

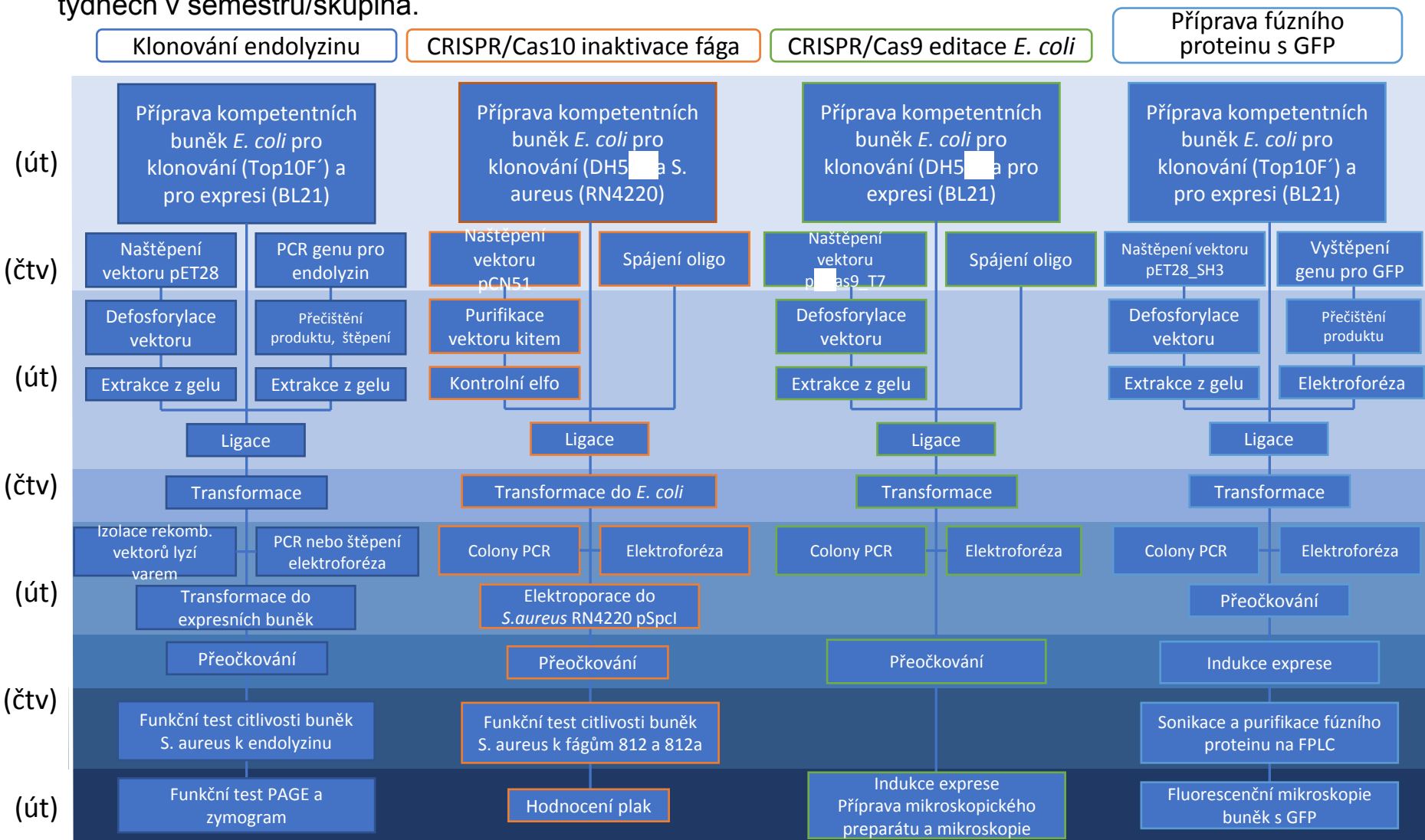
Harmonogram úloh

Vyučující: Ivana Mašlaňová, Lucie Kuntová, Roman Pantůček, Jiří Holoubek, Hana Šimečková

Kontakt: maslanova@sci.muni.cz, Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

Harmonogram cvičení z genového inženýrství – Jaro 2022

Teorie ke čtyřem úlohám bude probírána v úterky pro všechny zapsané studenty společně (3-4 v semestru), v učebně E25/209. Potřebné pomůcky: notebook. Účast povinná. Praktická část bude probíhat v cca 4 týdnech v semestru/skupina.



Restrikční enzymy - úvod

Vyučující: Ivana Mašlaňová, Lucie Kuntová, Roman Pantůček, Jiří Holoubek, Hana Šimečková

Kontakt: maslanova@sci.muni.cz, Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

Působení restrikčních enzymů

Typy RE: I, II, III a IV

TYPES AND ACTIVITIES OF RESTRICTION ENZYMES

Type I

Cleaves DNA at random sites far from its recognition sequence

Type II

Cleaves DNA at defined positions close to or within its recognition sequence

Type IIG

Cleaves outside its recognition sequence with both REase and MTase enzymatic activities in the same protein

Type IIP

Cleaves symmetric targets and cleavage sites

Type IIS

Recognizes asymmetric sequences

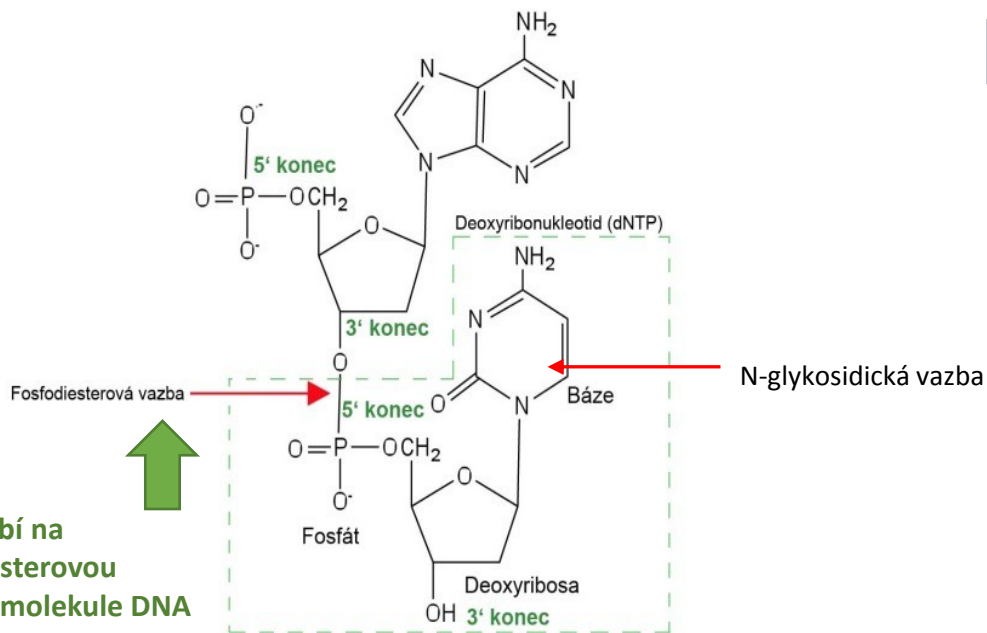
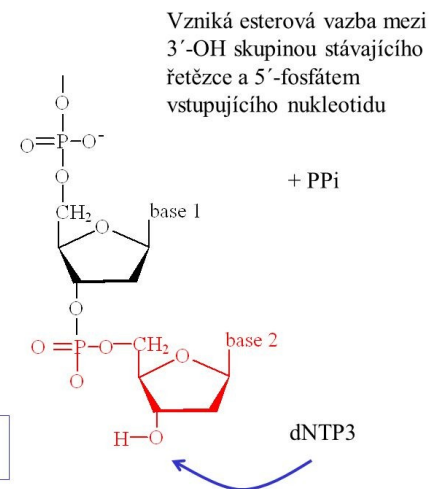
Type III

Cleaves outside its recognition sequence and require two sequences in opposite orientations within the same DNA

Type IV

Cleaves modified (e.g., methylated) DNA

5'
↓
3'



RE působí na fosfodiesterovou vazbu v molekule DNA

Definice jednotky enzymu

One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 μg of lambda DNA in 1 hour at 37°C in 50 μL of recommended reaction buffer

Aktivita enzymu

- ✓ závislá na teplotě
- ✓ závislá na typu substrátu
- ✓ závislá na čase
- ✓ závislá na chemických faktorech (druh pufru)
- ✓ závislá na koncentraci (U)

Závislost na čase

Classic vs. FastDigest

NdeI-Classic

- Incubate at 37°C for 1-16 hours.

NdeI-FD

Incubate at 37°C in a heat block or water thermostat for 5 min (plasmid DNA) or for 30 min (genomic DNA), or for ≥ 60 min (PCR product).

No detectable degradation of 1 μ g of lambda DNA due to nuclease contamination or star activity occurred during incubation with 1 μ L of FastDigest NdeI for 6 hours.

Longer incubation may result in star activity.

Závislost na čase / typu substrátu

BamHI – FD

- 1 μL of FastDigest BamHI is formulated to digest up to:
 - 1 μg of lambda DNA in 5 min.
 - 1 μg of plasmid DNA in 5 min.
 - 0.2 μg of PCR product in 5 min.
 - 1 μg of genomic DNA in 5 min, or 5 μg of genomic DNA in 30 min.

NdeI – FD

- 1 μL of FastDigest NdeI is formulated to digest up to:
 - 1 μg of lambda DNA in 5 min.
 - 1 μg of plasmid DNA in 5 min.
 - 0.2 μg of PCR product in ≥ 60 min.
 - 1 μg of genomic DNA in 30 min, or 5 μg of genomic DNA in 3 hours.

Závislost na typu substrátu

Enzyme	Oligo Sequence	Chain Length	% Cleavage	
			2 hr	20 hr
NdeI	CCATATGG	8	0	0
	CCCATATGGG	10	0	0
	CGCCATATGGCG	12	0	0
	GGGTTT CATATG AAACCC	18	0	0
	GGAATTC CATATG GAATTCC	20	75	>90
	GGAATTC CATATG GAATTCCC	22	75	>90

Enzyme	Base pairs from End	%Cleavage Efficiency	Vector	Initial Cut
HindIII	3	90	LITMUS 29	NcoI
	2	91	LITMUS 28	NcoI
	1	0	LITMUS 29	BamHI

Závislost na typu substrátu



be INSPIRED
drive DISCOVERY
stay GENUINE

Applications & Products

Tools & Resources

Support

About

Prokaryotic Methylation

In prokaryotes, MTases have most often been identified as elements of restriction/modification systems that act to protect host DNA from cleavage by the corresponding restriction endonuclease. Most laboratory strains of *E. coli* contain three site-specific DNA methylases.

- Dam methylase—methylation at the N⁶ position of the adenine in the sequence GATC (1,2).
- Dcm methyltransferases—methylation at the C5 position of the second cytosine in the sequences CCAGG and CCTGG (1,3).
- EcoKI methylase—methylation of adenine in the sequences AAC(N⁶)GTGC and GCAC(N⁶)GTT.

Some or all of the sites for a restriction endonuclease may be resistant to cleavage when isolated from strains expressing the Dam or Dcm methylases if the methylase recognition site overlaps the endonuclease recognition site. For example, plasmid DNA isolated from *dam*⁺ *E. coli* is completely resistant to cleavage by MboI, which cleaves at GATC sites.

Not all DNA isolated from *E. coli* is methylated to the same extent. While pBR322 DNA is fully modified (and is therefore completely resistant to MboI digestion), only about 50% of λ DNA Dam sites are methylated, presumably because the methylase does not have the opportunity to methylate the DNA fully before it is packaged into the phage head. As a result, enzymes blocked by Dam or Dcm modification will yield partial digestion patterns with λ DNA.

Restriction sites that are blocked by Dam or Dcm methylation can be un-methylated by cloning your DNA into a *dam*⁻, *dcm*⁻ strain of *E. coli*, such as *dam*⁻/*dcm*⁻ Competent *E. coli* (NEB #C2925).

Restriction sites can also be blocked if an overlapping site is present. In this case, part of the Dam or Dcm sequence is generated by the restriction enzyme sequence, followed by the flanking sequence. This situation should also be considered when designing restriction enzyme digests.

Eukaryotic Methylation

CpG MTases, found in higher eukaryotes (e.g., Dnmt1), transfer a methyl group to the C⁵ position of cytosine residues. Patterns of CpG methylation are heritable, tissue specific and correlate with gene expression. Consequently, CpG methylation has been postulated to play a role in differentiation and gene expression (4).

Note: The effects of CpG methylation are mainly a concern when digesting eukaryotic genomic DNA. CpG methylation patterns are not retained once the DNA is cloned into a bacterial host.

Závislost na teplotě a pufru

Pozor na současné štěpení více enzymy! <https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>

[Home Page](#) / [RE Digest](#)

Restriction Enzyme Single/Double Digestion

Sall

BssHII

[✕ clear 2nd selection](#)

Digest in NEBuffer r3.1

[Show Detailed Protocol](#)

Name	Cat #	Temp °C	Supplied Buffer	Add SAM	% Activity in NEBuffer™			
					r1.1	r2.1	r3.1	rCutSmart
Sall	R0138	37	NEBuffer r3.1	No	10	10	100	10
BssHII	R0199	50	rCutSmart Buffer	No	100	100	100	100

Name	Time-Saver™	Heat Inactivation (°C)	Methylation Sensitivity
Sall	Yes	65	cpg (Blocked)
BssHII	Yes	65	cpg (Blocked)

Notes:

1. Digest in NEBuffer r3.1 (or NEBuffer 3 + rAlbumin) at 37 °C with Sall, then add BssHII and raise temperature to 50 °C.
2. Sall has a High Fidelity version Sall-HF. High Fidelity (HF) Restriction Enzymes have been engineered for reduced star activity and have 100% activity in rCutSmart Buffer which may simplify your double digest.

Závislost na koncentraci

Menší koncentrace enzymu přemění stejné množství substrátu za delší čas.

Částečně expirovaný enzym lze kompenzovat:

1. Prodloužením doby inkubace.
2. Přidáním počtu jednotek (U/reakci)

Užitečné odkazy a zdroje:

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>

<https://international.neb.com/>

https://www.neb.com/~media/nebus/files/chart%20image/cleavage_olignucleotides_old.pdf

https://www.neb.com/~media/nebus/files/chart%20image/cleavage_linearized_vector_old.pdf

<https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/nebuffer-performance-chart-with-restriction-enzymes>

<https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>

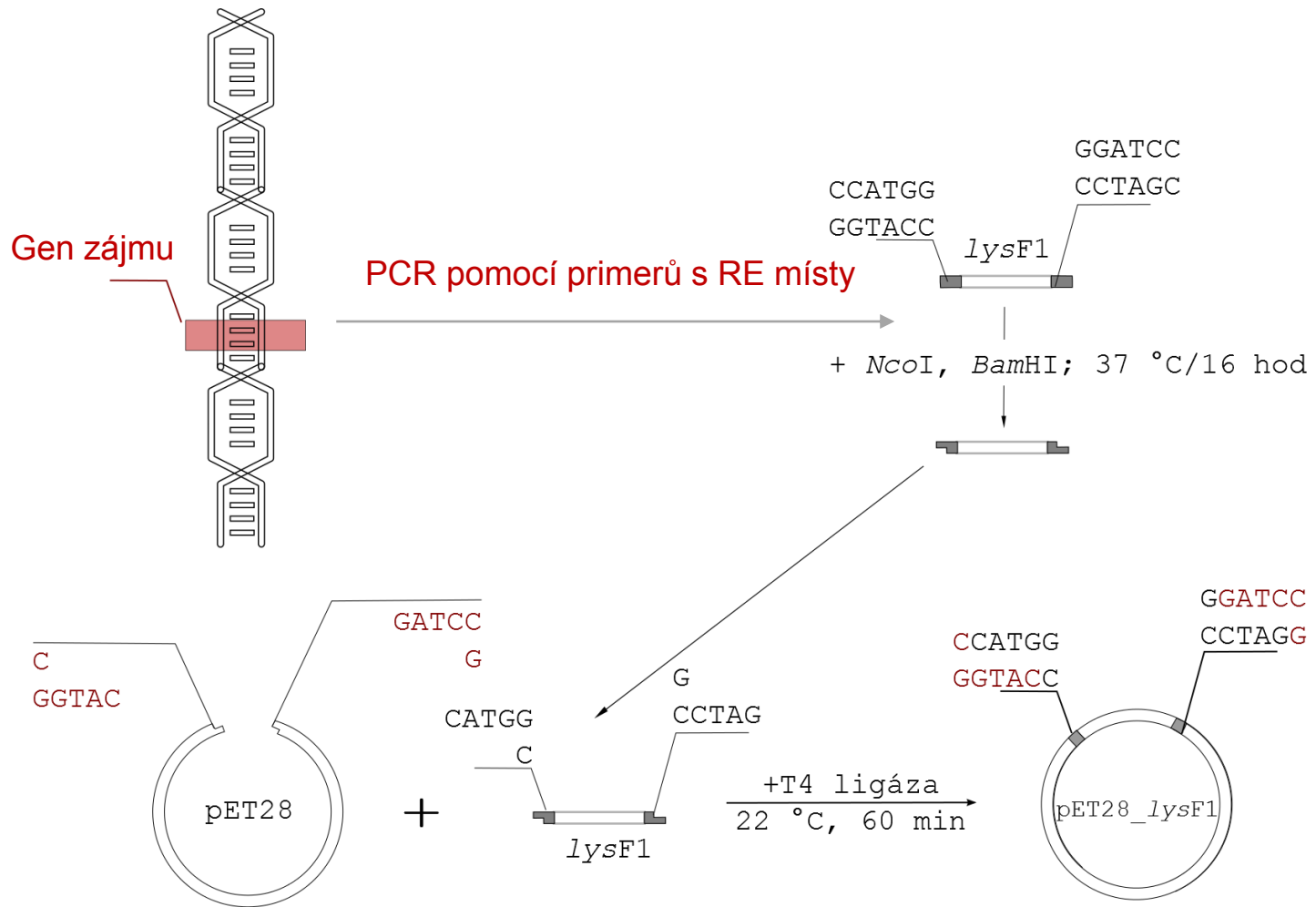
<https://nebcloner.neb.com/#/>

Klonování - úvod

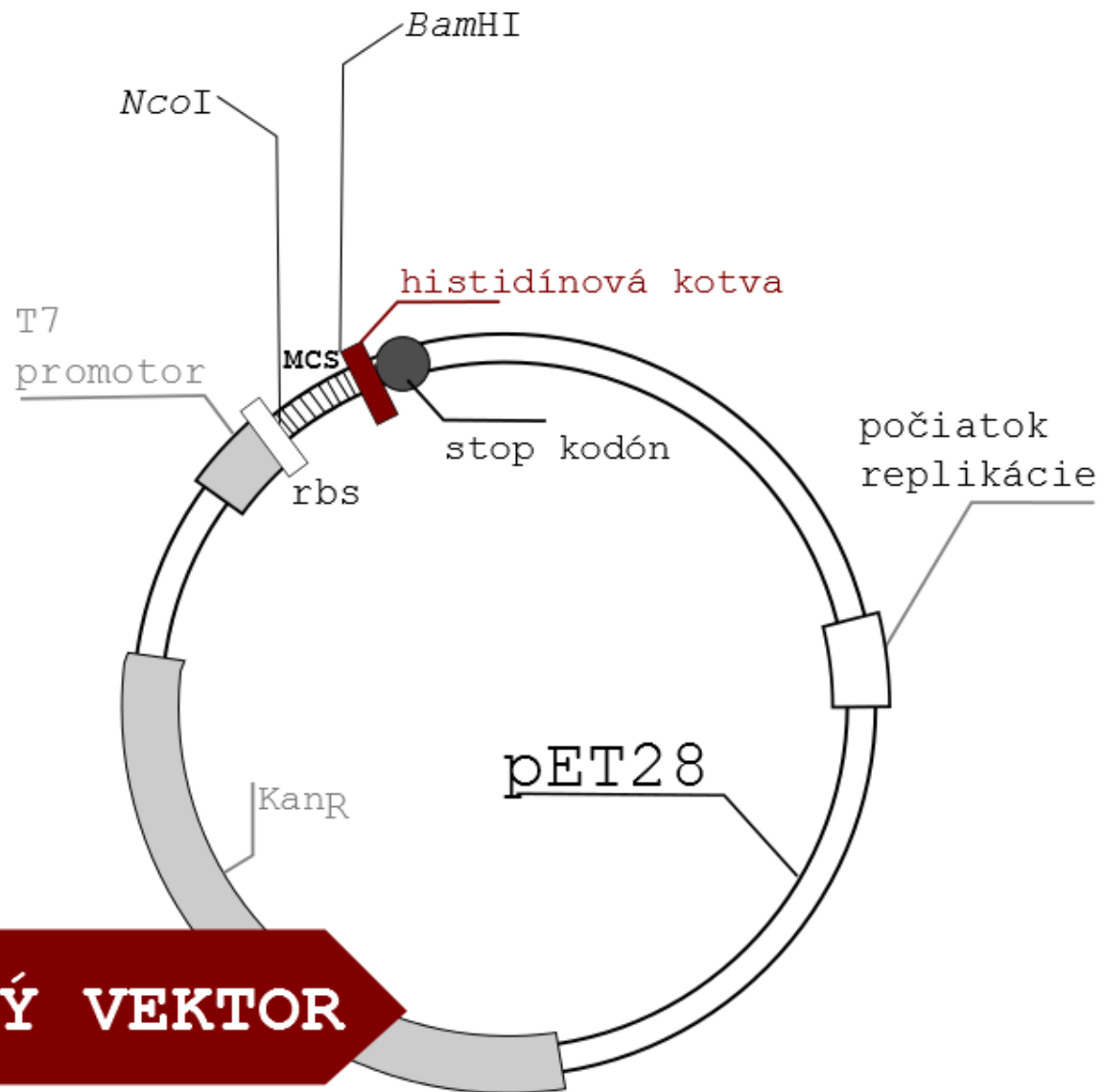
Vyučující: Ivana Mašlaňová, Lucie Kuntová, Roman Pantůček, Jiří Holoubek, Hana Šimečková

Kontakt: maslanova@sci.muni.cz, Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

Postup klonování

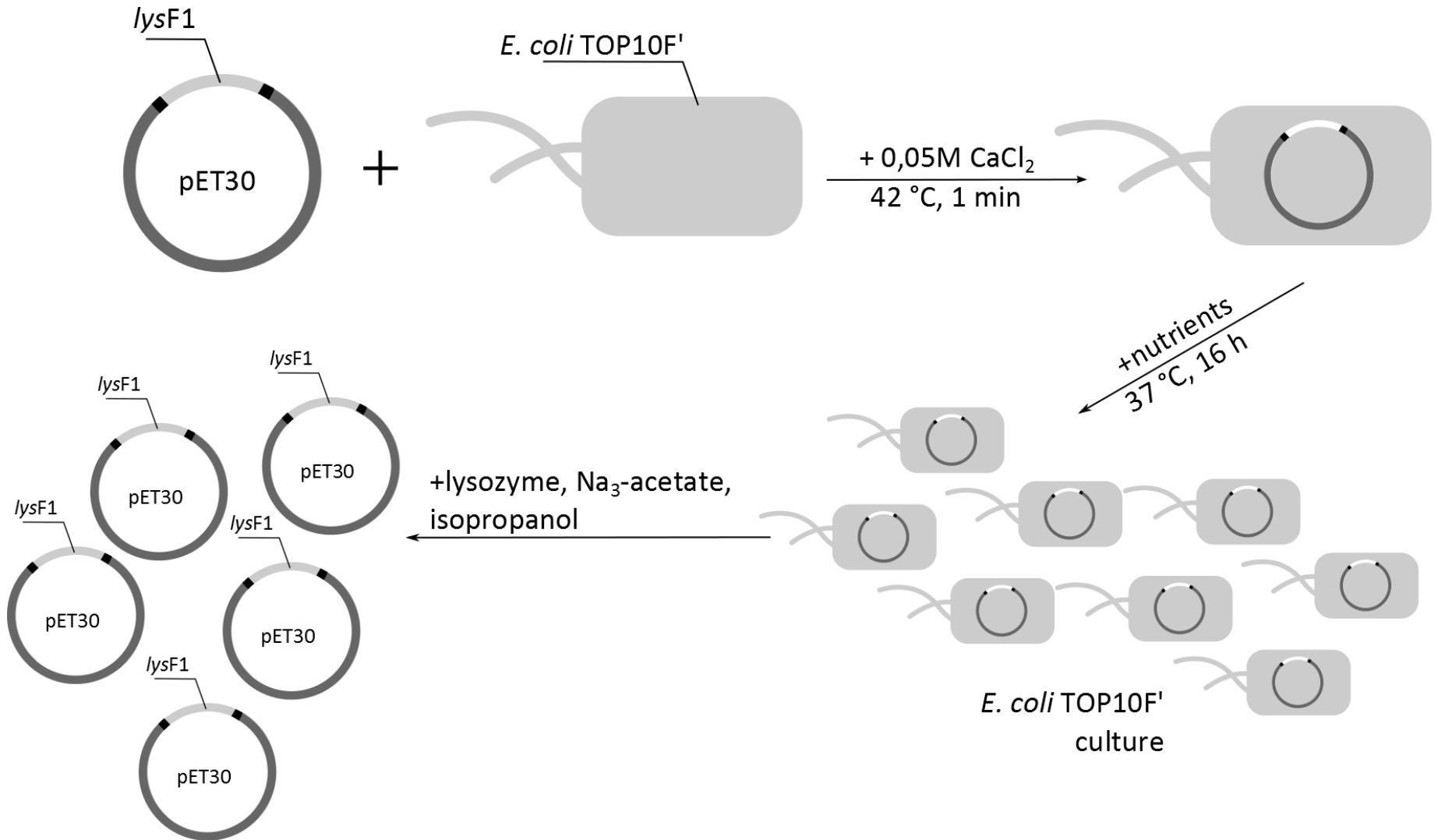


Naštěpení vektoru pET28 příslušnými
restriktázami (*NcoI*, *BamHI*)



EXPRESNÝ VEKTOR

Transformace *E. coli*

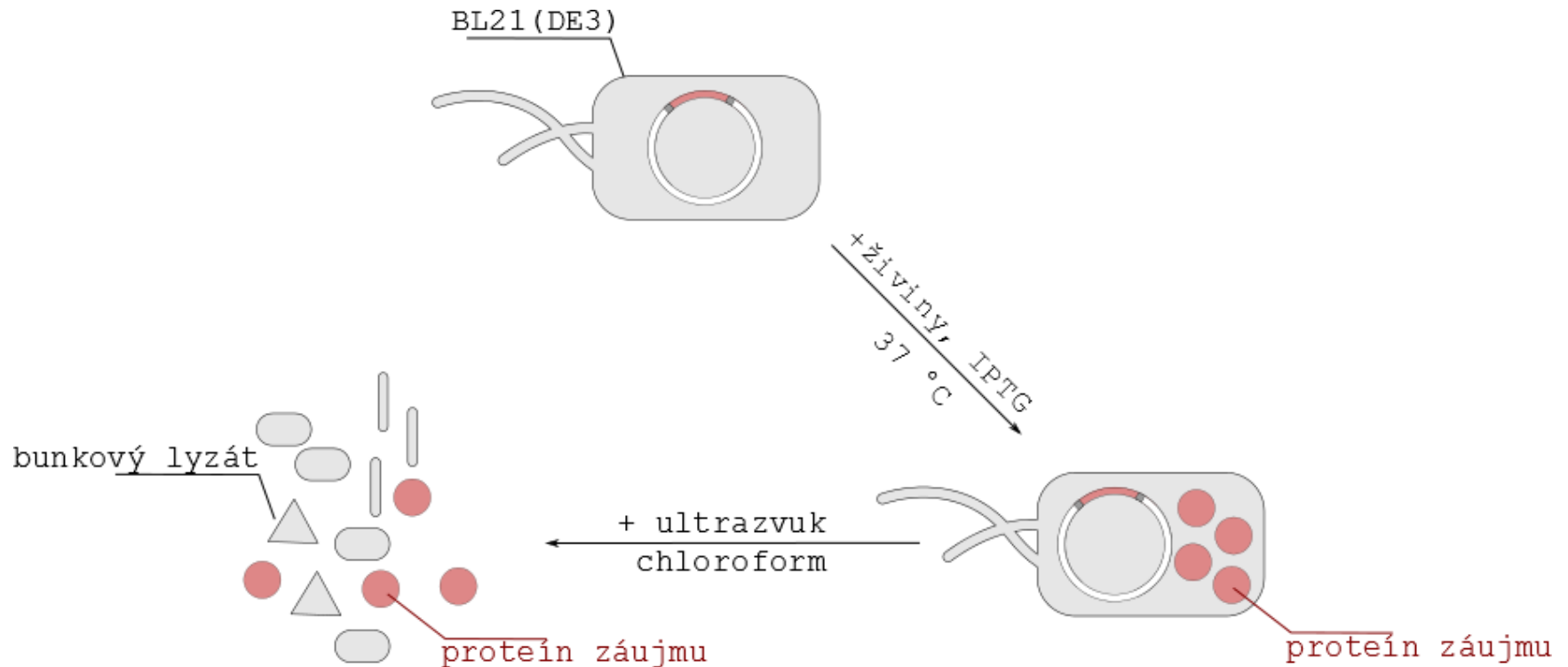


Expres heterologního genu v *E. coli*

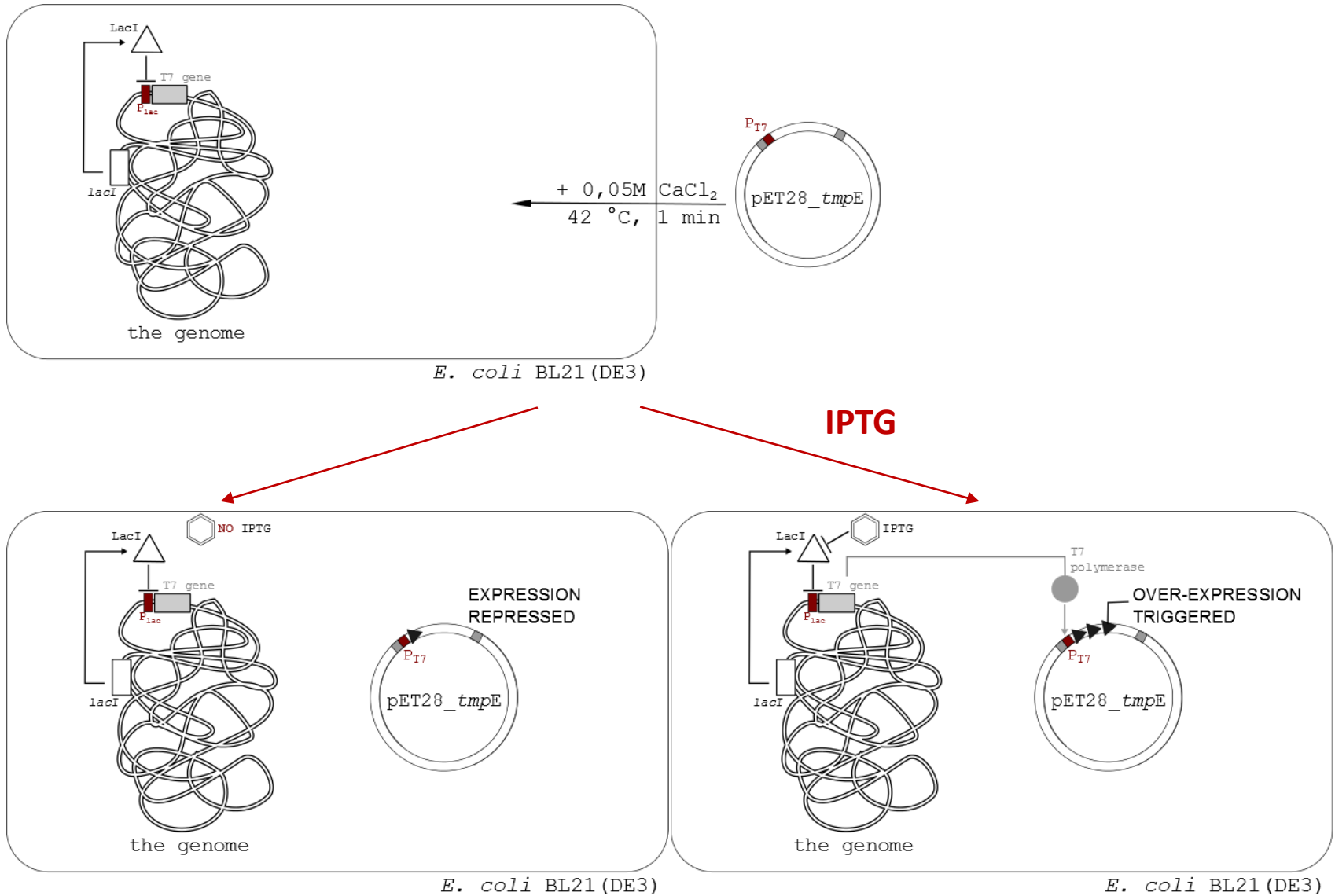
E. coli strain BL21(DE3)

Genotyp: *E. coli* B *dcm*⁻ *ompT*⁻ *hsdS*(rB-mB⁻) *gal*

- kmen obsahuje gen DE3 – gen pro T7 RNA polymerázu pod kontrolou promotoru lac UV5 a lacIq, IPTG je vyžadovaný jako induktor nutný pro expresi T7 RNA polymerázy.
- *dcm* (DNA-cytosine methyltransferase) - deficientní
- *ompT* (outer membrane protease) – deficientní
- *hsdS* (restrikčně-modifikační systém) – deficientní pro restrikci a modifikaci
- *gal* operon – metabolismus galaktózy



Express heterologního genu v *E. coli*

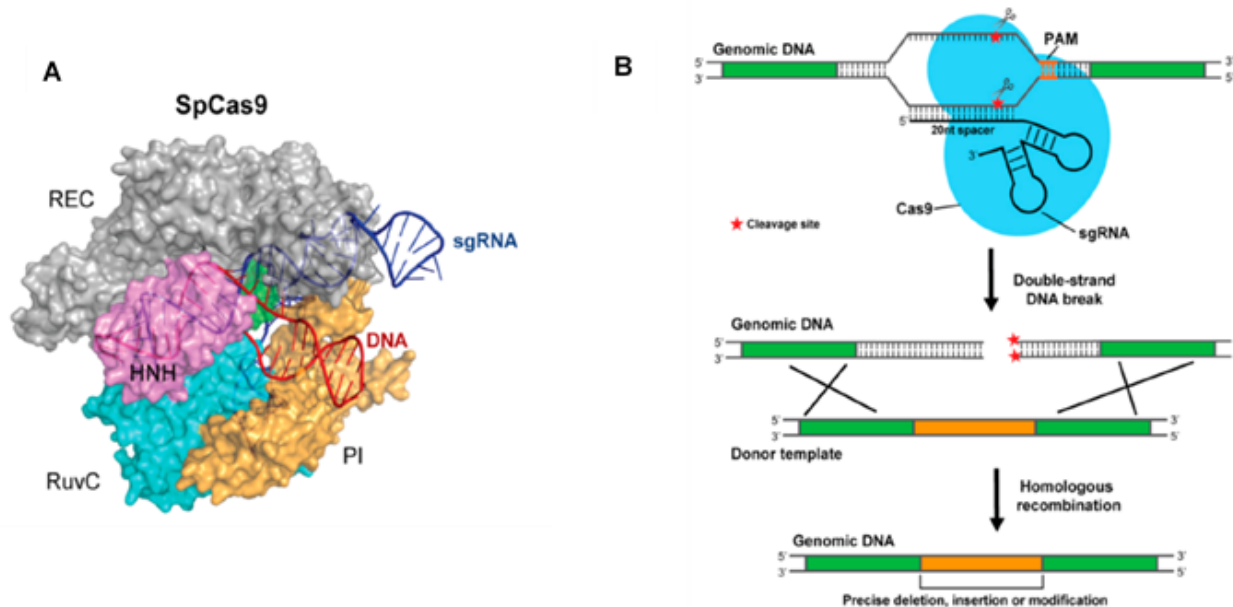


Úloha 3: Blokování tvorby septa u *E. coli* pomocí CRISPR/Cas9 systému

Vyučující: Ivana Mašlaňová, Lucie Kuntová, Roman Pantůček, Jiří Holoubek, Hana Šimečková

Kontakt: maslanova@sci.muni.cz, Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

CRISPR/Cas9 editační systém



Cas9 protein je endonukléza navádějí gRNA na cílovou sekvenci DNA.

Dvě funkční oblasti:

- oblast s **nukleázovou aktivitou** (NUC) a oblast s **rozpoznávací funkcí** (REC) tvořená α -helix (**Obr. 1A**).

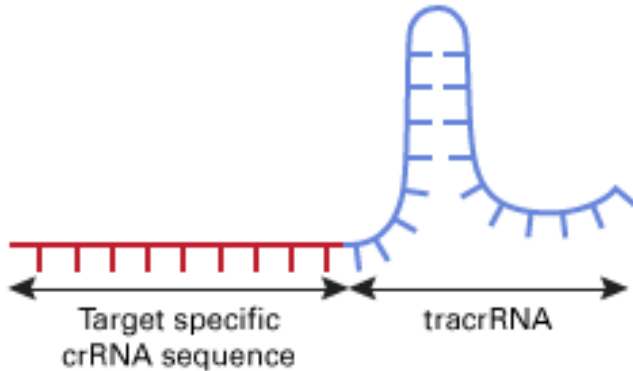
Oblast NUC obsahuje tři domény:

- i) HNH nukleázová doména štěpící cílový řetězec DNA
- ii) RuvC nukleázová doména štěpící „nontarget“ řetězec DNA,
- iii) PAM sekvence tzv. protospacer-adjacent motiv zajišťující specifické navedení Cas9 k cílové DNA sekvenci (PI – PAM-interacting domain).

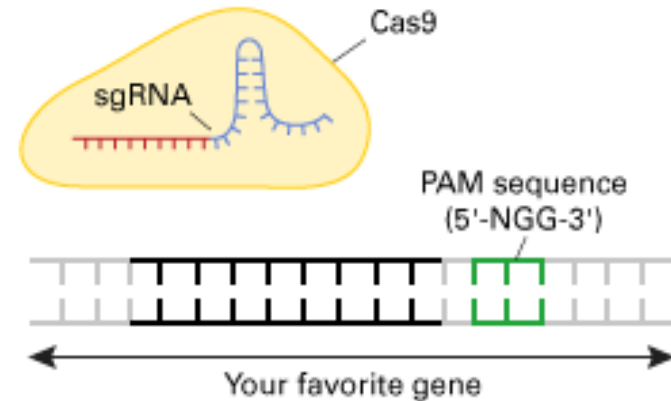
CRISPR/Cas9 editační systém

sgRNA – crRNA (navrhujeme) + tracrRNA

1 sgRNA (single guide RNA)



2 sgRNA + Cas9 protein



crRNA – jak ji navrhnout?

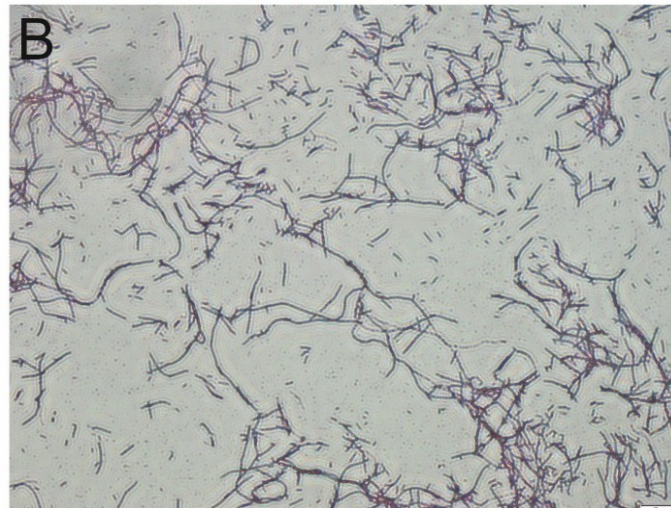
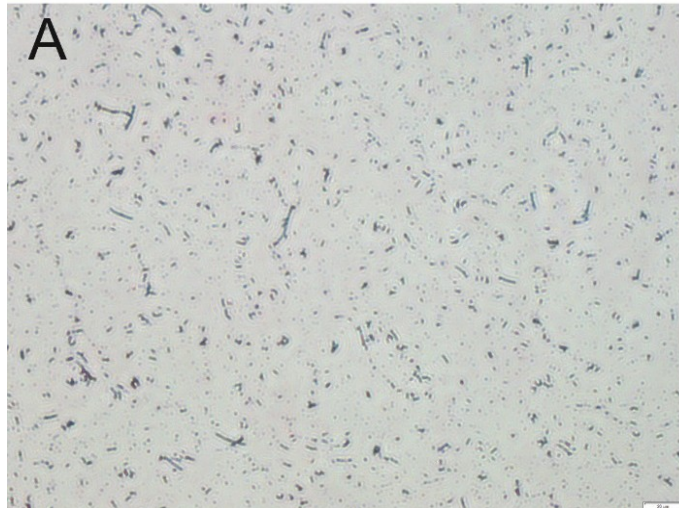
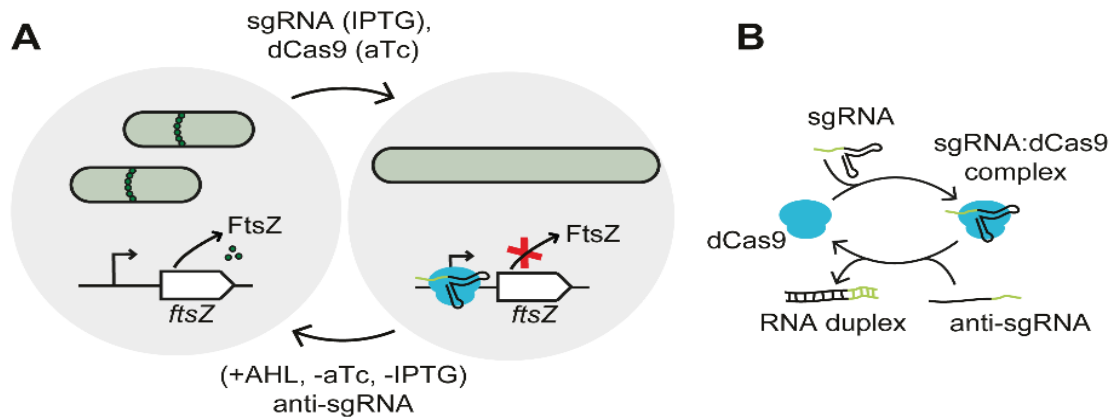
1. Ručně
2. Pomocí vhodných on-line nástrojů

<https://chopchop.cbu.uib.no/#>

<https://arep.med.harvard.edu/CasFinder/>



Schématické znázornění interference gRNA a umlčení exprese genu *ftsZ* vedoucí k defektu ve tvorbě septa.

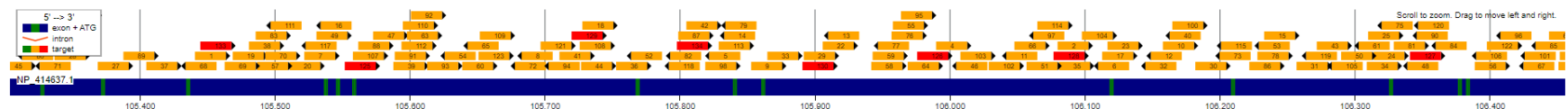


A. buňky *E. coli* bez editace septa, běžný fenotyp
B. buňky *E. coli* po umlčení genu *ftsZ*
Světelný mikroskop, barveno bazickým fuchsinem.

Návrh spaceru pro editaci septa u *E. coli*

1. Identifikace genu *ftsZ* v genomu *E. coli* – NCBI databáze
2. Návrh spaceru cílicího na danou DNA sekvenci (ručně, pomocí nástrojů např. chochop)

ftsZ



Download results:

[View in UCSC genome browser](#)

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
1	ACAAGCGCTGCGTAAACAGCGG	NC_000913.3:105442	+	50	0	1	0	0	0	73.73
2	CGTGTGGTTAACATCAGGGCGG	NC_000913.3:106081	+	55	1	1	0	0	0	73.53
3	AATGGAACCTACCAATGACGCGG	NC_000913.3:105316	+	40	0	1	0	0	0	71.25
4	GGCGAGCGGTGAAGACCGTGGG	NC_000913.3:105991	+	70	1	1	0	0	0	69.91
5	CATCCAGCAGGGAGATACCGCGG	NC_000913.3:105823	-	60	0	1	0	0	0	68.11
6	TTTCGAATCATCCAGACGACGAGG	NC_000913.3:106111	-	50	0	1	0	0	0	67.43
7	TCCAGAAGTTGGCCGAATGCGG	NC_000913.3:105523	+	55	0	1	0	0	0	66.84
8	AGGCTTAGTGACGACAGCAACGG	NC_000913.3:105684	-	50	0	1	0	0	0	66.34
9	GCAGCGAACGATGTACTGAAAGG	NC_000913.3:105854	+	50	0	1	0	0	0	65.92
10	TGTCCTCCGACAACGCGACTGTGG	NC_000913.3:106159	+	60	1	1	0	0	0	66.51
11	AGGTCGATATCTCCAGCAGCGG	NC_000913.3:106043	-	50	0	1	0	0	0	64.85
12	CGTTGTCGGAAGCAATGACCGG	NC_000913.3:106150	-	50	0	1	0	0	0	63.92
13	AAGTCCACGTTATCAAAACCGG	NC_000913.3:105911	-	45	0	1	0	0	0	63.83
14	TGCGCAAAACGATCCAGCAGGG	NC_000913.3:105834	-	60	0	1	0	0	0	63.55
15	TGTTGCGACAGGTATCGCATGG	NC_000913.3:106234	+	55	0	1	0	0	0	63.48
16	GATCCTCATAGCCGATTCGCGG	NC_000913.3:105535	-	55	2	1	0	0	0	64.76
17	GCGCTGGATGAGTTCGAAACGG	NC_000913.3:106114	+	50	0	1	0	0	0	62.42

navržené spacery

+/- řetězec

efektivita štěpení

Návrh spaceru pro editaci septa u *E. coli*

1. Identifikace genu *ftsZ* v genomu *E. coli* – NCBI databáze
2. Návrh spaceru cílicího na danou DNA sekvenci (ručně, pomocí nástrojů např. chochop)

Target: **ftsZ**

Rank: 1

Target sequence: **ACAAGCGCTGCGTAAACAGCGG**

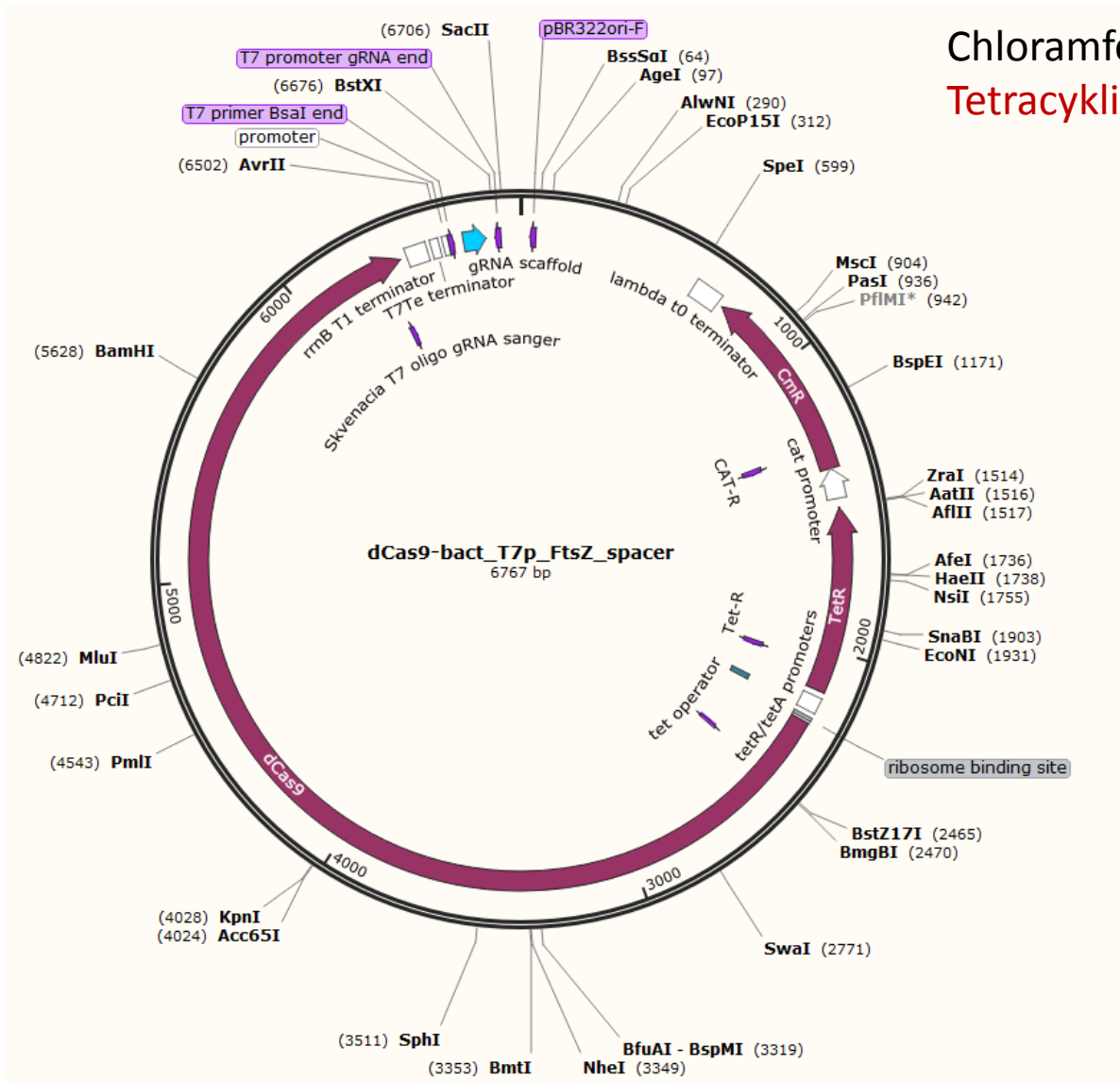
Google Translate



Download:

Pair	Left primer coordinates	Left primer	Left primer Tm	Left primer off-targets	Right primer coordinates	Right primer	Right primer Tm	Right primer off-targets	Pair off-targets	Product size
1	NC_000913.3:105224-105246	TGGCTGCGAAAAGAGTTTAAT	60.3	1	NC_000913.3:105486-105508	AGTCCTTTGGTGATACCGCTAC	59.5	1	0	284
2	NC_000913.3:105242-105264	TAATTTTTATGAGCCGACGAT	59.8	1	NC_000913.3:105486-105508	AGTCCTTTGGTGATACCGCTAC	59.5	1	0	266
3	NC_000913.3:105220-105242	TAGTTGGCTGCGAAAAGAGTTT	60.4	1	NC_000913.3:105486-105508	AGTCCTTTGGTGATACCGCTAC	59.5	1	0	288
4	NC_000913.3:105240-105262	TTTAATTTTTATGAGCCGACG	60.3	1	NC_000913.3:105486-105508	AGTCCTTTGGTGATACCGCTAC	59.5	1	0	268
5	NC_000913.3:105330-105352	ATGACGCGGTGATTAAGTCAT	60.8	1	NC_000913.3:105587-105609	CAGCAATAAAGACCATGTCTGC	59.8	1	0	279

Představení vektoru pro editaci CRISPR/Cas9



Představení vektoru pro editaci CRISPR/Cas9



promotor.....**ATGGAAACGAGACCATTGGTCTCAGTTTTAGAGCTAGAAA**.....sgRNA

Kazeta ve směru 5-3:

AvrII
 TCAT**CCTAGG**TAATACGACTCACTATAGGGAATATACAGGGGATTATATATA**ATGGAAAC**
GAGACCATTGGTCTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT
 ATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTTGAGATCTGTCCATACCCATGG
 TCTAGAATGCTCGAGTCAGAAA**CCGCGG**GAGA
SacII

Představení vektoru pro editaci CRISPR/Cas9

Kazeta ve směru 5-3:

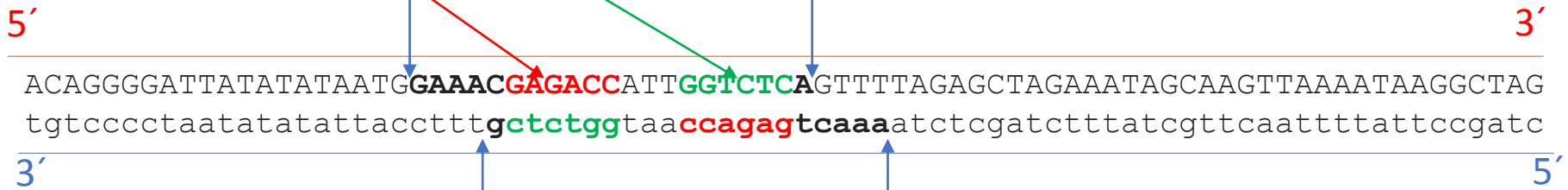
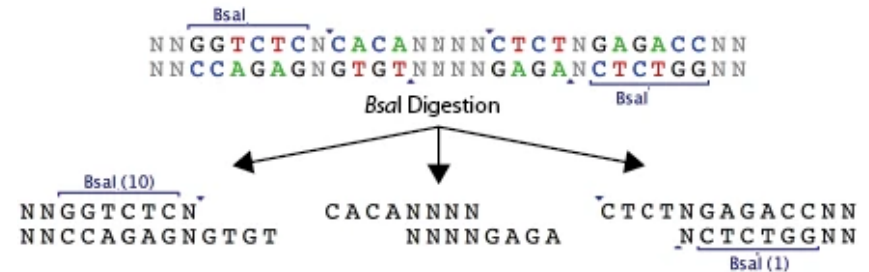
AvrII

TCATCCTAGGTAATACGACTCACTATAGGGAATATACAGGGGATTATATATAATGGAAACGAGACCATTGGTCTCAGTTTTAGAGCTAG
 AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAGATCTGTCCATACCCAT
 GGTCTAGAATGCTCGAGTCAGAAACCGCGGGAGA

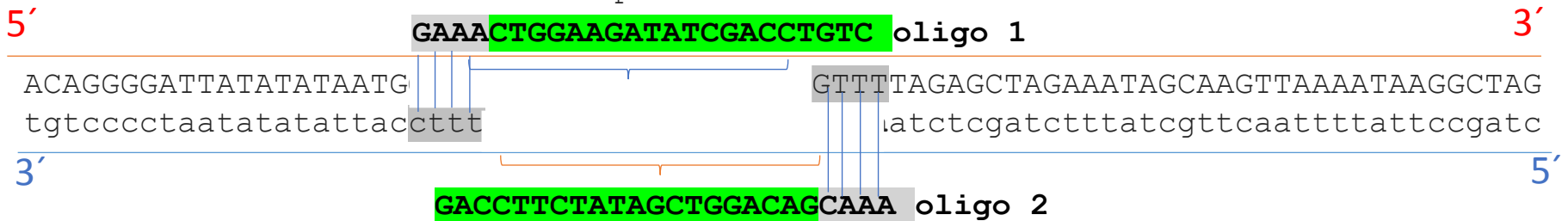
SacII

Kazetu štěpíme BsaI restriktázou:

5'... **GGTCTC** (N)₁ ... 3'
 3'... **CCAGAG** (N)₅ ... 5'



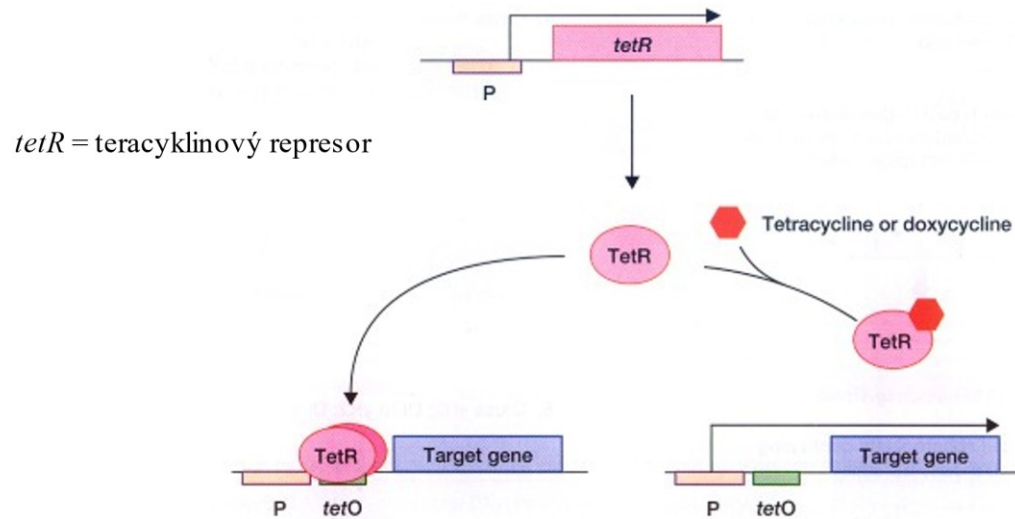
Po štěpení BsaI



Oligo 1 a **Oligo 2** - sekvence mezerníku cílicí na gen *ftsZ* doplněná o přesahy komplementární k naštěpené kazetě ve vektoru

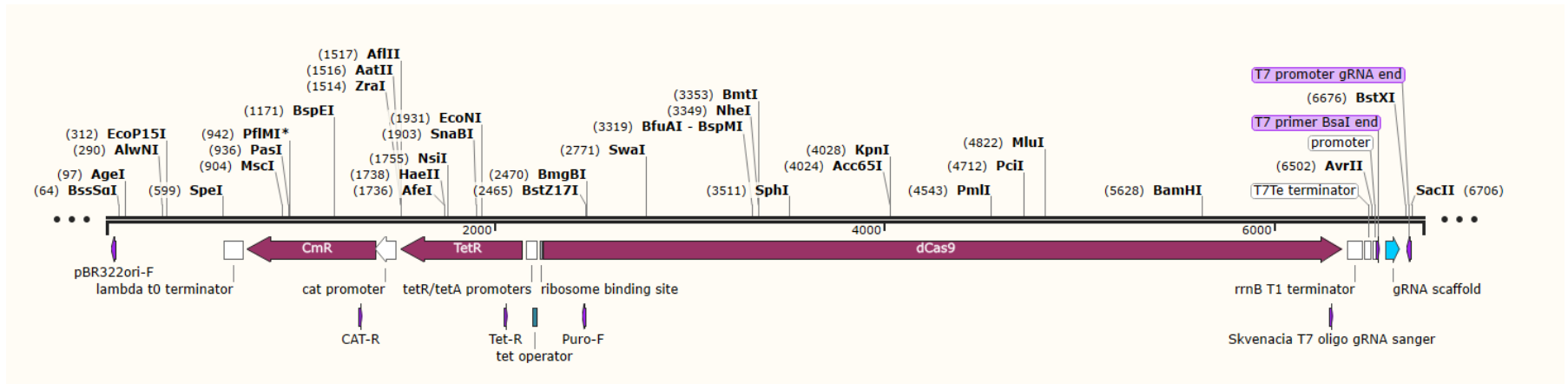
Expresa dCas9 indukovaná tetracyklinem

Základ expresního systému indukovatelného tetracyklinem



Konstitutivní exprese TetR povede k inaktivaci jakéhokoli transgenu, který obsahuje sekvenci operátoru, k níž se TetR váže. Po přidání tetracyklinu (nebo jeho analogu doxycyklinu) dojde k jeho navázání na TetR, jehož konformace se změní a není schopen se vázat na operátor, což vede k navození exprese transgenu.

Expresa dCas9 indukovaná tetracyklinem



Postup práce v bodech:

- I. Výchozím materiálem je plazmidová DNA **pΔCas9_T7** (vektor pro Cas9 editaci bez mezerníku, **Obr. 2**), kompetentní buňky *E. coli* **DH5α** a *E. coli* **BL21**.
- II. Vložení mezerníku do **pΔCas9_T7**: štěpení vektoru, vyřezání z gelu, spojení olig (mezerník), ligace
- III. Transformace upraveného vektoru (pΔCas9_T7_ztfs) do *E. coli* BL21, selekce na chloramfenikolu
- IV. Ověření transformant pomocí „colony PCR“
- V. Indukce exprese
- VI. Mikroskopie