

Занятие 6. ВЕКТОРНЫЕ СИСТЕМЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ.

Цель занятия: ознакомиться с плазмидными, фаговыми и космидными векторами, освоить методы введения и клонирования чужеродных ДНК с помощью векторов на примере решения типовых задач, получить представление о геномных библиотеках и способах их создания на примере решения типовых задач.

- 1 Векторы и их применение.
- 2 Простейшие плазмидные векторы pSC101 и pBR322.
- 3 Плазмидные векторы усложненной конструкции.
- 4 Получение векторов с использованием фага λ .
- 5 Строение космид.
- 6 Создание генных библиотек и их использование.

Тематика рефератов

1. Векторы прокариот и методы их введения в клетки.
2. Плазмидные векторы и принципы клонирования в космидах.
3. Векторы на основе бактериофагов, принципы клонирования.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое векторы и какое применение они находят в генной инженерии?
2. Что такое плазида?
3. Какими свойствами должны обладать плазмиды как векторы?
4. Дайте характеристику плазмидам pSC101 и pBR322.
5. Опишите строение и свойства плазмиды типа pUC.
6. Назовите виды векторов.
7. Каков недостаток плазмид как векторов?
8. Как конструируются специальные штаммы λ ?
9. Назовите этапы клонирования фрагмента ДНК.
10. Что называют космидами и каково их строение?
11. Что такое *cos*-сайты.
12. Как происходит составление геномных библиотек?

Задание 1. Разобрать понятия: маркер для селекции, реципиентный организм, трансформированные организмы, гены устойчивости,

участок множественного клонирования, кольцевая молекула ДНК, чужеродная ДНК, самостоятельная репликация.

Задание 2. Решить предлагаемые задачи:

1. Ниже приведён фрагмент ДНК, можно ли встроить его в плазмиду pSC101?

5'-АГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦА-3'
3'-ТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5'

2. Ниже приведены два одноцепочечных фрагмента ДНК. Какой из них в двухцепочечном варианте можно использовать для встраивания в плазмиду pSC101?

а) 5'-ГГЦЦТГААТТЦААГЦАТАГТГТГААТТЦАА-3'
б) 5'-ТЦЦГГАЦТТААТТГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5'

3. Кольцевая плазида pBR322 имеет участки расщепления различными рестриктазами. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5'-ЦЦГАТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГАТТЦАЦА-3'
3'-ГГЦТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТААГТГТ-5'
5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3'
3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5'

4. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в плазмиду pBR322?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3'
3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'
5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3'
3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГААГТГТАЦ-5'

5. В плазмиде pUC18 имеется полилинкерный участок, который содержит сайты рестрикции для 10 различных рестриктаз. Можно ли встроить в эту плазмиду приведённые ниже фрагменты двухцепочечной ДНК?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3'
3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'
5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3'
3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5'

6. Имеется фрагмент двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'- ТАГГАТЦЦАТ-
 ТАААТАГТТГГАТЦЦГТ -3`
 3`-
 АТЦЦТАГГТААТТТАТ-
 ЦАЦЦТАГГЦА-5`

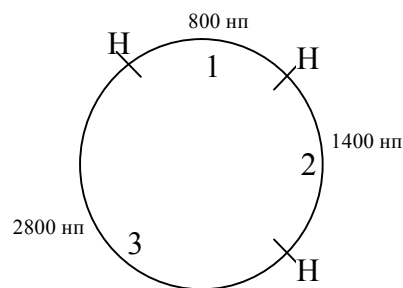


Рис. 1. Рестрикционная карта кольцевой плазмиды с указанием сайтов рестрикции для фермента Hind III.

Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

7. В плазмиду pBR322 вставлен фрагмент чужеродной ДНК. Трансформированные такой плазмидой бактерии растут на питательной среде с ампициллином, но не растут на питательной среде, содержащей тетрациклин. Какой известной вам рестриктазой можно вырезать чужеродную ДНК из плазмиды?

8. Ген *Ms* находится в кольцевой плазмиде величиной 5 000 нуклеотидных пар (5 000 нп). Разрезание плазмиды рестрикционным ферментом Hind III дает фрагменты 1, 2 и 3, как показано на рисунке 1 (Н - Hind III рестрикционные сайты):

Тандемная копия гена *Ms* содержится только в одном Hind III фрагменте. Если ген *Ms* кодирует регуляторный белок MSS4, состоящий из 300 аминокислот, то укажите, в каком фрагменте плазмиды расположены копии гена *Ms*?

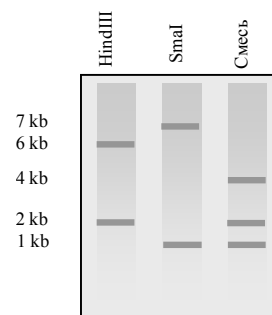


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов ДНК

9. Фрагмент ДНК мыши величиной 4 кб, имеющий на концах сайты рестрикции для EcoRI, содержит ген *M*. Этот фрагмент был встроен в плазмиду pBR322 по EcoRI сайту. Полученная рекомбинантная плаزمида была разрезана двумя рестриктазами, электрофоретический спектр полученных рестрикционных фрагментов, окрашенных этидиум бромидом, представлен на рисунке 2. Для фракций на геле, полученных после разрезания сразу двумя ферментами, была проведена Саузерн-блот гибридизация с использованием в качестве зонда меченого фрагмента плазмиды pBR322. С какими фракциями ДНК произойдет гибридизация меченого зонда?

10. Ген для белка β -тубулина был получен из грибка *Neurospora*, вставлен в кольцевую плазмиду и клонирован в бактерии *E.coli*. Опишите шаг за шагом последовательность действий, необходимых для того, чтобы клонировать этот ген от родственного грибка *Podospora*, используя в качестве вектора кольцевую плазмиду pBR, представленную на рисунке 3, которая несет два гена устойчивости к антибиотикам канамицину (kan) и тетрациклину (tet).

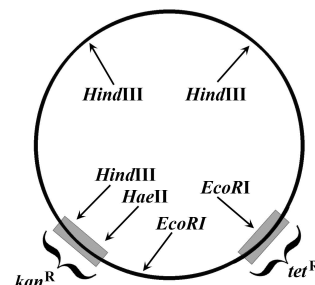


Рис. 3. Кольцевая плаزمида pBR, несущая два гена устойчивости к антибиотикам. Сайты рестрикции указаны стрелками.

11. Фрагмент человеческой ДНК величиной 6 кб был встроен в плазмиду pBR 322 по EcoRI сайту. После этого, рекомбинантная плаزمида была разрезана двумя рестриктазами, а полученные образцы подвергнуты электрофорезу в агарозном геле, как и в задаче 9. Электрофоретический спектр полученных фрагментов представлен на рисунке 4. Для фракций, полученных после разрезания сразу двумя ферментами, была проведена Саузерн-блот гибридизация с меченым зондом из плазмиды pBR322.

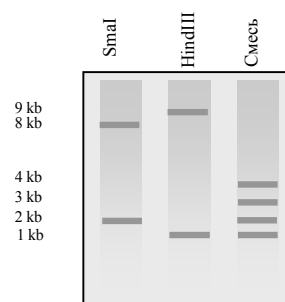


Рис. 4. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

С какими фракциями ДНК в этом случае произойдет гибридизация меченого зонда?

12. Исследователи для клонирования важного фрагмента человеческой ДНК величиной 1кб использовали плазмиду pUC18. Трансформированные гибридной плазмидой клетки *E. coli* были помещены на питательную среду, содержащую X-Gal. После культивирования в чашках Петри появились колонии синего и белого цвета. Удалось ли встроить нужный фрагмент человеческой ДНК в плазмиду pUC18?

13. Интересный фрагмент человеческой ДНК величиной 1 кб был встроен в плазмиду pUC18 по Hind III сайту и клонирован в *E. coli*. Если выделить гибридную плазмиду и разрезать рестриктазой Hind III то как будет выглядеть спектр фрагментов после электрофореза в агарозном геле в случае когда человеческая ДНК успешно встроилась в pUC18 и когда этого не произошло?

14. Изменится ли электрофоретический спектр фрагментов после электрофореза в агарозном геле, если выделенную по условиям задачи 13 гибридную плазмиду pUC18 разрезать сразу двумя рестрикта-

зами Hind III и EcoRI?

15. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно клонировать в бактериофаге λ ?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦ ТТЦГААГТГТАЦ-5`

16. Из семнадцатой хромосомы человека удалось выделить интересный ген, расположенный во фрагменте ДНК величиной около 8 кб. На флангах этого фрагмента имеются сайты рестрикции для фермента EcoRI. Можно ли успешно клонировать этот фрагмент человеческой ДНК в бактериофаге λ ?

17. В геноме эукариотического организма имеется сложный тандемно дуплецированный ген. Величина ДНК одной копии этого гена составляет чуть больше 20 кб.

Сумеют ли генные инженеры в своём арсенале найти подходящий вектор для клонирования тандемной копии данного гена?

18. Получен интересный фрагмент двухцепочечной человеческой ДНК с тупыми концами величиной около 200 нуклеотидных пар. Причем, в этом фрагменте не оказалось сайтов рестрикции для удобных рестриктаз, расщепляющих ДНК с образованием липких концов.

Удастся ли успешно клонировать этот фрагмент человеческой ДНК в известных вам плаزمидях?

19. Поскольку рестриктаза EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов, то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар.

Можно ли клонировать какие либо фрагменты ДНК дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae* в фаге λ , если они были разрезаны ферментом EcoRI (геном дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae*, состоящий из одной хромосомы, содержит около $13,5 \times 10^6$ нуклеотидных пар ДНК)?

20. Геном *Drosophila melanogaster*, состоящий из четырёх хромосом, содержит около 10^8 нуклеотидных пар ДНК. При создании геномной библиотеки дрозофилы меланогастер также использовали рестрикционный фермент EcoRI, а полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli*.

Сколько различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Drosophila melanogaster* составляют геномную библиотеку

вида в данном случае?

21. В ходе создания геномной библиотеки человека использовали рестрикционный фермент Not I, узнающий октамерную последовательность ГЦГЦЦГЦ, а полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli*.

Каково в этом случае будет минимальное число различных клонов, содержащих отличающиеся фрагменты ДНК в составе геномной библиотеки человека?

Задание 3. Объяснить следующие термины: вектор, плаزمид, клонирование, экспрессия, трансформация, полилинкер, фаг, вирус, космида, репортерный ген, участок расщепления, сайт рестрикции.

Тест 1

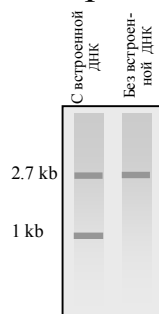
Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (1 – 8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

- . Нет, поскольку во фрагменте отсутствует сайт для EcoR I.
- . Второй с помощью рестриктазы Hind III.
- . Можно. Первый с использованием EcoR I, второй – Hind III.
- . Так как трансформированные бактерии не растут на среде, содержащей тетрациклин, то можно предположить, что в плазмидной ДНК вставкой поврежден ген устойчивости к этому антибиотику. Следовательно, из плазмиды нужный нам фрагмент можно «вырезать» при помощи рестриктазы Bam I.
- . Первый.

Тест 2

Ниже приведены еще 3 правильных ответа для 6 задач (9 - 14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

- . гибридизация меченого зонда произойдет с фракциями ДНК величиной 4 и 2 кб.
- . гибридизация произойдет с фракциями ДНК величиной 4 и 1 кб.
- .



–.

Тест 3

Ниже приведены еще 4 правильных ответа для 8 задач (1 - 8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

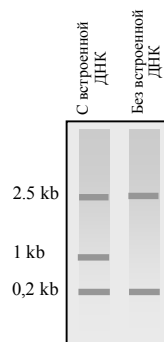
- а.
- Оба. Первый при помощи рестриктазы EcoR I, второй при помощи рестриктазы Hind III.
- При помощи фермента Bam I. Бактерии, трансформированные такой плазмидой, не будут расти на средах, содержащих тетрациклин.
- Поскольку белок состоит из 300 аминокислот, то величина гена Ms будет 900 нуклеотидных пар, а tandemная копия составит $900 \times 2 = 1800$ н.п. Следовательно, tandemная копия гена Ms может находиться только во фрагменте 3.
- Только один. При помощи рестриктазы Nae II.

Тест 4

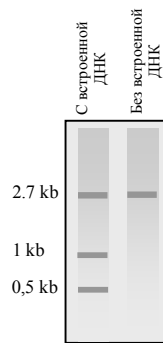
Ниже приведены еще 3 правильных ответа для 6 задач (9 - 14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

– На первом этапе необходимо определить, в какое место в плазмиде наиболее оптимально можно встроить ген, нужный нам для последующего клонирования. Фрагмент ДНК грибка *Podospora*, который содержит ген β -тубулина, можно встроить при помощи рестриктазы NaeII. Для этого ДНК грибка и плазмиду нужно обработать рестрикционным ферментом NaeII, произвести гибридизацию линейной молекулы плазмиды и ДНК *Podospora* с последующим сшиванием лигазой. Полученной гибридной плазмидой трансформировать *E. coli*. Далее трансформированные бактерии выращивать на среде, содержащей тетрациклин. Затем перенести реплику (отпечаток) колоний на среду, содержащую канамицин. Так как ген устойчивости к канамицину отключен из-за вставки, то бактерии, трансформированные гибридными плазмидами, не будут расти на среде, содержащей канамицин. Колонии устойчивые к тетрациклину, но чувствительные к канамицину, и будут искомыми.

–.



–.



–. Удалось. Так как в результате вставки чужеродной ДНК в плазмиду pUC18 произошло нарушение работы гена *lac Z*, то бактериальные клетки содержащие плазмиды со встроенной ДНК образовали неокрашенные колонии, а не синие.

Тест 5

Ниже приведены 7 правильных ответов для 7 задач (15 – 21). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Никакой, поскольку величина обоих фрагментов существенно меньше 15 кб.

–. Да, удастся в любой плазмиде, например pSC101, pBR322 или pUC18, если к данному фрагменту человеческой ДНК подшить с помощью ДНК-лигазы линкерную последовательность, допустим ГААТТЦ для действия рестриктазы *EcoRI*.

–. Да можно, поскольку *EcoRI* будет разрезать ДНК дрожжевого грибка на различные фрагменты (величина 4096 н. п. является только средней), в том числе и на фрагменты длиной около 15 кб, которые легко встроится в фаг λ (λ -вектор) для последующего размножения в *E. coli*.

–. Минимальное число различных клонов, содержащих отличающиеся фрагменты ДНК человека, составляющих геномную библиотеку, в данном случае будет $45776 + 23$ или 45799 .

–. Успешно клонировать данный фрагмент ДНК в бактериофаге λ не удастся, т. к. его величина существенно меньше 15 кб.

–. Да, сумеют, поскольку величина тандемной (двойной) копии данного гена составит около 41 кб и этот фрагмент ДНК можно будет успешно клонировать в космидном векторе.

–. Минимальное число различных клонов, содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Drosophila melanogaster*, составляющих геномную библиотеку этого вида, будет $24414+4$ или 24418 .

Тест 6

1. Что называется вектором?

а) молекула РНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать клонирование и работу

встроенного в нее искусственно гена;

б) молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать клонирование и работу встроенного в нее искусственно гена;

в) молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать клонирование встроенного в нее искусственно гена;

г) молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать экспрессию встроенного в нее искусственно гена.

2. У какой из ниже перечисленных плазмид имеется один сайт рестрикции для рестриктазы EcoR I и ген устойчивости к тетрациклину?

а) pSC101;

б) pBR322;

в) pUC18.

3*. Назовите антибиотики, к которым у плазмиды pBR322 имеются гены устойчивости.

а) тетрациклин;

б) ампицилин;

в) пеницилин.

4. Сколько сайтов рестрикции несет полилинкер у плазмиды pUC18?

а) 5;

б) 7;

в) 10

5. Назовите плазмиду, которая была использована для создания и клонирования первых рекомбинантных ДНК:

а) pSC101;

б) pBR322;

в) pUC18.

6. Выберите величину фрагмента ДНК, который можно встроить в плазмиду:

а) 4 кб;

б) 12 кб;

в) 23 кб;

г) 35 кб.

7. В каком векторе можно клонировать ген величиной 40 кб?

а) в плазмиде;

б) в космиде;

в) в фаге λ .

8. Как называется участок космиды, позволяющий ей реплицироваться в *E.coli*?

- а) полилинкер;
- б) *cos*-сайт;
- в) последовательность *ori*.

9. Какова длина *cos*-сайта?

- а) 10 нуклеотидов;
- б) 12 нуклеотидов;
- в) 16 нуклеотидов;
- г) 20 нуклеотидов.

10*. Назовите векторы, которые служат для доставки чужеродных генов в эукариотическую клетку:

- а) плазмиды;
- б) вирусы;
- в) космиды;
- г) фаги.

11. В каком году была создана геномная библиотека дрозофилы?

- а) в 1935г.;
- б) в 1967 г.;
- в) в 1974 г.;
- г) в 1983 г.

12*. Из ниже приведенного перечня выберите инструменты генетической инженерии:

- а) векторы;
- б) ДНК-полимеразы;
- в) рестриктазы;
- г) ДНК- лигазы;
- д) кДНКовые зонды.