

# **BAC/PAC knihovny a jejich využití pro FISH techniku**

Mgr. Gabriela Galiová

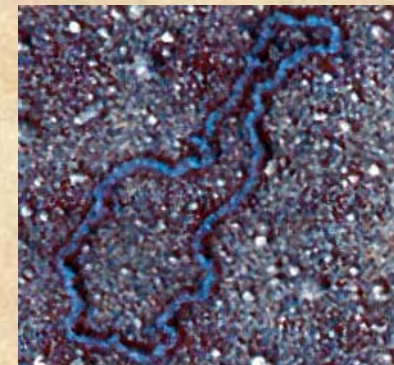
# Obsah

- **BAC, PAC, YAC** systémy, klonování, selekce, knihovny, využití
- **příprava DNA sondy**
  - izolace a purifikace plazmidové DNA
  - nick translace
  - Cot1 DNA
- **FISH** - typy a využití

# Co to je?

- BAC (Bacterial Artificial Chromosome)
- PAC (P1 Artificial Chromosome)
- YAC (Yeast Artificial Chromosome)
- uměle syntetizovaná plazmidová DNA, kterou lze vložit do „organismu“ (vektor)
- vektor x klonovací vektor
- BAC, PAC, YAC klonovací vektory jsou agens, které vnášejí úsek DNA do hostitelské buňky

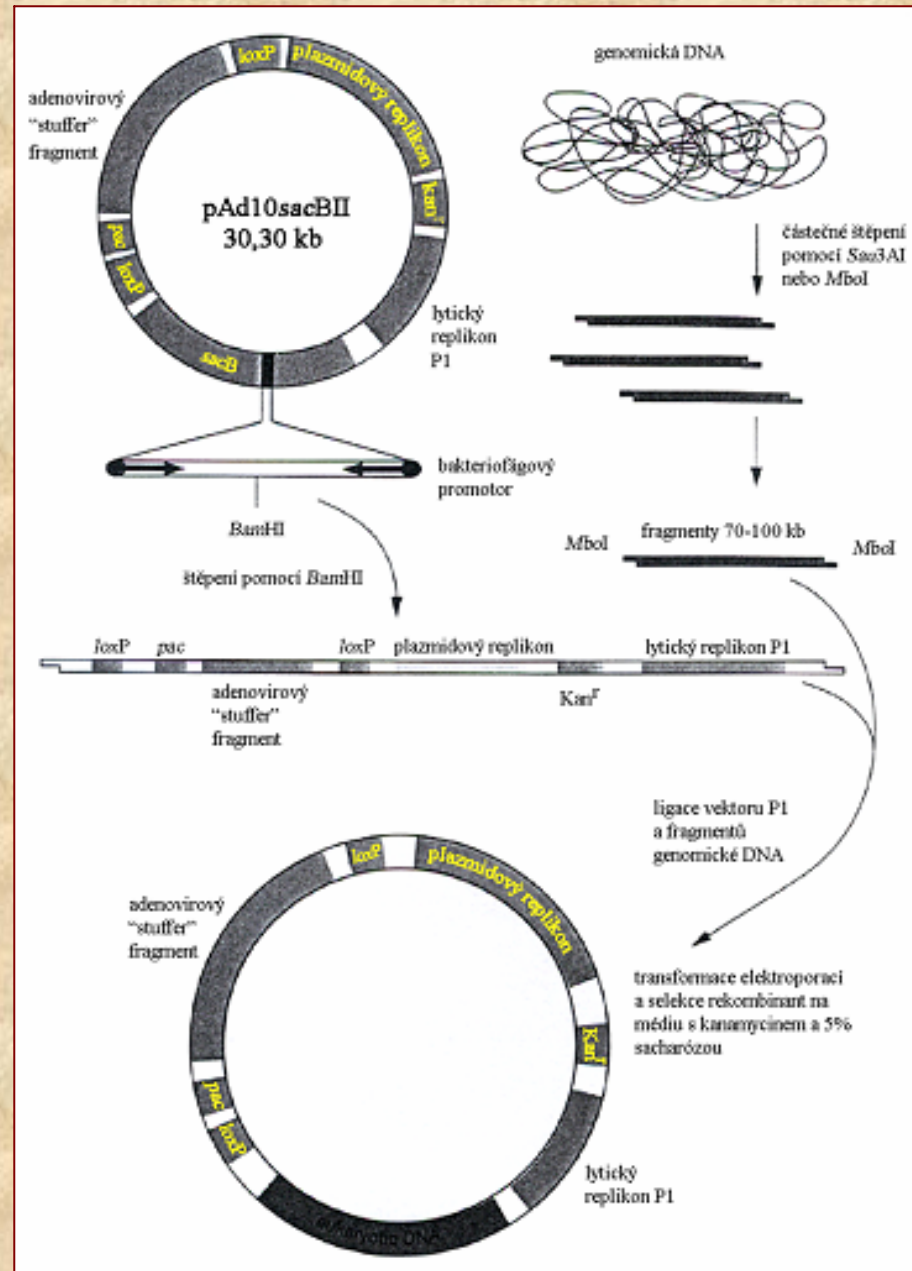
několik tisíc bp



# Schéma klonování do P1 vektoru

**Klonovací vektor musí obsahovat:**

- počátek replikace
- místo pro restriční endonukleázu (jedno)
- gen pro rozlišitelnou vlastnost



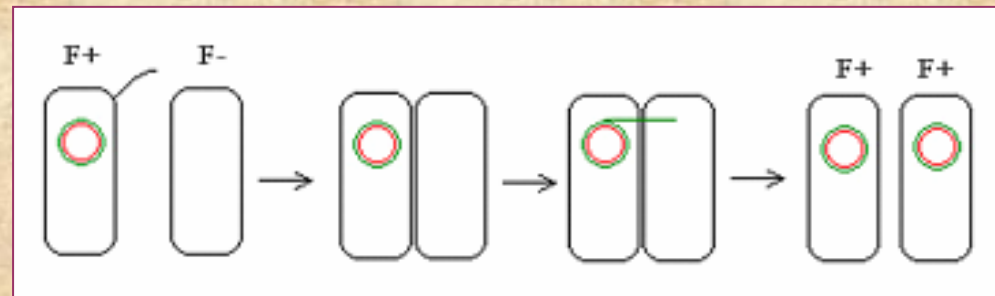
# Hostitelská buňka



- *Escherichia coli* (G-, *Enterobacteriaceae*)
- vhodný modelový organismus protože:
  - je dobře znám jeho genom (kruhová molekula DNA)
  - nenáročně se kultivuje, rychle roste, produkuje početné potomstvo (dělení)
  - obsahuje **F-faktor** = konjugativní plazmid o velikosti 100 Kb, který odpovídá za přenos genetické informace z F+ do F- buňky
- plazmid má vlastní počátek replikace – replikuje se nezávisle na bakteriálním chromozomu

# Přenos DNA do bakterií

- **konjugace**: donorová buňka → recipientní buňka



- F-plazmid se v buňce vyskytuje ve 2 formách: plazmid a Hfr (high frequency of recombination)
- **transformace**: příjem DNA z okolí bakterie (začlenění homologní rekombinací) BAC!!!
- **transdukce**: temperovaný bakteriofág (místně specifická rekombinace) Nepřesná excize DNA z hostitelského chromozomu – vezme sebou i kus chromozomální DNA a zabalí se do kapsidů. Infekcí se šíří dál. PAC!!!

# YAC systémy

- podílely se na mapování lidského genomu
- klonovací kapacita až 1000 Kb, mohou nést celé lidské geny
- v kvasince se udržují relativně stabilně v 1 nebo více kopiích
- ale při manipulaci **problémy** (nestabilita, přeskupování DNA, tvorba chimér s cizorodou DNA, malé výtěžky), nižší účinnost transformace

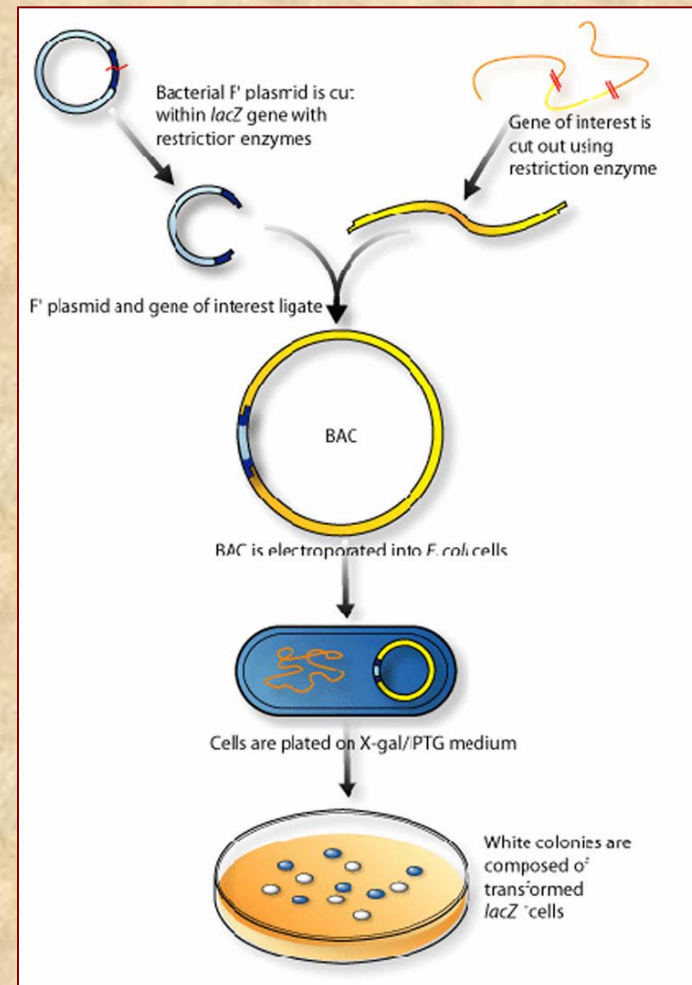
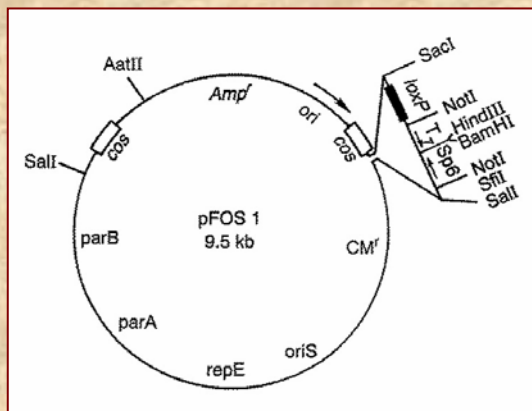
# BAC systémy

- struktura odvozena od F-plazmidů bakterie *Escherichia coli*
- klonovací kapacita 50-350 Kb
- v buňce v nízkém počtu kopií (1-2)
- vysoká strukturální **stabilita** v buňce *E. coli*, schopnost udržet vloženou DNA, snadná manipulace s DNA
- snadná izolace díky kruhové plazmidové struktuře (alkalická lyze, sloupcová chromatografie)
- tvorba chimér méně častá než u YAC



# BAC systémy - 2

- dobrá izolace díky selekčním znakům (př. gen pro rezistenci na antibiotika, přítomnost *lacZ*)
- vektory dále obsahují: místa pro restriční enzymy, geny pro regulaci: *parA* a *parB*, klonovací místa (*HindIII*, *BamHI*)



# PAC systémy

- 1. vektor odvozen od bakteriofága  $\lambda$  (nebyl vhodný pro mapování savčího genomu)
- proto vyvinuty P1 vektory a PAC systémy (odvozeny od temperovaného fága P1)
- **P1 vektor** se skládá ze 2 domén: adenovirový fragment (plní fágové kapsidy DNA) a P1 lytický replikon (spouští amplifikaci plazmidové DNA)

# PAC systémy - 2

- **PAC systém** má místo adenovirového fragmentu plazmid pUC povahy (zvyšuje výtěžek DNA)
- je to kombinace P1 vektoru a bakteriálního vektoru
- klonovací kapacita 130 - 150 Kb
- menší stupeň chimérizmu (jako u BAC), vyšší účinnost transformace, ale složitější příprava vektorů

# Využití klonovacích vektorů

- fyzikální mapování, analýza a sekvenace nejen savčího genomu
- příprava DNA sond
- **detekce** různých **poruch** genetické informace (delece, inzerce, ...) ← **klinické využití**
- detekce **nádorových buněk** ← **klinické využití**
- studium struktury chromatinu v buňkách
- tvorba genomových knihoven

# Genomové knihovny

- zásobárny klonů s různými vloženými úseky sekvenované genomové DNA
- úseky obsahují i nekódující sekvence (introny, repetitivní DNA, regulační oblasti genů, ...)
- cDNA knihovny: celková mRNA → cDNA  
(nepřerušená kódující sekvence genu – lze vyčíst aminokyselinové složení proteinu a využít je pro jejich syntézu v bakteriích nebo kvasinkách)
- hledání v knihovnách: pomocí sond
  - a) pro vyhledávání **sekvencí** DNA
  - b) pro vyhledávání **produktů** hledaných genů

# Konstrukce BAC knihoven

- linearizace vektoru restriktivními enzymy a ligace s naštěpenou genomickou DNA
- produkt elektroporací nebo chemickou transformací ( $\text{CaCl}_2$ ) vnesen do *E. coli* a transformanty selektovány na plotnách s antibiotikem nebo IPTG a X-gal
- vybrané transformanty jsou řazeny do mikrotitračních destiček
- vektory pomnožovány v kmenech *E. coli* s poruchou rekombinace (DH5 $\alpha$ , DH10B)

# Konstrukce PAC knihoven

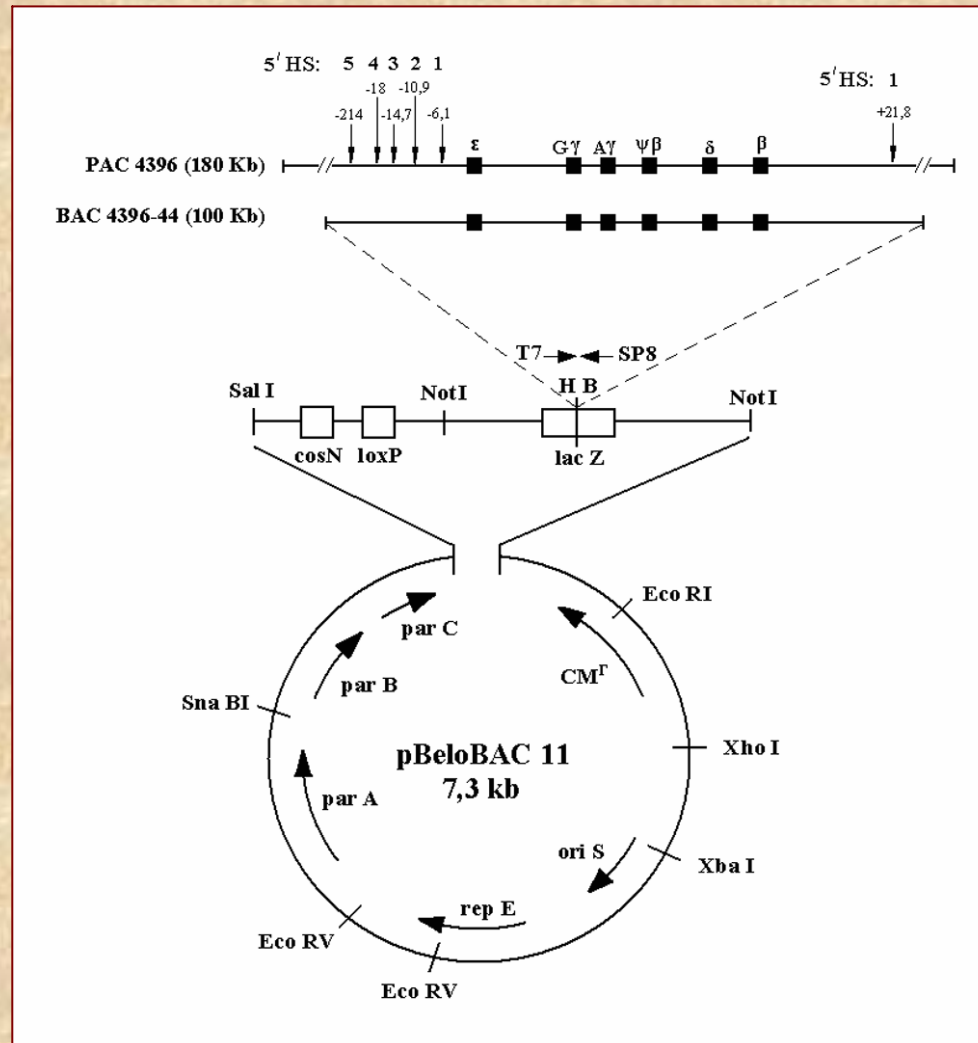
- linearizace vektoru restrikcími enzymy a ligace s fragmenty DNA
- produkty ligace zabaleny do fágových kapsidů a pak infekce buněk *E. coli*
- selekce (*sacB*) na médiu s antibiotikem a sacharózou
- uchování v mikrotitračních destičkách:
  - a) na 1 jamku více klonů (nevýhodné)
  - b) na 1 jamku 1 klon

# Klonování do BAC vektorů

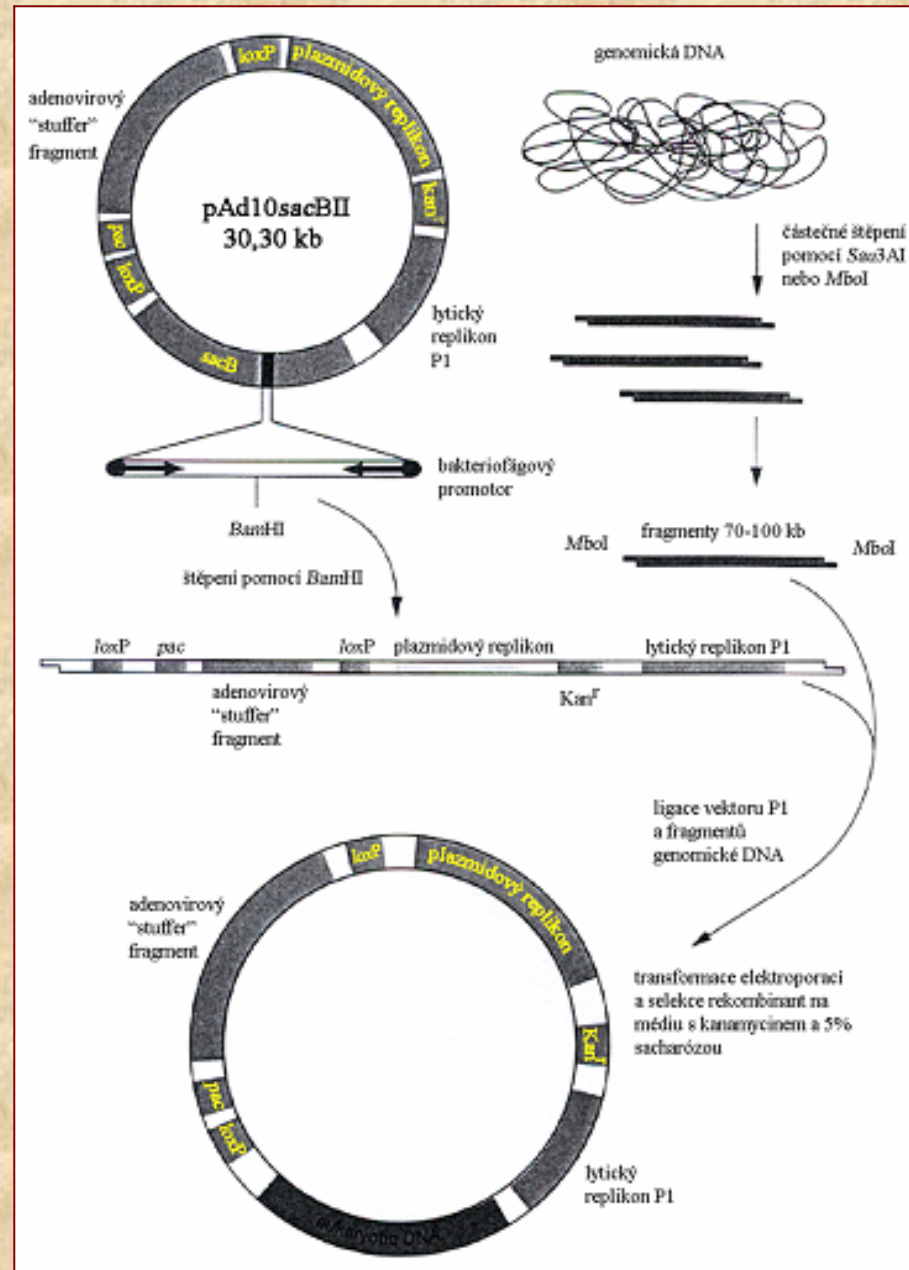
- asi nejpoužívanější je vektor **pBeloBAC11**
- postup: linearizace vektoru, ligace s fragmenty genomické DNA, elektroporace nebo chemická transformace do *E. coli*
- selekce a uchování (LB médium s antibiotikem a 30% glycerolem na -70°C nebo vpich do média při RT)
- izolace DNA z transformantů její analýza (PFGE, PCR)



# Vektor pBeloBAC11 (klastr globinových genů)



# Schéma klonování do P1 vektoru



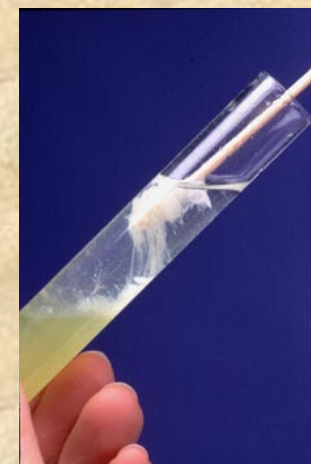
# *E. coli* (pBeloBAC11)

Po nárůstu bakterií na agaru se 1 kolonie (populace jedné bakterie) naočkuje do tekutého LB média a přes noc inkubuje při 37°C.



# Příprava DNA sondy

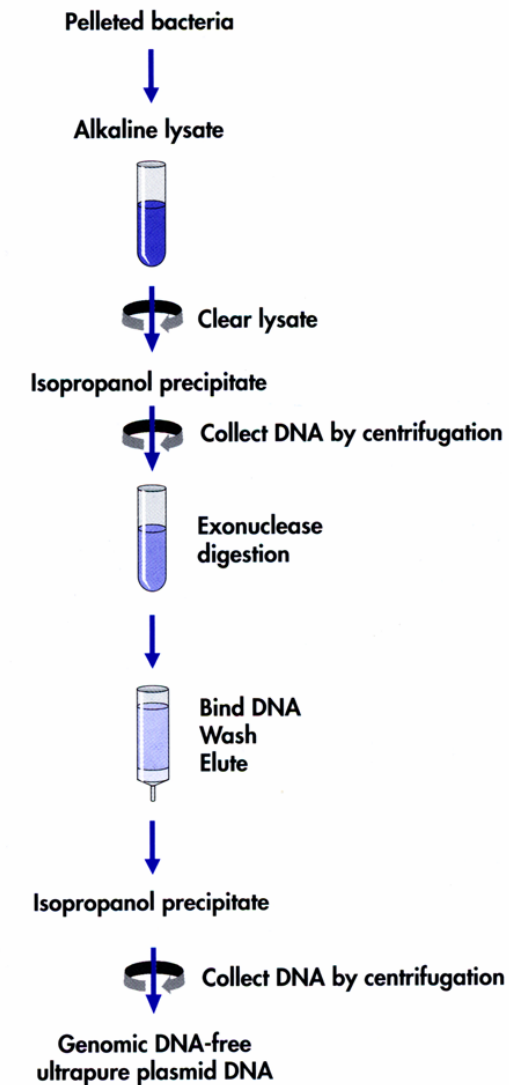
- nejprve **izolace** DNA z příslušného BAC nebo PAC vektoru pomnoženého v *E. coli*
- izolace klasickou metodou s vlastními roztoky nebo izolačním kitem
- izolace kitem je výhodnější (větší výtěžek, odstranění bakteriální DNA)
- DNA je polární (- náboj) → snadná precipitace alkoholem, možnost elektroforézy



# Schéma izolace DNA pomocí QIAGEN Large Construct Kit

- lyzační pufry rozruší buňky
- isopropanol vysráží DNA
- etanol přesráží DNA
- kolonky odstraní bakteriální DNA a RNA
- rozpuštění DNA v TE pufru, H<sub>2</sub>O
- měření velikosti a čistoty DNA pomocí gelové elektroforézy, spektrofotometrie, nanodropu

## QIAGEN Large-Construct Kit Procedure



# Čistota a koncentrace DNA

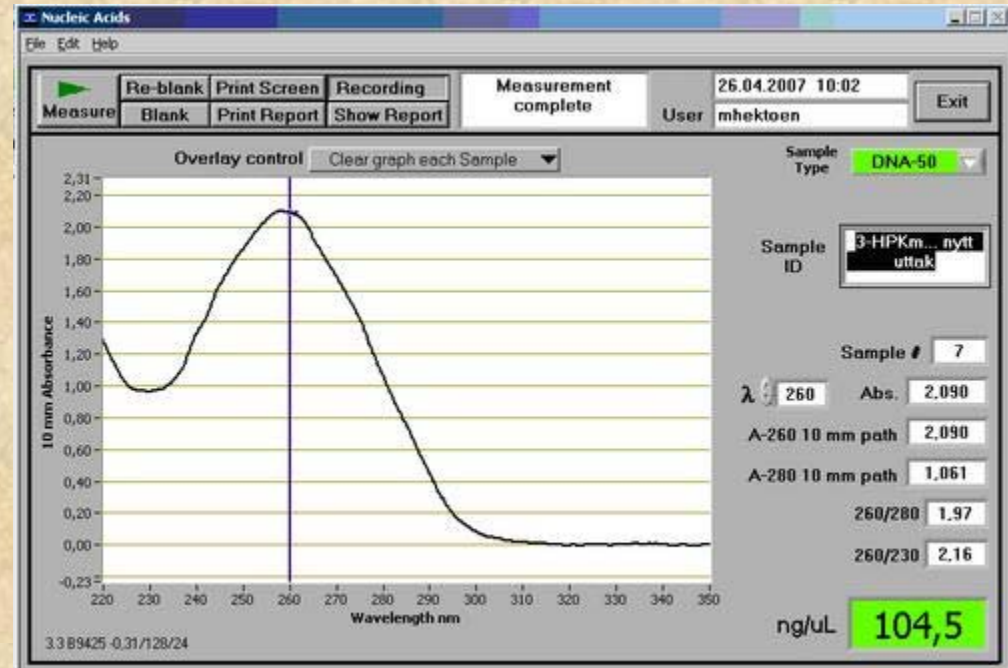
**Čistota DNA:** poměr A260/A280

- $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2 \rightarrow$  ideální hodnoty
- $A_{260}/A_{280} > 2 \rightarrow$  kontaminace RNA
- $A_{260}/A_{280} < 1,8 \rightarrow$  kontaminace proteiny

**Koncentrace dsDNA:**

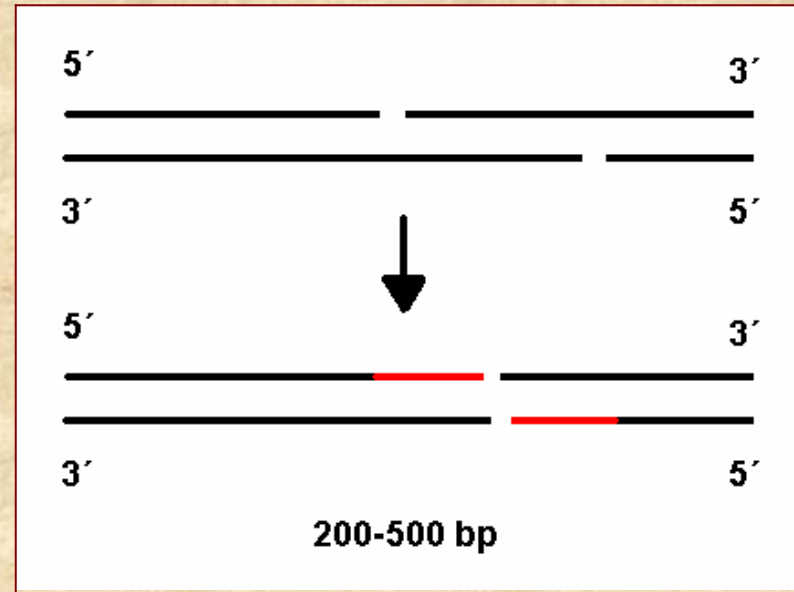
- maximální absorbance nukleotidů při 260nm

$1\text{OD} = 50\mu\text{g DNA/ml H}_2\text{O}$   
(optická denzita,  $A_{260} = 1$ )

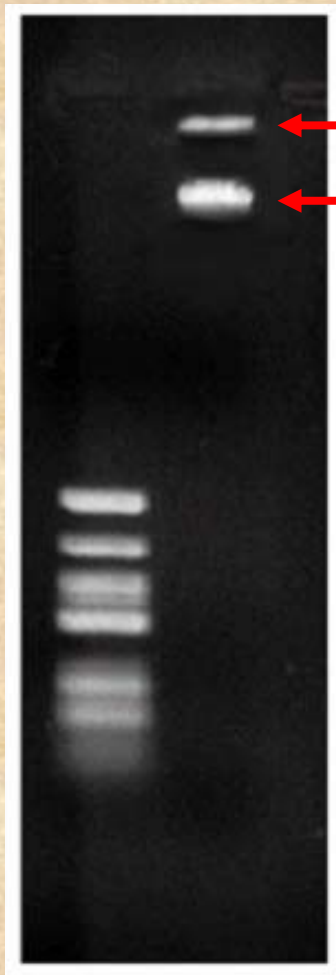


# Nick-translance

- vlastní příprava sondy inkorporací např. digoxigeninu do DNA
- nick-translační kit obsahuje 2 enzymy:
  - DNáza I
  - *E. coli* polymeráza I
- každý 20.-25. nukleotid je modifikován **DIG-dUTP**
- vznik fragmentů o velikosti 200-500 bp



**DNA po izolaci  
(pBeloBAC11)**

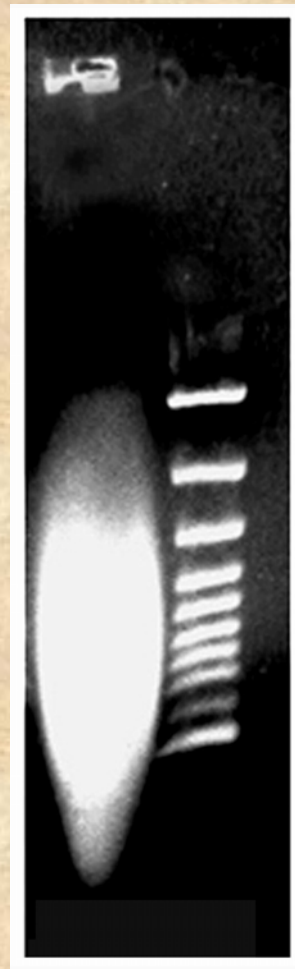
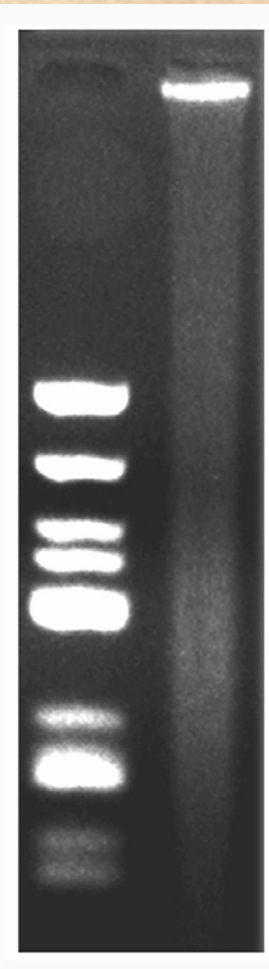


← bakteriální DNA  
← plazmidová DNA

**DNA po nick-translaci**

**pBeloBAC11**

**PAC825K22**



200-500  
bp



# Cot-1 DNA

- v lidském genomu jsou rozptýlené **repetitivní sekvence** SINEs, LINEs (např. Alu-elementy, L1-elementy)
- tyto repetice jsou obsaženy i v DNA sondě
- competitor DNA – lidská placentální DNA obohacená repetitivními sekvencemi
- repetitivní elementy sondy hybridizují s přebytkem repetit na COT-1 DNA
- nejvíce specifická místa na sondě zůstanou volná (jednořetězcová) pro hybridizaci na cílovou DNA
- potlačuje hybridizaci sondy na repetitivní sekvence při FISH a **zvýší se** tak **specifičnost** (přesnost) hybridizace

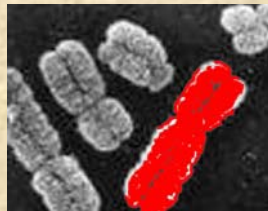
# Stručný návod k použití Cot-1 DNA

- ke 120 ng značené DNA přidat 6  $\mu\text{g}$  Cot-1
- doplnit salmon sperm DNA do mn. 20  $\mu\text{g}$
- přidat 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2 objemy 96% etanolu ( $-20^{\circ}\text{C}$ )
- promíchat, inkubovat 30 min při  $-70^{\circ}\text{C}$
- centrifugovat 15min/13000 rpm, slít supernatant
- promýt DNA 400  $\mu\text{l}$  70% etanolu ( $-20^{\circ}\text{C}$ )
- centrifugovat 5min/13000 rpm, slít supernatant
- sušit pelet a rozpustit ve 20  $\mu\text{l}$  hybridizolu (50% formamid a 2xSSC)

# FISH

## (Fluorescenční In Situ Hybridizace)

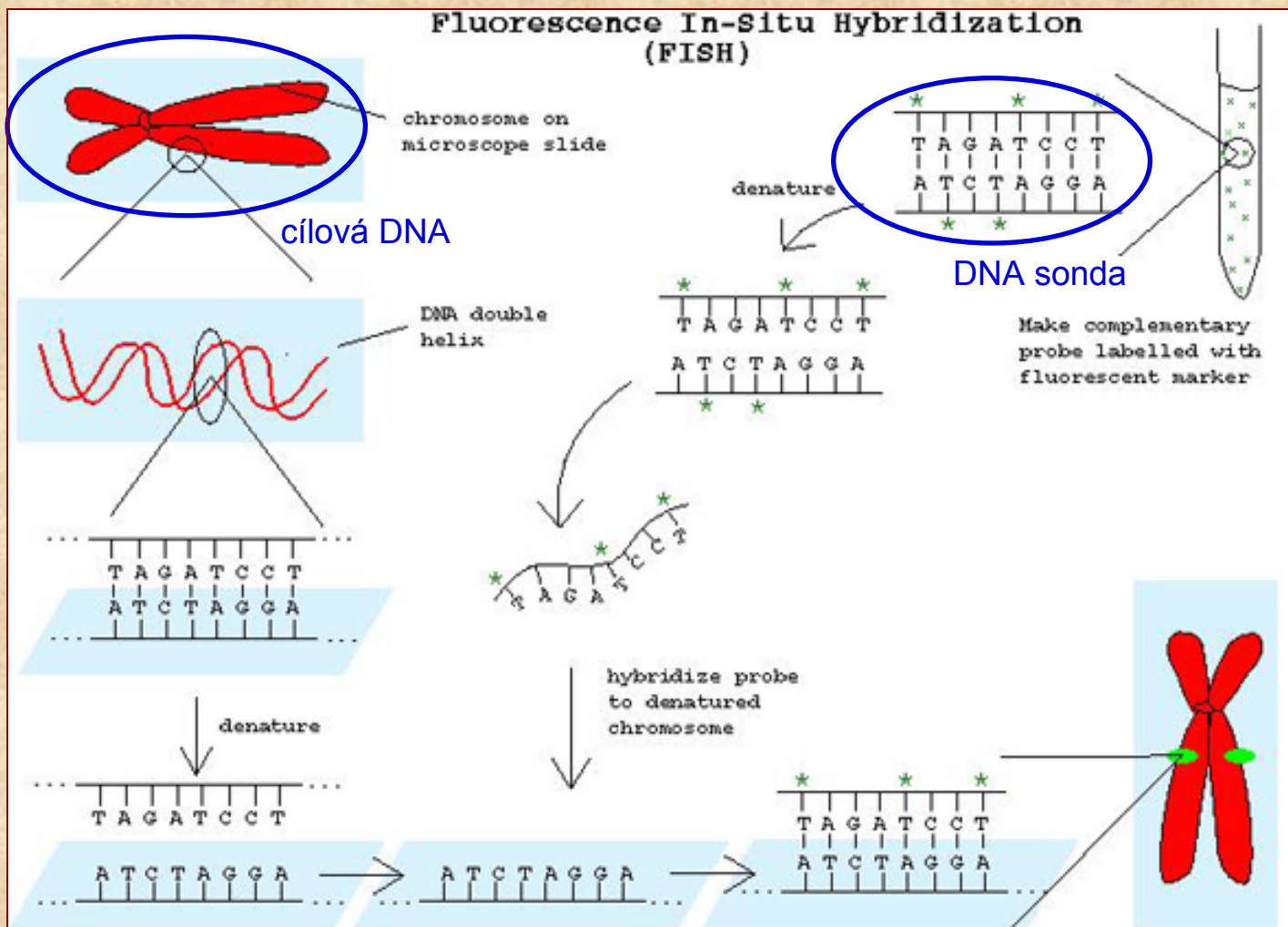
- metoda stanovení lokalizace specifických sekvencí DNA nebo i celých chromozomů v buněčných preparátech
- **princip** spočívá v navázání značené denaturované DNA sondy na komplementární místo cílové denaturované DNA
- **druhy** DNA sond: místně specifické (genové), celochromozomové, telomerické, centromerické



- **typy** DNA sond:
  - oligonukleotidové (chemicky syntetizované)
  - jednořetězcové (RT-PCR, PCR)
  - dvouřetězcové (BAC, PAC, YAC klony)
  - RNA sondy
- přímé a nepřímé fluorescenční značení
- duální barvení, SKY (spectral karyotyping), multicolour FISH, opakovaná hybridizace
- rozsáhlé klinické využití (prenatální diagnostika, cytogenetika nádorů)



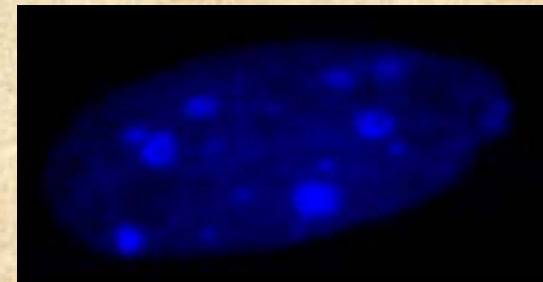
# Schéma FISH



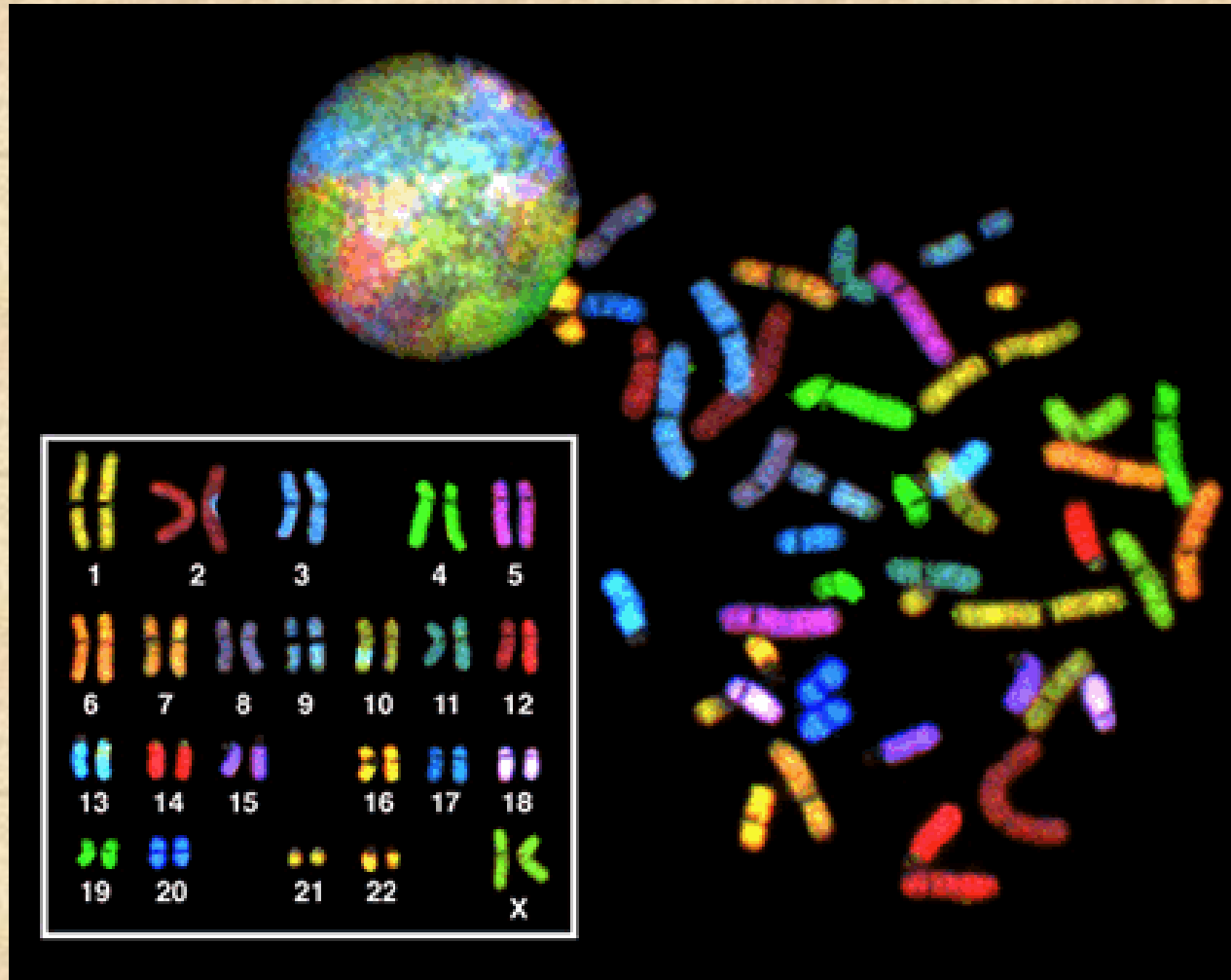
nepřímé značení - sekundární protilátka

# Nejčastěji používané látky

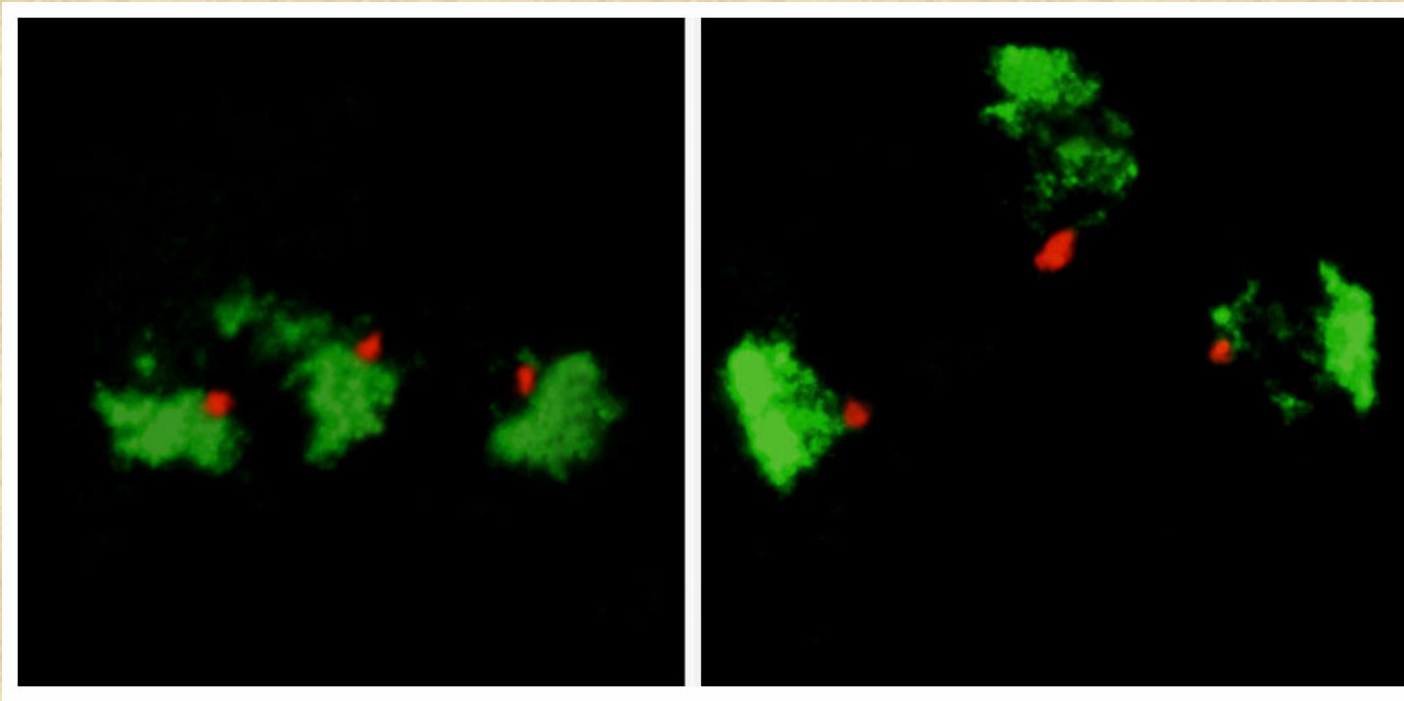
- nepřímé značení DNA sondy:  
ligandy typu digoxigenin, biotin (Roche)
- sekundární protilátky:  
Anti-DIG-Rhodamin, Fluorescein-avidin (Roche),  
FITC-avidin (Sigma)
- barvení jádra:  
DAPI (4',6-diamidin-2'-fenylyndol), TO-PRO®-3 iodide,  
PI (propidium iodide)
- přímé značení DNA sondy:  
Spectrum Orange, Green, Red, ...  
(Invitrogen), Cy3 (Cambio)



# SKY technika (spectral karyotyping)



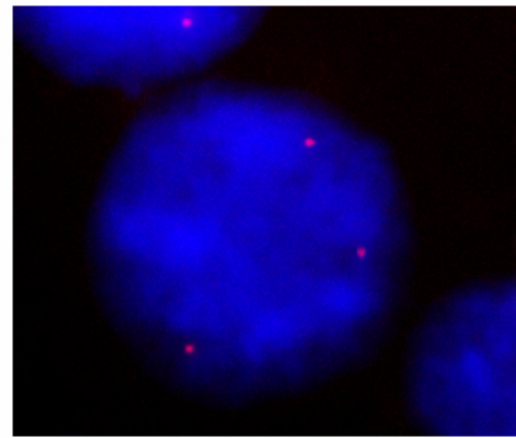
# Duální barvení



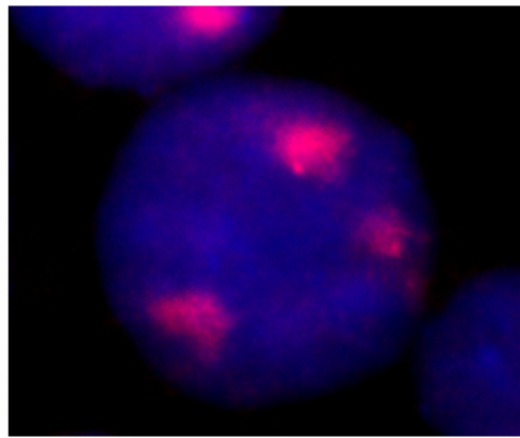
umístění  $\beta$ -globinového genu (červené signály) v rámci chromozomálního teritoria chromozomu 11 (zelené signály) u lidských leukemických buněk K562



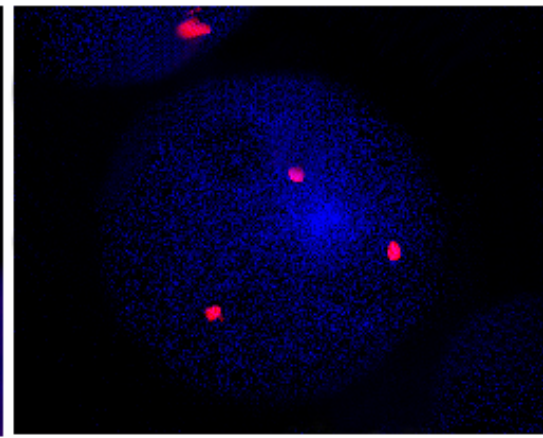
# Opakovaná DNA/DNA hybridizace



klastr globinových genů



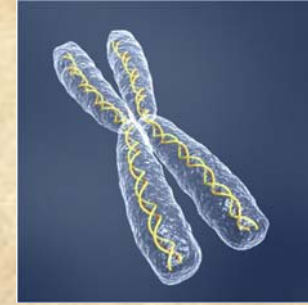
chromozom 11



centromera chromozomu 11



# Shrnutí



- **klonování** do BAC, PAC vektoru a transformace
- **izolace** plazmidové DNA z bakterií, purifikace izolované DNA
- inkorporace značených nukleotidů pomocí **nick-translace** – značení sondy
- vystínění repetitivních sekvencí sondy pomocí **Cot-1 DNA**
- **hybridizace** cílové DNA připravenou sondou pomocí FISH
- promytí přebytečné sondy a **detekce** signálů