

BIOINFORMATIKA V PRAXI – CVIČENÍ 6

KLONOVÁNÍ A RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ

STUDIJNÍ MATERIÁLY

Molekulárně biologické pozadí problematiky je obsaženo v knize **Metody molekulární biologie** (Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J.) 2005.

VEKTOR V MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

Pod pojmem vektor rozumíme v molekulární biologii molekulu DNA, která slouží k vložení úseku DNA (genu) a jeho přenos do cílového organismu (bakterie, buněčné kultury). Typicky se jedná o plasmidy. V současnosti je možno zakoupit široké spektrum plasmidů od různých dodavatelů. Liší se velikostí, použitím i cenou.

ÚKOL 1

Na stránkách firem **NEB** (www.neb.com), **Takara** (www.takara-bio.com/research.htm), **Life technologies** (www.lifetechnologies.com), **Merck-Millipore** (www.merckmillipore.cz) naleznete nabídku plasmidů (vektorů). Kolik různých plasmidů je možno zakoupit?

STRUKTURA PLASMIDU

Plasmidy používané v laboratořích jsou obvykle více či méně uměle upraveny tak, aby maximálně splňovaly svou funkci. K tomu je nezbytná přítomnost určitých úseků. Mezi základní patří selekční marker (obvykle gen pro rezistenci na antibiotikum) a mnohočetné klonovací místo (multiple cloning site).

ÚKOL 2

Naleznete informace o následujících plasmidech. Jaká je velikost těchto plasmidů a pro které antibiotikum nesou tyto plasmidy rezistenci?

Plasmid	Velikost [bp]	Rezistence
pET-41a (Merck-Novagen)		
pUC18 (TaKaRa)		
pKLAC1 (NEB)		
pTWIN-MBP (NEB)		
pET-3d (Merck-Novagen)		
pRSET A (Life technologies)		

RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ

Skupina endonukleas, která specificky rozpoznává tzv. palindromické sekvence, je označována jako restriční endonukleasy (restriktasy). Mnohé informace k nim lze nalézt na stránkách dodavatelů těchto enzymů, např. New England Biolabs (<http://www.neb.com>).

ÚKOL 3

Vytvářejí následující restriktasy tzv. kohezní konce? Pokud ano, jaké.

AfeI

BmtI
DraI
HpyCH4V
KasI
RsaI
Tsp509I
XbaI

ÚKOL 4

Některé restriktasy rozpoznávají tytéž palindromatické sekvence, avšak štěpí je v odlišném místě (jedná se o tzv. **isoschizomery**). Nalezněte alespoň dvě dvojice takových restriktas a uveďte, kde a jak štěpí DNA.

ÚKOL 5

Určité restriktasy rozpoznávají různé palindromatické sekvence, avšak vytvářejí tytéž převislé konce. K následujícím restriktasám doplňte vždy alespoň jednu další, která vytváří vzájemně kompatibilní převislé konce a přitom rozpoznává jiný palindrom.

AgeI
EagI
PstI
SpeI

ÚKOL 6

Některé z restriktas jsou aktivní v závislosti na tom, zda štěpená DNA je či není methylována (methylace adeninu nebo cytosinu). Uveďte alespoň jednu restriktasu, která je blokována methyací Dcm methylasou (methylace na C5 pozici cytosinu v sekvencích CCAGG nebo CCTGG). Využijte informace o citlivosti na methylaci (methylation sensitivity) na serveru NEB.

MULTIPLE CLONING SITE

MCS je z praktického hlediska nejzajímavější částí plasmidu. Jedná se o úsek, v němž se nachází přesně definované palindromy, které jsou rozpoznávány příslušnými restriktálními enzymy.

ÚKOL 7

Ke komerčně dodávaným plasmidům lze nalézt základní informace, včetně sekvence MCS. Vyhledejte tuto sekvenci pro následující plasmidy a zjistěte, pro které restriktální enzymy jsou zde vhodné palindromy.

Plasmid: pBAD/His A (Life technologies)

Restriktální místa v MCS:

Plasmid: pKLMF-EK (NEB)

Restrikční místa v MCS:

Plasmid : pETBlue-1 (Novagen - Millipore)

Restrikční místa v MCS:

RESTRIKČNÍ MAPA

Zanesením restrikčních míst do graficky znázorněné sekvence DNA (plasmidu) vzniká restrikční mapa. Z praktického hlediska je často nutné zjistit, která z restriktas štěpí plasmid právě jednou, která vícekrát a která vůbec. K tomuto účelu lze použít online programy, například **NEBcutter** (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

ÚKOL 8

Najděte sekvenci plasmidu pET-40b dodávaného firmou Merck (<http://www.merck-chemicals.cz/life-science-research/>) a detekujte restrikční místa. Uveďte restriktasy, které štěpí daný plasmid právě šestkrát. Kolik z nich je komerčně dostupných?

SOUČASNÉ ŠTĚPENÍ DVĚMA RESTRIKTASAMI

Pro účely klonování do vektoru (vlození genu do plasmidu) je obvykle třeba štěpit DNA dvěma restriktasami. S ohledem na prostředí, které tyto enzymy vyžadují pro optimální aktivitu, je možné provést toto štěpení v jednom kroku, nebo štěpit sekvenčně.

ÚKOL 9

Zjistěte aktivitu (v procentech maximální aktivity) následujících restriktas v uvedených komerčních pufrch.

Enzym	Pufr	Aktivita [%]
AgeI	NEB buffer 3.1	
HpaI	NEB buffer 2.1	
TseI	NEB buffer 1.1	
BanII	TaKaRa buffer M	
NaeI	TaKaRa buffer H	
XhoI	TaKaRa buffer K	

ÚKOL 10

Posuďte, zda je v případě následujících dvojic vhodné/nutné provést sekvenční štěpení – tj. štěpení DNA jednou restriktasou, převedení do jiného pufru a následné štěpení druhou restriktasou. Vycházejte z předpokladu, že pokud neexistuje pufr, v němž by oba enzymy měly alespoň 60% maximální aktivity, je vhodnější zvolit sekvenční štěpení. Vycházejte z informací na serverech firem NEB a TaKaRa.

<u>Enzym 1</u>	<u>Enzym 2</u>	<u>Sekvenční štěpení</u>
AscI	XcmI	
BamHI	PstI	
NotI	SspI	
SacI	SapI	

ÚKOL 11

Je možno v laboratoři nahradit pro štěpení enzymem HaeIII pufr 2.1 (NEB) pufrem K (Takara) při zachování alespoň 80% účinnosti enzymu? Existuje jiný pufr, v němž by bylo možno reakci provést při stejném nároku na účinnost? Informace naleznete na stránkách firem New England Biolabs (<http://www.neb.com>) a Takara (<http://catalog.takara-bio.co.jp/en/index.asp>).

UMĚLÉ VLOŽENÍ RESTRIKČNÍHO MÍSTA DO SEKVENCE

V praxi se často setkáváme s potřebou vytvořit v určitém místě genové sekvence (typicky na začátku a konci genu nebo některé jeho části). V takovém případě často navrhujeme primery, které daný úsek ohraničují a přitom kódují i restrikční místo. Tyto primery pak nemají sekvenci zcela totožnou se sekvencí DNA na kterou nasedají. Vzniklý PCR produkt však obsahuje konkrétní restrikční místa, která potřebujeme pro další práci.

SAMOSTATNÝ PROJEKT

U vašeho genu vypracujte restrikční mapu. Připojte rovněž seznam restrikčních enzymů, které váš gen neštěpí.