

# Inżynieria genetyczna INGE3

Michał Mikula

Zakład Genetyki  
Centrum Onkologii-Instytut  
im. Marii Skłodowskiej-Curie

email: [mikula.michal@gmail.com](mailto:mikula.michal@gmail.com)

<http://www.ire.pw.edu.pl/~trubel/dydaktyka/inge/>

# Praca z kwasami nukleinowymi

## ► Wymagania laboratoryjne

### ► Pomieszczenia i sprzęt laboratoryjny



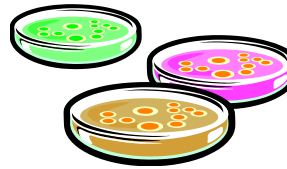
# Praca z kwasami nukleinowymi

## ► Wymagania laboratoryjne

► Pomieszczenia i sprzęt laboratoryjny



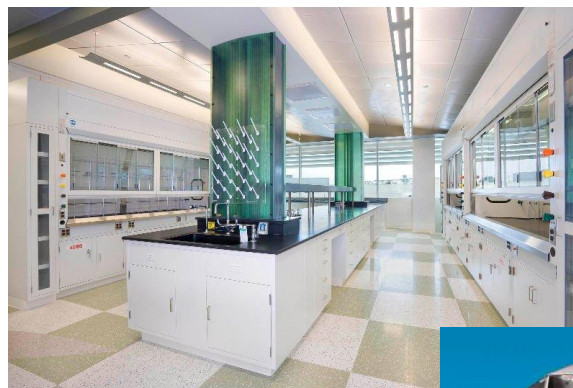
► Hodowla bakterii i linii komórkowych



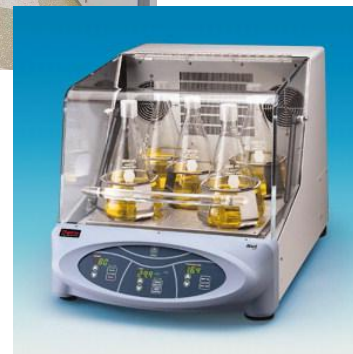
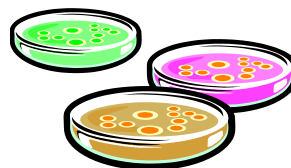
# Praca z kwasami nukleinowymi

## ► Wymagania laboratoryjne

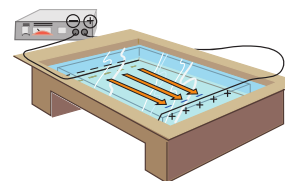
► Pomieszczenia i sprzęt laboratoryjny



► Hodowla bakterii i linii komórkowych



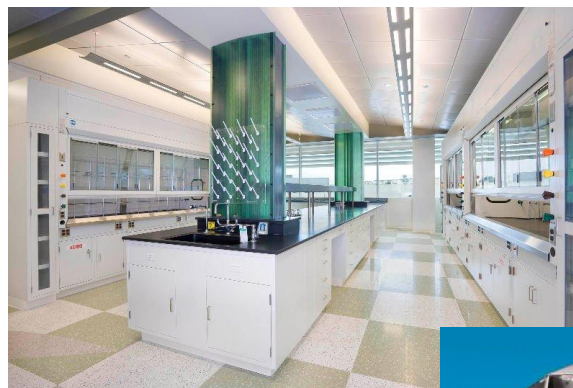
► Procesowanie i analiza kwasów nukleinowych



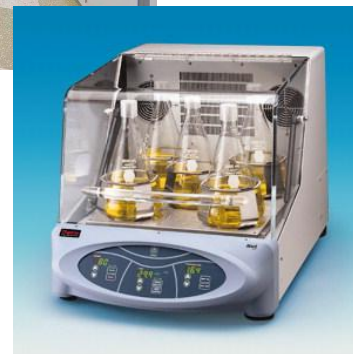
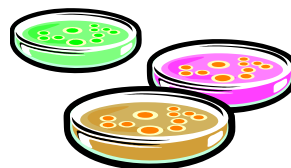
# Praca z kwasami nukleinowymi

## ► Wymagania laboratoryjne

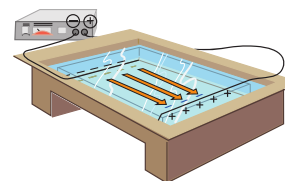
► Pomieszczenia i sprzęt laboratoryjny



► Hodowla bakterii i linii komórkowych



► Procesowanie i analiza kwasów nukleinowych

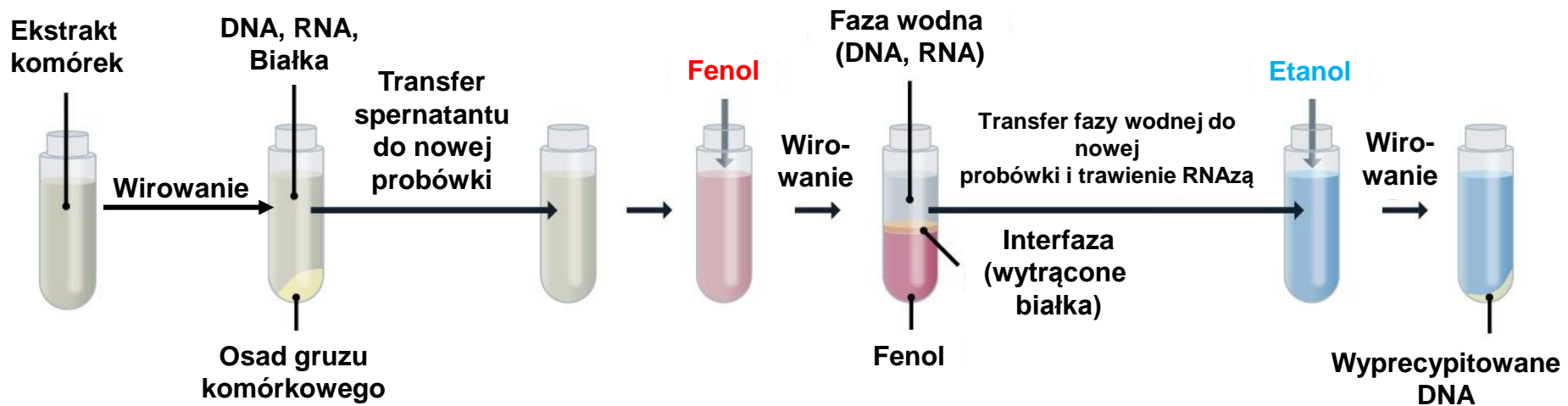


► Pracownicy



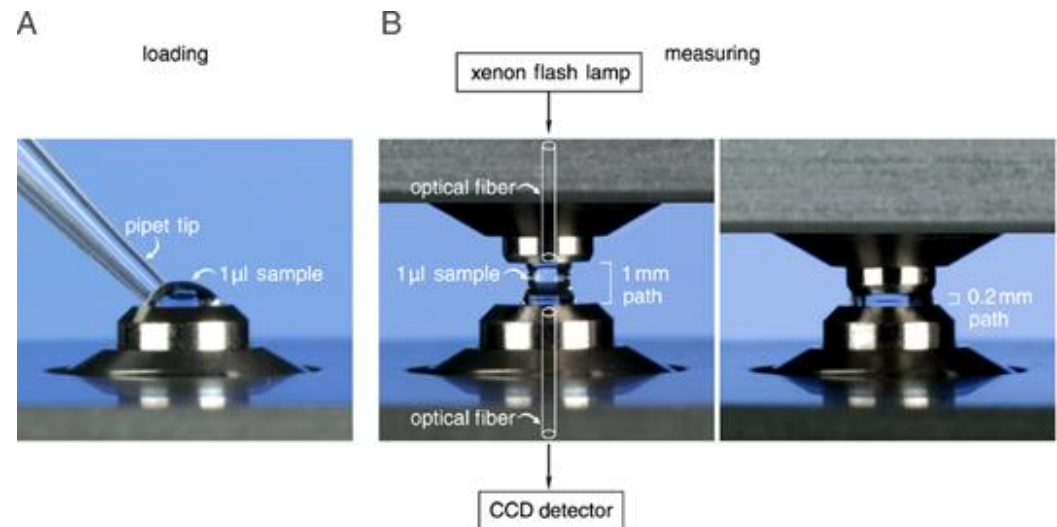
# Izolacja kwasów nukleinowych

- ▶ Każda manipulacja genami wymaga źródła kwasów nukleinowych
  1. Homogenizacja komórek w celu uwolnienia kwasów nukleinowych
  2. Odseparowanie kwasów nukleinowych od innych komponentów komórkowych (białek)
  3. Odzyskanie kwasów nukleinowych w czystej postaci
- ▶ Stosowane techniki mogą być wieloetapowe
- ▶ Coraz częściej stosuje się gotowe zestawy (kity)



# Pomiar ilości i czystości kwasów nukleinowych

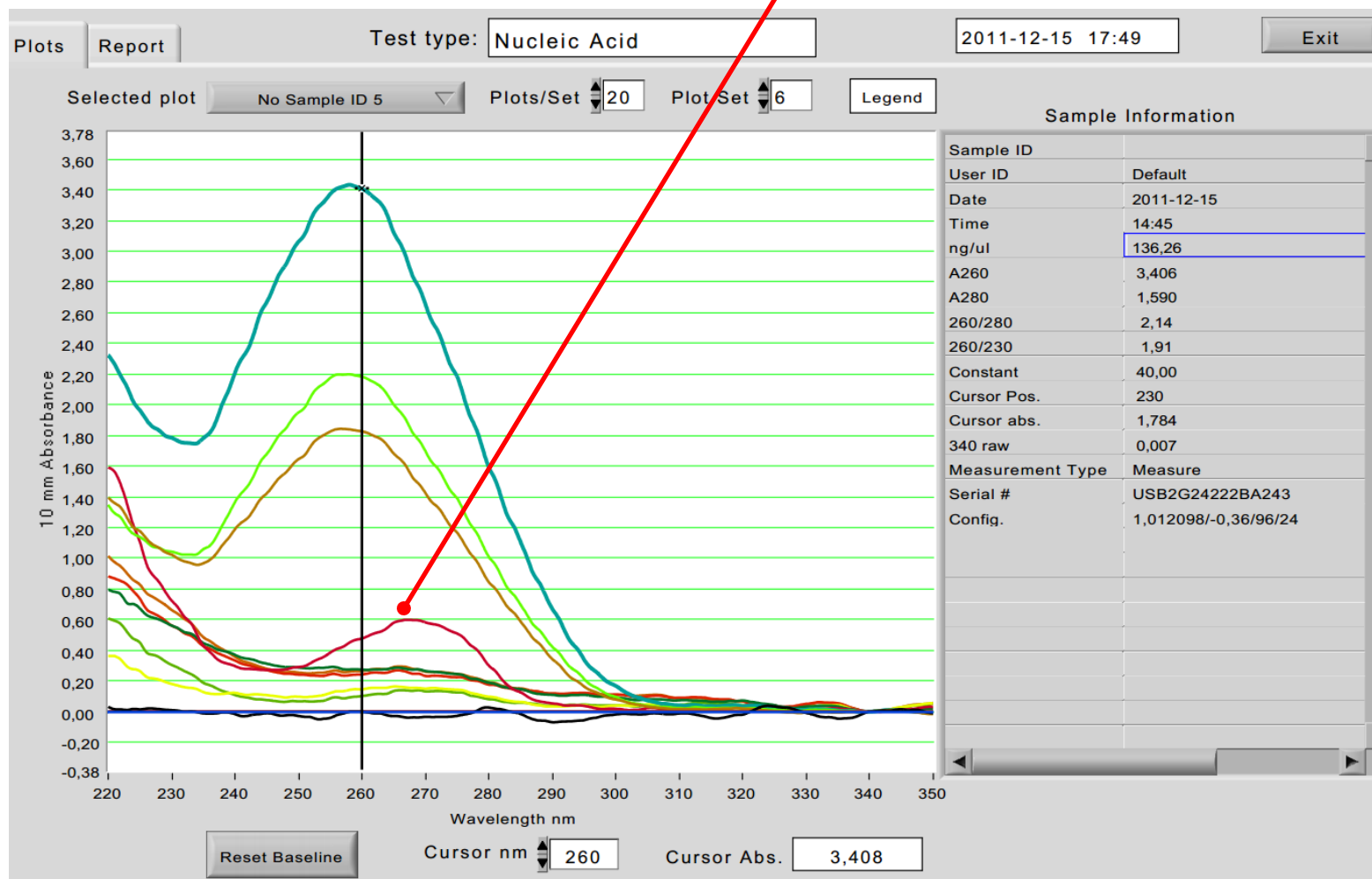
- ▶ W trakcie eksperymentu klonowania DNA często posługujemy się ilością DNA w skali mikro-, nano- i pikogramów
- ▶ Stężenie kwasów nukleinowych może być zmierzone z użyciem spektrofotometru – kwasy nukleinowe absorbują światło UV długości 260nm, detektor mierzy natężenie światła wiązki przechodzącej
- ▶ Metody spektrofotometryczne w oparciu o barwniki wiążące DNA – bromek etydy, sybr green





# Pomiar ilości i czystości kwasów nukleinowych


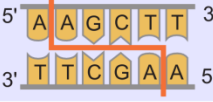


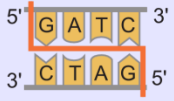





- Zdarza się, że próbki kwasów nukleinowych są skontaminowane innymi molekułami – białka, związki organiczne (**fenol**)





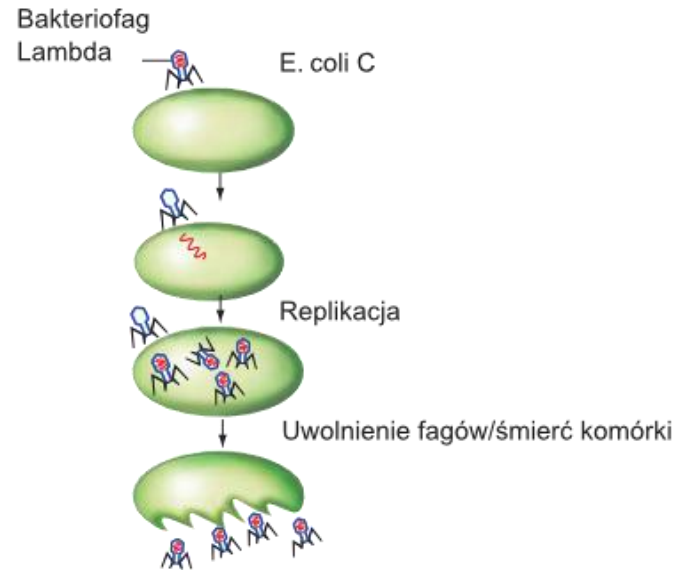
# Analiza informacji genetycznej – enzymy restrykcyjne

- ▶ Enzym restrykcyjny rozpoznaje specyficzną sekwencję DNA
  - Przecina wiązanie fosfodiesterowe (cukier+fosfor) obu nici
  - Rozpoznawana sekwencja ma długość 4 – 8 par zasad (**pz**)
  - Może posiadać strukturę palindromu – identycznych sekwencji gdy czytane od 5'-do-3'
  - Powstają tzw. **fragmenty restrykcyjne** – charakterystyczny wzór cięcia DNA danym enzymem

Enzym	Rozpoznawana sekwencja	Organizm	Enzym	Rozpoznawana sekwencja	Organizm
TaqI		<i>Thermus aquaticus</i> YTI	HindIII		<i>Haemophilus influenzae</i>
RsaI		<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	KpnI		<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8
Sau3AI		<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	ClaI		<i>Caryophanon latum</i>
EcoRI		<i>Escherichia coli</i>	BssHII		<i>Bacillus stearothermophilus</i>
BamHI		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.	NotI		<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>

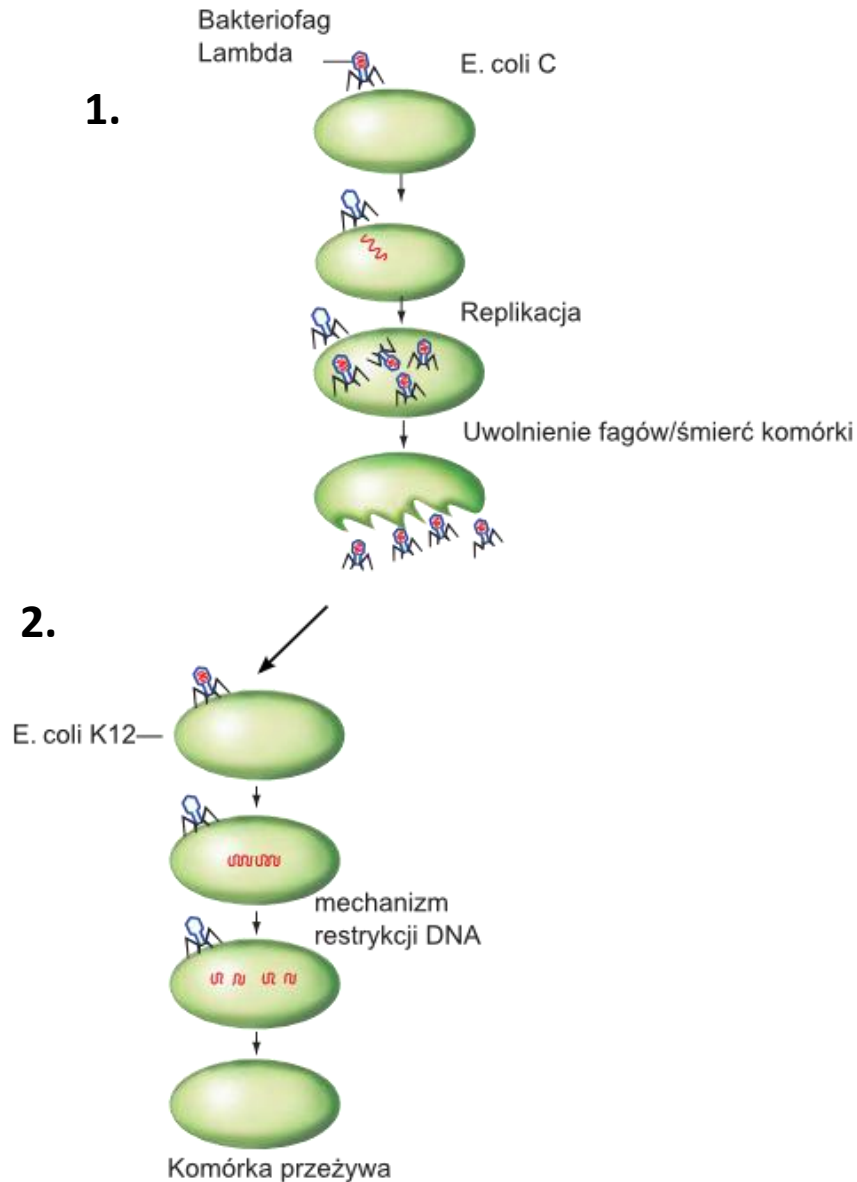
## ►Odkrycie **enzymów restrykcyjnych**

1.



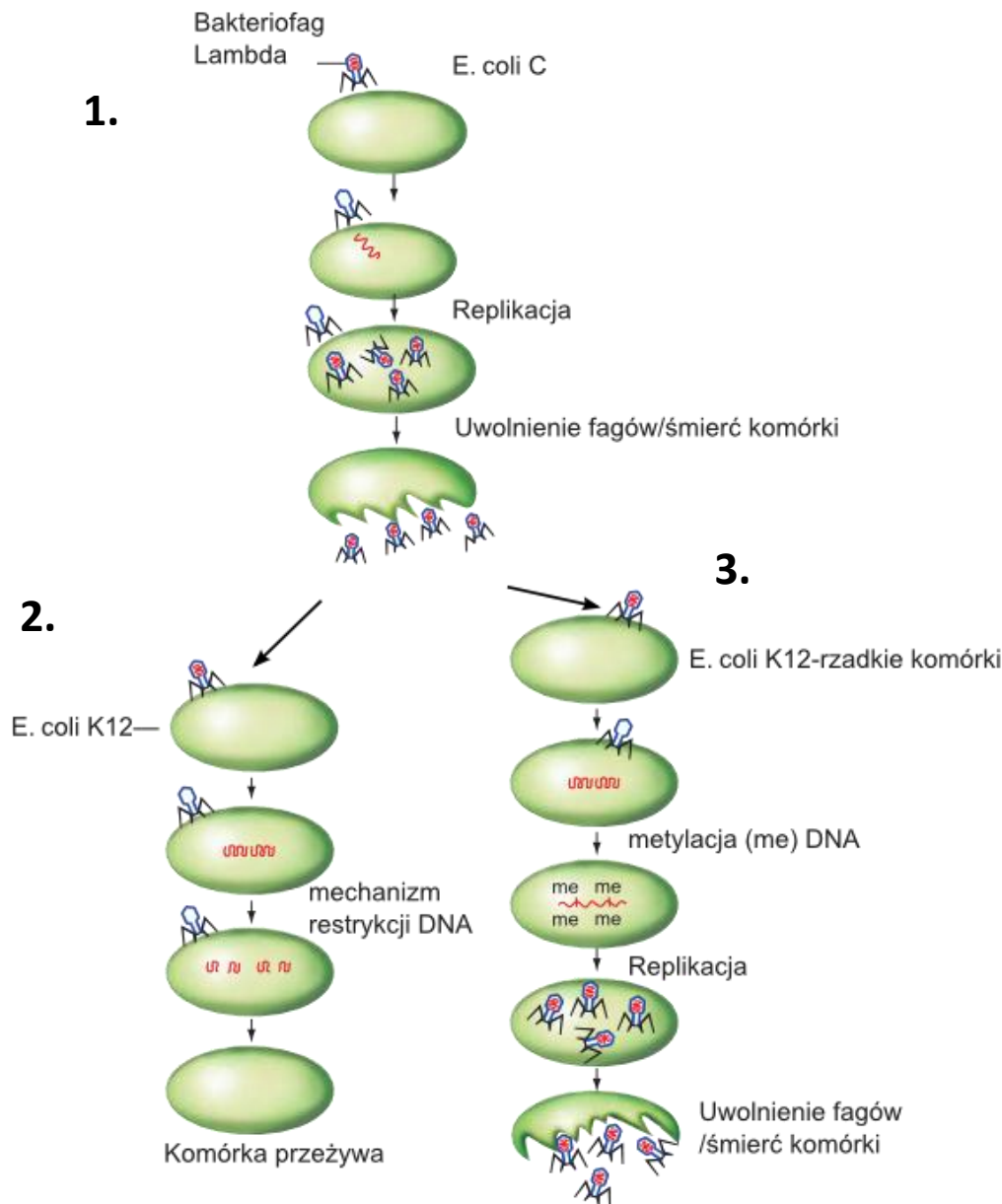
# Analiza informacji genetycznej – enzymy restrykcyjne

## ►Odkrycie **enzymów restrykcyjnych**



# Analiza informacji genetycznej – enzymy restrykcyjne

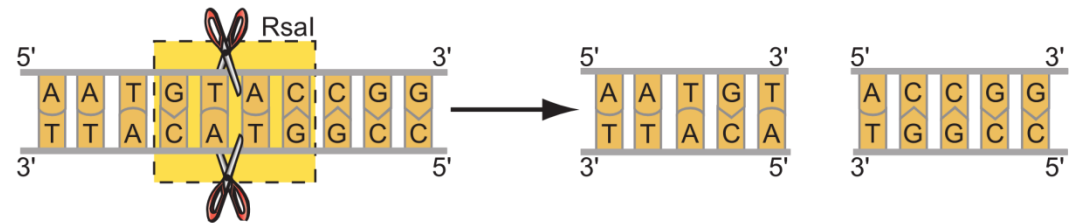
## ►Odkrycie **enzymów restrykcyjnych**



# Analiza informacji genetycznej – enzymy restrykcyjne

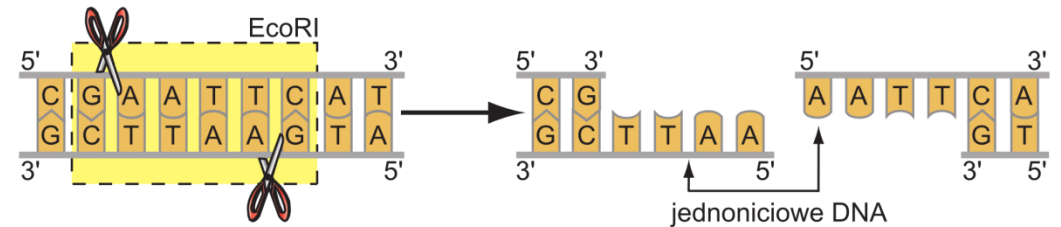
► **Tępe końce** – cięcie przez dwie nici DNA na osi symetrii

(a) *Tępe końce (RsaI)*

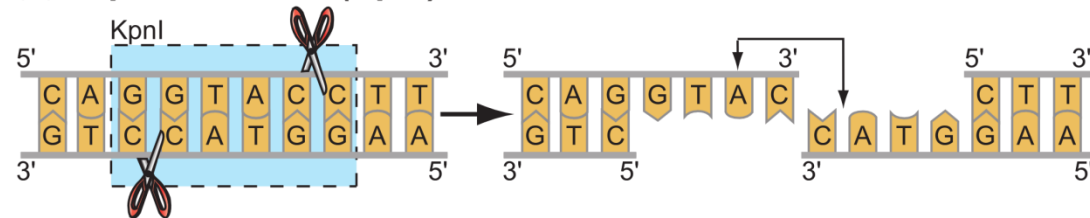


► **Lepkie końce** – cięcia są przesunięte równomiernie względem osi symetrii

(b) *Lepkie 5' końce (EcoRI)*



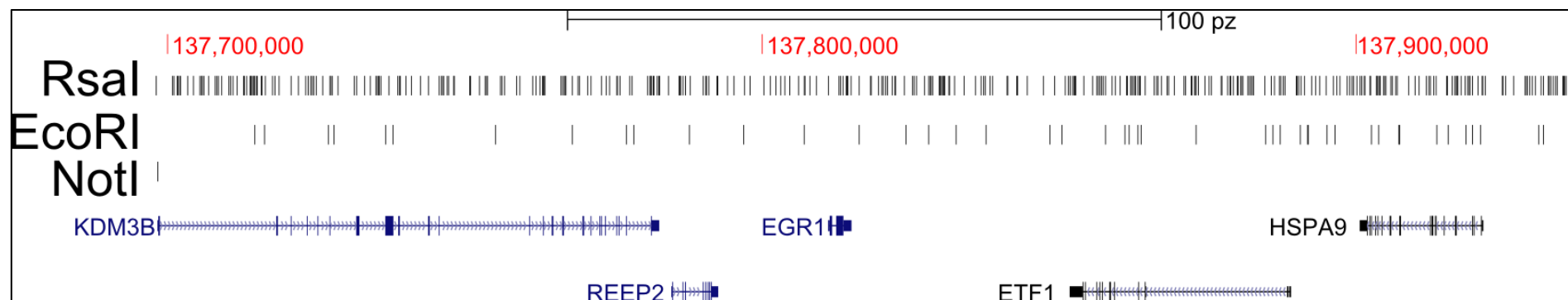
(c) *Lepkie 3' końce (KpnI)*



► Komplementarność sekwencji lepkich końców fragmentów pochodzących z tej samej lub różnych cząstek DNA powoduje, że mogą one samoistnie łączyć się ze sobą poprzez wiązania wodorowe

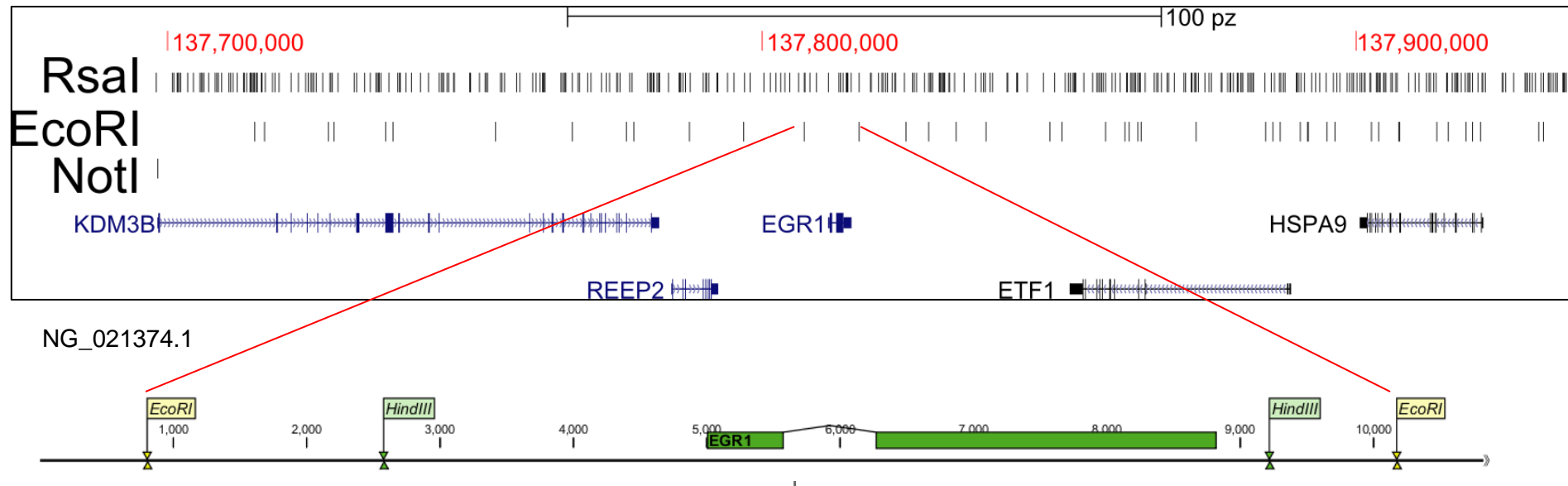
# Analiza informacji genetycznej – enzymy restrykcyjne

- ▶ **Enzymy generują fragmenty DNA o różnej długości**
- ▶ Średnia długość fragmentu wynosi  $4^n$ , gdzie  $n$  jest liczbą par zasad rozpoznawaną przez enzym
  - 4-zasadowy wzór występuje co  $4^4$ , średnia długość fragmentu 256 pz genom ludzki ( $3 \times 10^9$  pz / 256) będzie pocięty na  $1.2 \times 10^7$  fragmentów
  - 6-zasadowy wzór występuje co  $4^6$ , średnia długość fragmentu 4100 pz genom ludzki ( $3 \times 10^9$  pz / 4100) będzie pocięty na  $7 \times 10^5$  fragmentów
  - 8-zasadowy wzór występuje co  $4^8$ , średnia długość fragmentu 65 500 pz genom ludzki ( $3 \times 10^9$  pz / 65 500) będzie pocięty na  $4.6 \times 10^4$  fragmentów



- ▶ Miejsca restrykcyjne w obrębie odcinka ludzkiego **chromosomu 5** długości  $2.4 \times 10^5$  pz (chr5:137,687,234-137,927,103)

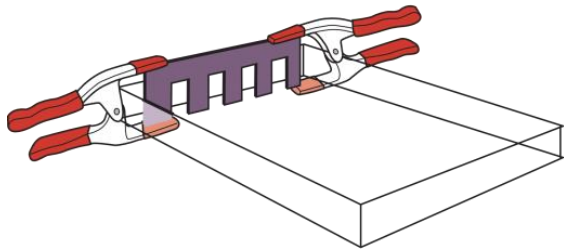
# Analiza informacji genetycznej – enzymy restrykcyjne



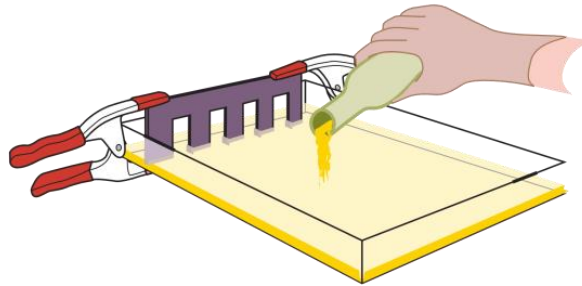


# Analiza informacji genetycznej – elektroforeza

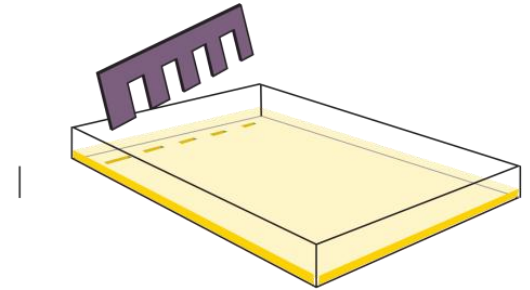
► **Elektroforeza w żelu** jest techniką umożliwiającą rozdzielenie obdarzonych ładunkiem cząsteczek (m.in. DNA) o różnej wielkości przez wymuszenie ich migracji w polu elektrycznym.



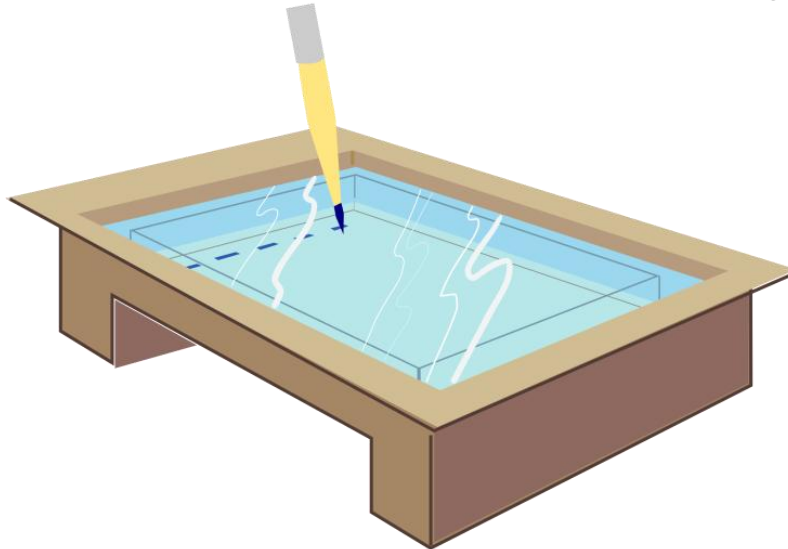
1. Ustabilizować grzebień w kuwecie



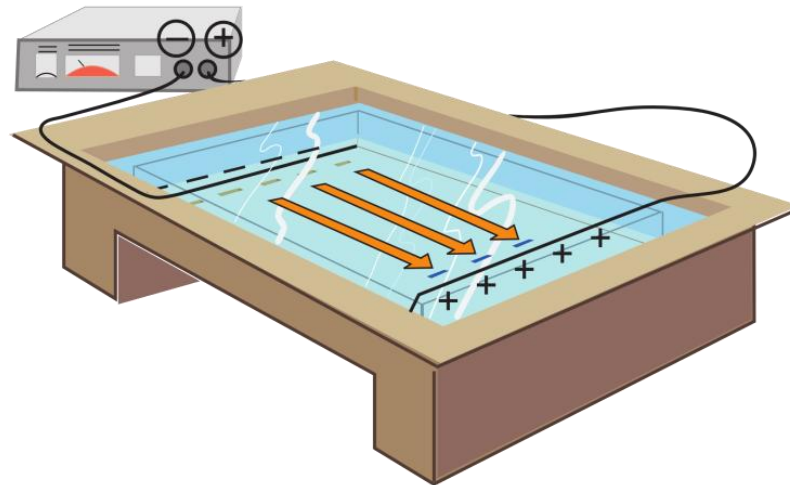
2. Wlać rozpuszczony roztwór agarozy. Czekać aż stężeje



3. Usunąć grzebień, usunąć żel z kuwety



4. Zanurzyć żel w buforze, nałożyć próbkę



5. Przyłożenie napięcia - DNA jest naładowane ujemnie migruje w kierunku "+"

# Analiza informacji genetycznej – elektroforeza

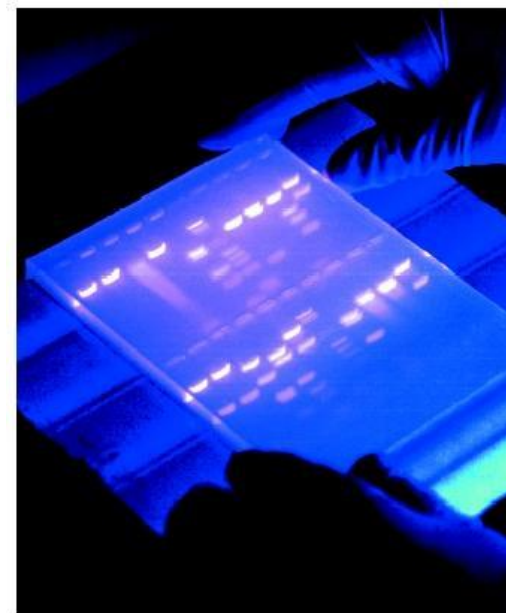
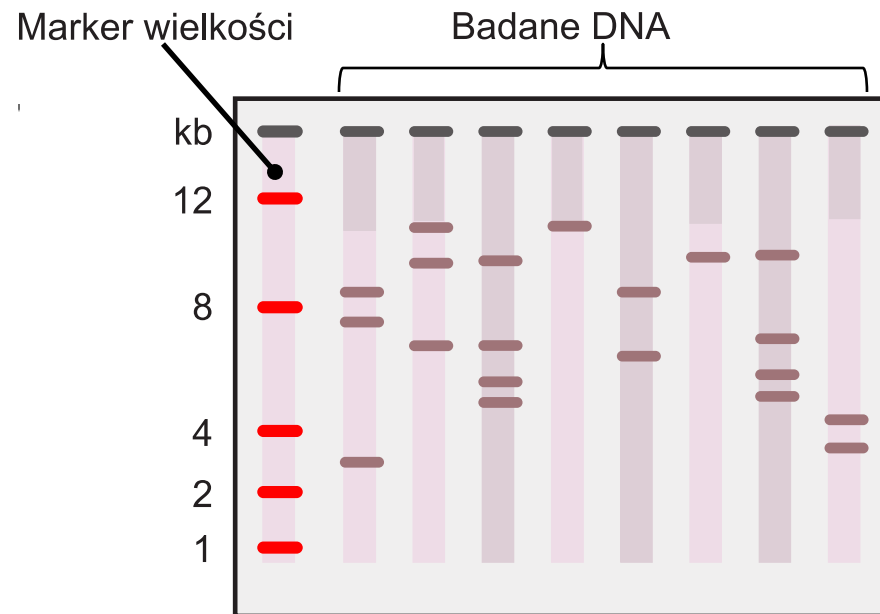
► Szybkość migracji cząsteczek jest zależna od ich wielkości: krótkie cząsteczki swobodniej przemieszczają się w żelu dzięki czemu wędrują szybciej niż cząsteczki dłuższe

► Po elektroforezie obraz fragmentów DNA archiwizuje się wybarwiając żel znacznikami fluorescencyjnymi (bromek etydyny) i wykonując zdjęcie w świetle UV

► Do rozdziału cząstek DNA najczęściej stosuje się dwa rodzaje żeli:

► **agarozowe** – do rozdziału długich fragmentów (niska rozdzielczość)

► **poliakrylamidowe** – do rozdziału krótkich fragmentów (wysoka rozdzielczość)



# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

► Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR – Polymerase Chain Reaction) jest techniką powielania wybranego obszaru cząsteczki DNA przy użyciu termostabilnej polimerazy DNA

► Wynaleziona w 1983 przez Kary'ego Mullis'a, Nagroda Nobla 1993

Podstawowe składniki potrzebne do reakcji PCR:

- Nukleotydy
- Matryca DNA/cDNA
- Startery/Primery/Oligonukleotydy: jednoniciowe krótkie DNA

komplementarne do rejonów matrycy w obszarze podlegającym amplifikacji

- Polimeraza DNA

Reakcja prowadzona jest w urządzeniu **termocykler**



# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

► Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR – Polymerase Chain Reaction) jest techniką powielania wybranego obszaru cząsteczki DNA przy użyciu termostabilnej polimerazy DNA

► Wynaleziona w 1983 przez Kary'ego Mullis'a, Nagroda Nobla 1993

Podstawowe składniki potrzebne do reakcji PCR:

- Nukleotydy
- Matryca DNA/cDNA
- Startery/Primery/Oligonukleotydy: jednoniciowe krótkie DNA

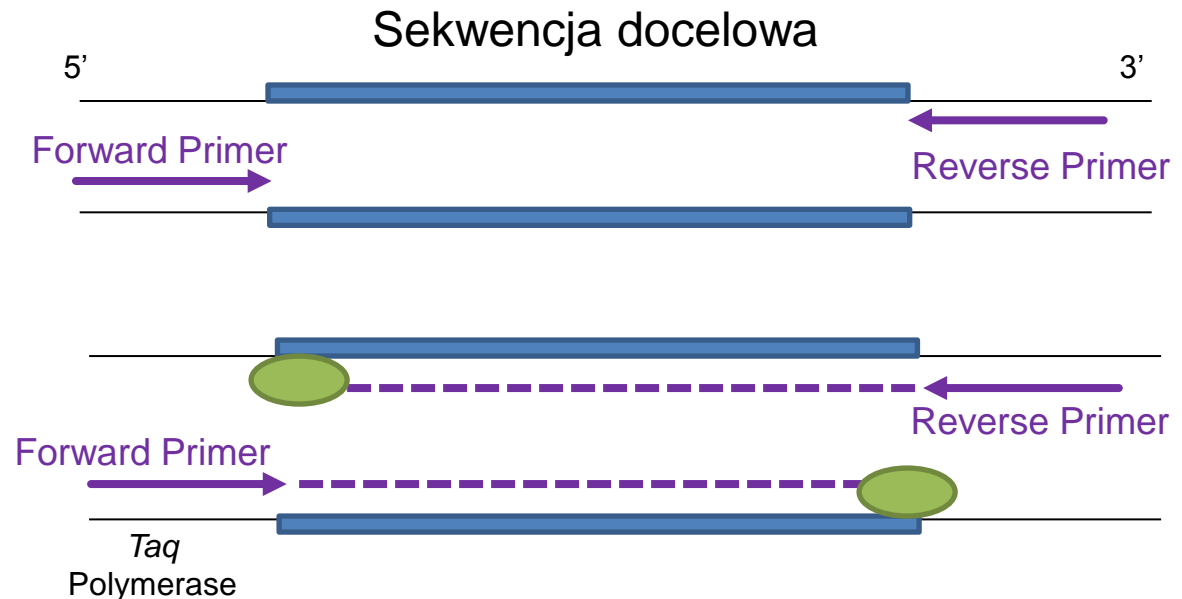
komplementarne do rejonów matrycy w obszarze podlegającym amplifikacji

- Polimeraza DNA

Reakcja prowadzona jest w urządzeniu **termocykler**

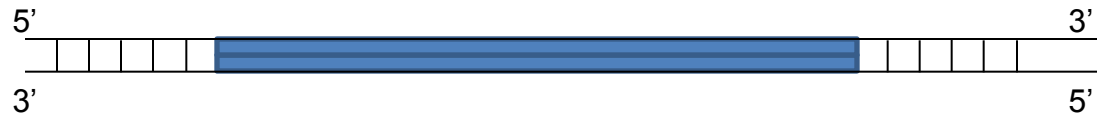
W reakcji PCR używane są syntetyczne oligonukleotydy flankujące pożądaną sekwencję

Synteza DNA jest katalizowana *in vitro* przez termostabilną polimerazę DNA



# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

## ► Cyklowanie PCR



# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

## ► Cyklowanie PCR

Denaturacja DNA  
(94°C)



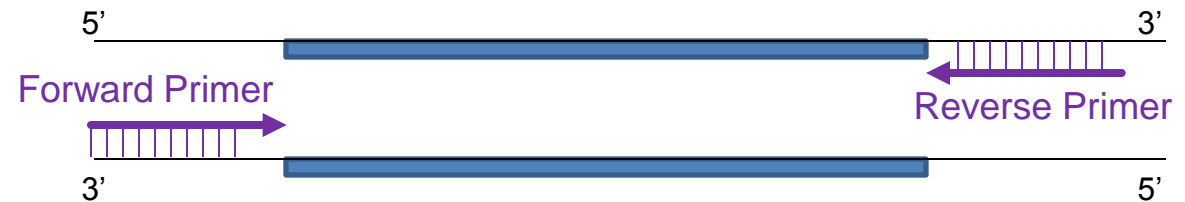
# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

## ► Cyklowanie PCR

Denaturacja DNA  
(94°C)



Dołączenie starterów  
(~50 = 65°C)





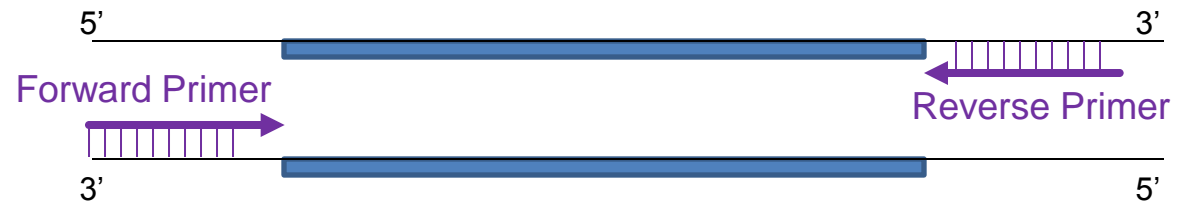
# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

## ► Cyklowanie PCR

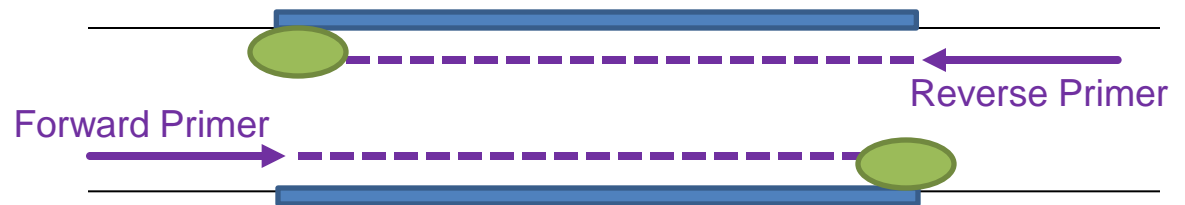
Denaturacja DNA  
(94°C)



Dołączenie starterów  
(~50 = 65°C)

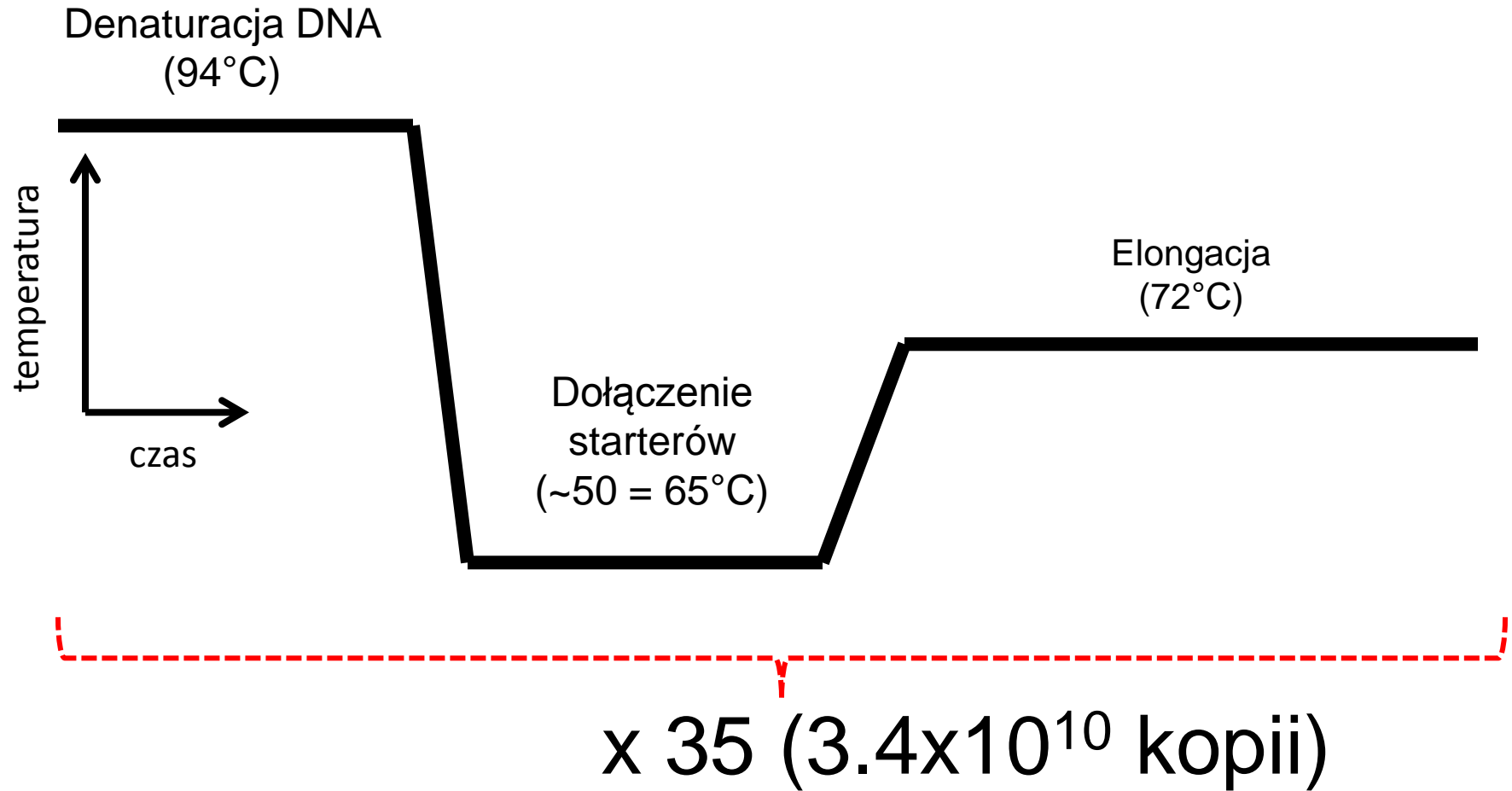


Elongacja  
(72°C)



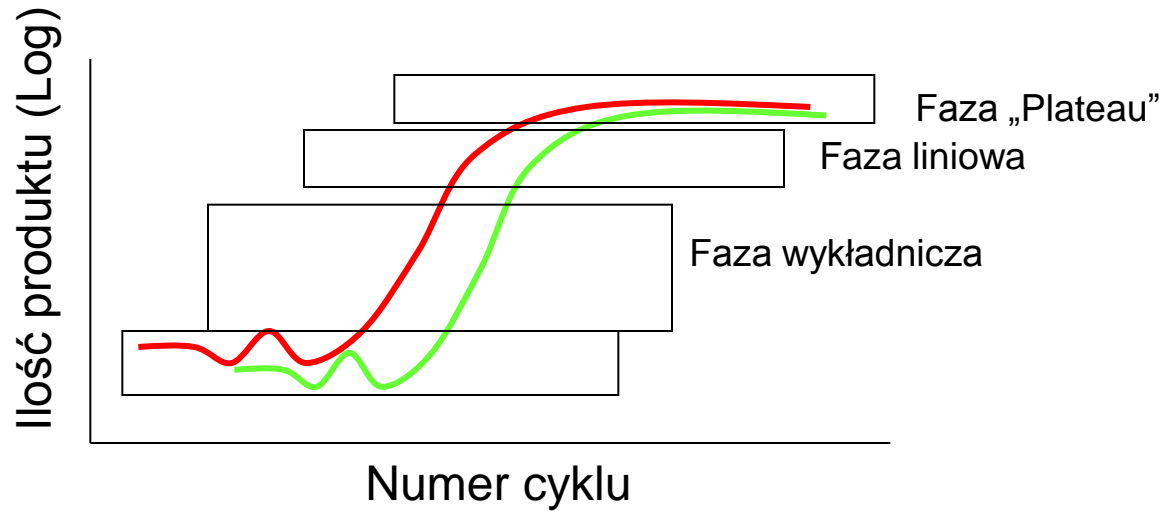
# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

- Cyklowanie PCR - możliwe uzyskanie miliardów kopii fragmentu DNA z pojedynczej cząsteczki w krótkim czasie; liczba kopii ( $y=2^n$ )



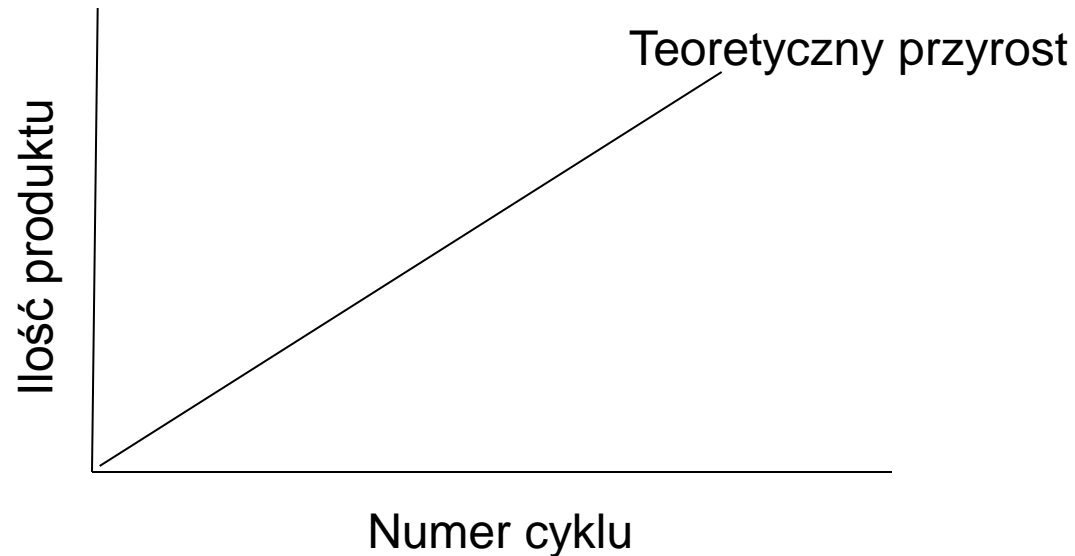
# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

## ► Etapy reakcji PCR



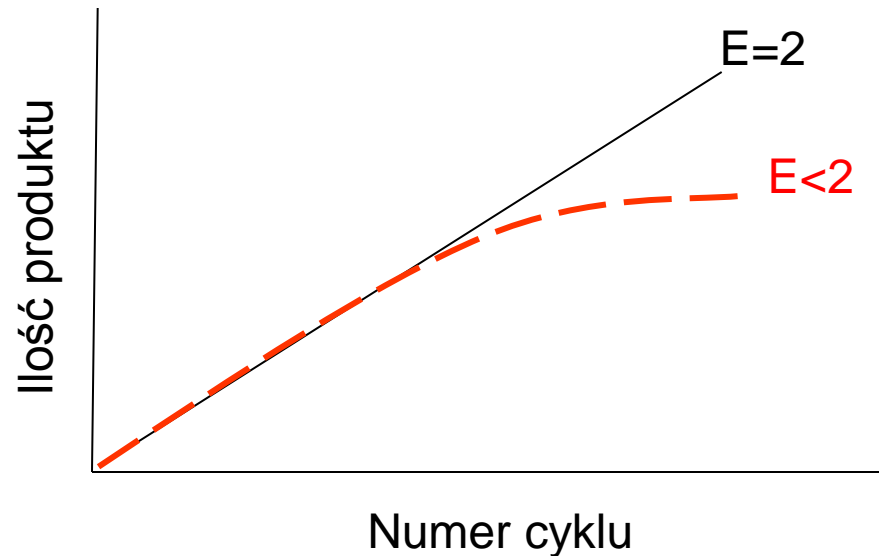
# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

- ▶ W teorii sekwencja docelowa jest podwajana w każdym cyklu PCR
- ▶ Podwojenie liczby kopii w każdym cyklu oznacza 100% wydajność reakcji PCR czyli wydajność „efficiency”  $(E) = 2$



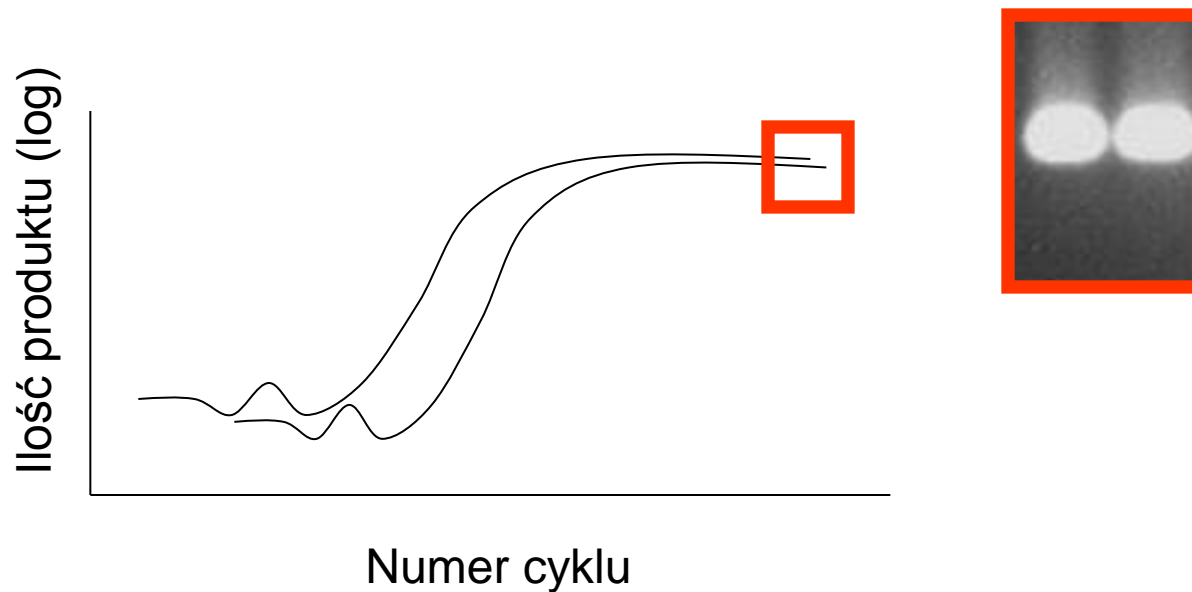
# Analiza informacji genetycznej – reakcja łańcuchowa polimerazy

- ▶ W teorii sekwencja docelowa jest podwajana w każdym cyklu PCR
- ▶ Podwojenie liczby kopii w każdym cyklu oznacza 100% wydajność reakcji PCR czyli wydajność „efficiency” ( $E$ ) = 2
- ▶ W praktyce wydajność ( $E$ ) zależy od wielu czynników i spada wraz z liczbą cykli



# Analiza informacji genetycznej – odmiany PCR

- ▶ PCR tradycyjny (konwencjonalny - cPCR) zakłada użycie pary starterów, a produkt jest wizualizowany na żelu agarozowym z bromkiem etydyny (EtBr) – odczyt endpoint



# Analiza informacji genetycznej – odmiany PCR

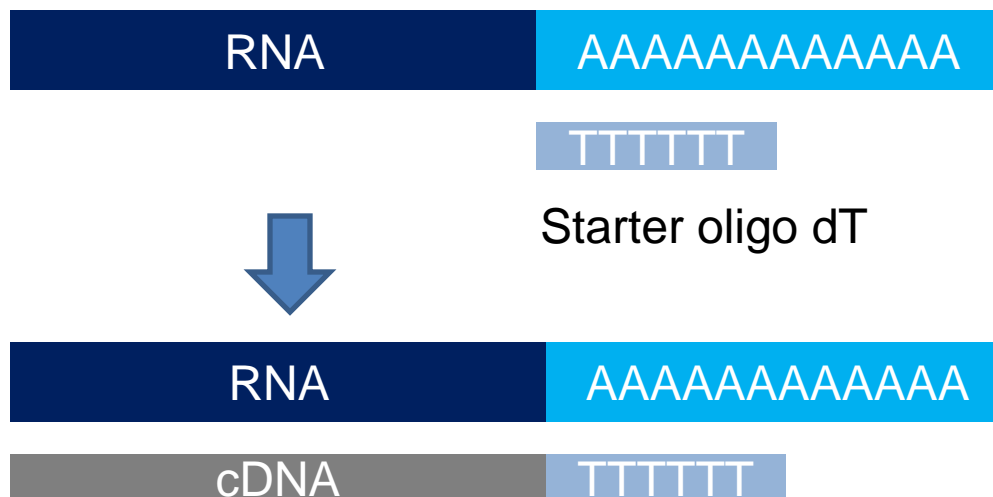
- ▶ Reakcja odwrotnej transkrypcji (reverse-transcriptase - RT) jest stosowana gdy amplifikacji/pomiarowi podlega RNA/mRNA “RT-PCR”

Reakcja RT może być zainicjowana z użyciem:

- ✓ Startera specyficznego do RNA
- ✓ Startera oligo dT
- ✓ Starterów „random” (mieszanina 6 nukleotydowych starterów z losową sekwencją)

Wszystkie cząsteczki mRNA posiadają ogon poli A

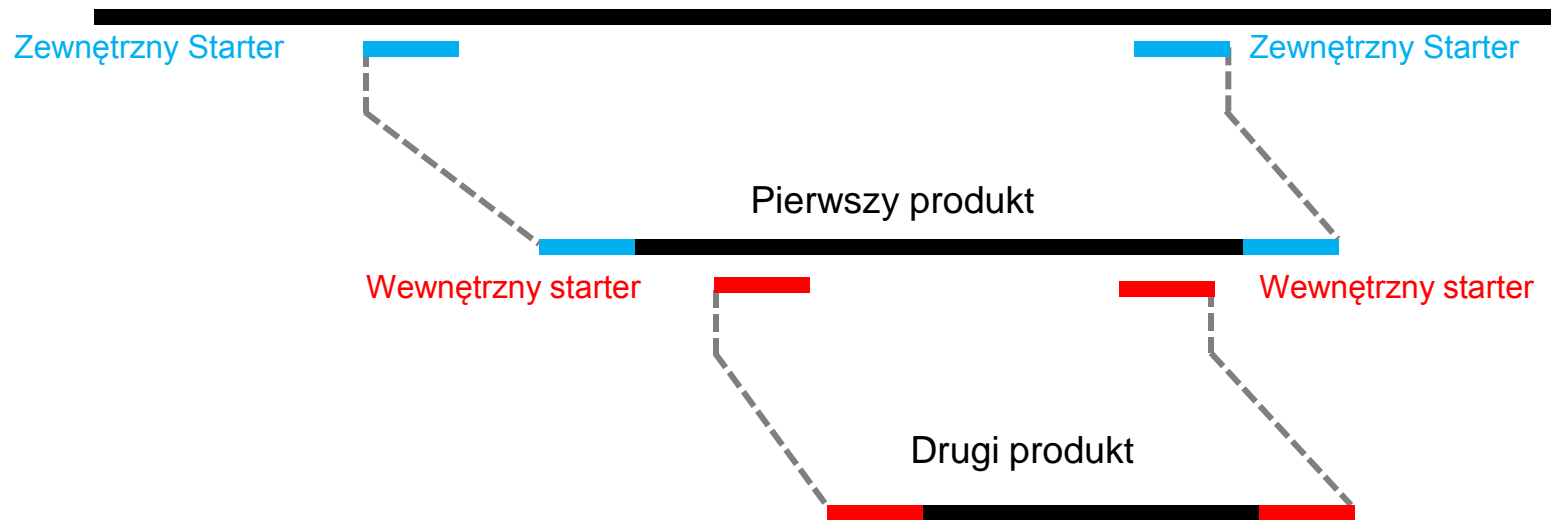
RNA jest przepisywane  
na komplementarne DNA  
(cDNA) przez enzym  
**odwrotna transkryptaza**





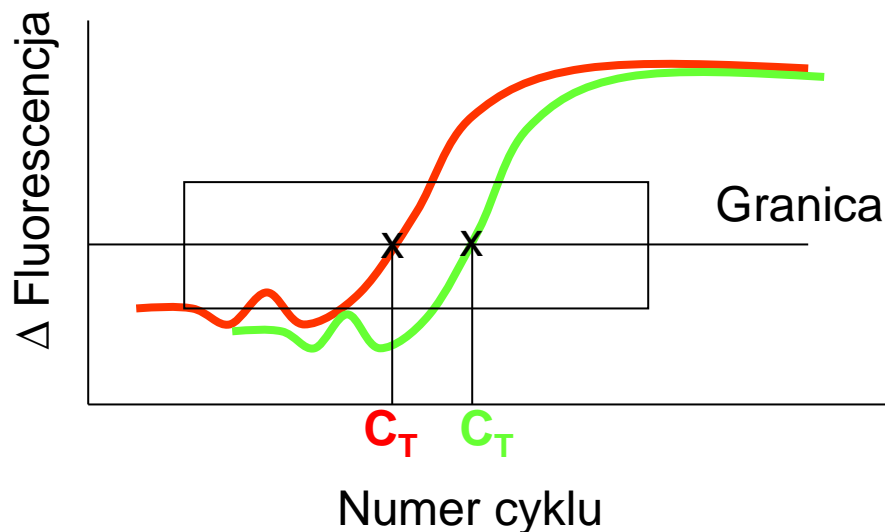
# Analiza informacji genetycznej – odmiany PCR

- ▶ Nested PCR („nPCR”) obejmuje dwie rundy PCR z użyciem starterów „zewnętrznych” i „wewnętrznych” do zwiększenia czułości i specyficzności identyfikacji



# Analiza informacji genetycznej – odmiany PCR

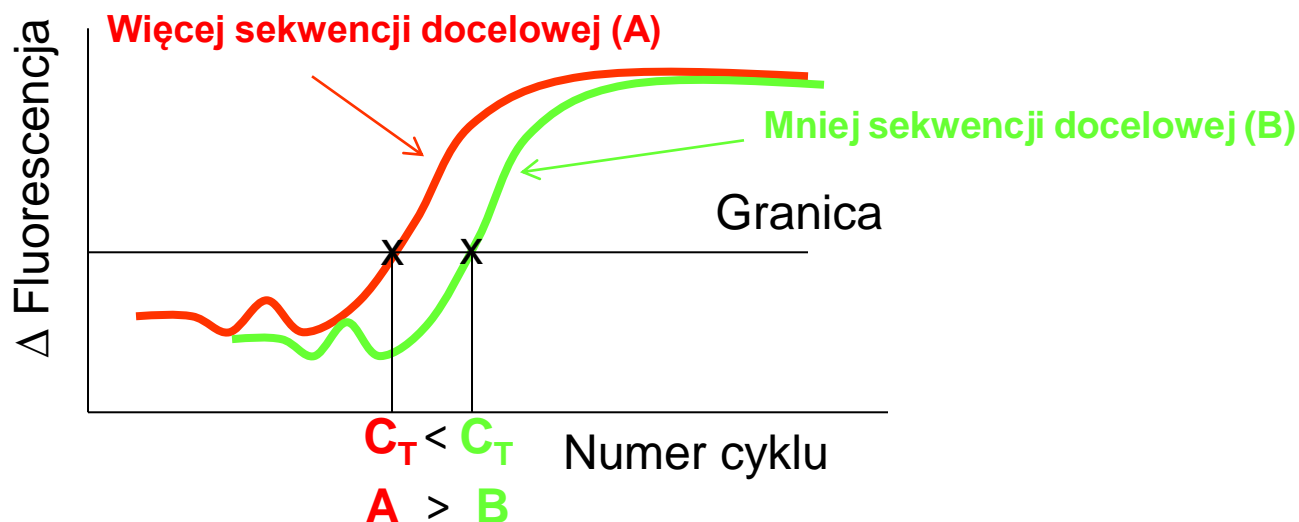
- ▶ Real-time PCR mierzy sygnał fluorescencji, który wzrasta z liczbą kopii produktu; poziom fluorescencji ( $\Delta$ ) jest monitorowany po każdym cyklu „w czasie rzeczywistym” - ‘real-time’



$C_T$  = Numer cyklu, w którym wykres amplifikacji przecina obraną granicę

# Analiza informacji genetycznej – odmiany PCR

- ▶ Real-time PCR mierzy sygnał fluorescencji, który wzrasta z liczbą kopii produktu; poziom fluorescencji ( $\Delta$ ) jest monitorowany po każdym cyklu „w czasie rzeczywistym” - ‘real-time’
- ▶ Nazywany również Quantitative PCR (qPCR) – ilościowy PCR – opiera się na założeniu proporcjonalności początkowej ilości badanej sekwencji docelowej do ilości produktu powstałego w fazie wykładniczej PCR



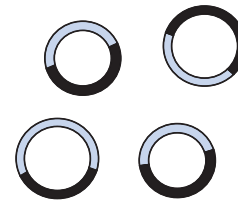
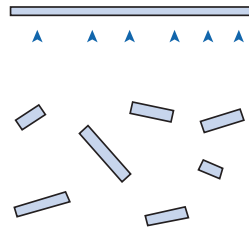
- ▶ Używany do pomiaru zmiany ekspresji genów, identyfikacji patogenów

- ▶ Pomiar ekspresji genów
- ▶ Identyfikacji patogenów bakteryjnych lub wirusowych
- ▶ Tworzenie sond molekularnych
- ▶ Diagnostyka mutacji/polimorfizmów
- ▶ Detekcja i identyfikacja DNA w materiale biologicznym z miejsca zbrodni
- ▶ **Amplifikacja genów do klonowania**
- ▶ **Identyfikacja klonów**

# Analiza informacji genetycznej – klonowanie fragmentów DNA

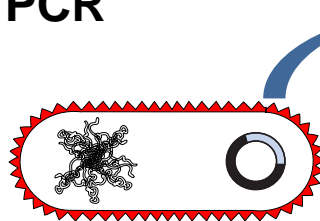
► Genomy zwierząt, roślin i mikroorganizmów są zbyt duże by analizować je wyłącznie technikami cięcia restrykcyjnego i elektroforezy

► Metodą umożliwiającą badanie pojedynczych elementów genomu (genów, rejonów regulatorowych) jest **klonowanie molekularne** – separowanie specyficznych fragmentów DNA, przenoszenie do DNA wektorowego i tworzenie ich kopii (klonów)



1. Fragmentowanie DNA przy użyciu
  - Enzymów restrykcyjnych
2. **Amplifikacja PCR**

3. Włączenie do wektora (plazmidu)



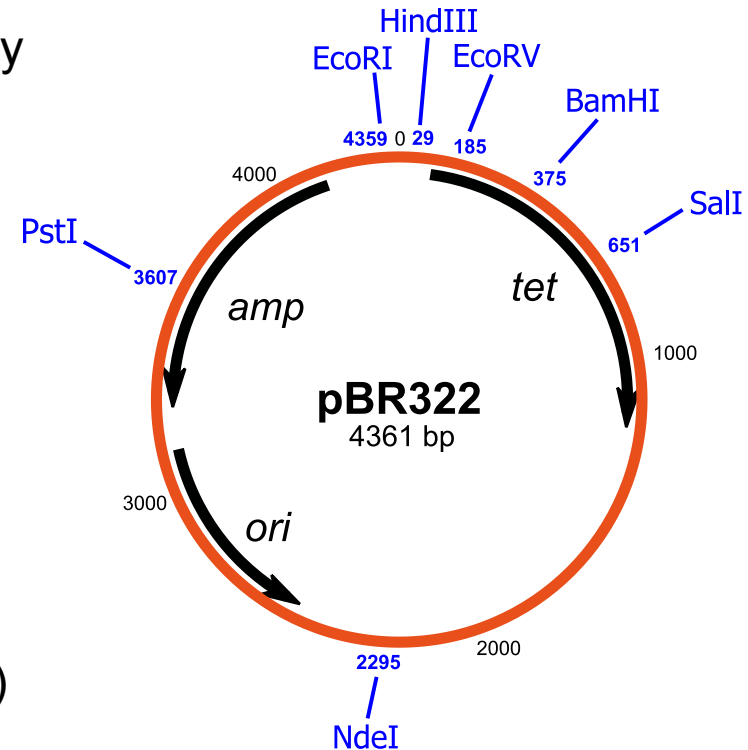
4. Wprowadzenie do komórki gospodarza (bakteria)

5. Hodowla klonów

► Sklonowany fragment może być analizowany metodą z użyciem enzymów restrykcyjnych oraz **sekwencjonowania DNA**

# Klonowanie fragmentów DNA – dobór wektorów do klonowania

- ▶ Jako wektory najodpowiedniejsze są małe plazmidy występujące w wielu kopiach i nienosące genów, które mogłyby nadać bakterii cechy szkodliwe dla człowieka
- ▶ **pBR322** (1976 r.) – zawiera geny oporności na ampicylinę (*amp*) i tetracyklinę (*tet*), można weń wstawić fragment DNA o długości 10 Kpz
  - ▶ Prekursor kolejnych, doskonalszych generacji wektorów plazmidowych
- ▶ Ewolucja cech wektorów:
  - ▶ Możliwość rozróżnienia klonów zawierających rekombinowane DNA (**insercyjna inaktywacja**)
  - ▶ Wyposażenie w **polilinkery** – sztuczne sekwencje DNA ułatwiające klonowanie
  - ▶ Zwiększenie liczby kopii w komórce bakteryjnej
  - ▶ Możliwość ekspresji białek rekombinowanych – **wektory ekspresyjne**
  - ▶ Działające w komórkach różnych gatunków bakterii – **wektory wahadłowe**
  - ▶ **Sztuczne chromosomy bakteryjne (BAC)** – fragmenty >300Kpz, używany intensywnie w projekcie sekwencjonowania genomu człowieka



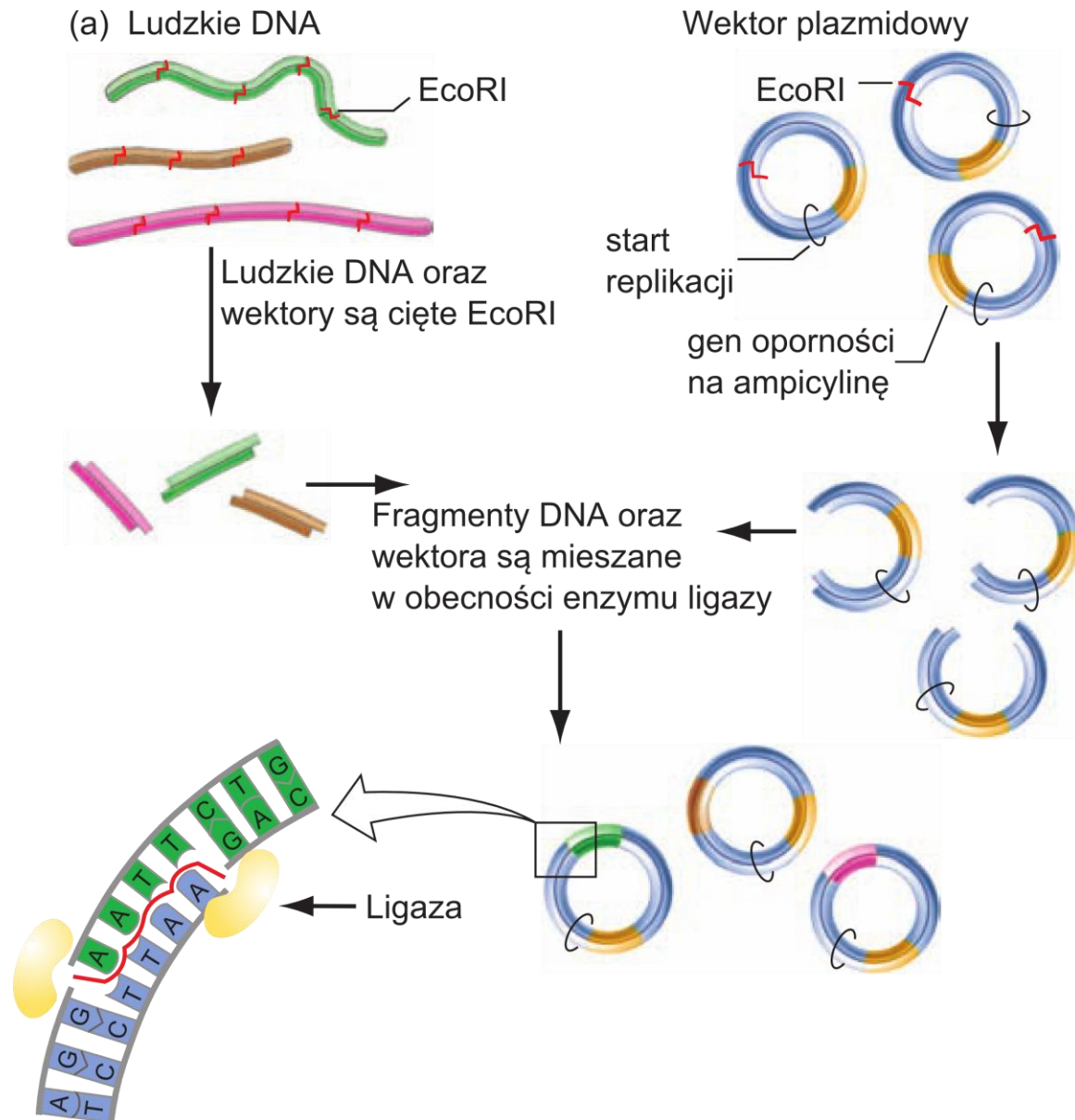
# Klonowanie fragmentów DNA – krok 1 – rekombinowane DNA

► Przykład klonowania fragmentów **EcoRI** ludzkiego DNA do wektora plazmidowego

► **Ligaza** łączy na nowo wiązania fosfodiesterowe na końcach DNA klonowanego fragmentu i wektora

- Komplementarne lepkie końce zwiększają specyficzną i wydajność łączenia dwóch cząsteczek DNA

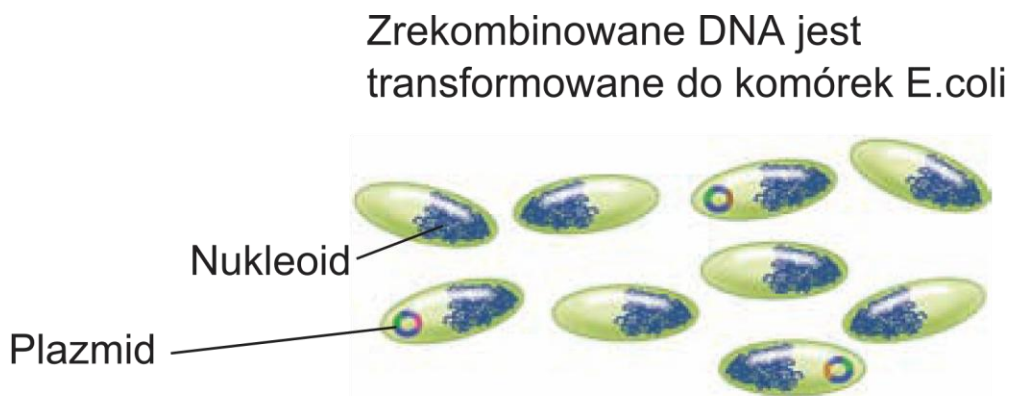
► Uzyskujemy **bibliotekę klonów** ludzkiego DNA



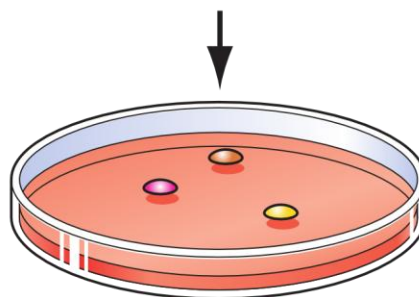


# Klonowanie fragmentów DNA – krok 2 – transformacja

- ▶ Do komórek bakterii obce DNA wprowadza się w procesie **transformacji** – pobranie plazmidu następuje w wyniku „**szoku cieplnego**” (gwałtowne zmiana temperatury z 4 na 42°C) lub **elektroporacji** błony komórkowej (impulsy elektryczne 4-5 milisekund o napięciu 12,3-15 kV/ cm)

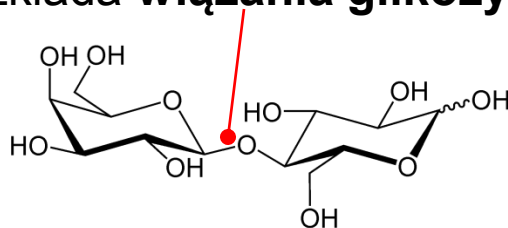


Bakterie są wysiewane na podłoże selekcyjne, zawierające ampicylinę. Rosną wyłącznie komórki (klony) posiadające plazmid



# Klonowanie fragmentów DNA – krok 3 – selekcja

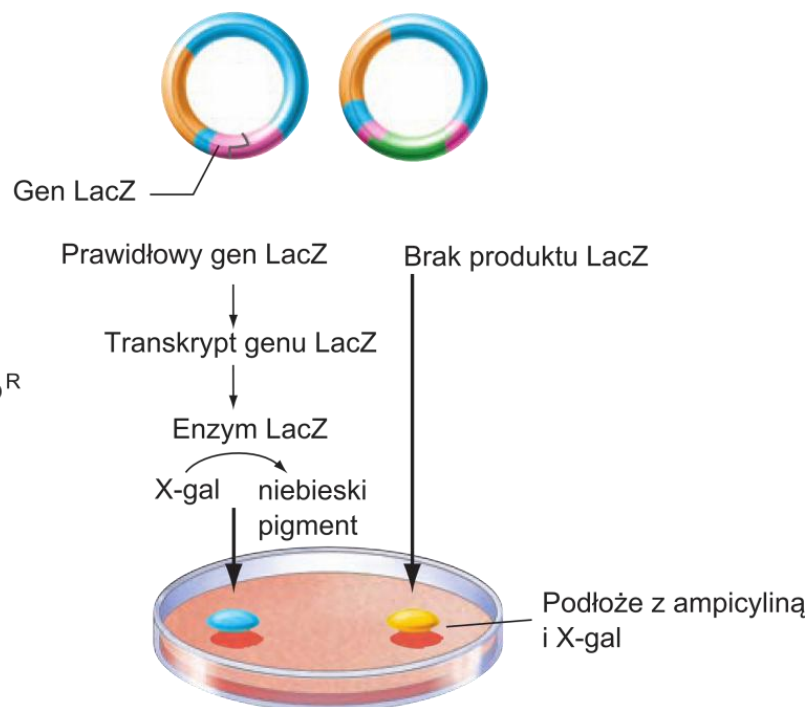
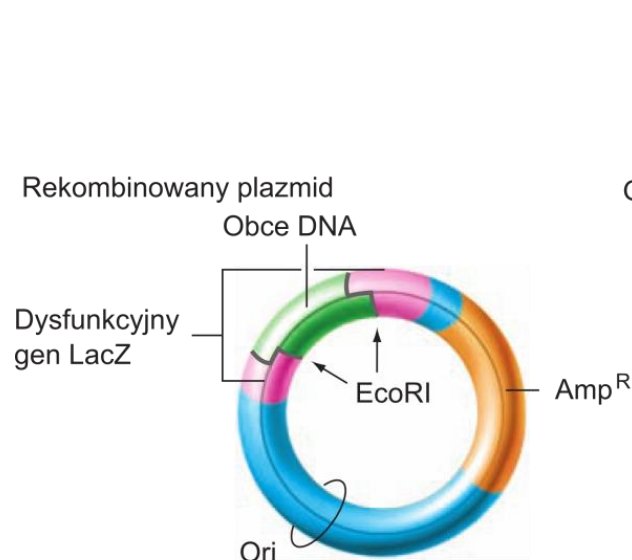
- ▶ Plazmid umożliwiający rozróżnianie klonów zawierających zrekombinowane DNA
- ▶ Przykład plazmidu zawierającego gen **lacZ** kodującego *b-galaktozydazę* (*b-gal*)
  - ▶ *b-gal* rozkłada **wiązania glikozydowe** w cząsteczce laktozy (glukoza+galaktoza)



▶ **Insercyjna inaktywacja (unieczynnienie genu)** – miejsce restrykcyjne na obce DNA w obrębie genu *b-gal*

plazmid bez wstawki

plazmid z obcym DNA



# Klonowanie fragmentów DNA – krok 4 – biblioteki klonów

## ► Biblioteki klonów

- Zbiór sklonowanych fragmentów DNA danego organizmu zdeponowany w bakteriach lub wirusach
- Niezbędne jest **przeszukanie przesiewowe** (screening) w celu odnalezienia konkretnego klonu

## ► Rodzaje bibliotek

- Genomowego DNA
- Komplementarnego DNA (biblioteka cDNA – z części kodującej genomu)

► Po etapie selekcji eksperymentator napotyka problem identyfikacji klonu zawierającego interesujący gen

► Metoda unieczynnienia genu różnicuje jedynie klony zawierające rekombinowane DNA

► W przypadku genomu ludzkiego pociętego EcoRI uzyskamy  $\sim 7 \times 10^5$  fragmentów

# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

► **Hybrydyzacja** – wykorzystanie zasady komplementarności pojedynczo niciowych cząsteczek RNA i DNA do tworzenia stabilnych dwu helikalnych struktur

## ► Hybrydyzacja kolonijna

► Zdenaturowane, jednoniciowe DNA jest inkubowane z **komplementarną** sondą znakowaną izotopem lub fluorescencyjnie

► Sonda wiąże się przez wiązania wodorowe

► Sonda powinna być wystarczająco długa by zapewnić czułość i specyficzność

► Sekwencja sondy musi być zdeteminowana przed eksperymentem



# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

- ▶ Sondy DNA mogą być uzyskane w reakcji **syntezy oligonukleotydów w synteźatorze DNA** bądź w reakcji PCR



<http://openwetware.org/images/thumb/0/04/Be109synthesizer.jpg/250px-Be109synthesizer.jpg>

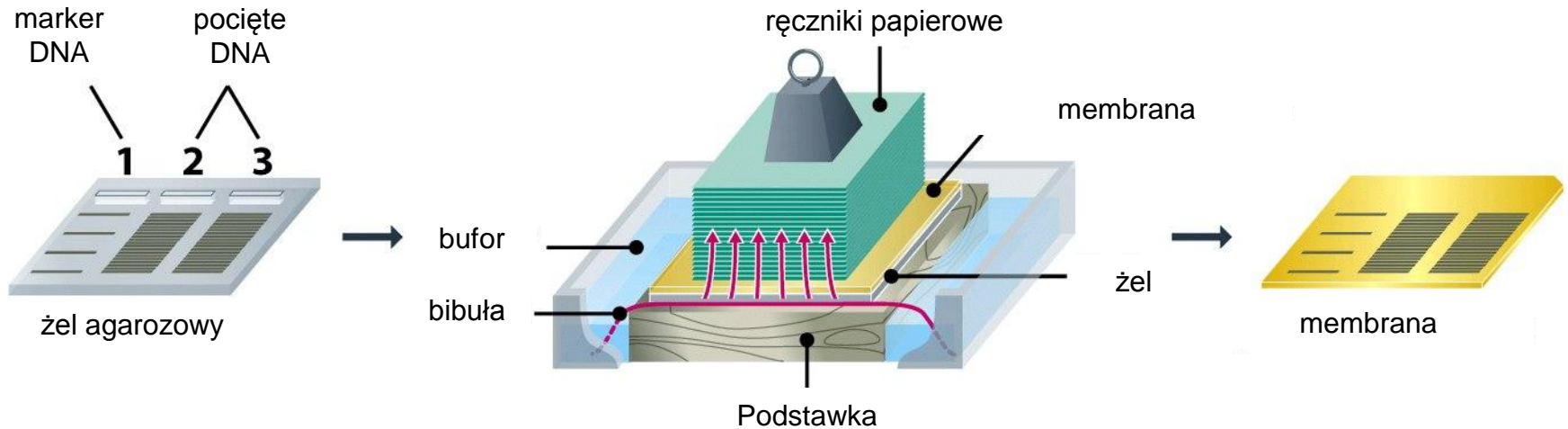
Sekwencja białka	Glu	Asp	Met	Trp	Tyr
↓					
Sekwencja kodująca	GAA	GAT	ATG	TGG	TAT
↓	GAG	GAC			TAC
Synteza możliwych kombinacji sond					
	GAA	GAT	ATG	TGG	TAT
	GAG	GAT	ATG	TGG	TAT
	GAA	GAC	ATG	TGG	TAT
	GAG	GAC	ATG	TGG	TAT
	GAA	GAT	ATG	TGG	TAC
	GAG	GAT	ATG	TGG	TAC
	GAA	GAC	ATG	TGG	TAC
	GAG	GAC	ATG	TGG	TAC

- ▶ **Odwrotna translacja** – generowanie zdegenerowanych sekwencji DNA posiadających wszystkie możliwe kombinacje kodonów dla danej sekwencji polipeptydu

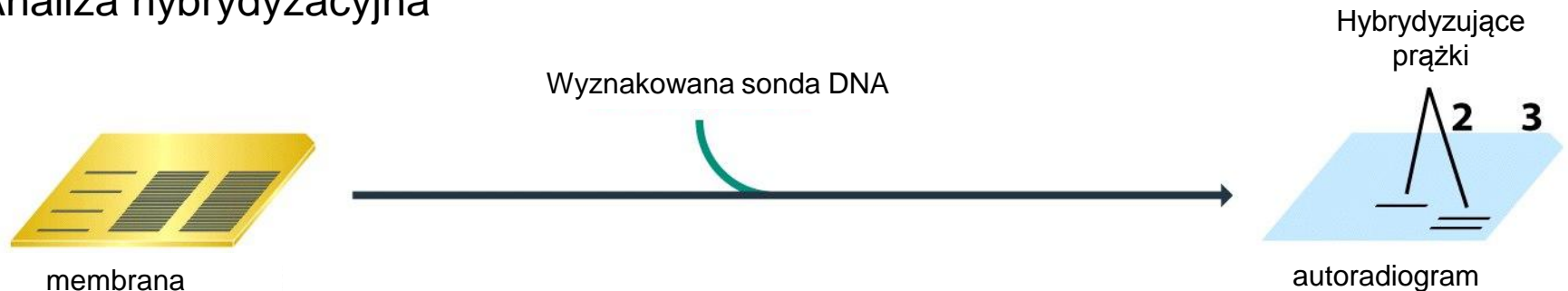
# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

► **Southern blot** – umożliwia identyfikację interesującego fragmentu DNA lub genu

## 1. Transfer DNA na membranę nylonową lub nitrocelulozową



## 2. Analiza hybrydazyjnej





# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

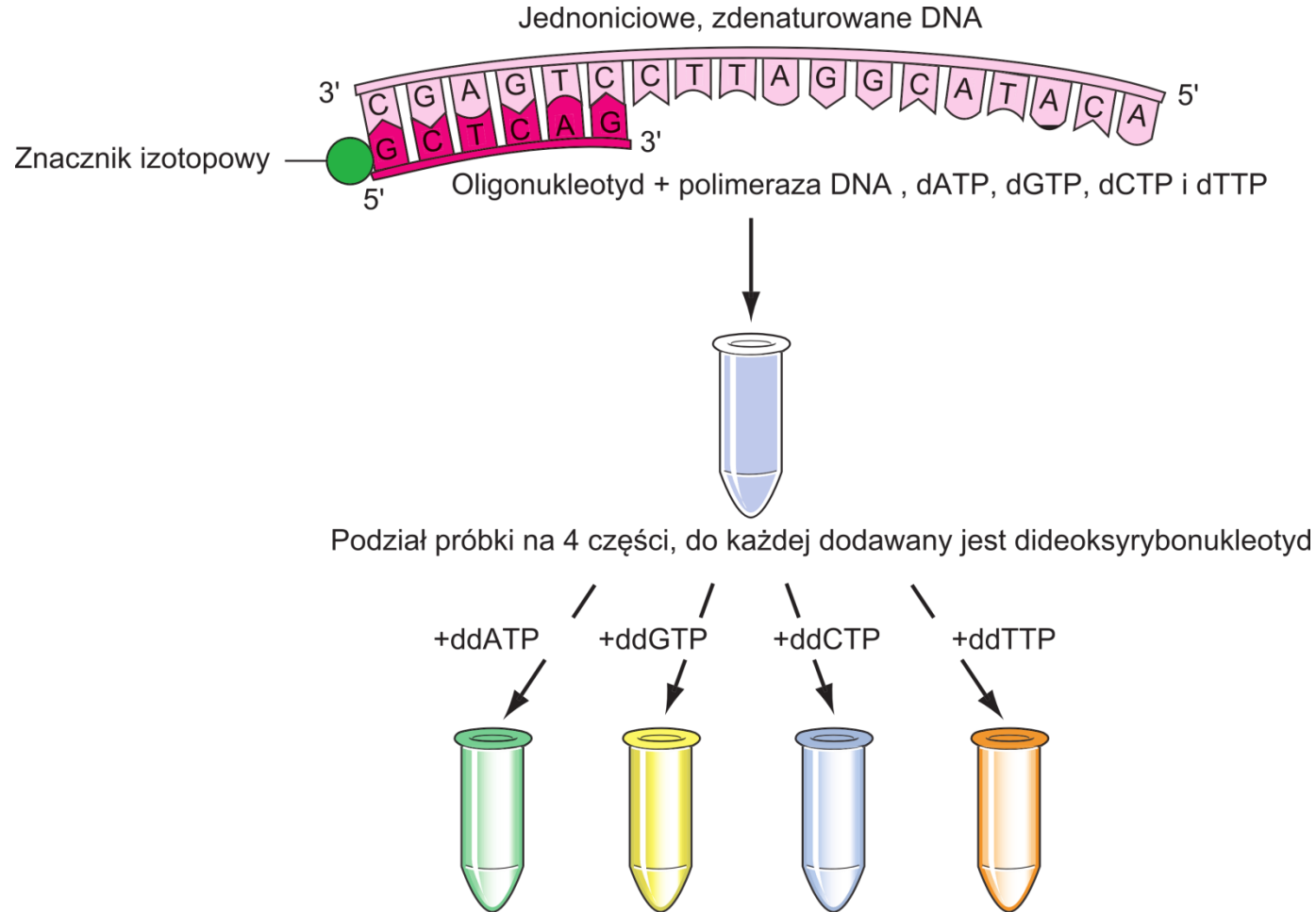
- ▶ **Sekwencjonowanie DNA** – metoda ustalania kolejności nukleotydów tworzących jedną z jej nici
- ▶ Dwie pierwotne metody
- ▶ **Metoda Maxama-Gilberta**
  - ▶ Chemiczne cięcie DNA (wciąż używana dla pewnych aplikacji np. badania oddziaływań białko-DNA)
- ▶ **Metoda Sanger**
  - ▶ Metoda terminacji łańcucha
- ▶ Obie metody mogą dostarczyć informacji o sekwencji 500-700 pz na reakcję i mają dokładność 99.9%
- ▶ metoda Sanger zdominowała sekwencjonowanie gdyż mogła być zautomatyzowana



**Frederick Sanger**  
<http://www.telegraph.co.uk>

# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

- ▶ **Sekwencjonowanie DNA – terminacja łańcucha**
- ▶ Matryca DNA jest denaturowana i mieszana ze znakowanym **izotopowo** starterem, polimerazą DNA i nukleotydami



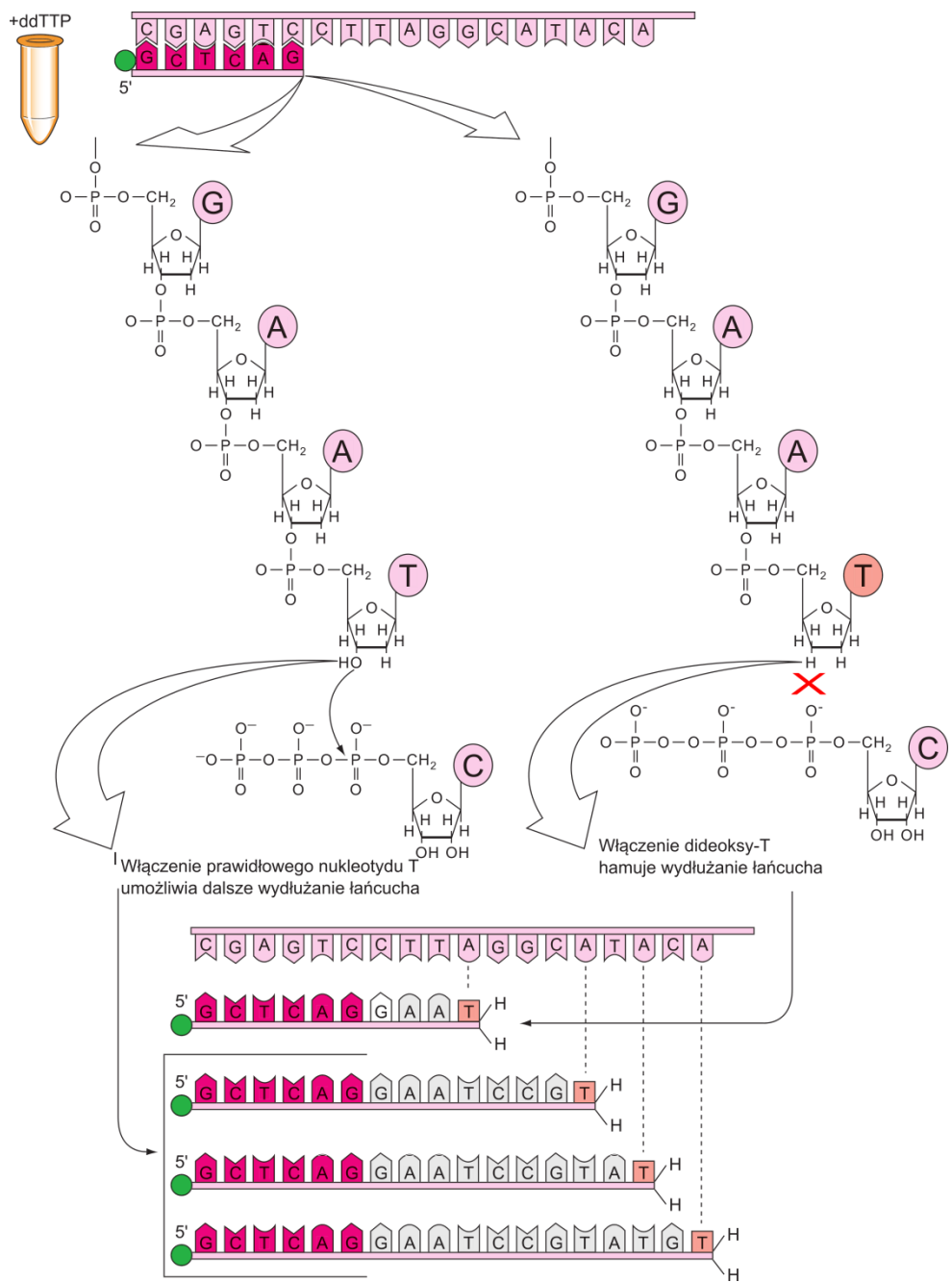


# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

## ► Sekwencjonowanie DNA – terminacja łańcucha

► W trakcie syntezy DNA, dd-nukleotydy są włączane nowej nici tak jak d-nukleotydy, ale brak grupy 3'OH uniemożliwia dalsze wydłużanie DNA

► Każda próbka z ddT produkuje serię różnej długości fragmentów zakończonych T co odpowiada A na nici matrycowej



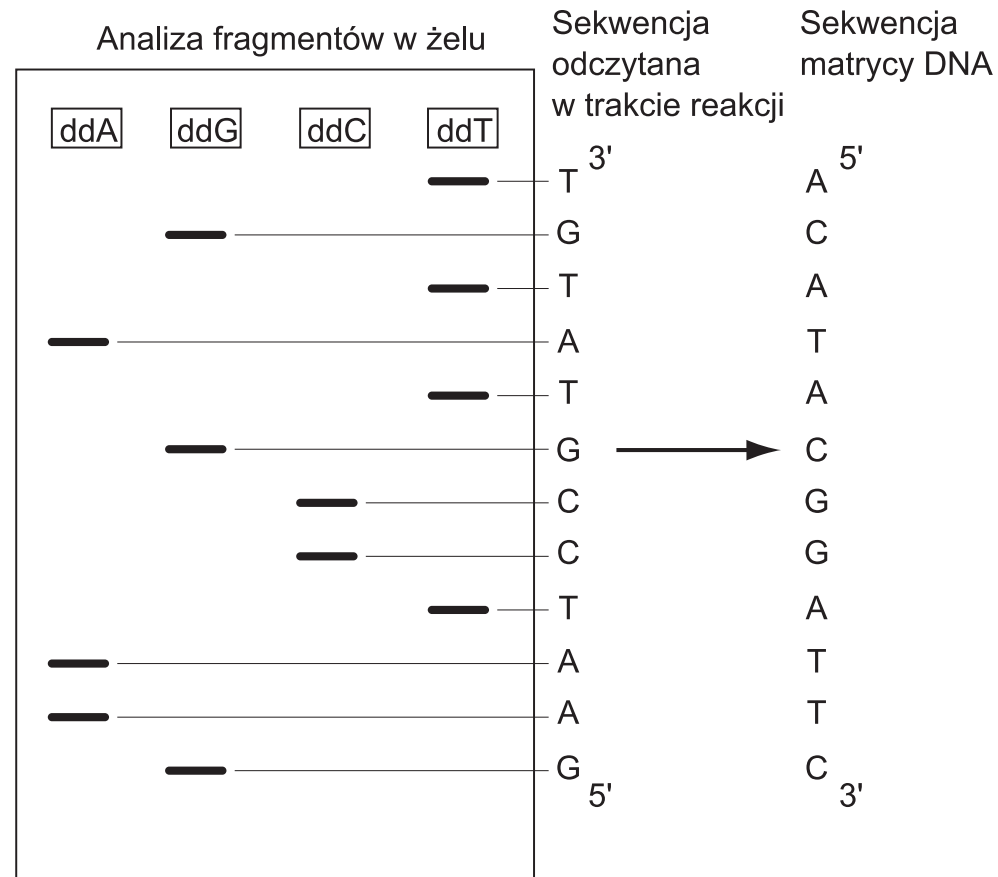
# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

## ► Sekwencjonowanie DNA – terminacja łańcucha

► Do rozdzielenia fragmentów wygenerowanych metodą Sangera używana jest elektroforeza w żelu poliakrylamidowym. Metoda ta ma wystarczającą rozdzielczość, aby rozdzielić cząstki DNA różniące długością się o jeden nukleotyd

► Wizualizacja fragmentów DNA o określonej długości odpowiada specyficznym dd-nukleotydom

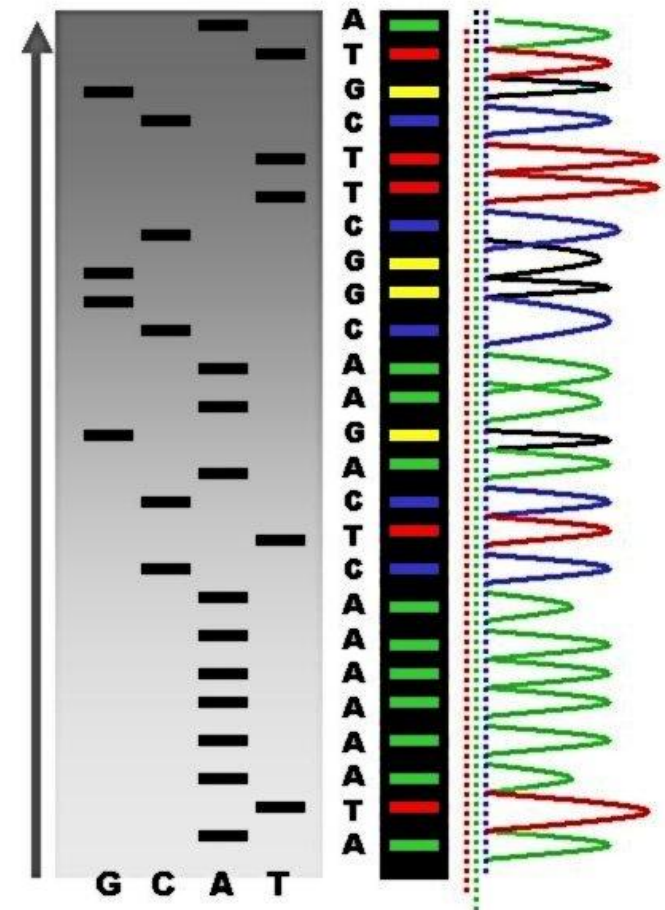
► Sekwencja 5'-do-3' syntetyzowanej nici jest czytana od dołu żelu



# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

## ► Automatyczne sekwencjonowanie DNA metodą Sanger

- Każdy dd-nukleotyd jest wyznakowany różnicowo **znacznikiem fluorescencyjnym** i wszystkie są używane w pojedynczej reakcji
- 4 dd-nukleotydy są rozwijane w tej samej linii w żelu/kapilarze
- Sygnał jest rejestrowany jako **chromatogram** fluorescencji i zapisywany w postaci cyfrowej

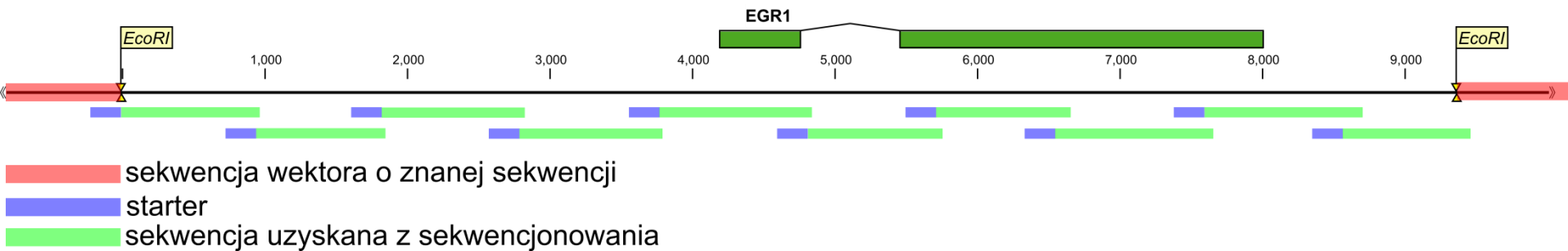


"Radioactive Fluorescent Seq"  
by Abizar at en.wikipedia.

# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

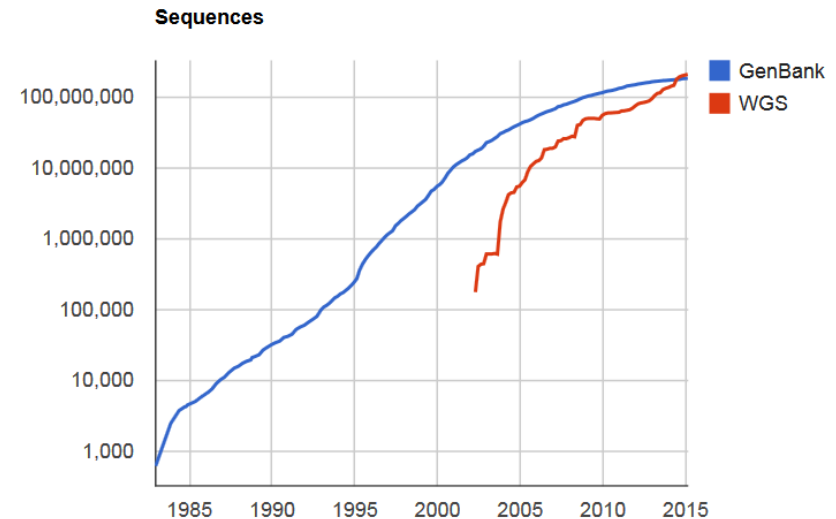
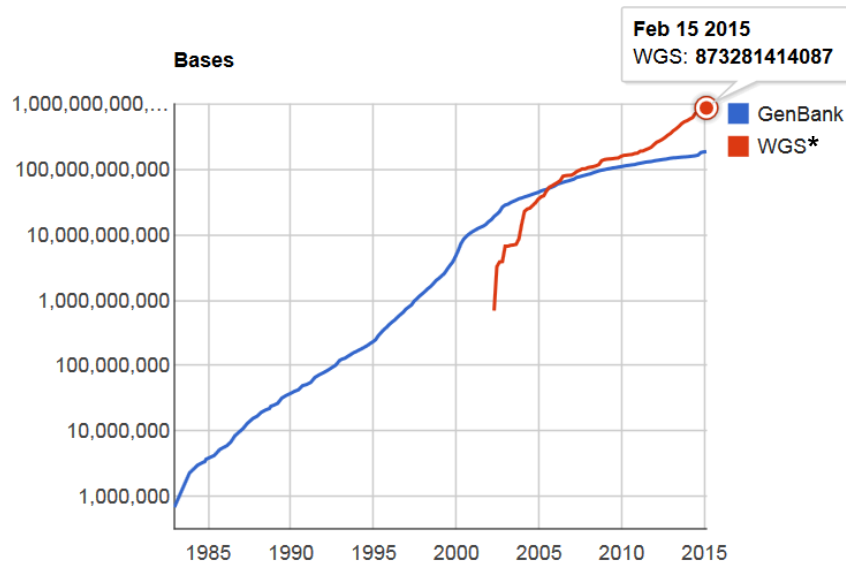
## ► Automatyczne sekwencjonowanie DNA metodą Sangera

- Ograniczeniem metody sekwencjonowania metodą terminacji łańcucha jest długość pomiaru  $< 1000$  pz.
- Rozwiązaniem jest sekwencjonowanie kolejnych odcinków DNA przy użyciu starterów wewnętrznych, tworzonych na podstawie informacji z wcześniejszych odczytów – metoda **primer walking**



# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

- ▶ **Analiza sekwencji klonów przez porównanie z bazą sekwencji DNA**
- ▶ Zapytanie do GenBank – pierwsze oficjalne i darmowe repozytorium sekwencji DNA (1982; National Institute of Health)
- ▶ Baza zawiera sekwencje genomów 300 tys. organizmów
- ▶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>



**\*Whole Genome Shotgun**

# Klonowanie fragmentów DNA – krok 5 – identyfikacja klonów

## ► Analiza sekwencji klonów przez porównanie z bazą sekwencji DNA

► **Basic Local Alignment Search Tool, BLAST**, narzędzie do porównywania homologii sekwencji badanej do sekwencji zdeponowanej w GenBanku

► [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

► Wpis dla fragmentu genomu ludzkiego zawierający gen EGR1

► [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_021374.1?report=docsum&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_021374.1?report=docsum&log$=seqview)

► Przeglądarka genomowa UCSC – narzędzie do nawigacji po genomach

► <http://genome.ucsc.edu/>

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Help About Us

**Human (*Homo sapiens*) Genome Browser Gateway**

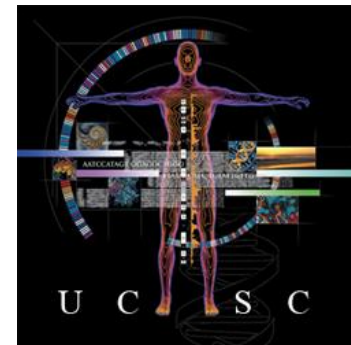
The UCSC Genome Browser was created by the [Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz](#).  
Software Copyright (c) The Regents of the University of California. All rights reserved.

group	genome	assembly	position	search term	
Mammal	Human	Feb. 2009 (GRCh37/hg19)	chr5:137801181-137805004	EGR1 (Homo sapiens early growth response 1)	submit

[Click here to reset](#) the browser user interface settings to their defaults. [More on-site workshops available!](#)

[track search](#) [manage custom tracks](#) [track hubs](#) [configure tracks and display](#)

Human Genome Browser – hg19 assembly ([sequences](#))



# INGE – Wykład 3 – podsumowanie

