

# *Vektory klonovania génov*

Miriama Miháčová Jana Mihályová Lenka Ondačková

## **Vektory**

### **Delenie podľa funkcie**

- klonovacie
- expresné
- špecializované
- (multifunkčné)

### **Delenie podľa hostiteľského organizmu**

- bakteriálne (*E. coli*, iné baktérie)
- kvasinkové
- cicavčie
- rastlinné
- shuttle

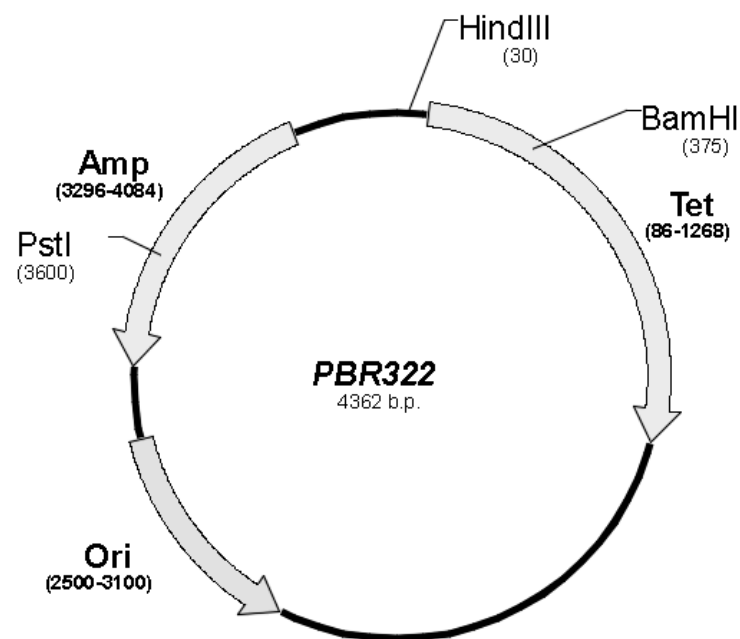
### **Delenie vektorov podľa pôvodu a spôsobu replikácie**

- plazmidy
- fagy
- YAC

## Plazmidové vektory:

### Všeobecné kritériá , ktoré musia spĺňať plazmidové vektory:

- **malá veľkosť, 2 – 15 kBp**  
(účinnosť prenosu pDNA do buniek je nepriamo úmerná veľkosti, menšia DNA je stabilnejšia, vyšší počet kópií)
- **stabilné udržiavanie cudzorodej DNA pri replikácii**, (vhodný počiatok replikácie)
- **selekčný marker** (gény rezistencie k antibiotikám – Ap, Tc, Cm, Km)
- **klonovacie miesta** (unikátne miesta pre štiepenie restriktívnymi endonukleázami, polylinker, MCS)



- **klonovacia kapacita 1 – 10 kBp**
- **vysoký počet kópií**

## Počet kópií niektorých plazmidových vektorov E. coli

Vektor	Veľkosť [kBp]	Origin	Počet kópií
pBR322	4,3	pMB1	15 – 20, amplifikovateľný
pUC19	2,6	pMB1	500 - 700
pACYC	3,9	p15A	10 – 12
pSC101	10	pSC101	>5
F (BAC)	103	F	1 – 2
R1	104	R1	3 – 6

## Vektory pre baktérie iné ako E. coli - - plazmidy so širokým spektrom hostiteľov:

<b>Vektor</b>	<b>Veľkosť</b>	<b>Inkompatibilita</b>	<b>Počet kópií</b>	
RP4	60 kBp	P	1 - 3	konjugatívny
RSF1010	8,68 kBp	Q	15 – 40	nekonjugatívny, mobilizovateľný
Sa	29,6	W	3 – 5	konjugatívny

## Vektory odvodené od bakteriofága $\lambda$

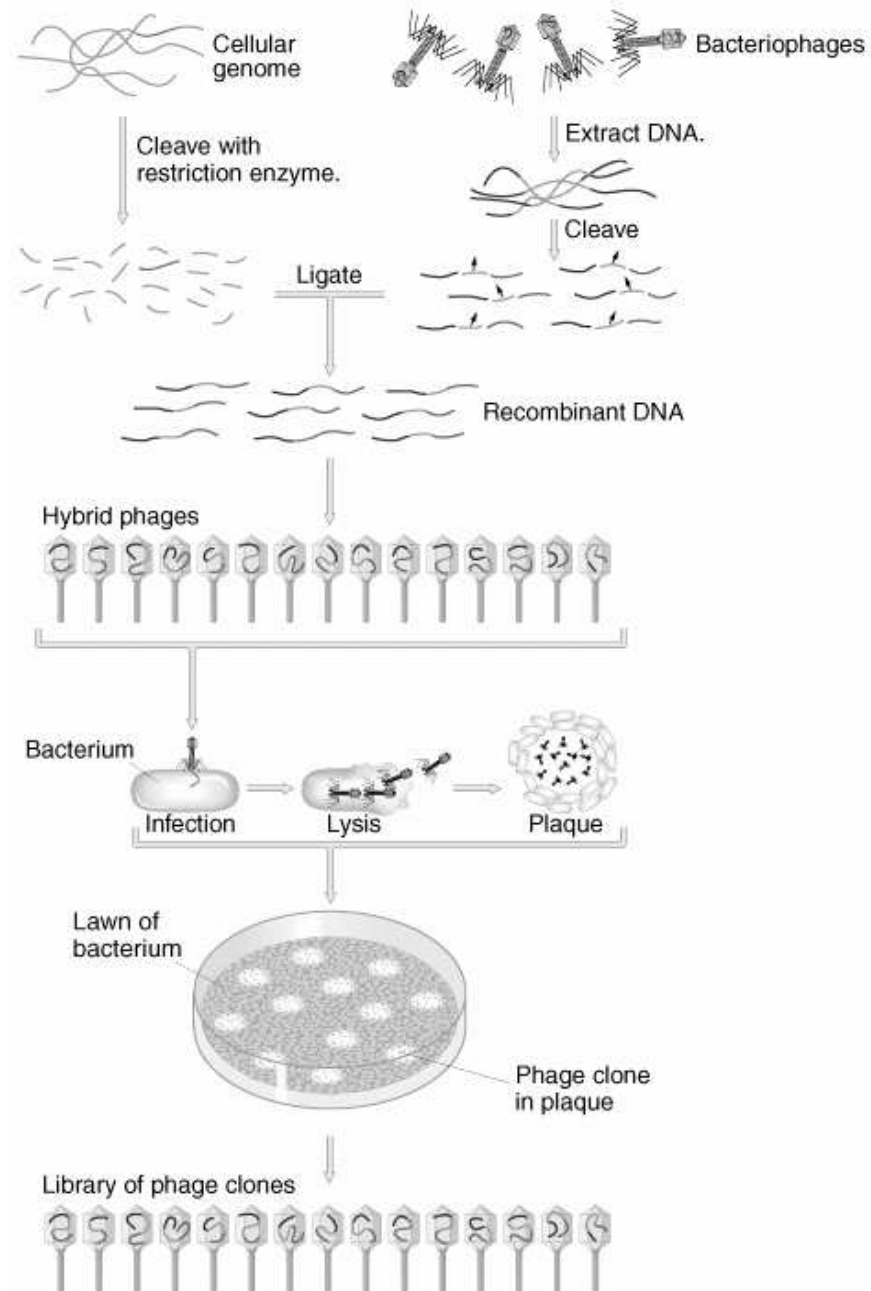
48 kBp

COS ————— COS

A .Hlavička ..| .Chvost ..| Lyzogenia| Regulácia | ...Lýza... R  
Replikácia

- do fágovej častice sa účinne vbaľuje DNA s veľkosťou 78 – 105% pôvodnej  $\lambda$  DNA, ktorá je ohraničená cos-miestami
- na lytický cyklus je potrebné iba časť génov, gény pre lyzogeniu nie sú potrebné
- pri tvorbe vektorov – boli odstránené restričné miesta, deletované nadbytočné gény, zavedené selekčné systémy

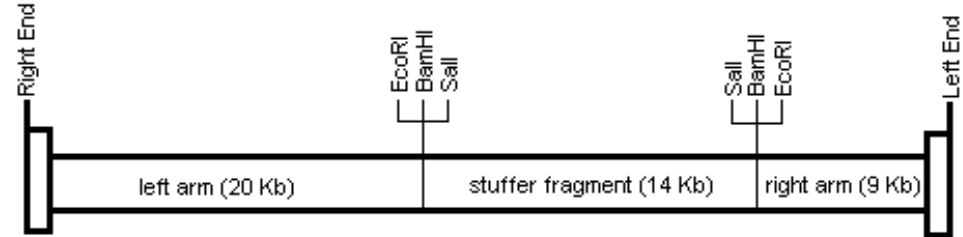
# Princíp klonovania vo vektoroch odvodených od bakteriofágu $\lambda$



# Substitučné vektory:

## Lambda EMBL4

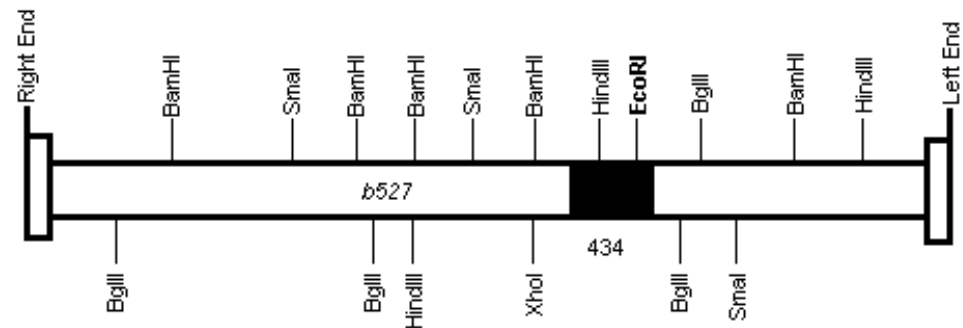
- klonovacia kapacita 9-23 kb
- cudzorodá DNA nahradzuje stredný úsek genómu fágového vektoru
- klonovanie chrom. DNA



# -Inzerčné vektory:

## $\lambda$ gt10

- klonovacia kapacita 7 kb
- cudzorodá DNA sa vkladá do jedného restričného miesta na molekule vektoru
- klonovanie cDNA



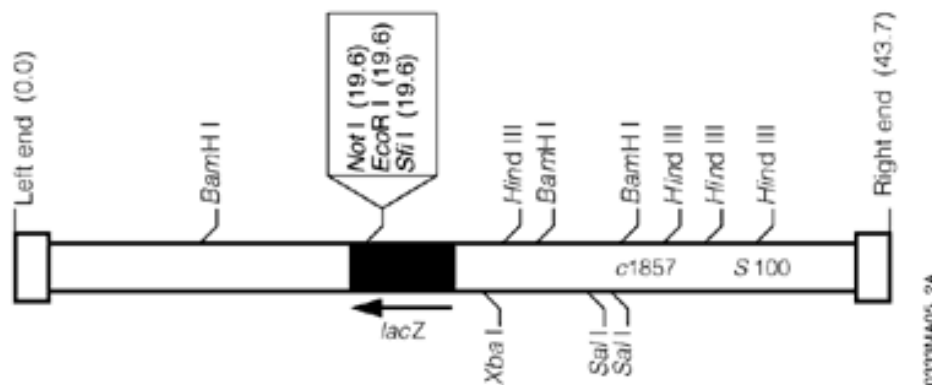


**Klonovacie vektory:**  $\lambda$ gt10, EMBL4

**Expresné vektory:**

$\lambda$ gt11

$\lambda$ gt11 *Sfi-Not*



**Výhody klonovania v lambdových vektoroch:**

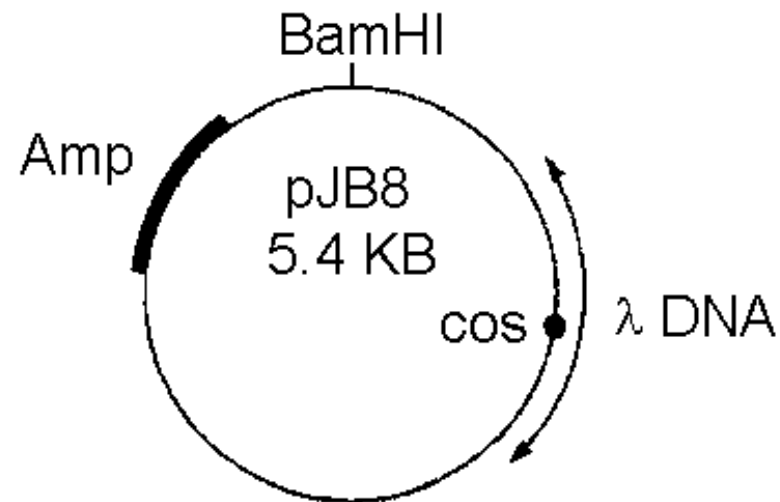
- je možné získať  $10^8$ - $10^9$  rekombinantov /1  $\mu$ g cDNA  
(100-krát viac ako v prípade plazmidových vektorov)
- je možné selektovať viac plakov na jednej miske
- rekombinantná DNA sa dá zbaľiť in vitro do fágových kapsidov a preniesť do hostiteľských buniek bežnou fágovou infekciou

## Kozmidy

hybrid plazmidu a fágu  $\lambda$

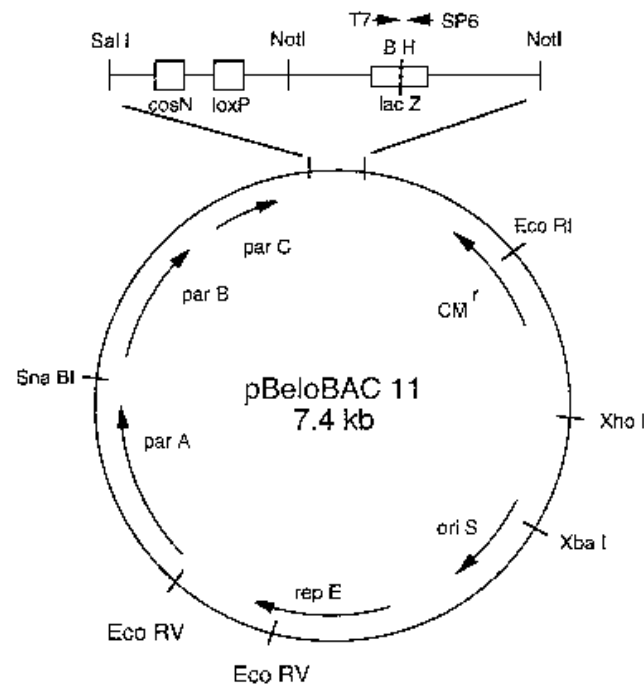
- plazmid s COS miestom
- klonovacia kapacita 35 – 50 kb
- využíva in vitro vbal'ovanie a transdukciu na vstup do bunky
- replikuje sa ako plazmid

### A typical cosmid

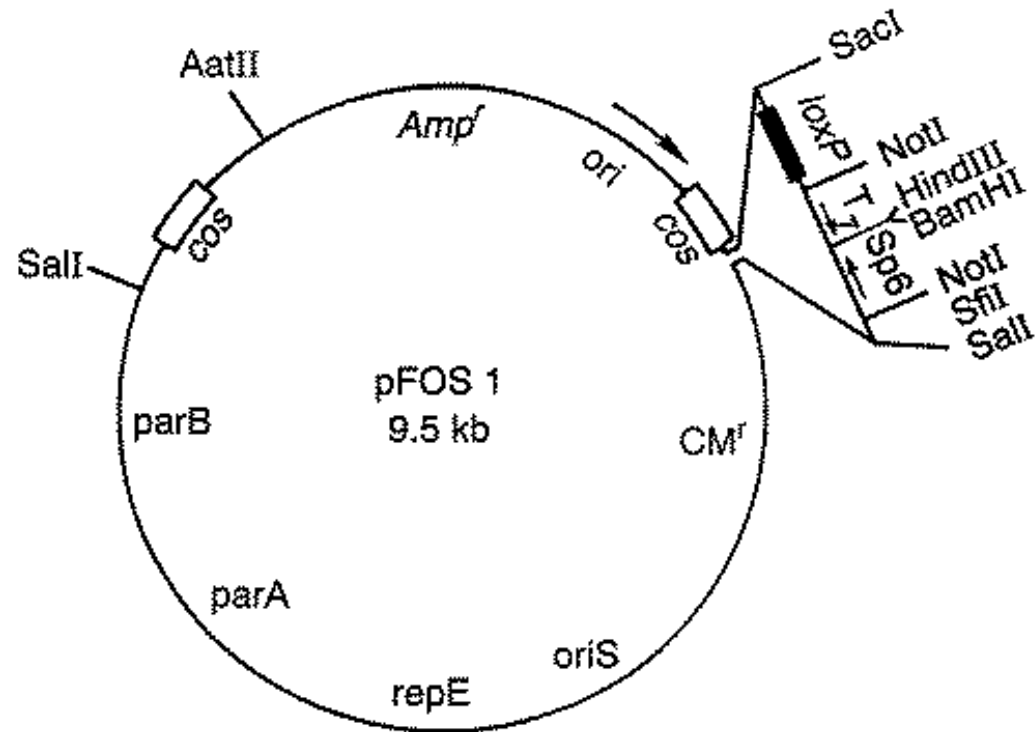


## **BAC vektory** (bacterial artificial chromosom)

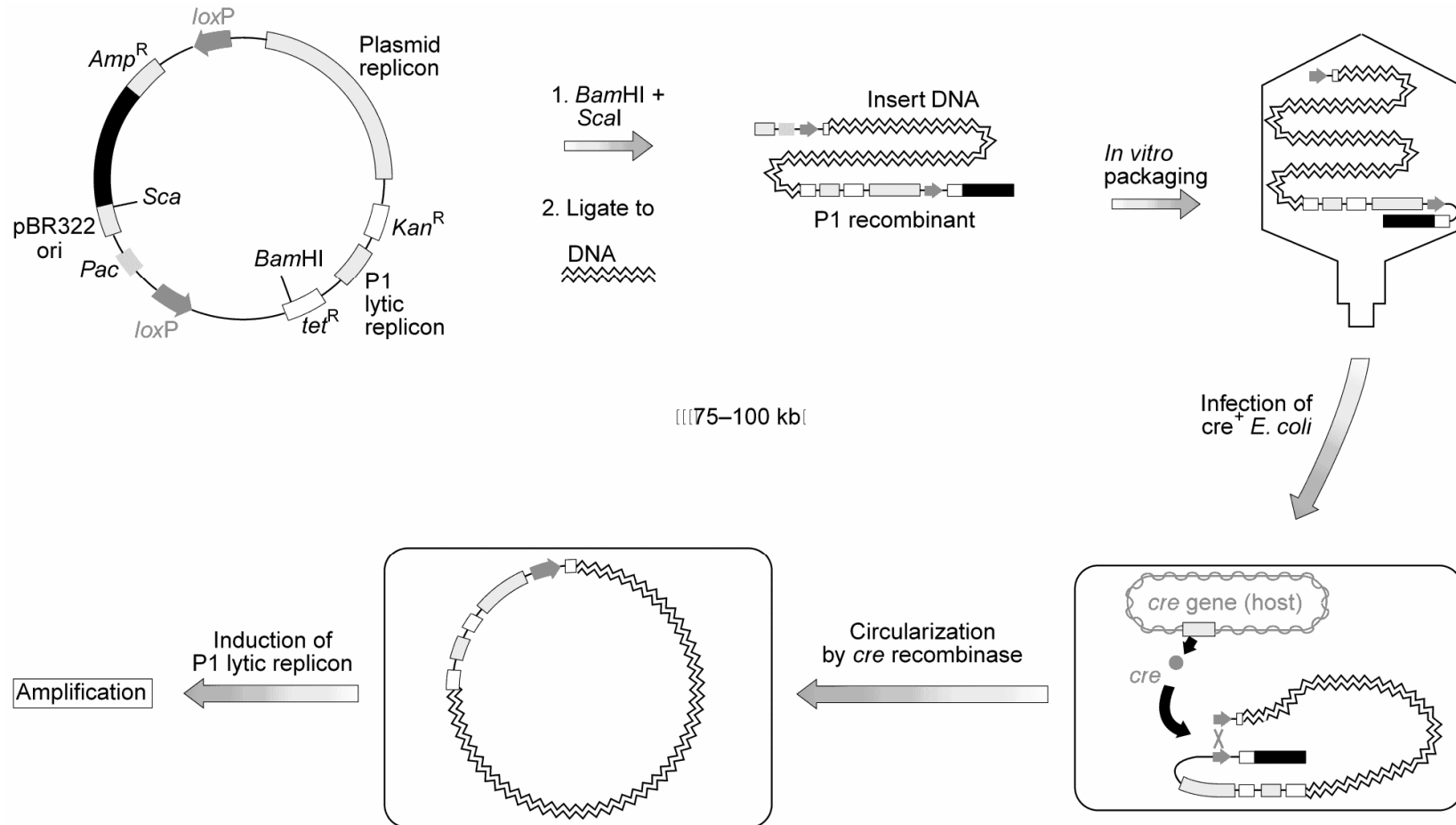
- odvodené od F plazmidu, nízky počet kópií
- veľká klonovacia kapacita (300 kb)
- stabilné uchovávanie plazmidu



# Fosmidy – kombinácia kosmidov a BAC

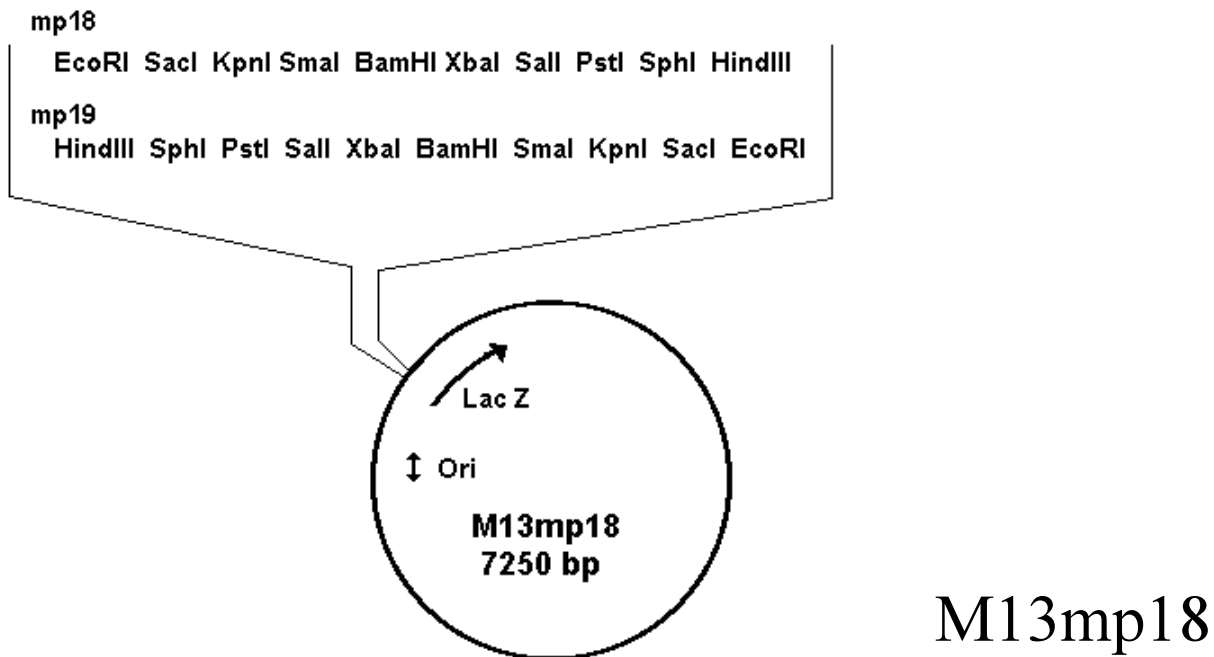


**P1 vektory:** odvodené od bakteriofága P1  
 klonovacia kapacita 125 kb  
 je možné vbaľovanie in vitro  
 nízkokópiové plazmidy  
 stabilné uchovávanie DNA



## Vektory odvozené od fágu M13:

- Genóm tvorený kružnicovou jednoreťazcovou DNA (6,4kb)
- dajú sa klonovať malé fragmenty



## **Kvasinkové vektory:**

eukaryotický model

## **Integračné vektory:**

- nemajú kvasinkový replikón
- v dôsledku homologickej rekombinácie sa vsunú do chromozómu kvasinky

## **Vektory s 2 $\mu$ replikónom**

- replikón z plazmidu prirodzene sa vyskytujúceho v kvasinkách

## **Vektory s ars sekvenciami**

- ars (autonomously replicating sequence) sekvencie sa nachádzajú v chromozóme kvasinky
- sú nestabilné

## Umelé kvasinkové chromozómy YACS

- kyvadlové plazmidové klonovacie vektory, ktoré sa replikujú v E. coli a kvasinkách
- obsahujú časti kvasinkového chromozómu
  
- **výhoda** – vysoká klonovacia kapacita >niekoľko 100 kb
- **nevýhoda** – nestabilita inzertov cudzorodej DNA



# Vnesenie rekombinantnej DNA do hostiteľskej bunky

## 1. Transformácia

v prevažnej miere plazmidovou DNA

Princíp metódy:

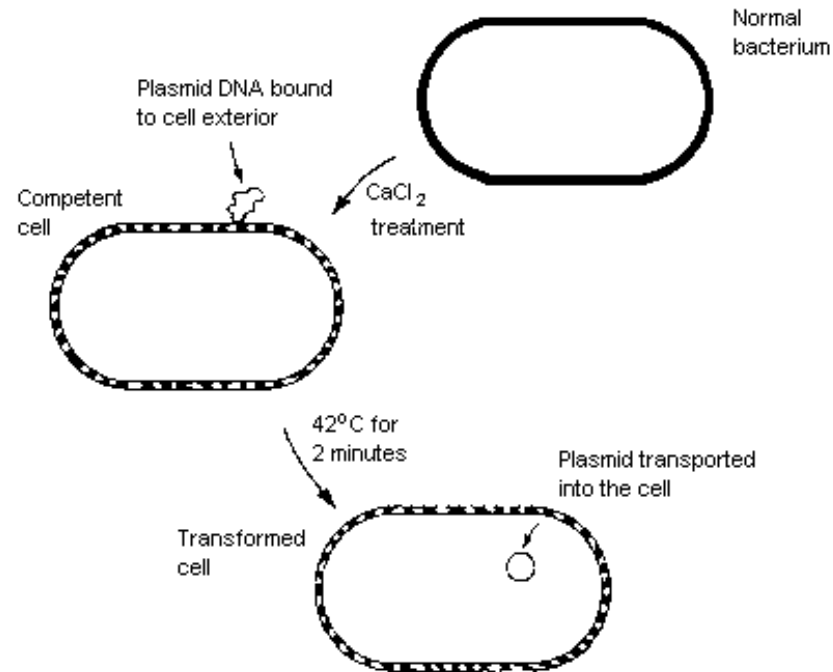
opracovanie bunkovej  
membrány

(Ca<sup>2+</sup>, chlad,

Mandel a Higa, 1972)

– jej väčšie sprístupnenie  
pre cudzorodú DNA

Transformation of *E. coli*.



## **Elektrotransformácia - elektroporácia:**

- pulzer (fy BioRad) umožňuje krátkodobý ( 5 ms) impulz vysokého napätia (až 2,5 kV pre bunky E. coli) a „nastrelenie“ DNA do bunky
- táto metóda sa používa pre Gram pozitívne, Gram negatívne baktérie, kvasinky aj cicavčie bunky

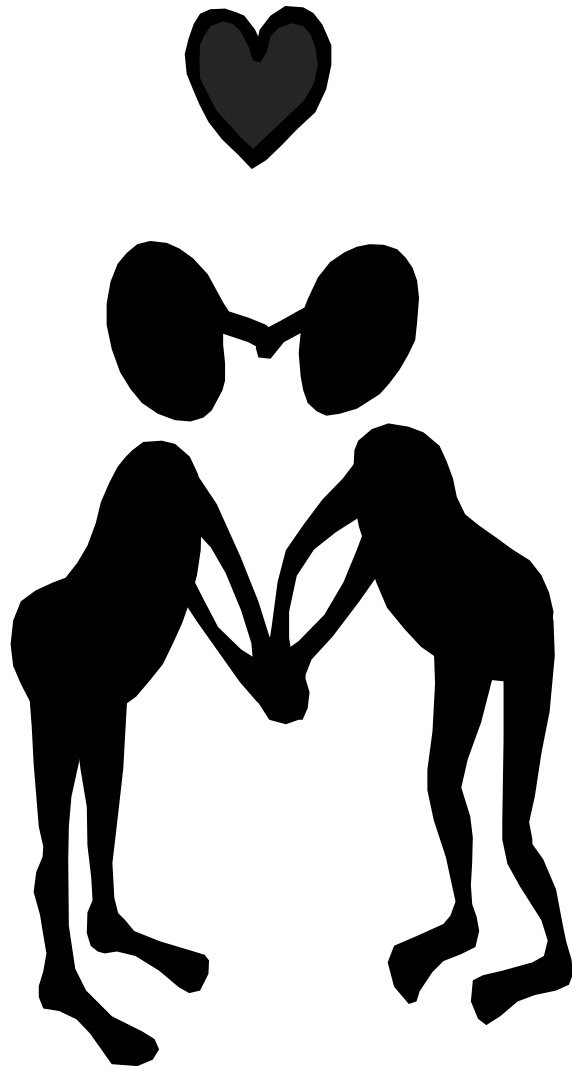
## **Účinnost' transformácie:**

počet transformantov/1  $\mu\text{g}$  DNA

Účinnost' transformácie závisí od veľkosti plazmidu  
– s veľkosťou účinnost' klesá

**2. Transfekcia** pomocou fágovej alebo vírusovej DNA

**3. Transdukcia** pomocou bakteriofágov (vbal'ovacie systémy, cháróny, kozmidy, mini-Mu deriváty, P1 fág)



- **Ked' biológiu miluješ, nie je čo riešiť...**
- **PS: veľa šťastia pri skúške**