

Sinteza cDNA

Priprava knjižnic

Transformiranje celic

sinteza cDNA 1.) izolacija RNA

cDNA: DNA, ki je komplementarna mRNA

Postopek priprave:

- izolacija celotne RNA
- izolacija mRNA
- encimska pretvorba v cDNA

Izolacija RNA

RNA rabimo tudi za: prenos northern, RT-PCR, mapiranje RNA, translacijo *in vitro*,...

- izbor tkiva
- homogeniziranje sveže odvzetega tkiva
- denaturiranje proteinov
- ločevanje od DNA

| tip mRNA | št. kopij /cel. | št. različnih mRNA/celico | delež posamezne mRNA |
|-----------------|-----------------|---------------------------|----------------------|
| redke | 5-15 | 11,000 | <0.004% |
| srednje pogoste | 200-400 | 500 | <0.1% |
| pogoste | ~12,000 | <10 | 3% |

RNaze so povsod

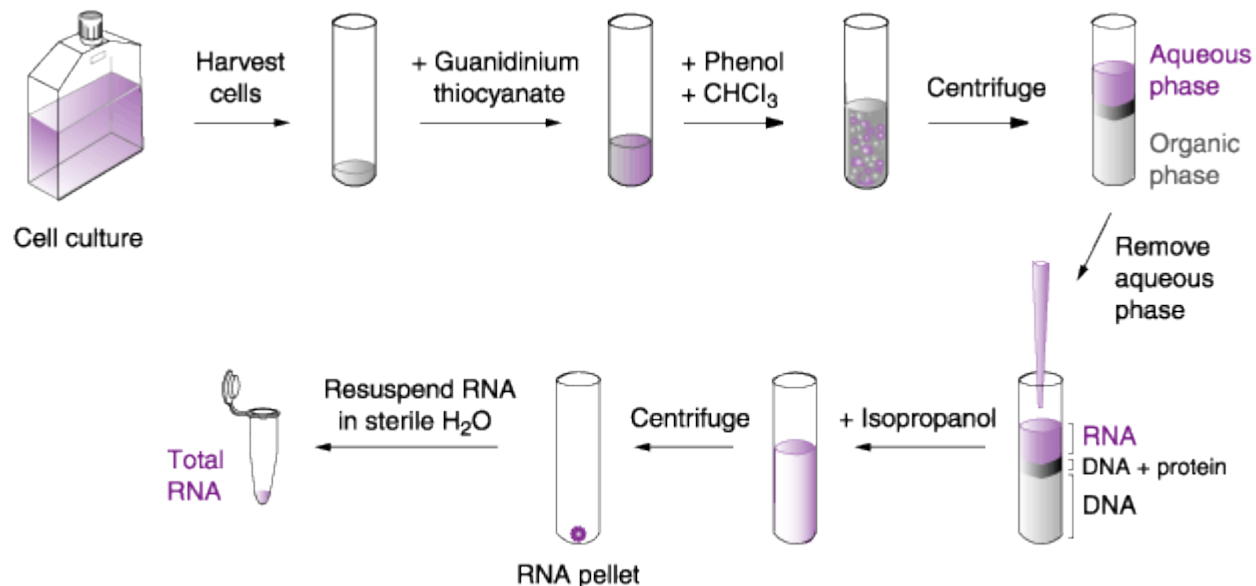
| High (4–2µg*) | Moderate (2–0.05µg*) | Low (0.05–0µg*) |
|--------------------------|--|----------------------------|
| Liver Spleen Heart | Brain Embryo Kidney Lung Ovary Thymus | Bladder Bone Adipose |
| 4µg | 2µg | 0.05µg |

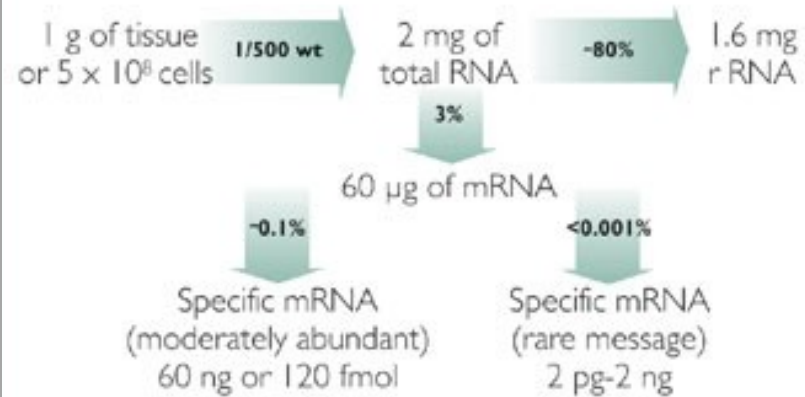
*µg total RNA/mg tissue. This is intended as a general guide only and may vary depending on physiological state or organism.

izolacija RNA /2

- Hkrati z razbitjem celic (mehansko ali encimsko) moramo zagotoviti pogoje, v katerih RNaze niso aktivne: npr. 4 M gvandinijev tiocianat, fenol, detergenti.
- Po dodatku kloroforma in centrifugiranju je RNA v vodni fazi, proteini in DNA <10 kb v organski fazi in dolge molekule DNA v interfazi.
- RNA oborimo iz vodne faze s pomočjo etanola ali izopropanola.
- Vsa steklovina je sterilizirana pri 180 °C >2 h, plastika in pufri obdelani z 0,1 % DEPC ali drugimi inhibitorji RNaz.

| | | Soft Animal Tissues (Spleen) | Hard Animal Tissues (Bone) | Plant Tissues | Arthropods | Yeast | Fungi | Bacteria | Soil, Rock |
|------------|---|------------------------------|----------------------------|---------------|------------|-------|-------|----------|------------|
| Mechanical | Grind in liquid N ₂ w/ Mortar & Pestle | • | • | • | • | | • | | |
| | Homogenize in Dounce or Polytron® | • | • | • | • | | • | • | |
| | Bead Mill | | | | | • | | • | • |
| | Freezer Mill | | • | | | | | | • |
| | Sonication | | | | | | | • | |
| Enzymatic | Lysozyme | | | | | | | • | |
| | Lyticase, Zymolase | | | | | • | | | |
| | Glucalase | | | | | | | | |



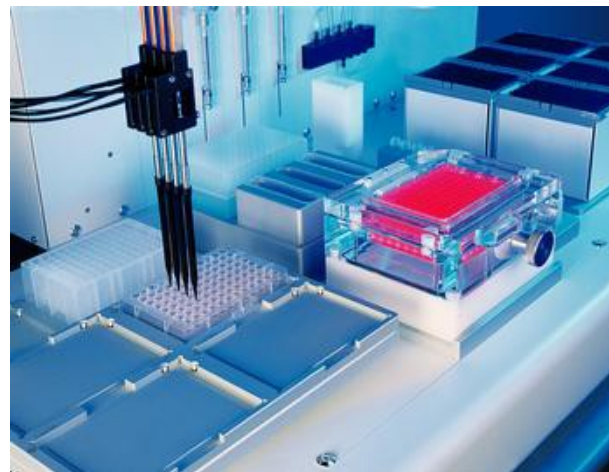
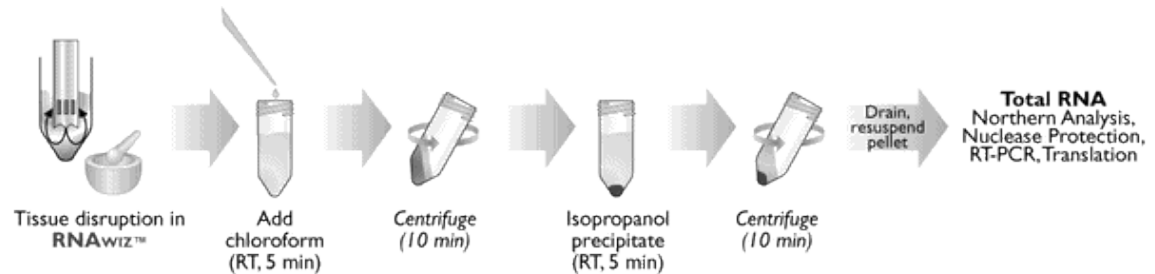


* Actual values may vary depending on tissue or cell type, physiological state, etc.

izolacija RNA /3

problematična tkiva: rastline (polifenoli; stene), mišična tkiva (vlaknasta, zato jih je težje homogenizirati), tkiva, bogata z NA (viskozni lizati, težja ločba faz), tkiva, bogata s proteini in lipidi (vodna faza belkasta), tkiva, bogata z nukleazami (razgradnja RNA).

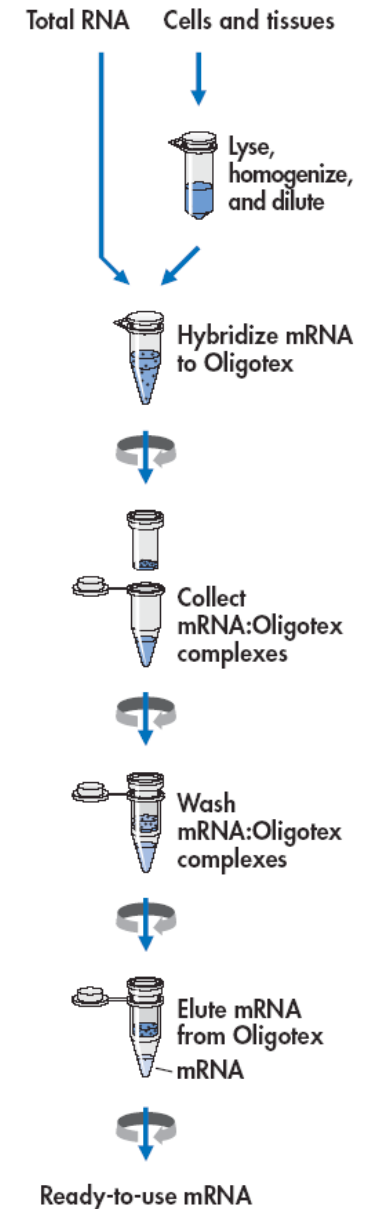
kompleti reagentov in avtomatizirani postopki

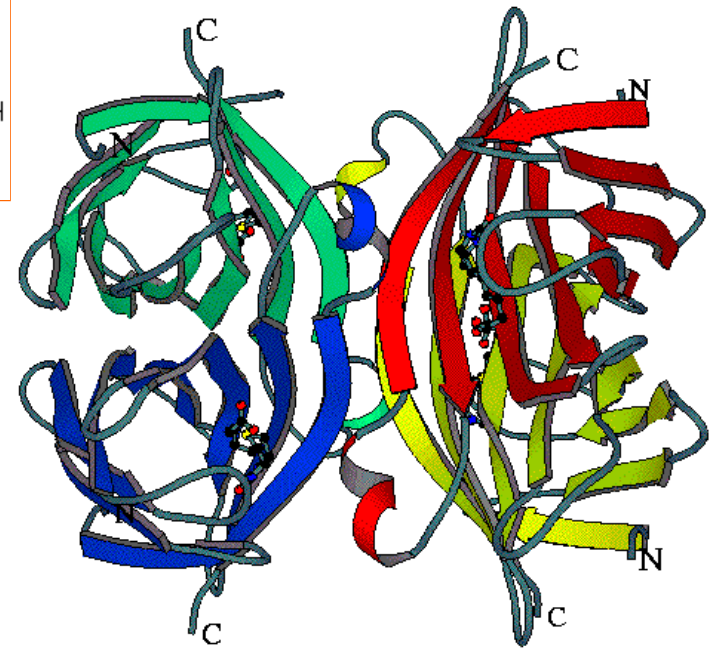
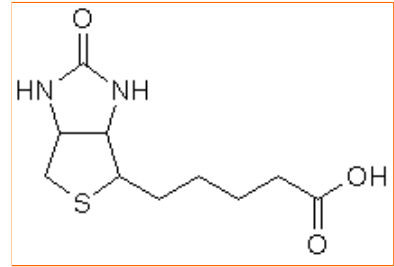
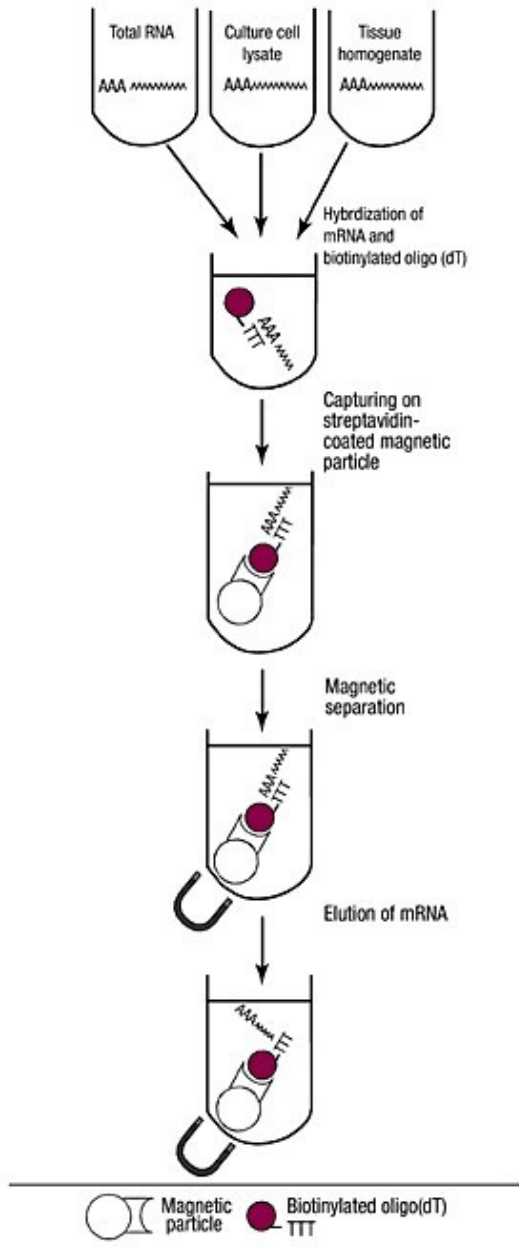


BioRobot (Qiagen)

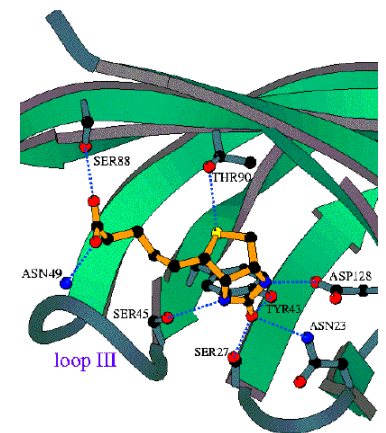
2.) izolacija evkariontske mRNA

- poli-A rep \Rightarrow afinitetna kromatografija na oligo-dT-celulozi
- oligo-dT je lahko vezan na magnetne kroglice ali druge nosilce
- vezanih je 12-30 dT zapored
- na nosilec vežemo segreto RNA v 0,5 M LiCl (3x zapored)
- speremo nevezano RNA
- eluiramo z 0,1 % NaDS
- postopek je enostaven in učinkovit
- obstajajo komercialni sistemi





<http://faculty.washington.edu/stenkamp/stefanieweb/abstract.html>

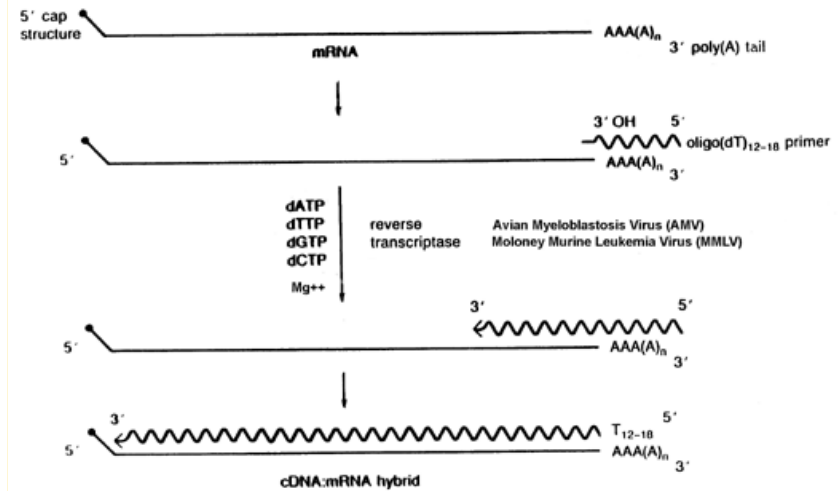


3.) encimska sinteza cDNA

osnovno reakcijo katalizira reverzna transkriptaza

encim rabi kratek odsek ds zaporedja na 3'-koncu mRNA:

- na poli-A rep mRNA vežemo oligo-dT
- v reakciji so še: prebitok dNTP, Mg²⁺, pufer in encim
- nastane hibrid cDNA:mRNA

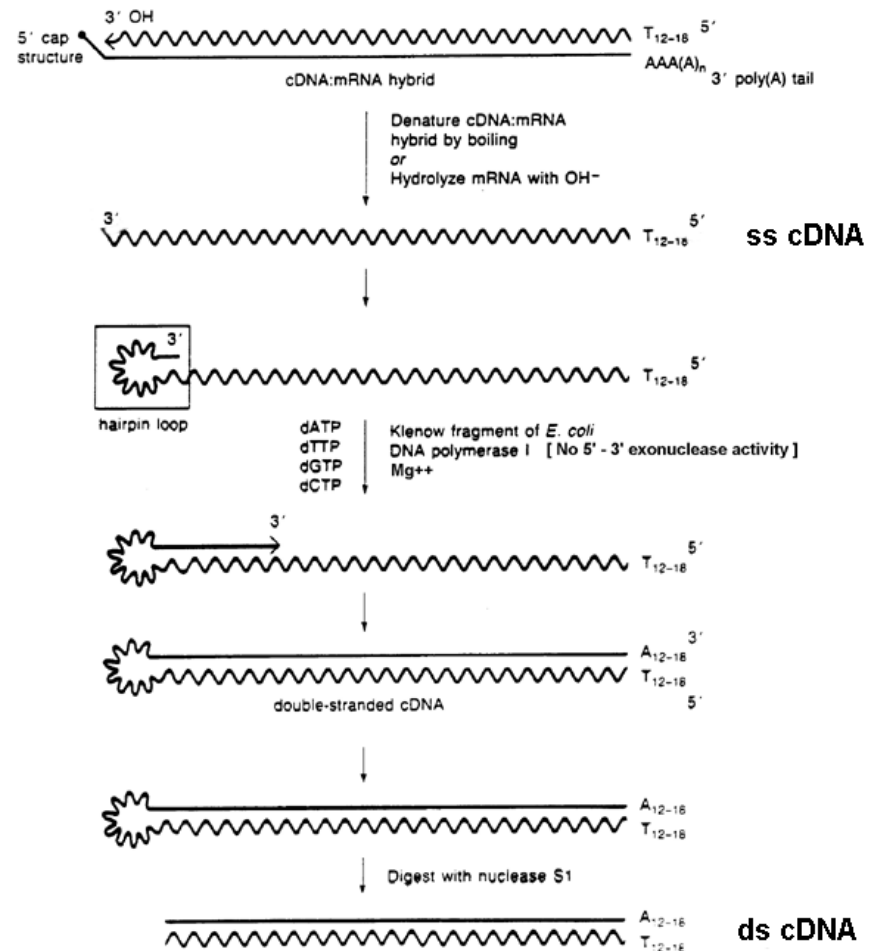


Synthesis of the first strand of cDNA using an oligo(dT) primer and reverse transcriptase.

encimska sinteza cDNA /2

verigo mRNA ločimo od cDNA s segrevanjem ali alkalno denaturacijo

sintezo komplementarne verige katalizira Klenow-fragment DNA-pol I; sinteza se začne na komplementarnem repu



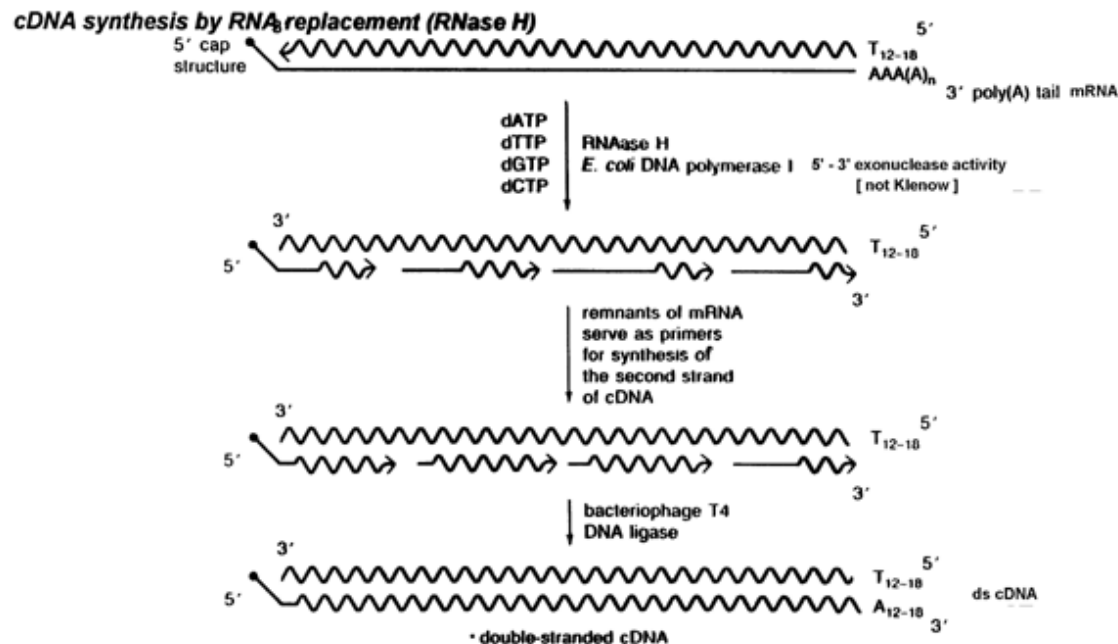
Synthesis of double-stranded cDNA by the self-priming method.

encimska sinteza cDNA /3

Alternativni postopek: Verigo mRNA lahko razgradimo z RNazo H, ki cepi nespecifično in za sabo pušča kratke odseke RNA - služijo kot startna mesta za polimerazo.

Za sintezo komplementarne verige uporabimo celotno DNA-polimerazo I, ki preko svoje 5'→3'-eksonukleazne aktivnosti odstrani ostanke RNA pred sabo.

Nastale fragmente cDNA povežemo s T4-ligazo.



Replacement synthesis of double-stranded cDNA.

DNA-knjižnice

zbirke genetskih informacij, vključenih v vektorje

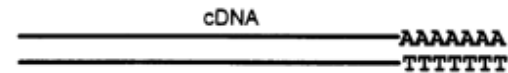
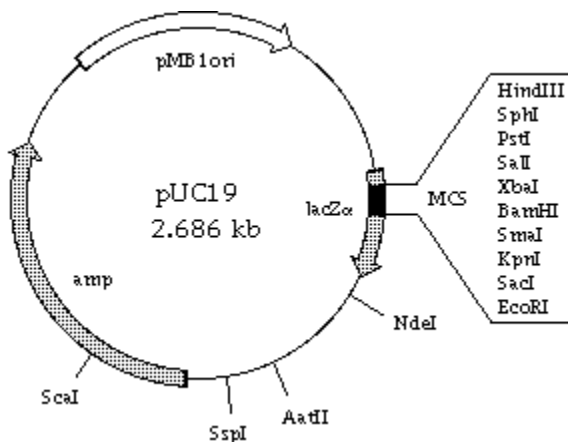
- knjižnice vsebujejo fragmente genoma ali cDNA → genomske / cDNA-knjižnice
- cDNA-knjižnice vsebujejo informacijo o stanju v tkivu, ki smo ga odvzeli (odvisno od stadija razvoja, organa, okolja, ...)
- genomska knjižnica nekega organizma vsebuje enako informacijo ne glede na življenjske pogoje, vir tkiva, razvojni stadij
- delo s knjižnicami je smiselno, če imamo učinkovite analitske metode in načine iskanja specifičnih zaporedij
- ekspresijske knjižnice omogočajo preiskovanje na ravni proteinov
- plazmidne knjižnice so namenjene predvsem za preiskovanje cDNA
- za daljše (genomske) fragmente uporabljamo kozmide, fozmide, BAC, YAC...

priprava cDNA-knjižnice

Sintetizirano cDNA s topimi konci vstavimo v vektor preko topih restrikcijskih mest s pomočjo DNA-ligaze T4.

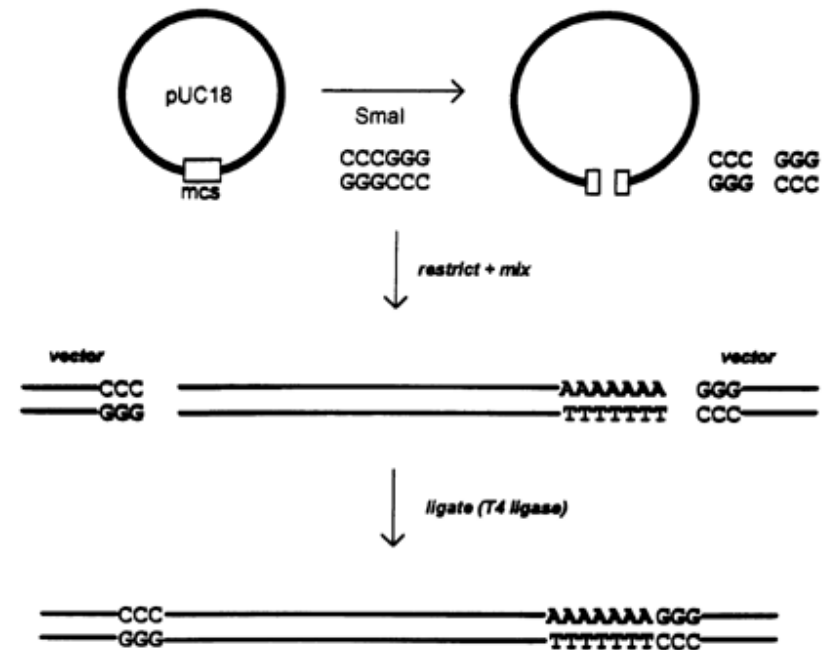
Ker sintetična DNA nima fosfatnih skupin na 5'-koncu, jih na oligo-dT predhodno vežemo s pomočjo T4-kinaze.

Vektor z obsežno polilinkersko regijo omogoča izrez cDNA preko restrikcijskih mest v bližini tistega, ki smo ga uporabili za vstavljanje.



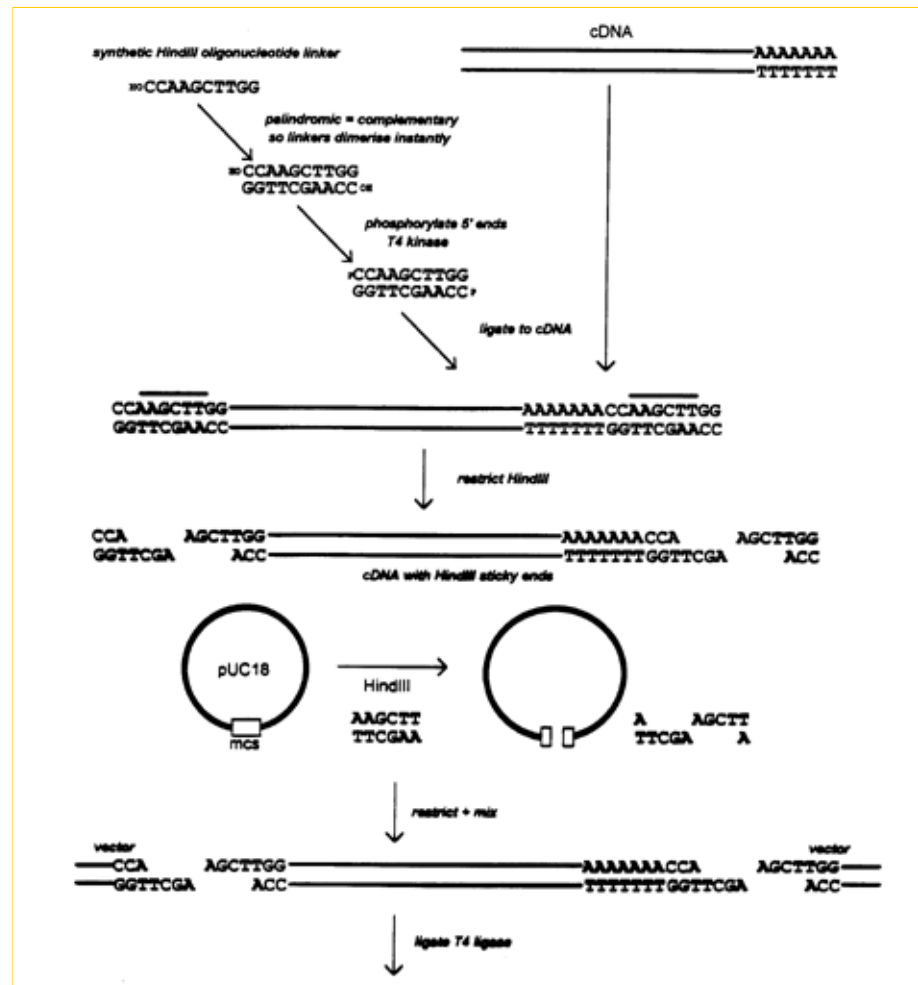
How can such molecules be joined (ligated) to vectors for cloning?

[1] If the molecules are accurately blunt or flush ended they can be ligated directly into a restriction site in the vector which produces blunt ends.



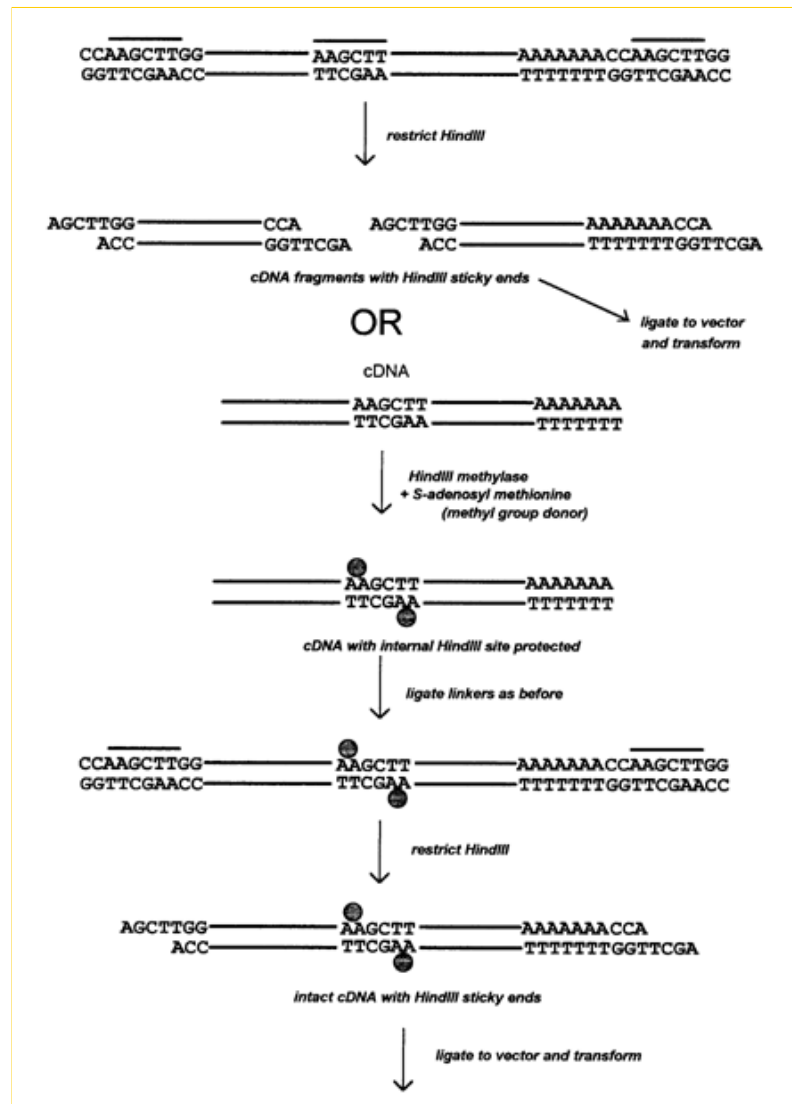
priprava cDNA-knjižnice /2

- na cDNA lahko pripravimo sintetične komplementarne oligonukleotide (linkerje) z zapisom za poljubna restrikcijska mesta
- linkerje fosforiliramo (T4-kinaza) in ligiramo s cDNA
- režemo z restriktazo, ki prepozna zaporedje na dodanih repih
- ligiramo v vektor, ki smo ga pred tem razrezali z enako restriktazo



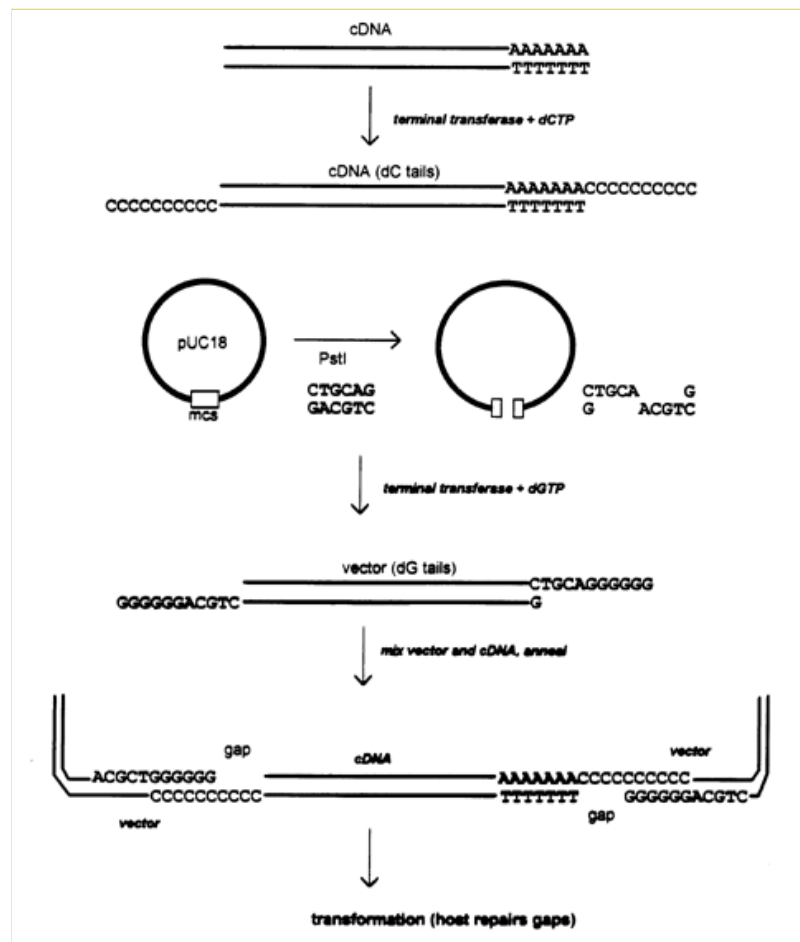
priprava cDNA-knjižnice /3

Če cDNA vsebuje zaporedje, ki bi ga rezal izbrani encim, lahko pred dodajanjem linkerja mesta na cDNA metiliramo in s tem zaščitimo.



priprava cDNA-knjižnice /4

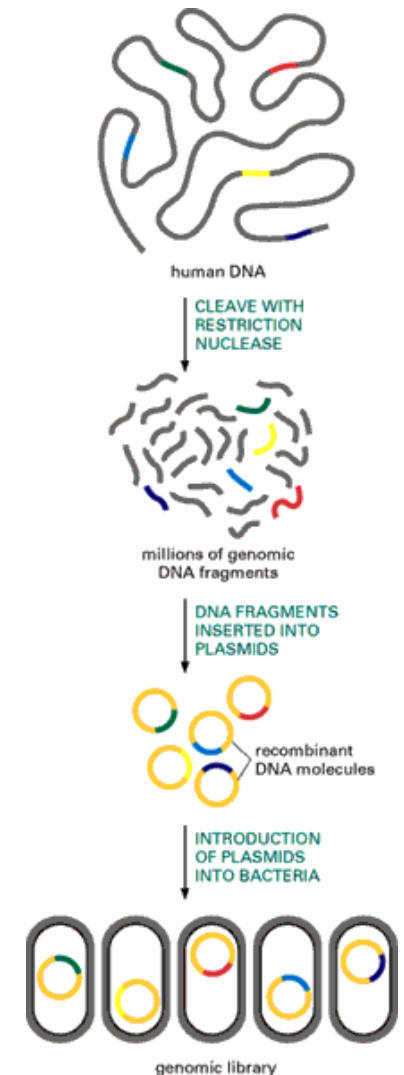
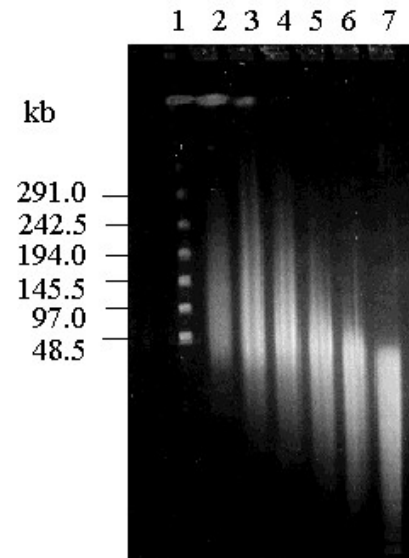
- cDNA lahko vstavimo v vektor tudi brez ligaz s pomočjo kohezivnih koncev: na 3'-konec cDNA vežemo npr. zaporedje nekaj dC, na vektor pa nekaj dG (terminalna transferaza): po hibridizaciji C-G in transformiranju bo gostiteljska celica zapolnila vrzel in povezala konce
- S pomočjo PCR v kombinaciji s predstopnjo - reakcijo z reverzno transkriptazo - lahko pomnožimo minimalne količine mRNA in dobimo cDNA (RT-PCR), ki ima na koncih lahko tudi že izbrana prepoznavna mesta za restriktaze - več v poglavju o PCR



priprava genomske knjižnice

- izoliramo genomsko DNA
- razrežemo jo z RE, da dobimo fragmente željene dolžine
- fragmente vstavimo v vektor

- ❖ DNA izoliramo iz tkiva, ki je bogato z DNA, ga je lahko homogenizirati, nima veliko DNaz,...
- ❖ restriktaza je lahko taka, da prepozna 4 bp ali več; čas rezanja prilagodimo želeni dolžini fragmentov
- ❖ vstavljamo v vektorje tako kot cDNA

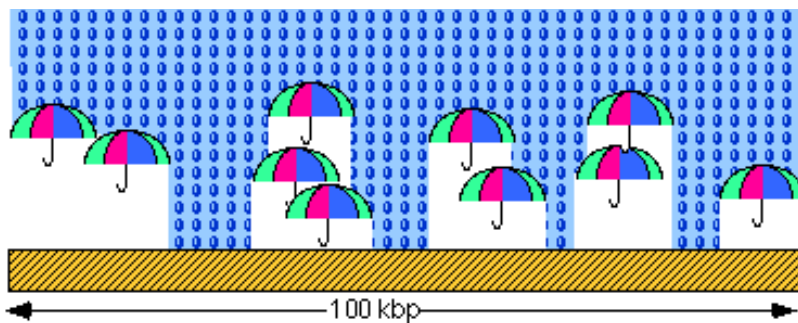


analize genskih knjižnic

- ali je knjižnica *reprezentativna*?
- teoretično mora imeti knjižnica število klonov (n), ki je

$n = \text{dolžina genoma} / \text{povpr. dolžina fragmenta}$

člov. genom v fagmidu: $n = 2,8 \text{ mio kb} / 20 \text{ kb} = 140.000$



praktično (ker gre za naključno generiranje fragmentov):

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-1/n)$$

kjer je P = verjetnost, da je neko poljubno zaporedje vključeno v knjižnici;
npr. za 95% verjetnost je v zgornjem primeru realno zahtevano število klonov =
 $\ln(1-0,95) / \ln(1-1/140.000) = 420.000$

presejanje knjižnic (screening)

analiza na ravni DNA:

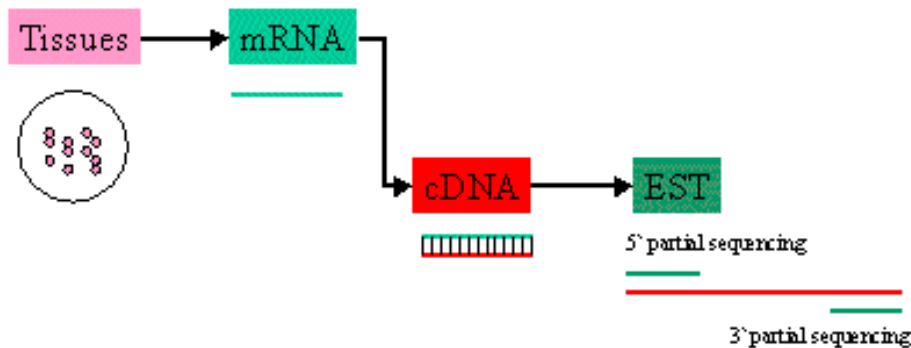
hibridiziranje s specifično DNA, ki je označena
(sonde → *sklop D2*)

analiza na ravni proteinov (ekspresijske knjižnice):

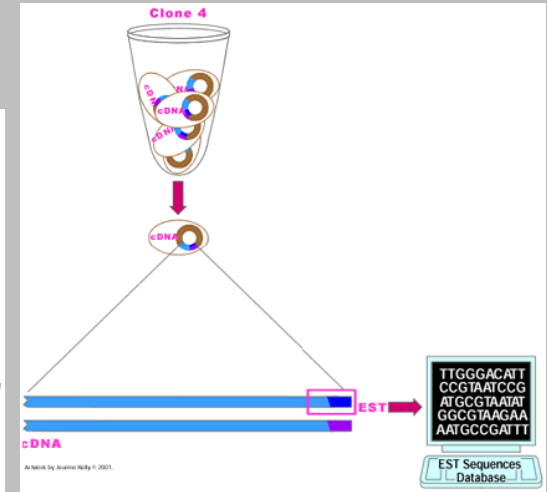
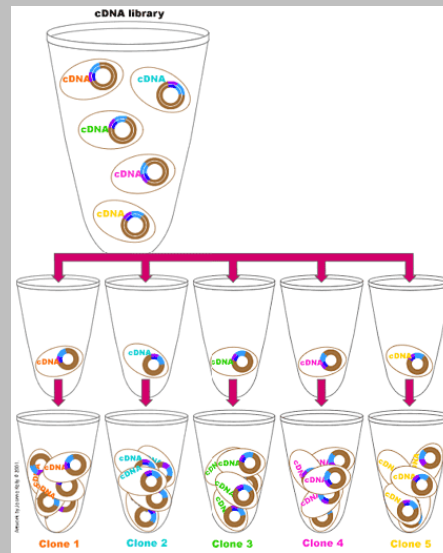
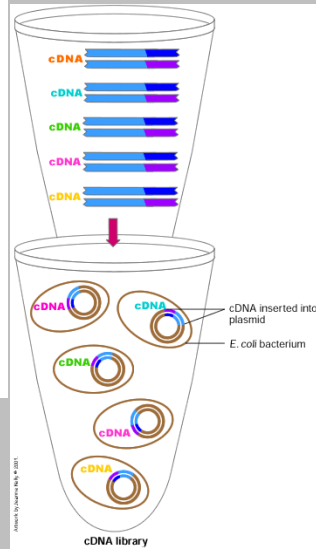
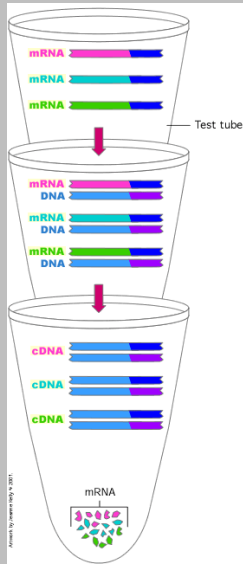
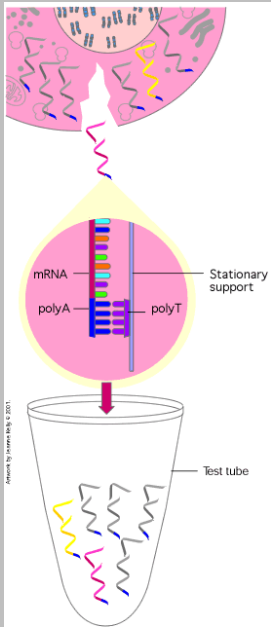
imunološka detekcija ali ugotavljanje aktivnosti proteina

knjižnice cDNA: EST

- EST (expressed sequence tag) ~ oznaka izraženega zaporedja / delno nukleotidno zaporedje kot identifikacija prisotne mRNA): kloni EST, ki so na voljo v (ne)profitnih zbirkah
- namen: primerjava različnih tkiv, obolelih celic, stadijev rasti
- uporabnost: tudi kot vir cDNA za raziskave



priprava EST-knjižnice



Adapted by Giovanni Nelli © 2001.

Adapted by Giovanni Nelli © 2001.

Adapted by Giovanni Nelli © 2001.

Adapted by Giovanni Nelli © 2001.

Adapted by Giovanni Nelli © 2001.

Transformacija celic

- **Transformacija:** naravna sposobnost nekaterih bakterij (ne *E. coli*), da sprejmejo tujo plazmidno DNA.
 - *in vitro* jo dosežemo s solnim in toplotnim šokom ali z elektroporacijo
 - pri evkariontih: spremembe v celični liniji, ki jih povzročijo tumorski virusi (maligna transformacija)
- **Transdukcija:** prenos genetske informacije med celicami s posredovanjem virusov
- **Konjugacija:** prenos delov kromosomske DNA med 2 (bakterijskima) celicama
- **Transfekcija:** vnos DNA v evkariontske celice (prehodna transfekcija) in njena kasnejša vključitev v kromosomsko DNA gostitelja (stabilna transfekcija) (tudi: okužba bakterij z golo fagno DNA)
- Transpozicija: prenos DNA z enega dela kromosoma na drugega (tudi na drug genom)

Kompetentne celice: sposobne sprejeti tujo DNA

- pripravimo jih s obdelavo z različnimi solmi, predvsem CaCl_2 in toplotnim šokom
- lahko jih zamrzujemo ob prisotnosti DMSO

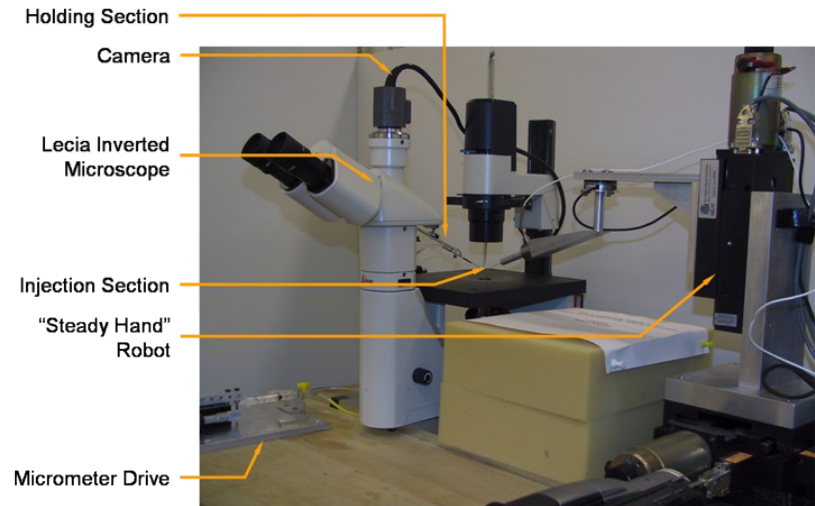
Postopek transformacije *E. coli*:

kompetentnim celicam dodamo vektor in inkubiramo na ledu 30 min., nato izvedemo toplotni šok (~1 min 42 °C), ponovno ohladimo in dodamo gojišče. Inkubiramo 1 h pri 37 °C, nato alikvot platiramo na plošče z ustreznim antibiotikom.

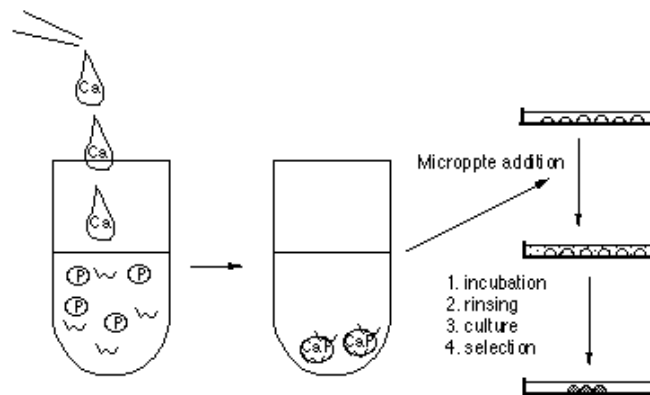
Funkcija CaCl_2 je, da pomaga pri adsorpciji DNA na membrane, toplotnega šoka pa, da prehodno zniža membranski potencial, ob čemer DNA vstopi v citosol.

Fizikalni načini vnosa tuje DNA

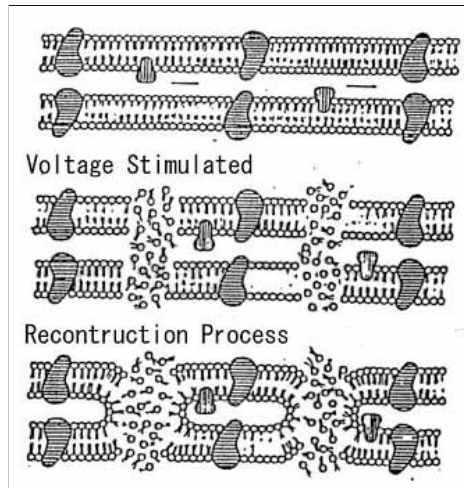
- Mikroinjiciranje



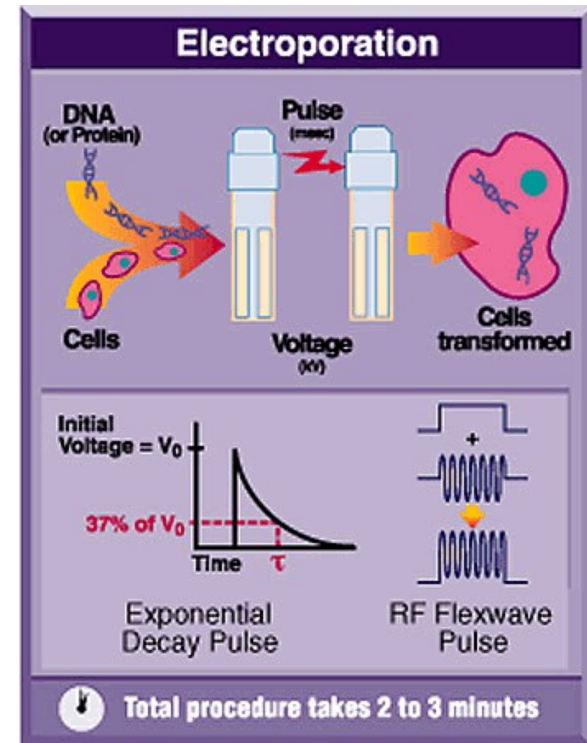
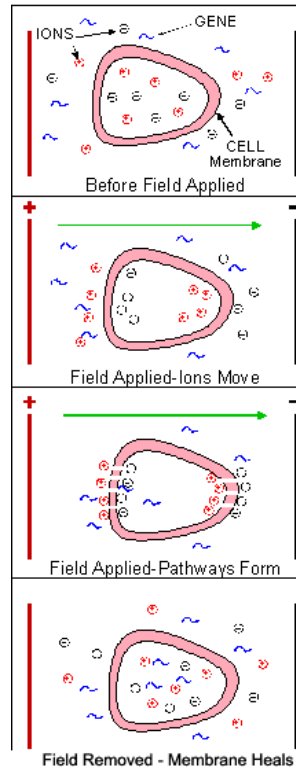
- Koprecipitacija



Elektroporacija

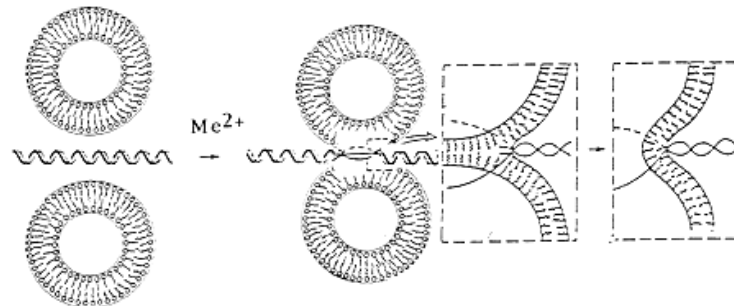
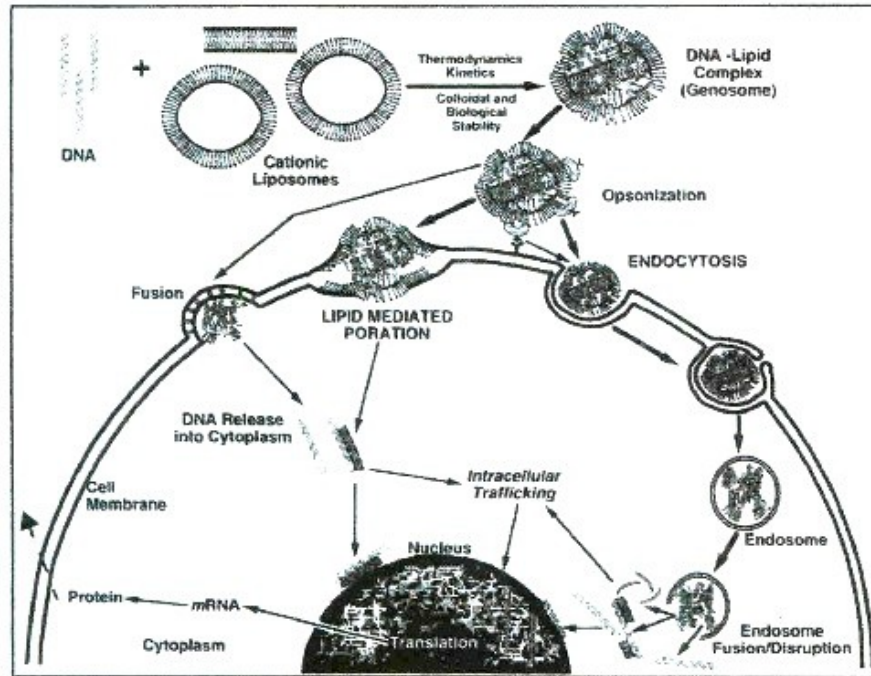


<http://bme.pe.u-tokyo.ac.jp/research/ep/img/electroporation.jpg>



<http://www.talron.co.il/products/instr/cytopulse/transfecttech1.htm>

Vnos z liposomi



Mikrobombardiranje (biolistika)

