

Pomnožení a exprese izolovaného genu v hostitelské buňce

Velkým pokrokem bylo zavedení metody, kterou lze izolovaný nebo syntetický gen pomnožit. Některé geny se v buňce vyskytují pouze v jediné kopii. Teprve jeho laboratorním pomnožením bývá k dispozici dostatek materiálu k potřebné analýze a k terapeutickému nebo biotechnologickému využití.

Syntéza vektoru

DNA, která má být pomnožena v hostitelské buňce, do ní vstupuje zcela výjimečně. Je nutno ji začlenit do větší molekuly DNA, která tuto vlastnost má a která se případně vestaví do hostitelského genomu. Těmto nosičům arteficiálních genů říkáme **vektory**. Bývá to nejčastěji plazmidová nebo virová DNA. **Plazmid** je přírodní extrachromosomální element, cirkulární dsDNA. Z různých typů těchto elementů jsou využívány zejména ty, jejichž geny jsou nositeli rezistence hostitelské bakterie na nějaké antibiotikum. Plazmid např. obsahuje gen pro enzym rozkládající určité antibiotikum. Přijme-li bakterie takový plazmid, stane se na toto antibiotikum rezistentní. Větším a vlastnostmi odlišným vektorem bývá některý z virů (λ -fág, nebo retrovirus). Jeho DNA se v hostitelské buňce pomnoží, případně integruje do hostitelského genomu.

Vybraný vektor i studovaný gen se pomocí restriktázy nebo synteticky opatří kohezními konci, pomocí kterých se gen do vektoru začlení a naváže se kovalentně DNA-ligázou. Vektor nesoucí exogenní gen je rekombinovanou DNA s původními vlastnostmi vektoru.

Selekce hostitelské buňky s přijatým novým genem

I za nejvhodnějších podmínek přijme exogenní (vektorovou) DNA jen část použitých buněk a jen tuto část je třeba rozeznat a použít k dalšímu postupu.

Tento problém je u plazmidových vektorů řešen tzv. **inzerční inaktivací** plazmidového genu, odpovědného za rezistenci hostitelské bakterie na antibiotikum. Plazmid *pBR322* obsahuje gen pro rezistenci na ampicilin (AMP) a gen pro odolnost na tetracyklin (TC). Vhodnou restriktázou je rozštěpen např. gen tetracyklinové rezistence a do tohoto místa vložen studovaný gen. Příjem plazmidu do bakterie je výhodně signalizován její rezistencí na antibiotika. Bakterie, které nepřijaly žádný plazmid, jsou rezistentní na obě antibiotika, bakterie obsahující plazmid, do kterého se nepodařilo začlenit nový gen, budou rezistentní na obě antibiotika. Pouze bakterie nesoucí plazmid se začleněným novým genem vykazují inzerční inaktivaci, tj. budou rezistentní na ampicilin a senzitivní na tetracyklin. Jedině ty má význam pomnožit a dále použít.

Klonování genu

Jsou i další způsoby, jak zjistit úspěšné vnesení genu do hostitelské buňky, např. pomocí komplementární próby, jestliže vektorem byl virus. Metody se používá při pomnožování, **klonování genu**, který se ve studovaném obrovském genomu vyskytuje třeba i v jediné kopii. Nejdříve je gen třeba v rozsáhlém genomu najít. Celková genomová DNA je proto rozštěpena restriktázami na velké množství fragmentů s kohezními konci, s jejichž pomocí jsou fragmenty vloženy do vektoru, např. fága A. Každý fág v získaném preparátu může obsahovat jiný fragment studovaného genomu. Fágy se pomnoží v *E. coli*, čímž vzniká tzv. **genomová knihovna**, kterou lze uchovat a kterýkoli fág s nějakým fragmentem studovaného genomu kdykoli pomnožit. Důležité je najít v této knihovně fága obsahujícího právě ten úsek studovaného genomu, který je třeba. Zředěná suspenze fága je vylita na agar pokrytý vrstvou bakterií. V místech infekce se objeví kruhová projasnění – **plaky**, vzniklé postupnou lýzou bakterií napadených fágy. Plaky obsahují obrovské množství identických fágových partikulí. Tato kultura se otiskne na nitrocelulosovou membránu, bakterie a fágy se lyzují pomocí NaOH, který současně denaturuje jejich DNA. Na tomto preparátu pak pomocí vhodné próby lze najít plak obsahující komplementární sekvenci DNA. Mimochodem, tímto způsobem lze **diagnostikovat** chybějící geny genomu pacienta s dědičnou poruchou. V originální kultuře (**matrici**) lze fágy z identifikovaného plaku přenést na čerstvé bakterie a pomnožit je i s genem, který byl do nich ve formě restriktčního fragmentu vnesen. Gen tak byl vybrán z obrovského množství jiných přítomných genů a sekvencí DNA a pomnožen (klonován).

Potřebnou próbu lze sestavit uměle na základě znalostí sekvence aminokyselin studovaného proteinu, nebo ji lze získat reverzní transkripcí příslušné mRNA pomocí virové RNA-dependentní DNA-polymerázy. Výsledkem je pak tzv. **cdNA**, která se u eukaryot může lišit od odpovídající genomové DNA nepřítomností intronů.

Vytvoření podmínek pro expresi umělého nebo přeuspořádaného genu v hostitelské buňce

Rekombinovaná molekula DNA může být využita k řízení syntézy proteinu v hostitelské buňce. Tímto způsobem lze pozměnit genomovou funkci buněk pacienta nebo *in vitro* vyrábět velké množství proteinu biotechnologicky. Musí však být vytvořeny podmínky pro expresi genu a syntézu produktu. Pak lze savčí protein syntetizovat dokonce v

bakterii. Z pankreatu byla izolována mRNA pro inzulin, reverzní transkripcí byla připravena inzulinová cDNA, začleněna do plazmidu a přenesena do *E. coli*. Bakterie produkovala proinzulin. Muselo být splněno několik podmínek, aby se tak cizorodá bílkovina mohla v bakterii tvořit:

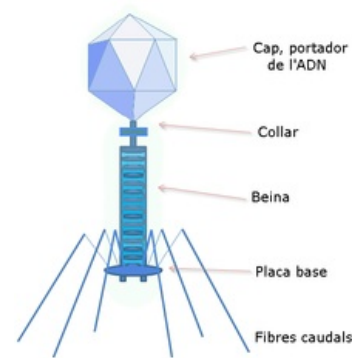
- Vektor musel být sestaven tak, aby gen byl začleněn ve správném čtecím rámci.
- Bylo výhodné před gen vložit výkonný promotor, který rychle zahajoval transkripci.
- Před gen byla vložena sekvence blízko před iniciační kodon, která byla vazebným místem mRNA na ribosom.

Gen byl začleněn do vektoru ve formě cDNA, nebyl tedy přerušován introny jako původní gen v pankreatu. Tím se obchází problém, že bakterie není schopna sestřihu eukaryotických pre-mRNA.

Je třeba si všimnout, že bakterie syntezovala proinzulin. Nemá enzymy pro posttranslační úpravu proteinu. Dnes je popsán způsobem vyráběna značná část proinzulinu potřebného k terapii diabetiků. Existují i metody pro vnesení exogenní DNA do eukaryotické buňky, kde pak nechybí zmíněné mechanismy pro posttranskripční a posttranslační úpravy produktů. DNA se v těchto systémech vnáší do buňky pomocí kalciumfosfátu, mikroinjekcí do hostitelské buňky nebo pomocí retrovirů jako vektorů. Krysí gen pro růstový hormon byl vnesen do myších germinálních buněk. Myši vyrostly do dvojnásobné velikosti (transgenní zvířata).

První úspěchy zaznamenali též botanici, když se podařilo vnést cizorodé geny do rostlinných buněk. Tento výzkum má vyřešit genetické šlechtění rostlin, zajistit jejich nezávislost na dusíkatých hnojivech a v podstatě zajistit výživu lidstva.

Podle některých futurologů díky pokrokům v biochemii nukleových kyselin lidstvo přechází z technické revoluce v revoluci biologickou. Přinese méně starostí a více výhod?



Bakteriofág

Odkazy

Související články

- Biochemie genového inženýrství
- Štěpení DNA
- Dělení fragmentů DNA elektroforézou
- Identifikace restrikčních fragmentů
- Syntéza umělé DNA

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.