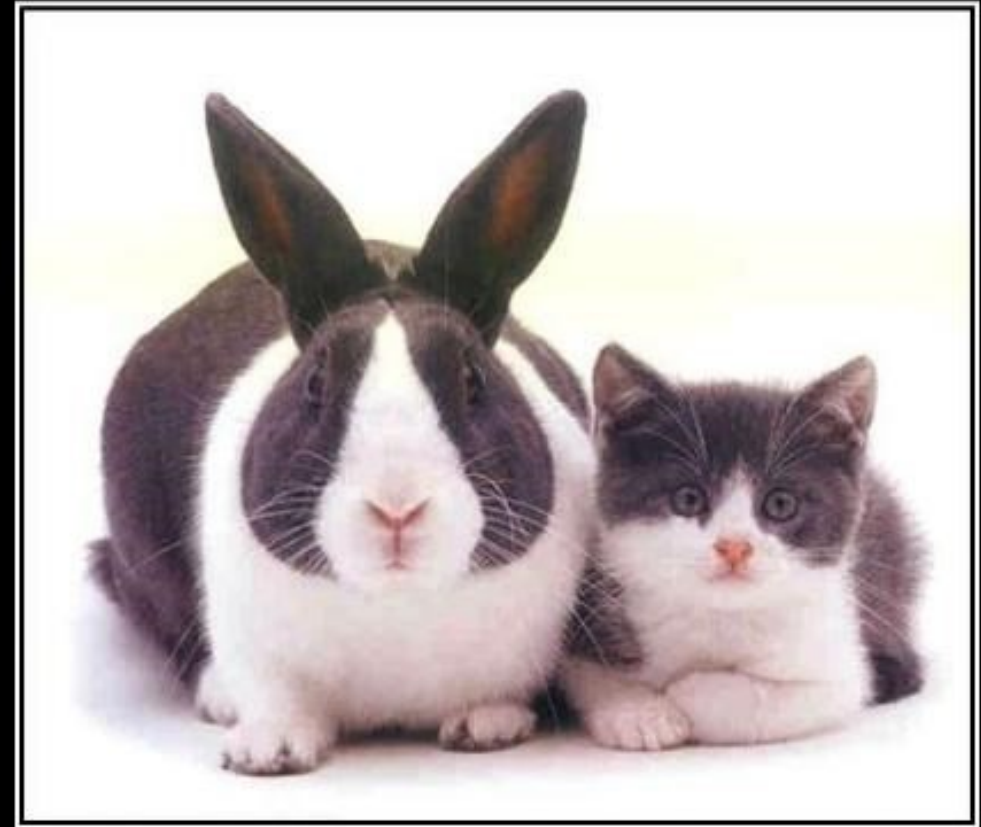


METODY KLONOVÁNÍ

Natalie Bazelová
Monika Buchtová
Patrícia Kittová
Martina Rievajová



CLONING

Results may vary

HISTÓRIA KLONOVANIA

- Október 1990 - Národný inštitút zdravia v USA oficiálne začal projekt skúmania ľudského genómu
- Júl 1995 - Škótski vedci naklonovali dve ovce Megan a Morag z dvoch rôznych embryí
- Február 1997 - Škótski vedci vyklonovali prvého dospelého cicavca - ovcu Dolly
- Júl 1997 - Opäť škótski výskumníci vyklonovali ovcu Polly z geneticky modifikovaných kožných buniek
- Júl 1998 - Havajskí vedci "vyrobili" z jednej myši 50 ďalších v troch generáciách
- Apríl 1999 - Vedci z Massachusetts (USA) vyklonovali tri kozy, pričom genetickou manipuláciou zmenili zloženie ich mlieka. V mlieku sa objavil proteín, ktorý pôsobí proti srdcovému infarktu a mŕtvici
- Január 2000 - Japonskí vedci vyklonovali býka. Ide o prvý prípad, kedy bol klonovaný veľký cicavec. Na klonovanie boli použité bunky z ucha kravy.
- 2000 - Výskumníci z Oregonu (USA) klonovali opicu Makak Rézus.
- November 2001 - V Massachusetts (USA) klonovali prvé ľudské embryá

KLONOVANIE

- Molekulárne klonovanie sa rozumie namnoženie úseku DNA z jednej kópie do obrovského kvanta kópií, a to prostredníctvom replikačného aparátu hostiteľskej bunky (baktérií, kvasiniek).
- Klón – súbor molekúl alebo buniek identických s pôvodnou molekulou či bunkou
- Využitie – rôzne účely ako konštrukcia chimérických génov, výroba hybridizačných sond, expresia rekombinantných proteínov

VYUŽITÍ KLONOVÁNÍ

DNA knihovny – kolekce klonovaných DNA fragmentů genomu určitého organismu (cDNA), které jsou skladovány uvnitř hostitelských organismů (zejména bakterií)

Soubor rekombinantních plazmidů nesoucích různé fragmenty představuje tzv. knihovnu genomové DNA

Využití

- Množení lidských proteinů pomocí bakteriálních kultur;
- Porovnávání vývojových změn ve tkáních;
- Získání dostatečného množství genetického materiálu pro určení sekvence genomu

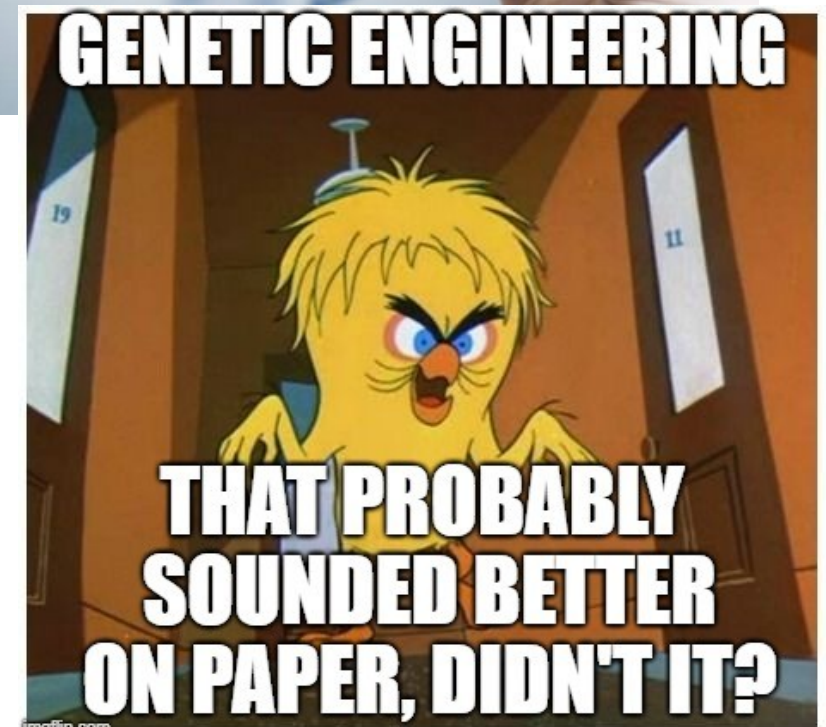
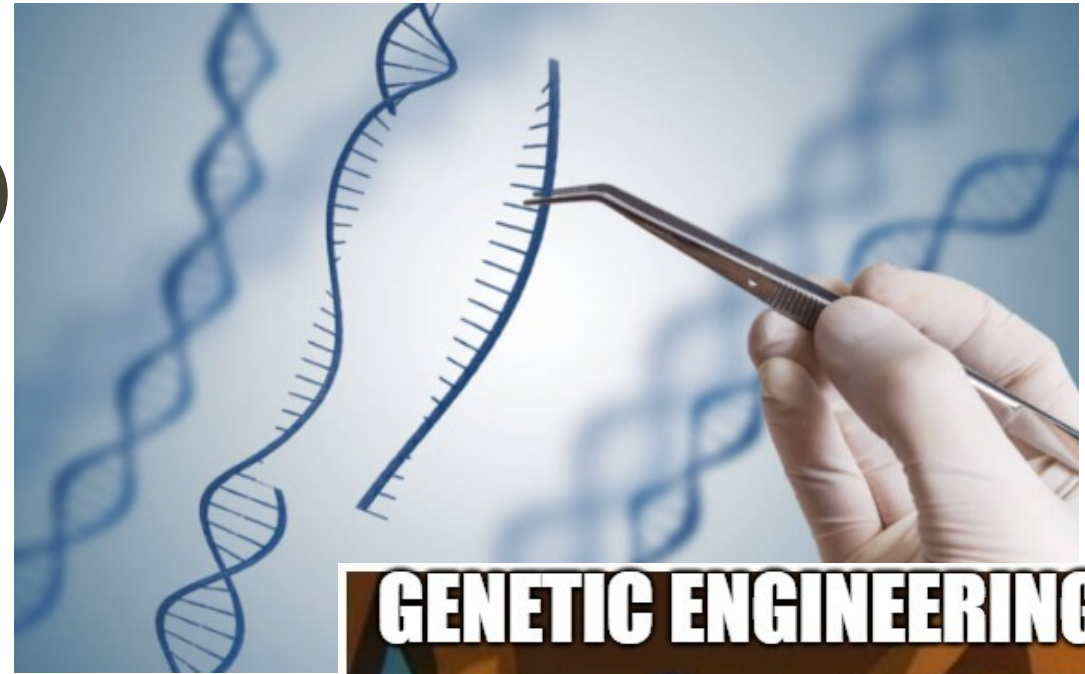
VYUŽITÍ KLONO

Genové inženýrství

Metodickým základem genového inženýrství jsou manipulace s DNA in vitro → vytvářením pozměněných či nových genů

Zavádění těchto genů do organismů → pozměňování a zlepšování vlastností organismů

Zvyšování výnosů rostlin a užitečnosti hospodářských zvířat (odolnost vůči chorobám, škůdcům nebo zevním vlivům)



VYUŽITÍ KLONOVÁNÍ



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

VYUŽITÍ KLONOVÁNÍ

Genové inženýrství – Živočichové

Zvířata (myši, drůbež, hospodářská zvířata, ryby) obsahující gen pro růstový hormon – rychlejší růst, změna vlastností produktů

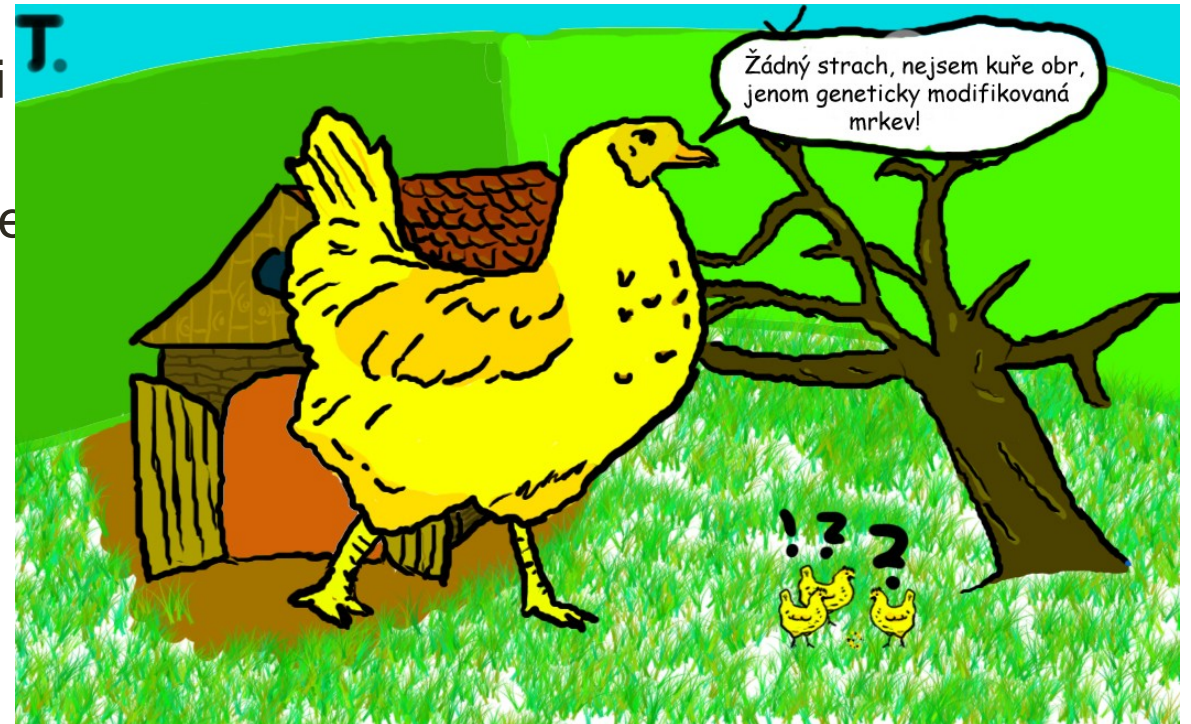
Přežvýkavci obsahující ve střevě GMO-mikroorganismy, které redukují toxicitu některých rostlin (rozšíření potenciálu krmiv)

Drůbež s pozměněnými trávicími schopnostmi (celulóza, lignin, tuky)

Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu ve vaječném bílku (využití v průmyslu a farmakologii)

Ovce s vylepšenou srstí

Zvířata jako dárci orgánů pro transplantace



VYUŽITÍ KLONOVÁNÍ

Genové inženýrství

Vnášení cizorodých genů nepříbuzných organismů a získávání produktů ve velkém množství (př. Příprava lidského insulinu v bakteriálních buňkách)

Příprava látek s novými vlastnostmi pozměňováním stávajících nebo vytvářením nových genů (enzymy protilátky, vakcíny)

Příprava látek (významné v lékařství, zemědělství a průmyslu)

VYUŽITÍ KLONOVÁNÍ

Genové inženýrství – Genová terapie

Léčba genetických chorob dědičných i nádorových

Do genomu pacienta je vložena sekvence DNA, přičemž tato sekvence kóduje nějaký chybějící nebo nefungující protein

Klasické genetické choroby /vrozené vady metabolismu/:

- Fenylketonurie, Hemofilie A, B, Poruchy srážlivosti, Poruchy imunity, Cystická fibróza

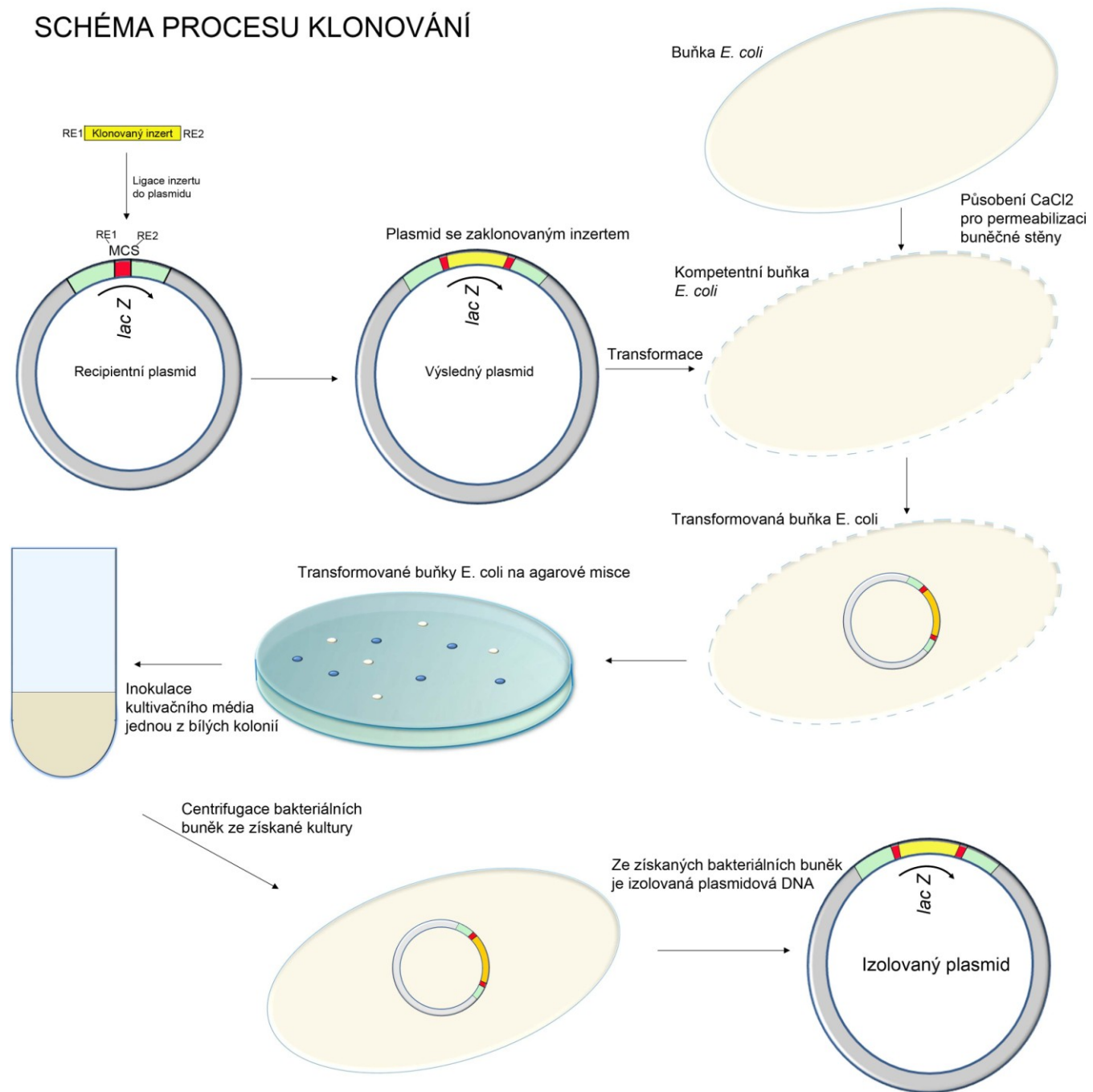
Komplexní genetické choroby

- Rakovina, kardiovaskulární choroby, diabetes apod.

NAJČASTEJŠÍ POSTUP PRI KLONOVANÍ

- I. Výber vhodného klonovacieho vektoru
- II. Úprava koncov vektorov a koncov klonovanej DNA tak aby boli konce vzájomne kompatibilné
- III. Vloženie DNA do vektoru
- IV. Vloženie vektoru s inzertom do hostiteľských buniek
- V. Namnoženie hostiteľských buniek
- VI. Izolácia namnoženej DNA s inzertom

SCHÉMA PROCESU KLONOVÁNÍ



PRENOS DNA DO BUNIEK

Plazmid môže byť vložený ako do vnútra bakteriálnej, tak aj do vnútra živočíšnej bunky.

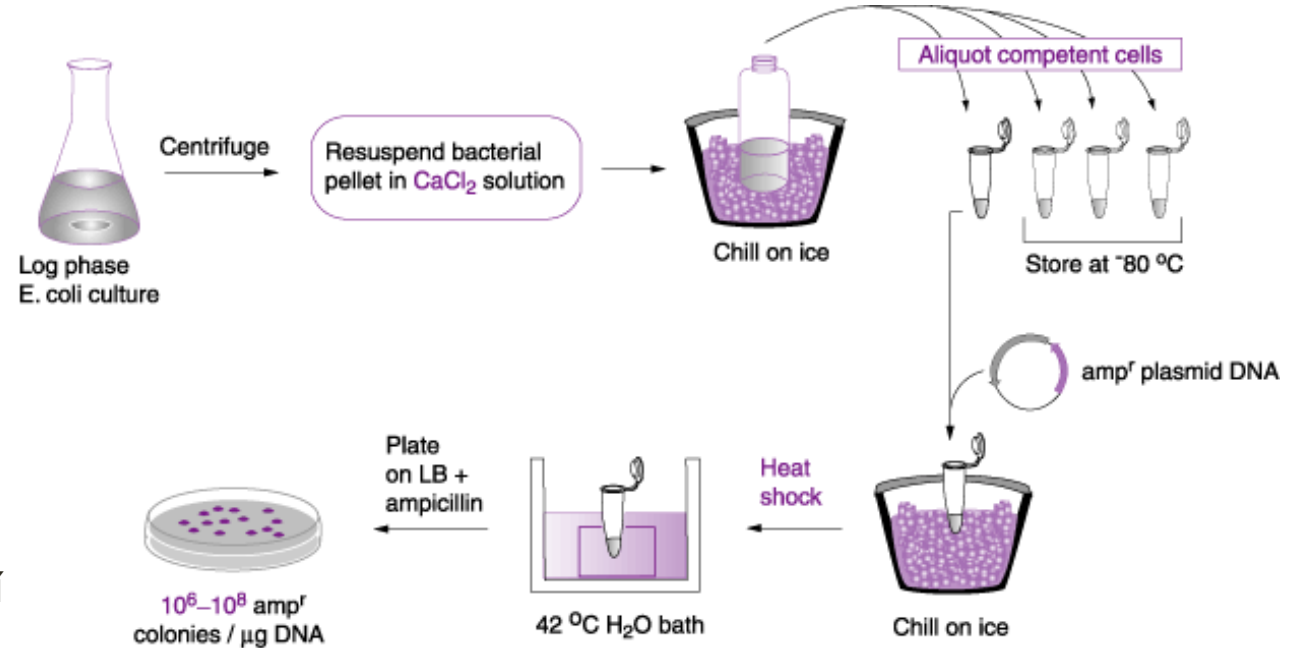
Transformácia – vkladanie DNA do bakteriálnej bunky (elektroporácia, mikroinjekcia alebo chemická cesta)

Transfekcia – vkladanie DNA do živočíšnej bunky (transfekcia fosforečnanom vápenatým, lipozómová transfekcia alebo transfekcia s využitím špeciálnych transfekčných reagentov)

Transdukcia je spôsob prenosu DNA pomocou vírusov

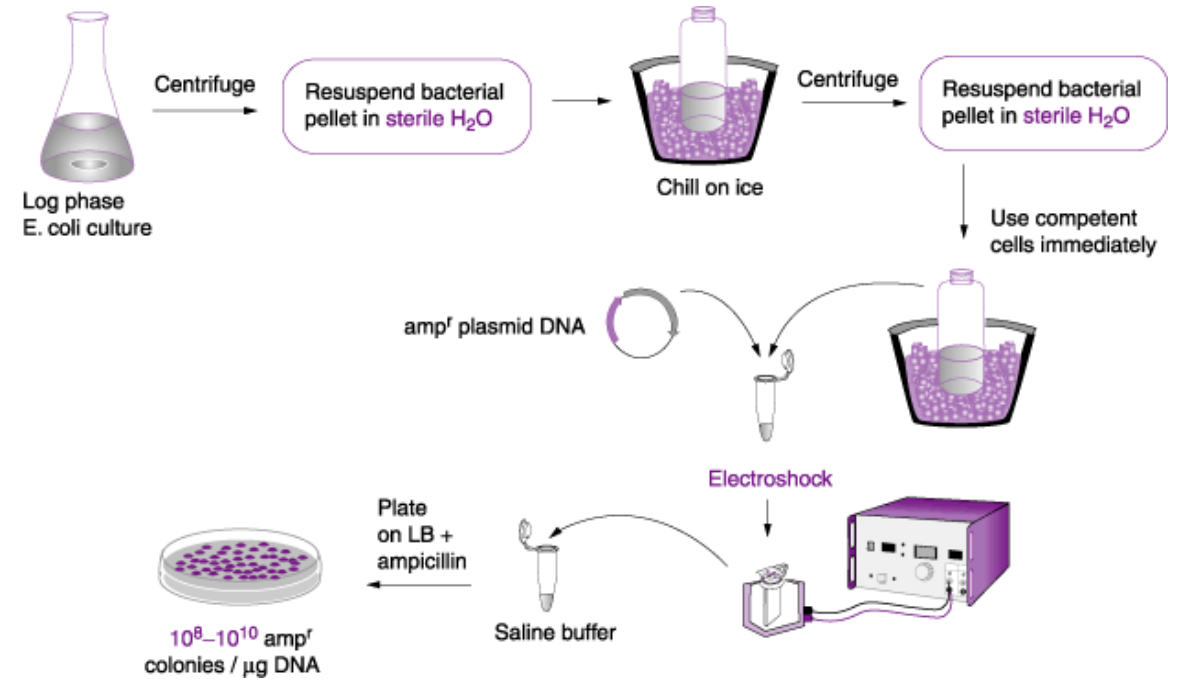
TRANSFORMÁCI A TEPELNÝM ŠOKOM ZA POUŽITIA CaCl_2

- Jedna z najčastejších foriem transformácie
- u *E. coli* sa pripravuje:
 - Premytím buniek ľadovým CaCl_2
 - Pridaním DNA
 - Miernym teplotným
 - Krátká inkubace v rústovom médiu (zotavení bakterií, exprese selekčného markeru)



TRANSFORMÁČIA ELEKTROPORÁČIOU

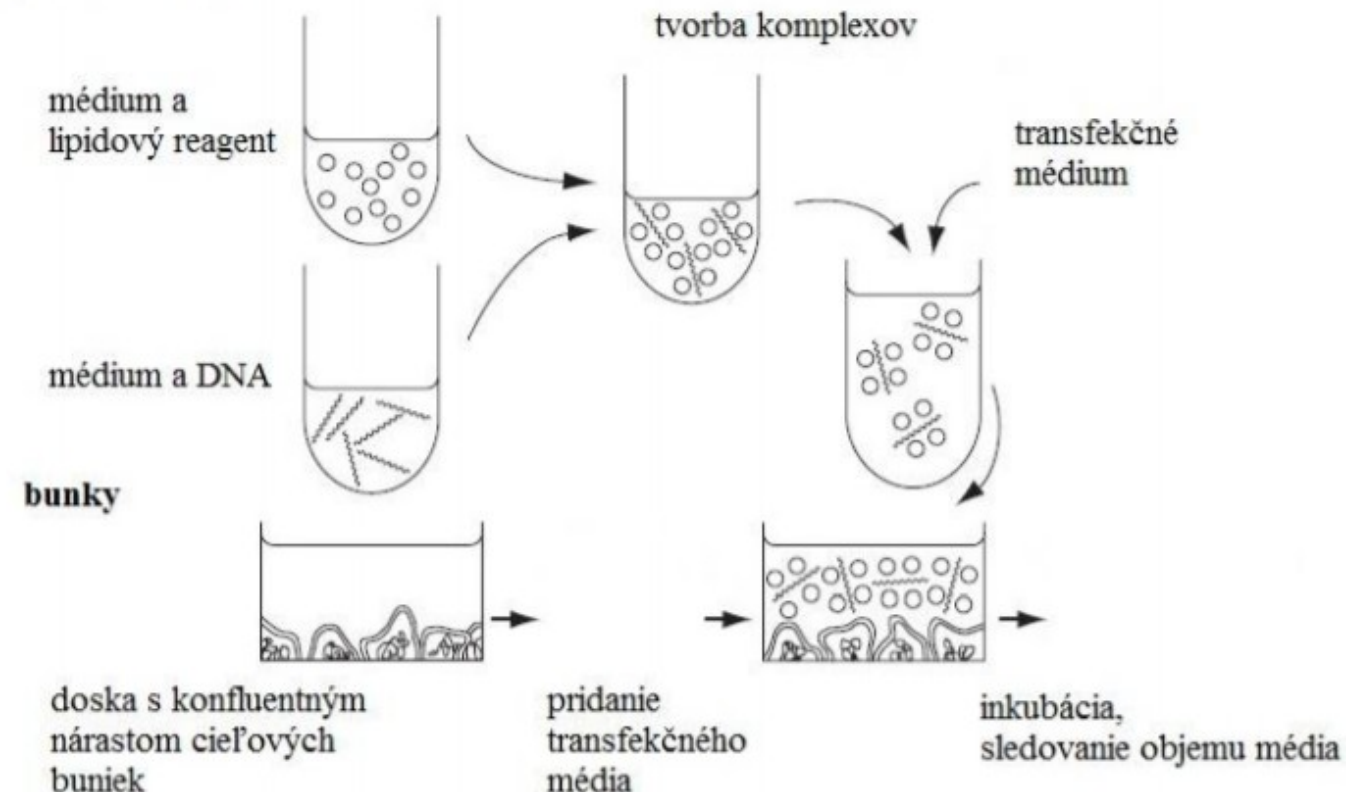
- Prepláchnutie buniek vodou (odmytie elektrolytov z rastového média)
- krátky elektrický puls o vysokom napätí
- dočasné otvory v bunečnom obale
- vstup DNA do bunky



LIPOFEKCI A

- Metóda vkladania funkčného genetického materiálu do cieľových buniek s využitím katiónových lipidov
- Využívanie v priemyselnej výrobe proteínov
- pozitívne nabité lipidy reagujú s negatívne nabitými molekulami NK a vytvárajú celistvý komplex
- tento komplex môže prechádzať cez bunkovú membránu
- Takto sa dajú cieľové bunky transfekovať nie len s DNA ale aj s RNA či s proteínmi

DNA-lipidové komplexy (vždy bez séra)



KLONOVACIE VEKTORY

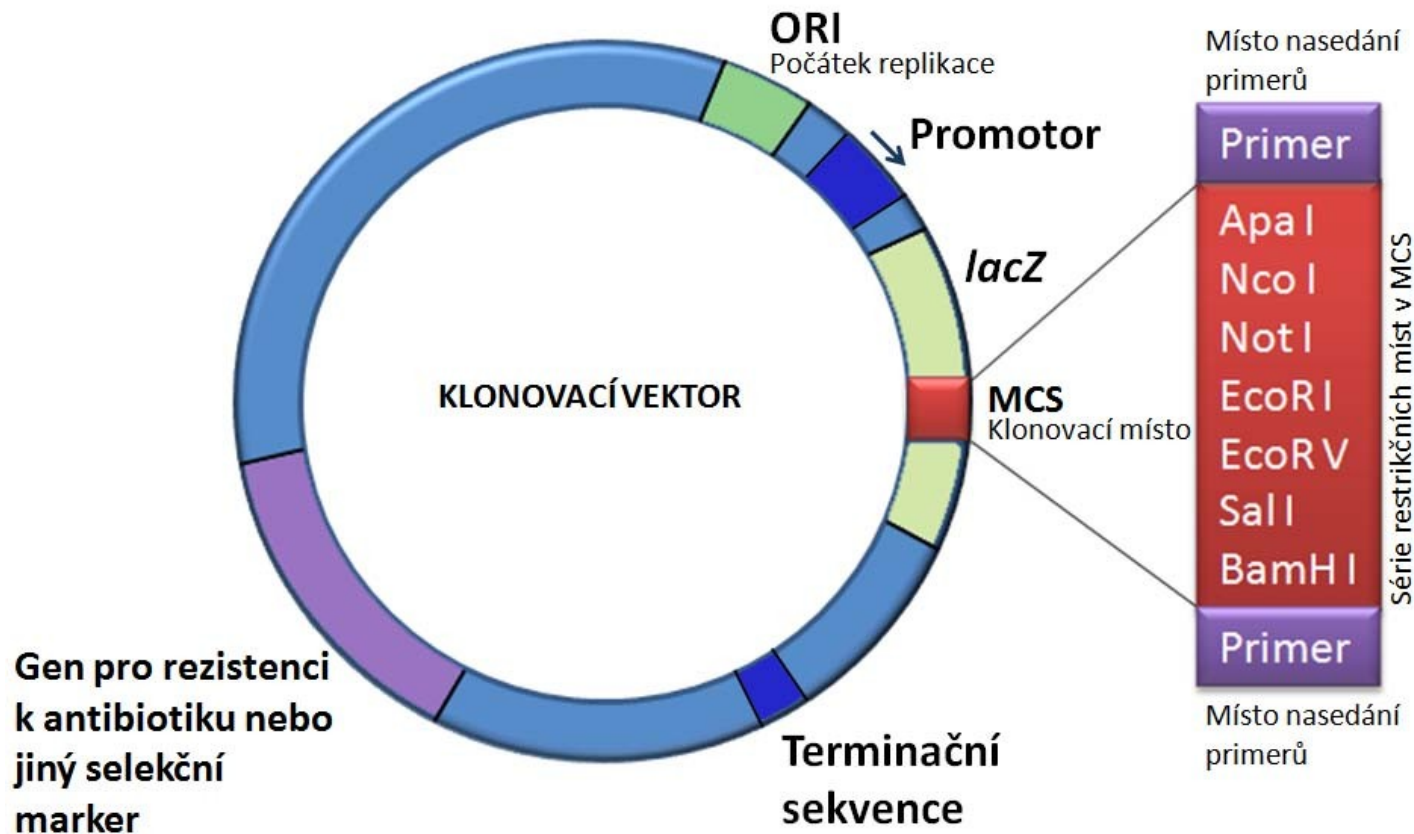
Podmienky pre klonovacie vektory:

- musia niesť gény k vlastnej replikácii
- Musia niesť klonovacie miesto tvorené radou rôznych restričných miest, ktoré po štiepení príslušnou restriktázou umožní inzerciu klonovaného úseku DNA do vektoru
- schopnosť umožniť selekciu, ktorá rozlíši hostiteľské bunky s vloženým vektorom od buniek bez vektoru alebo bunky s vektorom obsahujúcim inzert od buniek s prázdny vektorom

KLONOVACIE VEKTORY

POZNÁME:

- PLAZMIDY – čo sú malé kruhové molekuly DNA. Ku klonovaniu sa používajú geneticky modifikované plazmidy.
- FASMIDY – alebo tiež fagemidy, čo sú v podstate bežné bakteriálne plazmidy, ktoré nesú navyše časti genómu niektorého bakteriofága
- KOSMIDY – sú to modifikované plazmidové vektory na klonovanie veľkých fragmentov DNA
- BAKTERIOFÁGY – vírusy, ktoré napadajú baktérie. Pre klonovanie sú využívané ak je klonovaná väčšia molekula DNA
- UMELÉ BAKTERIÁLNE A KVASINKOVÉ CHROMOZÓMY – molekuly cudzej DNA väčšie než 47 kb je možné vklonovať do umelých chromozómov



Plazmidy používané ako klonovacie vektory obsahujú:

- replikátor (počiatok replikácie)
- selekčný marker
- klonovacie miesto
- často tiež obsahujú gén *LacZ*, ktorý umožní tzv. modro-bielu selekciu

PLAZMIDY AKO KLONOVACIE VEKTORY

POČIATOK REPLIKÁCIE (ori - ORIGIN OF REPLICATION)

Sekvencia DNA kde sa začína replikácia

Určuje *vector copy number* – počet vektorov v bunke

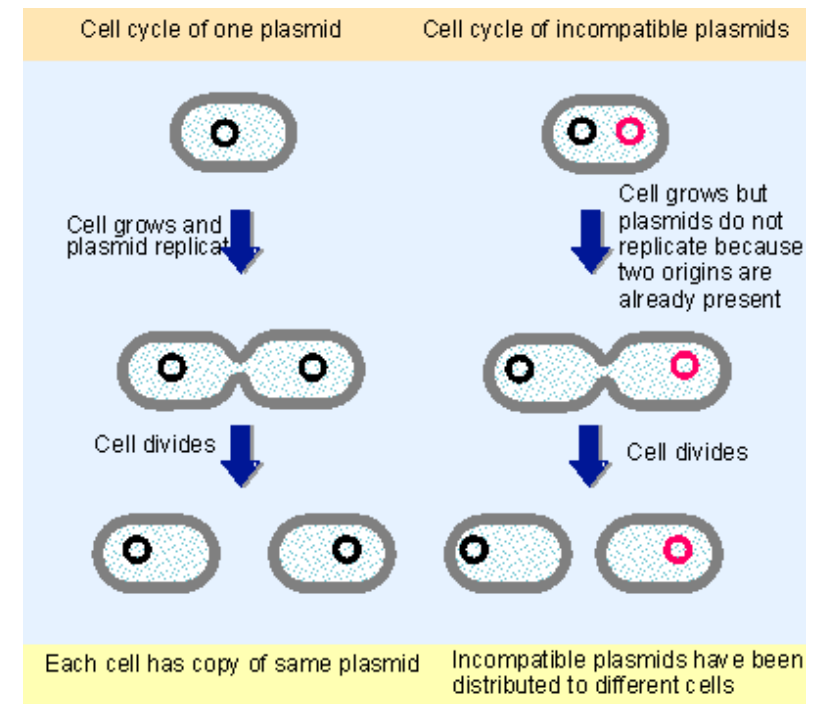
- Počet kópií má vplyv na stabilitu plazmidu

Určuje kompatibilitu plazmidu

- Schopnosť 2 plazmidov koexistovať v 1 bunkovej línii
- Blízko príbuzné plazmidy majú tendenciu byť inkompatibilné

Bežne využívané počiatky replikácie

Vektory	Počet kópií	ORI	Skupina nekompatibility
pUC	500-700	pMB1 (derivative)	A
pBR322	15-20	pMB1	A
pET	15-20	pBR322	A
pColE1	15-20	ColE1	A
pACYC	10	P15A	B

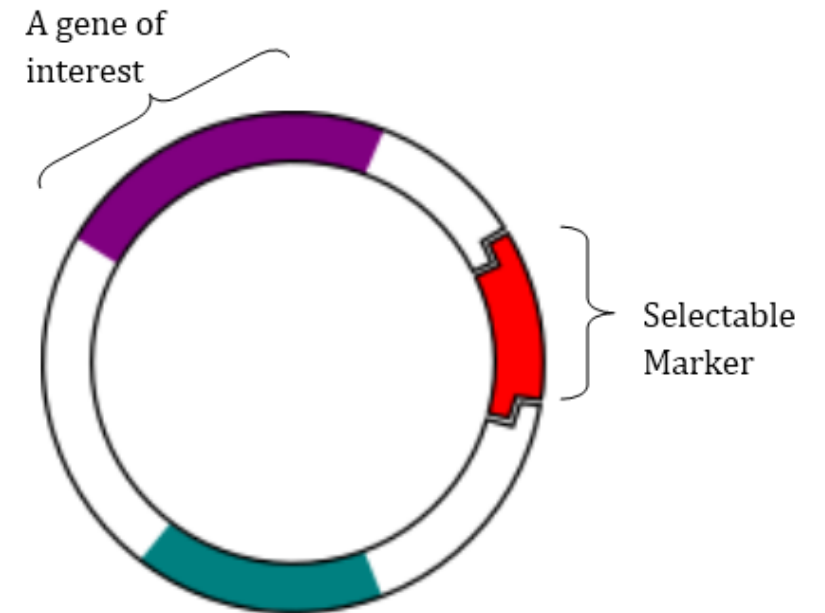


SELEKČNÉ MARKERY

Procesy ligácie a transformácie sú málo účinné (< 1%)

Selekčné markery - potvrdenie úspešného vloženia cudzej DNA do bunky

Gén pre selekčný marker je vkladajú do bunky zároveň s génom záujmu



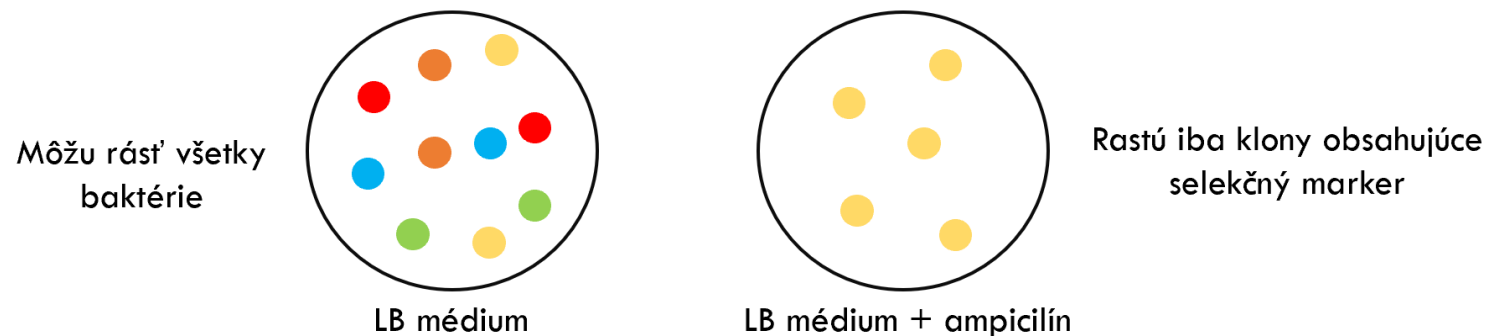
POZITÍVNE SELEKČNÉ MARKERY



Umožnenie rastu v prítomnosti toxických látok

Najčastejšie – rezistencia k antibiotikám napr. ampicilín, kanamycín, gentamicín...

Gén bla – kóduje enzým β -laktamázu, ktorá hydrolyzuje β -laktámové antibiotiká, napr. ampicilín



INZERČNÁ INAKTIVÁCIA

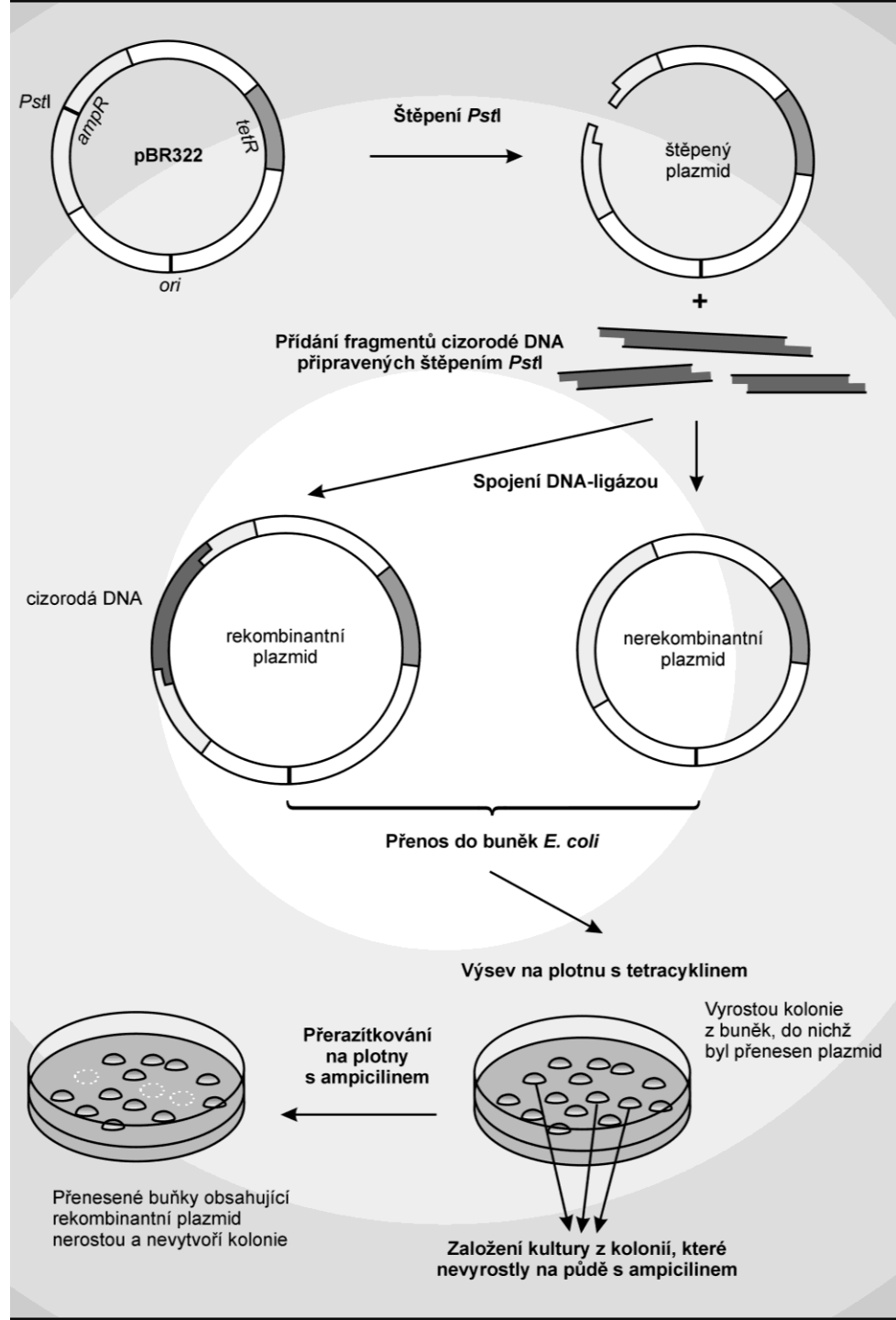
Úspešné začlenenie fragmentu do DNA –
prejav na fenotype transformovaných baktérií

Klonovacie miesto je zodpovedné za
rezistenciu

inzercia spôsobí stratu funkcie génu

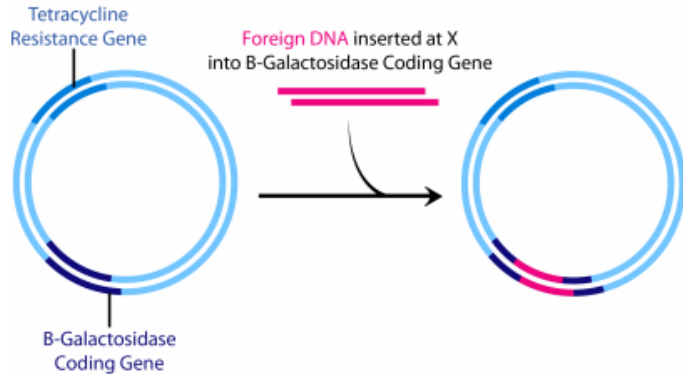
Klonovanie v plazmide pBR322

- Gén pre rezistenciu k ampicilínu – vkládaná cudzorodá DNA
- Gén pre rezistenciu k tetracyklínu



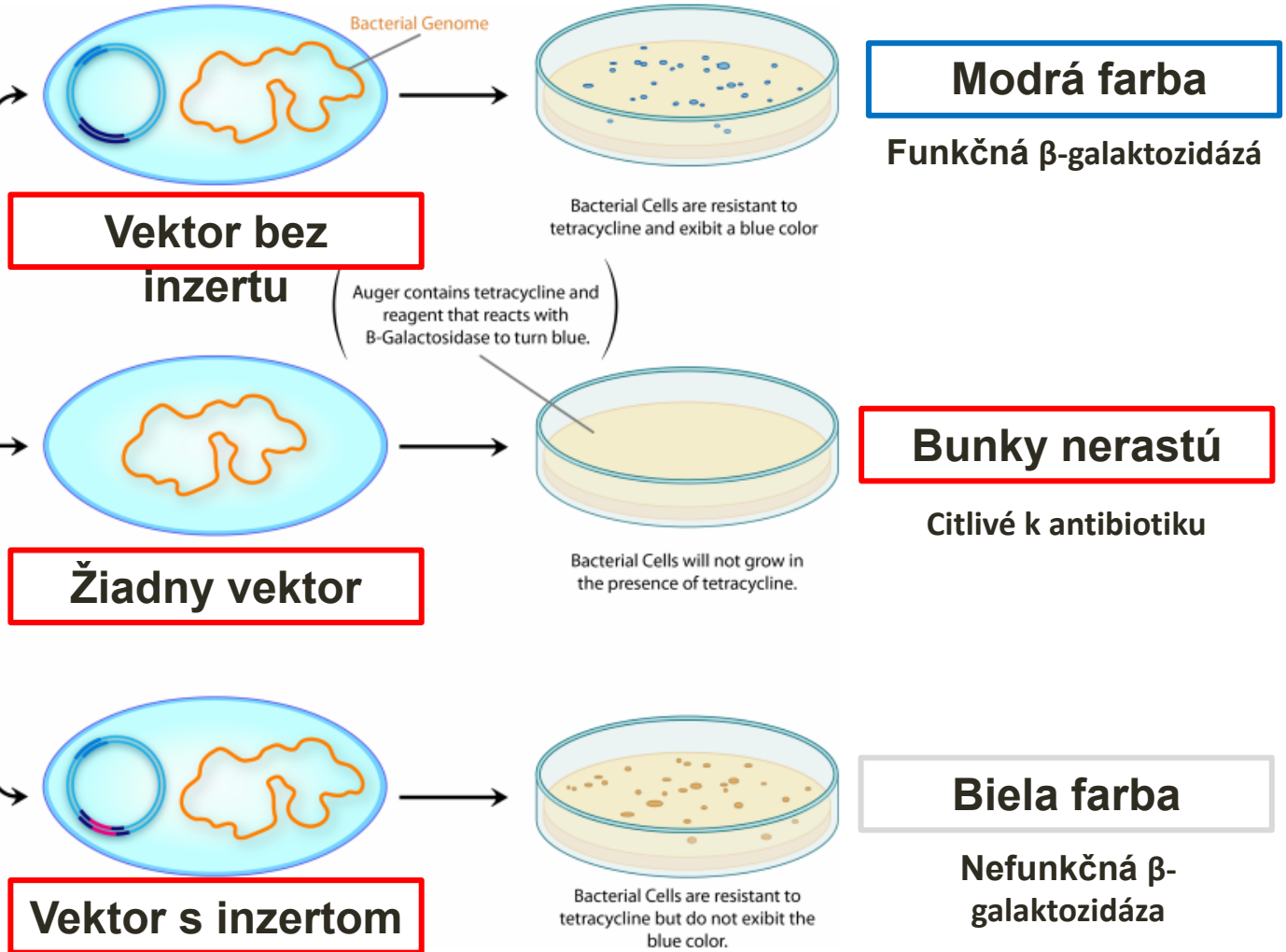
MODRO-BIELY TEST

Vektor obsahujúci gén pre rezistenciu k ATB a gén lacZ kódujúci β -galaktozidázu



Médium obsahuje vhodné antibiotikum, IPTG (induktor expresie) a X-Gal (substrát pre β -galaktozidázu)

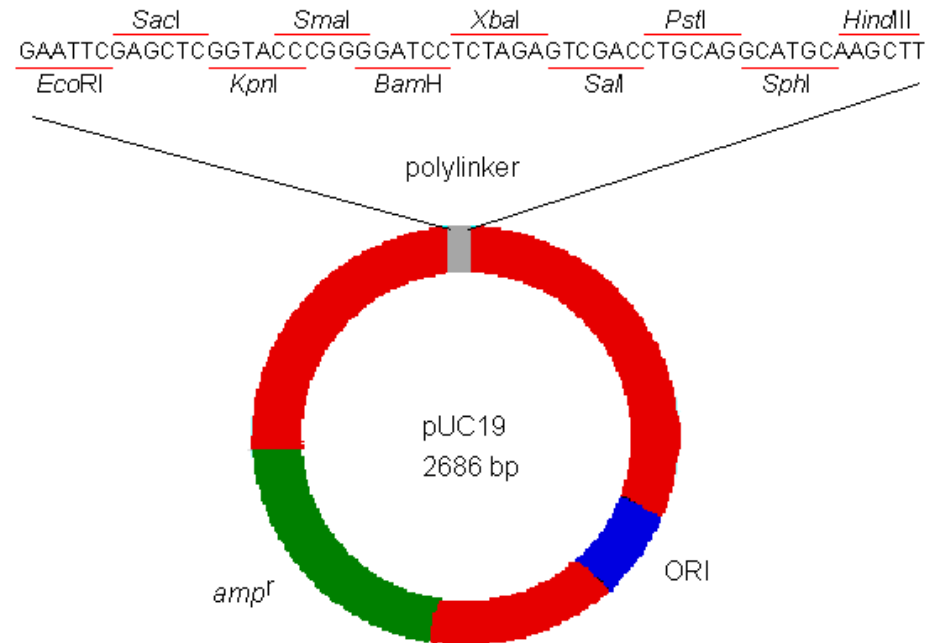
Mix Plasmids into Bacterial Cells



KLONOVACIE MIESTO (POLYLINKER, MULTIPLE CLONING SITE)

Krátky úsek DNA obsahujúci veľa jedinečných miest rozpoznávaných reštrikčnými enzýmami

Reštrikčné enzýmy štiepia plazmid a umožňujú inzerciu cudzorodej DNA bez narušenia zvyšku plazmidu



TA KLONOVÁNÍ

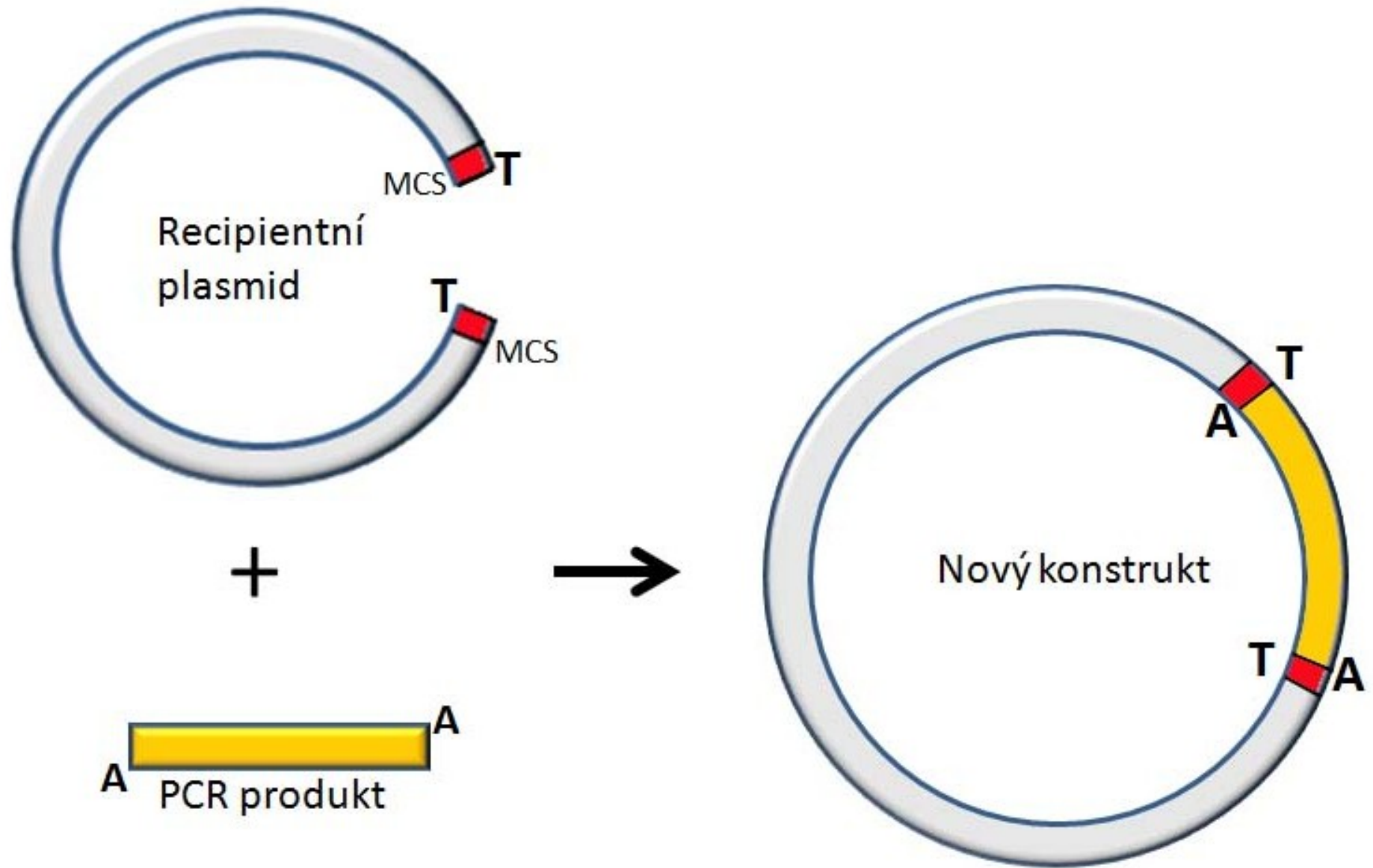
Využívá komplementarity mezi adeninem a thyminem

Jednoduchý způsob klonování

Zaklonování PCR produktů

Princip:

- Produkty PCR se amplifikují pouze s *Taq* DNA polymerázou
- Většina *Taq* polymeráz postrádá 3'→5' exonukleázovou aktivitu
- S velkou pravděpodobností na 3' konci PCR produktu zanechává A (PCR produkt, na 3' konci převis jednoho A)
- Využití v TA klonování: využití linearizovaného plazmidu, které nese na 5' konci převis T
- Smíchání vektoru s insertem → rekombinantní DNA



Při TA klonování jsou zaklonovány PCR produkty (nesoucí adeniny na svých koncích) do vektorů s převisy thyminů.

ZÁKLADNÍ POSTUP PŘI TA KLONOVÁNÍ:

1. Připravíme PCR reakci s primery k cílovému úseku
2. Získaný PCR produkt ověříme elektroforetickou separací, produkt přečistíme.
3. Provedeme standardní ligační reakci.
4. Získaný plasmid se zaklonovaným PCR produktem může dále použít pro subklonování, kdy využijete restričních míst v MCS daného plasmidu.
5. Pro TA klonování jsou na trhu dostupné příslušné vektory, tj. s převisy T.

Pro zvýšení pravděpodobnosti adeninového převisu na 3' konci PCR produktu je doporučováno použít primerů s guaninem 5' koncích.

Pro TA klonování je třeba zkontrolovat, zda dostupná Taq polymeráza nemá silnou 3'→5' exonukleázovou aktivitu, která by bránila tvorbě 3' adeninových převisů

VÝHODY

Není třeba použití restričních enzymů

Jednodušší, rychlejší, levnější

NEVHÝHODY

Gen má 50% šanci na klonování v opačném směru

RESTRIKČNÍ ENDONUKLEÁZY

Štěpí esterové vazby dsDNA

DNA hostitelské buňky je před účinkem vlastní endonukleázy chráněna metylací

Ochrana před cizorodým genetickým materiálem

V bakteriích – obrana proti bakteriofágům

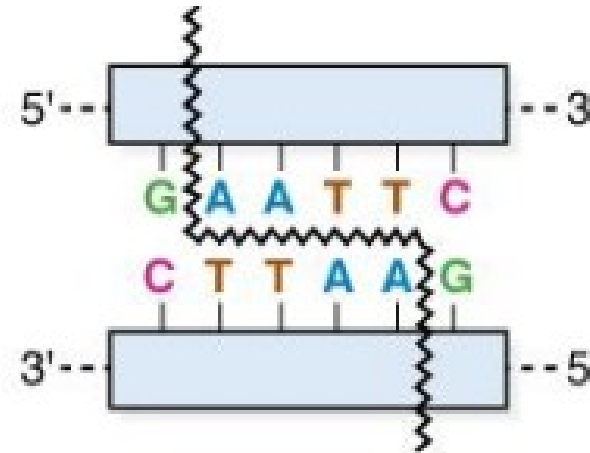
RESTRIKČNÍ ENDONUKLEÁZY

štěpí oba řetězce dsDNA

většina rozeznává palindromy

rozdělují se do tříd podle:

- složení podjednotky
- polohy štěpení
- sekvenční specifity
- požadavků na kofaktor



II TŘÍDA

Štěpí v místě nebo blízko vazebného místa

Není nutná hydrolýza ATP, ale přítomnost Mg^{2+}

Velikost - do 30 kDa

Rozpoznávají palindromické sekvence o 4-8 bp

Lepivé nebo tupé konce

Name	Origin	Recognition Sequence
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5' G//GATCC 3' 3' CCTAG//G 5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	5' G//AATTC 3' 3'CTTAA//G 5'
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	5' A//AGCTT 3' 3' TTCGA//A 5'
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' GG//CC 3' 3' CC//GG 5'
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5' GGTAC//C 3' 3' C//CATGG 5'

Double bars indicate the cleavage site in the DNA strand.

GATEWAY Y KLONOVÁNÍ

Firma Invitrogen (1990)

Přenos DNA sekvencí do vektorů pro funkční analýzu a proteinovou expresi

GATEWAY KLONOVÁNÍ

Zachovává orientaci a čtecí rámeček

Rychlý a efektivní (95 %) přenos DNA sekvencí do vektorů

Restrikční fragmenty, PCR produkty, cDNA klony

Přenos velkého množství DNA sekvencí do mnoha vektorů

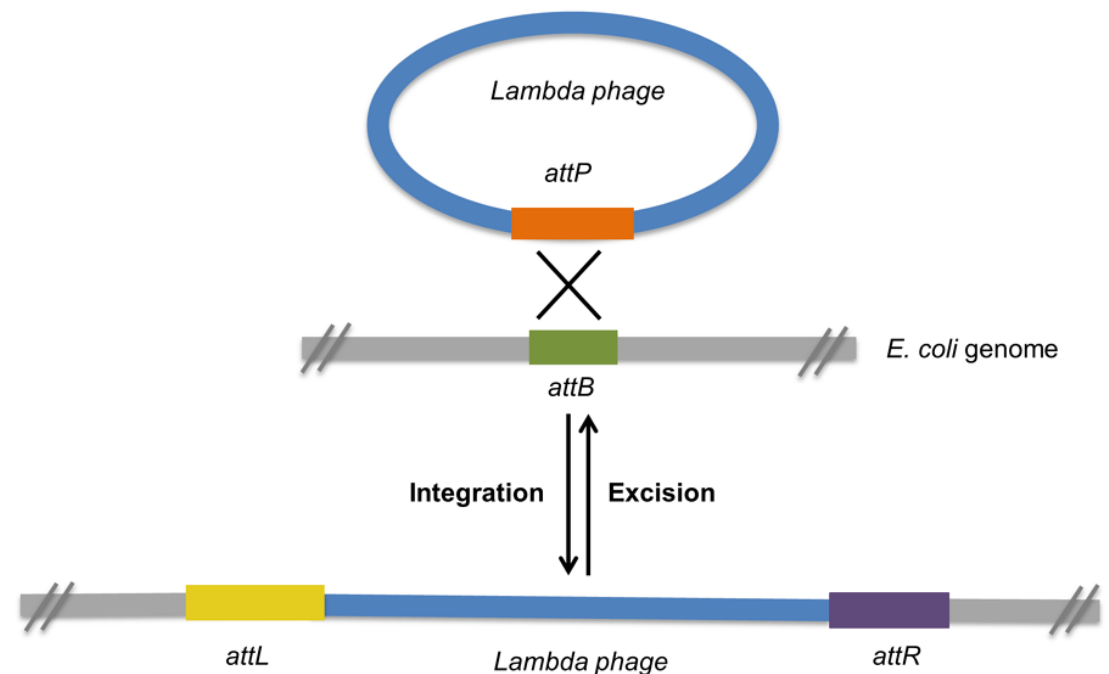
Reverzibilní rekombinace

PRINCIP GATEWAY KLONOVÁNÍ

Integrace bakteriofágu do
bakteriálního genomu

Tvorba nových rekombinantních míst
– attL a att R

Vystřížení bakteriofága – obnova attP
a att B



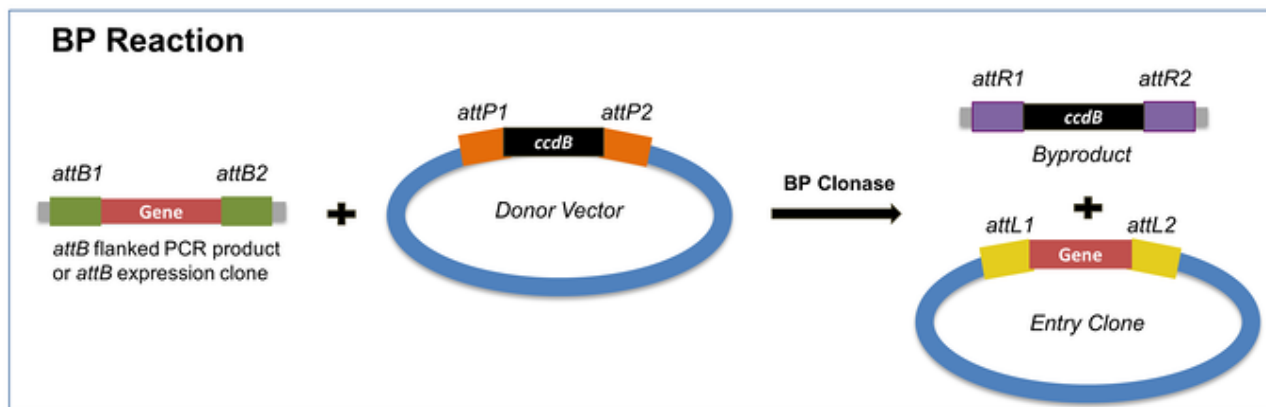
BP REAKCE

Inzert obsahuje attB sekvenci

Donor obsahuje attP sekvenci

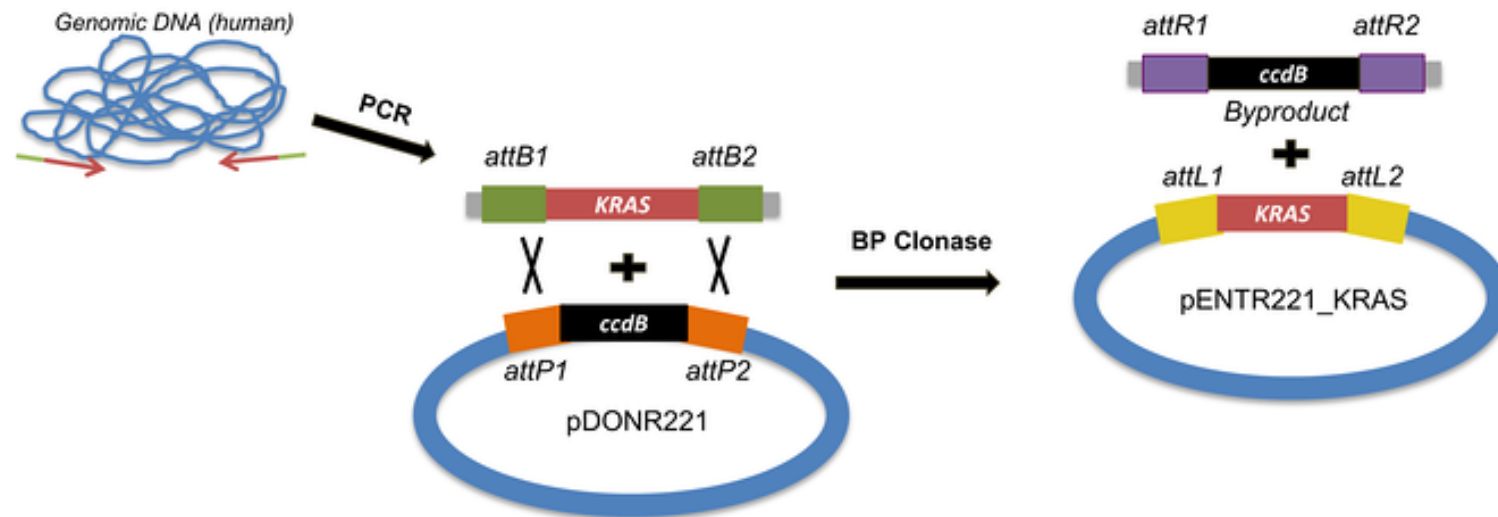
Tvorba Entry klonu – obsahuje DNA zájmu ohraničenou attL sekvencí

Vedlejší produkt



TVORBA ENTRY KLONŮ

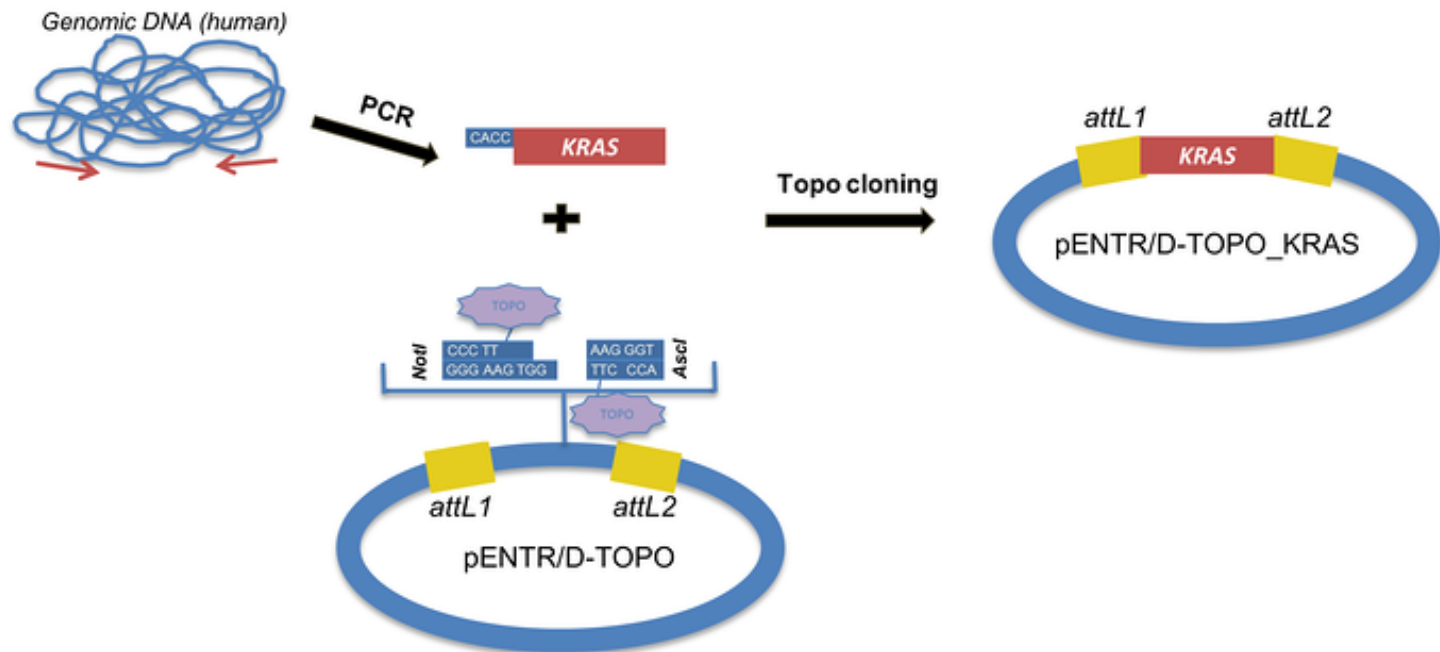
Rekombinace PCR produktu nebo plazmidu s donorním vektorem



TVORBA ENTRY KLONŮ

TOPO klonování

Na PCR produktu krátká
komplementární sek

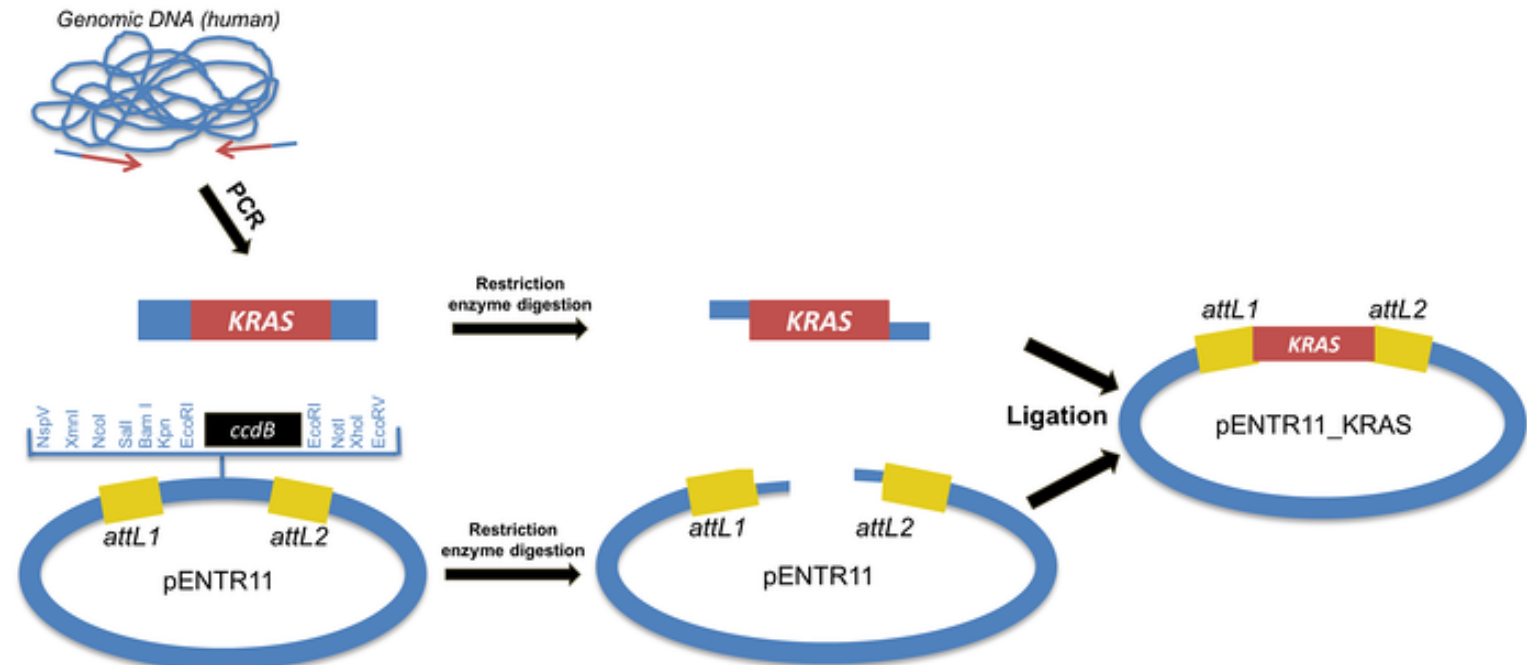


TVORBA ENTRY KLONŮ

Restrikční klonování

Restrikční endonukleázy

Lepivé konce



LR REAKCE

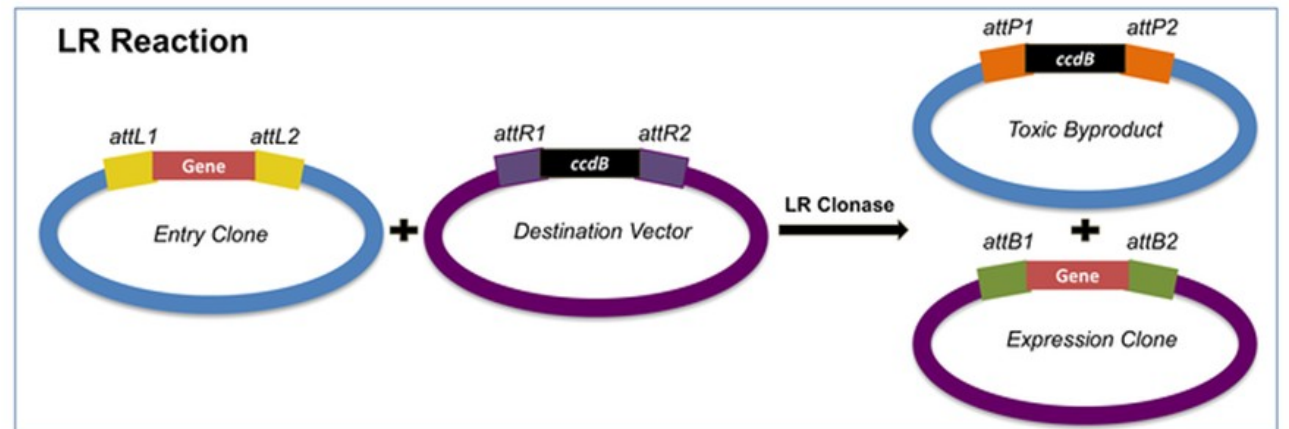
Entry klon obsahuje attL
sekvenci

Cílový vektor obsahuje attR
sekvenci

Tvorba expresního klonu s
DNA zájmu ohraničenou attB
sekvencí

Vedlejší produkt – toxický

Není nutná selekce



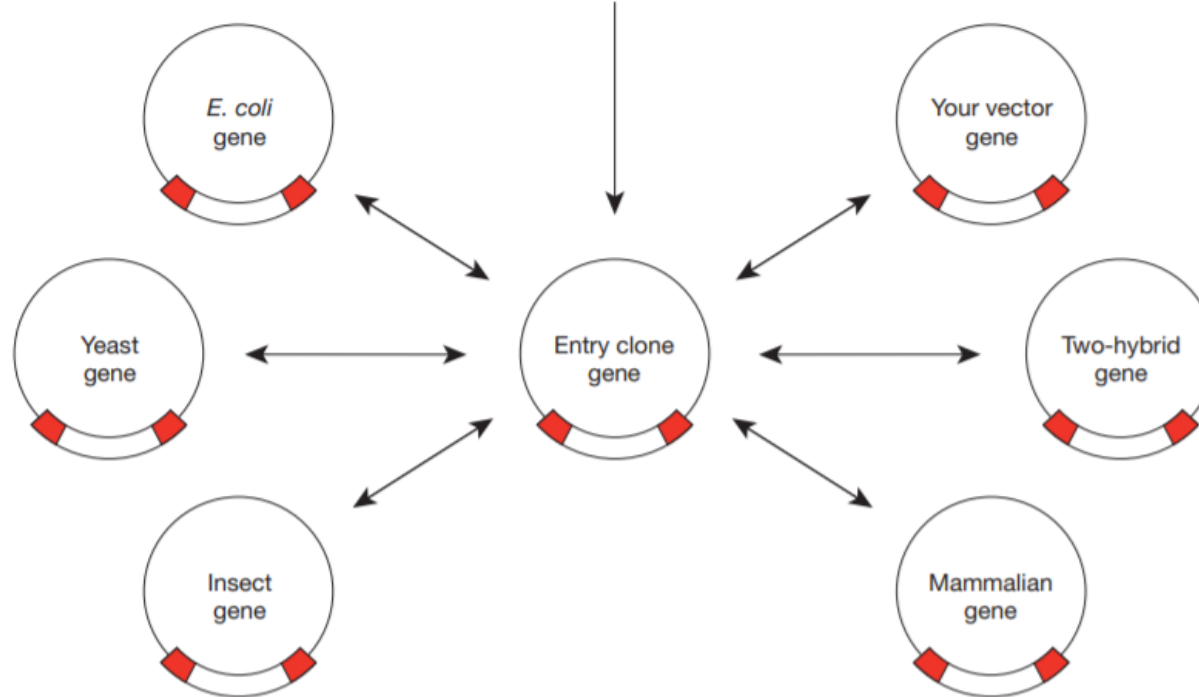
DNA fragments from:

Polymerase
chain reaction

Restriction
endonuclease
digestion and ligation

cDNA library or
clone collection

GeneArt Strings DNA
Fragments or Libraries



Děkujeme za pozornost!