

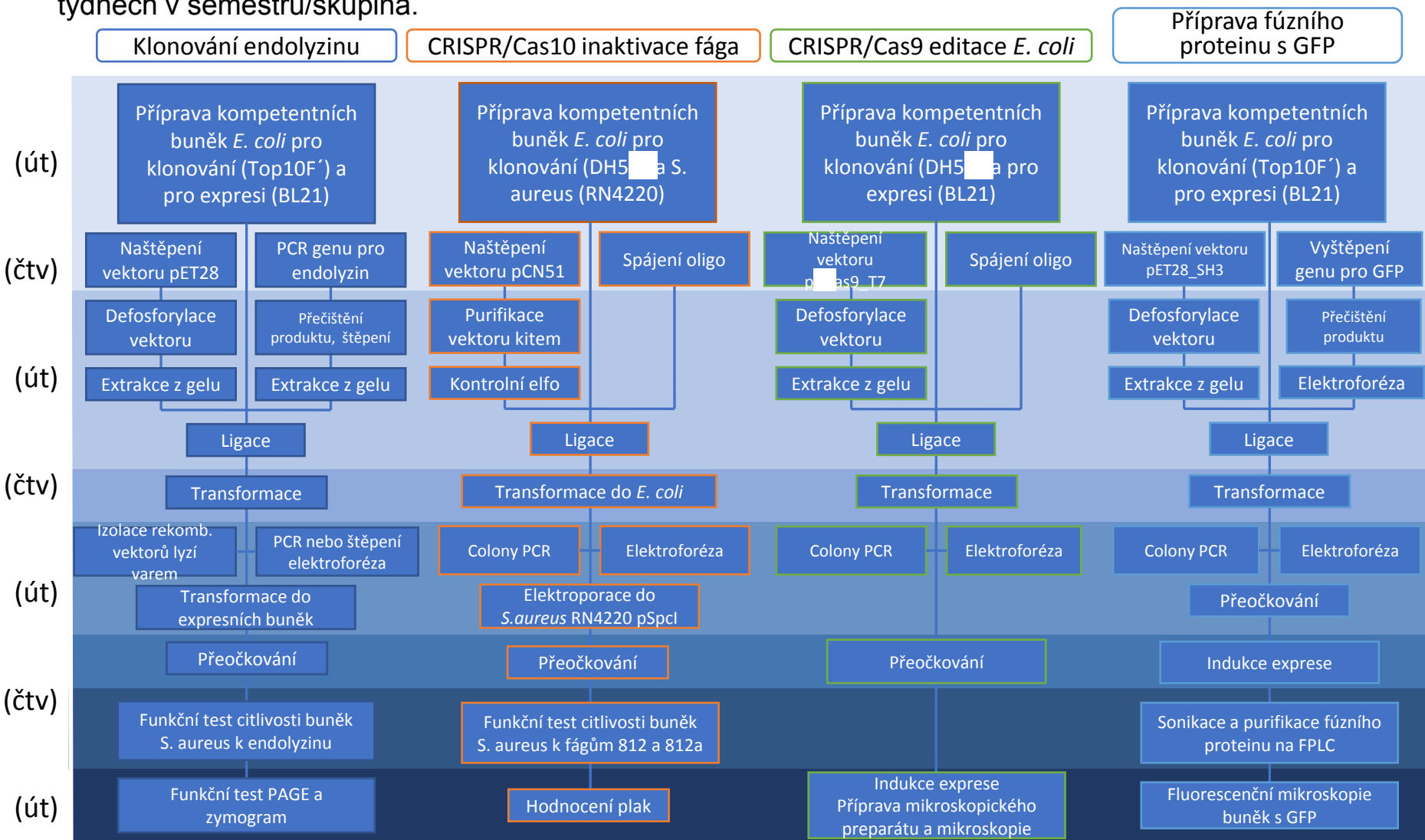
# Harmonogram úloh

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

**Kontakt:** [maslanova@sci.muni.cz](mailto: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.

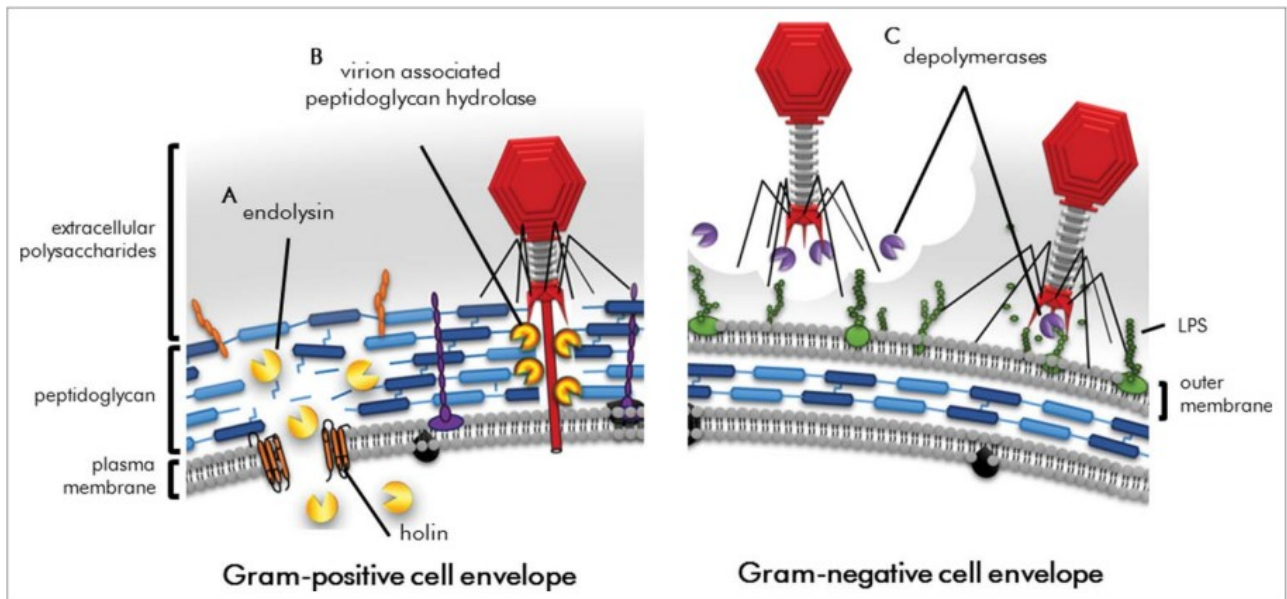
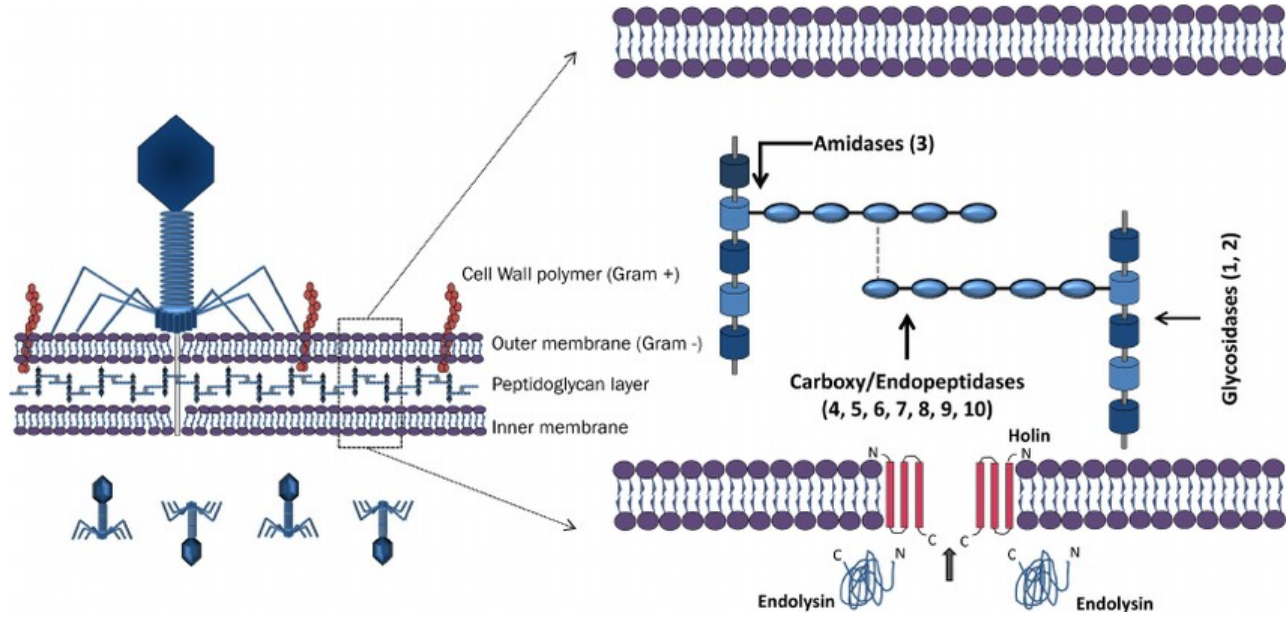


## Úloha 1: Klonování genu pro endolyzin v expresním systému pET28a(+)

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

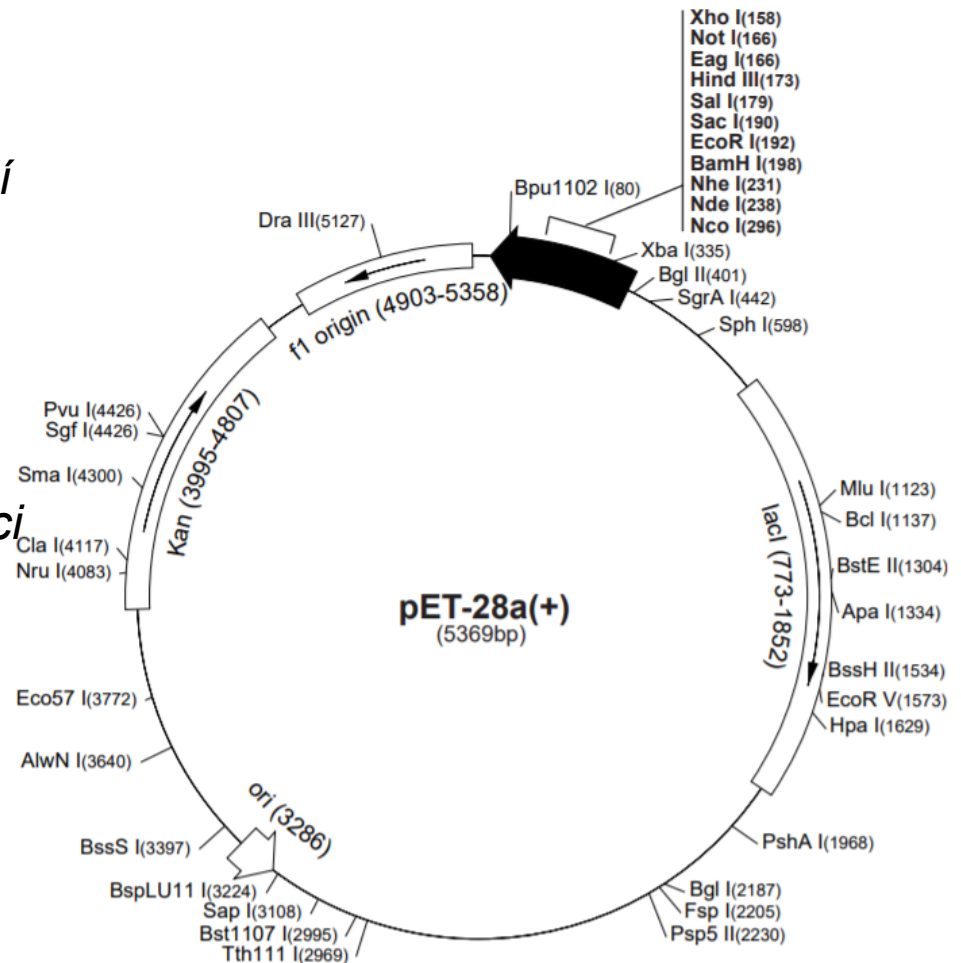
**Kontakt:** [maslanova@sci.muni.cz](mailto:maslanova@sci.muni.cz), Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

# Endolyzin

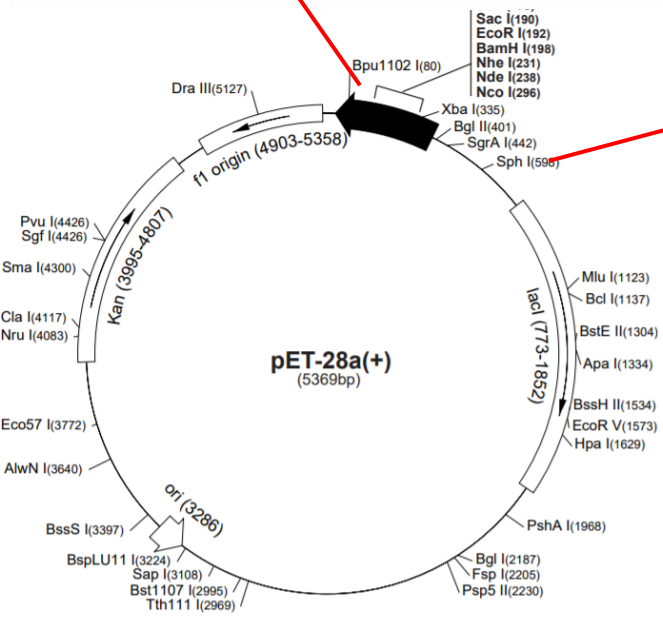


# Představení vektoru řady pET pro expresi v *E. coli*

- klonování a exprese rekombinantních proteinů v *E. Coli*
- pod silným T7 promotorem
  - Indukovatelný (IPTG)
  - *Expese T7 RNA polymerázou* hostitelské buňky
  - *Vysoká efektivita (rekombinantní protein tvoří až 50 % proteinů v buňce)*
  - *Nulová bazální exprese (bez induktoru se gen nepřepisuje)*
- *Značení 6xHis tag na N nebo C konci proteinu*
- *Vysoko-kopiový – 2 ori místa*

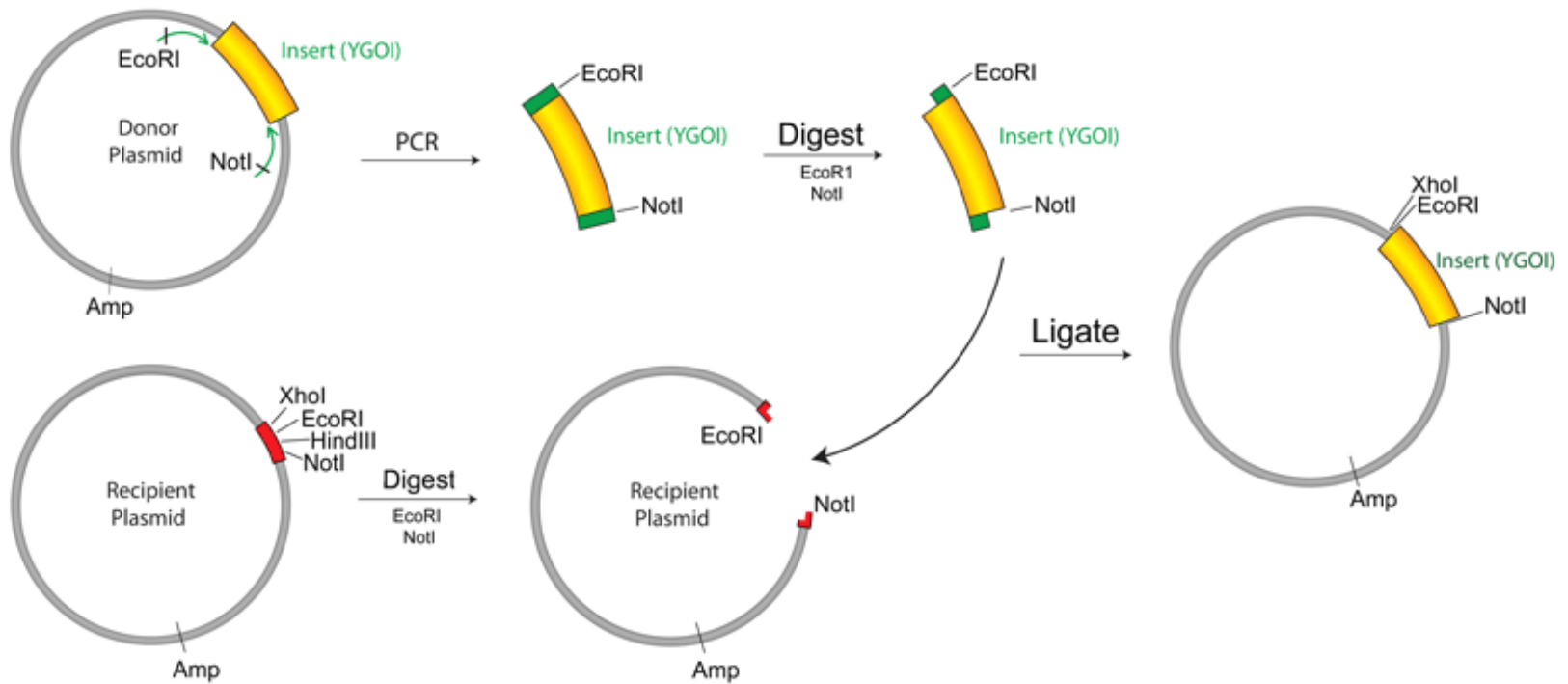


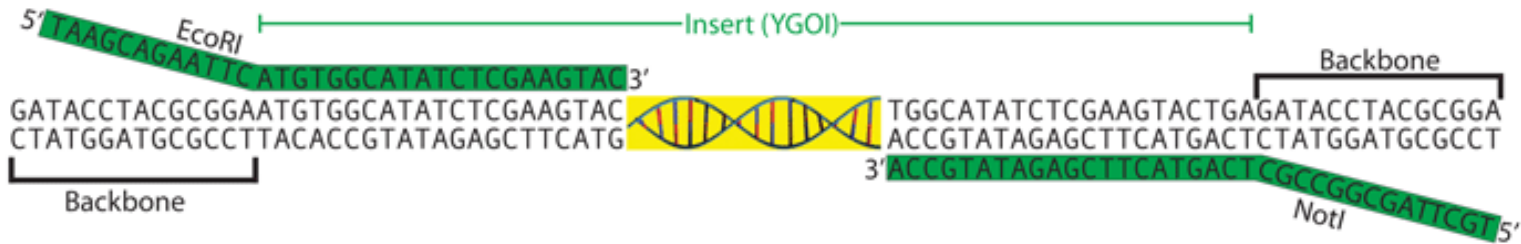
# PET-28(+) klonovací oblast – His tagy, promotor, MCS



# Klonování do plazmidového vektoru pomocí restriktáz

- <https://www.addgene.org/protocols/pcr-cloning/>





Forward primer:

1. Návrh primeru (18-21 bp, začíná iniciačním kodómem ATG)

5'-ATGTGGCATATCTCGAAGTAC-3'

2. Výběr vhodné restriktázy

EcoRI restriction site (**GAATTC**)

5'-**GAATTC**ATGTGGCATATCTCGAAGTAC-3'

3. Přidat volné nukleotidy pro optimální štěpení (3-6 nt)

**TAAGCA**

5'-**TAAGCA****GAATTC**ATGTGGCATATCTCGAAGTAC-3'

Reverse primer:

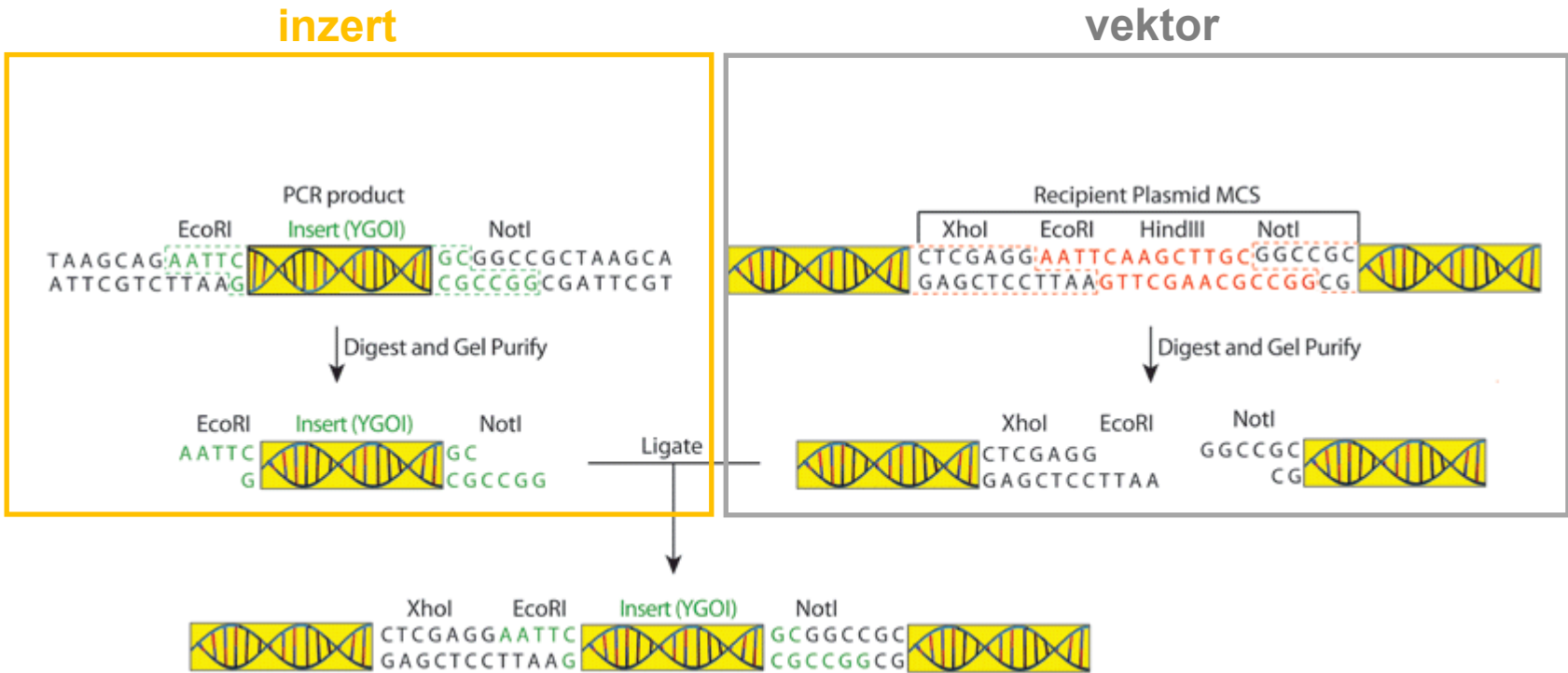
(5'-**NNNNNN****NNNNNN**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

.... reverzně komplementárně (<http://reverse-complement.com/>)



# Klonování do plazmidového vektoru pomocí restriktáz

- <https://www.addgene.org/protocols/pcr-cloning/>

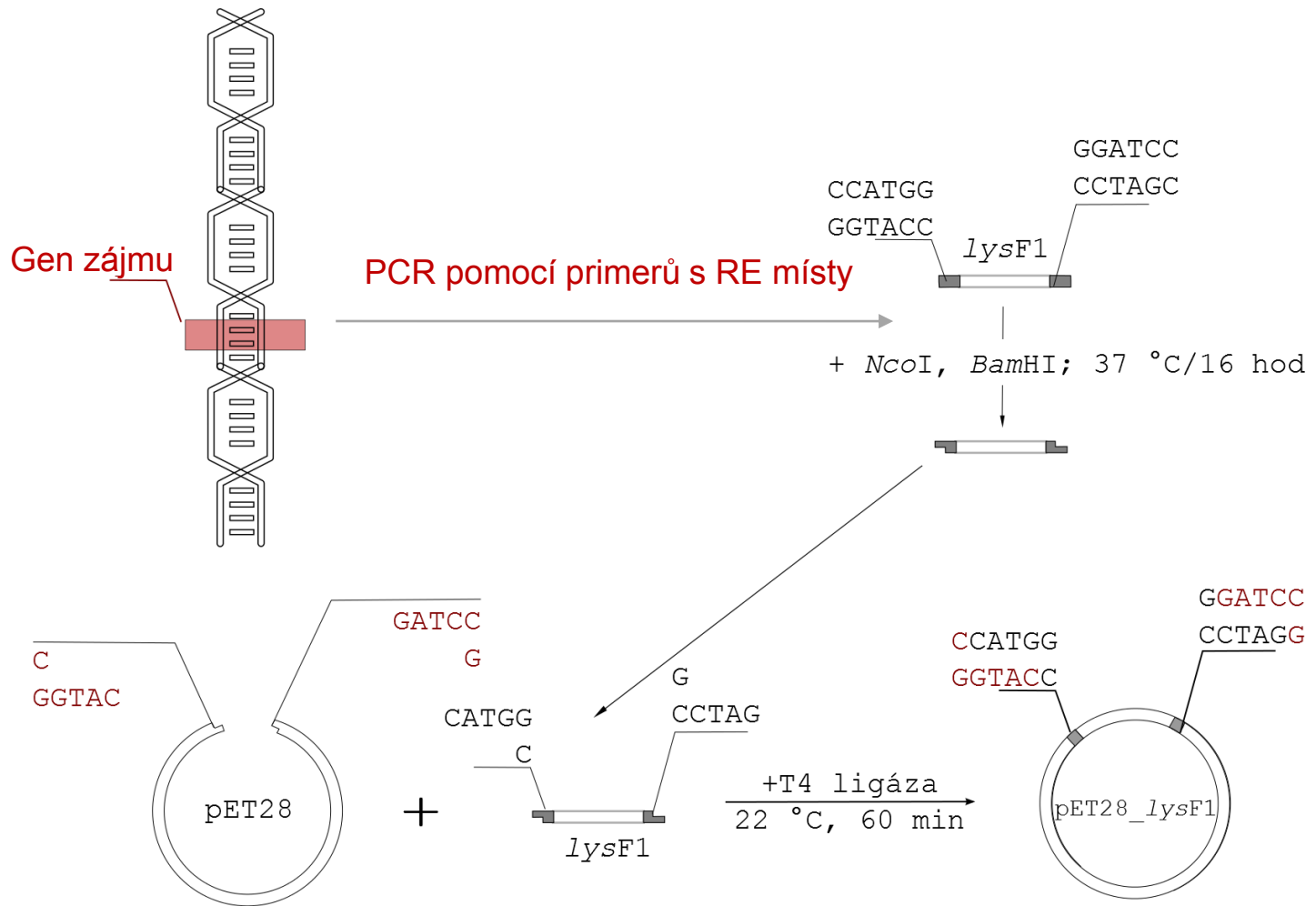


# Klonování

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

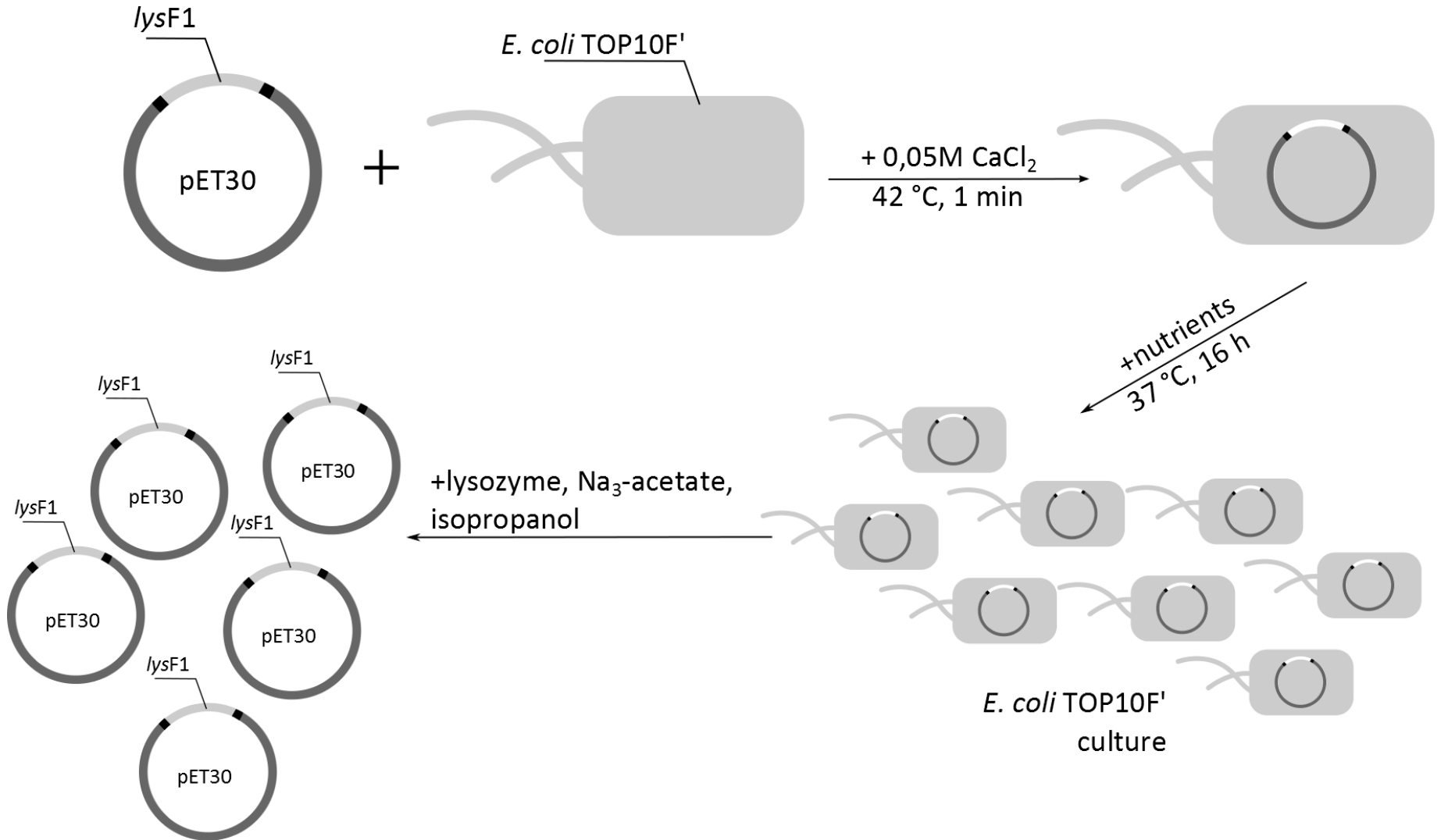
**Kontakt:** [maslanova@sci.muni.cz](mailto:maslanova@sci.muni.cz), Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

# Postup klonování



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

# Transformace *E. coli*

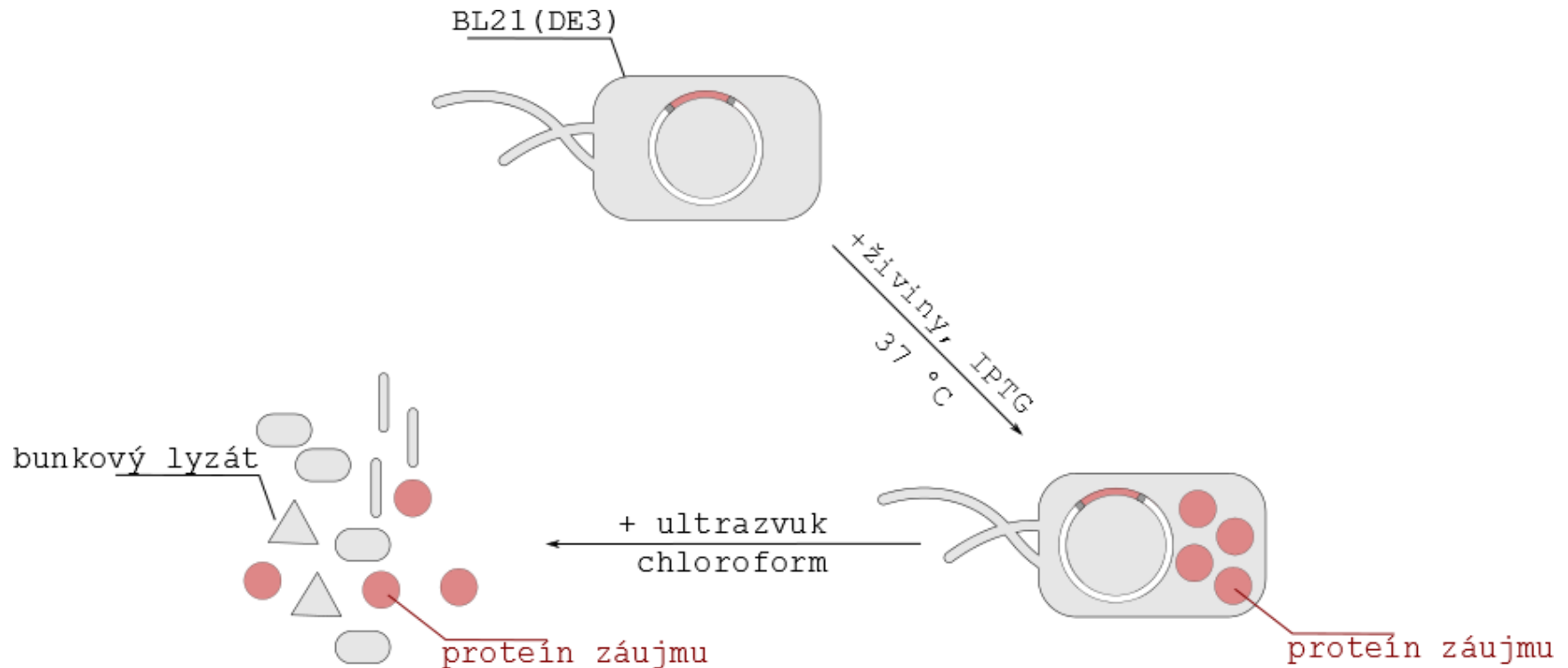


# Expres heterologního genu v *E. coli*

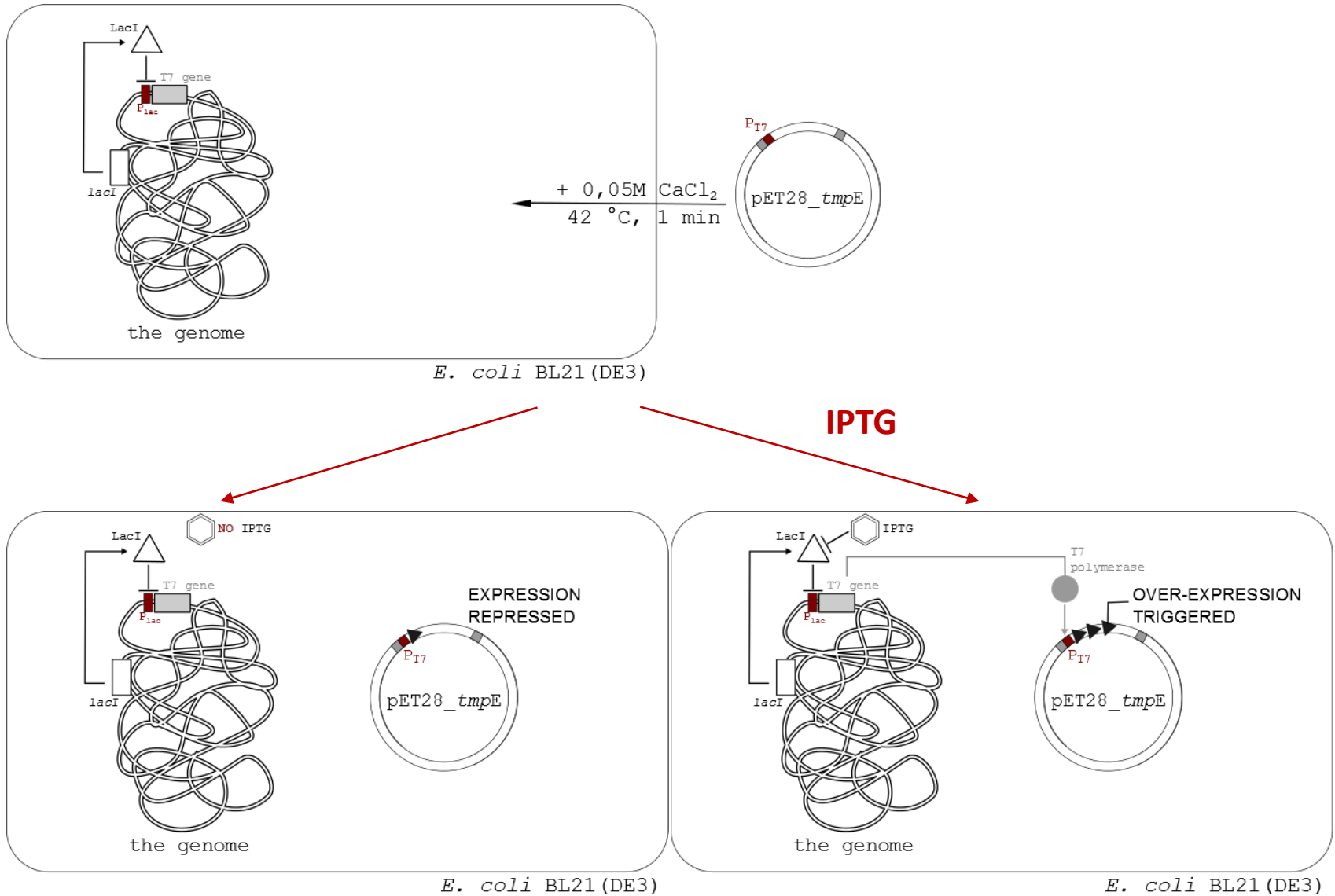
## *E. coli* strain BL21(DE3)

Genotyp: *E. coli* B *dcm*<sup>-</sup> *ompT*<sup>-</sup> *hsdS*(rB-mB<sup>-</sup>) *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*

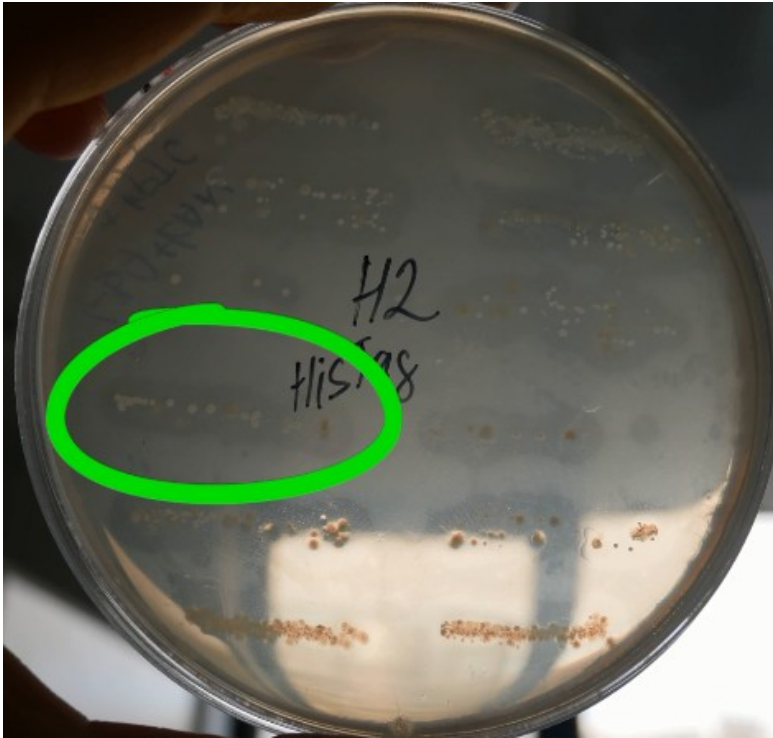


# **Funkční test**

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

**Kontakt:** [maslanova@sci.muni.cz](mailto:maslanova@sci.muni.cz), Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

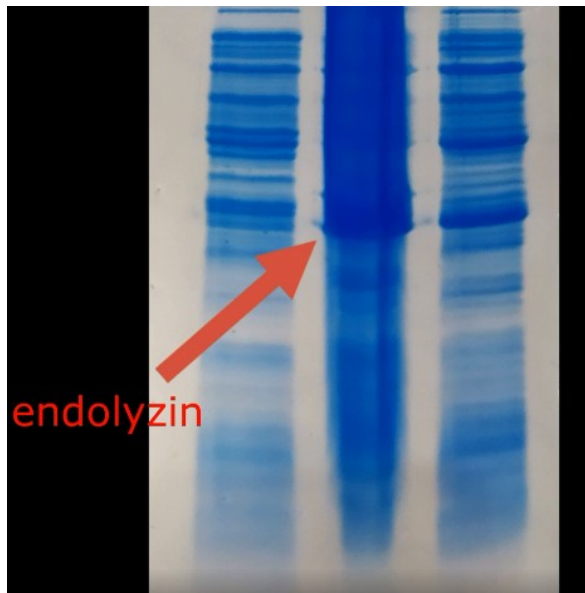
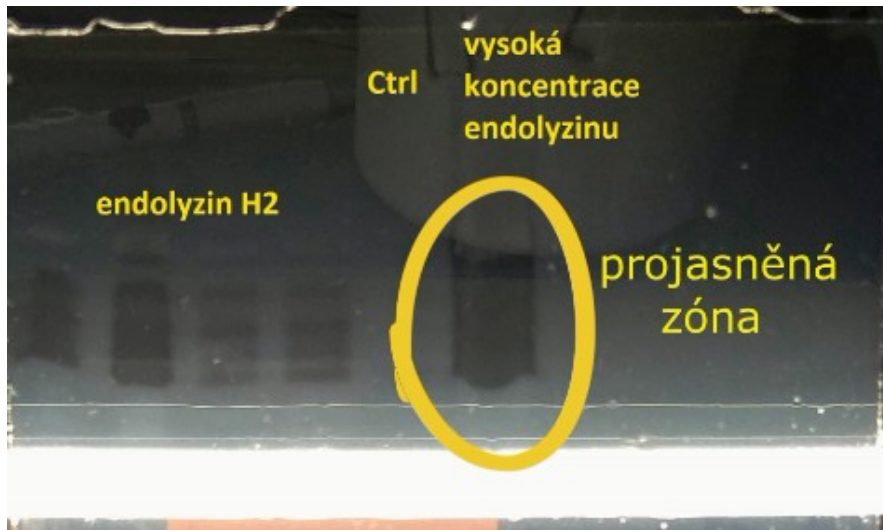
# Funkční test na plotnách



- Na agarovou plotnu s IPTG čárkujeme ověřené klony exprimující endolyzin
- Působením chloroformu lyzujeme buňky (klony)
- Celé přelijeme soft agarem se suspenzí usmrcených buněk *S.aureus*
- Pozorujeme zónu lyze kolem klonů – uvolněný endolyzin



# Funkční test - zymogram



- SDS PAGE
- Gel na SDS PAGE obsahuje buněčné stěny *S. aureus*
- Do jamek PAGE gelu nanášíme směs proteinů z úspěšných klonů
- Pozorujeme zónu lyze – endolyzin degraduje buněčné stěny
- Kontrola over-exprese endolyzinu obarvením proteinů na SDS PAGE bez přidavku buněčných stěn *S. aureus*

# **Restrikční enzymy - úvod**

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

**Kontakt:** [maslanova@sci.muni.cz](mailto: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

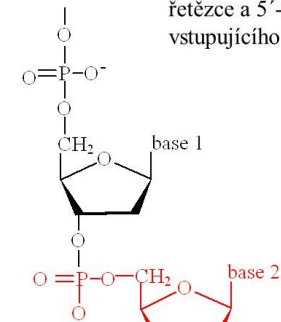
### Type III

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

### Type IV

Cleaves modified (e.g., methylated) DNA

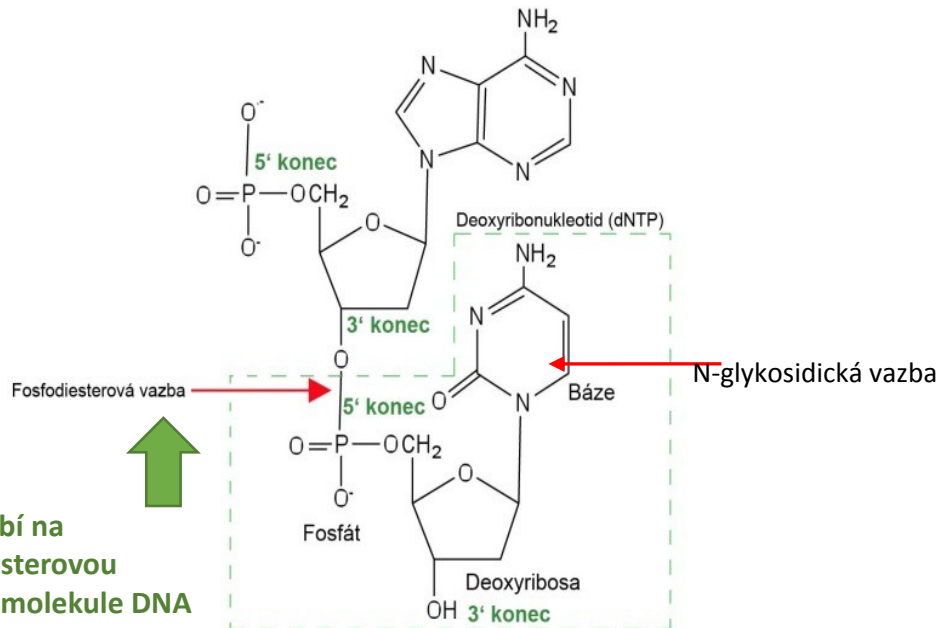
5'  
↓  
3'



Vzniká esterová vazba mezi 3'-OH skupinou stávajícího řetězce a 5'-fosfátem vstupujícího nukleotidu

+ PPi

prodluzování řetězce



RE působí na fosfodiesterovou vazbu v molekule DNA

## Definice jednotky enzymu

---

One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1  $\mu\text{g}$  of lambda DNA in 1 hour at  $37^\circ\text{C}$  in 50  $\mu\text{L}$  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  $\geq 60$  min (PCR product).

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

Longer incubation may result in star activity.

# Závislost na čase / typu substrátu

---

## BamHI – FD

- 1  $\mu\text{L}$  of FastDigest BamHI is formulated to digest up to:
  - 1  $\mu\text{g}$  of lambda DNA in 5 min.
  - 1  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA in 5 min.
  - 0.2  $\mu\text{g}$  of PCR product in 5 min.
  - 1  $\mu\text{g}$  of genomic DNA in 5 min, or 5  $\mu\text{g}$  of genomic DNA in 30 min.

## NdeI – FD

- 1  $\mu\text{L}$  of FastDigest NdeI is formulated to digest up to:
  - 1  $\mu\text{g}$  of lambda DNA in 5 min.
  - 1  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA in 5 min.
  - 0.2  $\mu\text{g}$  of PCR product in  $\geq 60$  min.
  - 1  $\mu\text{g}$  of genomic DNA in 30 min, or 5  $\mu\text{g}$  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 <b>CATATG</b> AAACCC	18	0	0
	GGAATTC <b>CATATG</b> GAATTCC	20	75	>90
	GGAATTC <b>CATATG</b> 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 N<sup>6</sup> 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(N<sup>6</sup>)GTGC and GCAC(N<sup>6</sup>)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*<sup>+</sup> *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  $\lambda$  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  $\lambda$  DNA.

Restriction sites that are blocked by Dam or Dcm methylation can be un-methylated by cloning your DNA into a *dam*<sup>-</sup>, *dcm*<sup>-</sup> strain of *E. coli*, such as *dam*<sup>-</sup>/*dcm*<sup>-</sup> 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 C<sup>5</sup> 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
<a href="#">Sall</a>	R0138	37	NEBuffer r3.1	No	10	10	100	10
<a href="#">BssHII</a>	R0199	50	rCutSmart Buffer	No	100	100	100	100

Name	Time-Saver™	Heat Inactivation (°C)	Methylation Sensitivity
<a href="#">Sall</a>	Yes	65	cpg (Blocked)
<a href="#">BssHII</a>	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_olignucleotides_old.pdf)

[https://www.neb.com/~media/nebus/files/chart%20image/cleavage\\_linearized\\_vector\\_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/#/>