



AU! AUVÁJS, ACH KOUVEJ! JOJ, TO MYŠLENÍ BOLÍ!

# Využití rekombinantní DNA při studiu mikroorganismů

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2012**

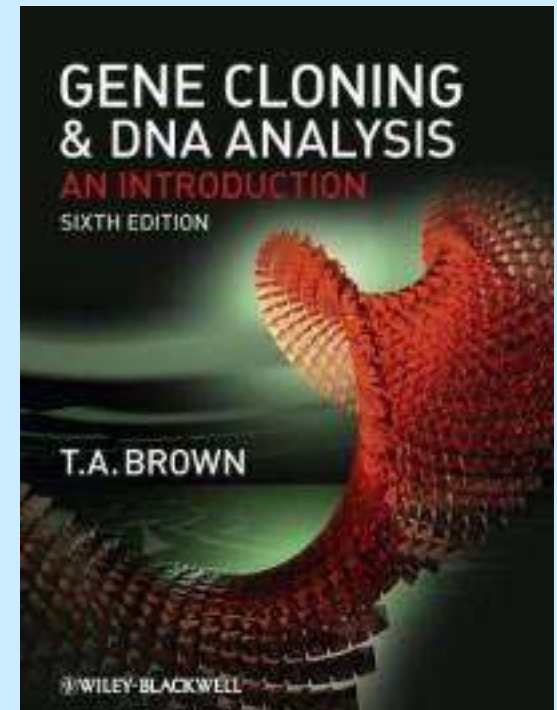
# ***Obsah přednášky***

- 1) Celogenomové metody sekvenování**
- 2) Sekvenování *H. influenzae***
- 3) Sekvenování *S. cerevisiae***
- 4) Contigy, jejich zpracování**
- 5) Využití repetitivních sekvencí**
- 6) Studium genové exprese a funkce genů**
- 7) Analýza transkriptů**
- 8) Analýza regulačních míst**
- 9) Techniky mutagenese *in vitro***
- 10) Příklad analýzy bakteriálního genu**



## *Doporučená literatura*

**Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition**



**K procvičování nachystat tabulku  
genetického kódu**

# *Metody sekvenování*

**Základní metody jsme  
probírali nedávno, tak si je  
pouze zopakujte**



# *Celogenomové sekvenování*

**Využívají automatických systémů, ručně už  
by to nikdo nedělal**

**Ručního sekvenování se využívá ve  
výzkumných laboratořích k ověřování identity  
klonů nebo k analýze konstruktů, sekvenují  
se relativně malé počty vzorků**

# *Dva přístupy k celogenomovému sekvenování*

## **Metoda tzv. „shotgun“**

- Genom je štěpen na nahodilé krátké fragmenty
- Fragmenty jsou sekvenovány
- Na fragmentech jsou identifikovány překryvy

## **Metoda využívající „contigy“**

- Nejprve jsou připraveny série překrývajících se klonů = contig
- Pořadí contigů je známo
- Jednotlivé contigy jsou sekvenovány

# *Shotgun*

**Klíčovým požadavkem jsou překryvy mezi všemi jednotlivě získanými sekvencemi**

- **Identifikace jednotlivých překryvů musí být přesná a bezrozporná**
- **Každá chyba může zničit celý náročný proces**
- **Riziko chyby roste s velikostí genomu**



**Metoda je vhodná na malé bakteriální genomy**



**Metodou shotgun byl  
osekvenován genom  
*Haemophilus influenzae***



# Co je to za bakterii ten *Haemophilus influenzae*?



<b>Čeled'</b>	<i>Pasteurellaceae</i>
<b>Barvení</b>	<i>Gramnegativní</i>
<b>Tvar</b>	<i>Tyčinka</i>
<b>Kyslík</b>	<i>Aerobní, fakultativně anaerobní</i>
<b>Patogenita</b>	<i>Oportunní patogen</i>

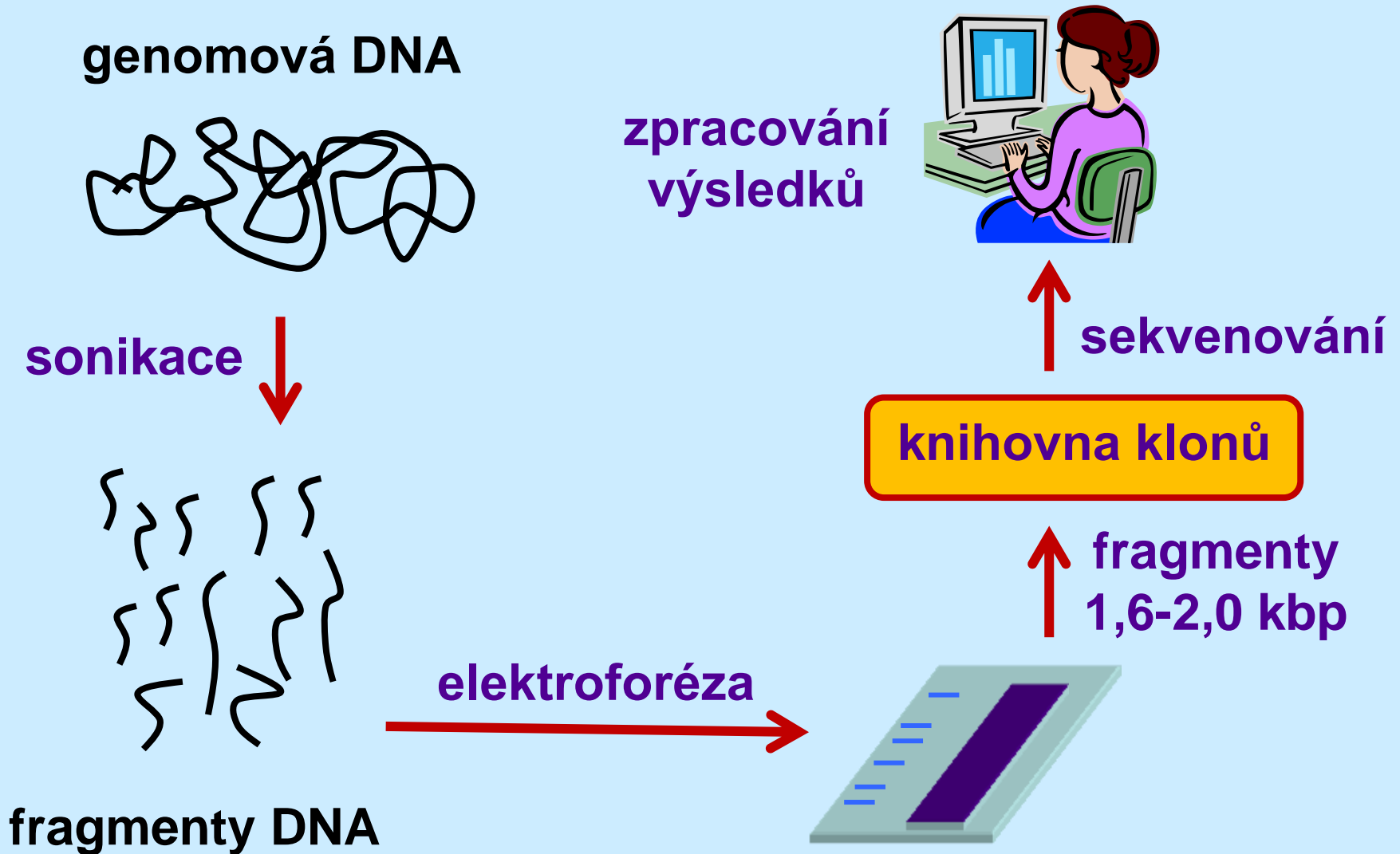


# ***Sekvenování genomu *H. influenzae****

**První sekvenovaný buněčný genom, 1995**

- **Craig Venter, TIGR**
- **Velikost kružnicového genomu je 1 830 140 bp**
- **1 740 strukturních genů**
- **58 genů pro tRNA**
- **18 dalších genů pro RNA**

# Postup sekvenování *H. influenzae*



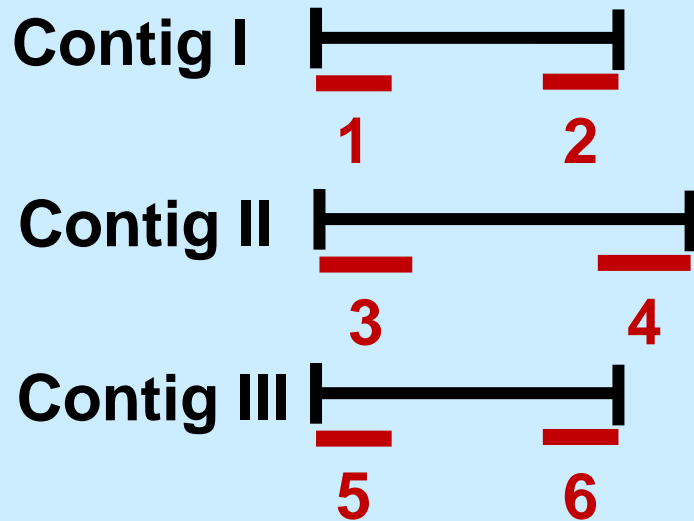
# ***Sekvenování genomu *H. influenzae****

## **Proč sonikace a ne restriktázy?**

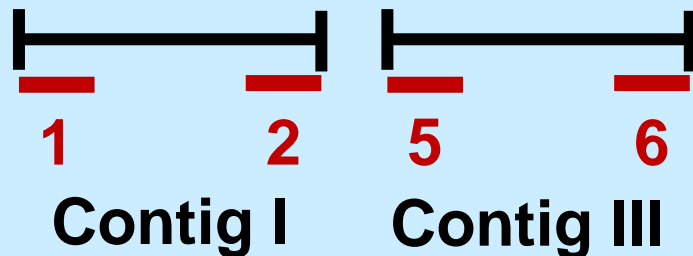
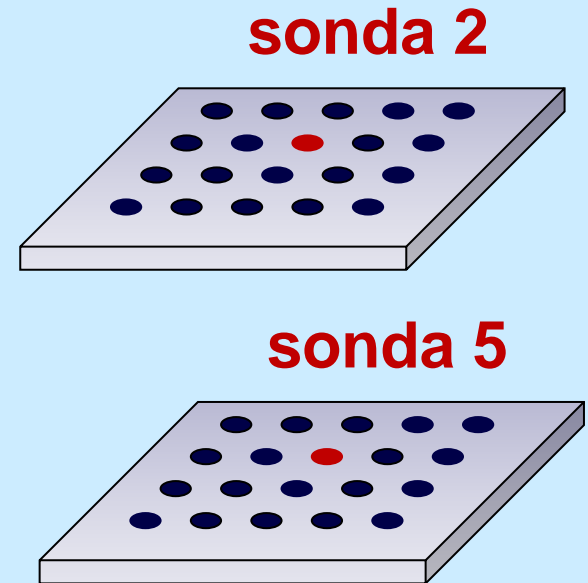
- **Po restriktázách by mohly zůstat mezery**

# Kontrola přítomnosti mezer

## Příprava oligonukleotidových sond



test  
genové  
knihovny



sonda 2 a 5  
pokrývají stejný  
fragment

# ***Sekvenování genomu *H. influenzae****

## **Proč sonikace a ne restriktázy?**

- **Po restriktázách by mohly zůstat mezery**

## **Další údaje**

- **19 687 klonů**
- **28 643 záznamů o sekvenování**
- **4 339 záznamů kratších 400 bp – byly odstraněny**
- **analýza zbylých 24 304 záznamů trvala počítači 30 hodin**
- **získáno bylo 140 specifických contigů**

**Metoda shotgun není vhodná pro  
sekvenování repetitivních sekvencí.**

**Ty se ale u bakterií příliš často  
nevyskytují**





# *Contigy*

**Tvorba série překrývajících se klonů DNA fragmentů**



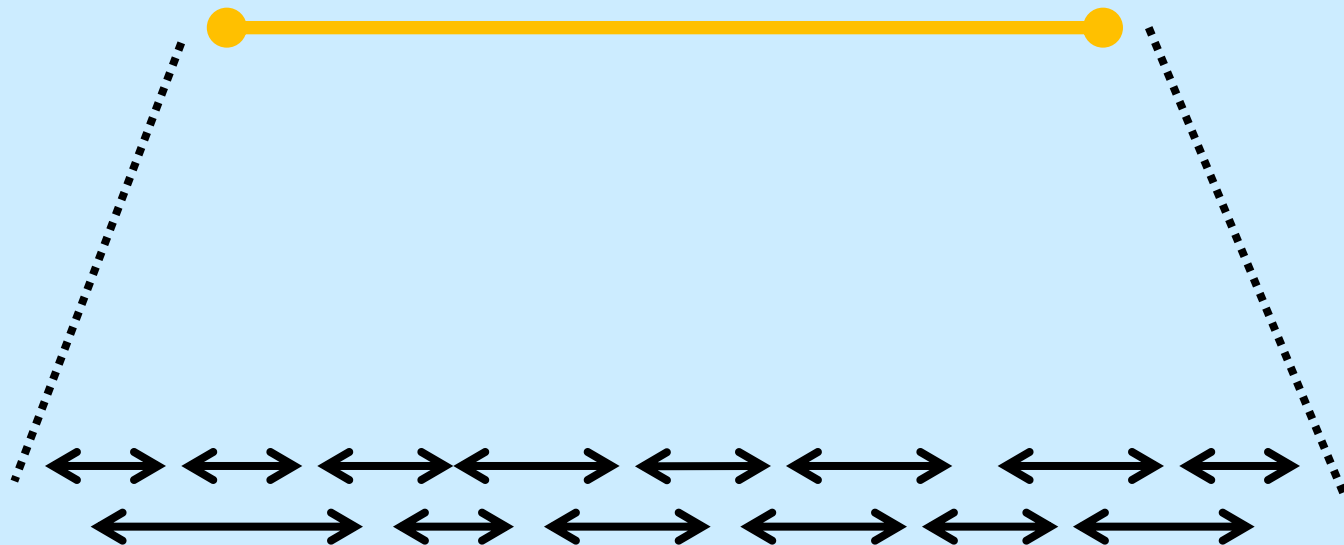
- **Je pracnější, trvá déle a stojí víc peněz**

**Metoda vhodná i pro dlouhé sekvence s repeticemi**

# ***Sekvenování chromozómu III*** ***S. cerevisiae***

**První eukaryotický chromozóm, 1992**

**Contigy 29 klonů fragmentů o průměrné délce 10,8 kbp v kosmidech**



# ***Jak na contigy?***

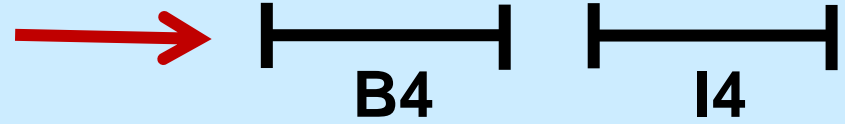
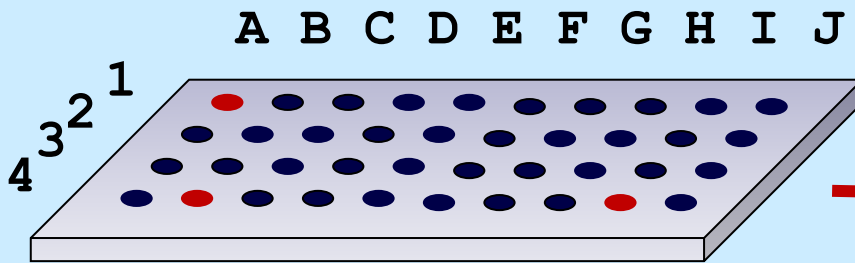
- 1) Procházení chromozómu (chromosome walking)**
- 2) Fingerprinting klonů (clone fingerprinting)**
- 3) PCR repetitivní DNA**
- 4) Analýza výskytu míst označené sekvence (sequence tagged site, STS)**

# ***Procházení chromozómu***

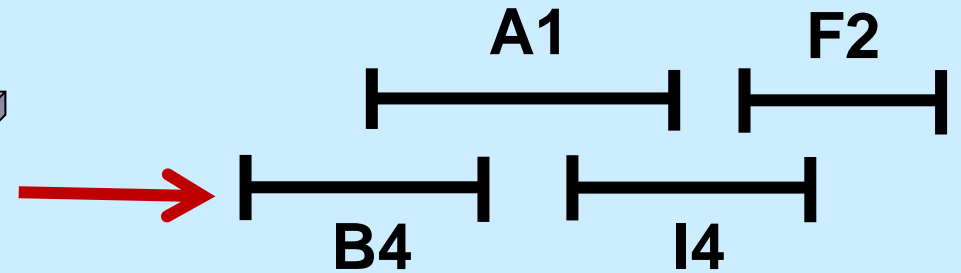
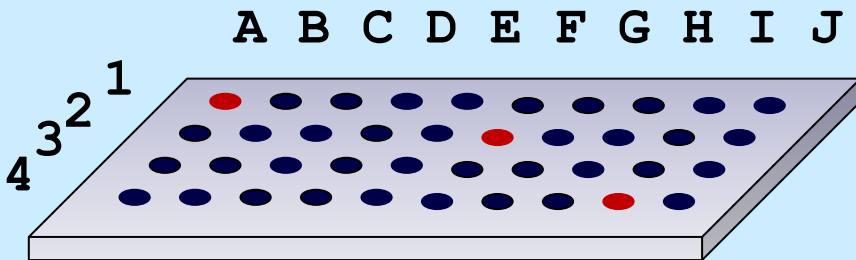
- 1) Z genomové knihovny je vybrán jeden klon**
- 2) Klon je naznačen a použit jako hybridizační sonda dalších klonů v knihovně**
- 3) Klony, které poskytují signál se překrývají s použitou sondou**
- 4) Nové klony jsou naznačeny a použity k dalšímu kolu hybridizace ...**

# Příklad procházení chromozómu

## Testování knihovny klonem A1

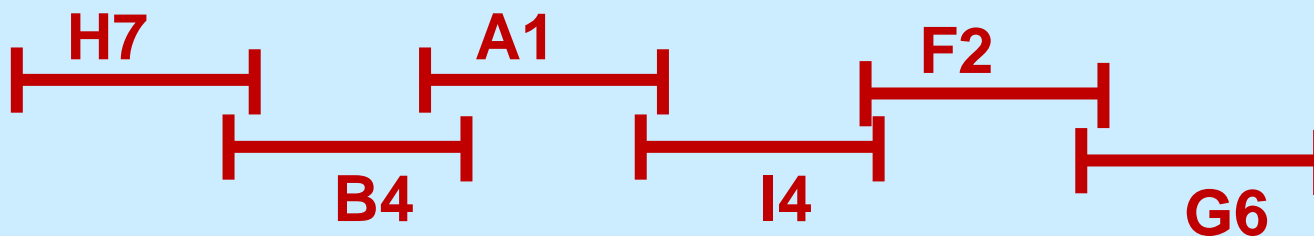
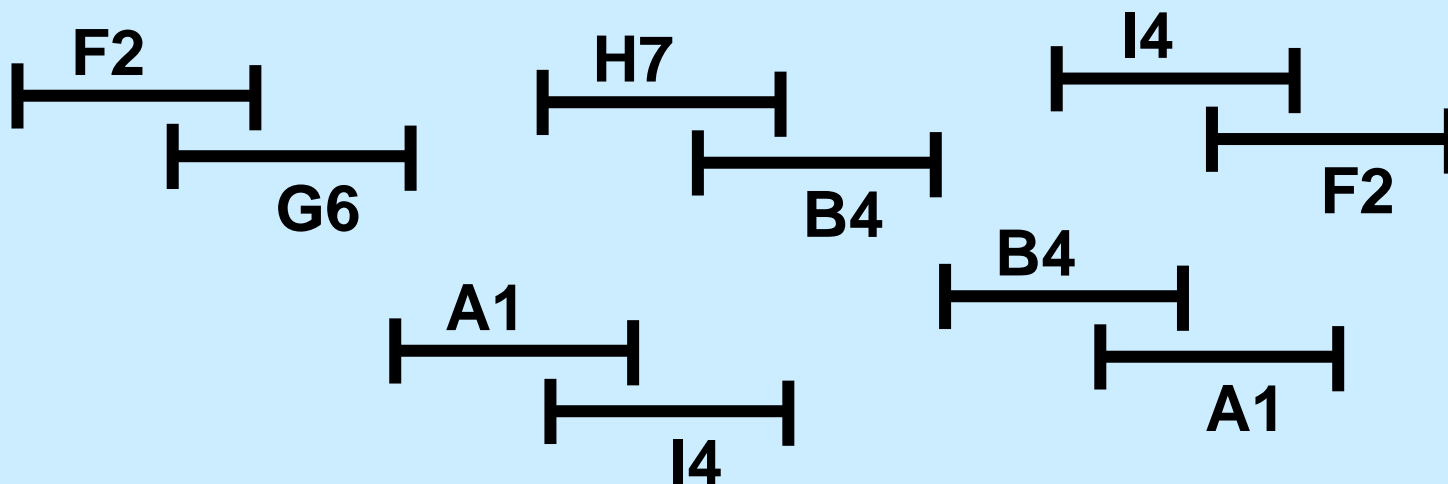


## Testování knihovny klonem I4

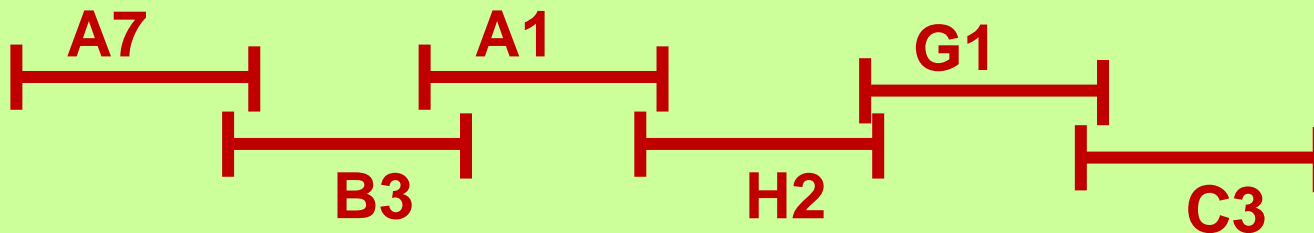
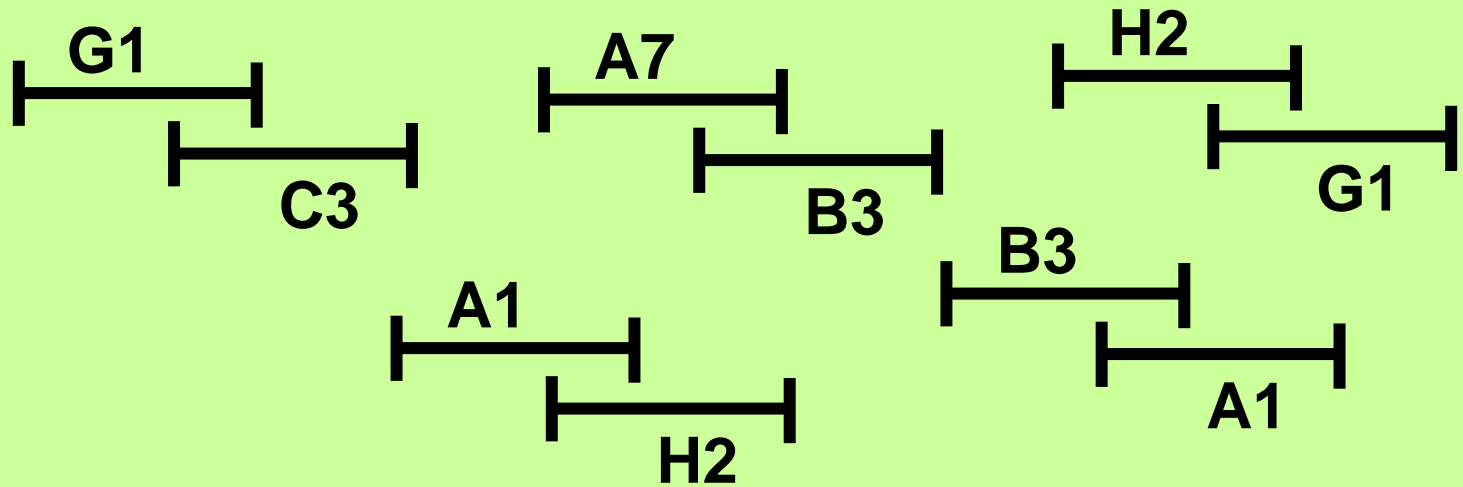


# *Fingerprinting klonů*

- 1) Nezačíná se z jednoho místa
- 2) Vyhledávají se dvojice překrývajících se klonů



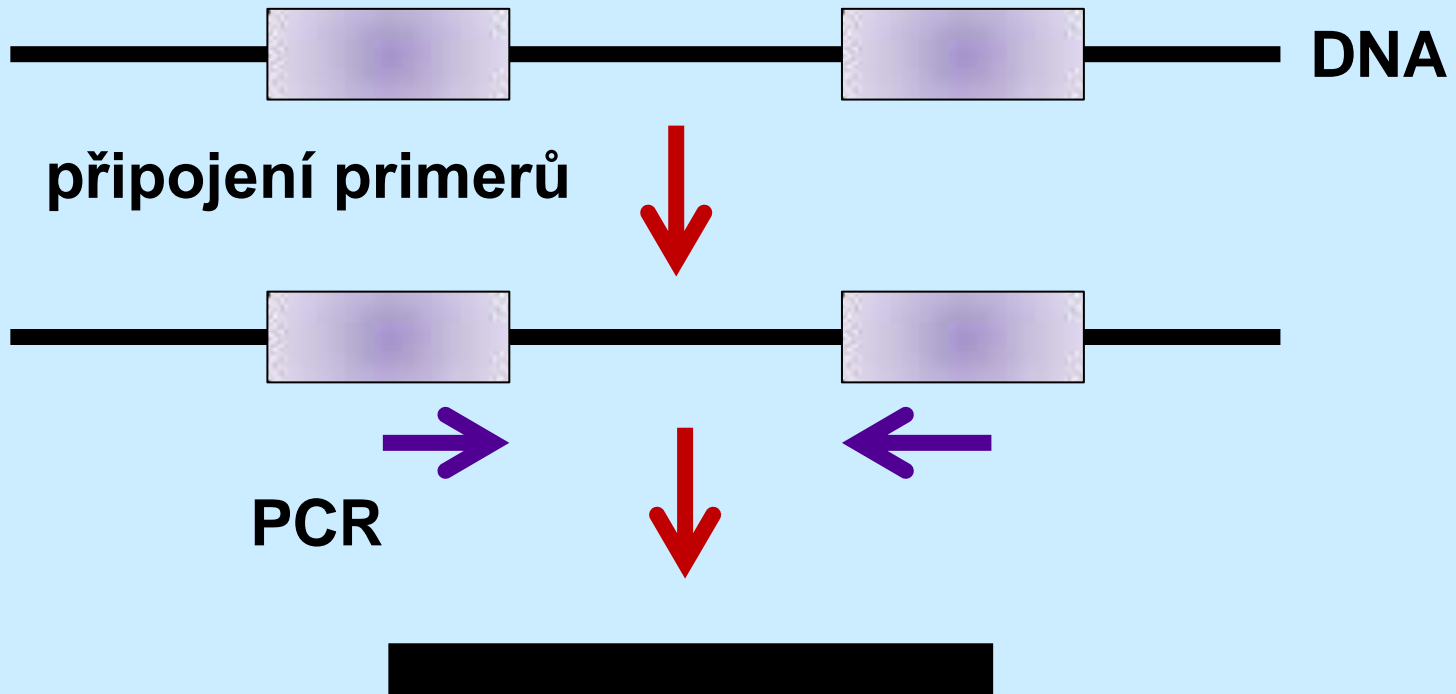
# Sestavte kontig klonů z následujících překryvů



# *PCR repetitivní DNA*

PCR z roztroušených repetitivních elementů  
(interspersed repeat element PCR, IRE-PCR)

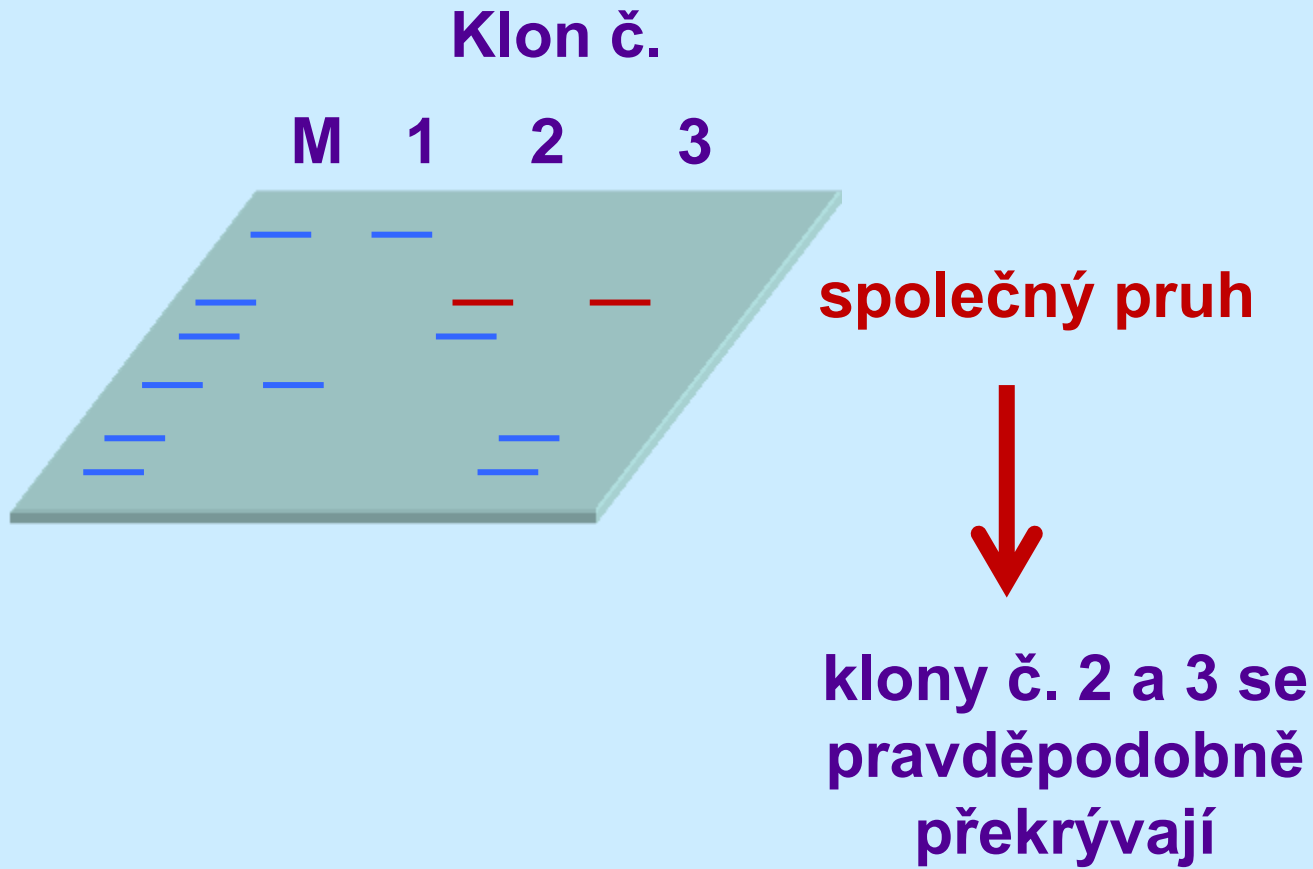
dvě identické repetice



amplikon překrývající oblasti mezi sousedícími repeticemi

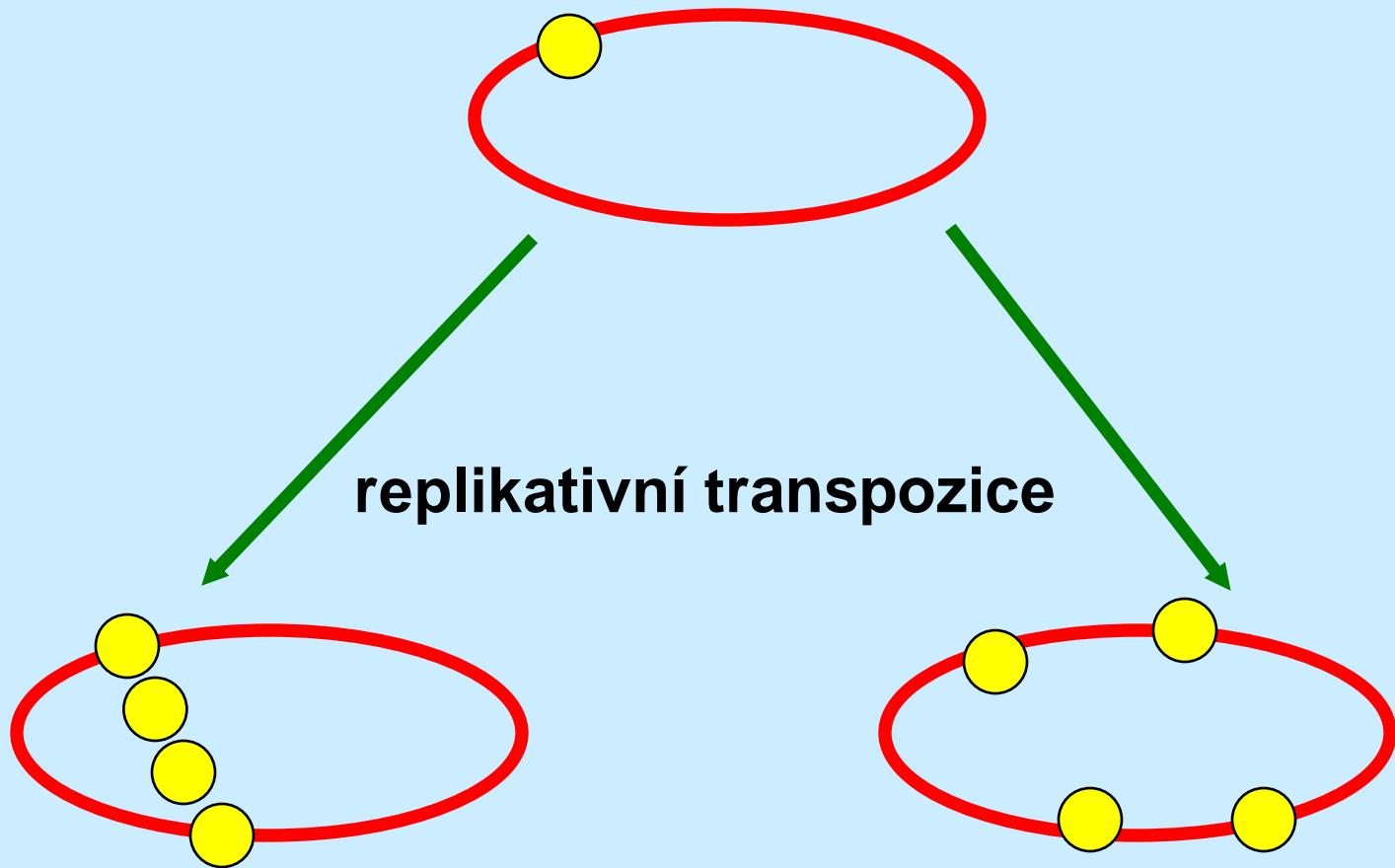


# PCR repetitivní DNA - vyhodnocení

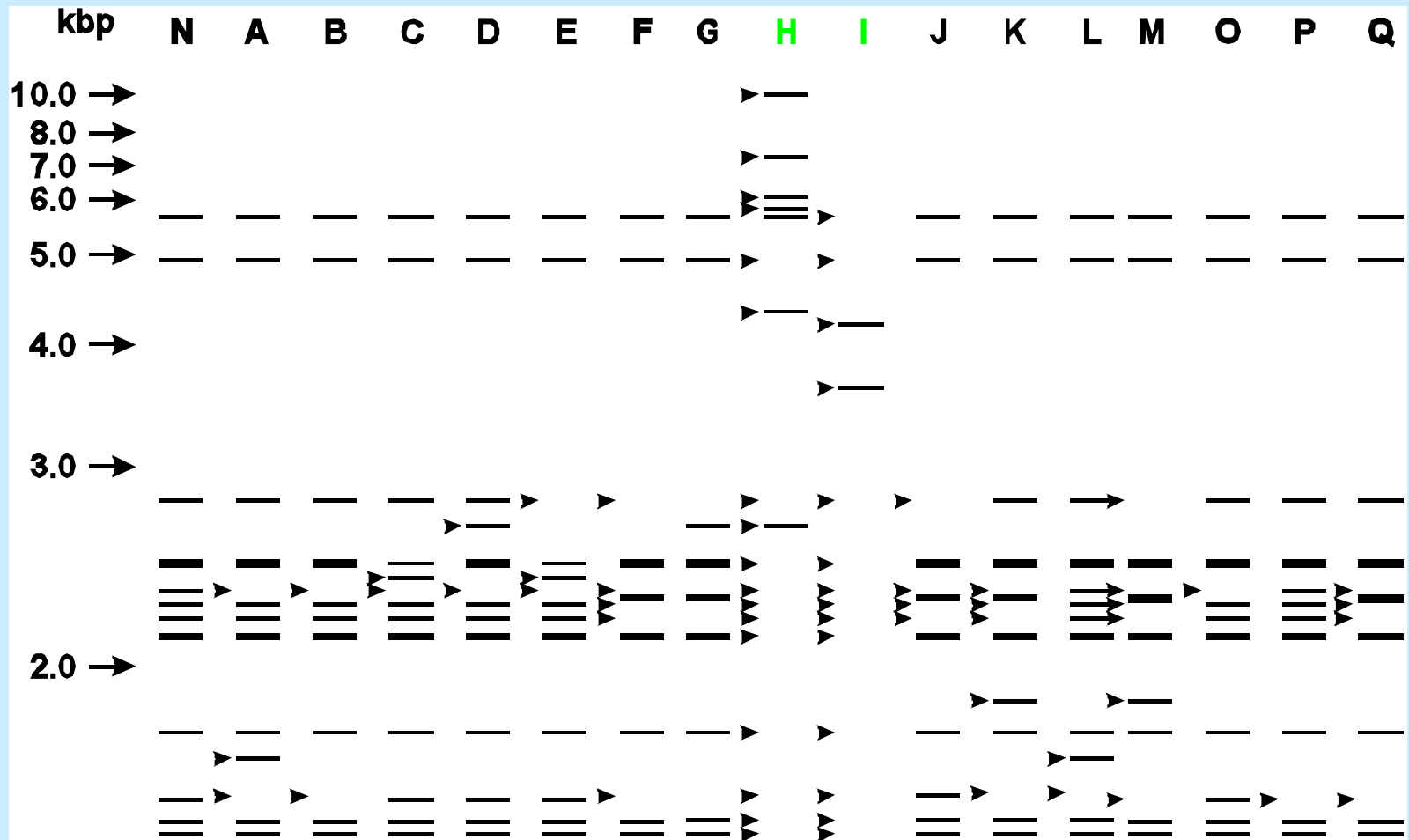


# ***Mapování genomu mykobakterií s využitím inzerčních sekvencí***

# *Inzerční sekvence jsou transponovatelné*



# Zopakujme si - IS901 RFLP profily pro studium epizootologie MAA



# ***Jaké otázky jsme si položili***

**Do jakých míst se začleňuje IS901?**

- **Identifikovali jsme celkem 16 lokusů**

**Kde jsou fragmenty těchto lokusů umístěny na RFLP mapě po štěpení *PvuII*?**

- **Mapovali jsme u 25 různých izolátů *MAA* lokusů**

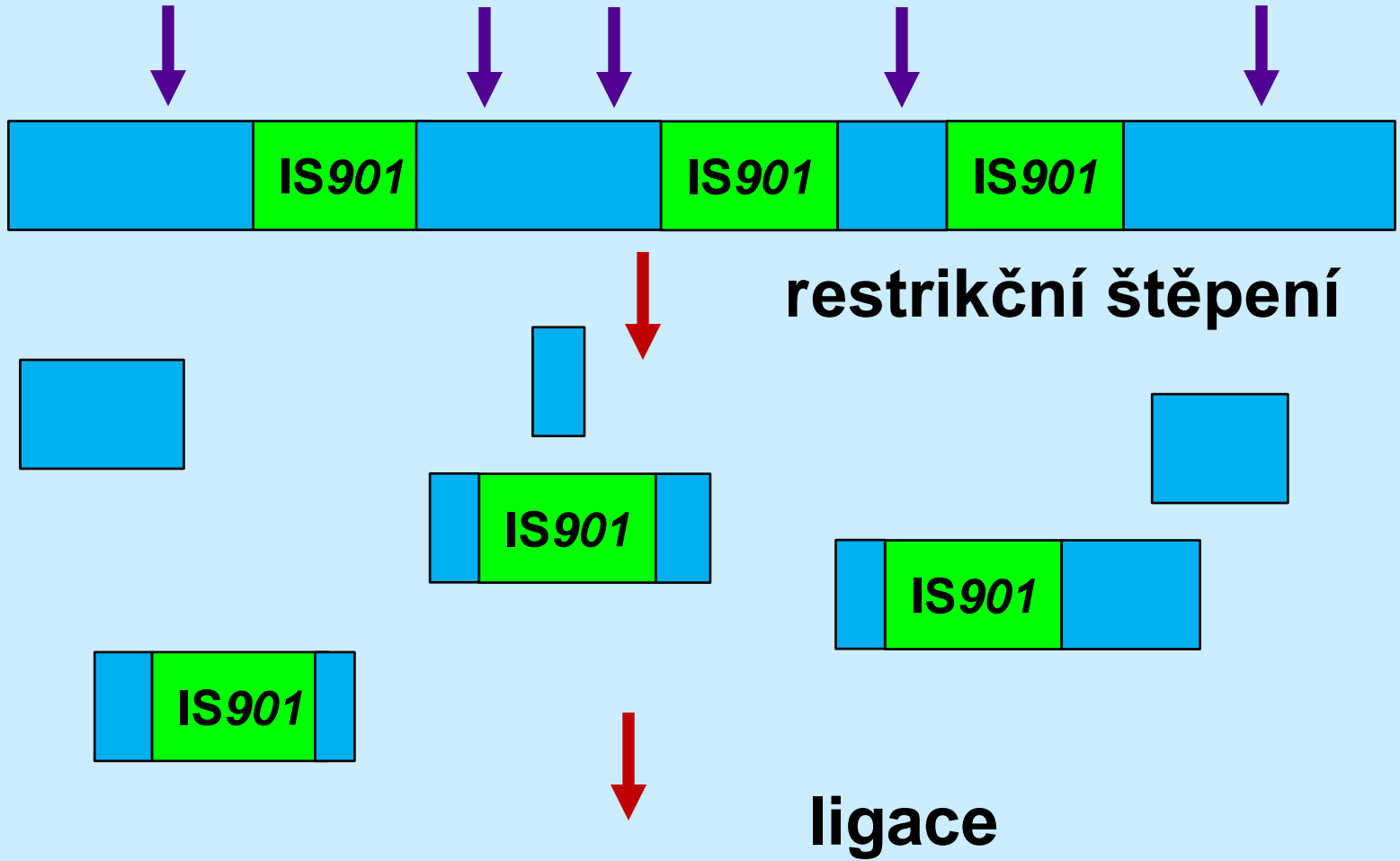
**Souvisí nějak inzerce IS901 s fyziologickými vlastnostmi příslušných kmenů *MAA*?**

- **Inzerce IS901 do genu *katE* – kataláza**
- **Rezistence k izonikotinhydrazidu**

# ***Jak jsme mapovali pozice IS901?***

- **Metoda tzv. inverzní PCR**
- ***Metoda tzv. anchor PCR* – velmi podobná PCR repetitivní DNA**

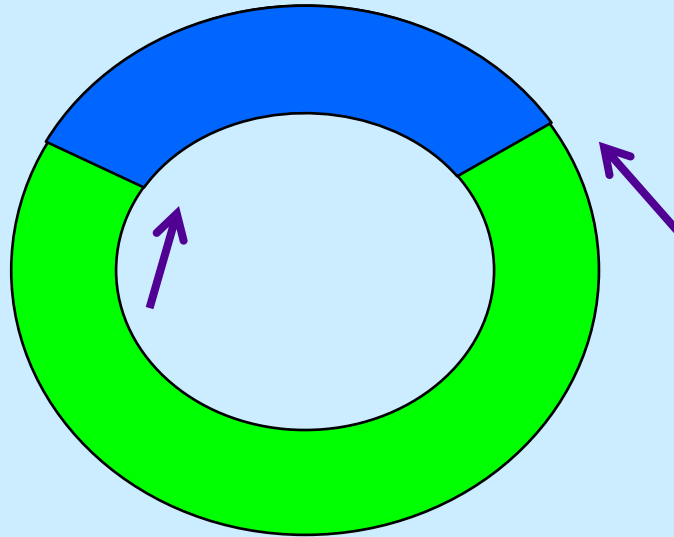
# *Průběh inverzní PCR pro IS901*



# *Průběh inverzní PCR pro IS901*



↓ ligace



↓

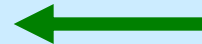


sekvenování  
PCR produktů



# *Anchor PCR*

Anchor primer



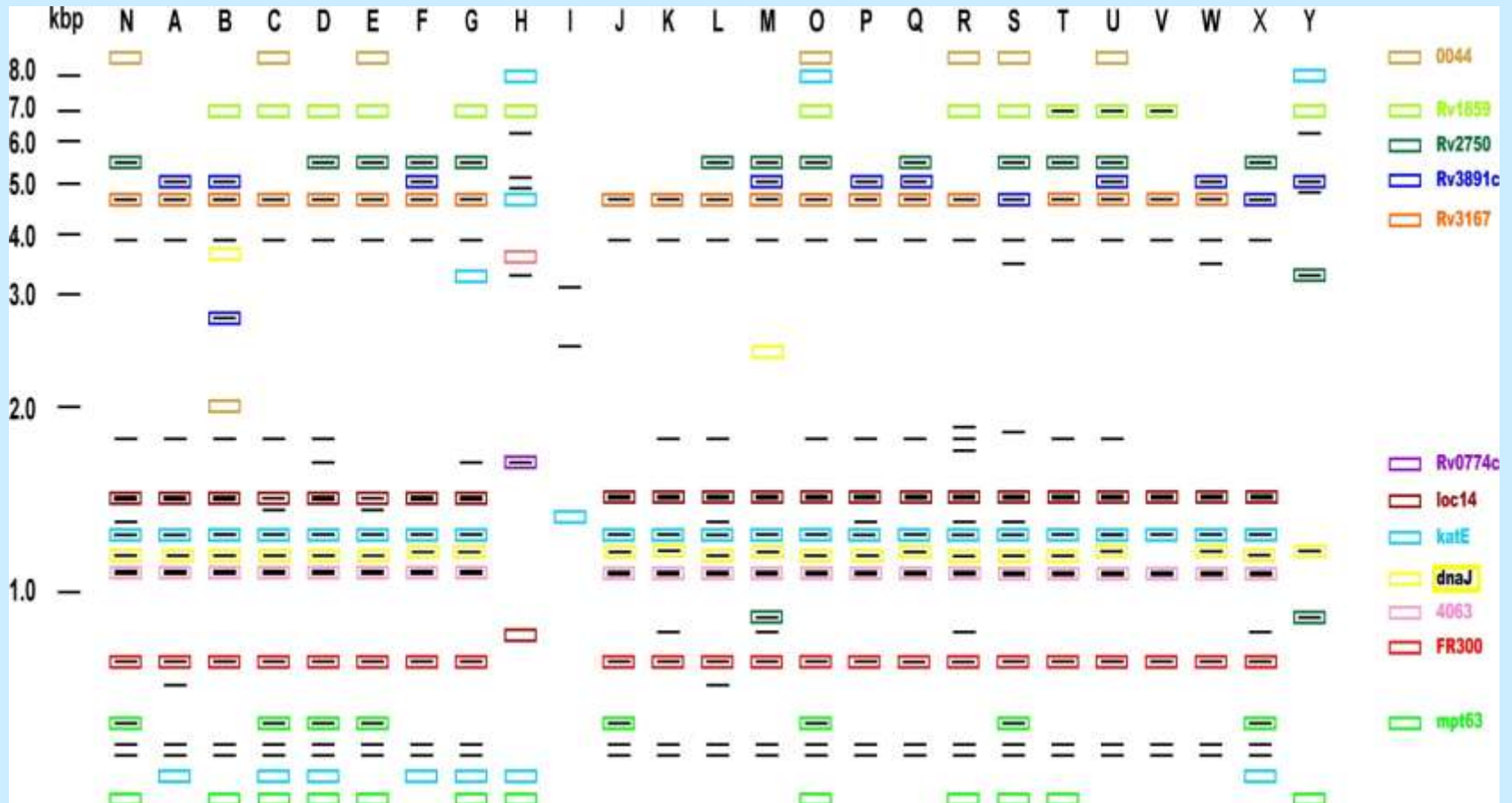
Nahodilý  
primer

PCR



sekvenování

# Výsledná fyzikální mapa pozic IS901

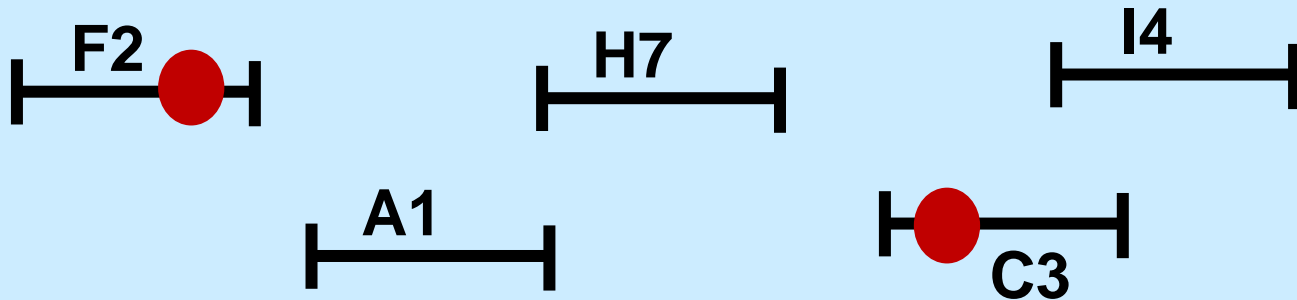


# ***Analýza výskytu míst označené sekvence***

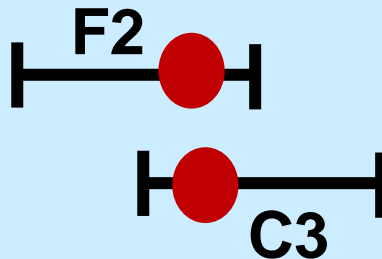
**sequence tagged site, STS**

- **vyhledávání párů klonů, které obsahují sekvenci DNA, která se v daném genomu vyskytuje jen 1x**
- **takové klony se zákonitě musí překrývat**
- **často jde o gen, jehož sekvence už je známa**
- **lze navrhnout specifické primery a získat specifickou sondu**
- **sondou „vyšetříme“ genomovou knihovnu**

# *Jak to vypadá při STS?*



**klony F2 a C3 se  
musí překrývat**



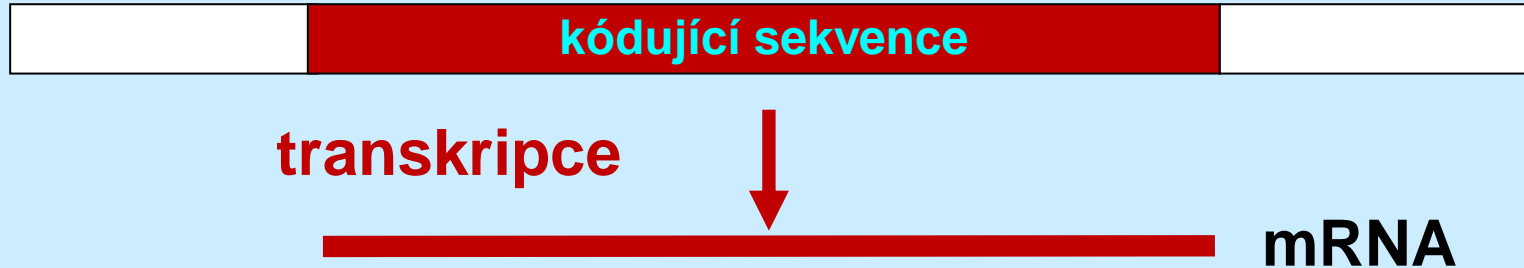
# ***Studium genové exprese a funkce genů***

**Pro lepší pochopení si zopakujte  
fáze genové exprese ze základní  
přednášky z molekulární biologie**

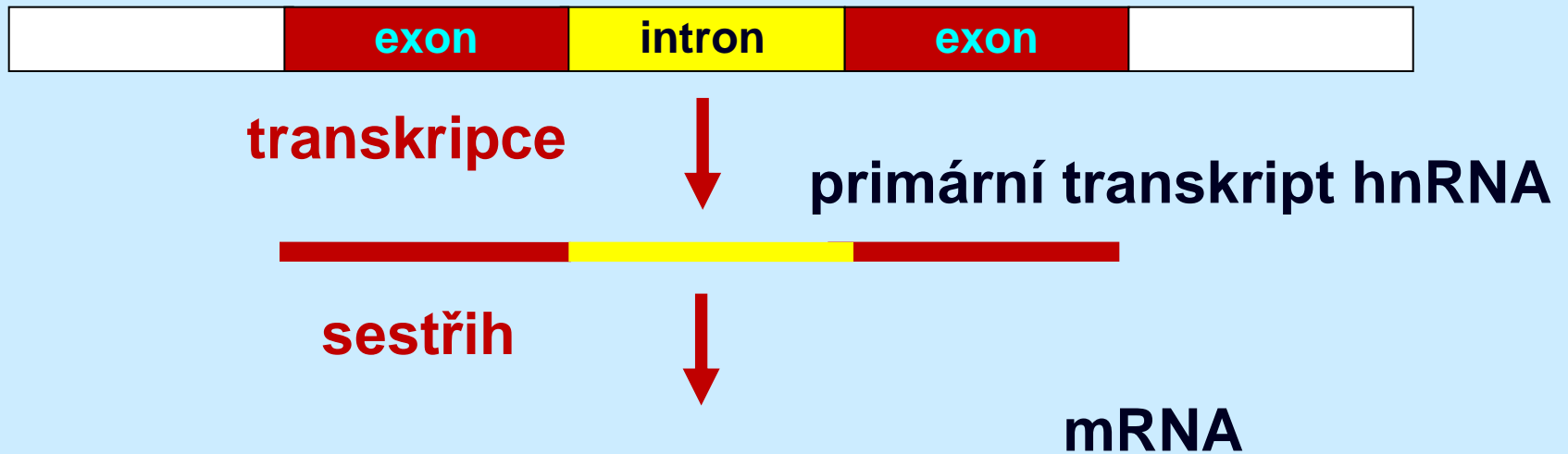


# Genová exprese

## Gen jednoduchý - prokaryota



## Gen složený - eukaryota



**Vedle transkriptů strukturních  
strukturních genů existují také  
transkripty**

- **Genů pro rRNA**
- **Genů pro tRNA**
- **Genů regulačních**

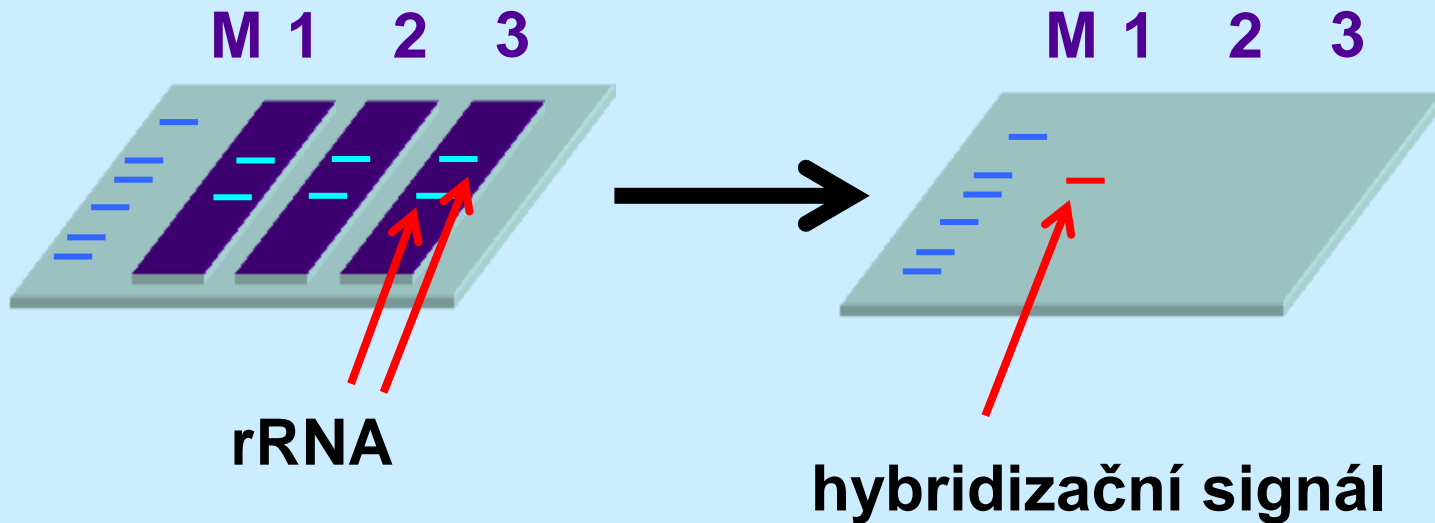




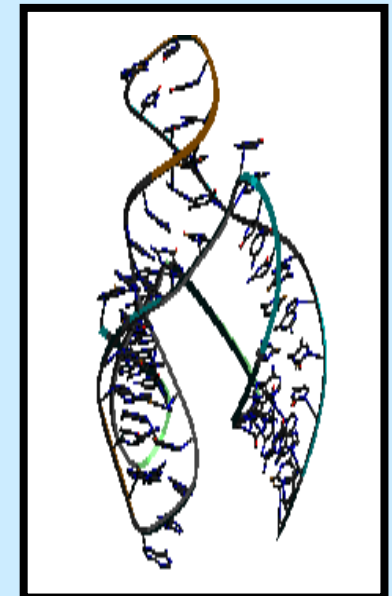
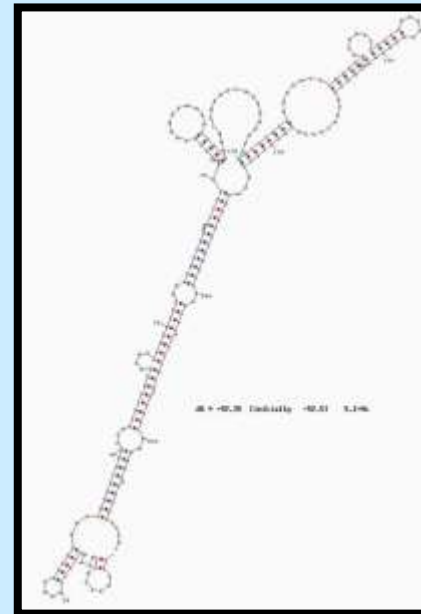
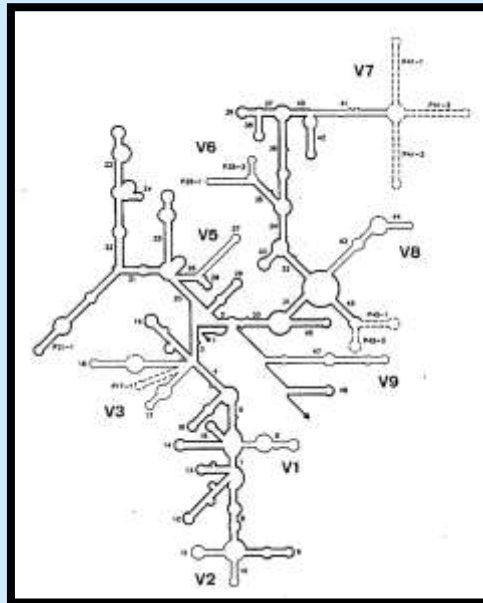
# ***Detekce transkriptů – Northern blotting***

**Umožňuje stanovit přítomnost a délku transkriptu**

**denaturační  
elektroforéza**



**Dejte si pozor na to, aby gel byl opravdu denaturující, jinak se transkripty pohybují v nativním a jinak v denaturovaném stavu**



# ***A když už máme konkrétní transkript?***

- **Převést zpětnou transkripcí do cDNA**
- **Sekvenovat**

- 1) Zopakujte si metody zpětné transkripce**
- 2) Kterou z metod nemůžeme použít a proč?**

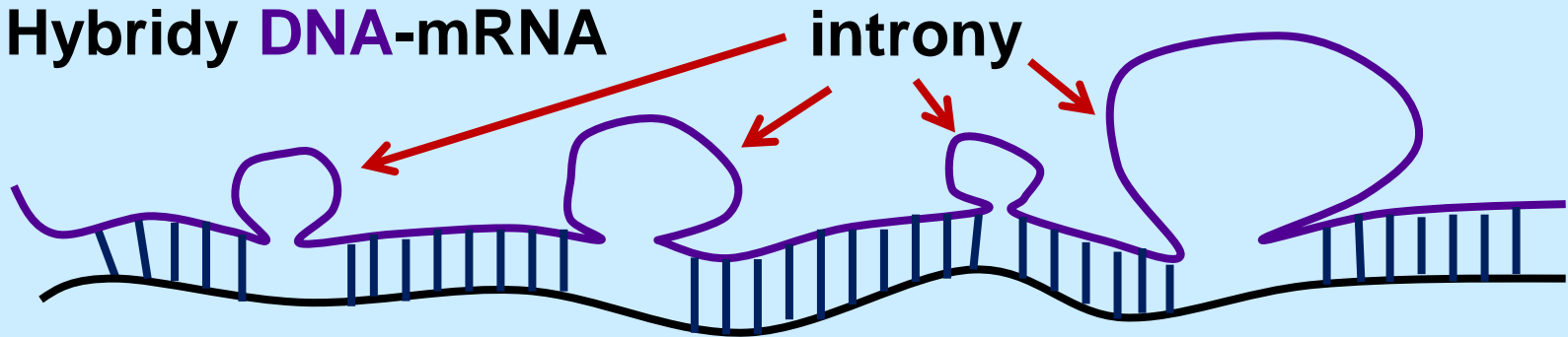
**Nelze použít nahodilé hexanukleotidy, protože sekvence transkriptu by nebyla celá**



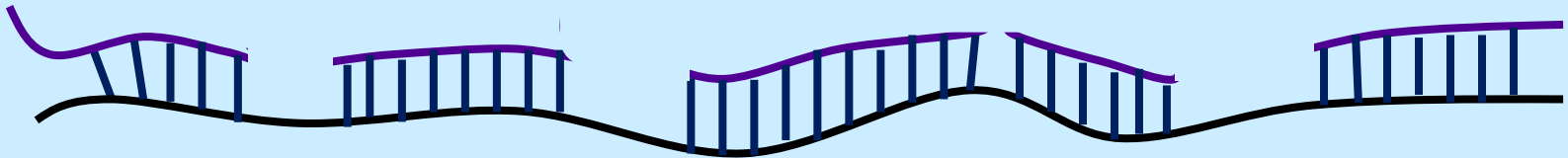
# Hybridizace mezi genem a RNA

## Stanovení exonů a intronů

Hybridy DNA-mRNA



Opracování S1 nukleázou



Degradace alkáliemi



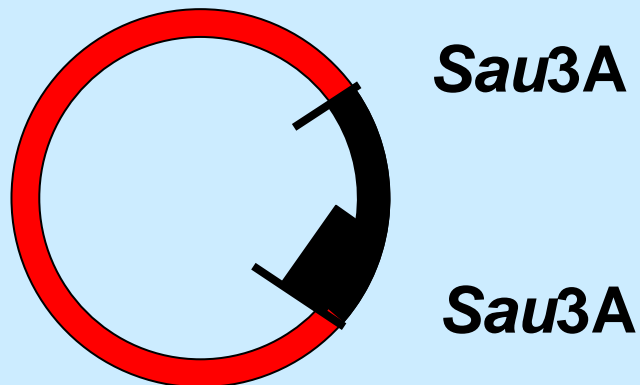
# Mapování S1 nukleázou

Určení počátku a konce transkriptů

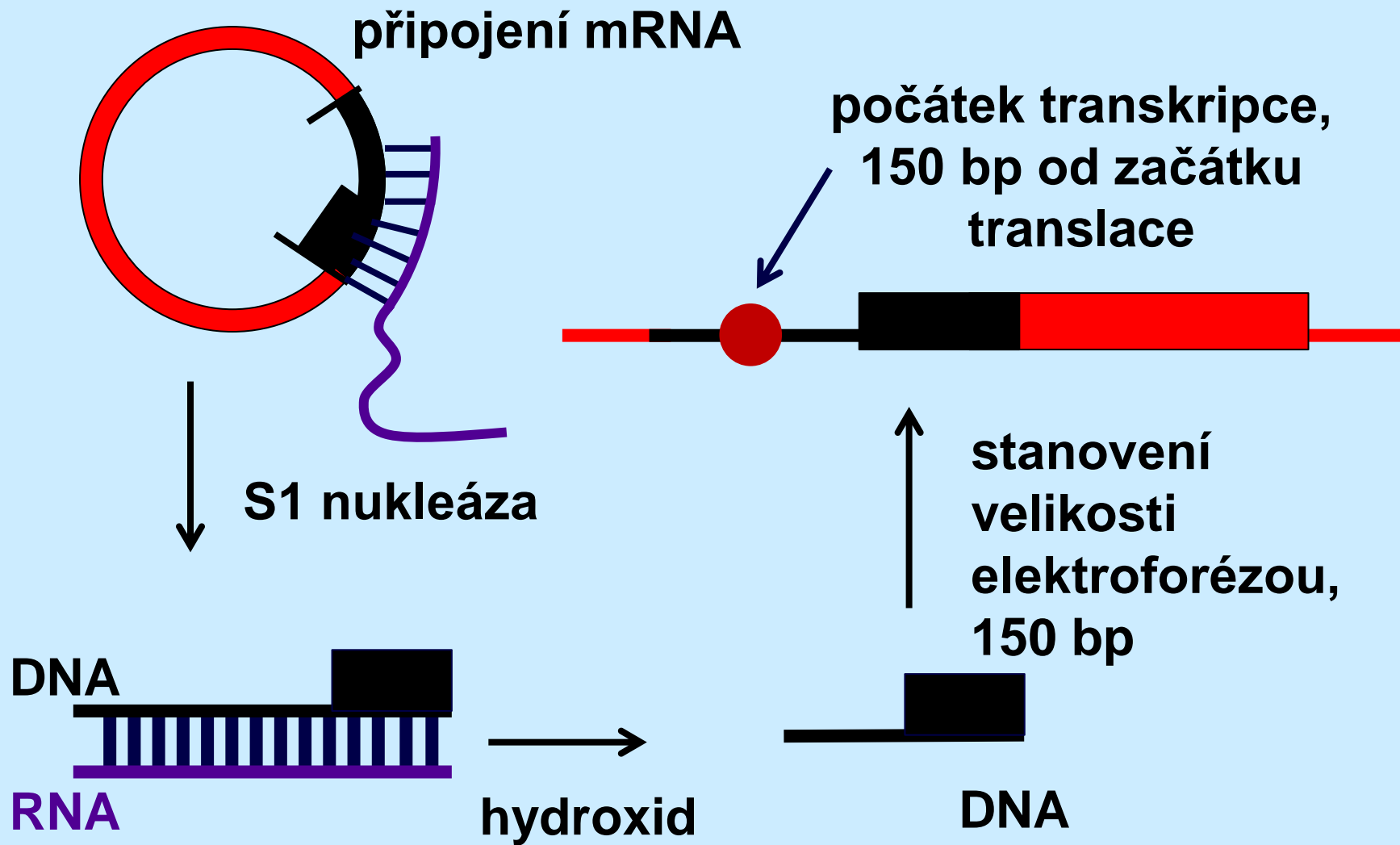
fragment *Sau3A*, 400bp



klonování do M13 a  
příprava ssDNA



# Mapování S1 nukleázou



# ***Mapování S1 nukleázou***

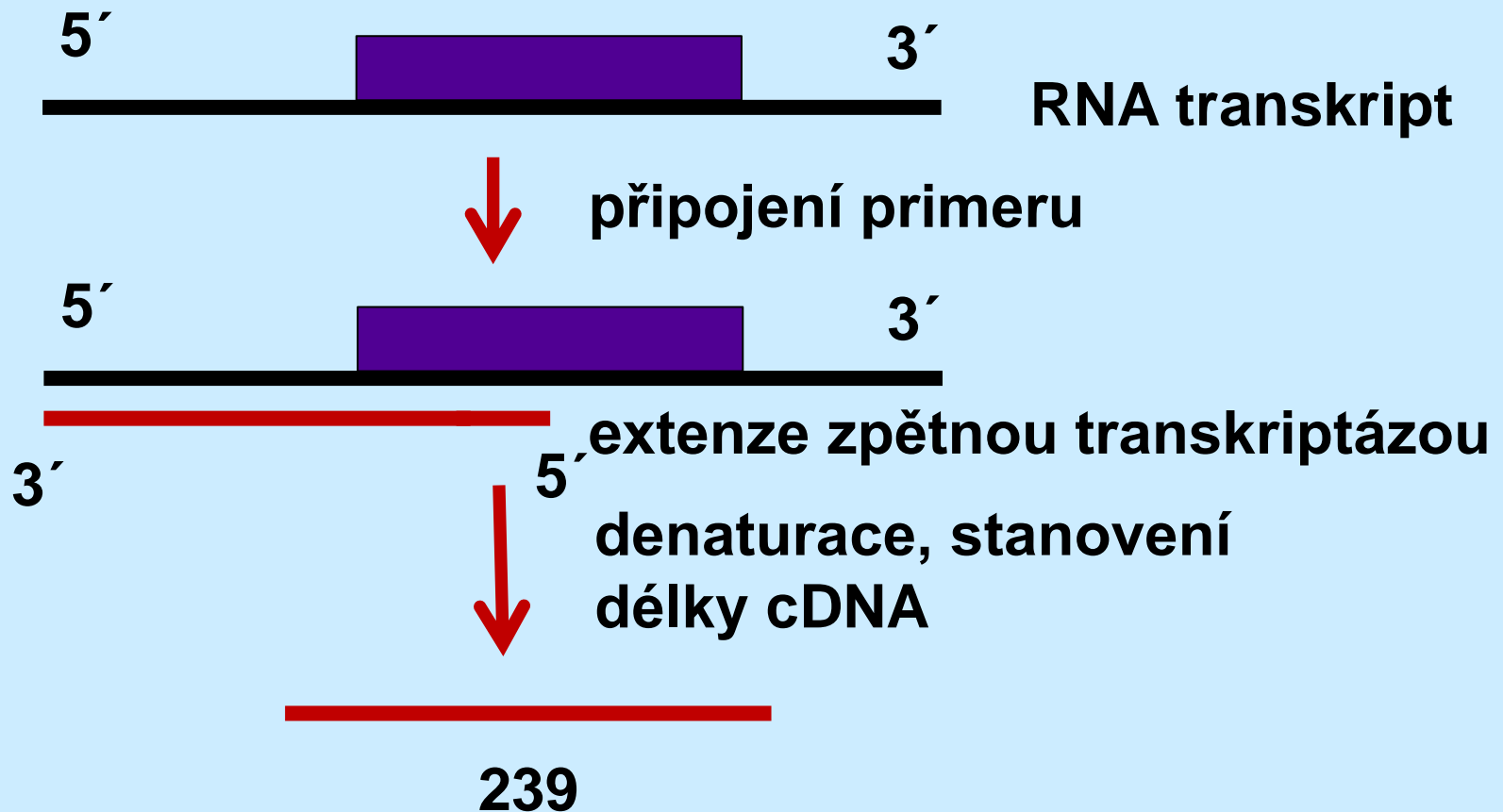
**Stejnou strategii lze použít k**

- **Mapování 5'-konců**
- **Mapování 3'-konců**
- **Mapování rozhraní intron-exon**

# *Prodloužení primeru*

Slouží jen k mapování 5'-konců transkriptů

- Musíme znát alespoň část sekvence transkriptu

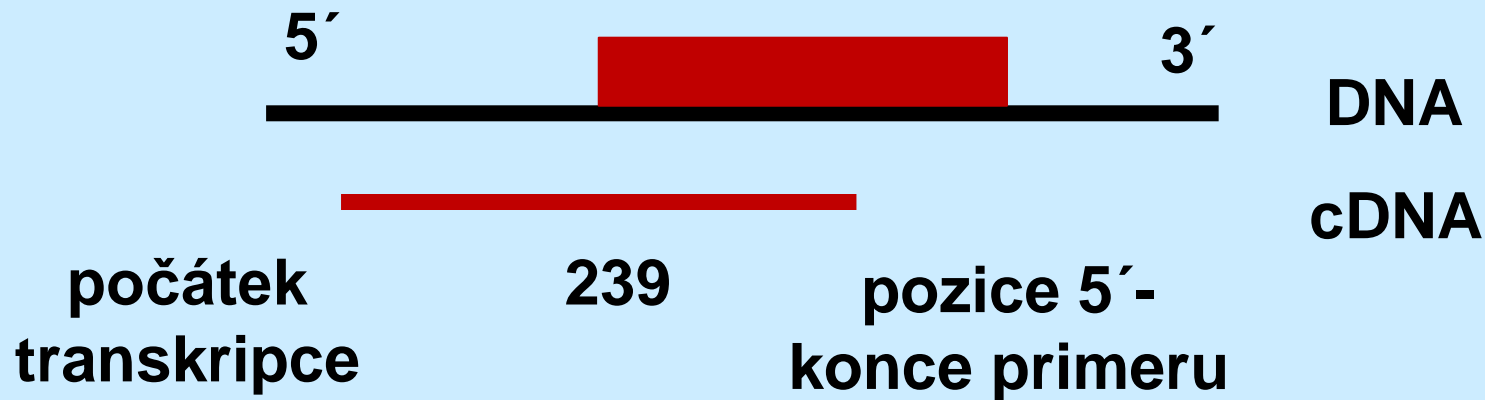




# *Prodloužení primeru*

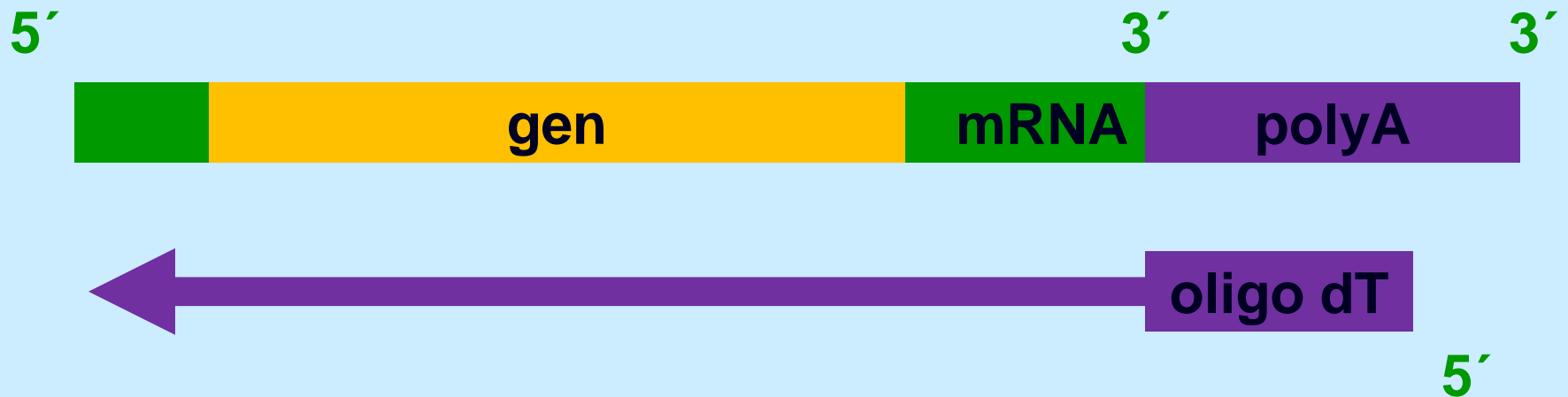
Porovnání délky výsledné cDNA s kódující částí DNA získáme informace o poloze transkriptu

- 3' konec nově syntetizované cDNA odpovídá 5'-konci transkriptu



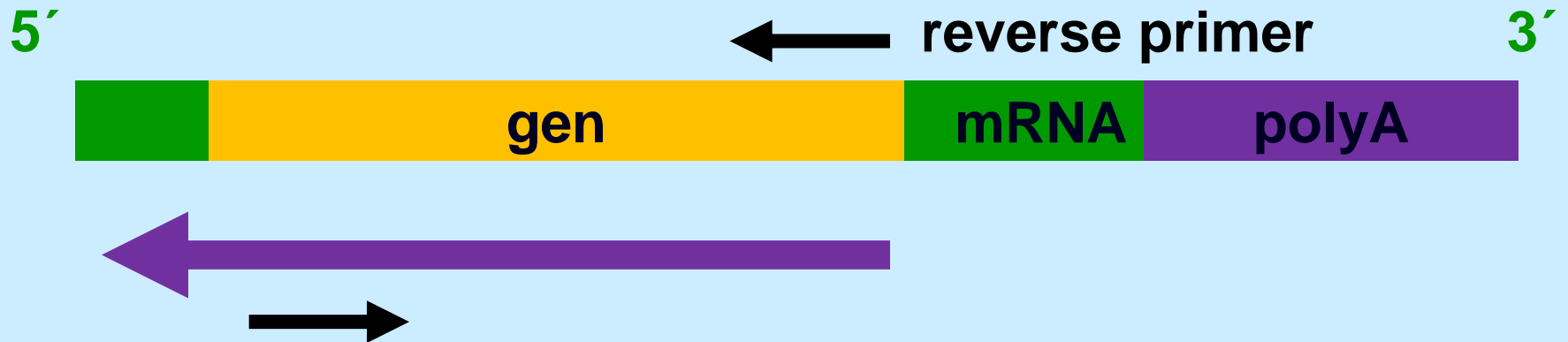
# *Metoda RT-PCR*

- Standardní procedura RT-PCR kopíruje vnitřní oblast molekuly RNA
- Neposkytuje informace o koncích molekuly RNA



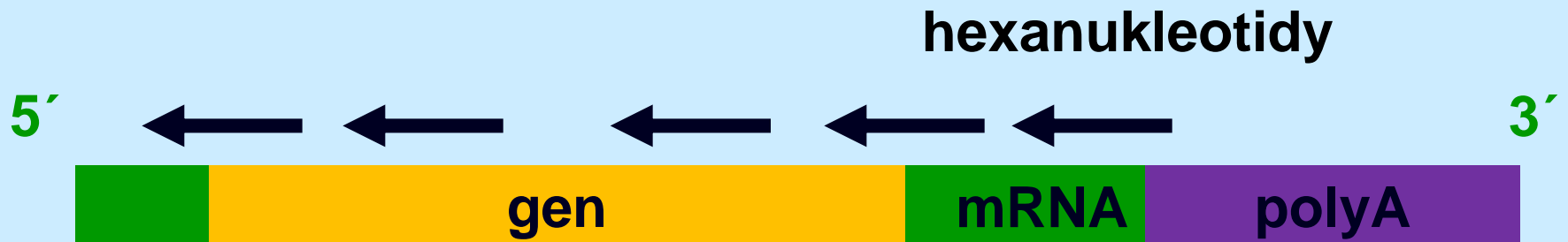
# Metoda RT-PCR

- Standardní procedura RT-PCR kopíruje vnitřní oblast molekuly RNA
- Neposkytuje informace o koncích molekuly RNA



# Metoda RT-PCR

- Standardní procedura RT-PCR kopíruje vnitřní oblast molekuly RNA
- Neposkytuje informace o koncích molekuly RNA

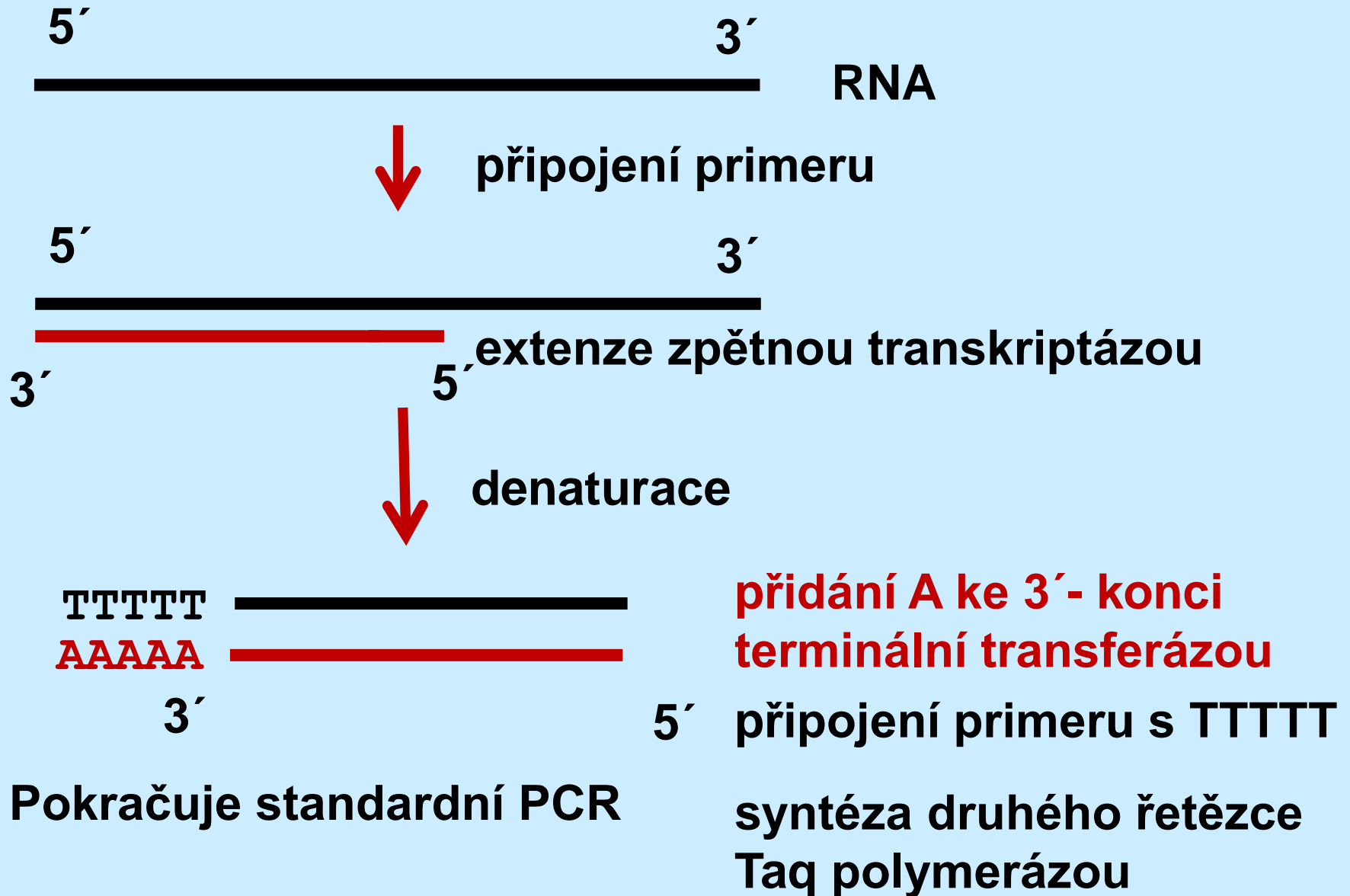


# ***RACE***

## **rapid amplification of cDNA ends**

- **umožňuje identifikovat 3' - i 5' - konce RNA molekul**
- **má mnoho variant**

# 5' - RACE



# **RACE**

## **rapid amplification of cDNA ends**

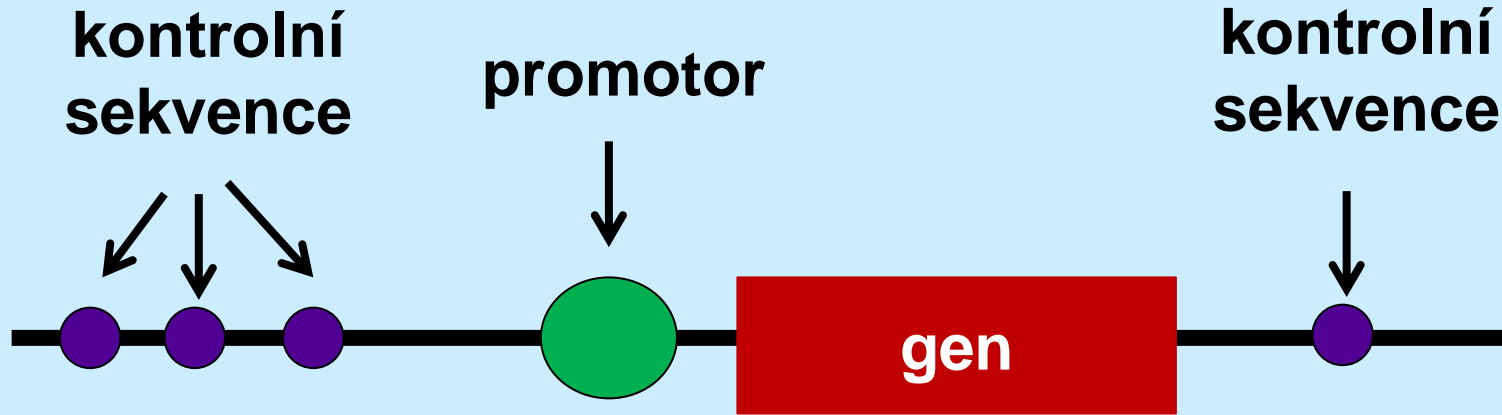
- **umožňuje identifikovat 3' - i 5' - konce RNA molekul**
- **má mnoho variant**

**Sekvenováním produktu PCR získáme znalost přesného počátku transkripce**

# ***Studium regulace genové exprese***



# *Obecné schéma regulačních míst*



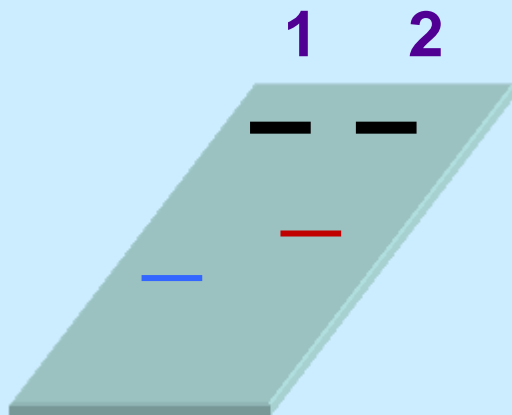
**Na regulační místa se váží regulační proteiny**

# ***Hledání vazebných míst pro proteiny***

- **Gelová retardace komplexů DNA-protein**
- **Footprinting pomocí DNázy I**
- **Test modifikované interference**
- **Deleční analýza**

# *Gelová retardace komplexů DNA-protein*

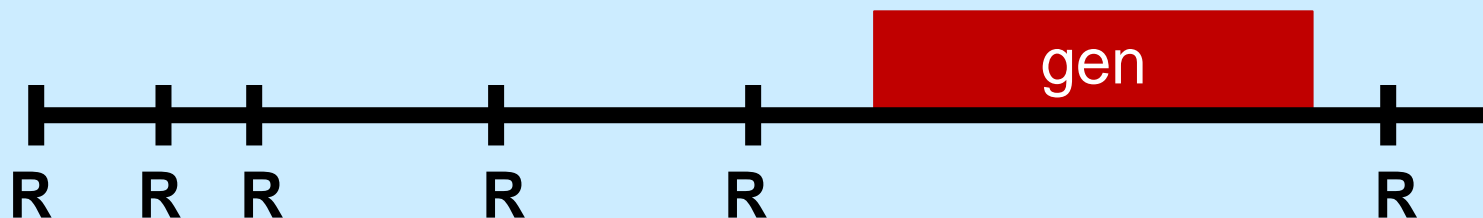
Protein vázaný na DNA fragment snižuje pohyblivost fragmentu na gelové elektroforéze



1 – pouze DNA fragment

2 – DNA fragment s navázaným proteinem

# *Provedení gelové retardace*



**štěpení restriktázou R**



**smíchání s regulačním proteinem**



**stanovení elektroforetické pohyblivosti**

## *... následuje*

- Příslušný fragment DNA je lokalizován na restrikční mapě
- Je stanovena nukleotidová sekvence

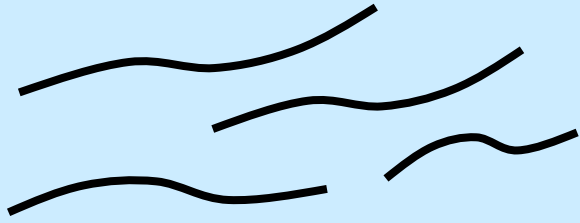
Protože jsou vazebná místa většinou krátká (kolem 10 bp), není tento způsob mapování dost přesný

# ***Footprinting pomocí DNázy I***

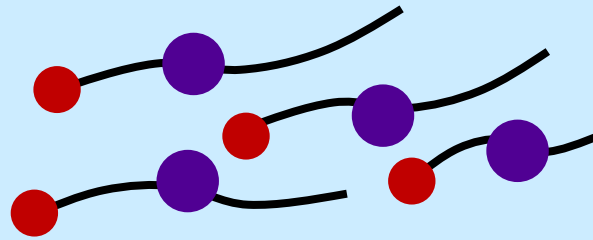
- **Umožňuje stanovit umístění řídicí oblasti v rámci restričního fragmentu identifikovaného gelovou retardací**
- **Využívá skutečnosti, že je sekvence DNA vázající se k proteinu chráněna před účinkem DNázy I**

# Provedení footprintingu I

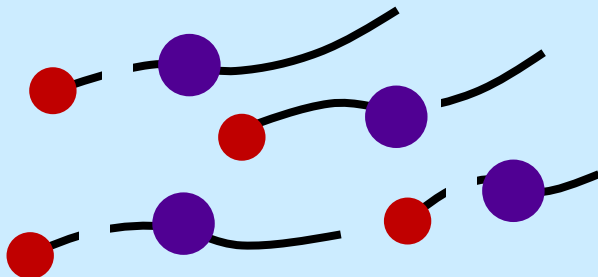
fragmenty DNA



koncové značení +  
regulační protein



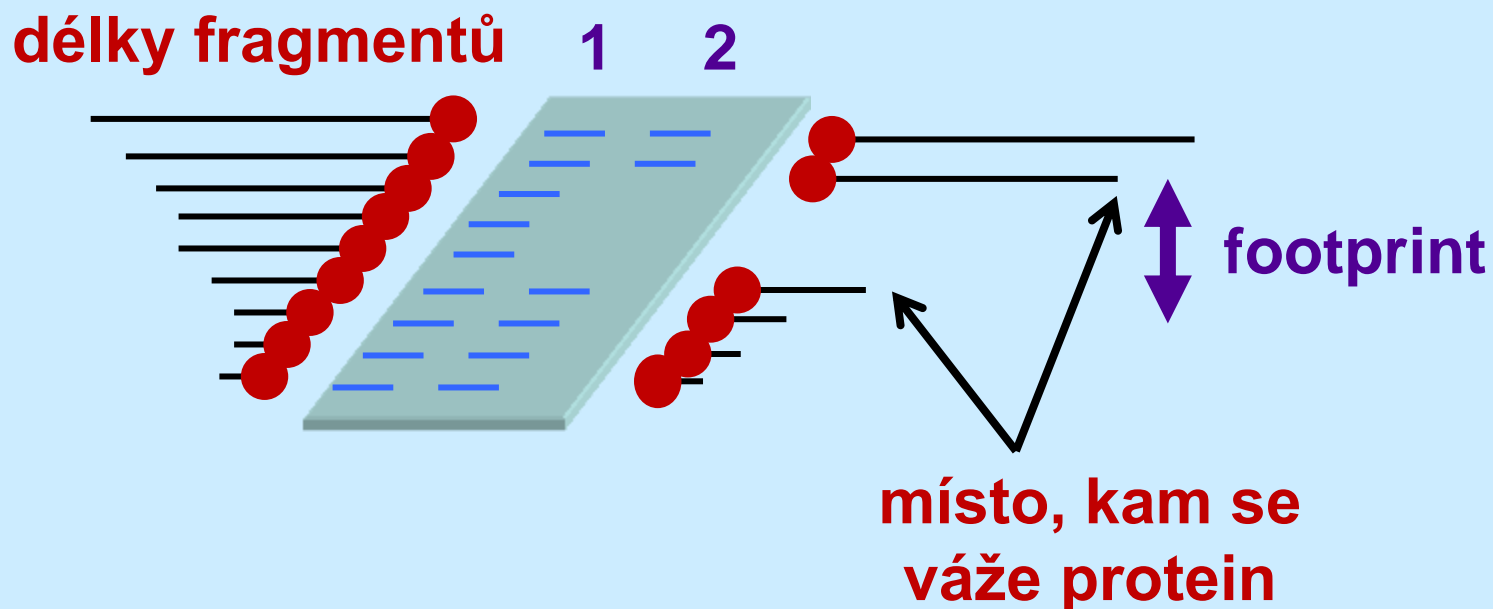
štěpení DNázou I



štěpí se kterákoli vazba, která  
není chráněna proteinem

# *Provedení footprintingu II*

Odstranění proteinu, gelová elektroforéza (PAGE) a detekce značených fragmentů



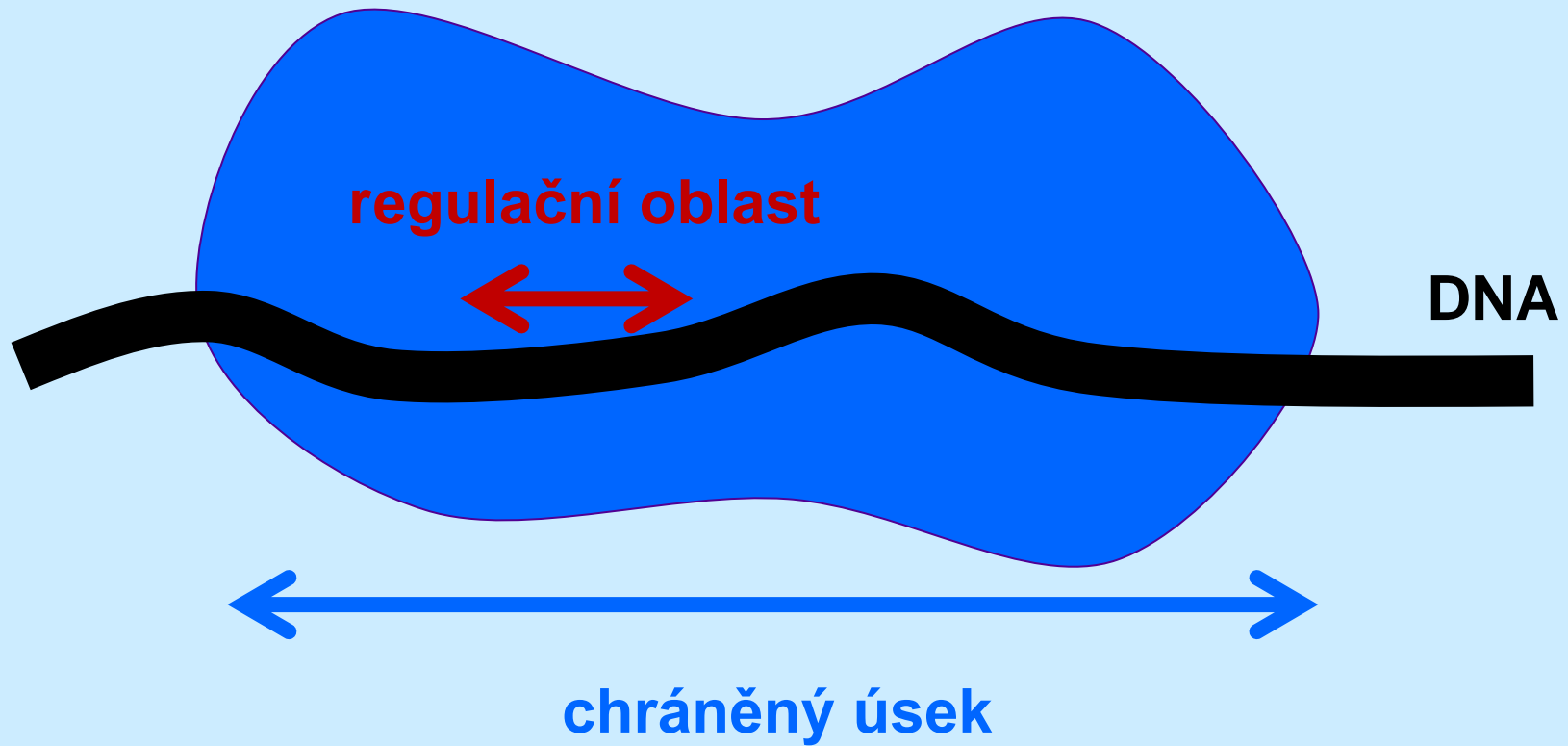
1 = kontrola, žádný navázaný protein

2 = testovaná DNA + navázaný protein

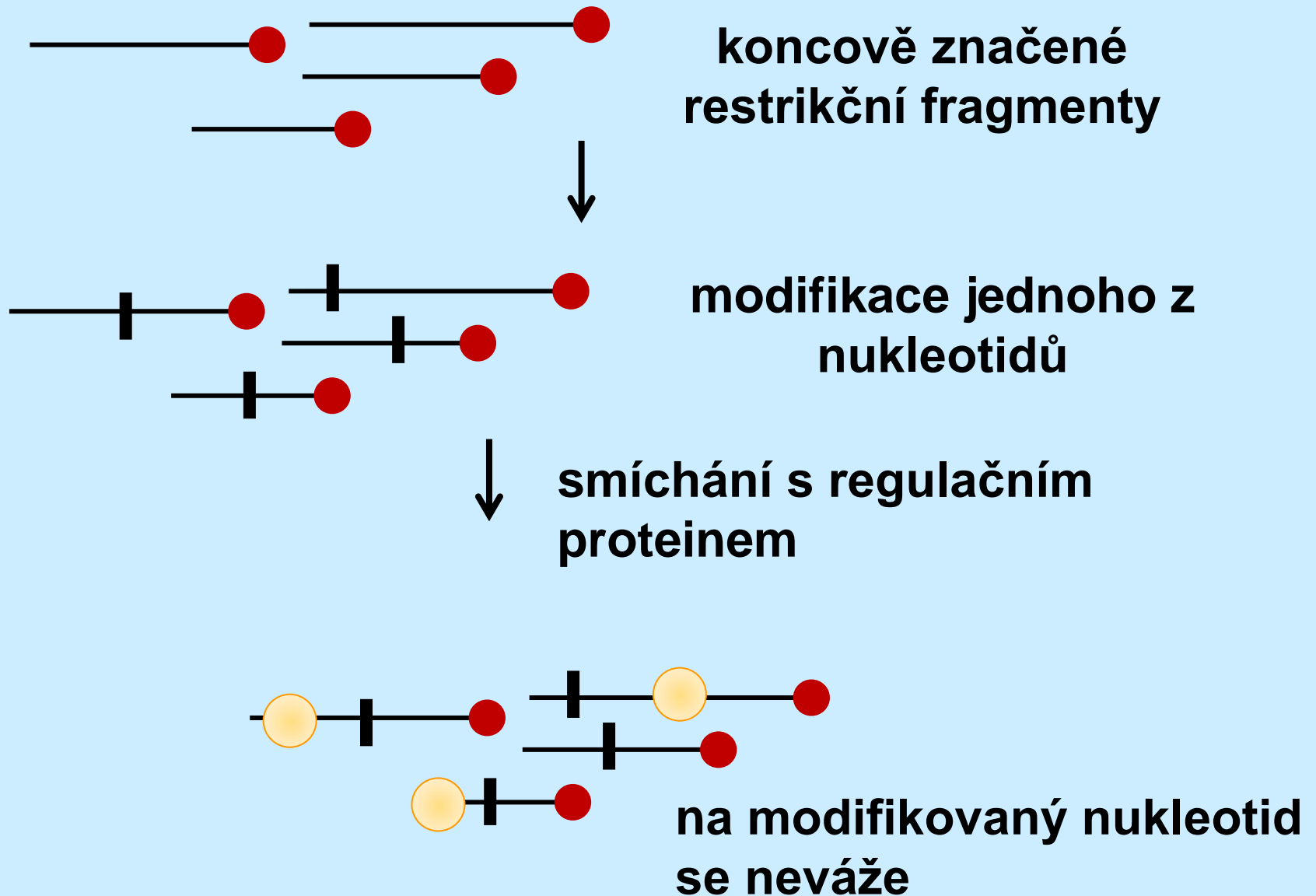


# *Test modifikované interference*

Vazebný protein chrání větší úsek DNA než jenom přesně ty nukleotidy, které jsou regulační oblastí

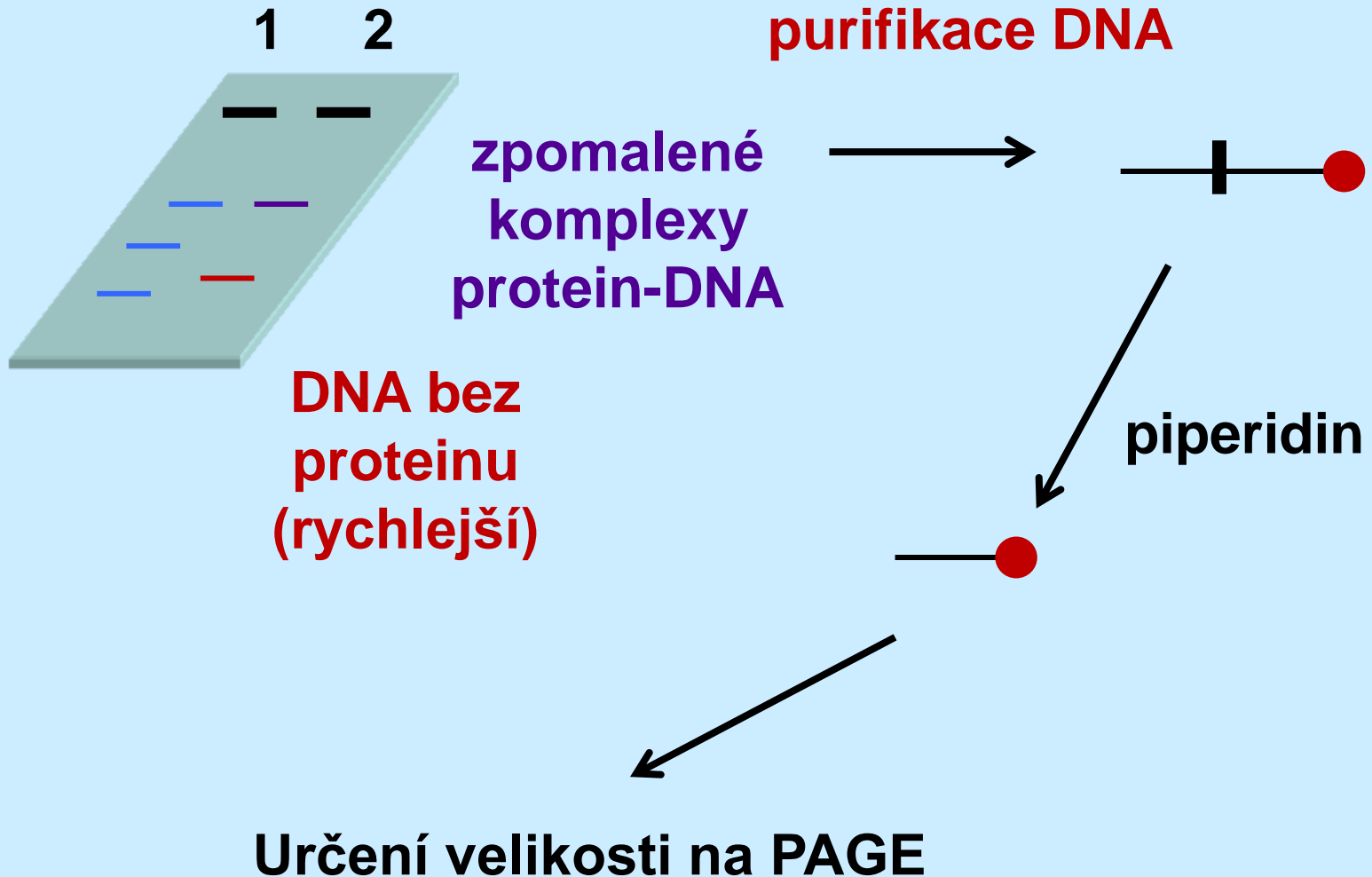


# *Test modifikované interference I*



# Test modifikované interference II

Následuje dělení fragmentů na gelové elektroforéze



**A tím zjistím, kde přesně v regulační oblasti leží jeden z nukleotidů**



**A to všechno zopakuješ pro každý ze 4 nukleotidů zvlášť a výsledné regulační místo poskládáš**



***Jak vypadá regulační místo tryptofanového operonu *Klebsiella aerogenes* jestliže jste na PAGE získali fragmenty o následujících velikostech ?***



**Blokace A = 105, 106, 111, 113, 116 a 117 bp**

**Blokace G = 107, 115 a 118 bp**

**Blokace C = 110 a 112 bp**

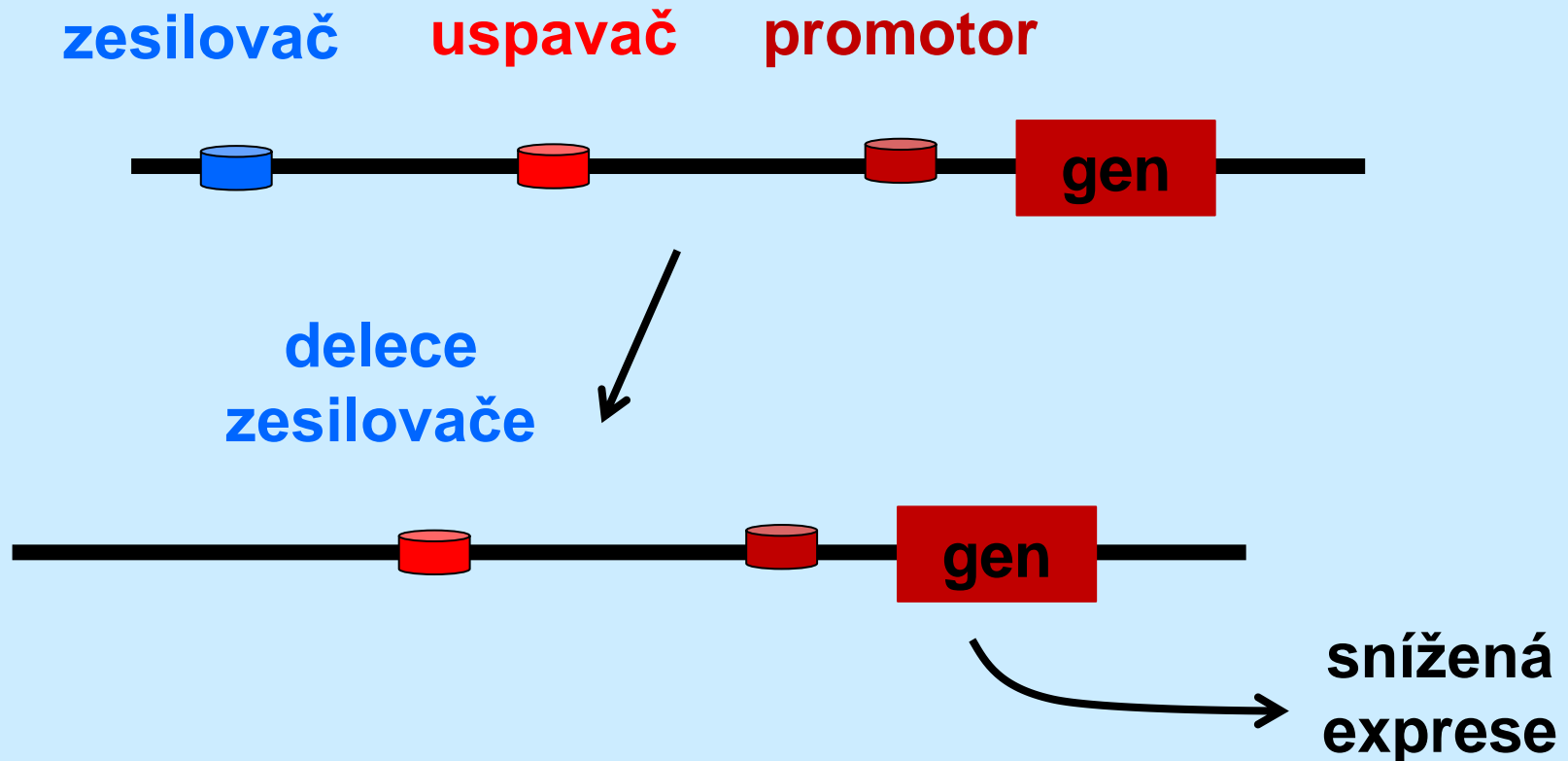
**Blokace T = 108, 109 a 114 bp**

**... AAGTTCACATGAAG ...**



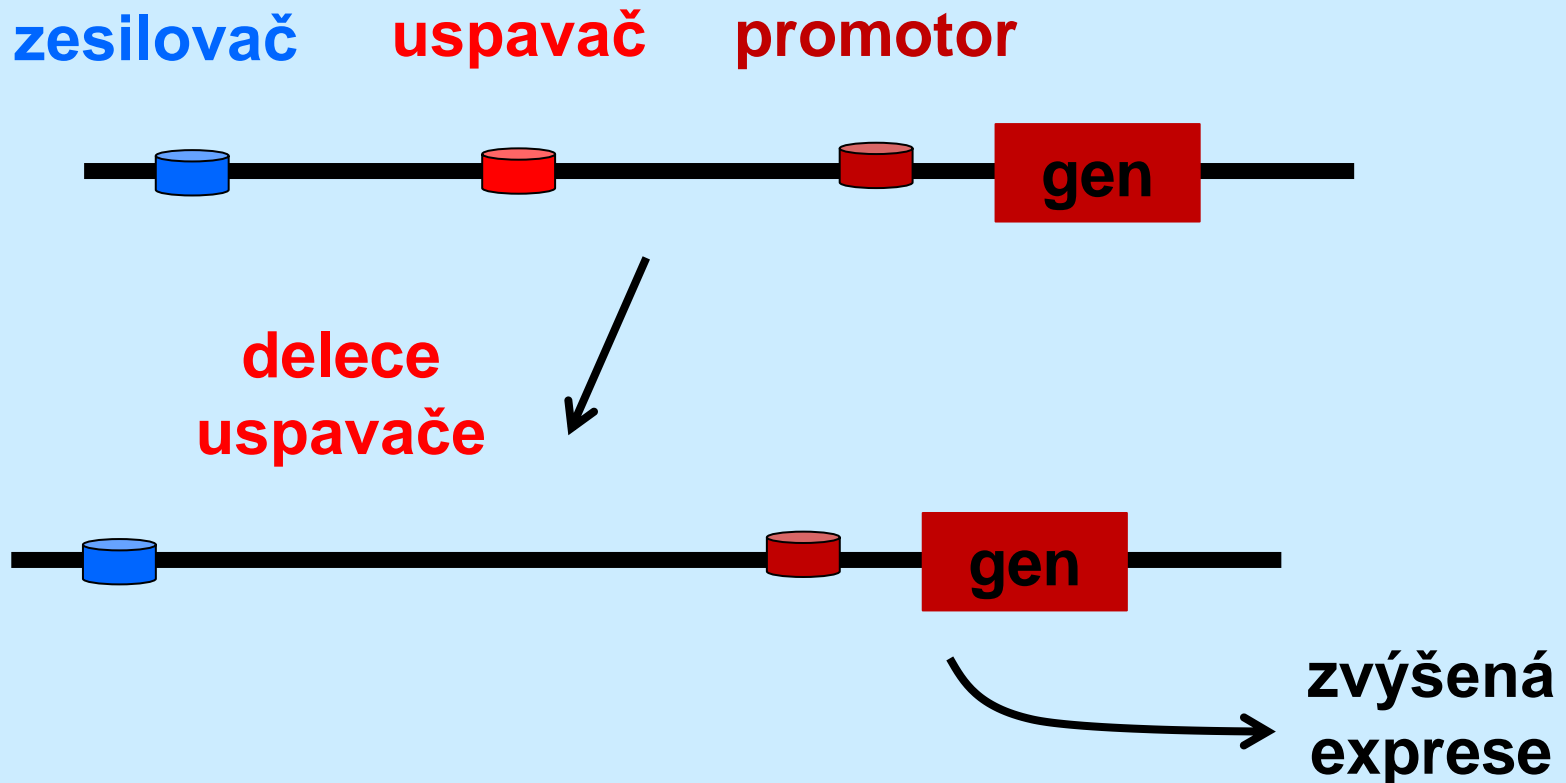
# Deleční analýza

- Umožňuje lokalizovat kontrolní elementy proti směru transkripce genu
- Dokáže určit i funkci příslušné sekvence



# Deleční analýza

- Umožňuje lokalizovat kontrolní elementy proti směru transkripce genu
- Dokáže určit i funkci příslušné sekvence



# Reportérové geny

Jejich produkty poskytují zřetelný, snadno monitorovatelný signál

zesilovač

uspavač

promotor



zesilovač

uspavač

promotor





# *Příklady reportérových genů*

*lacZ* =  $\beta$ -galaktozidáza

*cat* = chloramfenikolacetyltransferáza

*uidA* =  $\beta$  – glukuronidáza

GFP = zeleně fluoreskující protein

*lux* = luciferáza

# ***Studium produktů translace***

**Provádí se v bezbuněčných extraktech – platí pro analýzu rostlinných a živočišných genů**

**Zopakujte si přednášky z genetiky bakterií**



# ***Sekvenci genu můžeme změnit in vitro***

**A pak se můžeme zamyslet nad jeho funkcí**

**Existuje celá řada metod mutageneze *in vitro***

- **Odstranění restrikčního fragmentu**
- **Odstranění několika nukleotidů *Bal31***
- **Vložení oligonukleotidu**
- **Zavedení bodové mutace do klonovaného genu**
- **...**

# ***Smysl cílené mutagenese***

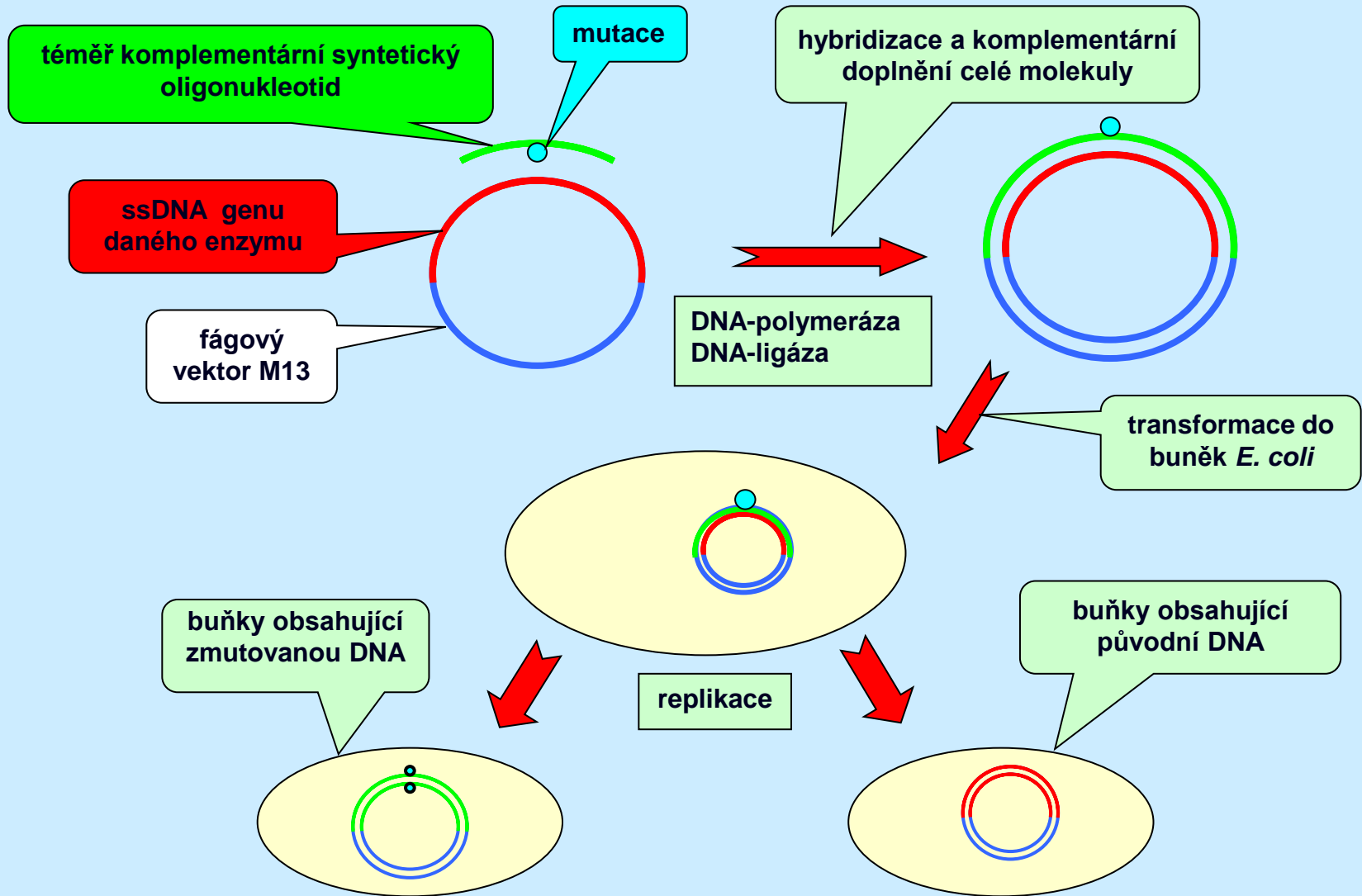
## **Změna ve struktuře proteinu**

- **zavedení nových disulfidových můstků**
- **zvýšení počtu vodíkových vazeb**
  
- **změna terciární struktury**
- **změna stability enzymu**
- **změna dalších vlastností**
  - **zvýšení katalytické aktivity a afinity k substrátu**
  - **modifikace substrátové specifity**
  - **rozšíření pH-optima**
  - **zvýšení odolnosti proti oxidačním činidlům a těžkým kovům**
  - **zvýšení rezistence vůči proteázám**
  - **stabilita v nevodném prostředí**

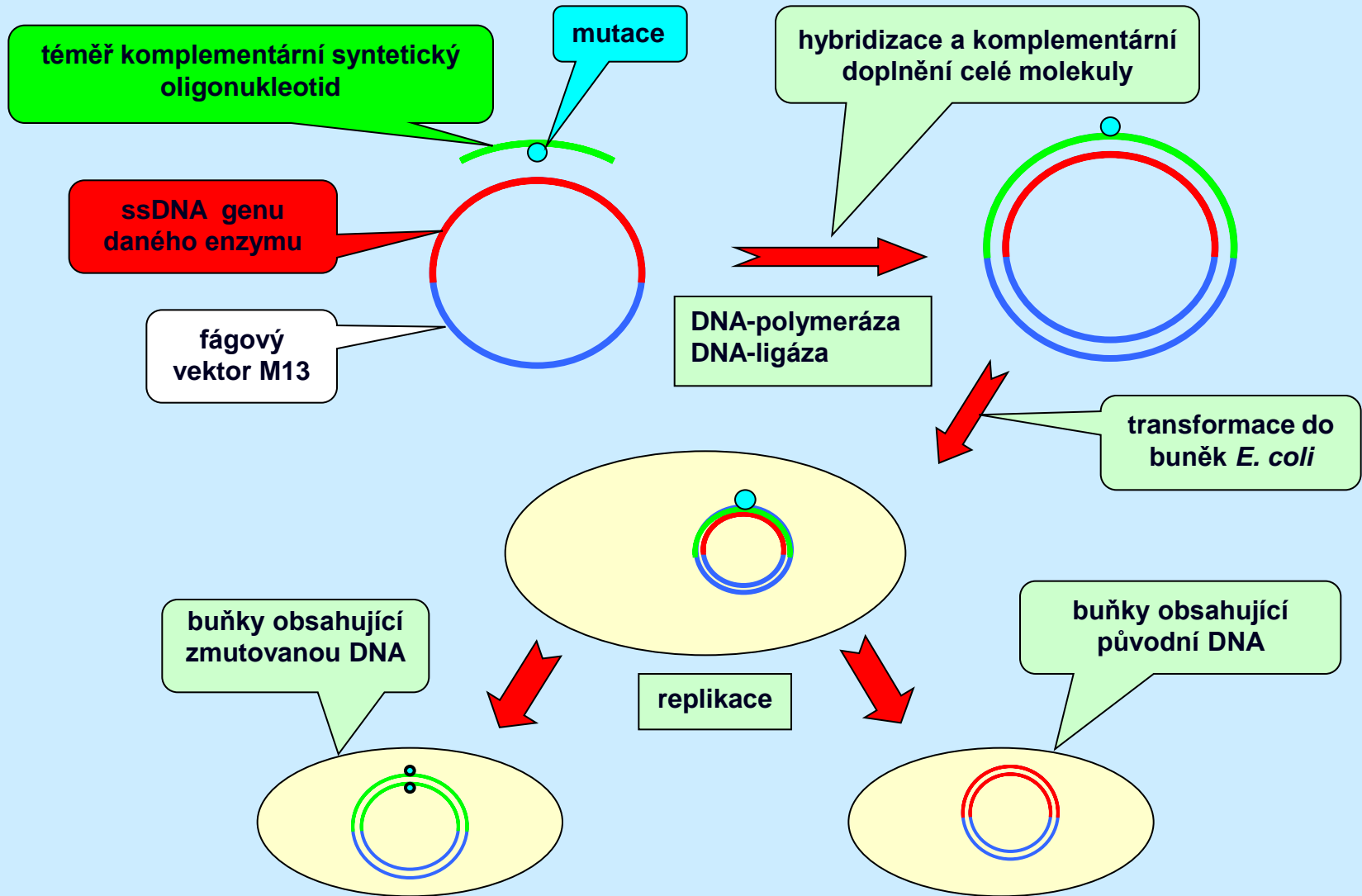
# *Průběh cílené mutagenese*

- 1) Vložení genu do jednořetězcového vektoru, např. M13**
- 2) Vlastní cílená mutagenese**
- 3) Vrácení genu do expresního vektoru**

# Schéma cílené mutagenese



# Schéma cílené mutagenese



***Příklad analýzy  
bakteriálního genu***



# ***Trp operon Klebsiella aerogenes***

Blumenberg Miroslav a Yanofski Charles (1982):  
Regulatory Region of the *Klebsiella aerogenes*  
Tryptophan Operon, Journal of Bacteriology 152 (1), 49-56.

- 1) Restrikční štěpení genomové DNA
- 2) Klonování fragmentu
- 3) Sekvenování regulační oblasti
- 4) Porovnání se *Salmonella typhimurium*
- 5) Odvození vlastností transkriptů
- 6) Konfirmace transkripce *in vitro*

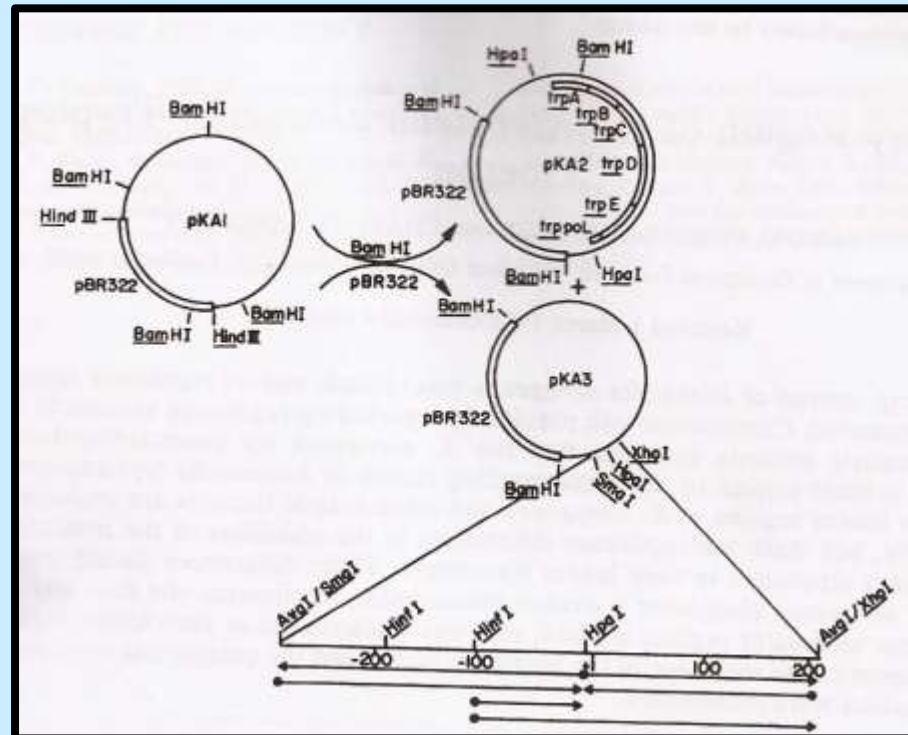
# Zopakujme si regulaci tryptofanového operonu

- **Pozitivní regulace**
- **Atenuace**



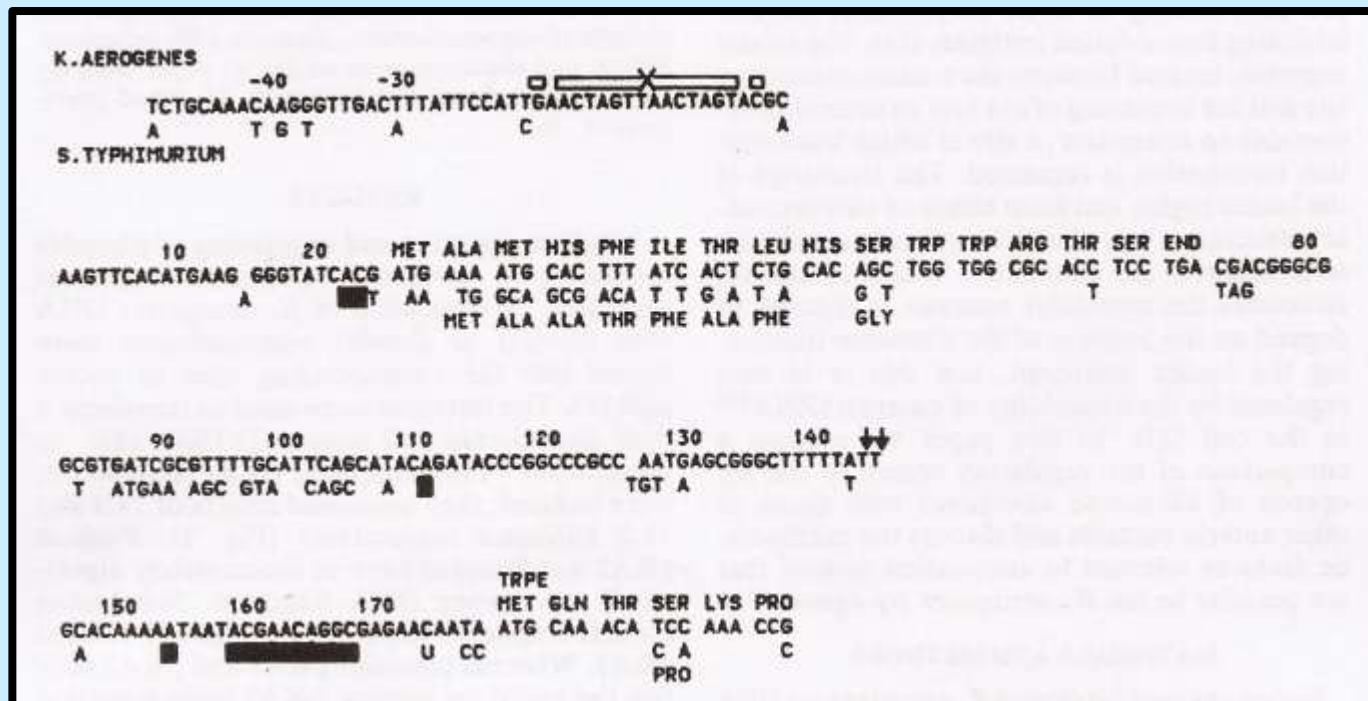
# Získání fragmentů

- 1) Restriktázy *Hind*III a *Bam*HI
- 2) Ligace do vektoru pBR322
- 3) Transformace *E. coli trpE* a vyhledání prototrofů
- 4) V pKA1 a pKA2 je celý *trpA*
- 5) Uvnitř *trpA* je *Bam*HI místo



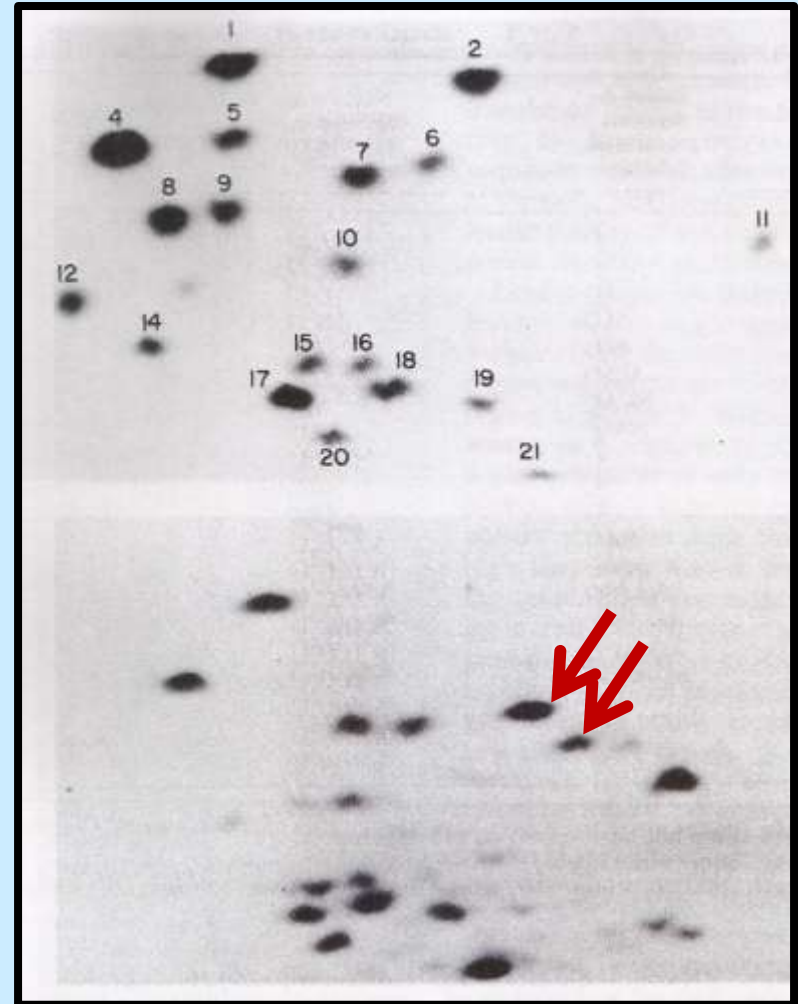
# Analýza fragmentů

- 1) Sekvenování dle Maxam a Gilbert
- 2) Porovnání sekvence s *S. typhimurium*
- 3) Identifikace promotoru, operátoru a vedoucí sekvence s atenuátorem



# *Transkripce in vitro*

- 1) Produkty transkripce analyzovány chromatograficky (iontoměničová celulóza)
- 2) Porovnání transkriptů značených jednotlivými dNTP po štěpení RNázou T1 (štěpí ssRNA v GTP)



**Dva oligonukleotidy na 3'-konci**

# Sekvenování vedoucí sekvence

## LEADER PEPTIDE SEQUENCES

K.A.	MET	LYS	MET	HIS	PHE	ILE	THR	LEU	HIS	SER	TRP	TRP	ARG	THR	SER	END				
E.C.	MET	LYS	ALA	ILE	PHE	VAL	LEU	LEU	LYS	GLY	TRP	TRP	ARG	THR	SER	END				
S.D.	MET	LYS	ALA	ILE	PHE	VAL	LEU	LEU	LYS	GLY	TRP	TRP	ARG	THR	SER	END				
S.T.	MET	ALA	ALA	THR	PHE	ALA	LEU	HIS	GLY	TRP	TRP	ARG	THR	SER	END					
C.F.	MET	LYS	ALA	THR	PHE	VAL	LEU	HIS	GLY	TRP	TRP	ARG	THR	SER	END					
S.H.	MET	ASN	THR	TYR	ILE	SER	LEU	HIS	GLY	<u>TRP</u>	<u>TRP</u>	ARG	THR	SER	LEU	LEU	ARG	ALA	VAL	END

## LEADER SEQUENCES

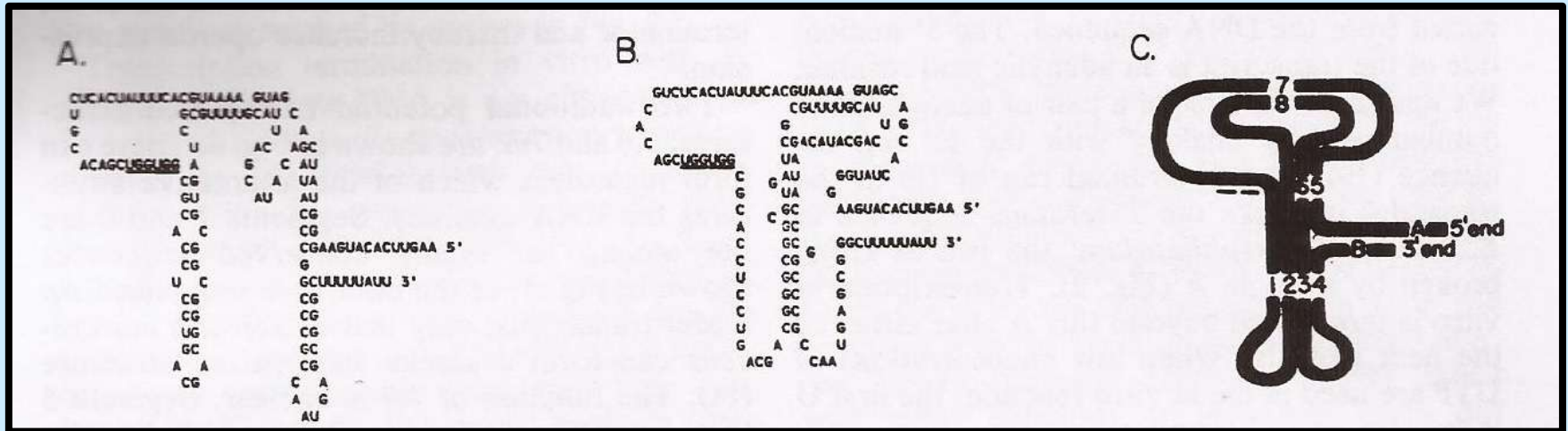
K.A.	<u>AAGUUCAC</u>	AUGAAG	<u>GGGUUUCACG</u>	AUGAAA	AUGCACUUAUCACUCUGCACAGCUGGUG	<u>GGCGACCUCCUGA</u>
E.C.	<u>AAGUUCAC</u>	GUAAAA	<u>GGGUUUC</u>	SACAAUGAAA	GCAUUUUUCGUACUGAAAGGUUGGUG	<u>GGCGACUCCUGA</u>
S.D.	<u>AAGUUCAC</u>	GUAAAA	<u>GGGUUUC</u>	SACAAUGAAA	GCAUUUUUCGUACUGAAAGGUUGGUG	<u>GGCGACUCCUGA</u>
S.T.	<u>AAGUUCAC</u>	AUGAAGA	<u>GGGUUUC</u>	JAAAAUGGCA	GGCACAUUUGCAUUACACGGUUGGUG	<u>GGCGACUCCUGA</u>
C.F.	<u>AAGUUCAC</u>	AUAGA	<u>GGGUUUC</u>	CGAUGAAA	GCAACAUUUGUUCUCACGGUUGGUG	<u>GGCGACUCCUGA</u>
S.H.	<u>AAGUUCAC</u>	CCAACGGCCGUGUCGGAUGAGAGUUAACAAAG	<u>AGAGUCU</u>	SCAAAUGAAC	ACAUACAUUUCUUCACGGUUGGUG	<u>GGCGUACCUCCUC</u>

CGACGGGCGGUGAUCGCG	UUUUGCAUUCAGCAUA	CAGUA	CCCGCCCGCC	AAUGAGCGGGUUUUUUU	(144)
AA CGGGCAGUGUA UUCAC	CAUGC GUAAAGCAAU	CAGUA	CCCGCCCGCC	AAUGAGCGGGUUUUUUU	(141)
AA CGGGCAGUGUA UUCAC	CAUGC GUAAAGCAAU	CAGUA	CCCGCCCGCC	AAUGAGCGGGUUUUUUU	(141)
UACCGGGCGUGUA UGAAC	AGCUGUAUUCAGCAAAC	GAUA	CCCGCCCGCC	UUGUUAAGCGGGUUUUUUU	(142)
UUUCGGGAGUGUC UJACG	UCCGCAAUUUGCAAC	CAGUA	CCCGCCCGCC	AAUGAGCGGGUUUUUUU	(132)
UUCGGGCGUGUAUUCGCAUAGCUGUCAUCUGACAAUGCA	UUUUUCCUGCCCGCAC	CUGA	UCCGGGUUUUUUUU		(176)

## SEQUENCES OF TRPE RIBOSOME BINDING SITE REGIONS

K.A.	GCACAAAAUUAUACGAACAGGCGAGAACAUAUAUG	
E.C.	GAACAAAAUJ	AGAGAAUAACAAUG
S.D.	GAACAAAAUJ	AGAGAAUAACAAUG
S.T.	GAACAAAAUAA	UGAGAAUAACCAUG
C.F.	GAACAAAAUJ	AAUGAGAAUAACGAUG
S.H.	GGACAGAAUUC	ACUGGAACCACCGAUGAUG

# Predikce struktury atenuátoru



... a porovnání celé regulační oblasti s jinými střevními bakteriemi

# ***Shrnutí***

- 1) Celogenomové metody sekvenování**
- 2) Sekvenování *H. influenzae***
- 3) Sekvenování *S. cerevisiae***
- 4) Contigy, jejich zpracování**
- 5) Využití repetitivních sekvencí**
- 6) Studium genové exprese a funkce genů**
- 7) Analýza transkriptů**
- 8) Analýza regulačních míst**
- 9) Techniky mutagenese *in vitro***
- 10) Příklad analýzy bakteriálního genu**