

DNA knihnice

- Čo je to DNA knižnica?
 - Súbor naklonovaných rekombinantných plazmidov nesúcich rôzne fragmenty DNA

- 2 typy DNA knižníc:
 - Genómová
 - cDNA

- Genomová knižnica obsahuje celú informáciu obsiahnutú v genóme (geny a nekódujúce sekvencie)

- cDNA knižnica obsahuje iba gény exprimované v určitom štádiu vývoja organizmu alebo v špecifickej tkanive

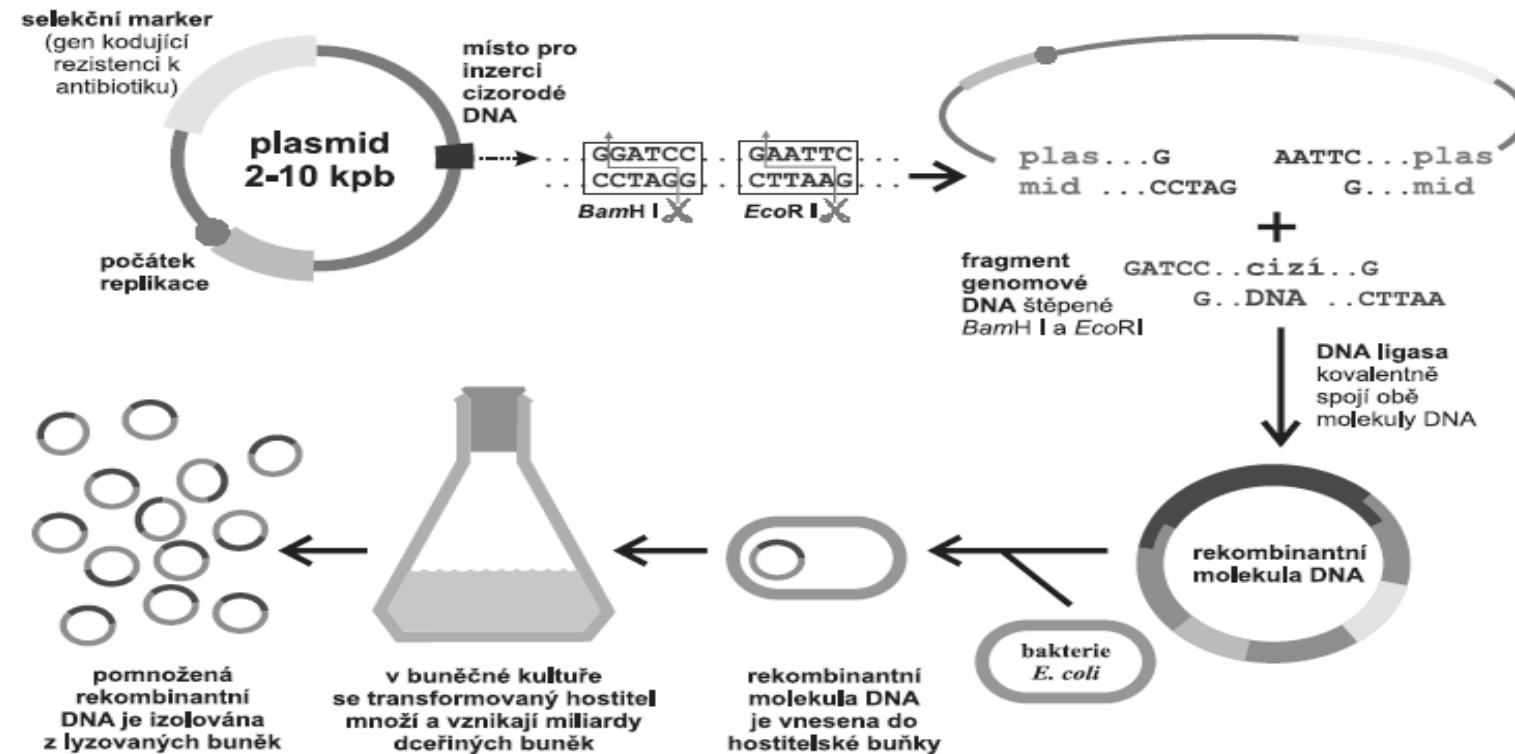
Čo je to **genómová knižnica**

- Genómovou knižnicou nazývame zbierku naklonovaných fragmentov bunečnej DNA

Príprava genómovej knižnice DNA

- Izolácia celkovej DNA zo vzorku tkaniva alebo bunecnej štruktúry
- Rozštiepenie celkovej genómovej DNA na menšie praktickejšie úseky
- Štiepenie prebieha buď mechanicky alebo restričnou endonukleazou
- Každý z fragmentov bunecnej DNA je zložený do klonovacieho vektora a pomnožený v hostiteľskej bunke (*E. coli*)

Tvorba DNA knihnice



Obrázek 2: Klonování DNA v bakteriích. Klonovaný úsek DNA je vložen do bakteriálního plasmidu a rekombinantní plasmid je vnesen do hostitelské buňky schopné DNA přijmout (kompetentní buňky) a replikovat. V selekčním médiu obsahujícím např. antibiotikum rostou pouze buňky nesoucí daný plasmid (plasmid obsahuje gen pro rezistenci k antibiotiku). Mnohonásobně pomnožený plasmid lze z buněk vyizolovat v čisté formě a naklonovaný fragment DNA vyštěpit pomocí restričních endonukleas.

Alternatívna stratégia – použitie RNA a
vytvorenie **cDNA knižnice**

cDNA knižnica

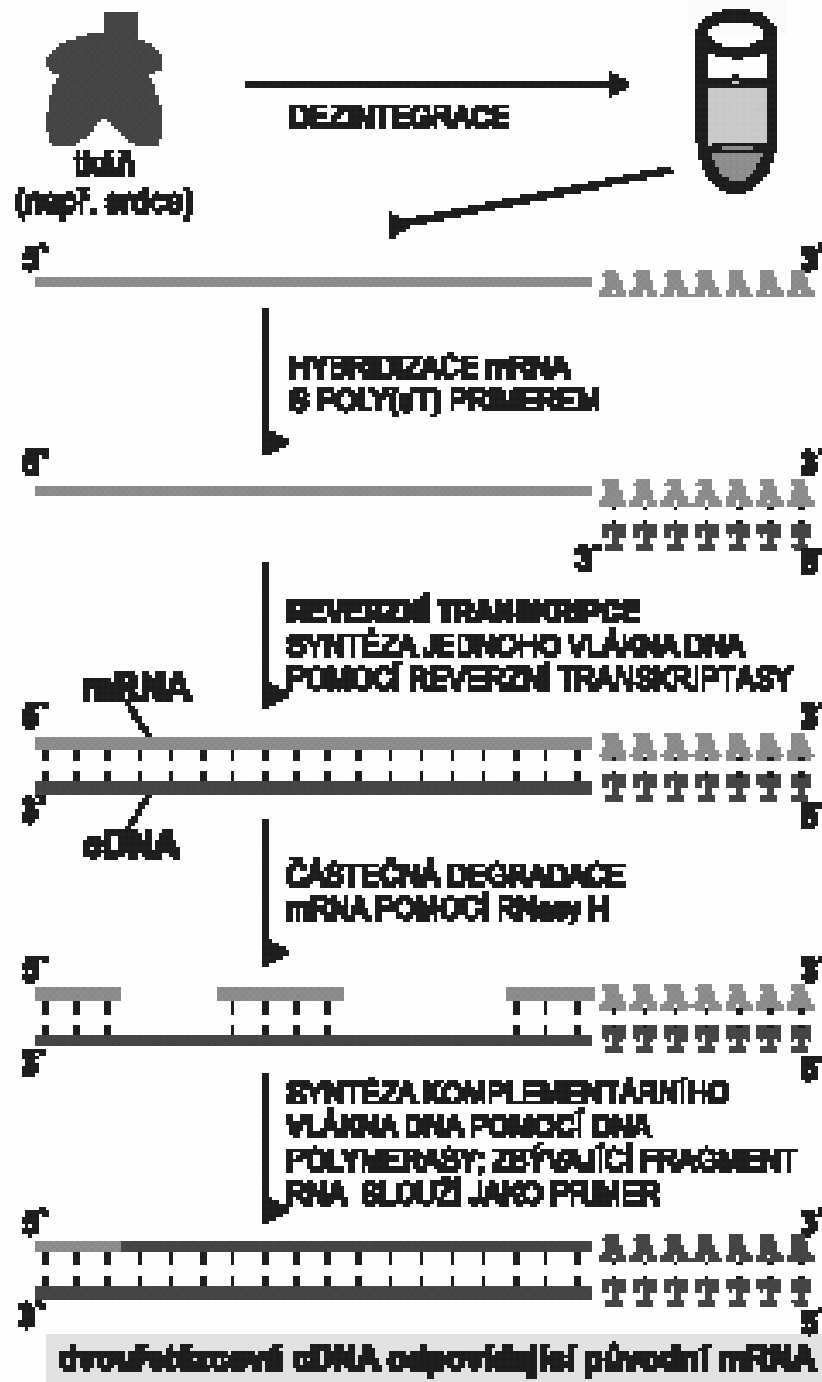
- DNA vyšších organizmov obsahuje intróny, ktoré sú pre DNA knižnicu nepotrebné (cDNA knižnica obsahuje len čisté kódujúce sekvencie!!!)
- Vhodnejšie použiť RNA (mRNA)
- V bunke došlo k transkripcii z DNA do RNA, prepísali sa len kódujúce sekvencie, intróny vystrihnuté
- RNA je špecifická pre danú bunku!!! (všetky bunky neobsahujú tu istú RNA, ako to bolo pri genómovej knižnici)

Tvorba cDNA knižnice

- Potreba prepísať RNA do sekvencie DNA – enzým reverzná transkriptáza (RT)
- RT vyžaduje primer (krátky úsek DNA)
- Vytvára komplementárne vlákno k RNA – tzv. **cDNA vlákno** (complementary DNA)
- Vzniká heteroduplexná dvojreťazcová RNA/DNA molekula
- Čiastočná degradácia RNA reťazca (enzým RNasa H)
- Dosyntetizovanie degradovaného reťazca DNA polymerázou, zvyšok RNA slúži ako primer

Tvorba cDNA knižnice

- Výsledok: dva reťazce DNA = **dvojreťazcová cDNA**
- Následne rovnaký postup ako pri tvorbe genómovej knižnice
- **cDNA knižnica = súbor klonov cDNA fragmentov, pripravených z mRNA izolovanej z určitého tkaniva**



Genómová knihnica – cDNA knihnica

Genómová knižnica

- Získanie dostatočného množstva genetického materiálu pre určenie sekvencie genómu
- Len niekedy na izolovanie žiadaného génu
 - Bakteriálne gény (kódujúce oblasti neporušené nekódujúcimi sekvenciami)
 - Identifikácia:
 - hybridizácia so značenou sondou
 - Vnesenie do mutantného hostiteľa

Vyššie organizmy

- Kódujúce sekvencie porušené intronmi
- ➔ Spätný prepis mRNA do DNA

Knižnica cDNA

- Obsahuje len tie kódujúce sekvencie, ktoré sú v danej bunke v daný čas exprimované
- Umožňuje zistiť sekvenciu AK v bielkovinách

Ďalšie typy DNA knižníc

EXPRESNÍ GENOMOVÁ KNIHOVNA

vychází z cDNA knihovny, která je ale umístěna v expresních vektorech (klonovací vektory, které navíc transgen v nich obsažený exprimují do proteinu) Používají se pro hledání genů pokud známe pouze protein, který kodují (pomocí protilátky)

CHROMOZOMOVÉ KNIHOVNY

obsahují informaci pouze z jednoho chromozomu (jsou menší)

HYBRIDNÍ KNIHOVNY

system pro studium interakce protein- protein, bait vector (návnada) obsahuje gen pro protein, který studujeme a fish vector (obsahuje danou cDNA expresní knihovnu)