

**Zdenka Gálová, Želmíra Balážová, Peter Chrenek,
Milan Chňapek, Jana Libantová,
Ildiko Matušíková, Jana Moravčíková,
Ján Salaj, Janka Drábeková**

Metódy a techniky génových manipulácií

Nitra 2018

Názov: Metódy a techniky génových manipulácií

Autori:

prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc. (AH 0,76)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
doc. Mgr. Želmíra Balážová, PhD. (AH 1,32)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
prof. Ing. Peter Chrenek, DrSc. (AH 1,13)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Ing. Milan Chňapek, PhD. (AH 2,75)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Ing. Jana Libantová, CSc. (AH 1,52)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Mgr. Ildiko Matušíková, PhD. (AH 1,35)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD. (AH 1,42)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
doc. RNDr. Ján Salaj, DrSc. (AH 1,22)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
RNDr. Janka Drábeková, PhD. (AH 1,78)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Recenzenti:

prof. RNDr. Klaudia Jomová, PhD., FPV UKF v Nitre
doc. Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD., FAPZ SPU v Nitre

Schválil rektor Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre dňa 16. 2. 2018
ako vysokoškolskú učebnicu pre študentov SPU v Nitre.

ISBN 978-80-552-1805-2

Obsah

Zoznam skratiek	7
Predslov	9
1 Vektorové systémy	11
1.1 Klonovacie systémy.....	11
1.1.1 Plazmidové klonovacie vektory.....	11
1.1.2 Plazmidové vektory pre sekvenčné účely	15
1.1.3 Lambda klonovacie vektory.....	15
1.1.3.1 Inzerčné fágové vektory	15
1.1.3.2 Substitučné fágové vektory	16
1.1.4 Kozmidové vektory	17
1.1.5 Bakteriálne umelé chromozómy	17
1.1.6 Kvasinkové vektory	18
1.2 Expresné systémy ..	21
1.2.1 Plazmidové expresné vektory	21
1.3 Vektorové systémy pre expresiu v eukaryotických bunkách.....	22
1.3.1 Vektory pre transformáciu cicavčích buniek.....	22
1.3.2 Vektory pre transformáciu rastlinných buniek.....	24
2 Enzýmy používané v DNA rekombinantných technológiách	27
2.1 Restriktčné endonukleázy	27
2.2 Enzýmy potrebné pri príprave a analýze rekombinantných DNA	30
3 Príprava rekombinantnej DNA	35
3.1 Základné princípy klonovania	35
3.1.1 Využitie <i>E. coli</i> plazmidov ako klonovacích vektorov	35
3.1.2 Klonovanie DNA fragmentov v plazmidoch	38
3.1.3 Klonovanie restriktčných fragmentov do vektorov	39
3.1.4 Klonovanie PCR fragmentov do vektora	40
3.1.5 Vlastnosti <i>E. coli</i> kmeňov využívaných na klonovanie	40
3.2 Základné metódy izolácie plazmidovej DNA, chromozomálnej DNA a mRNA ..	41
3.2.1 Extrakcia a purifikácia plazmidovej DNA	41
3.2.2 Extrakcia a purifikácia chromozomálnej DNA.....	42
3.2.3 Metódy izolácie RNA.....	42
4 Gélová elektroforéza, hybridizačné a imunologické metódy	45
4.1 Gélová elektroforéza	45
4.1.1 Gélová elektroforéza nukleových kyselín.....	46
4.1.2 Gélová elektroforéza proteínov	49
4.2 Hybridizačné a imunologické metódy detekcie rekombinantnej DNA.....	53
4.2.1 Southern blot analýza	55
4.2.2 Northern blot analýza.....	59
4.2.3 Western blot analýza.....	60
4.2.4 ELISA	63
5 Polymerázová reťazová reakcia	65
5.1 Polymerázová reťazová reakcia	65
5.1.1 PCR princíp	65

5.1.2	Zložky a priebeh PCR reakcie	70
5.1.2.1	Základné reakcie.....	70
5.1.2.2	Teplotný profil pre PCR cykly.....	70
5.1.2.3	Termocykler	71
5.1.2.4	Templátová molekula DNA	71
5.1.2.5	Primery	72
5.1.2.5.1	Koncentrácia primerov	73
5.1.2.5.2	Výpočet koncentrácie primerov.....	73
5.1.2.5.3	Dizajnovanie primerov.....	73
5.1.2.5.4	Navázovanie primerov	74
5.1.2.5.5	Predlžovanie primerov	75
5.1.2.5.6	Degenerované PCR primery	75
5.1.2.5.7	Skladovanie primerov.....	75
5.1.2.6	Tlmivý roztok a jeho zložky	76
5.1.2.7	Koncentrácia horčička	76
5.1.2.8	dNTP	77
5.1.2.9	Enzýmy v PCR	77
5.1.2.10	Dĺžka a teplota denaturácie	80
5.1.2.11	Cykly a počet cyklov.....	80
5.1.2.12	Plateau efekt.....	81
5.1.2.13	Špecifické typy PCR.....	82
5.1.2.13.1	RT-PCR.....	82
5.1.2.13.2	Nested PCR.....	82
5.1.2.13.3	Solid phase PCR.....	82
5.1.2.13.4	Multiplexná PCR.....	83
5.1.2.13.5	Kvantitatívna PCR	83
5.1.3	Použitie PCR	83
6	Sekvenovanie DNA	85
6.1	Maxam-Gilbertova metóda	85
6.2	Sangerova a Coulsonova metóda	87
6.3	Automatizované fluorescenčné sekvenovanie.....	88
7	Funkčná genomika	91
7.1	Knižnice DNA	91
7.1.1	Príprava DNA knižníc	92
7.1.2	Vektory pri tvorbe knižníc DNA.....	95
7.1.3	Skríning knižníc DNA.....	98
7.1.4	Využitie knižníc DNA	100
7.2	Analýzy mikročipov.....	100
7.2.1	Využitie mikročipov	101
8	Cytologické metódy detekcie génov a ich produktov.....	105
8.1	Mikroskopická detekcia nukleových kyselín.....	105
8.1.1	Klasické fluorescenčné farbivá	106
8.2	Lokalizácia génov a ich produktov hybridizáciou <i>in situ</i>	107
8.2.1	Sondy používané pri ISH	108
8.2.2	Značenie sond.....	110
8.2.3	Techniky značenia sond	111
8.3	Iné mikroskopické metódy detekcie génov a ich produktov.....	112

8.3.1	<i>In situ</i> PCR	112
8.3.2	PCR <i>in situ</i> hybridizácia	113
8.3.3	<i>In situ</i> RT-PCR	114
8.4	Vizualizácia bielkovín	115
8.4.1	Imunocytochémia vo svetelnej mikroskopii	117
8.4.2	Imunocytochémia v elektrónovej mikroskopii	118
8.5	Vizualizácia reportérových génov	119
8.5.1	β -glukuronidáza	120
8.5.2	NAN reportérový gén	120
8.5.3	Luciferáza ..	121
8.5.4	GFP (Green Fluorescent Protein)	121
8.5.5	RFP (Red Fluorescent Protein)	122
9	Proteomika	123
9.1	Terminológia	123
9.2	Pôvod proteomiky	124
9.3	Informácie o genóme	125
9.4	Význam proteomiky	125
9.4.1	Charakteristika genómu	125
9.4.2	Štúdium proteínovej expzie	125
9.4.3	Funkcia proteínov	126
9.4.4	Modifikácia proteínov	126
9.4.5	Lokalizácia a kompartmentácia proteínov	126
9.4.6	Interakcie proteín – proteín	126
9.5	Typy proteomiky ...	127
9.5.1	Proteomika expzie proteínov	127
9.5.2	Štrukturálna proteomika	127
9.5.3	Funkčná proteomika	127
9.6	Techniky analýzy proteínov	127
9.6.1	Izolácia a separácia proteínov	128
9.6.2	Identifikácia a diferenciácia proteínov na základe analýzy štruktúry proteínov	130
10	Molekulárne markery identifikácie genotypov	135
10.1	Molekulárne markery a ich využitie	135
10.2	DNA ako molekulárny marker	136
10.3	Hybridizačné techniky vyhľadávania polymorfizmu DNA	139
10.3.1	RFLP technika	139
10.3.2	DNA fingerprinting	140
10.4	Amplifikačné techniky vyhľadávania polymorfizmu	141
10.4.1	RAPD technika	143
10.4.2	AFLP technika	144
10.4.3	STMS technika	146
10.4.4	SNP technika	146
10.4.5	IRAP technika	146
11	Techniky prípravy transgénnych zvierat	149
11.1	Transgénne zvieratá – história a nevyhnutnosť	150
11.2	Prenos génov	151
11.2.1	Prírodný prenos génov	151

11.2.2	Umelý prenos génov	152
11.2.2.1	Metódy tvorby transgénnych zvierat prenosom génov do gonád	153
11.2.2.2	Metódy tvorby transgénnych zvierat prenosom génov do pohlavných buniek.....	153
11.2.2.3	Metódy tvorby transgénnych zvierat prenosom génov do oplodnených vajíčok alebo embryí.....	154
11.2.2.3.1	Mikroinjekcia DNA do prvojadra.....	154
11.2.2.3.2	Mikroinjekcia DNA do obidvoch prvojadier	154
11.2.2.4	Cytoplazmatická injekcia.....	155
11.2.2.5	Prenos génov sprostredkovaný embryonálnymi kmeňovými bunkami	155
11.2.2.6	Retrovírusmi (adenovírusmi) sprostredkovaný prenos génov ...	156
11.2.2.7	Prenos jadra	156
11.2.2.8	Metódy tvorby transgénnych zvierat prenosom génov do somatických buniek	156
11.2.2.9	RNA interferencia – RNAi	157
11.3	Faktory ovplyvňujúce úspešnosť tvorby transgénnych jedincov	157
11.4	Využitie transgénnych zvierat	159
11.5	Rôzne živočíšne systémy pre produkciu rekombinantných proteínov	160
11.6	Nevýhody transgenézy v porovnaní s klonovaním	161
11.7	Transgenéza v bunkových kultúrach	161
11.8	Manipulácia s bunkovými kultúrami	162
12	Databázy	165
12.1	Vlastnosti biologických databáz.....	165
12.2	Rozdelenie biologických databáz	168
12.2.1	Primárne databázy	168
12.2.2	Sekundárne databázy	170
12.2.3	Iné databázy	171
12.3	Nástroje na využívanie biologických databáz.....	172
13	Práca s rekombinantnou DNA v zmysle platnej legislatívy	175
14	Terminologický slovník	183
15	Použitá literatúra	193

Zoznam skratiek

AFLP	– technika detekcie dĺžkového polymorfizmu amplifikovaných fragmentov (A mplification F ragment L enght P olymorphism)
BACs	– bakteriálne umelé chromozómy (B acterial A rtificial C hromosomes)
ES cells	– embryonálne kmeňové bunky (E mbryonic S tem C ells)
EG cells	– embryonálne zárodočné bunky (E mbryonic G erm C ells)
EGFP	– zosilnený zelený fluorescenčný proteín (E nhanced G reen F luorescent P rotein)
FISH	– fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia (F luorescent I n S itu H ybridization)
GFP	– zelený fluorescenčný proteín (G reen F luorescent P rotein)
GM	– genetická modifikácia/manipulácia (G enetic M odification / M anipulation)
GMO	– geneticky modifikovaný organizmus (G enetically M odified O rganism)
HGT	– horizontálny prenos génov (H orizontal G ene T ransfer)
HGT	– horizontálny prenos génov (H orizontal G ene T ransfer)
LacZ	– gén <i>Escherichia coli</i> pre β -galaktozidázu (<i>Escherichia coli</i> gene for β -galactosidase)
LCRs	– kontrolné oblasti lokusov (C ontrol L oci R egions)
LGT	– laterálny prenos génov (L ateral G ene T ransfer)
OMGT	– prenos génov do vaječníkov
PACs	– umelé chromozómy odvodené od baktériofága P1 (A rtificial C hromosomes derived from bacteriophage P 1)
PCR	– polymerázová reťazová reakcia (P olymerase C hain R eaction)
PGC	– primordiálne zárodočné bunky (P rimordial G erm C ells)
RT-PCR	– reverzne transkripčná-PCR (R everse T ranscriptase- P CR)
YACs	– kvasinkové umelé chromozómy (Y east A rtificial C hromosomes)
PAGE	– elektroforéza na polyakrylamidovom géle (P olyacrylamide G el E lectrophoresis)
RAPD	– technika náhodne amplifikovanej polymorfickej DNA (R andom A mplified P olymorphic D NA)
RFLP	– technika detekcie dĺžkového polymorfizmu restričných fragmentov (R estriction F ragment L ength P olymorphism)
SMGT	– spermiov sprostredkovaný prenos génov (S perm- M ediated G ene T ransfer)

SMGT+ REMI	– reštrikčným enzýmom sprostredkovaná integrácia (R estriction E nzyme M ediated I ntegration)
SNP	– technika jednonukleotidového polymorfizmu (S ingle N ucleotide P olymorphism)
STMS	– technika detekcie sekvencií označených mikrosatelitných miest (S equence T agged M icrosatellite S ites)
TMGT	– prenos génov do semenníkov
VGT	– vertikálny prenos génov (V ertical G ene T ransfer)

Predslov

Predkladaná vysokoškolská učebnica je určená pre študentov a doktorandov FBP, FAPZ, FZKI SPU v Nitre a študentov iných fakúlt, ktorí majú vo svojich študijných programoch predmet molekulárna biológia, molekulárna genetika, genetické inžinierstvo, biotechnológie, biochemické technológie a ďalšie. Po obsahovej stránke je venovaná základným technikám aplikovaným pri príprave, analýze a selekcii geneticky modifikovaných mikroorganizmov, rastlín a živočíchov.

autori

Metódy a techniky génových manipulácií

Zdenka Gálová, Želmíra Balážová, Peter Chrenek, Milan Chňapek, Jana Libantová,
Ildiko Matušíková, Jana Moravčíková, Ján Salaj, Janka Drábková

Vydala: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Náklad: 150 ks

Vydanie: druhé doplnené

Tlač: Vydavateľstvo SPU v Nitre

AH-VH: 13,25-13,57

ISBN 978-80-552-1805-2