

# Vektory pro klonování genů

*Veronika Bernátová  
Lucie Adámková  
Michal Belejkaň*

## Pojmy

- *klon*
  - soubor identických buněk (organizmů) odvozených ze společného předka mitózou u eukaryot a prostým dělením u prokaryot
- *klonování DNA*
  - namnožení určitého úseku DNA pomocí klonovacího vektoru
- *klon DNA (molekulární klon)*
  - soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA

- *klonovací vektor (přenašeč)*
  - molekula DNA, která má schopnost přijmout cizorodou DNA ,spojit se s ní a autonomně se replikovat v hostitelské buňce
- *cizorodá DNA*
  - jakýkoliv úsek DNA vložený do klonovacího vektoru
- *rekombinantní molekula DNA*
  - molekula DNA vytvořená in vitro spojením cizorodé DNA s klonovacím vektorem

# Postup klonování

1. Příprava rekombinantní molekuly DNA
2. Vnesení vektoru do hostitelských buněk
3. Selektce klonů obsahujících rekombinantní DNA

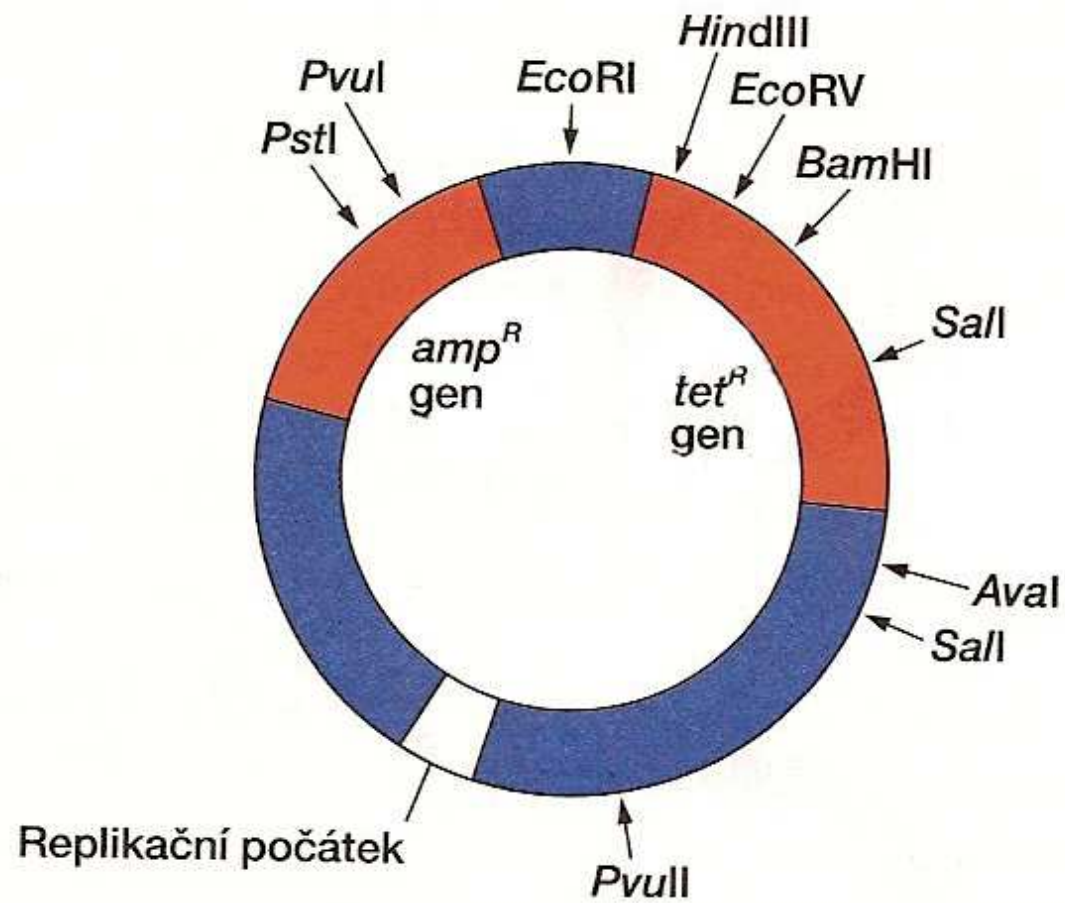
# 1. Příprava rekombinantních molekul DNA

Cizorodou DNA získáme ke klonování různými způsoby:

- genomovou DNA izolovanou z donorového organismu  
štěpení genomové DNA *restrikční endonukleázou* nebo  
mechanickým *stříháním* na kratší fragmenty  
předpokladem účinného spojení fragmentů s  
vektorovou DNA je vzájemná komplementarita jejich  
konců
- komplementární DNA (cDNA) připravenou zpětnou  
transkripcí z mRNA
- DNA připravenou uměle chemickou syntézou

## Příprava vektorové molekuly:

- ke spojení s cizorodou DNA je nutné její štěpení restriční endonukleázou, která vytváří komplementární konce ke koncům cizorodé DNA
- klasický vektor pro klonování je v E.coli plazmid pBR322
  - obsahuje geny pro rezistenci na ampicilin a tetracyklin a rekogniční sekvence pro 10 různých restričních enzymů
  - některá restriční místa leží i uvnitř genu pro rezistenci
    - *je-li integrována cizorodá DNA do tohoto úseku, projeví se to ztrátou rezistence na dané antibiotikum*



Plazmid pBR322

## Spojení cizorodé molekuly s vektorem

- po vytvoření směsi takto připravených molekul se jejich konce vzájemně spojí (renaturují) a po přidání *DNA-ligázy* se mezi nimi vytvoří kovalentní vazba
- vzniká tak *kružnicová rekombinantní DNA* ve formě *rekombinantního plazmidu*, který se přenesse do vhodného hostitele



## 2. Vnesení vektoru do hostitelských buněk

### Způsoby vnesení :

- *transformace*

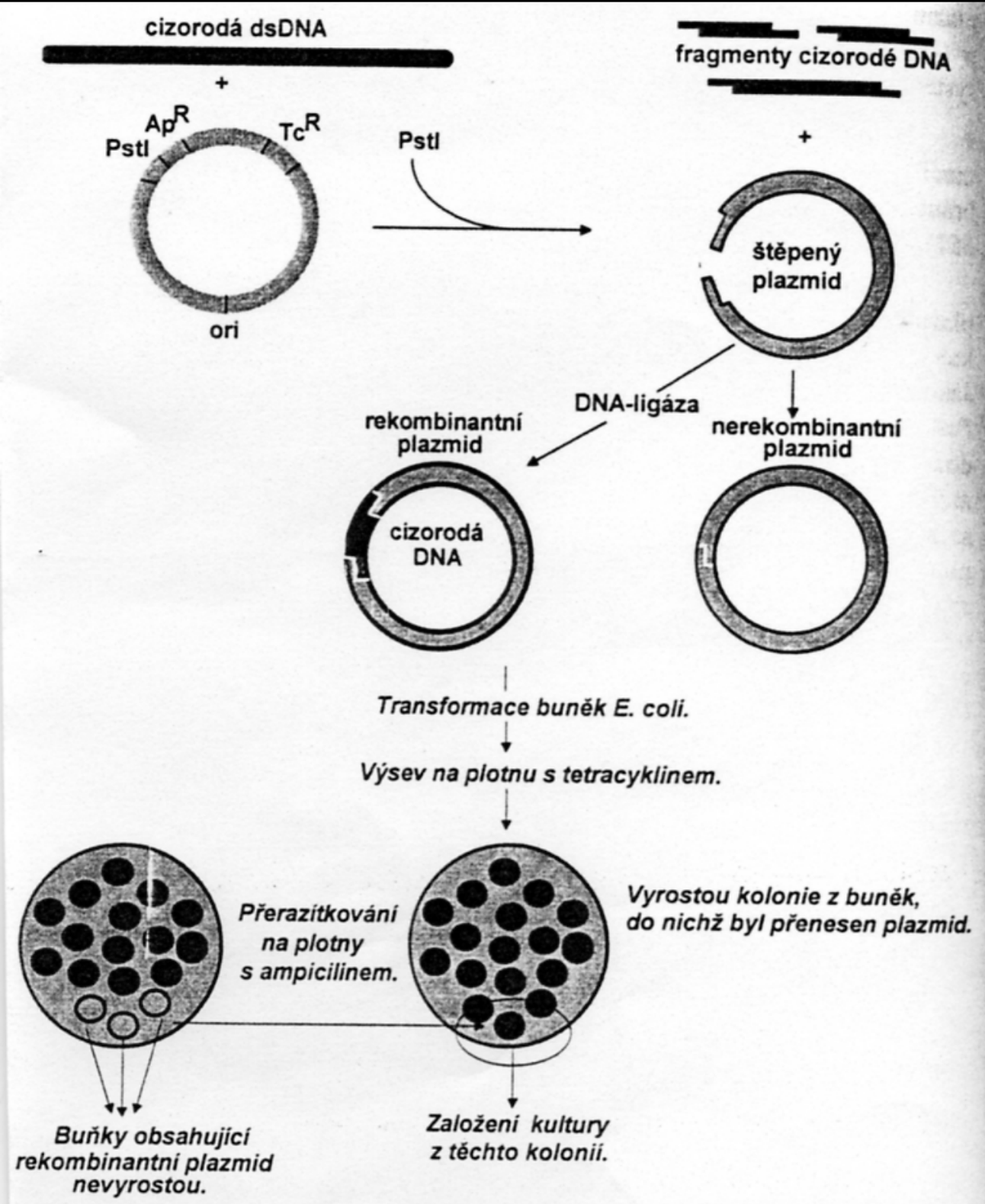
působením chloridu vápenatého a vyhladověním za chladu se buňka uvede do stavu kompetence, ve kterém je schopna přijmout exogenní DNA

- *elektroporace*

buňky se v roztoku s rekombinantní DNA vystaví krátkému elektrickému impulzu o vysokém napětí, čímž se v buněčné stěně vytvoří póry, kterými vstupuje exogenní DNA do buněk

### 3. Selekcce klonů obsahujících rekombinantní DNA

- po přenosu plazmidových molekul je třeba identifikovat buňky obsahující rekombinantní plazmidy a odlišit je od buněk bez plazmidu a buněk do nichž byl přenesen plazmid bez cizorodé DNA
- restrikční analýza  
cizorodou DNA vyštěpenou z rekombinantní DNA pomocí restrikční endonukleázy lze dokázat elektorforézou v gelu
- inzerční inaktivace  
pokud je klonovací místo ve vektoru umístěno v genu odpovědném za rezistenci k antibiotiku, inzerce cizorodé DNA vede ke ztrátě funkce  
buňky se stanou citlivé k antibiotiku, čímž je lze odlišit od buněk obsahujících vektor bez cizorodé DNA
- hybridizace  
buňky s rekombinantním plazmidem jsou vyhledávány pomocí sondy specifické pro sekvenci inzertu



## Vektory

- Jako klonovací vektory se nejčastěji používají kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace, odvozené zejména z *plazmidů* nebo *virů*.
- *klonovací kapacita vektoru*  
maximální délka fragmentu DNA, který může být do vektoru začleněn a stabilně udržován  
dosahuje až 16 kb

## Ideální klonovací vektor odvozený od plazmidu by měl mít tyto vlastnosti:

- malou velikost
  - čím menší je plazmidová DNA, tím je její přenos do buněk účinnější (snadno izolují a v buňkách dosahují vysokého počtu kopií)
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci a uchovávání klonů
- schopnost snadného a účinného přenosu do hostitelských buněk
- musí obsahovat geny, na základě jejichž fenotypového projevu lze buňky nesoucí plazmid snadno selektovat
  - označují se *selekční markery* (nejčastěji jsou to geny, které propůjčují buňkám rezistenci k antibiotikům, např. k ampicilinu, tetracyklinu nebo neomycinu)
- musí nést vhodná klonovací místa
  - tj. jedinečná restriční místa pro restriční endonukleázy, do nichž se začleňuje cizorodá DNA

# Kosmidy

- jsou to vektory odvozené od plazmidů, do nichž byla naklonovaná místa *cos* z bakteriofága lambda
- lze tak spojit výhody klonování do plazmidových a fágových vektorů rekombinantní DNA lze zavést do hostitelských buněk procesem normální fágové infekce (účinnost je o několik řádů vyšší)  
oproti plazmidovým vektorům má až 2x vyšší klonovací kapacitu
- přítomnost místa *cos* na plazmidu umožňuje, aby rekombinantní DNA byla sbalena do fágových kapsidů *sbalovacím extraktem* fága lambda a přenesena do hostitelských buněk fágovou infekcí
- v buňkách nabývá kružnicové formy a replikuje se jako plazmid
- do fágových hlav může být sbalena DNA o délce 37-52 kb a velikost kosmidů je zhruba 5kb, lze tedy pomocí nich klonovat DNA o velikosti 32-47 kb

## Vektory pro speciální účely

- *expresní vektory*

obsahují silný promotor umístěny proti směru transkripce od klonovacího místa

po naklonování cizorodého genu může dojít k jeho expresi a tvorbě příslušného produktu, který může vést ke smrti hostitelských buněk

## Význam

- Hlavní přínos klonování DNA tkví v možnosti izolovat z genomu dílčí úseky, ty ve formě rekombinantních molekul mnohonásobně množit a zpřístupnit je tak ke studiu.



## Konkrétní využití

- izolace genů a studium jejich struktury a funkce
- studium regulačních oblastí, které řídí expresi genů
- fyzikální a genetická analýza genomů
- exprese cizích genů a nepříbuzných hostitelích (*heterologní exprese*)
  - příprava látek využitelných v průmyslu, zdravotnictví a farmacii (hormony, krevní faktory, vakcíny, enzymy atd.)