

VYPRACOVALY:

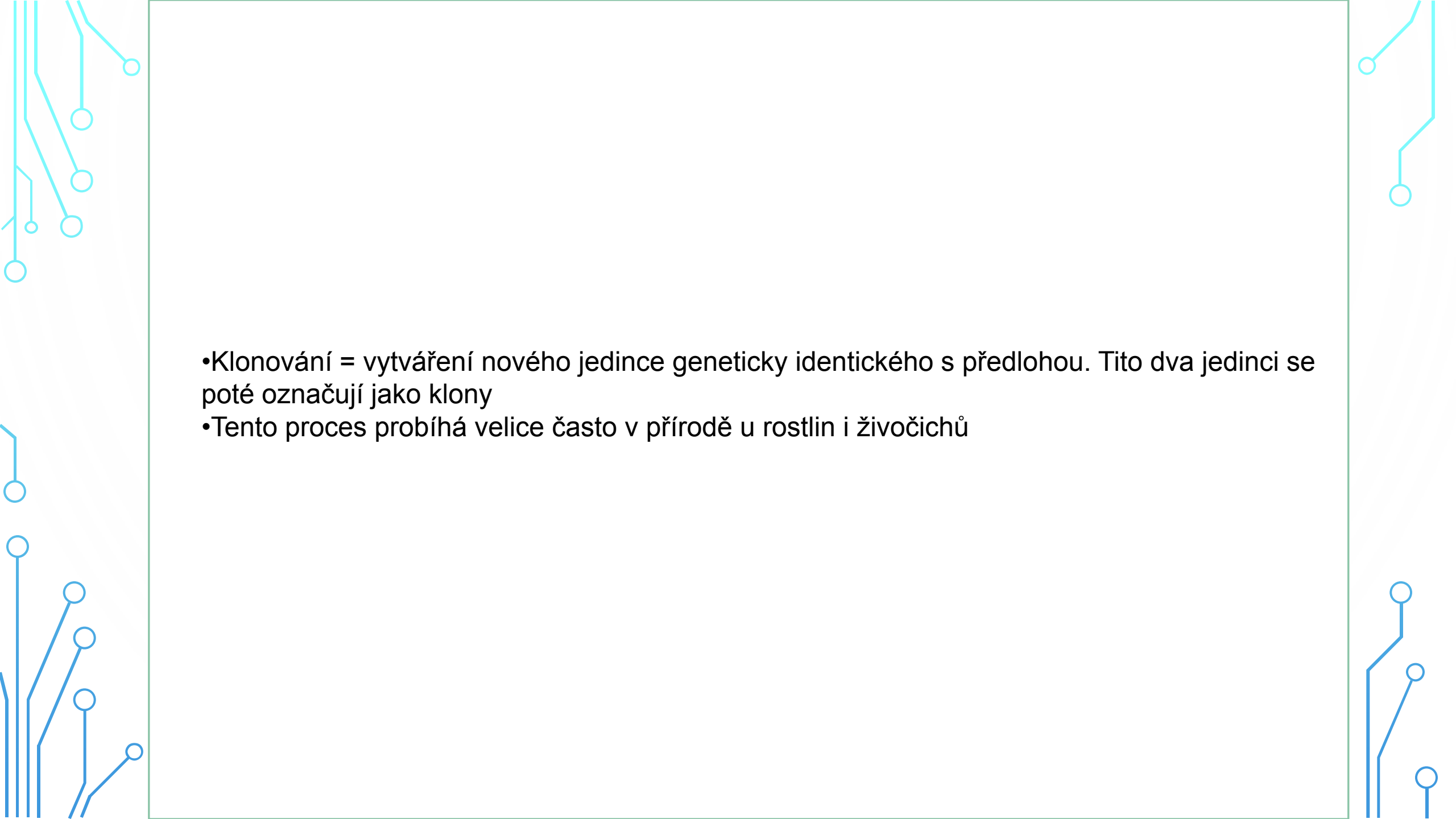
Trochu historie

- Vegetativní rozmnožování
- Pokusy o dělení embryí
- 1981 - přenesli do oocyty jádra z myších embryonálních buněk a narodily se tři zdravé myši
- 1986 - Willadsen naklonoval ovci

jádro z embryonální buňky tento vědec přenesl do vajíčka, které bylo právě v metafázi

- V řadě případů klonování bylo pozorováno, že klony trpěly řadou poruch a snížením životaschopnosti a v některých případech měly zkrácené telomery
- Genetické stáří jejich buněk tedy odpovídalo původnímu jedinci

Později bylo zjištěno, že při klonování většiny buněčných typů dochází k obnovení délky telomer

- 
- Klonování = vytváření nového jedince geneticky identického s předlohou. Tito dva jedinci se poté označují jako klony
 - Tento proces probíhá velice často v přírodě u rostlin i živočichů

Klonování DNA

= využívá schopnost bakterií přijímat a rozmnožovat kruhové úseky DNA (plazmidy)

1) příprava rekombinantního vektoru

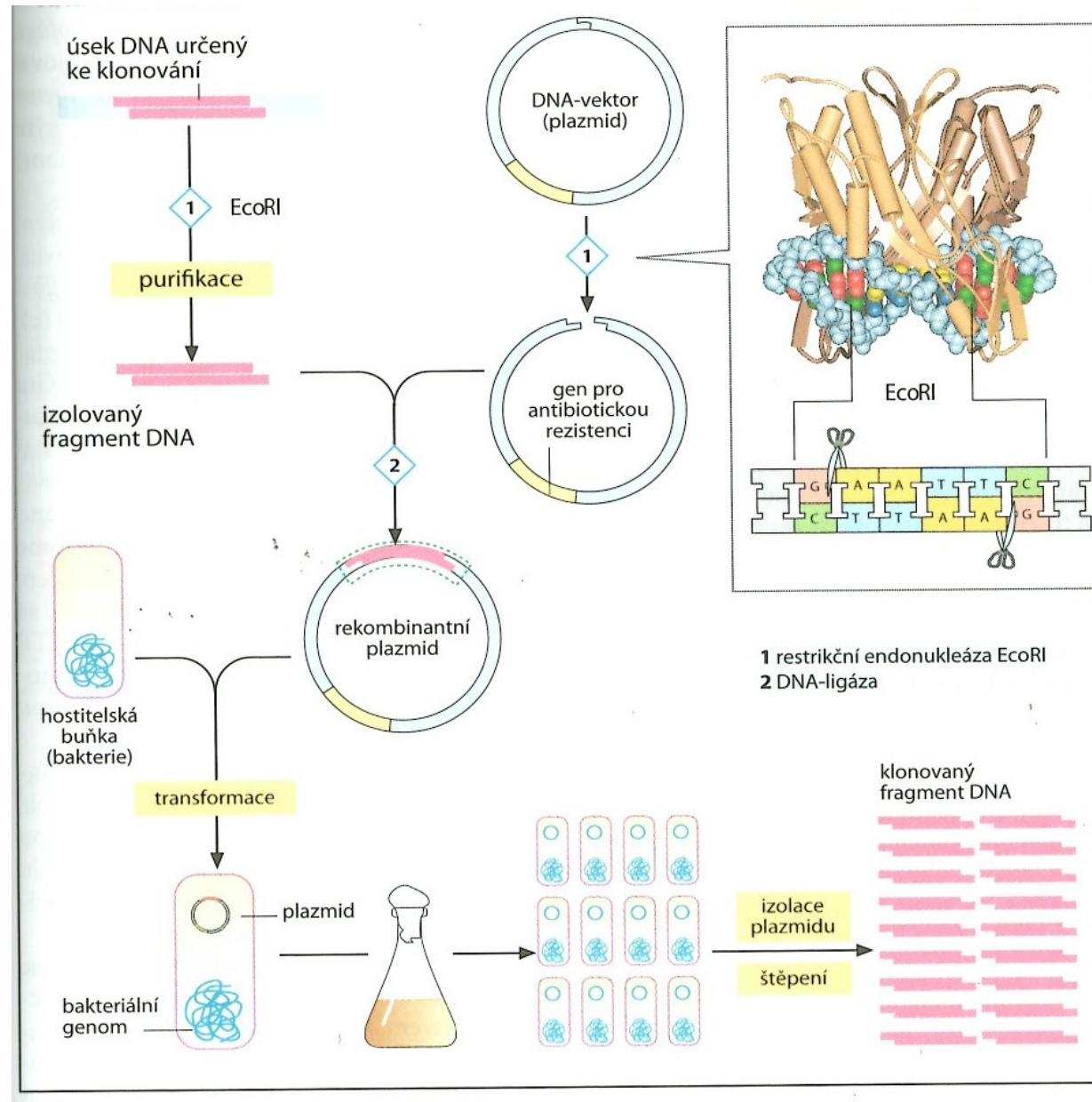
- Vybrání vhodného úseku DNA
- Není možné použít pouze sekvenci, kterou chceme namnožit.
- Sekvence musí zahrnovat důležité enzymy pro replikaci, a zamezit, aby došlo k rozložení DNA pomocí nukleáz
- vektor je DNA, která má tyto vlastnosti a je schopna proniknout do buňky
- Plazmidy, bakteriofágní DNA, umělé bakteriální chromozomy (BACs) či kosmidy

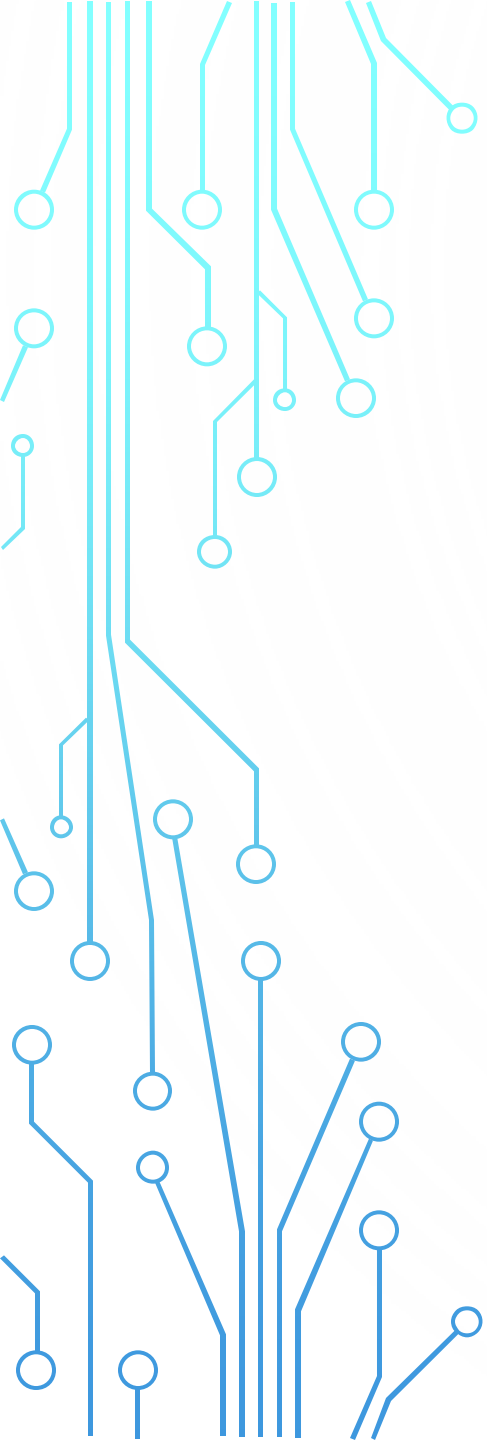


2) přenos takto připravených vektorů do buněk

- biologicky (pomocí adenovirů, retrovirů)
- chemicky (pomocí látek které vyvolají endocytózu)
- fyzikálně (tepelným šokem či elektropolací)
- hostitelskou buňkou bývají bakterie (*Escherichia coli*), kvasinky, bakteriofágy

3) selekce klonů obsahujících rekombinantní DNA a následně analýza klonované DNA.





Názvosloví

- transformace: přenos DNA do prokaryotických buněk
- transfekce: přenos DNA do eukaryotických buněk
- transfekuje/transformuje se buňka, nikoliv DNA

Typy přenosu DNA

Transformace/transfekce přechodná

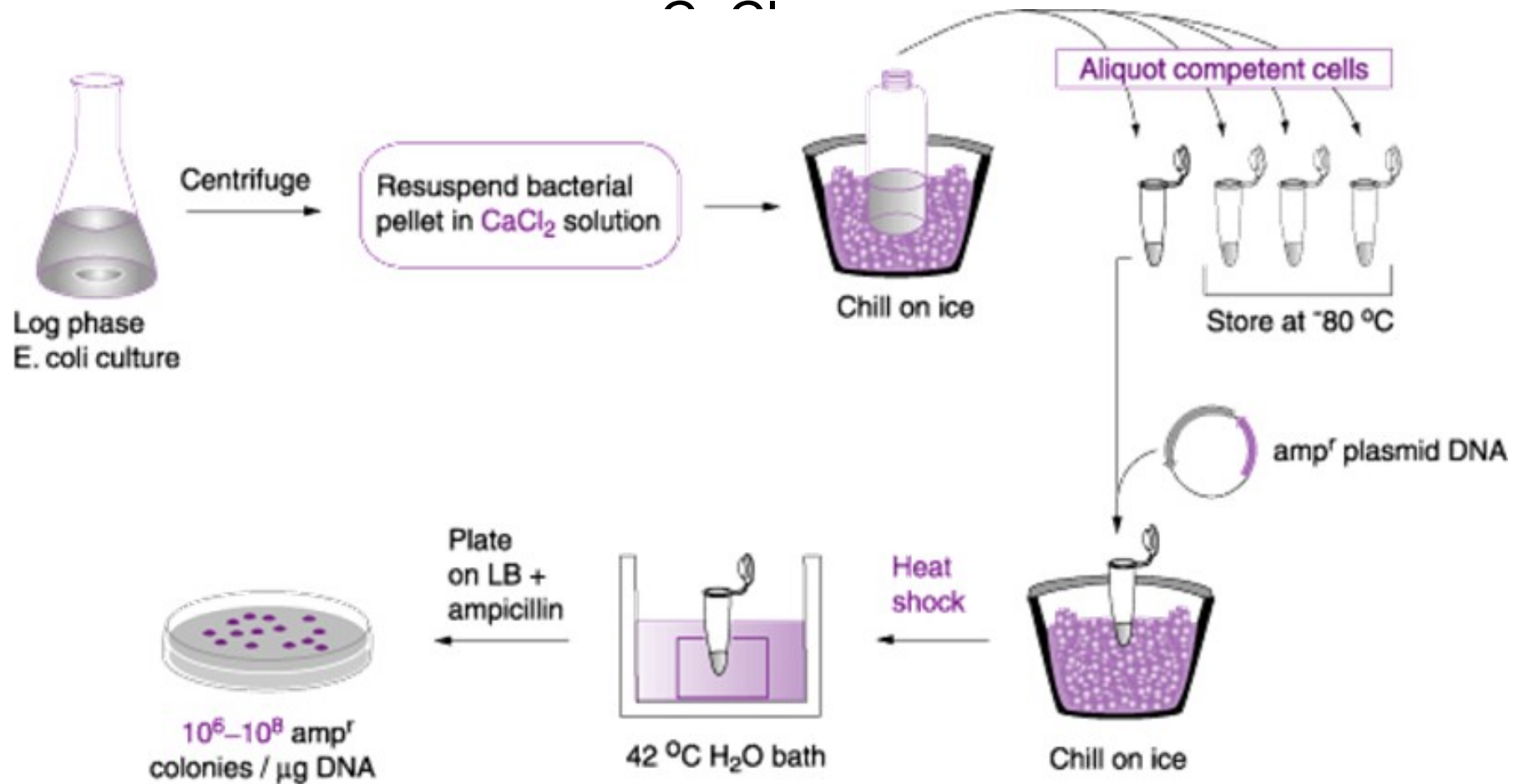
- přenášená DNA se v buňce nachází pouze extrachromozomálním stavu, transgen se přepisuje po omezenou dobu
- jedna buňka může obsahovat větší počet kopií přenesené DNA

Transformace/transfekce stabilní

- přenášená DNA se začleňuje do chromozomu hostitelské buňky (tento děj nastává s nízkou frekvencí 10^{-5} – 10^{-6})
- nízká pravděpodobnost výskytu dvou nebo více kopií transgenu v jedné buňce

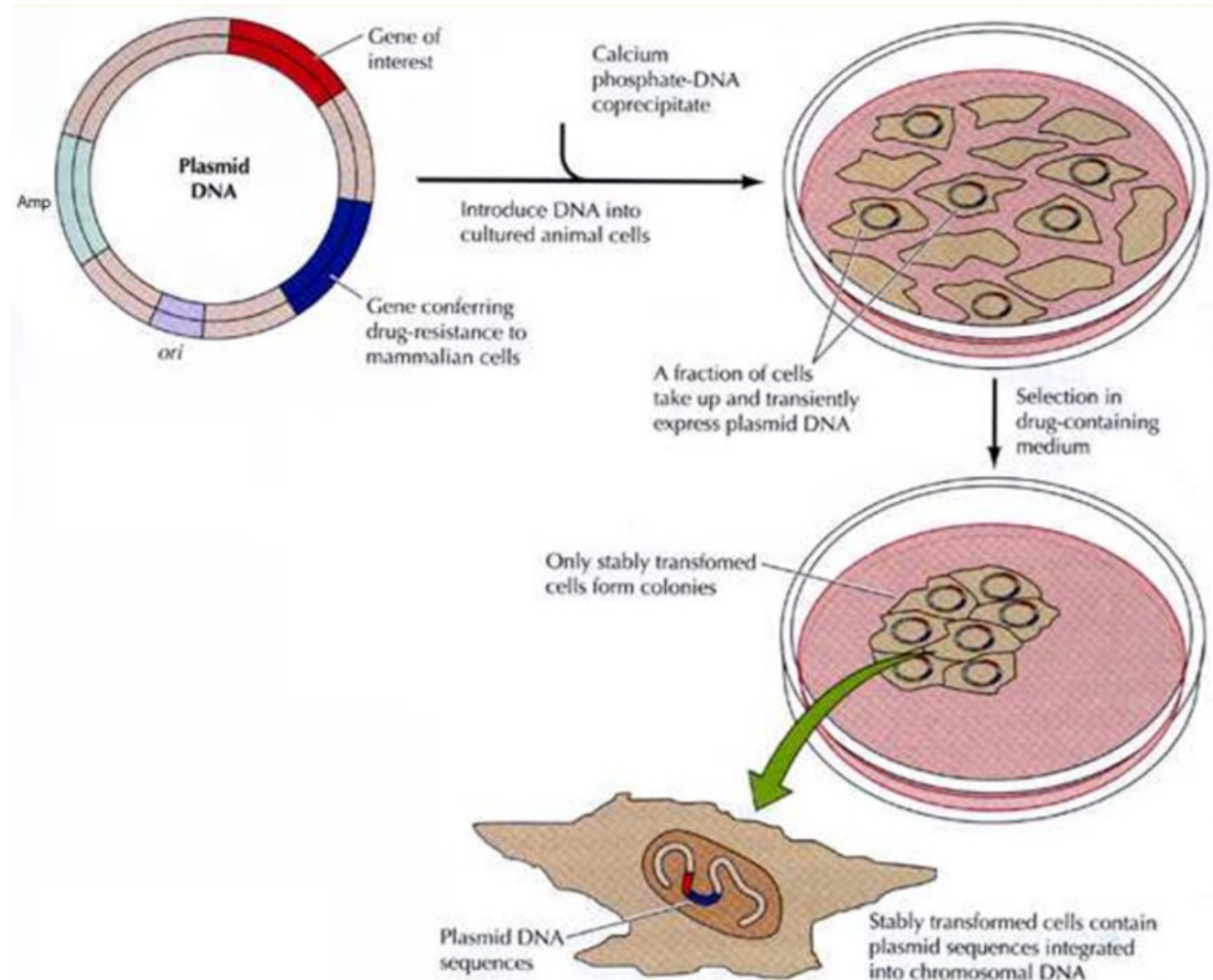
Metody přenosu - využití CaCl_2

Navození stavu kompetence bakterií promytím buněk ledovým



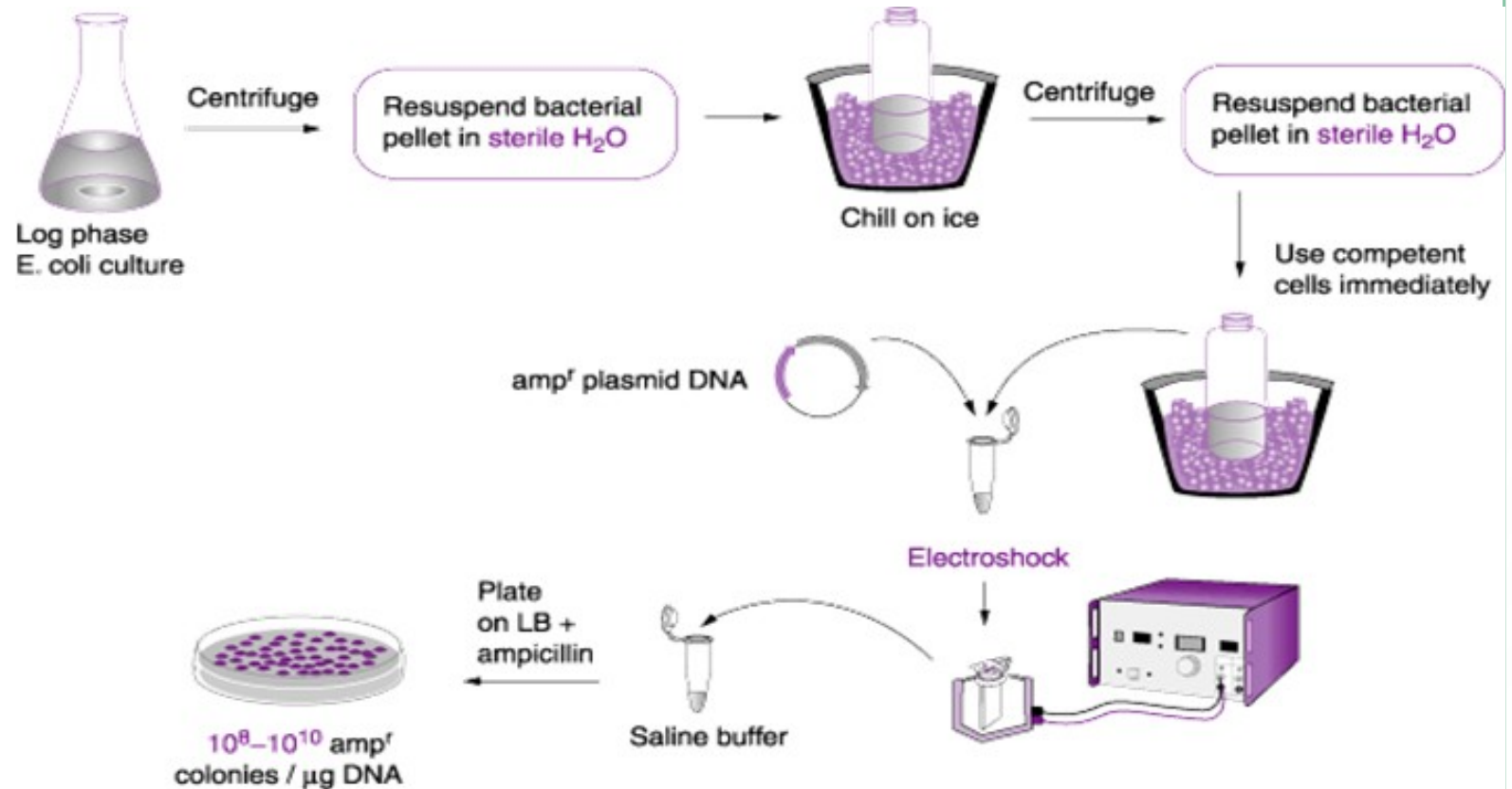
Metody přenosu - využití CaCl_2

- Transfekce zprostředkovaná fosforečnanem vápenatým
 - DNA se smíchá s CaCl_2 ve fosfátovém pufru dochází k precipitaci
 - Vznikne jemná sraženina DNA a fosforečnan u vápenatého



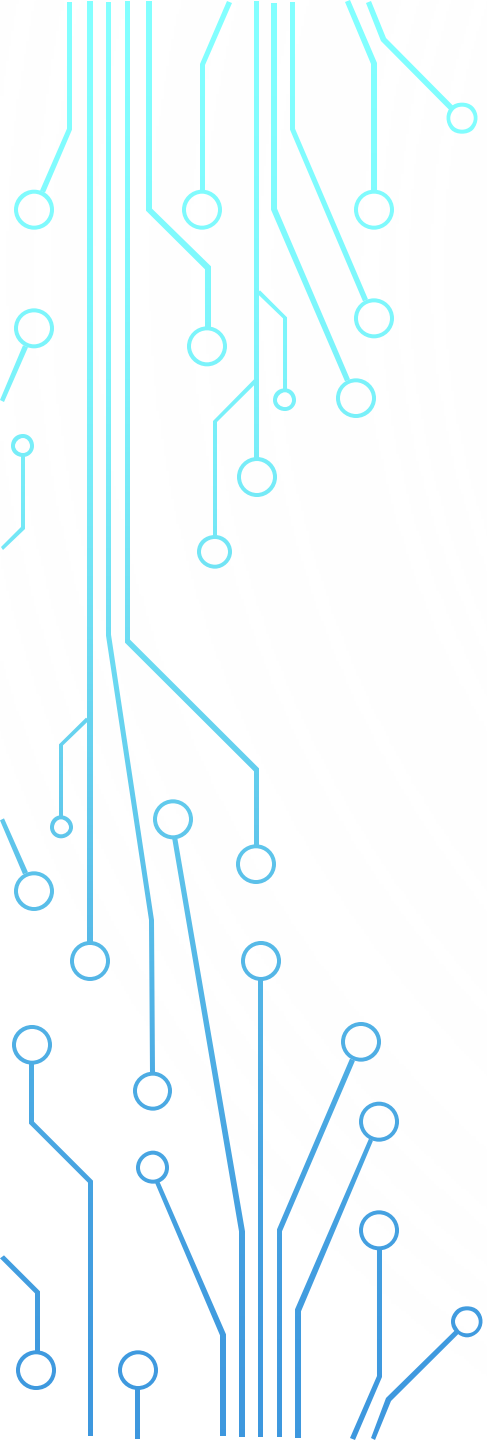
Metody přenosu - elektroporace

- Využitelné jak u bakterií, tak i u eukaryotických buněk
- Vystavení krátkému elektrickému pulzu o vysokém napětí
- V důsledku elektrického šoku dojde k otevření pórů v plazmatické membráně



Další transfekční postupy

1. prostřednictvím DEAE-dextranu
2. lipofekce
3. využití genové pistole
4. využití mikroinjekce
5. využití virových a fágových postupů



Selekce buněk, které přijaly vektor

Prokaryota

Gen *bla*

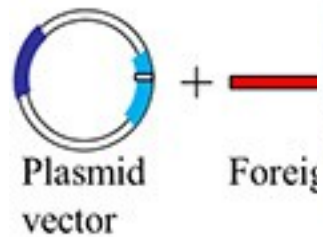
- Nachází se ve vektoru a poskytuje buňkám rezistenci k antibiotikům
- Kóduje enzym β -laktamázu - hydrolýza β -laktamových antibiotik

Eukaryota

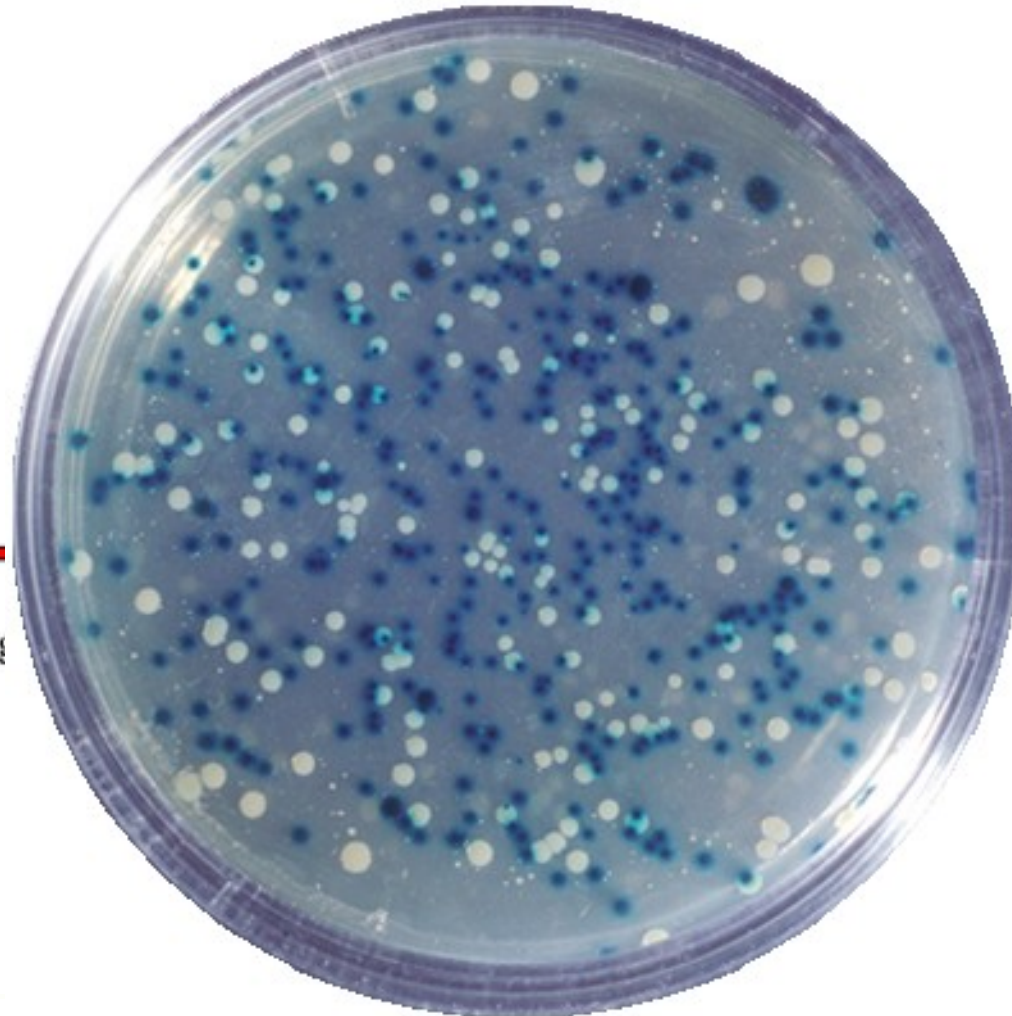
Využití bakteriálních enzymů fungujících u eukaryot

- guanin-fosforibozyltransferáz a (gpt)
- aminoglykozid-fosfotransferáza (neo)
- puromycin-N-acetyltransferáza

Inzerční inaktivace - Modrobílý test



Ligation



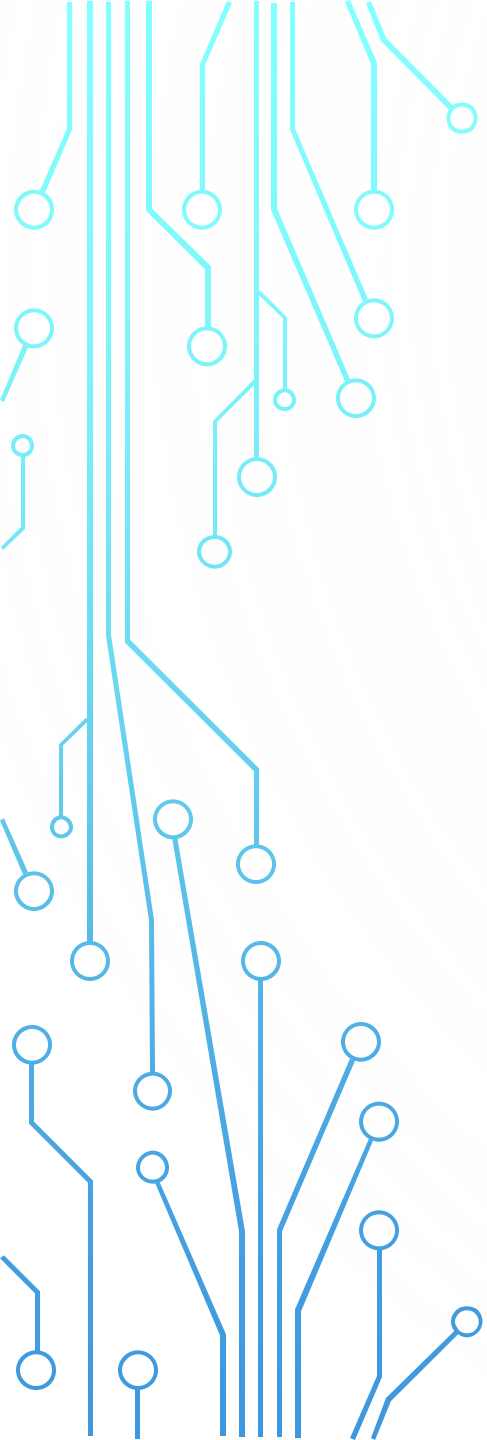
Medium with X-Gal+IPTG

→ White colonies

→ Blue colonies

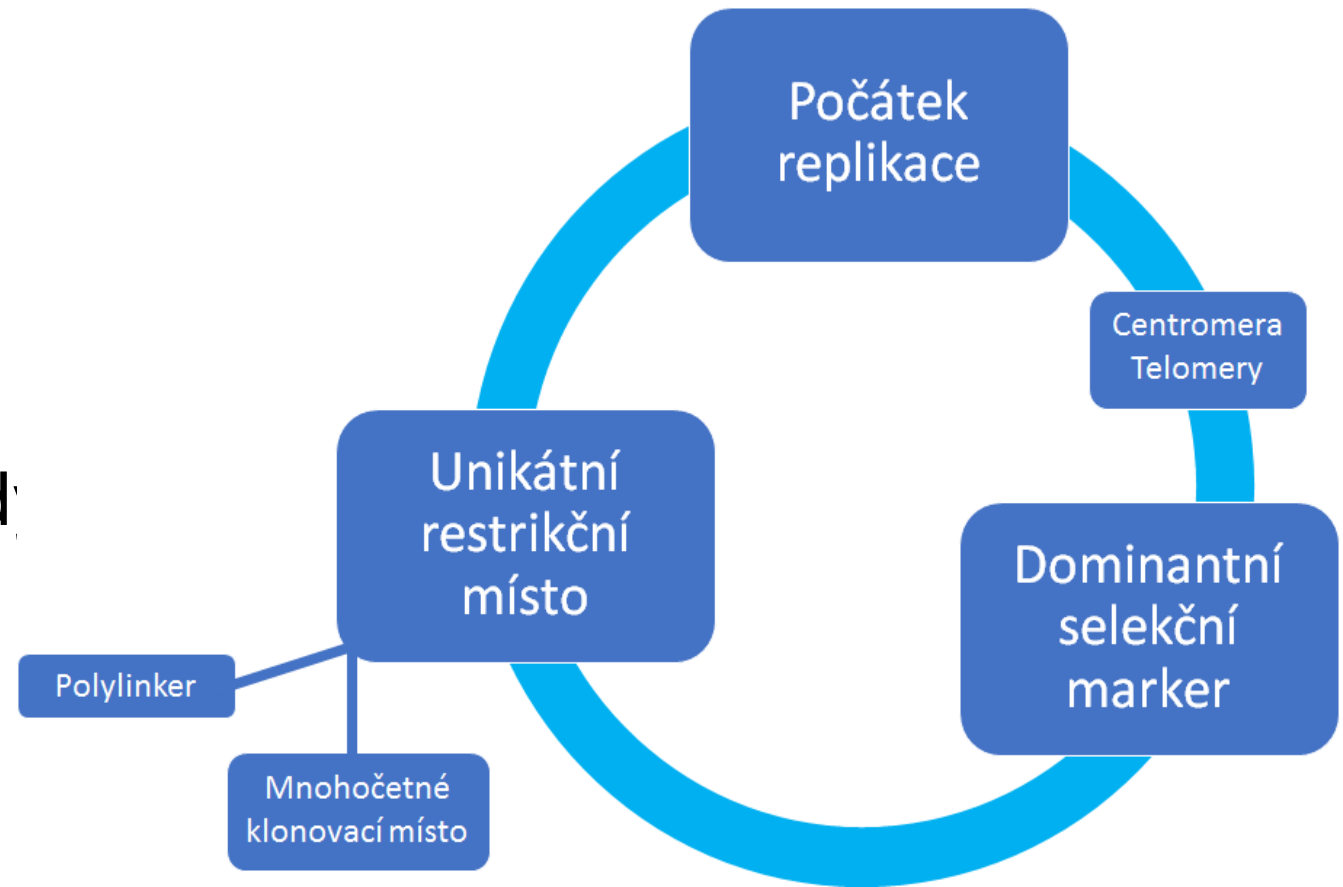
→ Blue colonies

Screening



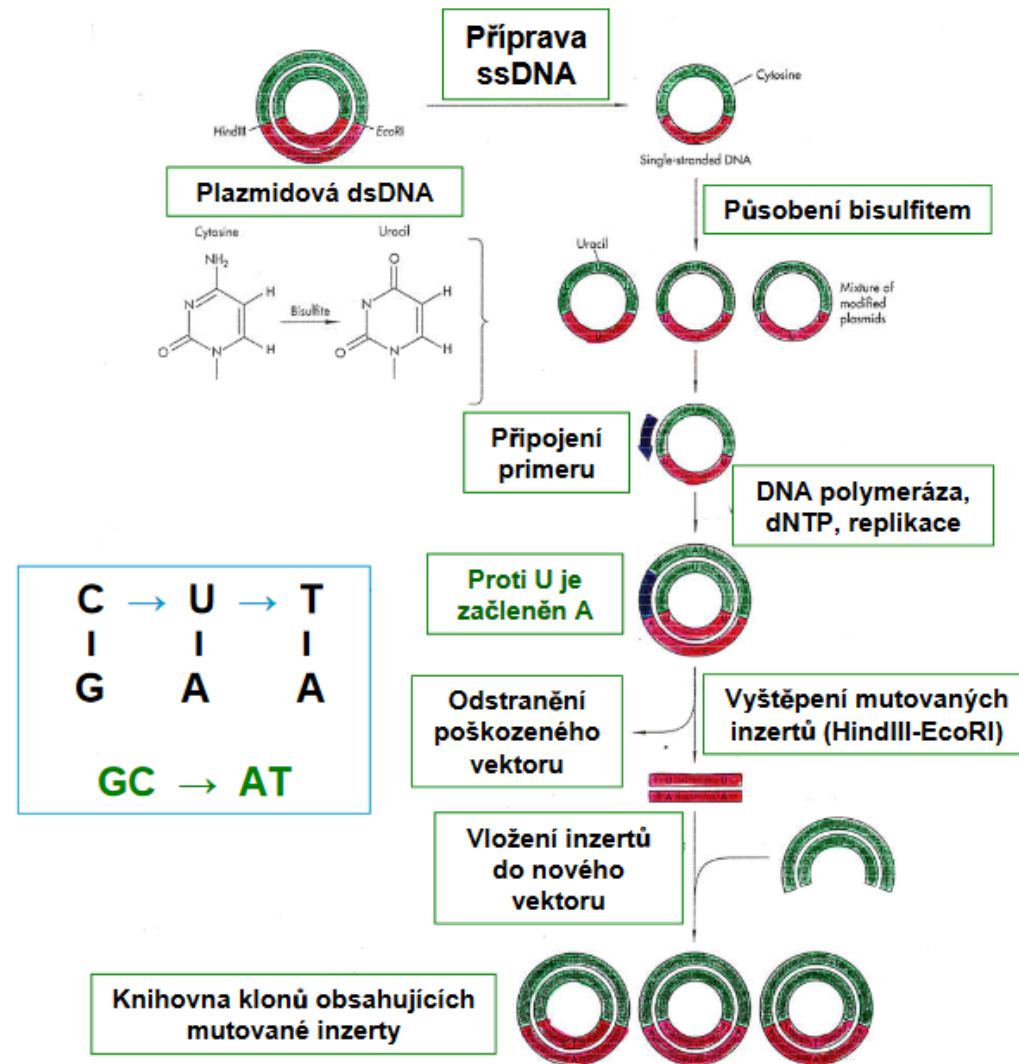
Vektory

- Replikace
- Plazmidy nebo chromozomy bakteriofágů
- 10-15 kb
- Fágomidy, kosmidy, YAC, BAC, PAC



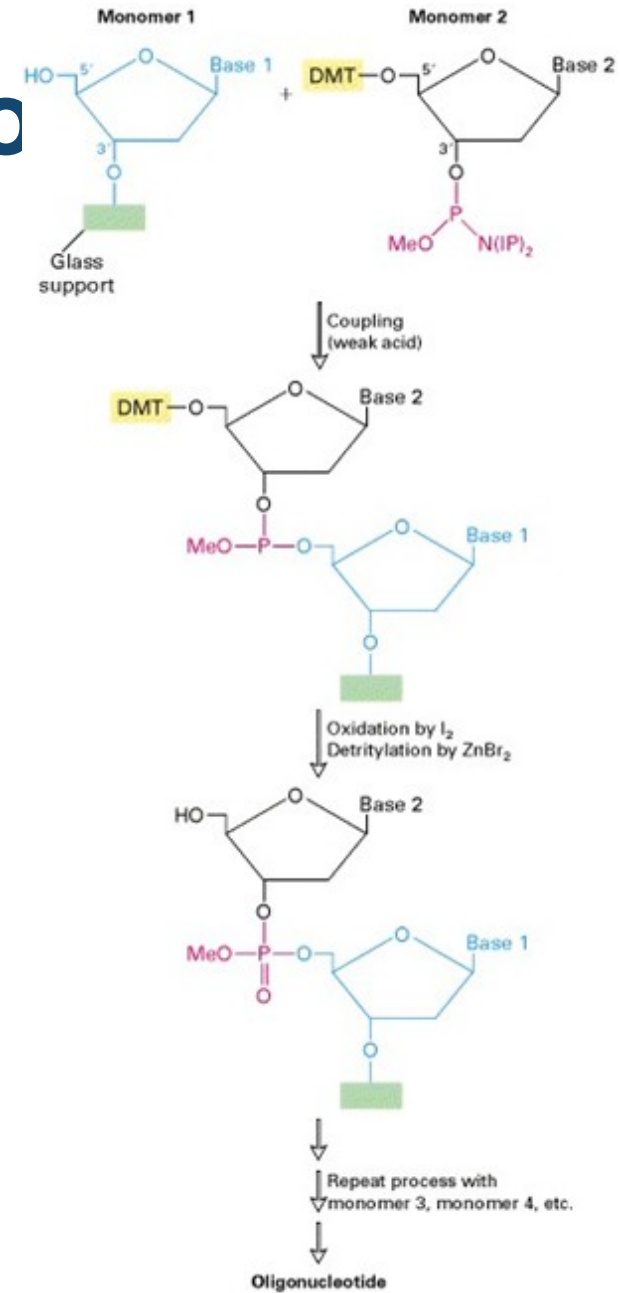
Chemická mutagenéza bisulfitem

Hydrogensířičitan



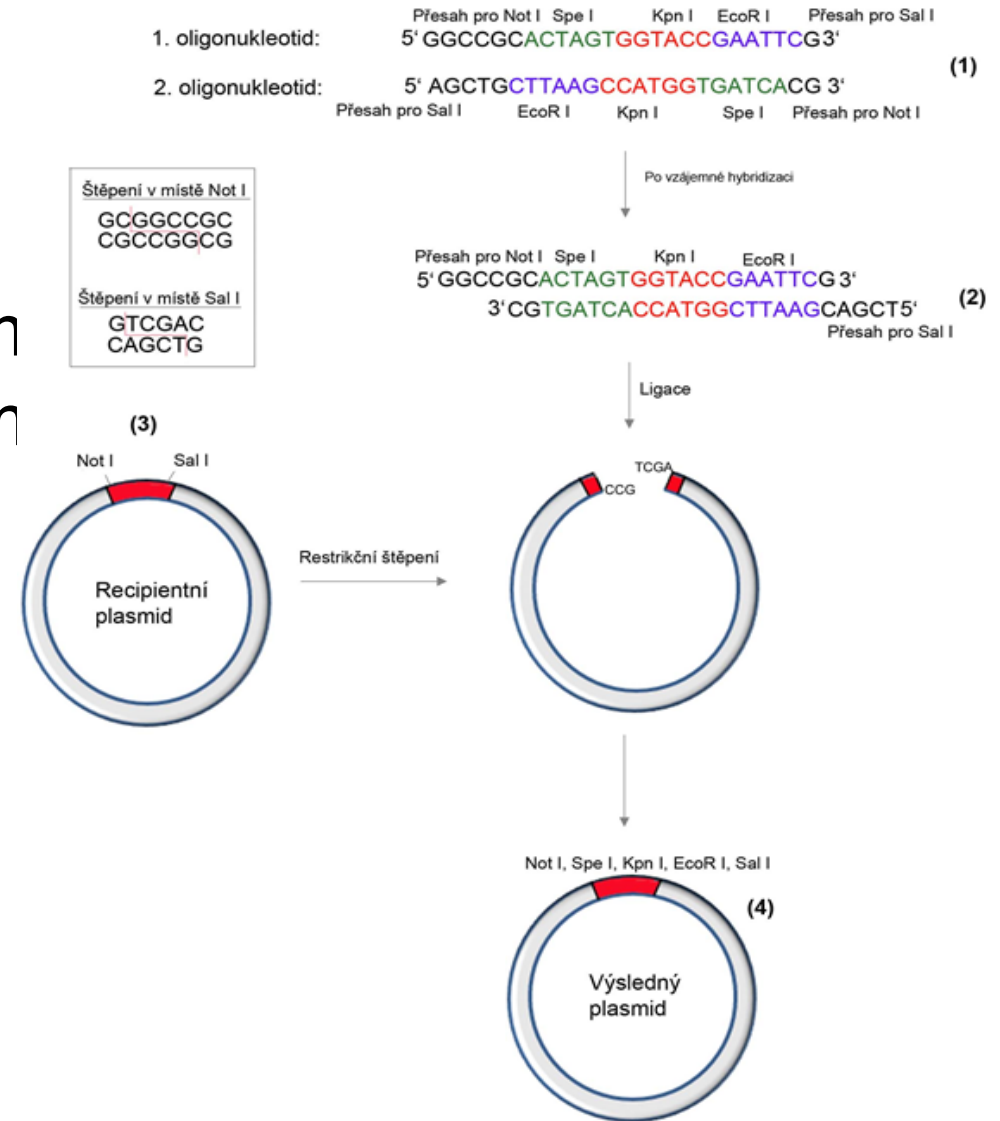
Příprava ssDNA in vitro

- Přímá syntéza požadovaného oligonuklidu
- Vložení do plazmidu pomocí „sticky“ end – „lepkavé“ konce nebo „blunt“
- Až 100 nukleotidů



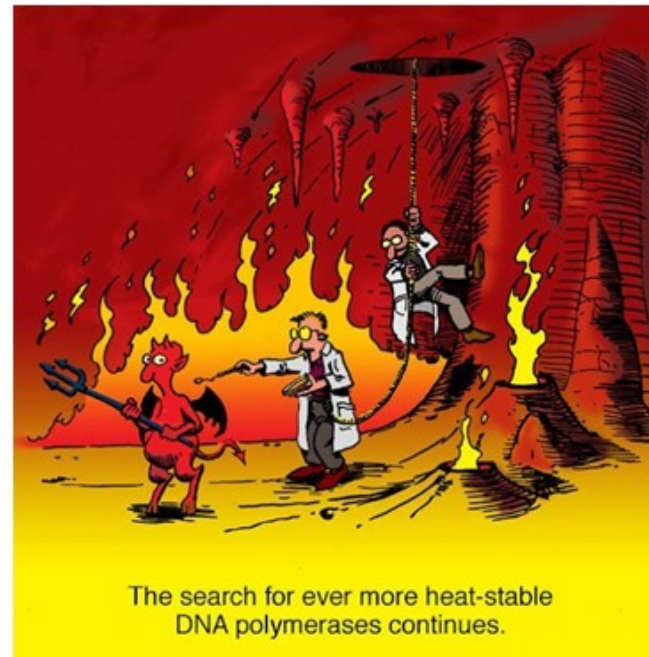
Oligo klonování

- Dva komplementární oligonuklidy s přesahem
- Náš vektor s restričními místy



PCR

- DNA-pol. (Taq, Pfu, Tli, Tfl...)
- Mg²⁺
- Templát
- Primery
- Nukleotidy



Get the reagents



Prepare the mix

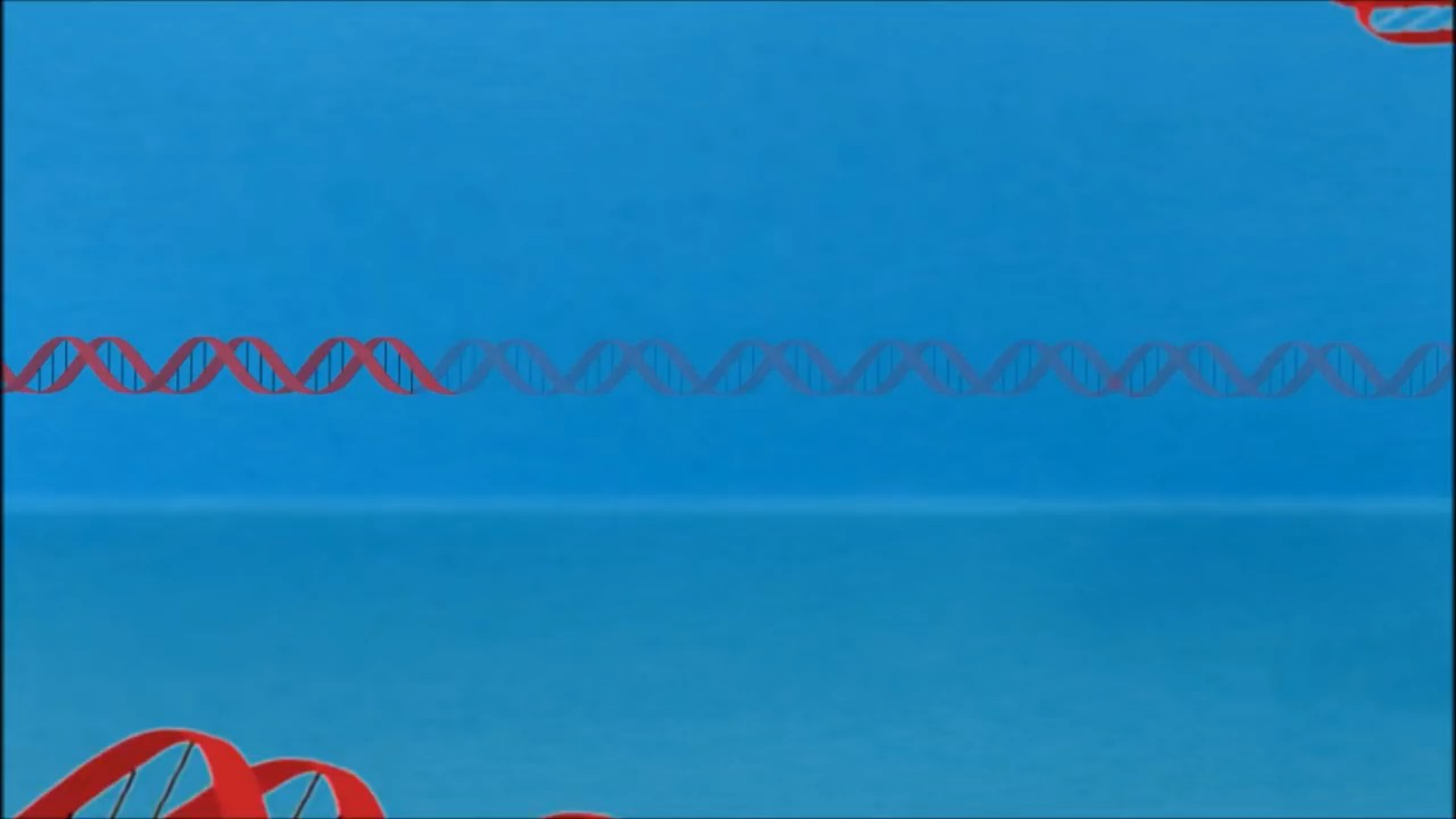


Lose your spot
setting up full plate



Cry





The background is a high-magnification electron micrograph of a cell, showing various organelles and structures in shades of blue, green, and purple. A large, semi-transparent circular overlay is positioned on the left side of the image, containing the title and a list of bullet points.

Restrikční endonukleázy

- Místně specifické enzymy
- 1970 Hamilton Smith – *Haemophilus influenzae*
- Ochrana genetického materiálu buňky před cizí DNA → „imunitní systém prokaryot“
- I. a III. – mimo X II. – uvnitř
- Palindromy, lepivé konce

Vlastnosti RE

- I. a III. – mimo X II. – uvnitř
- Palindromy, lepicé konce (DNA-ligáza)

Rekombinace DNA

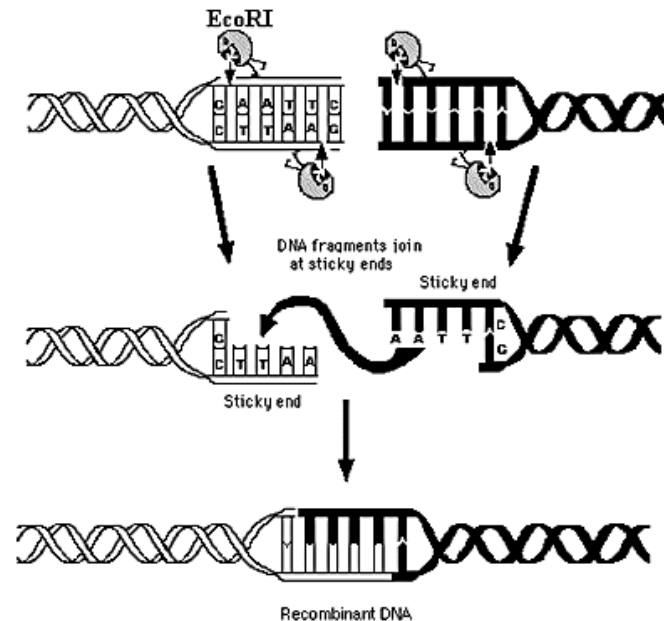
EcoRI

E. coli RY13

endonukleáza

metyláza

5'-GAA TTC-3'
3'-CTT AAG-5'



**Restriction Enzyme
Action of EcoRI**

CH₃
|
5'-GAA TTC-3'
3'-CTT AAG-5'
|
CH₃



CRISPR/Cas9

- Clustered **R**egularly **I**nterspersed **P**alindromic **R**epeats
- Systém antifágové imunity
- *S. pyogenes*
- Endonukleáza + RNA
- Cílená mutageneze, deletování, nahrazování a editování genů



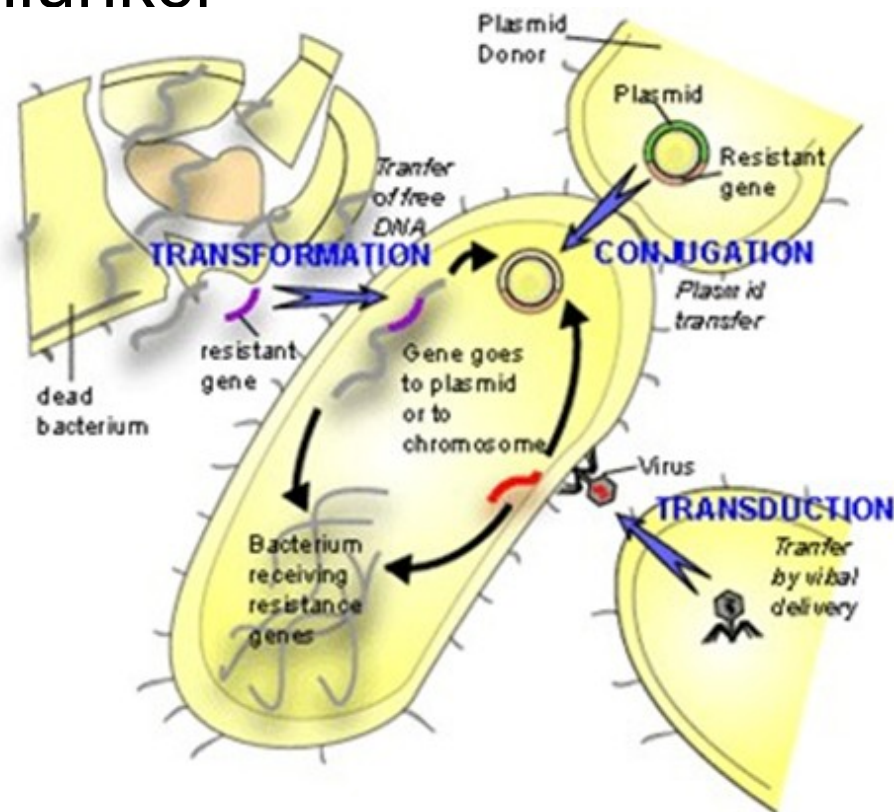
CRISPR-Cas9

Genová kazeta

- Obsahuje gen a rekombinantní místo
 - Malá mobilní genetická jednotka
 - Rezistence na antibiotika, exotoxiny
 - Horizontální přenos
-
- Genové inženýrství - RE

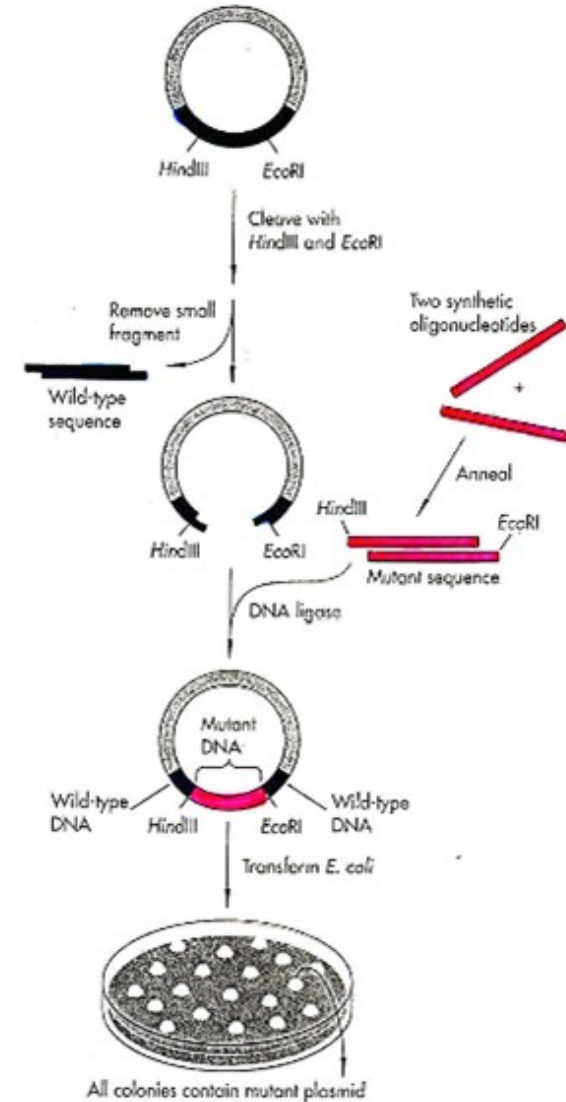
Horizontální přenos

- Mezi buňkami stejného druhu – nejčastěji bakterie
- Pomocí fágů - transdukcí, transformací nebo bakteriální koniunkcí



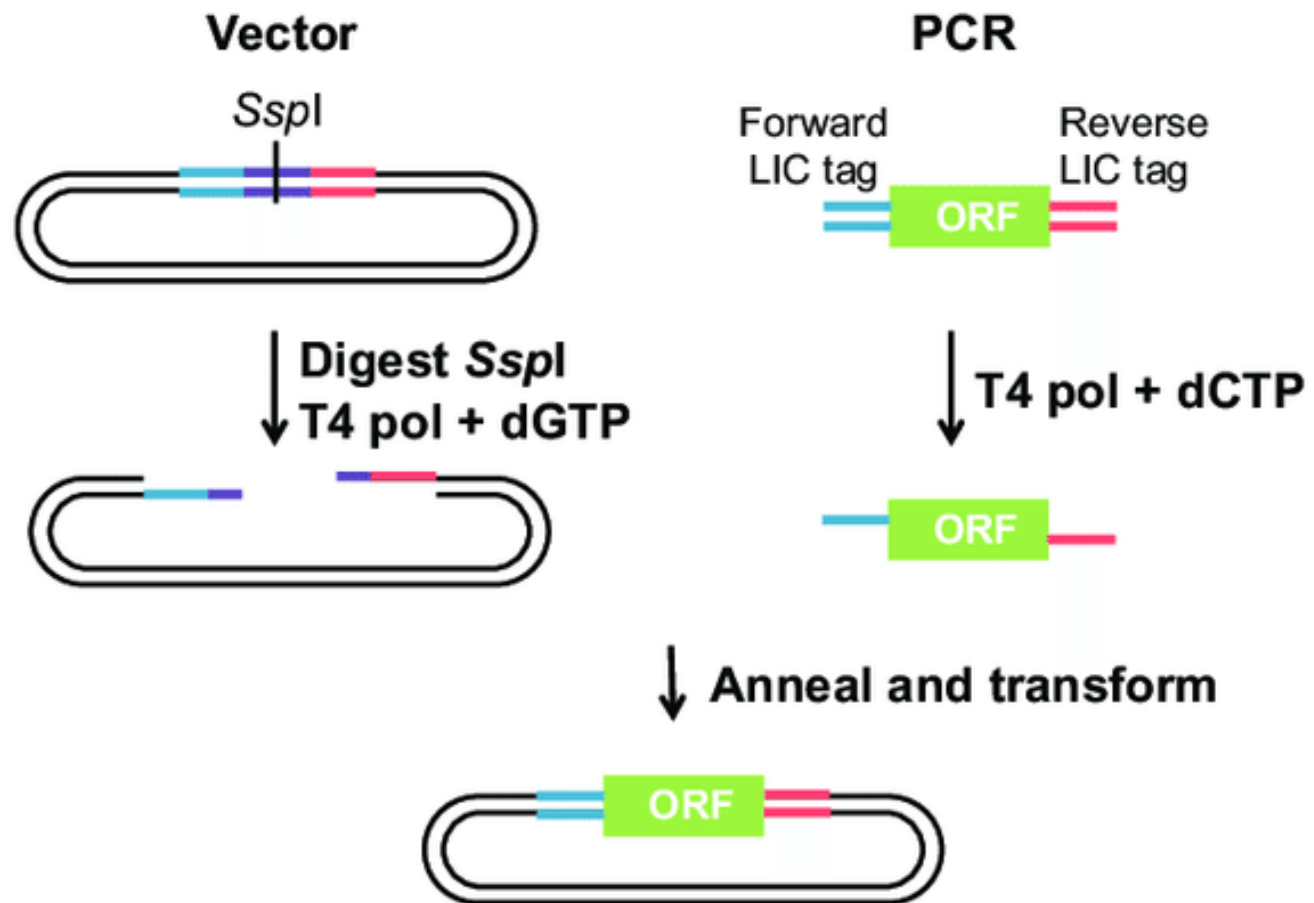
Expresní kazeta

- Obsahuje promotor, ORF, gen
- Regulační oblasti
- Různé přípony



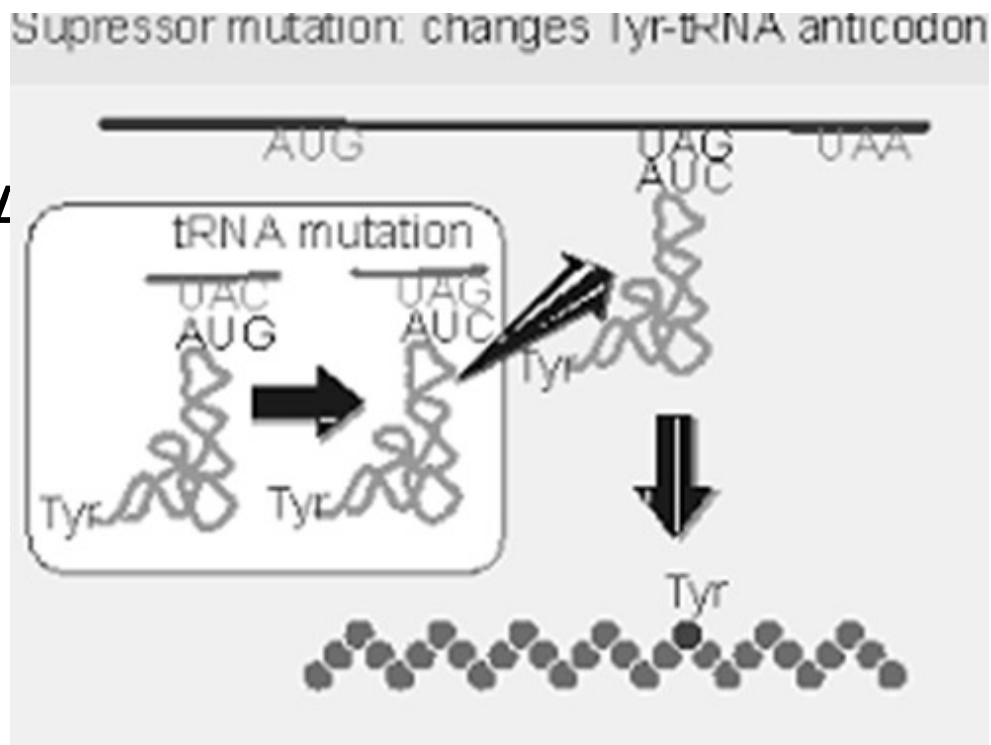
LIC klonování

- Klonování bez ligace
- Produkt PCR s přesně navrženým koncem
- Plazmid
- https://go.takarabio.com/EU-In-Fusion-webinar-series.html?gclid=CjwKCAjwsfreBRB9EiwAikSUHSfqNhEQyLERWZkSWP6VqbKsMRczR73B9LZUjkaDNgRkK0mnOh_hWhoCqEgQAvD_BwE



Supresorová tRNA

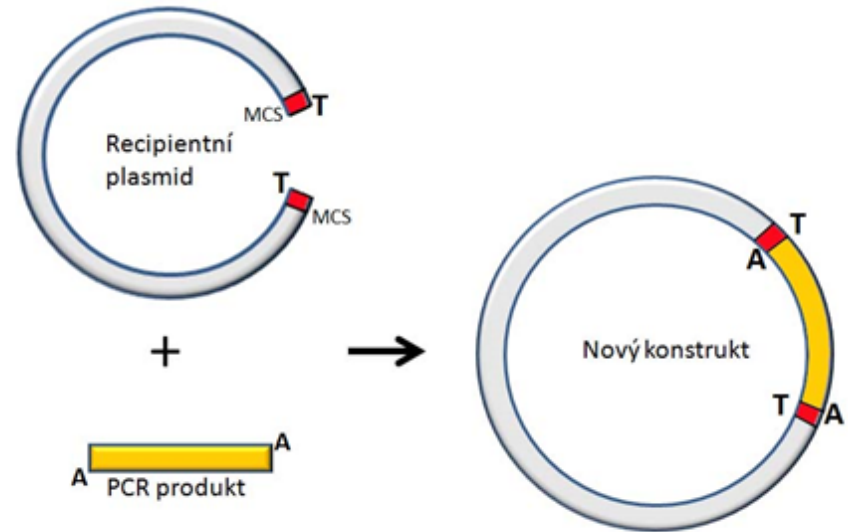
- Mutace se ztrátou smyslu
- Stop kodon
- Mutace v antikodonu tRNA
- Vnášení speciálních AMK





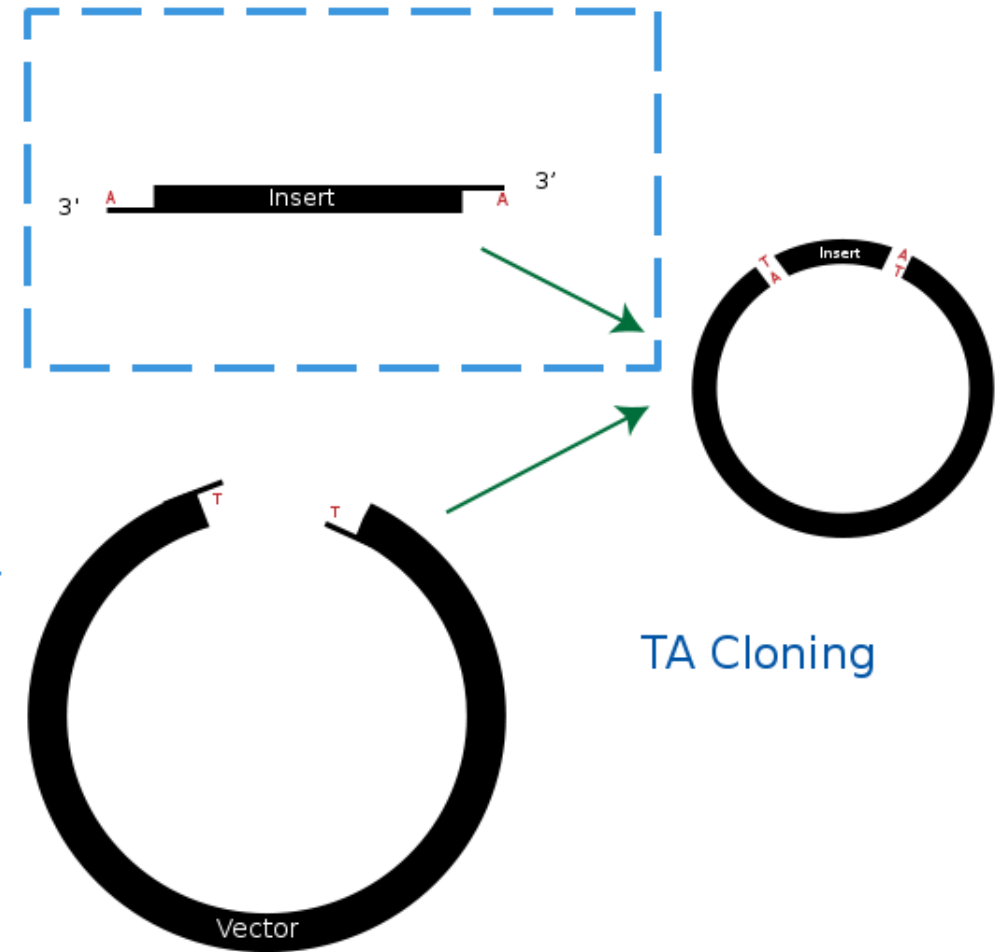
TA KLONOVÁNÍ ÚVOD

- jedna z nejpoužívanějších metod klonování/subklonování
- založená na schopnosti Adeninu (A) a Thyminu (T) hybridizovat



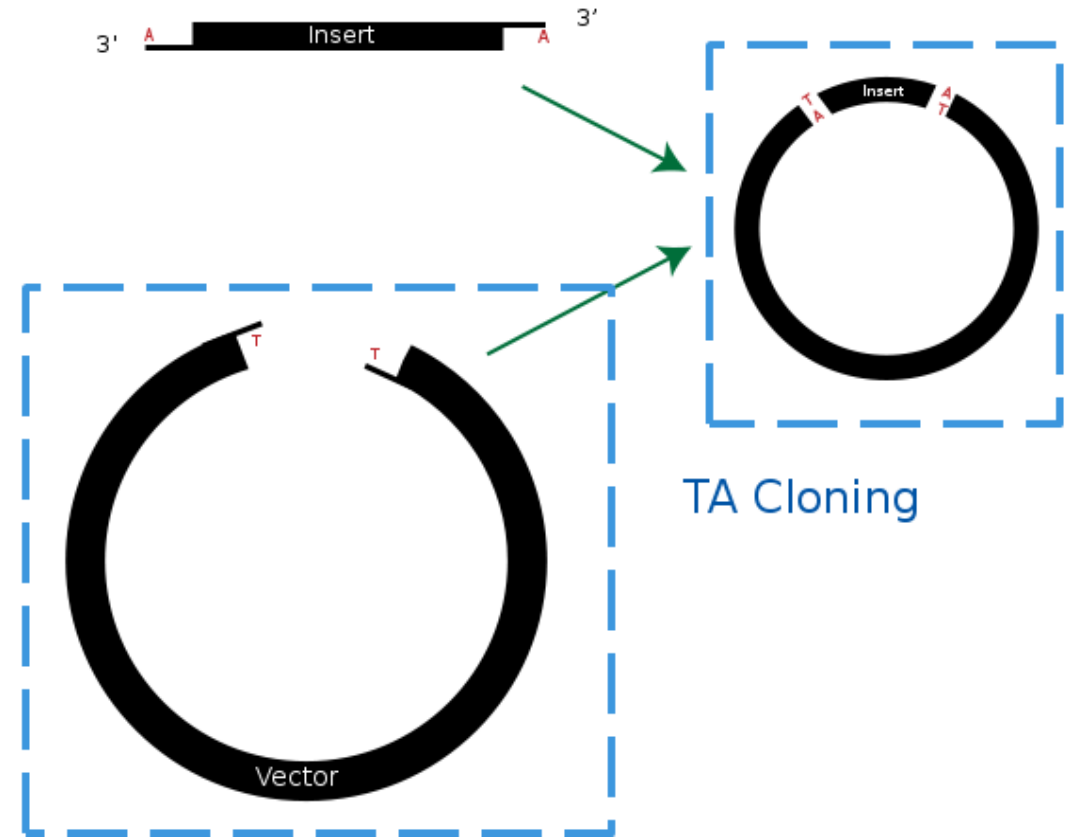
TA KLONOVÁNÍ MECHANISMUS

- produkty PCR se amplifikují pouze s *Taq* DNA polymerázou
- ta postrádá 5'-3' exonukleázovou schopnost
- je schopná přidávat dATP zbytek na 3' konce dsPCR produktu



TA KLONOVÁNÍ MECHANISMUS

- linearizovaný vektor s komplementárními ddTTP zbytky na 3' konci
- smíchání vektoru s insertem
- vzniká rekombinantní DNA
- rekombinace je způsobena DNA ligázou



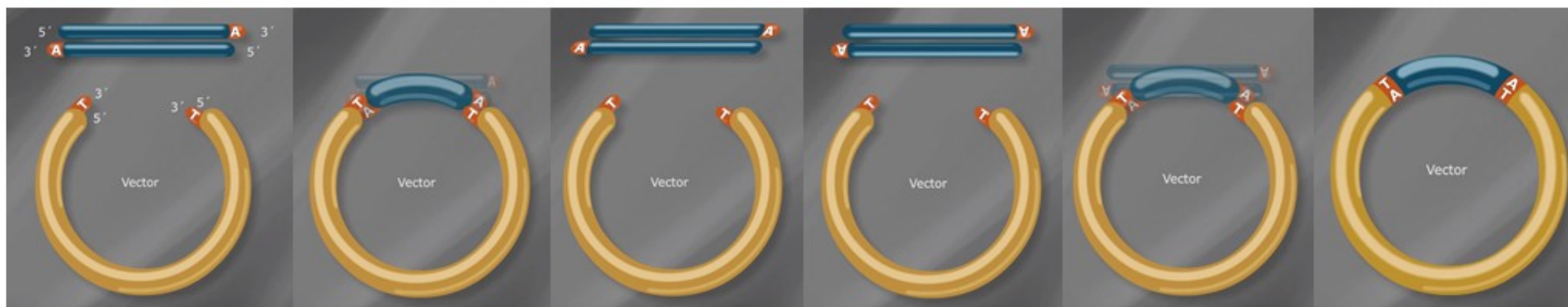
TA KLONOVÁNÍ VÝHODY (A NEVÝHODY)

VÝHODY

- není třeba použití restrikčních enzymů
- jednodušší, rychlejší, levnější

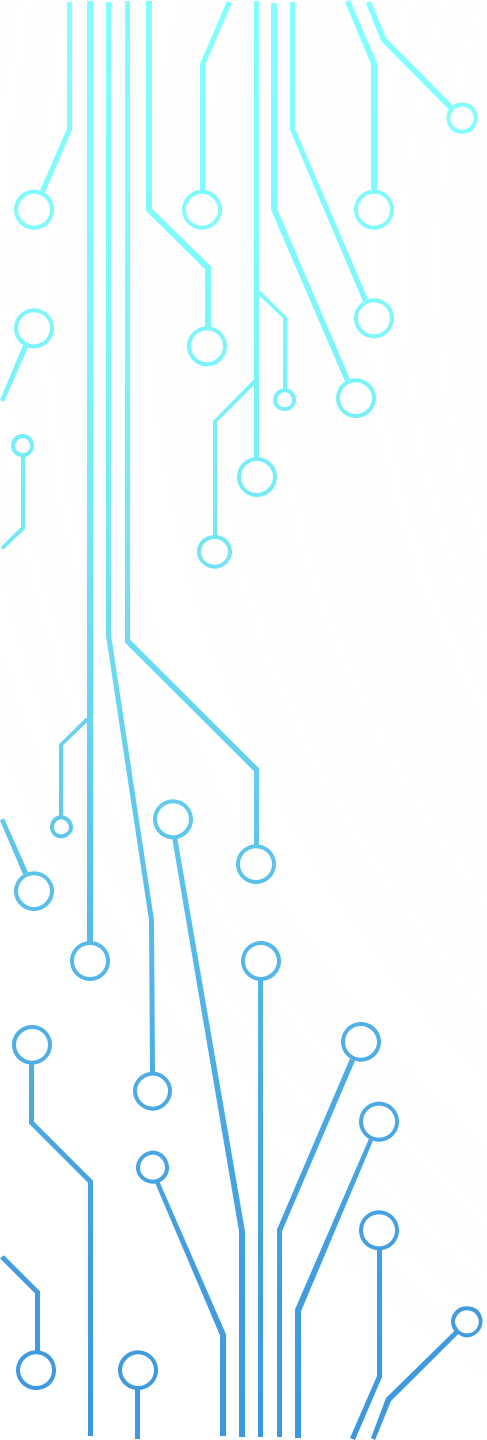
NEVÝHODY

× gen má 50% šanci na klonování v opačném směru



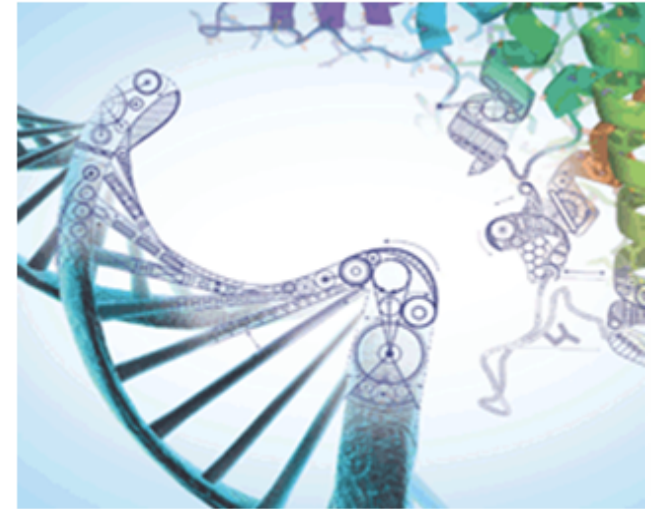
TA KLONOVÁNÍ VÝHODY (A NEVÝHODY)

ThermoFisher SCIENTIFIC	TA Cloning Kits	Competitor P
Účinnost klonování	80% (s kontrolou)	60% (s kontrolou)
Čas ligace	15 minut	1 hod
Teplota pro ligaci	Pokožová teplota	Pokožová teplota
Vyžaduje se čištění PCR produktu?	Ne	Doporučuje se
Selektivní antibiotika	Kanamycin & Ampicillin	Pouze Ampicillin



GATEWAY® KLONOVÁNÍ ÚVOD

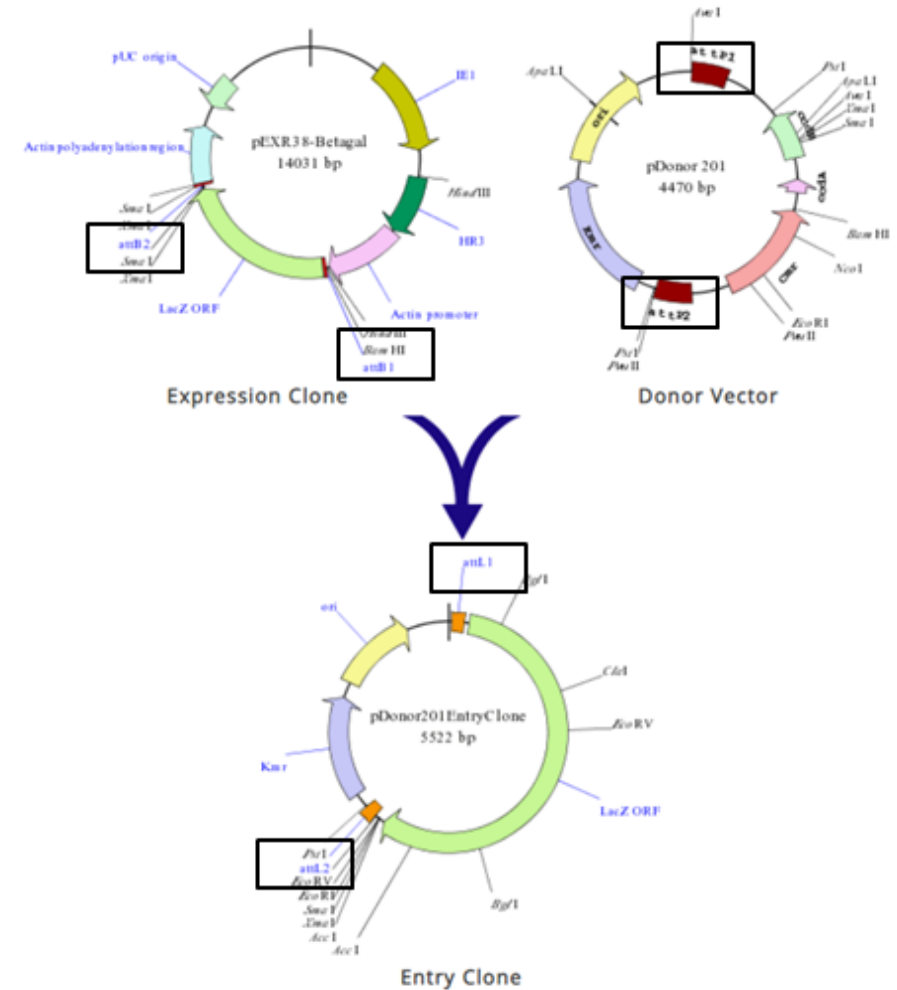
- komerční metoda vynalezena firmou Invitrogen (1990)
- umožňuje přenášet fragmenty DNA mezi různými vektory se zachováním čtecího rámce
- přenos tisíců fragmentů DNA do jednoho typu plasmidu nebo jednoho fragmentu do vícero různých plasmidů



GATEWAY® KLONOVÁNÍ MECHANISMUS

A. BP Reakce (PCR fragment + Donor vektor = Entry Clone)

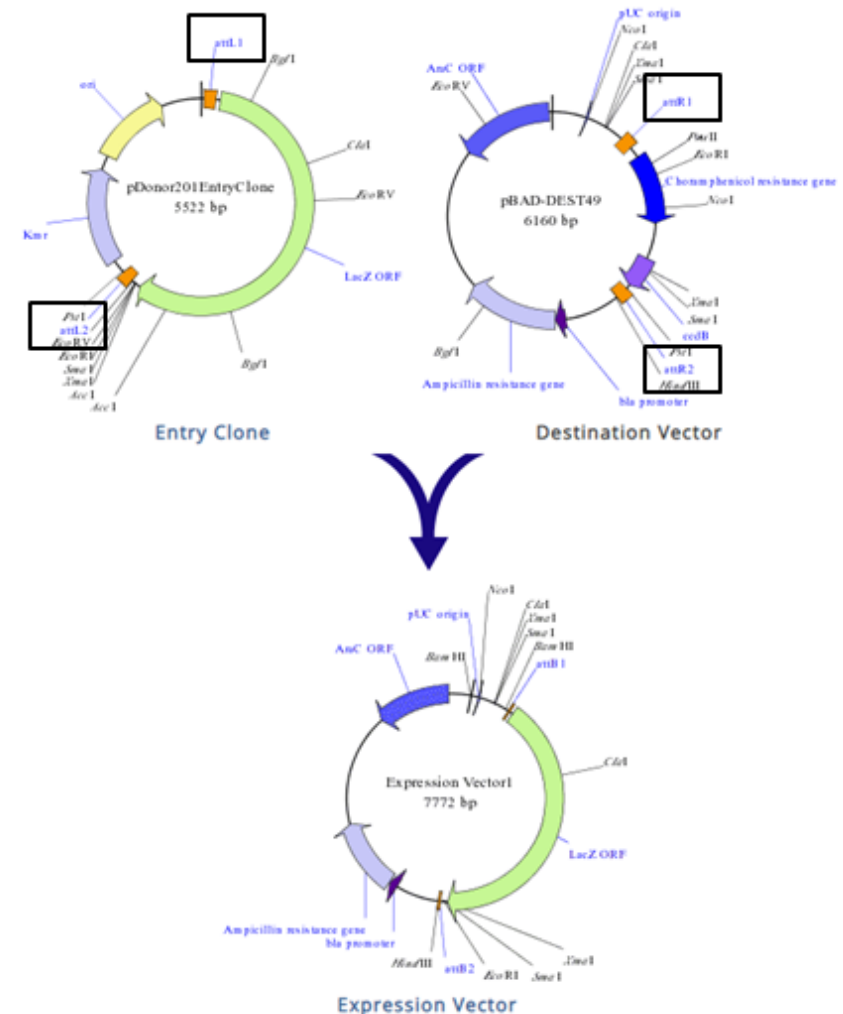
- DNA fragment je amplifikován s pomocí primeru značeného sekvencí attB
- Donor vektor obsahuje konce se sekvencí attP
- DNA fragment (s attB) se kombinuje s Donor vektorem (s attP) – vzniká Entry Clone
- Výsledný Entry Clone obsahuje požadovaný gen lemovaný sekvencemi attL



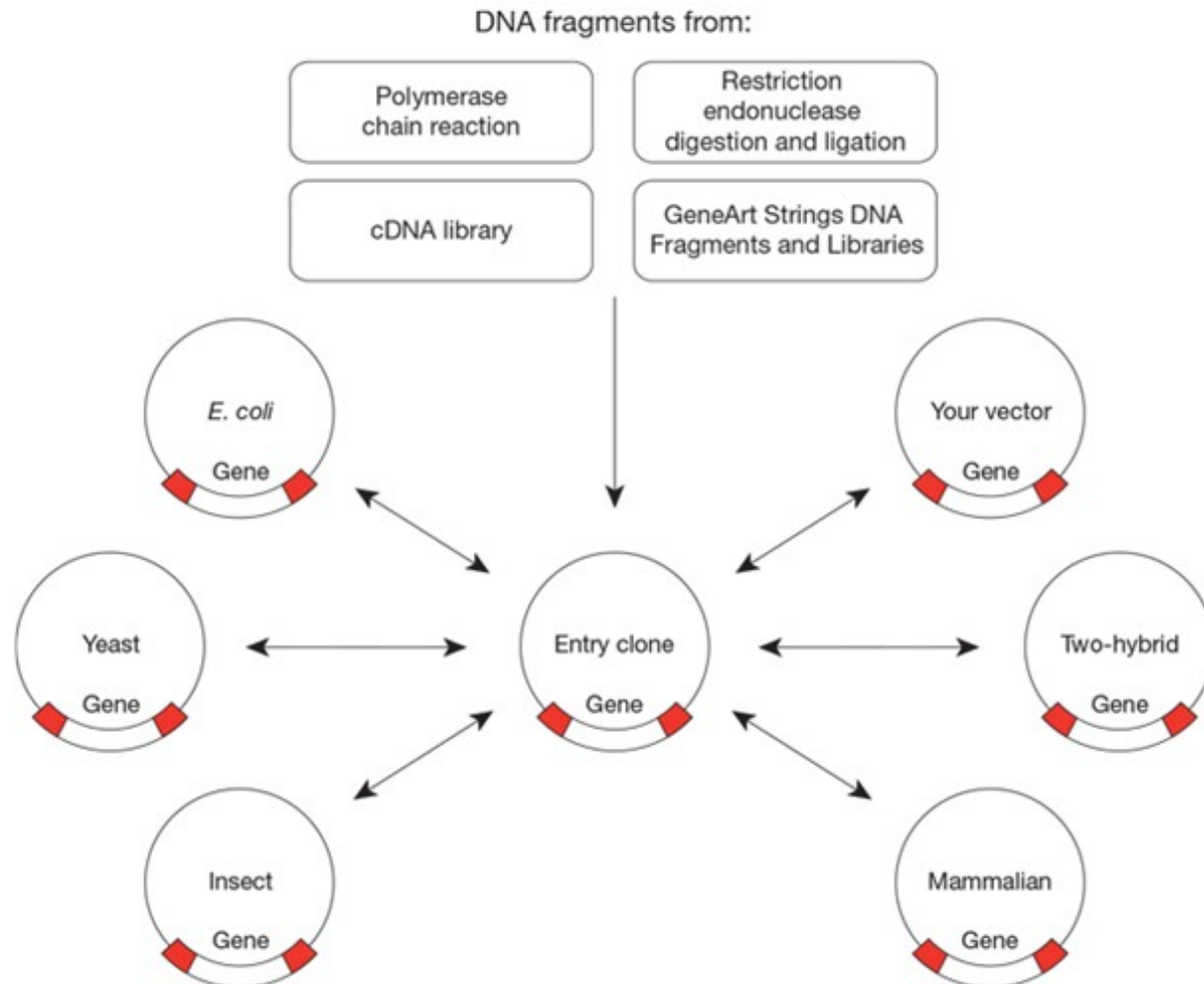
GATEWAY® KLONOVÁNÍ MECHANISMUS

B. LR reakce (Entry Clone + Cílový Vektor = Expression Clone)

- Rekombinantní reakce mezi attL a attR místy
- Entry Clone z BP reakce obsahuje attL místa
- Cílový vektor obsahuje attR místa
- Sledovaná sekvence je přenášena do jednoho nebo více cílových vektorů
- Do reakce je přidán vektor Gateway® a enzym Gateway® Clonase



GATEWAY® KLONOVÁNÍ CÍLOVÉ VEKTORY



GATEWAY® KLONOVÁNÍ CÍLOVÉ VEKTORY



Cílové vektory pro expresi proteinů

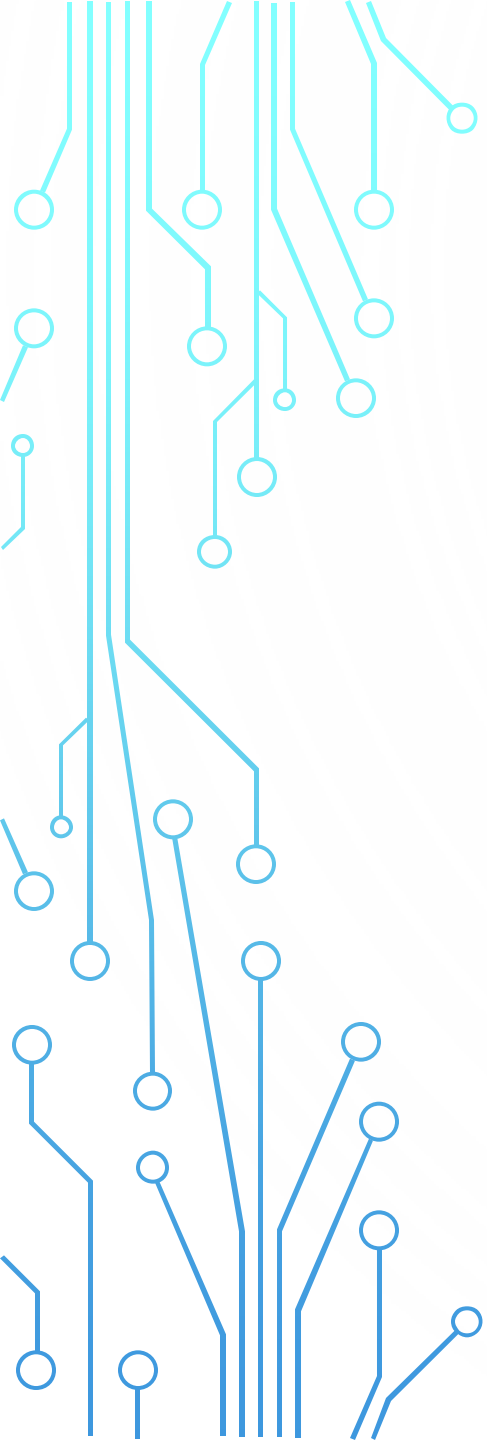
Hostitelé pro expresi proteinů	Gateway Cílové vektory
<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none">• pDEST 14, 15, 17, and 24• pET160 and pET161 DEST vectors
Kvasinky	pYES2-DEST52
Hmyzí buňky	BaculoDirect C-Term Expression
Savčí buňky (konstitutivní exprese)	pcDNA mammalian expression vector family
Savčí buňky (regulovaná exprese)	pT-REx-DEST30 , and pT-REx-DEST31
Savčí buňky (přenos virových genů)	ViraPower Lentiviral Expression Systems

Cílové vektory pro jiná použití

Použití	Gateway Cílové vektory
Produkce protilátek nebo antigenů	Champion pET Expression systems
Lokalizace	Vivid Colors pcDNA GFP Destination vector family
Protein array	Expressway Plus Expression System
Studování protein-protein interakcí	ProQuest Two-Hybrid System using Gateway technology
Reporter assay	GeneBLazer pcDNA vector family
RNAi	GeneBLazer pcDNA vector family

GATEWAY® KLONOVÁNÍ VÝHODY (A NEVÝHODY)

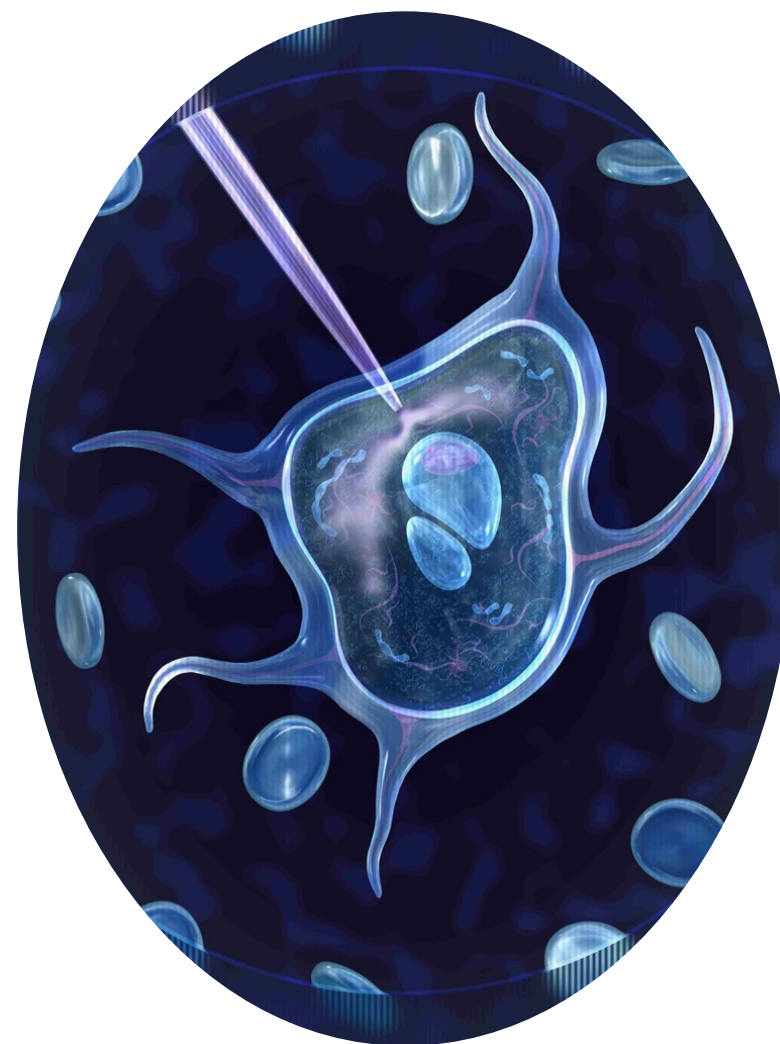
- 95 % účinnost klonování
- v průběhu klonování zachována orientace a čtecí rámeček
- rychlá reakce – přibližně 1 hod při pokojové teplotě
- snadná manipulace DNA materiálu z vektoru do vektoru



Genové inženýrství

Zabývá se vytvářením
pozměněných či nových genů a
jejich zaváděním do organismů s
cílem rekonstruovat jejich
genetickou výbavu

Metodickým základem genového
inženýrství jsou manipulace s
DNA in vitro
Cílené změny v genetické
informaci lze provádět také in
vivo.



DNA knihovny



Do bakteriálních buněk je možno vložit fragmenty z celého buněčného genomu.

→ Genomová knihovna



Genové inženýrství

Příprava látek významných v lékařství, zemědělství a průmyslu
vnášení cizorodých genů do nepříbuzných organismů a
získávání produktů ve velkém množství - překonání
reprodukčních bariér

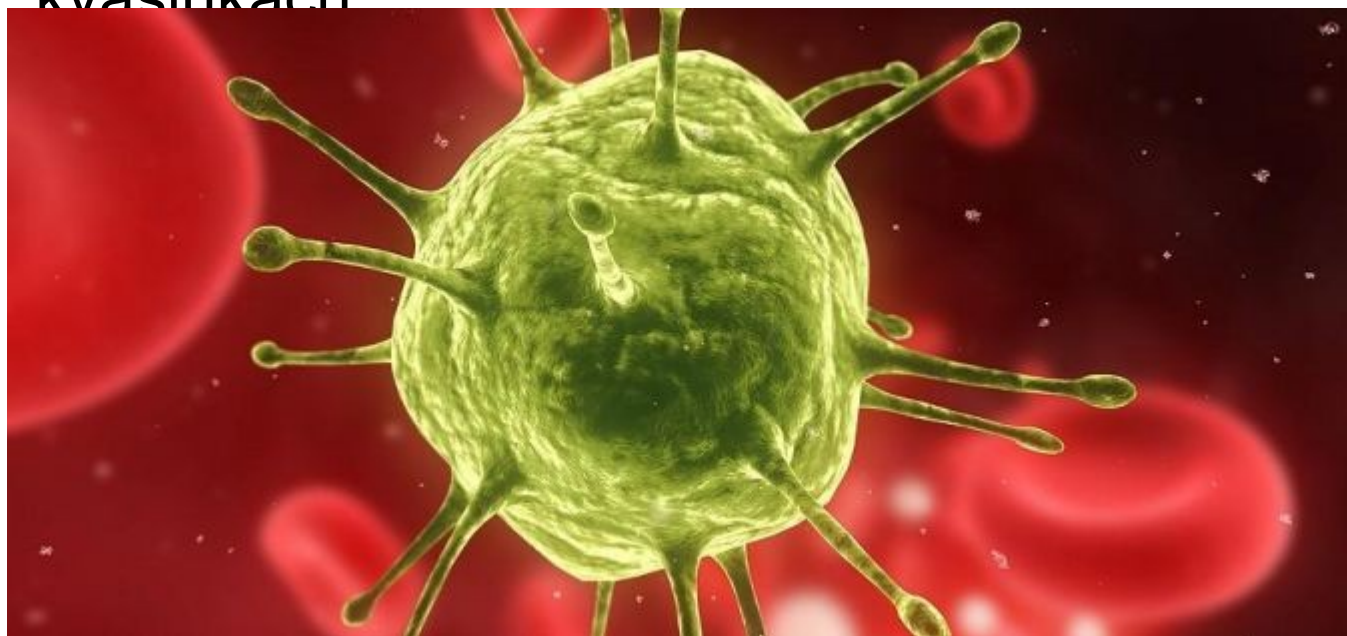


álních buňkách

Genové inženýrství

Příprava látek s novými vlastnostmi pozměňováním stávajících, nebo vytvářením nových genů - enzymy, protilátky, vakcíny aj.

Příprava podjednotkové vakcíny viru hepatitidy B (HBV) ve kvasinkách



Genové inženýrství

Pozměňování a zlepšování vlastností organismů

Příprava mikroorganismů pro biotechnologie

Zvyšování výnosů kulturních rostlin a užitkovosti hosp. zvířat

(odolnost vůči chorobám, škůdcům nebo zevním vlivům,
produkce cizích látek v tělech rostlin a zvířat)



Genové inženýrství

Potraviny a krmiva

-Ovlivňování agronomických vlastností

Rezistence k herbicidům

Rezistence k patogenům (hmyzu, virům, plísním apod.)

Tolerance ke stresům (vodní stres – sucho, mráz;
osmotický stres – zasolení půd)

-Modifikace posklizňových vlastností

Prodloužení skladovatelnosti

Zpomalení zrání a navození rezistence k skládkovým
chorobám

-Rezistence k virům

-Rezistence k hmyzím škůdcům

-Vylepšení nutričních hodnot plodů a semen nebo rostlinných
produktů využívaných průmyslově

Genové inženýrství

Živočichové

- Zvířata (myši, drůbež, hospodářská zvířata, ryby) obsahující gen pro
růstový hormon – rychlejší růst, změna vlastností produktů
- Přežvýkavci obsahující ve střevě GMO-mikroorganismy, které
redukuje toxicitu některých rostlin (rozšíření potenciálu
krmiv)
- Drůbež s pozměněnými trávicími schopnostmi (celulóza,
lignin, tuky)
- Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu (v
průmyslu a farmakologii)
- Ovce s vylepšenou srstí
- Zvířata jako dárci orgánů pro transplantaci



Genové inženýrství

Genová terapie

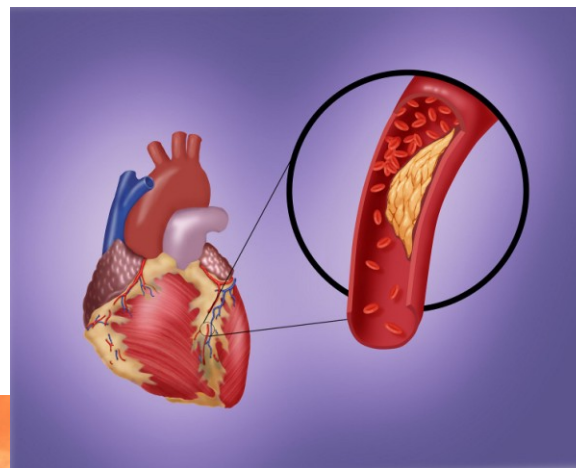
léčba genetických chorob dědičných i nádorových



Gaucherova choroba



fenylketonurie



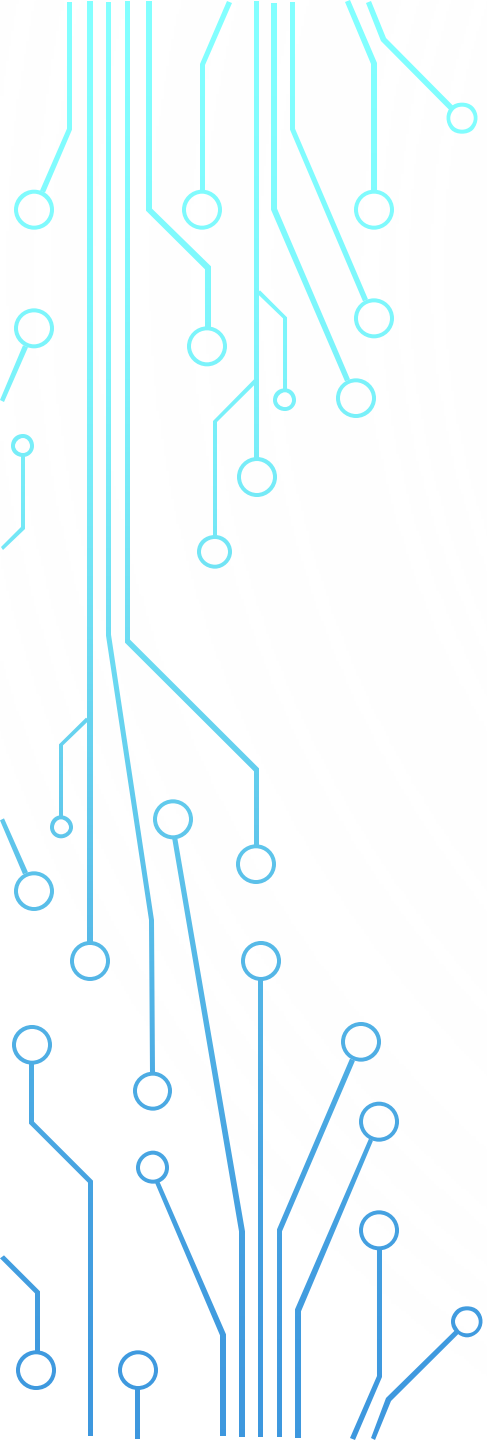
familiární
hypercholesterolemie

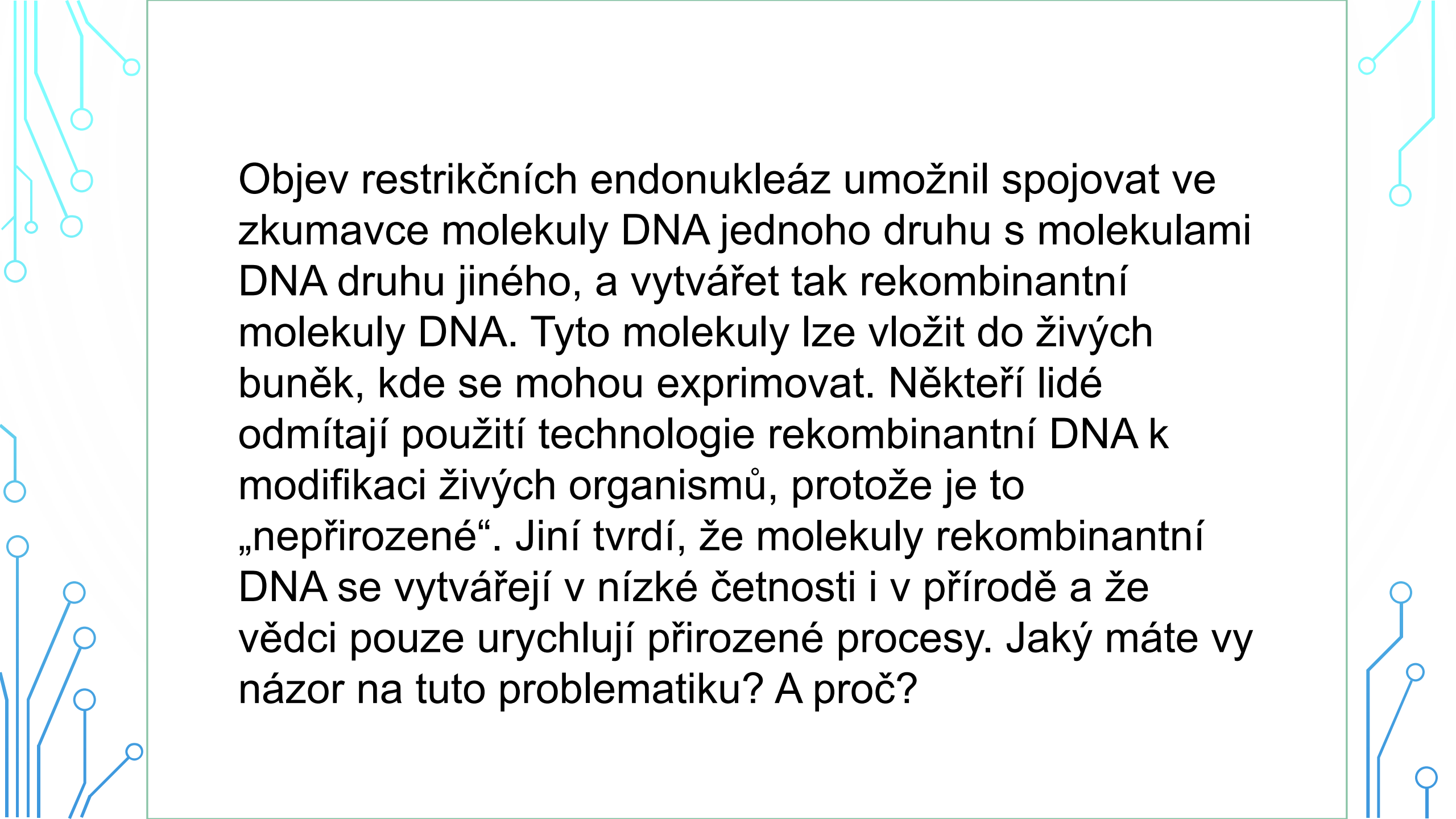


hemofilie



cystická fibróza





Objev restričních endonukleáz umožnil spojovat ve zkumavce molekuly DNA jednoho druhu s molekulami DNA druhu jiného, a vytvářet tak rekombinantní molekuly DNA. Tyto molekuly lze vložit do živých buněk, kde se mohou exprimovat. Někteří lidé odmítají použití technologie rekombinantní DNA k modifikaci živých organismů, protože je to „nepřirozené“. Jiní tvrdí, že molekuly rekombinantní DNA se vytvářejí v nízké četnosti i v přírodě a že vědci pouze urychlují přirozené procesy. Jaký máte názor na tuto problematiku? A proč?



"Holy great mother of God, I've been cloned!"