

Deň vedy vo Výskumnom centre AgroBioTech



RNDr. Hana Ďúranová, PhD., RNDr. Veronika Fialková, PhD.
Dr. Ing. Miroslava Požgajová

Nitra, 6.11.2018

Integrálne laboratóriá Výskumného centra AgroBioTech

**Laboratórium
mikroskopických analýz**



**Laboratórium
spektroskopických analýz**



**Laboratórium
genetických analýz**



Laboratórium mikroskopických analýz

RNDr. Hana Ďúranová, PhD.



Nitra, 6.11.2018

Laboratórium mikroskopických analýz

Prístrojové vybavenie

Ultramikrotóm LEICA EM UC7



**Invertný fluorescenčný mikroskop LEICA
DMI 6000B s kamerou DCF 345 FX**



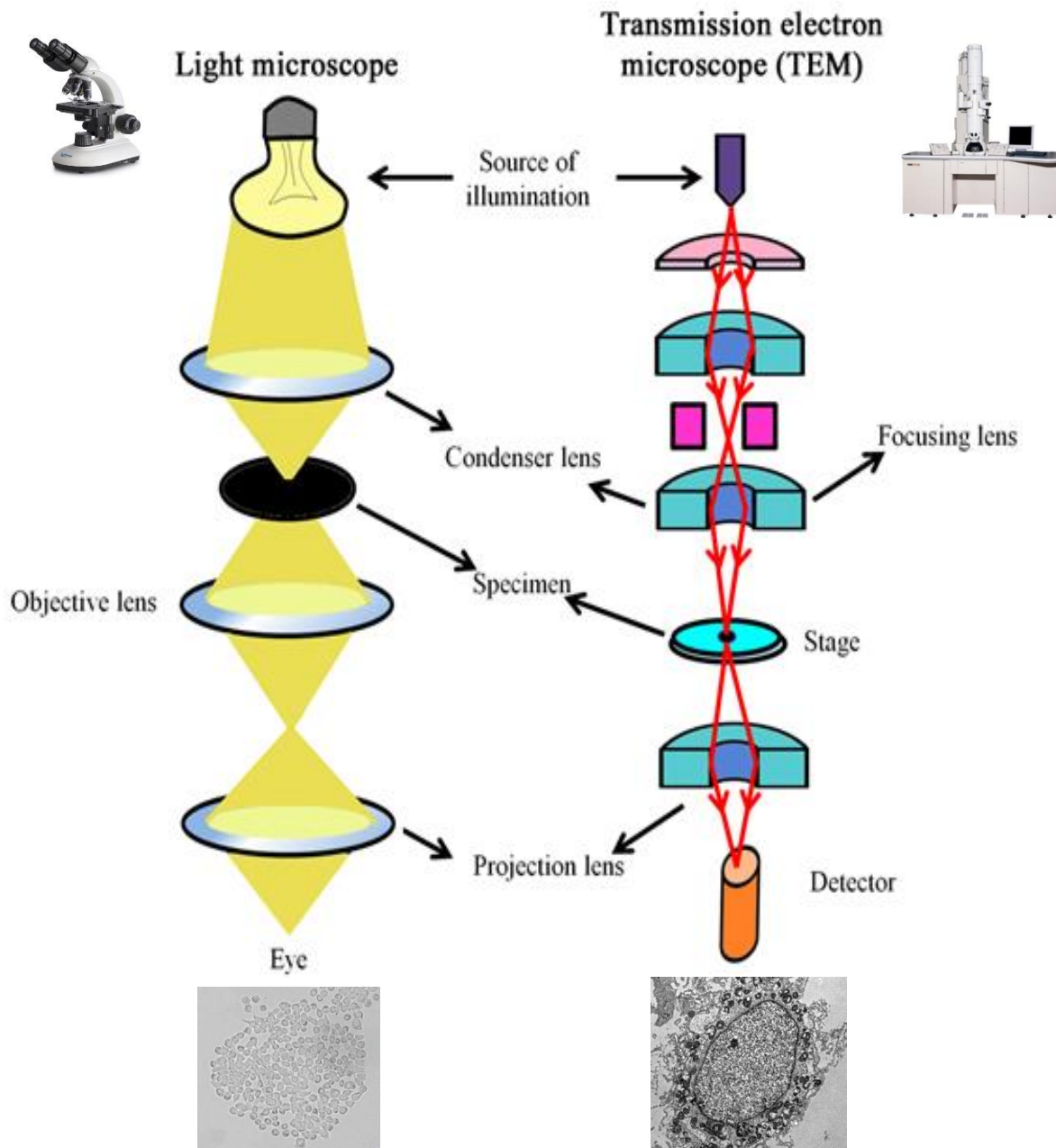
Kryotóm LEICA CM 1950



**Transmisný elektrónový mikroskop JEM-
2100 JEOL**



Transmisná elektrónová mikroskopia



$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_e e U}}$$

$$\begin{aligned} h &= 6,626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s} \\ m_e &= 9,109 \times 10^{-31} \text{ kg} \\ e &= 1,602 \times 10^{-19} \text{ C} \end{aligned}$$

λ viditeľného svetla:

380 – 780 nm

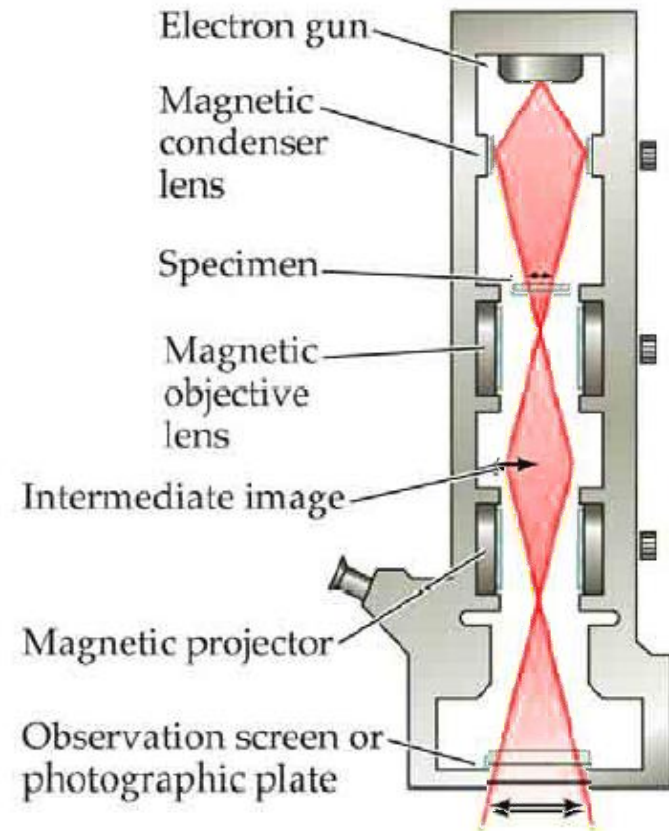
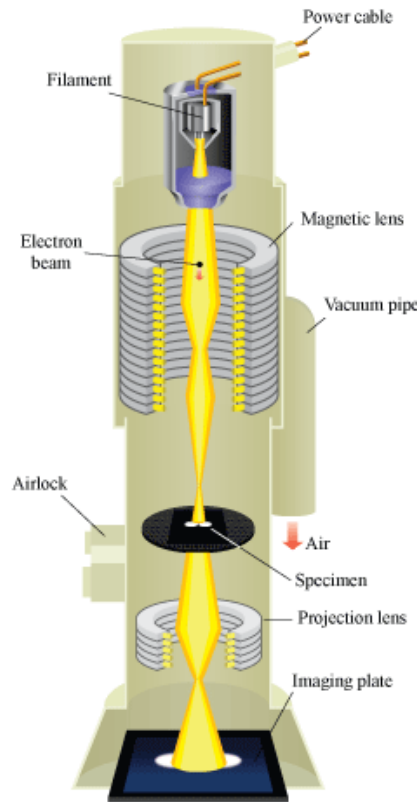
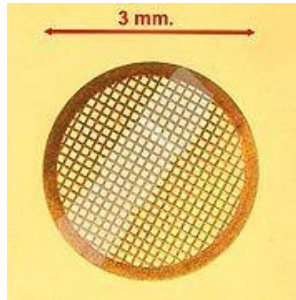
λ elektrónového lúča:

0,0037 nm pri 100 kV

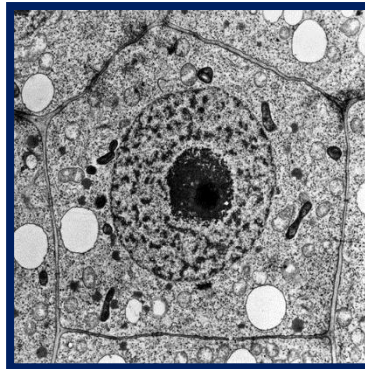
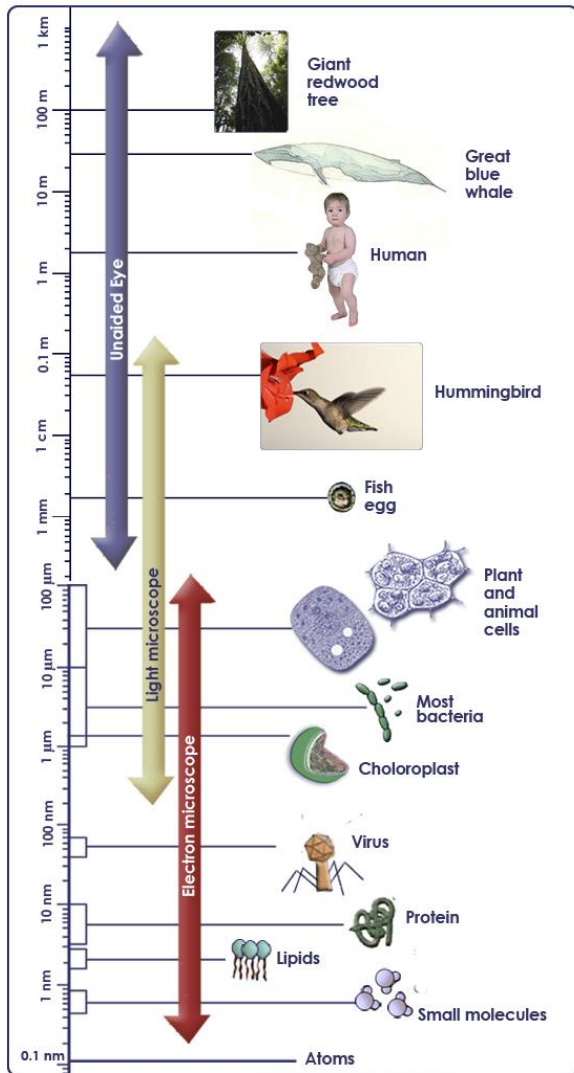
0,0025 nm pri 200 kV

Transmisná elektrónová mikroskopia

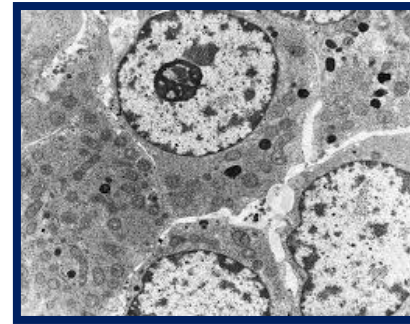
- zdroj elektrónov
- zdroj vysokého napätia (200 kV)
- až 1 500 000x zväčšenie
- 60-80 nm hrubé preparáty



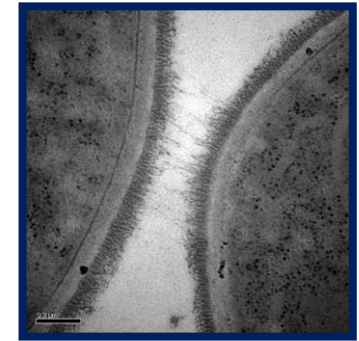
Transmisná elektrónová mikroskopia



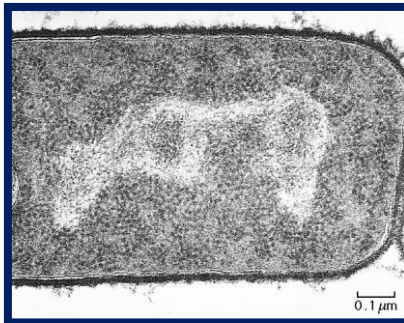
Zdroj: <http://www.vcbio.science.ru.nl/en/image-gallery/electron/>



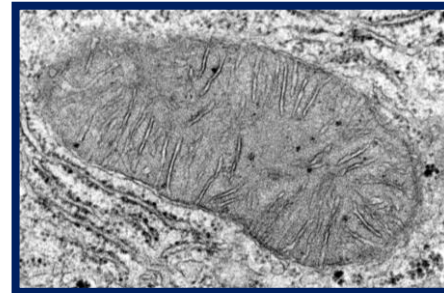
Zdroj: <https://www.sciencesource.com/archive/-SS2476251.html#/SearchResult&ITEMID=SS2476251>



Zdroj: <https://www.journals.elsevier.com/the-cell-surface/news/the-cell-surface-a-new-interdisciplinary-journal-on-cell-wall>



Zdroj: <http://www.austincc.edu/rlewis3/model.html>



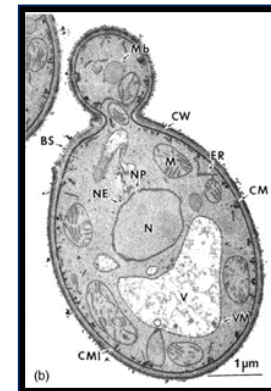
Zdroj: <http://dr-monsrs.net/2015/05/20/introduction-to-art-and-science/mito/>



Zdroj: <https://www.gettyimages.co.uk/detail/photo/transmission-electron-micrograph-showing-high-res-stock-photography/128619942>

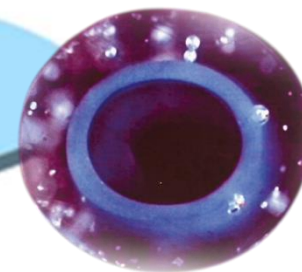
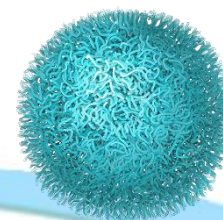
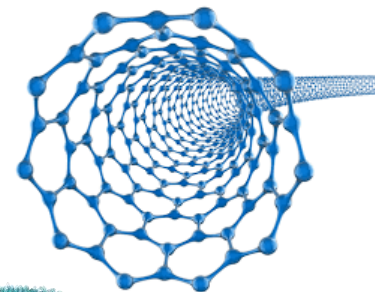
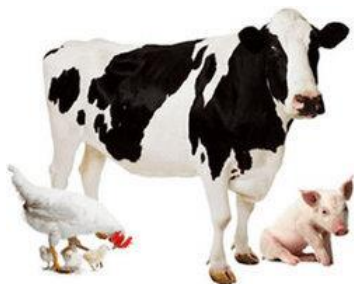


Zdroj: <https://bionews-tx.com/news/2014/08/07/utmb-experts-battling-ebola-in-labs-and-on-the-front-lines/>

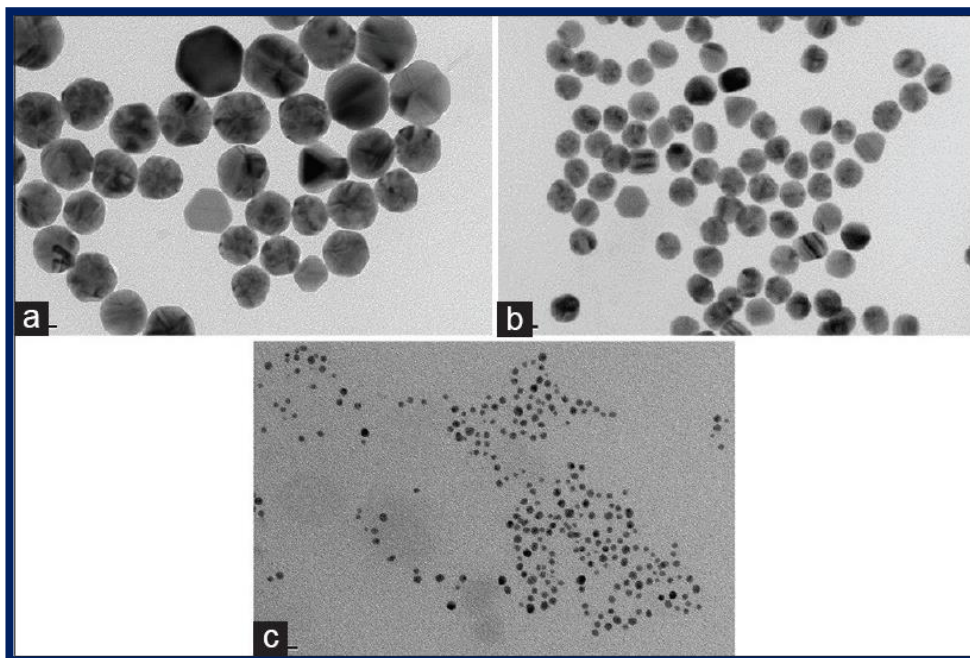


Zdroj: <https://academic.oup.com/jmicro/article/61/6/343/1989282>

Možnosti využitia transmisnej elektrónovej mikroskopie vo výskume

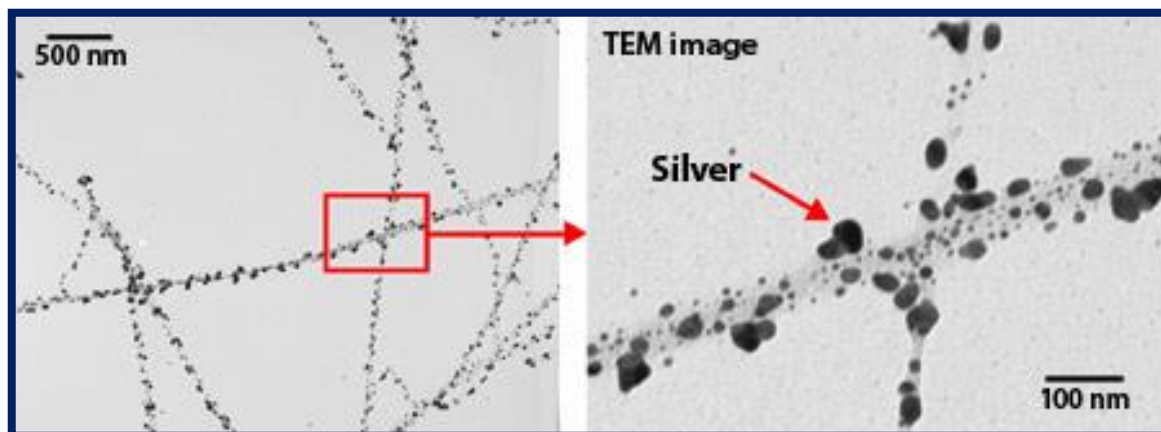


Transmisná elektrónová mikroskopia a nanočastice



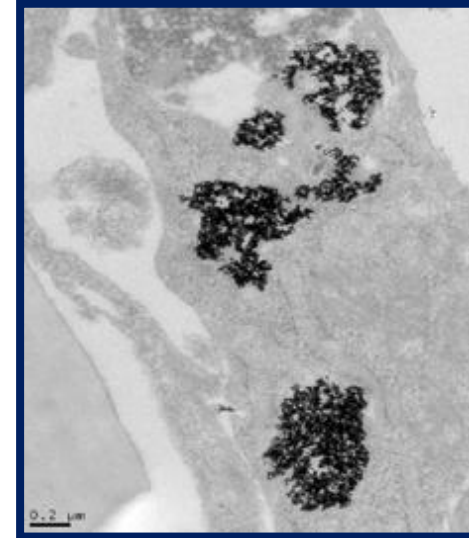
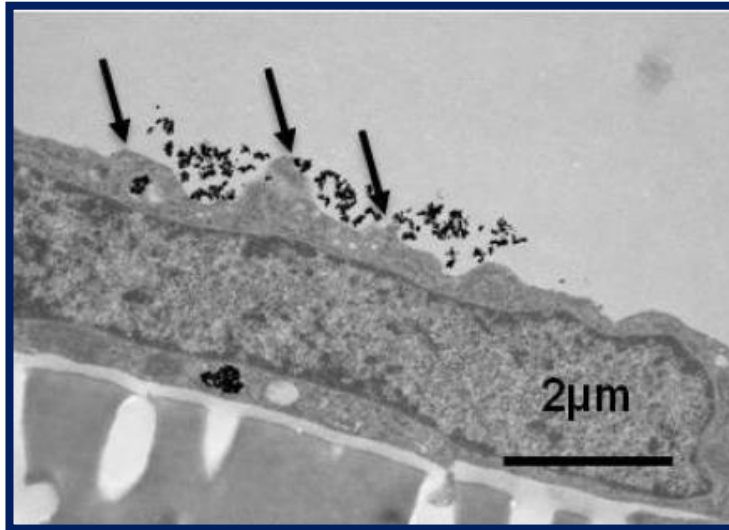
- a) 25 nm nanočastice Au
- b) 15 nm nanočastice Au
- c) 5 nm nanočastice Au

Zdroj: http://www.jfsmonline.com/viewimage.asp?img=JForensicSciMed_2016_2_4_195_197934_f4.jpg

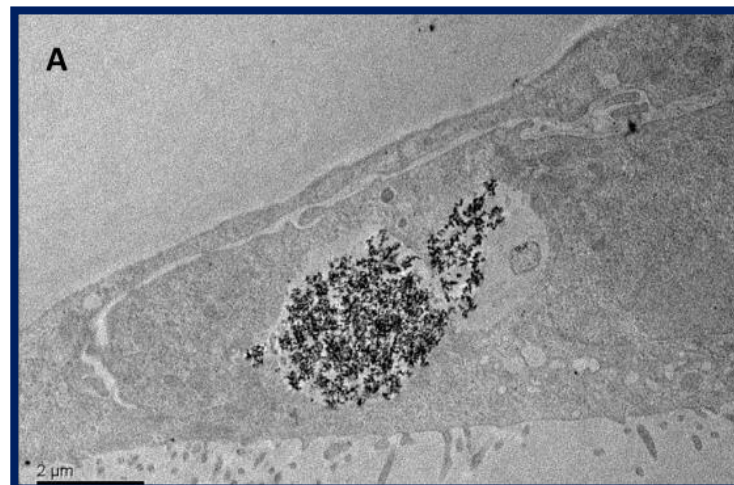


Zdroj: https://www.fs.fed.us/research/highlights/highlights_display.php?in_high_id=301

Transmisná elektrónová mikroskopia a bionanotechnológia

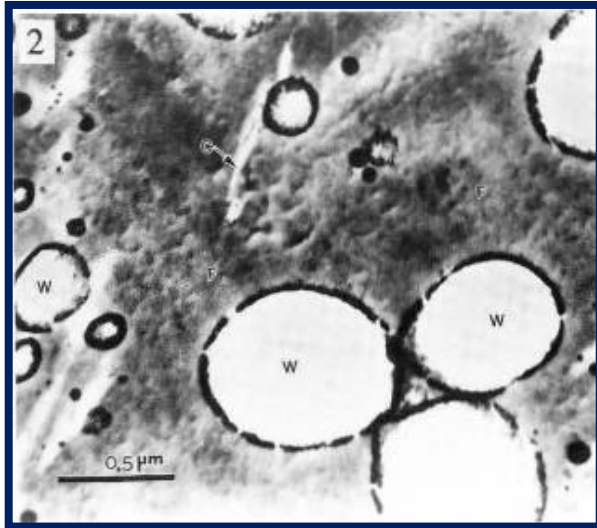


Zdroj: <https://www.omicsonline.org/impact-of-gold-nanoparticle-concentration-on-their-cellular-uptake-by-mc3t3-e1-mouse-osteocytic-cells-as-analyzed-by-transmission-electron-microscopy-2157-7439.1000118.php?aid=2473>

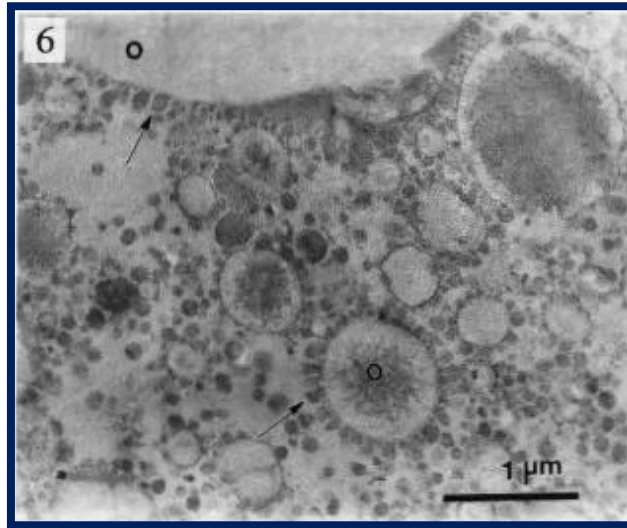


Zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2621238/>

Transmisná elektrónová mikroskopia a kvalita potravín

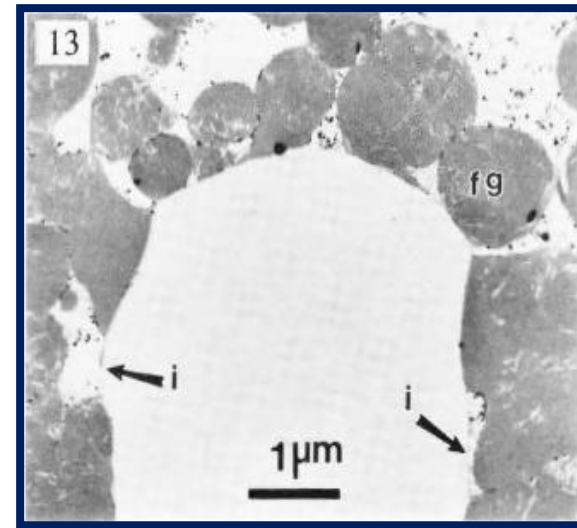


Ultraštruktúra margarínu

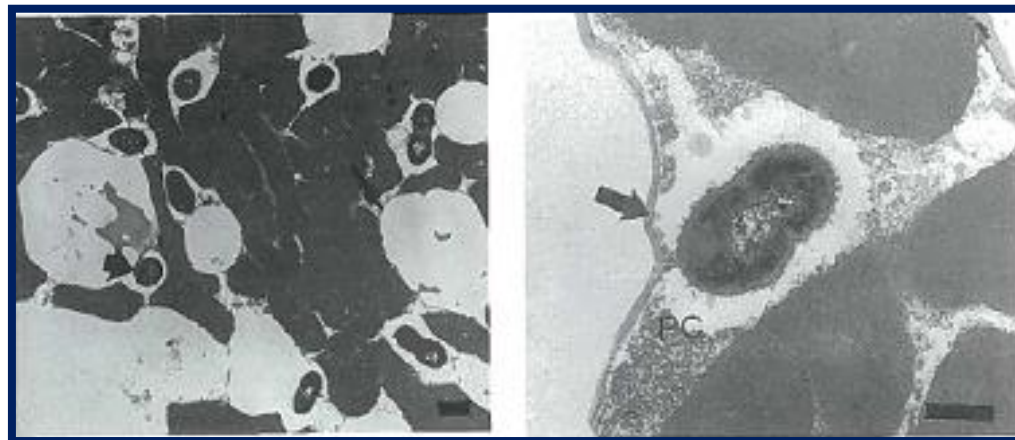


Homogenizované mlieko

Zdroj: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213329113000026>



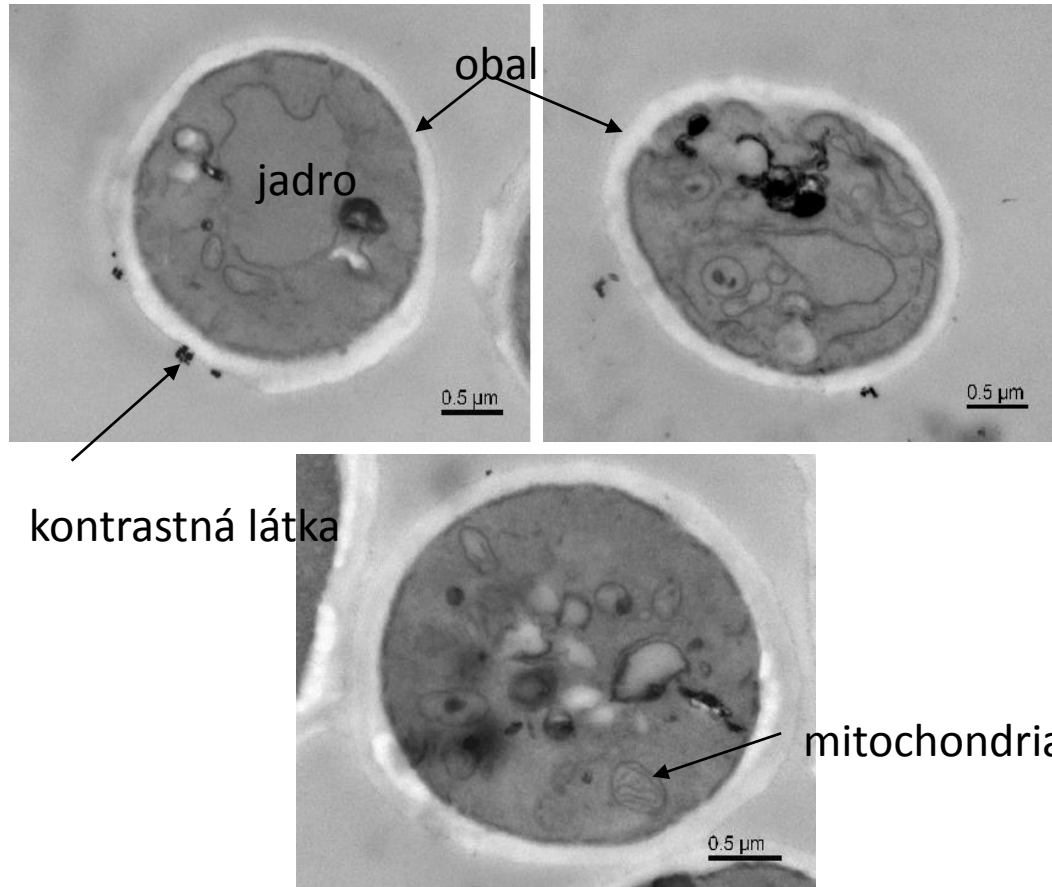
Ultraštruktúra šľahačky



Lactococcus lactis subsp. *cremoris* v plnotučnom syre Cheddar

Zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4332360/>

Transmisná elektrónová mikroskopia a *Schizosachcaromyces pombe*

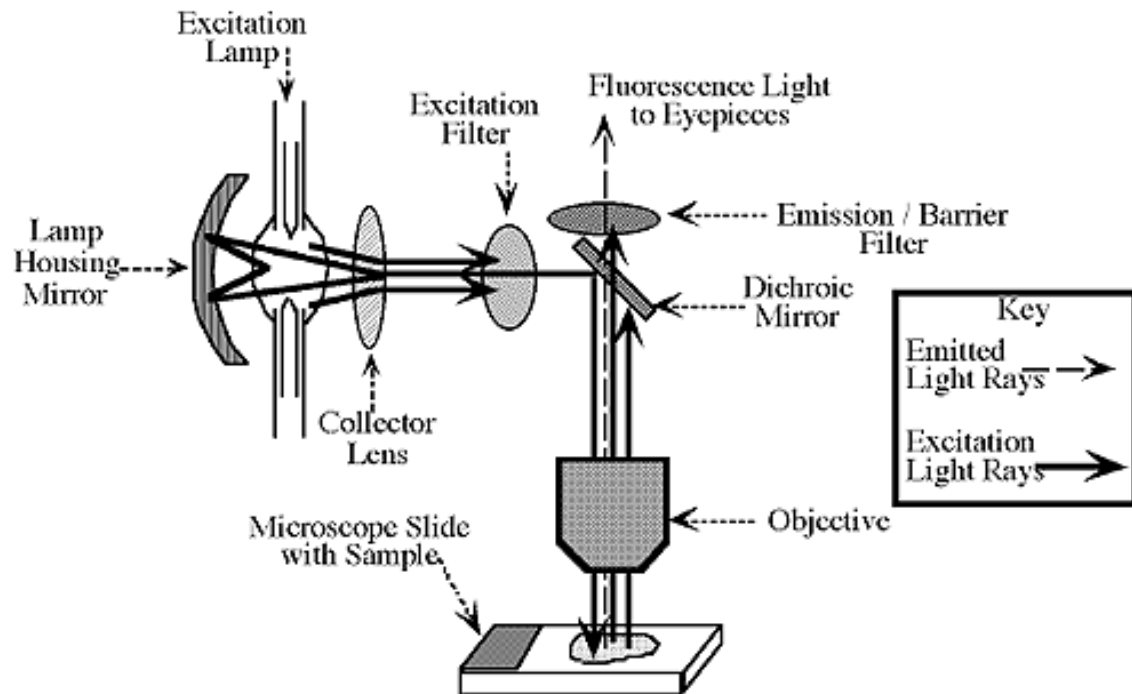


Fluorescenčná mikroskopia

Princíp

- osvetlenie fluorescenčných molekúl v testovanej vzorke do vyvolá excitáciu elektrónov do vyššieho energetického stupňa a vyžiarí sa svetlo
- Emitované žiarenie je oproti pôvodnému posunuté do dlhších vlnových dĺžok.

Základné komponenty fluorescenčného mikroskopu



Zdroj: <https://www.molecular.abbott/us/en/vysis-fish-knowledge-center/microscope-filters>

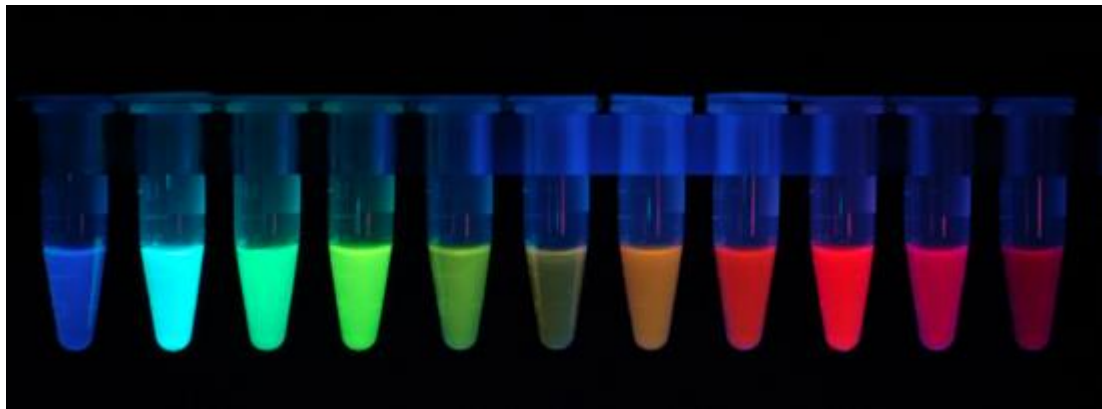
Fluorescenčná mikroskopia

Fluorescencia na bunkovej úrovni

Zdroje fluorescencie:

- Fluorescencia tvorená proteínmi
- Fluorescencia tvorená malými molekulami

Prvý **fluorescenčný proteín** „GFP“ bol izolovaný v roku 1960 z medúzy vedcom Osamu Shimomura. Počas ďalších rokov, ako stúpil záujem vedcov o vizualizáciu rôznych komponentov bunky, bola vytvorená celá paleta fluorescenčných proteínov modifikovaním GFP (ako napr. red fluorescent protein, cyan fluorescent protein, yellow fluorescent protein a pod.).



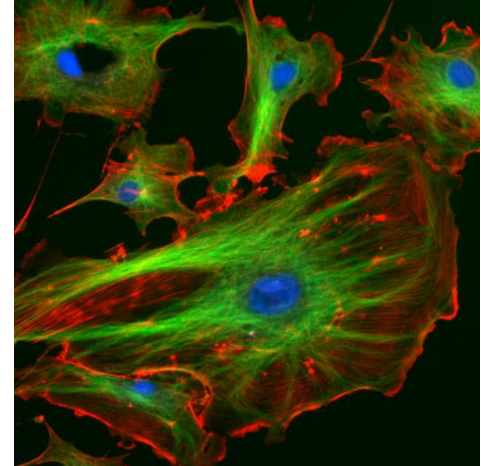
Panel fluorescenčných proteínov

Malé molekuly, ako napr. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) síce nie sú proteíny, napriek tomu, sú schopné produkovať fluorescenciu. DAPI vizualizuje DNA tak, že prejde cez bunkovú membránu a naviaže sa na DNA. Prípadne sa malou molekulou označí protilátka, špecificky sa viažuca na študovaný proteín.

Možnosti využitia fluorescenčnej mikroskopie vo výskume

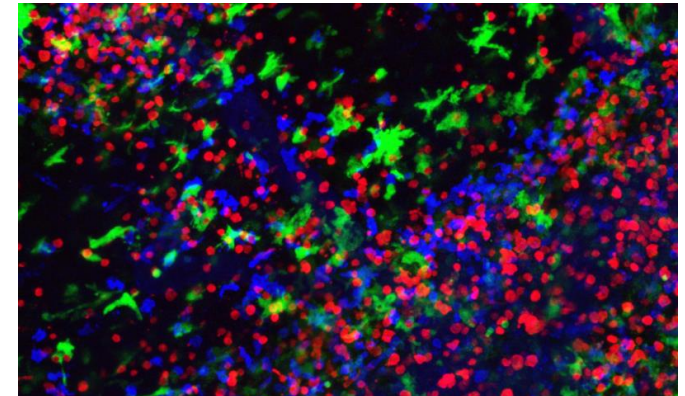
Využitie

- patrí ku kľúčovým technikám v odvetviach ako je imunológia, patológia, mikrobiológia, cytogenetika, ale aj v klinickej diagnostike, lokalizácia poškodenia buniek, tkanív a orgánov
- v biologických vedách - na zviditeľnenie fluorescenčne označených proteínov, sledovanie segregácie chromozómov, proteínovú interakciu, biochemických dejov



Štruktúra cytoskeletu cicavčej bunky: Jadro (DAPI), mikrotubuly (FITC), mikrofilamenty (TRITC)

Zdroj: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscopy.jpg>



Myeloid cells (green) redevelop the severity of multiple sclerosis by chemical signals that boost inflammation and attract autoimmune T cells (red) to the central nervous system.

Zdroj: <https://medicalxpress.com/news/2015-11-innate-immune-modulates-severity-multiple.html>

Laboratórium spektroskopických analýz

Dr. Ing. Miroslava Požgajová,

Mgr. Eva Kováčiková, PhD.



Nitra, 6.11.2018

Laboratórium spektroskopických analýz



Biochemický analyzátor



Spektrofotometer



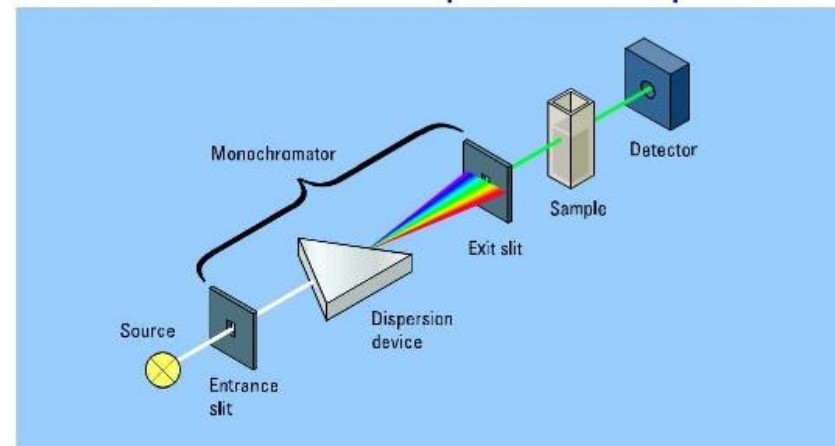
Spektrofotometer UV/VIS –
ultrafialovo-viditeľná spektroskopia

Laboratórium spektroskopických analýz

Spektroskopia:

- Využíva interakciu elektromagnetického žiarenia s látkou (atómami, molekulami, iónmi) na kvalitatívne prípadne kvantitatívne stanovenie jej vlastností alebo na štúdium fyzikálnych procesov

Measurement of optical absorption



Basic principle - split white light into component wavelengths using a dispersive element (e.g. a grating or prism). Measure how efficiently the different wavelengths are absorbed.

Využitie spektroskopických metód:

- analýza markerov oxidatívneho poškodenia buniek
- antioxidačná kapacita buniek
- biochemické parametre, hormonálny profil a rastové faktory v biologických tekutinách živočíchov i človeka
- stanovovanie obsahu vybraných látok v surovinách a potravinách rastlinného pôvodu

Laboratórium spektroskopických analýz

Analýzy:

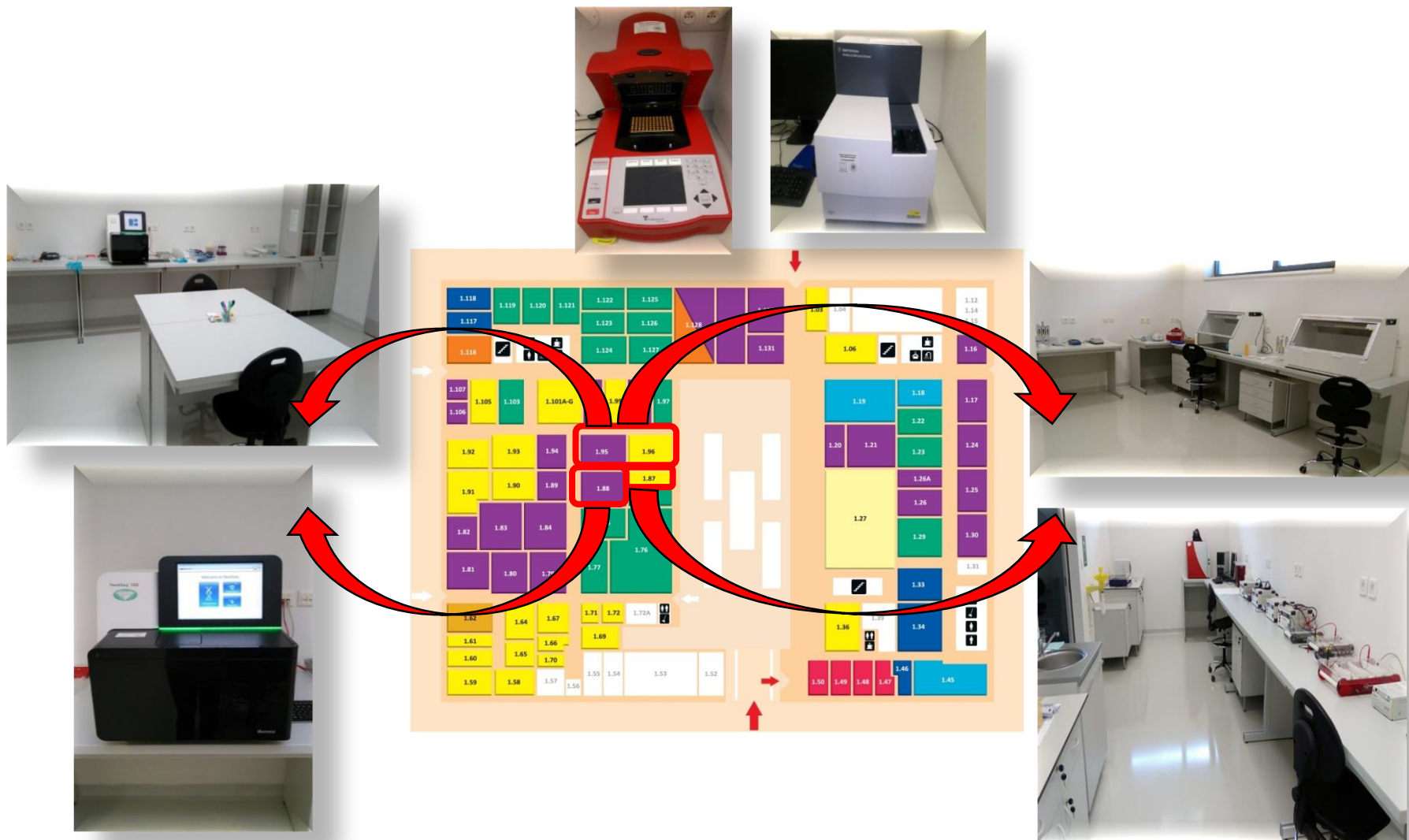
- koncentrácia hypofyzárnych peptidových hormónov (FSH, LH, prolaktín)
- koncentrácia pohlavných steroidných hormónov (testosterón, progesterón, androstendion, 17-beta-estradiol) a ich prekursorov (DHEA-S)
- koncentrácia rastových faktorov (IGF, TGF alfa, TGF beta) a ich receptorov
- aktivita pečňových enzýmov (AST, ALT, GGT, ALP)
- základné biochemické parametre krvi, moču i semennej plazmy
- parametre redoxného statusu (kataláza, redukovaný glutation, proteínové karbonyly)
- horkosť vo vybraných druhoch piva, sladiny a mladiny pri rôznom technologickom spracovaní

Laboratórium genetických analýz
RNDr. Veronika Fialková, PhD.,
Doc. Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD.



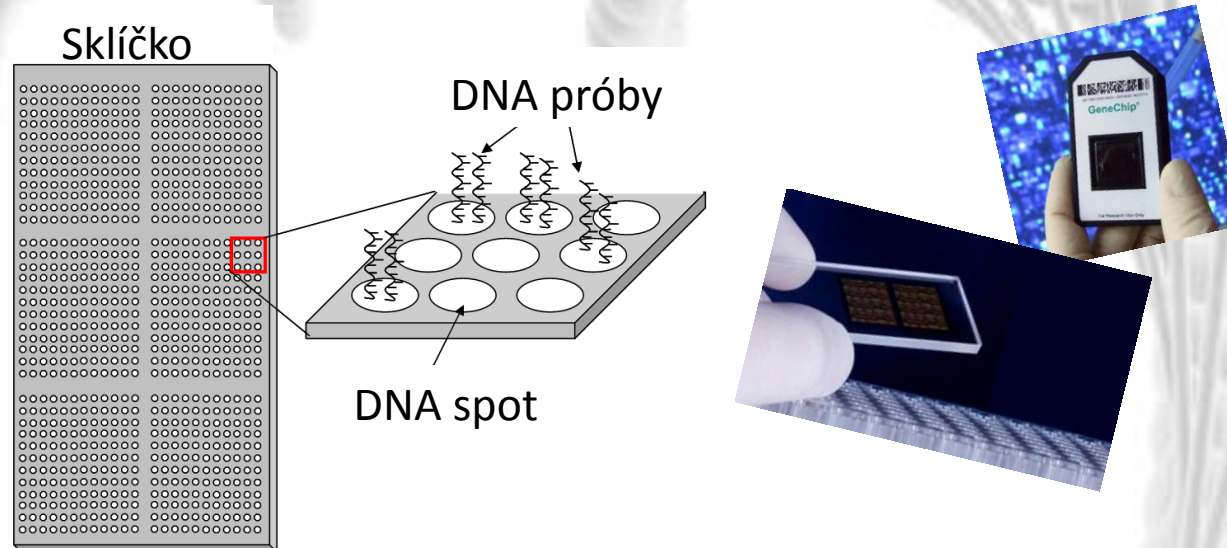
Nitra, 6.11.2018

Laboratórium genetických analýz



Čo je microarray?

- genomická technológia, ktorá umožňuje rýchly, simultánny skrining genomickej DNA pre rôzne sekvenčné varianty, využívajúca DNA čipy /mikročipy
- **Mikroskopické sklíčka - DNA čipy** - súbor nasyntetizovaných mikroskopických DNA spotov prichytených na solídnom povrchu (sklo, kremíkový podklad, nitrocelulóza..)
- **DNA spot** – pikomóly (10^{12} mólov) špecifických DNA sekvencií
= DNA próby, oligonukleotidy, gény



- Fluorescenčne značená cieľová sekvencia, ktorá sa naviaže na próbu vykazuje fluorescenčný signál – **génovú aktivitu** v sledovanom genetickom materiáli

Princíp a postup DNA microarray

- hybridizácia skúmanej nukleovej kyseliny so špecifickými hybridizačnými probami kovalentne viazanými na určitý nosič (nitrocelulóza, sklo..)

príprava vzorky a
značenie

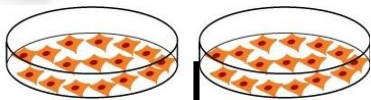
premývanie

hybridizácia

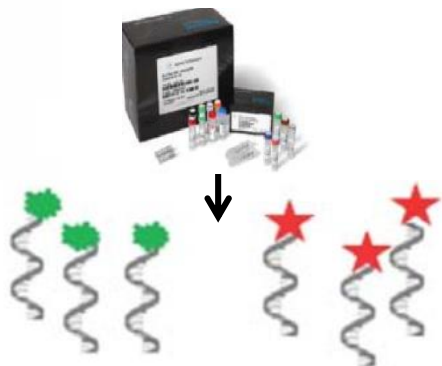
skenovanie a
analýza dát

Izolácia mRNA

kontrolná študovaná vzorka



prepis cDNA,
fluorescenčné farbenie

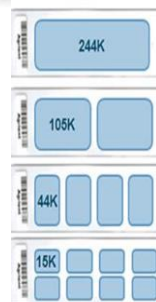
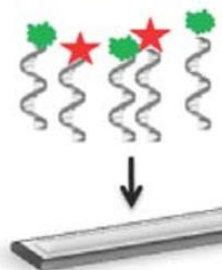


premývací a
stabilizačný
roztok

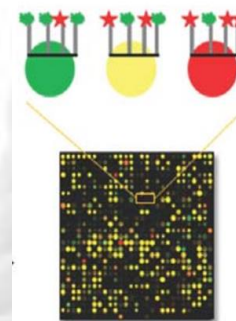


Wash Buffers &
Stabilization Sol.

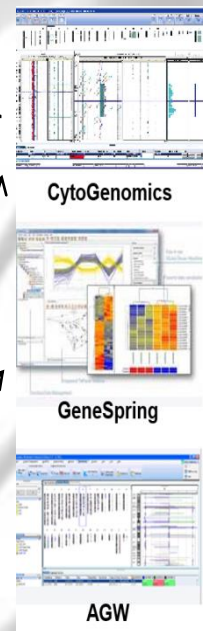
zmiešanie zmesi a
hybridizácia na
sklíčko



SureScan Dx M. skener



down- /up-regulácia

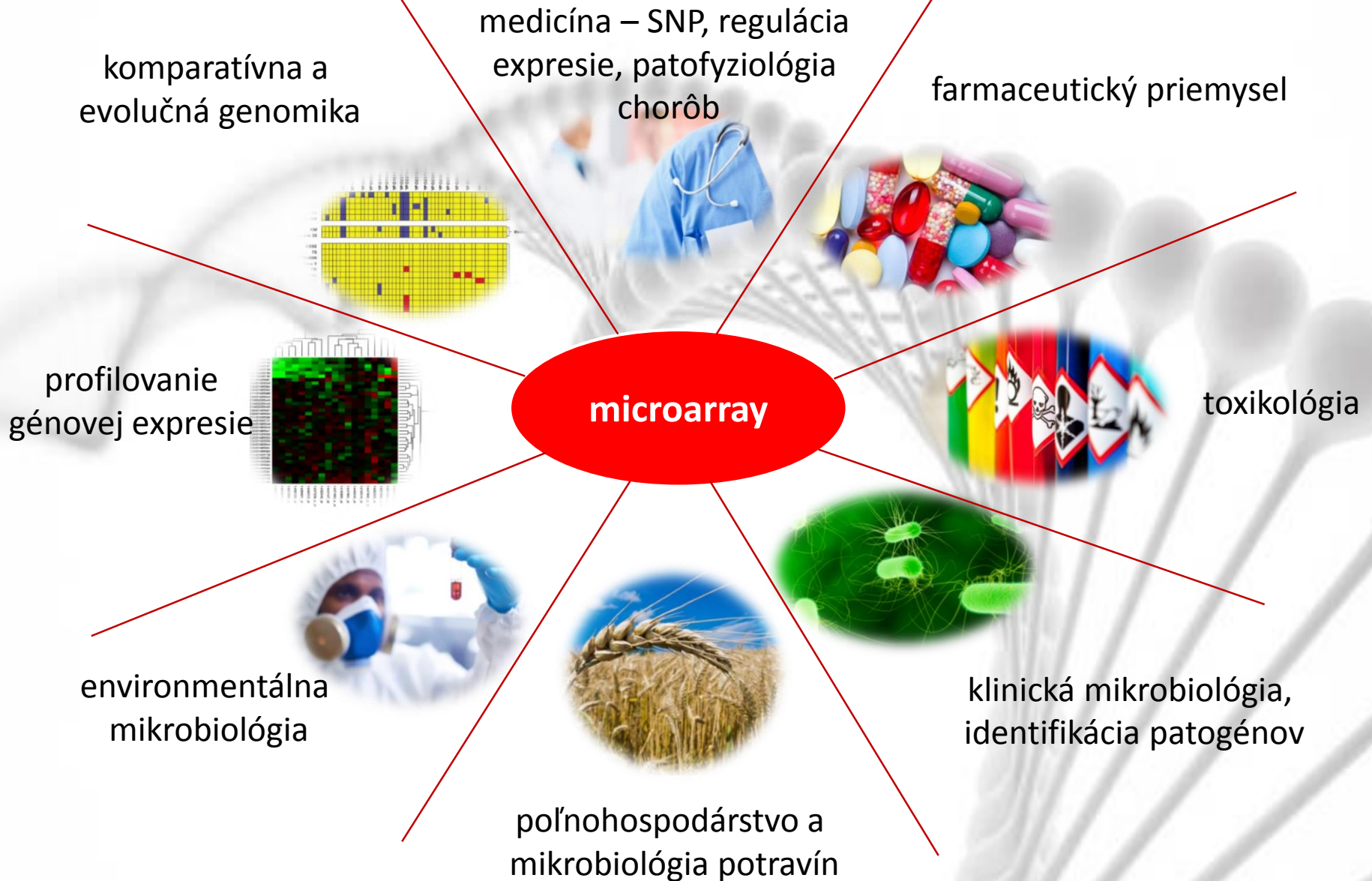


Microarray



výhody	nevýhody
✓ paralelná analýza tisícov génov naraz (analýza mikrobiálnych komúní, komplexné biologické procesy...)	✗ analýza len preddefinovaných génov (sekvenčná homológia, splicingové varianty)
✓ Viac-farebná hybridizačná detekcia	✗ vznik nešpecifických artefaktov pri hybridizácii
✓ kvantitatívne porovnanie množstva cieľovej sekvencie	✗ nepriame meranie relatívnej koncentrácie (kinetika hybridizácie)
✓ vysoká špecificita (neporózne povrchy)	
✓ vysoká senzitivita	
✓ jednoduchá a rýchla analýza dát (bioinformatické databázy)	

Microarray - aplikácie

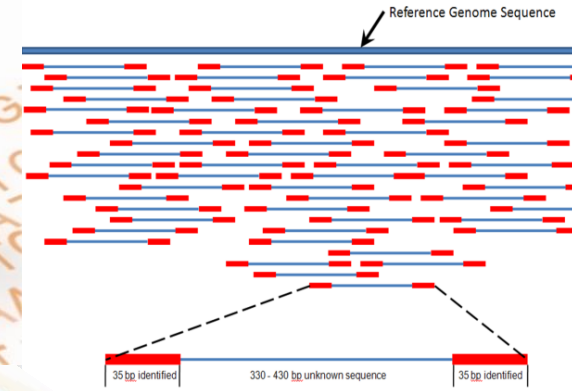


NGS – next generation sequencing

výhody

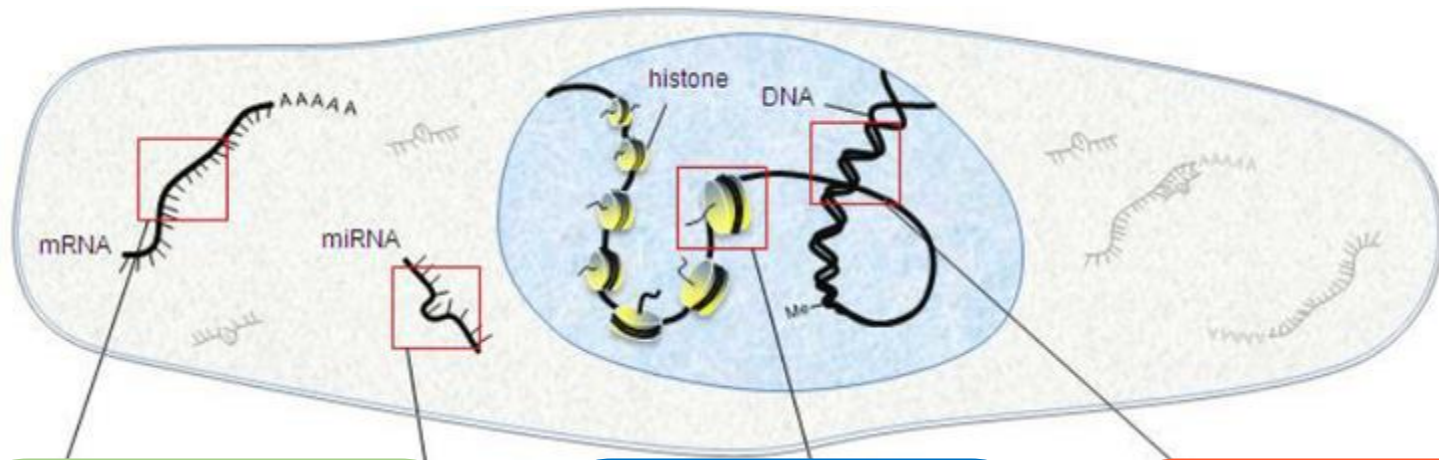
- ✓ rýchla (sekvencia celého genómu za menej ako 1 deň)
- ✓ účinná,
- ✓ nízko-nákladová sekvenčná platforma
- ✓ vysoká presnosť (sekvenovanie oboch koncov DNA fragmentov)
- ✓ paralelné sekvenovanie niekoľkých mil. fragmentov DNA
- ✓ schopnosť detegovať indely (inzercie, delécie báz v genóme)
- ✓ kvantitatívna detekcia genetických variácií
- ✓ produkuje veľké množstvo *DNA reads* (10^6 - 10^9)
- ✓ odstraňuje PCR duplikáty (vytvorené počas prípravy knižnice DNA)

Next Seq500 (Illumina)



2 x 150 *DNA reads* / čítaní
do 400 mil. čítaní / 120 Gb
1,2 dňa

NGS – oblasti výskumu a štúdia



Transkriptomika

- Analýza génovej expresie
- Sekvenovanie celkovej RNA,
- mRNA,
- Sekvenovanie miRNA
- RNA editing
- Detekcia génovej fúzie, izoformiem, SNP, splicingové varianty

Epigenomika

- Bisulfidové sekvenovanie
- CHIP sekvenovanie (interakcie DNA/RNA-proteín)
- Profilovanie ribozómov (analýza proteómu)

Genomika

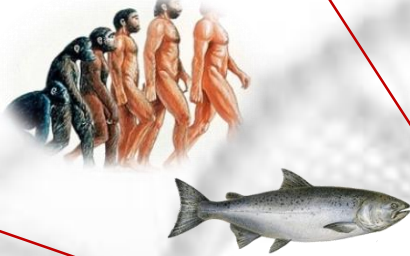
- Celogenómové sekvenovanie
- Sekvenovanie exozómov
- „De novo“ sekvenovanie
- Cieľové sekvenovanie
- Analýzy SNP, zriedkavých variantov, vybraných sig. dráh

NGS - aplikácie

medicína – klinický skríning,
onkológia, infekčné ochorenia

farmaceutický priemysel,

evolučná genomika



rastlinná virológia,
epidemiológia



**Next
generation
sequencing**

klinická mikrobiológia,
identifikácia neznámych patogénov



poľnohospodárstvo a
mikrobiológia potravín



metagenomika,
environmentálna
mikrobiológia



profilovanie
génovej
expresie



Laboratórium genetických analýz – aktuálny výskum a budúce vízie

- **Sledovanie genetických variant a polymorfizmov** alergénov génov (RFLP metóda a PAGE)

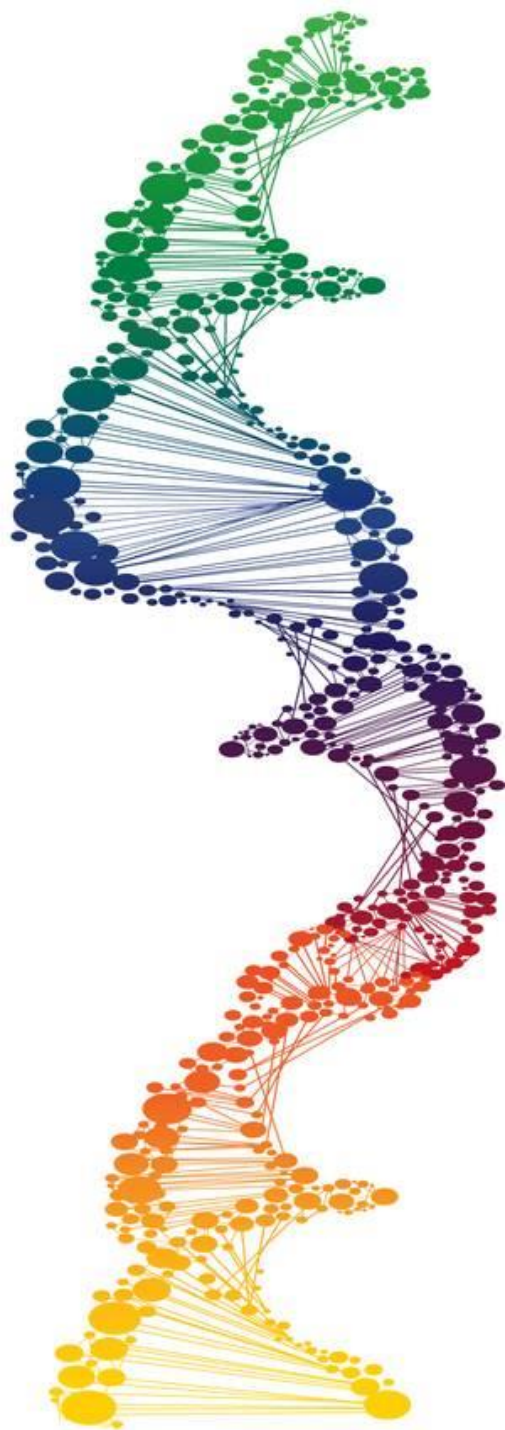


- **Transkriptomická analýza** šalátu siateho (salinita prostredia) (spolupráca s FBP, FAPZ SPU, UKF)



Analýza dát (120 Gb)

- **optimalizácia a dobudovanie infraštruktúry** genetických laboratórií
- **analýza génovej expresie** (RT-PCR a microarray)



Odborní riešitelia:

doc. Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD.

RNDr. Veronika Fialková, PhD.

Dr. Ing. Miroslava Požgajová

Mgr. Jana Bilčíková

prof. Ing. Norbert Lukáč, PhD.

Ing. Marián Tomka, PhD.

prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

Ing. Martin Vivodík, PhD.

Ing. Milan Chňapek, PhD.

doc. Mgr. Želmíra Balážová, PhD.

Ing. Juraj Medo, PhD.

doc. Ing. Katarína Ražná, PhD.

Ing. Lucia Zamiešková

Ing. Matúš Kyseľ



