

Biochemie genového inženýrství

Genové inženýrství je vědní obor zabývající se umělými rekombinacemi syntetických a přirozených nukleových kyselin *in vitro* se záměrem vytvořit nové biologické systémy prospěšné člověku.

Základní metody byly vyvinuty díky převratným objevům v enzymologii nukleových kyselin. Těmito metodami lze změnit genovou výbavu organismu nebo upravit uspořádání genomu. Úpravy DNA se provádí mnoha metodami, připomeňme si jen ty nejdůležitější.

Štěpení DNA

Definované štěpení DNA bylo umožněno objevem restričních endonukleáz (restriktáz). Tyto enzymy štěpí dsDNA na zcela určité centrálně symetrické sekvence nukleotidů zvané **palindrom** (viz tabulka). Restriktázy jsou přirozené enzymy bakterií, kde jsou součástí tzv. **restričně-modifikačního systému**. Tato sekvence je ve vlastní DNA tímto systémem methylována, což restriktázám brání v degradaci vlastní DNA. Systém je tedy mířen k degradaci cizorodé DNA, která dotyčné cílové sekvence nemá chráněny. Vnikne-li fágová DNA do bakterie, je v převážné míře degradována – fág podlehne restrikci. Jen výjimečně je některá z fágových DNA systémem methylována, fág přežije, byl modifikován a může se v daném bakteriálním kmenu množit.

Cílové sekvence DNA restriktáz

enzym	původ	cílová sekvence
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	G↓AATTC CTTAA↑G
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	A↓AGCTT TTCGA↑A
BsuI	<i>Bacillus subtilis</i>	GG↓CC CC↑GG

Specifita restriktáz byla využita v enzymologii DNA. Bylo popsáno kolem stovky takových enzymů, nazývají se zkratkami názvů bakterie, v níž byly objeveny (EcoRI – *E. coli*, HaeIII – *Haemophilus influenzae*). Každá restriktáza má specifickou cílovou sekvenci, v níž štěpí buď protější fosfodiesterové vazby dsDNA nebo vazby symetricky vzdálené několik nukleotidů od centra symetrie (viz tabulka). Ve druhém případě se tvoří **kohezní** („lepivé“) konce vzniklých restričních fragmentů, které se mohou reasociovat, a to i s fragmenty získanými štěpením jiné DNA stejnou restriktázou. Tato možnost je velice výhodná při rekombinaci fragmentů a konstrukci nových genů a genomů. Dnes ovšem není problémem uměle vytvořit jakékoli kohezní konce u kteréhokoli fragmentu dsDNA.

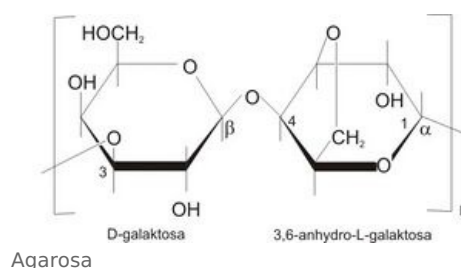
Dalším biotechnologicky významným enzymem je DNA-ligáza, objevená při studiu přirozené replikace DNA. Kovalentně spojuje 3'-OH konec řetězce s 5'-P koncem DNA.

Elektroforéza nukleových kyselin

Úseky DNA, produkty PCR reakce nebo štěpy DNA můžeme v zásadě dělit chromatograficky nebo elektroforézou. Elektroforetické dělení je mnohem používanější. Provádí se zpravidla v gelu, a to buď agarosovém, nebo polyakrylamidovém. V obou případech se molekuly, které v zásaditém prostředí nesou záporný náboj, pohybují v elektrickém poli od katody k anodě. Gely tvoří poměrně hustou síť, kterou větší molekuly procházejí pomaleji než menší molekuly – mluvíme proto o technice **molekulového síta**.

Elektroforéza v agarosovém gelu

Agarosa je polysacharid tvořený D-galaktosou a anhydro-L-galaktosou, který produkují některé mořské řasy a pod názvem agar se používá k výrobě gelů v potravinářství, mikrobiologii, imunologii či biochemii. Pro elektroforézu nukleových kyselin se používají gely obsahující 0,5 až 4 % agarosy. Čím je obsah polysacharidu vyšší, tím je lepší rozlišovací schopnost gelu, ale tím je také průběh elektroforézy pomalejší a příprava gelu je technicky náročnější.



Agarosa

Volba koncentrace agarosového gelu pro elektroforézu DNA

Obsah agarosy v gelu	Délka DNA
0,5 %	1–30 kbp
0,7 %	0,8–12 kbp
1,0 %	0,5–10 kbp
1,2 %	0,4–7 kbp
1,5 %	0,2–3 kbp
2,0 %	50 bp–2 kbp
3–4 %	10 bp–1 kbp

Do agarosového gelu se většinou přímo přidává ethidiumbromid, takže po skončení elektroforézy lze jednotlivé frakce zobrazit UV zářením. Jinou možností detekce je blotting na membránu a následné obarvení nukleových kyselin nebo hybridizace se značenými sondami.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

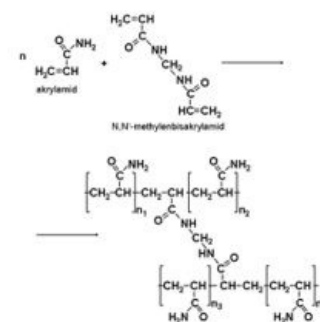
Jiným nosičem používaným při elektroforéze nukleových kyselin je **polyakrylamidový gel**. Polymerací akrylamidu vznikají lineární molekuly polyakrylamidu. Ty se spojují příčnými můstky, které vznikají kopolymerací s N,N'-metylenbisakrylamidem. Akrylamid i metylenbisakrylamid jsou poměrně stabilní látky; polymerace probíhá v nepřítomnosti vzdušného kyslíku (odstraní se odvodušením pomocí vakua) a zahajuje se přimíšením katalyzátorů peroxydisíranu amonného (známého pod starším názvem persíran amonný, krátce APS) a N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu (TEMED).

APS ve vodném roztoku s TEMED uvolňuje volné kyslíkové radikály, které atakují molekuly akrylamidu a bisakrylamidu a spouštějí tak jejich polymeraci.

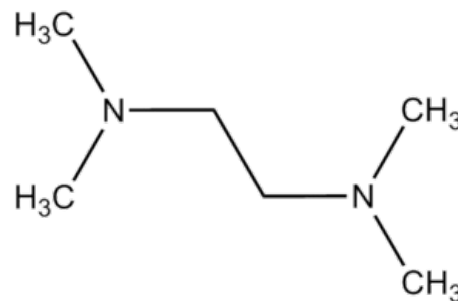
Molekulové síto polyakrylamidového gelu je poměrně husté, hodí se proto pro rozdělování kratších fragmentů.

Volba koncentrace polyakrylamidového gelu pro dělení DNA

Polyakrylamid	Délka DNA
3,5 %	1–2 kbp
5 %	75–500 bp
8 %	50–400 bp
12 %	35–250 bp
15 %	20–150 bp
20 %	5–100 bp



Polyakrylamid



TEMED

Díky tomu, že polyakrylamid je méně reaktivní než agarosa, lze fragmenty DNA kromě metod používaných v agarosovém gelu obarvit i dalšími technikami. Z klasických metod patří mezi nejcitlivější stříbření, kterým lze detekovat množství DNA i o několik řádů nižší než ethidiumbromidem.

Hybridizace

Často se využívá k identifikaci hledaného řetězce, nebo jeho části. Hledaná sekvence nukleotidů **hybridizuje** s předem připravenou a označenou **sondou** (řetězec DNA nebo RNA, označený fluorochromem nebo detekovatelným radioizotopem).

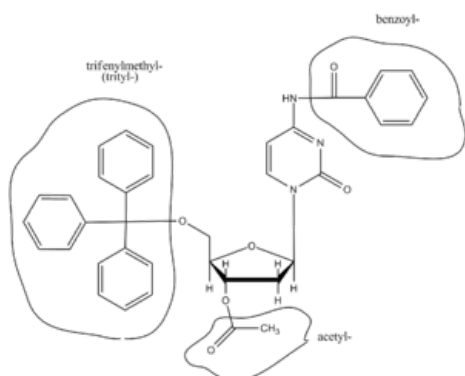
Hybridizace je děj, při kterém se spojují dva komplementární řetězce, je možné kombinovat DNA i RNA. zjednodušeně ji lze rozdělit na:

1. **denuraci vzorku** – rozpad vodíkových můstků mezi bazemi a oddělení řetězců (zahřátí),
2. **přidání sondy** – řetězec nukleové kyseliny, jehož komplementární část hledáme,
3. **renaturace** – pomalou renaturací (ochlazováním), při které se spojují komplementární řetězce,
4. **vyhodnocení experimentu, vyšetření**.

Syntéza umělé DNA

Potřebný řetězec DNA lze připravit různým způsobem. Jsou již k dispozici dokonce **automatizované postupy**, jak syntetizovat DNA o žádané sekvenci z jednotlivých nukleotidů.

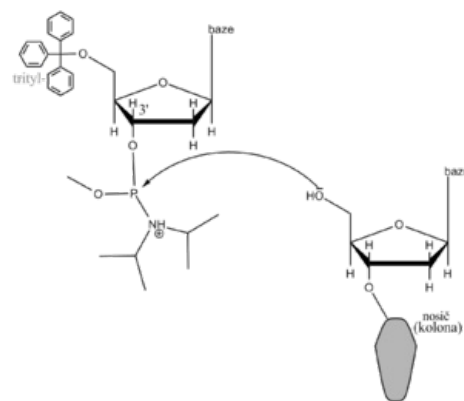
Základním principem je potlačit na nukleotidech reaktivitu 3'-OH, 5'-OH a případně i -NH₂ skupin, senzitivních na kondenzující agens. Jejich ochrany se docílí navázáním vhodných organických skupin, např. tritylové, benzoylové, acetylové apod. Tyto skupiny je možné snadno odstranit např. změnou pH, čímž se reaktivní skupina nukleotidu odkryje pro bezprostřední reakci.



Protektce reaktivních skupin při syntéze umělého oligonukleotidu

Typickým příkladem je toto uspořádání: na kolonu se skleněným nosičem (drobné částice) je navázán první nukleotid, na němž jsou popsáním způsobem chráněny všechny skupiny kromě 5'-OH. Kolona je pak promývána roztokem dalšího, aktivovaného nukleotidu. Bývá to **deoxyribonukleosid 3'-fosfoamidit**, který se naváže na 5'-OH fixovaného nukleotidu. Po oxidaci trojmocného fosforu na pětimocný vzniká fosfodiesterová vazba a dinukleotid.

Odstraní se protektce na jeho 5'-konci a kolona se promývá dalším aktivovaným nukleotidem atd. Vhodnými podmínkami se pak odstraní všechny protektivní skupiny a methyly z fosfátů, a uvolní se z kolony hotový oligonukleotid.



Vzorec fosfoamiditu (5'-OH je blokována tritylem) a jeho navázání na rostoucí polynukleotid, fixovaný na nosič v koloně.

Popis postupu je značně zjednodušen, syntéza oligonukleotidu trvá hodiny. Rychlost procesu nesnese srovnání s rychlostí přirozené biosyntézy (např. v *E. coli* 16 000 bazí za minutu). Nicméně možnost vytvořit DNA o jakékoli primární struktuře je nesmírným pokrokem. Syntetické fragmenty DNA lze enzymově spojovat v delší řetězec umělé DNA.

Pomnožení a exprese genu

Zjednodušeně tento postup vyžaduje:

- **konstrukci vektoru** – nosič nového genu, schopný vniknout do hostitelské buňky,
- **selekcce hostitelské buňky**- odlišit buňky se změněným genotypem,
- **pomnožení** vybraných hostitelských buněk,
- **vytvoření podmínek** pro efektivní resp. ekonomicky výhodnou expresi nového genu v hostitelské buňce.

V současné době jsou všechny tyto postupy do značné míry zvládnuty a využívány ke studiu lidského, živočišného i rostlinného genomu, k diagnostice molekulárních chorob (dědičných chorob) a k jejich terapii a k výrobě nových látek včetně léků, a též ke šlechtění hospodářských rostlin. Mnohé z těchto použití jsou řazeny do moderního průmyslového odvětví zvaného biotechnologie.

Odkazy

Související články

- Identifikace restrikčních fragmentů
- Pomnožení a exprese izolovaného genu v hostitelské buňce

Zdroj

- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie : uchování a exprese genetické informace*. 1. vydání. Praha : Medprint, 1998. ISBN 80-902036-2-0.

Použitá literatura

- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie : uchování a exprese genetické informace*. 1. vydání. Praha : Medprint, 1998. ISBN 80-902036-2-0.
- NEČAS, Oldřich. *Obecná bioogie pro lékařské fakulty*. 3. vydání. Jinočany : H+H, 2000. ISBN 80-86022-46-3.