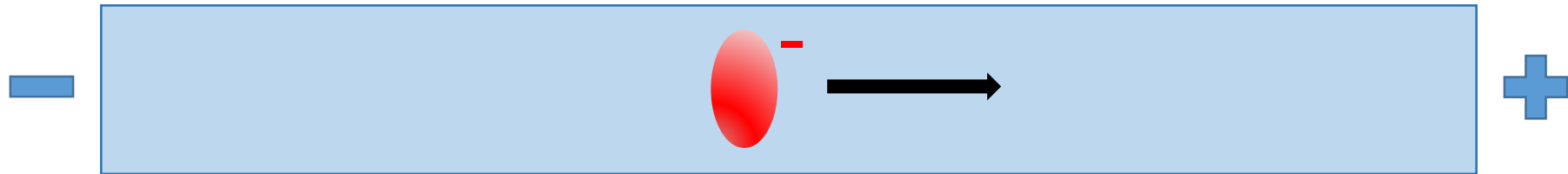


# Elektroforetické metody

# Elektroforéza

## Migrace nabitých částic v elektrickém poli



$$\text{Rychlost migrace částice} \quad = \quad \text{elektroforetická mobilita částice} \quad \times \quad \text{síla elektrického pole}$$

$[\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}] \qquad \qquad \qquad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \qquad \qquad \qquad [\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}]$

- velikost
- tvar
- náboj
- pH média
- teplota
- viskozita
- ...

# K čemu elektroforéza nukleových kyselin?

## Separace molekul

- Velikost
- Náboj
- Sekundární (vyšší) struktura

## Proč separovat **nukleové kyseliny**?

- Ověření výsledků enzymatických reakcí (polymerace, štěpení, ligace, ...) – nativní x denaturační gel
- Ověření konformace nukleových kyselin – nativní gel
- Kvalita syntetických oligonukleotidů – denaturační gel
- Purifikace nukleových kyselin – denaturační gel

## Proč separovat **proteiny**?

- Identifikace přítomnosti proteinů – SDS-PAGE + WB
- Proteomika – 2D-DIGE
- Ověření kvality nativních proteinů – nativní PAGE

# Elektroforéza – dělení + terminologie



## Metoda

- Zónová elektroforéza (na nosiči – gel)
- Volná elektroforéza (v roztoku)

## Separační médium - nosič

- Akrylamid
- Agaróza
- Speciální polymery
- ...

## Uspořádání

- Verikální
- Horizontální
- Kapilární

## Podmínky elektroforézy

- Denaturační (vyšší struktura biomolekul zničena)
- Nativní (zachována vyšší struktura biomolekul)



# Historie

Arne Wilhelm Kaurin Tiselius

Laureate

The Nobel Prize in Chemistry 1948

Prize Motivation: "for his research on electrophoresis and adsorption analysis, especially for his discoveries concerning the complex nature of the serum proteins"

Born: 10 August 1902, Stockholm, Sweden

Died: 29 October 1971, Uppsala, Sweden

Field: Physical chemistry Analytical biochemistry

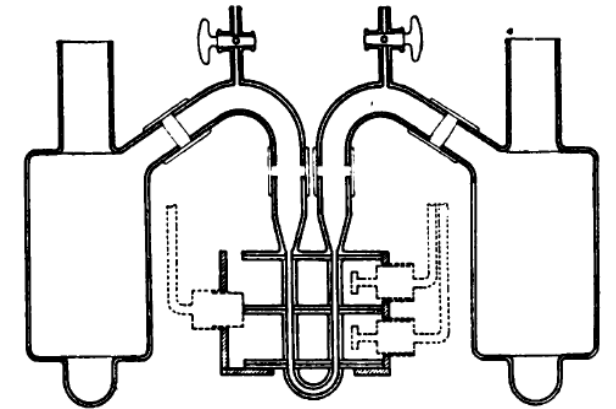


Fig. 1. Apparatus for electrophoretic analysis.

CLXXXII. ELECTROPHORESIS OF  
SERUM GLOBULIN  
II. ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF  
NORMAL AND IMMUNE SERA

By ARNE TISELIUS

*From the Institute of Physical Chemistry, University of Uppsala*

*(Received 1 July 1937)*

# Elektroforéza

V molekulární biologii se standardně používá gelová elektroforéza

## Výhody gelové elektroforézy

- Jednoduchost, rychlost, cena
- Snadná izolace separovaných molekul
- Snadná změna podmínek – jiné chování biomolekul
- Široká škála množství materiálu – preparativní x analytická

## Požadavky na separační medium (gel)

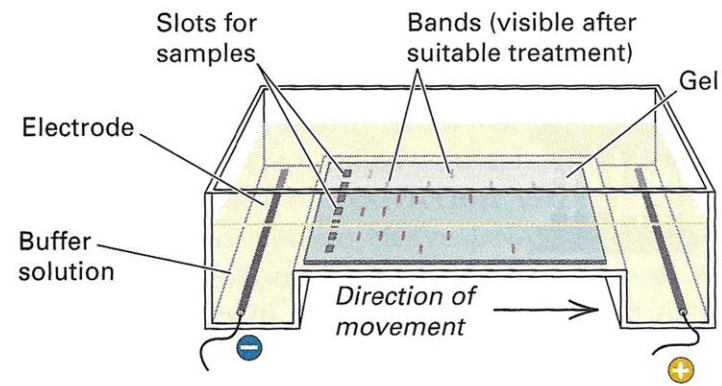
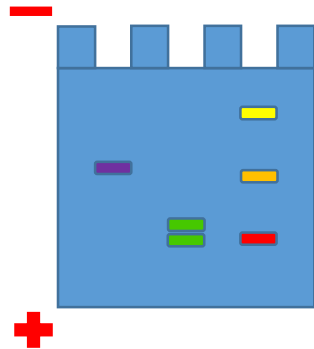
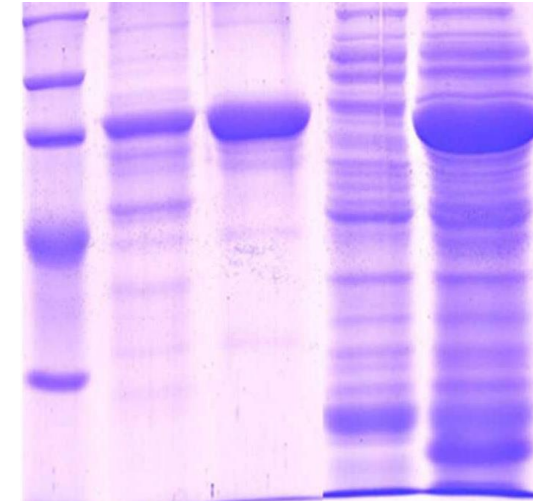
- Homogenita
- Inertnost
- Reprodukovatelnost
- Snadná příprava
- Transparentnost - vizualizace

## Používané gely

- Akrylamidový
- Agarozový
- Speciální polymery

# Elektroforéza

SDS-PAGE proteinů

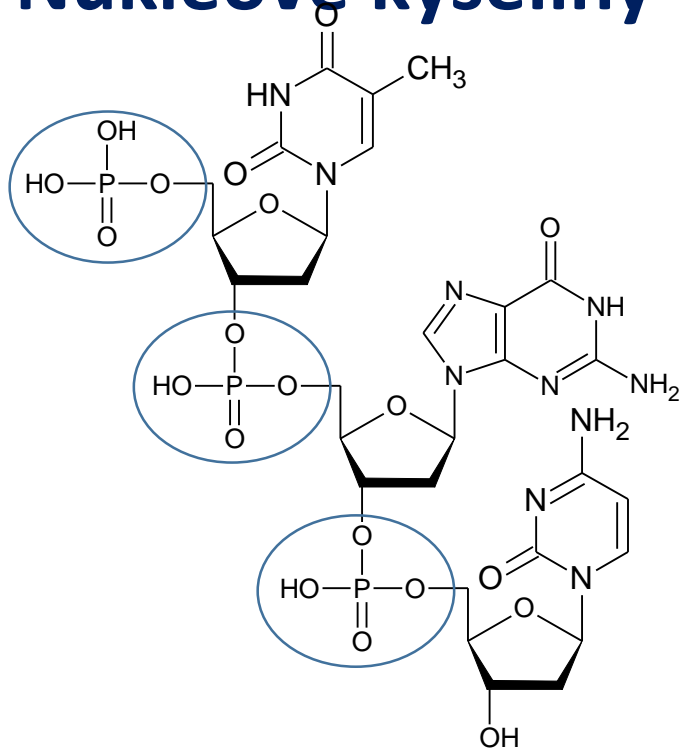


DNA sekvenační gel



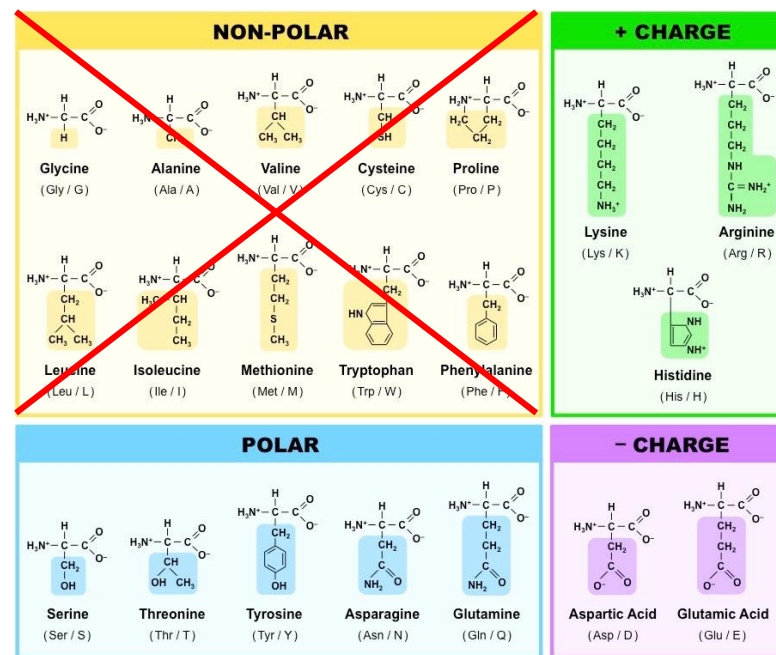
# Náboj makromolekul

## Nukleové kyseliny



- Náboj z cukr-fosfátové páteře
- Celkový náboj úměrný velikosti/délce molekuly

## Proteiny



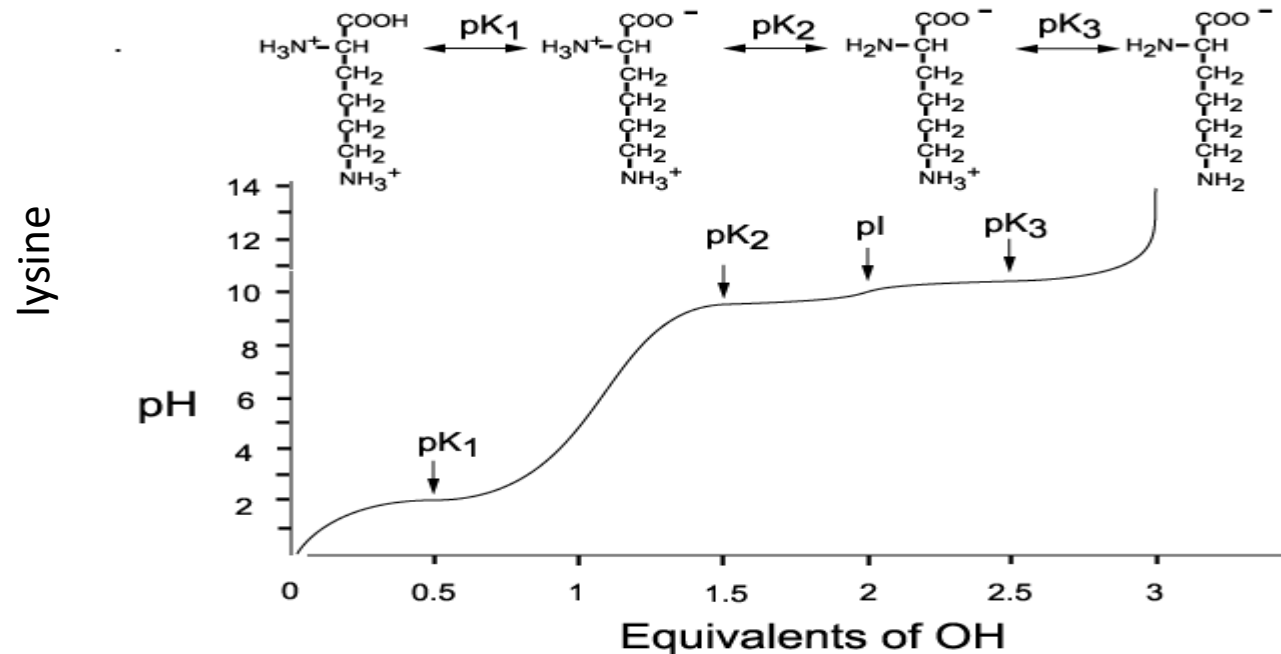
- Náboj z nabitých a polárních aminokyselin
- Celkový náboj silně závisí na sekvenci aminokyselin – tzv. **izoelektrický bod** (pI) proteinu



# Náboj proteinu – Izoelektrický bod

Celkový náboj proteinu je sumou nábojů jednotlivých aminokyselin v sekvenci proteinu, ale

Náboj aminokyselin je determinován pH roztoku



**Izoelektrický bod (pI) = pH při kterém má aminokyselina (protein) nulový náboj**

Pozitivní a negativní náboje se vzájemně kompenzují

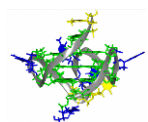
- Při pH vyšším než pI – protein má celkový náboj záporný – migrace k anodě
- Při pH nižším než pI - protein má celkový náboj kladný – migrace ke katodě

# Elektroforéza dle podmínek

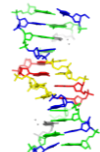
Denaturační

## Nukleové kyseliny

S1-G4-22b



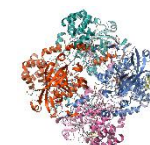
S2-DX-2x12b



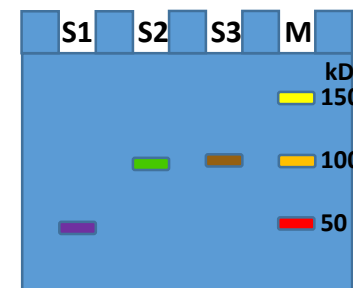
- Sekundární struktura zničena
- Migrace dle velikosti/délky
- 7M močovina + formamid + 50°C
- 100s – 1000s V

## Proteiny

S1-4x500AA-pl 5



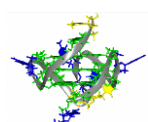
S2-1x825AA-pl 5  
S3-1x825AA-pl 10



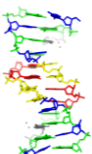
- Vyšší struktury zničeny
- Migrace dle velikosti/délky
- SDS-PAGE - dodecyl sulfát sodný
- 100s V

Nativní

S1-G4-22b

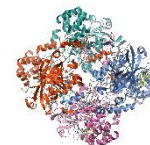


S2-DX-2x12b



- Sekundární struktura zachována
- Migrace dle velikosti, tvaru, molekularity
- Nativní podmínky
- 10s – 100s V

S1-4x500AA-pl 5



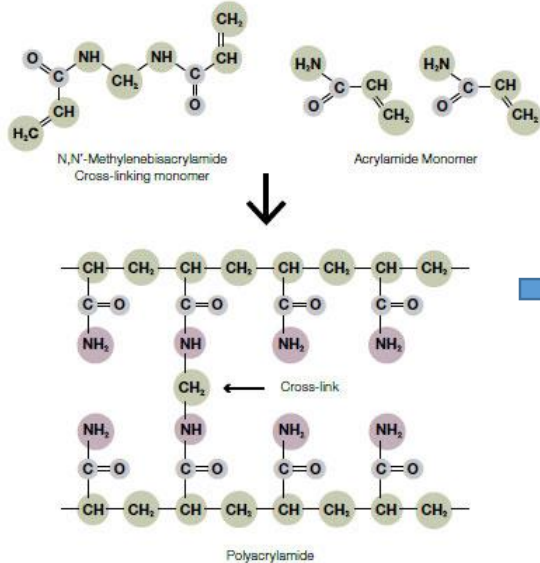
S2-1x825AA-pl 5  
S3-1x825AA-pl 10



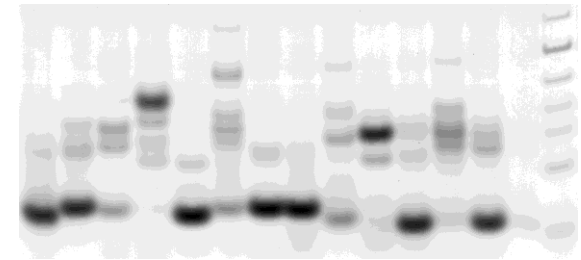
- Vyšší struktury zachovány
- Migrace dle velikosti (multimery) a pl proteinu
- Nativní podmínky
- 100s V

# Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

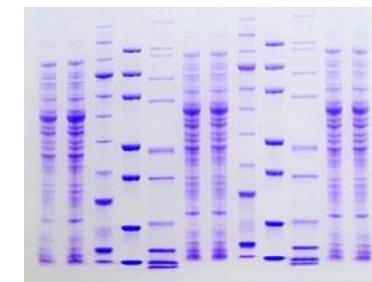
- Gel je směsí monomerů akrylamidu (polymerizuje do dlouhých lineárních řetězců) a N,N'-metylen bisakrylamidu (propojuje lineární řetězce akrylamidu) – **monomery jsou neurotoxiny**
- Standardní poměr mono : bis = 29 : 1 or 19 : 1      **nižší poměr = hustší gel (menší póry)**
- Standardní celkový obsah mono+bis 4 až 20 % w/v      **vyšší koncentrace = hustší gel (menší póry)**
- Polymerace iniciována přidávkem amonium persulfátu (APS) a tetrametylen diaminu (TEMED) ve finální koncentraci 0,1 % - radikálová polymerace
- Standardně vertikální uspořádání
- Vizualizace variabilní dle typu biomolekul



Nukleové kyseliny



Proteiny



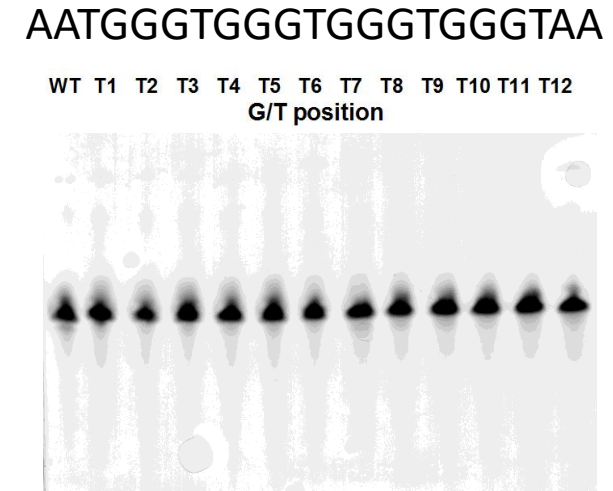
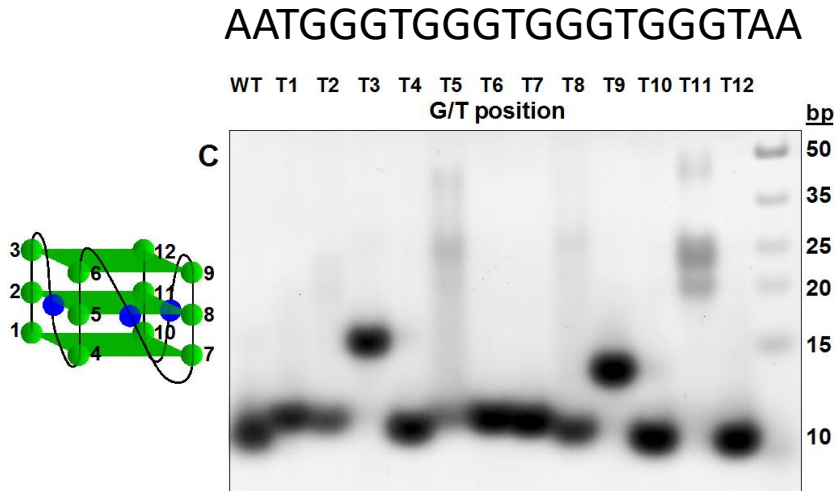
# Denaturační x nativní PAGE nukleových kyselin

Nativní PAGE DNA tvořící kvadruplex

- 16% PAG, 10mM K-fosfát pufr, pH7 + 85 mM KCl
- 40V, 15 h, 20°C
- StainAll

Denaturační PAGE DNA tvořící kvadruplex

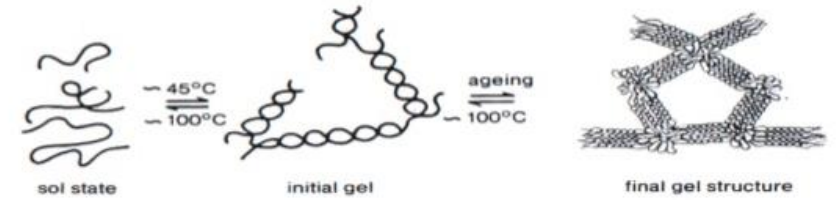
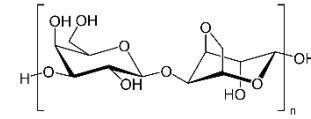
- 20% PAG, 1xTBE, 7M urea
- 500V, 1 h, 50°C
- StainAll



- Sekvence mají stejnou délku – 21 nt a velice podobnou velikost (1x G/T)
- Odlišná migrace na **nativním gelu** dána odlišnou konformací (T3) nebo molekuláritou (T11)
- Na **denaturačním gelu** migrace identická

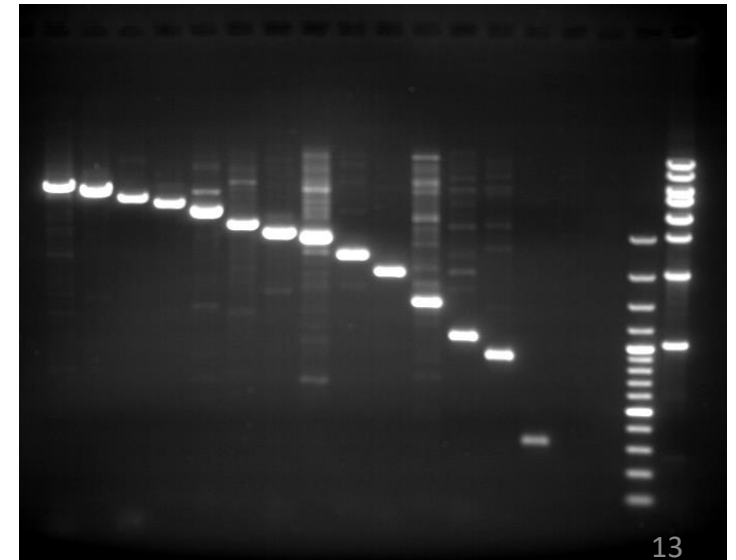
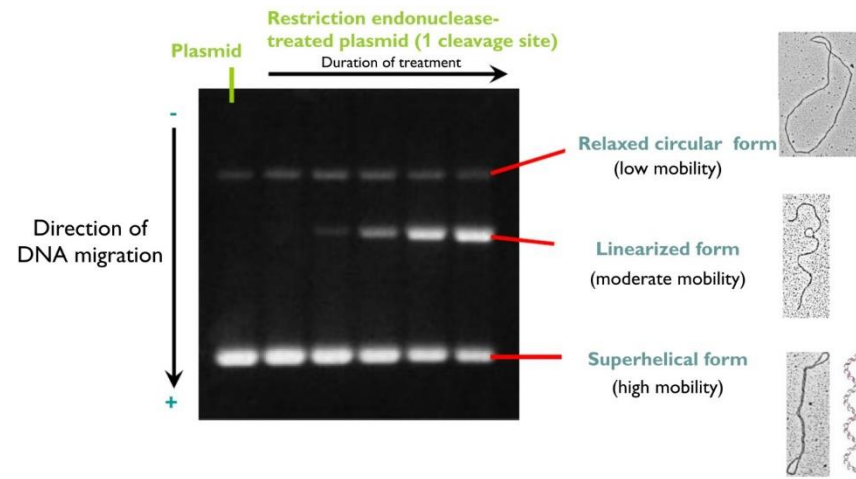
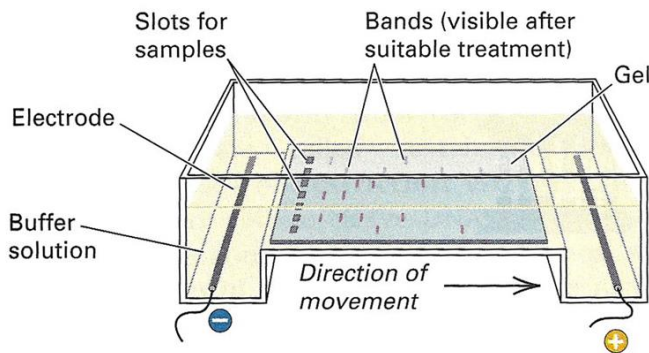
# Agarozová elektroforéza nukleových kyselin

- Matrix gelu tvořen agarozou – kopolymer manózy a galaktózy izolovaný z mořských řas
- Standardně se používá 0,3 – 4 % w/v + nativní podmínky
- Čím vyšší koncentrace tím vhodnější pro menší fragmenty
- Varem v roztoku pufru dojde k tání agarozy – následně nalití do formy a během chladnutí agarozy polymeruje
- Elektroforéza standardně v horizontálním uspořádání
- Obvykle barva pro vizualizaci přímo v gelu (EtBr, SYBR, ...) – přidává se během tuhnutí agarozy



Nativní agarozová elektroforéza PCR amplifikovaných fragmentů promotoru genu *oct4*

- 1,5% agaróza, 1xTAE pufr, pH 7
- 80V, 45 min, 25°C
- Ethidium bromid v gelu + UV transiluminace



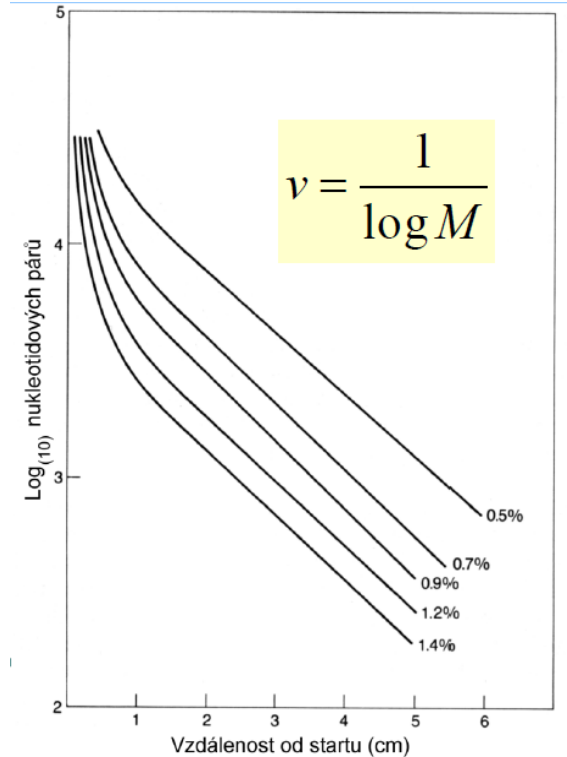
# Separace nukleových kyselin

- Pro **menší** molekuly se využívá **akrylamidový** gel
- Pro **větší** molekuly se využívá **agarozový** gel

Table 8.2: Approximate gel concentrations for separation of DNA linear fragments of various sizes

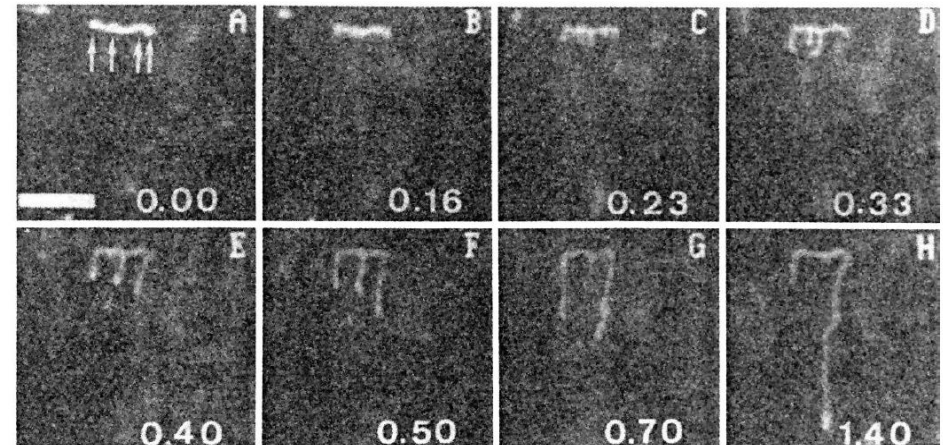
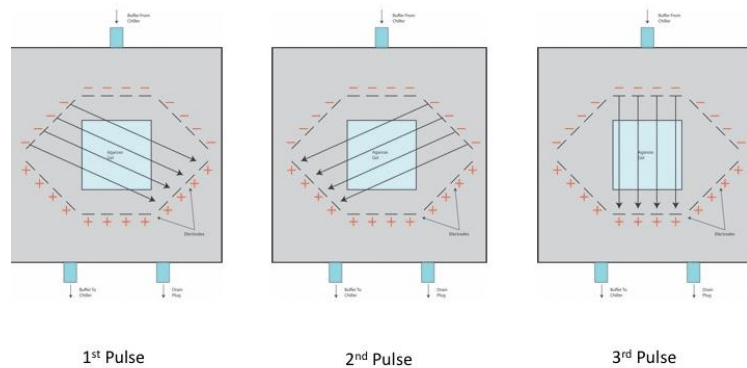
Gel Concentration	Separation Range (bp)
agarose - 0.3%	60,000 - 5,000
agarose - 0.7%	20,000 - 800
agarose - 0.9%	7,000 - 500
agarose - 1.2%	6,000 - 400
agarose - 1.5%	4,000 - 200
agarose - 2.0%	3,000 - 100
agarose - 4.0%	500 - 10
acrylamide - 4%	1,000 - 800
acrylamide - 10%	500 - 25
acrylamide - 20%	50 - 1

Separace molekul DNA dle velikosti v agarozovém gelu



# Pulzní gelová elektroforéza

- Elektroforetická metoda pro separaci velkých molekul DNA (>30 kbp) – agarozový gel
- Molekuly NK>20-30 kbp migrují v (agarozovém) gelu při elektroforéze v konstantním elektrickém poli stejně, nezávisle na svoji velikosti – nerozlišitelné
- Pokud měníme v průběhu elektroforézy orientaci elektrického pole (tzv. pulzní pole), větší molekuly se re-orientují obtížněji – výsledný přímý pohyb je pomalejší - dochází k separaci i velkých molekul NK (horní limit až 10 Mbp – celé kvasinkové chromozomy, ...)



- Standardní uspořádání směrů elektrického pole – možná jsou i jiná uspořádání

# Vizualizace – nukleové kyseliny

	Metoda	Detekce	Citlivost	Konformační selektivita	Signál vztažen na	Typ gelu
	<b>Přímé značení NK</b>	Fluorescence, radiodetekce	Velmi vysoká (pmol-fl., fmol-radio.)	Ne	Značku = řetězce NK	PAG + agar.
	<b>UV shadowing (žádná značka)</b>	epi UV (254) + TLC deska	Nízká (0.3 µg)	Ne	Báze NK	PAG
	<b>Blot + hybridizace</b>	Fluorescence, radiodetekce	Velmi vysoká	Ne	Značku = řetězce NK	
Barvení po elektroforéze	<b>Ethidium bromid</b>	Fluorescence - trans UV (254)	vysoká (0.1 ng dsDNA) až nízká (konformace)	Vysoká	Báze NK	Agar. (PAG)
	<b>SYBR Gold/Green,...</b>	Fluorescence - VIS	Vysoká (0.02 ng dsDNA) až nízká (konformace)	Vysoká	Báze NK	Agar. (PAG)
	<b>StainsAll (Sigma)</b>	Foto - VIS	Střední až nízká (100-1 ng)	Nízká	Báze NK	PAG
	<b>Stříbro</b>	Foto - VIS	Vysoká (pg)	Střední	Báze NK	PAG

Barva v gelu

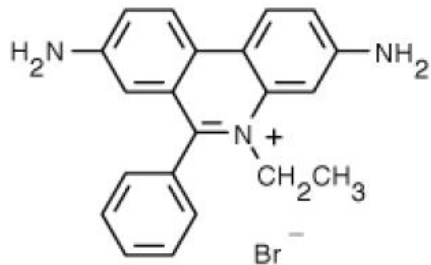
EtBr a další barvy mohou být přidány přímo do gelu – mohou ovlivňovat migraci při detekci je vyšší pozadí, ale práce je jednodušší



# Vizualizace – nukleové kyseliny

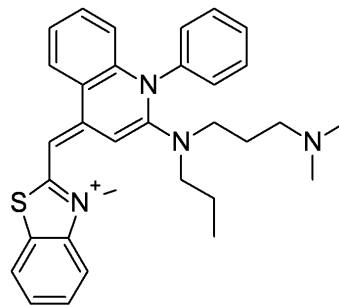
## Ethidium bromid

- Interkalační barvivo
- 20-30x nárůst fluorescence po interkalaci – UV 254, 312 nm
- 1 EtBr / 4-5 bp DNA
- RNA i DNA, preferenčně ds - 0,1ng (dsDNA) – 5 ng (RNA)
- Akrylamid zhasí EtBr fluorescenci
- **Silně mutagenní**



## SYBR Green I

- Interkalační barvivo
- 1000x nárůst fluorescence po interkalaci – UV 300, VIS 490 nm
- RNA i DNA, preferenčně ds - 0,05ng (dsDNA) – 1 ng (RNA)
- Konformační selektivita
- **Mnohem méně mutagenní**

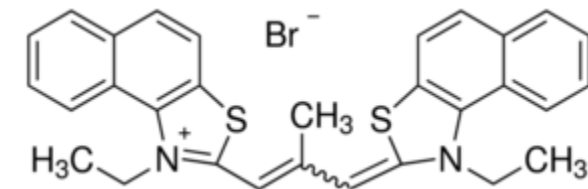


## Stříbro

- Přímá vizualizace - viditelné
- RNA, DNA i proteiny
- Citlivost obdobná EtBr
- Vhodné i pro akrylamidové gely
- Složitější barvení – fixace, ...

## Stains All

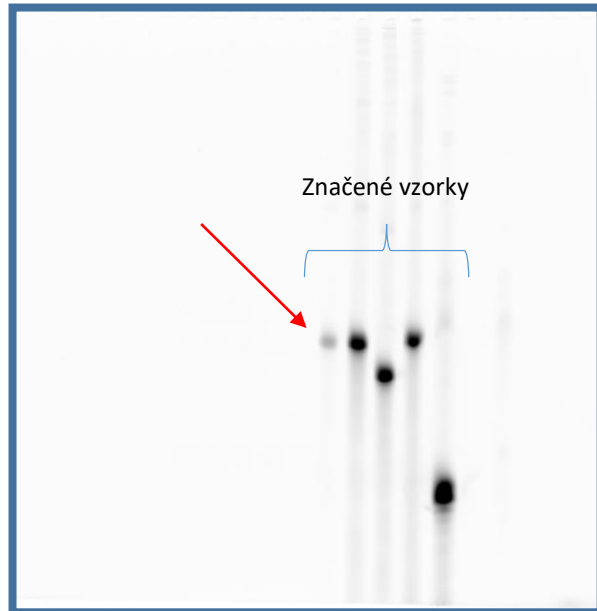
- Přímá vizualizace - viditelné
- RNA, DNA i proteiny
- Citlivost nižší než EtBr
- Vhodné pro akrylamidové gely



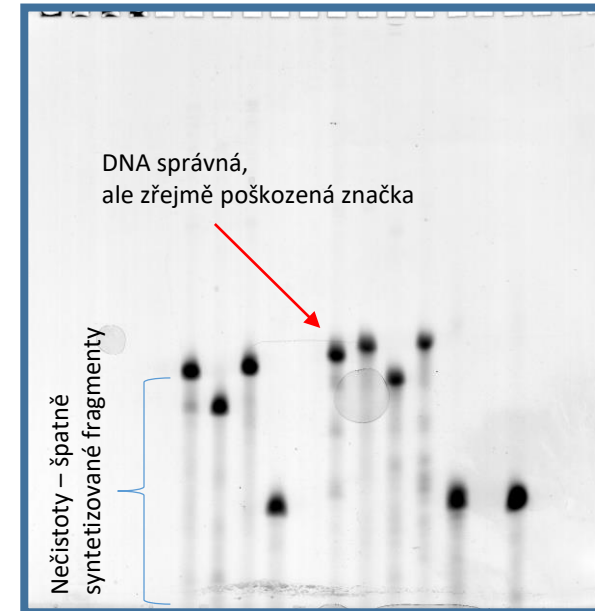
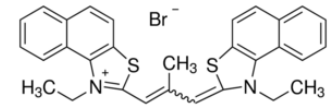
# Denaturační PAGE DNA - barvení

Přímá vizualizace vzorků  
Některé značené 5'-FAM  
Typhoon FLA9300 skener

- Laser 473 nm
- Emisní filtr LBP (long-pass blue)



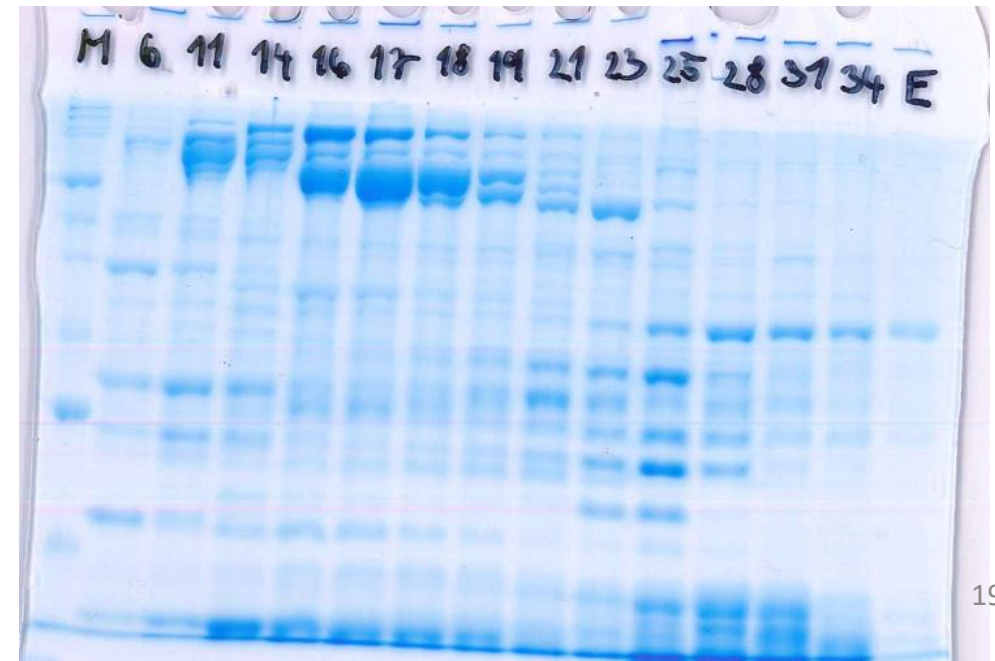
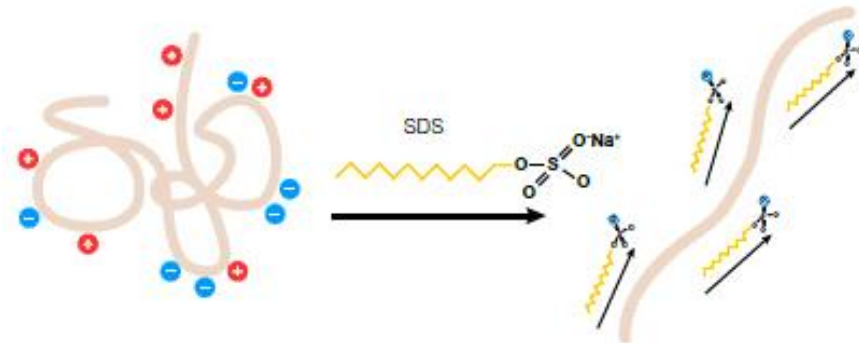
Post-elektroforetické barvení Stains-All  
Barví vše  
Klasický skener – viditelné světlo



# Denaturační PAGE proteinů – SDS

- Migrace proteinů za nativních podmínek je ovlivněna velikostí, konformací a především **nábojem (pI)** – na rozdíl od NK – obtížná interpretace elektroforetogramu za nativních podmínek
- Konstantního náboje a linearizace molekuly proteinu je docíleno obalením molekulami detergentu – **dodecylsulfátu sodného (SDS)** – protein je **denaturován**
- SDS se váže poměrně konstantně – náboj daný SDS zhruba odpovídá molekulové hmotnosti proteinu – separace pouze dle velikosti
- Disulfidové vazby v proteinech se eliminují **redukčním činidlem** ( $\beta$ -merkaptoetanol, dithiothreitol) a následným **varem**

SDS-PAGE frakcí lyzátu buněk E.coli – barvení Comassie



# Denaturační PAGE proteinů – SDS

## Stacking gel

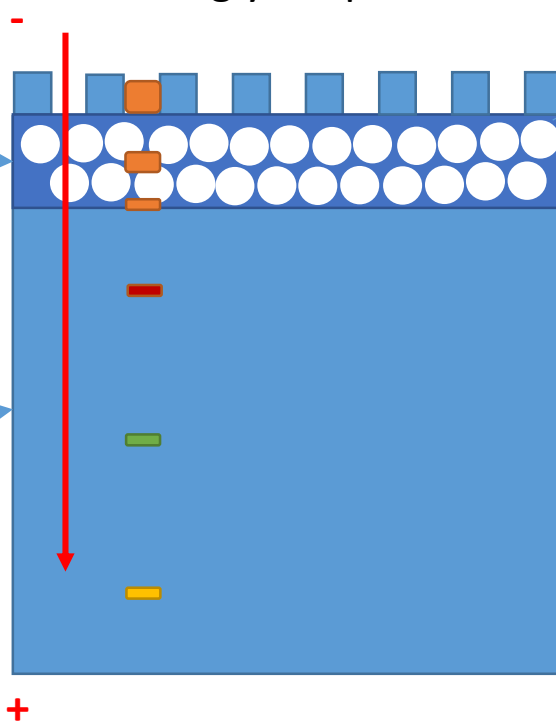
- Zostření směsi proteinů do jednoho úzkého proužku – při následné separaci dle velikosti startují zároveň
- Silně porézní gel (málo akrylamidu)
- cca 5% akrylamid + SDS
- Tris.Cl pufr, pH 6.8

## Running gel

- Separace proteinů dle velikosti
- 4-20% akrylamid + SDS
- Tris.Cl pufr, pH 8.8

## Elektroforetický pufr

- Tris-glycin, pH 8.3



pH 8.3 – glycinát negativně nabitý – rychlý

Hranice - změna

pH 6.8 – glycinát = zwitter-ion – migrace na konci  
pH 6.8 – proteiny v SDS – migrace uprostřed  
pH 6.8 – Cl- – migrace v čele

Hranice – změna – proteiny tlačeny vpřed  
glycinátovou zónou, která v pH 8.8 začíná  
migrovat rychle

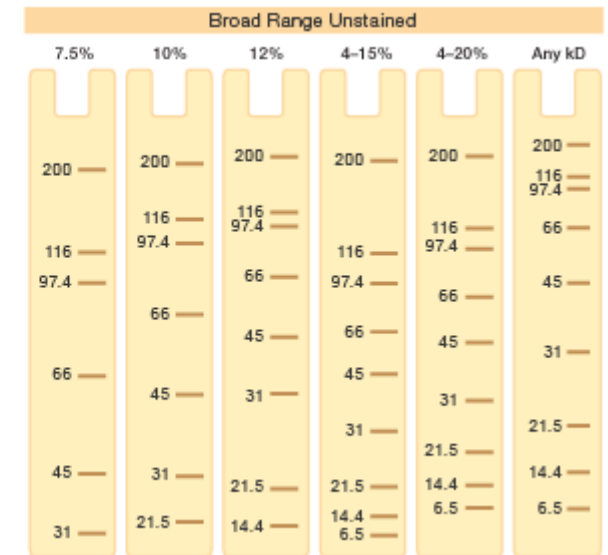
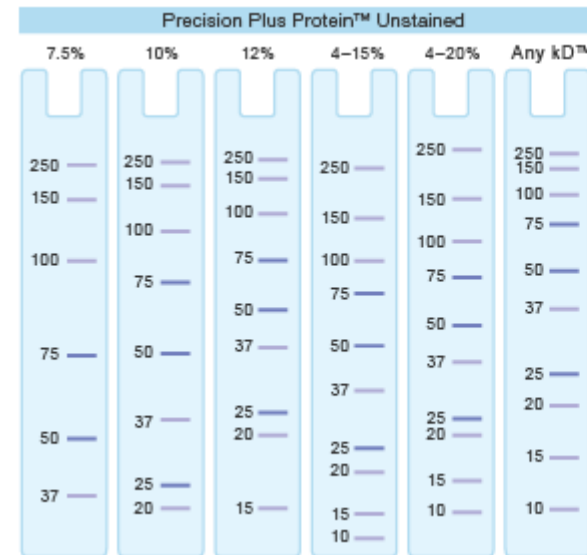
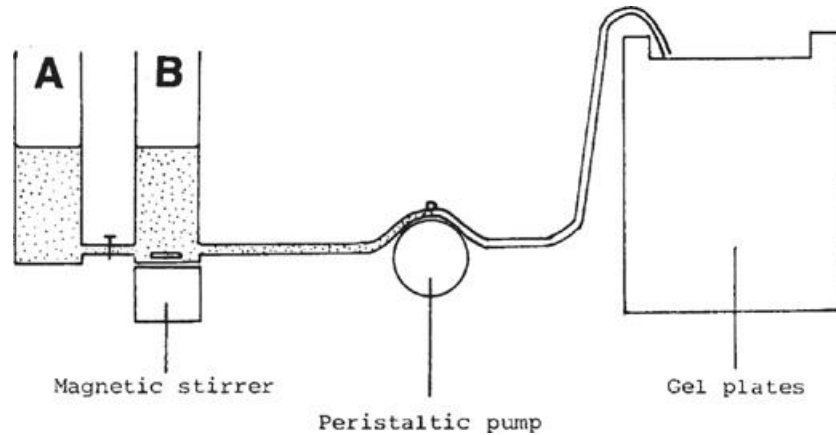
pH 8.8 – glycinát negativně nabitý – rychlý

## Izotachoforéza

- Iso-tacho = stejná rychlost
- Glycinate (na konci) – proteiny (uprostřed) – chloridy (v čele) migrují stejnou rychlostí
- Stabilní uspořádání v průběhu migrace stacking gelem – jednotlivé komponenty jsou omezeny v možnosti přecházet do jiných zón (pH x pI, síla el. pole, ...)

# Gradientové polyakrylamidové gely

- Zvyšující se koncentrace akrylamidu v gelu směrem ke spodní části gelu
- Větší rozsah molekulových hmotností separovaných gelem
- Lepší rozlišení proteinů o podobné molekulové hmotnosti

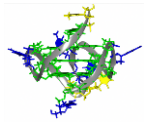


# Nativní x Denaturační

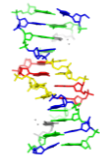
Denaturační

## Nukleové kyseliny

S1-G4-22b



S2-DX-2x12b



- Sekundární struktura zničena
- Migrace dle velikosti/délky
- 7M močovina + formamid + 50°C
- 100s – 1000s V



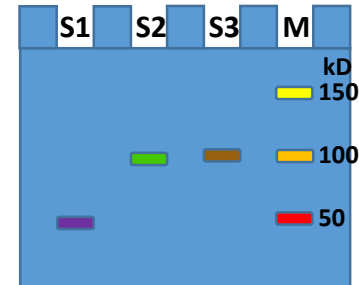
## Proteiny

S1-4x500AA-pl 5



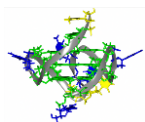
S2-1x825AA-pl 5  
S3-1x825AA-pl 10

- Vyšší struktury zničeny
- Migrace dle velikosti/délky
- SDS-PAGE - dodecyl sulfát sodný
- 100s V

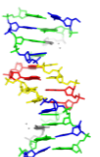


Nativní

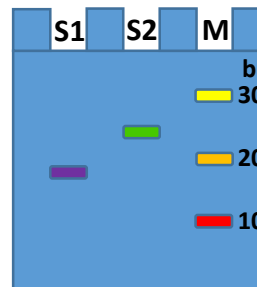
S1-G4-22b



S2-DX-2x12b



- Sekundární struktura zachována
- Migrace dle velikosti, tvaru, molekularity
- Nativní podmínky
- 10s – 100s V

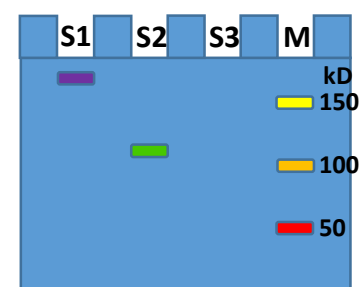


S1-4x500AA-pl 5



S2-1x825AA-pl 5  
S3-1x825AA-pl 10

- Vyšší struktury zachovány
- Migrace dle velikosti (multimery) a pl proteinu
- Nativní podmínky
- 100s V



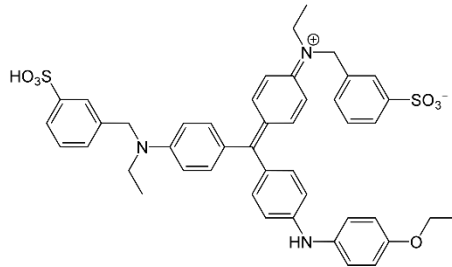
# Vizualizace proteinů – SDS-PAGE

## Nespecificky

- Barvení všech proteinů v gelu nespecifickým barvivem

### Comassie brilliant blue

- Přímá vizualizace - viditelné
- Proteiny –  $\text{SO}_3^{2-}$  reaguje s pozitivními AK, benzen s negativními AK
- Nutné odbarvení - destain



### Stříbro

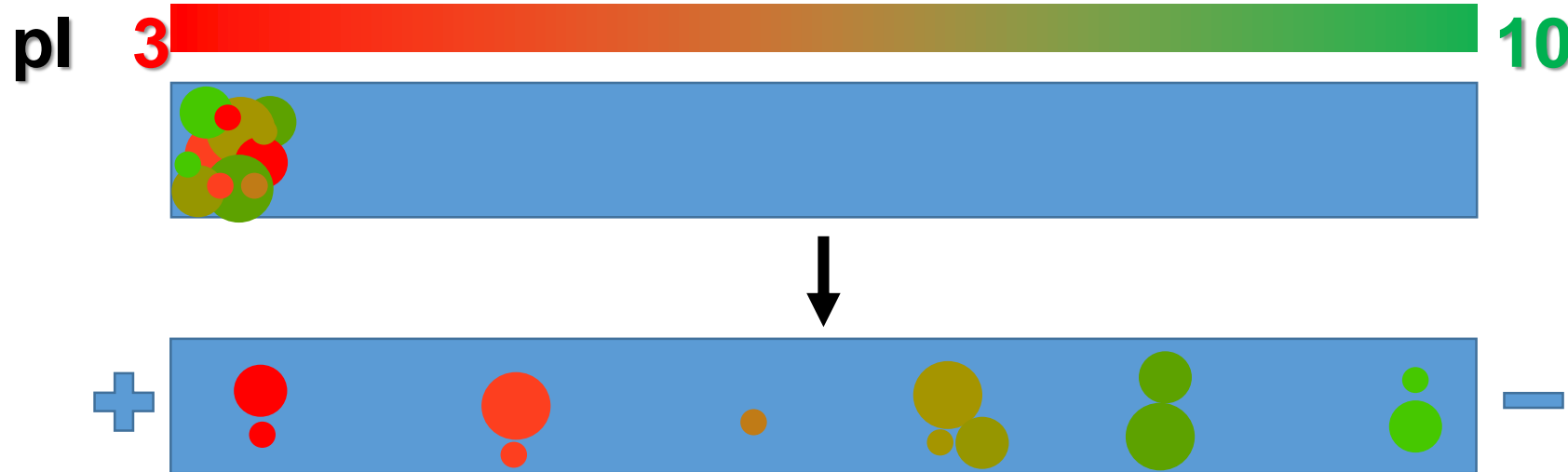
- Přímá vizualizace - viditelné
- RNA, DNA i proteiny
- Citlivost obdobná EtBr
- Vhodné i pro akrylamidové gely
- Složitější barvení – fixace, ...

## Specificky

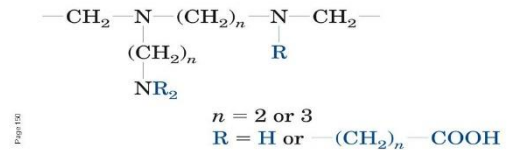
- Přenos proteinů z gelu na membránu (nitrocelulóza, ...) – western blot – někdy příště
  - Barvení membrány prostřednictvím protilátek

# Izoelektrická fokusace (IEF)

- Gel připraven s fixním gradientem pH (immobilized pH gradient – IPG) – směs amfolytů (slabé kyseliny či báze) kovalentně vázaných do struktury gelu – IPG stripy komerčně dostupné
- Akrylamidový gel s velkými póry – nemá separační účinek – separace pouze dle pI proteinu, ne velikosti
- Při migraci proteinu gelem s pH gradientem se mění náboj proteinu – v oblasti kde pI = pH protein ztratí náboj a přestane migrovat



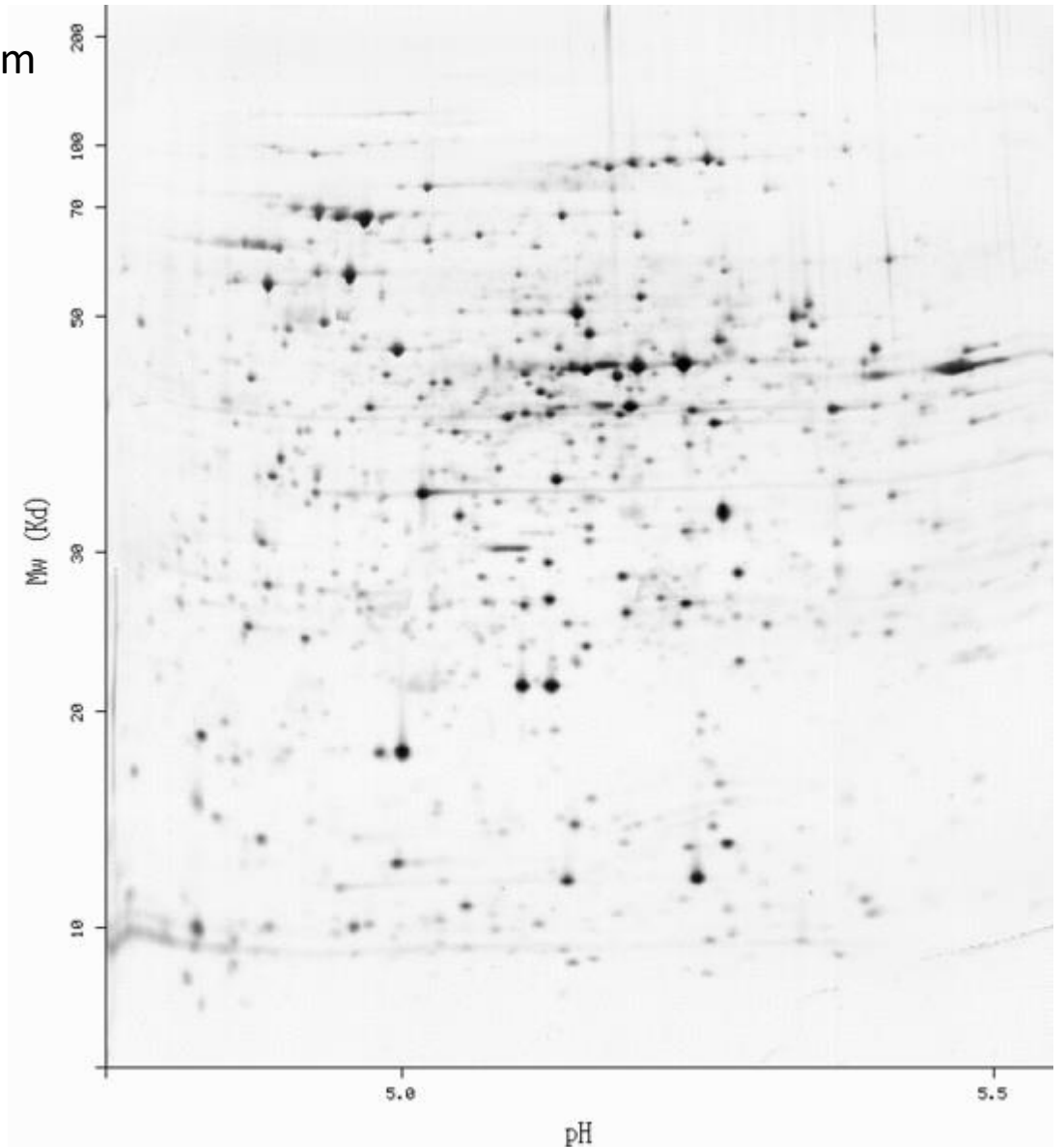
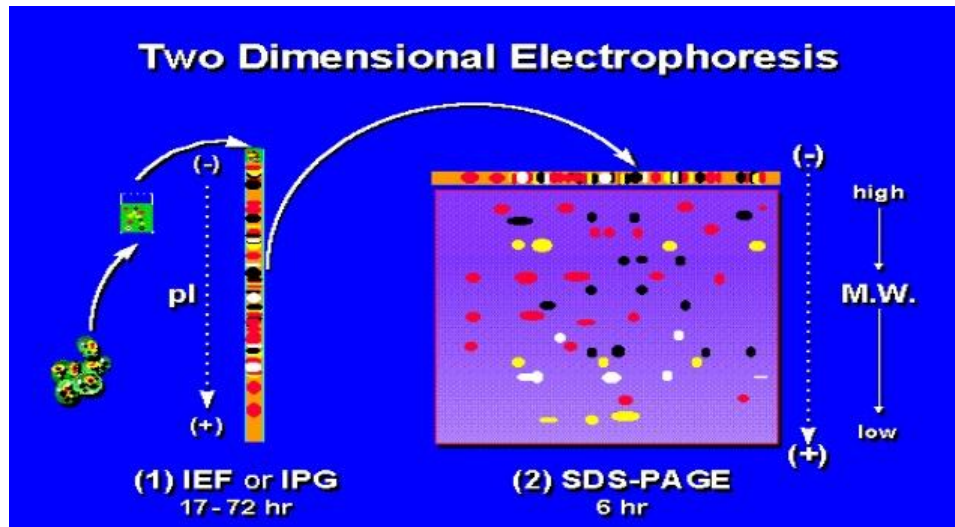
**Figure 6-26** General formula of the ampholytes used in isoelectric focusing.





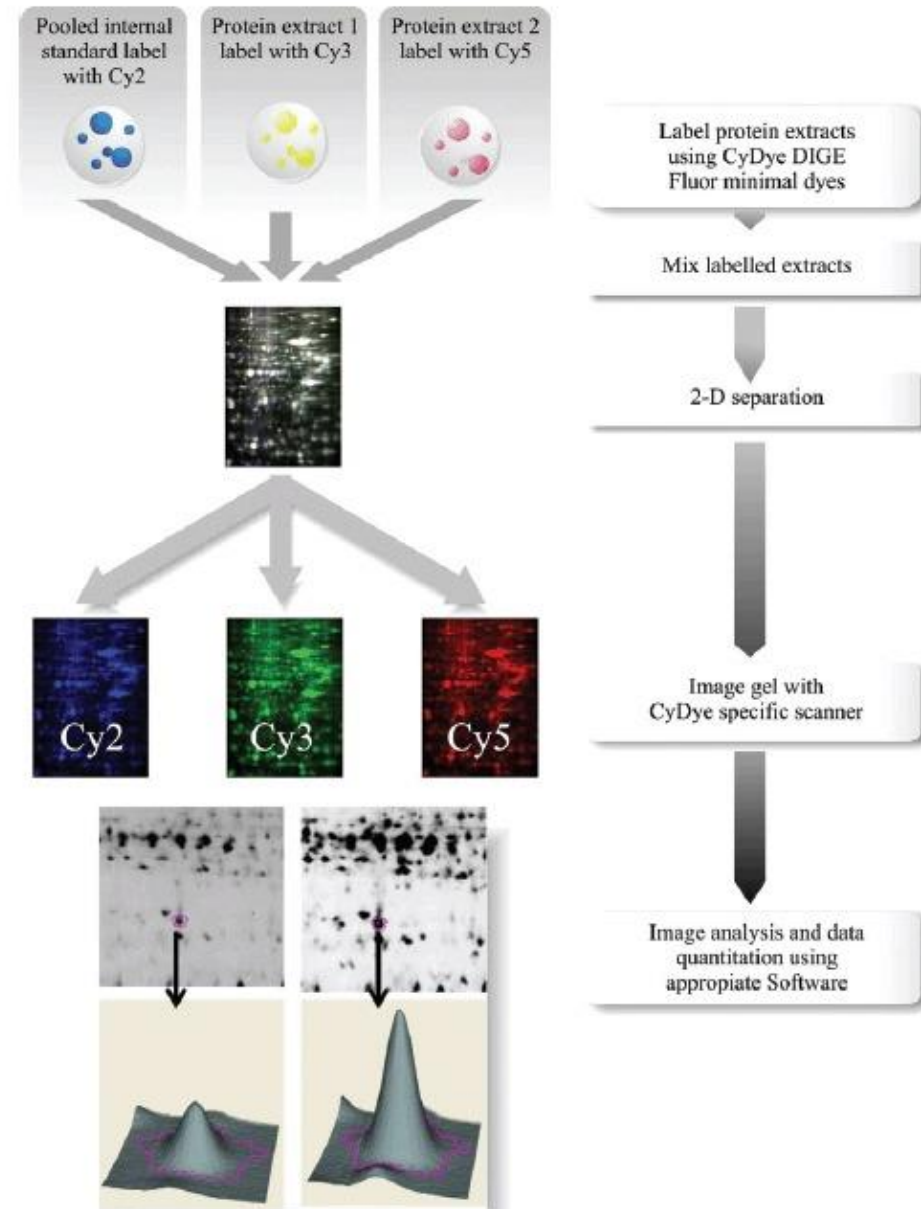
# Dvourozměrná (dvoudimenzionální) PAGE

- Souběžná analýza velkého množství proteinů (>1000) – proteom
- Nejprve izoelektrická fokusace v IPG stripu – separace dle pI
- Následně SDS-PAGE v kolmém směru – separace dle velikosti
- Následně barvení
- Každý protein má unikátní pozici
- Obtížná interpretace



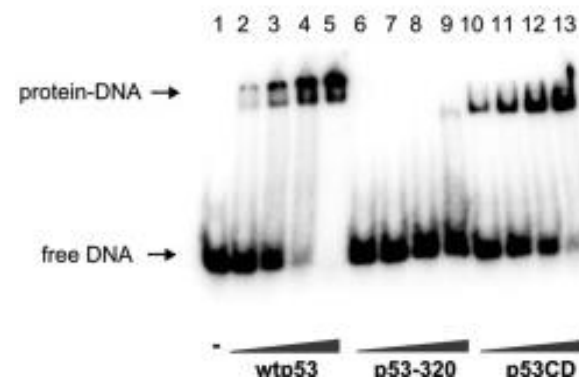
# Diferenční 2D gelová elektroforéza (2D-DIGE)

- Extrakty proteinů získané např. za různých podmínek kultivace označeny různými fluorescenčními značkami
- Třetí fluorescenční značkou označen kontrolní experiment
- Vše smícháno, následně 2D-PAGE
- Analýza výsledku v jednotlivých barevných kanálech pro použité fluorescenční barvy – 2D-DIGE
- Rozdíly indikují změny v expresi příslušných proteinů



# Elektroforetická retardační analýza

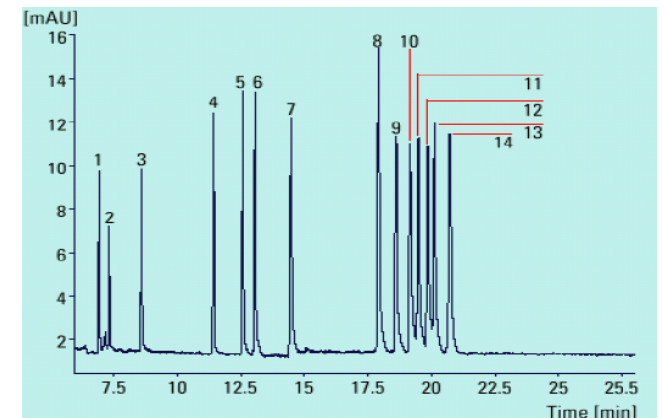
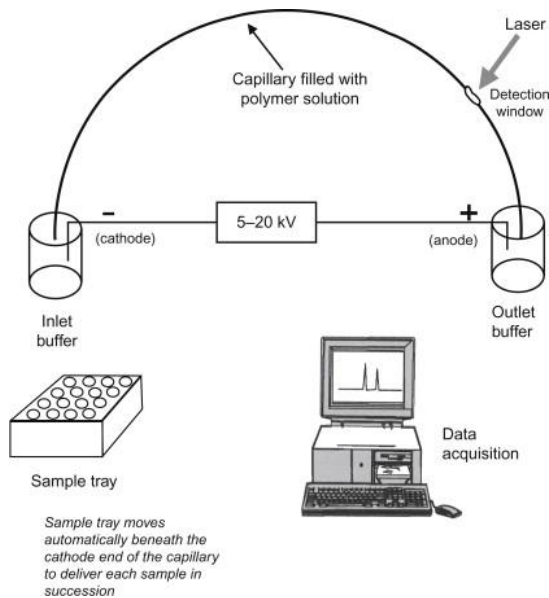
- Electromobility shift assay (EMSA)
- Srovnání elektroforetické migrace např. molekuly DNA samotné a při interakci s vazebným proteinem – vázaný protein zvyšuje velikost komplexu - rozdíl v migraci – kvantifikovatelné
- Tzv. Supershift assay – k interagujícímu proteinu je přidána příslušná protilátka – podstatné zvýšení velikosti komplexu – výraznější zpomalení



{Petr M. et al., Biosci Rep, 2016}

# Kapilární gelová elektroforéza

- Gel (komerční syntetický polymer) umístěn v kapiláře; výrazně vyšší napětí (desítky kV)
- Nutné menší množství vzorku, lepší rozlišení
- Variabilní možnosti detekce – standardně fluorescence – možnost vícebarevného značení x interní velikostní standard
- Možnost automatizace a paralelizace – kapilární sekvenátory



# Enzymy v molekulární biologii

Daniel Renčiuk  
BFU AV ČR, v.v.i.  
[renciuk@ibp.cz](mailto:renciuk@ibp.cz)

MU, Brno  
26.10.2023

# Dělení enzymů

## Dle typu reakce:

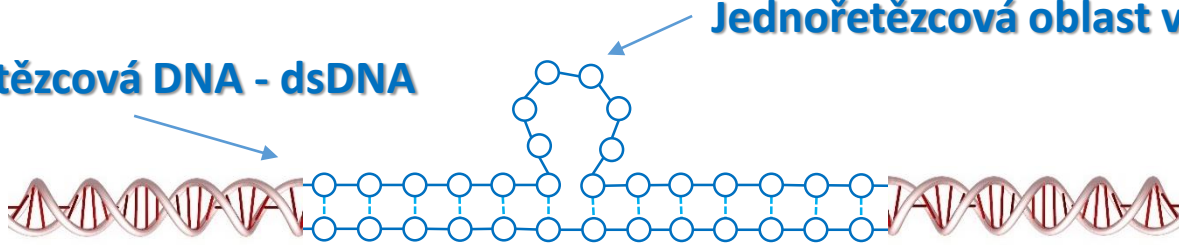
- **Polymerázy** – syntéza nového polynukleotidového řetězce dle matrice
- **Nukleázy** – štěpení polynukleotidového řetězce
- **Kinázy** – fosforylace substrátu – připojení fosfátové skupiny na 5' konec
- **Fosfatázy** – defosforylace substrátu – odštěpení fosfátové skupiny z 5' konce
- **Ligázy** – spojení dvou konců polynukleotidového řetězce
- **Transferázy** – připojení funkční skupiny nebo nukleotidu (bez matrice)

## Dle typu substrátu:

- **DNA**
- **RNA**

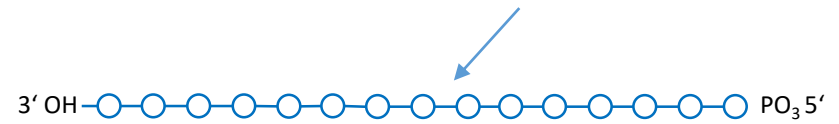
# Terminologie

Dvouřetězcová DNA - dsDNA

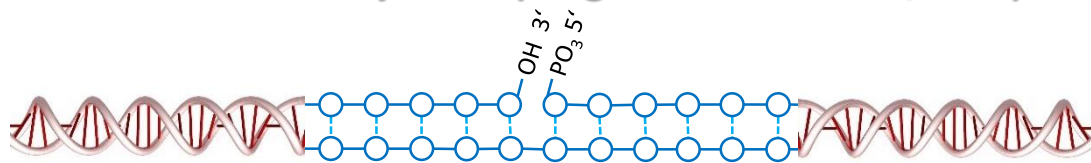


Jednořetězcová oblast v dsDNA

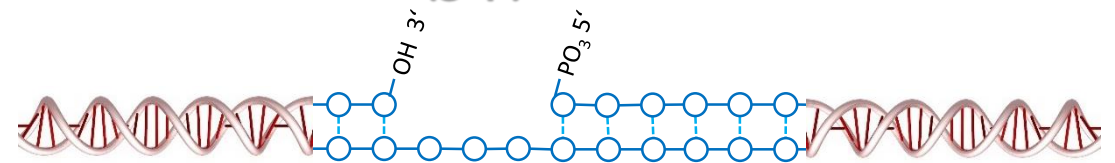
Jednořetězcová DNA - ssDNA



Jednořetězcový zlom (single-strand break; nick)

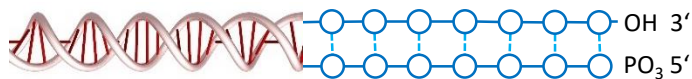


Mezera (gap)



Konce řetězců NK

Tupý konec (blunt end)

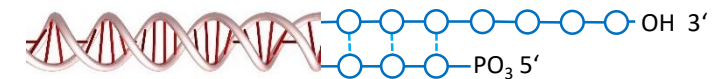


Lepivé /kohezivní konce  
(sticky / cohesive ends)

3' recessed x 5' protruding



5' recessed x 3' protruding



# Polymerázy

- syntéza nového řetězce DNA (RNA) dle matrice DNA (RNA) – XNA-dependentní-YNA-polymerázy
  - DNA polymerázy - připojováním nukleotidů k 3'-OH primeru
  - RNA polymerázy – pomocí komplementarity de novo a následně připojováním nukleotidů k 3'-OH nukleotidů připojených dříve
- anabolické enzymy

## DNA-dependentní DNA-polymerázy

**DNA polymeráza I**

**Klenowův fragment polymerázy I**

**Termostabilní DNA polymerázy** – izolované z termofilních mikroorganismů – přednáška o PCR

## RNA-polymerázy

**T7 RNA polymeráza**

**poly-A polymeráza** – bez templátu

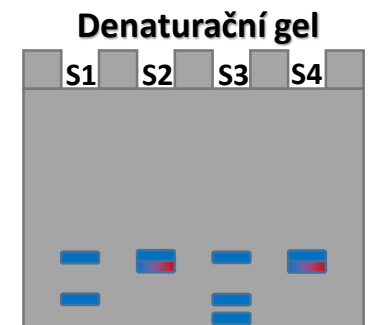
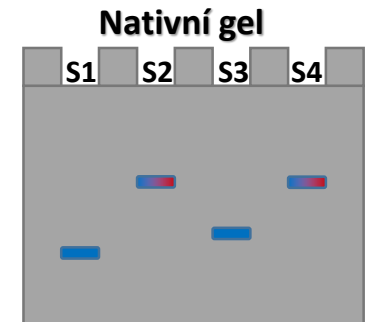
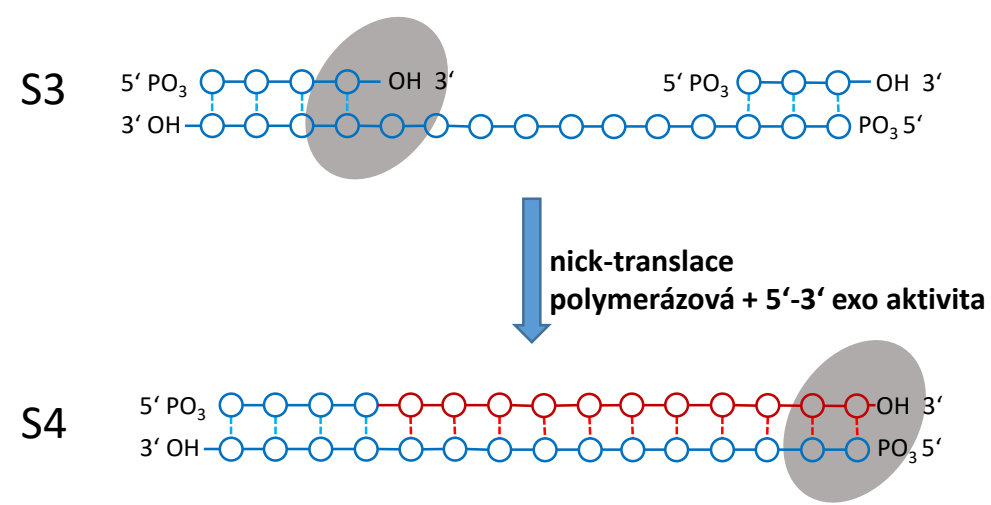
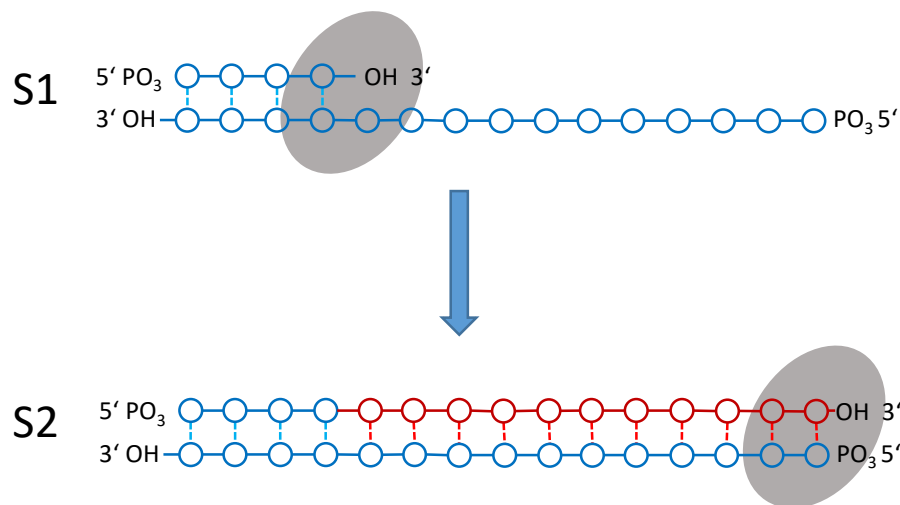
## RNA-dependentní DNA-polymerázy

**Reverzní transkriptáza**



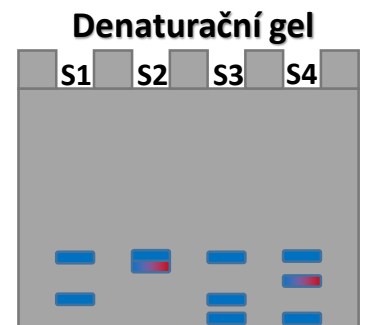
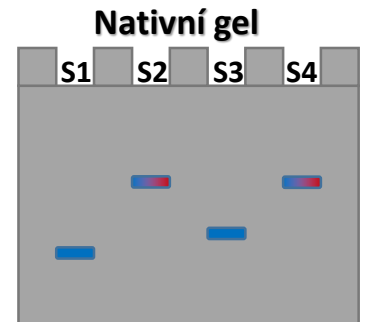
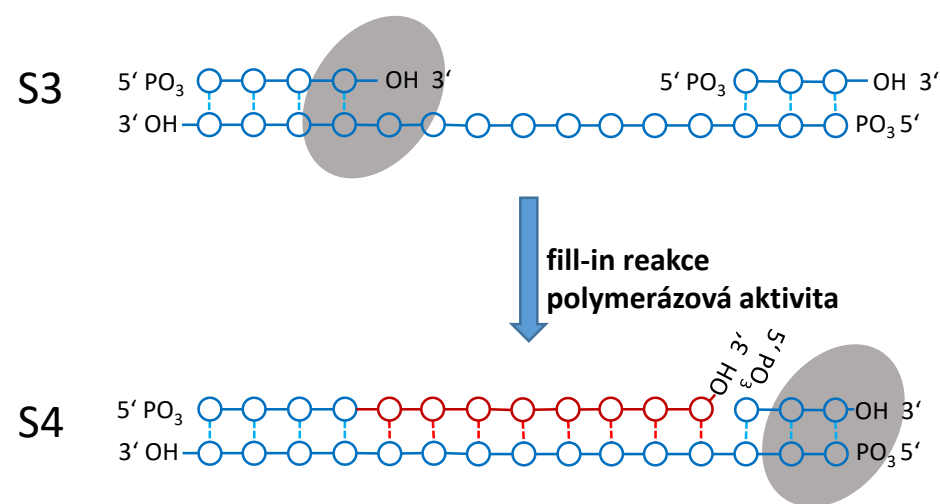
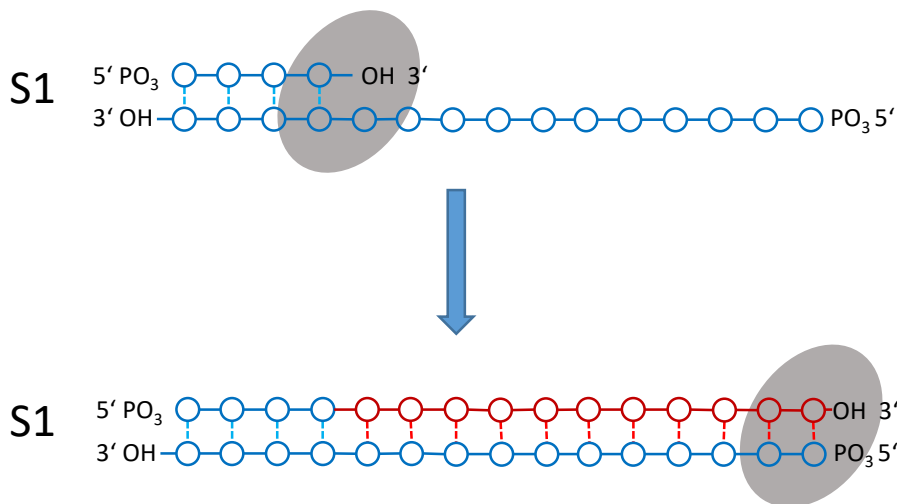
# DNA polymeráza I

- 5'-3' polymerázová aktivita, 5'-3' i 3'-5' (proofreading) exonukleázová aktivita – převažující aktivita v závislosti na templátu a koncentraci dNTP
- Jeden protein (109 kDa) se třemi doménami pro příslušné enzymové aktivity
- Zdroj: bakteriální, nyní jako rekombinantní protein
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$
- Využití: Značení DNA („nick-translace“), syntéza dvouřetězcové cDNA, modifikace konců molekul DNA



# Klenowův fragment DNA polymerázy I

- 5'-3' polymerázová aktivita, pouze 3'-5' exonukleázová aktivita, existuje i varianta exo- bez této aktivity
- Vzniká odstraněním N-koncové domény DNA polymerázy I štěpením subtilizinem
- Zdroj: nyní jako rekombinantní protein
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$
- Využití: Doplnění zkrácených 3' konců („fill-in reaction“), syntéza dvouřetězcové cDNA, polymerase-stop assay



# Termostabilní DNA polymerázy

- Syntéza nového řetězce DNA dle matrice DNA připojováním nukleotidů k 3'-OH primeru
- Izolace z termofilních organismů
- Katalytická aktivita maximální při 70-80°C, klesá s klesající teplotou
- Nyní spíše rekombinantní upravené varianty s optimalizovanými vlastnostmi
  - Optimalizovaná procesivita – schopnost polymerovat dlouhé molekuly DNA (desítky kb)
  - Zvýšená fidelity – velmi nízká chybovost – proofreading mechanismus
  - Optimalizovaná schopnost polymerovat GC bohaté oblasti
- Kofaktor: Mg<sup>2+</sup>
- Využití: polymerázová řetězová reakce (PCR - *in vitro* amplifikace DNA)

**Taq** – *Thermus aquaticus* – poločas cca 1,5 h při 95°C

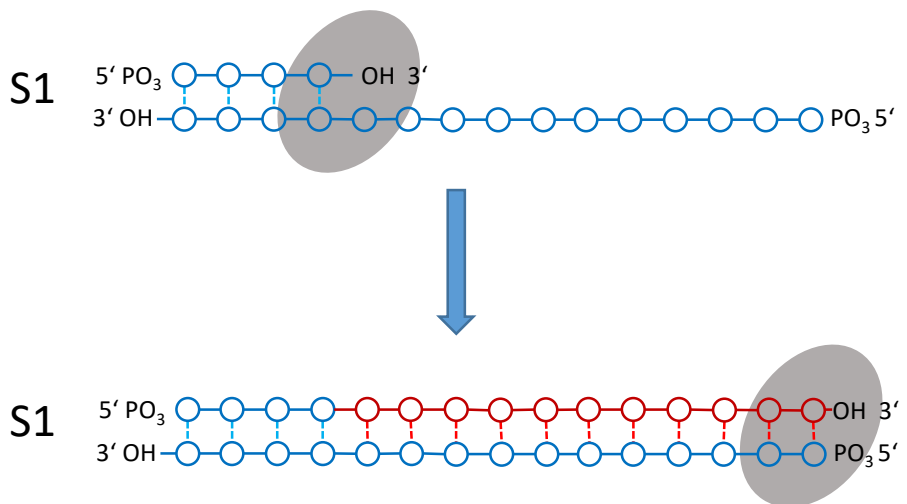
**Pfu** – *Pyrococcus furiosus* – extrémně přesná

**Vent** – *Thermococcus litoralis* – poločas až 7 h při 95°C

- **Podrobnosti v přednášce o PCR**

# Reverzní transkriptázy

- RNA-dependentní DNA-polymerázy, možná RNáza H aktivita
- syntéza nového řetězce DNA (obvykle tzv. cDNA – complementary DNA) dle matrice RNA
- Vyžaduje primer (náhodné hexanukleotidy, oligo T – pro mRNA, ...)
- Zdroj: virového původu (AMV-Avian Myeloblastosis Virus; M-MuLV- Moloney Murine Leukemia Virus), nyní obvykle rekombinantní (ProtoScript, ...)
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$
- Využití: syntéza cDNA



# Nukleázy

- štěpení polynukleotidového řetězce DNA (RNA) od konců (**exonukleázy**) nebo uvnitř řetězce (**endonukleázy**)
- katabolické enzymy

## DNA nukleázy (DNázy)

**Bal31**

**Exonukleáza fága lambda ( $\lambda$ )**

**Nukleáza ExoIII**

**Dnáza I**

**Nukleáza S1**

**Restrikční endonukleázy** – sekvenčně specifické - samostatná přednáška o PCR

## RNA nukleázy (RNázy)

**RNáza A**

**RNáza H**

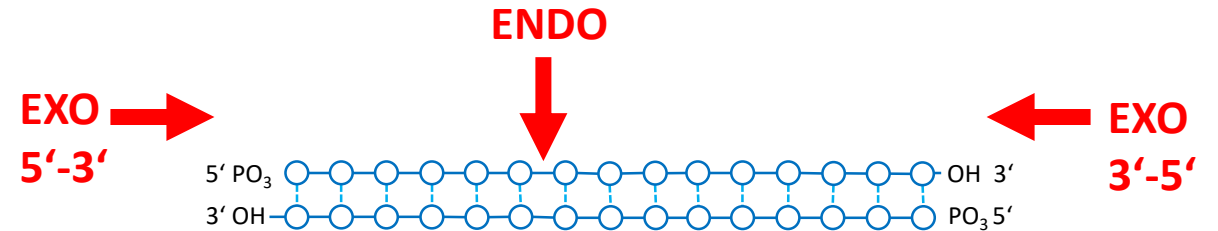
**RNáza T1**

## Nukleázy využívané pro editaci genomu

**Cas9 – CRISPR/Cas9**

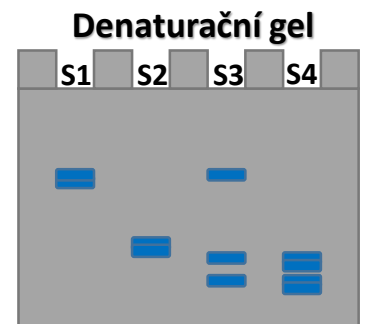
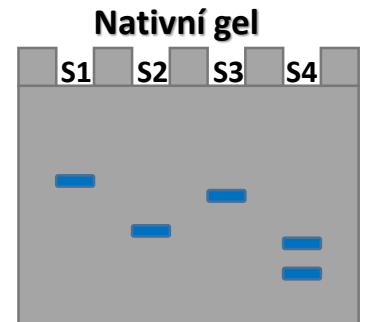
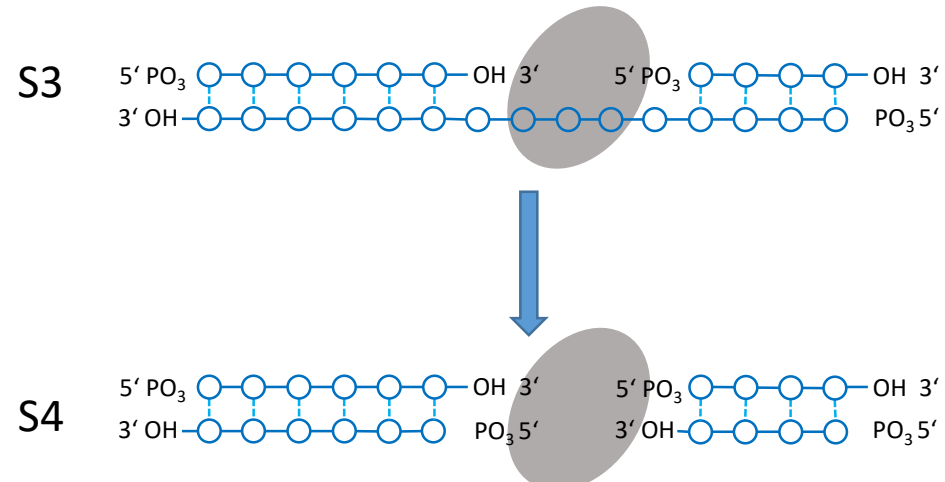
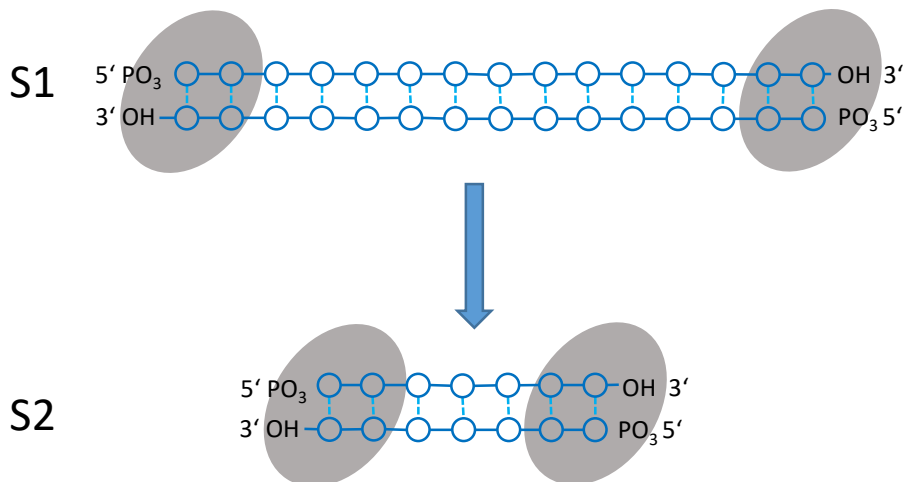
**ZFN**

**TALEN**



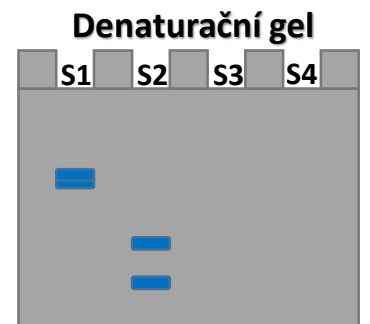
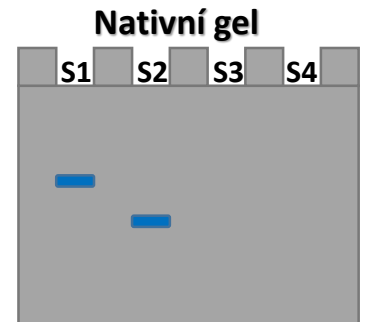
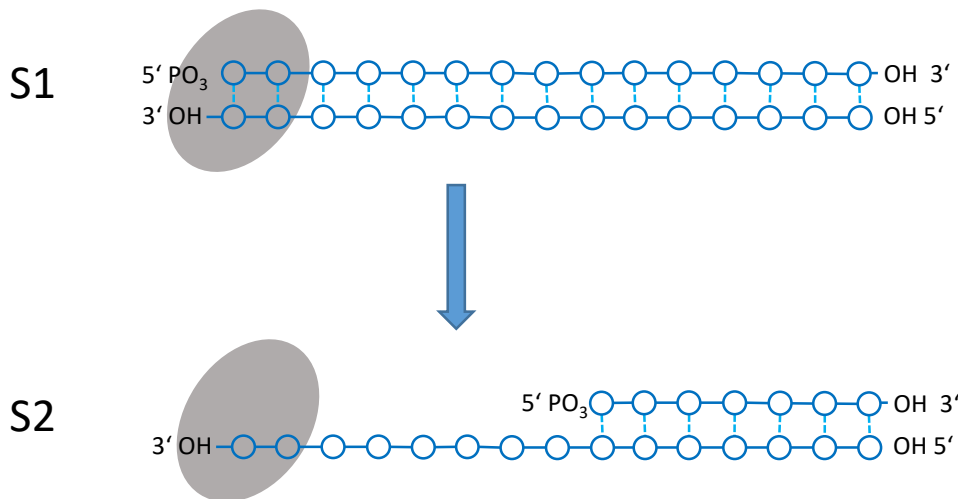
# Nukleáza Bal31

- Primárně exonukleázová aktivita od obou konců dsDNA (5'-3' i 3'-5')
- Sekundární endonukleázová aktivita specifická pro jednořetězcové oblasti DNA i RNA v rámci dsDNA (zlomy, mezery, ...)
- Netvoří intramolekulární zlomy v dsDNA
- Zdroj: bakterie *Alteromonas esperijana*
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$
- Využití: zkracování dsDNA z obou konců, odstranění jednořetězcových oblastí z DNA:RNA hybridu



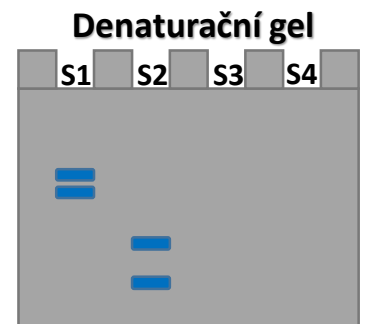
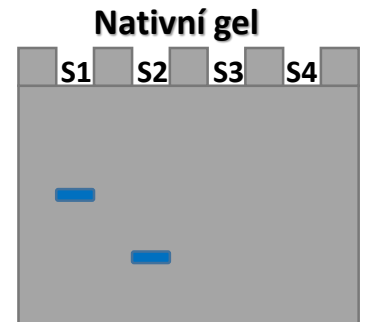
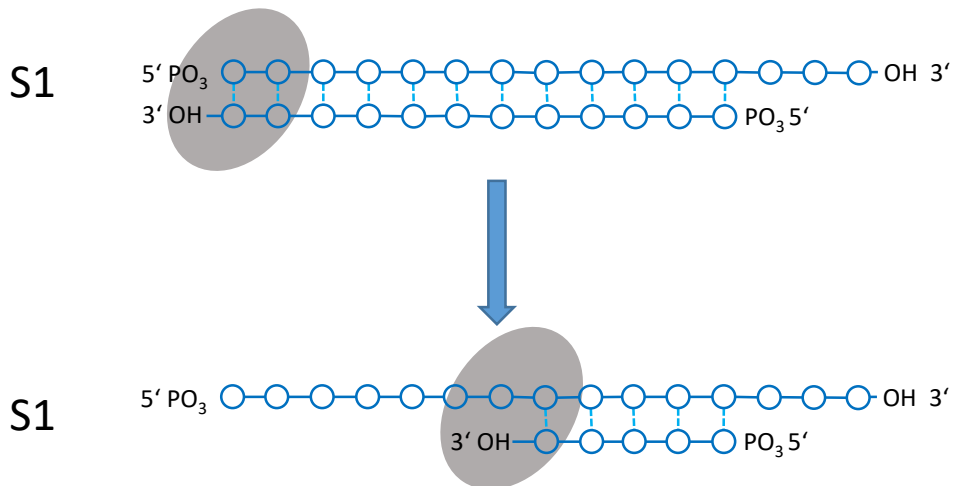
# Exonukleáza fága lambda ( $\lambda$ )

- Exonukleázová aktivita ve směru 5'-3' na ds DNA, odštěpuje nukleosid-monofosfáty
- Silná preference pro 5' fosforylovaný řetězec, ale slabě štěpí i nefosforylovaný a jednořetězcovou DNA
- Není schopna začít štěpit v místě zlomů a mezer
- Zdroj: *E. coli* infikovaná bakteriofágem T4
- Využití: tvorba jednosměrných delecí, příprava ssDNA z dsDNA



# Nukleáza ExoIII

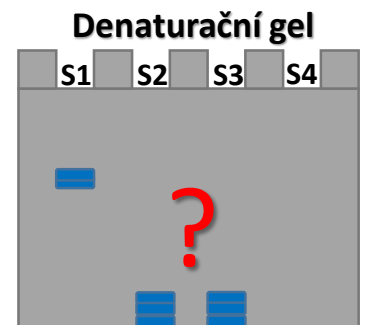
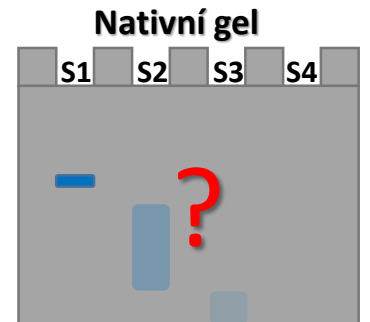
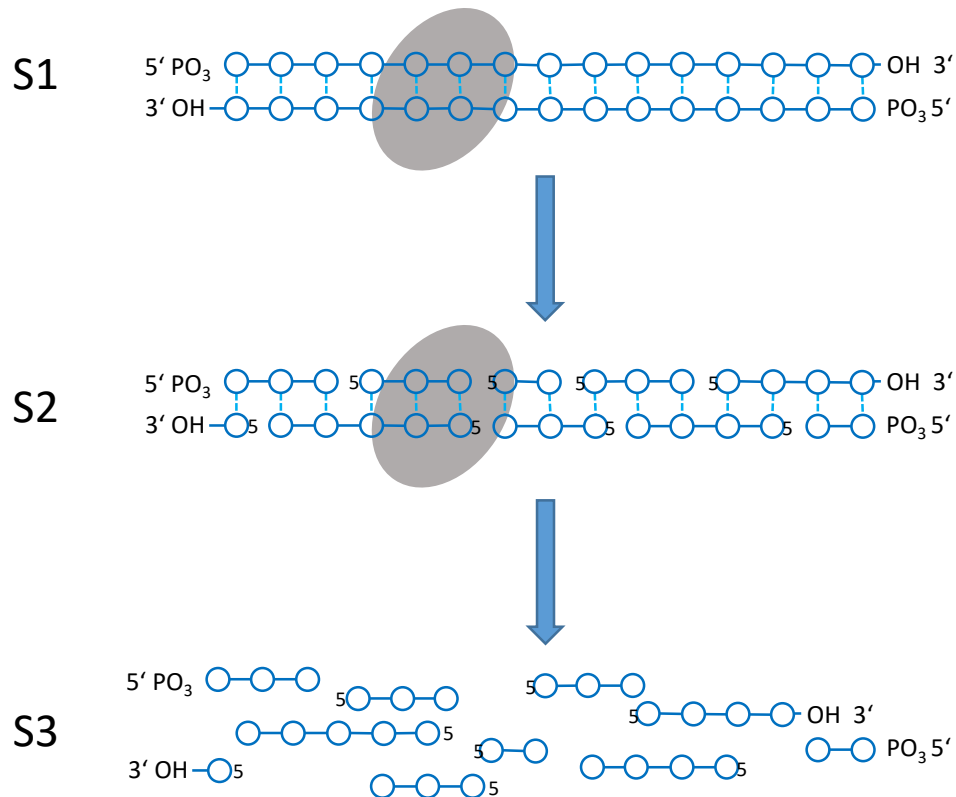
- Exonukleáza postupně odbourávající nukleosid-monofosfáty z 3' OH konců dsDNA (3'-5' exonukleáza)
- Vyžaduje tupé nebo 3' recesivní konce, 3' přesahující konce jsou rezistentní
- Schopna štěpit i v jednořetězcových zlomech, vytváří mezery
- Zdroj: *E. coli*
- Využití: příprava delecí, mutageneze, příprava jednořetězcových sond a substrátů pro dideoxy- sekvenování



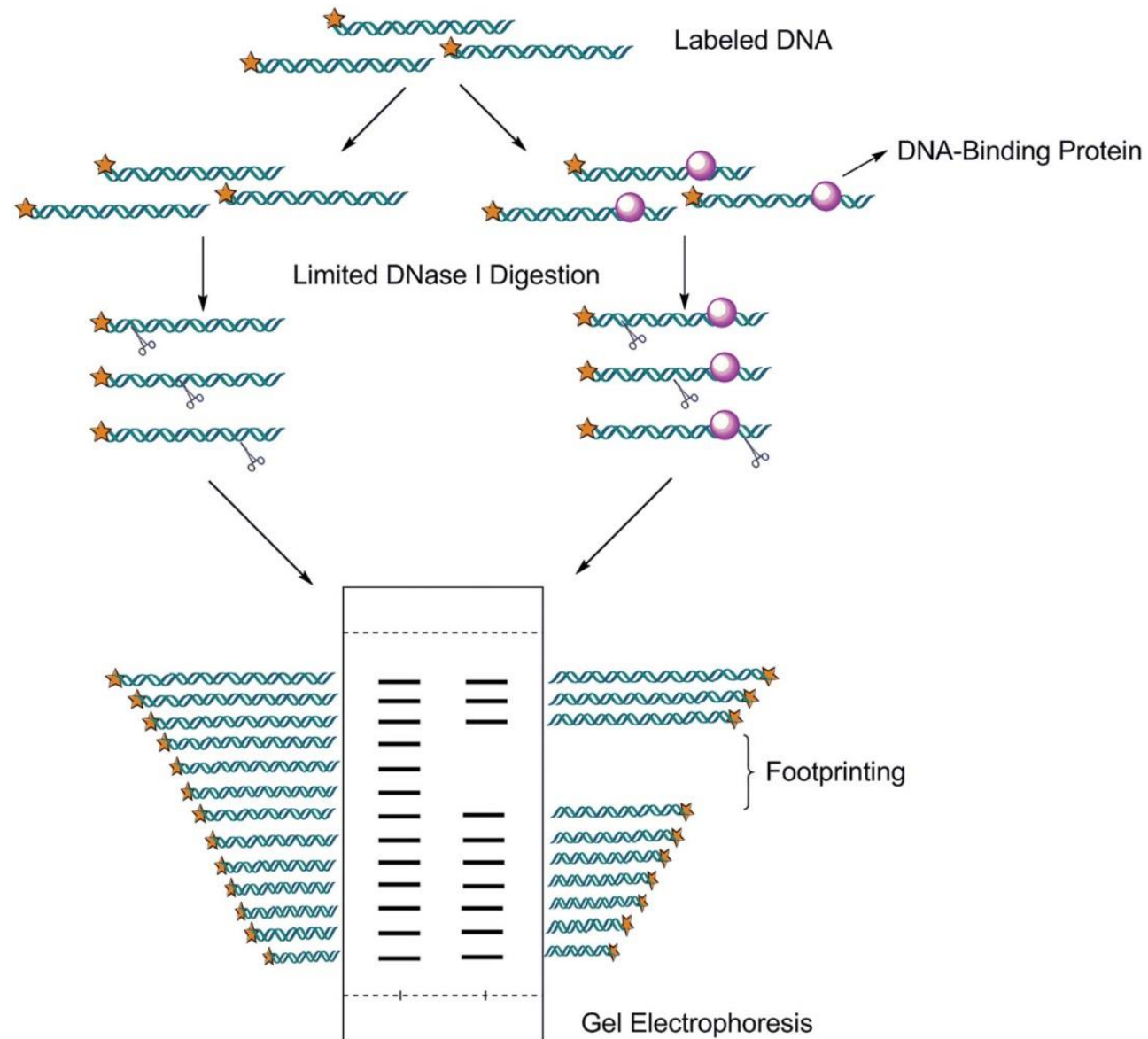


# Dnáza I

- Nespecifická endonukleáza štěpící dsDNA i ssDNA, v DNA vytváří zlomy
- Produkuje di-, tri-, tetra- nukleotid-monofosfáty fosforylované na 5' koncích
- Zdroj: bakterie *Alteromonas esperijana*
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$  - náhodné zlomy v obou řetězcích,  $Mn^{2+}$  - zlomy v obou vláknech proti sobě
- Využití: zlomy v dsDNA při nick translaci (nízká koncentrace), vyštěpení DNA při izolaci RNA (vysoká koncentrace), DNase footprinting (nízká koncentrace)

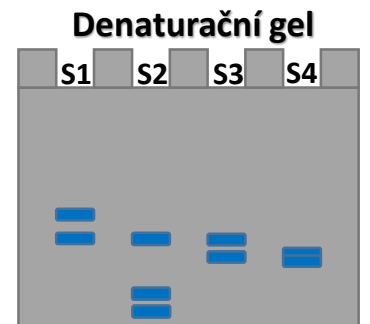
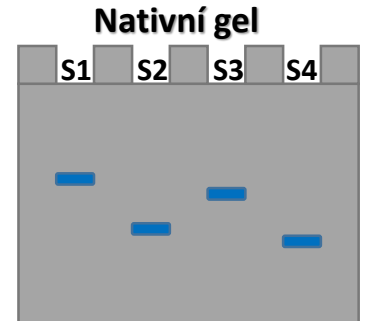
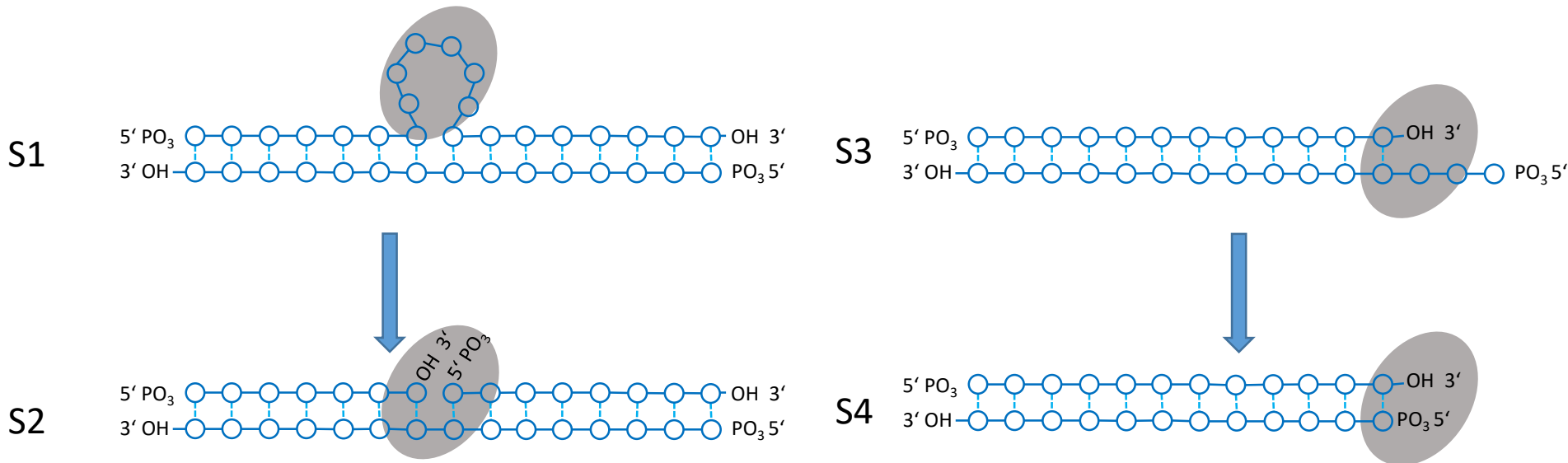


# Sondování DNázou I (Dnase footprinting)



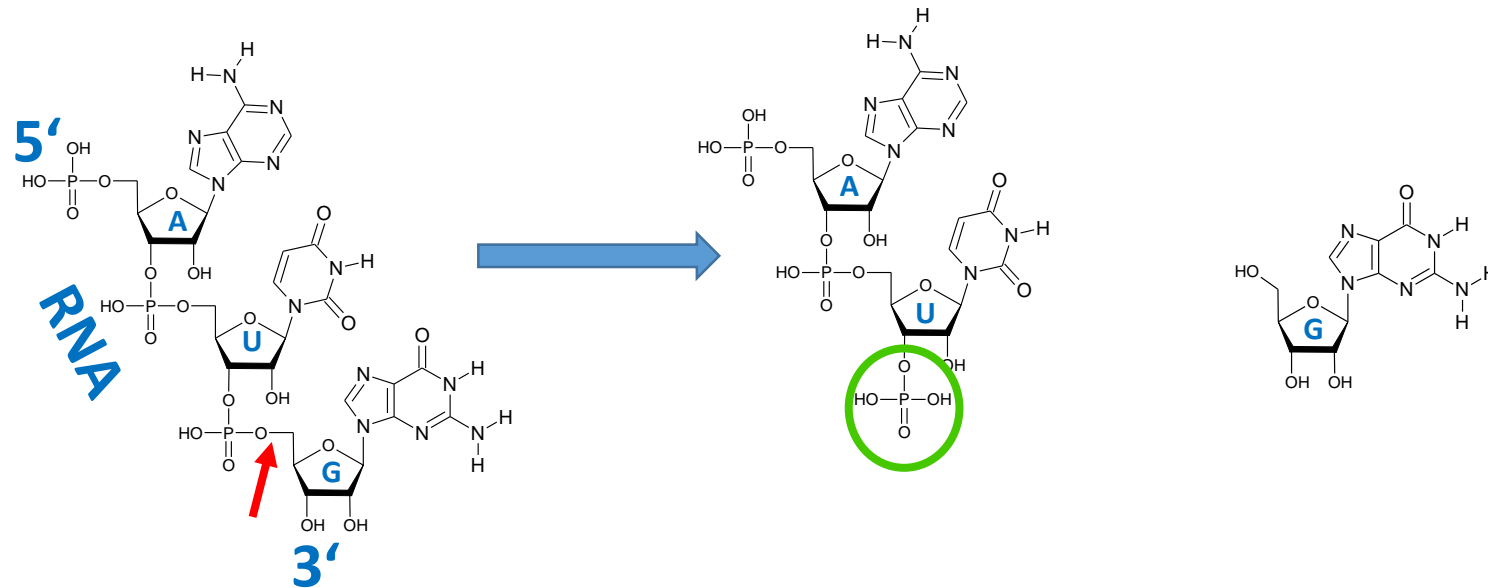
# Nukleáza S1

- Endonukleáza specificky štěpící ssDNA a jednořetězcové oblasti v rámci dsDNA
- Produkuje di-, tri-, tetra- nukleotid-monofosfáty fosforylované na 5' koncích
- Zdroj: bakterie *Aspergillus oryzae*
- Kofaktor:  $Zn^{2+}$
- Využití: mapování jednořetězcových oblastí DNA, zatupení kohezivních konců
- Obdobné nukleázy P1, Mung Bean atp.



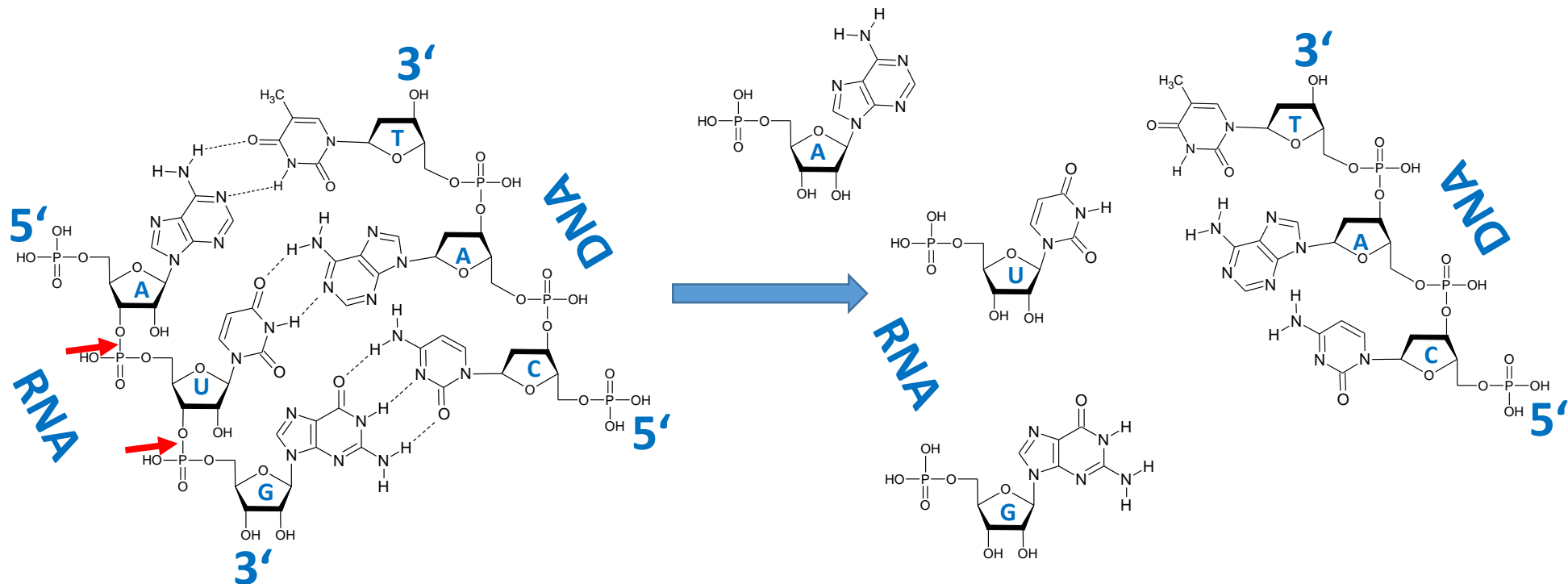
# RNáza A

- Hydrolyzuje preferenčně fosfodiesterové vazby v jednořetězcové molekule RNA na 3' konci nespárovaných pyrimidinových nukleotidů (U a C)
- Produktem jsem ribonukleosid-monofosfáty s fosfátovou skupinou na 3' konci a OH skupinou na 5' konci
- Neštěpí ssDNA ani dsDNA
- Kofaktor: žádné
- Zdroj: hovězí slinivka – příprava intenzivním vařením hrubého buněčného extraktu – ostatní bílkoviny denaturovány
- Využití: odstranění RNA z roztoku (izolace DNA, ...), strukturní studie (nespárované úseky RNA)



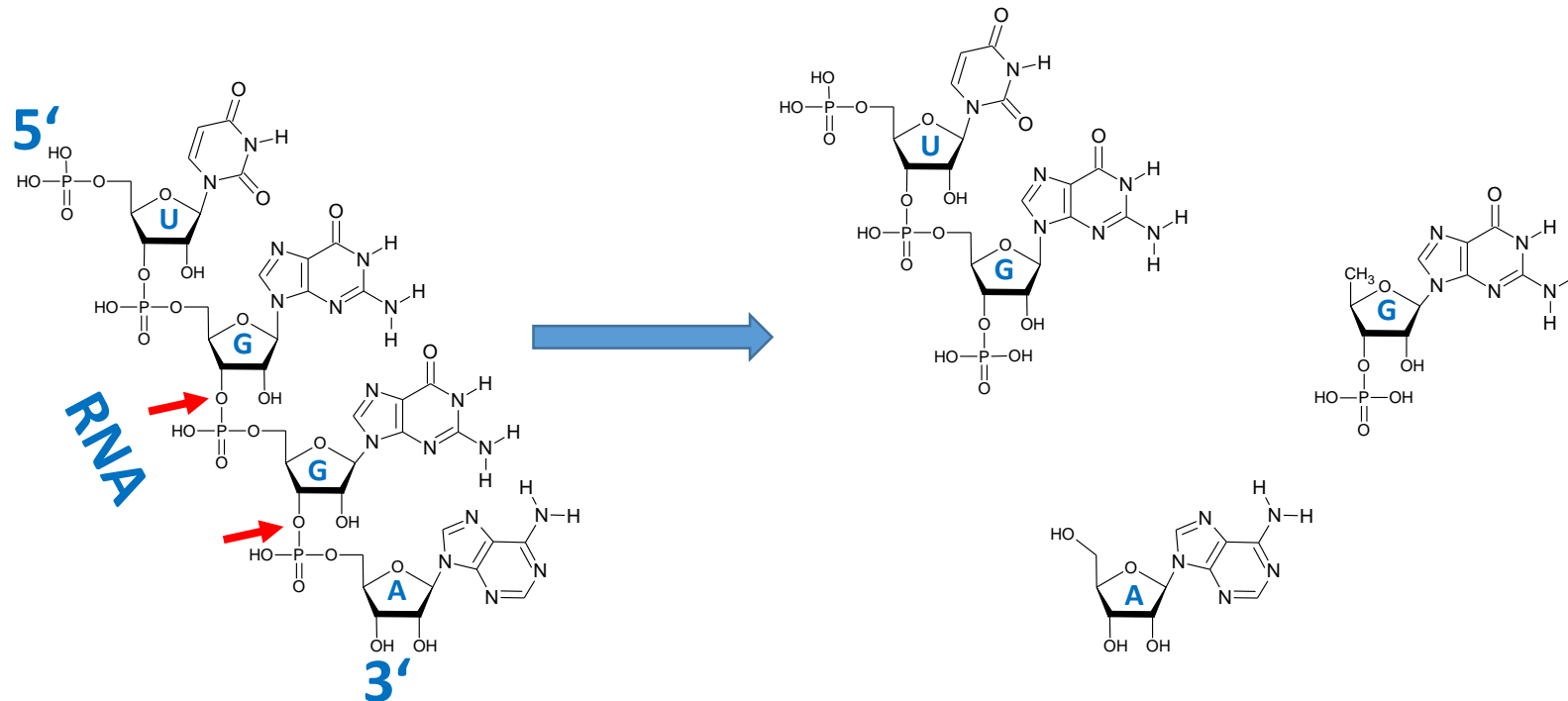
# RNáza H

- Sekvenčně nespecificky hydrolyzuje preferenčně fosfodiesterové vazby v RNA molekule párované s DNA molekulou (hybrid RNA:DNA)
- Produktem jsou ribonukleosid-monofosfáty s fosfátovou skupinou na 5' konci a OH skupinou na 3' konci
- Neštěpí ssDNA ani dsDNA
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$
- Zdroj: *E. coli*



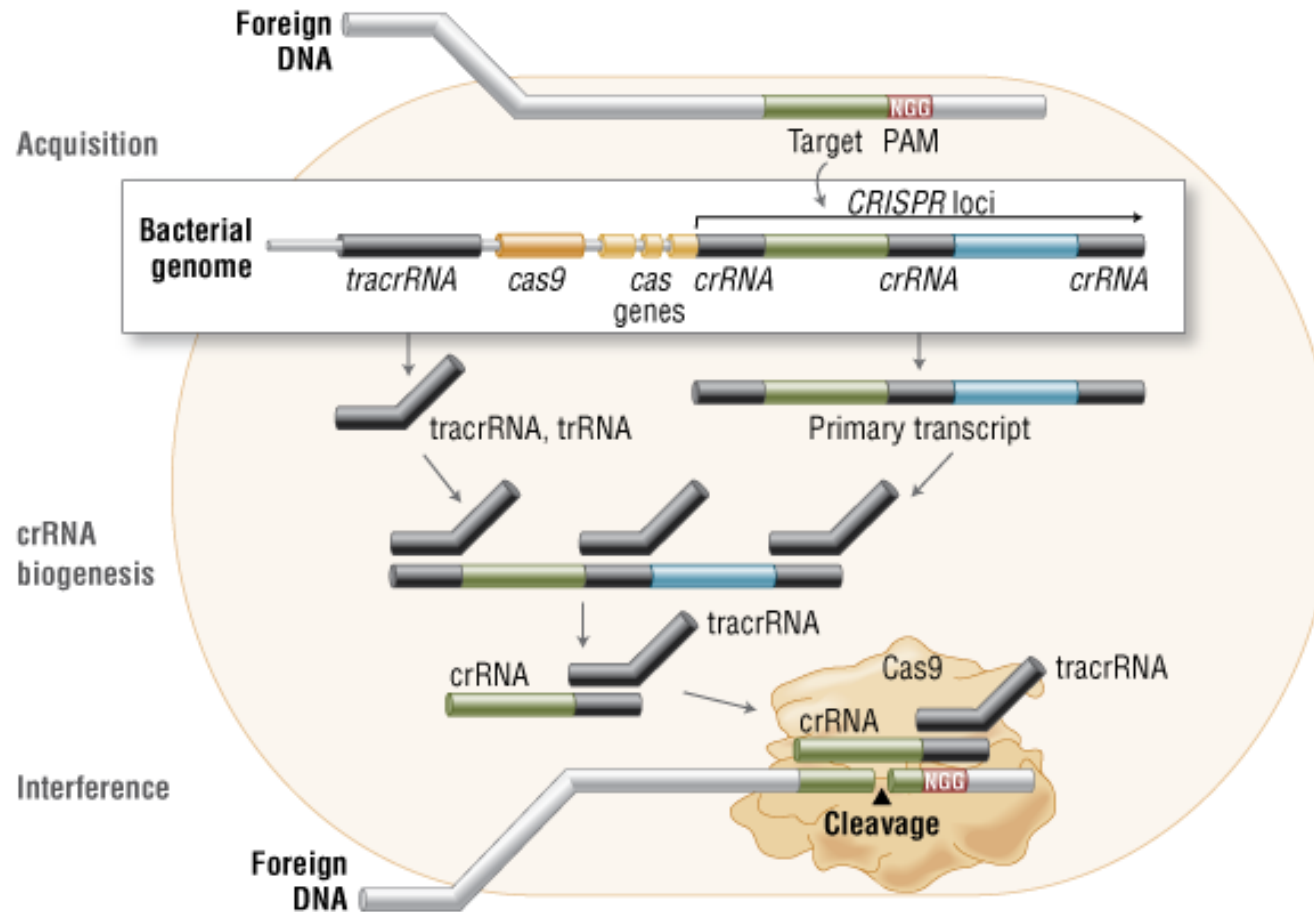
# RNáza T1

- Hydrolyzuje preferenčně fosfodiesterové vazby v jednořetězcové molekule RNA na 3' konci guanosinových zbytků
- Produktem jsou oligoribonukleotidy končící G s fosfátovou skupinou na 3' konci a OH skupinou na 5' konci, případně GMP (s  $\text{PO}_4$  na 3' konci)
- Neštěpí ssDNA ani dsDNA
- Kofaktor: žádné
- Zdroj: *Aspergillus oryzae*, dnes rekombinantní protein produkovaný *E. coli*
- Využití: strukturní studie RNA, sekvenování RNA



# Cas9 nukleázy – CRISPR/Cas9

- Původně součást „imunitního systému“ bakterií, nyní rekombinantní
- endonukleáza Cas9 sekvenčně specificky směřovaná na DNA pomocí gRNA (crRNA+tracrRNA) – *in vivo* editace genomu
- CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeats



The Nobel Prize in Chemistry 2020 was awarded jointly to Emmanuelle Charpentier and Jennifer A. Doudna "for the development of a method for genome editing.,," (Jínek et al., *Science* 337, 2012)

## Genome Editing Glossary

Cas = CRISPR-associated genes

Cas9, Csn1 = a CRISPR-associated protein containing two nuclease domains, that is programmed by small RNAs to cleave DNA

crRNA = CRISPR RNA

dCAS9 = nuclease-deficient Cas9

DSB = Double-Stranded Break

gRNA = guide RNA

HDR = Homology-Directed Repair

HNH = an endonuclease domain named for characteristic histidine and asparagine residues

Indel = insertion and/or deletion

NHEJ = Non-Homologous End Joining

PAM = Protospacer-Adjacent Motif

RuvC = an endonuclease domain named for an *E. coli* protein involved in DNA repair

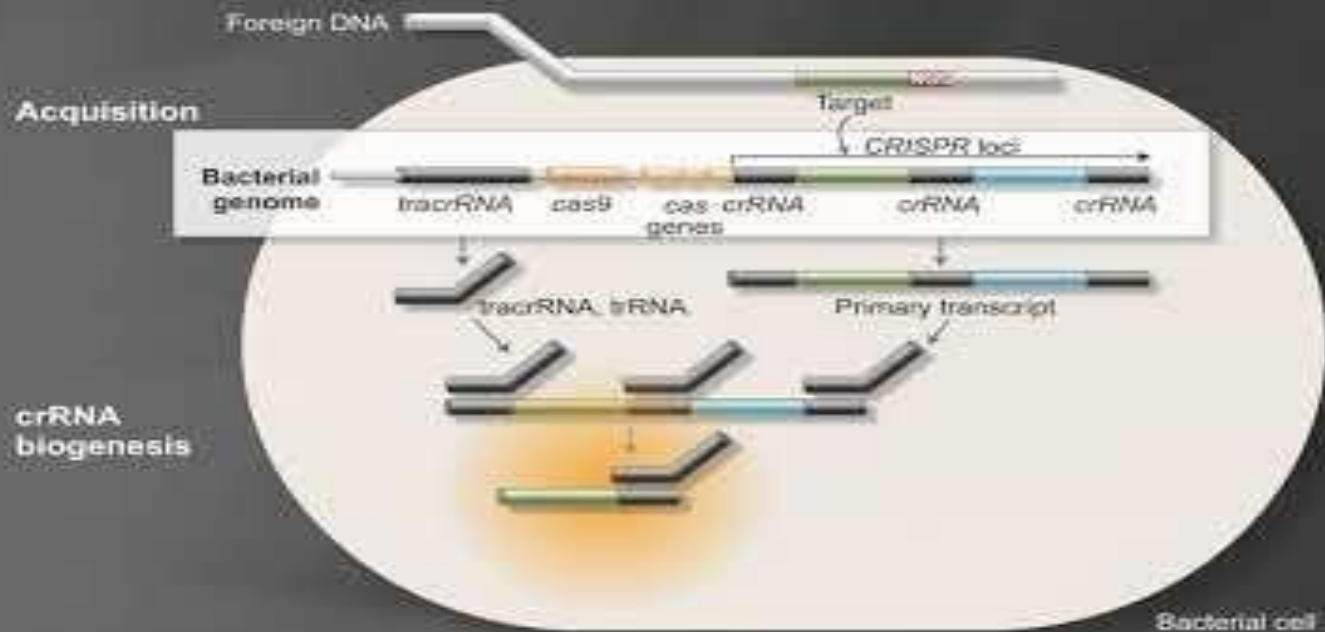
sgRNA = single guide RNA

tracrRNA, trRNA = trans-activating crRNA

TALEN = Transcription-Activator Like Effector Nuclease

ZFN = Zinc-Finger Nuclease

# Cas9 nukleázy – CRISPR/Cas9



## Genome Editing Glossary

Cas = CRISPR-associated genes

Cas9, Csn1 = a CRISPR-associated protein containing two nuclease domains, that is programmed by small RNAs to cleave DNA

crRNA = CRISPR RNA

dCAS9 = nuclease-deficient Cas9

DSB = Double-Stranded Break

gRNA = guide RNA

HDR = Homology-Directed Repair

HNH = an endonuclease domain named for characteristic histidine and asparagine residues

Indel = insertion and/or deletion

NHEJ = Non-Homologous End Joining

PAM = Protospacer-Adjacent Motif

RuvC = an endonuclease domain named for an *E. coli* protein involved in DNA repair

sgRNA = single guide RNA

*tracrRNA*, *trRNA* = trans-activating crRNA

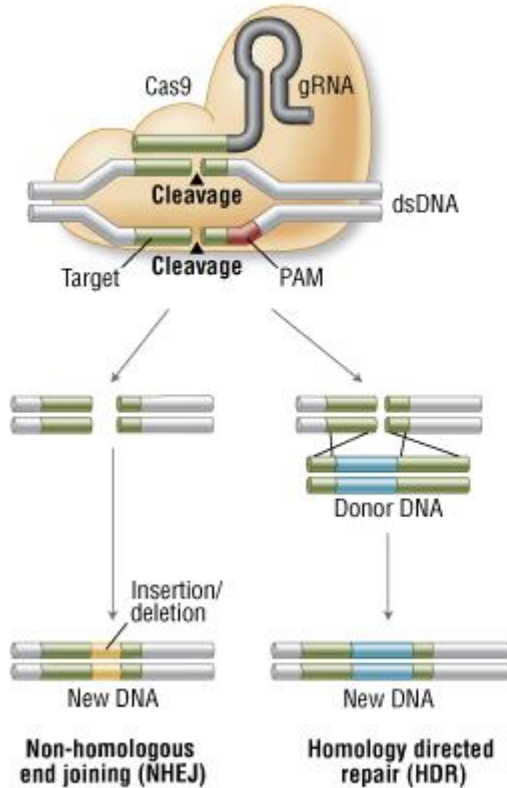
TALEN = Transcription-Activator Like Effector Nuclease

ZFN = Zinc-Finger Nuclease

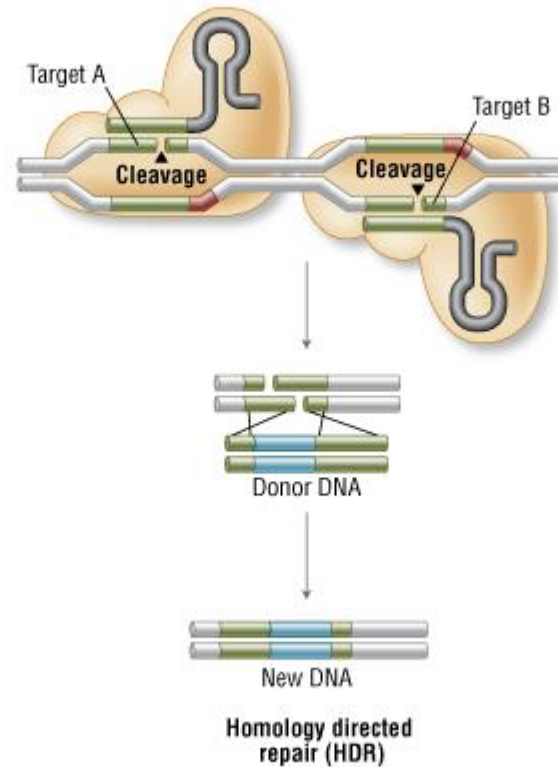


# Cas9 nukleázy – CRISPR/Cas9 – Genome editing

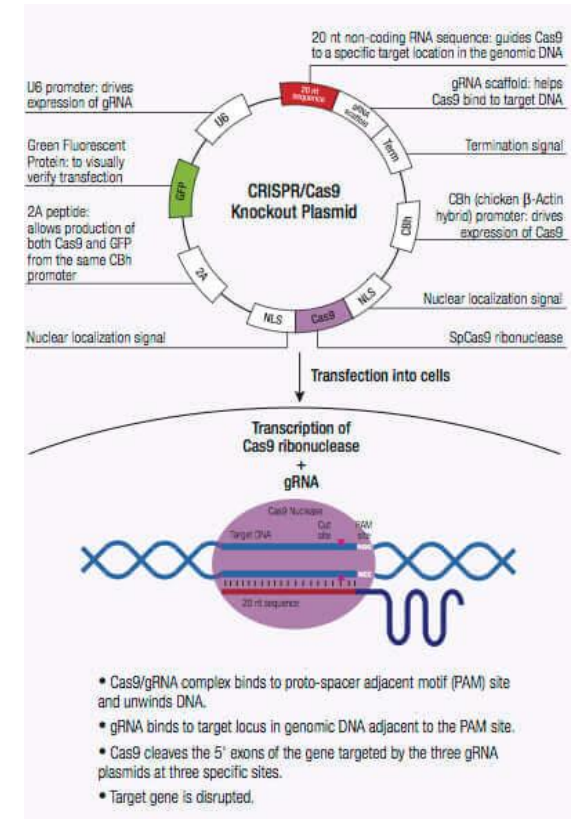
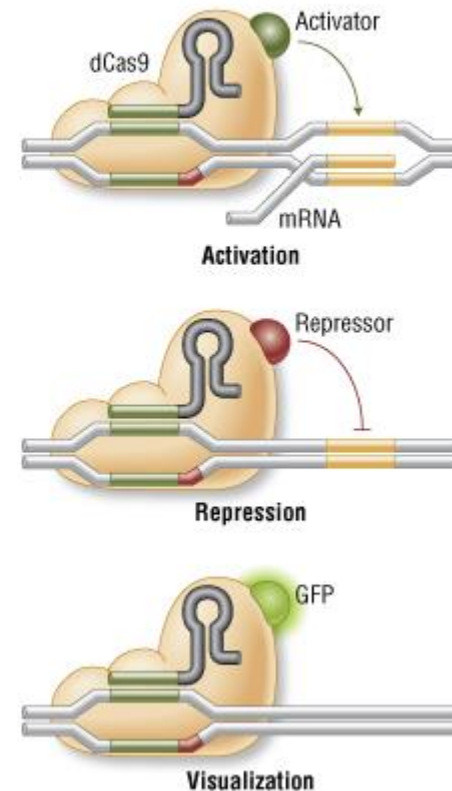
A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



B. Genome Engineering By Double Nicking With Paired Cas9 Nickases



C. Localization With Defective Cas9 Nuclease



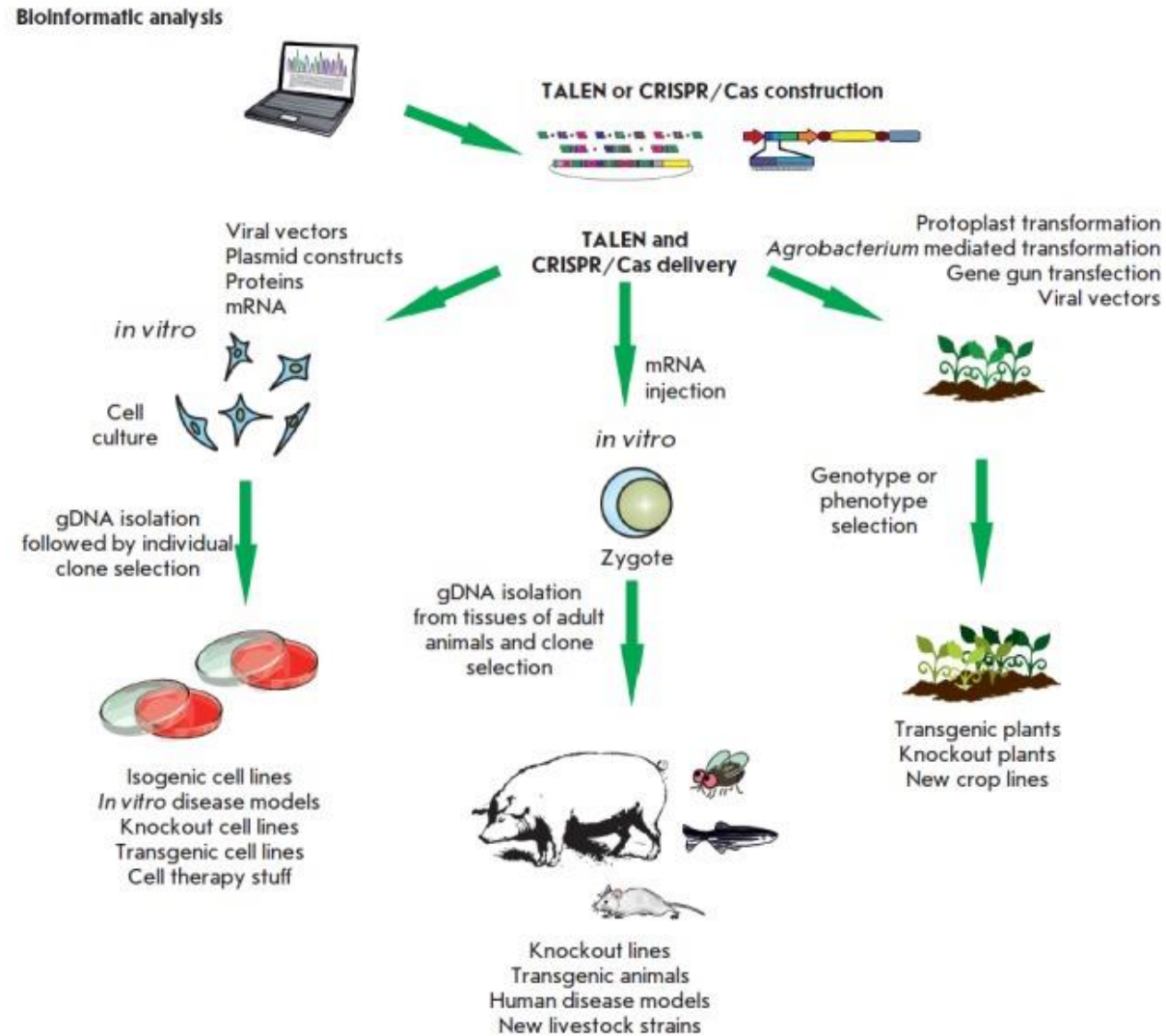
A. Wild-type Cas9 nuclease site specifically cleaves double-stranded DNA activating double-strand break repair machinery. In the absence of a homologous repair template non-homologous end joining can result in indels disrupting the target sequence. Alternatively, precise mutations and knock-ins can be made by providing a homologous repair template and exploiting the homology directed repair pathway.

B. Mutated Cas9 makes a site specific single-strand nick. Two sgRNA can be used to introduce a staggered double-stranded break which can then undergo homology directed repair.

C. Nuclease-deficient Cas9 can be fused with various effector domains allowing specific localization. For example, transcriptional activators, repressors, and fluorescent proteins.

{<https://www.scbt.com/scbt/whats-new/crispr-systems>}

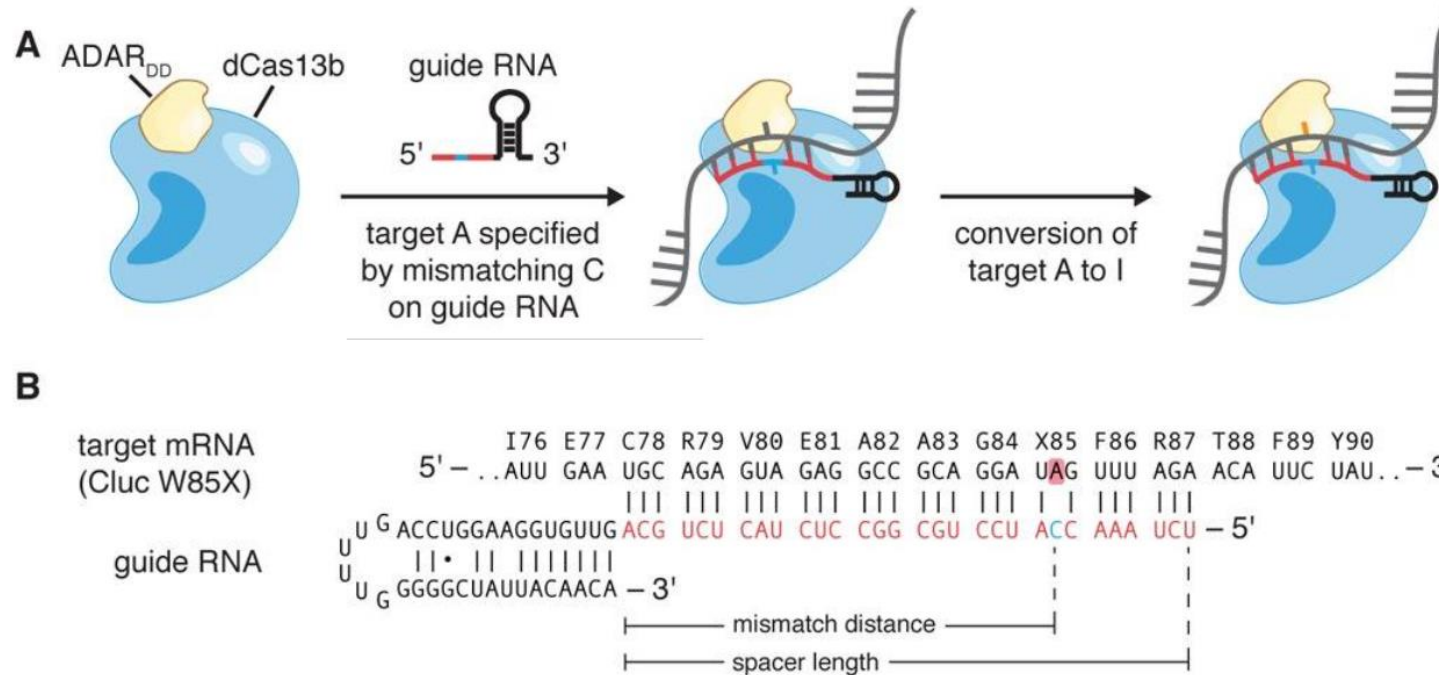
# Genome editing



*A general scheme of the strategy for using the TALEN and CRISPR/Cas systems in genomic engineering*

# Cas13 nukleázy – Genome editing

Komplex katalyticky inaktivní nukleázy Cas13 (dCas13b) s guide RNA a RNA-specifické Adenosin Deaminázy ADAR místně specificky (primární sekvence z gRNA, rozpoznána Cas13) katalyzuje deaminaci A na I (ADAR), který funguje jako G



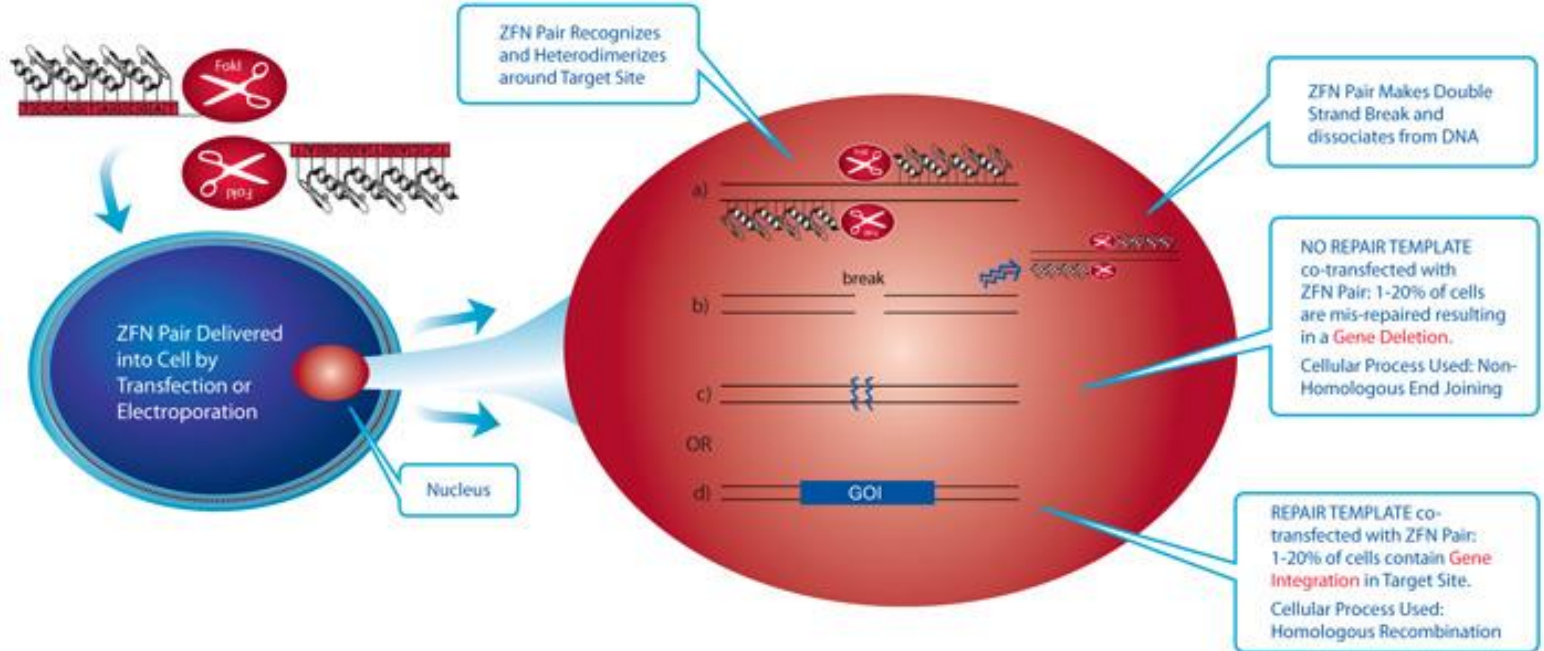
A) Schematic of RNA editing by dCas13b-ADAR<sub>DD</sub> fusion proteins. Catalytically dead Cas13b (dCas13b) is fused to the deaminase domain of human ADAR (ADAR<sub>DD</sub>), which naturally deaminates adenosines to inosines in dsRNA. The crRNA specifies the target site by hybridizing to the bases surrounding the target adenosine, creating a dsRNA structure for editing, and recruiting the dCas13b-ADAR<sub>DD</sub> fusion. A mismatched cytosine in the crRNA opposite the target adenosine enhances the editing reaction, promoting target adenosine deamination to inosine, a base that functionally mimics guanosine in many cellular reactions.

B) Schematic of *Cypridina luciferase* W85X target and targeting guide design. Deamination of the target adenosine restores the stop codon to the wildtype tryptophan. Spacer length is the region of the guide that contains homology to the target sequence. Mismatch distance is the number of bases between the 3' end of the spacer and the mismatched cytosine. The cytosine mismatched base is included as part of the mismatch distance calculation.

# ZFN nukleázy – Genome editing

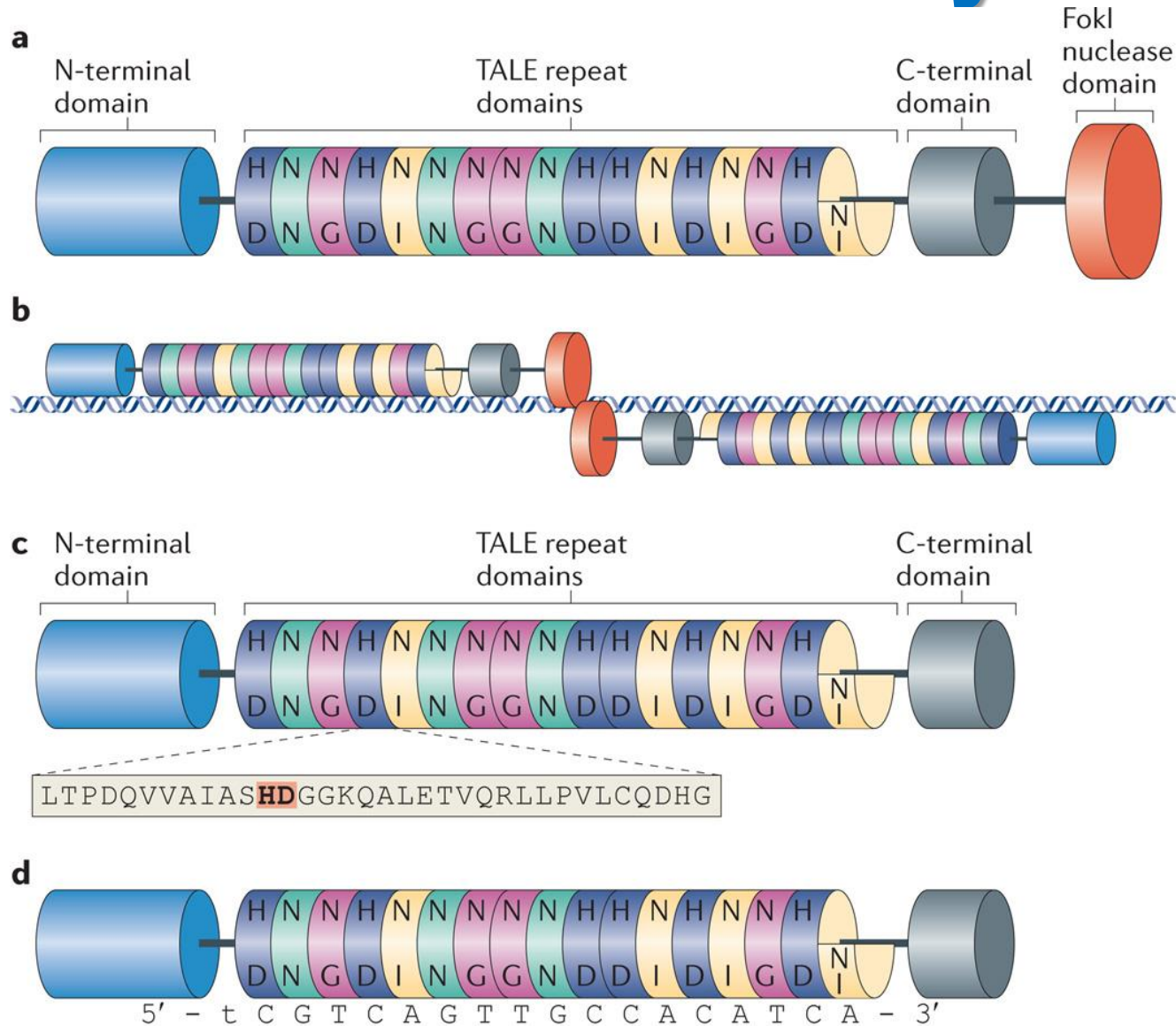


Each Zinc Finger Nuclease (ZFN) consists of two functional domains: a.) A DNA-binding domain comprised of a chain of two-finger modules, each recognizing a unique hexamer (6 bp) sequence of DNA. Two-finger modules are stitched together to form a Zinc Finger Protein, each with specificity of  $\geq 24$  bp. b.) A DNA-cleaving domain comprised of the nuclease domain of Fok I. When the DNA-binding and DNA-cleaving domains are fused together, a highly-specific pair of 'genomic scissors' are created.



ZFN-mediated genome editing takes place in the nucleus when a ZFN pair targeting the user's gene of interest is delivered into a parental cell line, either by transfection, electroporation or viral delivery.

# TALEN nukleázy – Genome editing



## Transcription Activator-Like Effector Nucleases

**a** | Schematic diagram of a TALEN. TALE repeats are shown as colored cylinders with a final carboxy-terminal truncated “half” repeat. Letters inside each repeat represent the two hypervariable residues. TALE-derived amino- and carboxy-terminal domains required for DNA-binding activity are shown as longer blue and grey cylinders, respectively. The non-specific nuclease domain from the FokI endonuclease is shown as a larger orange cylinder. **b** | TALENs bind and cleave as dimers on a target DNA site. Note that the TALE-derived amino- and carboxy-terminal domains flanking the repeats may make some contacts to the DNA. Cleavage by the FokI domains occurs in the “spacer” sequence that lies between the two regions of the DNA bound by the two TALEN monomers. **c** | Schematic diagram of a TALE-derived DNA-binding domain. The amino acid sequence of a single TALE repeat is expanded below with the two hypervariable residues highlighted in orange and bold text. **d** | TALE-derived DNA-binding domain aligned with its target DNA sequence. Note the matching of repeat domains to single bases in the target site according to the TALE code. Also note the presence of a 5' thymine preceding the first base bound by a TALE repeat.

# Další enzymy

**Ligázy** – spojování fragmentů nukleových kyselin

**T4 DNA ligáza**

**Transferázy** – připojování funkčních skupin a nukleotidů bez templátu

**Terminální transferáza (TdT)**

**DNA metyltransferázy (DNA MTase)** – metylace DNA – obvykle na C

**Kinázy** – připojení fosfátové skupiny

**T4 polynukleotid kináza**

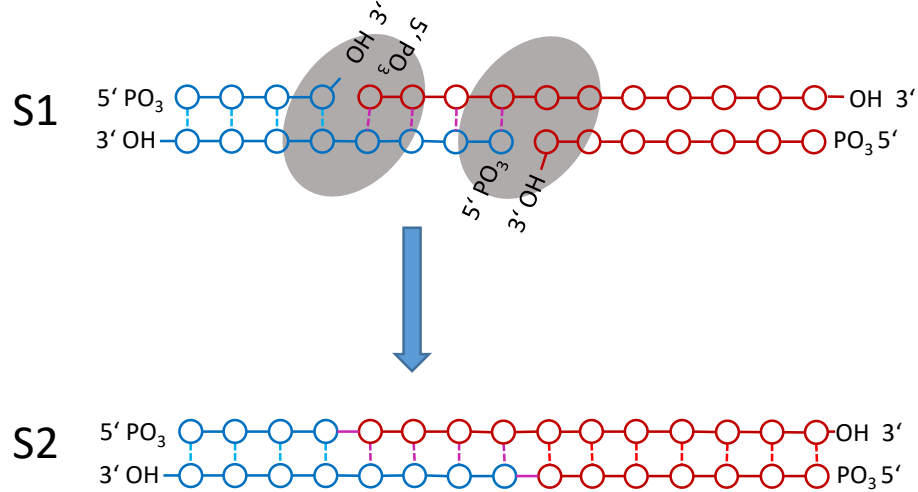
**Fosfatázy** – odštěpení fosfátové skupiny

**Alkalická fosfatáza**

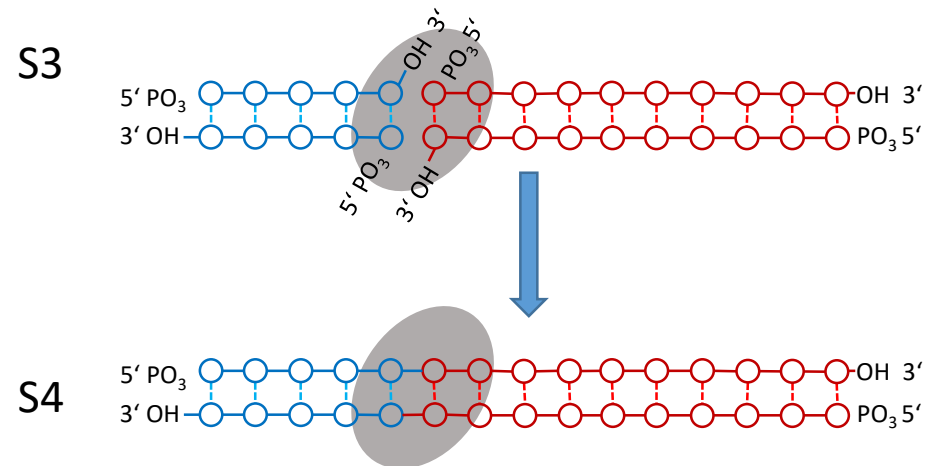
# T4 DNA ligáza

- Spojuje dva konce polynukleotidového řetězce DNA, tupé i lepivé konce
- Vyžaduje přítomnost OH skupiny na 3' konci a fosfátové skupiny na 5' konci v místě spojení
- Nutné ATP nebo NAD jako zdroj energie pro vytvoření fosfodiesterové vazby
- Zdroj: *E. coli* infikovaná bakteriofágem T4
- Opravuje jednořetězcové zářezy („nick“) v dsDNA, RNA i DNA/RNA hybridech

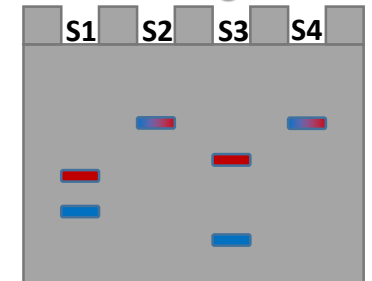
Spojení lepivých konců



Oprava tupých konců



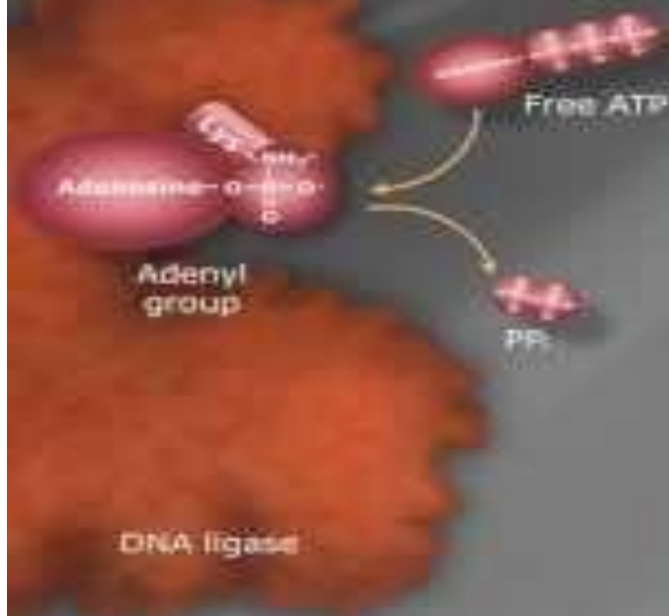
Nativní gel



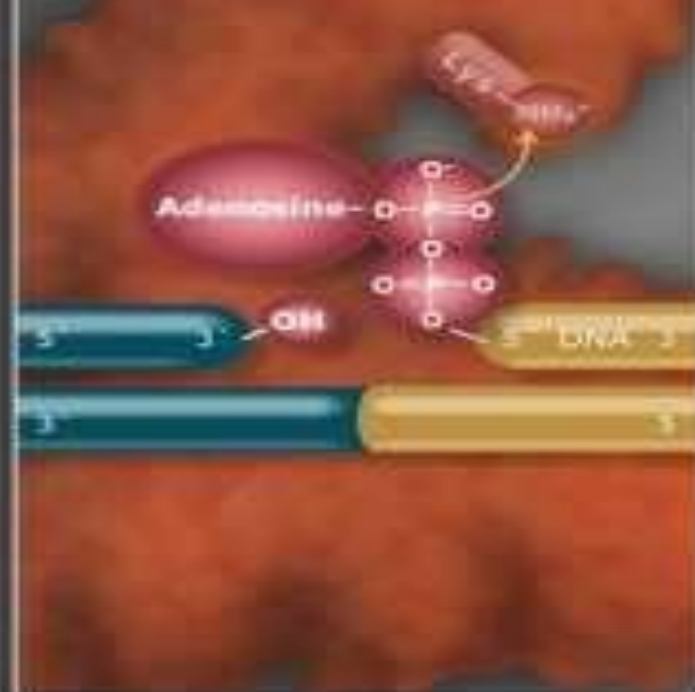
# T4 DNA ligáza

## LIGATION STEPS

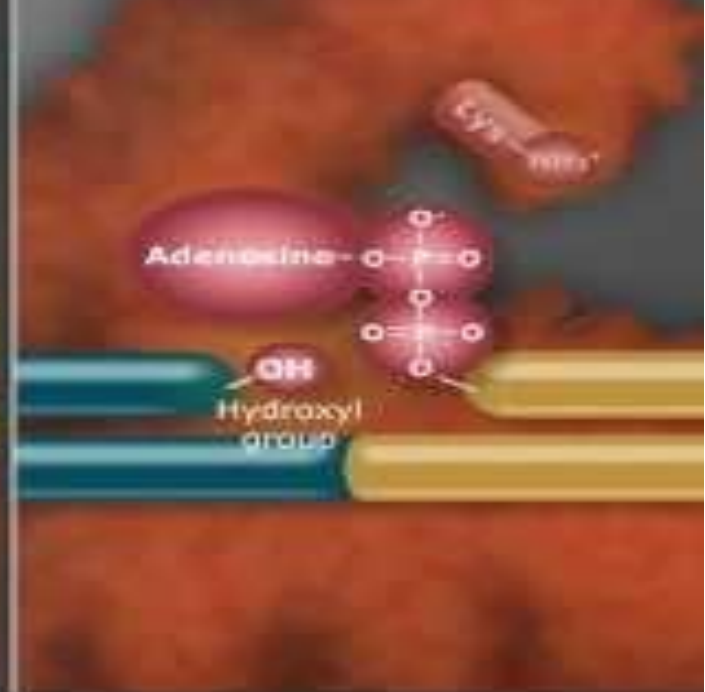
### 1 SELF-ADENYLATION OF DNA LIGASE



### 2 ADENYL GROUP TRANSFER TO DNA



### 3 PHOSPHODIESTER BOND FORMATION





# Úprava konců ligací

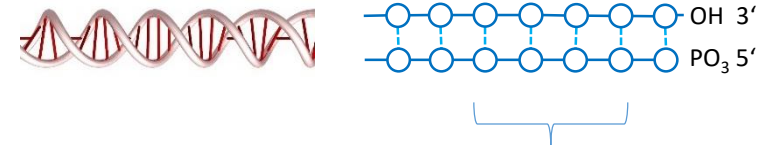
- Ligázou připojené krátké fragmenty dsDNA
- Specifický výběr modifikovaného konce zajištěn příslušnou fosforylací – T4 DNA ligáza preferenčně spojuje s fosforylovaným 5' koncem

## Adaptory



- Mění tupý konec na lepivý
- Specifická sekvence a směr
- Pro připojení inzertu, primeru, ...

## Linkery

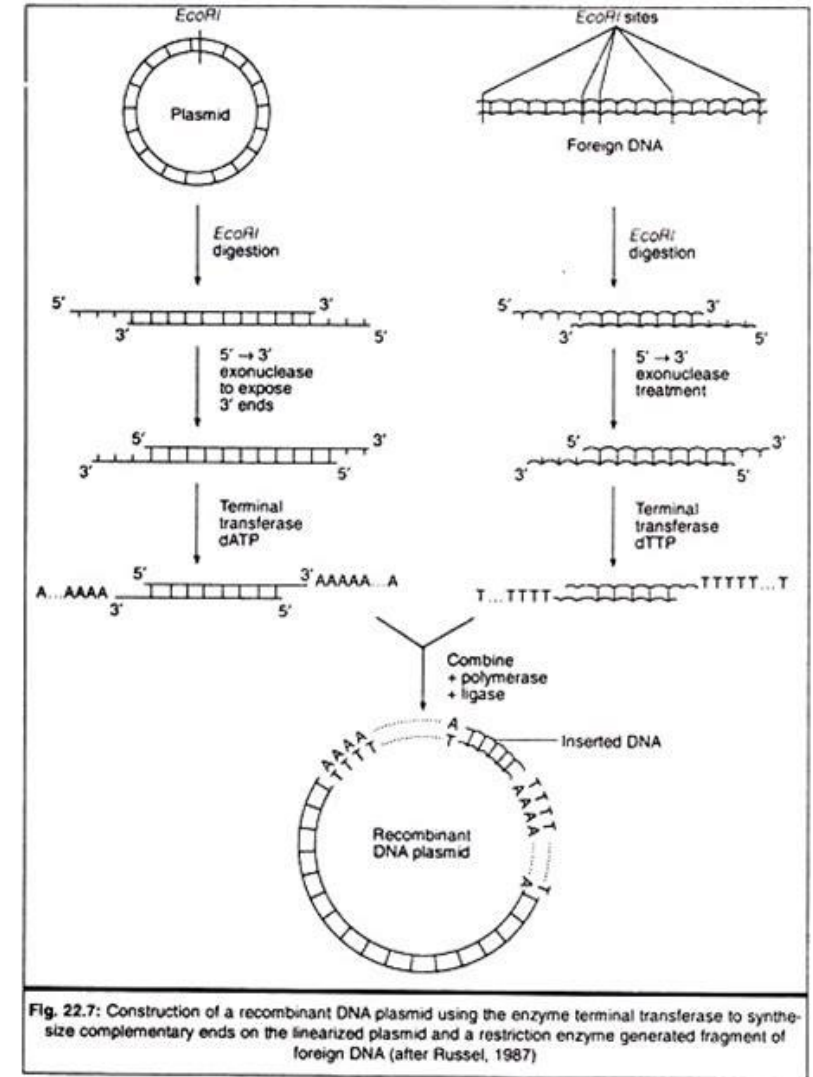


Restrikční místo

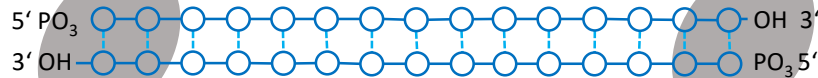
- Vnáší na konec specifickou sekvenci
- Pro štěpení restrikční endonukleázou
- Pro připojení primeru - PCR

# Terminální transferáza (TdT)

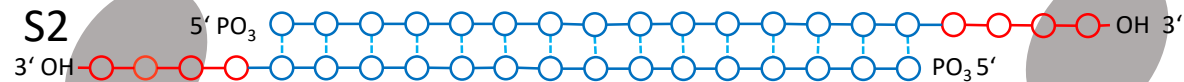
- Přidání deoxynukleotidů k 3' OH skupině bez nutnosti matrice
- Substrátem jsou jak ssDNA, tak tupé recesivní i přesahující konce dsDNA
- Zdroj: např. hovězí brzlík, nyní rekombinantní v *E. coli*
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  - zvyšuje aktivitu
- Využití: 3' terminální značení DNA, přidávání homopolymerních konců, klonování pomocí TdT, ...



S1



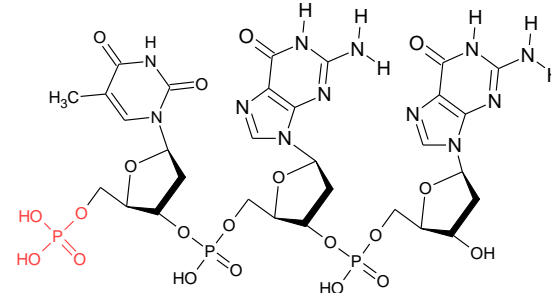
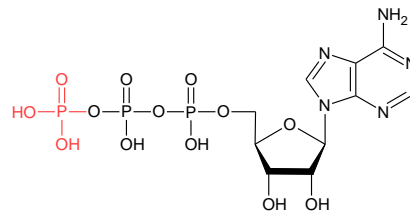
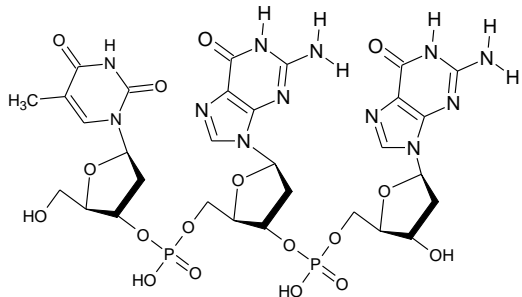
S2



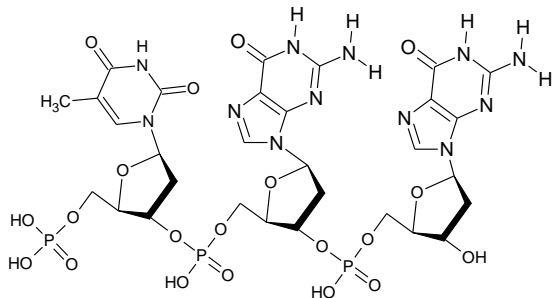
# T4 polynukleotid kináza (T4 PNK)

- Katalyzuje přesun (forward reaction) nebo výměnu (exchange reaction)  $\gamma$  fosfátu z ATP na 5' konec ssDNA, dsDNA, RNA i dNTP
- Exchange reakce probíhá s nižší efektivitou – pro značení vhodnější defosforylace, pokud je 5' konec fosforylován
- Zlomky nejsou výrazněji fosforylovány, mezery ano za vyšší koncentrace ATP
- ATP může být nahrazeno jinými NTP, popřípadě dATP, dTTP
- Zdroj: nyní rekombinantní v *E. coli*
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$
- Využití: 5' terminální značení DNA, fosforylace 5' konce, odstraňování 3' fosfátu z DNA

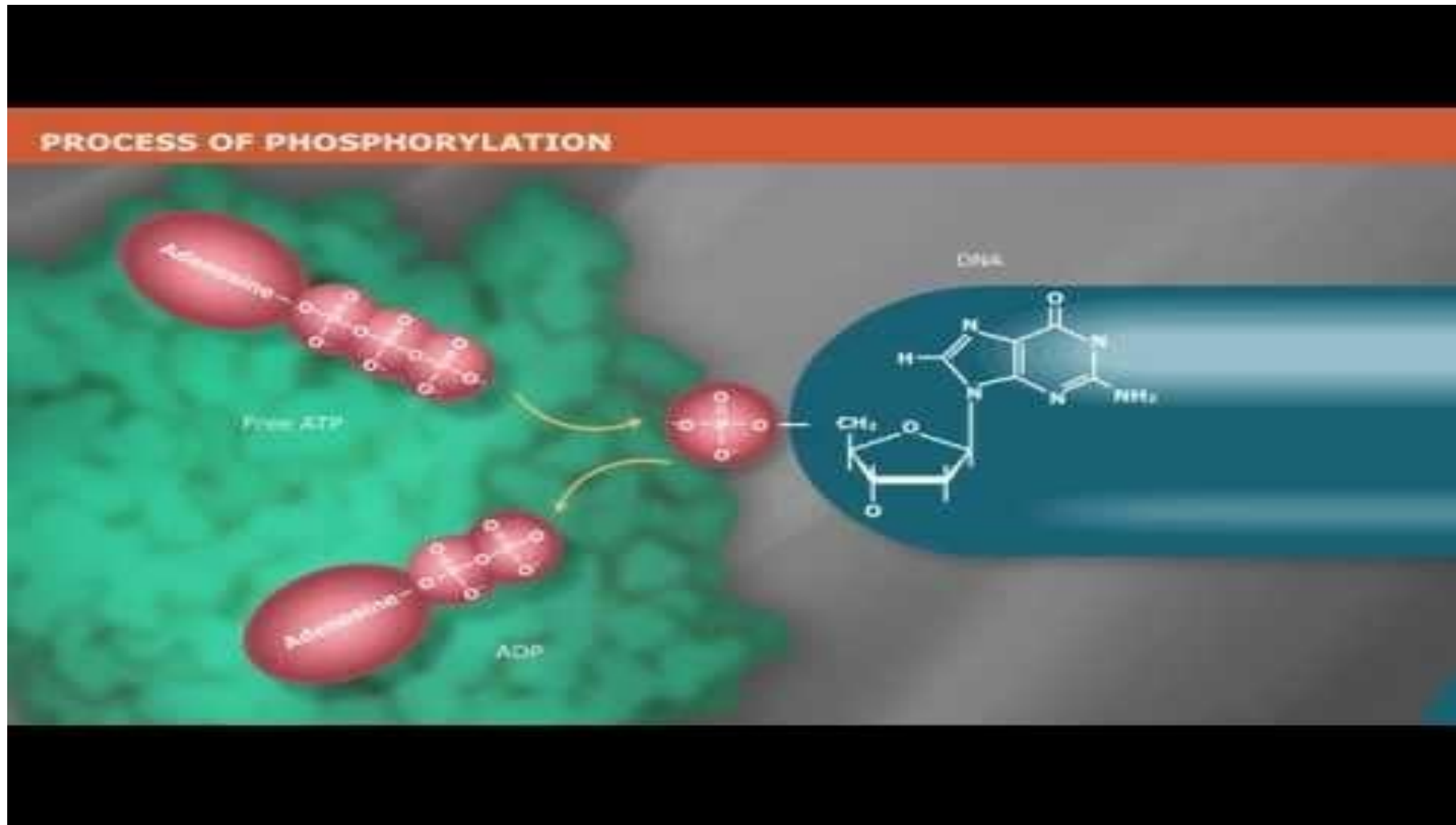
FORWARD



EXCHANGE

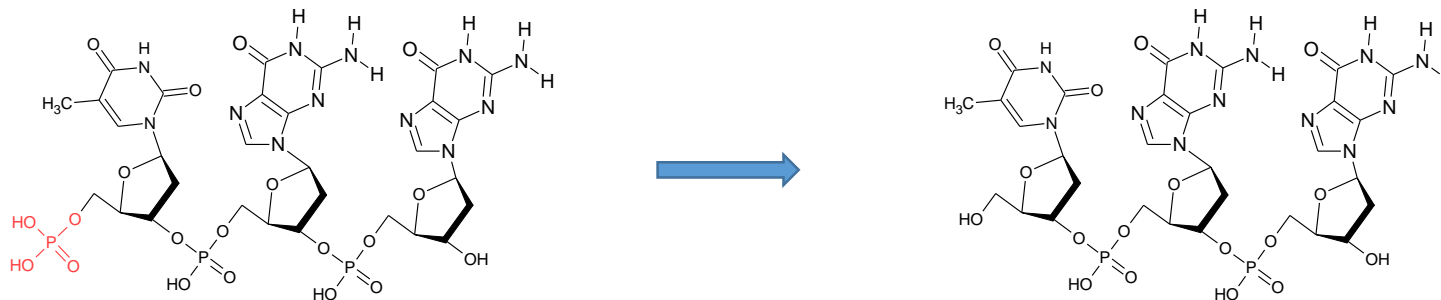


# T4 polynukleotid kináza (T4 PNK)



# Alkalická fosfatáza

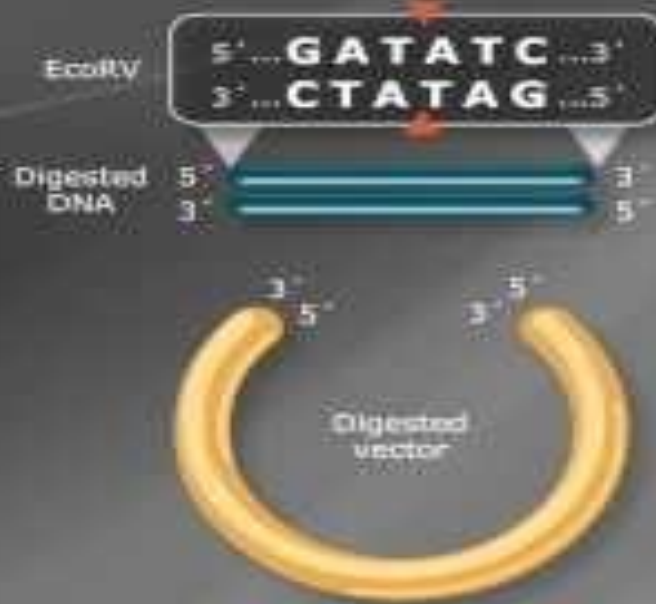
- Katalyzuje odstranění fosfátu z 5' i 3' konce ssDNA, dsDNA (recesivní, přesahující i tupé konce), RNA, dNTP
- Defosforyluje i proteiny (Ser, Thr, Tyr)
- Zdroj: telecí střevo (CIP) – aktivnější, těžko kontrolovatelná, *E. coli* (BAP) – méně aktivní
- Kofaktor:  $Mg^{2+}$ ,
- Využití: defosforylace fragmentů při klonování, značení T4 PNK, odstranění dNTP z reakce



# Klonování

## DIGESTION

### SINGLE-ENZYME DIGESTION (NON-DIRECTIONAL)



### DOUBLE-ENZYME DIGESTION (DIRECTIONAL)

