



# Vektory pre klonovanie génov

---

*Ľubica Byrtusová*

*Tomáš Buday*

---

# Čo je klonovanie DNA?

---

- ➔ Je to množenie určitého úseku DNA
- ➔ V molekulárnej genetike sa na klonovanie DNA výhodne využívajú enzymatické systémy živých buniek, ktoré sú schopné konkrétnu DNA kopírovať a klonovať prakticky bezchybne a pri nízkych nákladoch
- ➔ Prakticky to znamená prinútiť určité bunky, aby kopírovali úsek cudzej DNA, ktorý sme predtým pripravili inou molekulárne – genetickou metódou a ktorý po namnožení získame späť

# Pojem „vektor“ v biológii

---

- ➔ kolektívne označenie pre replikovateľné molekuly DNA (vírusy, plazmidy alebo umelé chromozómy), ktoré slúžia na klonovanie nukleových kyselín v bunkách

# Ako pripraviť úsek DNA pre klonovanie?

---

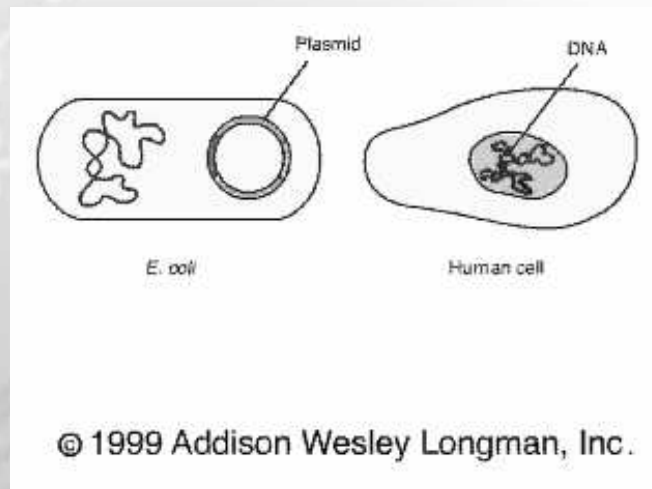
## ➔ Technológia rekombinantnej DNA

- ✓ Všeobecné označenie postupov, ktoré umožňujú vytvárať nové kombinácie molekúl DNA, ktoré sa v prirodzenom stave spoločne nevyskytujú

## ➔ Využíva možnosti:

- ✓ štiepenia DNA
- ✓ triedenia fragmentov štiepenej DNA
- ✓ identifikácie a izolácie konkrétnych fragmentov
- ✓ spájania fragmentov pomocou ligácie

# Technológia rekombinantnej DNA



# Ako prinútiť bunky kopírovať cudziu DNA?

---

- ➔ Zjednodušene povedané – musíme ich oklamať:
  - ✓ cudzia DNA musí vyzerat' ako ich vlastná
  - ✓ musí mať všetky predpoklady pre vstup do danej živej bunky
  - ✓ musí sa replikovať
- ➔ Najlepšie je, ak jej množenie prináša hostiteľskej bunke určitú výhodu v porovnaní s bunkami bez cudzej DNA

# Aké bunky použiť pre klonovanie DNA?

---

Kvôli jednoduchosti a ekonomickej výhodnosti kultivácie sa používajú:

- baktérie (krátke úseky)
- kvasinky (dlhé úseky DNA vcelku)

# Aký klonovací vektor použiť?

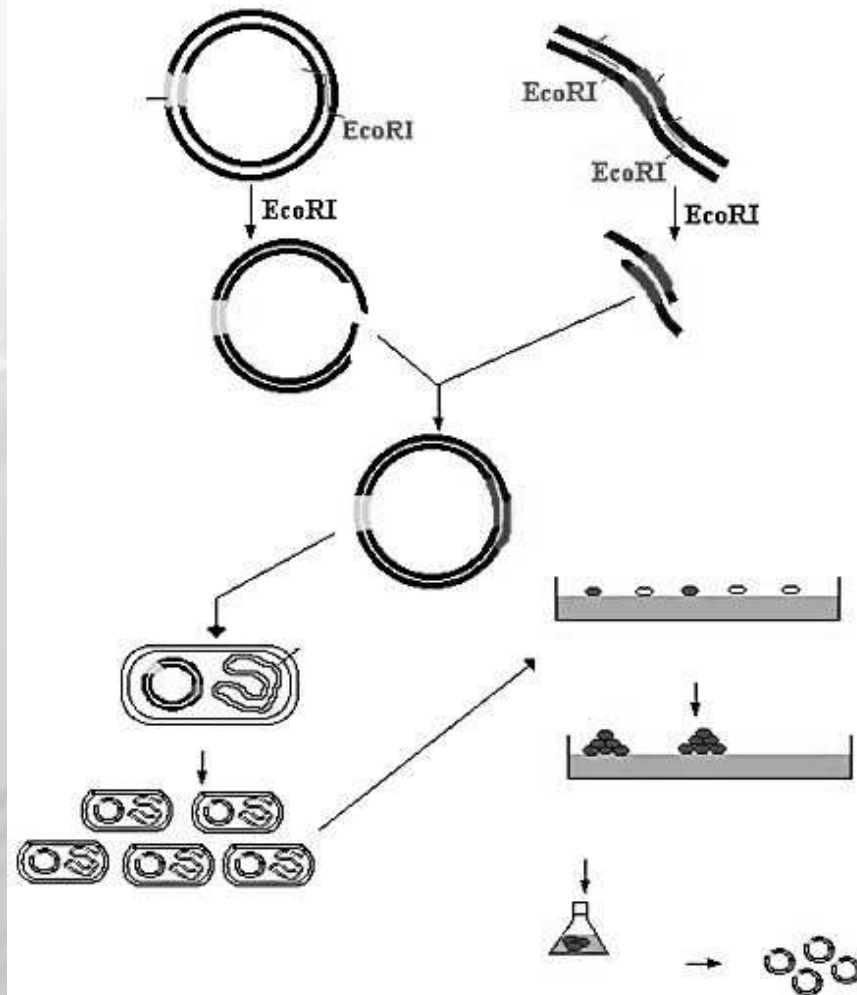
- ➔ Plazmidy
- ➔ Fasmidy
- ➔ Bakteriofágy
- ➔ Umelé bakteriálne chromozómy (BAC, angl. *bacterial artificial chromosome*)
- ➔ Umelé kvasinkové chromozómy (YAC, angl. *yeast artificial chromosome*)



# Ako sa klonuje pomocou plazmidu?

- ➔ Plazmidy vhodné na klonovanie sú komerčne dostupné
  - ✓ Najznámejší plazmid *pBluescript*
- ➔ Zloženie plazmidu:
  - ✓ sekvencia, ktorú rozoznáva DNA polymeráza hostiteľskej bunky–tzv. *ori sekvencia* (*ColE1ori*)
  - ✓ gén zabezpečujúci hostiteľským bunkám, ktoré plazmid uchovávajú a množia, určitú selekčnú výhodu oproti bunkám, ktoré plazmid neobsahujú (rezistencia voči ampicilínu)
  - ✓ mnohopočetné klonovacie miesto, kde sa dá plazmid rozštiepiť rozličnými reštrikčnými endonukleázami

# Ako sa klonuje pomocou plazmidu?



# Ako plazmid dostať do baktérie, naklonovať a získať späť?

---

- ➔ Baktérie majú okrem cytoplazmatickej membrány aj bunkovú stenu → treba prekonať dve bariéry
- ➔ Postup, ktorým sa do baktérie vpravuje plazmid sa označuje ako transformácia
  - ✓ na jej úspech treba použiť tzv. kompetentné bunky (tzn. bunky schopné prijať cudziu DNA)
  - ✓ takisto je potrebná destabilizácia cytoplazmatickej membrány (tepelný šok, ióny  $\text{Ca}^{2+}$ )
- ➔ Transformované baktérie je výhodné kultivovať v podmienkach, ktoré zvyhodňujú udržovanie a množenie plazmidu
- ➔ Zmnožené plazmidy sa získajú adsorpciou na silikátový povrch
  - ✓ podmienky sú upravené tak, že sa získajú selektívne malé molekuly – plazmidy, zatiaľ čo bakteriálny chromozóm sa behom izolácie stratí

# Ako spoznáme, že baktéria obsahuje plazmid s vloženou molekulou cudzej DNA?

---

- ➔ Pri vkladaní cudzej molekuly DNA do plazmidu technológiou rekombinantnej DNA sa cudzia DNA nemusí spojiť s linearizovaným plazmidom
  - ✓ uzavretie plazmidu bez včlenenia cudzej DNA
  - ✓ spájanie plazmidov alebo cudzích molekúl medzi sebou apod.
  
- ➔ Táto zmes je po ligačnej reakcii použitá na transformáciu baktérii
  
- ➔ Nie každá baktéria musí plazmid prijať, resp. prijme nežiadúci plazmid
  - ✓ tieto baktérie je treba odlíšiť
  - ✓ rozlišovanie má dve fázy

# Ako spoznáme, že baktéria obsahuje plazmid s vloženou molekulou cudzej DNA?

---

## ➔ I. fáza rozlišovania:

- ✓ využitie génu, ktorý zabezpečuje výhodu
- ✓ (v prípade plazmidu pBluescript sa baktérie naočkujú na živné médium s obsahom ampicilínu – baktérie, ktoré plazmid prijali prežijú, iné nie)

## ➔ II. fáza rozlišovania:

- ✓ je potrebné odlíšiť bunky, ktoré prijali plazmid s cudzou DNA od tých, ktoré prijali nezmenený plazmid
- ✓ používajú sa tzv. reporter gény
- ✓ (gén pre  $\alpha$ -peptid  $\beta$ -galaktozidázy, ktorý pri kultivácii na špeciálnom médiu zaisťuje tzv. modro-bielu selekciu)

# Prečo klonovať DNA?

---

- ➔ SONDY
- ➔ SEKVENCOVANIE DNA
- ➔ TRANSKRIPCIA IN VITRO
- ➔ VYTVÁRANIE RÔZNE UPRAVENÝCH KOMBINOVANÝCH MOLEKÚL DNA (→ upravené proteíny → liečebné účely)
- ➔ ...

# Zhrnutie klonovania génov pomocou plazmidov

---

[Video](#)



# Ďakujeme za pozornost

*Ľubica Byrtusová  
Tomáš Buday*

