

# 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](http://www.neb.com)), **Takara** ([www.takara-bio.com/research.htm](http://www.takara-bio.com/research.htm)), **Life technologies** ([www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)), **Merck-Millipore** ([www.merckmillipore.cz](http://www.merckmillipore.cz)) nalezněte nabídku plasmidů (vektorů).

### 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

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

Plasmid	Velikost [bp]	Rezistence
pET-41a (Merck-Millipore)		
pKLAC1 (NEB)		
pTWIN-MBP (NEB)		
pRSET A (Life technologies)		

### RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ

Skupina endonukleas, která specificky rozpoznává tzv. palindromatické 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.

BmtI

DraI

KasI  
RsaI  
Tsp509I

#### 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.

EagI  
PstI  
SpeI

#### **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 restriktčními enzymy.

#### ÚKOL 7

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

Plasmid: pBAD/His A (Life technologies)  
Restriktční místa v MCS:

Plasmid: pKLMF-EK (NEB)  
Restriktční místa v MCS:

Plasmid : pETBlue-1 (Merck - Millipore)  
Restriktční místa v MCS:

#### **RESTRIKČNÍ MAPA**

Zanesením restričních míst do graficky znázorněné sekvence DNA (plasmidu) vzniká restriční 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://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

#### ÚKOL 8

Detekujte restriční místa v sekvenci plasmidu pET-40b. 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	Pufř	Aktivita [%]
AgeI	NEB buffer 3.1	
HpaI	NEB buffer 2.1	
TseI	NEB buffer 1.1	
BanII	TaKaRa buffer M	
NaeI	TaKaRa buffer H	

#### 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 pufř, 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	

#### VOLITELNÝ ÚKOL 11

Je možno v laboratoři nahradit pro štěpení enzymem HaeIII pufř 2.1 (NEB) pufrem K (Takara) při zachování alespoň 80% účinnosti enzymu? Existuje jiný pufř, 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 ([www.takara-bio.com/research.htm](http://www.takara-bio.com/research.htm)).

### **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.