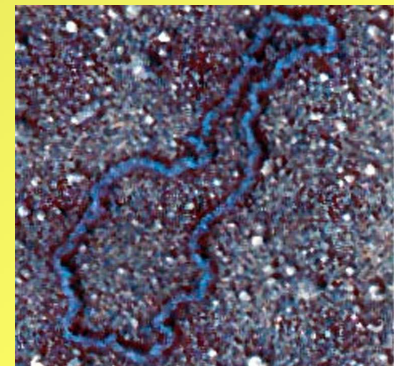


BAC/PAC knihovny a jejich využití pro FISH techniku

Metody používané v
Laboratoři molekulární
cytologie a cytometrie BFÚ,
Brno

Co to je?

- BAC (**B**acterial **A**rtificial **C**hromosome)
- PAC (**P**1 **A**rtificial **C**hromosome)
- YAC (**Y**east **A**rtificial **C**hromosome)
- uměle syntetizovaná plazmidová DNA, kterou lze vložit do „organizmu“
- vektor x klonovací vektor



YAC systémy

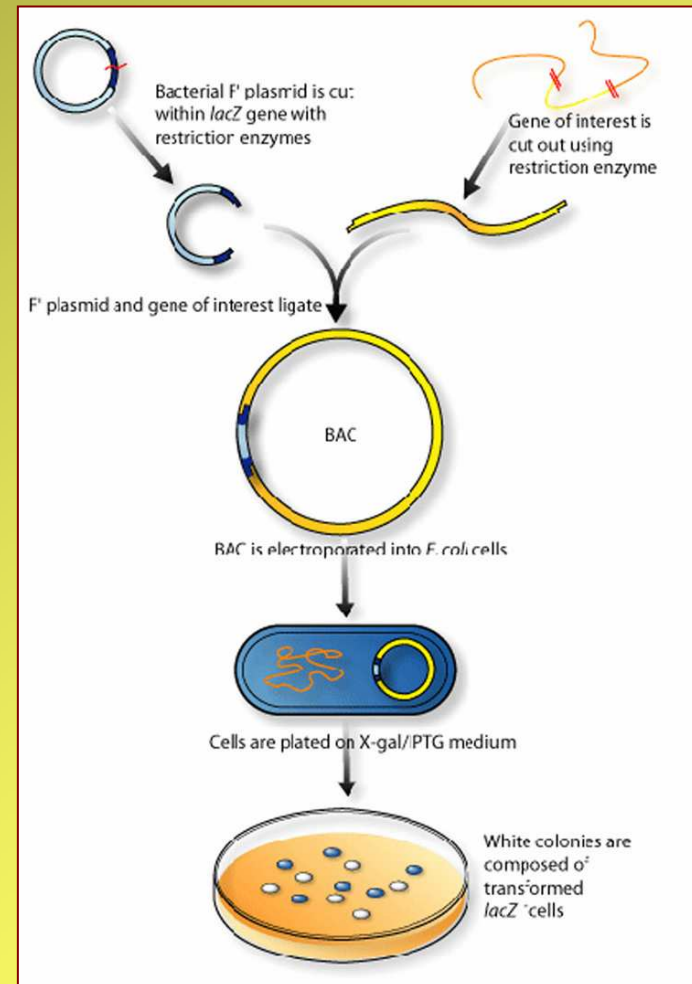
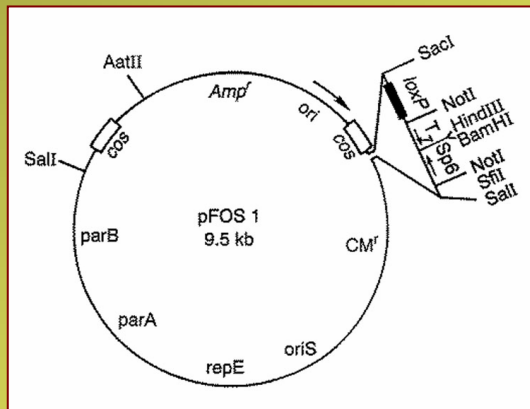
- podílely se na mapování lidského genomu
- klonovací kapacita až 500 Kb, mohou nést celé lidské geny
- v kvasince se udržují relativně stabilně v 1 nebo více kopiích
- ale při manipulaci **problémy** (nestabilita, přeskupování DNA, tvorba chimér s cizorodou DNA, malé výtěžky), nižší účinnost transformace

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

- Nevhodný vektor odvozen od bakteriofága λ (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 genomických knihoven

Genomické knihovny

- zásobárny klonů s různými vloženými úseky sekvenované genomické DNA
- konstrukce knihoven: různý postup v závislosti na typu vektoru
- hledání v knihovnách: pomocí sond
 - a) pro vyhledávání **sekvencí** DNA
 - b) pro vyhledávání **produktů** hledaných genů

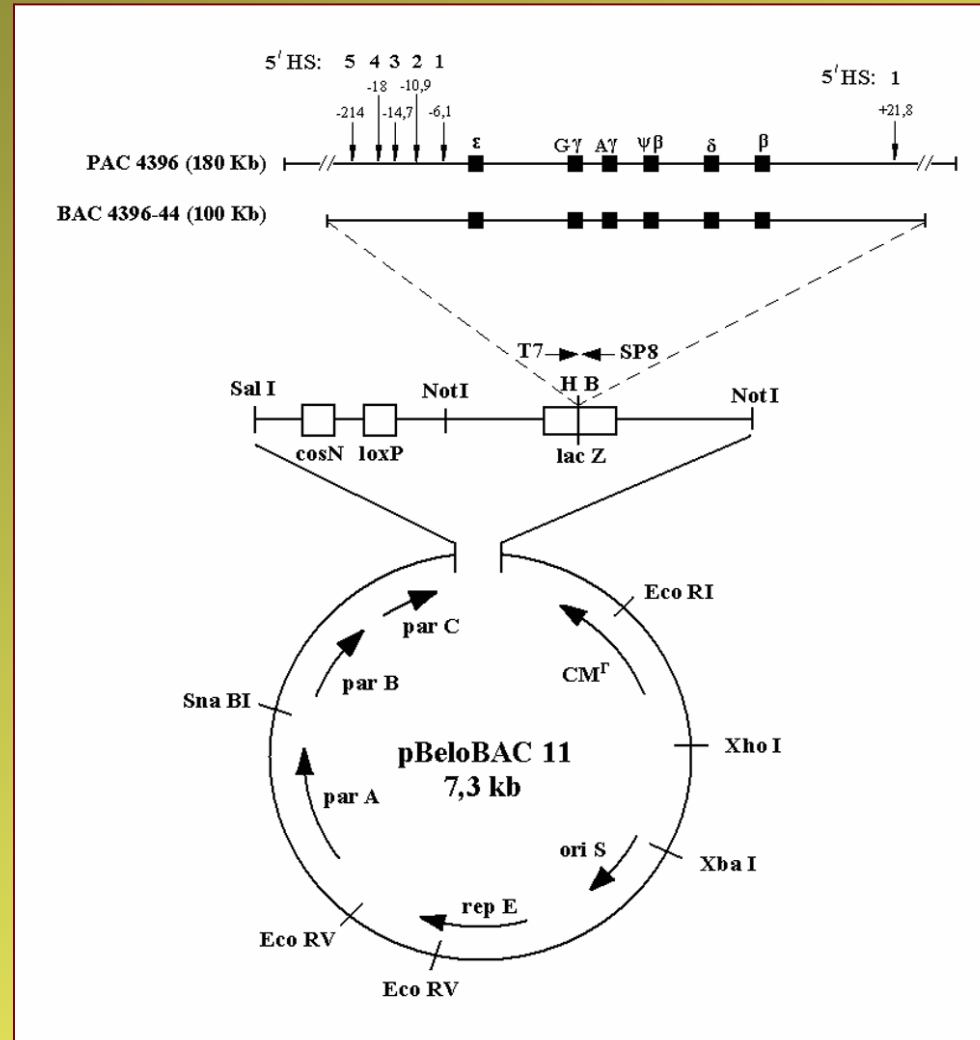
Konstrukce BAC knihoven

- linearizace vektoru restriktčními enzymy a ligace s naštěpenou genomickou DNA
- produkt elektroporací 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 α , DH10B)

Klonování do BAC vektorů

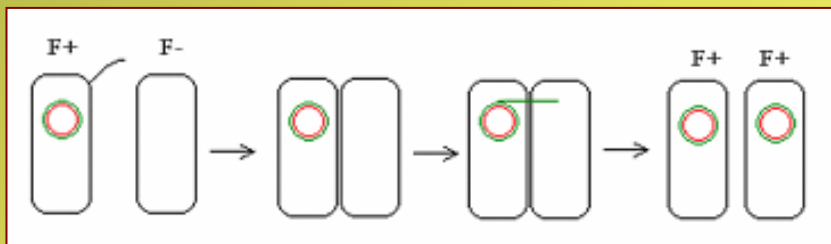
- asi nejpoužívanější je vektor **pBeloBAC11**
- postup: linearizace vektoru, ligace s fragmenty genomické DNA, elektroporace nebo chemická transformace do *E. coli*
- selekce a uchování (LB médium s antibiotikem a 30% glycerolem na -70°C nebo vpich do média při RT)
- izolace DNA z transformantů její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

Vektor pBeloBAC11 (klastr globinových genů)



Hostitelská buňka

- *Escherichia coli* (G-, *Enterobacteriaceae*)
- vhodný modelový organismus protože:
 - je dobře znám jeho genom
 - nenáročně se kultivuje, rychle roste, produkuje početné potomstvo
 - obsahuje **F-faktor** (konjugativní plazmid o velikosti 100 Kb, který odpovídá za přenos genetické informace z F+ do F- buňky), v buňce je ve 2 formách (plazmid a Hfr)



Příprava DNA sondy

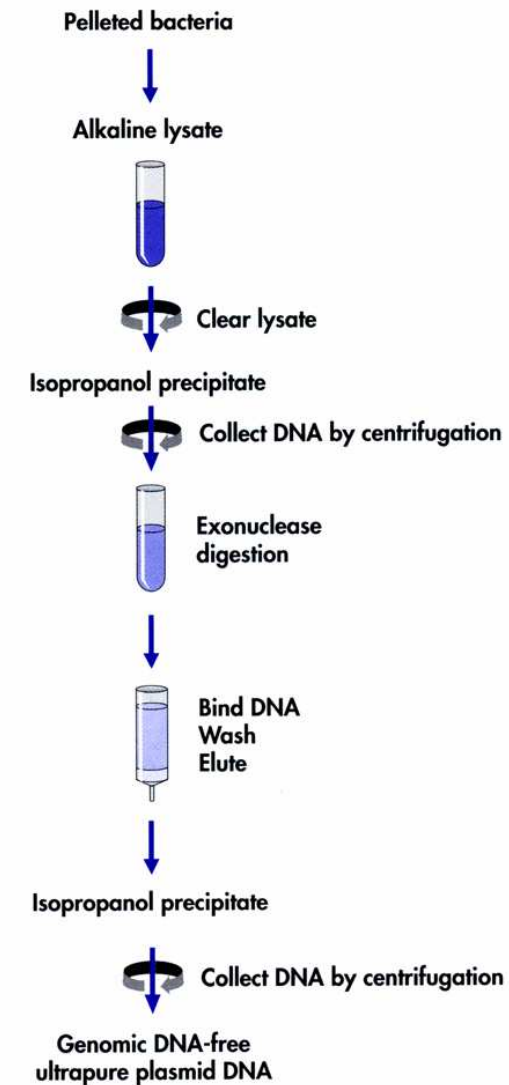
- nejprve **izolace** DNA z příslušného BAC nebo PAC vektoru pomnoženého v *E. coli*
- izolace klasickou metodou s vlastními roztoky nebo izolačním kitem
- izolace kitem je výhodnější (větší výtěžek, odstranění bakteriální DNA)



Schéma izolace DNA pomocí QIAGEN Large Construct Kit

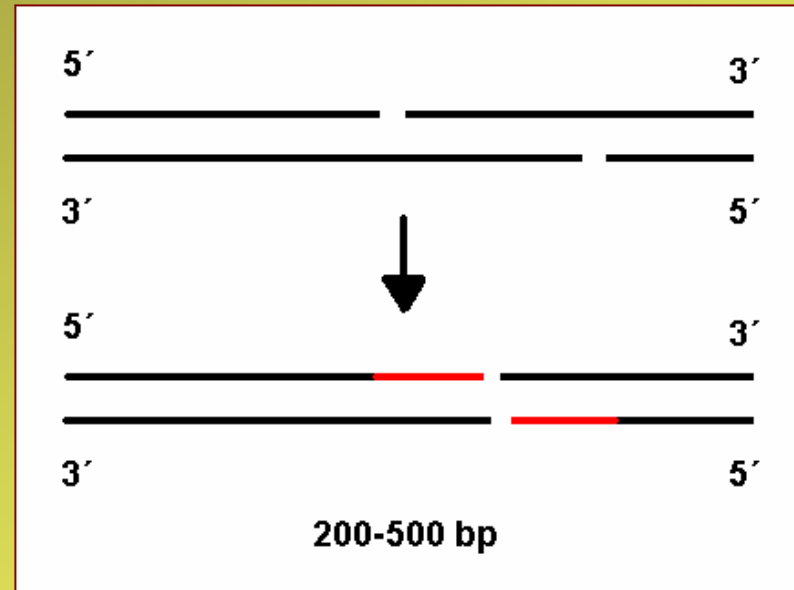
- lyzační pufry rozruší buňky
- isopropanol vysráží DNA
- etanol přesráží DNA
- kolonky odstraní bakteriální DNA a RNA
- následuje měření velikosti a čistoty DNA pomocí gelové elektroforézy a spektrofotometrie

QIAGEN Large-Construct Kit Procedure

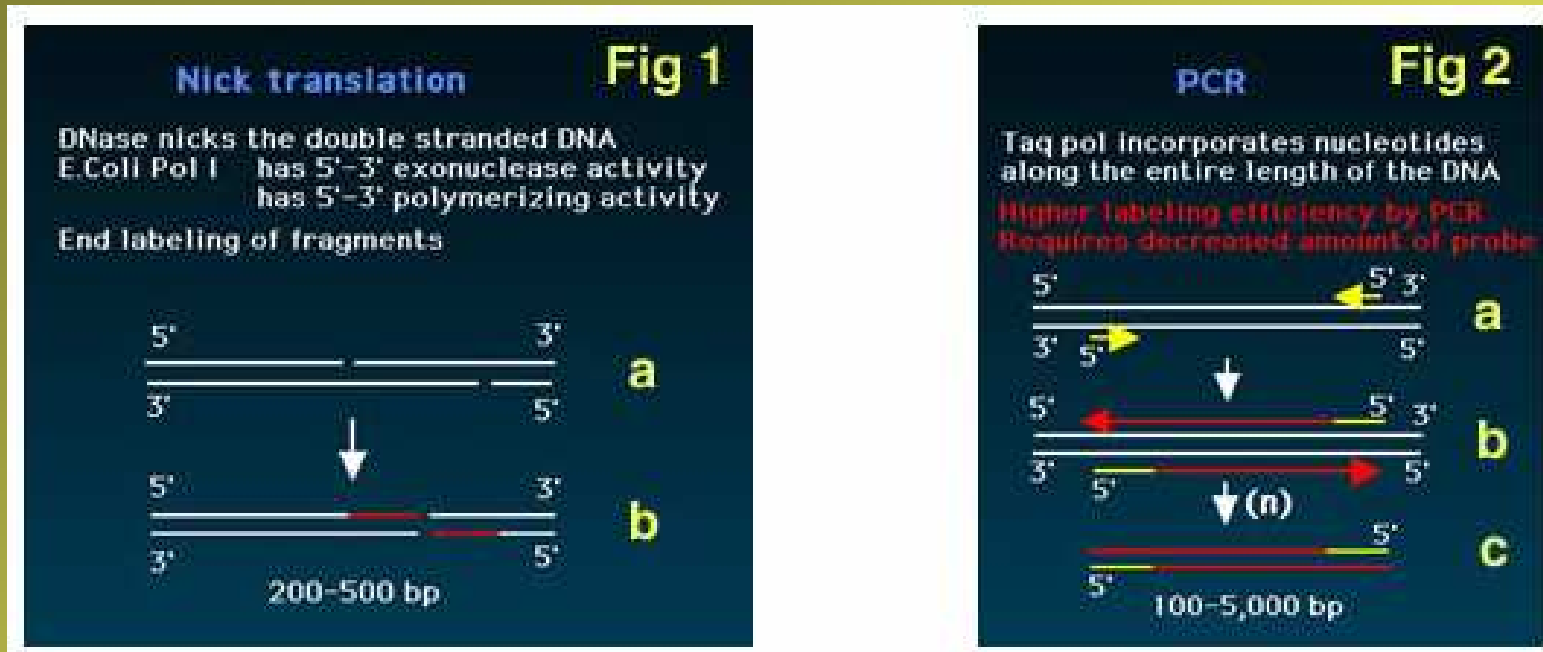


Nick-translace

- 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



NICK TRANSLATION



This process is called nick translation because the DNA to be processed is treated with DNase to produce single-stranded "nicks." This is followed by replacement in nicked sites by [DNA polymerase I](#), which elongates the 3' hydroxyl terminus, removing nucleotides by 5'-3' exonuclease activity, replacing them with dNTPs.

**DNA po izolaci
(pBeloBAC11)**



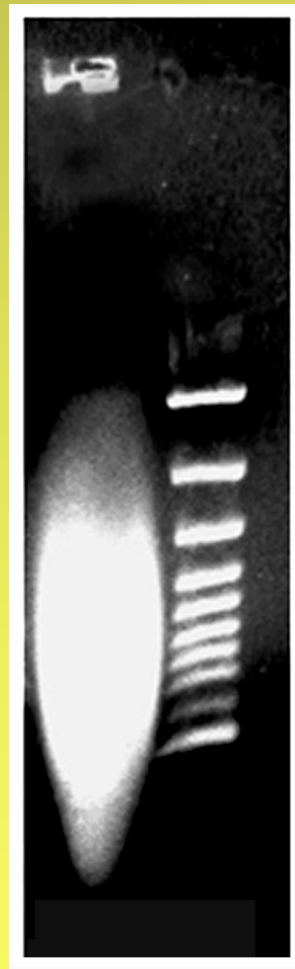
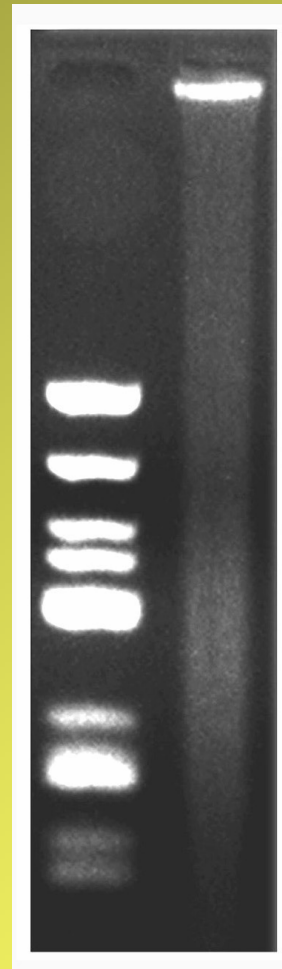
← bakteriální DNA

← 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 repetice 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

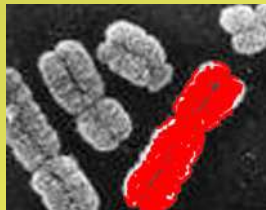
Stručný návod k použití Cot-1 DNA

- ke 120 ng značené DNA přidat 6 μg Cot-1
- doplnit salmon sperm DNA do mn. 20 μg
- přidat 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2 objemy 96% etanolu (-20°C)
- promíchat, inkubovat 30 min při -70°C
- centrifugovat 15min/13000 rpm, slít supernatant
- promýt DNA 400 μl 70% etanolu (-20°C)
- centrifugovat 5min/13000 rpm, slít supernatant
- sušit pelet a rozpustit ve 20 μl 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)



DOP-PCR

semi-degenerate oligonucleotides (CGACTCGAGNNNNNNATGTGG)
that bind at a low annealing temperature.

N: A,T,G, C

R: A,G,

Y: C,T

M: A, C

K: G, T

S: G, C

W: A,T

V: G, A, C

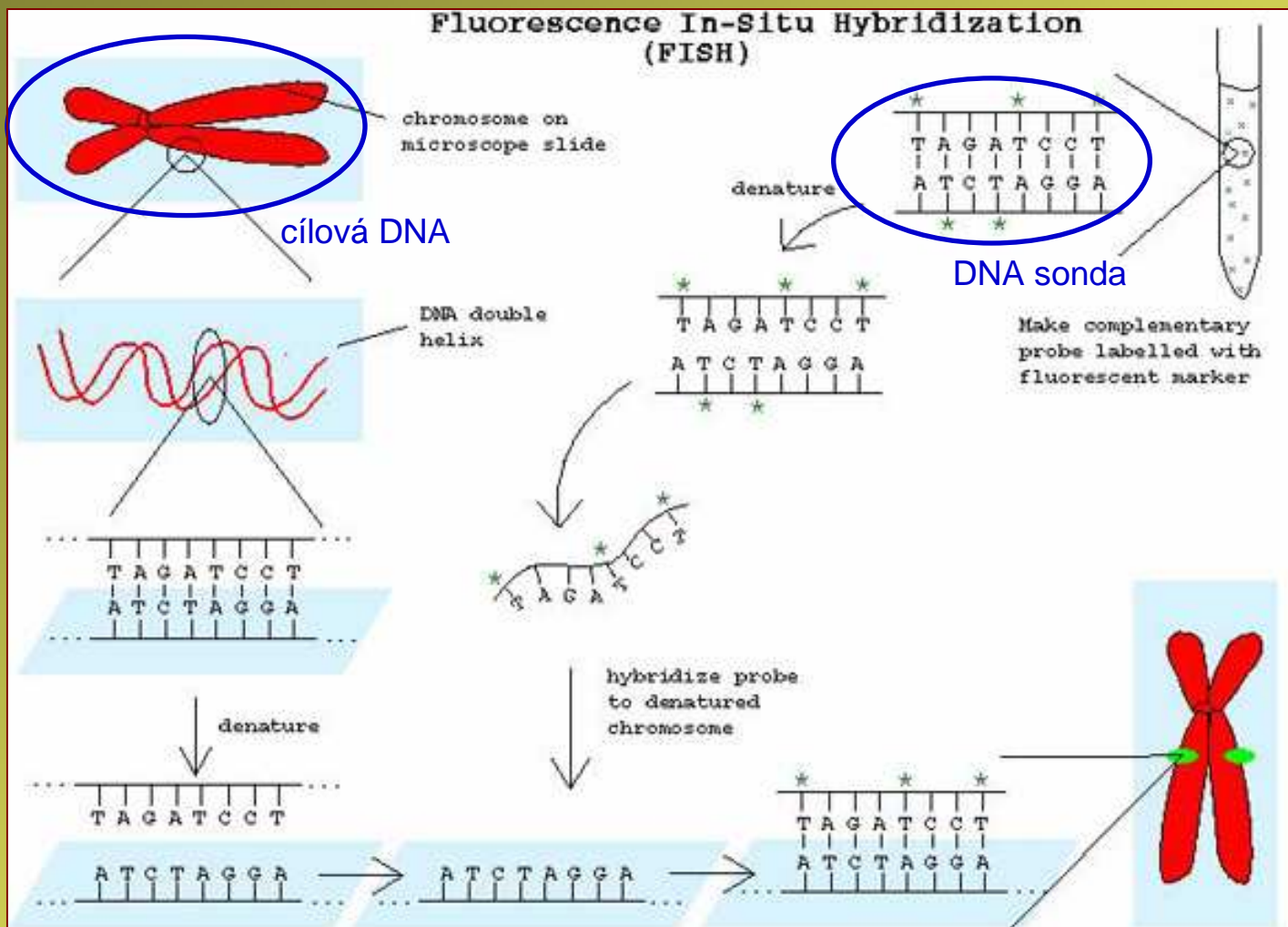
D: G, A, T

H: A, T, C

B: G, T,C

fragments that are in average 400-500 bp, with a maximum size of 3 kb, although Kittler and coworkers reported a DOP-PCR method that was able to produce fragments up to 10 kb.

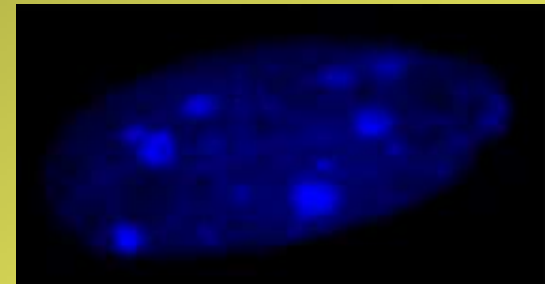
Schéma FISH



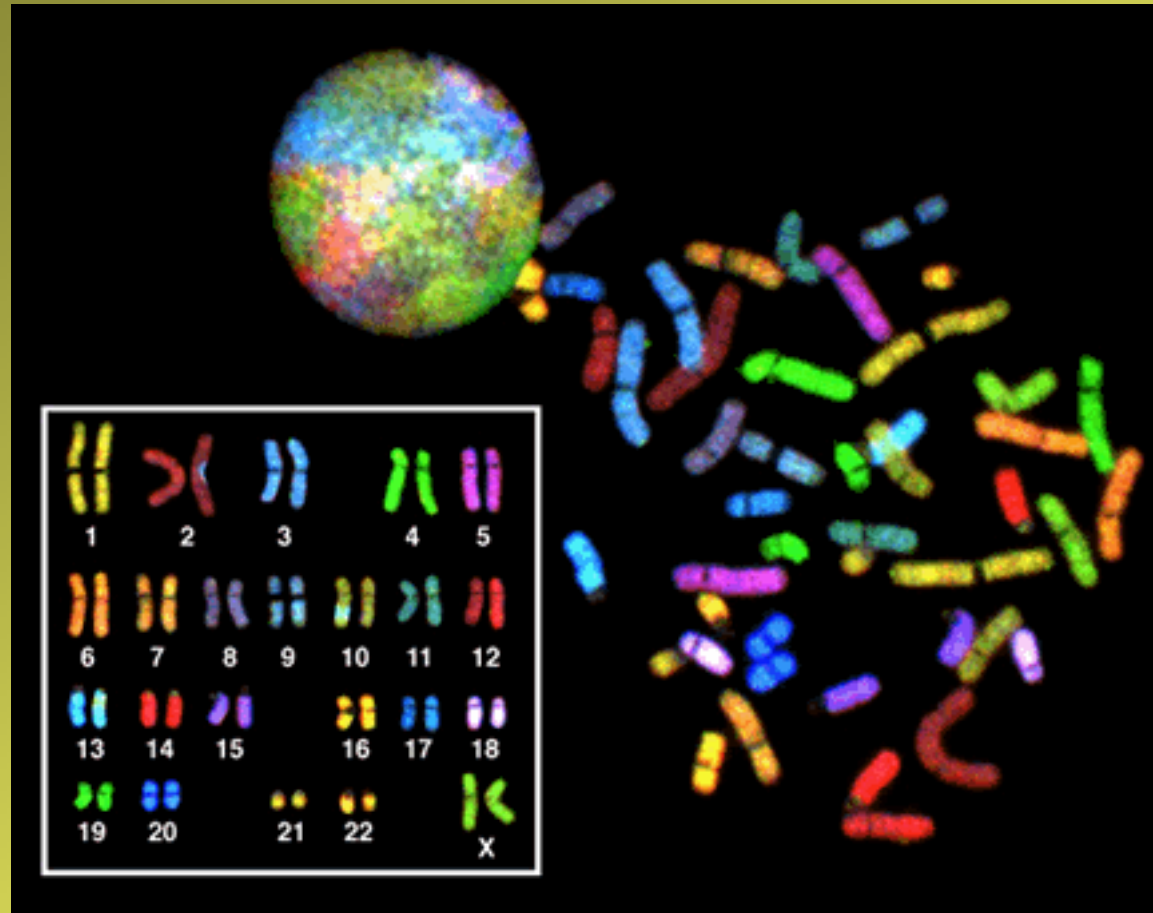
nepřímé značení - sekundární protilátka

Nejčastěji používané látky

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

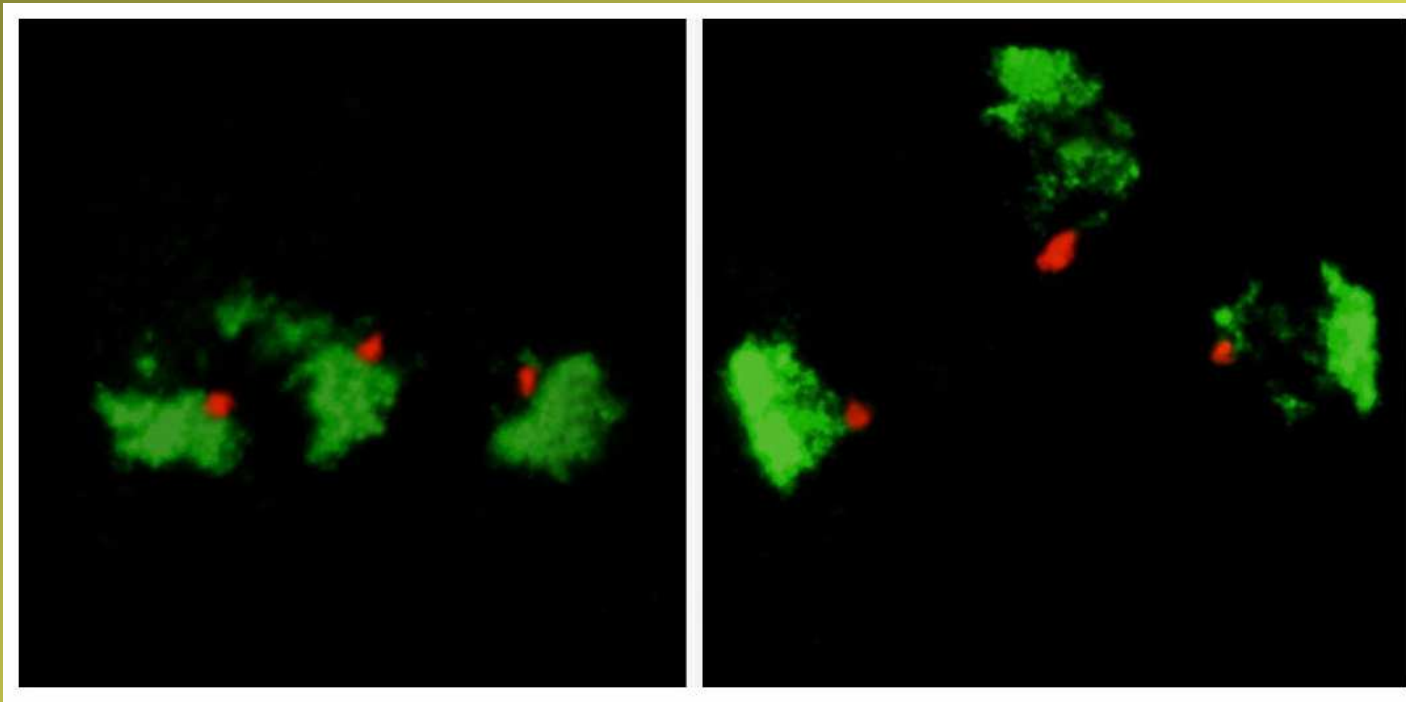


SKY technika



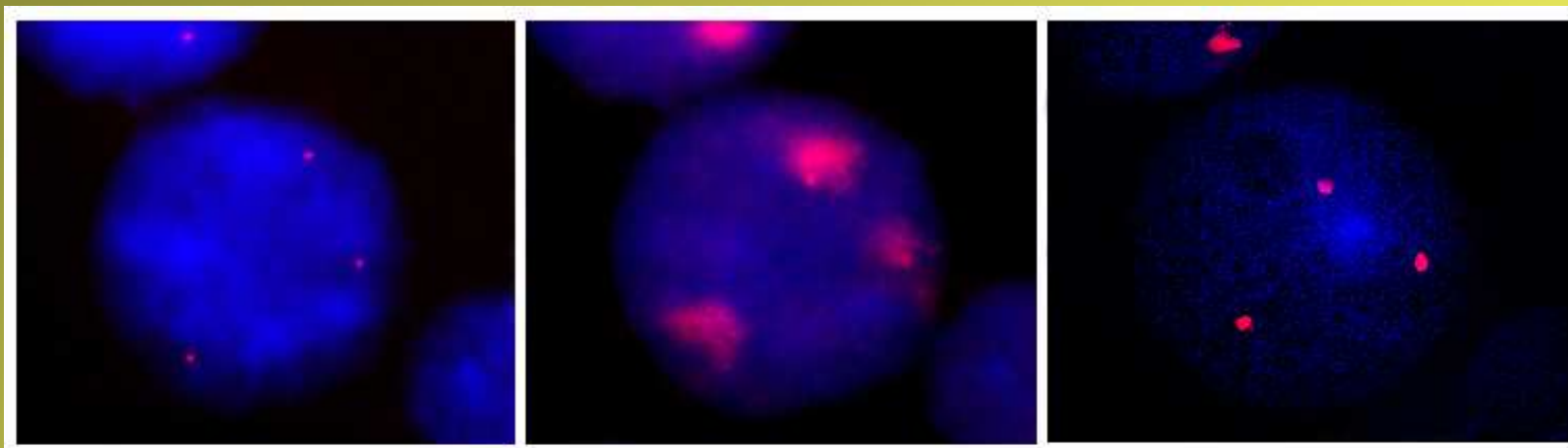
www.genome.gov

Duální barvení



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

Opakovaná DNA/DNA hybridizace

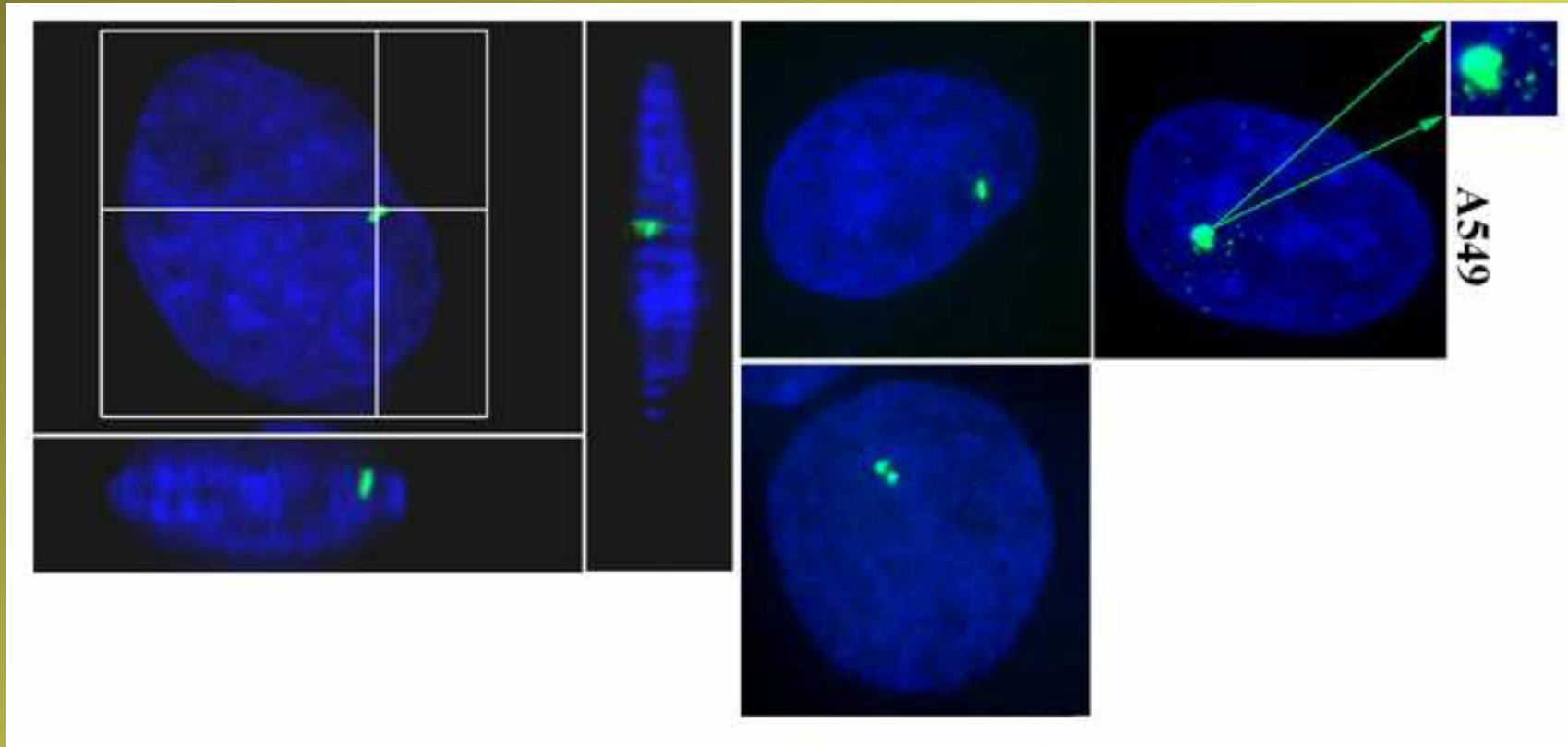


klastr globinových genů

chromozom 11

centromera chromozomu 11

C-myc transcript



Zeiss Axiovert 100 + konfokální jednotka CARV

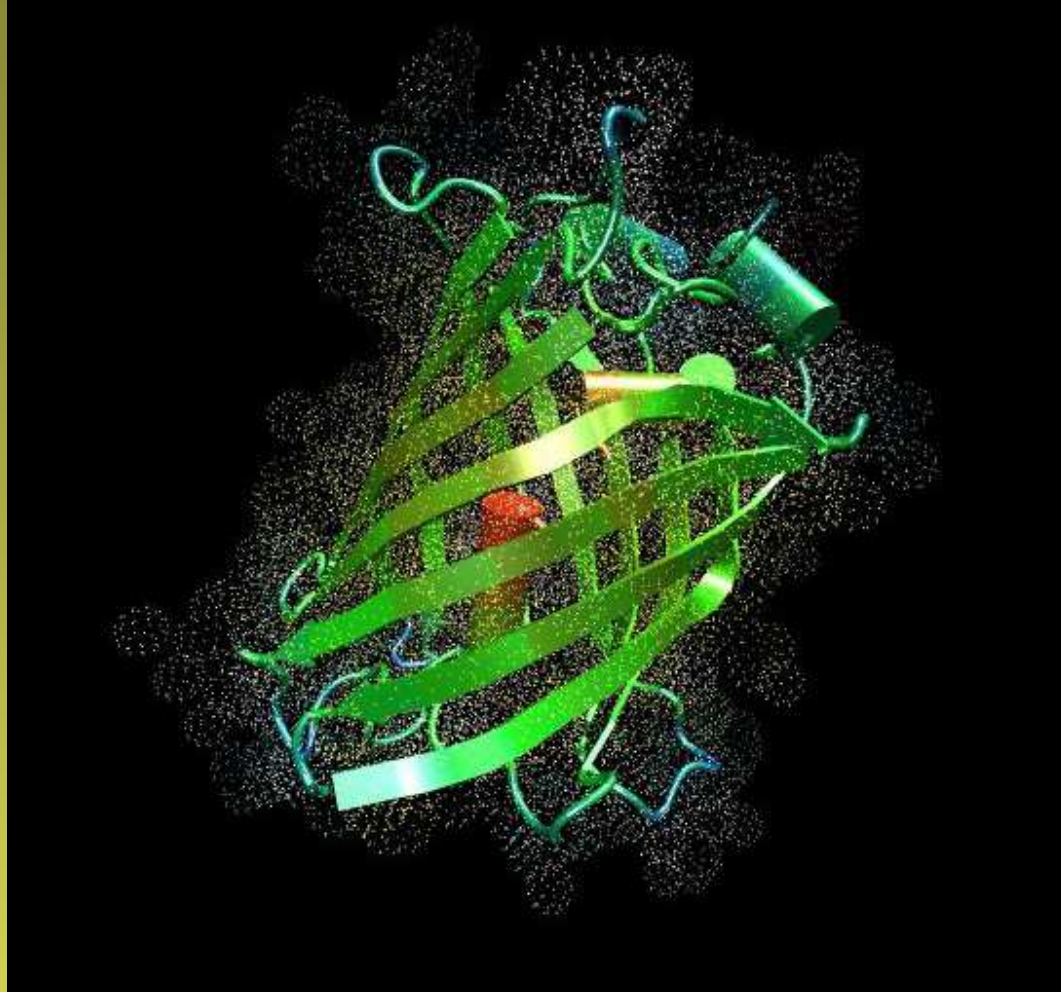


CCD MicroMax

Konfokální jednotka CARV

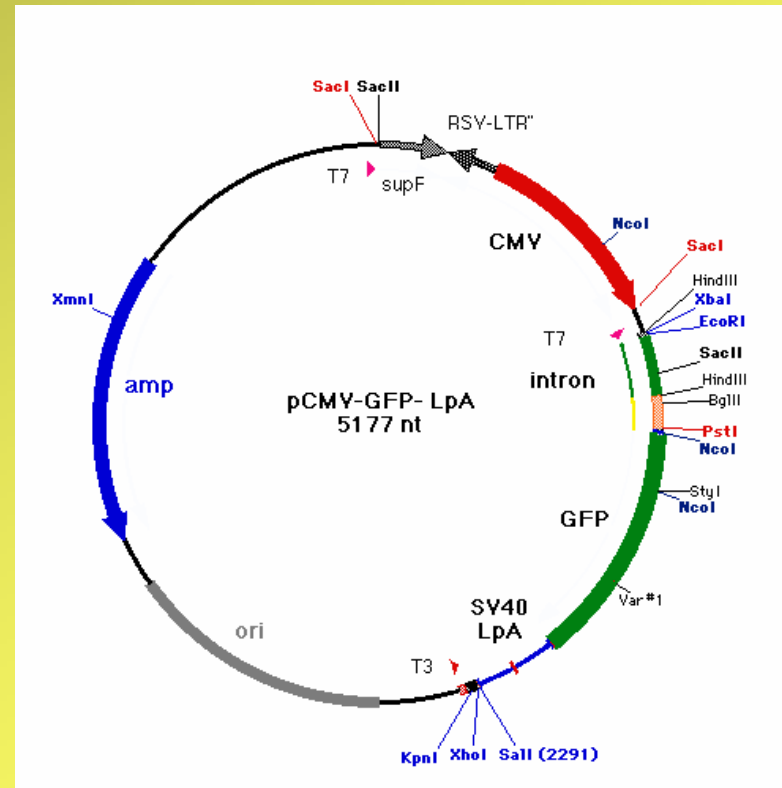
Axiovert 100

GFP

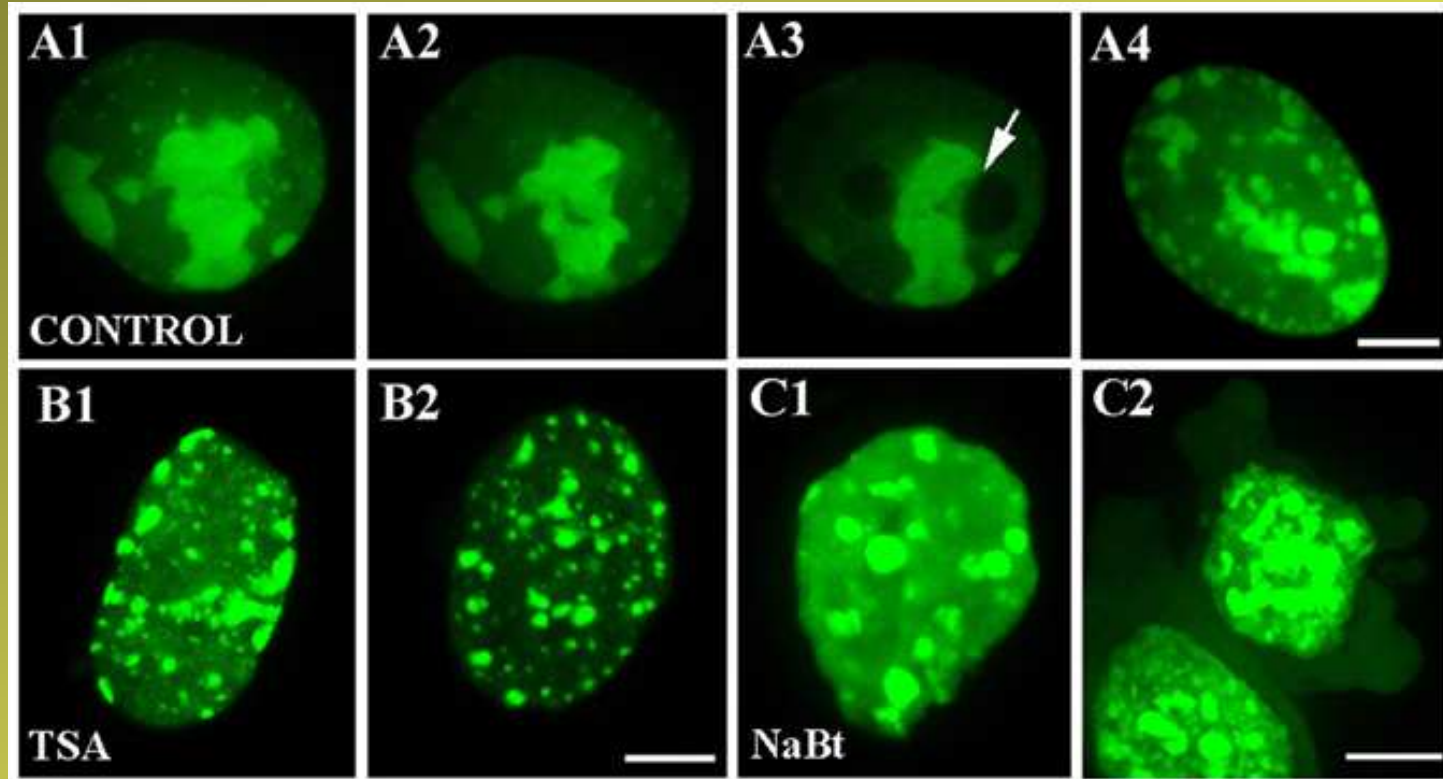




Pacific jellyfish, *Aequoria victoria*

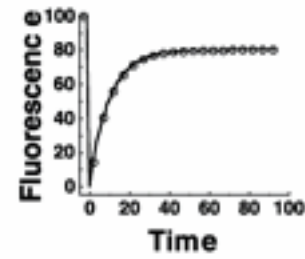
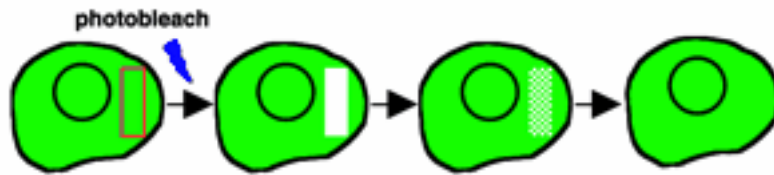


GFP-HP1 beta

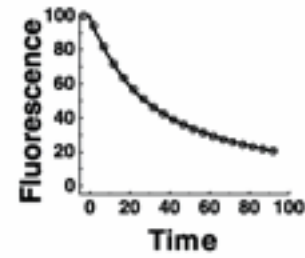
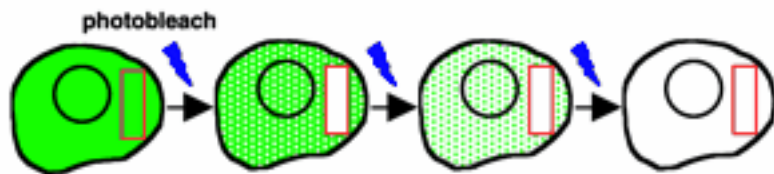




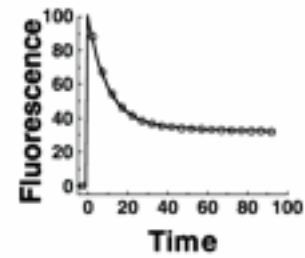
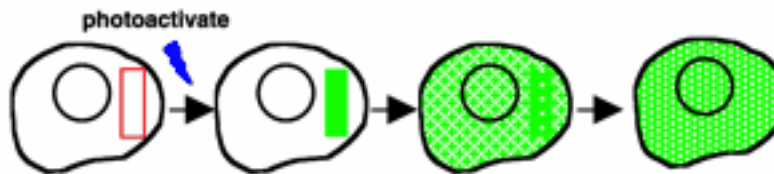
A Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)



B Fluorescence Loss in Photobleaching (FLIP)

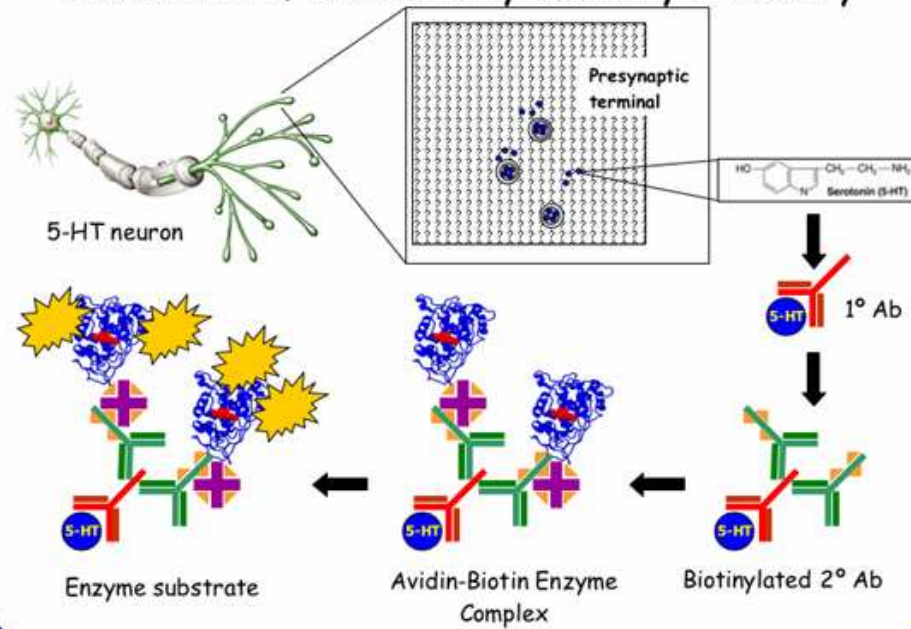


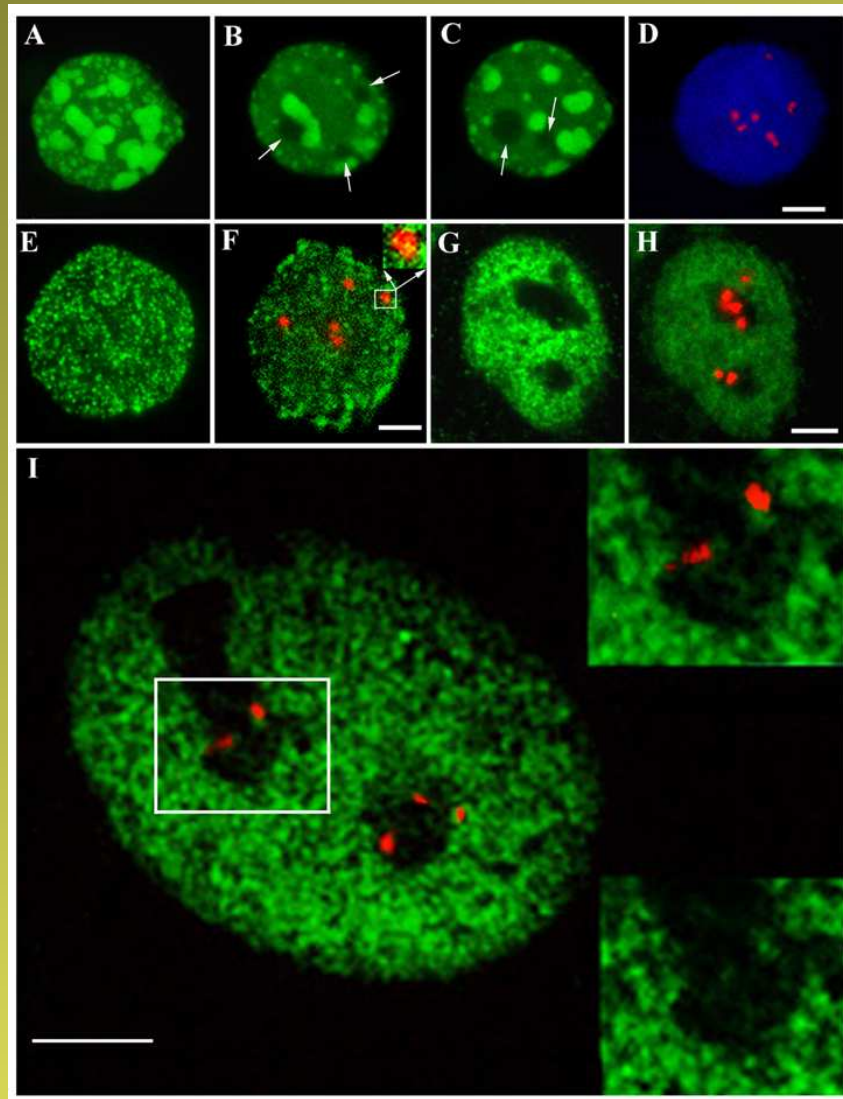
C Photoactivation



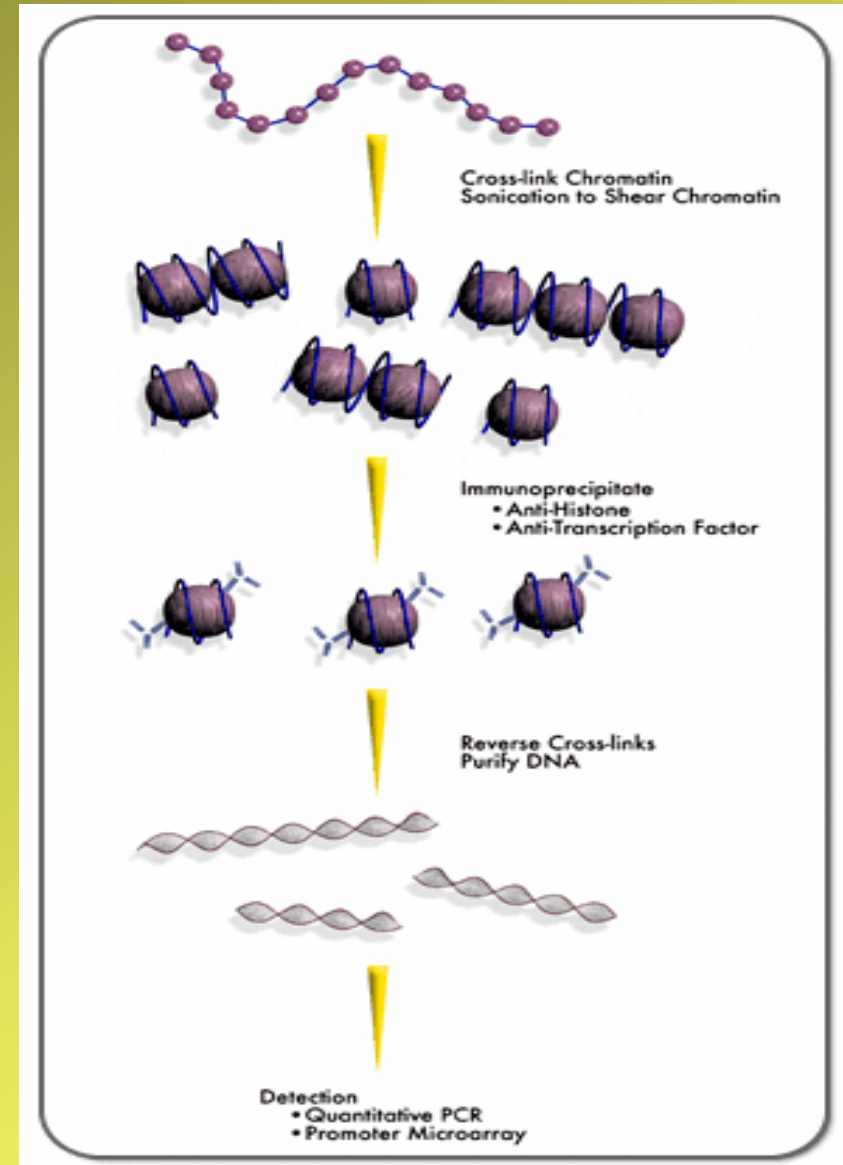
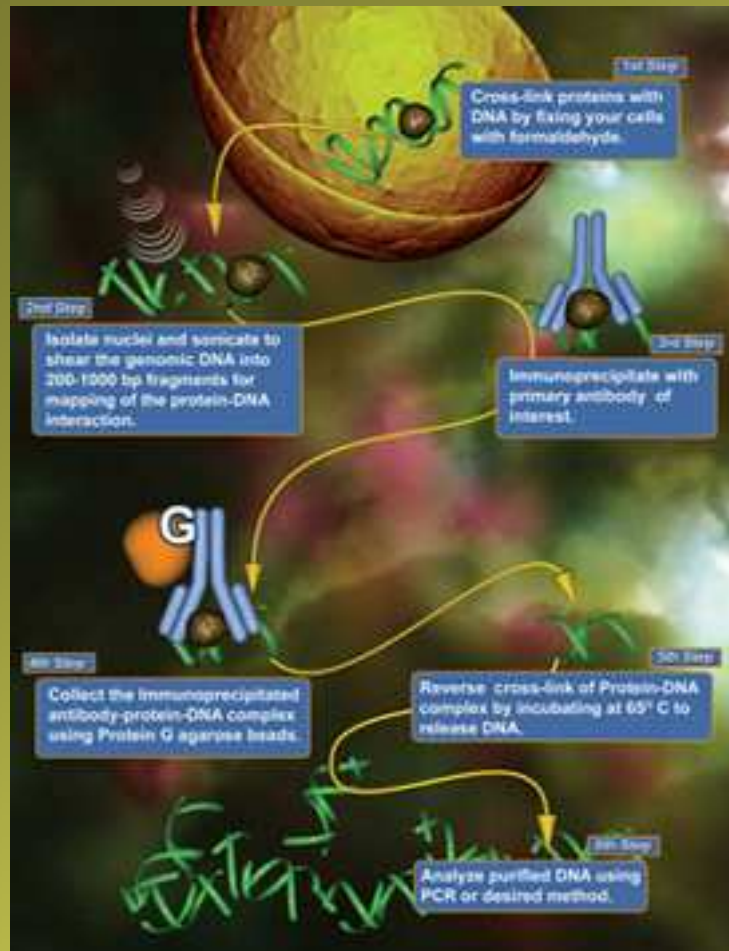
Immunocytochemistry

Visualization of Brain Cells by Immunocytochemistry

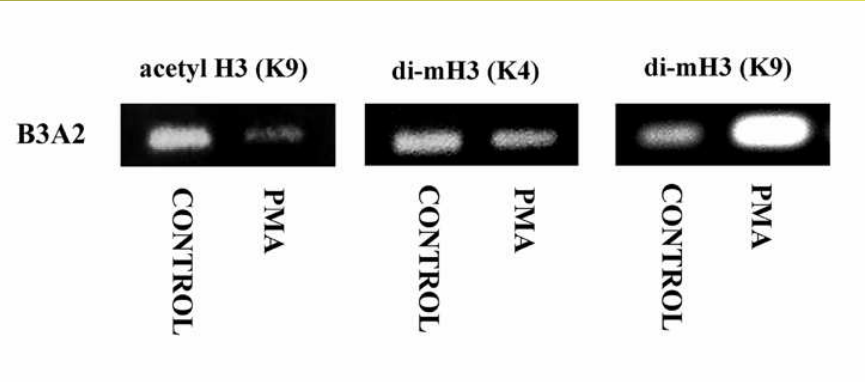
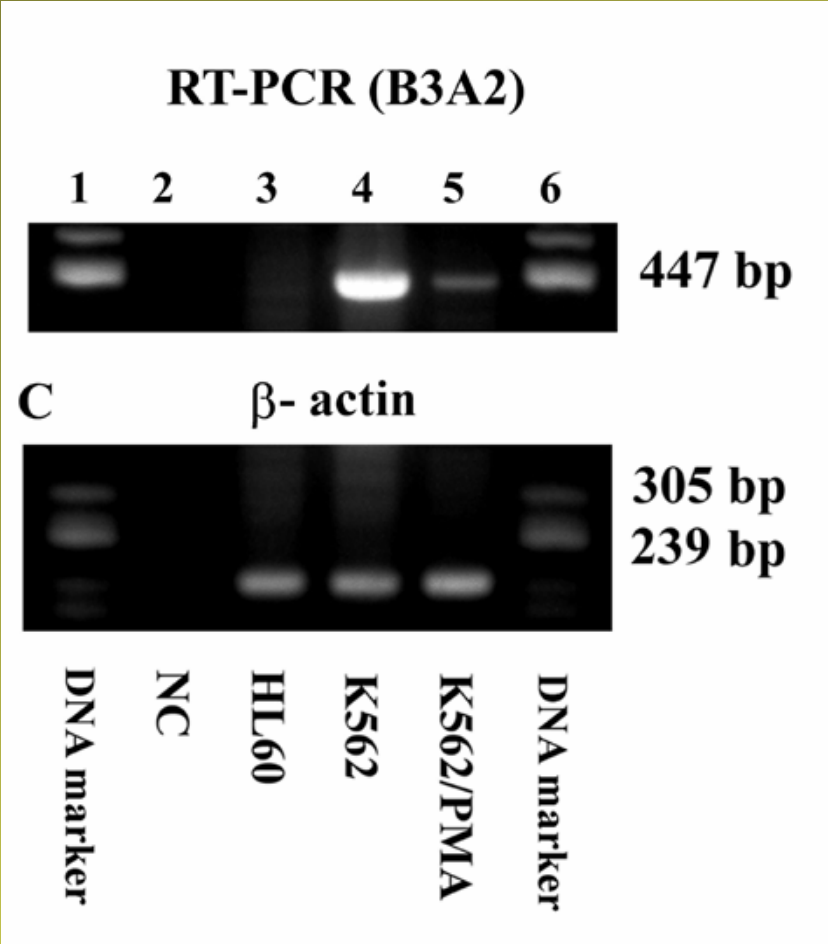




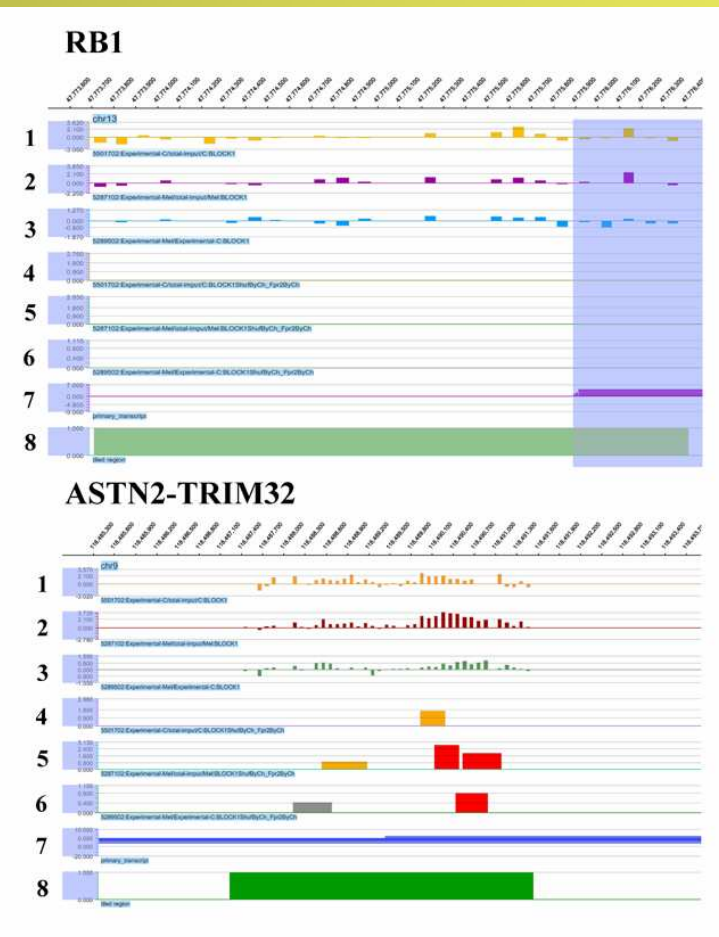
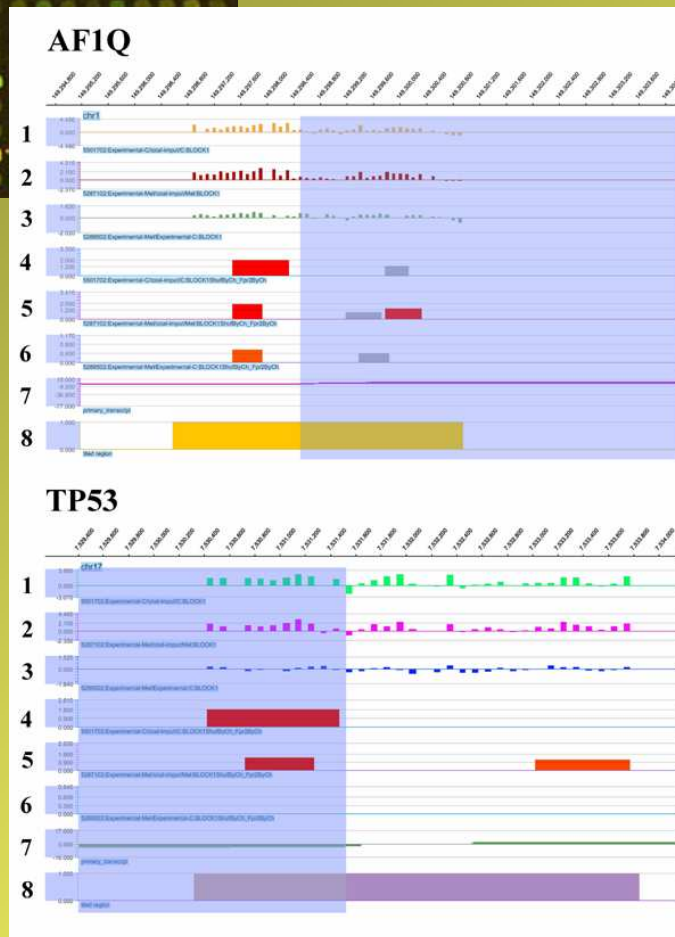
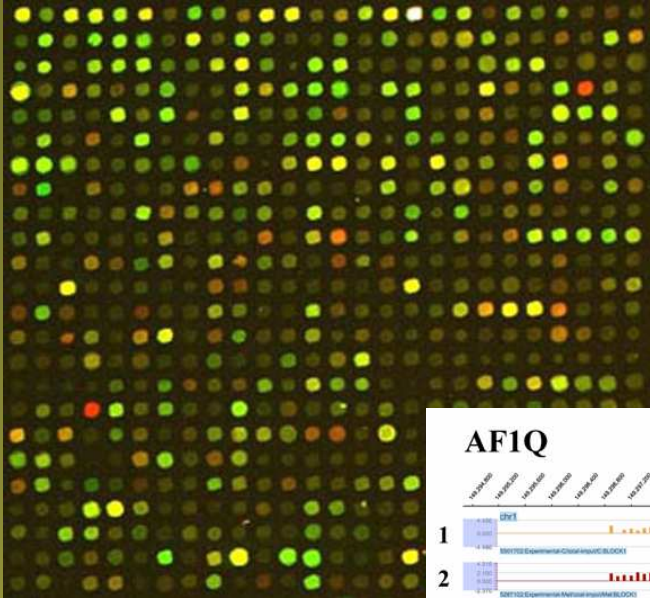
CHIP-PCR

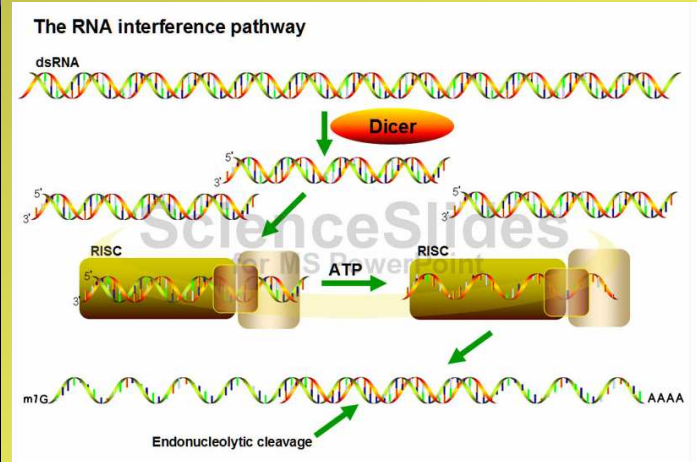
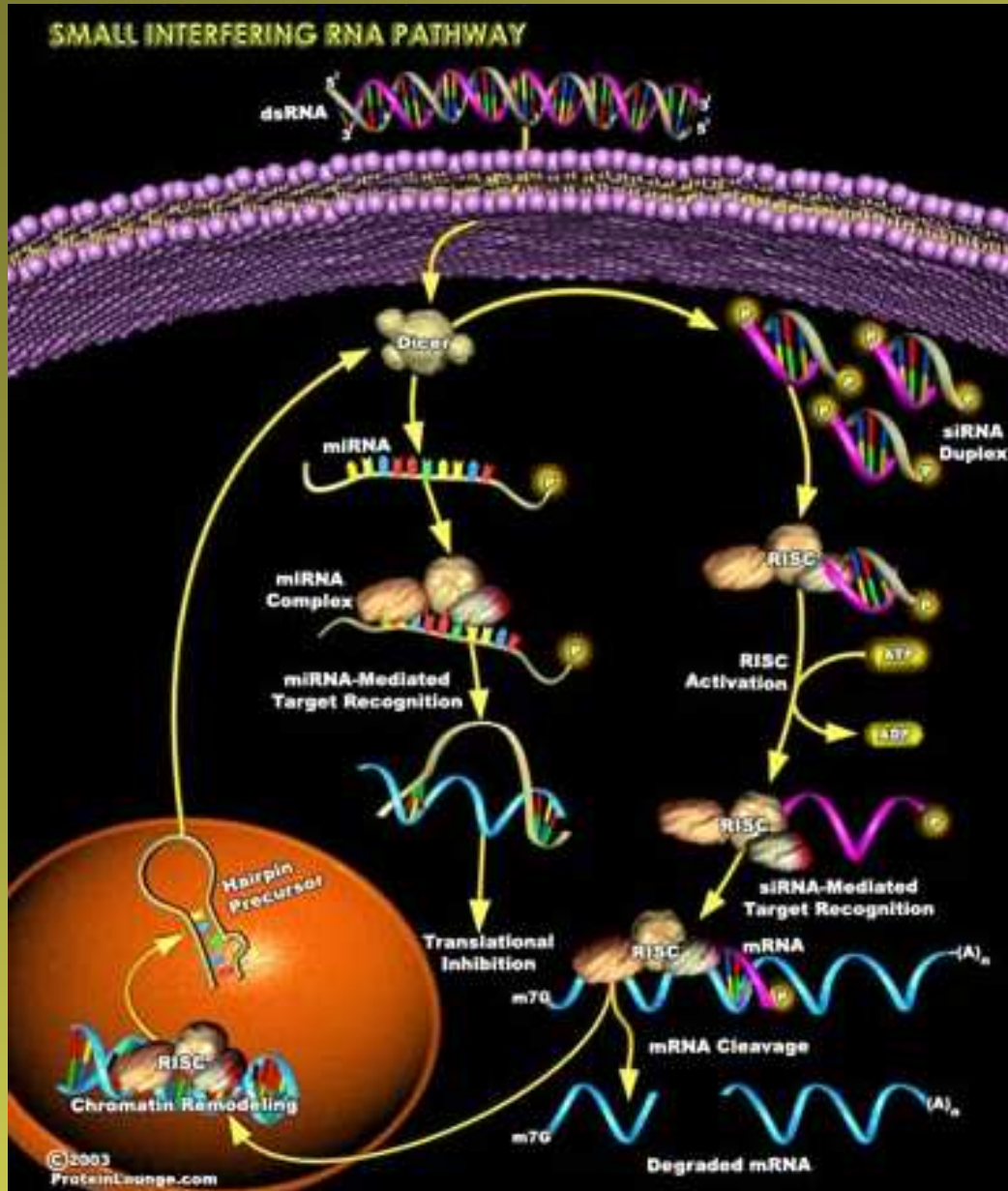


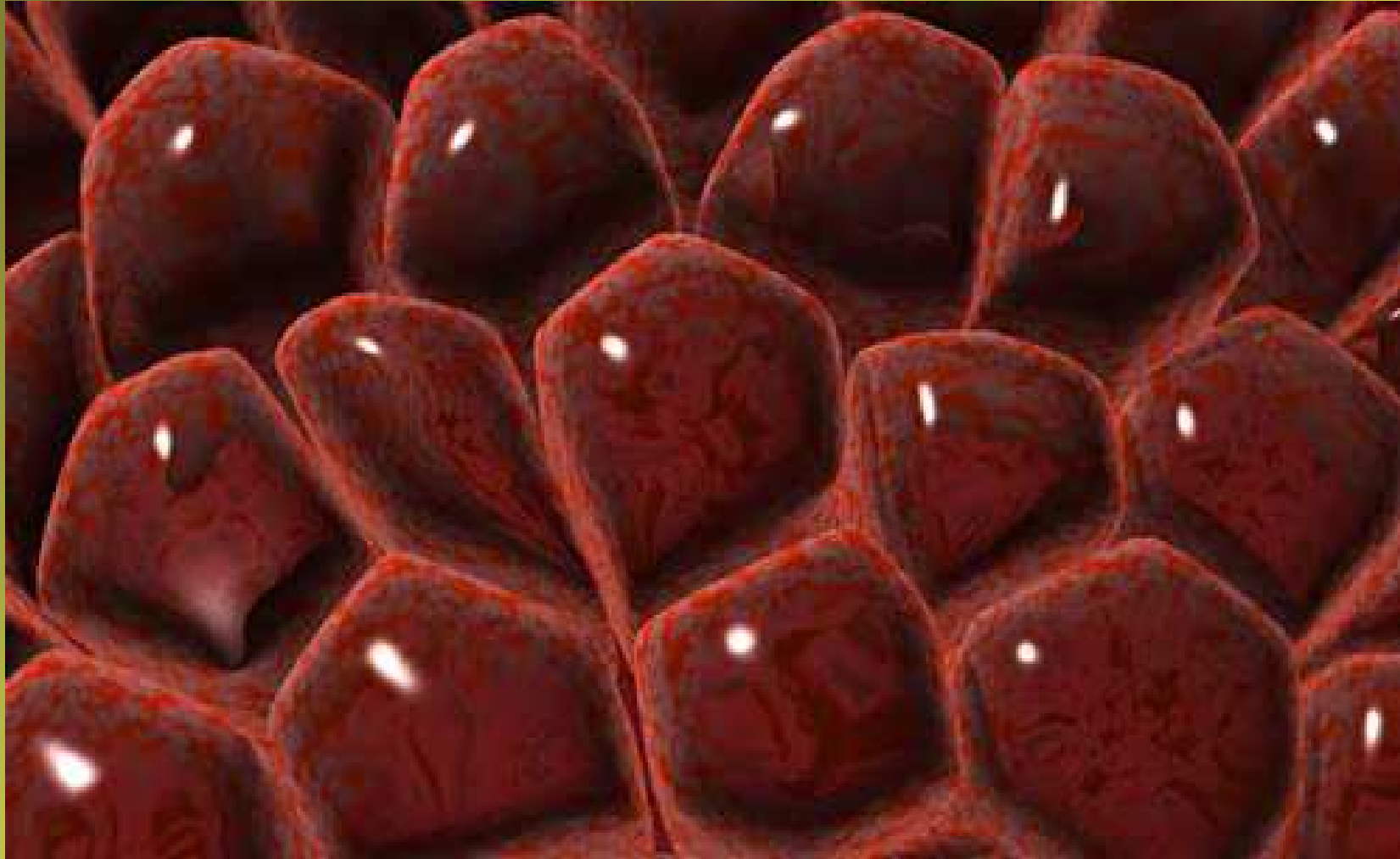
ChIP-PCR



ChIP on chip H3K9 acetylation







i) the dsRNA is initially recognized by an enzyme of the RNase III family of nucleases, named Dicer, and processed into small double-stranded molecules, termed siRNA and (ii) the siRNAs are bound by the RNA-induced silencing complex (RISC-RNA induced silencing complex), which is a multi-protein complex (with RNase activity) that guides the targeted mRNA to degradation

A specific RNAase III enzyme was then found to be responsible for cleaving the dsRNAs and was named Dicer ([Bernstein et al. 2001](#)).

Following the cleavage of dsRNA into siRNAs by Dicer the second important stage of mRNA degradation occurs.

