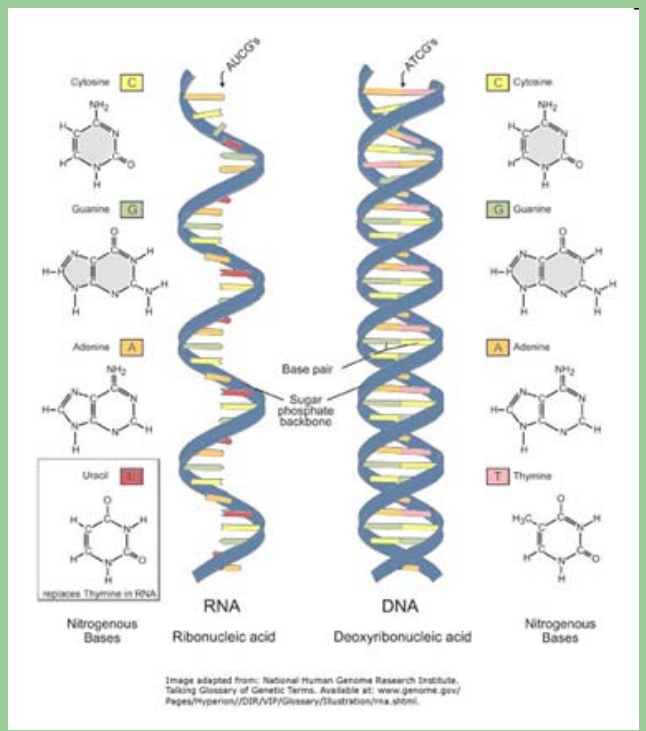
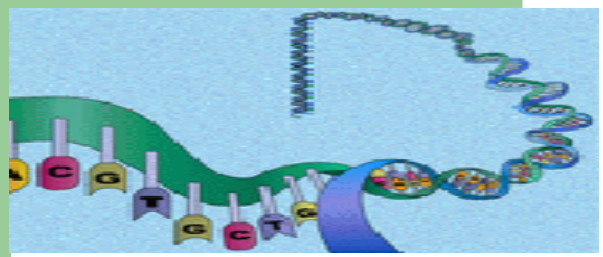
Metoda RACE



Aneb práce s nukleovými kyselinami

Ing. Milena Musilová



RACE

Rapid **A**mplification of **c**DNA **E**nds

↓

Rychlá amplifikace konců cDNA

- používána k usnadnění klonování cDNA o úplné délce

Co je cDNA?

- komplementární DNA
- syntetická deoxyribonukleová kyselina
- připravená přepisem specifické mRNA
- působením enzymu reverzní transkriptasy
- sled nukleotidů je komplementární sledu nukleotidů v použité RNA

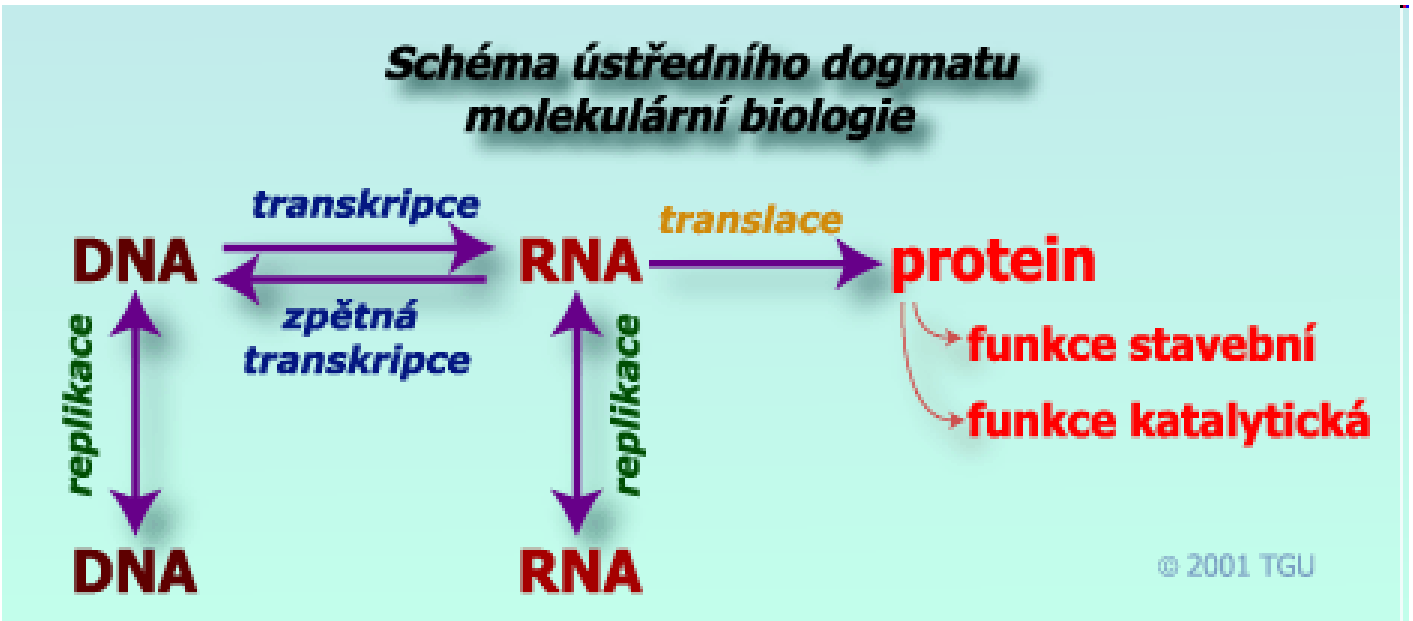


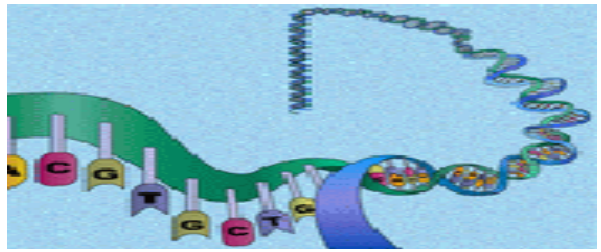
! neobsahuje introny

! je tedy kratší než genomická DNA



Cesta k cDNA – malé opakování





Princip metody RACE

- Amplifikace kratších úseků od obou konců cDNA
- Nezbytná znalost části sekvence uvnitř molekuly mRNA – specifický primer

Specifický primer:

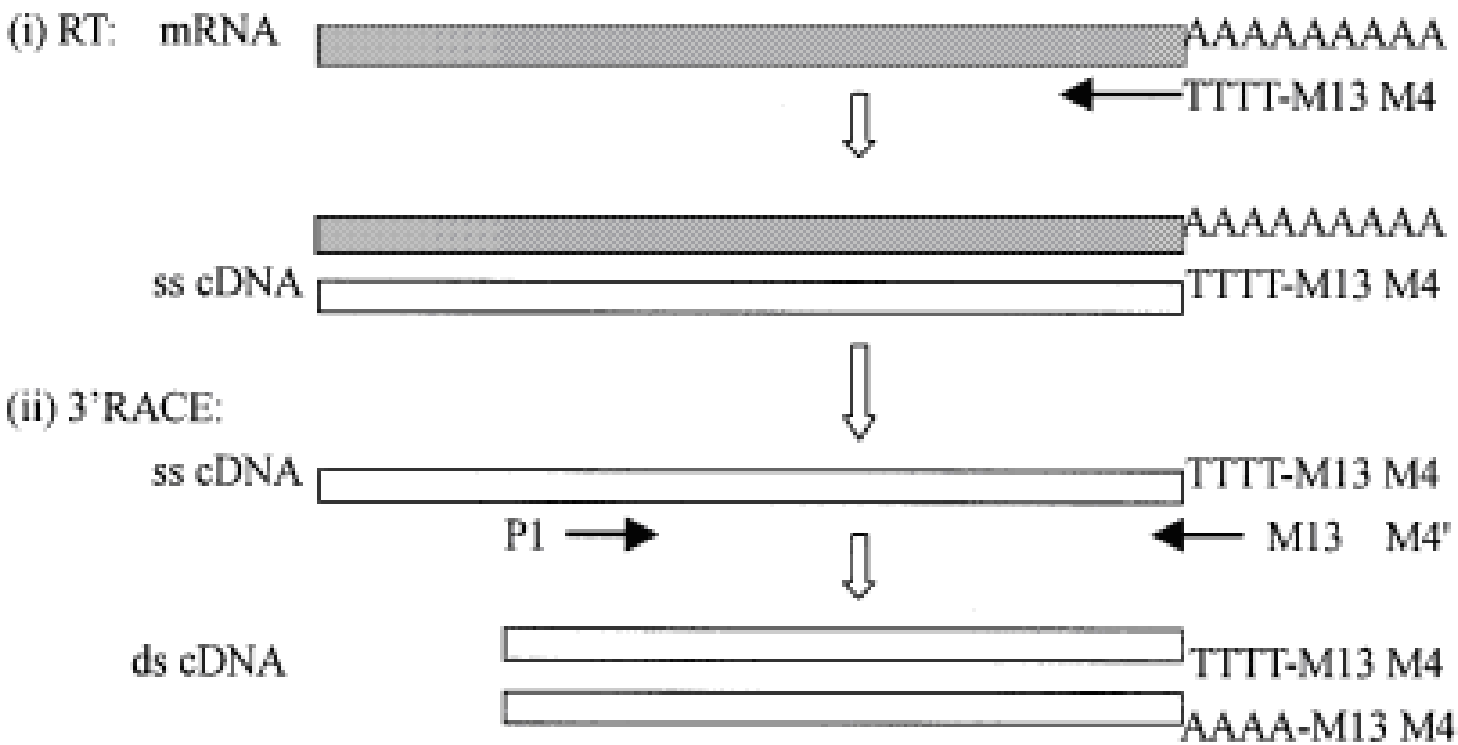
- Orientován ve směru 3´ nebo 5´
- Umožňuje produkci překrývajících se fragmentů cDNA

- Dělí se na 3´RACE a 5´RACE

3´RACE

- využívá přirozeného poly(A)-konce na mRNA jako místa pro zahájení PCR amplifikace
- pro zpětnou transkripci od 3´konce se použije složený primer obsahující 17 zbytků oligo(dT) navázaných na 17-mer kotevní adaptor
- adaptor má vyšší T_m než oligo(dT)
- pro PCR se pak použije primer komplementární k adaptoru a druhý, genově specifický primer navržený na střední části cDNA

3´RACE


(i) RT: mRNA
AAAAAAAAA
TTTT-M13 M4
AAAAAAAAA
ss cDNA
TTTT-M13 M4
(ii) 3'RACE:
ss cDNA
TTTT-M13 M4
P1
M13 M4'
ds cDNA
TTTT-M13 M4
AAAA-M13 M4'

5´RACE

- při 5´RACE cDNA syntetizována použitím genově specifického primeru GSP1 a zpětné transkriptasy
- reakční produkt zpětné transkripce je pak purifikován od nukleotidů, primerů a vybaven 3´-poly(dA)-koncem připojeným terminální transferasou
- úsek cDNA s napojeným koncem je pak amplifikován PCR s použitím vnějšího genově specifického primeru GSP2, složeného primeru oligo(dT) s kotevním adaptorem a *Taq* DNA-polymerasy.

Rozdíl mezi 3´a 5´RACE



Postup a naše úkoly



- Izolace RNA
- DNázování
- Reverzní transkripce
- Preamplifikace
- PCR
- Kontrolní elektroforéza

Izolace



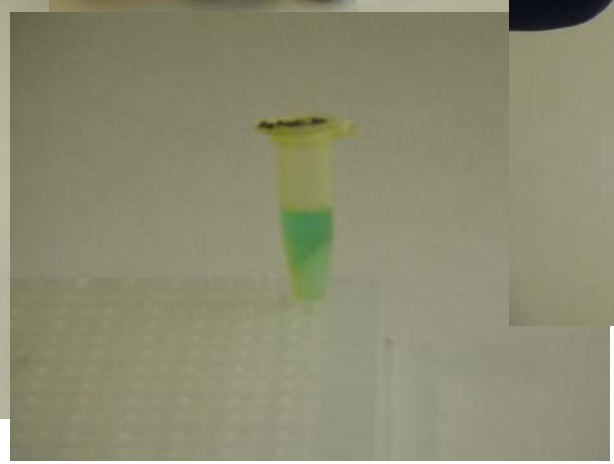
- získávání nukleových kyselin v nativním stavu v dostatečném množství a čistotě
- rozmělnění na vychlazené třecí misce
- využívány fenolové sloučeniny
- chlazenou centrifugací a přidáváním rozpouštědel odstraňování nepotřebných frakcí

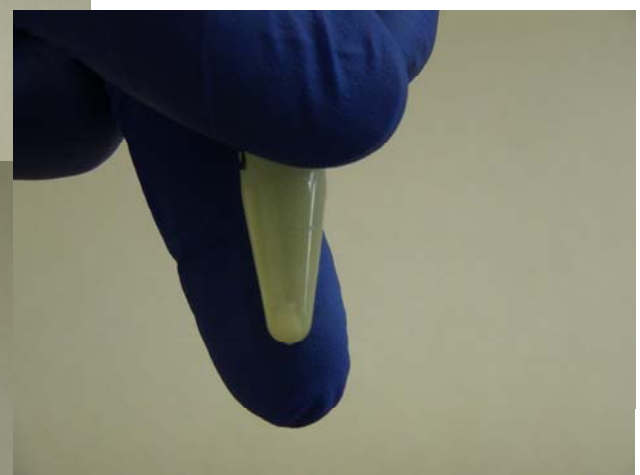
Izolace









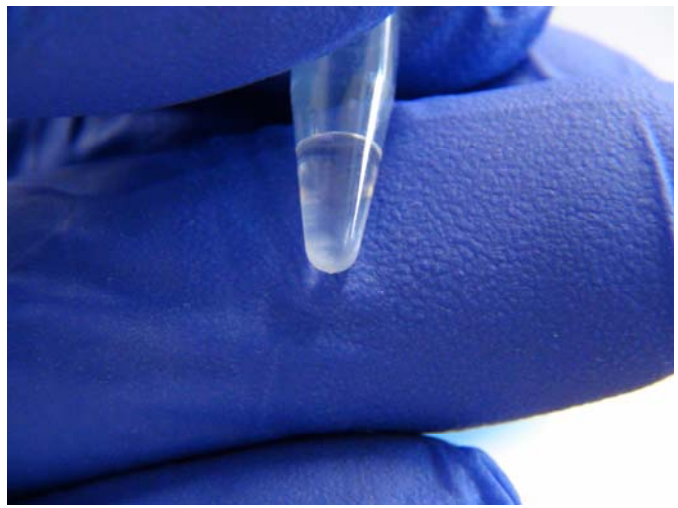


DNázování



- Postup nutný k odstranění kontaminujících Dnáz





Reverzní transkripce

- metoda určená pro amplifikaci molekul RNA
- hraje důležitou roli v aktivitách některých typů virů
- využívá schopnosti reverzní transkriptasy (RT)
- RT dokáže tvořit molekulu DNA na základě přepisu informace uložené v RNA



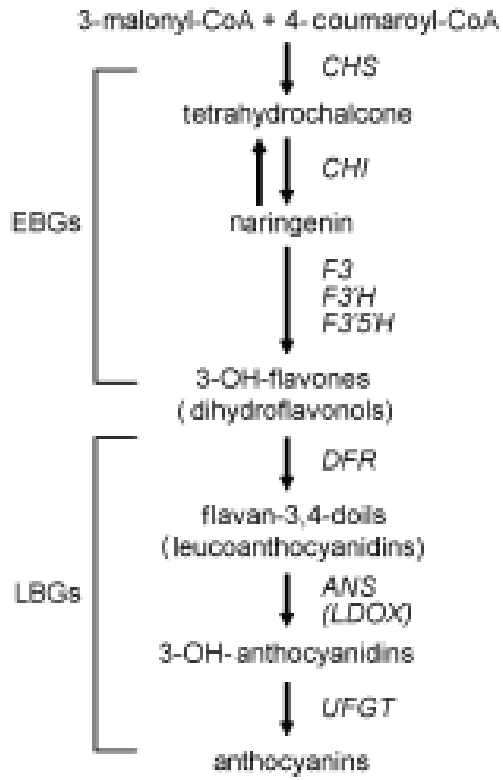
Preamplifikace

- Asymetrickou PCR
- Pomocí GSP – genově specifického primeru dojde k amplifikaci úseku odpovídajícího danému vybranému genu pro **DFR – dihydroflavonol reduktázu**
- Asymetrická PCR je modifikace PCR, která umožňuje preferenční syntézu jen jednoho vlákna z duplexu DNA tím, že jeden z primerů je v nadbytku
- Jako produkt PCR tak vzniká jednovláknová DNA vhodná např. pro sekvenování

DFR - dihydroflavonol reduktáza



- enzym biosyntetické dráhy anthokyanů
- podílí se na tvorbě purpurového/modrého zbarvení pokusných obilek
- předmětem dalšího výzkumu je studium exprese genů pro tyto enzymy u barevných pšenic

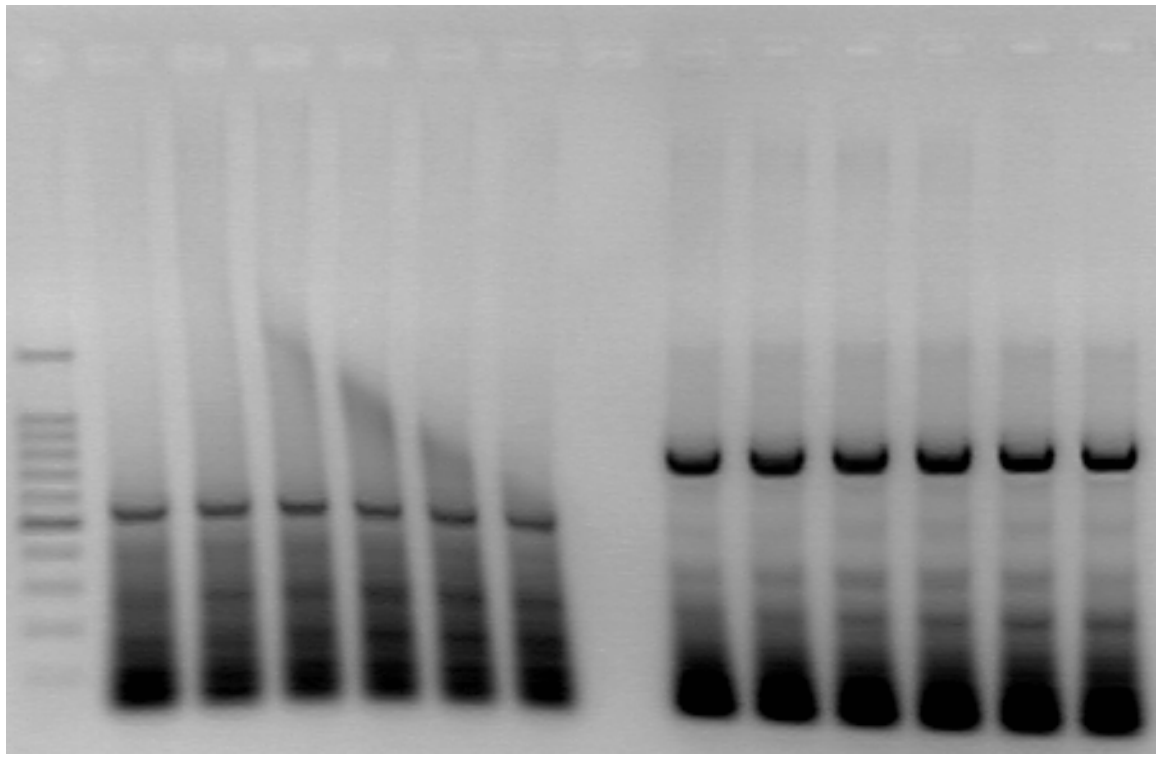




Konečná PCR

- Na závěr je potřeba daný úsek, charakteristický pro gen enzymu DFR amplifikovat klasickou polymerázovou řetězovou reakcí
- A provést kontrolu úspěšnosti horizontální elektroforézou na 1,5% agarozovém gelu

Výsledné produkty



Děkuji za pozornost

