

Klonování

Klonování: proces tvorby klonů

Klon: soubor geneticky identických buněk (resp. organismů), odvozených ze společného předka

Klonování DNA: tvorba klonů DNA

Klon DNA: soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA, připravených např. množením rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo PCR (*in vitro*)

Rekombinantní molekula DNA: molekula DNA vytvořená spojením cizorodé (klonované) DNA s klonovacím vektorem

Klonování DNA

Stěžejní metoda molekulární biologie:

umožňuje izolovat z komplexního genomu jeho dílčí úseky (např. geny), ty ve formě rekombinantních molekul mnohonásobně zmnožit a zpřístupnit je tak dalšímu studiu

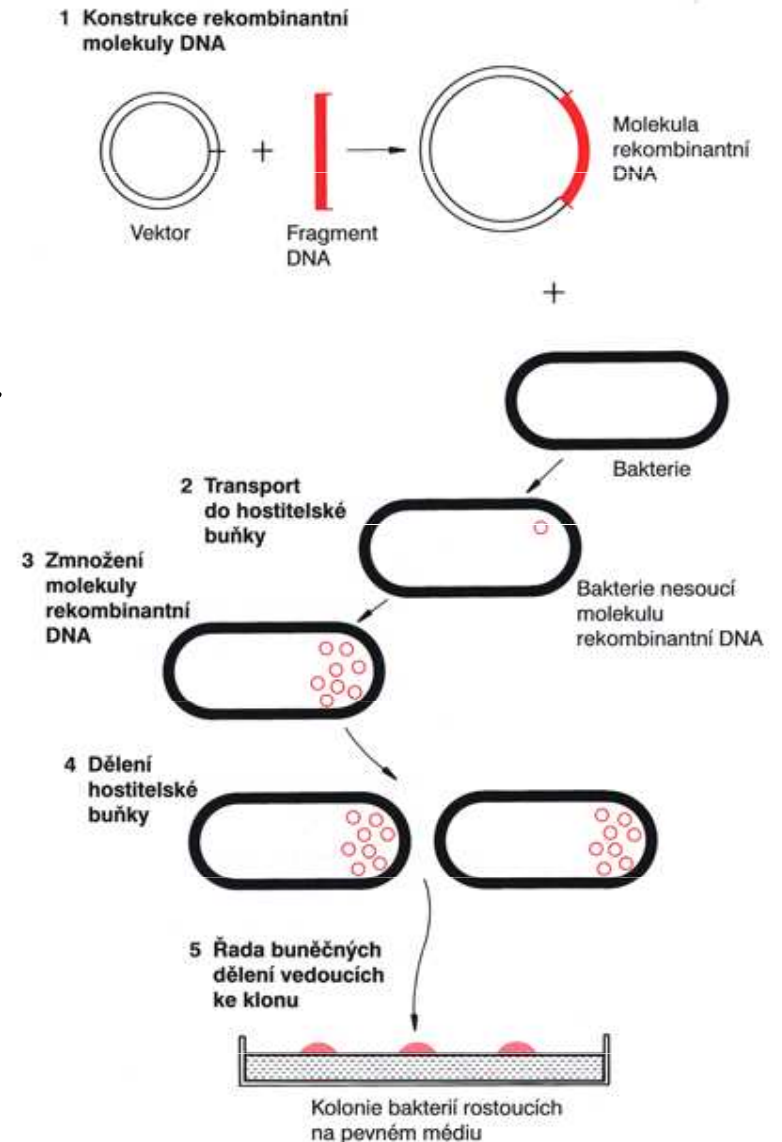
Využití klonování DNA:

- izolace genů
- studium regulačních oblastí, které řídí genovou expresi
- fyzikální a genetická analýza genomů
- exprese cizích genů v nepříbuzných hostitelích (**heterologní exprese**) za účelem přípravy žádaných produktů
- základ genového inženýrství (příprava transgenních organismů)

Postup klonování DNA

1. příprava rekombinantní molekuly DNA
2. přenos rekombinantní DNA do hostitelské buňky
3. zmnožení rekombinantní DNA v hostitelské buňce
4. zmnožení hostitelských buněk obsahujících rekombinantní DNA
5. Identifikace klonů buněk nesoucích rekombinantní DNA

Pro zajištění klonování jsou nezbytné
klonovací vektory



Klonovací vektory - funkce

- zajištění přenosu studované DNA do hostitelské buňky (obvykle bakterie)
- zajištění propagace vlastní struktury vektoru, včetně klonované sekvence v hostitelské buňce
- zajištění segregace do dceřinných hostitelských buněk
- mnohonásobným množením transformované buňky vzniká klon identických buněk, z nichž každá obsahuje jednu nebo více kopií rekombinantní DNA: nesený gen je klonovaný

Klonovací vektory - základní struktura

- nejčastěji kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace
- obvykle odvozené z plazmidů nebo virů
- navíc obsahují pomocné sekvence různého původu usnadňující vložení cizorodé DNA, její expresi, selekci transformantů, apod.)
- pro vektory je výhodná malá velikost (do 10 kb) - usnadnění purifikace a manipulace

Typy vektorů

Plazmidové: pBR322, pUC18, BACs

Fágové:
- odvozené od bakteriofága Lambda
- odvozené od fága M13

Kosmidy: hybridy mezi plazmidy a fágy

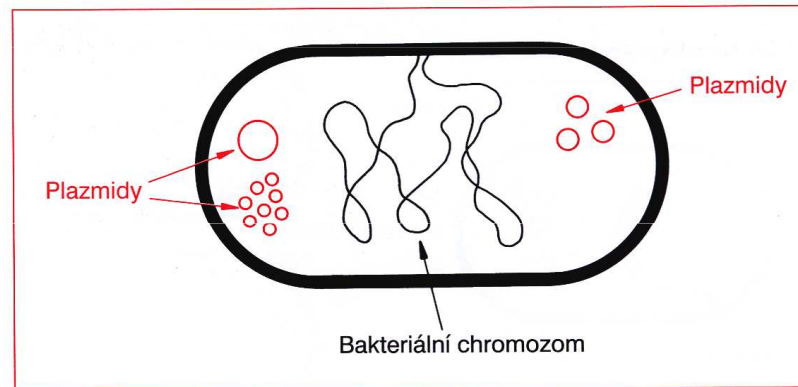
Vektory pro eukaryontní buňky:

- kvasinkové
- rostlinné
- živočišné

Plazmidové vektory

Vlastnosti:

- jednoduchá manipulace
- přirozený výskyt v mnoha druzích bakterií
- variabilita ve velikosti: jednotky kb - stovky kb (pro klonování obvykle 2-15 kb)
- většina odvozena od plazmidu **ColE1** bakterie *E. coli*



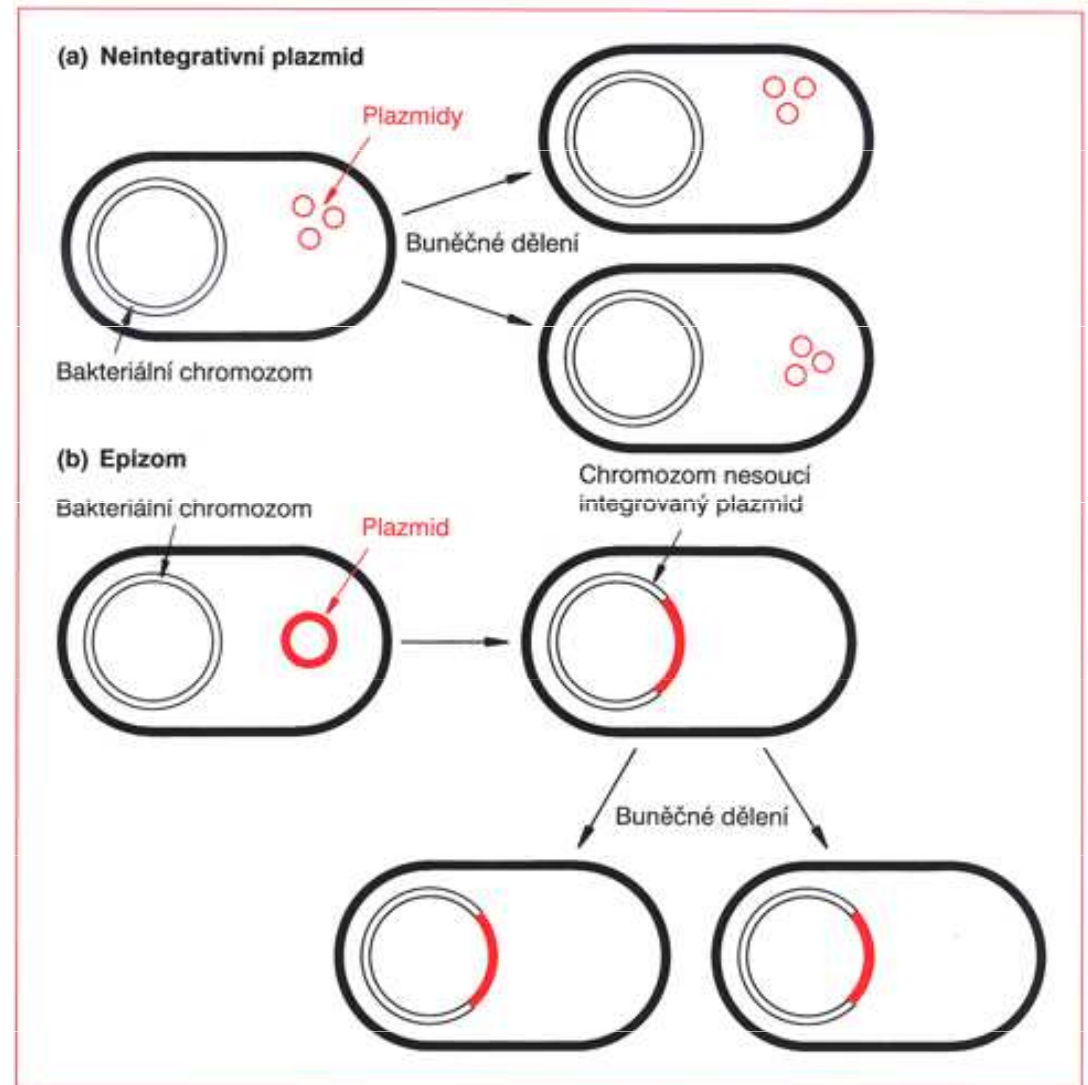
Přirozené plazmidy

Neintegrační plazmidy

- extrachromozomální molekuly DNA, obvykle kruhové, dvouřetězcové, tvořící nadšroubovici
- obsahují vlastní počátky replikace
- replikují se nezávisle na chromozomu
- menší plazmidy využívají ke své replikaci enzymy hostitelské buňky, větší si kódují vlastní

Integrační plazmidy - epizomy

- molekuly DNA, které se replikují jako součásti bakteriálního chromozomu
- v určité fázi se vyčlení a existují jako samostatné elementy



Klasifikace plazmidů

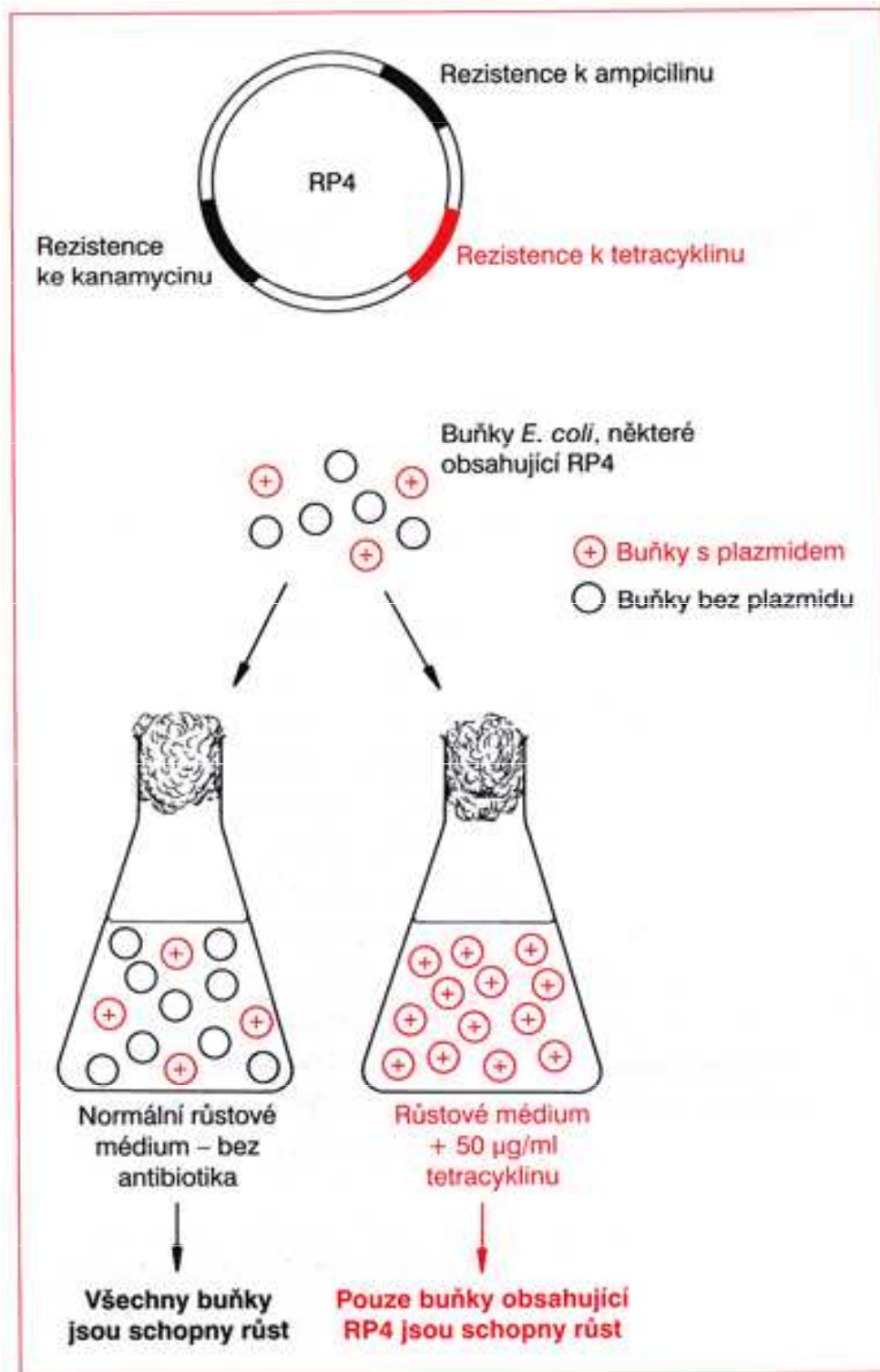
dle znaků kódovaných plazmidovými geny

1. Fertilitní plazmidy (**F plazmidy**)
nesou pouze geny *tra* (řídící konjugaci) , stimulují konjugativní přenos plazmidů (např. F plazmid *E. coli*)
2. Rezistenční plazmidy (**R plazmidy**)
nesou geny, které hostitelům poskytují rezistenci k jednomu nebo více antibakteriálním látkám (např. RP4 plazmid *Pseudomonas*)
3. **Col plazmidy**
kódují koliciny, které zabíjejí jiné bakterie (např. ColE1 plazmid *E. coli*)
4. **Degradativní plazmidy**
umožňují hostiteli metabolizovat neobvyklé molekuly jako např. toluen nebo kyselinu salicylovou (TOL plazmid *Pseudomonas putida*)
5. **Virulentní plazmidy**
propůjčují hostiteli virulenci (např. Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens*, způsobující tvorbu nádorů u dvouděložných rostlin)

Přirozené plazmidy

- typ bakteriálního parazita ve formě DNA: schopnost replikace uvnitř bakterie, občasný přechod do jiné buňky
- výhoda poskytovaná plazmidem hostitelské buňce je zároveň výhodou pro plazmid
- zodpovídají za šíření **genů pro rezistenci k antibiotikům**
- je zakázáno provádět takové experimenty, které by mohly způsobit rozšíření nových genů pro rezistenci k antibiotikům v patogenních bakteriích

Geny zajišťující rezistenci na antibiotika, které jsou přítomné na plasmidech velmi zjednodušují sledování přítomnosti plazmidů v buňkách - fungují jako selekční markery



Charakteristika plazmidových vektorů

- **autonomní replikace v bakteriální buňce**
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restrikčních (klonovacích) míst, využitelných pro klonování
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace, jednoduchá izolace)

Replikace plazmidů

- základní předpoklad pro využití plazmidů jako klonovacích systémů (namnožení fragmentu DNA)
- hostitelské buňka je vybavena veškerým aparátem pro replikaci DNA

Počátek replikace (ori)

- genetická informace, kterou musí plazmid disponovat, aby mohl být v bakteriální buňce replikován
- je tvořen jen několika stovkami párů bází

Charakteristika plazmidových vektorů

- autonomní replikace v bakteriální buňce
- **tvorba více kopií v buňce**
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

Tvorba více kopií plazmidu v buňce

- deriváty ColE1 jsou „multi-copy“ plazmidy
- ColE1 divokého typu - cca 15 kopií v 1 buňce
- uměle vylepšené deriváty - několik set kopií
- faktory řídící počet kopií plazmidů v buňce nejsou jasné

Výhody

- snadná purifikace s vysokými výtěžky
- vysoká exprese klonovaného genu

Nevýhody:

- pomalejší růst hostitelské buňky
- nadměrná exprese klonovaného genu může být pro buňku zátěž

Charakteristika plazmidových vektorů

- autonomní replikace v bakteriální buňce
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

Plazmidy a rozmezí hostitelů

- některé plazmidy se replikují v rozmanitých bakteriálních druzích (široké rozmezí hostitelů): RP4, RSF1010, pC194
- většina vektorů užívaných pro klonování se replikuje jen v úzkém rozmezí hostitelů

Výhoda:

- snížení rizika rozšíření pozměněné genetické informace

Nevýhoda:

- pokud potřebujeme experimentovat s jinými bakteriemi než *E. coli* musíme si připravit „vlastní vektor“ se specifickým *ori*

Pendující (bifunkční, „shuttle“) vektory

pJK3-1, pKT240, PGC3311

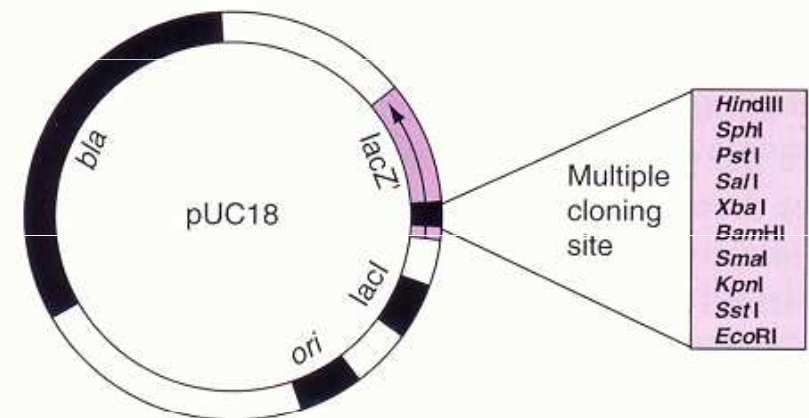
- možný přenos mezi dvěma bakteriálními druhy
- 2 místa *ori* v jednom plazmidu

Charakteristika plazmidových vektorů

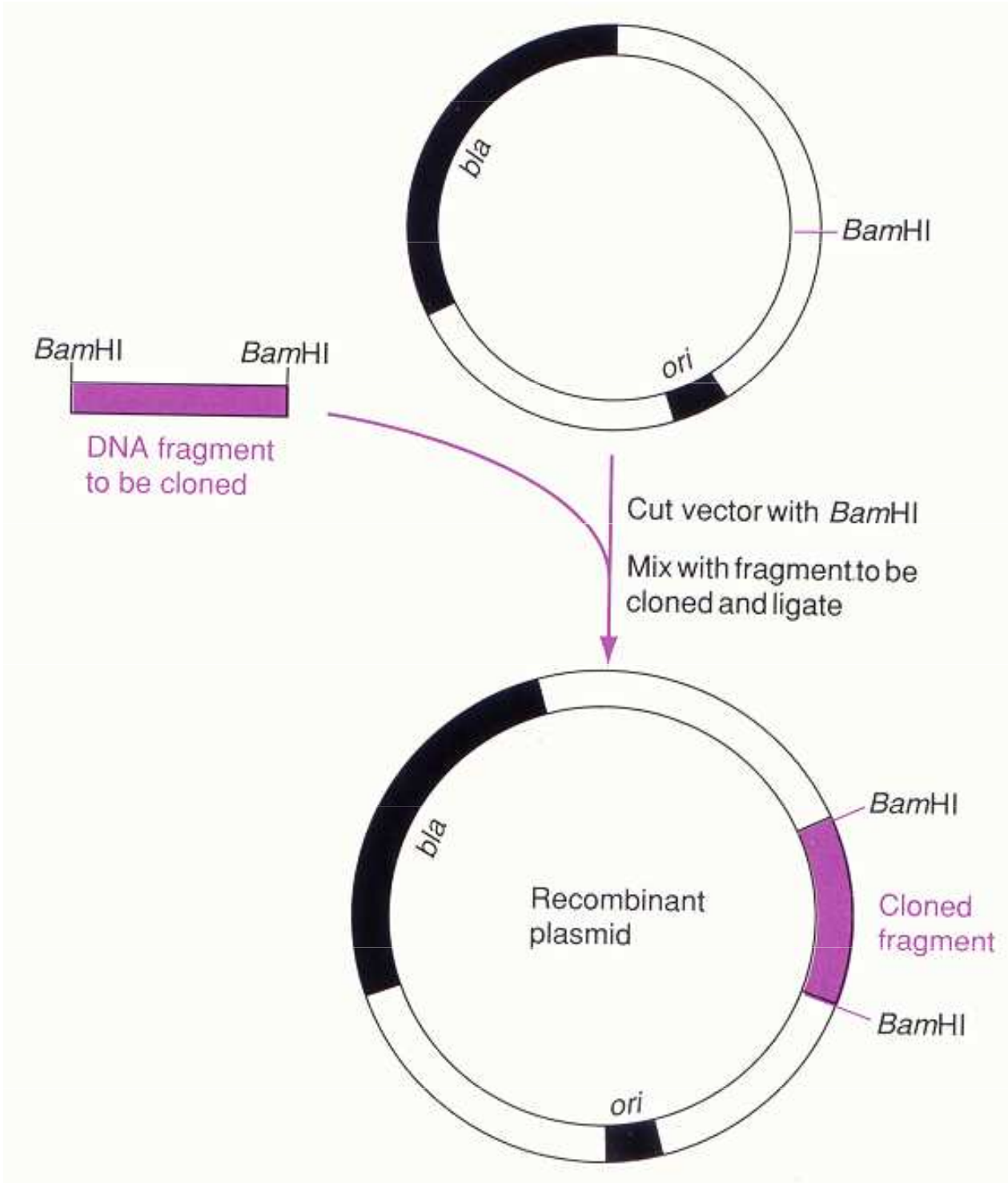
- autonomní replikace v bakteriální buňce
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- **přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování**
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

Klonovací místo

- unikátní restriční místo (zastoupené pouze jednou v molekule plazmidu), do kterého se začleňuje cizorodá DNA
- větší počet různých restričních míst se obvykle seskupuje do krátkého úseku DNA (mnohočetné klonovací místo, polylinker)
- poloha klonovacího místa nesmí narušit funkci oblasti *ori* nebo jiné důležité funkce plazmidu
- začlenění fragmentu DNA do určitého klonovacího místa vede k vzniku rekombinantního plazmidu se dvěma cílovými místy téhož restričního enzymu - možno využít pro identifikaci rekombinantního plazmidu



bla = beta-lactamase (ampicillin resistance); selective marker
ori = origin of replication
lacZ' = beta-galactosidase (partial gene)
lacI = repressor of *lac* promoter

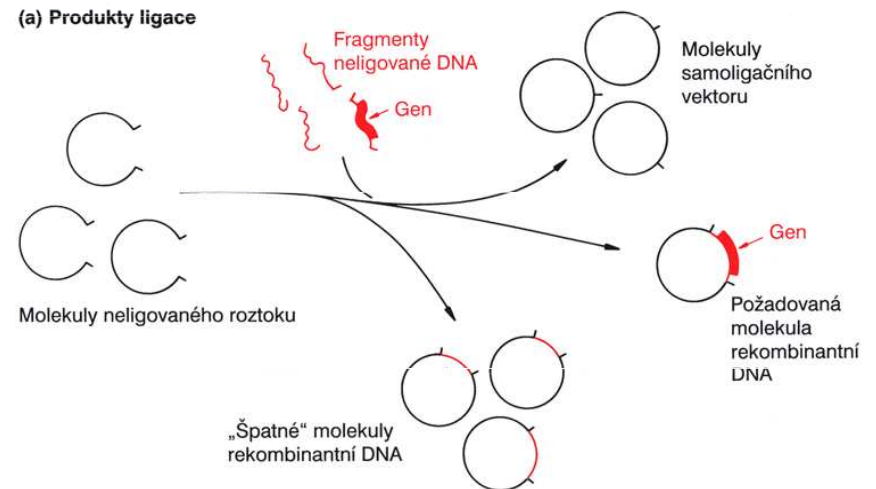


Charakteristika plazmidových vektorů

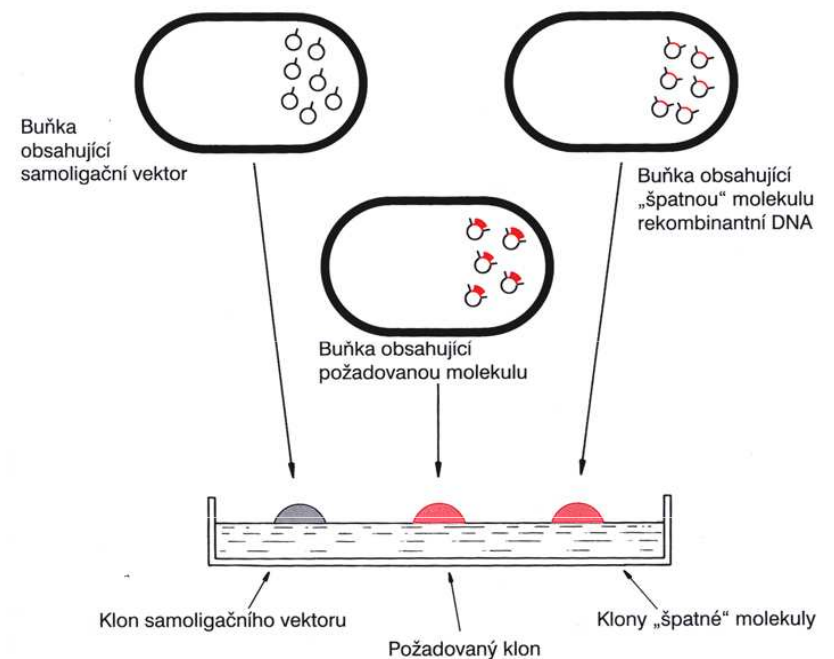
- autonomní replikace v bakteriální buňce
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenositelnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování
- **snadný a účinný přenos do hostitelských buněk**
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

Přenos plazmidových vektorů do hostitelských buněk

- podmínka klonování
- je nepravděpodobné, že by jedna buňka přijala více než 1 molekulu DNA
- z každé buňky vyroste jedna kolonie
- každá kolonie je klonem identických buněk nesoucích stejnou molekulu DNA

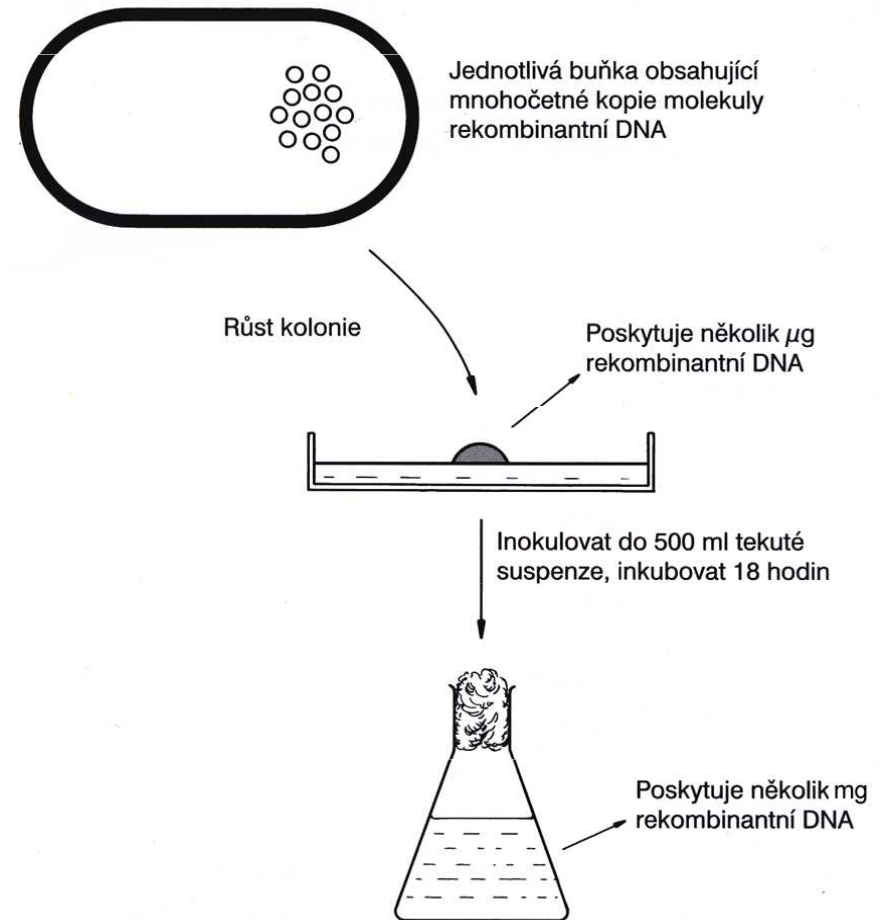


(b) Všechny kružnicové molekuly budou klonovány



Přenos plazmidových vektorů do hostitelských buněk

- umožňuje propagaci klonované DNA

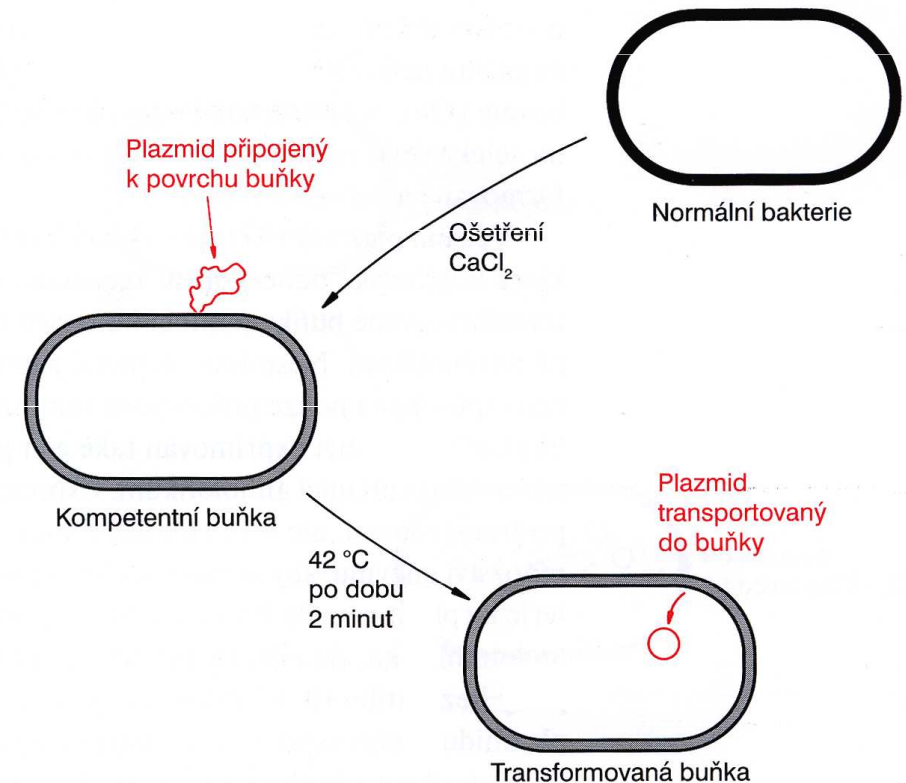


Transformace: přenos molekuly DNA do bakteriální buňky

- bakterie se liší v míře schopnosti přijímat cizorodou DNA
- většina přijímá jen omezené množství DNA (výjimka bakterie rodu *Bacillus* a *Streptococcus*)
- ostatní musí být chemicky nebo fyzikálně ošetřeny, aby se účinnost transformace zvýšila: přivedení do stavu **kompetence**

Příprava kompetentních buněk *E. coli*

- 70. léta 20. století: suspendování buněk *E. coli* v ledovém solném roztoku vede k navození stavu kompetence
- tradičně se používá 50 mM roztok CaCl_2
- mechanismus nejasný
- sůl usnadňuje přichycení DNA na vnější buněčný povrch stěně (nikoliv průnik stěnou)
- pohyb DNA dovnitř buňky je nastává po krátkém zvýšení teploty na 42°C („teplotní šok“)



Transformace bakteriálních buněk

- po transformaci se bakteriální buňky krátce inkubují v růstovém médiu (zotavení bakterií, exprese selekčního markeru)
- výsev na agarové plotny
- selekce transformantů
- výtěžek cca 1000 - 10.000 transformovaných buněk na 1 ng plazmidu

Transformace bakterií elektroporací

- promytí buněk vodou (odmytí elektrolytů z růstového média)
- krátký elektrický puls o vysokém napětí
- dočasné otvory v buněčném obalu
- vstup DNA do buňky

Výhody elektroporace

- vyšší účinnost přenosu
- funguje u různých bakterií

Nevýhody elektroporace

- nutno optimalizovat řadu parametrů (růstové podmínky, teplota, délka pulzu, napětí)
- otvory mohou pronikat do buněk i jiné molekuly (RNA, proteiny)
- není zajištěn směr přenosu

Výhodné vlastnosti plazmidových vektorů

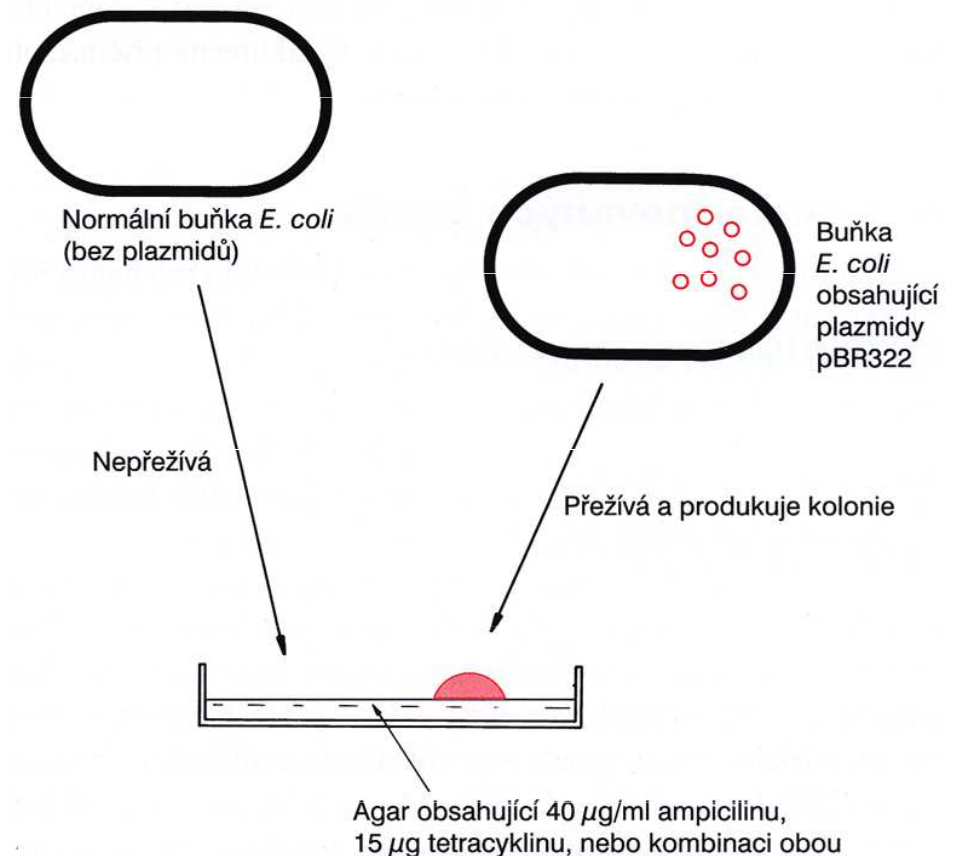
- autonomní replikace v bakteriální buňce
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenositelnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- **přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)**
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

Selekční markery

- nezbytné pro funkci vektoru
- procesy ligace i transformace jsou málo účinné: max. 1% bakteriálních buněk (*E. coli*) DNA přijme, v praxi obvykle méně
- nutno rozlišit transformované buňky (menšinu) od většiny netransformovaných buněk (tj. zabránit v růstu netransformovaným buňkám)
- obvykle zajištěno genem, který hostitelským buňkám poskytne rezistenci na antibiotikum

Princip identifikace transformantů

- bakterie *E. coli* jsou citlivé na ampicilin a tetracyklin
- pokud nesou plazmid pBR322 získávají rezistenci na Tet a Amp
- Amp rezistenci zajišťuje gen *bla*
- další 2 geny kódují enzymy, které detoxifikují Tet

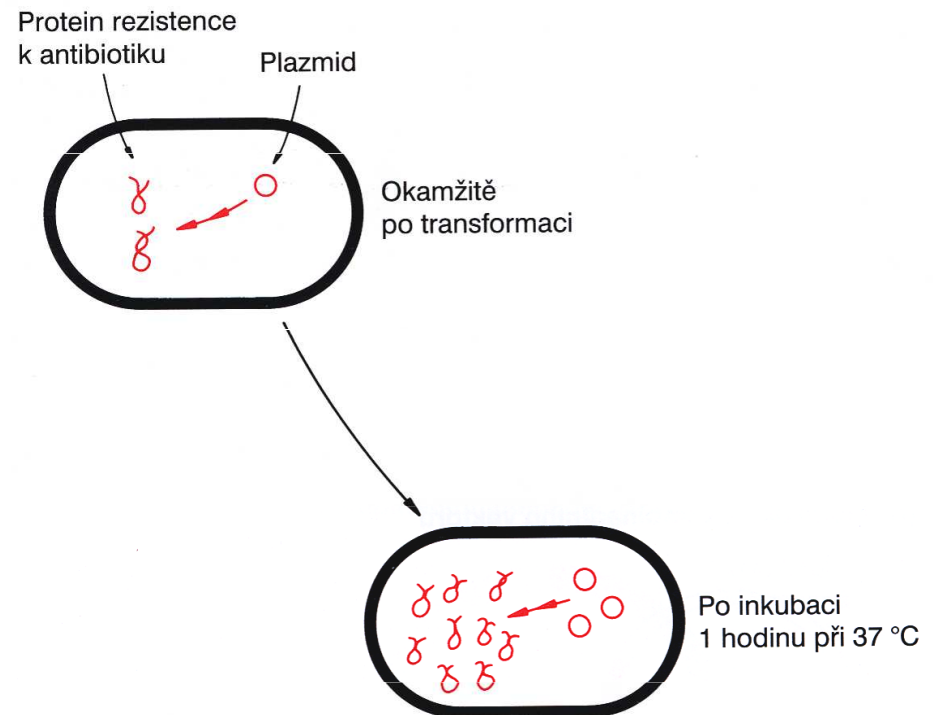


Gen bla

- kóduje enzym β -laktamázu
- β -laktamáza hydrolyzuje β -laktamová antibiotika (příbuzná penicilinu), např. ampicilin
- mění tato antibiotika na formu, která není pro bakterii toxická

Ne přítomnost plazmidu, ale exprese nesených genů rozhoduje o rezistenci

- není vhodné transformanty okamžitě vysévat na selekční médium
- po teplotním šoku je třeba buňky krátce kultivovat v médiu bez antibiotik
- čas je nutný pro expresi genu, který hostitelské buňce zajistí přežití v selekčních podmínkách



Identifikace bakteriálních kolonií obsahujících rekombinantní plazmidy

- selekce transformantů neřeší problém varianty neseného plazmidu
- rezistenci zajistí „prázdný“ i rekombinantí vektor

Problém řeší:

- restriční analýza plazmidové DNA
- inzerční inaktivace
- alfa-komplementace

Restrikční analýza

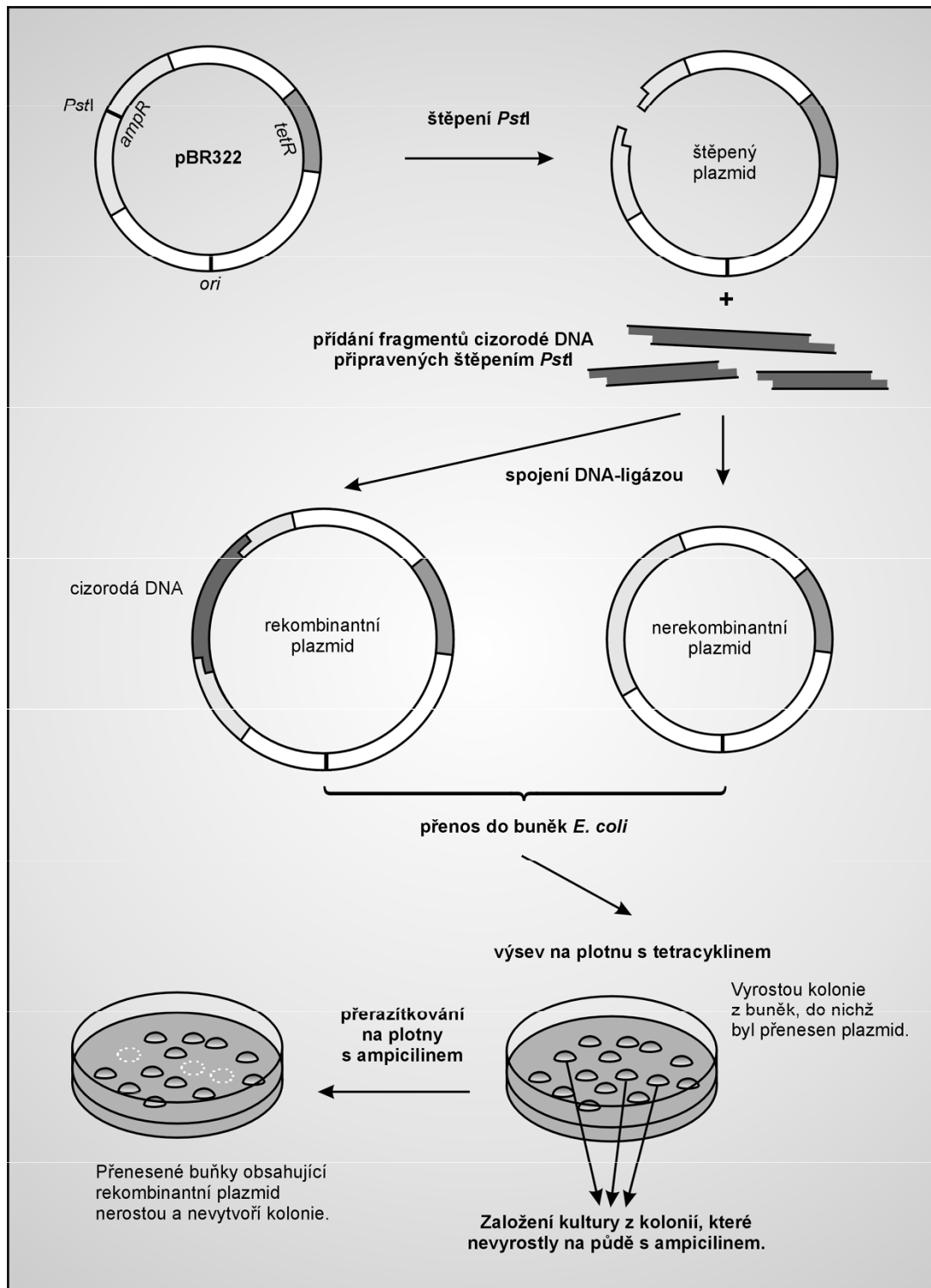
- začlenění klonované DNA změní restrikční vzorec (přítomnost nových restrikčních míst)
- je třeba izolovat plazmidy z jednotlivých klonů transformantů, štěpit je vhodnou restrikční endonukleázou a provést gelovou elektroforézu
- vhodný způsob zjištění orientace klonovaného fragmentu

Inzerční inaktivace

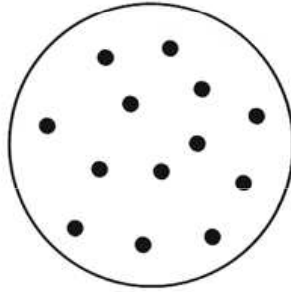
- fenotypový projev úspěšného začlenění fragmentu DNA do klonovacího místa v transformovaných bakteriích
- přímá identifikace kolonií nesoucích rekombinantní plazmid

Inzerční inaktivace

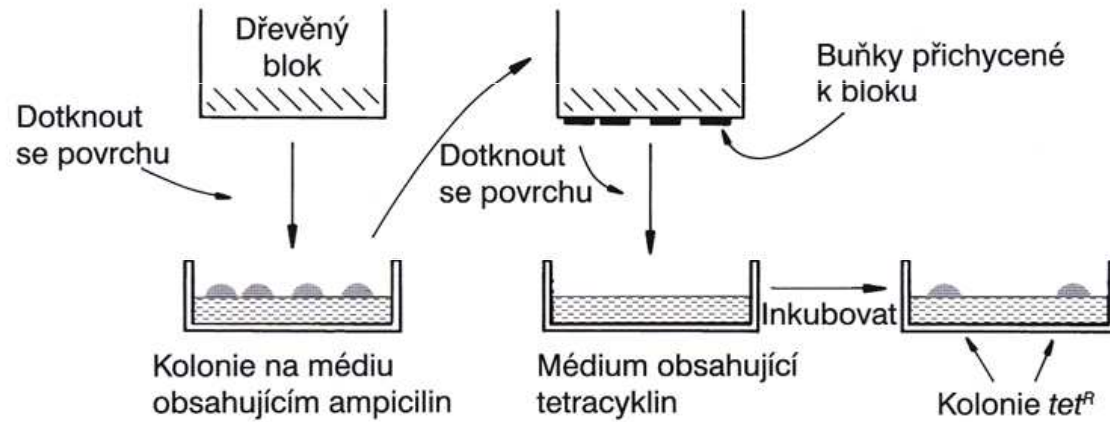
- klonovací místo je ve vektoru (např. pBR322) umístěno v genu zodpovědném za rezistenci hostitelské buňky k antibiotiku
- inserce klonované DNA způsobí ztrátu funkce tohoto genu
- buňky nesoucí rekombinantní plazmid jsou k danému antibiotiku citlivé, buňky nesoucí prázdný vektor jsou rezistentní



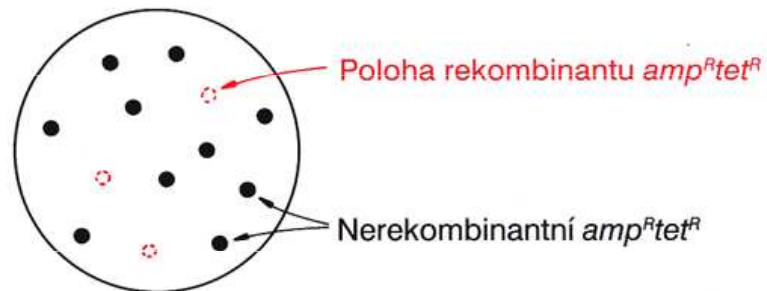
(a) Kolonie na médiu obsahujícím ampicilin



(b) „Replica plating“



(c) Kolonie $amp^R tet^R$ rostou na médiu obsahujícím tetracyklin



Alfa-komplementace

- klonovací místo (např. plazmidu pUC18) je umístěno v blízkosti 5' konce genu *lacZ* kódujícího β -galaktozidázu
- buňky obsahující plazmid pUC8 jsou amp^r a mohou tvořit β -galaktozidázu
- přítomnost klonovacího místa nenarušuje čtecí rámec *lacZ*, pouze k tomuto genu přidává několik kodonů, funkce produktu (hydrolýza laktózy) tím není narušena (**modré kolonie** na plotnách s chromogenním substrátem)
- včleněním klonovaného fragmentu DNA do klonovacího místa vektoru se přeruší sekvence *lacZ*, kolonie jsou amp^r, ale β -galaktozidázu tvořit nedokážou (**bílé kolonie** na plotnách s chromogenním substrátem)
- pUC18 nese jen část genu *lacZ*, zbytek genu poskytuje hostitelská bakterie (princip komplementace)

Kultivační podmínky pro detekci aktivity β -galaktozidázy v bakteriích

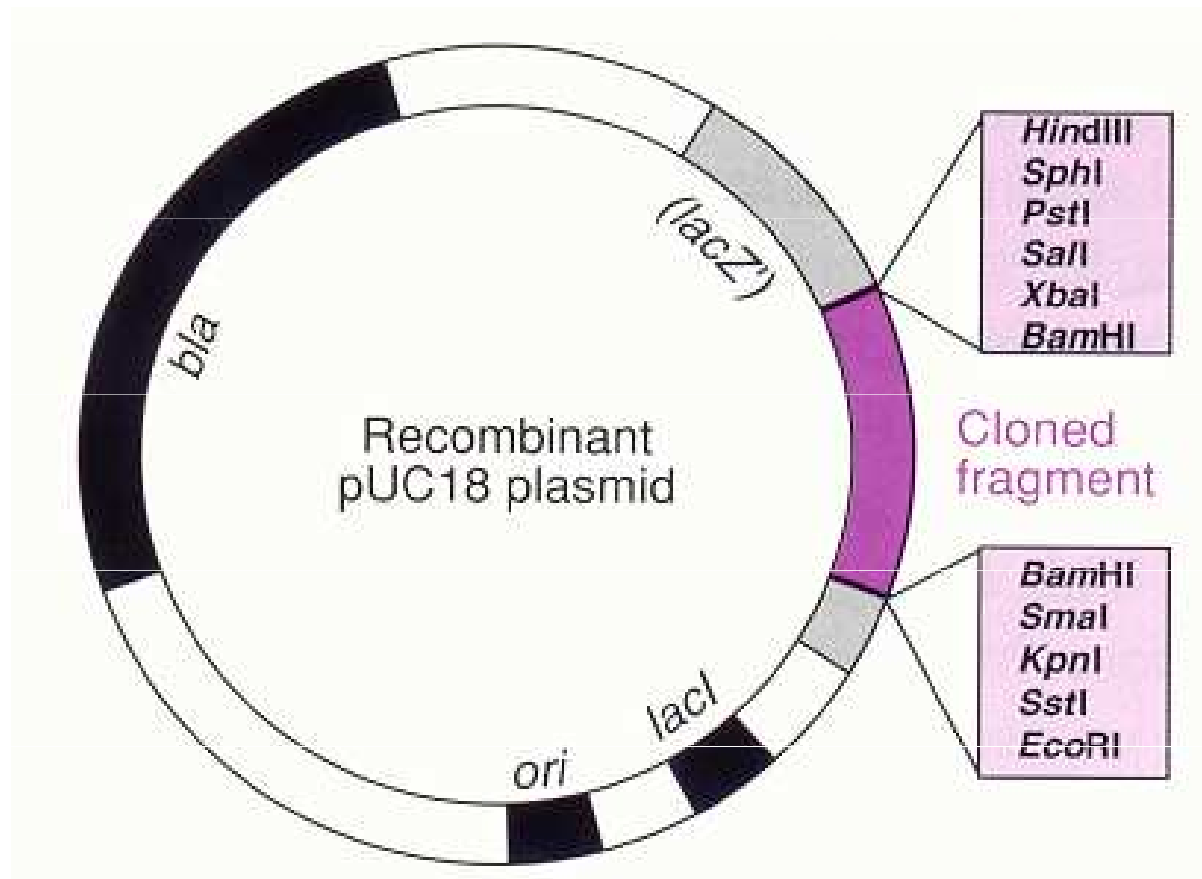
- místo štěpení laktózy na galaktózu testujeme odlišnou reakci katalyzovanou tímto enzymem:
- substrátem je látka analogická laktóze **X-gal** (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktozid), která se β -galaktozidázou štěpí na zabarvený produkt
- induktorem enzymu je **IPTG** (izopropytiogalaktozid)
- X-gal a IPTG se přidávají spolu s Amp do agarového média

Princip reakce:

X-gal je bezbarvý substrát, který je β -galaktozidázou konvertován na tmavě modrý produkt.

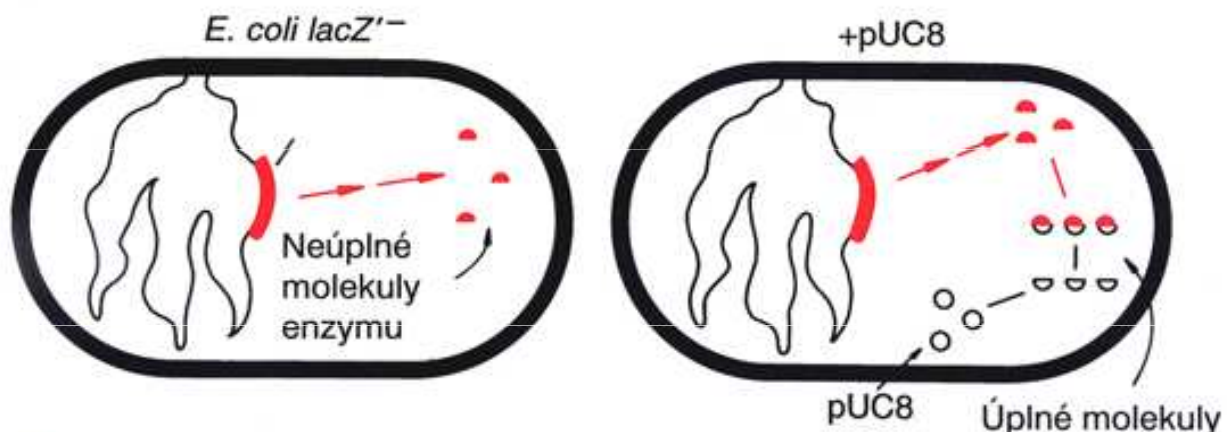
Modrá kolonie: buňky produkují β -galaktozidázu plazmid je intaktní, žádný klonovaný fragment

Bílá kolonie: buňky netvoří β -galaktozidázu, plazmid má přerušen gen *lacZ*, klonování bylo (patrně) úspěšné



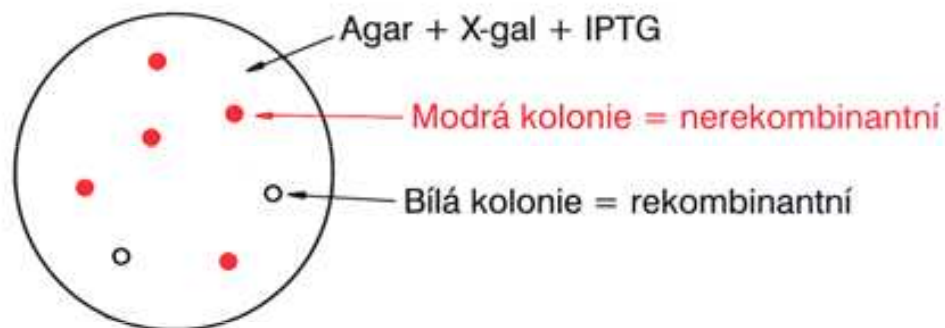
Gen *lacZ* byl přerušen začleněním klonovaného fragmentu DNA: na X-gal plotnách vzniknou bílé kolonie

(a) Úloha genu *lacZ'*



- Fragment β-galaktosidázy kódované bakteriálním genem
- Fragment β-galaktosidázy kódované plazmidovým genem
- Úplná molekula β-galaktosidázy

(b) Screening rekombinantů pUC8



- Modré kolonie** = syntéza β-galaktosidázy
X-gal → **modrý produkt**
- Bílé kolonie** = bez syntézy β-galaktosidázy
X-gal → bez modrého produktu

Výhody alfa-komplementace

Jednoduše poskytuje informace o úspěšnosti ligace:

- bakterie přijala plazmid (je Amp^R)
- bílá barva kolonie signalizuje, že přijatý plazmid nevznikl recirkularizací prázdného vektoru

Nevýhody alfa-komplementace

- pokud je **inzert malý a nepřerušuje čtecí rámeček**, β -galaktozidáza může mít dostatek aktivity pro zmodrání kolonií
- **bílá kolonie nemusí vždy znamenat důsledek úspěšného klonování** (delece v MCS, včlenění nežádoucího úseku DNA, který poruší čtecí rámeček)

Vektory pro speciální účely

- **expresní vektory**: obsahují promotor, kterým lze zajistit produkci cizího proteinu v hostitelských buňkách (vhodné inducibilní systémy)
- **kyvadlové vektory**: obsahují dva počátky replikace - možnost propagace ve dvou různých organismech (např. *E.coli* a *B. subtilis*)

Fágové vektory -odvozené od fága Lambda

Výhody:

- rekombinantní DNA lze sbalit do kapsidů a přenést do hostitelských buněk infekcí (o několik řádů vyšší účinnost přenosu než při transformaci plazmidovou DNA)
- v jedné zkumavce lze uchovávat ve formě fágových virionů celou genovou knihovnu (např. několik miliónů rekombinantních klonů)
- vhodné pro klonování větších fragmentů DNA (výhodné pro tvorbu genových knihoven)

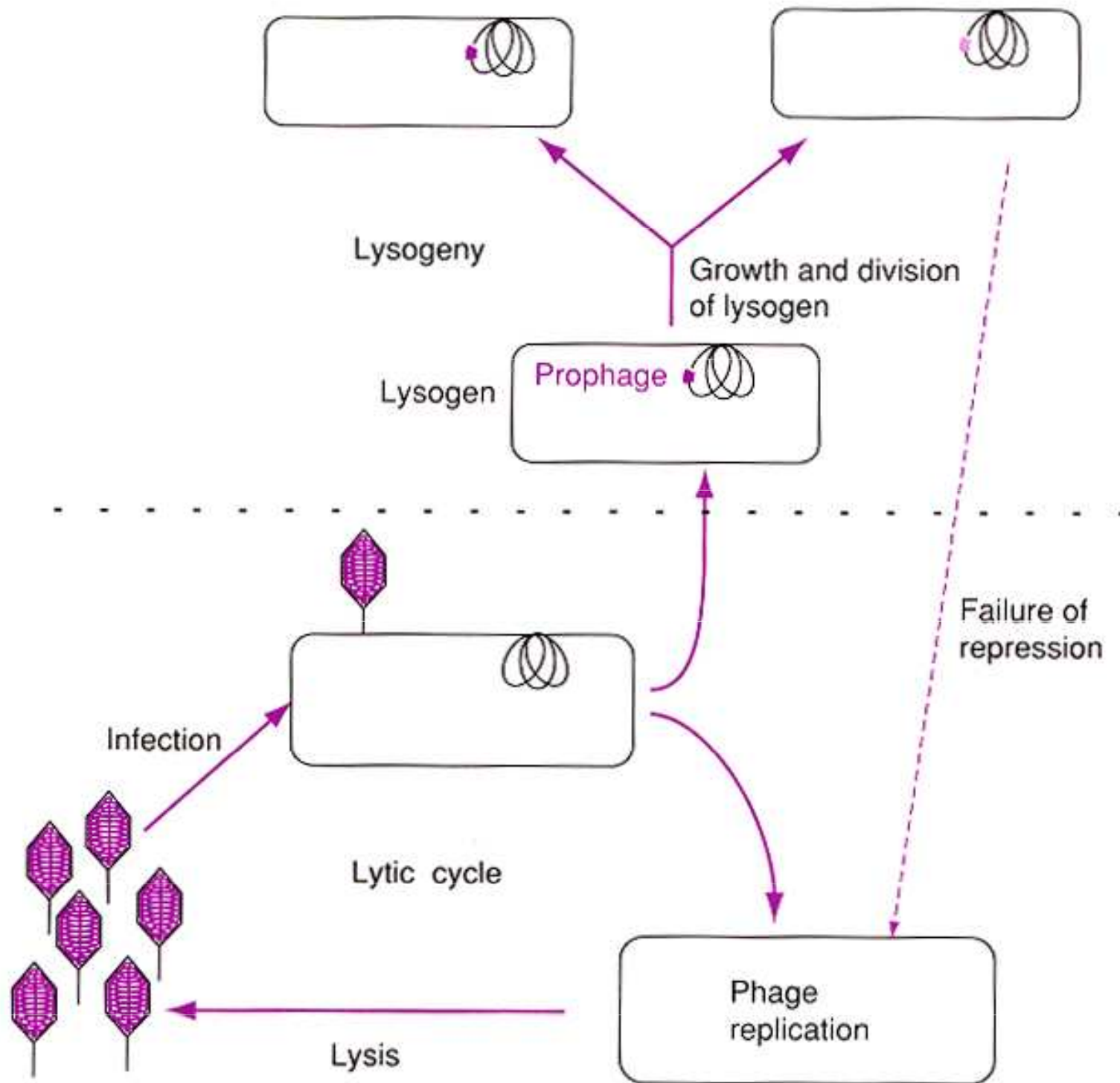
Pozn: rekombinantní plazmidy s velkými inzerty jsou méně stabilní (nízká klonovací kapacita), transformace je méně účinná, nízký výtěžek při purifikaci z E. coli

Lysogenní a lytický cyklus

- Lambda je **temperovaný bakteriofág** (po infekci *E.coli* může podstoupit lytický nebo lysogenní cyklus)
- rozhodují vlivy okolí, genetická charakteristika hostitele i fága
- existují mutanti fága Lambda podstupující pouze lytický cyklus (**jasné plaky**)
- divoký typ poskytuje **zakalené plaky** (přítomnost lysogenů rezistentních k další infekci fága: „*superinfection immunity*“)

Lysogenie

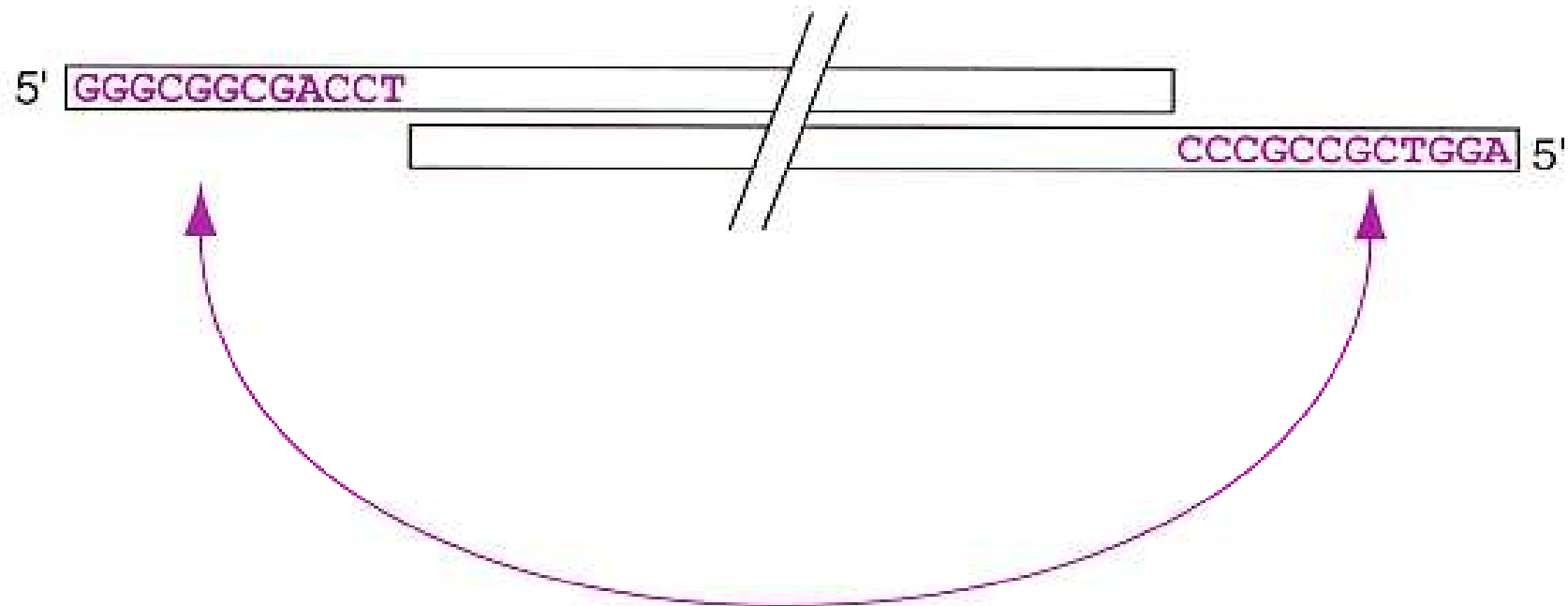
- exprese téměř všech fágových genů je vypnuta fágovým represorem (produkt genu *cI*)
- spontánní represe není absolutní
- reparační mechanismy aktivované poškozením DNA (UV záření) ničí represor *CI* (přechod na lytický cyklus)
- genom Lambda je *obvykle* integrován do genomu hostitele místně specifickou rekombinací a spolu s ním replikován
- genom Lambda může být replikován i v extra-chromozomálním stavu



Genom fága Lambda

- dvouřetězcová lineární DNA (48.514 bp)
- 12 nespárovaných, ale komplementárních bází na obou koncích (*lepivé konce*)
- párování koncových sekvencí je vzhledem k jejich délce stabilní i při 37°C
- v infikované buňce se objevuje i kruhová struktura: důsledek kovalentní vazby katalyzované bakteriální DNA ligázou

Lepivé konce DNA fága Lambda



Cohesive ends:
annealing produces a
circular structure

Lytický cyklus

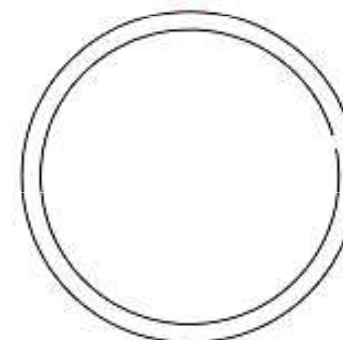
- kruhová DNA se nejdříve replikuje obdobně jako plasmidy: vznik dceřinných kruhových molekul
- později se replikace přepíná na „otáčející se kruh“: vznik dlouhých lineárních molekul DNA, obsahujících mnoho spojených kopií genomu Lambda (konkatemery)

Replikace DNA fága Lambda

Linear DNA, with sticky ends, in phage particle



Injection into cell followed by circularization

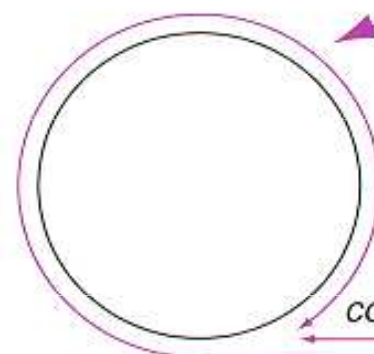


DNA nicks sealed *in vivo* by ligase

Theta replication



Rolling-circle replication



Multiple-length linear DNA

cos

cos

cos



Length of DNA packaged

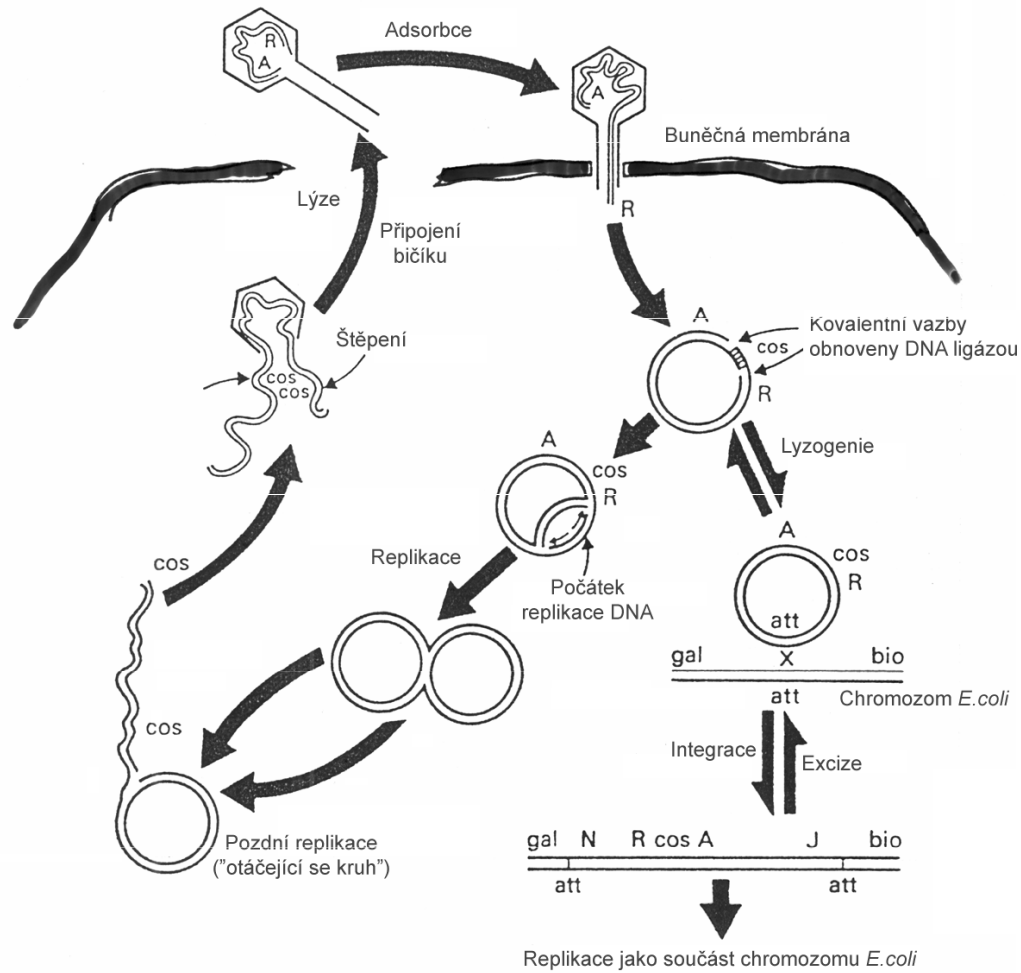
Sestavování fágových částic

- exprese fágových genů
- sestavení prázdné fágové hlavy
- sbalení DNA
- připojení bičíku

Sbalení DNA („DNA packaging“)

- enzymy **rozeznávají** specifická místa na molekule DNA obsahující mnoho kopií fágového genomu (konkatemerů) a provedou v nich **asymetrická štěpení**: vznik lepicích konců („**cohesive end sites**“ - **cos**)
- oblast vymezená 2 místy **cos** je sbalena a přenesena do fágové hlavy

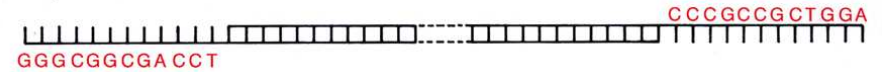
Životní cyklus fága Lambda



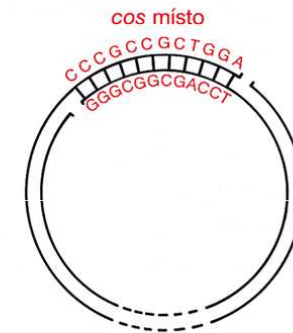
(a) Lineární forma molekuly DNA fága λ

Levý kohezní konec

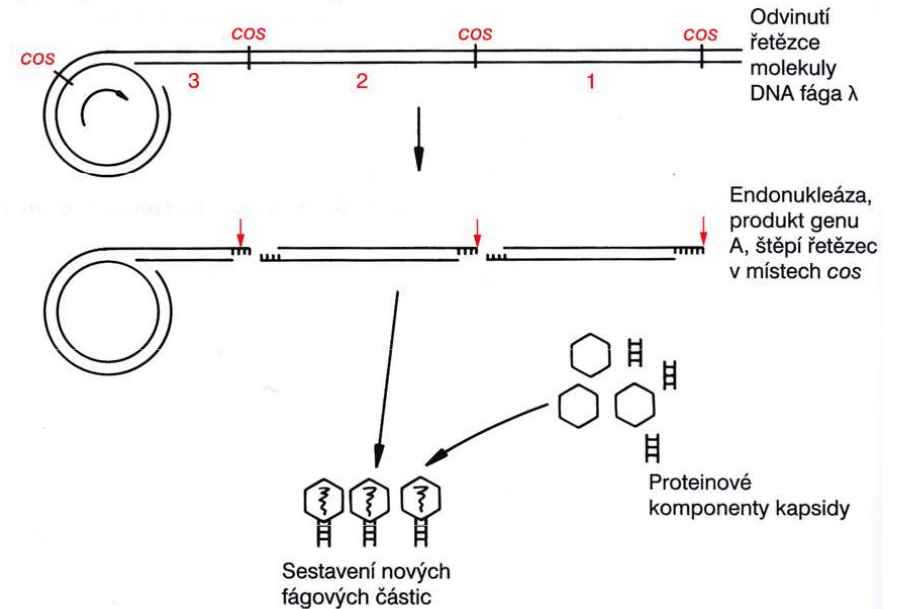
Pravý kohezní konec



(b) Kružnicová forma molekuly DNA fága λ



(c) Replikace a sbalení DNA fága λ



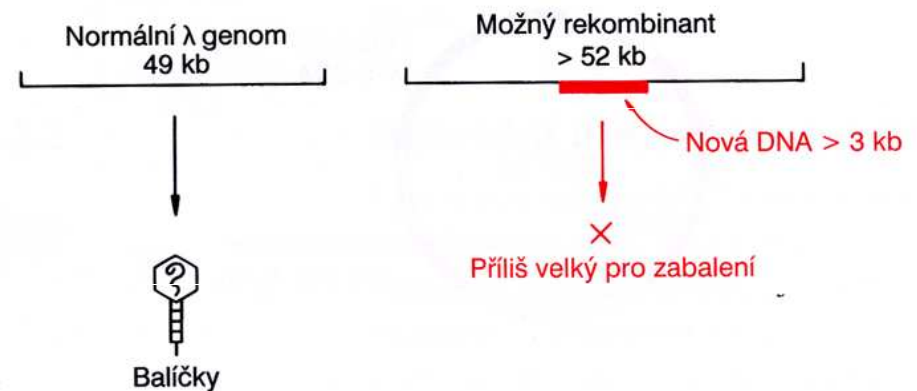
Lýze bakteriální buňky

- zajištěna produktem fágového genu *S*
- mutace v genu *S* způsobuje oddálení nebo úplné selhání lýze (využívají některé vektory pro zvýšení výtěžku bakteriofága v důsledku vícenásobné replikace)

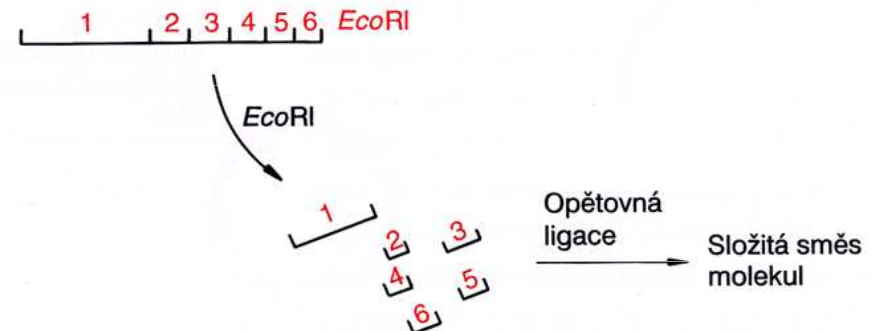
Vektory fága lambda mají 2 omezení

- molekulu DNA lambda lze zvětšit jen asi o 5%, což odpovídá přidání pouze cca 3 kb nové DNA (větší molekuly se nazabalí do fágové hlavy)
- genom lambda je tak velký, že obsahuje cílová místa pro všechny běžné restriktázy (komplikace pro klonování, riziko rozpadu vektoru)

(a) Omezení velikosti

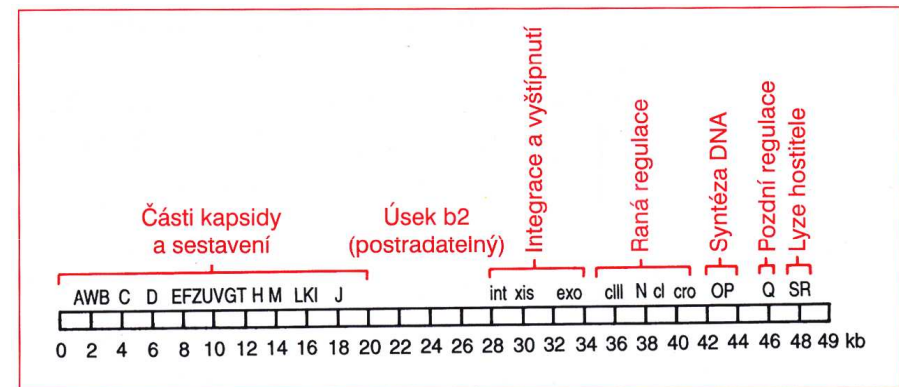
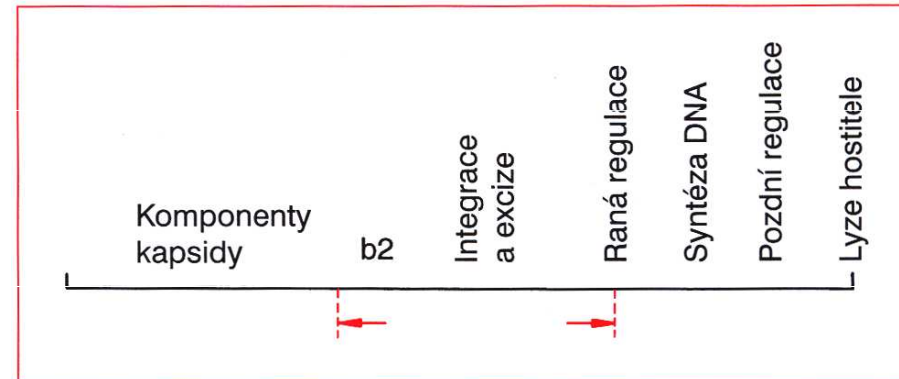


(b) Vícenásobná restriktční místa



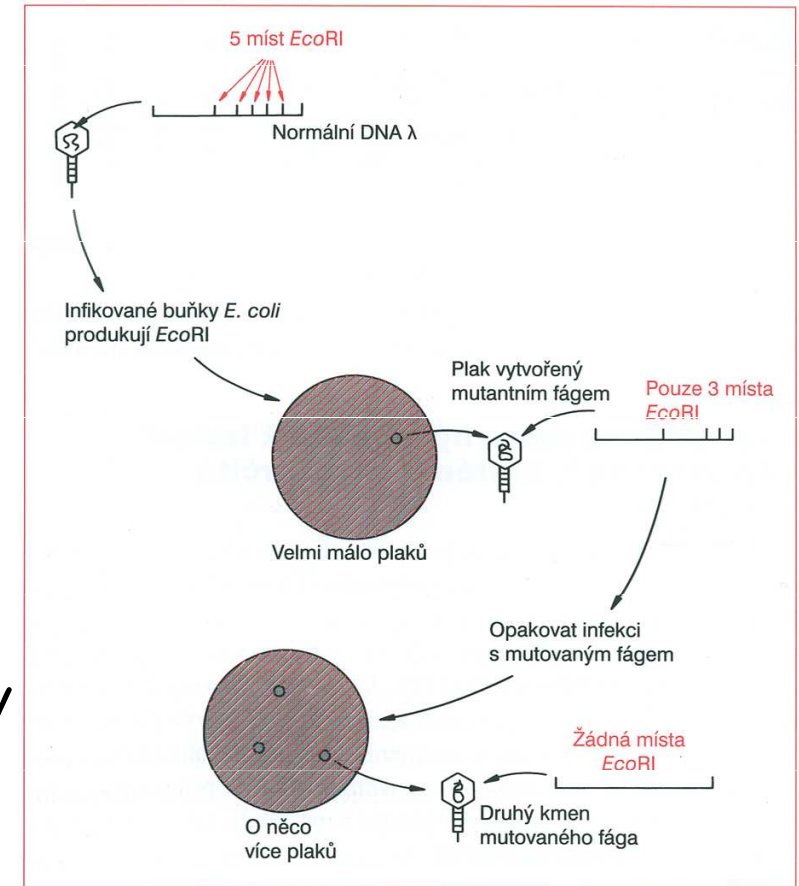
Zvýšení klonovací kapacity vektoru lambda

- odstranění postradatelných genů, které zajišťují lysogenní cyklus (integraci a vyštěpení profága) - cca 15 kb
- zmenšený genom není lysogenní a prochází pouze lytickým cyklem



Odstranění cílových míst pro RE

- **mutagenese *in vitro***
(štěpení RE, modifikace konců DNA, zpětná ligace)
- **přirozená selekce**
 - hostitelem je např. kmen *E. coli* produkující *EcoRI*
 - *EcoRI* zničí většinu molekul DNA fága lambda, které napadají buňky
 - pokud se objeví plaky - reprezentují mutované fágy, v nichž došlo k pozměnění cílových míst pro *EcoRI*
 - opakovanými cykly infekce lze získat molekuly lambda, ve kterých budou chybět všechna místa *EcoRI*



Sbalování DNA *in vitro*

- přenos fágové DNA do buněk transfekcí je méně účinný než infekcí (větší velikost než obvyklé plazmidy)
- fágovou DNA lze účinněji přenést do buněk prostřednictvím fágových částic, které se sestaví pomocí **sbalovacích extraktů**, obsahujících prekurzory fágových hlav a bičíků
- rekombinantní lineární molekula DNA zakončená místy *cos* se sbalí do fágových kapsidů
- vytvořenými viriony se infikují hostitelské buňky *E.coli*, kde se rekombinantní DNA pomnoží

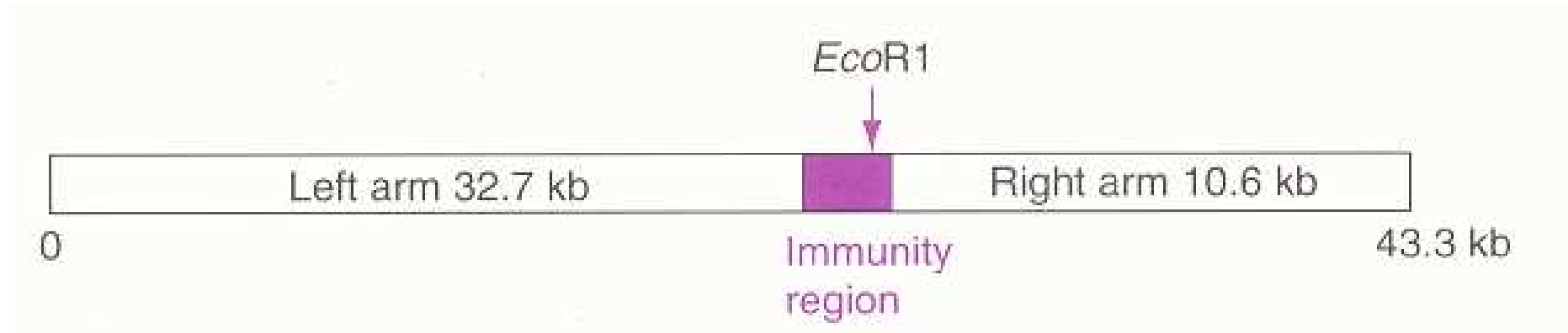
Dva typy vektorů odvozených od fága Lambda

- **Inzerční vektory:** cizorodá DNA se vkládá do 1 restrikčního místa. Maximální klonovací kapacita dosahuje cca 13 kb.
- **Substituční vektory:** cizorodá DNA nahrazuje střední úsek genomu fágového vektoru, který je z něj restrikčními endonukleázami před vložením cizorodé DNA vyštěpen. Klonovací kapacita se pohybuje dosahuje až 23 kb.

Inzerční vektory (např. λ gt10)

- genetickými manipulacemi odstraněny postradatelné sekvence genomu fága Lambda
- obsahuje 1 unikátní klonovací místo (*EcoRI*) v genu *cI*
- schopnost tvorby životaschopných částic je zachována
- klonovací kapacita: **8 kb**

Inzerční vektor λ gt10



- vektor se štěpí *EcoRI*: vznik 2 fragmentů (pravé a levé rameno)
- ligací se klonovaný fragment vkládá do místa *EcoRI*
- lepivé konce různých molekul mají tendenci se párovat: tvorba konkatemerů
- štěpení v místech *cos* a včlenění rekombinantní DNA do fágových hlav probíhá při sbalování „*in vitro*“: životaschopné fágové částice
- infekce bakterií na misce: tvorba plak



genomová DNA

částečné štěpení restriktázou



vektor

inzerční

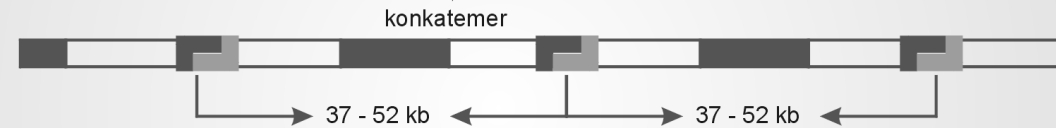
substituční

štěpení restriktázou



střední fragment

spojení ligázou



konkatemer

37 - 52 kb

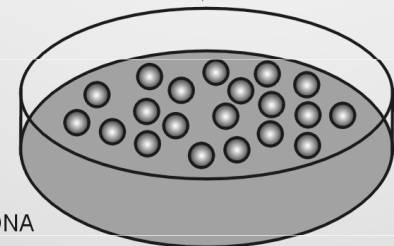
37 - 52 kb

sbalovací extrakt

obalování *in vitro*



infekce buněk *E. coli*



plaky obsahující fágové viriony s rekombinantní DNA

Inzerční inaktivace umožňuje odlišit rekombinantní vektor λ gt10 od prázdného

- místo *EcoRI* je umístěno v genu *cI* kódujícím represor
- **rekombinantní fág** netvoří funkční represor: neschopnost lysogenie - **jasné plaky**
- **parentální fág**: zakalené plaky

Kmen *E. coli hfl* usnadňuje identifikaci rekombinantních fágů

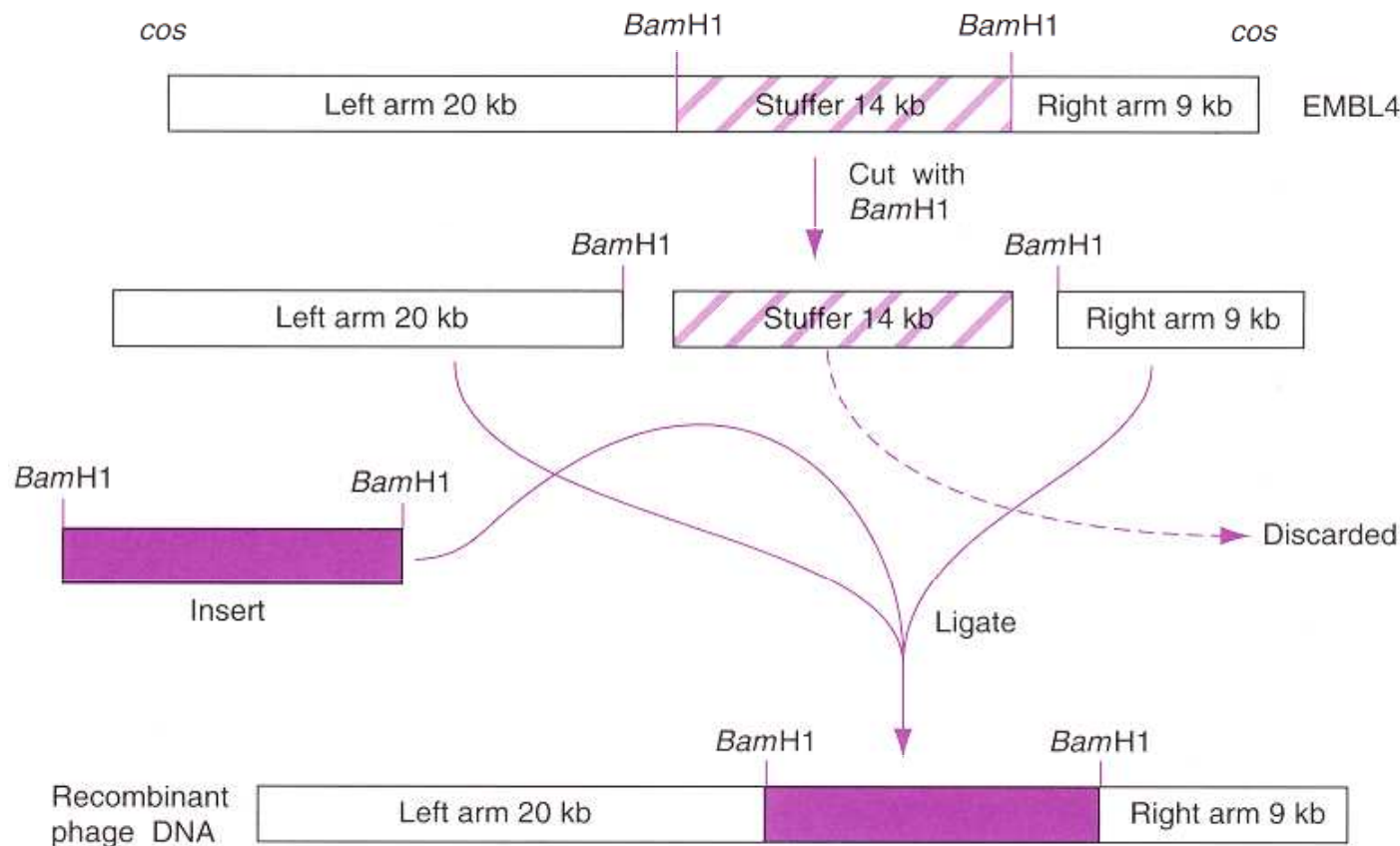
- *hfl* „high frequency of lysogenization“
- parentální fág navozuje lyzogenizaci s vysokou preferencí: neposkytne žádné plaky
- rekombinantní fágy s nefunkčním represorem do lyzogenního stavu nevstoupí: vzniknou jasné plaky

Substituční (náhradní) vektory

- deriváty fága Lambda
- vyšší klonovací kapacita (až **23 kb**)
- využívají přítomnosti sekvencí, které nejsou nezbytné pro lytický cyklus, ale jejich absence by u inzerčních vektorů znemožnila tvorbu životaschopných fágových částic (fágová hlava požaduje určitou minimální velikost DNA, ale nezáleží na nukleotidové sekvenci)
- mají pro restriktázu určenou pro klonování 2 rozpoznávací místa, která lemují „nepotřebnou DNA“, tzv. „stuffer“, vycpávka

Vlastnosti substitučního vektoru EMBL4

- 2 klonovací *Bam*HI místa vymezují postradatelný fragment „stuffer“
- štěpením se uvolňuje „stuffer“+ pravé a levé rameno
- ramena mají tendenci se spojovat (lepivé konce)



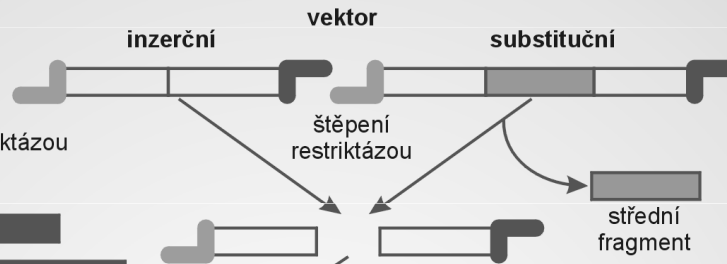
Klonování do substitučního vektoru

- štěpení vektoru enzymem *BamHI*
- oddělení vzniklých fragmentů *elektroforézou*
- *eluce ramen* z gelu
- *ligace ramen s klonovaným fragmentem*, který má kompatibilní konce
- rekombinantní fágová DNA v podobě konkatemeru je *štěpena in vitro* před začleněním do fágových hlaviček („*DNA packaging*“)
- *infekce „trávníkových“ bakterií*, tvorba *plak*



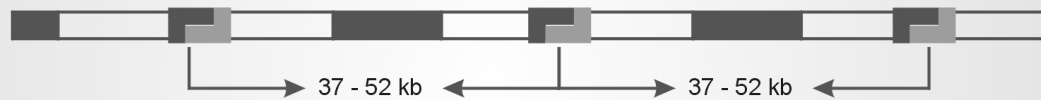
genomová DNA

částečné štěpení restriktázou



spojení ligázou

konkatemer

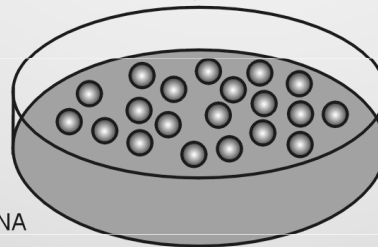


sbalovací
extrakt

obalování *in vitro*



infekce buněk *E. coli*



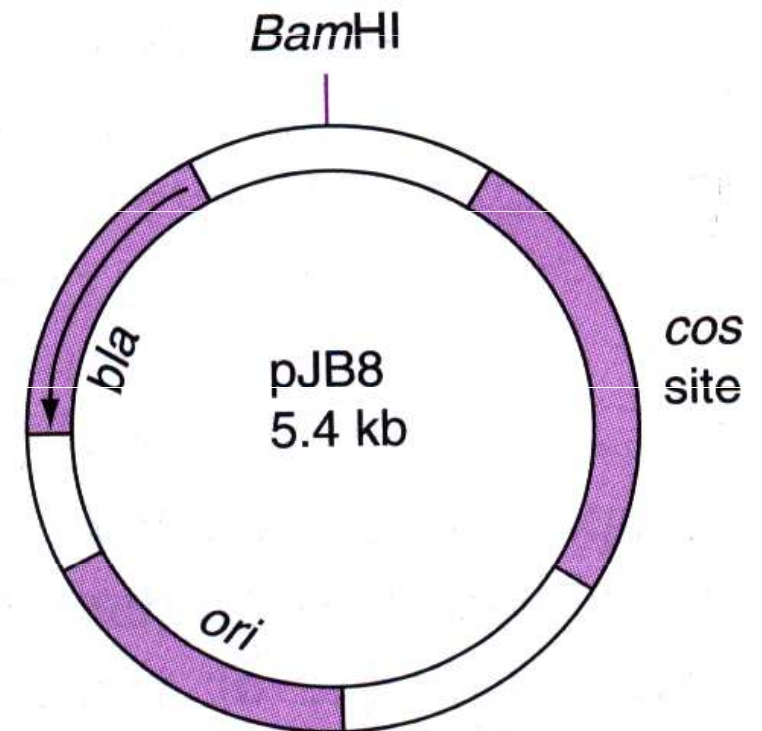
plaky obsahující
fágové viriony
s rekombinantní DNA

Výhody substitučních vektorů

- preferenčně jsou klonovány větší fragmenty (pokud je fragment menší než 8 kb nejsou částice životaschopné)
- defosforylace inzertu: zamezení tvorby většího počtu tandemově uspořádaných insertů
- rozlišení rekombinantních a prázdných vektorů: střední fragment může kódovat β -galaktozidázu: plaky původního (nerekombinovaného) fága jsou modré na médiu obsahujícím X-gal

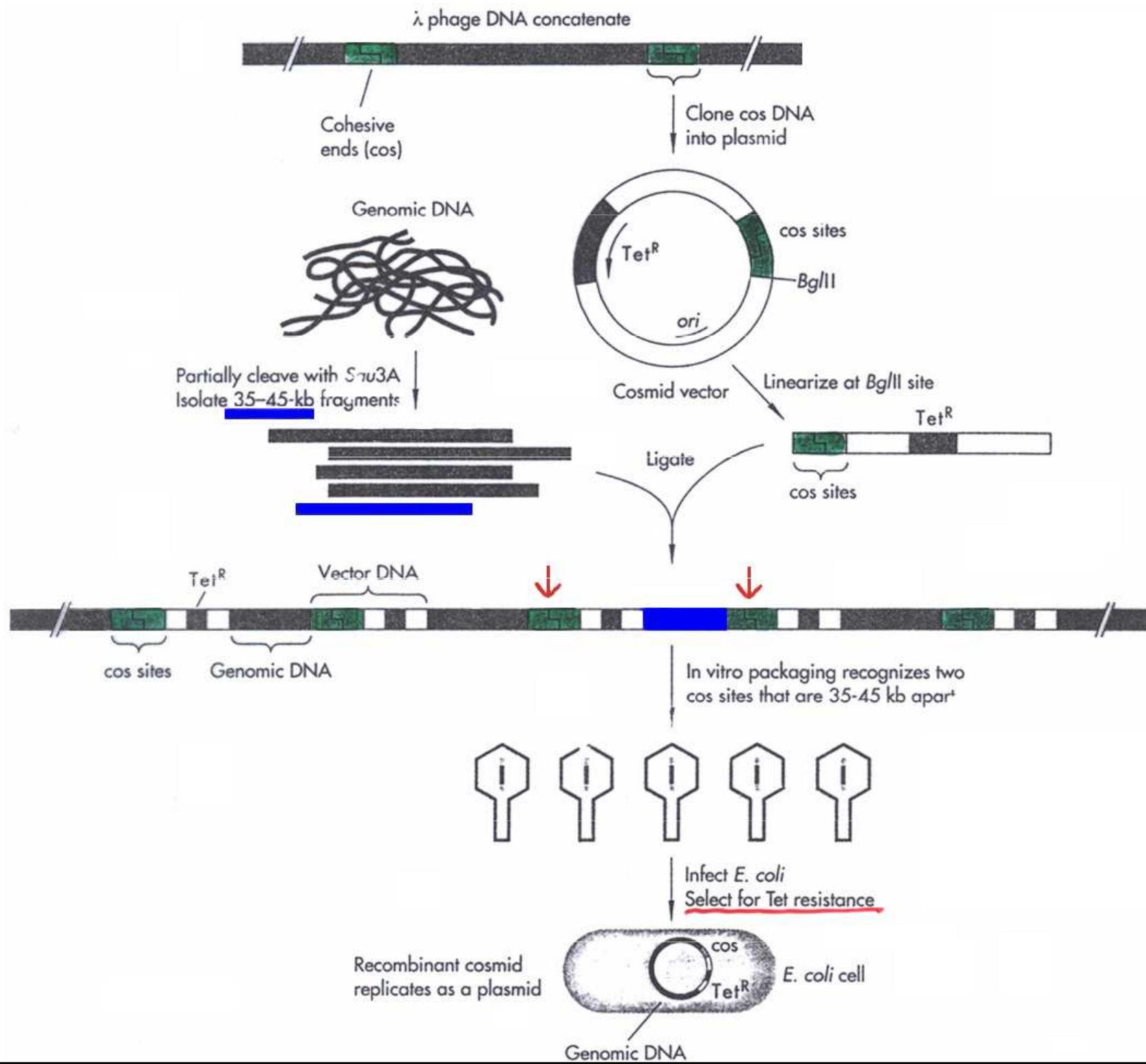
Kosmidy

- hybridy mezi fágovou DNA a bakteriálním plasmidem
- plazmidy, které obsahují místo *cos*
- spojení výhod plazmidových vektorů a vektorů odvozených od fága Lambda
- využívají toho, že sbalování probíhá *in vitro* nejen s genomy lambda, ale také s jakoukoliv molekulou DNA nesoucí místa *cos* ve vzdálenosti 37-52 kb



Využití kosmidů pro klonování

- štěpení, ligace insertů a purifikace rekombinantních klonů se provádí stejně jako při práci s plazmidy
- ligační podmínky se nastaví tak, aby byla podporována tvorba konkatemerů
- místo transformace bakterií se ligační směs podrobí sbalování *in vitro* („DNA packaging“)
- vzniknou fágové částice, které zajistí přenos rekombinantní DNA do bakterií, ale nejsou životaschopné (nedochází k tvorbě plak, v kosmidu nejsou přítomny fágové geny)
- kosmid se bude v bakteriích replikovat jako plazmid



Výhody kosmidů

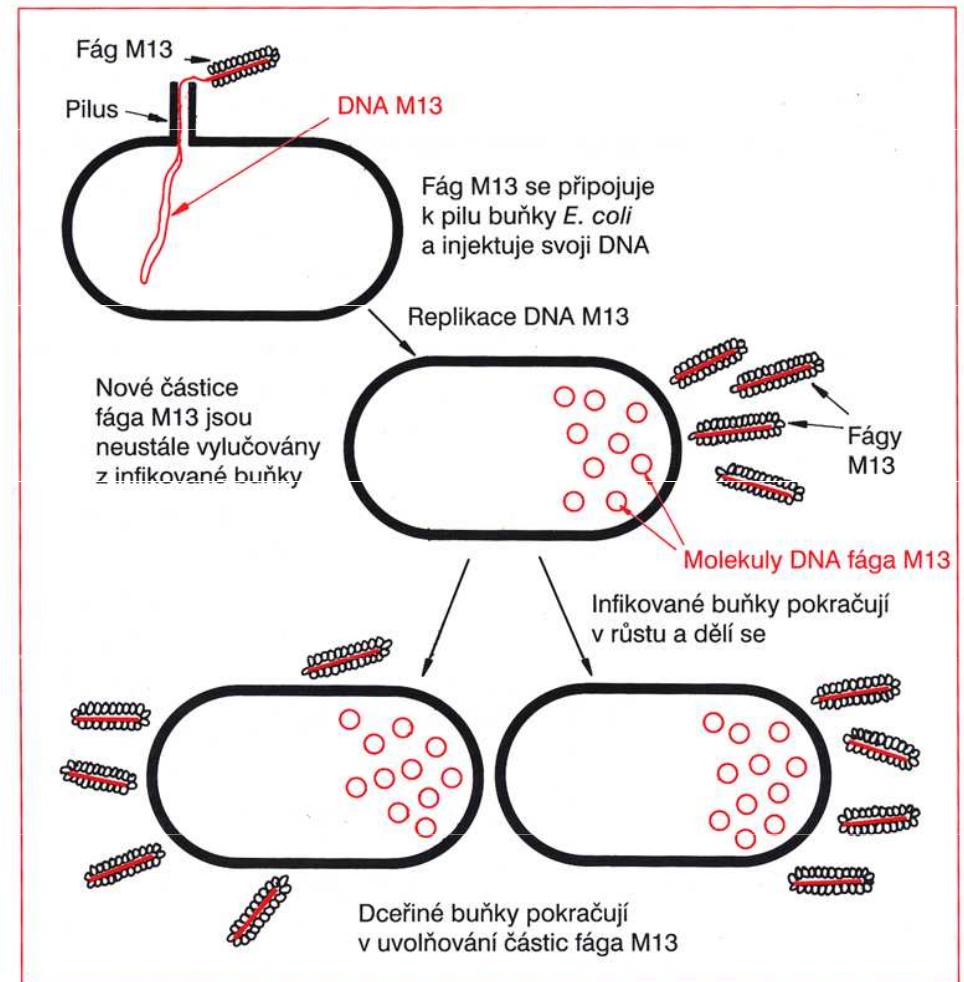
- klonovací kapacita **30 - 44 kb**
- možnost propagace a purifikace konvenčními metodami pro práci s plasmidy
- přirozená selekce pro velké inzerty

Bakteriofág M13

- vláknitý bakteriofág infikující *E.coli*
- připojuje se na špičky povrchových výrůstků bakterií (pilusy), které nesou F-plazmid
- neinfikuje bakterie F-
- dlouhý vláknitý tvar fágové částice
- obsahuje jednořetězcovou kružnicovou molekulu DNA (6,4 kb), obsahující sekvence 10 genů
- pouze jedna mezigenová sekvence o velikosti 507 nukleotidů, kam je možné klonovat

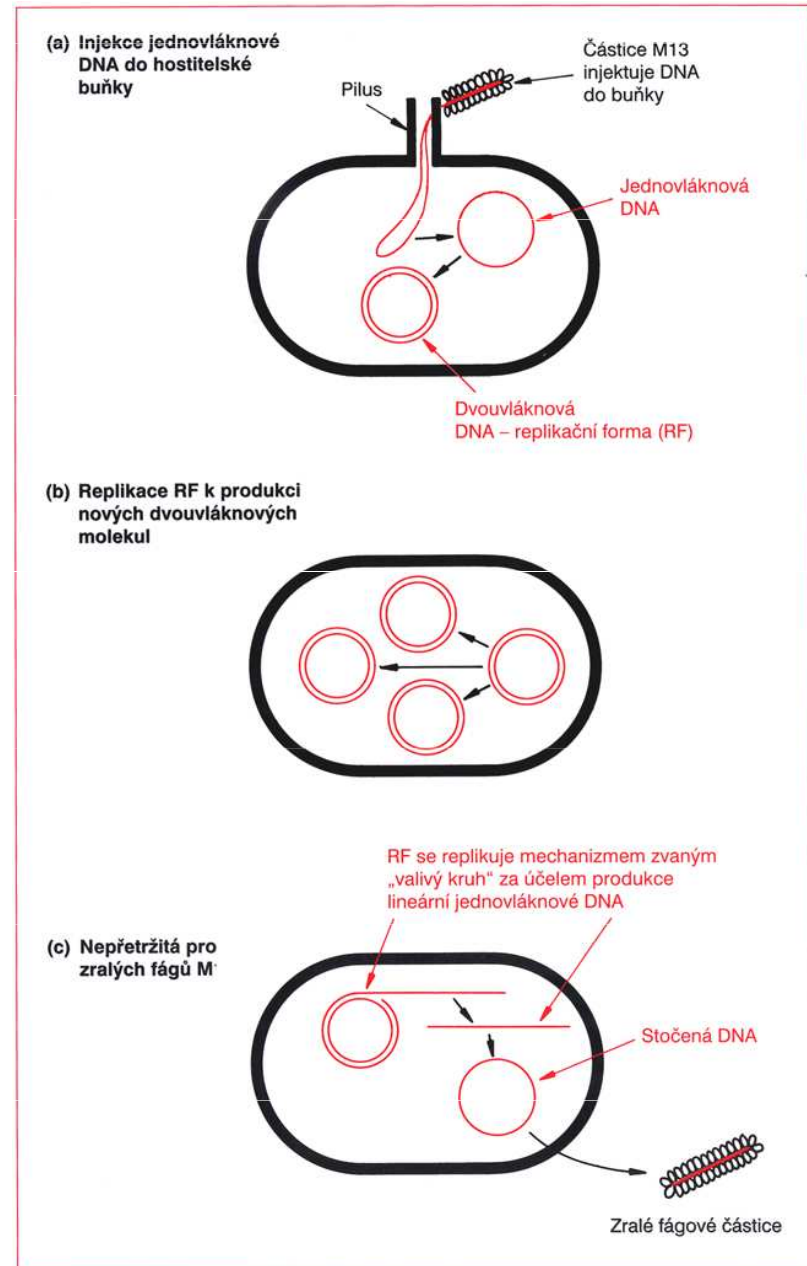
Životní cyklus fága M13

- obsahuje jednořetězcovou DNA
- nekóduje proteiny pro integraci do genomu hostitele
- injekce DNA využívá pilu (pilus), tj. výrůstků pro konjugaci
- jednovláknová molekula DNA M13 uvnitř buňky funguje jako templát pro syntézu komplementárního vlákna a replikuje se
- DNA M13 se nevčleňuje do genomu hostitele, ale přechází do obou dceřinných buněk při dělení
- nové fágové částice se tvoří průběžně, hostitelské bakterie pokračují v růstu



Replikace DNA fága M13

- jednořetězcová DNA se uvnitř buňky mění na dvouřetězcovou DNA (replikační forma - RF)
- RF se replikuje mechanismem „valivého kruhu“, jehož produktem je lineární jednořetězcová DNA
- vzniklé vlákno se opět mění na RF nebo se začleňuje do dceřinných fágových virionů



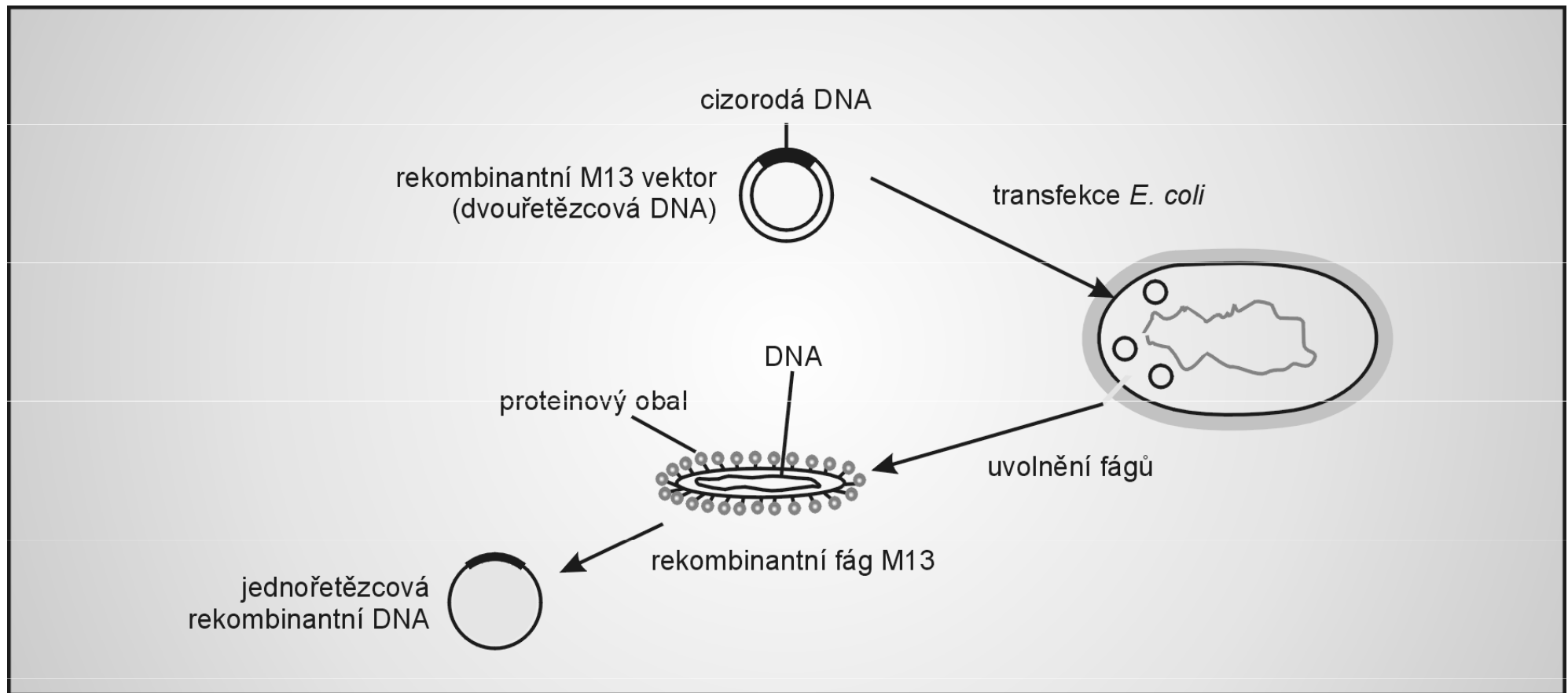
Tvorba částic fága M13

- při replikaci fágové DNA se v buňce hromadí mnoho kopií molekul podobných plazmidům
- zároveň se exprimují fágové geny
- fágový protein 5 se váže k ssDNA a zahajuje její přesun k membráně, kde dojde k sestavení dceřinných fágových částic
- viriony nezpůsobují lyzi buňky (matné plaky)

Výhody vektorů odvozených od M13

- replikace zahrnuje tvorbu ds DNA, kterou lze z buněk izolovat jako plazmidovou DNA a dále s ní jako s plazmidem manipulovat (použít ke klonování)
- významně usnadněno získání ssDNA: do fágových virionů jsou sbalovány jednořetězcové kružnicové molekuly DNA, které lze snadno izolovat
- velikost virionu vláknitého fága je určena délkou molekuly DNA: délka klonované DNA není omezena (lze klonovat fragmenty DNA, jejichž velikost dosahuje několikanásobku délky fágového genomu)
- infikované buňky jsou viabilní: nevznikají plaky, ale zóny pomaleji rostoucích buněk jsou viditelné - lze získat fágy o vysokém titru

Klonování ve vektorech M13

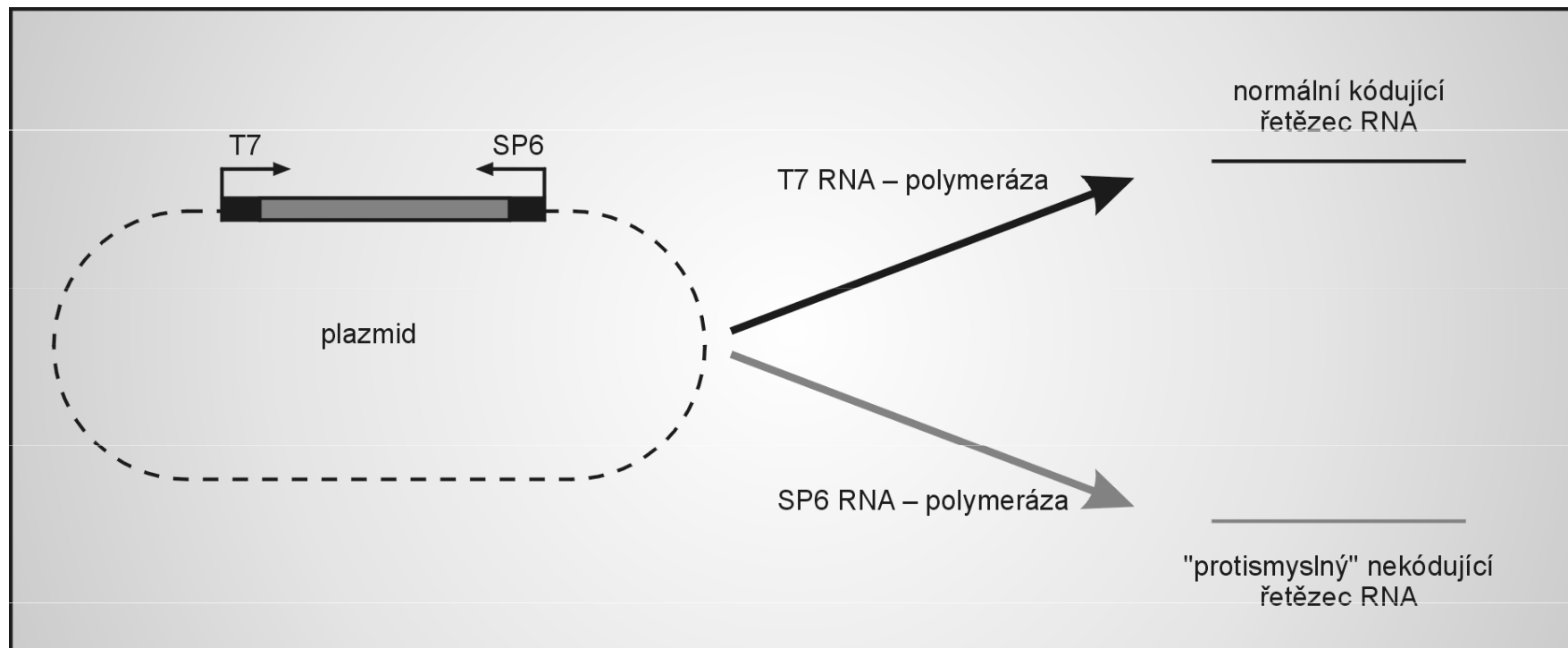


Expresní vektory

- upraveny nejen pro klonování DNA, ale také pro její **expresi**
- obsahují signály pro:
 - **iniciaci transkripce (promotor)** *u transkripčních fúzních vektorů*
 - **iniciaci transkripce a translace (promotor, RBS a startovní kodon)** *u translačních fúzních vektorů*
- cizorodá DNA může být přepisována *in vitro*

na opačných koncích klonovacího místa mohou být umístěny odlišné promotory: umožnění přepisu obou řetězců inzertu

Využití: hybridizační sondy, translace *in vitro*



2 typy expresních vektorů

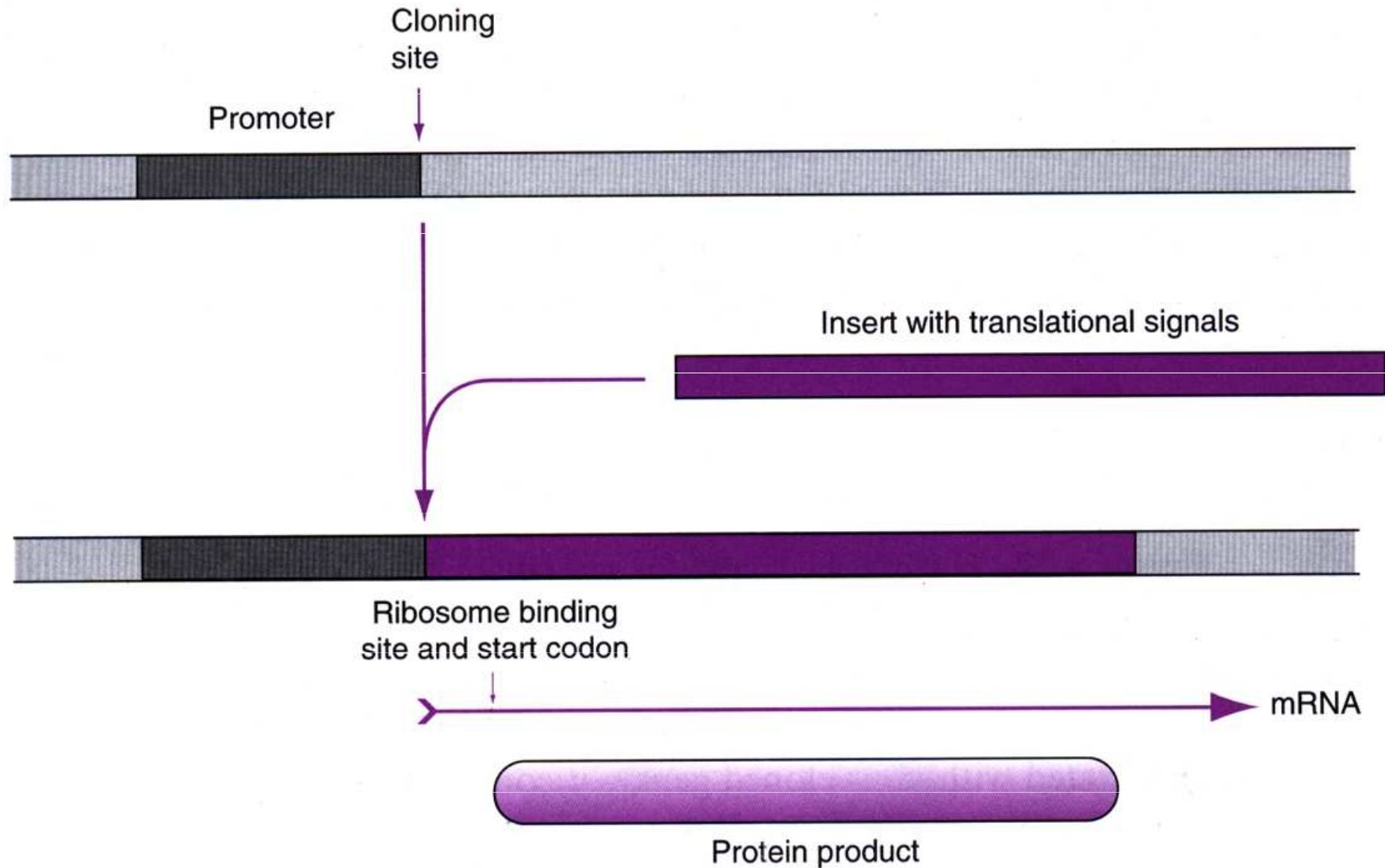
1. Transkripční fúzní vektor

- obsahuje promotor
- translační signály poskytuje klonovaná DNA

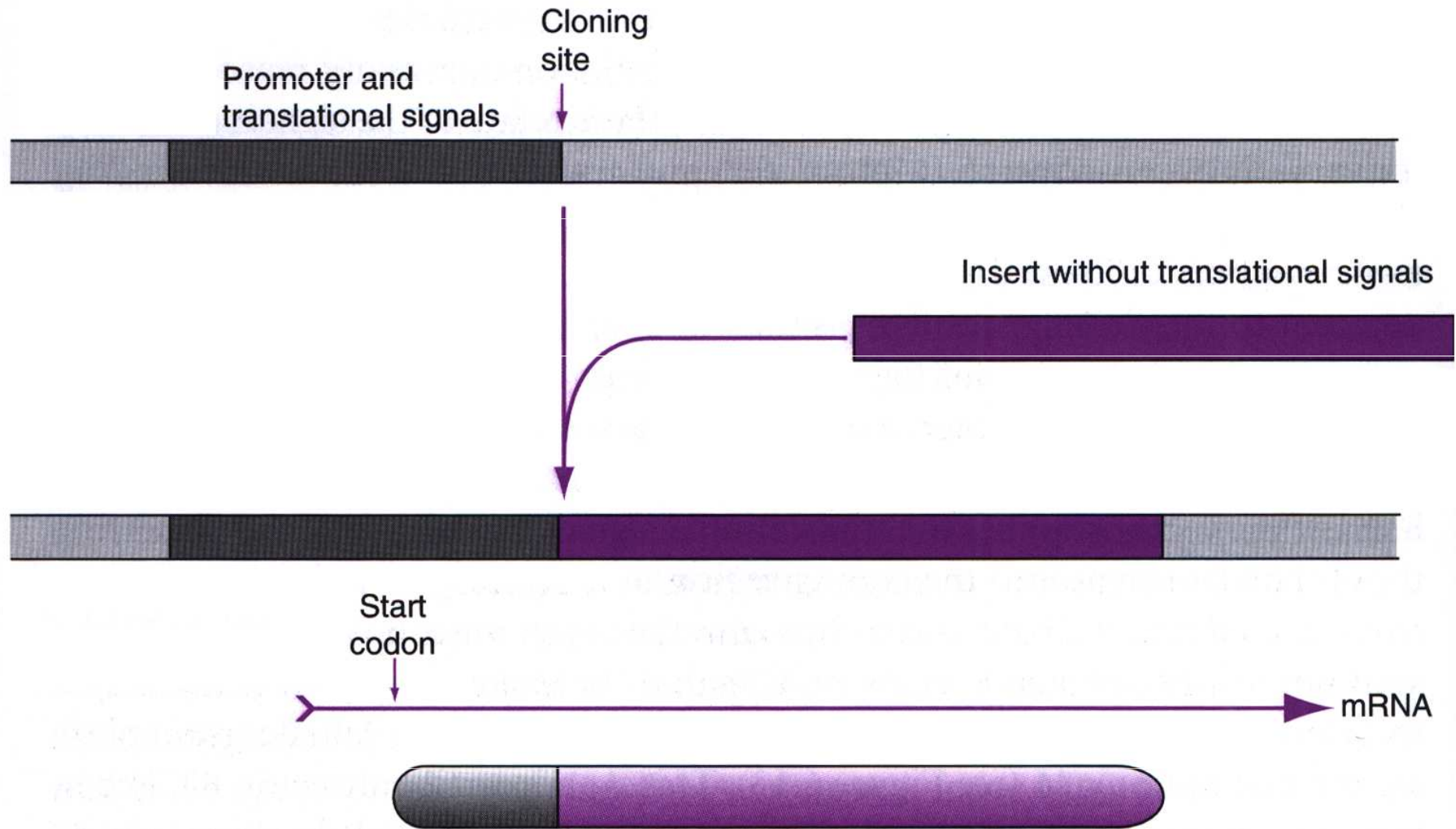
2. Translační fúzní vektor

- obsahuje signály pro iniciaci transkripce i translace
- klonovaný fragment se začleňuje do kódující oblasti genu ve vektoru
- inzert musí respektovat čtecí rámeček

Transkripční fúzní vektor



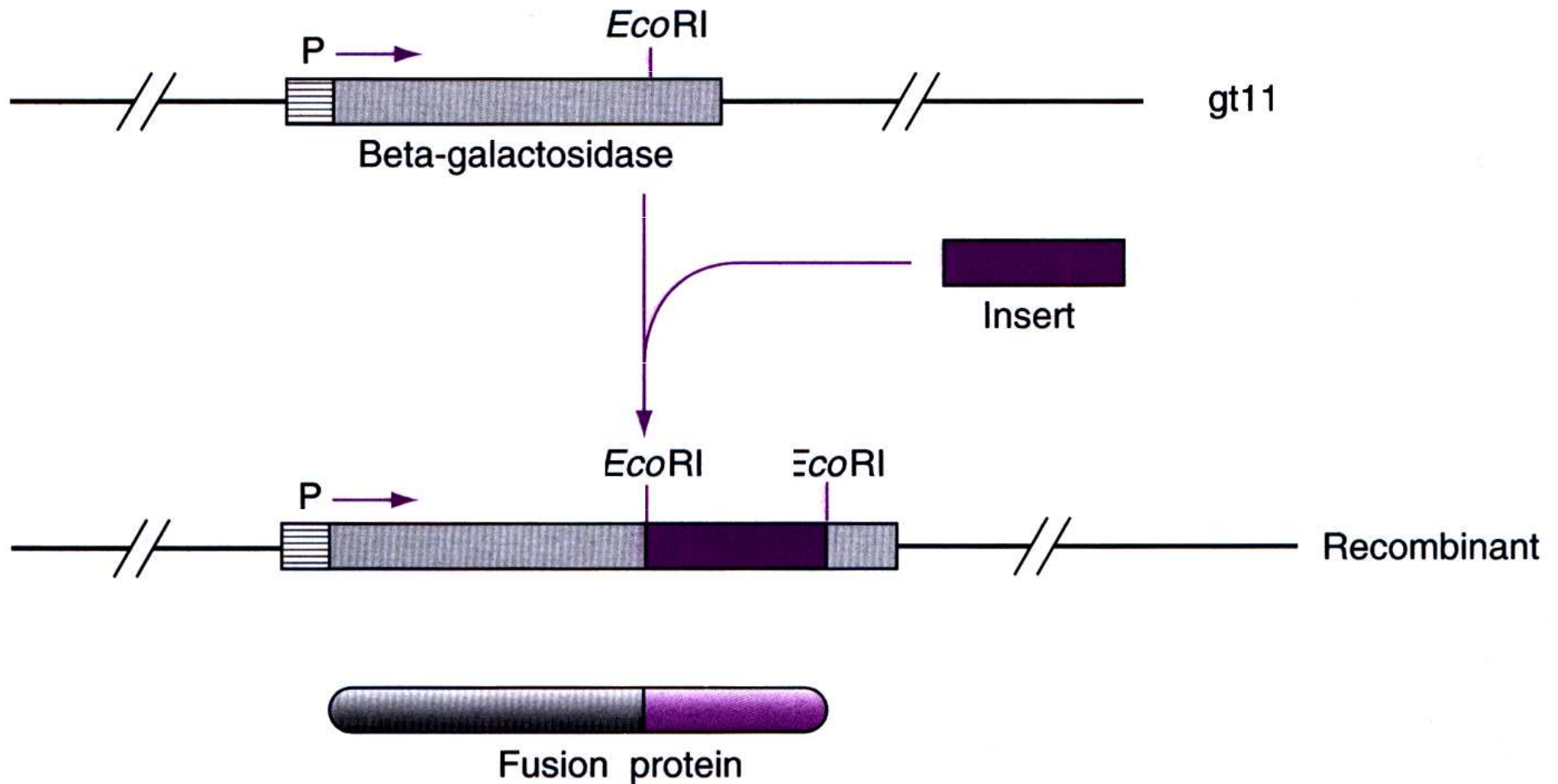
Translační fúzní vektor



Expresní vektor λ gt11

- inzerční vektor
- obsahuje klonovací místo *EcoRI* uvnitř genu β -*gal*: inzerce fragmentu inaktivuje β -galaktozidázu - bílé plaky na médiu X-gal
- pokud je inzert ve správném čtecím rámci, vznikne proteinová chiméra - produkt fúze klonovaného genu a β -*gal*
- protein je možno detekovat protilátkou

Proteinová chiméra tvořená z vektoru λ gt11



Inducibilita exprese

- nežádoucí exprese z neindukovaných promotorů limituje klonování, pokud je produkt klonovaného genu toxický
- výhodný je promotor fága T7: není rozeznán RNA polymerázou *E. coli*

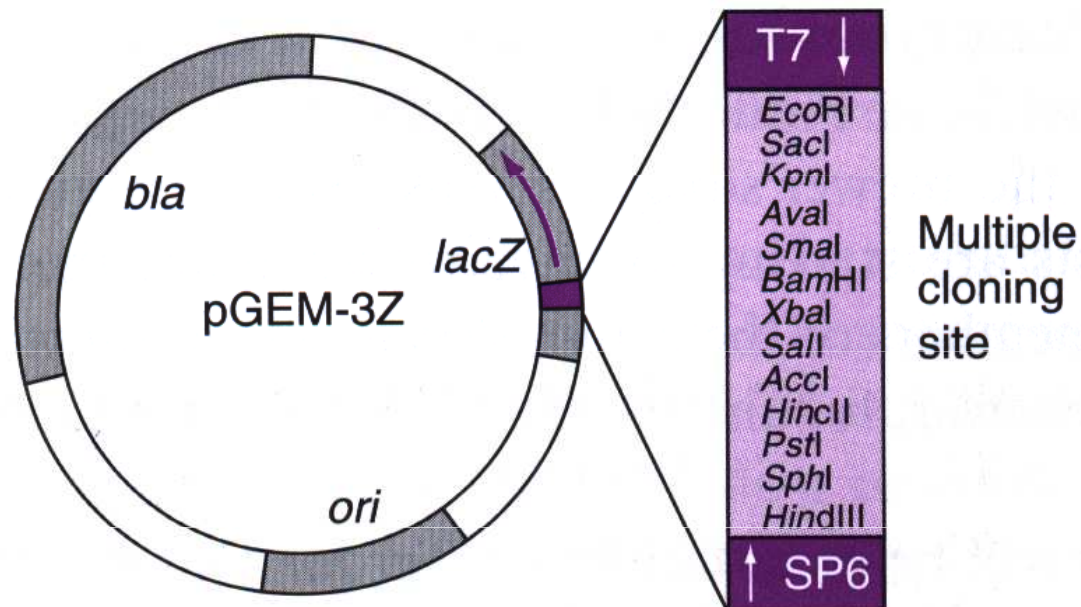
Využití expresních vektorů

Postup:

- klonování fragmentu DNA do vektoru pod kontrolu promotoru T7
- přenesení plazmidu do kmene *E. coli*, který obsahuje gen pro T7 RNA polymerázu pod kontrolou *lac* promotoru
- exprese T7 RNA polymerázy je inducibilní IPTG, částečná „netěsnost“ neindukovaného promotoru *lac* se řeší přidáním inhibitorů
- T7 RNA polymeráza zajistí expresi klonovaného genu

Vektory pGEM

- expresní vektory
- MCS je obklopeno dvěma opačně orientovanými fágovými promotory (T7 a SP6)
- možno snadno získat „sense“ a „antisense“ transkript klonovaného genu

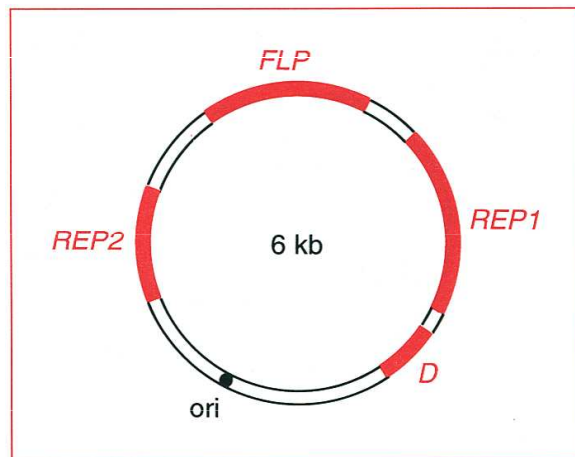


Vektory pro klonování a expresi genů v eukaryotických buňkách

- primární klonování se provádí v bakteriích *E. coli*, následuje přenos do eukaryotických buněk
- v eukaryotických buňkách se často sleduje funkce genu, interakce jeho produktu s jinými proteiny, atd.
- studium možností regulace a zdokonalení syntézy důležitých metabolických produktů (např. hormonů - inzulin)
- změny vlastností organismu (např. zvýšení odolnosti užitkových rostlin k herbicidům)
- větší důraz na expresi daného genu než na tvorbu genových knihoven (výjimka: vektory YAC)

Kvasinkové epizomální vektory

- využití: např. při výrobě léčiv z klonovaných genů
- založené na přirozených kvasinkových plazmidech **2 μ m**, které se vyskytují u většiny kmenů *S. cerevisiae*
- 70-200 kopií na buňku

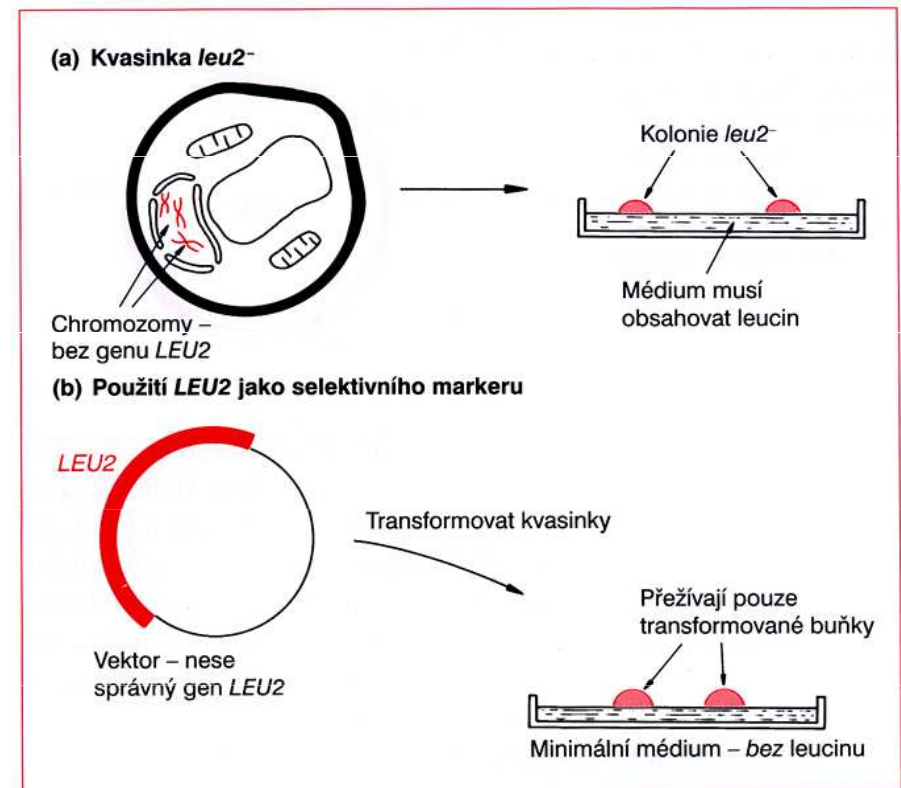


REP - zapojeny do replikace plazmidu

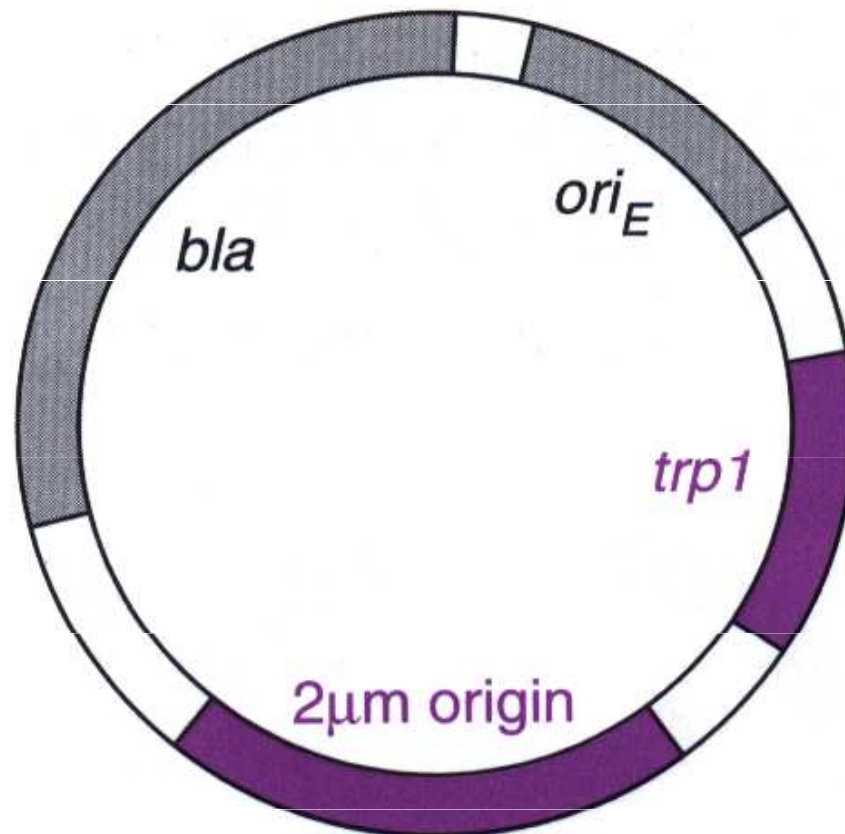
FLP - zapojen do intramolekulární rekombinace

Kvasinkové epizomální vektory (YEps)

- samostatná **replikace v kvasinkách**
- obsahují místo **ori** pro replikaci v *E. coli* (**kyvadlové vektory**)
- selekce založena na komplementaci auxotrofních mutací hostitelského kmene např. v genech *trp1*, *ura3*, *leu2*, *his3* (podíl na biosyntéze aminokyselin)
- hostitelský kmen musí nést příslušnou mutaci (kvasinka neporoste v médiu postrádajícím příslušnou aminokyselinu)
- nedostatek antibiotik, ke kterým jsou kvasinky citlivé
- nesou marker pro rezistenci k antibiotiku pro selekci v *E. coli*



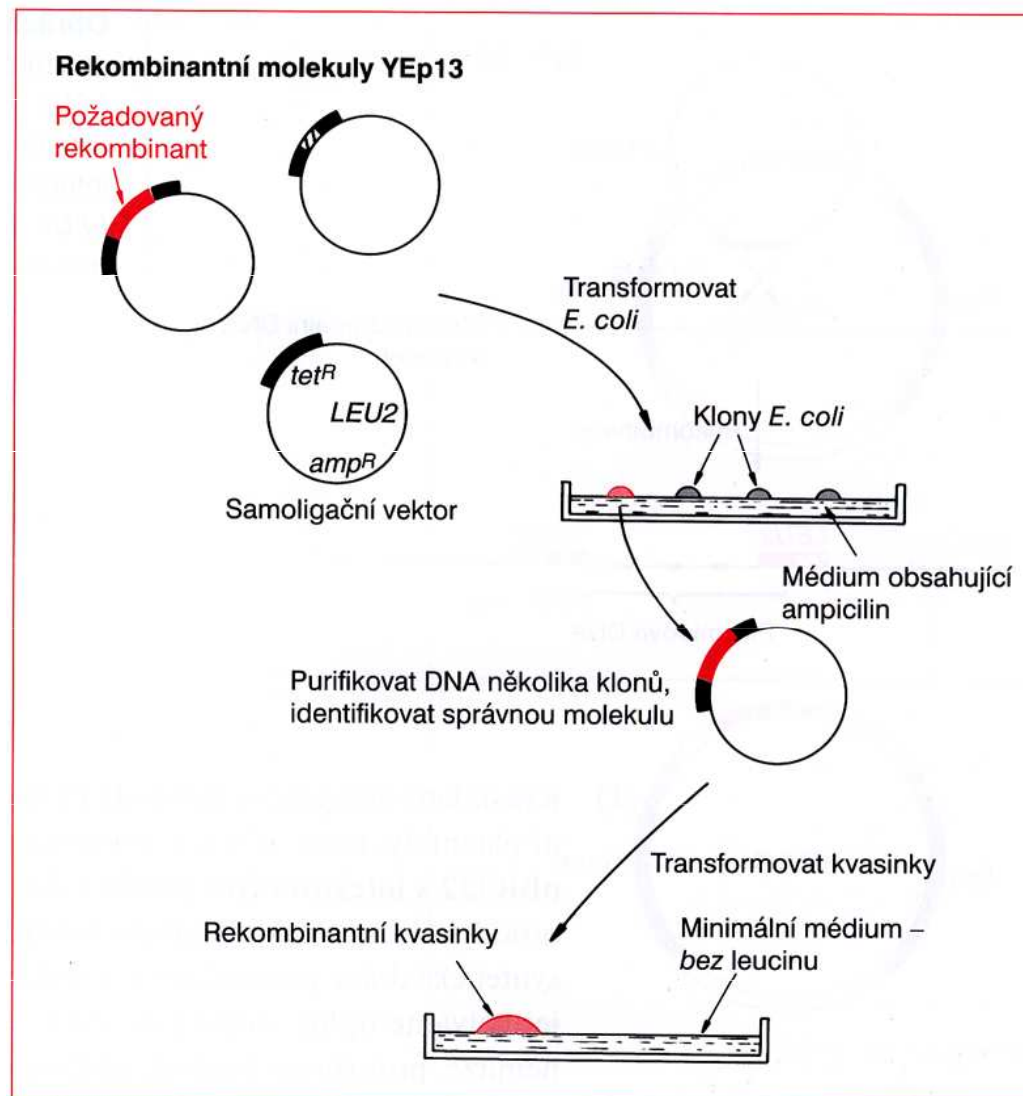
Kvasinkový epizomální vektor



Kvasinkové epizomální vektory

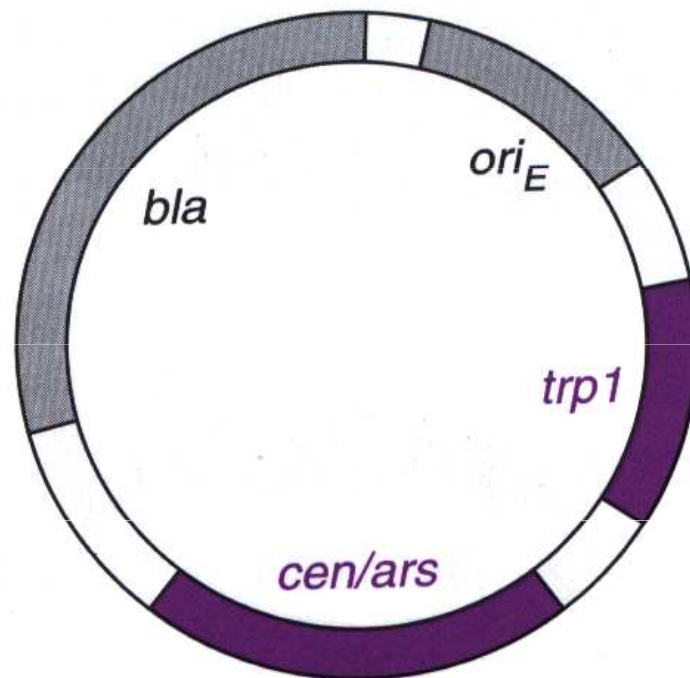
- nízká stabilita v kvasinkových buňkách plynoucí z občasné chybné segregace při mitóze
- občasná integrace do kvasinkového chromozomu homologní rekombinací (gen fungující jako selekční marker je velmi podobný mutované formě genu, která se nachází chromozomální DNA)

Klonování v kvasinkových epizomálních vektorech



Kvasinkové centromerové vektory

- obsahují kvasinkový počátek replikace *ars* „*autonomně se replikující sekvenci*“
- obsahují **centromeru**
- nízký počet kopií v buňce (1-2)



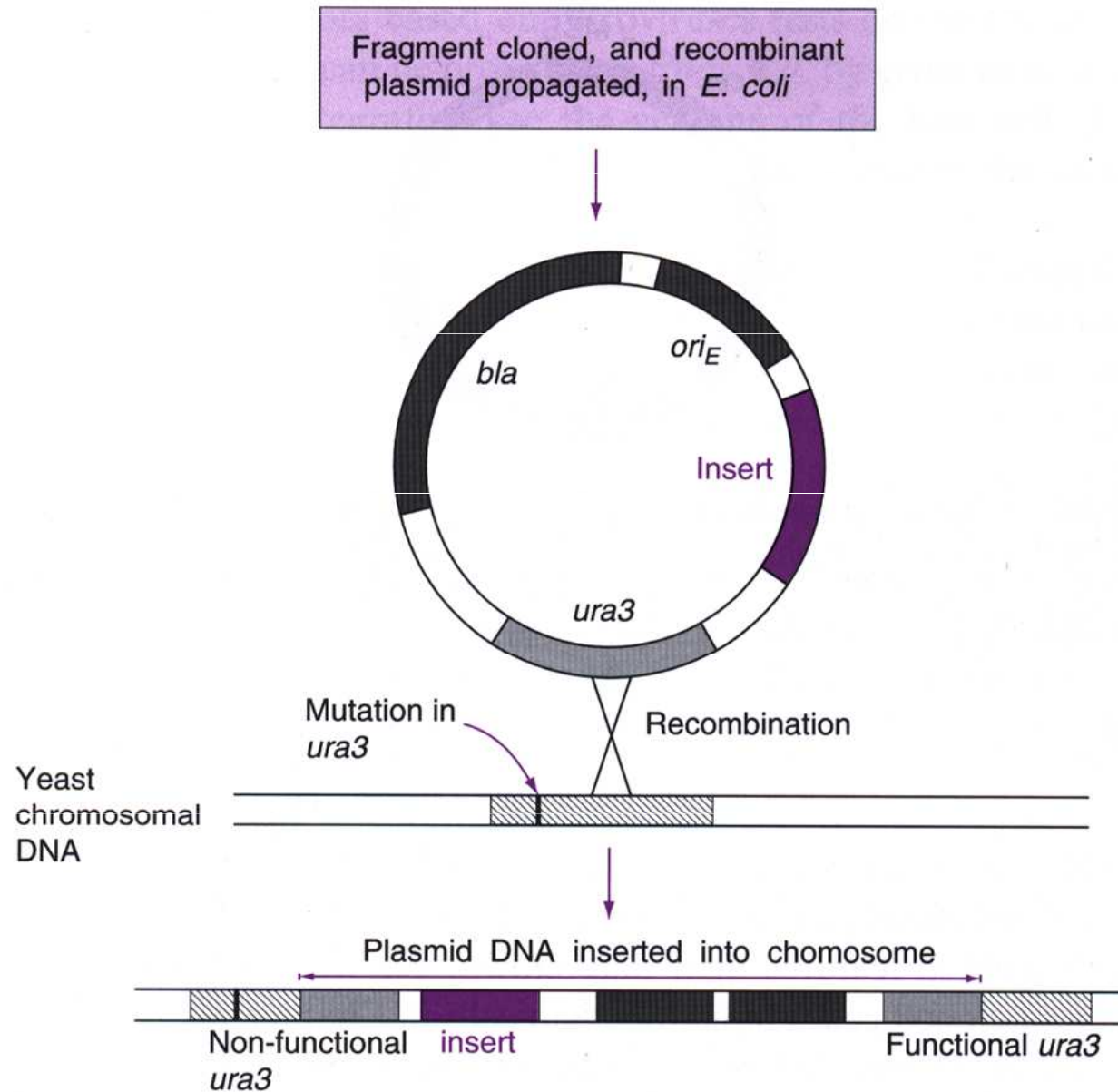
Expresní kvasinkové vektory

- většina kvasinkových vektorů má zajišťovat expresi klonované sekvence
- obdoba bakteriálních vektorů, signály pro expresi musí respektovat kvasinku jako hostitelský organismus
 - promotory srozumitelné kvasinkám
 - signály pro sekreci
 - signály pro transport do buněčných kompartmentů

Kvasinkový integrační plazmid (Yip)

- bakteriální plazmid nesoucí kvasinkové geny
- neschopen samostatné replikace v kvasinkách
- integruje se do chromozomu homologní rekombinací
- nízká účinnost transformace
- obtížné získání rekombinantního vektoru po transformaci
- výrazně vyšší stabilita než u autonomně se replikujících plazmidů

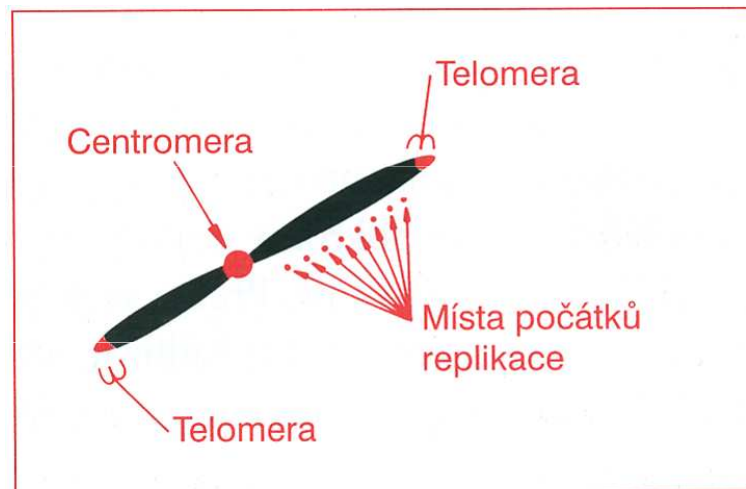
Kvasinkový integrační plazmid (Yip)



Umělý kvasinkový chromozom (YAC)

Obsahuje:

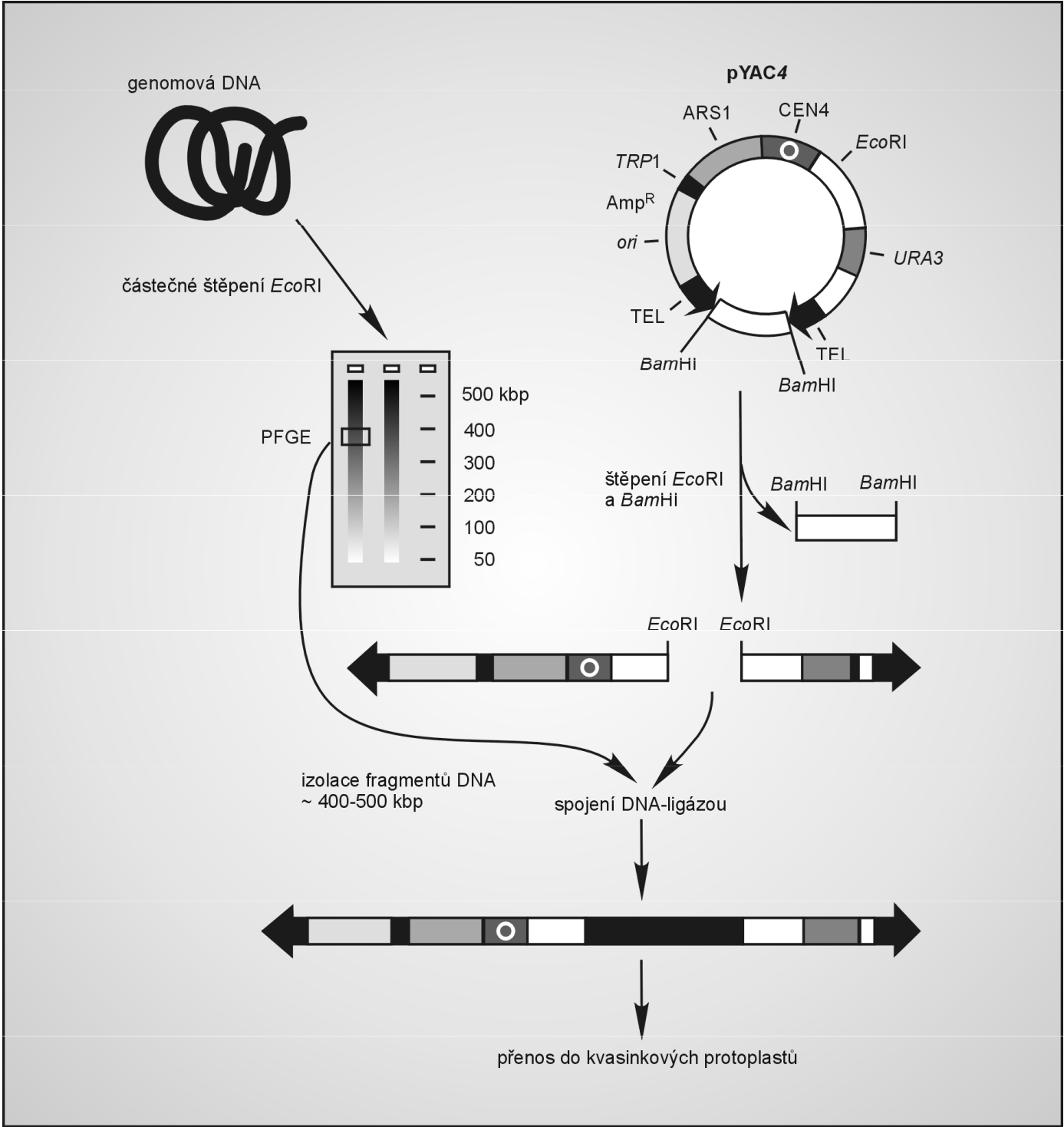
- dvě kvasinkové **telomery** (správná replikace konců, ochrana před exonukleázami, udržování lineární podoby chromozomu)
- **centromeru** (rozdělení do sesterských buněk)
- **sekvence pro autonomní replikaci** (počátky replikace po celé délce chromozomu)
- selektovatelné **signální markery**
- replikuje se v buňkách *E.coli* i kvasinkách (kyvadlový vektor)
- vhodný pro klonování velkých fragmentů DNA (0,2 - 2 Mb)



Klonování v YAC

- propagace v *E. coli* v kruhové plazmidové formě
- odstranění vyplňovacího fragmentu mezi telomerami („stuffer“) restričním štěpením
- vznikají dvě lineární ramena nesoucí selekční markery
- ligace insertu mezi ramena (podobně jako u fága Lambda)
- transformace kvasinkových buněk s částečně narušenou buněčnou stěnou (sféroplastů)
- selekce založená na komplementaci auxotrofních markerů (rekombinanti obsahují obě ramena)

Klonování v YAC



YAC

Výhody:

- vysoká klonovací kapacita
 - lze klonovat celé eukaryotické geny, včetně regulačních sekvencí

Nevýhody:

- nižší stabilita inzertu (možnost vnitřní rekombinace)
- obtížná purifikace

PAC a BAC

- bakteriální vektory
- **PAC** = umělý chromozom odvozený od bakteriofága P1, který pojme inserty o velikosti kolem 150 kb
- **BAC** = vektor založený na F plazmidu, který pojme inserty až do velikosti 300 kb
- výrazně vyšší stabilita než YAC
- hojně používané u sekvenačních projektů

Klonovací kapacita vektorů

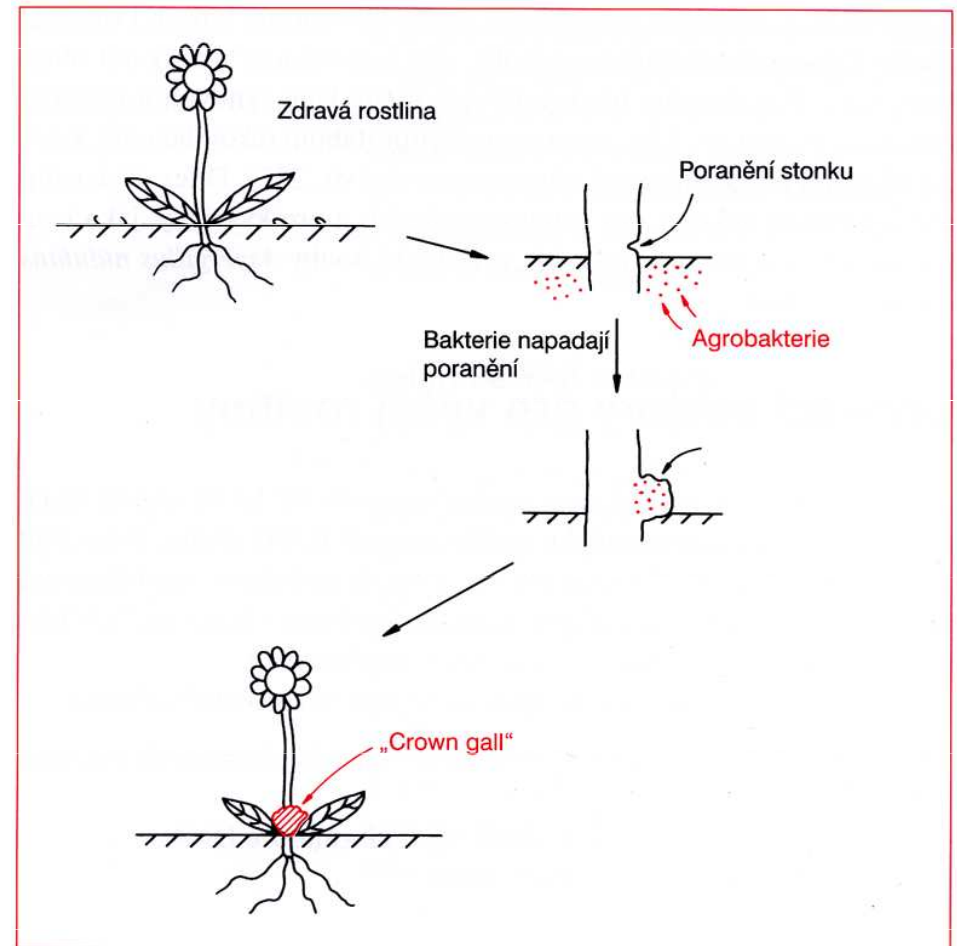
Klonovací vektor	Velikost inzertu
Běžné plazmidové vektory	0-10 kb
λ Inzerční vektory	0-10 kb
λ Substituční vektory	9-23 kb
Kosmidové vektory	30-44 kb
PAC vektory	130-150kb
BAC vektory	≤ 300 kb
YAC vektory	0.2 - 2.0 Mb

Klonování ve vyšších rostlinách

- vektory založené na přirozeně se vyskytujících plazmidech bakterie *Agrobacterium*
- vektory založené na rostlinných virech
- možnost přímého přenosu genů

Vektory odvozené od plazmidu Ti *Agrobacterium tumefaciens*

- není známý žádný plazmid specifický pro rostliny
- bakteriální plazmid Ti má pro rostliny velký význam
- bakterie *A. tumefaciens* pronikají do dvouděložné rostliny v místě poranění a vyvolají zde onemocnění „crown gall“ - zával plynoucí z nadměrné proliferace buněk
- příčinou je Ti („tumor-inducing“) plazmid

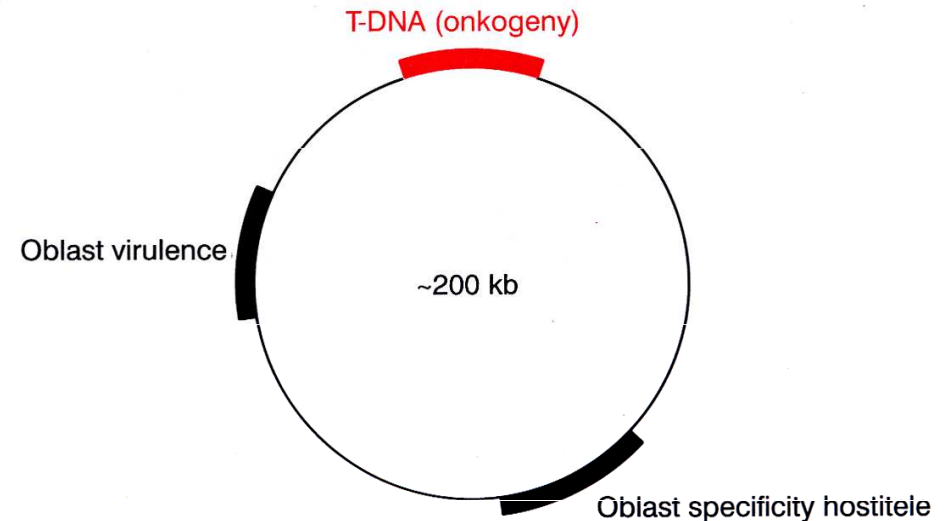


Ti plazmidy *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens:

- bakterie, která vyvolává tvorbu nádorů na tělech rostlin
- přenáší **Ti („tumor-inducing“)** plazmid do rostlinných buněk
- Ti plazmid se začleňuje do chromozomální DNA

(a) Plazmid Ti



Funkční elementy Ti plazmidu:

- **oblast T**, která se integruje do chromozomu rostlinné buňky
- **oblast vir**, která nese geny, jejichž produkty napomáhají přenosu T oblasti
- značná velikost plazmidu (cca 200 kb)

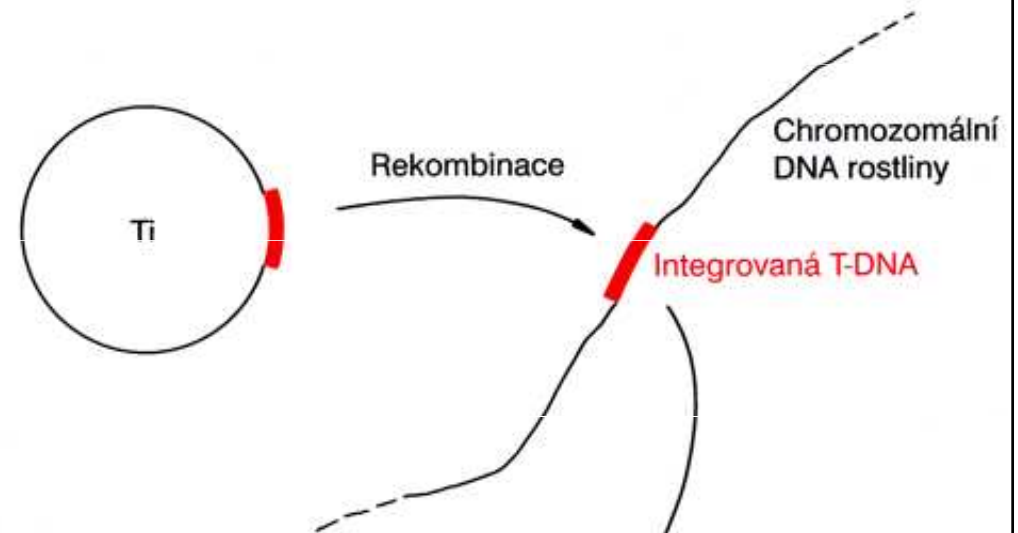
Pokud se do T-DNA začlení žádaná nukleotidová sekvence, dojde k jejímu přenosu do rostlinných buněk

Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens*

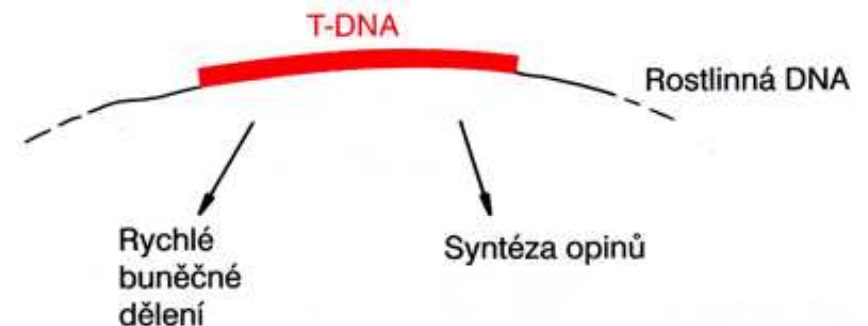
T-DNA obsahuje cca 8 genů, které se v hostitelské buňce exprimují a jsou zodpovědné za:

- její nadměrnou proliferaci
- syntézu opinů, které bakterie potřebují pro svou výživu

(b) Integrace T-DNA do rostlinného genomu



(c) Expres T-DNA genů



Využití Ti plazmidu k přenosu genů do rostlin

Problém:

Ti plazmid o velikosti 200 kb nemá vhodná unikátní restrikční místa

Řešení:

1. strategie binárního vektoru
2. strategie kointegrace

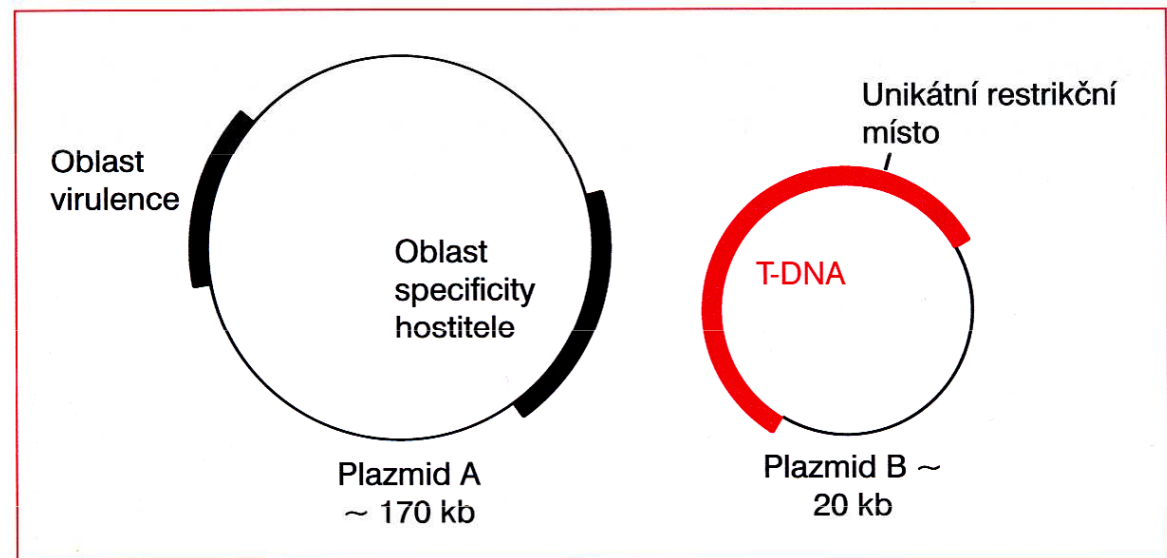
Využití Ti plazmidu k přenosu genů do rostlin

1. strategie binárního vektoru

- T-DNA nemusí být fyzicky spojena se zbytkem plazmidu
- buňky transformovat dvěma plazmidy:
 - „malým“ plazmidem nesoucím T-DNA (obsahuje unikátní klonovací místo)
 - „velkým“ plazmidem obsahujícím běžné sekvence Ti plazmidu s výjimkou T-DNA

Pokud jsou oba plazmidy v jedné buňce *A. tumefaciens*, tak se doplňují:

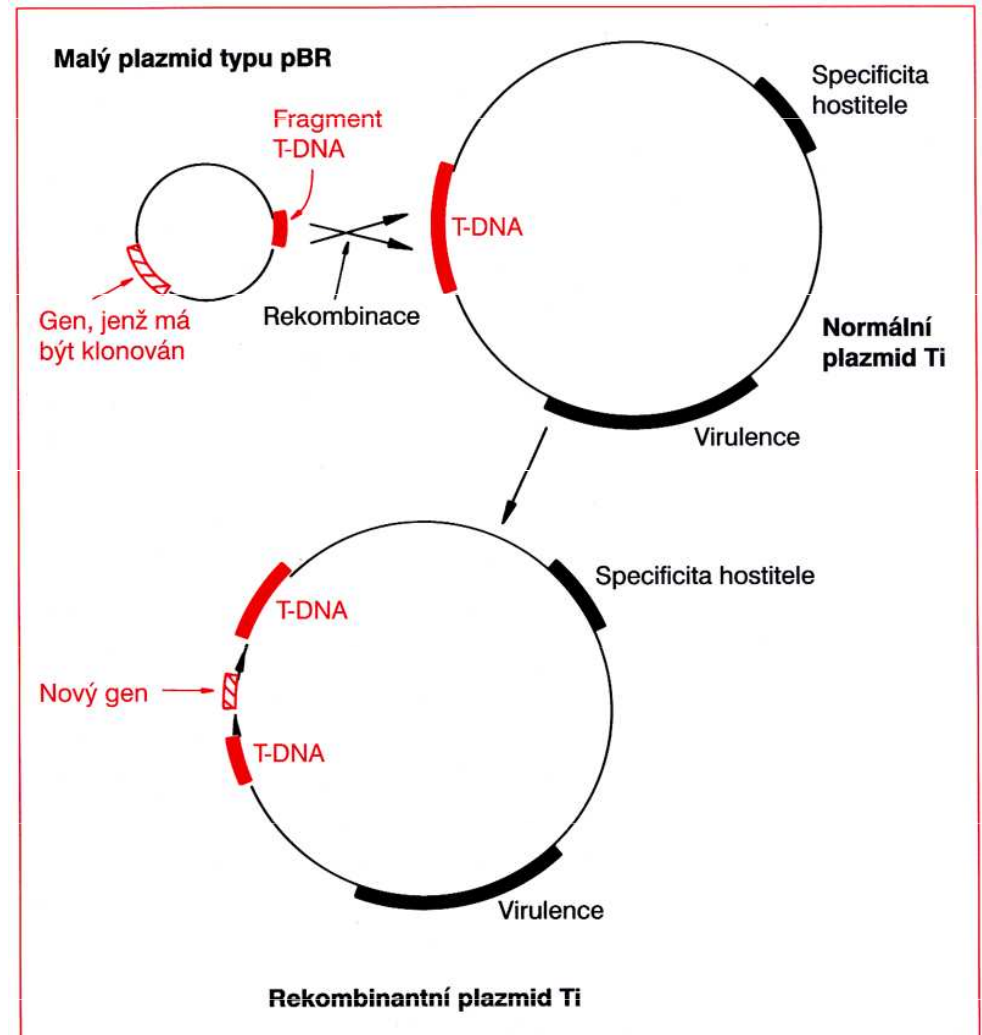
- T-DNA nesená malým plazmidem se přenesse do rostlinné chromozomální DNA pomocí proteinů, které kóduje velký plazmid



Využití Ti plazmidu k přenosu genů do rostlin

2. strategie kointegrace

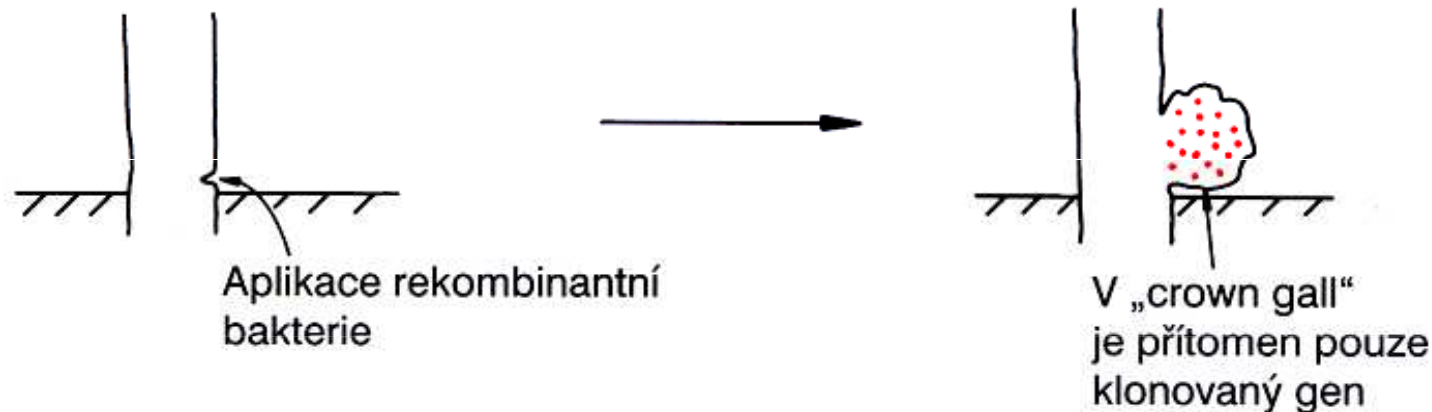
- klonovaný gen se vloží do běžného plazmidu s klonovanou krátkou sekvencí T-DNA
- tento plazmid se přenesse do *A. tumefaciens* nesoucí Ti plazmid
- klonovaný gen se do Ti plazmidu přenesse homologní rekombinací
- při infekci se přirozeně integruje do rostlinného chromozomu



Ne všechny rostlinné buňky přijmou exogen

přirozeným průnikem *A. tumefaciens* s Ti plazmidem do rostliny (např. infekce poraněného stonku) se klonovaný gen objeví pouze v buňkách „závalu“

(a) Infekce poraněného místa rekombinantní *A. tumefaciens*

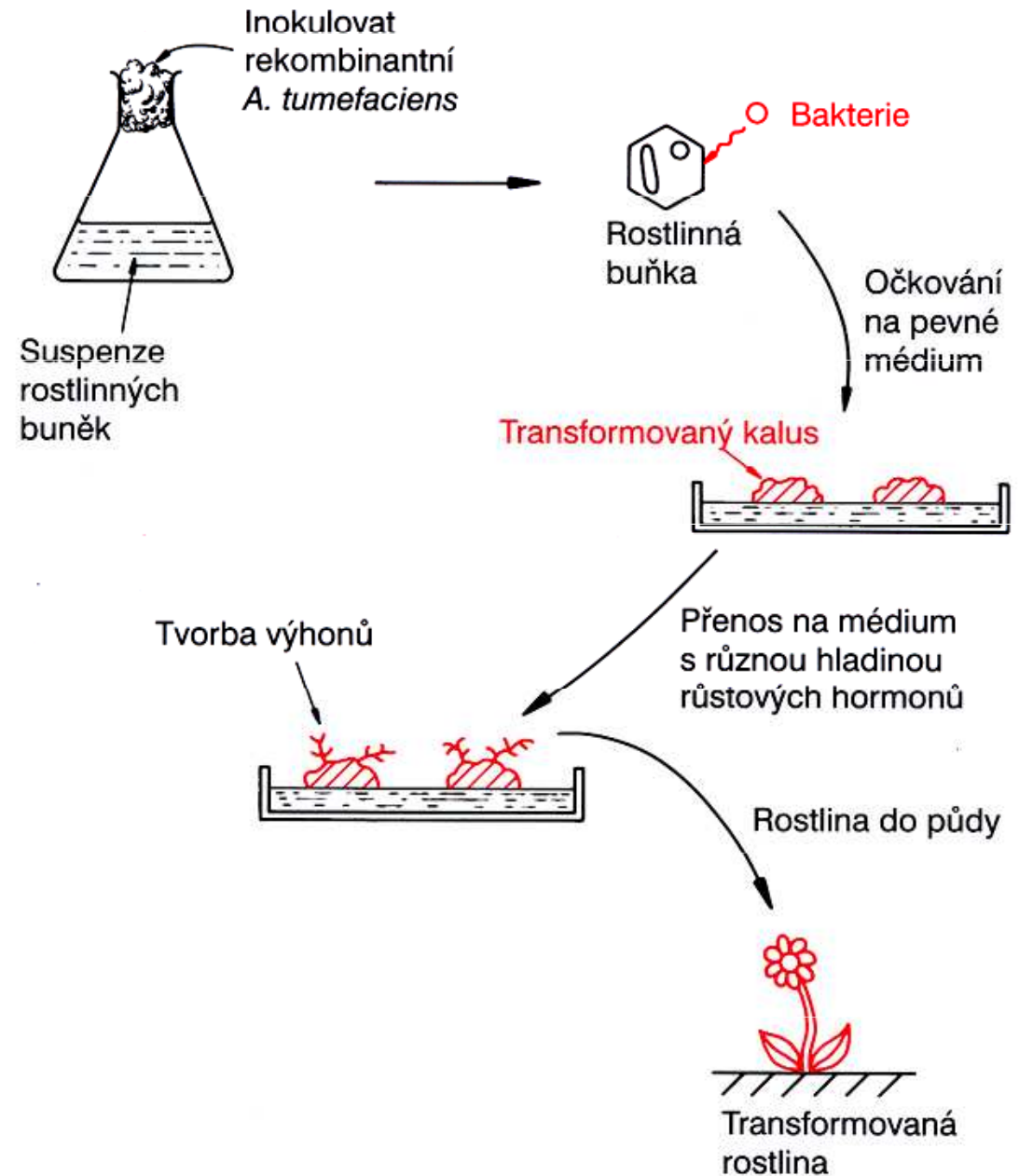


- malý praktický význam z hlediska biotechnologií
- jsou potřeba metody, kterými se gen dostane do všech buněk organismu

Regenerace rostlin z transformovaných buněk

- infekce rostlinných buněk v kultuře
- selekce transformantů
- regenerace rostliny z transformovaných buněk
- všechny buňky rostliny ponesou klonovaný gen

(b) Transformace kultivovaných buněk



Podmínka regenerace: úprava Ti plazmidu

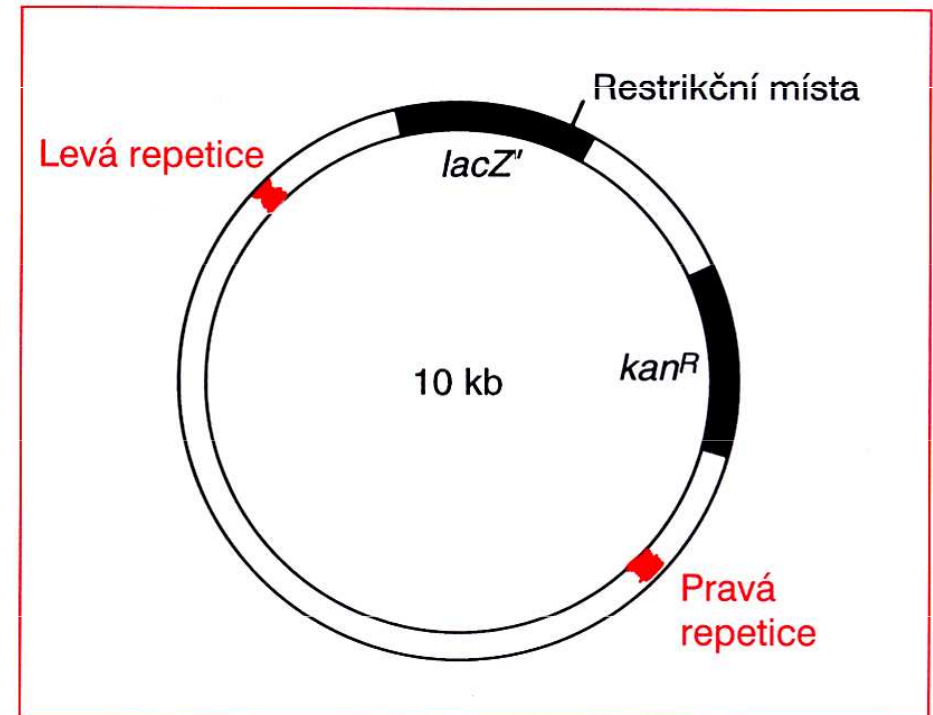
- musí ztratit svůj „nádorotvorný“ potenciál
- odstraněním nádorových genů z T-DNA se nenaruší infekčnost
- infekčnost reguluje virulentní oblast Ti plazmidu (mimo T-DNA) a 2 opakující se sekvence (25 bp) vymezující T-DNA
- oblast mezi opakujícími se sekvencemi může být změněna, aniž by došlo k ohrožení jejího přenosu do rostliny

Plazmid pBIN19 mezi repeticemi obsahuje:

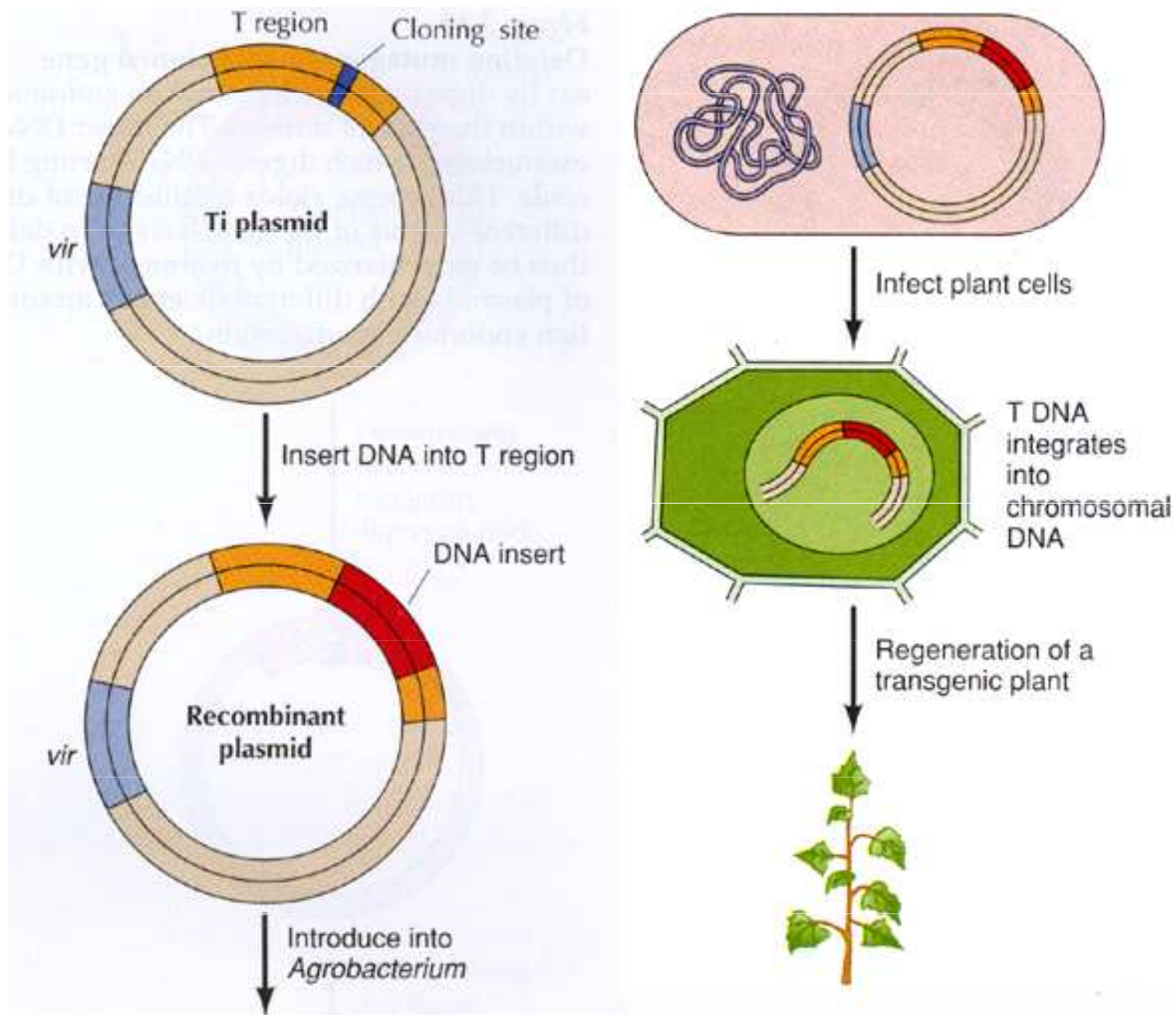
- klonovací místa v genu *lacZ'*
- gen pro rezistenci ke kanamycinu

Je to binární vektor: počáteční manipulace v *E.coli*, následuje přenos do *A. tumefaciens* a pak do rostliny

selektce transformovaných rostlinných buněk na médiu s kanamycinem

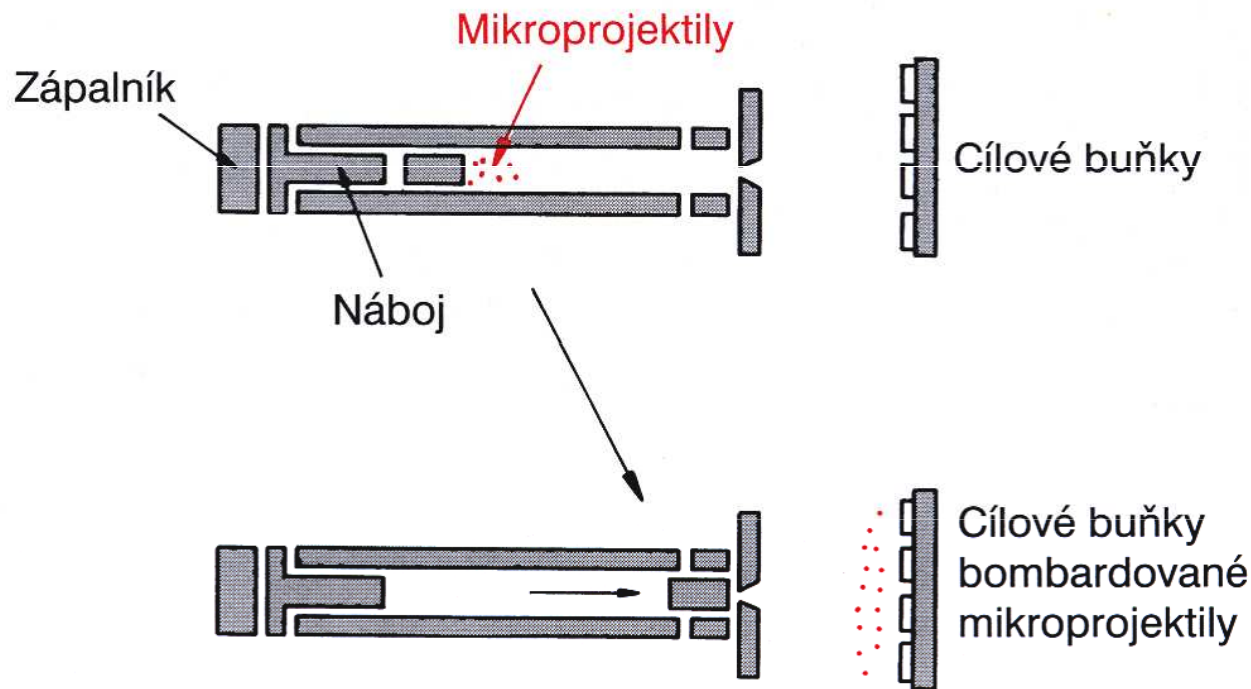


Přenos genů do rostlin



Přímý přenos genů do rostlin (biolistika)

- buňky rostlinného embrya jsou bombardovány vysokorychlostními mikroprojektily ze zlata nebo wolframu, které jsou pokryté DNA



Vektory pro živočichy

- potřebné pro biotechnologie: produkce žádaných proteinů živočišnými buňkami, pokud nelze využít bakterií

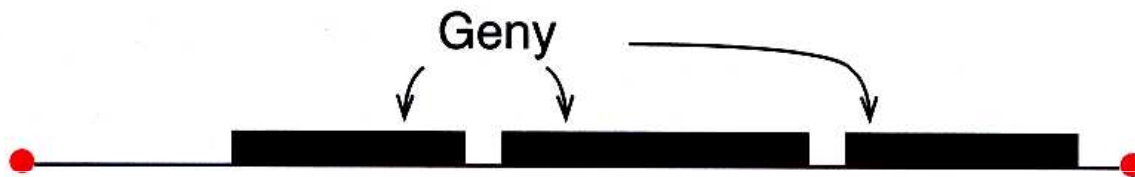
Vektory pro hmyz

- vývoj hmyzích vektorů souvisí s atraktivností modelového systému octomilky (*Drosophila melanogaster*)
- problém: u drozofily nejsou známy žádné plazmidy
- vektory proto založeny na transpozonu (P element)

Transpozony

- krátké úseky DNA (obvykle kratší než 10 kb), které se v buněčných chromozomech přemísťují z jednoho místa na druhé
- P elementy jsou transpozony octomilky (2,9 kb): tvořeny 3 geny a krajními invertovanými repeticemi

Struktura P elementu

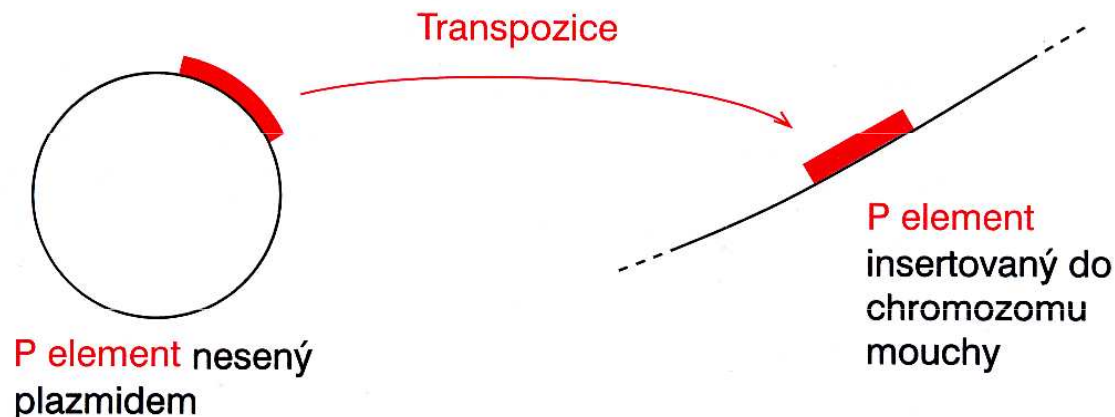


● Koncová převrácená repetice

P elementy

- 1 gen kóduje transponázu
- invertované repetice představují rozpoznávací sekvence, které transponáze umožňují identifikovat konce transpozonu
- mohou se pohybovat i mezi chromozomy a plazmidem

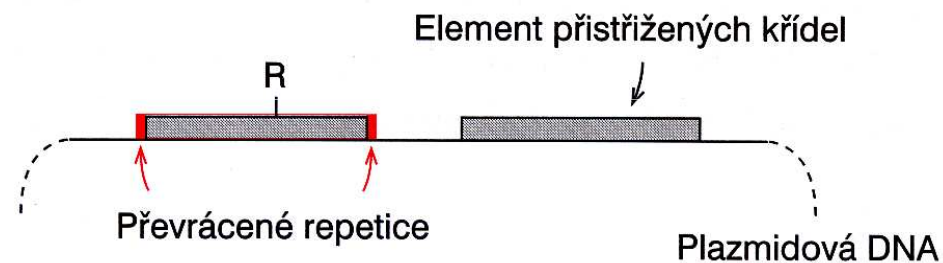
Transpozice P elementu



Vektory založené na P elementech

- plazmidy nesoucí 2 modifikované P elementy, z nichž jeden obsahuje inzerční místo pro klonovanou DNA v genu kódujícím transponázu a druhý postrádá koncové repetice
- vložením klonované DNA se transponáza inaktivuje, takže tento P element je inaktivní
- druhý P element je rovněž defektní, protože jeho konce nemohou být transponázou rozeznány

Struktura klonovaného vektoru založeného na P elementu



Klonování ve vektorech založených na P elementech

- klonovaný gen integrujeme do příslušného restrikčního místa v jednom z P elementů
- mikroinjekce plazmidu do embryí octomilky
- transponáza druhého z P elementů řídí přenos P elementu s integrovaným genem do některého z chromozomů octomilky
- pokud k tomu dojde v jádru zárodečné linie, vyvine se dospělá moucha obsahující klonovaný gen ve všech svých buňkách

Vektory založené na bakulovirech

- používané k produkci rekombinantních proteinů
- bakuloviry jsou viry, které se běžně vyskytují u hmyzu
- genom bakuloviru obsahuje gen pro polyhedrin, jehož produkt se na konci infekčního cyklu v hmyzích buňkách hromadí ve formě jaderných inkluzních částic
- tento gen lze nahradit genem jiným a dosáhnout tak jeho výrazné exprese v hmyzích buňkách

Vektory pro klonování u savců

využití pro:

- knokautování genu (studium jeho funkce)
- produkci rekombinantních proteinů v kultuře savčích buněk
- genové terapie

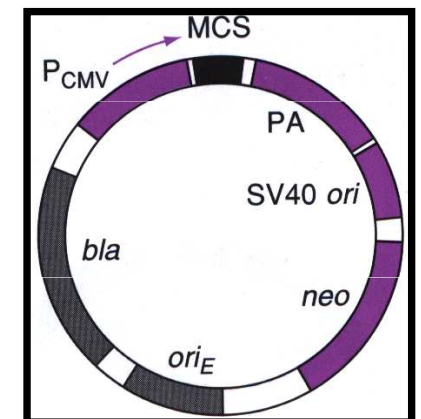
Vektory pro savčí buňky

- replikace extrachromozomálních elementů typu plazmidů je v savčích buňkách obtížná
- vektory s počátkem replikace viru SV40 se replikují epizomálně v některých savčích buňkách (např. v buňkách COS)
- stabilní klony většinou vznikají po začlenění DNA do chromozomu

Vektory pro savčí buňky odvozené z plazmidů

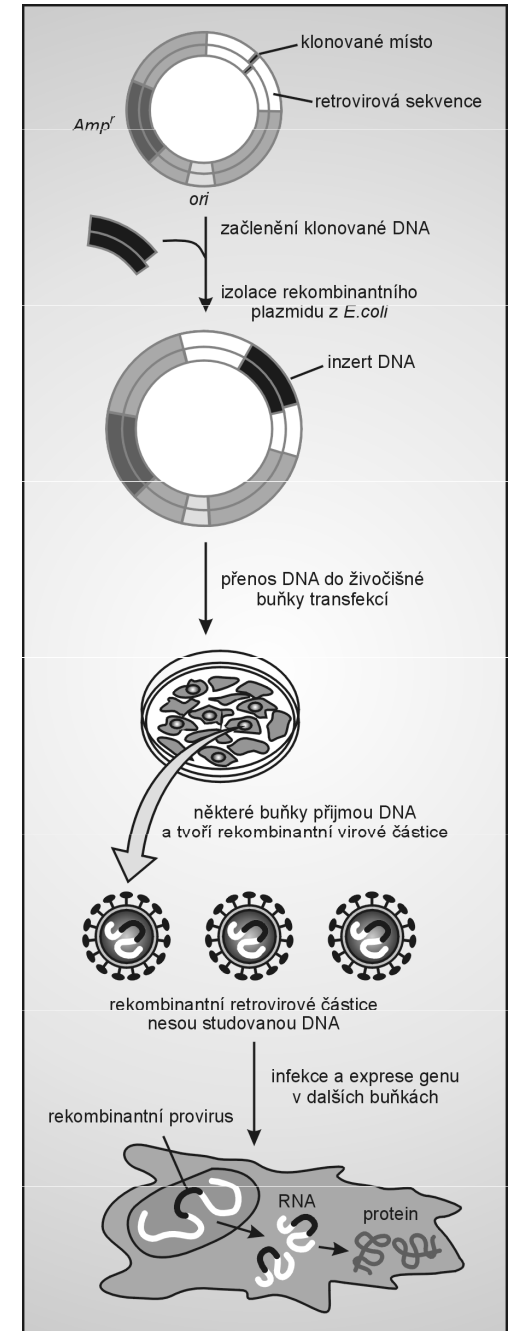
Obsahují signály, které savčí buňka vyžaduje pro zajištění genové exprese:

- obvykle virového původu (SV40, CMV)
- promotor (např. CMV) (vysoká konstitutivní exprese)
- polyadenylační signál (zvýšení stability mRNA)
- počátek replikace *ori* (např. SV40)
- počátek replikace *E. coli*
- bakteriální selekční marker (*bla*)
- selekční marker pro savčí buňky *neo* (rezistence na antibiotikum G418 - geneticin)



Virové vektory

- živočišné buňky pěstované v kultuře jsou transfekovány retrovirovým vektorem obsahujícím žádanou DNA např. metodou precipitace fosforečnanem vápenatým
- v buňkách, které DNA přijaly, se tvoří rekombinantní retrovirové částice, které nesou cizorodou DNA a pučením buňky opouštějí
- tyto rekombinantní virové částice se použijí pro infekci žádaných buněk
- v infikovaných buňkách retroviry zajistí stabilní integraci dané DNA do chromozomu tvorbou provirů



Klonovací vektory pro savčí buňky odvozené z virů

- první klonování savců provedeno s vektorem odvozeným z opičího viru SV40 (1979)
- SV40 infikuje několik savčích druhů
- u některých hostitelů probíhá lytický cyklus, u jiných lyzogenní
- genom (5.2 kb) obsahuje rané a pozdní geny

Vektory odvozené od viru SV40

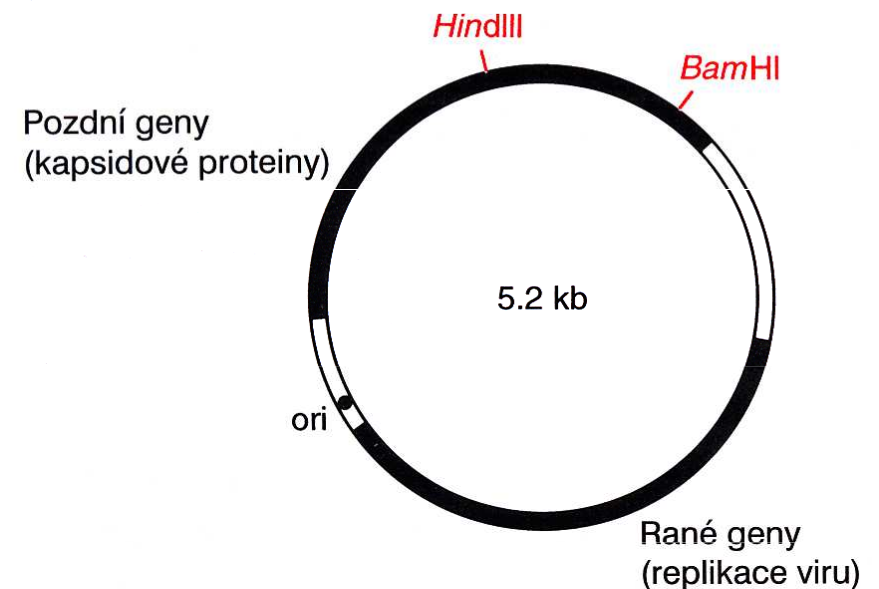
rané geny:

- exprimují se dříve než pozdní
- kódují proteiny účastnící se replikace virové DNA

pozdní geny:

- kódují proteiny virové kapsidy

(a) Genom SV40



Klonování založené na vektorech SV40

stejný problém jako u fága lambda:

- systém sbalování do kapsidy omezuje velikost klonované DNA
- cizí DNA musí nahradit jeden nebo více virových genů

Klonování založené na jiných virových vektorech

Vektory odvozené od adenovirovů a papilomavirů

- klonování DNA až do velikosti 8 kb

Vektory odvozené od adeno-asociovaného viru (AAV)

- AAV není příbuzný adenoviru, ale využívá některé z proteinů syntetizovaných adenovirem, aby mohl dokončit svůj replikační cyklus
- objevuje se ve stejných infikovaných buňkách
- neobvyklá vlastnost: integruje se do stejného místa v 19. chromozomu člověka (velmi perspektivní pro genové terapie)

Retrovirové vektory

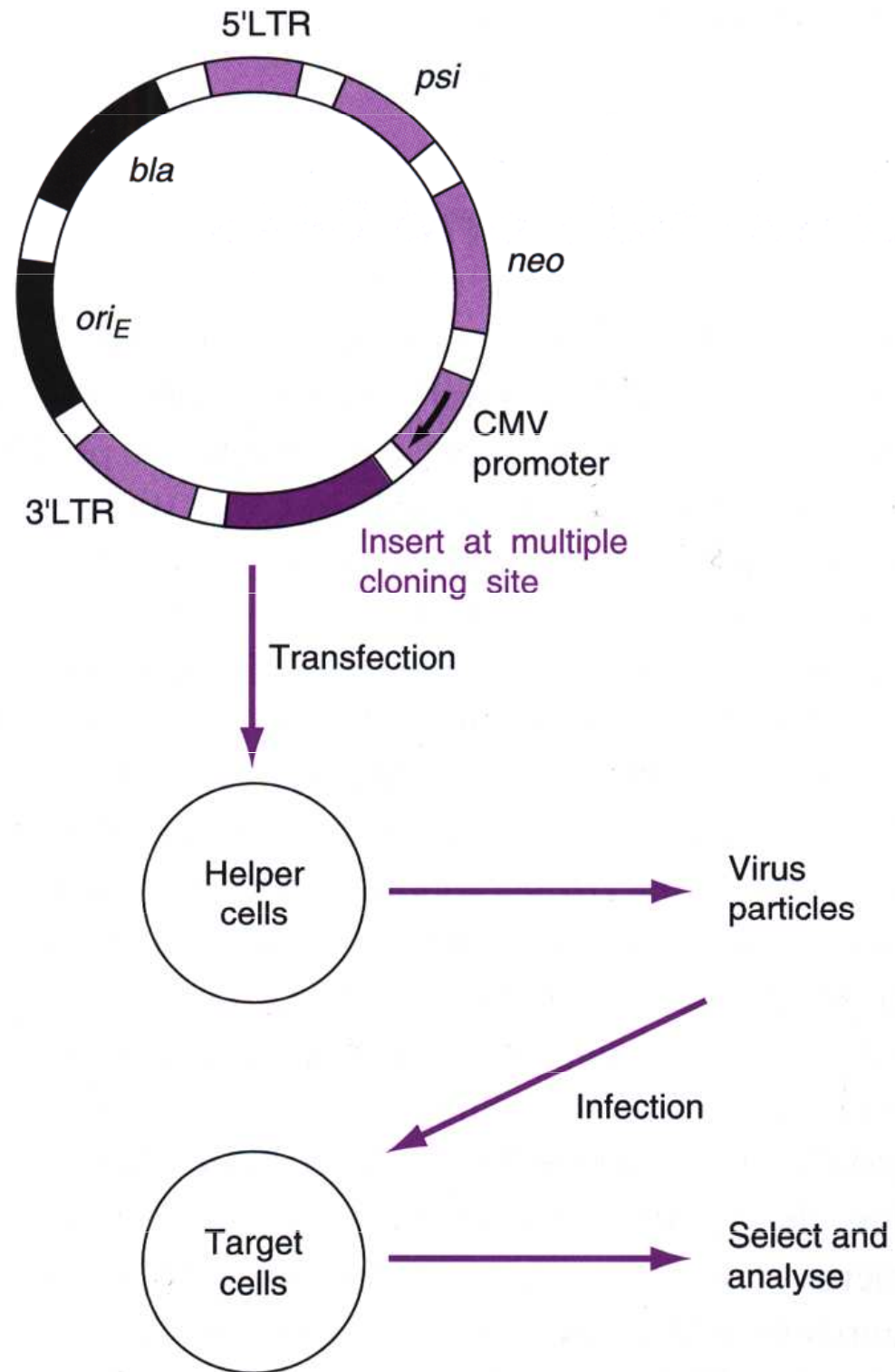
- velmi účinné, protože životní cyklus retrovirů zahrnuje zpětnou transkripci a integraci virové DNA do genomu infikované buňky
- mají charakter plazmidů, do kterých byly klonovány určité retrovirové sekvence
 - studovaná DNA se začlení do virové sekvence daného plazmidu a rekombinantní plazmidová DNA se izoluje z bakterií
- integrace není místně-specifická, ale velmi stabilní
- využití možnosti „trans“ komplementace retrovirových funkcí defektním pomocným („helper“) virem nebo hostitelem
- funkce, které nelze „trans“ komplementovat, musí kódovat samostatný vektor (L-TP a místo psí)

Retroviry

- RNA genom
- v infikované buňce se RNA kopíruje do dvouřetězcové DNA *zpětnou transkripcí*
- zpětná transkriptáza je obsažena ve virionu a vstupuje do buňky zároveň s RNA
- DNA se cirkularizuje a integruje do DNA hostitelské buňky působením *integrázy*
- integrovaná DNA je ohraničena sekvencemi LTR
- LTR obsahuje promotor pro transkripci genů *gag, pol, env*
- transkripty se sbalují do virových částic pomocí domény *psi*
- sestavené částice pučí ven z buňky, aniž ji lyzují a získávají tak glykoproteiny z hostitelské buněčné membrány

Klonování do retrovirových vektorů

- využití možnosti propagace v *E. coli* - vytvoření rekombinantní verze plazmidu a její namnožení v bakteriích
- transfekce speciální buněčné linie („*helper cells*“), která ve svém genomu obsahuje geny *gag*, *pol* a *env*
- transfekované buňky budou tvořit viriony obsahující RNA kopii vytvořeného konstruktů
- virové částice mohou infikovat jiné buňky, které neobsahují integrované esenciální geny
- přítomnost zpětné transkriptázy a integrázy ve virionech zajistí konverzi RNA do DNA a její stabilní integraci do genomu
- další viriony se nevytvoří



Klonování genu bez vektoru

- nejefektivnějším přenosem do savčích buněk je mikroinjekce
- plazmidová nebo lineární DNA mikroinjikovaná do jádra savčích buněk se začleňuje do chromozomu
- mikroinjekce do oplodněné vaječné buňky se uplatňuje při tvorbě knokautované myši (krátká kultivace *in vitro*, implantace do náhradní matky)
- mikroinjekce embryonálních kmenových buněk (mikroinjekce, vložení zpět do embrya, implantace do náhradní matky) vede k tvorbě chimérických myší (směs upravených a neupravených buněk)

Přenosy genů do zárodečných myších buněk mikroinjekcí

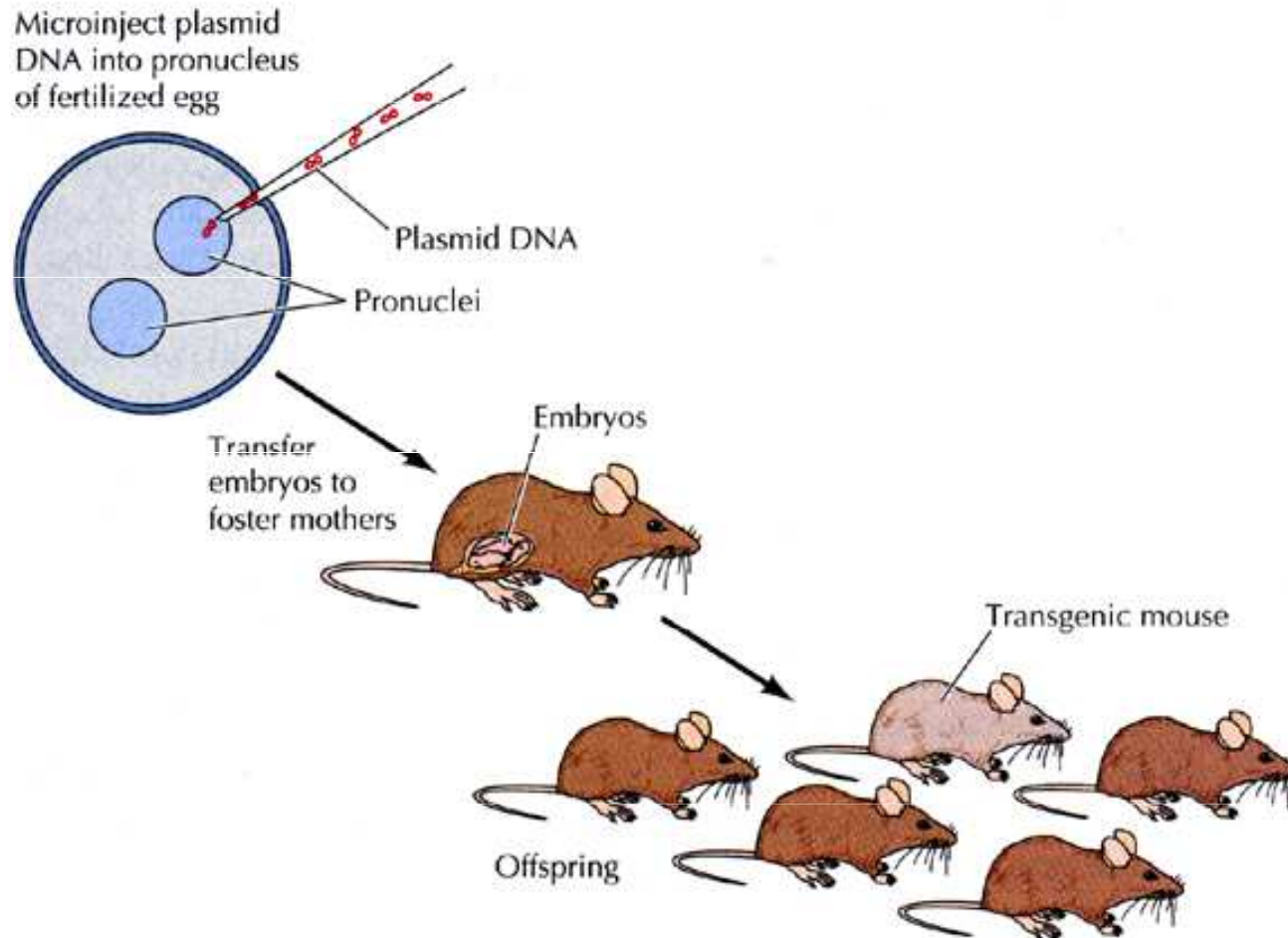
Význam:

- umožňují studium funkce genů v kontextu intaktního organismu
- myši, které tímto způsobem získaly cizí geny se nazývají transgenní myši

Princip:

- DNA se mikroinjekcí vpraví do prvojádra oplozeného myšního vajíčka
- po mikroinjekci se vajíčka přenesou do pseudobřezí myši, kde se dále vyvíjejí
- u přibližně 10% potomstva bude cizorodá DNA integrována do genomu všech buněk
- protože cizorodá DNA se v potomstvu vyskytuje v somatických i zárodečných buňkách, přenáší se křížením do dalšího potomstva stejně, jako kterýkoliv jiný gen

Vytvoření transgenní myši



Přenosy genů do myši prostřednictvím embryonálních kmenových (ES) buněk

ES buňky jsou uměle kultivované buňky odvozené z raných myších embryí, tzv. blastocyst, které mohou být kultivovány *in vitro* a později raným embryím opět předány a podílet se tak na vývoji všech tkání.

Princip:

- přenos DNA do ES buněk v kultuře
- selekce stabilně transfekovaných buněk
- přenos transfekovaných buněk do blastocysty mikroinjekcí
- přenos blastocysty do pseudobřezí myši

Přenosy genů do myši prostřednictvím embryonálních kmenových (ES) buněk

Výsledek:

některá z mlád'at budou obsahovat jednak buňky odvozené z transfekovaných ES buněk a jednak normálních buněk.

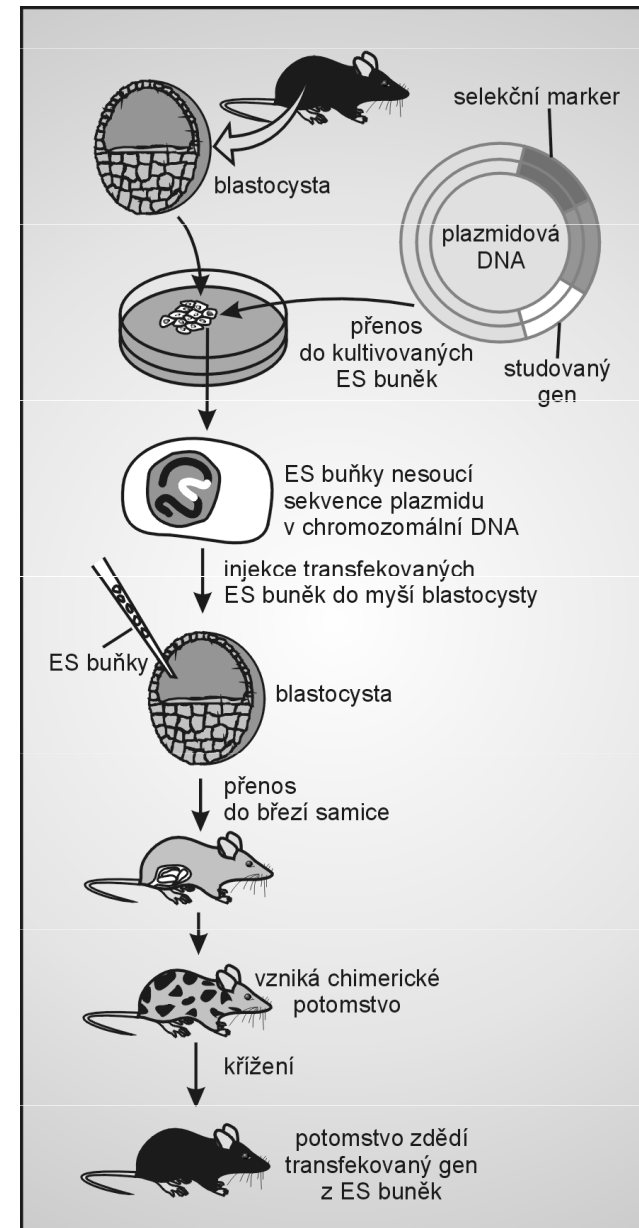
Myši představující směs dvou různých buněčných typů - **chimérické myši**.

U některých mlád'at mohou být buňky odvozené z transfekovaných ES buněk v zárodečné linii:

- jejich křížením se transfekovaný gen bude přenášet na potomstvo jako stabilní znak

(transgenní myši).

- pokud byl normální gen pozměněn ve smyslu úplné ztráty funkce, označují se tyto myši jako **knockout - myši**.



Souhrn technik používaných při genetických manipulacích s myšimi ES buňkami

