

Klonování DNA

Klonování: proces tvorby klonů

Klon: soubor geneticky identických buněk (resp. organismů), odvozených ze společného předka

Klonování DNA: tvorba klonů DNA

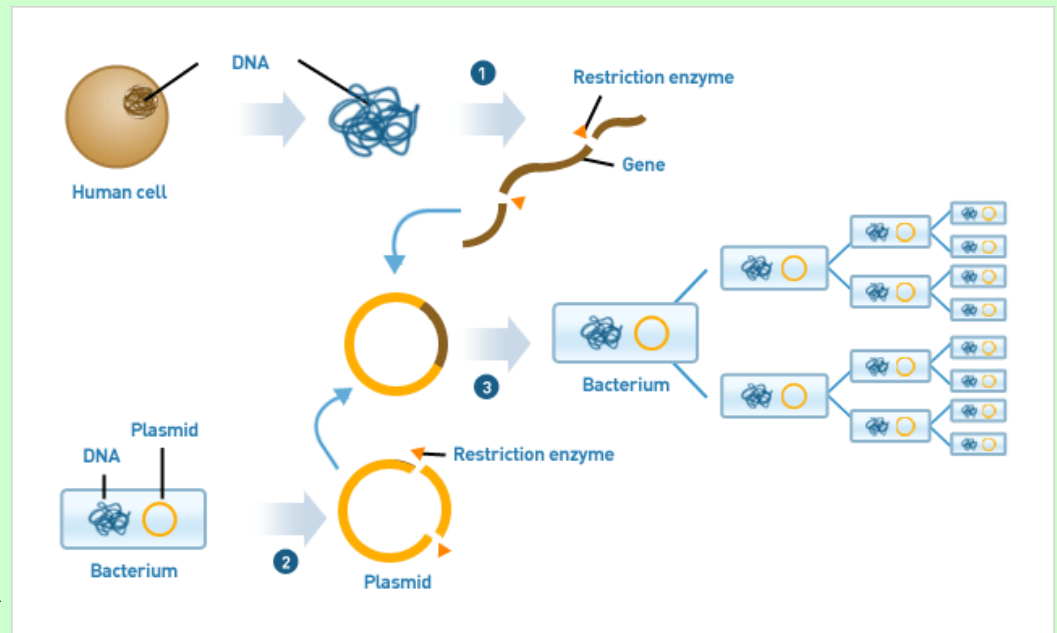
Klon DNA: soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA, připravených např. množением rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo PCR (*in vitro*)

Rekombinantní molekula

DNA: molekula DNA vytvořená spojením cizorodé (klonované) DNA s klonovacím vektorem

Objevitelé klonování

Paul Berg – připravil první rekombinantní DNA viru SV40 a fága lambda, Nobelova cena za chemii



Klonování DNA

Stěžejní metoda molekulární biologie:

umožňuje izolovat z komplexního genomu jeho dílčí úseky (např. geny), ty ve formě rekombinantních molekul mnohonásobně zmnožit a zpřístupnit je tak dalšímu studiu

Využití klonování DNA:

- izolace genů
- studium regulačních oblastí, které řídí genovou expresi
- fyzikální a genetická analýza genomů
- exprese cizích genů v nepříbuzných hostitelích (**heterologní exprese**) za účelem přípravy žádaných produktů
- základ genového inženýrství (alelická výměna, CRISPR/Cas editace, příprava transgenních organismů, genové terapie)

Klonování zahrnuje 3 kroky

1. příprava rekombinantní molekuly DNA
2. přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky
3. Selektce klonů obsahujících rekombinantní DNA

Pro zajištění bodu 2 jsou zapotřebí **klonovací vektory**

Klonovací vektory

- nejčastěji kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace
- obvykle odvozené z plazmidů nebo virů
- navíc obsahují pomocné sekvence různého původu usnadňující vložení cizorodé DNA, její expresi, selekci transformantů, apod.)

Typy vektorů pro klonování DNA

Plazmidové: pBR322, pUC18, BACs

Fágové:

- odvozené od bakteriofága lambda
- odvozené od fága M13

Kosmidy: hybridy mezi plazmidy a fágy

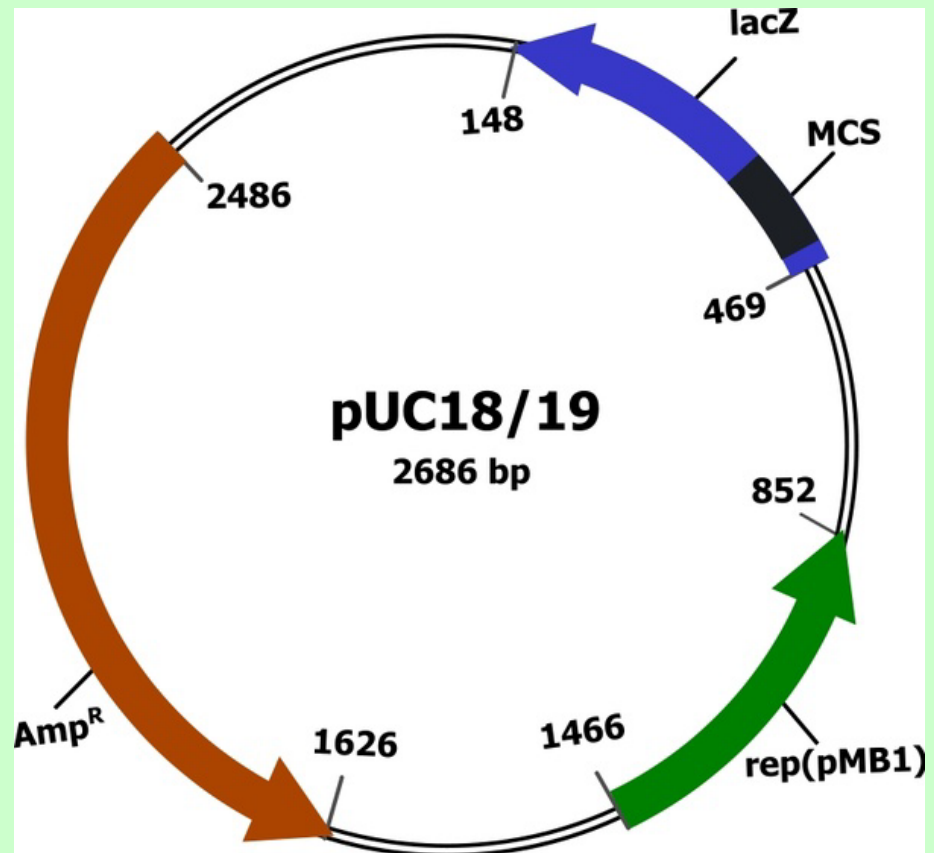
Vektory eukaryotické buňky:

- kvasinkové
- rostlinné
- živočišné

Plazmidové vektory

Vlastnosti:

- Jednoduchá manipulace
- Přirozený výskyt v mnoha druzích bakterií
- Variabilita ve velikosti: jednotky kb – stovky kb (pro klonování obvykle malé 2-5 kb)



Přirozené plazmidy

- **Extrachromozomální** molekuly DNA, obvykle kruhové, dvouřetězcové a tvoří nadšroubovici
- Schopnost **replikace** uvnitř bakterie, občasný přechod do jiné buňky)
- **Selekční výhoda** poskytovaná plazmidem hostitelské buňce je zároveň výhodou pro plazmid
- Zodpovídají za šíření genů pro **rezistenci** k antibiotikům
- Je zakázáno provádět takové experimenty, které by mohly způsobit rozšíření nových genů pro rezistenci k antibiotikům v patogenních bakteriích

Žádoucí vlastnosti plazmidových vektorů

1. **Autonomní replikace v bakteriální buňce**
2. Možnost tvorby více kopií v buňce
3. Plazmid by neměl být přenositelný konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
4. Přítomnost restričních míst, využitelných pro klonování
5. Přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
6. Velikost by měla být co nejmenší (zvýšení účinnosti transformace)

Replikace plazmidů

- Základní předpoklad pro využití plazmidů jako klonovacích systémů (namnožení fragmentu DNA)
- Hostitelské buňka je vybavena veškerým aparátem pro replikaci DNA
- Počátek replikace (*ori*)
 - genetická informace, kterou musí poskytnout plazmid, aby mohl být v bakteriální buňce replikován
 - Je tvořen jen několika stovkami párů bazí
- Segregace do dceřiných buněk

Žádoucí vlastnosti plazmidových vektorů

1. Autonomní replikace v bakteriální buňce
2. Možnost tvorby více kopií v buňce
3. Plazmid by neměl být přenositelný konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
4. Přítomnost restričních míst, využitelných pro klonování
5. Přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
6. Velikost by měla být co nejmenší (zvýšení účinnosti transformace)

Žádoucí vlastnosti plazmidových vektorů

1. Autonomní replikace v bakteriální buňce
2. Možnost tvorby více kopií v buňce
3. Plazmid by neměl být přenositelný konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
4. Přítomnost restričních míst, využitelných pro klonování
5. Přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
6. Velikost by měla být co nejmenší (zvýšení účinnosti transformace)

Plazmidy a rozmezí hostitelů

- některé plazmidy se replikují v rozmanitých bakteriálních druzích (**široké rozmezí hostitelů**): RP4, RSF1010, pC194
- většina vektorů užívaných pro klonování se replikuje jen v úzkém rozmezí hostitelů

Výhoda:

- snížení rizika rozšíření
pozměněné genetické
informace

Nevýhoda:

- pokud potřebujeme experimen-
tovat s jinými bakteriemi než
E. coli musíme si připravit „vlastní
vektor“ se specifickým **ori**

• **Pendlující (bifunkční, „shuttle“) vektory**

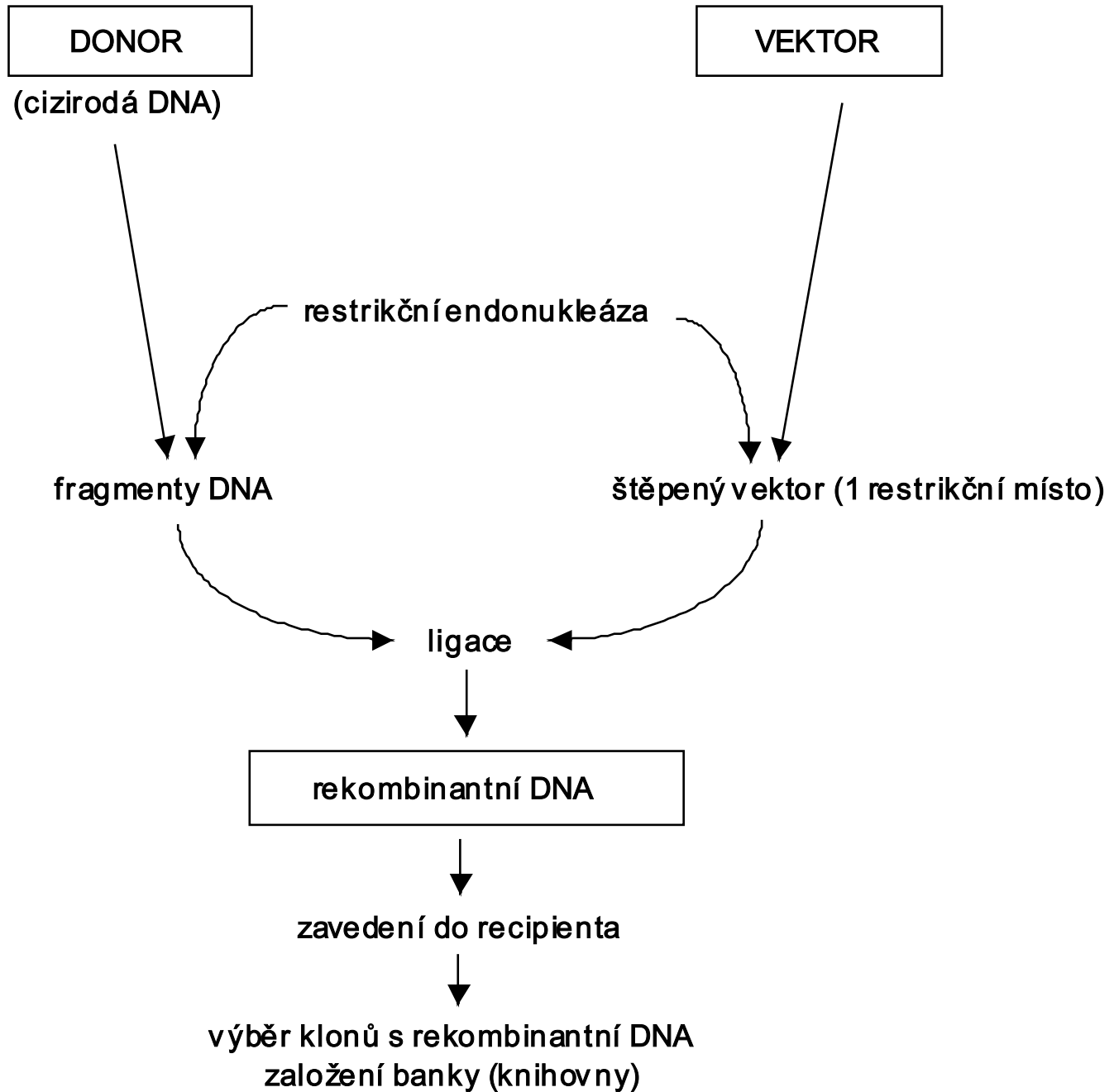
- Možný přenos mezi dvěma bakteriálními druhy
- 2 místa ori v jednom plazmidu

Žádoucí vlastnosti plazmidových vektorů

1. Autonomní replikace v bakteriální buňce
2. Možnost tvorby více kopií v buňce
3. Plazmid by neměl být přenositelný konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
4. Přítomnost restričních míst, využitelných pro klonování
5. Přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
6. Velikost by měla být co nejmenší (zvýšení účinnosti transformace)

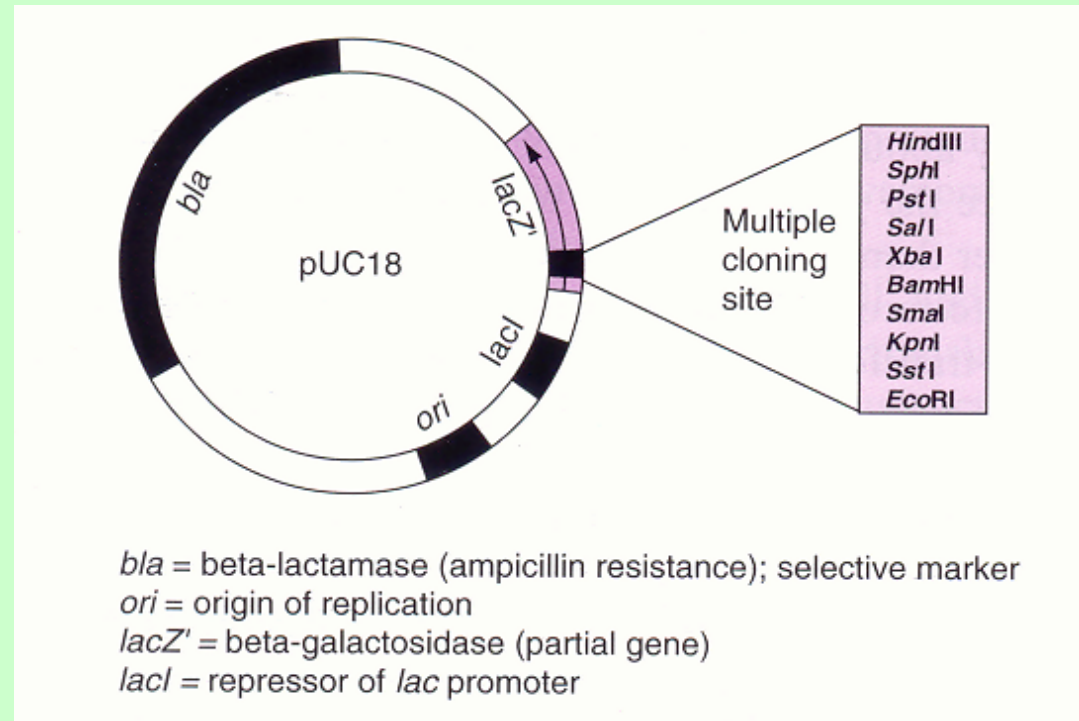
Klonovací místo

- Unikátní restriční místo (zastoupené pouze jednou v molekule plazmidu)
- poloha klonovacího místa nesmí narušit funkci oblasti ori nebo jiné důležité funkce plazmidu
- začlenění fragmentu DNA do určitého klonovacího místa vede k vzniku rekombinantního plazmidu se dvěma cílovými místy téhož restričního enzymu - možno využít pro identifikaci rekombinantního plazmidu

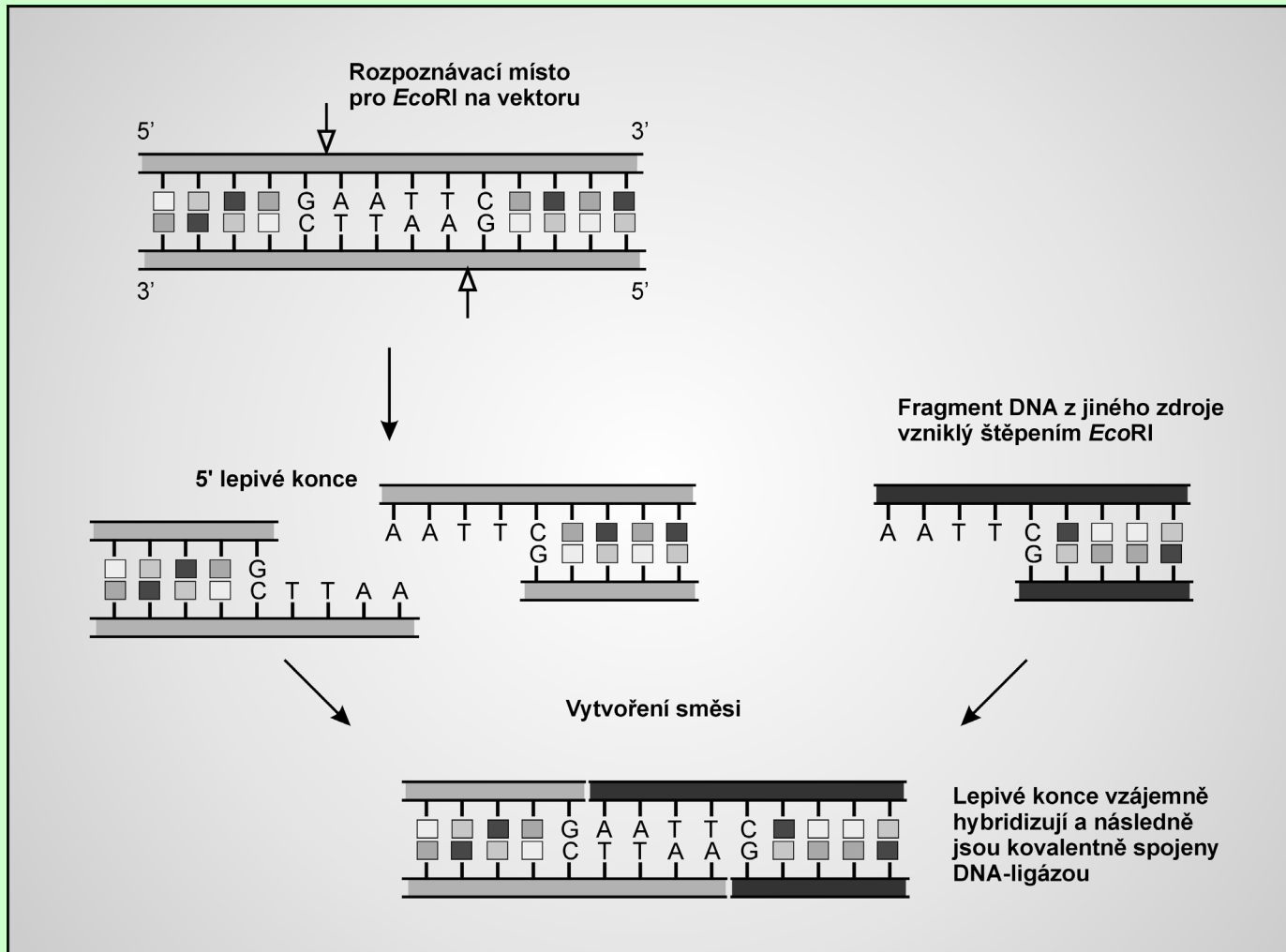


Místo „MCS“ (Multiple cloning site)

- Krátká oblast DNA, která obsahuje cílová místa několika restrikčních enzymů
- je vytvořeno uměle (nasyntetizováno a včleněno do vektoru ligací)
- možno použít pro včlenění většího počtu sekvencí

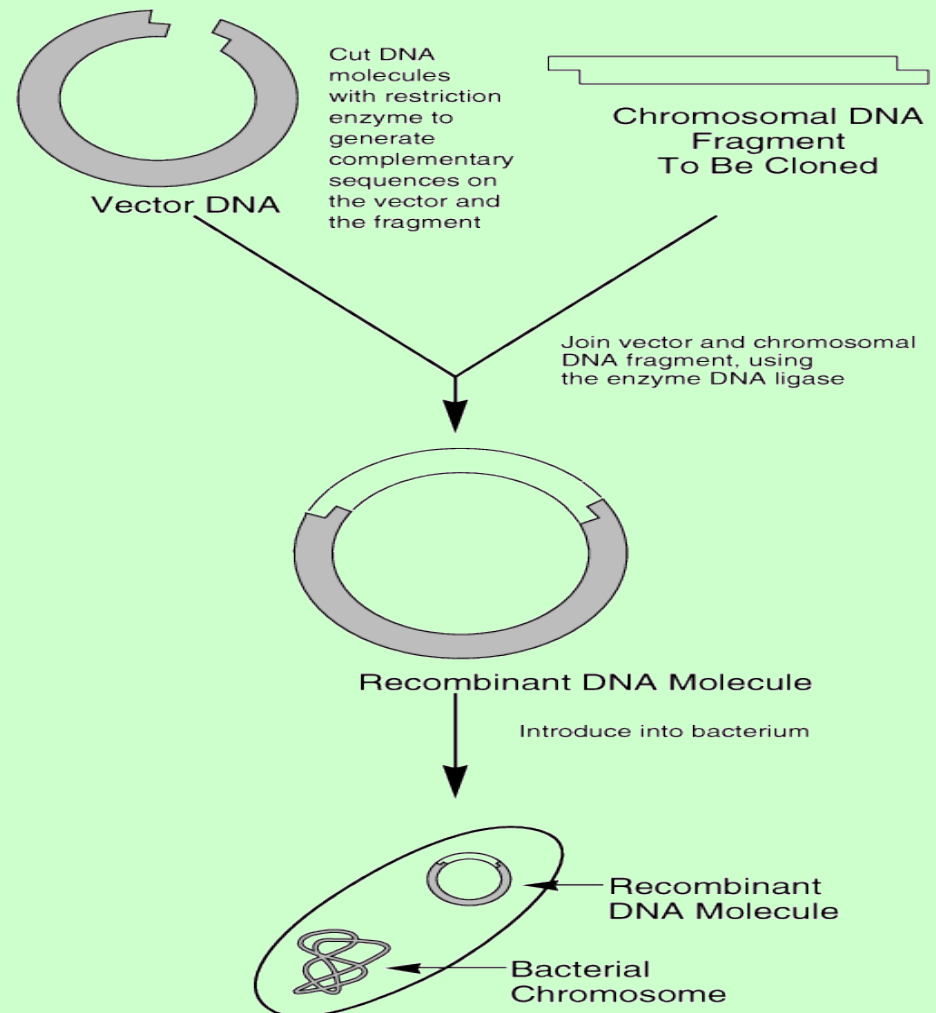


Spojení fragmentů DNA prostřednictvím kohezních konců



Proces klonování

- **Geny (oblasti) zájmu jsou štěpeny RE**
- **Vektor je štěpen stejnou RE**
- **Klonovaný fragment je vložen do vektoru a spojen ligázou**
- **Nový rekombinantní plazmid je vnesen do hostitelské buňky**



Využití spojek a adaptorů

Spojka obsahující
rozpoznávací místo
pro *EcoRI*

5' CCGAATTCGG 3'
3' GGCTTAAGCC 5'



dsDNA se zarovnanými konci

T4-ligáza spojky



EcoRI



Klonování
do místa *EcoRI*
na vektoru

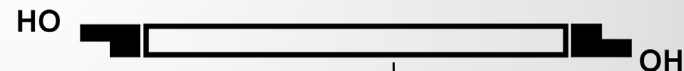
Adaptor nesoucí
kohezní konec
pro *BamHI*

5' OH-GATCCCCGGG-OH 3'
3' GGGCCC-P



dsDNA se zarovnanými konci

adaporty T4-ligáza



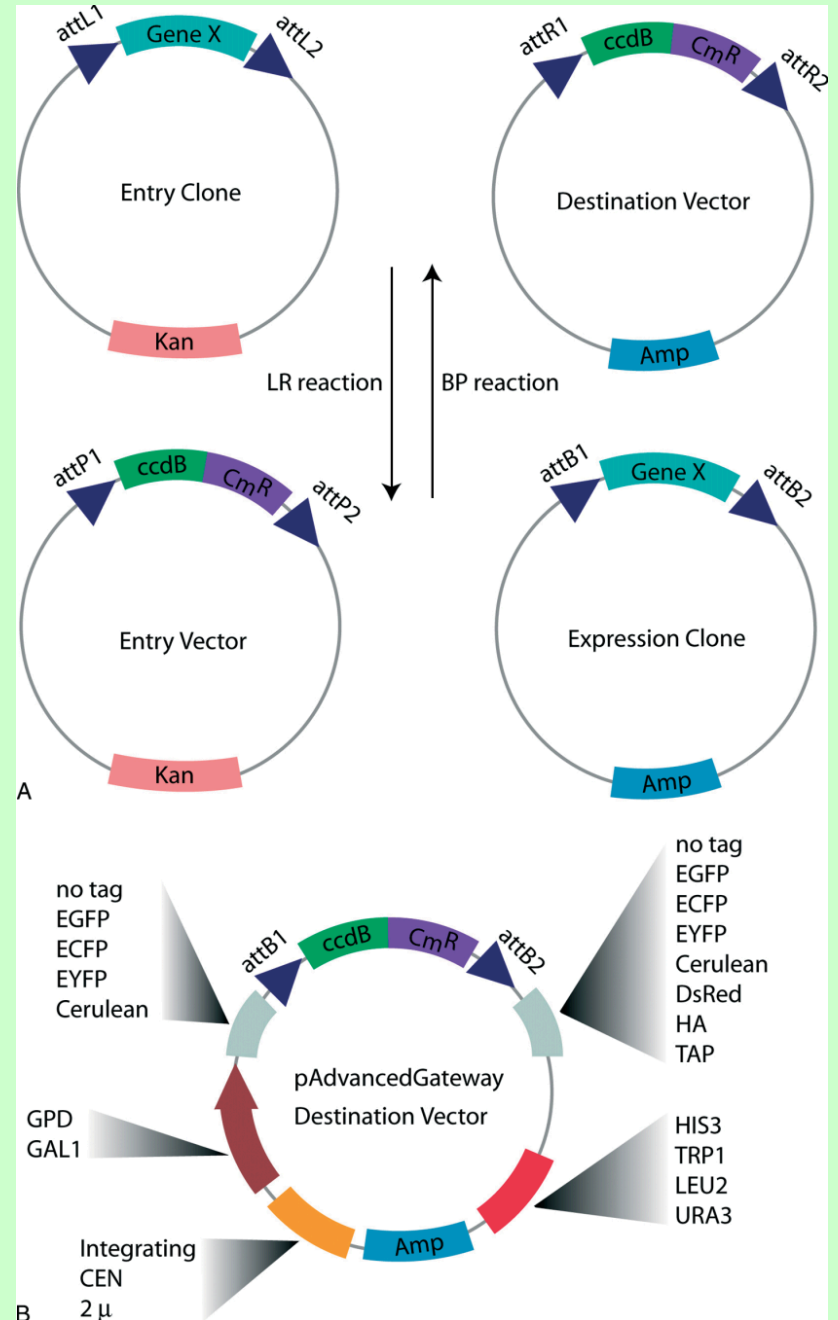
polynukleotidkináza ATP



Klonování
do místa *BamHI*
na vektoru

Využití rekombinací

- Rekombinační klonování pomocí Gateway technologie
- Funguje na principu reversibilní rekombinační reakce
- Nejsou zapotřebí restriční enzymy



Další metody tvorby rekombinantní DNA bez využití klasických restriktáz

- Homopolymerní konce (terminální transferáza)
- Golden gate klonování (endonukleázy štěpící v sousedství rozpoznávacího místa)
- TOPO klonování (sekvenčně specifická topoizomeráza I z Vaccinia viru)
- SLIC klonování (T4 DNA polymeráza)
- Gibson assembly (exonukleáza + polymeráza)
- Gateway klonování (rekombináza)

Přenos plazmidových vektorů do hostitelských buněk

Transformace:

- bakterie uvedeny do stavu kompetence (u *E.coli* působením chloridu vápenatého za nízké teploty)
- po přidání DNA a krátkém zahřátí na 42 °C) přechází transformující DNA do buněk

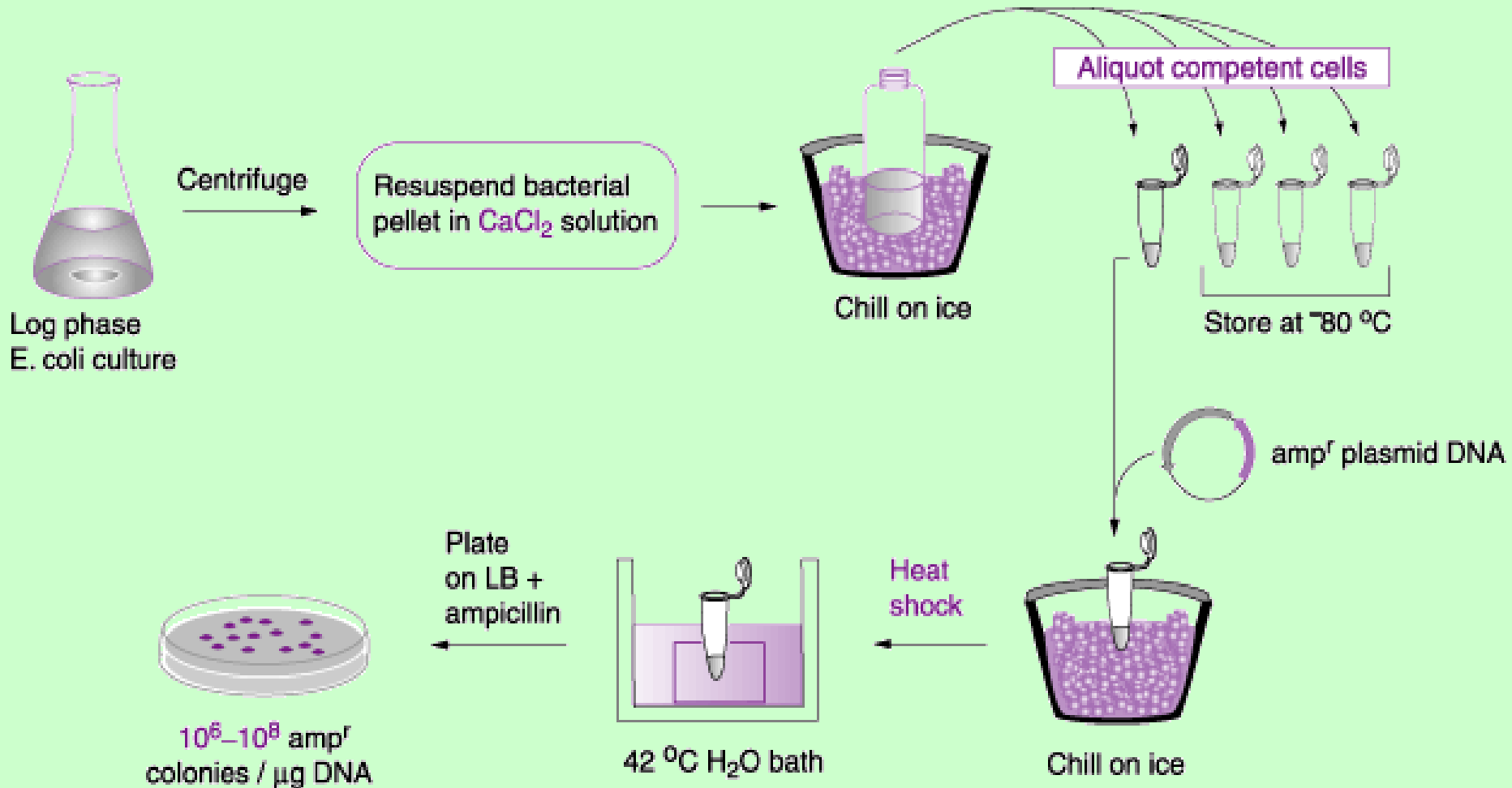
Elektroporace:

- buňky jsou vystaveny krátkému elektrickému impulsu o vysokém napětí – v buněčné stěně vznikají póry, kterými exogenní DNA vstupuje do buněk

Transformace bakteriálních buněk

- závislá na **stavu kompetence** buněk
- u některých bakterií se stav kompetence objevuje přirozeně (*S. pneumoniae*)
- u *E.coli* se připravuje uměle - promytím buněk ledovým CaCl_2
 - přidání DNA
 - mírný teplotní „šok“ (2 min, 42°C)
 - krátká inkubace v růstovém médiu(zotavení bakterií, exprese selekčního markeru)

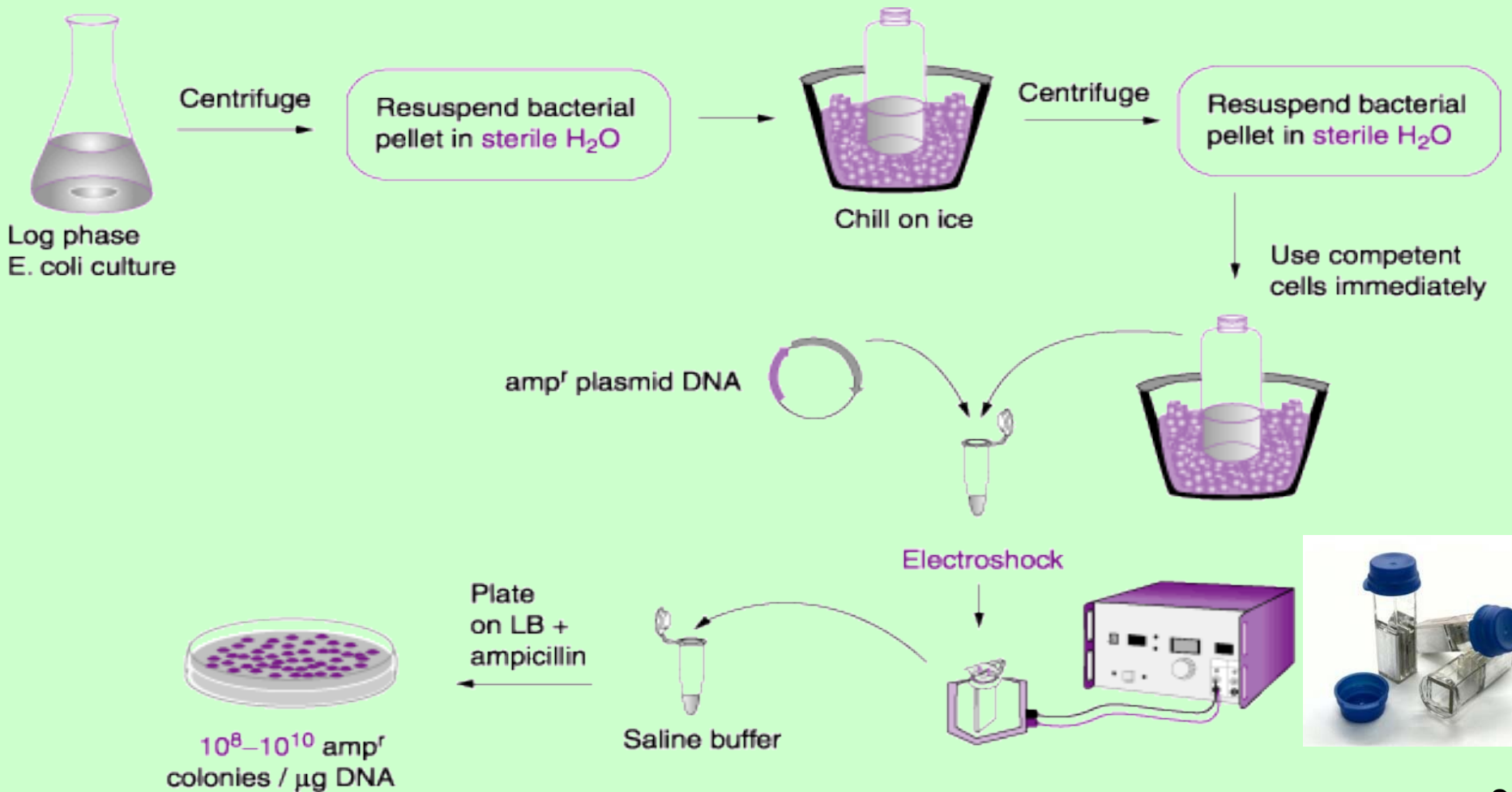
Transformace tepelným šokem s využitím CaCl_2



Transformace bakterií elektroporací

- Promytí buněk vodou (odmytí elektrolytů z růstového média)
- krátký elektrický puls o vysokém napětí
- dočasné otvory v buněčném obalu
- vstup DNA do buňky

Transformace elektroporací



Žádoucí vlastnosti plazmidových vektorů

1. Autonomní replikace v bakteriální buňce
2. Možnost tvorby více kopií v buňce
3. Plazmid by neměl být přenositelný konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
4. Přítomnost restričních míst, využitelných pro klonování
5. Přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
6. Velikost by měla být co nejmenší (zvýšení účinnosti transformace)

Selekční markery

- Nezbytné pro funkci vektoru
- procesy ligace i transformace jsou málo účinné: max. 1% bakteriálních buněk (*E.coli*) DNA přijme, v praxi obvykle méně
- nutnost zabránit v růstu netransformovaným buňkám
- obvykle zajištěno genem, který hostitelským buňkám poskytne rezistenci na antibiotikum

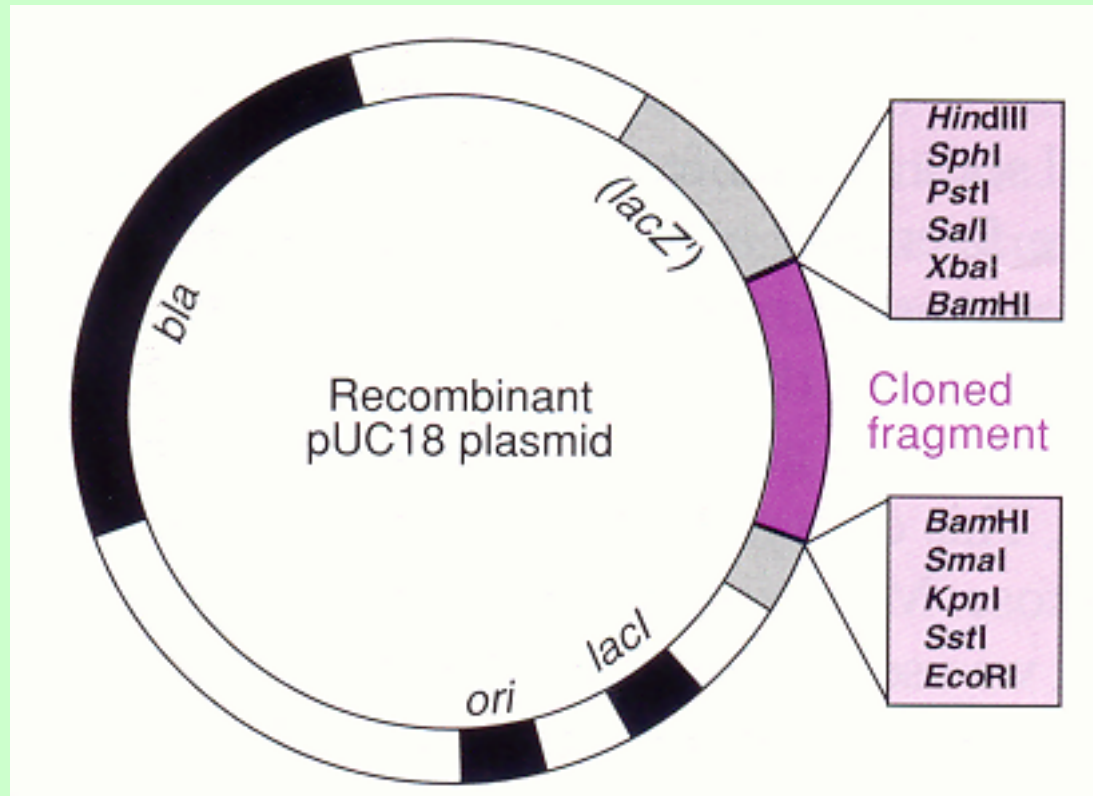
Gen *bla*

- kóduje enzym β -laktamázu
- β -laktamáza hydrolyzuje β -laktamová antibiotika (příbuzná penicilinu), např. ampicilin

Inzerční inaktivace

- projev úspěšného začlenění fragmentu DNA do klonovacího místa na fenotypu transformovaných bakterií
 - klonovací místo je ve vektoru umístěno v genu zodpovědném za rezistenci hostitelské buňky k antibiotiku
 - inzerce klonované DNA způsobí ztrátu funkce tohoto genu
 - buňky nesoucí rekombinantní plazmid jsou k danému antibiotiku citlivé, buňky nesoucí prázdný vektor jsou rezistentní

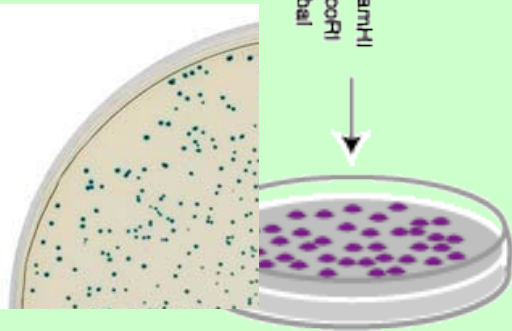
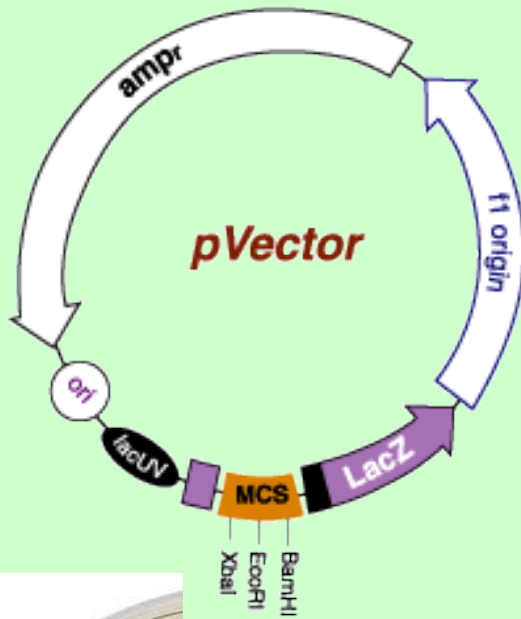
Princip inzerční inaktivace



Gen *lacZ* byl přerušen začleněním klonovaného fragmentu DNA: na X-gal plotnách vzniknou bílé kolonie

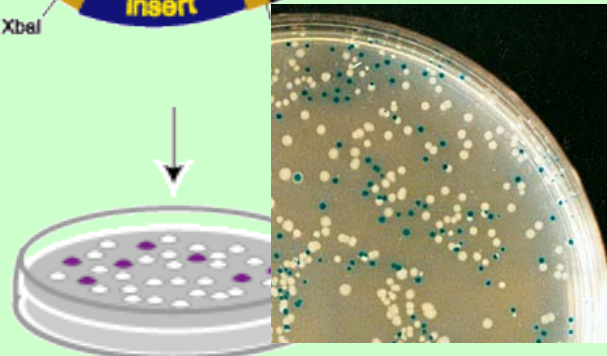
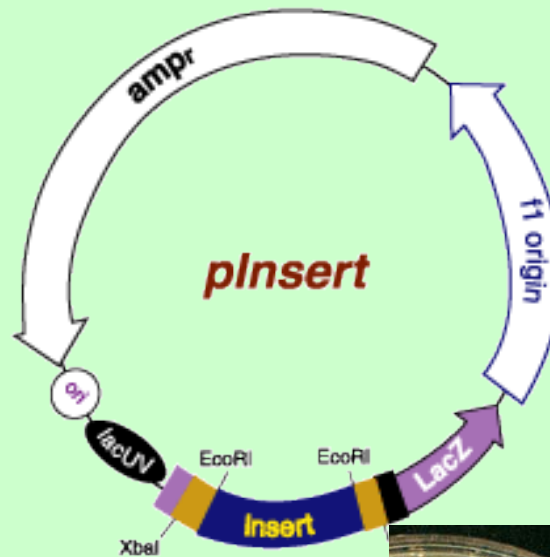
Růst na selekčním médiu

Vector religation



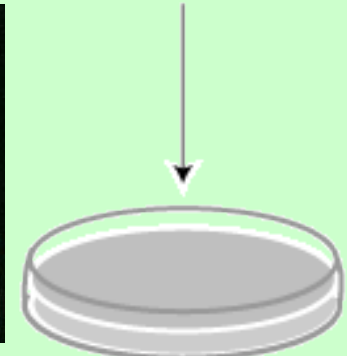
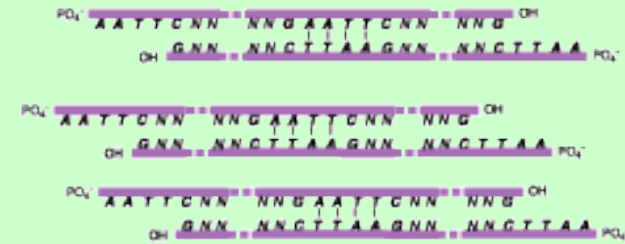
Amp+X-Gal plate

Vector + insert ligation



Amp+X-Gal plate

Insert self-ligation



Amp+X-Gal plate

Modro-bílý test

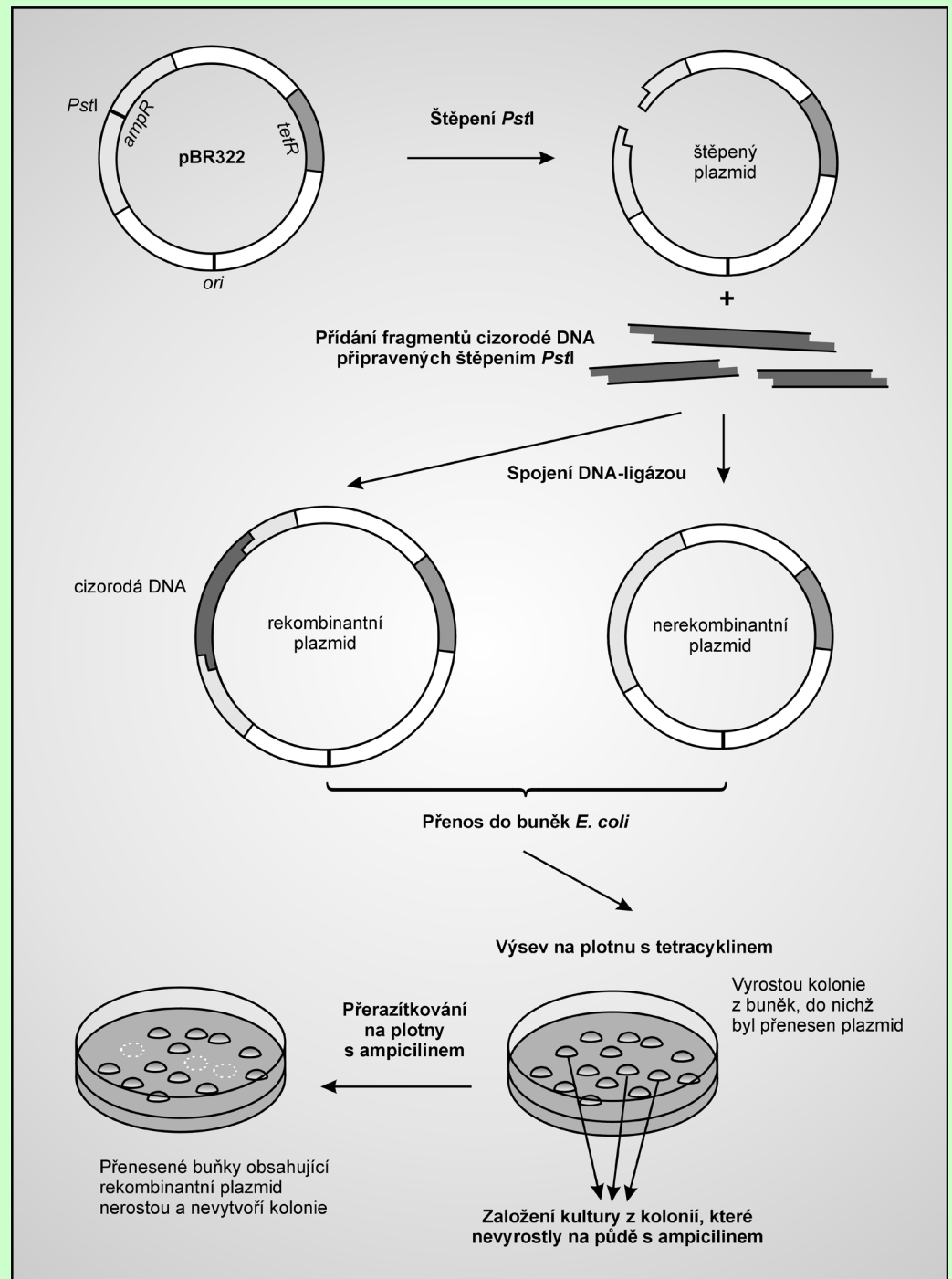
- **Modré kolonie** reprezentují ampicilin-rezistentní bakterie obsahující **plazmidový vektor** a exprimující funkční alfa fragment z intaktní LacZ alfa kódující sekvence.
- **Bílé kolonie** reprezentují ampicilin-rezistentní bakterie obsahující **plazmidový vektor s inzertem** a exprimující nefunkční alfa fragment LacZ

Výhody inzerční inaktivace

Jednoduše poskytuje informace o úspěšnosti ligace:

- bakterie přijala plazmid (je Amp^R)
- bílá barva kolonie signalizuje, že přijatý plazmid nevznikl recirkularizací prázdného vektoru

Klonování v plazmidu pBR322 – příklad inzerční inaktivace



Vektory pro speciální účely

- **expresní vektory**: obsahují promotor, kterým lze zajistit produkci cizího proteinu v hostitelských buňkách (vhodné inducibilní systémy)
- **kyvadlové vektory**: obsahují dva počátky replikace – možnost propagace ve dvou různých organismech (např. *E.coli* a *B. subtilis*)

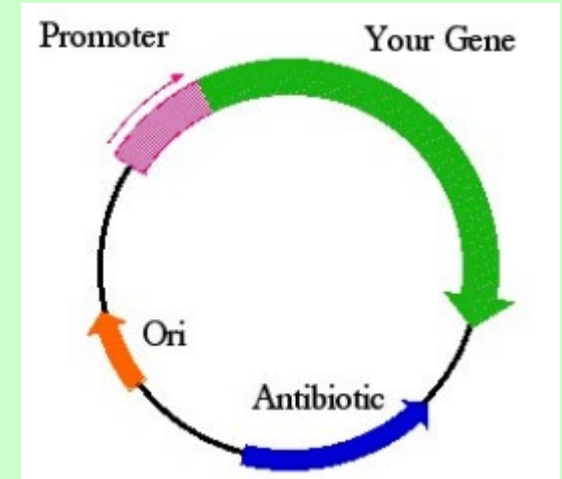
Expresní vektory

- Upraven nejen pro klonování DNA, ale také pro její expresi
- Obsahují signály pro:
 - iniciaci transkripce (promotor)
 - iniciaci translace (**vazebné místo pro ribozóm a startovní kodon**) *u translačních fúzních vektorů*

2 typy expresních vektorů

1. Transkripční fúzní vektor

- Obsahuje promotor, translační signály musí poskytnout klonovaná DNA



2. Translační fúzní vektor

- Obsahuje signály pro iniciaci transkripce i translace
- Klonovaný fragment se začleňuje do kódující oblasti genu ve vektoru
- Inzert musí respektovat čtecí rámeček
- Restrikční endonukleázy obsahující ATG kodon

NcoI

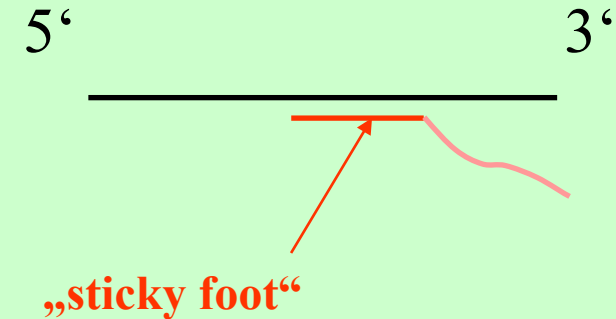
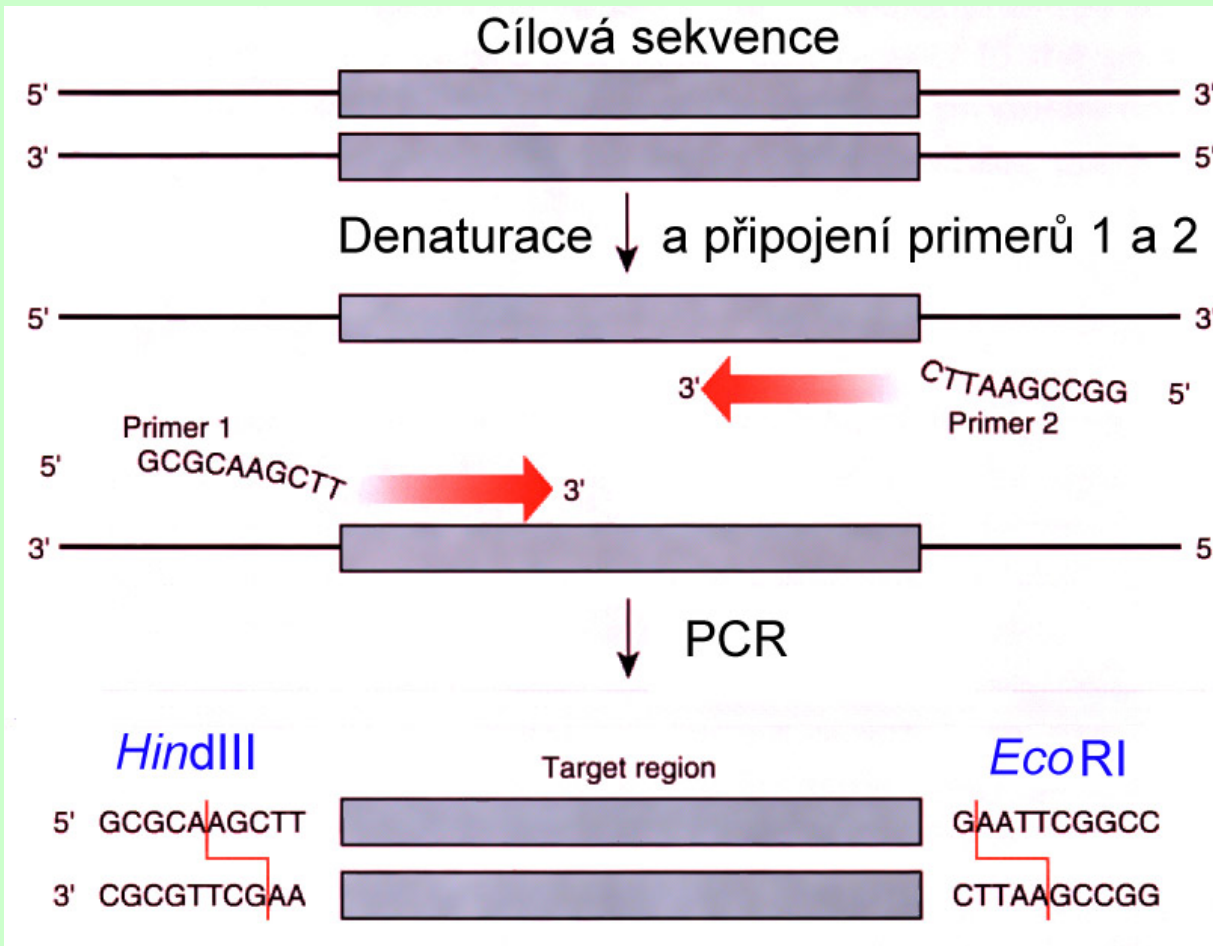
C/CATGG

NdeI

CA/TATG

Modifikace konců DNA, expression cassette PCR (EC-PCR)

Připojení sekvencí prostřednictvím 5'-konců primerů



- Přidávané sekvence
 - RE místa
 - Promotory
 - Terminátory
 - Translační signály

Potřebné regulační sekvence pro expresi

fem gene

```
1 ATATGGTCAGTGCATATAAAAATTTGTTATCATTAGAGTAATTAAGGTCATTTAATAACTTTTGGGAATCA 70
71 ATTGGAGGTTCTCATATGTTATCTTTTAGTCAAATAGAAGTCATAGCTTAGAACAACTTTAAAAGAAG 140
141 GATATTCACAAATGGCTGATTTAAATCTCTCCCTAGCGAACGAAGCTTTTCCGATAGAGTGTGAAGCATG 210
211 CGATTGCAACGAAACATATTTATCTTCTAATTCAACGAATGAATCATTAGACGAGGAGATGTTTATTTAG 280
281 CAGATTTATCACCAGTACAGGGATCTGAACAAGGGGGAGTCAGACCTGTAGTCATAATTCAAATGATAC 350
351 TGGTAATAAATATAGTCTACAGTTATTGTTGCGGCAATAACTGGTAGGATTAATAAAGCGAAAATACCG 420
421 ACACATGTAGAGATTGAAAAGAAAAAGTATAAGTTGGATAAAGACTCAGTTATATTATTAGAACAAATTC 490
491 GTACACTTGATAAAAAACGATTGAAAGAAAACTGACGTA CTTATCCGATGATAAAATGAAAGAAGTAGA 560
561 TAATGCACTAATGATTAGTTTAGGGCTGAATGCAGTAGCTCACCAGAAAAATTAGGCGTCTATTATATGT 630
631 ATTTTTTCAGAGATAAATAAAATATTGATATAAAAGACAATAACTTTATAATAATTATAACTATTTCTAAA 700
701 TTCTGTACGAAGAATTTTCTTATAAACAAAGATTTTAGCAAATACCAGTTATGATATTCATATTTTTTAT 770
771 TATAAAAGGATGTCTTAAGTTTTTTTAGGCTTTAGGTATTCCATCCTAAAGTTTTTTTTTAGCTTAAAAGTA 840
841 TCATCTACAGCAAATTTGCAAACGACAAAATTTGATAAGTGCAATTAATAAATGTTAGTAAGTGAATCAT 910
911 AATTATCCTTGCTTAAGCATTTGCTTTGTAAGGGAAGTGAGGAGGCAACTAATCG 965
```

rsbU gene

putative promotor

putative RBS

start

stop

terminator

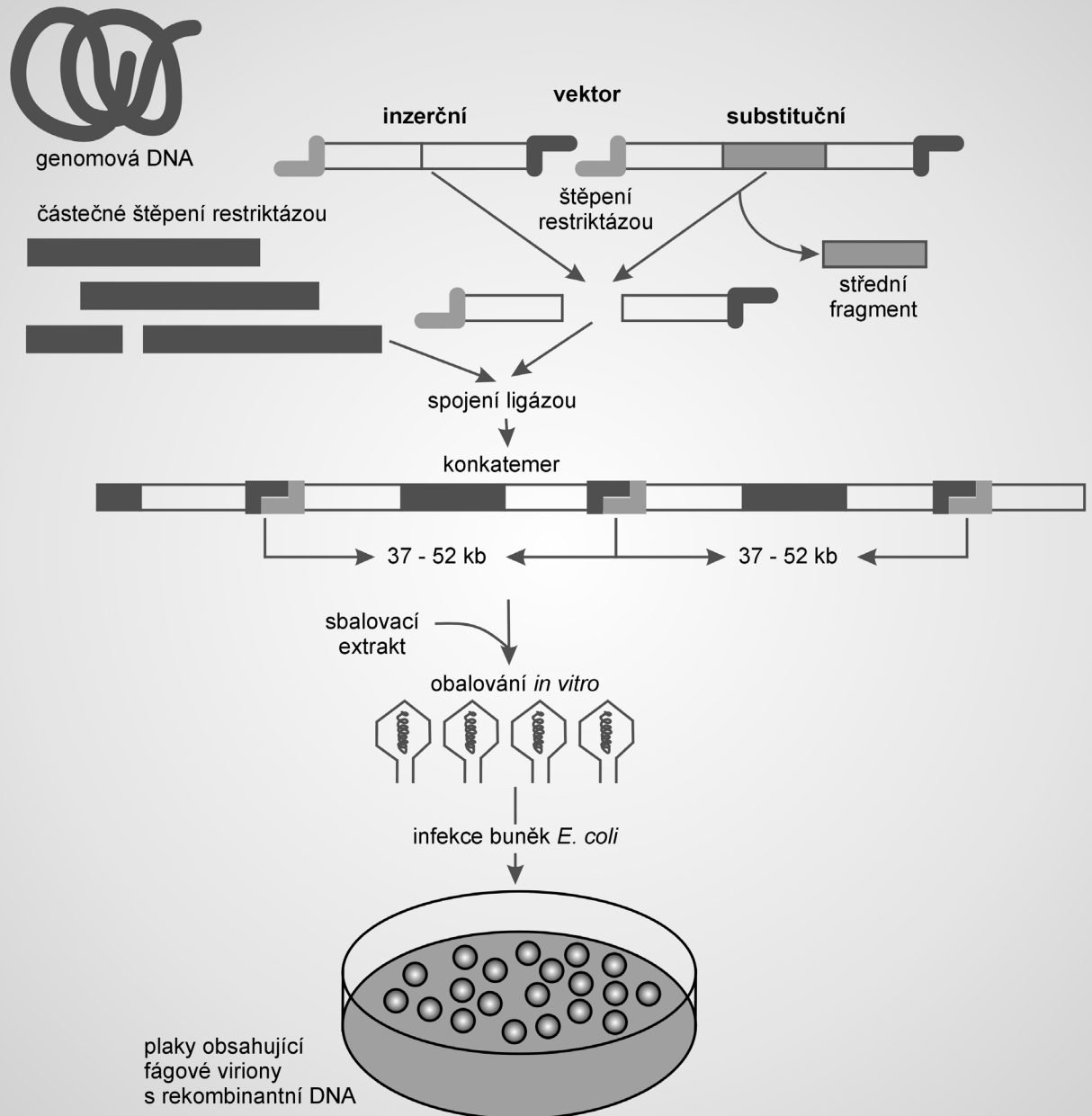
Fágové vektory –odvozené od fága λ

Výhody:

- rekombinantní DNA lze sbalit do kapsidů a přenést do hostitelských buněk infekcí (o několik řádů vyšší účinnost přenosu než při transformaci plazmidovou DNA)
- v jedné zkumavce lze uchovávat ve formě fágových virionů celou genovou knihovnu (např. několi miliónů rekombinantních klonů)
- vhodné pro klonování větších fragmentů DNA (výhodné pro tvorbu genových knihoven)

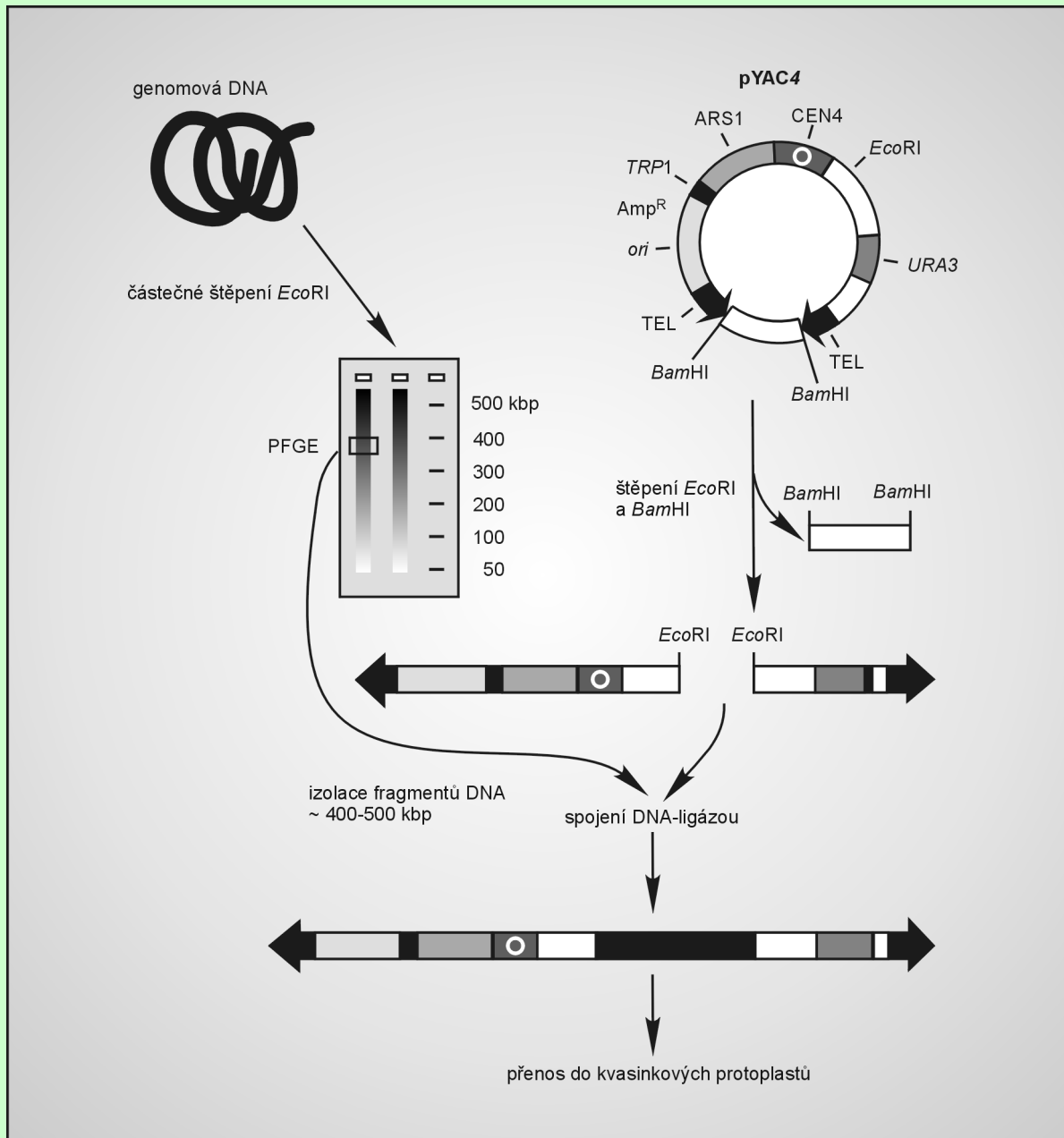
Pozn: rekombinantní plazmidy s velkými inzerty jsou méně stabilní (nízká klonovací kapacita), transformace je méně účinná, nízký výtěžek při purifikaci z E. coli

Vektory odvozené od fága λ



Umělý kvasinkový chromozom (YAC)

- Obsahuje 2 kvasinkové telomery, které umožňují jeho udržování v kvasinkách jako lineární strukturu
- Centromera
- Sekvence pro replikaci
- Selektovatelné signální znaky
- Replikuje se v buňkách *E.coli* i kvasinkách
- Vhodné pro klonování velkých fragmentů DNA (0,2 – 2 Mb)



Umělý bakteriální chromozóm (BAC)

- Bakteriální vektory s nižší klonovací kapacitou než YAC
- BAC = vektor založený na F plazmidu, který pojme inserty až do velikosti 300 kb
- Výrazně vyšší stabilita než YAC
- Hojně používané u sekvenačních projektů

Vektory pro savčí buňky

- Replikace extrachromozomálních elementů typu plazmidů je v savčích buňkách obtížná
- Vektory s počátkem replikace viru SV40 se replikují epizomálně v některých savčích buňkách (např. buňky COS)
- Většinou stabilní klony vznikají po začlenění DNA do chromozomu

Retrovirové vektory

- využití schopnosti retrovirů zajistit integraci DNA do genomu
- využití možnosti „trans“ komplementace retrovirových funkcí defektním pomocným („helper“) virem
- Funkce, které nelze „trans“ komplementovat, musí být přítomny na samotném vektoru (LTR a místo *psi*)

Klonovací kapacita vektorů: přehled

Klonovací vektor	Velikost inzertu
Běžné plazmidové vektory	0-10 kb
λ Inzerční vektory	0-10 kb
λ Substituční vektory	9-23 kb
Kosmidové vektory	30-44 kb
BAC (umělý bakteriální chromozom)	≤ 300 kb
YAC vektory (umělý kvasinkový chromozom)	0.2 – 2.0 Mb