



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Zpráva o řešení projektu reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002362

Autor: kolektiv autorů pod vedením prof. MUDr. Petra Zacha, CSc. z Ústavu Anatomie 3. LF UK

Metody studia DNA a RNA II

Mgr. Petr Daniel

petr.daniel@lf3.cuni.cz

Primery

- Krátké oligonukleotidy (20 – 30 nukleotidů)
- Přímý primer a zpětný primer – každý se váže na jedno vlákno DNA
- Jsou komplementární k sekvencím na 3' konci odpovídajícího řetězce

- Ohraničují cílovou oblast DNA, kterou chceme amplifikovat (namnožit)
- Nasednutí primerů ovlivňuje teplota – je dána délkou primerů a obsahem nukleotidů

Syntéza oligonukleotidů

- Na pevném nosiči (např. porézní sklo)

- Až 200 nukleotidů (IDT Tech.)
- Modifikované deoxyribonukleotidy
- Blokování reaktivních skupin
- Nezreagované meziprodukty se musí blokovat a odstranit (HPLC, elektroforéza)

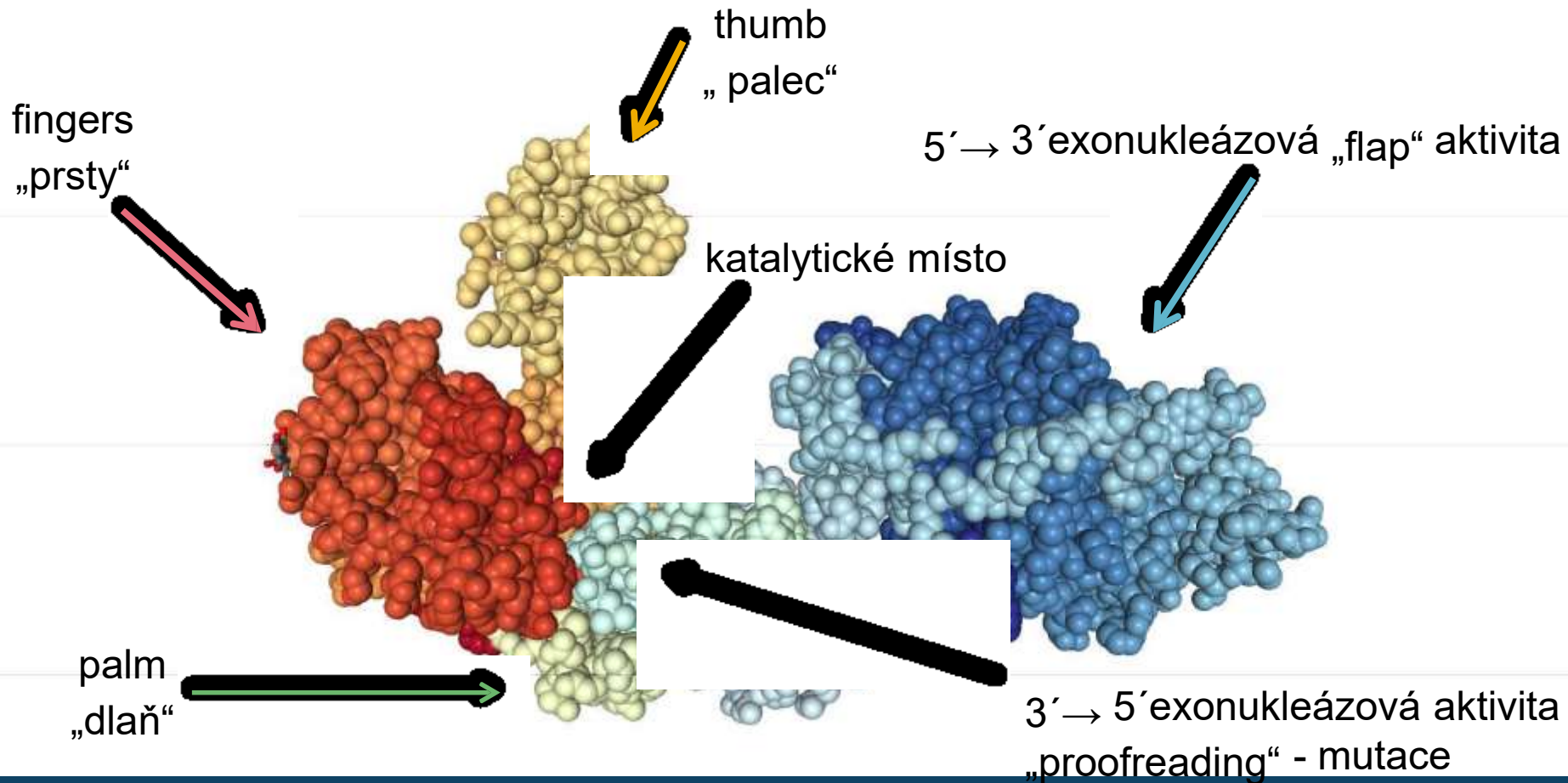
Polymerázy používané při PCR

Taq polymeráza (*Thermus aquaticus*)



- ⦿ Termostabilní DNA „polymeráza“
- ⦿ Katalytická aktivita 75°C
- ⦿ Vysoká procesivita
- ⦿ Nemá 3' → 5' exonukleázovou (korekční, proofreadingovou) aktivitu
- ⦿ Má 5' → 3' exonukleázovou aktivitu
- ⦿ Má slabou terminální transferázovou deoxynukleotidylovou aktivitu (Tdt aktivita)
Palm doména (dlaň) – obsahuje katalytické místo

Model Taq polymerázy



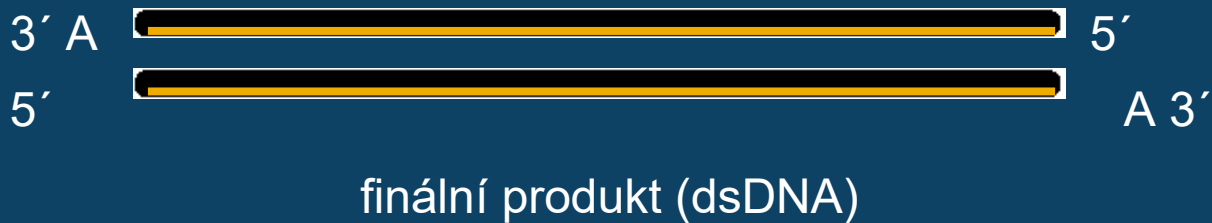
Fingers (prsty) – pozicování DNA

Thumb (palec) – vazba DNA

Exonukleázová doména – odstraňuje DNA (využití Taqman PCR)

Polymerázy používané při PCR

- Taq polymeráza (Tdt aktivita specifická pro A)



⦿ High-fidelity polymeráza



finální produkt (dsDNA)

Zvolení správné DNA polymerázy

Chybovost Taq polymerázy – amplifikace kratších úseků

Pyrococcus furiosus DNA polymerase (2.8×10^{-5})

Taq DNA polymerase (2.28×10^{-5})

Number of PCR cycles: 35

Calculate error

Estimated percentage of PCR products having an error (i.e., DNA molecules with 1 error): 39.9

Length of PCR product in bp: 500

Number of PCR cycles: 35

Example

What percent of the product molecules contain an error after PCR (30 cycles) with different polymerases?

Polymerase	1 kb template	3 kb template
Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (HF Buffer)	1.32%	3.96%
Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (GC Buffer)	2.85%	8.55%
<i>Pyrococcus furiosus</i> DNA polymerase	9.4%	25.2%
Taq DNA polymerase	68.4%	205.2%

The table above demonstrates the low error rate of Phusion DNA Polymerase. After 30 cycles of PCR amplifying a 3 kb template, only 3.96% of the product DNA molecules contain 1 (nucleotide) error each. This means that 96.04% of the product molecules are entirely error-free. In contrast, after the same PCR protocol performed with Taq DNA polymerase, every product molecule contains an average of 2 errors.

DNA produkt
500bp/35 cyklů –
40% molekul
obsahuje mutaci

PCR (polymerázová řetězová reakce)

PRINCIP: namnožení (amplifikace) vybraného úseku DNA

Reakce probíhá v cyklech (30 – 40 cyklů)

Každý cyklus má 3 kroky (změna teploty je řídicí konstanta ovlivňující jednotlivé kroky)

- denaturace
- annealing (reasociace)

- extenze

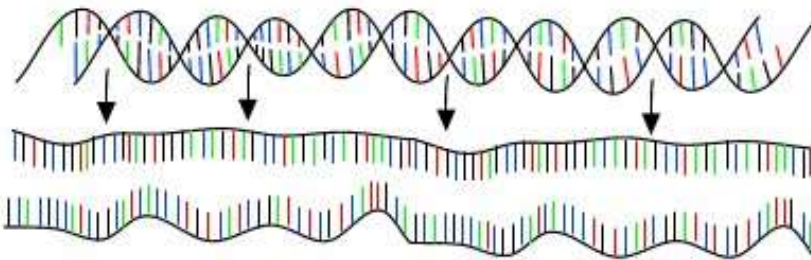
Kroky PCR

- 1. Denaturace** porušení H-můstku v dvoušroubovici DNA za vzniku separátních vláken ($T > 94^{\circ}\text{C}$)
- 2. Annealing (reasociace)** připojení primerů k odděleným vláknům DNA
($T_{\text{anneal.}} = ?$)

3. Extenze (elongace) prodlužování, syntéza nového vlákna DNA pomocí DNA polymerázy podle starého vlákna jako templátu ($T = 72^{\circ}\text{C}$)

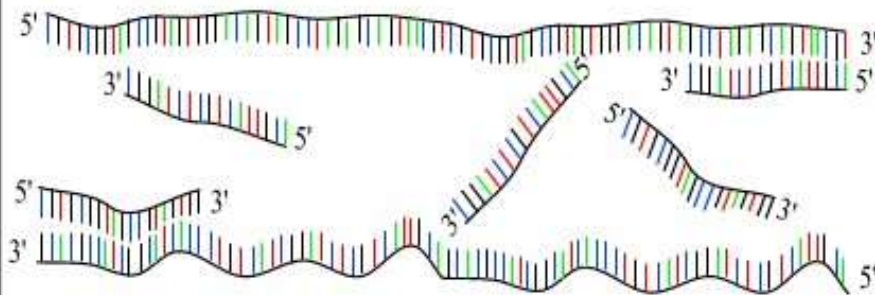
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

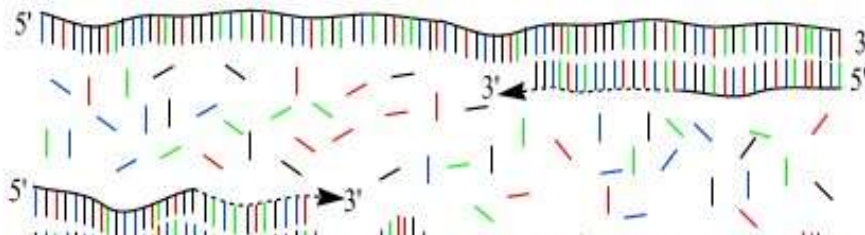
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

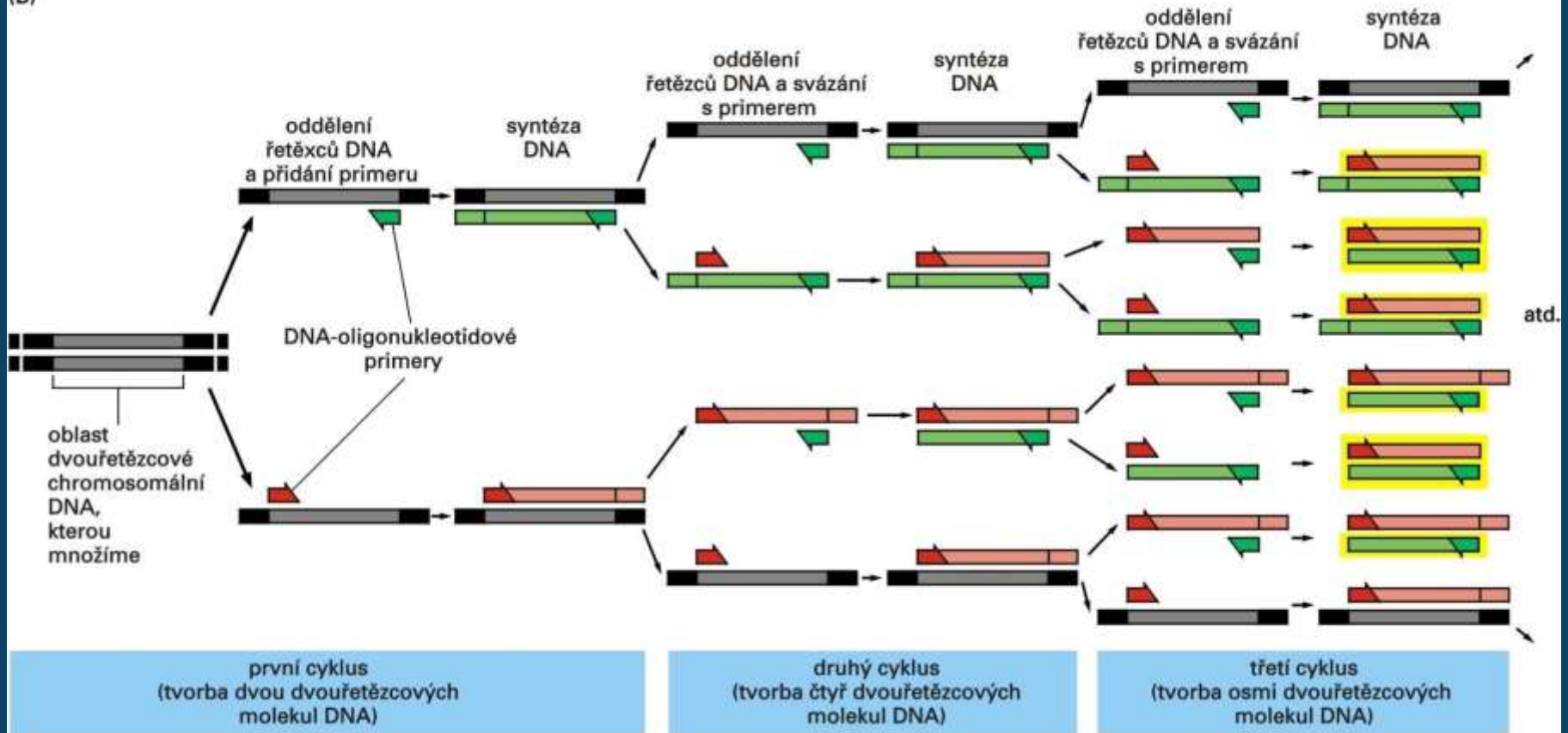
2 minutes 72 °C

only dNTP's

Amplifikace

- ⦿ Exponenciální průběh
 - > Počet kopií množeného úseku DNA = 2^n , kde n je počet cyklů

(B)



Výchozí DNA



X

1 molekula dsDNA

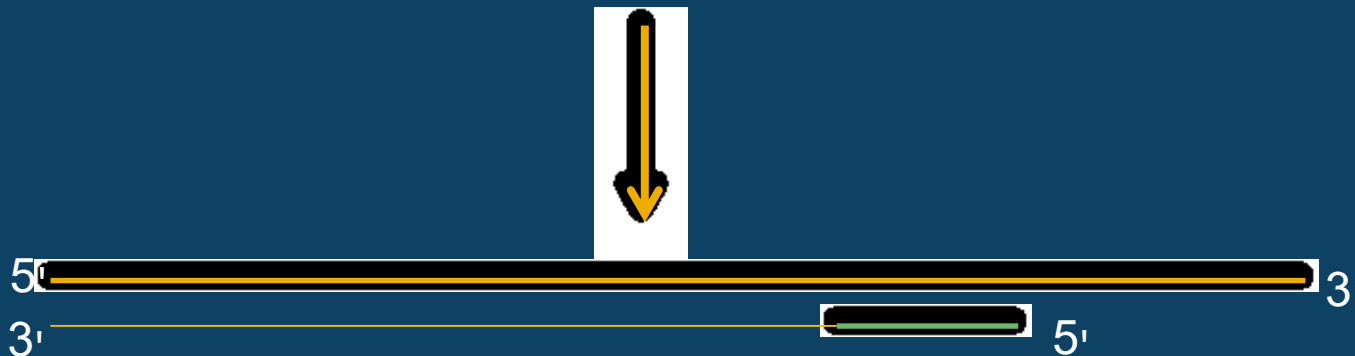


1. cyklus

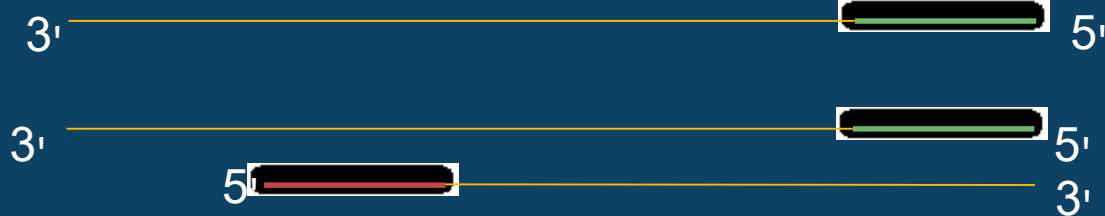
2X



X

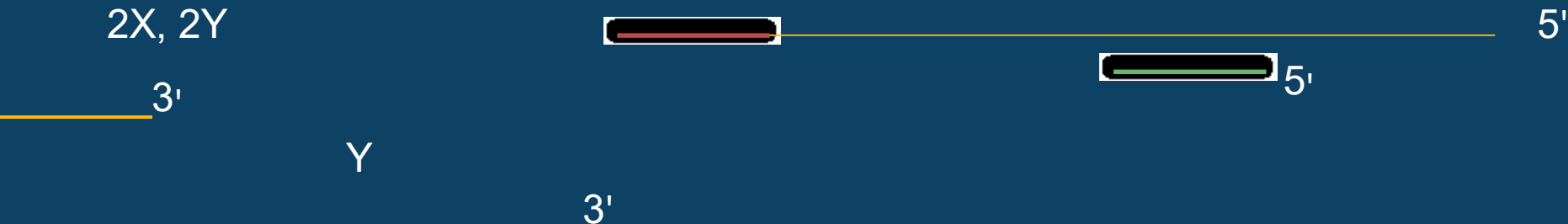


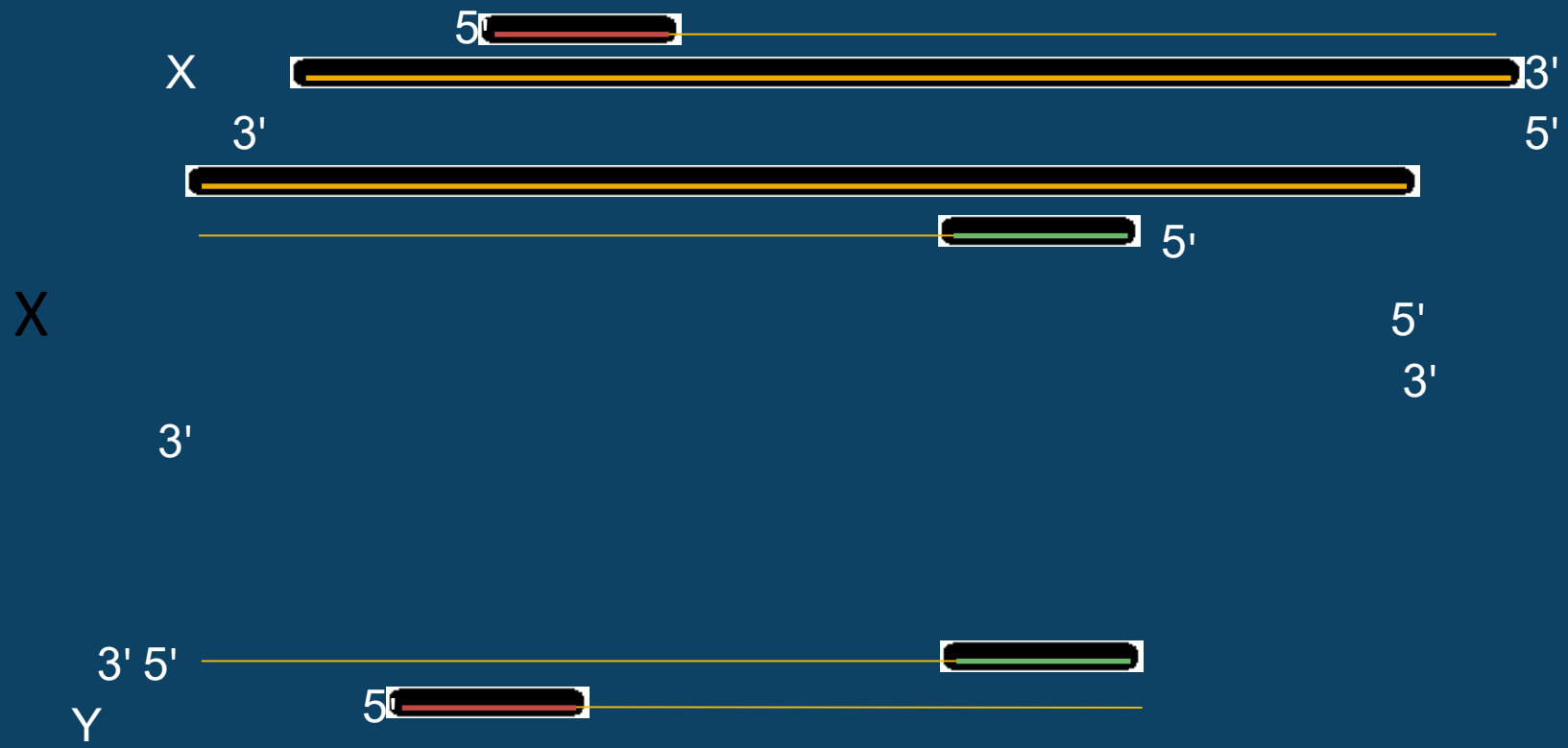
Y



2. **cyklus**
4 molekuly

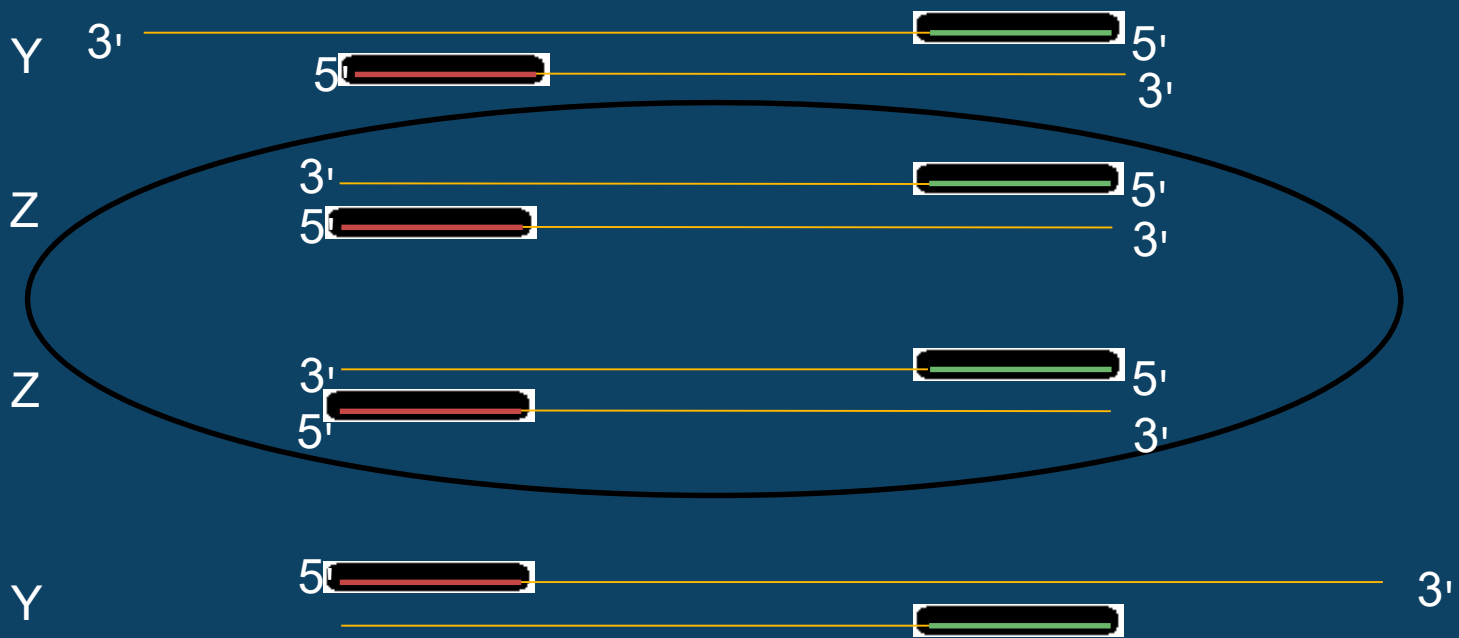
2X, 2Y





3'

3. Kolo
8 molekuly
(2X+4Y+2z)





cyklus	Počet molekul X	Počet molekul Y	Počet molekul Z
1	2	0	0
2	2	2	0

3	2	4	2
4	2	6	8
5	2	8	22
10	2	18	1004
30	2	58	1,073,741,764

	X	Y	Z
n = počet cyklů	2	2^{n-2}	$2^n - 2n$

2^n (platí pro velké n)

Závěrečná fáze PCR

- Trvání extenze posledního cyklu se prodlužuje na 5 min
- Ukončení reakce
 - EDTA – chelatační činidlo pro Mg^{2+}
 - (EGTA – Ca^{2+})
- Uchování vzorku na ledu/mrazák
- Následuje analýza reakce gelovou elektroforézou

Typy PCR

◎ PCR se alelově specifickými primery

(ASO-PCR = PCR s alelově specifickými oligonukleotidy)

– *cílená analýza*

- *rozpoznávají místo*

mutace

- ◎ PCR s obecnými primery – následuje analýza PCR produktu – *cílená, kompletní analýza*

Podtypy PCR

⦿ **Nested PCR**

(ASO-PCR = PCR s alelově specifickými nukleotidy)

- zahrnuje dvě následující PCR
- snižuje riziko nespecifického nasedání primerů

⦿ **Multiplex PCR**

– dvě a více PCR probíhají v jedné reakční směsi ve stejném čase

Nested PCR

1. PCR



2. PCR



Finální produkt

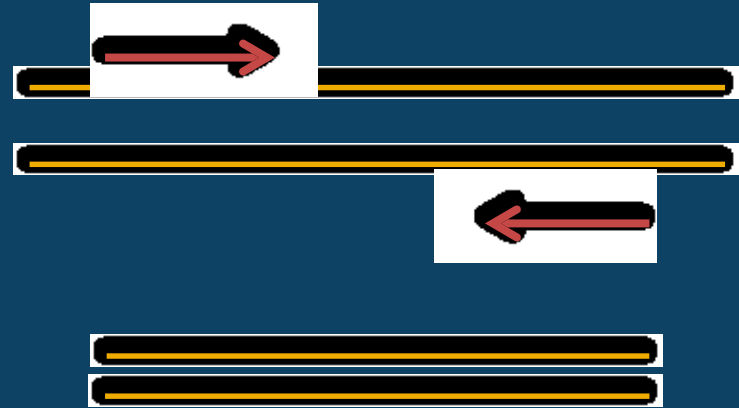


Červený pár primerů nasedá na jiné místo v DNA
Zelený pár primerů je specifický

Multiplex PCR

1. PCR – 2 páry primerů, 2 produkty



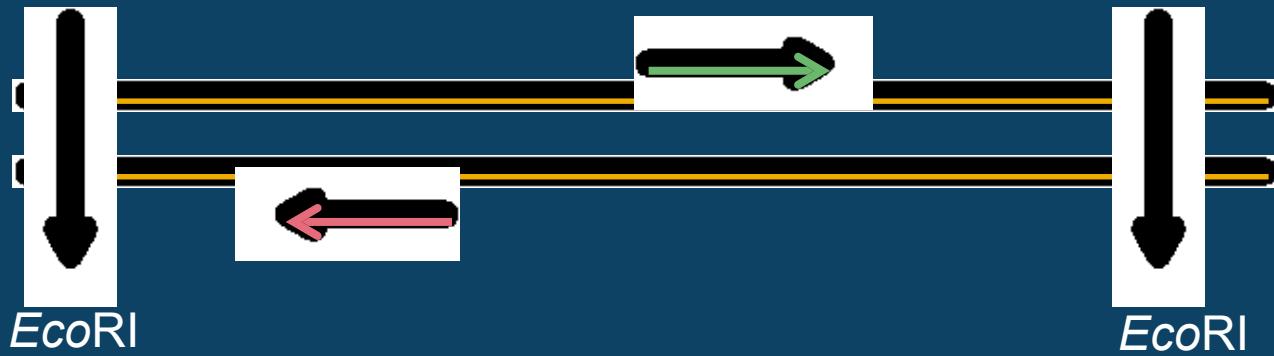


Inverzní PCR

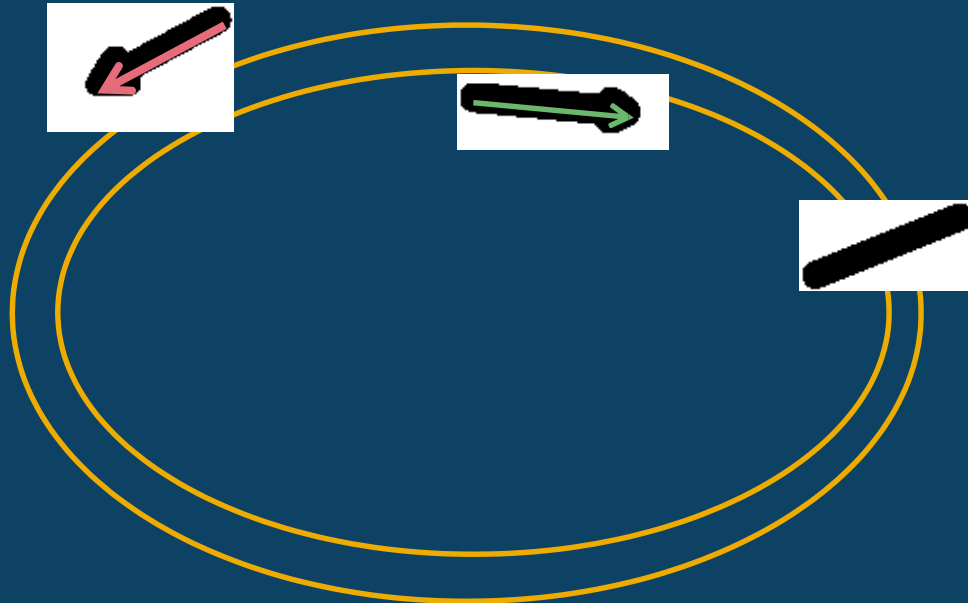
- Zjišťujeme sekvenci vně primerů
- Např. integrace viru HIV-A
- Nejprve štěpíme DNA restriční endonukleázou

- DNA ligujeme (kruhovitá struktura)
- Provedeme PCR





PCR



Analýza PCR produktu

Neznámá mutace – *kompletní analýza*

◎ **Sekvenování**

hledání kompletního (přesného) pořadí nukleotidů v amplifikovaném úseku DNA

Analýza PCR produktu

Známa mutace – cílená analýza

● **Hybridizace**

PCR produkt analyzujeme pomocí značené sondy

● **RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)**

PCR produkt specificky štěpíme pomocí restrikčních enzymů (restrikční endonukleáza – restriktáza)

Detekce exprese určitého genu

- Genová exprese na úrovni – mRNA
– proteinů

- mRNA – Real-Time PCR, Southern blot

- Proteiny – Western blot

Genová exprese na úrovni mRNA

Real-Time PCR → PCR i pro kvantitativní analýzu (x DNA diagnostika – kvalitativní analýza)

- > Měříme narůstající množství PCR produktu v čase (kolik) – v každém cyklu PCR reakce
- > Pokud není gen exprimován, mRNA nevzniká – nedochází k amplifikaci

Real-time PCR

Reverzní transkripce > RNA Reverzní transkriptáza cDNA
(komplementární DNA)

>Čím více mRNA daného genu, tím více cDNA, tím rychleji se amplifikuje → gen je více exprimován (komparativní analýza)

Reverzní transkripce

1st strand cDNA synthesis

5' cap AAAAAAAAAAAAAAAA 3'

RNA-DNA
3' 5'



RNA-DNA hybrid

primer – oligo dT



RNáza H/PCR

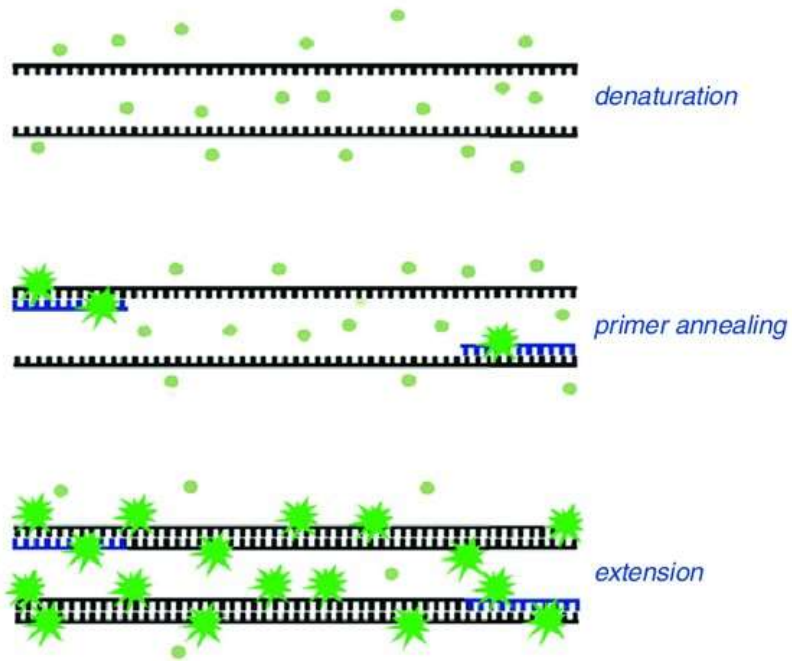
1. Cyklus PCR

DNA



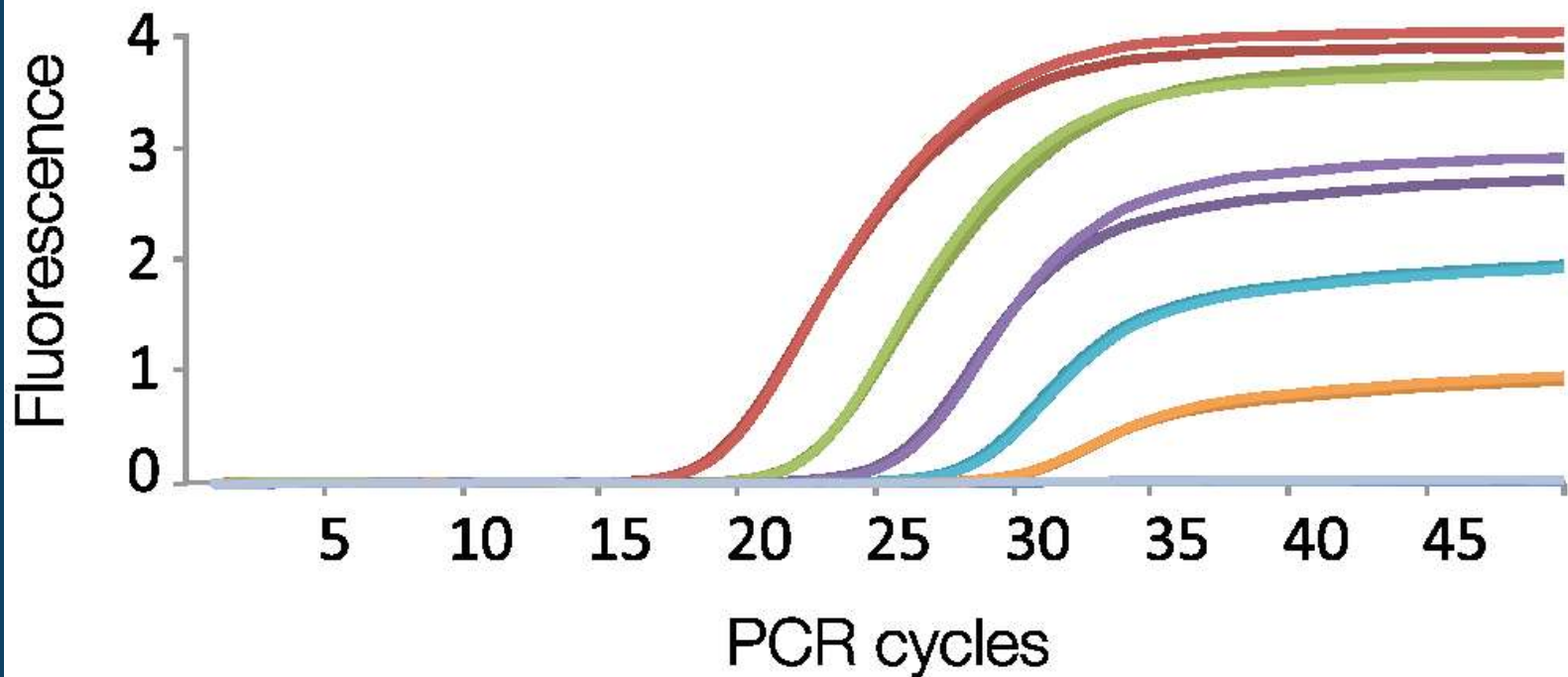
Real-time PCR SYBR Green

- SYBR green se váže do malého žlábků dsDNA
- Po každém cyklu se změří fluorescence



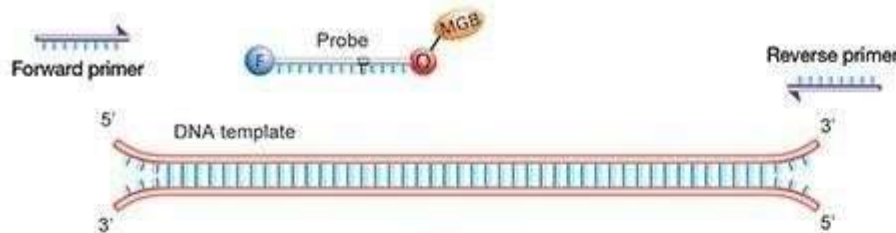
Real-time PCR SYBR Green

probe-based qPCR assay, NONO mRNA,
total RNA dilution series: 100 - 0.01 ng/reaction

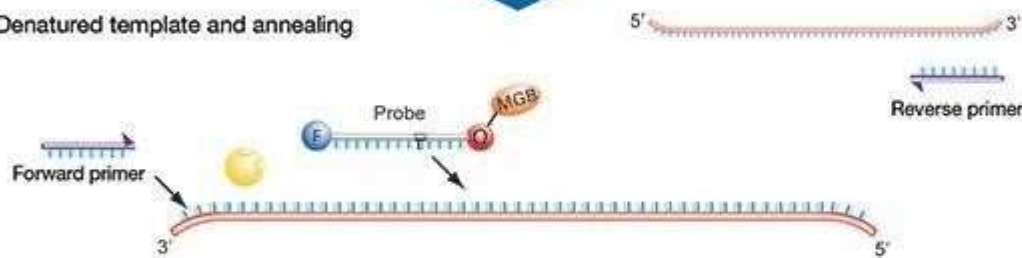


TaqMan real-time PCR

1. Assay components and DNA template











2. Denatured template and annealing



3. Polymerization and signal generation



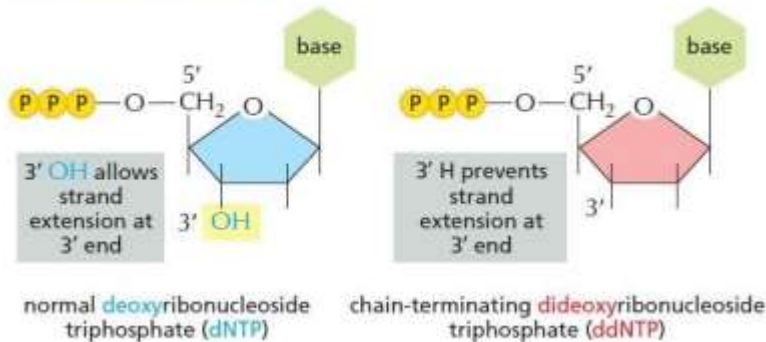
Legend

-  Applied Biosystems™ FAM™ or VIC™ dye
-  Nonfluorescent quencher (NFQ)
-  Minor groove binder
-  Applied Biosystems™ AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase
-  Probe
-  Primer
-  Template
-  Newly synthesized DNA

Chain-termination sequencing

- Sangerovo, dideoxy sekvenování
 - PCR reakce (množství produktu narůstá lineárně)
- 1 primer, speciální polymeráza (Taq pol.), **směs deoxyribonukleotidů a dideoxyribonukleotidů** (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
 - ddNTP – postrádá na 3' C 2-deoxyribosy OH skupinu (viz obr.)

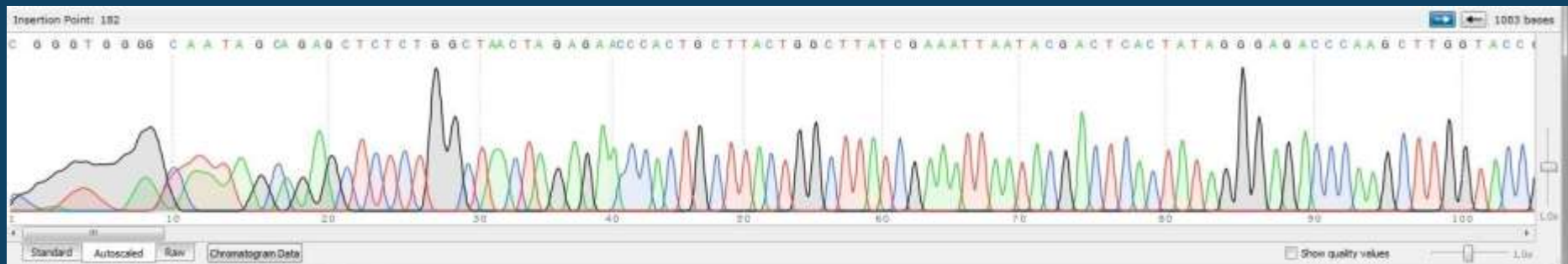
DNA SEQUENCING



Dideoxy sequencing, or Sanger sequencing (named after the scientist who invented it), uses DNA polymerase, along with special chain-terminating nucleotides called dideoxynucleoside triphosphates (*left*), to make partial copies of the DNA fragment to be sequenced. These ddNTPs are derivatives of the normal deoxyribonucleoside triphosphates that lack the 3' hydroxyl group. When incorporated into a growing DNA strand, they block further elongation of that strand.

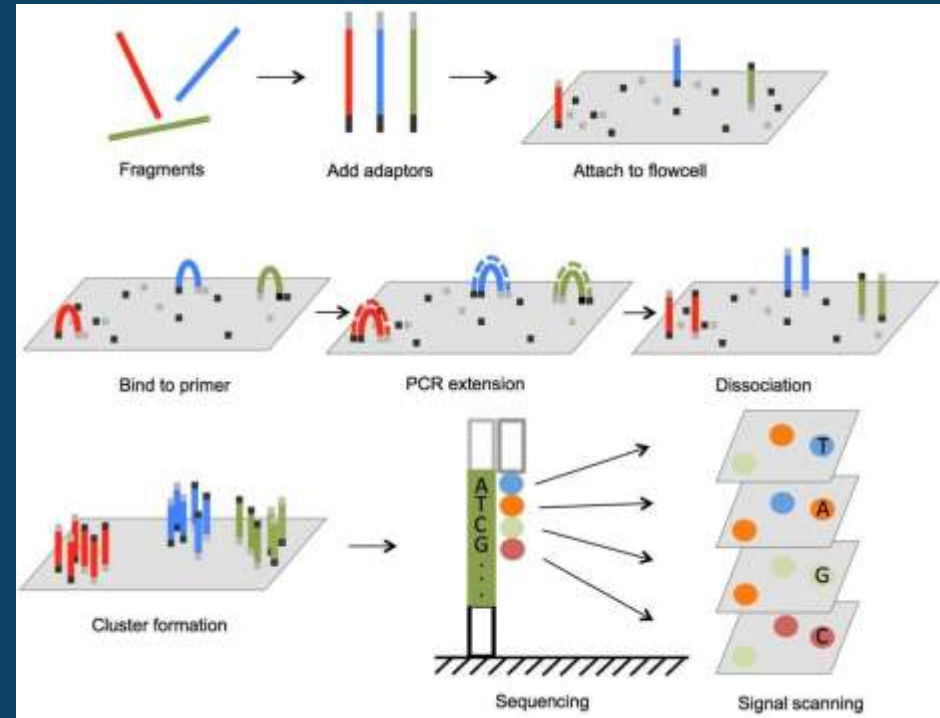
- ddNTP jsou značené fluorescenční značkou
- Produkty se oddělují kapilárovou gelovou elektroforézou (50cm, 0,1cm)
- Během elektroforézy produkty oddělené o 1 nt prochází přes detektor fluorescence
- Limit – 750 b/1 run
- Automatizace – až 7 milionů nt/den

(1 přístroj sekvenuje lidský genom za 2321 dní)



New generation sequencing (NGS)

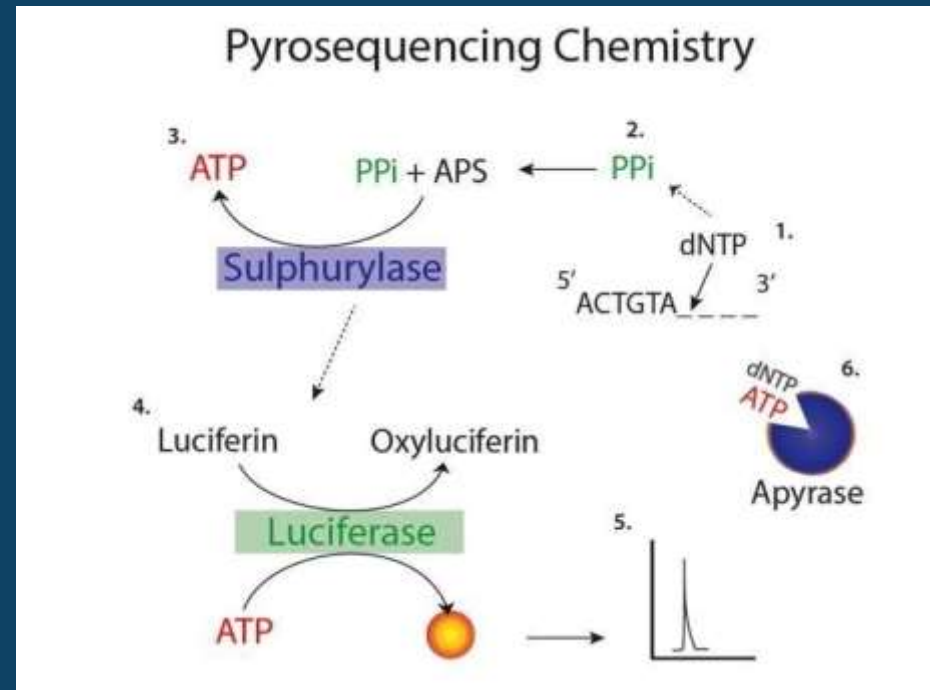
- Tisíce až miliony DNA fragmentů se paralelně sekvenují v 1 experimentu
- DNA – sonikace – immobilizace fragmentů na adaptorové molekuly
- Amplifikace (vznik clusterů)
- Sekvence (pyrosekvenování, Illumina, ion torrent)



Pyrosekvenování (454 sekvenování)

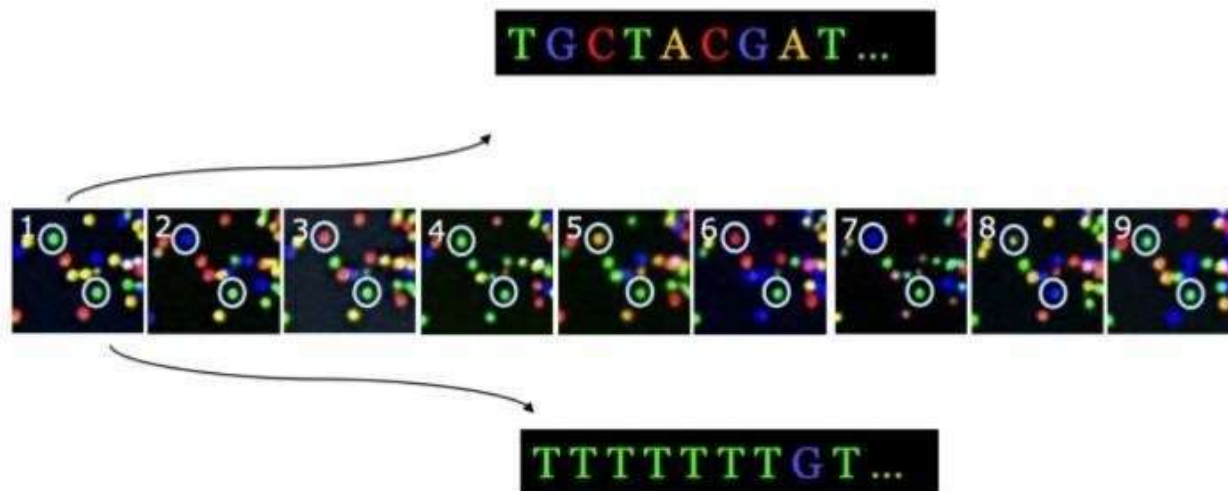
- 1000 bp

- Zařazení dNTP provází uvolnění **pyrofosfátu**
- Pyrofosfát přeměněn na ATP (**ATP-sulfonyláza**)
- Vzniklé ATP využívá **luciferáza**, která produkuje světelný signál
- Světelný signál je produkován při zařazení deoxyribonukleotidu
- Enzym **apyráza** degraduje nezreagované dNTP a ATP



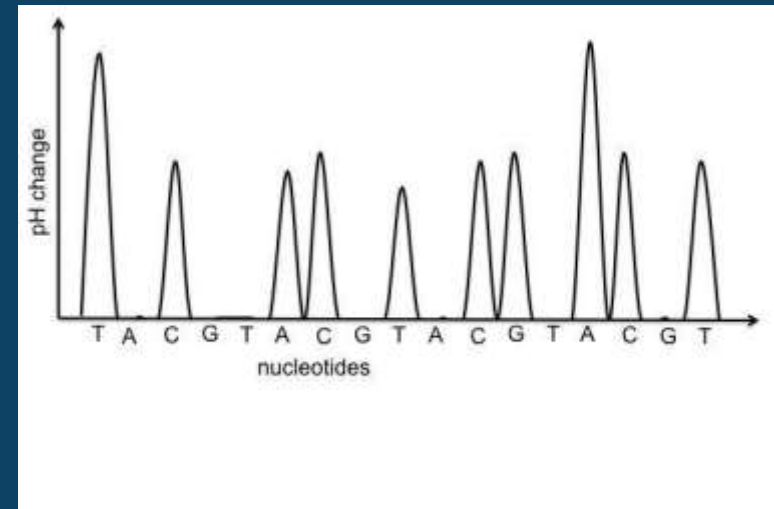
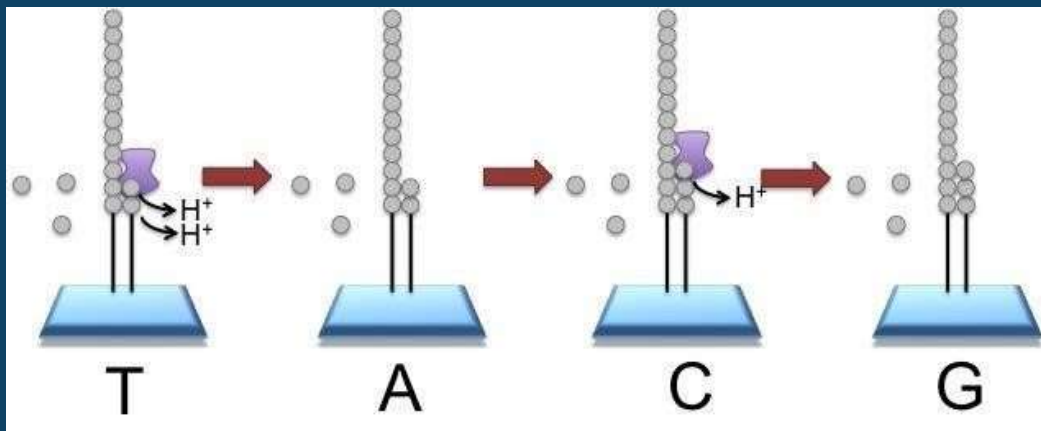
Illumina (Solexa) sekvenování

- 300 b (2000Mb/run)
- Reverzibilní terminace
 - Skupina na 3' konci deoxyribonukleotidu je fluorofor
- Blokující skupina se odstraní po detekci signálu



Ion torent sekvenování

- 400 b
- Zařazení dNTP se uvolní H^+ - sníží se pH



○ Uvolněný H^+ detekuje ISFET