

Tehnologija rekombinantne DNA

Pod pojmom **tehnologija rekombinantne DNA** razumemo nabor tehnik za manipulacijo nukleinskih kislin, ki se uporabljajo v laboratorijih v različne namene.

Rekombinantna DNA je v laboratoriju pripravljena DNA, ki združuje genetski material iz različnih virov (organizmov), ki ga v taki obliki ne najdemo v naravi.

Molekulsko kloniranje je postopek priprave rekombinantne DNA, ki se je sposobna samo razmnoževati v gostiteljskem organizmu. Ko se prejemniška celica deli, se v njenih potomkah razmnožuje tudi rekombinantna DNA, ki je s tem *klonirana*.

Če v gostiteljsko celico vstavimo zapis za protein, ki je pod kontrolo promoterja, ki se v tej celici lahko prepisuje, se bo v gostiteljski celici izrazil **rekombinanten protein**.

Nekatera ključna orodja trDNA:

encimi za manipulacijo z DNA – restrikataze, ligaze, polimeraze

verižna reakcija s polimerazo

vektorji – plazmidi, prirejeni za sprejem tuje DNA in razmnoževanje v gostiteljski celici

gostiteljski organizmi – *E. coli*, kvasovke, sesalske celične kulture

Tehnologija rekombinantne DNA

Nekateri pogosteje uporabljeni encimi v namene molekulskega kloniranja:

TABLE 9–1 **Some Enzymes Used in Recombinant DNA Technology**

Enzyme(s)	Function
Type II restriction endonucleases	Cleave DNAs at specific base sequences
DNA ligase	Joins two DNA molecules or fragments
DNA polymerase I (<i>E. coli</i>)	Fills gaps in duplexes by stepwise addition of nucleotides to 3' ends
Reverse transcriptase	Makes a DNA copy of an RNA molecule
Polynucleotide kinase	Adds a phosphate to the 5'-OH end of a polynucleotide to label it or permit ligation
Terminal transferase	Adds homopolymer tails to the 3'-OH ends of a linear duplex
Exonuclease III	Removes nucleotide residues from the 3' ends of a DNA strand
Bacteriophage λ exonuclease	Removes nucleotides from the 5' ends of a duplex to expose single-stranded 3' ends
Alkaline phosphatase	Removes terminal phosphates from either the 5' or 3' end (or both)

Table 9-1

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Tehnologija rekombinantne DNA

Shema osnovnega eksperimenta molekulskega kloniranja.

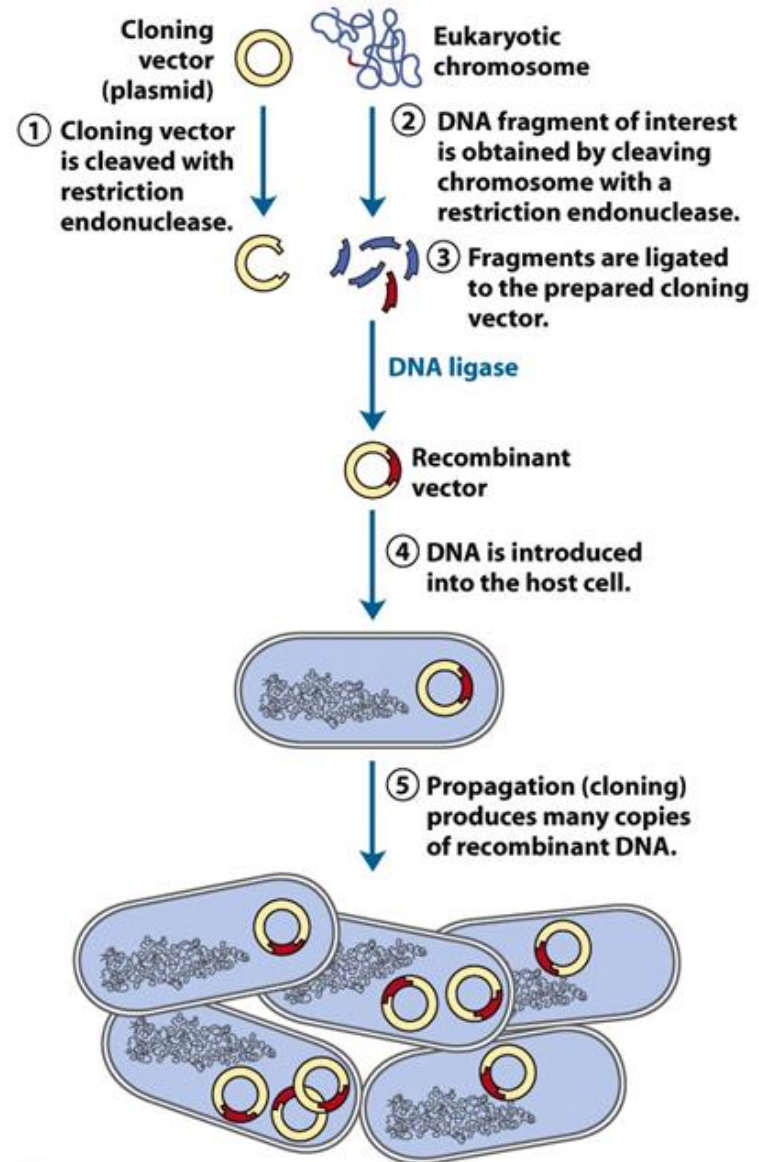


Figure 9-1

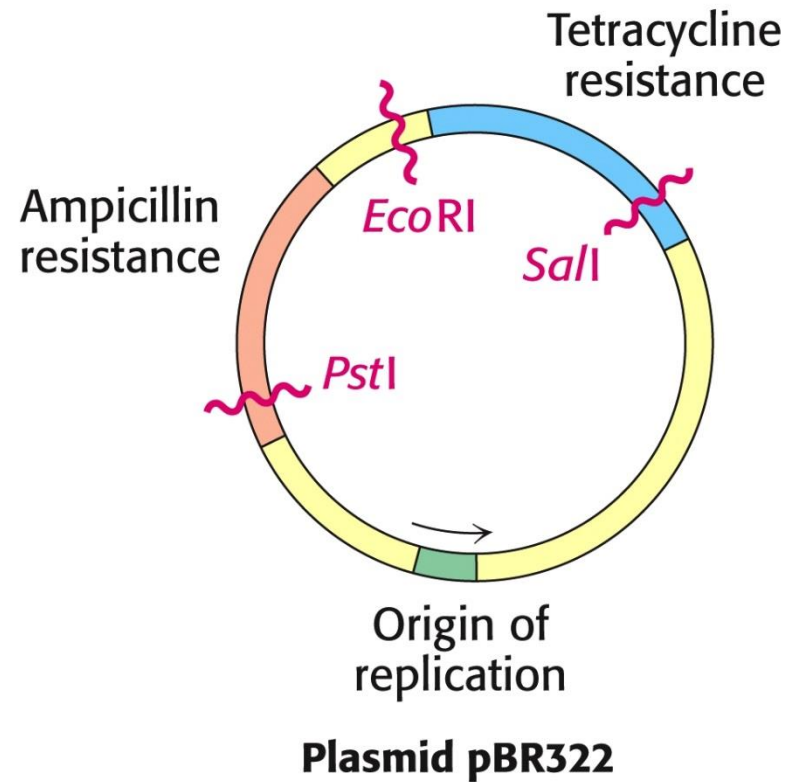
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Plazmidni vektorji

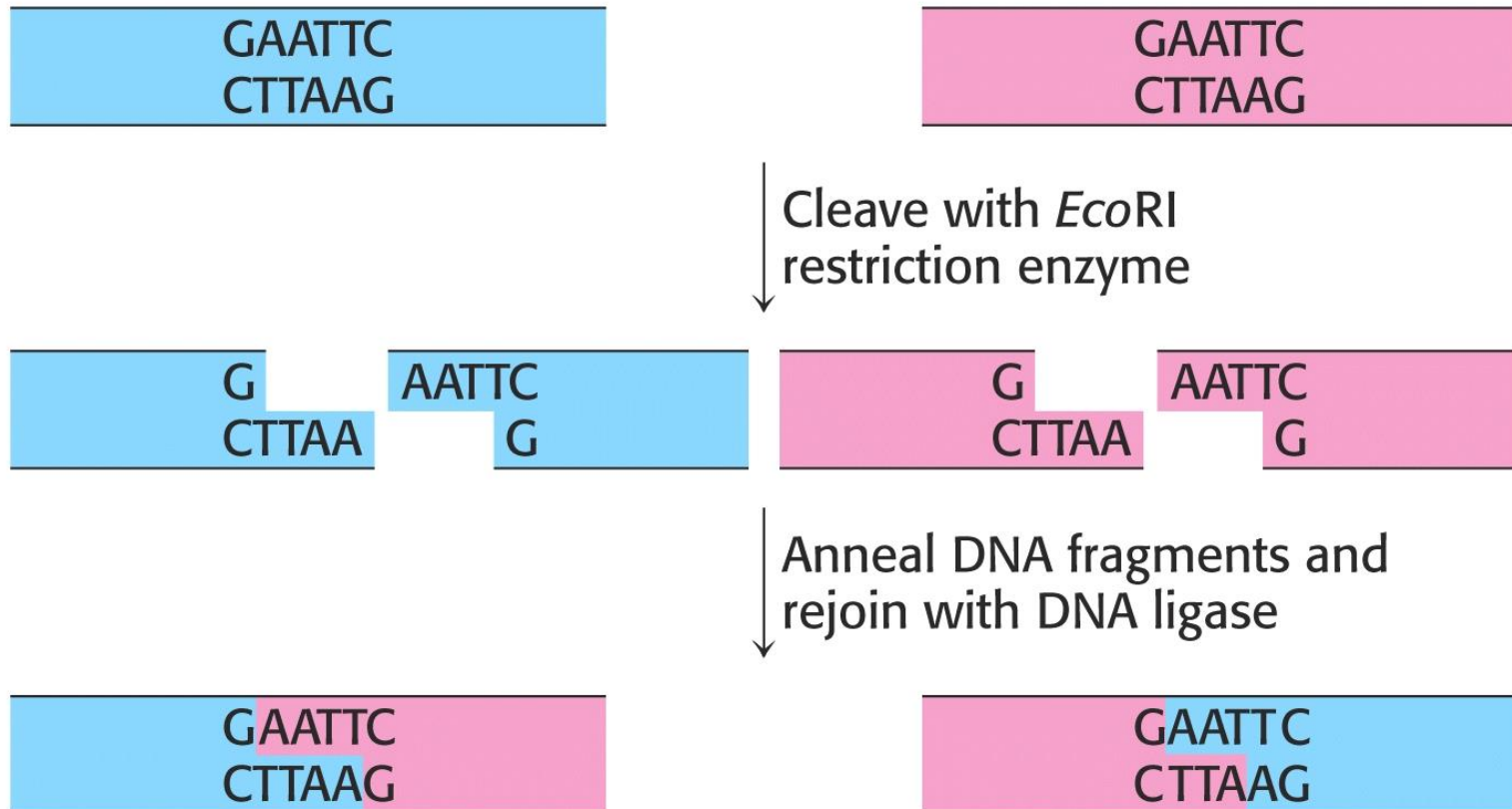
Eden najenostavnejših vektorjev za kloniranje je pBR322. Vsebuje minimalne elemente plazmidnega vektorja:

- selekcijski marker
- mesto začetka replikacije
- restrikcijska mesta za vstavljanje tuje DNA



Restriktaze

Osnovna metoda za vstavljanje tuje DNA (inserta) v vektor je preko restrikcijskih mest, tj. mest cepitve restrikcijskih endonukleaz. Posamezen encim vedno cepi na točno določenem mestu znotraj palindromnega prepoznavnega zaporedja. Na ta način pri rezanju dveh različnih molekul DNA z isto restriktazo ustvarimo fragmente obeh molekul, ki so si med seboj navzkrižno kompatibilni.



Restriktaze

Osnovna metoda za vstavljanje tuje DNA (inserta) v vektor je preko restrikcijskih mest, tj. mest cepitve restrikcijskih endonukleaz.

Restriktaze lahko ustvarijo **tope** ali **lepljive** konce

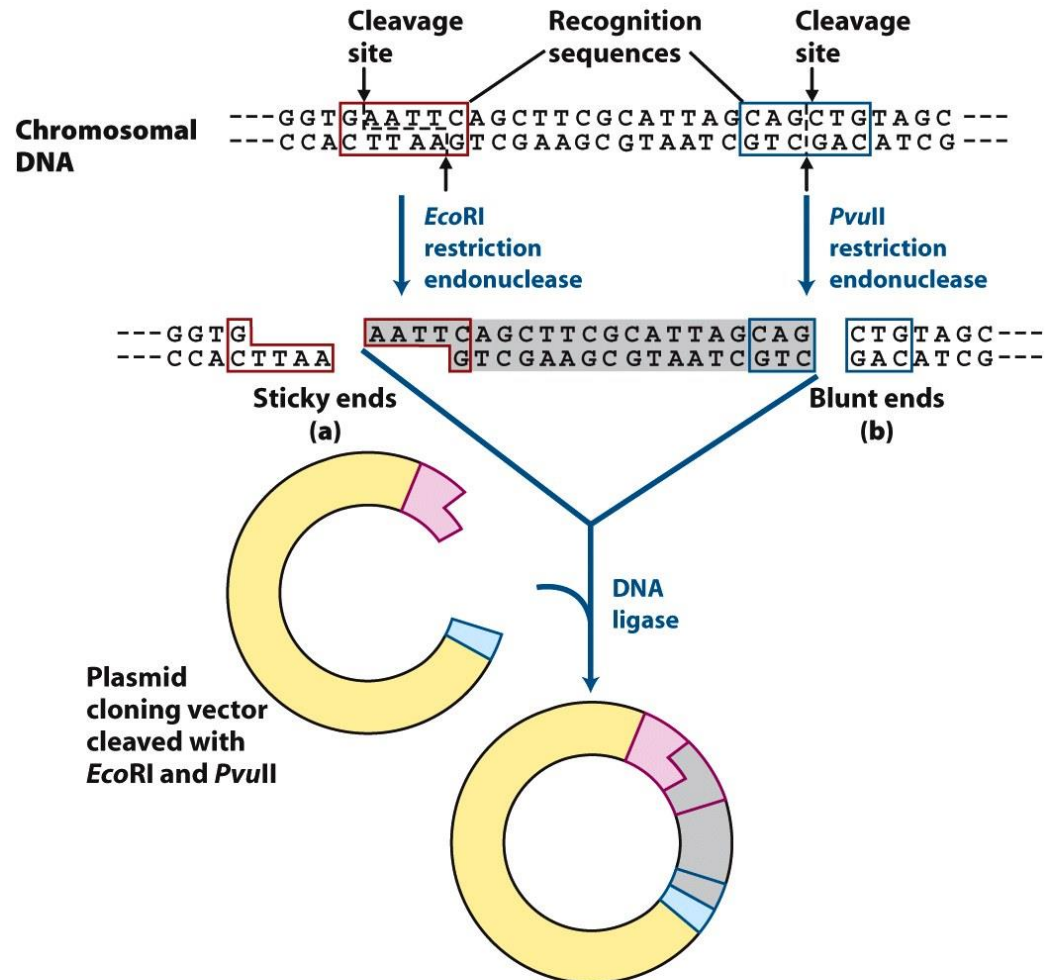


Figure 9-2ab
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Polilinkerska regija vektorjev

Večina plazmidnih vektorjev je bila v laboratoriju spremenjenih tako, da vsebujejo regijo, ki vsebuje več zaporednih restrikcijskih mest za različne restriktaze. To mesto imenujemo polilinkerska regija ali klonirno mesto (multiple cloning site). Vanj ponavadi vstavimo svoj insert.

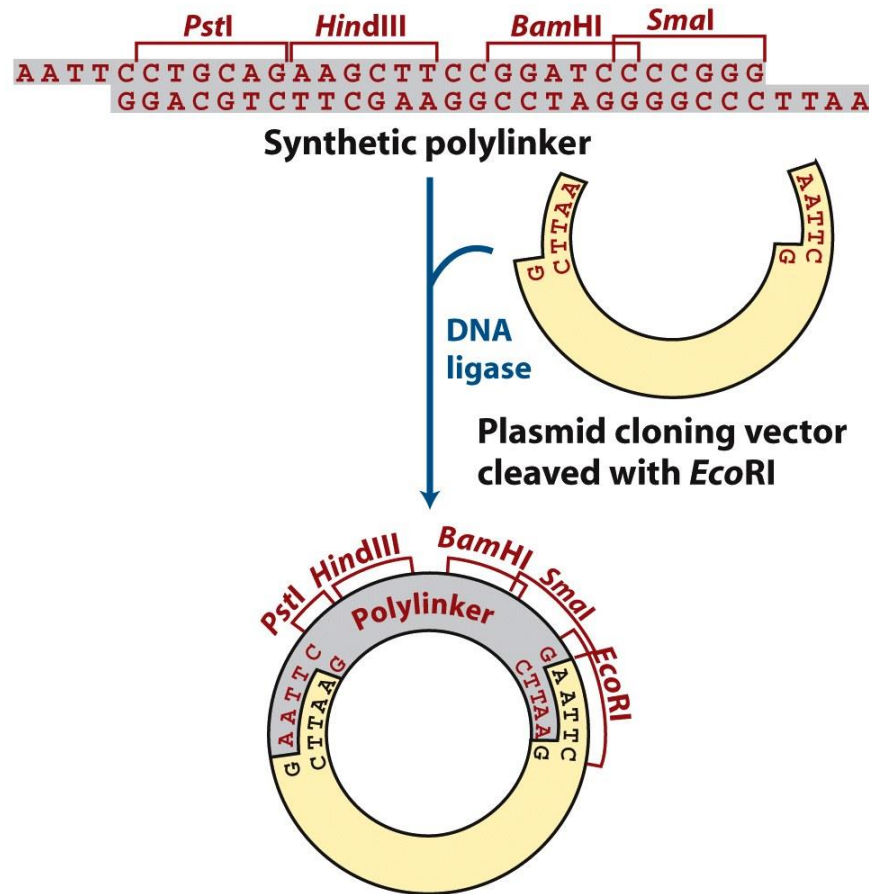


Figure 9-2c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Restriktaze

Za vstavljanje inserta v vektor izberemo ustrezno kombinacijo restriktijskih mest. Pri tem moramo paziti, da izberemo restriktazo ali kombinacijo restriktaz, ki ne režejo znotraj inserta, katerega želimo vstaviti v vektor.

TABLE 9-2		Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases	
<i>Bam</i> HI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{GGATCC} (3') \\ \text{CCTAGG} \\ * \quad \uparrow \end{array}$	<i>Hind</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{AAGCTT} (3') \\ \text{TTCGAA} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Cl</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ATCGAT} (3') \\ \text{TAGCTA} \\ * \quad \uparrow \end{array}$	<i>Not</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{GCGGCCGC} (3') \\ \text{CGCCGGCG} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Eco</i> RI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{GAATTC} (3') \\ \text{CTTAAG} \\ * \quad \uparrow \end{array}$	<i>Pst</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{CTGCAG} (3') \\ \text{GACGTC} \\ \uparrow * \end{array}$
<i>Eco</i> RV	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{GATATC} (3') \\ \text{CTATAG} \\ \uparrow \end{array}$	<i>Pvu</i> II	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{CAGCTG} (3') \\ \text{GTCGAC} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Ha</i> eIII	$\begin{array}{c} \downarrow * \\ (5') \text{GGCC} (3') \\ \text{CCGG} \\ * \uparrow \end{array}$	<i>Tth</i> 111I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{GACNNGTC} (3') \\ \text{CTGNNCAG} \\ \uparrow \end{array}$

Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by each restriction endonuclease. Asterisks indicate bases that are methylated by the corresponding methylase (where known). N denotes any base. Note that the name of each enzyme consists of a three-letter abbreviation (in italics) of the bacterial species from which it is derived, sometimes followed by a strain designation and Roman numerals to distinguish different restriction endonucleases isolated from the same bacterial species. Thus *Bam*HI is the first (I) restriction endonuclease characterized from *Bacillus amyloliquefaciens*, strain H.

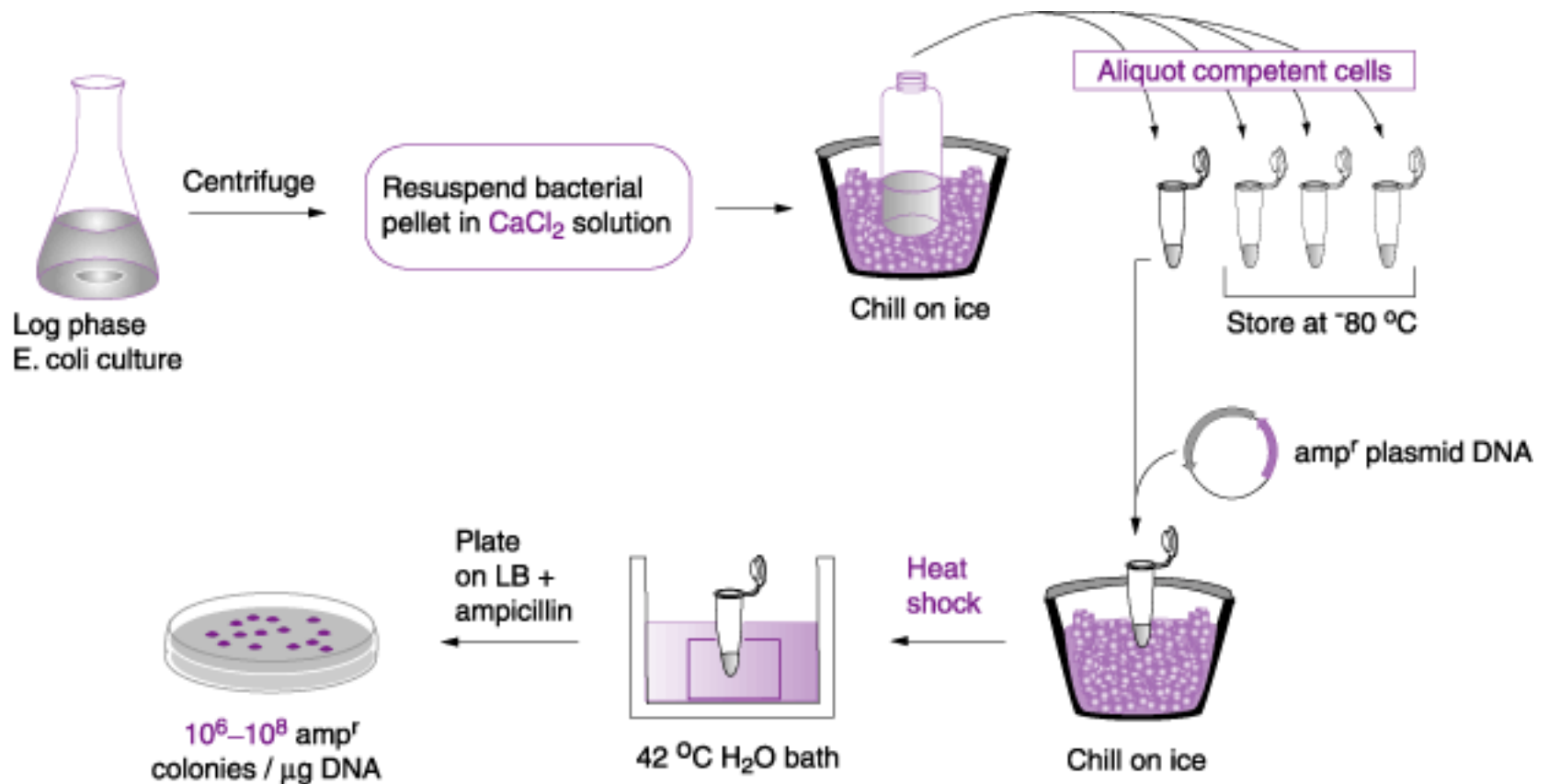
Table 9-2

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

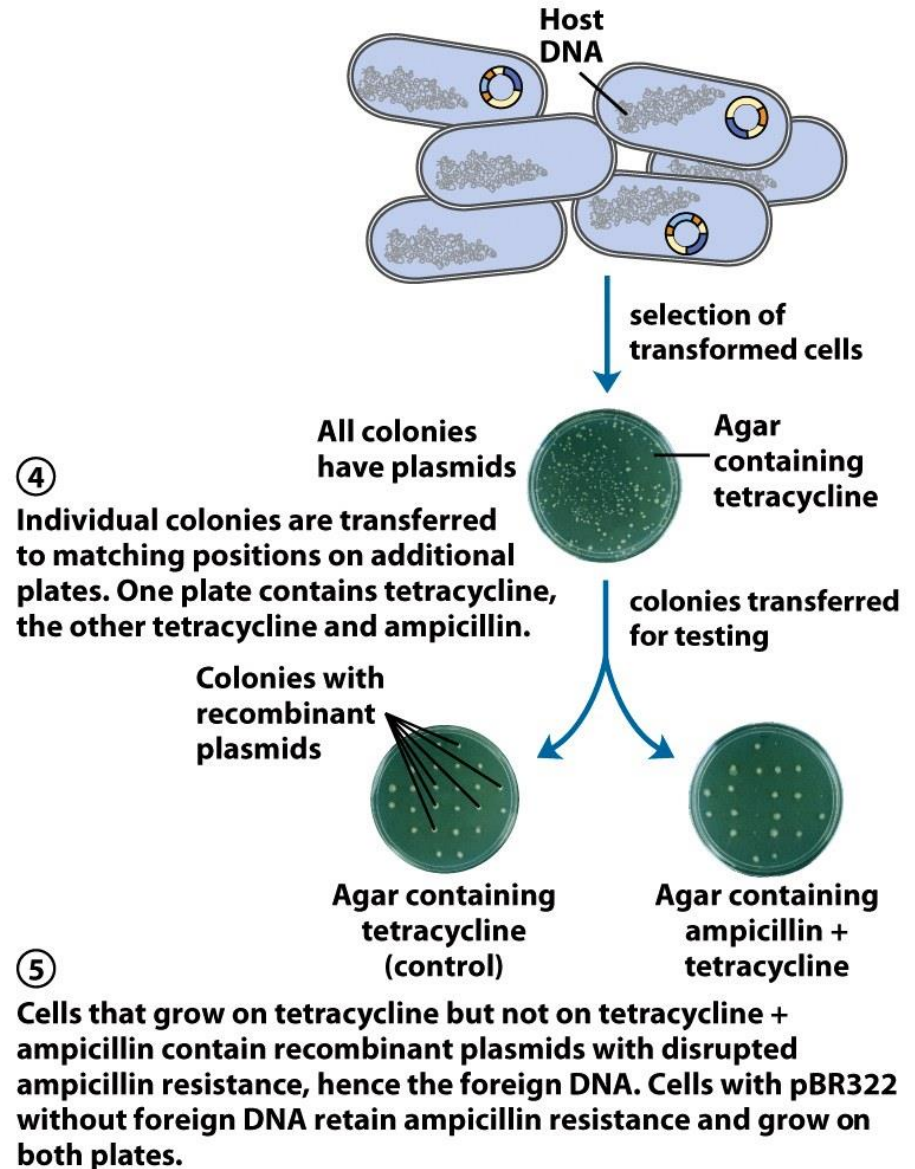
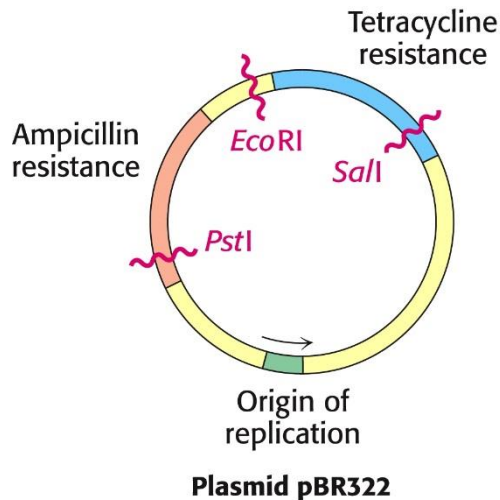
Transformacija *E. coli*

Bakterijam, ki so sposobne sprejeti tujo DNA, pravimo, da so kompetentne. Celice *E. coli* po naravi niso kompetentne, lahko pa jih pripravimo do tega. Vnos tuje DNA v kompetentne bakterijske celice imenujemo transformacija (pri sesalskih celicah ta pojem označuje spremembo normalne celice v tumorsko).



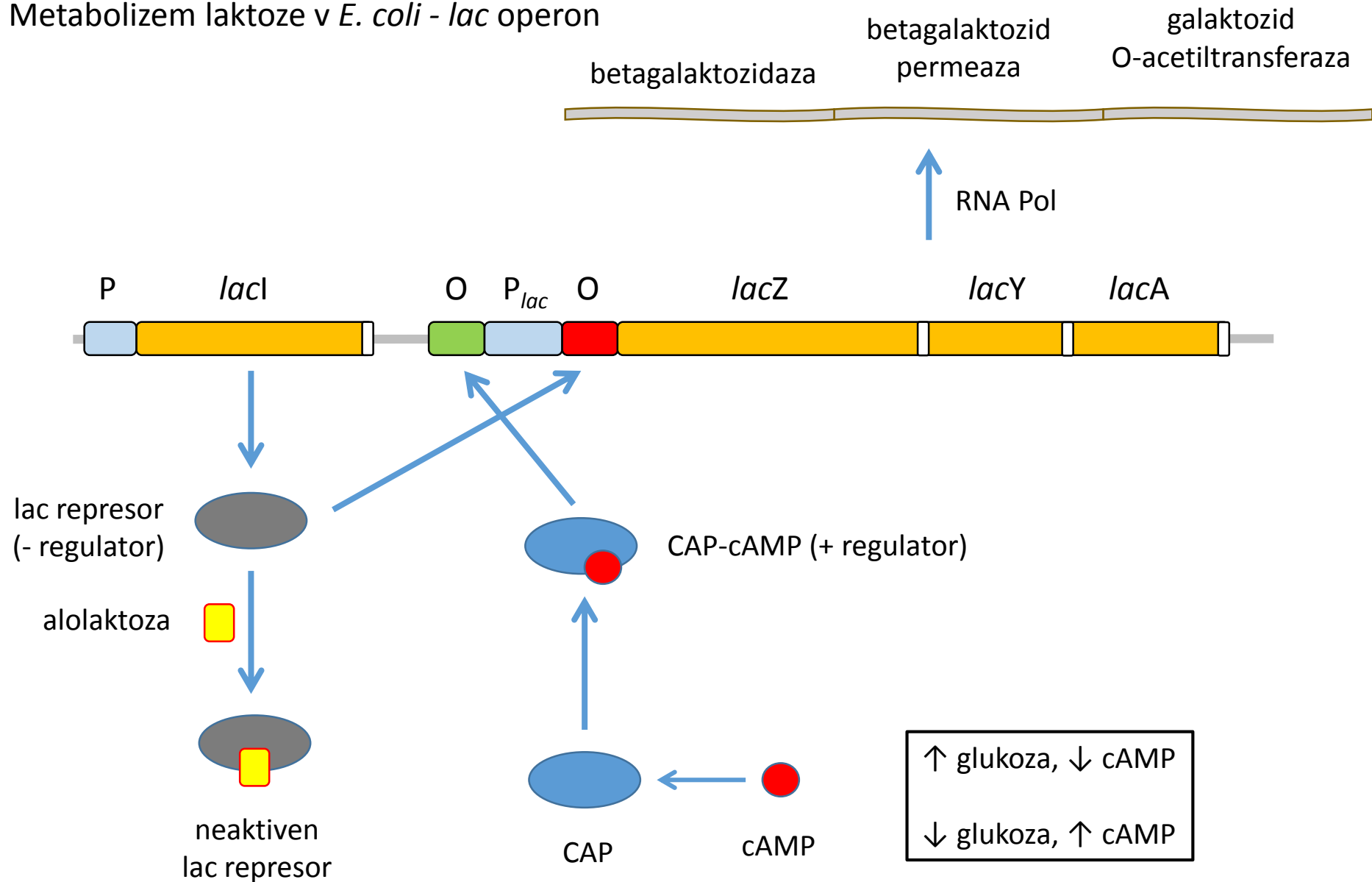
Selekcija s pBR322

Če vstavimo zapis v plazmid preko restrikcijskega mesta *PstI*, bo insert prekinil bralni okvir gena za rezistenco proti ampicilinu → bakterije, ki bodo sprejele plazmid z insertom, ne bodo rastle na ampicilinu. Bakterije, ki bodo sprejele prazen plazmid, bodo rastle na gojišču z ampicilinom.

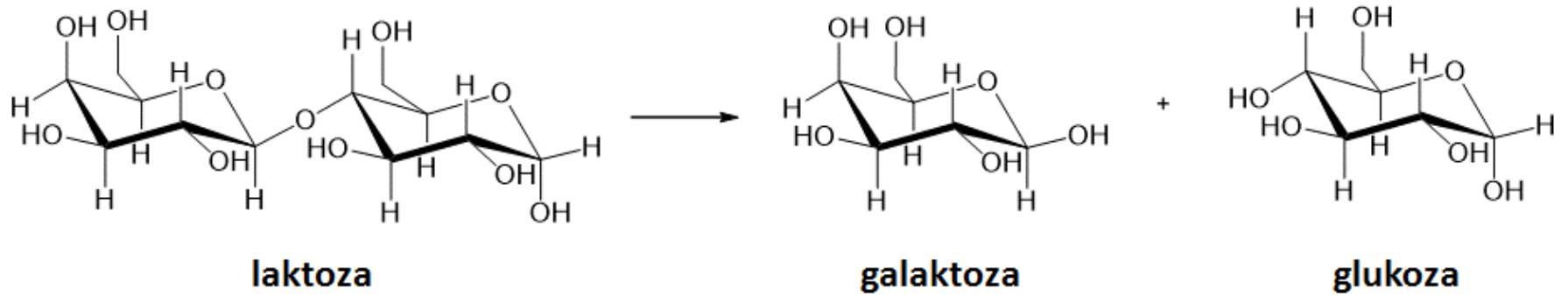


Selekcija z α -komplementacijo

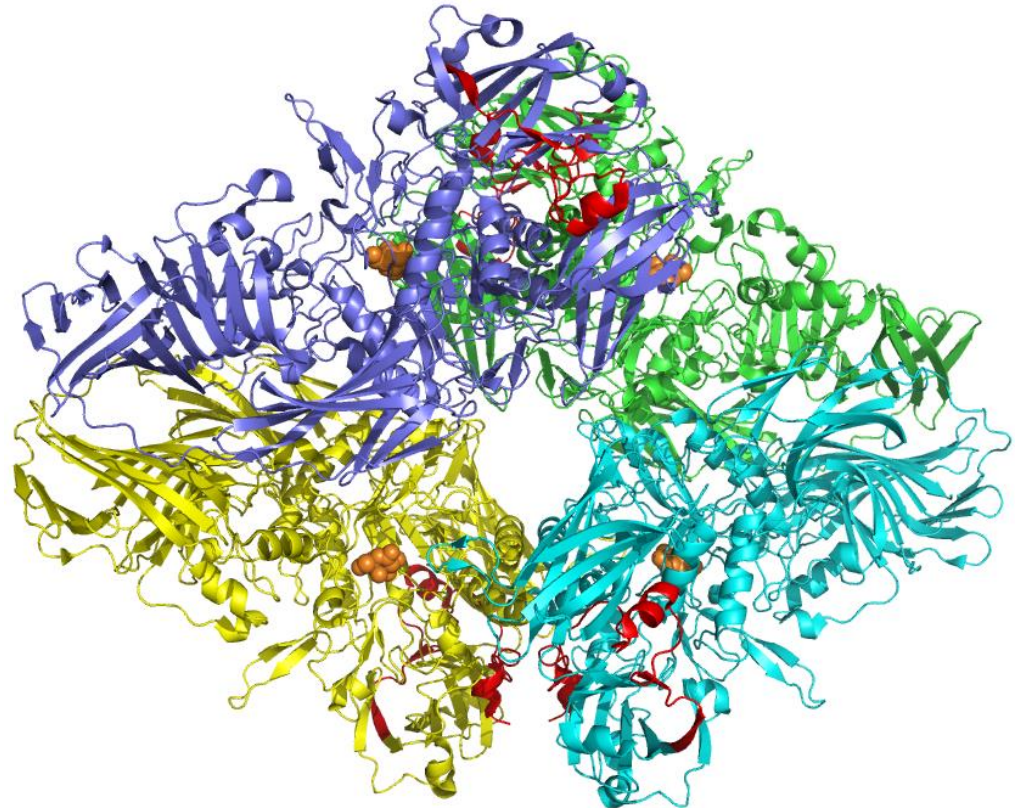
Metabolizem laktoze v *E. coli* - *lac* operon



Betagalaktozidaza



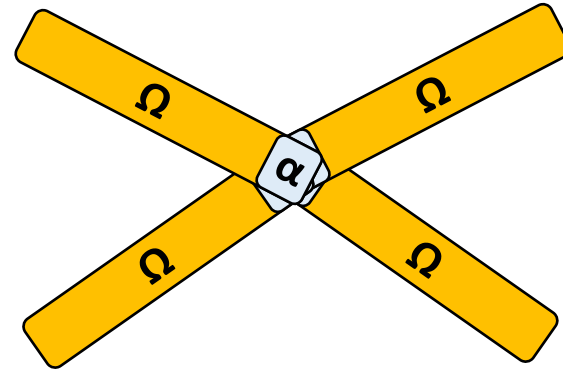
Aktivna oblika betagalaktozidaze je tetramer z molekulsko maso pribl. 450 kDa.



Betagalaktozidaza

N-končen fragment proteina (pribl. 60 ostankov) imenujemo α -peptid in je nujen za tetramerizacijo (in s tem aktivnost).

divji tip betagalaktozidaze



aktivna
oblika

zapis brez α -peptida



pravilno zviti monomeri,
ne tetramerizirajo,
neaktiven encim



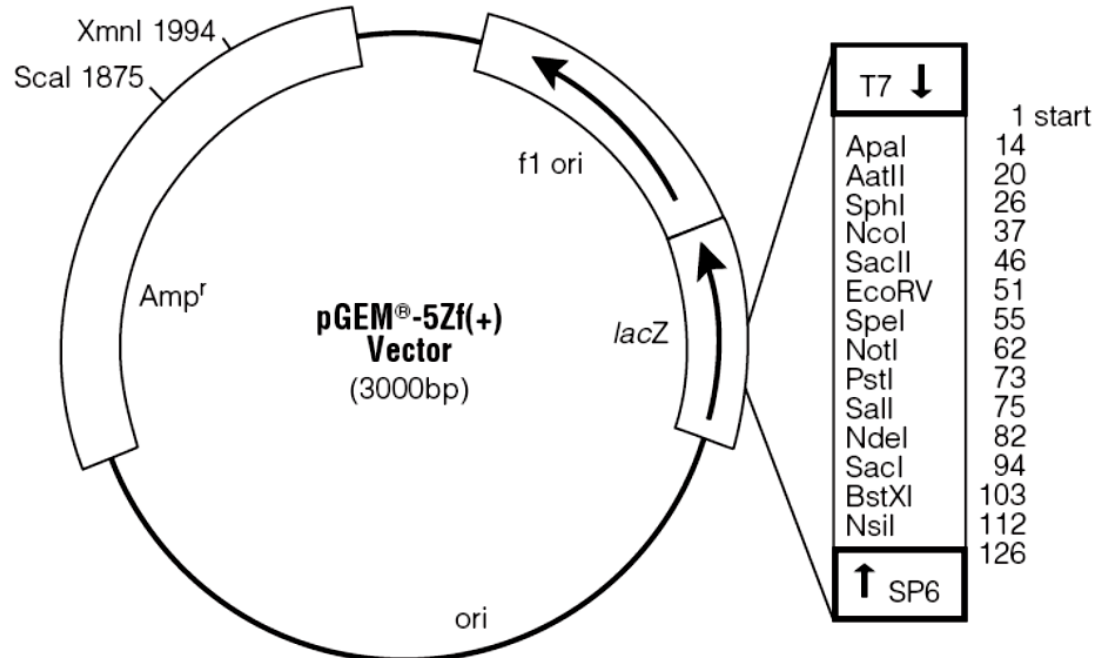
zapis za Ω fragment + zapis za α -peptid

Selekcija z α -komplementacijo

lacZ α + lacZ Ω = aktivna betagalaktozidaza

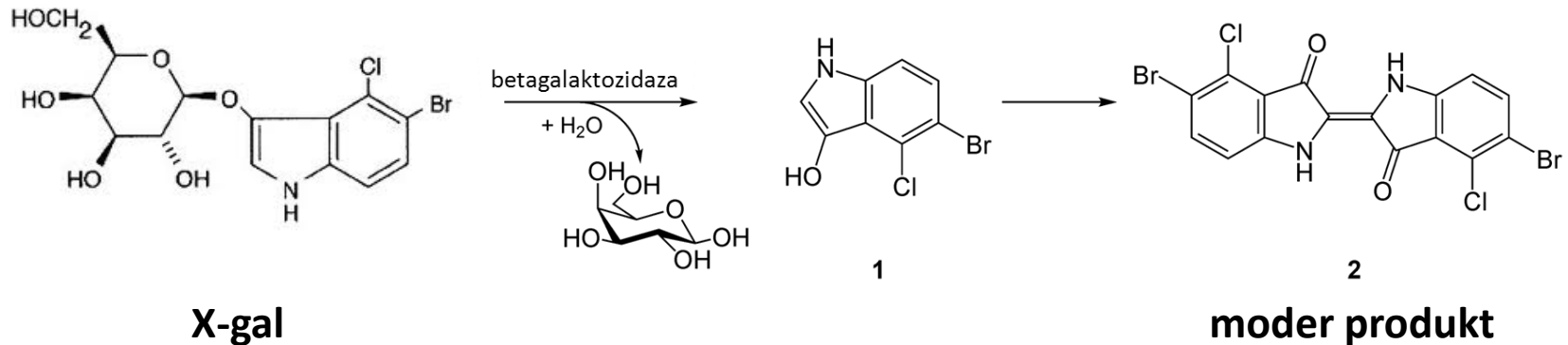
Princip α -komplementacije:

sev *E. coli*, ki vsebuje zapis za lacZ Ω fragment (npr. DH5 α)
+
plazmid z zapisom za lacZ α peptid

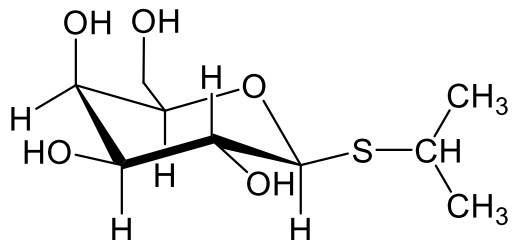


Selekcija z α -komplementacijo

Kako detektiramo aktivnost betagalaktozidaze:



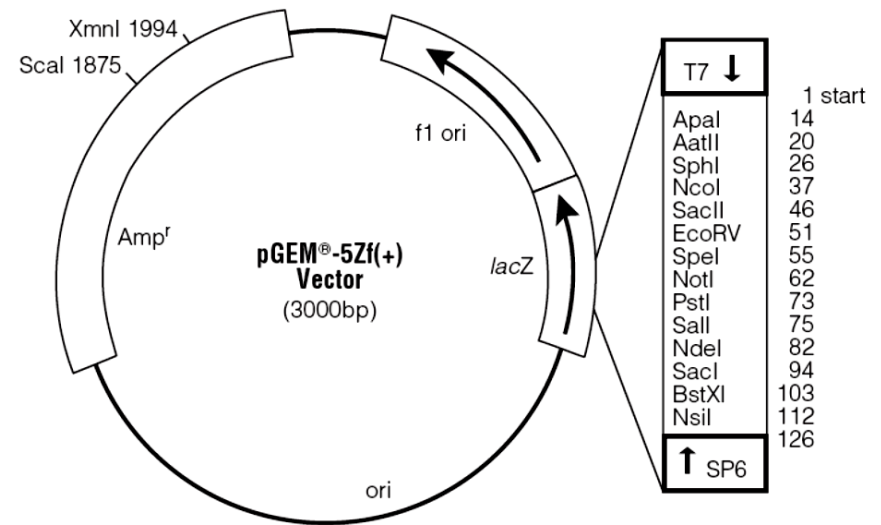
Ker je sistem pod kontrolo lac operatorja, potrebujemo še *induktor*, ki inaktivira lac represor. Naravni induktor je alolaktoza (derivat laktoze). Ker je alolaktoza hkrati substrat betagalaktozidaze, je uporaba le-te neustrezna, zato kot induktor uporabljamo derivat galaktoze IPTG.



IPTG
(izopropiltiogalaktozid)

Selekcija z α -komplementacijo

Ta način selekcije imenujemo tudi modro-beli test.



Vse kolonije vsebujejo plazmid.

Modre kolonije vsebujejo plazmid brez inserta.

Bele kolonije vsebujejo plazmid z insertom.

trdno gojišče z ampicilinom

Bakteriofagi kot vektorji

Bakteriofage kot vektorje uporabljamo za molekularno kloniranje daljših fragmentov DNA.

Približno 1/3 bakteriofagne DNA je neesencialne in jo lahko nadomestimo z insertom do 23,000 bp

DNA molekule se in vitro spakirajo v virusne delce – dodamo jih v lizat bakterij, ki so bile okužene s fagom

Rekombinantni bakteriofagi se učinkovito razmnožujejo v bakterijah.

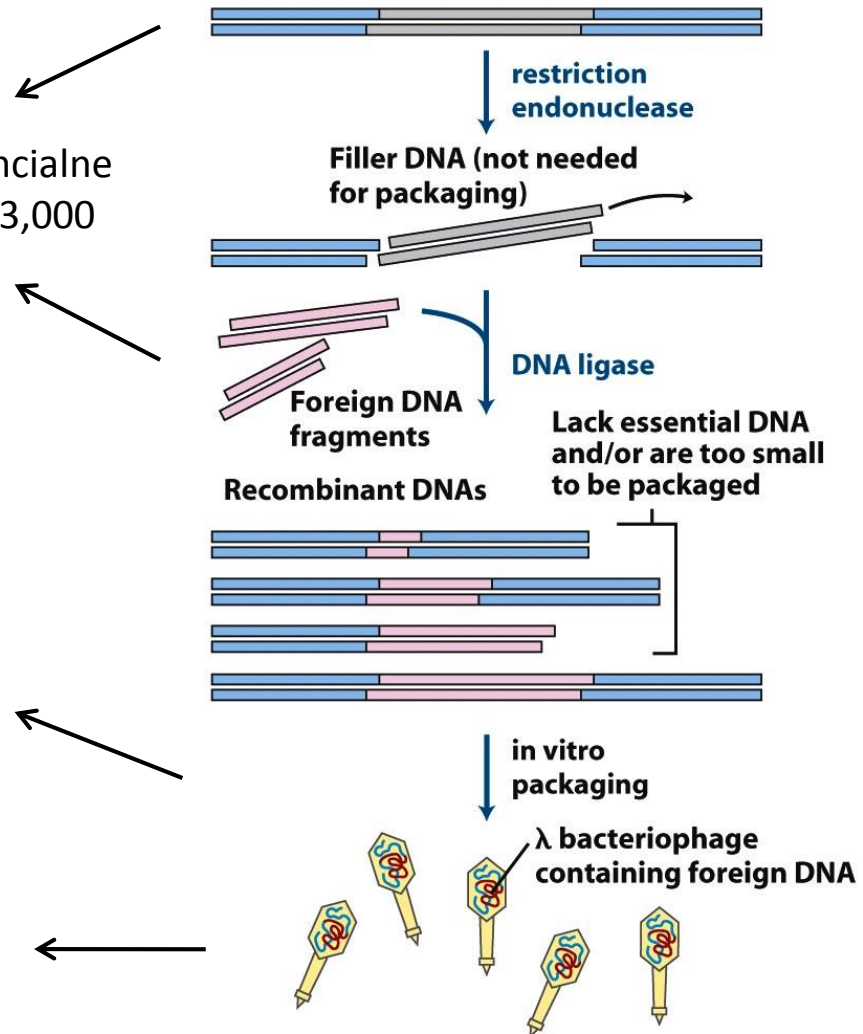
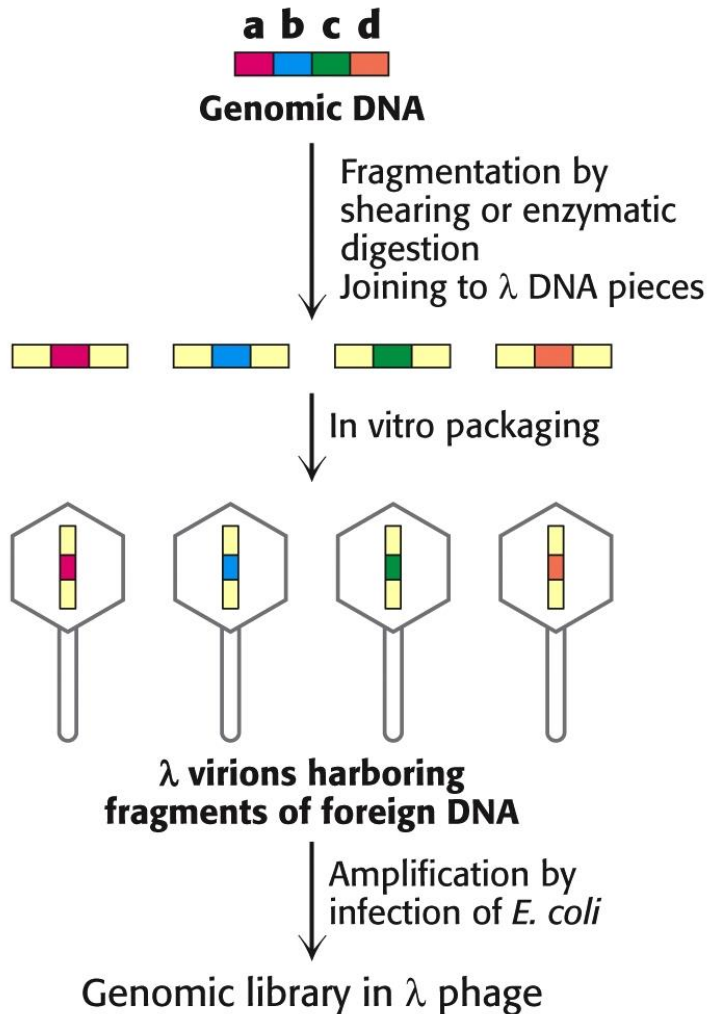


Figure 9-5
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Bakteriofagi kot vektorji

Bakteriofage kot vektorje uporabljamo za molekularno kloniranje daljših fragmentov DNA.



Z uporabo bakteriofagnih vektorjev lahko ustvarimo knjižnico fragmentov celotnega genoma nekega organizma.

DNA molekule fragmentiramo s fizičnimi ali encimskimi metodami (delna razgradnja z restriktazami), nato izoliramo fragmente ustreznih velikosti (cca. 15 kb) in jih vstavimo v bakteriofagno DNA.

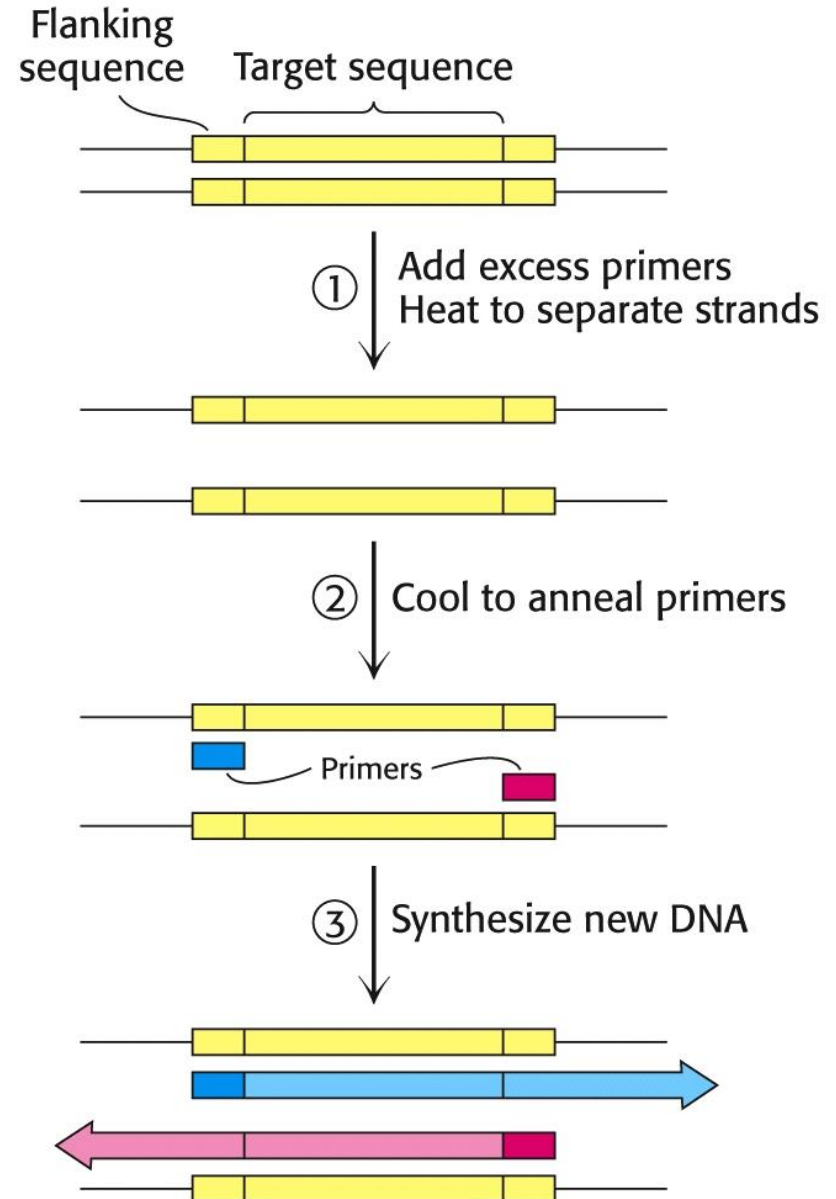
Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda za *in vitro* pomnoževanje fragmentov DNA in njihovo manipulacijo. V osnovi temelji na ciklih denaturacije izvorne (matrične) DNA, ki vsebuje zapis, ki ga želimo pomnožiti, vezavi dveh sintetičnih oligonukleotidov na začetek in konec odseka matrične DNA, ki ga želimo pomnožiti in sinteze nove DNA s podaljševanjem začetnih oligonukleotidov.

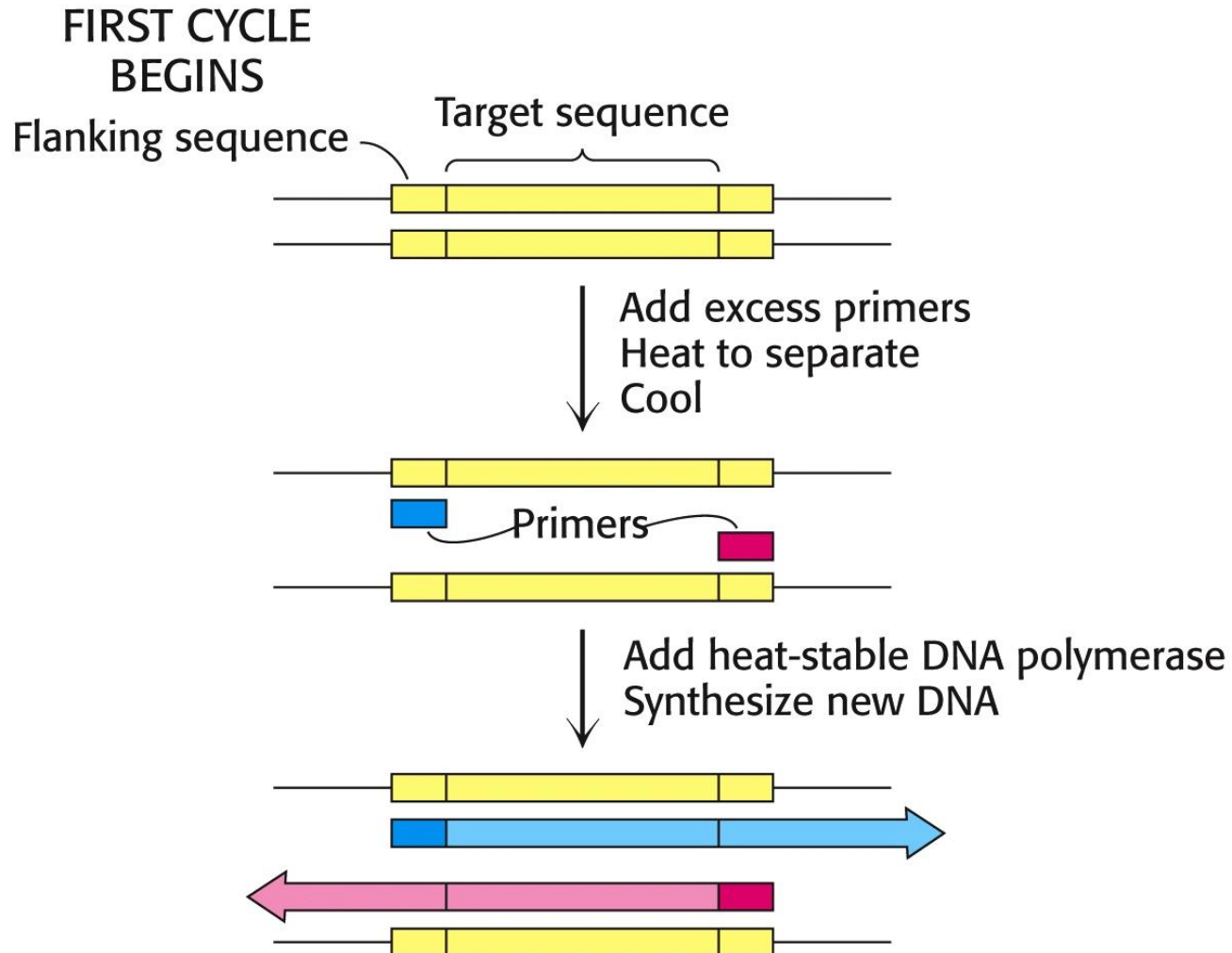
Postopek je avtomatiziran, v reakcijo moramo poleg naštetih materialov dodati le še deoksiribonukleotide (dNTP) in ustrezen pufer. Uporabiti moramo termostabilno DNA polimerazo (izolirane iz termofilnih organizmov).

Reakcija ponavadi poteka v 25 do 35 ciklih izmenjujočih se temperatur po programu:

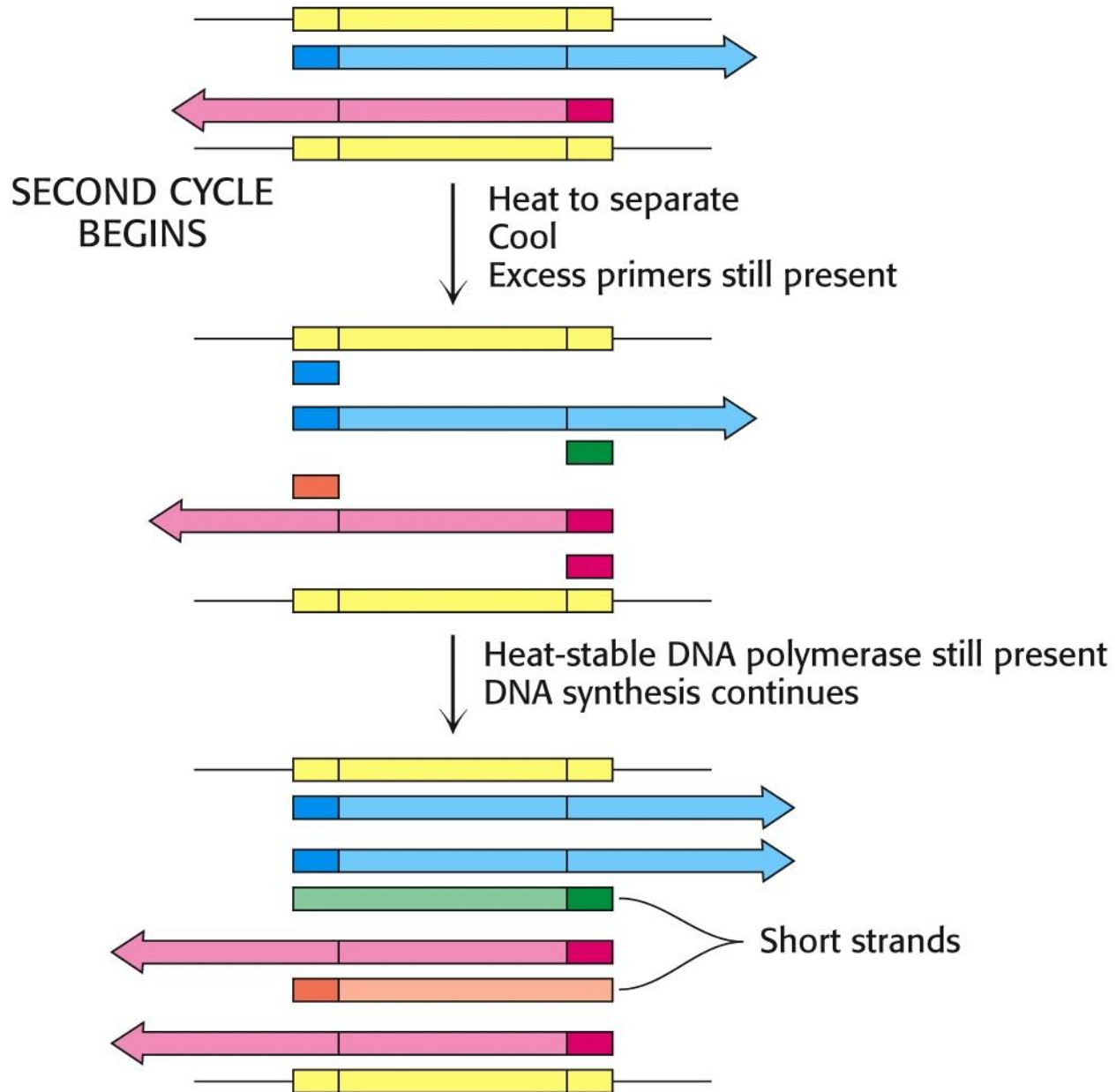
95 °C	30 sec	denaturacija DNA
50-65 °C	30 sec	prileganje začetnih oligov
72 °C	1 min/kb	podaljševanje



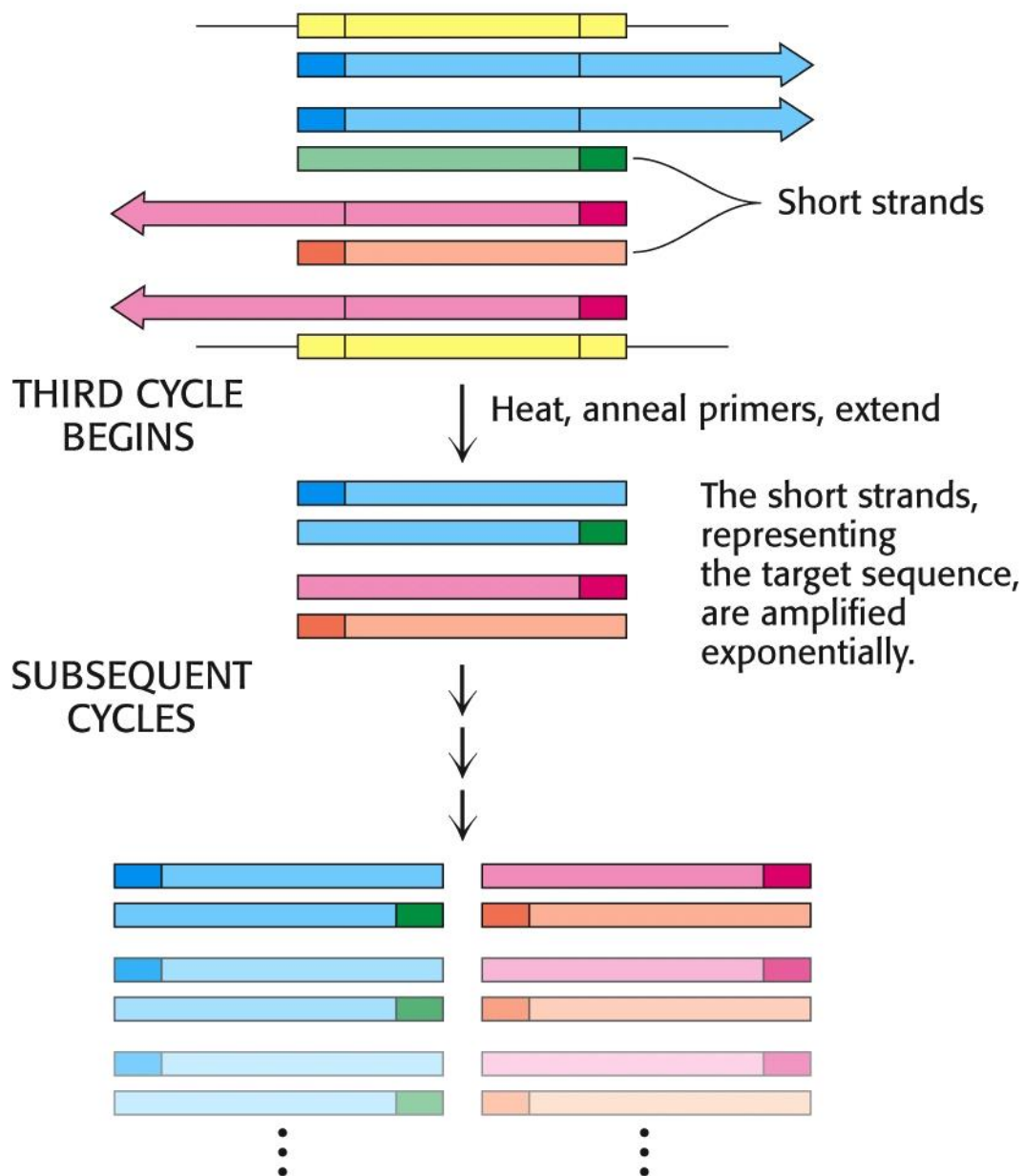
Verižna reakcija s polimerazo



Verižna reakcija s polimerazo

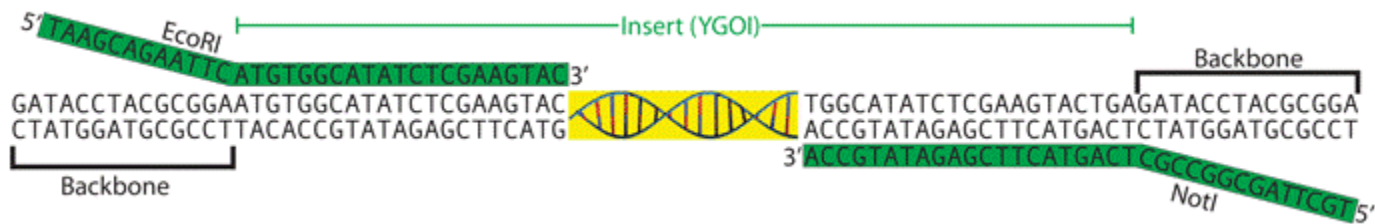


Verižna reakcija s polimerazo

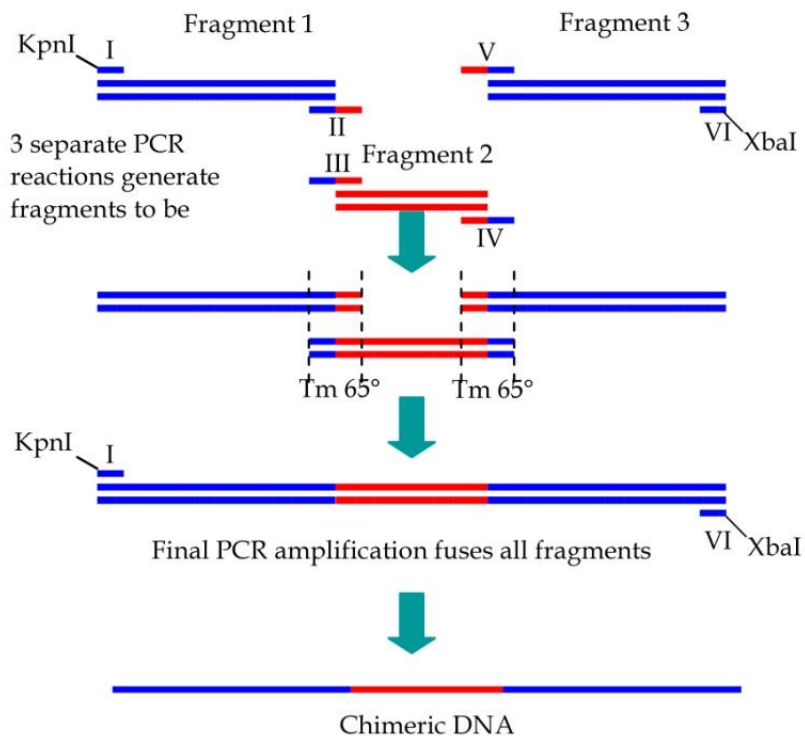


Verižna reakcija s polimerazo

Z dodatkom restrikcijskih mest na začetne oligonukleotide lahko skonstruiramo rekombinantne DNA molekule, ki se bodo v vektor vključili na točno določen način (ki smo si ga izbrali).

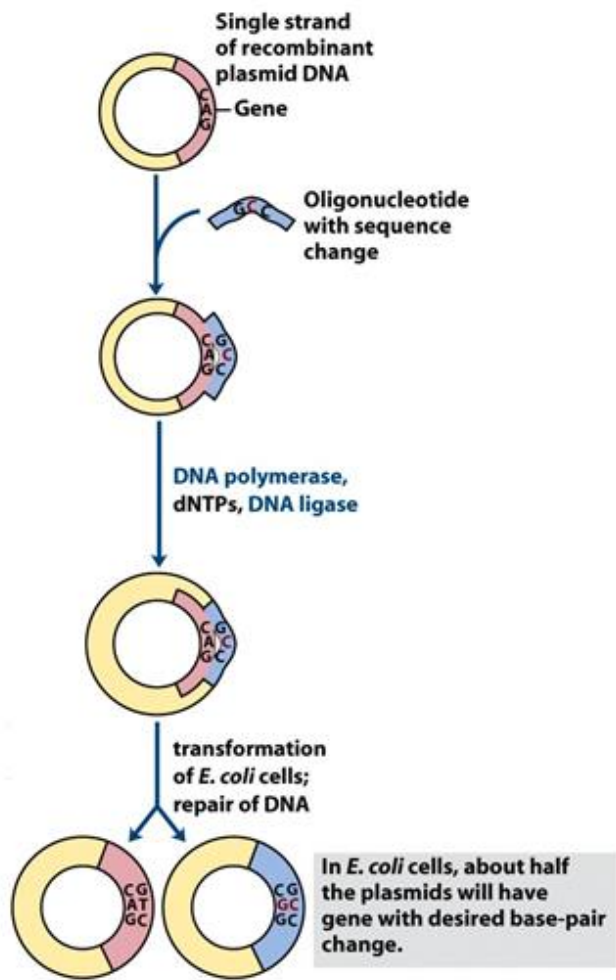


Z ustreznimi oligonukleotidi lahko inženiramo tudi himerne DNA molekule (in s tem proteine).

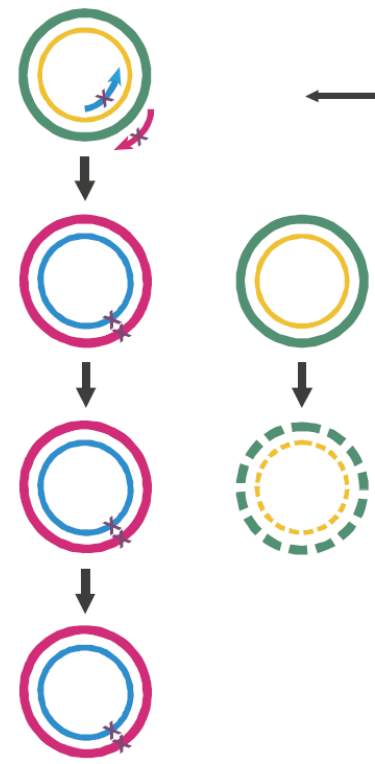


Verižna reakcija s polimerazo

S PCR lahko v zapise uvajamo tudi mutacije, in sicer tako naključne kakor tudi specifične. S t.i. mestno-usmerjeno mutagenezo lahko npr. zamenjamo eno aminokislino v proteinu z drugo.



One-Day Method



Mutant Strand Synthesis
Perform thermal cycling to:
1) Denature DNA template
2) Anneal mutagenic primers containing desired mutation
3) Extend primers with *PfuUltra* DNA polymerase

izhodni plazmid

Dpn I Digestion of Template
Digest parental methylated and hemimethylated DNA with *Dpn I*

Transformation
Transform mutated molecule into competent cells for nick repair

Določanje nukleotidnega zaporedja

Uporabimo PCR reakcijo z enim oligonukleotidom in mešanico dNTP in ddNTP, ki so fluorescentno označeni (vsak nukleotid drugače). Ko se vgradi v verigo ddNTP se sinteza konča, ker ni proste 3'OH skupine.

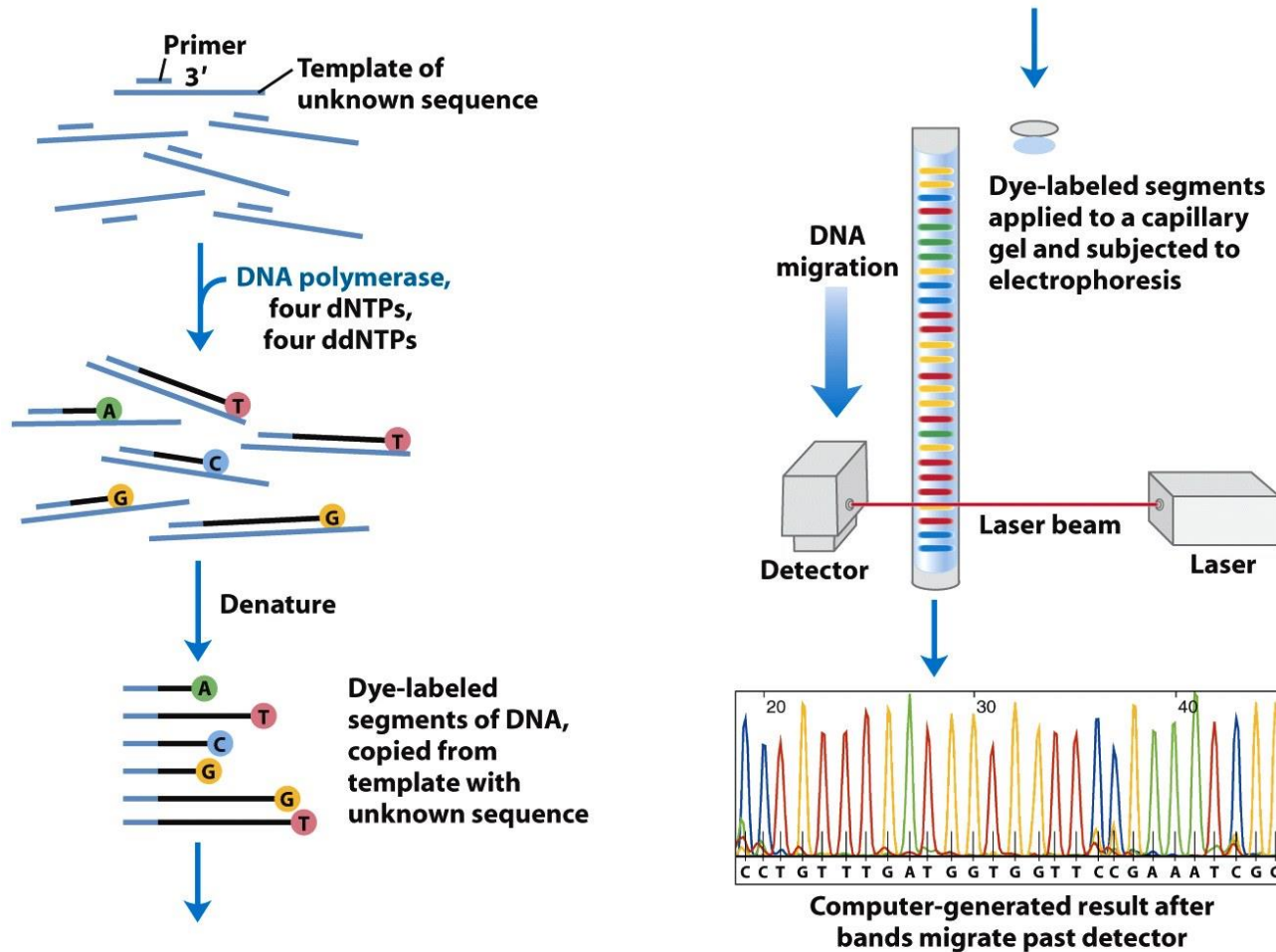


Figure 8-34
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

cDNA knjižnice

cDNA knjižnice so DNA prepisi celične mRNA. Ne vsebujejo intronov, zato so bolj uporabni pri molekularnem kloniranju zapisov za proteine kot genomska DNA.

Dobimo jih z zaporednima reakcijama z reverzno transkriptazo in DNA polimerazo ob uporabi ustreznih oligonukleotidov.

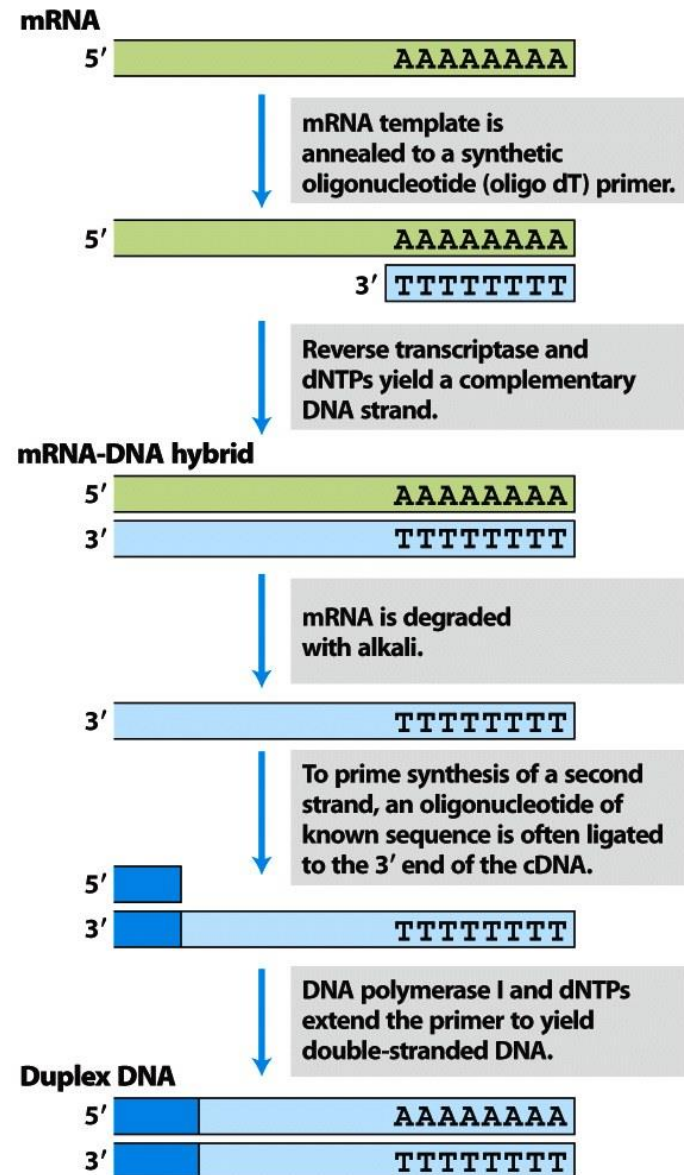


Figure 9-14

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Izražanje rekombinantnih proteinov

Proizvodnja rekombinantnih proteinov je koristna tako v znanstvene kot medicinske in tehnološke namene.

rekombinantni protein

terapevtska uporaba

človeški inzulin

zdravljenje sladkorne bolezni

človeški rastni hormon
(somatotropin)

zdravljenje pritlikavosti

tkivni aktivator plazminogena
(TPA)

zdravljenje pri srčnem infarktu in možganski kapi;
raztaplja krvne strdke

eritropoetin

stimulira nastajanje eritrocitov pri anemiji

interferoni

zdravljenje raka

superoksid-dismutaza

razgrajuje reaktivne radikale, ki nastajajo iz O₂

atrijski natriuretski dejavnik

znižuje visok krvni tlak

leptin

zdravljenje debelosti

Izražanje rekombinantnih proteinov v *E. coli*

Za izražanje rekombinantnih proteinov potrebujemo med seboj kompatibilna sev in vektor. Pri kloniranju moramo paziti na to, da je zapis za protein vstavljen v pravem bralnem okvirju.

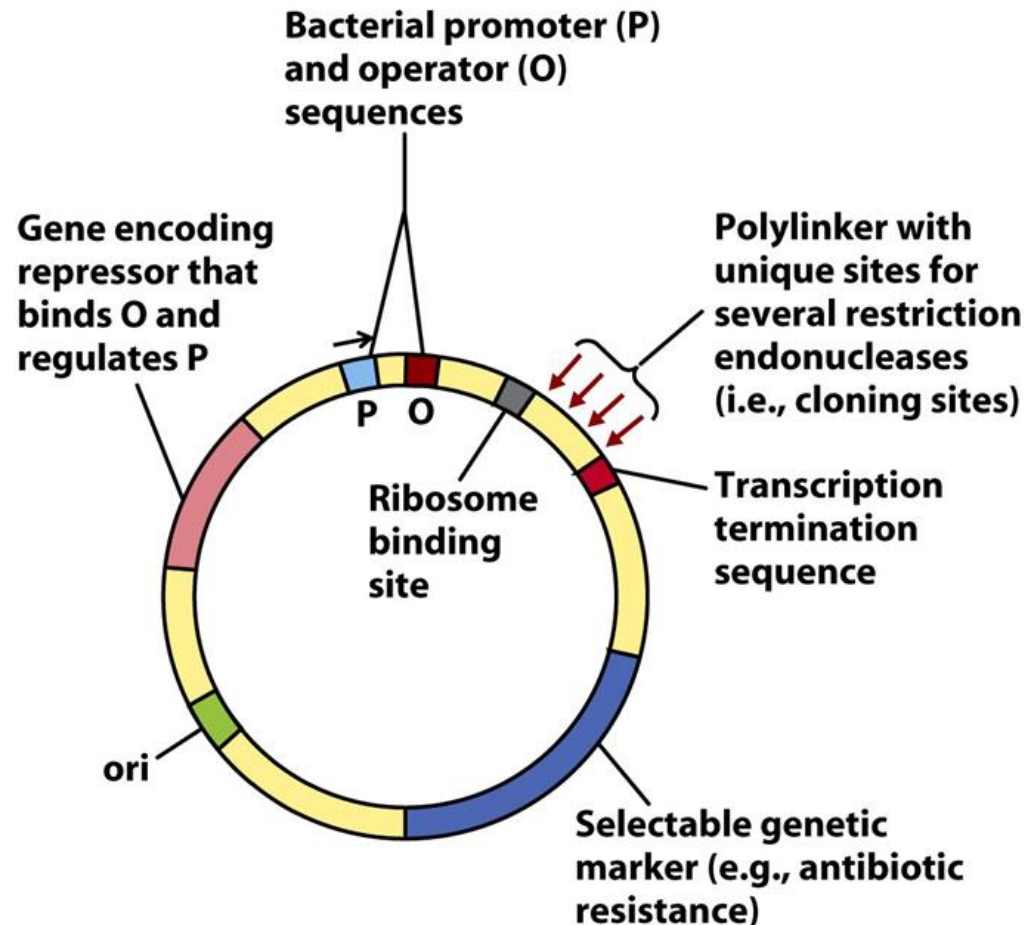
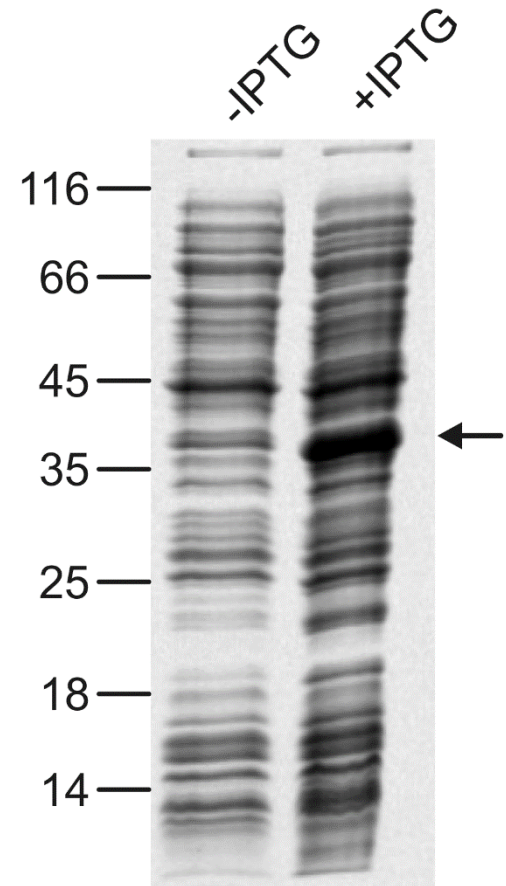
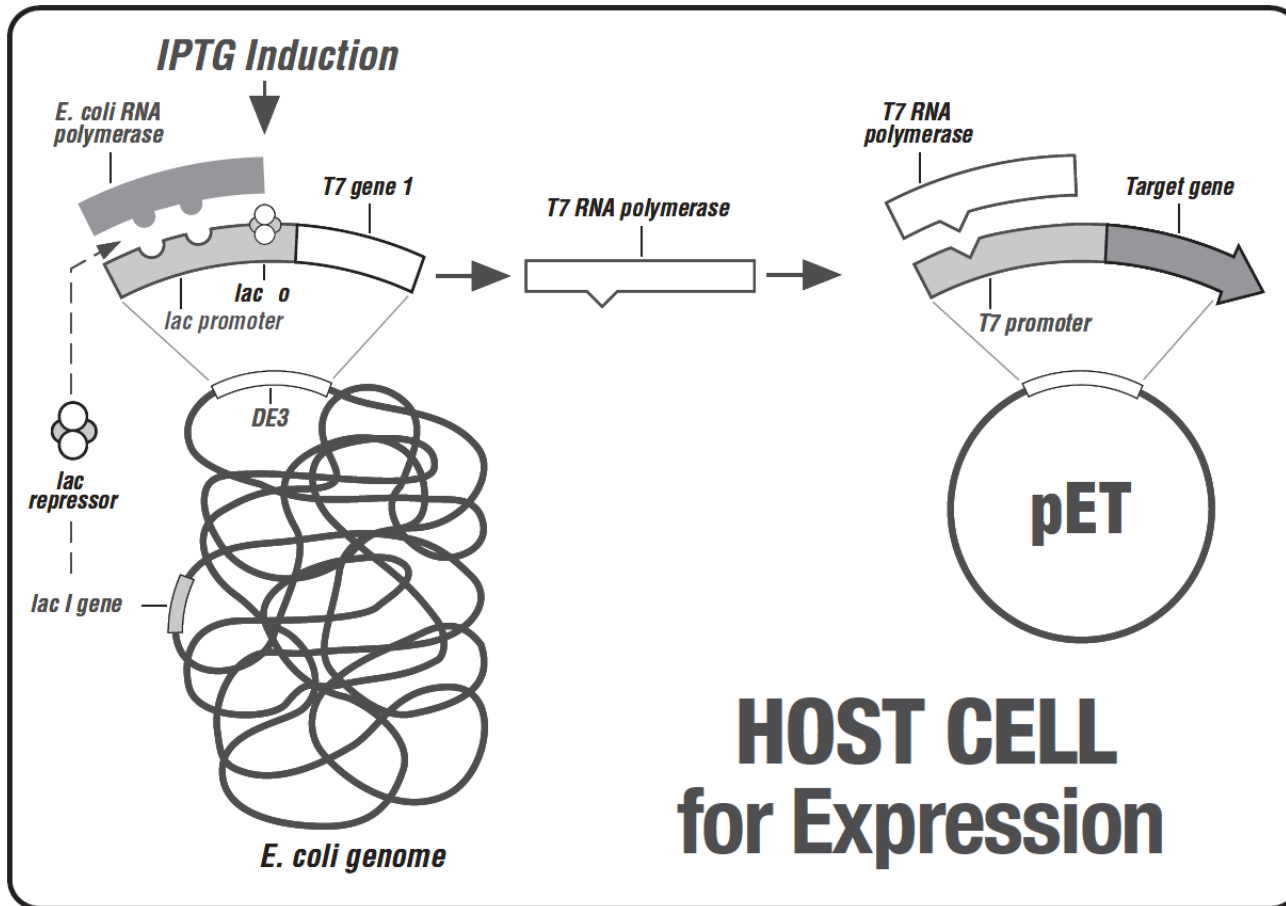


Figure 9-10
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

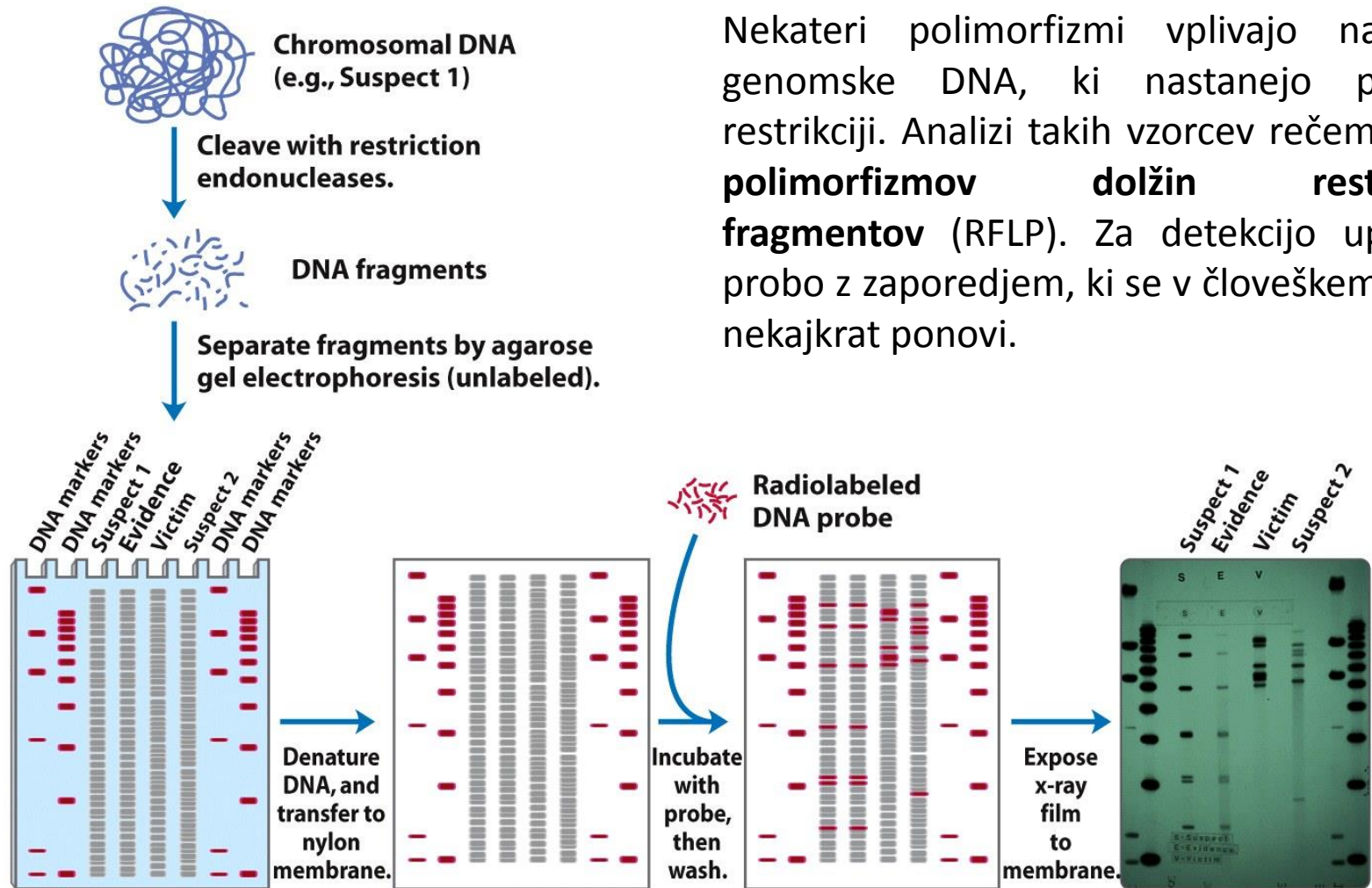
Izražanje rekombinantnih proteinov v *E. coli*

Eden najučinkovitejših sistemov je sistem izražanja, kjer je zapis za rekombinanten protein pod kontrolo promoterja bakteriofaga T7. Kompatibilen sev *E. coli* v svojem genomu vsebuje zapis za T7 RNA polimerazo, ki je pod kontrolo lac operatorja – indukcija z IPTG.



DNA v forenziki

V forenzične namene se uporabljajo t.i. DNA prstni odtisi. Gre za analizo razlik (polimorfizmov) v DNA med posamezniki (v povprečju se med ljudje razlikujemo v 1 od 1000 bp).



Nekateri polimorfizmi vplivajo na vzorce genomske DNA, ki nastanejo pri njeni restrikciji. Analizi takih vzorcev rečemo analiza **polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov** (RFLP). Za detekcijo uporabimo probo z zaporedjem, ki se v človeškem genomu nekajkrat ponovi.

Box 9-1 figure 1

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

DNA v forenziki

Bolj občutljiva je analiza dolžin kratkih zaporednih ponovitev (STR). V genomu je več lokusov, sestavljenih iz različnega števila 4-nukleotidnih ponovitev. Analiza kombinacije 16 takih lokusov daje 10^8 različnih možnih vzorcev.

TABLE 1		Properties of the Loci Used for the CODIS Database		
Locus	Chromosome	Repeat motif	Repeat length (range)*	Number of alleles seen†
CSF1PO	5	TAGA	5–16	20
FGA	4	CTTT	12.2–51.2	80
TH01	11	TCAT	3–14	20
TPOX	2	GAAT	4–16	15
VWA	12	[TCTG][TCTA]	10–25	28
D3S1358	3	[TCTG][TCTA]	8–21	24
D5S818	5	AGAT	7–18	15
D7S820	7	GATA	5–16	30
D8S1179	8	[TCTA][TCTG]	7–20	17
D13S317	13	TATC	5–16	17
D16S539	16	GATA	5–16	19
D18S51	18	AGAA	7–39.2	51
D21S11	21	[TCTA][TCTG]	12–41.2	82
Amelogenin	X,Y	Not applicable		

Source: Adapted from Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd edn, Academic Press, San Diego, p. 96.

*Repeat lengths observed in the human population. Partial or imperfect repeats can be included in some alleles.

†Number of different alleles observed to date in the human population. Careful analysis of a locus in many individuals is a prerequisite to its use in forensic DNA typing.

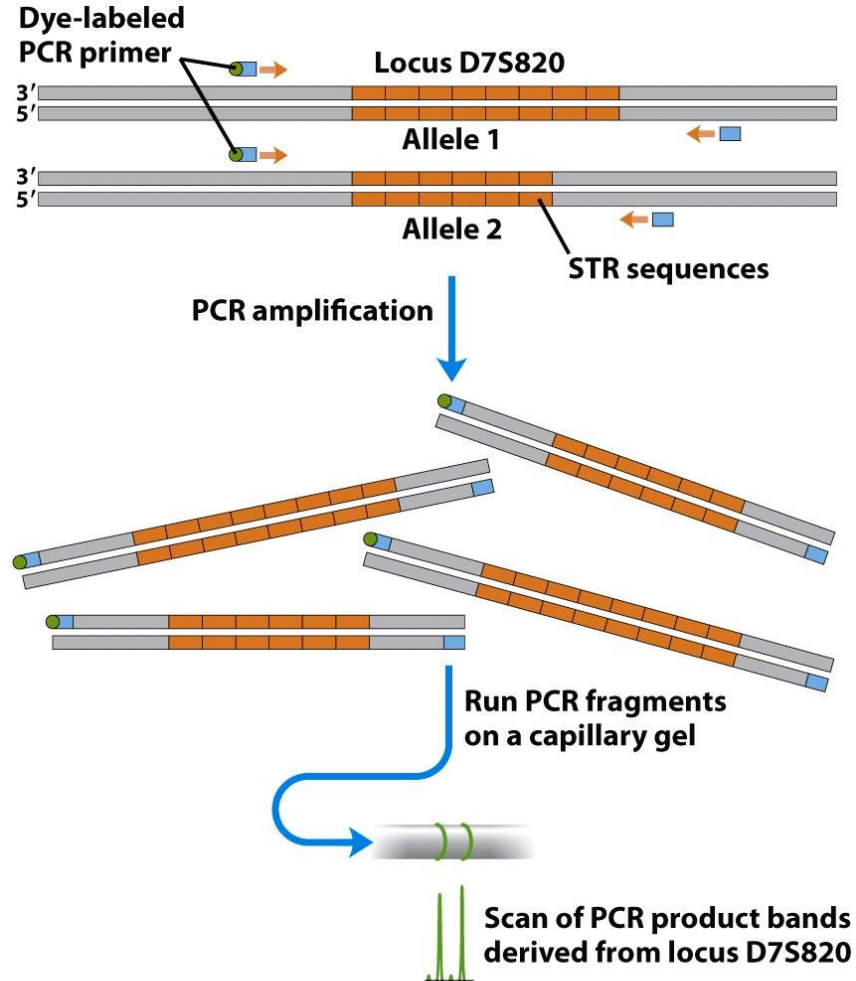
Box 9-1 table 1

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W.H. Freeman and Company

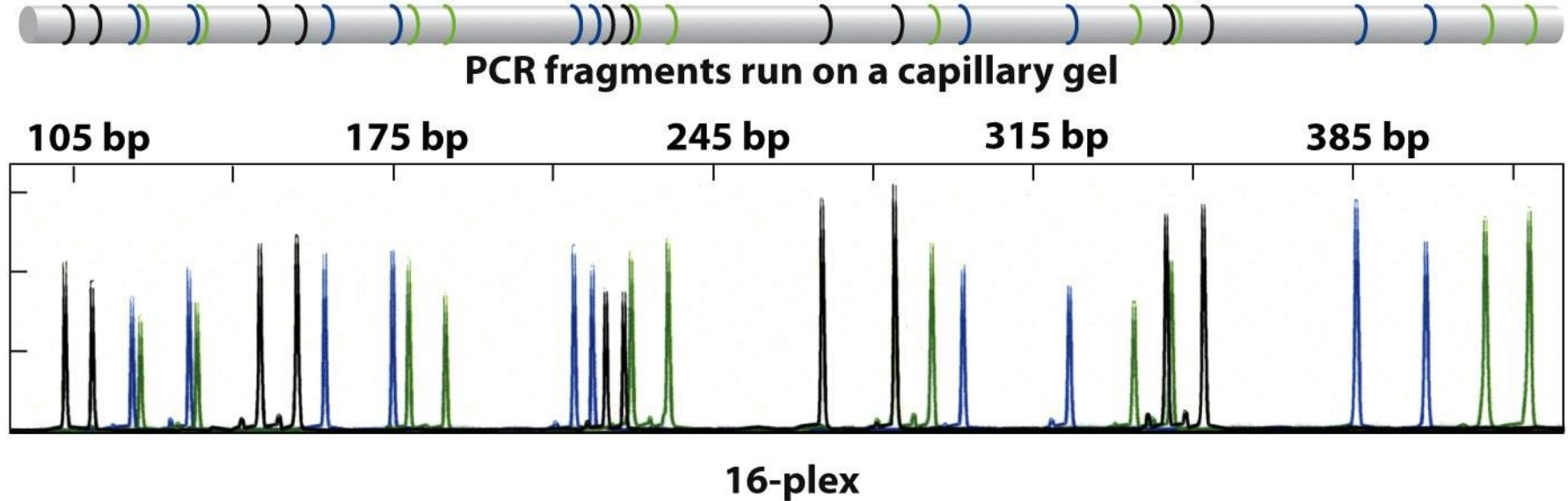
DNA v forenziki

Bolj občutljiva je analiza dolžin kratkih zaporednih ponovitev (STR). V genomu je več lokusov, sestavljenih iz različnega števila 4-nukleotidnih ponovitev. Analiza kombinacije 16 takih lokusov daje 10^8 različnih možnih vzorcev.



DNA v forenziki

Bolj občutljiva je analiza dolžin kratkih zaporednih ponovitev (STR). V genomu je več lokusov, sestavljenih iz različnega števila 4-nukleotidnih ponovitev. Analiza kombinacije 16 takih lokusov daje 10^8 različnih možnih vzorcev.



Box 9-1 figure 2b

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company