

TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK GENOMIKA

Katedra za biologiju

TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

- Analiza i manipulacija genetskim materijalom - izvor brojnih otkrića:
 - ▣ Proizvodnja insulina u industrijskim količinama



TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

Sinestezija večeg broja biohemijskih,
mikrobioloških i molekularnih tehnika

restrikcione
endonukleaze

kloniranje DNK

hibridizacija
nukleinskih
kiselina

sekvencioniranje
DNK

genetsko
inženjerstvo

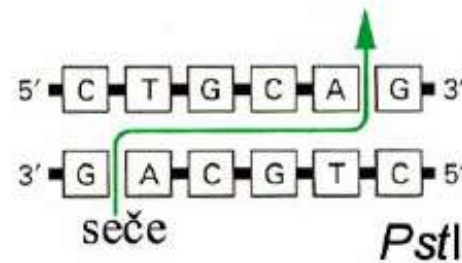
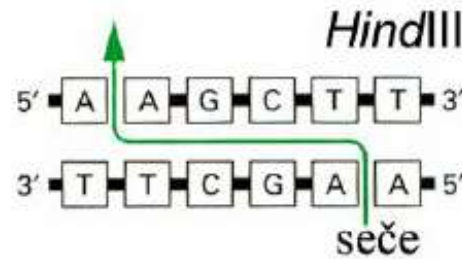
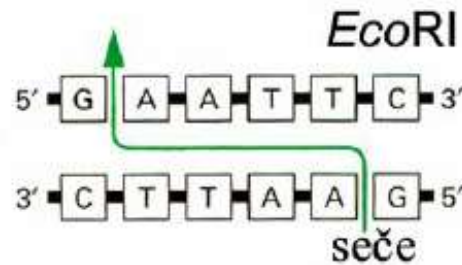
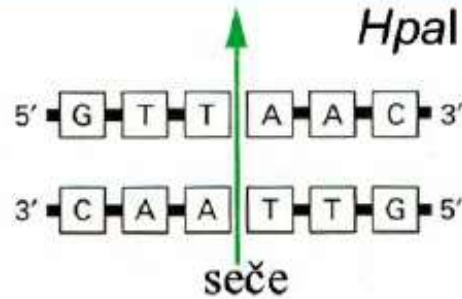
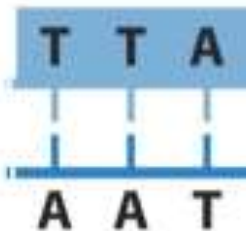
RE

TEHNOLOGIJA

ITNE DNK

UPOTR
RESTRIKCIOM

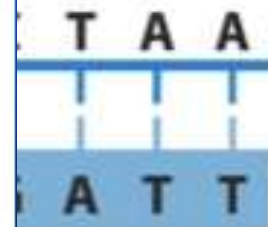
Res
endo



poreklom
od
procaryota

4-8
kleotida

preko 3000
komercijalno 600

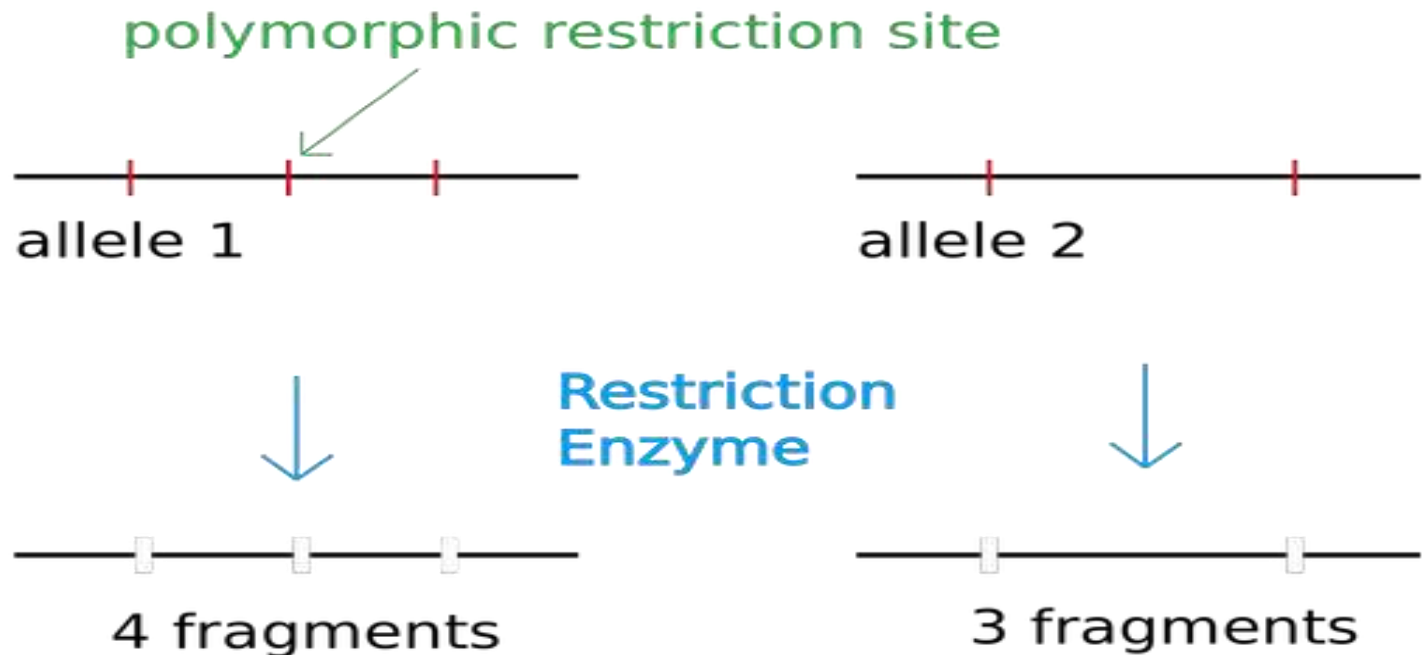


TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

□ **ULOGA RESTRIKCIONIH ENZIMA**

▣ **RFLP - „Restriction fragment length polymorphism“**

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata

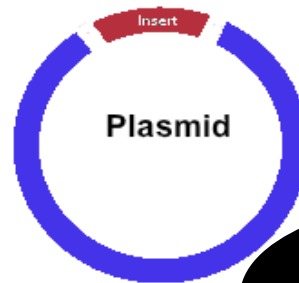
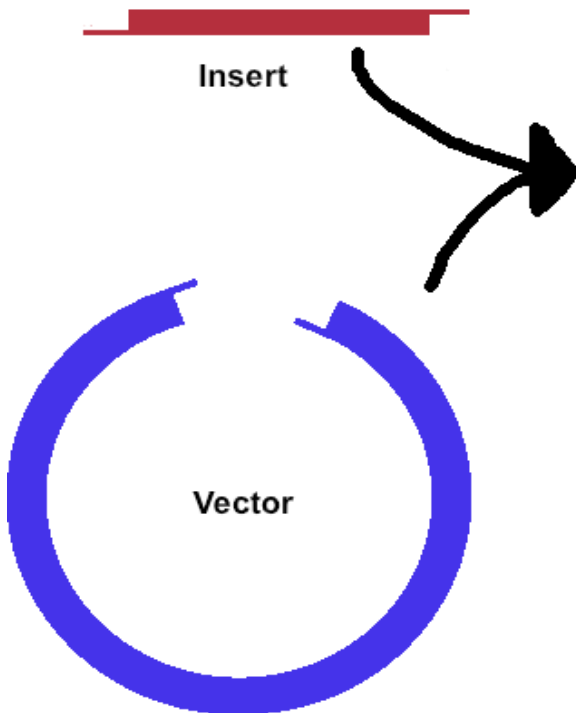


TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK



TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

KLONIRANJE DNK



umnožavanje segmenata DNK
ili rekombinovane DNK



Cirkularna dvolančana DNK
plazmida (klonirajući
vektor)

Restrikciona
endonukleaza

fragment DNK
za kloniranje



DNK ligaza

Rekombinantna DNK



200 nm



200 nm



Proizvodnja insulina

- Humani insulin je pomoću bakterije *Escherichia coli* proizveden 1978. a za terapijske svrhe je odobren 1982.
- Za 42 gr. goveđeg ili svinjskog insulina potrebno je žrtvovati preko **3000** goveda (ili više od **6000** svinja) da se tehnološkim postupkom ekstrakcijom iz njihovih pankreasa dobije 41,6 gr. insulina.
- Poređenja radi, istovremeno potrebna je jedna jedina bakterija s genom za humani insulin koja se razmnoži u bioreaktoru zapremnine oko 1000 l i za **72 sata** iz njega se izoluje 41,6 gr. humanog insulina.

TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

KLONIRANJE
DNK



PCR - Polymerase chain reaction
„Lančana reakcija polimeraze“

simuliranje normalne
replikacije u ćeliji

umnožavanje delova
DNK pomoću egzogene
polimeraze

TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

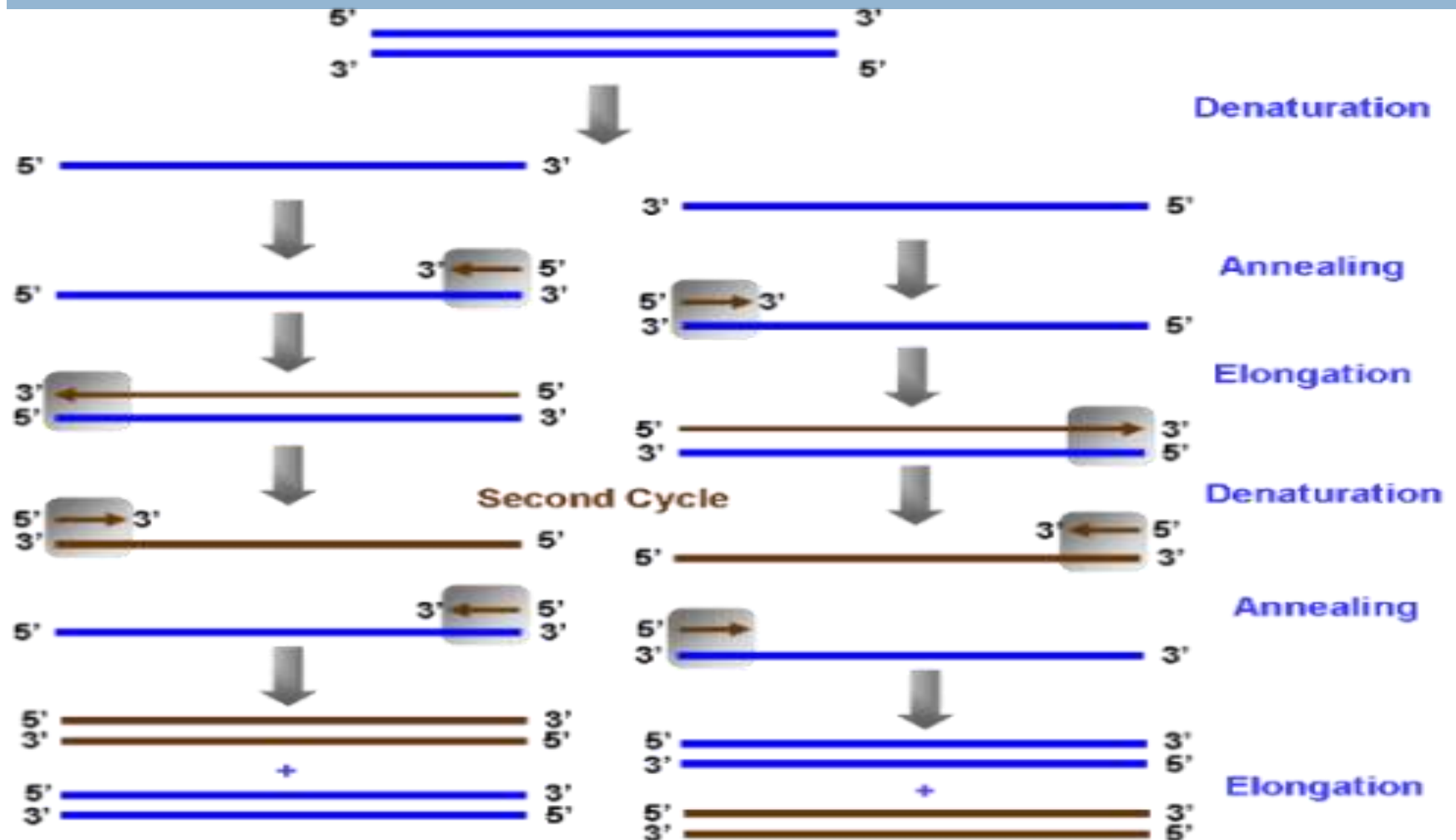
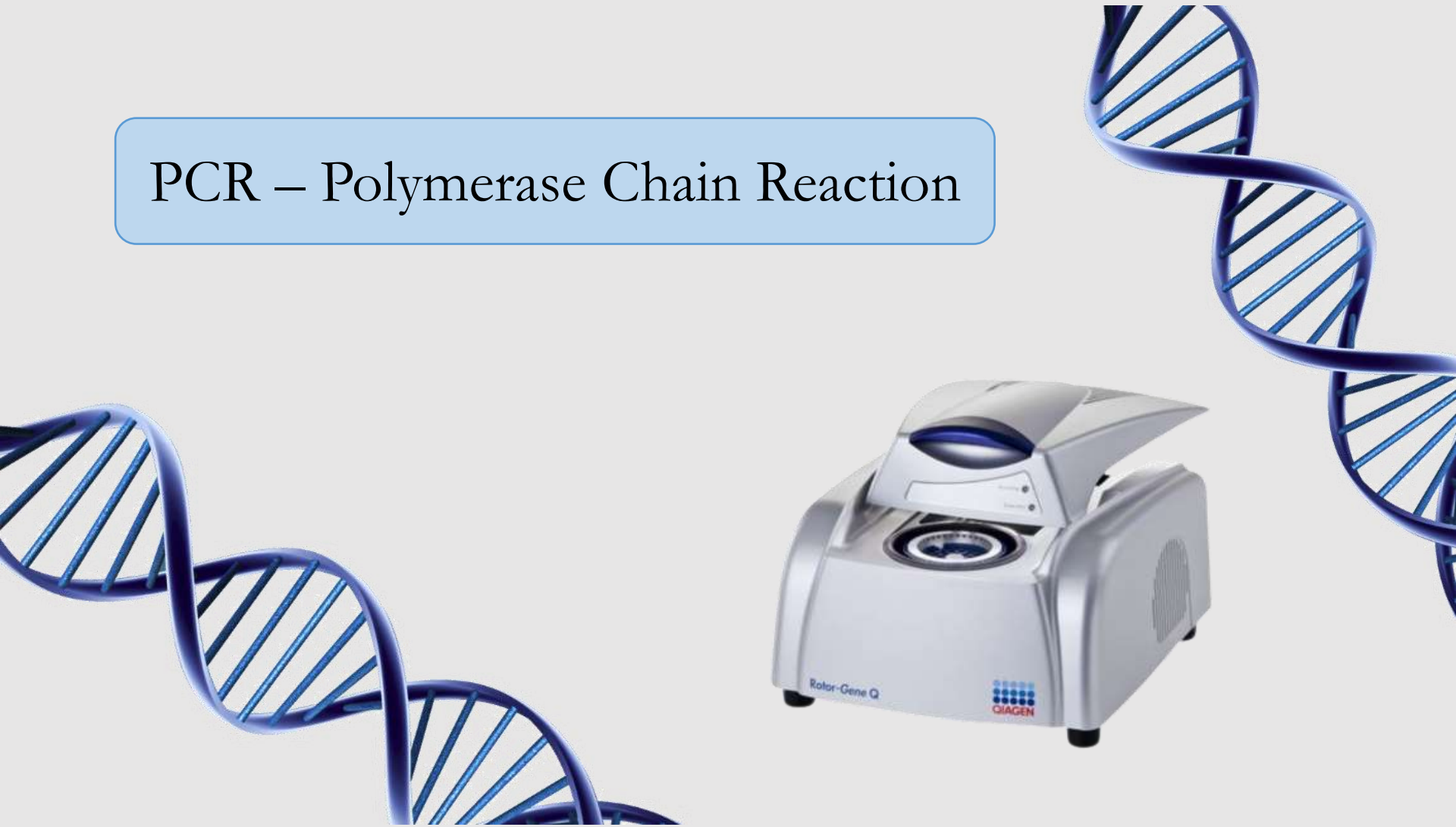


Fig. Stages of PCR

PCR – Polymerase Chain Reaction



KOMPONENTE PCR-a



DNK



Enzim – Taq
polmeraza

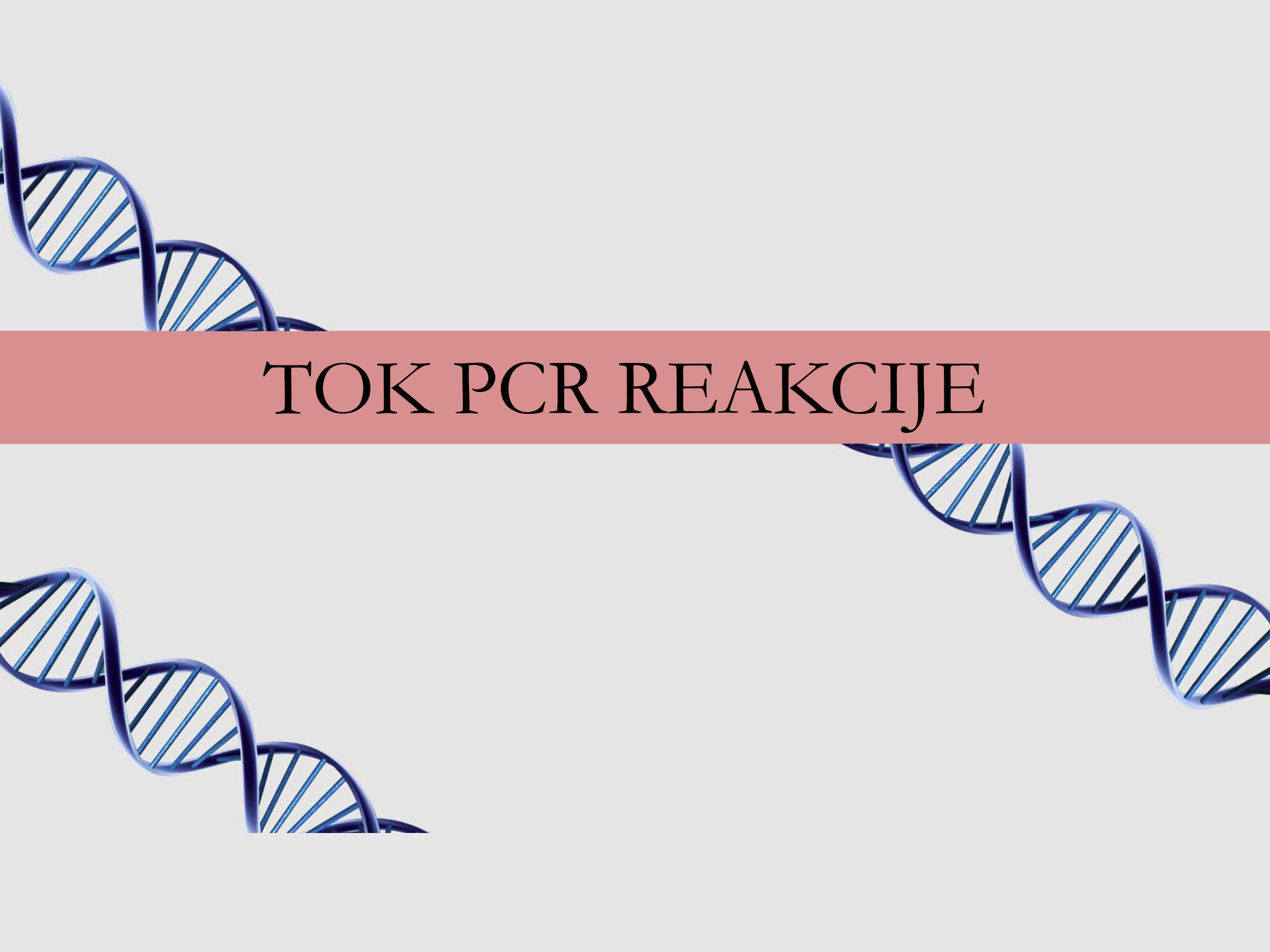


Prajmer
i



Nukleotid
i



A blue DNA double helix structure is shown, winding across the top and bottom of the slide. The helix is composed of two strands connected by horizontal rungs representing base pairs. The background is a solid light gray.

TOK PCR REAKCIJE

CIKLUS

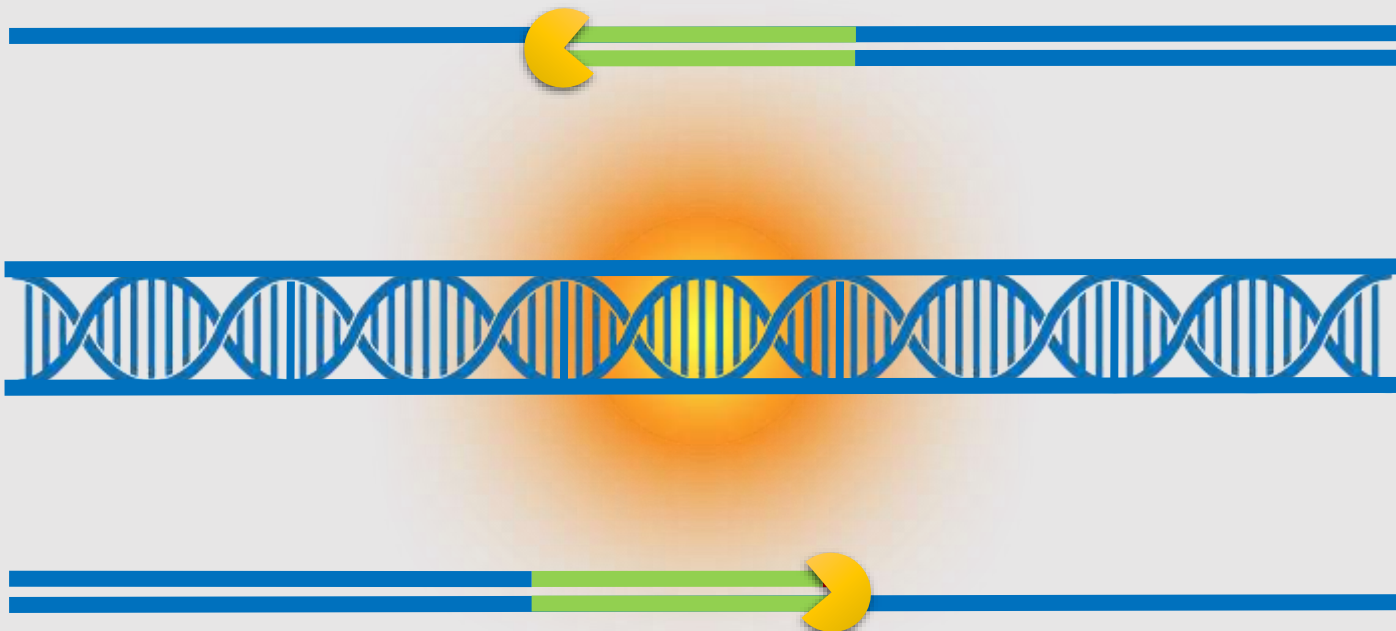
1



Denaturacija
95°C

Vezivanje prajmera
55-65 °C

Elongacija
72 °C

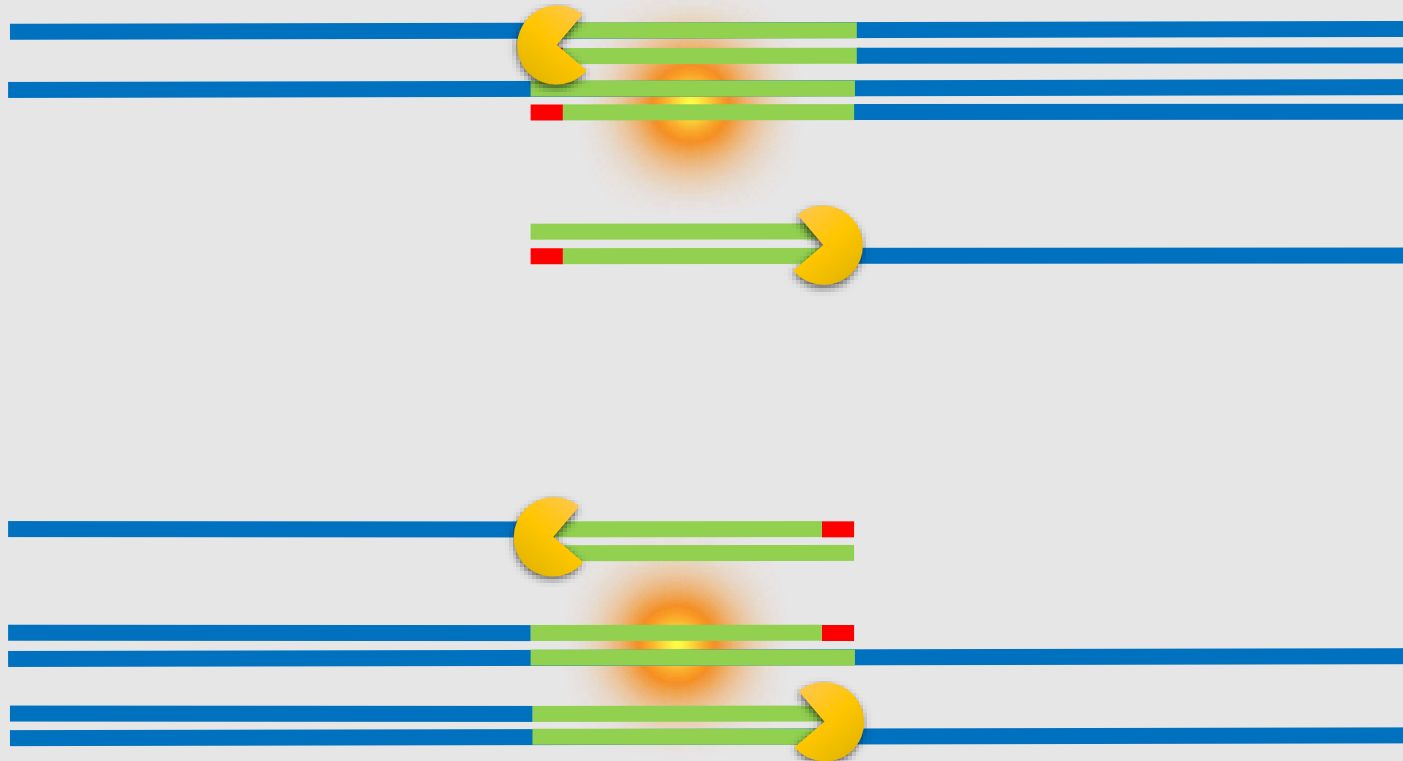


CIKLUS 2

Denaturacija
95°C

Vezivanje prajmera
55-65 °C

Elongacija
72 °C

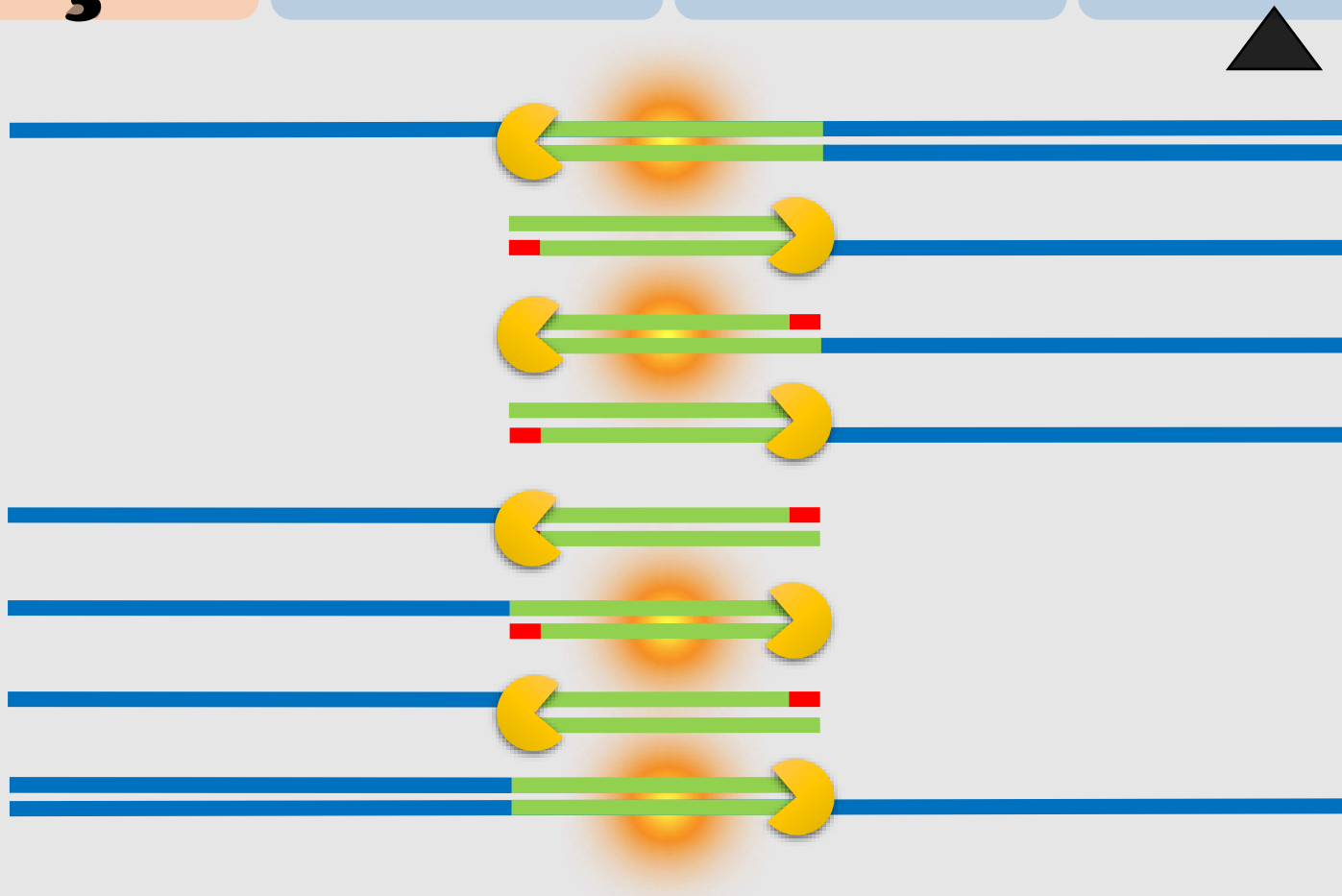


CIKLUS 3

Denaturacija
95°C

Vezivanje prajmera
55-65 °C

Elongacija
72 °C



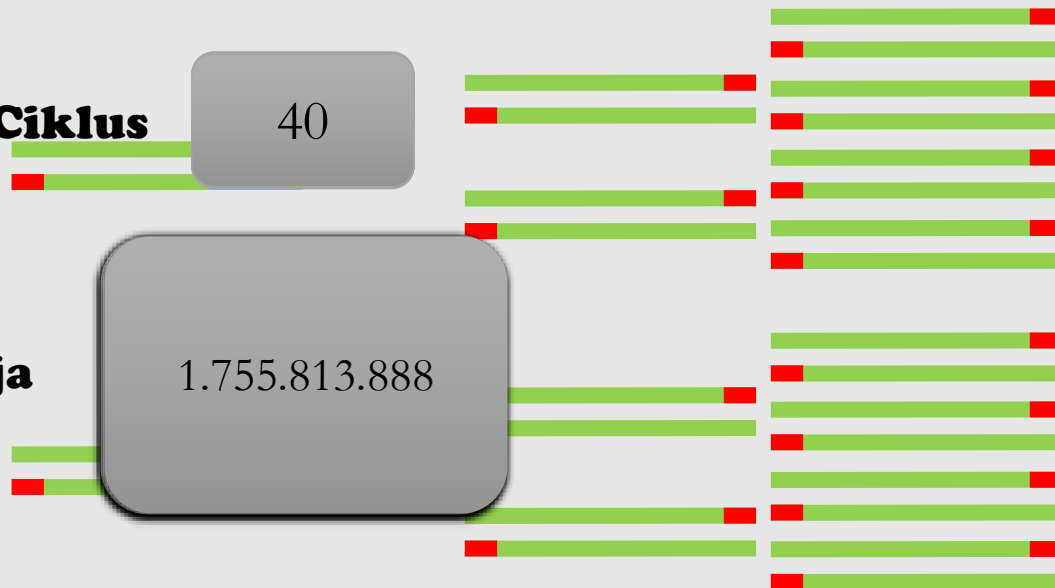


Ciklus

40

Broj kopija

1.755.813.888



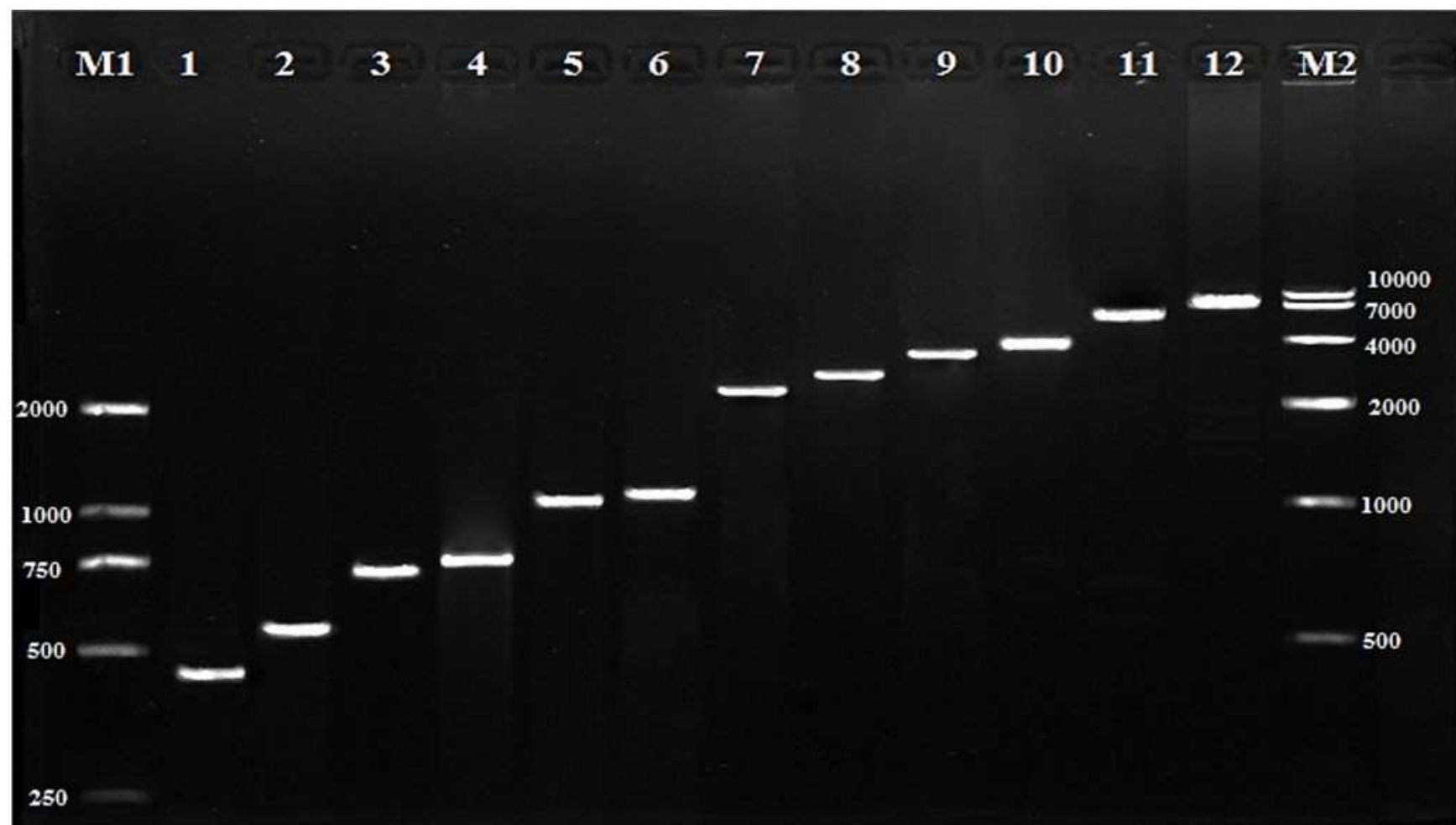
Real time PCR



- Očitavanje reakcije moguće tek nakon završetka procesa amplifikacije
- Očitavanje se vrši na elektroforeznom gelu (agarozni gel)
- Elektroforeza obezbeđuje razdvajanje molekula različite dužine pod uticajem električnog polja prilikom njihovog kretanja kroz agarozni ili poliakrilamidni gel koji je potopljen u rastvor slabog elektrolita
- Fragmenti DNK različite dužine imaju različitu elektropokretljivost te kroz gel putuju različitom brzinom (kraći fragmenti pređu duži put u odnosu na duže fragmente)
- Po završetku elektroforeze, fragmenti su razdvojeni ali još uvek nisu vidljivi, te je neophodno gel obojiti rastvorom etidijum bromida.

End point PCR

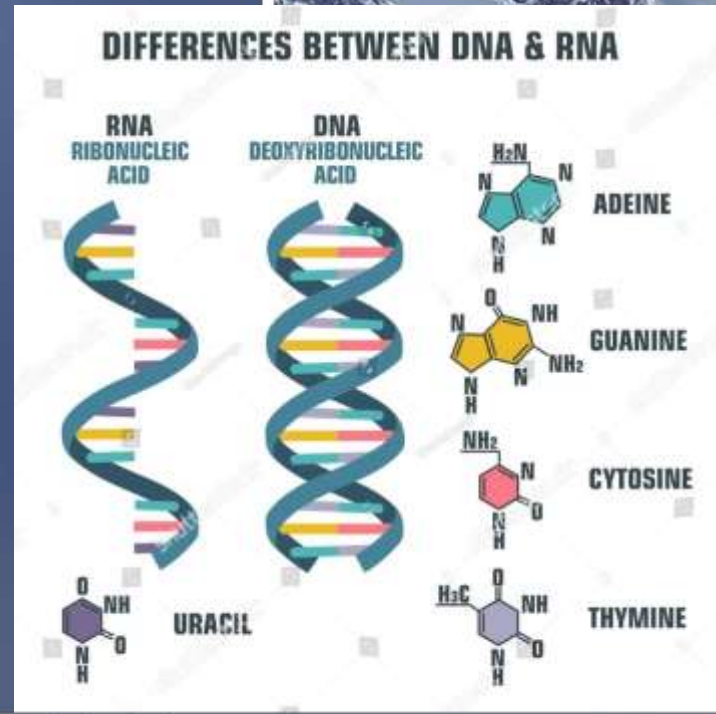




- **Polymerase chain reaction (PCR)** je metoda za brzo umnožavanje miliona/milijardi kopija specifične sekvence DNK u *in vitro* uslovima.

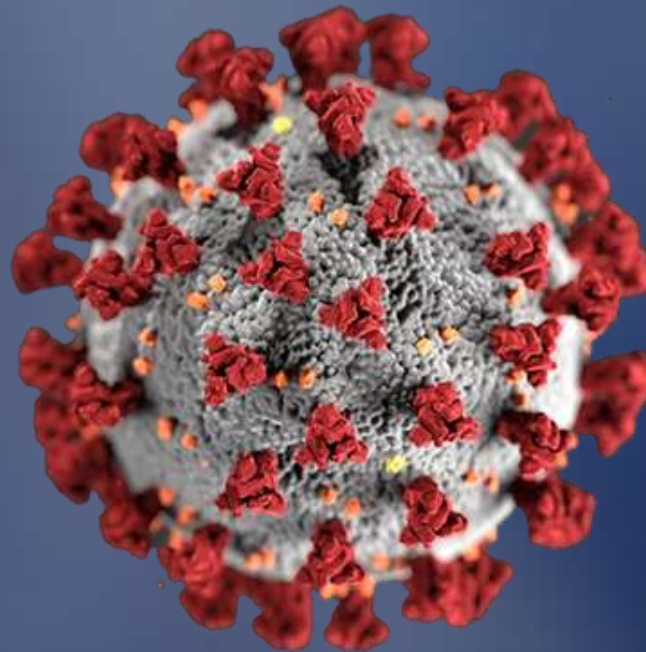


- *In vitro* amplifikacija RNK?



RNK

- Analizi eukariotske informacione RNK (iRNK) engl. messenger RNA (mRNA) – analizu genske ekspresije
- Amplifikaciju virusne RNK.



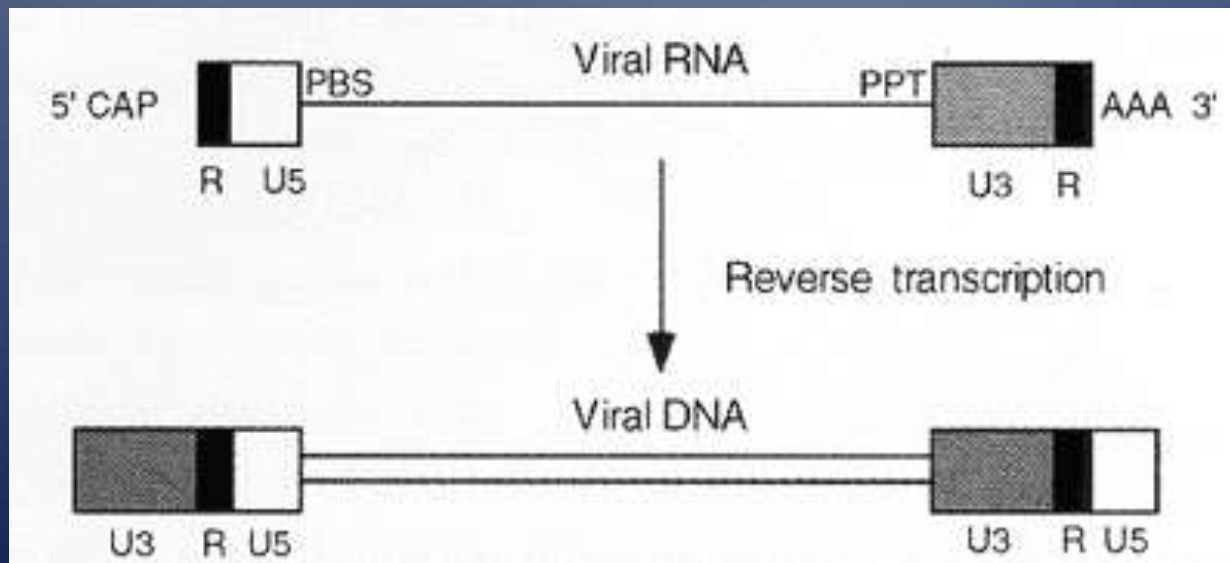
PCR amplifikacija

- DNK uzorak
- Polimeraza
- dNTP mix
- Prajmeri specifični za DNK sekvencu
- Puferi



Reverzna transkripcija

- Enzim reverzna transkriptaza – retrovirusi



Koraci reverse transcription (RT)-PCR

- Prvi komplementarni DNK lanac
- Dvolančani hibrid RNK/DNK.
- Enzim RNK-aza razgrađuje RNK
- Sintetiše drugi DNK –
dvolančana DNK – cDNA (kDNK)
- PCR



Prajmeri za RT-PCR

- Oligo (dT) prajmeri nekoliko uzastopnih deoksitimina (dT) koji se po sistemu komplementarnosi lepe za 3' poli A repu (EUKARIOTI)
- Random prajmeri sekvence sa nasumičnim redosledom nukleotida – random heksameri
- **Specifični prajmeri**

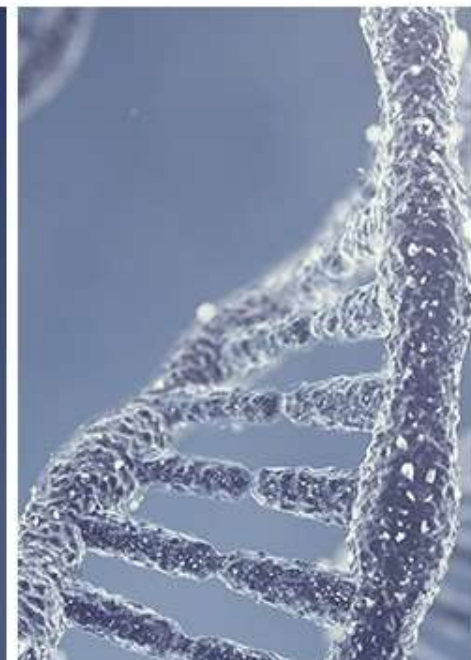


■ RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

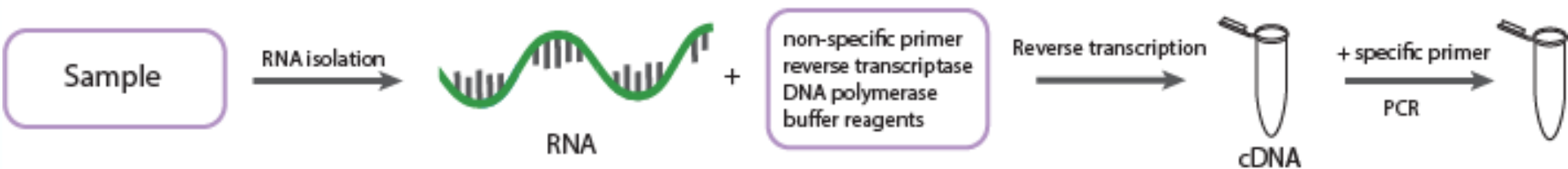
■ OneStep RT-PCR

■ TwoStep RT-PCR

1. Reverzna transkripcija
2. Amplifikacija



One-step RT-PCR

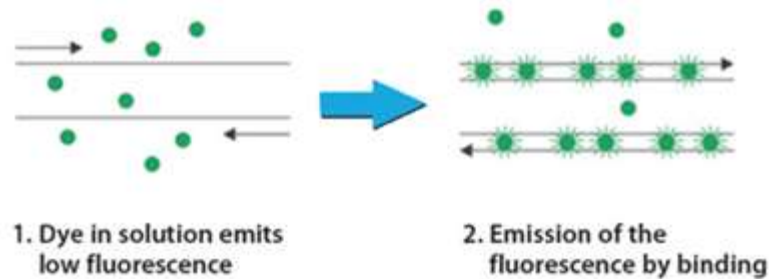


Two-step RT-PCR

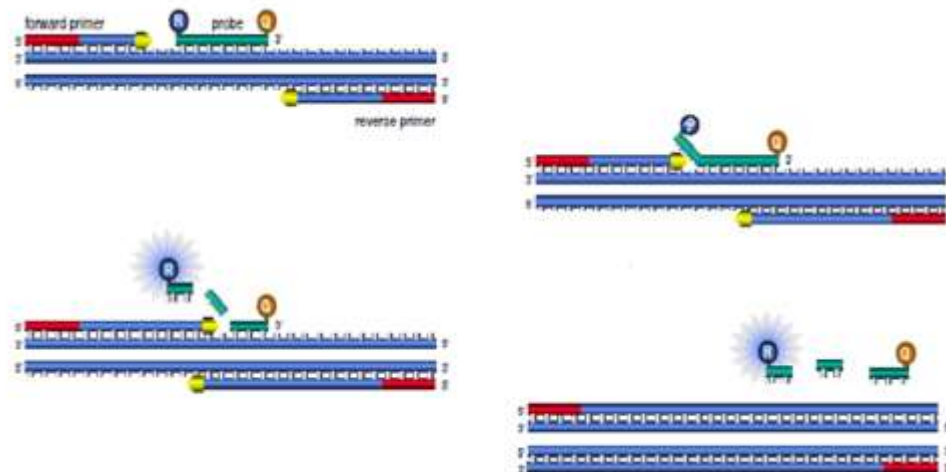
Kako real-time PCR radi?

- Razvijene su dve različite real-time PCR tehnologije:

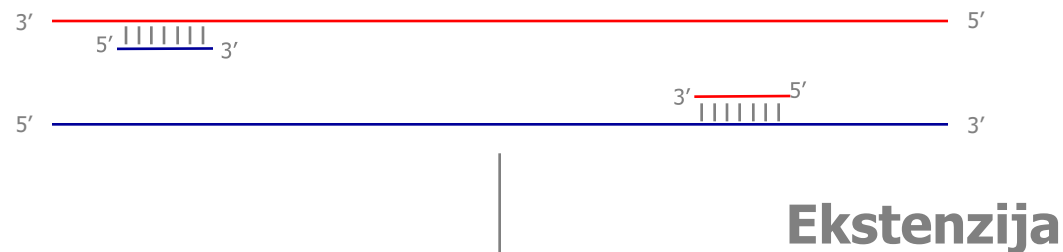
1. SYBR-Green® tehnologija



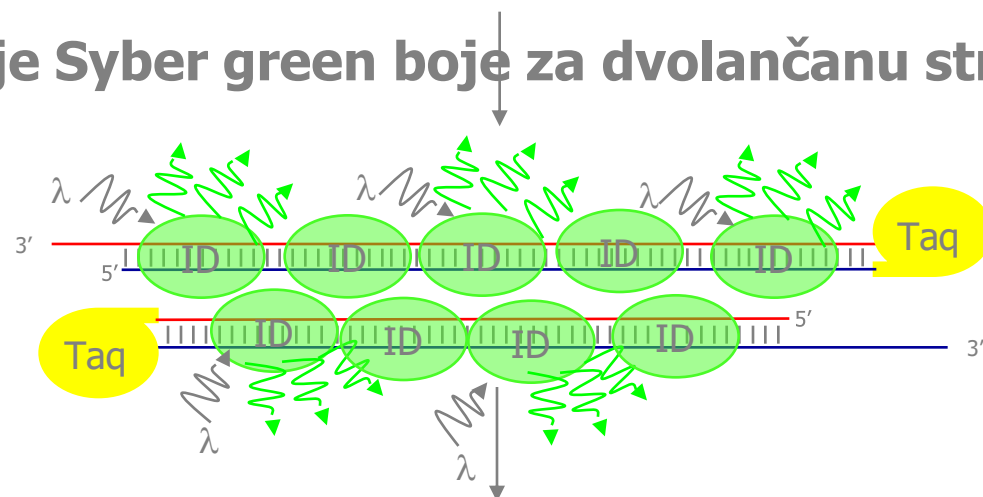
2. TaqMan® probe tehnologija



1. SYBR-Green[®] tehnologija



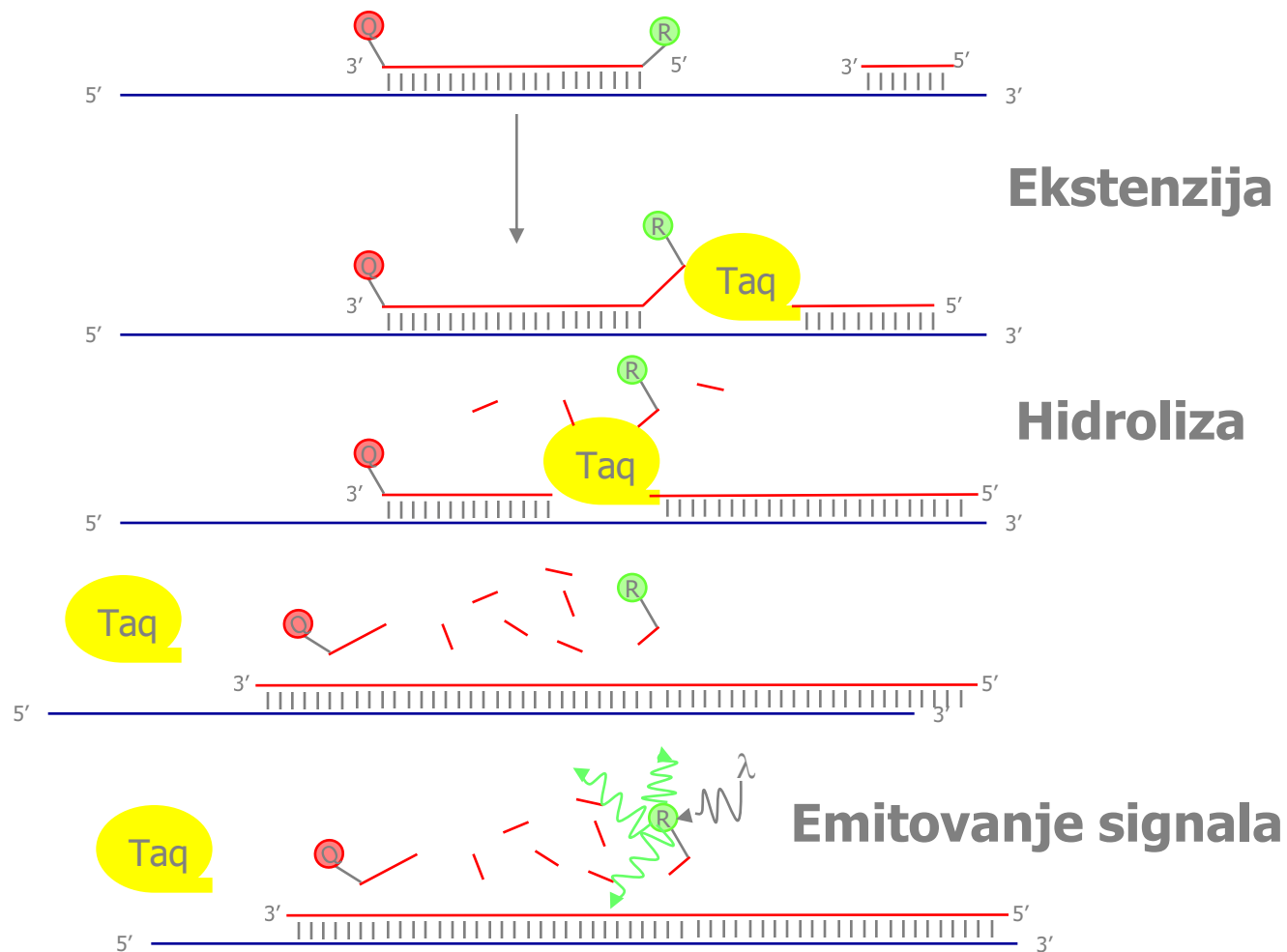
Vezivanje Syber green boje za dvolančanu strukturu

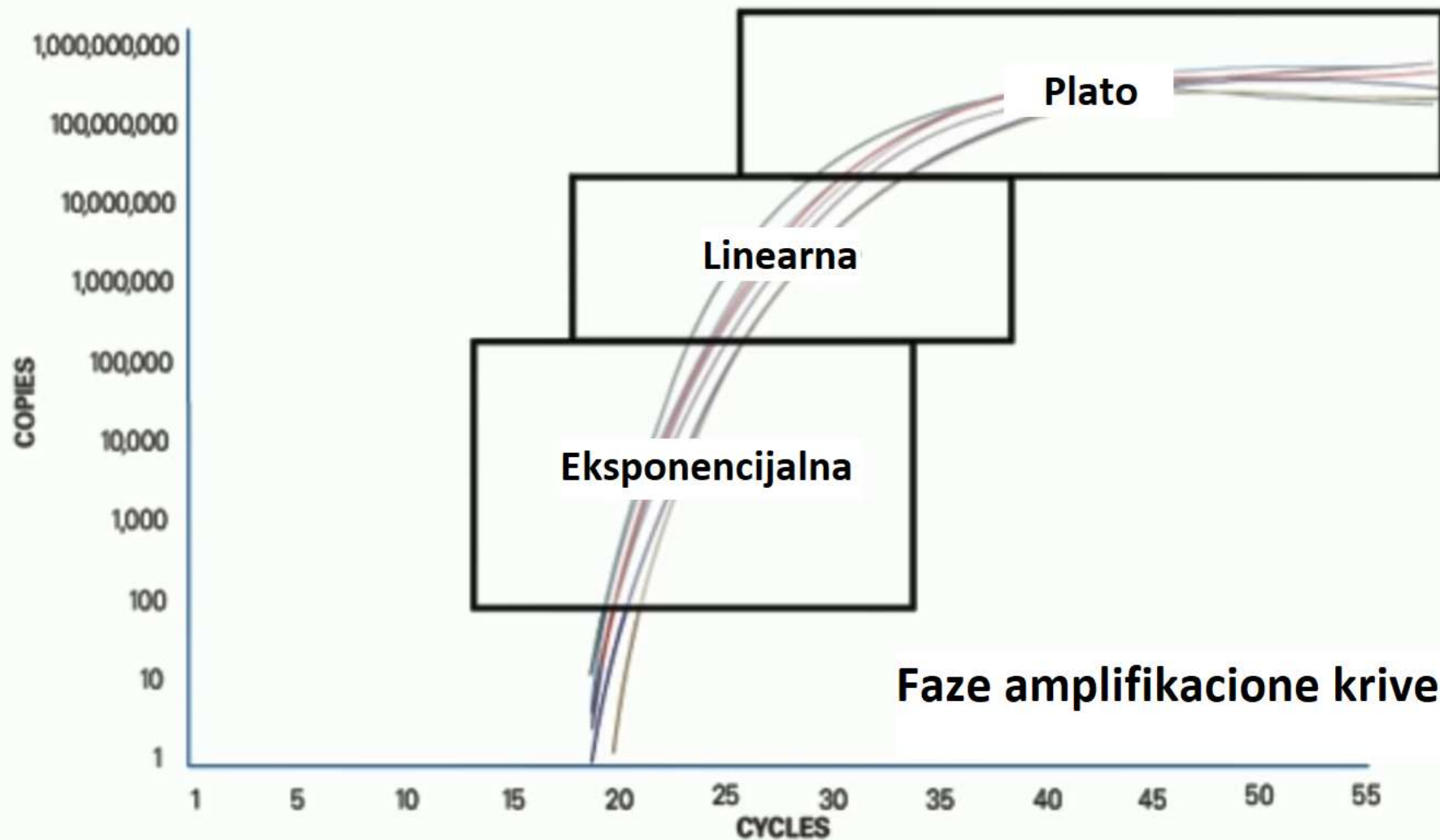


Emitovanje fluorescentnog signala

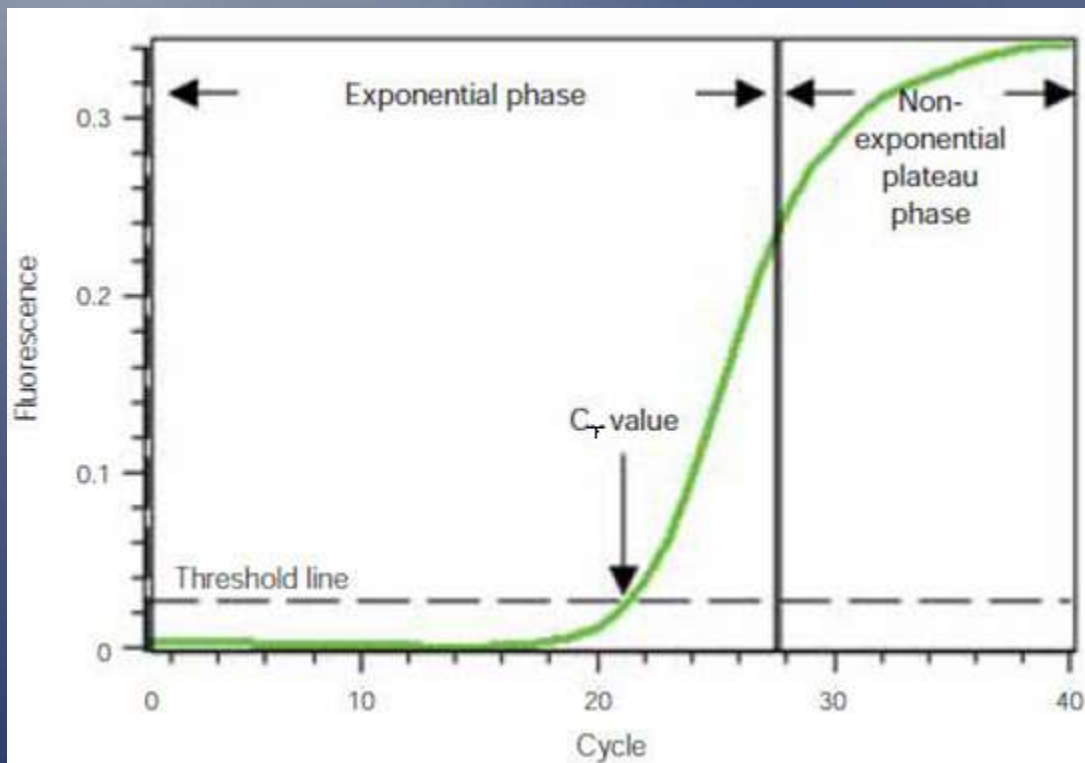
Kada se SYBER+DNK kompleks osvetljava sa svetlošću 490nm, on fluorescira na 520nm

2. TaqMan[®] probe tehnologija





Amplifikaciona kriva



Ct vrednost definiše broj ciklusa kada amplifikaciona kriva preseče threshold.

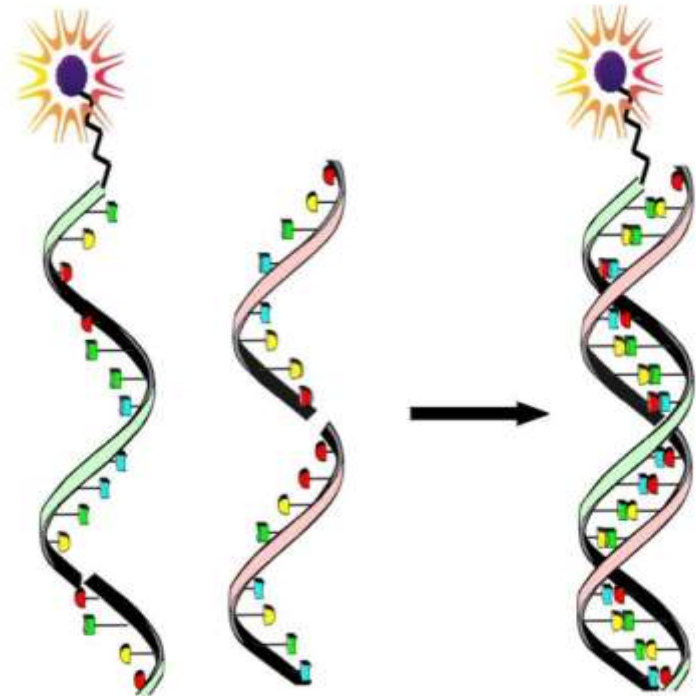


TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

Hibridizacija
nukleinskih kiselina

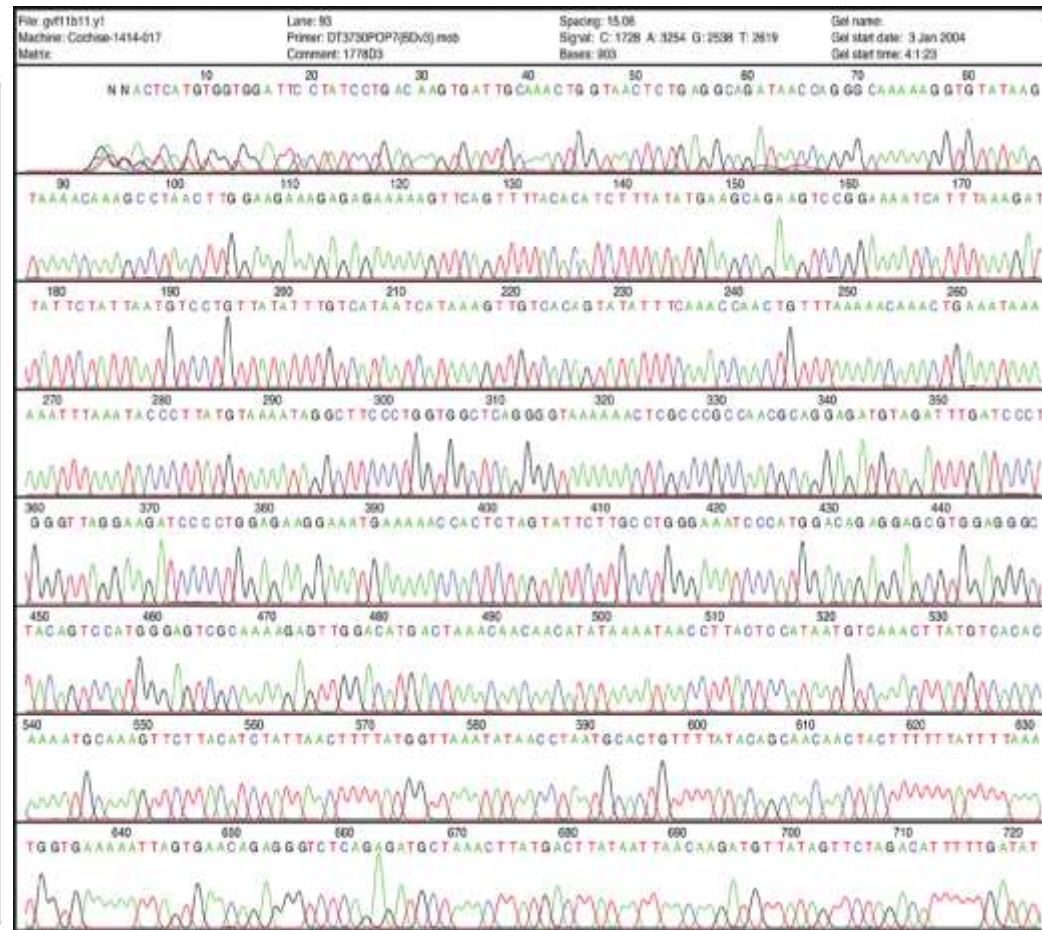
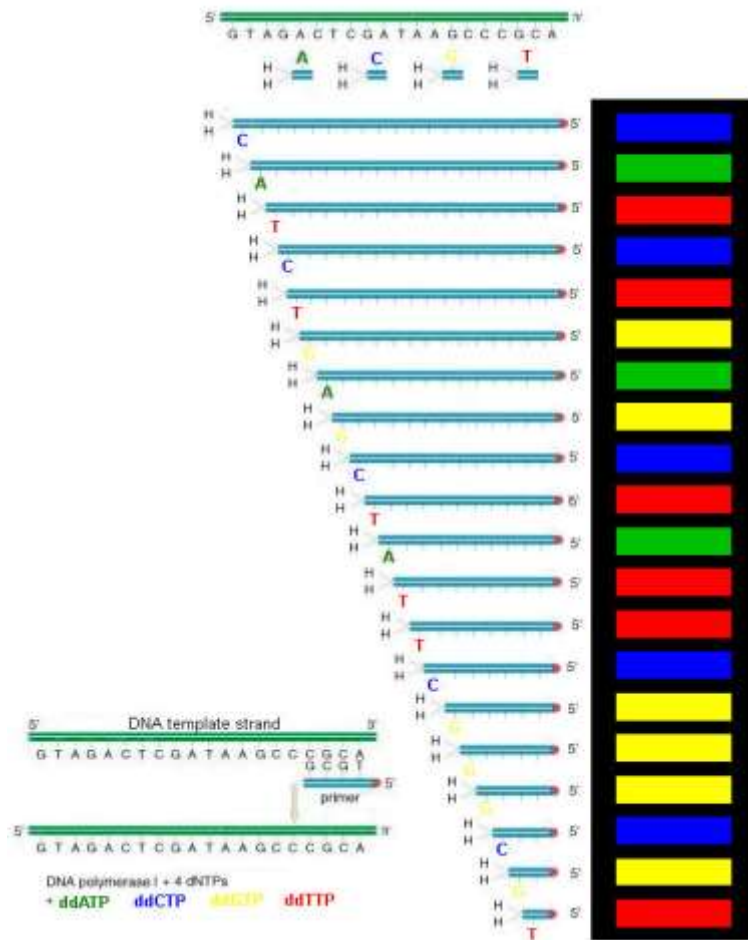
DNK-DNK
DNK-RNK

**PRONALAŽENJE SRODNIH
GENA KOD RAZLIČITIH VRSTA**



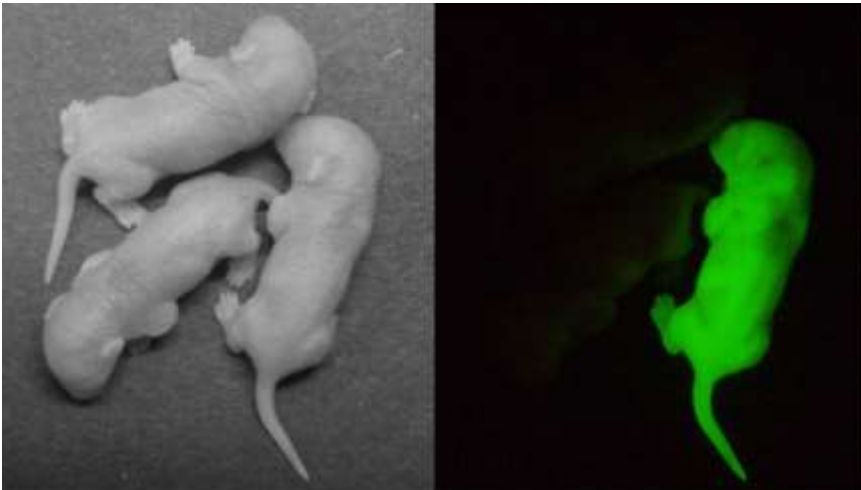
TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

SEKVENCONIRANJE DNK



TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

□ Primena genetskog inženjeringa





MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA U VETERINARSKOJ MEDICINI



- Primena molekularnih tehnika u selekciji životinja
 - ▣ genomsko testiranje priplodnjaka
 - ▣ polimorfizam gena koji kodiraju sintezu proteina mleka
 - ▣ dokazivanje vrste mesa u prehrambenim proizvodima
 - ▣ sprečavanje krivolova
 - ▣ određivanje pola ptica i sisara

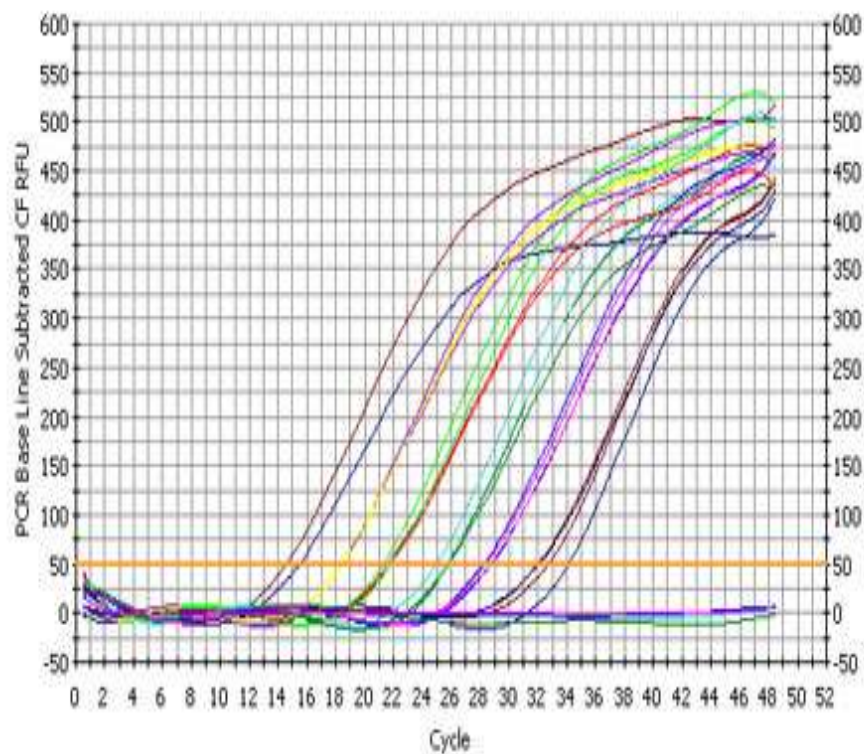
- Primena u detekciji naslednog materijala različitih patogena
 - ▣ patogeni pčela - virusi, bakterije, mikrosporidije
 - ▣ patogeni domaćih životinja
 - virusne bolesti pasa i mačaka - štenećak, parvoviroza, panleukopenija mačaka, FIV
 - parazitarna oboljenja domaćih životinja - babezioza, tajlerioza, dirofilarioza
 - ▣ patogeni divljih životinja - BTV, TVE ...



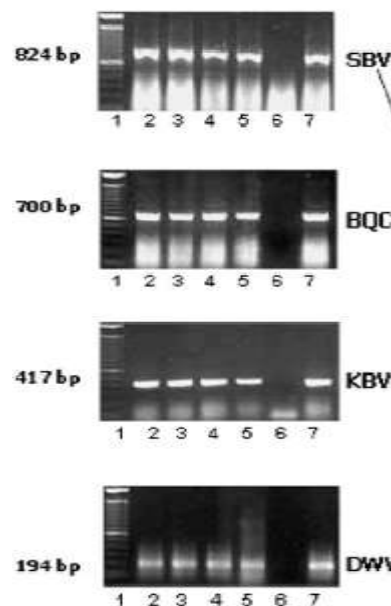




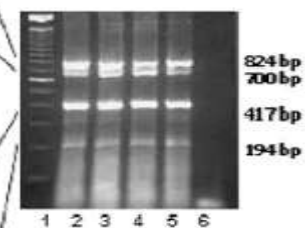




A: Uniplex RT-PCR



B: Multiplex RT-PCR



USLUGE

u Laboratoriji za genetiku životinja na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine

Naziv usluge / analize	Cena po UZORKU u dinarima (sa PDV-om)	
Utvrđivanje pola kod ptica (PCR)	3000	
Analiza pčela na prisustvo virusa <i>ABPV</i> , <i>CBPV</i> , <i>DWV</i> (real-time PCR)	3400 (jedan virus) 3800 (dva virusa) 4200 (tri virusa)	2500 (jedan virus) 3000 (dva virusa) 3500 (tri virusa) #
Utvrđivanje vrste mikrosporidije roda <i>Nosema</i> kod pčela (duplex PCR i PCR-RFLP)	2000	
Utvrđivanje vrste mikrosporidije roda <i>Nosema</i> i protoze roda <i>Lotmaria</i> kod pčela (PCR, duplex PCR i PCR-RFLP)	2350	
Utvrđivanje vrste mikrosporidije roda <i>Nosema</i> i protoza <i>Lotmaria</i> i <i>Crithidia</i> kod pčela (PCR, duplex PCR i PCR-RFLP)	2750	
Analiza pčela na prisustvo nozeme	300 (za manje od 10 uzoraka) 120 (za 10 i preko 10 uzoraka)	
Utvrđivanje prisustva protozoa <i>Lotmaria passim</i> kod pčela (PCR)	2000	
Kvantitativno određivanje protozoa <i>Lotmaria passim</i> kod pčela (real-time PCR)	1700 (preko 100 uzoraka) 2000	
Utvrđivanje prisustva protozoa <i>Crithidia mellificae</i> (PCR)	1850 (preko 100 uzoraka) 2000	
Kvantitativno određivanje protozoa <i>Crithidia mellificae</i> kod pčela (real-time PCR)	1700 (preko 100 uzoraka) 2000	
Utvrđivanje prisustva protozoa <i>Lotmaria passim</i> i <i>Crithidia mellificae</i> (PCR)	1850 (preko 100 uzoraka) 2350	
Kvantitativno određivanje protozoa <i>Lotmaria passim</i> i <i>Crithidia mellificae</i> kod pčela (real-time PCR)	2000 (preko 100 uzoraka) 2350	
Određivanje haplotipa pčelinjeg krpelja <i>Varroa destructor</i>	2250 (preko 100 uzoraka) 2400	
Genotipizacija uzročnika američke truleži <i>Poenibacillus larvae</i> (rep-PCR)	2400	
Diferencijalna dijagnostika <i>Poenibacillus larvae</i> i virusa mešinstog legla (SPV) (rep-PCR, real-time PCR)	5800	
Utvrđivanje prisustva uzročnika "bolesti kijuna i para" – <i>PBFD</i> (PCR)	2400	
Dijagnostika bolesti policističkih bubrega (PKD) kod mačaka analizom DNK (PCR-RFLP)*	2400	
Utvrđivanje prisustva <i>Babesia sp.</i> - uzročnika babezioze pasa (PCR)*	2400	

Utvrđivanje prisustva <i>Dirofilaria repens</i> (PCR)*	2400
Utvrđivanje prisustva i specifijska identifikacija <i>Dirofilaria immitis</i> i <i>Dirofilaria repens</i> (PCR)*	3500
Utvrđivanje prisustva i specifijska identifikacija (PCR-RFLP) <i>Theilazia</i> – uzročnika telazioze	2400
Utvrđivanje prisustva uzročnika štenećaka pasa (RT-PCR)*	2400
Utvrđivanje prisustva uzročnika parvoviroze pasa/panleukopenije mačaka (PCR)*	2400
Utvrđivanje prisustva bakterije <i>Lawsonia intracellularis</i> (real time PCR)	2600
Utvrđivanje prisustva bakterije <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> (real time PCR)	2600
Utvrđivanje prisustva bakterije <i>Brachyspira pilosicoli</i> (real time PCR)	2600
Utvrđivanje prisustva i specifijska identifikacija <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> i <i>Brachyspira pilosicoli</i> (real time PCR)	2900
Utvrđivanje prisustva bakterije <i>Lawsonia intracellularis</i> i specifijska identifikacija <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> i <i>Brachyspira pilosicoli</i> (real time PCR)	3300
Utvrđivanje pedigreea goveda (PCR)	cena po dogovoru u zavisnosti od broja uzoraka
Određivanje genotipa za defensin, laktoferin i leptin kod goveda	2400 za svaki gen
Određivanje genotipa za kazein i laktoglobulin kod goveda	2400 za svaki gen
Genotipizacija magaraca	cena po dogovoru u zavisnosti od broja uzoraka
Određivanje specifijskog porekla mesa	2400
Analiza ekspresije gena za immune peptide insekata	2000
Komet test - utvrđivanje mutagenih efekata	3670
Kariotip iz periferne krvi	4850
Ekspertize u domenu delatnosti	22200
* U okviru saradnje sa Katedrom za bolesti životinja, mesojeda, živine i divljači	
# Subvencionisane cene u okviru "projektnih" istraživanja	

Beograd: 15. 09. 2016.

Šef katedre za biologiju
i rukovodilac Projekta III 46002
prof. dr Zoran Stanimirović

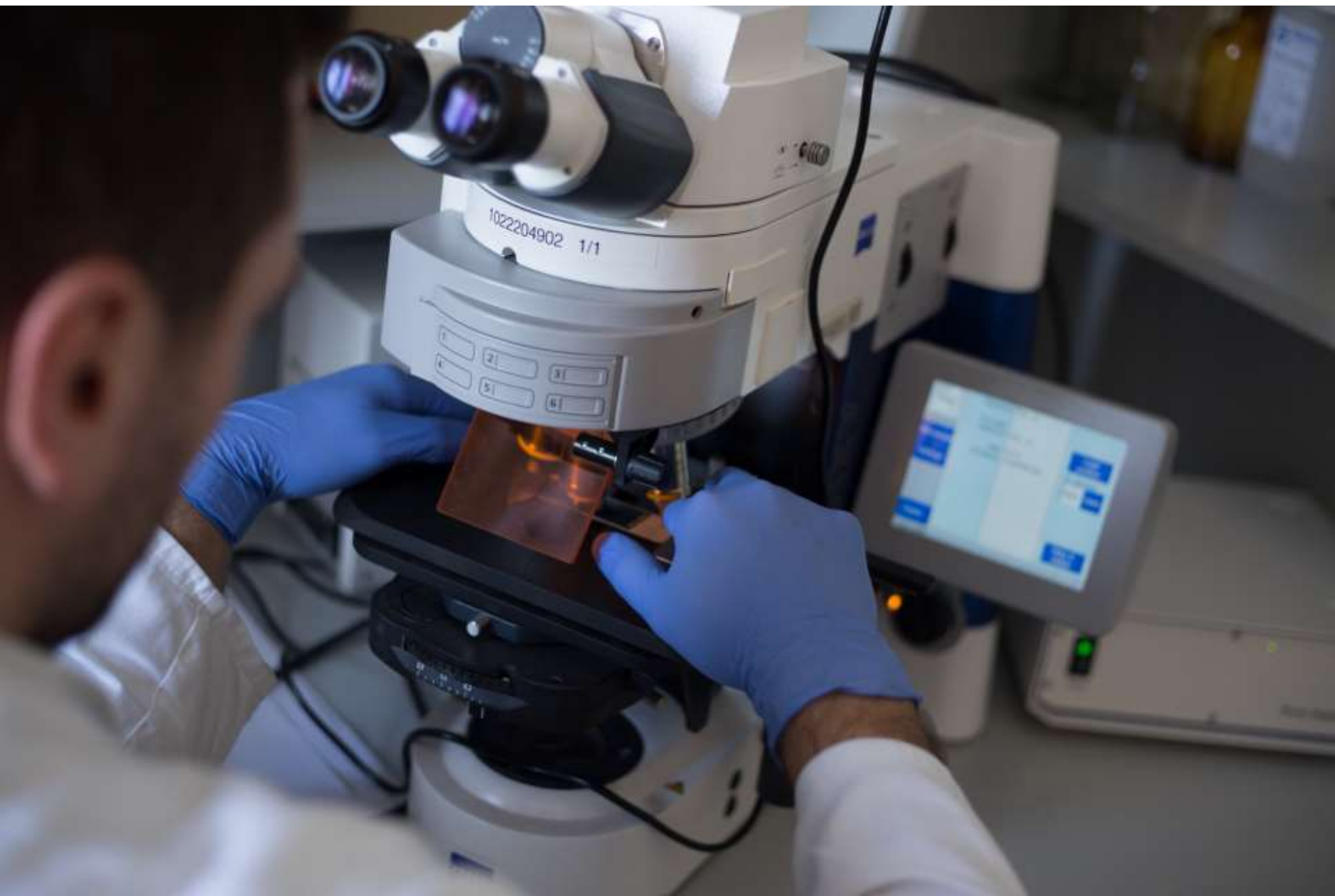


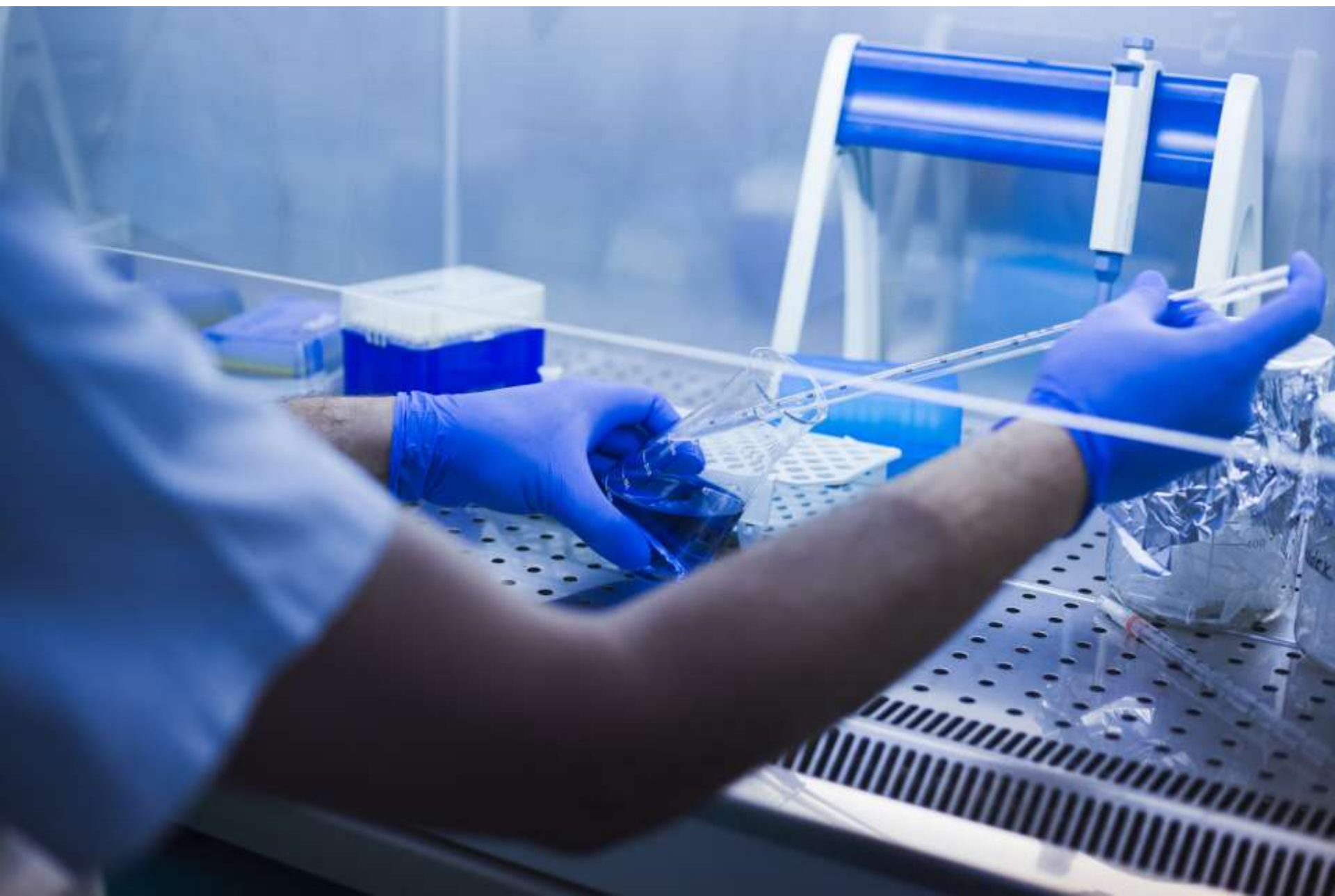










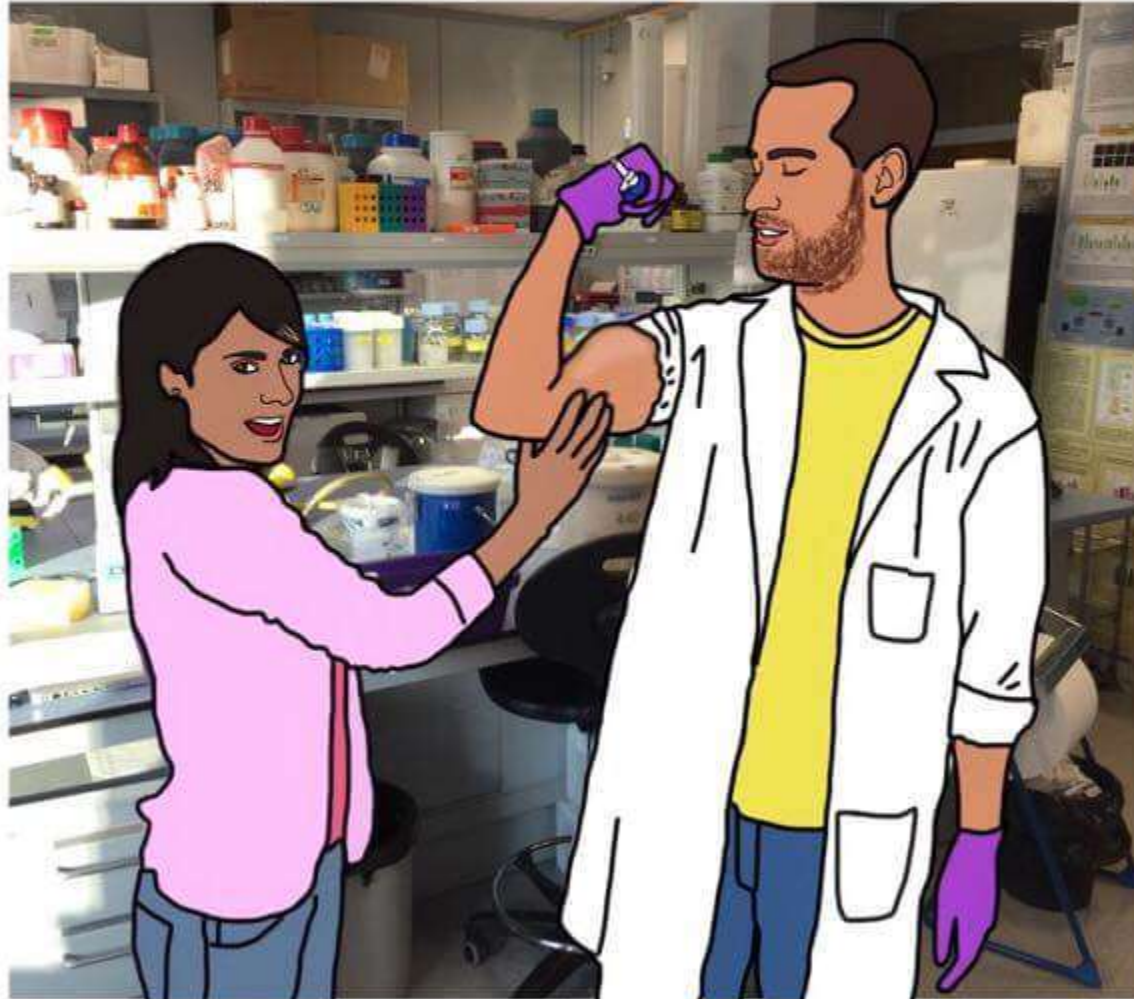


GENOMIKA

- Genomika je naučna oblast nastala kao rezultat dostignuća molekularne biologije i razvoja tehnika kojima je moguće odrediti sekvencu nukleinskih kiselina.
- Predmet istraživanja su genomi pojedinih vrsta
- Istraživanja multidisciplinarna:
 - ▣ struktura i sastav gena
 - ▣ genska ekspresija
 - ▣ funkcija proteina

How do you build muscle?

Pipetting baby





The story of my life



PEOPLE



ME

Veterinari u Srbiji, Kragujevac 1903. godine





HVALA NA PAŽNJI!!!

