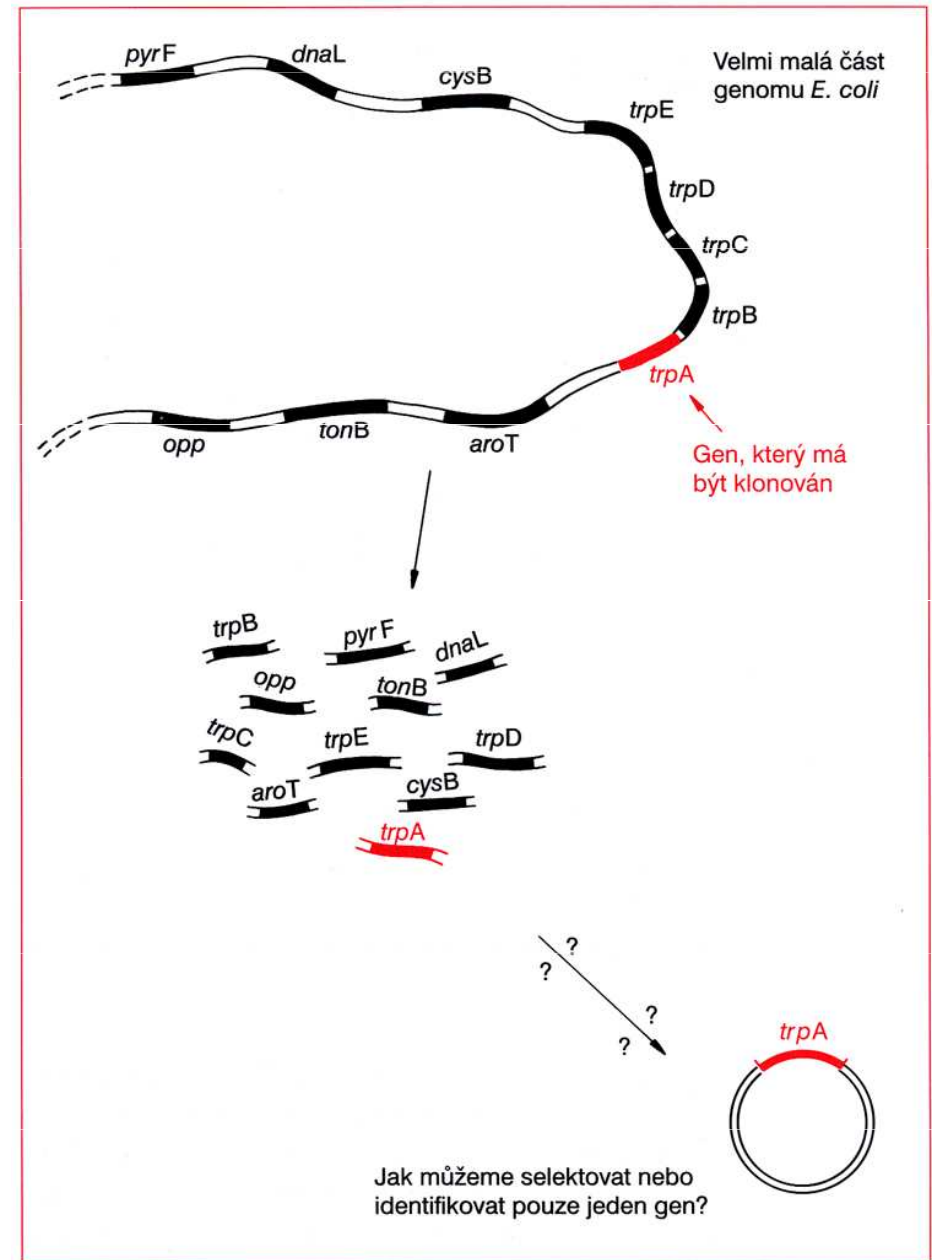


Získání klonovaných genů

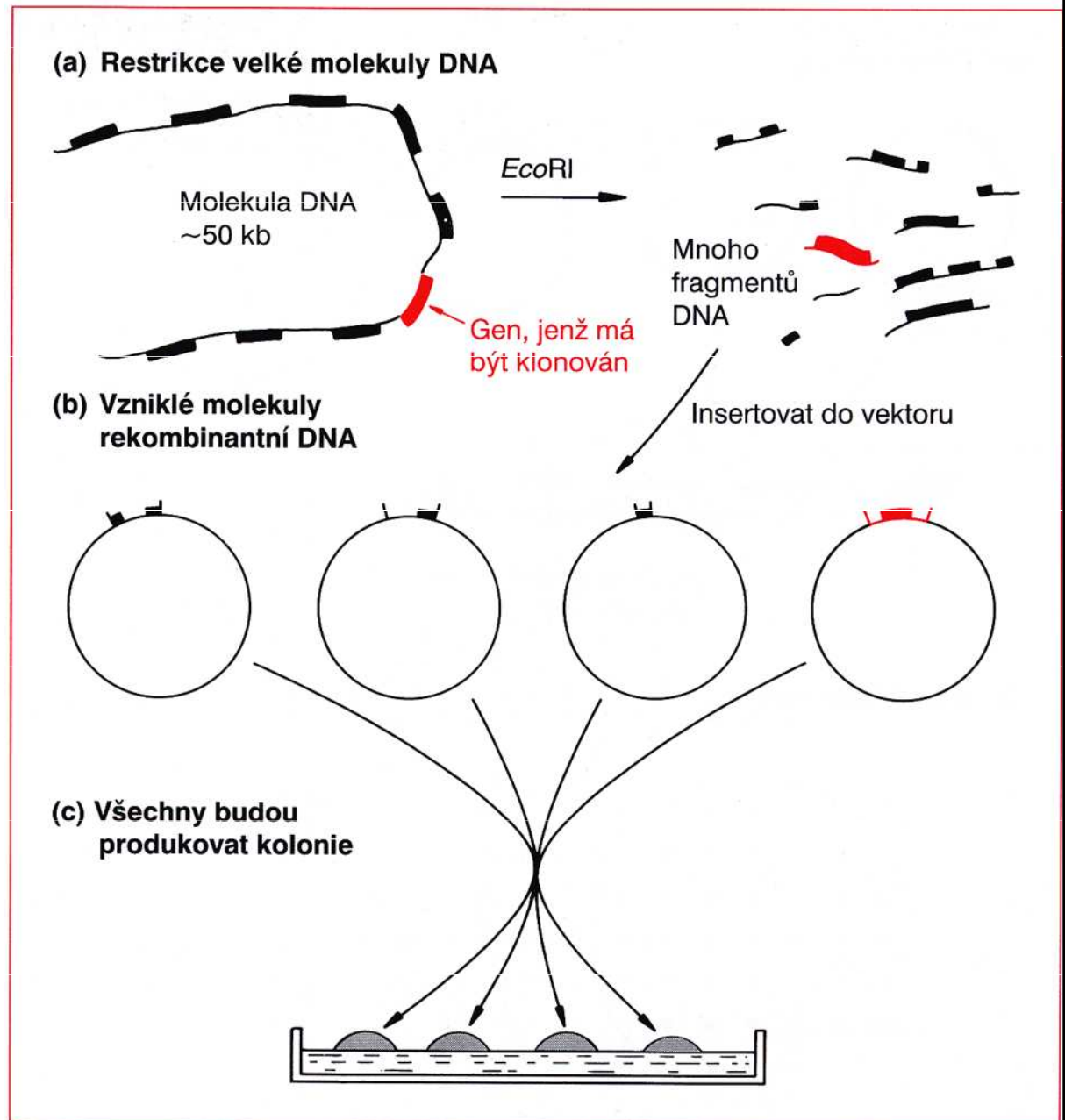
Problém:

genom organismů je komplexní
a je proto obtížné v něm najít
a klonovat specifický gen



Získání klonovaných genů

Po restričním štěpení genomové DNA i jednoduchých organismů, začlenění fragmentů DNA do vektoru a transformaci dostaneme mnoho klonů, mezi kterými je třeba identifikovat ten správný

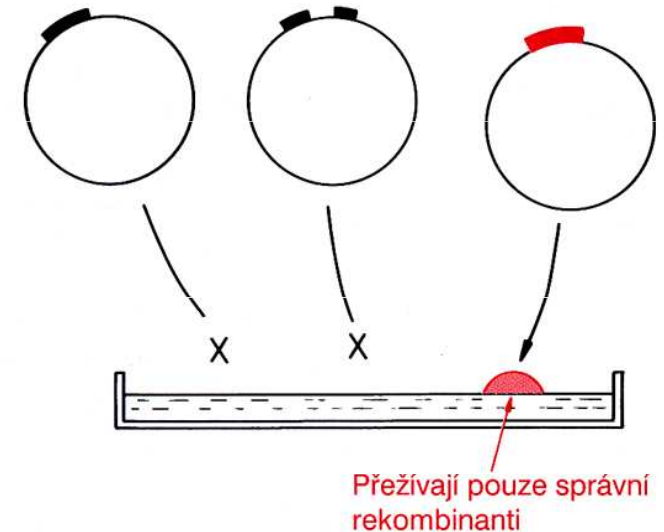


Získání klonovaných genů

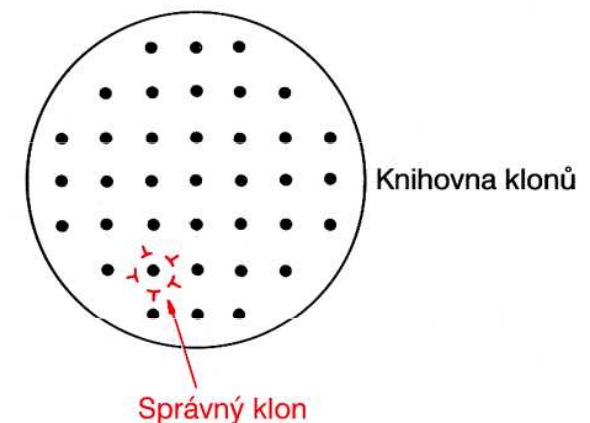
Jsou popsány 2 selekční přístupy:

- přímá selekce požadovaného genu
- identifikace klonu pomocí genové knihovny

(a) Přímá selekce

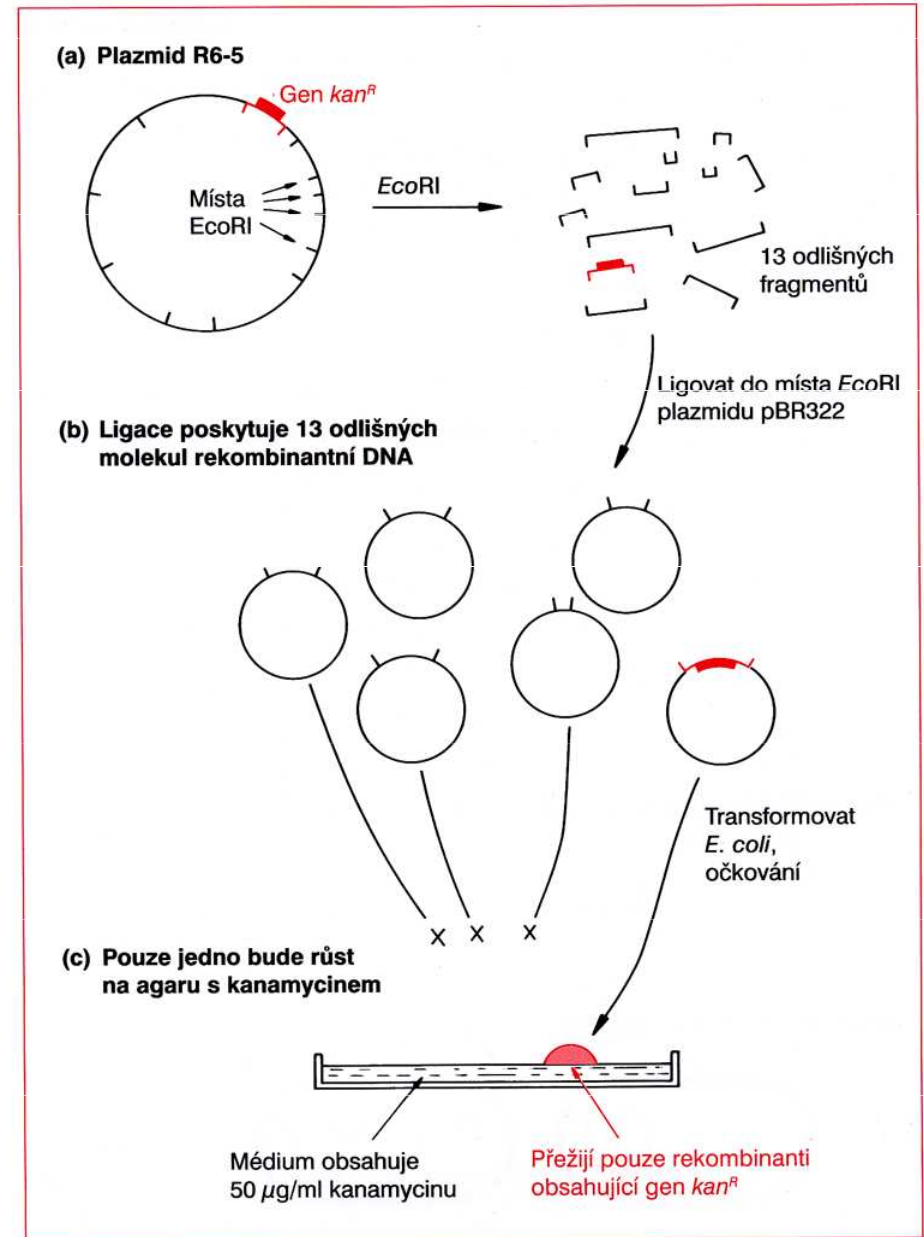


(b) Identifikace klonu



Přímá selekce

Požadovaný gen přímo zajišťuje transformovaným buňkám vlastnost, kterou lze pro selekci využít (např. zajišťuje rezistenci k antibiotiku)



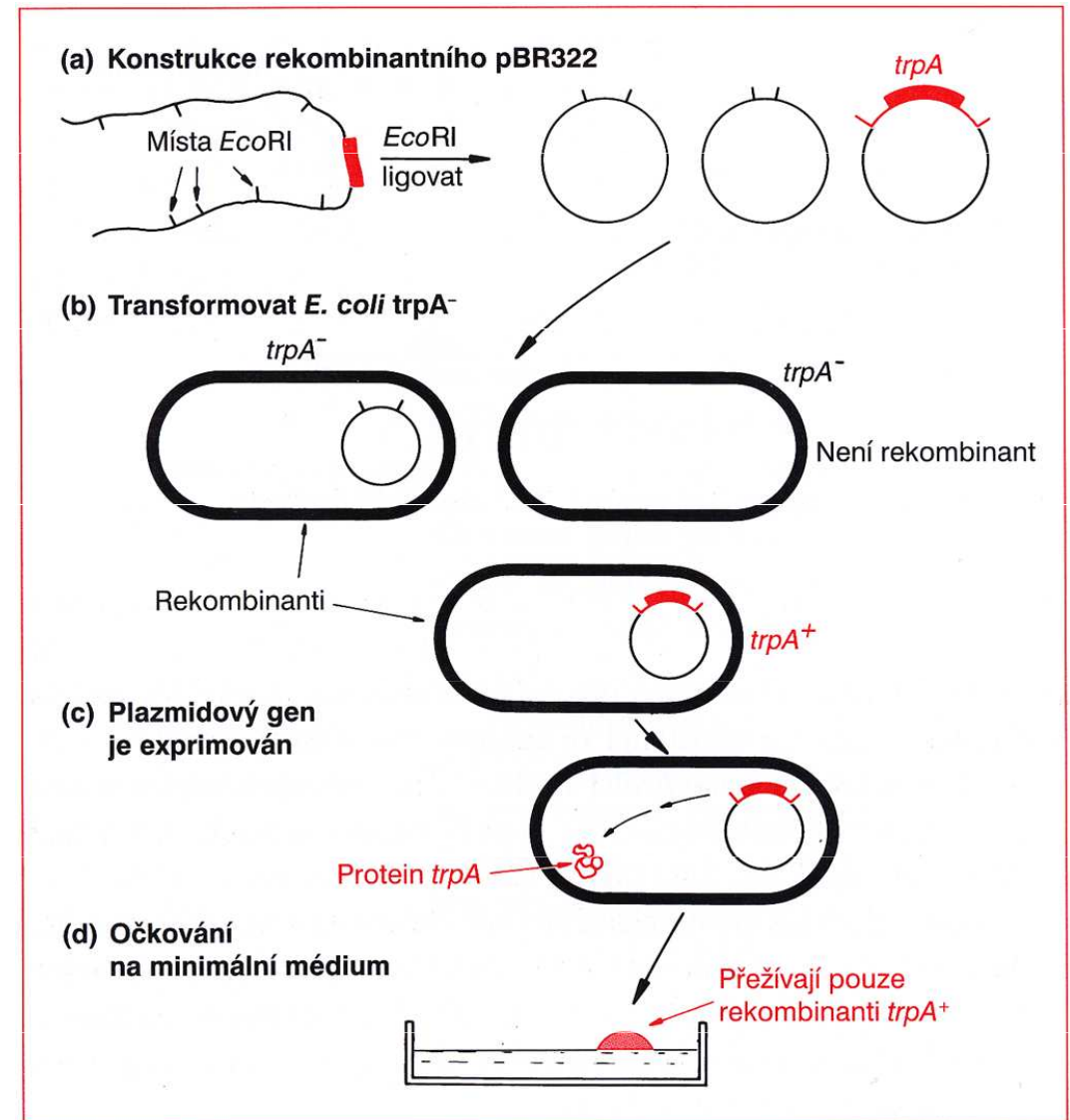
Přímá selekce - „marker rescue“

Princip:

- hostitelský bakteriální kmen nese mutaci pro některý z esenciálních znaků (např. auxotrofní mutaci $trpA^-$)
- neroste na půdě bez tryptofanu
- klon nesoucí standardní $trpA$ bude deficienci v biosyntéze tryptofanu kompenzovat

Nevýhody:

- pro hledaný gen musí existovat mutantní kmen
- musí existovat médium, na kterém přežívá standardní a ne mutantní kmen



Genová knihovna (genová banka)

- soubor náhodně klonovaných fragmentů genomové DNA příslušného organismu
- základ klonovacích strategií
- používá se tehdy, když techniky přímé selekce jsou nepoužitelné: je třeba získat co nejvíce klonů (genovou knihovnu) a prohledáváním (skríninkem) mezi nimi najít ten správný

Klasifikace

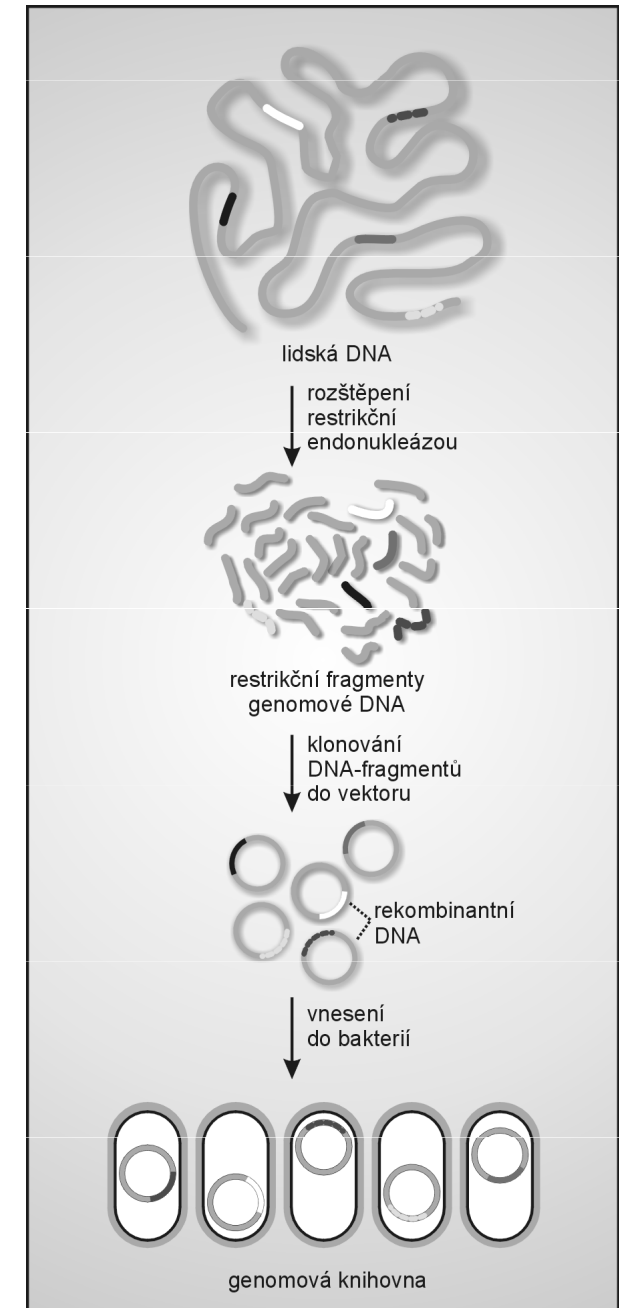
Podle původu DNA:

- **genomová knihovna** - soubor klonů, který zahrnuje všechny geny daného organismu
- **knihovna cDNA** - soubor klonů komplementární DNA (cDNA), které byly připraveny zpětnou transkripcí mRNA a v podobě cDNA tak reprezentují **transkriptom** daného organismu/tkáně/buňky v daném čase
- knihovny cDNA připravené z různých tkání téhož organismu jsou odlišné
- **expresní knihovna** - knihovna cDNA vytvořená expresními vektory
 - klonované sekvence mohou být exprimovány

Genomová knihovna

Příprava:

- izolace celkové buněčné genomové DNA
- fragmentace na části o vhodné velikosti (restrikční endonukleázy)
- klonování fragmentů do vhodného vektoru
- u vektorů Lambda, nebo kosmidů: ligační směs se smísí se sbalovacími extrakty
- u plazmidových vektorů: ligační směs se použije k transformaci bakterií
- knihovna má podobu transformovaných bakterií nebo fágových částic
- identifikace klonu obsahujícího studovaný fragment



Vyhledávání genů v knihovně

Hledání klonů nesoucích studované sekvence.

Obvykle založeno na hybridizacích se sondami DNA třech typů:

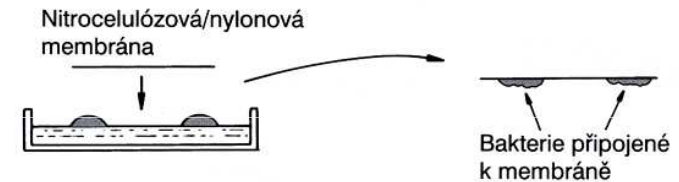
- **cDNA** připravené z mRNA tkáně, ve které dochází k silné expresi daného genu
- sekvence **DNA** genu příbuzného organismu
- synteticky připravené **oligonukleotidy** odvozené ze sekvence aminokyselin proteinu

Je-li znám proteinový produkt a jedná-li se o knihovnu expresní, je možno pro detekci hledaného klonu použít protilátky.

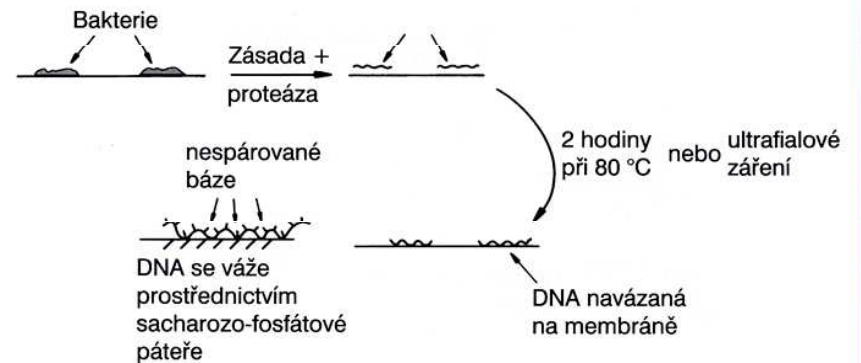
Prohledávání knihovny hybridizací (přístup *in situ*)

- kolonie nebo plaky jsou přeneseny na nitrocelulózovou nebo nylonovou membránu
- louhem je odstraněn kontaminující materiál, současně se denaturuje DNA
- zapečením při 80°C (nitrocelulóza) nebo UV zářením (nylon) se jednovláknové molekuly DNA pevně spojí s membránou svou cukr-fosfátovou kostrou, báze se uvolní pro hybridizaci
- membránu promyjeme v roztoku se značenou sondou za hybridizačních podmínek
- promytí, sušení, autoradiografie nebo chemiluminiscence

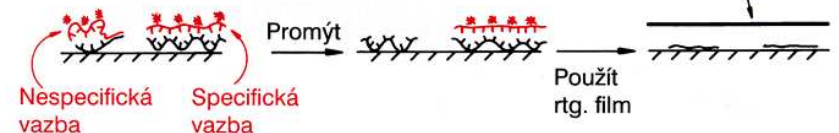
(a) Přenos kolonií na nitrocelulózu nebo nylon



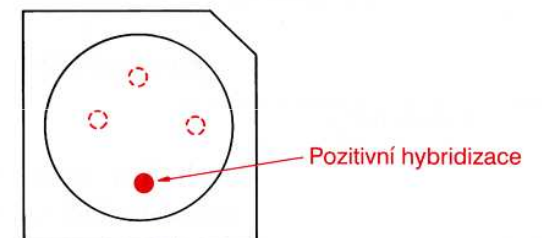
(b) Degradovat buňky, vyčistit DNA



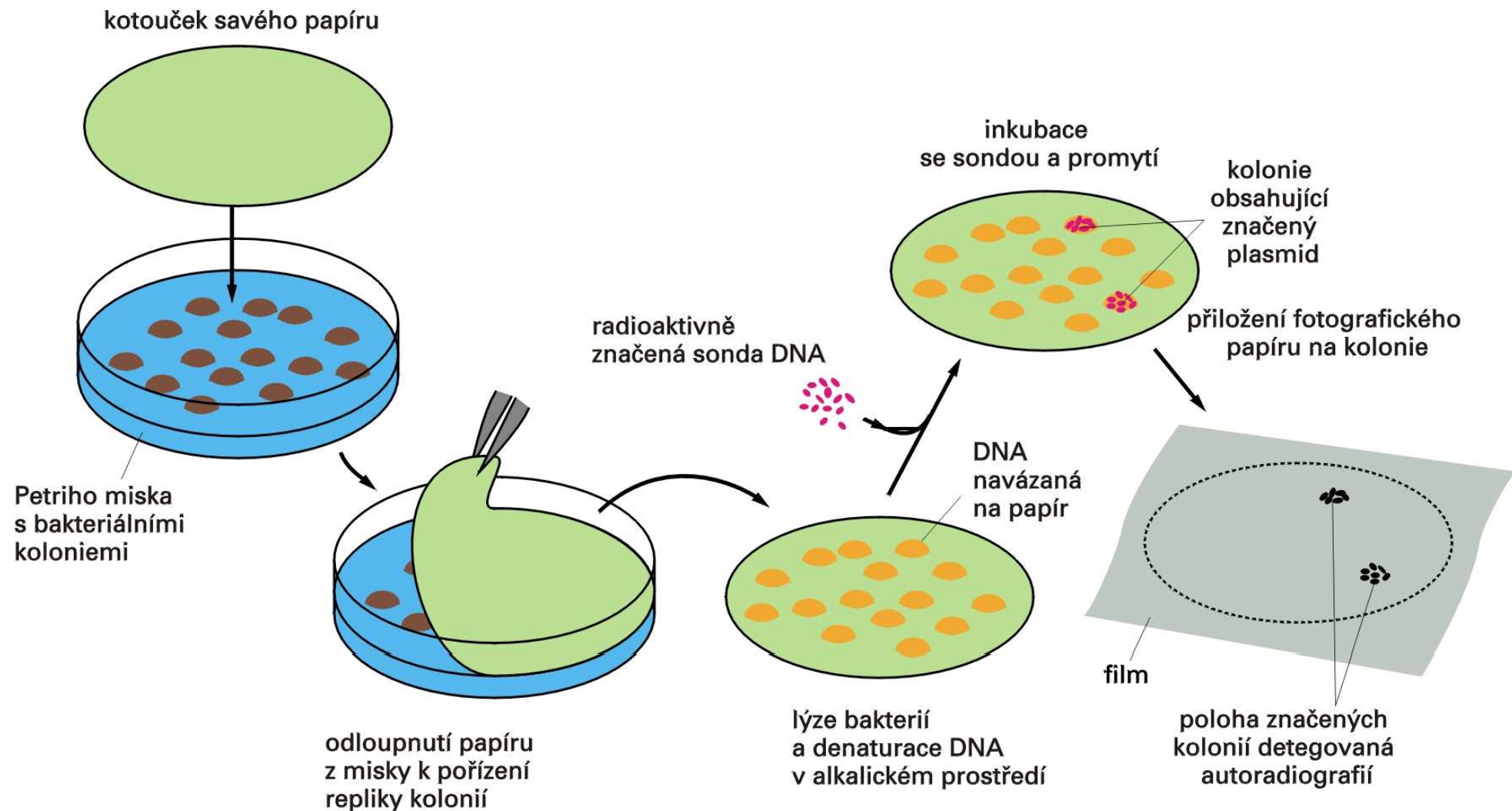
(c) Proba s označenou DNA



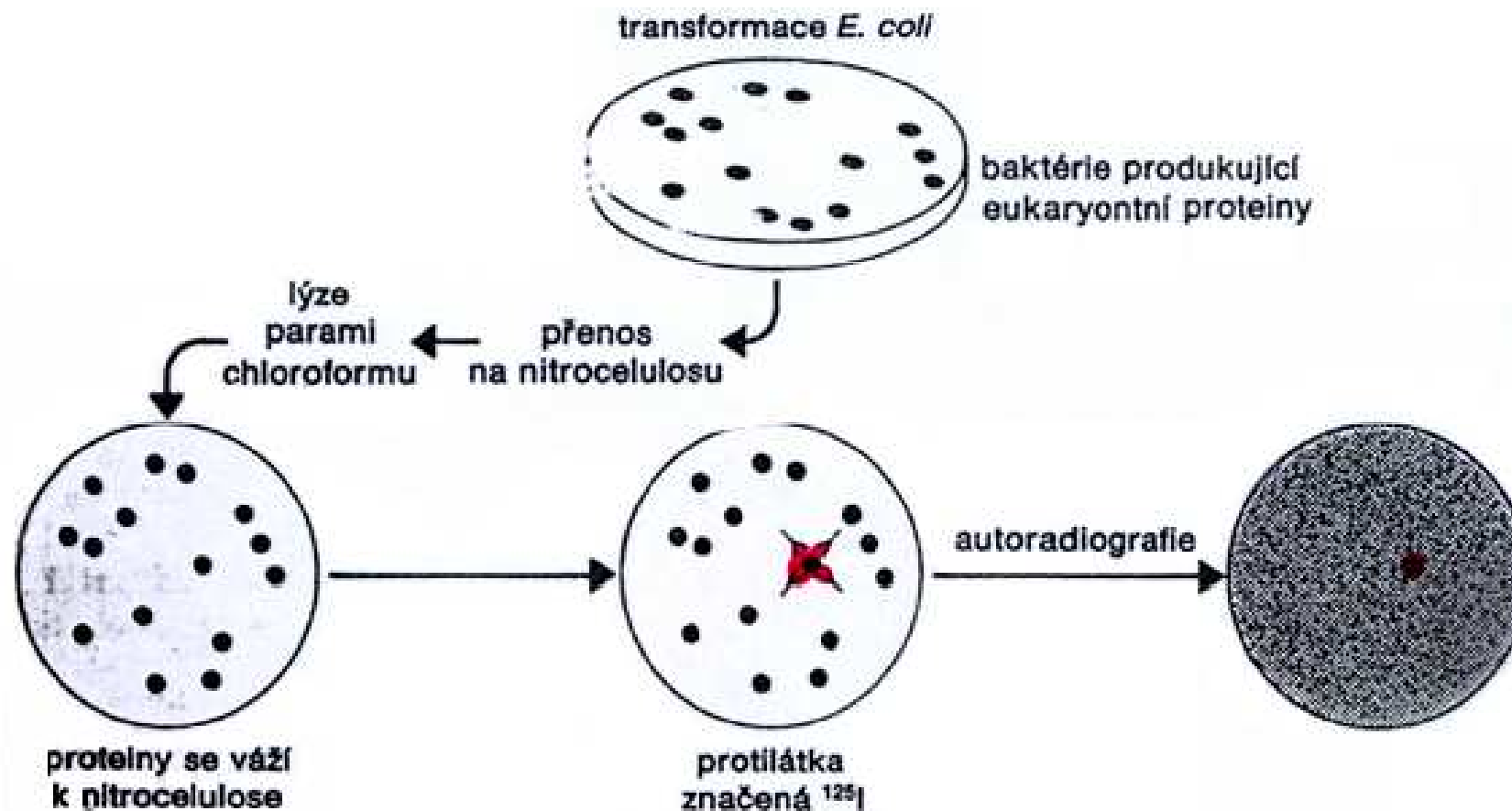
(d) Výsledný autoradiogram



Prohledávání knihovny hybridizací (přístup *in situ*)

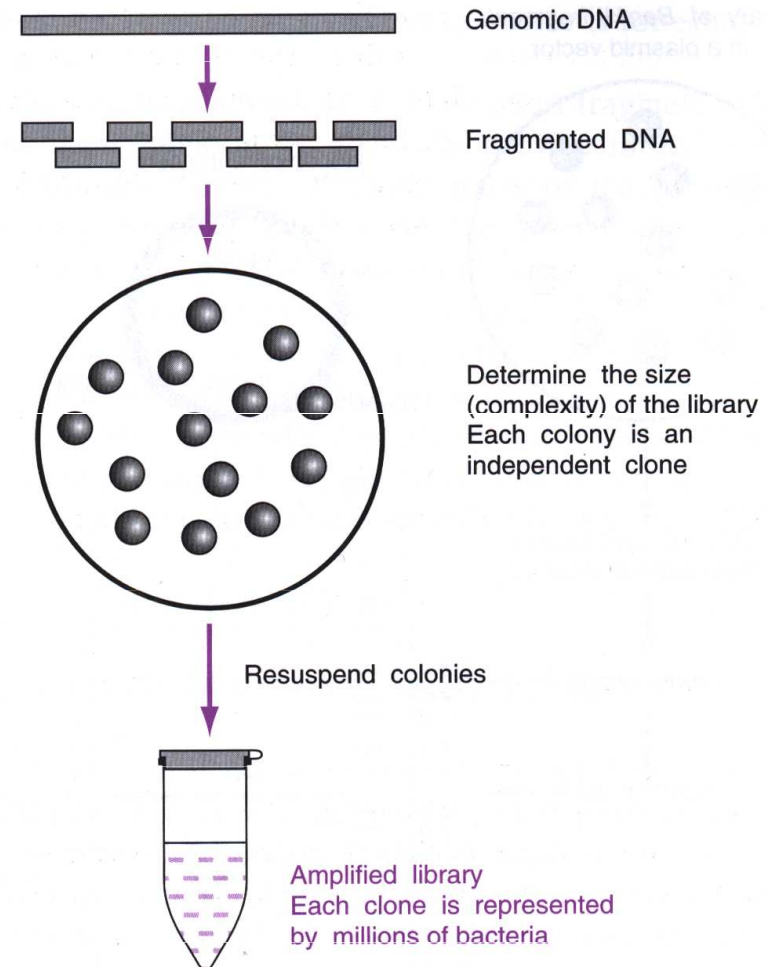


Prohledávání expresní knihovny protilátkou (imunologický screening)



Uchování knihovny

- zamražení bakteriální suspenze vytvořené ze smíchaných kolonií nebo fágového lyzátu vytvořeného ze směsi plaků
- knihovna je smícháním původních jednotlivých transformantů nebo fágových virionů **amplifikována**: každý klon je v amplifikované knihovně zastoupen v mnoha kopiích



Výhody a nevýhody

Knihovna cDNA:

- menší velikost (neobsahuje introny, regulační sekvence, nepřepisované oblasti)
- snadnější prohledávání
- možnost sledování změn genové exprese souvisejících s genetickými chorobami, rakovinou, diferenciací, atd.

Genomová knihovna:

- větší velikost
- umožňuje studium genů v přirozené podobě, včetně intronů a regulačních sekvencí
- nutná pro fyzikální analýzu genomu

Velikost knihovny

- udává minimální počet klonů postačující pro zachycení celého genomu

Závisí na:

- velikosti genomu
- velikosti inzertu, který lze začlenit do daného vektoru (klonovací kapacitě vektoru)

Příklad výpočtu počtu klonů nutných pro vytvoření úplné genové knihovny

Zjednodušeně:

Velikost genomu = 4 Mb (4×10^6 b)

Velikost fragmentů = 4 kb (4×10^3 b)

Počet klonů = 1000

Možné jen za předpokladu, že

- a) všechny klony jsou odlišné
- b) klony se nepřekrývají

Výpočet počtu klonů nutných pro vytvoření úplné genové knihovny

- není možné zajistit, aby daná knihovna obsahovala úplnou genetickou informaci daného genomu se 100% pravděpodobností
- se zvyšujícím se počtem klonů se zmenšuje pravděpodobnost, že další klon přinese novou informaci (redundance)
- matematicky lze stanovit, s jakou pravděpodobností se daný gen v knihovně vyskytuje

Výpočet počtu nezávislých klonů nutných pro vytvoření úplné genové knihovny

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - F)$$

N = počet klonů

P = pravděpodobnost, že knihovna obsahuje žádaný fragment DNA

F = frakce genomu reprezentovaná průměrným klonem (podíl průměrné velikosti inzertu a celkové velikosti genomu)

Odhad velikosti genových knihoven

Organismus	Velikost genomu (b)	Vektor	Velikost inzertu (kb)	P	Velikost knihovny
Bakterie	4×10^6	Plazmid	4 kb	0,99	$4,6 \times 10^3$
		λ subst	18 kb	0,99	$1,0 \times 10^3$
		Kosmid	40 kb	0,99	458
		BAC	300 kb	0,99	59
Savec	3×10^9	Plazmid	4 kb	0,99	$3,5 \times 10^6$
		λ subst	18 kb	0,99	$7,7 \times 10^5$
		Kosmid	40 kb	0,99	$3,5 \times 10^5$
		BAC	300 kb	0,99	$4,6 \times 10^4$

Ověření kvality knihovny

Otázky:

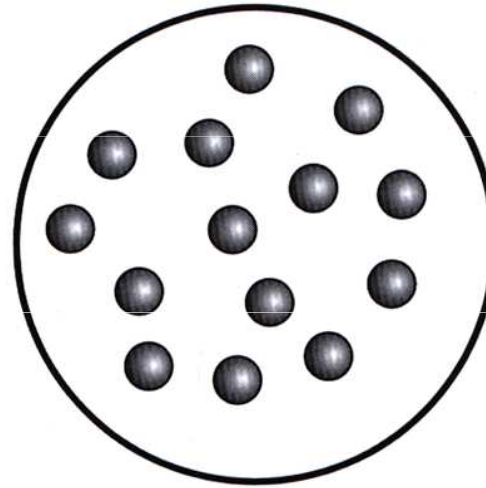
- jaká je proporce klonů, které obsahují inzert?
- jaká je velikost klonovaných inzertů?

Odpovědi:

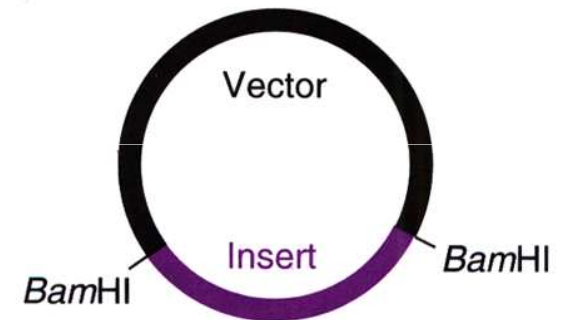
- namnožení jednotlivých klonů, extrakce plazmidové nebo fágové DNA, restriční analýza, gelová elektroforéza
- využití „modro-bílého“ testu

Ověření kvality knihovny

Library of *Bam*HI fragments in a plasmid vector



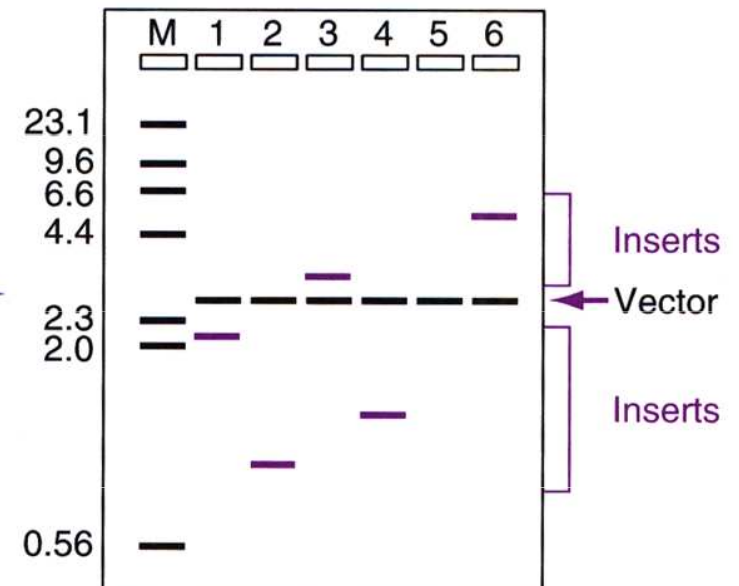
Recombinant plasmid



Plasmid preparation from individual clones

*Bam*HI digest

Agarose gel



Problémy spojené s tvorbou genových knihoven

- nestejná velikost fragmentů: rozdílná pravděpodobnost jejich začlenění do vektoru
- omezená klonovací kapacita vektorů neumožňuje charakterizaci dostatečně dlouhých úseků DNA

Procházení po chromozomu

Cíl:

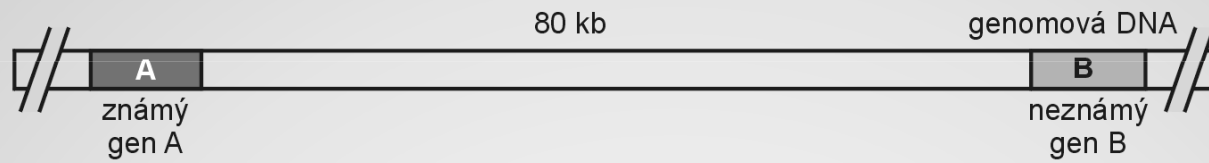
- vyhledání klonů, které nesou překrývající a na sebe navazující inserty
- uspořádáním těchto klonů lze získat informaci o spojitě sekvenci v určité oblasti genomu

Předpoklad:

- z předchozí genetické analýzy je přibližně známa oblast genomu, v níž se hledaný gen nebo sekvence nachází
- jsou k dispozici sekvence okolních oblastí, které slouží jako výchozí body pro procházení

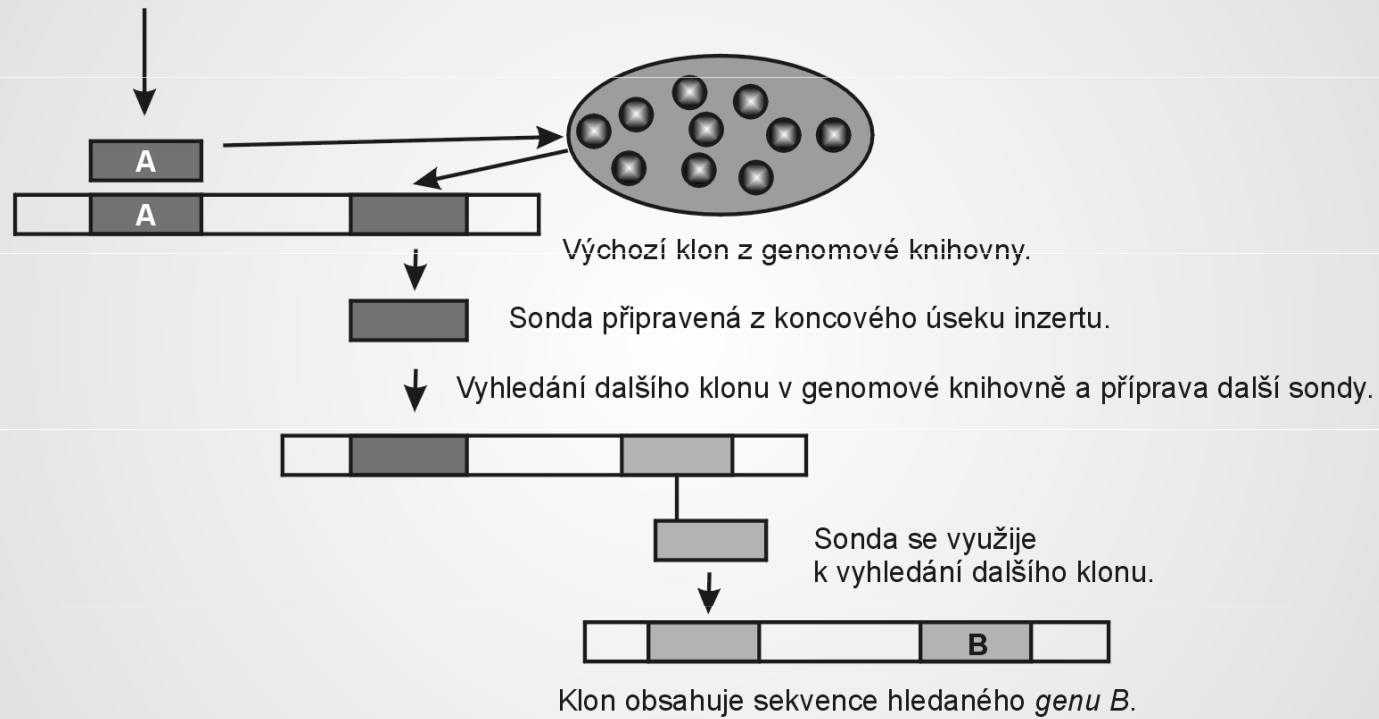
Procházení po chromozomu - postup

- sondou se vyhledá klon nesoucí již dříve charakterizovaný úsek genomu
- z koncových částí inzertu takto nalezeného klonu jsou připraveny sondy, kterými je genová knihovna znovu prohledána, atd.
- opakováním tohoto postupu se získá informace o souvislé sekvenci, která má začátek v charakterizovaném úseku genomu a končí v oblasti vzdálené stovky kilobází

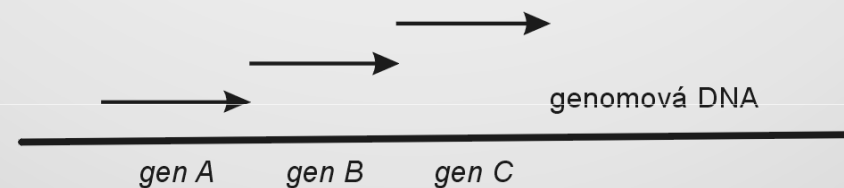


sonda připravená z genu A se použije pro vyhledání prvního klonu

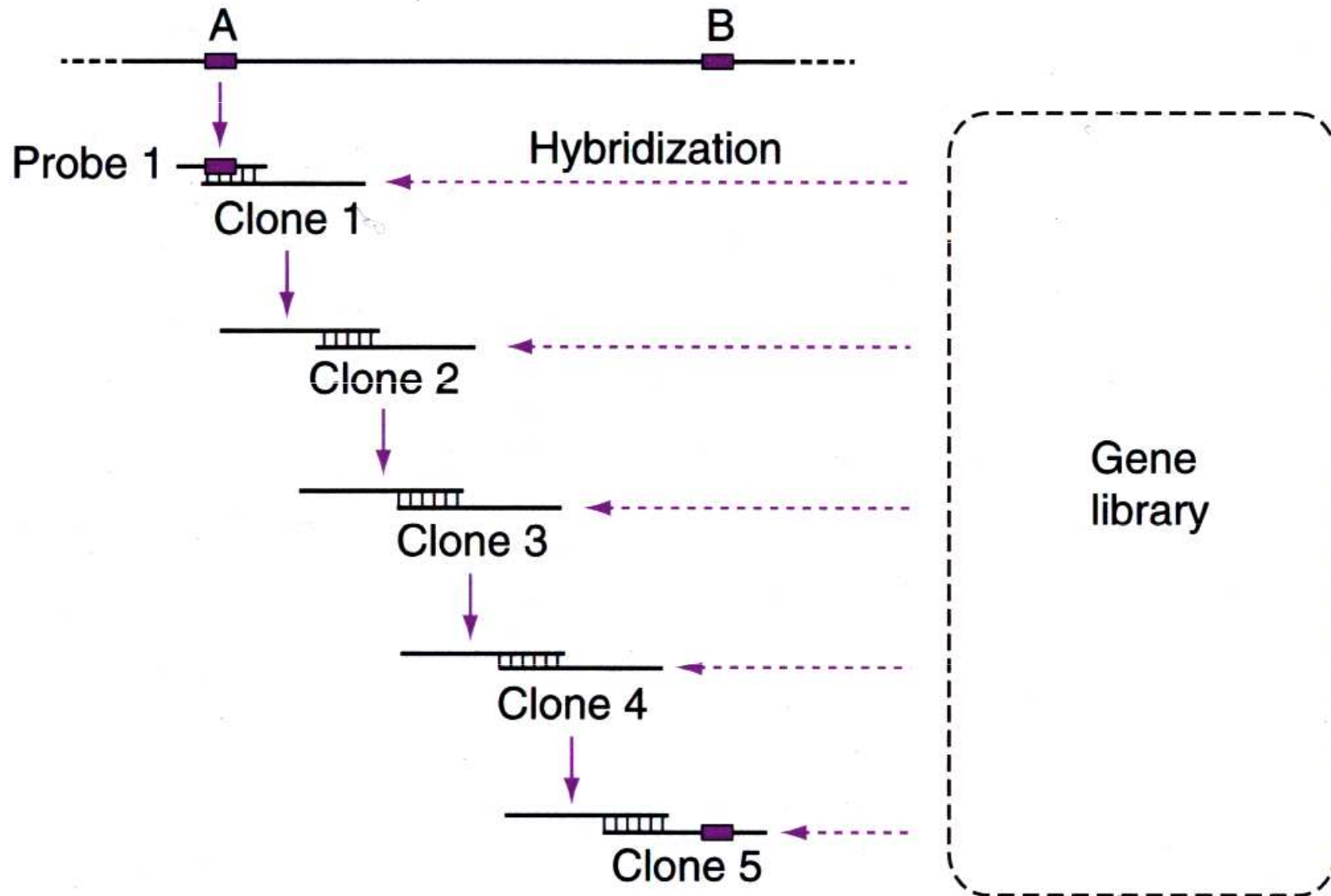
- a) částečné štěpení *EcoRI*
- b) klonování do fágového vektoru lambda,
- c) konstrukce genomové knihovny



Schema pohybu po chromozomu.



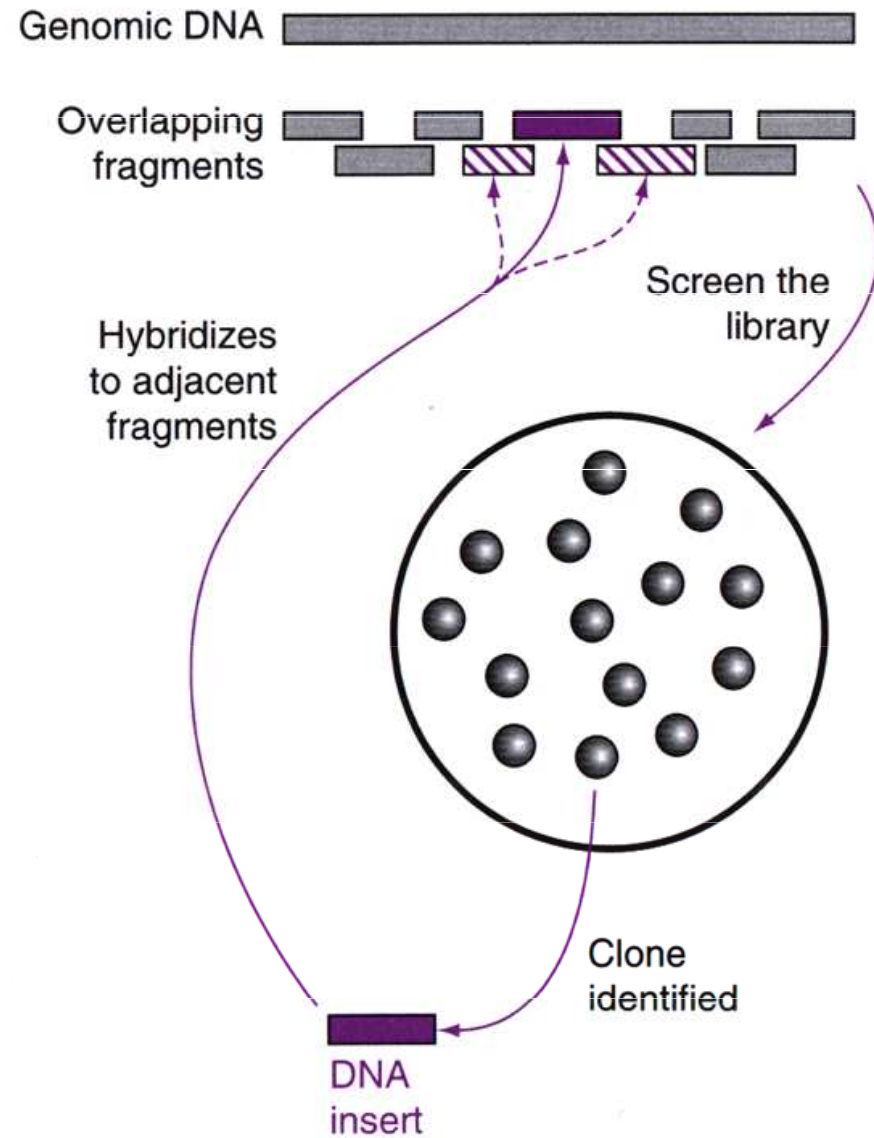
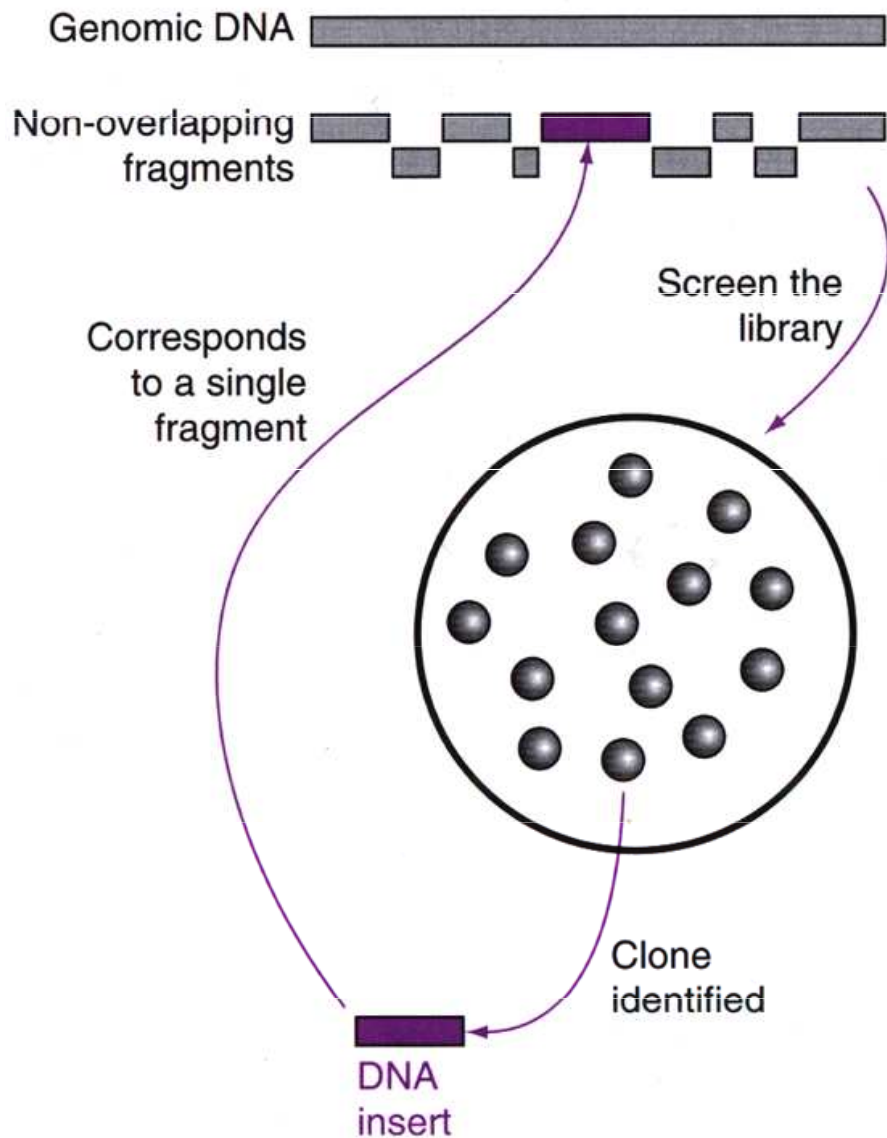
„Chromosome walking“



Nevýhody techniky „procházení po chromozomu“

- Některé úseky genomu se obtížně klonují
- Některé úseky genomu jsou tvořeny repeticemi, které nelze jako sondy použít

Srovnání knihoven překrývajících a nepřekrývajících se fragmentů DNA



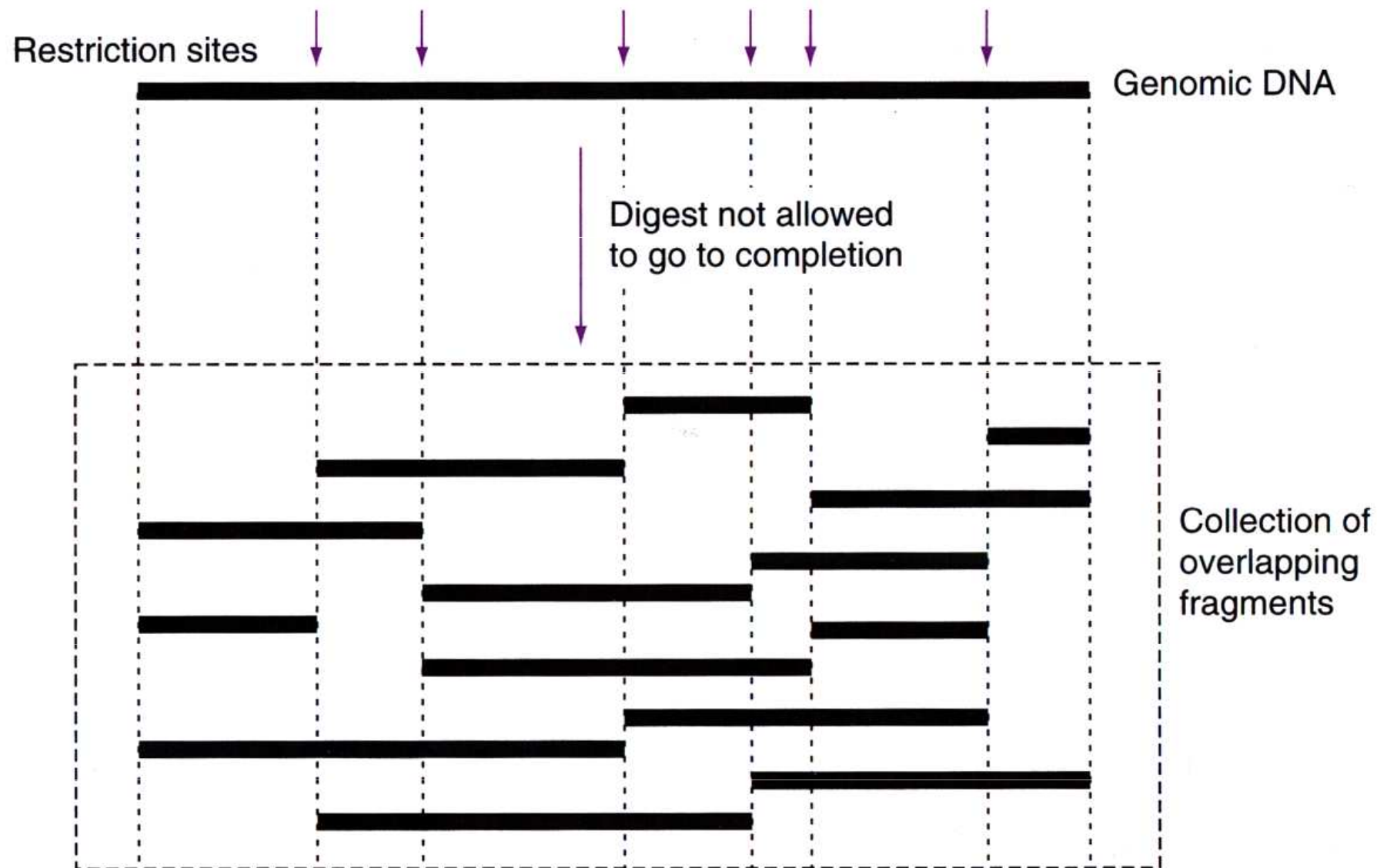
Částečné štěpení DNA („partial digest“)

Přerušení DNA jen v některých z cílových míst pro daný restriktivní enzym.

Možné experimentální přístupy:

- zkrácený reakční čas
- nižší počet jednotek enzymu
- snížená inkubační teplota

Částečné štěpení DNA pro přípravu překrývajících se fragmentů



Přeskakování po chromozomu

Cíl:

překlenutí chybějících mezer v sekvencích genomové DNA (doplněk k technologii procházení chromozomu)

Princip:

- příprava knihovny pro přeskakování, která obsahuje přeskakovací klony
- přeskakovací klony nesou nesousedící sekvence ze vzdálených oblastí genomu

Přeskakování po chromozomu - postup

- částečným štěpením genomové DNA se vytvoří velké fragmenty ze segmentu DNA, který nese hledanou sekvenci a rozdělí se pulzní gelovou elektroforézou
- izolace fragmentů o velikosti 50-200 kb
- spojením konců fragmentů DNA ligázou se vytvoří kružnicové molekuly - v nich se původně vzdálené sekvence objeví v těsné blízkosti
- štěpením kružnicových molekul DNA jinou restriktázou vzniknou fragmenty, z nichž část ponese spojené konce původních fragmentů
- tato spojení jsou klonována do fágového vektoru za účelem založení knihovny pro přeskakování
- z počátečního úseku studované DNA se připraví sonda, která se použije k vyhledání přeskakovacího klonu
- jakmile je klon nalezen, použije se druhý konec jeho inzertu k přípravě sondy, kterou lze zahájit procházení po chromozomu oběma směry