

RENČÍN

A NAPIŠEŠ ZA TŘEST DVĚSTĚKRÁT NEBUDU JIŽ VÍCE GENOVĚ INŽENÝROVAT!

# **Příprava rekombinantních molekul pro diagnostické účely**

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2012**

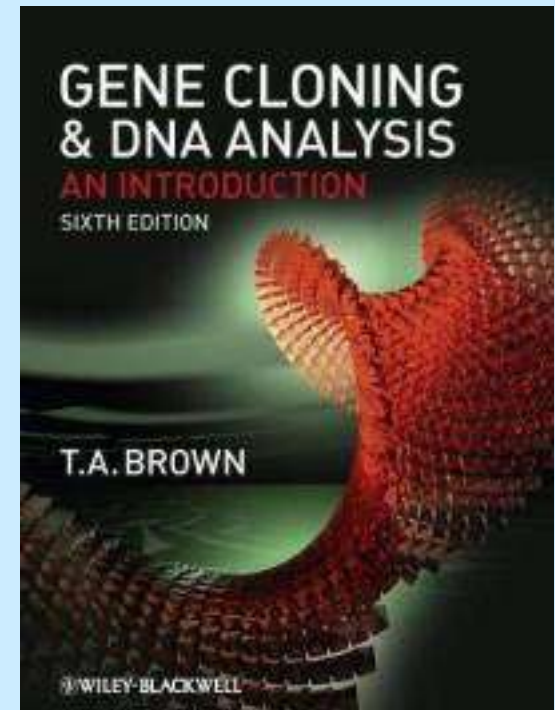
# ***Obsah přednášky***

- 1) Pojem rekombinantní DNA**
- 2) Historické milníky**
- 3) Proč je klonování genů důležité i v mikrobiologii?**
- 4) Jak se klonování genů provádí**
- 5) Metody detekce klonovaných genů**
- 6) Dot blot a Southern blot**
- 7) Identifikace na úrovni translace**



## *Doporučená literatura*

**Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition**



**K procvičování nachystat tabulku  
genetického kódu**

# ***Co je to rekombinantní DNA?***

**Rekombinantní DNA je DNA sekvence připravená v laboratoři a obsahující části z různých zdrojů**

**Rekombinantní DNA se zpravidla nevyskytuje u organismů přirozeně**

**Rekombinantní DNA se využívá v mnoha aplikacích**

# ***Proč vůbec můžou existovat rekombinantní DNA?***

- 1) Všechny organismy mají společný původ**
- 2) Genetický kód je univerzální napříč živými systémy**
- 3) Transkripční a translační aparáty jsou podobné**

**Proto můžeme jednotlivé části DNA mezi sebou zaměňovat**

# ***Několik historických milníků I***

**1865 - J.G. Mendel**

- **pravidla vysvětlující dědičnost**

**1900 - DeVries, Correns a Tschermak**

- **objevili nezávisle a formulovali Mendelovy zákony dědičnosti**

**1910 – Thomas Hunt Morgan**

- **geny jsou umístěny na chromozómech - *Drosophilla melanogaster***

# ***Několik historických milníků II***

**1922 – Morgan a kol.**

- **technika mapování genů – pozice 2 000 genů na 4 chromozómech *Drosophilla melanogaster***

**1944 – Avery, MacLeod, MacCarty**

- **genetickým materiálem je DNA**

**1953 – Watson a Crick**

- **popsali strukturu DNA a vysvětlili její základní biologické funkce**

**1966 – Nirenberg, Khorana, Ochoa**

- **popsali genetický kód**



# ***Několik historických milníků III***

**1971-1973**

- **Vznikají metodiky rekombinantní technologie**

**1973**

- **V bakteriálních buňkách byl naklonován první živočišný gen z DNA žáby *Xenopus laevis***

**1977**

- **Byl naklonován gen pro první lidský protein do bakterií - rekombinantní inzulin, na trhu v roce 1982**

# ***Několik historických milníků IV***

**1996**

- byl sekvenován kompletní genom *Saccharomyces cerevisiae*
- byla sekvenována první archaebakterie *Metanococcus jannaschi*

**1997**

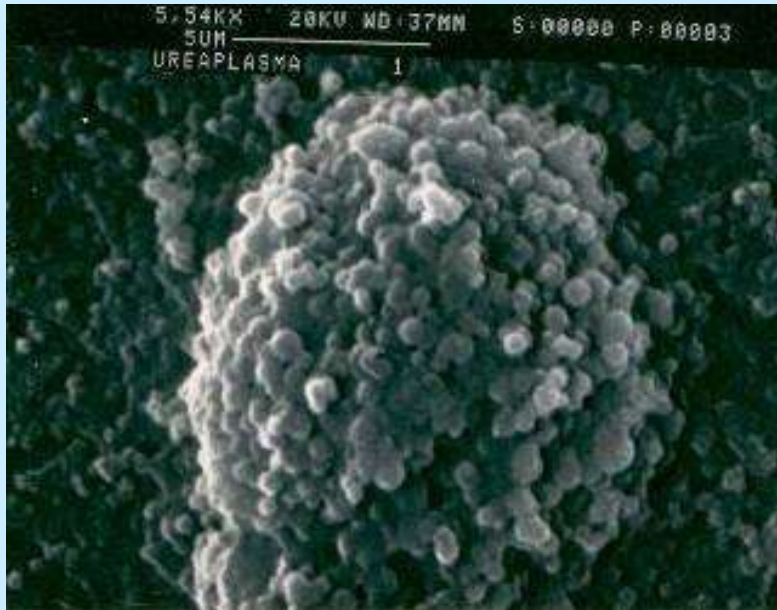
- byl sekvenován kompletní genom *Escherichia coli* (4,6 x 10<sup>6</sup> bp, 4 000 genů)

**2010**

- byl vytvořen první syntetický organismus

# Vytvoření umělého života

Synteticky a genovým inženýrstvím připraven  
genom *Mycoplasma genitalium*



- **kolem 600 000 nukleotidů**
- **517 genů**
- **podpisy**

(<http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=3244>)

# ***Základní aplikace rekombinantní DNA***

- 1) Identifikace genů**
- 2) Sledování funkce genů**
- 3) Studium regulace genové exprese**

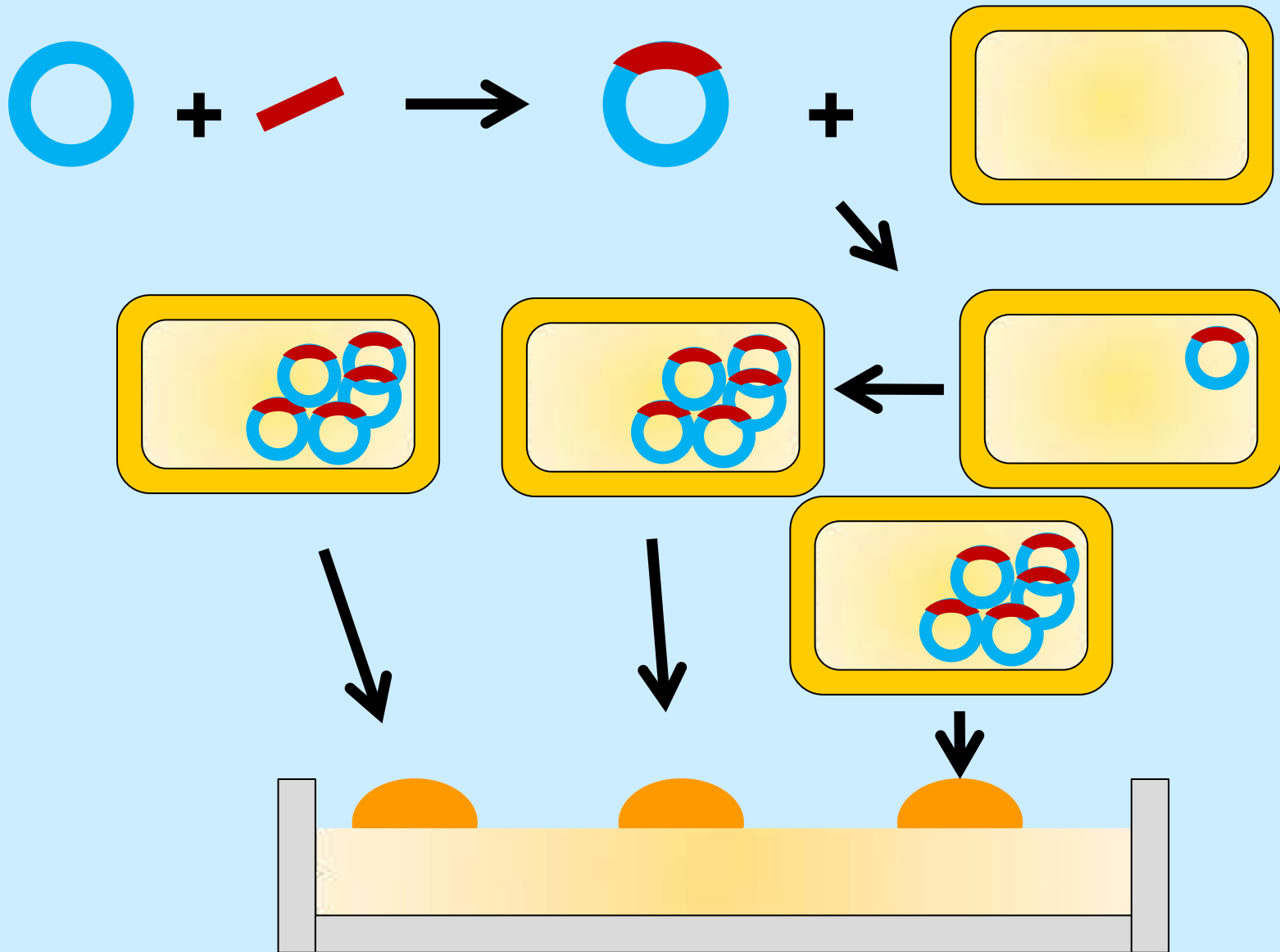
# ***Rekombinantní DNA vzniká klonováním***

- 1) DNA fragment je vložen do vektoru**
- 2) Vektor s fragmentem (rekombinantní DNA) je transformován do hostitele**
- 3) V hostiteli se rekombinantní DNA namnoží**
- 4) Pokud se hostitel rozmnožuje, množí se i rekombinantní DNA**
- 5) Po celé řadě množení vzniká klon**

- 1) Každá buňka klonu obsahuje jednu nebo více kopií rekombinantní molekuly**
- 2) Gen nesený rekombinantní molekulou je tzv. klonovaný**

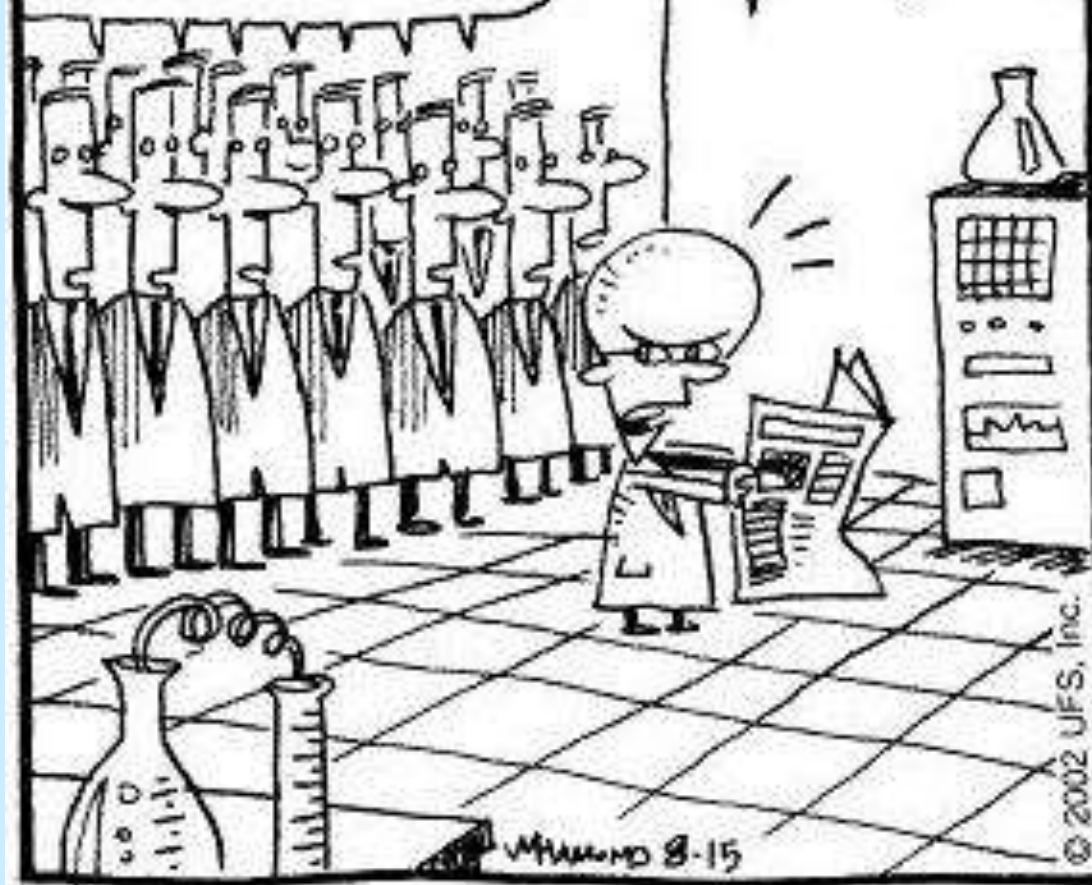


# Základní schéma klonování



IF THEY WANT TO BAN CLONING  
RESEARCH, THEY SHOULD AT  
LEAST PUT IT TO A VOTE! DON'T  
— YOU THINK?!

I AGREE, BOSS...





# *Co je potřeba pro klonování genů*

- **vlastní gen – fragment DNA**
  - **vektor – plasmid, fág, kosmid**
  - **hostitel – příjemce rekombinantní DNA**
- 
- **inzert = gen začleněný do vektoru**
  - **rekombinantní DNA = vektor s inzertem**

# ***Důsledek klonování genů = transformace***

**Permanentní dědičná změna v genetickém materiálu buňky způsobená přijetím a začleněním cizí genetické informace**

- **schopnost replikace**
- **schopnost exprese**

## **Zdroje cizí genetické informace**

**živočišný**

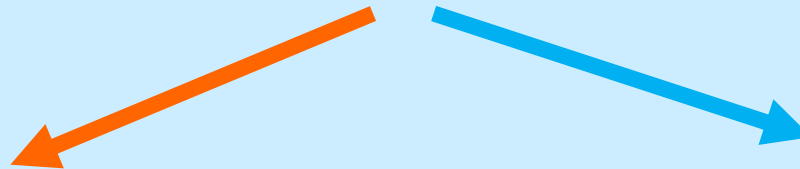
**rostlinný**

**mikrobiální**

**syntetický**

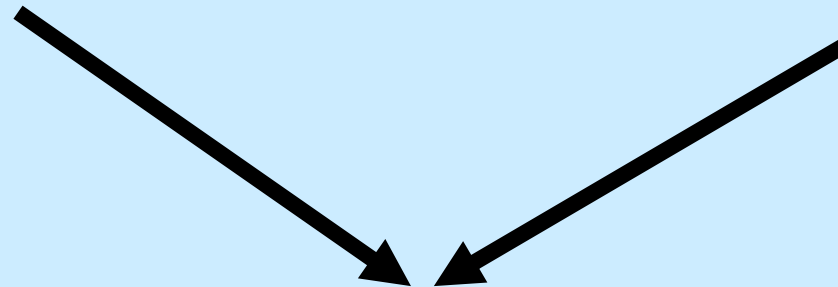
# *Jak začít klonovat?*

**Izolovat DNA v nativním stavu**



**Opracovat enzymy**

**Provést PCR**



**Naklonovat do vektoru**

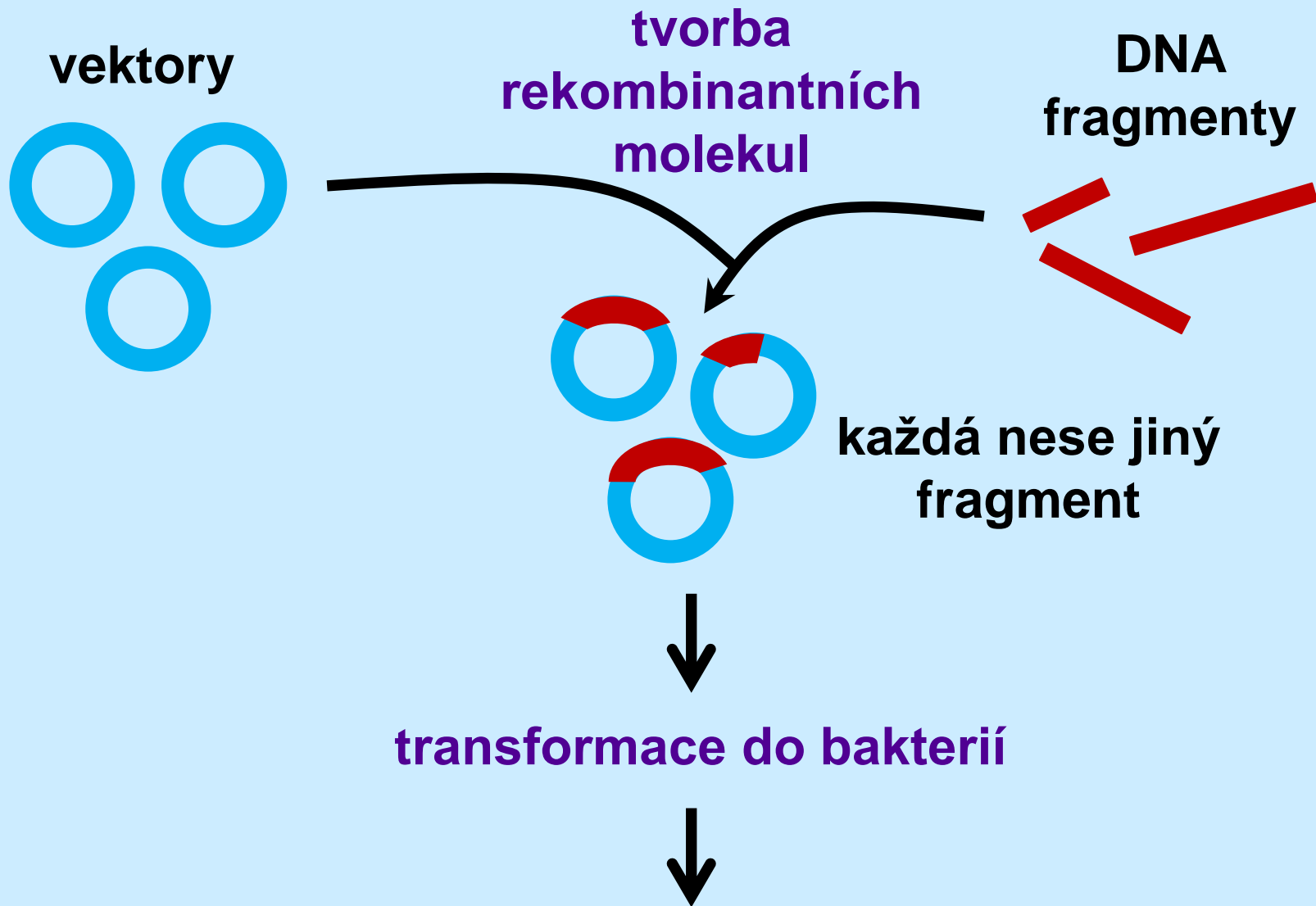
# *Proč je to klonování tak důležité?*



**Umožňuje získat čistý vzorek  
jednotlivého genu prostého genů  
jiných**



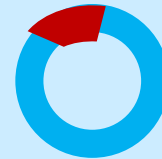
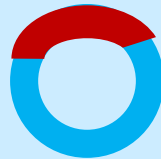
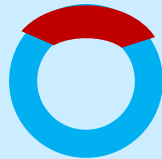
# *Jak klonováním získat jediný gen*



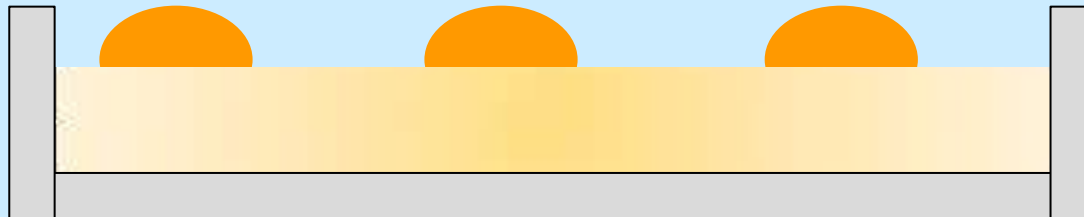
# *Jak klonováním získat jediný gen*



**Vysetí na selektivní médium**

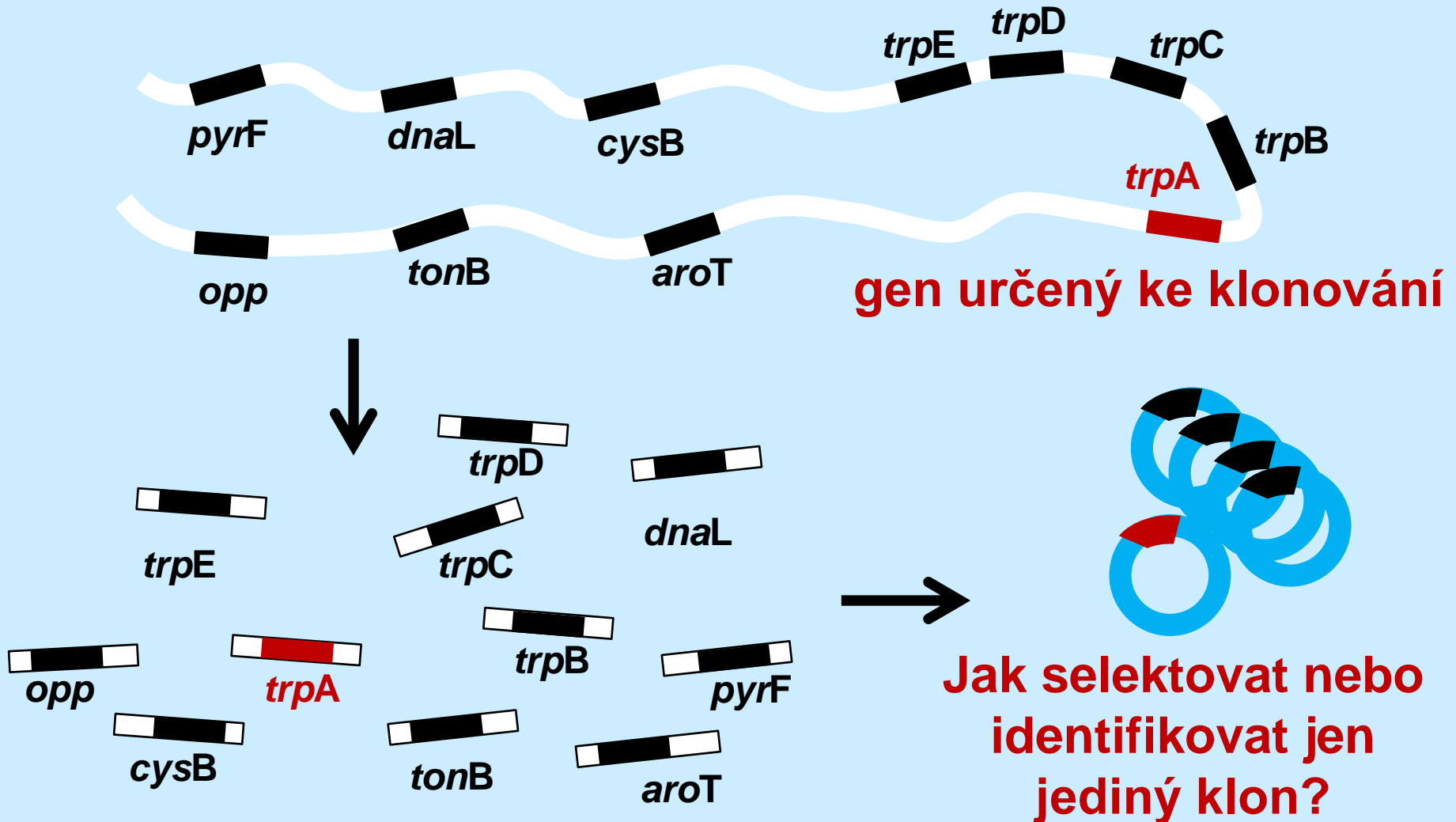


**Každá kolonie (klon) obsahuje jen jednu molekulu rekombinantní DNA**



# A co dál?

Nejdůležitější je identifikovat specifický klon mezi spoustou dalších



# ***Jak identifikovat ten správný klon***

## **Přímá selekce**

- **Provést klonování tak, aby vznikly jen klony nesoucí požadovaný gen**

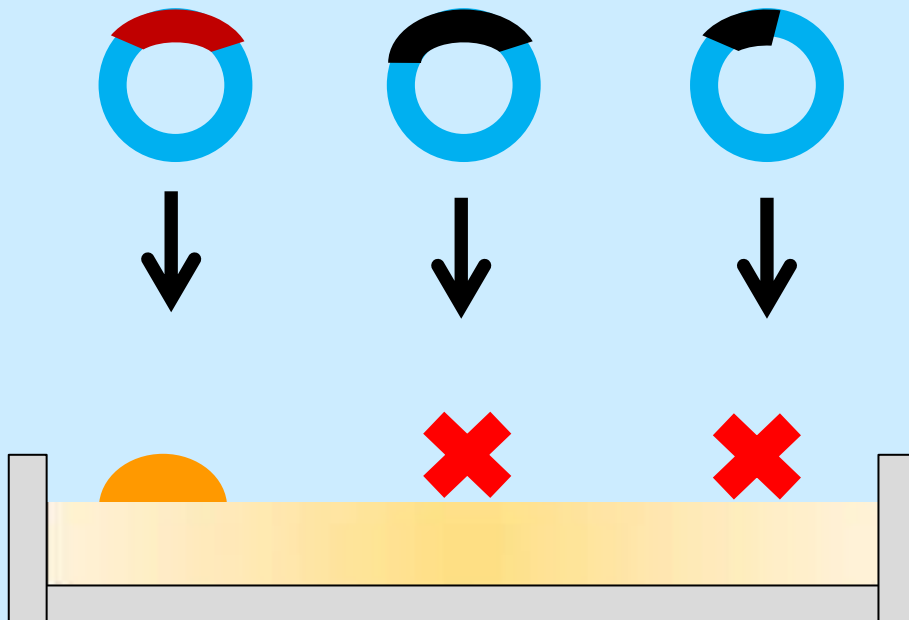
## **Nepřímá selekce z genové knihovny**

- **Nejprve vytvořit kolekci všech možných genů (genovou knihovnu)**
- **Analyzovat genovou knihovnu a vybrat ten správný gen**



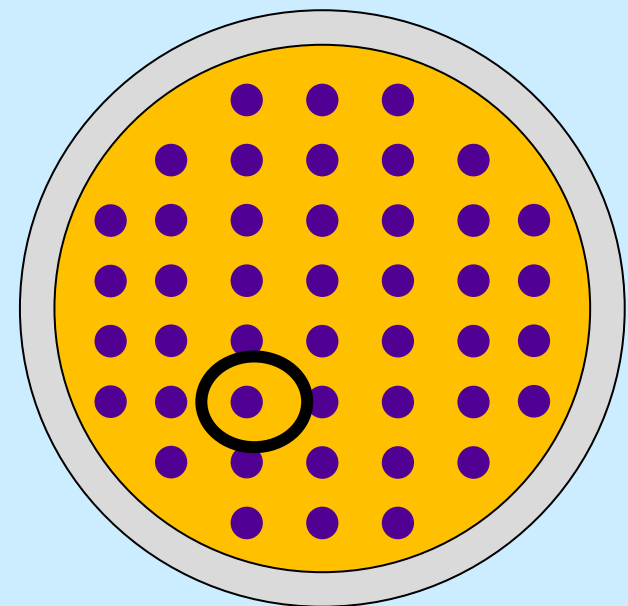
# Porovnání přímé a nepřímé selekce

## Přímá selekce



## Nepřímá selekce

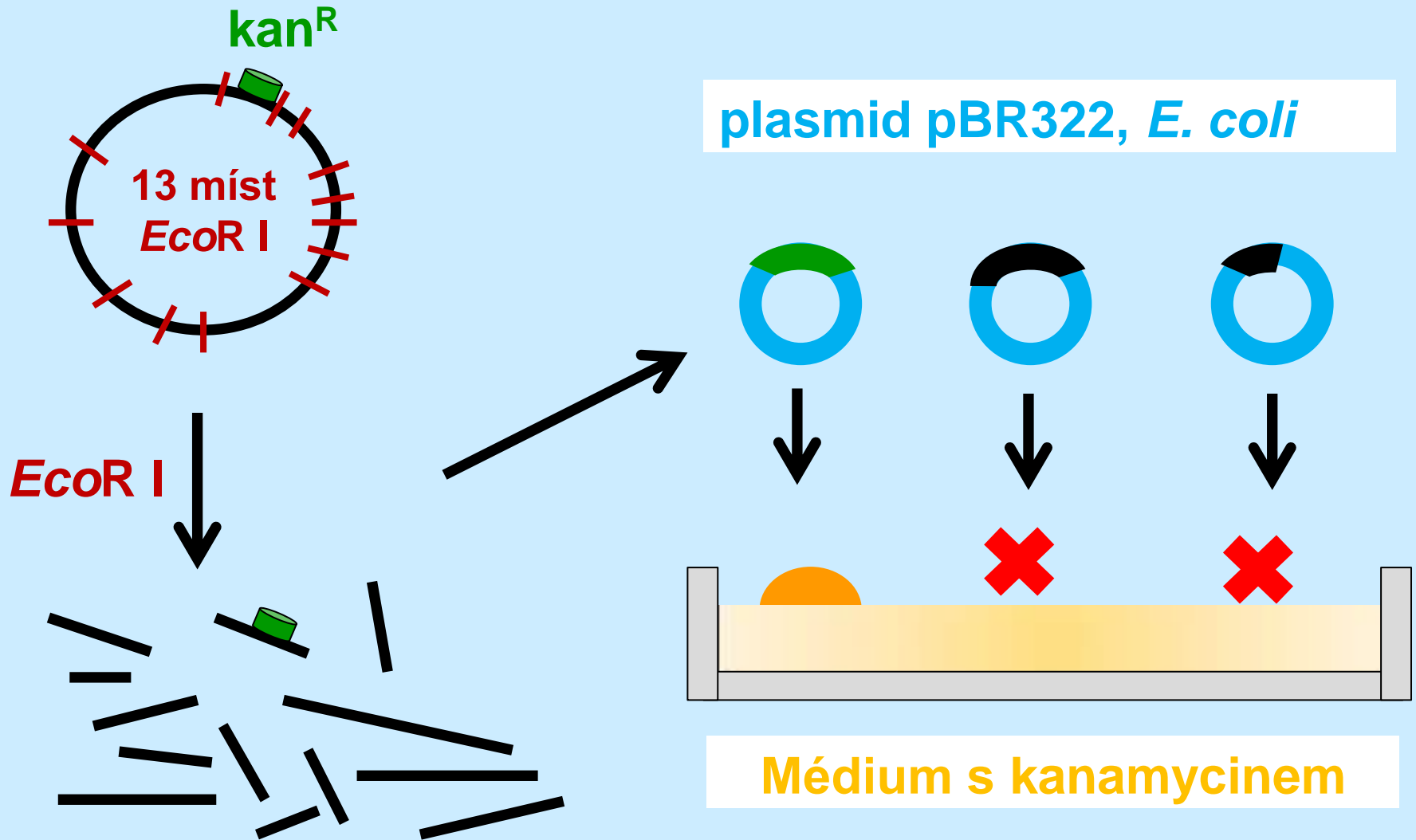
### Knihovna klonů



Klon s hledaným genem

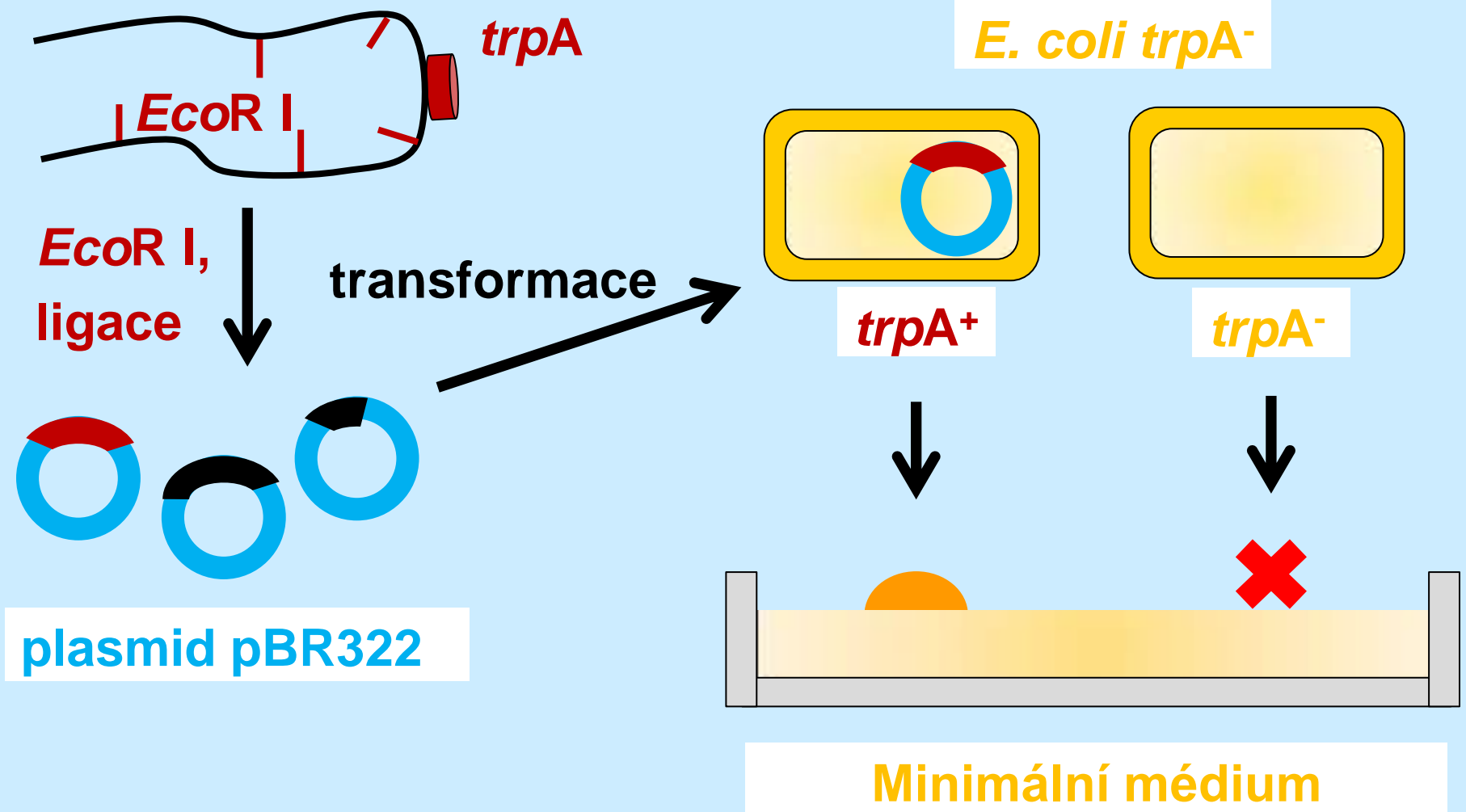
# Přímá selekce – geny rezistence

Gen pro rezistenci ke kanamycinu z plasmidu



# Přímá selekce – jiné geny

Gen *trpA* pro tryptofan syntázu z *E. coli*



# Omezení a využití auxotrofie

## Omezení

- Musí existovat mutantní kmeny pro hledané geny
- Musí být dostupné médium pro přežití wt kmenů

## Využití

- Pro geny kódující enzymy biosyntetických drah
- Metoda není omezena na *E. coli* nebo bakterie
- Auxotrofní kvasinky nebo vláknité houby
- Auxotrofní kmeny *E. coli* využitelné i pro geny jiných organismů

# Identifikace nepřímá

## Genová knihovna

- Kolekce klonů o dostatečném počtu entit, která obsahuje teoreticky všechny geny daného organismu

## Kolik klonů je třeba?

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-a/b)}$$

**N** = počet potřebných klonů, **p** = pravděpodobnost, že je přítomen kterýkoliv z genů, **a** = průměrná velikost klonovaných fragmentů, **b** = celková velikost genomu

# Vypočítejte



Počty klonů potřebných pro následující organismy

Druh	Velikost genomu, bp	Počet klonů	
		Fragmenty 17 kbp	Fragmenty 35 kbp
<i>E. coli</i>	$4,6 \times 10^6$		
<i>S. cerevisiae</i>	$1,8 \times 10^7$		
Drosophila	$1,2 \times 10^8$	21 500	10 000
Člověk	$3,0 \times 10^9$	564 000	274 000

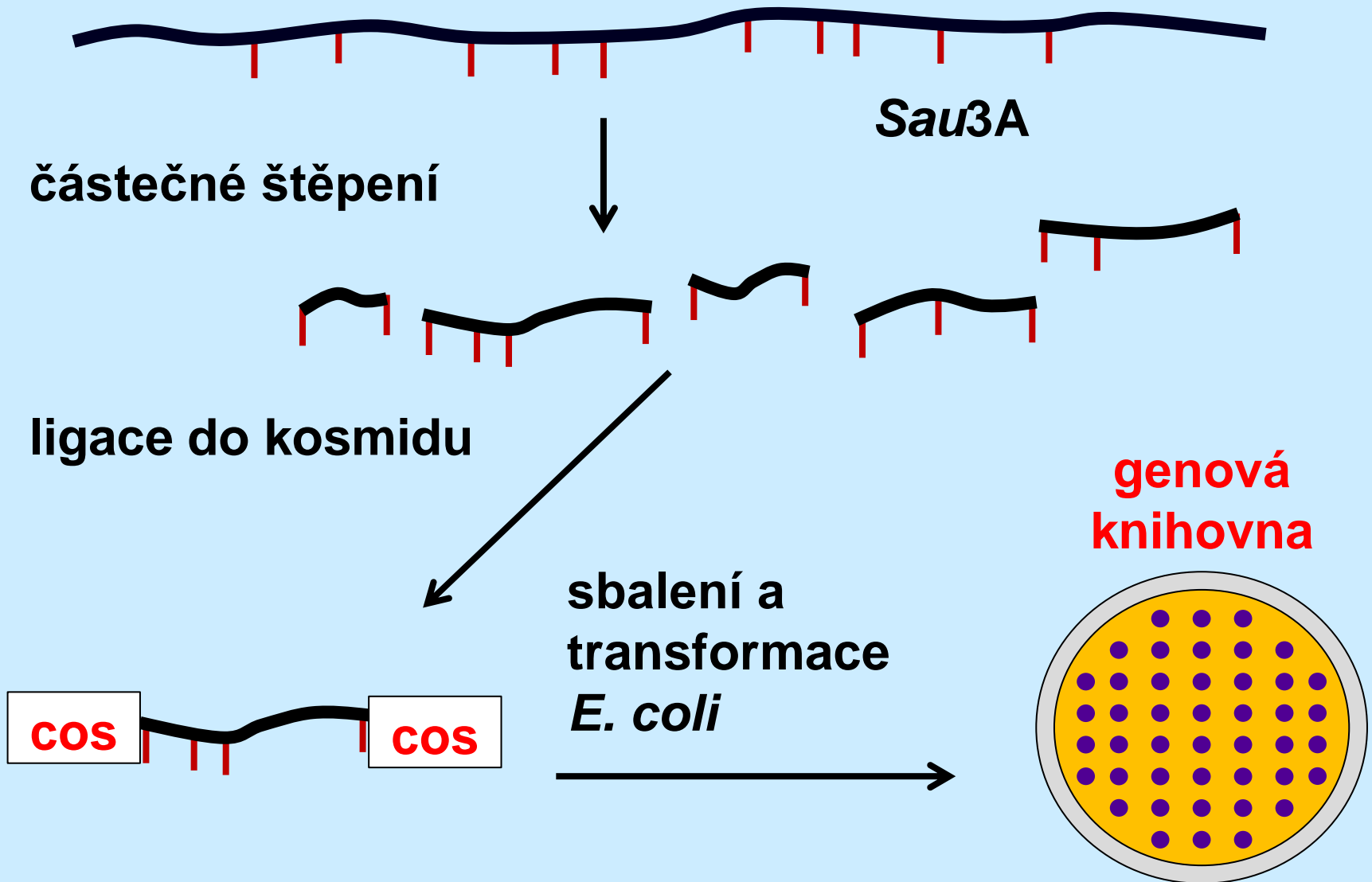


# Vypočítejte

Počty klonů potřebných pro následující organismy

Druh	Velikost genomu, bp	Počet klonů	
		Fragmenty 17 kbp	Fragmenty 35 kbp
<i>E. coli</i>	$4,6 \times 10^6$	820	410
<i>S. cerevisiae</i>	$1,8 \times 10^7$	3 225	1 500
Drosophila	$1,2 \times 10^8$	21 500	10 000
Člověk	$3,0 \times 10^9$	564 000	274 000

# Příprava genové knihovny

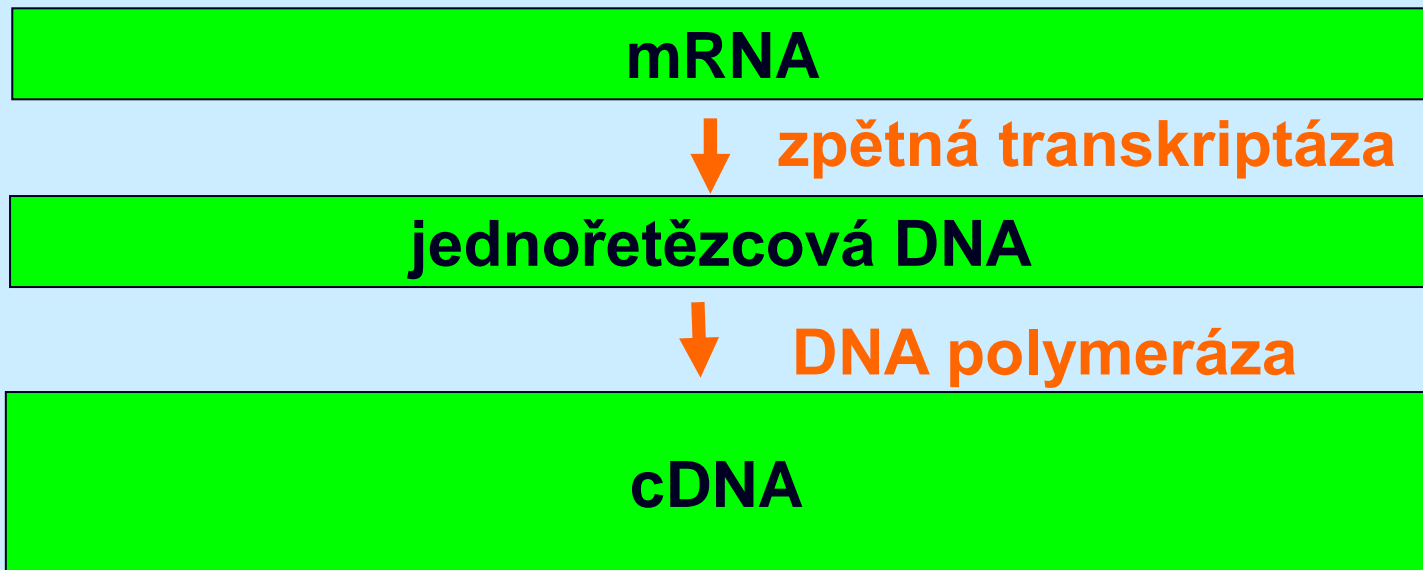




# *Příprava knihovny cDNA*

**Je to knihovna transkriptů mRNA**

- Celková mRNA je přepsána zpětnou transkriptázou do cDNA

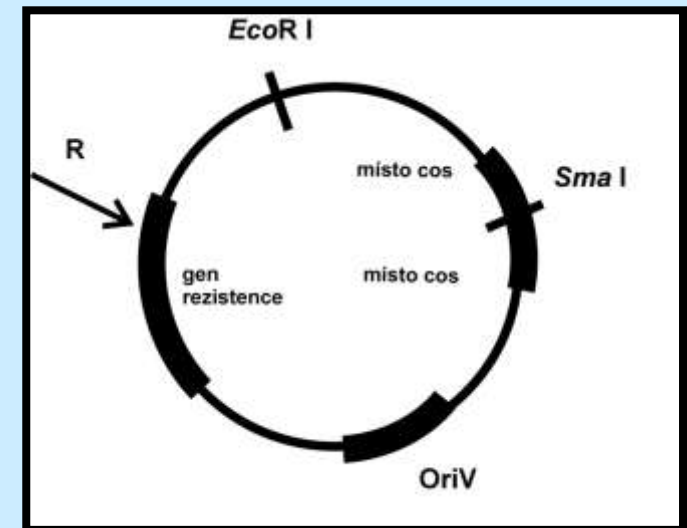
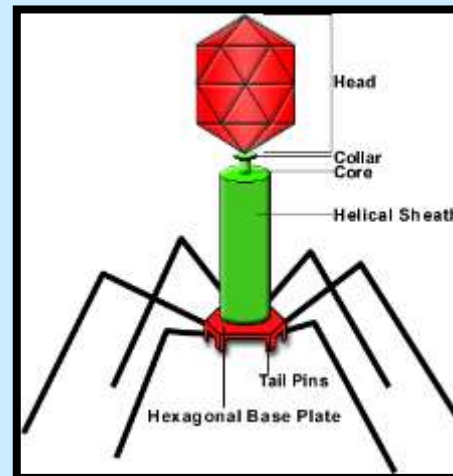
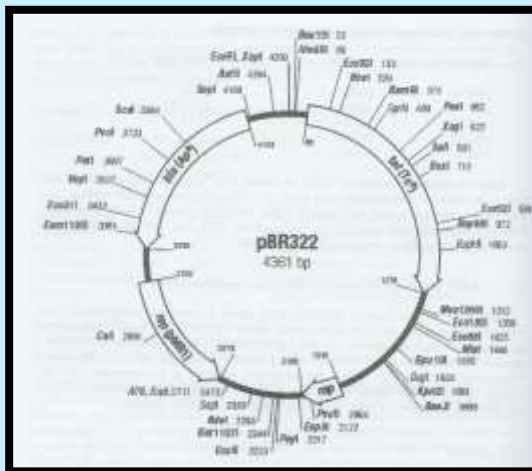


- Vzniklé cDNA jsou klonovány stejně jako genomová dsDNA

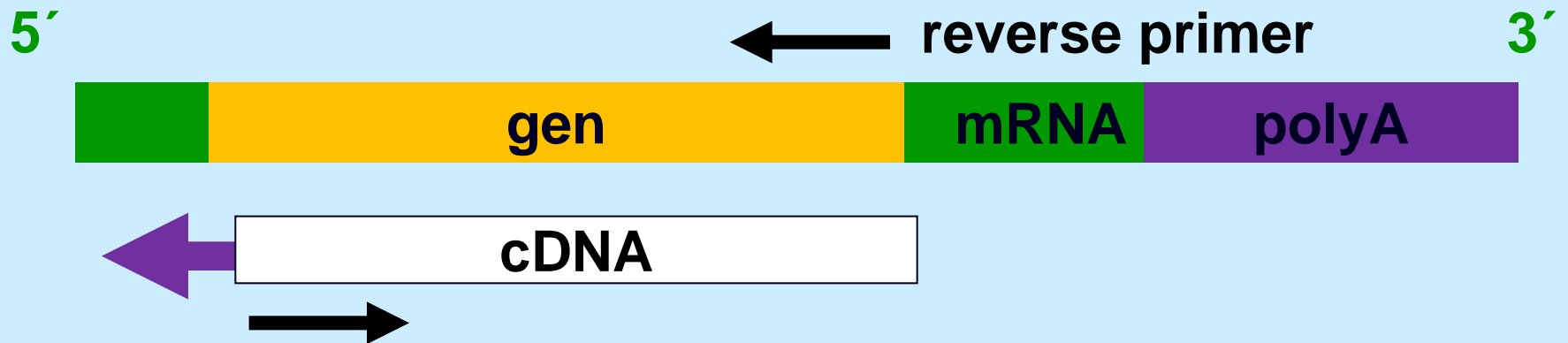
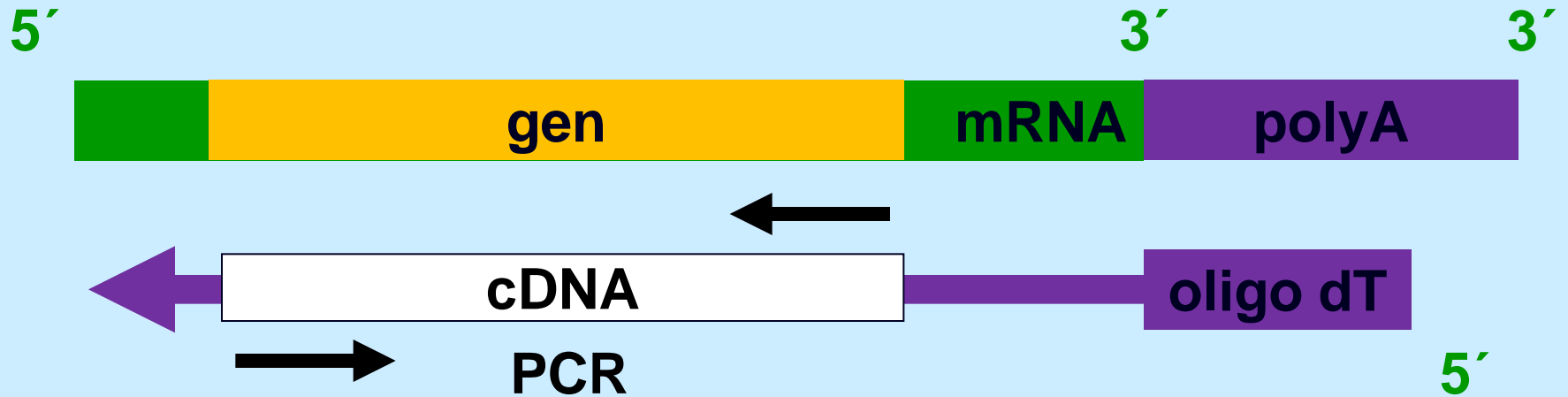
# Klonovat jen do kosmidů?

## Další typy vektorů

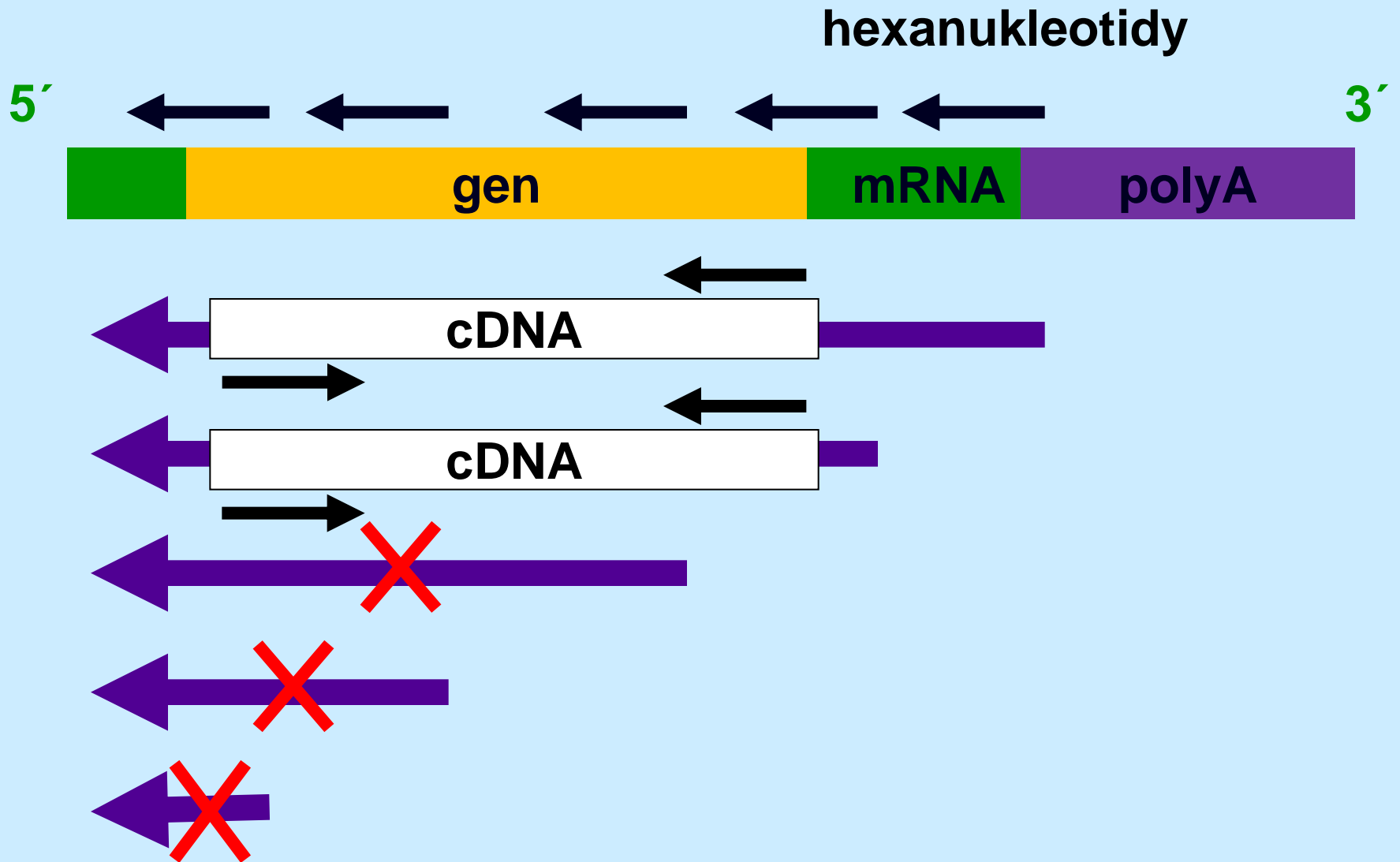
- Plasmidy
- Bakteriofágy
- Kosmidy
- Umělé chromozómy



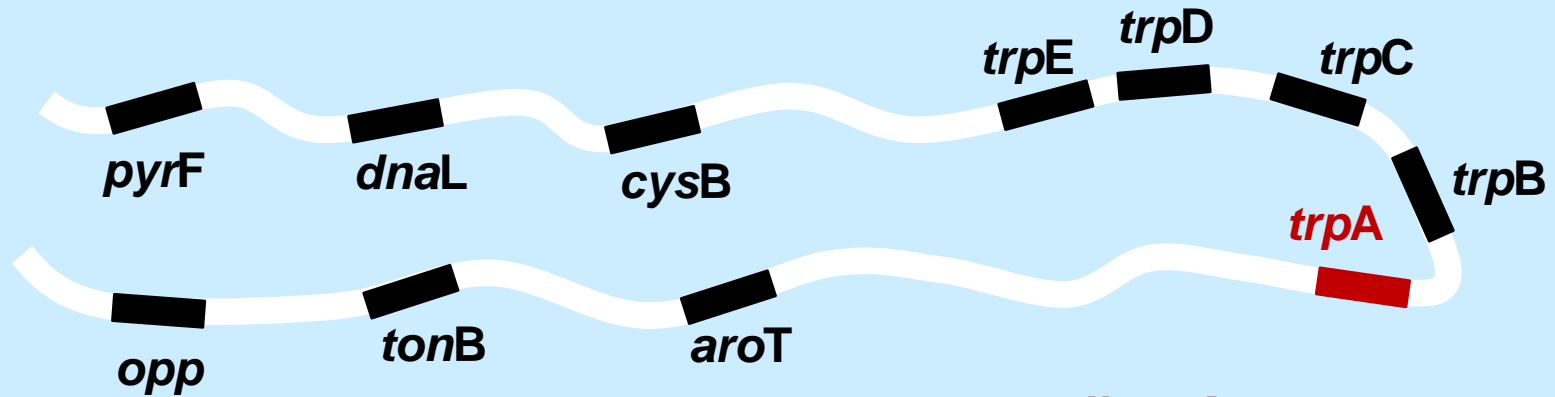
# Jak získat cDNA z mRNA - I



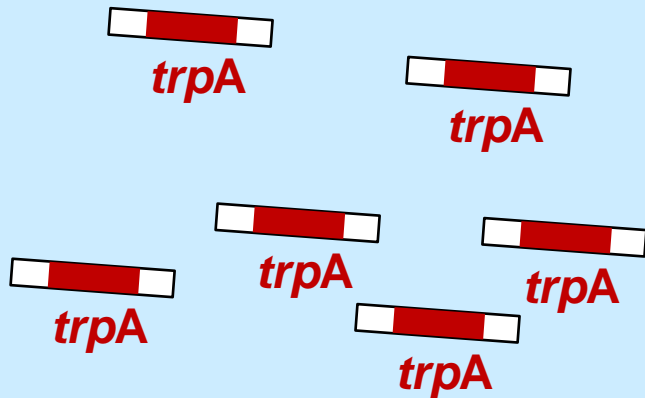
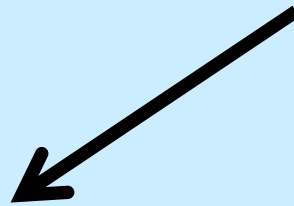
# Jak získat cDNA z mRNA - II



# *Purifikaci genu zajistí i PCR*



**gen určený ke klonování**



**několik miliard  
specifického produktu**

# ***I gen získaný PCR je třeba klonovat***

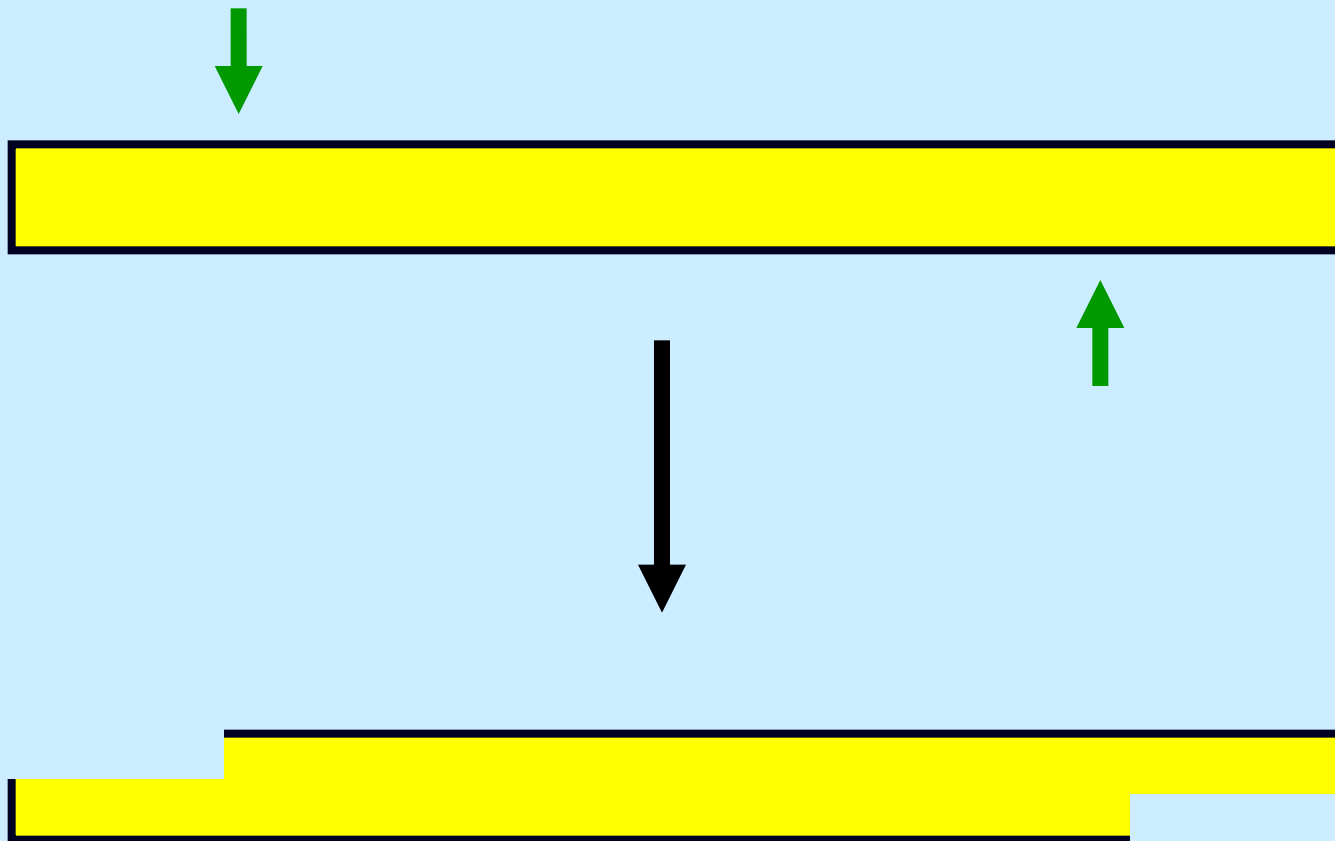
- **Pokud chceme sledovat jeho projev v buňce**
- **Pokud chceme prozkoumat mechanismy regulace exprese genu**

**Techniky klonování PCR produktů jsou dnes běžné**



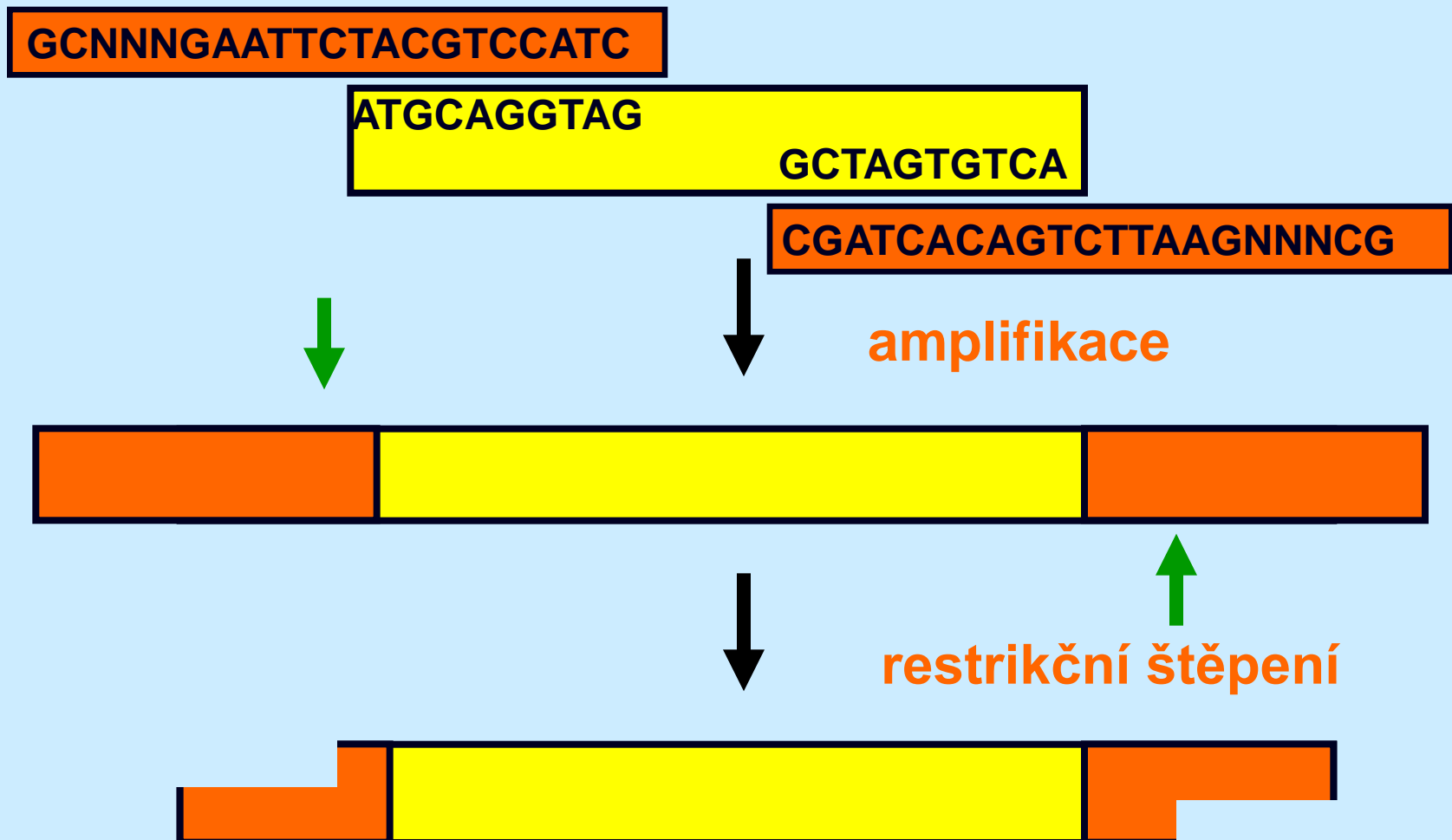
# *Klonování produktů PCR - I*

## 1) restriční štěpení



# *Klonování produktů PCR - II*

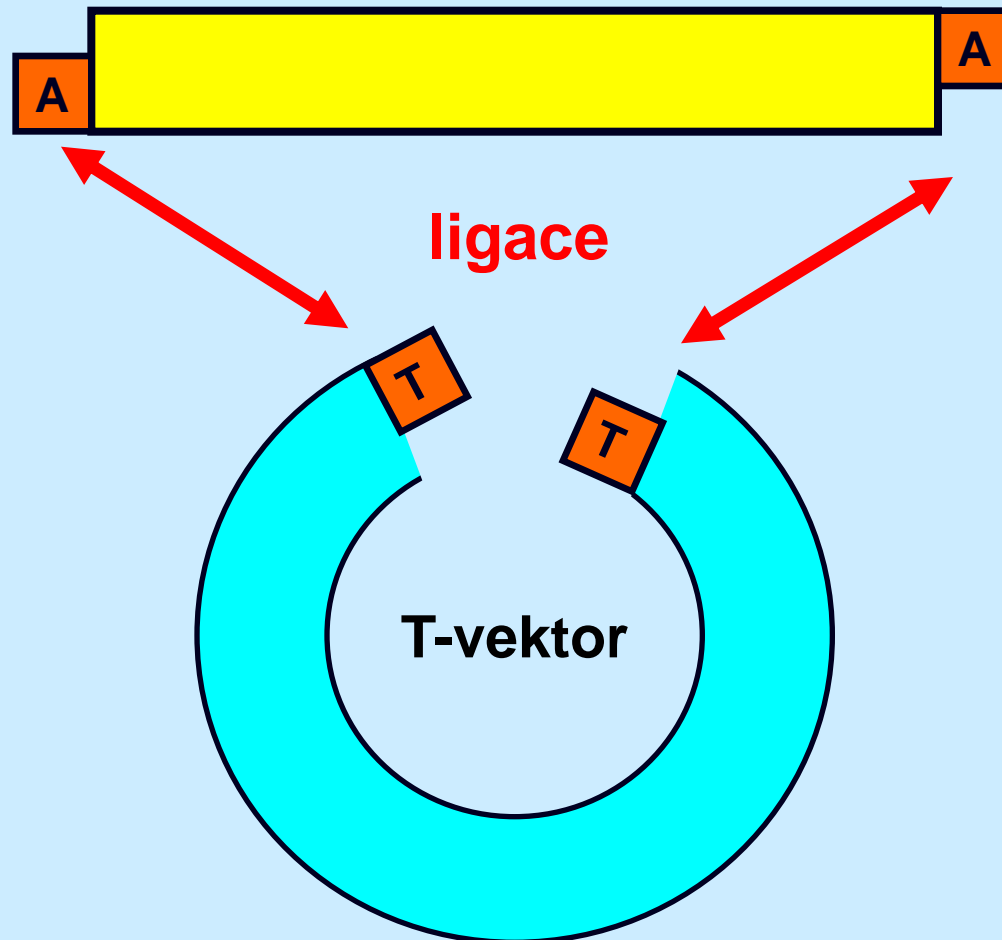
## 2) připojení restričních míst a restriční štěpení





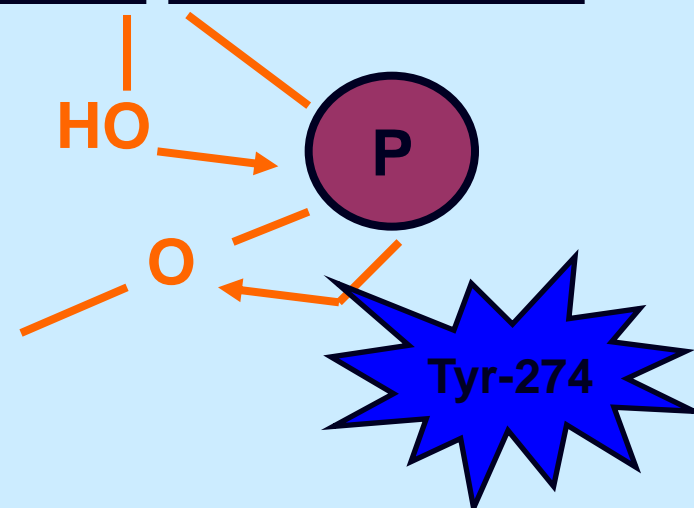
# *Klonování produktů PCR - III*

## 3) TA-klonování



# Klonování produktů PCR - IV

## 3) TOPO-klonování



# Proč tedy klonování?

## PCR má alespoň dvě omezení

- Musíme znát sekvenci genu, nelze tedy efektivně získat geny neznámé
- Řada genů je delších než je procesivita *Taq* polymeráz



Jak dlouhé DNA fragmenty lze amplifikovat?

- do 5 kbp relativně snadno
  - do 40 kbp použitím specifických postupů
- 

# Domácí úkol



Nalezněte příklady bakteriálních genů dlouhých

- a) do 5 kbp
- b) do 40 kbp
- c) delších než 40 kbp

Zkuste totéž pro kvasinky

**Kdo najde nejdelší mikrobiální gen?**

Nezapomeňte, že složené geny mají introny!



# *Ještě dvě otázky*

**Lze obejít to, že neznáme přesnou sekvenci nového genu?**



**Můžeme se pokusit využít známou sekvenci téhož genu u příbuzného organismu**

**Lze obejít délku genu?**



**???**

# ***Metody identifikace klonů***

## **Identifikace na bázi nukleových kyselin**

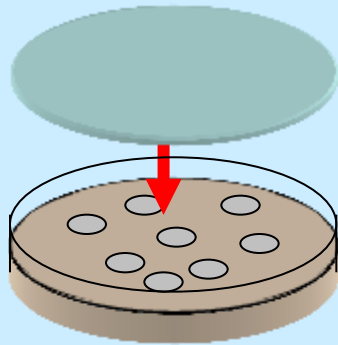
- **Hybridizace kolonií a plak – dot blot hybridizace**
- **Southern blotting**

## **Identifikace na úrovni translace**

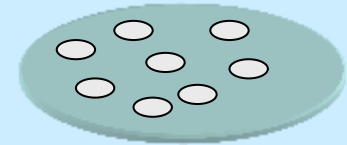
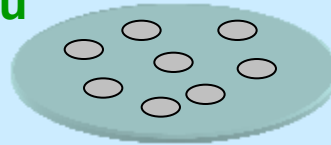
- **Využití protilátek**

# Hybridizace kolonií

nylonová membrána



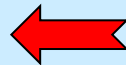
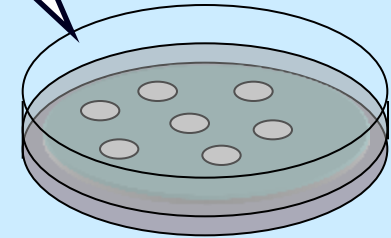
otisk kolonií na membránu



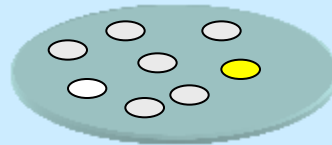
otisk chromozómové DNA

bakteriální kolonie (genomová banka)

denaturovaná značená cDNA



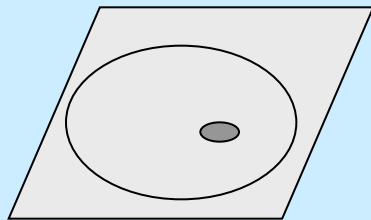
RTG film



expoziční

inkubace přes noc, hybridizace

identifikace kolonie



# ***Jak připravit sondu***

## **Sondy radioaktivně značené**

- **Nick translace**
- **Vyplnění jednořetězcových konců**
- **Nahodilé značení**
- **Zpravidla se využívá radioaktivní fosfor  $^{32}\text{P}$**

## **Sondy fluorescenčně značené**

- **Značení biotinem**
- **Značení digoxigeninem**
- **Značení křenovou peroxidázou**
- **Citlivější, bezpečnější, dnes už používané častěji**



**Zopakujte si metody  
radioaktivního i  
neradioaktivního značení z  
přednášky o hybridizaci**



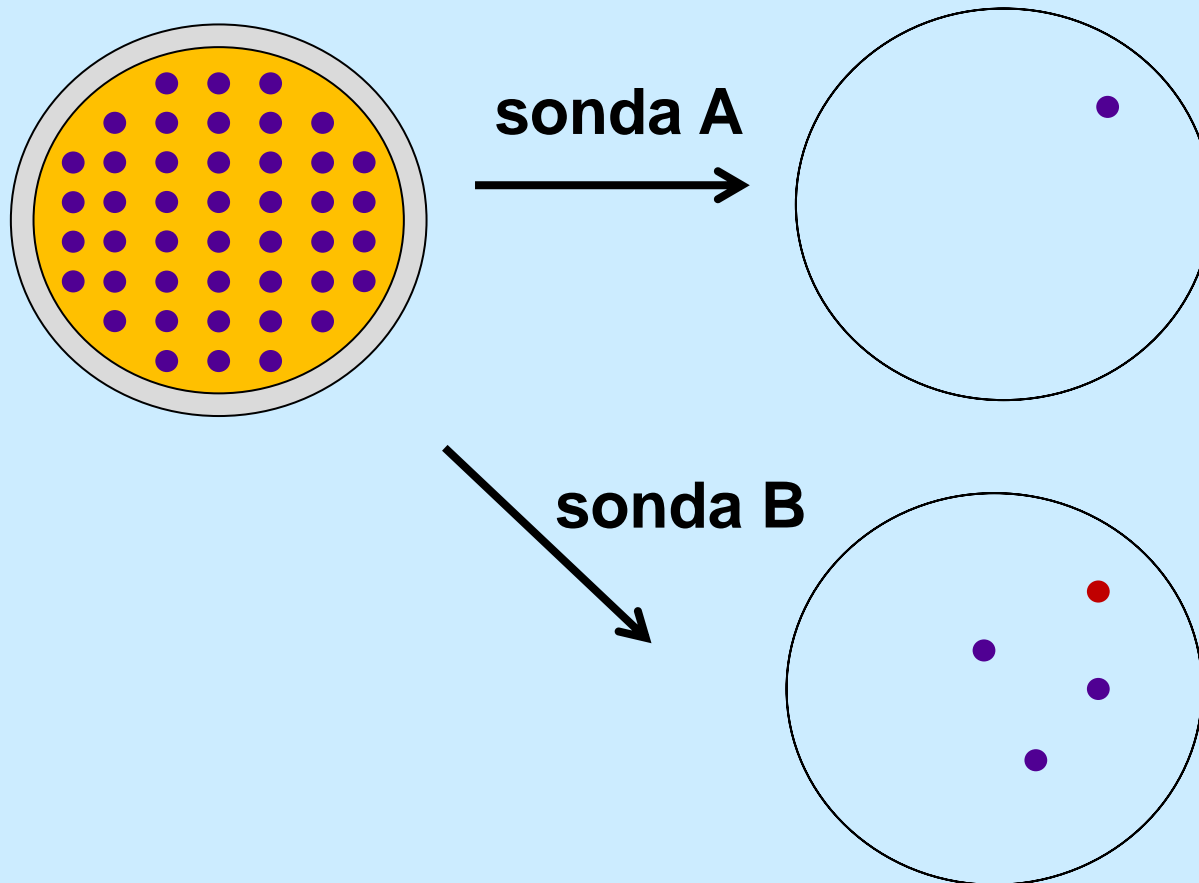
# ***Některé aspekty práce s genomovou knihovnou***

- **Selekce nejlepší sondy**
- **Příprava sondy s využitím produktu translace**
- **Identifikace příbuzných genů**

# Selekce nejlepší sondy I

Některé sondy hybridizují lépe, některé méně

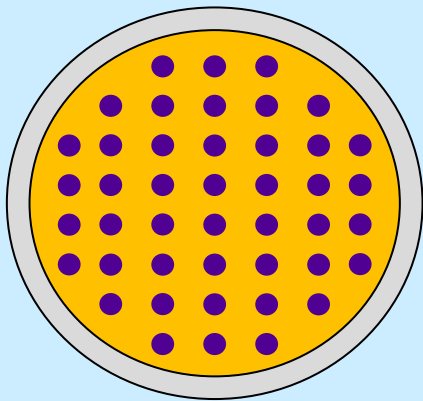
Knihovna klonů



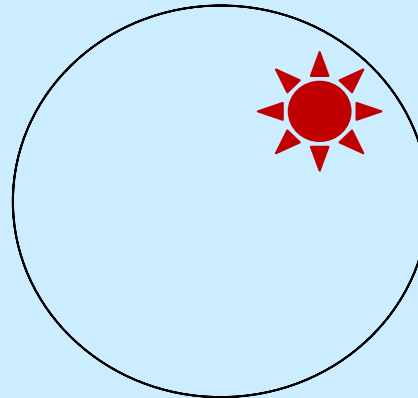
- 1) Nespecifická hybridizace?
- 2) Více kopií genu?

# Selekce nejlepší sondy II

**Knihovna klonů**



**sonda B\***

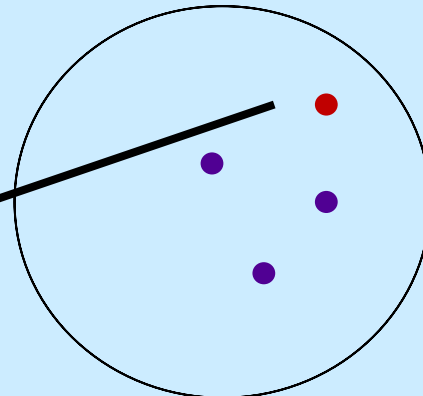


**Silná  
zřetelná  
hybridizace**

**Příprava nové sondy B\***



**Izolace DNA**



# ***Příprava sondy s využitím produktu translace***

- **Pokud známe sekvenci aminokyselin můžeme využít tabulku genetického kódu a stanovit kodóny**

**AUG = Met**

**GUU = Val**

- **Jenže genetický kód je degenerovaný!**

# *Které kodóny můžeme ze sekvence aminokyselin stanovit naprosto přesně?*



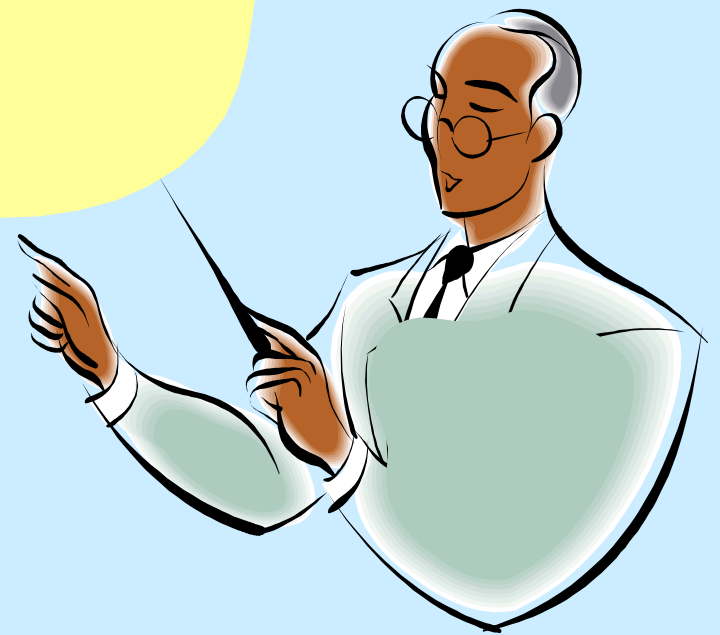
**Metionin = AUG**

**Tryptofan = UGG**

**Všechny ostatní aminokyseliny jsou kódovány alespoň dvěma kodóny**



**U kodónových rodin můžeme  
spolehlivě určit 2 ze 3  
nukleotidů v kodónu**



# *Návrh sondy pro cytochrom c*

...-Asn-Val-Leu-Trp-Asp-Glu-Asn-Asn-Met-Ser-Glu-Tyr-...



**Pomocí tabulky genetického kódu stanovte sekvenci nukleotidů v potenciální sondě**

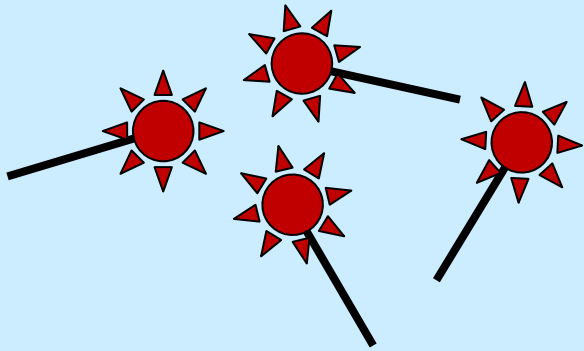
**TGG-GA(T/C)-GA(A/G)-AA(T/C)-AA(T/C)-ATG**





# Identifikace klonu s genem pro cytochrom c

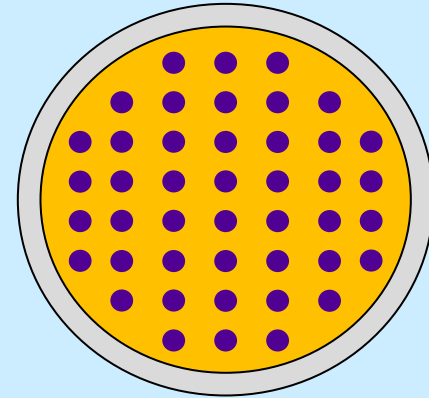
Syntetické oligonukleotidy



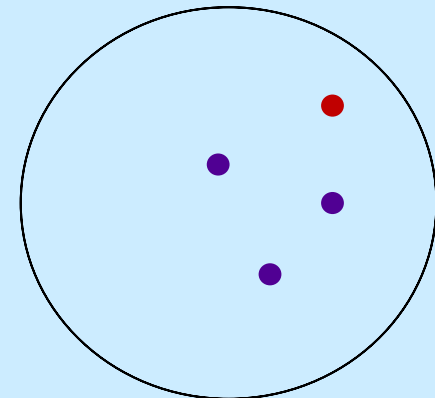
první sonda



Knihovna klonů



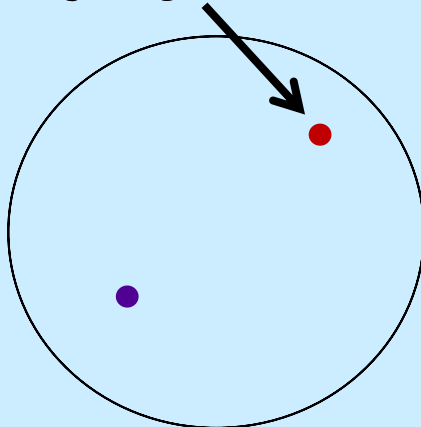
potenciální klony



druhá sonda



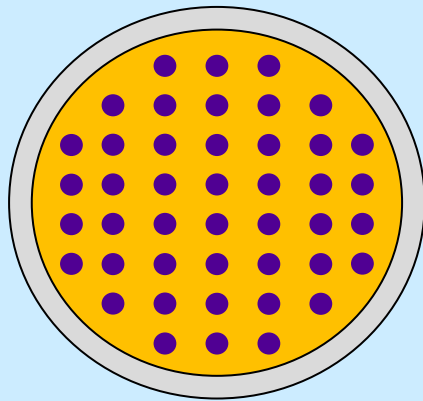
jistý klon



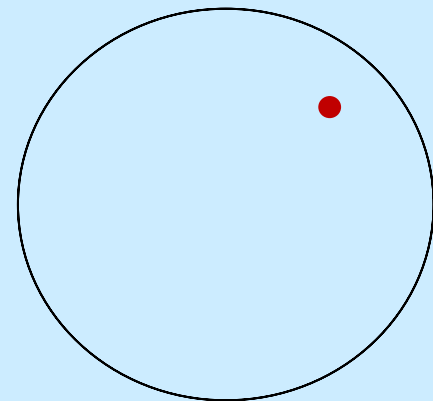
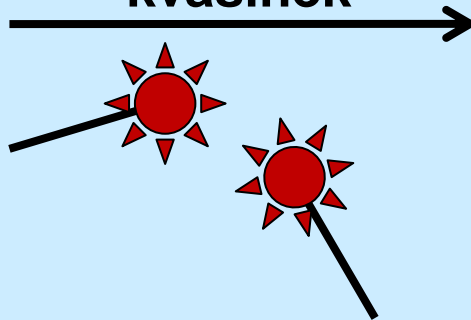
# Identifikace příbuzných genů

## Vyhledávání sondou mezidruhovou

Knihovna klonů z DNA  
*Neurospora crassa*



sonda z genu pro  
cytochrom c  
kvasinek

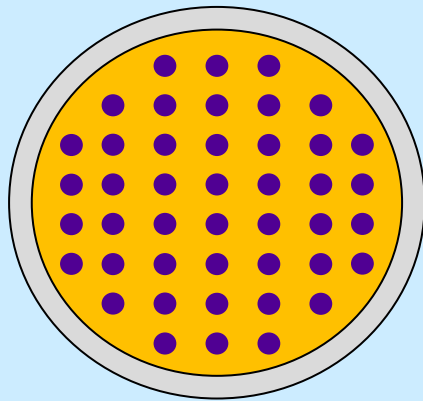


klon, který  
pravděpodobně  
nese gen pro  
cytochrom c

# Identifikace příbuzných genů

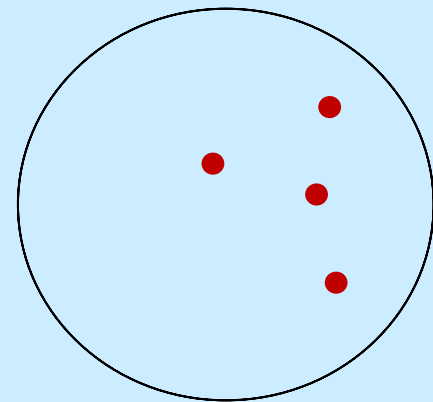
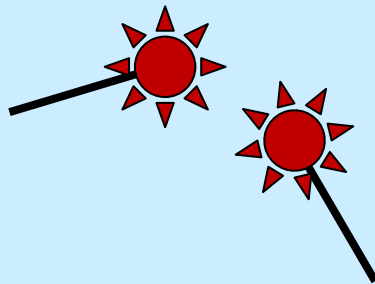
## Vyhledávání sondou vnitrodruhovou

Knihovna klonů z DNA  
*Escherichia coli*



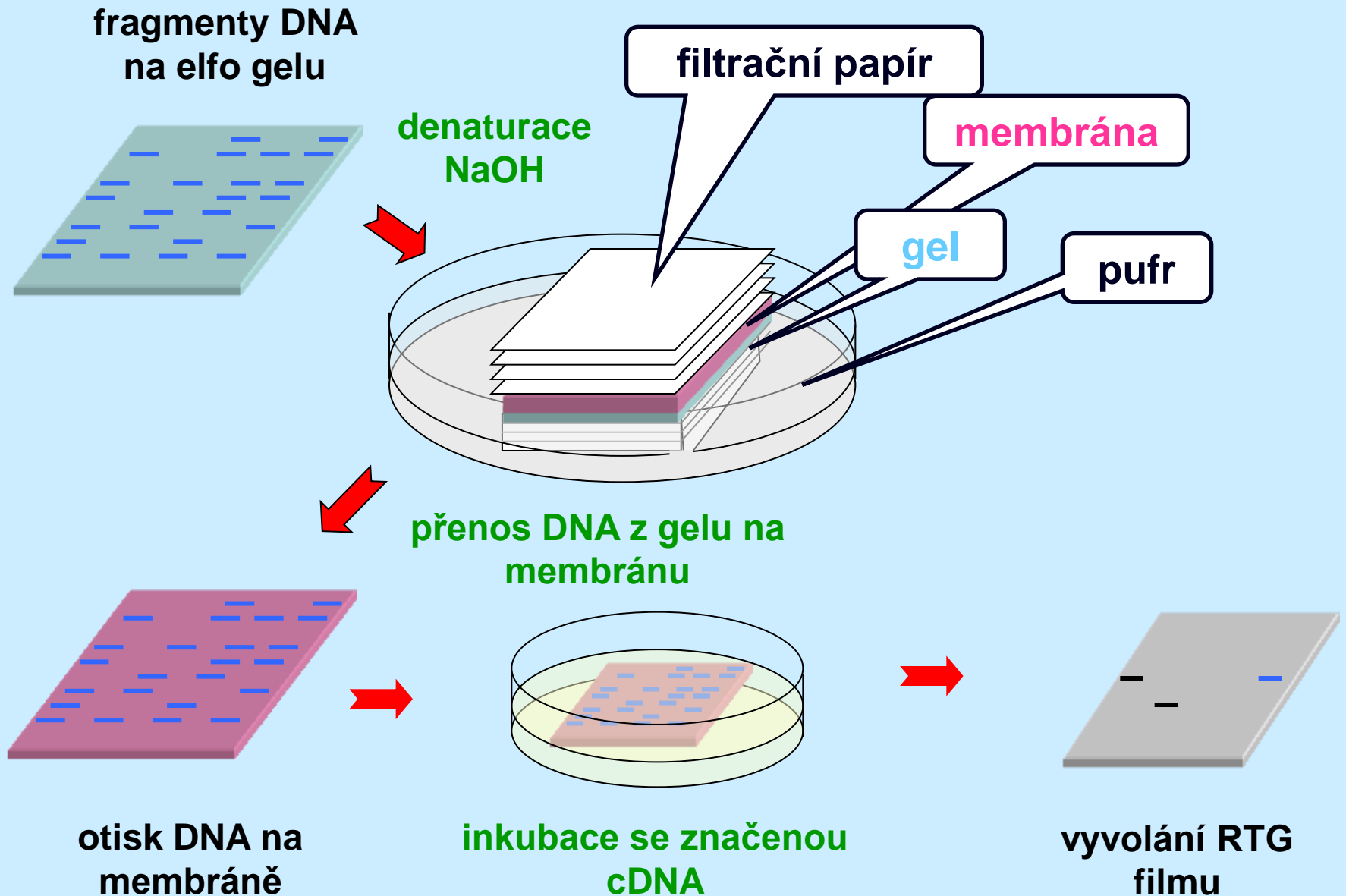
sonda z genu pro  
histidin kinázu z  
*E. coli*

→



klony  
pravděpodobně  
nesoucí geny  
genové rodiny

# Southern blotting



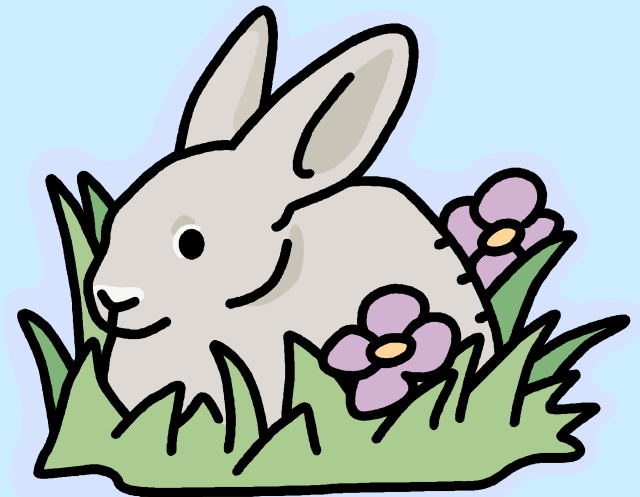
**Příkladem využití Southern blotu byly RFLP profily získané sondami *IS6110*, *IS901* a *IS900* u mykobakterií**



# ***Identifikace produktů translace***

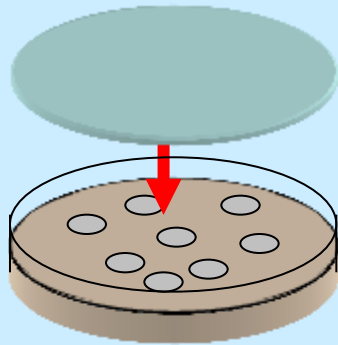
**Podmínkou je, aby byl protein buňkami  
exprimován**

- **Používají se protilátky polyklonální nebo monoklonální**
- **Testují se přímo kolonie**
- **Metoda se velmi podobá DOT BLOT hybridizaci**

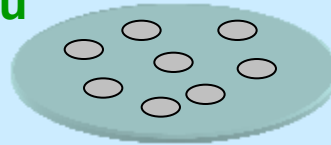


# Imunoscreening kolonií

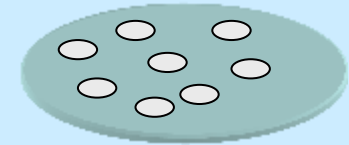
nylonová membrána



otisk kolonií na membránu



lyze buněk chloroformem

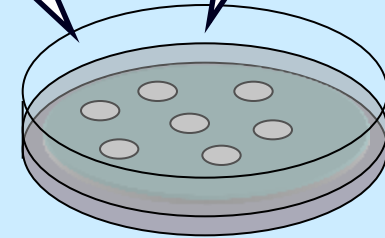


otisk proteinů

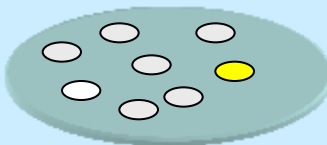
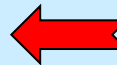
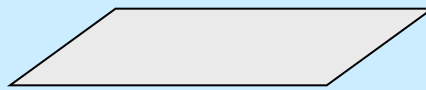
bakteriální kolonie (genomová banka)

specifická protilátka

značený protein A



RTG film



expozice



identifikace kolonie

inkubace přes noc, hybridizace

# *Ještě pár poznámek*

**1) Monoklonální protilátky produkují hybridomy**

[http://en.wikipedia.org/wiki/Hybridoma\\_technology](http://en.wikipedia.org/wiki/Hybridoma_technology)

**2) Protein A je bakteriální protein, který se specificky váže k protilátkám**

**3) Moderní přístupy využívají systému primární-  
sekundární protilátka, detekce pak může být  
fluorescenčně**

**Více např. přednášky ze 3. ročníku – Western blot**



# ***Shrnutí***

- 1) Pojem rekombinantní DNA**
- 2) Historické milníky**
- 3) Proč je klonování genů důležité i v mikrobiologii?**
- 4) Jak se klonování genů provádí**
- 5) Metody detekce klonovaných genů**
- 6) Dot blot a Southern blot**
- 7) Identifikace na úrovni translace**