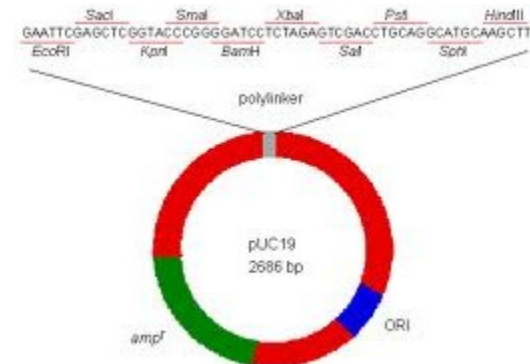
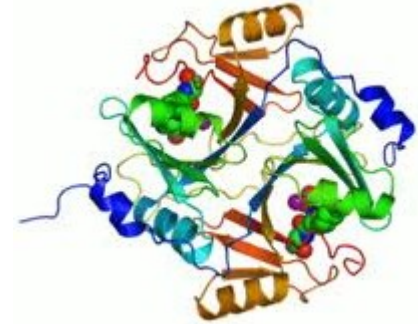


ENZYMY V MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

VEKTORY, KLONOVÁNÍ

ZNAČENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN



RESTRIKČNÍ ENZYMY

Specifická vazba a štěpení dvouvláknové DNA ve specifickém místě.

RE typu I: jeden protein má modifikační (metylační) i restriční aktivitu.
Váže se na rozpoznávací sekvenci, ale štěpí v náhodném místě v okolí.

RE typu III: jeden protein má modifikační (metylační) i restriční aktivitu.
Štěpí v rozpoznávací sekvenci, pak disociuje od substrátu.

RE typu II: restričně modifikační systém – RE štěpí ve specifické sekvenci
metyláza modifikuje v téže sekvenci
Rozpoznávací místo: většinou 4 – 6 nukleotidů, **palindromové sekvence**

RESTRIKČNÍ ENZYMY

NOMENKLATURA:

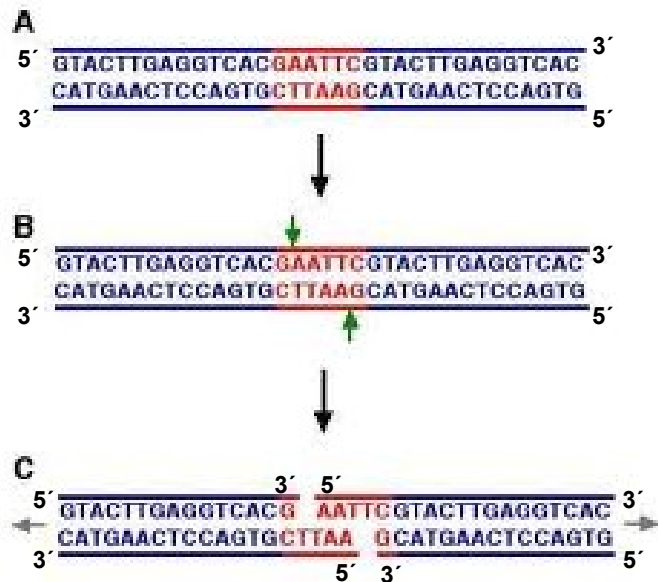
EcoRI

ZKRATKA	VÝZNAM	POPIS
E	Escherichia	rod
CO	coli	druh
R	RY13	kmen
I	první	pořadí, ve kterém byla RE identifikována v dané bakterii

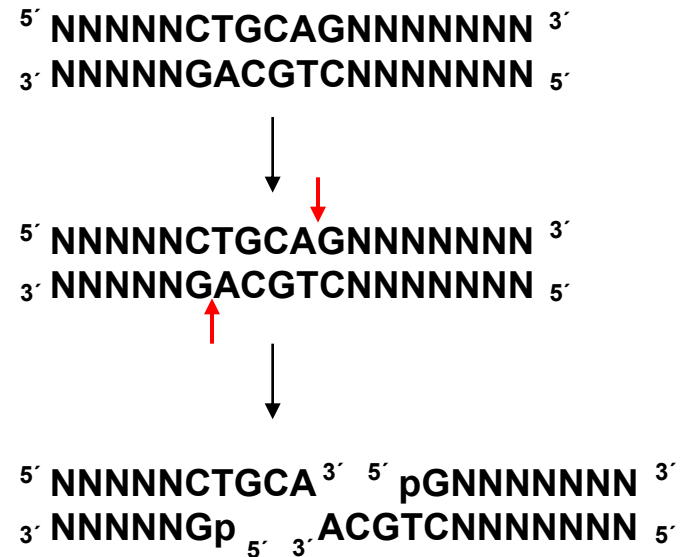
RESTRIKČNÍ ENZYMY

- vznik kohezních konců

EcoRI (GAATTC) – 5'kohezní konce



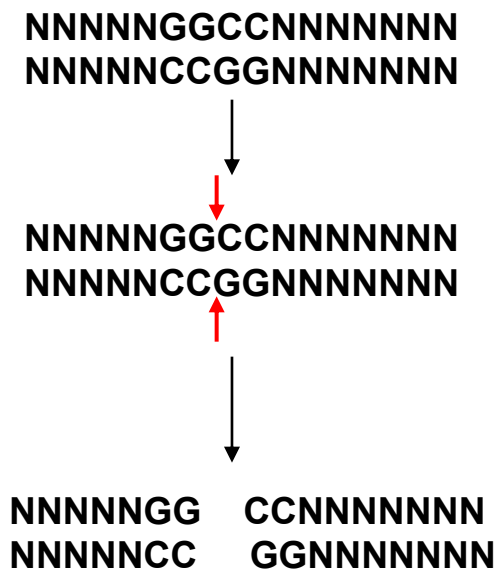
PstI (CTGCAG) – 3'kohezní konce



RESTRIKČNÍ ENZYMY

- vznik tupých konců

*Hae*III (GGCC):



MOLEKULÁRNÍ KLONOVÁNÍ

METYLAČNĚ – RESTRIKČNÍ SYSTÉM

Bakteriální obranný mechanismus, bakteriální genomová DNA není systémem rozpoznávána

Specifické metylační systémy v *E. coli*:

- *dam* - metylace ⁶N adeninu v sekvenci **GATC**
role v opravných procesech, replikace DNA, exprese genů
 - Bam*HI – GGATCC + (*Bacillus amyloli*)
 - Bcl*I – TGATCA - (*Bacillus caldolyticus*)
 - Mbo*I – GATC -
 - Sau*3AI – GATC +
- *dcm* - metylace vnitřního cytozinu (⁵C) v sekvenci **CCAGG**, **CCTGG**
 - Eco*RII -
 - Bst*NI +
- *Eco*KI – metylace adeninů AAC(N)₆GTGC, GCAC(N)₆GTT

DNA (plasmidová) namnožená a izolovaná z kmene *E. coli* *dam*⁺ je rezistentní ke štěpení restriční endonukleázou *Mbo*I

Klonováním zmizí původní metylační obraz;
při použití *dam*⁺ a *dcm*⁺ kmenů mají
klony metylaci v místech specifických pro daný kmen

Odbočka – metylace DNA

Distribuce metylace v eukaryotických genomech:

Metylace C v symetrických sekvencích

- CpG (dublety)
- CpNpG (triplety; rostliny)

Metylace C v asymetrických sekvencích

(rostliny, omezeně u živočichů)

METYLAČNĚ CITLIVÉ RE

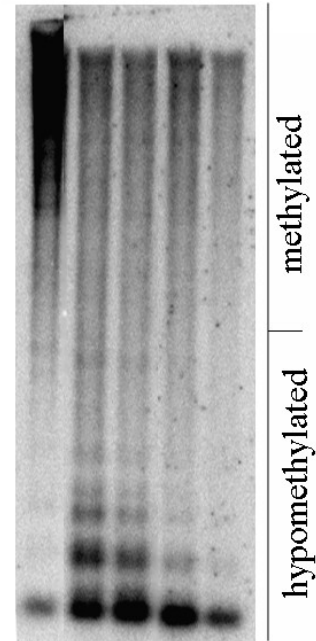
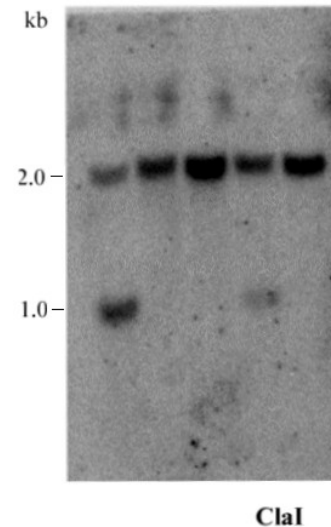
v rozpoznávací sekvenci mají cytosin,
(ne)štěpí, pokud je metylován

CG:	<i>HpaII</i>	mC^mCGG
	<i>CfoI</i>	G^mCGC
	<i>SmaI</i>	CC^mCGGG
	<i>TaqI</i>	A^mCGT
	<i>ClaI</i>	AT^mCGAT

CNG: *MspI* $mCCGG$

CHH: *Sau96I* $GG(A/T)^mC^mC$

(záleží na tom, co v sekvenci následuje)



DNA POLYMERÁZY

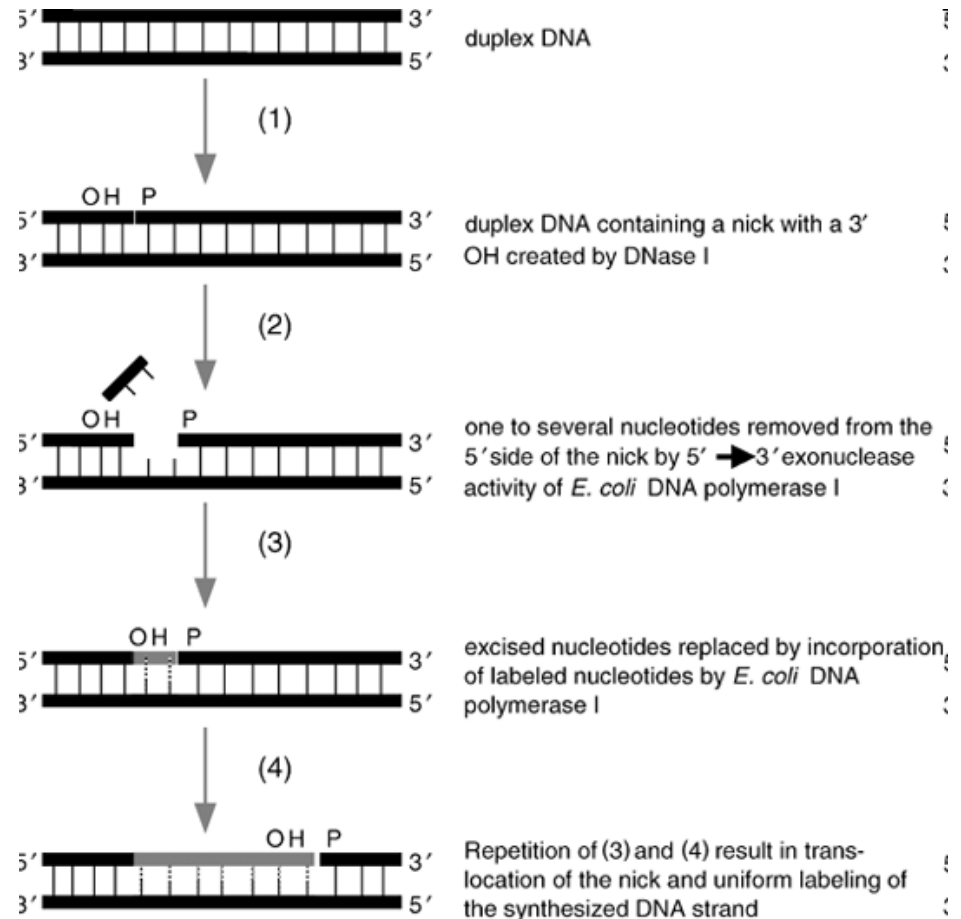
E. coli DNA polymerase I:

5' → 3' polymeráza

5' → 3' exonukleáza !!!

3' → 5' exonukleáza

Značení DNA „nick translation“:

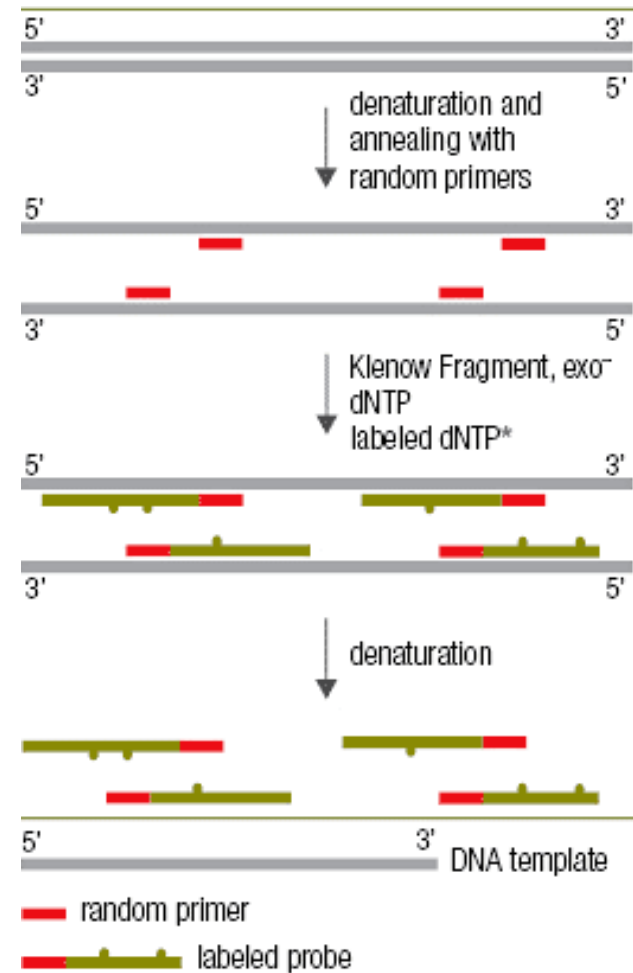


DNA POLYMERÁZY

Klenow fragment:

5' → 3' polymeráza
3' → 5' exonukleáza

Značení DNA „random priming“:



DNA POLYMERÁZY

Termostabilní DNA polymerázy:

Taq DNA polymerase (*Thermus aquaticus*)

Optimální reakční teplota 72 – 80 °C

Polymerázová řetězová reakce (Lekce 4)

Reverzní transkriptáza

RNA-dependentní DNA polymeráza

MuLV (Moloney murine leukemia virus)

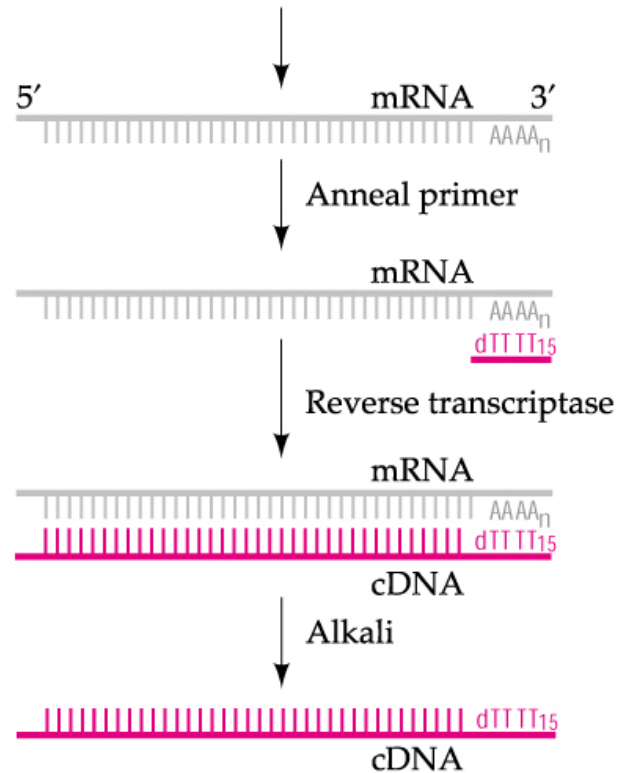
AMV (avian myeloblastosis virus)

} Při teplotě 37 – 42 C

„SuperScript“: vyšší teploty

bez RNaseH aktivity

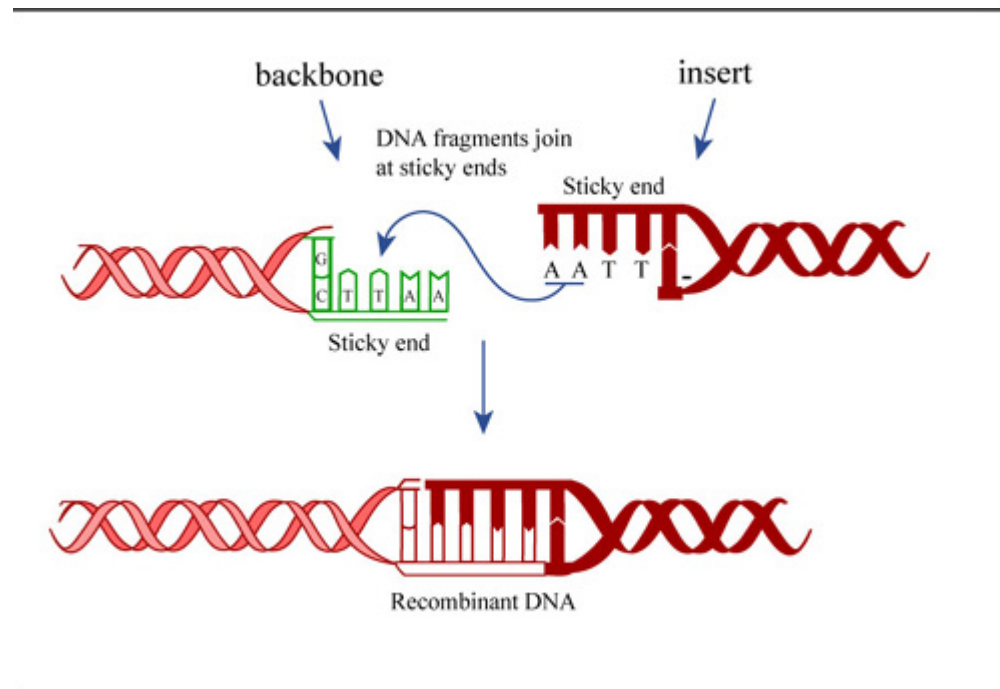
(detaily – Lekce 4)



DNA ligázy

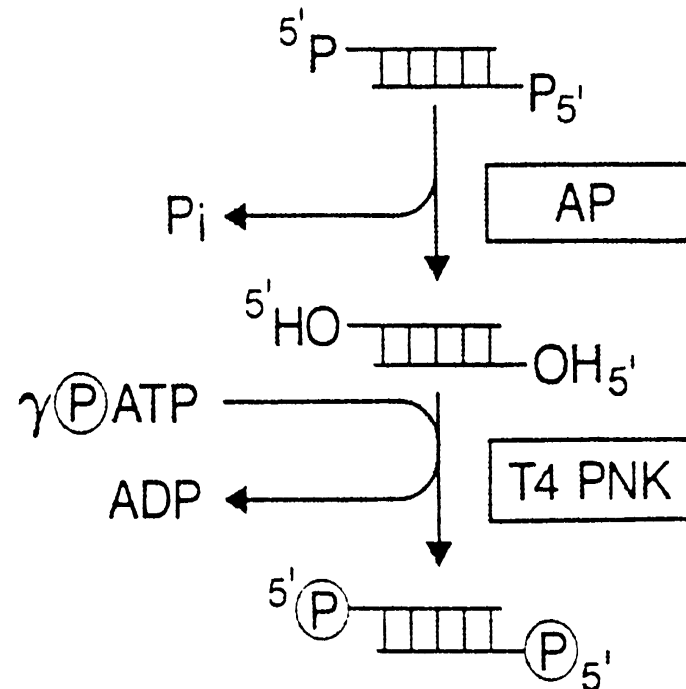
Bacteriophage T4 DNA ligase:
spojuje kohezní i tupé konce

E. coli DNA ligase:
spojuje kohezní konce



T4 polynucleotidyl kinase:

Přenos fosfátu z ATP (v poloze γ) na 5'konec DNA (defosforylovaný templát)
koncové značení DNA (end labelling)



Alkalická fosfatáza:

Odstranění $5'P$ (před koncovým značením; zabránění self-ligaci vektorů)
bakteriální alkalická fosfatáza (BAP)
calf intestinal phosphatase (CIF)

NUKLEÁZY

Bal31 nuclease: štěpí 3' a 5' konce v dsDNA, AT-bohaté oblasti rychleji
endonukleáza – ss úseky v dsDNA (niky, mezery)
Identifikace terminálních sekvencí (telomer)
Mapování pozice restričních míst v kratších fragmentech DNA

Nuclease S1: štěpí ssDNA (RNA), nespecif. endo- a exonukleolytické štěpení
nízké pH (4.5) – depurinace, limitace použití
Odstranění jednovláknových přesahů
Otevření vlásenkových smyček

Mung Bean Nuclease: štěpí ssDNA („jemnější“ ve srovnání s S1)
Odstranění jednovláknových přesahů

Nuclease P1: štěpí ssDNA a RNA, nespecif. endo- a exonukleolytické štěpení
nedegraduje dsDNA

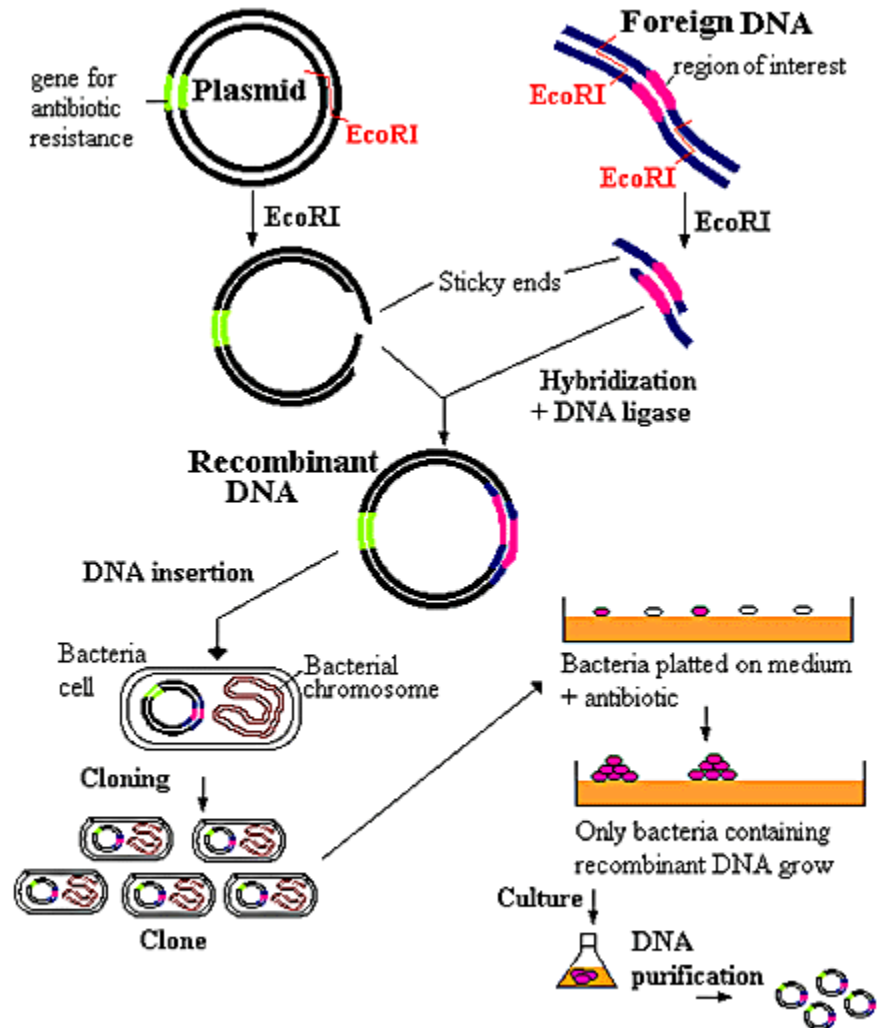
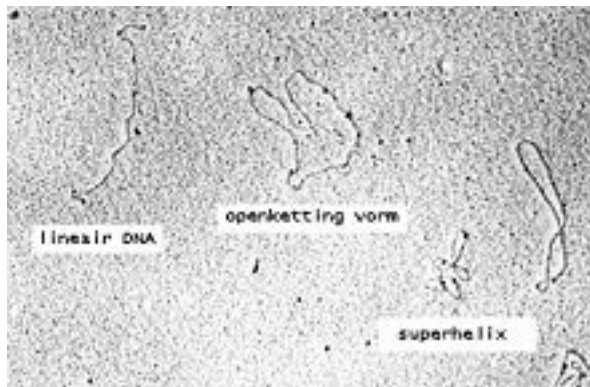
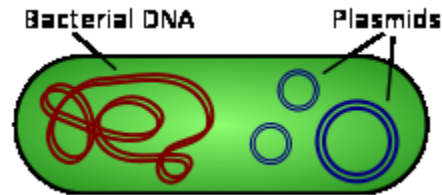
Exonuclease III: štěpí 3' OH konce dsDNA, neštěpí ssDNA (3' přesahy
delší než 4 nt jsou rezistentní)

NUKLEÁZY

RNase A: endoribonukleáza, štěpí ssRNA po Py
nepotřebuje kofaktory a kationty
purifikace preparátů DNA
mapování jednobázových mutací v DNA

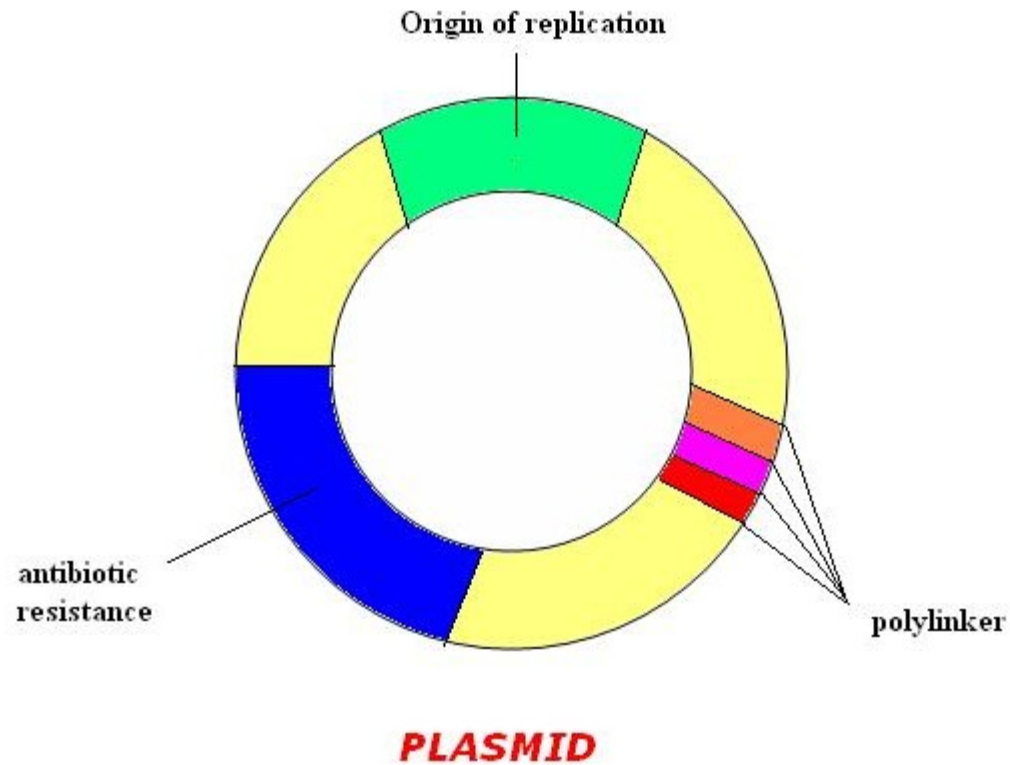
DNase I: endonukleáza, štěpí dsDNA i ssDNA po Py
zavedení náhodných nicků do DNA (značení nick translací)
mapování interakcí DNA – protein (DNA footprinting)

VEKTORY - PLASMIDY

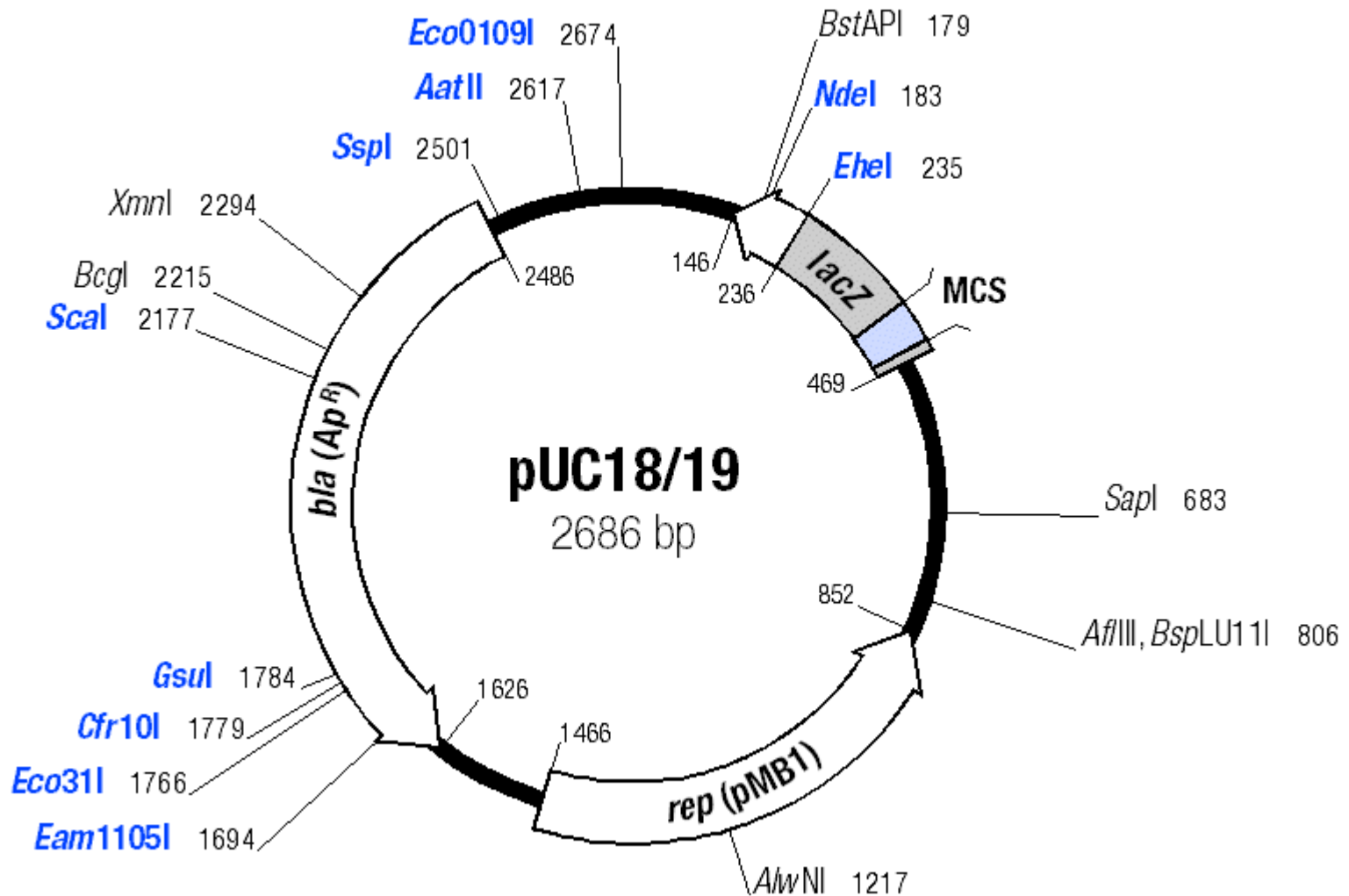


Cloning into a plasmid

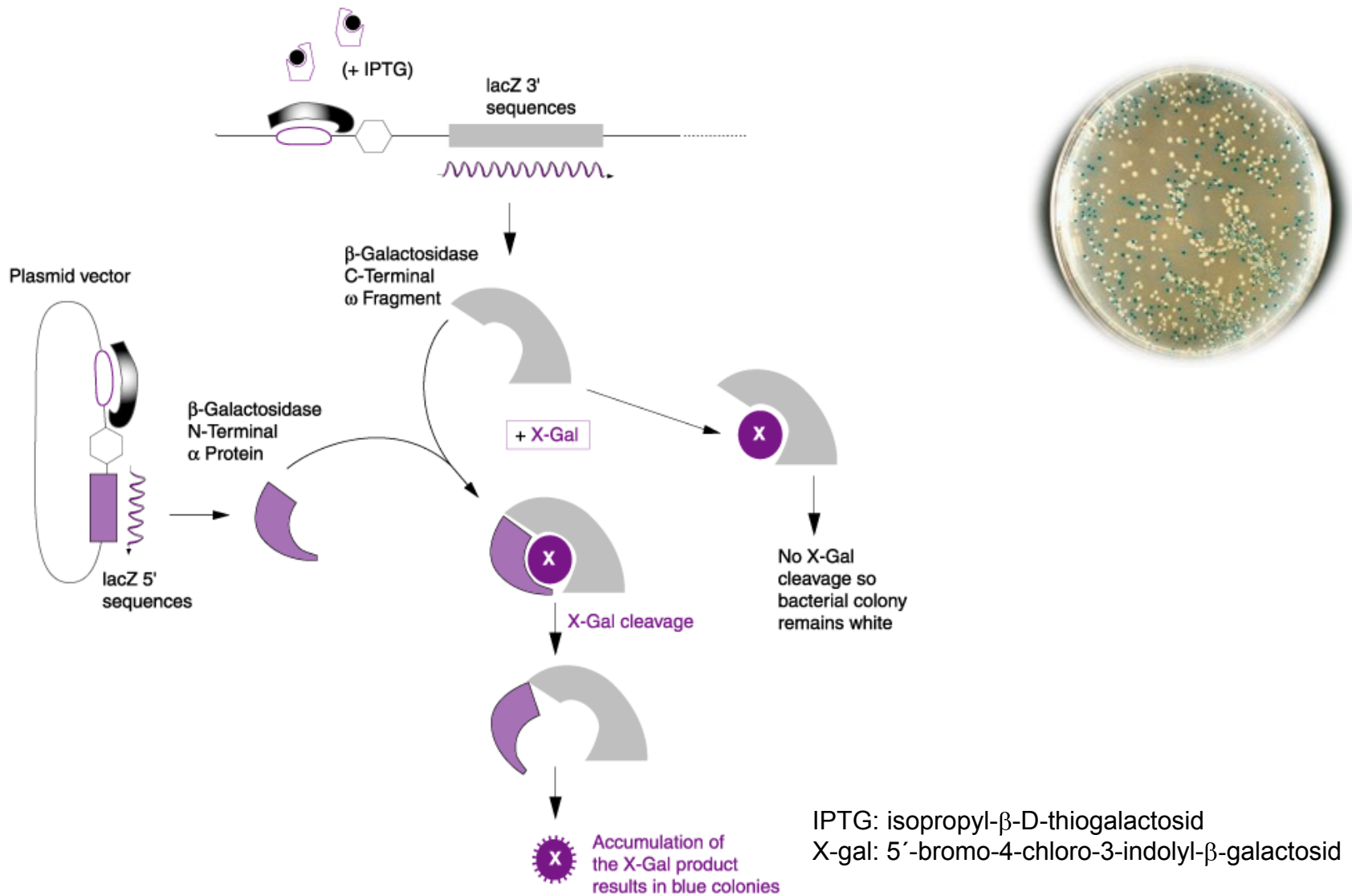
VEKTORY - PLASMIDY



VEKTORY - PLASMIDY



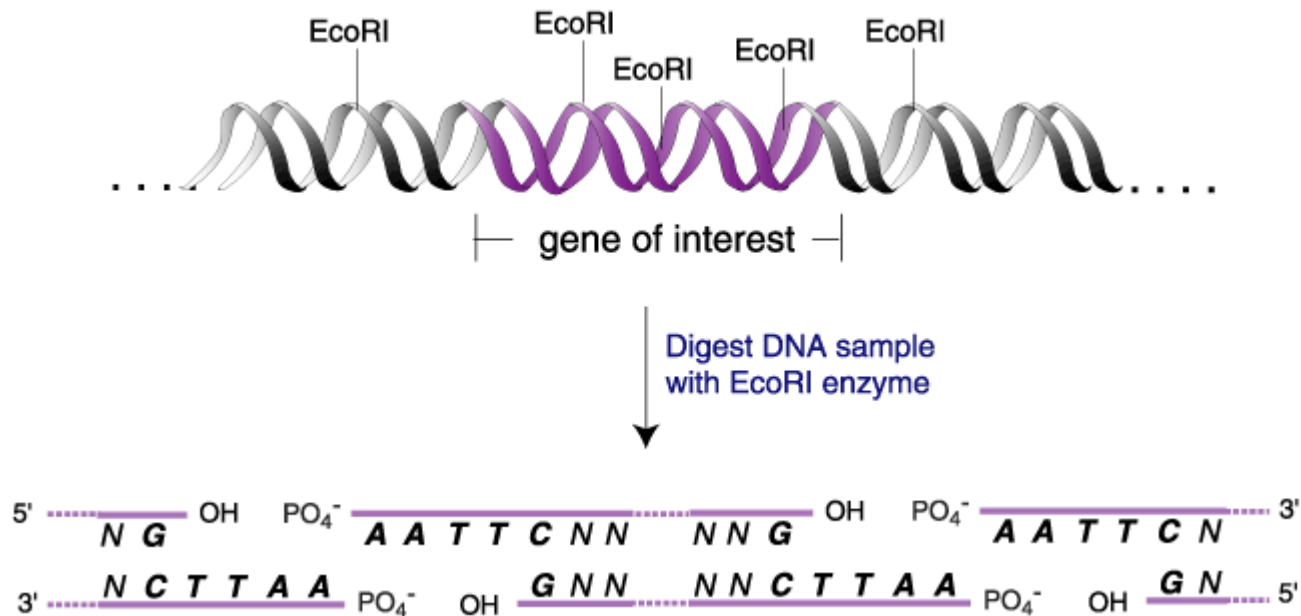
VEKTORY - PLASMIDY



IPTG: isopropyl-β-D-thiogalactosid
X-gal: 5'-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactosid

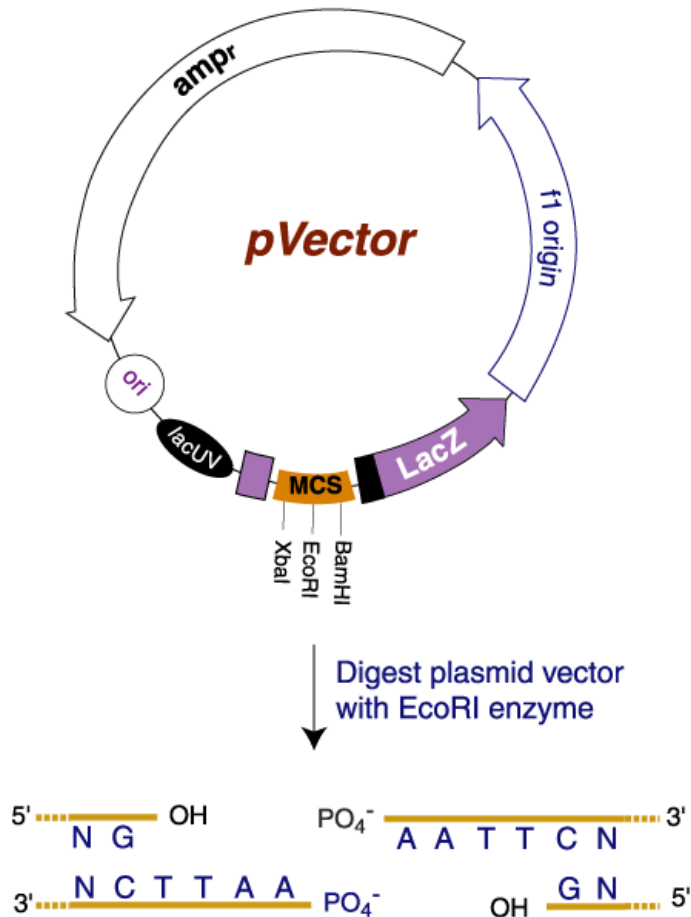
KLONOVÁNÍ – PLASMIDOVÝ VEKTOR

1. Digesce DNA restrikční endonukleázou

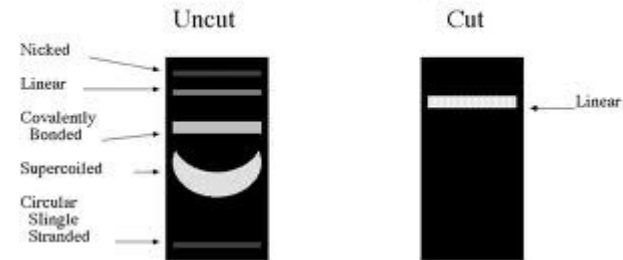


KLONOVÁNÍ – PLASMIDOVÝ VEKTOR

2. Digestce plasmidu restriktivní endonukleázou



Relative Positions of Different DNA Forms of a Plasmid on a Tris-Acetate Agarose Gel

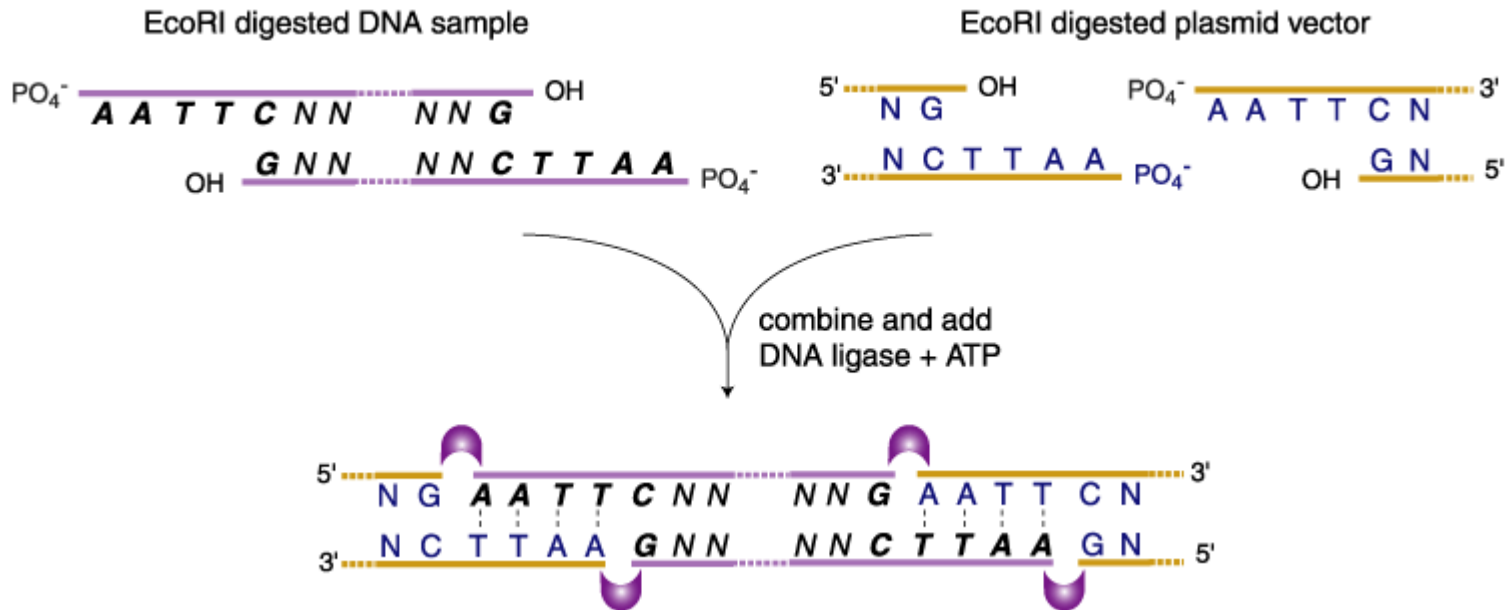


http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/

Fosfatázování linearizovaného plasmidu (BAP, CIP) – zabrání recirkularizaci

KLONOVÁNÍ – PLASMIDOVÝ VEKTOR

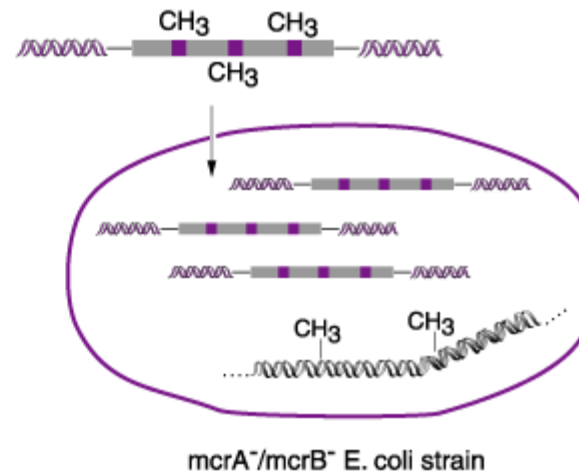
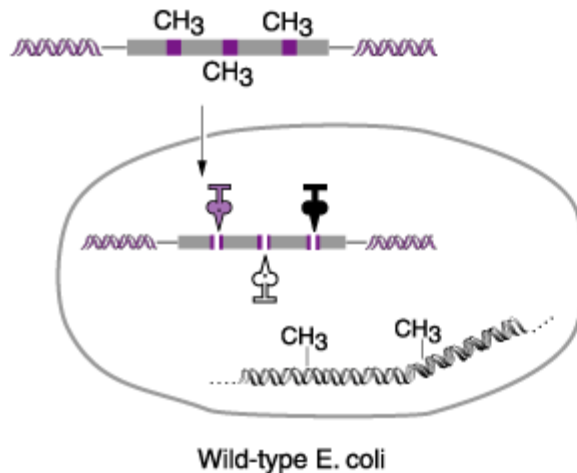
3. Ligace – štěpená DNA + štěpený plasmid



KLONOVÁNÍ – PLASMIDOVÝ VEKTOR

4. Transformace bakterií rekombinantním plasmidem

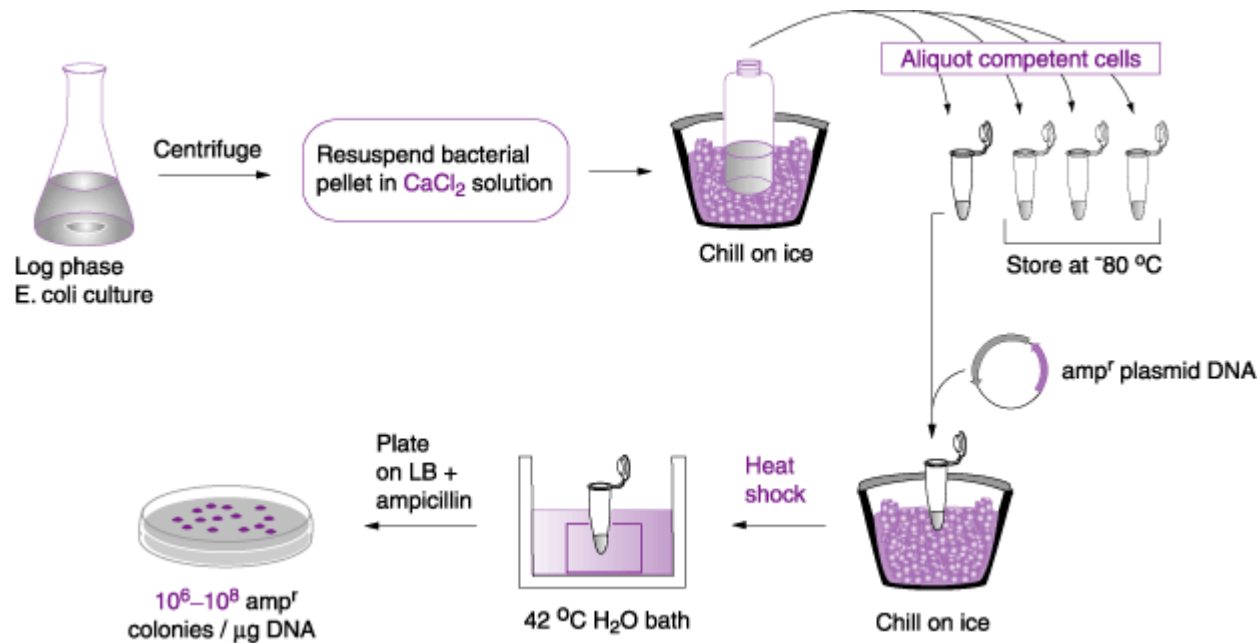
Bakteriální kmen K12: odstraněn metylačně-závislý restriční systém
mutace v genu *recA* (prevence nežádoucích přestaveb)
mutace v genu *endA* (kóduje DNA specif. endonukleázu
- zvýšení výtěžku plasmidu a kvality izolované DNA)



KLONOVÁNÍ – PLASMIDOVÝ VEKTOR

4. Transformace bakterií rekombinantním plasmidem

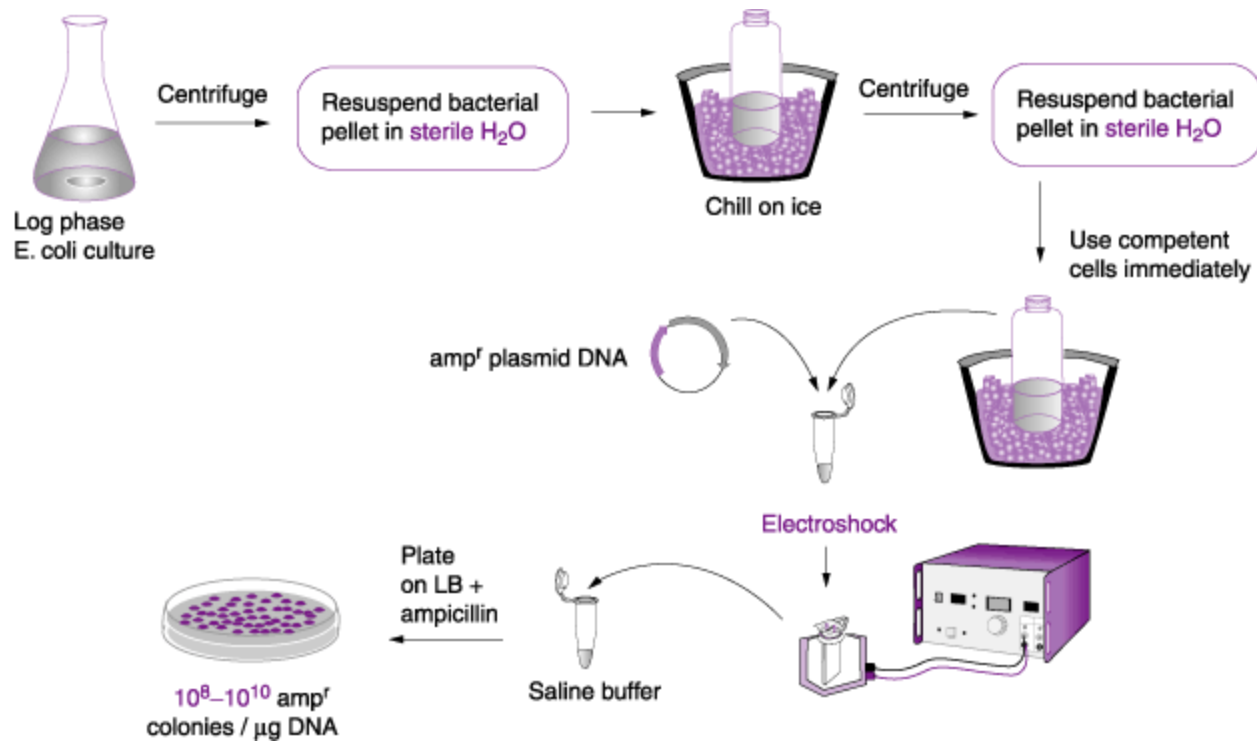
Chemicky kompetentní buňky



KLONOVÁNÍ – PLASMIDOVÝ VEKTOR

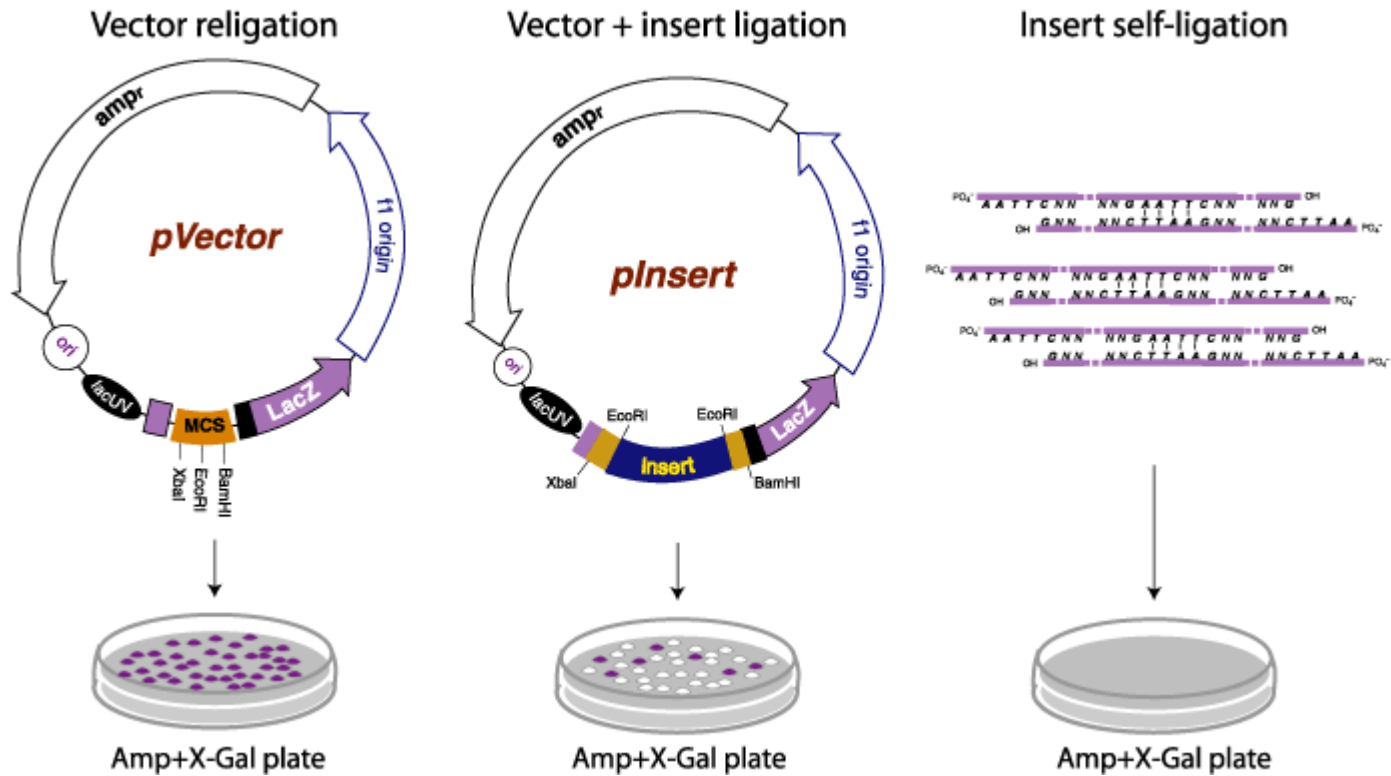
4. Transformace bakterií rekombinantním plasmidem

Elektroporace



KLONOVÁNÍ – PLASMIDOVÝ VEKTOR

5. Růst bakterií na miskách s agarovým médiem, selekce pozitivních klonů



KLONOVÁNÍ – PLASMIDOVÝ VEKTOR

Plasmidy s promotory z bakteriofágů: T3, T7, SP6

přilehlé ke klonovacímu místu

in vitro transkripce inzertu z linearizovaného plasmidu

Plasmidové expresní vektory: silný promotor

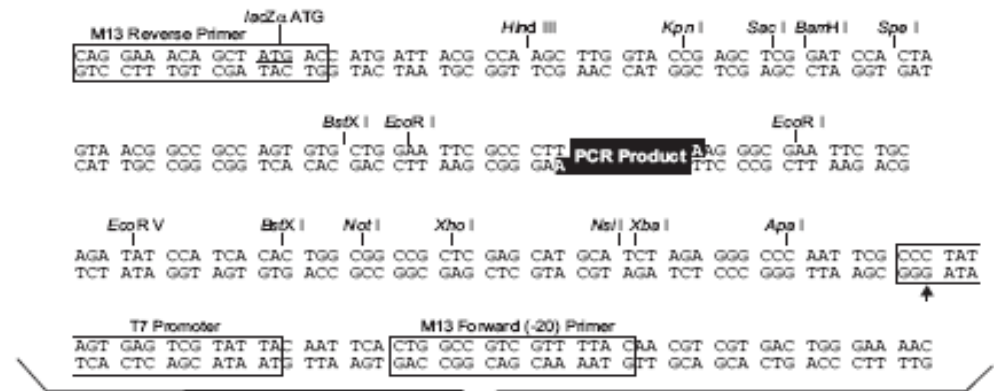
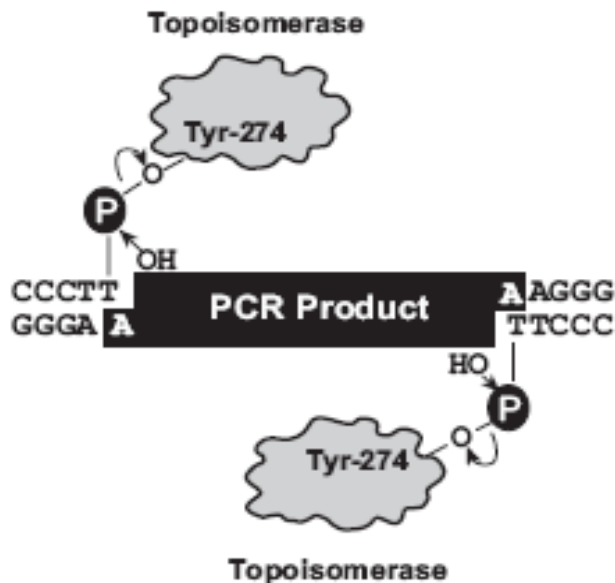
Plasmidové vektory s přímou detekcí rekombinantních klonů:

bakterie s nerekombinantními plasmidy nevyrostou (plasmid nese letální gen)

KLONOVACÍ KITY

TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen

5 min klonování PCR produktů s Taq polymerázou (A na 3'konci)



Restriction enzyme sites for pCR[®]2.1-TOPO[®] are indicated by nucleotides

DALŠÍ VEKTORY PRO KLONOVÁNÍ

Bakteriofágy: bakteriofág λ , ~ 50 kb genom

místa pro štěpení RE, klonování kratších fragmentů DNA

Selekce rekombinantních bakteriofágů: modro-bílá selekce

Cosmidy: modifikované plasmidy, nesou sekvenci pro sbalení do fágové částice

Mají replikační počátek a gen pro Amp rezistenci – transformace

a replikace jako plasmidy

Uspořádání do fágových částic – přenos mezi buňkami (transdukce)

Délka inzertů 40 – 50 kb

Selekce na základě velikosti

BAC (bacterial arteficial chromosome): DNA konstrukt (s replikačním počátkem)

až 300 kb inzerty

Human Genome Project

YAC (yeast arteficial chromosome): umělá sekvence s centromerou, telomerami, autonomní replikační sekvencí (replikační počátek)

100 – 3 000 kb inzerty

Mohou být využity pro expresi eukaryotických proteinů v kvasinkách

Méně stabilní než BAC (chiméry)

TRANSFORMACE DO EUKARYOTICKÝCH MODELŮ

Kvasinky: v přítomnosti Li^+ , Cs^+ ; elektroporace

Rostliny:

- ***Agrobacterium*** – prosté ponoření rostlin (pupenů) do suspenze
- ***Bombardování*** zlatými nebo wolframovými částicemi potaženými DNA
- ***Elektroporace***
- ***Transdukce*** – virová transformace

Živočišné buňky: transfekce (sc plasmidy, siRNA, protilátky)

CaCl_2 , elektroporace, kationické lipidy, kationické polymery,
optická transfekce

transdukce

Při stabilní transformaci – ko-transformace „markerového“ genu

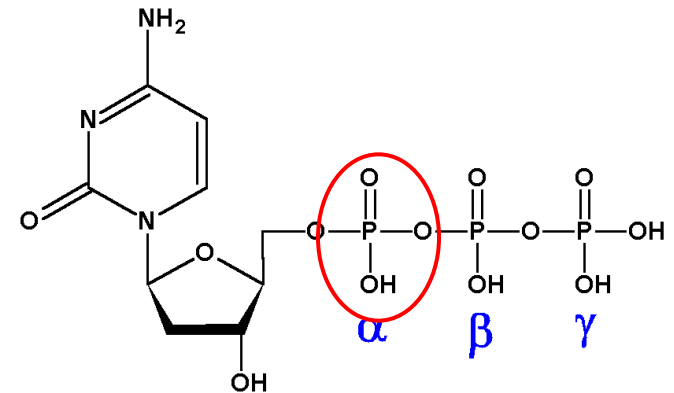
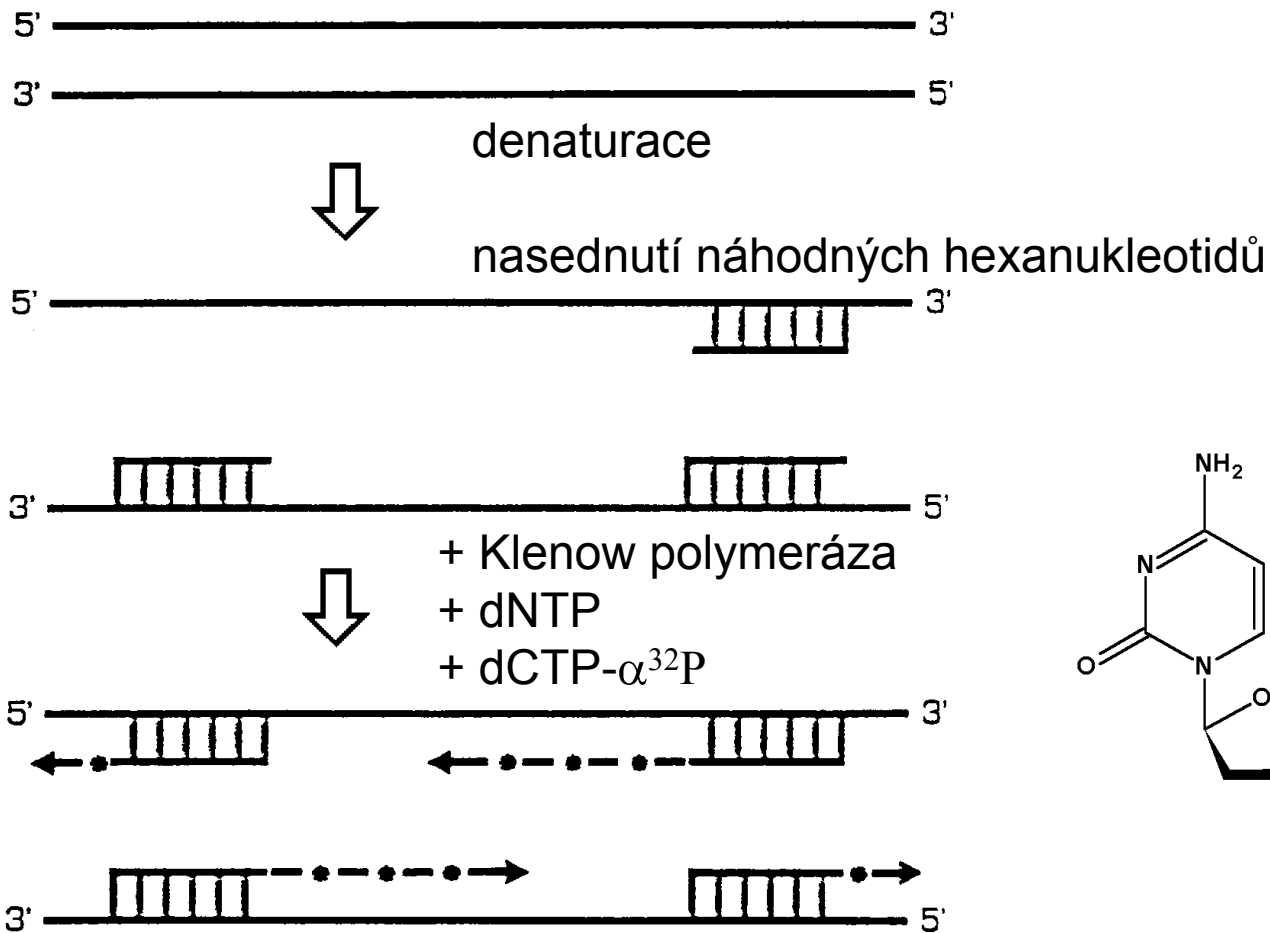
Fúzní konstrukty (YFP, GFP) – fluorescenční identifikace úspěšných transformantů

RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ DNA

Radioizotop	^{32}P	^{35}S	^3H	^{14}C	^{131}I
Typ záření	β	β	β	β	β, γ
T1/2	14.3 dnů	87.4 dnů	12.26 let	5730 let	8.04 dnů
β energie (Mev)	1.709	0.167	0.019	0.156	0.806

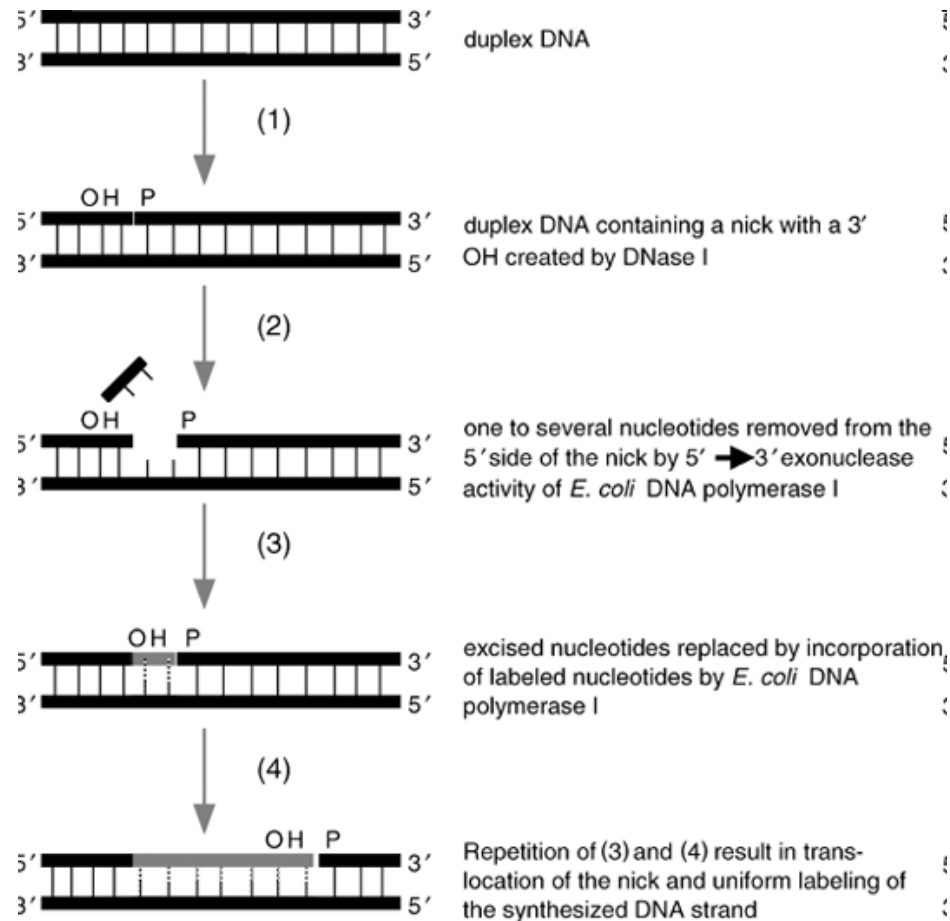
RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ DNA

Značení delší (~100 pb) sondy DNA:
„random priming“



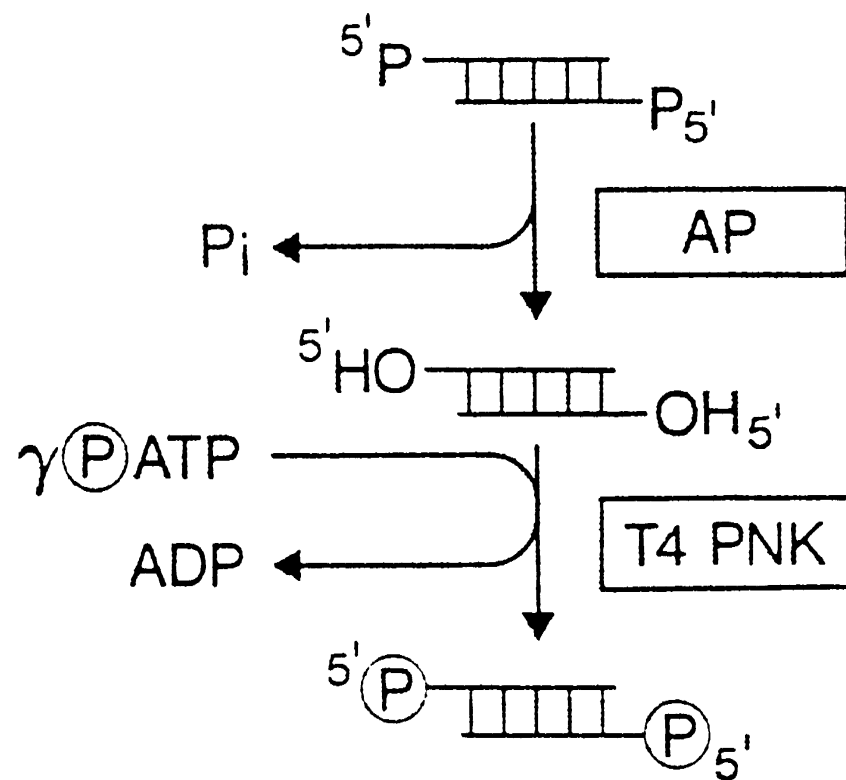
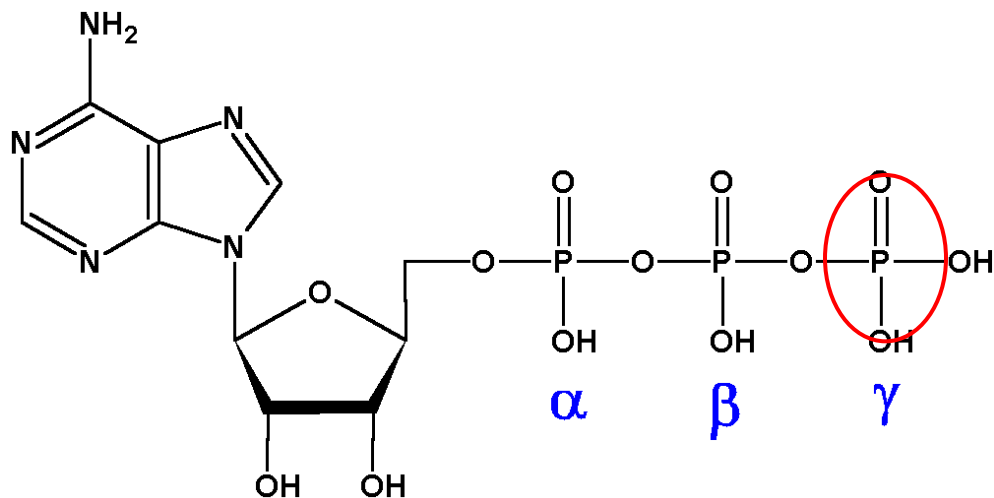
RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ DNA

Značení delší (~100 pb) sondy DNA:
„nick translation“



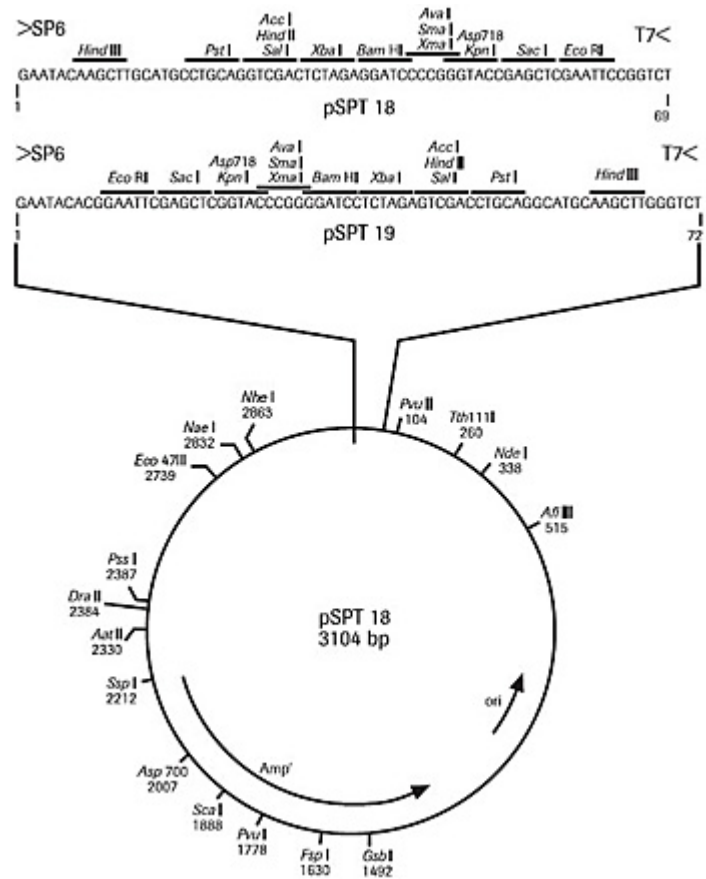
RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ DNA

Značení kratší sondy DNA (oligonukleotidy):
koncové značení



RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ RNA

Transkripce – SP6 a T7 RNA polymerázy



NERADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ DNA

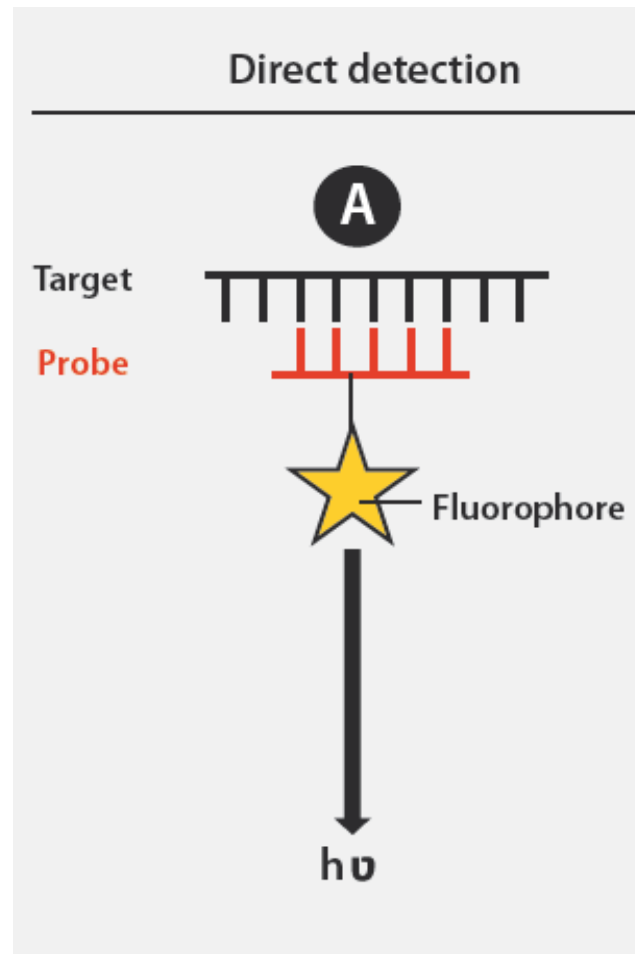
- biotin – protilátka – enzym – sustrát
- biotin – streptavidin – enzym – substrát
- sulfonová skupina – protilátka – enzym – substrát
- digoxigenin – protilátka – enzym – substrát
- fluorescenční detekční systém (rhodamin, fluorescein)

Použití chromogenních, chemiluminiscenčních, fluorescenčních substrátů

Enzym konjugován s protilátkou nebo streptavidinem

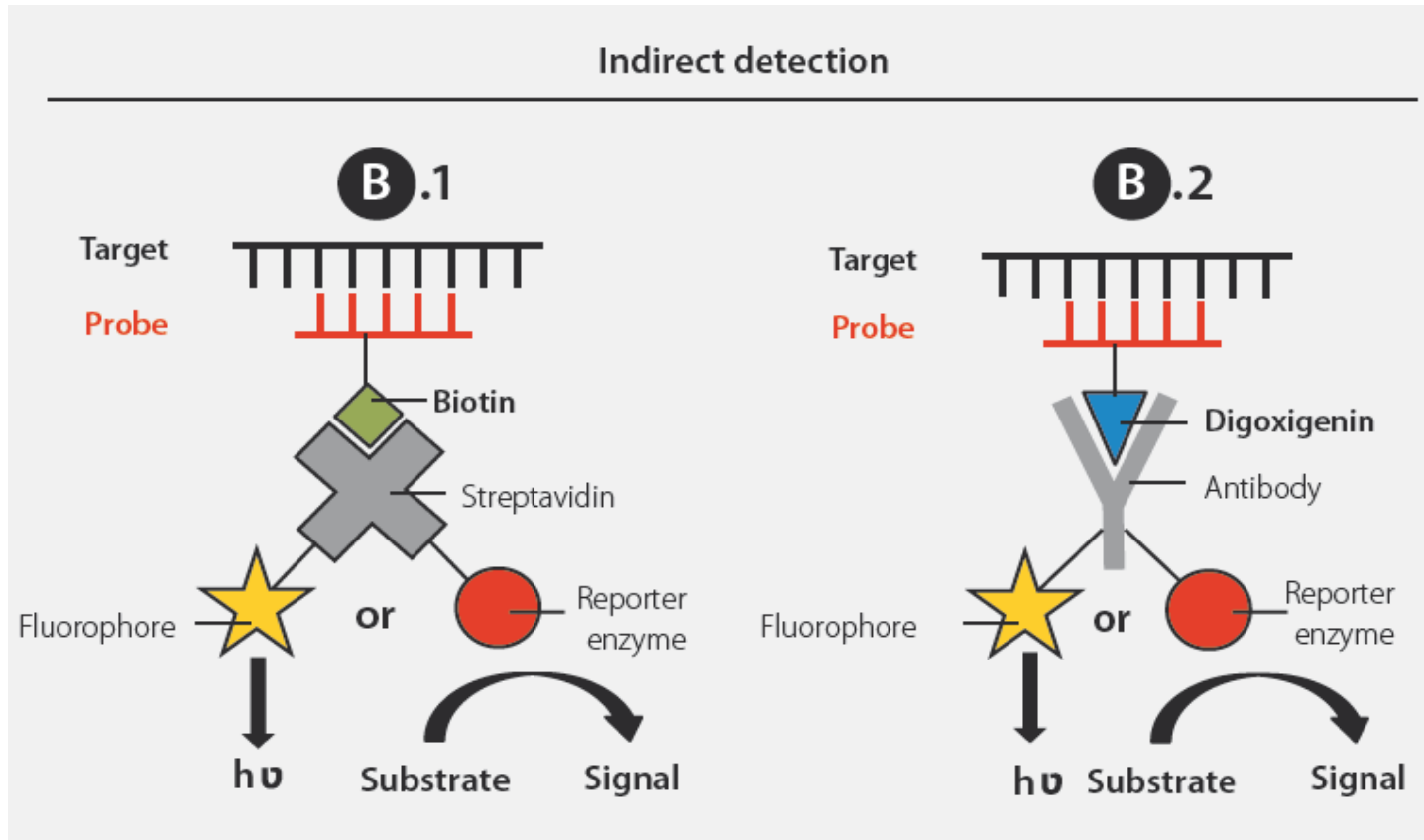
alkalická fosfatáza, peroxidáza, glukosidáza, β -galaktosidáza

NERADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ DNA



<http://www.jenabioscience.com/>

NERADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ DNA



<http://www.jenabioscience.com/>