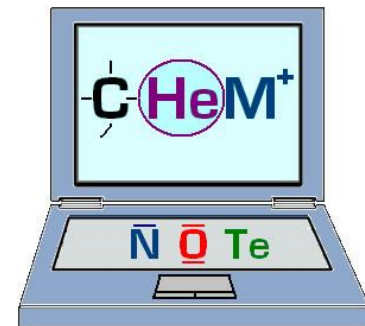




Evropský sociální fond

Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



NUKLEOVÉ KYSELINY

Nukleotidy

- 3 složky
 - dusík obsahující báze (purin či pyrimidin)
 - pentosa
 - fosfát

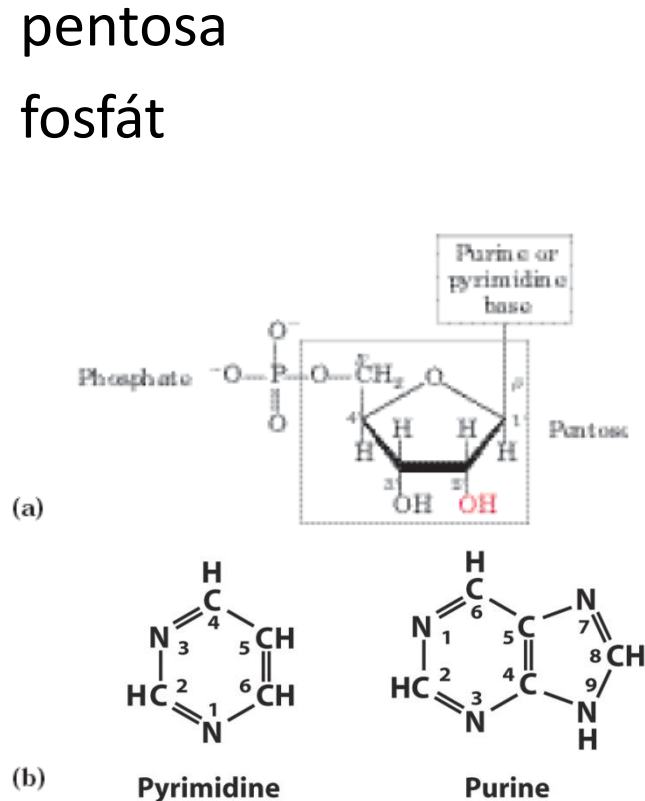


FIGURE 8-1 Structure of nucleotides. (a) General structure showing the numbering convention for the pentose ring. This is a ribonucleotide. In deoxyribonucleotides the —OH group on the 2' carbon (in red) is replaced with —H. (b) The parent compounds of the pyrimidine and purine bases of nucleotides and nucleic acids, showing the numbering conventions.

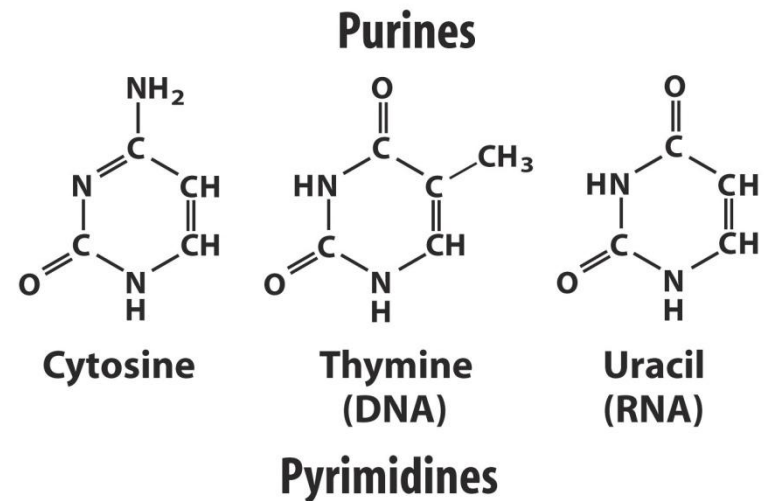
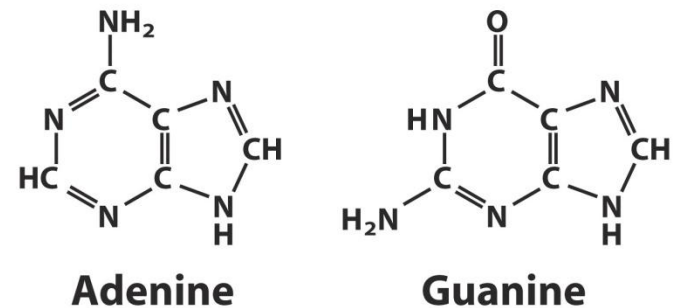
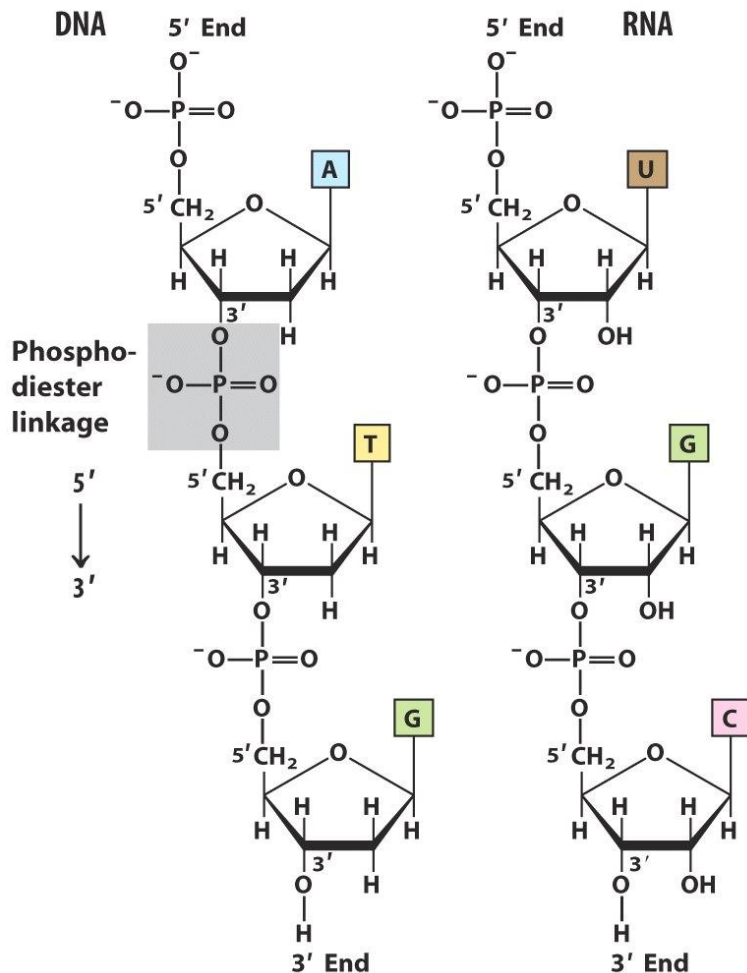


FIGURE 8-2 Major purine and pyrimidine bases of nucleic acids. Some of the common names of these bases reflect the circumstances of their discovery. Guanine, for example, was first isolated from guano (bird manure), and thymine was first isolated from thymus tissue.

Fosfodiesterová vazba.

Vyskytuje se mezi následnými nukleotidy v NK.
Stejná u DNA i RNA.



5' - fosfátová skupina jednoho nukleotidu se váže ke 3'hydroxylové skupině dalšího nukleotidu.

Konvence: struktura jednoho řetězce NK je psána s 5'koncem vlevo a 3'koncem vpravo.

Vzniká tak páteř DNA, tvořená fosfátovými a pentosovými zbytky – dusíkaté báze jsou napojeny jako postranní řetězce.

Fosfátová skupina je negativně nabitá

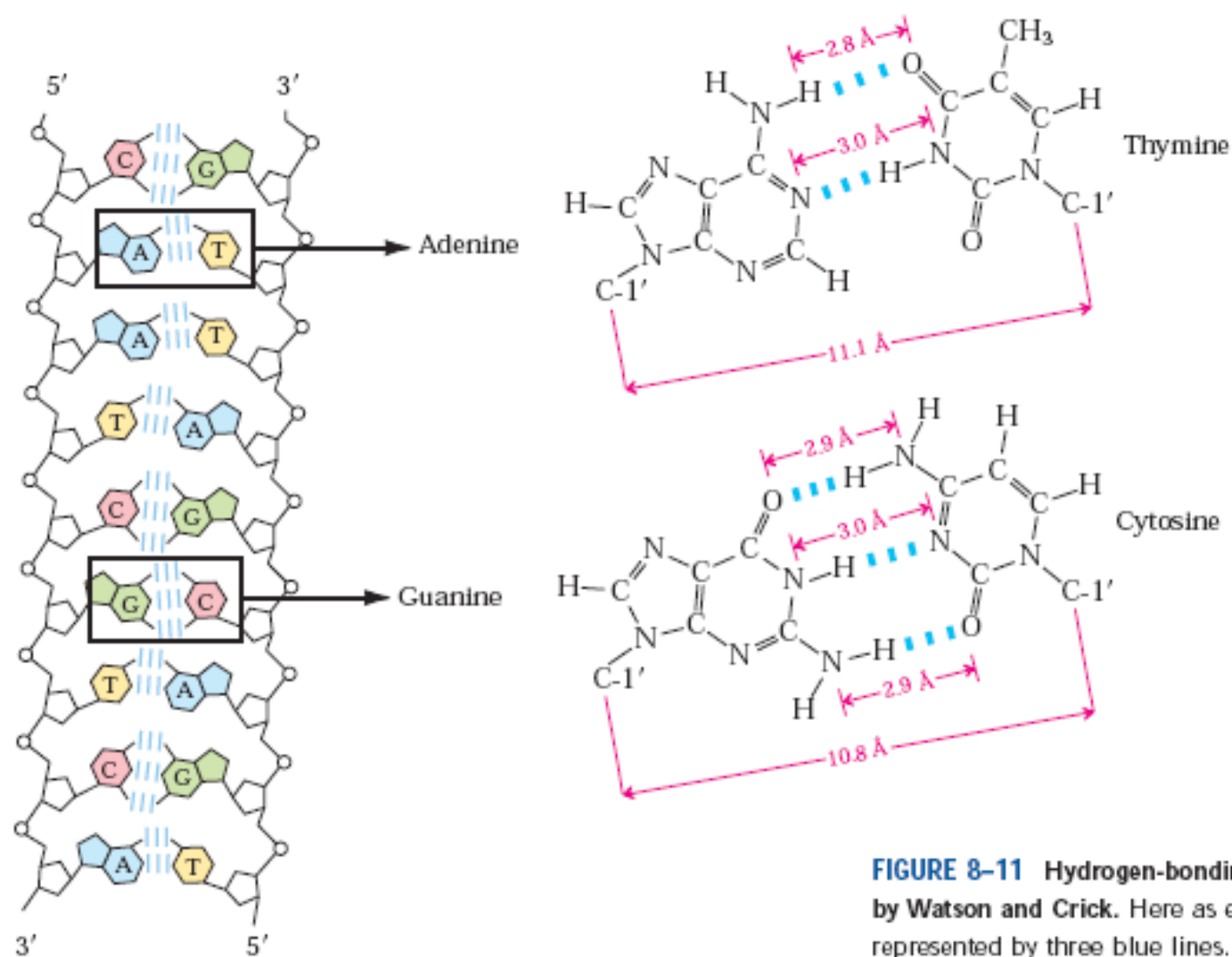


FIGURE 8-11 Hydrogen-bonding patterns in the base pairs defined by Watson and Crick. Here as elsewhere, hydrogen bonds are represented by three blue lines.

Názvosloví

TABLE 8-1 Nucleotide and Nucleic Acid Nomenclature

<i>Base</i>	<i>Nucleoside</i>	<i>Nucleotide</i>	<i>Nucleic acid</i>
Purines			
Adenine	Adenosine	Adenylate	RNA
	Deoxyadenosine	Deoxyadenylate	DNA
Guanine	Guanosine	Guanylate	RNA
	Deoxyguanosine	Deoxyguanylate	DNA
Pyrimidines			
Cytosine	Cytidine	Cytidylate	RNA
	Deoxycytidine	Deoxycytidylate	DNA
Thymine	Thymidine or deoxythymidine	Thymidylate or deoxythymidylate	DNA
Uracil	Uridine	Uridylate	RNA

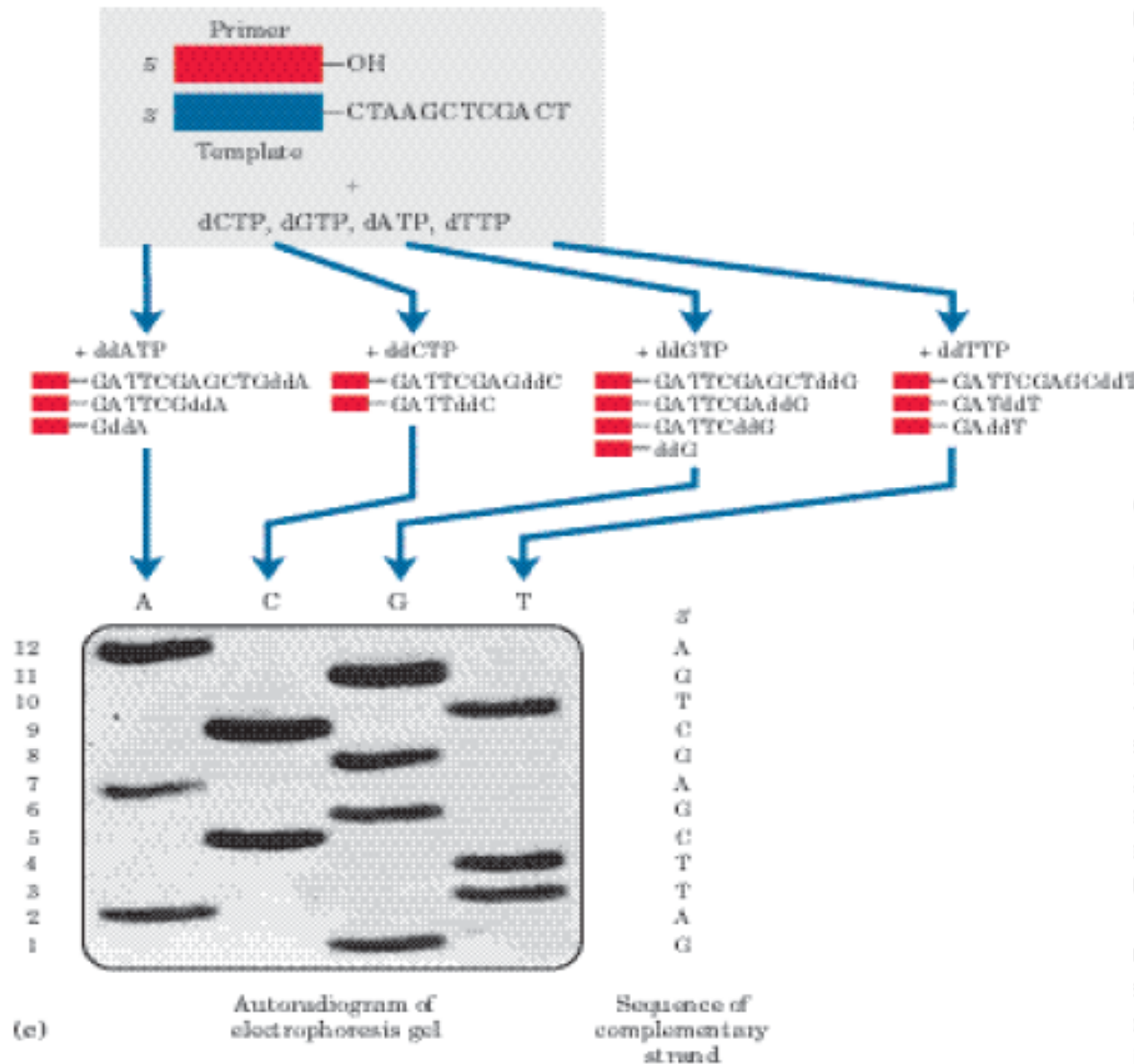
Určování sekvence DNA

- Existují dva odlišné principy sekvenace
 - chemická metoda (Maxam-Gilbertova)
 - používají se fragmenty DNA terminálně značené pomocí ^{32}P , které jsou vystaveny působení chemických činidel, štěpících specificky pouze za jedním nebo dvěma nukleotidy. Metoda je založena na schopnosti hydrazinu, dimethyl sulfátu (DMS) a kyseliny mravenčí specificky modifikovat různé báze v molekule DNA. Poté je přidán piperidin, který katalyzuje štěpení řetězců v místech obsahujících tyto modifikované báze. Za specifitu je tedy zodpovědná první (modifikační) reakce. Pro dobrý výsledek sekvenování je nutné zajistit takové reakční podmínky, aby bylo modifikováno pouze nízké procento příslušných bází. Druhá, degradační reakce musí naopak být zcela kvantitativní

Určování sekvence DNA

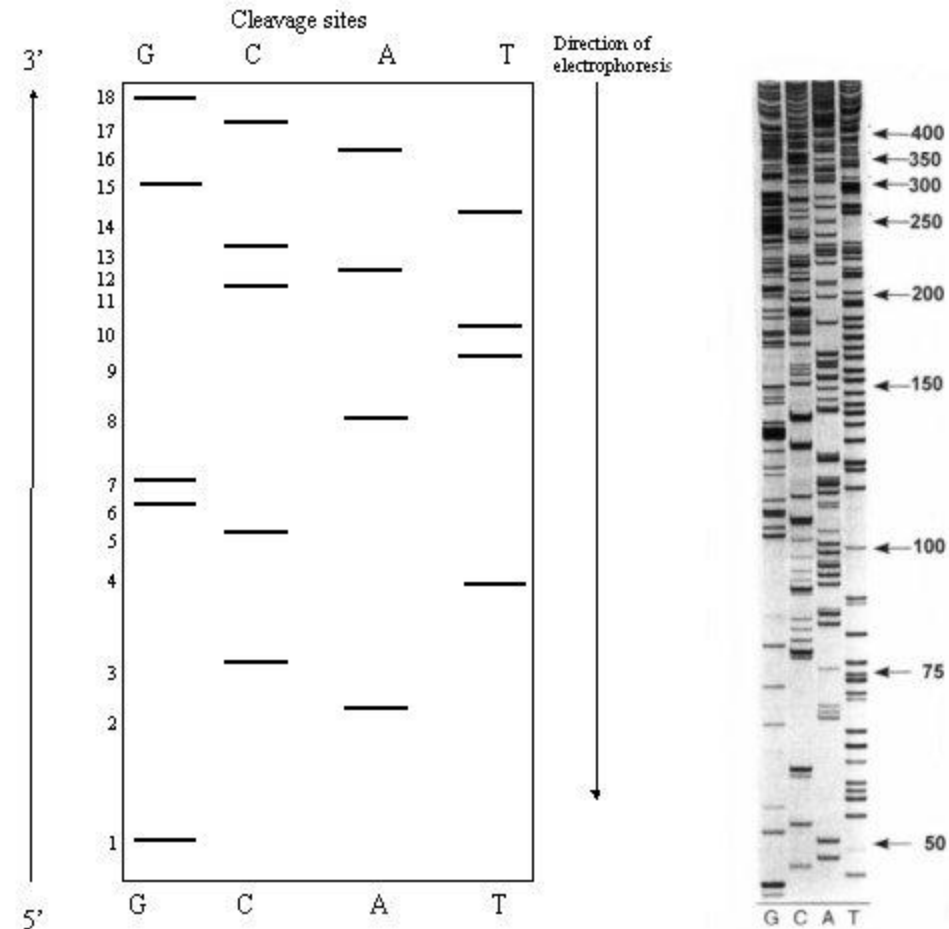
- dideoxy metoda (Sangerova) – enzymová
 - metoda využívá DNA polymerasu pro vytvoření komplementární kopie jednořetězcového templátu
 - založena na schopnosti DNA polymerasy používat 2', 3'-dideoxynukleosid trifosfáty (ddNTP) jako substráty. Je-li takováto modifikovaná báze inkorporována do rostoucího řetězce, dojde k zastavení jeho syntézy, neboť takový řetězec postrádá terminální 3'-hydroxylovou skupinu
 - DNA polymerasa nemůže iniciovat polymeraci bez přítomnosti primeru z jehož 3' konce pokračuje elongace. Primer po připojení ke komplementární části templátu vymezuje úsek, který bude sekvenován. Deoxynukleotidy jsou připojovány na základě komplementarity k templátu a řetězec je prodlužován tvorbou fosfodiesterové vazby mezi 3' hydroxylovou skupinou a 5' fosfátovou skupinou nově připojovaného deoxynukleotidu.
 - Aby byly vytvořeny čtyři sekvenační směsi ukončené specificky vždy v pozici jediného nukleotidu, je do těchto reakční směsí přidán vždy pouze jeden typ ddNTP. Poměr ddNTP a směsi všech čtyř dNTP je volen tak, aby jednotlivé podíly elongačních produktů byly ukončeny se stejnou pravděpodobností. Tímto způsobem vznikají ve čtyřech elongačních reakčních směsích podíly řetězců se stejným 5' koncem definovaným použitým primerem a s variabilním 3' koncem, zakončeným specifickým dideoxynukleotidem. Tato metoda může být různě modifikována. Po zastavení sekvenační reakce jsou dvojřetězcové molekuly DNA denaturovány tak, aby došlo k oddělení templátu od značených vláken ukončených jednotlivými dideoxynukleotidy. Tyto fragmenty jsou pak elektroforeticky za denaturačních podmínek (vysoká teplota a přítomnost močoviny) rozděleny na polyakrylamidovém gelu

FIGURE 8-36 DNA sequencing by the Sanger method. This method makes use of the mechanism of DNA synthesis by DNA polymerases (Chapter 25). **(a)** DNA polymerases require both a primer (a short oligonucleotide strand), to which nucleotides are added, and a template strand to guide selection of each new nucleotide. In cells, the 3'-hydroxyl group of the primer reacts with an incoming deoxynucleoside triphosphate (dNTP) to form a phosphodiester bond. **(b)** The Sanger method uses a deoxynucleoside triphosphate (ddNTP) instead of a dNTP. (The Sanger method is also known as dideoxy sequencing because ddNTP is inserted in place of a dNTP; the analog is added, because it lacks the 3'-OH needed for the next step.)

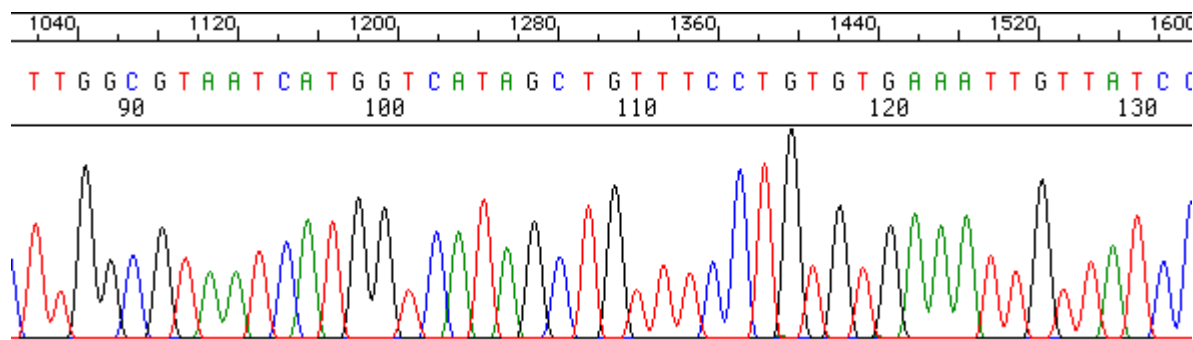


to be sequenced is used as the template, and a short primer, radioactively or fluorescently labeled, is annealed to it. By addition of small amounts of a single ddNTP, for example ddCTP, to an otherwise reaction system, the synthesized strand is prematurely terminated at some location where a C normally occurs. Given the excess of dNTPs, the probability that the analog will be incorporated is small. However, ddCTP is present in each reaction, so that each new strand has a high probability of being terminated at some point during synthesis. The mixture of labeled fragments, each ending with a specific nucleotide in the sequence, generates a set of bands, such that the different-sized fragments can be identified. The sequence is then read from an autoradiogram of the gel.

Because the fragments migrate faster, the fragments near the bottom of the gel (closer to the primer) represent the beginning of the sequence read (in the 5' → 3' direction). The sequence obtained is that of the strand being analyzed.



08_dideoxy_sequencing.swf



PCR – polymerasová řetězová reakce

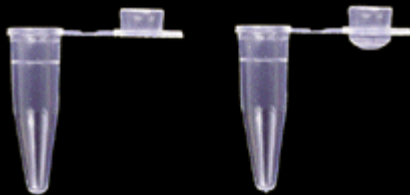
- **P**olymerase **C**hain **R**eaction
- REPLIKACE *in vitro*
- specifické namnožení určitého úseku DNA i z komplexní směsi
- DNA templát, termostabilní DNA polymerasa, nukleotidy, primery vymezující amplifikovaný úsek



Amplifikace pomocí PCR

Pro zajištění přesných teplotních režimů a snadnější průběh amplifikace se využívá programovatelných termocyklerů.

Vzorky se do termocykleru vkládají v mikrokumavkách o obsahu 0,2ml.



Doba trvání amplifikace: 2 - 3 hodiny



[Thermocycler Biometra T-Gradient]

Výhody a nevýhody PCR

Výhody

- + nízká mez detekce
- + možnost sériových analýz
- + možnost analýz několika parametrů v jedné reakci (multiplex PCR)
- + malé reakční objemy (nižší cena stanovení)
- + možnost analýz potravinářských surovin i technologicky opracovaných potravin

Nevýhody

- nemožnost kvantifikace pomocí klasické metody PCR
- některé sekvence podléhají patentovému zákonu (v běžné praxi jsou nedostupné pro návrh primerů)
- poměrně vysoká cena základního vybavení
- malé reakční objemy (náročné na zkušenost experimentátora a výběr vhodných podmínek reakce)

Templát pro PCR

- Stačí velmi malé množství, teoreticky jediná molekula
- Netřeba izolovat tuto molekulu od jiných
- Netřeba vysoká čistota vzorku

=>

- Krev, sliny, skvrny semene, vlas, hmyz v jantaru 😊



Aplikace

- Zdravotnická diagnostika
- „klonování“
- Forensní vědy

Modifikace, odvozené techniky

- Reverzní PCR
- Multiplex PCR
- Nested PCR
- Kvantitativní kompetitivní PCR
- Real time PCR