



Biotechnologie léčiv – Základy genového inženýrství II.

Doc. RNDr. Jan Hošek, Ph.D.
hosek@mail.muni.cz

Ústav molekulární farmacie
FaF MU

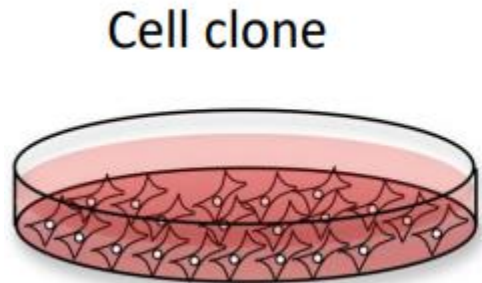
Klonování

- **Klasická definice**

- vytváření nového jedince geneticky identického (shodného) s předlohou

- **Biotechnologická definice**

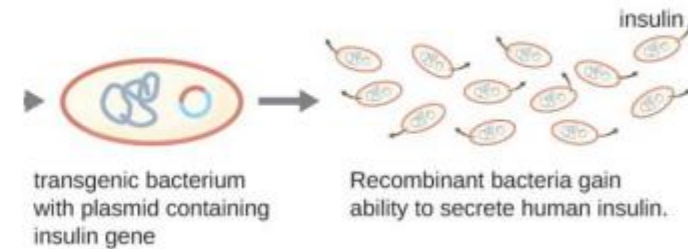
- spojení vektoru s genem → **vytváření geneticky identických buněk/organismů nesoucích vektor s inzertem**



Human clone



Gene clone



▼ gen, fragment

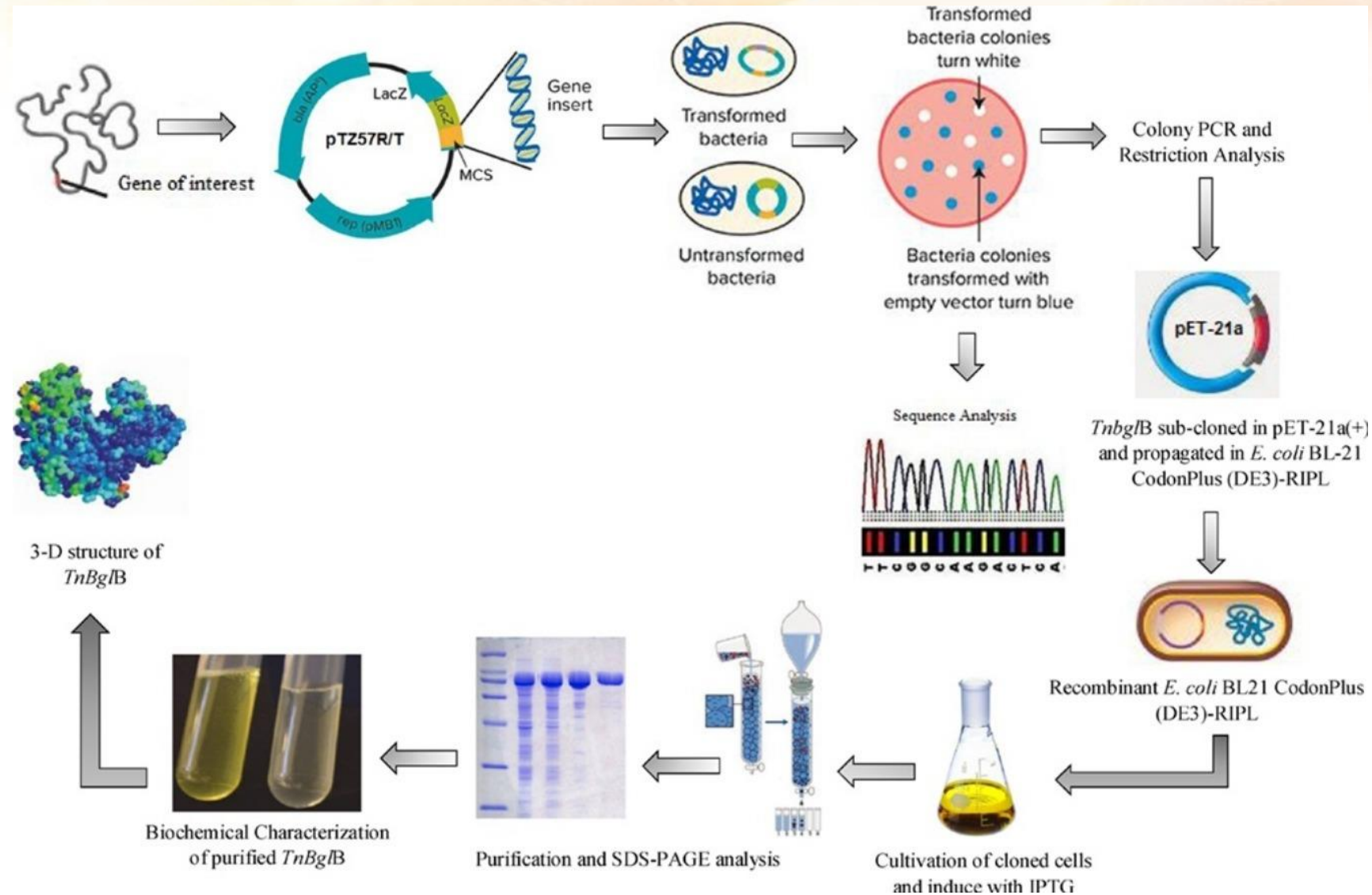


ligace



Základní kroky při klonování genů

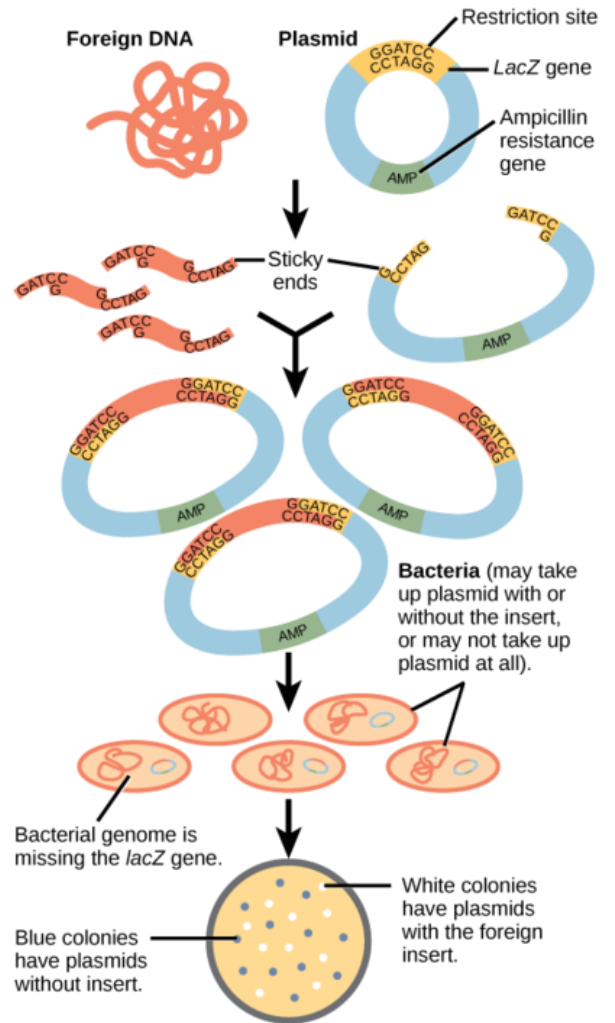
- 1) Štěpení DNA na požadovaných místech
- 2) Rekombinace - spojení DNA-fragmentů
- 3) Transformace – vpravení rekombinované DNA do buňky
- 4) Selekcce buněk obsahující cizí gen
- 5) Analýza klonované DNA



Štěpení DNA restriktázami

Neorientované klonování - spojujeme fragmenty DNA s vektorem po jejich rozštěpení stejnou restriktázou = **stejné přechínající konce na obou stranách**

Orientované klonování - pro štěpení vektoru a klonované DNA jsou použity různé restriktázy = **různé přechínající konce na každé straně**



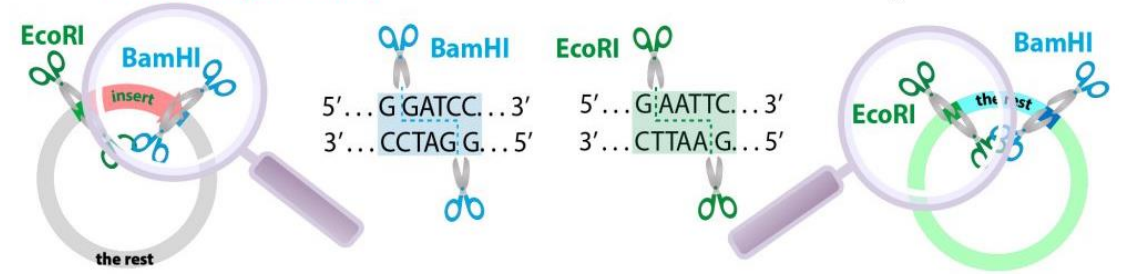
The foreign DNA and plasmid are cut with the same **restriction enzyme**, which recognizes a particular sequence of DNA called a *restriction site*. The restriction site occurs only once in the plasmid, and is located within the *lacZ* gene, a gene necessary for metabolizing lactose.

The restriction enzyme creates sticky ends that allow the foreign DNA and cloning vector to anneal. An enzyme called ligase glues the annealed fragments together.

The ligated cloning vector is transformed into a bacterial host strain that is ampicillin sensitive and is missing the *lacZ* gene from its genome.

Bacteria are grown on media containing ampicillin and X-gal, a chemical that is metabolized by the same pathway as lactose. The ampicillin kills bacteria without plasmid. Plasmids lacking the foreign insert have an intact *lacZ* gene and are able to metabolize X-gal, releasing a dye that turns the colony blue. Plasmids with an insert have a disrupted *lacZ* gene and produce white colonies.

cut insert (what you want to put in) and **vector (home you want to put it in)** with the same 2 restriction enzymes

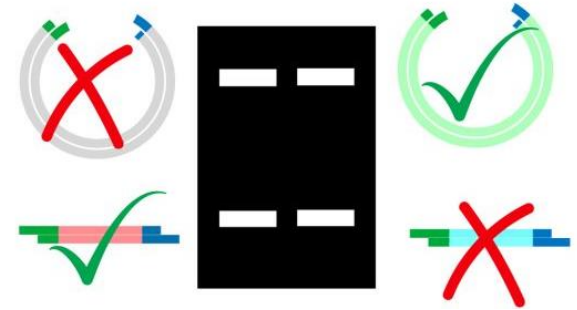


This generates DNA pieces with complementary "sticky ends" you can mix & match (once you separate them)

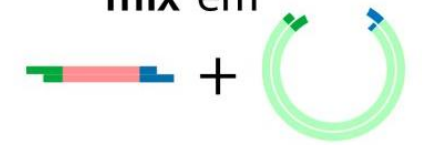


purify the pieces you want

run an agarose gel to separate by size, then cut out & purify those you want



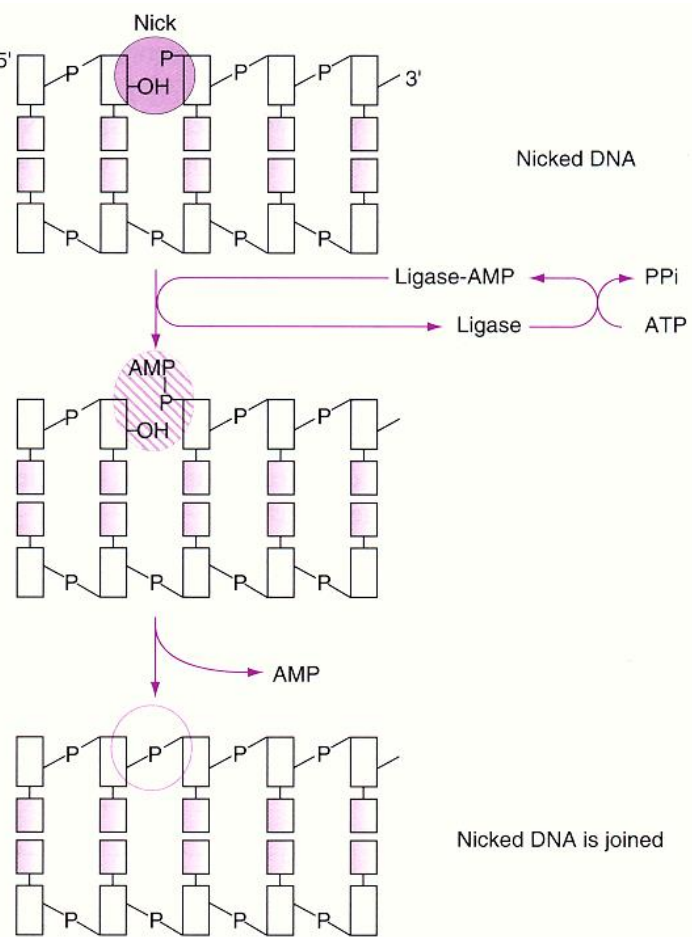
mix 'em



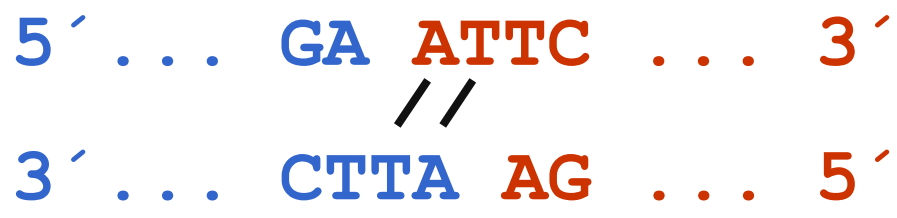
stitch 'em



Ligase = kovalentní spojení vektoru s fragmentem



samovolné připojení



**spojení ligázou
+ 2 x ATP**



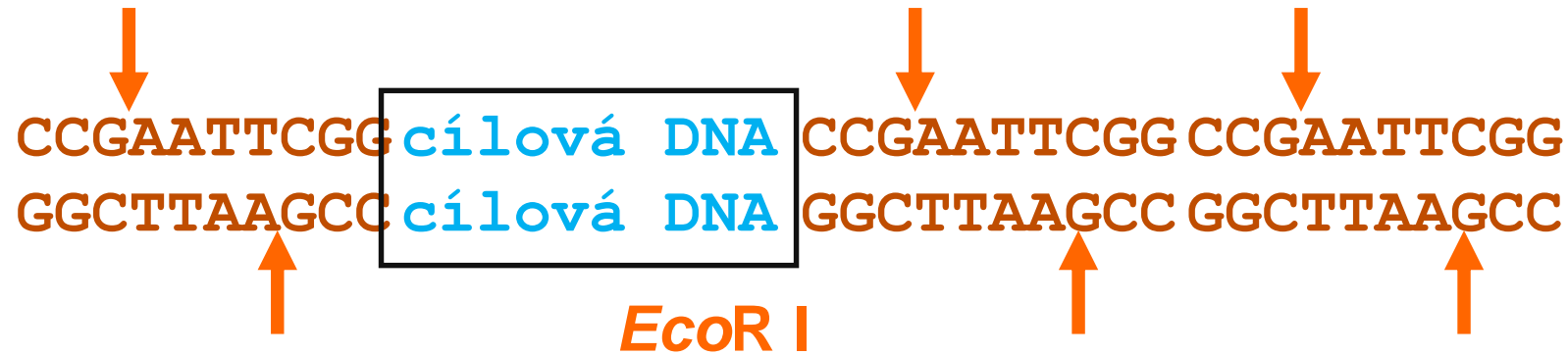
Vytvoření přechnívajících konců - linkery

ligace

5' ... CCGAATTCGG ... 3'
3' ... GGCTTAAGCC ... 5'

+

cílová DNA
cílová DNA



5' ... AATTCGG cílová DNA CCG ... 3'
3' ... GCO cílová DNA GGCTTAA ... 5'

Klonování produktů PCR – I → připojení restričních míst a restriční štěpení

GCNNNGAATTCTACGTCCATC

ATGCAGGTAG

GCTAGTGTC

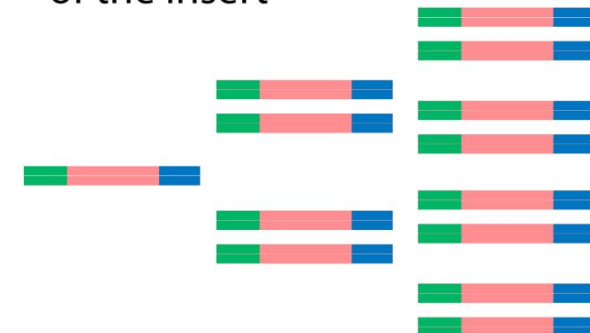
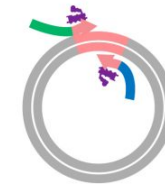
CGATCACAGTCTTAAGNNCG

amplifikace

restriční štěpení

you can use PCR to make lots of copies of the insert

something with insert you want



and you can use the primers to add on cut sites you want

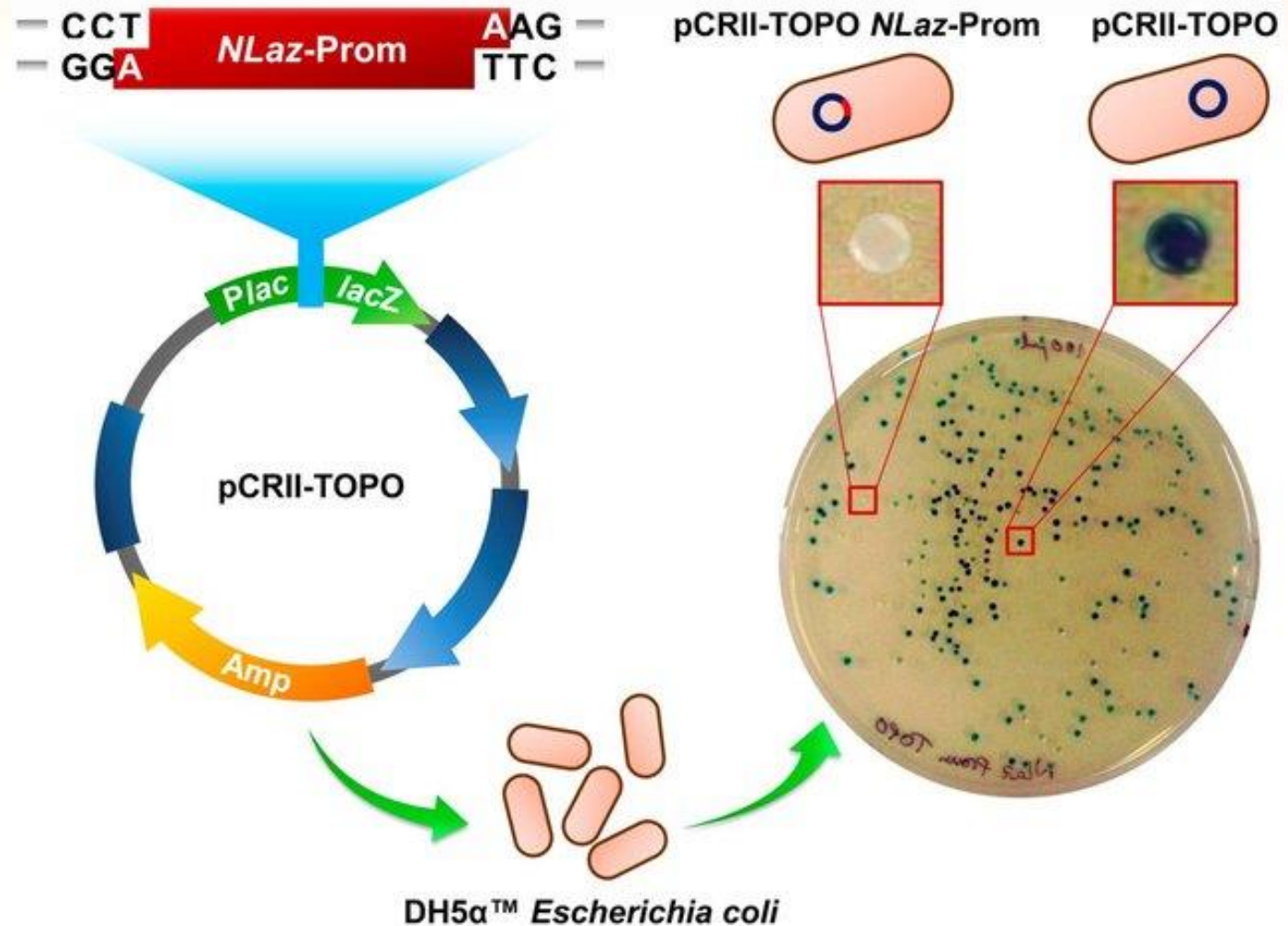
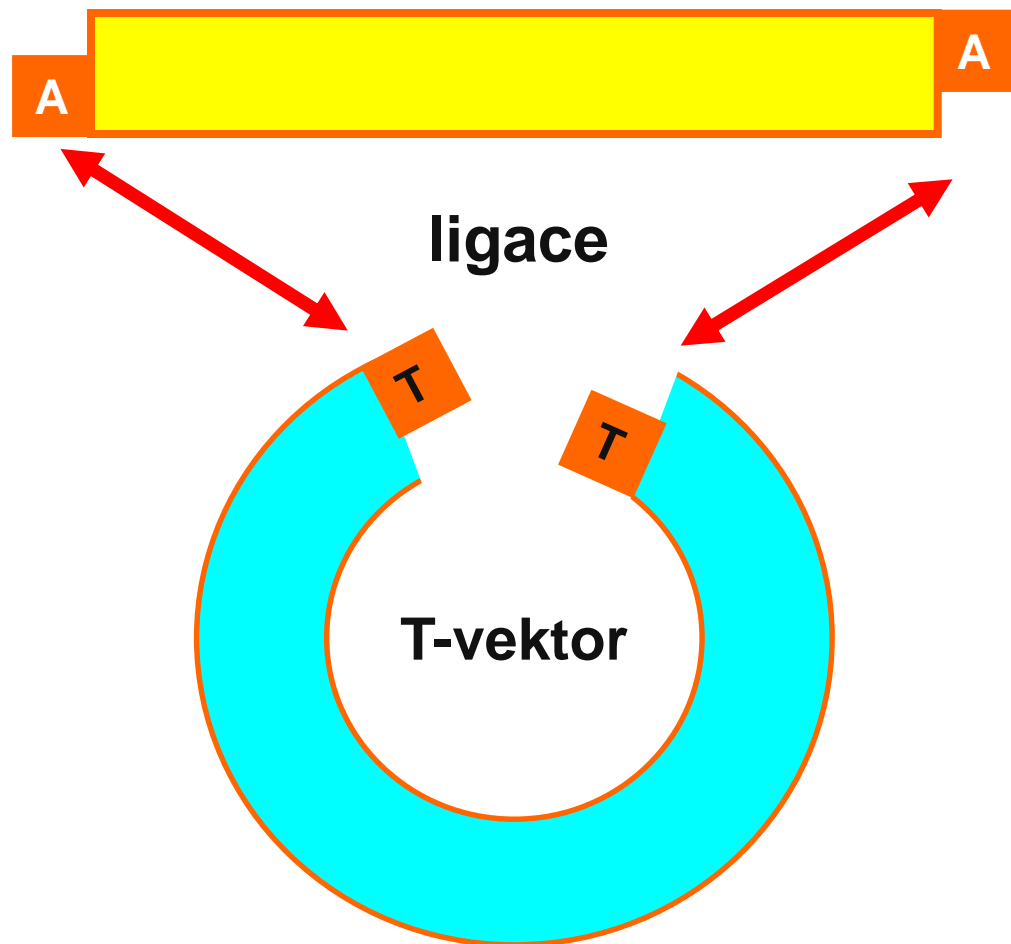


this cutting leaves you with phosphorylated ends but the primers are usually synthesized without phosphates - this only comes into play if your vector is dephosphorylated

Klonování produktů PCR – II →

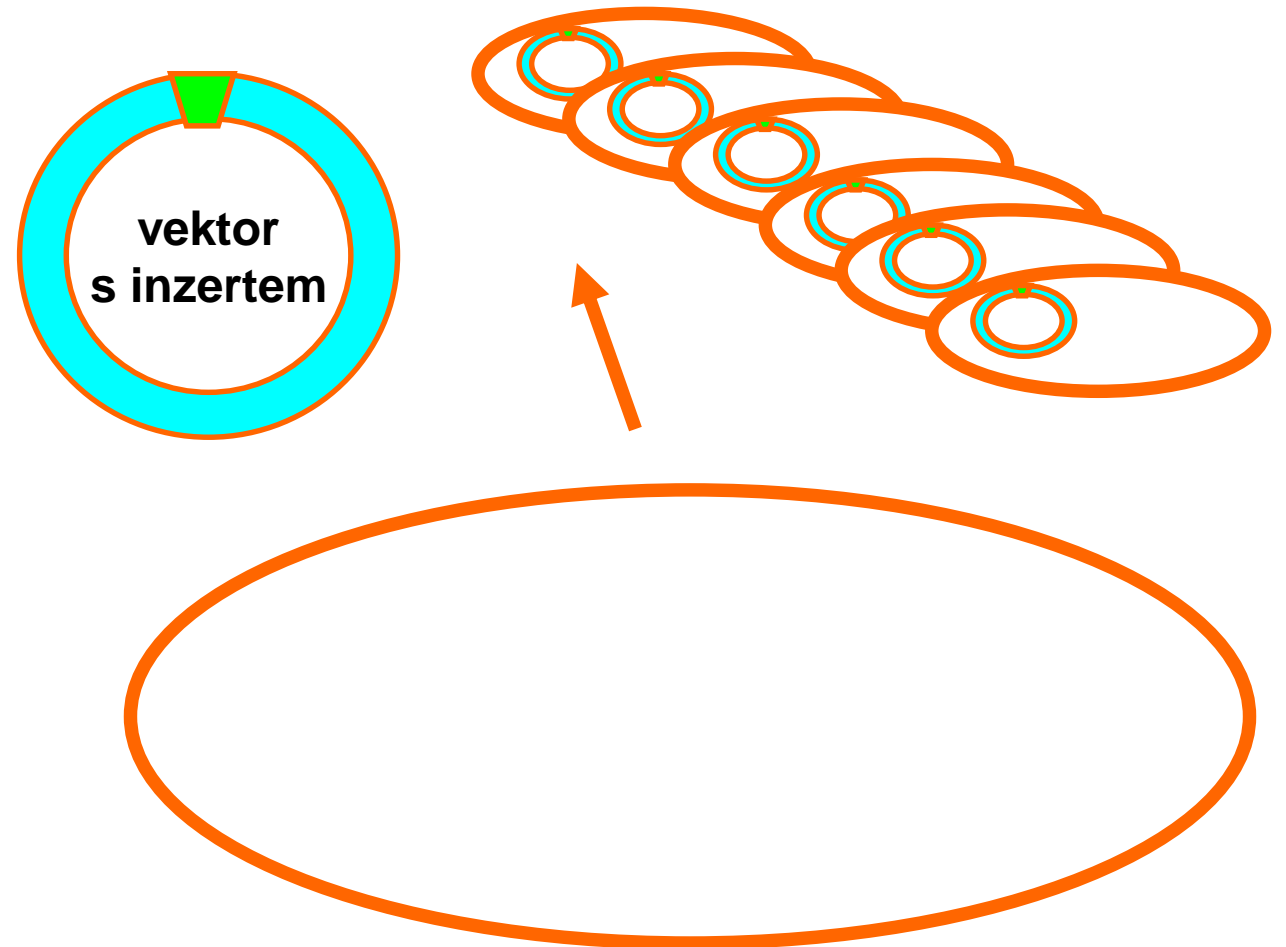
TA klonování

Taq polymeráza vytváří jednonukleotidové 3'-přesahy, nejčastěji A



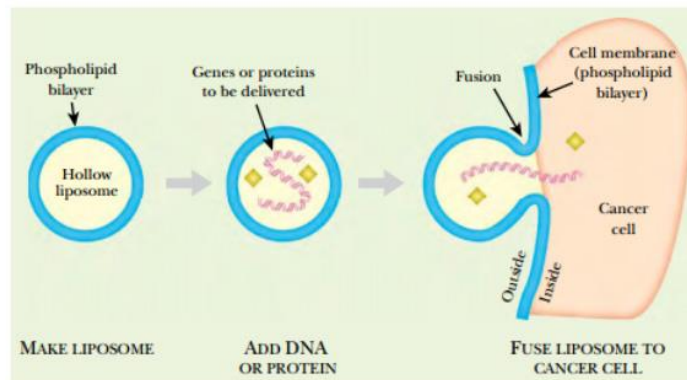
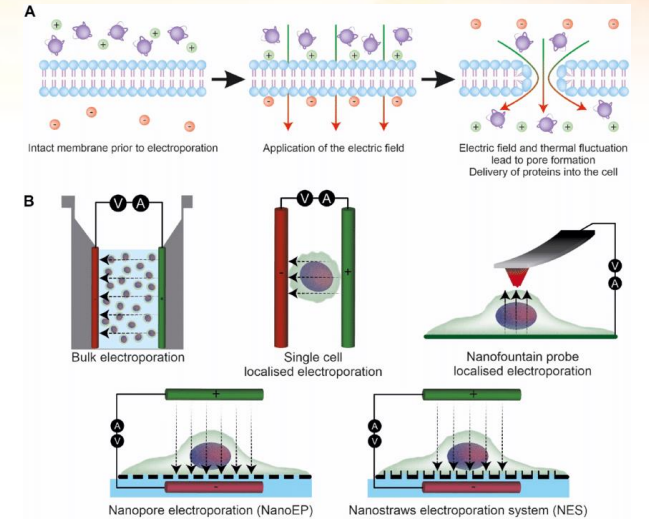
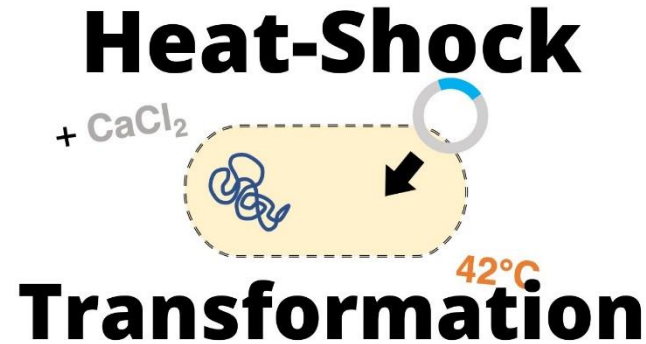
Vnesení konstruktu do hostitele

- **Transformace** = vnesení nevirové DNA do **prokaryot** a neživočišných eukaryot
- **Transfekce** = vnesení DNA do **euraryotické** buňky
- **Transdukce** = přenos DNA pomocí virových vektorů



Metody transformace/transfekce

- Heat shock + CaCl_2
- Elektroporace
- Lipofekce
- Mikroinjekce a „gene gun“



„Heat shock“

Chemokompetentní buňky s CaCl_2

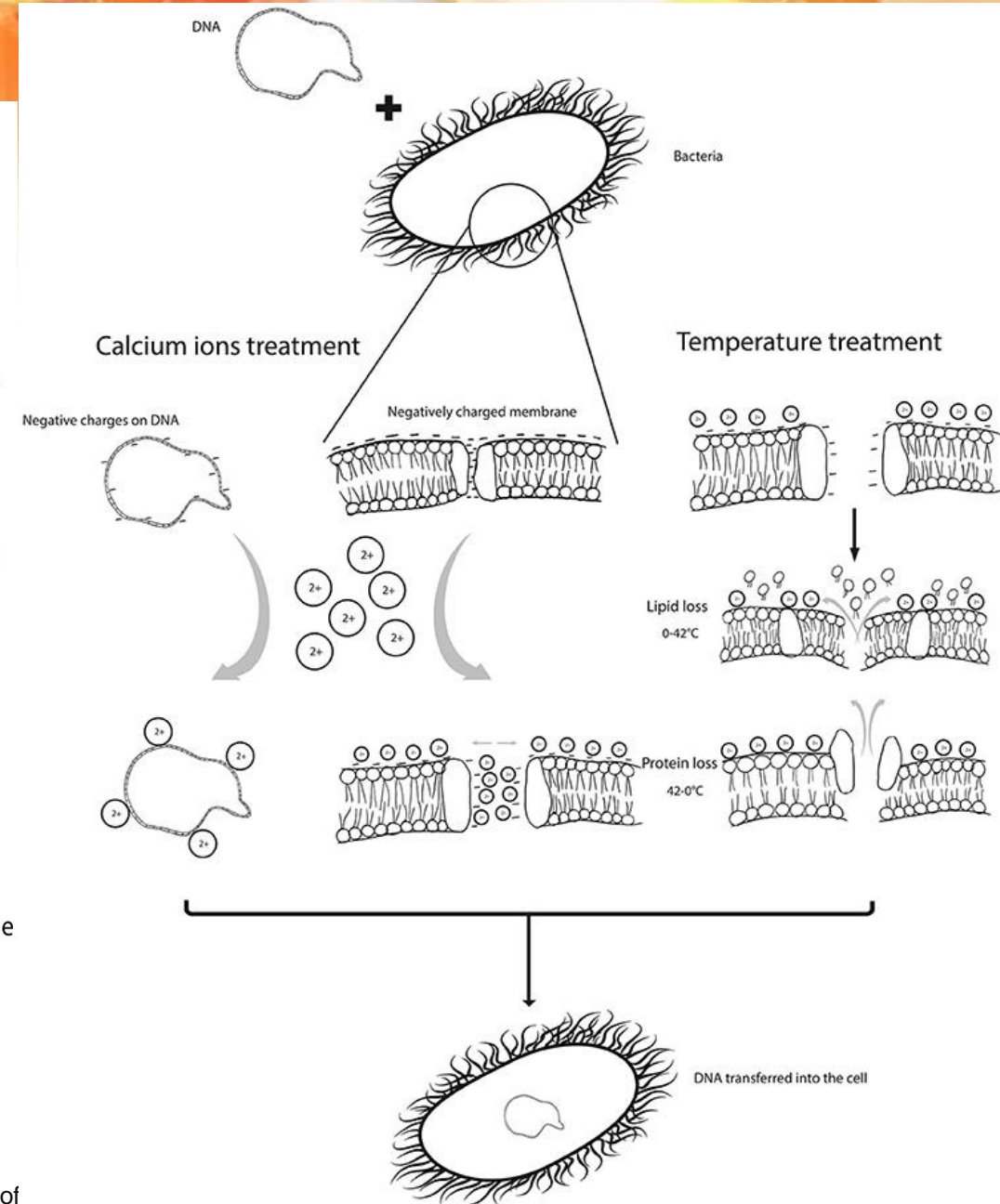
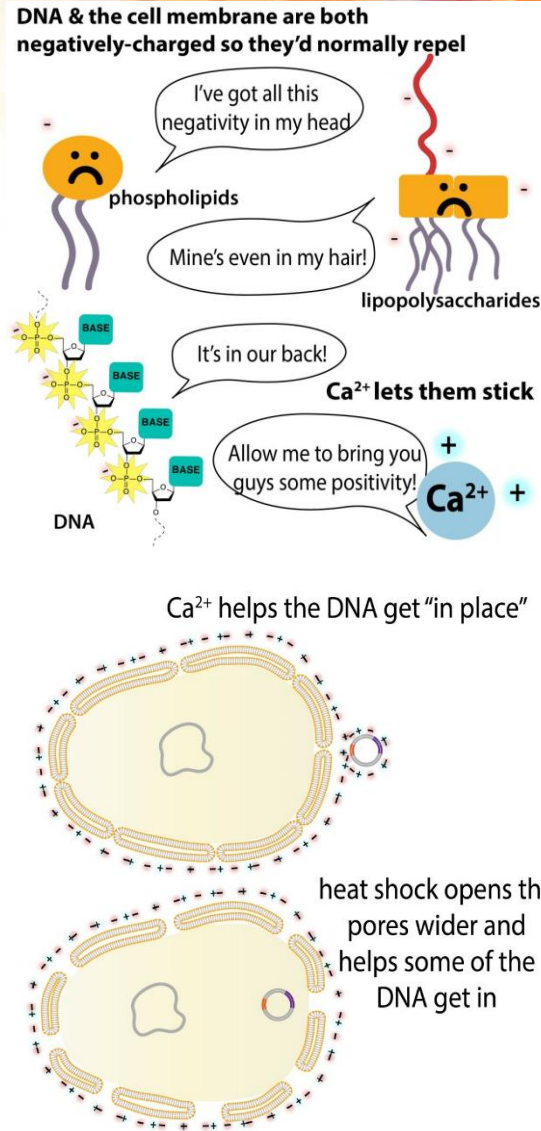
Přidat DNA, 4° C, 30 min

Příjem cizí DNA do buněk

Teplotní šok, 42° C, 30 s

Inkubace buněk

Selekce transformantů

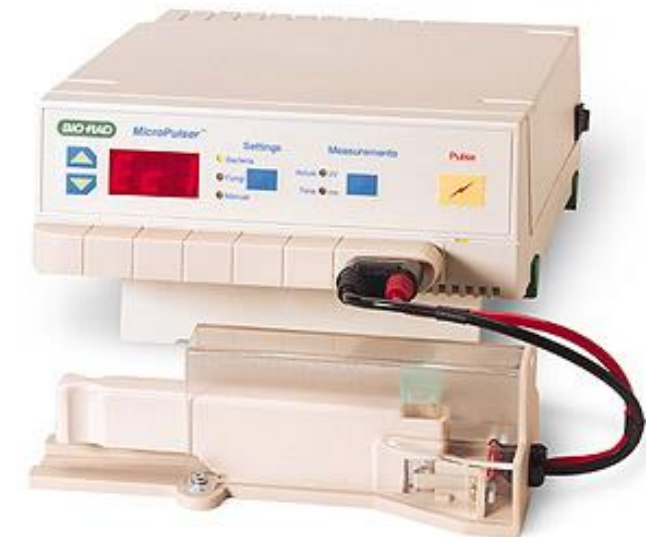
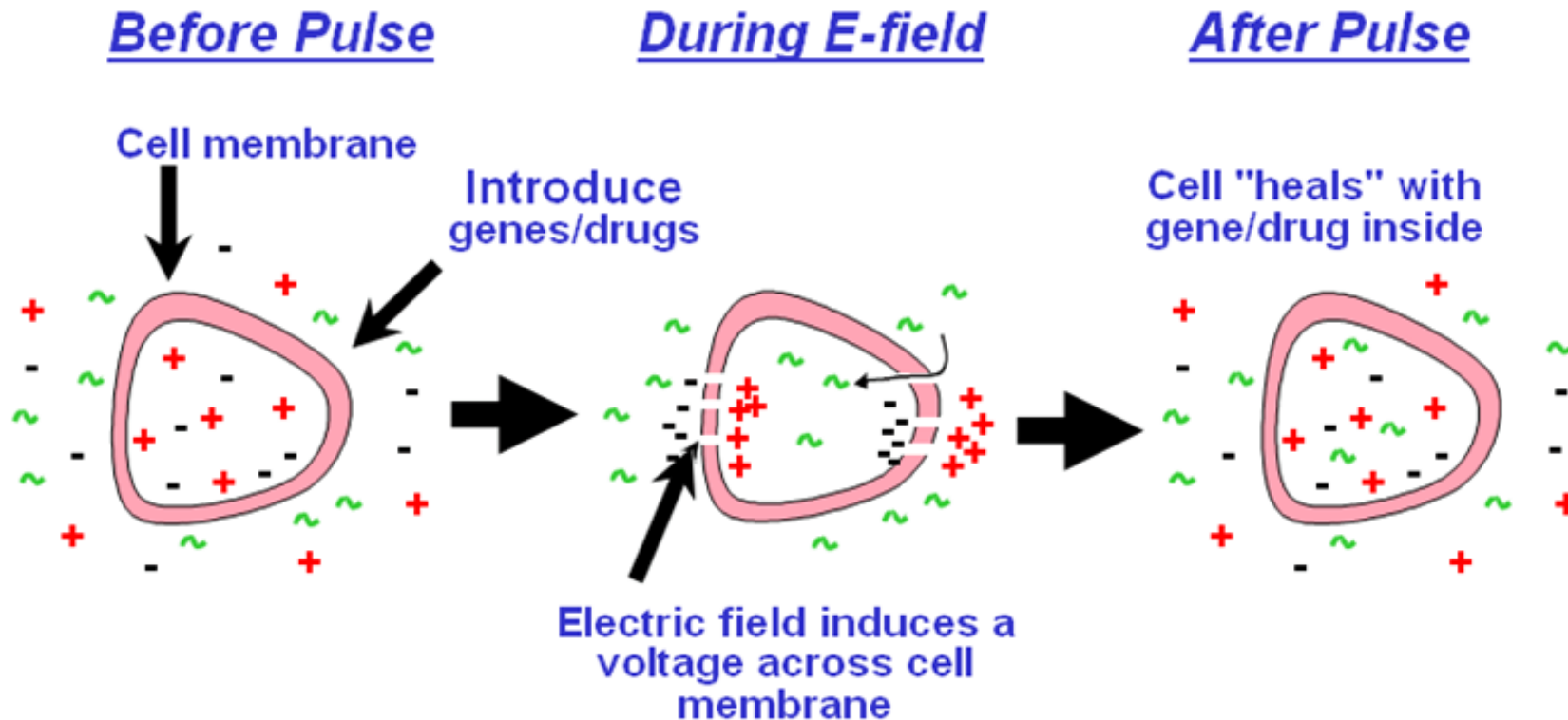


<https://thebumblingbiochemist.com/365-days-of-science/bacterial-transformation-heat-shock-chemically-competent-cells/>

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02169>

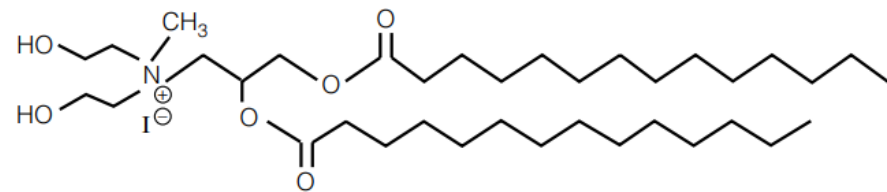
Elektroporace

- Elektrické impulzy způsobují vznik pórů buněčné membrány a vstup exogenní DNA do buňky



Lipofekce

- Tvorba liposomů s enkapsulovanou DNA
- Možnost transfekce oligo DNA, RNA, siRNA, YAC
- Hojně využívané u eukaryot
- Možnost transfekce *in vivo*



Structure of the synthetic cationic lipid component of the TransFast™ Reagent.

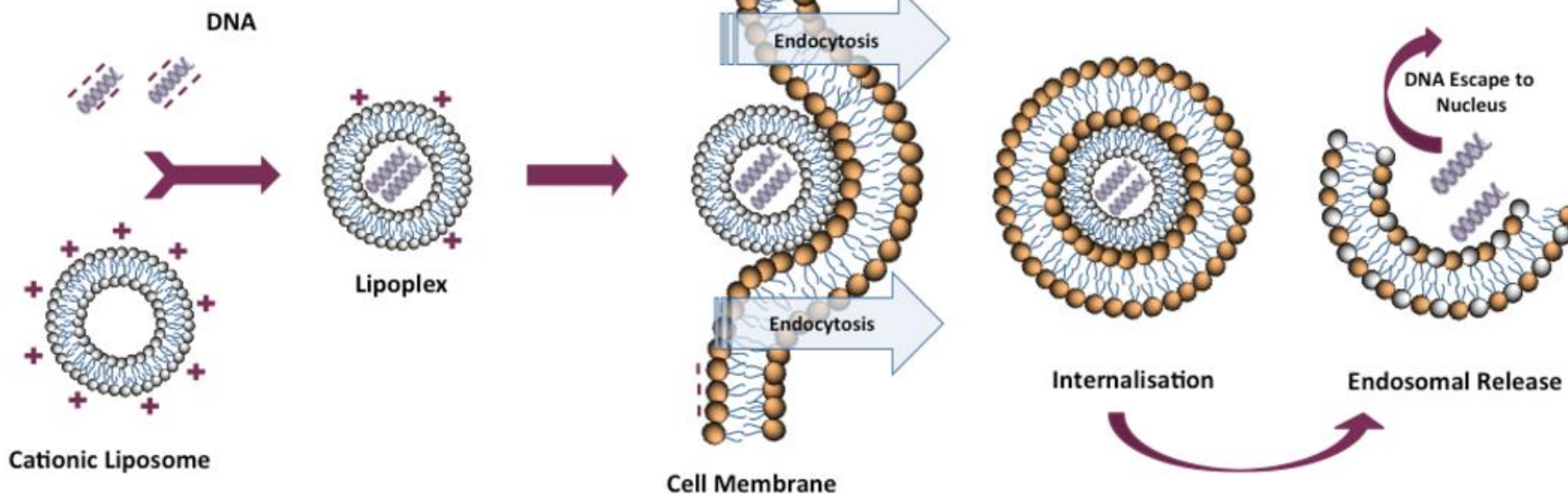
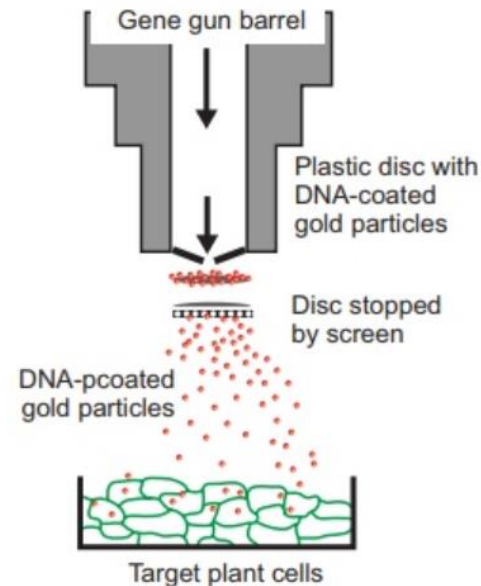
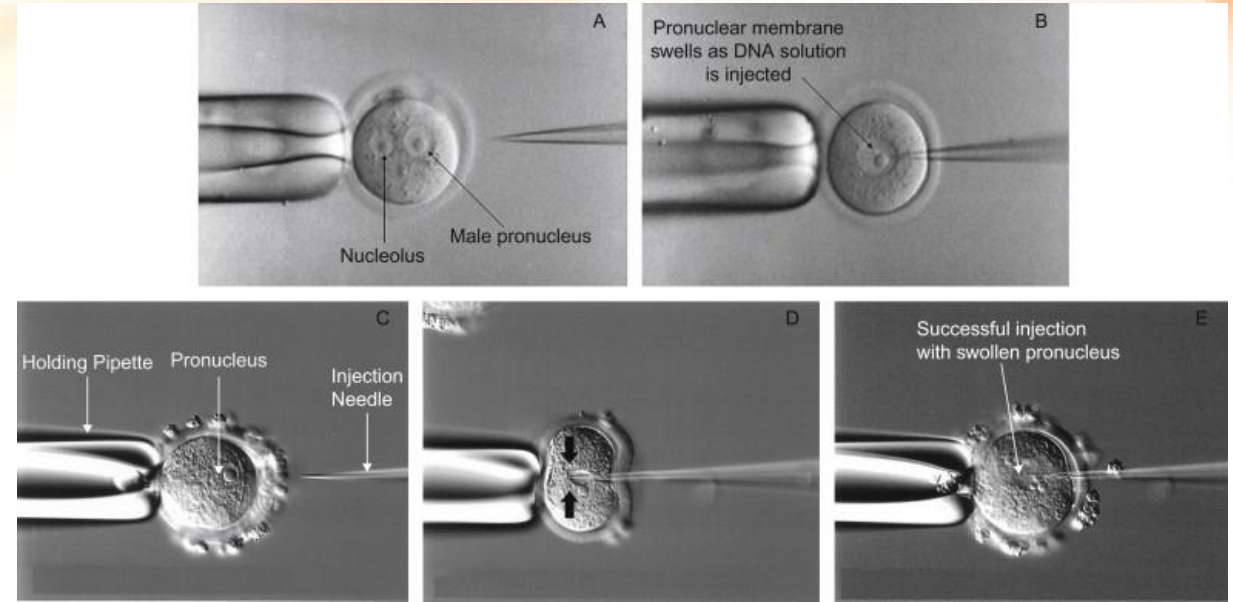


Figure 1.5: Proposed mechanisms of cationic lipoplex condensation and uptake. In brief, cationic liposomes are attracted by electrostatic interactions to the negative charges of DNA forming a lipoplex. Lipoplex binding to the cell surface followed by internalisation and then release of DNA from the lipoplex. DNA enters the nucleus and in the nucleus, RNA will be transcribed.

„Gene gun“ a mikroinjekce

<https://doi.org/10.1016/C2011-0-05817-9>

- Mechanické vnesení DNA do buňky – kvůli velikosti „vektorů“ vhodné hlavně pro eukaryota
- Mikroinjekce – vnesení DNA přímo do jádra buňky (vajíčka, embryonální kmenové buňky...)
- „Gene gun“ (biobalistická technika) – vstřelování nano-/mikročástic obalených DNA do buněk



Gene gun Helios™ by BioRad is used to transfect cells in cultures and plant leaves

Selekce buněk s rekombinantním genem

- 1) Restrikční analýza plasmidové DNA po minipreparaci
- 2) Inzerční inaktivace
- 3) α -komplementace
- 4) Hybridizace kolonií
- 5) Test PCR
- 6) Sekvenování

Selekce probíhá primárně na základě rezistence k antibiotikům

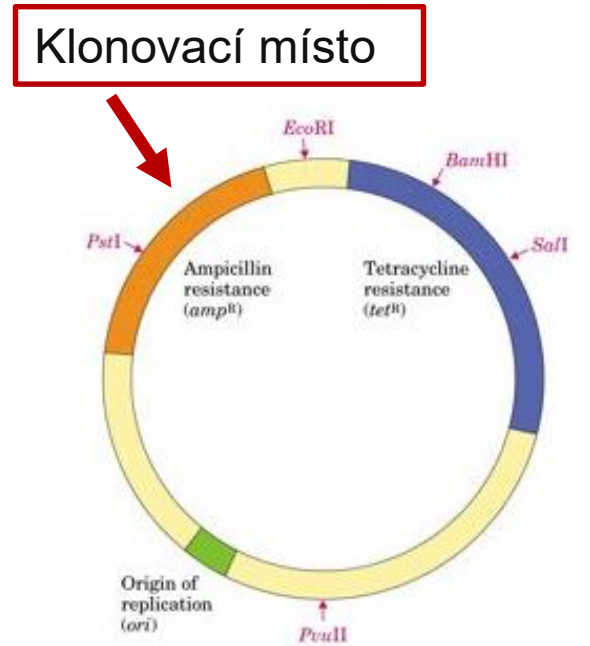
Hostitelská buňka je senzitivní k antibiotiku

Vektor přináší geny rezistence

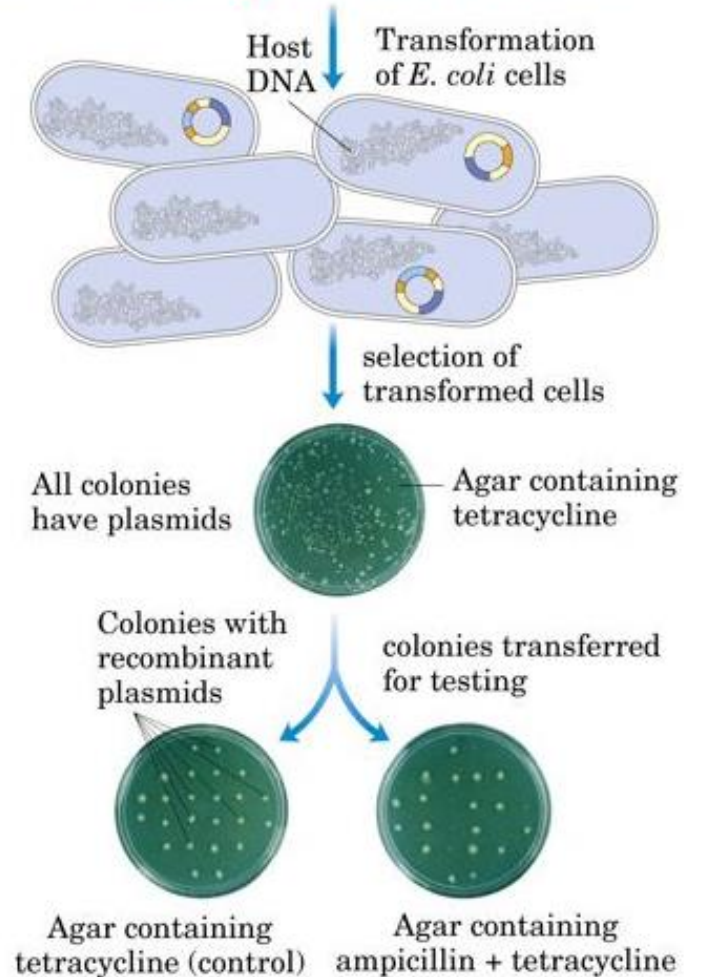


Transformovaná buňka je rezistentní k antibiotiku

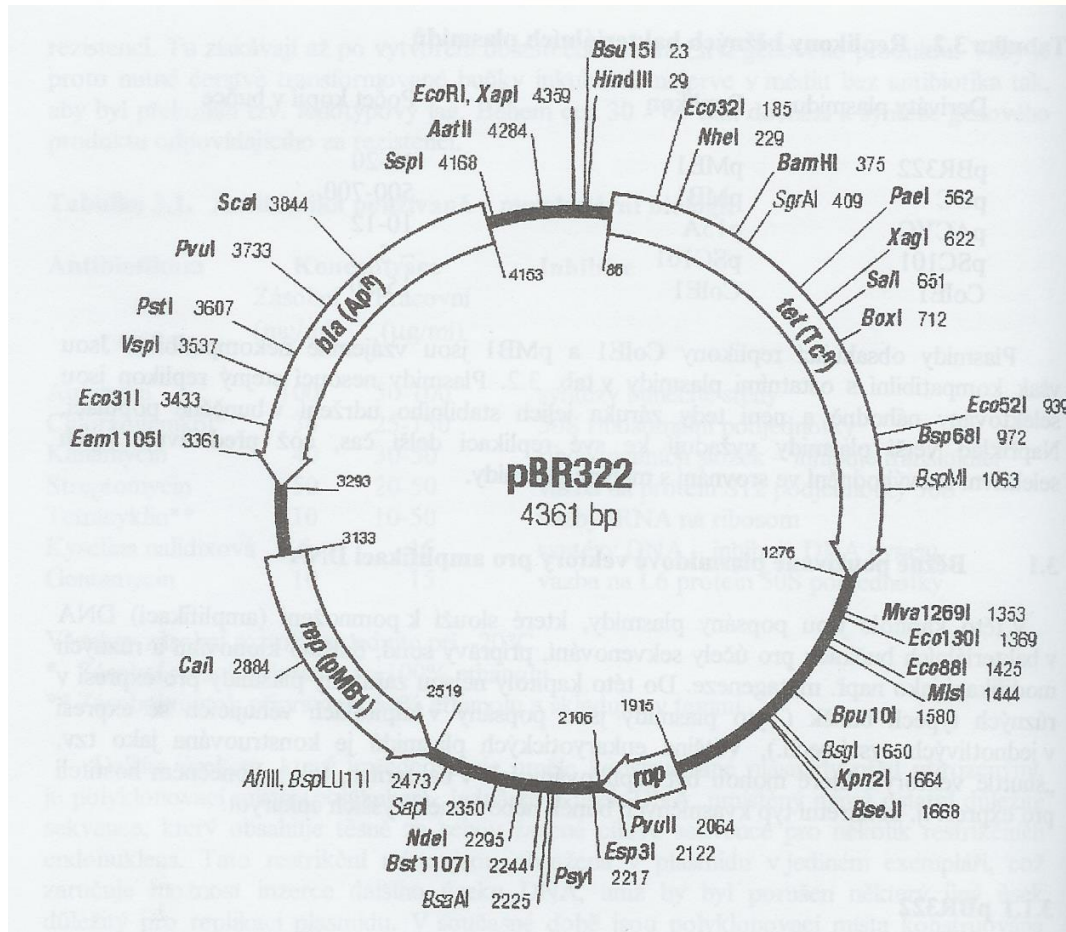
Cloning foreign DNA using *E. coli*, cont.



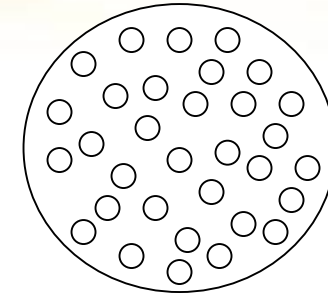
Determine colonies with insert using selection on antibiotic plates



Inzerční inaktivace – selekce na TET^S

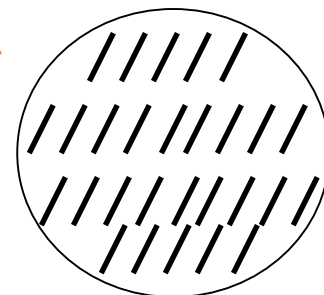
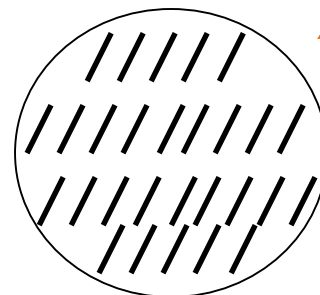


kolonie transformovaných buněk



TET

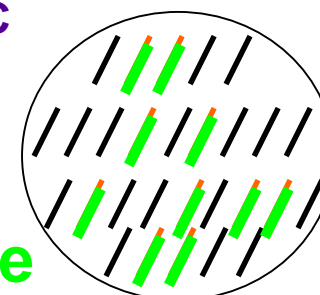
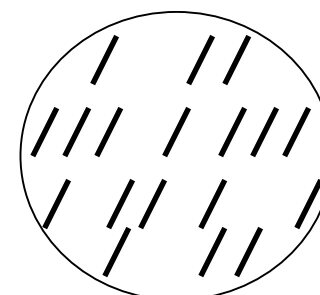
AMP



přeochkování sterilním párátkem

TET

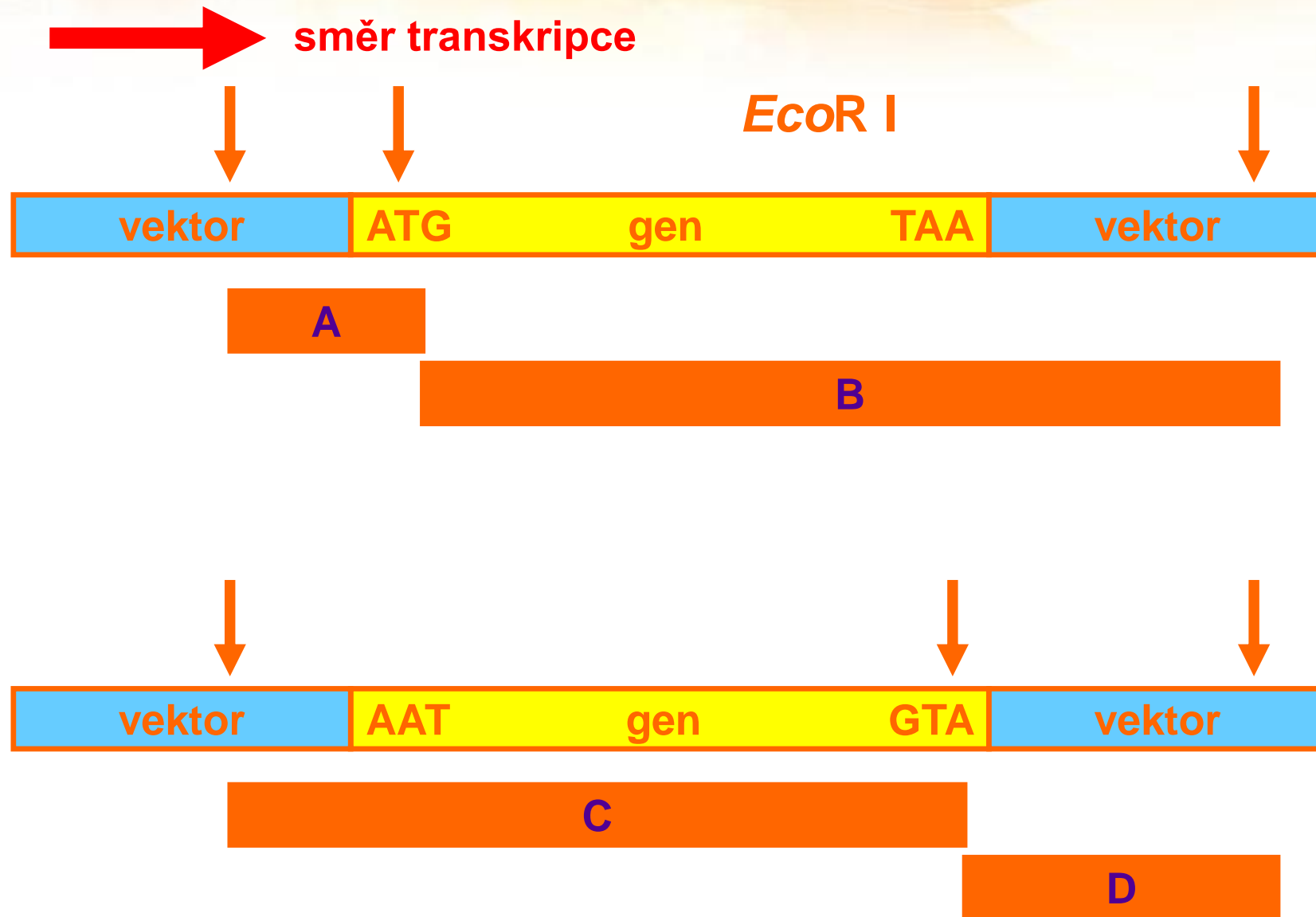
AMP



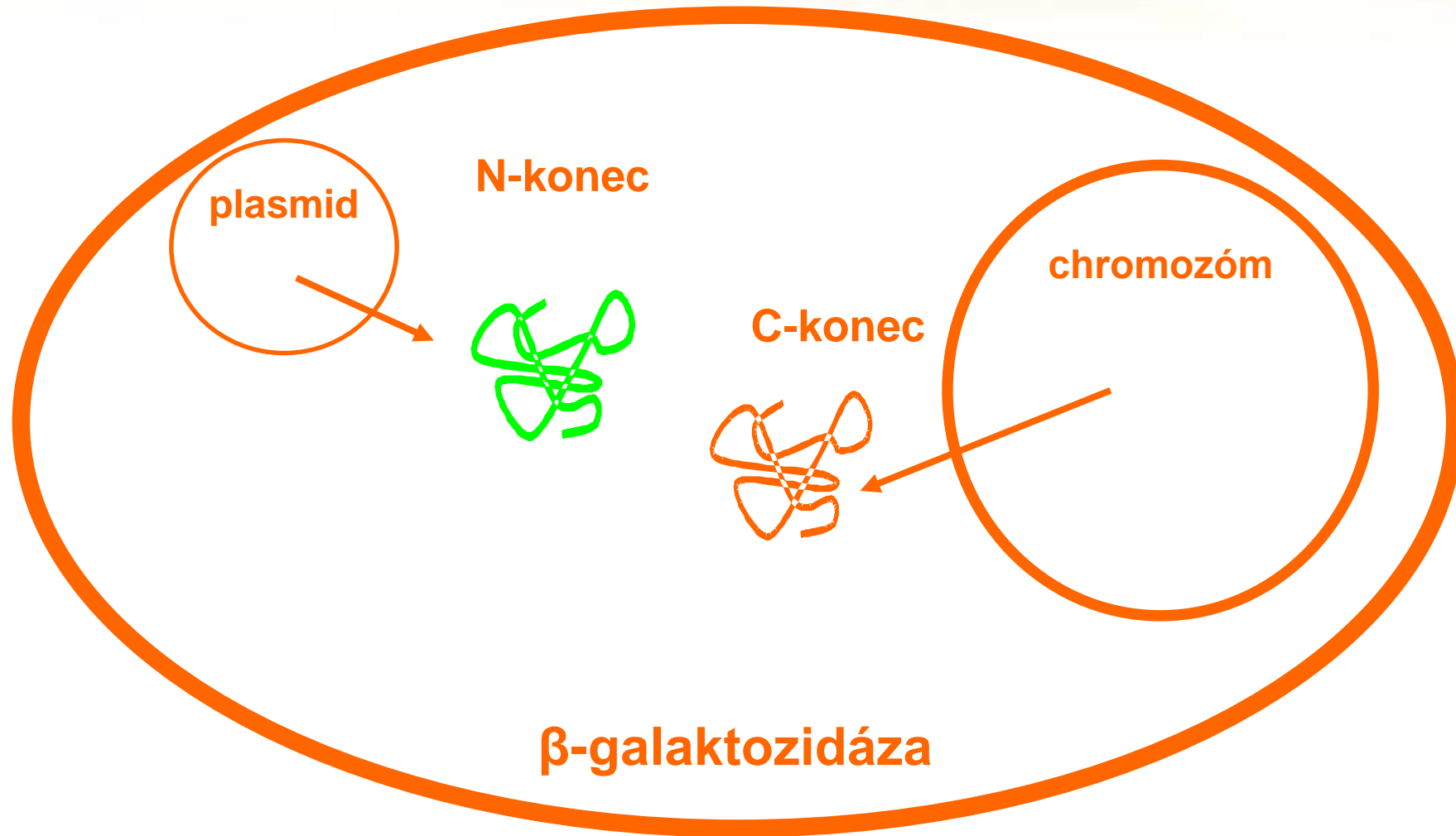
inkubace přes noc při 37°C

AMP^R, TET^S kolonie

Restrikční štěpení plasmidu



Funkce β -galaktozidázy α -komplementace



Funkce β -galaktozidázy

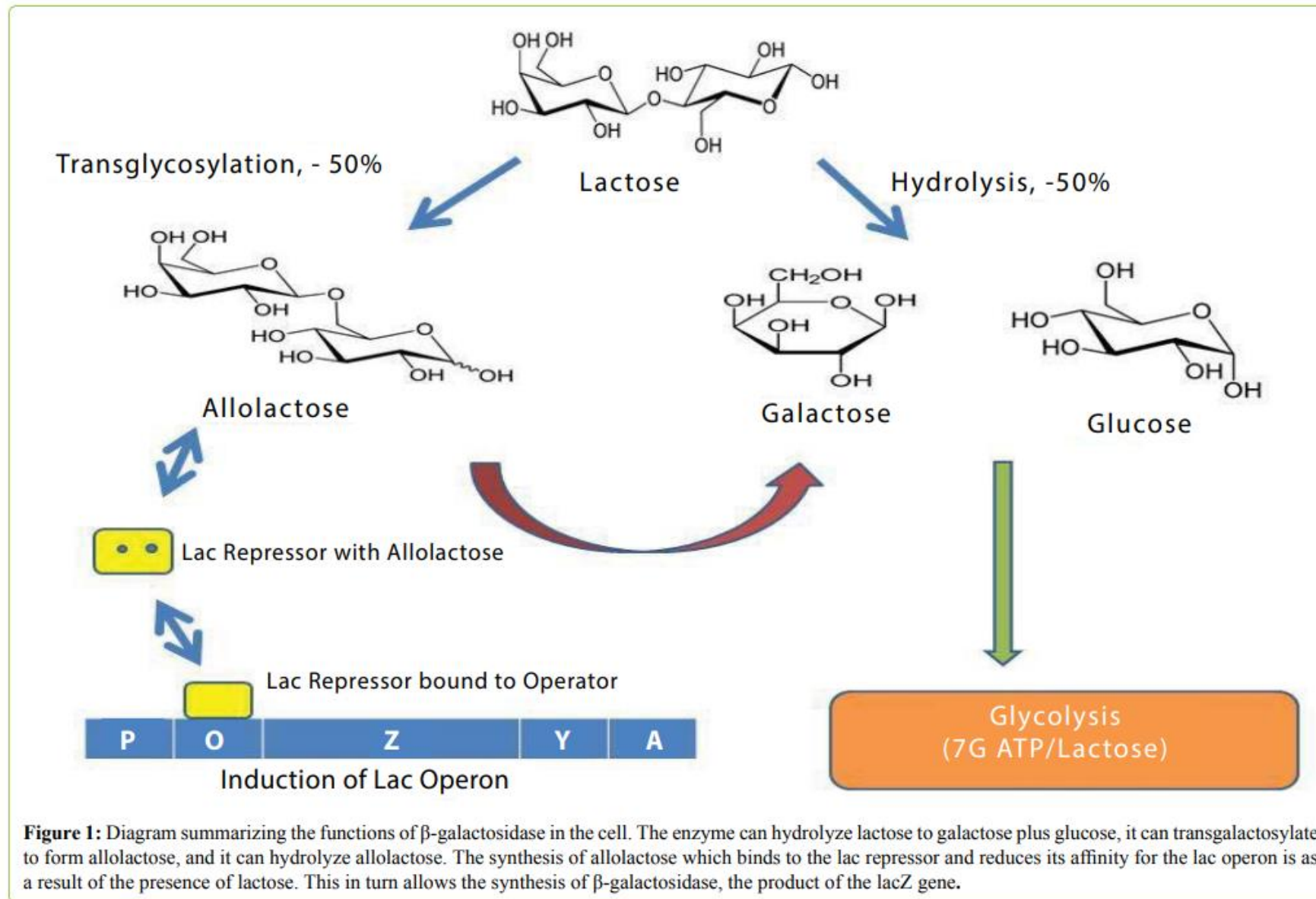
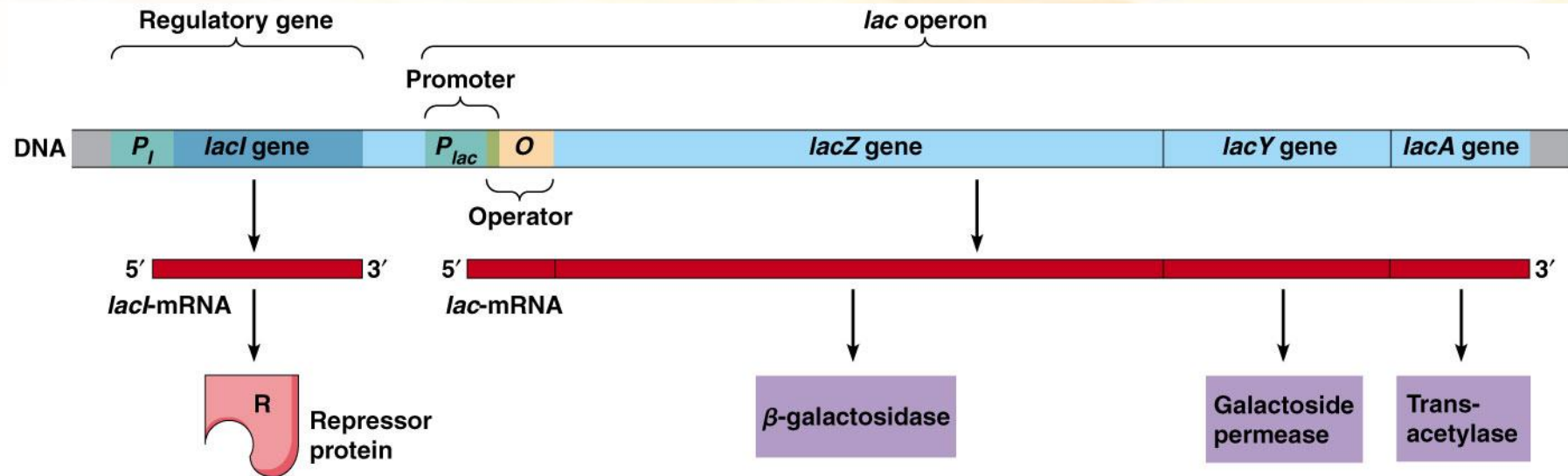


Figure 1: Diagram summarizing the functions of β -galactosidase in the cell. The enzyme can hydrolyze lactose to galactose plus glucose, it can transgalactosylate to form allolactose, and it can hydrolyze allolactose. The synthesis of allolactose which binds to the lac repressor and reduces its affinity for the lac operon is as a result of the presence of lactose. This in turn allows the synthesis of β -galactosidase, the product of the lacZ gene.

lac operon *Escherichia coli*

enzymy pro metabolismus laktózy



© 2012 Pearson Education, Inc.

I: kóduje represor

Z: kóduje enzym beta-galaktozidázu ($lac \rightarrow glu + gal$)

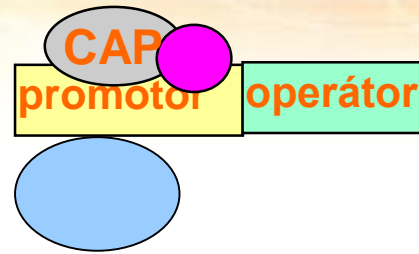
Y: kóduje enzym permeázu

A: kóduje enzym thiogalaktozidtransacetylázu

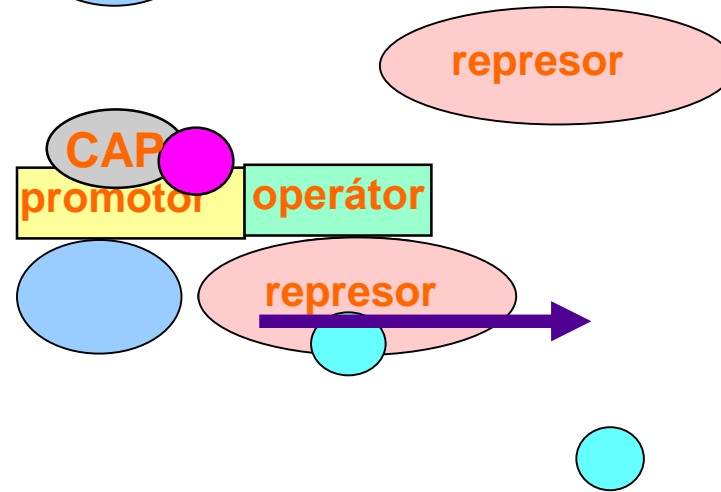
induktor - laktóza

Regulace *lac* operonu

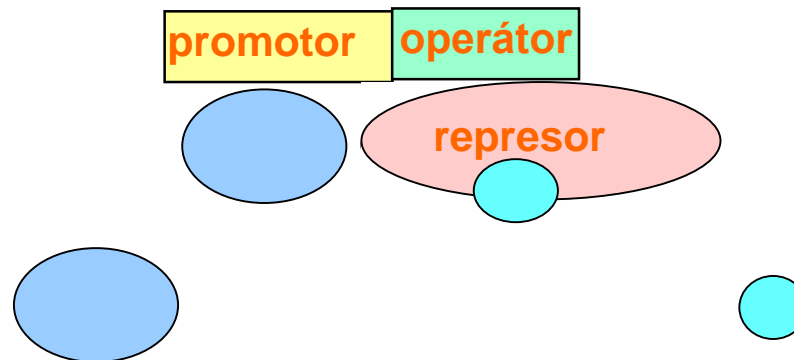
a) glc nepřítomna, lac nepřítomna
→ vazba represoru na operátor



b) glc nepřítomna, lac přítomna
→ enzymová indukce



c) glc přítomna, lac přítomna
→ katabolická represe



Regulate *lac* operonu

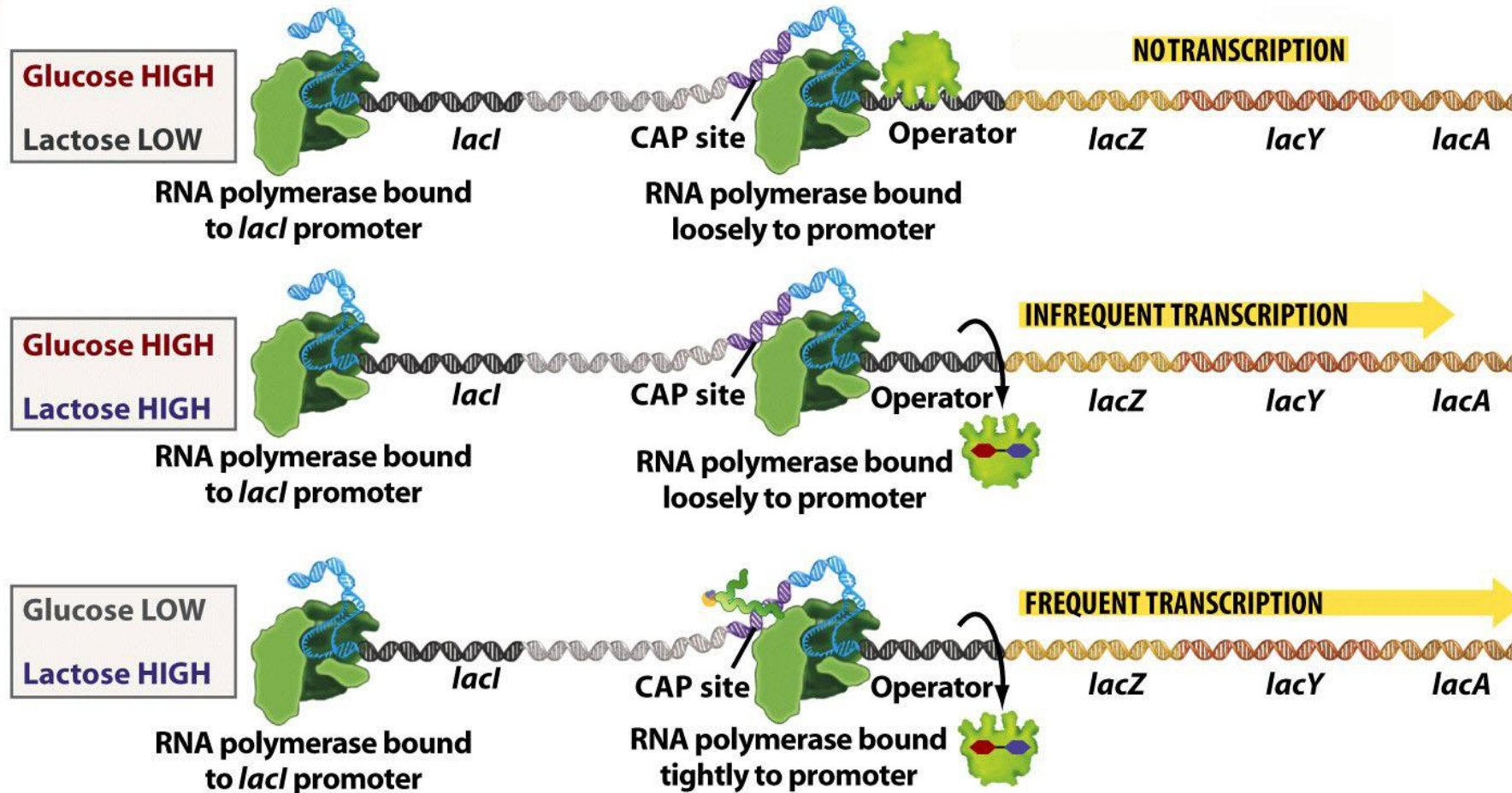
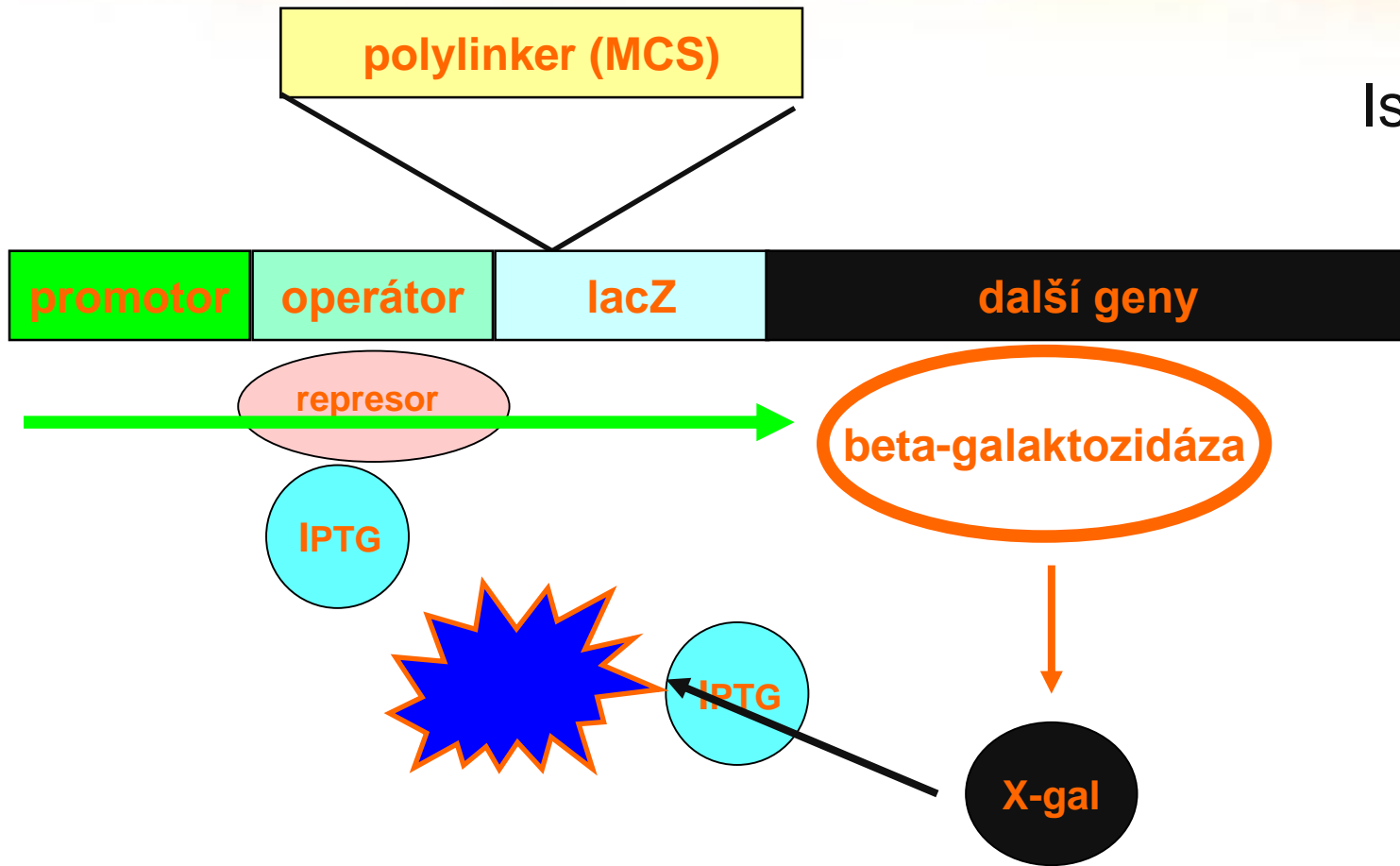
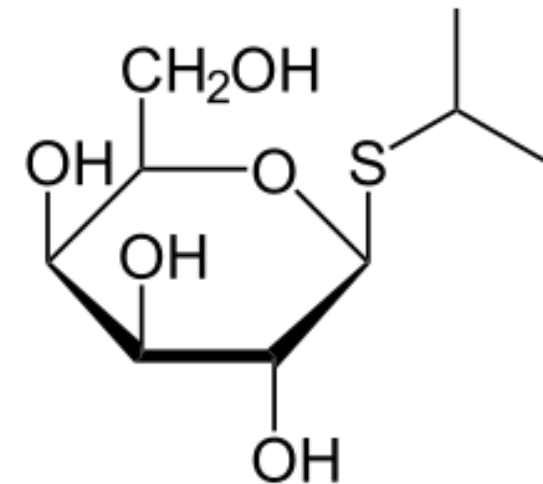


Figure 17-10 Biological Science, 2/e

Regulace exprese β -galaktozidázy

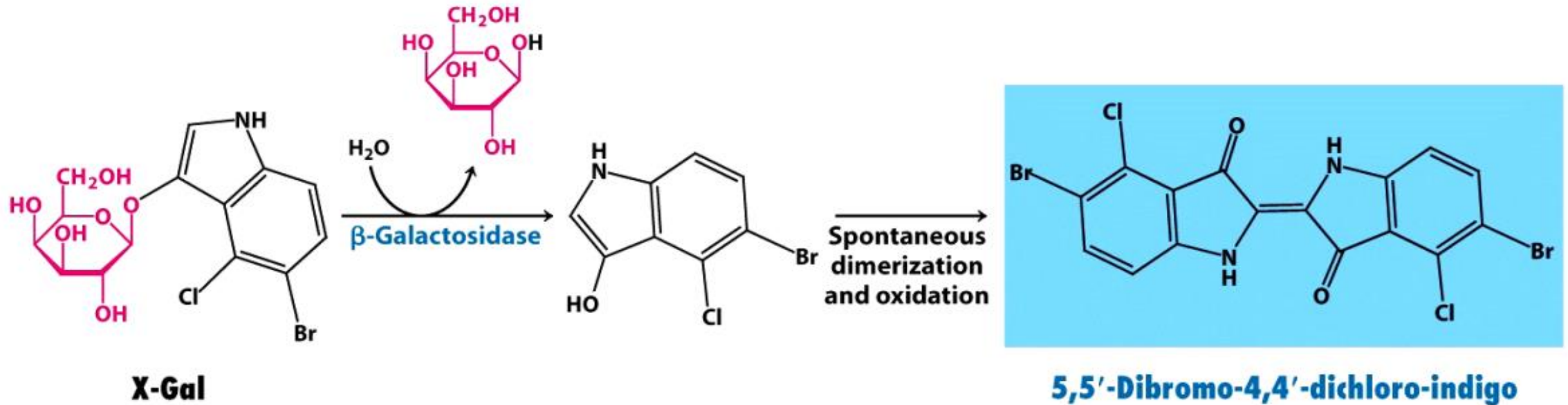


IPTG
Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid



Médium nesmí obsahovat glukózu !

Vznik modrého zbarvení

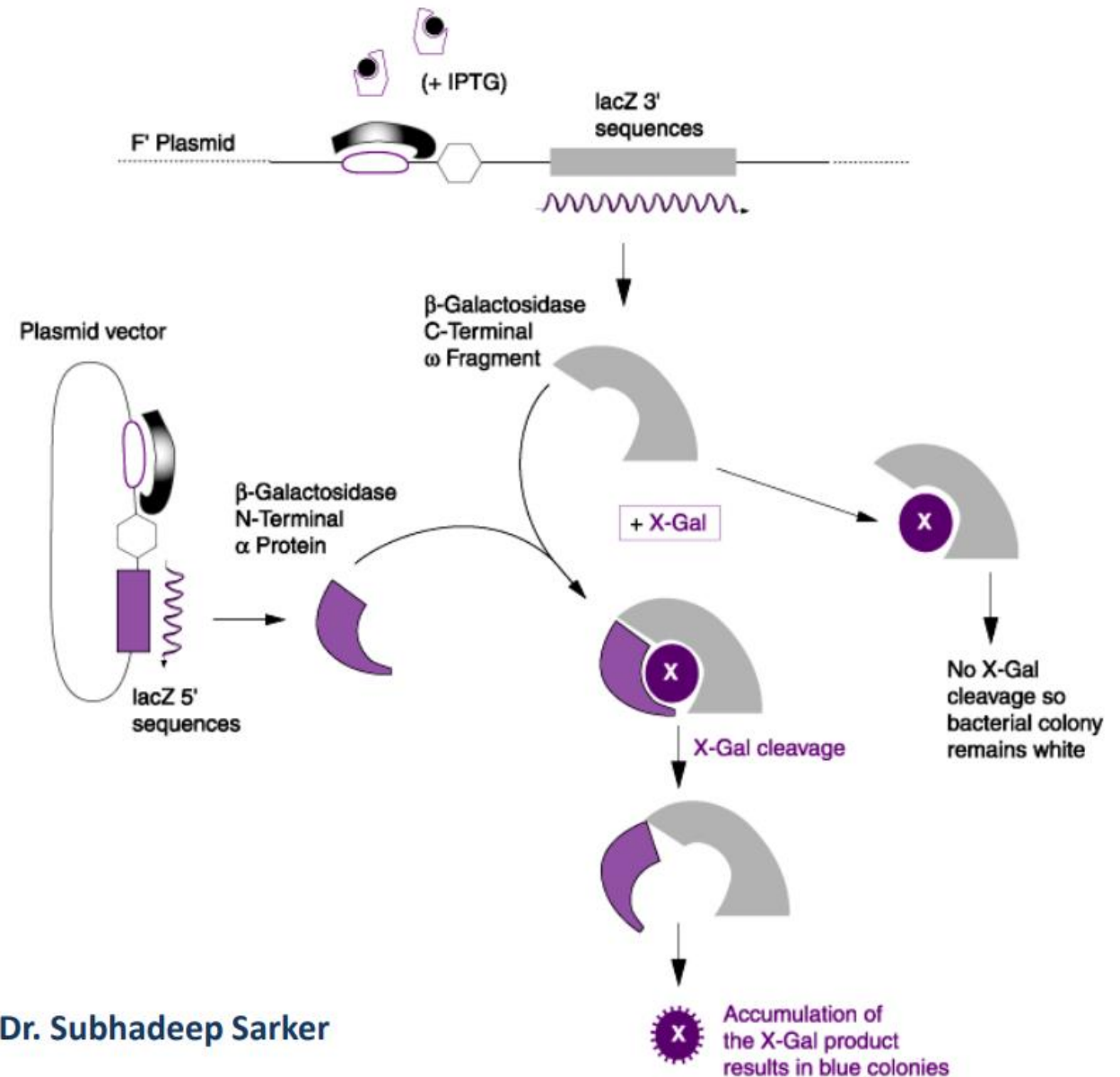


Dr. Subhadeep Sarker

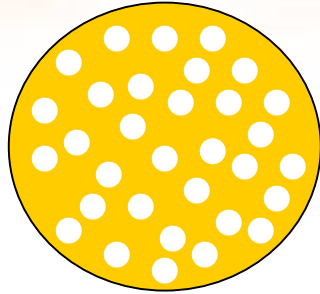
Selekce na základě α -komplementace

- Část genu pro β -galaktosidázu je přítomna na chromosomu, druhá na vektoru
- Buňka musí exprimovat obě podjednotky současně, aby vytvořily funkční enzym

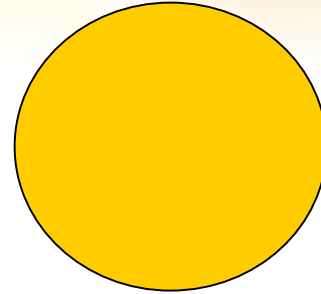
http://seramporecollege.org/a-s-c/wp-content/uploads/2020/03/Blue_White_Screening_ss.pdf



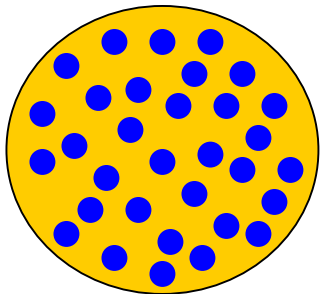
Selekce na základě α -komplementace



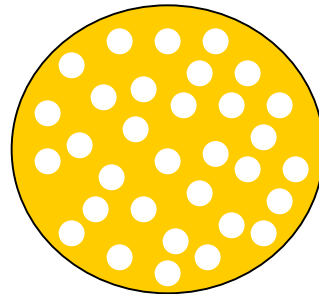
buňky bez plasmidu
LB médium



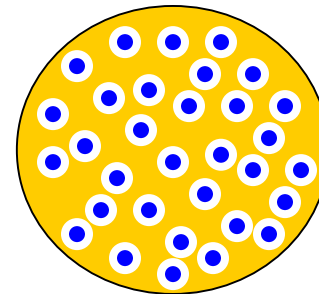
buňky bez plasmidu
LB médium, ampicilin, X-gal, IPTG



buňky s plasmidem
bez inzertu

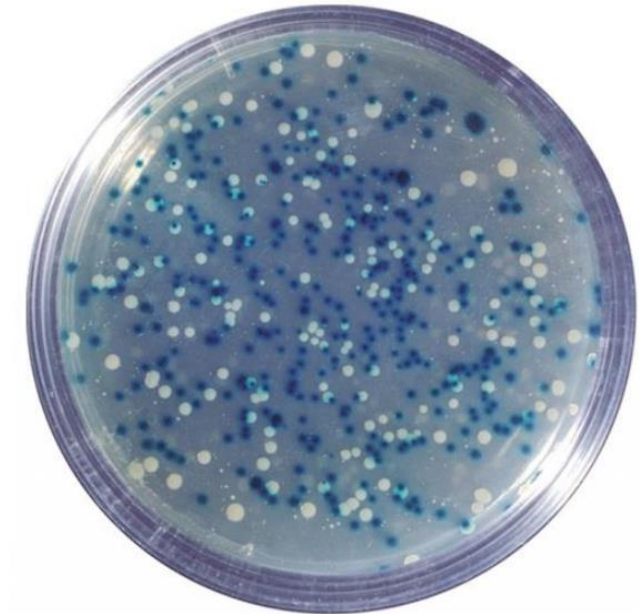


buňky s plasmidem
s dlouhým inzertem

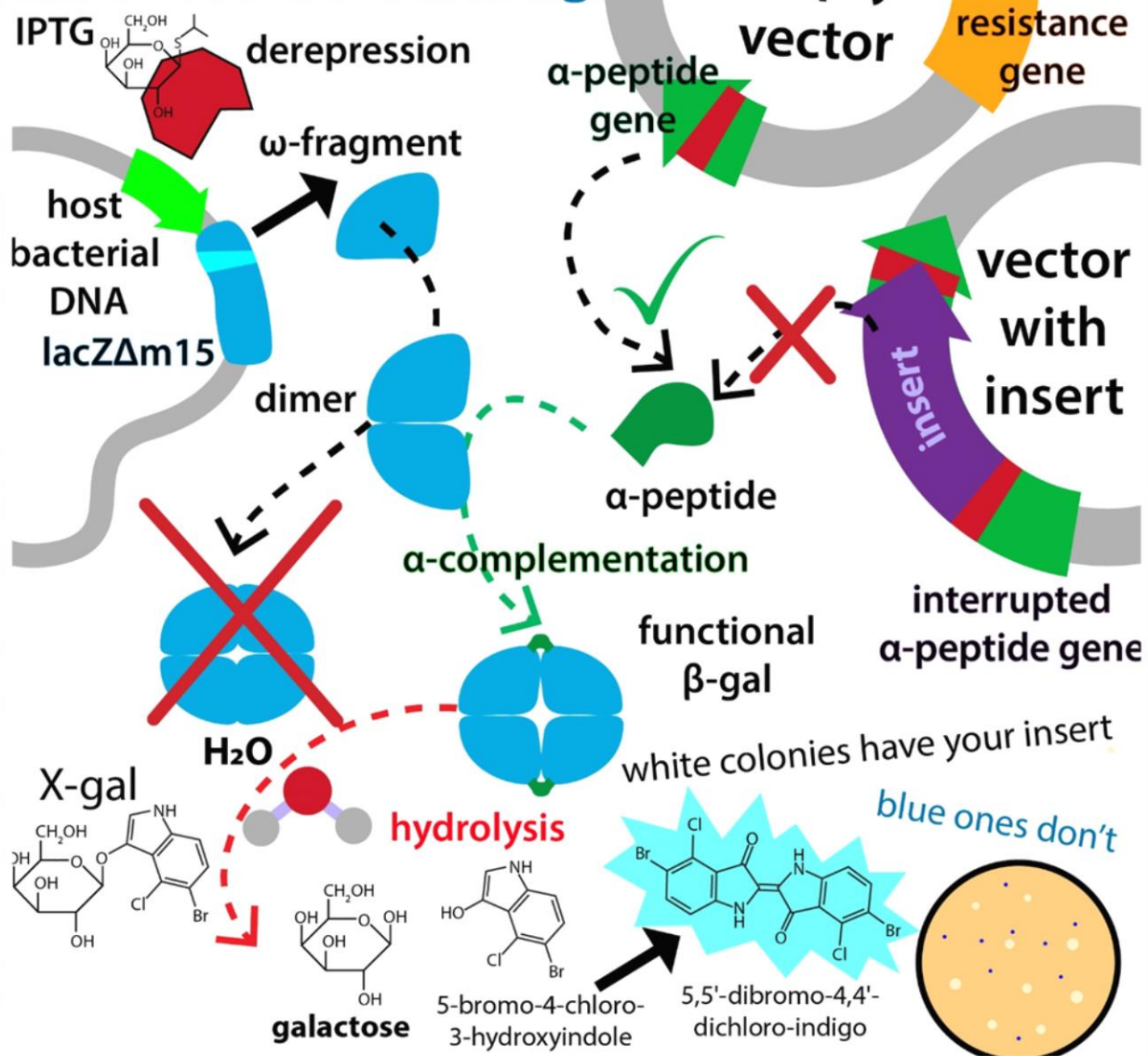


buňky s plasmidem
s krátkým inzertem

LB médium, ampicilin, X-gal, IPTG

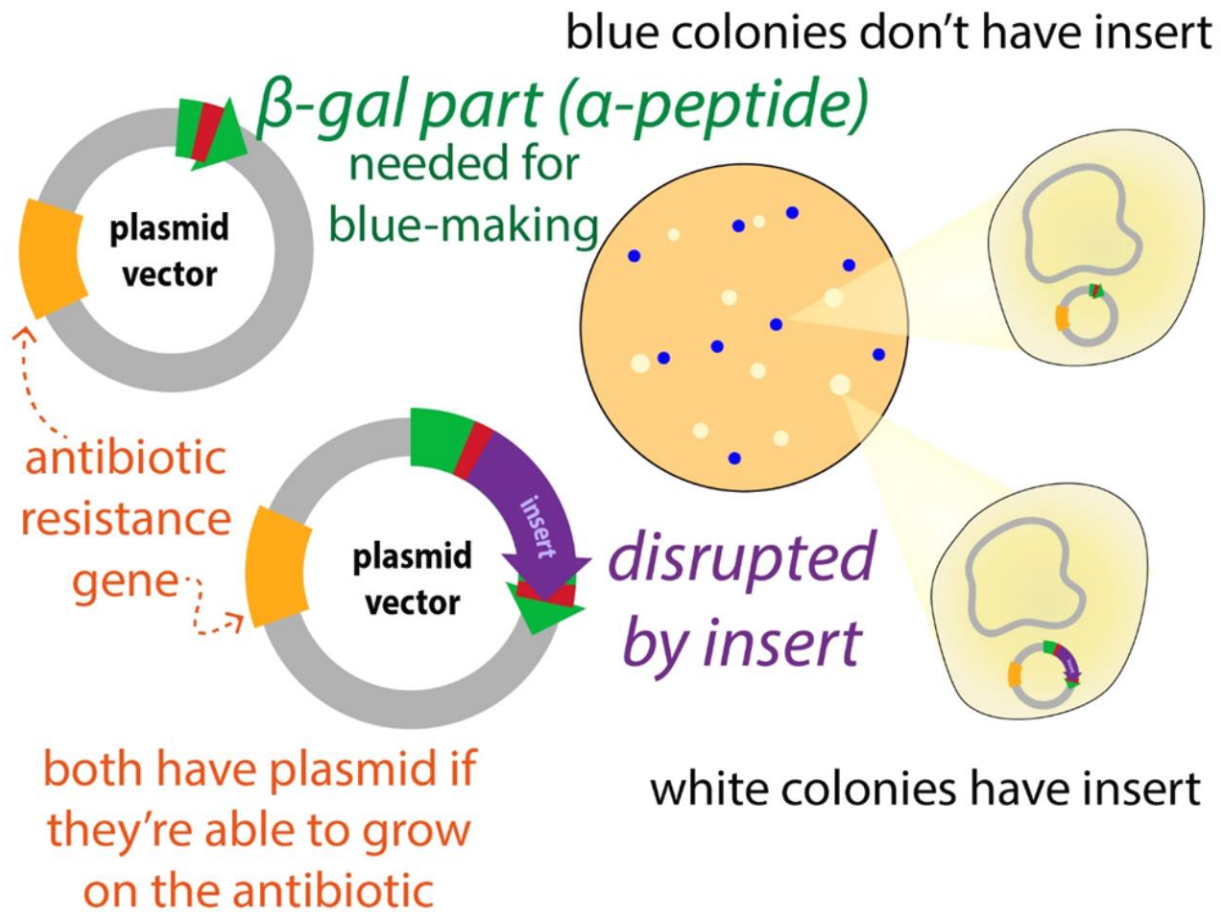


blue-white screening



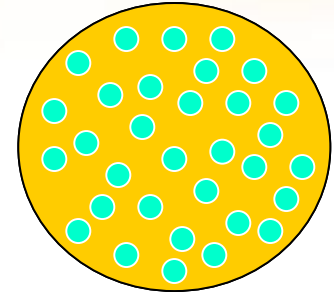
blue-white screening

is a way to check if you inserted a sequence into a plasmid vector



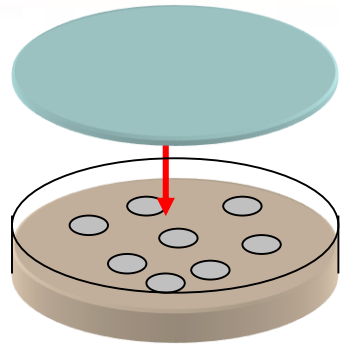
Klonování do bakteriofága λ

- roste na bakteriích ve formě plak
- k infekci potřebuje jen asi 2/3 genomu
- naklonovat lze až 20 kbp DNA
- efektivně lze sbalit DNA o délce 78-105%

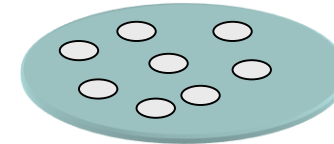
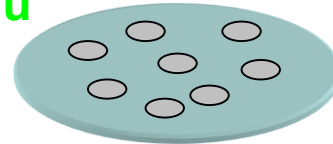


Hybridizace kolonií

nylonová membrána



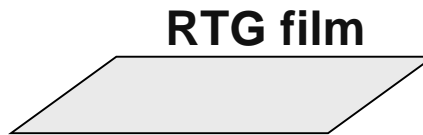
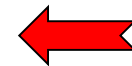
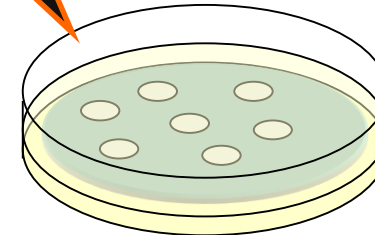
otisk kolonií na membránu



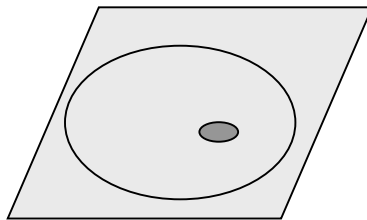
otisk chromozómové DNA

bakteriální kolonie (genomová banka)

denaturovaná značená cDNA



RTG film

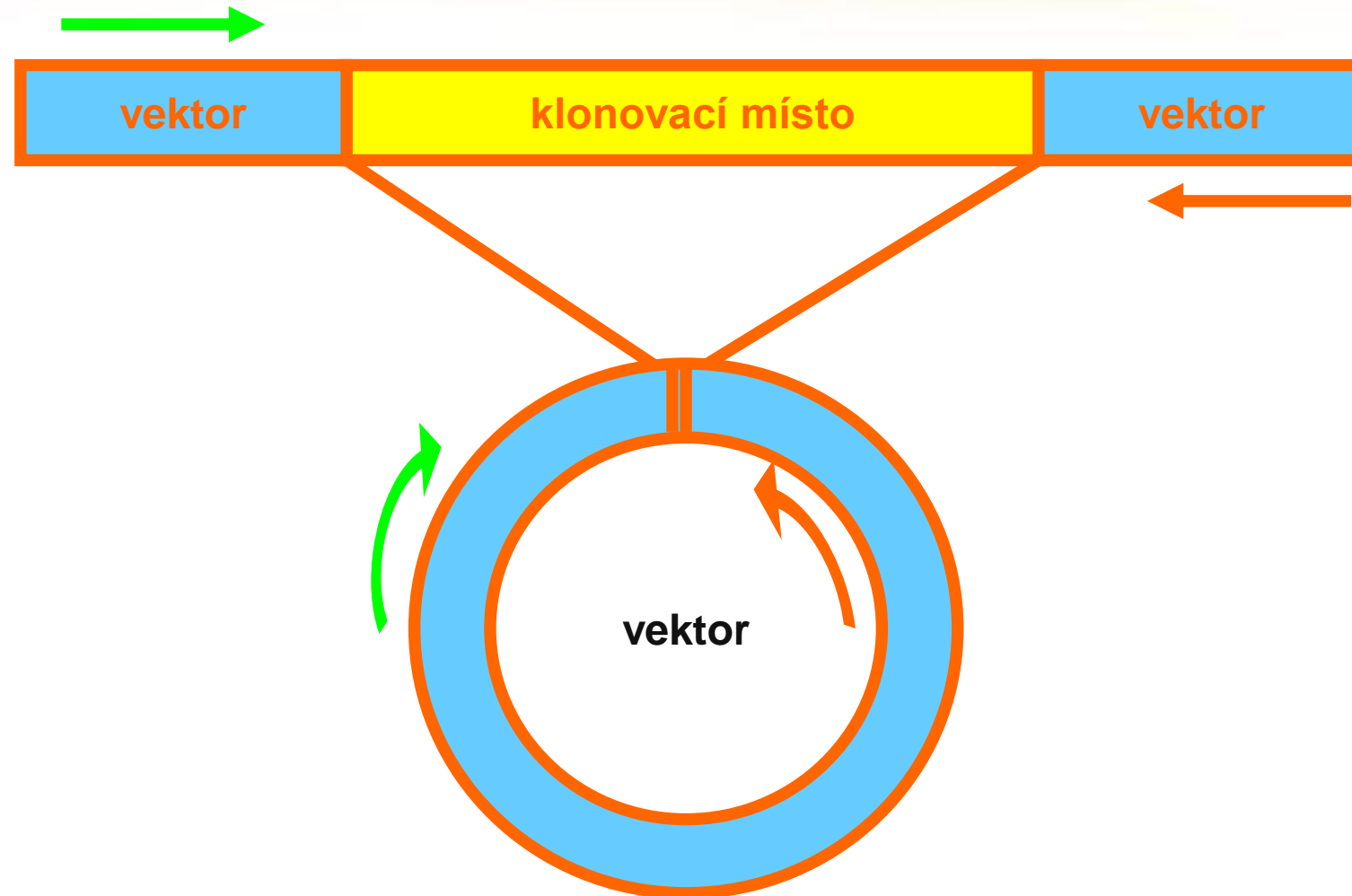


identifikace kolonie

expozice

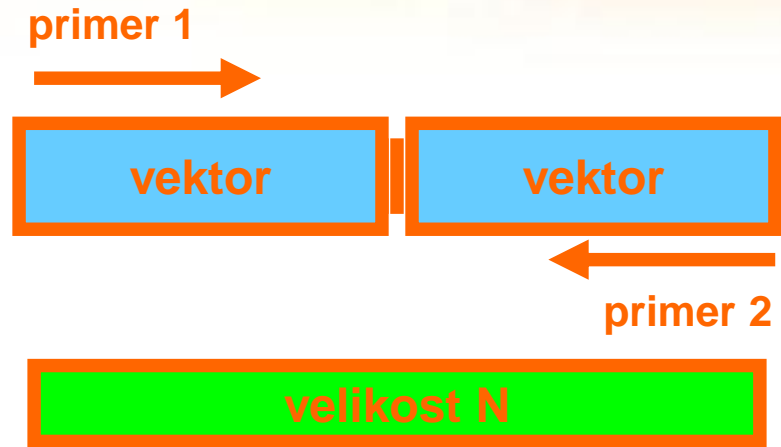
inkubace přes noc, hybridizace

Testování rekombinantních plasmidů metodou PCR

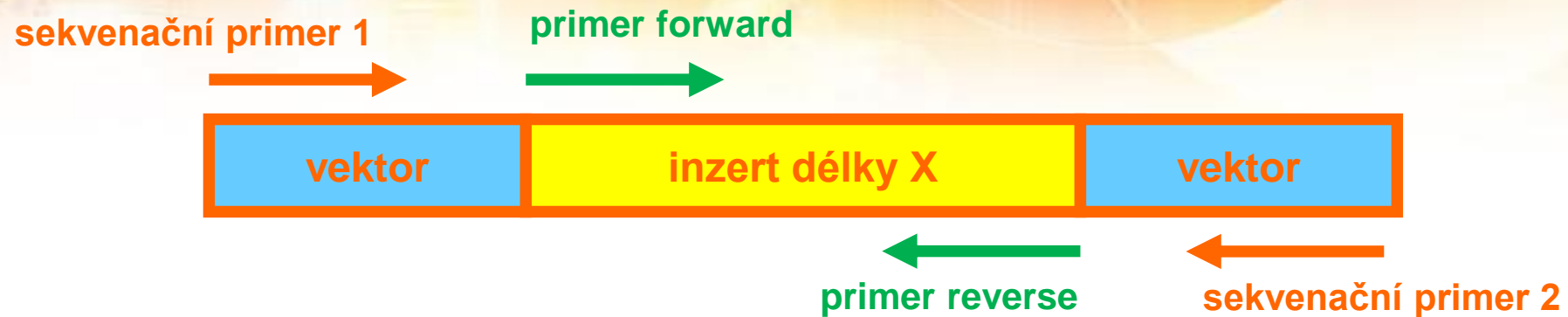


primery pro sekvenování

Potvrzení přítomnosti inzertu využitím primerů pro sekvenování

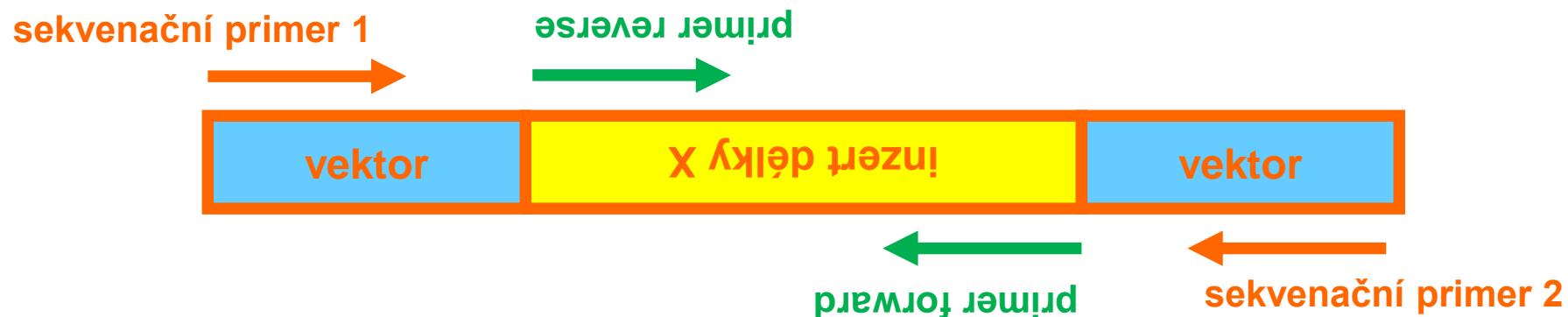


Stanovení orientace inzertu ve vektoru



Amplikony vznikají kombinací primerů

- sekvenační primer 1 + sekvenační primer 2 (délka ampikonu = $N + X$)
- primer forward + primer reverse (délka ampikonu = X)
- sekvenační primer 1 + primer reverse
- sekvenační primer 2 + primer forward



Sekvenování

- rozhodující metoda
- každý inzert je třeba sekvenovat

