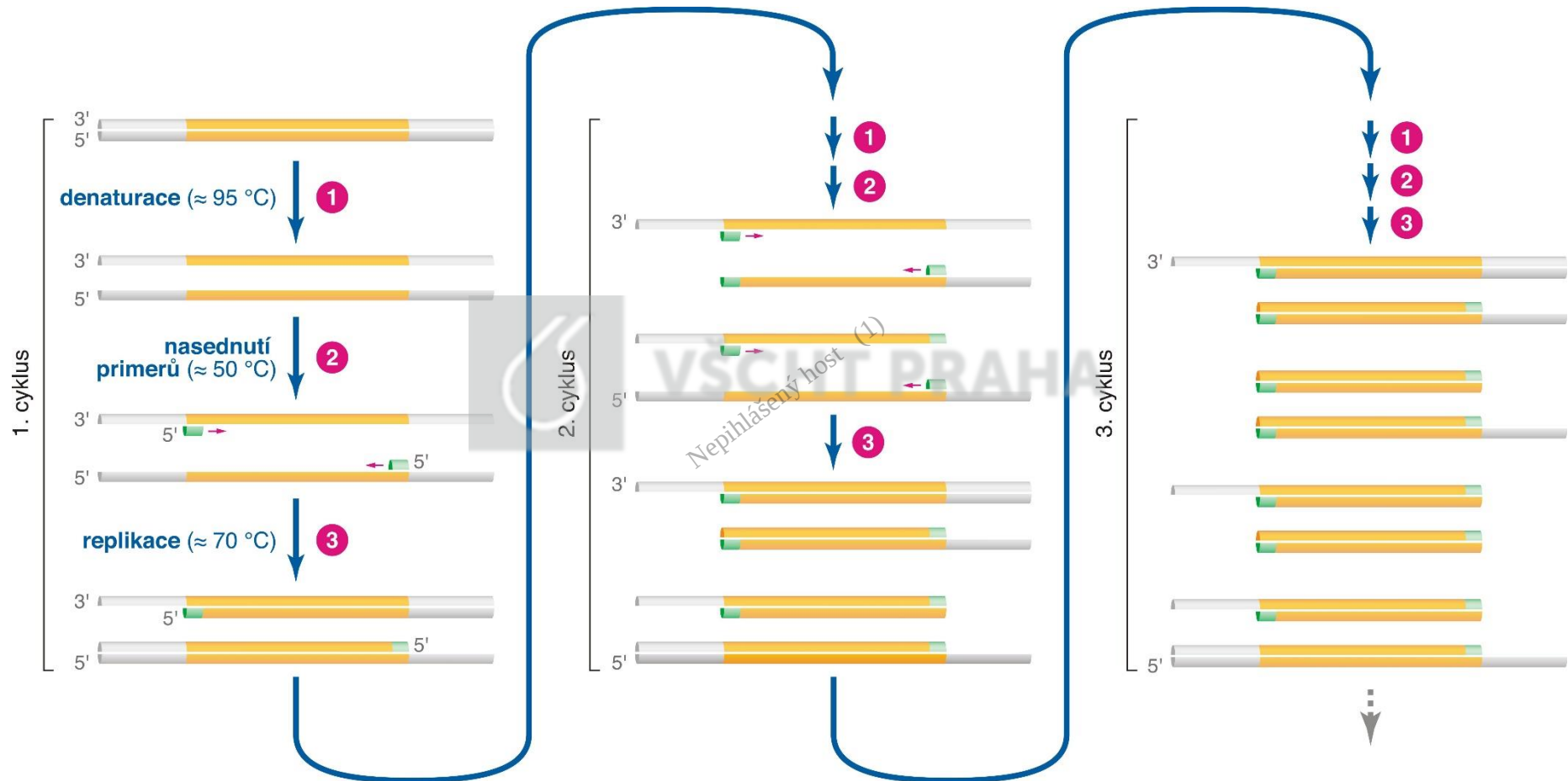
# Náhled do genového inženýrství II



VŠCHT PRAHA

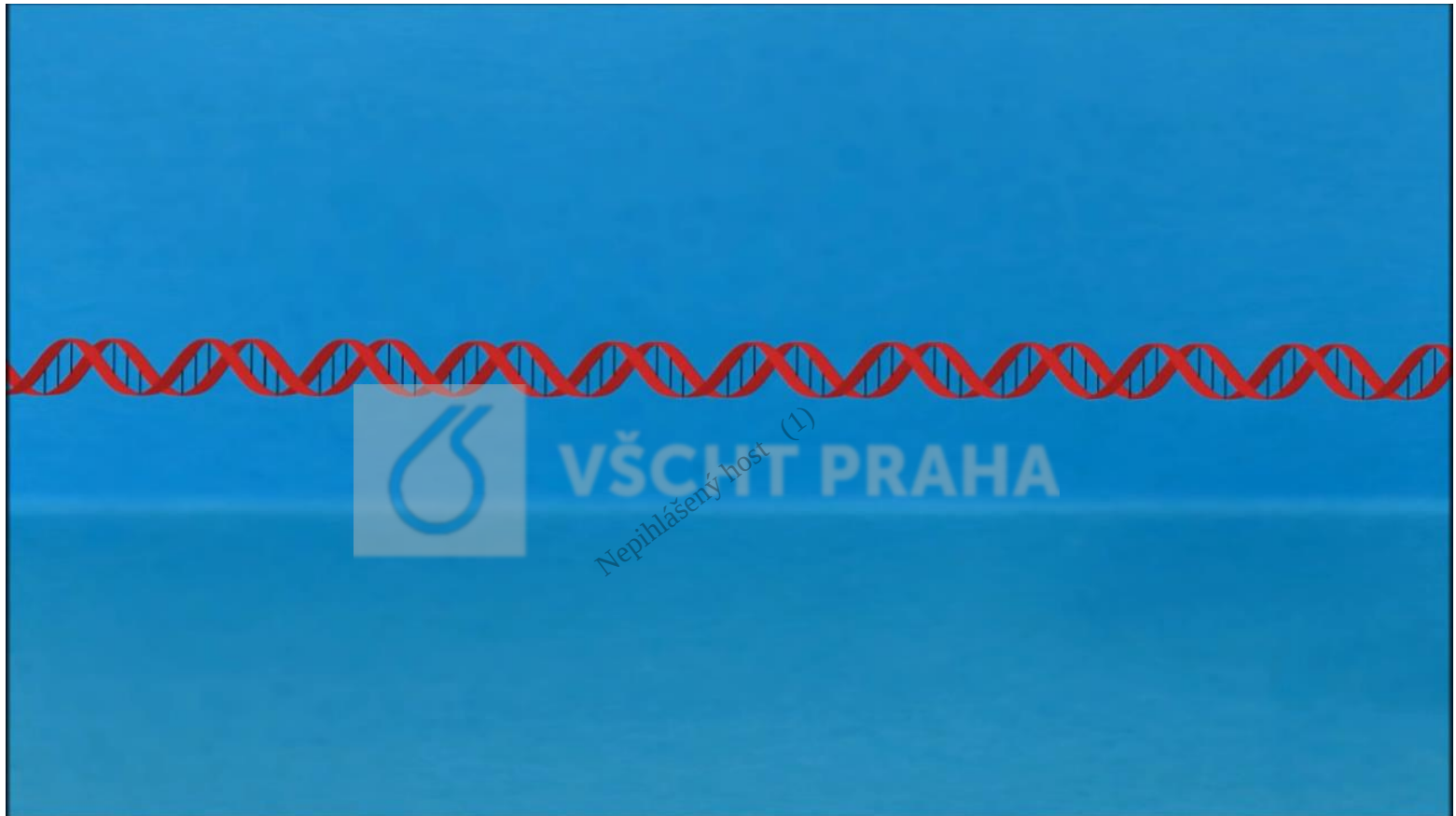
Nepřihlášený host (1)

# Polymerasová řetězová reakce - PCR



**Co dát do zkumavky?**

templát + primery + dNTP + polymerasu (+ difosfatasu)



# K čemu slouží PCR?

- Namnožení konkrétního úseku DNA pro další biotechnologické metody, jako je:
  - Klonování
- Identifikace organismů rDNA (rRNA)
- Vnášení mutací do genů
- Diagnostika infekčních nemocí
- Identifikace dědičných chorob
- Jednoznačná identifikace osob - **Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)**
- Analýza genové exprese (RT-PCR, qPCR)

# Ribosomální RNA

Prokaryotická rRNA – 70S  
(S-Svedberg)

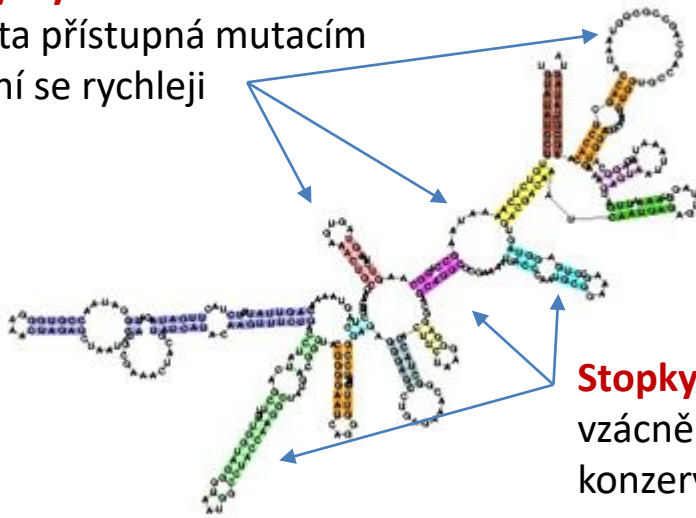
- velká podjednotka 50S — 5S + 23S
- malá podjednotka 30S — **16S** + proteiny

Eukaryotická rRNA – 80S

- velká podjednotka 60S — 5S + 5,8S + 28S + proteiny
- malá podjednotka 40S — **18S** + proteiny

## Smyčky

místa přístupná mutacím  
mění se rychleji



## Stopky

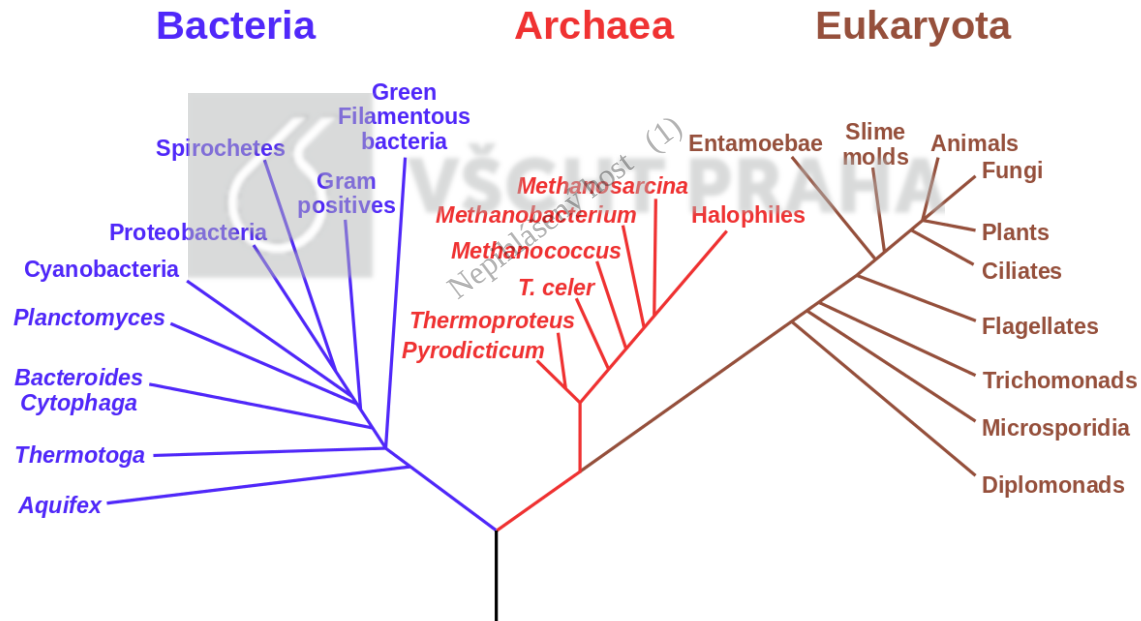
vzácně mutovaná místa  
konzervovaná



- PCR
- sekvenace
- porovnání s databází

# Fylogenetický strom života

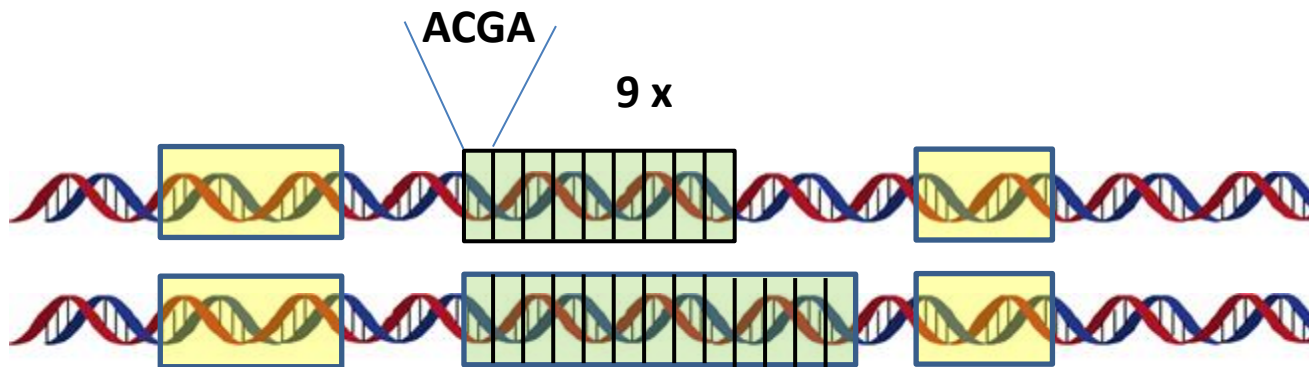
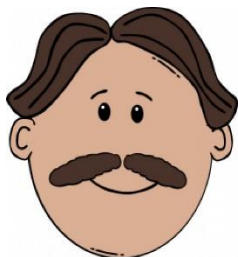
## Phylogenetic Tree of Life



# K čemu slouží PCR?

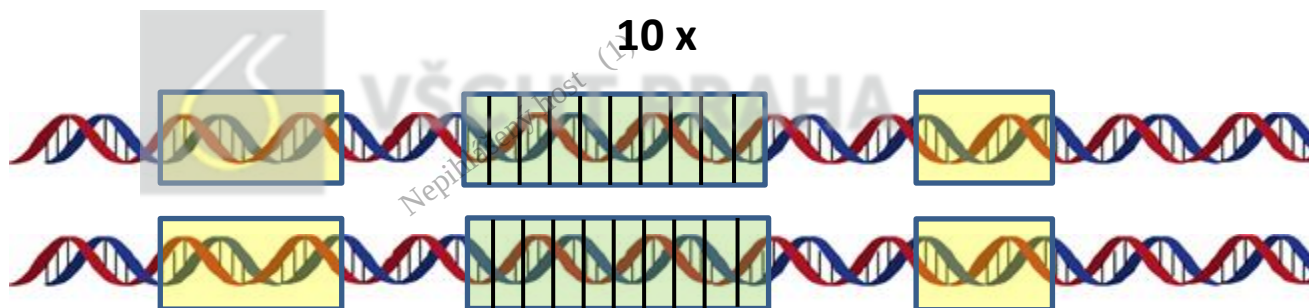
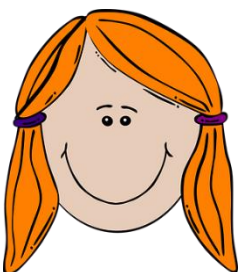
- Namnožení konkrétního úseku DNA pro další biotechnologické metody, jako je:
  - Klonování
- Identifikace organismů rDNA (rRNA)
- Vnášení mutací do genů
- Diagnostika infekčních nemocí
- Identifikace dědičných chorob
- Jednoznačná identifikace osob
- Analýza transkripce genů (RT-PCR, qPCR)

# STR (short tandem repeat) - identifikace osob

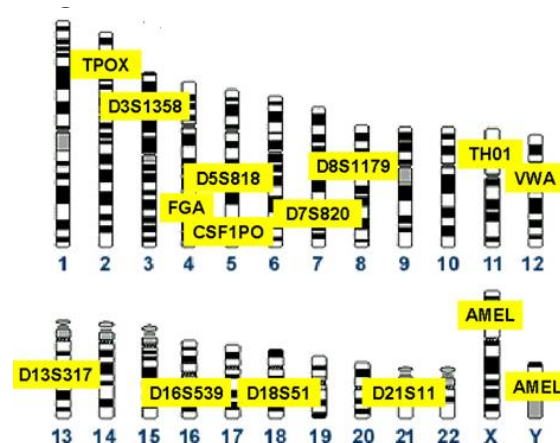
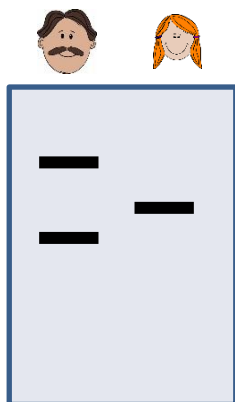


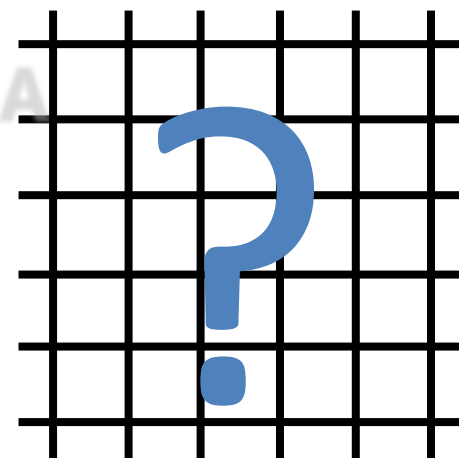
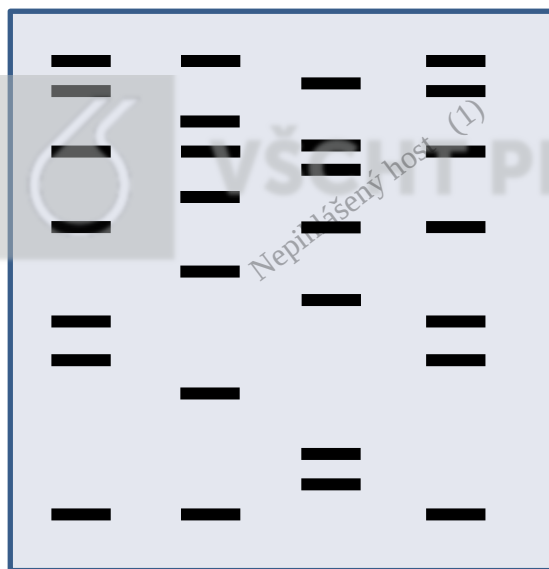
13 x

10 x



PCR





# Věznice Světlá nad Sázavou

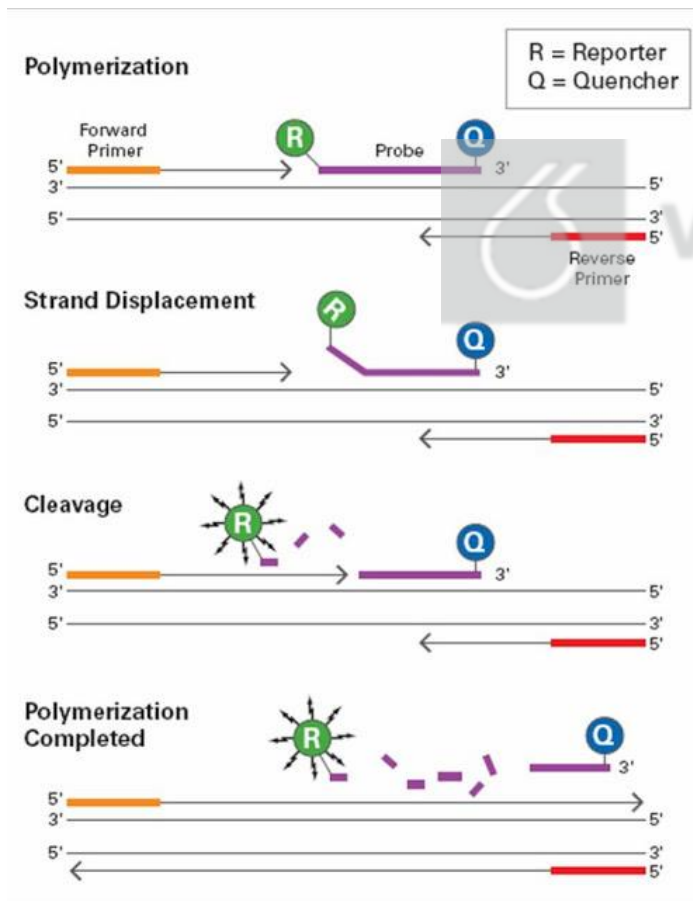
# K čemu slouží PCR?

- Namnožení konkrétního úseku DNA pro další biotechnologické metody, jako je:
  - Klonování
- Identifikace organismů rDNA (rRNA)
- Vnášení mutací do genů
- Diagnostika infekčních nemocí
- Identifikace dědičných chorob
- Jednoznačná identifikace osob
- **Kvantifikace DNA (RT-PCR, qPCR)** - analýza transkripce genů

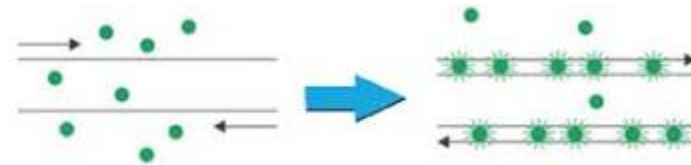
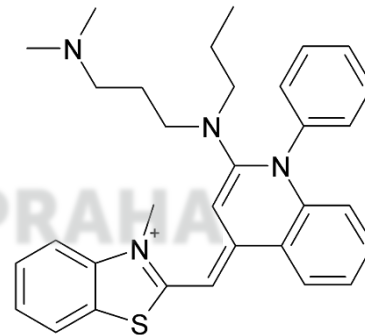
# Kvantifikace DNA

- qPCR – kvantitativní PCR

## TaqMan sonda

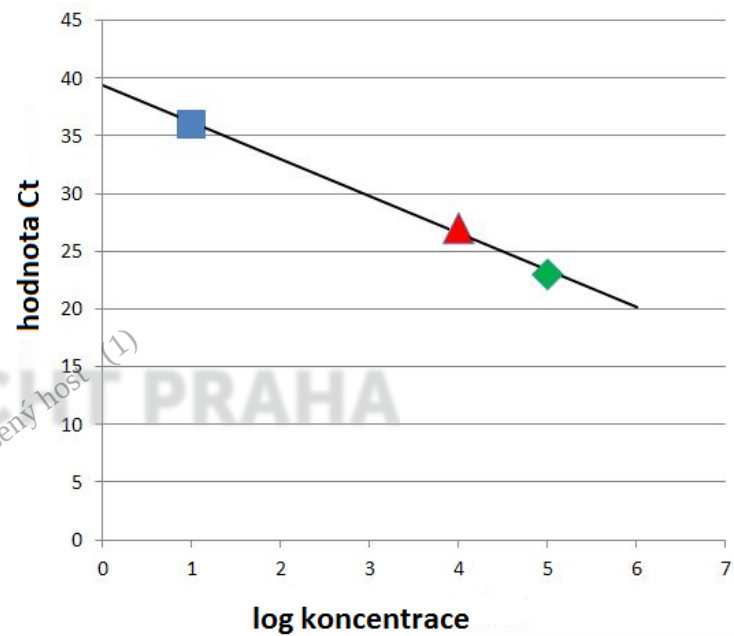
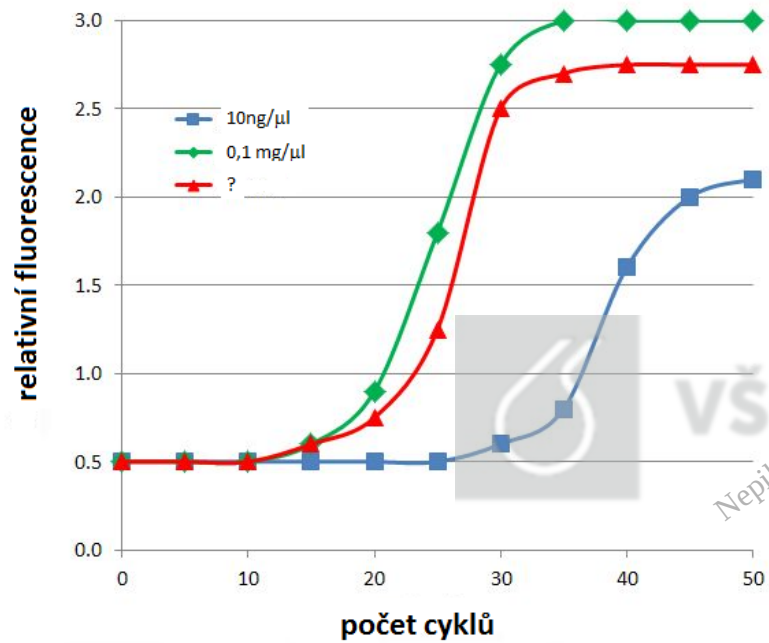


## Syber Green, Eva green, ...

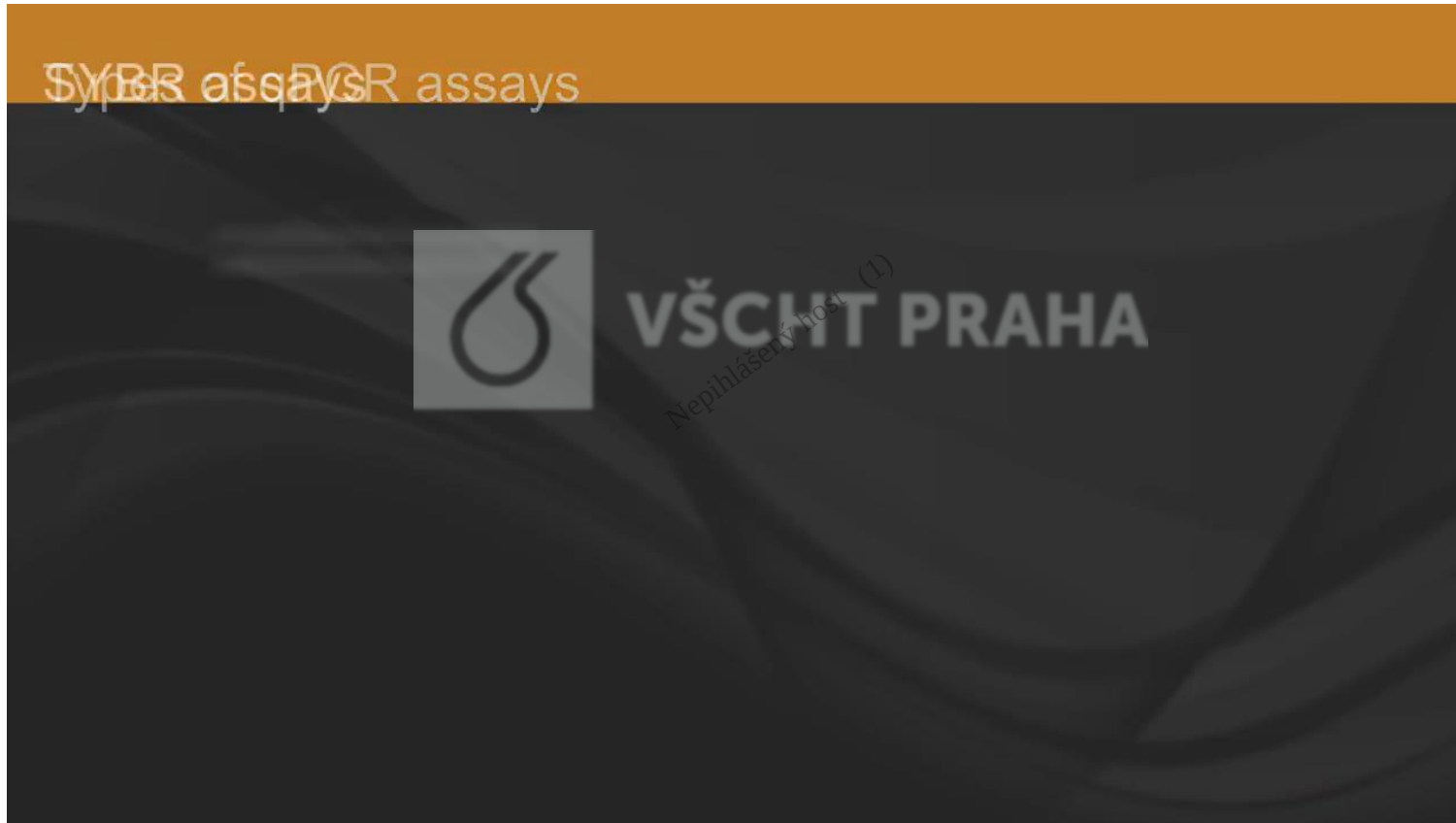


v roztoku:  
malá fluorescence

po vazbě:  
silná fluorescence



- **qPCR – kvantitativní PCR**



# Analýza transkripce genů

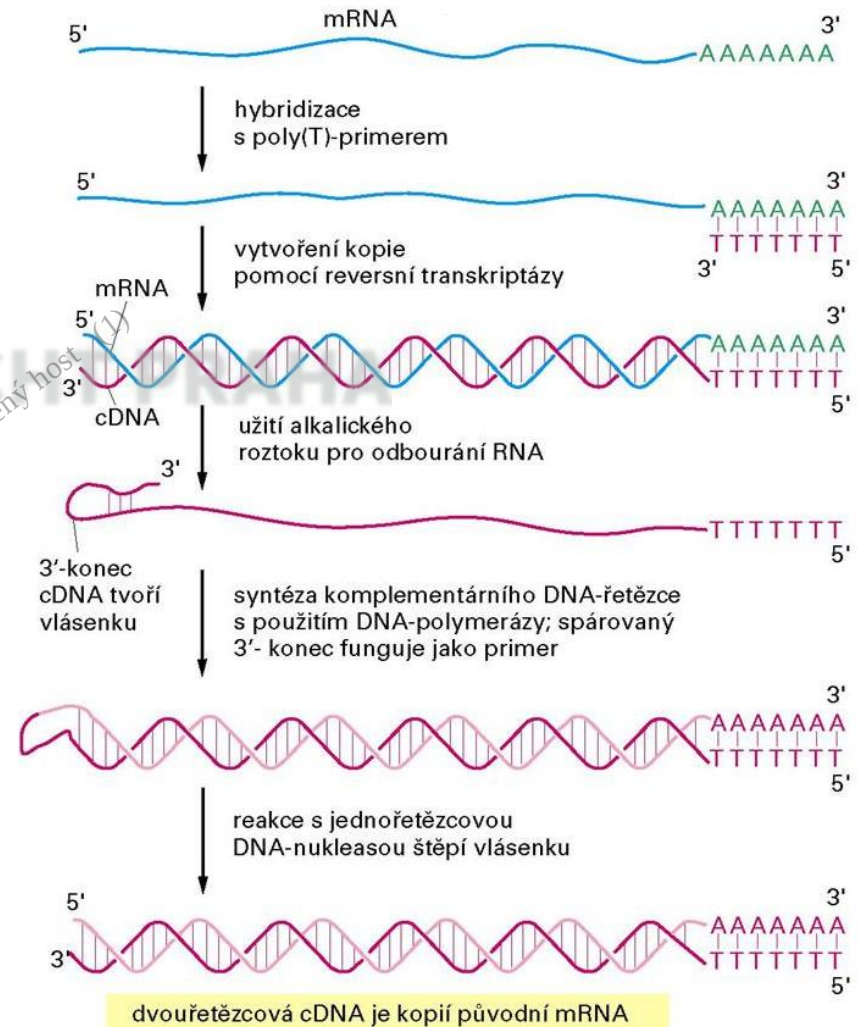
## Reversní transkripce

Přepis RNA do DNA (cDNA)

- Reversní transkriptasa



shutterstock.com • 258247925



# PCR detekce SARS-CoV-2

ARTICLE

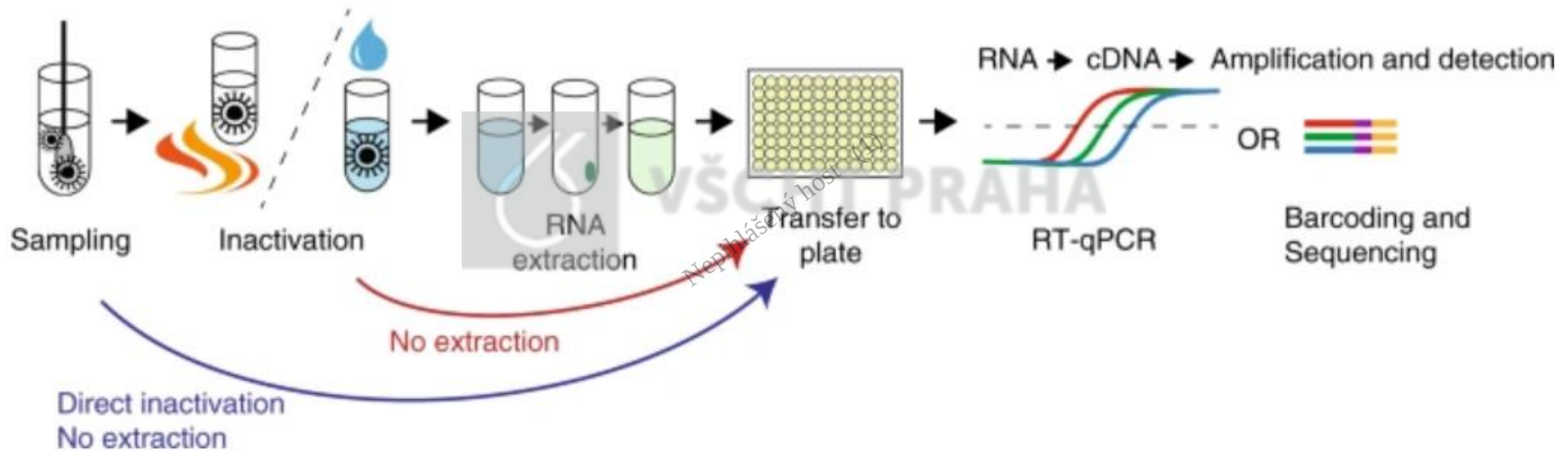
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>

OPEN

Check for updates

Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR

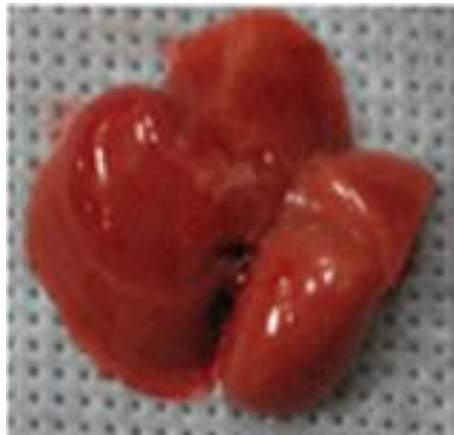
Ioanna Smyraki<sup>1,5</sup>, Martin Ekman<sup>2,5</sup>, Antonio Lentini<sup>1</sup>, Nuno Rufino de Sousa<sup>3</sup>, Natali Papanicolaou<sup>1</sup>, Martin Vondracek<sup>2</sup>, Johan Aarum<sup>2</sup>, Hamzah Safari<sup>2</sup>, Shaman Muradrasoli<sup>4</sup>, Antonio Gigliotti Rothfuchs<sup>3</sup>, Jan Albert<sup>2,3</sup>, Björn Högberg<sup>1</sup> & Björn Reinius<sup>1,2</sup>



Geny kódující: RNA-dependentní RNA polymerasu, obalový protein a nucleocapsid

# Analýza transkripce genů

- Využití metody „microarray“ pro určení profilu exprimovaných genů



isolace RNA  
ze zdravé tkáně

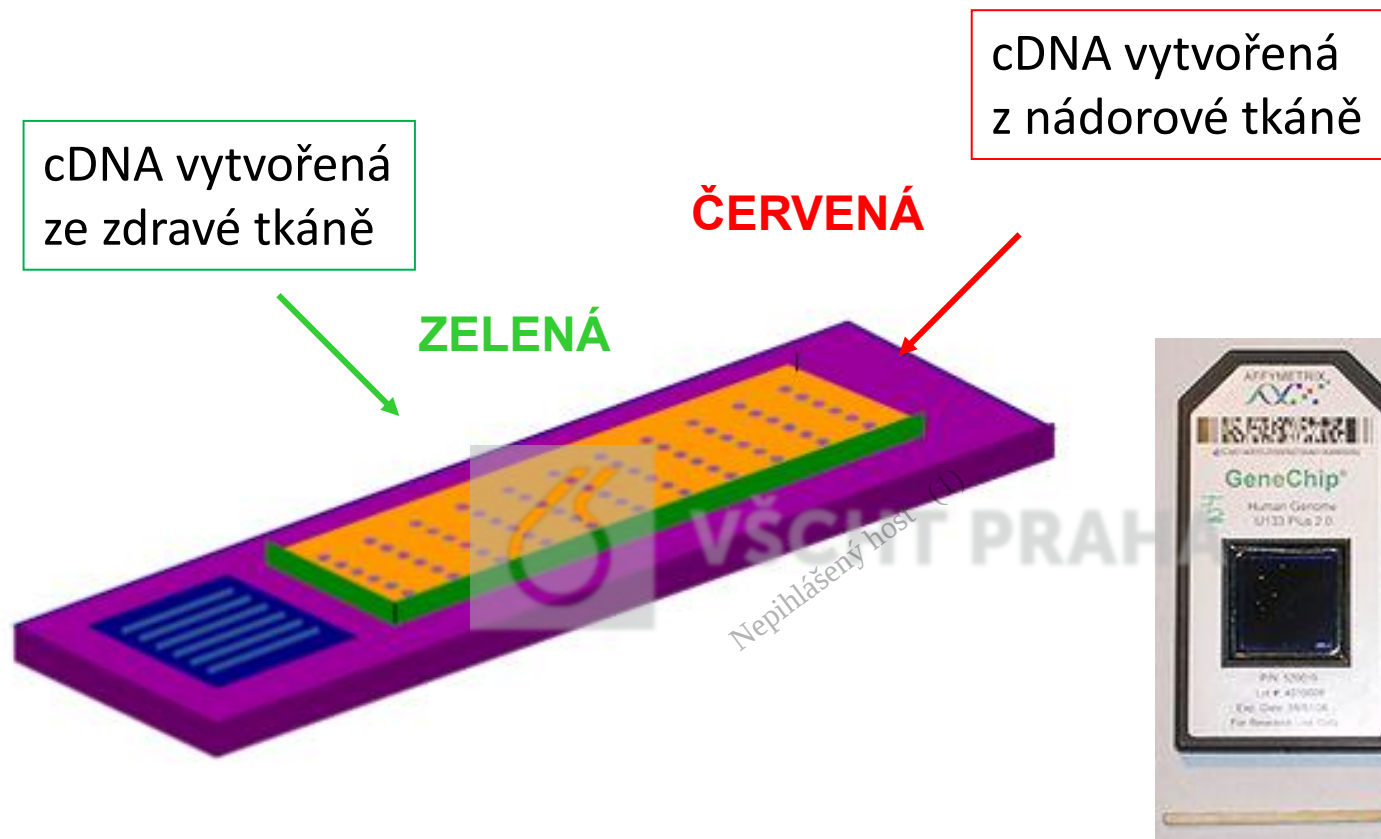
Příprava fluorescenčně  
značené cDNA  
(**ZELENÁ**)



isolace RNA  
z nádoru

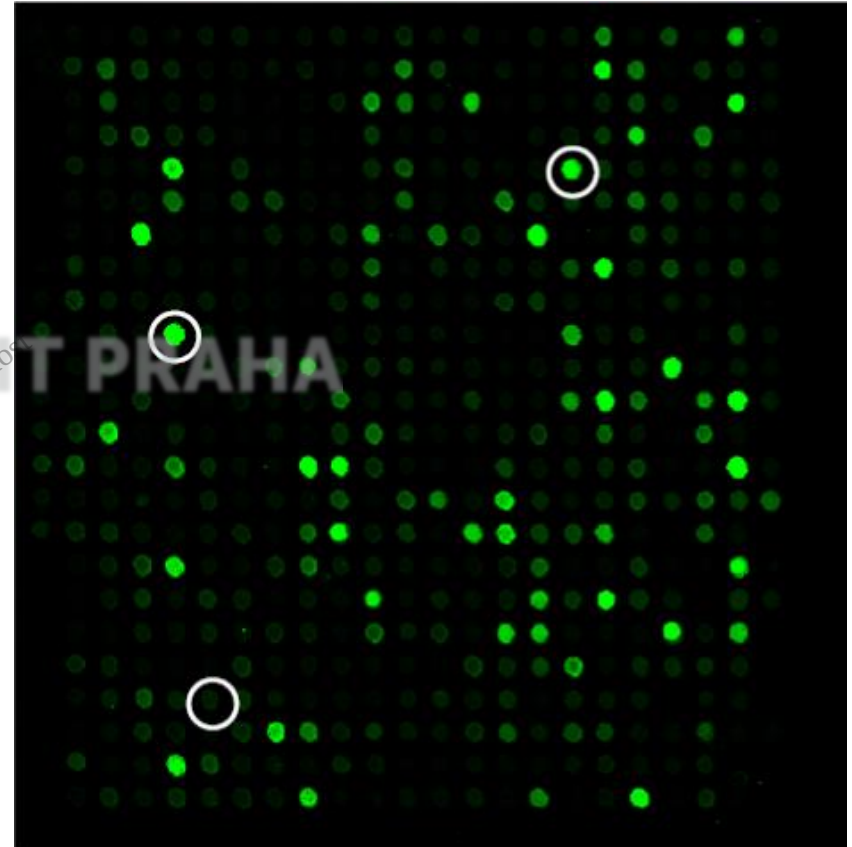
Příprava fluorescenčně  
značené cDNA  
(**ČERVENÁ**)





- smíchání fluorescenčně značené cDNA z obou tkání
- aplikace na destičku s imobilizovanou DNA

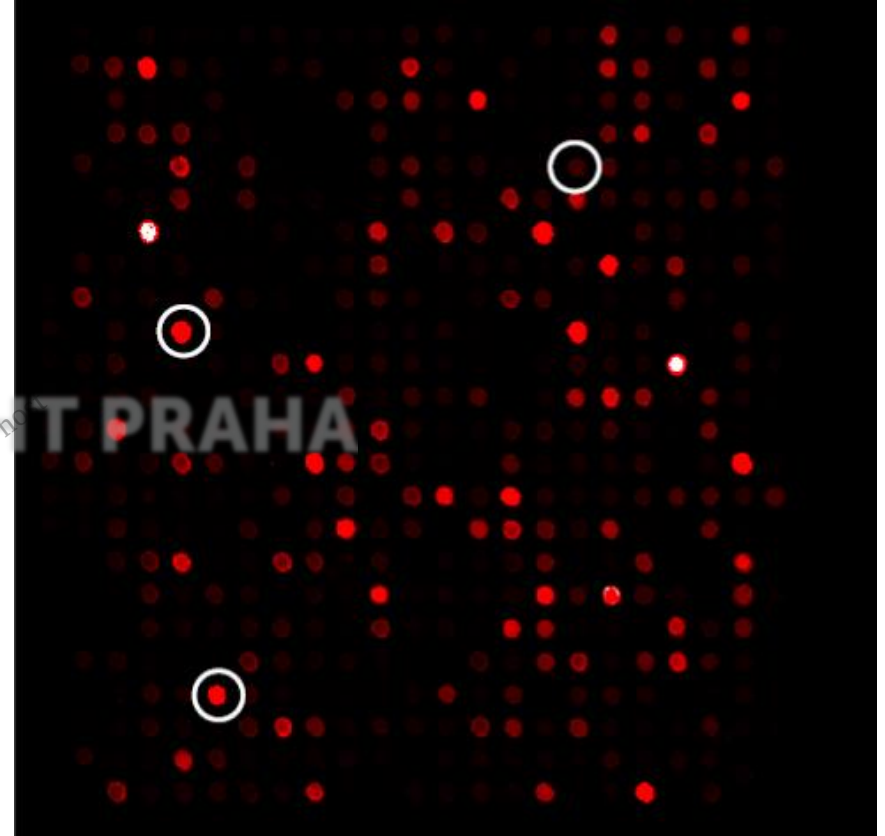
- zdravá tkáň značená zelenou fluorescenční barvou
- intensita zelené barvy spotu (tečky) odpovídá hladině exprese daného genu
  - ➡ intenzivně zelené spoty – silná exprese genu
  - ➡ slabě zelené spoty - slabá exprese genu



- nádorová tkáň značená červenou fluorescenční barvou
- intenzita červené barvy spotu (tečky) odpovídá hladině exprese daného genu

➡ intenzivně červené spoty – silná exprese genu

➡ slabě červené spoty - slabá exprese genu

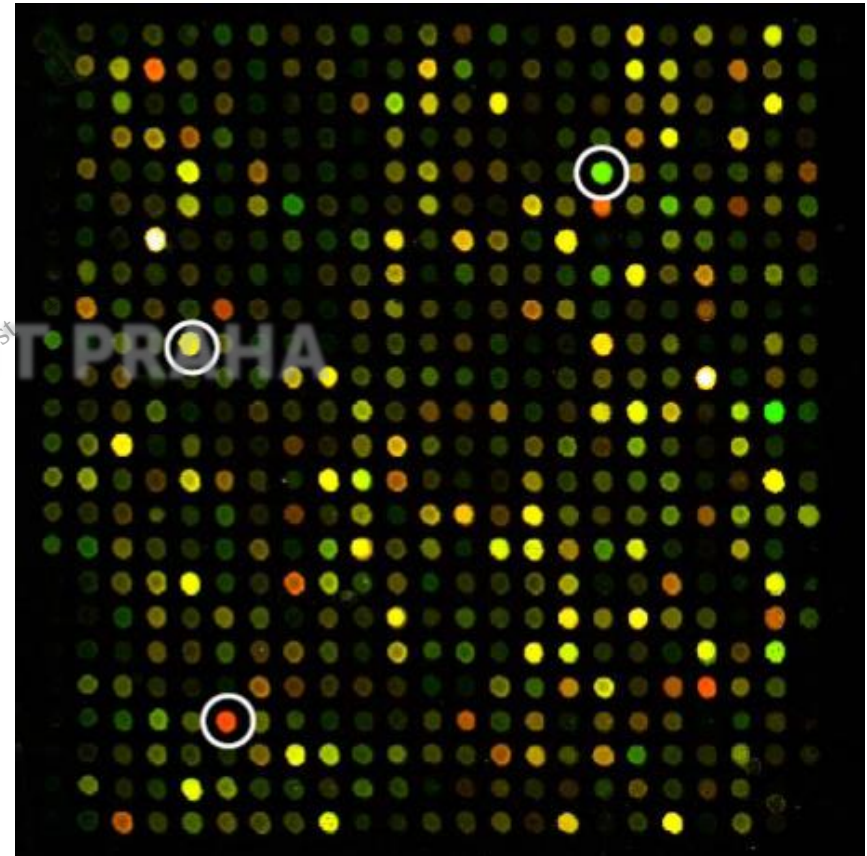


překryv zelených a červených dat stejné destičky – rozdílná exprese genu

**ZELENÁ** – geny přepisované ve  
zdravých buňkách

**ČERVENÁ** - geny přepisované v  
nádorových buňkách

**ŽLUTÁ** - geny přepisované v obou  
typech buněk



# - OMIKY



## GENOMIKA

- vědní obor, který se zabývá studiem genomů organismů. Spadá sem především získávání sekvencí DNA organismů, genetické mapování a anotace genomů.

## TRANSKRIPTOMIKA

- vědní obor, který se zabývá sledováním exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi na úrovni transkripce (za různých podmínek, v různých stádiích vývoje, v různých orgánech, ...)

## PROTEOMIKA

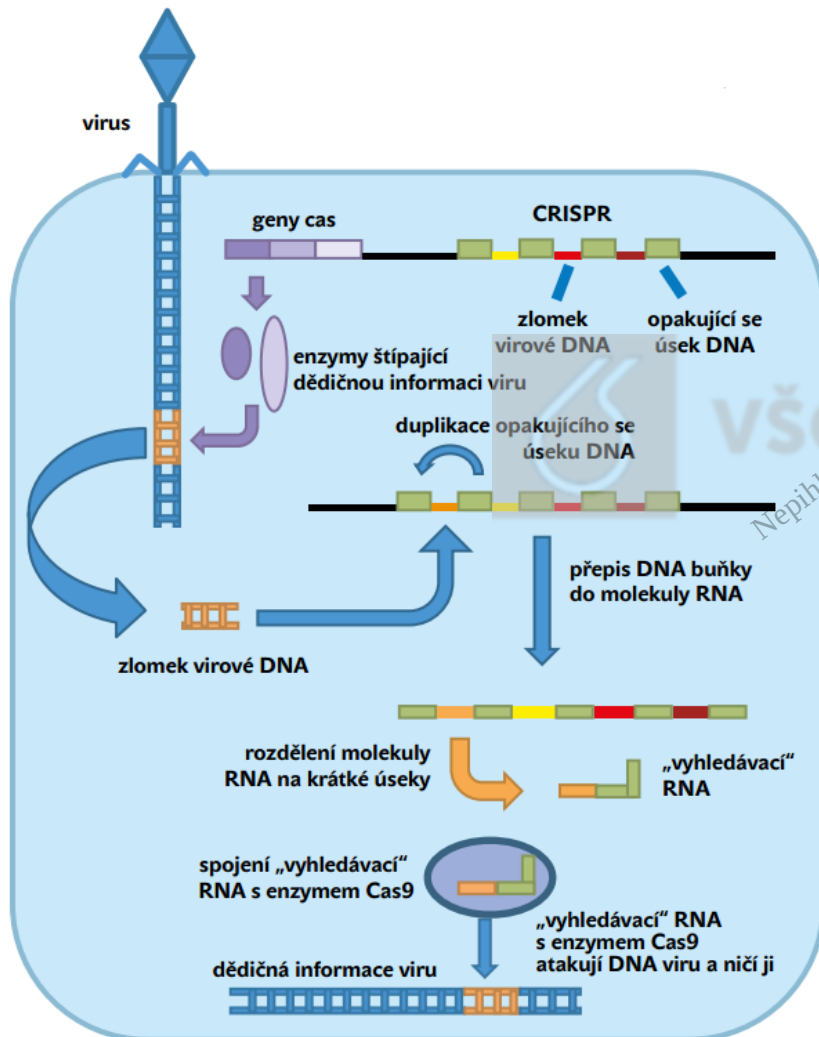
- vědní obor zabývající se studiem proteomu - soubor všech proteinů ve všech formách, které se v organismu nacházejí v daném okamžiku
- dvojrozměrná elektroforesa, hmotnostní spektrometrie (MALDI – TOF, ESI-Q-TOF)

## METABOLOMIKA

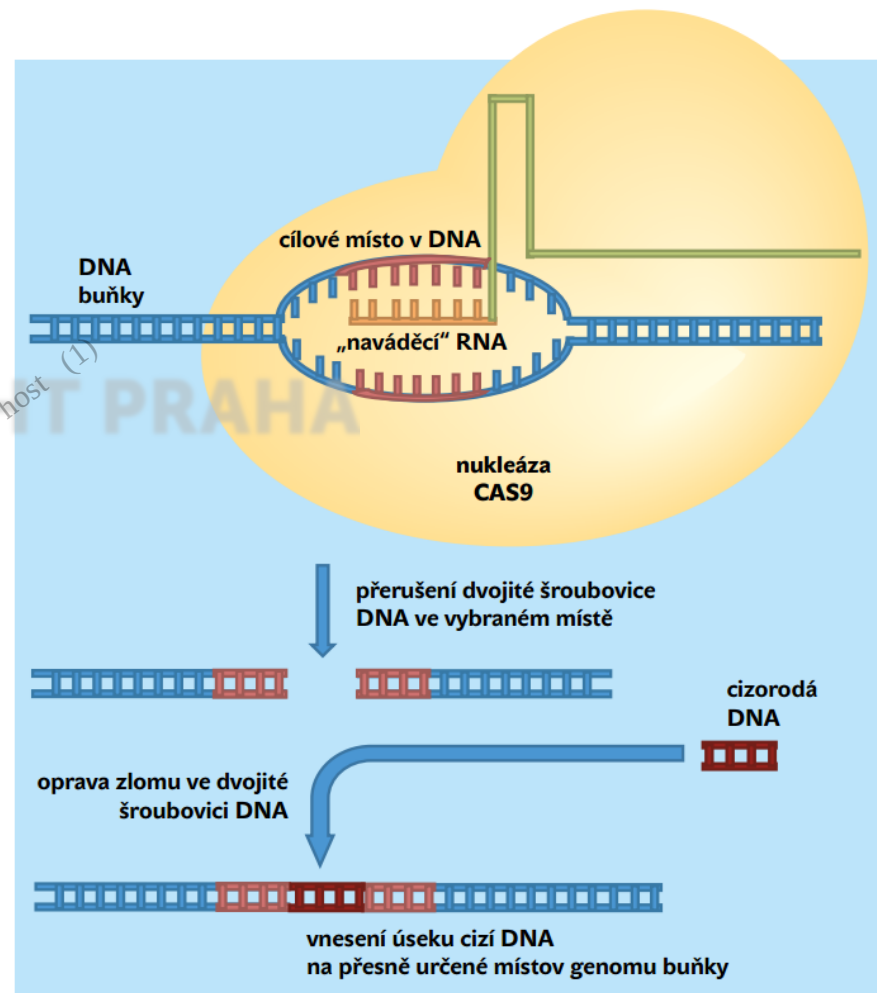
- vědní disciplína zaměřená na studium metabolomu - kompletní soubor nízkomolekulárních látek, přítomných v buňce či biologickém systému v daném čase (Fiehn, 2002)

# CRISPR-Cas9 - narušení vybraných genů

Imunitní systém bakterií a archeí



Jak pracuje systém CRISPR-Cas9





## DIY Bacterial Gene Engineering CRISPR Kit



\$159.00

Shipping: Calculated at checkout



★★★★★ 7 product reviews

Quantity:

1

Add To Cart

Add to Wishlist

### Product Description

There is currently ~1 week time till shipment.

Due to the overwhelming number of emails we will not respond to emails asking when your item will be shipped. Understand we are doing our best to get it to you.

Comes with an example experiment that teaches you many molecular biology and gene engineering techniques.

Want to really know what this whole CRISPR thing is about? Why it could revolutionize genetic engineering? This kit includes everything you need to make precision genome edits in bacteria at home including Cas9, tracrRNA, crRNA and Template DNA template for an example experiment.

Includes example experiment to make a genome mutation(K43T) to the rpsL gene changing the 43rd amino acid, a Lysine(K) to a Threonine(T) thereby allowing the bacteria to survive on Strep media which would normal prevent its growth.

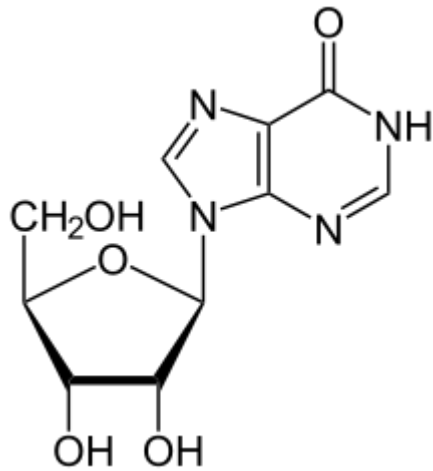
Kit contains enough materials for around 5 experiments or more

- LB Agar
- LB Strep/Kan/Arabinose Agar
- Glass bottle for pouring plates
- Non-pathogenic E. coli bacteria
- Inoculation Loops/Plate Spreader
- 10-100uL variable volume adjustable pipette(1uL increments)
- Box of 96 Pipette Tips
- 14 Petri Plates
- Microcentrifuge tube rack
- Nitrile Gloves
- Microcentrifuge tubes
- 50mL Tube for measuring
- Bacterial transformation buffer 25mM CaCl2, 10% PEG 8000
- LB Media for transformation recovery
- Cas9 plasmid
- gRNA plasmid
- Template DNA

[Protocol For Experiment](#)

# Editace genomu

- wobble párování kodonu



**Inosin**

párování



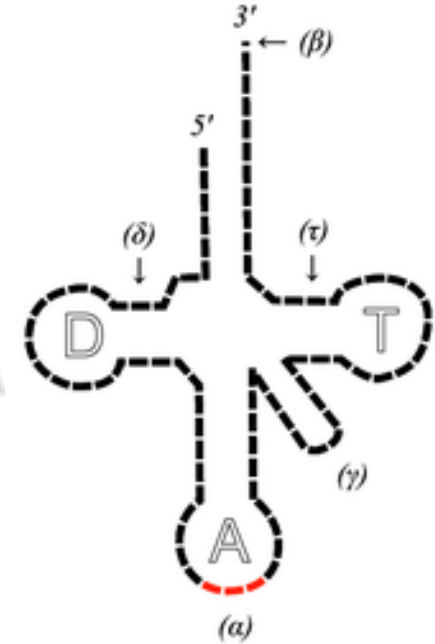
Adenosin



Cytidin

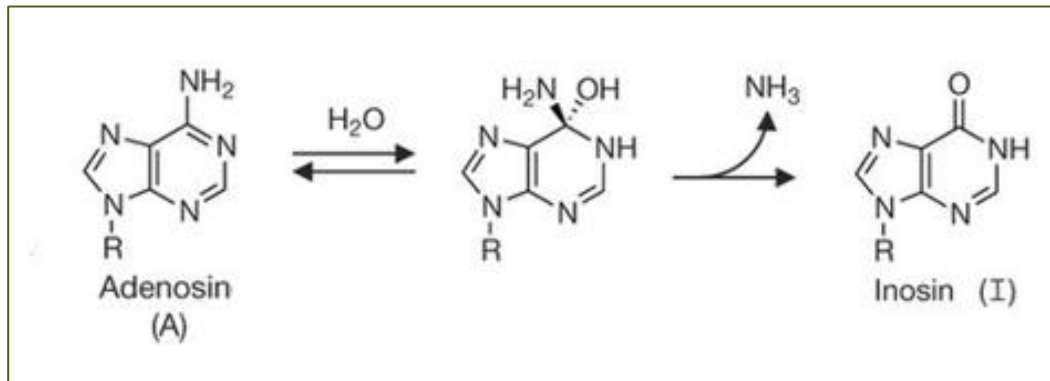


Uridin

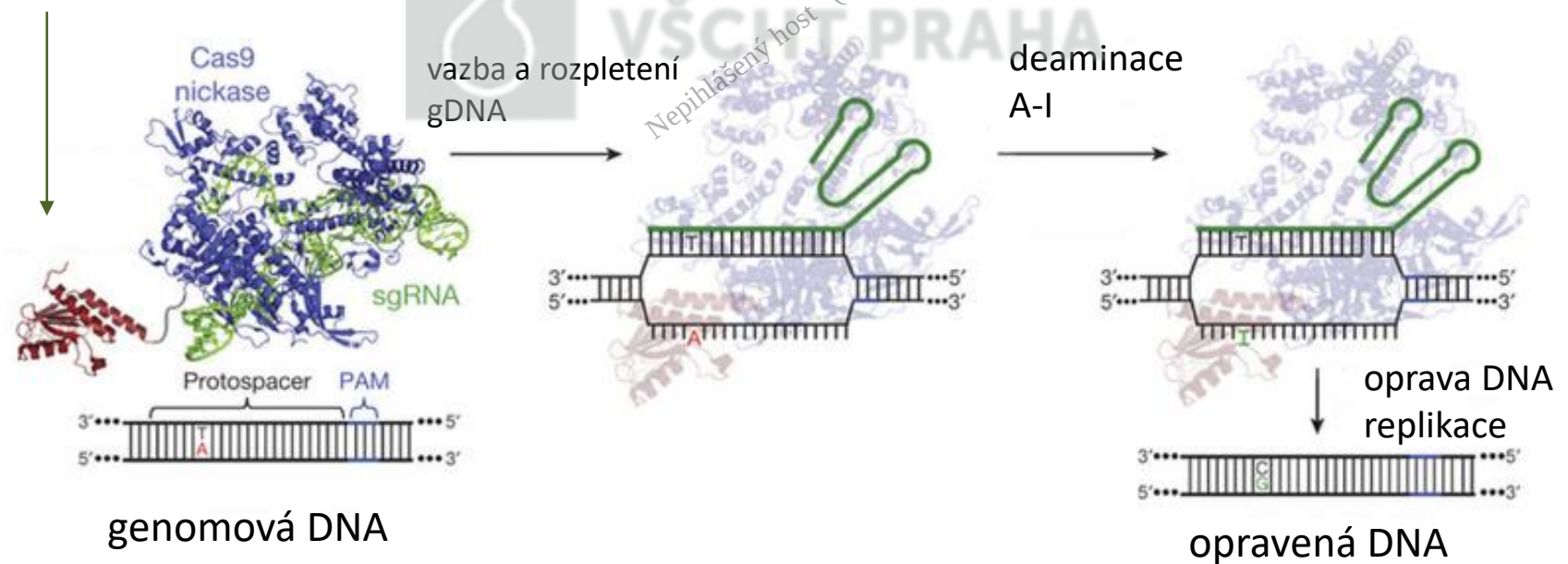


- DNA polymerasa čte inosin jako guanin

# Editace genomu



enzym s deoxyadenosin-deaminasovou aktivitou

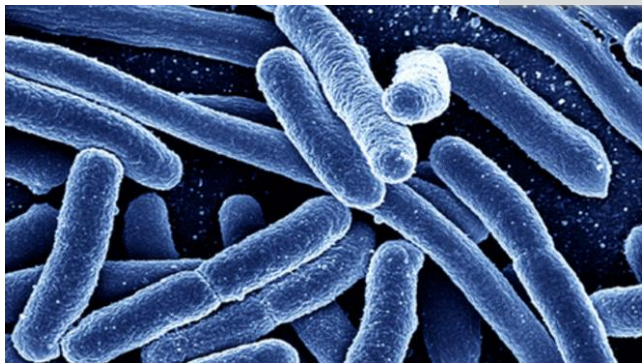


# Příprava rekombinantních proteinů

## Rekombinantní DNA:

uměle syntetizovaná DNA, která vzniká inzercí genu nebo určité části genu jednoho organismu do genomu jiného

- **Prokaryotní expresní systém**



- nejpoužívanější
- „jednoduchý“
- vysoký výtěžek produkovaného proteinu
- „nízká cena“
- malá časová náročnost
- modifikace proteinu umožňující snadnější purifikaci
- nejsou posttranslační modifikace

- **Eukaryotní expresní systém**

**Kvasinkový systém:**

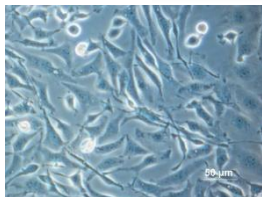
„nízká cena“  
časově náročnější  
posttranslační modifikace

**Hmyzí buňky:**

nutné striktně aseptickém prostředí  
náročné na praktické provedení, čas i finanční prostředky  
nižší výtěžky

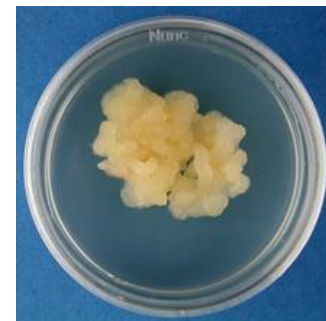
**Savčí expresní systém:**

podobný systému hmyzímu  
specifická hladina kyslíku a oxidu uhličitého  
posttranslační modifikace



**Rostlinné expresní systémy:**

nižší cena než savčí systémy  
posttranslační modifikace



# Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

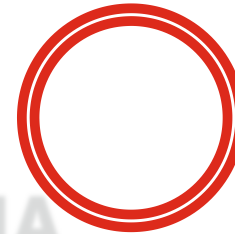
## Příprava inzertu

- PCR



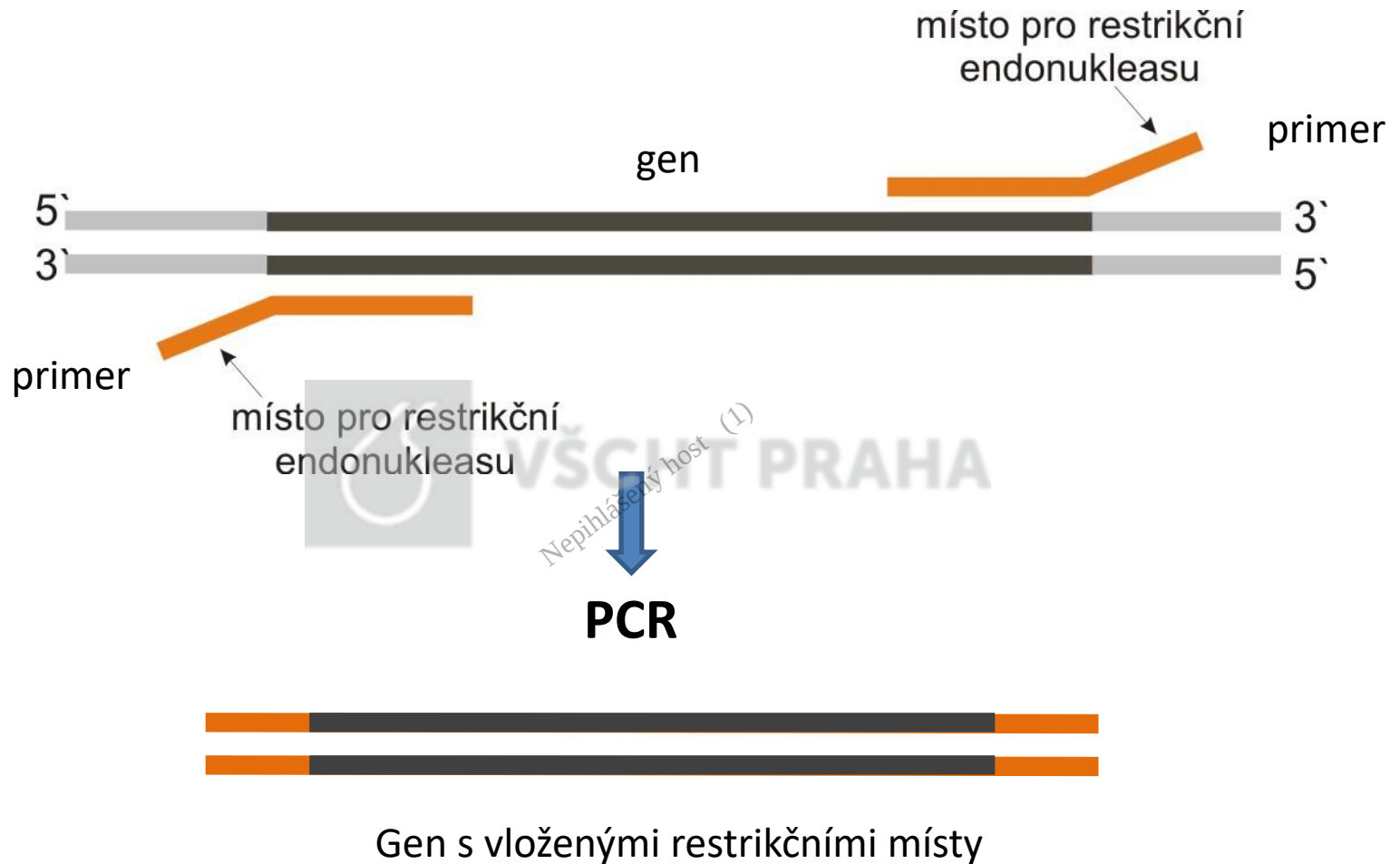
## Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA



Nepihlášený host (1)  
VŠCHT PRAHA

# Vnesení restrikčního místa na konec genu



# Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

## Příprava inzertu

- PCR

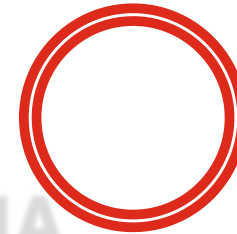


štěpení restriční  
endonukleasou/  
-ami



## Příprava plasmidu

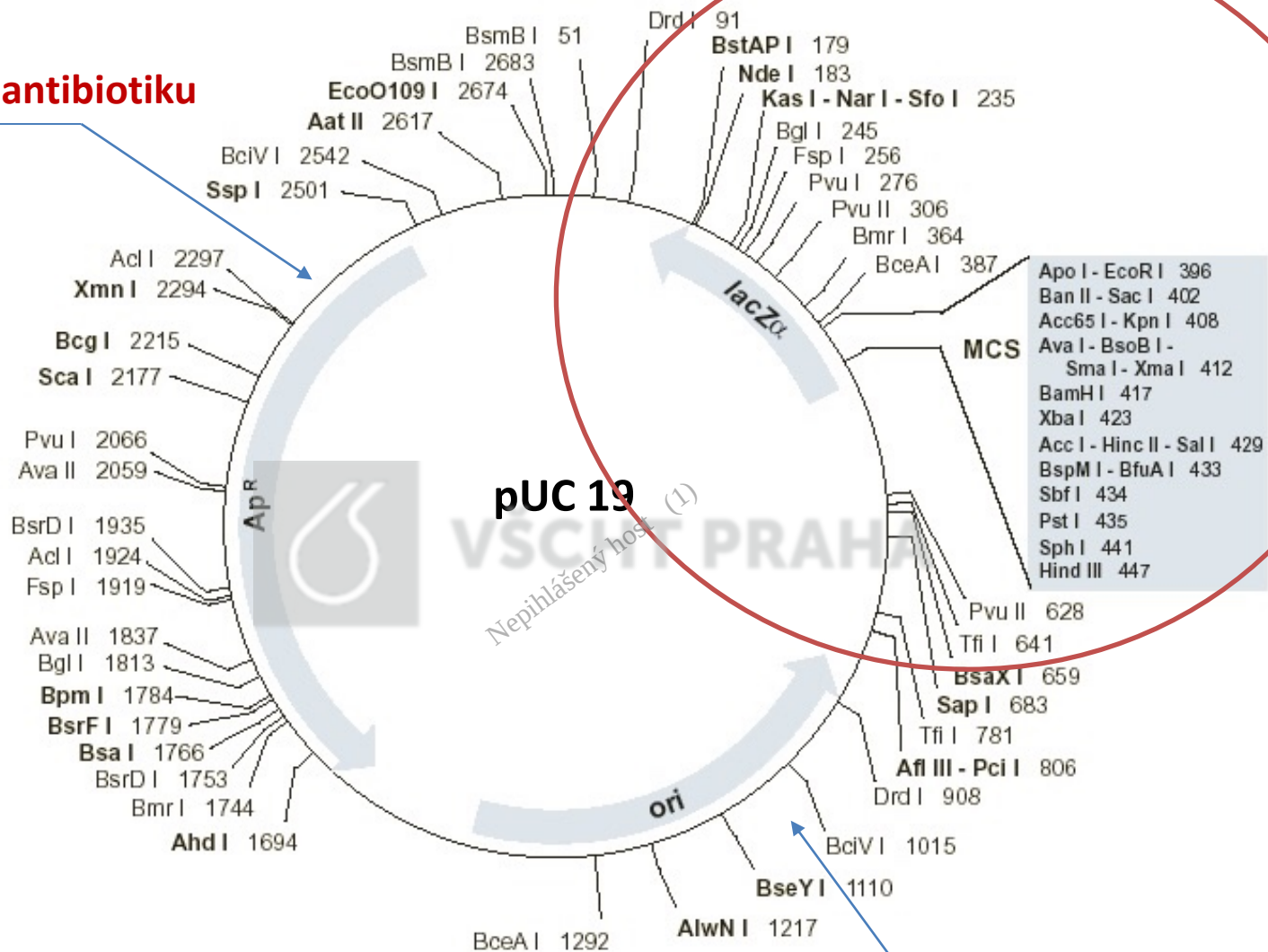
- izolace plasmidové DNA



VŠCHT PRAHA

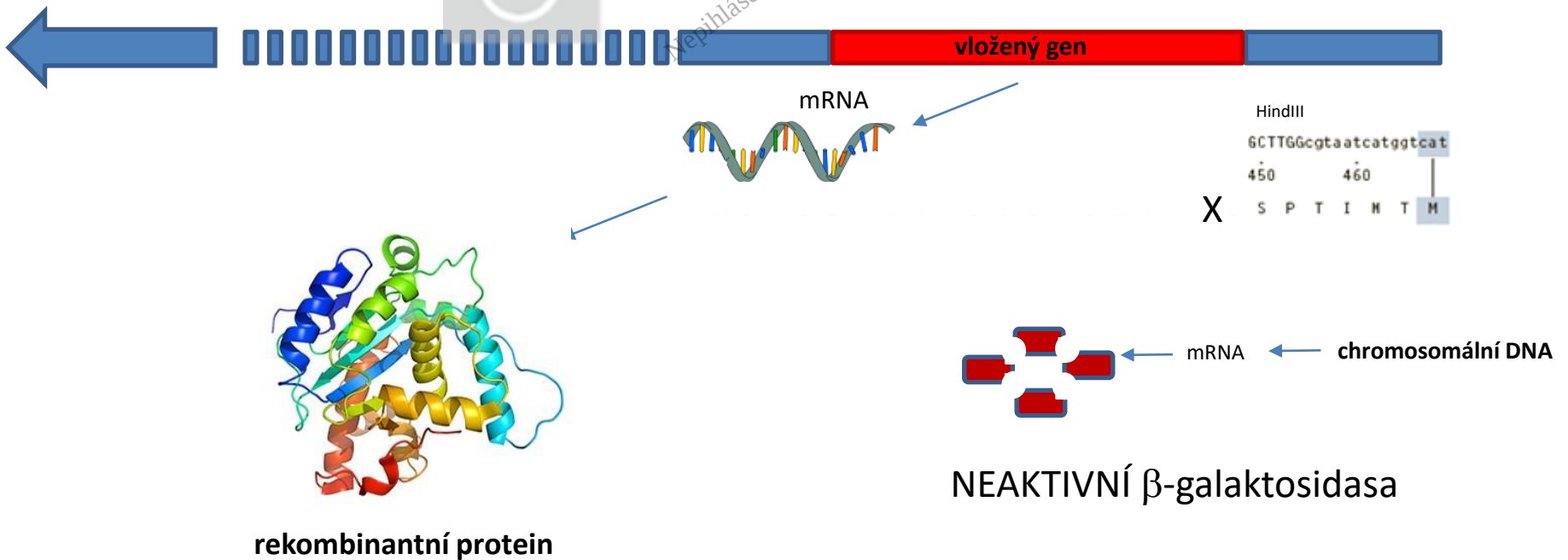
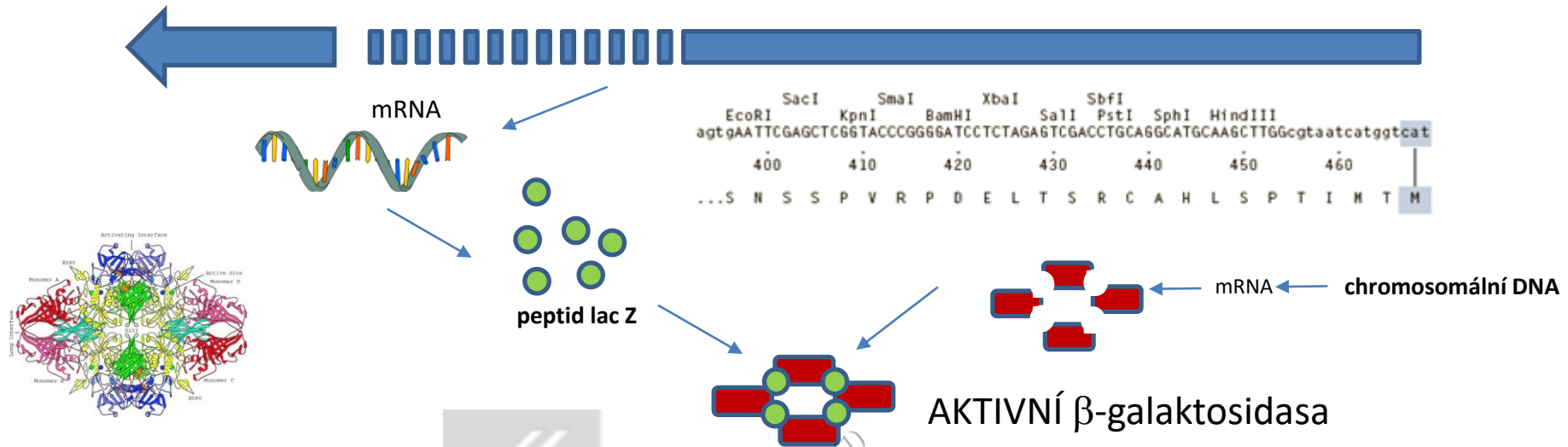
Nepřihlášený host (1)

rezistence k antibiotiku



počátek replikace

# Lac Z



# Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

## Příprava inzertu

- PCR



štěpení restrikční  
endonukleasou/  
-ami



## Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA



štěpení restrikční  
endonukleasou/  
-ami



VŠCHT PRAHA  
Nepihlášenný host (1)

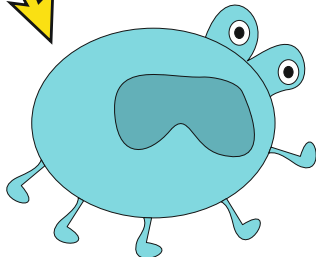
# Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

## Příprava inzertu

- PCR



štěpení restrikční  
endonukleasou/  
-ami



## Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA



štěpení restrikční  
endonukleasou/  
-ami

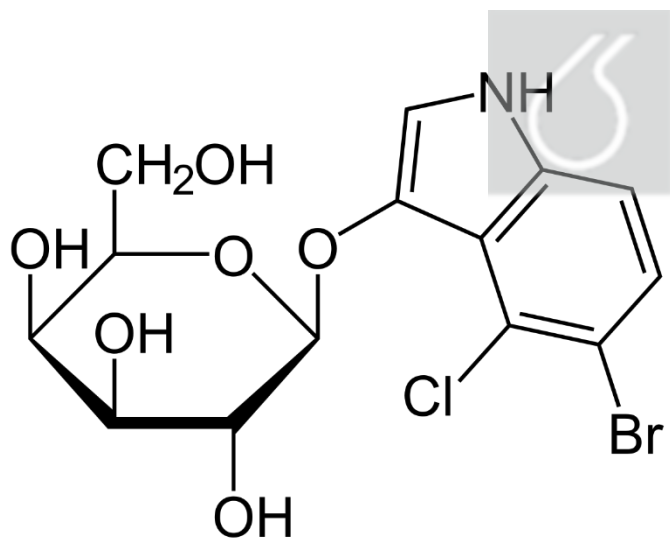


- ligace
- transformace buněk (tepelný šok, elektroporace, ...)

- SELEKCE TRANSFORMOVANÝCH BUNĚK - antibiotikum
- SELEKCE BUNĚK S VNESENÝM GENEM – Blue-white screening

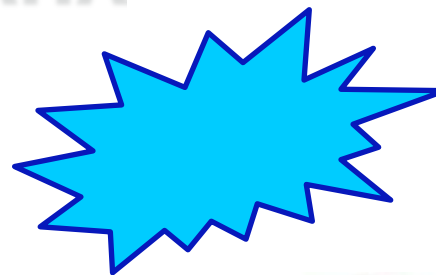
## Blue-white screening

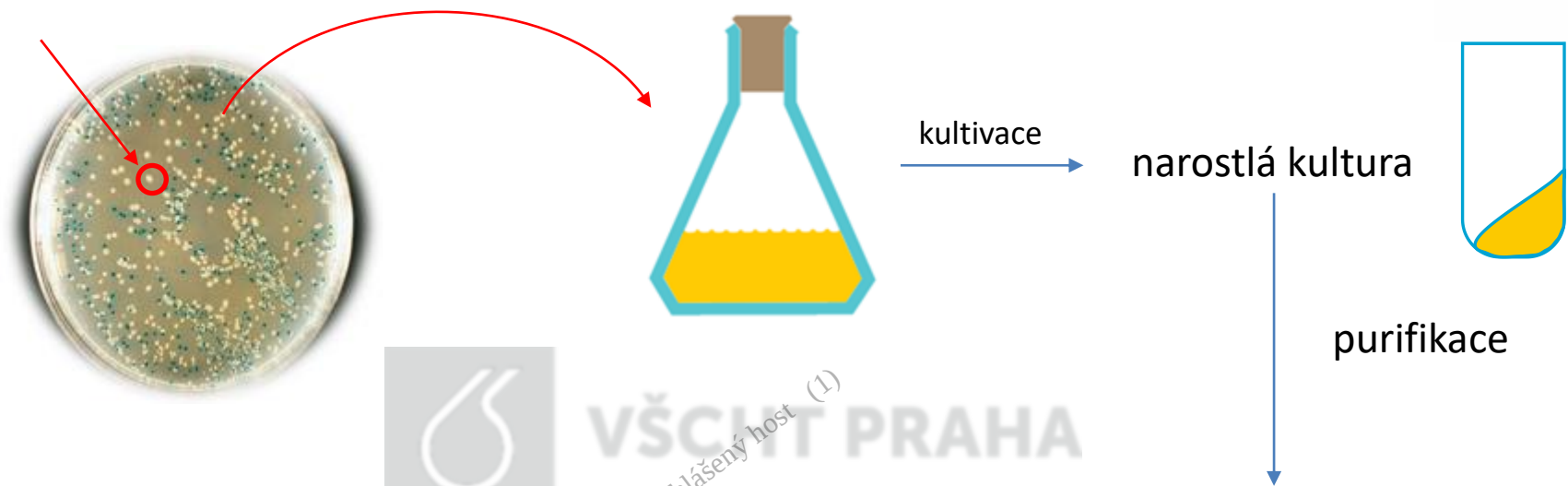
- založeno na aktivitě  $\beta$ -D-galaktosidasy



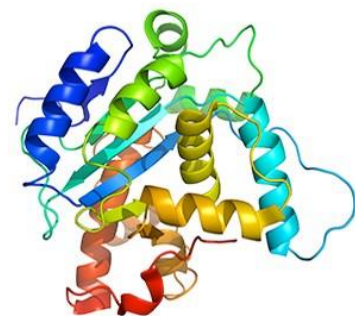
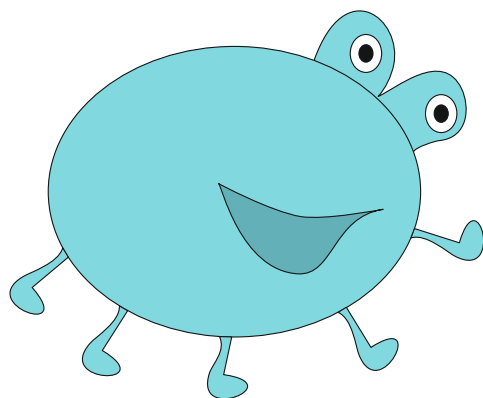
5-bromo-4-chloro-3-indolyl -D-galactopyranoside

$\beta$ -D-galaktosidasa



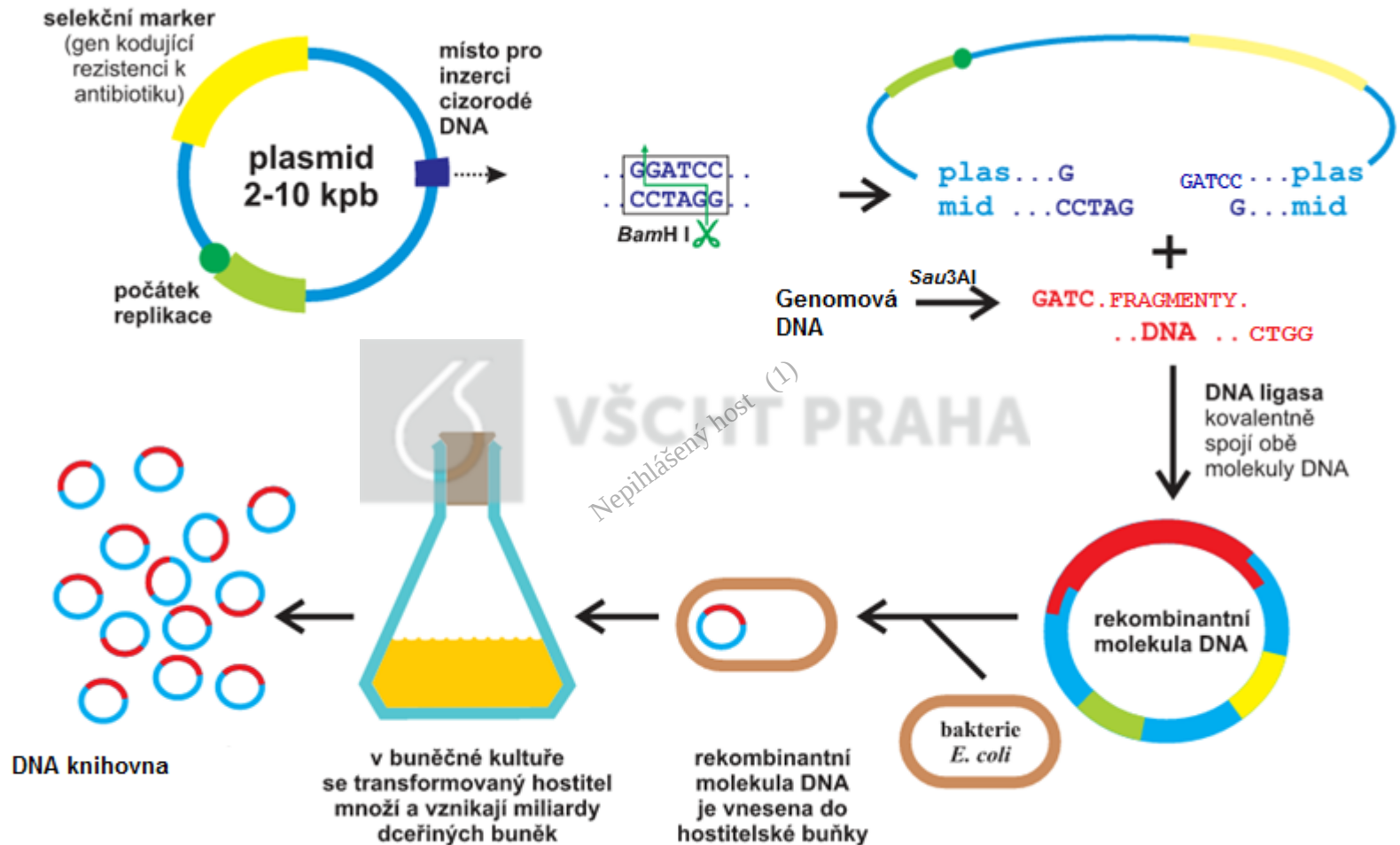


VŠCHT PRAHA  
Nepihlášenný host (1)



**rekombinantní protein**

# Příprava genomové knihovny



# Příprava rekombinantního eukaryotního proteinu!

## Příprava inzertu

- izolace mRNA
- reversní transkripce - cDNA
- namnožení genu PCR

## Volba správného produkčního organismu

- posttranslační modifikace
- použití kodonů – codon usage
- toxicita
- ....

Nepihlášený host (1)

VŠCHT PRAHA

# Příprava protilátek

**monoklonální PL chemické individuum**, všechny protilátky mají identickou primární strukturu (stejná afinita i specifita) - pouze proti jednomu epitopu daného Ag

**polyklonální PL směs protilátek**, lišících se jak afinitou, tak specifikou k jednotlivým epitopům daného Ag - více epitopů na molekule imunogenu, složitost imunitního systému, různé reakce jednotlivců

**rekombinantní PL** izolace genů kódujících PI  $\Rightarrow$  klonování  $\Rightarrow$  exprese - rychlost, kvalita, vyšší hustota vaz. míst

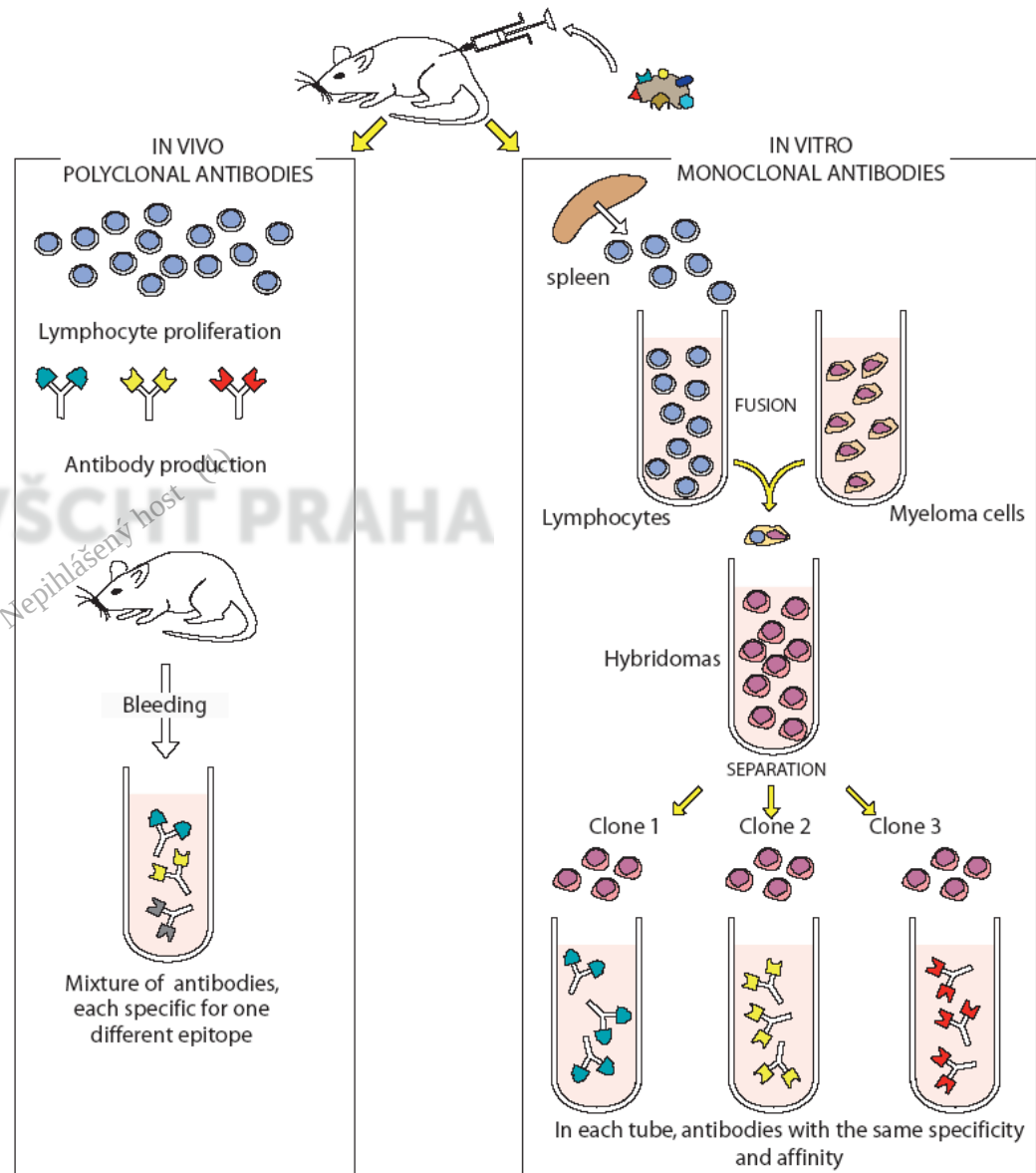


Figure 12. Polyclonal and monoclonal antibodies.

