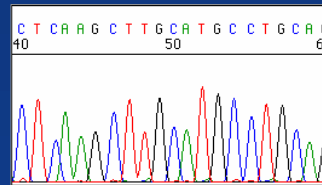
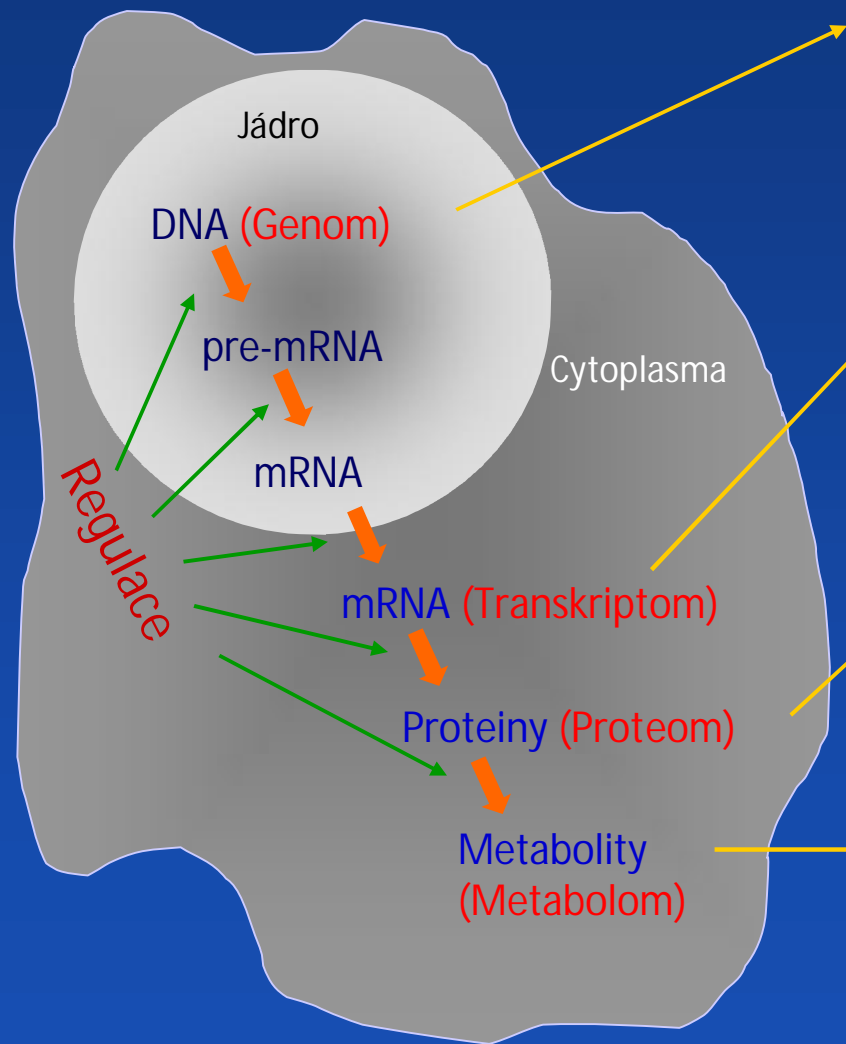


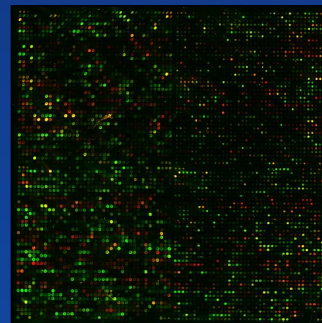
Studium transkripce

Analýzy toku informací v buňce

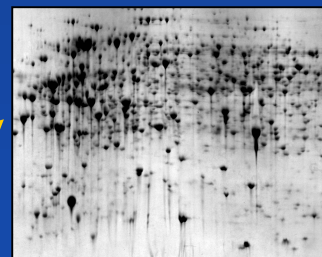


- Genomové mapování
- Genomové sekvenování
- Anotace genomu

Strukturní genomika

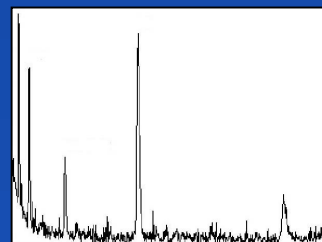


- DNA arraye a čipy
- (semi) qRT-PCR
- Northern blot + hybrid.
- Transkripční fúze



- 2D elektroforéza
- Hmotová spektrometrie
- Proteinové sekvenování
- Translační fúze
- Immunodetekce
- Enzymové aktivity, ...

Funkční genomika



- Chromatografie
- Hmotová spektrometrie
- NMR

Transkriptom

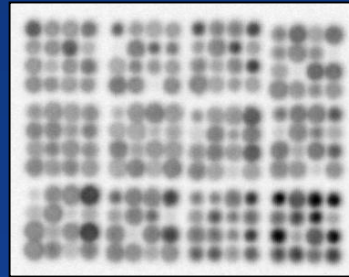
- soubor všech mRNA přítomných v dané buňce, pletivu, ...
- odráží míru exprese genů a stabilitu jejich transkriptů

Transkriptomika

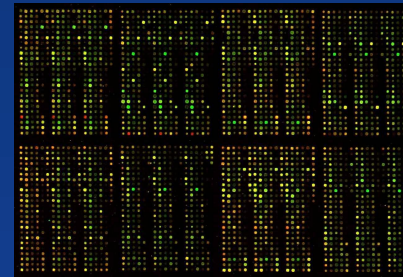
- sledování exprese populací genů,
- hledání rozdílů v genové expresi
(za různých podmínek, v různých stádiích vývoje,
v různých orgánech, ...)

Sledování transkripce genů

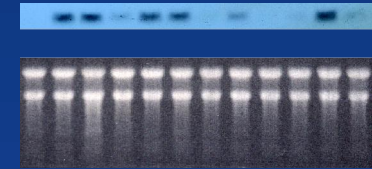
Metody založené
na hybridizaci NK



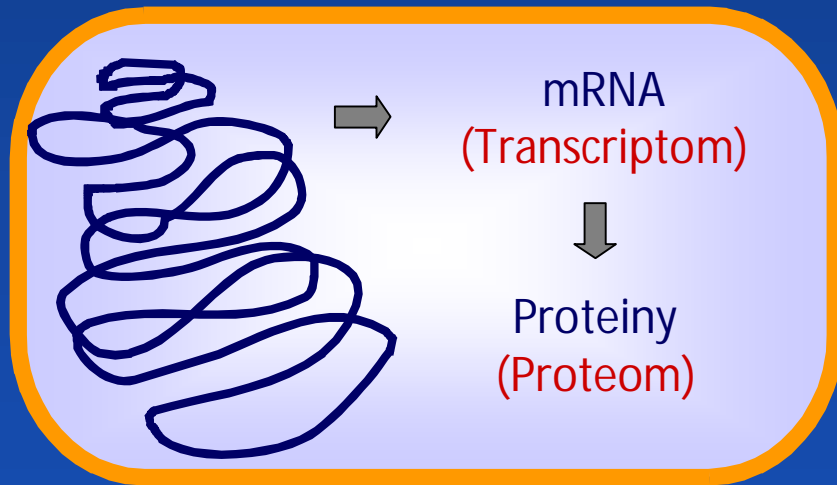
Macroarrays



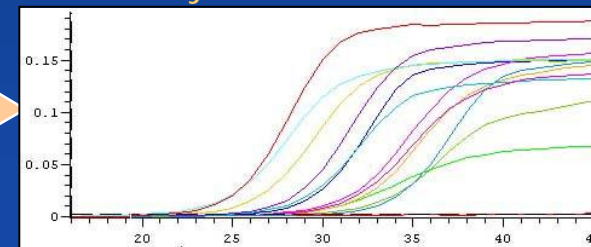
Microarrays



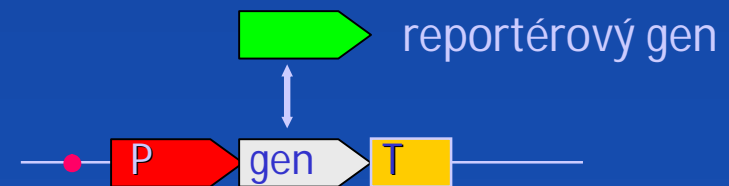
Hybridizace na
Northern blotu



Metody založené na PCR



Real time PCR
qRT-PCR;
Semikvant.
RT-PCR

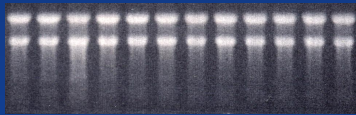


Transkripční fúze promotoru
s reportérovým genem

qRT-PCR a Semikvantitativní RT-PCR

množství produktu či počet cyklů potřebných k dosažení určité koncentrace odráží množství výchozího templátu

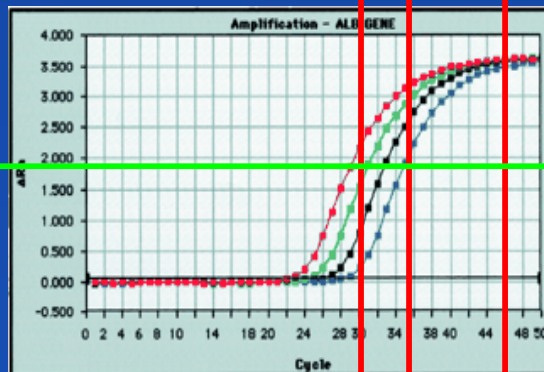
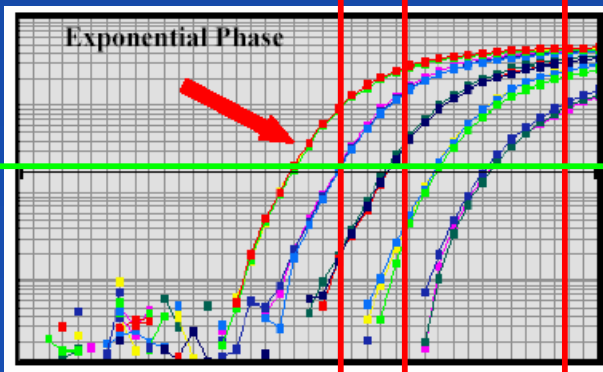
Izolace celkové RNA (mRNA)



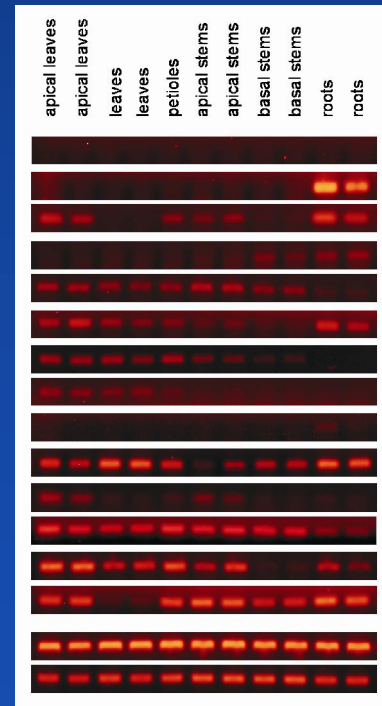
Reverzní transkripce
(oligo T-primer, či specifický reverze primer)

cDNA

qRT-PCR

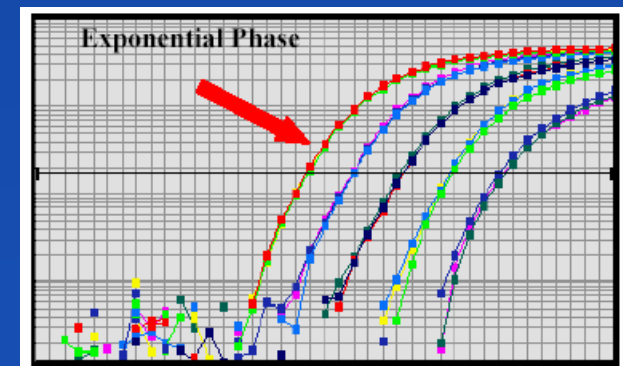
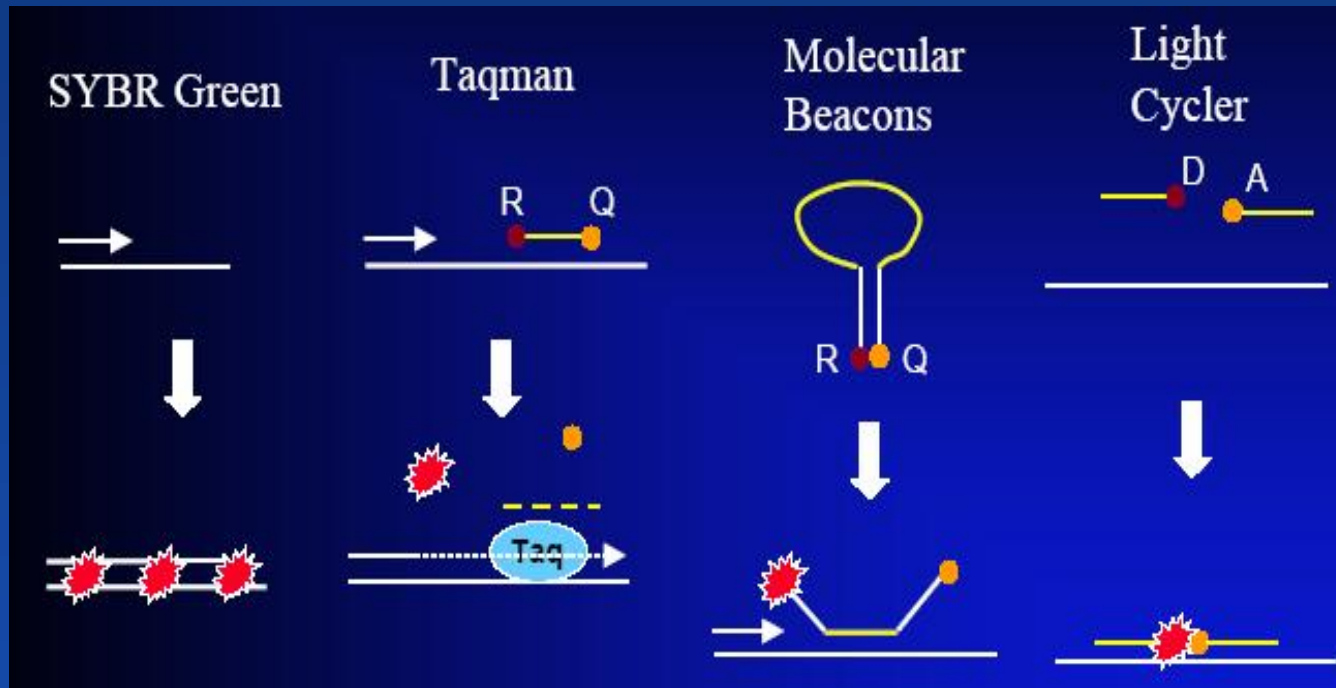


Semikvantitativní RT-PCR



qReal Time - PCR

Detekce množství produktu



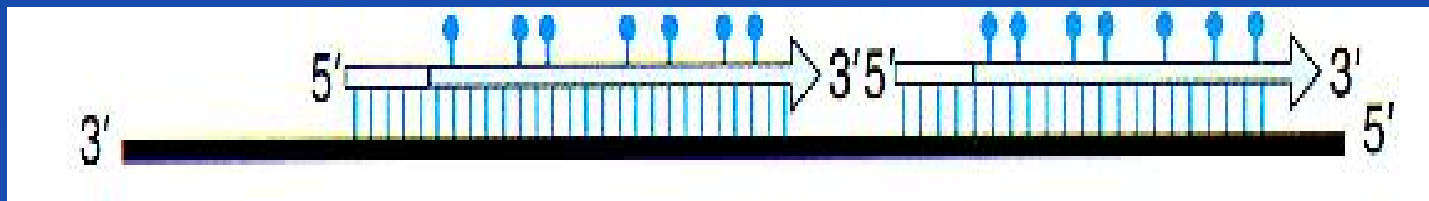
Princip hybridizace nukleových kyselin

značené sondy (proby): sonda = vlákno NK o známé sekvenci
využívané k detekci komplementárních NK

Typy značení – radioaktivní (nejčastěji ^{32}P)

- fluorescenční značení

- digoxigenin, biotin apod. –
následná detekce protilátkou

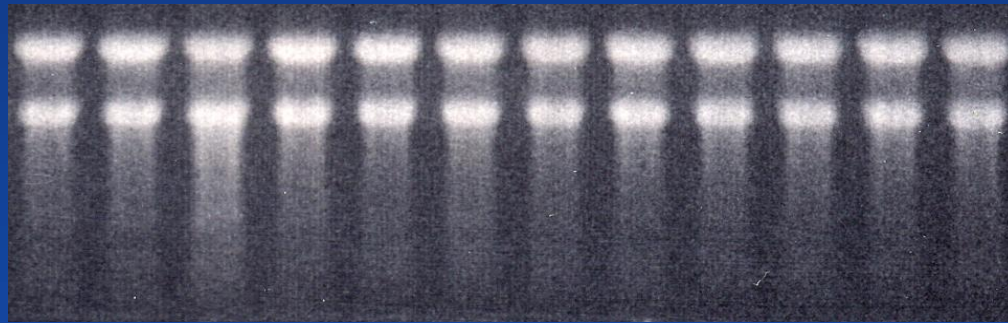


Hybridizace na Northern blotu

Izolace RNA



Rozdělení na elektroforéze



Přenos RNA z gelu na membránu - blotování

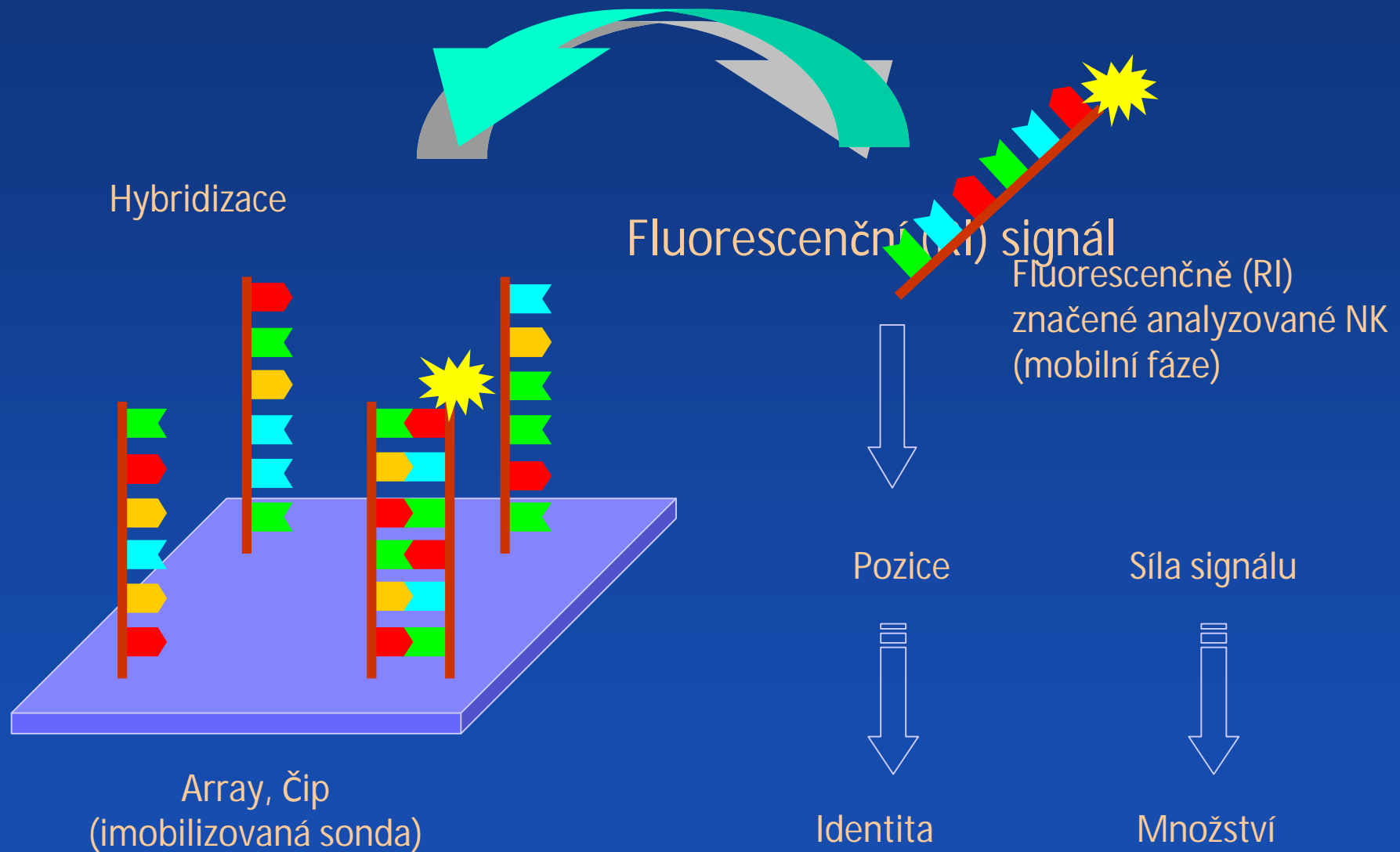


Hybridizace se značenou sondou, detekce

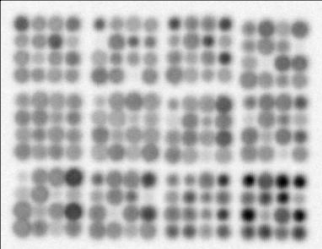
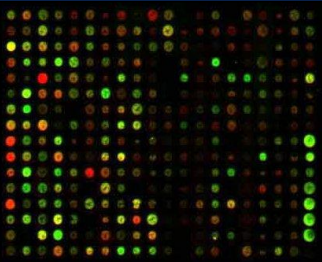
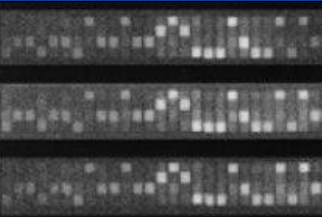


(Značení sondy (určité sekvence): např. PCR se značenými dNTP)

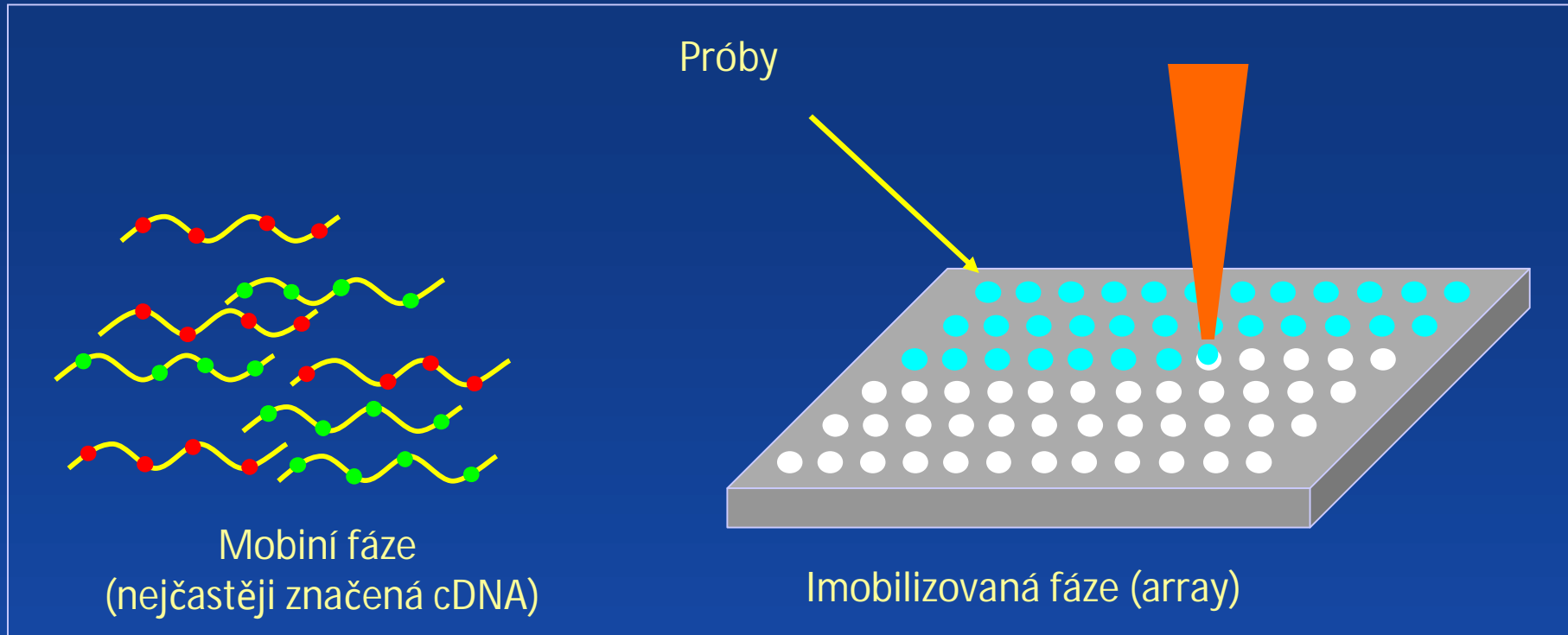
DNA arraye a DNA čipy - princip



Definice pojmů: array, čip

	Příprava	Podklad	Hustota [probes/cm ²]	
Macroarray (High Density Array)	Nanášení oligonucleotidů nebo PCR fragmentů	Membrána	max. 64	
Microarray	Nanášení oligonucleotidů nebo PCR fragmentů	např. sklo	až 10 ⁴	
Chip	Přímá syntéza na podkladu	např. sklo	až 2.5 × 10 ⁵	

Arraye

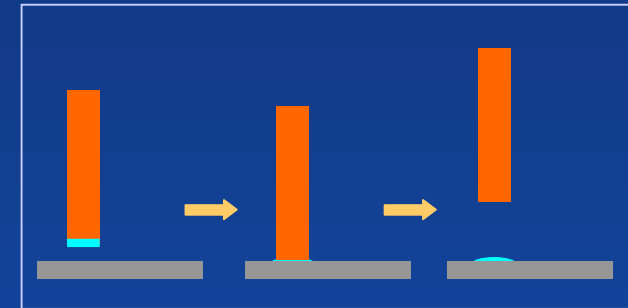


Automatizovaná příprava makroarrayí nanášením - contact printing



Flexys Workstation (Perkin Elmer)
96ti nebo 384 jehlový nástavec

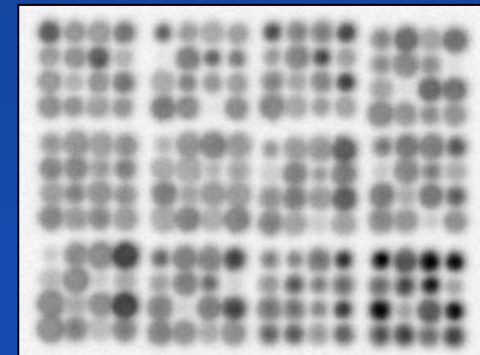
Hustota: až 64 prób na cm^2
na nylonových membránách, pevném
nosiči či agarových plotnách



MicroGrid II (Biorobotics)
384 jehlový nástavec

Hustota: až 64 prób na cm^2
na nylonových membránách či
pevném nosiči

4.5 mm
↔

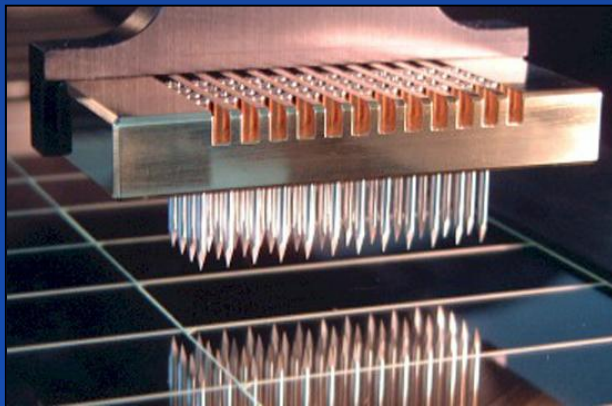
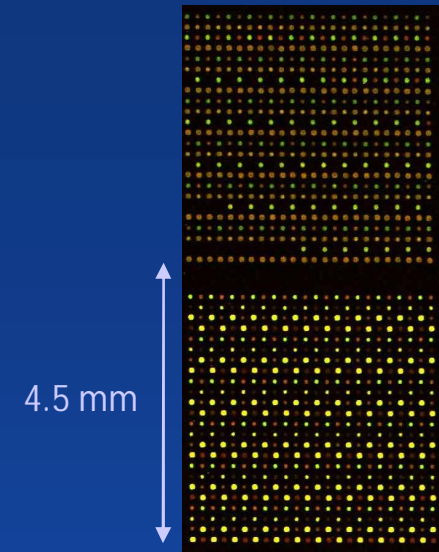


Hybridizace s použitím
radioaktivně (P^{33})
značeného vzorku

Příprava mikroarrayí nanášením - contact printing



MicroGrid II (Biorobotics)
1 až 64 jehlový nástavec (Telechem)
Hustota: až 6400 prób na cm^2
na až 108 sklíčkách
oligonukleotidy a DNA fragmenty až 12 kb
dlouhé



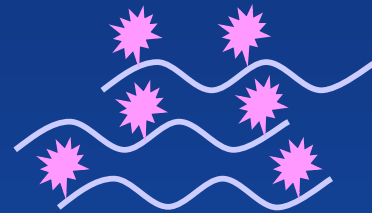
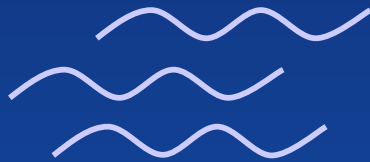
48 jehlový nástavec (Telechem)



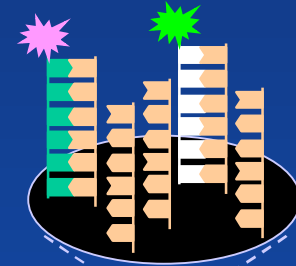
SMP3 nebo SMP2 jehly (Telechem), kapacita 0.25 μl , nanášení 600 pl,
průměr tečky 90 až 100 μm

Porovnávání genové exprese pomocí mikroarrayí

Situace I



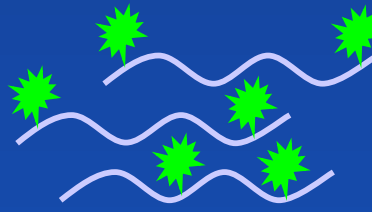
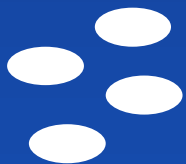
Hybridizace



Izolace RNA

Značení

Situace II



Alternativa: nezávislé hybridizace a porovnání arrayí

Problémy při použití arrayí

1. Nespecifické (cross-) hybridizace, pozadí
2. Intenzita signálu závislá i na sekvenci (účinnosti hybridizace) nejen na množství sondy
3. Reprodukovatelnost

Řešení:

- každá próba na více pozicích na čipu
- více prób od každého genu