

# Klonování

**Klonování:** proces tvorby klonů

**Klon:** soubor geneticky identických buněk (resp. organismů), odvozených ze společného předka

**Klonování DNA:** tvorba klonů DNA

**Klon DNA:** soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA, připravených např. množením rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo PCR (*in vitro*)

**Rekombinantní molekula DNA:** molekula DNA vytvořená spojením cizorodé (klonované) DNA s klonovacím vektorem

# Klonování DNA

Stěžejní metoda molekulární biologie:

umožňuje izolovat z komplexního genomu jeho dílčí úseky (např. geny), ty ve formě rekombinantních molekul mnohonásobně zmnožit a zpřístupnit je tak dalšímu studiu

## Využití klonování DNA:

- izolace genů
- studium regulačních oblastí, které řídí genovou expresi
- fyzikální a genetická analýza genomů
- exprese cizích genů v nepříbuzných hostitelích (**heterologní exprese**) za účelem přípravy žádaných produktů
- základ genového inženýrství (příprava transgenních organismů)

# Klonování zahrnuje 3 kroky

1. příprava rekombinantní molekuly DNA
2. přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky
3. Selektce klonů obsahujících rekombinantní DNA

Pro zajištění bodu 2 jsou zapotřebí **klonovací vektory**

# Klonovací vektory

- nejčastěji kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace
- obvykle odvozené z plazmidů nebo virů
- navíc obsahují pomocné sekvence různého původu usnadňující vložení cizorodé DNA, její expresi, selekci transformantů, apod.)

# Typy vektorů

Plazmidové: pBR322, pUC18, BACs

Fágové:  
- odvozené od bakteriofága Lambda  
- odvozené od fága M13

Kosmidy: hybridy mezi plazmidy a fágy

Vektory pro eukaryontní buňky:

- kvasinkové
- rostlinné
- živočišné

# Plazmidové vektory

## Vlastnosti:

- jednoduchá manipulace
- přirozený výskyt v mnoha druzích bakterií
- variabilita ve velikosti: jednotky kb - stovky kb (pro klonování obvykle 2-15 kb)
- většina odvozena od plazmidu **ColE1** bakterie *E. coli*

# Přirozené plazmidy

- extrachromozomální molekuly DNA, obvykle kruhové, dvouřetězcové, tvořící nadšroubovici
- typ bakteriálního parazita ve formě DNA: schopnost replikace uvnitř bakterie, občasný přechod do jiné buňky
- výhoda poskytovaná plazmidem hostitelské buňce je zároveň výhodou pro plazmid
- zodpovídají za šíření genů pro rezistenci k antibiotikům
- je zakázáno provádět takové experimenty, které by mohly způsobit rozšíření nových genů pro rezistenci k antibiotikům v patogenních bakteriích

## Výhodné vlastnosti plazmidových vektorů

- **autonomní replikace v bakteriální buňce**
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restričních (klonovacích) míst, využitelných pro klonování
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace, jednoduchá izolace)



# Replikace plazmidů

- základní předpoklad pro využití plazmidů jako klonovacích systémů (namnožení fragmentu DNA)
- hostitelské buňka je vybavena veškerým aparátem pro replikaci DNA

## Počátek replikace (ori)

- genetická informace, kterou musí plazmid disponovat, aby mohl být v bakteriální buňce replikován
- je tvořen jen několika stovkami párů bází

## Výhodné vlastnosti plazmidových vektorů

- autonomní replikace v bakteriální buňce
- **tvorba více kopií v buňce**
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

# Tvorba více kopií plazmidu v buňce

- Deriváty ColE1 jsou „multi-copy“ plazmidy
- ColE1 divokého typu - cca 15 kopií v 1 buňce
- Uměle vylepšené deriváty - několik set kopií

## Výhody

- snadná purifikace s vysokými výtěžky
- vysoká exprese klonovaného genu

## Nevýhody:

- pomalejší růst hostitelské buňky
- nadměrná exprese klonovaného genu může být pro buňku zátěž

## Výhodné vlastnosti plazmidových vektorů

- autonomní replikace v bakteriální buňce
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

# Plazmidy a rozmezí hostitelů

- některé plazmidy se replikují v rozmanitých bakteriálních druzích (široké rozmezí hostitelů): RP4, RSF1010, pC194
- většina vektorů užívaných pro klonování se replikuje jen v úzkém rozmezí hostitelů

## Výhoda:

- snížení rizika rozšíření pozměněné genetické informace

## Nevýhoda:

- pokud potřebujeme experimentovat s jinými bakteriemi než *E. coli* musíme si připravit „vlastní vektor“ se specifickým *ori*

## Pendující (bifunkční, „shuttle“) vektory

pJK3-1, pKT240, PGC3311

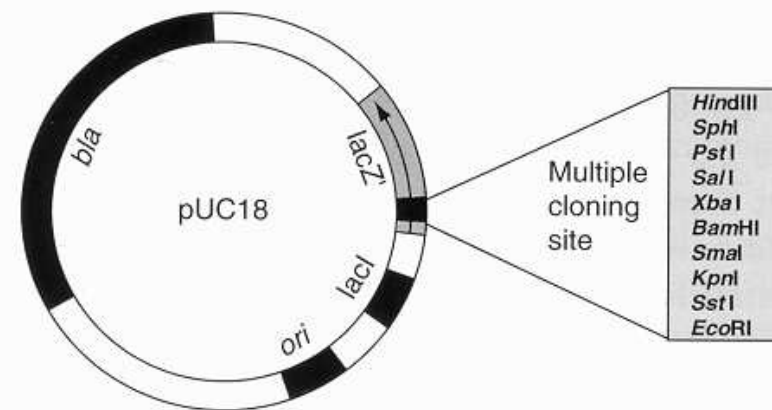
- Možný přenos mezi dvěma bakteriálními druhy
- 2 místa *ori* v jednom plazmidu

## Výhodné vlastnosti plazmidových vektorů

- autonomní replikace v bakteriální buňce
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- **přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování**
- snadný a účinný přenos do hostitelských buněk
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

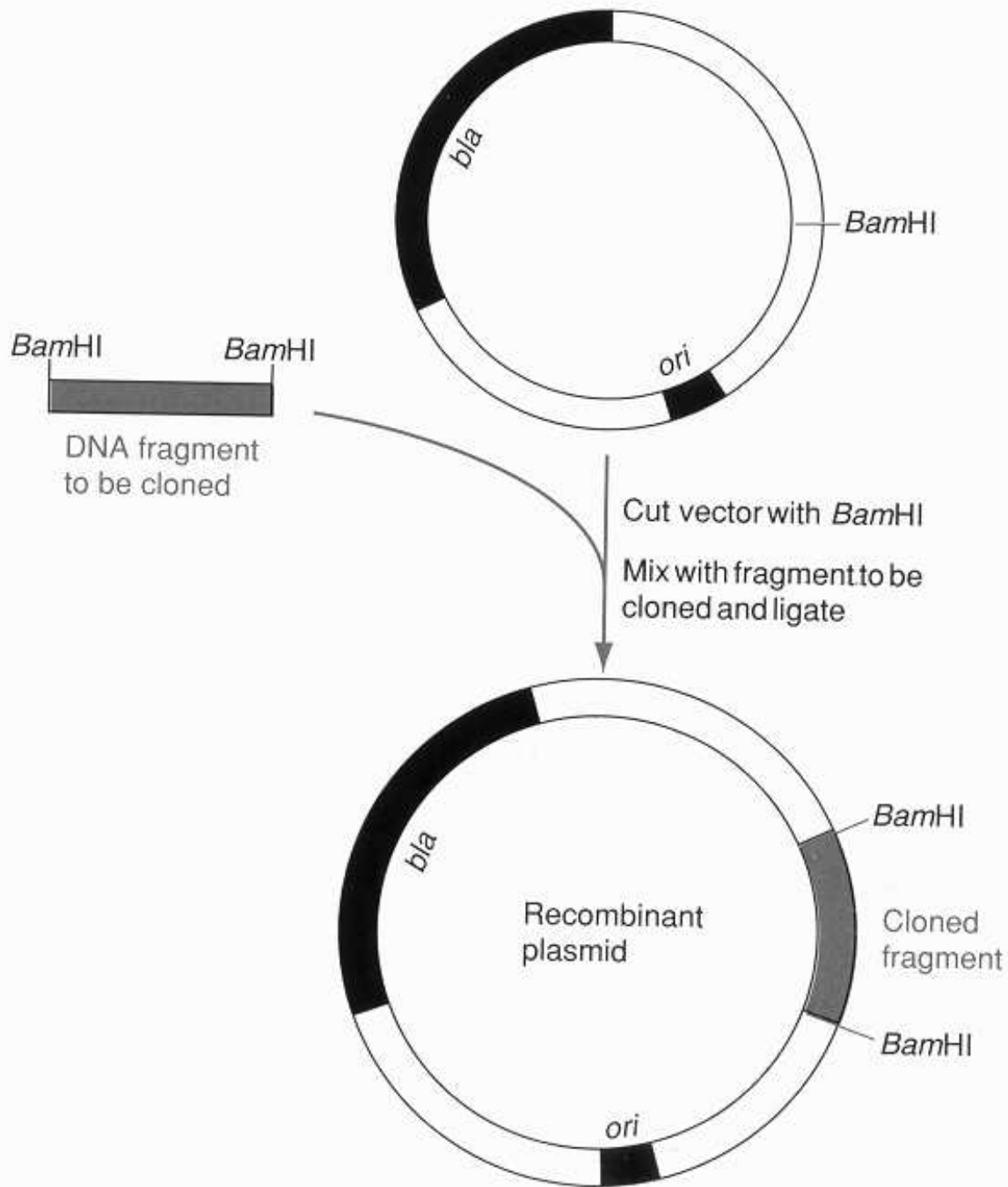
# Klonovací místo

- unikátní restriční místo (zastoupené pouze jednou v molekule plazmidu), do kterého se začleňuje cizorodá DNA
- větší počet různých restričních míst se obvykle seskupuje do krátkého úseku DNA (mnohočetné klonovací místo, polylinker)
- poloha klonovacího místa nesmí narušit funkci oblasti *ori* nebo jiné důležité funkce plazmidu
- začlenění fragmentu DNA do určitého klonovacího místa vede k vzniku rekombinantního plazmidu se dvěma cílovými místy téhož restričního enzymu - možno využít pro identifikaci rekombinantního plazmidu



*bla* = beta-lactamase (ampicillin resistance); selective marker  
*ori* = origin of replication  
*lacZ'* = beta-galactosidase (partial gene)  
*lacI* = repressor of *lac* promoter





## Výhodné vlastnosti plazmidových vektorů

- autonomní replikace v bakteriální buňce
- tvorba více kopií v buňce
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci, nepřenosnost do dalších buněk konjugací (bezpečnost práce s novými konstrukty)
- přítomnost restrikčních míst, využitelných pro klonování
- **snadný a účinný přenos do hostitelských buněk**
- přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
- malá velikost (zvýšení účinnosti transformace)

# Přenos plazmidových vektorů do hostitelských buněk

## Transformace:

- bakterie uvedeny do stavu kompetence (u *E.coli* působením chloridu vápenatého za nízké teploty)
- po přidání DNA a krátkém zahřátí na 42 °C) přechází transformující DNA do buněk

## Elektroporace:

- buňky jsou vystaveny krátkému elektrickému impulsu o vysokém napětí - v buněčné stěně vznikají póry, kterými exogenní DNA vstupuje do buněk

# Transformace bakteriálních buněk

- závislá na stavu kompetence buněk
- u některých bakterií se stav kompetence objevuje přirozeně (*S. pneumoniae*)
- u *E.coli* se připravuje uměle - promytím buněk ledovým  $\text{CaCl}_2$ 
  - přidání DNA
  - mírný teplotní „šok“ (2 min, 42°C)
  - krátká inkubace v růstovém médiu (zotavení bakterií, exprese selekčního markeru)

## Výtěžek při transformaci *E.coli* teplotním šokem

- klasický postup:  $10^4$  transformantů /  $\mu\text{g}$  DNA
- postupné vylepšování metody (odlišné soli při přípravě kompetentních buněk, speciální varianty *E.coli*): max.  $10^9$  /  $\mu\text{g}$  DNA

# Transformace bakterií elektroporací

- promytí buněk vodou (odmytí elektrolytů z růstového média)
- krátký elektrický puls o vysokém napětí
- dočasné otvory v buněčném obalu
- vstup DNA do buňky

## Výhody elektroporace

- vyšší účinnost přenosu
- funguje u různých bakterií

## Nevýhody elektroporace

- nutno optimalizovat řadu parametrů (růstové podmínky, teplota, délka pulzu, napětí)
- otvory mohou pronikat do buněk i jiné molekuly (RNA, proteiny)
- není zajištěn směr přenosu

# Selekční markery

- nezbytné pro funkci vektoru
- procesy ligace i transformace jsou málo účinné: max. 1% bakteriálních buněk (*E. coli*) DNA přijme, v praxi obvykle méně
- nutnost zabránit v růstu netransformovaným buňkám
- obvykle zajištěno genem, který hostitelským buňkám poskytne rezistenci na antibiotikum



# *Gen bla*

- kóduje enzym  $\beta$ -laktamázu
- $\beta$ -laktamáza hydrolyzuje  $\beta$ -laktamová antibiotika (příbuzná penicilinu), např. ampicilin

## Identifikace bakteriálních kolonií obsahujících rekombinantní plazmidy

- restrikční analýza plazmidové DNA
- inzerční inaktivace
- alfa-komplementace

# Restrikční analýza

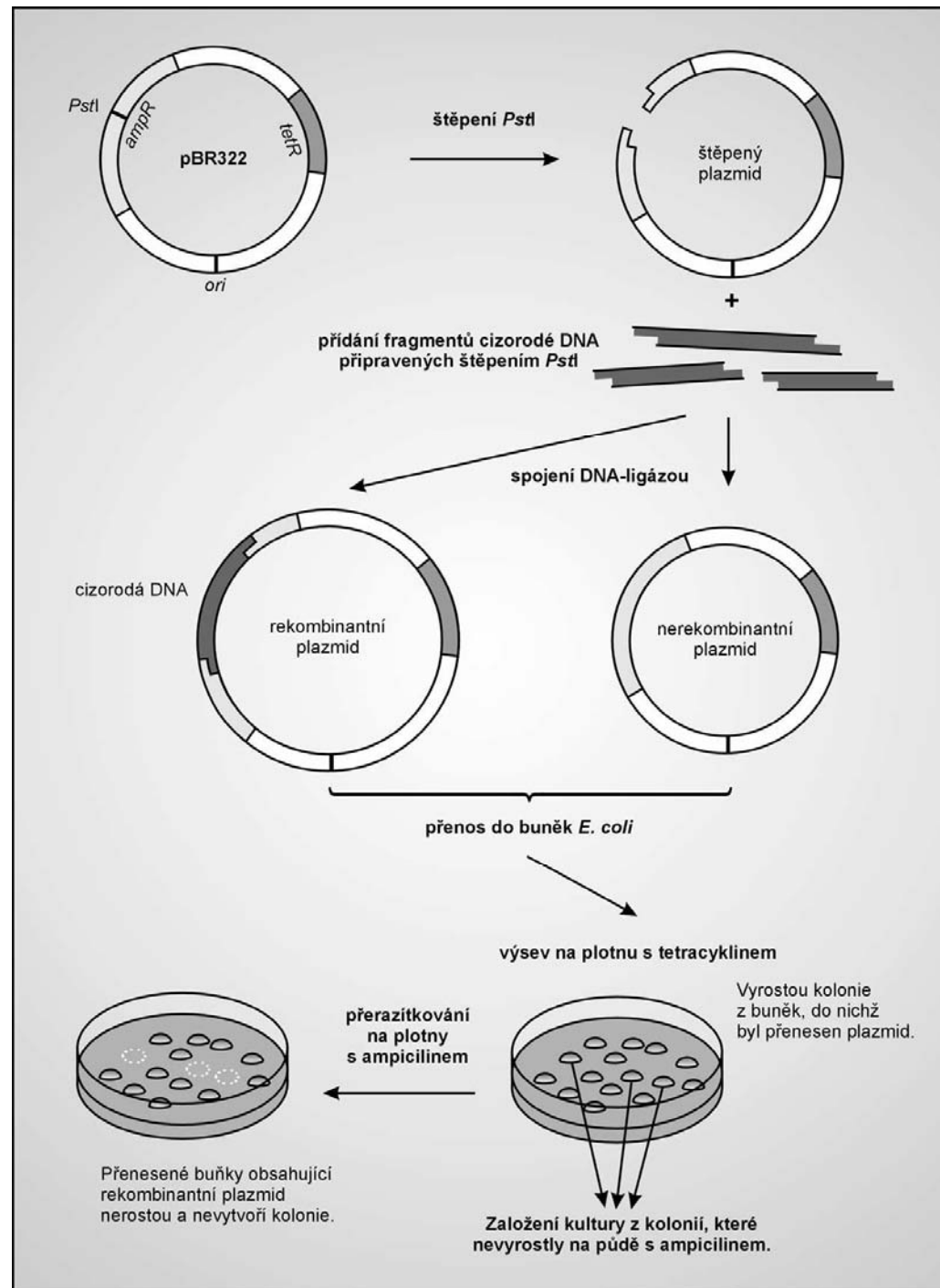
- začlenění klonované DNA změní restrikční vzorec (přítomnost nových restrikčních míst)
- možno využít pro identifikaci rekombinantních klonů a
- vhodný způsob zjištění orientace klonovaného fragmentu

# Inzerční inaktivace

- fenotypový projev úspěšného začlenění fragmentu DNA do klonovacího místa v transformovaných bakteriích
- přímá identifikace kolonií nesoucích rekombinantní plazmid

# Inzerční inaktivace

- klonovací místo je ve vektoru umístěno v genu zodpovědném za rezistenci hostitelské buňky k antibiotiku
- inserce klonované DNA způsobí ztrátu funkce tohoto genu
- buňky nesoucí rekombinantní plazmid jsou k danému antibiotiku citlivé, buňky nesoucí prázdný vektor jsou rezistentní



# Alfa-komplementace

- klonovací místo je umístěno v blízkosti 5' konce části genu *lacZ* kódujícího  $\beta$ -galaktozidázu
- přítomnost klonovacího místa nenarušuje čtecí rámec *lacZ*, pouze k tomuto genu přidává několik kodonů, funkce produktu (hydrolýza laktózy) tím není narušena (**modré kolonie** na plotnách s chromogenním substrátem)
- včleněním klonovaného fragmentu DNA do MCS vektoru se přeruší sekvence *lacZ* (**bílé kolonie** na plotnách s chromogenním substrátem)
- pUC18 nese jen část genu *lacZ*, zbytek genu poskytuje hostitelská bakterie (princip komplementace)

# Kultivační podmínky pro detekci aktivity $\beta$ -galaktozidázy v bakteriích

agarové plotny musí obsahovat:

1. **substrát X-gal** (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktozid)
2. **induktor IPTG** (izopropyl thiogalaktozid)  
- induktor tvorby  $\beta$ -galaktozidázy

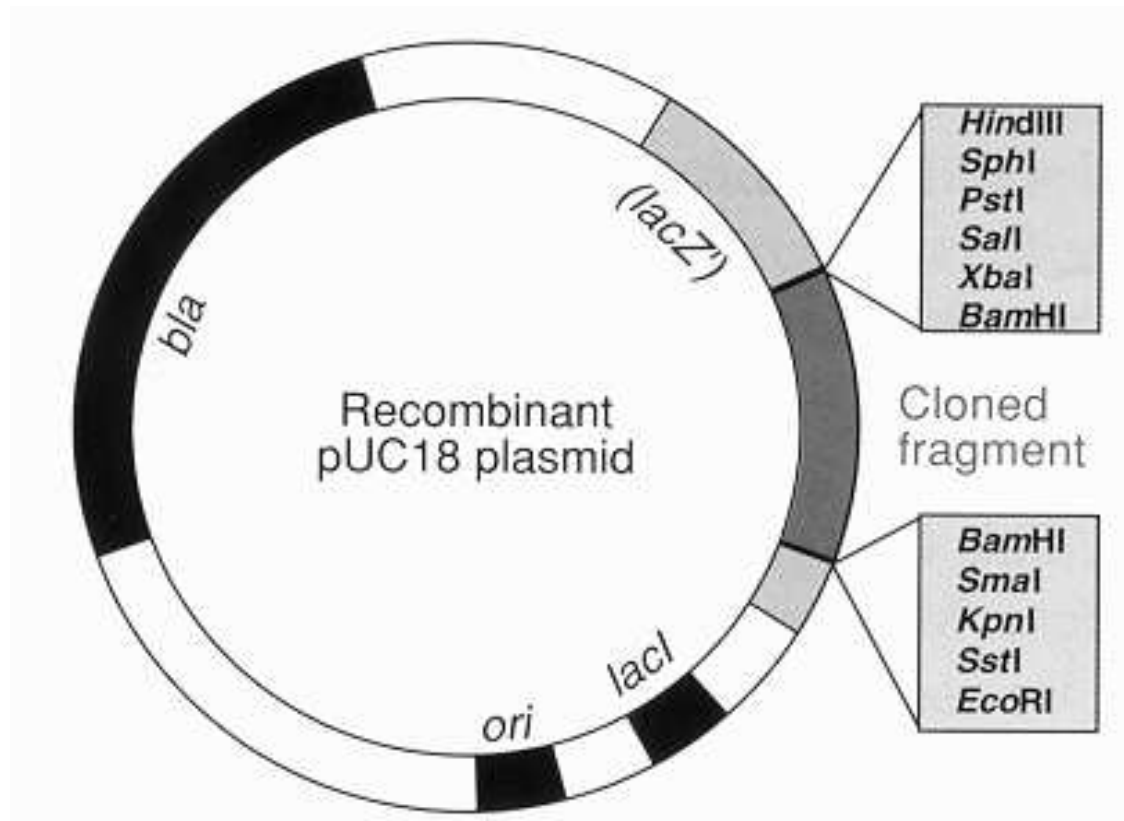


## Princip reakce:

X-gal je bezbarvý substrát, který je  $\beta$ -galaktozidázou konvertován na tmavě modrý produkt.

Modrá kolonie: plazmid pUC18 je intaktní

Bílá kolonie: plazmid pUC18 má přerušen gen *lacZ*, klonování bylo úspěšné



**Gen *lacZ* byl přerušen začleněním klonovaného fragmentu DNA: na X-gal plotnách vzniknou bílé kolonie**

# Výhody alfa-komplementace

Jednoduše poskytuje informace o úspěšnosti ligace:

- bakterie přijala plazmid (je Amp<sup>R</sup>)
- bílá barva kolonie signalizuje, že přijatý plazmid nevznikl recirkularizací prázdného vektoru

## Nevýhody alfa-komplementace

- pokud je inzert malý a nepřerušuje čtecí rámeček,  $\beta$ -galaktozidáza může mít dostatek aktivity pro zmodránění kolonií
- bílá kolonie nemusí vždy znamenat důsledek úspěšného klonování (delece v MCS, včlenění nežádoucího úseku DNA, který poruší čtecí rámeček)

## Vektory pro speciální účely

- **expresní vektory:** obsahují promotor, kterým lze zajistit produkci cizího proteinu v hostitelských buňkách (vhodné inducibilní systémy)
- **kyvadlové vektory:** obsahují dva počátky replikace - možnost propagace ve dvou různých organismech (např. *E.coli* a *B. subtilis*)

# Fágové vektory -odvozené od fága Lambda

## Výhody:

- rekombinantní DNA lze sbalit do kapsidů a přenést do hostitelských buněk infekcí (o několik řádů vyšší účinnost přenosu než při transformaci plazmidovou DNA)
- v jedné zkumavce lze uchovávat ve formě fágových virionů celou genovou knihovnu (např. několi miliónů rekombinantních klonů)
- vhodné pro klonování větších fragmentů DNA (výhodné pro tvorbu genových knihoven)

*Pozn: rekombinantní plazmidy s velkými inzerty jsou méně stabilní (nízká klonovací kapacita), transformace je méně účinná, nízký výtěžek při purifikaci z E. coli*

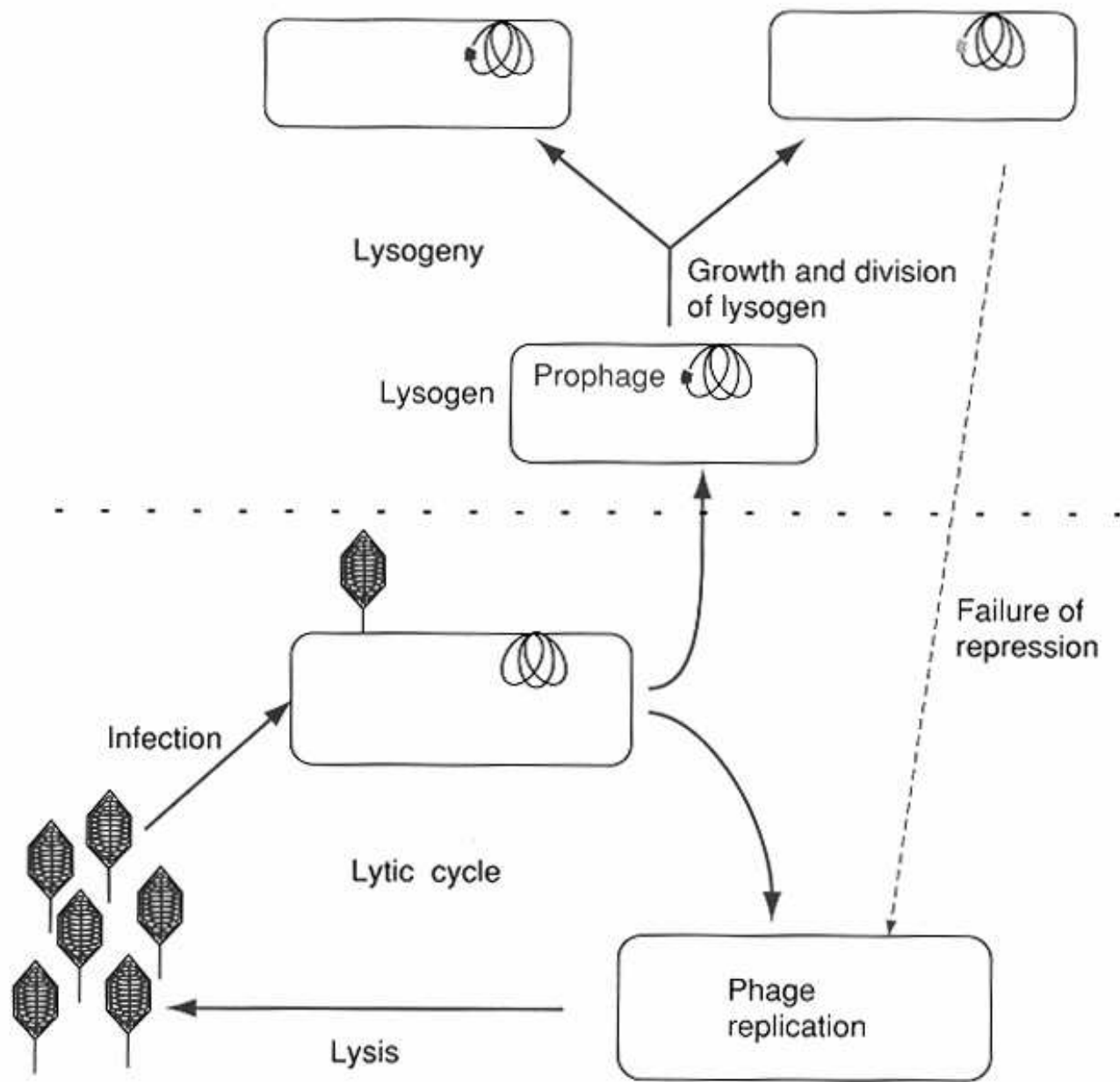
# Lysogenní a lytický cyklus

- Lambda je temperovaný bakteriofág (po infekci *E.coli* může podstoupit lytický nebo lysogenní cyklus)
- rozhodují vlivy okolí, genetická charakteristika hostitele i fága
- existují mutanti fága Lambda podstupující pouze lytický cyklus (**jasné plaky**)
- divoký typ poskytuje **zakalené plaky** (přítomnost lysogenů rezistentních k další infekci fága: „*superinfection immunity*“)

# Lysogenie

- exprese téměř všech fágových genů je vypnuta fágovým represorem (produkt genu *cI*)
- spontánní represe není absolutní
- reparační mechanismy aktivované poškozením DNA (UV záření) ničí represor *CI* (přechod na lytický cyklus)
- genom Lambda je *obvykle* integrován do genomu hostitele místně specifickou rekombinací a spolu s ním replikován
- genom Lambda může být replikován i v extra-chromozomálním stavu

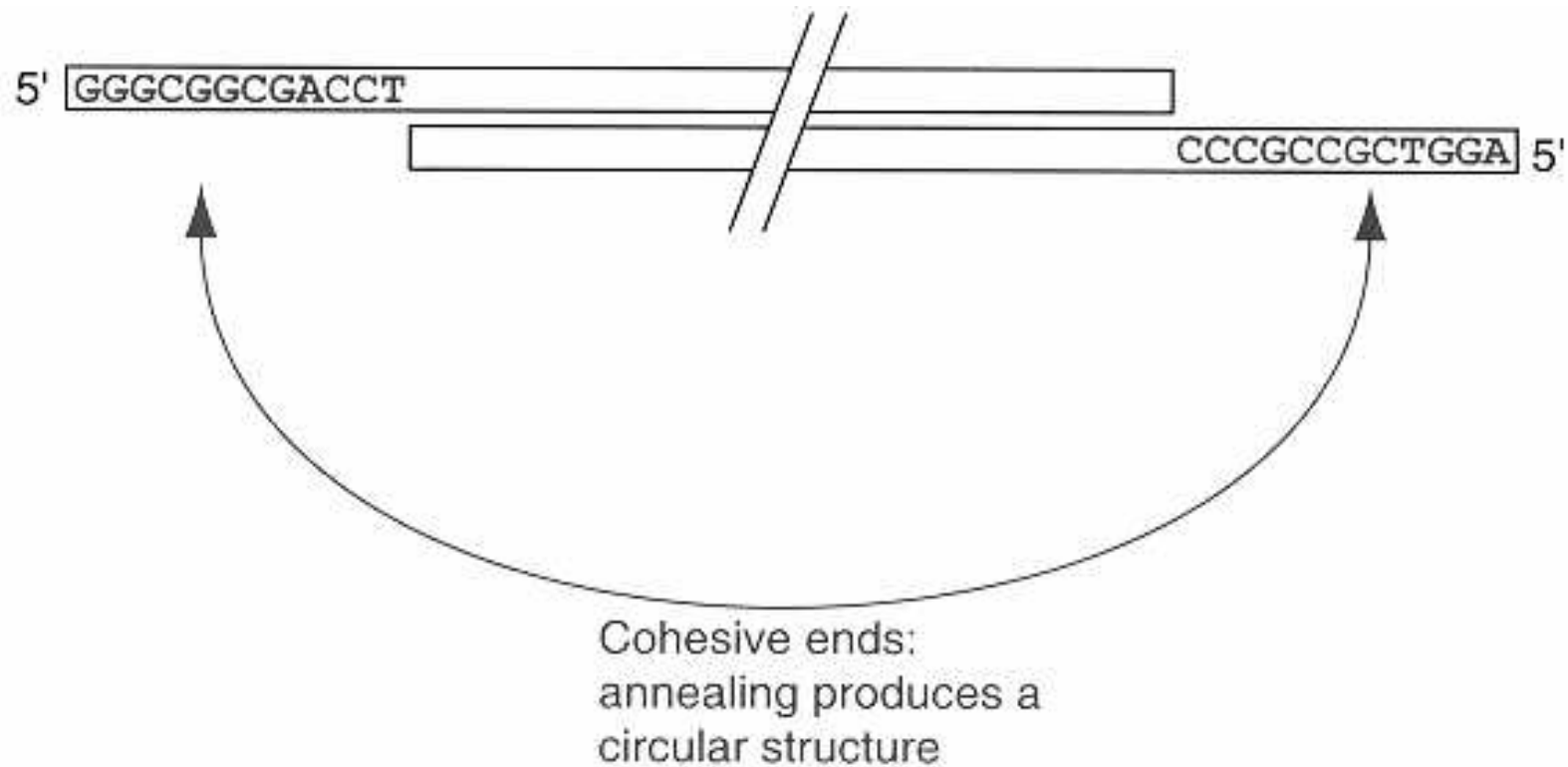




# Genom fága Lambda

- dvouřetězcová lineární DNA (48.514 bp)
- 12 nespárovaných, ale komplementárních bazí na obou koncích (lepivé konce)
- párování koncových sekvencí je vzhledem k jejich délce stabilní i při 37°C
- v infikované buňce se objevuje i kruhová struktura: důsledek kovalentní vazby katalyzované bakteriální DNA ligázou

# Lepivé konce DNA fága Lambda

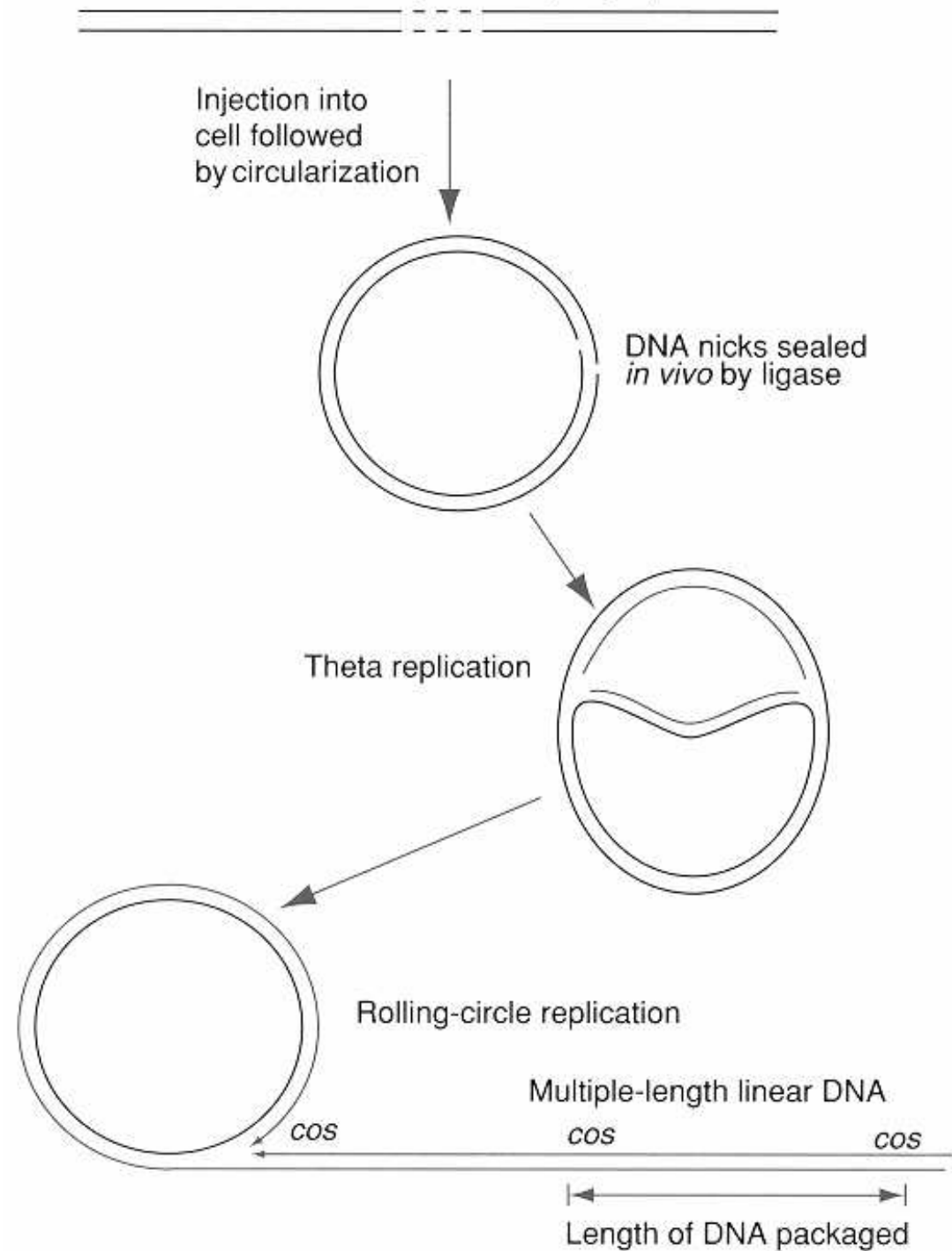


# Lytický cyklus

- kruhová DNA se nejdříve replikuje obdobně jako plasmidy: vznik dceřinných kruhových molekul
- později se replikace přepíná na „otáčející se kruh“: vznik dlouhých lineárních molekul DNA, obsahujících mnoho spojených kopií genomu Lambda (konkatemery)

# Replikace DNA fága Lambda

Linear DNA, with sticky ends, in phage particle



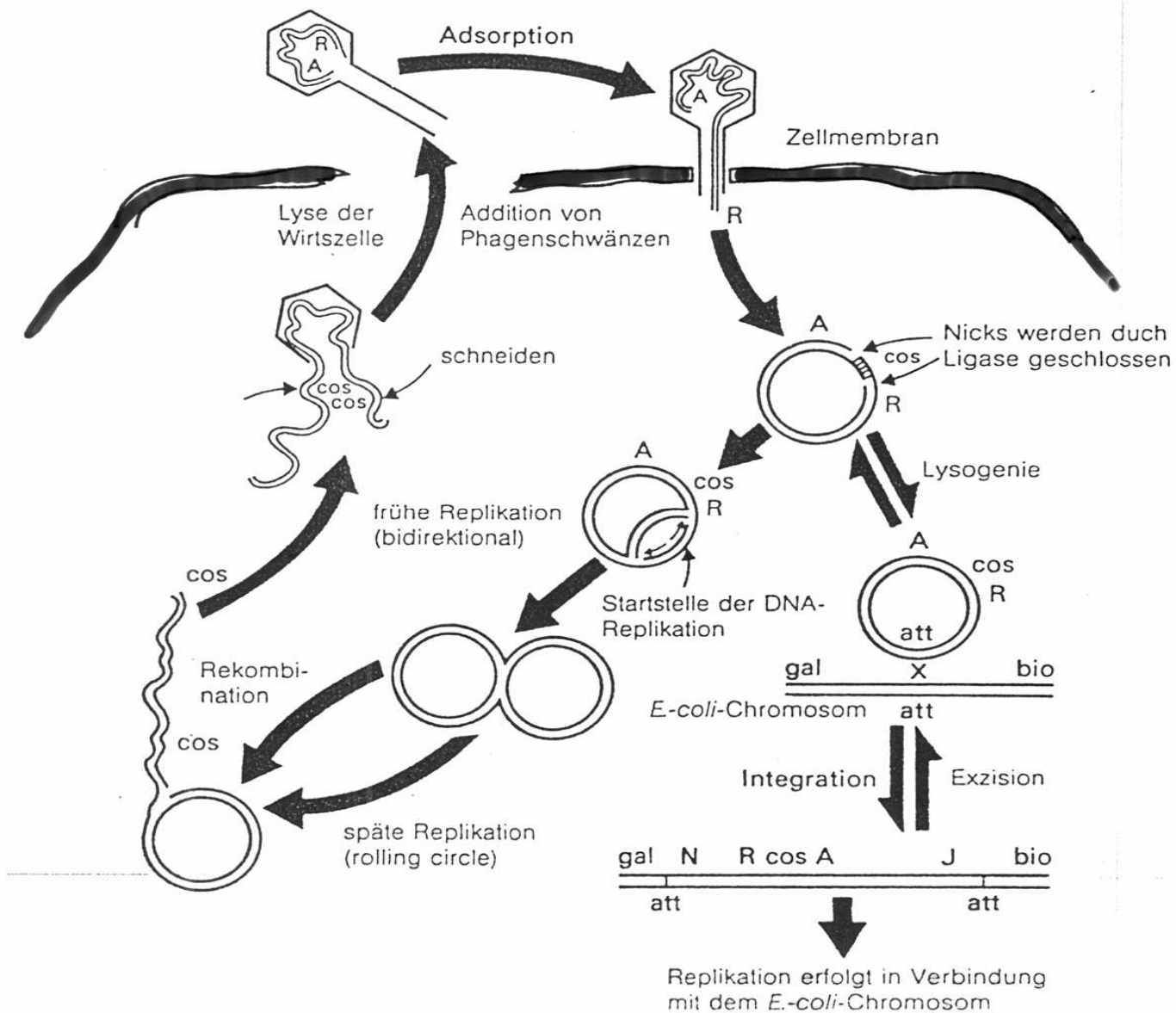
# Sestavování fágových částic

- exprese fágových genů
- sestavení prázdné fágové hlavy
- sbalení DNA
- připojení bičíku

# Sbalení DNA („DNA packaging“)

- enzymy rozeznávají specifická místa na molekule DNA obsahující mnoho kopií fágového genomu (konkatemerů) a provedou v nich asymetrická štěpení: vznik lepicích konců („cohesive end sites“ - *cos*)
- oblast vymezená 2 místy *cos* je sbalena a přenesena do fágové hlavy

# Životní cyklus fága Lambda





# Lyze bakteriální buňky

- zajištěna produktem fágového genu *S*
- mutace v genu *S* způsobuje oddálení nebo úplné selhání lyze (využívají některé vektory pro zvýšení výtěžku bakteriofága v důsledku vícenásobné replikace)

# Velikost DNA a kapacita fágové hlavy

- mezi místa *cos* lze včlenit fragment cizí DNA, ale celková velikost nesmí překročit 51 kb (cizí DNA max. 2500 bp)
- kapacitu lze zvětšit odstraněním postradatelných genů, které zajišťují lysogenní cyklus (min. 37 kb DNA wt musí být zachováno)

# Sbalování DNA *in vitro*

- přenos fágové DNA do buněk transfekcí je méně účinný než infekcí (větší velikost než obvyklé plazmidy)
- fágovou DNA lze účinněji přenést do buněk prostřednictvím fágových částic, které se sestaví pomocí sbalovacích extraktů, obsahujících prekurzory fágových hlav a bičíků
- konkatemerní rekombinantní molekula DNA se štěpí v místech *cos* a sbalí do fágových kapsidů
- vytvořenými viriony se infikují hostitelské buňky *E.coli*, kde se rekombinantní DNA pomnoží

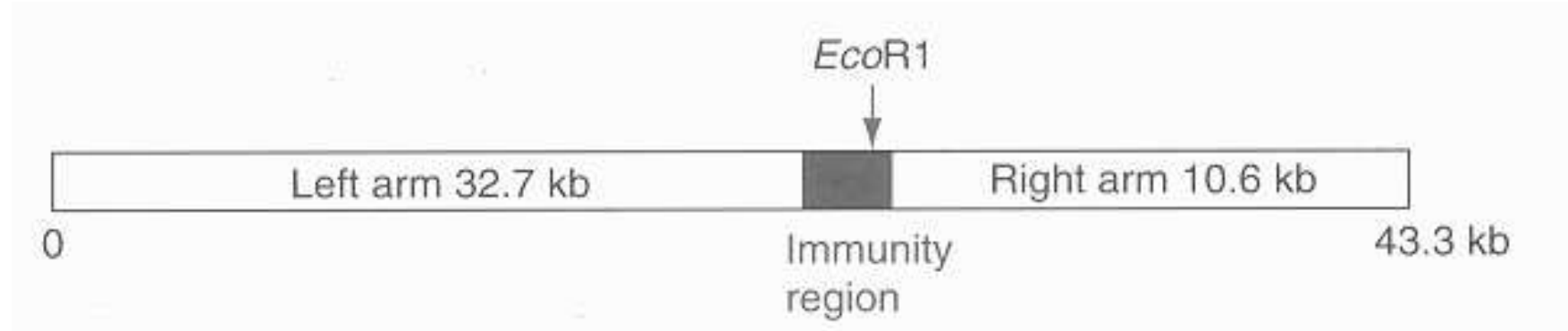
## Dva typy vektorů odvozených od fága Lambda

- **Inzerční vektory:** cizorodá DNA se vkládá do 1 restrikčního místa. Maximální klonovací kapacita dosahuje cca 13 kb.
- **Substituční vektory:** cizorodá DNA nahrazuje střední úsek genomu fágového vektoru, který je z něj restrikčními endonukleázami před vložením cizorodé DNA vyštěpen. Klonovací kapacita se pohybuje od 9 - 23 kb.

# Inzerční vektory (např. $\lambda$ gt10)

- genetickými manipulacemi odstraněny postradatelné sekvence genomu fága Lambda
- obsahuje unikátní klonovací místo (*EcoRI*)
- schopnost tvorby životaschopných částic je zachována
- max. klonovací kapacita: **13 kb**

# Inzerční vektor $\lambda$ gt10

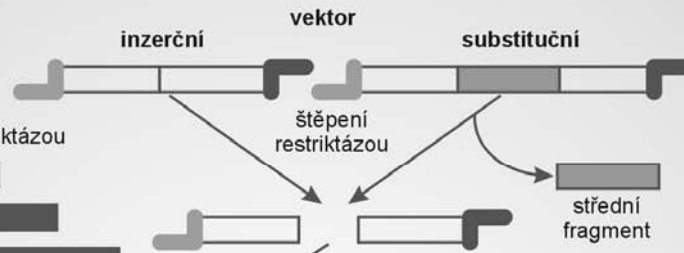


- vektor se štěpí *EcoRI*: vznik 2 fragmentů (pravé a levé rameno)
- ligací se klonovaný fragment vkládá do místa *EcoRI*
- lepivé konce různých molekul mají tendenci se párovat: **tvorba konkatemerů**
- štěpení v místech *cos* a včlenění rekombinantní DNA do fágových hlav probíhá při sbalování „in vitro”: **životaschopné fágové částice**
- infekce bakterií na misce: **tvorba plak**



genomová DNA

částečné štěpení restriktázou



spojení ligázou

konkatemer

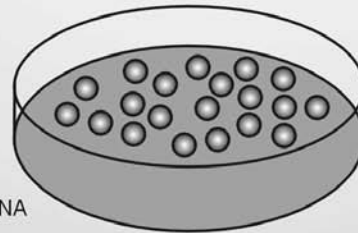


sbalovací  
extrakt

obalování *in vitro*



infekce buněk *E. coli*



plaky obsahující  
fágové viriony  
s rekombinantní DNA

Inzerční inaktivace umožňuje odlišit rekombinantní vektor  $\lambda$ gt10 od prázdného

- místo *EcoRI* je umístěno v genu *cI* kódujícím represor
- rekombinantní fág netvoří funkční represor: neschopnost lysogenie - jasné plaky
- parentální fág: zakalené plaky



## Kmen *E. coli hfl* usnadňuje identifikaci rekombinantních fágů

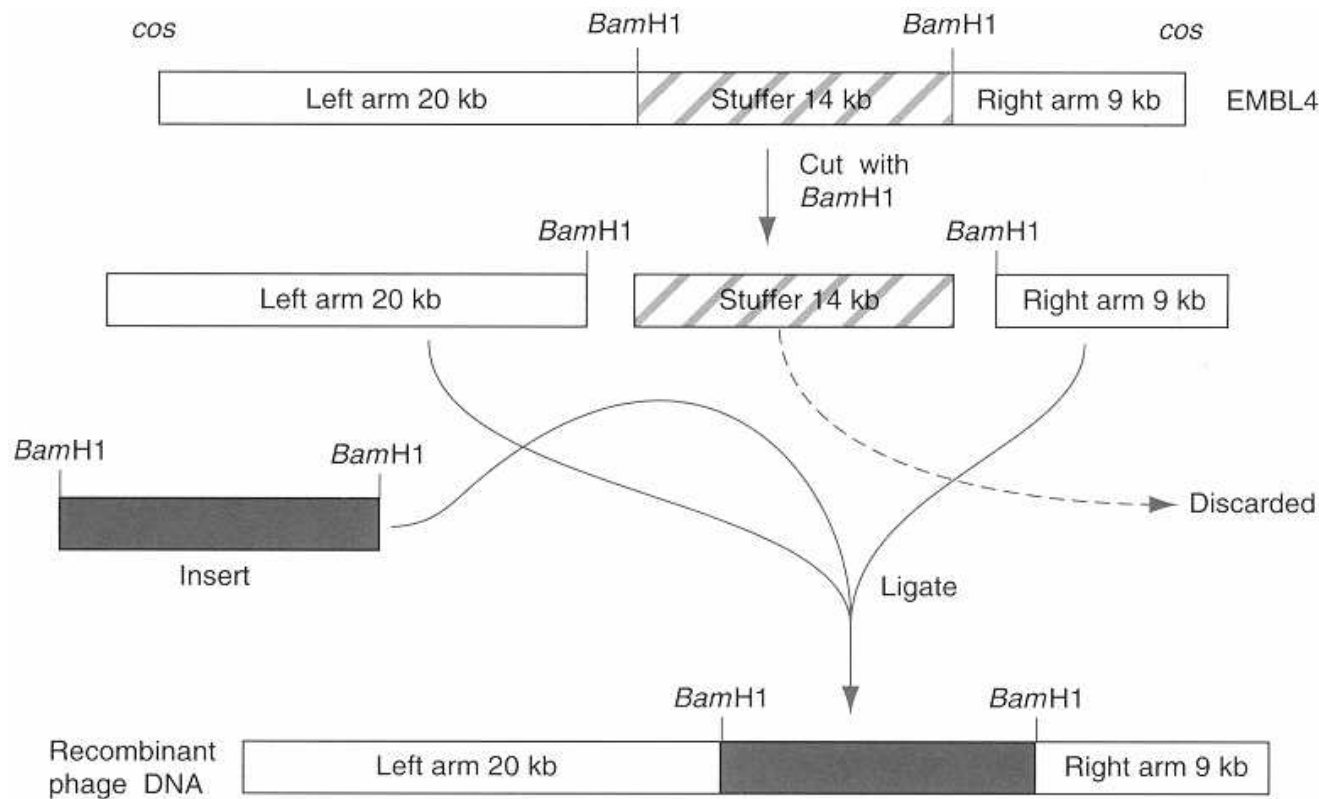
- *hfl* „high frequency of lysogenization“
- **parentální fág** navozuje lyzogenizaci s vysokou preferencí: neposkytne **žádné plaky**
- **rekombinantní fágy** s nefunkčním represorem do lyzogenního stavu nevstoupí: vzniknou **jasné plaky**

# Substituční vektory

- deriváty fága Lambda
- vyšší klonovací kapacita (až 23 kb)
- využívají přítomnosti sekvencí, které nejsou nezbytné pro lytický cyklus, ale jejich absence by u inzerčních vektorů znemožnila tvorbu životaschopných fágových částic (fágová hlava požaduje určitou minimální velikost DNA, ale nezáleží na nukleotidové sekvenci)

# Vlastnosti substitučního vektoru EMBL4

- 2 klonovací *Bam*HI místa vymezují postradatelný fragment „stuffer“
- štěpením se uvolňuje „stuffer“+ pravé a levé rameno
- ramena mají tendenci se spojovat (lepivé konce)



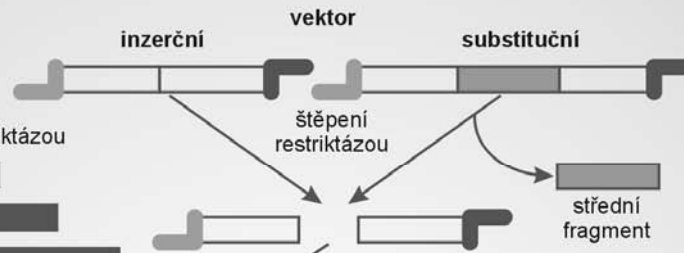
# Klonování do substitučního vektoru

- štěpení vektoru enzymem *Bam*HI
- oddělení vzniklých fragmentů elektroforézou
- eluce ramen z gelu
- ligace ramen s klonovaným fragmentem, který má kompatibilní konce
- rekombinantní fágová DNA v podobě konkatemeru je štěpena *in vitro* před začleněním do fágových hlaviček („DNA packaging“)
- infekce „trávníkových“ bakterií, tvorba plak



genomová DNA

částečné štěpení restriktázou



spojení ligázou

konkatemer

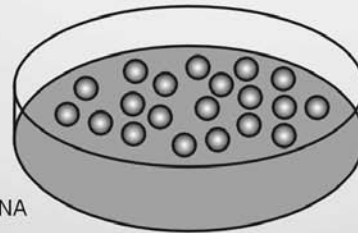


sbalovací  
extrakt

obalování *in vitro*



infekce buněk *E. coli*



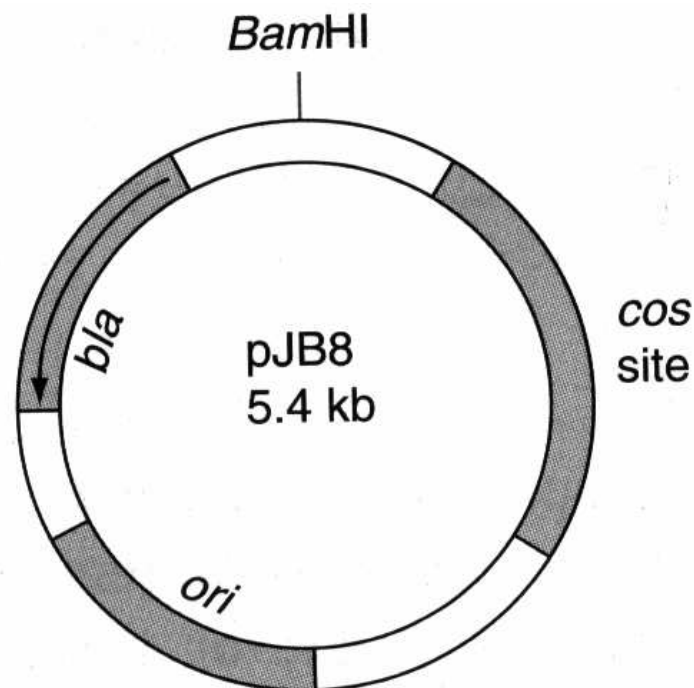
plaky obsahující  
fágové viriony  
s rekombinantní DNA

## Výhody substitučních vektorů

- preferenčně jsou klonovány větší fragmenty (pokud je fragment menší než 8 kb nejsou částice životaschopné)
- defosforylace inzertu: zamezení tvorby většího počtu tandemově uspořádaných insertů
- rozlišení rekombinantních a prázdných vektorů: střední fragment může kódovat  $\beta$ -galaktozidázu: plaky původního (nerekombinovaného) fága jsou modré na médiu obsahujícím X-gal

# Kosmidy

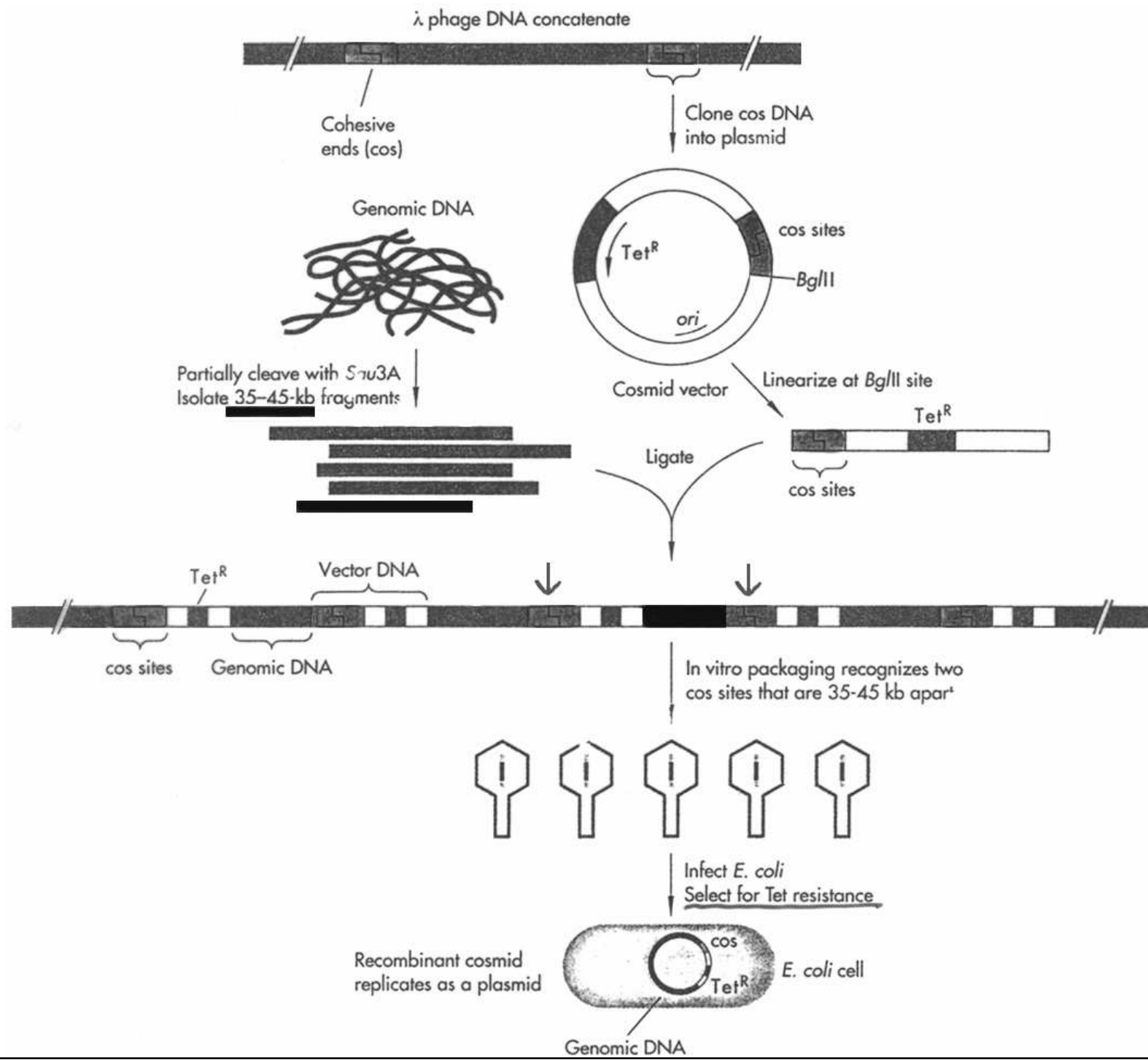
- plazmidy, které obsahují místo *cos*
- spojení výhod plazmidových vektorů a vektorů odvozených od fága Lambda



# Klonování do kosmidů

- štěpení, ligace insertů a purifikace rekombinantních klonů se provádí stejně jako při práci s plazmidy
- ligační podmínky se nastaví tak, aby byla podporována tvorba konkatemerů
- místo transformace bakterií se ligační směs podrobí sbalování *in vitro* („DNA packaging“)
- vzniknou fágové částice, které zajistí přenos rekombinantní DNA do bakterií, ale nejsou životaschopné (nedochází k tvorbě plak, na kosmidu nejsou přítomny fágové geny)
- kosmid se bude v bakteriích replikovat jako plazmid





$\lambda$  phage DNA concatenate

Cohesive ends (cos)

Clone cos DNA into plasmid

Genomic DNA

Partially cleave with *Sma*III  
Isolate 35-45-kb fragments

Cosmid vector

Linearize at *Bgl*II site

Ligate

cos sites

$Tet^R$

Vector DNA

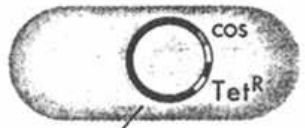
cos sites

Genomic DNA

In vitro packaging recognizes two cos sites that are 35-45 kb apart

Infect *E. coli*  
Select for  $Tet^R$  resistance

Recombinant cosmid replicates as a plasmid



*E. coli* cell

Genomic DNA

## Výhody kosmidů

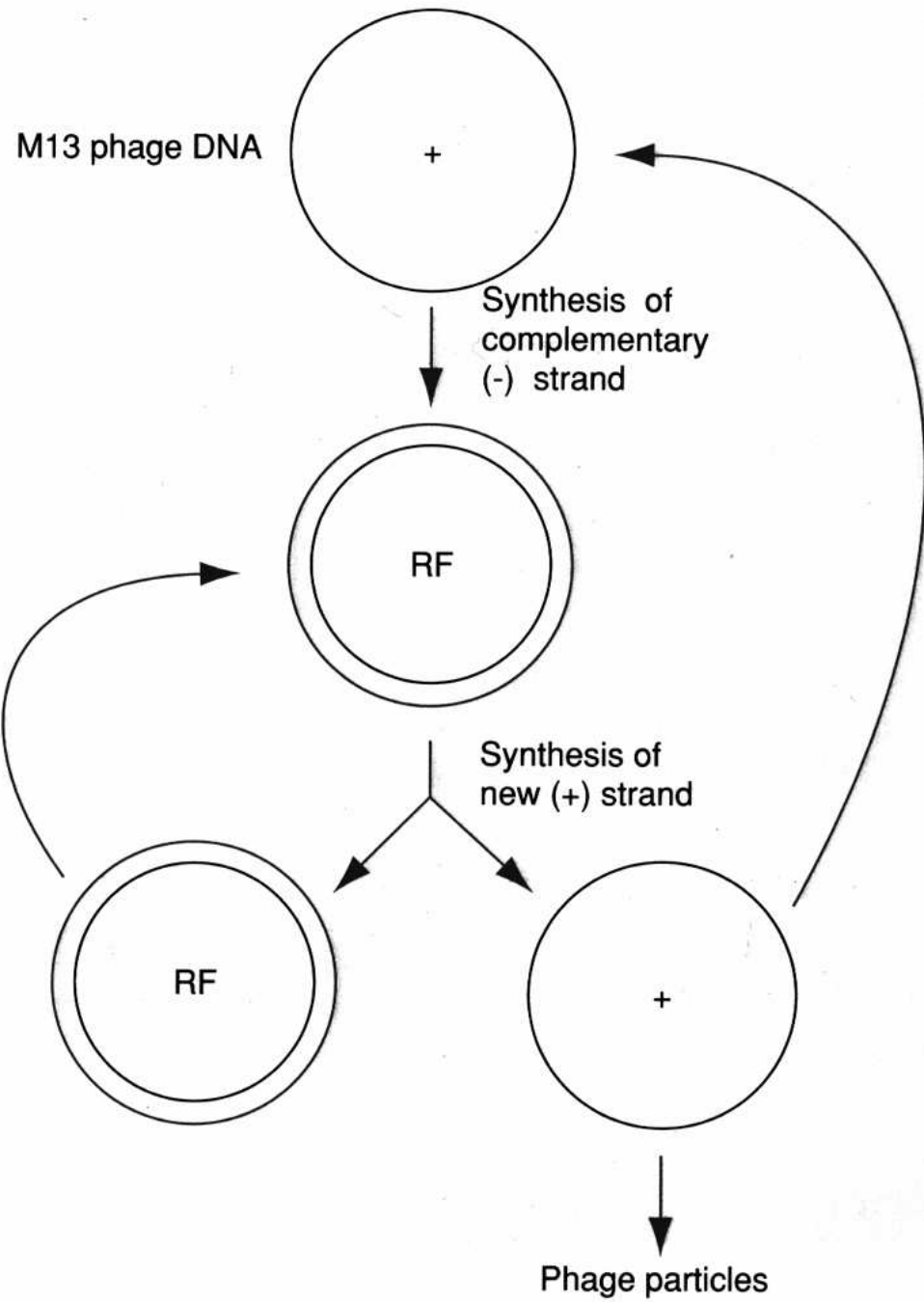
- klonovací kapacita 30 - 44 kb
- možnost propagace a purifikace konvenčními metodami pro práci s plasmidy
- přirozená selekce pro velké inzerty

# Bakteriofág M13

- vláknitý bakteriofág infikující *E.coli*
- připojuje se na špičky povrchových výrůstků bakterií (pilusy), které nesou F-plazmid
- neinfikuje bakterie F-
- dlouhý vláknitý tvar fágové částice
- obsahuje jednořetězcovou kružnicovou molekulu DNA (6,4 kb)

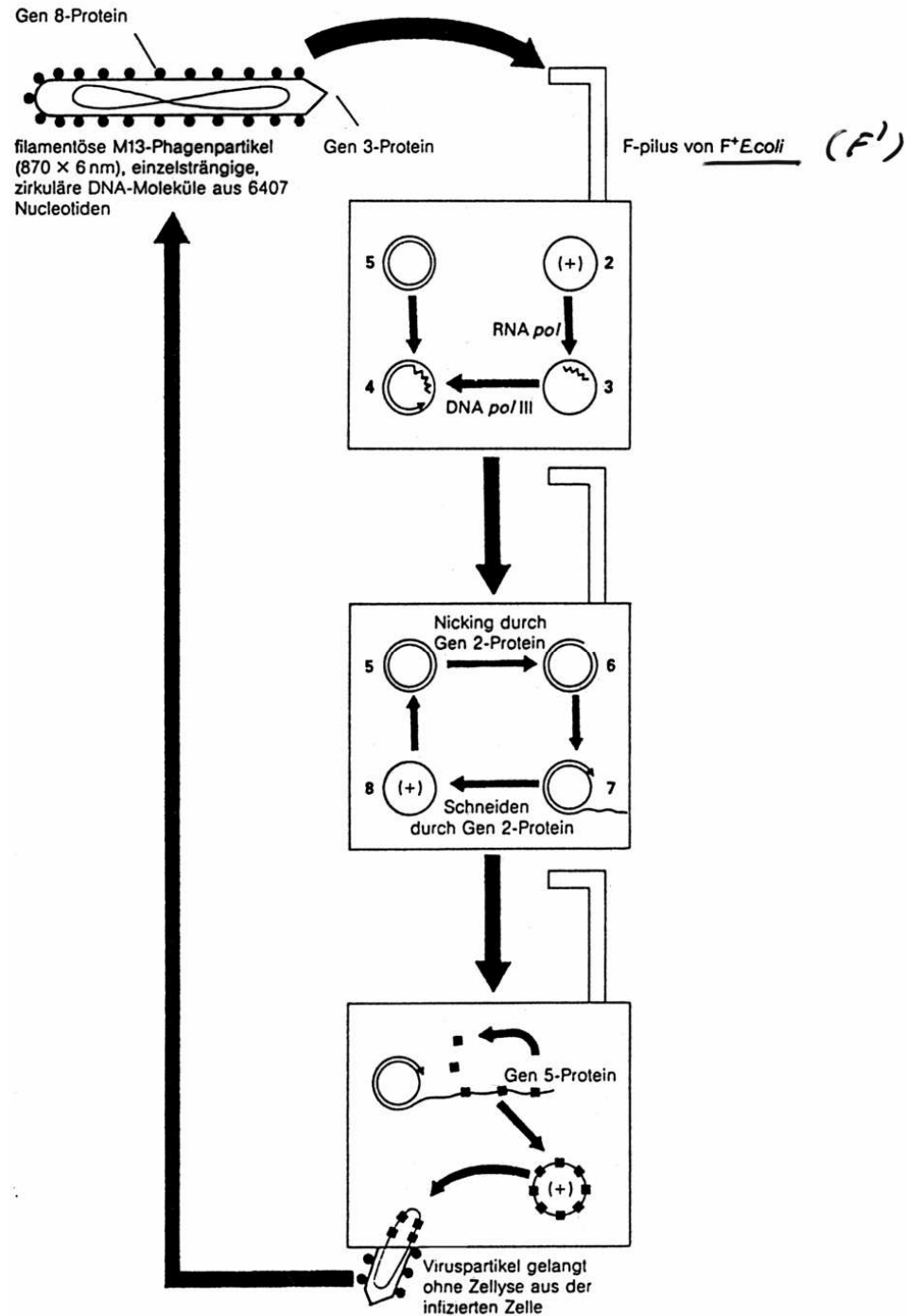
# Replikace bakteriofága M13

- jednořetězcová DNA se uvnitř buňky mění na dvouřetězcovou DNA (replikační forma - RF)
- RF se replikuje a vytváří kruhovou jednořetězcovou kopii jednoho vlákna DNA (důsledek přítomnosti specifického signálu na jednom řetězci DNA)
- vzniklé vlákno se opět mění na RF nebo se začleňuje do dceřinných fágových virionů



# Tvorba částic fága M13

- při replikaci fágové DNA se v buňce hromadí mnoho kopií molekul podobných plazmidům
- zároveň se exprimují fágové geny
- fágový protein 5 se váže k ssDNA a zahajuje její přesun k membráně, kde dojde k sestavení dceřinných fágových částic
- viriony nezpůsobují lyzi buňky (matné plaky)

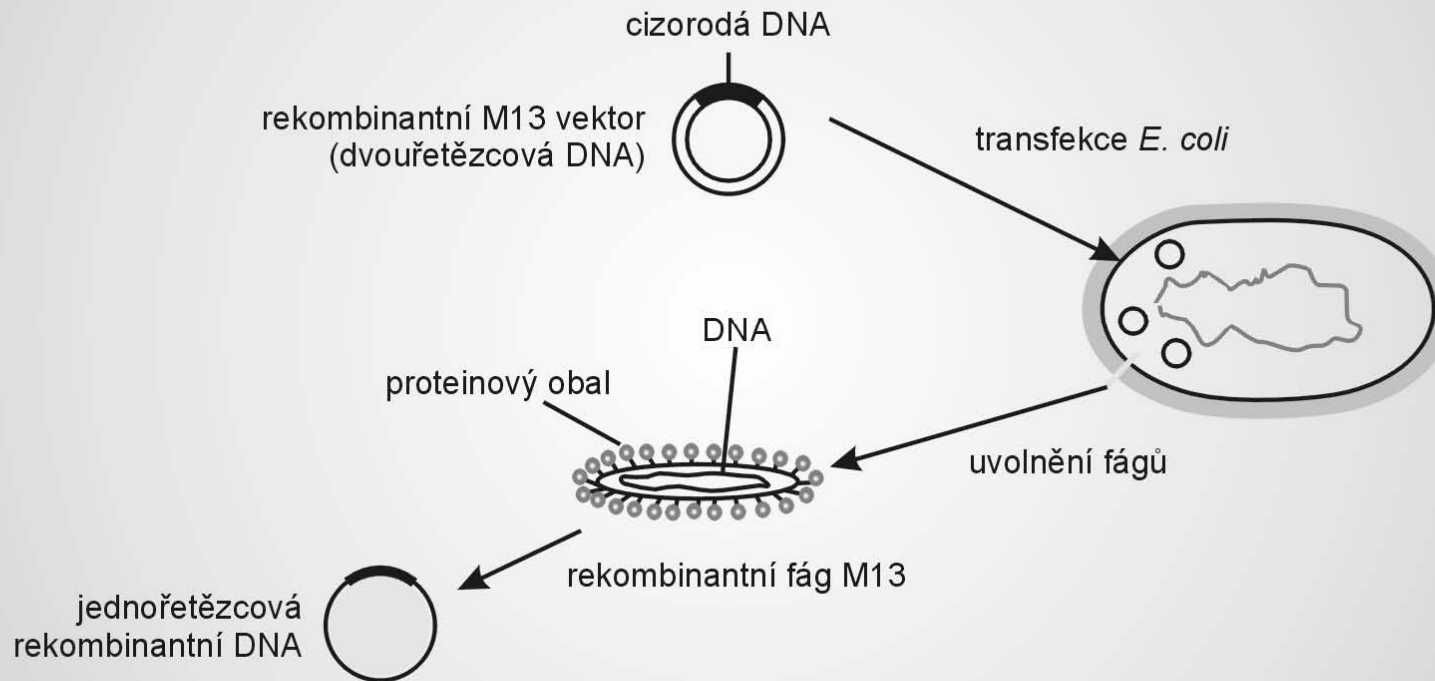


# Výhody vektorů odvozených od M13

- replikace zahrnuje tvorbu ds DNA, kterou lze z buněk izolovat jako plazmidovou DNA a dále s ní jako s plazmidem manipulovat (použít ke klonování)
- významně usnadněno získání ssDNA: do fágových virionů jsou sbalovány jednořetězcové kružnicové molekuly DNA, které lze snadno izolovat
- velikost virionu vláknitého fága je určena délkou molekuly DNA: délka klonované DNA není omezena (lze klonovat fragmenty DNA, jejichž velikost dosahuje několikanásobku délky fágového genomu)
- infikované buňky jsou viabilní: nevznikají plaky, ale zóny pomaleji rostoucích buněk jsou viditelné - lze získat fágy o vysokém titru



# Klonování ve vektorech M13

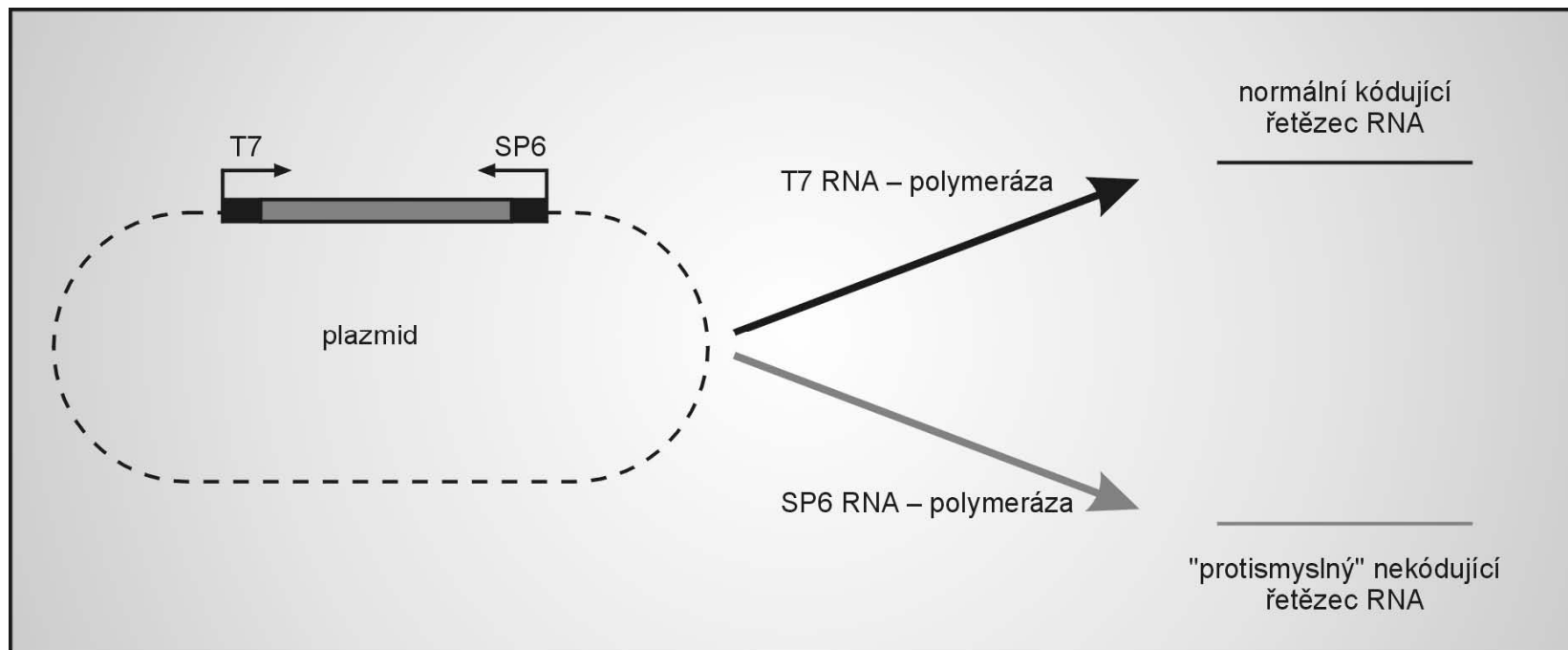


# Expresní vektory

- upraveny nejen pro klonování DNA, ale také pro její **expresi**
- obsahují signály pro:
  - iniciaci transkripce (promotor) *u transkripčních fúzních vektorů*
  - iniciaci transkripce a translace (promotor, RBS a startovní kodon) *u translačních fúzních vektorů*
- cizorodá DNA může být přepisována *in vitro*

na opačných koncích klonovacího místa mohou být umístěny odlišné promotory: umožnění přepisu obou řetězců inzertu

Využití: hybridizační sondy, translace *in vitro*



## 2 typy expresních vektorů

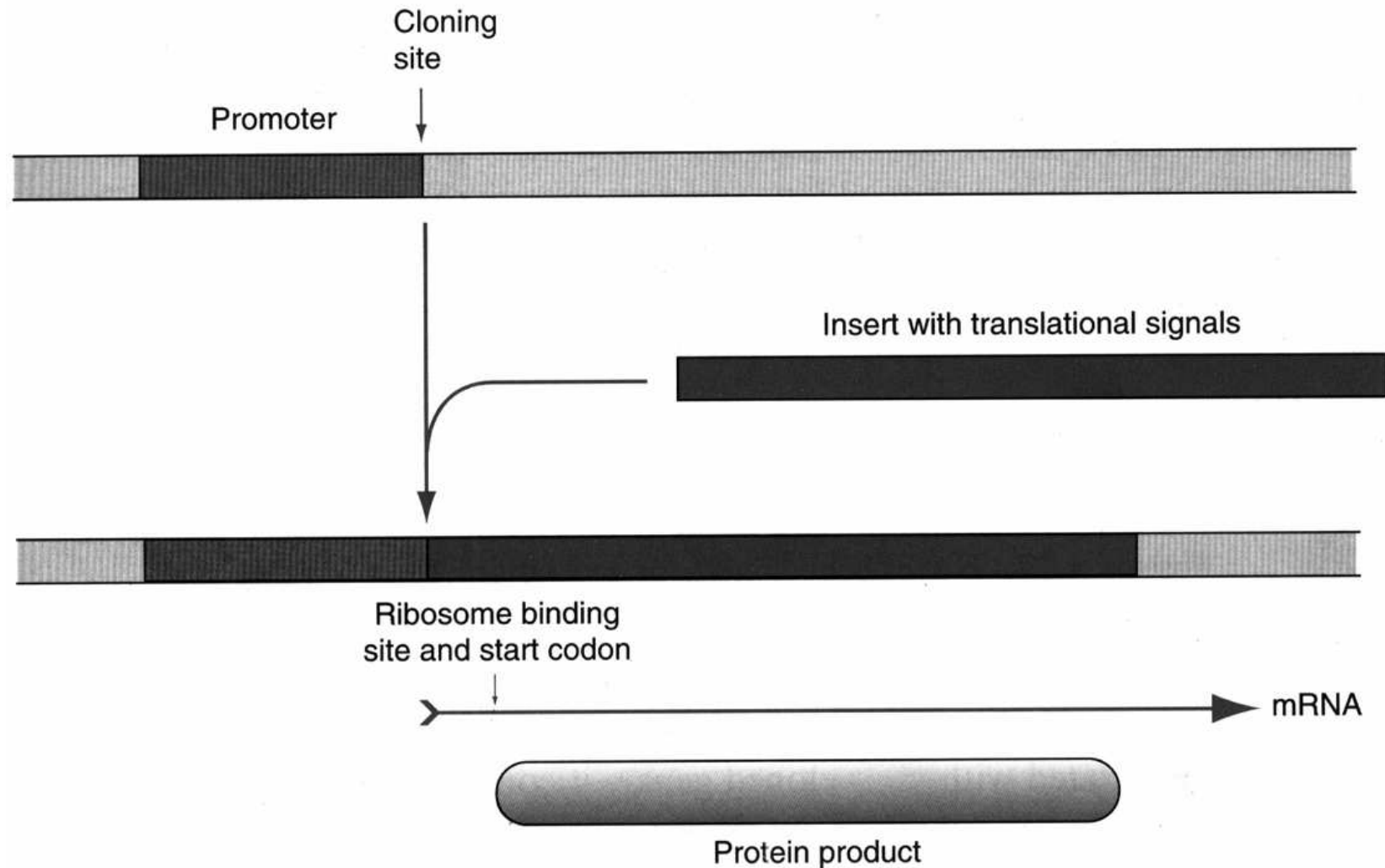
### 1. Transkripční fúzní vektor

- obsahuje promotor
- translační signály poskytuje klonovaná DNA

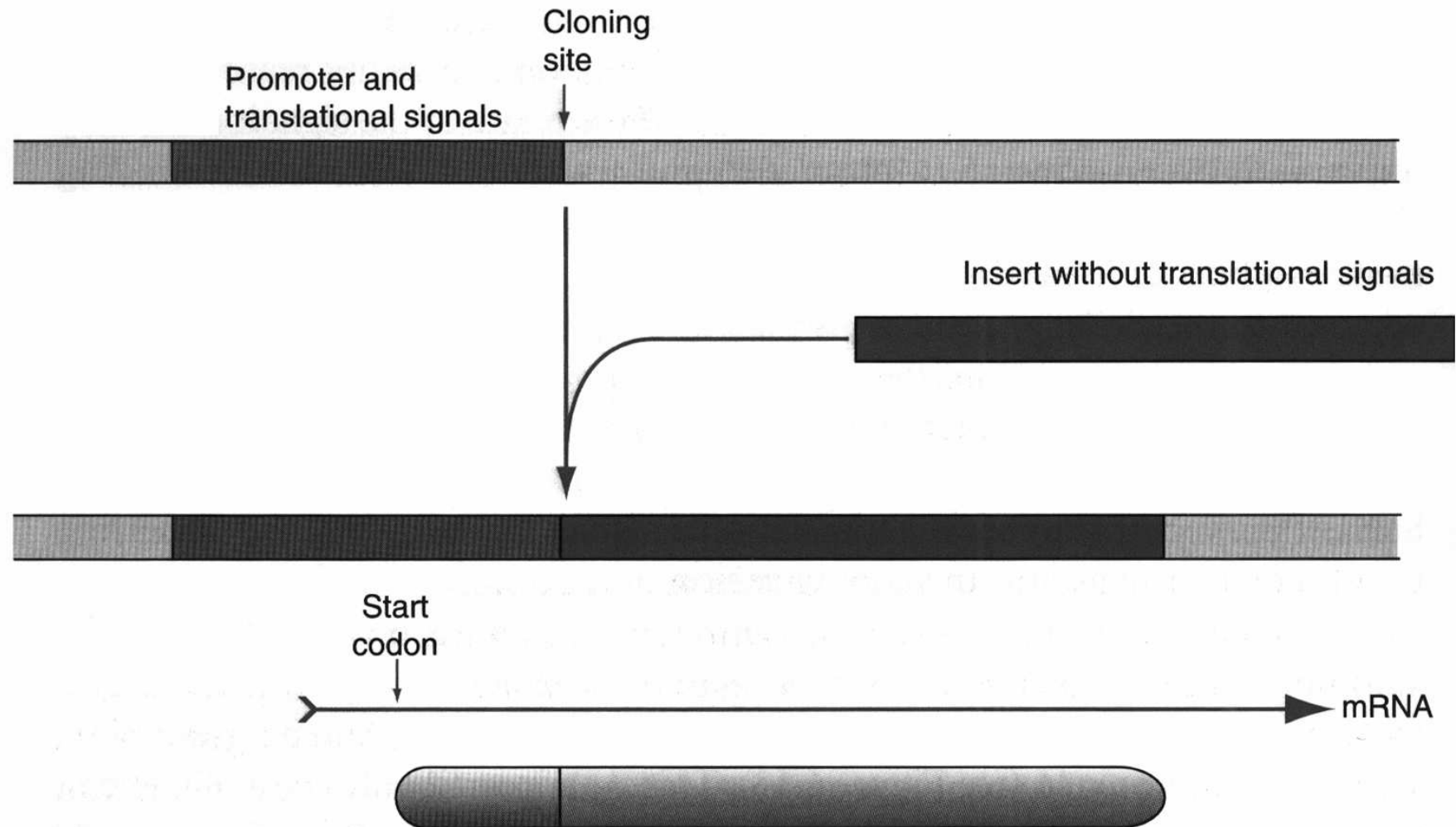
### 2. Translační fúzní vektor

- obsahuje signály pro iniciaci transkripce i translace
- klonovaný fragment se začleňuje do kódující oblasti genu ve vektoru
- inzert musí respektovat čtecí rámeček

# Transkripční fúzní vektor



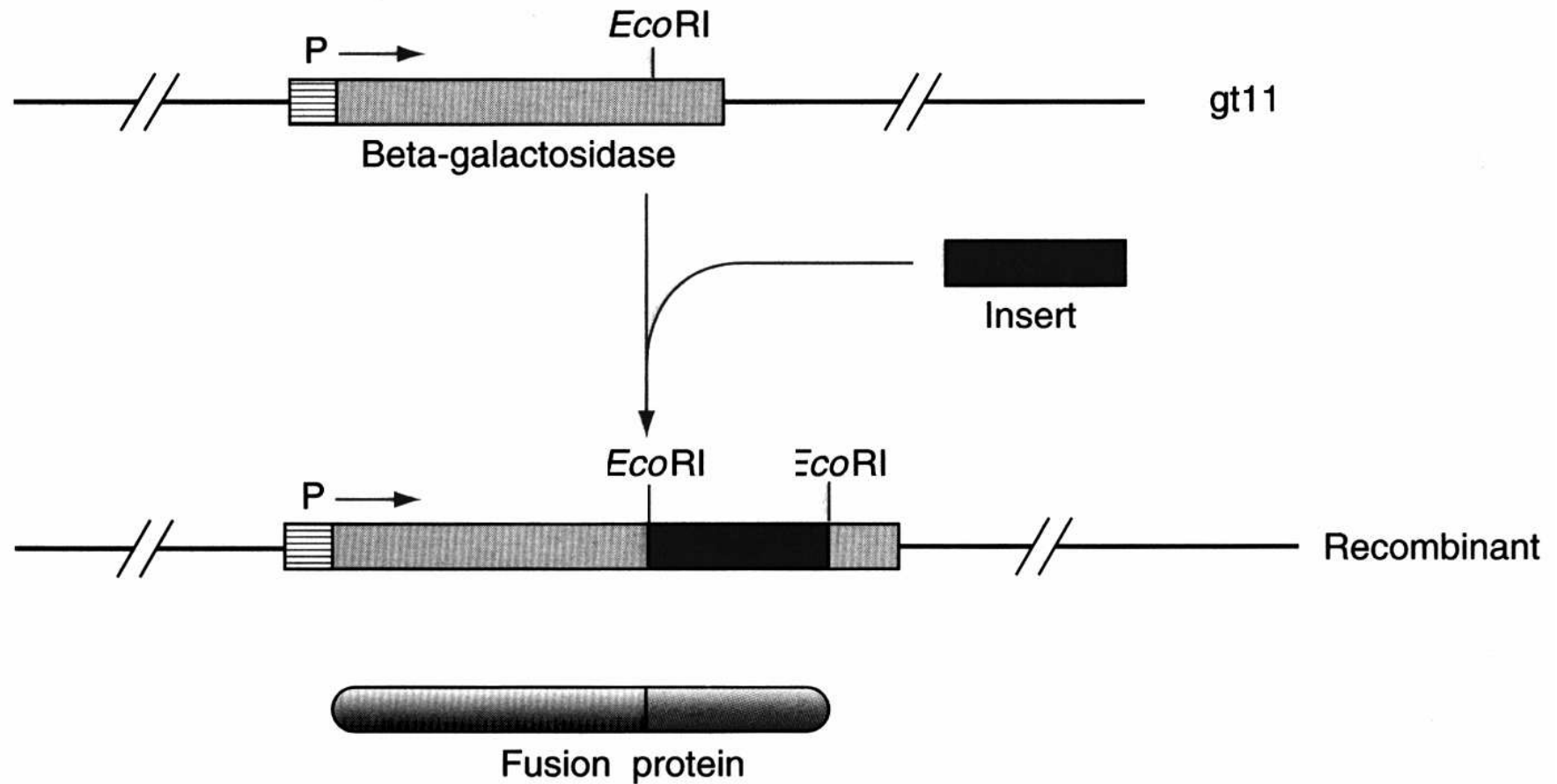
# Translační fúzní vektor



# Expresní vektor $\lambda$ gt11

- inzerční vektor
- obsahuje klonovací místo *EcoRI* uvnitř genu  $\beta$ -*gal*: **inzerce fragmentu inaktivuje  $\beta$ -galaktozidázu - bílé plaky** na médiu X-gal
- pokud je inzert ve správném čtecím rámci, vznikne proteinová chiméra - produkt fúze klonovaného genu a  $\beta$ -*gal*
- protein je možno detekovat protilátkou

# Proteinová chiméra tvořená z vektoru $\lambda$ gt11





# Inducibilita exprese

- nežádoucí exprese z neindukovaných promotorů limituje klonování, pokud je produkt klonovaného genu toxický
- výhodný je promotor fága T7: není rozeznán RNA polymerázou *E. coli*

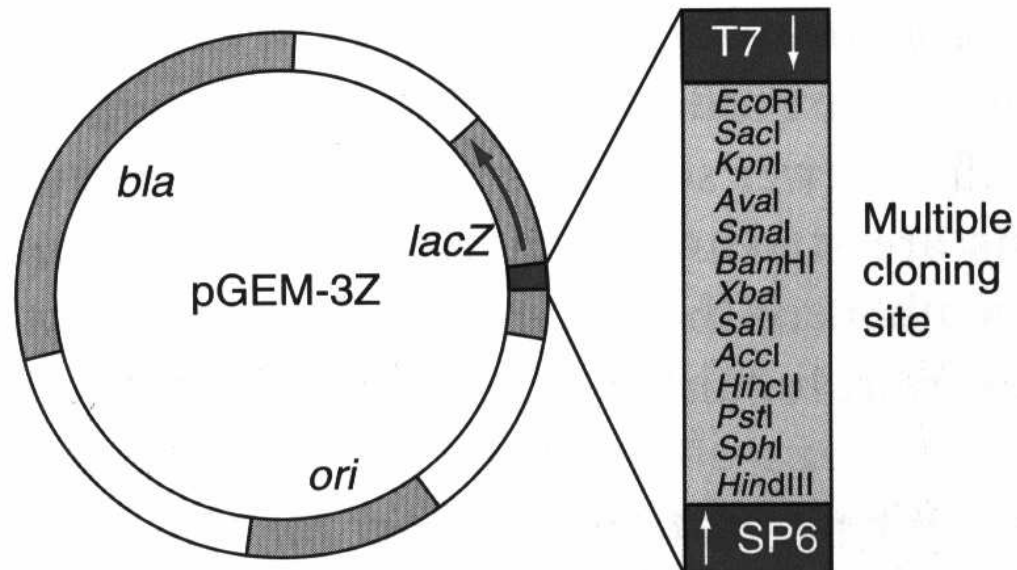
# Využití expresních vektorů

## Postup:

- klonování fragmentu DNA do vektoru pod kontrolu promotoru T7
- přenesení plazmidu do kmene *E. coli*, který obsahuje gen pro T7 RNA polymerázu pod kontrolou *lac* promotoru
- exprese T7 RNA polymerázy je inducibilní IPTG, částečná „netěsnost“ neindukovaného promotoru *lac* se řeší přidáním inhibitorů
- T7 RNA polymeráza zajistí expresi klonovaného genu

# Vektory pGEM

- expresní vektory
- MCS je obklopeno dvěma opačně orientovanými fágovými promotory (T7 a SP6)
- možno snadno získat „sense“ a „antisense“ transkript klonovaného genu



# Vektory pro klonování a expresi v eukaryotických buňkách

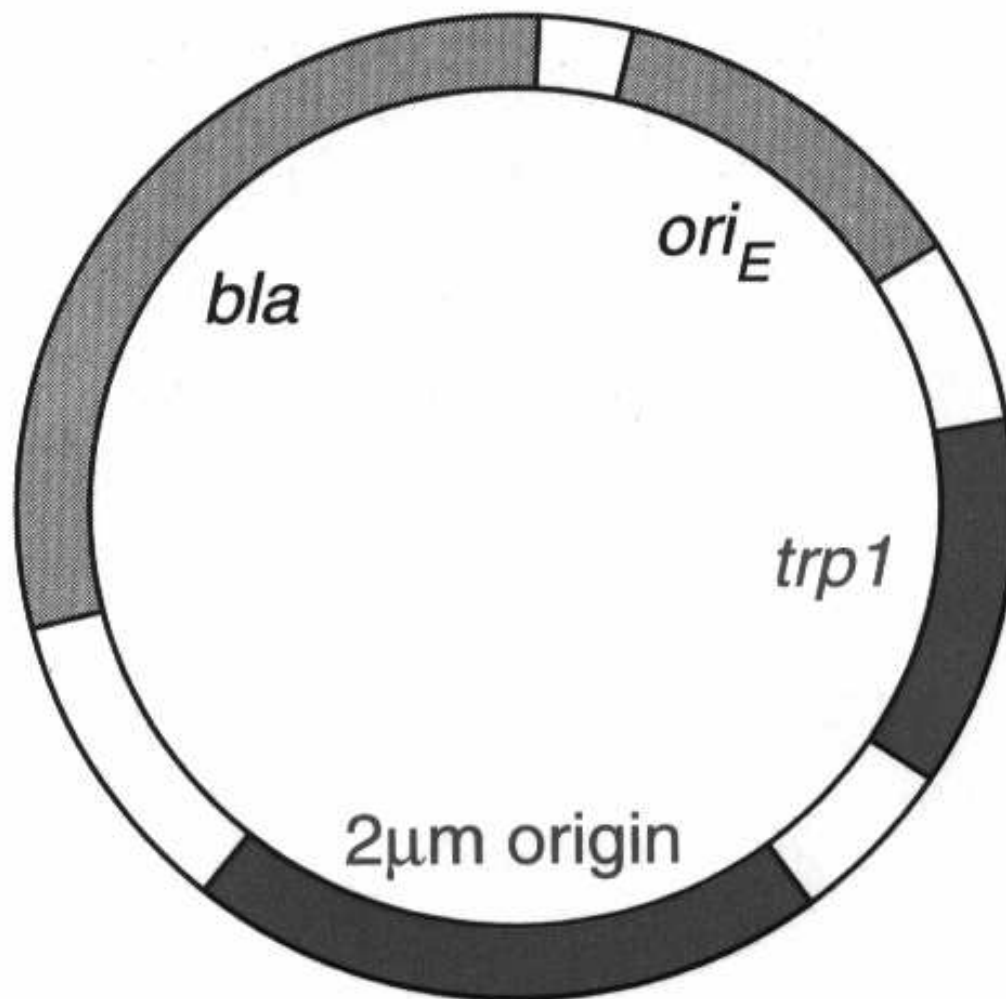
- primární klonování se provádí v bakteriích *E. coli*, následuje přenos do eukaryotických buněk
- v eukaryotických buňkách se často sleduje funkce genu, interakce jeho produktu s jinými proteiny, atd.
- větší důraz na expresi daného genu než na tvorbu genových knihoven (výjimka: vektory YAC)

# Kvasinkové epizomální vektory

Založené na existenci přirozených kvasinkových plazmidů 2  $\mu\text{m}$

- samostatná replikace v kvasinkách
- vysoký počet kopií v buňce (25-100)
- obsahují místo *ori* pro replikaci v *E. coli*
- selekce založena na komplementaci auxotrofních mutací hostitelského kmene např. v genech *trp1*, *ura3*, *leu2*, *his3* (z důvodu nedostatku antibiotik, ke které jsou kvasinky citlivé)
- nesou marker pro rezistenci k antibiotiku pro selekci v *E. coli*

# Kvasinkový epizomální vektor

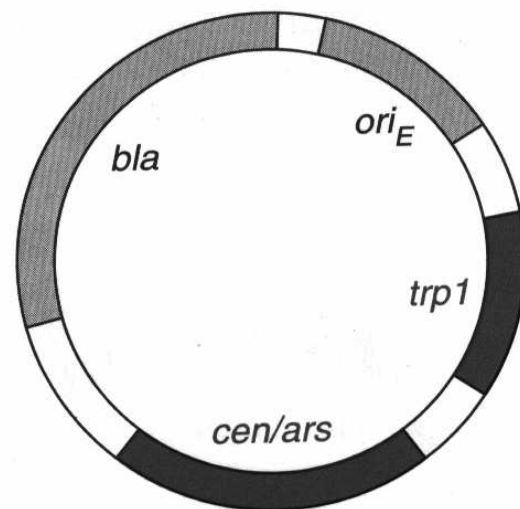


## Nevýhoda kvasinkových epizomálních vektorů

- nízká stabilita v kvasinkových buňkách plynoucí z občasné chybné segregace při mitóze

# Kvasinkové centromerové vektory

- obsahují kvasinkový počátek replikace *ars* „*autonomně se replikující sekvenci*“
- obsahují **centromeru**
- nízký počet kopií v buňce (1-2): výhodné např. pokud je studovaný protein pro buňky škodlivý





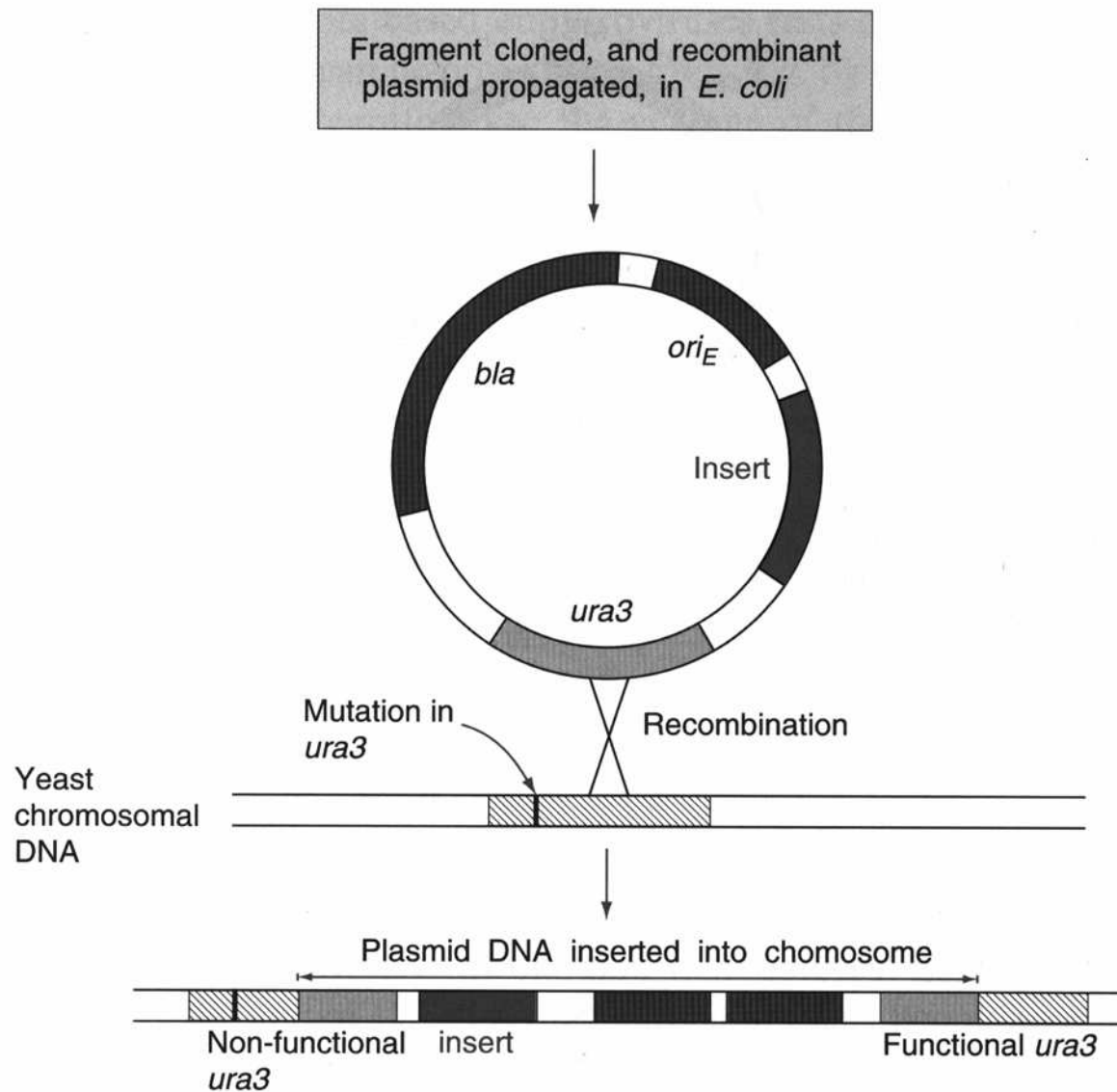
# Expresní kvasinkové vektory

- většina kvasinkových vektorů má zajišťovat expresi klonované sekvence
- obdoba bakteriálních vektorů, signály pro expresi musí respektovat kvasinku jako hostitelský organismus
  - promotory srozumitelné kvasinkám
  - signály pro sekreci
  - signály pro transport do určitých buněčných kompartmentů
- nejsou vhodné pro zajištění excize intronů

# Kvasinkový integrační plazmid (Yip)

- neschopen samostatné replikace
- integruje se do chromozomu homologní rekombinací
- nízká účinnost transformace
- obtížné získání rekombinantního vektoru po transformaci
- výrazně vyšší stabilita než u autonomně se replikujících plazmidů

# Kvasinkový integrační plazmid (Yip)



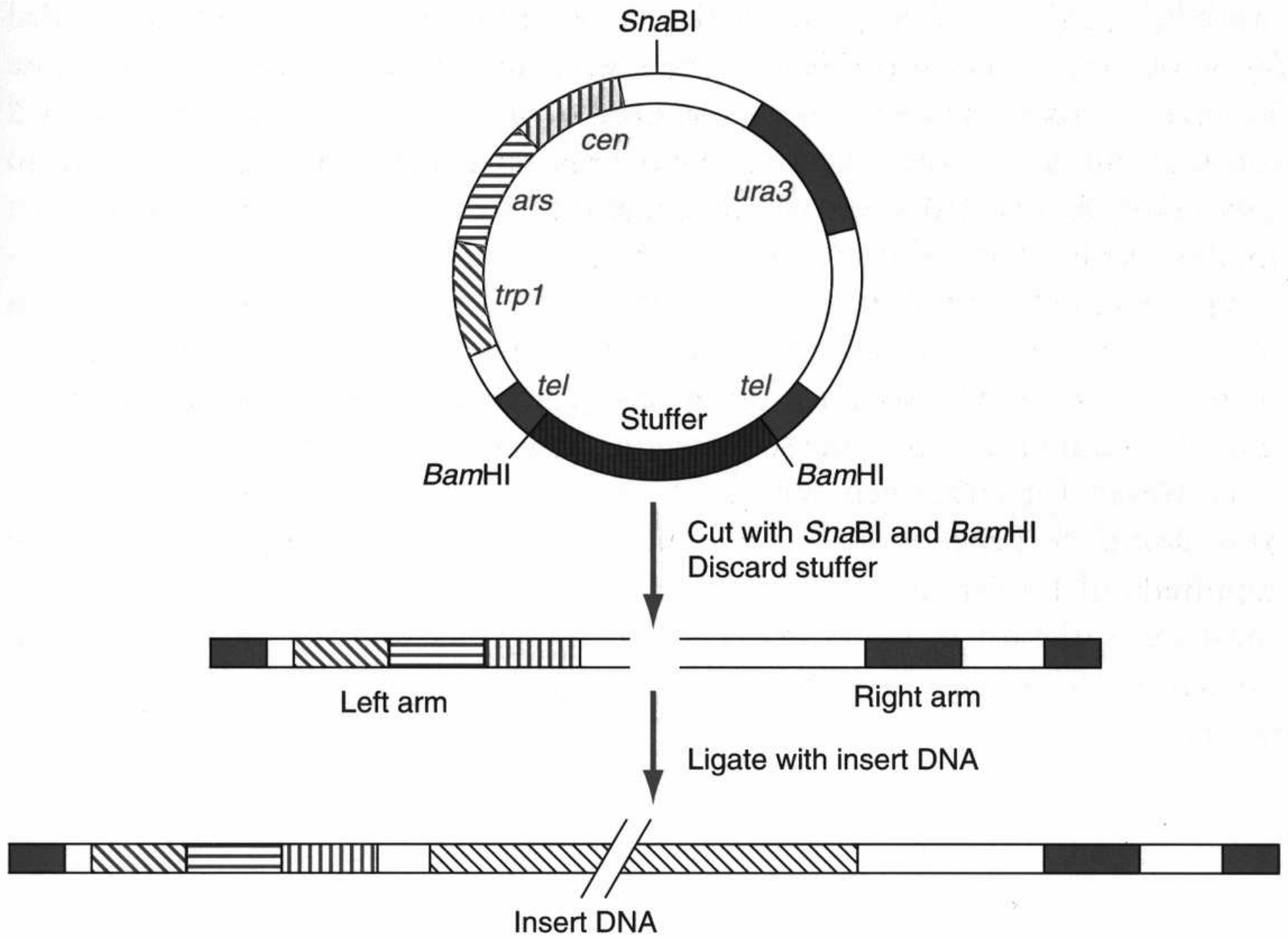
# Umělý kvasinkový chromozom (YAC)

## Obsahuje:

- 2 kvasinkové **telomery**, které umožňují jeho udržování v kvasinkách v lineární podobě
- **centromeru**
- **sekvence pro replikaci**
- **selektovatelné signální znaky**
- replikuje se v buňkách *E.coli* i kvasinkách (kyvadlový vektor)
- vhodný pro klonování velkých fragmentů DNA (0,2 - 2 Mb)

# Klonování v YAC

- propagace v *E. coli*
- odstranění vyplňovacího fragmentu mezi telomerami („stuffer“) restričním štěpením
- vznikají dvě lineární ramena nesoucí selekční markery
- ligace insertu mezi ramena (podobně jako u fága Lambda)
- transformace kvasinkových buněk (sféroplastů)
- selekce založená na komplementaci auxotrofních markerů (rekombinanti obsahují obě ramena)
- sekvence *te/v* transformantech zajistí tvorbu funkčních telomer



# YAC

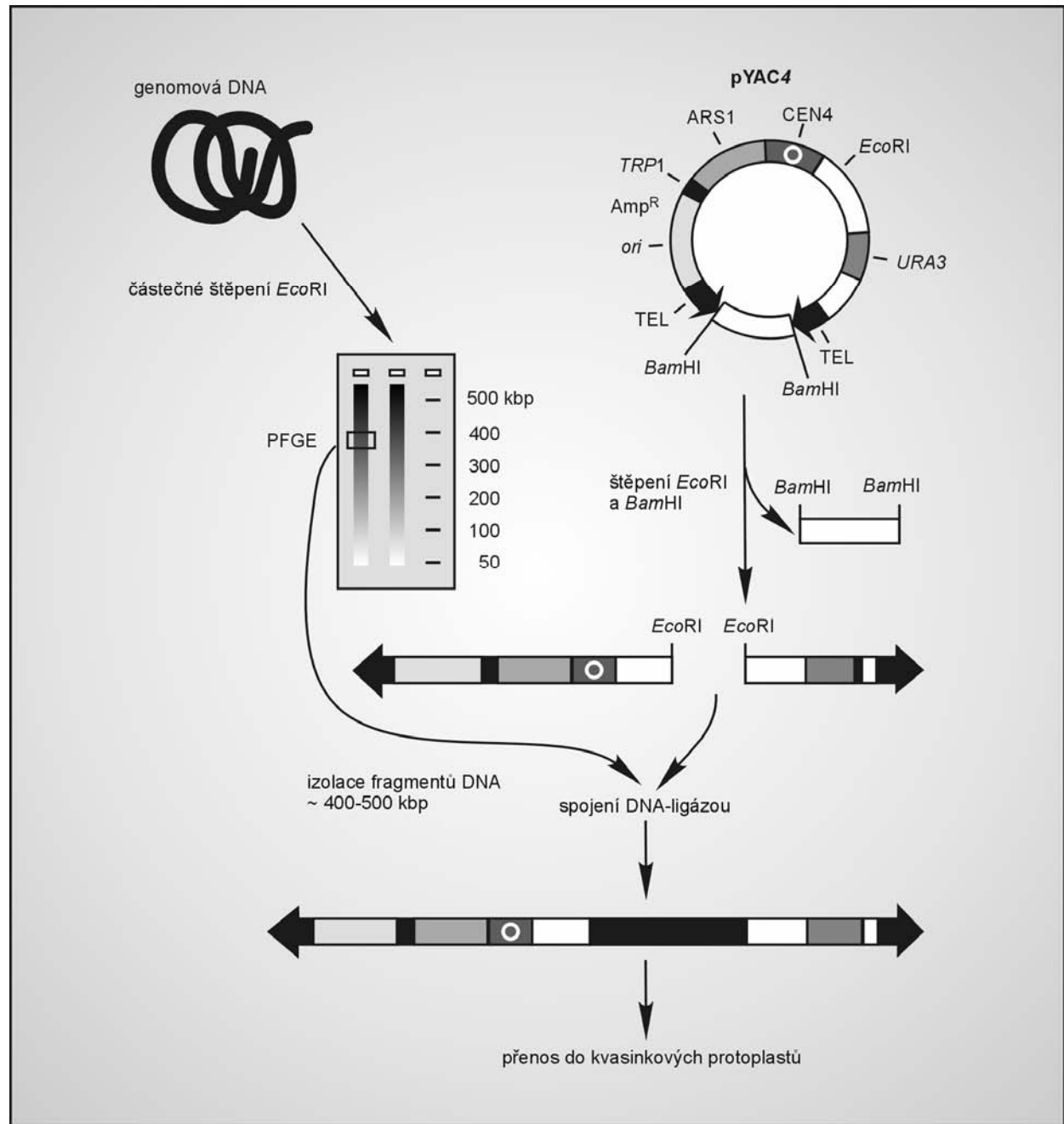
## Výhody:

- vysoká klonovací kapacita
  - lze klonovat celé eukaryotické geny, včetně regulačních sekvencí

## Nevýhody:

- nižší stabilita inzertu (možnost vnitřní rekombinace)
- obtížná purifikace

# Klonování genů v YAC





# PAC a BAC

- bakteriální vektory s nižší klonovací kapacitou než YAC
- **PAC** = umělý chromozom odvozený od bakteriofága P1, který pojme inserty o velikosti kolem 150 kb
- **BAC** = vektor založený na F plazmidu, který pojme inserty až do velikosti 300 kb
- výrazně vyšší stabilita než YAC
- hojně používané u sekvenačních projektů

# Vektory pro savčí buňky

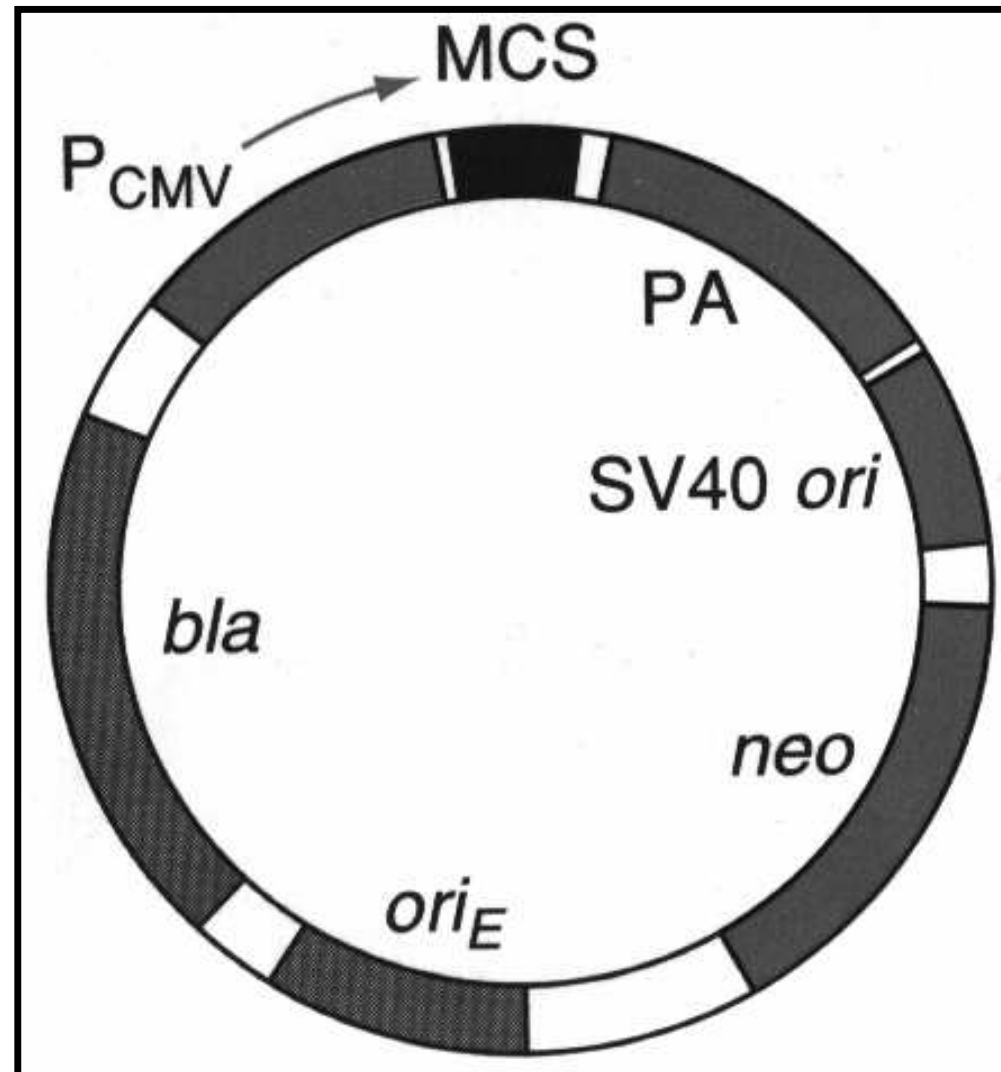
- replikace extrachromozomálních elementů typu plazmidů je v savčích buňkách obtížná
- vektory s počátkem replikace viru SV40 se replikují epizomálně v některých savčích buňkách (např. v buňkách COS)
- stabilní klony většinou vznikají po začlenění DNA do chromozomu

# Vektory pro savčí buňky

Obsahují signály, které savčí buňka vyžaduje pro zajištění genové exprese:

- obvykle odvozeny od virů (SV40, CMV)
- promotor (např. CMV) (vysoká konstitutivní exprese)
- polyadenylační signál (zvýšení stability mRNA)
- počátek replikace *ori* (např. SV40)
- počátek replikace *E. coli*
- bakteriální selekční marker (*bla*)
- selekční marker pro savčí buňky *neo* (rezistence na antibiotikum G418 - geneticin)

# Vektory pro savčí buňky



# Retrovirové vektory

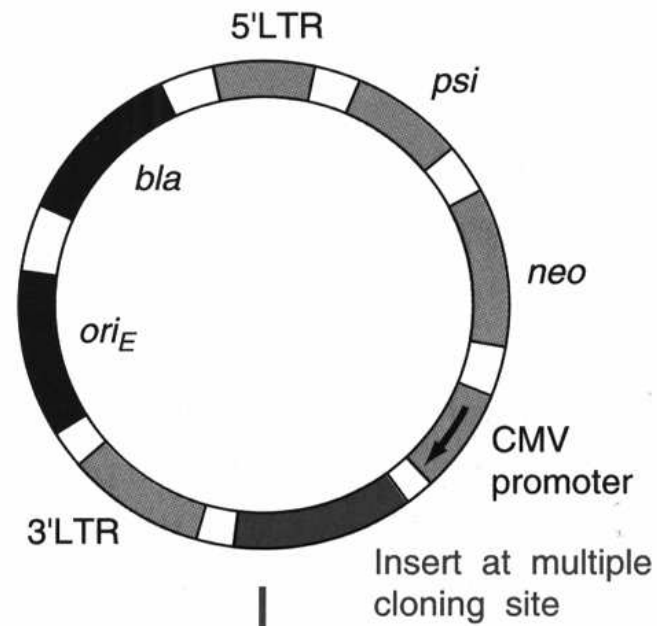
- využití schopnosti retrovirů zajistit integraci DNA do genomu
- využití možnosti „trans“ komplementace retrovirových funkcí defektním pomocným („helper“) virem
- funkce, které nelze „trans“ komplementovat, musí být přítomny na samotném vektoru (LTR a místo *psi*)

# Retroviry

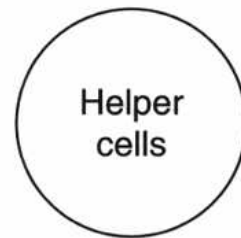
- RNA genom
- v infikované buňce se RNA kopíruje do dvouřetězcové DNA *zpětnou transkriptázou*
- zpětná transkriptáza je obsažena ve virionu a vstupuje do buňky zároveň s RNA
- DNA se cirkularizuje a integruje do DNA hostitelské buňky působením *integrázy*
- integrovaná DNA je ohraničena sekvencemi LTR
- LTR obsahuje promotor pro transkripci genů *gag, pol, env*
- transkripty se sbalují do virových částic pomocí domény *psi*
- sestavené částice pučí ven z buňky, aniž ji lyzují a získávají tak glykoproteiny z hostitelské buněčné membrány

# Klonování do retrovirových vektorů

- využití možnosti propagace v *E. coli* - vytvoření rekombinantní verze plazmidu a její namnožení v bakteriích
- transfekce speciální buněčné linie („*helper cells*“), která ve svém genomu obsahuje geny *gag*, *pol* a *env*
- transfekované buňky budou tvořit viriony obsahující RNA kopii vytvořeného konstruktu
- virové částice mohou infikovat jiné buňky, které neobsahují integrované esenciální geny
- přítomnost zpětné transkriptázy a integrázy ve virionech zajistí konverzi RNA do DNA a její stabilní integraci do genomu
- další viriony se nevytvoří

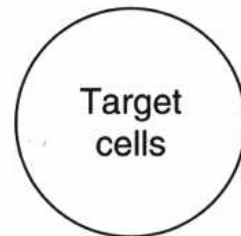


Transfection



Virus particles

Infection



Select and analyse



# Klonovací kapacita vektorů

Klonovací vektor	Velikost inzertu
Běžné plazmidové vektory	0-10 kb
$\lambda$ Inzerční vektory	0-10 kb
$\lambda$ Substituční vektory	9-23 kb
Kosmidové vektory	30-44 kb
PAC vektory	130-150kb
BAC vektory	$\leq 300$ kb
YAC vektory	0.2 - 2.0 Mb