

# DNA Knihovny

# DNA knihovna

- genomová
- cDNA

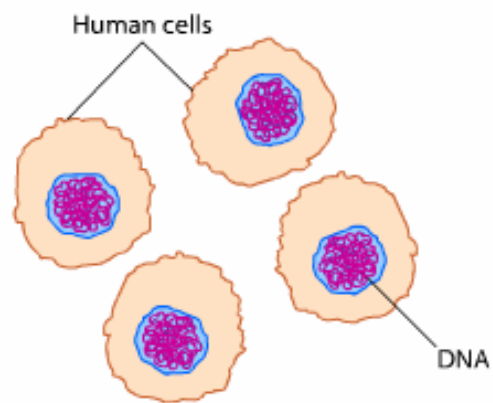
# GENOMOVÁ DNA KNIHOVNA

- Knihovna genomové DNA je soubor fragmentů DNA jednoho organismu, které jsou uchovávány v plasmidech hostitelského organismu (např. bakterii).
- V této formě mohou být fragmenty vyšetřovány pro identifikaci genů. Každý z fragmentů buněčné DNA vložený do klonovacího vektoru a pomnožený v hostitelské buňce představuje klon genomové DNA .

- Soubor rekombinantních plasmidů nesoucích různé fragmenty představuje tzv. knihovnu genomové DNA.

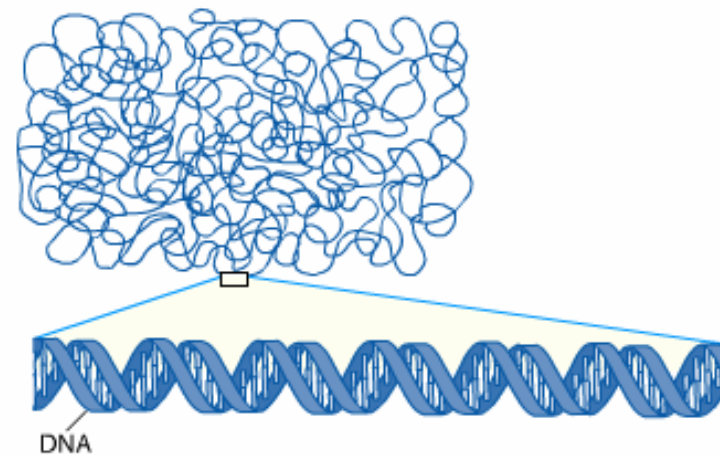
Vytváření genomové DNA knihovny ?

# 1. Izolování a vyčištění DNA



## **Creating a DNA Library**

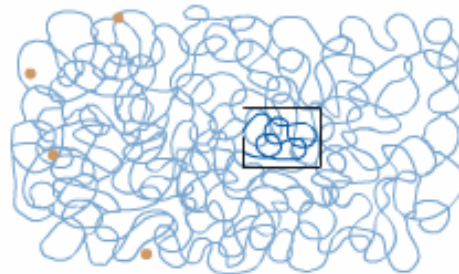
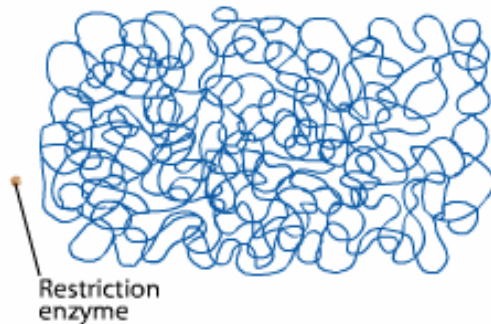
1. Extract and purify DNA.



## 2. Natrávení DNA pomocí restrikčních enzymů

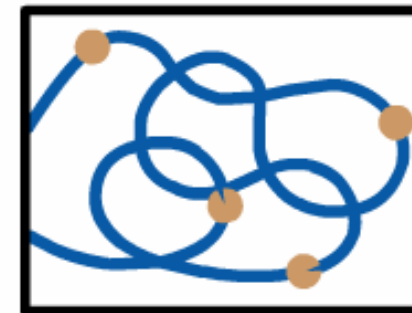
### Creating a DNA Library

1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.



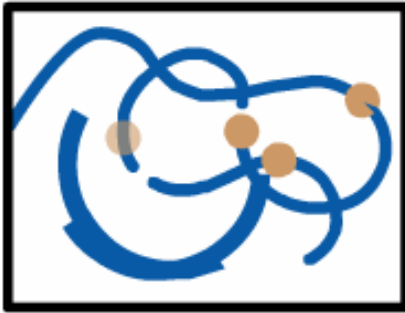
### Creating a DNA Library

1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.



### Creating a DNA Library

1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.



### Creating a DNA Library

1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.



### Creating a DNA Library

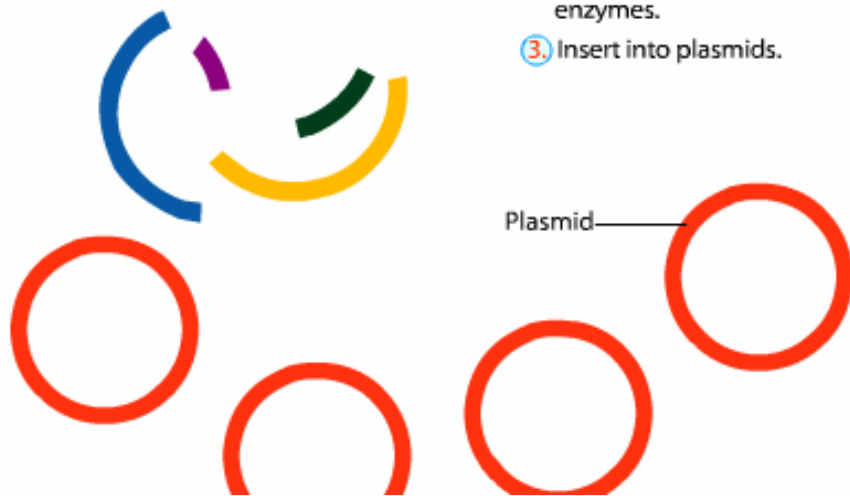
1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.



# 3. Vložení fragmentů do plasmidů

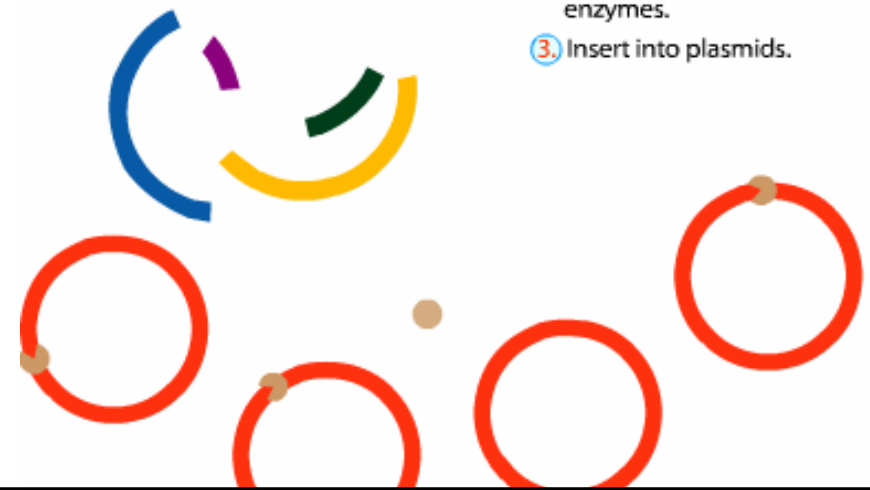
## Creating a DNA Library

1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.
3. Insert into plasmids.



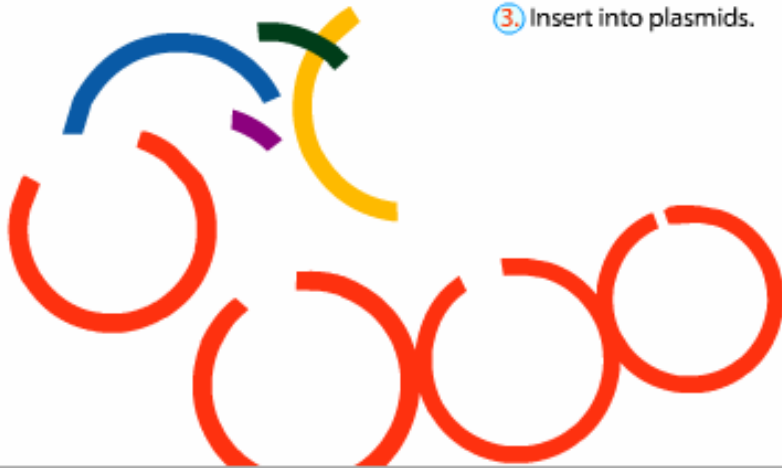
## Creating a DNA Library

1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.
3. Insert into plasmids.



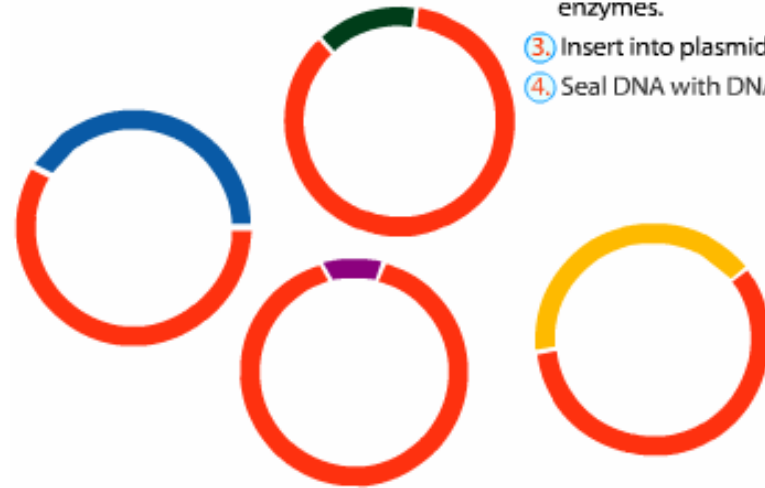
### **Creating a DNA Library**

1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.
3. Insert into plasmids.

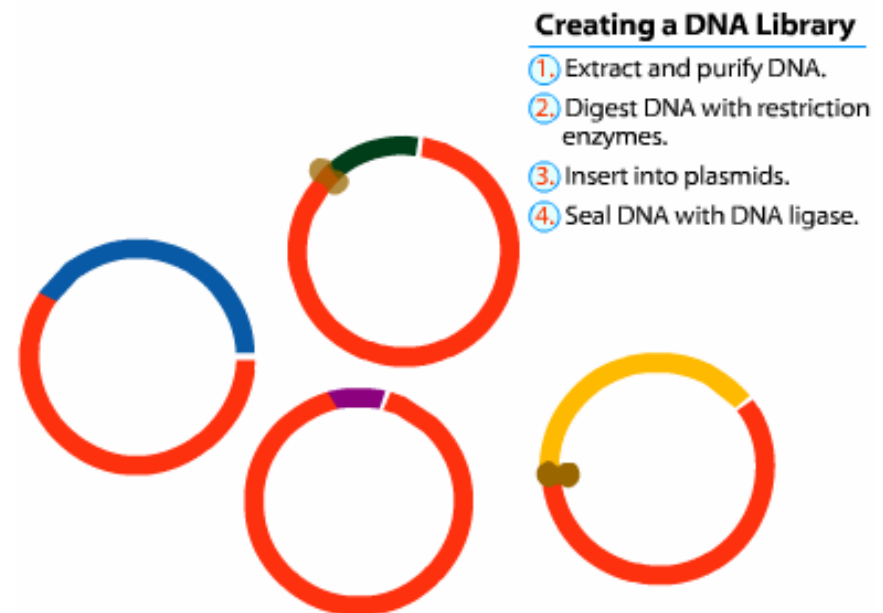
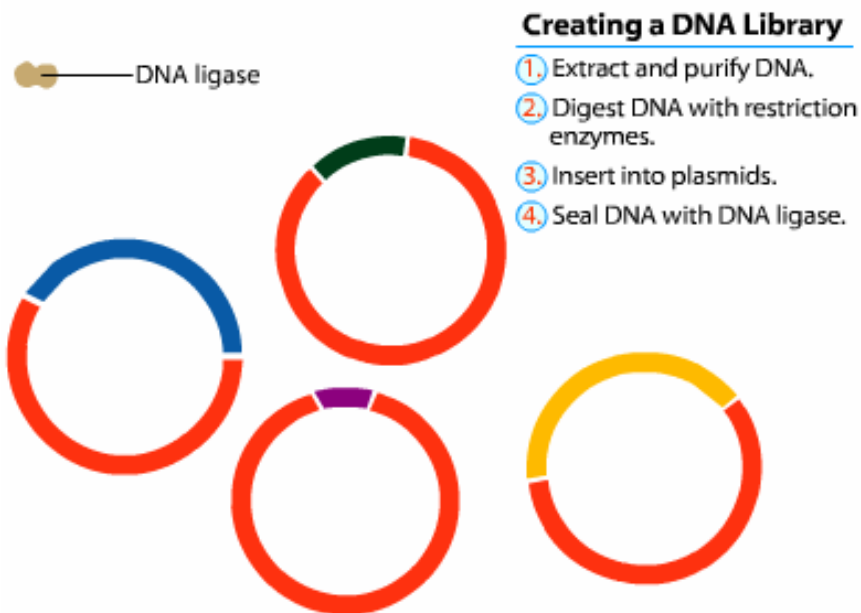


### **Creating a DNA Library**

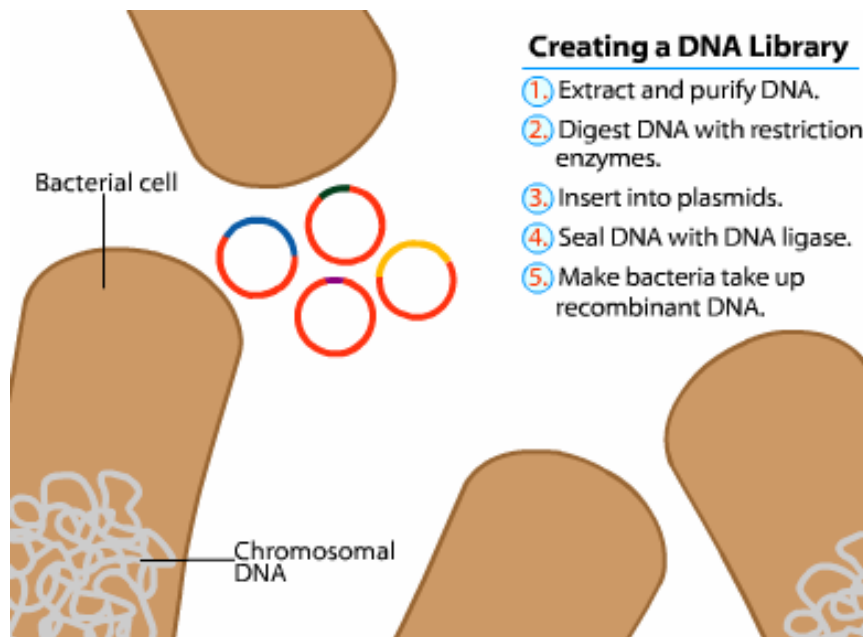
1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.
3. Insert into plasmids.
4. Seal DNA with DNA ligase.



# 4. Zapečetění DNA pomocí DNA ligás v plasmidech

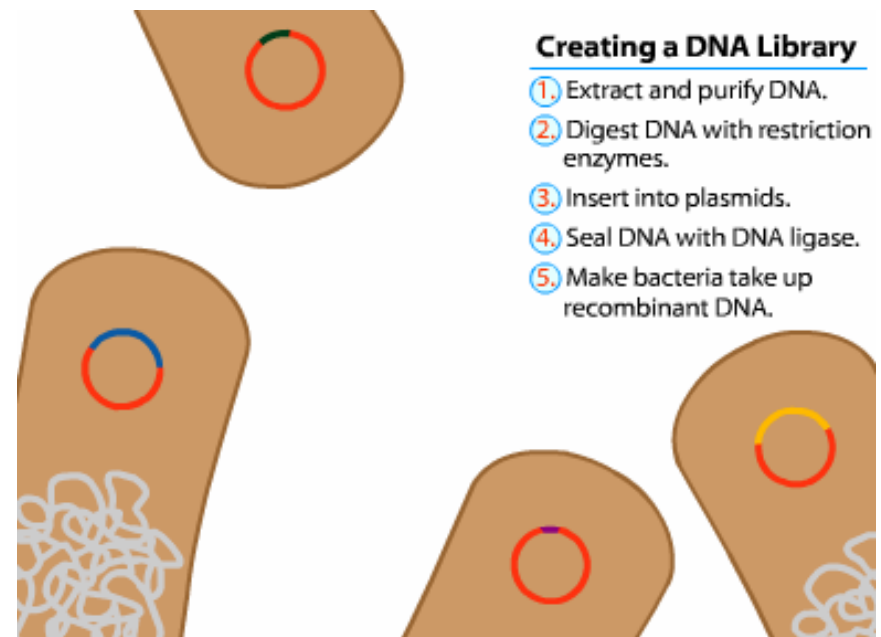


# 5. Vložení rekombinantních plasmidů do bakteriální buňky



## Creating a DNA Library

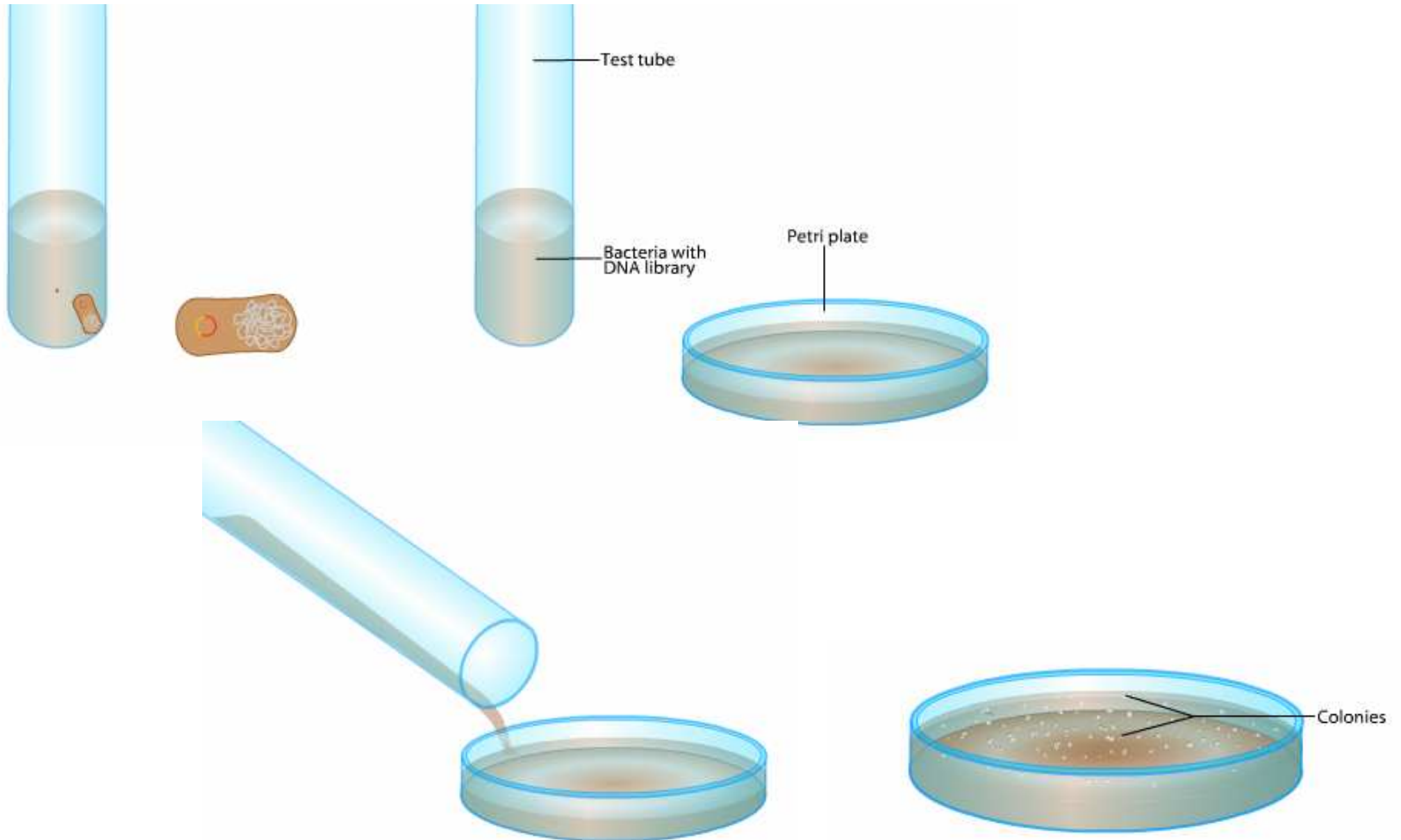
1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.
3. Insert into plasmids.
4. Seal DNA with DNA ligase.
5. Make bacteria take up recombinant DNA.



## Creating a DNA Library

1. Extract and purify DNA.
2. Digest DNA with restriction enzymes.
3. Insert into plasmids.
4. Seal DNA with DNA ligase.
5. Make bacteria take up recombinant DNA.

# 6. Pomnožení bakterií na živné půdě



- Knihovny genomové DNA se využívají především pro získání dostatečného množství genetického materiálu pro určení sekvence genomu.
- Z genomové knihovny lze izolovat žádaný gen jen v některých případech. Jedná se především o bakteriální geny, jejichž kódující oblasti nejsou přerušeny nekódujícími sekvencemi (introny) a na poměrně krátkém úseku DNA zůstává celistvý gen.

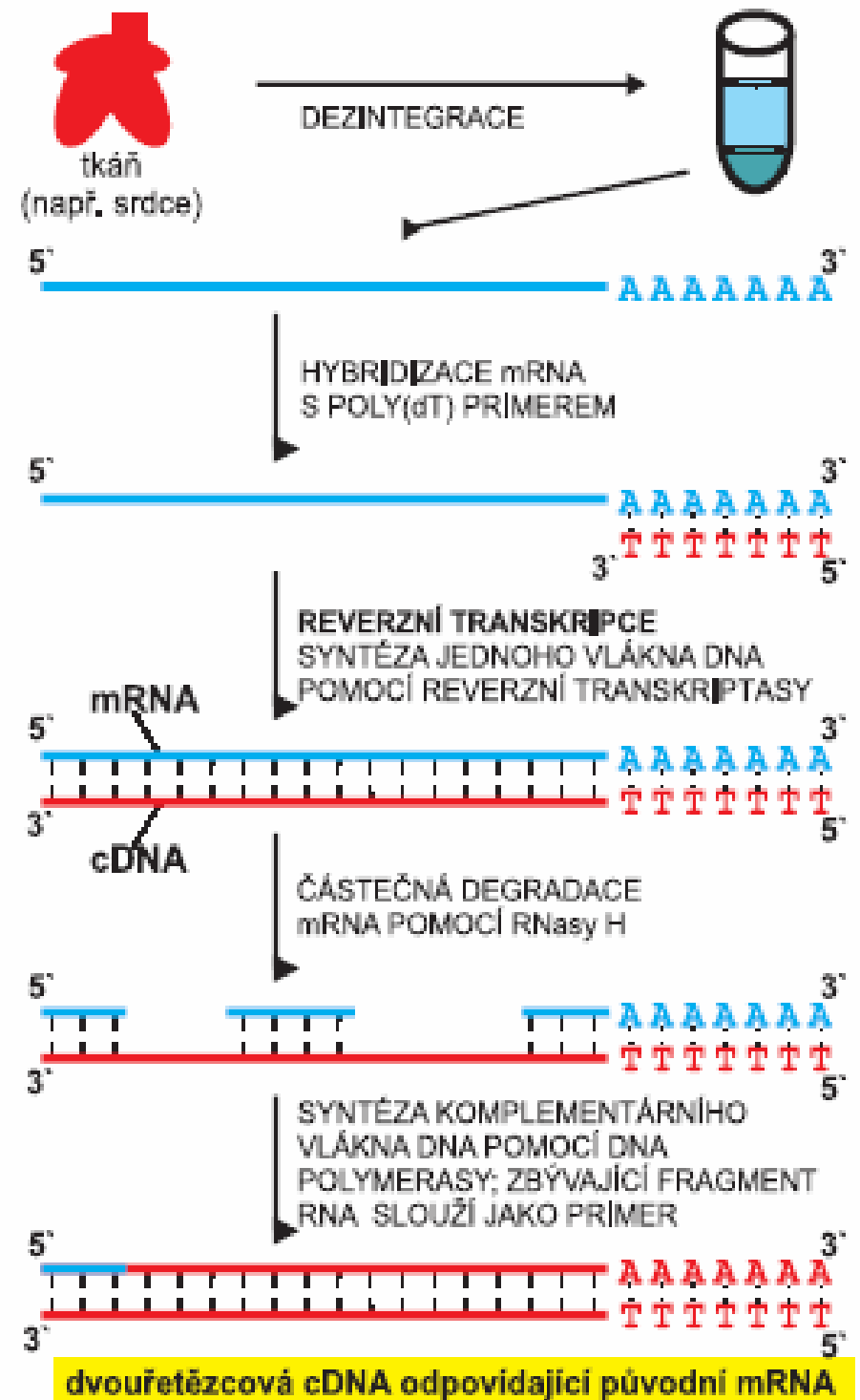
- Genomový klon obsahující žádaný gen lze identifikovat hybridizací se značenou sondou nebo jeho vnesením do mutantního hostitele, který danou vlastnost postrádá (je-li projev genu detekovatelný).

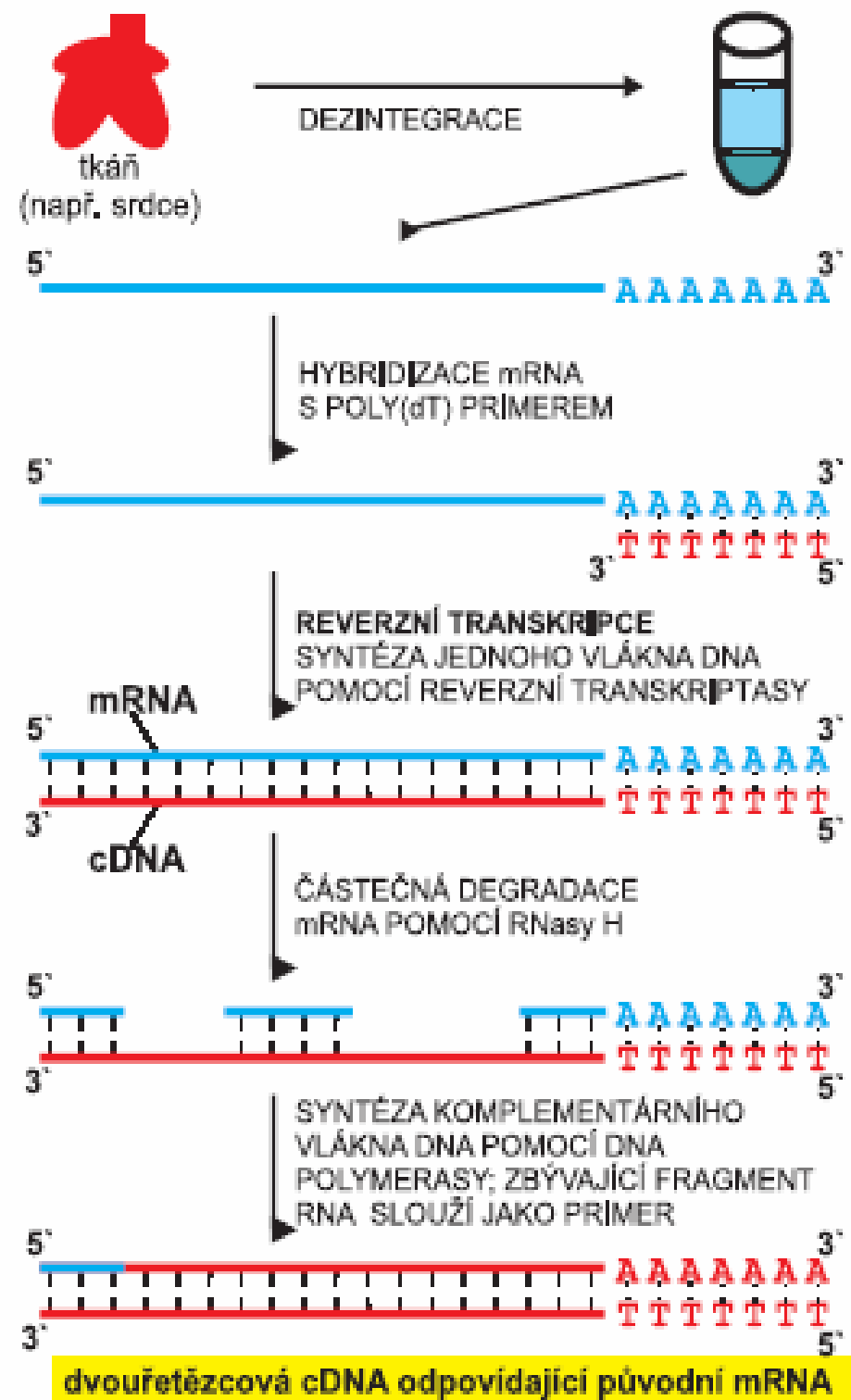
# cDNA KNIHOVNA

- V případě vyšších organismů v jejichž genech jsou kódující sekvence (exony) přerušeny introny lze využít alternativní strategii – zpětný přepis mediátorové RNA (mRNA) do sekvence DNA.
- V buňce z níž je mRNA izolována totiž po přepisu genu (transkripci) již došlo k vystřížení intronů z mRNA, její sekvence tak odpovídá celistvé kódující oblasti a je zakončena sekvencí několika desítek adenosinů.



- Pro přepis mRNA in vitro se využívá specifické DNA polymerasy, enzymu reverzní transkriptasy (RT) izolované z retrovirů (1970; Baltimore a Temin).





- Podobně jako jiné DNA polymerasy neumí RT iniciovat polymeraci de novo, ale vyžaduje přítomnosti krátkého úseku DNA (očka - primeu) již připojeného na matrici (mRNA) podle které vytváří komplementární vlákno DNA, tzv. cDNA (z angl. Complementary DNA).

- Jako obecného primeru se v tomto případě s výhodou využívá krátkého oligonukleotidu poly(deoxyT) a vzniká heteroduplexní dvouřetězcová RNA/DNA molekula. RNA je následně naštěpena pomocí enzymu RNasy H a druhé vlákno DNA je syntetizováno pomocí DNA polymerasy, která využívá nerozštěpenou RNA jako primer.

- Vytvořená dvouřetězcová DNA je následně vložena do klonovacího vektoru a vzniká cDNA klon. Soubor cDNA klonů připravený z mRNA izolované z určité tkáně se nazývá knihovna cDNA.
- Na rozdíl od knihovny genomové DNA obsahuje knihovna cDNA pouze ty kodující sekvence, které jsou v dané buňce (tkáni) v daný čas exprimovány.

- Knihovna cDNA je cenným materiálem umožňujícím predikovat aminokyselinové sekvence kódovaného proteinu nebo jeho nadprodukcii proteinů v bakteriálních nebo kvasničných buňkách, které nejsou schopny vyštěpovat introny.

# Bude na měsíci knihovna ?

- S tímto zajímavým nápadem jak zachránit život na Zemi v případě globální katastrofy přišla nedávno Evropská kosmická agentura.
- ESA chce v budoucnu vytvořit na našem kosmickém sousedovi jakousi „Noemovu archu“, kde by byly uloženy vzorky DNA zástupců fauny a flory a také člověka. Vzorky z této knihovny by pak byly použity v případě globální katastrofy, tedy například kolize Země s cizím tělesem, nebo jaderné války.

- Se sběrem a archivací vzorků DNA začali vědci před nedávnem, dostat něco na Měsíc umíme již od šedesátých let minulého století.
- Jediné v čem tak trochu pokulháváme je zpětný postup, tedy ze vzorků DNA vytvořit zdravé zvíře či rostlinu. Díky velkému a rychlému rozvoji genetiky a příbuzných věd, bude i tento problém brzy vyřešen. Ona „Noemova archa“ by pak mohla být součástí lunární základny, která by měla na Měsíci vyrůst do dvaceti let.