

Náhled do genového inženýrství



=

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

nejdůležitější snímek všech dob...

pp. 4388. April 25, 1953. NATURE 137.

appears, due to Dr. G. B. Deacon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* who spent time in making the observations.

Received by the Editor, May 1, 1953.

¹ T. G. Cowell, R. S. Stein, and R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1018 (1953).

² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1019 (1953).

³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1020 (1953).

⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1021 (1953).

⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1022 (1953).

⁶ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1023 (1953).

⁷ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1024 (1953).

⁸ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1025 (1953).

⁹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1026 (1953).

¹⁰ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1027 (1953).

¹¹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1028 (1953).

¹² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1029 (1953).

¹³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1030 (1953).

¹⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1031 (1953).

¹⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1032 (1953).

¹⁶ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1033 (1953).

¹⁷ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1034 (1953).

¹⁸ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1035 (1953).

¹⁹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1036 (1953).

²⁰ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1037 (1953).

²¹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1038 (1953).

²² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1039 (1953).

²³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1040 (1953).

²⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1041 (1953).

²⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1042 (1953).

²⁶ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1043 (1953).

²⁷ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1044 (1953).

²⁸ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1045 (1953).

²⁹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1046 (1953).

³⁰ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1047 (1953).

³¹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1048 (1953).

³² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1049 (1953).

³³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1050 (1953).

³⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1051 (1953).

³⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1052 (1953).

³⁶ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1053 (1953).

³⁷ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1054 (1953).

³⁸ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1055 (1953).

³⁹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1056 (1953).

⁴⁰ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1057 (1953).

⁴¹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1058 (1953).

⁴² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1059 (1953).

⁴³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1060 (1953).

⁴⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1061 (1953).

⁴⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1062 (1953).

⁴⁶ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1063 (1953).

⁴⁷ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1064 (1953).

⁴⁸ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1065 (1953).

⁴⁹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1066 (1953).

⁵⁰ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1067 (1953).

⁵¹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1068 (1953).

⁵² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1069 (1953).

⁵³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1070 (1953).

⁵⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1071 (1953).

⁵⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1072 (1953).

⁵⁶ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1073 (1953).

⁵⁷ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1074 (1953).

⁵⁸ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1075 (1953).

⁵⁹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1076 (1953).

⁶⁰ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1077 (1953).

⁶¹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1078 (1953).

⁶² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1079 (1953).

⁶³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1080 (1953).

⁶⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1081 (1953).

⁶⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1082 (1953).

⁶⁶ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1083 (1953).

⁶⁷ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1084 (1953).

⁶⁸ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1085 (1953).

⁶⁹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1086 (1953).

⁷⁰ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1087 (1953).

⁷¹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1088 (1953).

⁷² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1089 (1953).

⁷³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1090 (1953).

⁷⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1091 (1953).

⁷⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1092 (1953).

⁷⁶ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1093 (1953).

⁷⁷ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1094 (1953).

⁷⁸ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1095 (1953).

⁷⁹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1096 (1953).

⁸⁰ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1097 (1953).

⁸¹ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1098 (1953).

⁸² R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1099 (1953).

⁸³ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1100 (1953).

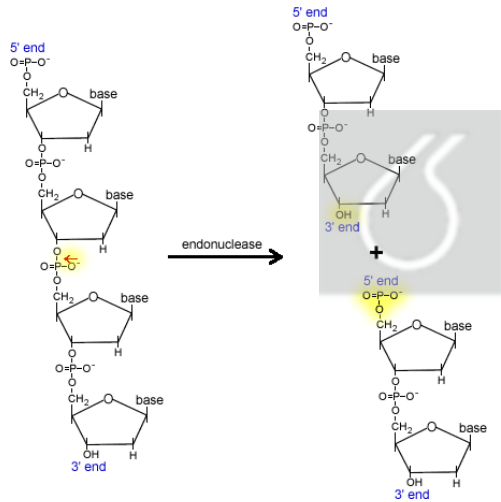
⁸⁴ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1101 (1953).

⁸⁵ R. L. Smith, *Can. Jour. Chem.*, **31**, 1102 (1953).

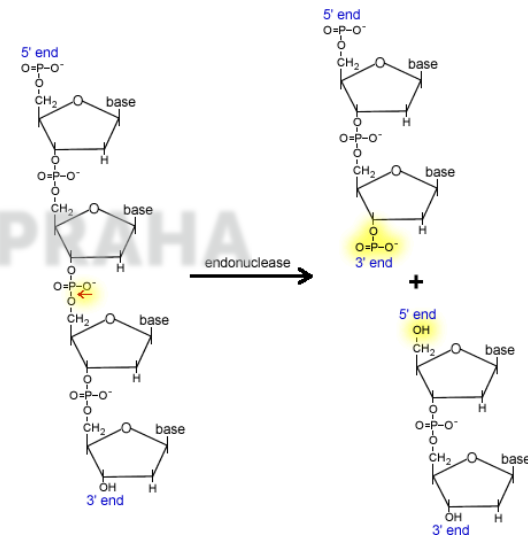
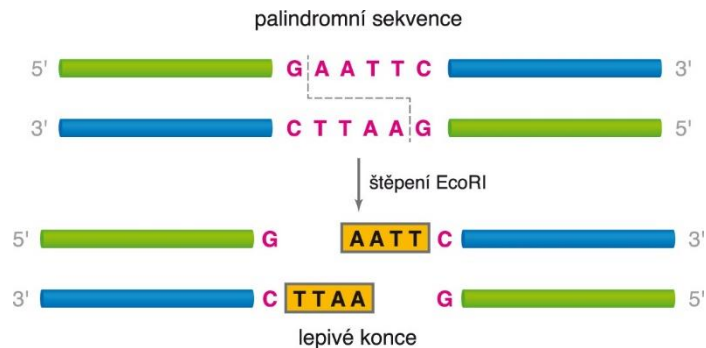
1962 - **Arber** přinesl první důkazy o existenci DNA restrikčních endonukleas (štěpí v přesně definovaných místech molekulu DNA na fragmenty)

Restrikční endonukleasy

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



EcoRI – kohezivní konce



SmaI – tupé konce

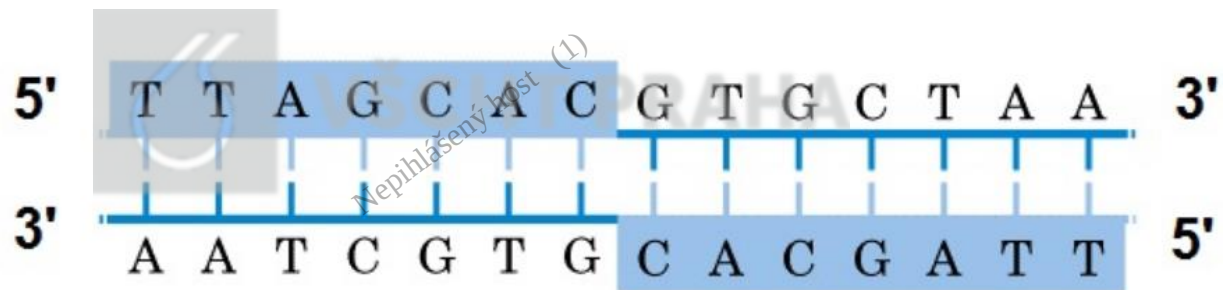


Palindrom - je slovo, věta, číslo nebo melodie (obecně jakákoliv sekvence symbolů, např. sekvence DNA), která má tu vlastnost, že ji lze číst v libovolném směru (zprava doleva nebo zleva doprava) a má vždy stejný význam.

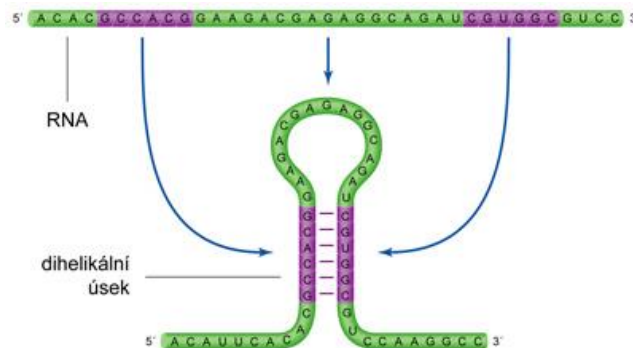
Jelenovi pivo nelej

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

dsDNA



ssDNA RNA



➡ vlásenka

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]

New England Biolabs (UK), Ltd.
0275 969 2000 244 440



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



vevox
Audience Engagement

Join at vevox.app

Or search [Vevox](#) in the app store

ID: 129-744-574



Jsou dány 4 různé jednořetězcové DNA. U které z nich, ve dvouřetězcové formě, byste očekávali, že bude štěpena restriční endonukleasou?

1. 5'-CTCGCATGCTAACTCGTC-3'

2. 5'-GCCTCATACGATGCCTGA-3'



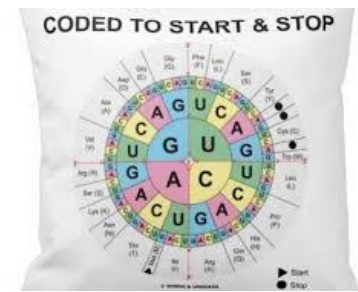
3. 5'-ACTCCAATGCATACTCCG-3'

4. 5'-ACTCCACTCCCGACTCCA-3





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



Genetický kód

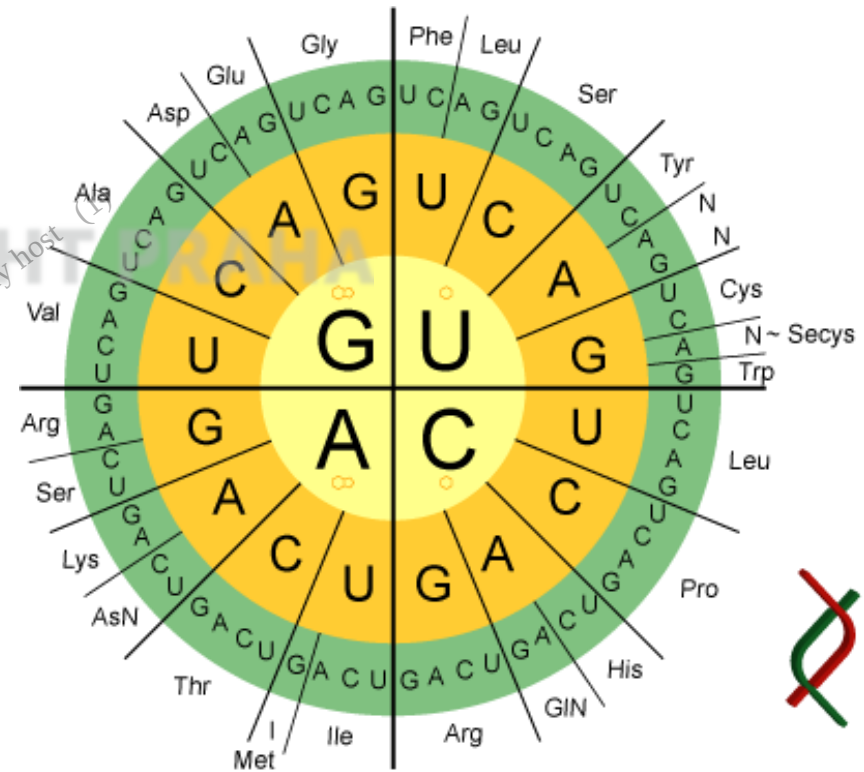
- složen z tripletů
- degenerovaný
- téměř univerzální

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

5'3' Frame 1

SILNRNPSRSRSRSPQYRQYRSRSRSMFRPQYSPGRSRSRSPGRYVYATMDGGGSPGYMRGRGTPPMLRSPFLHDGGLGSPSRRGPRMWSRSRSPFTHRMHHPDQGLYPASPSYSHDPSLSRSPSPSPNGRMHLKSSPLQVRQLSPKREARYDRGDGYGDGDNRRGRGRGMRGGRGNHGPFGHWSQENSLDDFDSAGLE
RDDRRAAGALEPVSFRAGYDHDGRDGRGPRRVEYSDGRRAQYGERAYEDRRNGVRERERAPNEQDAGRKIPTDEEDYRATEDRRKRGPIEDRRARYGDKKREDEDRARYENRAGHGEYDTPQVFETERYSTDDSRYSRDKRGRARDENUVVYVVEDGRAGGAGYDKKEDRDISHSGSGSRQRHNSQEDSIRSKS
FDSFGKNSRRTPPFRDKORDADKKDLGVRADRDDEKVVVDSERDIDKRKTVELEQKIDIDIKARELSQKIDIDIKARELERIEREKDRDKDRKDRDPGYRSRDRERRELEQREKESEYDPEYKSGKRNKVLASSSHKGDRTPHDEESHRYNADSDRERSRERKEQVTEKDTGEGAKEMKHDKKKKKKKRRASQTSEISGGEG
SGDGEKKKKKKKKKKKKLEDEVEGASGDEGDEKKKKKKKKKKSKSKSDLVPTDVSVGATTEVEGKESKSVETENKSKAAVSDLTONTAATETLVPVPLPQLSKWEDDEVEMTPEKSKETKIQEEEEQVTKDLIKRAEQAILYKGGQLASRKVFLVEVQKQEVDPKLESOKPESKEQKEDGEGPGGKSKSESQEAEX
RSPTPEWPDHAKRARGPSIQITISKNEAKITGRPKRGRSDSPDPGRKSGVEGDKLETAQDPGRKAKSPLOFTSSSKSTSVHEHSTSRSSNSNTSRSPVETNTRSSNRQNSQSSGSSSSRNQSDNTRTKSPDSSSGRSLSRSTRGRQNDKARSRSPGLDARQRSFVEPNIRTNRTNSTENKESNTSRSTRSR
KNDKNDISDENKEDLKGNEALSKSSDNGSLSDTPKPKNSATSDTGVRENEKNEKNSNENIDNQGPIEDPILSEIMSPRLQKIMTHNAEENHGKSKNSFSSENDPSNATEKEKDLVASSDGHGAEEKEKLLNTSVKPDNASKIRDTSSHAKKELHSSATSEKHEIPKIEEMKEQNAIINARNSKDEQKDEVNLTSS
QVEGREYKVLDSYEYSYENDPSKSDTYASSRYGRKSHDDKYDKGKGDAAYGKGNDAVGEADAYGTTTSYGVGHDKGHGSHSLYEYKYPQEDSSRISSEVSYSSKYDPGHRVNPDEVEEGELIEEIEEVEEHIEGGPQENVSYSKSSSYNTDSHALHSSMLNSSSNFVGAGPANRCSPIRPLSASPTDMVLKEKNKKKK
RRSSSPSSSSSSSSSSSSSSSSDEEILKKRKKKKKKLANSDSGEALNKRSHKKKKKKKKKKKK

5'3' Frame 2

PI-BIDRPDHDQGLHSIASIDLWVVECHVDSIHLVDVHLEVGIMLLMMVAVILPAICAGGEPHQC-GLHHCMTGVLTVLRHREVLGAGHAHALPHPYTECIHMIKAYTQHRHLHIMTHHYHQADHQVPMGVCI-SPLLCRCDNSHQREDEDIEVMMETISTIEVEVVEE-EVVEEIEVMEVIGNLKKTAMTISIQQDYQ
GMIGEAMP-NPMSVGLGIMMAGHTEALEGGGHSRMVDVKMENELMRIVATIVDVKEKLLGMNQEERYLILRKIIGDMKMTGNEQVLRKTEEDMMVKIRDMKRVKDMVKTAGDIKSMILNVLYQKQNVILRMIVNGILIEKEIEGTMTFELKLMVDVEDEGMIRKKIGI-AKVVDSDQKGIQGGKIVTEASL
LTLQERILGELHEPFIIRIEMLIKKILDIKTEKMKRKL-WIVAGILKEKHMILNKRLLILI-RLNCPRLI-TSKLKN-RKEFARKEIKT-KEKIRETLVTEVDGIGKON-EKONLSMIHMKKGAKGM-SLLQVHIKETEHRMMKMLTEIMLIVTENAVLSEKSRLEQKTKQKEKLLK-SMIRKRRKNVELHRHLKTFQVARD
LVMMKVKRKRKRTKENTLRLMRFLVFKVLVTVKTRKRKEKIRVVRVKLI-PPOMLVLVELLR--KGGKAKKALKITRVLQFLQILILILLQON-SLQCHNSPNKGEKMMK--LLRNQKQLSKRRKKNK-QKIFLNLQSKOYVIKONG-HQEKYF-KFKGRKR-IN-KNRNRRNQKNNKGGKMDLREVNQKVKRKLKS
VVOLLINGPML-EKQSAVALQFKLYPLKMRHK-DVFNVDALTHLVOTVGNQVRVIN-KQBNMMKELKVB-IQLHQQKVKLLSIITVQEVDTQIHTAEVL-RLIQEVOEIVEMQVWVWEISQILELKKQOHTQGGLLEV-DLEQVMMITKLDQEVREN-MQREVOLSPFIELELQIKRKLKSSILLQEEQVIG
KIMIRILIPKTKMS-RVMKG-VKRVLITEA-VIPLKGIPLHOTIV-GMMKMKGTVMKT-RIIKDPLRIQFQKL-AQGYKK--LTMKKIMEKVRATALAKMIFLQKILKGGKIN-LVMGNMGLKKGFS-TLA-NITMLQR-BIQVVMQKNTIITQOLVKSMMKYLKKK-KSMQLMLKKEKILRSMKMR-ICQHG
NMKESTRS-IHMNVLMKILAKTILMHLEMDENLMNINMGKMMHLMVKEMEMAKGMHLLMDMLMTVKMVLTH-NIMNTHARIPVEFDQRFTVASTKIQTVESTQMR-RKGS--KKR--RKKFMK-EARNRKMVMAGREPTQILMHYIIVC-VTILVILV-QVLPYVAVHDPFSLVQQTWFSKKIRKEKR
EADHLLQVVQVIVVHVWVWVMMKY-KRERARRSLQTIVVMKE-INFDIKRRKKRRKK

5'3' Frame 3

RSEKSTVQITIKVSTVSPVSI-SFHATISVFTW-ISFTISRSVLCYGGWRSFSRLYARAGNPPTNEVSTTA-RGSWSLSTVTKASLVTLTSPHTQNST-SRPIPSIAIFT-PITITQKITKSQWAYAEVLSSAGATILTKEKEKI--R-WLWRLQSWKRSWANERSWRKKKSWSWSASLAI SRKQLG-LRFSRITK
G-SARHGLRTPQWEGHW-S-WQDQRPWREEGGVGN-TTSRIWRTSL-GS-RQRM-T-KRSS-E-TRCPKMDI-Y-GR-L-EI--RQETKTRY-GR-KKIN--KEI-R-GS-KIN-KPQGTSRV-YSTCSTRNRTFLYG---TVF--KRR-KGRKRCS-S-RMT-KTRGI--ERR-GYKQ-RVTKKA-FRARR-LQKQVF
-LSRKEF-ENSTQR-EGSRC--KRSWISKRQR-ECSCGS-RKGY-KKMI-T-KD-Y-KYG-RIVPED-YRQGS-RTRGNSREKR-RPRKR-ERFWLQKMG-GRTIKRRI-V-SI-KREKCEKACFKFT-RQNTT--RISQKLC--QRTQFS-AKRAQWNRKRRKRS-KNEA--EKEKET-SFTDI-LFNWAGI
W-R-KEKKKEKQKQKISA-G-GFW-SLW-R-ROKEEKKR-E-KE-RFSRRHC-WCHY-GSRERKQKGS-N-R-OCCSCFRS-Y--YCCRYTSPSSAIATTLQMGK--GNDG-GIKRN-PRGGRRSDKRSY-TS-ASNTI-RTTVISIKKISFSSKAEGR-IKRIG-TEGRITKRR-RT-GR-IRKRSKGS-KA
-SNG-MGSCCERSGAKWFFNSIYIIL-K-GNTRQTWTL-HI-SRPWEISGG--IRNSPT-W-KS-KISIRNFIIKK-NFCGASF-YK-K-TPKYQKSCRD-YKFK-KSK-KW-K--KSVR-Y-N-KPNRFIKGD-K-FKI-NKRSK--QS-IKKSGRIRCKTEKSS-AQYSN-K-NFN-K-GRKYFKQKHK-E
R---EY-PRQKGS-VKG--SSK-KEF--RT-REFRYIRHWCKE-EK-KEQ-KRQG-SRTH-GNSFNENYKATKNNDSQC-RKSKKKEFEQL-RK-PFEKCY-KRKGSGS--WETWG-GKREAFEH-KT-QCFKDKRYK-YTCKRTSFFSN-KQA-N-T-NRERAEYNY-C-KKGF-G-AER-GEFVNIT
I-KIRKQRLFT-I-L-K-S-QRQVLCI-IWKKS-QT-RWERG-COCIW-RK-CIWRGCGCHIKHYFWIWSQRQTWFSLIRI-KIPTGGFQ-NSIVGLQ-QVCEPSQSPR-GRGRGNRRDRNRGRSS-RDRRPFATGKQOL-WVVLQHRFSCTIF-YVK-L-S--WCSSRCQYTLTHTTFLC-SNRHGSQRKE-EKKKE
KEIFRSK-PK-----FIQ-----RNKKEKEKEKACQ---W-SLK-IQT-EKEKEKEKEKE

3'5' Frame 1

LEFLFLFLFLFLMSGFI-GFTITITVCKLLFLLLSLF-YFFIITITITITG-TTIT-TIWR-SLSLFSLILFFENHVCHVTSREGSYG-ATYGRCTYTRITRTV-HIPL-CMBICVWGRPIITDIFLLRASVLMNFFLYLYFFY-LPFLYLWVDVSTWIFVLATVNL-RSNSTGILLWVFFI-VRMSEVVTISRS
ACISGIFALCISSTFICSSISIPFBIPIVIMREFSSISR-GISTVVARIFITIFI-I-DIVSSSFL-C-QHILFILLRLIFPSIINCCILLTGFENRY-MAETIS-RMKFEFFCMITCISYL-SIVAFVSVQVLFLFLS-PMETISYQLEFFSIF-RKIIIFAKGVLATFS-IFIESIVSHVL-PWAFNF-KNWLING
LSIILVFTIVFLFIFILPYSV-CGIPFPRGIT-ASVIRTILT-FTIIL-LILFVGINILLIIFPTSCSS-SRIFFLIFS-SSISSYGLNWTLSLSCI-PERS-SFVILITSCSSS-TTSSP-I-CWAFSSSII-LISTITIT-FILTSIS-TSCISLYRTSAVCI-IRTSCTRMHLRSFIF---SWI-WTFS
FIRLQGC-FITLH-FPTGOWTRCVASTFGSILFIRGYSNLM-RATACFSHSGIPSPSWTILFSSFLFT-FTSRARSFIFLFF-PLAFIRFF-FIVLFLPLNF-KYFS-C-PLSFI-YCLISSFKMCHFFLFLDLSFF-FLRSHVITLISFFPGEGLWMMWRD-PCSSSISISIKI-NSCSTIVIFSNAFAFF
FFYLVSSGGINICGM-ITFLFILFSLFLVLTGVRGTRGLKRSFVFLFSLFTFIRSLAT-NKRL-SSTFLFLFLFLMLHFFSFGFVFLSIFLRTAFSIVFISISGVRMSVCFM-T-SKLYIPFAFFFIWILRFFFS-LFFIPSTSVSTVSLISFISF-VFISILANSFL-FPSFDVIMLL
QGGSSLYNINLLFLFKTFCSPNIPATHIWNFLPVSFISIKIFISISILLSSGNSPILWWRKALASVIFLP-IMPLS-LSTFIAYIPIFFLIISPSSTISIFMNSINVEVPSISPSIRPIITIRAITFCFWRILSITILLMSPAVTISITFILLFISLITITISSSIFLMTWFSFVFVITISPIIFLSIKYLSSTCIT
FIPASPTSTINASTIILSSSITILSSSITIKLHPFSPRASVFAIMIPSPPTDMGF-GHASP-IPW-SC-IEVIAQVFLRLPVSIR-MISSSTSHSSSTSSSTVEHSITISISSLSL-EISLQARGLMHTPIGTW-SAW---WYM-I-RRCWV-AL-TMMHSHVWGGR-A-PARST-RWRVTIKVMMQRFPQ
MMGSSPFAHAGRMATIHSSIVFSRW-TRSTR-ILSTWHTTITSLAILNRP-S-SGRSISQIG

3'5' Frame 2

FFFFFSFFFFFLCLDLFKASPSLSLFASFFFFFLFFNITSSSSLLLLLDELILLSLELGEDDLFLFLFLFLSLRTMSVGLAERGMGEQRIILAGPATPGLLELLNILECNA-ESVL-DDPS-LTFSCGPPITS-TSSSIISSSISPSSTSSGGLT-PSGLYLLT-TSDDRILLESSCGVFLYSNE-EPCLPS-PYPEVV
PYAASPSPYASFLPYAASPSPPFLYLSS-DPLPYLDEA-VLSLGLGS-LYSYESKTYLSLPSYCVDKFTSSFCSSLEFFLSALVIAFCSFISILGSCSSLSVAEE-SFFACVLVLSLIFALSGFTIVFKSFSFSAACFPSSLATKSFSFVFEEKSFSKLFFELFP-FSSAL-VIIFCSGLISIRIGSSMG
P-LSSMFLLSFSSFFSFLSFAEPFLGVLRLPFLSSLSFSLFSLFILLVLEVEFSSLSFEVFLFLLGTSFLLGLCLASMSGLDALLSFL-PIVLDKLMLVLDSEVGLLVLLDF-LFLLLLPLDSF-LFLELLLVVITSGLLCLFELDLILLVE-CSTEVLFDDDEVGSGLLAL
LPNGWAPLNSPSTDPRGSGLDVERPRIGRPTCASFLIEDIVI-IEGPRFASLTALGSHSGVGLRFSASS-LSFLDPLPGSPSSGFCSDSFGSLDSFNLSFCL-TSNTFLDMACRPLYSIACASARLISFVCSGSSSWSILVSDSLGWTSSSSLSHLESCNGTGTGNVAAVLSVRSSETAALLSSVSTLLSF
PSTTSVAVNLTISVGTKLLSLLLSLFLSFFLSSSSPSSPEASPESTSSS-DFLSFFFFLFFSSPSSDPEIDISDCEALRFFFFFLSCFISAFSFSVSPVTCFSRFSRSLSSLSA-PL-DSSCGVLSPLCELAASFLLKFLFFPSYGSYSDFSFLNCSLSLHRL-PGSLSLFLSRLSIFRILSSSSALLMSISIFW
DNLSLISISIFSSSSSVLLLSLRSITITFFSSLSFRYPSFSLASRSLFLSGVLLLEFFPGESKDLLL-LSSCEPLCLCLDCLPILLISLSLSFLYPRLLRPSSTLTSTRSSLSLSPFLSEYRLLSVE-RSVSGTR-VYS-CPLRFSPYLLSSSSSYFLSSPYLLSSSIPGFRFLSSSYLL-SSSVSNIFLPASC
FISGLSRLPLPLRSS-ARSPT-RRLPDSTLLPGPLSILPS-SYPALPLTWGSKMPPRSLSGSPAESKSKSLFS-DCQ-PPGP-FLPFRPLIPRPLRPLKSP-PSPLSYLLSLFGESCRTCRGDFKCIPLGLGLDLSGDSGCEYEGDAGYRP-SCGCILC-MGGERERDQGLRFDGGE-PRPSCSGGDINI
GGGVPRPRI-PGE-PPSPIVA-YRPDGERDLPGEYCRRGMERLDRYRYCGDLDRDLGRFLRS

3'5' Frame 3

FSFSSLSFSFYVYVYLRLLHHYHCLQASSSSSSFLILHHHHYYYYYMMYYHNLNYLEKMSIFSSFFSYSLF-EPCLLD-ORGWVWSNVYQDHLQDY-SYLY-NWHEMLCCRTTHN-HFFVAGLLSLHELLPLLSLLLLAPLPLHLG-LCDLDCTCYCKPLTIEFYWNPVPGIYIILMSENHVLCDRHQK-C
RMQHPRHMHHLFMYQHHLFSLHYLCHHEIFPH-MRHKYCLD-DHFNHYHMLNAPCTILFHVLMNINSHLSAR-NFFQR--LHSAISFLQF-VHACH-LMNEVFLHVVYLYLLSLKHCQVLR-CSKASLFPQPHVSHY-LPNFLFYQLKKNHR-SGSSNHFDFLQHCSEFLFVALGS-FKLDPQW
LDVGLFCFYCHFSFHSFSPSLMLN-RNSL-VWYHGLFGRYSPSYFLHYLTHPLCFRNGYSYHYSYFLFLK-NFLPYQLKFTF-FYWAQGLDFVSLHILDFELL-LCYHFDLLF-LINFY-SLPMHLLGE-Y-LYITDFPYFYHYLHDFDYFLNLY-SLDQFCVCYIN-IYFLY-NDAPQKYSFLMMKLIDGDF-LF
YHQVGLFYLHYHPLSHGGDL-MCQSVHVMWDLVFEH-RI--FELGAGALLSQHWDPQIEDVAYQLPDLFLIYL-LVHLFVLPYSPYIILYPLSAFELLKILFLMLTVYLYVLLAQV-EYLLSIVLLPLFGS-FLLIP-BSLPHHFLFWRVMALEGLIL-QOYQYQDLQQLQHSQYQLQCLFIS
LLLPQ-WHQH-HLWELNLYSYFYSYLFSSFCSLHRQLRHLQKHPQAEI-FFCLSPSFSFHLHHQIPRHLKFQMSVLYLYSSSSFSYHASFFQLFLCLFLPQALFAHENCVLCHQBNFCEILHHVFCILLVNLKQALHSFCSLFHMDHTQILFLFLVLPYIPDFCNGQSLSYFLFLGLYLSRREFFLVL-L-CLYQSSG
TIL-PLYQYQSPVQVMMFF-YPPFYDPDLFSHLCLFDIQLFYQHLDSYLVWES-NSFLESQKTCFNYLLALNAYVILVHYLCLYPLLSYPLVFFVHLQ-LEHRFPFYLLFYQNTVYVH-NWVLFLQDVVEYHLDVPGFHHIFYPDHLHSFYHHHIFYYLPQVFLVYSCLHHISYNLPQVQISFFFLHV
HS-BLLFHVYQACVDPHKLVLHLDVYHPTPPSLGGLCPSCDHDTQPSH-HGVLRCLADHPLVVLNRSPPCFLEIASDLQDHDFLHDLFLHDLFDHDCRSLHNNHLYHIFSLISLVVVAPEERTSNAYAHWDVICIVTMGHVNMKAMGLGDLHDVAFVWGESVSVTSEAFHVTVSDQDPRHVAVETSL
VGGFFARAYSRENDRHHB--HSTDLEWVNEIYQVNTVDVAMNDYEIDTGTIVETLVIWTVGDSR

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>.

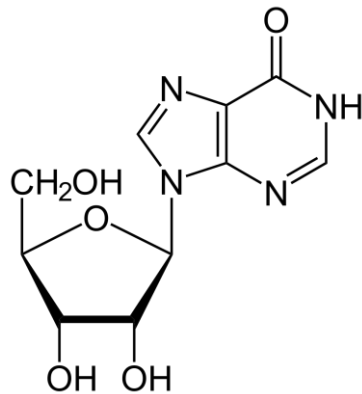
² The letter in parenthesis represents the one-letter code for the amino acid.

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.

Kolik existuje tRNA?

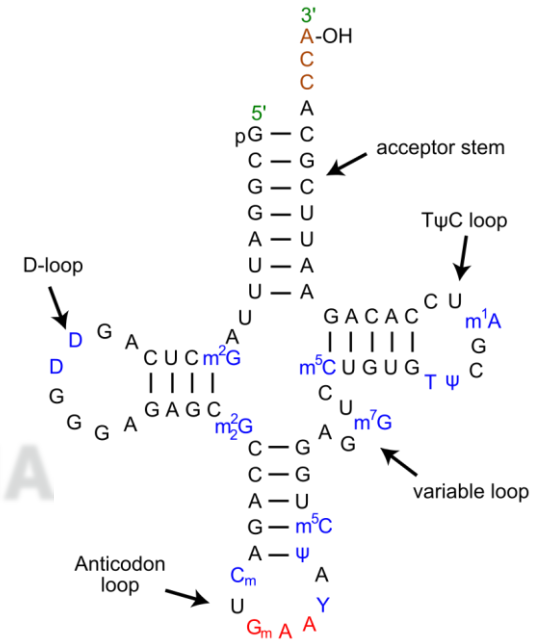
- **cytosol** - 40 - 61 typů tRNA
- **lidská mitochondrie** - 22 typů tRNA
- **chloroplast** – 30 typů tRNA



INOSIN



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 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

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



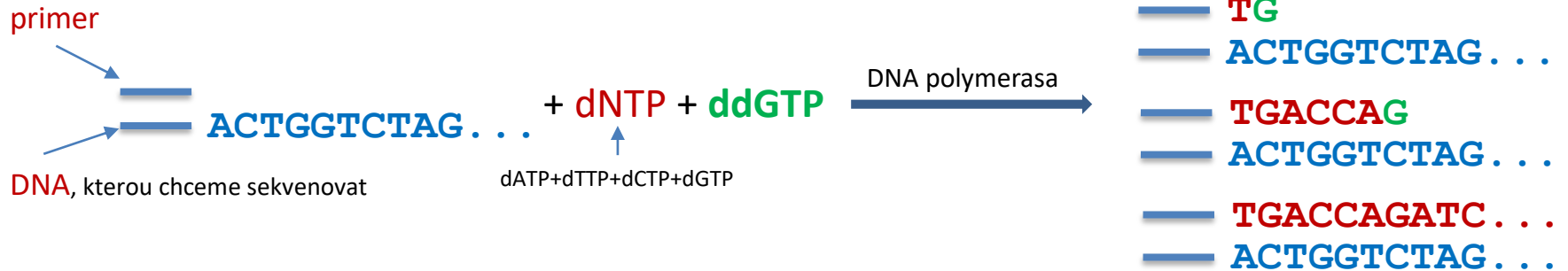
5. elektroforéza, detekce radioaktivity



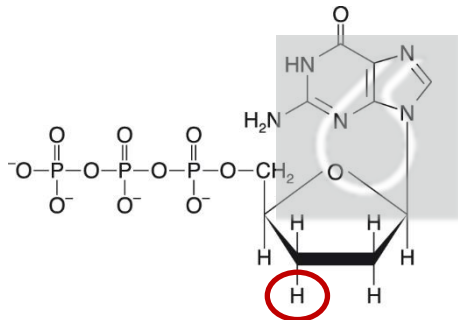
6. přechtení sekvence

?TTGACTTAGCC

Sangerova metoda - „dideoxy sekvenování“



ddGTP

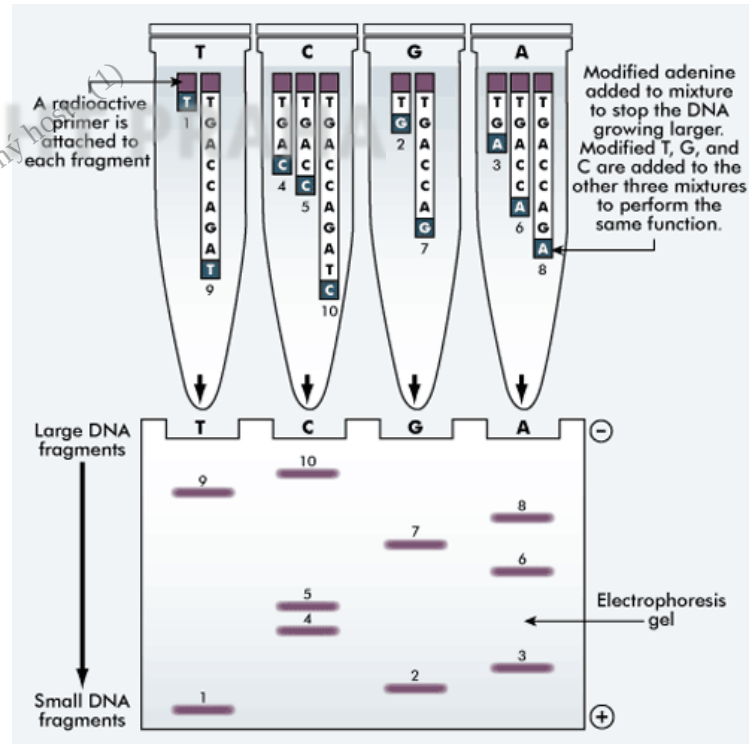


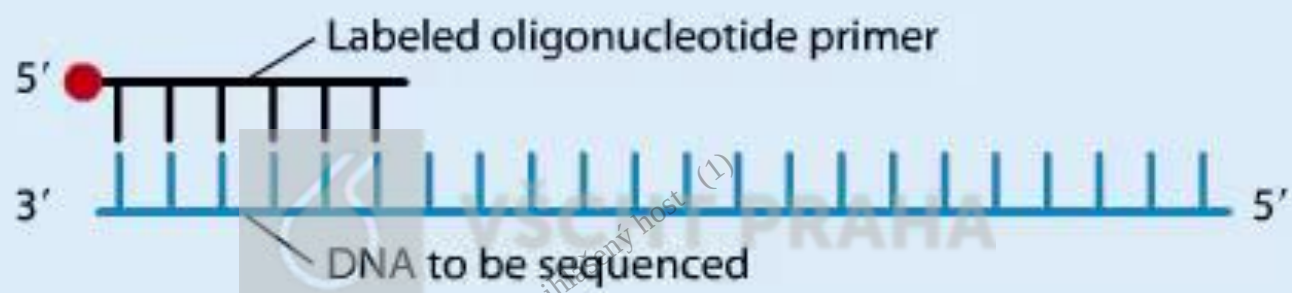
dideoxyguanosintrifosfát, ddGTP

ddTTP

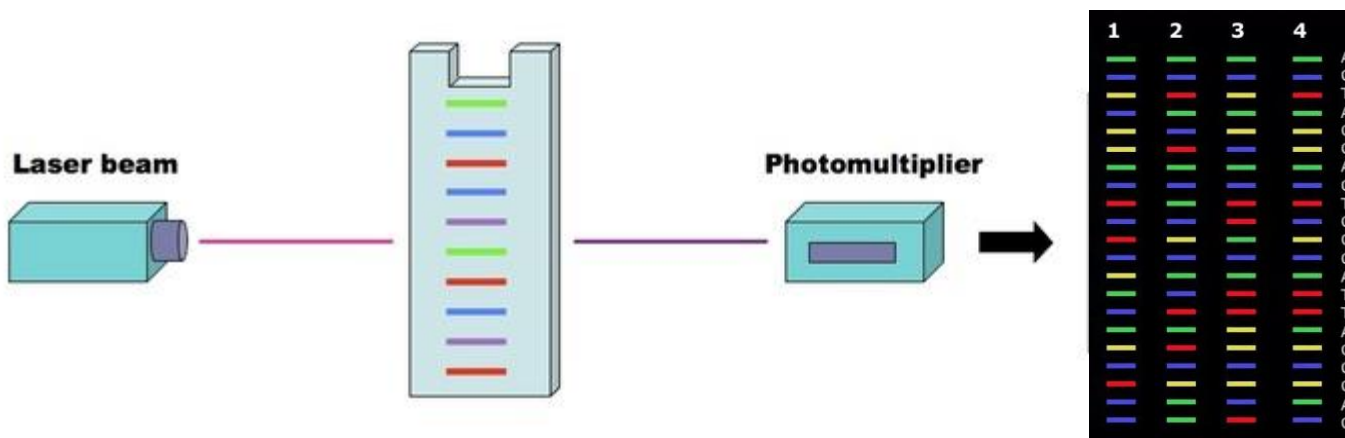
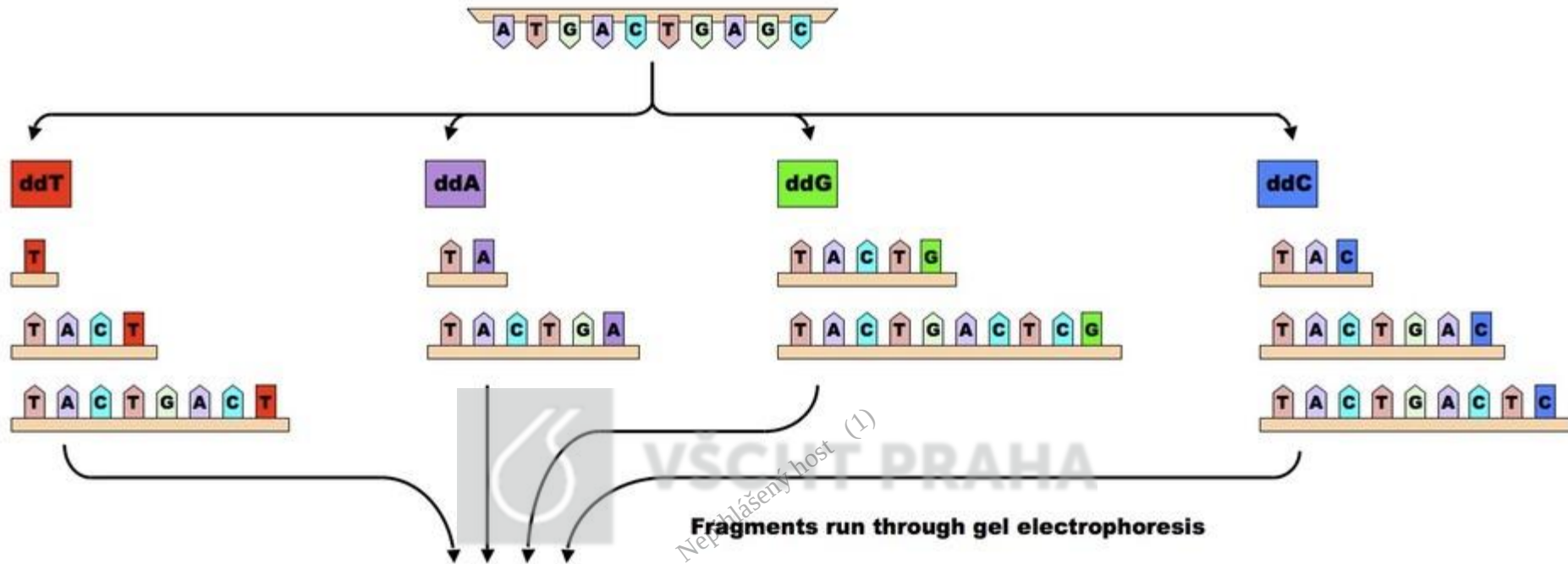
ddATP

ddCTP



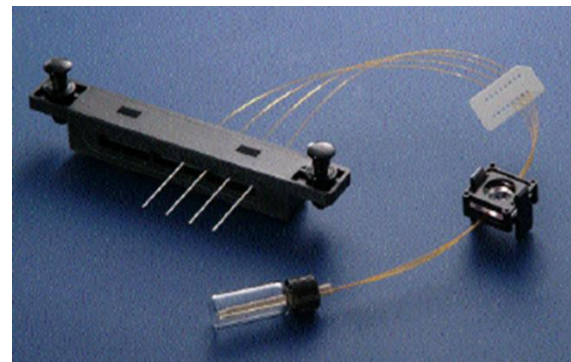
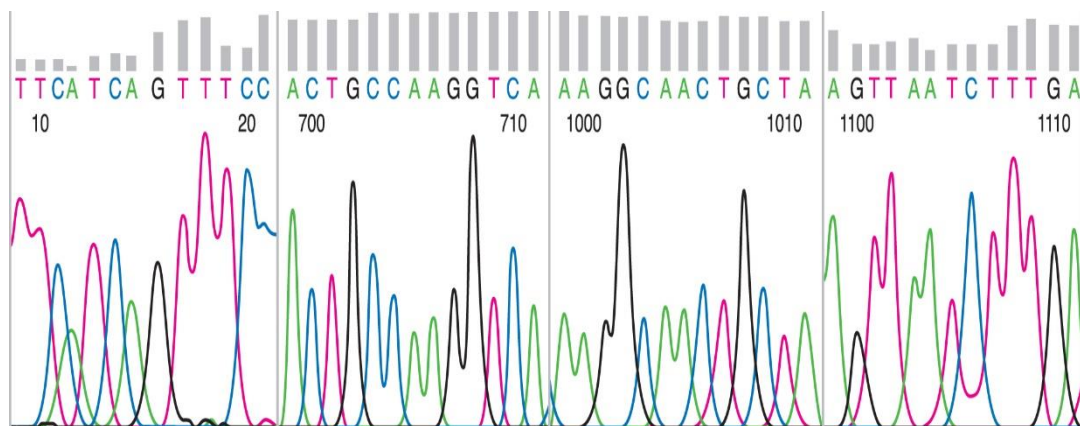
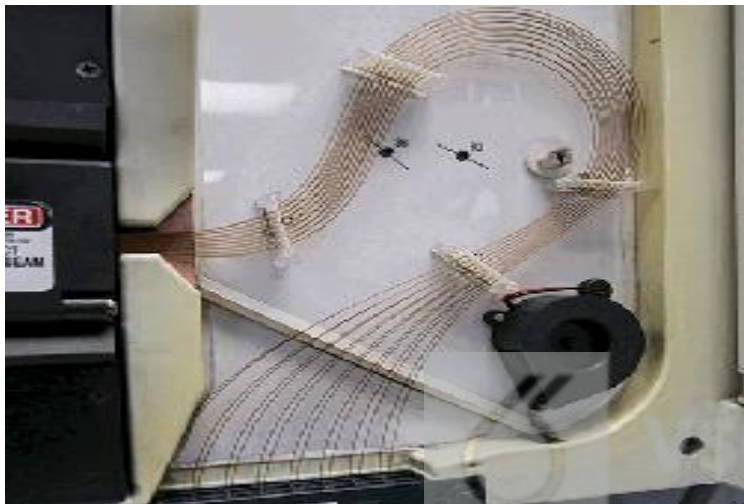


PCR in presence of fluorescent, chain-terminating nucleotides



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).

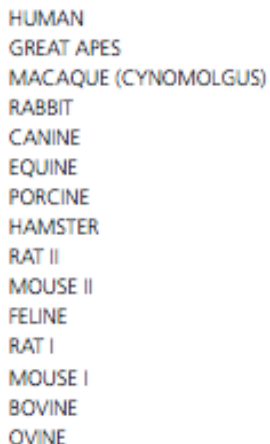
1975 - 1977 - Sanger s Barrellem a Maxam s Gilbertem vyvinuli techniky sekvenování DNA

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



FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K T
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K T
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K T
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K S
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K S
FV**K**QHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP **M**S
FV**K**QHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP **M**S
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A
FV**K**QHLCG**P**HLEALYLVCGERGFFYTP K S
FV**K**QHLCG**P**HLEALYLVCGERGFFYTP K S
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP K A

CPH PC1

RR EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ
RR EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ
RR EAEDPQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ
RR EVEELQVGQAELEGGGPGAGGLQPSALELALQ
RR EVEDLQVRDVELAGAPGEGGLQPLALEGAQ
XX EAEDPQVGVELGGGPGGLGGLQPLALEGPQQ
RR EAENPQAGAVELGGGLGG--LQALALEGPPQ
RR GVEDPQVAQLLEGGGPGADDLQTLALEVAQ
RR EVEDPQVAQLLEGGGPGAGDLQTLALEVARQ
RR EVEDPQVAQLLEGGGPGAGDLQTLALEVAQ
RR EAEDLQGRDAELGEAPGAGGLQPSALEAPLQ
RR EVEDQVPPQLEGGGPEAGDLQTLALEVARQ
RR EVEDPQVEQLELGGSP--GDQTLALEVARQ
RR EVEGPQVGALELAGGPG-----AGGLEGGPPQ
RR EVEGPQVGALELAGGPG-----AGGLEGGPPQ

KR GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
 XX GIVEQCCT **G** I CSLYQLENYCN
 KR GIVEQCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIV**D**QCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIV**D**QCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIV**D**QCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIVEQCC**A**S**V**CSLYQLE**H**YCN
 KR GIV**D**QCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIV**D**QCCT S I CSLYQLENYCN
 KR GIVEQCC**A**S**V**CSLYQLENYCN
 KR GIVEQCC**AGV**CSLYQLENYCN

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)

LEGISLATIVA:

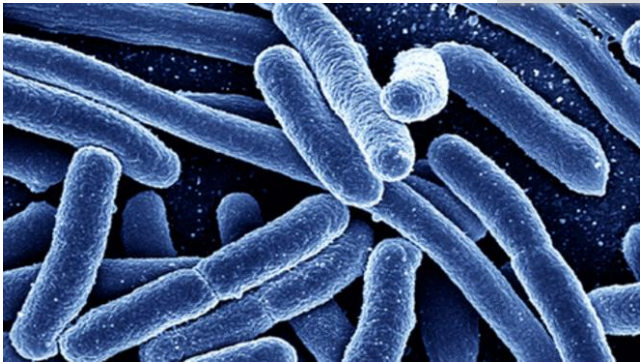
příbalový leták: *produkt byl připraven „technikami rekombinantní DNA“*

Příprava rekombinantních proteinů

Rekombinantní DNA:

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

- Prokaryotní expresní systém

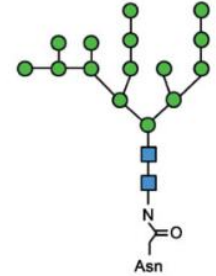


- nejpoužívanější
- „jednoduchý“
- vysoký výtěžek produkovaného proteinu
- „nízká cena“
- malá časová náročnost
- modifikace proteinu umožňující snadnější purifikaci
- nejsou posttranslační modifikace

- **Eukaryotní expresní systém**

Kvasinkový systém:

„nízká cena“
časově náročnější
posttranslační modifikace

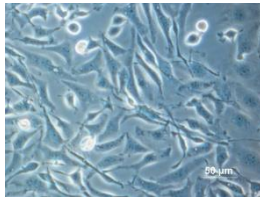


Hmyzí buňky:

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

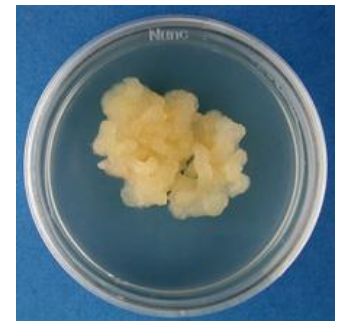
Savčí expresní systém:

podobný systému hmyzímu
specifická hladina kyslíku a oxidu uhličitého
posttranslační modifikace



Rostlinné expresní systémy:

nižší cena než savčí systémy
posttranslační modifikace



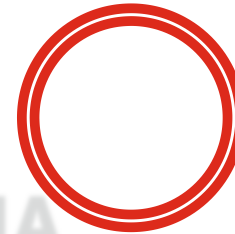
Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

Příprava inzertu

- PCR

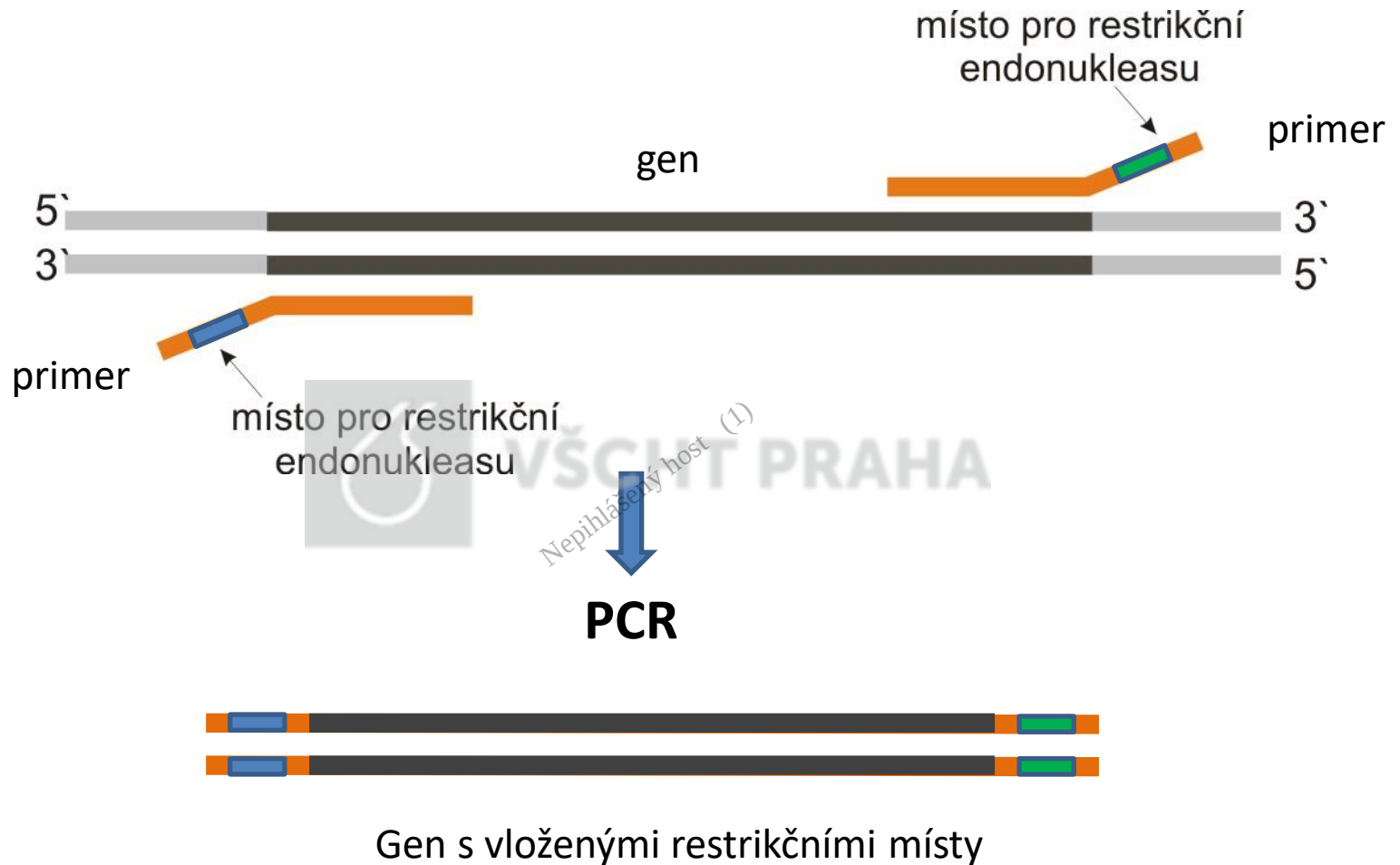
Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Vnesení restrikčního místa na konec genu



Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

Příprava inzertu

- PCR

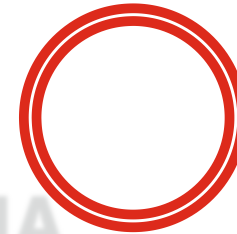


štěpení restriční
endonukleasou/
-ami



Příprava plasmidu

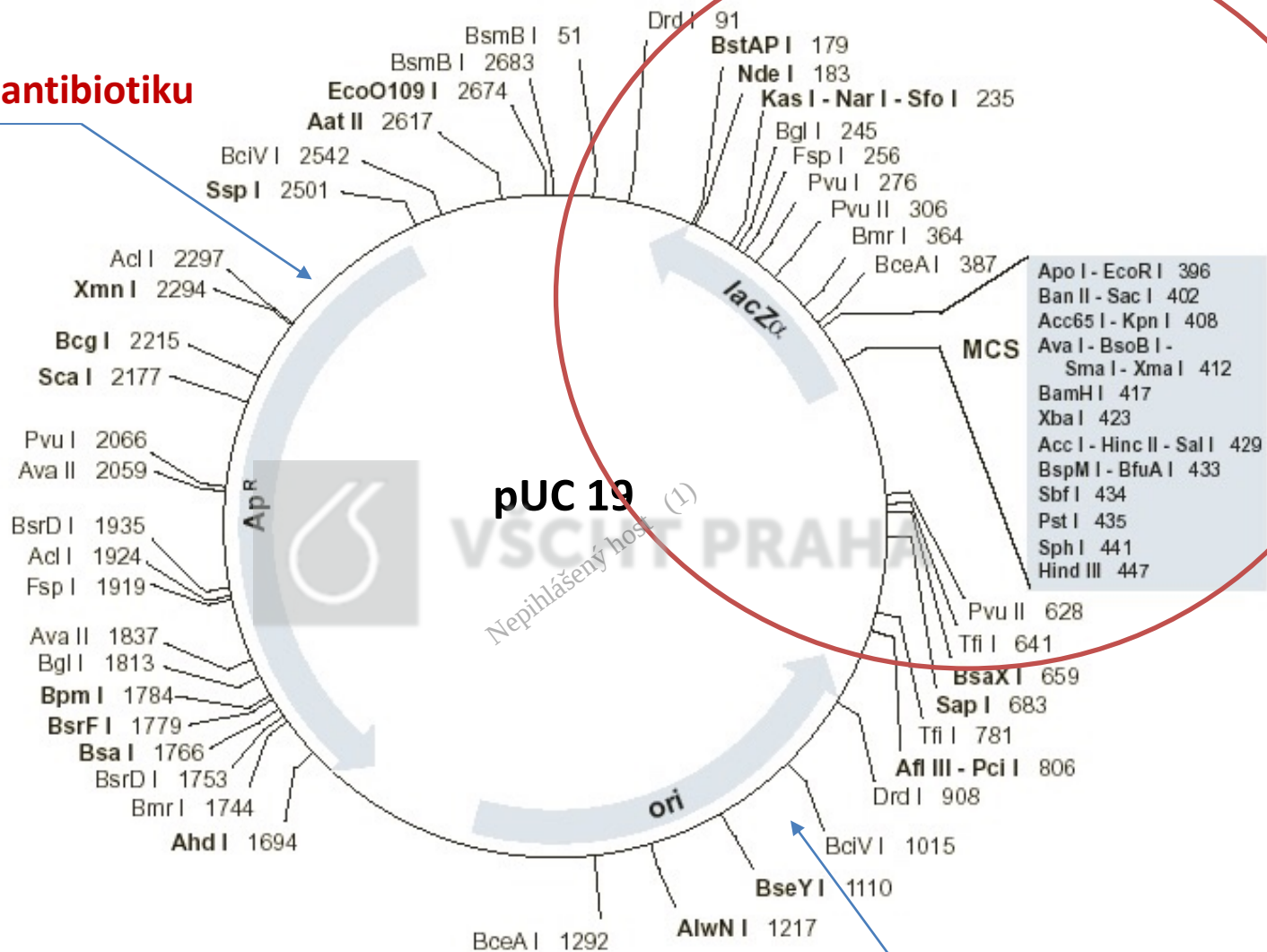
- izolace plasmidové DNA



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

rezistence k antibiotiku



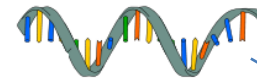
počátek replikace

Lac Z (gen pro peptid lacZ)

plasmidová DNA

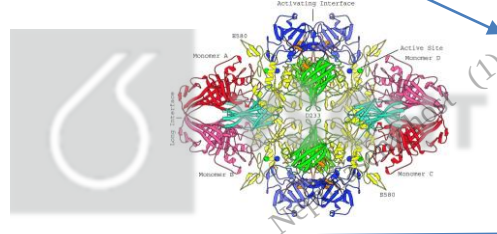
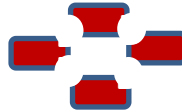


mRNA



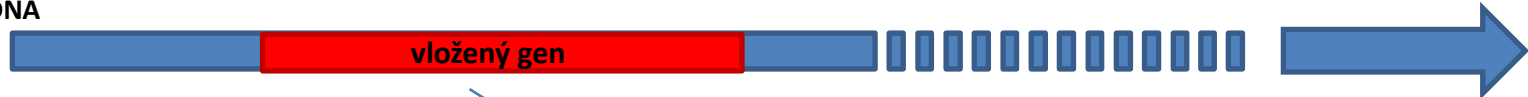
chromosomální DNA

mRNA

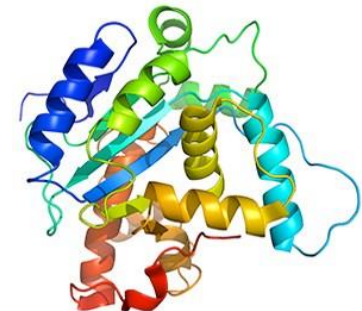
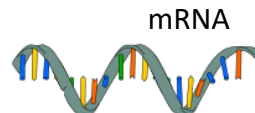


AKTIVNÍ β -galaktosidasa

plasmidová DNA

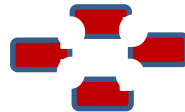


mRNA



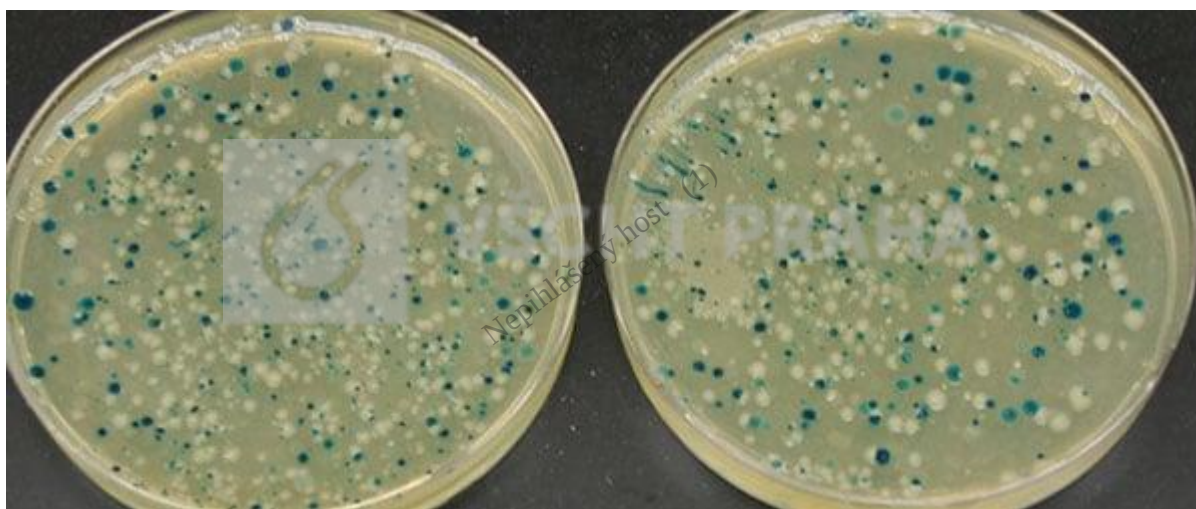
chromosomální DNA

mRNA



NEAKTIVNÍ β -galaktosidasa

rekombinantní protein



Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

Příprava inzertu

- PCR

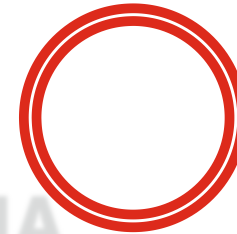


štěpení restrikční
endonukleasou/
-ami



Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA



štěpení restrikční
endonukleasou/
-ami



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

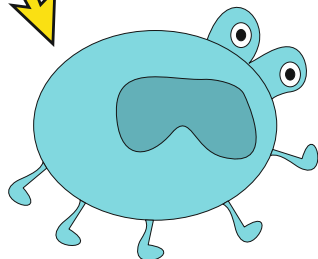
Příklad přípravy rekombinantního proteinu v bakterii *E.coli*

Příprava inzertu

- PCR



štěpení restriční
endonukleasou/
-ami



Příprava plasmidu

- izolace plasmidové DNA



štěpení restriční
endonukleasou/
-ami

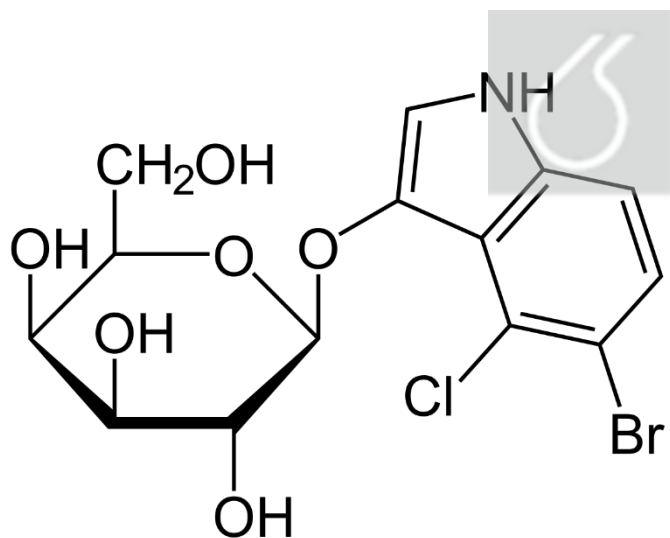


- ligace
- transformace buněk (tepelný šok, elektroporace, ...)

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

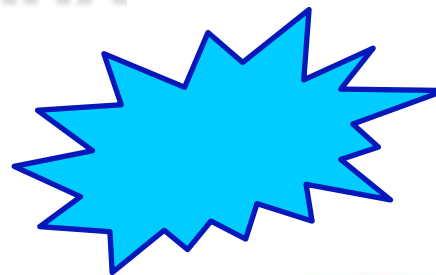
Blue-white screening

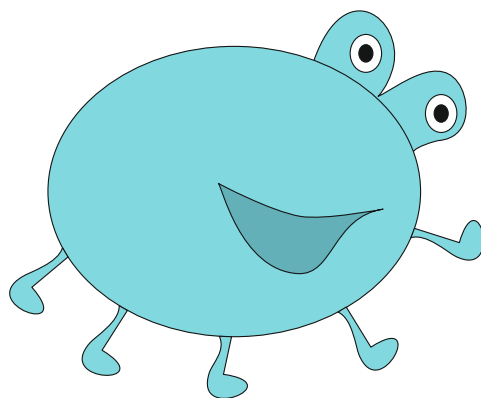
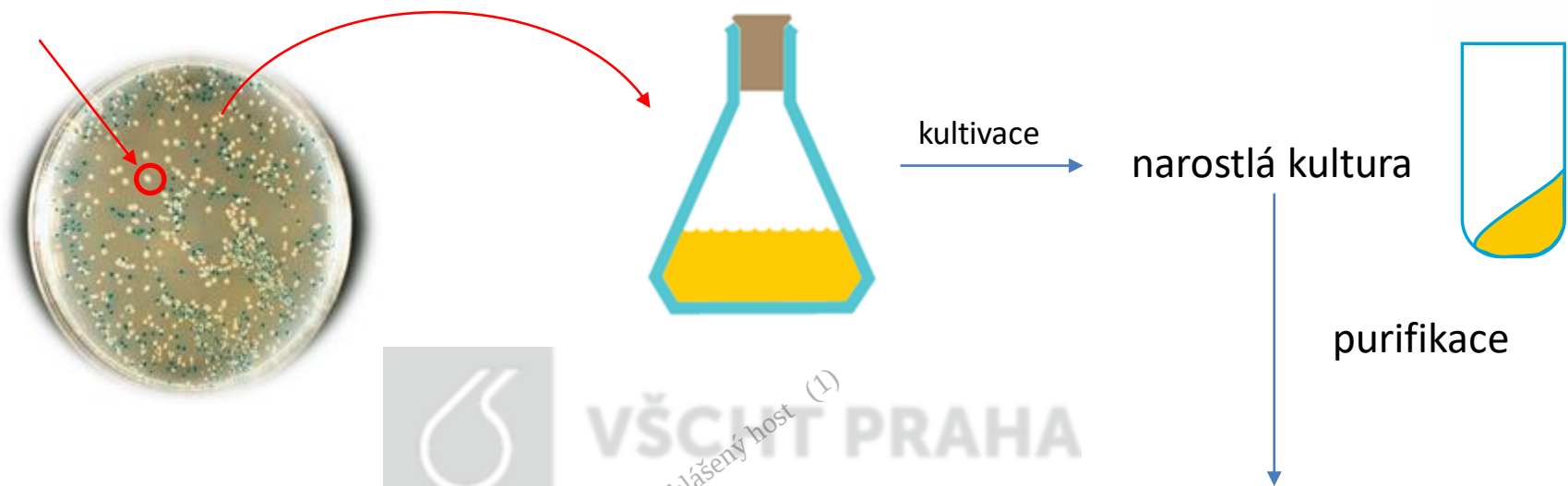
- založeno na aktivitě β -D-galaktosidasy



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

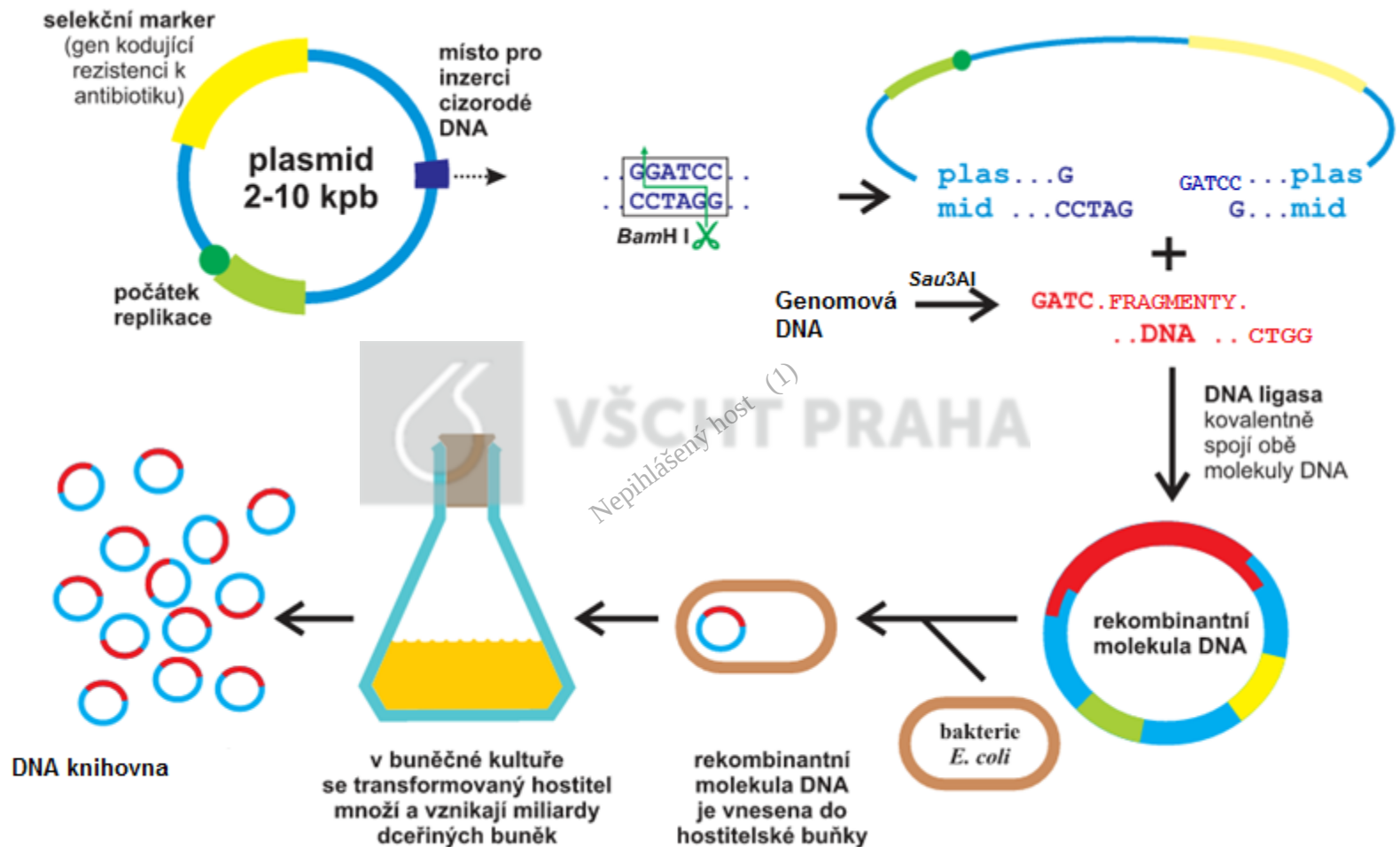
β -D-galaktosidasa





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 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

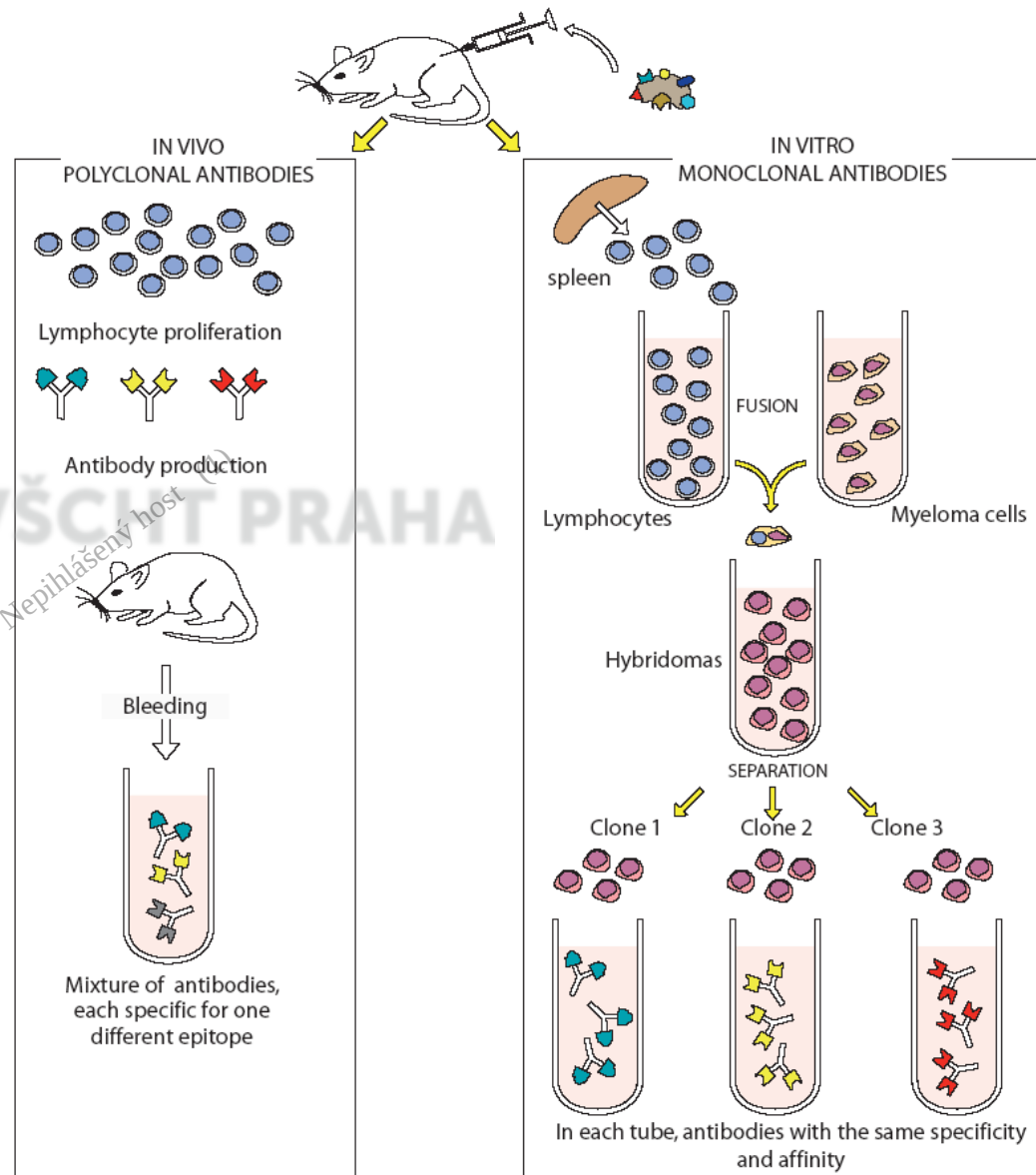
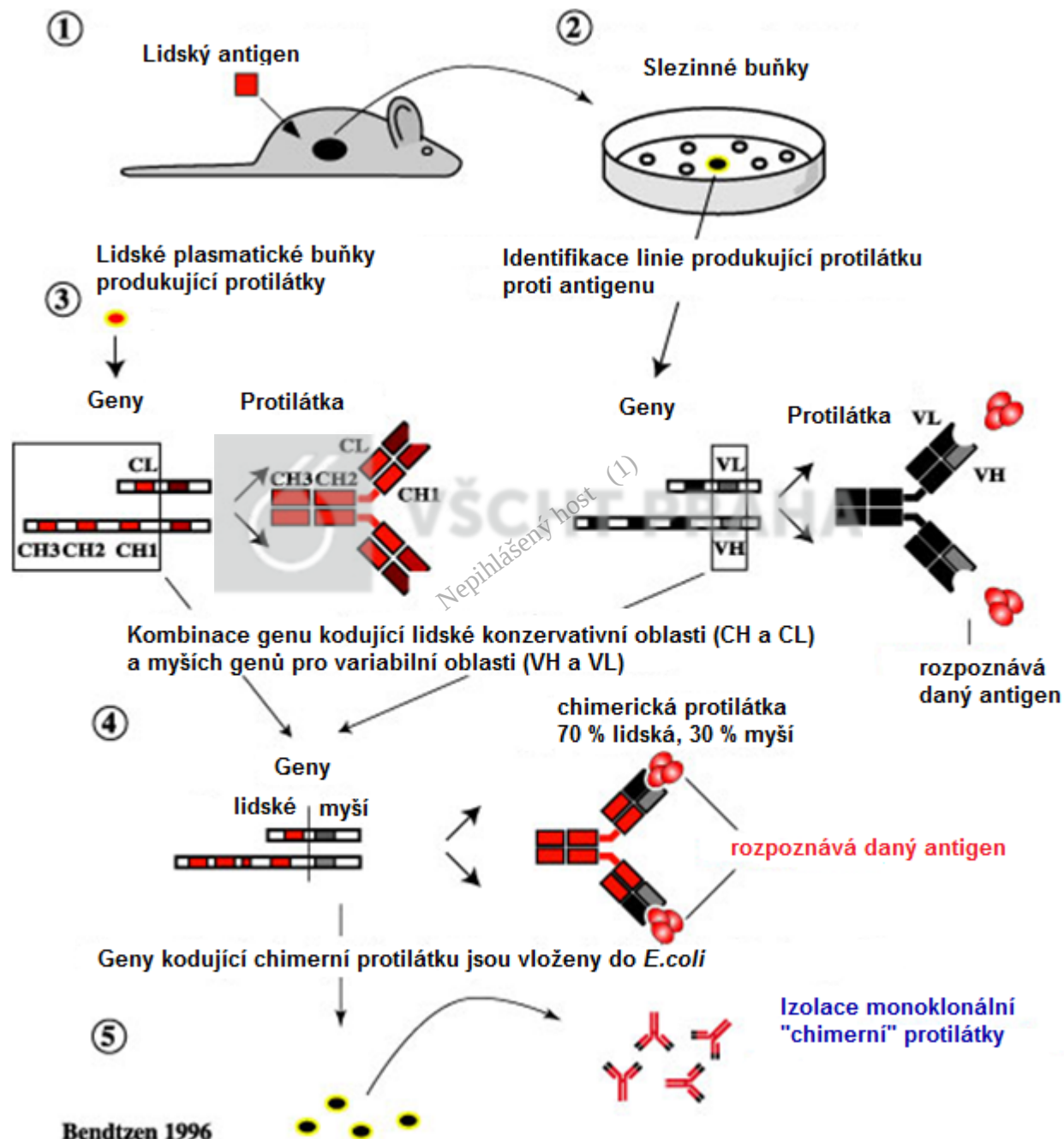


Figure 12. Polyclonal and monoclonal antibodies.



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).

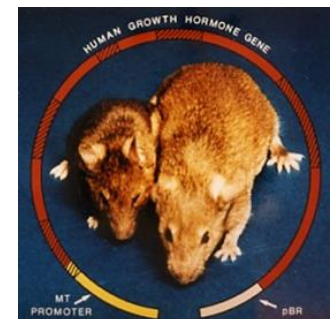
1975 - 1977 - **Sanger** s **Barrellem** a **Maxam** s **Gilbertem** vyvinuli techniky sekvenování DNA

1978 – 1980 – první rekombinantní protein

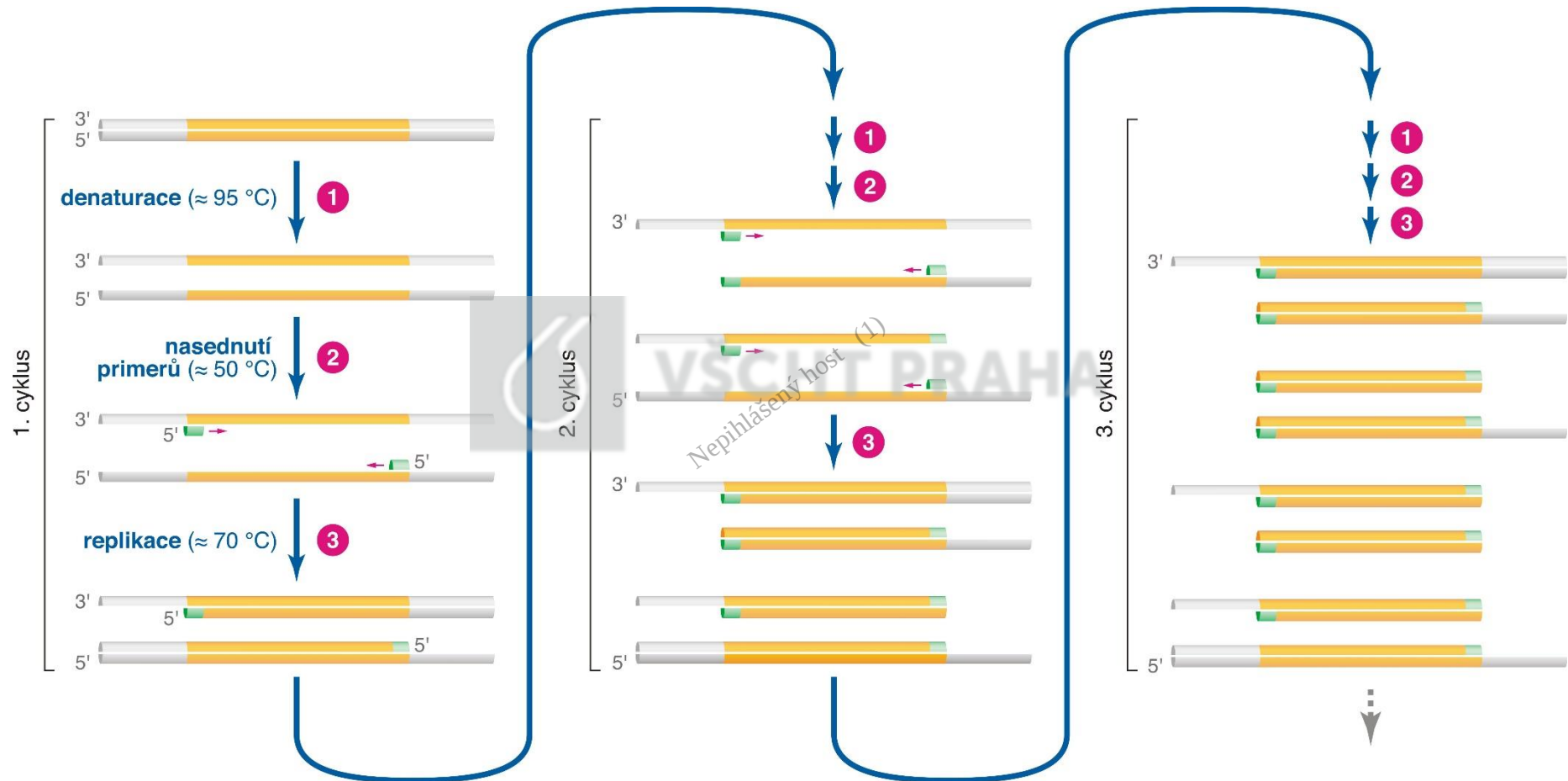
1981 - 1982 - **Palmiter** a **Brinster** přivedl na svět

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

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

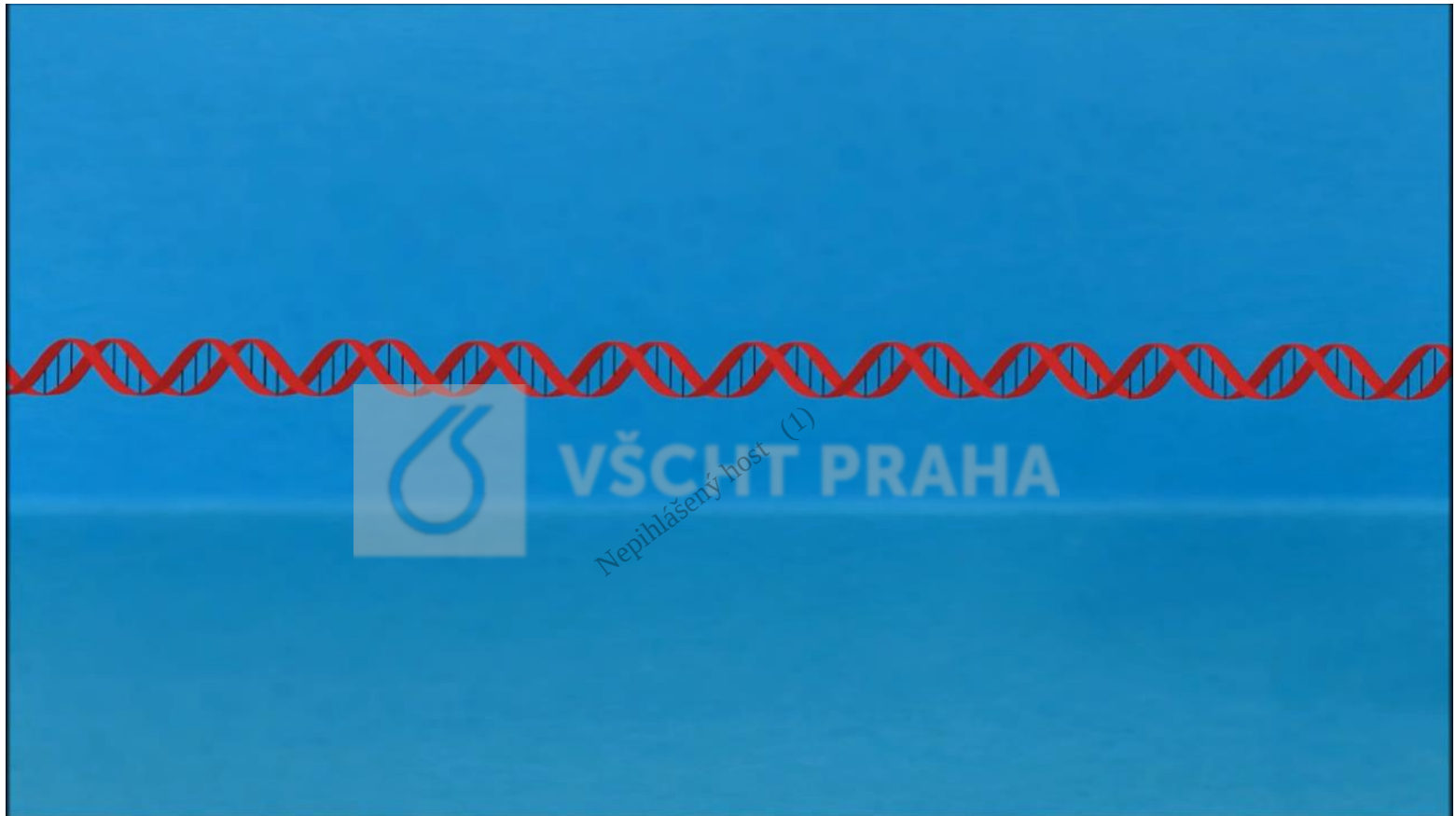


Polymerasová řetězová reakce - PCR



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)

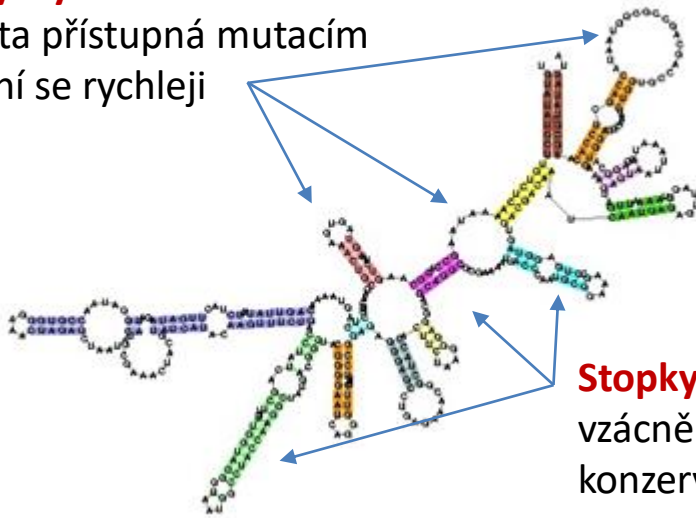
- velká podjednotka 50S — 5S + 23S
- malá podjednotka 30S — **16S** + proteiny

Eukaryotická rRNA – 80S

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

Smyčky

místa přístupná mutacím
mění se rychleji



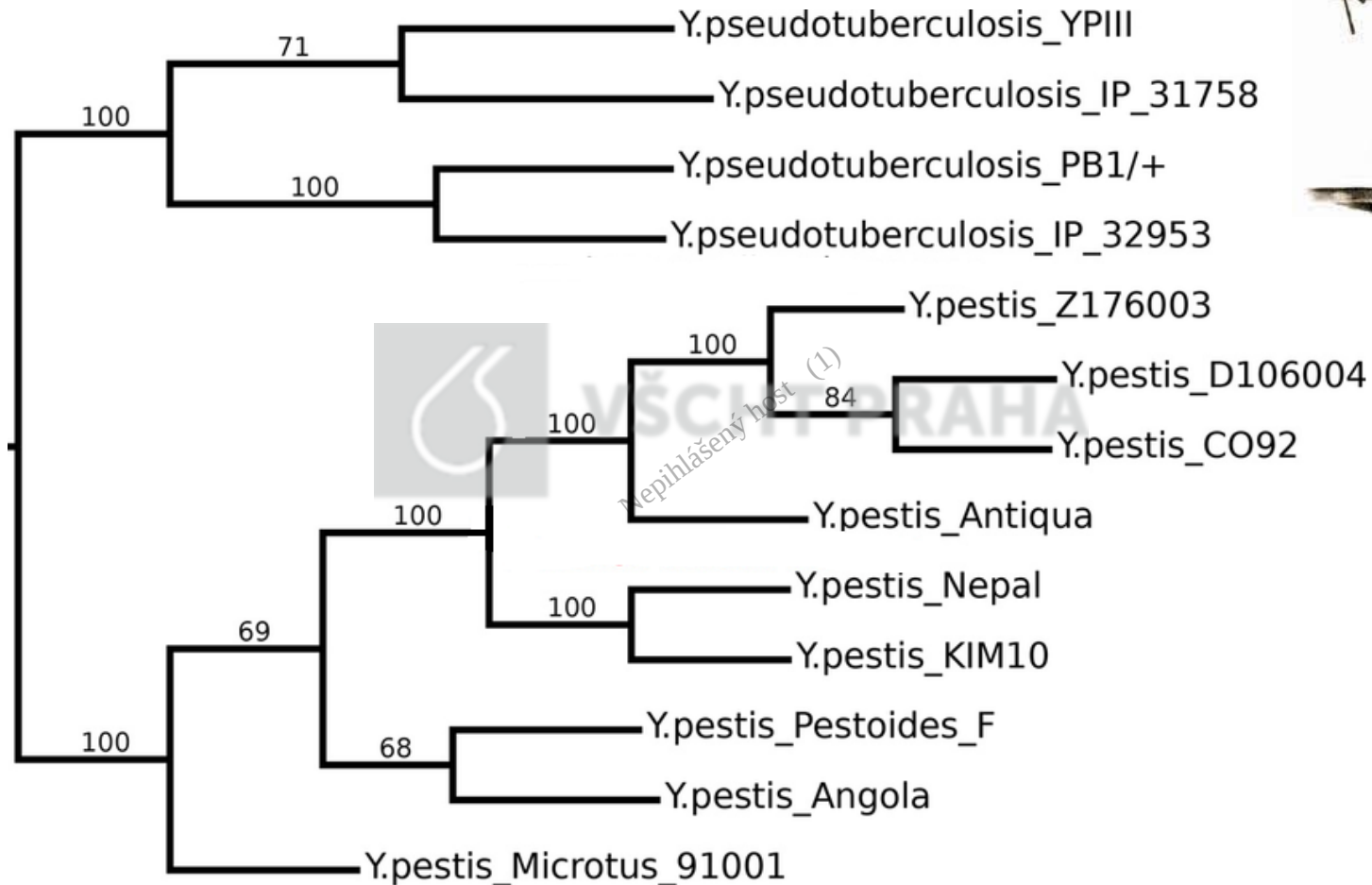
Stopky

vzácně mutovaná místa
konzervovaná



- PCR
- sekvenace
- porovnání s databází

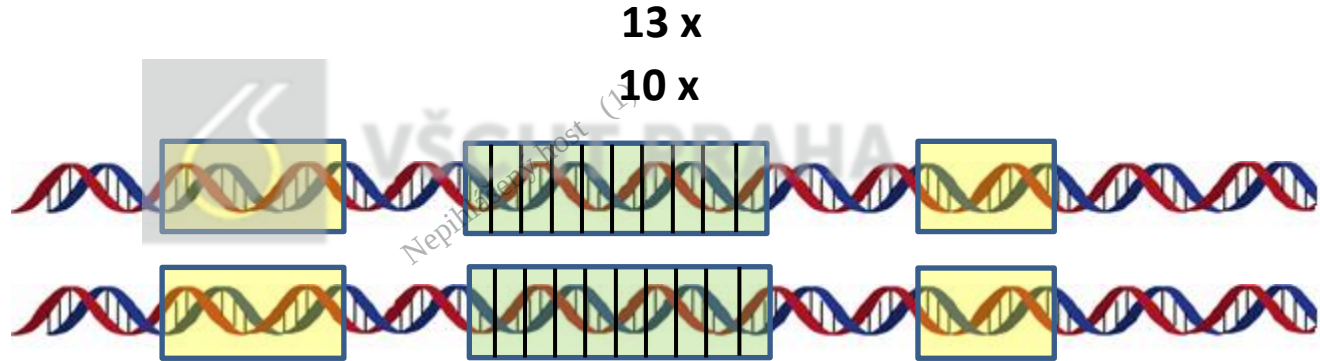
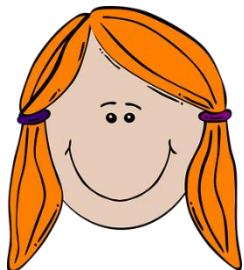
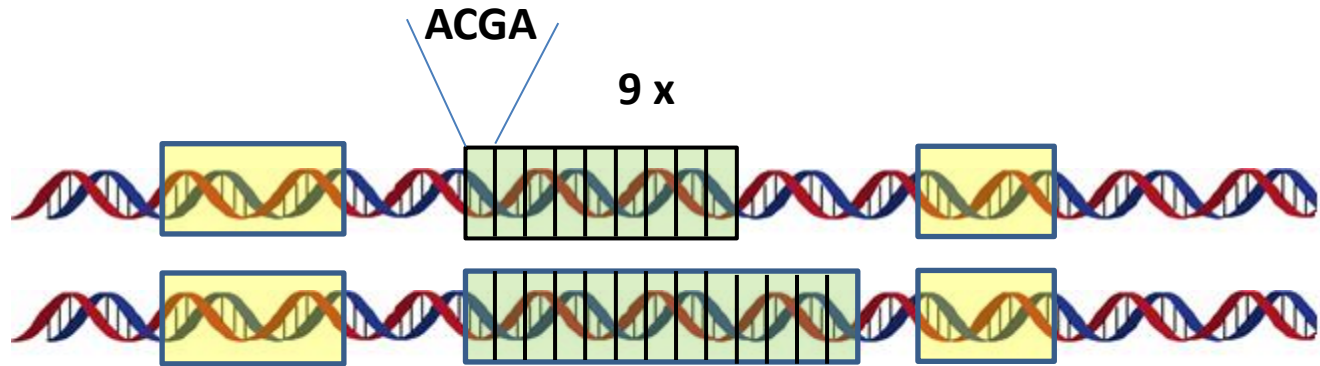
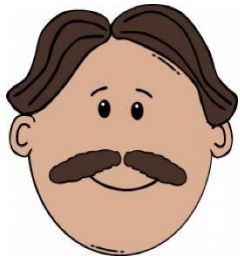
Fylogenetický strom *Yersinia*



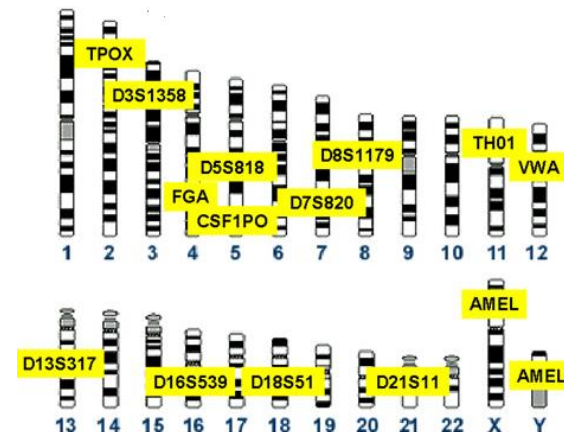
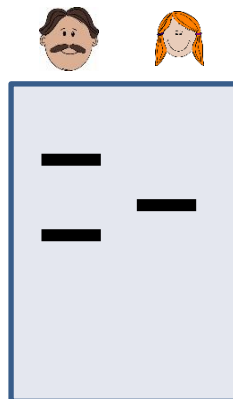
K čemu slouží PCR?

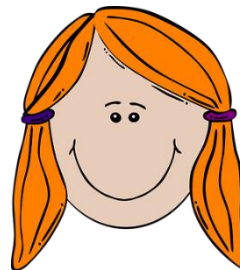
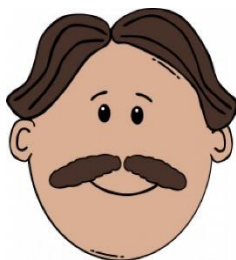
- Namnožení konkrétního úseku DNA pro další biotechnologické metody, jako je:
 - Klonování
- Identifikace organismů rDNA (rRNA)
- Vnášení mutací do genů
- Diagnostika infekčních nemocí
- Identifikace dědičných chorob
- Jednoznačná identifikace osob
- Kvantifikace DNA (RT-PCR, qPCR) - analýza transkripce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

STR (short tandem repeat) - identifikace osob



PCR



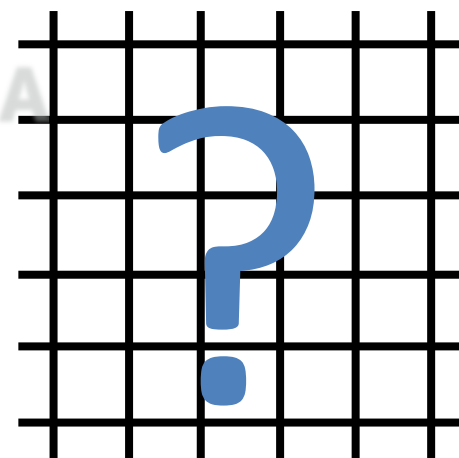
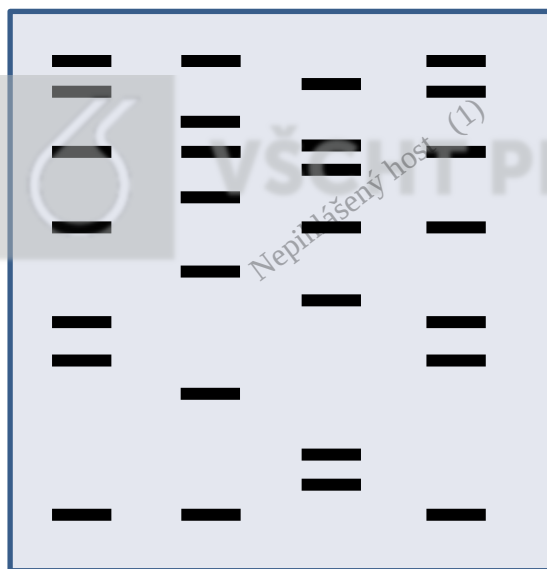


máte k dispozici
DNA z místa činu

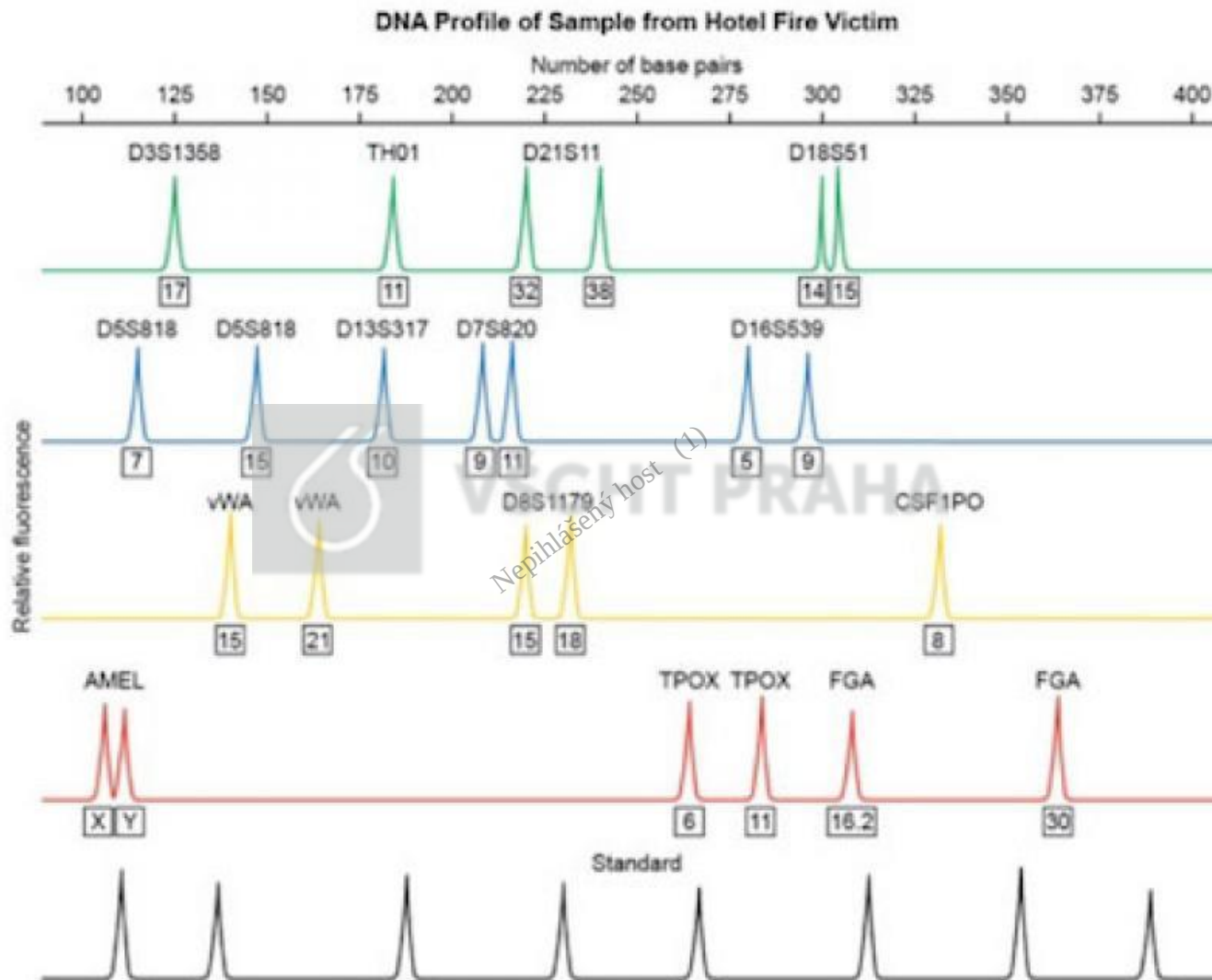


?

PCR



Věznice Světlá nad Sázavou



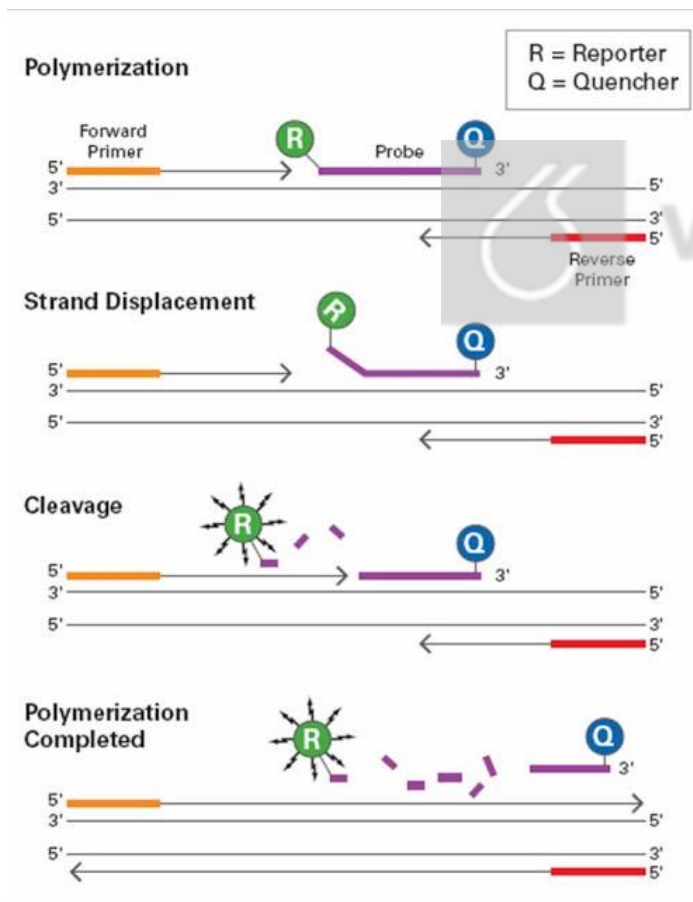
K čemu slouží PCR?

- 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

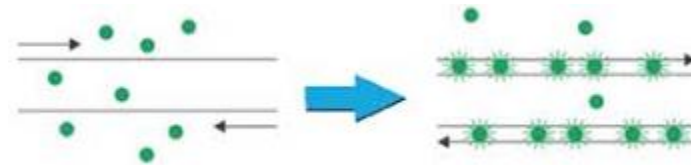
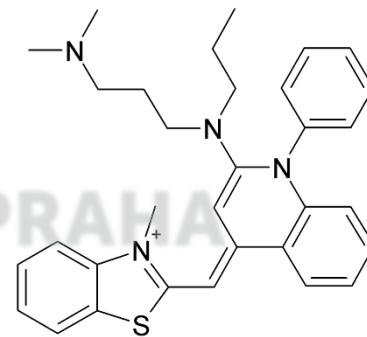
Kvantifikace DNA

- qPCR – kvantitativní PCR

TaqMan sonda

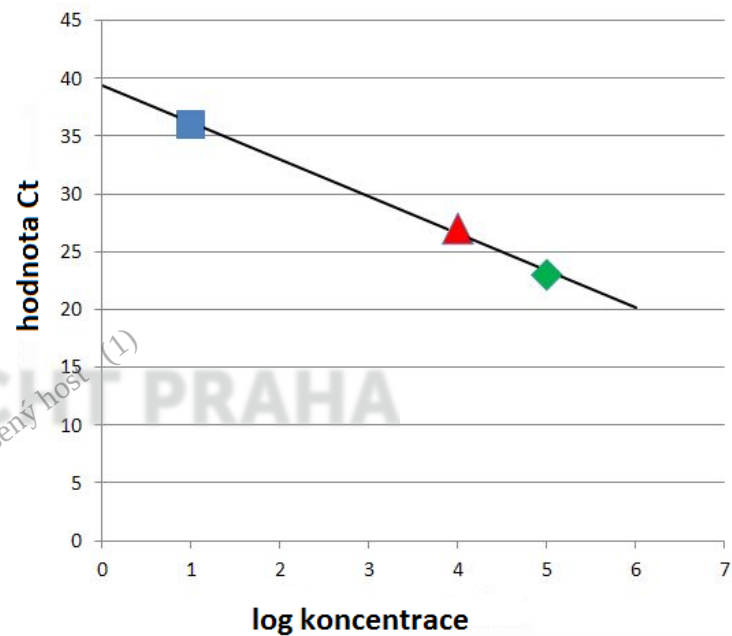
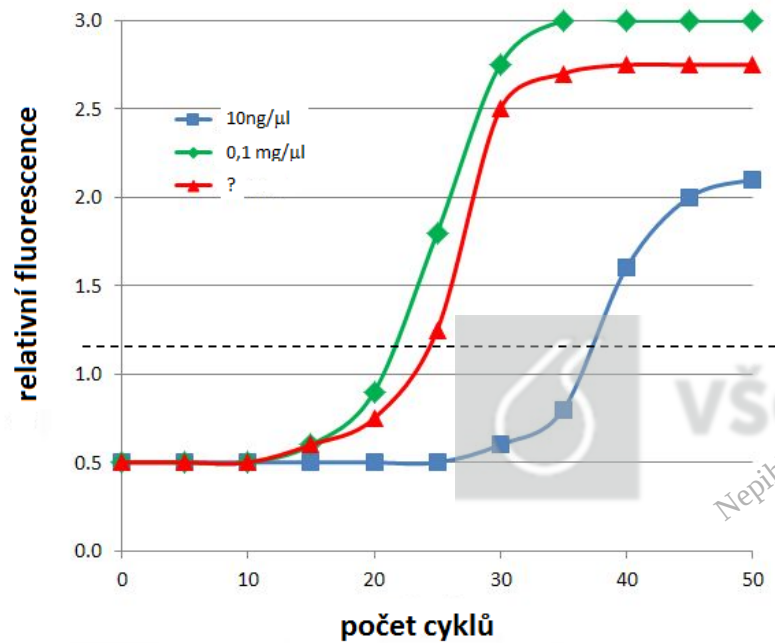


Syber Green, Eva green, ...



v roztoku:
malá fluorescence

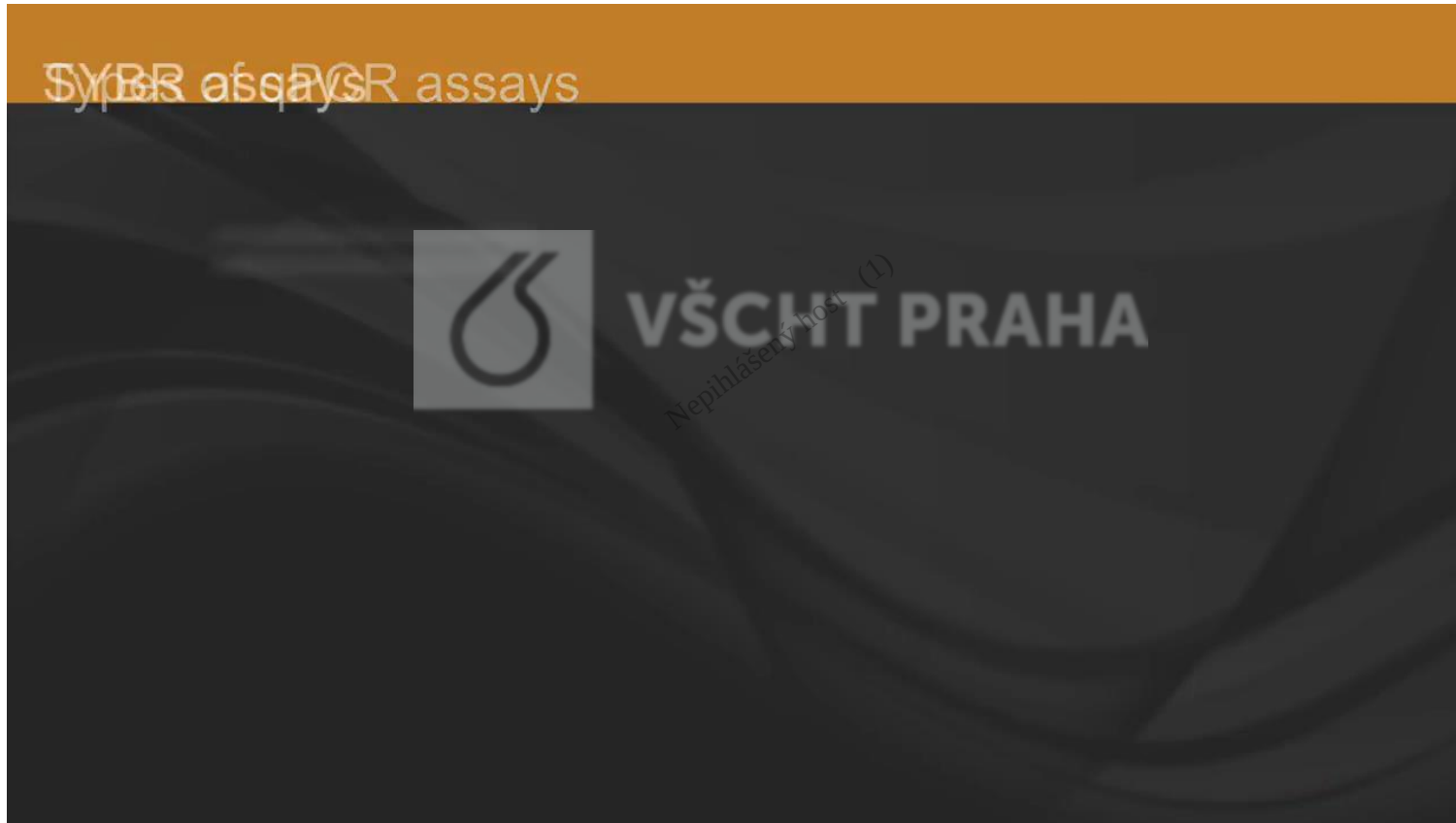
po vazbě:
silná fluorescence



t – „threshold“ - prahová hodnota

C_t – cyklus, při kterém bylo dosaženo prahové hodnoty fluorescence

- **qPCR – kvantitativní PCR**



Analýza transkripce genů

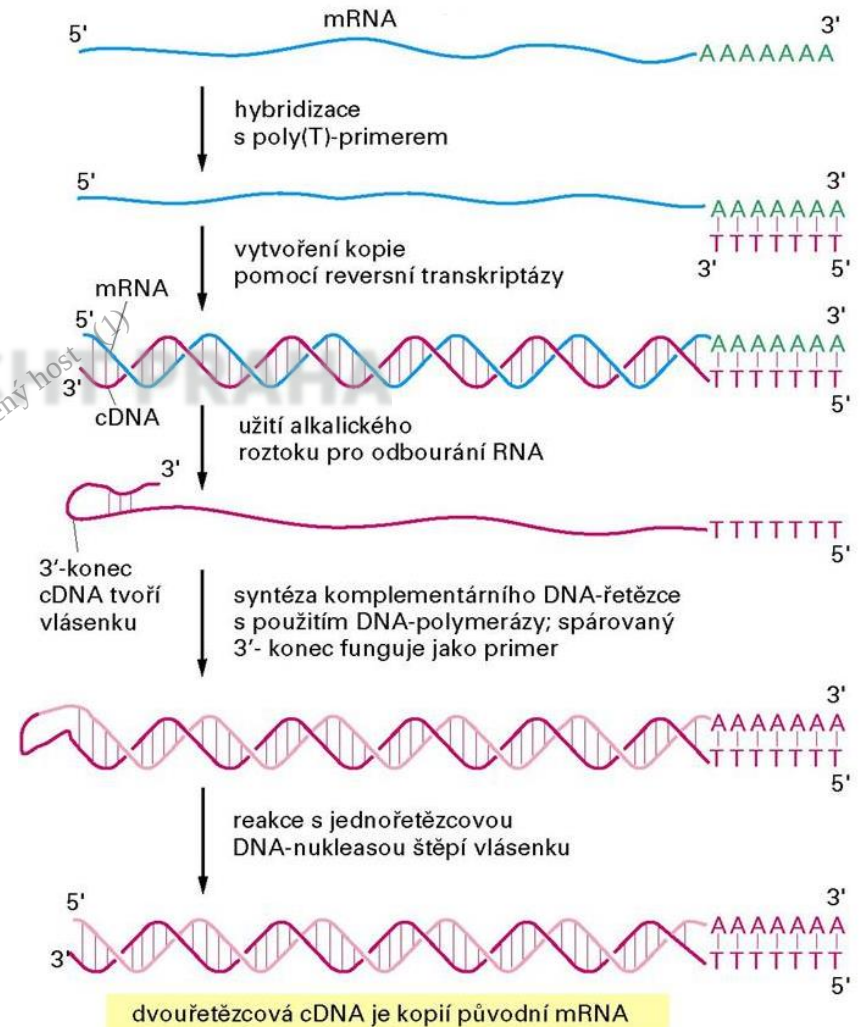
Reversní transkripce

Přepis RNA do DNA (**cDNA**)

- Reversní transkriptasa



shutterstock.com • 258247925



PCR detekce SARS-CoV-2

ARTICLE

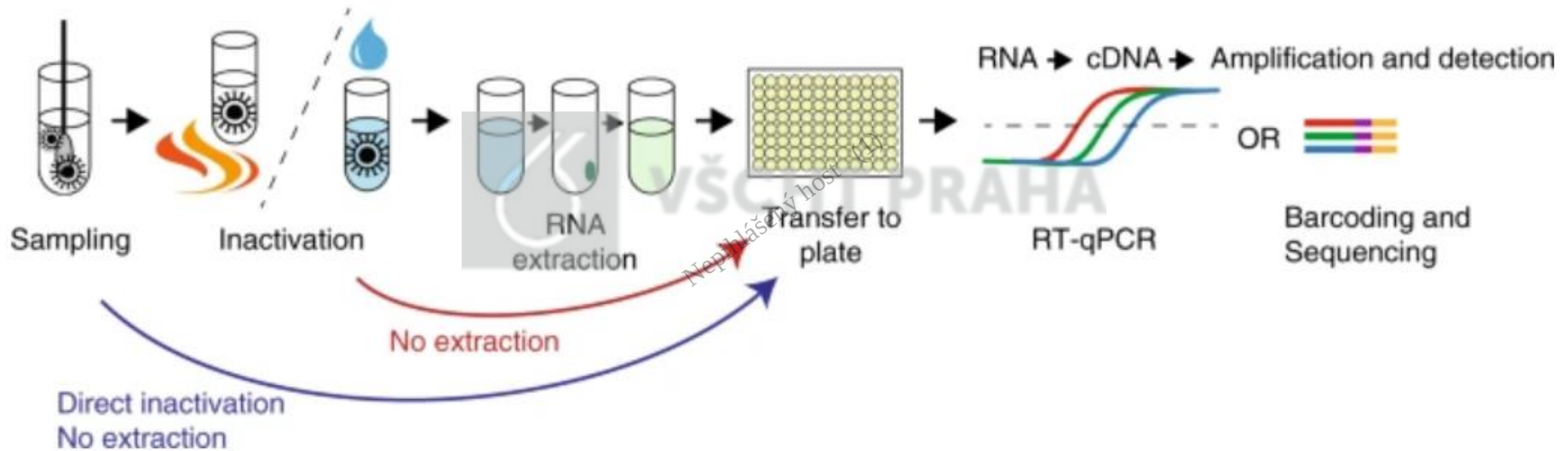
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>

OPEN

Check for updates

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

Ioanna Smyraki^{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^{1,2,3}



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

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

Next-generation DNA sequencing (NGS)

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
 - ...

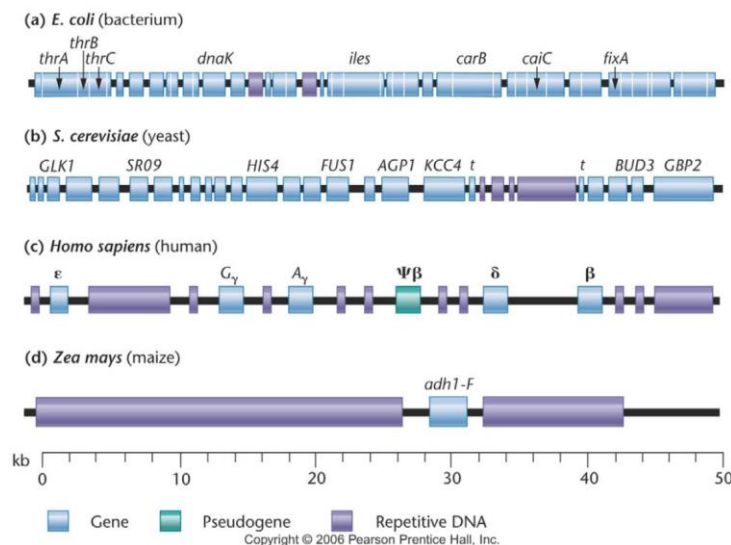
Srovnání genomů prokaryot/eukaryot

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

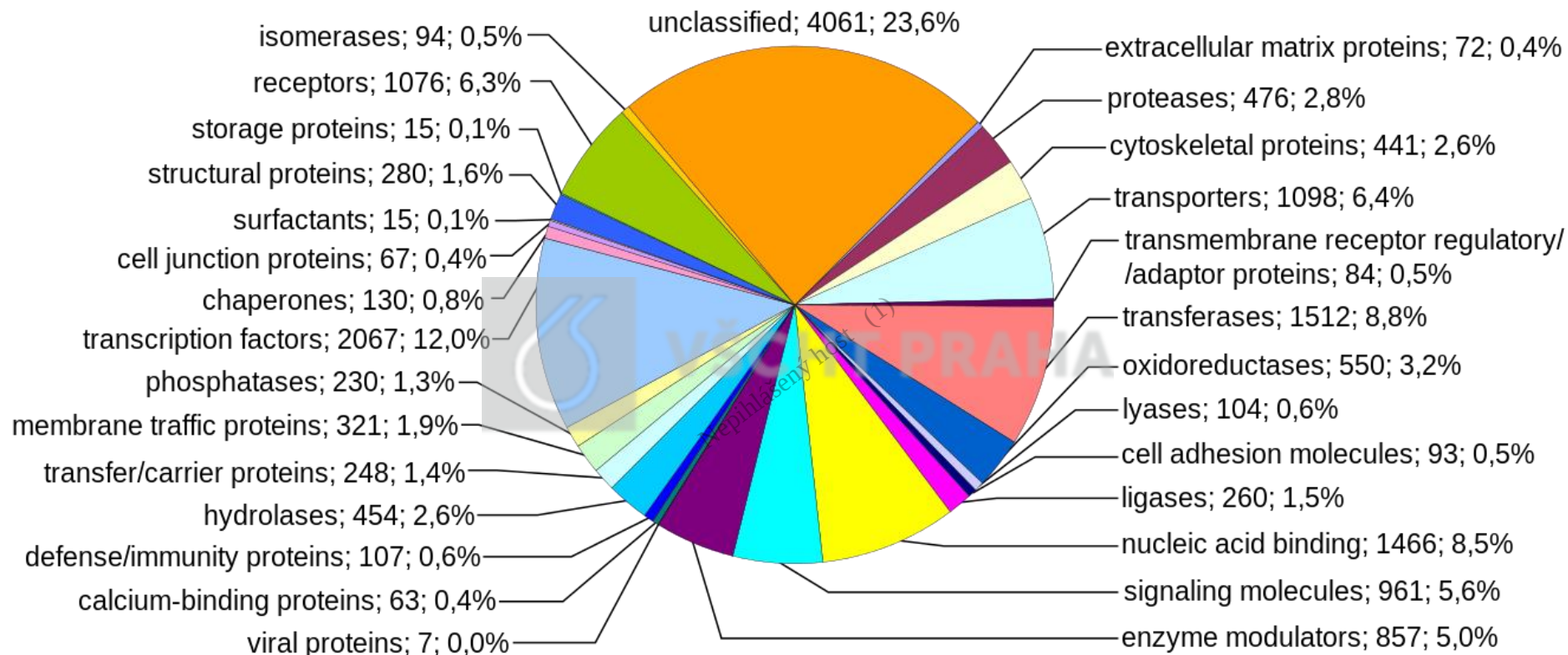
Organismus	Velikost (bp)
bakteriofág MS2	3 569
bakteriofág ΦX-174	5 386
bakterie <i>Haemophilus influenzae</i>	$1,83 \cdot 10^6$
kvasinka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$12,1 \cdot 10^6$
hlístice <i>Caenorhabditis elegans</i>	$98 \cdot 10^6$
rostlina <i>Arabidopsis thaliana</i>	$157 \cdot 10^6$
člověk <i>Homo sapiens sapiens</i>	$3\,200 \cdot 10^6$
Polychaos dubium sladkovodní měňavka	$670\,000 \cdot 10^6$



VS.



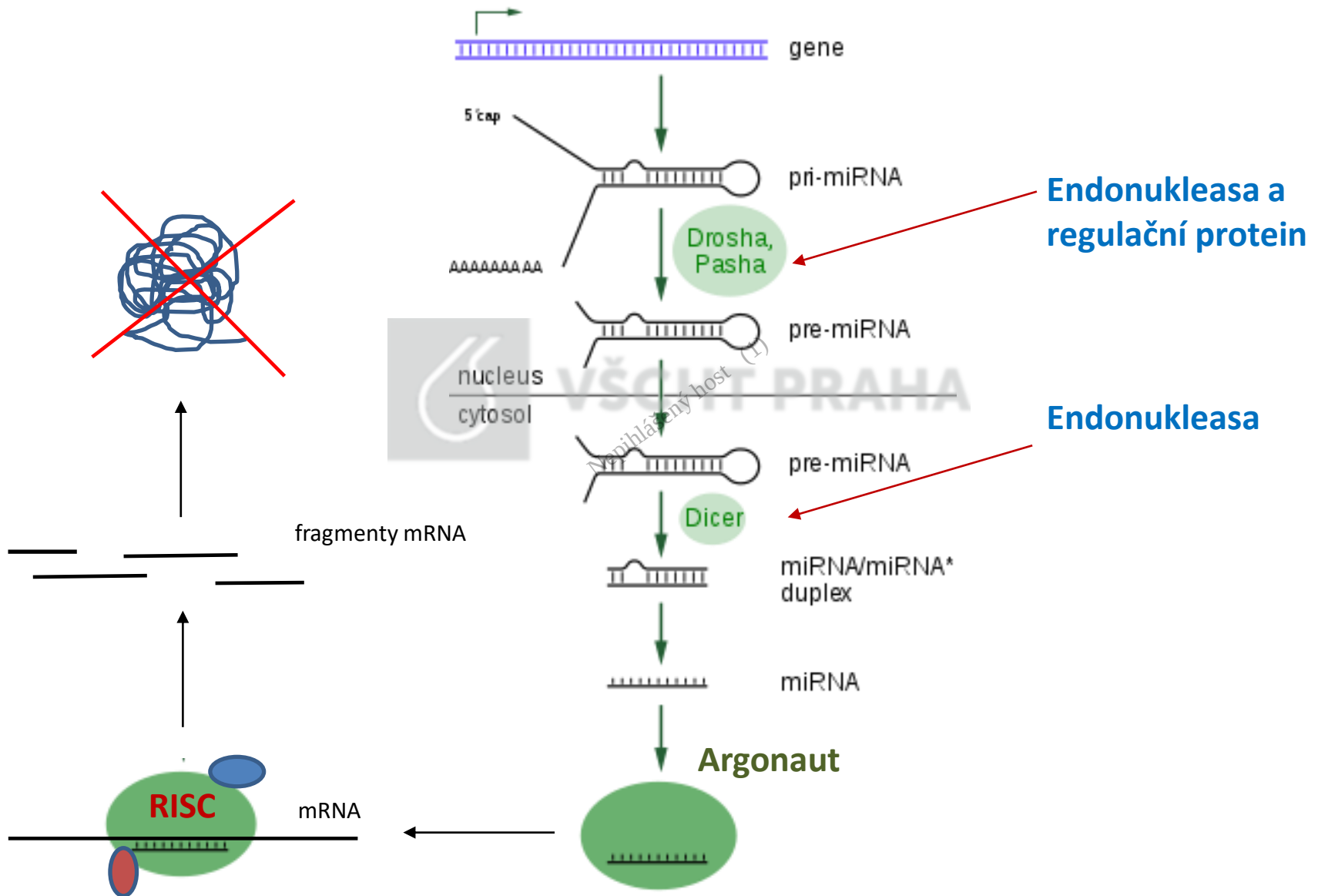
Lidský genom – cca 20–25 tisíc genů (1,5% genomu kóduje proteiny)



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

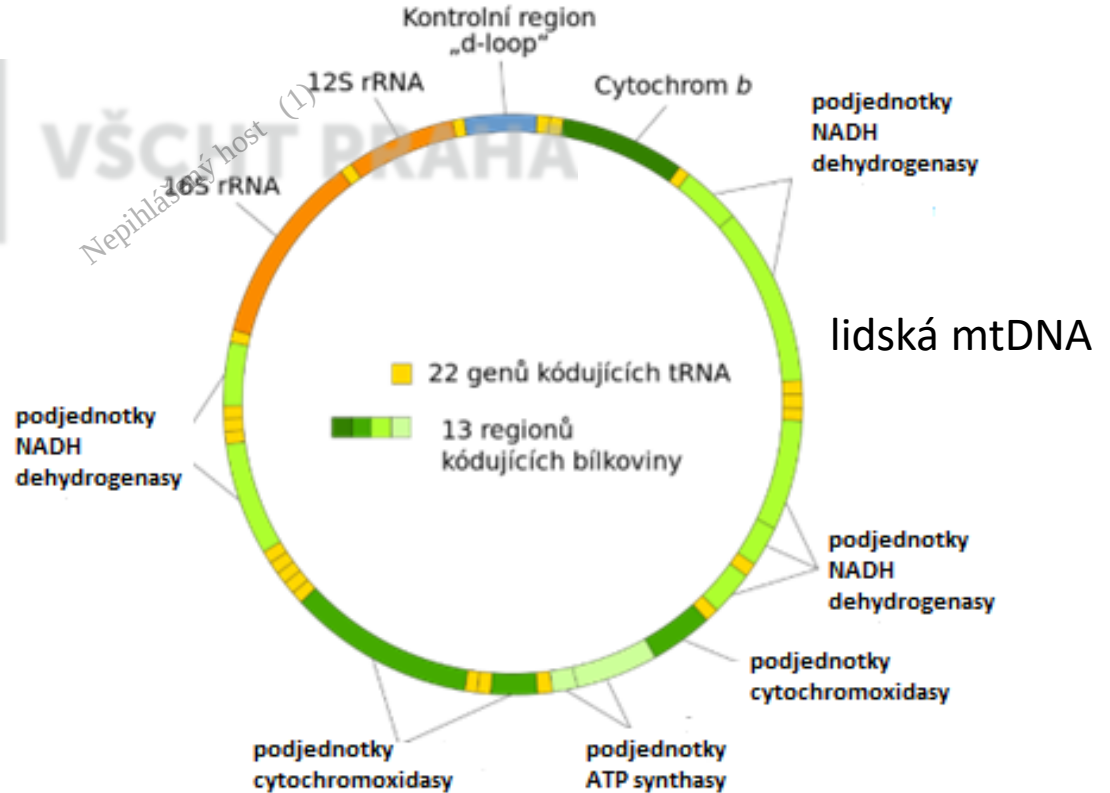
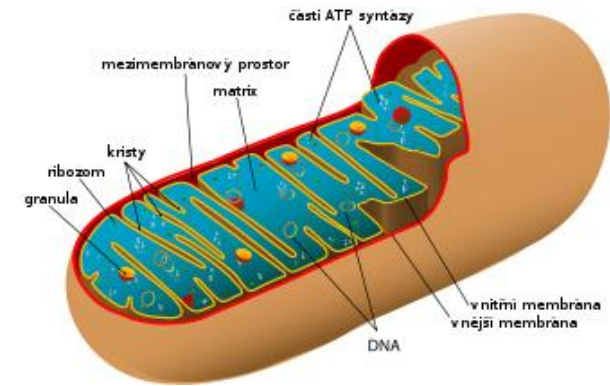
Eduard Kejnovský, Zdeněk Kubát | 6. 9. 2021 | Vesmír 100, 574, 2021/9

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



Co byste měli znát?

- vlastnosti restrikčních endonukleas
- informace o genetickém kódu
- dideoxy metodu sekvenování
- PCR, qPCR + k čemu všemu se může využívat
- příprava rekombinantních proteinů – základní přehled (rozdíl prokaryotní a eukaryotní proteiny)
- základní informace o genomu (eukaryotní vs. prokaryotní, co vše je v něm kódováno – základní přehled)
- RNA interference – základ, k čemu slouží
- definice „ - OMIK“

- 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

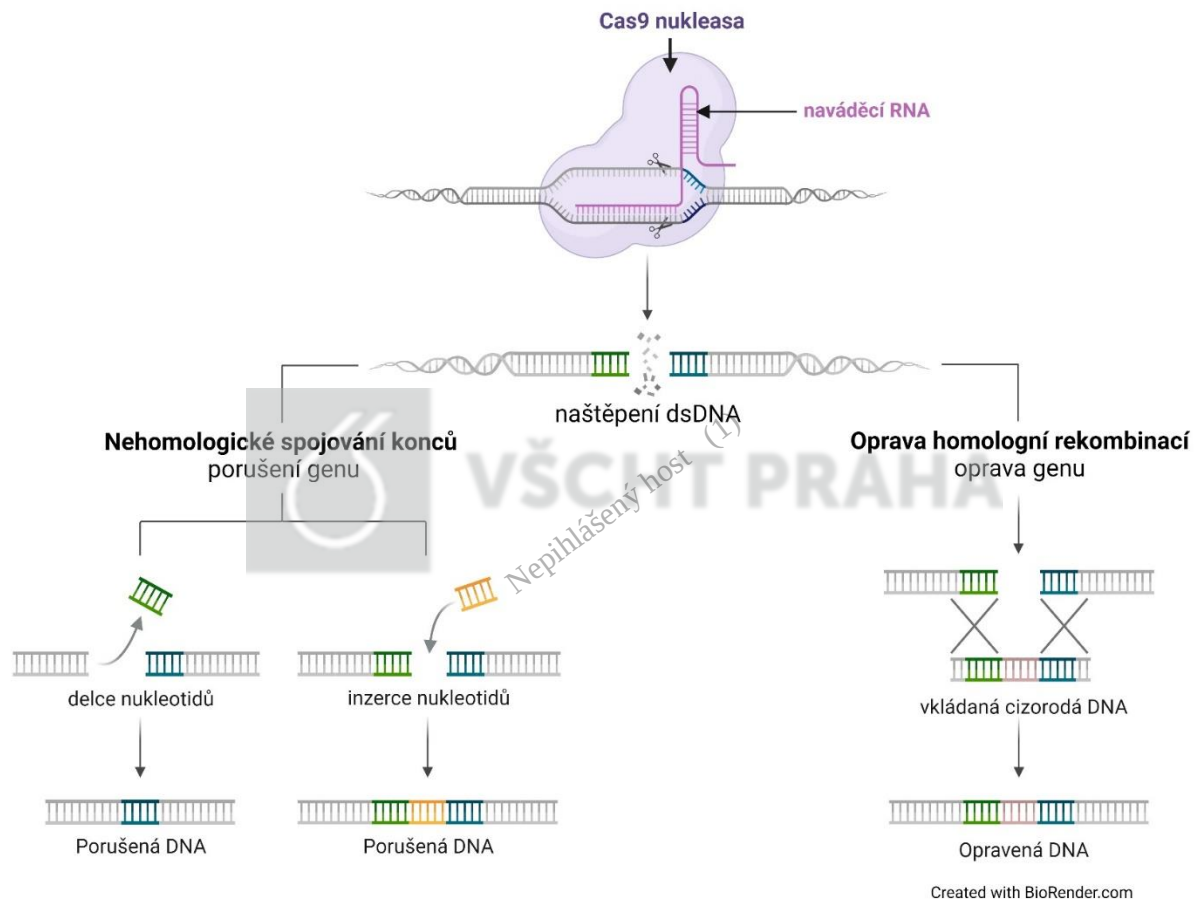
METABOLOMIKA

- 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.

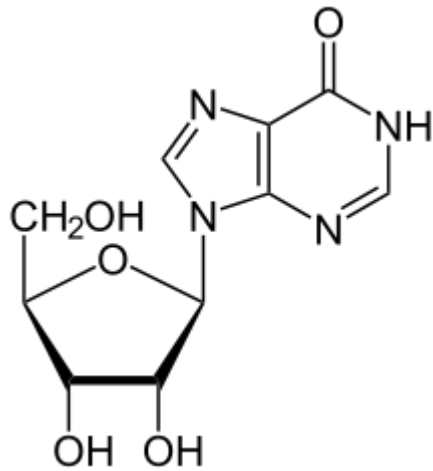
Kit contains enough materials for around 5 experiments or more

- 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



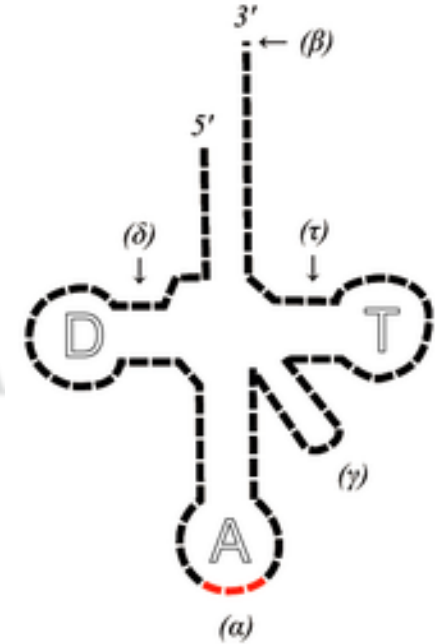
Adenosin



Cytidin

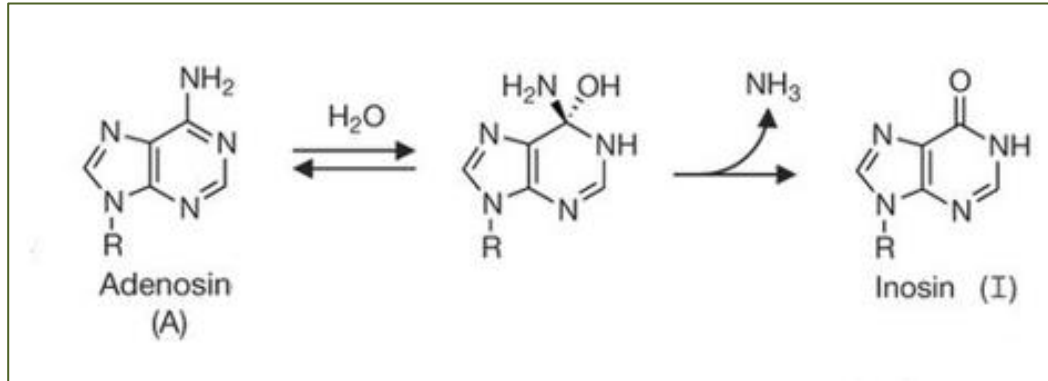


Uridin

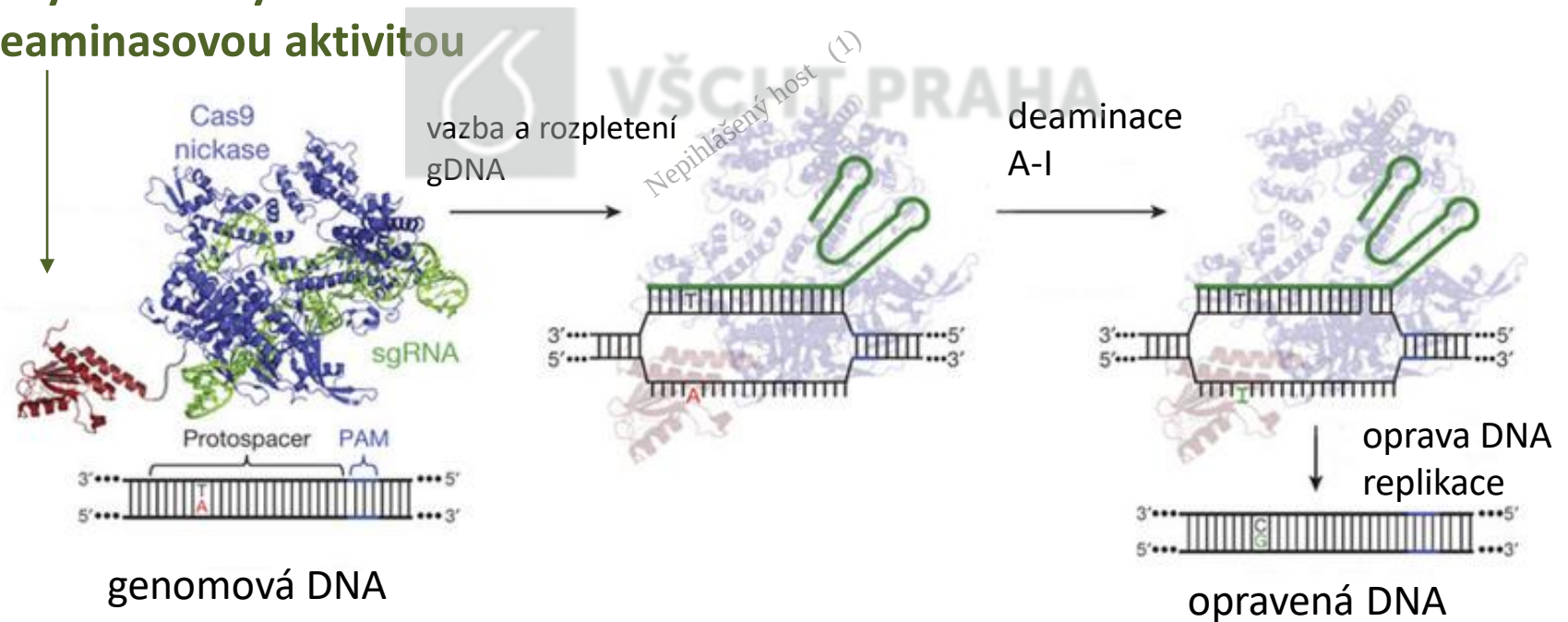


- DNA polymerasa čte inosin jako guanin

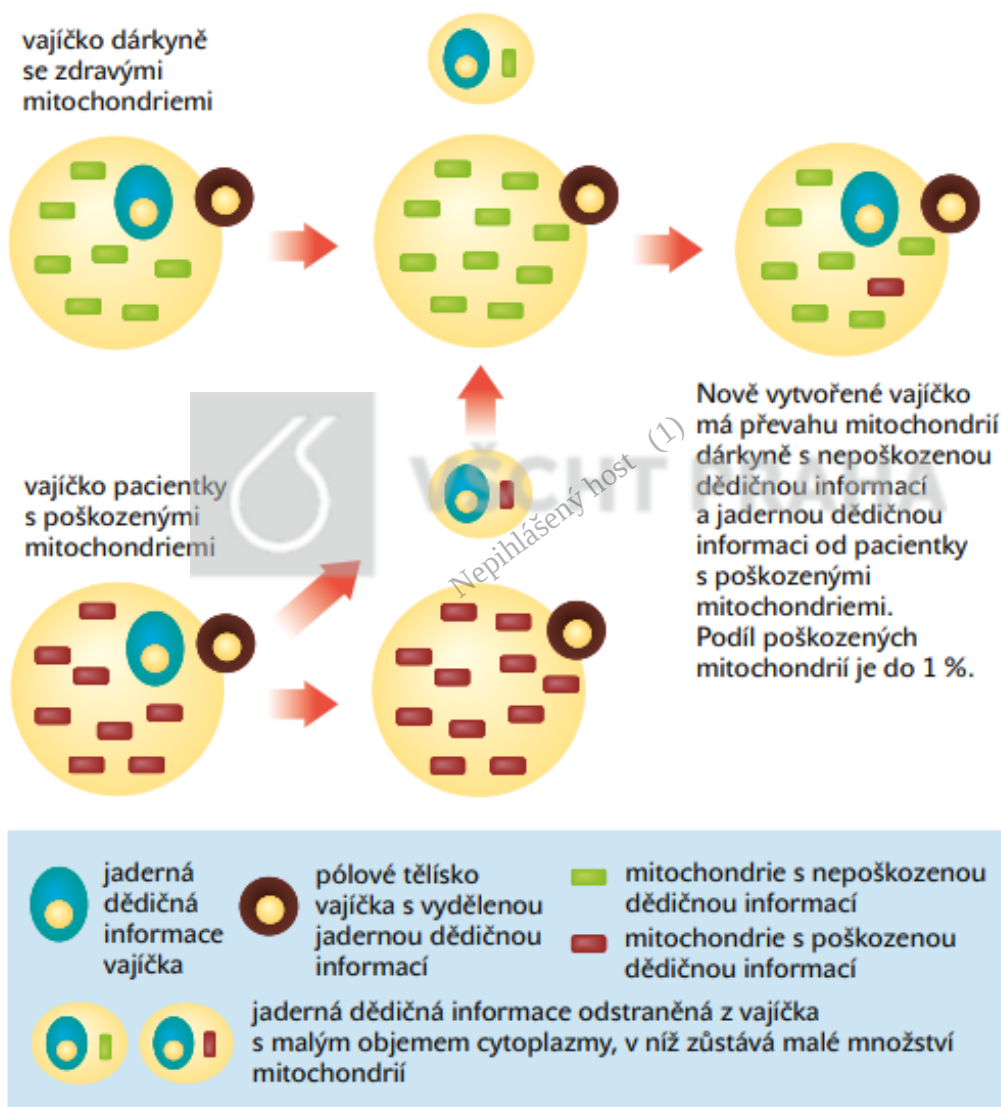
Editace genomu



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/>