



DE WONDERE WERELD VAN SYNTHETISCHE BIOLOGIE

LES 1

INHOUD



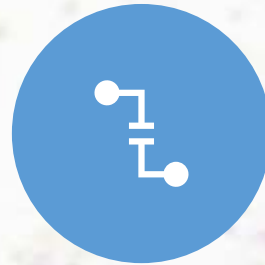
Centrale dogma



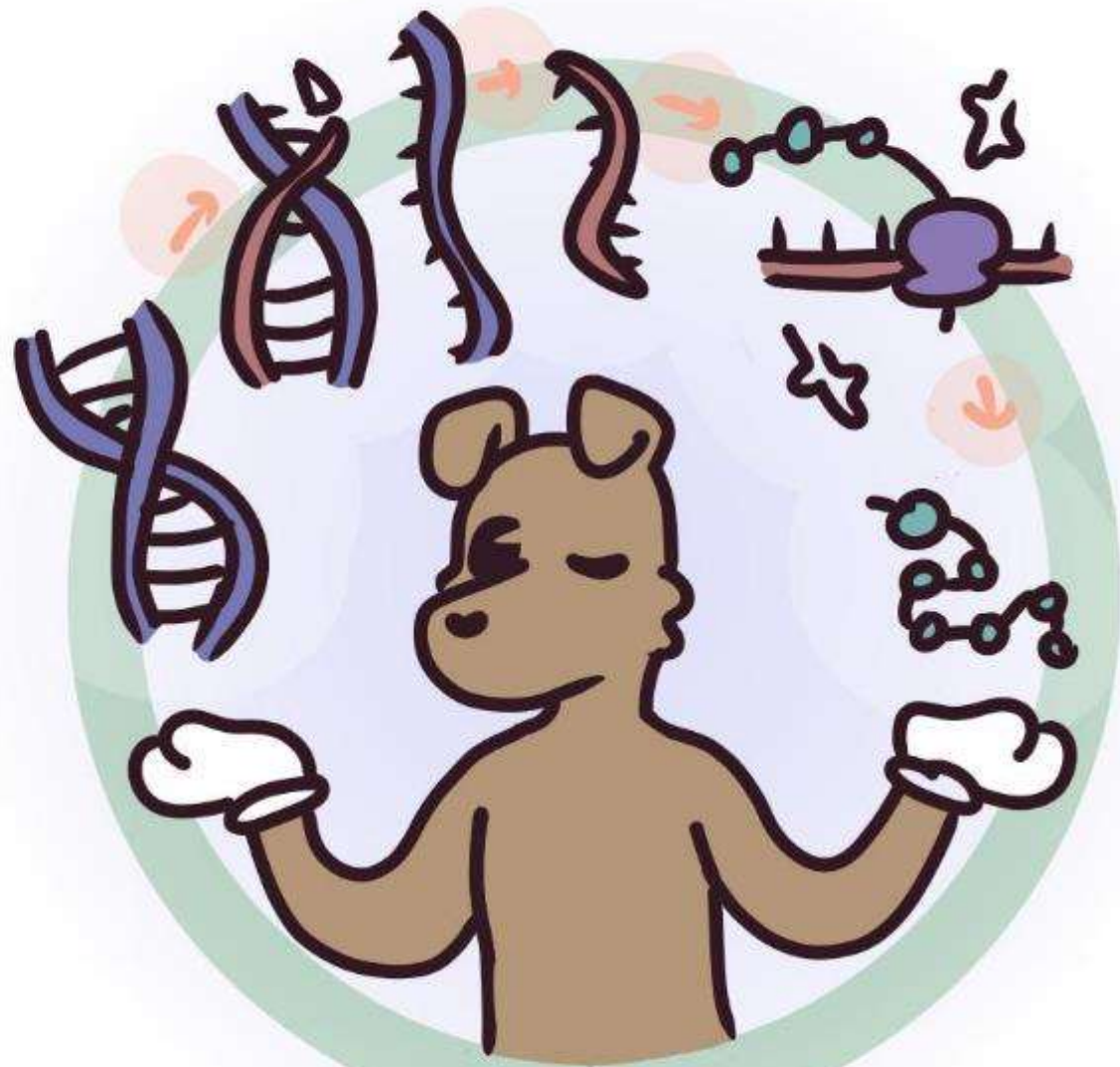
Restrictie



PCR

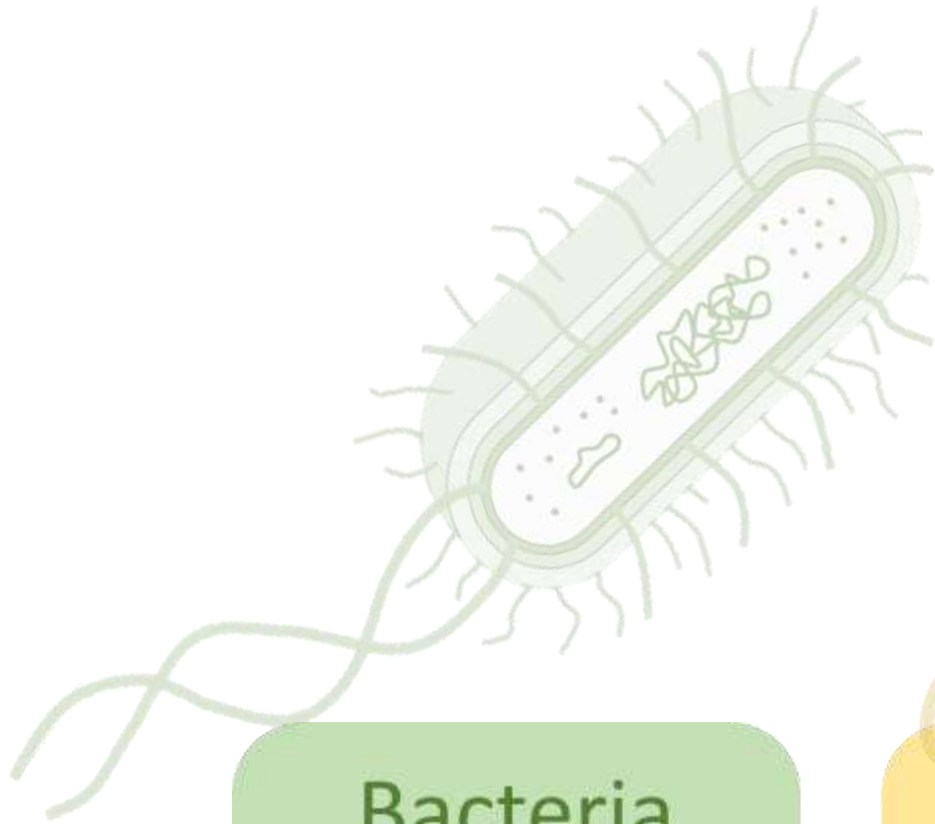


Elektroforese



THE CENTRAL DOGMA





Bacteria

E. coli



Archaea

*Methanococcus
jannaschii*



Eukaryota

*Saccharomyces
(yeast)*



Prokaryoten

Eukaryoten



Cellen kunnen worden onderverdeeld in drie domeinen: de bacteriën, de archaea en de eukaryoten. Allen berusten ze op een fundamentele bouwsteen: het DNA.

In eukaryoten is dit omkapseld in een celkern, terwijl DNA bij bacteriën en archaea vrij voorkomt in het cytoplasma.

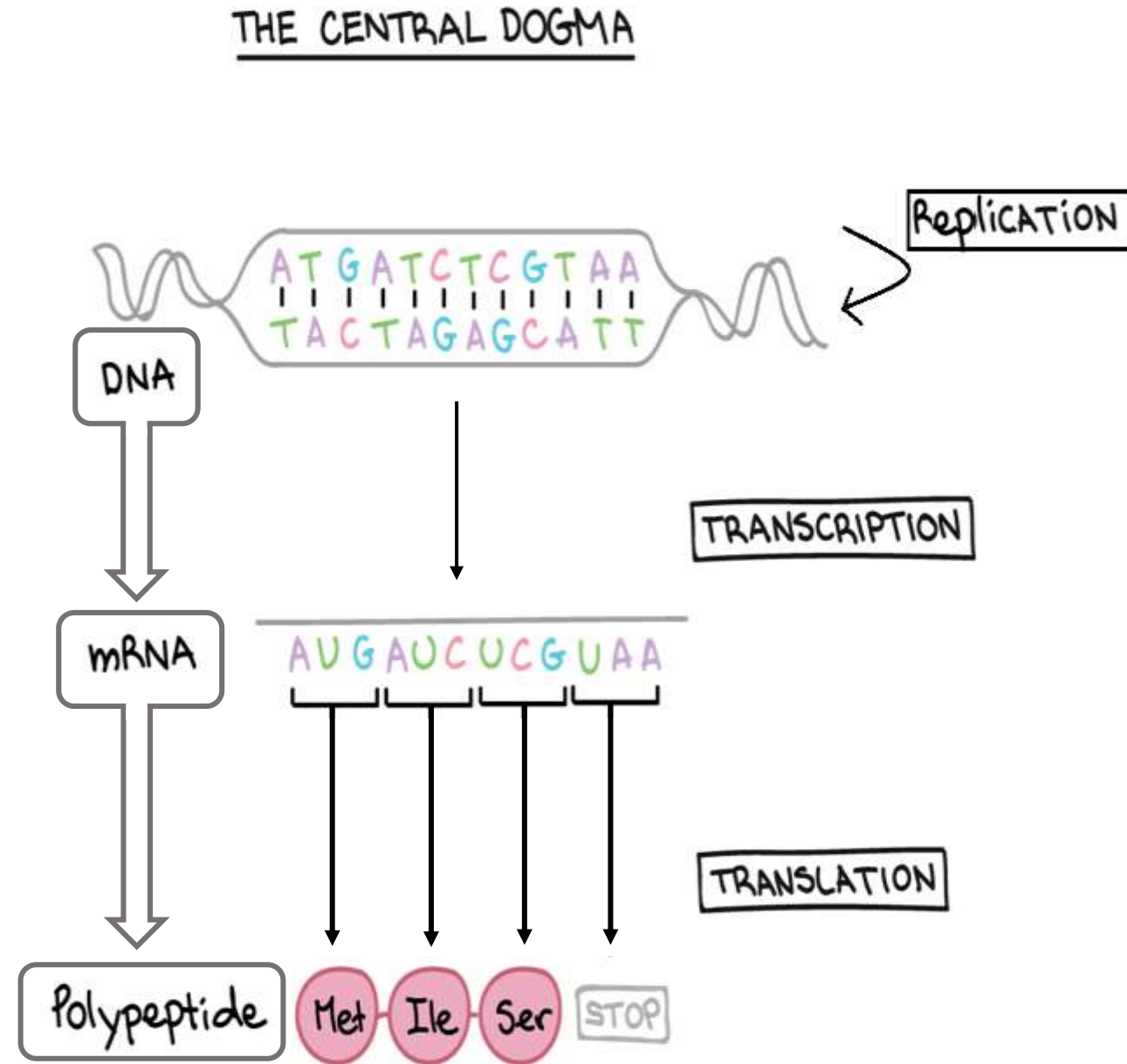
Ook al kennen deze verschillende cellen andere verschijningsvormen van DNA, toch berust de werking van deze cellen op hetzelfde principe: **het centrale dogma**.

Het centrale dogma is een alomtegenwoordig natuurprincipe dat werd beschreven door Francis Crick, een van de ontdekkers van de DNA-helix.

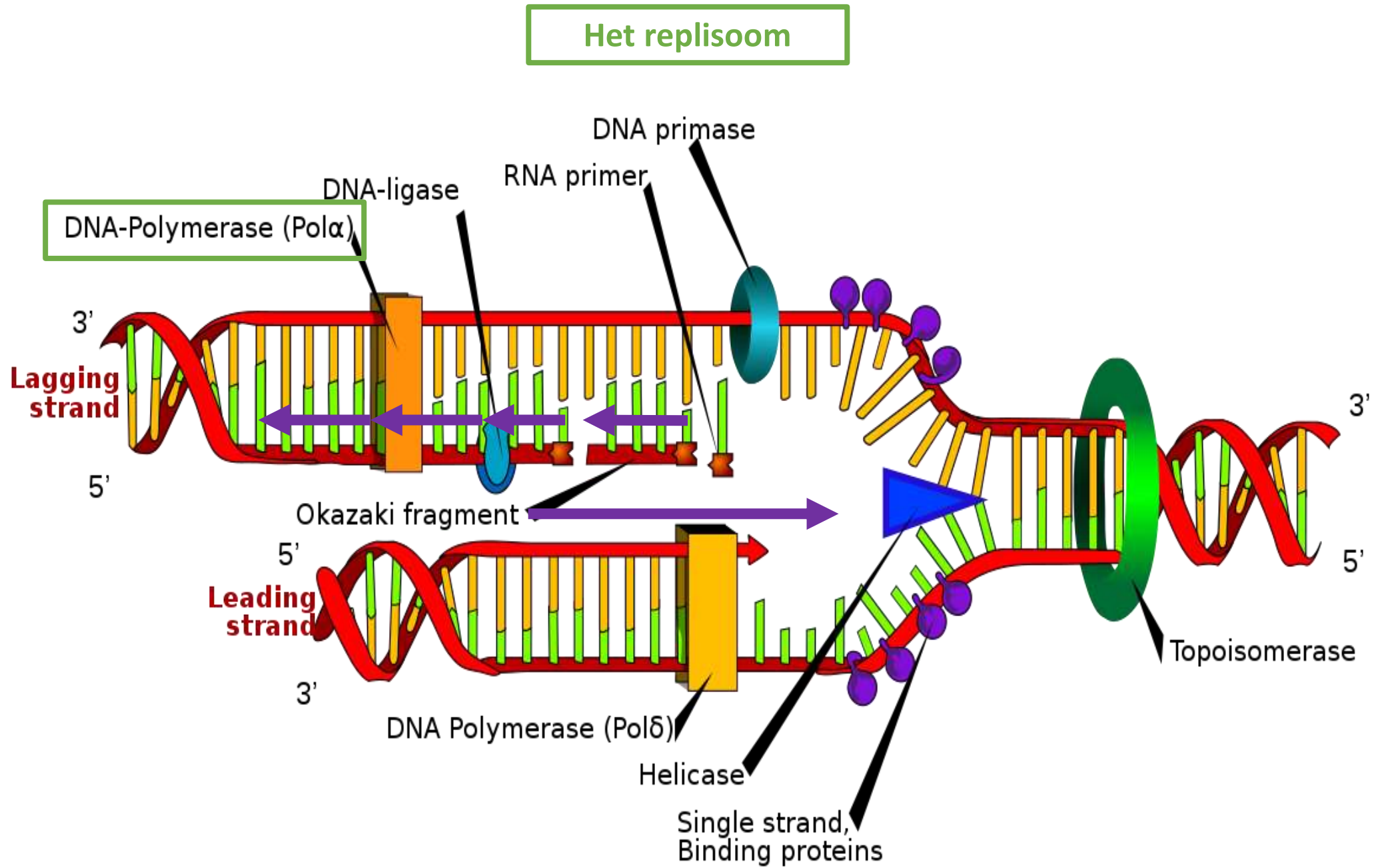
Het centrale dogma stelt dat informatie opgeslagen zit in genetisch materiaal (DNA en RNA) en dat het wordt vrijgegeven onder de vorm van proteïnes.

In de cel gebeuren complexe processen die DNA repliceren tijdens de celdeling en het vertalen naar RNA, wat op zijn beurt vertaald wordt in een proteïne. Dit RNA wordt messenger-RNA genoemd (mRNA).

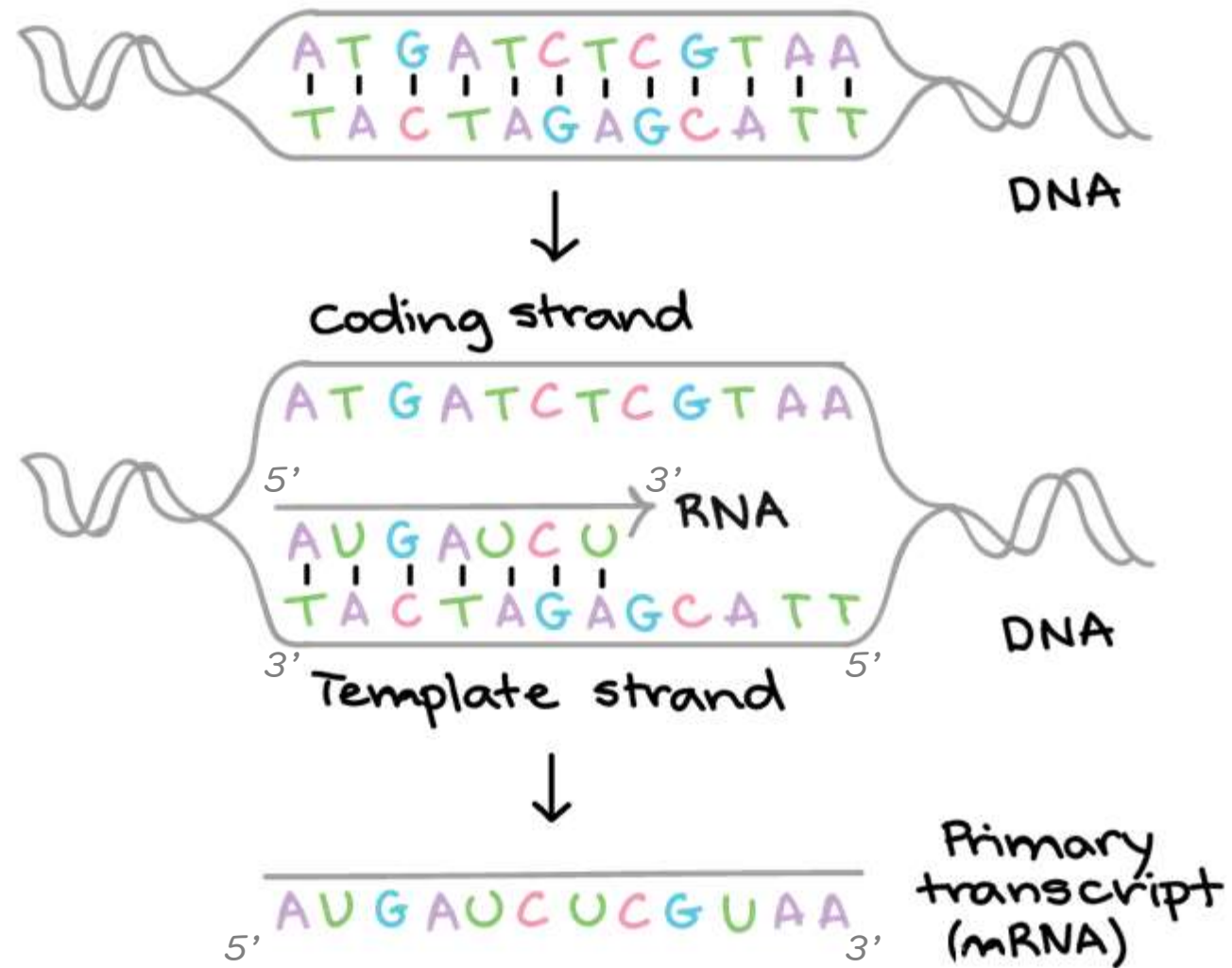
Het centrale dogma werkt maar in één richting, waardoor informatie van proteïnes niet terug kan worden omgezet naar genetisch materiaal.



GENREPLICATIE



GENTRANSCRIPTIE

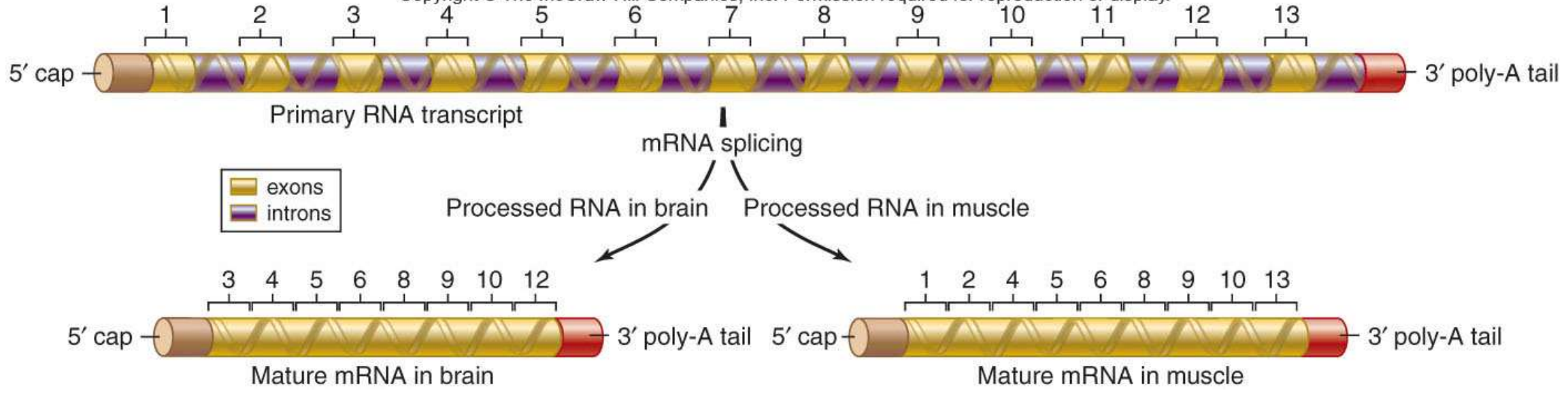


Er zijn ongeveer 87000 verschillende proteïnen in een mens gevonden, terwijl er maar 25000 genen zijn ontdekt. Hoe kan dit?

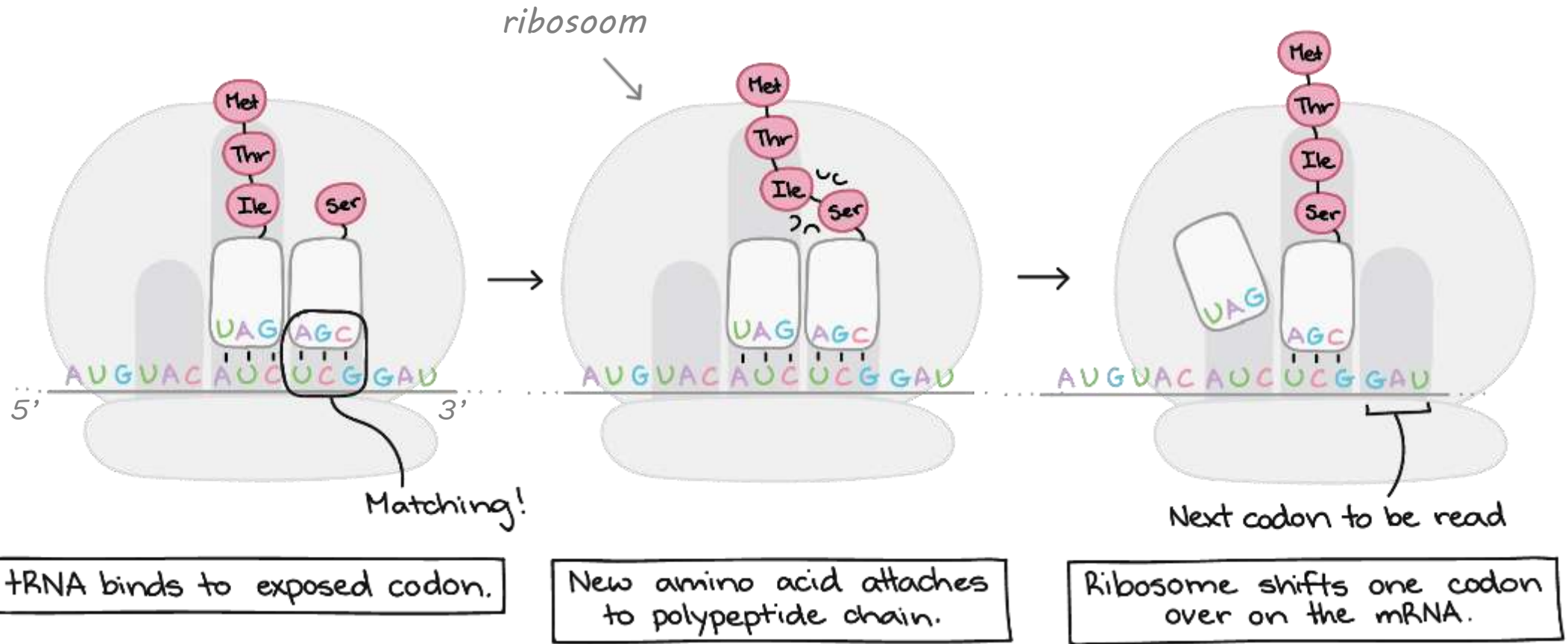
Alternative splicing

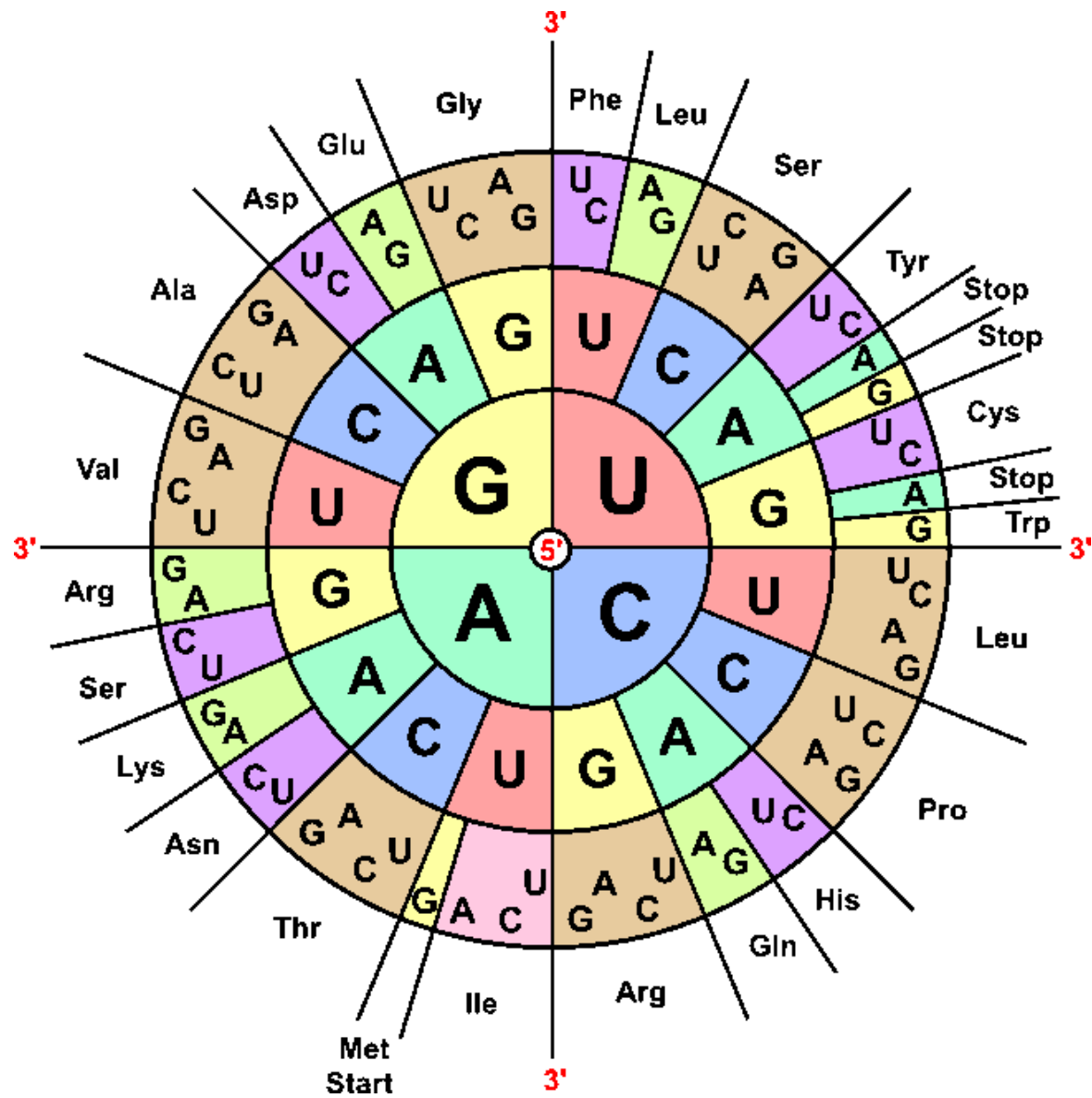
Het initieel afgeschreven RNA bevat niet-coderende stukken (**intronen**) en wel-coderende stukken (**exonen**). Maar niet alle exonen worden altijd gebruikt. Naargelang de noodzaak worden er verschillende exonen gebruikt om een proteïne te produceren. Hierdoor kunnen verschillende proteïnes gemaakt worden uit eenzelfde DNA-streng.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



GENTRANSLATIE



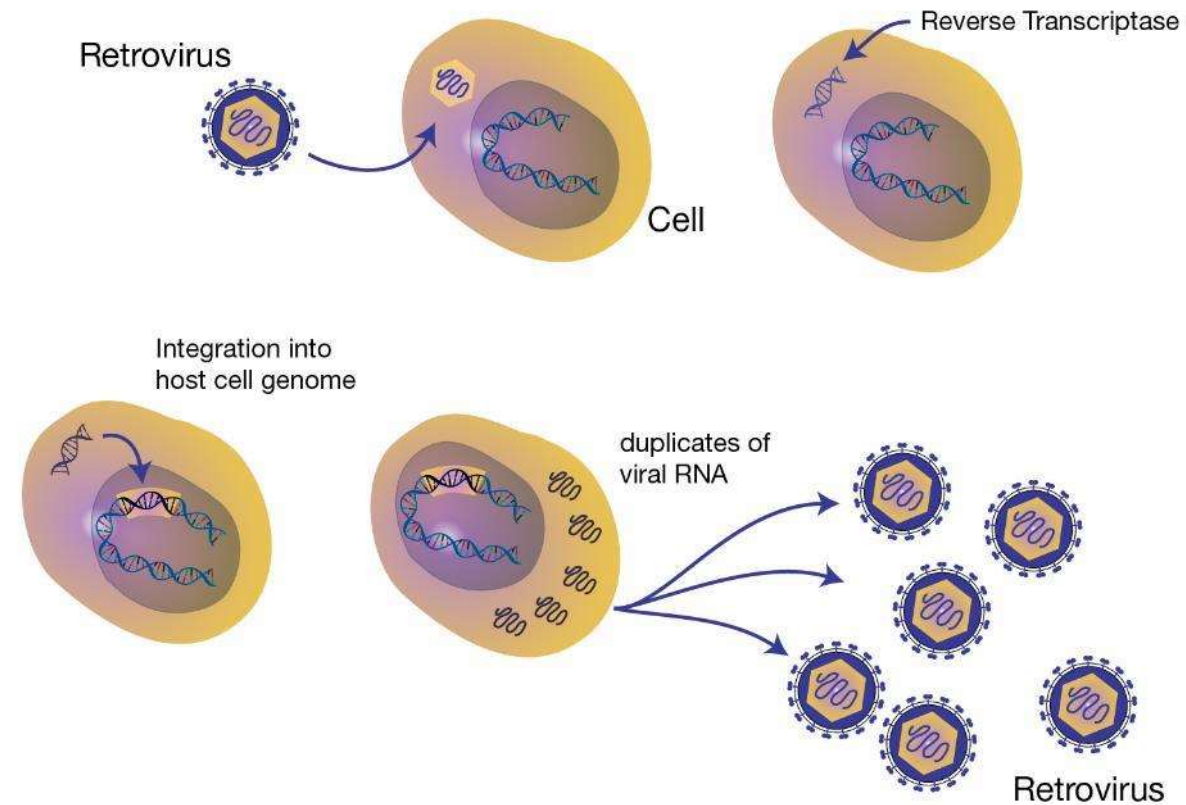


CENTRALE DOGMA IN RETROVIRUSSEN

Retrovirussen (zoals HIV) bezitten in hun proteïnemantel twee ssRNA strengen

Na het infecteren van een cel wordt dit enkelstrengig RNA omgezet naar dubbelstrengig DNA (m.b.v. reverse transcriptase), wat vervolgens in het genoom van de cel geïncorporeerd wordt.

Deze virussen zetten hun RNA dus eerst om naar DNA, i.p.v. het RNA te gebruiken voor translatie.





WAT IS PCR?

Polymerase Chain Reaction (PCR) is een techniek om veel kopieën van een specifiek DNA-gebied *in vitro* (in een reageerbuis in plaats van een organisme) te maken.

PCR is gebaseerd op een thermostabiel DNA polymerase, *Taq polymerase*, en vereist DNA primers speciaal ontworpen voor de DNA-regio van belang.

In PCR wordt de reactie herhaaldelijk uitgevoerd door een reeks temperatuurveranderingen, waardoor veel kopieën van het doelgebied kunnen worden geproduceerd.

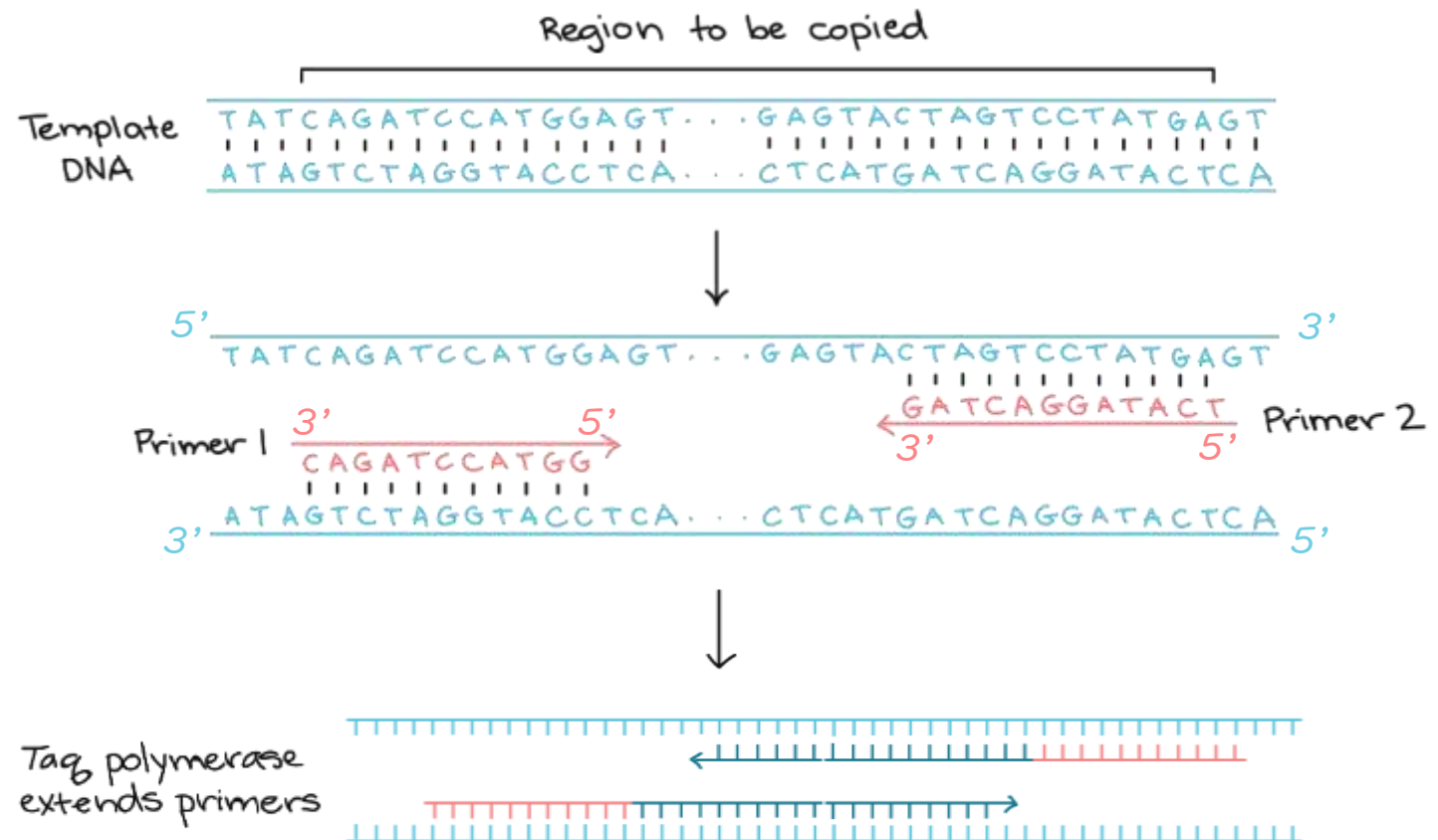
PCR wordt veel gebruikt in onderzoek en praktische toepassingen. Het wordt routinematig gebruikt in DNA klonen, medische diagnostiek, en forensische analyse van DNA.

Het doel van PCR is om een gewenst DNA-deel (bv. het insuline gen) te kloneren. Hiervoor zijn twee belangrijke hulpmiddelen nodig.

DNA-polymerase is nodig om nieuwe DNA-strengen aan te maken. Dit enzym zal gedenateerd enkelstrengig DNA vervullen tot dubbelstrengig DNA o.b.v. het complementariteitsprincipe.

Ten tweede moet een specifiek DNA-deel geïsoleerd kunnen worden tijdens het proces. Dit wordt bewerkstelligd door **primers** toe te voegen. Deze primers zijn ook noodzakelijk om DNA-polymerase functioneel te maken.

Dit zijn twee kleine stukken DNA die aan het begin en einde van het gewenste DNA-deel binden, en worden daarom de 3'- en 5'-primer genoemd.

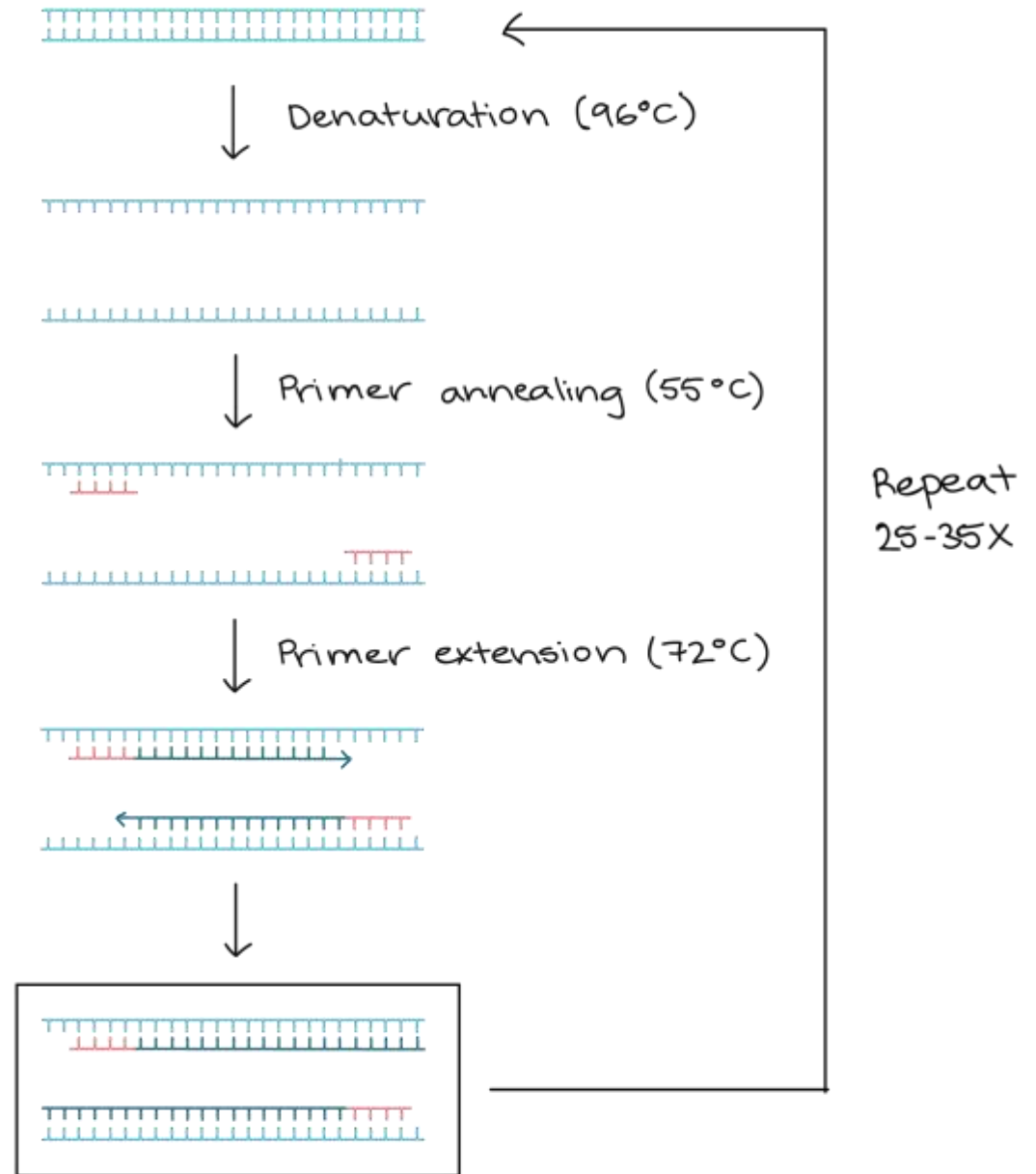


STAPPEN VAN PCR-PROCES

Denaturatie: Verwarm de reactie sterk om de DNA-strengen te scheiden of te denatureren. Dit biedt een sjabloon met één streng voor de volgende stap.

Annealing: Koel af zodat de primers kunnen binden aan hun complementaire sequenties op het enkelstrengig DNA.

Polymerisatie: Verhoog de reactietemperatuur zodat *Taq polymerase* de primers verlengt en nieuwe DNA-strengen synthetiseert.

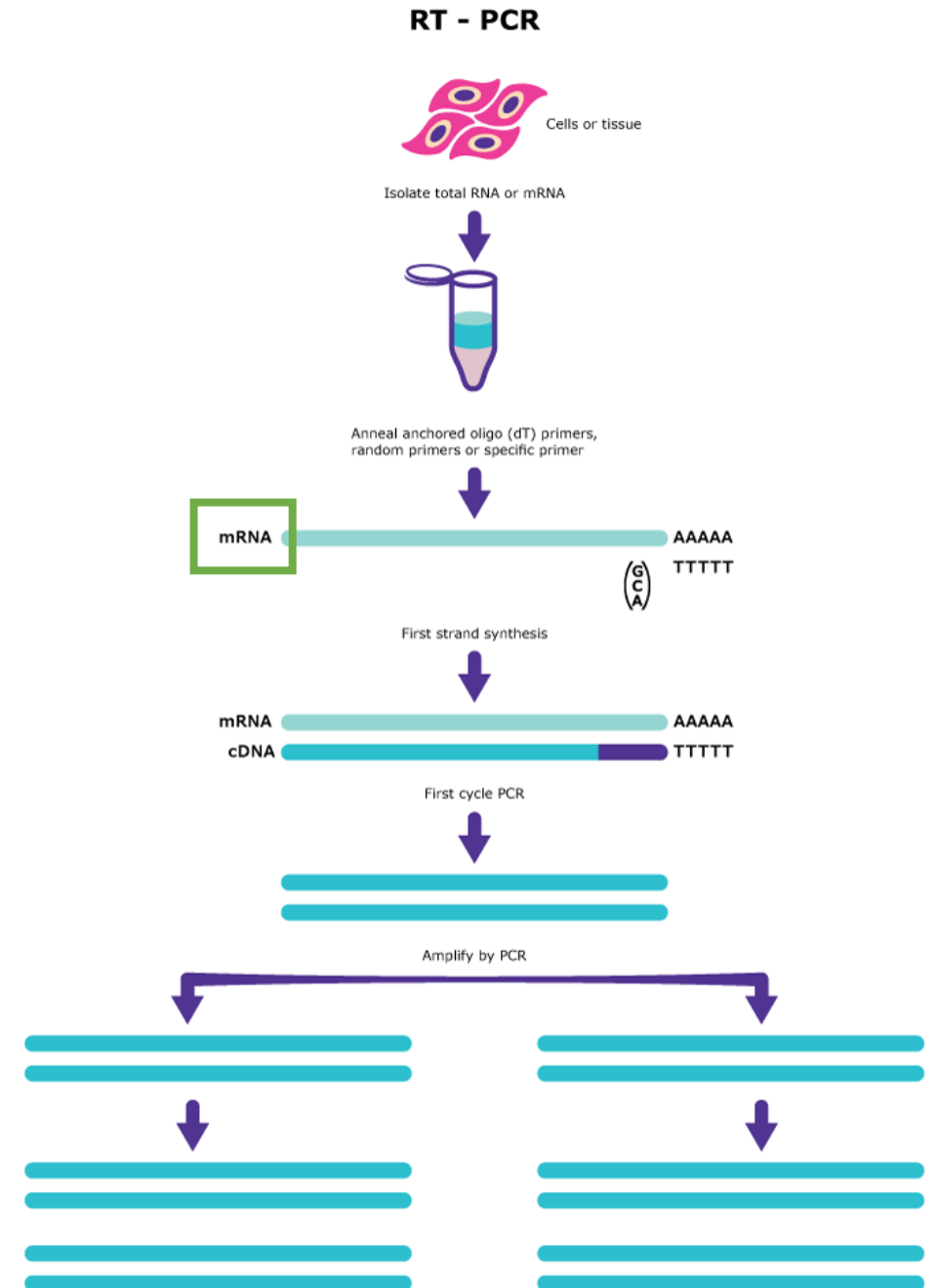


RT - PCR

Indien we geen DNA stuk, maar een RNA stuk gekregen hadden, moet een andere aanpak gevolgd worden, aangezien DNA-polymerase hier niet zou werken.

In dit geval moet een extra enzym worden toegevoegd, nl. **reverse transcriptase (RT)**, dat op het enkelstrengig RNA een complementaire DNA-streng (cDNA) voegt (= RNA-DNA-hybride).

Daarna worden terug de standaardstappen van een PCR uitgevoerd om dubbelstrengige DNA-kopieën te creëren.



REAL TIME - PCR

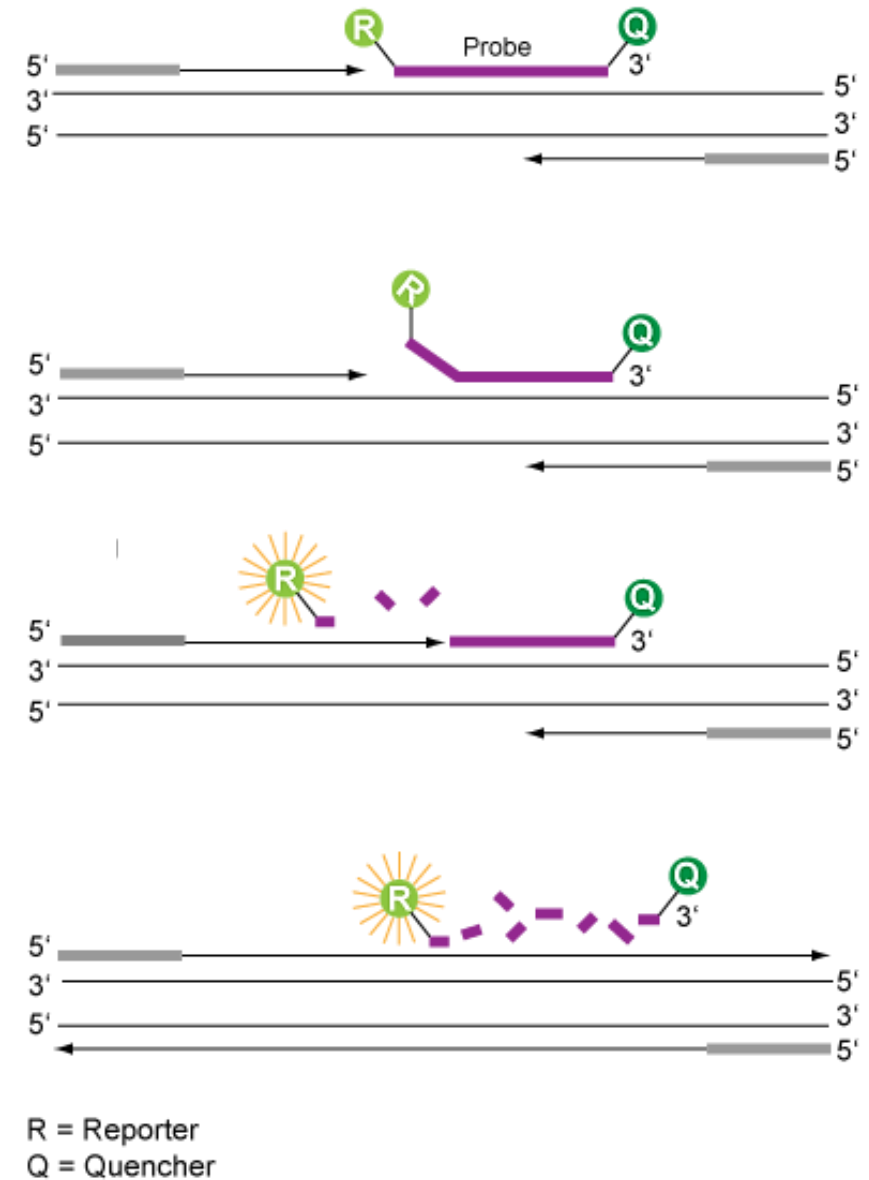
PCR wordt niet enkel gebruikt om DNA-fragmenten te kloneren, maar ook om hun aanwezigheid aan te tonen.

Als het fragment niet aanwezig is, zal na toevoeging van de correcte gen-specifieke primers het DNA-fragment uiteraard niet worden geamplificeerd.

De aanwezigheid van het DNA-fragment kan op verschillende manieren worden aangetoond. Men kan bv. een DNA-kleuring toevoegen, zoals SYBR-green. Dit molecule zendt een detecteerbaar groene kleur uit wanneer het aan dubbelstrengig DNA bindt.

Een andere methode berust op de toevoeging van een reporter-probe die op de gensequentie bindt (zie figuur). Tijdens de polymerisatie wordt de probe afgebroken door DNA-polymerase waardoor een fluorofoor wordt vrijgezet.

Beide methoden zorgen er voor dat in elke kloneringscyclus meer detecteerbare signalen geproduceerd worden waarmee de DNA-hoeveelheid gekwantificeerd kan worden.





Restrictie in bacteriële klonering

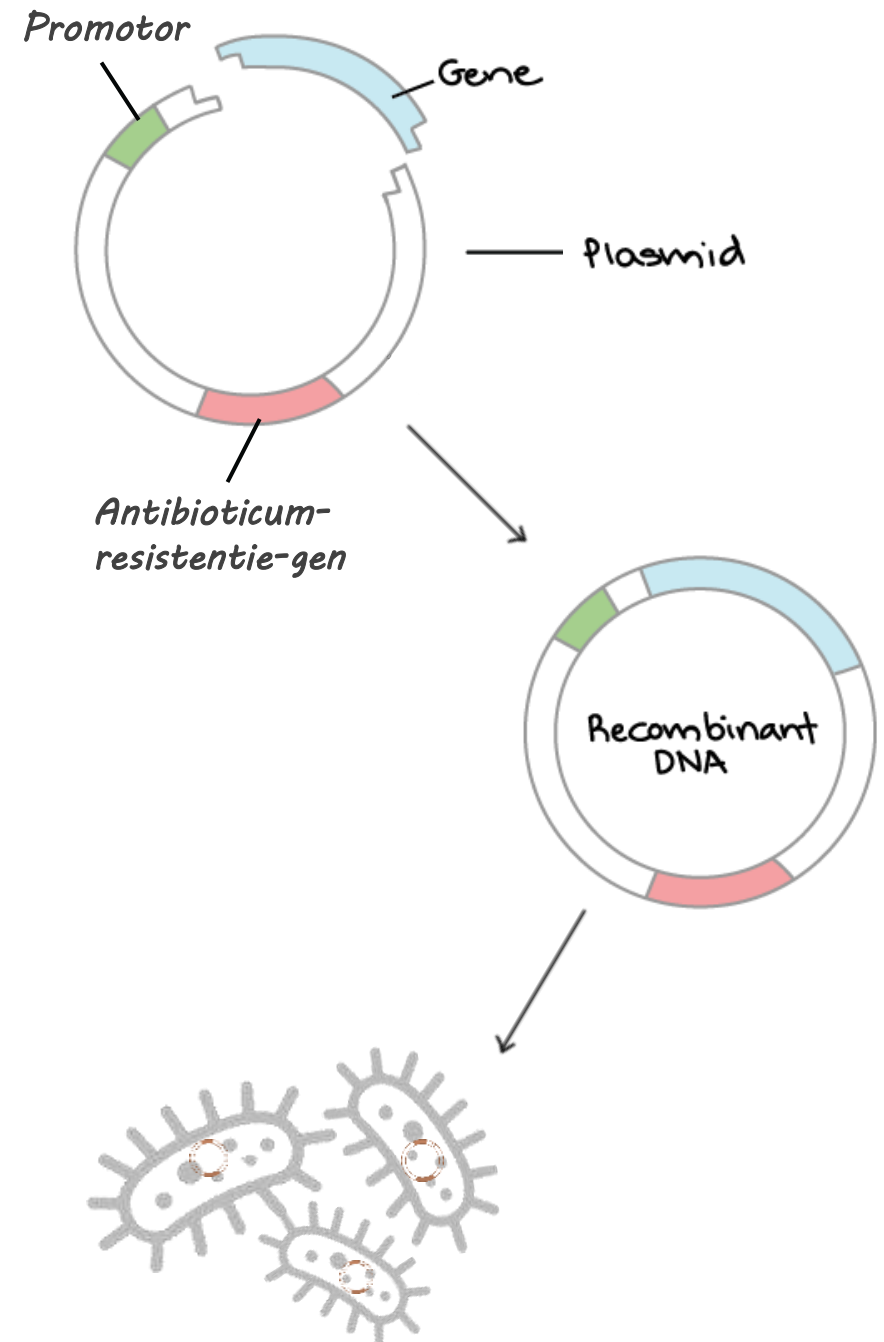
WAT IS DNA KLONEN?

DNA klonen is een techniek uit de moleculaire biotechniek die veel identieke kopieën van een stukje DNA maakt, zoals een gen.

In een bacterieel kloningsexperiment wordt een doelgen ingebracht in een cirkelvormig stuk DNA, een plasmide. Dit plasmide bevat een antibioticumresistentie-gen om latere selectie van de correcte bacteriën mogelijk te maken.

De plasmide wordt geïntroduceerd in bacteriën via een proces genaamd transformatie. Bacteriën die de plasmide opnemen, overleven in de aanwezigheid van een antibioticum o.w.v. het antibioticumresistentie-gen.

Bacteriën met de juiste plasmide worden gebruikt om meer plasmides aan te maken of, in sommige gevallen, geïnduceerd om het gen af te schrijven en gewenste eiwitten te maken.



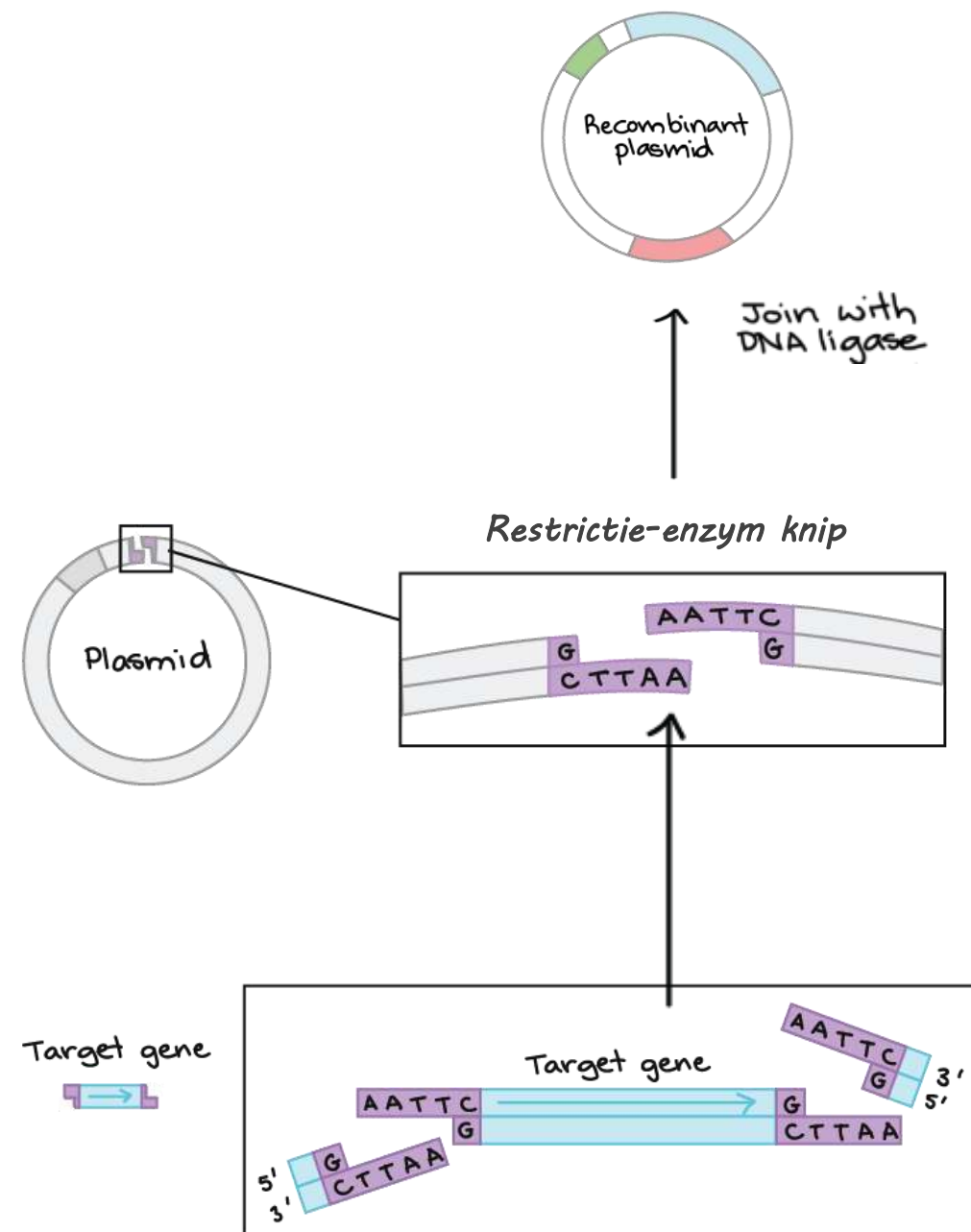
GEN IN PLASMIDE LIGEREN

De plasmide wordt opengeknipt met een **restrictie-enzym**. Dit creëert een opening waarin het gewenste gen kan worden geplakt.

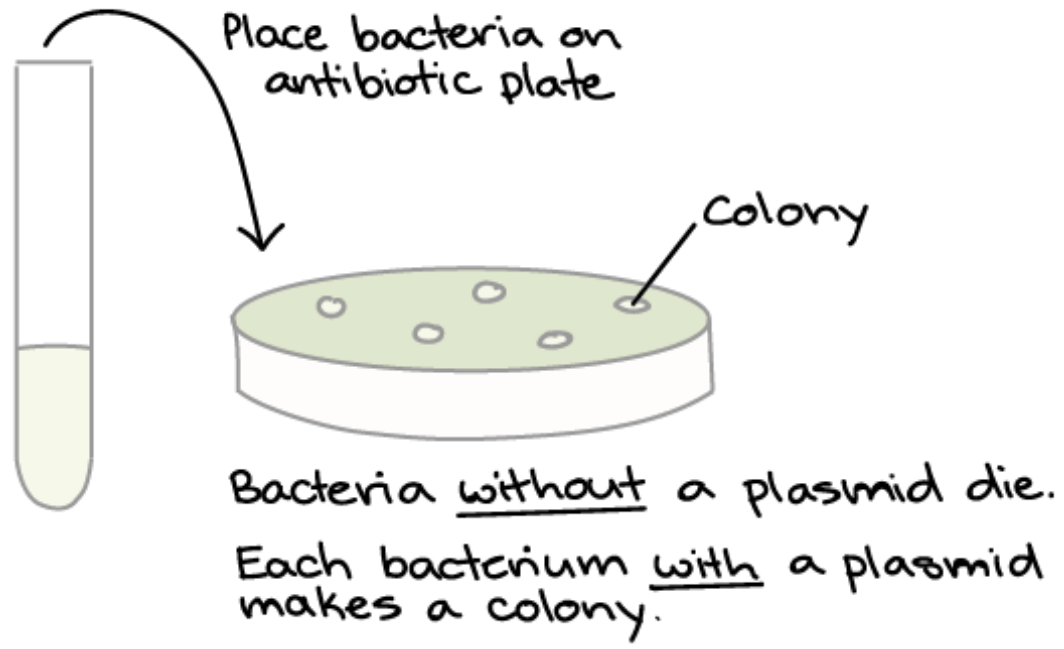
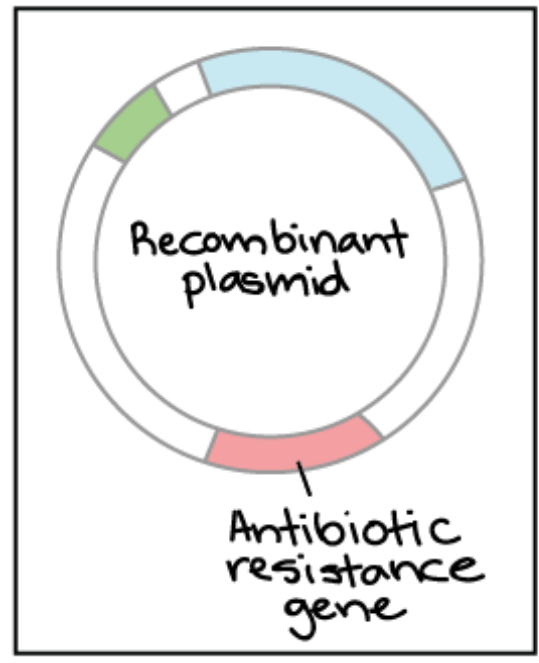
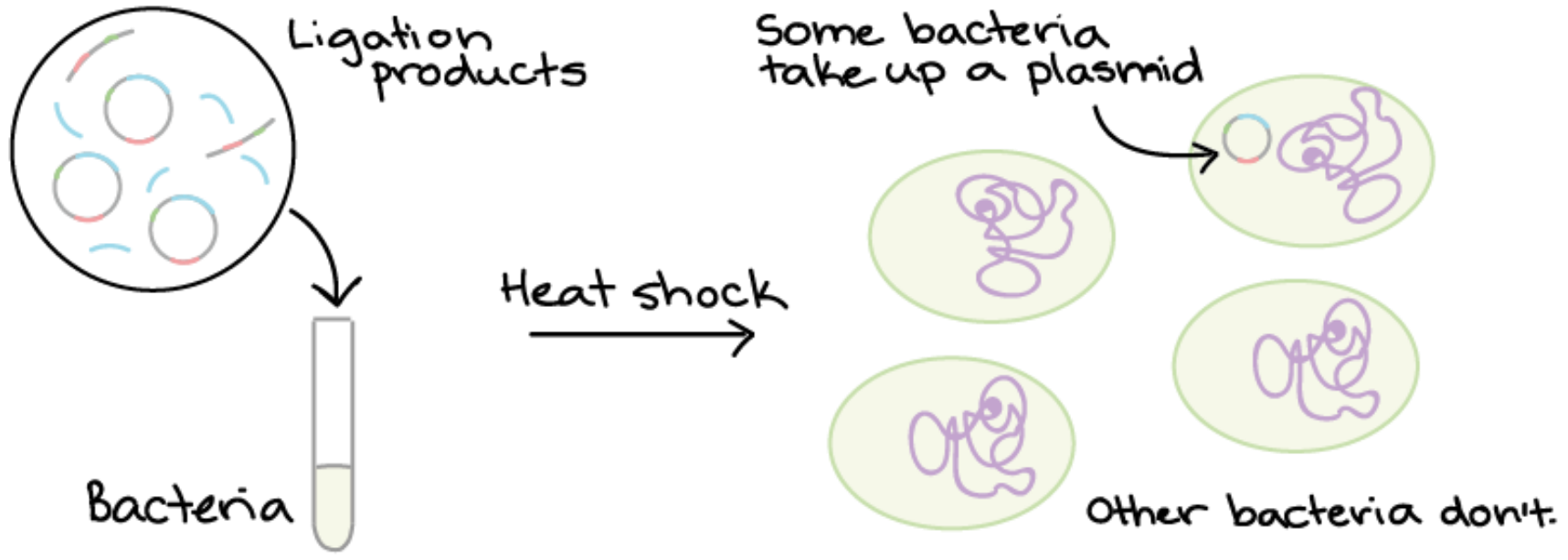
Aan de uiteindes van het gewenste gen worden dezelfde restrictie-sequenties toegevoegd m.b.v. PCR. Deze worden daarna ook geknipt.

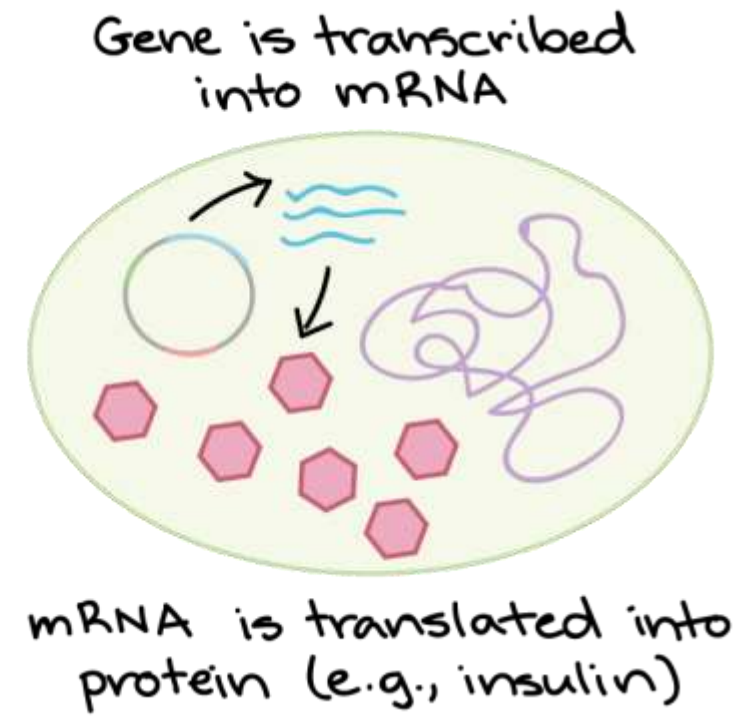
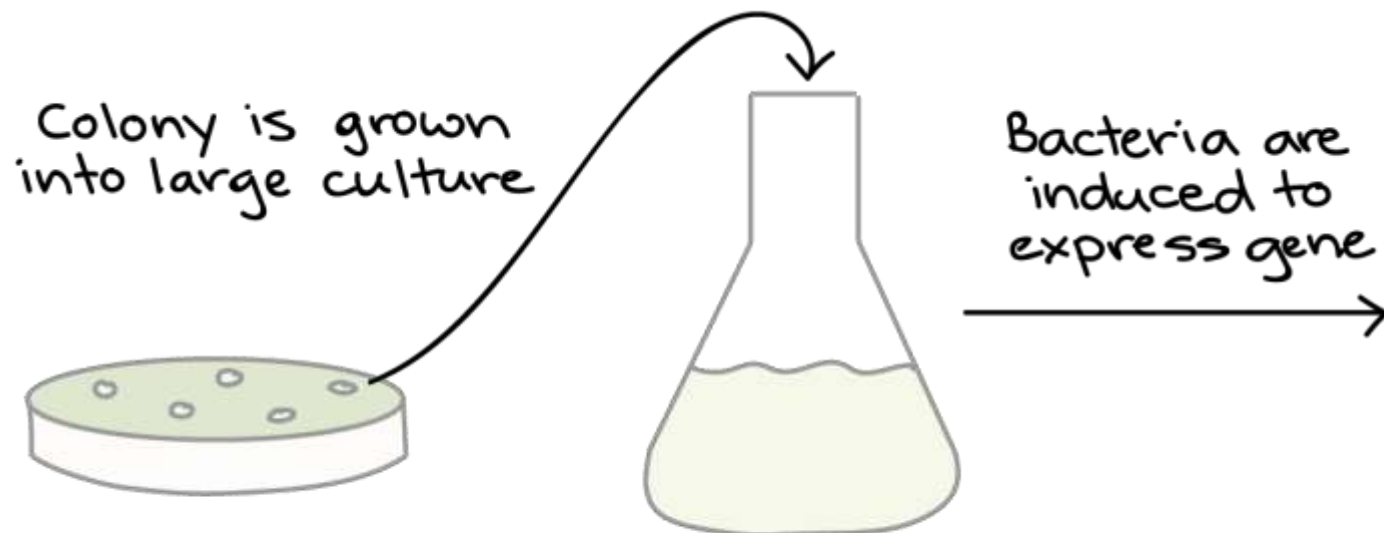
Sommige restrictie-enzymen knippen dwars door het DNA en vormen zo een "blunt" knip. Andere enzymen knippen asymmetrisch (figuur) ter vorming van "sticky ends".

Sticky ends zijn beter omdat deze DNA-fragmenten dan als puzzelstukken in elkaar passen. Daarna zal **DNA-ligase** deze covalent aan elkaar plakken.

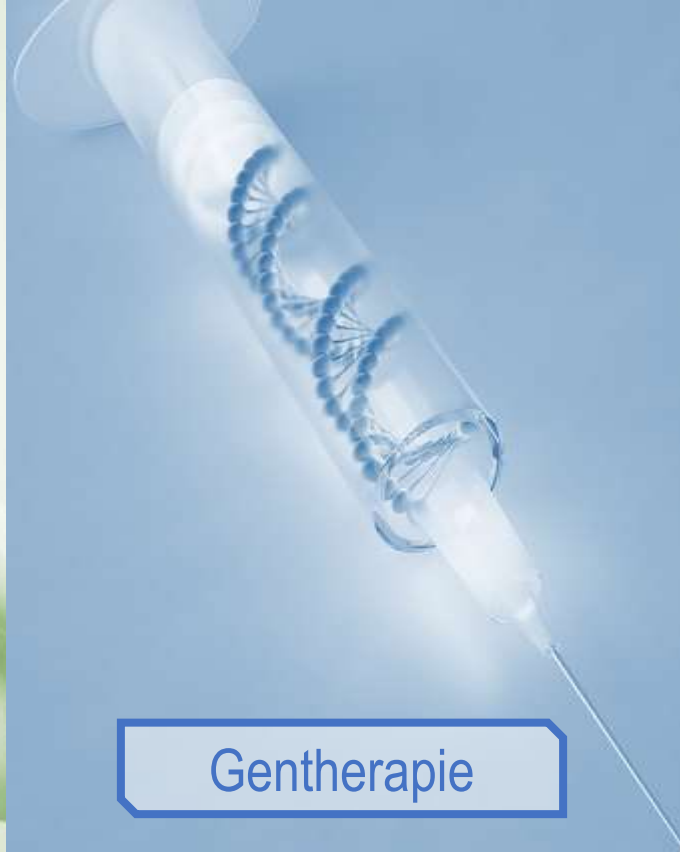


BACTERIËLE TRANSFORMATIE





TOEPASSINGEN VAN DNA-KLONEN



WAT IS GEL ELECTROFORESE?

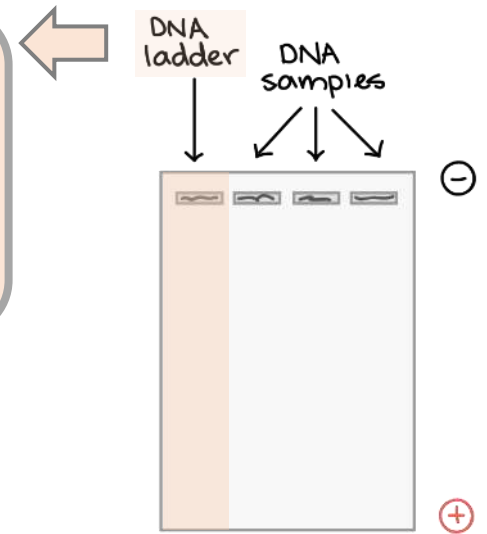
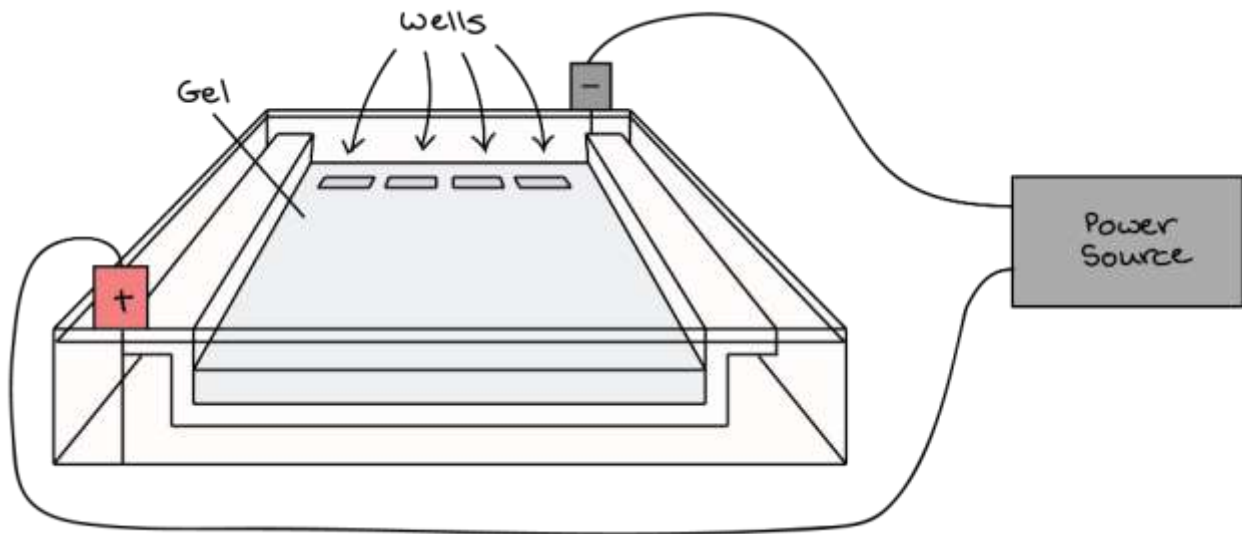
Gelelektroforese is een techniek die wordt gebruikt om **DNA**-fragmenten te scheiden op basis van hun grootte.

DNA-monsters worden geladen in inkepingen aan de bovenkant van een agarose-gel, en een elektrische spanning wordt aangelegd om ze door de gel te laten migreren.

DNA is negatief geladen waardoor het naar de positieve elektrode (anode) beweegt. Agarose-gel bestaat uit netwerken van polymeren die in elkaar verstrikt zitten. Kleine DNA-monsters bewegen daar sneller doorheen dan grotere.

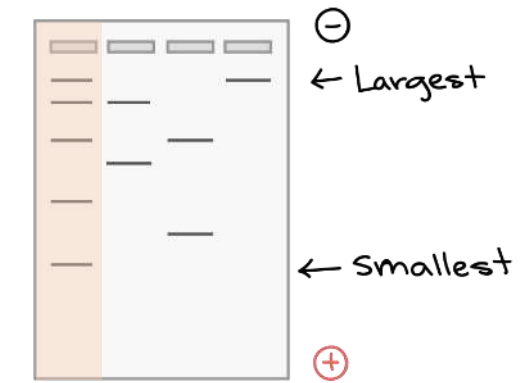
Wanneer een DNA-bindende kleurstof werd toegevoegd, zijn de gescheiden DNA-fragmenten zichtbaar als individuele bandjes in de gel, die bijgevolg elk een groep vertegenwoordigen van DNA-fragmenten van dezelfde grootte.

De 'ladder' bevat een referentiestaal met een gekende samenstelling. Deze functioneert als een ijkling van de grootte van de DNA-fragmenten. Door de stalen hiermee te vergelijken, kunnen de genen in de stalen geïdentificeerd worden.



DNA samples are loaded into wells

Power is turned on and DNA fragments migrate through gel



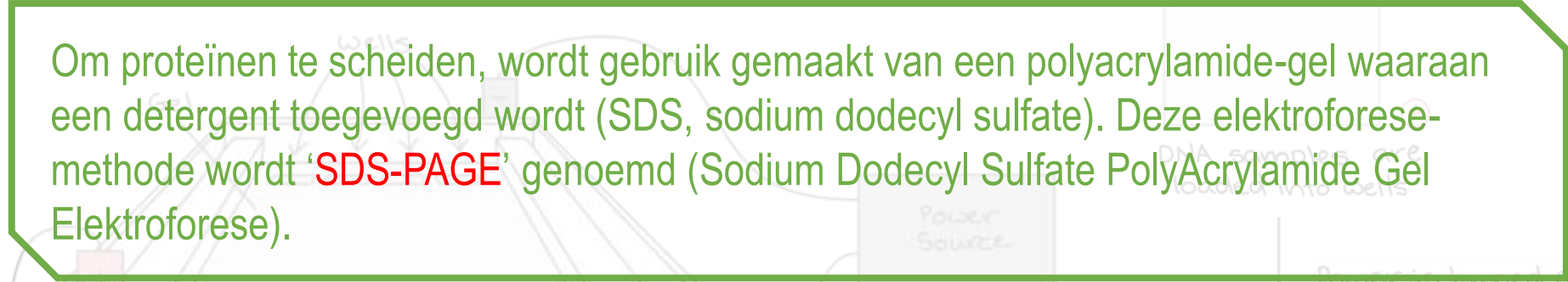
The fragments are now separated by size.

Deze techniek maakt het ook mogelijk om **proteïnen** te scheiden op basis van hun moleculaire massa volgens hetzelfde principe.

Om proteïnen te scheiden, wordt gebruik gemaakt van een polyacrylamide-gel waaraan een detergent toegevoegd wordt (SDS, sodium dodecyl sulfate). Deze elektroforese-methode wordt '**SDS-PAGE**' genoemd (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Elektroforese).

De aanwezigheid van het SDS-detergent zorgt er voor dat alle proteïnen een negatieve lading krijgen en de verschillende subeenheden van elkaar los komen.

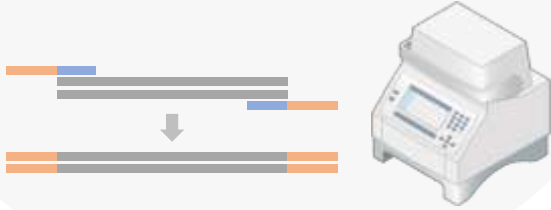
Dit zorgt er voor dat de proteïne-eenheden gescheiden kunnen worden o.b.v. hun grootte (moleculaire massa).



BIOTECHNOLOGISCHE TOEPASSING: De productie van medicinale **insuline**

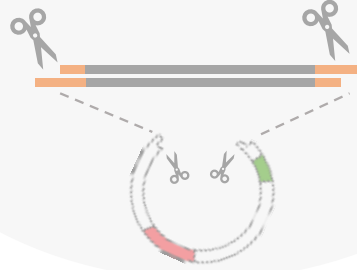
1 PCR

- Amplificeren van het insuline-gen
- Gebruik **primers** met **digestie**-knip-plaats



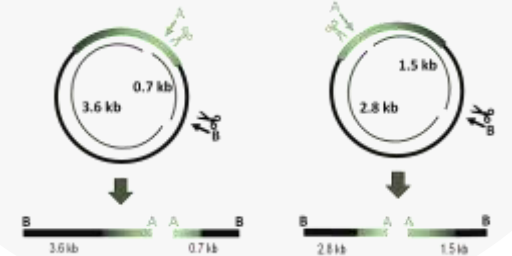
2 Restrictie-ligatie

- Plakken van het gekloonde insuline-gen in een plasmide d.m.v. restrictie-enzymen



3 Restrictie-mapping

- Controleren of insert in juiste oriëntatie geligeerd werd



4 DNA GE

- De lengte van de DNA-fragmenten uit de restrictie-mapping kan onderzocht worden a.d.h.v. gel-elektroforese



5 Bacteriën

- Het plasmide met het correcte insuline-gen wordt in bacteriën gebracht
- Deze schrijven het gen af en produceren zo het insuline proteïne



6 Proteïne GE

- M.b.v. gel elektroforese kan worden nagegaan of het insuline-gen weldegelijk geproduceerd werd

