

DNA knihovny



26.4.07

Vítězslav Kříž, Biologický ústav LF MU

Co to jsou DNA knihovny

Informace ve formě DNA která reprezentuje určitý aspekt daného organismu či dané buňky

Nejčastější typy knihoven:

Genomové knihovny

cDNA knihovny (komplementární knihovny)

Proč se tvoří DNA knihovny?

Shromáždění informací o určitém organismu nebo o určité buňce

Analýza těchto informací



Co je třeba na tvorbu DNA knihovny?

- **Enzymy:**
 - » Restrikční endonukleáza
 - » DNA Ligáza
- **Analyzovaná DNA**
- **Vektor**
- **Buňka umožňující namnožení klonované DNA**
 - » bakterie, kvasinka

• Restrikční endonukleázy (restriktázy)

- Enzymy které štěpí fosfodiesterové vazby v dsDNA
- Každý enzym rozeznává specifickou palindromatiku sekvenci ve které štěpí

-Příklad EcoRI rozeznává tuto sekvenci: 5'-GAATTC-3'

štěpí tímto způsobem:

5 ' ---G	AATTC --- 3 '
3 ' ---CTTAA	G --- 5 '

CCGGCATGCATGCAGGAATTCGGGCCTAGCCTTTAAAGACGGCGAATTC CCC
GGCCGTACGTACGTCTTAAGGCCGGATCGGAAATTTCTGCCGCTTAAGGGG

CCGGCATGCATGCAG AATTCCGGCCTAGCCTTTAAAGACGGCG AATTCCCC
GGCCGTACGTACGTCTTAA GGCCGGATCGGAAATTTCTGCCGCTTAA GGGG

• DNA ligáza -Enzymy které spojují fosfodiesterové vazby v DNA

-umožňují spojovat (ligovat) dva DNA fragmenty, rozštěpené stejnou restriktázou, nezávisle na tom z jakého organismu DNA pochází

Vektor

-DNA molekula do které může být vložen fragment cizorodé DNA

-slouží jako „přenašeč“ fragmentu do hostitelské buňky

-typy vektorů: plasmidové (<10kb)

virové-bakteriofágy (desítky kb)

BACs -bakteriální umělé chromosomy(100-300kb)

YACs kvasinkové umělé chromosomy(100kb-1Mb)

Plasmid

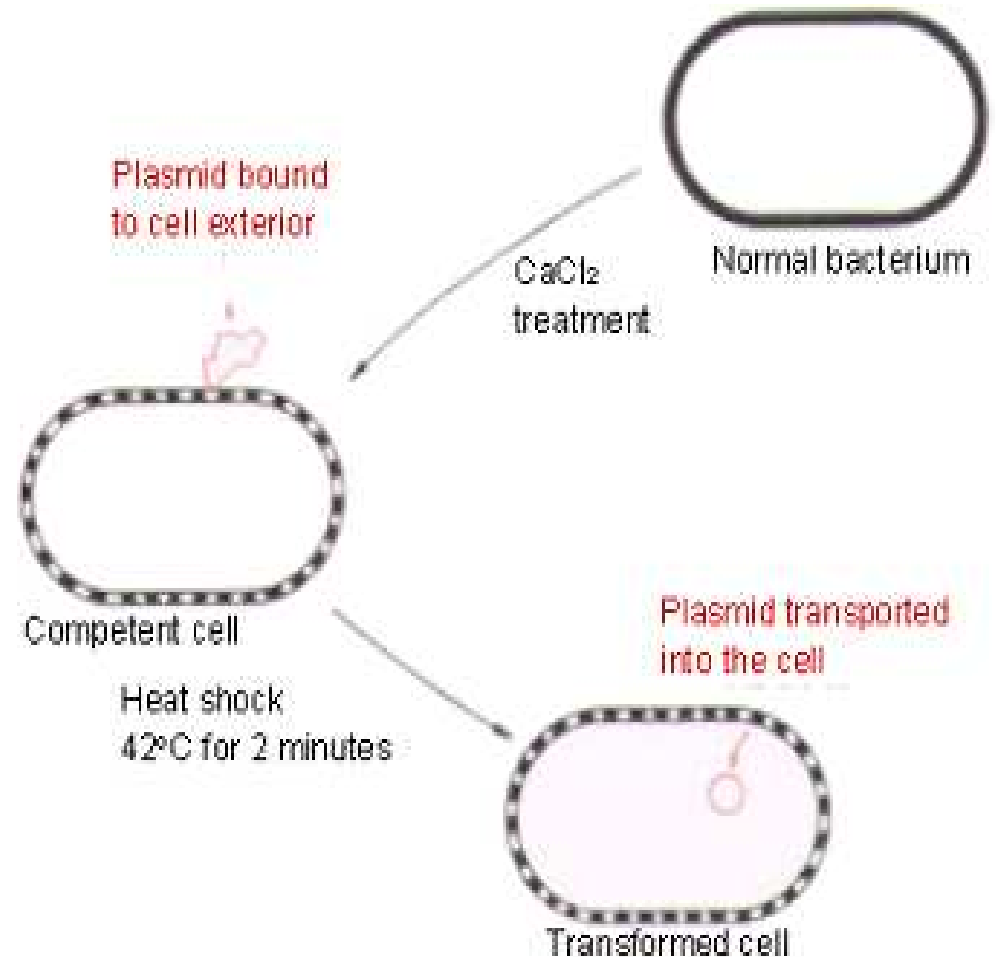
většinou kruhová dsDNA
obyčejně v bakteriích
množí se nezávisle na
bakteriálním chromosomu-ORI

Proces, kterým se plasmid dostává do
bakterie označujeme jako **transformace**

Plasmid nese resistenci vůči
antibiotiku, pouze bakterie s
plasmidem na agaru s antibiotikem
přežívají- **selekce**



8 colonies



•<http://www.sumanasinc.com/webcontent/anisamples/nonmajorbiology/dnlibrary.html>

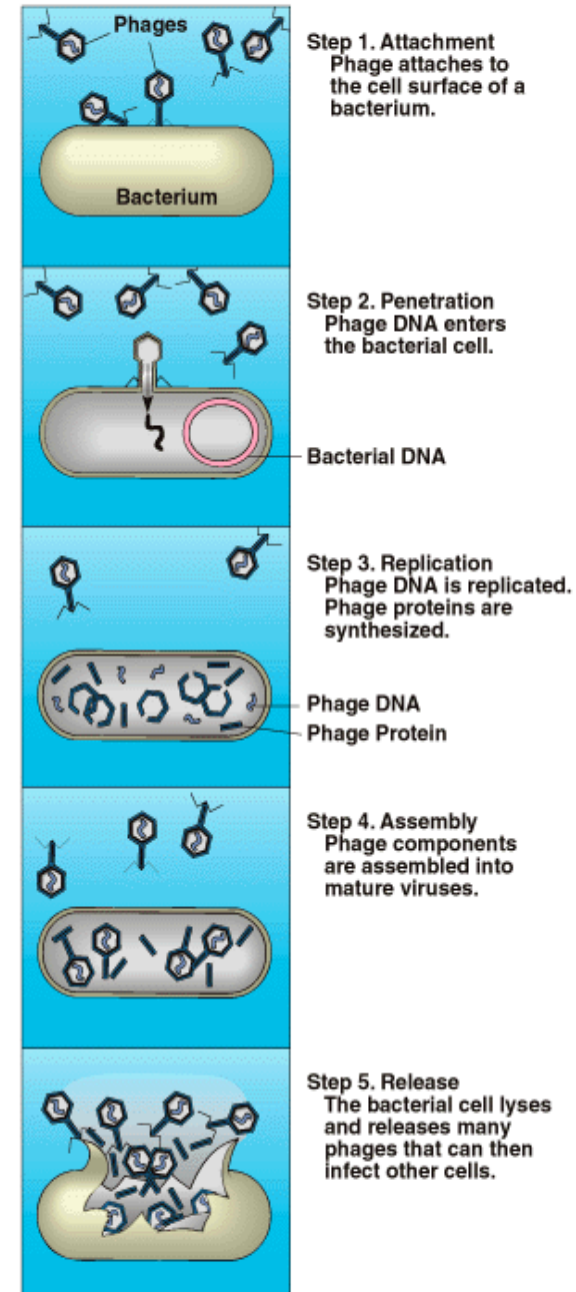
Bakteriofág lambda

Velikost genomu:50kb

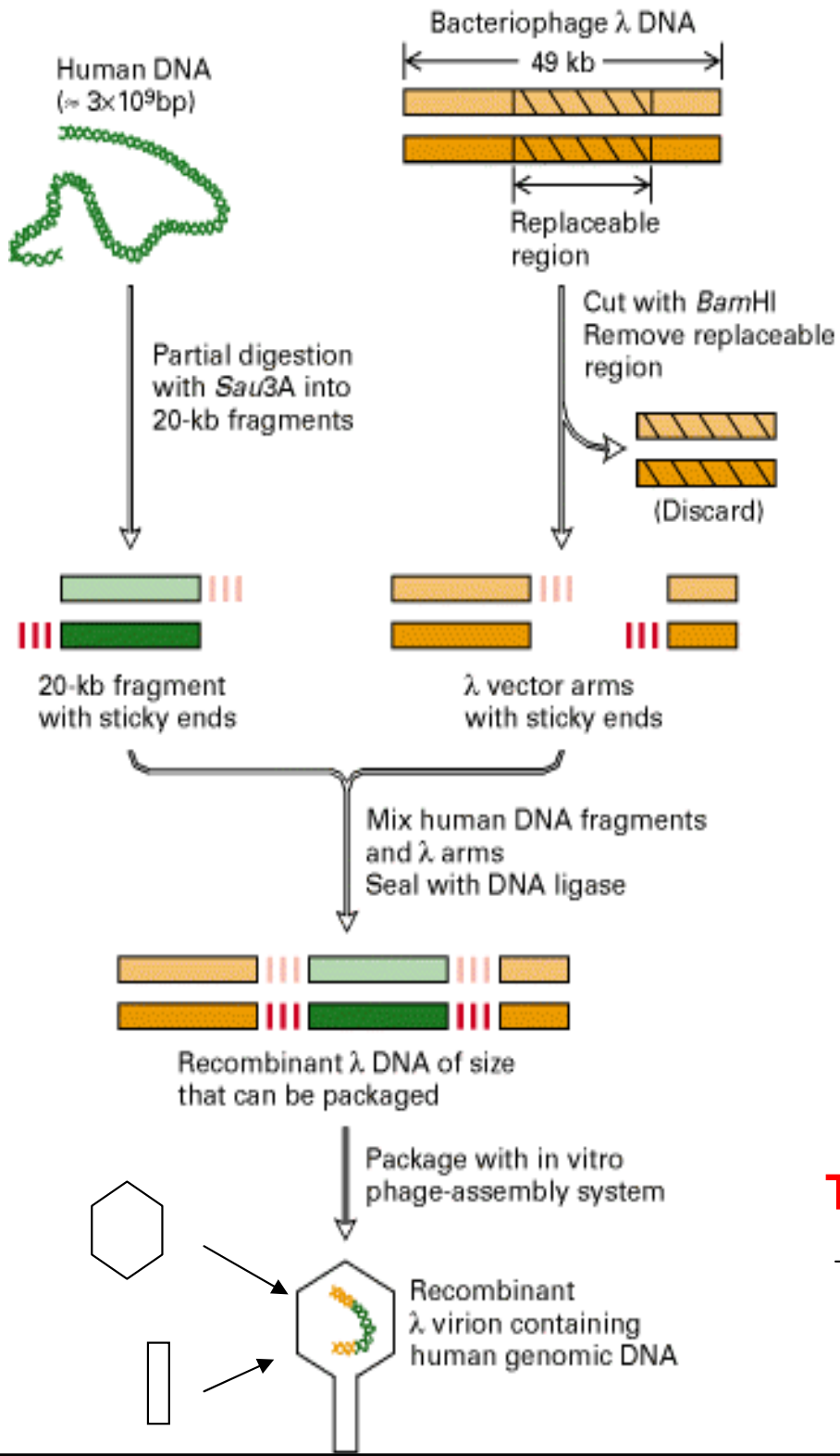
Až 25kb může být nahrazeno
cizorodou DNA

Virion infikuje E. coli- **lytický cyklus**

Solomon: Biology, 5/e
Figure 23.2a



(a)



Bakteriofág lambda

Vložení fragmentu do fágové DNA

Sestavení fága In vitro (DNA+hlavička+ocásek)

Transdukce bakterií

Transdukce

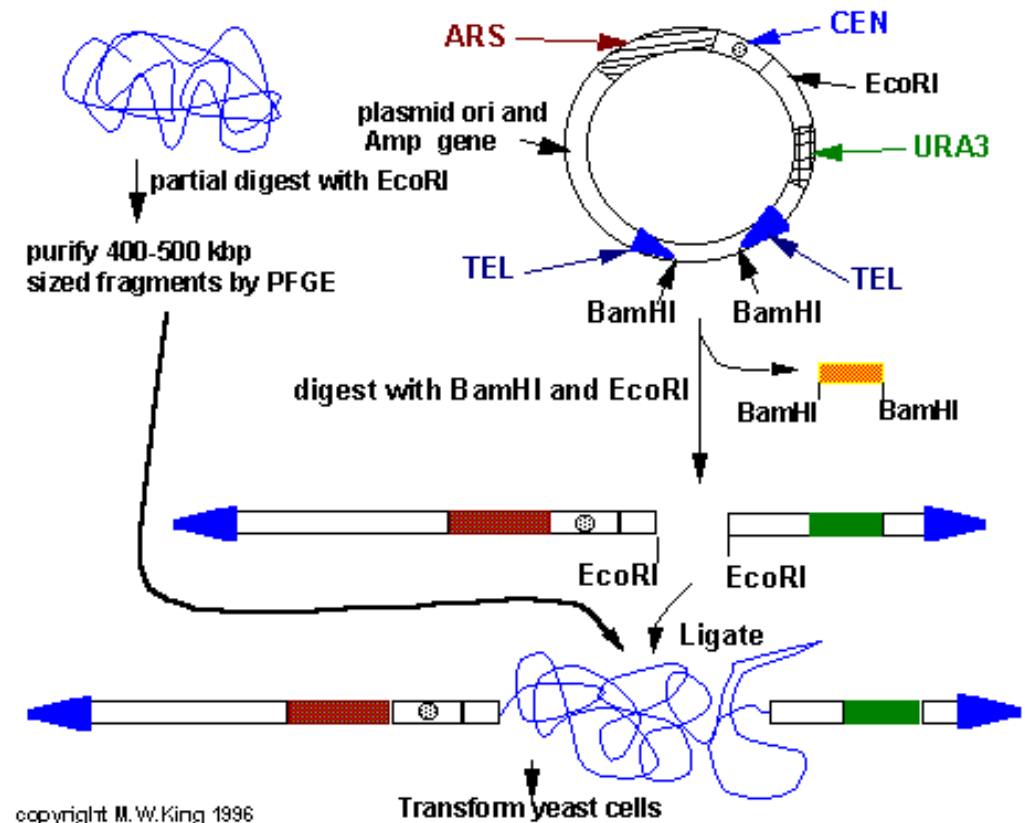


BAC: Umělý bakteriální chromozóm

- Fragment může mít velikost až 300kb
- Vektor je odvozen od konjugativního F-plasmidu u bakterií
- Používané při mapování lidského genomu (Human Genome Project)

YAC: Umělý kvasinkový chromozóm

- Fragment může mít velikost 100kb-3Mb
- Obsahuje telomery, centroméru a počátek replikace
- Používané při mapování lidského genomu, méně stabilní než BAC



Jak se tvoří DNA knihovny

- Restriktázami štěpíme analyzovanou DNA, vzniknou **inzerty**
- Stejnými restriktázami je roztěpen i vektor
- DNA ligáza spojí vektor s fragmentem tzv. **ligace** → vzniká **rekombinantní DNA**
- vpravení rekombinantní DNA do hostitelské buňky proces transformace, transdukce

Genomové X cDNA knihovny

Genomové knihovny

Genomová DNA z určitého organismu či ze specifické buněčné linie

Obsahuje i sekvence, které nejsou transkribovány

cDNA knihovny

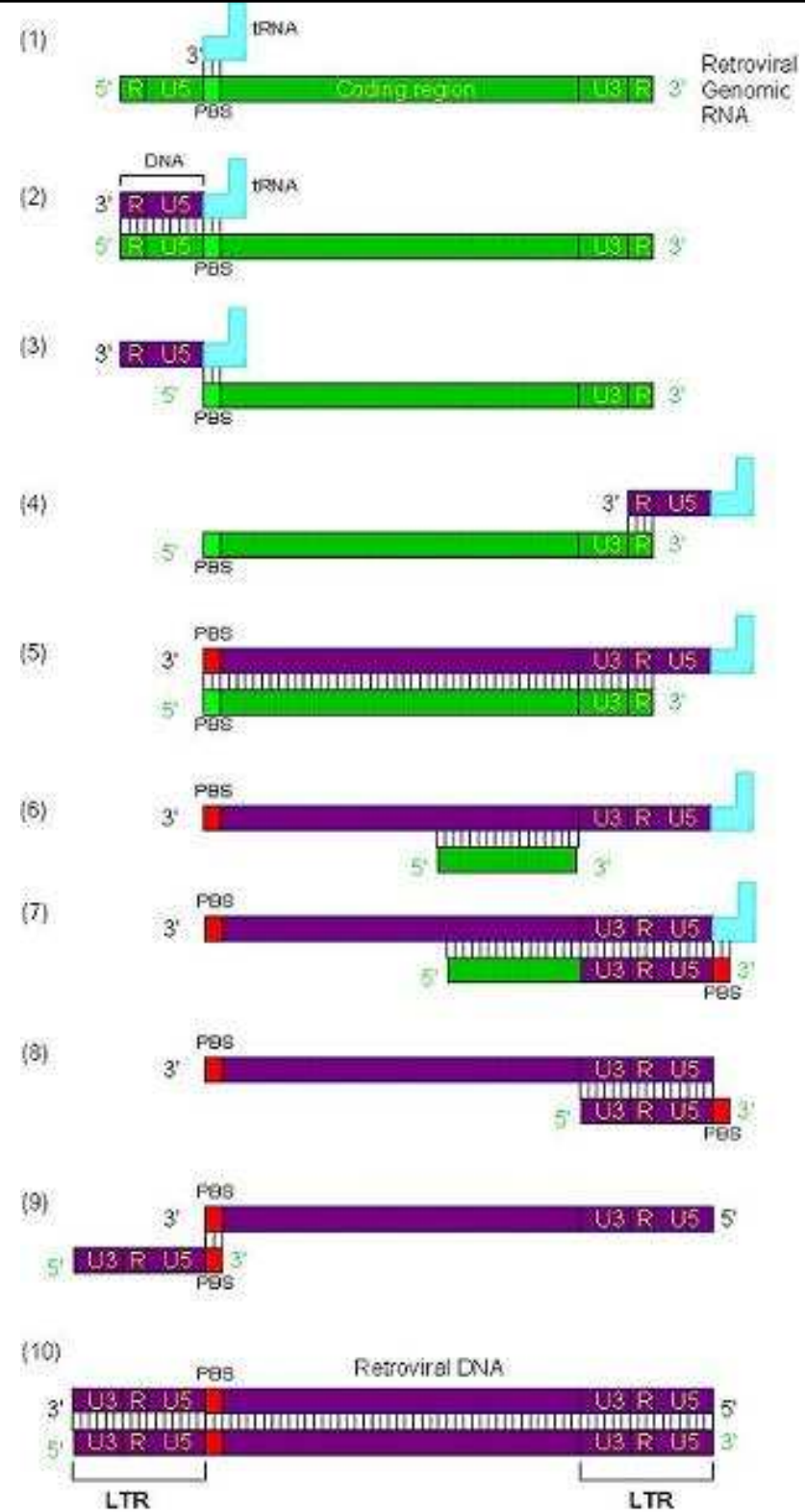
Zmapování těch částí genomu, které jsou transkribovány

Izolována totální RNA a přepsána do cDNA

Reverzní transkripce

Reverzní transkripce

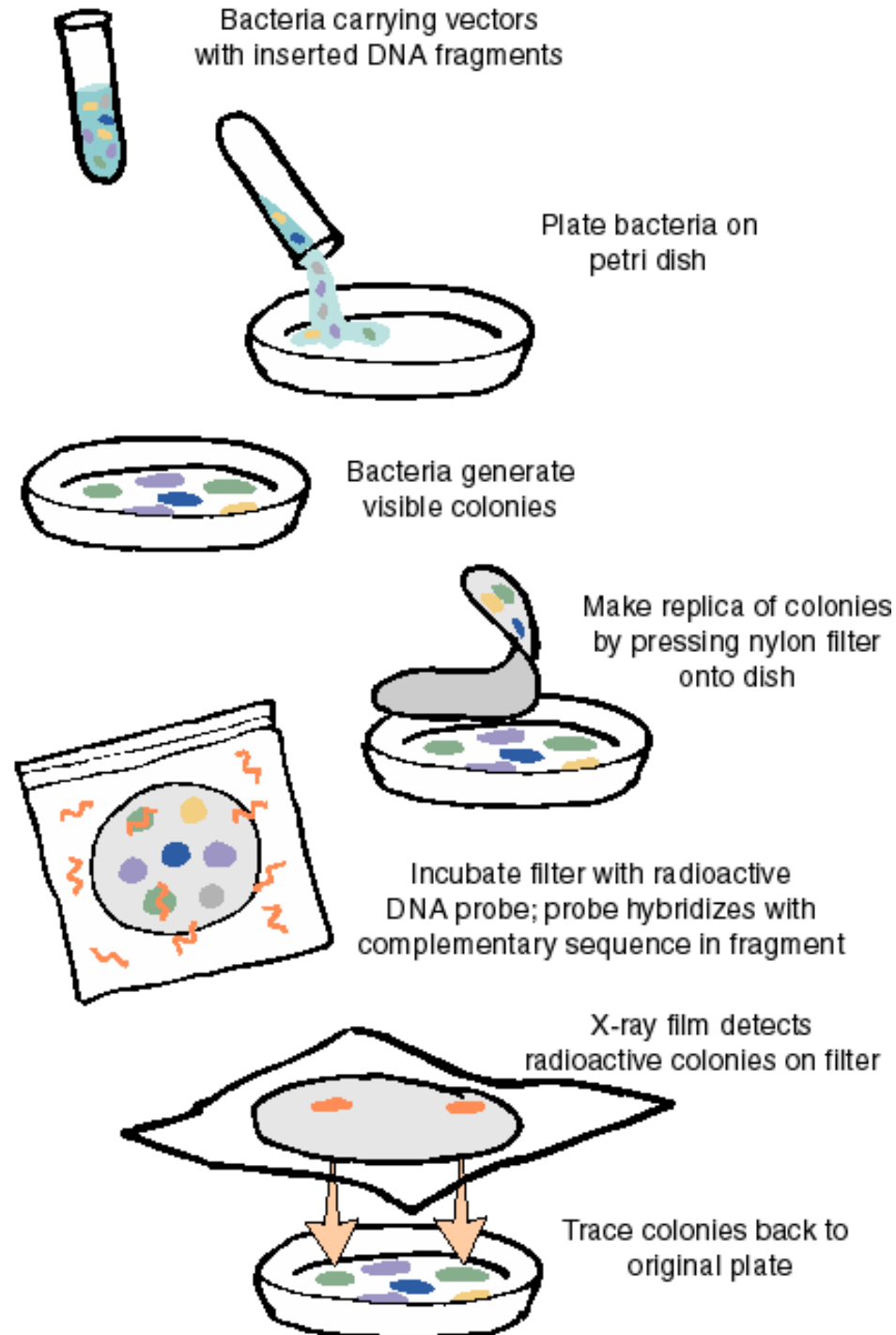
- Enzym reverzní transkriptáza
- Retrovirový původ
- Ze ssRNA vytváří dsDNA
- dsDNA stabilní, umožňuje použít restriktázy



Hledání v DNA knihovnách

- **Sekvenci úseku DNA který hledáme označíme radioaktivně - tzv. DNA sonda**
- **Denaturace sondy ssDNA**
- **Denaturovat DNA u buněk, která nesou klonované fragmenty**
- **Hybridizace-sonda označí ty klony, které mají sekvenci shodnou se sondou**
- **Pozitivní klony jsou vybrány**

Screening a DNA library



Využití DNA knihoven v medicíně a v molekulární biologii

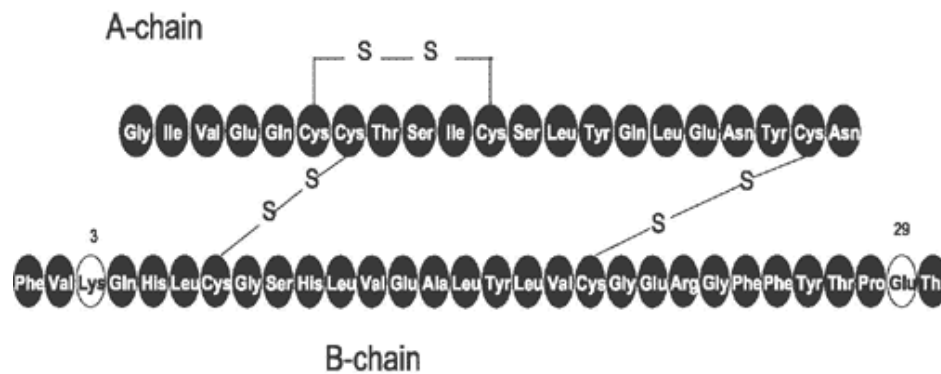
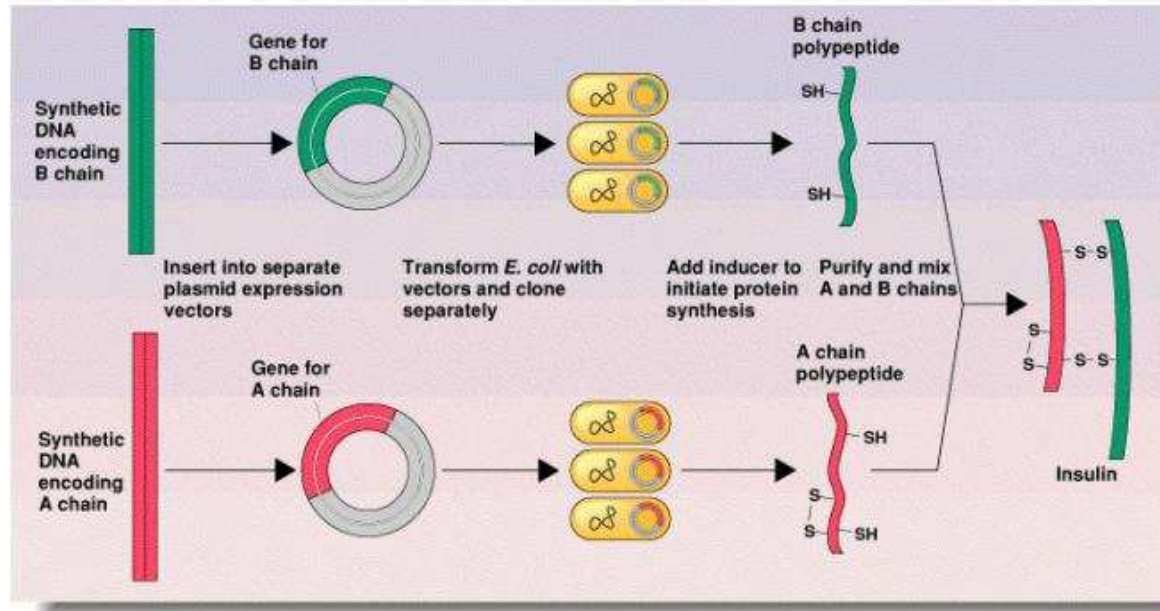
- Hledání nových genů, identifikace mutací určitého genu v genomu jiného organismu, určení funkce genu <http://www.ensembl.org/index.html>
- Restrikční analýza +Southern blot http://highered.mcgraw-hill.com/olc/dl/120078/bio_g.swf
- PCR <http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/pcr.html>
- Sekvenování <http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/cycseq.html>

Využití DNA knihoven v medicíně a v molekulární biologii

- **Produkce proteinů**
 - cDNA je do vektoru
 - Transformace bakterií či kvasinek (další eukaryota)
 - Omezení-vzdálené organizmy jinou post translační úpravu
 - Příklad: insulin
Vakcíny

Produkce rekombinantního insulínu

Campbell, Biochemistry, 3/e
Text Figure 10.14



Trace & Company

Sledování exprese-DNA microarrays

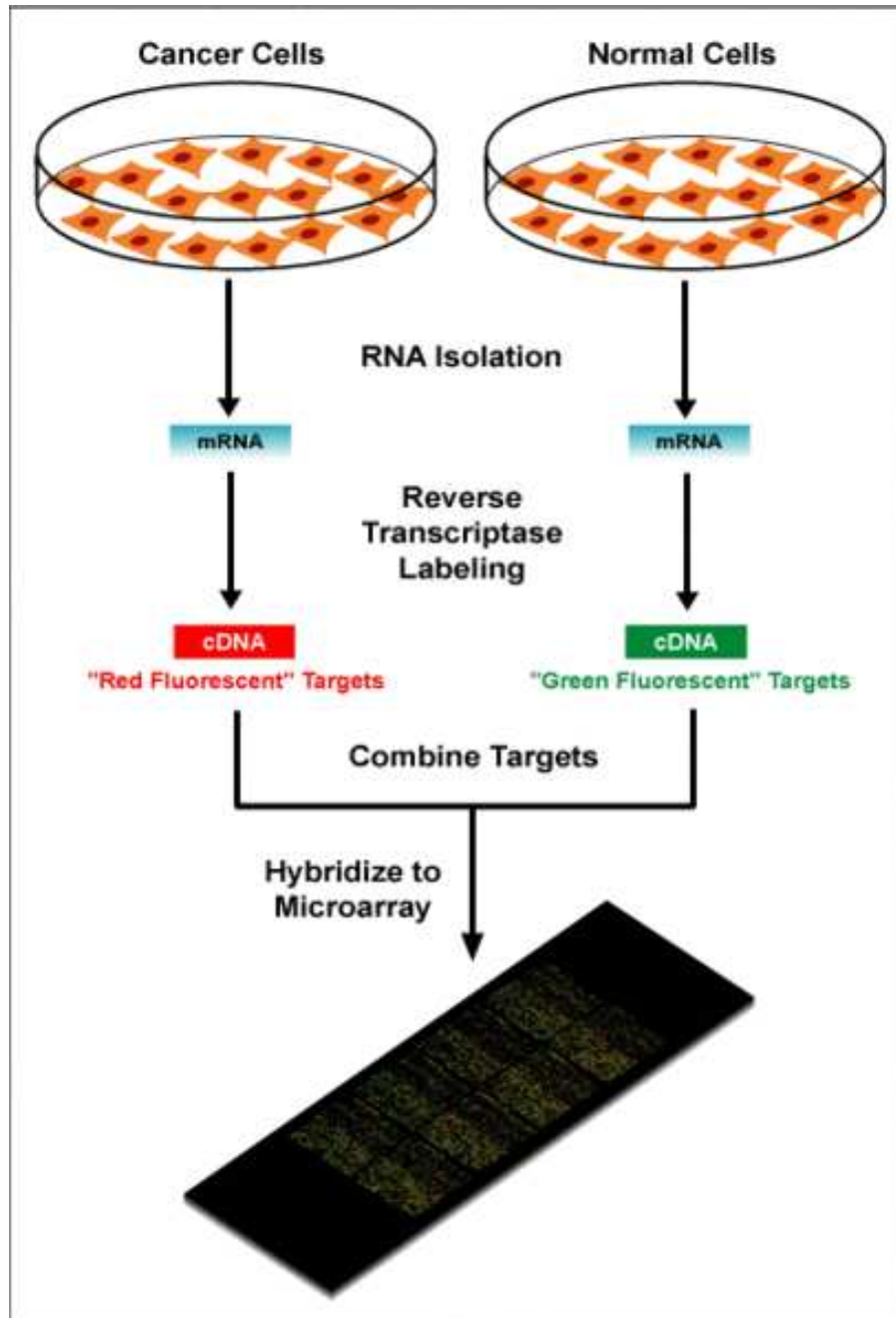
Mikročip-komerčně dodávaný, navázaná ssDNA, každý bod čipu cDNA z jednoho genu, jeden čip > 10 000 genů

Oligonucleotidové microarrays (Affymetrix)

- Izolace RNA → cDNA → (T7 polymeraza cRNA) fluorescenčně značena → čip
- Hybridizace → promytí
- Intenzita fluorescence=hladina exprese genu
- Absolutní hladina exprese 2 vzorky= 2 čipy
- Referenční sekvence



- *Dvoubarevné microarrays (Eppendorf)*
- Srovnávání dvou vzorků cDNA (kontrola, pacient)
- Každý vzorek je obarven jinou fluorescenční barvou
- Vzorky smíchány dohromady → čip
- Hybridizace → promytí
- Relativní rozdíl exprese jednotlivých genů mezi dvěma vzorky



Dvoubarevné microarrays

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/dnaarray.html>

Využití DNA knihoven v medicíně, v molekulární biologii a v zemědělství

Tvorba knockautovaných a transgenních zvířat

Knockout-vyřazení určitého genu

Transgen-exprese nějakého genu navíc



**Produkce lidských proteinů
do kravského mléka pro
předčasně narozené děti**

Analýza funkce různých genů



Děkuji za pozornost

