

KLONOVÁNÍ GENŮ

Martina Machalová a Barbora Magdolenová

KLONOVÁNÍ

Molekulární klonování:

- multi-krokový proces který vytvoří kolekci definovaných fragmentů dané DNA pomocí restričních endonukleáz
- spojení vybraných DNA fragmentů (většinou jednoho genu) se speciálním nosičem – **vektor** pomocí T4 DNA ligázy
- přenos vzniklého konstruktů do živých buněk (často bakterie)
- mnohonásobné namnožení vložených DNA fragmentů replikací v živé buňce – **DNA KLONY**

Buněčné klonování:

- vytváření geneticky identických buněk (organismů)
- v živé přírodě přirozené:
 - kolonie bakterií
 - řízkování rostlin
 - jednovaječná dvojčata



KLONOVACÍ VEKTORY

A) Bakteriální – PLAZMIDY

- extrachromosomální kružnicové molekuly DNA, které se nachází v celé řadě bakteriálních druhů (rezistence k antibiotikům, metabolismus nezvyklých substrátu...) 1-100kb

- replikují se nezávisle na bakterii

- vlastní plasmidové vektory vznikly úpravou přirozených

1970' - pBR (Bolivar a Rodriguez)

- 4.36 kb menší než je přirozeně se vyskytující v *E.coli*

- **ori** vlastní počátek replikace

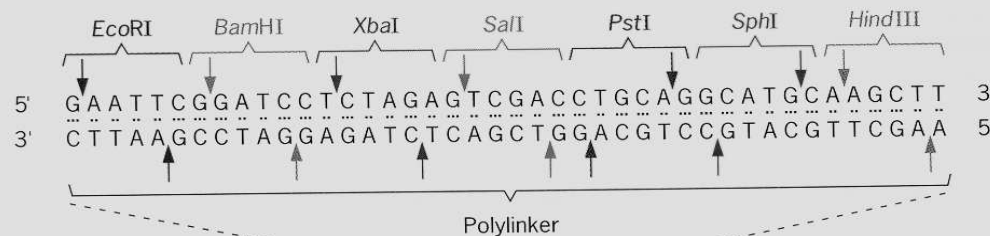
- rezistence k Amp a Tc

- unikátní restrikční místa

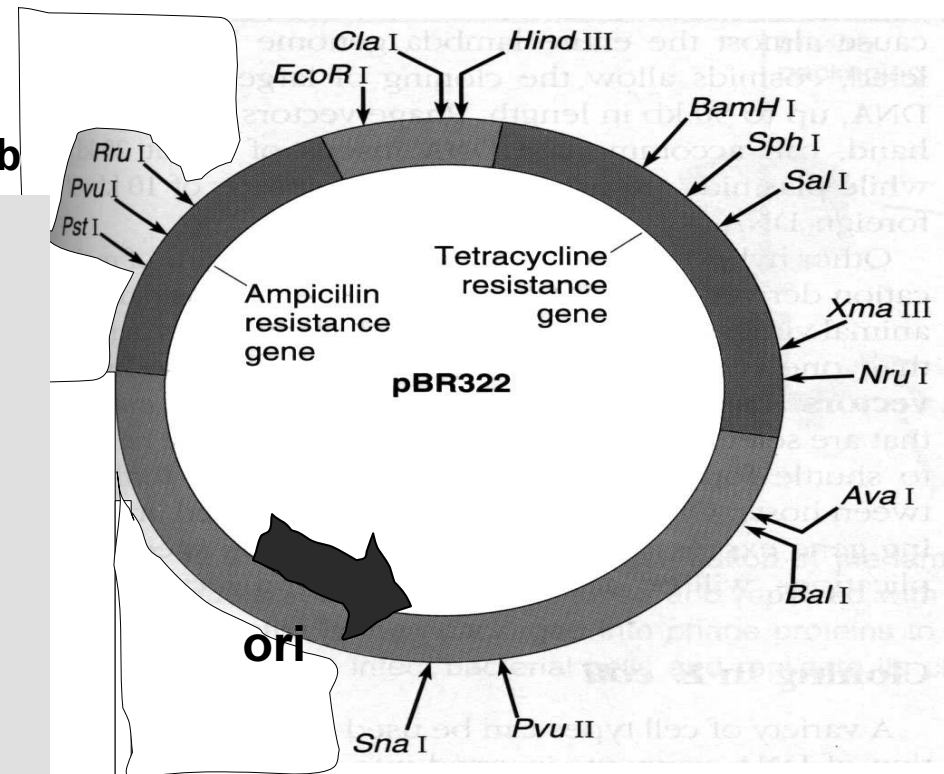
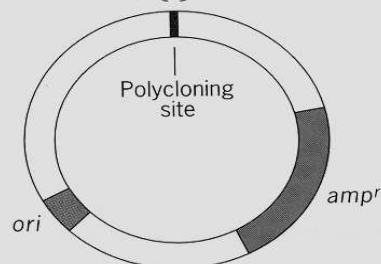
- kapacita pro inzertovou DNA 1-5 kb

high copy plasmidy

100-1000 kopií v buňce



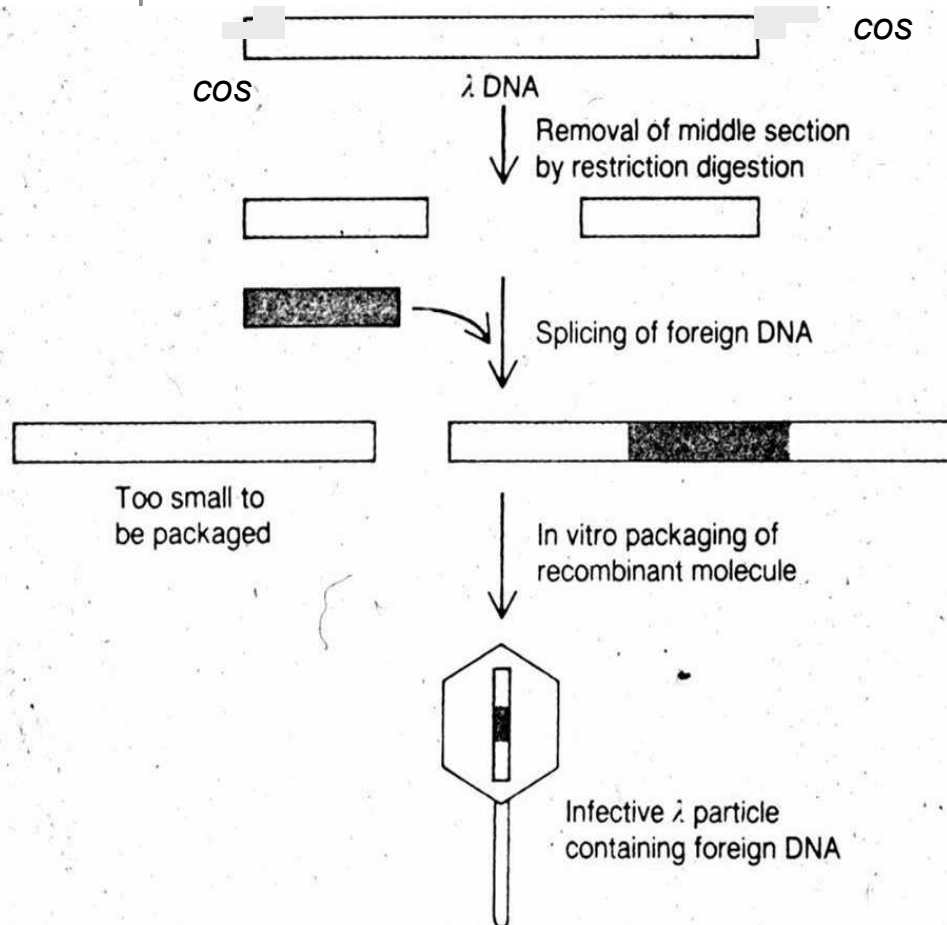
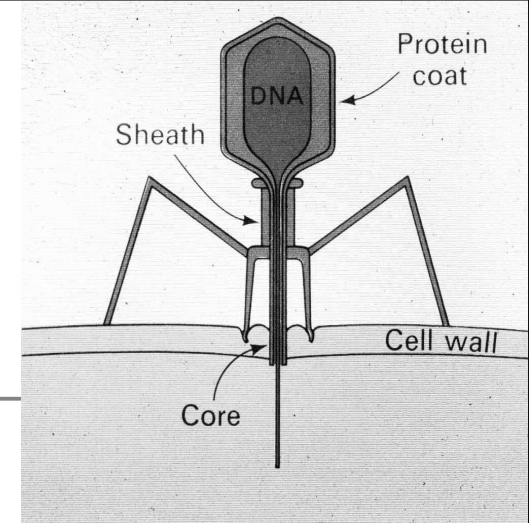
MCS
multiple
cloning
site
(polylinker)



KLONOVACÍ VEKTORY

B) Virové - BAKTERIOFÁGY

- bakteriální viry s dvouřetězcovou lineární DNA
- schopny se v hostitelské buňce replikovat, aniž by ji zahubily
- klonovací kapacita **2-25kb** insertu
- mnohonásobné množení v závislosti na hostitelské bakterii



BAKTERIOFÁG lambda 49kb

- Sřední část genomu není důležitá pro lytický růst a lze ji nahradit insertovou DNA
- snadná manipulace díky cos místům (lepivé konce) na koncích λ DNA, které umožňují její cirkulaci
- zacirkulovat lze pouze bakteriofága, který má vzdálenost mezi cos místy 37-52kb
- tvorba cDNA a genomových knihoven

KLONOVACÍ VEKTORY

C) bakteriálně-virové - KOSMIDY

- odvozené z plasmidu do kterého byly naklonovány cos místa bakteriofága λ
- Inzertová DNA je naklonována do lineárního kosmidu a sbalena in vitro virovým mechanismem a infikována do bakterie
- v bakterii je pak cirkulována a replikuje se dál jako plasmid
- malá velikost cca 5kb – není potřeba infekčních lytických λ proteinů, pouze selekční marker k antibiotiku může se velikost inzertové DNA pohybovat až k 47kb

D) bakteriálně-virové - **FAZMIDY (phagemid)**

- odvozené od bakteriofága M13 s malou ssDNA (6.4kb), který se po infekci do bakterie replikuje jako kruhovitá dsDNA (plasmid, snadná manipulace, restrikce)
- infekční fágové částice však opět obsahují pouze ssDNA (vhodný zdroj pro izolaci ssDNA např. pro hybridizaci)
- do infekčních částic mohou být sbaleny částice až dvakrát větší než je fágová DNA

Obecný princip molekulárního klonování

klonovací vector + DNA obsahující požadovaný gen (izolace)

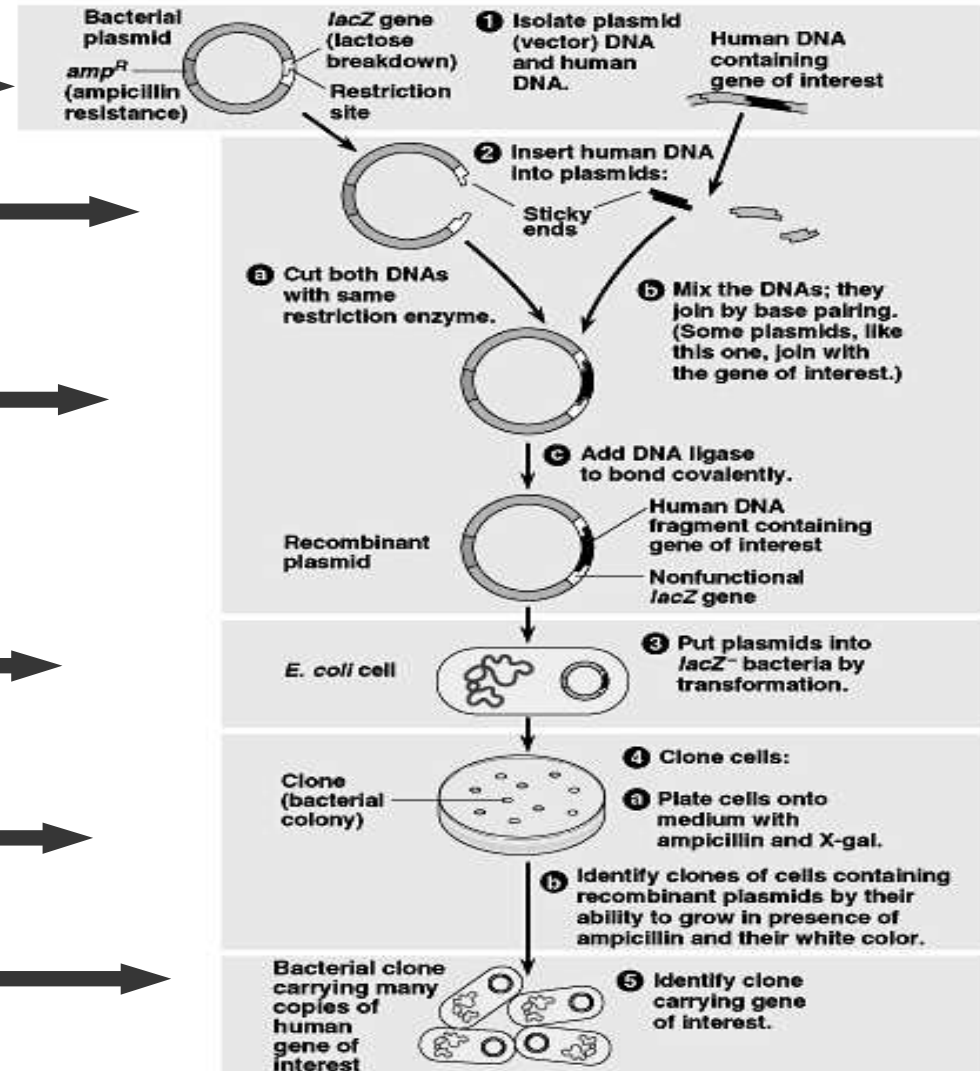
restrikce

ligace

transformace

selekce pomocí selekčních markerů

reprodukce a syntéza cílového proteinu
izolace



Základní kroky při klonování genů:

- 1. štěpení DNA na požadovaných místech**
- 2. rekombinace - spojení DNA-fragmentů**
- 3. transformace – vpravení rekombinované DNA do buňky**
- 4. selekce buněk obsahující cizí gen**
- 5. analýza klonované DNA**

1. Štěpení DNA – restrikční enzymy:

- při genových manipulacích je žádoucí molekulu DNA štěpit na přesně definovaných místech tak, aby byl tento proces reprodukovatelný
- štěpení se provádí pomocí *restrikčních enzymů* – enzymy, které bakterie používají jako obranný systém při napadení fágy.

Tyto enzymy štěpí DNA na přesně definovaných místech daných specifickou sekvencí bází. Takových enzymů bylo objeveno již celá řada.

2. Spojování molekul DNA:

Bylo zjištěno, že do otevřeného vektoru může být vložen fragment DNA, pokud mají obě molekuly na koncích komplementární DNA-řetězce. Tento fakt byl nejdříve ověřen při spojování poly-A-konce na poly-T-konec, později se zjistilo, že stejnou službu zastanou i kohezivní konce získané pomocí restričních enzymů. Vektor a DNA, která se do něj vkládá, se štěpí pomocí stejného enzymu, čímž se získají komplementární kohezivní konce. Tyto rozštěpené molekuly se smísí za podmínek, které jsou vhodné pro napojení komplementárních řetězců (v reakční směsi působí i DNA-ligasa). Díky tomu se zapojí DNA-fragment do vektorové DNA.

3. Transformace:

Jakmile je cizí DNA vložena do daného vektoru, je potřeba vložit tento vektor zpět do živé buňky.

Dlouho se předpokládalo, a experimenty to potvrzovaly, že bakterie nemohou být transformovány vložáním cizí DNA. Nicméně v 70. letech se zjistilo, že při extrémních podmínkách to možné je.

Aktivně rostoucí buňky se přenesou do hypotonického prostředí CaCl_2 při 4°C , čímž se během 30 min se výrazně změní propustnost buněčné stěny. K této buněčné suspenzi se přidá vkládaná DNA a směs se nechá dalších 30 min ve 4°C . Následuje krátký teplotní šok (42°C), jehož následkem buňky přijmou cizí DNA. Po krátké inkubaci v růstovém mediu buňka obnoví své funkce včetně tvorby transformovaných plasmidů.

Potíž je v tom, že účinnost transformace je i s použitím nejlepší techniky stále dosti nízká, jinými slovy, pouze malé procento buněk nakonec přijme cizí DNA. Proto je nutné, aby po transformaci následovaly metody, které jednoznačně určí, které z nově narostlých buněk nesou transformovanou DNA a které ne. Obvykle se zjišťuje přítomnost daného vektoru v buňce. Vektory jsou konstruovány s ohledem na snadnou selekci (např. nesou gen zodpovědný za resistenci k určitému antibiotiku)

4. Hybridizace kolonií – získání chromosomálního genu:

Působením vysoké teploty nebo alkálií dvouřetězcová DNA denaturuje – jednotlivé řetězce se od sebe oddělí. Po ochlazení nebo neutralizaci se příslušné řetězce opět spojí na principu komplementarity bází.

Spojované řetězce mohou pocházet buď ze stejné molekuly, nebo mohou pocházet z různých zdrojů, samozřejmě pokud splňují podmínky komplementarity.

Podobnost řetězců chromosomálního genu a jeho cDNA umožňuje takové spojení – *hybridizaci*. Díky tomu se může pomocí cDNA identifikovat klon, který obsahuje příslušný chromosomální gen.

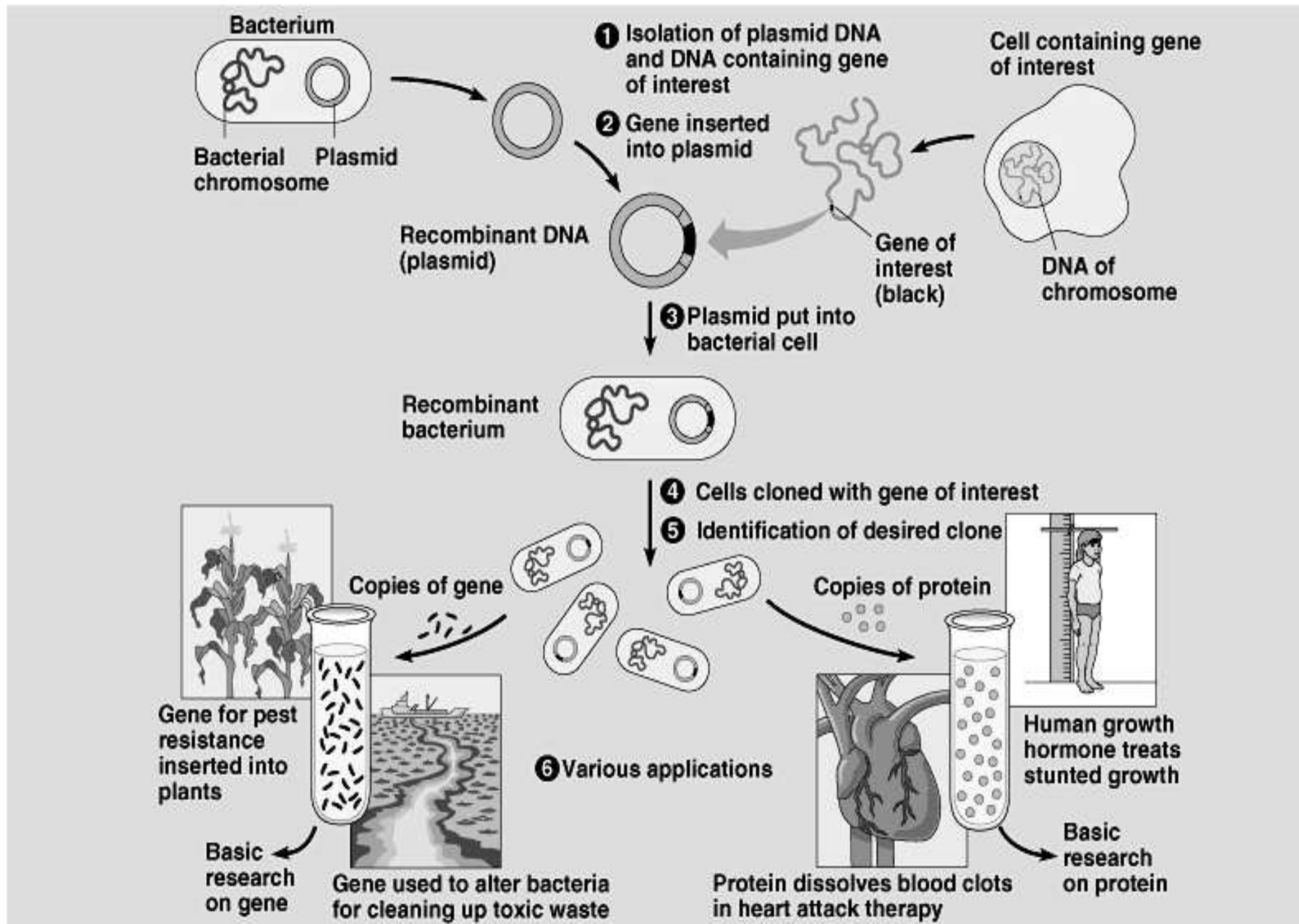
5. Analýza klonované DNA:

Výše uvedeným způsobem jsme zjistili, který klon z genomové banky nesoucí určitý fragment chromosomu obsahuje požadovaný gen. Nyní musíme určit přesnou polohu daného genu v tomto fragmentu.

Obvykle má tento segment délku okolo 20 – 40 kb, přičemž aktuální kódovací oblast zaujímá přibližně 10 % jeho délky. Restrikční analýzou tohoto segmentu opět získáme řadu fragmentů, z nichž jeden (nebo několik, pokud se restrikčním místem daný úsek rozdělil na víc částí) nese hledaný gen. Postup, jak zjistíme, o který z nich se jedná, je opět založený na hybridizaci s cDNA a je velmi podobný postupu již uvedenému.

Využití molekulárního klonování

- **uchovávání, zmnožení a manipulace s genetickou informací (cDNA a genomové knihovny)**
- **produkce proteinů pro různorodé využití**
- **vnášení nových či pozměněných genů do organismů (GMO, genová terapie)**



Děkujeme za pozornost

