

RENČÍN

A NAPIŠEŠ ZA TŘEST DVĚSTĚKRÁT NEBUDU JIŽ VÍCE GENOVĚ INŽENÝROVAT!

Příprava rekombinantních molekul pro diagnostické účely

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2014

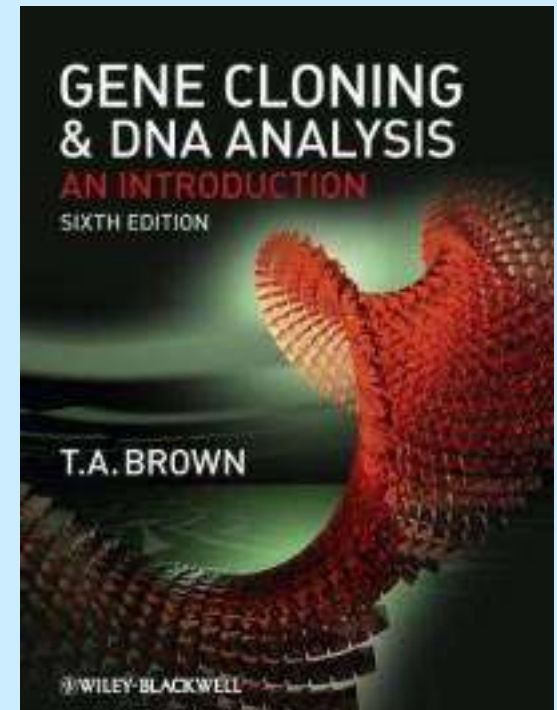
Obsah přednášky

- 1) Pojem rekombinantní DNA**
- 2) Historické milníky**
- 3) Proč je klonování genů důležité i v mikrobiologii?**
- 4) Jak se klonování genů provádí**
- 5) Metody detekce klonovaných genů**
- 6) Dot blot a Southern blot**
- 7) Identifikace na úrovni translace**



Doporučená literatura

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



**K procvičování nachystat tabulku
genetického kódu**

Co je to rekombinantní DNA?

Rekombinantní DNA je DNA sekvence připravená v laboratoři a obsahující části z různých zdrojů

Rekombinantní DNA se zpravidla nevyskytuje u organismů přirozeně

Rekombinantní DNA se využívá v mnoha aplikacích

Proč vůbec můžou existovat rekombinantní DNA?

- 1) Všechny organismy mají společný původ**
- 2) Genetický kód je univerzální napříč živými systémy**
- 3) Transkripční a translační aparáty jsou podobné**

Proto můžeme jednotlivé části DNA mezi sebou zaměňovat

Několik historických milníků I

1865 - J.G. Mendel

- **pravidla vysvětlující dědičnost**

1900 - DeVries, Correns a Tschermak

- **objevili nezávisle a formulovali Mendelovy zákony dědičnosti**

1910 – Thomas Hunt Morgan

- **geny jsou umístěny na chromozómech - *Drosophilla melanogaster***

Několik historických milníků II

1922 – Morgan a kol.

- **technika mapování genů – pozice 2 000 genů na 4 chromozómech *Drosophilla melanogaster***

1944 – Avery, MacLeod, MacCarty

- **genetickým materiálem je DNA**

1953 – Watson a Crick

- **popsali strukturu DNA a vysvětlili její základní biologické funkce**

1966 – Nirenberg, Khorana, Ochoa

- **popsali genetický kód**

Několik historických milníků III

1971-1973

- **Vznikají metodiky rekombinantní technologie**

1973

- **V bakteriálních buňkách byl naklonován první živočišný gen z DNA žáby *Xenopus laevis***

1977

- **Byl naklonován gen pro první lidský protein do bakterií - rekombinantní inzulín, na trhu v roce 1982**

Několik historických milníků IV

1996

- byl sekvenován kompletní genom *Saccharomyces cerevisiae*
- byla sekvenována první archaebakterie *Metanococcus jannaschi*

1997

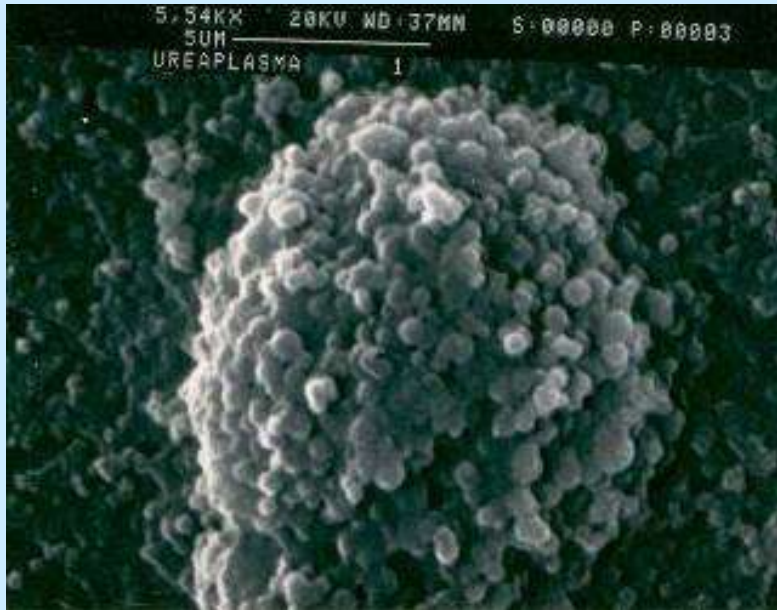
- byl sekvenován kompletní genom *Escherichia coli* (4,6 x 10⁶ bp, 4 000 genů)

2010

- byl vytvořen první syntetický organismus

Vytvoření umělého života

Synteticky a genovým inženýrstvím připraven
genom *Mycoplasma genitalium*



- **kolem 600 000 nukleotidů**
- **517 genů**
- **podpisy**

(<http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=3244>)

Základní aplikace rekombinantní DNA

- 1) Identifikace genů**
- 2) Sledování funkce genů**
- 3) Studium regulace genové exprese**

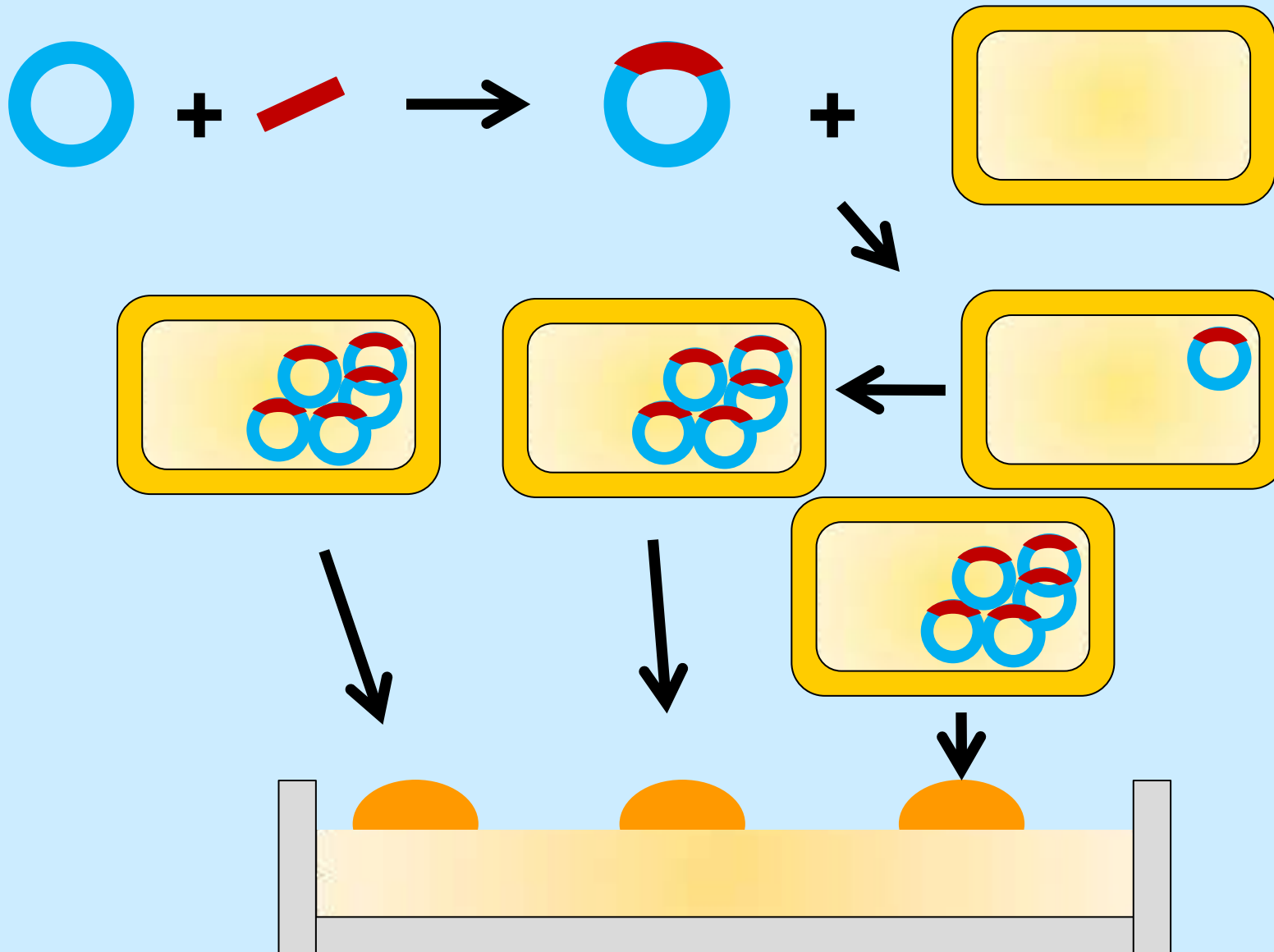
Rekombinantní DNA vzniká klonováním

- 1) DNA fragment je vložen do vektoru**
- 2) Vektor s fragmentem (rekombinantní DNA) je transformován do hostitele**
- 3) V hostiteli se rekombinantní DNA namnoží**
- 4) Pokud se hostitel rozmnožuje, množí se i rekombinantní DNA**
- 5) Po celé řadě množení vzniká klon**

- 1) Každá buňka klonu obsahuje jednu nebo více kopií rekombinantní molekuly**
- 2) Gen nesený rekombinantní molekulou je tzv. klonovaný**

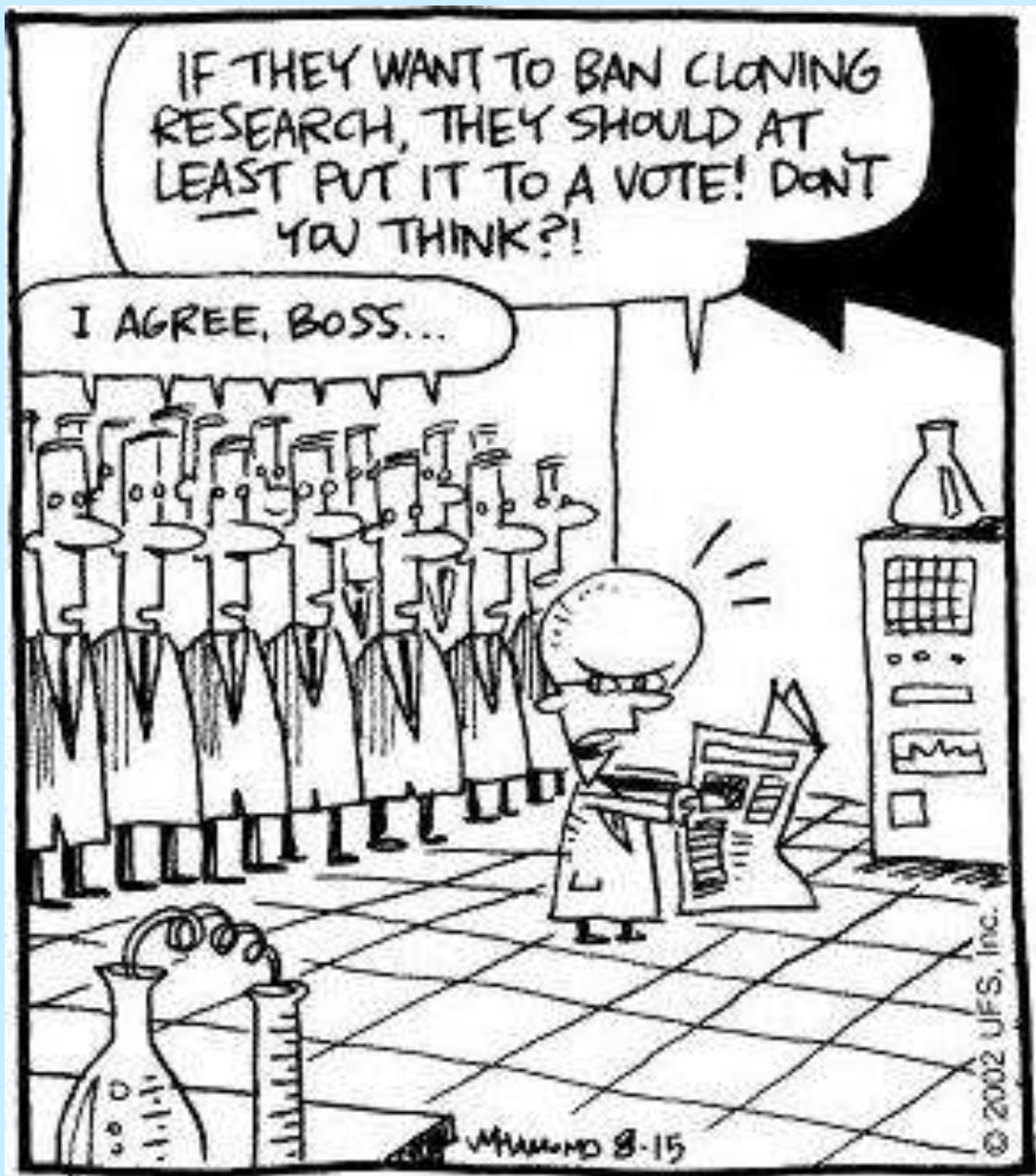


Základní schéma klonování



IF THEY WANT TO BAN CLONING RESEARCH, THEY SHOULD AT LEAST PUT IT TO A VOTE! DON'T YOU THINK?!

I AGREE, BOSS...



© 2002 UFS, Inc.

Co je potřeba pro klonování genů

- **vlastní gen – fragment DNA**
 - **vektor – plasmid, fág, kosmid**
 - **hostitel – příjemce rekombinantní DNA**
-
- **inzerť = gen začleněný do vektoru**
 - **rekombinantní DNA = vektor s inzertem**

Důsledek klonování genů = transformace

Permanentní dědičná změna v genetickém materiálu buňky způsobená přijetím a začleněním cizí genetické informace

- **schopnost replikace**
- **schopnost exprese**

Zdroje cizí genetické informace

živočišný

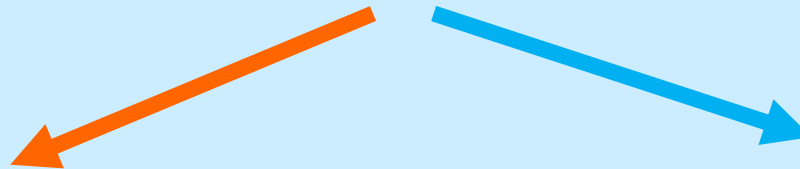
rostlinný

mikrobiální

syntetický

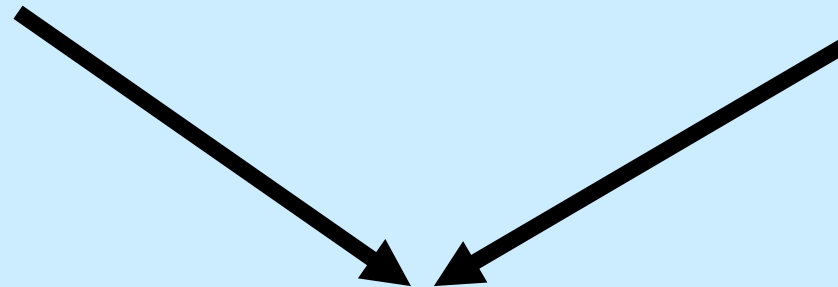
Jak začít klonovat?

Izolovat DNA v nativním stavu



Opracovat enzymy

Provést PCR



Naklonovat do vektoru

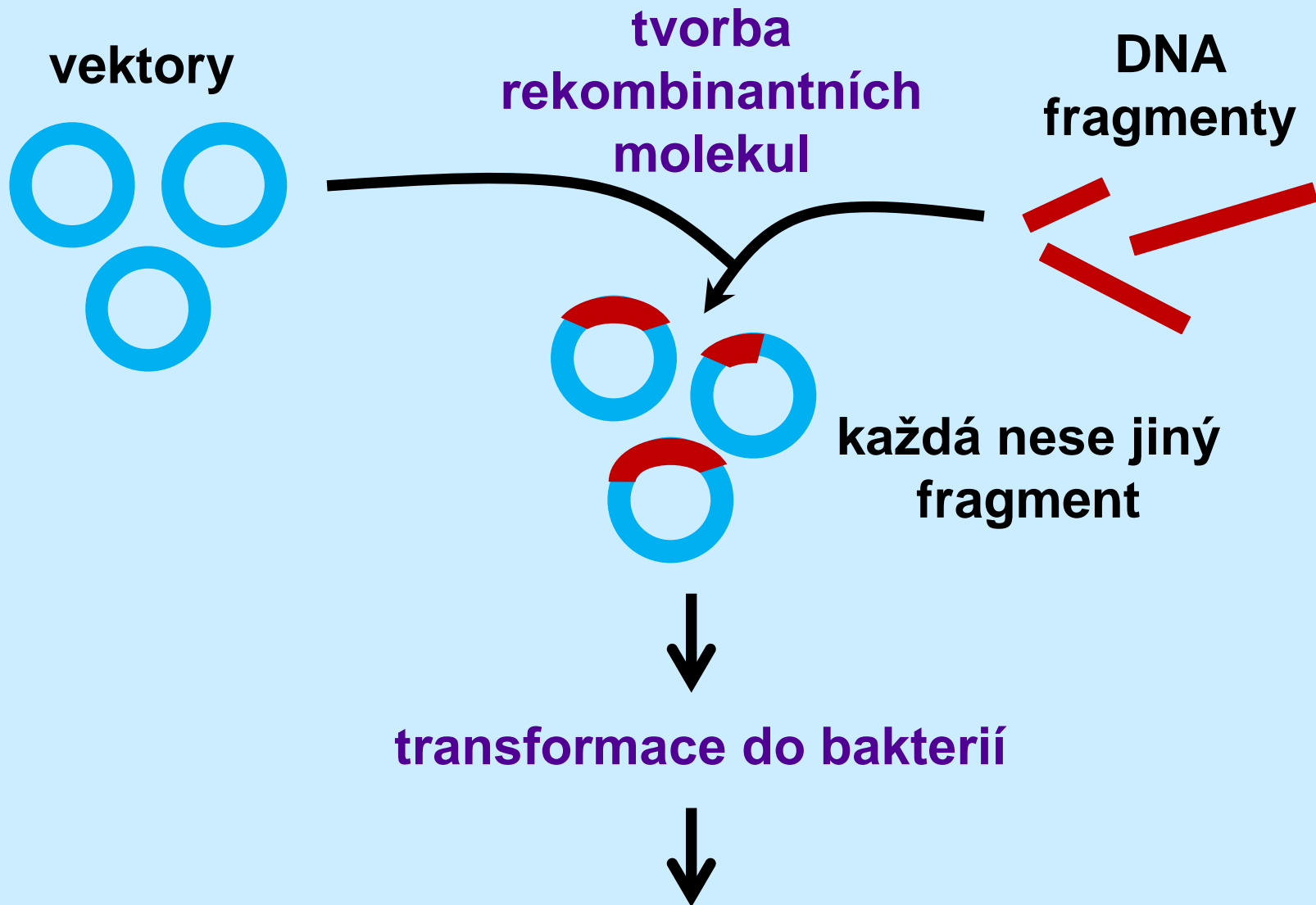
Proč je to klonování tak důležité?



**Umožňuje získat čistý vzorek
jednotlivého genu prostého genů
jiných**



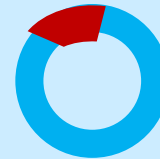
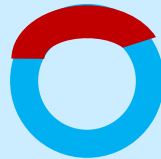
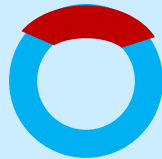
Jak klonováním získat jediný gen



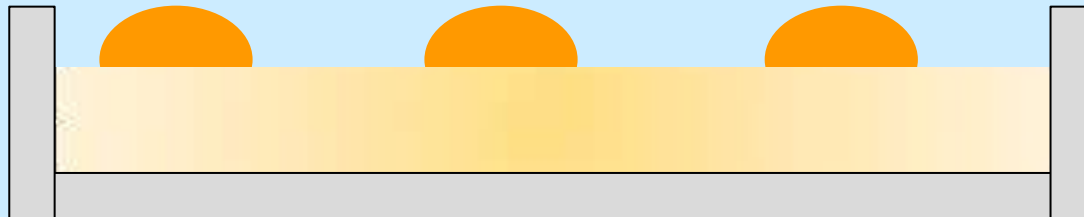
Jak klonováním získat jediný gen



Vysetí na selektivní médium

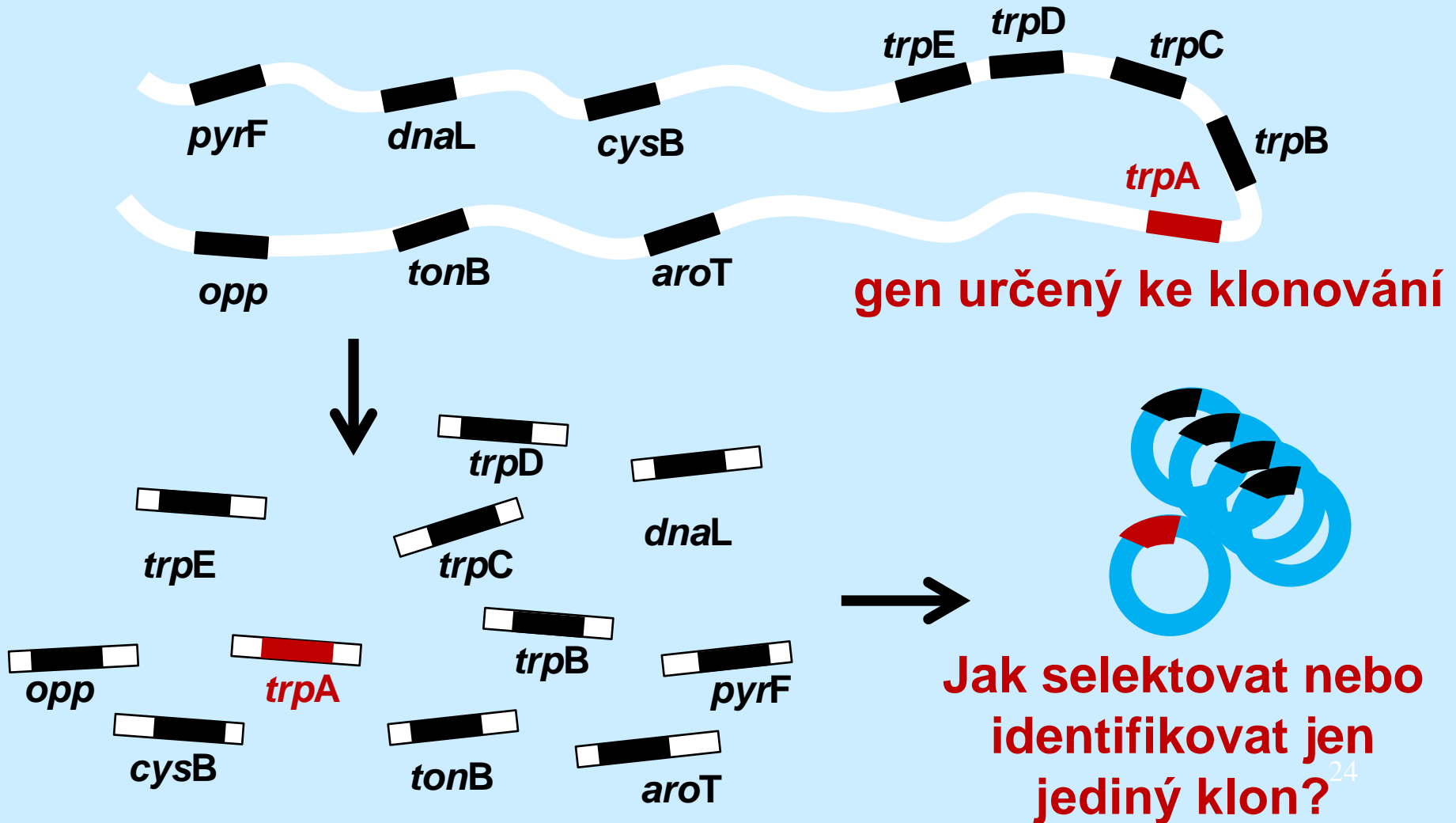


Každá kolonie (klon) obsahuje jen jednu molekulu rekombinantní DNA



A co dál?

Nejdůležitější je identifikovat specifický klon mezi spoustou dalších



Jak identifikovat ten správný klon

Přímá selekce

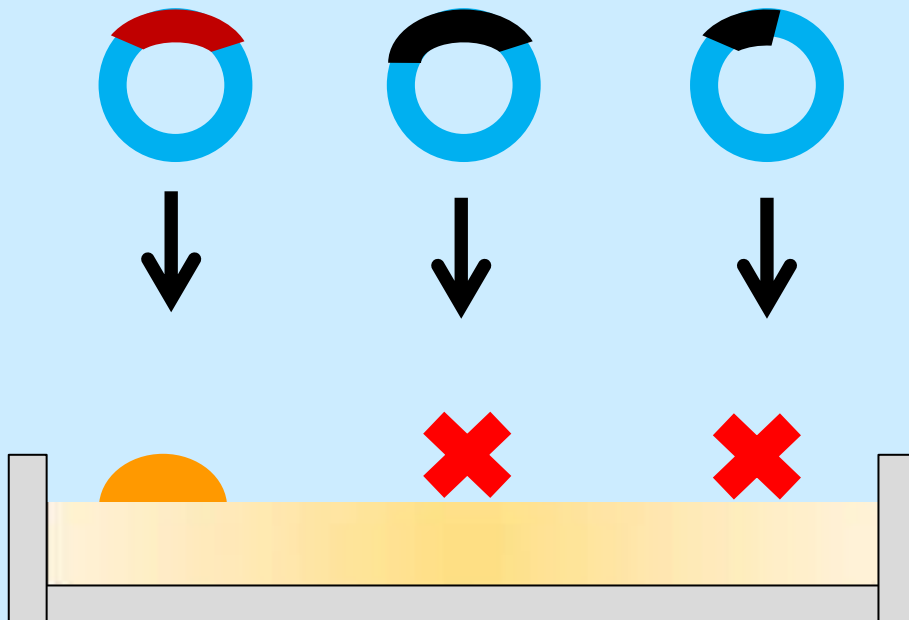
- **Provést klonování tak, aby vznikly jen klony nesoucí požadovaný gen**

Nepřímá selekce z genové knihovny

- **Nejprve vytvořit kolekci všech možných genů (genovou knihovnu)**
- **Analyzovat genovou knihovnu a vybrat ten správný gen**

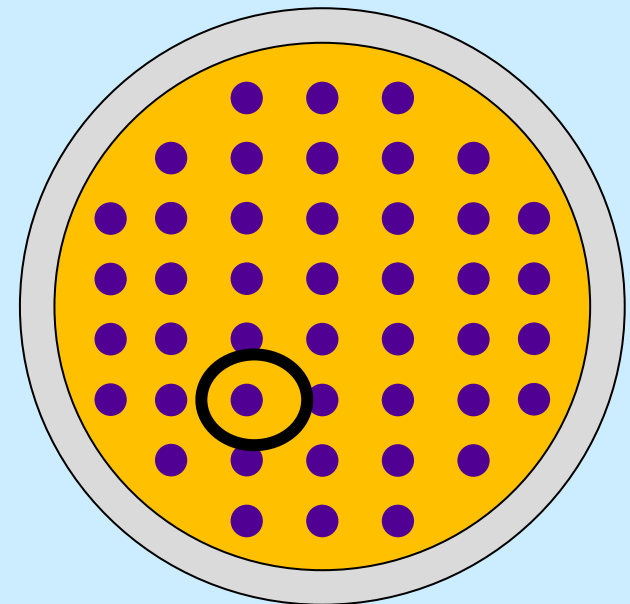
Porovnání přímé a nepřímé selekce

Přímá selekce



Nepřímá selekce

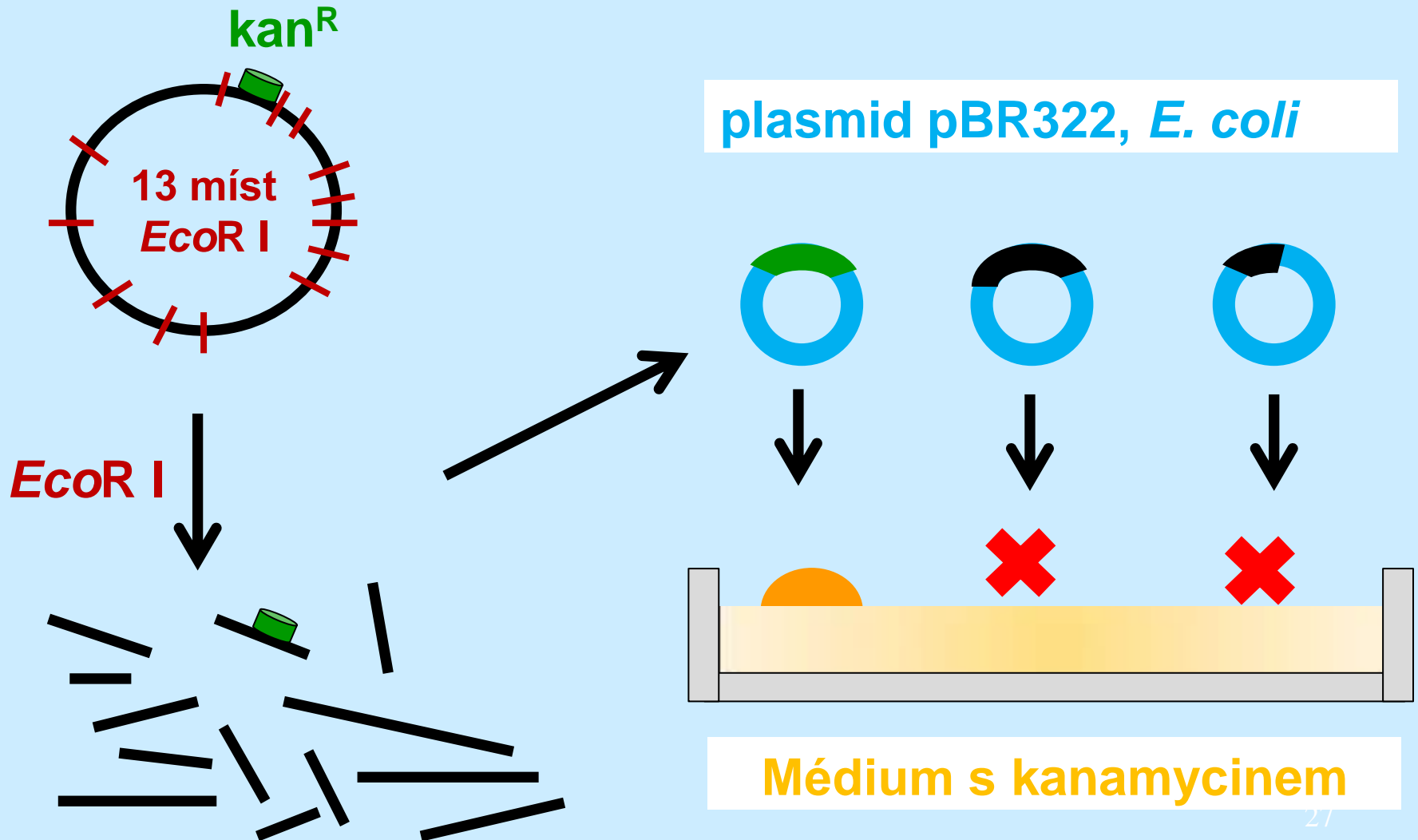
Knihovna klonů



Klon s hledaným genem

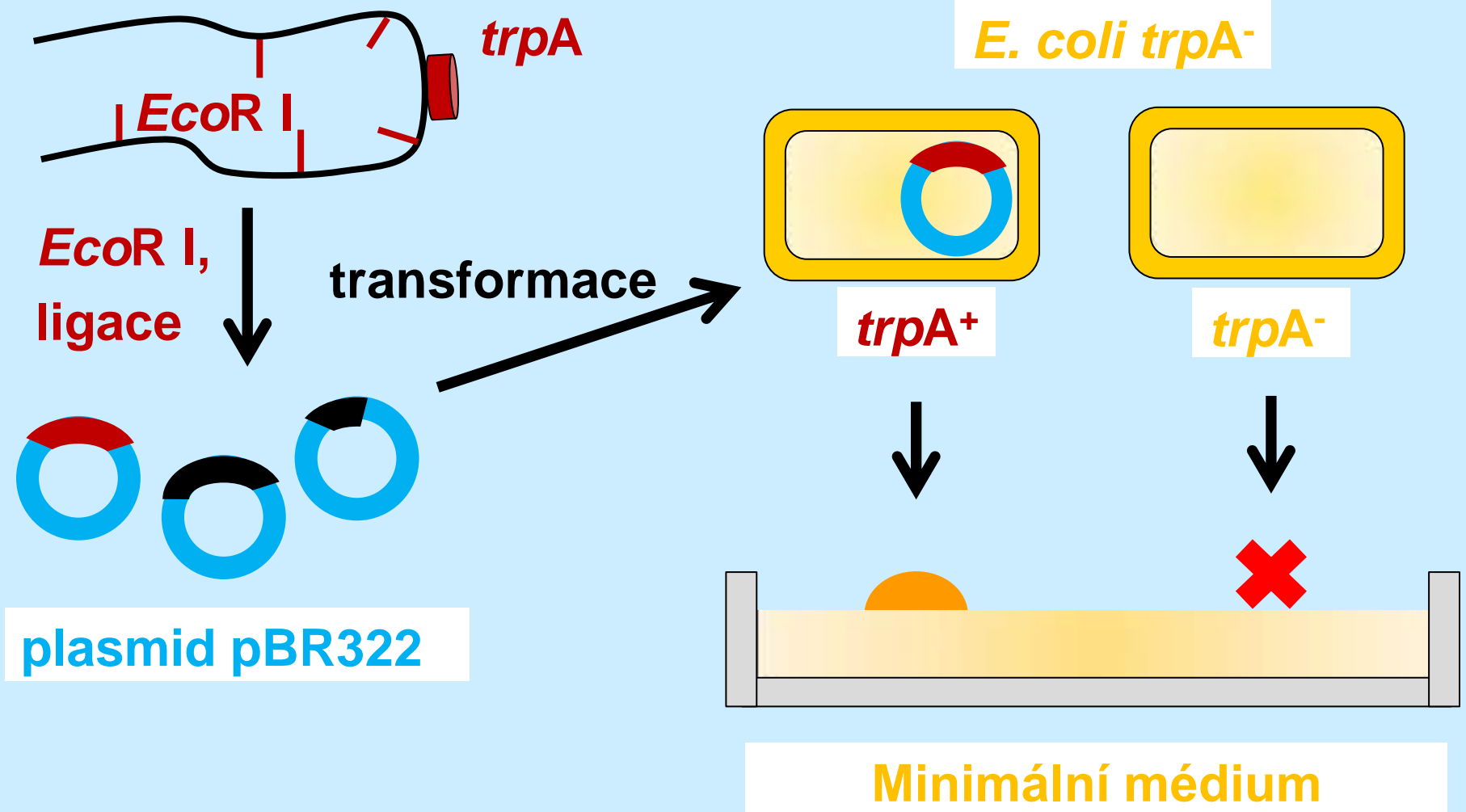
Přímá selekce – geny rezistence

Gen pro rezistenci ke kanamycinu z plasmidu



Přímá selekce – jiné geny

Gen *trpA* pro tryptofan syntázu z *E. coli*



Omezení a využití auxotrofie

Omezení

- Musí existovat mutantní kmeny pro hledané geny
- Musí být dostupné médium pro přežití wt kmenů

Využití

- Pro geny kódující enzymy biosyntetických drah
- Metoda není omezena na *E. coli* nebo bakterie
- Auxotrofní kvasinky nebo vláknité houby
- Auxotrofní kmeny *E. coli* využitelné i pro geny jiných organismů

Identifikace nepřímá

Genová knihovna

- Kolekce klonů o dostatečném počtu entit, která obsahuje teoreticky všechny geny daného organismu

Kolik klonů je třeba?

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-a/b)}$$

N = počet potřebných klonů, **p** = pravděpodobnost, že je přítomen kterýkoliv z genů, **a** = průměrná velikost klonovaných fragmentů, **b** = celková velikost genomu

Vypočítejte



Počty klonů potřebných pro následující organismy

Druh	Velikost genomu, bp	Počet klonů	
		Fragmenty 17 kbp	Fragmenty 35 kbp
<i>E. coli</i>	$4,6 \times 10^6$		
<i>S. cerevisiae</i>	$1,8 \times 10^7$		
Drosophila	$1,2 \times 10^8$	21 500	10 000
Člověk	$3,0 \times 10^9$	564 000	274 000

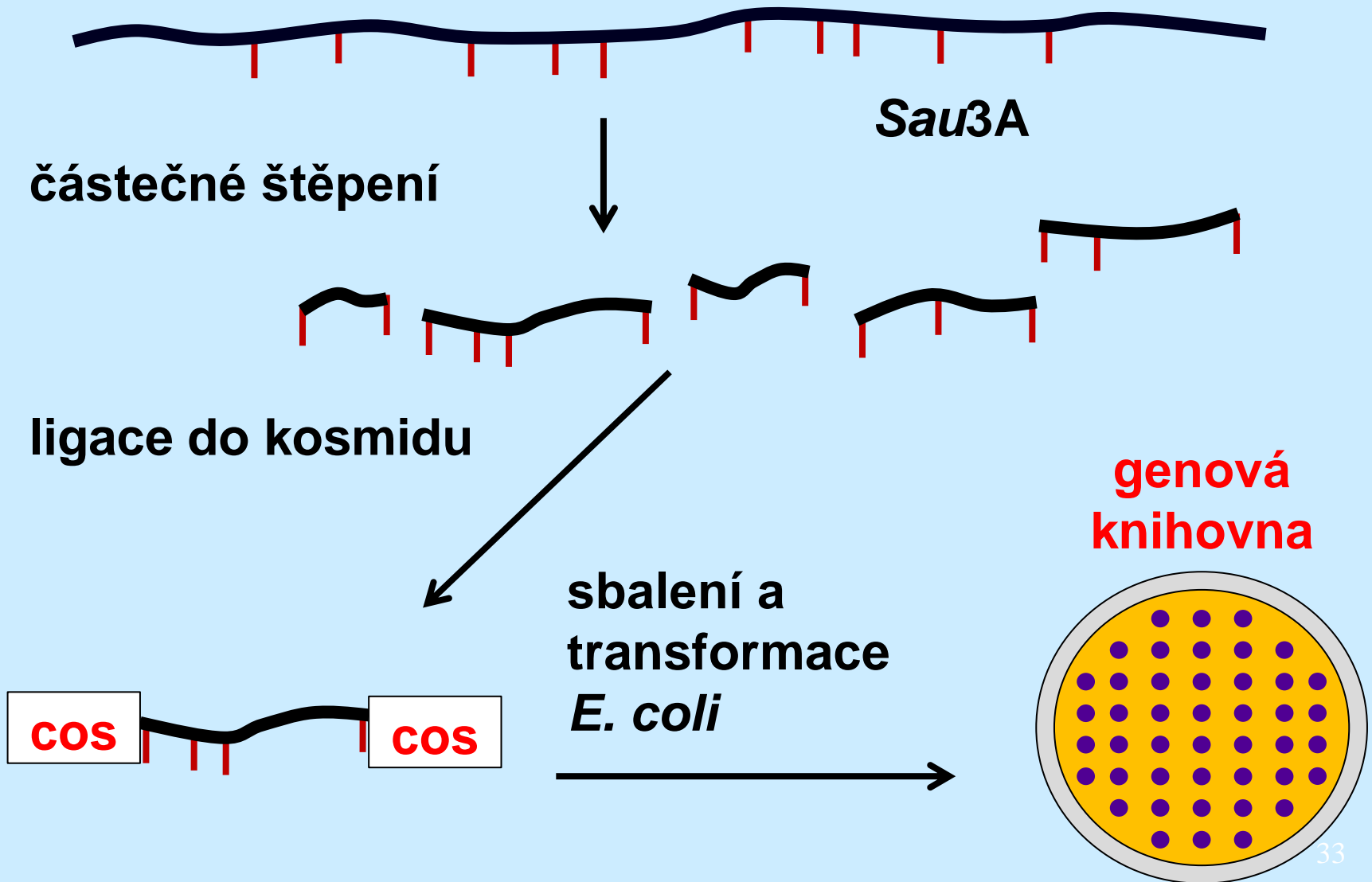
Vypočítejte



Počty klonů potřebných pro následující organismy

Druh	Velikost genomu, bp	Počet klonů	
		Fragmenty 17 kbp	Fragmenty 35 kbp
<i>E. coli</i>	$4,6 \times 10^6$	820	410
<i>S. cerevisiae</i>	$1,8 \times 10^7$	3 225	1 500
Drosophila	$1,2 \times 10^8$	21 500	10 000
Člověk	$3,0 \times 10^9$	564 000	274 000

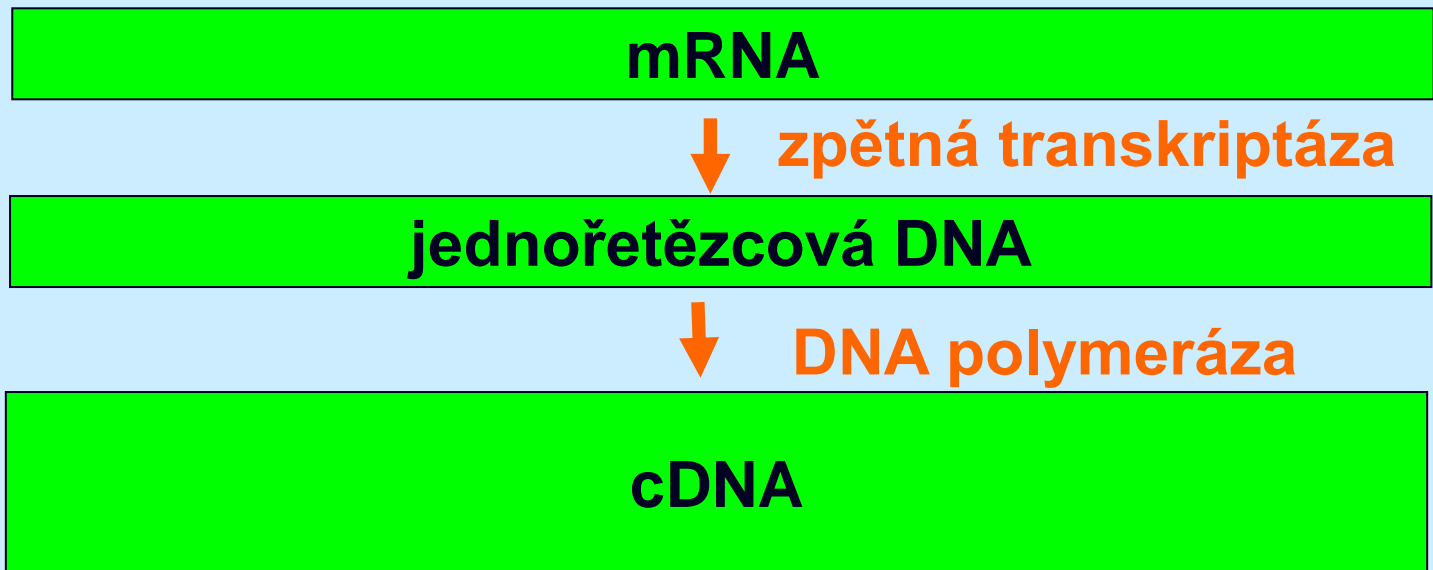
Příprava genové knihovny



Příprava knihovny cDNA

Je to knihovna transkriptů mRNA

- **Celková mRNA je přepsána zpětnou transkriptázou do cDNA**

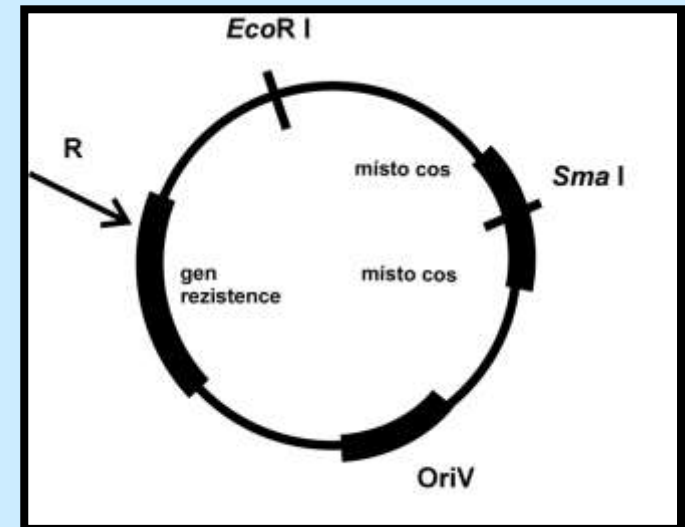
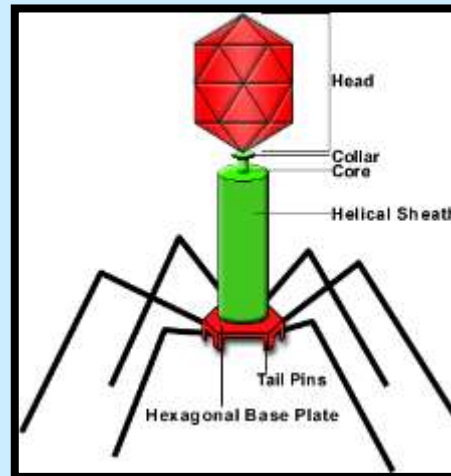
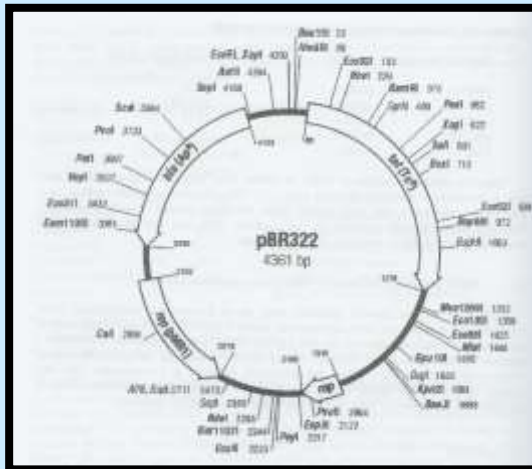


- **Vzniklé cDNA jsou klonovány stejně jako genomová dsDNA**

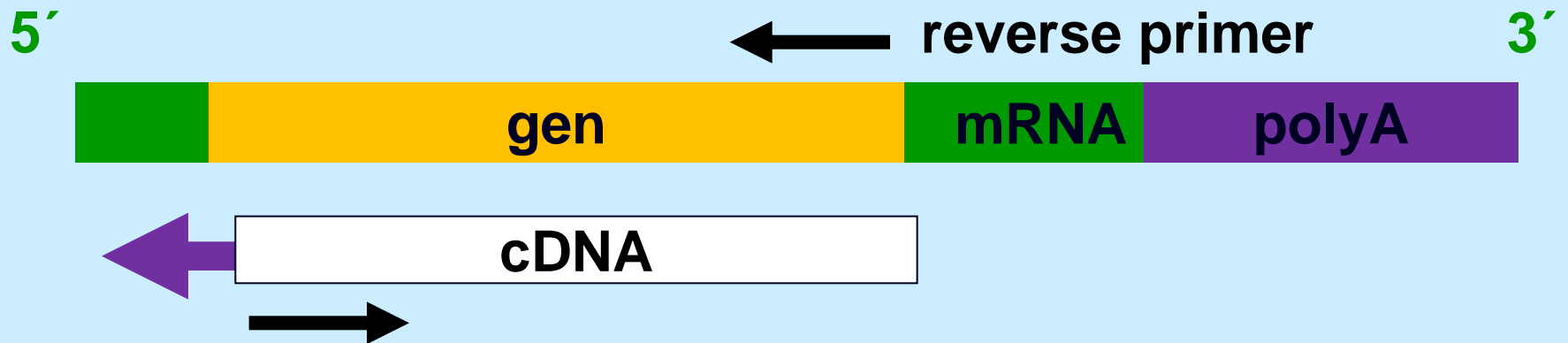
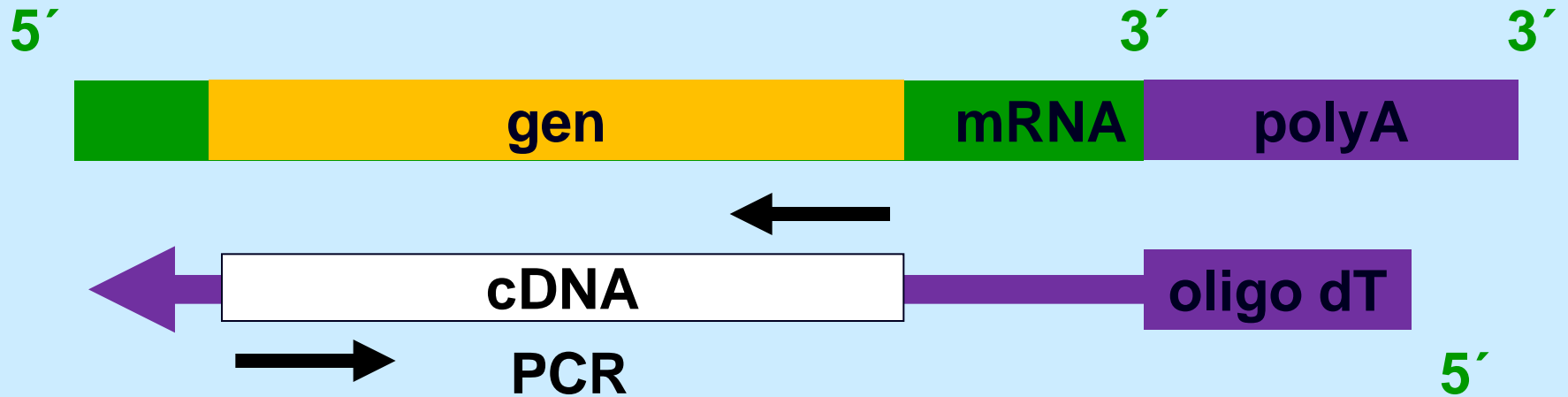
Klonovat jen do kosmidů?

Další typy vektorů

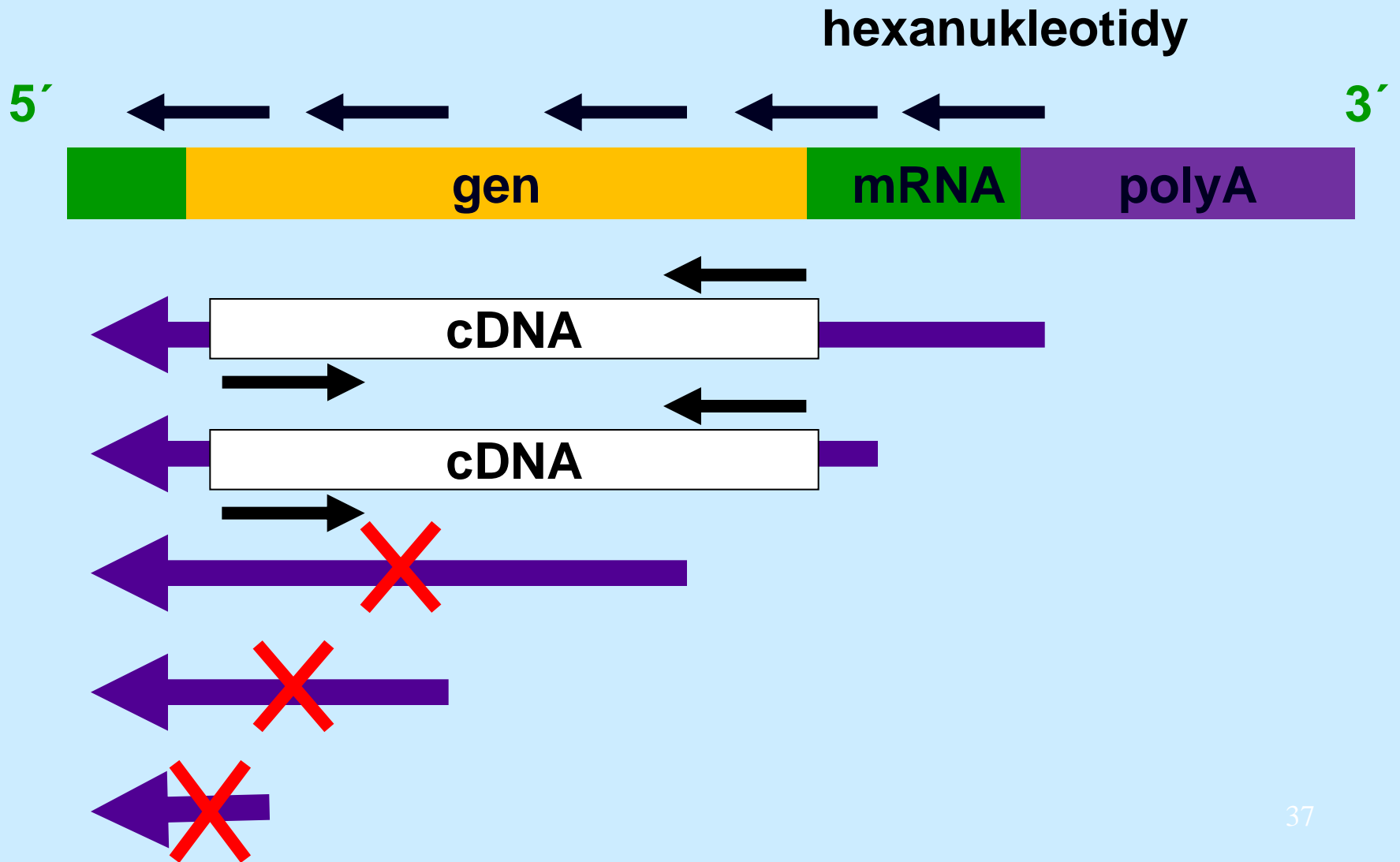
- Plasmidy
- Bakteriofágy
- Kosmidy
- Umělé chromozómy



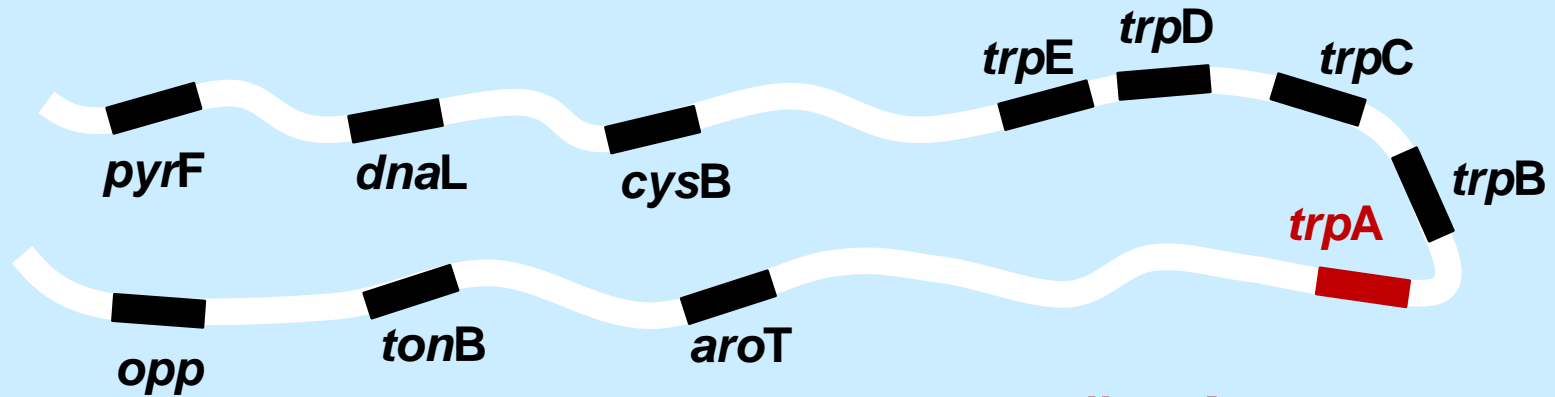
Jak získat cDNA z mRNA - I



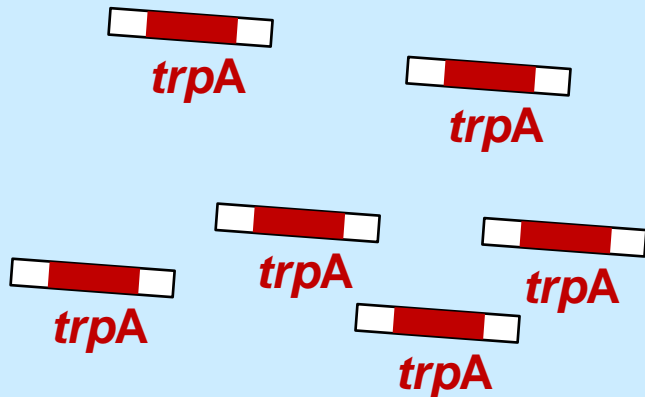
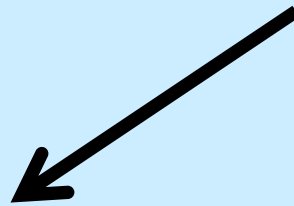
Jak získat cDNA z mRNA - II



Purifikaci genu zajistí i PCR



gen určený ke klonování



několik miliard
specifického produktu

I gen získaný PCR je třeba klonovat

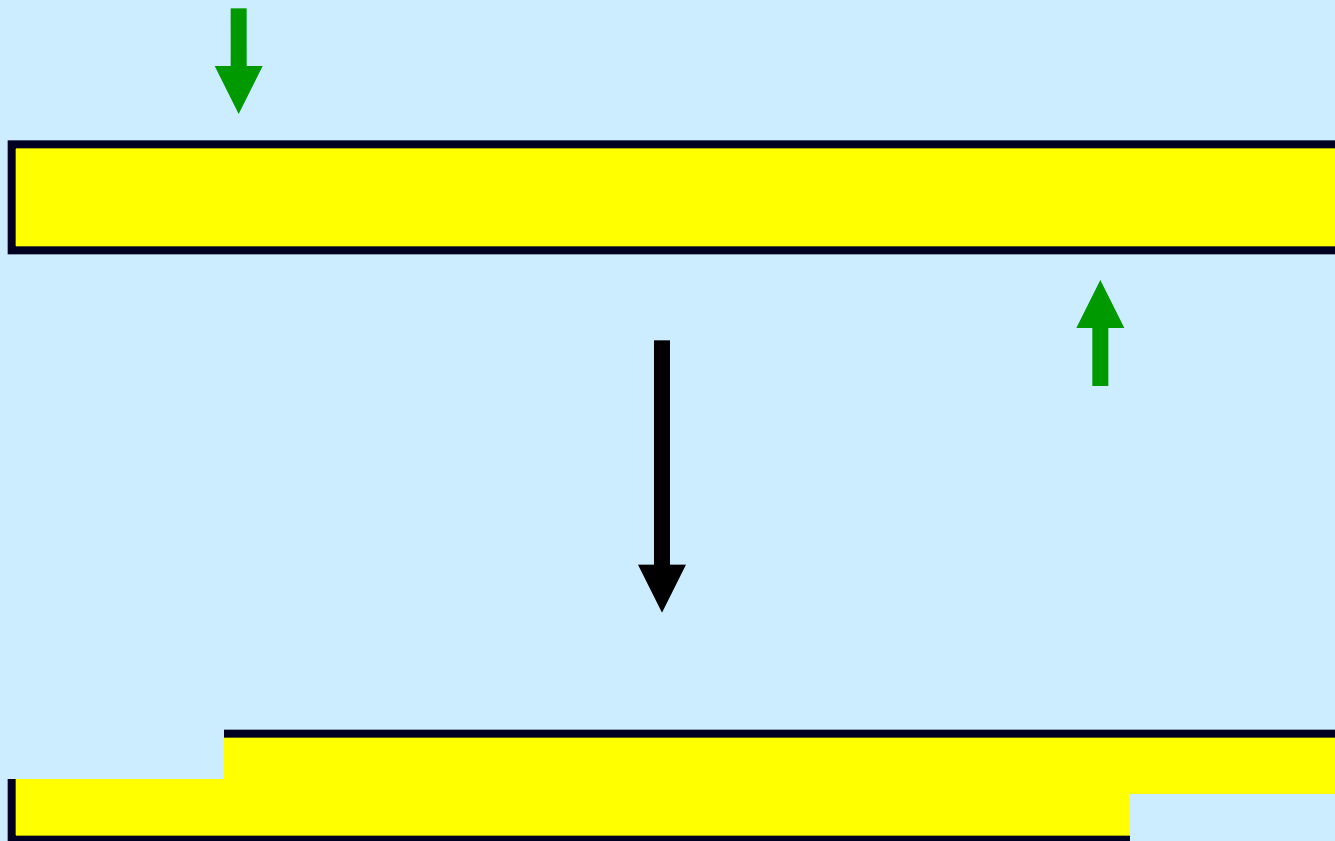
- **Pokud chceme sledovat jeho projev v buňce**
- **Pokud chceme prozkoumat mechanismy regulace exprese genu**

Techniky klonování PCR produktů jsou dnes běžné



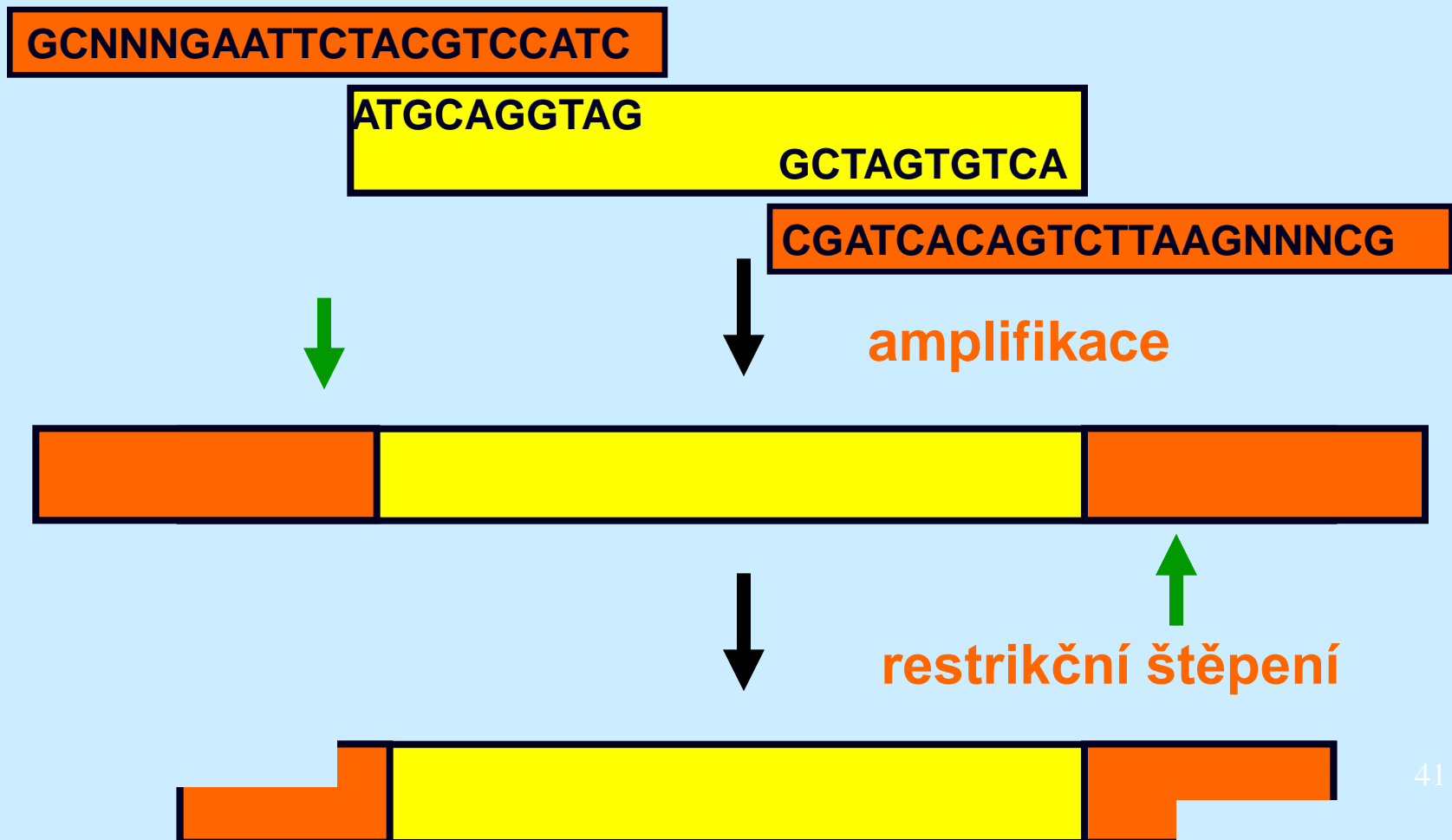
Klonování produktů PCR - I

1) restriční štěpení



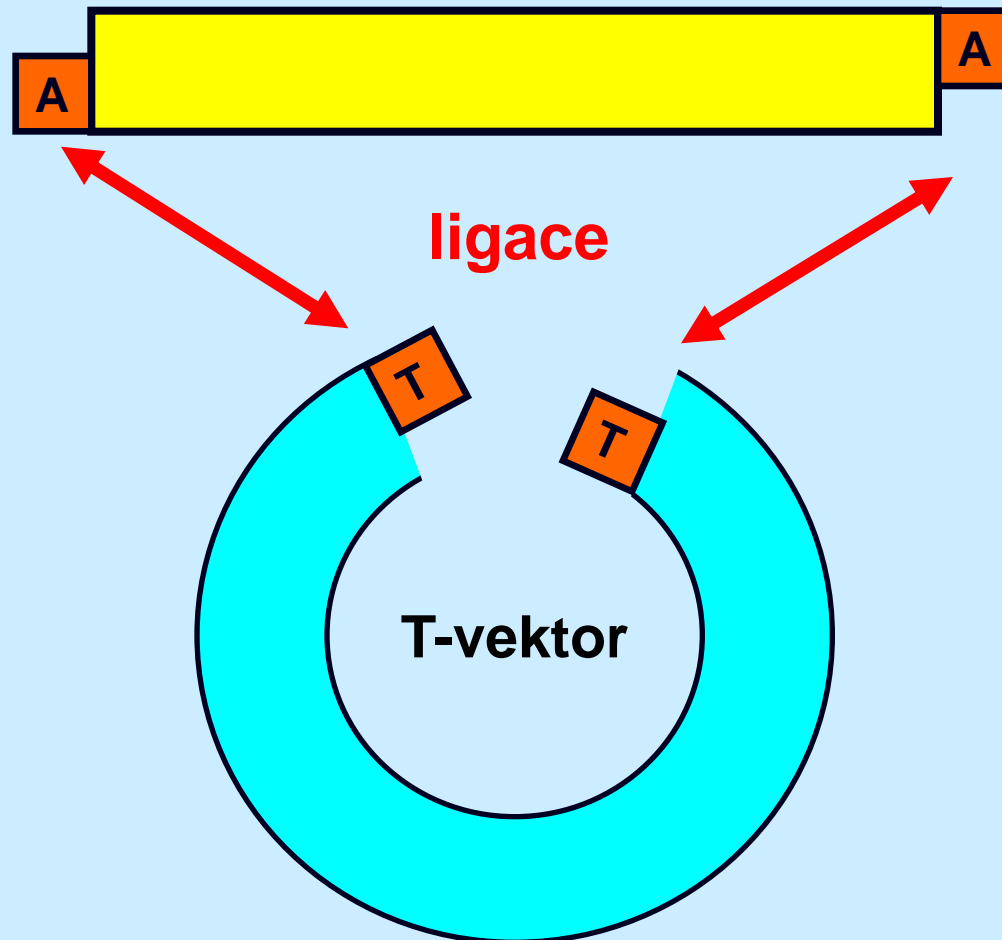
Klonování produktů PCR - II

2) připojení restričních míst a restriční štěpení



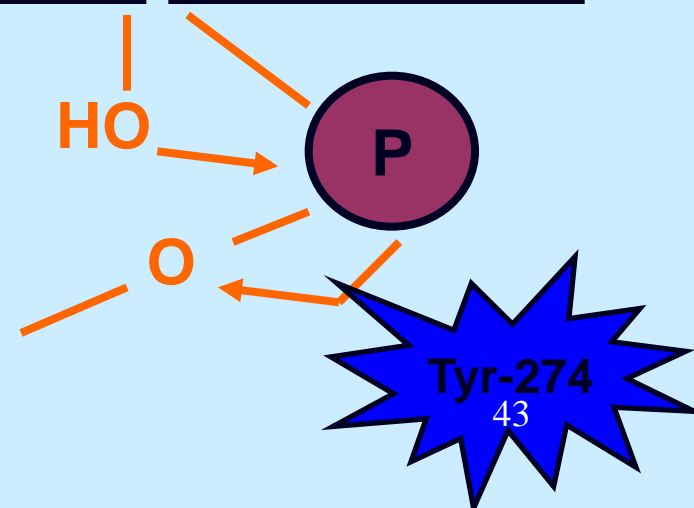
Klonování produktů PCR - III

3) TA-klonování



Klonování produktů PCR - IV

3) TOPO-klonování



Proč tedy klonování?

PCR má alespoň dvě omezení

- Musíme znát sekvenci genu, nelze tedy efektivně získat geny neznámé
- Řada genů je delších než je procesivita *Taq* polymeráz



Jak dlouhé DNA fragmenty lze amplifikovat?

- do 5 kbp relativně snadno
- do 40 kbp použitím specifických postupů



Domácí úkol



Nalezněte příklady bakteriálních genů dlouhých

- a) do 5 kbp
- b) do 40 kbp
- c) delších než 40 kbp

Zkuste totéž pro kvasinky

Kdo najde nejdelší mikrobiální gen?

Nezapomeňte, že složené geny mají introny!



Ještě dvě otázky

Lze obejít to, že neznáme přesnou sekvenci nového genu?



Můžeme se pokusit využít známou sekvenci téhož genu u příbuzného organismu

Lze obejít délku genu?



???

Metody identifikace klonů

Identifikace na bázi nukleových kyselin

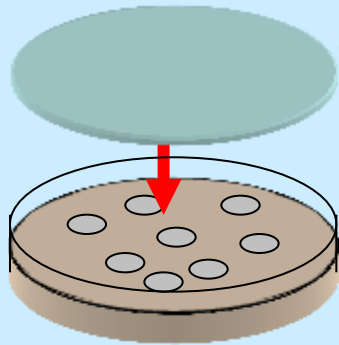
- **Hybridizace kolonií a plak – dot blot hybridizace**
- **Southern blotting**

Identifikace na úrovni translace

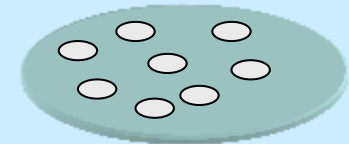
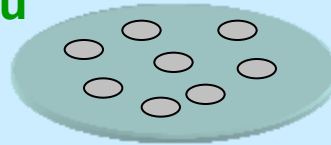
- **Využití protilátek**

Hybridizace kolonií

nylonová membrána



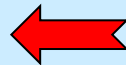
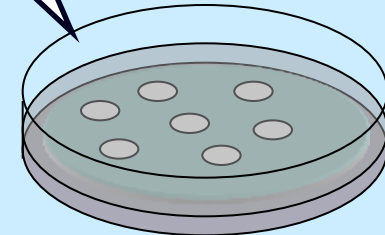
otisk kolonií na membránu



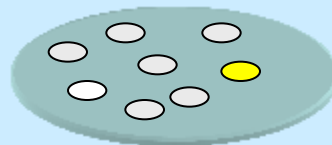
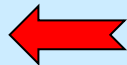
otisk chromozómové DNA

bakteriální kolonie (genomová banka)

denaturovaná značená cDNA



RTG film



expozice

inkubace přes noc, hybridizace

identifikace kolonie

Jak připravit sondu

Sondy radioaktivně značené

- **Nick translace**
- **Vyplnění jednořetězcových konců**
- **Nahodilé značení**
- **Zpravidla se využívá radioaktivní fosfor ^{32}P**

Sondy fluorescenčně značené

- **Značení biotinem**
- **Značení digoxigeninem**
- **Značení křenovou peroxidázou**
- **Citlivější, bezpečnější, dnes už používané častěji**

**Zopakujte si metody
radioaktivního i
neradioaktivního značení z
přednášky o hybridizaci**



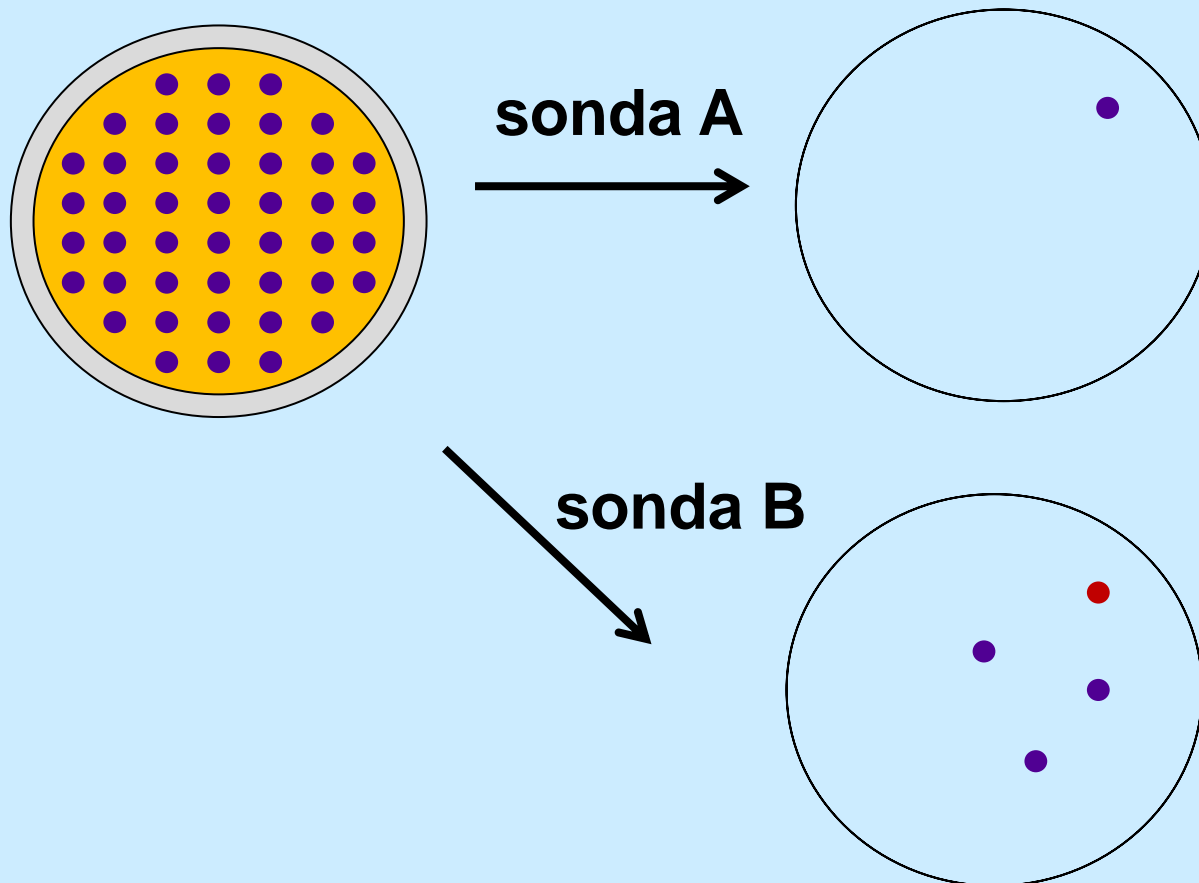
Některé aspekty práce s genomovou knihovnou

- **Selekce nejlepší sondy**
- **Příprava sondy s využitím produktu translace**
- **Identifikace příbuzných genů**

Selekce nejlepší sondy I

Některé sondy hybridizují lépe, některé méně

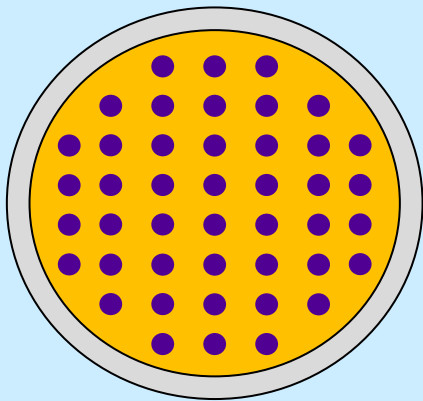
Knihovna klonů



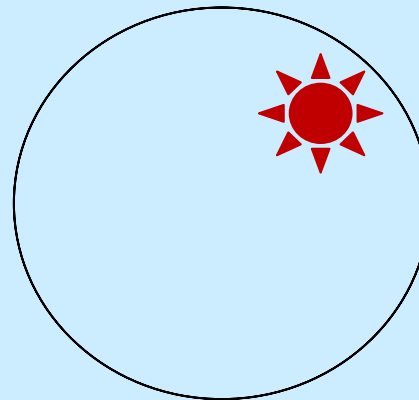
- 1) Nespecifická hybridizace?
- 2) Více kopií genu?

Selekce nejlepší sondy II

Knihovna klonů



sonda B*

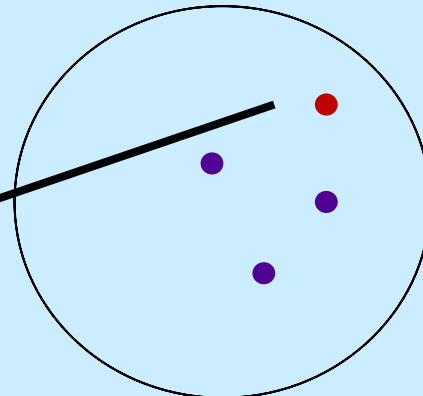


**Silná
zřetelná
hybridizace**

Příprava nové sondy B*



Izolace DNA



Příprava sondy s využitím produktu translace

- **Pokud známe sekvenci aminokyselin můžeme využít tabulku genetického kódu a stanovit kodóny**

AUG = Met

GUU = Val

- **Jenže genetický kód je degenerovaný!**

Které kodóny můžeme ze sekvence aminokyselin stanovit naprosto přesně?



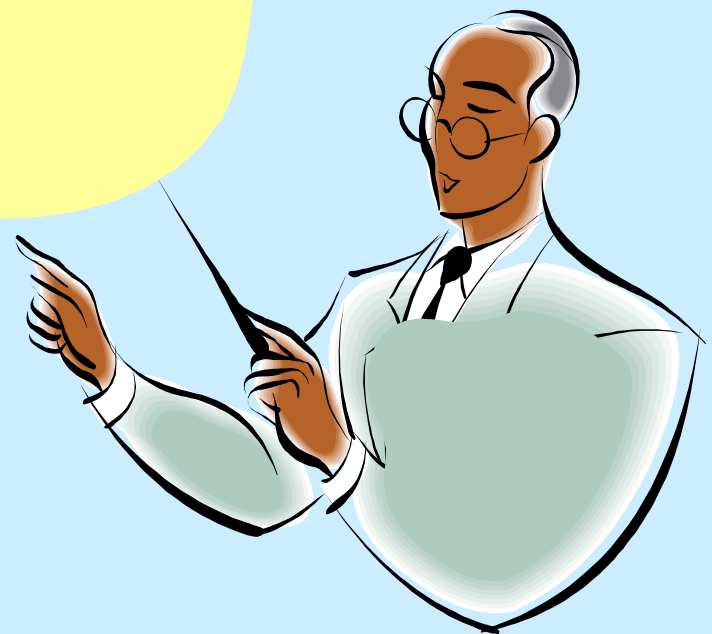
Metionin = AUG

Tryptofan = UGG

Všechny ostatní aminokyseliny jsou kódovány alespoň dvěma kodóny



**U kodónových rodin můžeme
spolehlivě určit 2 ze 3
nukleotidů v kodónu**



Návrh sondy pro cytochrom c

...-Asn-Val-Leu-Trp-Asp-Glu-Asn-Asn-Met-Ser-Glu-Tyr-...



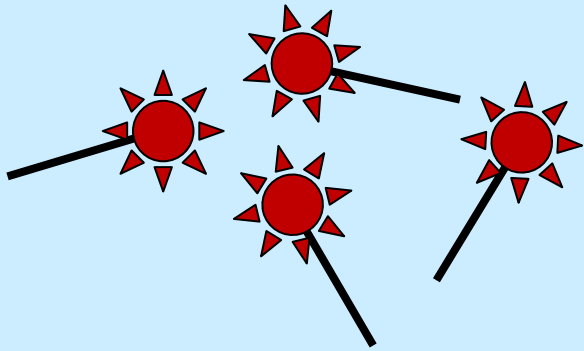
Pomocí tabulky genetického kódu stanovte sekvenci nukleotidů v potenciální sondě

TGG-GA(T/C)-GA(A/G)-AA(T/C)-AA(T/C)-ATG



Identifikace klonu s genem pro cytochrom c

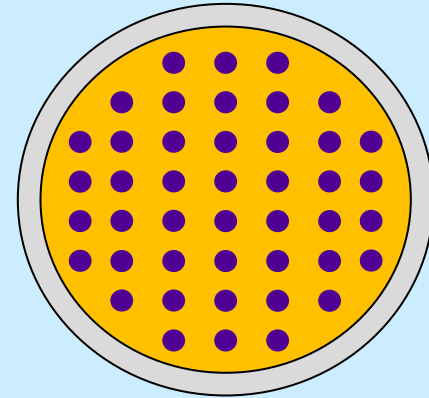
Syntetické oligonukleotidy



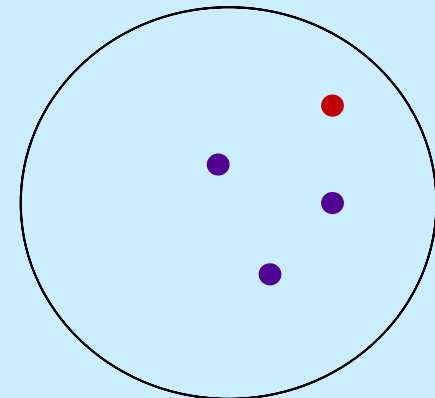
první sonda



Knihovna klonů



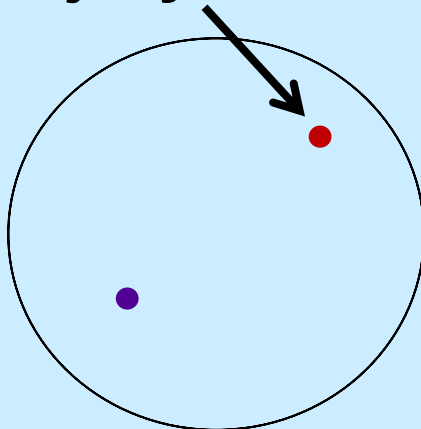
potenciální klony



druhá sonda



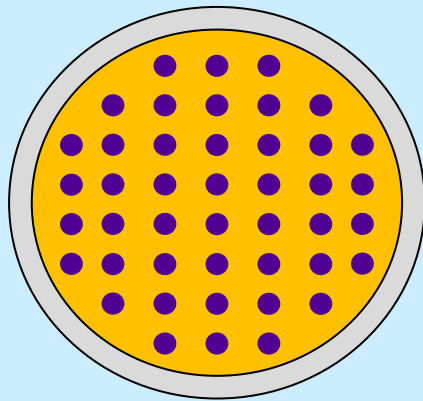
jistý klon



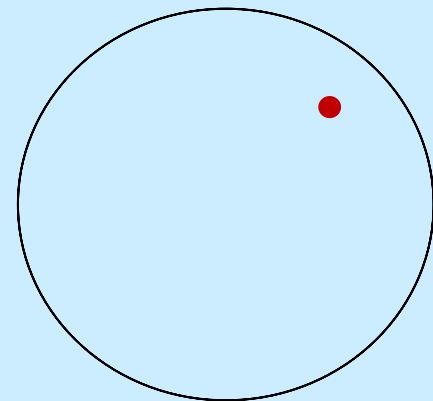
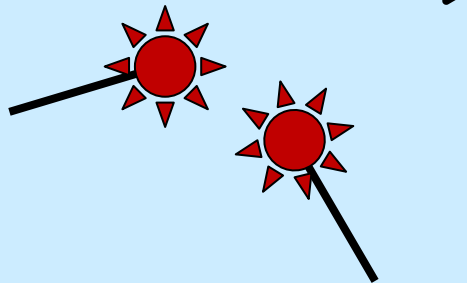
Identifikace příbuzných genů

Vyhledávání sondou mezidruhovou

Knihovna klonů z DNA
Neurospora crassa



sonda z genu pro
cytochrom c
kvasinek

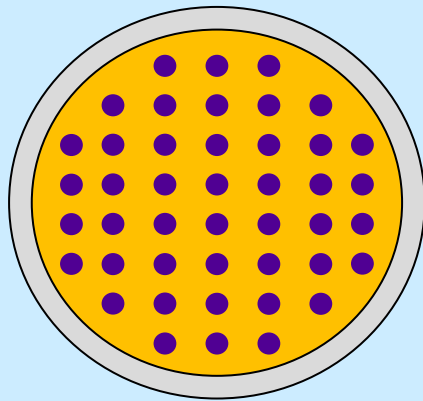


klon, který
pravděpodobně
nese gen pro
cytochrom c

Identifikace příbuzných genů

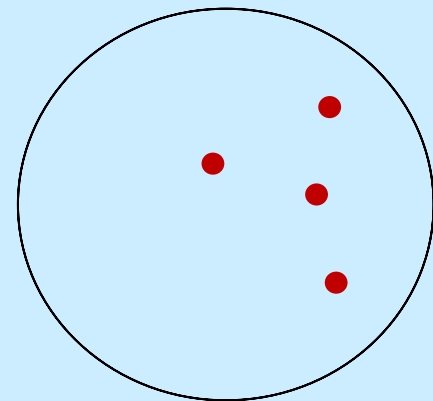
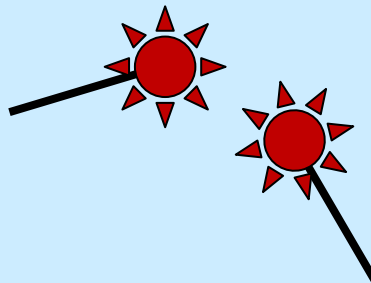
Vyhledávání sondou vnitrodruhovou

Knihovna klonů z DNA
Escherichia coli



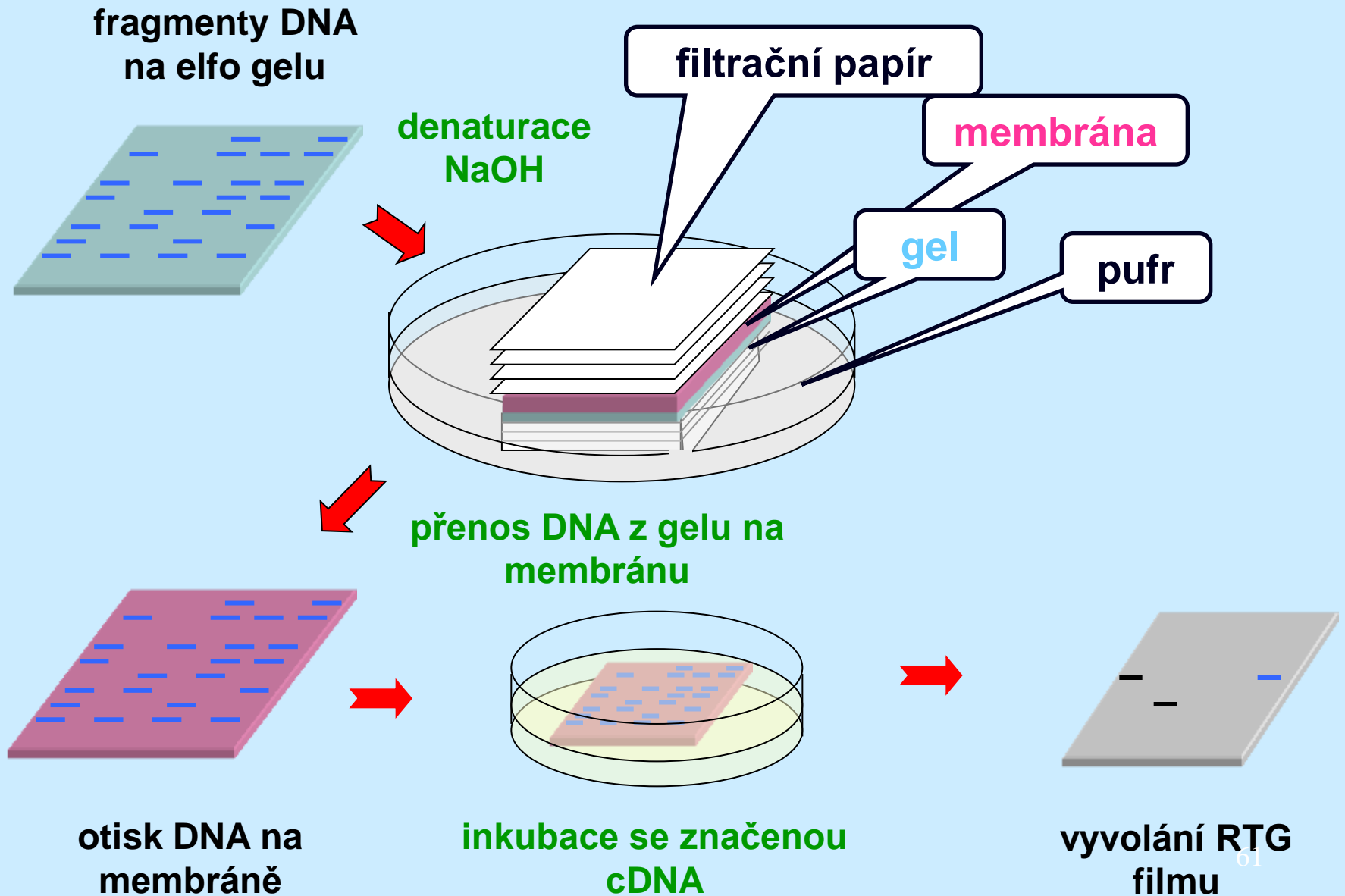
sonda z genu pro
histidin kinázu z
E. coli

→



klony
pravděpodobně
nesoucí geny
genové rodiny

Southern blotting



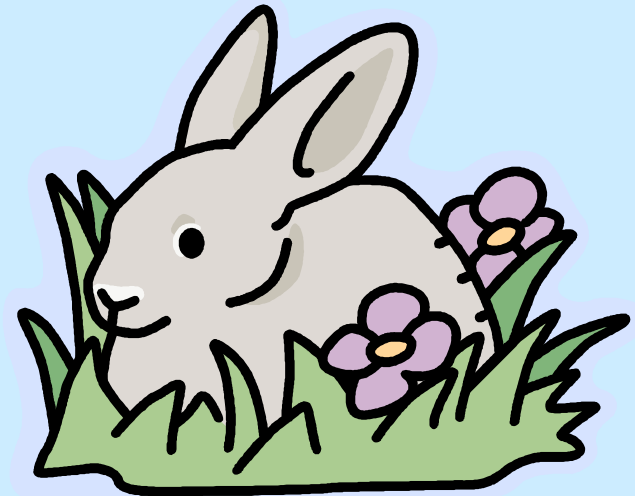
Příkladem využití Southern blotu byly RFLP profily získané sondami *IS6110*, *IS901* a *IS900* u mykobakterií



Identifikace produktů translace

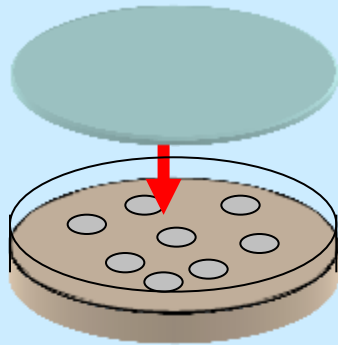
**Podmínkou je, aby byl protein buňkami
exprimován**

- **Používají se protilátky polyklonální nebo monoklonální**
- **Testují se přímo kolonie**
- **Metoda se velmi podobá DOT BLOT hybridizaci**

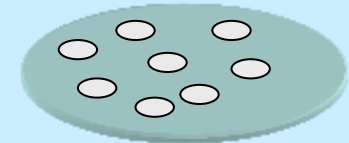
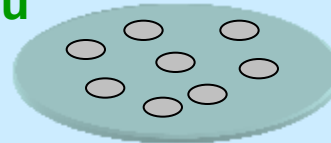


Imunoscreening kolonií

nylonová membrána



otisk kolonií na membránu



otisk proteinů

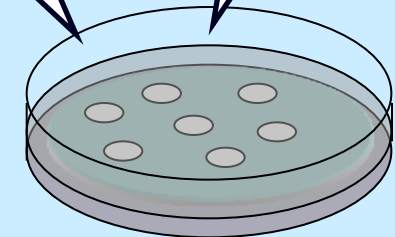
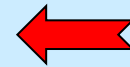
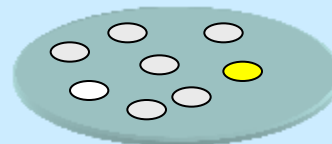
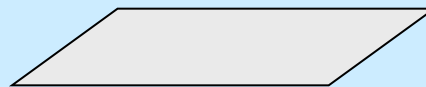
bakteriální kolonie
(genomová banka)

specifická
protilátka

značený
protein A



RTG film



expozice

inkubace přes noc,
hybridizace

identifikace
kolonie

Ještě pár poznámek

1) Monoklonální protilátky produkují hybridomy

http://en.wikipedia.org/wiki/Hybridoma_technology

2) Protein A je bakteriální protein, který se specificky váže k protilátkám

**3) Moderní přístupy využívají systému primární-
sekundární protilátka, detekce pak může být
fluorescenčně**

Více např. přednášky ze 3. ročníku – Western blot

Shrnutí

- 1) Pojem rekombinantní DNA**
- 2) Historické milníky**
- 3) Proč je klonování genů důležité i v mikrobiologii?**
- 4) Jak se klonování genů provádí**
- 5) Metody detekce klonovaných genů**
- 6) Dot blot a Southern blot**
- 7) Identifikace na úrovni translace**