

Molekulární biotechnologie

Č.4

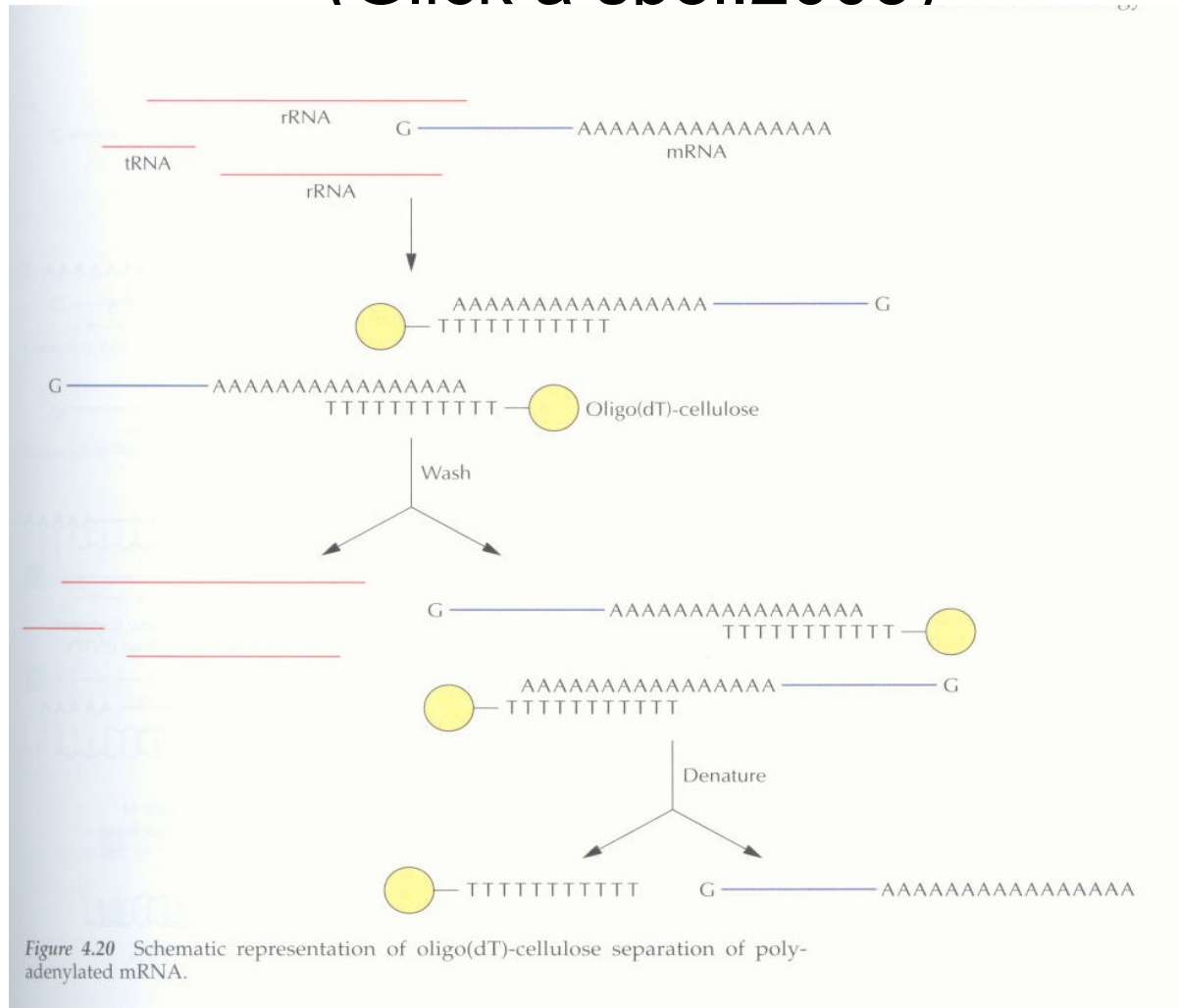
Klonování DNA sekvencí, které kódují eukaryotické proteiny

- Se odlišuje od klonování genů kódujících prokaryotické proteiny
- Eukaryotické geny obsahují exony a introny
- Prokaryotické buňky nejsou schopny odstraňovat introny z transkribovaných RNA molekul (hnRNA)
- Vychází se z mRNA

Funkční eukaryotická mRNA bez intronů

- Se nachází v cytoplasmě eukaryotických buněk
- má na 5'konci G čepičku a na 3'konci polyadenylovaný zbytek (několik set A)
- polyA konce lze použít k oddělení frakce mRNA od molekul rRNA a tRNA

Oddělení frakce funkční eukaryotické mRNA na koloně s nosičem s navázaným tyminovými zbytky (Glick a spol.2003)



Navázání a eluce mRNA z kolony

- Molekuly s poly(A) se navážou na poly(T)
- Ostatní molekuly projdou kolonou
- Kolona se promyje
- mRNA je z kolony eluována pomocí pufru, který štěpí vodíkové vazby mezi A a T

Speciální postup klonování eukaryotických genů

- Z buněk (z celkové RNA) se izoluje mRNA
- mRNA je přepsána (reverzní transkriptázou) do komplementární DNA (cDNA)
- cDNA je klonována do vektoru (na tupu)
- Konstrukt vektor-cDNA je transformován do buněk *E.coli*

Přepis mRNA do cDNA

- Využívá 2 různé polymerázy: reverzní transkriptázu a Klenowův fragment DNA pol-I (postrádá 5'-3' exonukleázovou aktivitu)
- Jako primer pro reverzní transkriptázu slouží oligo-dT
- Po syntéze prvního DNA řetězce dojde k ohybu vlákna a k syntéze druhého řetězce, který začíná syntézu od vlásenkové smyčky
- Řetězec RNA v komplexu RNA/DNA je degradován pomocí RNasy H
- S1 nukleáza štěpí řetězec v místě vlásenkové distorze
- Výsledkem je fragment dvouřetězcové cDNA

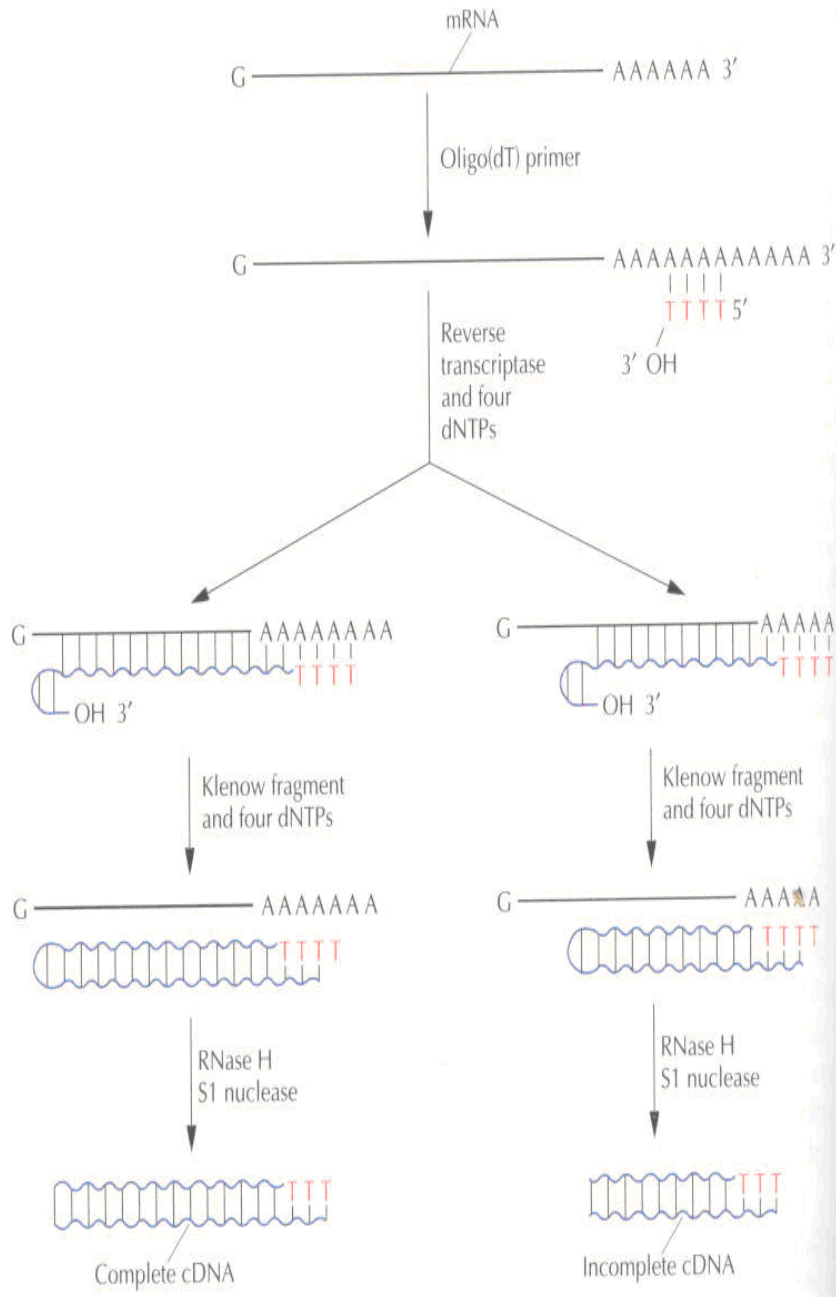


Figure 4.21 Synthesis of cDNA. Oligo(dT) primer is added to a purified mRNA preparation, and reverse transcriptase with the four dNTPs is used for the production of DNA from the RNA template. Reverse transcriptase does not always produce full-length cDNA copies of the RNA from every template molecule (lower right). The looping back of the growing DNA strand produced by the reverse transcriptase provides a 3' hydroxyl group for the Klenow fragment to complete the synthesis of the second strand, using the first DNA strand as a template. After synthesis of the second strand is completed, the mRNA is hydrolyzed with the enzyme RNase H, and the DNA is treated with S1 nuclease to produce blunt-ended linear molecules without hairpin loops.

Syntéza cDNA řetězce *in vitro*

- Bývá často neúplná z důvodu předčasného ohybu prvního řetězce

Vzorek cDNA

- Představuje směs kopií nejčastěji se vyskytujících mRNA v původním vzorku

Knihovna cDNA (banka cDNA)

- Soubor klonů (nesoucích rekombinantní plasmidovou DNA), do nichž jsou naklonovány molekuly cDNA připravené zpětnou transkripcí mRNA izolované z buněk organismu

Knihovna genová expresivní

- Knihovna cDNA vytvořená expresivními vektory (plasmidy s promotorem), pomocí nichž lze klonované sekvence vyjádřit (exprimovat) do proteinů

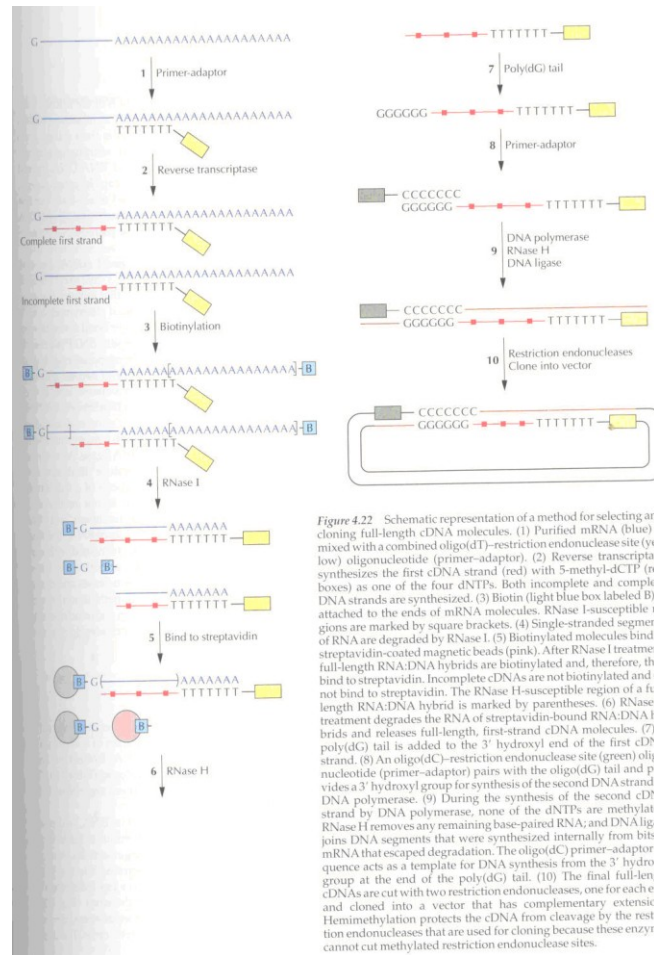
Pro identifikaci klonů nesoucích specifický konstrukt plasmid-cDNA je knihovna tříděna

- DNA/DNA hybridizací s využitím DNA sondy
- Imunologicky (je-li cDNA umístěna za promotor, který zajistí transkripci a translaci v *E.coli*)

U pozitivních klonů musí být

- Sekvencováním ověřeno, že nesou úplnou sekvenci cílového genu
- U většiny klonovacích vektorů není zaručeno, že po inserci cDNA budou nukleotidy ve správném čtecím rámci a že budou řídit syntézu proteinu se správnou sekvencí aminokyselin
- Protože syntéza cDNA bývá neúplná

Metoda umožňující selekci kompletních cDNA molekul (Glick a spol.2003)



Ochrana cDNA před štěpením restriktázami použitými pro klonování

- Pro syntézu prvního cDNA řetězce reverzní transkriptázou je v dNTP místo dCTP použit 5-methyl-dCTP
- Díky tomu se syntetizuje hemimetylovaná cDNA
- Pro klonování se použijí enzymy, které neštěpí metylované restriční místo

Klonovací kapacita vektoru - definice

- Maximální délka fragmentu DNA (insertu), který se ještě může začlenit do vektoru a stabilně se v něm udržovat

Klonovací kapacita plasmidů

- V plasmidech (pBR322, pUC19) lze klonovat jen fragmenty DNA určité délky
- Plasmidy mají klonovací kapacitu 0.1-10 kb

Vektory pro klonování dlouhých úseků DNA

- Pro klonování dlouhých úseků DNA byly připraveny další vektory
- Vektory odvozené od bakteriálních virů (fága lambda)
- Kosmidy
- Umělé (arteficierní) chromozomy

Klonovací kapacita různých vektorů – přehled (Glick a spol. 2003)

Table 4.6 Insert capacities of some commonly used vector systems

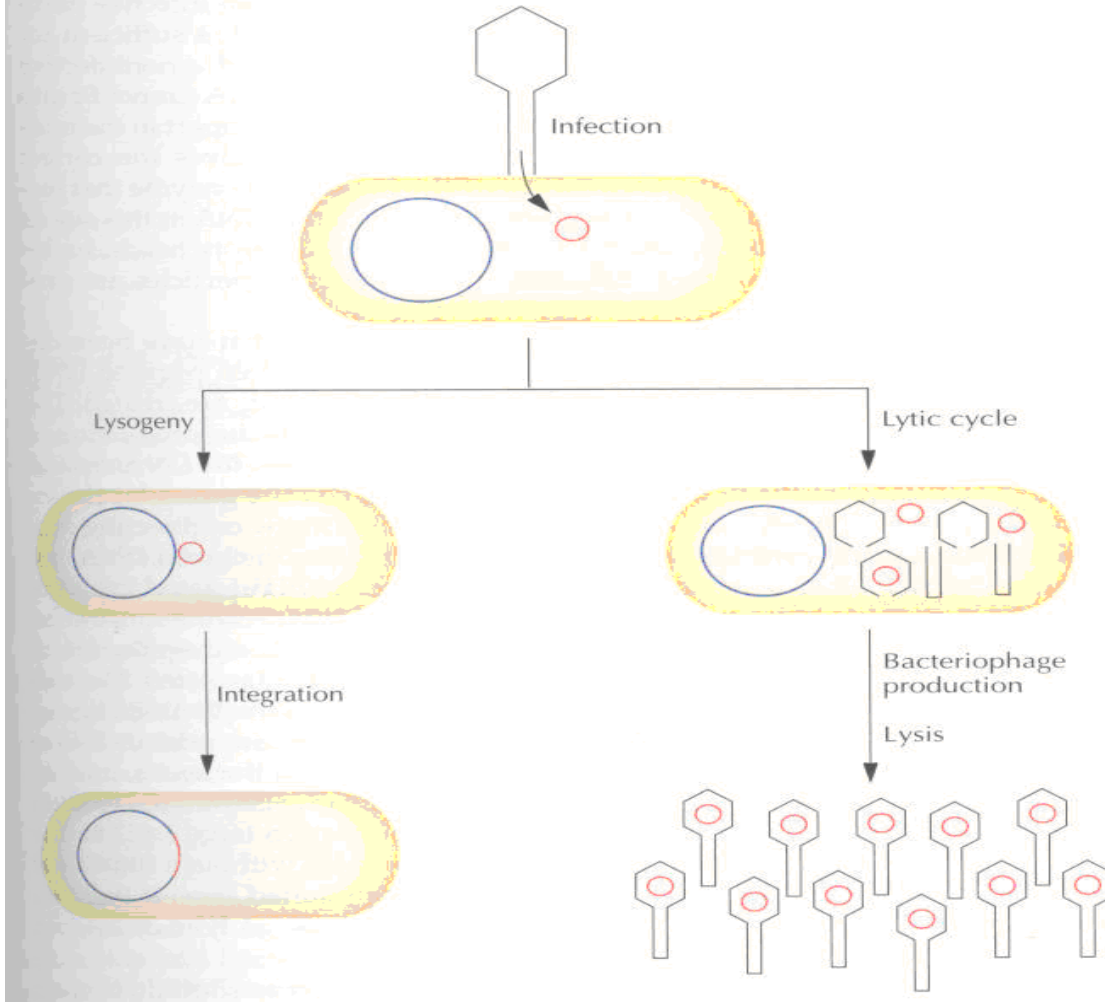
Vector system	Host cell	Insert capacity (kb)
Plasmid	<i>E. coli</i>	0.1–10
Bacteriophage λ	λ / <i>E. coli</i>	10–20
Cosmid	<i>E. coli</i>	35–45
Bacteriophage P1	<i>E. coli</i>	80–100
BAC	<i>E. coli</i>	50–300
P1 bacteriophage-derived artificial chromosome	<i>E. coli</i>	100–300
Yeast artificial chromosome	Yeast	100–2,000
Human artificial chromosome	Cultured human cells	>2,000

Příprava vektorů pro klonování dlouhých fragmentů DNA odvozených od bakteriofága lambda (*E. coli*)

- Vychází ze znalosti životního cyklu fága lambda

Životní cyklus bakteriofága lambda (Glick a spol.2003)

Figure 4.23 Life cycle of bacteriophage λ . Lysogeny occurs when the bacteriophage λ genome (red) becomes integrated into the host chromosome (blue); otherwise, the lytic cycle is initiated, resulting in the production and release by cell lysis of about 100 bacteriophage particles about 20 minutes after infection.



Lytický cyklus a replikace fágové DNA v buňce

- Při lytickém cyklu fága dochází k replikaci fágové DNA v buňce
- DNA fága lambda se replikuje za vzniku konkatemerů – dlouhých molekul DNA
- Z konkatemerů je v cos místech odštěpována DNA fágového virionu (enzymem lokalizovaným v místě vstupu DNA do hlavičky)
- a balena do fágové hlavičky
- Po nabalení DNA se připojí fágový bičík a vznikne infekční částice

Lytický cyklus - balení DNA do fágové hlavičky (Glick a spol.2003)

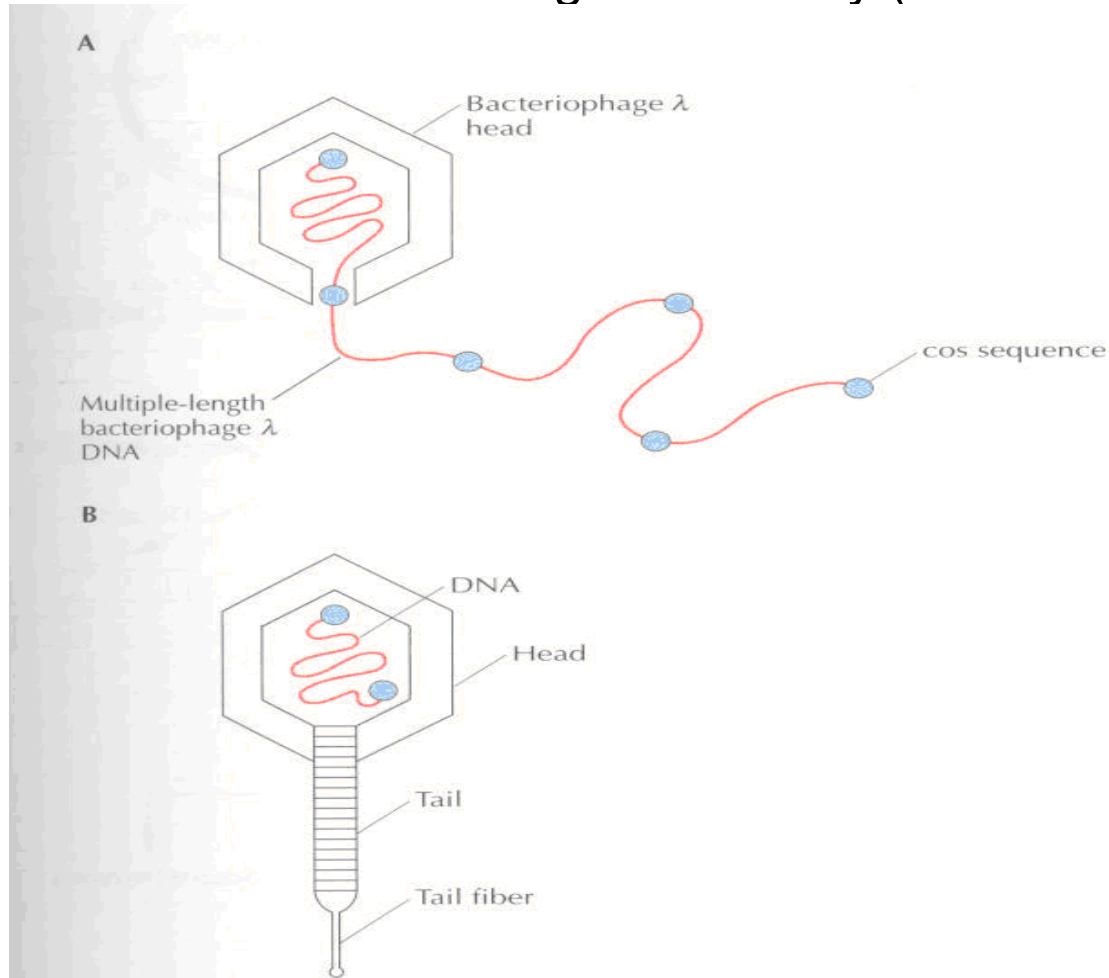


Figure 4.24 Packaging of bacteriophage λ DNA into heads during the lytic cycle. **A.** DNA replication from the circular form of bacteriophage λ creates a linear form that has contiguous, multiple lengths (concatemers) of bacteriophage DNA with units of approximately 50 kb each. **B.** Each newly assembled head is filled with a 50-kb unit of λ DNA before the tail assembly is attached.

Lytický cyklus – ukončení

- Po sestavení infekčních fágových částic v cytoplasmě buňky dojde
- k lyzi bakteriální buňky, k uvolnění fágových částic a k infekci dalších buněk.
- To se v tekutém kultivačním médiu projeví projasněním média.
- Na pevném médiu (agarová miska) fágové částice tvoří na vrstvě indikátorových bakterií *E. coli* tzv. plaky.

Pro lytický cyklus fága lambda nejsou potřeba

- geny pro integraci a excisi fágové DNA do bakteriálního chromozomu (oblast I/E)
- byly uvolněny pro klonování
- Jedná se o 15 – 20 kb

Fág lambda a klonování

- Jsou konstruovány rekombinantní molekuly DNA fága lambda nesoucí cizorodou DNA (38 až 52 kb)
- Cizorodá DNA se množí v lytickém cyklu fága jako rekombinantní DNA fága lambda
- Vytvářejí se fágové částice (viriony), které
- tvoří plaky (na vrstvě citlivých bakterií)
- Využívají se jako inserční vektory nebo substituční vektory

Klonovací vektor EMBL3

- Substituční vektor odvozený od fága lambda

Vektor EMBL3 (DNA)

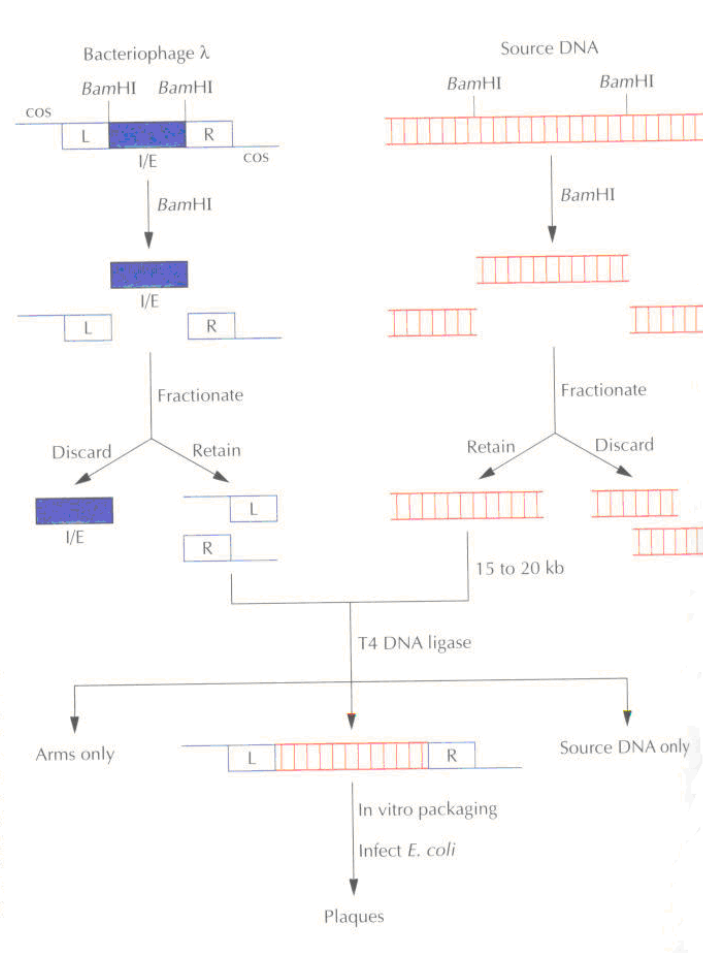
- Má 2 *Bam*HI místa, která ohraničují oblast I/E
- Po štěpení vzniknou 3 fragmenty DNA:
- levé rameno (L oblast) s geny pro syntézu hlavičky a bičíku
- pravé rameno (R oblast) s geny pro DNA replikaci a buněčnou lyzi
- prostřední fragment s geny pro integraci a excisi (I/E)
- Cílem je nahradit fragment (I/E) klonovanou DNA (15 až 20 kb)

Klonovaná DNA

- Je štěpena *Bam*HI
- Jsou izolovány fragmenty DNA o velikosti 15-20 kb
- Ty jsou smíchány s vektorem EMBL3 naštěpeným restriktázou *Bam*HI
- Je přidána T4 ligáza
- a připravena rekombinantní DNA

Štěpení a klonování cizorodé DNA do vektoru EMBL3 (Glick a spol.2003)

Figure 4.25 Bacteriophage λ cloning system. Bacteriophage λ is engineered to have two *Bam*HI sites that flank the integration/excision region (I/E). For cloning, the source DNA is cut with *Bam*HI and fractionated by size to isolate pieces that are about 15 to 20 kb long. The bacteriophage λ DNA is also cut with *Bam*HI and fractionation removes the I/E segment. The left (L) and right (R) arms plus the 15- to 20-kb source DNA molecules are mixed with T4 DNA ligase. The ligation reaction will produce a number of different DNA molecules including ligated arms only; combined L and R arms only; and molecules that have a source DNA molecule flanked by L and R arms. The latter molecules are packaged into bacteriophage heads *in vitro* and infective particles are formed after the addition of tail assemblies. The recombinant bacteriophage λ are perpetuated by infection of *E. coli*. Some 50-kb source DNA ligation products may be packaged into heads but since this DNA lacks both a functional origin of replication and *cos* ends, it cannot be perpetuated. Other ligation products are either too small or too large to be packaged.



Infekce buněk rekombinantní fágovou DNA

- Ke směsi lze přidat prázdné fágové hlavičky a bičíky (sbalovací extrakt)
- dojde k balení DNA do fágových hlaviček a k tvorbě kompletních virových částic, které lze použít k infekci bakteriálních buněk
- Účinnost takového přenosu je o několik řádů vyšší než transformace buněk plasmidovou DNA

Elektrotransformace

- Rekombinantní fágová DNA může být transformována do bakteriálních buněk metodou elektrotransformace
- Pro transformaci (i infekci) se používají buňky *E. coli*, které neumožňují růst fága, který opětovně získal oblast I/E.

Na nárůstu buněk se tvoří plaky

- Které jsou analyzovány na přítomnost rekombinantní DNA
- Každá plaka představuje fágový klon
- Na 1 Petriho misce lze současně analyzovat několik set (až 1000) plak
- (V jedné zkumavce lze uchovávat celou genomovou knihovnu několika milionů rekombinantních klonů)

Selekce rekombinantní fágové DNA se provádí

- Hybridizací fágových plak
- na membránu jsou přeneseny plaky, fágové částice jsou lyzovány, DNA uvolněna, přichycena a je provedena hybridizace s DNA sondou a detekce značky
- Immunologickým testem (pomocí specifické protilátky je detekován protein, kódovaný cizorodým genem, který je zabudován ve fágové hlavičce)

Kosmidy

- Spojují výhody plasmidových vektorů a vektorů odvozených od fága lambda
- Mohou být v *E. coli* uchovávány jako plasmidy
- Mohou nést delší fragmenty cizorodé DNA než fág lambda

Kosmid pLRF-5

- Je dlouhý 6 kb
- Má 2 cos místa fága lambda
- oddělená 1 cílovým místem pro restriktázu *ScaI*
- Mnohočetné klonovací místo pro 6 restriktáz
- Plasmidový počátek replikace *ori*
- Gen pro tetracyklin resistenci jako selekční marker

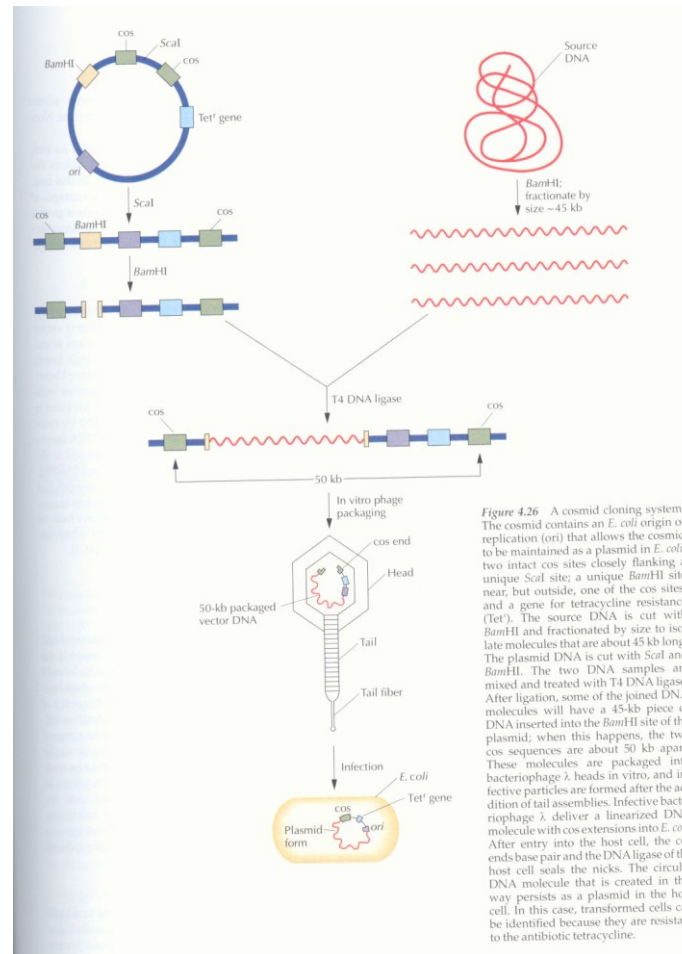
Klonovací kapacita kosmidu pLRF-5

- Je asi 40 kb
- Fragmenty DNA této délky jsou připraveny neúplným štěpením cílové DNA restriktázou (např. *Bam*HI)
- a centrifugací v sacharózovém gradientu

Použití pRLF-5 jako klonovacího vektoru

- DNA pRLF-5 je štěpena restriktázou *ScaI* (linearizace) a potom *BamH* (klonujeme-li do tohoto místa)
- Vzorek je smíchán s fragmenty cizorodé DNA a ligován T4 ligázou.
- Molekuly, které získaly 40 kb insert, mají cos místa vzdálená asi 50 kb a mohou být účinně baleny do fágových hlaviček *in vitro*.

Klonování cizorodé DNA v kosmidu pLRF-5 (Glick a spol.2003)



Transformace a selekce transformantů nesoucích rekombinantní kosmid pRLF-5

- Elektrotransformace nebo po vytvoření funkčních fágových částic injekce DNA do hostitelských buněk citlivých na tetracyklin
- V hostitelských buňkách se cos místa spojí a vytvoří se kruhová molekula DNA
- Kruhová molekula DNA je stabilní, v buňkách se množí a uchovává jako plasmid
- Gen pro rezistenci na tetracyklin umožňuje selekci buněk nesoucích kosmid (po výsevu na misky s tetracyklinem)

Výhoda použití kosmidů

- Větší klonovací kapacita
- Dají se klonovat operony (soubory genů kódujících určitou metabolickou dráhu)
- Dají se klonovat dlouhé eukaryontní geny
- Větší insert ve vektoru umožňuje testování menšího počtu klonů

Další vektory odvozené od bakteriofágů

- Např. kosmid odvozený od fága P1 *E. coli* (115 kb DNA) má klonovací kapacitu 80 až 100 kb cizorodé DNA
- Nazývá se PAC vektor (fágový umělý, arteficierní, chromozom)

BAC vektory – bakteriální arteficierní (umělé) chromozomy

- Jsou odvozeny od konjugativního fertilitního faktoru F *E. coli*
- Mají vysokou klonovací kapacitu (100 až 350 kb, i 1/4 chromozomu *E. coli*)
- Jsou stabilní (bez vnitrobuněčné rekombinace a s nízkou hladinou přeskupování cizorodé DNA)

BAC jako klonovací vektor

- Je dlouhý 7,4 kb
- Má mnohočetné klonovací místo v části genu pro beta-galaktosidázu (jako pUC19)
- Selekční marker (gen pro rezistenci na chloramfenikol)

Transformace a selekce buněk nesoucích rekombinantní BAC

- Rekombinantní molekuly jsou transformovány do vhodného kmene *E. coli*, citlivého na chloramfenikol a nesoucího část genu kódujícího N terminální část beta-galaktozidázy
- Transformanty jsou vysévány na medium s chloramfenikolem, IPTG a Xgal
- Pro rozlišení buněk nesoucích rekombinantní a nerekombinantní BAC se využívá alfa-komplementace (stejně jako pUC19) (buňky nesoucí rekombinantní BAC rostou bíle)