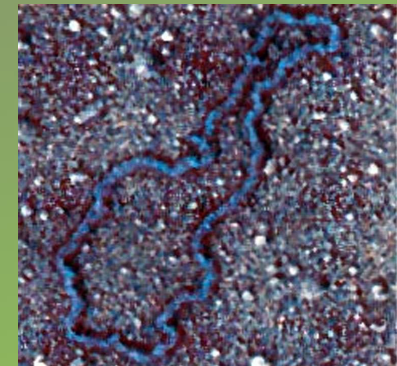


# BAC/PAC knihovny a jejich využití pro FISH techniku

Metody používané v  
Laboratoři molekulární  
cytologie a cytometrie BFÚ,  
Brno

# Co to jsou BAC/PAC klony?

- BAC (Bacterial Artificial Chromosome)
- PAC (P1 Artificial Chromosome)
- YAC (Yeast Artificial Chromosome)
- uměle syntetizovaná plazmidová DNA, kterou lze vložit do „organismu“
- vektor x klonovací vektor



# YAC systémy

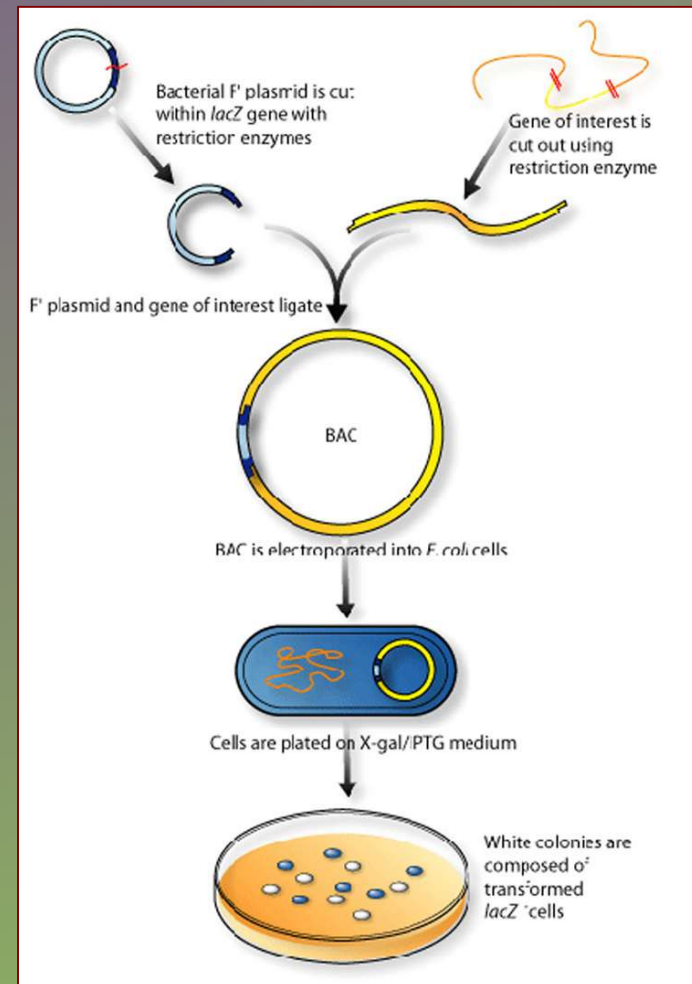
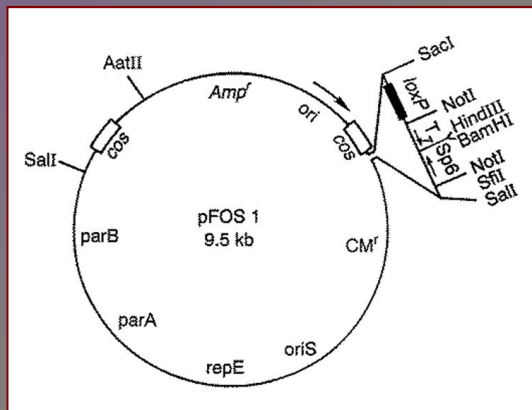
- podílely se na mapování lidského genomu
- klonovací kapacita až 500 Kb, mohou nést celé lidské geny
- v kvasince se udržují relativně stabilně v 1 nebo více kopiích
- ale při manipulaci **problémy** (nestabilita, přeskupování DNA, tvorba chimér s cizorodou DNA, malé výtěžky), nižší účinnost transformace

# BAC systémy - 1

- 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

- Nevhodný 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 pro FISH techniku
- **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

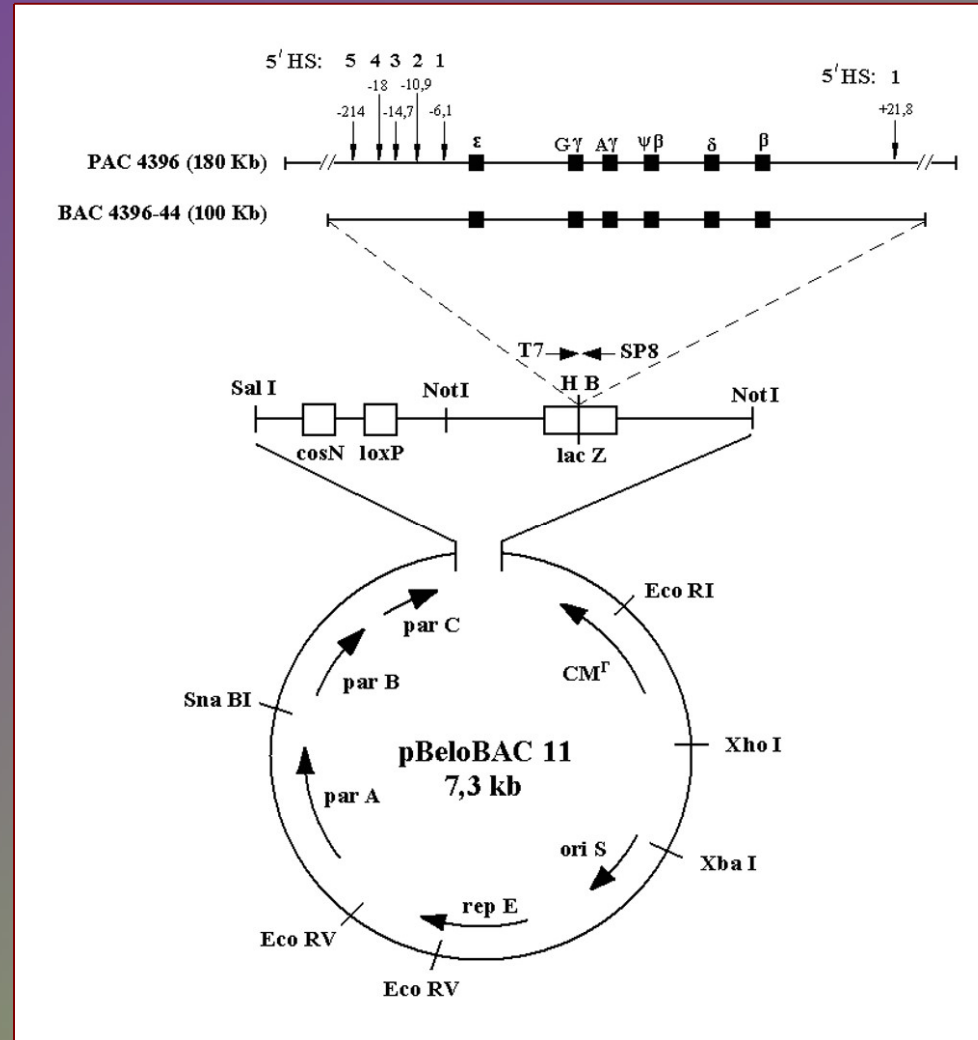
# Konstrukce BAC knihoven

- 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 $\alpha$ , DH10B)

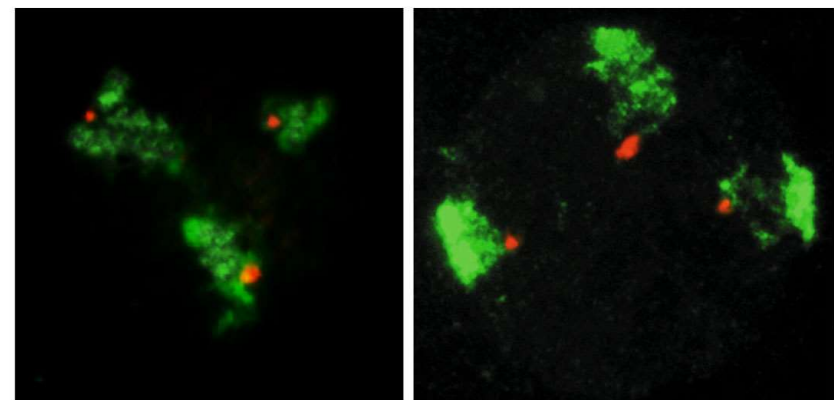
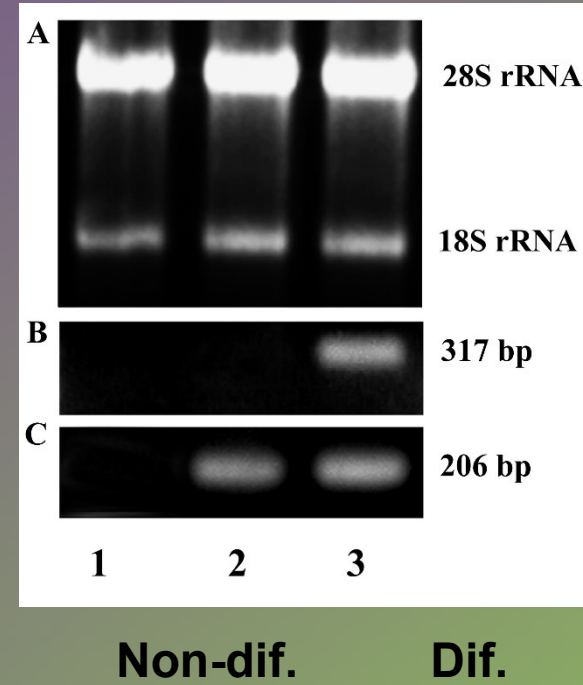
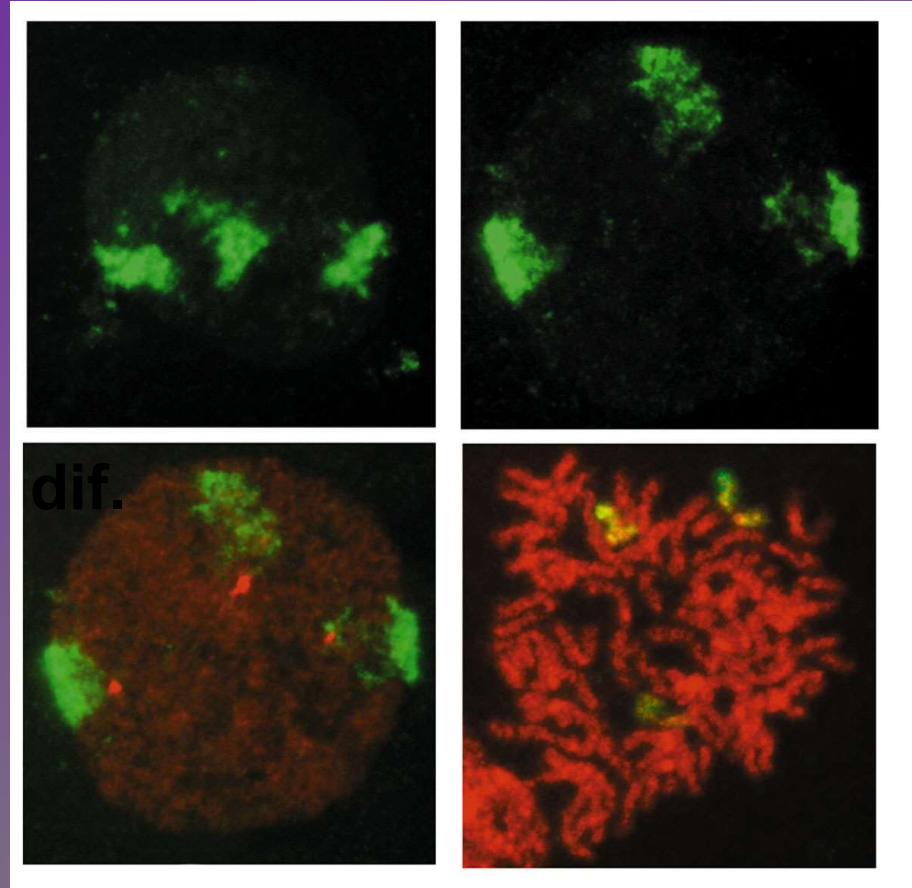
# Klonování do BAC vektorů

- 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)

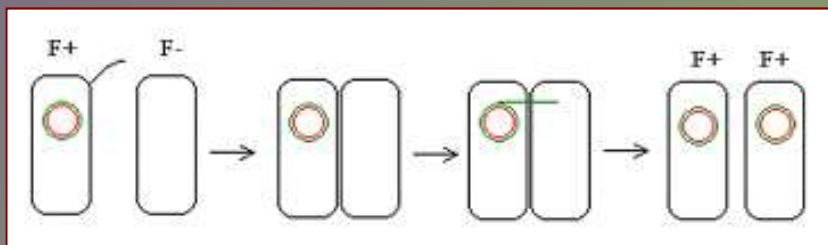


# Differentiation of human hemopoietic cells into erythroid pathway



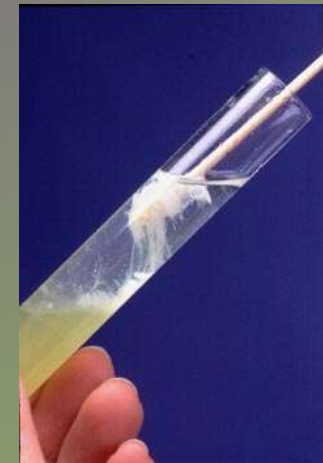
# Hostitelská buňka

- *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

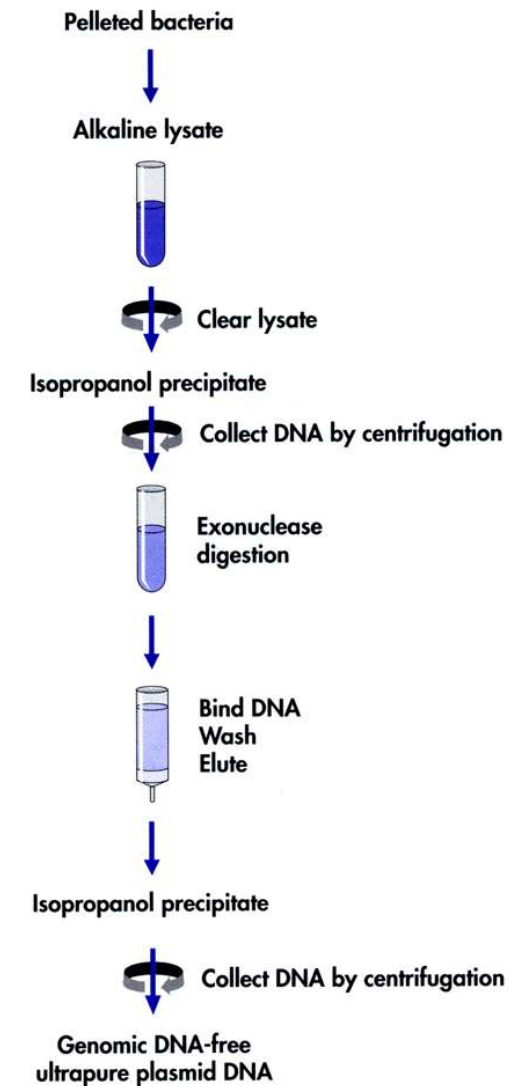
- nejprve **izolace** DNA z příslušného BAC nebo PAC vektoru pomnoženého v *E. coli*
- izolace klasickou metodou s vlastními roztoky nebo izolačním kitem
- izolace kitem je výhodnější (větší výtěžek, odstranění bakteriální DNA)



# 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

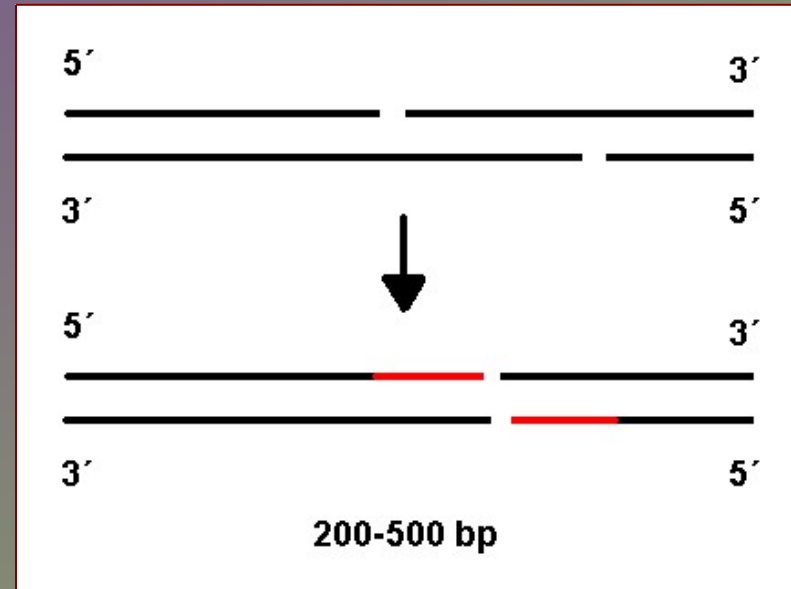
## QIAGEN Large-Construct Kit Procedure



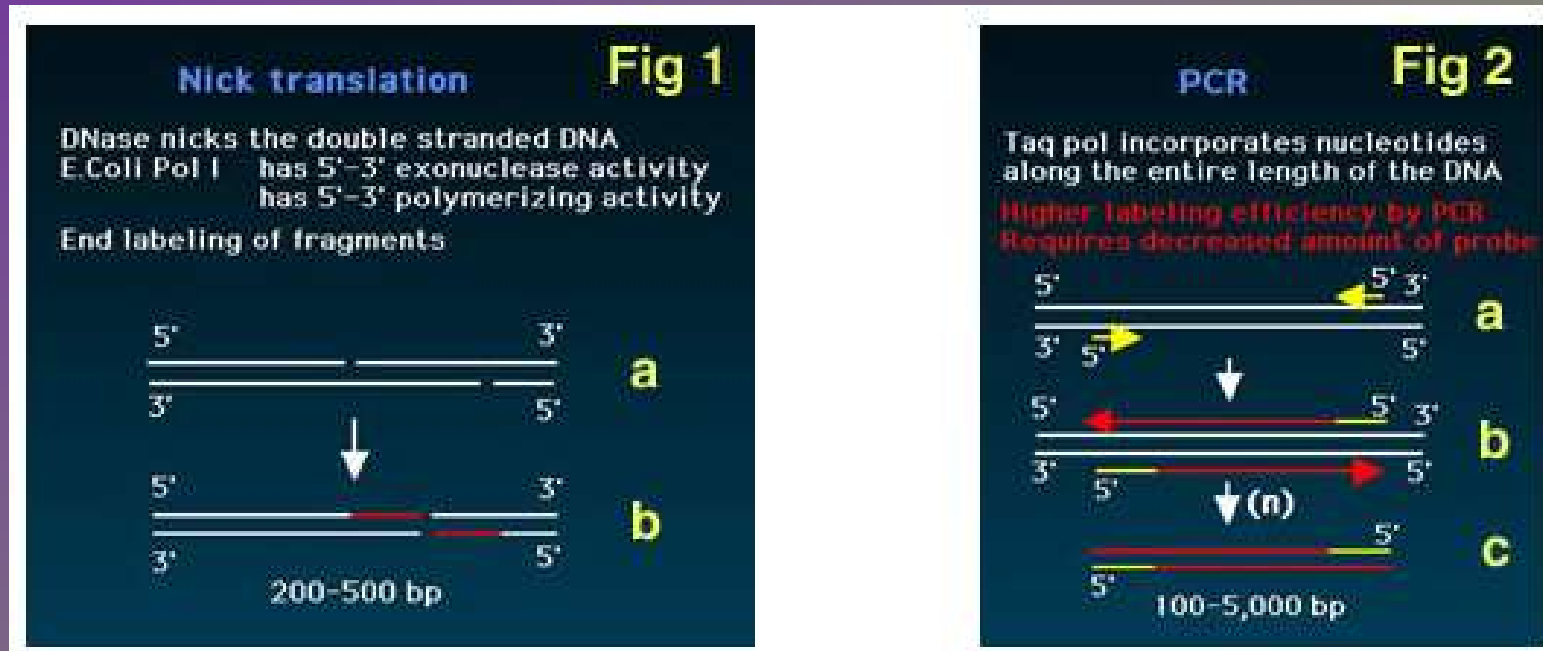


# Nick-translace

- 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)



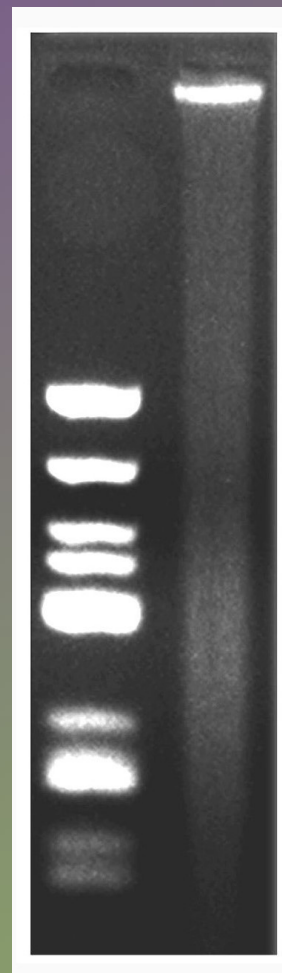
bakteriální DNA

plazmidová DNA

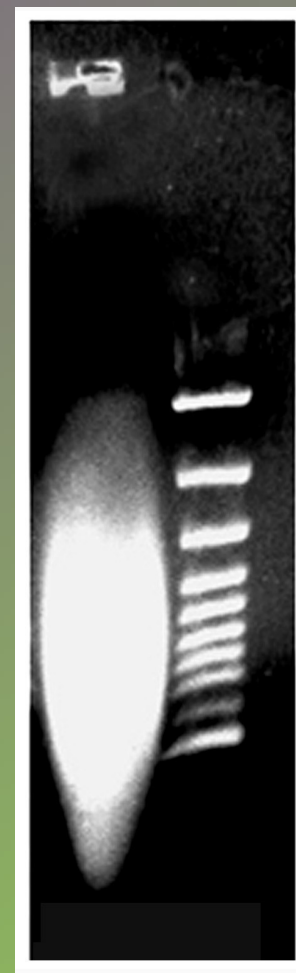
### DNA po nick-translaci

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 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

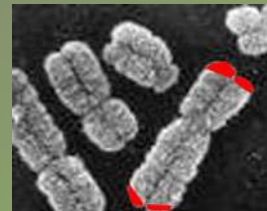
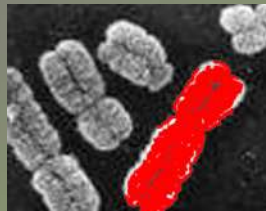
# Stručný návod k použití Cot-1 DNA

- 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)

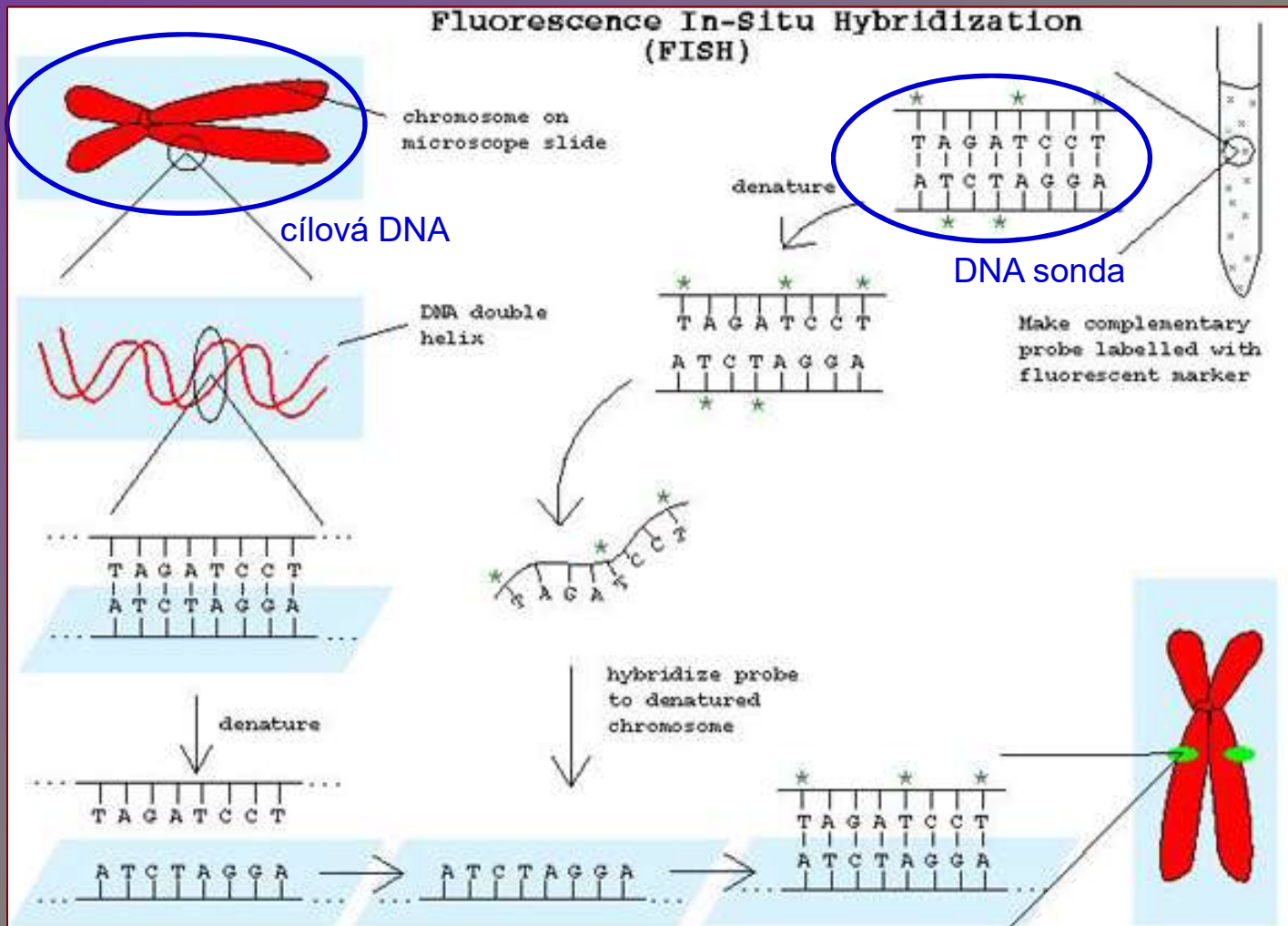
- metoda stanovení lokalizace specifických sekvencí DNA nebo i celých chromozomů v buněčných preparátech
- **princip** spočívá v navázání značené denaturované DNA sondy na komplementární místo cílové denaturované DNA
- druhy DNA sond: místně specifické (genové), celochromozomové, telomerické, centromerické



- 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

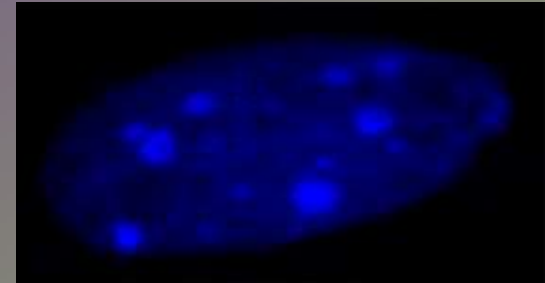


nepřímé značení - sekundární protilátka

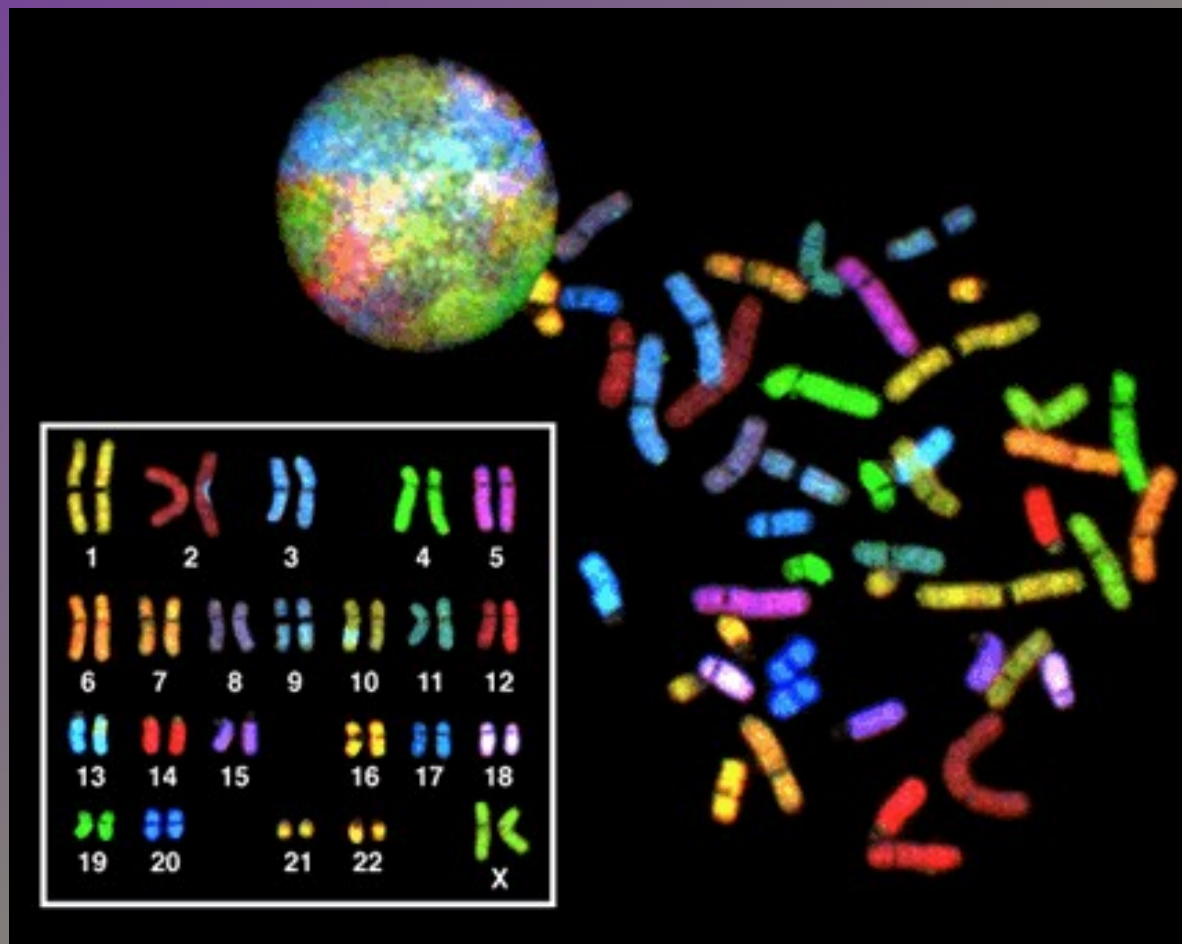


# Nejčastěji používané chemikálie pro FISH

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

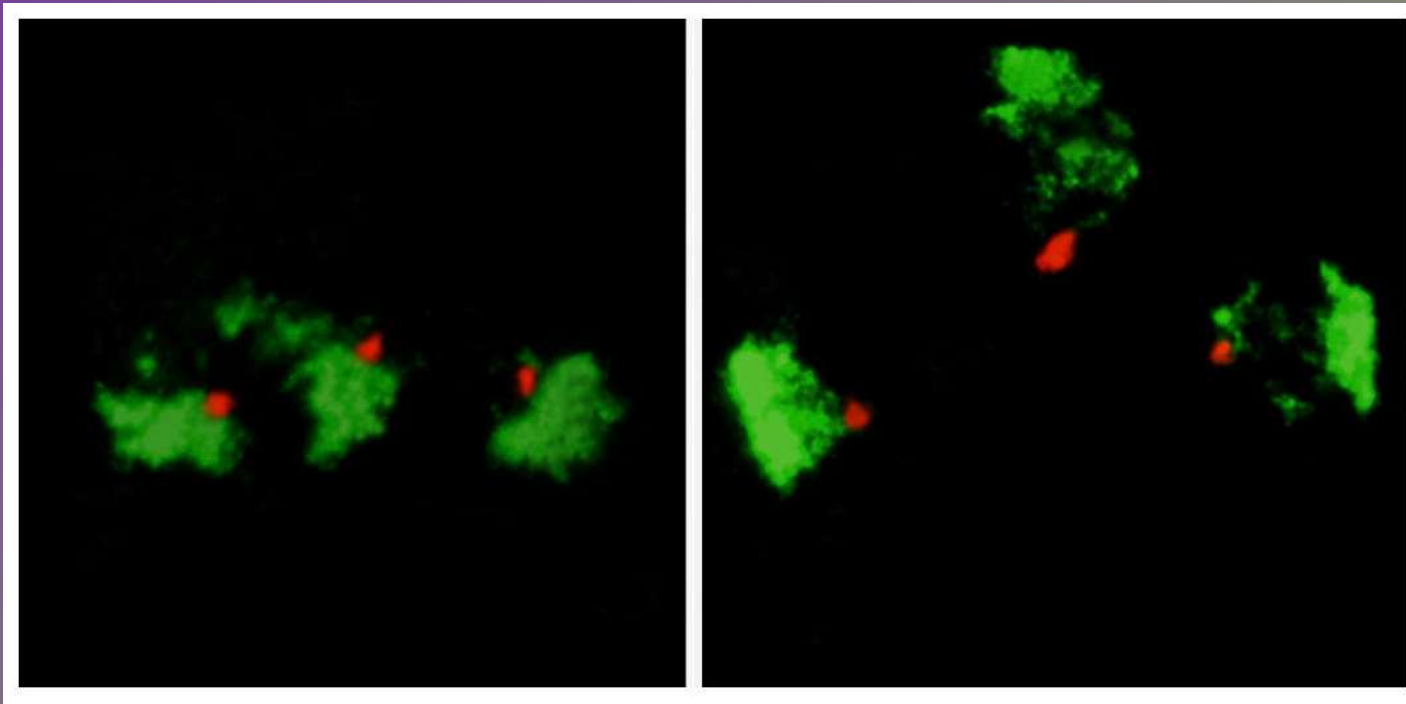


# SKY technika



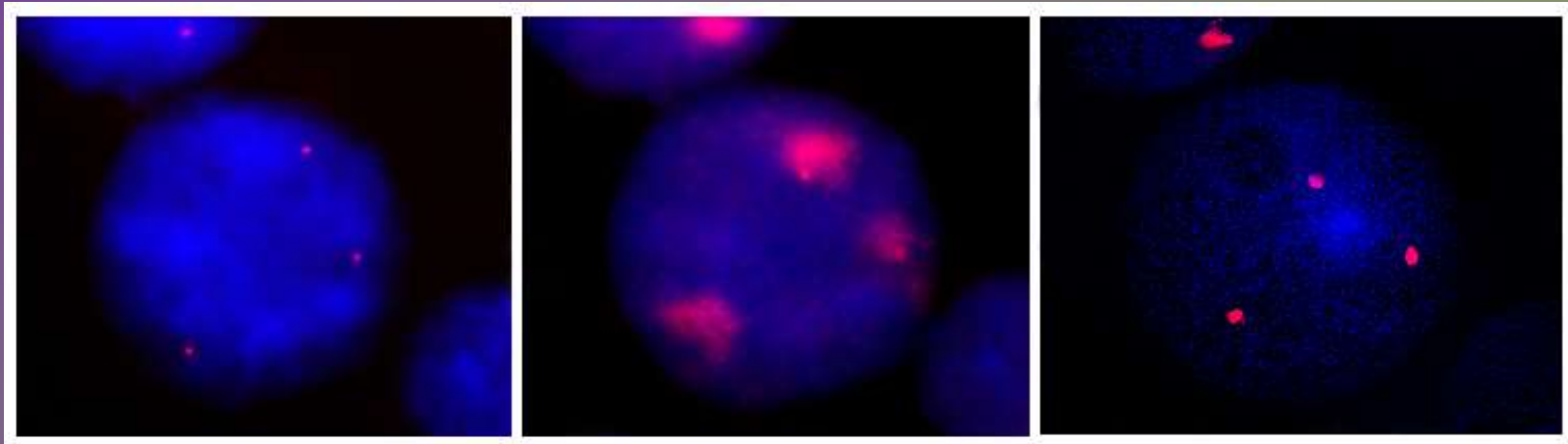
[www.genome.gov](http://www.genome.gov)

# Duální barvení HSA a genu



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

# Opakovaná DNA/DNA hybridizace

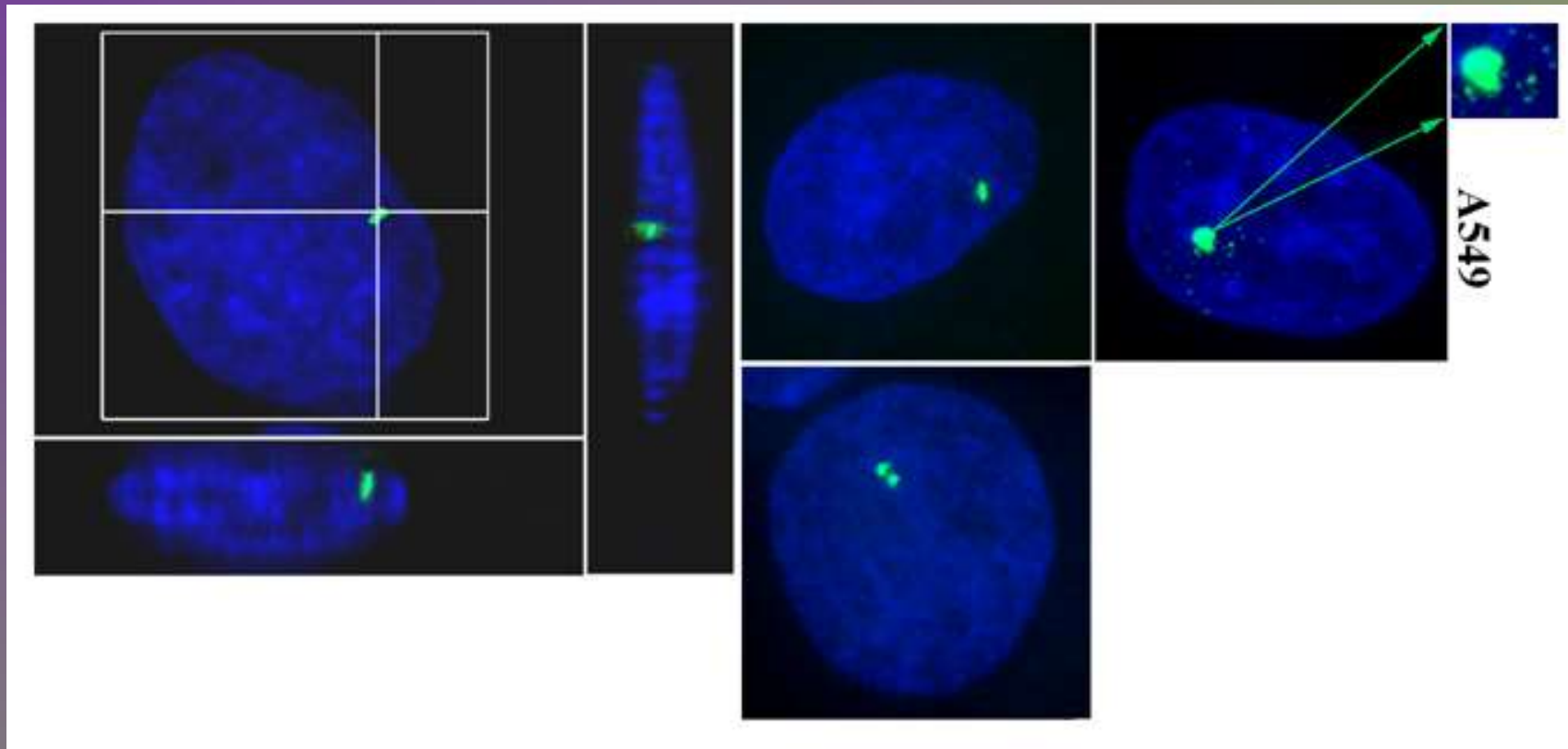


klastr globinových genů

chromozom 11

centromera chromozomu 11

# c-myc transcript RNA-FISH technika



# Zeiss Axiovert 100 + konfokální jednotka CARV

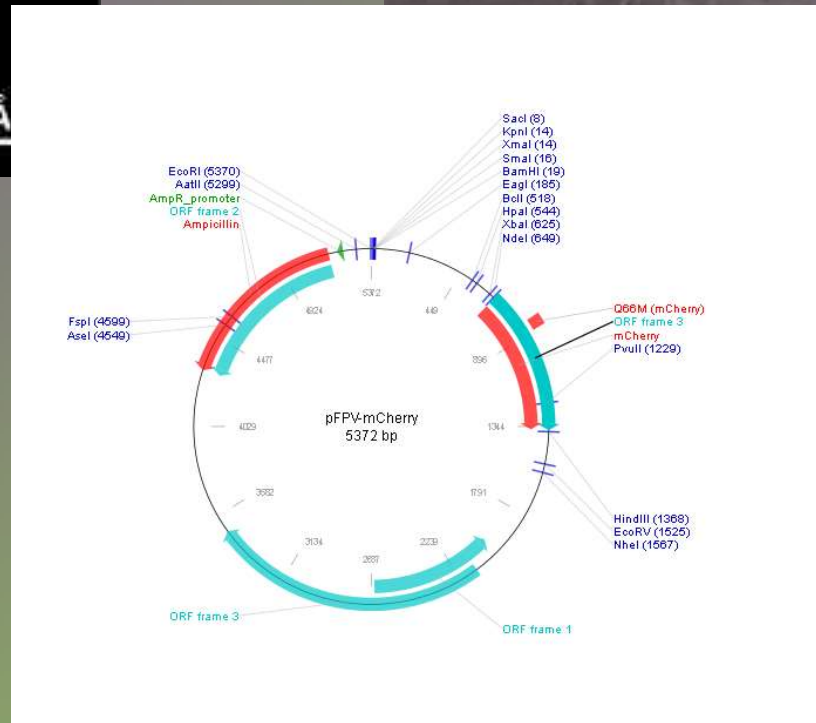
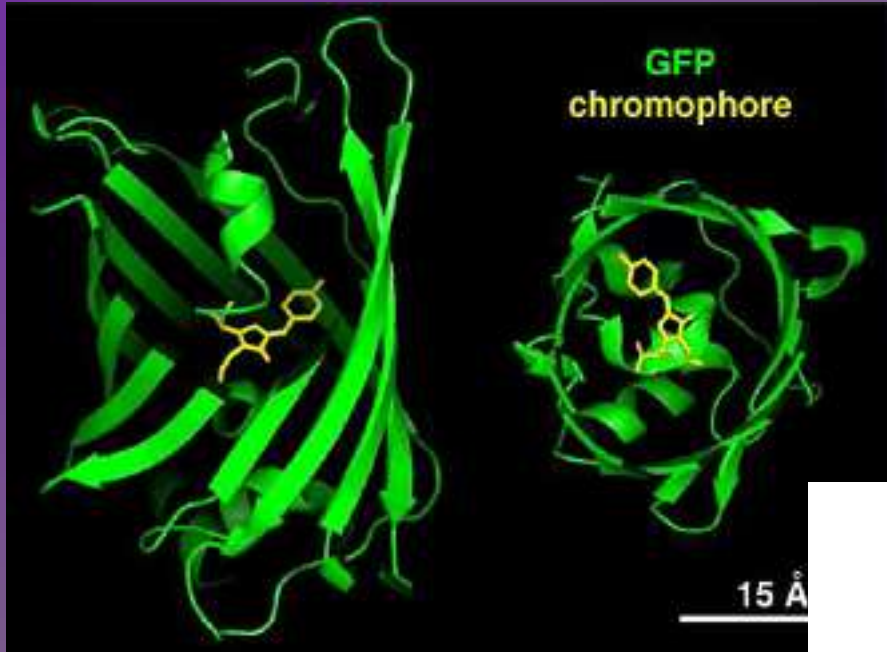


CCD MicroMax

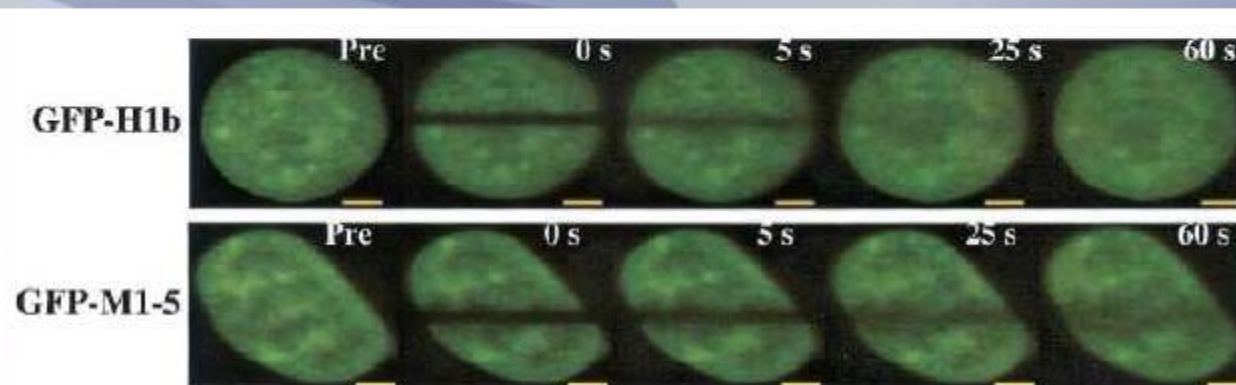
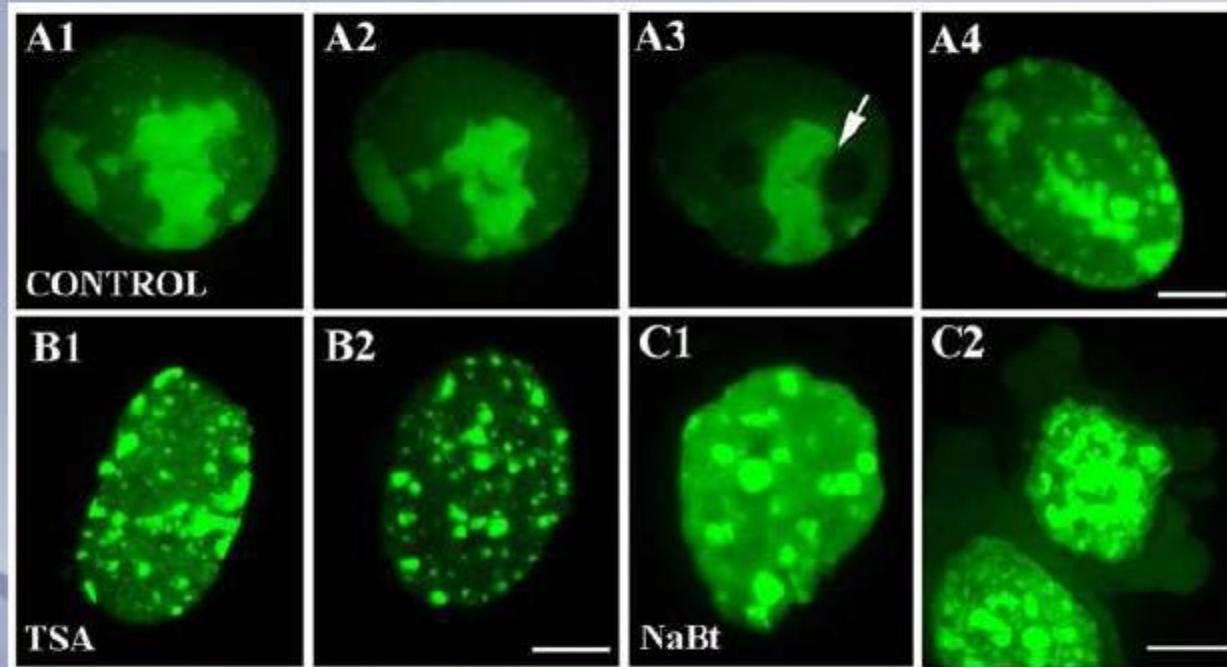
Konfokální jednotka CARV

Axiovert 100

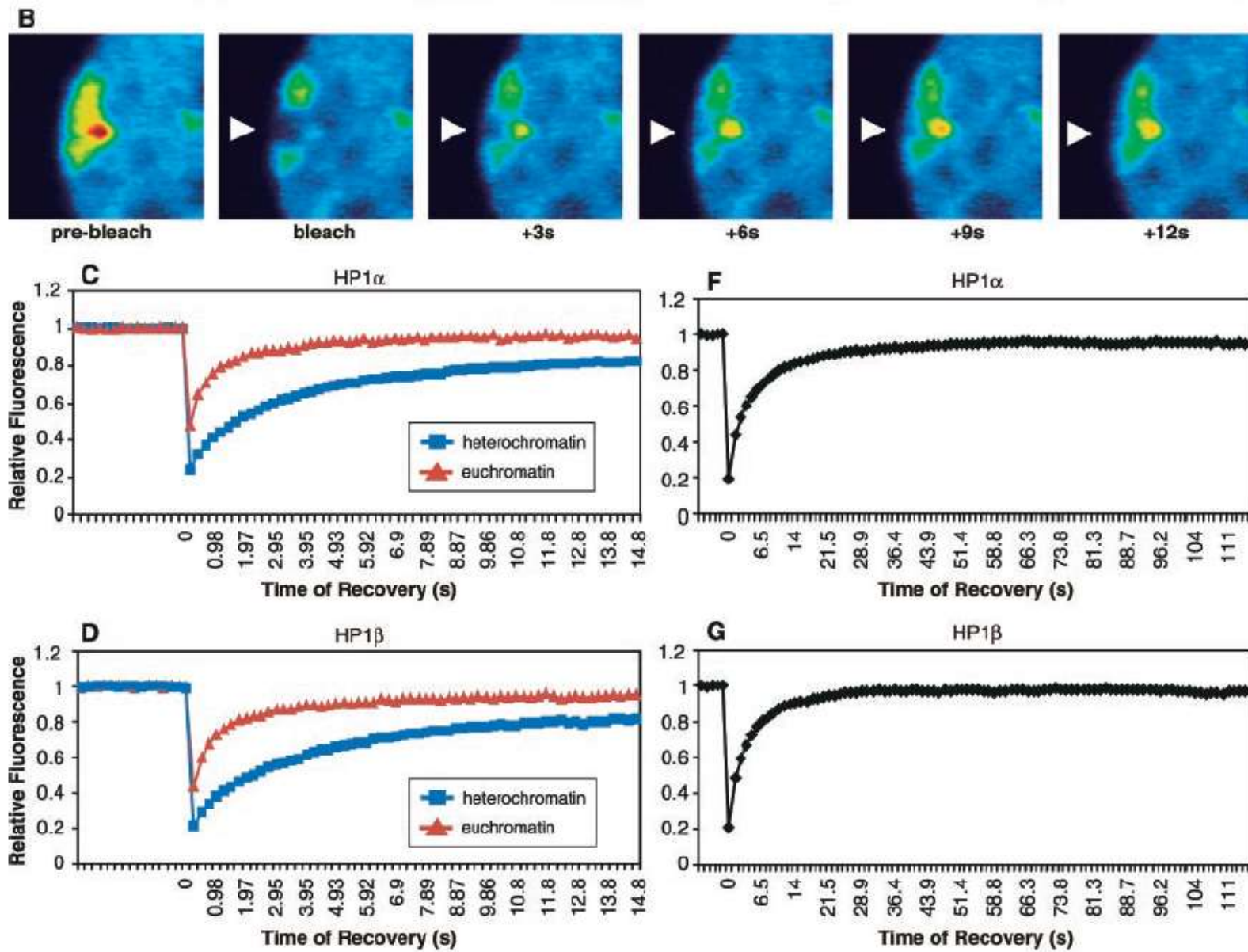
# Living Cell Studies - GFP technology



# GFP-HP1 $\beta$







Cheutin et al. Science (2003)

## An Endogenously Tagged Fluorescent Fusion Protein Library in Mouse Embryonic Stem Cells

Arigela Harikumar,<sup>1,6</sup> Raghu Ram Edupuganti,<sup>1,6,7</sup> Matan Sorek,<sup>1,2</sup> Gajendra Kumar Azad,<sup>1,2</sup> Styliani Markoulaki,<sup>3</sup> Petra Sehnalová,<sup>4</sup> Soňa Legartová,<sup>4</sup> Eva Bártoová,<sup>4</sup> Shlomit Farkash-Amar,<sup>5</sup> Rudolf Jaenisch,<sup>3</sup> Uri Alon,<sup>5</sup> and Eran Meshorer<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, The Alexander Silberman Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel

<sup>2</sup>The Edmond and Lily Safra Center for Brain Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel

<sup>3</sup>Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA

<sup>4</sup>Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Molecular Cell Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

<sup>6</sup>Co-first author

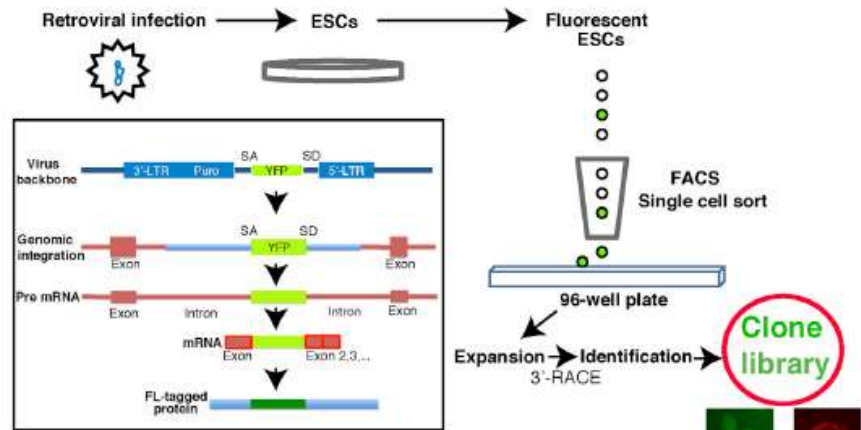
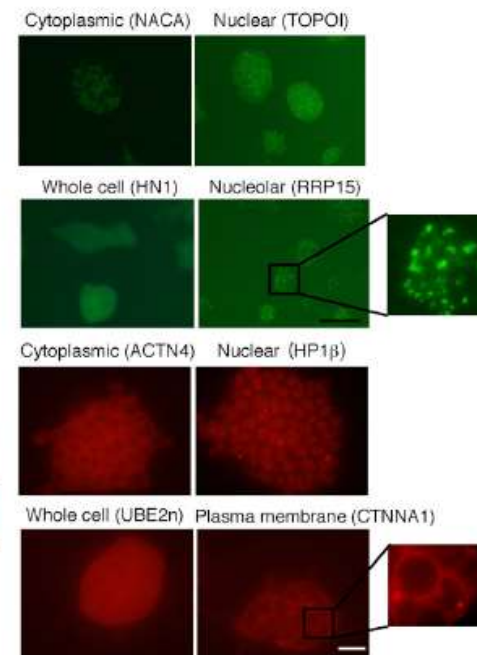
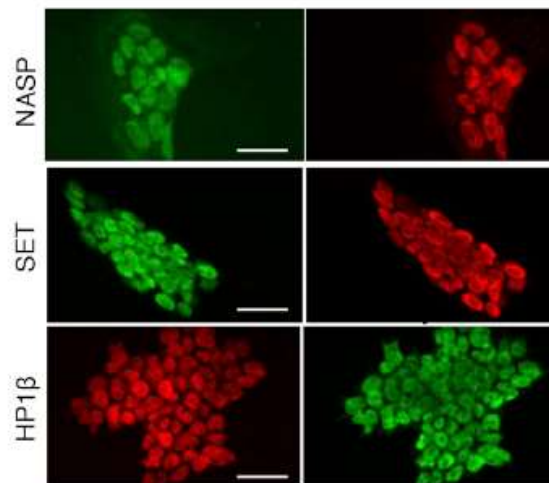
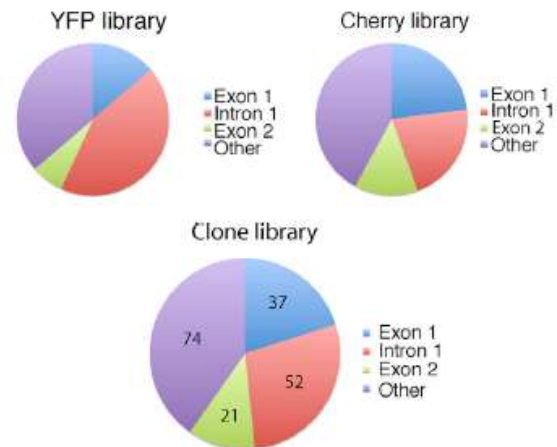
<sup>7</sup>Present address: Department of Molecular Biology, Faculty of Science, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen, 6525 Nijmegen, the Netherlands

\*Correspondence: [meshorer@huji.ac.il](mailto:meshorer@huji.ac.il)

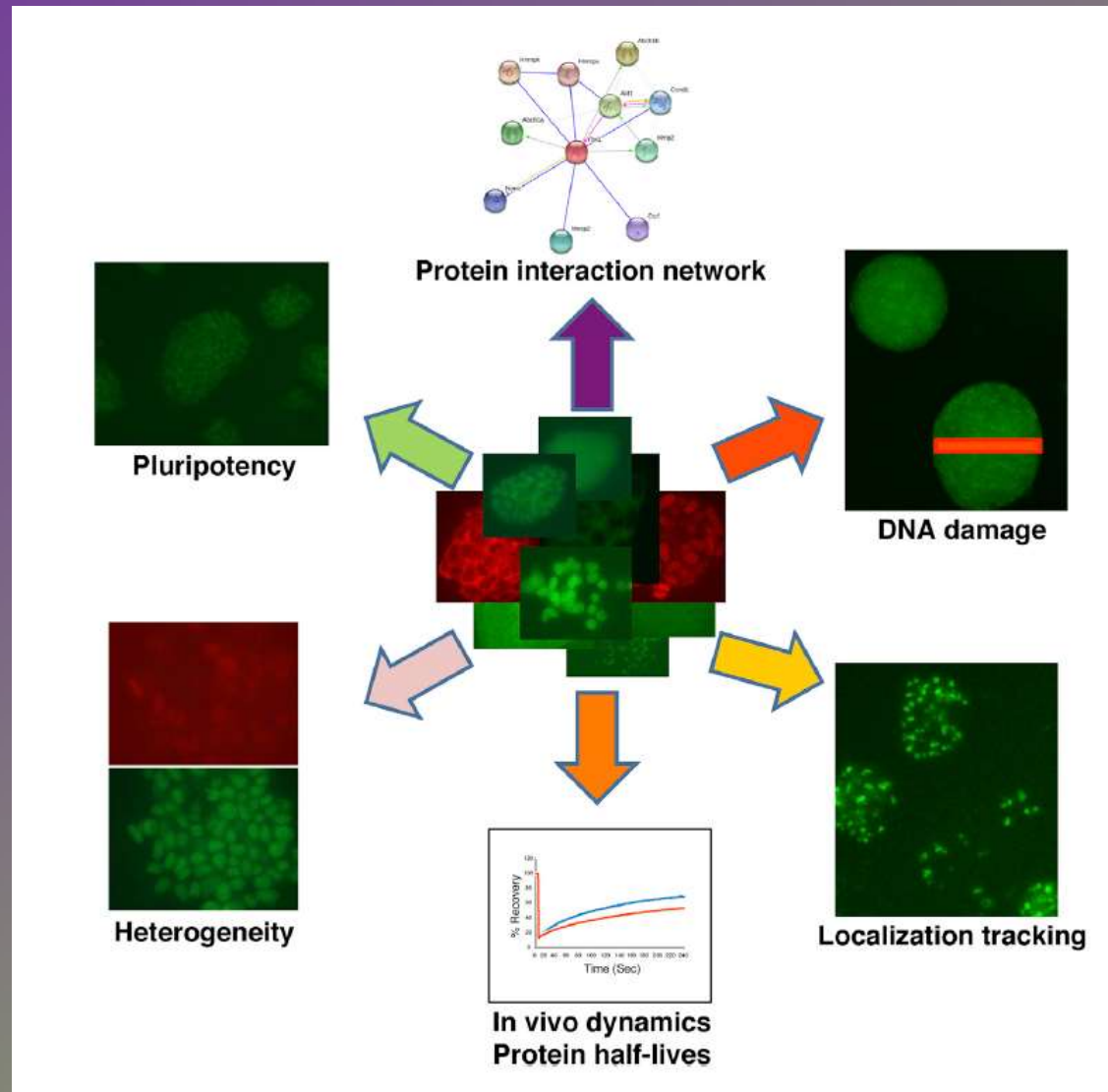
<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.08.022>

### SUMMARY

Embryonic stem cells (ESCs), with their dual capacity to self-renew and differentiate, are commonly used to study differentiation, epigenetic regulation, lineage choices, and more. Using non-directed retroviral integration of a YFP/Cherry exon into mouse ESCs, we generated a library of over 200 endogenously tagged fluorescent fusion proteins and present several proof-of-concept applications of this library. We show the utility of this library to track proteins in living cells; screen for pluripotency-related factors; identify heterogeneously expressing proteins; measure the dynamics of endogenously labeled proteins; track proteins recruited to sites of DNA damage; pull down tagged fluorescent fusion proteins using anti-Cherry antibodies; and test for interaction partners. Thus, this library can be used in a variety of different directions, either exploiting the fluorescent tag for imaging-based techniques or utilizing the fluorescent fusion protein for biochemical pull-down assays, including immunoprecipitation, co-immunoprecipitation, chromatin immunoprecipitation, and more.

**A****B****C****D**

# Využití knihovny fluorescenčních proteinů



## Doplňující témata ke zkoušce:

### 1) transposony a repetitivně elementy – LINE, SINE

**Retrotranspozon** je běžný typ transpozonů, tedy sekvencí DNA přítomných v genomu a schopných se přesouvat z místa na místo. Pro retrotranspozony je typické, že mechanismus jejich šíření je velice podobný životnímu cyklu retrovirů – DNA retrotranspozonů se přepíše do RNA (pomocí RNA polymeráz II či III), načež se tato RNA může opět přepsat reverzní transkripcí do DNA. Retrotranspozony známe z genomu většiny organismů, včetně kvasinek, octomilky i savců. V lidské DNA tvoří možná kolem 45% celkové sekvence a mají tedy obrovský význam pro pochopení nekódující DNA vůbec.

- TR retrotranspozony – též pod označením „endogenní retroviry“; obsahují na koncích dlouhé repetitivní části zvané LTR („long terminal repeat“); tvoří kolem 8% lidského genomu.
- Non-LTR retrotranspozony – patří k nim LINE a SINE elementy
- LINE – *long interspersed nuclear elements* – velmi hojné v lidském genomu (21% celku), nejčastěji tzv. LINE-1 (v milionech kopií, desítky stále aktivní); v překladu tzv. dlouhé rozptýlené jaderné elementy obsahují ve své sekvenci i geny ORF1 a ORF2, které se účastní jejich další replikace
- SINE – *short interspersed nuclear elements* – rovněž velmi hojné v lidském genomu (hlavní skupinou jsou Alu elementy, jichž je v lidské DNA více než milion a představuje 11% celkového genomu).
- Velikost SINE elementů činí méně než 500 bp. Samy nekódují žádné geny a zneužívají pouze určité buněčné proteiny (včetně ORF proteinů LINE elementů).
- Pouze se přepisují v RNA a následně pomocí reverzních transkriptáz zpět na nějaké místo do DNA.

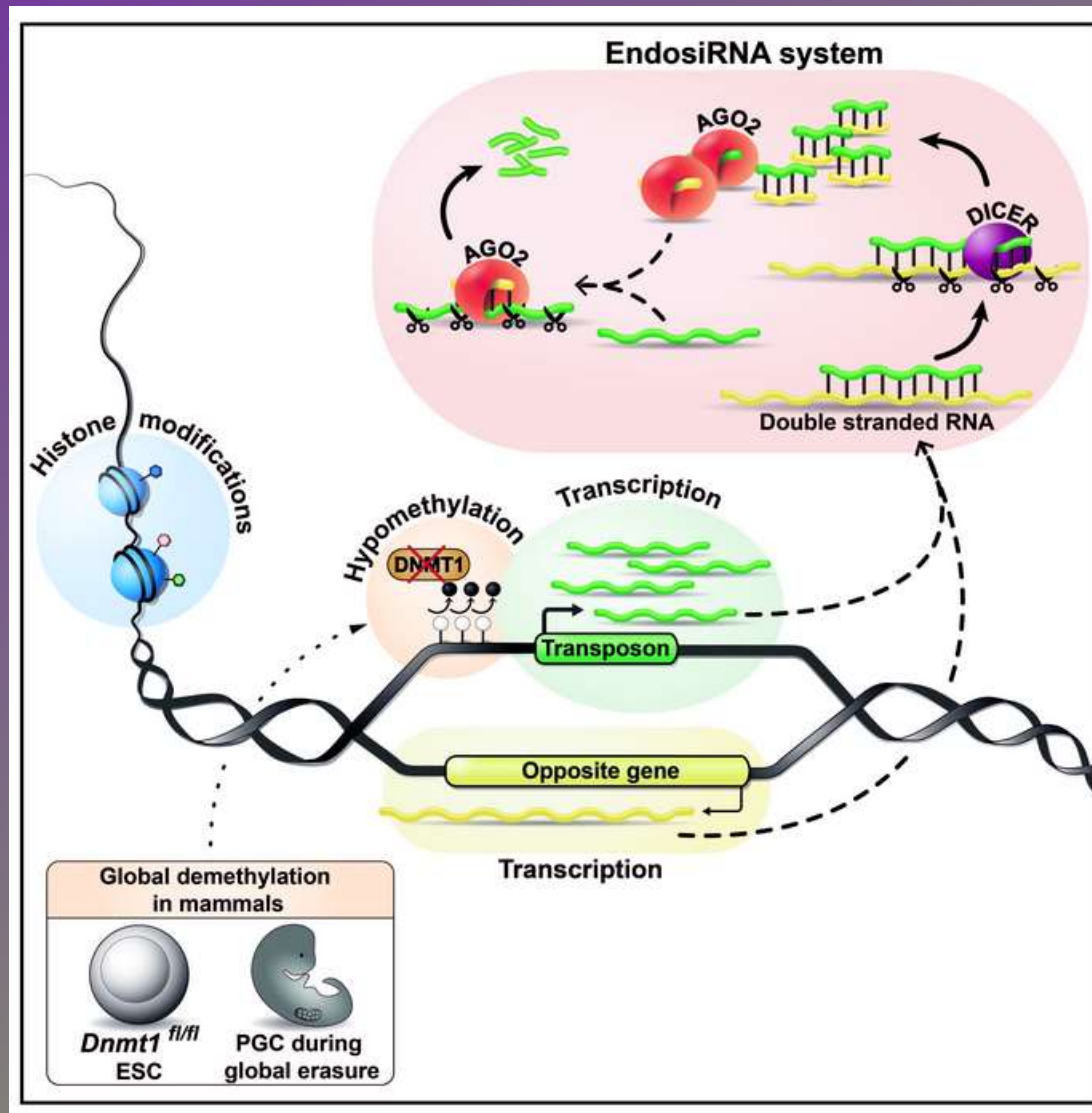
Chemical markers in DNA called methyations can keep transposons inactive.

In each new generation most methyations are temporarily erased and renewed by a process called epigenetic reprogramming.

This means that, during sperm and egg production there is a short time when methyations do not control transposon activity, leaving them free to damage genes and shuffle DNA.

Active transposons produce messages in the form of RNA molecules, which have many similarities to DNA.

The endosiRNAs then act like a trap allowing a protein called Argonaute2 (Ago2) to seek and destroy transposon messages before they cause any harm.



Natural epigenetic reprogramming happens in primordial germ cells

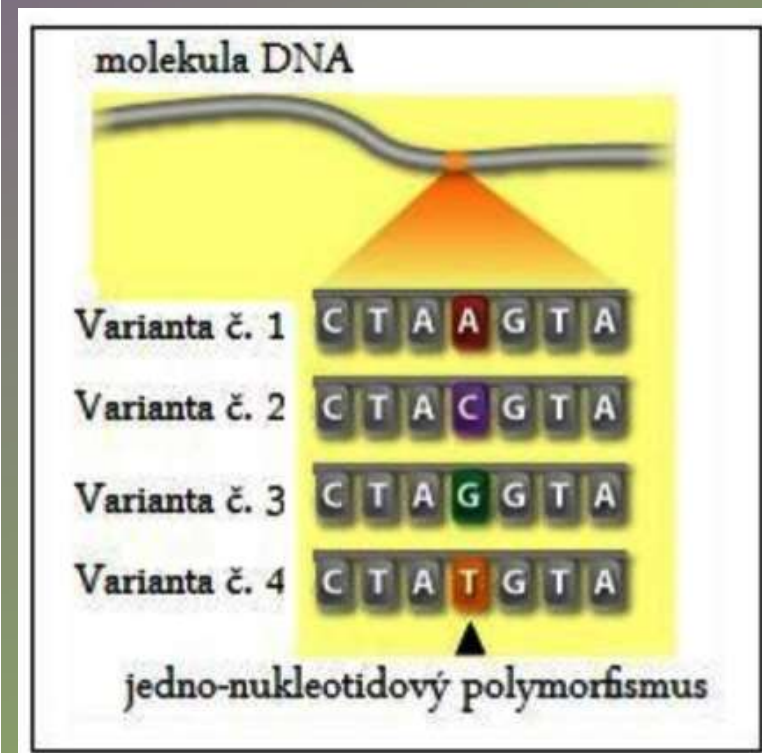
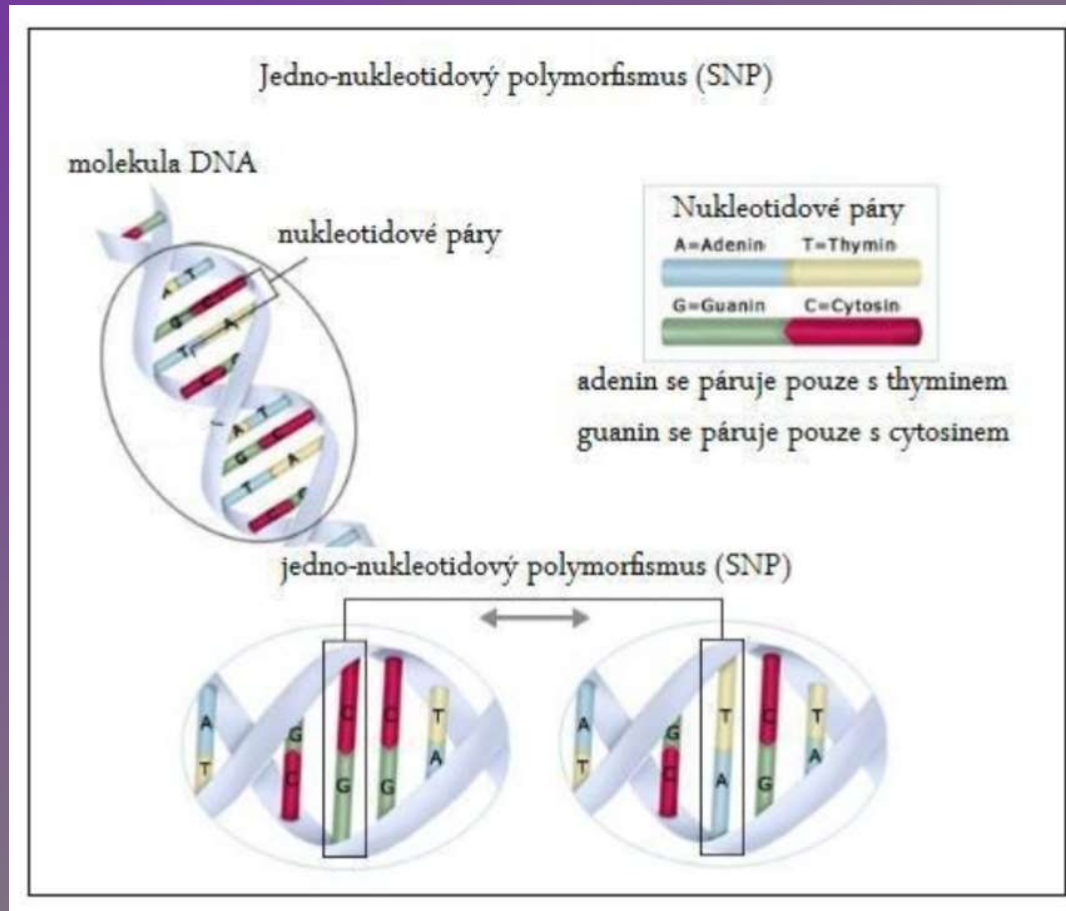
**Genetický polymorfismus** je dle definice existence dvou nebo více alel (variant genů) v jednom lokusu, převyšující svým výskytem 1% výskyt v populaci.<sup>[1]</sup> Příčinou přitom nejsou opakovaně probíhající mutace.<sup>[2]</sup> Příkladem je polymorfismus v genu RHD, který určuje lidský Rh faktor: tento gen se vyskytuje v populaci v alelách Rh<sup>+</sup> a Rh<sup>-</sup>. Polymorfismus může být pouze na přechodnou dobu, jindy se udržuje trvale a vzniká tzv. **balancovaný polymorfismus** (poměry alel jsou dlouhodobě stabilní). Pokud je nacházen polymorfismus při srovnávání populací v různých částech areálu, jedná se o **geografický polymorfismus**.<sup>[3]</sup> Jedinci s konkrétní alelou, která je činí odlišnými od ostatních, se někdy nazývají morfy.<sup>[2]</sup> Polymorfismus v nekódujících částech genomů umožňuje analyzovat DNA pomocí metody RFLP, k mapování evoluce se také používá jednonukleotidový polymorfismus (SNP).

**Bodový polymorfismus** Vzniká následkem bodových mutací v DNA. Obvykle záměnou jednotlivých nukleotidů, které vedou k zařazení jiné aminokyseliny. Tento stav bývá detekován pomocí metody RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism. Někdy bývá tento typ označován také jako **SNP** – single nucleotide polymorphism. V některých výzkumech byla nalezena spojitost mezi určitými formami SNP a multifaktoriálními chorobami – např.: hypertenze, diabetes nebo srdeční choroby.

**Repetitivní sekvence** Úseky nukleotidů, které se v DNA vyskytují v mnoha kopiích. V rámci populace se však jejich délky a počty individuálně odlišují. Dědičnost odpovídá Mendelovským pravidlům.



# Polymorfismy



Mlčochová, Bc práce MU