

Využití rekombinantní DNA při studiu mikroorganismů

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2014



AU! AUVAJS, ACHIKOUVEJ! JOJ, TO MYŠLENÍ BOLÍ!

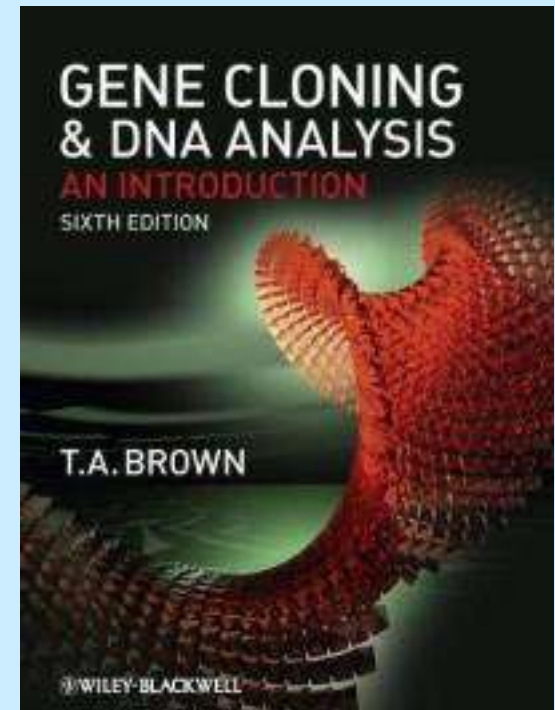
Obsah přednášky

- 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



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**

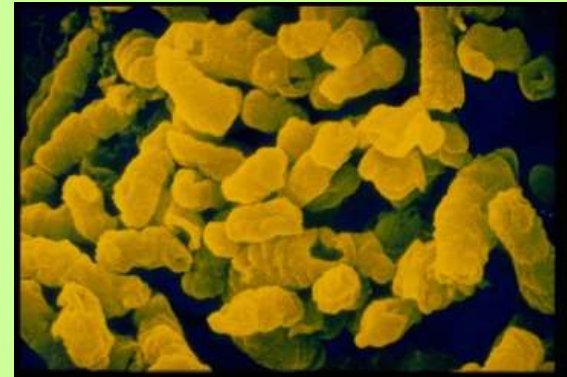


Metoda je vhodná pro malé bakteriální genomy

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



Co je to za bakterii ten *Haemophilus influenzae*?



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

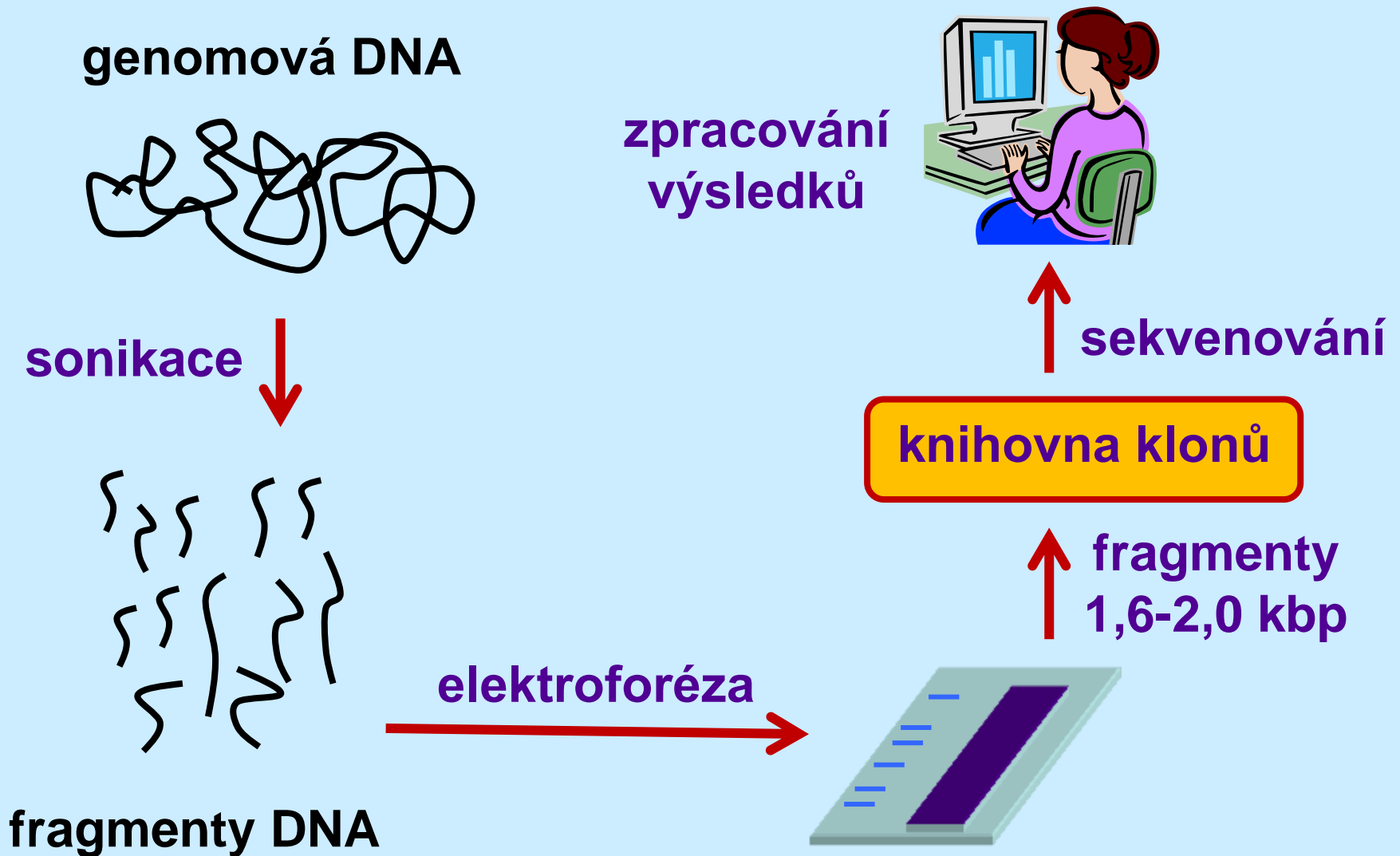


Sekvenování genomu *H. influenzae*

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*



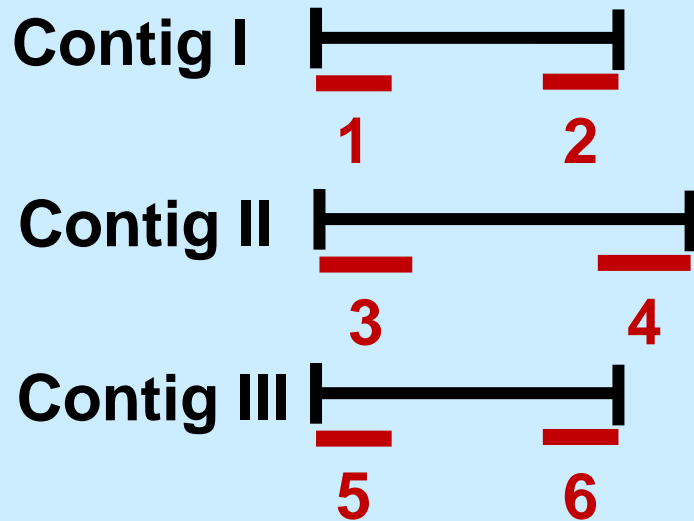
Sekvenování genomu *H. influenzae*

Proč sonikace a ne restriktázy?

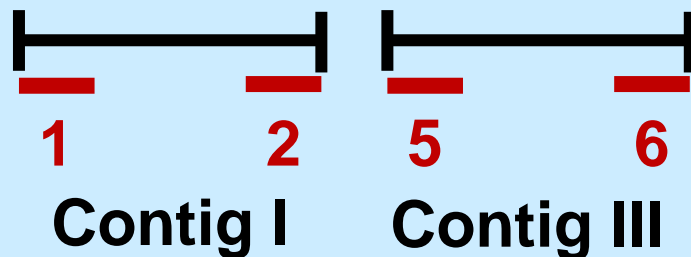
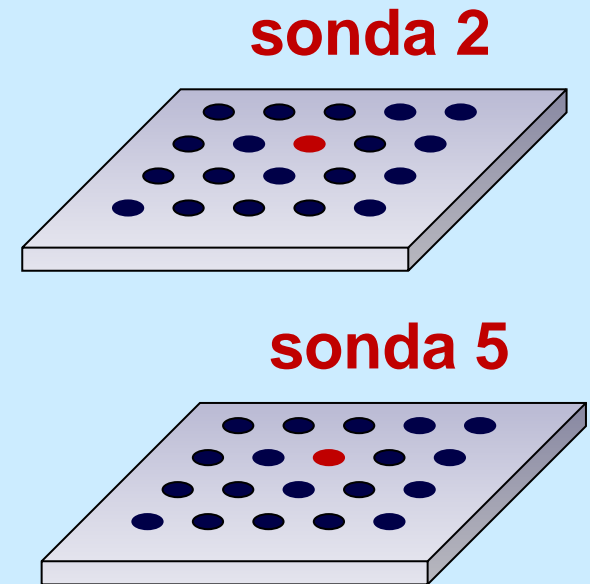
- **Po restriktázách by mohly zůstat mezery**

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



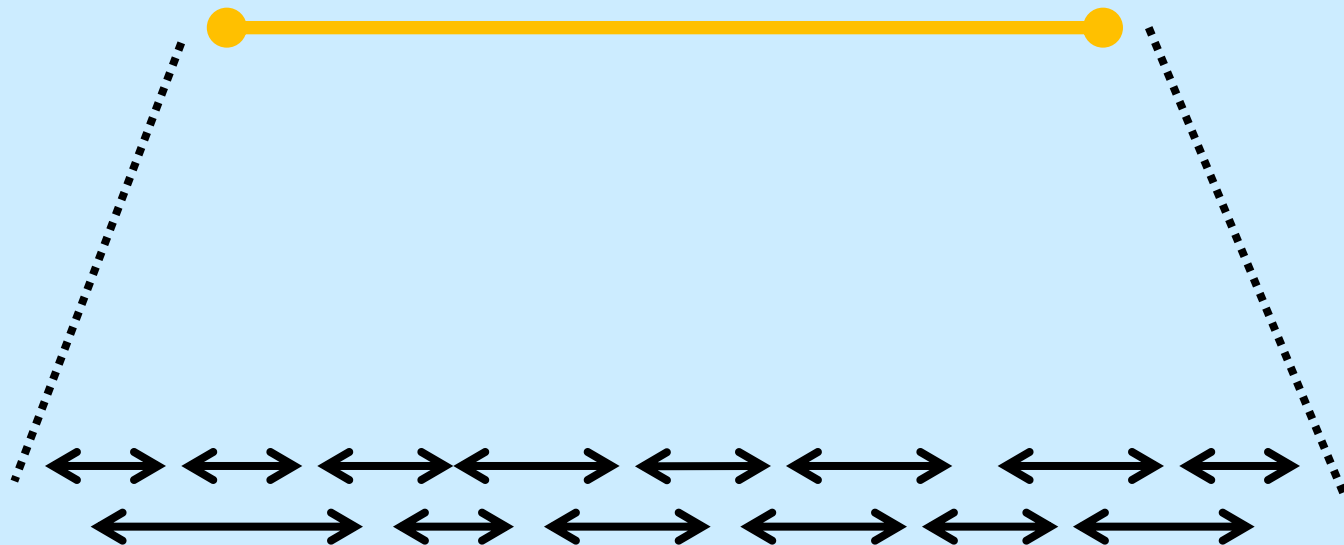
- **Je pracnější, trvá déle a stojí víc peněz**

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?

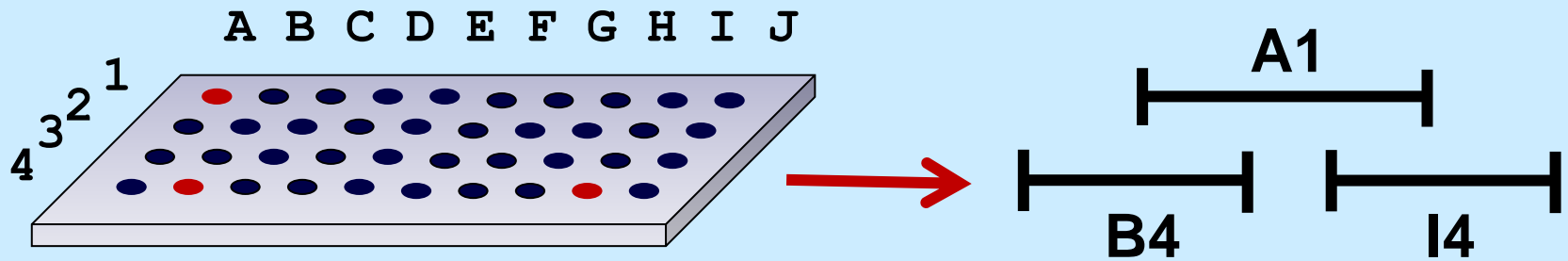
- 1) Procházení chromozómu (chromosome walking)**
- 2) Fingerprinting klonů (clone fingerprinting)**
- 3) PCR repetitivní DNA**
- 4) Analýza výskytu míst označené sekvence (sequence tagged site, STS)**

Procházení chromozómu

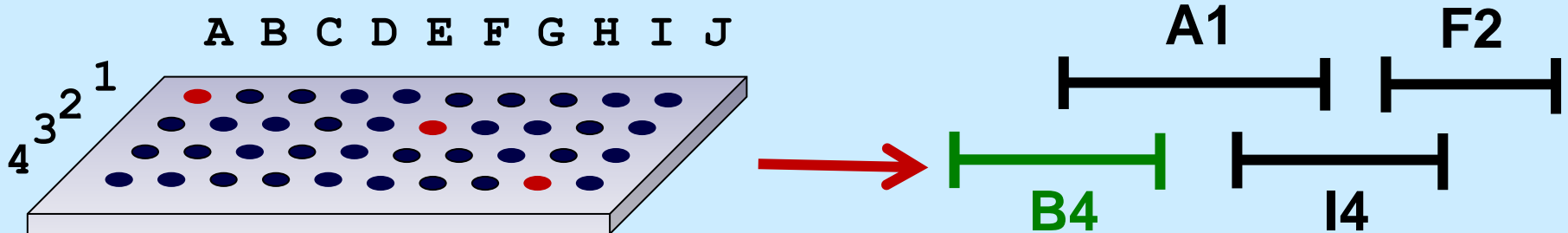
- 1) Z genomové knihovny je vybrán jeden klon**
- 2) Klon je naznačen a použit jako hybridizační sonda dalších klonů v knihovně**
- 3) Klony, které poskytují signál se překrývají s použitou sondou**
- 4) Nové klony jsou naznačeny a použity k dalšímu kolu hybridizace ...**

Příklad procházení chromozómu

Testování knihovny klonem A1

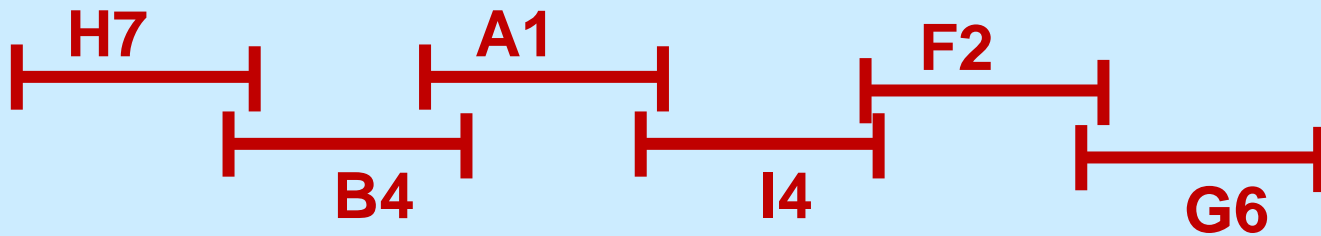
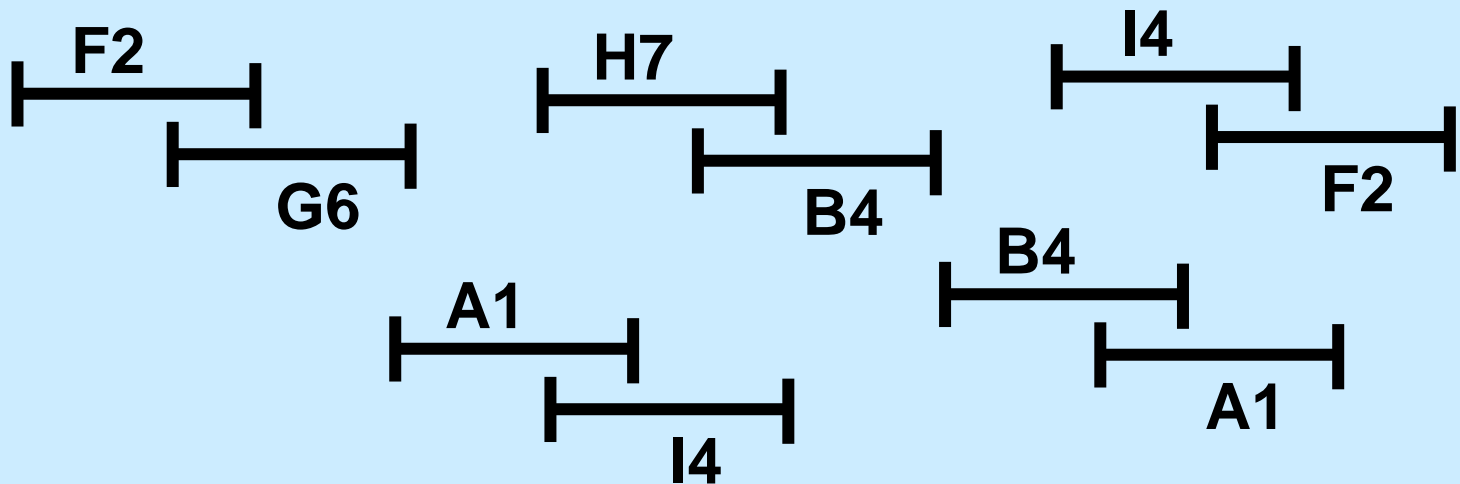


Testování knihovny klonem I4

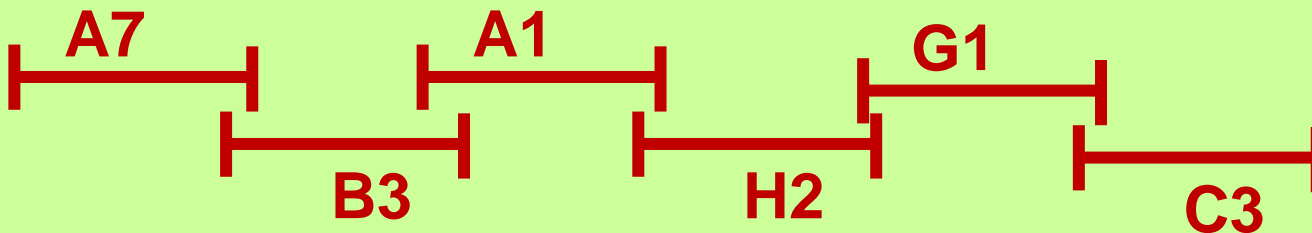
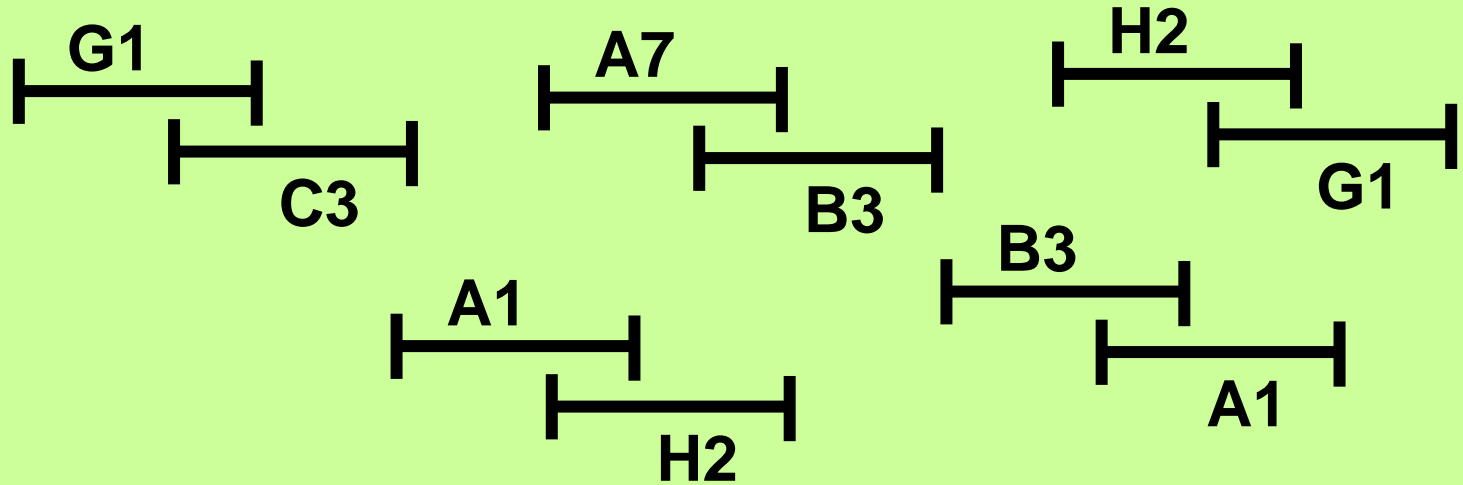


Fingerprinting klonů

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



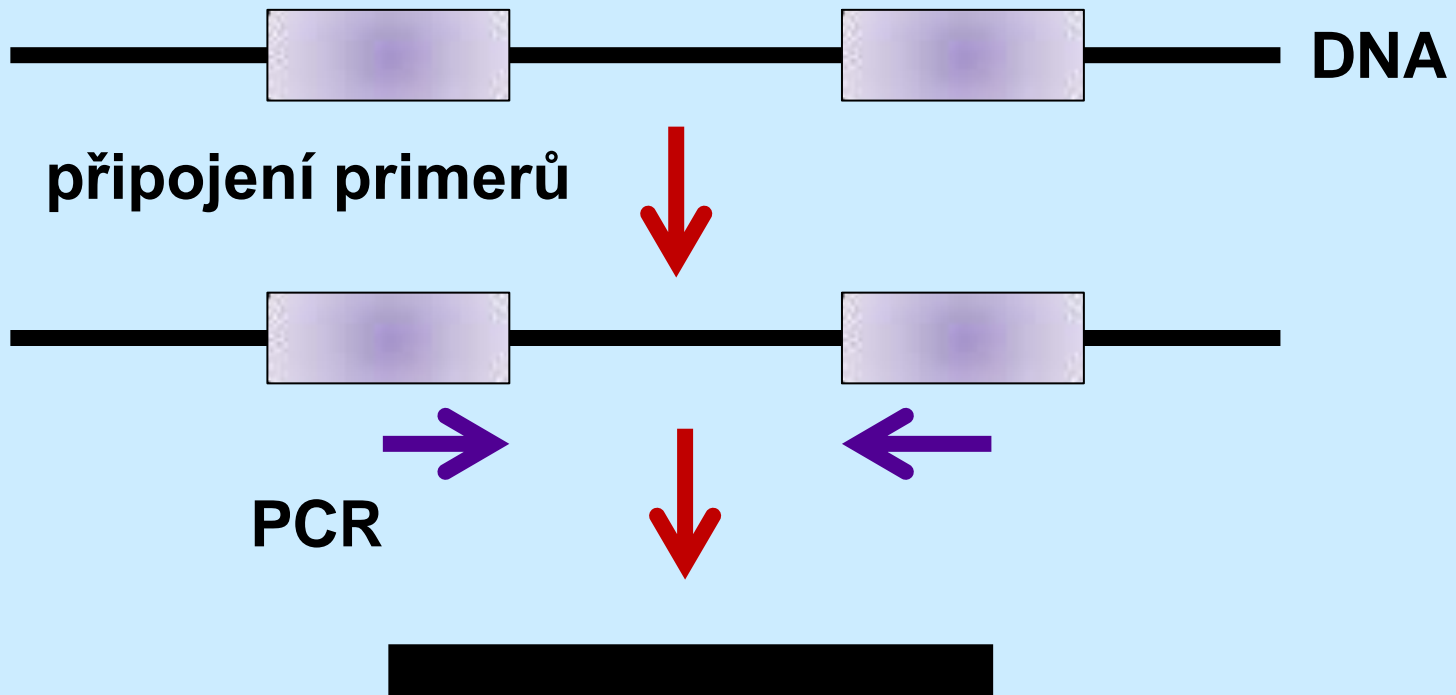
Sestavte kontig klonů z následujících překryvů



PCR repetitivní DNA

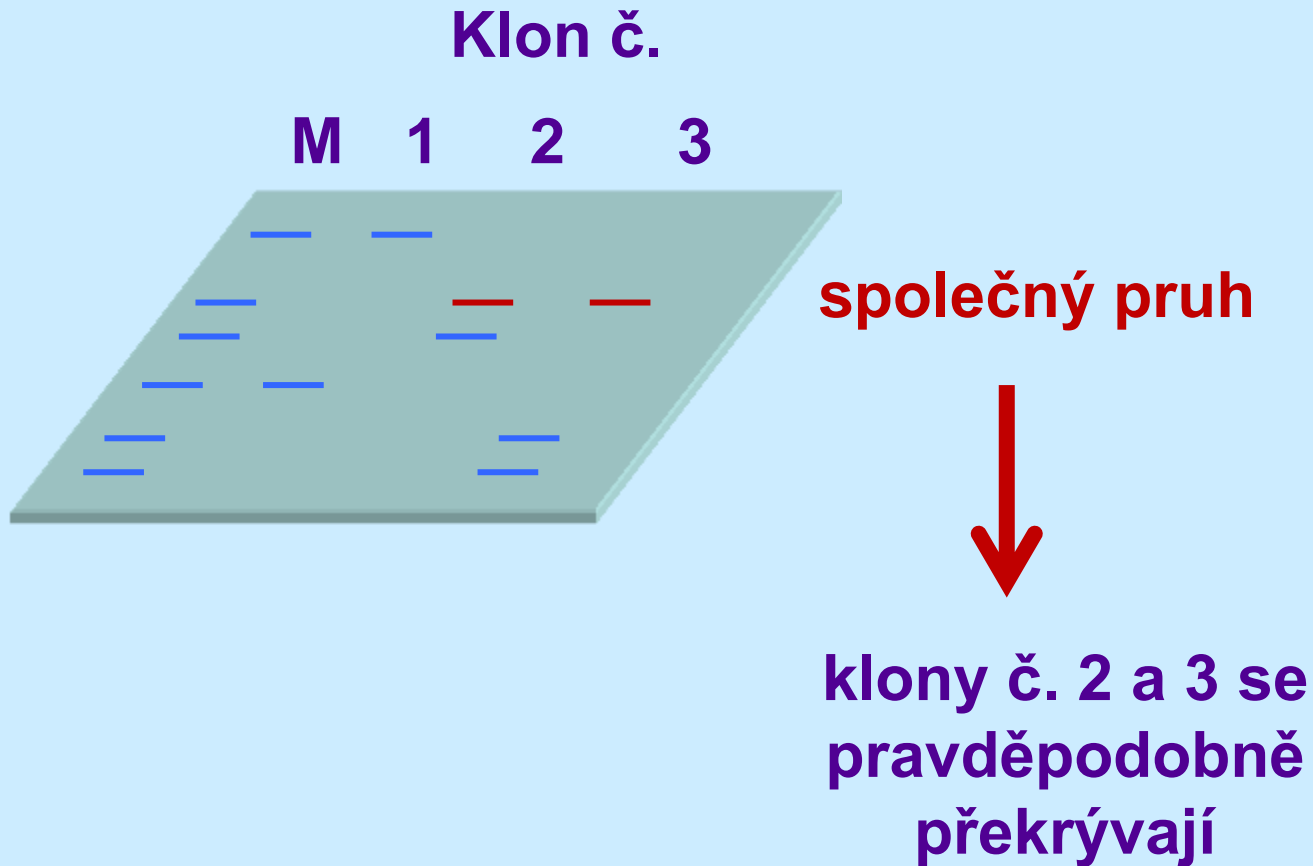
PCR z roztroušených repetitivních elementů
(interspersed repeat element PCR, IRE-PCR)

dvě identické repetice



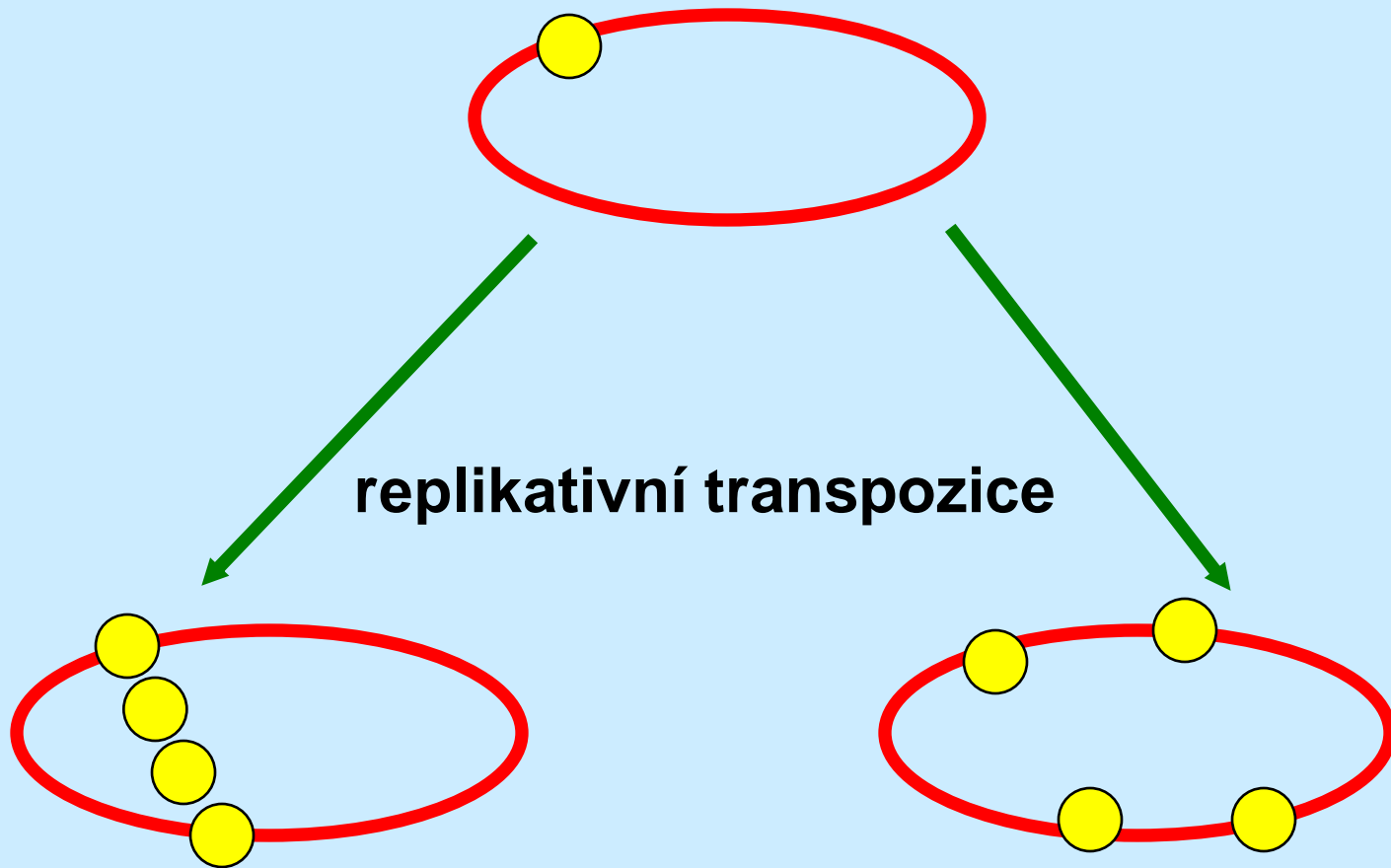
amplikon překrývající oblasti mezi sousedícími repeticemi

PCR repetitivní DNA - vyhodnocení

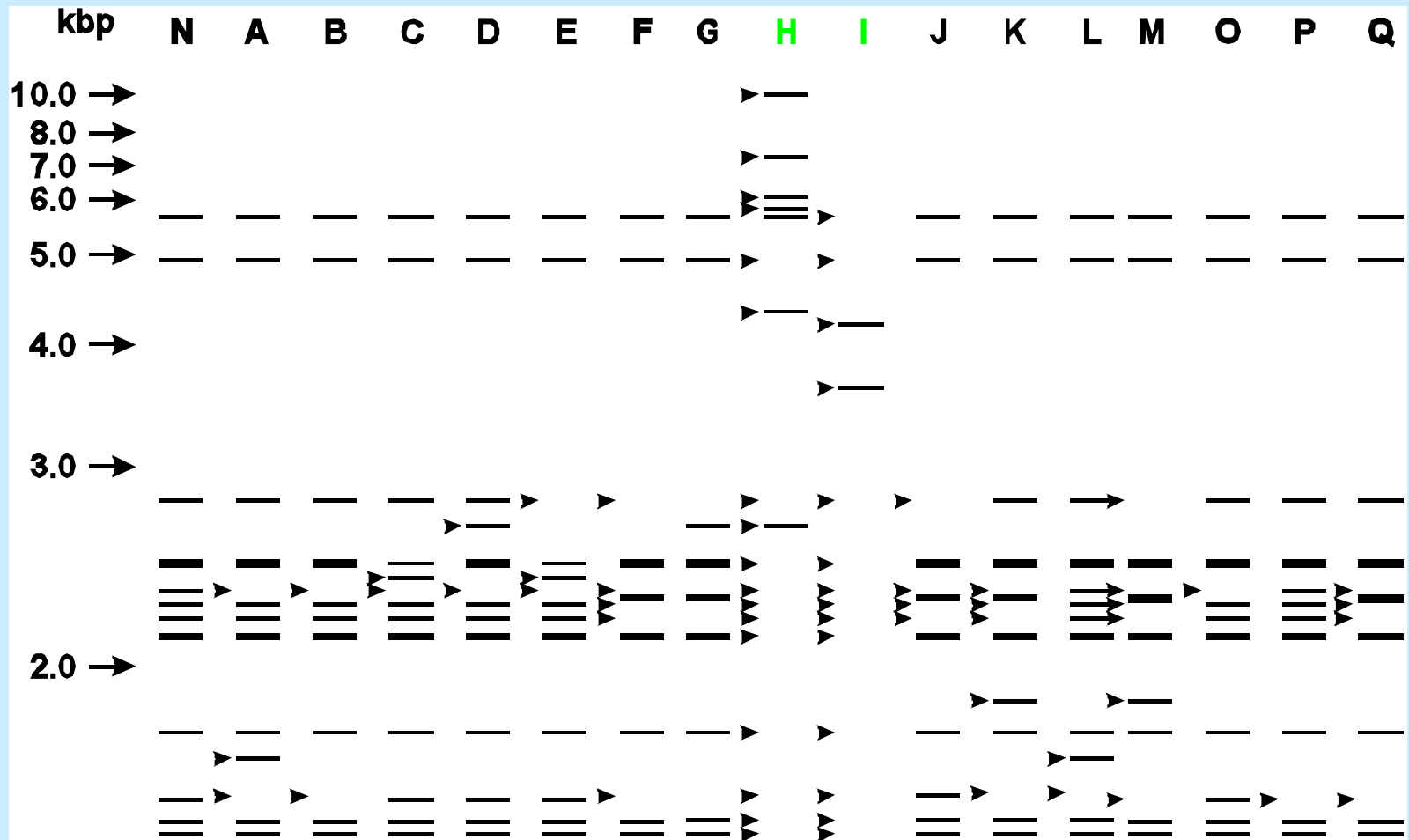


Mapování genomu mykobakterií s využitím inzerčních sekvencí

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**

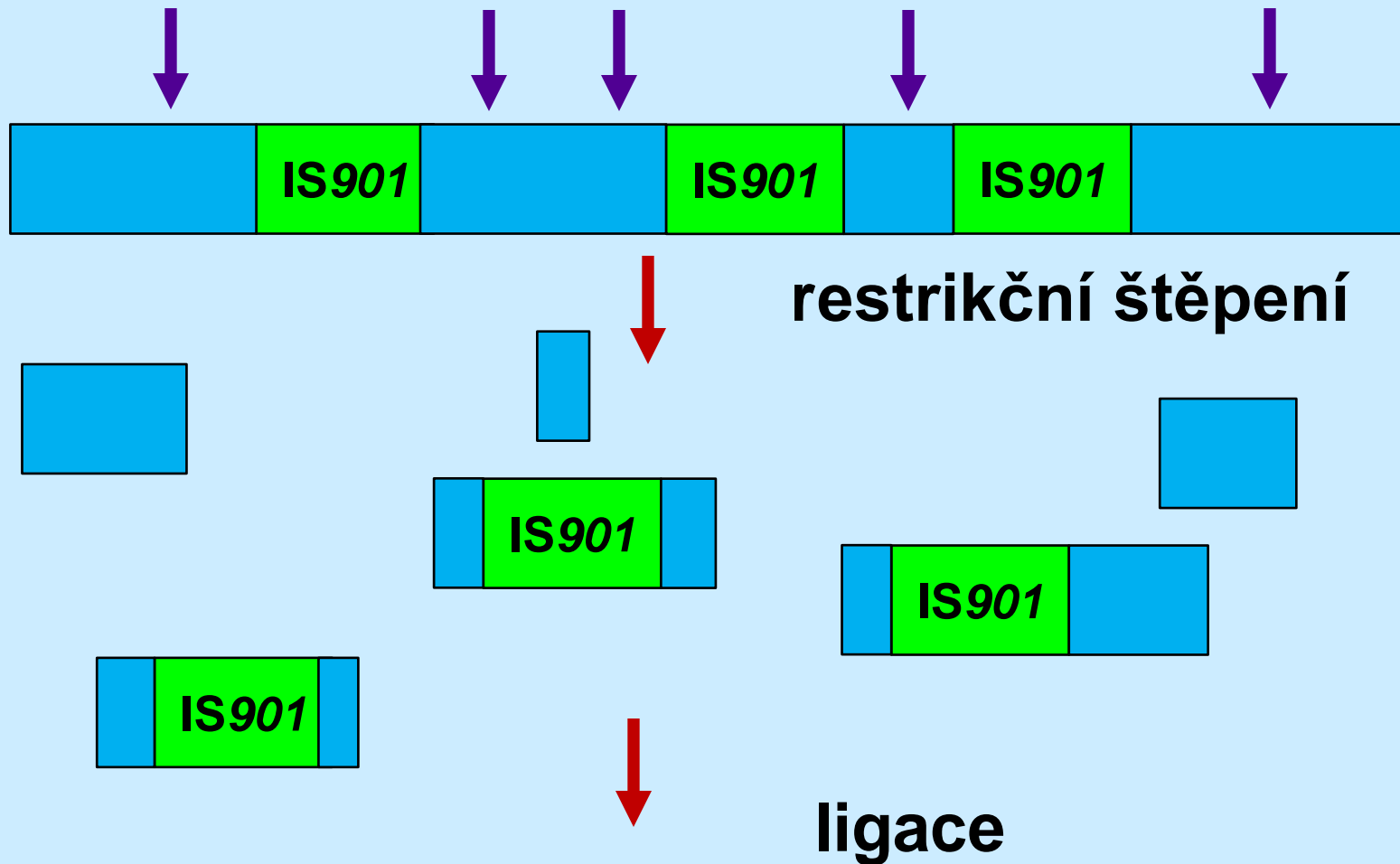
Souvisí nějak inzerce IS901 s fyziologickými vlastnostmi příslušných kmenů *MAA*?

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

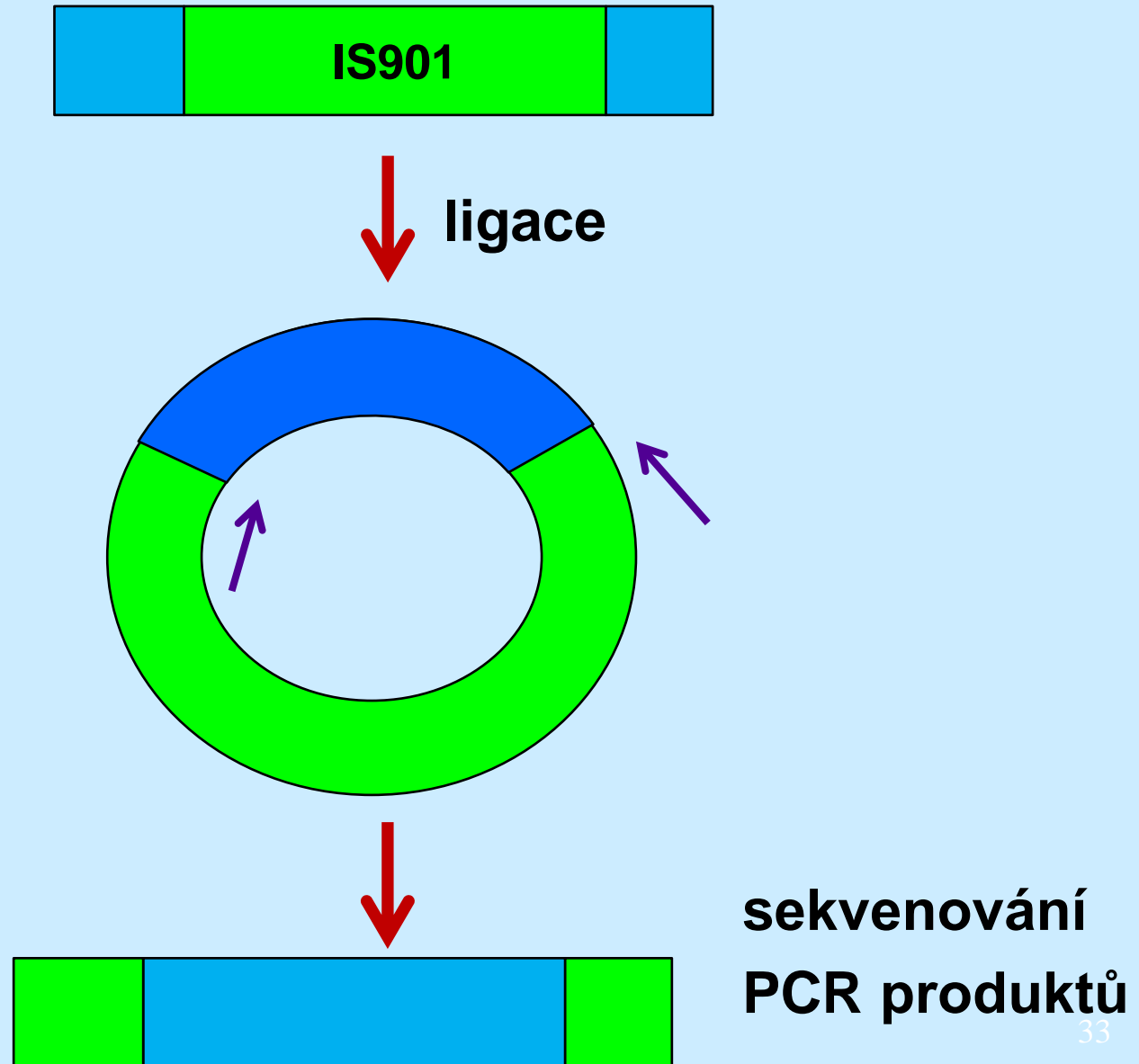
Jak jsme mapovali pozice IS901?

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

Průběh inverzní PCR pro IS901



Průběh inverzní PCR pro IS901



Anchor PCR

Anchor primer



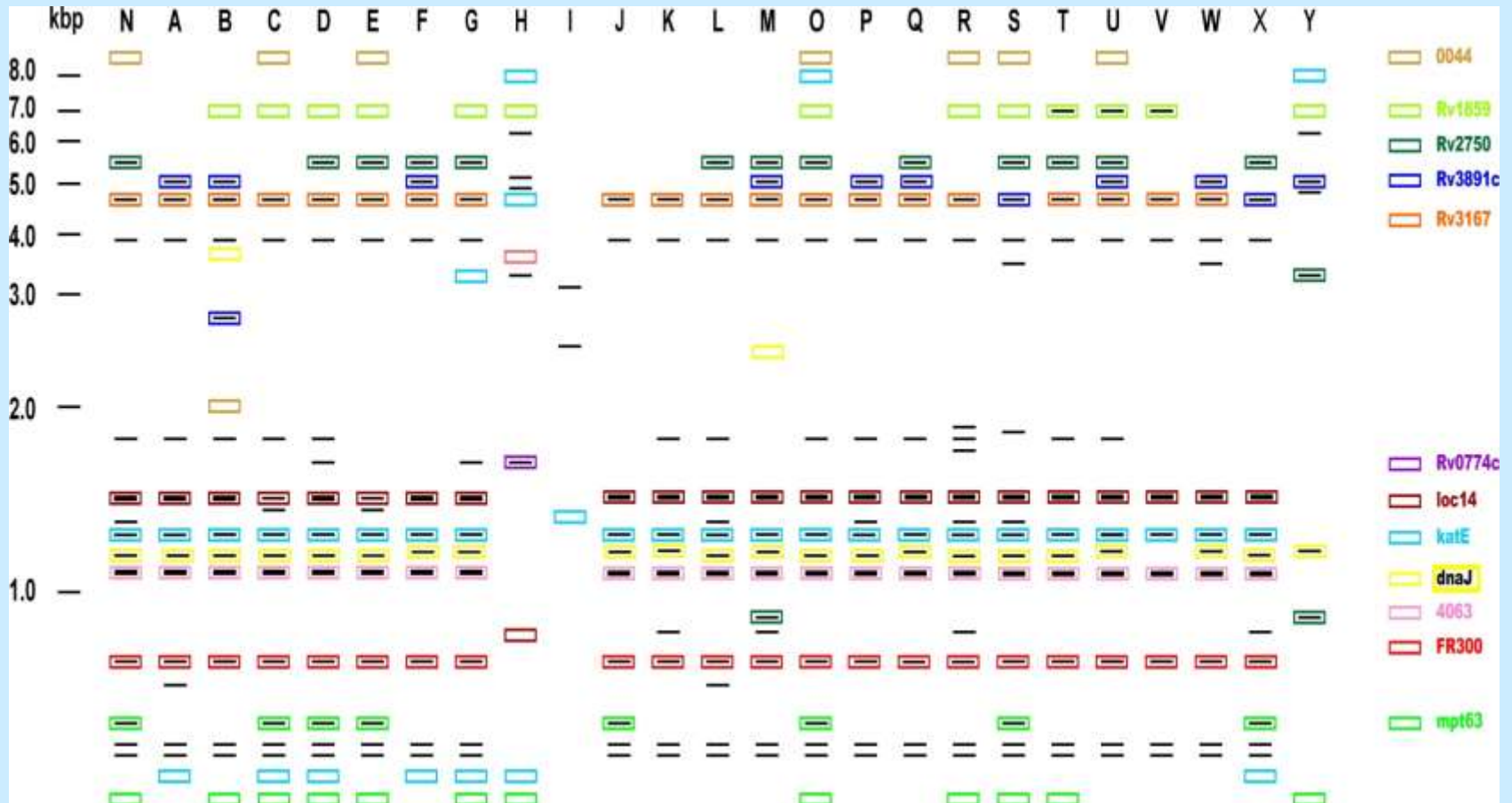
Nahodilý
primer

PCR



sekvenování

Výsledná fyzikální mapa pozic IS901

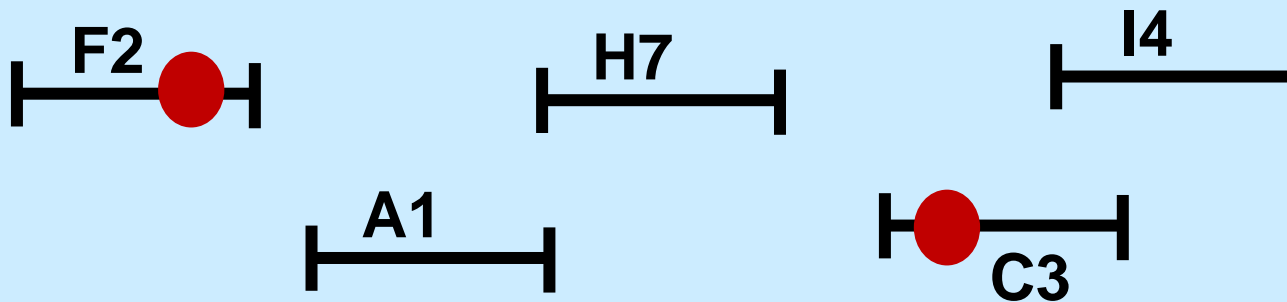


Analýza výskytu míst označené sekvence

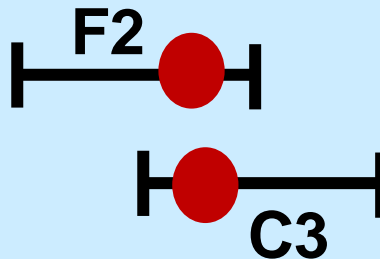
sequence tagged site, STS

- **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**



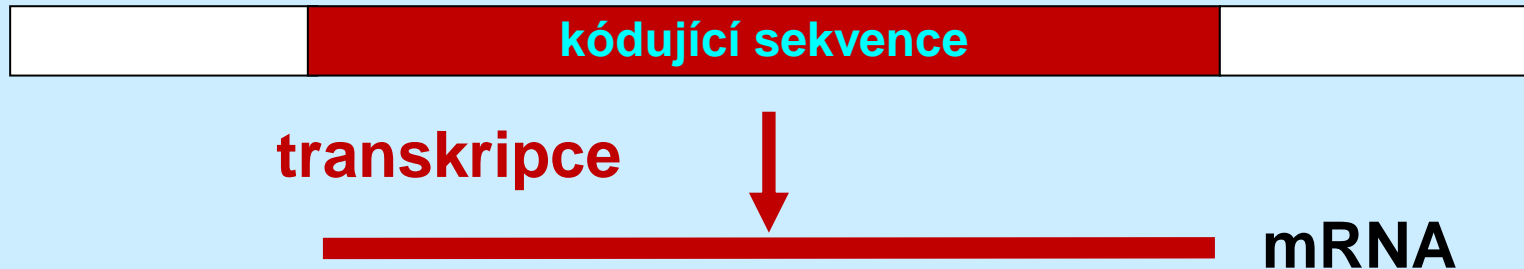
Studium genové exprese a funkce genů

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

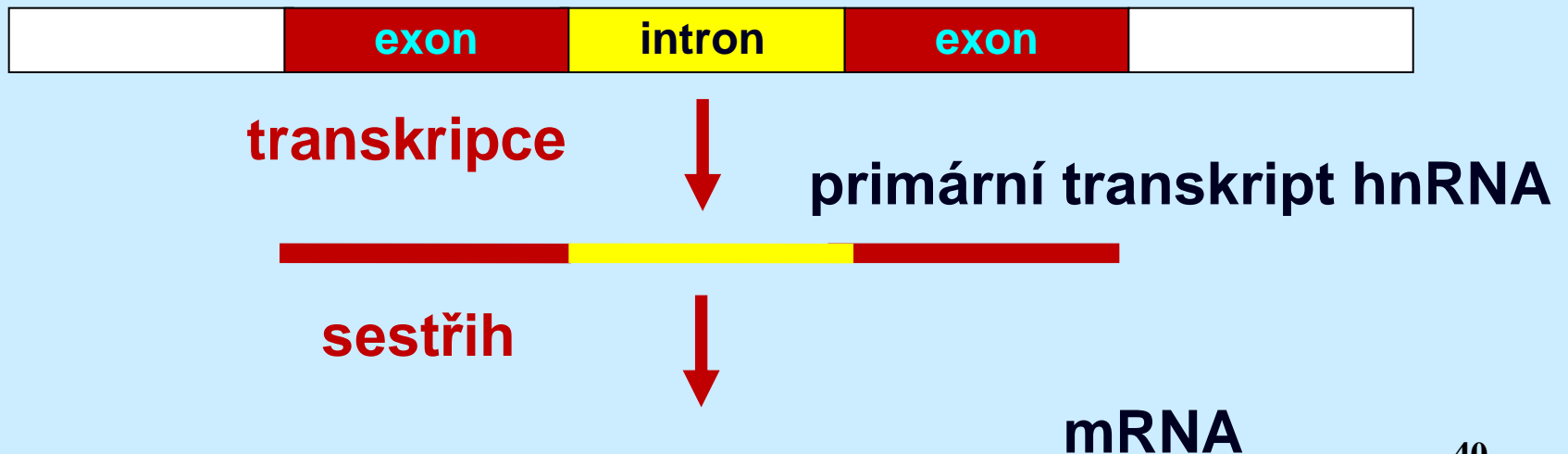


Geny jednoduché a složené

Gen jednoduchý - prokaryota



Gen složný - eukaryota



**Vedle transkriptů strukturních genů
existují také transkripty**

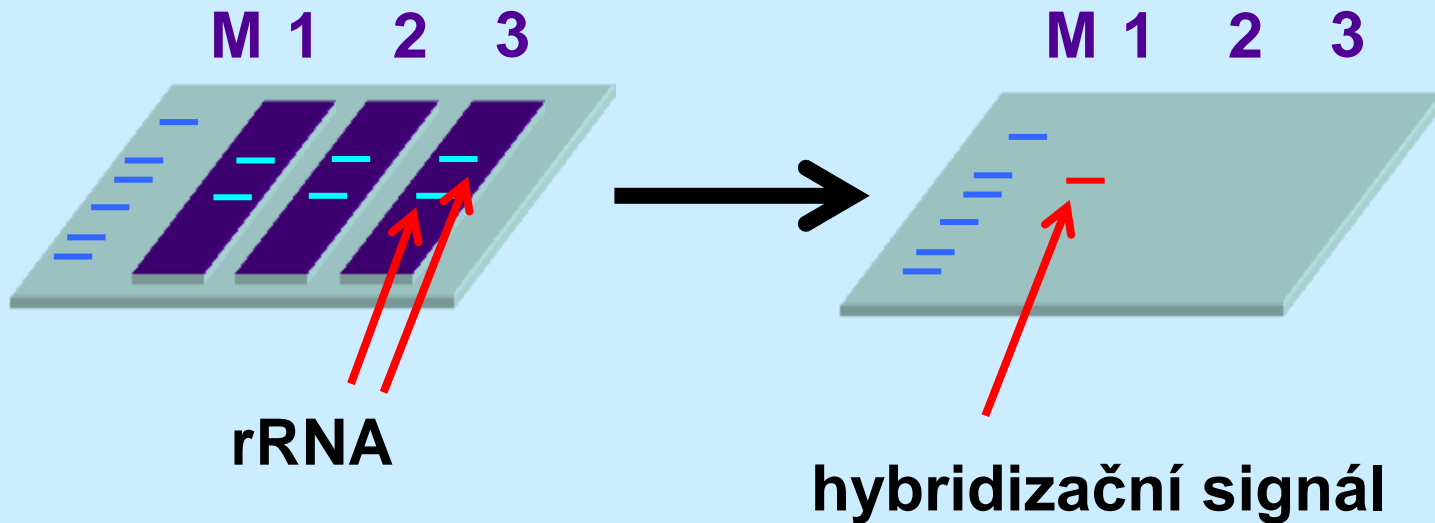
- **Genů pro rRNA**
- **Genů pro tRNA**
- **Genů regulačních**



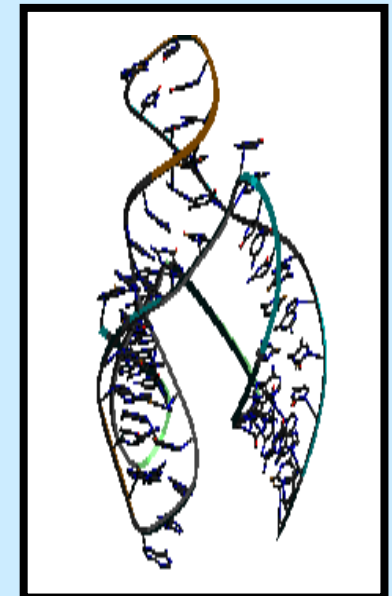
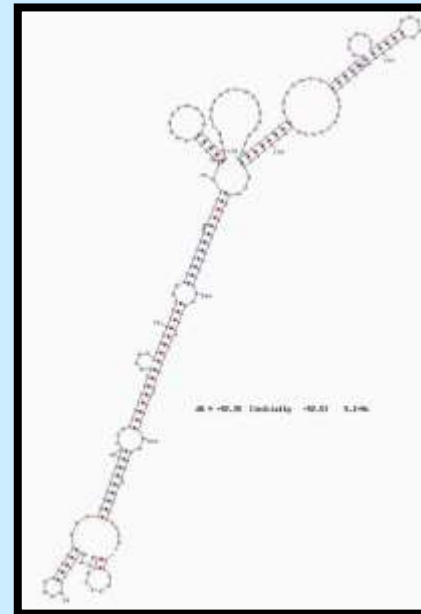
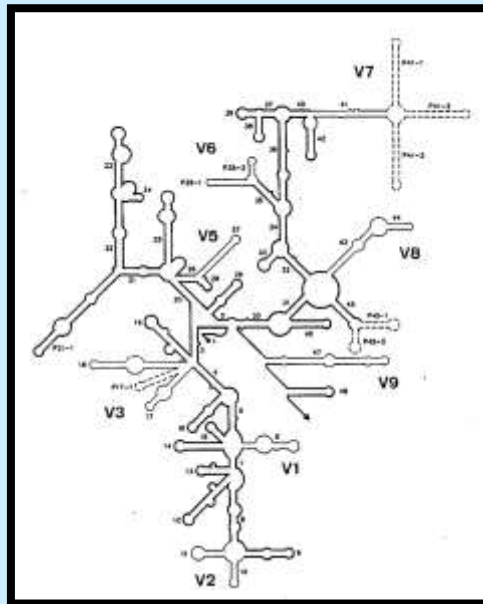
Detekce transkriptů – Northern blotting

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?

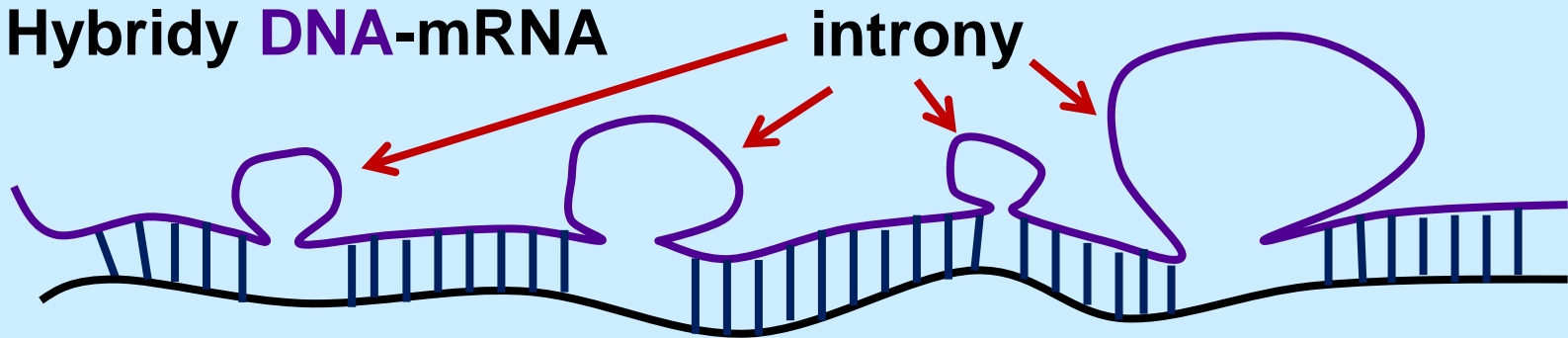
Nelze použít nahodilé hexanukleotidy, protože sekvence transkriptu by nebyla celá



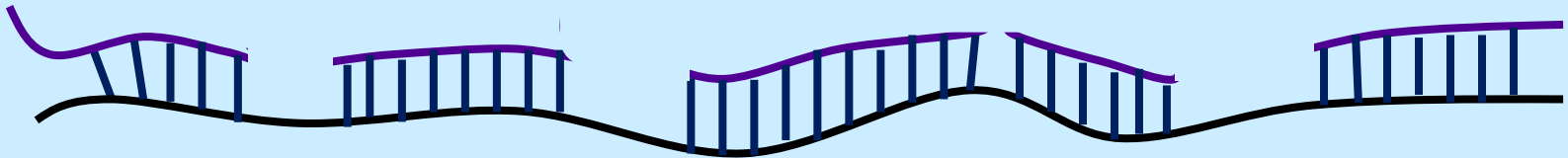
Hybridizace mezi genem a RNA

Stanovení exonů a intronů

Hybridy DNA-mRNA



Opracování S1 nukleázou



Degradace alkáliemi



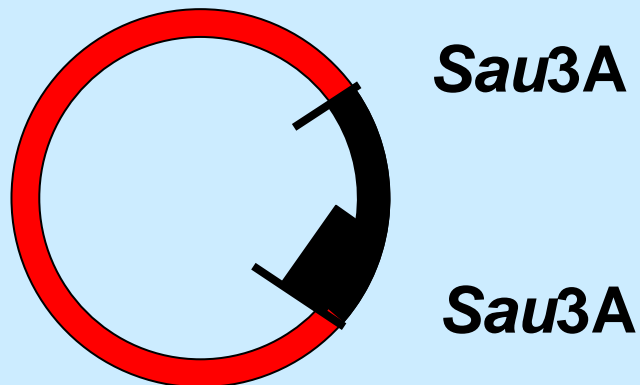
Mapování S1 nukleázou

Určení počátku a konce transkriptů

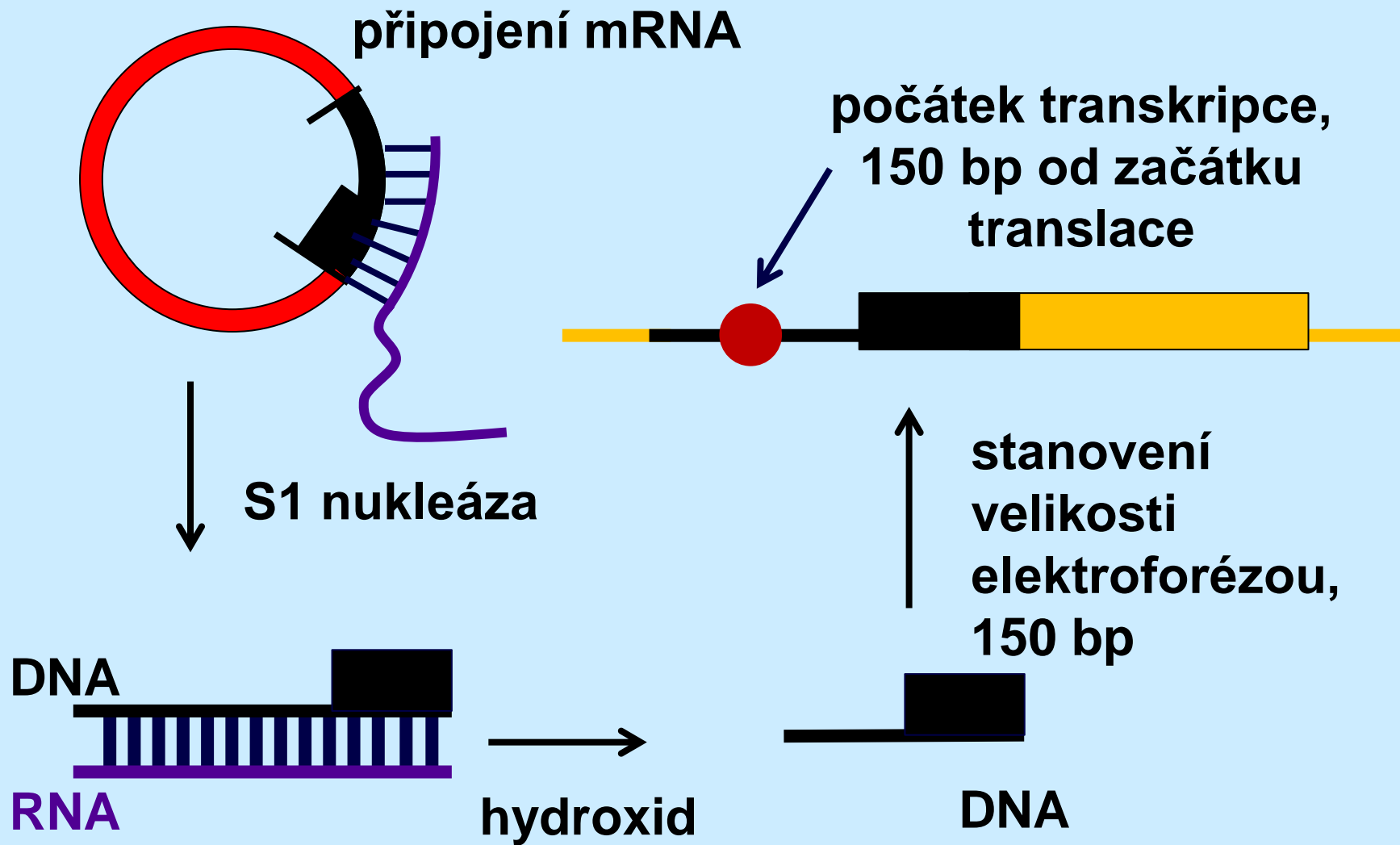
fragment *Sau3A*, 400bp



klonování do M13 a
příprava ssDNA



Mapování S1 nukleázou



Mapování S1 nukleázou

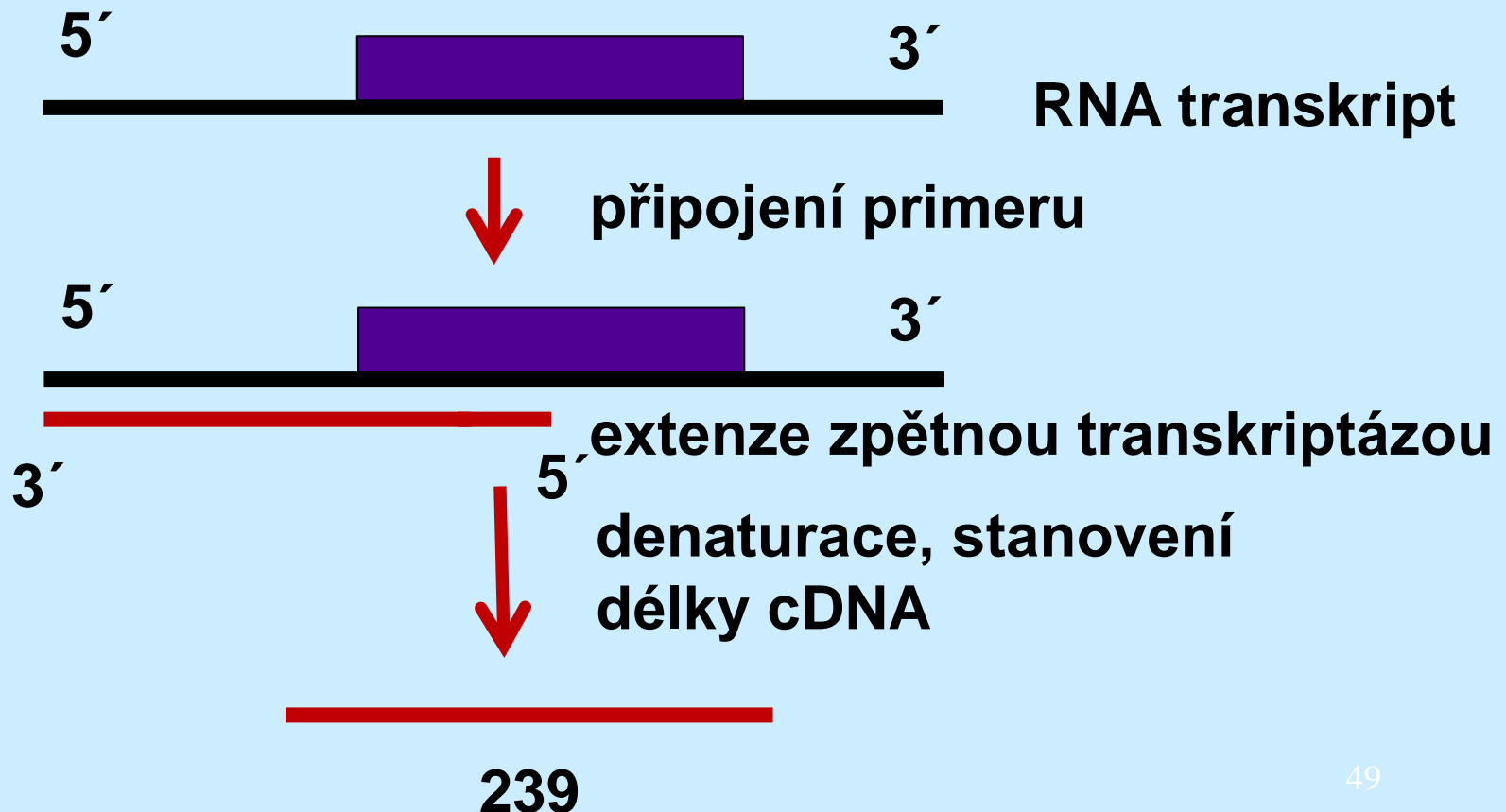
Stejnou strategii lze použít k

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

Prodloužení primeru

Slouží jen k mapování 5'- konců transkriptů

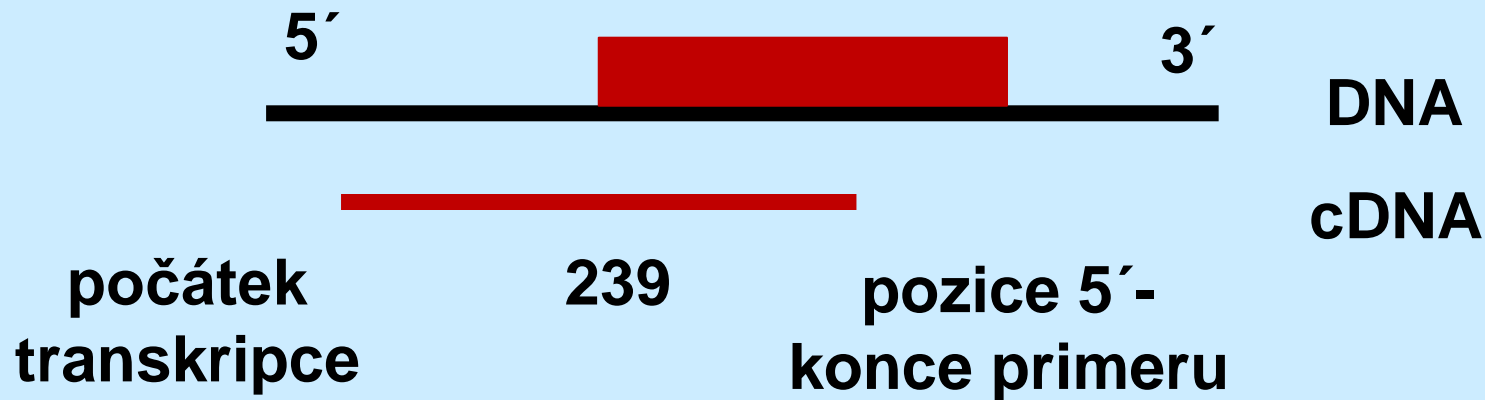
- Musíme znát alespoň část sekvence transkriptu



Prodloužení primeru

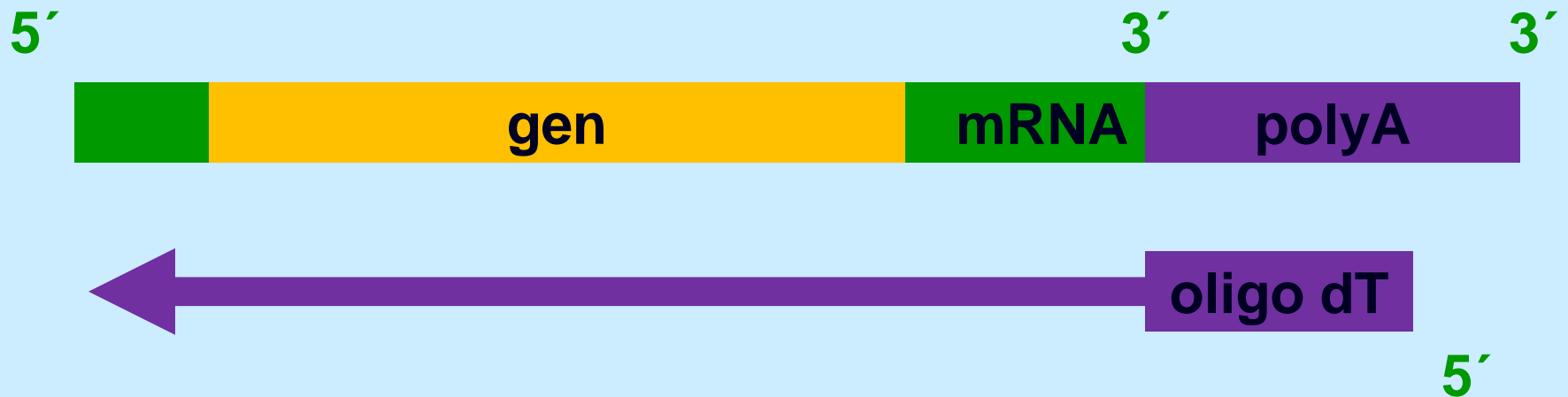
Porovnání délky výsledné cDNA s kódující částí DNA získáme informace o poloze transkriptu

- 3'-konec nově syntetizované cDNA odpovídá 5'-konci transkriptu (počátku transkripce)



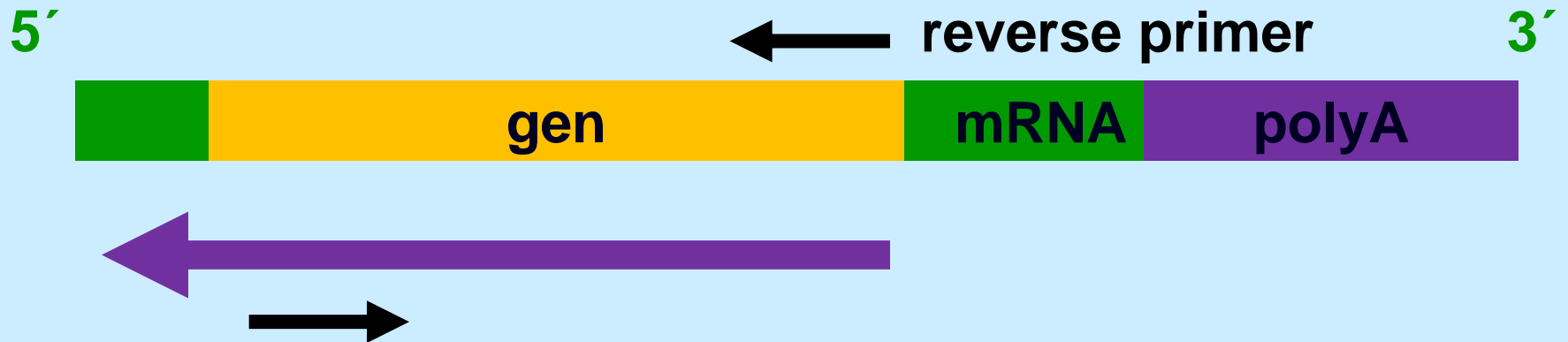
Metoda RT-PCR

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



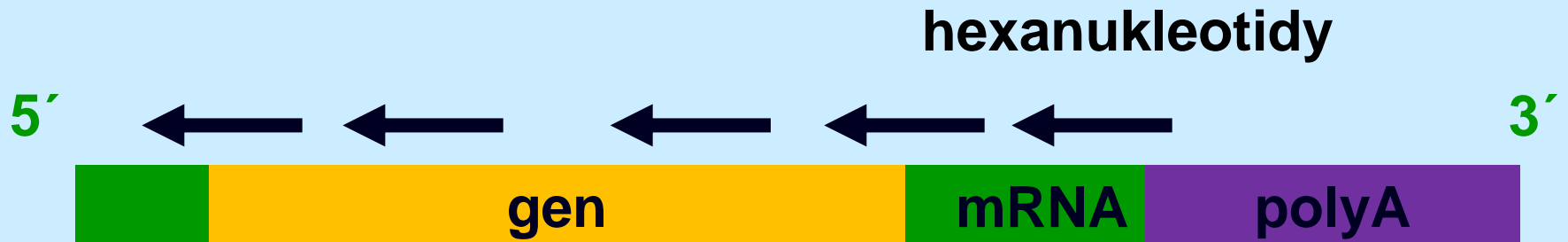
Metoda RT-PCR

- 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

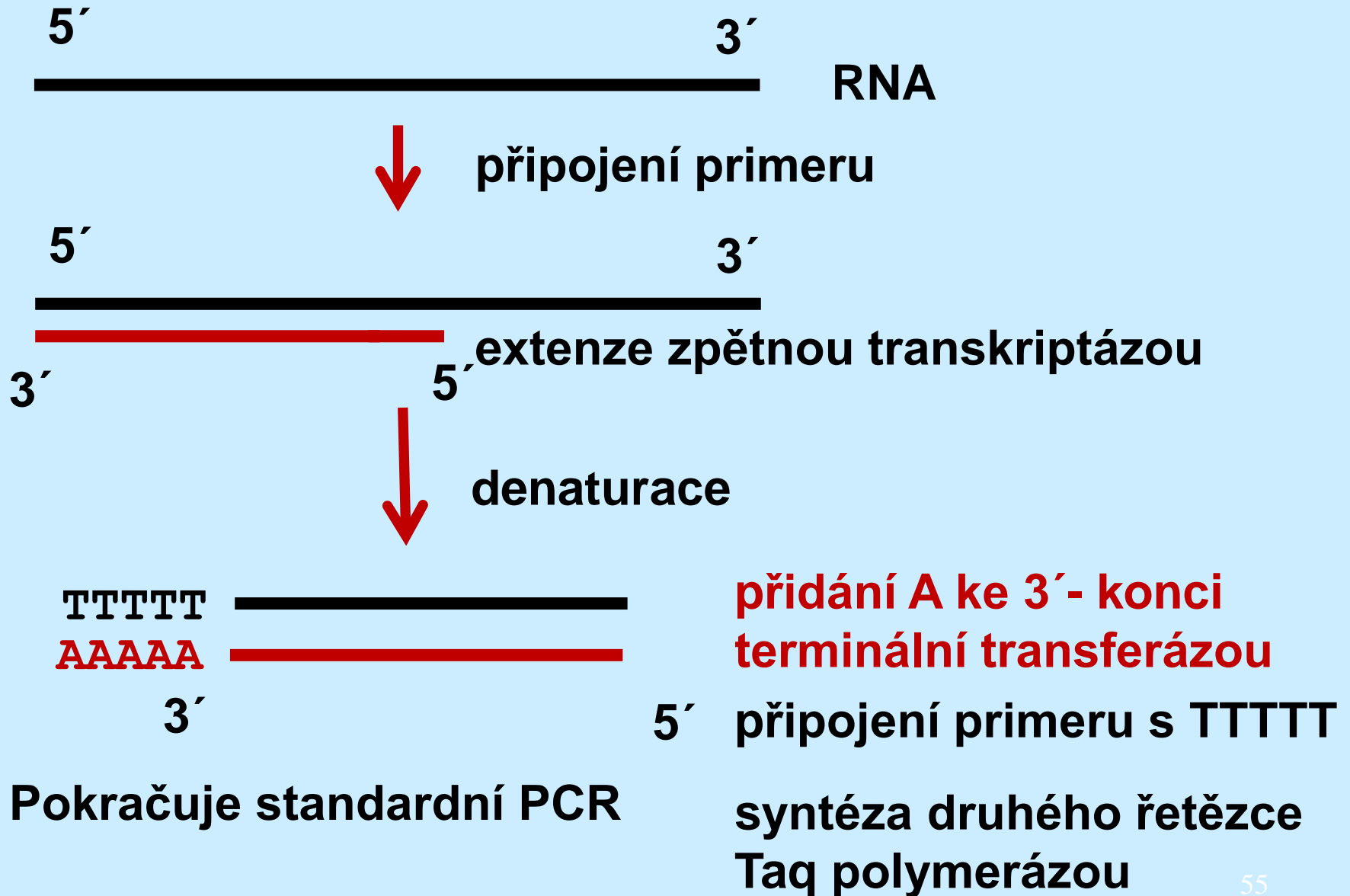


RACE

rapid amplification of cDNA ends

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

5' - RACE



RACE

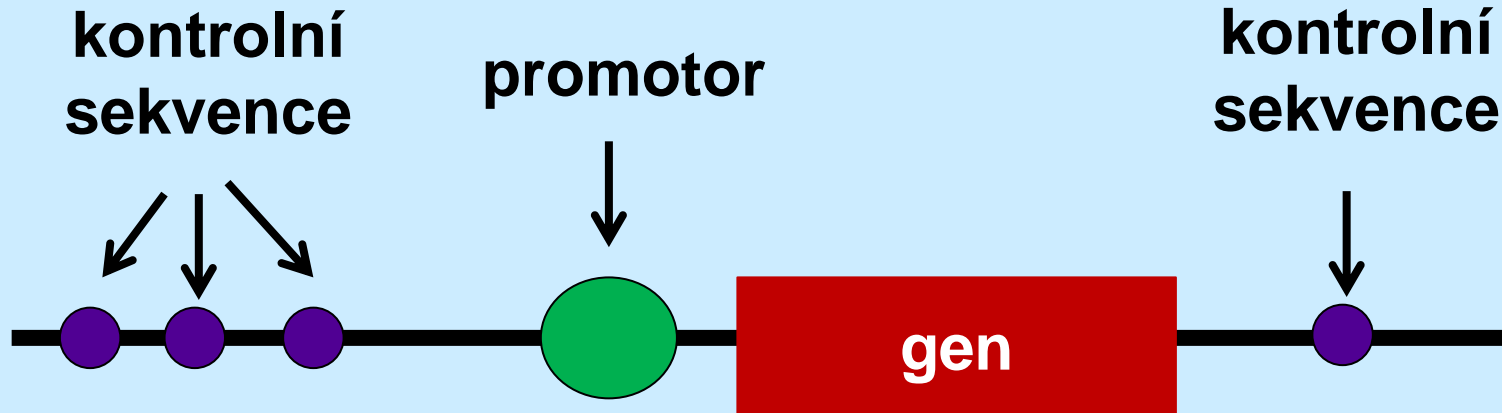
rapid amplification of cDNA ends

- **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



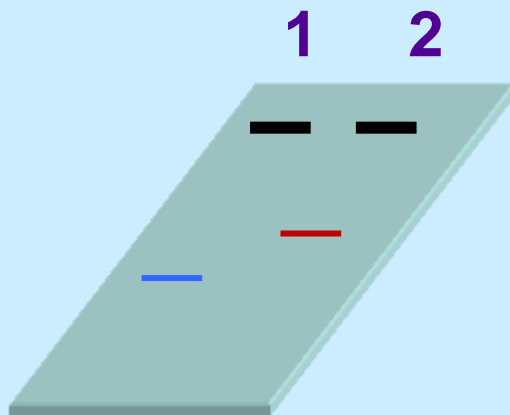
Na regulační místa se váží regulační proteiny

Hledání vazebných míst pro proteiny

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

Gelová retardace komplexů DNA-protein

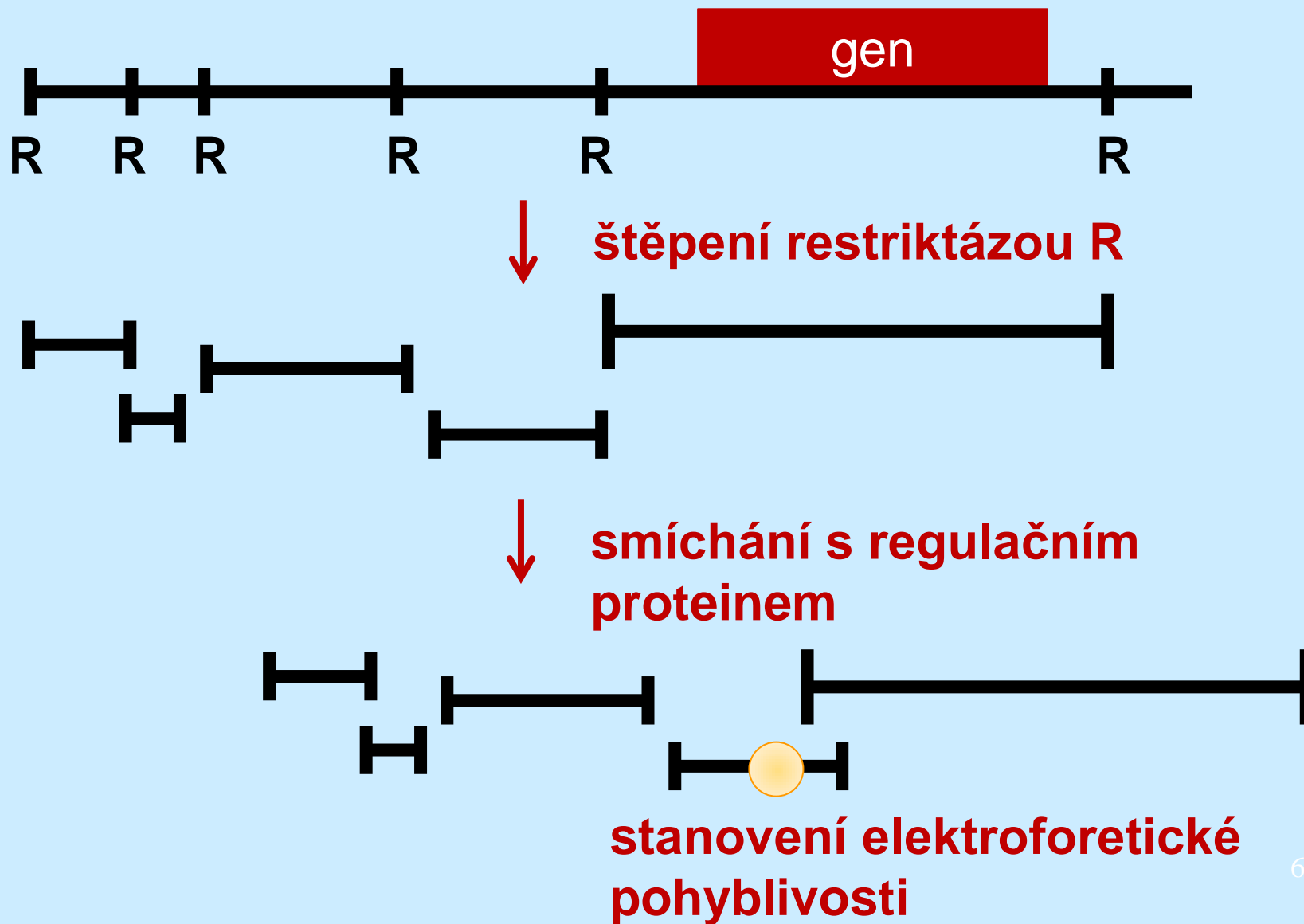
Protein vázaný na DNA fragment snižuje pohyblivost fragmentu na gelové elektroforéze



1 – pouze DNA fragment

2 – DNA fragment s navázaným proteinem

Provedení gelové retardace



... následuje

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

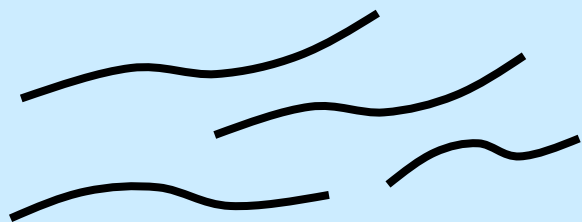
Protože jsou vazebná místa většinou krátká (kolem 10 bp), není tento způsob mapování dost přesný

Footprinting pomocí DNázy I

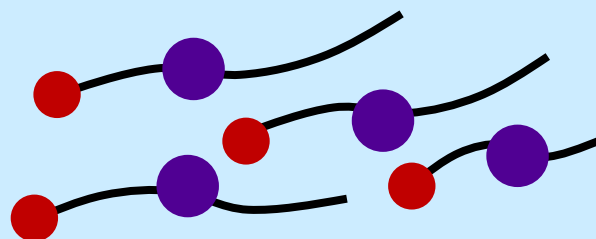
- **Umožňuje stanovit umístění řídicí oblasti v rámci restričního fragmentu identifikovaného gelovou retardací**
- **Využívá skutečnosti, že je sekvence DNA vázající se k proteinu chráněna před účinkem DNázy I**

Provedení footprintingu I

fragmenty DNA

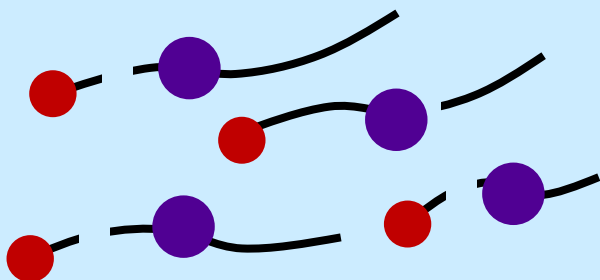


koncové značení +
regulační protein



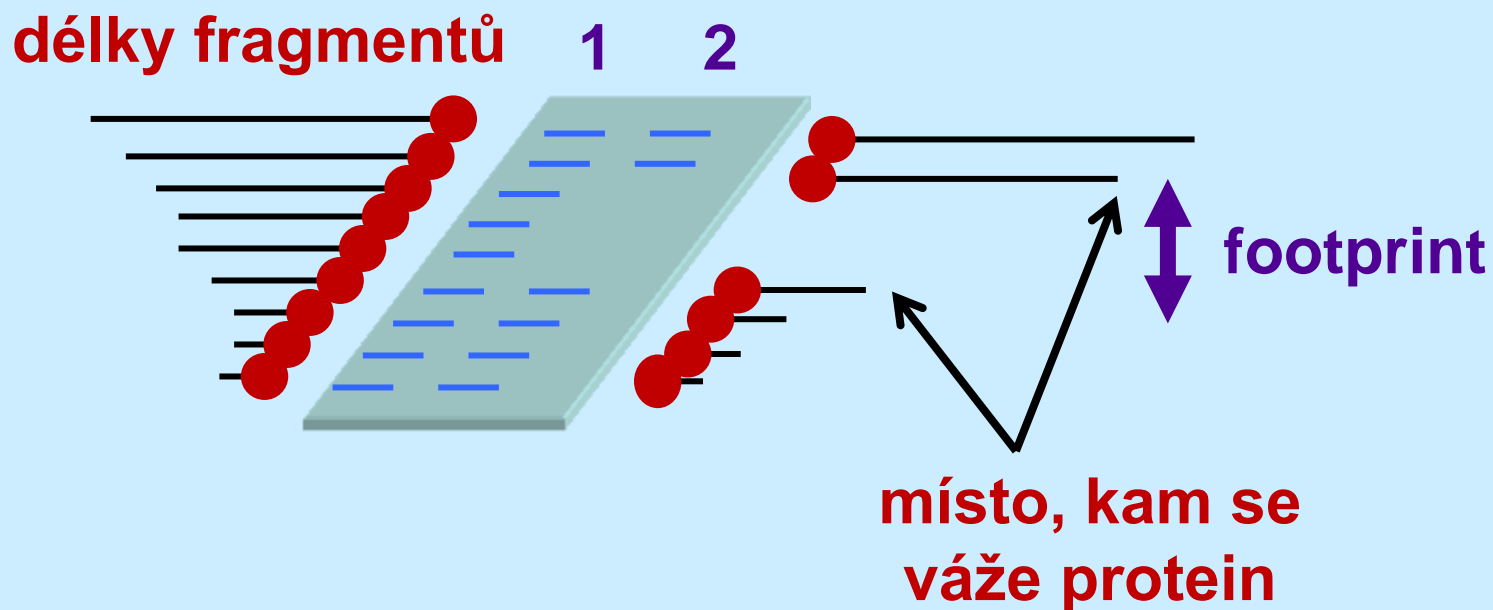
štěpení DNázou I

štěpí se kterákoli vazba, která
není chráněna proteinem



Provedení footprintingu II

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

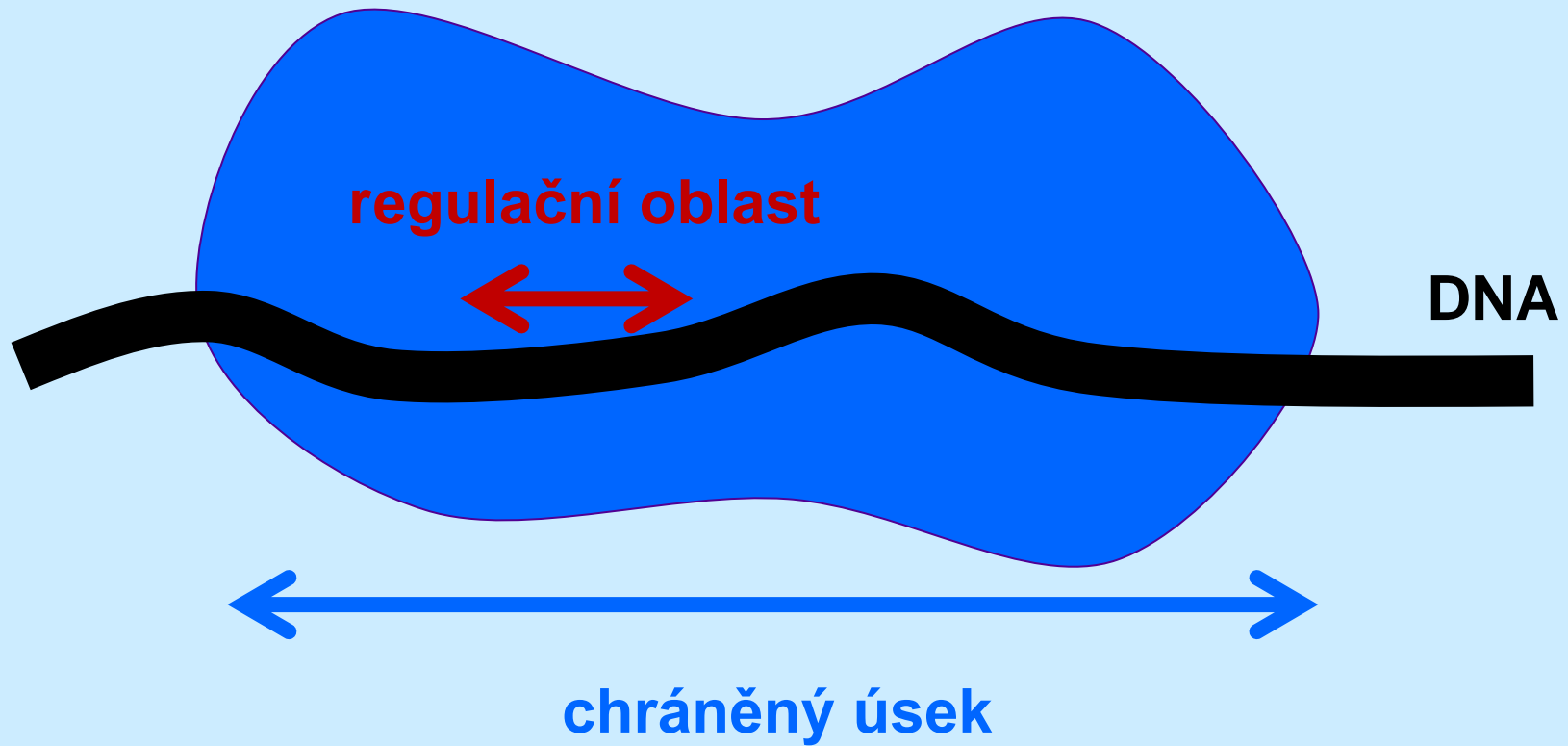


1 = kontrola, žádný navázaný protein

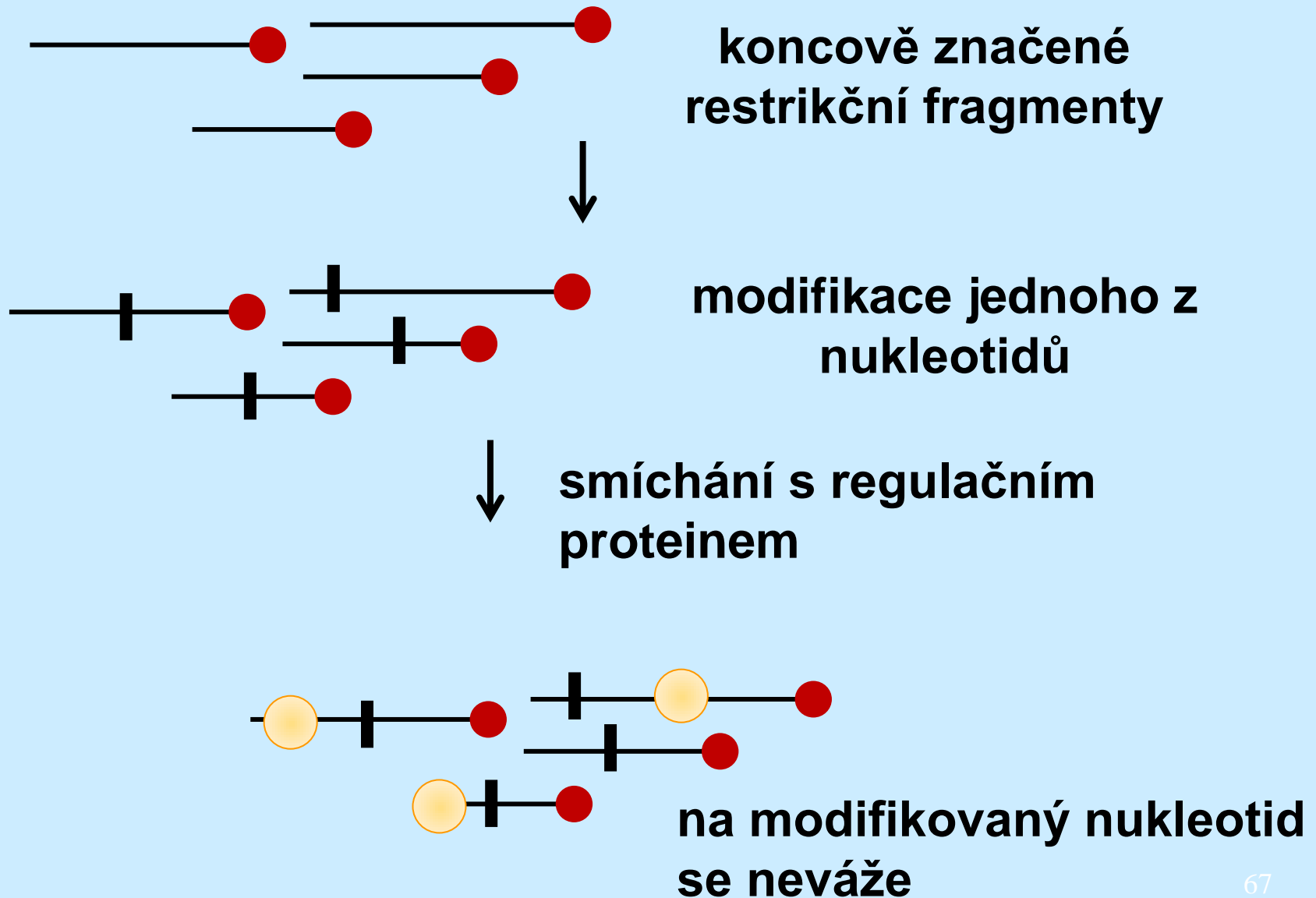
2 = testovaná DNA + navázaný protein

Test modifikované interference

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

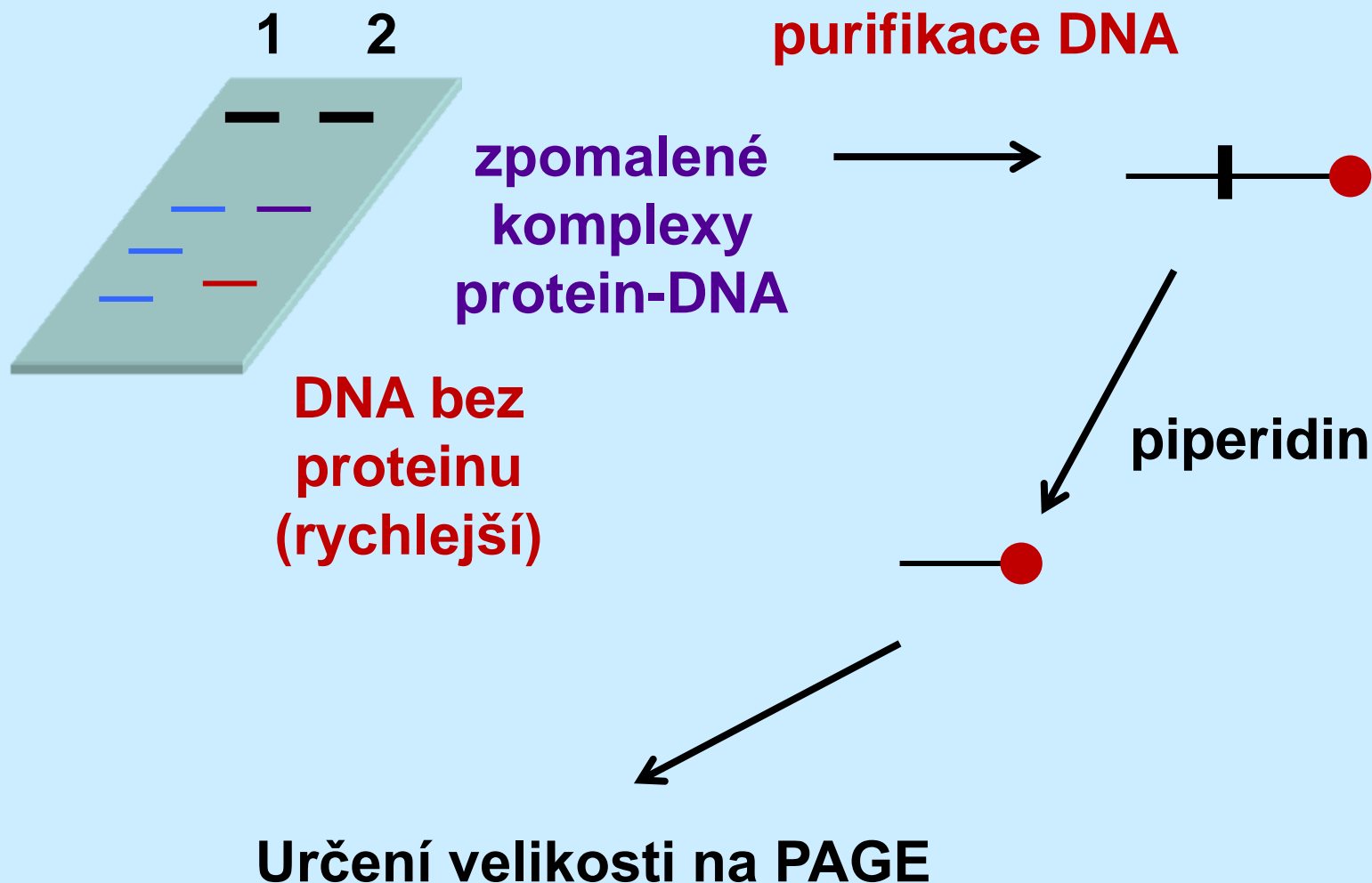


Test modifikované interference I



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

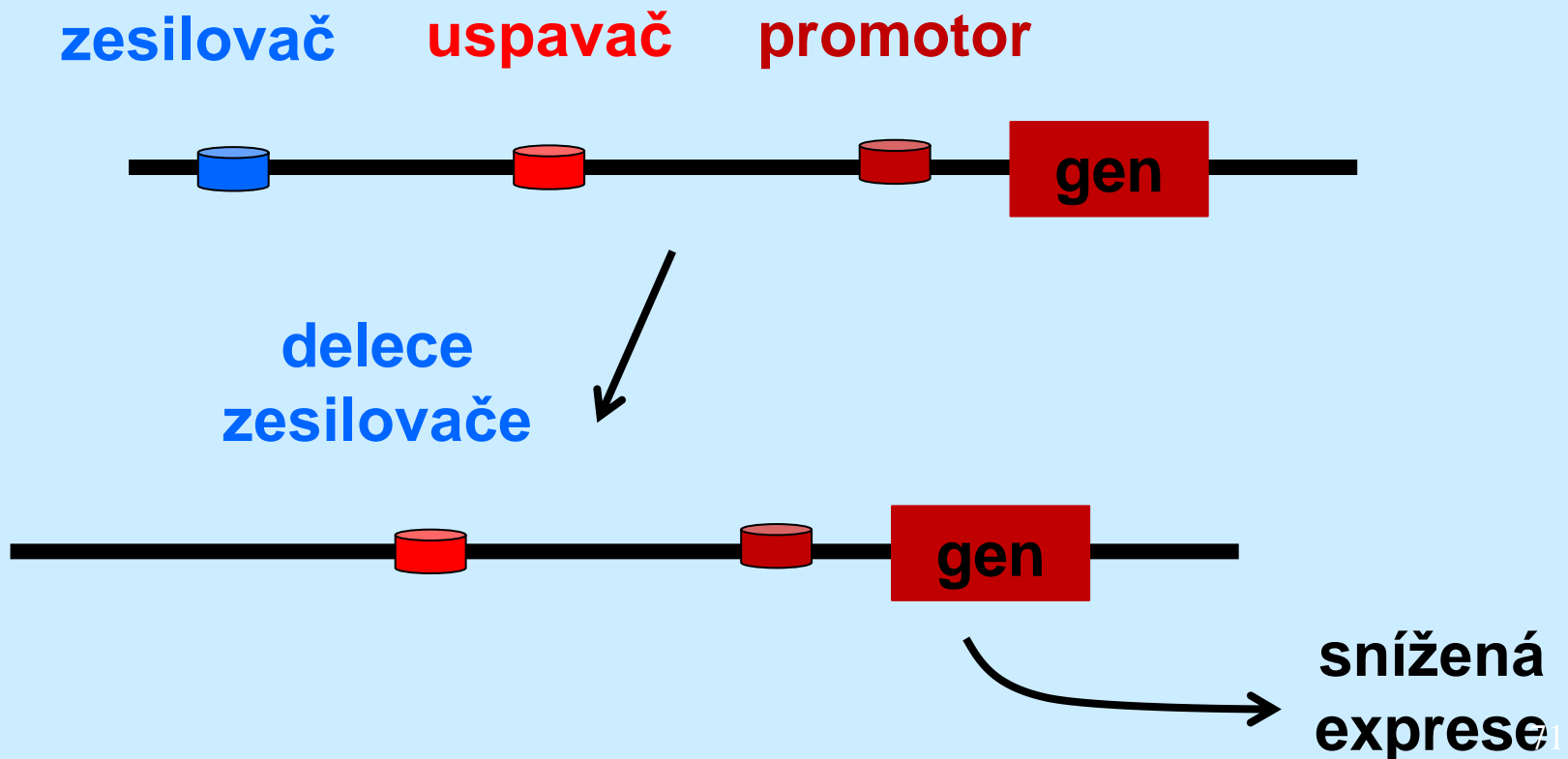
Blokace T = 108, 109 a 114 bp

... AAGTTCACATGAAG ...



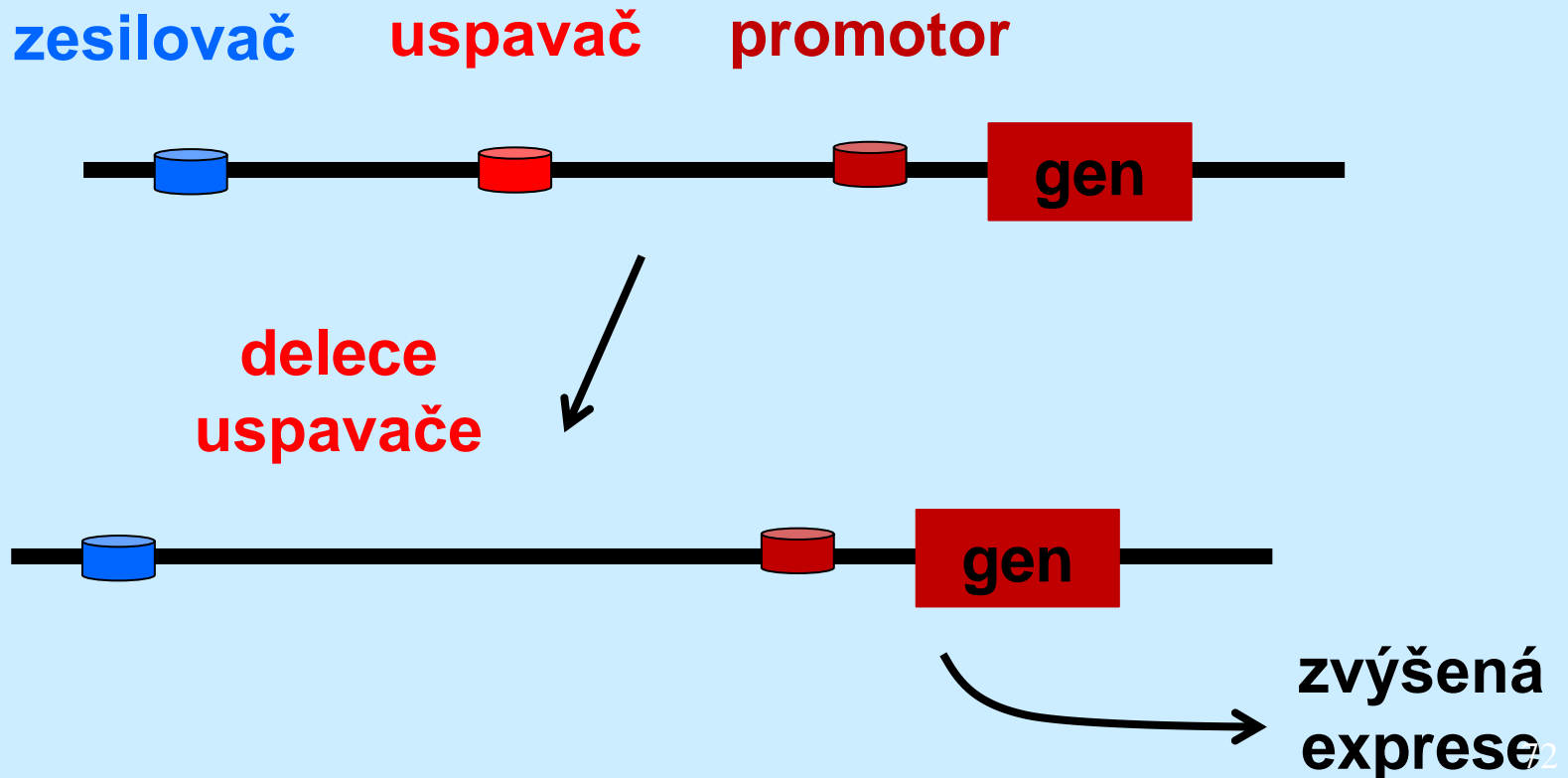
Deleční analýza

- 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* = β -galaktozidáza**

***cat* = chloramfenikolacetyltransferáza**

***uidA* = β – 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

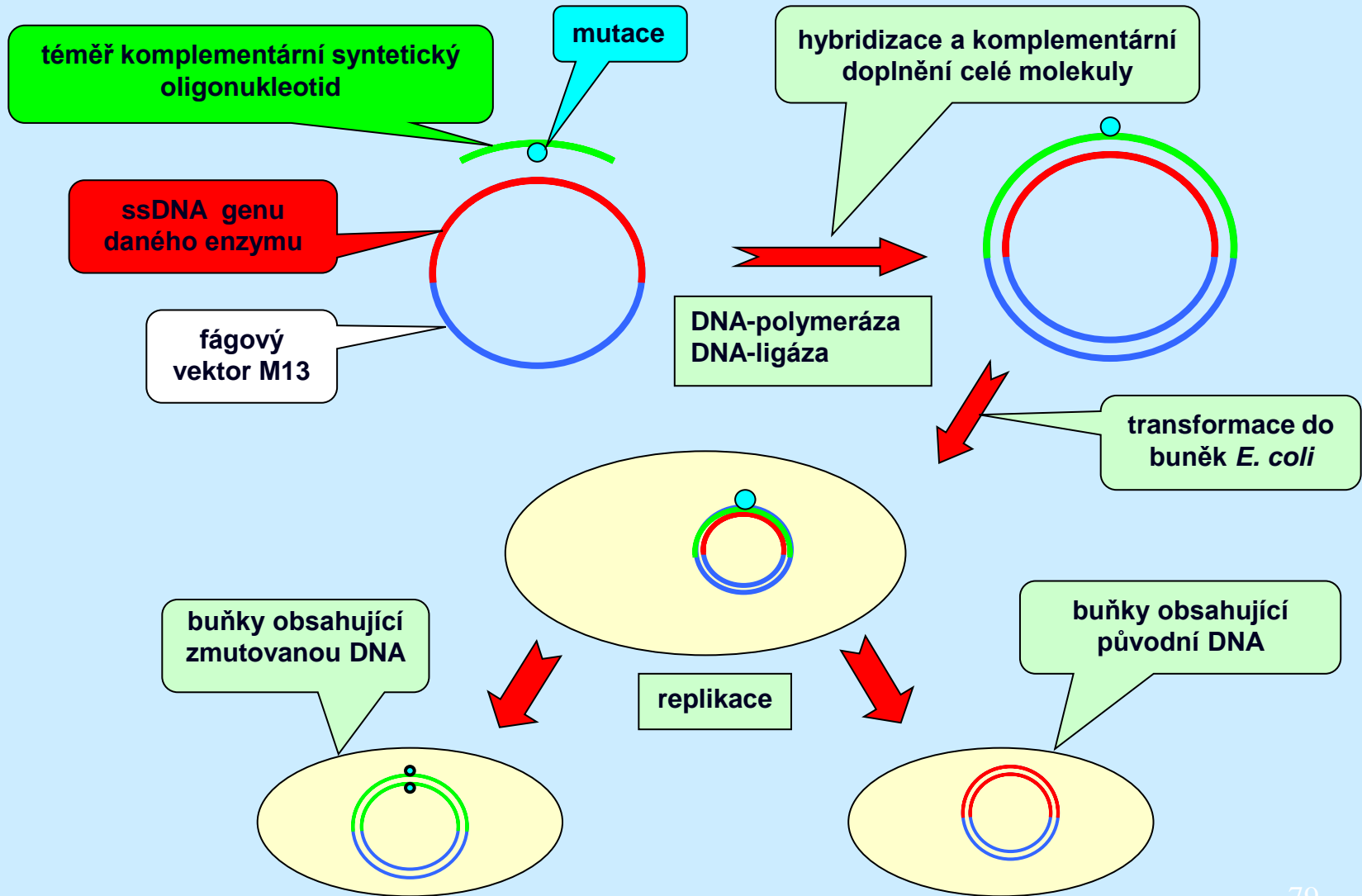
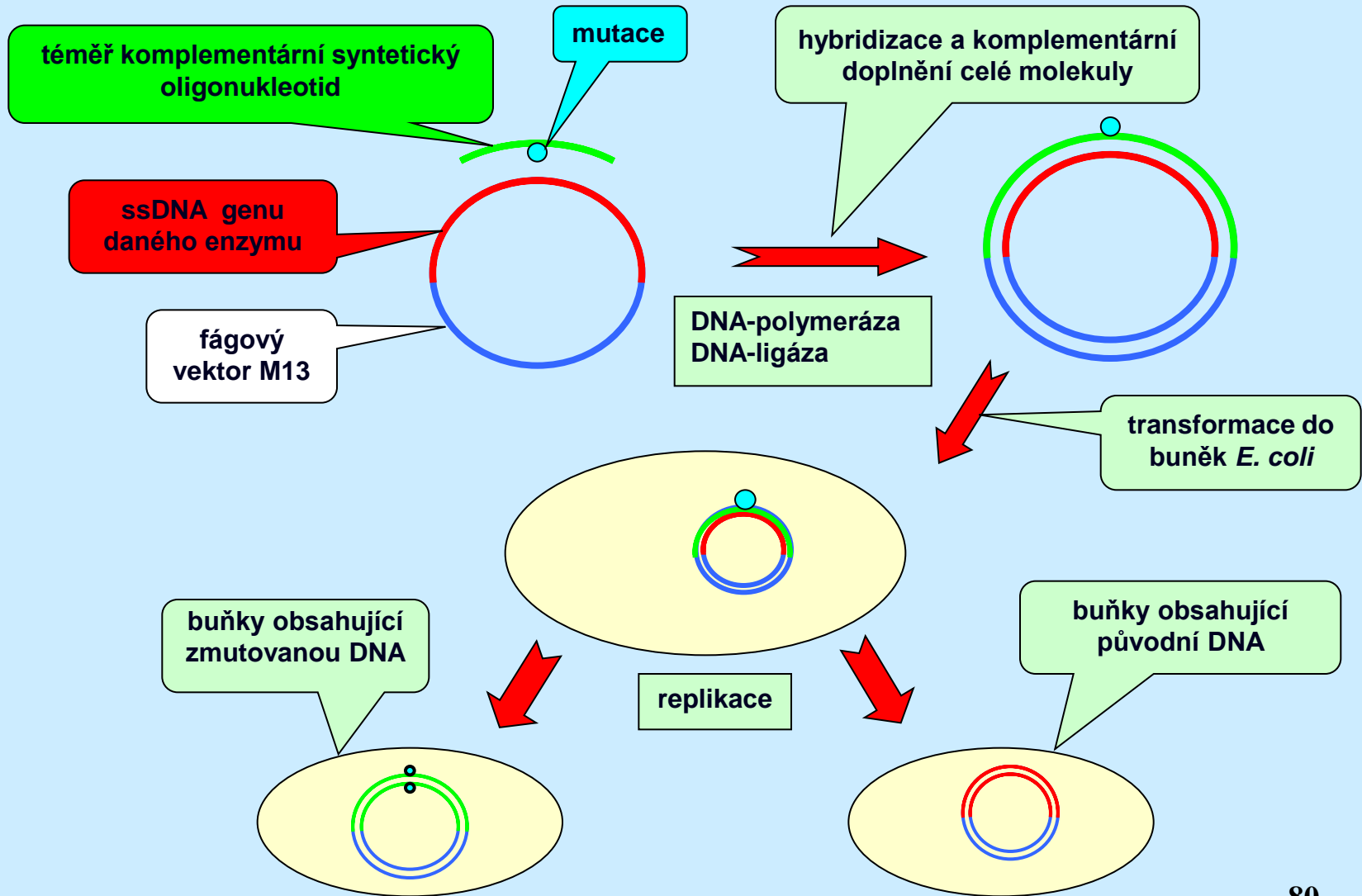


Schéma cílené mutagenese



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*

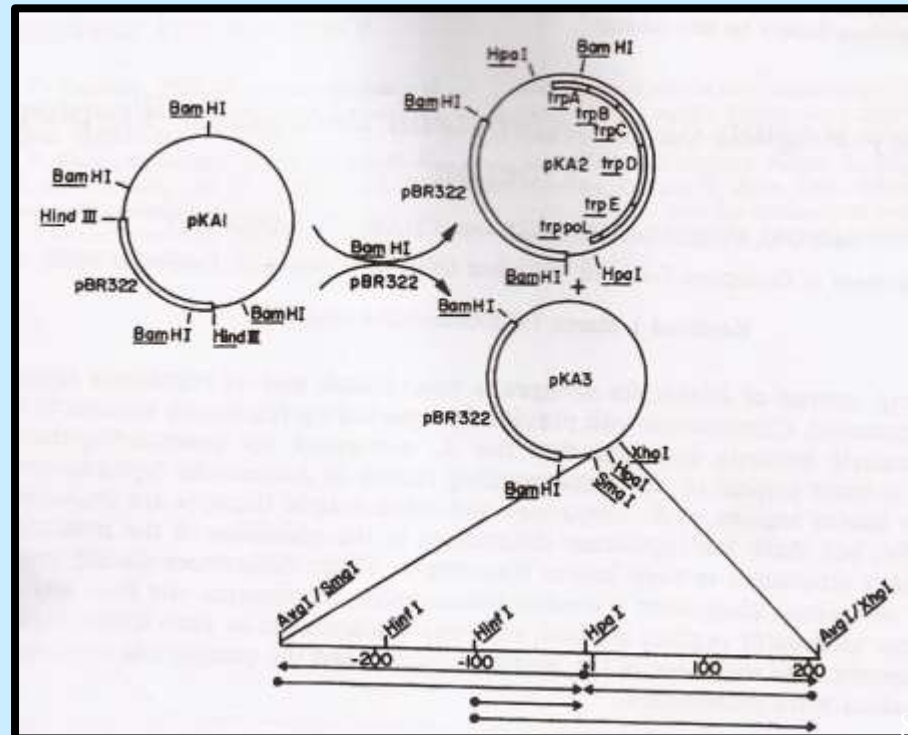
Zopakujme si regulaci tryptofanového operonu

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



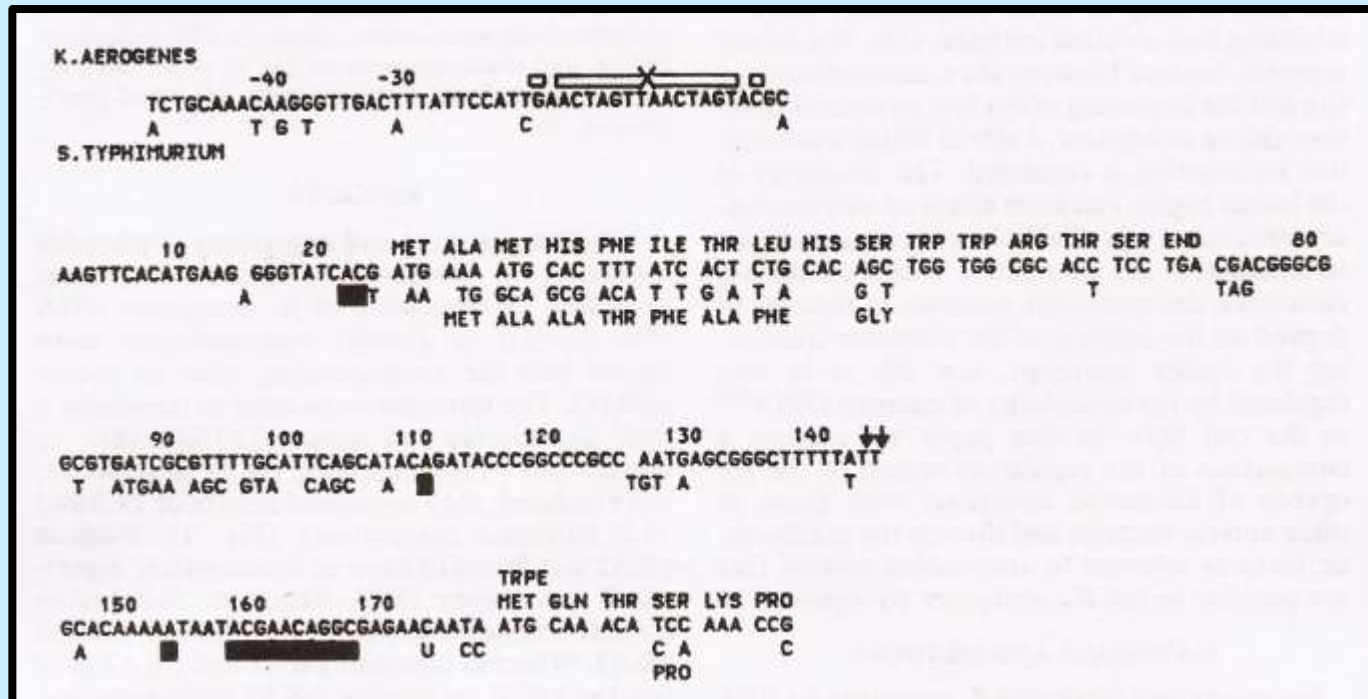
Získání fragmentů

- 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



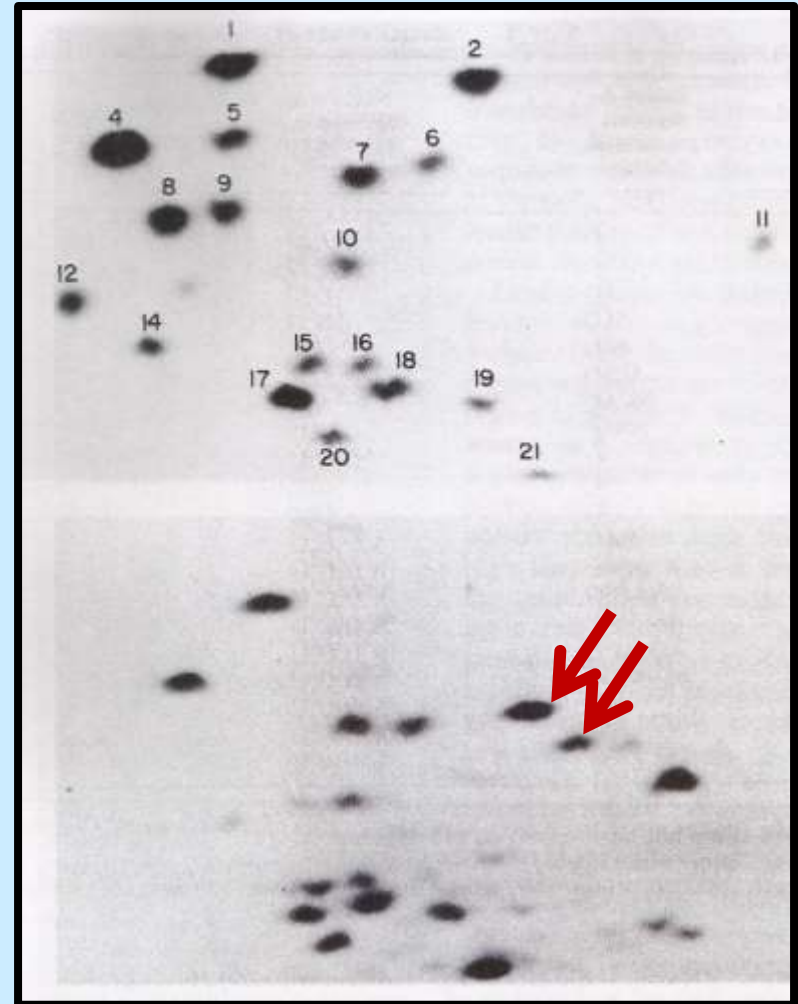
Analýza fragmentů

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



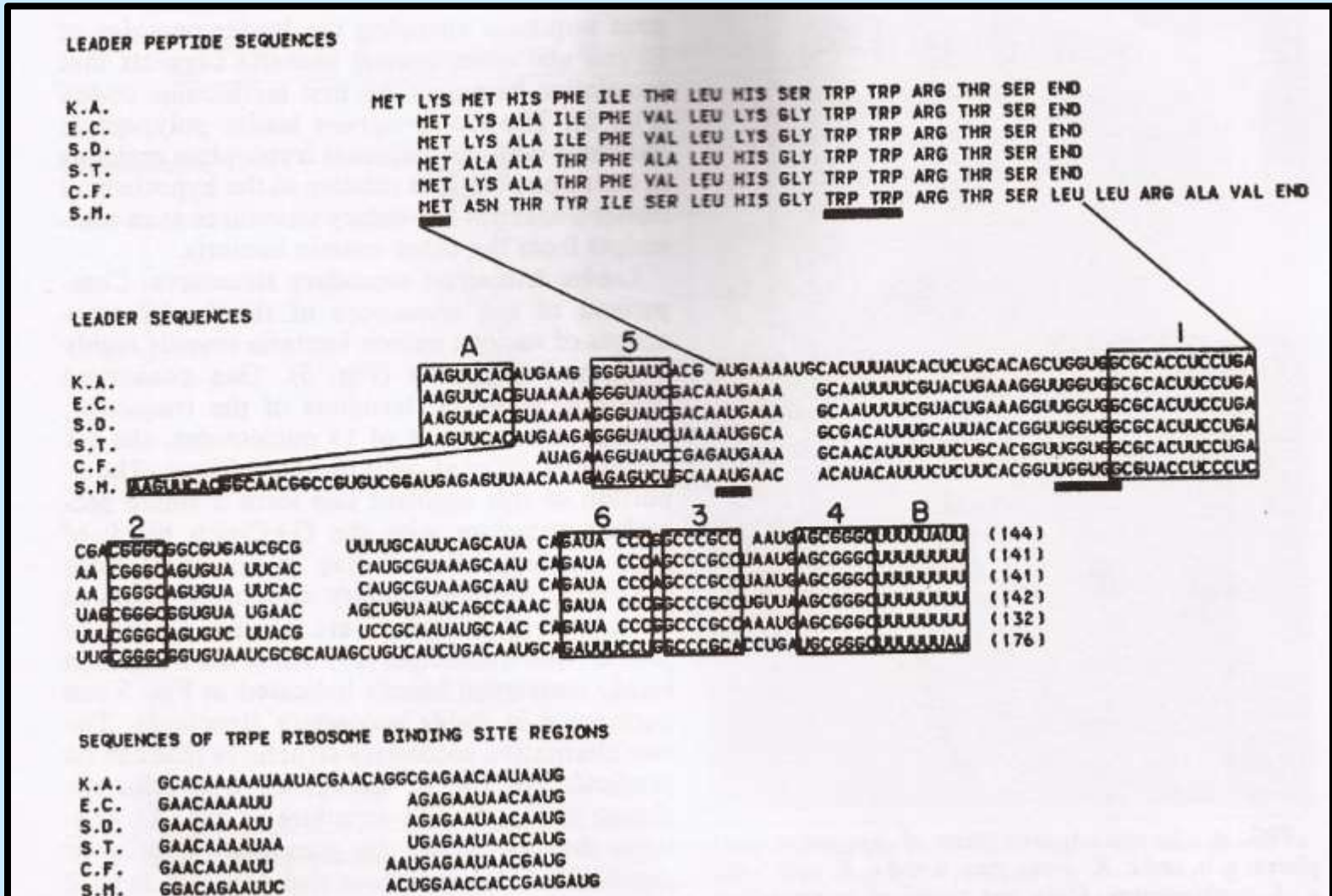
Transkripce in vitro

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

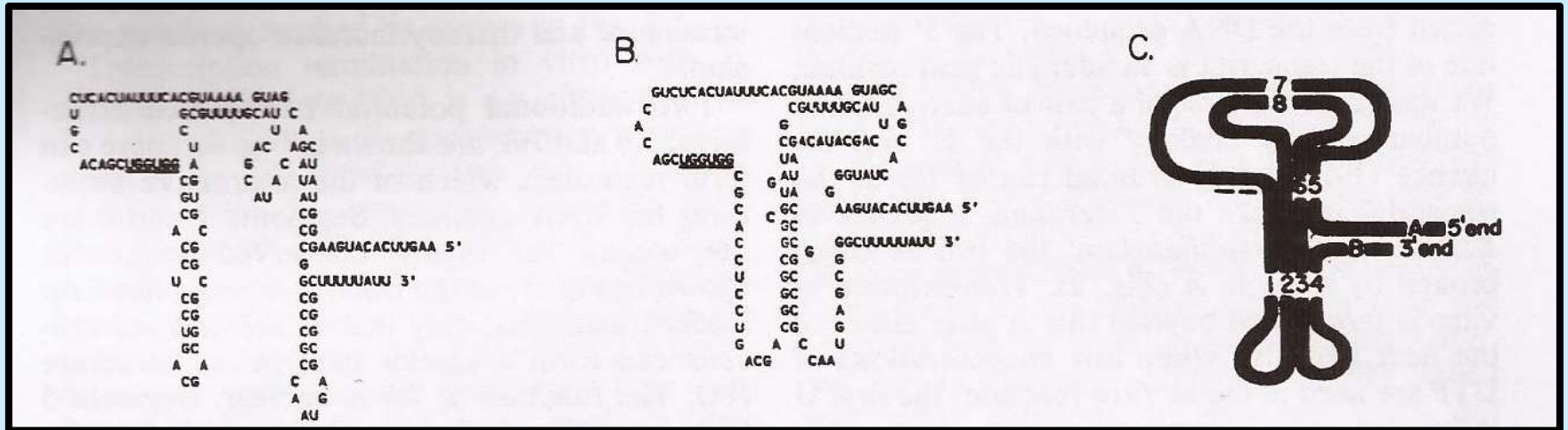


Dva oligonukleotidy na 3'-konci

Sekvenování vedoucí sekvence



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**