

Klonování DNA a fyzikální mapování genomu

.

Terminologie

- Klonování je proces tvorby klonů
- Klon je soubor identických buněk (příp. organismů) odvozených ze společného předka dělením (např. jedna bakteriální kolonie)

Klon DNA (molekulární klon)

- je soubor identických molekul (fragmentů, úseků) DNA
- připravených množením rekombinantních molekul v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo PCR (*in vitro*)

Rekombinantní molekula DNA

- Molekula DNA vytvořená *in vitro*
- Spojením cizorodé DNA s klonovacím vektorem
- Klonovací vektor (přenašeč)
- Je molekula DNA, která má schopnost přijmout cizorodou DNA, spojit se s ní a autonomně se replikovat v hostitelské buňce
- Cizorodou DNA je jakýkoliv úsek DNA vložený do klonovacího vektoru
- Označuje se též klonovaná DNA (vkládá se do vektoru za účelem klonování) nebo též jako insert.

Hlavní oblasti využití klonování

- Izolace genů, studium jejich struktury a funkce
- Exprese cizích genů v nepříbuzných hostitelích (heterologní exprese) a získávání jejich produktů využitelných v průmyslu (enzymy, hormony, krevní faktory, vakcíny)
- Studium regulačních oblastí, které řídí expresi genů
- Fyzikální a genetická analýza genomů

Příprava rekombinantních molekul DNA

- Je základem genového inženýrství
- Zabývá se přípravou umělých (nepřirozených) kombinací genů
- Vytvářením pozměněných nebo zcela nových genů a jejich zaváděním do organismů s cílem upravit nebo doplnit jejich genetickou výbavu
- Lze tak připravit transgenní organismy, obsahující cizorodé geny a vyznačující se novými vlastnostmi (např. rostliny odolné vůči hmyzům a virovým škůdcům nebo herbicidům, mikroorganismy produkující různé proteiny a průmyslově významné látky)

Klonování zahrnuje 3 základní kroky

- Přípravu rekombinantní molekuly DNA
- Přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky
- Selekcí klonů obsahujících rekombinantní DNA

Ke klonování lze použít molekuly různého původu

- Genomovou DNA izolovanou z organismu
- cDNA připravenou zpětnou transkripcí z mRNA
- Chemicky syntetizovanou DNA
- PCR produkty (amplikony)

Předpokladem účinného spojení fragmentu s vektorovou DNA

- Je vzájemná komplementarita jejich konců. Té lze dosáhnout
- Štěpením genomové a vektorové DNA restriční endonukleázou, která vytváří kohezní konce – Obr.16
- Úpravou konců molekul vektoru a fragmentu připojením homopolymerních, vzájemně komplementárních konců terminální transferázou – Obr.17
- Připojením spojek (linkerů) k zarovnaným koncům DNA – Obr.18
- Linkery jsou chemicky syntetizované oligonukleotidy, které obsahují 1 nebo více restričních míst pro restriktázy
- Adaptory jsou uměle syntetizované oligonukleotidy s předem připravenými kohezními konci, které jsou komplementární ke koncům vytvořeným určitou restriktázou
- T4 ligázou lze vzájemně spojit i zarovnané konce DNA, ale s nižší účinností.

Příprava cDNA

- K přípravě cDNA se používá purifikovaná mRNA
- Připojením krátkého řetězce oligo(dT) k poly(A) konci mRNA získáme primer, od něhož bude zpětnou transkriptázou syntetizován první řetězec cDNA.
- Po odbourání mRNA (pomocí NaOH) se dokončí syntéza komplementárního řetězce cDNA DNA polymerázou, která využívá jako primer vlásenkový ohyb prvního vlákna cDNA vytvořeného reverzní transkriptázou
- Ohyb se pak vyštěpí S1-nukleázou
- Konce ds cDNA se upraví připojením homopolymerních konců nebo spojek
- Obr.19

DNA syntetizovaná chemicky

- Se připravuje postupným spojováním kratších ds úseků
- Vytvořených ze vzájemně komplementárních oligonukleotidů

Příprava vektorové molekuly

- Ke spojení s cizorodou DNA je založena na jejím štěpení v klonovacím místě restriční endonukleázou

Rekombinantní DNA (vektor)

- Po smíchání molekul cizorodé a vektorové DNA se jejich vzájemné konce navzájem spojí (renaturují) a po přidání DNA ligázy se mezi nimi vytvoří kovalentní vazba.
- Rekombinantní vektor se přenese do vhodného hostitele (bakteriálních buněk), v němž se replikuje a přenáší do potomstva

Klonovací vektory

- Kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace, odvozené zejména z plasmidů nebo virů
- Musí obsahovat geny (např. geny pro rezistenci k antibiotikům tzv. selekční markery), na základě jejichž fenotypového projevu lze buňky nesoucí plasmid snadno selektovat
- Musí nést vhodná klonovací místa (jedinečná restrikční místa pro restriktázu), do nichž se začleňuje cizorodá DNA.

Způsoby přenosu do hostitelských buněk

- Metoda chemické transformace (stav kompetence u buněk *E.coli* se navozuje působením CaCl_2 při 0°C a pak krátkým zahřátím na 42°C)
- Elektrotransformace (směs rekombinantní DNA a buněk se vystaví na krátkou dobu silnému elektrickému pulsu)

Identifikace bakteriálních kolonií obsahujících rekombinantní plasmidy

- Restrikční analýza plasmidové DNA
- Inerční inaktivace (klonovací místo je umístěno v genu pro rezistenci k antibiotiku, inserce cizorodé DNA způsobí ztrátu funkce tohoto genu) (např. plasmid pBR322) Obr.
- Alfa-komplementace (spojení N-terminálního fragmentu beta-galaktosidázy, jehož gen je nesen na vektoru, s C-terminálním fragmentem, jehož gen je nesen hostitelskou buňkou) (např. plasmid pUC19) Obr.
- Vyhledání klonu nesoucího specifickou sekvenci se provádí pomocí hybridizace.

Vektory pro speciální účely

- Expresní vektory – obsahují silný promotor umístěný proti směru transkripce od klonovacího místa. Po naklonování cizorodého genu může dojít k jeho expresi a tvorbě příslušného produktu,
- Kyvadlové vektory – mají 2 počátky replikace, které jim umožňují účinně se replikovat v buňkách 2 různých organismů (*E. coli* a *B. subtilis*, *E. coli* a kvasinky)
- Vektory odvozené z bakteriofága M13, lambda (inserční vektory, substituční vektory).
- Kosmidy jsou odvozené z plasmidů (pBR322), do nichž byla naklonována místa *cos* bakteriofága lambda. V buňkách se replikuje jako plasmid.
- BAC, YAC a PAC vektory (umělé bakteriální a kvasinkové chromosomy a chromosomy odvozené z bakteriofága P1)

Zakládání genových knihoven

- Jestliže má být vyhledán a klonován konkrétní gen určitého organismu, je obvykle prvním krokem založení jeho genomové knihovny (genomové banky) nebo cDNA knihovny.

Genomová knihovna

- Soubor klonovaných fragmentů připravených štěpením genomové DNA, které dohromady reprezentují celý genom daného organismu.
- Genomová knihovna umožňuje studovat geny v jejich přirozené podobě, včetně intronů a regulačních oblastí.
- Knihovna cDNA je tvořena klony, které obsahují molekuly cDNA, připravené zpětnou transkripcí mRNA izolované z buněk organismu.
- Expresní genomová knihovna je knihovna cDNA vytvořená expresními vektory, které umožňují klonované sekvence exprimovat.
- Výběr vektoru závisí na velikosti genomu, z něhož se knihovna připravuje.

Vyhledávání genů v knihovně

- Sondy a hybridizace (homologní, heterologní, cDNA sondy, oligonukleotidové sondy)
- Imunologická detekce
- Proteinová aktivita
- Komplementace

Analýza dlouhých úseků genomu

- Procházení po chromosomu
- Přeskakování po chromosomu

Fyzikální mapování genomu

- Konstrukce restričních map je jedním ze základních kroků při charakterizaci DNA
- Restriční mapa je schematické znázornění poloh a vzdáleností restričních míst na molekule DNA.
- Jedná se o fyzikální mapu DNA, jelikož se vzdálenosti mezi jednotlivými místy udávají v počtech nukleotidů.
- Postup, podle kterého probíhá sestavování restriční mapy se nazývá restriční mapování.

Konstrukce restriční mapy

- Kombinovaným štěpením dvěma restričními enzymy

Str.54 Detekce polymorfismů v genomech

- .