

NÁHLED DO GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

 Petra Lipovová, VŠCHT Praha

Biochemie II

genového inženýrství



VŠCHT PRAHA

Guest user (1)

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

Co byste měli umět..

- definovat pojem restriční endonukleasa, palindrom, kodon, „kodon usage“, otevřený čtecí rámec (ORF), rekombinantní protein, primer, proba, metody NGS (next generation sequencing), genom, transkriptom, proteom, metabolom, lipidom, RNA interference, CRISPER Cas9
- umět popsat metodu dideoxy sekvenování (Sangerovo), PCR, qPCR,
- vědět příklady využití PCR v praxi
- rámcově umět: popsat postup a rozdíly v přípravě rekombinantních proteinů pocházejících z prokaryotních a eukaryotních organismů, základní informace o genomu (eukaryotní vs. prokaryotní, co vše je v něm kódováno – základní přehled)

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

Restrikční endonukleasy

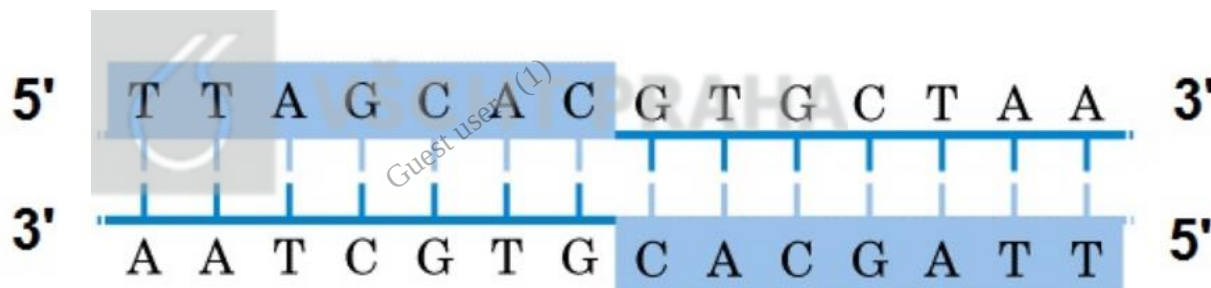


Palindrom - je slovo, věta, číslo nebo melodie (obecně jakákoliv sekvence symbolů, např. sekvence DNA), která má tu vlastnost, že ji lze číst v libovolném směru (zprava doleva nebo zleva doprava) a má vždy stejný význam.

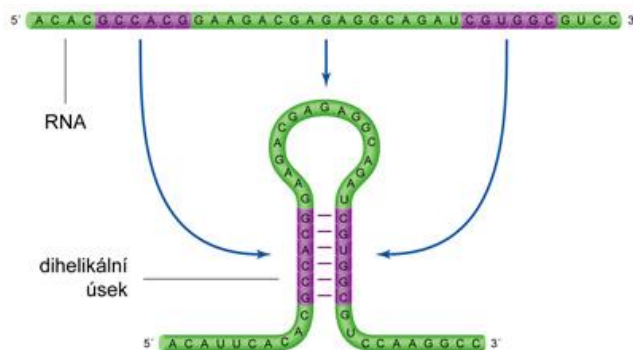
Jelenovi pivo nelej

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

dsDNA



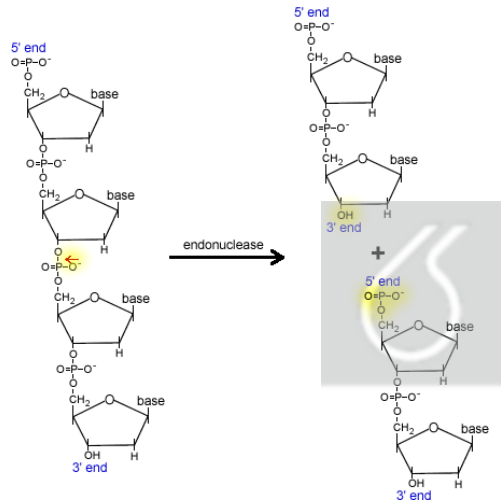
ssDNA RNA



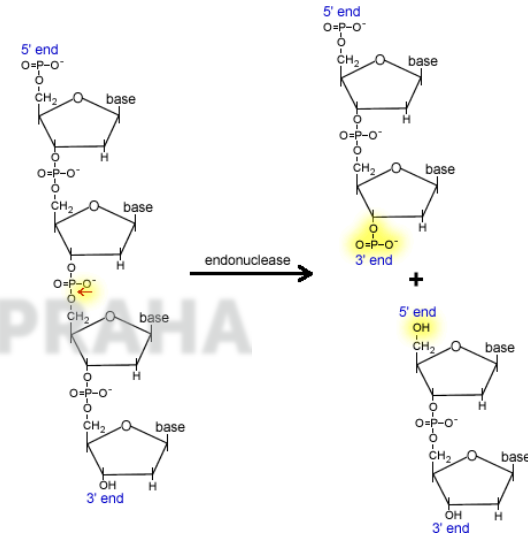
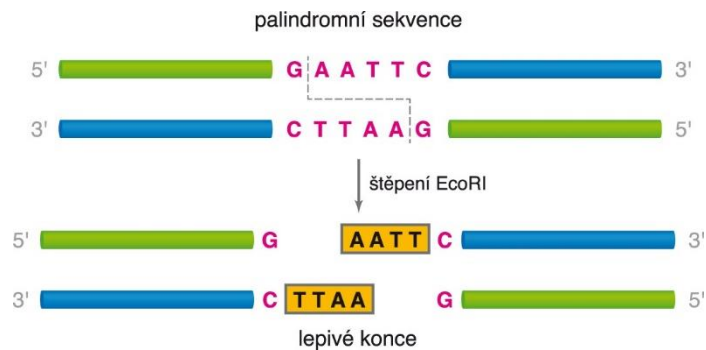
➡ vlásenka

Restrikční endonukleasy

- **Endonucleasy** - štěpí fosfodiesterovou vazbu v polynukleotidovém řetězci
- Velmi specifické



EcoRI – kohezivní (lepivé) konce



SmaI – tupé konce



NEW ENGLAND
BioLabs Inc.

Updates to this chart can be found at NEBCutSmart.com

Visit NEBtools.neb.com to
restriction enzyme digests

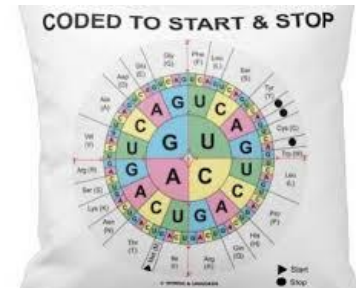


© Printed in the USA at approved venue (2015, FCM)

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

Genetický kód

- složen z tripletů – proč?
- degenerovaný
- téměř univerzální

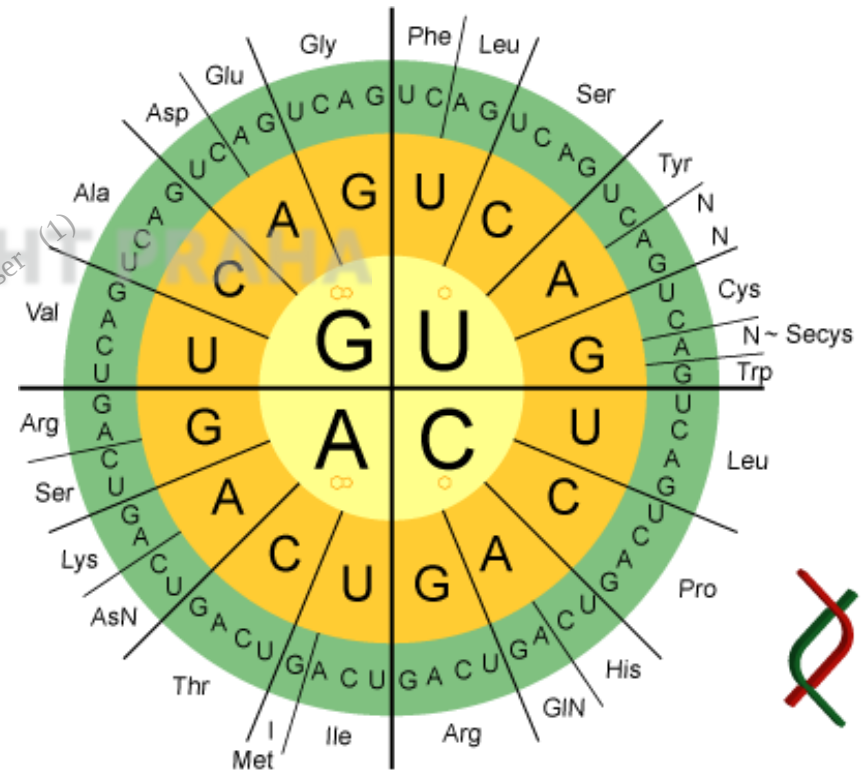


Otevřený čtecí rámec

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

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	
	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	
	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	
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	
	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	
	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	
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	
	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	
	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	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	
	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	
	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	
	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.

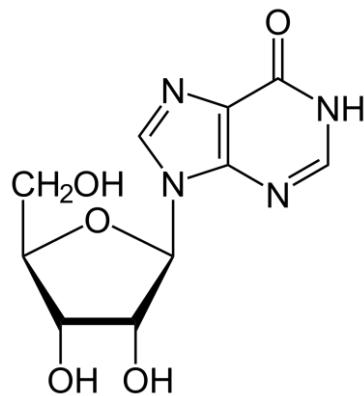
Pichia pastoris [gbpln]: 137 CDS's (81301 codons)

fields: [triplet] [frequency: **per thousand**] ([number])

UUU F 0.54 24.1 (1963)	UCU S 0.29 24.4 (1983)	UAU Y 0.47 16.0 (1300)	UGU C 0.64 7.7 (626)
UUC F 0.46 20.6 (1675)	UCC S 0.20 16.5 (1344)	UAC Y 0.53 18.1 (1473)	UGC C 0.36 4.4 (356)
UUA L 0.16 15.6 (1265)	UCA S 0.18 15.2 (1234)	UAA * 0.72 0.8 (69)	UGA * 0.28 0.3 (27)
UUG L 0.33 31.5 (2562)	UCG S 0.09 7.4 (598)	UAG Q 0.01 0.5 (40)	UGG W 1.00 10.3 (834)
CUU L 0.16 15.9 (1289)	CCU P 0.35 15.8 (1282)	CAU H 0.57 11.8 (960)	CGU R 0.17 6.9 (564)
CUC L 0.08 7.6 (620)	CCC P 0.15 6.8 (553)	CAC H 0.43 9.1 (737)	CGC R 0.05 2.2 (175)
CUA L 0.11 10.7 (873)	CCA P 0.42 18.9 (1540)	CAA Q 0.60 25.4 (2069)	CGA R 0.10 4.2 (340)
CUG L 0.16 14.9 (1215)	CCG P 0.09 3.9 (320)	CAG Q 0.39 16.3 (1323)	CGG R 0.05 1.9 (158)
AUU I 0.50 31.1 (2532)	ACU T 0.40 22.4 (1820)	AAU N 0.48 25.1 (2038)	AGU S 0.15 12.5 (1020)
AUC I 0.31 19.4 (1580)	ACC T 0.26 14.5 (1175)	AAC N 0.52 26.7 (2168)	AGC S 0.09 7.6 (621)
AUA I 0.18 11.1 (906)	ACA T 0.24 13.8 (1118)	AAA K 0.47 29.9 (2433)	AGA R 0.48 20.1 (1634)
AUG M 1.00 18.7 (1517)	ACG T 0.11 6.0 (491)	AAG K 0.53 33.8 (2748)	AGG R 0.16 6.6 (539)
GUU V 0.42 26.9 (2188)	GCU A 0.45 28.9 (2351)	GAU D 0.58 35.7 (2899)	GGU G 0.44 25.5 (2075)
GUC V 0.23 14.9 (1210)	GCC A 0.26 16.6 (1348)	GAC D 0.42 25.9 (2103)	GGC G 0.14 8.1 (655)
GUA V 0.15 9.9 (804)	GCA A 0.23 15.1 (1228)	GAA E 0.56 37.4 (3043)	GGA G 0.33 19.1 (1550)
GUG V 0.19 12.3 (998)	GCG A 0.06 3.9 (314)	GAG E 0.44 29.0 (2360)	GGG G 0.10 5.8 (468)

Kolik existuje tRNA?

- **cytosol** - 40 - 61 typů tRNA
- **lidská mitochondrie** - 22 typů tRNA
- **chloroplast** – 30 typů tRNA

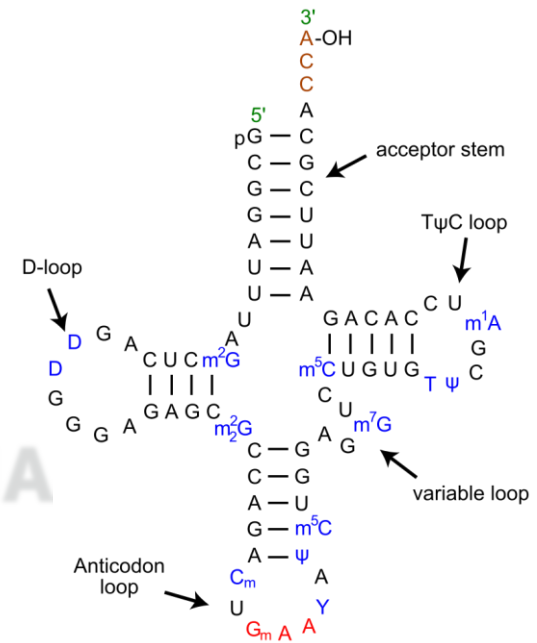


INOSIN



Guest user (1)

C, U, A



497 genů v lidském genomu, plus pseudogeny

(2008) **tRNA** (transfer RNA). In: Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_17521

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 metodu 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

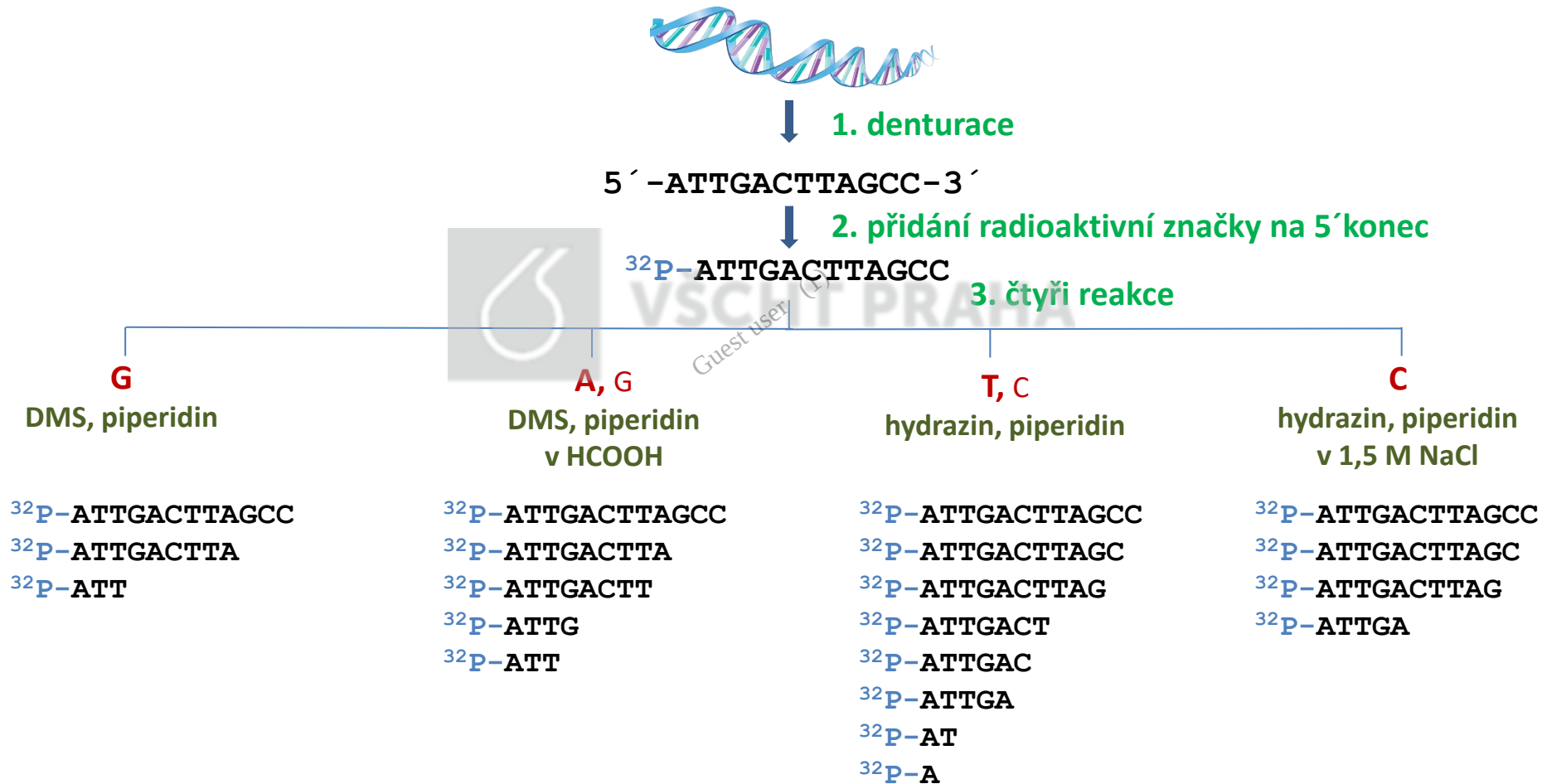
1978 – 1980 – první rekombinantní protein

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

Maxam-Gilbertova metoda - „chemické sekvenování“



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

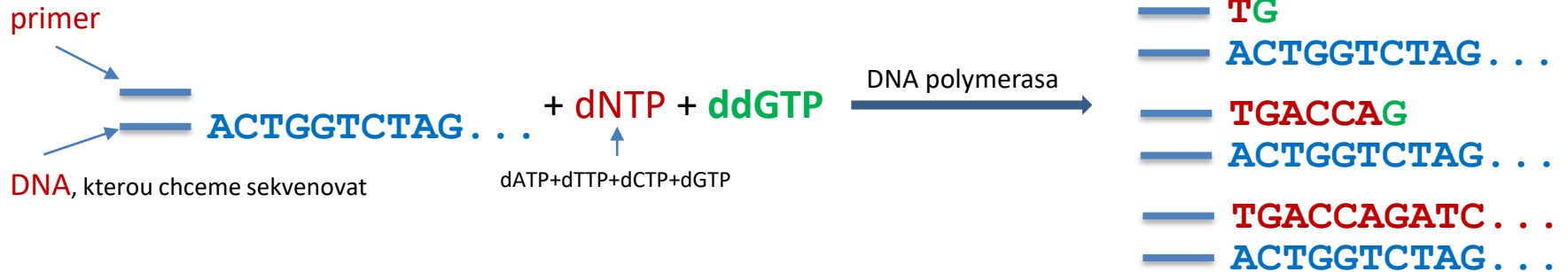
³²P-ATTGACTTAGCC
³²P-ATTGACTTAGC
³²P-ATTGACTTAG
³²P-ATTGA



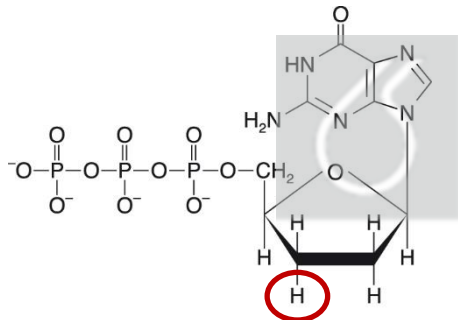
6. přečtení sekvence

?TTGACTTAGCC

Sangerova metoda - „dideoxy sekvenování“



ddGTP

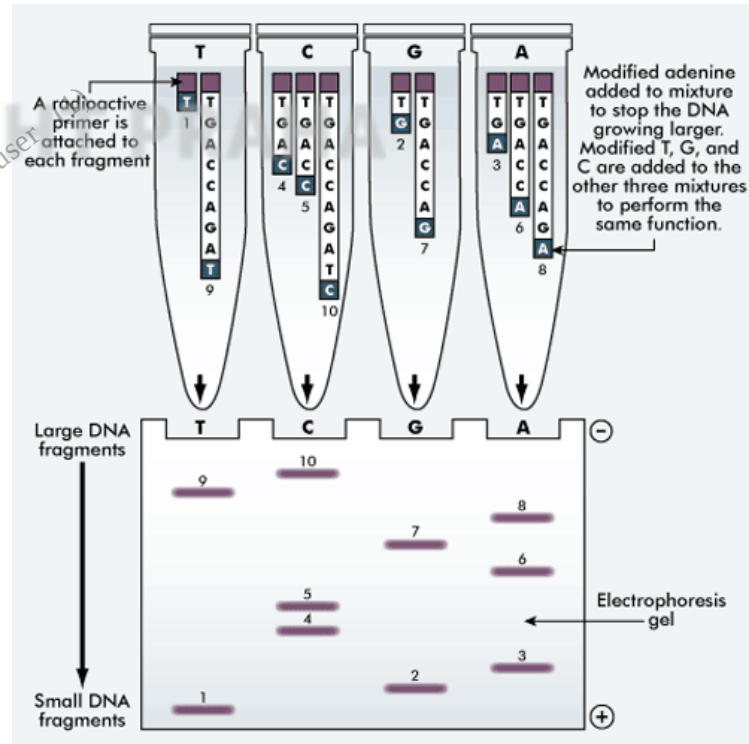


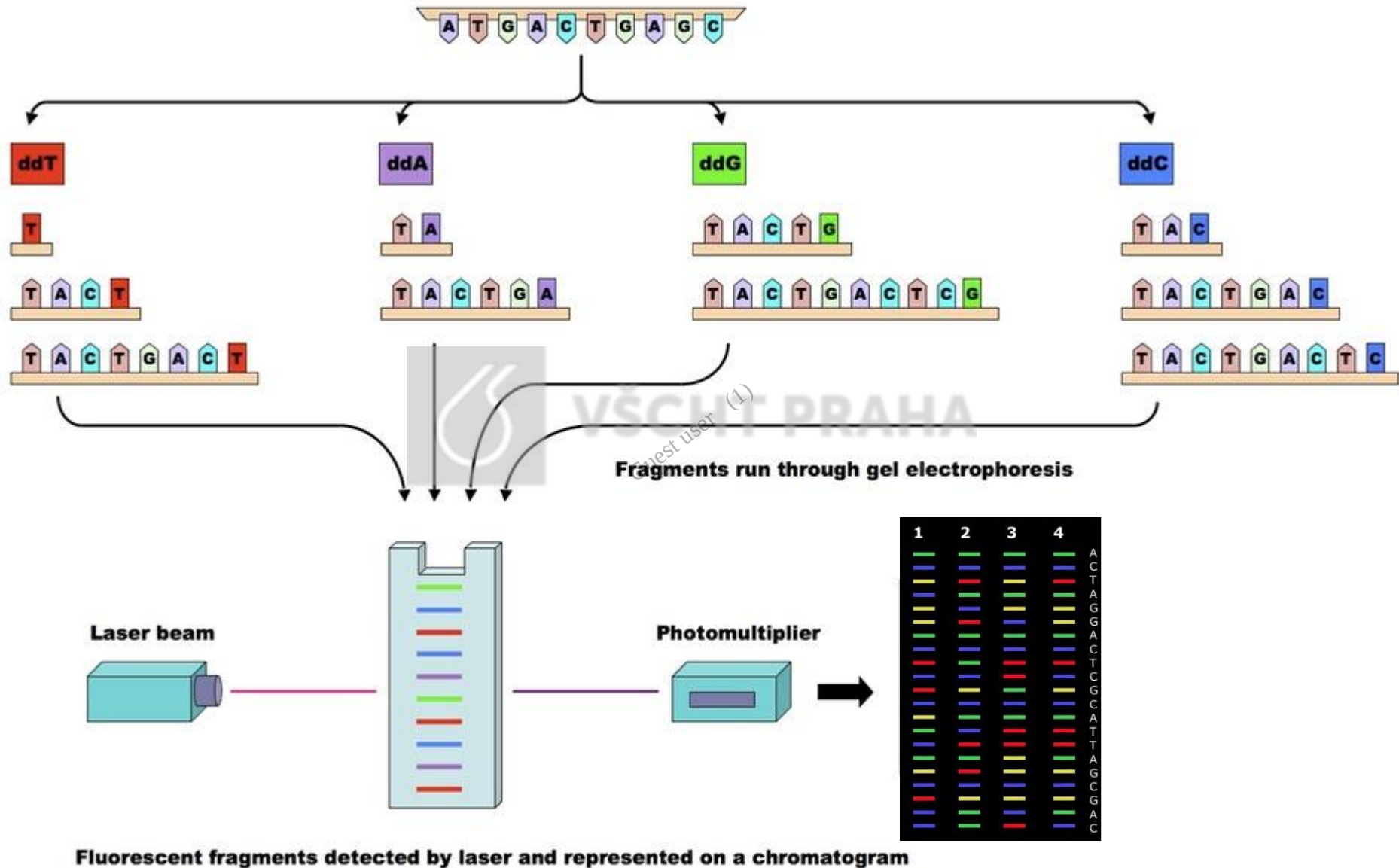
dideoxyguanosintrifosfát, ddGTP

ddTTP

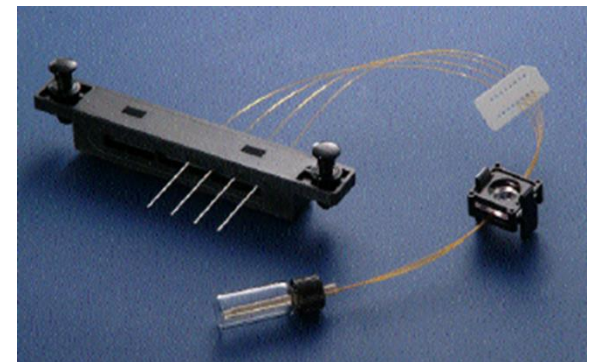
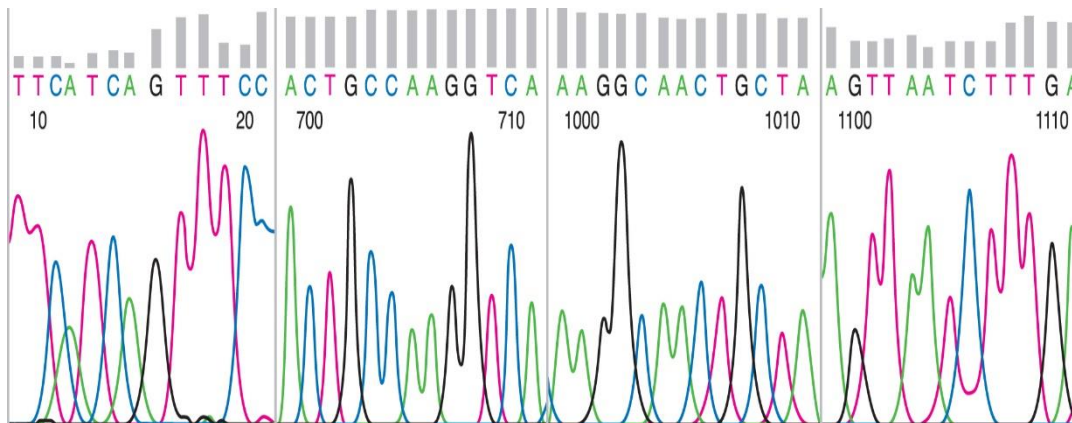
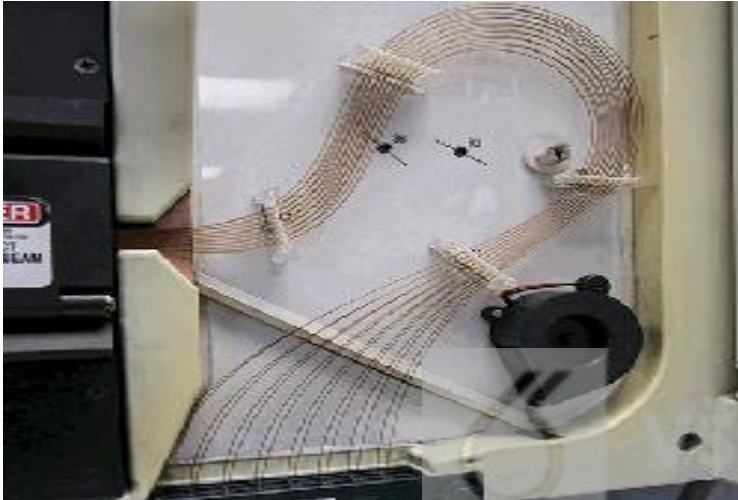
ddATP

ddCTP





- kapilární elektroforéza



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 metodu 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



		CPHPC1			
		↓	↓	↓	↓
HUMAN	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K T	RR	EAEDLQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQ	KR	GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
GREAT APES	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K T	RR	EAEDLQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQ	KR	GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
MACAQUE (CYNOMOLGUS)	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K T	RR	EAEDPQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQ	KR	GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
RABBIT	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K S	RR	EVEELQVGQAE LGGGPGAGGLQPSALE LALQ	KR	GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
CANINE	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A	RR	EVEDLQVRDVELAG A PG EGGLEQLPLALEGALQ	KR	GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
EQUINE	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A	XX	EAEDPQVG EVELGGGPG LGGLQLALAGPQQ	XX	GIVEQCCT G I CSLYQLENYCN
PORCINE	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A	RR	EAENPQAG AVELGGGLGG - -LQALALEGPPQ	KR	GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
HAMSTER	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K S	RR	GVEDPQVAQ LELGGGPGAGDDLQTLALEVAQQ	KR	GIVDQCCT S I CSLYQLENYCN
RAT II	FV KQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPMS	RR	EVEDPQVAQ LELGGGPGAGDLQTLALEVARQ	KR	GIVDQCCT S I CSLYQLENYCN
MOUSE II	FV KQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPMS	RR	EVEDPQVAQ LELGGGPGAGDLQTLALEVAQQ	KR	GIVDQCCT S I CSLYQLENYCN
FELINE	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A	RR	EAEDLQ GKDAELGE A PGAGGLQPSALEAPLQ	KR	GIVEQCCAS VCSLYQLEH YCN
RAT I	FV KQHLCGPHLVEALYLVCGERGFFYTP K S	RR	EVEDPQVPQLELGGGEAGDLQTLALEVARQ	KR	GIVDQCCT S I CSLYQLENYCN
MOUSE I	FV KQHLCGPHLVEALYLVCGERGFFYTP K S	RR	EVEDPQVEQLELGG SP - -GDQTLALEVARQ	KR	GIVDQCCT S I CSLYQLENYCN
BOVINE	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A	RR	EVEGPQVGALELAGGPG - - - -AGGLEGPQQ	KR	GIVEQCCAS VCSLYQLENYCN
OVINE	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A	RR	EVEGPQVGALELAGGPG - - - -AGGLEGPQQ	KR	GIVEQCCAGVCSLYQLENYCN

Insulin B-chain

C-peptide

Insulin A-chain





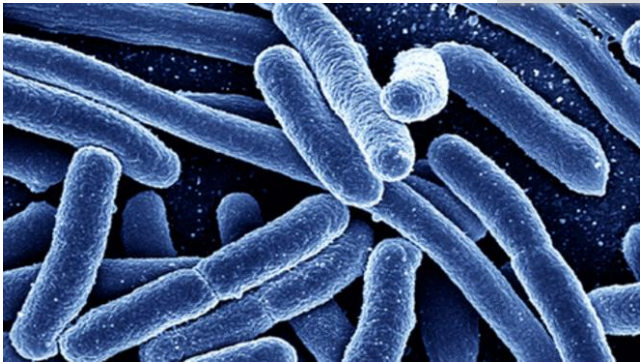
DRUHY INZULINU	Nástup účinku	Maximální efekt	Trvání účinku	Prodejní název
Velmi krátce působící	5-20 minut	1-3 hodiny	3-5 hodin	NovoRapid, Humalog, Apidra
Krátce působící	30 minut	1-3 hodiny	8 hodin	Actrapid, Humulin R, Insuman Rapid
Mixované humanní Mixované analoga	30 minut 10-20 minut	2-8 hodin 1-4 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)

Příprava rekombinantních proteinů

Rekombinantní DNA:

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

- **Prokaryotní expresní systém**

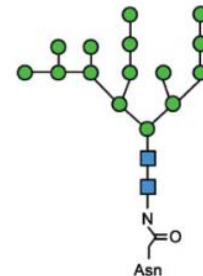


- nejpoužívanější
- „jednoduchý“
- vysoký výtěžek produkovaného proteinu
- „nízká cena“
- malá časová náročnost
- modifikace proteinu umožňující snadnější purifikaci
- nejsou posttranslační modifikace

- **Eukaryotní expresní systém**

Kvasinkový systém:

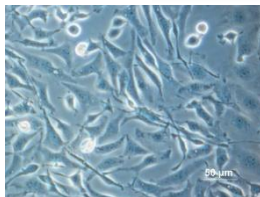
„nízká cena“
časově náročnější
posttranslační modifikace



Hmyzí buňky:

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

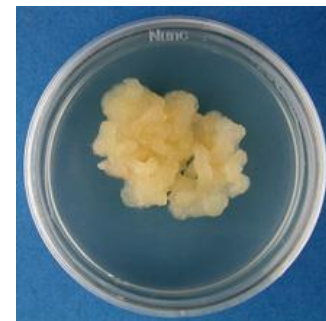
Savčí expresní systém:



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 (genu)

- PCR

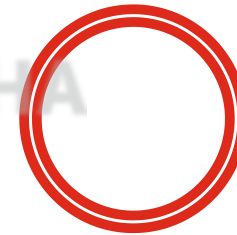
Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA

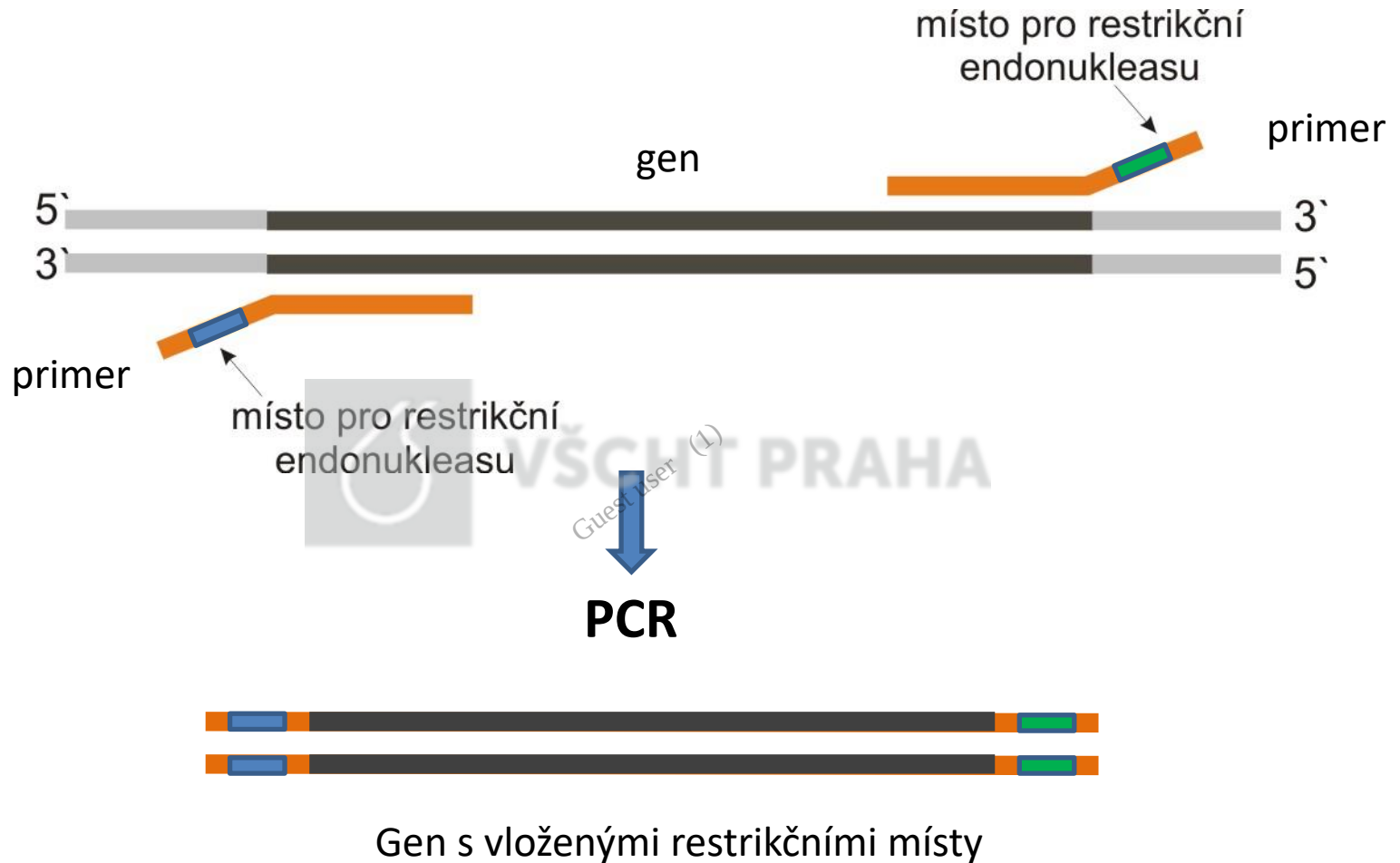


Guest user (1)

VŠCHT PRAHA



Vnesení restrikčního místa na konec genu



Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

Příprava inzertu

- PCR

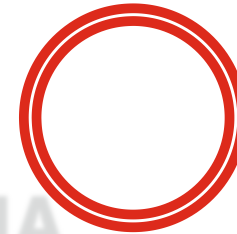


štěpení restriční
endonukleasou/
-ami



Příprava plasmidu

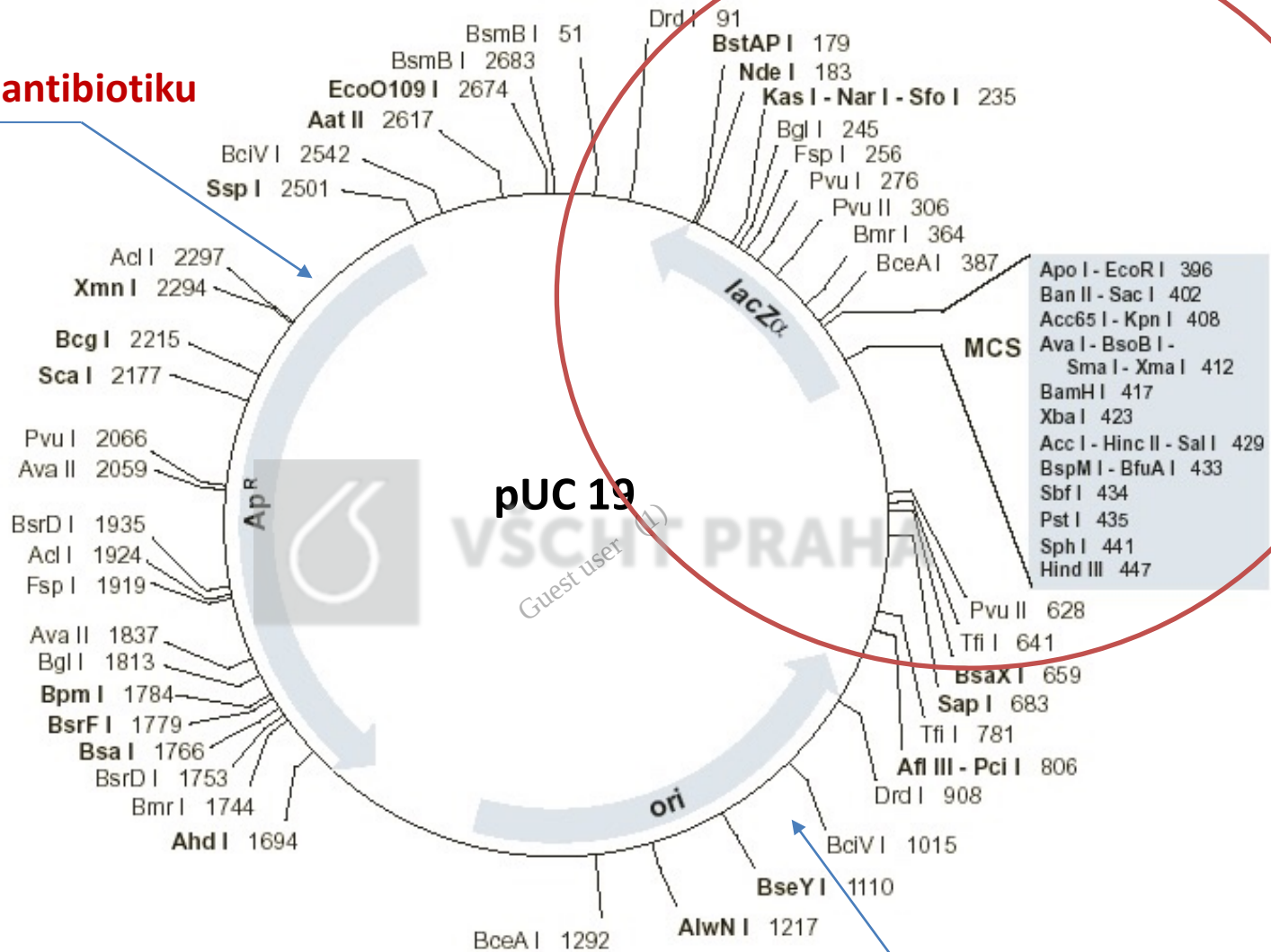
- izolace plasmidové DNA



VŠCHT PRAHA

Guest user (1)

rezistence k antibiotiku



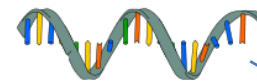
počátek replikace

Lac Z (gen pro peptid lacZ)

plasmidová DNA



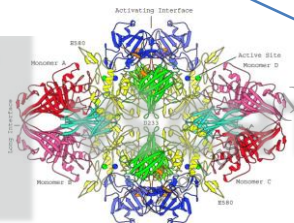
mRNA



peptid lac Z

chromosomální DNA

mRNA

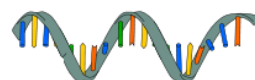


AKTIVNÍ β -galaktosidasa

plasmidová DNA



mRNA



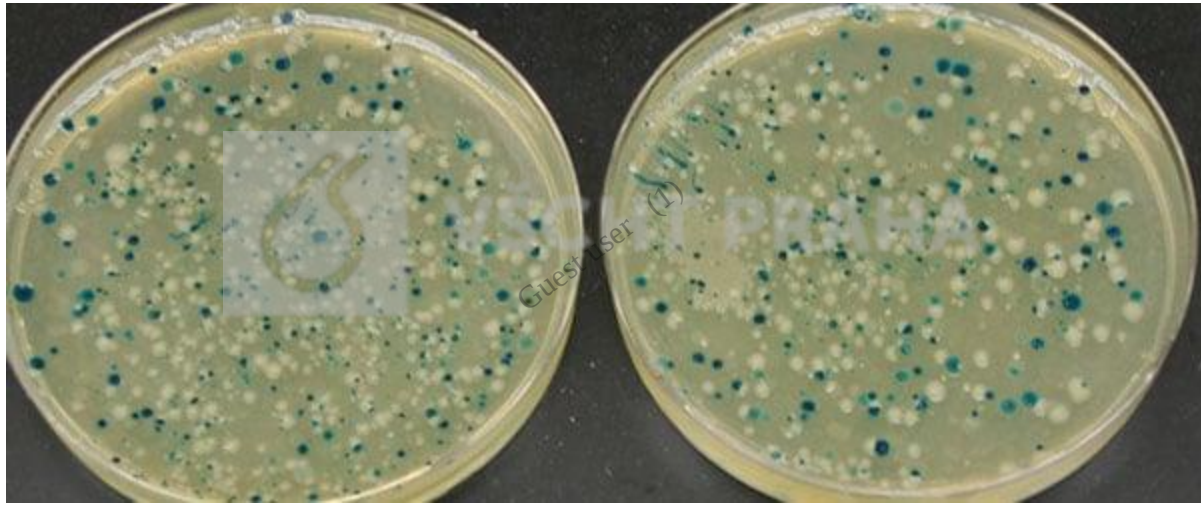
chromosomální DNA

mRNA



NEAKTIVNÍ β -galaktosidasa

rekombinantní protein



Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

Příprava inzertu

- PCR

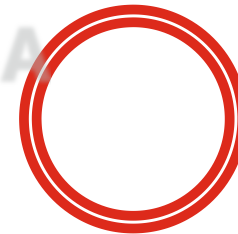


štěpení restriční
endonukleasou/
-ami



Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA



štěpení restriční
endonukleasou/
-ami



VŠCHT PRAHA

Guest user (1)

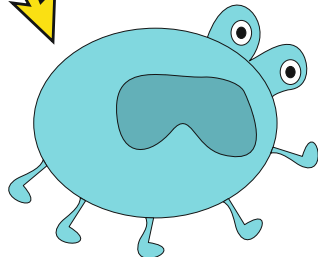
Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

Příprava inzertu

- PCR



štěpení restrikční
endonukleasou/
-ami

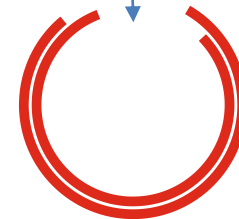


Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA



štěpení restrikční
endonukleasou/
-ami

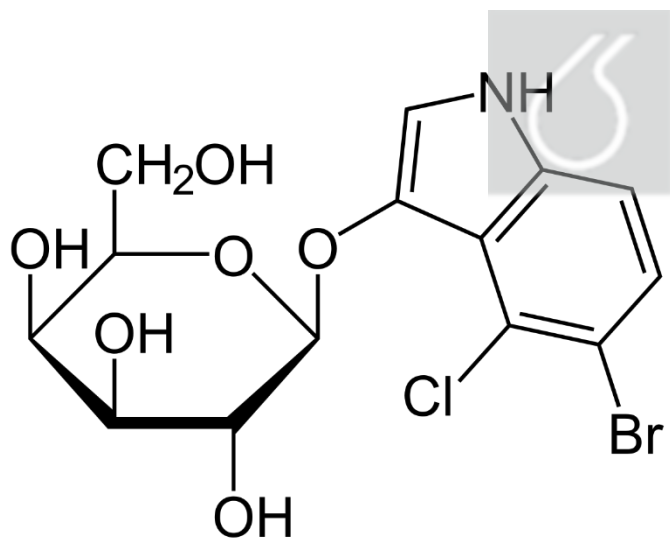


- ligace
- transformace buněk (tepelný šok, elektroporace, ...)

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

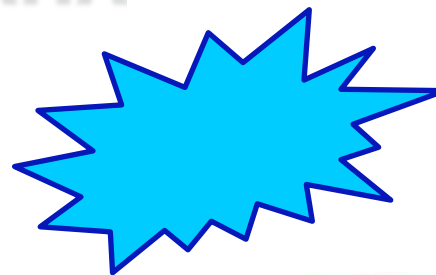
Blue-white screening

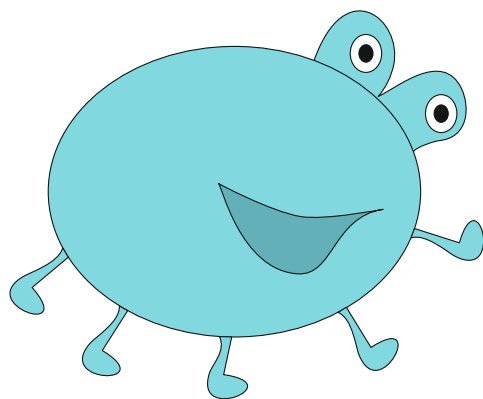
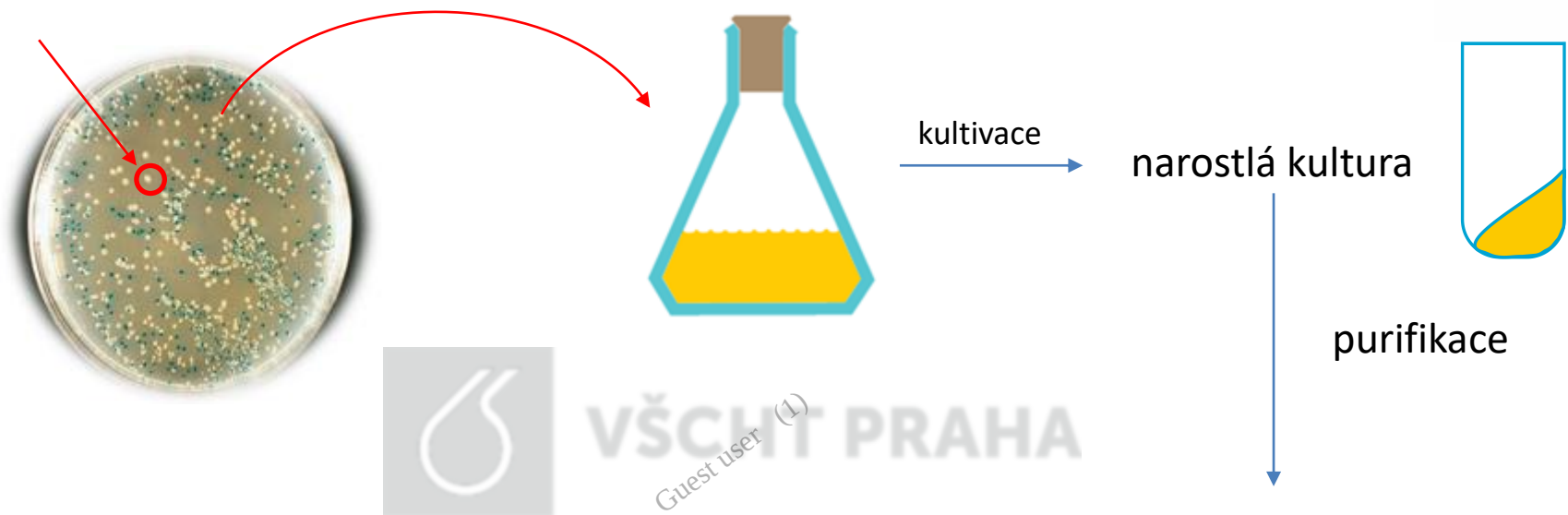
- založeno na aktivitě β -D-galaktosidasy



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

β -D-galaktosidasa

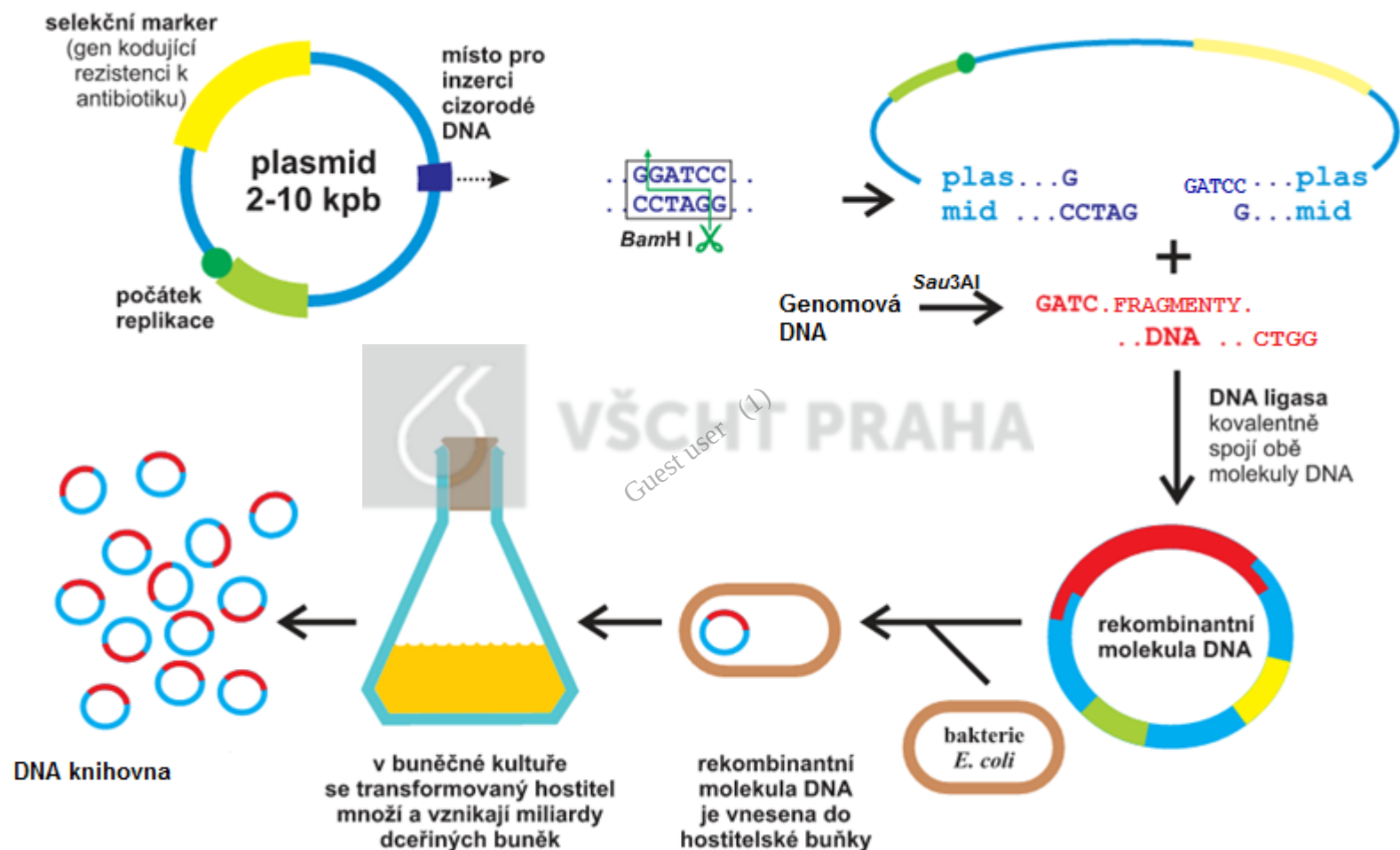




VŠCHT PRAHA

Guest user (1)

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
-

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 specifitou 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

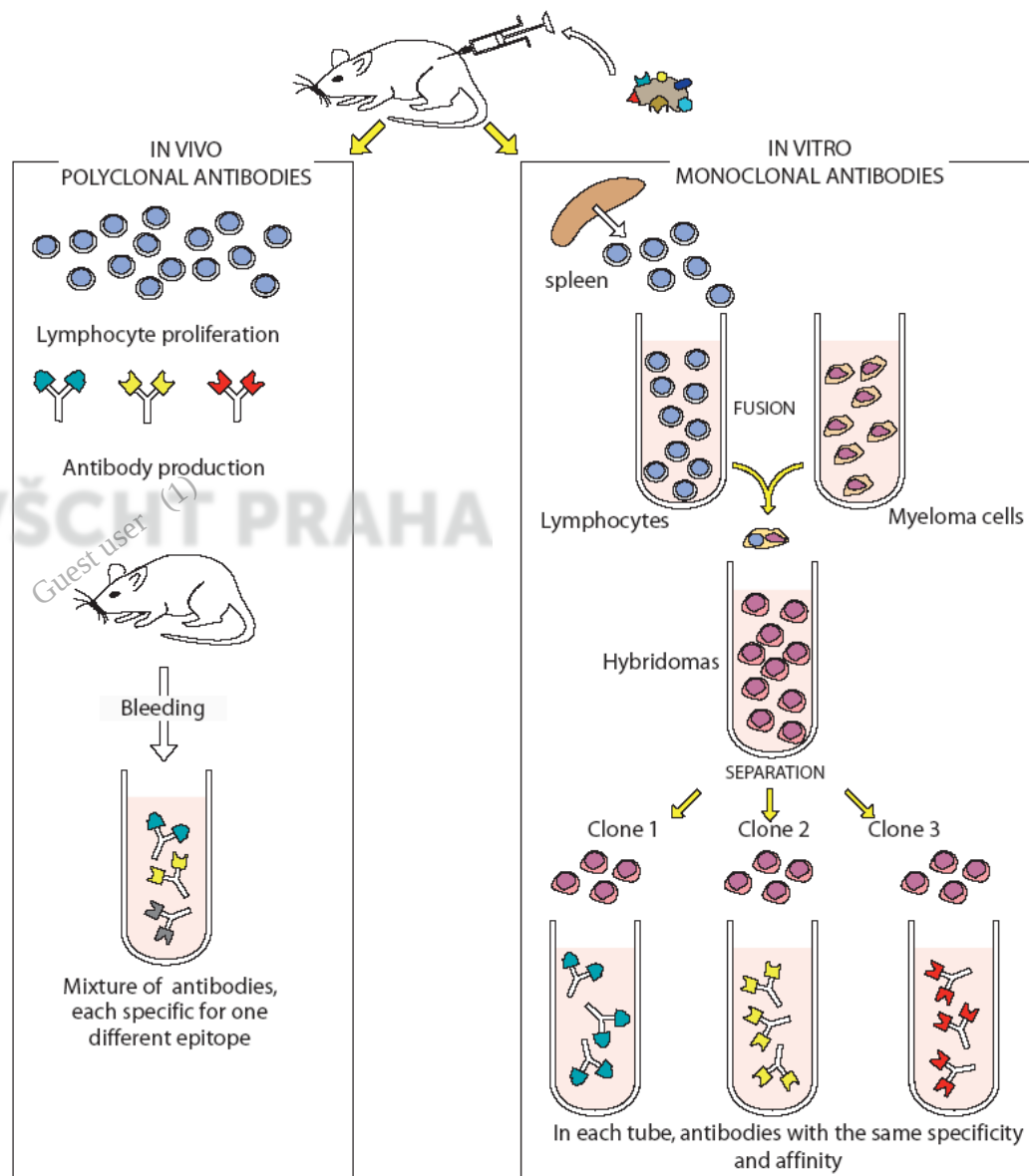
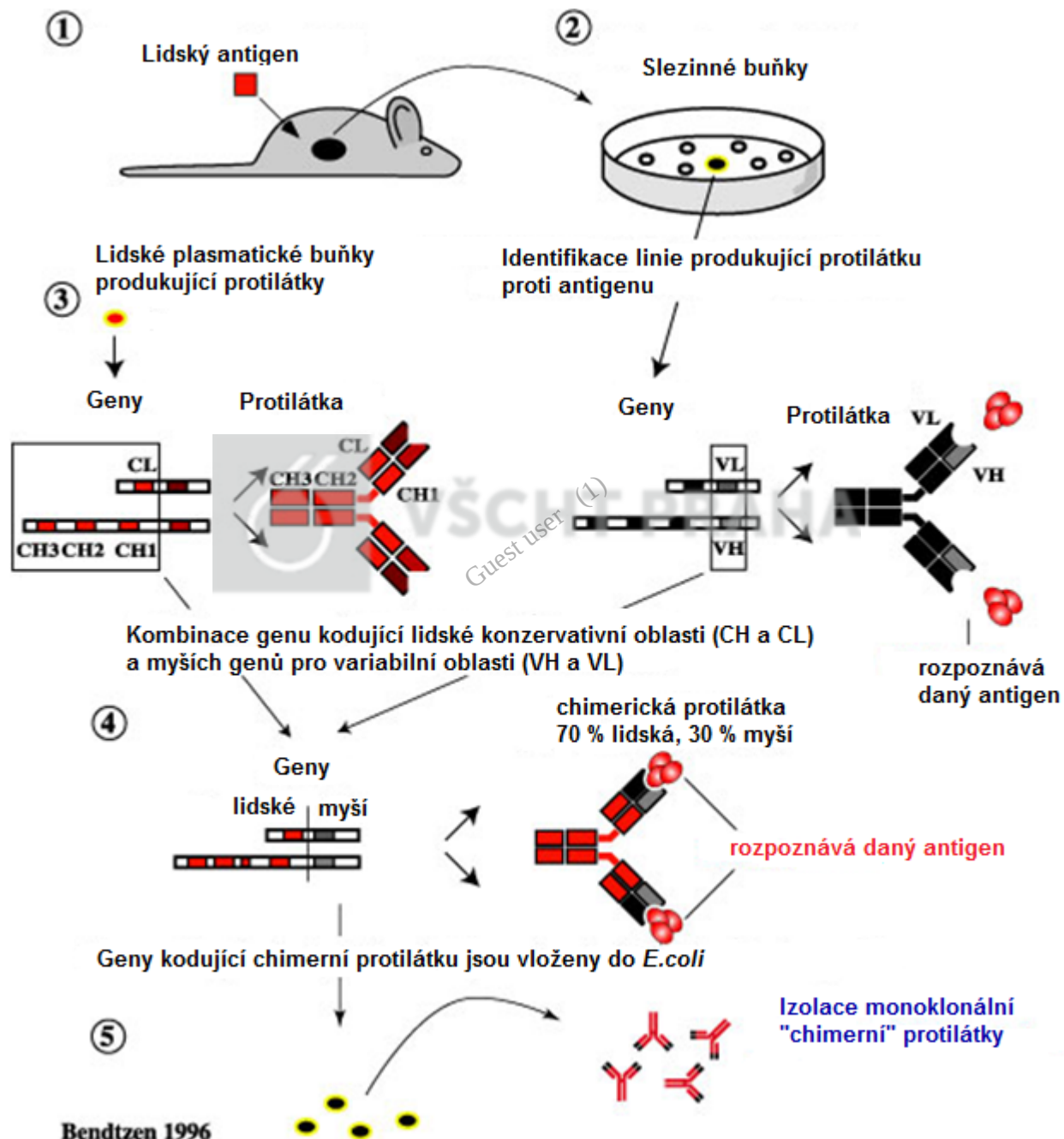


Figure 12. Polyclonal and monoclonal antibodies.



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).

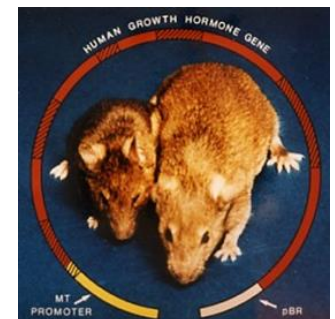
1975 - 1977 - Sanger s Barrellem a Maxam s Gilbertem vyvinuli techniky sekvenování DNA

1978 – 1980 – první rekombinantní protein

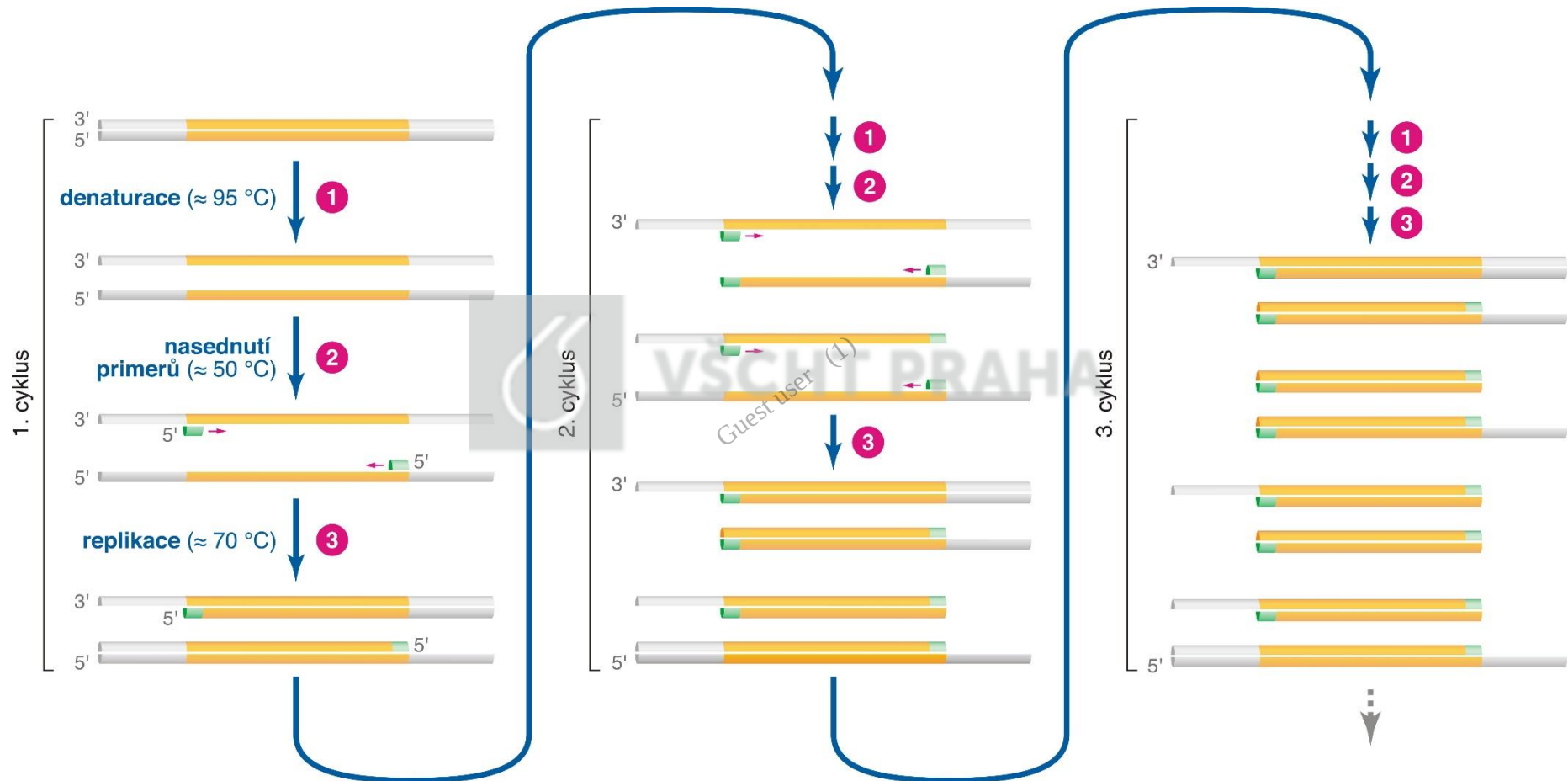
1981 - 1982 - Palmiter a Brinster přivedl na svět

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

1985 - Mullis spolu s kolegy vynalezl PCR



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)

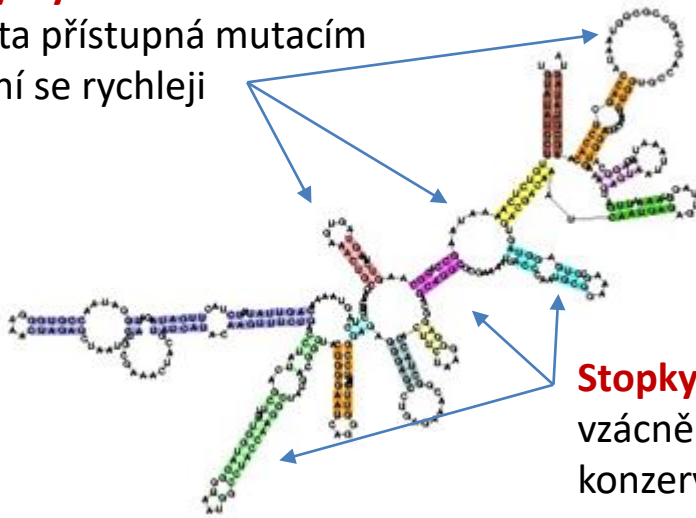
- velká podjednotka 50S — 5S + 23S
- malá podjednotka 30S — **16S** + proteiny

Eukaryotická rRNA – 80S

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

Smyčky

místa přístupná mutacím
mění se rychleji



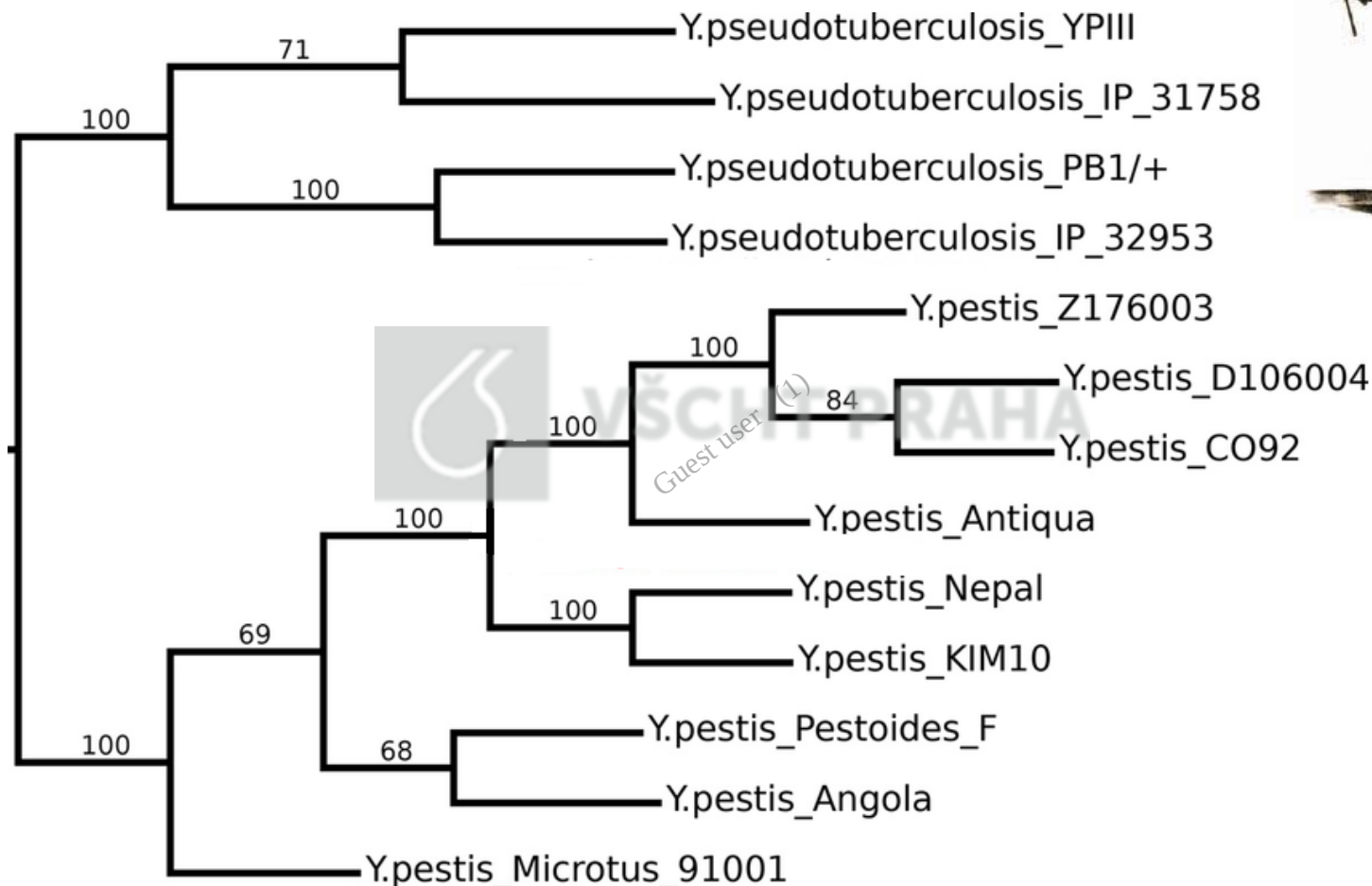
Stopky

vzácně mutovaná místa
konzervovaná



- PCR
- sekvenace
- porovnání s databází

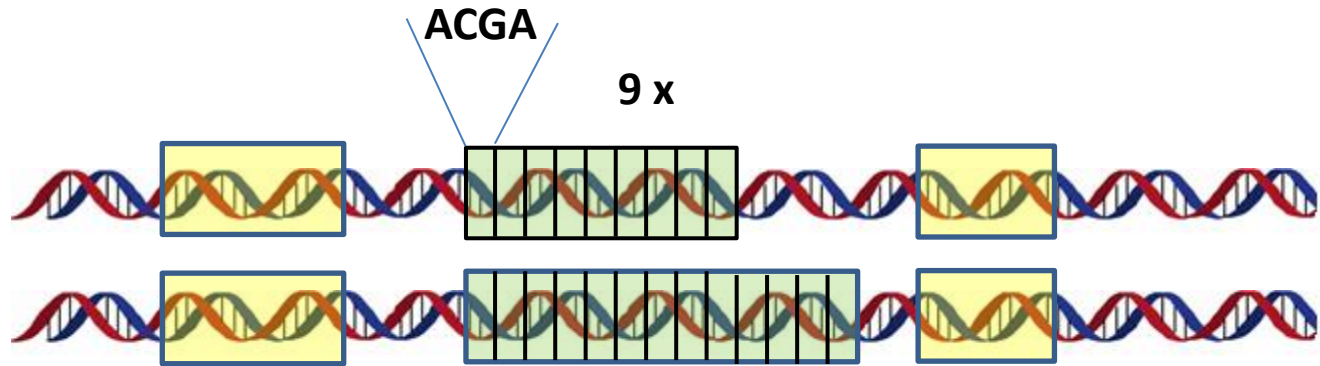
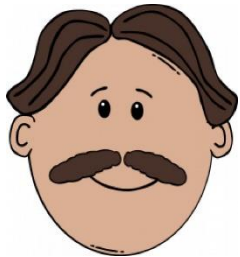
Fylogenetický strom *Yersinia*



K čemu slouží PCR?

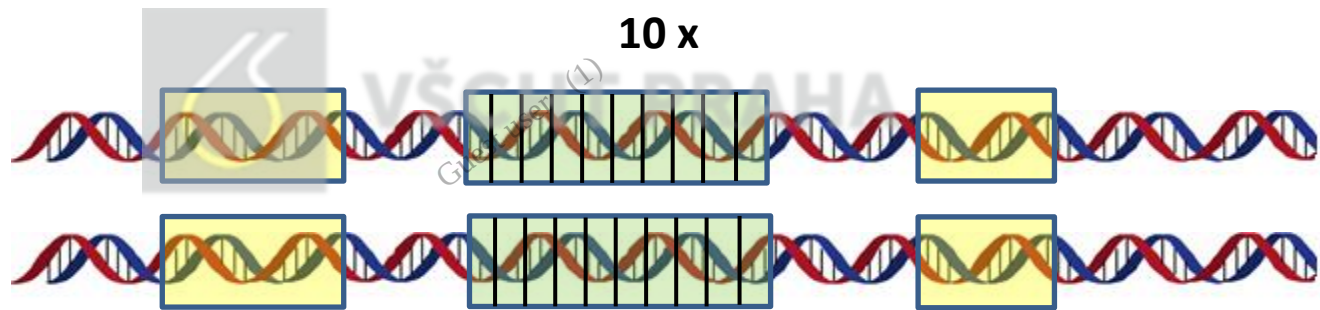
- Namnožení konkrétního úseku DNA pro další biotechnologické metody, jako je:
 - Klonování
- Identifikace organismů rDNA (rRNA)
- Vnášení mutací do genů
- Diagnostika infekčních nemocí
- Identifikace dědičných chorob
- Jednoznačná identifikace osob
- Kvantifikace DNA (RT-PCR, qPCR) - analýza transkripce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

STR (short tandem repeat) - identifikace osob

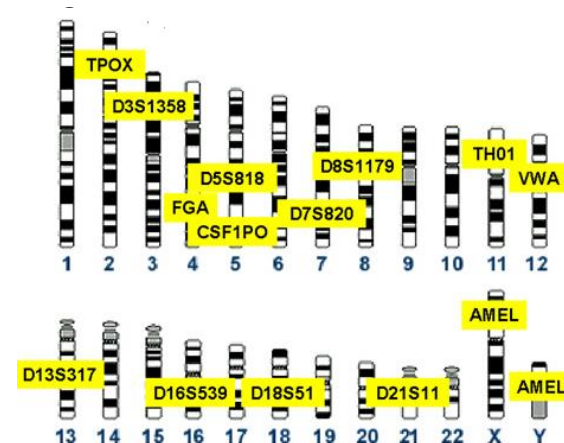
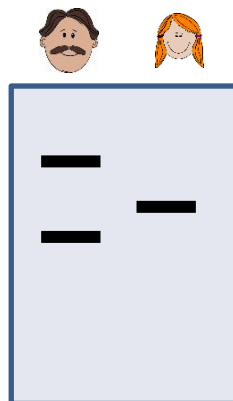


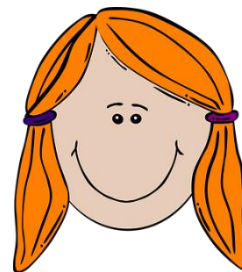
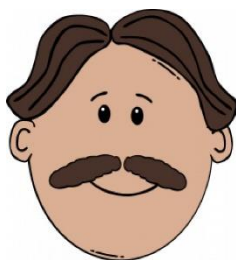
13 x

10 x



PCR



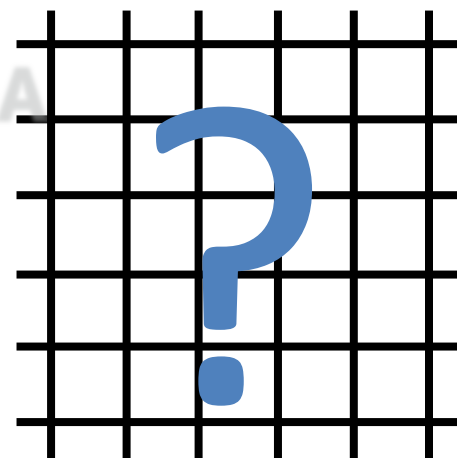
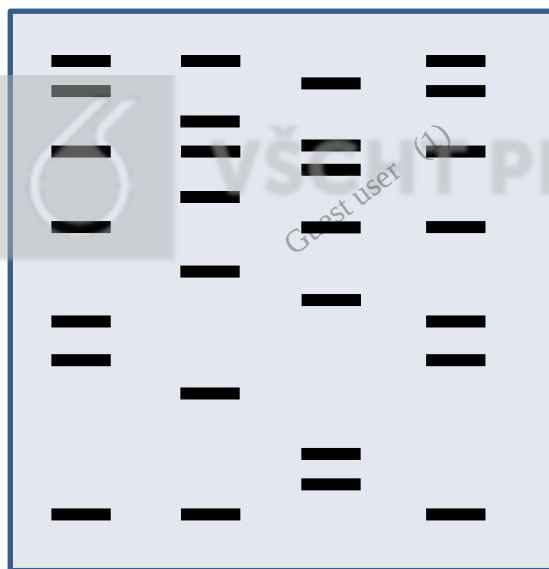


máte k dispozici
DNA z místa činu

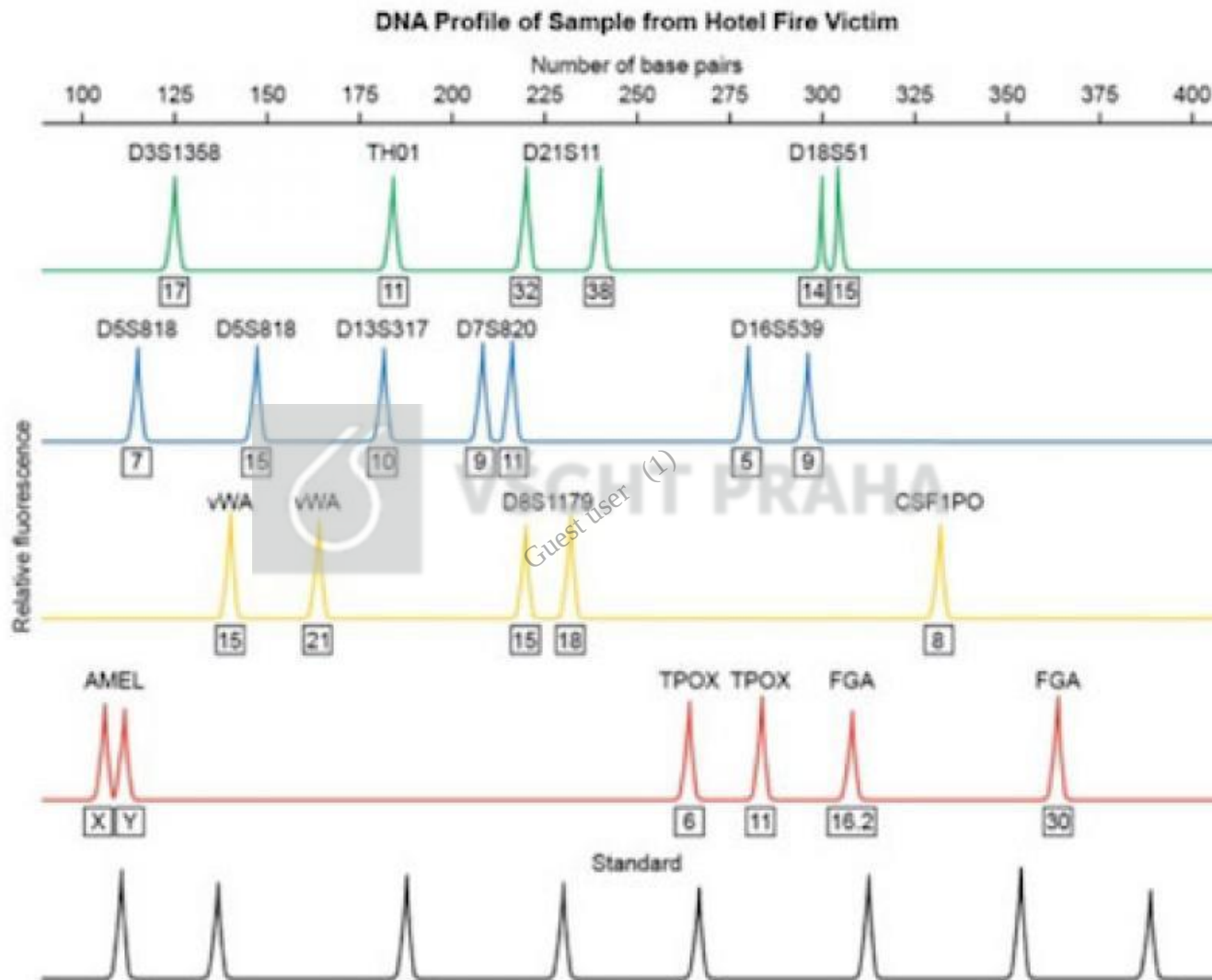


?

PCR



Věznice Světlá nad Sázavou



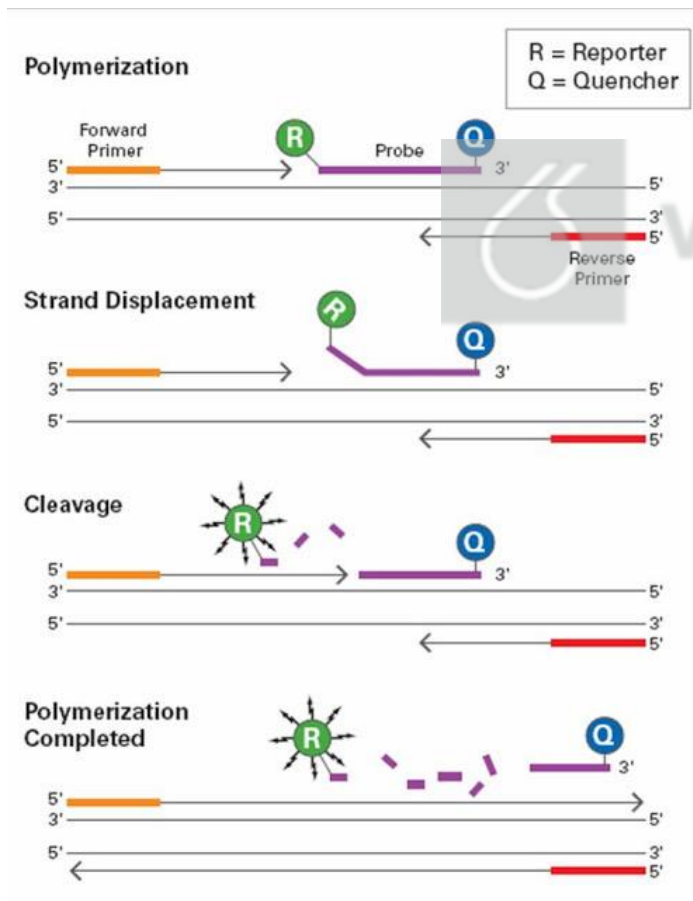
K čemu slouží PCR?

- 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

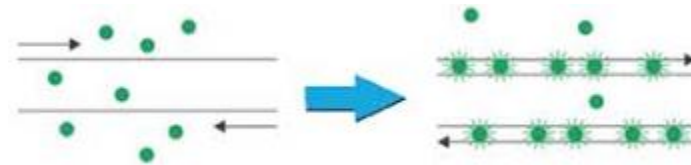
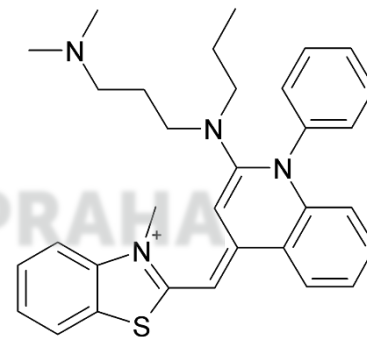
Kvantifikace DNA

- qPCR – kvantitativní PCR

TaqMan sonda

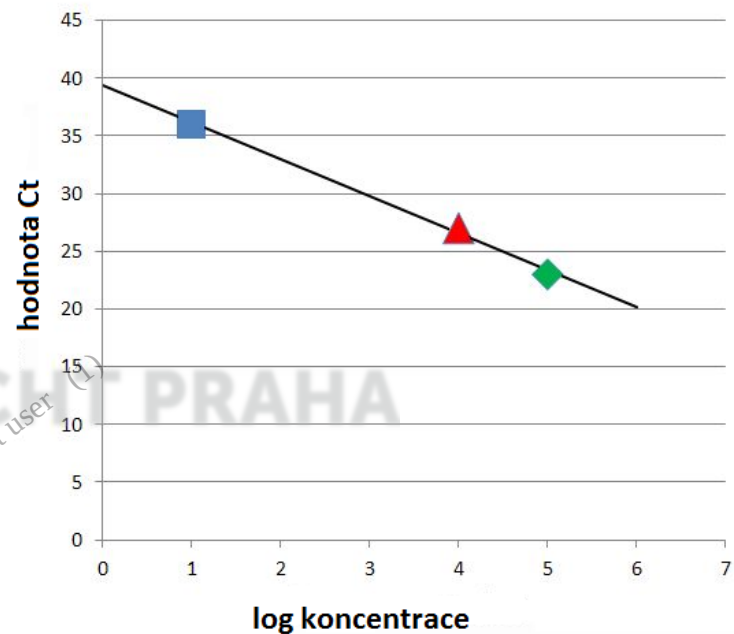
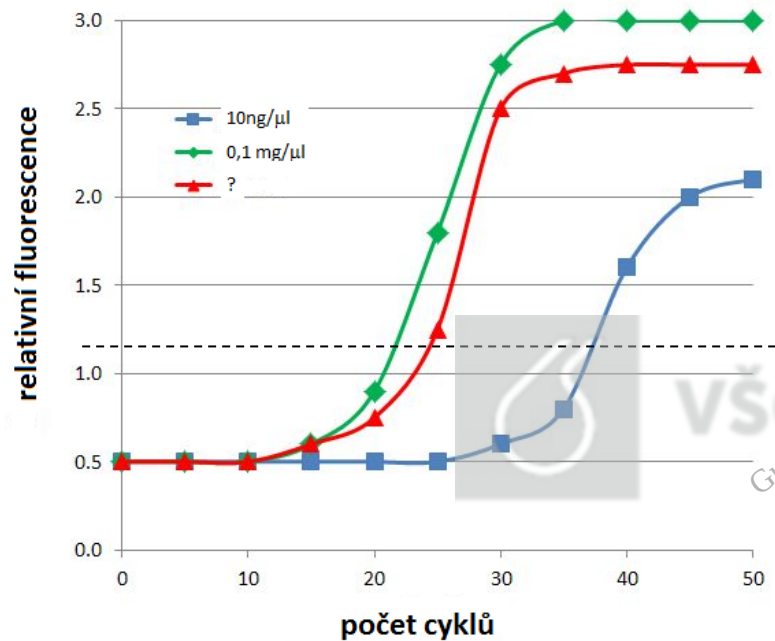


Syber Green, Eva green, ...



v roztoku:
malá fluorescence

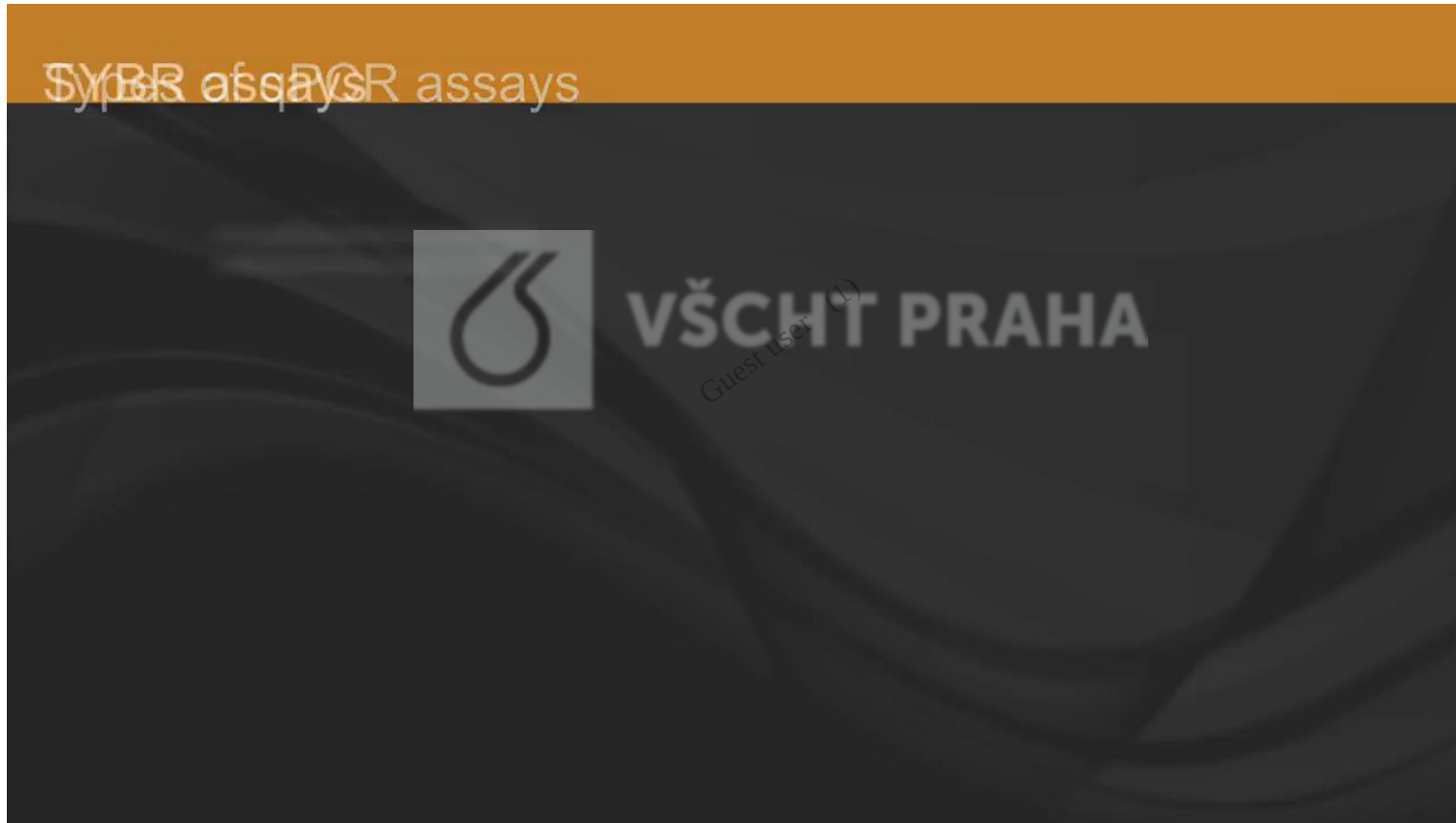
po vazbě:
silná fluorescence



t – „threshold“ - prahová hodnota

C_t – cyklus, při kterém bylo dosaženo prahové hodnoty fluorescence

- qPCR – kvantitativní PCR



Analýza transkripce genů

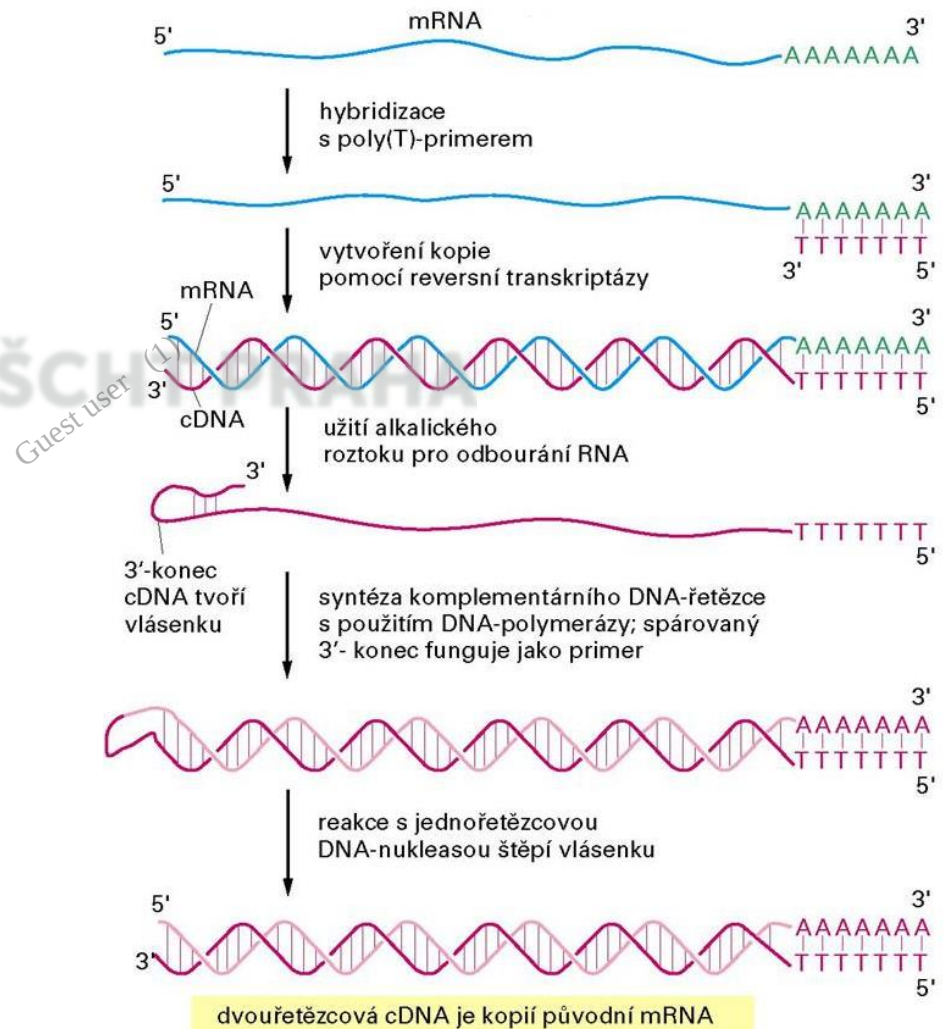
Reversní transkripce

Přepis RNA do DNA (**cDNA**)

- Reversní transkriptasa



shutterstock.com • 258247925



PCR detekce SARS-CoV-2

ARTICLE

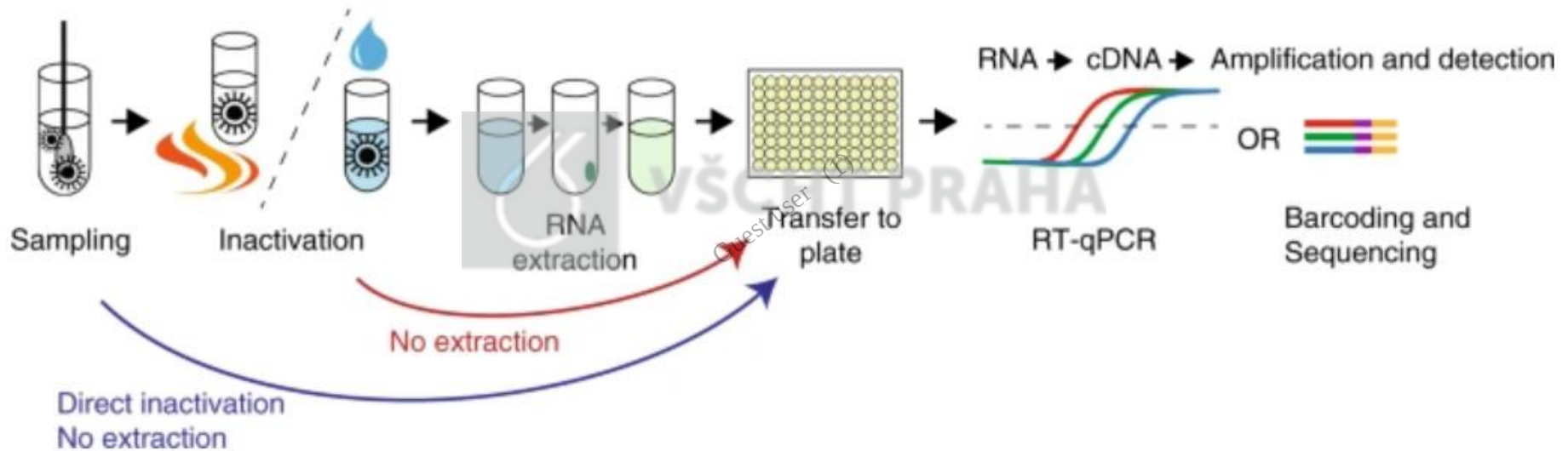
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>

OPEN

Check for updates

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

Ioanna Smyrlaki^{1,5}, Martin Ekman^{2,5}, Antonio Lentini¹, Nuno Rufino de Sousa³, Natali Papanicolaou¹, Martin Vondracek², Johan Aarum², Hamzah Safari², Shaman Muradrasoli⁴, Antonio Gigliotti Rothfuchs³, Jan Albert^{2,3}, Björn Högberg¹ & Björn Reinius^{1,5}



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

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

16 FEBRUARY 2001 VOL 291 SCIENCE

articles

Initial sequencing and analysis of the human genome

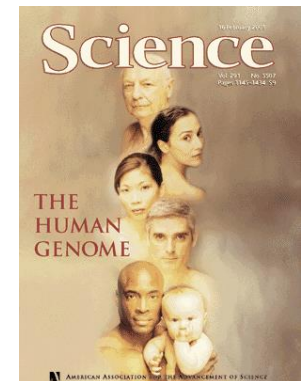
International Human Genome Sequencing Consortium*

* 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

[illegible]

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

Pyrosekvenování - „pyrosequencing“

- Sekvenování v průběhu syntézy komplementárního vlákna
 - Postupně se přidávání nukleotid trifosfáty a sleduje se, který nukleotid se naváže.
-
- Illumina
 - Solid, Solexa
 - Ion Torrent
 - single-molecule real-time sequencing, SMRT
 - nanopórové sekvenování
 - ...

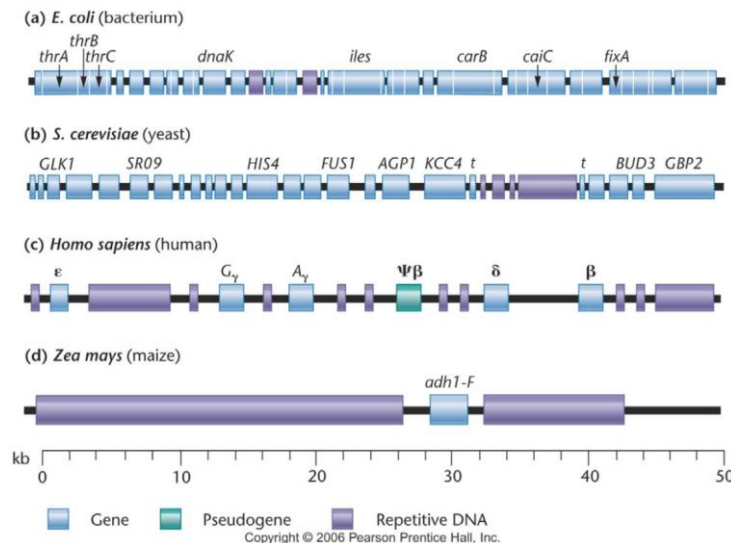
Srovnání genomů prokaryot/eukaryot

Prokaryota:

- Malé, kompaktní genomy, téměř samé geny
- Výjimečně 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

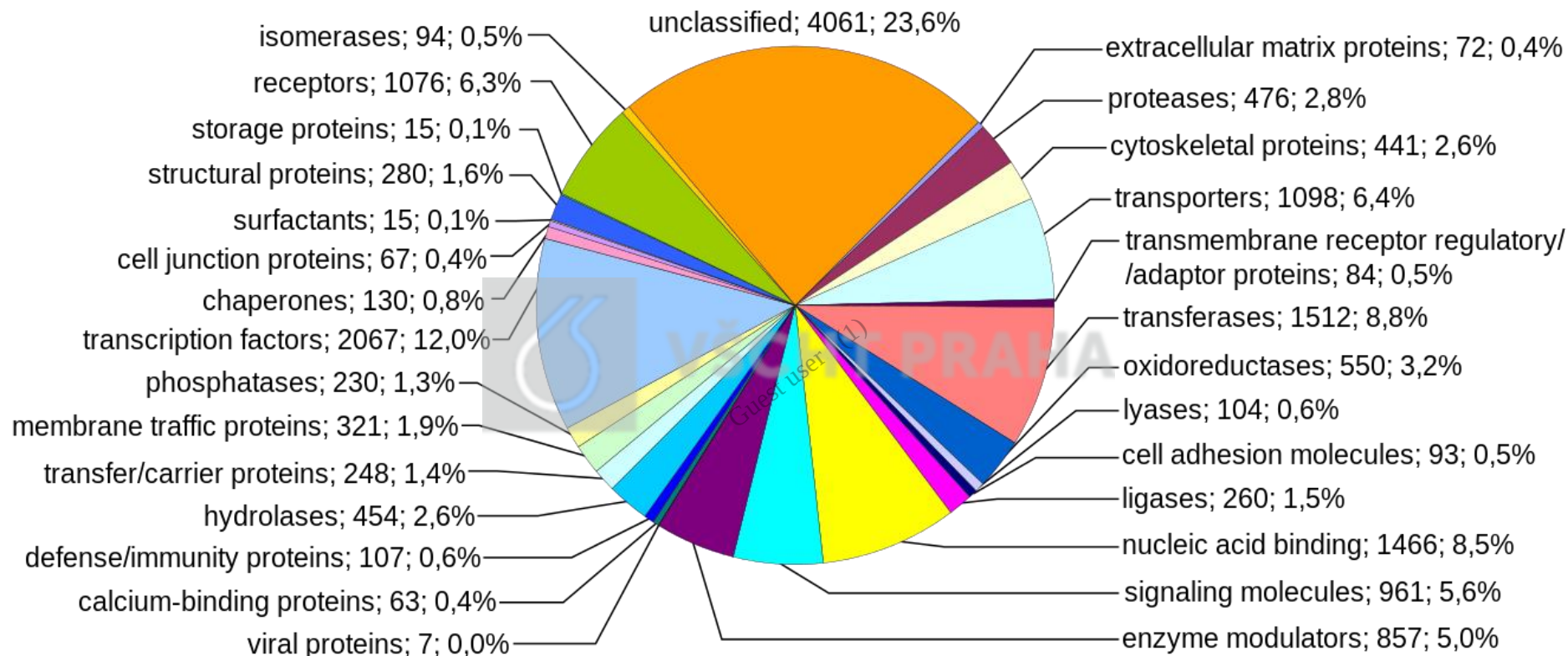
Organismus	Velikost (bp)
bakteriofág MS2	3 569
bakteriofág ΦX-174	5 386
bakterie <i>Haemophilus influenzae</i>	1,83 .10 ⁶
kvasinka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12,1 .10 ⁶
hlístice <i>Caenorhabditis elegans</i>	98 .10 ⁶
rostlina <i>Arabidopsis thaliana</i>	157 .10 ⁶
člověk <i>Homo sapiens sapiens</i>	3 200 .10 ⁶
Polychaos dubium sladkovodní měňavka	670 000.10 ⁶



VS.



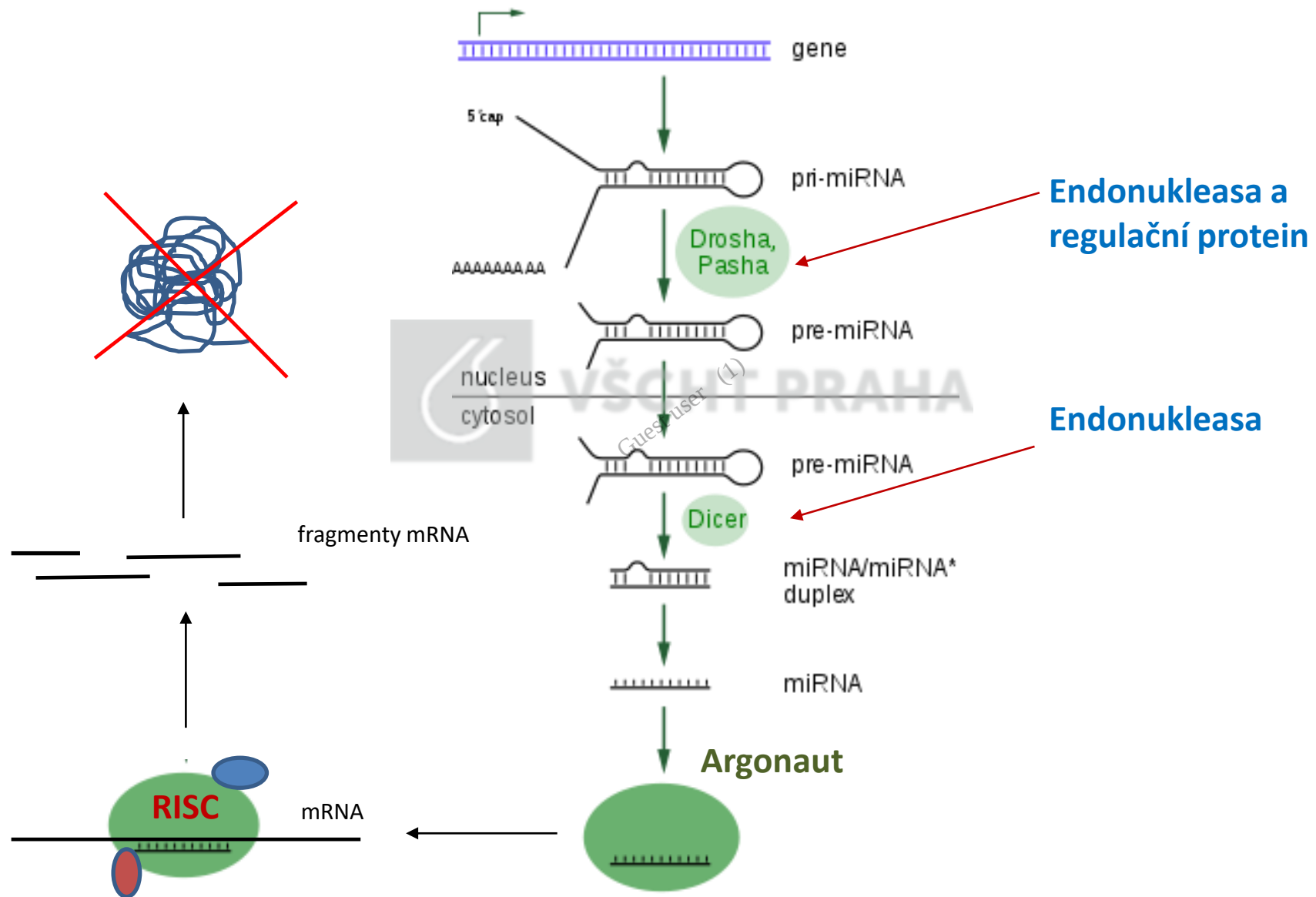
Lidský genom – cca 20–25 tisíc genů (1,5% genomu kóduje proteiny)



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)

☐ prenatální 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)



Hledání kódu lidství

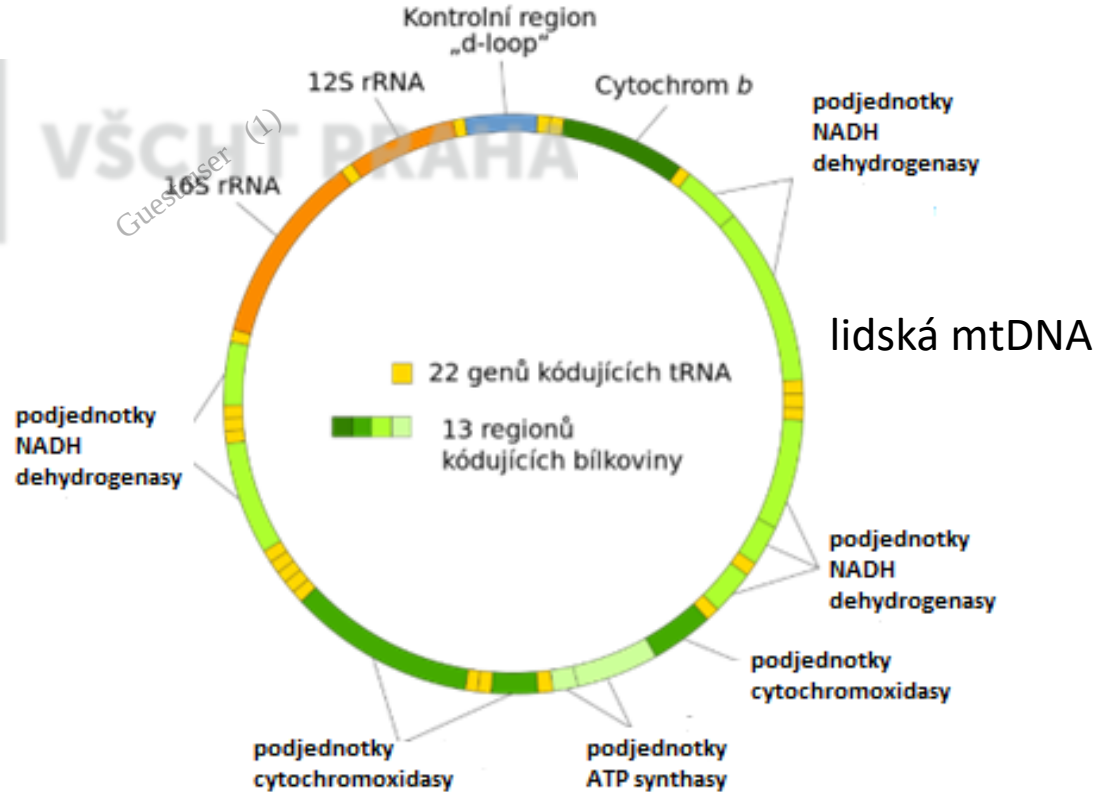
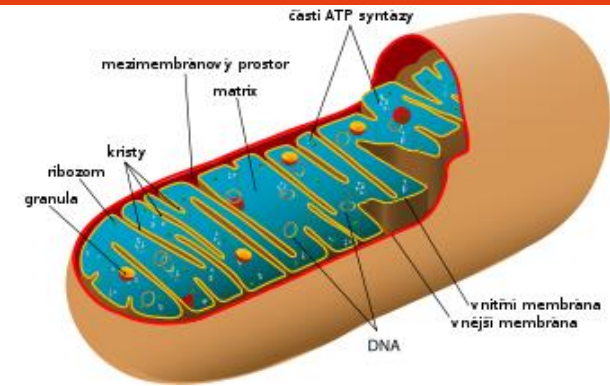
Eduard Kejnovský, Zdeněk Kubát | 6. 9. 2021 | Vesmír 100, 574, 2021/9

Člověk se od nejbližšího žijícího příbuzného – šimpanze – liší v pouhých 1,2 % písmen dědičné informace. Tak nepatrný rozdíl nám umožnil vytvořit celoplanetární civilizaci, formulovat náboženství, rozvinout složité jazyky, umění a vědu – a současně dovolil vystavět koncentrační tábory, zorganizovat genocidy a dle schopnosti ze dne na den zničit všechny dosavadní vymoženosti. Co stojí v pozadí lidství? Jsme schopni zjistit, které geny dělají člověka člověkem?

Mitochondriální DNA

mtDNA

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



- 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
- hmotnostní spektrometrie (MALDI – TOF, ESI-Q-TOF), 2D elektroforesa, 2D chromatografie

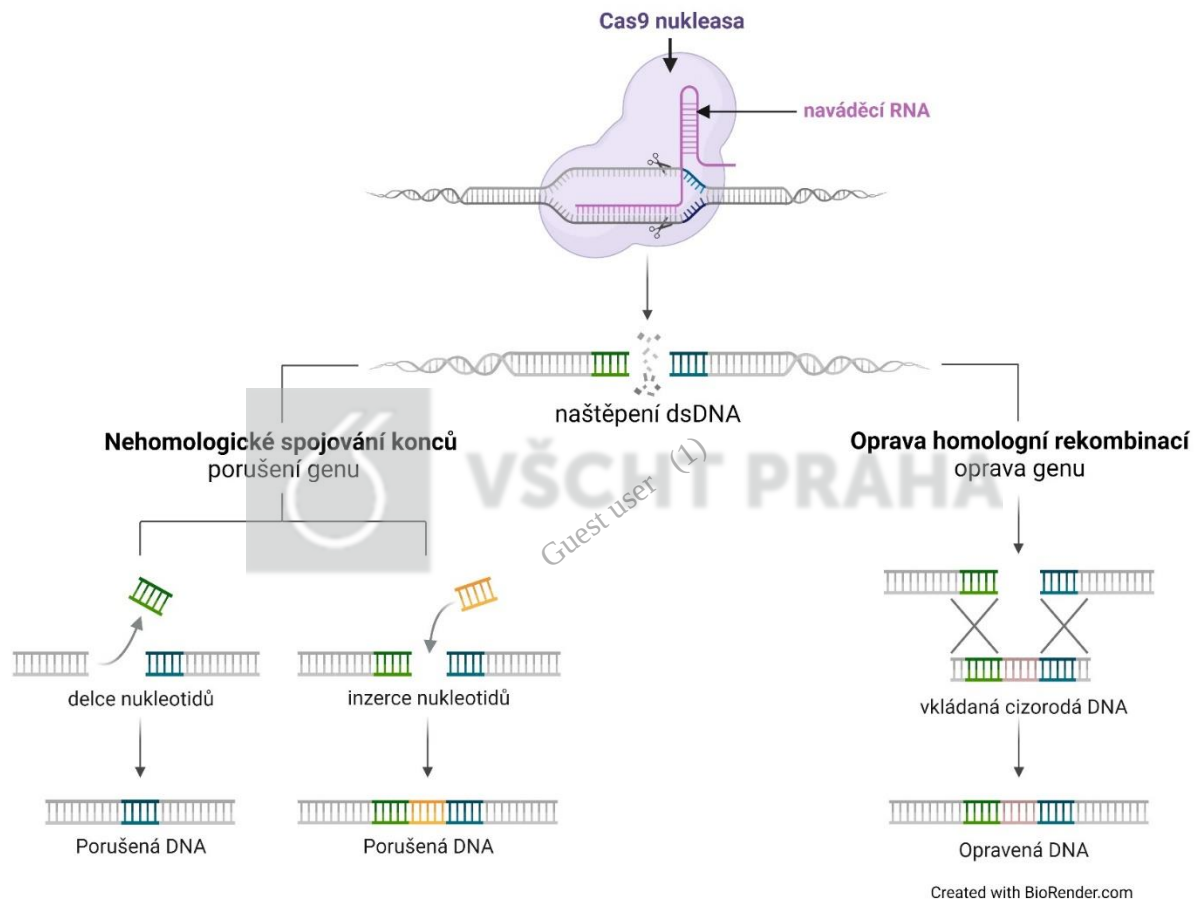
METABOLOMIKA

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

Etické problémy:

- UNESCO: **Všeobecná deklarace 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
- Kyperští Řekové: k žádosti o sňatek předložit potvrzení o testu na β -talasemii
- arabští beduini - přítomnost recesivního genu pro leucinosu
→ ženy se nevďají

CRISPR-Cas9 - narušení vybraných genů



Etické otázky • úprava ko-receptoru CCR5 pro HIV

Rizika • chyby při použití CRISPR-Cas9 0,1 % - 60 %.

- mutagenní řetězová reakce (vnesení na oba chromosomy)



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.

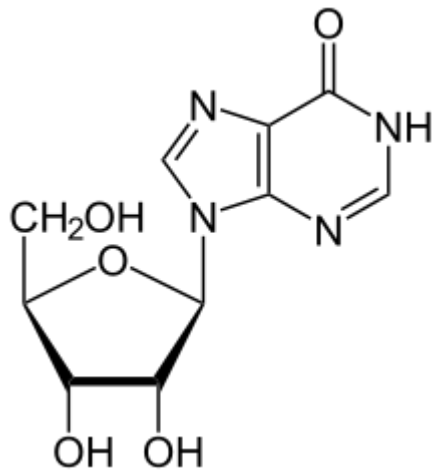
Kit contains enough materials for around 5 experiments or more

- 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



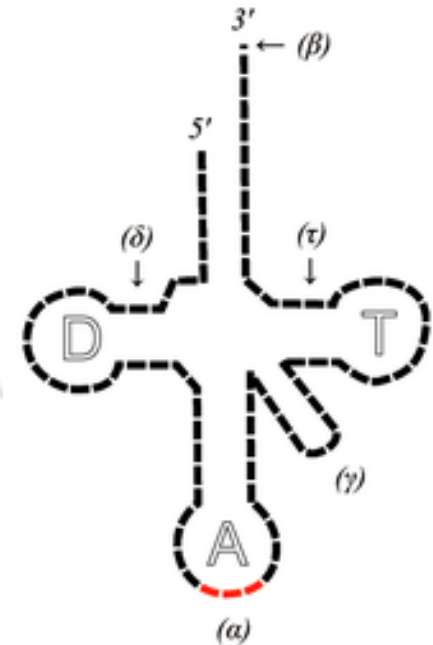
Adenosin



Cytidin

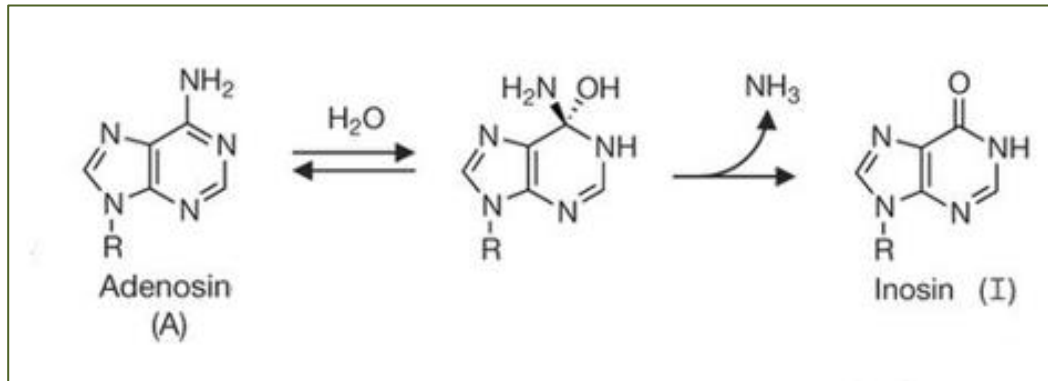


Uridin

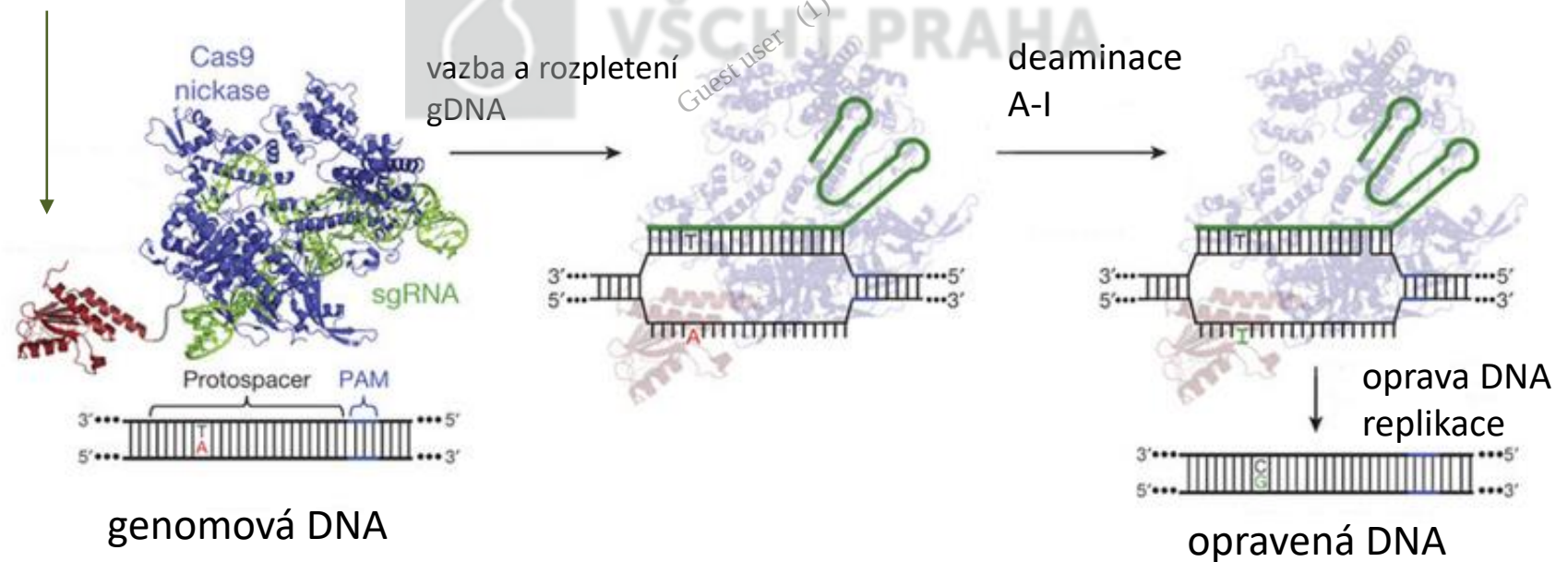


- DNA polymerasa čte inosin jako guanin

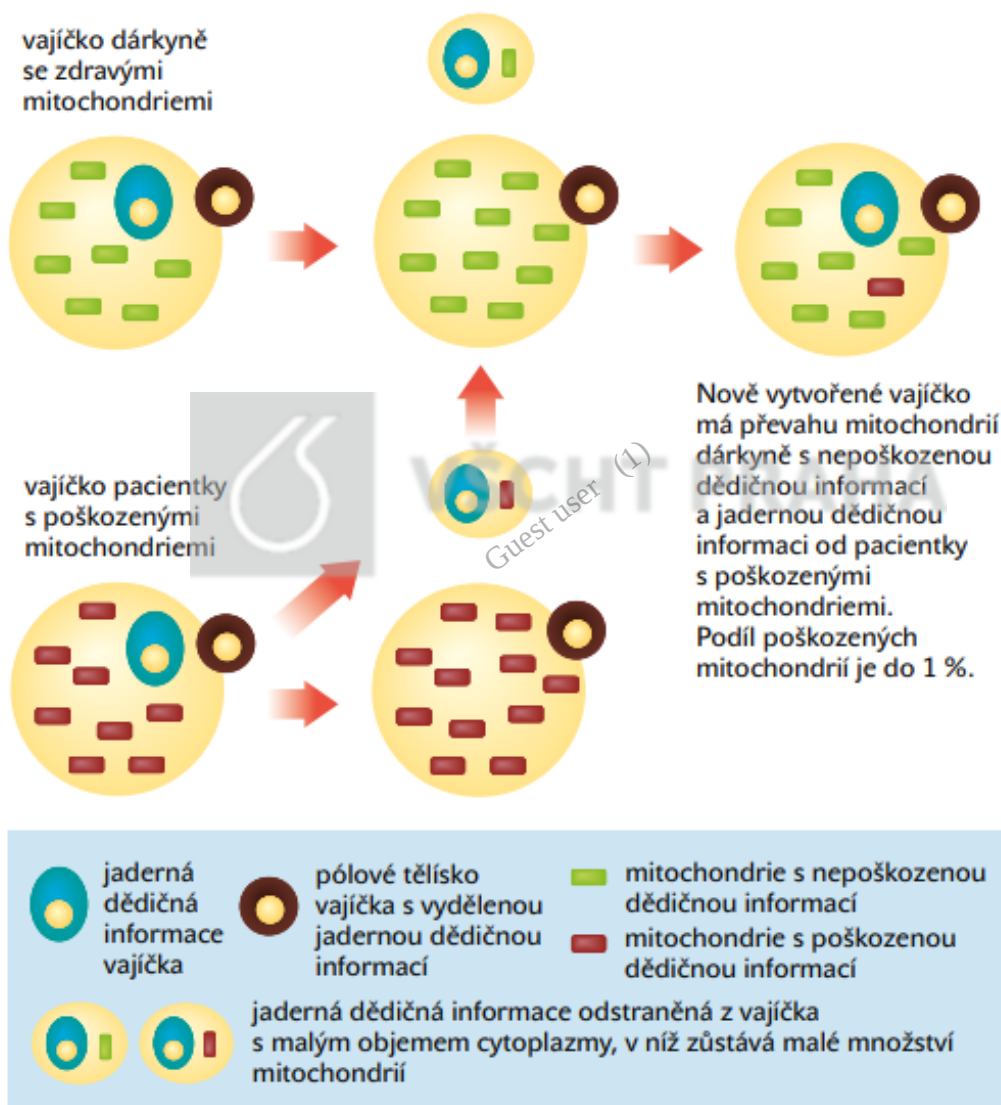
Editace genomu



enzym s deoxyadenosin-deaminasovou aktivitou



Děti tří rodičů



Generation of functional oocytes from male mice in vitro

Kenta Murakami, Nobuhiko Hamazaki, Norio Hamada, Go Nagamatsu, Ikuhiro Okamoto, Hiroshi Ohta, Yoshiaki Nosaka, Yukiko Ishikura, Tomoya S. Kitajima, Yuichiro Semba, Yuya Kunisaki, Fumio Arai, Koichi Akashi, Mitinori Saitou, Kiyoko Kato & Katsuhiko Hayashi 

Nature 615, 900–906 (2023) | [Cite this article](#)

32k Accesses | 1 Citations | 2960 Altmetric | [Metrics](#)

Vědci vypěstovali vajíčka z mužských buněk. Dva myšáci zplodili zdravé myši, nepotřebovali samičku

Jaroslav Petr
21. března 2023

 SDÍLET NA FACEBOOKU

 TWEETNOUT



Genom psa



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

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

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

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

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>





<https://www.genomia.cz/cz/test/caniline/>

Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution Licence 4.0

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), která umožňuje neomezené užití a šíření díla za podmínky řádného uvedení původního díla, jeho zdroje a použité licence.



Jak odkazovat na toto dílo: Lipovová Petra, Náhled do genového inženýrství, e-learning, VŠCHT Praha, 2024. Dostupné z: <https://e-learning.vscht.cz/course/view.php?id=301>