

Ohranjanje in prenos biološke informacije

Tehnologija rekombinantne DNA

Zgodovina tehnologije rekombinantne DNA

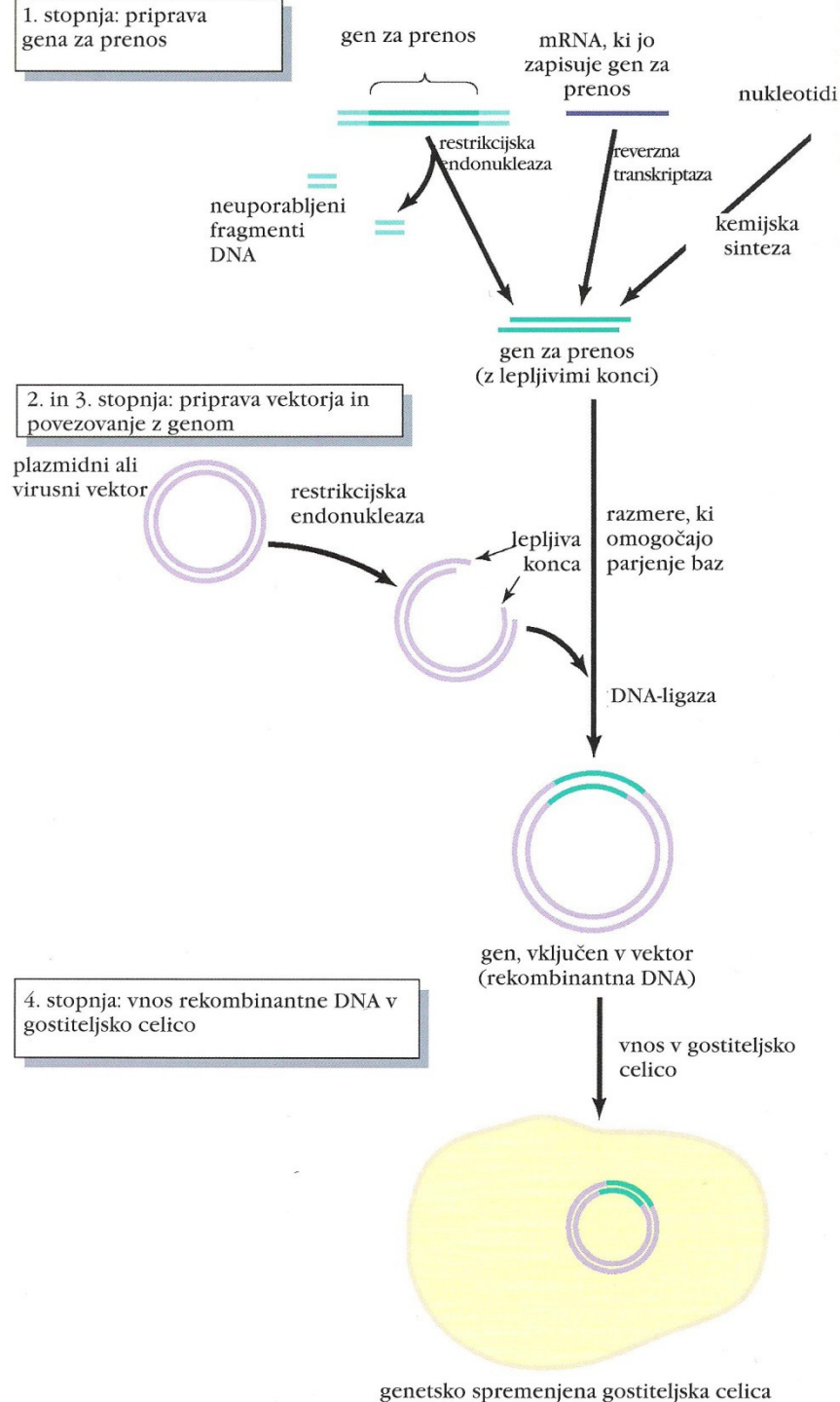
- odkritje DNA: 1868
- poznavanje vloge DNA pri prenosu informacij: 1944
- odkritje strukture DNA: 1953
- razjasnitev genetskega koda: v 60. letih prejšnjega stoletja
- priprava in podvojevanje rekombinantne plazmidne DNA: sredi 70. let prejšnjega stoletja
- “nova biotehnologija” - industrijska uporaba genetsko spremenjenih organizmov: sredi 70. let prejšnjega stoletja

Molekulsko kloniranje

- molekularno kloniranje = rekombinacija DNA: kovalentna vključitev fragmenta DNA iz ene vrste celic ali organizma v DNA druge vrste
- kloniranje DNA: prejemniška celica se deli in njene potomke proizvedejo več kopij hibridne DNA
- proizvodnja večjih količin proteinov: fragment z zapisom za nek protein vstavimo navzdol od promotorske regije – gostiteljske celice proizvajajo kopije tega zapisa in proteina

Priprava rekombinantne DNA

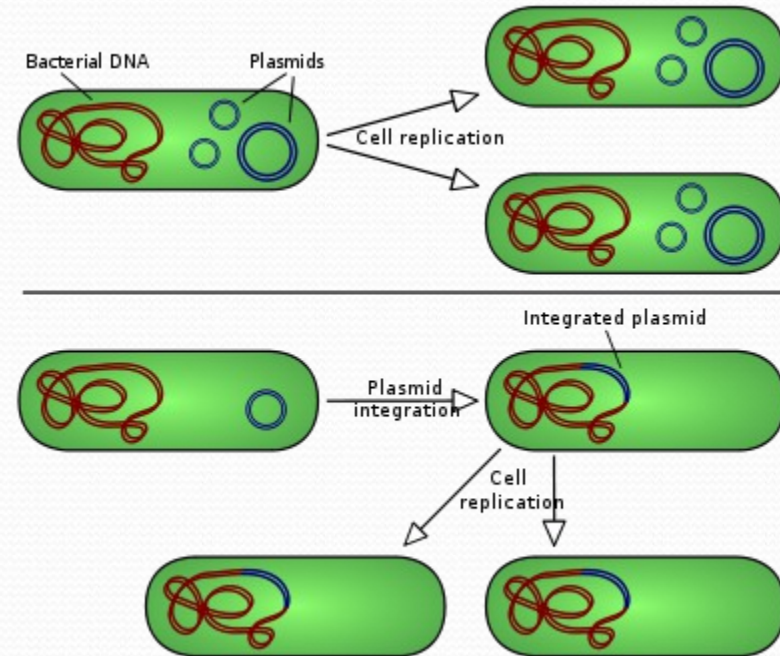
1. Izbor in izolacija molekule DNA (**vektorja**) za prenos v tujo DNA
2. Rezanje prenosnika DNA z restrikcijsko endonukleazo
3. Priprava in vstavitev fragmenta tuje DNA v vektor – nastane **rekombinantna** ali **hibridna** DNA
4. Vnos hibridne DNA v gostiteljski organizem – **transformacija**
5. Razvoj metode za pregledovanje gostiteljskih celic s hibridno DNA



Klonirni vektorji

Za celice *Escherichia coli* uporabljamo 2 tipa molekulskih vektorjev:

- plazmidi
- bakteriofagna DNA



Za evkariontske gene in druge dolge fragmente DNA:

- umetni kromosomi kvasovke (YAC)
- umetni kromosomi bakterij (BAC)

Plazmidi

- zunajkromosomske molekule DNA v bakterijah, ki se samostojno podvojujejo;
- krožna dvoverižna DNA,
- mnogo manjša molekula od kromosomske DNA
- običajno informacija za proteine, ki dajejo specializirano (lahko obrambno) značilnost – encimi za proizvodnjo antibiotikov in drugih toksinov ali za njihovo razgradnjo
- način podvojevanja:
 - omejen: samo nekaj kopij v celici
 - sproščen: tudi do 200 kopij v celici; lahko nastane tudi do 2000 ali 3000 kopij
- lahko sprejmejo vključke do 15 000 baznih parov

Idealni plazmidni klonirni vektor

- podvojevanje na sproščen način
- biti mora majhen
 - lažja ločitev od velike kromosomske DNA
 - lažja obdelava brez poškodb
 - malo mest za napad restriksijske endonukleaze
- vsebovati mora markerje (označevalce) za ugotavljanje prisotnosti v hčeinskih celicah, npr. odpornost proti antibiotikom
- le eno cepitveno mesto za določeno restriksijsko endonukleazo

Bakteriofagna DNA

- Najpogosteje uporabljeni klonirni vektor te skupine: fag λ
 - dvoverižna molekula DNA s približn 50 000 baznimi pari
- Prednosti:
 - V gostiteljski celici možna namnožitev mnogo kopij rekombinantne DNA
 - Rekombinantna fagna DNA se lahko učinkovito pakira v fagne delce (ovojnice bakteriofagov)
 - Možna preprosta identifikacija rekombinantne fagne DNA
 - Fag λ je večji od plazmidne DNA – primeren za vnos daljših fragmentov evkariontske DNA

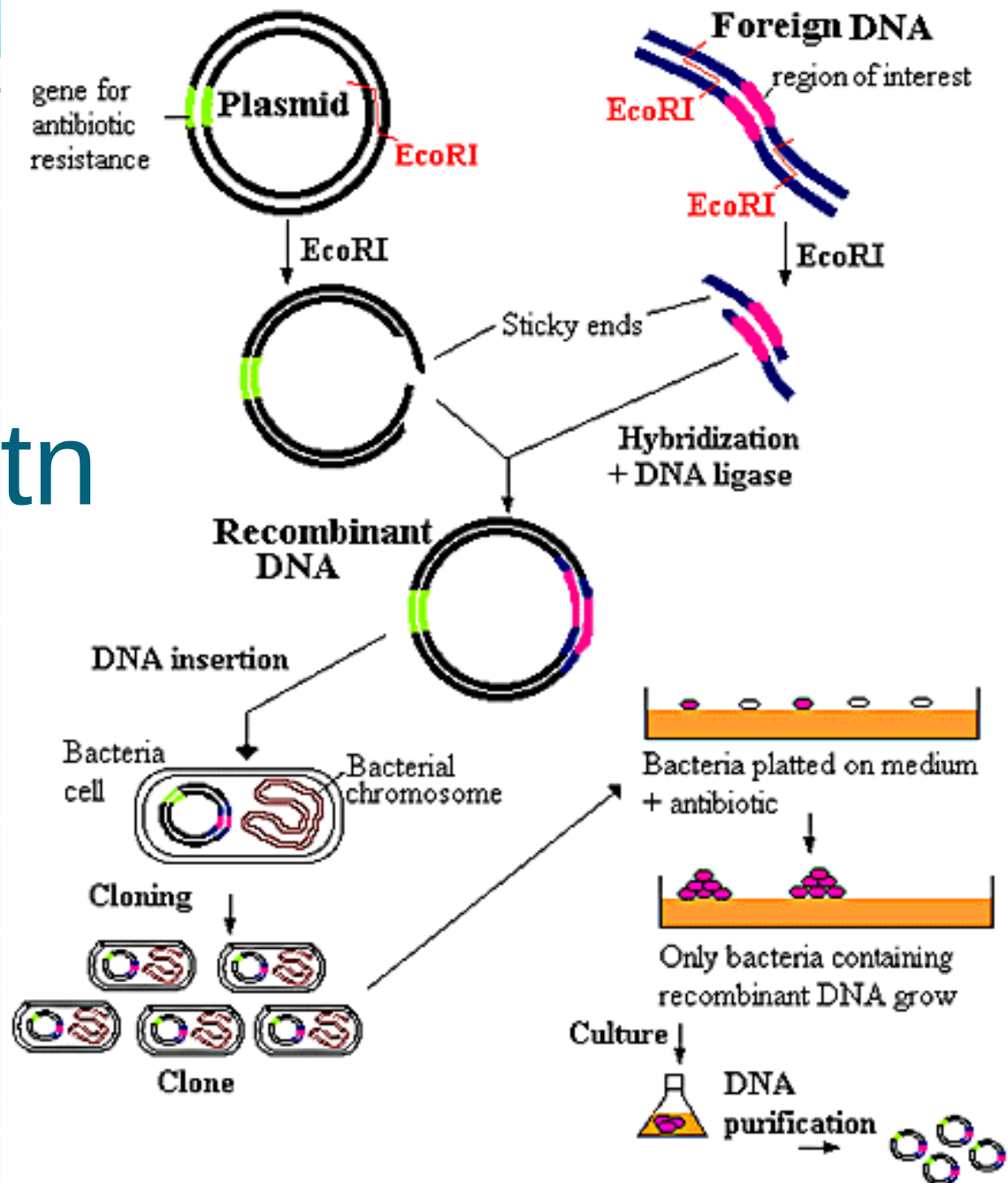
Priprava rekombinantne DNA

- S kemično sintezo
- Z delovanje restrikcijskih endonukleaz na daljši fragment DNA: najpogosteje za pripravo prokariontske DNA
- Z reverzno transkripcijo RNA

Konci fragmentov DNA, pripravljani za vnos v plazmid:

- topi
- lepljivi (kohezivni)

Priprava rekombinantn e DNA



Cloning into a plasmid

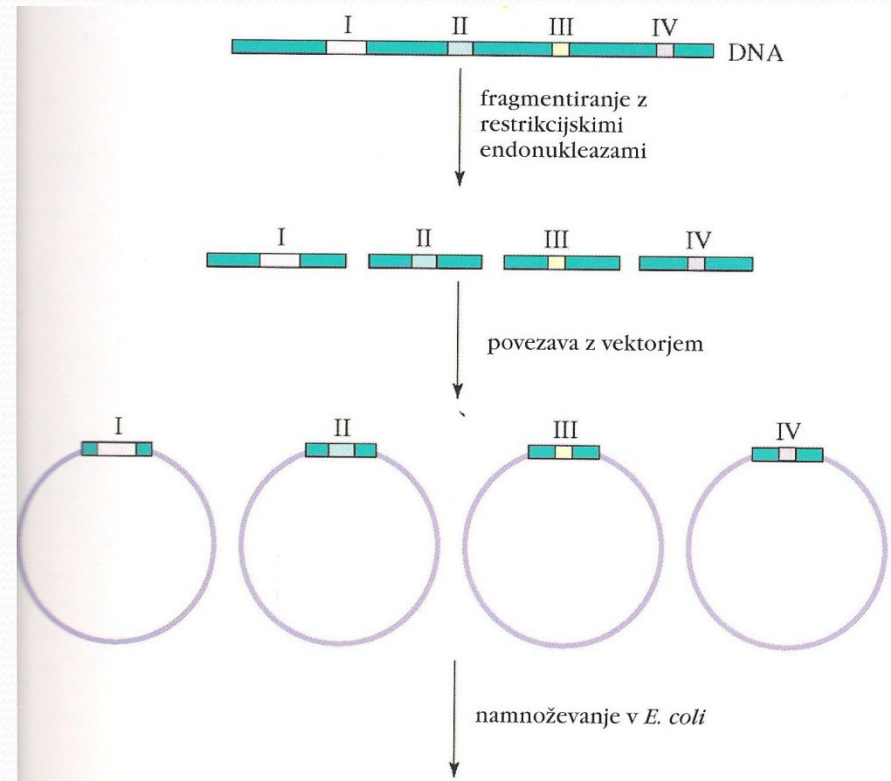
Transformacija

- Vnos rekombinantne DNA v gostiteljsko celico, kjer se bo lahko podvojevala
- Uspešno se vključi le 1 od 10 000 molekul DNA
- Dovolj hibridne DNA in proteina (produkta) za analizo
- Kloniranje plazmidnih vektorjev s transformacijo celic bakterije *E. coli*
- Kloniranje bakteriofagne DNA z infekcijo gostiteljskih bakterijskih celic (transdukcija)
- CaCl_2 pospešuje vstop plazmidne in fagne DNA v *E. coli*

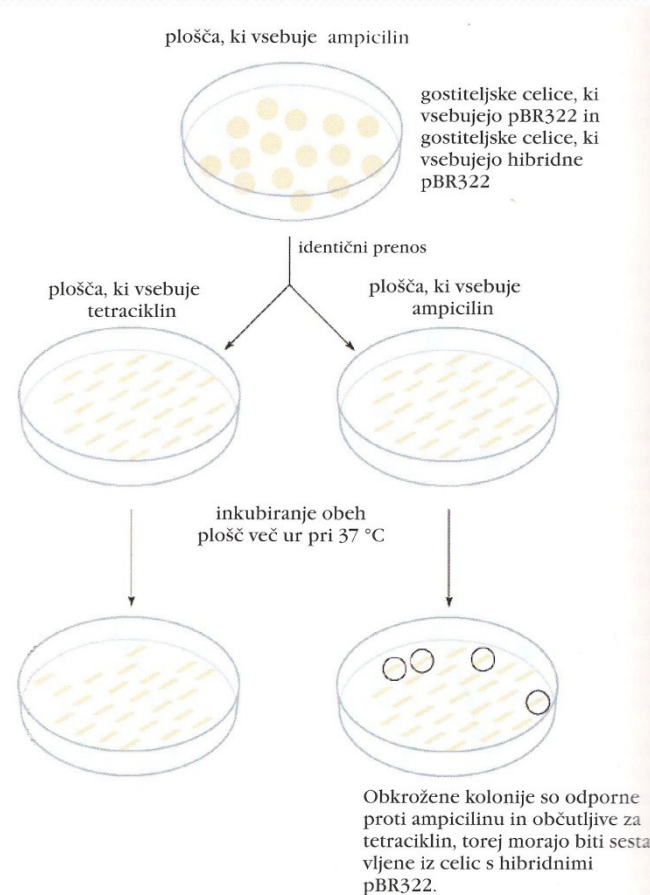
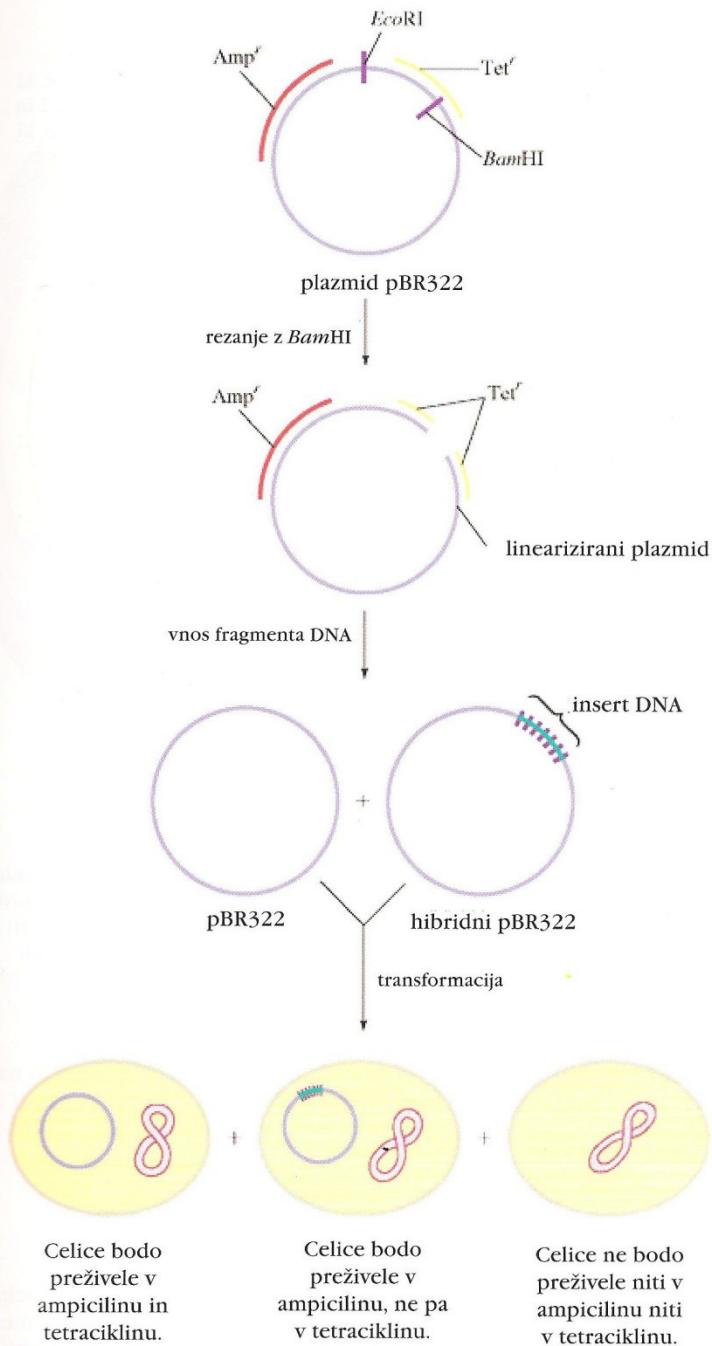
Izolacija in kloniranje enega samega gena

1. Priprava genomske knjižnice: z restrikcijskimi endonukleazami genomsko DNA razrežemo na več 1000 fragmentov – naključna populacija fragmentov
2. Ločimo fragmente
3. Na fragmente s pomočjo encima pripnemo nukleotide in jih povežemo v homopolimerni rep
4. Fragmente vstavimo v linearizirane vektorje
5. Kloniramo v *E. coli*

Priprava genomske knjižnice:
I, II, III in IV: geni znotraj fragmentov



Testiranje učinkovitosti prenosa in podvojevanja hibridne DNA



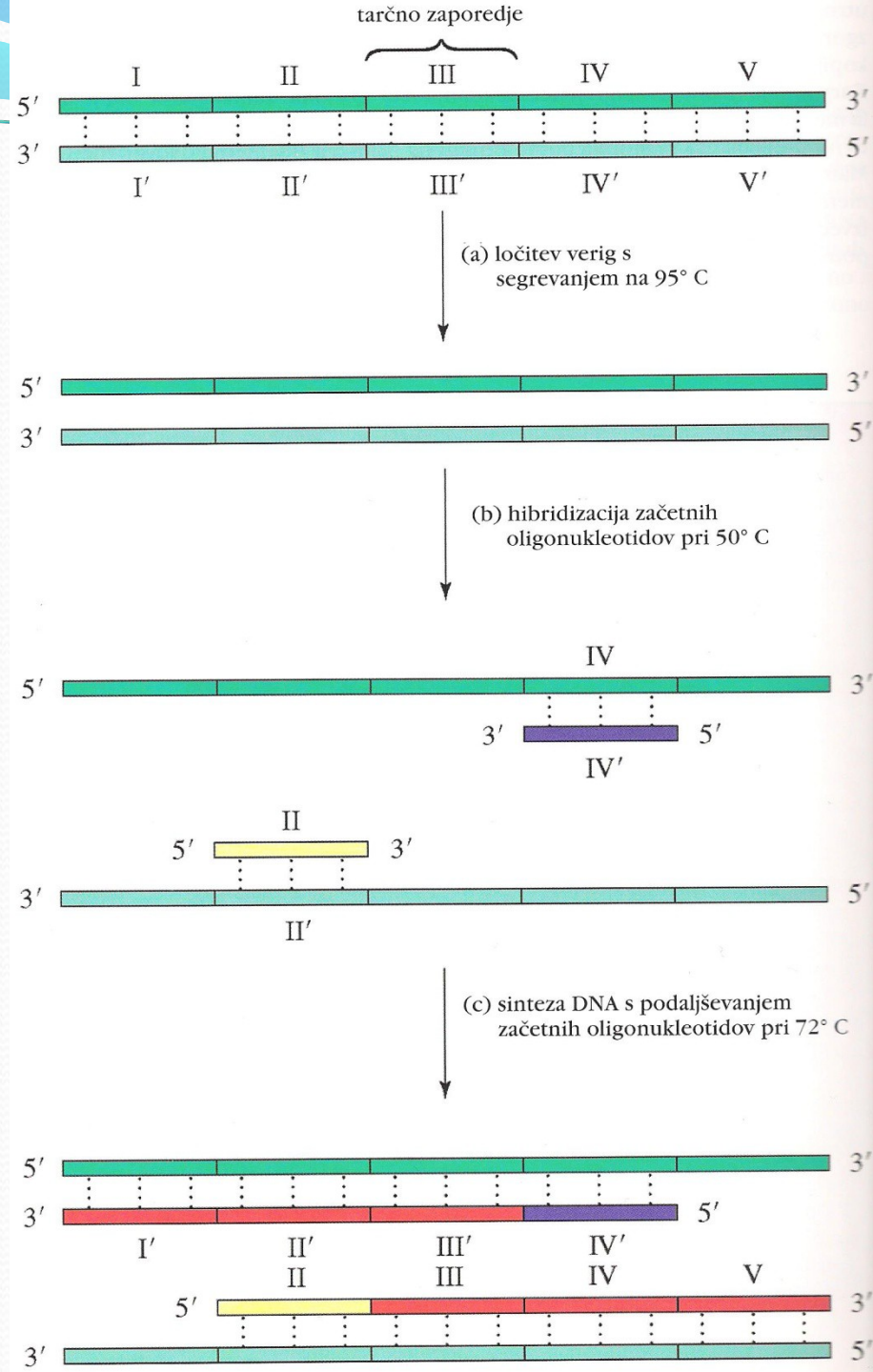
PCR

- Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo
- Nobelova nagrada 1993: Kary Mullis
- 3 stopnje, ciklično ponavljamo:
 1. Denaturacija pri 95 °C (30 s)
 2. Hipna ohladitev na 37 – 55 °C, dodamo prebitek začetnih oligonukleotidov: hibridizacija
 3. Segrevanje na 72 °C: polimerizacija DNA s termostabilno DNA-polimerazo *Taq* – reakcija sinteze DNA končana v 30 s
- V 1-3 urah dobimo milijardkratno pomnožitev DNA

PCR

- Potrebujemo:

- 2 sintetična nukleotida, dolga cca 20 nukleotidov, ki sta komplementarna zaporedjema II' in IV
- termostabilno polimerazo
- vse 4 deoksiribonukleozidtrifosfate (dATP, dGTP, dCTP in dTTP)



Uporaba tehnologije rekombinantne DNA

- Rekombinantni proteinski produkti (inzulin, goveji rastni hormon,...)
- Genetsko spremenjeni organizmi
 - Mikroorganizmi
 - Rastline
 - Živali
- Gensko zdravljenje pri človeku