

# Metody založené na práci s DNA

- **Izolace DNA**
- **Separace DNA**
- **PCR**
- **Manipulace genové exprese**
- **Plazmidy**
- **Transfekce**

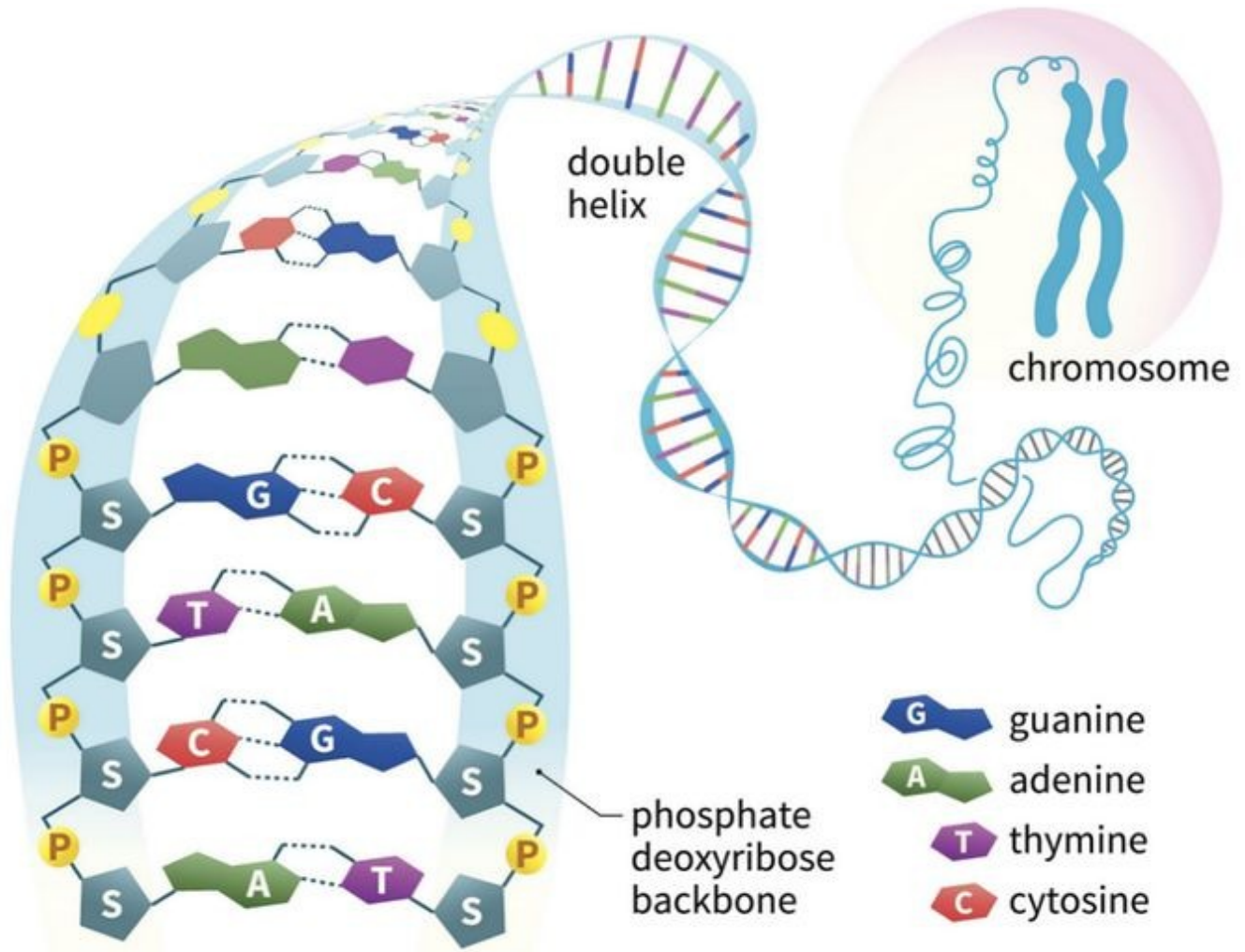
Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.

Oddělení fyziologie a imunologie živočichů

[jipro@sci.muni.cz](mailto:jipro@sci.muni.cz)

# DNA – primární a sekundární struktura

DNA



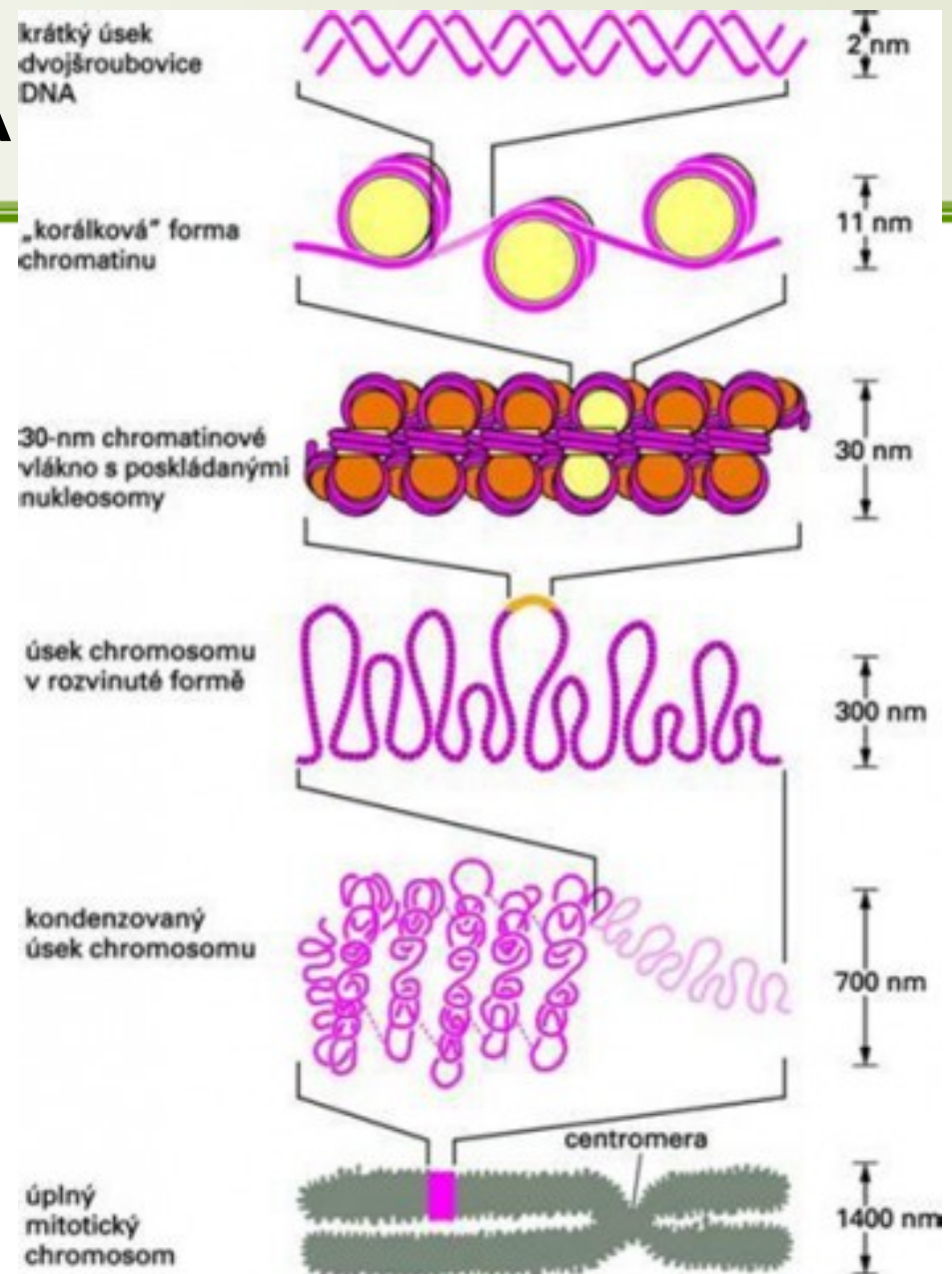
# Terciární struktura DNA

Lineární forma

- Jaderná DNA eukaryot

Kruhová forma

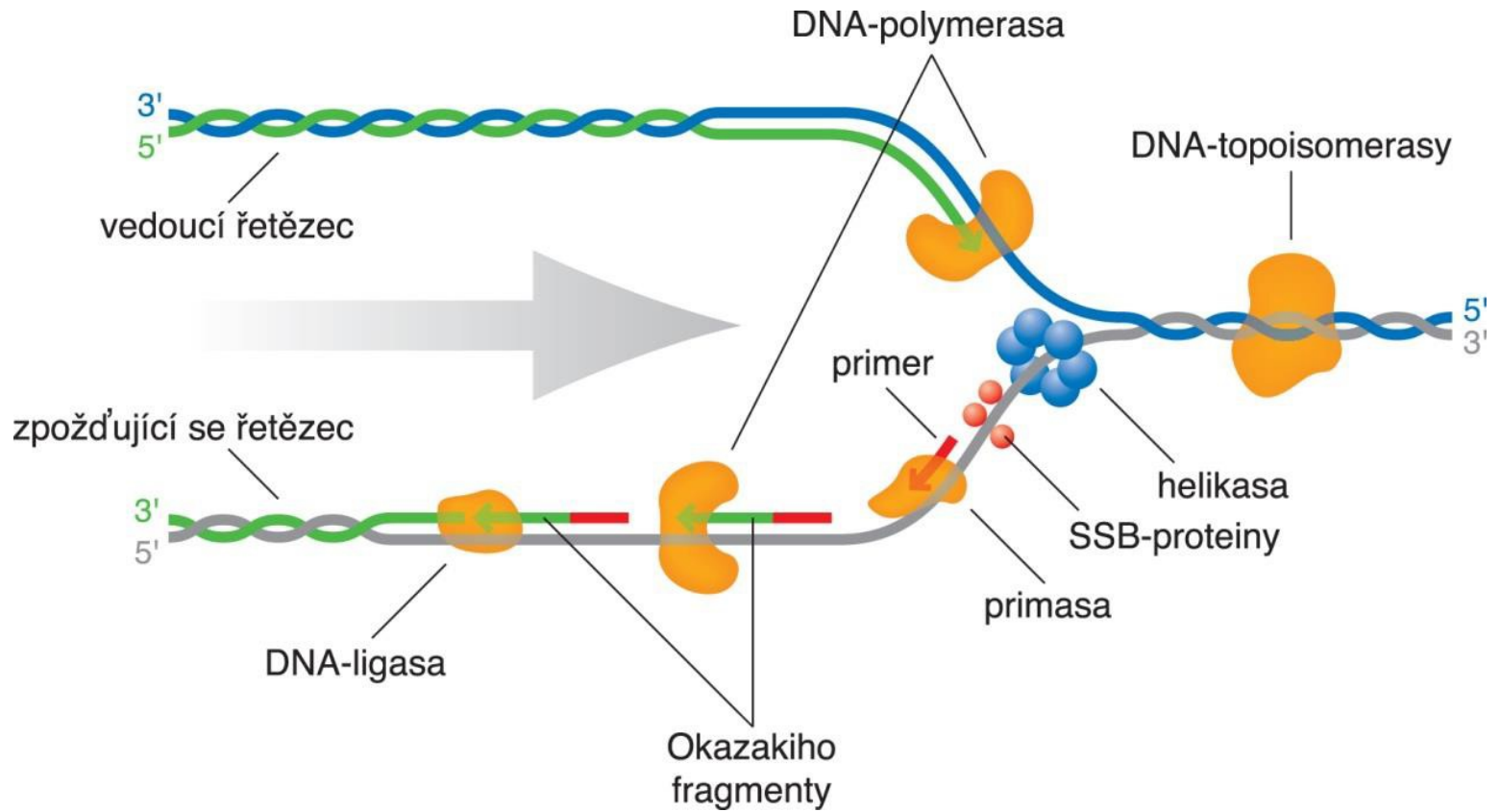
- Prokaryota,
- Plastidy, mitochondrie



Čistý výsledek: Každá molekula DNA je zabalena do mitotického chromosomu tak, že je 50 000krát kratší než v rozvinuté formě.

# Replikace DNA

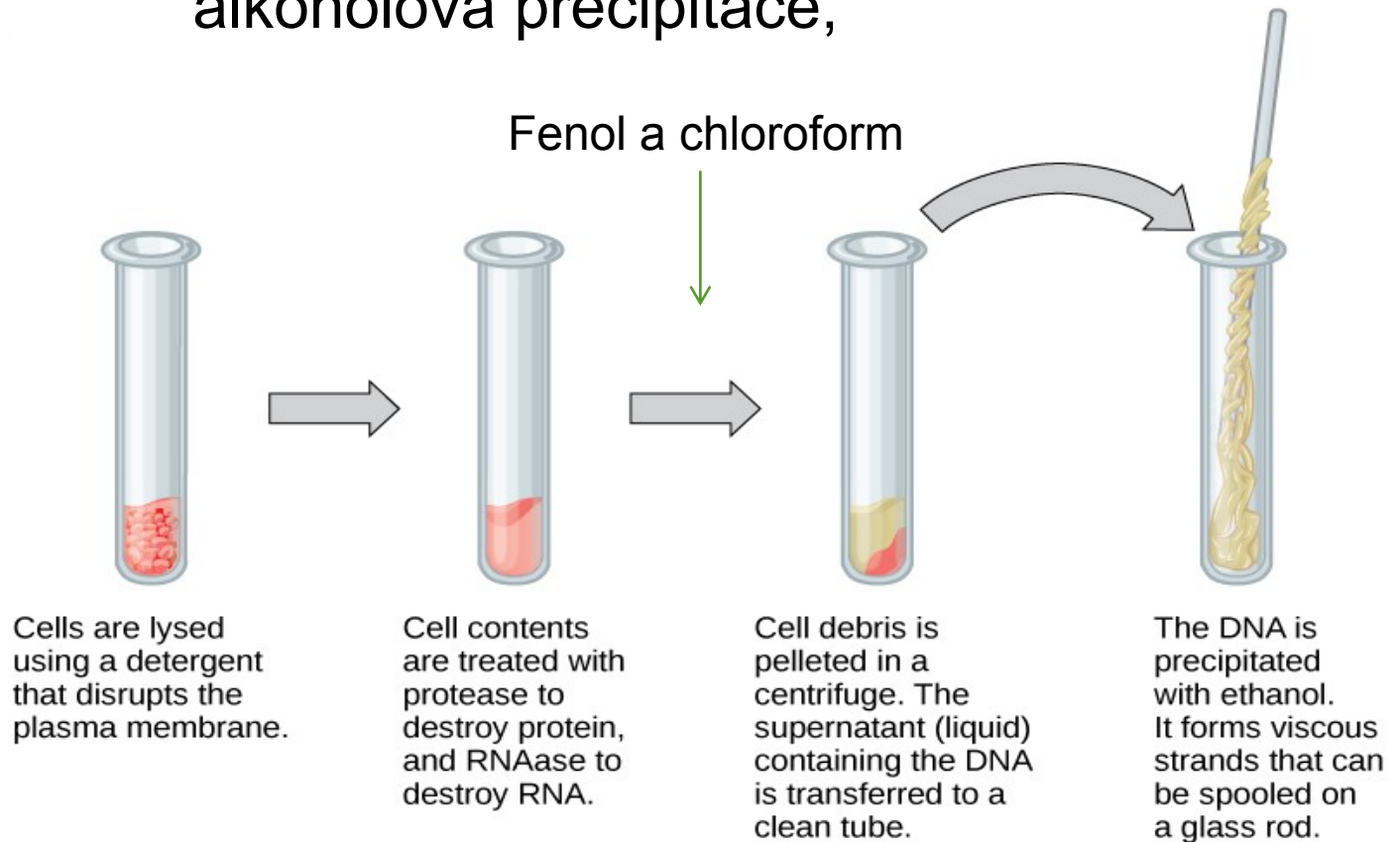
DNA



# Izolace DNA

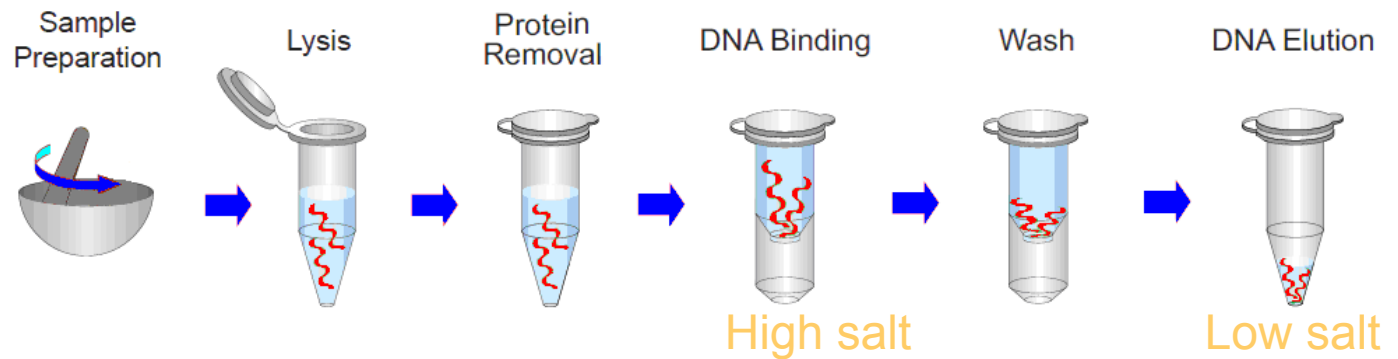
DNA

fenol-chloroformová izolace  
alkoholová precipitace,

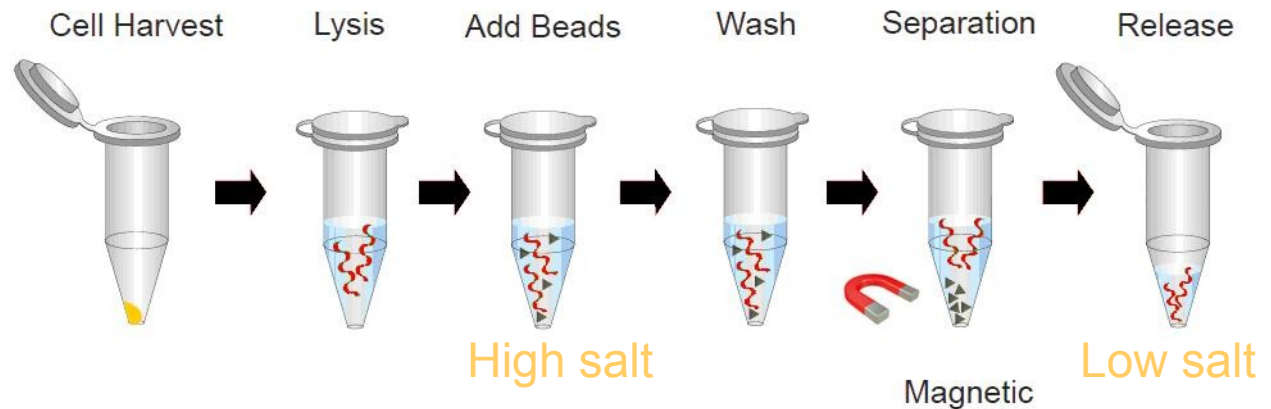


# Izolace DNA dnes

Kity založené na kolonkách na bázi oxidu křemičitého a různé koncentraci solí



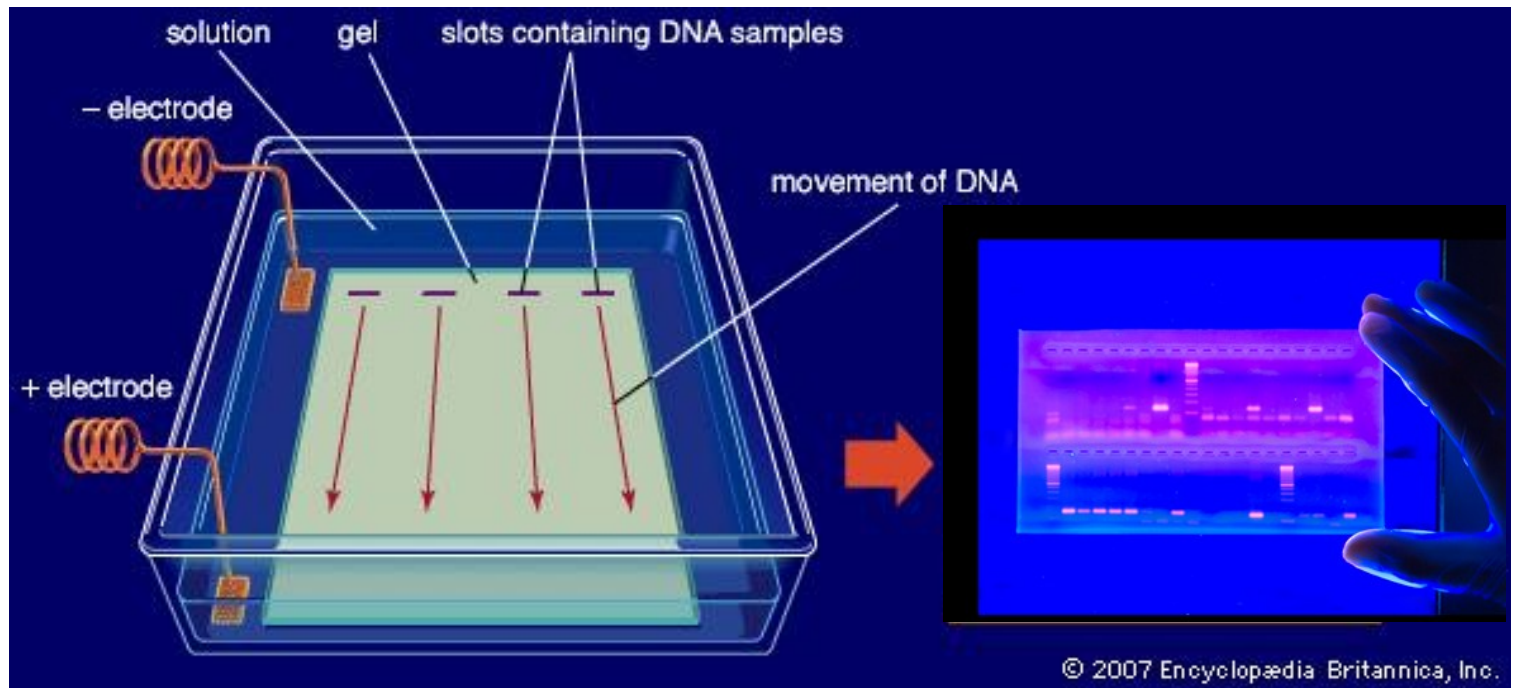
Kity založené na magnetických kuličkách





# Separace DNA

- DNA je **záporně** nabitá, míchá se s loading puforem - bromfenolová modř + xylen cyanol (5 kbp fragment) a těžítko – sacharóza, glycerol



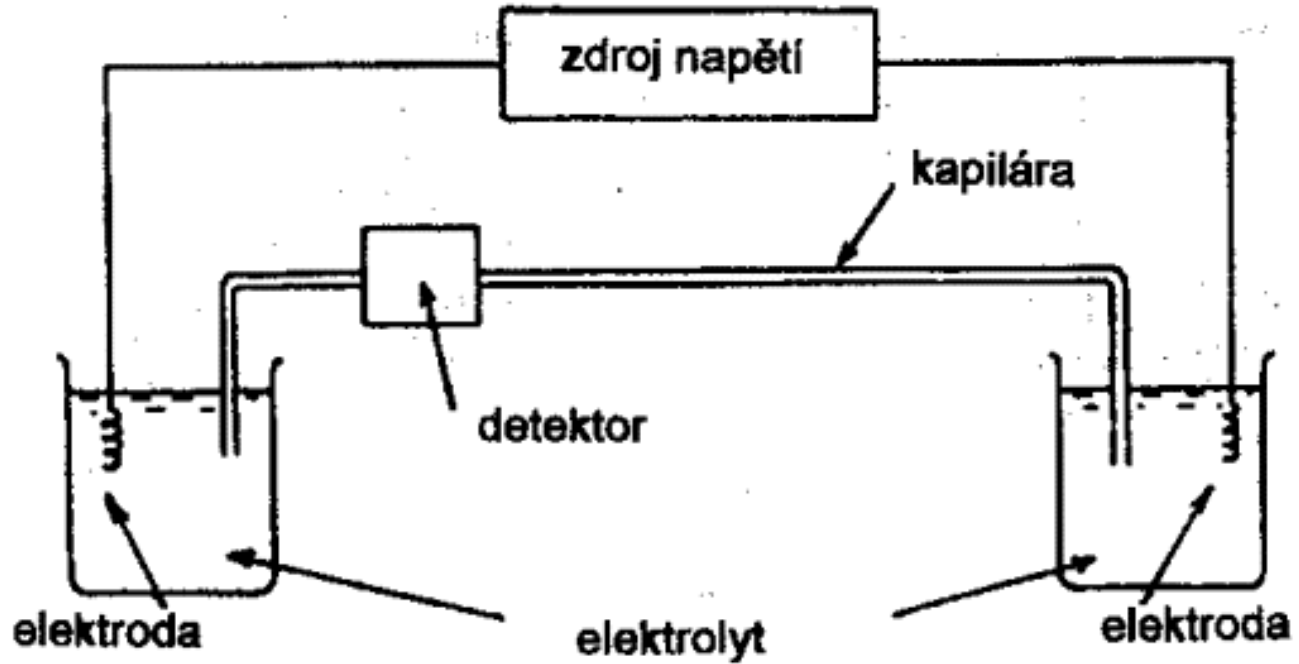
- Separace v 1% agarózovém gelu, barvení ethidium bromidem

Návod: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>

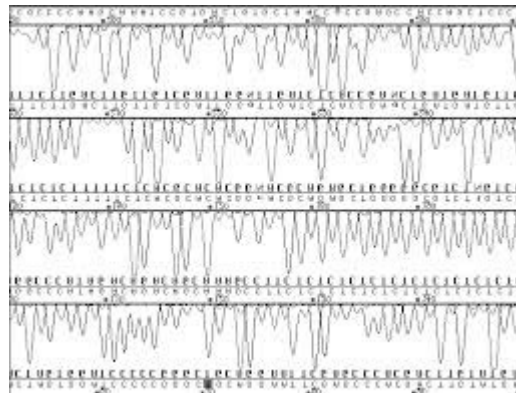
<https://www.britannica.com/science/gel-electrophoresis>

# Kapilární elektroforéza

DNA



Záznam:



- Využívá se fluorescenčně značených PCR produktů
- Nutný vnitřní standard  
- Fragменты konkrétní délky



# Pokročilé separační metody (pro zvědavé hlavičky)

- Variace na agarózové elfo:
  - kapilární elektroforéza  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18428903>
  - pulsed field-gradient electrophoresis  
[https://www.researchgate.net/publication/20485237\\_Large\\_DNA\\_separation\\_using\\_field\\_alternation\\_agar\\_gel\\_electrophoresis](https://www.researchgate.net/publication/20485237_Large_DNA_separation_using_field_alternation_agar_gel_electrophoresis)
- DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26936389>
- Size-selective separation of DNA fragments by using lysine-functionalized silica particles  
<https://www.nature.com/articles/srep22029>
- DNA Separation in Nanowall Array Chips  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac201184t>

# PCR

## ➤ Klasická forma

### ➤ Vzniklé produkty

Jsou separovány na agarózovém gelu, EtBr

- Namnožení fragmentu DNA podle specifických primerů
- PubMed (Nucleotide), nalezení genu a navržení primerů

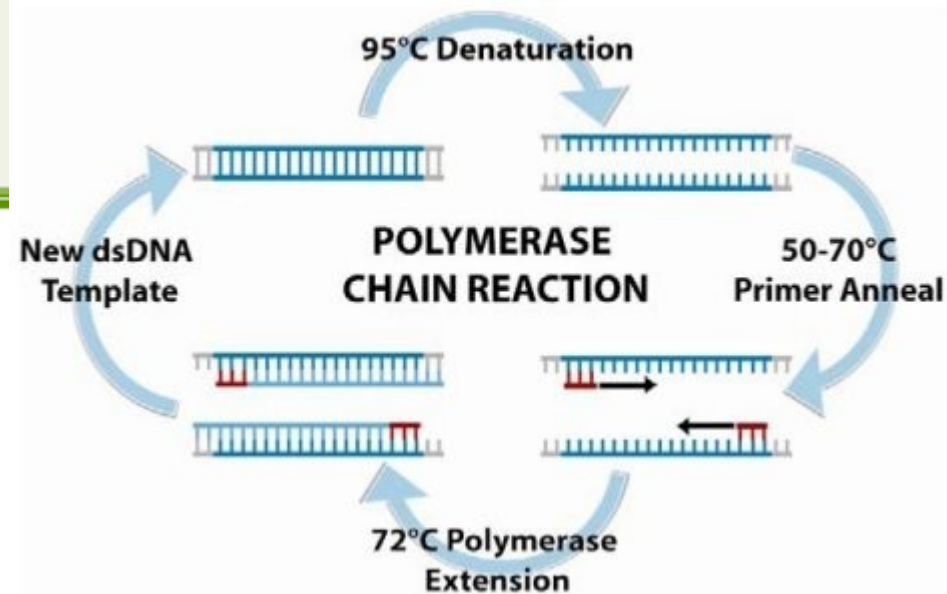
## ➤ real time PCR

➤ Po každém cyklu PCR vzroste fluorescence o nově vzniklé molekuly, možno monitorovat ihned

➤ Umožňuje kvantifikovat (relativně nebo absolutně) množství původních templátových molekul DNA

➤ S pomocí reverzní transkripce (přepis mRNA na cDNA) umožňuje stanovit hladinu exprese příslušného genu

<https://www.slideshare.net/sheetalnarkar01/polymerase-chain-reaction-8421686>



# Variace PCR

- ▶ Nested PCR - 2 sady primerů, první delší produkt slouží jako templát pro druhou reakci
- ▶ Asymetrická PCR – jeden primer je v nadměrném množství – preferenčně se syntetizuje jen jeden řetězec
- ▶ AFLP PCR – pro detekci polymorfismů (využívá RFLP)  
(<https://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/aflp.html>)
- ▶ Inverzní PCR – v plazmidu, namnoží úsek kolem známého místa
- ▶ Multiplex PCR – více párů primerů v jedné reakci
- ▶ In situ PCR – přímo v buňce ukotvené na sklíčku
- ▶ Alelově specifická PCR – identifikace SNP, který je součástí primeru
- ▶ Long PCR – velmi dlouhé úseky (specifická polymeráza)

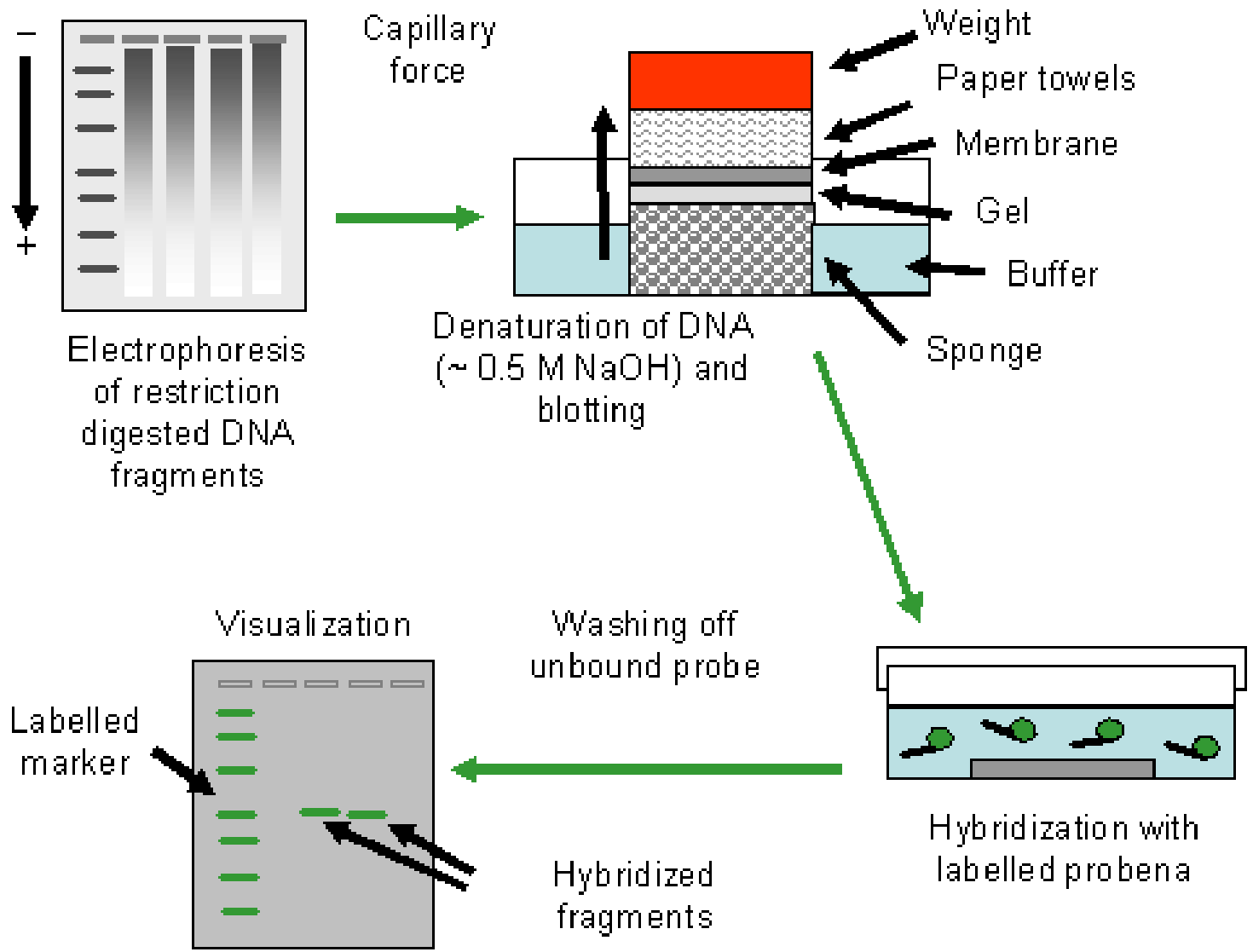
# Analýza fragmentů DNA

## Nejpoužívanější metody:

- ▶ Southern blotting a hybridizace se značenou sondou
- ▶ RFLP
- ▶ Vyříznutí fragmentu po restrikním štěpení dle velikosti, osekvenování
- ▶ FISH

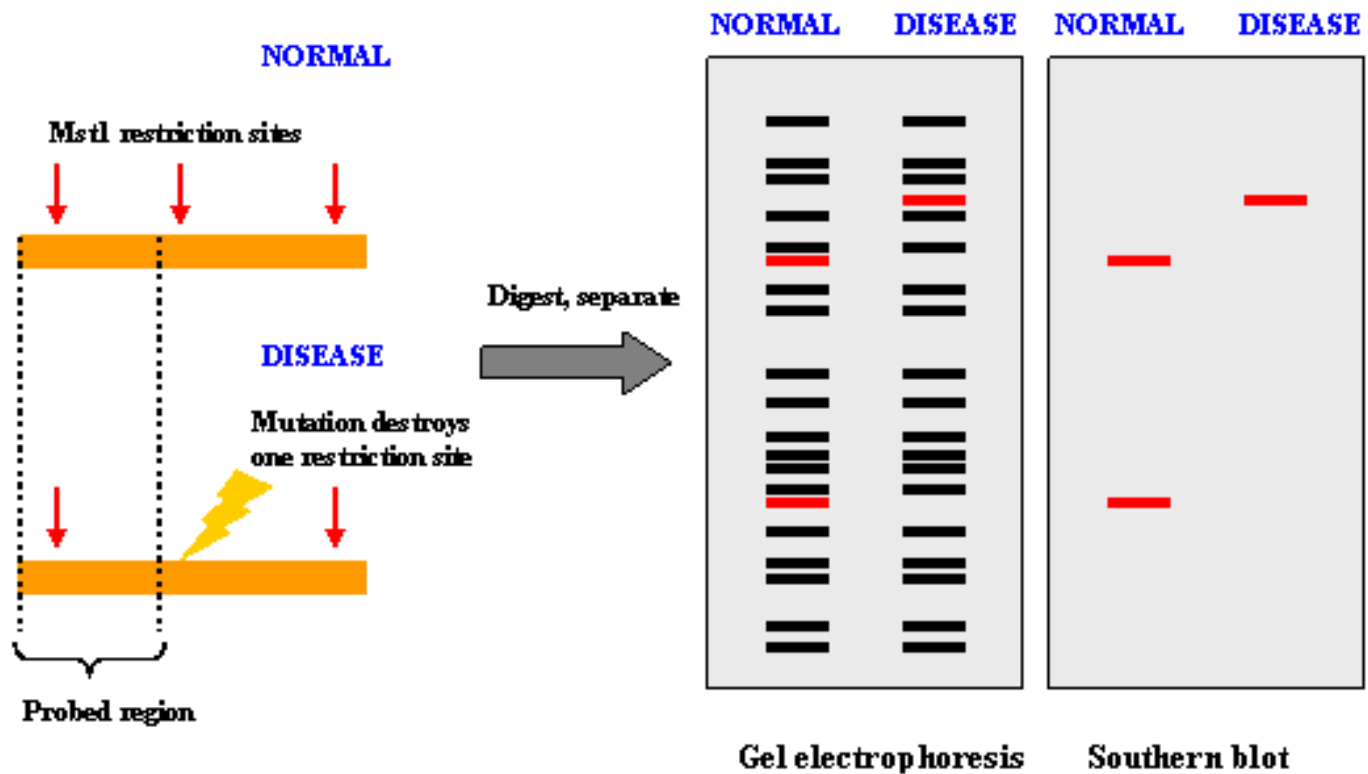
# Southern Blotting

DNA



## RFLP

- Polymorfismus délky restričních fragmentů
- Mutace mohou vytvořit nebo zničit restriční místo

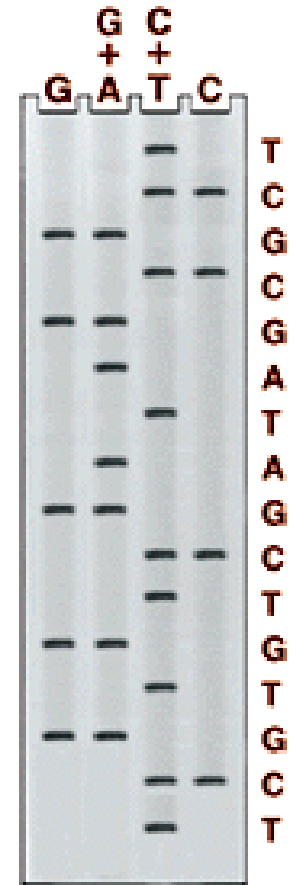


- Možné kombinovat s PCR – namnožení úseku s předpokládanou mutací <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrfp/>



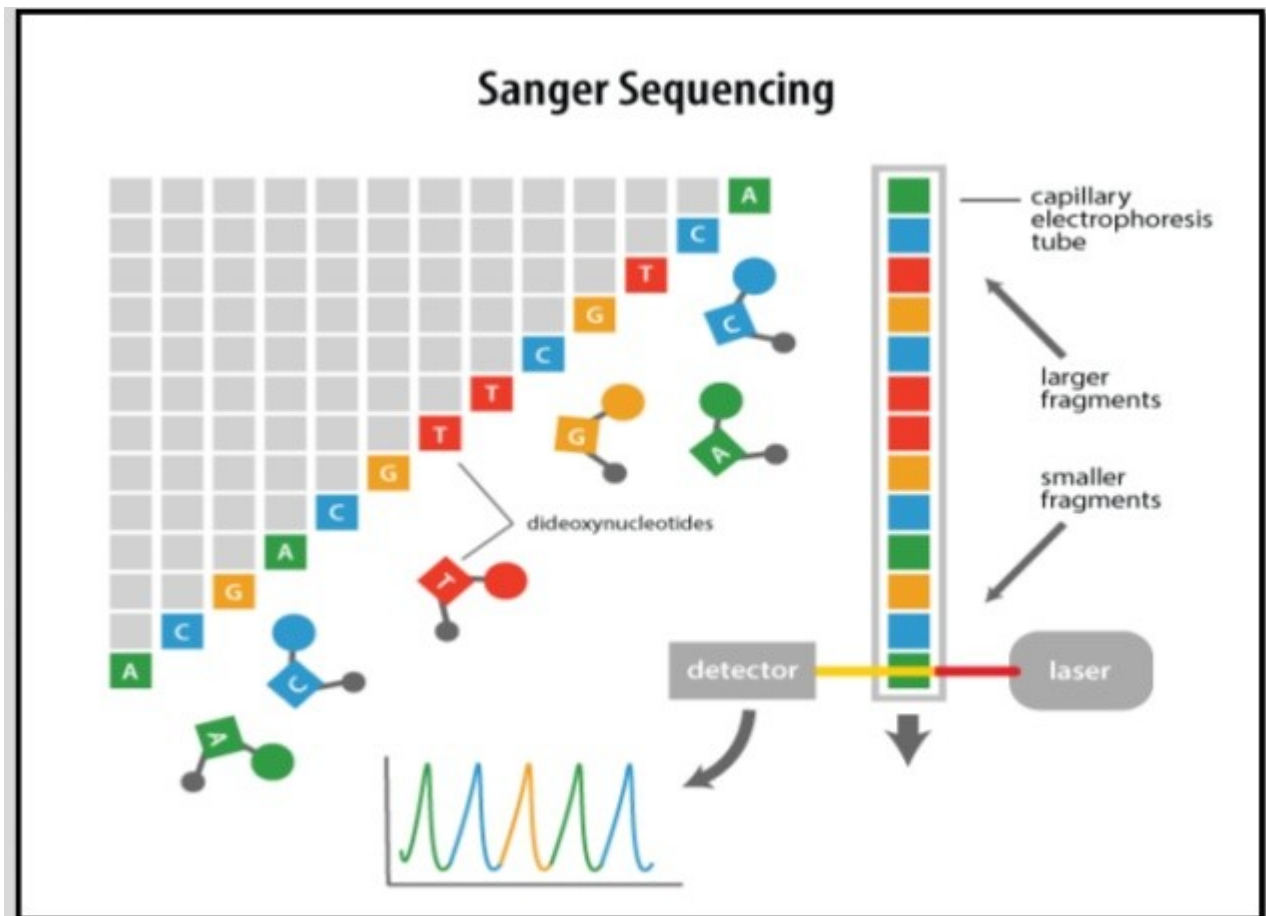
## Sekvenace DNA - Maxam Gilbert

- Namnožení úseku pomocí PCR
- Značení 5' konců pomocí  $^{32}\text{P}$
- Chemická modifikace bází + štěpení
  - G – dimetyl sulfát + piperidin
  - G+A – kys. mravenčí + piperidin
  - C – NaCl + hydrazin
  - C+T –  $\text{H}_2\text{O}$  + hydrazin
- DMS a hydrazin jsou toxické!!!
- Nepříliš oblíbená metoda



# Sekvenace DNA - Sanger

- Různě fluorescenčně značené terminální nukleotidy (dideoxynukleotidy) v PCR s jedním primerem



# Next Generation Sequencing

Princip: Velké množství reakcí Sangerovi metody v malém objemu jede paralelně na čipu

Výhody:

- v jednom běhu jede mnoho reakcí zároveň (miliony)
- Reakce jsou v mikrolitrech a mohou být provedeny na čipu
- Velice rychlá reakce
- Mnohem levnější než Sanger (sekvenace lidského genomu: 2001 – 100 milionů dolarů, 2015 – 1245 dolarů)
- Krátký fragment – 50-700 bp

<http://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/>

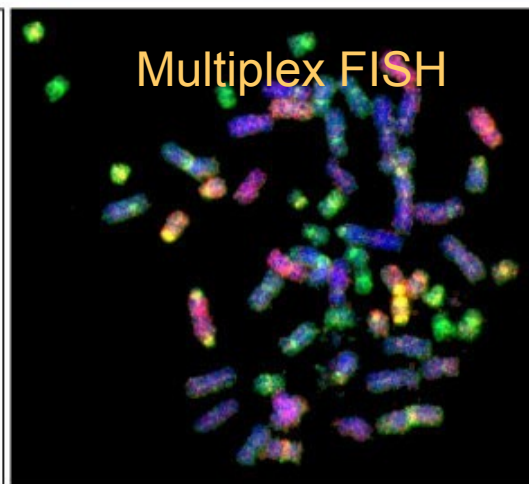
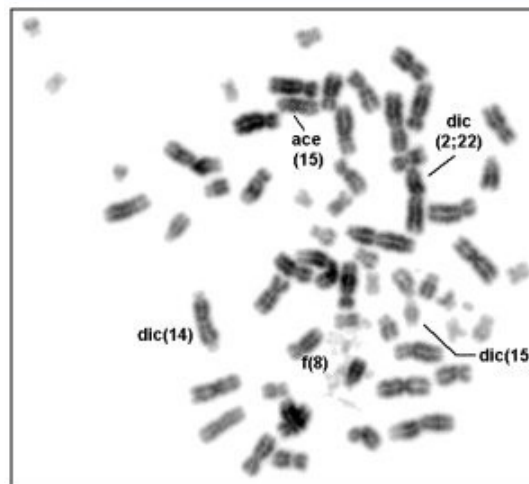
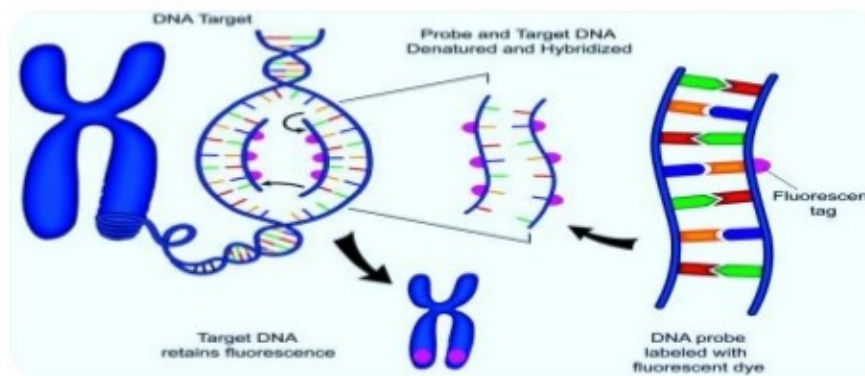
[http://web.natur.cuni.cz/zoologie/biodiversity/prednasky/GenetickeMetodyVZoologii/Prednasky\\_2013/NextGenerationSequencing\\_2013.pdf](http://web.natur.cuni.cz/zoologie/biodiversity/prednasky/GenetickeMetodyVZoologii/Prednasky_2013/NextGenerationSequencing_2013.pdf)

Srovnání pokročilých sekvenačních metod: [https://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_sequencing](https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing)

# FISH - fluorescence *in situ* hybridization

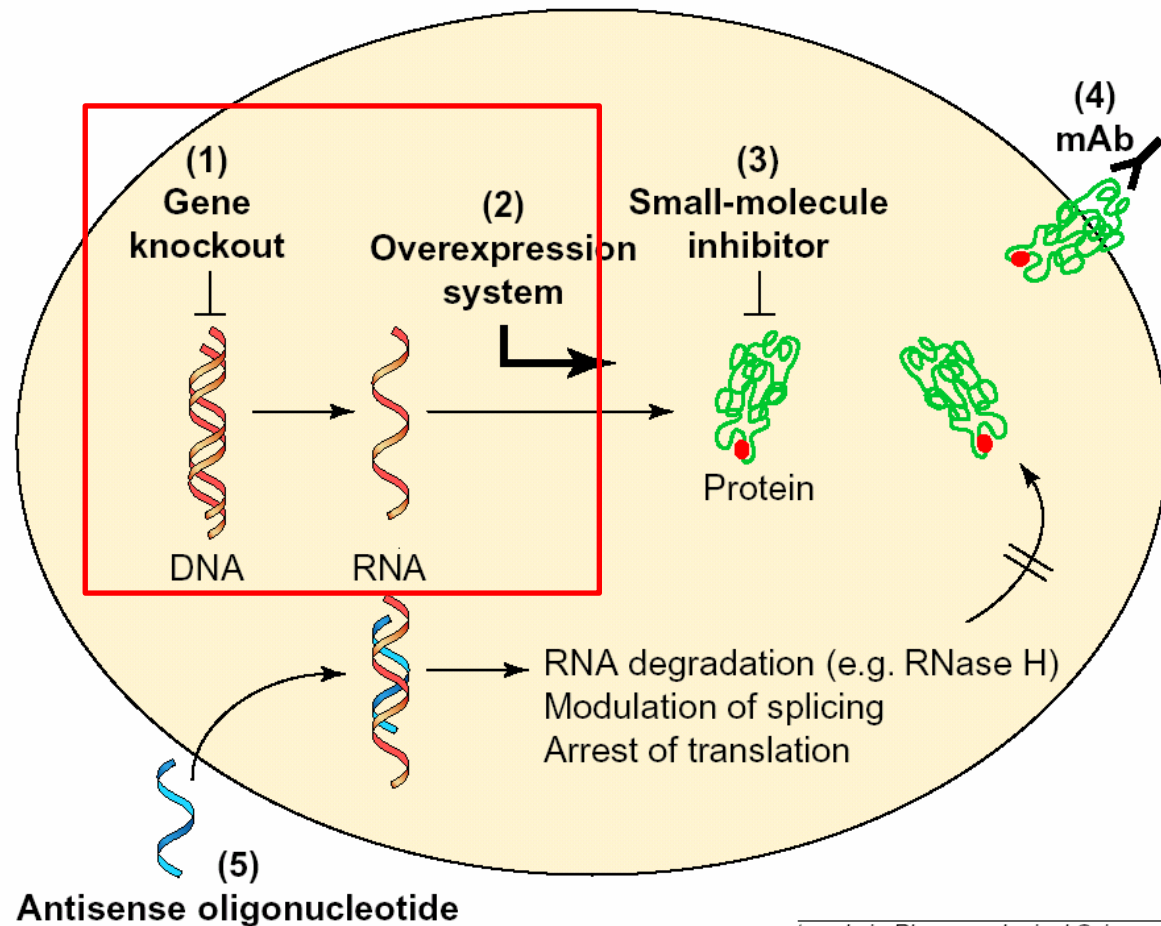


- rozeznání specifické sekvence nukleotidů přímo *in situ* pomocí fluorescenčně značených sond



# Manipulace genové exprese

- Šlechtění
- *In vitro* metody



# Genové inženýrství



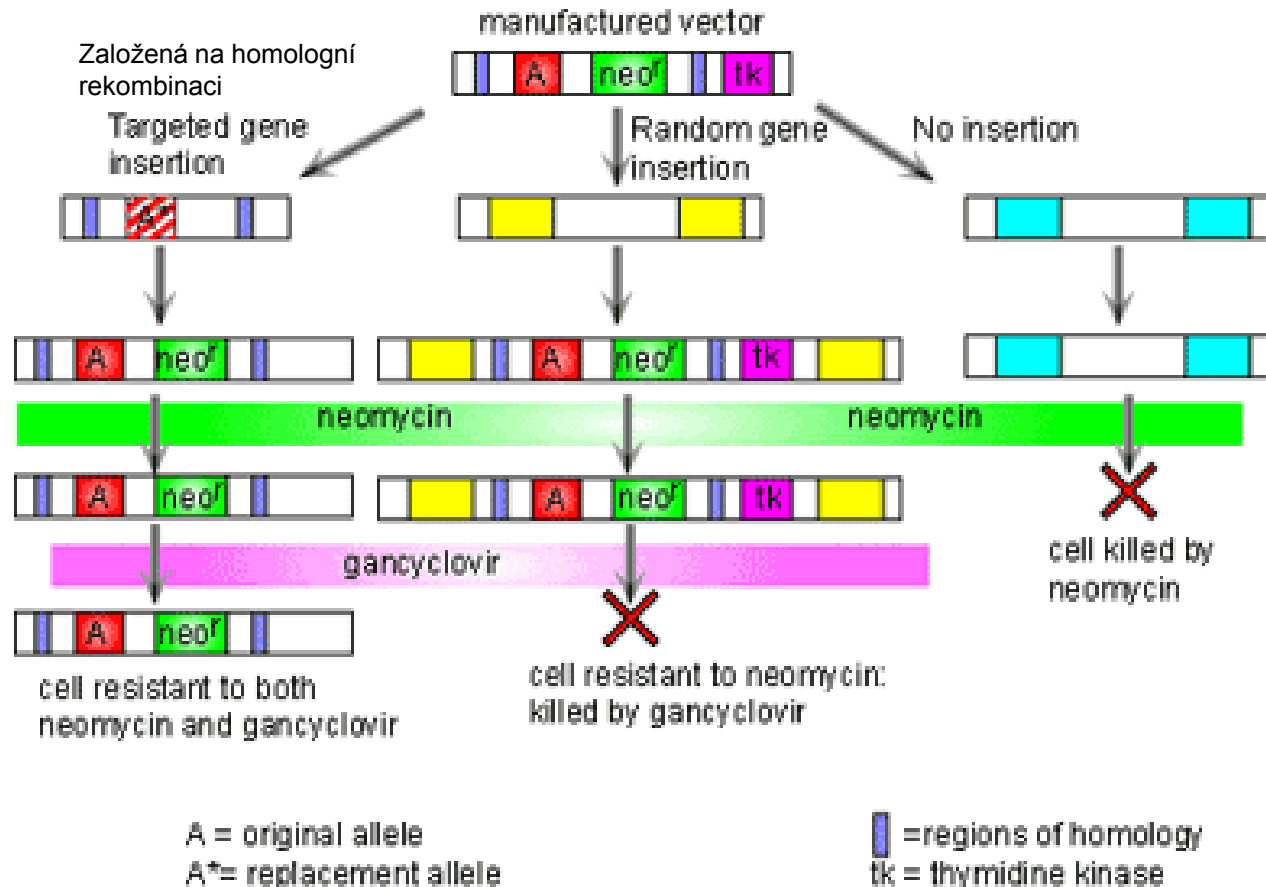
## Hlavní úspěchy:

- Stanovení sekvence řady genomů, regulačních sekvencí atd.
- Konstrukce fylogenetických stromů druhů
- Biotechnologie (vakcíny, produkce hormonů, atd.)
- Perspektivní využití v genové terapii monogenních chorob
- Modifikace genů vedoucí k získání žádoucích vlastností organismu
- **Modifikace genů pro studium signálních drah nebo výrobu živočišných modelů lidských chorob**



# Knock-out genu: homologní rekombinace – selekce rezistentního mutanta embryonální kmenové buňky

GENOVÁ EXPRESE



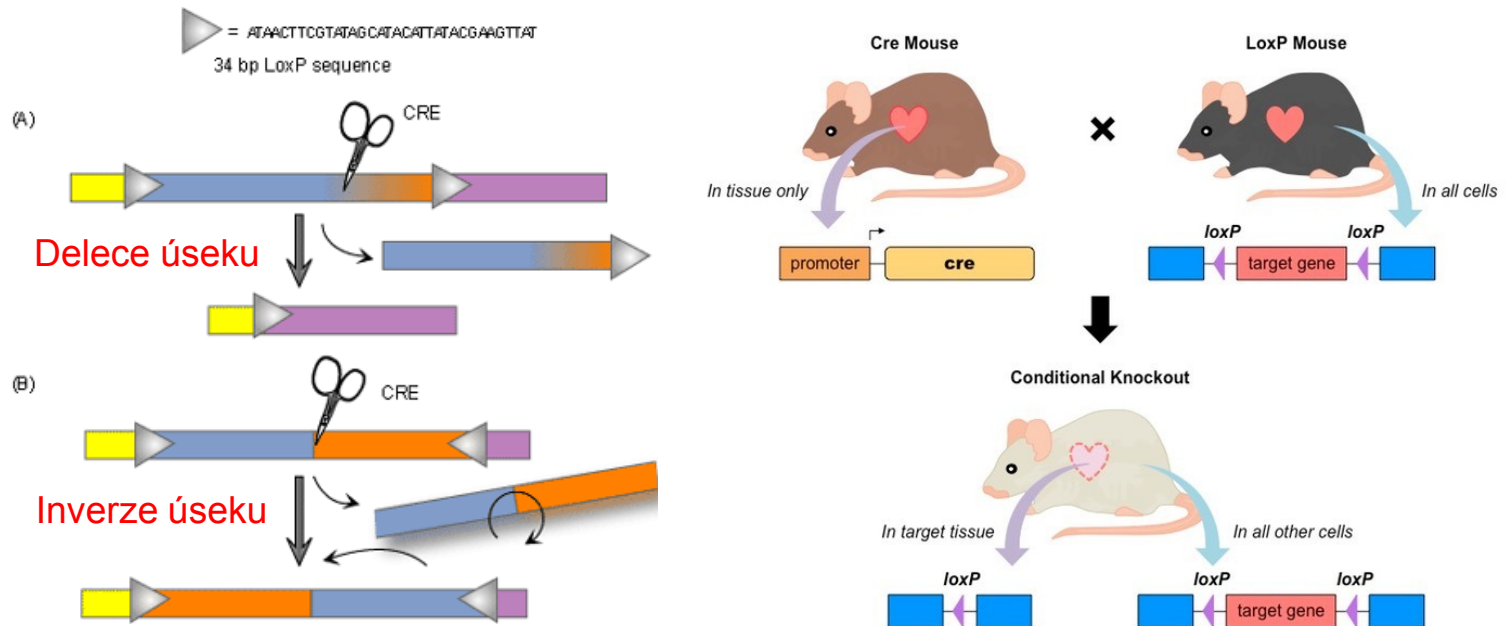
Herpesvirová TK – fosforyluje gancyclovir (analog T) - fosforylovaná forma zastavuje syntézu DNA a tak indukuje apoptózu

Článek: <https://www.scq.ubc.ca/studying-gene-function-creating-knockout-mice>

<https://www.slideshare.net/nanayawsam/gene-knockout-41679109>

# Knock-out genu: Cre/LoxP systém

- Systém pochází z bakteriofága P1
- Cre – rekombináza (štěpí mezi sekvencemi LoxP)
- Exprese Cre může být specificky časově nebo tkáňově limitována
- loxP místa se musí vklonovat pomocí PCR
- Buňky s podmíněnou expresí Cre x myší modely

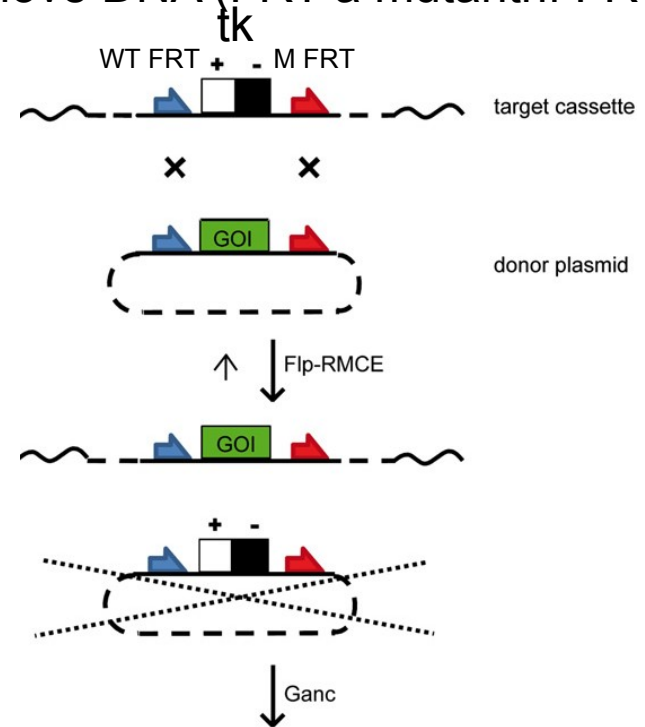
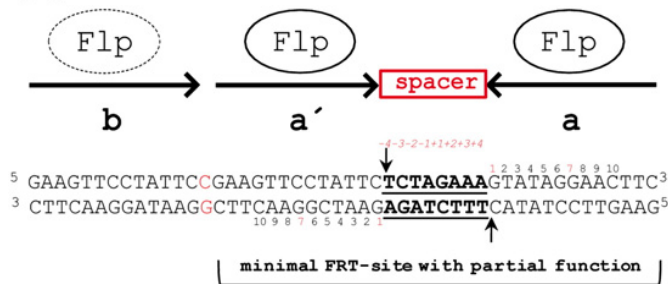


<https://www.scq.ubc.ca/studying-gene-function-creating-knockout-mice>

# Knock-out: Recombinase-mediated cassette exchange FLP/FRT (RMCE)

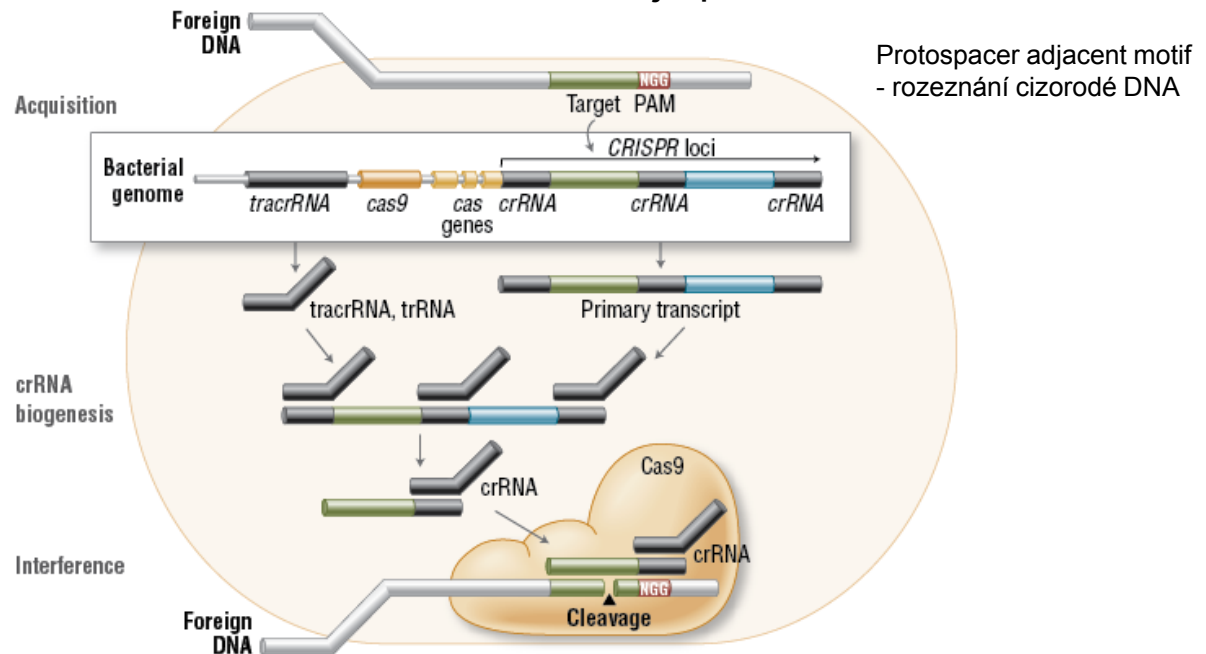
- Systém pochází z kvasnic
- Rekombináza Flipáza (FLP) se váže na FRT vazebná místa (nebo jejich mutovanou variantu), jsou v genomu přirozeně
- Vyštěpení genu (FRT ve stejném směru) nebo jeho inverze (FRT v opačném směru), nebo integrace nové DNA (FRT a mutantní FRT)

FRT sekvence:



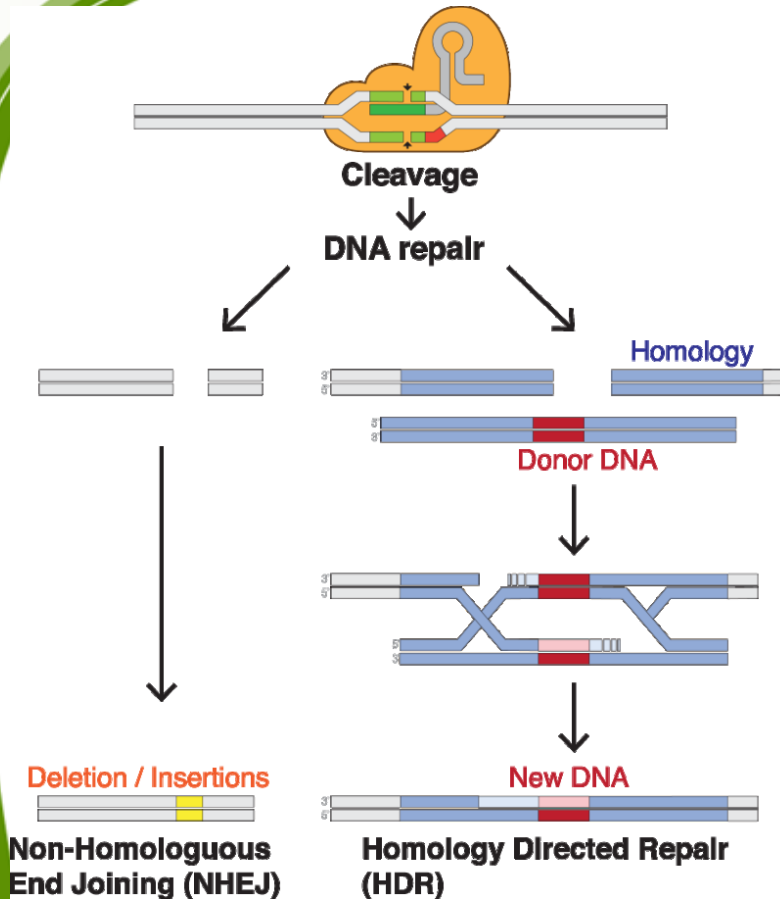
# Knock-out: CRISPR/CAS9 systém

- ▶ CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- ▶ CAS9 – enzym s nukleázovou a helikázovou aktivitou –
  - Zdrojem je adaptivní imunitní systém prokaryot
  - Cizorodá DNA se inkorporuje do CRISPR míst – přepis do RNA, nastříhání do crRNA – s pomocí transaktivující tracrRNA
  - crRNA pak rozeznává cizorodou DNA, která je pomocí Cas9 rozstříhána

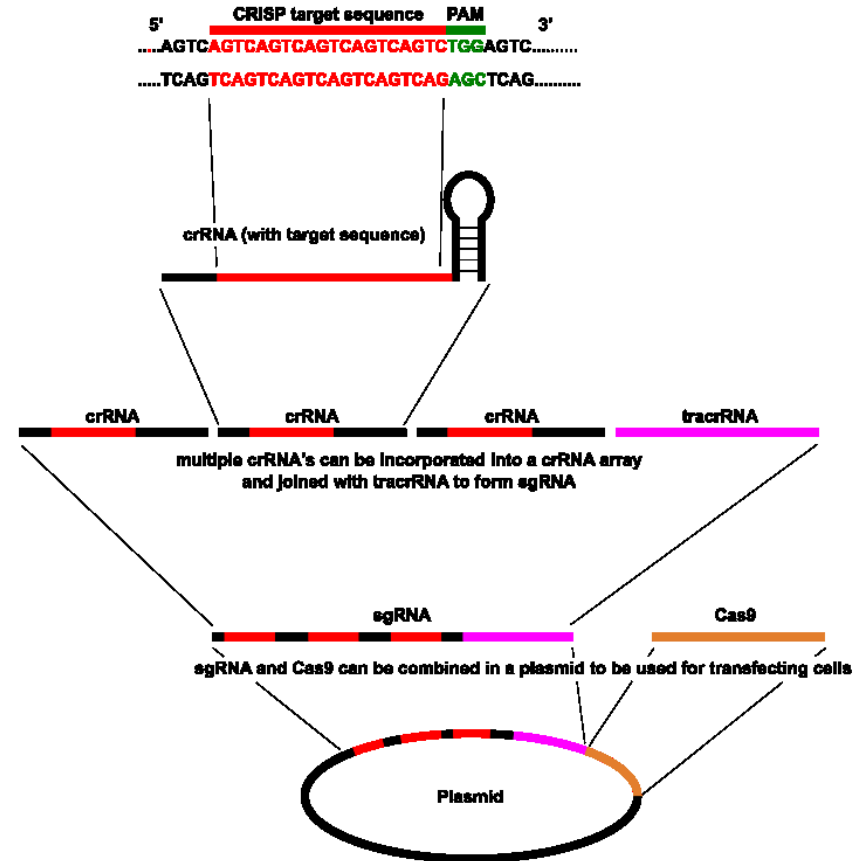


<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>

# CRISPR/CAS9 systém

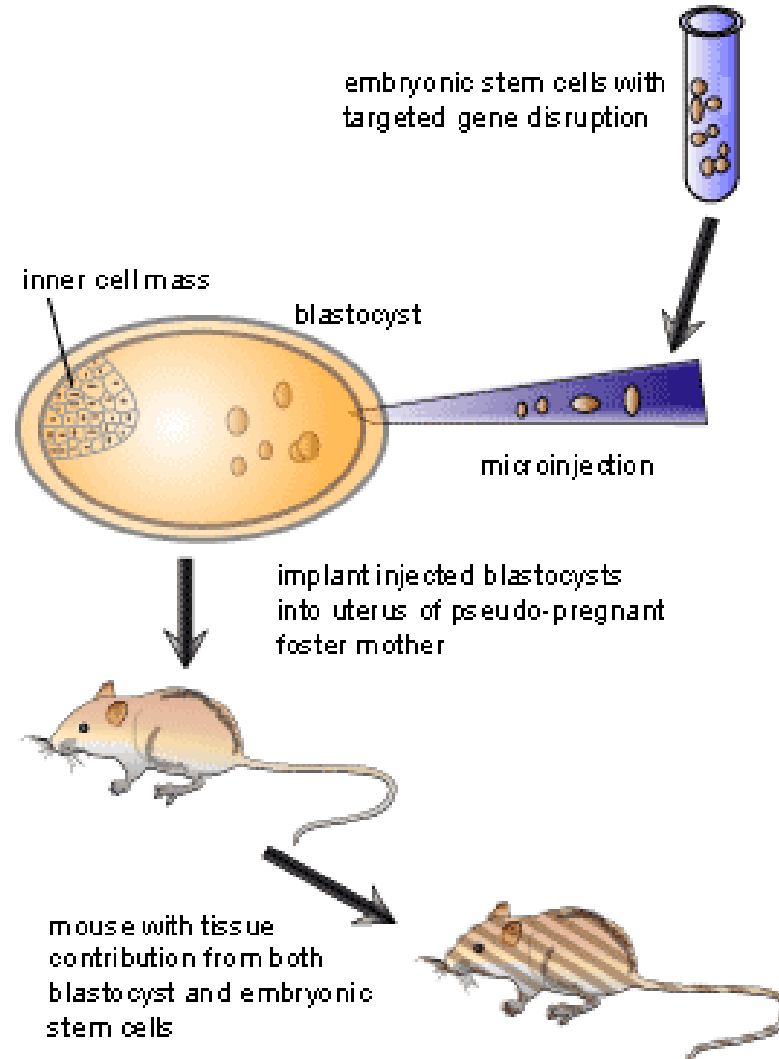


## CRISPR-Cas9 AND GENOME EDITING



- HDR – 70-90 bp kolem místa štěpení
- Single guiding RNA – různé crRNA a jedna tracrRNA

# Produkce mutantních myší





# Typy mutací typu loss of function

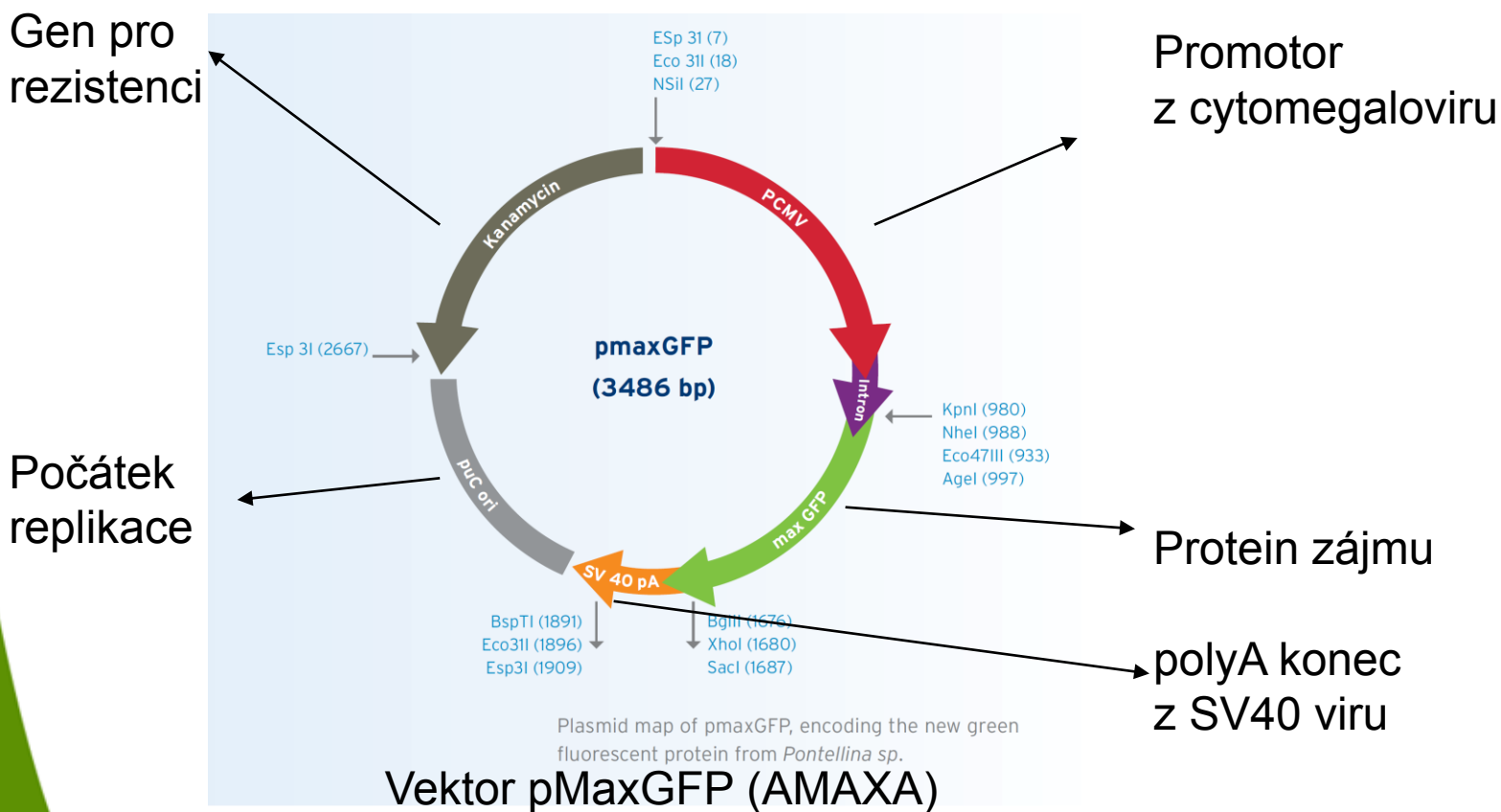
- ▶ Ztráta funkce genu
  - ▶ Úplná nebo částečná ztráta funkce genu
- ▶ Hypomorfní mutace
  - ▶ Částečná ztráta funkce, zvláště v různých obdobích vývoje organismu
- ▶ Podmínečná mutace
  - ▶ Ztráta funkce genu za speciálních podmínek (teplotně senzitivní mutanti, přidání chemikálií)
  - ▶ Ztráta funkce genu v různých vývojových stádiích
- ▶ Dominantně negativní mutace
  - ▶ Potlačuje funkci wt alely u heterozygotů
  - ▶ Haploinsuficience – pro vývoj jsou nutné dvě wt alely, proto je mutantní alela dominantní u heterozygota

## Nadměrná exprese genu

- Konstitutivně aktivní gen (výměna podmíněně aktivované domény za konstitutivně aktivní doménu)
- Gen zájmu fúzovaný s promotorem pro často přepisovaný, silně inducibilní promotor (myosin, Gal1)
- Genová amplifikace (spontánně v případě řady onemocnění)
- Exprese původně inaktivního genu (demethylace, acetylace promotoru)
- Nejčastěji je nadměrné exprese dosaženo pomocí **TRANSFEKCE PLAZMIDŮ**

## Plazmidy

- Umělé jednořetězcové kruhové molekuly DNA sestavené z různých prokaryot
- GFP izolovaný z planktonové korýše *Pontellina Plumata*



## Izolace DNA - princip

- Plazmidy (i jinou nízkomolekulární DNA) je možné množit pomocí kompetentních bakterií a následně izolovat pomocí kolonkových kitů (mini-, midi- a maxiprep)
- Heat shock kompetentních bakterií E. Coli plazmidem zájmu
- Růst bakterií na selekční půdě (antibiotikum)
- Izolace rezistentní kolonie a její namnožení v selekčním LB médiu
- Izolace nízkomolekulární DNA pomocí kolonkového kitu:
  - Lyzace bakteriálního peletu a RNA
  - Precipitace proteinů a genomové DNA
  - Přenos supernatantu na kolonu a vazba plazmidu na pryskyřičných kuliček (promytí)
  - Eluce plazmidové DNA a její přečištění

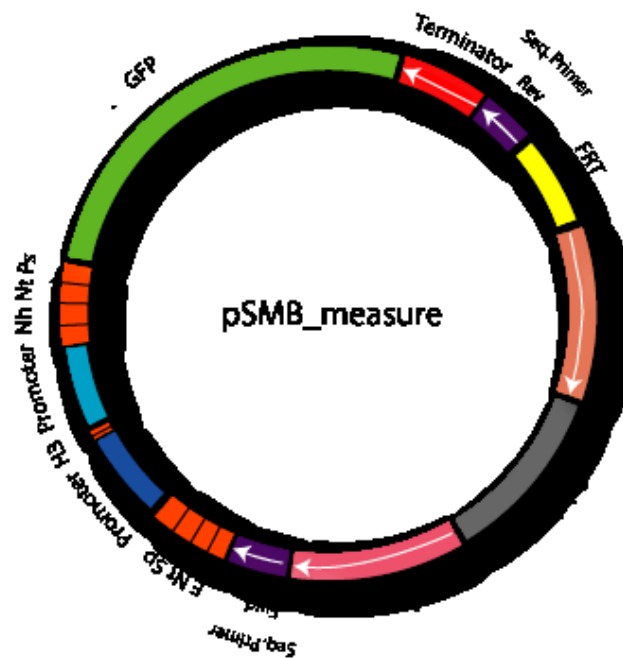
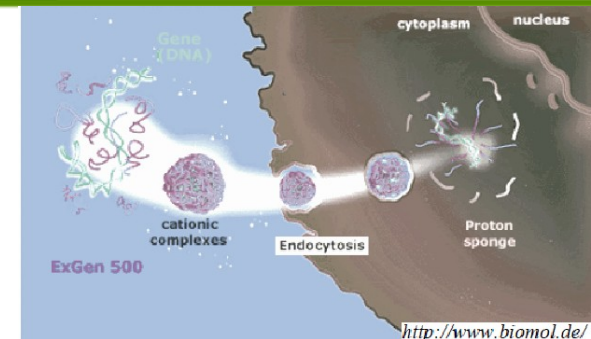
## Izolace plazmidové DNA pomocí kolonkového kitu

video návod on line

[https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s\\_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4.video](https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4.video)

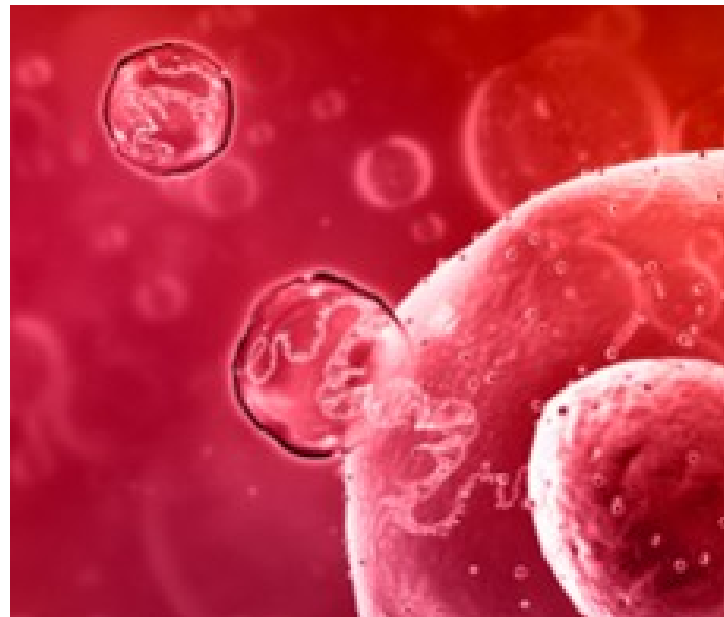
## Transfekce

- Přenos cizorodé DNA pomocí vektorů
- Vektory - molekuly DNA do nichž je včleněn gen zájmu
- Nejčastěji se používají **plazmidy** - malé bakteriální kruhové molekuly DNA
- **SiRNA** (*in vitro* i *in vivo*)



## Transfektanti

- ▶ Cílem je vnesení cizorodé DNA do jádra eukaryotických buněk
- ▶ Transfektanti – buňky obsahující cizorodou DNA
  - **Stabilní transfektanti:** cizorodá DNA se včlenila do buněčného genomu
  - **Tranzientní transfektanti:** cizorodá DNA není integrovaná do genomu, geny v plazmidu jsou přepisovány jen po omezenou dobu cca 24 až 96 hodin

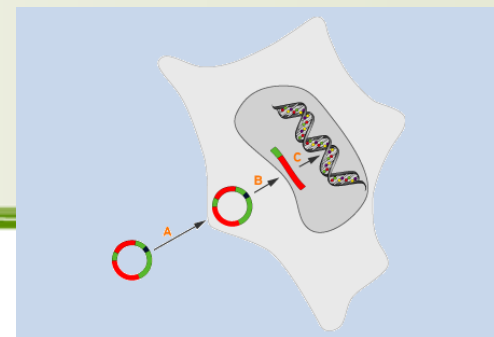




## Důležité parametry

- ▶ Pro transfekci je vhodná 40 – 80 % konfluence buněk
  - Málo buněk – buňky nejsou v kontaktu a rostou špatně
  - Mnoho buněk – kontaktní inhibice, zastavení v G0 vede k rezistenci k průniku DNA i jiných makromolekul
- ▶ DNA proniká lépe do aktivně se dělících buněk než do G0
  - V průběhu mitózy dochází k rozložení jaderné membrány, což umožní průnik DNA do jádra
- ▶ U primárních kultur je kritické číslo pasáže
- ▶ Snaha o co nejnižší pasáž i u stabilních linií (<50)
- ▶ V sadě experimentů by se číslo pasáže nemělo příliš lišit
  - U immortalizovaných linií se mění charakteristika buněk v průběhu času a proto je možné že nereagují stejně i když se transfekce provádí při stejných podmínkách

## Stabilní transfektanti



- Inkorporace plazmidové DNA nesoucí gen zájmu do genomu tak, aby nebyla umlčena, byla správně zařazená do čtecího rámce a rychle překládaná
- Nutný selekční marker (rezistence k antibiotiku) – buď ve stejném plazmidu nebo transfekce dvou plazmidů najednou (5:1 ve prospěch genu zájmu)
- Postup:
  1. Elektroporace genu zájmu a selekčního markeru
  2. 48 h inkubace v médiu bez selekčního ATB
  3. Pasážování naředěných buněk (1:100, 1:500) do média se selekčním ATB – výměna po 3 dnech (do 10 dnů by měly zahynout buňky bez inkorporovaného selekčního markeru)
  4. Za 2 – 5 týdnů se objeví ostrůvky rezistentních buněk
  5. Vypíchnutí těchto dobře rostoucích kolonií a jejich další kultivace v médiu s ATB
  6. Naředit rezistentní buňky tak, aby byla 1 b. na 100 ul média a rozpipetovat je do 96 jamkové desky. Ujistit se, že není v jamce více jak jedna buňka. Pod tlakem ATB vybrat nejlépe rostoucí kolonii.

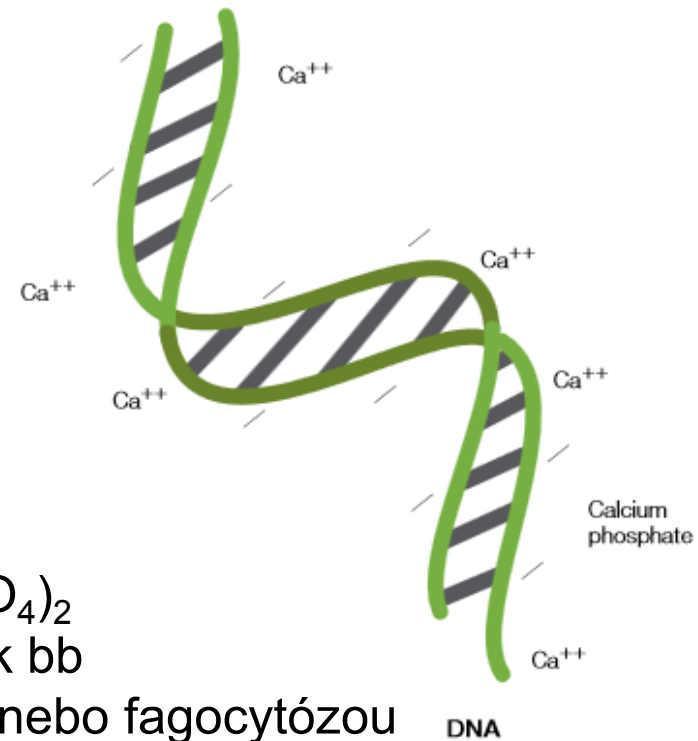
## Nejčastější metody transfekce

- Směs negativně nabitého  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  a pozitivně nabitého  $\text{CaCl}_2$  tvoří precipitát, do kterého se naváže DNA
- Kationické polymery DEAE-dextran, **polyetylenimin (PEI)** – negativně nabitá DNA se naváže na polykation a endocytózou se přenese do buněk
- Liposomy (**lipofectamin**) – DNA je obalena lipidovou kapsulkou, která může fúzovat s membránou
- **Fugene** – neznámé složení neliposomálního typu, etanol
- Elektroporace – vytvoření pórů (**Neon**)

*Krevní buňky je možné transfekovat jen elektroporací*

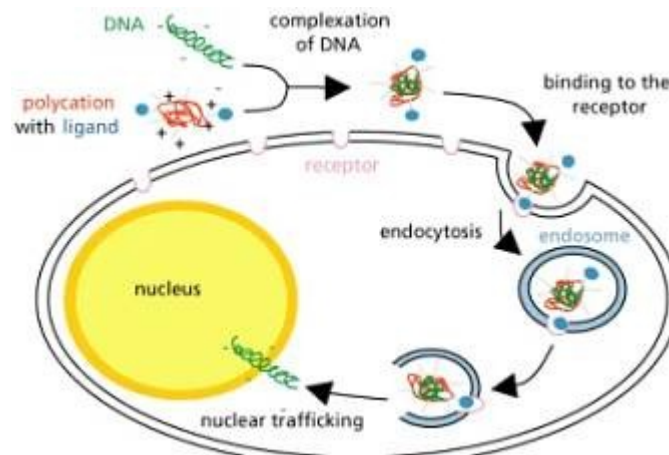
## Vápenaté ionty

- ▶ Smíchání DNA s  $\text{CaCl}_2$
- ▶ Přidání směsi do roztoku  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
- ▶ Tvorba precipitátu, který se přidá k bb
- ▶ Pohlcení precipitátu endocytózou nebo fagocytózou



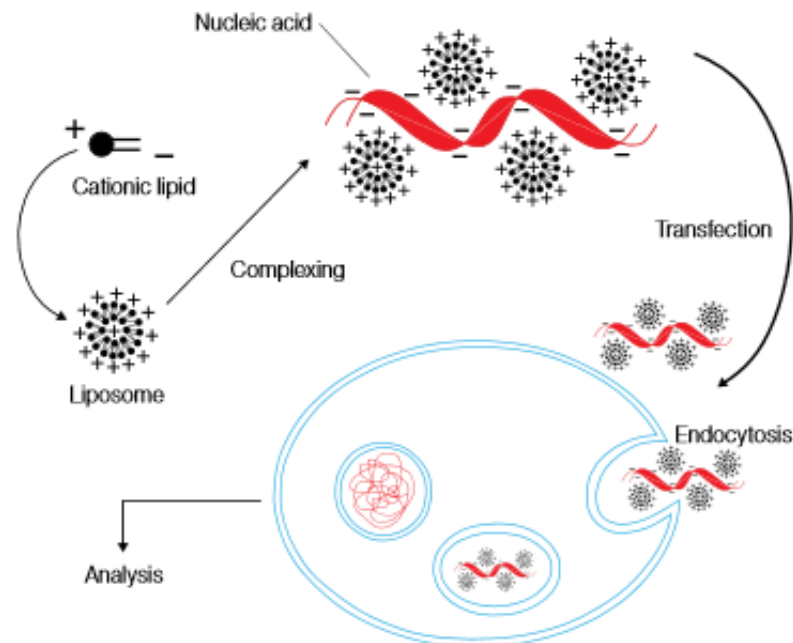
## PEI

- Kationické polymery jsou hydrofilické, a proto jsou rozpustné ve vodě
- Jsou schopné velmi efektivně kondenzovat DNA (záporný náboj)
- Komplexy DNA/PEI musí být malé (< 100 nm)
- Internalizace endocytózou
- Akumulace v endosomech a lyzosomech kolem jádra
- Jen malé množství komplexů z těchto organel unikne a dostane se do jádra



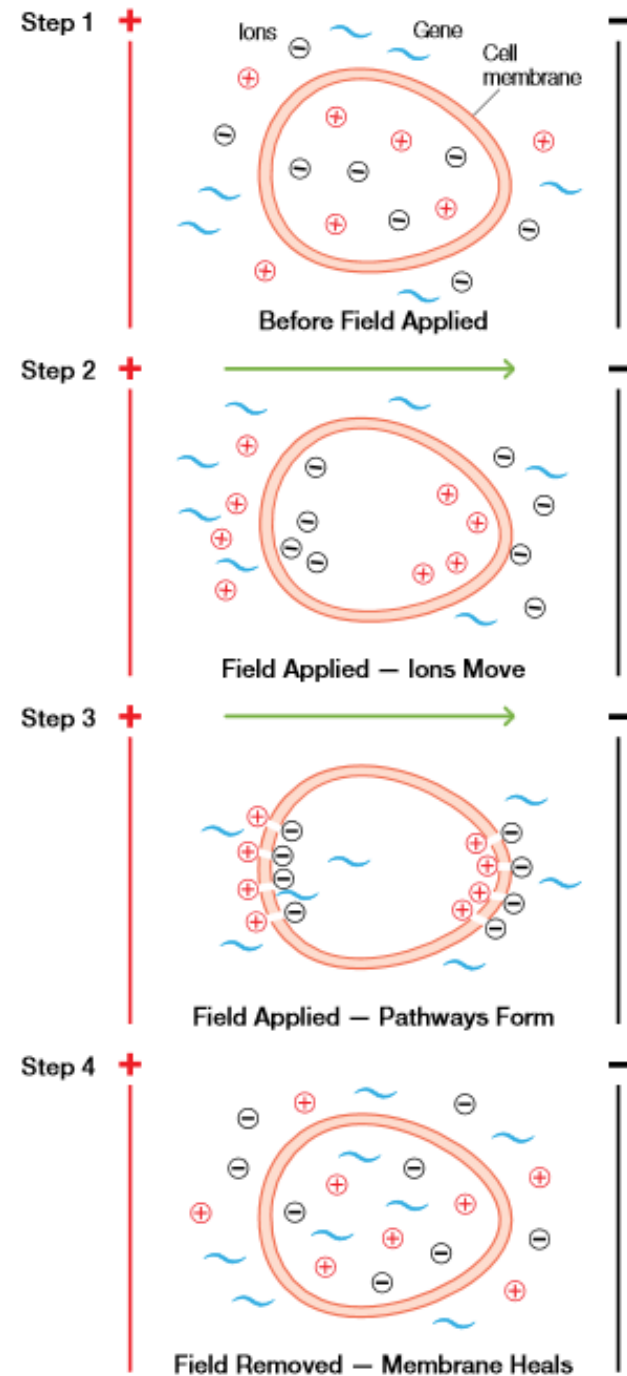
# Lipofekce

- ▶ Kationické lipidy – liposomy/lipoplexy (Lipofectamin)
- ▶ Jsou to amfifilické molekuly s kladně nabitou polární částí, která je spojena s nepolární hydrofobickou doménou
- ▶ Elektrostatické interakce mezi kladnou částí a negativně nabitou DNA vede k tvorbě komplexů pohlcených endocytózou



## Elektroporace

- Vystavení buněk elektrickému poli vede ke zvýšení permeabilizace membrány
- Směs buněk a plazmidu v pufru se v kyvetě vloží do elektroporátoru
- Podmínky
  - proud kV/cm
  - délka pulsu  $\mu\text{m-s}$





## ELEKTROPORACE - NUKLEOFEKCE

- Kombinace elektroporace a dalších činidel (Resuspension buffer R/T) pro zvýšení účinnosti transfekce



- Elektrickým pulzem se naruší i jaderná membrána a plazmid se dostane přímo do jádra buněk – vysoká efektivita

## Méně časté metody

- **Magnetické kuličky**
  - Paramagnetické kuličky pokryté vektorovou DNA jsou pomocí magnetu vneseny do buněk
- **Balistické technologie** (gene gun/bioballistic=biolistic)
  - Částičky zlata s navázaným genem se vstřelí do buněk
- **Mikroinjekce**
  - Skleněnou pipetou je vnesen roztok s DNA propíchnutím membrány (mikromanipulátory)
- **Laserfekce/optoinjekce**
  - Pomocí objektivou s vysokou aperturou je světlo zaostřeno na bod (cca 1  $\mu\text{m}$  v průměru) po setinu sekundy, čímž se naruší cytoplazmatická membrána
- *Metody založené na použití virů (infekce)*

## Výhody a nevýhody

- ▶ PEI
  - + cena/efektivita
  - nutnost výměny média (toxicita)
- ▶ Lipofectamine
  - + efektivita
  - nutnost výměny média, cena
- ▶ NEON
  - + efektivita, není nutno měnit médium, použití na krevní buňky
  - cena
- ▶ Fugene
  - + efektivita, není nutno měnit médium
  - cena

Rozhodující je poměr efektivita : cena

## Možnosti využití transfekce

### Transfekcí je možné ovlivnit

- Molekulární mechanismy zahrnuté v kontrole buněčné proliferace, diferenciaci, přežití/smrti
- změnu buněčného fenotypu a mezibuněčné komunikace
- **Uvedené procesy hrají úlohu ve vývoji nádorových onemocnění a mohou být potencionálně využity v protinádorové terapii.**

### Transfekcí můžeme vnést do buněk také

- Reportérový plazmid ( $\beta$ GAL, LUC, CAT...)
- Expresní plazmid (konjugát proteinu a fluorescenčního proteinu – GFP, YFP, mCherry...)
- SiRNA (cílený knock-out genů)

## SHRNUTÍ transfekce

