

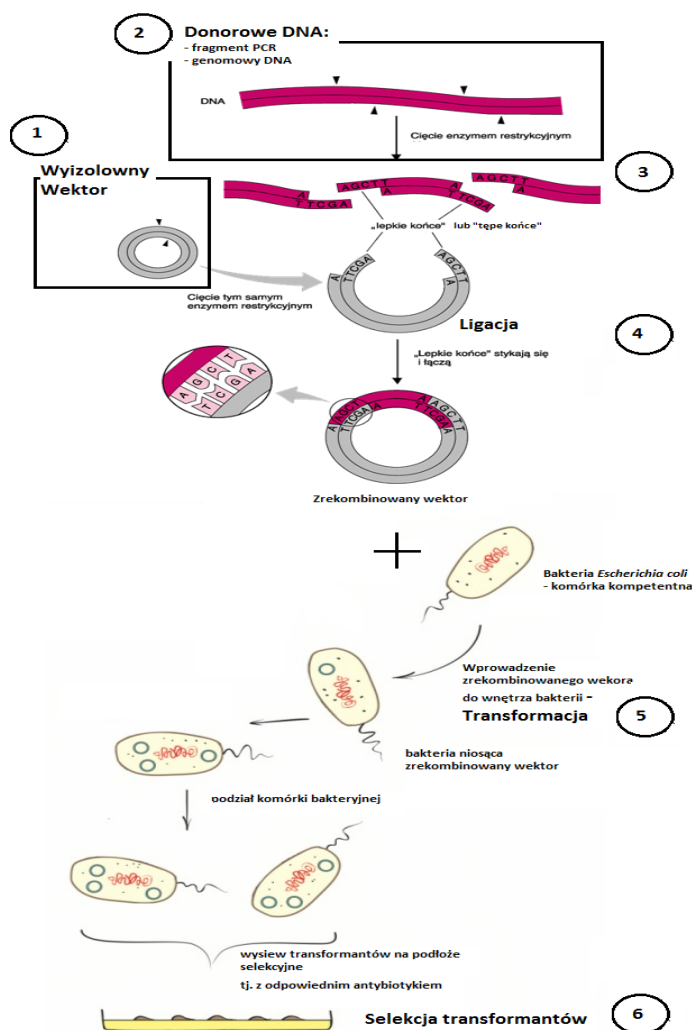
Ćwiczenia 1 Wirtualne Klonowanie

Prowadzący: mgr Anna Pawlik i mgr Maciej Dylewski

Część teoretyczna:

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z planowaniem konstrukcji zrekombinowanego wektora, czyli klonowania genów – klonowanie *in silico*. Do tego celu wykorzystamy program komputerowy Serial Cloner. Ćwiczenia 2-4 będą obejmowały realizację klonowania genu z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej w warunkach laboratoryjnych – klonowanie w praktyce, na stole laboratoryjnym.



Rysunek 1 Schemat klonowania.

Poniżej zostały wymienione etapy klonowania genu wraz z zaznaczeniem, na których ćwiczeniach dany etap będzie wykonywany oraz jaki rodzaj DNA będzie stanowił materiał badawczy podczas ćwiczeń (rys. 1):

1. Wybór i izolacja wektora: wektor pUC18. Instrukcja do ćwiczeń: podpunkt I. Realizacja: ćwiczenie 2
2. Przygotowanie wstawki (z wykorzystaniem reakcji PCR) Instrukcja do ćwiczeń: podpunkt II. A. Realizacja: ćwiczenie 3
3. Trawienie restrykcyjne wektora: enzymami BamHI oraz PstI, oraz modyfikacja końców wstawki (enzymem fosforylującym końce DNA). Instrukcja do ćwiczeń: podpunkt II.B/C. Realizacja: ćwiczenie 3
4. Ligacja, czyli reakcja łączenia wektora ze wstawką. Instrukcja do ćwiczeń: podpunkt III. Realizacja: ćwiczenie 4
5. Wprowadzenie otrzymanego konstruktów do komórek gospodarza, czyli transformacja komórek biorcy otrzymanym konstruktem. Instrukcja do ćwiczeń: podpunkt IV. Realizacja: ćwiczenie 4
6. Selekcja transformantów - po ćwiczeniu 4

Do klonowania genów są potrzebne:

- I. **Wektor**, zapewniający powielenie obcego DNA w komórkach gospodarza. Stosuje się generalnie dwa rodzaje wektorów: plazmidowe i pochodzenia wirusowego.
- II. **Fragment DNA**, który zamierzamy klonować. Najczęściej jest to krótki odcinek DNA powstały po trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (posiada lepkie lub tępe końce), bądź produkt PCR stworzony z wykorzystaniem komplementarnych primerów (starterów).
- III. **Ligaza**, enzym niezbędny podczas reakcji ligacji, czyli łączenia wektora ze wstawką
- IV. **Gospodarz**, zwykle jest to szczep bakteryjny, drożdżowy lub eukariotyczna linia komórkowa o odpowiednio zmodyfikowanym dla celów inżynierii genetycznej i ściśle określonym genotypie – niezbędny w procesie transformacji.

I. Wektory

Plazmidy - koliste zamknięte, autonomicznie replikujące się cząsteczki DNA. Stały się one główną bazą do konstrukcji wektorów plazmidowych. Występują naturalnie w komórkach wielu gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Przenoszą informację genetyczną, która wielokrotnie pełni ważną funkcję w komórce. Wśród najistotniejszych cech fenotypowych kodowanych przez plazmidowe DNA wymienić można: oporność na antybiotyki, jony metali ciężkich, produkcję antybiotyków, prostych węglowodanów, niektórych toksyn itp.

Wektor – to autonomicznie replikująca się cząsteczka DNA, która została skonstruowana sztucznie, na bazie naturalnych plazmidów, w celu przenoszenia dodatkowej informacji genetycznej. Ogólnie rzecz biorąc wektory są pochodnymi naturalnie występujących plazmidów.

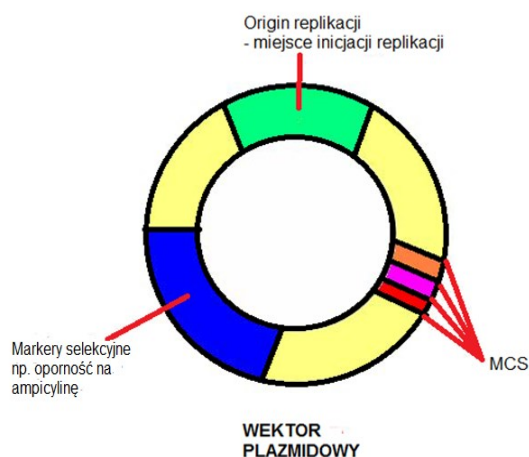
W celu uzyskania dobrego wektora wprowadza się do wektorów plazmidowych pewne modyfikacje:

1. Redukcja masy cząsteczkowej. Im mniejszy wektor tym większa jego pojemność oraz prościej nim manipulować (np. tworzyć mapę restrykcyjną klonowanego DNA)
2. Usunięcie genów warunkujących możliwość transferu zrekombinowanego plazmidu do innych bakterii – przekazywanie wektora odbywać się będzie jedynie w pionie (czyli z komórek macierzystych do potomnych).
3. Włączenie w miejscu gdzie ma być wklonowane obce DNA syntetycznego oligonukleotydu z sekwencjami rozpoznawanymi przez wiele enzymów restrykcyjnych – miejsce wielokrotnego klonowania (ang. Multiple Cloning Sites– MCS). MCS umożliwia bezpośrednie wstawienie fragmentów klonowanego DNA, które

powstały przez trawienie jednym z wielu lub (najczęściej) dwoma różnymi enzymami. Oznacza to, że wektor, który zostanie wybrany do klonowania musi w miejscu MCS posiadać miejsca restrykcyjne dla takich samych enzymów, jakimi zostanie potraktowany fragment obcego DNA, który ma być do niego wprowadzony. Dzięki temu łączone za pomocą ligazy końce będą komplementarne.

Inne istotne cechy, które powinien posiadać **dobry wektor**:

- Obecność jednego lub kilku genów markerowych, służących do wyróżnienia i selekcji transformantów, czyli komórek, które pobrały zrekombinowany wektor (głównie są to geny oporności na antybiotyk, np. ampicylinę, tetracyklinę, chloramfenikol, kanamycynę)
- Powinien być dobrze scharakteryzowaną pod względem fizycznym i chemicznym cząsteczką, łatwą do oczyszczenia.
- Posiadać miejsce MCS



II. Do konstrukcji wstawki potrzebne są:

A) Produkt PCR – fragment DNA uzyskany w wyniku reakcji PCR z wykorzystaniem odpowiednich primerów (starterów).

Primer – jest to krótki, zsyntetyzowany fragment DNA (10-30 par zasad), komplementarny do matrycy DNA, z której chcemy uzyskać produkt PCR

Podczas konstrukcji primerów możemy wprowadzić miejsce cięcia dla enzymów restrykcyjnych na końcu 5', aby możliwe było trawienie restrykcyjne, a później klonowanie.

Primery powinny spełniać kilka warunków:

- Długość startera: 19-25 nt
- Temperatura topnienia: 58-62°C
- Oba startery w parze powinny mieć zbliżoną temperaturę topnienia [T_m]
- $40 < \%GC < 60$
- Sekwencja startera powinna być pozbawiona powtórzeń (ang. runs), np. 'AAAA'
- Starter nie powinien mieć powtórzeń G/C na końcach 5' i 3', ale dobrze jeśli występuje jeden nt 'C' lub 'G'
- Przynajmniej jeden starter powinien być specyficzny dla fragmentu (fragmentów) DNA, który może zostać powielony

B) Enzymy restrykcyjne - Enzymy restrykcyjne (zwane także restryktazami, endonukleazami restrykcyjnymi) są enzymami izolowanymi z bakterii, zdolnymi do rozpoznawania specyficznych sekwencji w DNA i do

przecinania dwuniciowej cząsteczki DNA. W przypadku cięcia enzymami restrykcyjnymi powstają tępe i lepkie końce, pozwalające na wklonowanie genu w odpowiedniej orientacji.

C) Podstawowe enzymy modyfikujące DNA przydatne do klonowania:

1) Alkaliczna fosfataza:

Katalizuje usuwanie grup 5' fosforanowych z DNA, RNA oraz tri fosforanów.

Zastosowanie:

- defosforylacja końców DNA przy przygotowywaniu wektorów do klonowania (fragmenty pozbawione grup fosforanowych na końcach nie mogą zamykać się w kółko w reakcji ligacji)
- defosforylacja DNA lub RNA przed znakowaniem końców przy użyciu kinazy polinukleotydowej T4
- defosforylacja białek

2) Fragment Klenowa polimerazy DNA I:

Fragment Klenowa jest produktem proteolizy polimerazy DNA I z *E.coli*, który ma aktywność polimeryzacji (3'→5') i aktywność egzonukleolityczną 3'→5', ale stracił aktywność egzonukleolityczną 5'→3'. Dzięki temu zachował wierność polimeryzacji holoenzymu nie degradując końców 5'.

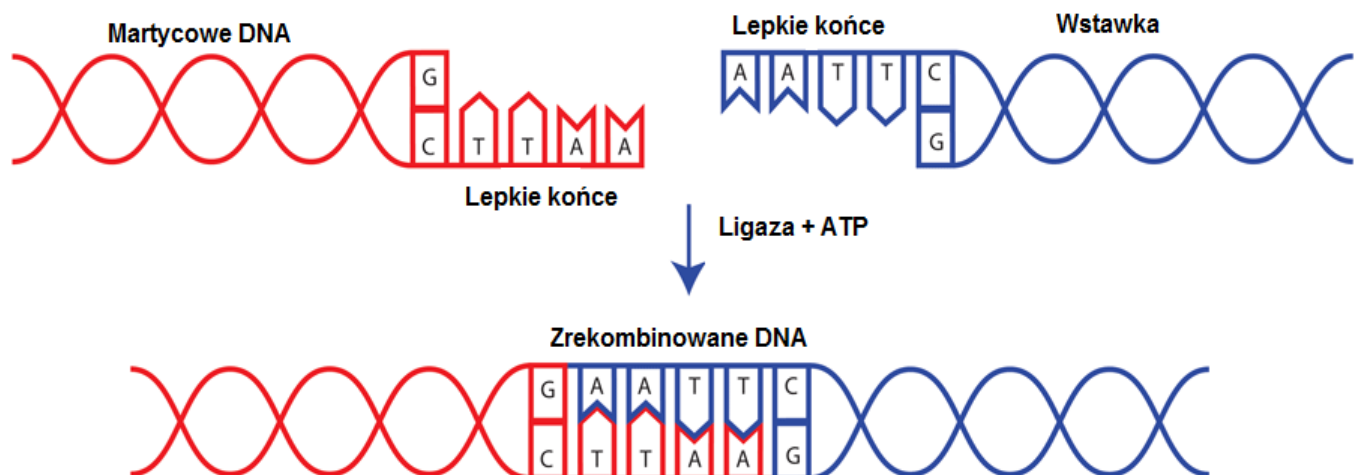
Zastosowanie:

- fosforylacja - wypełnianie lepkich końców (jednoniciowe odcinki wysunięte w kierunku 5', niż 3' cofnięta)
- sekwencjonowanie metodą Sangera
- synteza drugiej nici cDNA

III. Ligacja i ligazy

Ligazy DNA – są klasą enzymów modyfikujących DNA. W organizmie żywym pełnią kluczową rolę - bez nich wszelkie procesy genetyczne nie byłyby możliwe. Ligazy DNA są enzymami ligującymi, co oznacza, że potrafią tworzyć wiązania chemiczne pomiędzy dwoma fragmentami. Funkcją ligaz DNA jest łączenie przerw w DNA, co ma miejsce przy wszystkich procesach angażujących syntezę nowych nici DNA (replikacja, naprawa DNA) czy wycinanie i wstawianie ich fragmentów (rekombinacja genetyczna). Działanie ligaz opiera się na prostej reakcji chemicznej, która, będąc endoenergetyczną, wymaga do prawidłowego przebiegu obecności substratu energetycznego - ATP.

Ligacja – proces łączenia dwóch fragmentów lub końców nici DNA za pomocą ligazy. Proces ligacji wymaga energii w postaci ATP lub NAD (w zależności od ligazy).



Rysunek 2 Reakcja ligacji

IV. Gospodarz

Transformacja – proces pobierania dostępnego DNA (np. zrekombinowany wektor uzyskany podczas klonowania) ze środowiska przez komórki gospodarza *Escherichia coli*.

Zagadnienia do samodzielnego przygotowania:

1. Rodzaje wektorów do klonowania
2. Wektory wahadłowe
3. Wektory wysoko- i niskokopijne oraz ich zastosowanie

Literatura

1. J. Kur „Podstawy inżynierii genetycznej. Teoria, ćwiczenia, testy.” Wydawnictwo PG, 1994.
2. B. Zalewska-Piątek, M. Olszewski, R. Piątek, S. Milewski, J. Kur „Biologia molekularna. Ćwiczenia laboratoryjne.” Wydawnictwo PG, 2009.

Część praktyczna

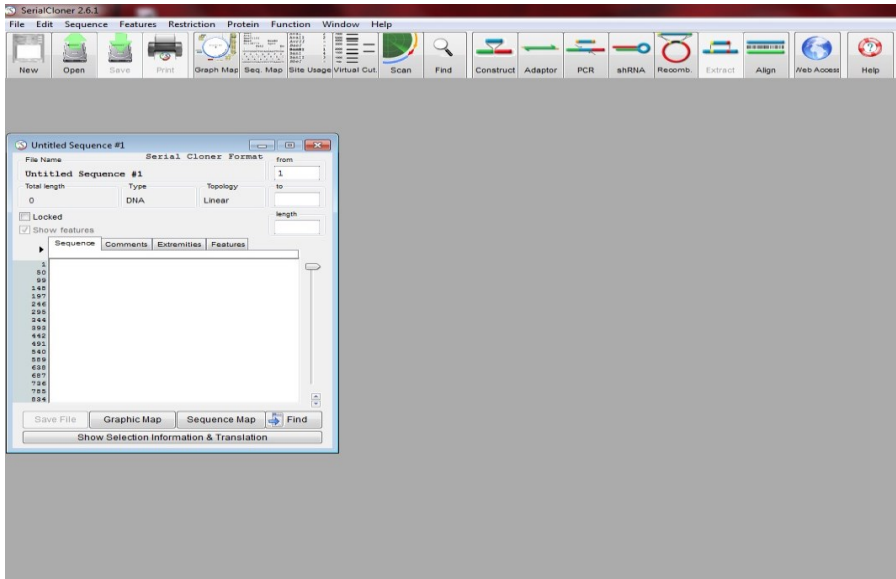
W części praktycznej wykorzystywać będziemy darmowy program SerialCloner, który posiada m. in. funkcje wirtualnego klonowania fragmentów DNA, projektowania starterów do reakcji PCR, czy sprawdzenia homologii dwóch sekwencji DNA.

Wykorzystanie programu Serial Cloner podczas kolejnych etapów klonowania:

1. Wybór i izolacja wektora (wektor pUC18) – wizualizacja sekwencji, MCS oraz dostępnych genów markerowych
2. Przygotowanie wstawki pochodzącej z plazmidu pCB104 – symulacja przebiegu reakcji PCR
3. Trawienie restrykcyjne wektora (enzymami BamHI oraz PstI) oraz fosforylacja końców wstawki (enzymami modyfikującymi DNA) – dobór enzymów restrykcyjnych i przedstawienie graficzne powstałych fragmentów
4. Ligacja czyli reakcja łączenia wektora ze wstawką – wizualizacja powstałego konstruktu (zrekombinowanego wektora)

Wprowadzenie do programu:

Widok okna programu.



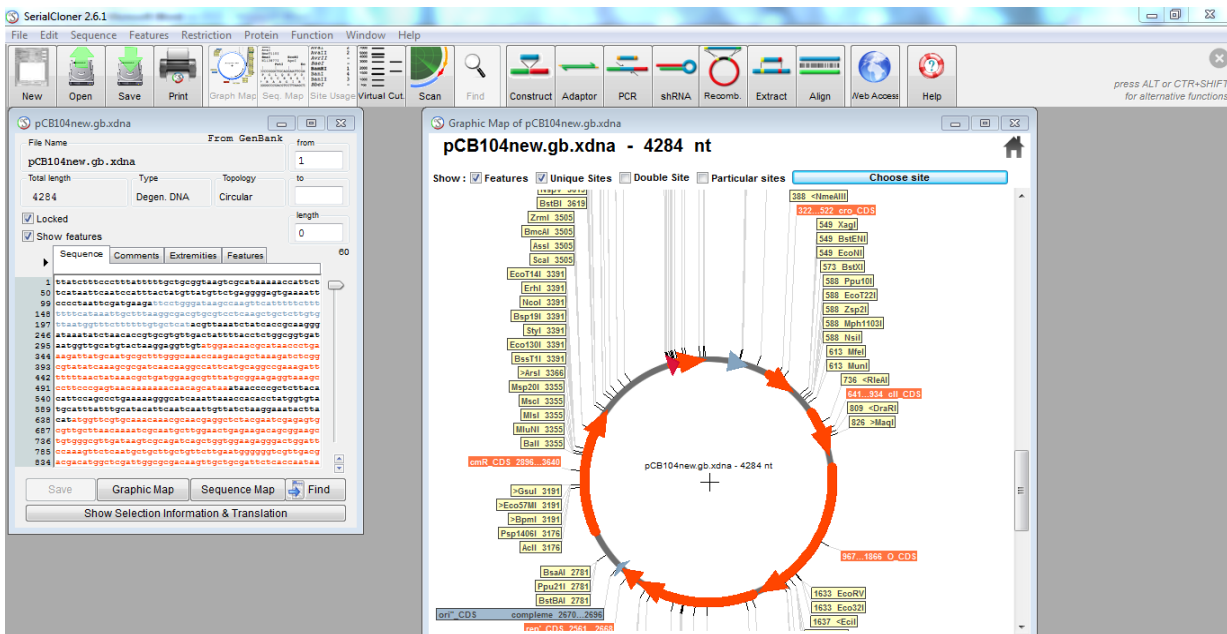
Podstawowe narzędzia, które będziemy wykorzystywać w pracy z tym programem na zajęciach:



- 1 – otwiera nową sekwencję do obróbki
- 2 – otwiera sekwencję DNA zapisaną na dysku, nad którą wcześniej pracowaliśmy
- 3 – zapisuje zmienioną sekwencję DNA
- 4 – pokazuje w sposób graficzny otwartą sekwencję DNA
- 5 – pokazuje szczegóły wczytanej sekwencji z miejscami restrykcyjnymi
- 6 – wskazuje ilość miejsc cięcia dla danego enzymu restrykcyjnego w wybranej sekwencji DNA
- 7 – pozwala przeprowadzić analizę po użyciu enzymów restrykcyjnych na żelu agarowym
- 8 – zaznacza miejsca z genami, które warunkują specyficzne cechy wektora
- 9 – pozwala odnaleźć odpowiednie miejsca na wskazanej sekwencji, np. miejsca restrykcyjne
- 10 – pozwala na przeprowadzenie wirtualnej ligacji fragmentów DNA
- 11 – pozwala na projektowanie primerów i przeprowadzenie wirtualnej reakcji PCR
- 12 – pozwala na sprawdzenie miejsc homologicznych pomiędzy sekwencjami

Wprowadzanie sekwencji do programu:

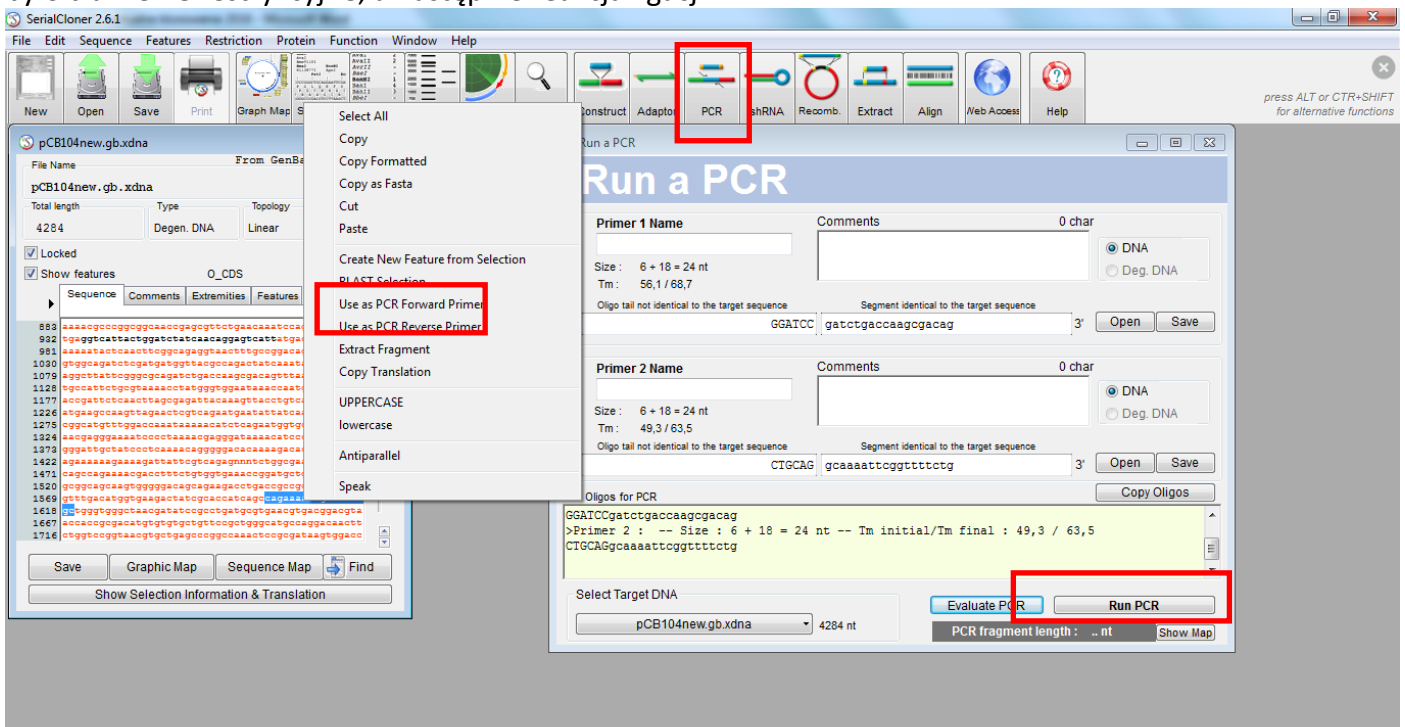
- file
- open
- wybór pliku (plazmid pCB104)
- w celu wizualizacji plazmidu wybierz opcję „Graphic Map”, a następnie wybierz opcję „Circularize”



Po wczytaniu danej sekwencji DNA do programu, możemy określić jej wielkość, wskazać miejsce inicjacji replikacji, czy sprawdzić występujące tu markery selekcyjne, np. geny warunkujące oporności na antybiotyki.

Projektowanie primerów/ reakcja PCR:

Aby uzyskać produkt po reakcji PCR i kolejno wklonować go do wektora, konieczne jest zaprojektowanie primerów komplementarnych do interesującej nas sekwencji DNA (matrycy DNA), którą chcemy powielić. Podczas konstrukcji wprowadzamy miejsce cięcia dla enzymów restrykcyjnych na końcu 5', aby możliwe było trawienie restrykcyjne, a następnie reakcja ligacji.



Wprowadzamy sekwencję, do której chcemy zaprojektować startery, i zaznaczamy fragment sekwencji. Sprawdzamy czy starter ma odpowiednią długość, ilość par GC, temperaturę topnienia.

Za pomocą tego programu możemy również przeprowadzić wirtualną reakcję PCR z wykorzystaniem ówczśnie zaprojektowanych pimerów.

Wczytujemy sekwencję matrycową (opcja u dołu okna „Run a PCR”), czyli tę samą do której projektowaliśmy primery, i otrzymujemy produkt PCR, który później będziemy wykorzystać do reakcji ligacji.

Etapy:

- wybierz opcję PCR
- wstaw sekwencje rozpoznawane i cięte przez oba enzymy restrykcyjne na końcach 5' projektowanych primerów w miejscu „oligo tail not indentical to the target sequence”, oraz sekwencje pochodzące z plazmidu pCB104 w miejscu „segment identical to the target sequence”. Po wyborze sekwencji pochodzącej z plazmidu pCB104 należy zaznaczyć opcję „ use as PCR forward primer” oraz „ use as PCR reverse primer”
- wstaw matrycę „select target DNA” i wybierz pCB104
- wciśnij Run PCR

Wirtualne ligowanie dwóch fragmentów DNA:

Program ten pozwala na przeprowadzenie wirtualnej reakcji ligacji dwóch fragmentów DNA: wektora oraz wstawki (fragmentu DNA po reakcji PCR), które zostały potrawione tymi samymi enzymami restrykcyjnymi.

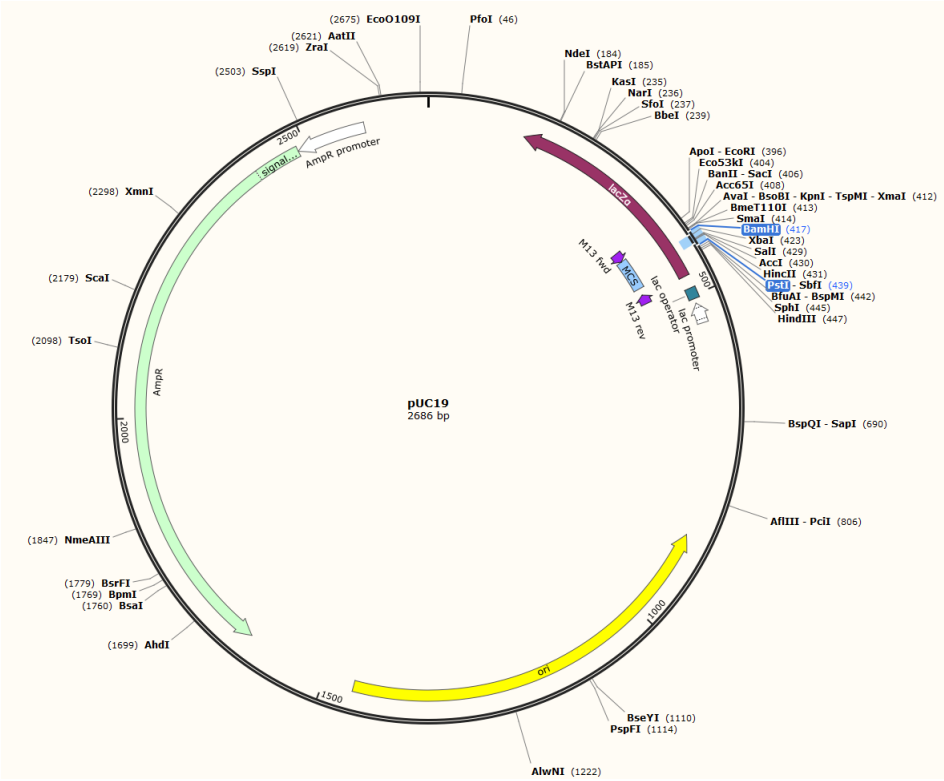
Wprowadzamy wcześniej przygotowaną i sprawdzoną sekwencję DNA do programu SerialCloner. Zaznaczamy wybrane przez nas enzymy restrykcyjne i uzyskujemy informację na temat rodzaju cięcia restrykcyjnego: końce tępe, lepkie oraz wielkości otrzymanego fragmentu DNA.

Tak uzyskane fragmenty DNA ligujemy, a uzyskany konstrukt zapisujemy – poniżej mapa powstałego konstruktury oraz dwóch plazmidów wykorzystanych do jego stworzenia.

Etapy ligacji:

- po pocięciu enzymami restrykcyjnymi plazmidu pUC19 oraz wstawki z plazmidu pCB104 wybieramy opcję „Construct”, a następnie wstawiamy „otwartą” sekwencję nukleotydową plazmidu pUC19 w „Select DNA 1” oraz sekwencję nukleotydową wstawki w „ Select DNA2”
- reakcję wirtualnej ligacji przeprowadzamy poprzez naciśnięcie opcji „LIGATE”

Plazmid pUC19 zawierający fragment genu *lacZ* kodujący N-końcowy fragment β-galaktozydazy



Konstruk uzyskany w wyniku molekularnego klonowania

