

# 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.

# Příprava rekombinantních molekul DNA

- Je základem genového inženýrství

# Genové inženýrství se zabývá

- izolací genů a 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

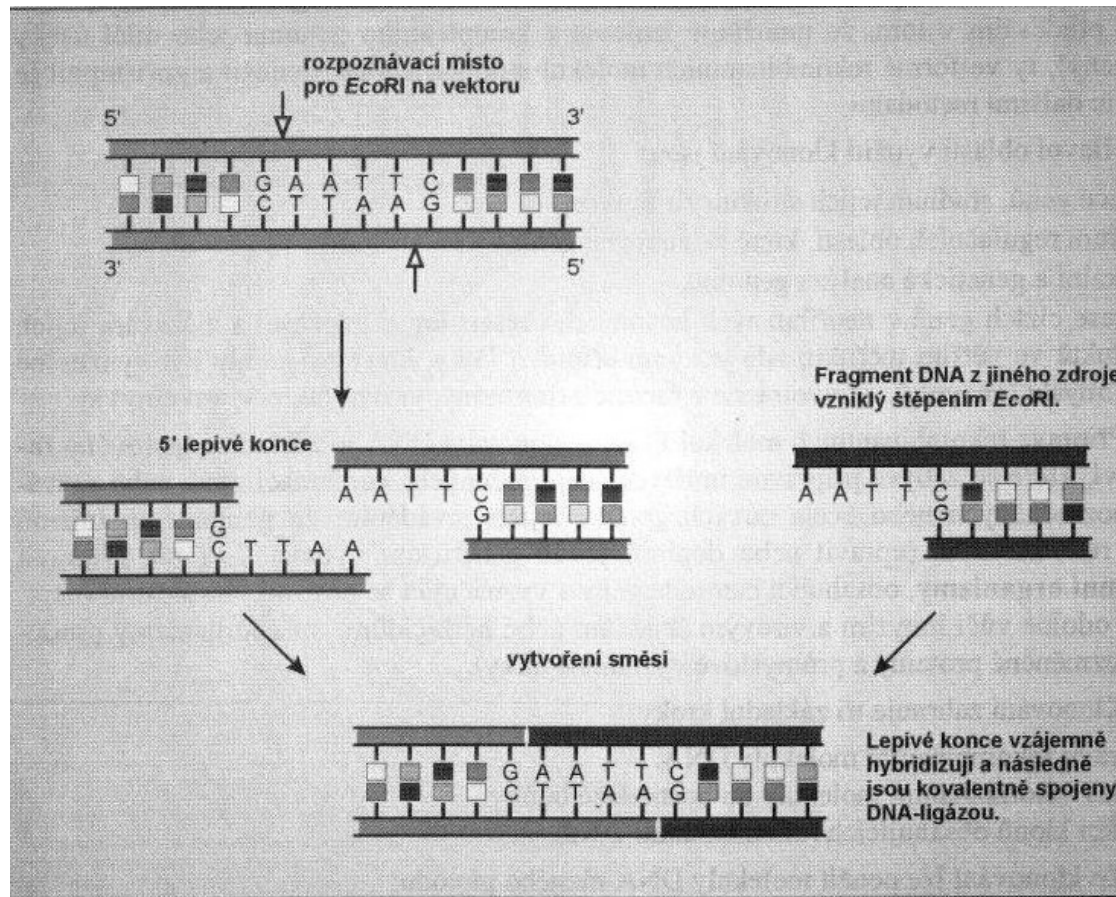
# Ke klonování lze použít molekuly různého původu

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

# Předpokladem účinného spojení fragmentu s vektorovou DNA

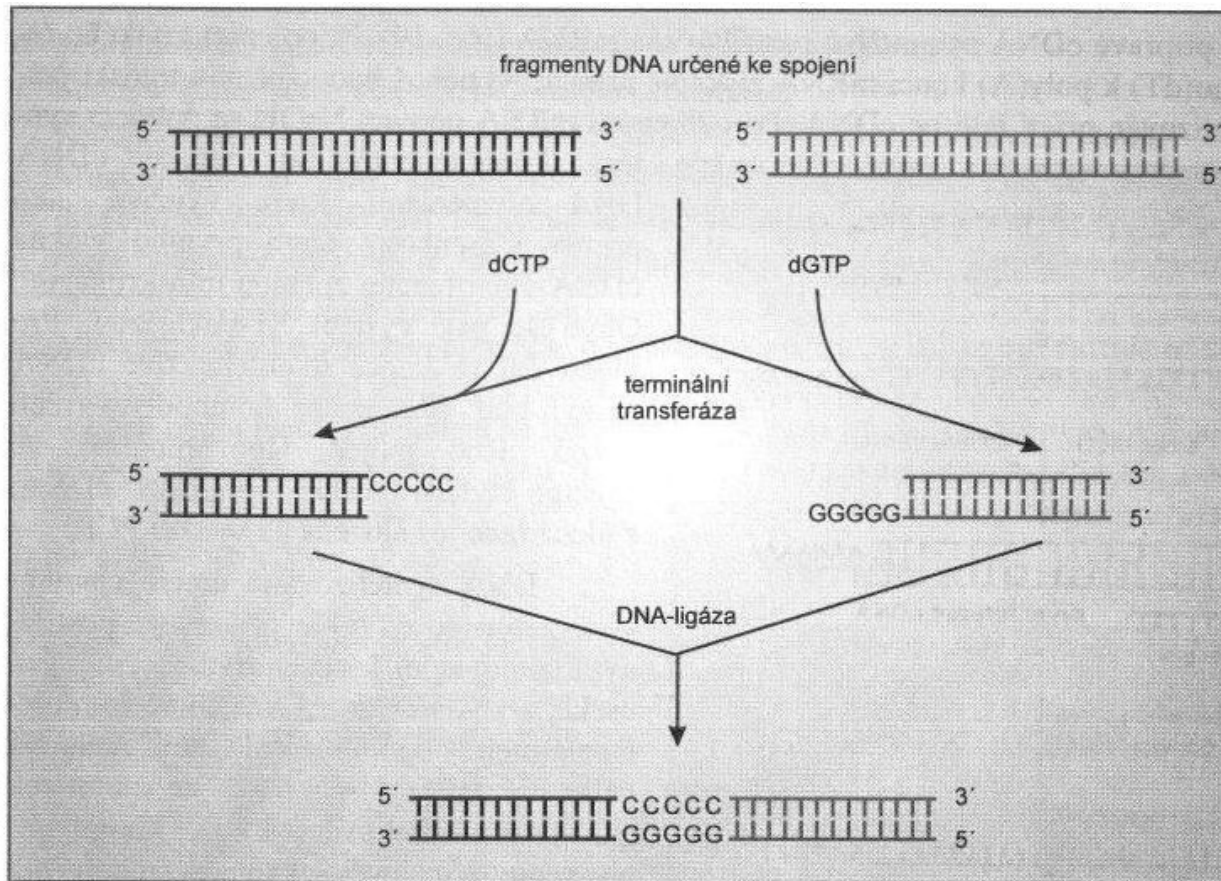
- Je vzájemná komplementarita jejich konců. Té lze dosáhnout :
- Štěpením genomové a vektorové DNA restriční **endonukleázou**, která vytváří kohezní konce – Obr.16
- Úpravou konců molekul vektoru a fragmentu připojením homopolymerních, vzájemně komplementárních konců **terminální transferázou** – Obr.17
- Připojením spojek (linkerů) nebo adaptorů 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

# Spojování fragmentů DNA s lepivými konci (Šmarda a spol. 2005)



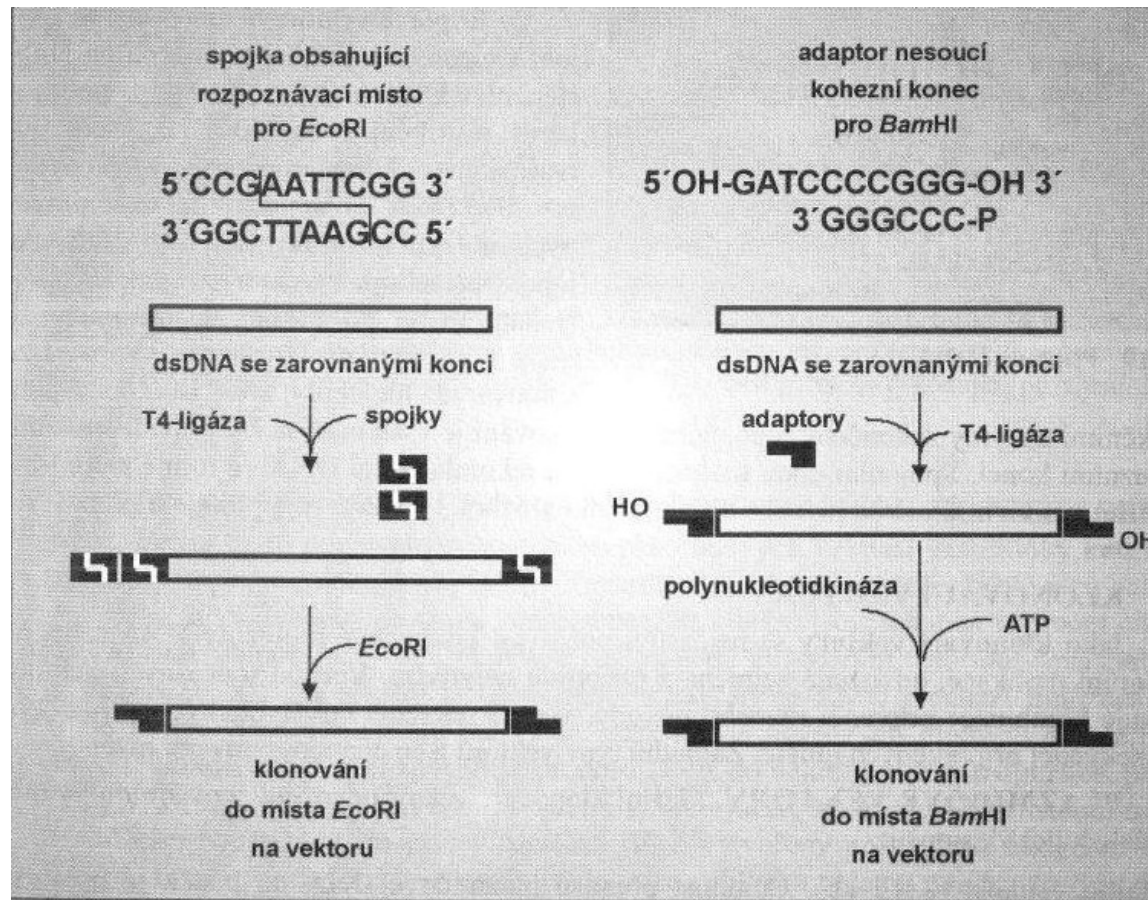
Obr. 16 Spojování fragmentů DNA s lepivými konci

# Spojování fragmentů DNA pomocí homopolymerních konců (Šmarda a spol.2005)



Obr. 17 Spojování fragmentů DNA pomocí homopolymerních konců

# Spojování fragmentů DNA pomocí spojek a adaptorů

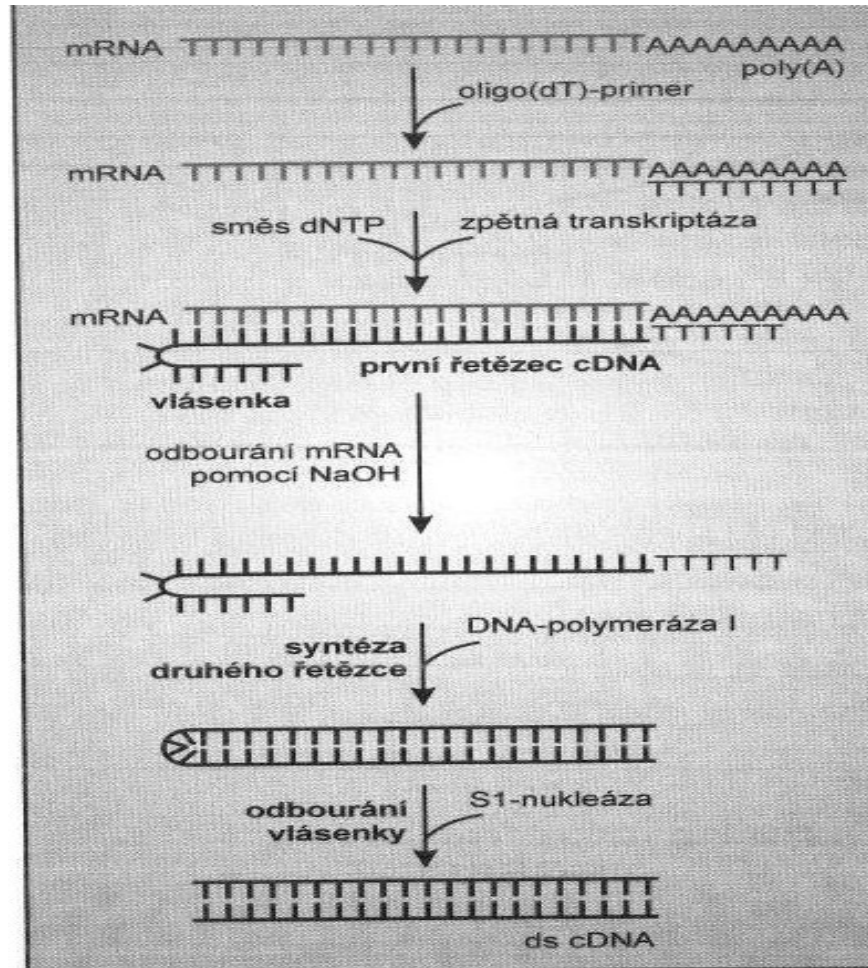


Obr. 18 Spojování fragmentů DNA pomocí spojek a adaptorů

# 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 Obr.19
- konce ds cDNA se upraví připojením homopolymerních konců nebo spojek
- T4 ligázou lze vzájemně spojit i zarovnané konce DNA, ale s nižší účinností.

# Příprava komplementární DNA (Šmarda a spol.2005)



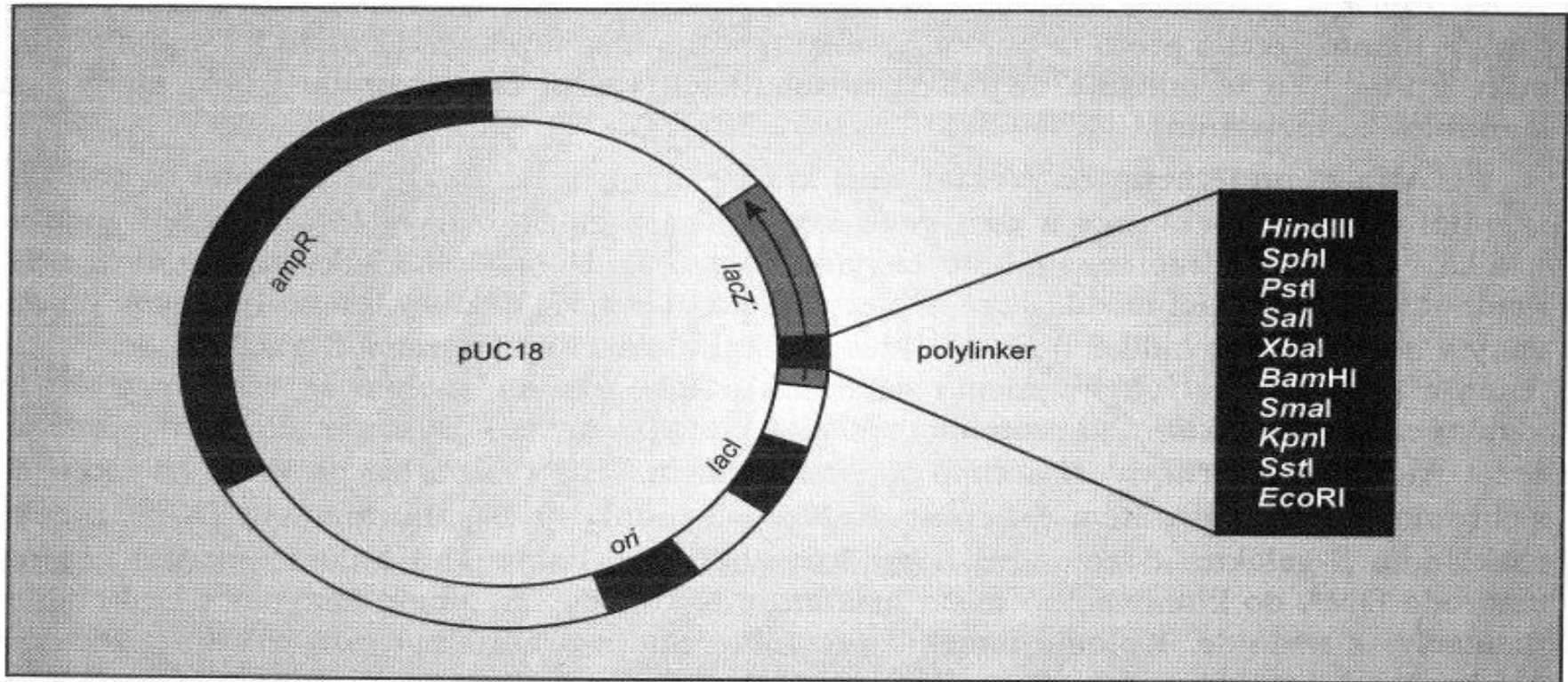
Obr. 19 Příprava cDNA



# Příprava vektorové molekuly (klonovacího vektoru)

- Ke spojení s cizorodou DNA je založena na jejím štěpení v klonovacím místě restriční endonukleázou
- Polylinker je mnohočetné klonovací místo
- Obr.20

# Klonovací vektor pUC18 (Šmarda a spol. 2005)



**Obr. 20** Struktura klonovacího vektoru pUC18. V rámečku jsou uvedeny restriční endonukleázy, jejichž cílová místa se nacházejí v polylinkeru. *ampR* = gen pro rezistenci k ampicilinu (selekční marker), *ori* = počátek replikace a *lacZ'* = část genu *lacZ* kódující proximální úsek  $\beta$ -galaktozidázy.

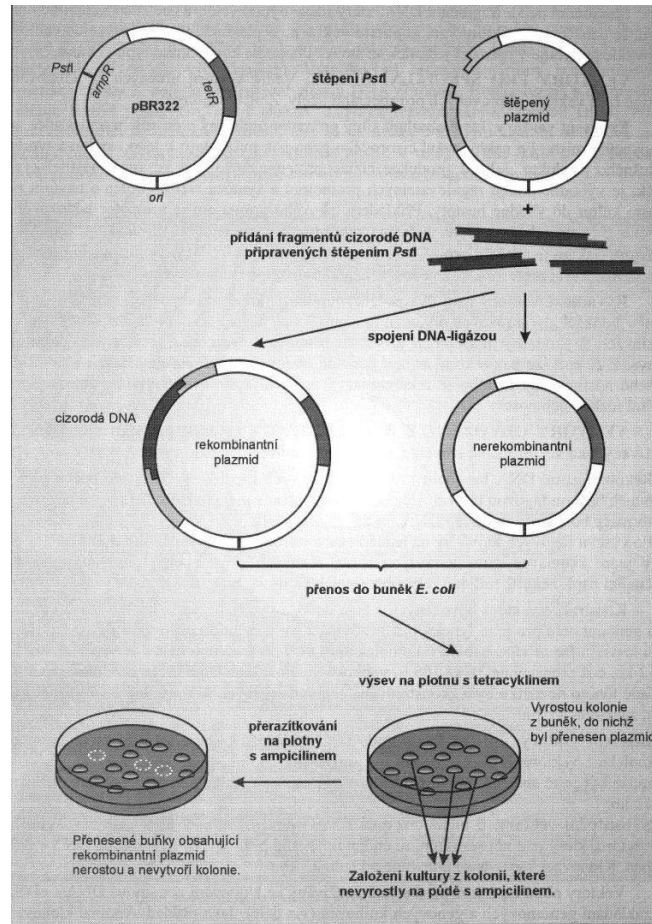
# Příprava rekombinantní DNA (rekombinantního vektoru)

- 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 přenesse do vhodného hostitele (bakteriálních buněk), v němž se replikuje a přenáší do potomstva

# Klonovací vektory

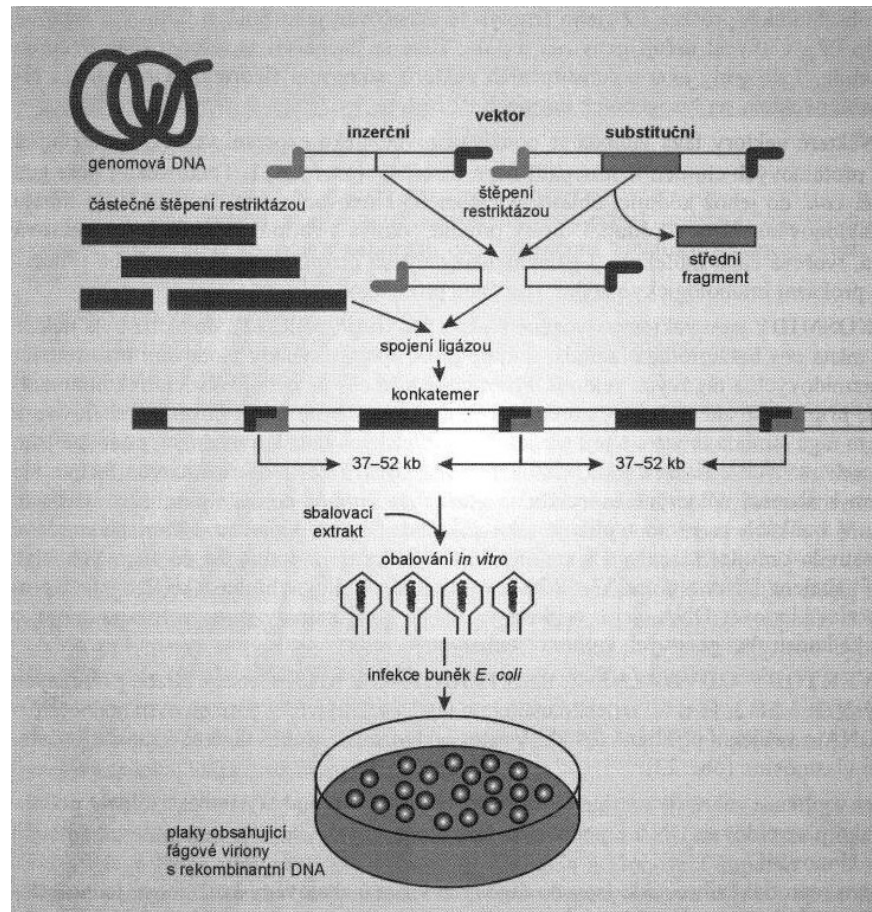
- Kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace, odvozené zejména z plasmidů nebo virů
- Musí obsahovat geny (např. geny pro rezistenci k antibiotikům tzv. selekční markery), na základě jejichž fenotypového projevu lze buňky nesoucí plasmid snadno selektovat
- Musí nést vhodná klonovací místa (jedinečná restriční místa pro restriktázu), do nichž se začleňuje cizorodá DNA.
- Obr.21

# Klonování v plasmidovém vektoru pBR322 (Šmarda a spol. 2005)



Dbr. 21 Klonování DNA v plasmidovém vektoru pBR322

# Klonování DNA ve fágovém vektoru (Šmarda a spol.2005)



Obř. 22 Klonování DNA prostřednictvím vektorů odvozených z fága lambda

# Způsoby přenosu do hostitelských buněk

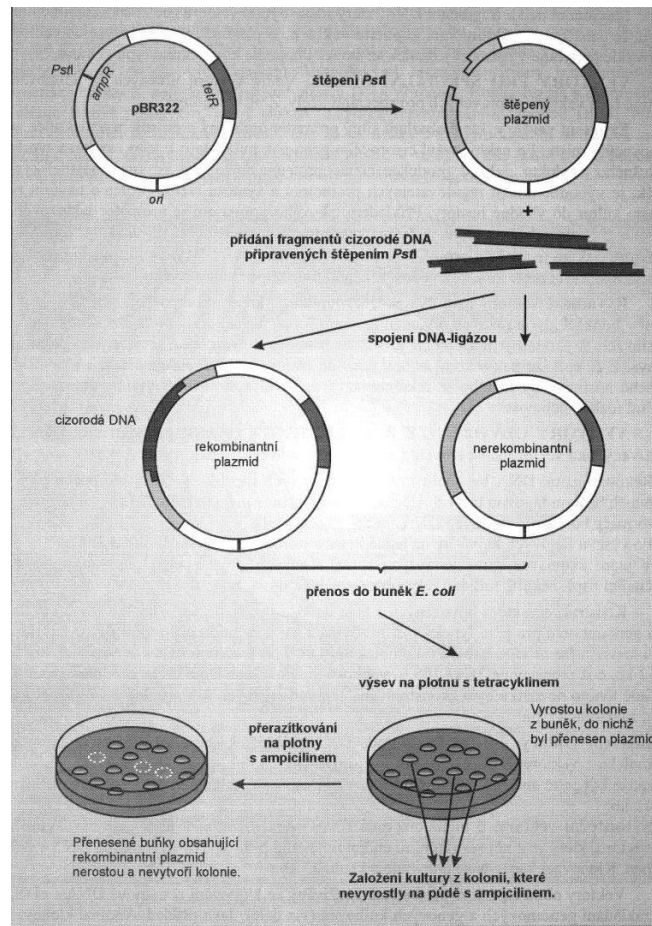
- Metoda chemické transformace (stav kompetence u buněk *E.coli* se navozuje působením  $\text{CaCl}_2$  při  $0^\circ\text{C}$  a pak krátkým zahřátím na  $42^\circ\text{C}$ )
- Elektrotransformace (směs rekombinantní DNA a buněk se vystaví na krátkou dobu silnému elektrickému pulsu  $18\text{kV/cm}$ )

# Identifikace bakteriálních kolonií obsahujících rekombinantní plasmidy

- Inerční inaktivace (klonovací místo je umístěno v genu pro rezistenci k antibiotiku, inserce cizorodé DNA způsobí ztrátu funkce tohoto genu) (např. plasmid pBR322) Obr.21
- 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 pUC18 nebo pUC19) Obr.20

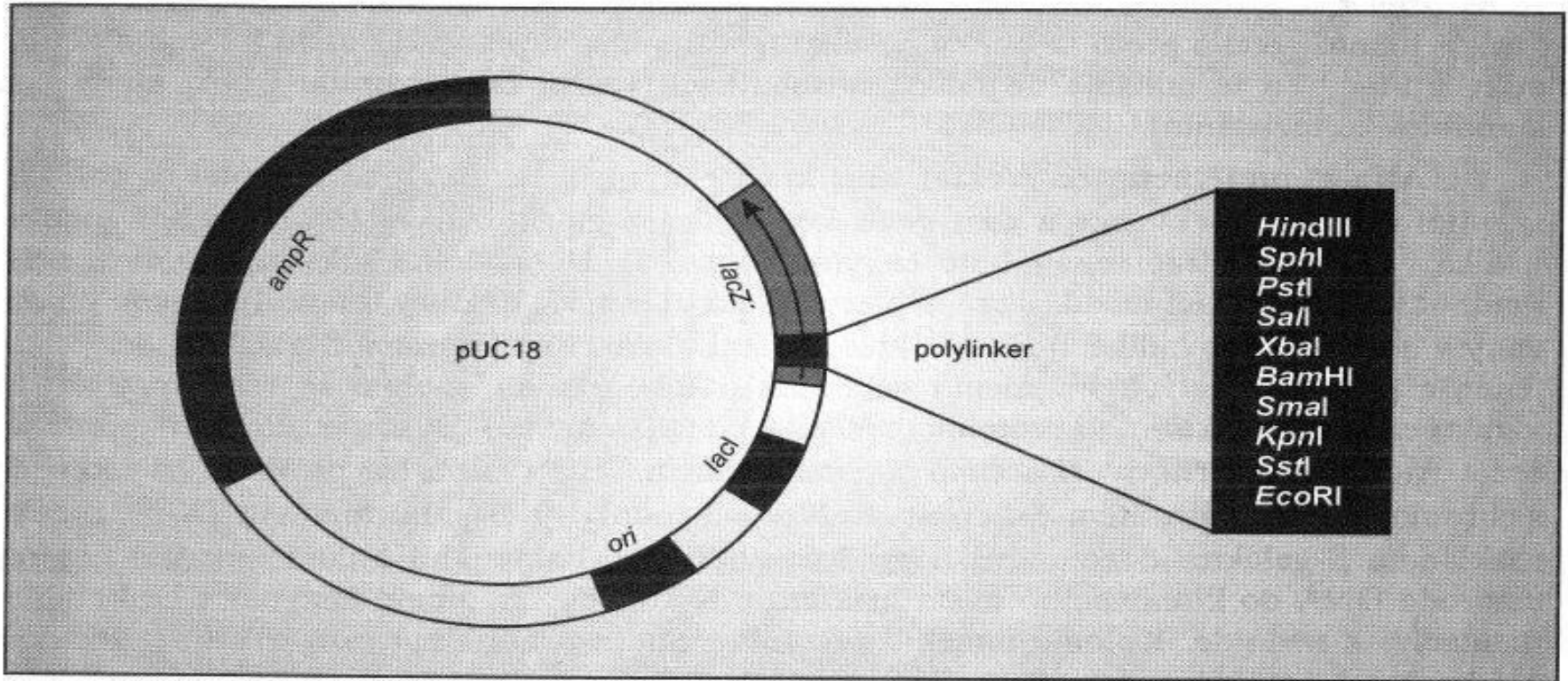


# Identifikace bakterií nesoucí rekombinantní plasmidy (Šmarda a spol.2005)



Dbr. 21 Klonování DNA v plazmidovém vektoru pBR322

# Identifikace bakterií nesoucí rekombinantní plasmidy (Šmarda a spol. 2005)

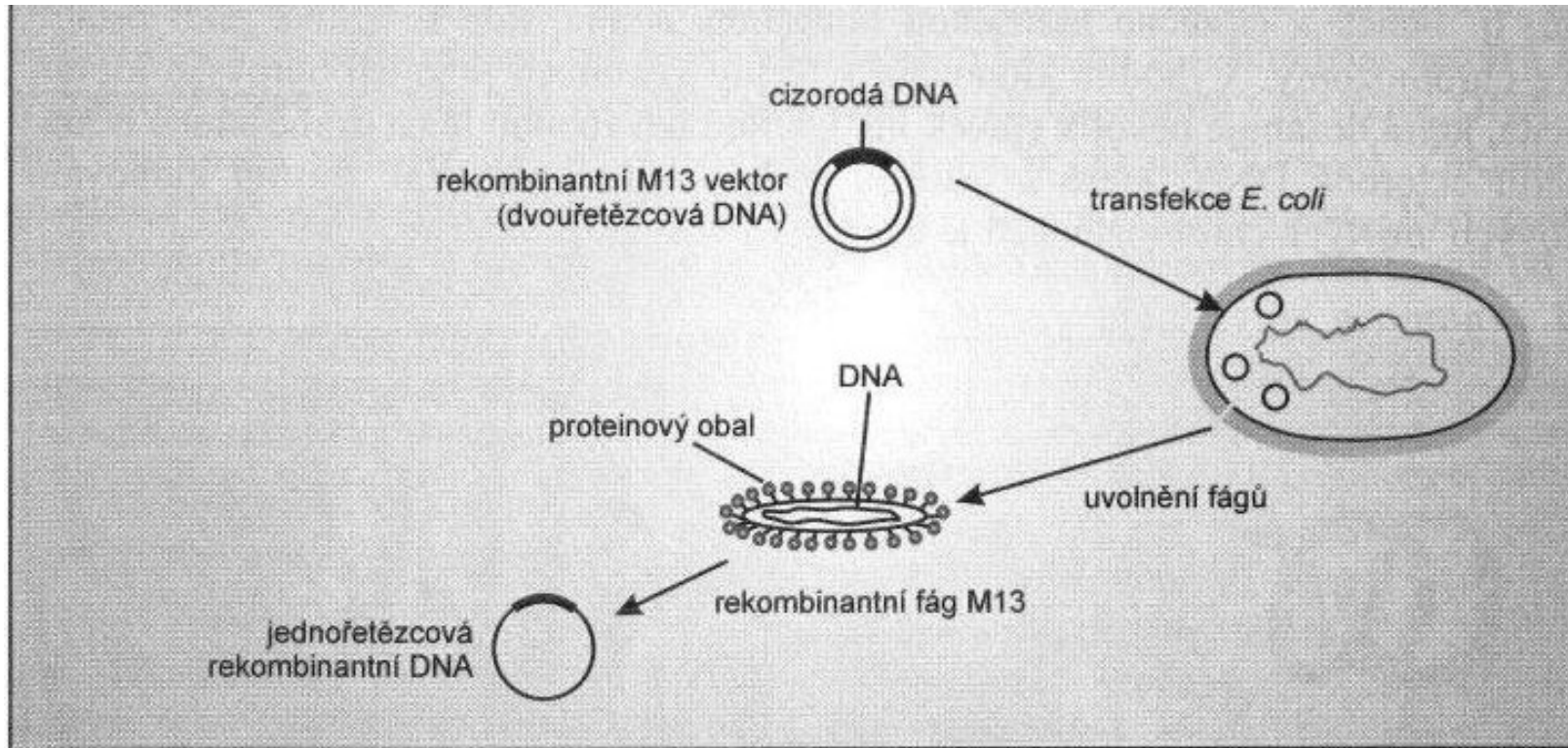


**Obr. 20** Struktura klonovacího vektoru pUC18. V rámečku jsou uvedeny restriční endonukleázy, jejichž cílová místa se nacházejí v polylinkeru. *ampR* = gen pro rezistenci k ampicilinu (selekční marker), *ori* = počátek replikace a *lacZ'* = část genu *lacZ* kódující proximální úsek  $\beta$ -galaktozidázy.

# Vektory pro speciální účely

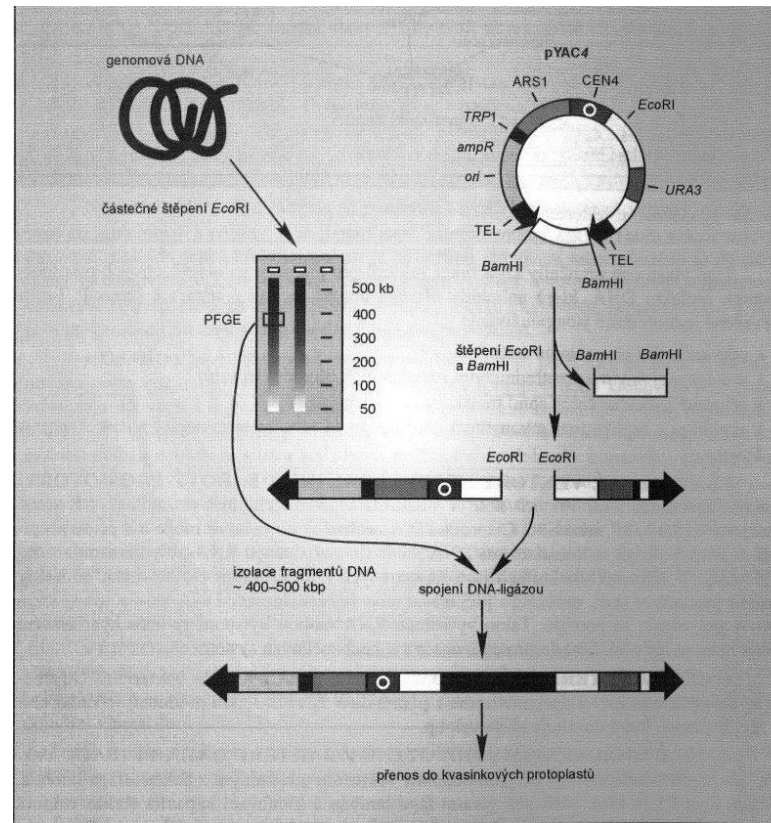
- Expresní vektory – obsahují silný promotor umístěný proti směru transkripce od klonovacího místa. Po naklonování cizorodého genu může dojít k jeho expresi a tvorbě příslušného produktu,
- Kyvadlové vektory – mají 2 počátky replikace, které jim umožňují účinně se replikovat v buňkách 2 různých organismů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

# Klonování v M13 vektorech (Šmarda a spol. 2005)



Obr. 23 Klonování ve vektorech M13

# Klonování genů v YAC vektorech (Šmarda a spol. 2005)



Obr. 24 Klonování genů v kvasinkových umělých chromozomech

Vysvětlivky: ARS1 – počátek replikace aktivní v kvasinkové buňce, TEL – telomerová sekvence z *Tetrahymena*, CEN4 – centromera, TRP1 a URA3 – markery pro selekci vektoru v kvasinkových buňkách, *ampR* – bakteriální selekční marker, *ori* – počátek replikace aktivní v bakteriální buňce.

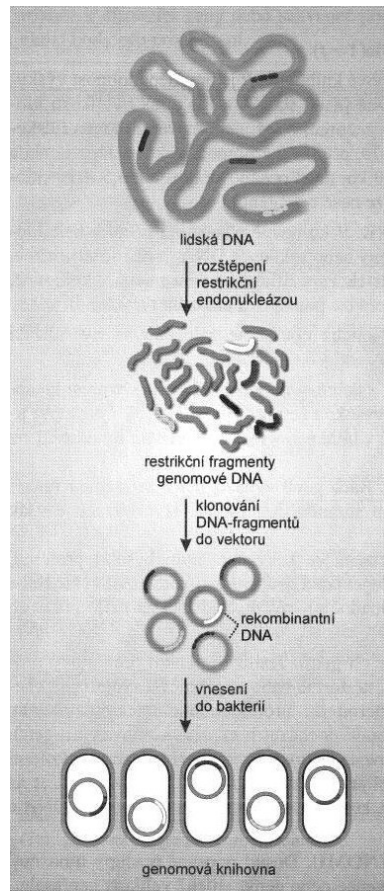
# Zakládání genových knihoven

- 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.

# Konstrukce genomové knihovny (Šmarda a spol.2005)



Obr. 25 Konstrukce genomové knihovny z lidského genomu



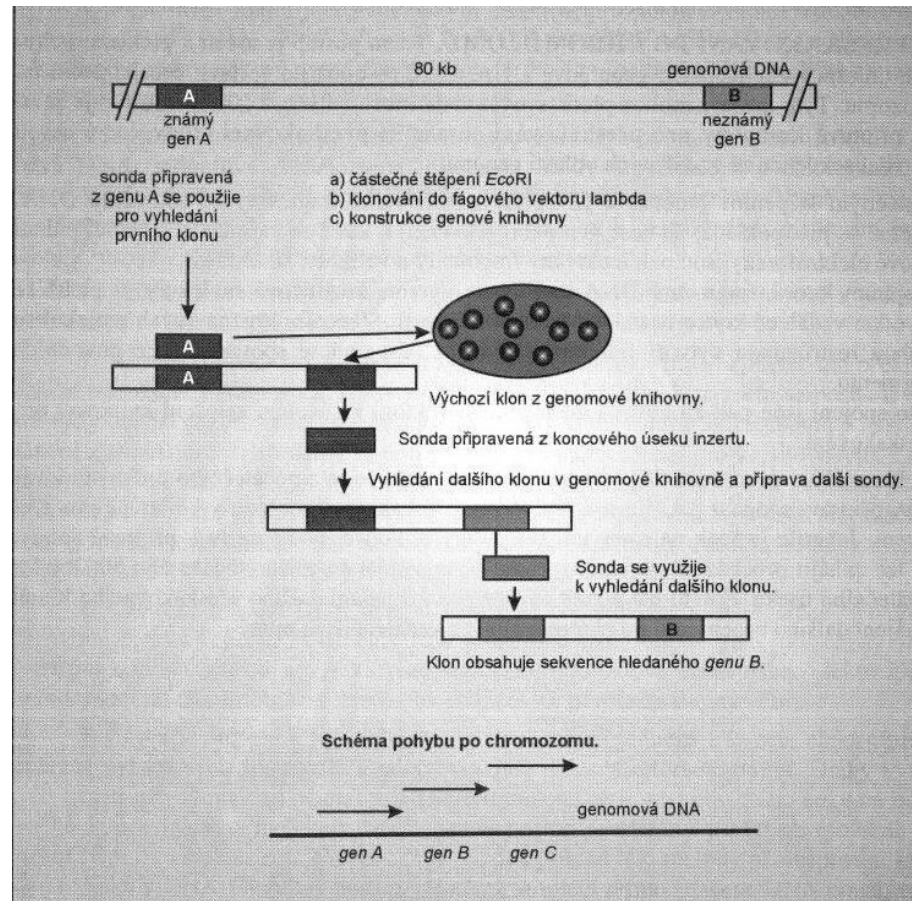
# Vyhledávání genů v knihovně

- DNA sondy a DNA/DNA hybridisace (homologní, heterologní, cDNA sondy, oligonukleotidové sondy)
- Immunologická detekce (je-li protilátka)
- Proteinová aktivita (když buňky protein nesyntetizují)
- Komplementace (transformuje se do mutantních buněk)

# Analýza dlouhých úseků genomu

- Procházení po chromosomu
- Přeskakování po chromosomu
- Obr.26

# Procházení po chromosomu (Šmarda a spol. 2005)



Obr. 26 Procházení pro chromozomu

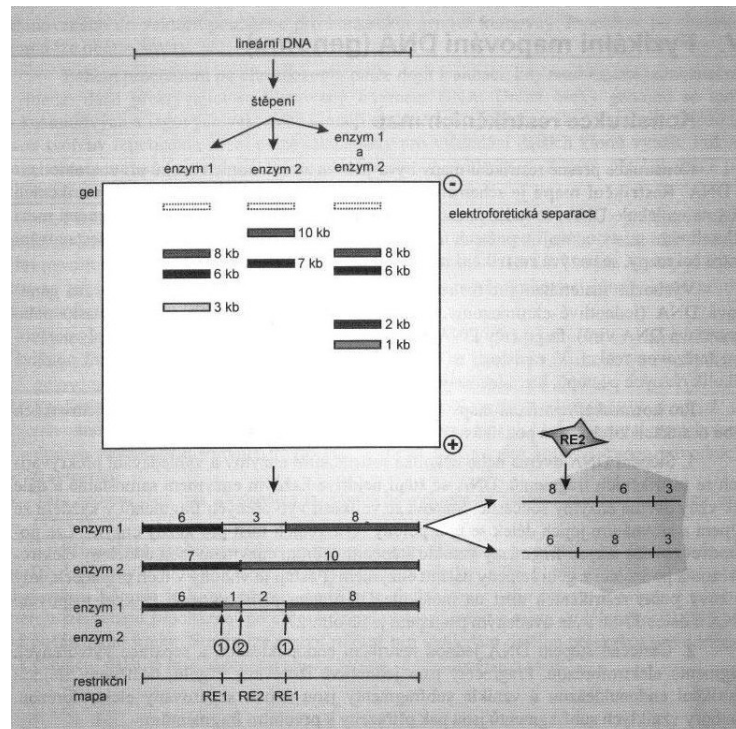
# Fyzikální (restrikční) mapování genomu

- Konstrukce restrikčních map je jedním ze základních kroků při charakterizaci molekul DNA
- Restrikční mapa je schematické znázornění poloh a vzdáleností restrikčních 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 restrikční mapy se nazývá restrikční mapování.

# Konstrukce restriční mapy

- Kombinovaným štěpením dvěma restričními enzymy
- Konstrukce restriční mapy
- Obr.27

# Konstrukce restrikční mapy (Šmarda a spol. 2005)



Obr. 27 Konstrukce restrikční mapy kombinovaným štěpením dvěma restrikčními enzymy. Štěpení molekuly DNA enzymem 1 vedlo k vytvoření 3 kb, 6 kb a 8 kb fragmentů (tj. na DNA jsou pro tento enzym dvě cílová místa), ale neprokázalo, zda se 3 kb fragment nachází uprostřed nebo na konci štěpené sekvence. Kombinované štěpení enzymy 1 a 2 ponechalo 6 kb a 8 kb fragmenty intaktní, ale došlo k rozštěpení 3 kb fragmentu, což dokazuje, že enzym 2 štěpí uvnitř 3 kb fragmentu vytvořeného enzymem 1. Pokud by 3 kb fragment byl na konci analyzované sekvence, pak štěpení samotným enzymem 2 musí dávat 1 kb nebo 2 kb fragment. Protože tomu tak není, musí být 3 kb fragment vytvořený po štěpení enzymem 1 uprostřed. To, že cílové místo pro enzym 2 leží blíže 6 kb fragmentu než 8 kb fragmentu lze odvodit z faktu, že po štěpení enzymem 2 vznikají fragmenty o velikostech 7 kb a 10 kb.

■