

GENOVÉ TECHNOLOGIE

Základní technologie rekombinantní DNA:

Základní technologie rekombinantní DNA - enzymy, vektory, metody transformace, konstrukce genových knihoven.

Restrikční enzymy

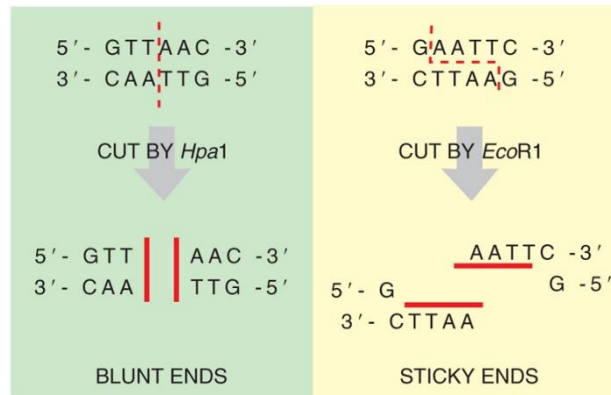
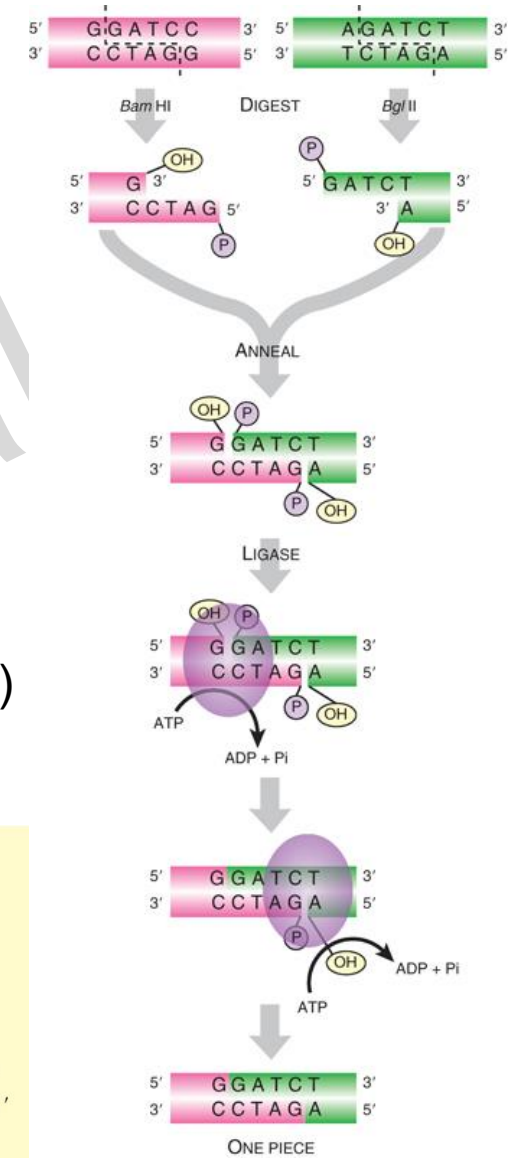
- Bakteriální enzymy vážící se na specifickou sekvenci a štípající obě vlákna
- Ochrana bakterií před cizí DNA (viry)
- Jsou citlivé na metylaci DNA
- Rozlišujeme dva základní druhy:

Typ I – štípou řetězec DNA 1000 a více bází od rozpoznávané sekvence

Typ II - štípou řetězec DNA v místě rozpoznávané sekvence (tupé, ostré konce)

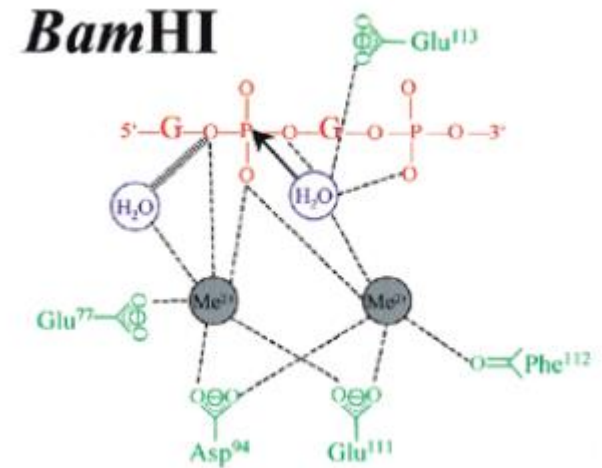
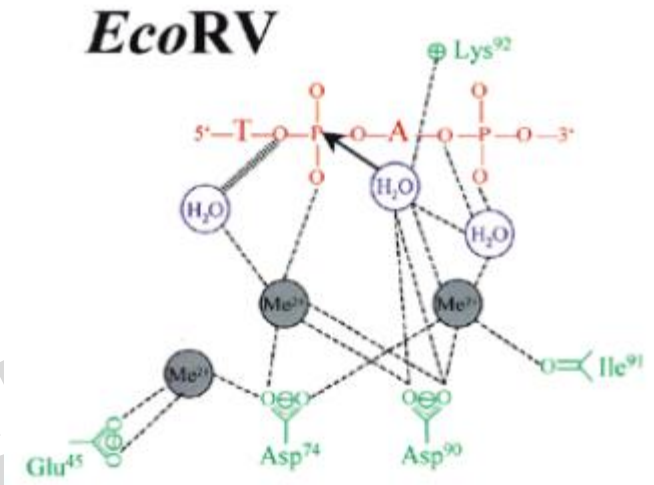
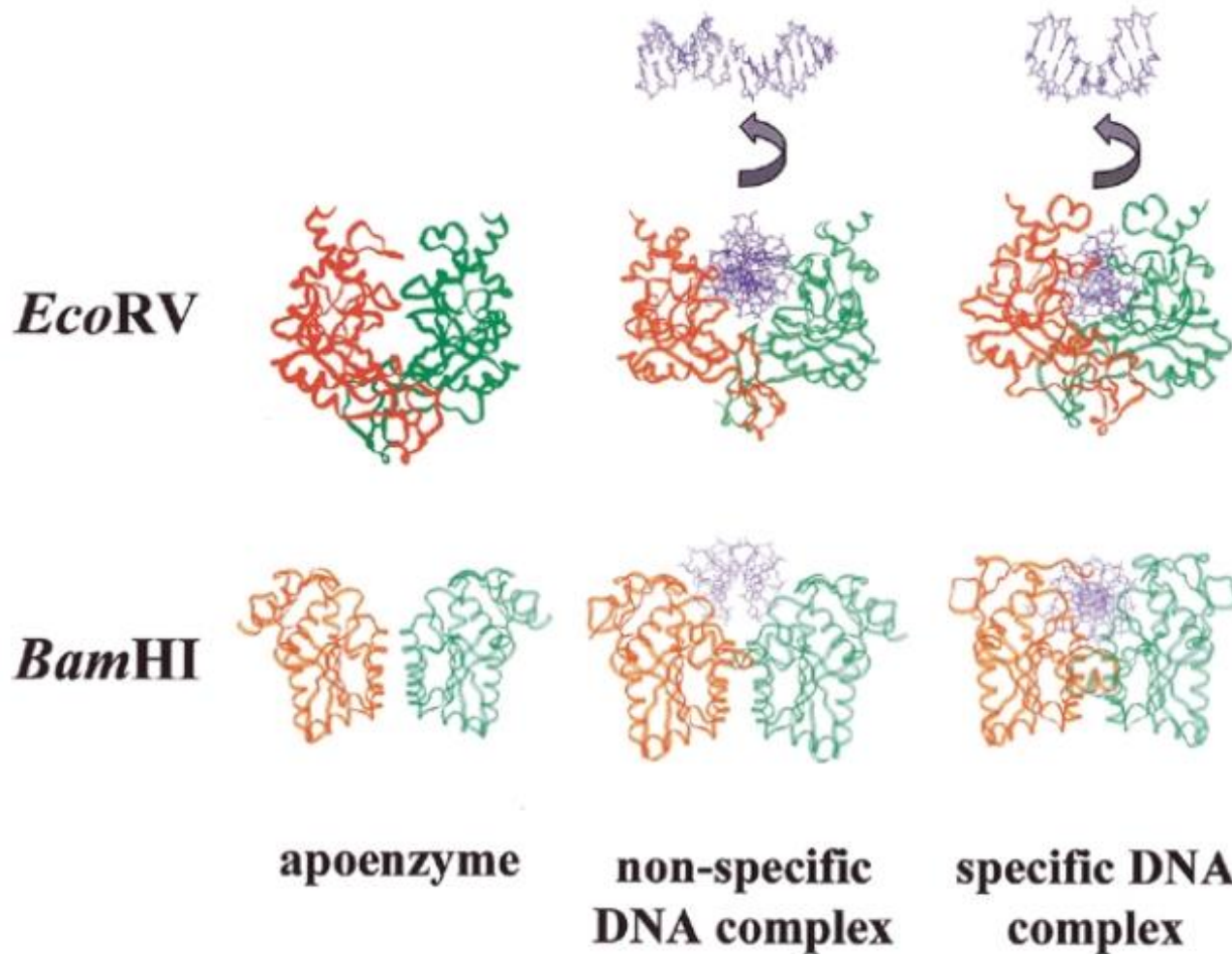
Počet rozpoznávaných bází určuje míru fragmentace cílové DNA

- Spojení fragmentů - ligáza (T4 ligáza)

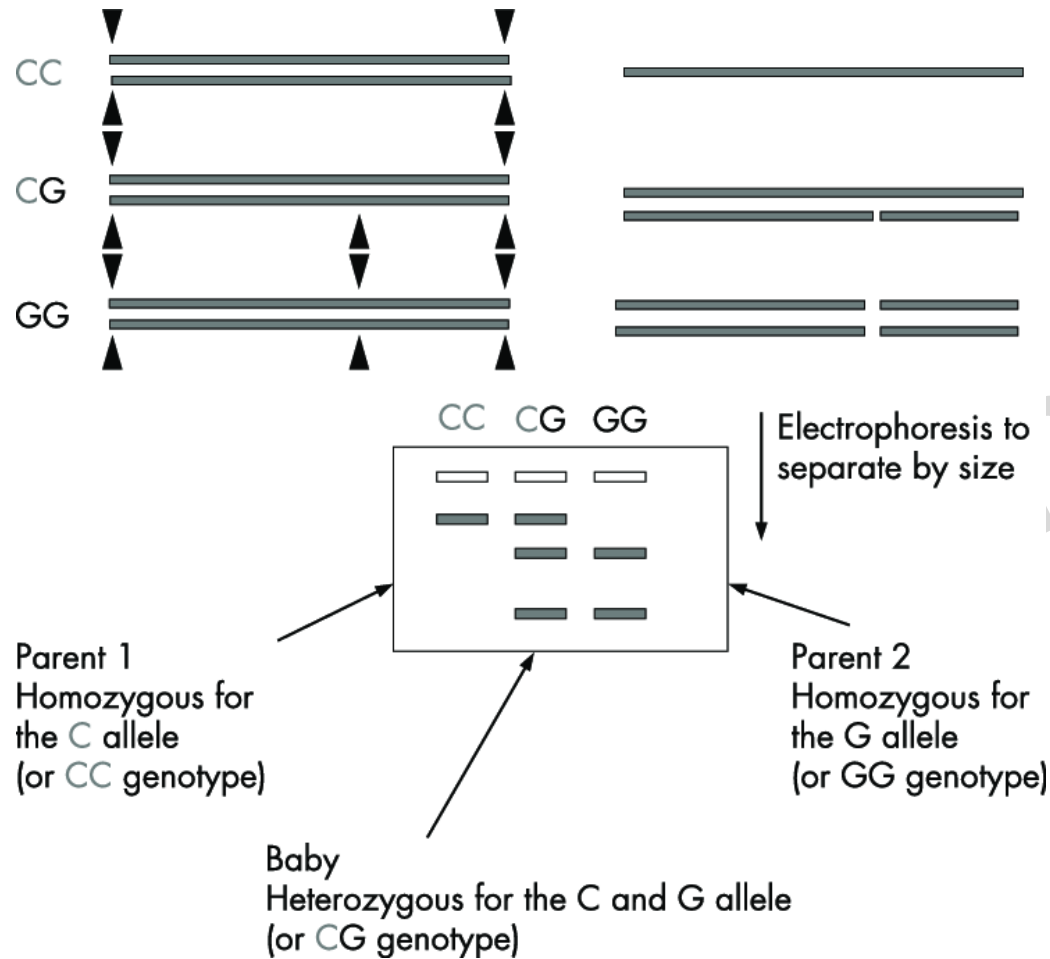


Clark and Pazdernik, 2016

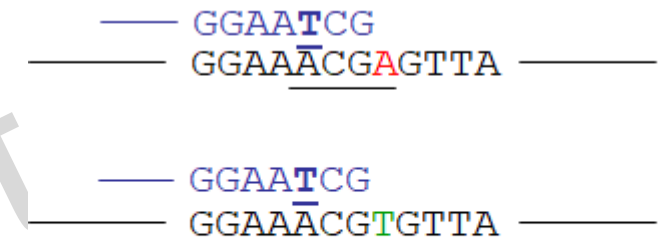
Restrikční enzymy (struktura)



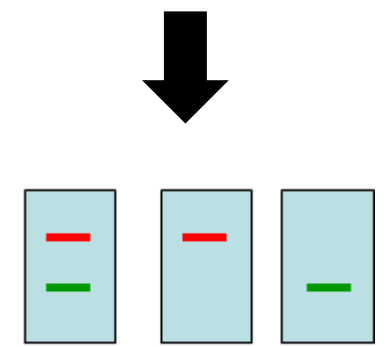
Restriction Fragment Length Polymorphism



Použití mis-match primerů

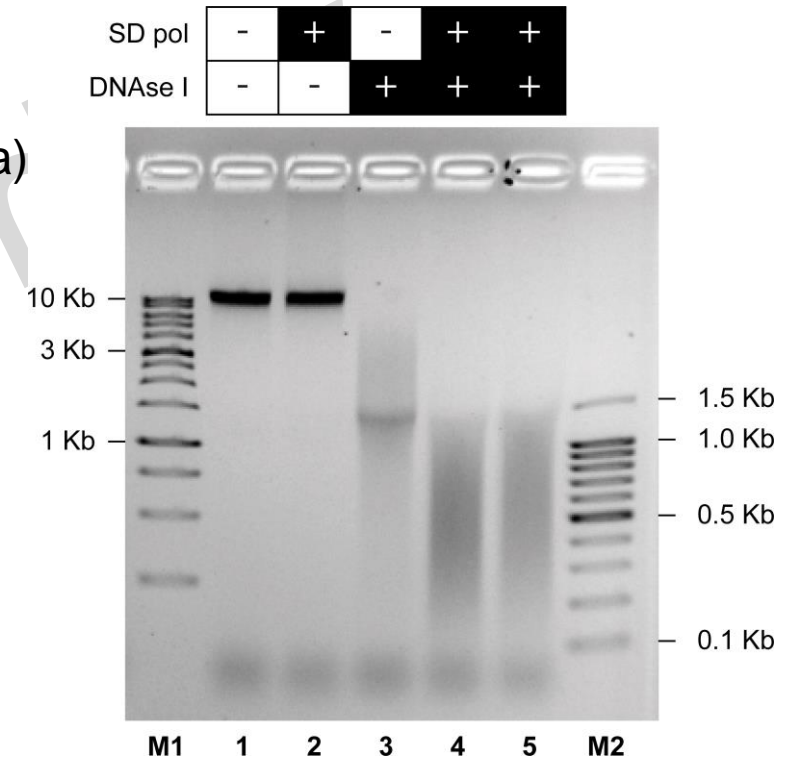
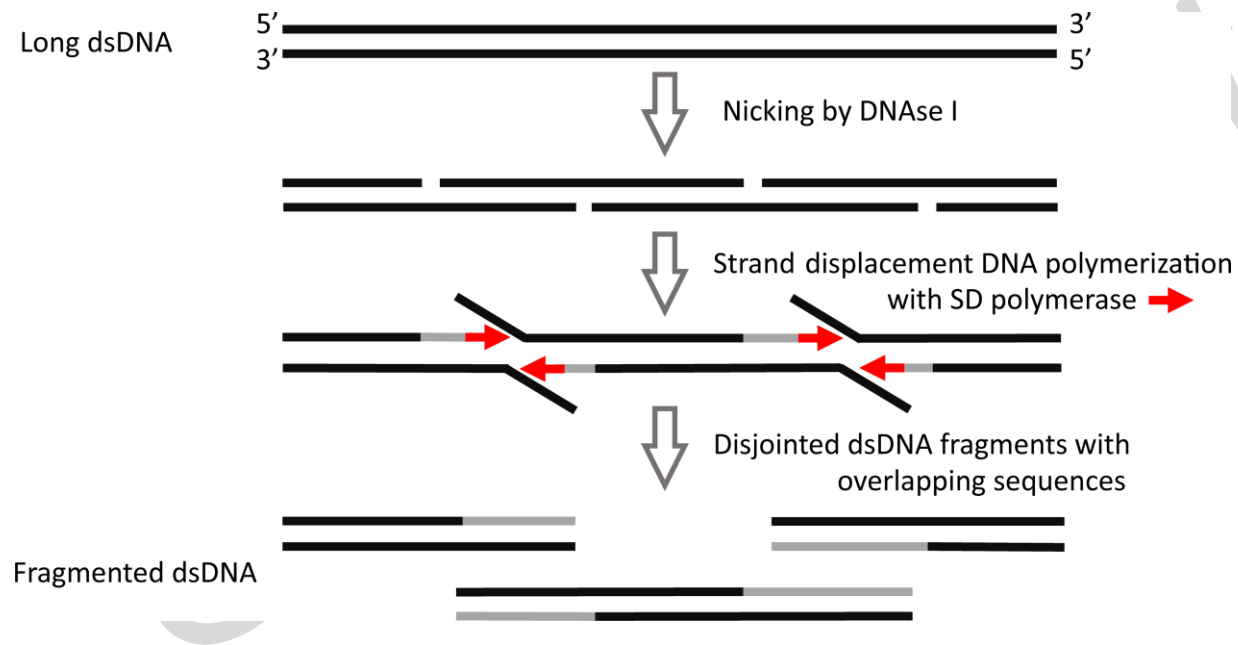


Taq1 - TCGA



Fragmentáza

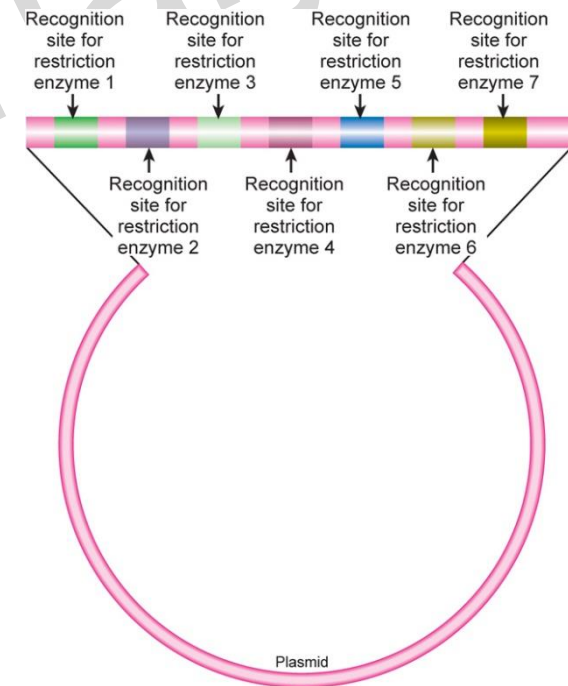
- Používaná k fragmentaci DNA u NGS
- Směs dvou enzymů (DNase I a SD (strand-displacement) polymeráza)



Ignatov et al. 2019

Klonovací vektory

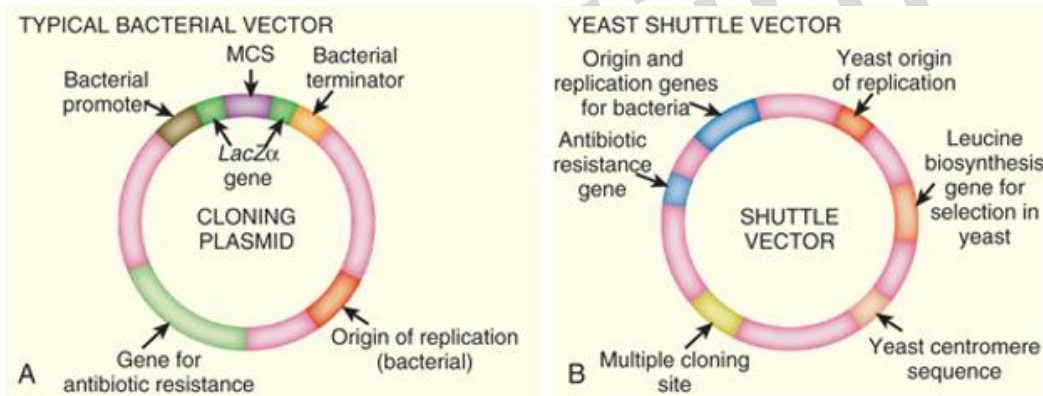
- Specializované plazmidy (jiné elementy) nesoucí cizorodou DNA za účelem studia/manipulací
- V současné době používáme rovněž arteficiální chromosomy a viry
- Základní vlastnosti klonovacích vektorů:
 - malá velikost (snadná manipulovatelnost a izolace)
 - snadný přenos mezi buňkami transformací
 - snadná izolace z hostitelského organismu
 - snadná detekce a selekce
 - výskyt ve větším počtu kopií (kontrola *ori* místem)
 - mnohočetné klonovací místo pro vložení klonované DNA
 - Metoda detekce přítomnosti vložené DNA ve vektoru



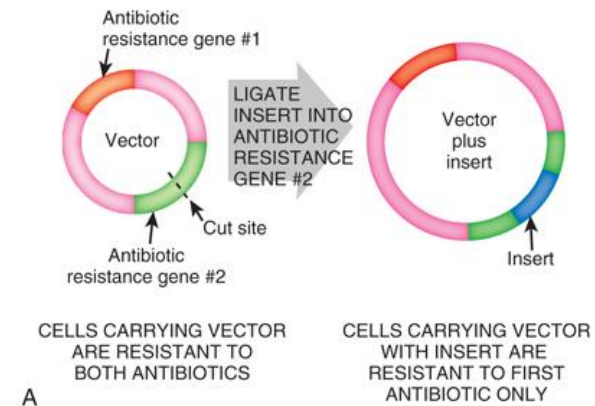
Clark and Pazdernik, 2016

Klonovací vektory

- Možnosti kontroly vložení DNA:
 - inserční inaktivace (gen rezistence na ATB)
 - *ccdB* gene (gen smrti interferující s aktivitou DNA gyrázy) <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00280310>)
 - alfa komplementace (β -galaktozidáza)
- Kvasinkové vektory založená na 2 μ circle
 - ori místo dvou organismů, Cen sekvence
 - selekce na základě syntézy AK

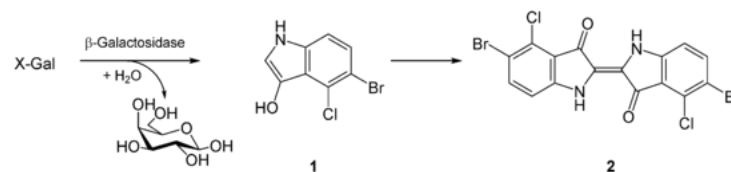
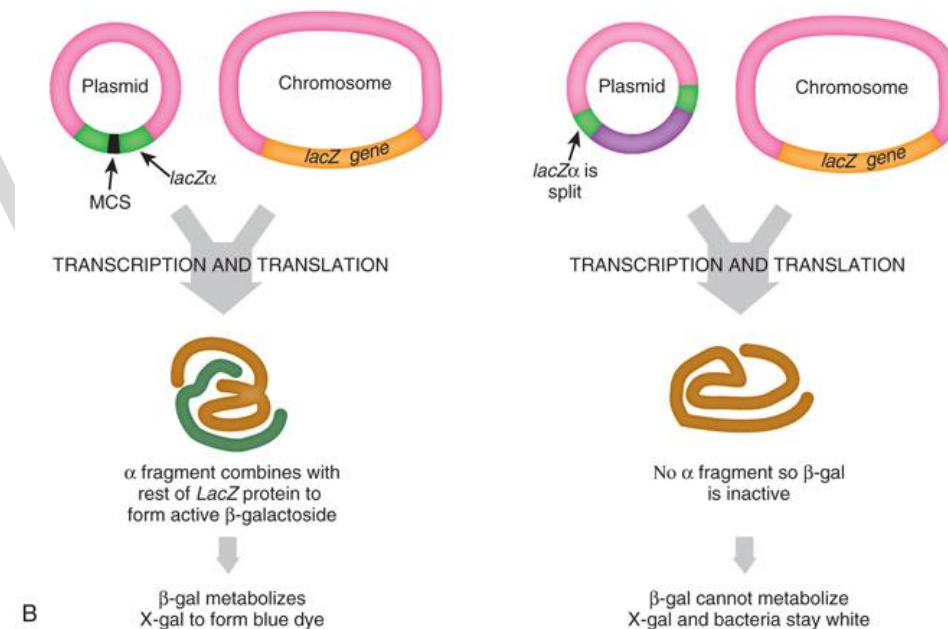


INSERTIONAL INACTIVATION



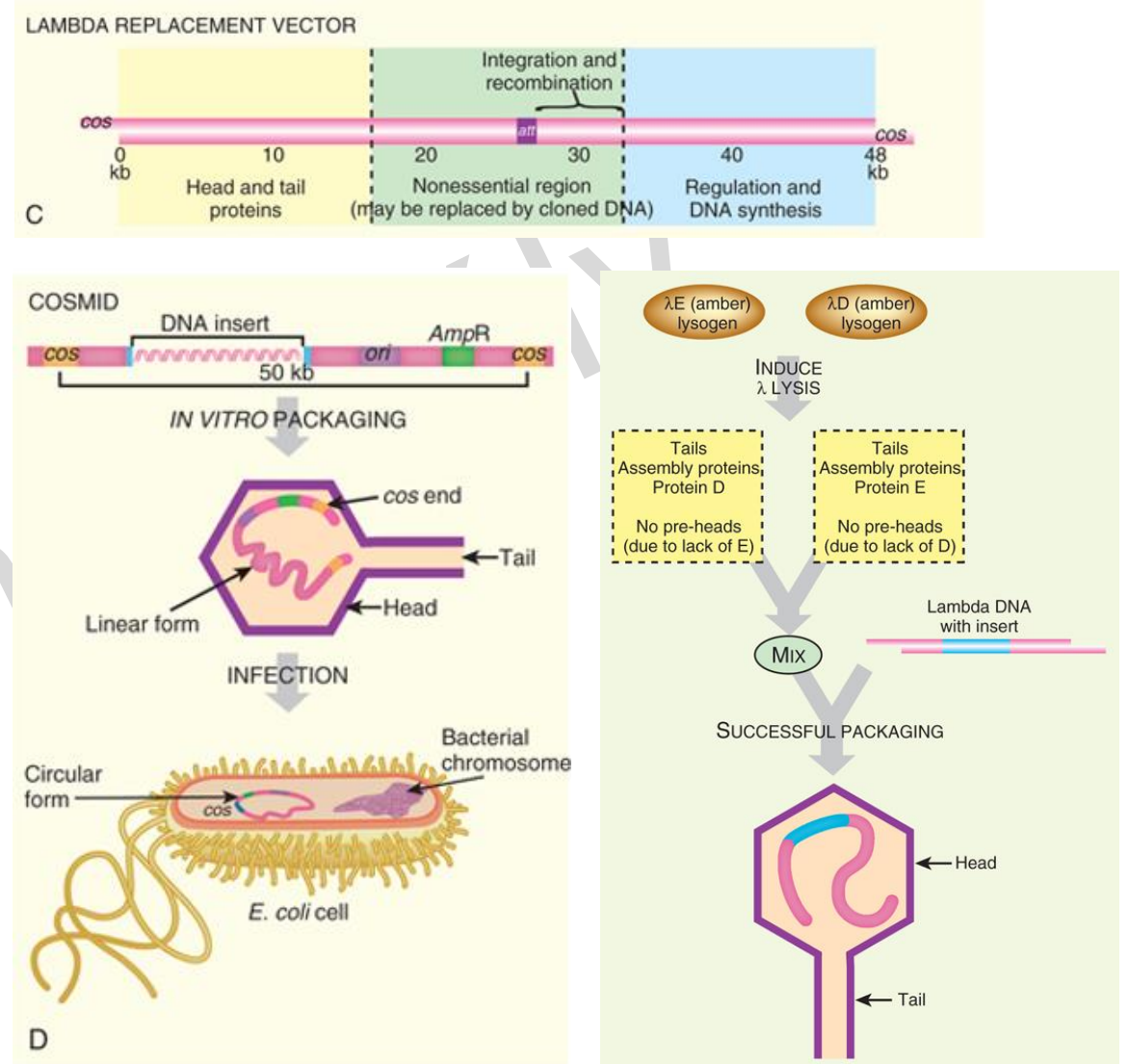
ALPHA COMPLEMENTATION

Clark and Pazdernik, 2016



Virové vektory

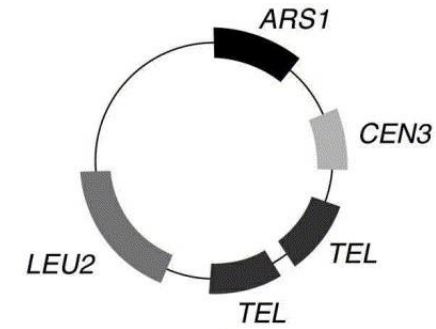
- Bakteriofágové vektory
 - upraveny, tak že mohou nést ne-virovou DNA v kapsidě
 - spojení *cos* sekvencí = tvorba replikační formy (RF) replikované valivou kružnicí
 - může být vložen insert o velikosti 37 až 52 kb
 - využití pomocných virů pro sbalení DNA do virových částic
- Cosmidy
 - vysoce modifikovaný lambda vektor mající pouze *cos* místa
 - nutnost sbalení pomocí pomocného fága



Clark and Pazdernik, 2016

Arteficiální chromozomy

- Slouží pro manipulace s velkými částmi DNA (150 – 2000 kb)
- Zahrnují:
 - kvasinkové arteficiální chromozomy (YACs)
 - bakteriální arteficiální chromozomy (BACs)
 - P1 bakteriofágové arteficiální chromozomy (PACs)
- YACs obsahují centromeru a telomery pro trvalé udržení v kvasince
- BACs jsou cirkularizovány a množeny v bakteriích (*ori* místo a gen rezistence)

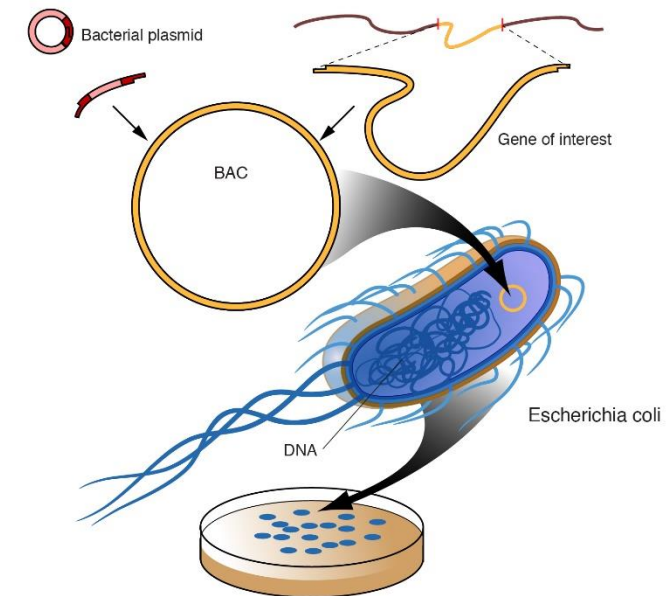


Transform into yeast spheroplasts



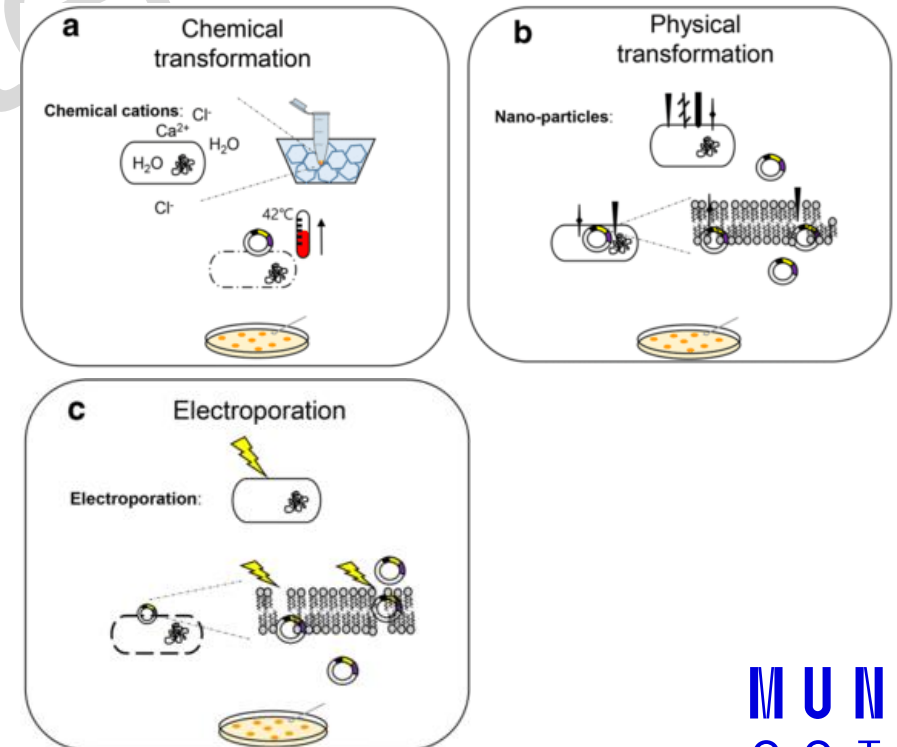
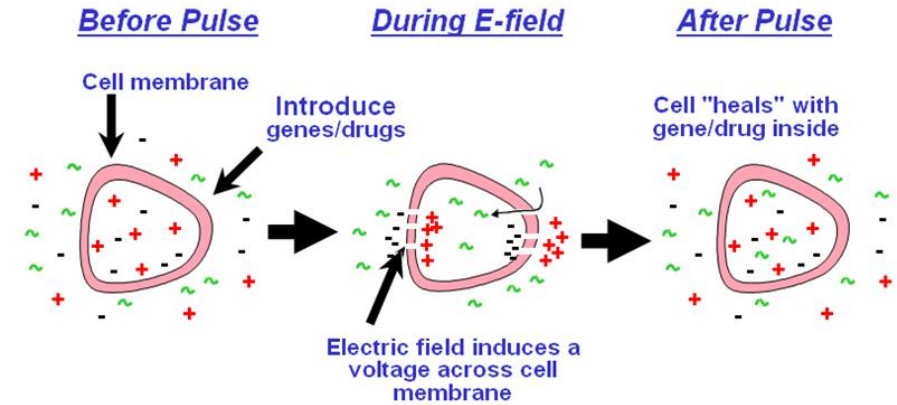
trends in Biotechnology

Trends in Biotechnology 2000, DOI: (10.1016/S0167-7799(00)01438-4)



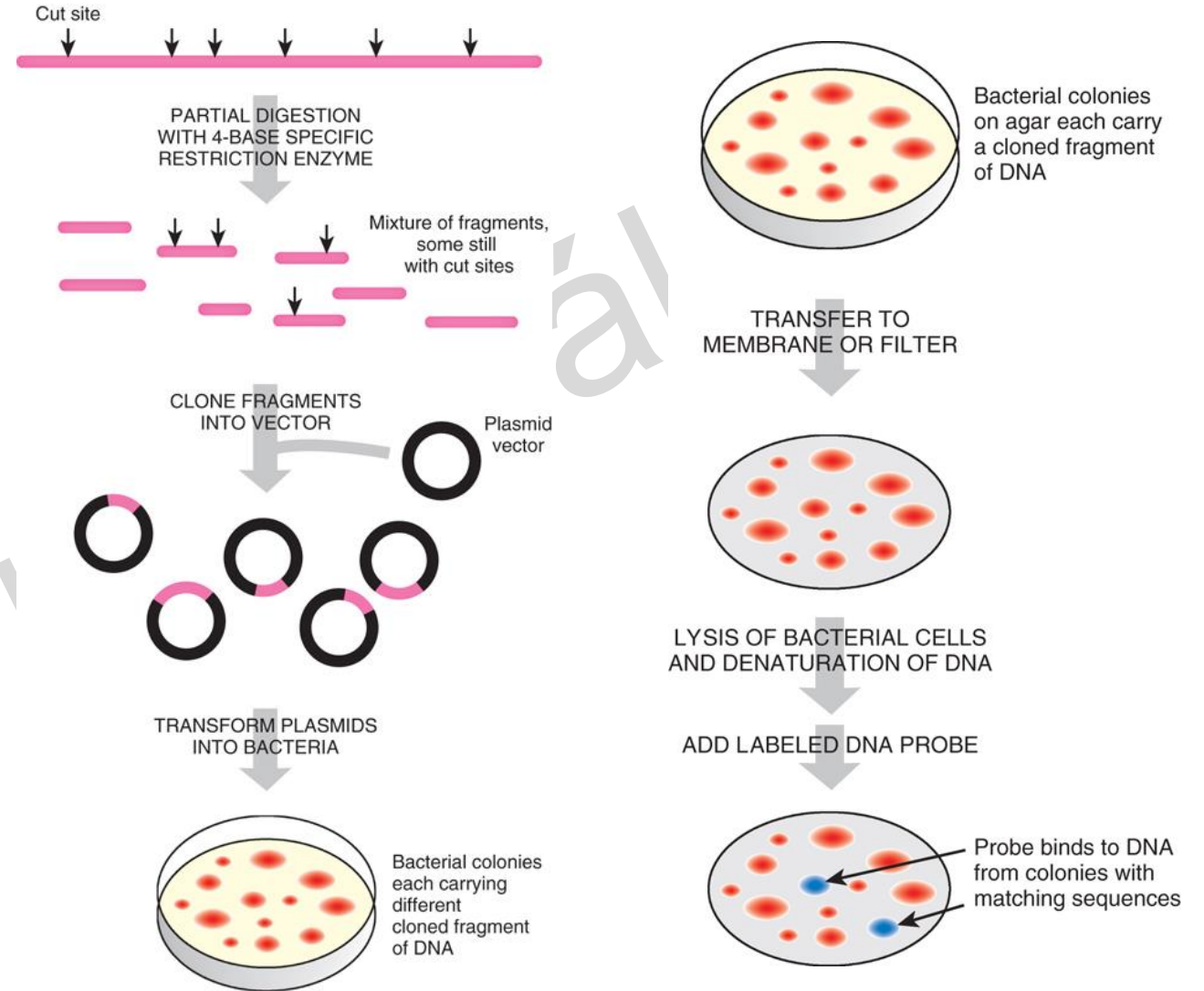
Transformace DNA

- Transformace je proces, kterým se cizí DNA zavádí do buňky.
- Kompetentní buňky *E. coli*:
 - použití vápenatých iontů a teplotního šoku pro zvýšení permeability buněčné stěny a membrány
 - použití elektroporace pro otevření buněčné stěny a membrány
- Kompetentní kvasinky:
 - kombinace octanu litného, jednovláknové nosné DNA a polyethylenglykolu (PEG)



DNA knihovny

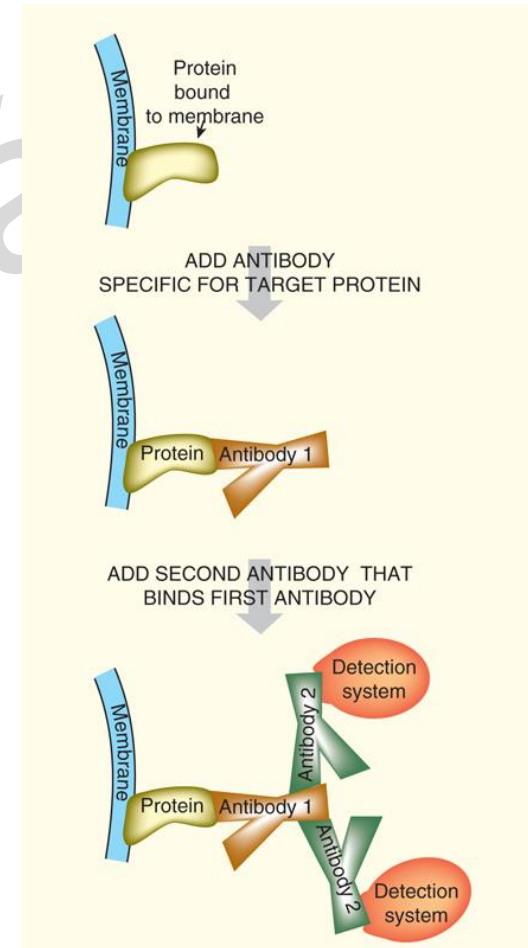
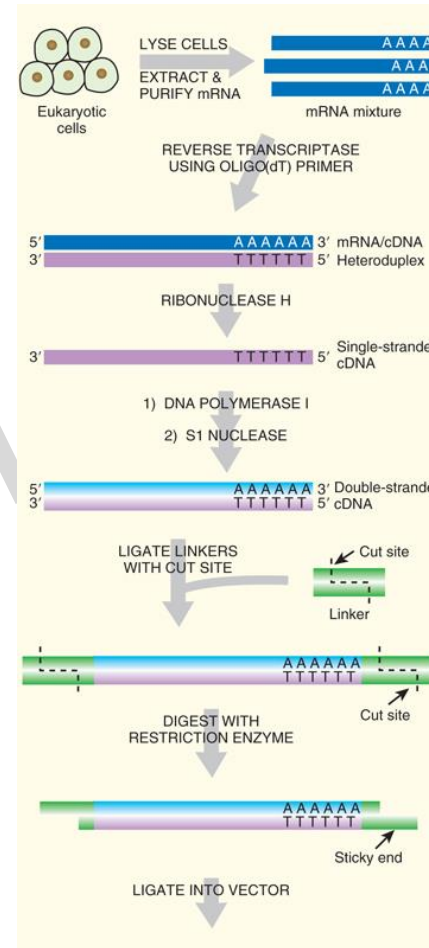
- Používané pro:
 - nalezení nových genů
 - sekvenaci genomů
 - porovnání genů z různých organizmů
- Základní kroky v rámci tvorby knihovny:
 - izolace chromozomální DNA
 - naštěpení DNA restričním enzymem
 - linearizace příslušného vektoru
 - vložení fragmentů do vektoru
 - transformace do E. coli



Clark and Pazdernik, 2016

Eukaryotické expresní knihovny

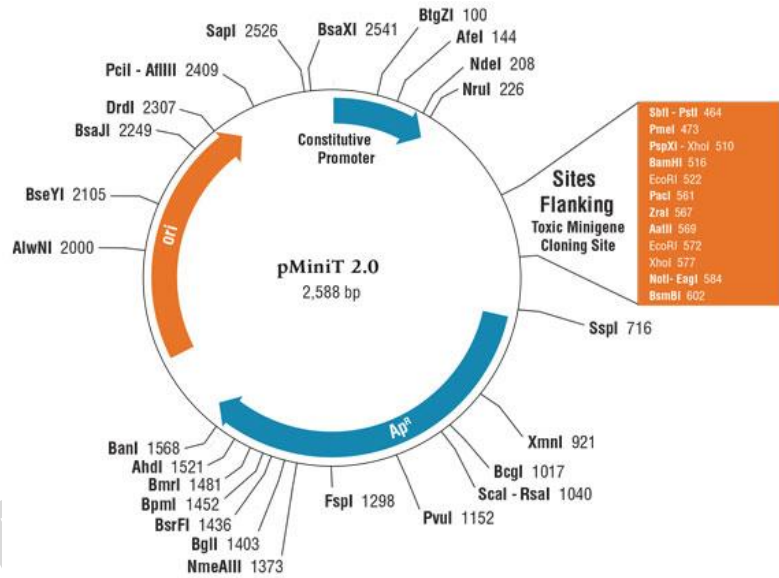
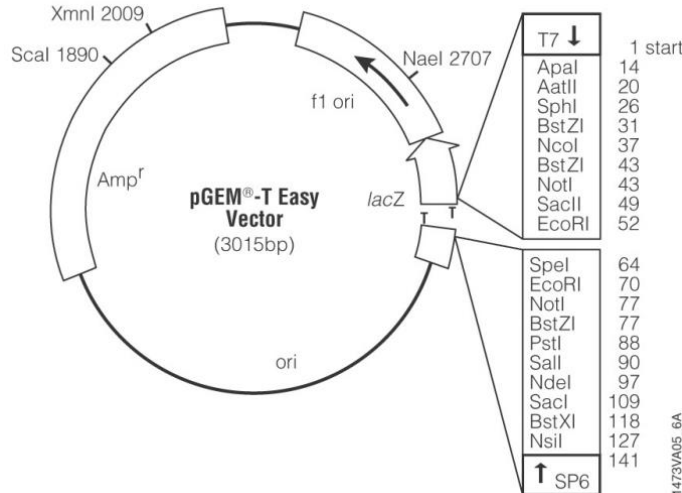
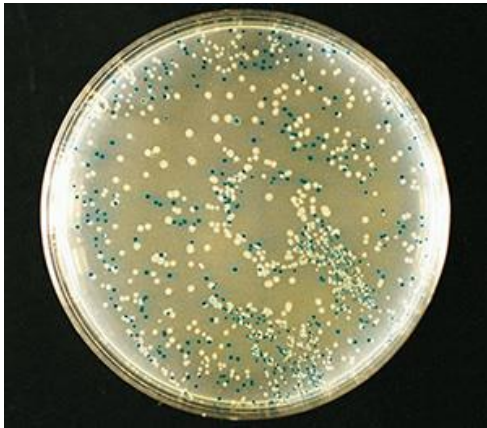
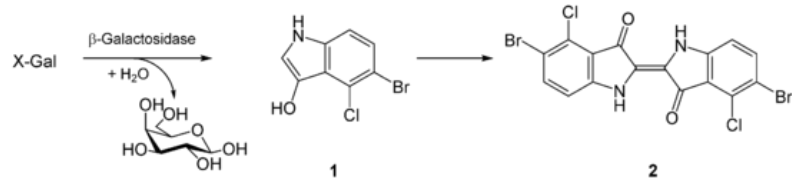
- Vektor obsahuje sekvenci nutnou pro transkripci a translaci
- Konstruovány z komplementární DNA (cDNA)
- Identifikace nových genů, sestřihových variant



Clark and Pazdernik, 2016

Klonovací strategie

- TA klonování
 - využití vlastnosti Taq DNA polymerázy přidat na 3' konec A
 - pMiniT 2.0 (toxic mini-genes) (NEB)
 - pGEM-Teasy (modrobílá selekce) (Promega)



Features within Sequence Flanking the Toxic Minigene/Cloning Site

Cloning Analysis Forward Primer

```

5' ACC TGC CAA CCA AAG CGA GAA CAA AAC ATA ACA TCA GAA GAA TCG ACC GAT TGT TAG GTA ATC GTC ACC TGC AGG AAG GGT
3' TGG ACG GTT GGT TTC GCT CTT GTT TTG TAT TGT AGT TTG CTT AGC TGG CTA ACA ATC CAT TAG CAG TGG ACG TCC TTC GAA

```

SP6 Promoter

```

5' TAA ACG CAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA GTG TGT ATC GCT CGA GGG ATC CGA ATT CAG GAG GTA AAA ACC
3' ATT TGC GTA AAT CCA CTG TGA TAT CTT CAC ACA TAG GCA GCT CCC TAG GCT TAA GTC CTC CAT TTT TGG

```

INSERT
 Met Ile (Interrupted)

Two Amino Acid Toxic Minigene with Cloning Site Shown
(As diagrammed, minigene inactivated if insert cloned into site)

```

5' TTA ATT AAG ACG TCA GAA TTC TCG AGG CGG CCG CAT GTG CGT CTC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAT TTC GCG GGC
3' AAT TAA TTC TGC AGT CTT AAG AGC TCC GCC GGC GTA CAC GCA GAG GAA TAT CAC TCA GCA TAA TTA AAG CCG CCG

```

T7 Promoter

```

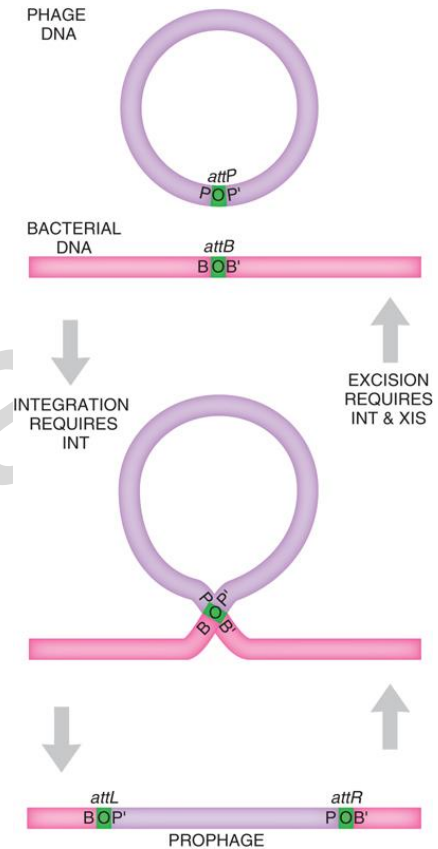
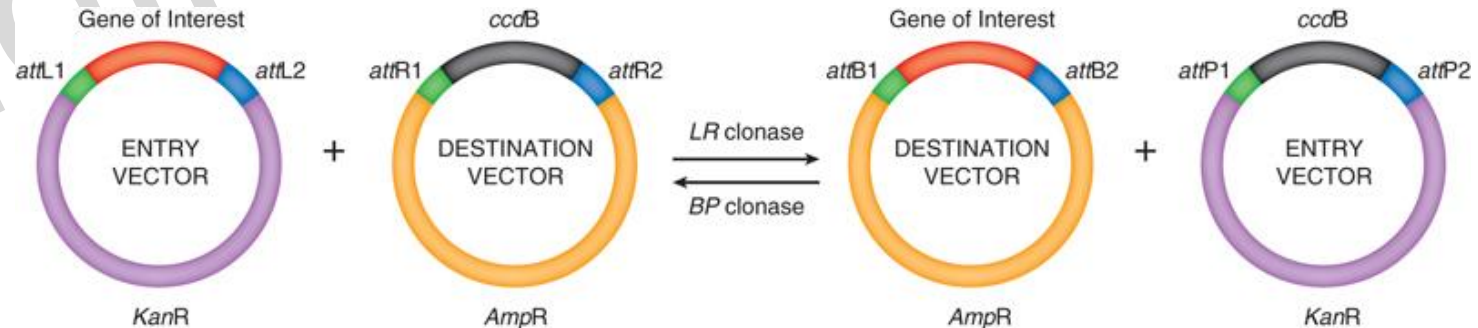
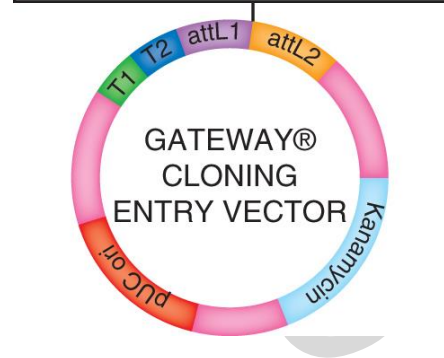
5' GGA ACC CCT ATT TGT TTA TTT TTC TAA ATA CAT TCA AAT ATG TAT CCG CTC ATG AGA CAA TAA CCC TGA 3'
3' CCT TGG GGA TAA ACA AAT AAA AAG ATT TAT GTA AGT TTA TAC ATA GGC GAG TAC TCT GTT ATT GGG ACT 5'

```

Cloning Analysis Reverse Primer

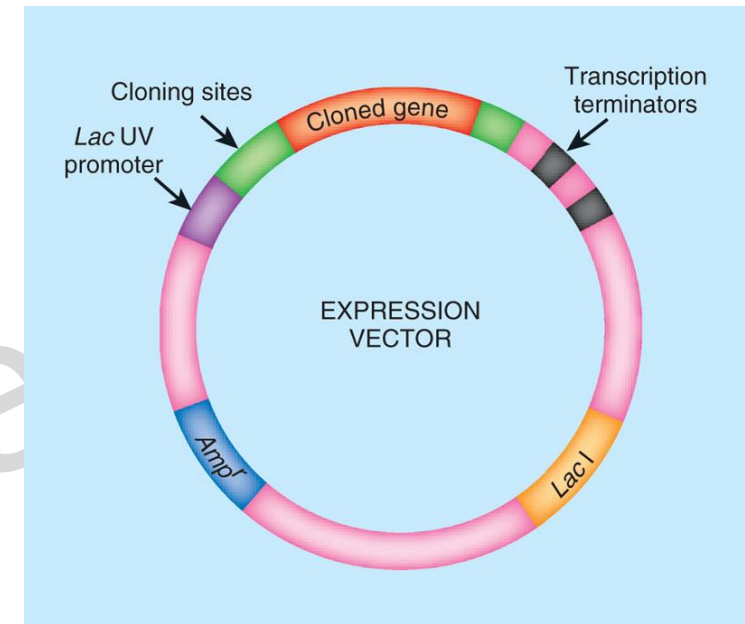
Klonovací strategie

- GATEWAY klonovací vektory (Invitrogen-Thermo)
 - využití enzymů fága lambda integrázy a excisionázy
 - použití ENTRY a DESTINATION vektorů
 - LR reakce odstraňuje gen zájmu z *attL* míst a vkládá ho do *attR* míst
 - BP reakce odstraní gen zájmu z *attR* míst a vloží ho do *attL* míst.



Expresní vektory

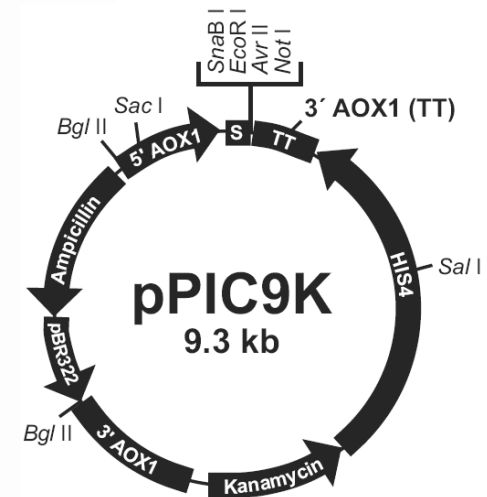
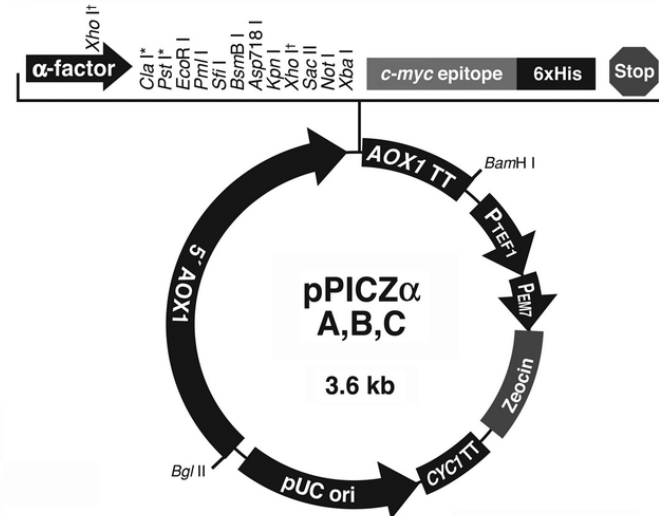
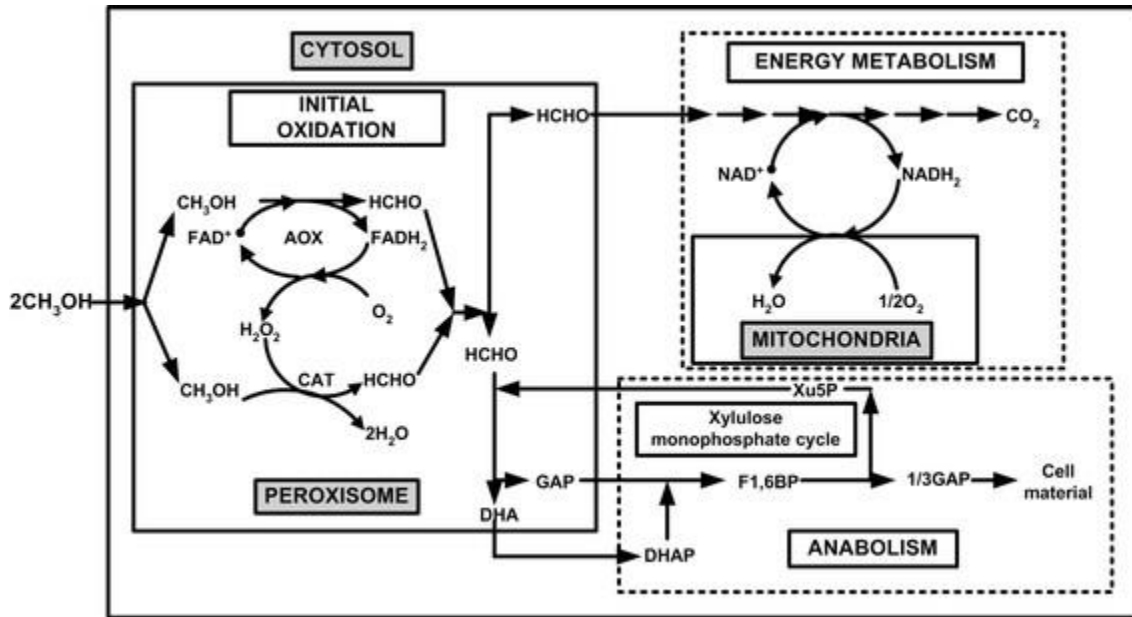
- Nejčastěji používaný promotor *lacUV* (upravený *lac* promotor)
 - místo pro vazby RNA polymerázy
 - místo pro *lacI* represor
 - místo počátku transkripce
 - místo ukončení transkripce
- Další často používaný promotor je lambda left promotor (P_L)
 - místo pro vazbu lambda represoru
 - nejčastější aktivace zvýšenou teplotou (42°C)
- Expresní systémy rovněž využívají promotor vázající pouze RNA polymerázu T7 bakteriofága
 - kmeny *E. coli* nesoucí T7 RNA polymerázu po kontrolou induktoru
- Expresní vektory často obsahují sekvence pro různé kotvy (6His, Myc, FLAG, S-tag, MBP)



Clark and Pazdernik, 2016

Kvasinkové expresní vektory

- Inducibilní AOX promotor (methanol)
- Možnost intracelulární a extracelulární exprese
- Exprese v kvasinkách *P. pastoris* a *S. cerevisiae*



Comments for pPICZα A 3593 nucleotides

5' AOX1 promoter region: bases 1-941
 5' AOX1 priming site: bases 855-875
 α-factor signal sequence: bases 941-1207
 Multiple cloning site: bases 1208-1276
 c-myc epitope: bases 1275-1304
 Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1320-1337
 3' AOX1 priming site: bases 1423-1443
 AOX1 transcription termination region: bases 1341-1682
 TEF1 promoter: bases 1683-2093
 EM7 promoter: bases 2095-2162
 Sh ble ORF: bases 2163-2537
 CYC1 transcription termination region: bases 2538-2855
 pUC origin: bases 2866-3539 (complementary strand)

* Pst I is in Version B only
 Cla I is in Version C only

† The two Xho I sites in the vector allow the user to clone their gene in frame with the Kex2 cleavage site, resulting in expression of their native gene without additional amino acids at the N-terminus.