

Ugotavljanje števila bakterij, ki tvorijo kolonije (cfu)

Št kolonij zraslih na plošči × faktor redčenja na plošči × 10ⁿ = x cfu/mL

DNA fingerprinting: omogoča opazovanje genskih razlik med ljudmi na podlagi števila mikrosatelitov ali STR (=short tandem repeats v kromosomu). Običajno se za detekcijo mikrosatelitov uporablja PCR. Število ponovitev se pri vsakem posamezniku razlikuje, zato se to metodo lahko uporablja pri identifikaciji, raziskovanju zločinov in pri testih očetovstva

Kaj je FISH tehnika?

»Fluorescence *in situ* hybridization«. = hibridizacijska tehnika pri kateri uporabljamo fluorokrome različnih barv in omogočimo lociranje 2 ali več genov v kromosomu z enim *in situ* eksperimentom. Kloniran fragment DNA označimo s fluorescentnim markerjem in nato hibridizirani v preparat imobiliziranih kromosomov na steklu. Fizično mesto DNA fragmenta v kromosomu lahko tako vidimo z mikroskopom. Lahko uporabimo več različnih markerjev za lociranje večih fragmentov. Raztegnjeni kromosomi- bolj natančna hibridizacija- fizično mapiranje

Kaj je DNA footprinting?

Omogoča lociranje vezave proteina na DNA molekulo z ugotavljanjem katere fosfodiesterne vezi so zaščitene pred rezom Dnaze

Kaj so STR (short tandem repeats) in kako jih lahko uporabljamo za identifikacijo oz. pri metodi DNA profiling?

STR je kratko zaporedje (1-13 nukleotidov) ki se večkrat v genomu pojavlja v tandemu. Pri človeku je najpogostejši dinukleotid CA ki se ponovi 5-20krat. Število ponovitev se lahko spremeni z dodajanjem/odstranjanjem med replikacijo DNA. V populaciji je lahko tudi 10 različnih verzij določenega STR-ja- vsak alel ima drugačno število ponovitev.

Pri DNA profiling identificiramo alele izbranih različnih STR-jev. To lahko dosežemo hitro in z malo količine DNA s PCR-jem z markiranimi primerji ki se vežejo na sekvenco DNA na obeh straneh ponovitve. Po PCR-ju produkte pregledamo z elektroforezo na agaroznem gelu. Velikost fragmentov nam pove kateri alel/aleli so prisotni v testirani DNA. Lahko dobimo 2 alela v enem vzorcu, ker imamo v genomu 2 kopiji vsakega STRja- eden na kromosomu podedovanem od mame in drugi na kromosomu podedovanem od očeta. Pregledujemo 12 STR-jev (dvojčka imata isto)

Genska mapa: označuje pozicijo genov ali markerjev glede na frekvenco rekombinacije. Ker je frekvenca rekombinacije na različnih regijah različna so genske mape »približne«. Približne so tudi zato, ker težko opazujemo rekombinacijo v primeru, da opazujemo lokusa, ki sta si razmeroma blizu. Fizične mape, ki so narejene na podlagi sekvence DNA in restrikcijske mape so bolj natančne.

Bakteriofag M13: Nima niti litičnega niti lizogenega ciklusa. Ko M13 okuži bakterijo se fagni deli neprekinjeno sintetizirajo in zapuščajo celico. DNA M13 se ne vključi v bakterijski genom in se ne potuhne/postane neaktiven. Pri takih fagih nikoli ne pride do celične lize- okužene bakterije normalno rastejo in se razmnožujejo, čeprav bolj počasi. Vektor za kloniranje

Shranjevanje bakterij in fagov

- Trajna gojišča – trajniki (stab vials). Eno bakterijsko kolonijo zabodemo v takšno gojišče. Bakterijske seve v trajnikih shranjujemo v temnem pri sobni temperaturi.
 - Zamrznjene bakterijske kulture z dodanim glicerolom ali DMSO shranjujemo pri - 80°C.
 - Bakteriofagne lizate z dodanim kloroformom lahko hranimo pri 4°C več let. Pozorni moramo biti, s kakšnim virusom delamo. Tisti, ki imajo ovoje iz maščob so občutljivi za kloroform.
 - Če fage zamrznemo na - 80°C jim dodamo DMSO.
-

Mutageneza

Kromosomske mutacije: (večje spremembe)

- **Kromosomske preureditve** (struktura kromosoma)
 - Duplikacije
 - Delecije
 - Inverzije
 - translokacije
- **Aneuploidije** (spremenjeno število kromosomov): izguba kromosoma, nerazdvajanje kromosomov

Genske mutacije: (manjše spremembe)

- Glede na molekularno osnovo:
 - Tranzicije (purin-purin, pirimidin-pirimidin)
 - Transverzije (pur-pir, pir-pur)
 - Frameshift (zamik čitalnega okvirja)
 - Expanding trinucleotide repeats (anticipacija)
- Glede na fenotipski učinek: forward/reverse
 - Loss of function
 - Gain of function
 - Pogojne mutacije
 - Letalne mutacije

Skupine kemijskih mutagenov:

- Analogi baz (5-bromouracil, 2-aminopurin)
- Alkilirajoči agensi
- Oksidativni agensi
- Interkalirajoči agensi
- Sevanje (x-žarki, gama žarki, UV sevanje)

Kaj so mutatorski sevi in za kakšen namen jih uporabljamo v laboratoriju?

Uporaba mutatorskih sevov je mikrobiološki način vnosa mutacij. Mutatorski sevi imajo okvare v natančnosti prepisovanja

Avksotrofni sevi: imajo okvarjen zapis za sintezo ene ali več AK, zato jih ne morejo izdelovati sami. Take seve lahko izoliramo na podlagi prehranskih zahtev

Prototrofni sevi: nimajo okvarjenih genov za sintezo AK ali pa imajo zapise na plazmidih, kar jim omogoča sintezo vseh AK, potrebnih za rast na minimalnem gojišču

Zakaj v laboratoriju potrebujemo seve z različnimi lastnostmi? Da lahko opazujemo spremembe, ki se zgodijo ob določenih genetskih procesih (npr.: prenos lastnosti s konjugacijo, vnos lastnosti preko bakteriofagov, mutacija lastnosti, izmenjava plazmidov, dedovanje lastnosti,..)

Mutageneza z EMS-alkilirajočim agensom. Ali lahko predvidite, kje bodo nastale mutacije? Kako izolirate sev s točno določenim mutantnim fenotipom? Ali ima ta sev okvarjene samo gene za fenotip ki ste ga želeli izolirati?

- EMS doda etilno skupino na gvanin- dobimo etilgavnin, ki se narobe povezuje s timinom (tranzicija). Lahko pa doda etilno skupino tudi na timin- dobimo etiltimin, ki se pari z gvaninom (tranzicija). Okvirno lahko torej pričakujemo mutacije na G in T bogatih območjih- specifičnega mesta pa ne moremo določiti.
- Sev s točno določenim mutiranim fenotipom izoliramo na podlagi prehranskih zahtev, sposobnosti (loss/gain of function), morfologije, celic
- Ne, mutacija ni specifična. Izoliramo lahko seve z mutiranimi geni za neko lastnost, vendar ne moremo zagotoviti da niso okvarjeni tudi kakšni drugi geni

Učinek sevanja na DNA: Purinske in pirimidinske baze absorbirajo UV- sevanje, kar vodi v tvorbo vezi med sosednjimi pirimidini na isti verigi- tvorijo se pirimidinski dimeri (blokirajo replikacijo- zaradi spremenjene konfiguracije DNA)

Amesov test= metoda za ugotavljanje potencialnih kancerogenih kemikalij (1974- Bruce Ames)

- Bazira na tem da so oboji (rak in mutacije) posledica poškodb na DNA
- Ames pravi da lahko mutageneza v bakterijah služi kot indikator kancerogenosti pri človeku
- Nekateri spojine niso kancerogene, ampak se lahko v take spremenijo, ko pridejo v telo
 - Take potencialne mutagene zato najprej inkubiramo v ekstraktu sesalčjih jeter (podgane), ki vsebuje metabolne encime
- Uporabimo avksotrofen sev bakterije *Salmonella typhimurium*: ima okvarjen lipopolisaharidni plašč (ki ponavadi bakterije varuje pred zunanjimi kemikalijami), inaktiviran DNA popravljalni sistem, nosi *his*- mutacijo (pomeni da ne more sintetizirati histidina)
- Bakterije nacepimo na gojišče brez histidina- posledično zrastejo samo tiste, ki so z (sponatno) reverzno mutacijo pridobile nazaj popolni histidinski gen in ga lahko posledično tudi sintetizirajo
- Kemikalije ki jih želimo testirati dodamo na gojišča z bakterijami- št zraslih kolonij primerjamo s št bakterij na kontroli (brez kemikalij+ izvleček podganjih jeter- zrastejo zaradi sponatne *his*- → *his*+ mutacije= revertante)
- Vsaka (potencialno mutagena) kemikalija ki občutno poveča št kolonij na gojišču je mutagena in precej verjetno kancerogena

Popravljanje poškodb zaradi UV in ionizirajočega sevanja:

- Poškodbe se popravljajo z neposrednim popraviljem spremenjenih nukleotidov v originalno obliko (strukturo)
- Za popraviljanje takih poškodb so celice razvile posebno, **počasnejšo DNA polimerazo**, ki lahko nadaljuje svoje delo kljub napakam v konformaciji molekule, ki navadne polimeraze ustavijo. Počasnejše polimeraze pa pogosto delajo napake v tistih mestih DNA, ki jo sintetizirajo. Te napake popravijo popravljalni mehanizmi. Poleg tega pa napake ki jih ustvirajo počasnejše polimeraze niso tako slabe kot so vrzeli v DNA.
- Mehanizem **fotoreaktivacija** UV- induciranih pirimidinskih dimerov- fotoliza ob pomoči svetlobne energije prekine kovalentne vezi med pirimidinskimi dimeri
- Ionizirajoče sevanje pogosto vodi v zlome obeh verig

SOS sistem= sistem proteinov in encimov, ki celici omogočajo replikacijo DNA kljub okvarjeni strukturi DNA.

Dela številne napake pri replikaciji in zviša raven mutacije. Ko pirimidinski dimeri blokirajo replikacijo se celica tudi deliti ne more več in ponavadi umre (zato je UV uporaben sterilizator). Za pojav mutacije se mora premostiti blokata replikacije- SOS sistem (encimi lahko vstavljajo tudi nespecifične baze)

Konjugacija

Konjugacija=prenos DNA med dvema bakterijama, ki sta v neposrednem celičnem stiku.

- Stik omogočajo posebne strukture-pili.
- Pri konjugaciji se iz bakterijske celice donorja v celico recipienta običajno prenese **plazmidna DNA**. Če je plazmid vključen v kromosom donorja, se poleg dela plazmidne prenese tudi del kromosomske DNA donorja (sevi Hfr).
- Bakterijske celice recipienta ki so po konjugacijskem prenosu dobile plazmid oziroma del kromosomske DNA zasledimo na **seleksijskih gojiščih**. Ta gojišča so sestavljena tako, da omogočajo le rast recipienta z določeno pridobljeno lastnostjo (ne pa tudi samega donorja oz. recipienta). Če sta donor in recipient avksotrofna lahko naredimo kontraselekcijo na minimalnih gojiščih (brez dodanih AK, drugih rastnih dejavnikov). Najlažja je selekcija in kontraselekcija z antibiotiki ki jih dodamo k hranilnim gojiščem

Konjugacija (hfr) Če je konjugativen plazmid vključen v kromosom donorja, se prav tako lahko začne konjugacija.

- Najprej se prenese del plazmidne DNA, nato pa kromosomska DNA
- Velikost prenešene kromosomske DNA je odvisna od časa vzpostavitve konjugacijskega mostička (zaradi nestabilnosti stika se skoraj nikoli ne prenese celotna kromosomska DNA in preostali del plazmida)
- Če obstaja homologija med donorsko in recipientsko kromosomno DNA se lahko prenesena kromosomska DNA rekombinira v kromosom recipientske celice
- Uporabna za ugotavljanje mesta vstavitve plazmida v kromosom in smer prenosa kromosomskih genov

V katerih primerih konjugacijskih mešanic pred razmazom ni treba spirati? spiraš zaradi tega, ker je bila kultura pred tem v hranilnem gojišču in so še prisotne aminokisliline, ti pa pol ugotavljaš če so avksotrofi ali ne in bi to lahko vplivalo na rezultate. iz tega sklepam da ni treba spirati tistih mešanic, ki niso bile v hranilnem gojišču oz. tistih, za katere ni pomembno ali so avksotrofi ali ne.

Zakaj so frekvence prenosa nižje, kadar je recipient recA-? Recipient z recA- ima okvarjen gen za protein RecA, ki sodeluje v homologni rekombinaciji; geni, prenešeni s konjugacijo, se torej ne morejo rekombinirati v recipientski kromosom. (po mojem)

Konjugacija in genske mape:

- Genske mape lahko ustvarimo tudi s konjugacijo
- Postopek:
 - Zmešamo Hfr sev z F- sevom (seva morata imeti različen genotip)
 - Mešanice ne stresamo- med celicami se mora vzpostaviti pilus
- Povezava ne traja večno- iz donorske se v recipientsko prenesejo različni fragmenti
- Transfer se vedno začne z delom integriranega F faktorja (Hfr seva)
- Če bi želeli prenesti cel kromosom bi morali celice obdržati v stiku vsaj 100 minut, kar je nemogoče
- Čas prenosa posameznega gena je odvisen od njegove pozicije na kromosomu (mape so označene z minutami) in od smeri prenosa

Zakaj inkubiramo konjugacijsko mešanico brez stresanja? Da ne pretrgamo pilov

Transdukcija

Transdukcija= prenos DNA ene bakterije v drugo s pomočjo bakteriofaga (fag=vektor). Pri pakiranju se v fagne glave pakira tudi nekaj bakterijske DNA. Fag se pri splošni transdukciji lahko integrira v katerokoli mesto v genomu bakterije- zato je mogoč prenos kateregakoli gena v drugo bakterijo

Transduksijski fagi so navadno defektni glede nekaterih lastnosti: npr ne morejo se razmnoževati, dokler ne dobijo pomoči od Helper faga.

Splošna transdukcija: bakteriofag inficira bakterijsko (donorsko) celico→ degradacija bakterijskega genoma, transkripcija in translacija fagnih genov→ pakiranje fagov (spakira se lahko tudi bakterijska DNA-nenatančno rezanje)→ liza celice in izpustitev novih fagov (nekateri z bakterijsko DNA)→ transducirajoči bakteriofag okuži drugo bakterijo(recipientsko)→ njegova (Dna prejšnje bakterijske gostiteljice) se rekombinira z DNA bakterije

Specializirana transdukcija: zaradi nepravilne ekscizije profaga nastane fag, ki nosi s seboj vedno točno določene dele gostiteljskega kromosoma (tiste ki ležijo levo ali desno od mesta lizogenacije-mesta vstavitve faga). Tak transducirajoči fag prenaša vedno točno določene dele kromosoma

Vaja: Z bakteriofagom P22 delamo splošno transdukcijo v bakterijske seve Salmonella typhimurium. S splošno transdukcijo se lahko prenašajo relativno majhni odseki DNA (največ v velikosti fagnega genoma- pakiranje v fagne glave). Na vaji smo s fagi P22 prenesli (transducirali) gen, ki posreduje rezistenco proti tetraciklinu.

- Priprava transducirajočih bakteriofagov P22 na sevu bakterije ki ima determinanto rezistence proti tetraciklinu: prekonočna nasičena kultura rezistentnega seva + LB z dodanimi bakteriofagi→ inkubacija→ centrifugiranje→ ostanki liziranih celic na dnu+ namnoženi bakteriofagi v supernatantu= fagni lizat→ spiranje s kloroformom
- Transdukcija gena, čigar produkt posreduje odpornost proti tetraciklinu: prekonočna kultura neodpornega seva+ fagni lizat→ inkubacija→ razmaz nerazredčene transduksijske mešanice na ploščo z gojiščem LB-Tet in 10x razredčene na drugo ploščo→ inkubacija→zrastejo samo tiste ki so prejele gen
- Kontrola: s kontrolo se prepričamo da na selekcijskem gojišču za transduktante ne zraste neodporni sev niti nič iz fagnega lizata s katerim naredimo transdukcijo: na LB-Tet odpipetiramo neodporen sev in fagni lizat (ločeno)
- Ugotavljanje titra (koncentracije) bakteriofaga: redčenje fagnega lizata (P22/odporen sev) s fiziološko do 10^8 in 10^9 (v epruveto z mehkim agarjem neodporen sev + razredčen fagni lizat→ inkubacija→štetje plakov):
št.plakov x redčitev x 10= X pfu/mL
- Ugotavljanje frekvence transdukcije = razmerje med št. transduktant/mL in številom bakteriofagov v lizatu (titer faga)
Frekvenca transdukcije= št. transduktant deljeno s titrom faga

Kaj vse (kateri fagi) so po toplotni indukciji seva CSH 135 v fagnem lizatu?

MudX in Mucts62. Prej sta bila inkorporirana v gostiteljskem genomu. Toplotna indukcija povzroči sprostitve iz kromosoma.

Litični ciklus: fagna DNA vstopi v celice→ replikacija in transkripcija fagne DNA→ sinteza fagnih proteinov→ sestavljanje novih fagov→ celična liza in izpustitev novih fagov

Lizogeni ciklus: v nekaj bakterijskih celicah se fagna DNA integrira v bakterijski kromosom in celica se še naprej normalno deli- stabilno stanje, lahko neprekinjeno dolgo časa, dokler ni stimulusa ko sproži profag in celica vstopi v litični ciklus

Pakiranje fagne DNA v kapside:

- »**head full**«: DNA se pakira v kapsido dokler je prostor po principu kotalečega kroga. Encimi za pakiranje spoznajo določena zaporedja PAC- zaporedja (konci niso enaki)
- **Cos-mesta:** točno določena mesta ki omejujejo začetek in konec fagnega zaporedja. Encimi spoznajo 2 cos-mesti in odrežejo. Vsi fagi imajo določeno DNA (cos mesta..lepljivi konci..poskrbijo da se zaokroži)

Pomen transdukcije v medicinski mikrobiologiji (lizogena konverzija)

Z lizogeno konverzijo se lahko nevirulentne bakterije spremenijo v zelo virulentne- virulentni faktorji se lahko prenašajo na profagih

Kaj je lizogena konverzija?

Je sprememba fenotipa neke bakterije, bodisi v morfološkem ali metabolnem pogledu, ki je posledica lizogenije. Lizogenija je stanje bakterijske celice, ki ima v svojem kromosomu vgrajen genetski material virusa. Fag prenaša virulenčne dejavnike; kadar je v bakteriji, vključen v kromosom, se njena virulenca poveča. Npr. s proizvodnjo toksinov. Primeri: *Vibrio cholerae*; *C. botulinum*, *Corynebacterium diphtheriae*; *Streptococcus pyogenes*; vsi ti so virulentni (tj. delajo toksine) zaradi fagov. Virulenten = škodljiv.

Ali se lahko s transdukcijo prenesejo plazmidi? Plazmidi se po mojem ne morejo transducirati, ker so preveliki. Prenašajo se lahko manjši plazmidi, ki so naravno prisotni v celicah (?)

Kaj je kotransdukcija? Je sočasen prenos dveh ali več genov iz ene bakterije v drugo z istim bakteriofagom. Lizogeni fag pri izrezovanju samega sebe s kromosoma vzame s sabo več bližnjih in blizu skupaj ležečih genov kromosoma. S kotransdukcijo se lahko prenašajo samo geni, ki so blizu skupaj. Bližje kot so, večja je verjetnost kotransdukcije.

Ali se s transdukcijo prenašajo večji ali manjši odseki kromosoma glede na kojucijo?

S transdukcijo se prenašajo manjši deli DNA ene bakterije. Pri splošni transdukciji lahko predpostavimo, da se lahko prenese celoten genom celice, vendar samo po delih (en fag- en del). Določena je velikost glede na velikost fagne glave.

Zakaj uporabljamo transdukcijo v laboratoriju?

Transdukcijo uporabljajo molekularni biologi za stabilno vstavitve tujega gena v gostiteljski genom (ni potreben celični stik!)

Pomen transdukcije v naravi?

Prenos genov (za rezistenco, encime) ki bakteriji dajo nove/uporabne lastnosti- pomemben evlucijski faktor

Spojitev regulatornih regij preučevanih genov s poročevalskimi-reporterskimi geni

Velikokrat nas zanima **uravnava je izražanja posameznih genov**, npr. kaj v okolju (sami celici ali zunaj nje) vpliva na to ali se gen izraža in na nivo izražanja. Količine produktov genov ne moremo vedno meriti, ker večina genov ne kodira fenotipsko enostavno sledljivih lastnosti (produktov)

Ker je transkripcija odvisna od regulatorne regije (ne pa od samega strukturnega gena) lahko regulatorno regijo gena (katerega izražanje želimo preučiti) spojimo z **reproterskim/poročevalskim genom**(=gen z zapisom za lastnost, ki jo lahko enostavno fenotipsko zasledimo in tudi količinsko ovrednotimo.. pogosti: gen za β -galaktozidazo, gen za luciferazo in gen za zeleni fluorescenčni protein- GFP)

Kako spojimo regulatorno regijo preučevanega gena s poročevalskim genom?

- Poročevalski geni ki jih uporabljamo so večinoma na vektorjih (plazmidih)
- S pomočjo restrikcijskih encimov v tak vektor (pred poročevalski gen) vstavimo izoliran fragment DNA z regulatorno regijo gena ki ga preučujemo- **hibridni vektor**

Z izrezovanjem in dodajanjem posameznih nukleotidov v regulatorno regijo pripravimo vrsto hibridnih vektorjev (z mutacijami v regulatorni regiji). Ta hibridni vektor lahko vnesemo nazaj v laboratorijskega gostitelja in tako opazujemo sovpadanje vrste in pozicije mutacije s količino nastalega produkta, ki ga zapisuje poročevalski gen- iz tega lahko sklepamo **kateri deli regulatornih regij so pomembni za izražanje gena**

Lahko opazujemo vpliv različnih regulatornih dejavnikov na izražanje poročevalskih genov- Vnašanje hibridnega plazmida z nemutirano regulatorno regijo vnašamo v različne **izogene seve** (=sevi ki se razlikujejo le v enem genu- običajno je to gen za nek regulatorni dejavnik katerega vpliv na izražanje našega gena proučujemo

Hibridni vektor lahko vnesemo tudi v celice **evkariotskih organizmov**. Če se iz posamezne celice razvije cel organizem ima vsaka celica tudi naš reporterski gen vezan na regulatorno regijo, ki jo preučujemo. Če je naš reporterski gen GFP lahko takšna celica zeleno fluorescira ob osvetlitvi s svetlobo primerne valovne dolžine. Takšno transgeno žival lahko izpostavimo različnim razmeram ali dejavnikom (spr temperature, hrane) hkrati pa spremljamo izražanje reporterskega gena. Iz tega lahko sklepamo kako se v takšnih okoliščinah izraža (originalni) gen, ki je sicer za regulatorno regijo. Prav tako pa lahko v embriologiji zasledujemo časovno in prostorsko vklapljanje izražanje preučevanih genov.

Transkripcijske (operonske) fuzije:

Za transkripcijske fuzije je značilno da ima poročevalski gen lastno mesto *rbs* in ATG kodon. Iz celokupne prepisane mRNA se na ribosomu zato prevedeta 2 proteina: cel ali okrnjen **protein X** (tisti, ki ga preučujemo vendar ga je fenotipsko težko zaznati) in **reporterski protein**.

Translacijske (genske) fuzije:

Pri translacijskih fuzijah pa poročevalski gen nima svojega mesta *rbs* in ATG-kodona in je sklopljen s celim ali okrnjenim genom, katerega izražanje preučujemo. Tako se na ribosomu prevede v en sam, iz produktov dveh genov sestavljen hibridni protein

V nobenem primeru (transkripcijske in translacijske) pa poročevalski geni nimajo lastnih regulatornih zaporedij za vezavo polimeraze RNA in je prepisovanje odvisno izključno od promotorja preučevanega gena

Kako lahko namnožimo bakteriofage iz lizogenega bakterijskega seva?

Bakteriofage vzgajamo v gostiteljskih celicah. Fagna DNA se prenaša skozi generacije ob delitvah neopaženo, poseben stimulus (UV, kemikalije) pa lahko sprožijo njegov litični cikel.)

V katerem primeru dobimo uspešno fuzijo faga MudX s promotorji seva CSH142? Kako to opazite?

Sev okužimo z lizatoma bakteriofaga. Po vstopu v gostiteljsko celico se bo fag vključil na različna mesta v kromosom bakterije. Če se vključi tako, da se *lac* operon faga poveže(=fuzija) z aktivnim promotorjem, dobimo aktivno transkripcijsko enoto (pomeni da je fuzija uspešna). Če je fuzija pravilna in je promotor aktiven se prepíše gen za β -galaktozidazo. Ker bomo na plošče z gojiščem dodali X-gal (analog laktoze) bodo kolonije (kjer so bakterije s pravilnimi fuzijami in aktivnimi promotorji) modre.

Izolacija DNA

Principi izolacije DNA

1. Namnoževanje bakterij in pobiranje pridelka:

- Namnoževanje kulture: nacepimo kulturo v npr juho LB- inkubiramo preko noči na rotacijskem streaslniku
- ločitev celic od rastnega gojišča s **centrifugiranjem**

2. Liza celic- sprostitve vsebine (priprava celičnega ekstrakta)

- **EDTA:** veže divalentne katione (Mg^{2+}) in na ta način destabilizira *zunanj*o membrano, tako da lahko lizocim pride do celične stene. EDTA poleg tega inhibira DNA-ze, ki bi sicer lahko razgradile DNA.
- **Lizocim:** je encim ki ga najdemo v beljaku, slini, solzah in razgradi polimere v rigidni celični steni
- **Detergent (npr. SDS):** raztaplja membranske proteine- celična vsebina se sprosti
- Ločevanje supernatanta od ostankov celične stene s **centrifugiranjem**.
- *Rastlinske in glivne celice potrebujejo dodatno obdelavo (mehansko ali encimatsko) zaradi drugačne celične stene*
- *Nenadna liza celice običajno povzroči fragmentacijo kromosomske DNA. Za izolacijo nepoškodovane kromosomske DNA zato uporabljamo druge metode. Opisani postopek je zato bolj primeren za izolacijo plazmidne DNA.*

3. Ločitev DNA od ostalih komponent

- **Odstranitev proteinov:**
 - Ekstrakcija proteinov z mešanico fenola in kloroforma (1:1). Pri mešanju proteini denaturirajo in se oborijo v interfazi. Nukleinske kisline ostanjejo v zgornji vodni fazi, ki jo odpipetiramo
 - Afinitetna kromatografija
 - Razgradnja s proteolitičnimi encimi- npr. proteinaza K
- **Odstranitev RNA:** z encimom ribonukleaza

4. Koncentriranje raztopine DNA

- **Obrajanje DNA z etanolno precipitacijo:** To je najpogosteje uporabljena metoda za izolacijo –obarjanje DNA iz vodnih raztopin. Ob prisotnosti soli (=monovalentnih kationov: Na^+ , K , NH_4) in temperaturi $20^{\circ}C$ ali manj, etanol učinkovito precipitira NK. Etanol odstrani hidratacijski ovoj iz nukleinskih kislin. Posledično se izpostavi negativni naboj na fosfatnih ostankih DNA. Monovalentni kationi nevtralizirajo ta naboj. Tako se zmanjšajo odbojne sile med polinukleotidnima verigama do takšne mere, da se DNA obori iz raztopine. Včasih se oborijo tudi nekatere soli, ki pa jih lahko odstranimo s spiranjem s 70-80% etanolom.

Ločevanje plazmidne DNA od kromosomske

- **Po velikosti:** Če pri izolaciji DNA iz bakterij celice previdno liziramo, so zlomljeni fragmenti kromosomske DNA še vedno večji od plazmidov, in jih lahko odstranimo skupaj z drugimi celičnimi ostanki (bakterijski kromosom je pripet na zunanjo membrano) s centrifugiranjem.
- **Po zgradbi-obliki:** Večina plazmidov v bakterijskih celicah je v obliki ccc(superzviti), medtem ko so fragmenti kromosomske DNA linearni
 - **Alkalna denaturacija:** tehnika bazira na ozkem rangu pH pri katerem linearna kromosomska DNA denaturira, ccc plazmidna DNA pa ne. Če dodamo natrijev hidroksid in tako naravnamo pH na 12-12.5 se vodikove vezi v linearni kromosmski DNA pretrgajo- dvojni heliks se odvij. Nato dodamo kislino- verige denaturirane DNA se znova povežejo v zavozano maso. Tako oborjeno kromosomsko DNA lahko ločimo od plazmidne s centrifugiranjem- plazmidna ostane v supernatantu.
 - **Centrifugiranje lizata v gradientu cezijevega klorida in etidijevega bromida:**

Izolacija pDNA z alkalno hidrolizo: kaj se zgodi v izolacijski mešanici po dodatku raztopine I, II in III?

- **Raztopina I** (glukoza, Tris-CL(pH8), EDTA): EDTA razgradi zunanjo membrano
- **Raztopina II** (NaOH, SDS): SDS raztopi membranske proteine, NaOH dvigne pH na 12-12.5 (vodikove vezi v kromosomski se pretrgajo)
- **Raztopina III** (kalijev acetat, očetna kislina): spust pH (kromosomska se poveže v zavozlano maso)

Izolacija plazmidne DNA

- **z alkalno hidrolizo.** (ds DNA se razbije na enovrežno.. ccc ostane isti.. centrifugiranje)
- **z lizo bakterijskih celic** ob povečani temperaturi "boiling lysis method" Ta izolacija je primerna za manjše plazmide in za izolacijo iz sevov z veliko ogljikovih hidratov.
- **direktno iz kolonije.** Taka DNA ni dovolj čista za npr. restrikcijo, ligacijo,...

- s komercialnimi kompleti (kiti) za izolacijo pDNA.

Opišite uporabo CTAB (cetil-amil amonijevega bromida) pri preučevanju kromosomske in plazmidne DNA ter pri čiščenju DNA s komercialnimi kompleti(kiti).

CTAB je detergent ki tvori kompleks z nukleinskimi kislinami. Ko je dodan k celičnemu ekstraktu se kompleks NK-CATB obori in pusti ogljikove hidrate, proteine in drugo v supernatantu. Po centrifugaciji oborino resuspendiramo v 1M NaCl, ki razbije kompleks. NK lahko potem koncentriramo z oborjenjem z etanolom. RNA se znebimo z ribonukleazami.

- Iz raztopin z nizko ionsko jakostjo obarja nukleinske kisline in kisle polisaharide, proteini in nevtralni polisaharidi pa ostanejo v raztopini (izolacija plazmidne)
- V raztopinah z visoko ionsko jakostjo (>0.7 M NaCl) pa tvori CTAB komplekse s proteini in (predvsem) kislimi polisaharidi, ne obarja pa nukleinskih kislin. (izolacija kromosomske)

Gvanidinijev tiocianat= močan denaturant in ima dve uporabni lastnosti pri izolaciji DNA: Denaturira in raztopi vse molekule razen DNA. Tako se le-ta lahko sprosti iz celic in tkiv. Ob prisotnosti gvanidinijevega tiocianata se DNA veže na silikatne delce. Tako lahko izločimo DNA iz mešanice denaturiranih celičnih sestavin. (Uporaba v kompletih). Ker inhibira/denaturira tudi endogene RNAze, se uporablja tudi pri izolaciji RNA

Čiščenje plazmidne DNA:

- S fenolno ekstrakcijo (denaturiranih proteinov), sledi obarjanje DNA z etanolom ali izopropanolom.
- S kromatografijo (kompleti: hidrofobne interakcije, ionsko izmenjevalne in adsorpcijske kolone).
- Čiščenje plazmidne DNA oblike ccc s centrifugiranjem v gradientu cezijevega klorida in etidijevega bromida.

Navedite najpomembnejše lastnosti/značilnosti plazmidov!

- Krožna molekula DNA (neodvisno v bakterijski celici)
- Nosi enega ali več genov, ki so velikokrat odgovorni za koristne lastnosti (rezistenca na antibiotik)
- Ima vsaj eno ORI mesto (=origin of replication)- kar pomeni da se lahko v celici delijo neodvisno od glavnega bakterijskega kromosoma
- Velikost plazmidov variira od 1 kb- 250 kb (kot vektor za kloniranje so uporabni samo tisti z okoli 10 kb)
- Nekateri plazmidi se lahko vgradijo v kromosomsko DNA in se z njo podvajajo

Restrikcija

Napiši 5 restriksijskih in modifikacijskih encimov, način delovanja in za kaj se uporabljajo v laboratoriju.

***Nukleaze:** režejo, skrajšajo NK

-eksonukleaze: postopno odstranjujejo nukleotide s koncev DNA

- *Bal31*: odstranjuje nukleotide iz obeh verig dsDNA (dlje kot deluje, krajši je fragment)
- *Eksonuleaza III*: nukleotide odstranjuje samo iz ene verige dsDNA (rezultat: ssDNA)

-endonukleaze: cepijo fosfodiestrsko vez znotraj verige

- *S1*: reže samo ssDNA
- *Dnaza I (deoksiribonukleaza I)*: reže ssDNA in dsDNA (rezultat: mešanica mononukleotidov in kratkih oligonukleotidov)
- *Restriksijske endonukleaze*: režejo dsDNA na omejenih specifičnih prepoznavnih mestih-palindromska zaporedja (za kloniranje- tip II)

Primeri restriksijskih endonukleaz

encim	spoznano zaporedje (bp)	nastali konci	izvor encima	
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	6	5' lepljivi	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>BamHI</i>	G/GATCC	6	5' lepljivi	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>BglII</i>	A/GATCT	6	5' lepljiv	<i>Bacillus globigii</i>
<i>PstI</i>	CTGCA/G	6	3' lepljivi	<i>Providencia stuartii</i>
<i>XmaI</i>	C/CCGGG	6	5' lepljivi	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	6	topi	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Sau3A</i>	/GATC	4	5' lepljivi	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
<i>AhaI</i>	AG/CT	4	topi	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>NciI</i>	GC/GGCCGC	8	5' lepljivi	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
<i>PacI</i>	TTAAT/TAA	8	3' lepljivi	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>

***Ligaze:** združijo 3'OH in 5'P konec v verigi DNA s fosfodiestersko vezjo

***Polimeraze:** sintetizirajo novo verigo DNA, ki je komplementarna na obstoječo matrično DNA ali RNA

- *DNA polimeraza I*: pritrdi se na kratko regijo ss (zareza) v večinsko ds -sintetizira novo ss verigo in odstranja že obstoječo ss (taq Dna- za PCR, termostabilna, zdrži visoke potrebne temperature)
- *Klenow fragment (modificiran iz DNA pol I- ima samo njeno polimerizacijsko funkcijo)*: samo zapolni zarezo (uporaben za sekvenciranje)
- *Reverzna transkriptaza*: sinteza verige DNA z uporabo RNA matrice (za tehniko complementary DNA kloniranja- cDNA)

***Modifikacijski encimi:** modificirajo DNA z adicijo ali odstranitvijo specifičnih skupin

- *Alkalna fosfataza*: odstrani fosfatno skupino iz 5' konca
- *Polinukleotidna kinaza*: adicija fosfatne skupine na 5' konec
- *Terminalna deoksinukleotidna transferaza*: doda 1 ali več nukleotidov na 3' konec

RFLP: »Restriction fragment length polymorphism«: variacije v velikosti fragmentov po restrikciji DNA.

Razlike v velikosti fragmentov zaradi različnega števila ponovitev sekvenc znotraj restriksijskih mest.

Princip ločevanja DNA z gelsko elektroforezo. Kako lahko vidimo DNA na gelu? Sestava pufru TBE.

***Princip ločevanja:** Elektroforeza na podlagi različnih nabojev loči molekule. DNA ima negativni naboj in tako migrirajo proti pozitivnemu polu, če jih postavimo v električno polje. Hitrost premikanja molekule je odvisna od njene oblike in razmerja med maso in nabojem. DNA molekule so vse enake oblike, zato elektroforezo izvajamo v gelu. Gel je običajno iz agaroze, poliakrilamidov ali njune mešanice. Gel vsebuje kompleksno mrežo por skozi katere mora DNA potovati da doseže pozitivni konec. Manjša kot je molekula, hitreje in posledično dlje se prebije skozi gel. Gelska elektroforeza tako ločuje molekule DNA po velikosti.

***Ugotavljanje velikosti fragmentov:** Po elektroforezi primerjamo hitrost potovanja linearnih fragmentov DNA v našem vzorcu s hitrostjo potovanja fragmentov linearnega velikostnega standarda (npr. 1kb ruler od Fermentas-a). Ker je velikost linearnih fragmentov v standardu znana, lahko sklepamo, da je naš fragment, ki je v enakem č od linearnih fragmentovasu prepotoval enako po, enako velik. Hitrost potovanja nerazrezanega plazmida v ccc obliki ne smemo primerjati s hitrostjo potovanja linearnih fragmentov standarda. DNA v ccc obliki potuje hitreje

***Ugotavljanje koncentracije DNA:** primerjava fluorescence etidijevega bromida v našem vzorcu s fluorescenco standarda z znano koncentracijo DNA (masni standard)

***Kako jo lahko vidimo:** Po končani elektroforezi gel položimo na transiluminator, ki ima izvor UV svetlobe z valovno dolžino 320nm. Etidijev bromid (ki ga dodamo gelu ob pripravi) se vrine med bazne pare v DNA in absorbira UV svetlobo pri 320nm, ter jo nato oddaja (fluorescira) pri 590nm. (primerjava koncentracij). Ker pa je EtBr mutagen uporabljamo druga barvila (pufri) k obarvajo DNA zeleno, rdeče ali modro. Večina se jih uporabi po elektroforez ali pa so vključeni v pufer v katerem je gel pripravljen. Nekatera barvila potrebujejo UV svetlobo da jih lahko vidimo, druga barvila lahko zaznamo pa z osvetljevanjem z drugimi valovnimi dolžinami (modra luč)

***Sestava pufra TBE:** Tris baze, borova kislina, EDTA; pH8, voda

Opišite poskus s katerim so odkrili restrikcijske encime:

V letu 1950 se je pokazalo, da so nekateri bakterijski sevi imuni na infekcijo s fagom- fenomen z imenom »host-controlled restriction«. Do restrikcije pride, ker bakterija proizvaja encim ki razgradi fagno DNA preden ima čas da se ta replicira in sintetizira nove fagne dele. Bakterijska DNA je pred lastnim encimom zaščitena, ker nosi dodatno metilno skupino ki prepreči encimu razgradnjo. Ti encimi se imenujejo restrikcijske endonukleaze, ki jih imajo skoraj vse bakterije.

Delna restrikcija: Encimu onemogočimo da reže na vseh mestih kjer ima prepoznavno mesto (restrikcijska mesta). To dosežemo s skrajšanjem inkubacijske dobe (da encim nima časa rezati na vseh mestih), z manjšo količino encima in z inkubacijo pri nizki temperaturi (kar omeji aktivnost encima).Uporabljamo encime ki imajo spoznavno mesto dolgo 4bp in cepija DNA pogosteje. Delne restrikcije se uporabljajo za pridobivanje prekrivajočih se fragmentov za genomske knjižnice. **Popolna restrikcija** je ravno obratna- encim reže na vseh mestih kjer ima spoznavno zaporedje

Kako pripravimo delne restrikcije?

- V mikrocentrifugirko damo želeno količino **DNA raztopljene v pufru TE** (vloga pufra TE je »raztopiti« DNA in jo varovati pred razgradnjo).
- Preden dodamo encim, mora biti raztopina v kateri je DNA prilagojena, da zagotovi prave pogoje za delovanje encima- to storimo z dodatkom **restrikcijskega pufra**. Večina restrikcijskih nukleaz ima optimum pri pH 7.4. Mnogi pa se razlikujejo v potrebi po ionični moči (NaCl) in koncentraciji Mg²⁺. Vse restrikcijske endonukleaze potrebujejo magnezij za delovanje (koncetracija Mg in NaCl je zelo pomembna). Vse to vsebuje resrikcijski pufer za določen encim.
- Glede na encimske enote nato dodamo ustrezno količino **restrikcijske endonukleaze** (ki jo dobimo od komercialnega dobavitelja, kot čisto raztopino z znano koncentracijo) v mešanico. Za delne restrikcije uporabimo encime, ki imajo spoznavno zaporedje dolgo 4bp in režejo DNA pogosteje
- Poleg tega dodamo v mešanico še **sterilno vodo**, da dobimo skupen volumen 20 µL.
- Restrikcijsko mešanico nato **centrifigiramo** in damo v **inkubacijo**. Inkubiramo v vodni kopeli na 37°C (večina restrikcijskih endonukleaz deluje najbolje pri taki T).
- Za namene delne restrikcije **zmanjšamo čas inkubacije** (za popolno restrikcijo traja inkubacija 1 uro) na nekaj minut in mešanico takoj po inkubaciji prestavimo v **vodno kopel ogreto na 68°C**, da inaktiviramo encim.

Enota za encim: 1 enota za encim je definirana kot količina (encima) potrebna za rezanje 1 µg DNA v eni uri.

Kako inaktiviramo restrikcijske mešanice?

Če imamo namen dobljene fragmente DNA (po restrikciji) uporabiti pri kloniranju, moramo nekako uničiti encim, da kasneje ne razgradi druge molekule DNA, ki bi jih dodali. Inaktiviramo jih lahko s kratko inkubacijo pri 70°C, s fenolno ekstrakcijo ali z dodatkom EDTA (etilendiamin tetraacetat), ki veže Mg²⁺ ione in prepreči delovanje restrikcijske endonukleaze.

Ali lahko uporabite restriksijsko mešanico za nadaljno restrikcijo, če ste prvo restrikcijo inaktivirali z dodatkom EDTA? Kaj boste storili?

Lahko uporabimo to mešanico, ker EDTA dejansko ni škodil encimu v smislu ireverzibilne denaturacije, ampak mu je samo odvzel Mg^{2+} ione (vezal jih je nase) ki jih encim potrebuje za delovanje. Mešanici bi samo dodali Mg^{2+} ione v taki količini, da jih je poleg tistih vezanih na EDTA v mešanici dovolj za normalno delovanje encima.

Po navodilih ste pripravili restriksijsko mešanico. Po analizi ste ugotovili, da restrikcije ni bila uspešna. Zakvaaj? Kateri so možni vzroki?

Previsoka temperatura inkubacije, premalo encima.

Kakšne encime (glede na spoznavno zaporedje) uporabljamo za pripravo vektorjev za kloniranje in kakšne za pripravo prekrivajočih se fragmentov DNA?

Prekrivajoče se fragmente DNA (za npr. genomske knjižnice) pridobivamo z delno restrikcijo. Uporabljamo restriksijske encime, ki imajo spoznavno zaporedje dolgo 4bp in cepijo DNA pogosteje (v povprečju na vsakih 256 bp)

Takih encimov pa ne moremo uporabljati za *odprtje vektorjev*, saj imajo le-ti praviloma kar nekaj mest za razcep s temi encimi (ker imajo kratko spoznavno zaporedje). Vektor bi v takem primeru razpadel na krajše odseke, ki se ne sestavijo več pravilno skupaj. Zato za odprtje vektorjev uporabljamo encime, ki imajo spoznavno zaporedje dolgo 6 bp (režejo DNA v povprečju na vsakih 4096 bp). Vektor ima ponavadi samo eno spoznavno mesto za encim in to je ponavadi v t.i. poliklonskem mestu

Transformacija

Frekvenca transformacije: Relativna frekvenca prenosa parov genov, ki se prenašata skupaj (kontransformacija) označuje razdaljo med tema dvema genoma. Geni ki so bližje skupaj se pogosteje kottransformirajo kot geni, ki so daleč narazen. Za transformacijo ne potrebujemo celičnega stika. Recipientna celica privzame DNA direktno iz okolja. DNA iz donorja moramo v ta namen sprostiti v okolje in jo razbiti na delce, ki jih recipient lahko privzame.

Transformacija & LacZ

Moderni plazmid pUC8 nosi rezistenco na ampicilin in gen imenovan *LacZ'*, ki kodira del encima β -galaktozidaza. Kloniranje z pUC8 vključuje insercijsko inaktivacijo gena *LacZ'*. β -galaktozidaza je ena iz serije encimov, ki sodelujejo v razgradnji laktoze (na glukozo+galaktozo). Ponavadi je kodirana z *LacZ* genom, ki ga najdemo v kromosomu *E.coli*. Nekateri sevi *E. coli* imajo modificiran *LacZ* gen- tako da mu manjka del *LacZ'*. Te mutante lahko sintetizirajo encim samo če dobijo plazmid (npr. pUC8) ki nosi manjkajoč del gena (= *LacZ'*). Kloniranje s pUC8 vključuje selekcijo **transformant** na agarju z dodanim ampicilinom in nato preverjanje aktivnosti β -galaktozidaze za identifikacijo **rekombinant**. Celice ki dobijo normalen plazmid (**transformante**) so rezistentne na ampicilin in zmožne sinteze encima. **Rekombinante** so tudi odporne na ampicilin ampak nezmožne sinteze encima (**dobijo plazmid v katerega je bila v gen *LacZ'* vstavljena DNA tujega organizma in ga tako inaktivirala z insercijo**). Detekcija prisotnosti β -galaktozidaze je precej enostavna. X-gal je analog laktozi, ki ga β -galaktozidaza razgradi do produkta, ki je temno modre barve. Če dodamo X-gal k agarju poleg ampicilina, bodo nerekombinantne celice ki so zmožne sinteze encima pobarvane modro, medtem ko bodo rekombinante bele. Izjemoma so lahko tudi modre, če insert ne vpliva na čitalni okvir in je posledično β -galaktozidaza ostane funkcionalna. Rezistenca na ampicilin in odsotnost β -galaktozidaze sta testirani na isti plošči.

Iskanje klonov z rekombinantnimi plazmidi

Genomske knjižnice: Genomska knjižnica je zbirka dovolj velikega števila klonov, da lahko rečemo, da vsebujejo vse gene, ki so prisotni v organizmu. Genomske knjižnice so narejene z delno restrikcijo celotnega genoma celice. Dobljene fragmente kloniramo v ustreznem vektorju.

cDNA knjižnice: uporabne za večcelične organizme- vsaka celica ima ogromen (v primerjavi z bakterijskim) genom z zapisom za številne gene, ki pa niso izraženi v vseh celicah (diferenciacija celic v krvne, kožne, mišične, živčne,...) mnogi so utišani. Ustvarjanje genomske knjižnice za tako obsežen genom je skoraj nemogoče, zato delamo cDNA knjižnice za posamezno vrsto celic. V diferencirani celici se prepisujejo samo določeni geni (zelo zastopani) v mRNA. mRNA pa ne moremo vstaviti v vektor, zato jo pretvorimo v DNA s sintezo komplementarne DNA (cDNA). Encim reverzna transkriptaza sintetizira DNA verigo komplementarno že obstoječi mRNA verigi. Ko se sinteza cDNA konča, se lahko RNA del hibrida delno razgradi z ribonukleazami- fragmenti RNA, ki ostanejo služijo, kot primerji za DNA polimerazo I, ki sintetizira srudo verigo cDNA- rezultat: ds DNA fragment ki ga lahko vstavimo v vektor in kloniramo

Kako poiščemo pravi klon iz genomske knjižnice?

-Komplementarne NK se med seboj povežeta- hibridizacija: (DNA-DNA tudi DNA-RNA kombinacije, verigi se ne rabita popolnoma ujemati da se združita). Tako hibridizacijo lahko uporabimo za identifikacijo želenega rekombinantnega gena če imamo na voljo DNA ali RNA sondo komplementarno želenemu genu (lahko je samo sosredni gen, ki ga poznamo)

- Bakterijsko kulturo ali fagne plake najprej **prenesemo na nitrocelulozno ali najlonsko ploščo**
- Vzorec nato obdelamo, da **ostanejo samo DNA** molekule- ponavadi se ob tem procesu razcepijo tudi vodikove vezi- tako dobimo individualne verige= ss DNA (heliks se odvijajo)
- Nastale **ss DNA nato tesno vežemo s ploščo** (molekule se povežejo z membrano preko sladkor-fosfatne hrbtenice- baze so proste za parjenje)
 - vezava na nitrocelulozno membrano s segrevanjem za kratek čas na 80°C
 - vezava na najlonsko membrano z obsevanjem z UV svetlobo
- **Označevanje komplementa(=sonde)** z radioaktivnim (ali kakšnim drugačnim) markerjem- inkorporacija nukleotidov z radioaktivnim izotopom fosforja. Različni načini
 - **Nick translation:** večina očiščenih vzorcev DNA ima (ne glede na pazljivost pri pripravi) zareze v verigah. To pomeni da se lahko DNA polimeraza I pritrdi na DNA in vstavi nadomestno verigo. Ta reakcija potrebuje zalogo nukleotidov- če je eden od teh nukleotidov radioaktivno označen, je tako označeno tudi molekula
- **Spiranje vzorca na filtru z označenim komplementom v raztopini** (raztopina prispeva k boljši hibridizaciji NK)
- **Spiranje nevezanih komplementov s plošče**
- **Sušenje**
- **Detekcija kolonij/plakov na katere se je vezal komplement z obsevanjem** (ker je to odtis lahko potem na mester plošči poiščeš kolonijo v kateri je gen)

Kaj je »pravi klon«? pravi klon je bakterijska celica v katero je bil vnešen gen, ki ga iščemo (nas zanima).

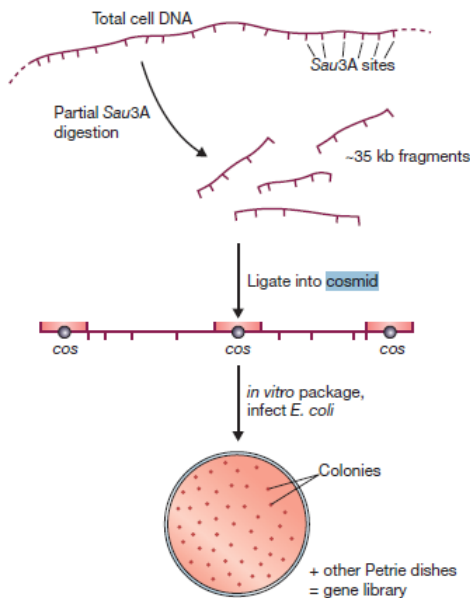
Kakšne vektorje uporabljamo za pripravo genomske knjižnice bakterij?

Običajno uporabljamo plazmide ali fage. Ekspresijski fagi morajo vsebovati še sekvence, ki omogočajo transkripcijo in translacijo tuje DNA v recipientski celici

Opišite (shema) pripravo genomske knjižnice v cosmidnem vektorju.

Cosmidni vektor= plazmid ki nosi λ cos mesto (uprabljamo ga za kloniranje DNA fragmentov velikih do 40kb). Je hibrid med fagno DNA in bakterijskim plazmidom. Encimi ki pakirajo λ DNA v fagno glavo potrebujejo le cos mesta.

Totalna celična DNA- delna restrikcija- vstavev z ligacijo v cosmid- inficiranje E.coli (vse so rekombinantne, ker se cosmidi v katere ni bil vstavljen fragment premajhni da bi šli v fagno glavo)



Kako velike fragmente želimo klonirati za pripravo genomskih knjižnic bakterij?

Za pripravo genomskih knjižnic bakterij želimo klonirati fragmente genoma, ki jih dobimo z delno restrikcijo. Taki fragmenti so lahko razmeroma veliki, velikost ni točno določena in se razlikuje od seva do seva- odvisna je od tega koliko je v genomu prepoznavnih sekvenc za restrikcijo.

Možnosti priprave in vnosa rekombinantnih molekul v rastline in kvasovke:

Čprav so plazmidi zelo prkatično za vnos genskega materiala v bakterijske celice se v veliki meri uporabljajo tudi za vnos DNA v druge organizme, predvsem za kvasovke. Pri drugih evkariontih (glive, rastline, živali) genetskega materiala ne moremo najti v obliki plazmidov (imajo samo kromosome). Za take višje organizme kot vektorje uporabimo viruse.

Rastline: genetski material v rastline vnašamo s 3 metodami

- Vektorji na osnovi naravnega plazmida *Agrobacterium*
 - *Ti plazmid* (iz bakterije *Agrobacterium tumifaciens*): velik- preko 200kb, vsebuje gene ki pri rastlinah povzročijo tumorsko rast, plazmid se lahko integrira v rastlinski kromosom (kar pomeni da lahko v rastlino vstavimo kakršnekoli gene- te enostavno vstavimo v plazmid), slabost: zaradi velikosti je z njim težko manipulirati (otežena specifična restrikcija)
 - *Ri plazmid* (iz bakterije *Agrobacterium rhizogenes*): zelo podoben *Ti* plazmidu, povzroča bolezen korenin- močna delitev celic- tanke zelo razvejane korenine
 - *Ti in Ri plazmida* uporabljamo za vnos genskega materiala v dvokaličnice. V enokaličnice genski material vnašamo z balističnimi izstrelki
- Direktno vnos genetskega materiala v jedro
- Vektorji na osnovi rastlinskih virusov

Kvasovke:

- 2 μ m plazmid: 6kb (idealno za vektor), sposoben replikacije, naraven- iz njega izhajajo episomalni plazmidi
- Integrativni plazmidi- biotehnoški, bolj učinkoviti, več različnih kvasovk ga lahko sprejme

Kaj bi storili, če bi za zaporedno restrikcijo uporabil encima, ki ne delujeta v enakem pufri?

Najprej omogočiš pogoje za delovanje prvega encima z ustreznim pufrom. Mešanico inkubiraš in nato inaktiviraš (najbolje da s temperaturo). Mešanico nato spiraš s pufrom ki ustreza pogojem drugega encima in šele nato dodaš drugi encim. Mešanico inkubiraš in inaktiviraš.

Kako bi ugotovili velikost izoliranega plazmida? Elektroforeza s standardi z znano velikostjo

Kaj je in kako bi pripravili restrikcijsko mapo izoliranega plazmida?

Restrikcijska mapa je mapa plazmida, na kateri so označena spoznavna mesta za restrikcijske encime. Tako mapo bi lahko naredil tako, da bi fragmente plazmida (dobljene s popolno restrikcijo) znova sestavil nazaj- prekrivajoči elementi pokažejo kje se je godil rez

PCR= polymerase chain reaction

PCR= verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

- Poznati moramo nukleotidna zaporedja ki mejijo na odsek DNA ki ga želimo pomnožiti, zato da lahko dizajniramo začetna oligonukleotida- primerja
- Najbolj poznana in največkrat uporabljena polimeraza= Taq
- **Priprava PCR mešanice** v tankostenski mikrocentrifugirki:
 - vzorec DNA
 - enaka koncentracija vseh 4 nukleotidov (dNTP)
 - začetna oligonukleotida (povečana koncentracija povzroči da polimeraza naredi več napak ali pajo celo inhibira)
 - Magnezijev klorid (je kofaktor polimeraze Taq.. več ko ga je več bo produkta
 - pufer za delovanje polimeraze (vzpostavi optimalen pH za delovanje polimeraze)
 - polimeraza (Taq, Pfu)
- **Pomnoževanje:**
 - **Začetna denaturacija** (93-95/ 5 min)
 - **Ciklično** ponavljanje **denaturacije** (95/30sek), **vezave začetnih oligonukleotidov** (50-60/30sek) in **izgradnje verige** DNA (72-74/ Taq potrebuje 1min za 1kb- 1.5 min)... **20-35 ciklov**
 - **Zaključno pomnoževanje** (72-74/ 7 min)
 - Zakaj take temeperature
 - 93-95: razcepi vodikove vezi med bazami in tako pripravi ssDNA matrico za sintezo ki sledi
 - 50-60: primerji se vežejo na matrico.. če je temperatura previsoka ne pride do hibridizacije in tako matrica in primerji ostanejo ločeni.. če pa je temperatura prenizka se tvorijo stabilni hibridi pri katerih niso vse baze pravilne povezane (mismatch hybrids)
 - 72-74: DNA sinteza.. ponavadi malo pod optimumom Taq polimeraze

PCR pomnožek→ analiza prisotnosti in velikosti (agarozna gelska elektroforeza)/ Izrez iz gela ali direktno čiščenje v PCR-mešanici s kompletom in sekvenciranje ter analiza nukleotidnega zaporedja. (RFLP, STR, genetski testi,...)/ Kloniranje PCR-pomnožkov v vektor(je) (metagenomske knjižnice mestno specifična mutageneza).

Sekvenciranje

- Izhodiščna matrična DNA za sekvenčno reakcijo je lahko **PCR pomnožek** – fragment linearne DNA ali pa **kloniran fragment**.
- Pri fragmentih, ki jih kloniramo v t.i. standardne vektorje npr. pUC19, za sekvenciranje uporabimo začetne nukleotide, ki se vežejo na plazmidno DNA na koncu poliklonskega mesta. Tako lahko za sekvenciranje različnih insertov v enak vektor uporabljamo enake začetne oligonukleotide.
- “Klasično” encimsko **sekvenciranje po Sanger-ju** temelji na blokirani sintezi komplementarne DNA zaradi dodanih dideoksinukleotidov (DNA polimeraza potrebuje prost 3' konec, vstavitve dideoksinukleotida prepreči nadaljno sintezo). Analizo velikosti dobljenih fragmentov, ki so nastali po dodatku različnih dideoksinukleotidov v posamezne reakcijske mešanice, lahko naredimo z elektroforezo na **poliakrilamidnih gelih**.
 - 4 reakcije: ssDNA, primer, vse 4 nukleotide –dNTP, DNA polimeraza + 1 ddNTP
 - dodajanje nukleotidov, dokler ddNTP→ posledično različno dolgi kosi DNA
- **Avtomatsko sekvenciranje:** primer+ ssDNA + navadni nukleotidi+ DNA polimeraza+ manjša količina ddNTP-jev označenih s fluorokromi→ sekvencijska reakcija→ elektroforeza na poliakrilamidnem gelu→ analiza podatkov

Kloniranje

Kloniranje= nespolno razmnoževanje= dobimo genetsko enake potomce

- **Kloniranje genov ali delov DNA (uporablja tehnologijo rekombinantne-hibridne DNA)** : gen ali del DNA "izrežemo" iz prvotnega genoma in ga - običajno na vektorju (da zagotovimo stabilnost in replikacijo znotraj celice) - prenesemo v drug organizem, kjer se pomnoži. Tako dobimo veliko število kopij posameznega dela DNA ali gena. (transgeni organizmi (GSO), biotehnološki procesi (rekombinantni encimi, ...) genska terapija, bazične raziskave klonirane DNA
- **Kloniranje bakterij:** namnoževanje oziroma precepljanje posameznih bakterijskih kolonij. Vsi potomci (razen v primeru mutacij) so genetsko podobni izhodni bakterijski celici – koloniji. To je bakterijski sev ali klon. Če se dve bakteriji razlikujeta samo v delu DNA (v genu ali delu gena) sta to dva različna seva ali klona.
- **Kloniranje rastlin:** vzamemo posamezne dele rastline in iz njih vzgojimo nove, genetsko enake rastline.
- **Kloniranje živali:** jedro iz somatske celice prenesemo v "izpraznjeno" jajčno celico. Razvije se osebku, ki je enak (genotip ali fenotip ??) osebku, iz katerega je jedro.
- **Terapevtsko kloniranje – matične/izvirne celice** (totipotentne, pluripotentne, multipotentne)= vzgajanje embrijev za pridobivanje matičnih celic.
- **Reproduktivno kloniranje** – prenos somatskega jedra, razdružitev posameznih celic (do 8 celic)

Vektor za kloniranje: mora vsebovati ORI mesto (origin of replication) eno ali več spoznavnih zaporedij za restrikcijo in izolirne markerje (za fluorescenco, rezistenco, UV, X-ray). Ekspresijski vektor vsebuje sekvence, ki omogočajo transkripcijo in translacijo genov. Za vnos genskega materiala v evkarionte so posebni plazimidi/vektorji (Ti, Ri)