

Molekulární biotechnologie

Č.3

Základní kroky při přenosu genů – klonovací vektory (Glick a spol.2006)

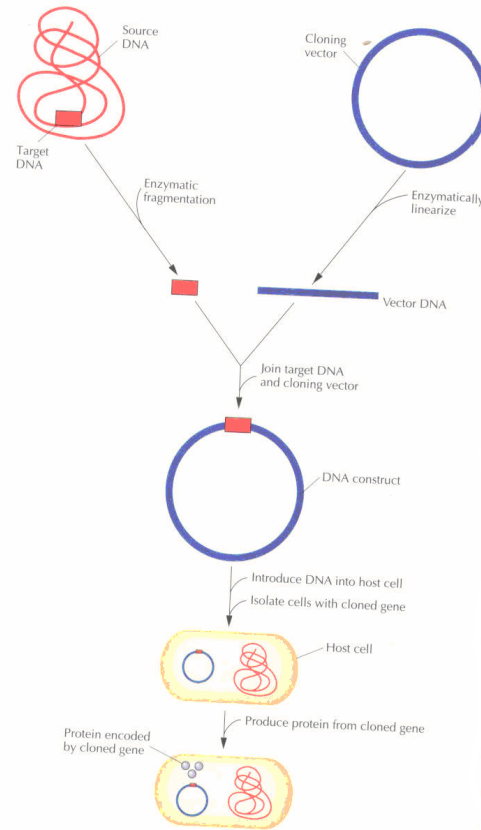


Figure 4.1 Recombinant DNA cloning procedure. DNA from a source organism is cleaved with a restriction endonuclease and inserted into a cloning vector. The cloning vector-insert DNA construct is introduced into a target host cell, and those cells that carry the construct are identified and grown. If required, the cloned gene can be expressed (transcribed and translated) in the host cell, and the protein (recombinant protein) can be harvested.

DNA (cílová, cizorodá, klonovaná)

- Je izolována z donorového organismu a
- enzymaticky naštěpena na fragmenty.
- Fragmenty jsou včleněny do jiné molekuly DNA (klonovací vektor)
- za vzniku rekombinantní DNA (konstrukt vektor-insert)

Jako klonovací vektory

- Se využívají plasmidy - autonomní samoreplikující se genetické elementy
- Upravené tak, aby měly žádoucí vlastnosti

Vlastnosti klonovacího vektoru vysoké kvality

- Malá velikost (účinnost přenosu do *E.coli* se snižuje u plasmidů nad 15 kb)
- Přítomnost 1 cílového místa pro restriční nukleázu (pro vnesení cizorodé DNA)
- Vhodný selekční marker pro identifikaci buněk, které nesou plasmid

Klonovací vektor pBR322

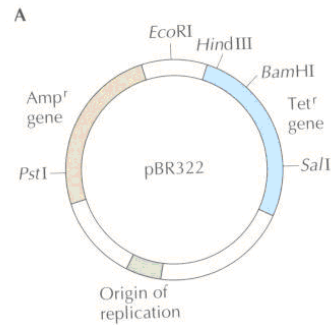
- První klonovací vektor
- Funkční v *E. coli*
- 40 kopií/buňku
- 4361 bp
- nekonjugativní

Plasmid pBR322 – základní genetické elementy

- Místo ori (počátek replikace) funkční v *E. coli*
- Gen pro resistenci k ampicilinu s jedním cílovým místem pro *PstI*
- Gen pro resistenci k tetracyklinu s jedním cílovým místem pro *HindIII*, *BamHI* a *SalI*
- Jedno cílové místo pro *EcoRI* mimo kódující oblasti

Genetická a fyzikální mapa plasmidu pBR322 (Glick a spol. 2006)

Figure 4.8 Plasmid pBR322. A. Genetic map of the plasmid cloning vector pBR322. Unique *Hind*III, *Sal*I, *Bam*HI, and *Pst*I recognition sites are present in the genes for tetracycline resistance (*Tet*^r) and ampicillin resistance (*Amp*^r). The unique *Eco*RI site is just outside the tetracycline resistance gene. The origin of replication functions in the bacterium *E. coli*. The complete DNA sequence of pBR322 consists of 4,361 bp. B. Electron micrograph of plasmid pBR322. Magnification, ×100,000. Courtesy of K. G. Murti/©Visuals Unlimited.



B



Použití plasmidu pBR322 jako klonovacího vektoru – 2 kroky

- Vložení cizorodého fragmentu DNA do plasmidu (příprava rekombinantní DNA)
- Transformace a selekce transformantů nesoucích rekombinantní DNA

Pro vložení cizorodého fragmentu DNA

- jsou k dispozici cílová místa pro restriktázy lokalizovaná v genech pro rezistenci na antibiotika (ampicilin, tetracyklin)

Vložení cizorodého fragmentu DNA do plasmidu pBR322

- Plasmidová DNA je štěpena restriktázou, která má jediné cílové místo v některém genu pro resistenci k antibiotiku
- Vzniknou lineární molekuly plasmidové DNA s přečnávajícími konci se sekvencemi nukleotidů podle použitého enzymu
- Tyto linearizované molekuly jsou smíchány s cílovou DNA, která byla naštěpena stejnou restriktázou
- Směs je inkubována s DNA ligázou (T4 DNA ligáza) za přítomnosti ATP)
- Klonuje se do *Pst*I místa v genu pro resistenci k ampicilinu (vkládají se fragmenty DNA získané po naštěpení DNA enzymem *Pst*I)
- Klonuje se do *Bam*HI, *Hind*III nebo *Sal*I místa v genu pro resistenci na tetracyklin (vkládají se fragmenty získané po naštěpení DNA enzymem *Bam*HI, *Hind*III nebo *Sal*I)

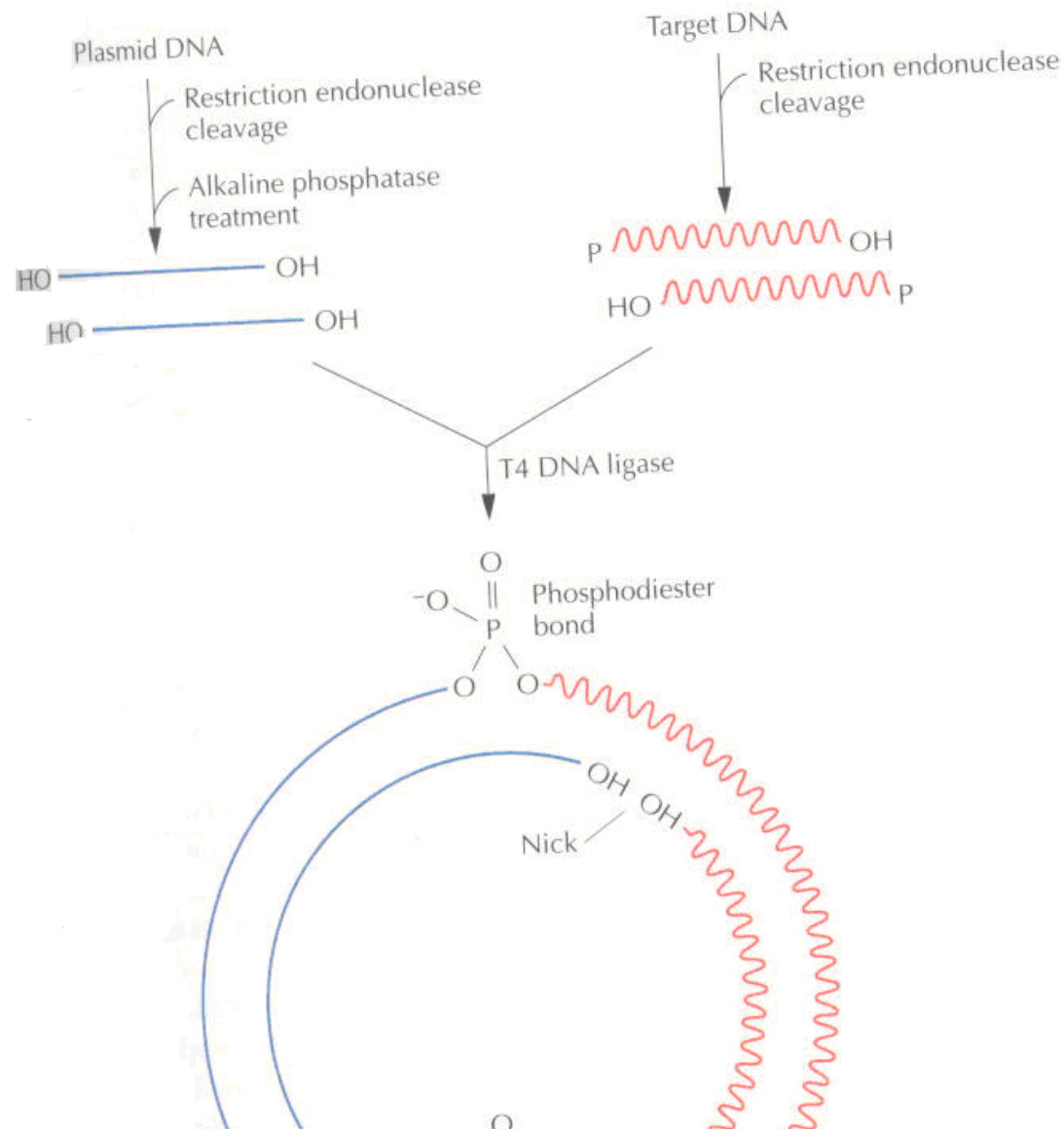
Působením T4 ligázy

- Vznikají rekombinantní DNA molekuly (plasmid-insert)
- Dochází k recirkularizaci plasmidu

Recirkularizaci linearizovaného plasmidu se zamezí

- odstraněním fosfátových skupin alkalickou fosfatázou

Ostranění fosfátových skupin alkalickou fosfatázou (Glick a spol. 2006)



Vznik rekombinantní DNA se zlomy (nicky)

- Dvě fosfodiesterové vazby mezi plasmidovou DNA a klonovaným DNA fragmentem udrží obě molekuly pohromadě
- Zlomy v rekombinantní DNA jsou po transformaci opraveny reparačním systémem bakteriální buňky

Vpravení klonované DNA do buněk *E. coli*

- Se nazývá transformace
- Chemická transformace je málo účinná (transformováno méně než 0.01% buněk)
- Většina buněk plasmid nezíská
- Některé buňky získají recirkularizovaný plasmid
- Některé buňky získají jinou DNA než plasmidovou
- Pouze část buněk obsahuje správný DNA konstrukt

K rozlišení buněk, které získaly po transformaci cizorodou DNA slouží

- Selektivní markery
- Jsou to geny pro rezistenci k antibiotikům
- Umožňují rozlišit buňky (transformanty), které nesou nerekombinantní a rekombinantní DNA

Antibiotika používaná pro selekci (Glick a spol. 2006)

Table 4.4 Some antibiotics commonly used as selective agents

Antibiotic	Description
Ampicillin (Ap, Amp)	Inhibits cell wall formation; inactivated by β -lactamase
Hygromycin B (HygB)	Blocks translocation from amino acyl site to peptidyl site; inactivated by a phosphotransferase
Kanamycin (Km, Kan)	Binds to 30S subunit and prevents translocation from aminoacyl-tRNA site to peptidyl site; inactivated by a phosphotransferase
Neomycin (Nm, Neo)	Binds to 30S subunit and inhibits protein synthesis; inactivated by a phosphotransferase
Streptomycin (Sm, Str)	Blocks protein initiation complex formation and causes misreading during translation; inactivated by a phosphotransferase
Tetracycline (Tc, Tet)	Prevents binding of aminoacyl-tRNA to 30S ribosomal subunit; resistance gene encodes an inner cell membrane protein that passes the antibiotic out of the cell and blocks the passage of the antibiotic through the cell wall

Transformace se provádí do buněk *E.coli*

- *E.coli* citlivých na tetracyklin a ampicilin
- (rozmezí hostitele záleží na místě *ori* na plasmidu)

Selekce transformantů nesoucích rekombinantní pBR322 DNA

- se provádí podle toho, do kterého cílového místa pro restriktázu byl klonován cizorodý fragment DNA

Selekce transformantů s rekombinantní DNA se provádí ve dvou krocích

- Klónujeme-li do *Bam*HI místa (v genu pro resistenci na tetracyklin) porušíme gen pro rezistenci na tetracyklin.
- Transformanty se vysévají nejprve na misky s ampicilinem. Tam narostou všechny ampicilin rezistentní transformanty (kolonie), co získaly plasmid.
- V druhém kroku se rozlišuje mezi transformanty, co získaly rekombinantní a nerekombinantní plasmid výsevem na misky s tetracyklinem
- Rekombinantní plasmid s cizorodou DNA nesou transformanty citlivé na tetracyklin.

Selekce transformantů s rekombinantní DNA se provádí ve dvou krocích

- Klonujeme-li do restrikčních míst v genu pro resistenci na ampicilin, dojde k porušení tohoto genu
- Transformanty jsou testovány výsevem na misku s tetracyklinem. Tam narostou (vytvoří kolonie) buňky, co získaly plasmid
- Tyto jsou v dalším kroku testovány výsevem na misky s ampicilinem
- Rekombinantní plasmid s cizorodou DNA nesou transformanty citlivní na ampicilin (a rezistentní) na tetracyklin.
- K analýze transformantů lze použít tzv. bakteriologické razítko

Význam *EcoRI* místa v DNA pBR322

- Pro linearizaci a stanovení velikosti
- nerekombinantního plasmidu (bez cizorodého fragmentu DNA) a
- rekombinantního plasmidu.
- Velikost plasmidu se stanoví pomocí agarózové gelové elektroforézy (spolu se standardy o známé délce)

Nevýhody plasmidu pBR322 jako klonovacího vektoru

- Malý počet klonovacích míst
- Časově náročnější selekce buněk nesoucích rekombinantní plasmid (2 dny)

Plasmidový vektor pUC19

- Připraven genetickými manipulacemi
- Funkční v *E. coli*
- 1000 kopií na buňku
- 2686 bp
- nekonjugativní

Plasmid pUC19 – základní genetické elementy

- Místo ori (počátek replikace, z plasmidu pBR322)
- Gen pro resistenci k ampicilinu (selekční marker)
- Mnohočetné klonovací místo (polylinker) s cílovými místy pro 20 restriktáz
- Část laktóзовého operonu z *E. coli* (regulační oblast s *lacI* genem a *lacZ'* genem)
- *lacI* gen kóduje represor, který reguluje expresi laktóзовého operonu vazbou na P
- *lacZ'* gen, který kóduje N terminální část betagalaktosidázy
- Mezi *lacI* a *lacZ'* je umístěno mnohočetné klonovací místo (polylinker) tak, že není narušen čtecí rámeček

Klonovací vektor pUC19 – genetická mapa (Glick a spol. 2006)

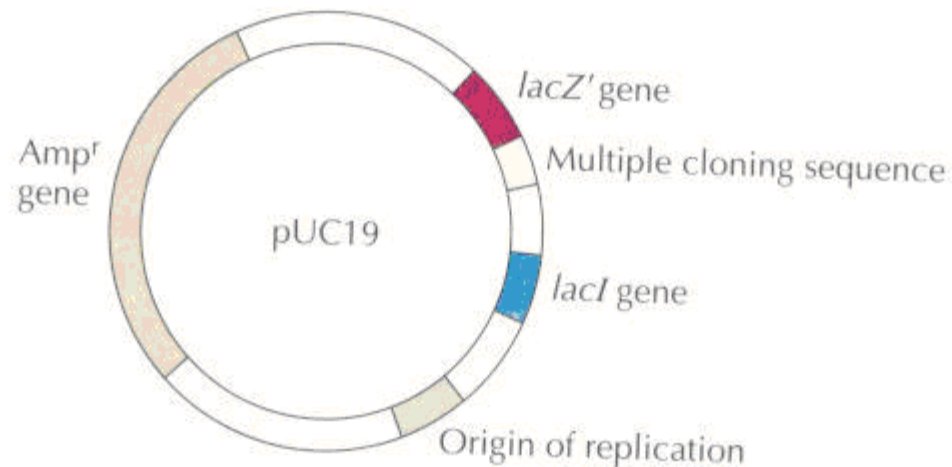
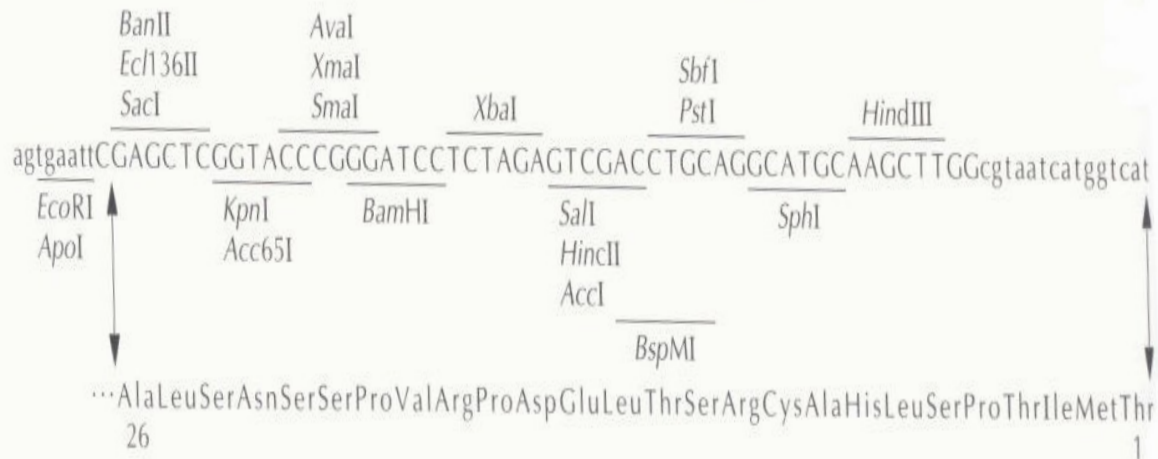


Figure 4.10 Genetic map of the plasmid cloning vector pUC19. The multiple cloning site contains unique sites for the restriction endonucleases that are used for the insertion of cloned DNA. The plasmid contains an ampicillin resistance gene, an origin of replication that functions in *E. coli*, and the *lacI* gene, which produces a repressor that blocks the transcription of the *lacZ'* gene in the absence of the inducer IPTG. The complete DNA sequence of pUC19 is 2,686 bp long.

Mnohočetné klonovací místo (polylinker) plasmidu pUC19 (Glick a spol. 2006)

Figure 4.11 Plasmid pUC19 multiple cloning site. The multiple cloning site (uppercase nucleotides) is inserted into the *lacZ'* gene (lowercase nucleotides). Some of the unique restriction endonuclease sites of the multiple cloning site are named and demarcated by horizontal lines. The double arrows mark the *lacZ'* / multiple cloning site DNA sequence that encodes the first 26 amino acids of the hybrid LacZ' protein. Insertion of DNA into any of the unique restriction endonuclease sites of the multiple cloning site invariably changes the reading frame of the *lacZ'* gene and prevents the correct translation of the LacZ' protein.



Jak funguje pUC19 jako klonovací vektor

- Plasmidová DNA je štěpena některou restriktázou, která má jediné cílové místo v mnohočetném klonovacím místě
- Vzniknou lineární molekuly s přečnávajícími konci podle použitého enzymu
- Linearizované molekuly jsou (po defosforylaci alkalickou fosfatázou) smíchány s fragmentem cílové DNA, která byla naštěpena stejnou restriktázou
- Směs je inkubována s T4 ligázou (v přítomnosti ATP) a transformována do buněk *E. coli*, vhodných pro selekci transformantů nesoucích rekombinantní plasmid pUC19

Transformace se provádí do

- buněk *E. coli* , které nesou delecii (Δ M15) v genu pro beta-galaktosidazu a které jsou citlivé na ampicilin
- V buňkách se syntetizuje C terminální část beta galaktosidázy, která není funkční
- Hostitelské buňky nevyužívají laktózu a ani nehydrolyzují substrát X-gal
- Na médiu s laktózou rostou béžově
- Na médiu s X gal tvoří bílé kolonie

Alfa komplementace

- Získají-li buňky *E. coli* Δ M15 chybějící část genu pro beta galaktozidázu (tj. gen *lacZ'*), v buňkách se syntetizuje jak C terminální tak N terminální část proteinu
- obě části proteinu v cytoplasmě komplementují za vzniku funkční beta galaktosidázy (a buňky využívají laktózu a hydrolyzují X-gal)
- Na miskách s Mac Conkey agarem rostou červeně, na miskách s Xgal rostou modře
- Chybějící část genu pro beta galaktosidázu mohou získat spolu s nerekombinantním plasmidem pUC19

Selekce transformantů se provádí

- Se provádí v jednom kroku
- Transformanty jsou vysety na LB misky s ampicilinem a X-gal substrátem (a IPTG, který inaktivuje represor)
- Vyrůstou všechny kolonie (transformanti), co získaly plasmid
- Vysévat lze i na Mc Conkey agar s ampicilinem a IPTG

Selekce transformantů nesoucích rekombinantní a nerekombinantní DNA pUC19

- Využívá toho, že díky inserci cizorodé DNA se poruší gen *lacZ'*
 - Kolonie transformantů se odlišují zabarvením
 - **modře rostou** kolonie, co získaly nerekombinantní plasmid, protože se v buňkách tvoří funkční beta galaktosidáza, která štěpí X-gal
 - **bíle rostou** kolonie, co získaly rekombinantní plasmid a v jejichž buňkách se netvoří funkční beta galaktosidáza a nedochází k štěpení X-gal
- tzv. Modro-bílá selekce**

Na Mac Conkeyho agaru je selekce červeno-béžová

Isopropylthiogalaktosid - IPTG

- Se váže na represor (produkt genu *lacI* laktózového operonu)
- Díky této vazbě dojde k uvolnění represoru z operátoru
- To umožní navázání RNA polymerázy na promotor
- a transkripci (a následnou translaci) genu *lacZ'*

Dvě funkce klonovacích míst na vektoru

- Inserce cizorodé DNA
- Excise cizorodé DNA
- K excisi se používá stejná restriktáza, která byla použita pro inserci

- PřF 5.10.2010
- 7.10. FCh