

Molekulární biotechnologie

Č.3

Izolace cílového fragmentu DNA (genu)

- Který představuje malou část genomu (0.02% u *E.coli*)
- Umožňují genové či genomové knihovny

Množství DNA v různých organismech (Glick a spol.2003)

Table 4.5 DNA content of various organisms

Organism	Size (millions of base pairs [Mb])
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0.58
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1.66
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	1.83
<i>Neisseria meningitidis</i>	2.27
<i>Lactococcus lactis</i>	2.36
<i>Mycobacterium leprae</i>	3.26
<i>Vibrio cholerae</i>	4.00
<i>Bacillus subtilis</i>	4.20
<i>Escherichia coli</i> K-12	4.60
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	5.50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.30
<i>Mesorhizobium loti</i>	7.59
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125
<i>Drosophila melanogaster</i>	165
<i>Fugu rubripes</i>	400
<i>Solanum tuberosum</i>	840
<i>Zea mays</i>	2,700
<i>Mus musculus</i>	3,000
<i>Homo sapiens</i>	3,300
<i>Hordeum vulgare</i>	5,500
<i>Triticum aestivum</i>	17,300

Definice genomové knihovny

- Soubor klonovaných fragmentů připravených štěpením genomové DNA, které dohromady reprezentují celý genom daného organismu
- (knihovna genová: soubor náhodně klonovaných fragmentů genomové DNA příslušného organismu)
- Synonymum: klonová banka
- (genom: všechny molekuly DNA živé soustavy, které se vyznačují replikací a dědí se na potomstvo)

Genomové knihovny (banky)

- vytváření (založení, příprava, konstrukce)
- testování (třídění, skrínig)

Vytváření genomové knihovny

- Proces rozdělení genomové DNA do klonovatelných fragmentů
- Inserce fragmentů do vektoru
- Přenesení (transformace) do hostitelských buněk *E.coli*
- Selektce klonu (identických buněk) nesoucích určitý insert
- (jednotlivé klony se liší insertem)

Snahou je klonovat geny tj.

- Fragmenty DNA přiměřeně dlouhé (asi 1000 – 1200 bp)

Jakou restriktázu zvolit pro štěpení genomové DNA

- Restriktázy, co rozpoznávají 4 bp sekvence štěpí na malé kousky (každých 256 bp)
- Restriktázy, co rozpoznávají 6 bp sekvence štěpí na velké kousky (každých 4096 bp)

Parciální, neúplné štěpení

- Používá se restriktáza, co rozpoznává 4bp sekvenci např. *Sau3AI*
- Podmínky štěpení jsou voleny tak, aby došlo k neúplnému štěpení
- Tak se vytvoří fragmenty DNA různé velikosti, z nichž některé mohou nést celé geny

Parciální (neúplný) digest (Glick a spol. 2003)

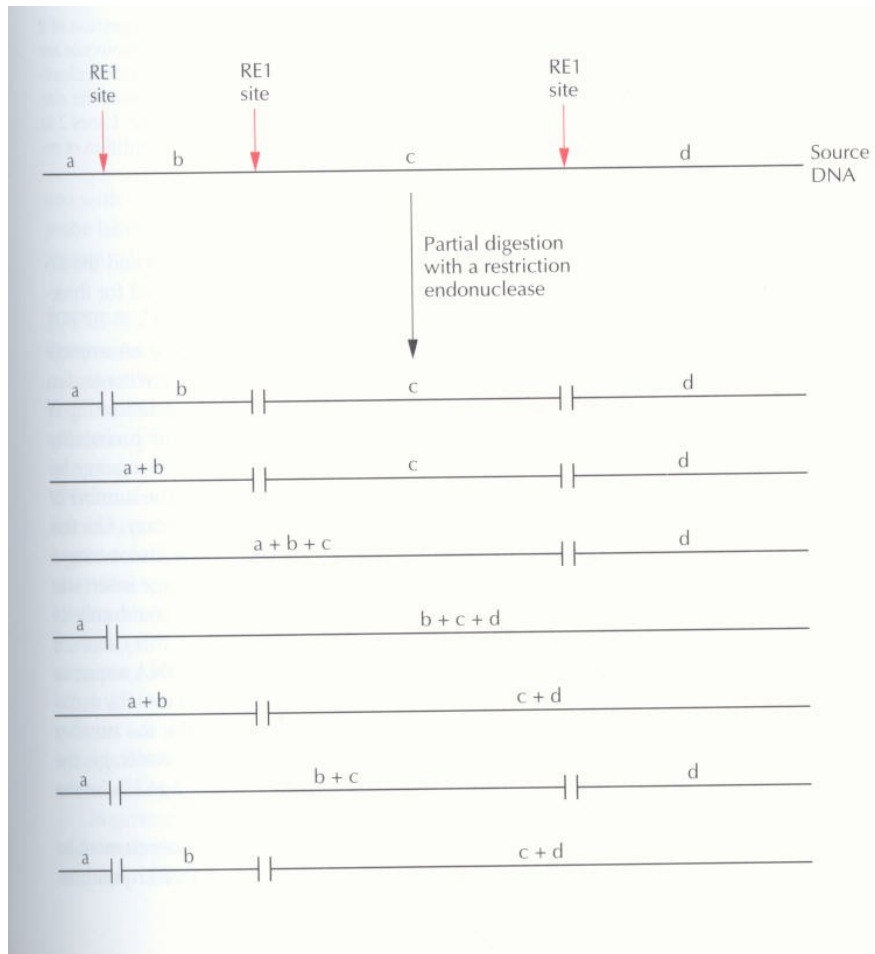


Figure 4.12 Partial digestion of a fragment of DNA with a type II restriction endonuclease. Partial digestions are usually performed by varying either the length of time or the amount of enzyme used for the digestion. In some of the DNA molecules, the restriction endonuclease has cut at all sites (each labeled RE1). In other molecules, fewer cleavages have occurred. The desired outcome is a sample with DNA molecules of all possible lengths.

Agarozová gelová elektroforéza fragmentů DNA vznikajících během štěpení restriktázou (Glick a spol.2003)

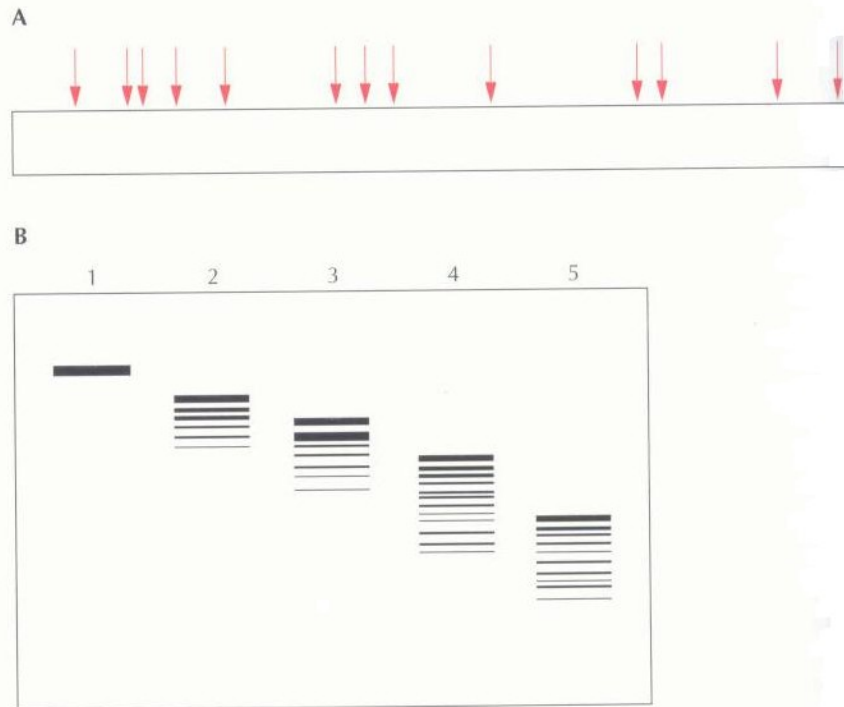


Figure 4.13 Effect of increasing the time of restriction endonuclease digestion of a DNA sample. **A.** The restriction endonuclease sites (arrows) of a DNA molecule are shown. **B.** As the duration of restriction endonuclease treatment is extended, cleavage occurs at an increased number of sites (lanes 1 to 5). Lane 1 represents the size of the DNA molecule at the time of addition of restriction endonuclease. Lanes 2 to 5 depict the extent of DNA cleavage at increasing intervals after the addition of restriction endonuclease.

Fragmenty DNA z parciálního digestu

- jsou použity pro konstrukci genomové banky
- Tím se zvětší pravděpodobnost klonování celých genů
- Některé fragmenty mohou být pro klonování příliš dlouhé
- V tom případě získáme neúplnou knihovnu

Testování (třídění) knihovny

- Znamená vyhledávání a identifikaci specifického klonu nesoucího cílovou DNA
- Každá buňka (transformant nesoucí rekombinantní DNA) po výsevu na Petriho misku vytvoří kolonii (klon identických buněk)

Metody třídění genomových knihoven tj. vyhledávání specifického klonu

- DNA/DNA hybridizace
- Imunologický test
- Proteinová aktivita
- Komplementační test

Pro třídění genomových knihoven se používají sondy

- homologní (se zcela komplementární sekvencí) např. chemicky syntetizované
- heterologní s ne zcela komplementární sekvencí DNA (např. klonovaná DNA příbuzného genu)
- Podmínky hybridizace lze volit (vysoká stringence, nízká stringence)

Vyhledávání specifického klonu pomocí DNA/DNA hybridizace

- K vyhledávání se používá DNA sonda (značený jednořetězcový fragment DNA) a jeho
- Páruje se s komplementárním úsekem jednořetězcové DNA.

Schématické znázornění DNA/DNA hybridizace (Glick a spol.2003)

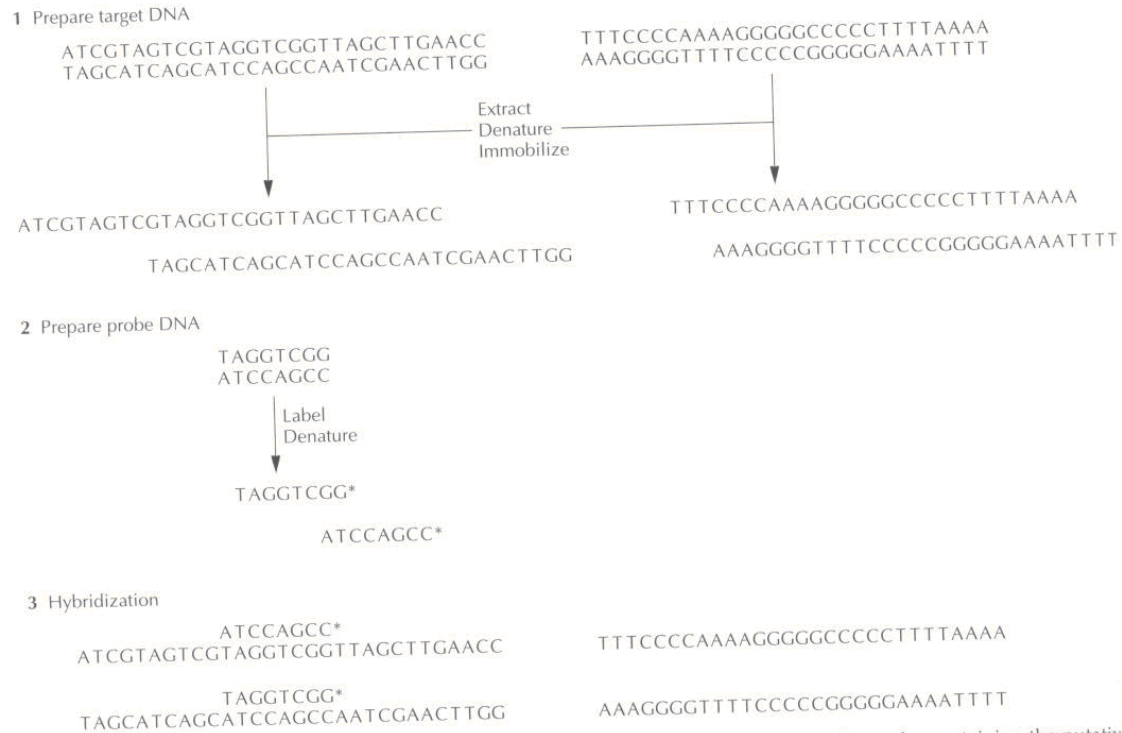
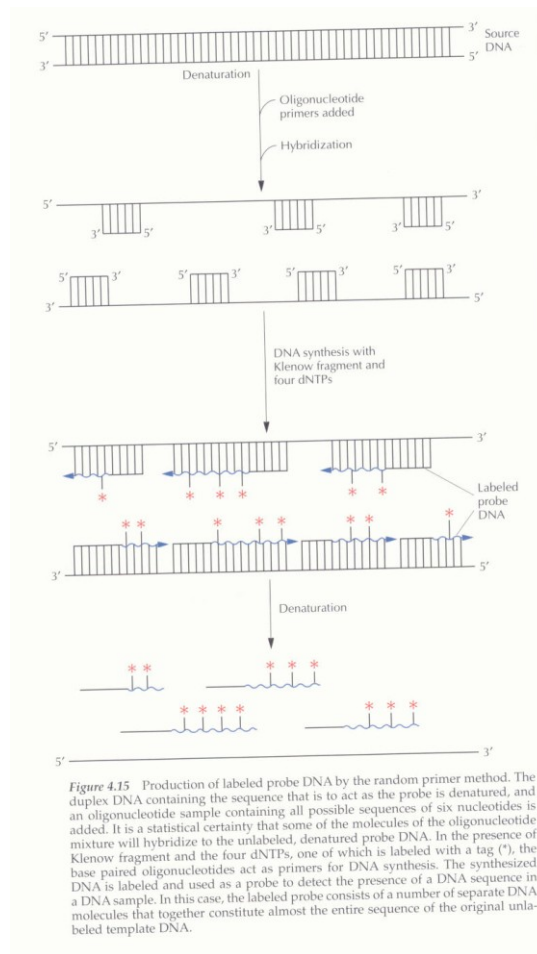


Figure 4.14 DNA hybridization. (1) The DNA of samples containing the putative target DNA is denatured and the single strands are kept apart, usually by binding them to a solid support, such as nitrocellulose or nylon membrane. (2) The probe, which is often 100 to 1,000 bp in length, is labeled, denatured, and mixed with the denatured putative target DNA under hybridization conditions. (3) After the hybridization reaction, the membrane is washed to remove unhybridized probe DNA and assayed for the presence of the labeled tag. If the probe does not hybridize, no label is detected. The asterisks (*) denote the labeled tag (signal) of the probe DNA.

Příprava DNA sondy (Glick a spol. 2003)



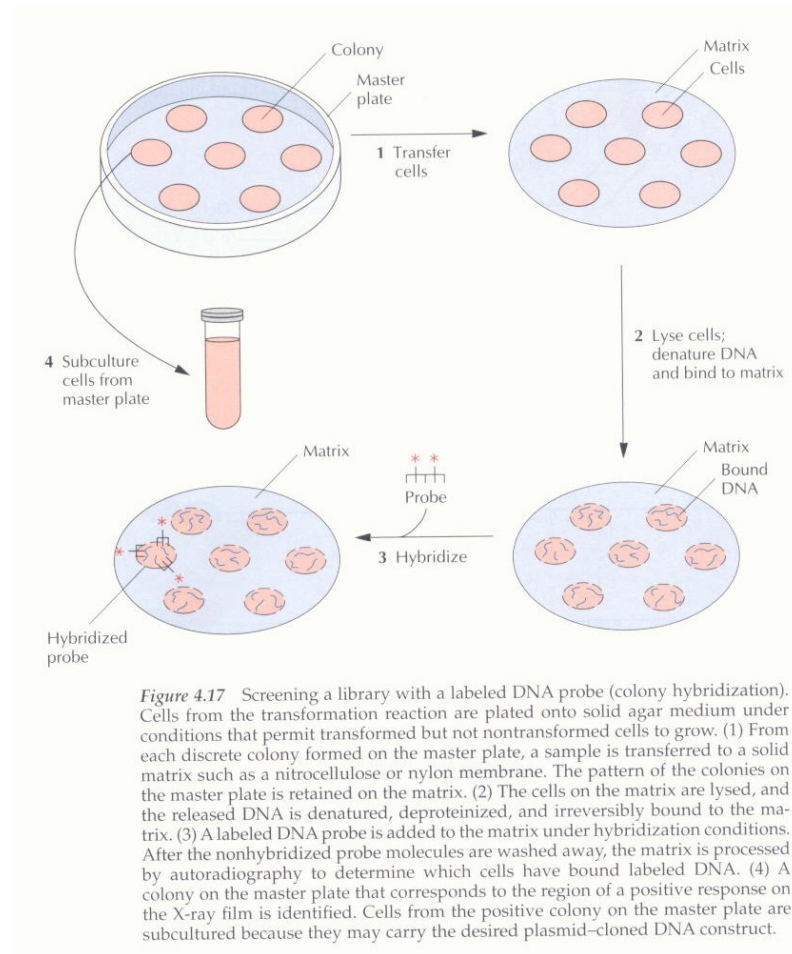
Detekce hybridizačního produktu

- Hybridizační produkt je detekován v závislosti na povaze značky, kterou sonda nese.
- Je-li DNA značena radioaktivně, je hybridizace detekována autoradiograficky.
- Je-li sonda značena neradioaktivně (např. digoxigeninem), je hybridizace detekována imunologicky.

DNA/DNA hybridizace bakteriálních kolonií

- K hybridizaci lze použít bakteriální kolonie narostlé na misce
- Kolonie jsou přeneseny na nitrocelulózovou membránu, lyzovány, denaturovány
- DNA je na membráně imobilizovaná, je přidána DNA sonda a provedena DNA/DNA hybridizace
- Hybridizační produkt je detekován podle použité značky
- Viz Obr.

DNA/DNA hybridizace kolonií (Glick a spol.2003)



Pozitivní signál po DNA/DNA hybridizaci

- Může dát větší počet kolonií (klonů)
- Důležité je určit, které klony dají celou sekvenci hledaného genu
- Izoluje se rekombinantní DNA (plasmid) a insert se vyštěpí restriktázou
- Pomocí gelové elektroforézy se určí délka insertu
- Pomocí fyzikální mapy se identifikují inserty (fragmenty) se stejnými a překrývajícími se sekvencemi
- Fragmenty s překrývajícími se sekvencemi lze spojit ligací ve funkční gen

Kompletní gen lze identifikovat

- Pomocí sekvencování –
- Podle startovacího a stop kodonu a
- Dostatečně dlouhé řady nukleotidů mezi nimi

Záruku, že v knihovně nalezneme celý gen nemáme

- V případě neúspěchu lze knihovnu připravit pomocí jiné nukleázy a
- Třídění provést buď s původní sondou nebo se sondou odvozenou z první knihovny

Pravděpodobnost, že některé klony knihovny ponesou
kompletní gen se zvětší

- Klonováním DNA fragmentů větších než je průměrná velikost prokaryontního genu
- Genomové knihovny řady organismů lze získat komerčně

Třídění genomové banky imunologickým testem

- V imunologickém testu se využívá reakce protilátky s antigenem (klonovaným proteinem)
- Imunologický test lze použít v případě, že
- dochází k transkripci a translaci klonované DNA
- Máme k dispozici protilátku vůči hledanému proteinu

Třídění imunologickým testem

- se technicky podobá DNA/DNA hybridizaci
- Bakteriální klony knihovny se nechají narůst na miskách
- Přenesou se na matrici, buňky se lyzují a uvolněné proteiny se imobilizují
- Přidá se primární protilátka, nechá se navázat
- Přidá se sekundární protilátka s přikonjugovaným enzymem (alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza)
- Přidá se substrát a odečte se např. barevná reakce
- (substrátem pro alkalickou fosfatáza je 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát-Nitro-Blue-Tetrazolium: BCIP-NBT)

Třídění genomové knihovny imunologickým testem (Glick a spol.2003)

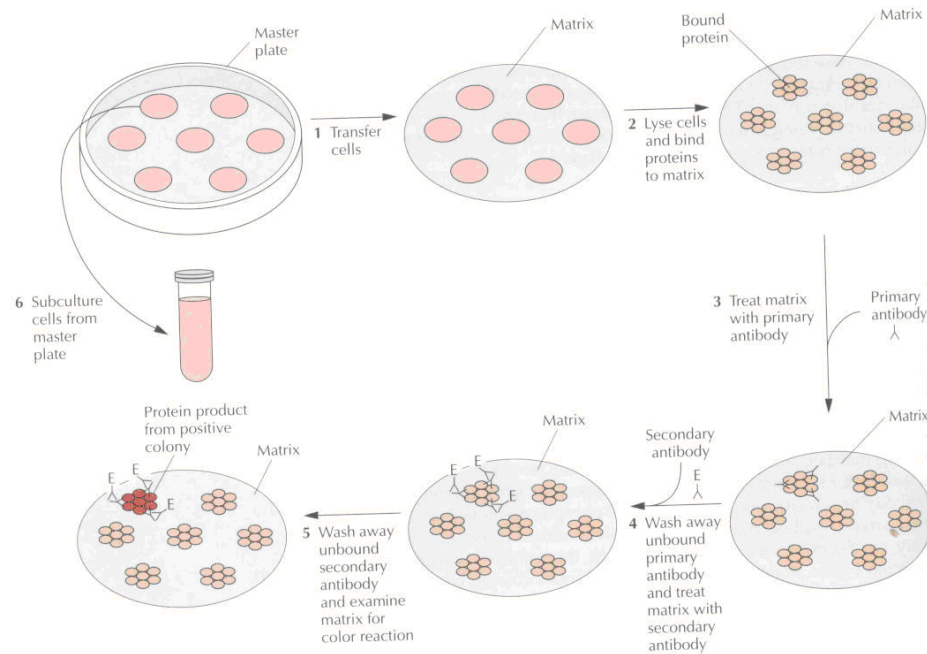


Figure 4.18 Immunological screening of a gene library (colony immunoassay). Cells from the transformation reaction are plated onto solid agar medium under conditions that permit transformed but not nontransformed cells to grow. (1) From the discrete colonies formed on this master plate, a sample from each colony is transferred to a solid matrix such as a nitrocellulose or nylon membrane. (2) The cells on the matrix are lysed, and their proteins are bound to the matrix. (3) The matrix is treated with a primary antibody that binds only to the target protein. (4) Unbound primary antibody is washed away, and the matrix is treated with a secondary antibody that binds only to the primary antibody. (5) Any unbound secondary antibody is washed away, and a colorimetric reaction, which can occur only if the secondary antibody is present, is carried out. (6) A colony on the master plate that corresponds to a positive response on the matrix is identified. Cells from the positive colony on the master plate are subcultured because they may carry the plasmid-insert DNA construct that encodes the protein that binds the primary antibody.

Třídění pomocí proteinové aktivity

- lze využít tehdy, když se v buňce syntetizuje enzym klonovaný cizorodým genem a
- tento enzym není normálně hostitelskou buňkou syntetizován

Funkční gen lze identifikovat pomocí proteinové aktivity

- Výsevem na misky s vhodným substrátem
- Např. geny pro alfa amylázu z různých organismů byly identifikovány výsevem genomové knihovny *E. coli* na médium obsahující škrob.
- Pomocí selektivního barvení byly identifikovány kolonie, které tento substrát využívají.

Třídění pomocí komplementačního testu

- Jestliže hledané geny kódují produkt esenciální (nezbytný) pro růst
- Knihovna je připravena v mutantních buňkách, které rostou pouze na plnohodnotném mediu a nerostou na minimálním mediu (bez esenciálního substrátu)
- Buňky schopné růst na minimálním mediu (bez esenciálního substrátu) získaly rekombinantní plasmid s funkčním genem

Komplementační test byl použit

- pro izolaci např. genů kódujících biosyntézu aminokyselin, vitaminů, antibiotik, genů pro utváření nodulů na kořenech motýlokvětvých rostlin u bakterií fixujících vzdušný dusík apod.
- Komplementační test je uveden na následujícím obrázku

Komplementační test – schéma funkční komplementace (Glick a spol.2003)

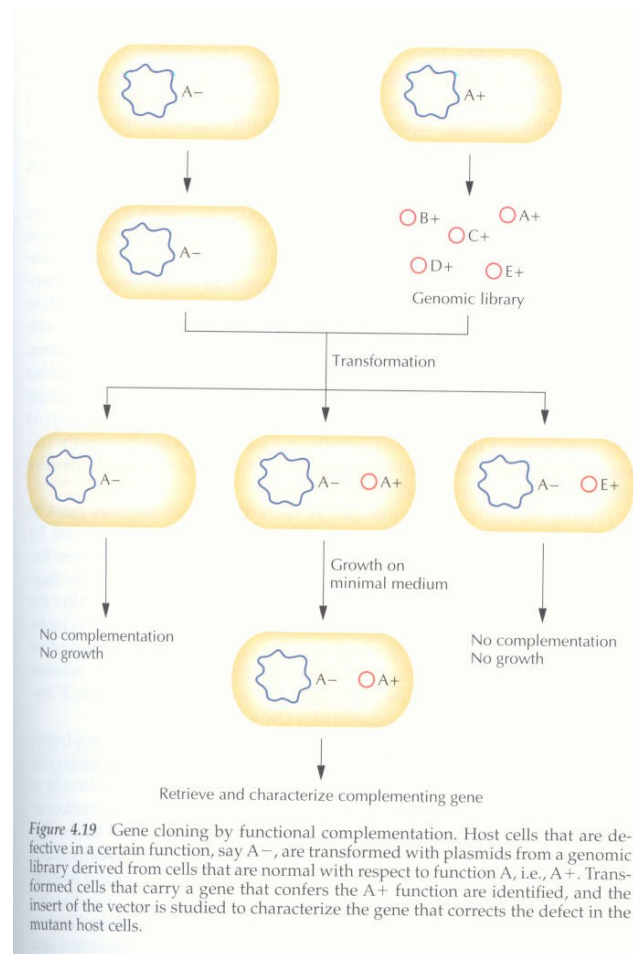


Figure 4.19 Gene cloning by functional complementation. Host cells that are defective in a certain function, say A^- , are transformed with plasmids from a genomic library derived from cells that are normal with respect to function A , i.e., A^+ . Transformed cells that carry a gene that confers the A^+ function are identified, and the insert of the vector is studied to characterize the gene that corrects the defect in the mutant host cells.