

**Materiały do ćwiczeń z przedmiotu
Genetyka z inżynierią genetyczną D - blok**

Inżynieria Genetyczna

ćw. 1

**Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii,
Uniwersytet Warszawski, rok akad. 2018/2019**

*Prosimy o nierozpowszechnianie materiałów bez
naszej zgody*

Analiza funkcjonalna białka Pet127p z *S. cerevisiae*

- **Pet127p** to mitochondrialne białko kodowane jądrowo, odpowiedzialne za dojrzewanie transkryptów mitochondrialnych
- W danych literaturowych figuruje jako potencjalna egzorybonukleaza, degradująca mitochondrialne RNA w kierunku 5' → 3'
- Brak białka Pet127 (**delecja genu *PET127***) zaburza metabolizm RNA w mitochondriach, co objawia się upośledzeniem procesu oddychania tlenowego w komórkach drożdży w temp. 37°C
- **Oddychanie tlenowe** – możliwość wzrostu na niefermentowalnym źródle węgla (np. glicerolu)
- **Oddychanie beztlenowe** – fermentacja w cytoplazmie (np. glukozy)
- Analiza funkcjonalna poprzez **ukierunkowaną mutagenezę** i kontrolę fenotypów oddychania (testy wzrostowe na podłożach z fermentowalnym lub niefermentowalnym źródle węgla)

Schemat mutagenezy Pet127p

1. **PCR** z wykorzystaniem oligonukleotydowych starterów, zawierających zmianę nukleotydu w miejscu wprowadzanej mutacji, na matrycy plazmidowego DNA (wektora bifunkcyjnego, bakteryjno-drożdżowego, ze sklonowanym genem *PET127*)
2. **Usunięcie metylowanej matrycy** - trawienie matrycy enzymem restrykcyjnym Dpn1 po reakcji PCR
3. **Transformacja bakterii *E. coli***
4. **Izolacja DNA plazmidowego** z wielu klonów
5. **Analiza sekwencji poszczególnych plazmidów** poszukiwanie pozytywnych klonów
6. **Transformacja drożdży** plazmidami zawierającymi zmutowane sekwencje genu *PET127*
7. **Analiza fenotypów** – kroplowe testy wzrostowe na podłożach z glukozą lub glicerolem w temp. 30°C lub 37°C
8. **Kontrola genotypów:** sekwencjonowanie plazmidów użytych do transformacji (kontrola mutagenezy) i test PCR na obecność wektora i kasy delecyjnej w otrzymanych szczepach (kontrola molekularna mutantów)

Ćwiczenie praktyczne 1

Mutageneza:

- Podmiana kodonów reszt aminokwasowych w potencjalnej domenie egzorybonukleolitycznej *Pet127p*
- Matryca do mutagenezy – bifunkcyjny wektor drożdżowo-bakteryjny ze sklonowanym genem *PET127* (pYCplac33::*PET127* - 8,6 kb)
- Wg zmodyfikowanego protokołu Stratagene QuickChange Site-Directed Mutagenesis, z zastosowaniem polimerazy Phusion

Ćwiczenie praktyczne 1 – wykonanie

- 1. Przygotowanie reakcji PCR.** Do **40,0 μ l** mieszaniny reakcyjnej zawierającej 1x bufor, polimerazę Phusion, dNTP. Dodać matrycę DNA (pYCplac33::PET127) po **5 μ l** oraz dodać po **2,5 μ l** każdego z 2 starterów do mutagenezy (w stężeniu 50 ng/ μ l).
- 2. Reakcję prowadzić w termocyklerze wg programu:**
98°C, 30 sek (98°C, 30 sek; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min 15 sek) x12, 4°C, ∞ .
- 3. Trawienie matrycy.** Po skończeniu reakcji PCR dodać 2,0 μ l enzymu restrykcyjnego DpnI. Inkubować w 37°C, 15 min. a następnie wstawić mieszaninę reakcyjną na lód.
- 4. Transformacja bakterii chemokompetentnych *E. coli*.** Do probówki zawierającej 100 μ l chemokompetentnych komórek *E. coli* szczepu MH2 dodać **10 μ l** mieszaniny reakcyjnej.

Próby inkubować 10 minut na lodzie, a następnie przenieść na dokładnie 90 sek do temp. 42°C.

Natychmiast przenieść próby na lód i inkubować przez 2 min. Po inkubacji dodać 900 μ l pożywki SOB i wysiać 100 μ l mieszaniny na szalkę LB z dodatkiem 50 μ g/ml ampicyliny. Wstawić szalki do cieplarki i inkubować przez noc w 37°C.

Ćwiczenie praktyczne 1

cz. 1 - PCR do mutagenezy

Przygotowanie reakcji PCR. Do **40,0 μ l** mieszaniny reakcyjnej zawierającej 1x bufor, polimerazę Phusion, dNTP. Dodać matrycę DNA (pYCplac33::PET127) po **5 μ l** oraz po **2,5 μ l** każdego z 2 starterów do mutagenezy (w stężeniu 50 ng/ μ l).

Proszę wykonać dwie **kontrole doświadczenia** - po 1 na grupę: -DNA (mieszanina bez plazmidu dla dowolnie wybranej pary starterów) oraz efektywności trawienia Dpn1 (**5 μ l wody zamiast starterów**). Traktować je dalej jak standardowe reakcje.

Reakcję przeprowadzić w termocyklerze wg programu:

98°C, 30 sek

(98°C, 30 sek; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min 15 sek) x12,

4°C, ∞ .

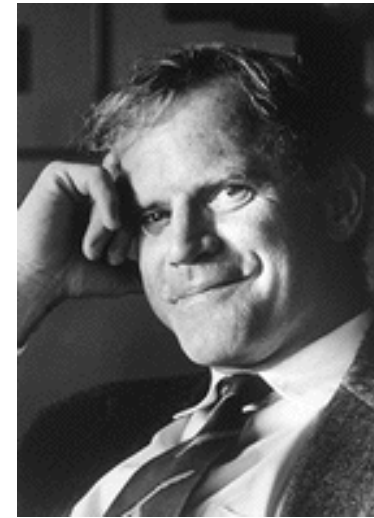
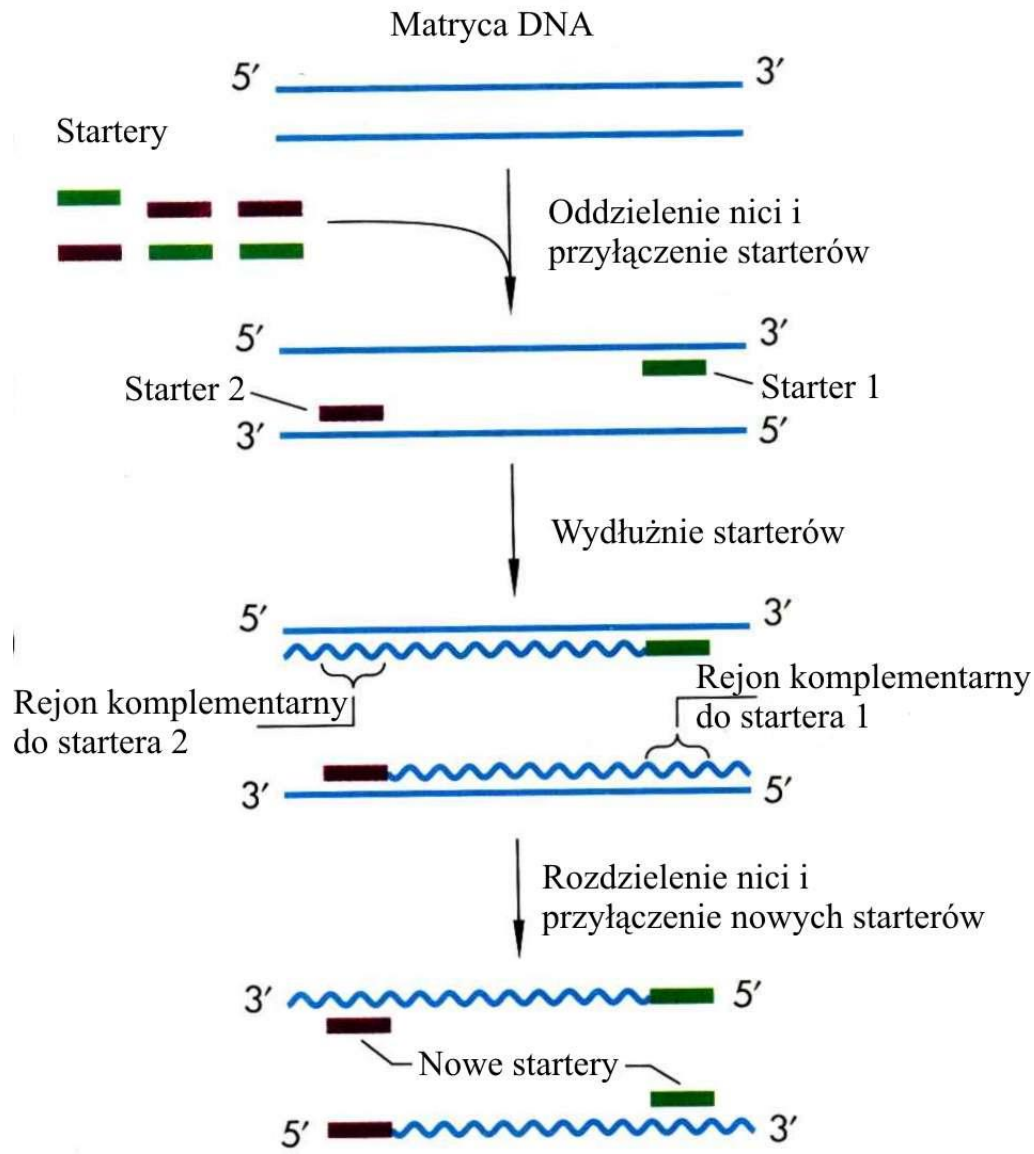
PCR

(ang. Polymerase Chain Reaction)

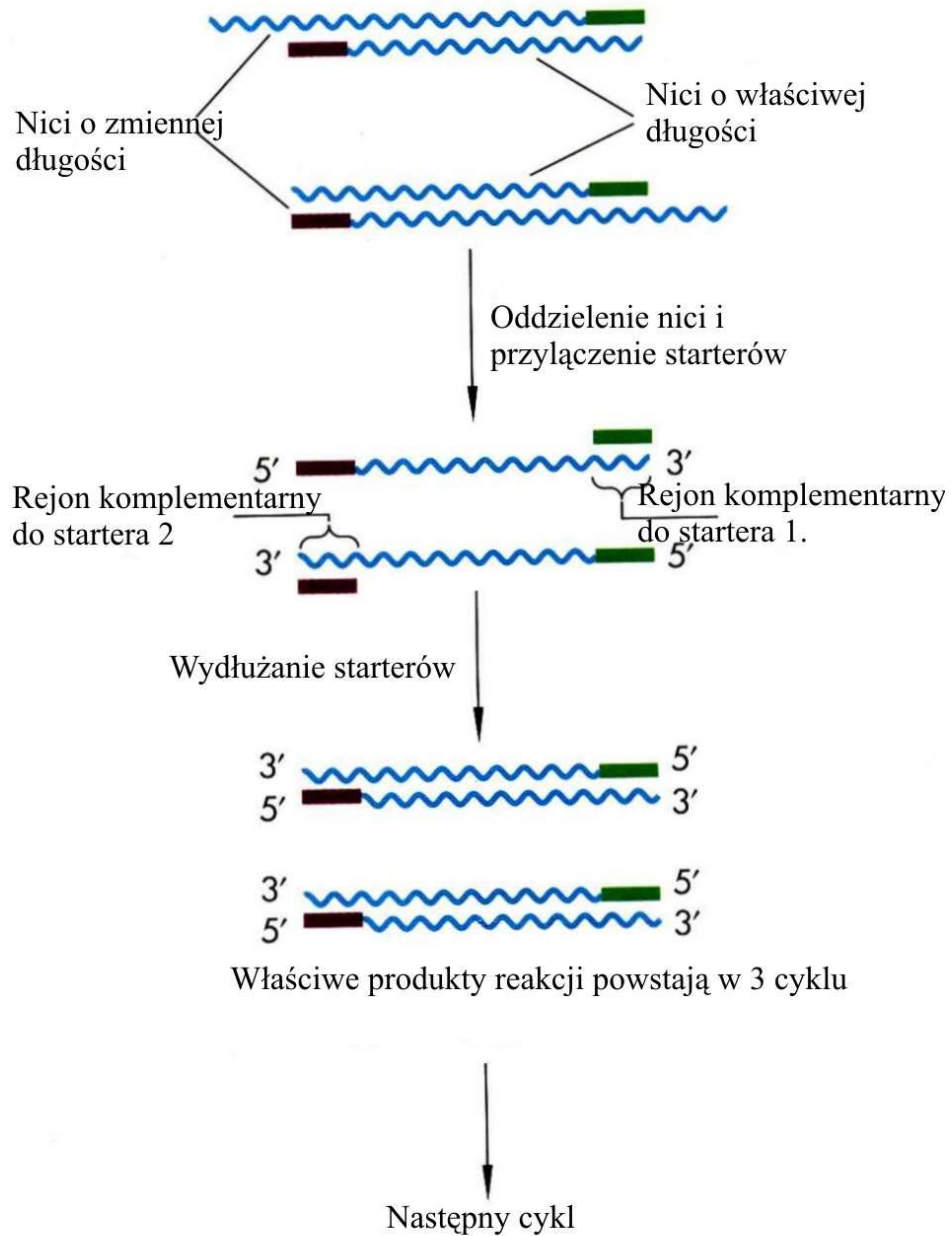
Łańcuchowa reakcja polimerazy

- podstawowa technika biologii molekularnej, która umożliwia powielenie określonego fragmentu DNA

Schemat reakcji PCR:



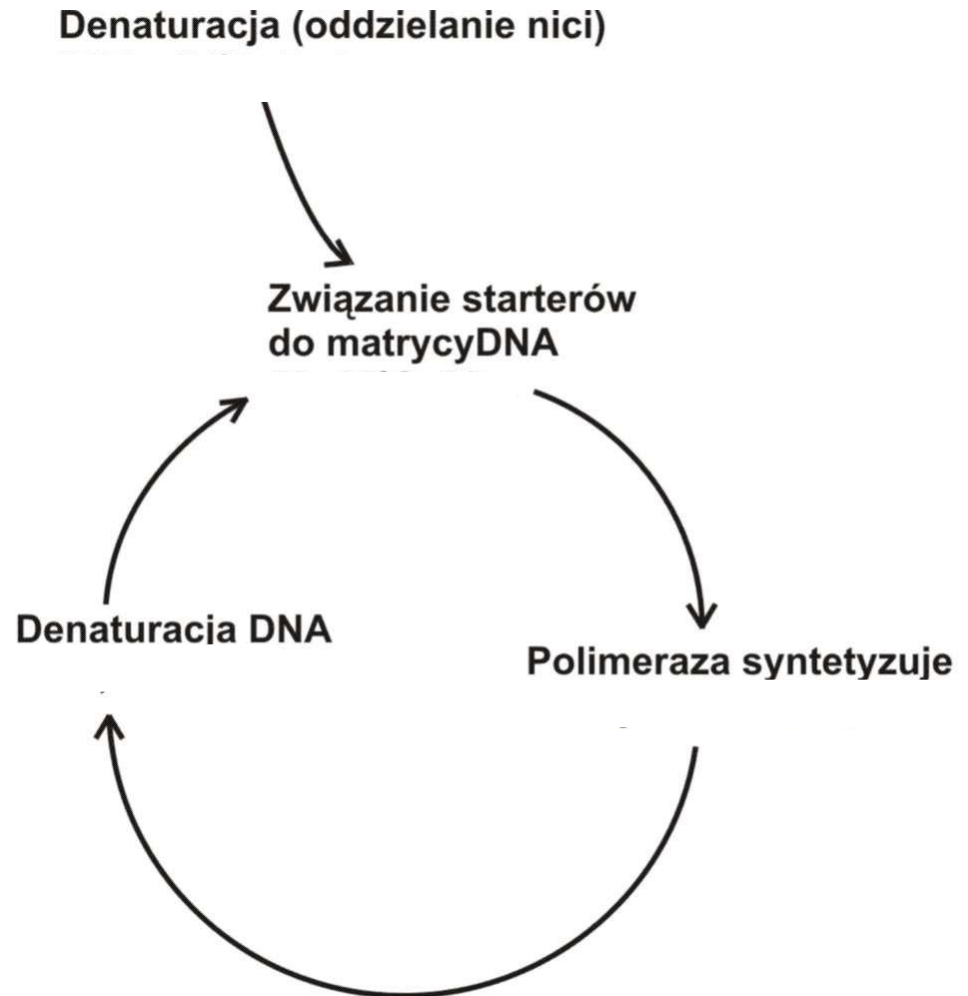
Kary Mullis – wymyślając w połowie lat 80-tych technikę PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy), zrewolucjonizował biologię molekularną.



Liczba powstających produktów:

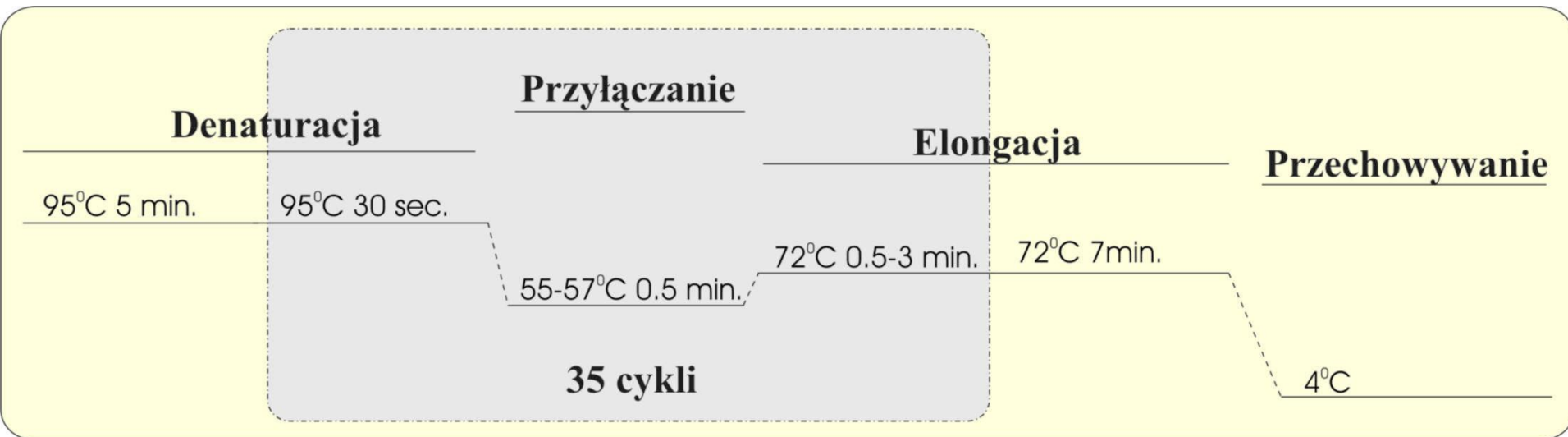
Cykl Liczba cząsteczek produktu

1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16,384
17	32,768
18	65,536
19	131,072
20	262,144
21	524,288
22	1,048,576
23	2,097,152
24	4,194,304
25	8,388,608
26	16,777,216
27	33,544,432
28	67,108,864
29	134,217,728
30	268,435,456
31	536,870,912
32	1,073,741,824



Zmiany temperatury podczas reakcji PCR

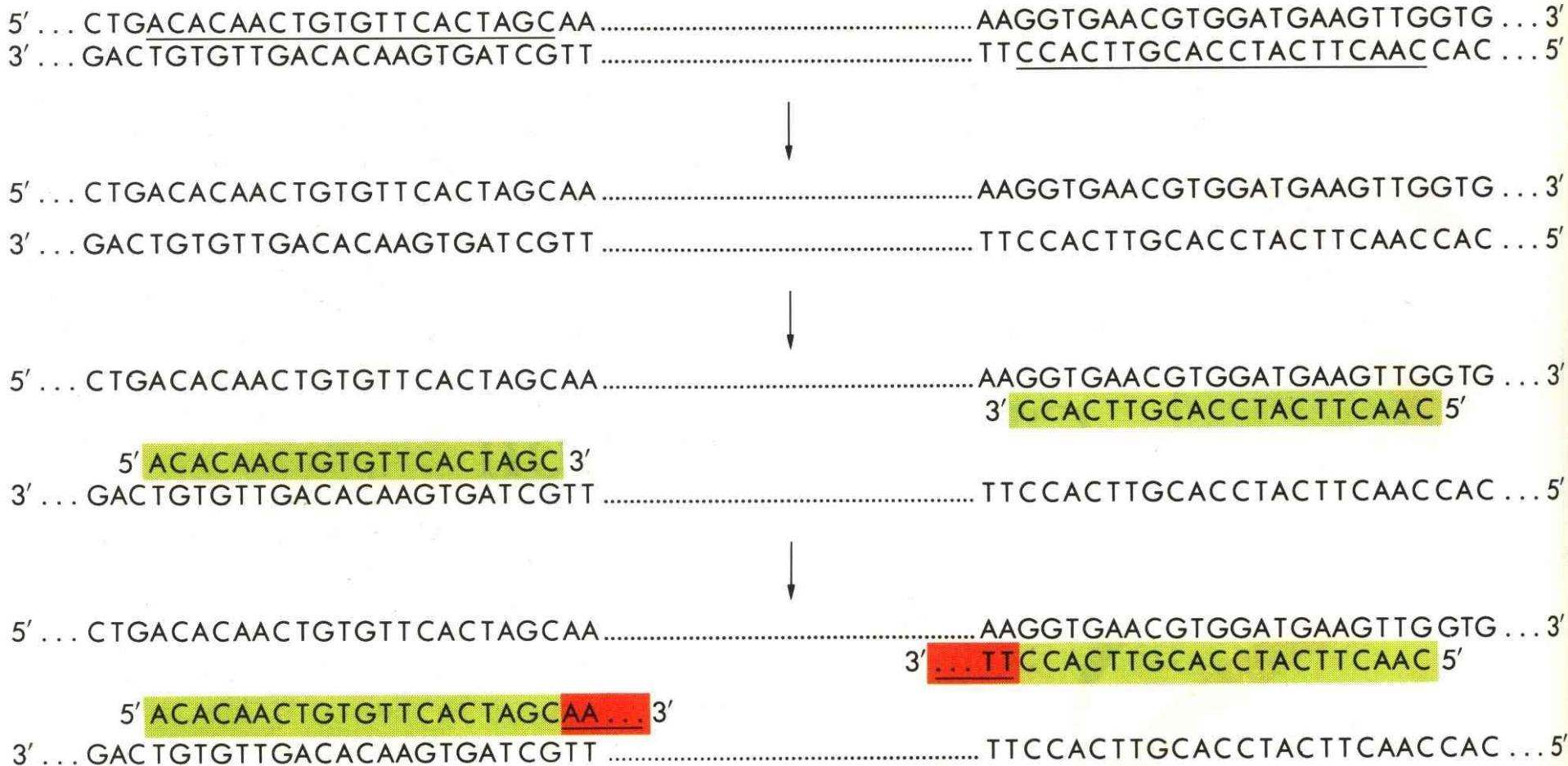
Przylączenie starterów – temperatura zależy od ich długości i sekwencji



Denaturacja – nici DNA rozłączają się pod wpływem temperatury

Wydluzanie – polimeraza dobudowuje komplementarną sekwencję

Startery to krótkie odcinki DNA komplementarne do powielanej sekwencji



Składniki reakcji PCR

- Matryca
- Polimeraza DNA
 - syntetyzuje nić DNA tylko w jednym kierunku ($5' \rightarrow 3'$)
 - do rozpoczęcia syntezy potrzebuje startera
- Startery
- Mieszanina dezoksyrybonukleotydów (dNTP)
- Bufor

Zalety i wady PCR

Zalety:

- bardzo wysoka czułość
- specyficzność
- krótki czas trwania
- prostota

Wady:

- bardzo wysoka czułość

Dlatego konieczne są odpowiednie **kontrole** czystości reakcji i jej prawidłowego przebiegu.

Jakie??

Kontrole reakcji PCR

Kontrola pozytywna (+):

- próba, o której wiemy, że w danych warunkach reakcji da odpowiedni produkt

Kontrola negatywna (-):

- próba, w której przy zachowaniu właściwej czystości pracy nie powstanie żaden produkt, najczęściej bez matrycy

Jaka jest sekwencja starterów?

Poniżej przedstawiono sekwencję 700 nukleotydów mitochondrialnego DNA człowieka. Napisz sekwencję starterów o długości 20 nukleotydów, które umożliwią namnożenie DNA, które odpowiada pogrubionej sekwencji. Sekwencję starterów wpisz zgodnie z regułą 5'→3'. Jaką długość będzie miał produkt reakcji PCR?

GATCACAGGT	CTATCACCCCT	ATTAACCCACT	CACGGGAGCT	CTCCATGCAT
TTGGTATTTT	CGTCTGGGGG	GTGTGCACGC	GATAGCATTG	CGAGACGCTG
GAGCCGGAGC	ACCCTATGTC	GCAGTATCTG	TCTT TGATTC	CTGCCTCATC
CTATTATTTA	TCGCACCTAC	GTTCAATATT	ACAGGCGAAC	ATACTTACTA
AAGTGTGTTA	ATTAATTAAT	GCTTGTAGGA	CATAATAATA	ACAATTGAAT
GTCTGCACAG	CCGCTTTCCA	CACAGACATC	ATAACAAAAA	ATTTCCACCA
AACCCCCCCC	CTCCCCCCGC	TTCTGGCCAC	AGCACTTAAA	CACATCTCTG
CCAAACCCCA	AAAACAAAGA	ACCCTAACAC	CAGCCTAACC	AGATTTCAAA
TTTTATCTTT	TGGCGGTATG	CACTTTTAAAC	AGTCACCCCC	CAACTAACAC
ATTATTTTCC	CCTCCCCTC	CCATACTACT	AATCTCATCA	ATACAACCCC
CGCCCATCCT	ACCCAGCACA	CACACACCGC	TGCTAACCCC	ATACCCCGAA
CCAACCAAAC	CCCAAAGACA	CCCCCACAG	TTTATGTAGC	TTACCTCCTC
AAAGCAATAC	ACTGAAAATG	TTTAGACGGG	CTCACATCAC	CCCATAAACA
AATAGGTTTG	GTCCTAGCCT	TTCTATTAGC	TCTTAGTAAG	ATTACACATG

Długość produktu reakcji PCR: 302 pz

GATCACAGGT CTATCACCT ATTAACCACT CACGGGAGCT CTCCATGCAT
 TTGGTATTTT CGTCTGGGGG GTGTGCACGC GATAGCATTG CGAGACGCTG
 GAGCCGGAGC ACCCTATGTC GCAGTATCTG TCTTTGATTC CTGCCTCATC
CTATTATTTA **TCGCACCTAC** **GTTCAATATT** **ACAGGCGAAC** **ATACTTACTA**
AAGTGTGTTA **ATTAATTAAT** **GCTTGTAGGA** **CATAATAATA** **ACAATTGAAT**
GTCTGCACAG **CCGCTTTCCA** **CACAGACATC** **ATAACAAAAA** **ATTTCCACCA**
AACCCCCCCC **CTCCCCCCGC** **TTCTGGCCAC** **AGCACTTAAA** **CACATCTCTG**
CCAAACCCCA **AAAACAAAGA** **ACCCTAACAC** **CAGCCTAACC** **AGATTTCAAA**
TTTTATCTTT **TGGCGGTATG** **CACTTTAAC** **AGTCACCCCC** **CAACTAACAC**
 ATTATTTTCC CCTCCCCTC CCATACTACT AATCTCATCA ATACAACCCC
 CGCCCATCCT ACCCAGCACA CACACACCGC TGCTAACCCC ATACCCCGAA
 CCAACCAAAC CCCAAAGACA CCCCCACAG TTTATGTAGC TTACCTCCTC
 AAAGCAATAC ACTGAAAATG TTTAGACGGG CTCACATCAC CCCATAAACA
 AATAGGTTTG GTCCTAGCCT TTCTATTAGC TCTTAGTAAG ATTACACATG

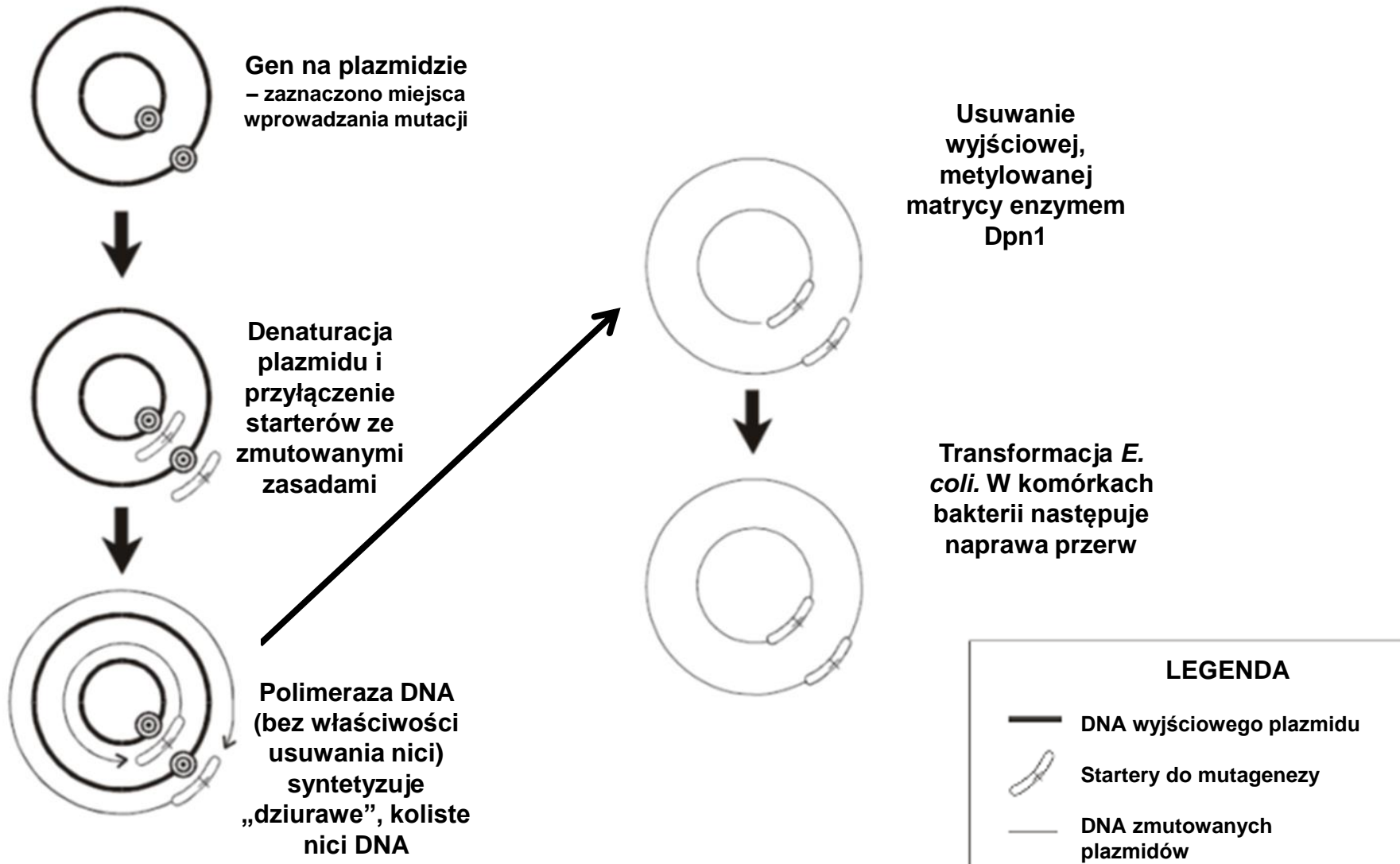
Długość produktu reakcji PCR: 302 pz

GATCACAGGT CTATCACCT ATTAACCACT CACGGGAGCT CTCCATGCAT
 TTGGTATTTT CGTCTGGGGG GTGTGCACGC GATAGCATTG CGAGACGCTG
 GAGCCGGAGC ACCCTATGTC GCAGTATCTG TCTTTGATT CTGCCTCATC
CTATTATTTA TCGCACCTAC GTTCAATATT ACAGGCGAAC ATACTTACTA
AAGTGTGTTA ATTAATTAAT GCTTGTAGGA CATAATAATA ACAATTGAAT
GTCTGCACAG CCGCTTTCCA CACAGACATC ATAACAAAA ATTTCCACCA
AACCCCCCC CTCCCCCGC TTCTGGCCAC AGCACTTAAA CACATCTCTG
CCAAACCCA AAAACAAAGA ACCCTAACAC CAGCCTAACC AGATTTCAA
TTTTATCTTT TGGCGGTATG CACTTTTAAC AGTCACCCCC CAACTAACAC
 ATTATTTTCC CCTCCCCTC CCATACTACT AATCTCATCA ATACAACCCC
 CGCCCATCCT ACCCAGCACA CACACACCGC TGCTAACCCC ATACCCCGAA
 CCAACCAAAC CCCAAAGACA CCCCCACAG TTTATGTAGC TTACCTCCTC
 AAAGCAATAC ACTGAAAATG TTTAGACGGG CTCACATCAC CCCATAAACA
 AATAGGTTTG GTCCTAGCCT TTCTATTAGC TCTTAGTAAG ATTACACATG

Starter lewy: **TGATTCTGCCTCATCCTAT**

Starter prawy: **GTGACTGTTAAAAGTGCATA**

Schemat mutagenезy ukierunkowanej wg protokołu Stratagene QuickChange Site-Directed Mutagenesis

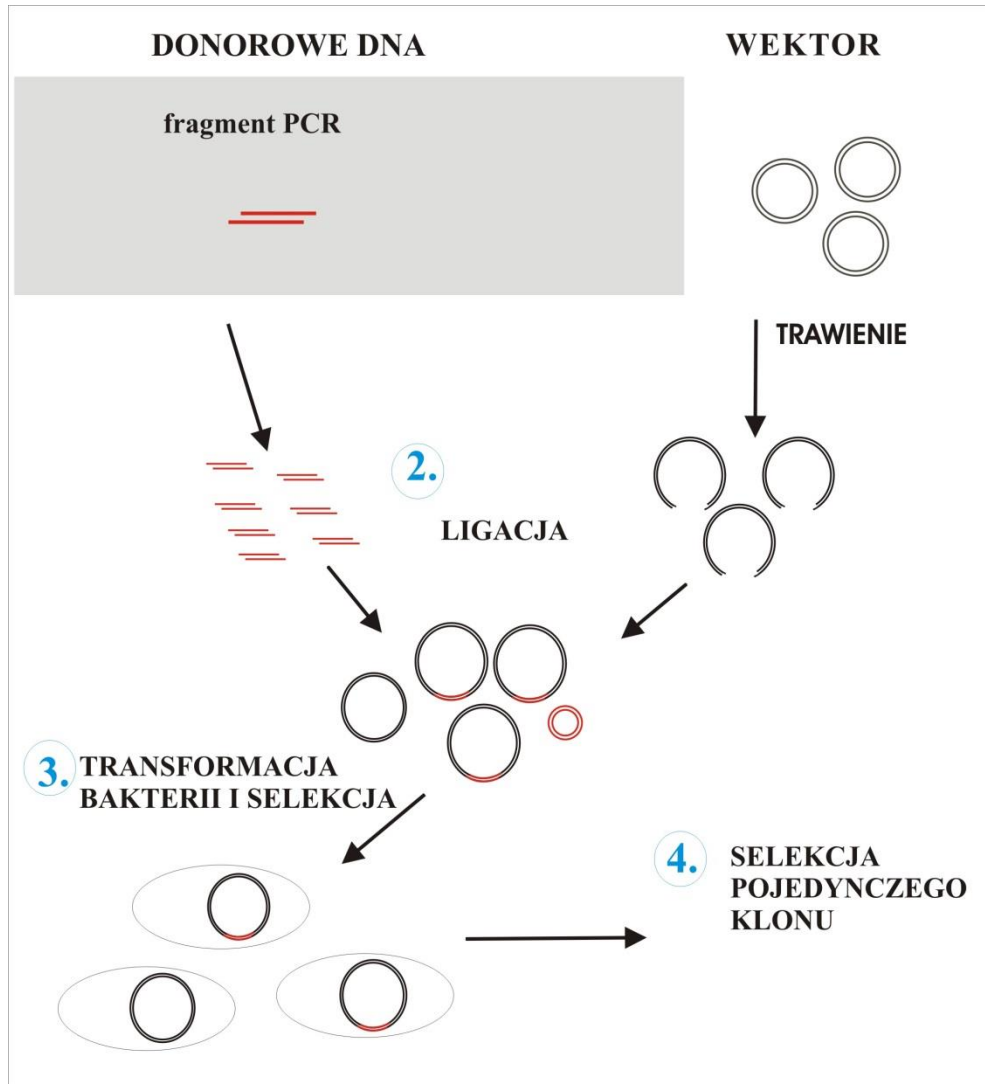


Ćwiczenie praktyczne 1

cz. 2 - trawienie Dpn1 metylowanych matryc w produktach reakcji PCR

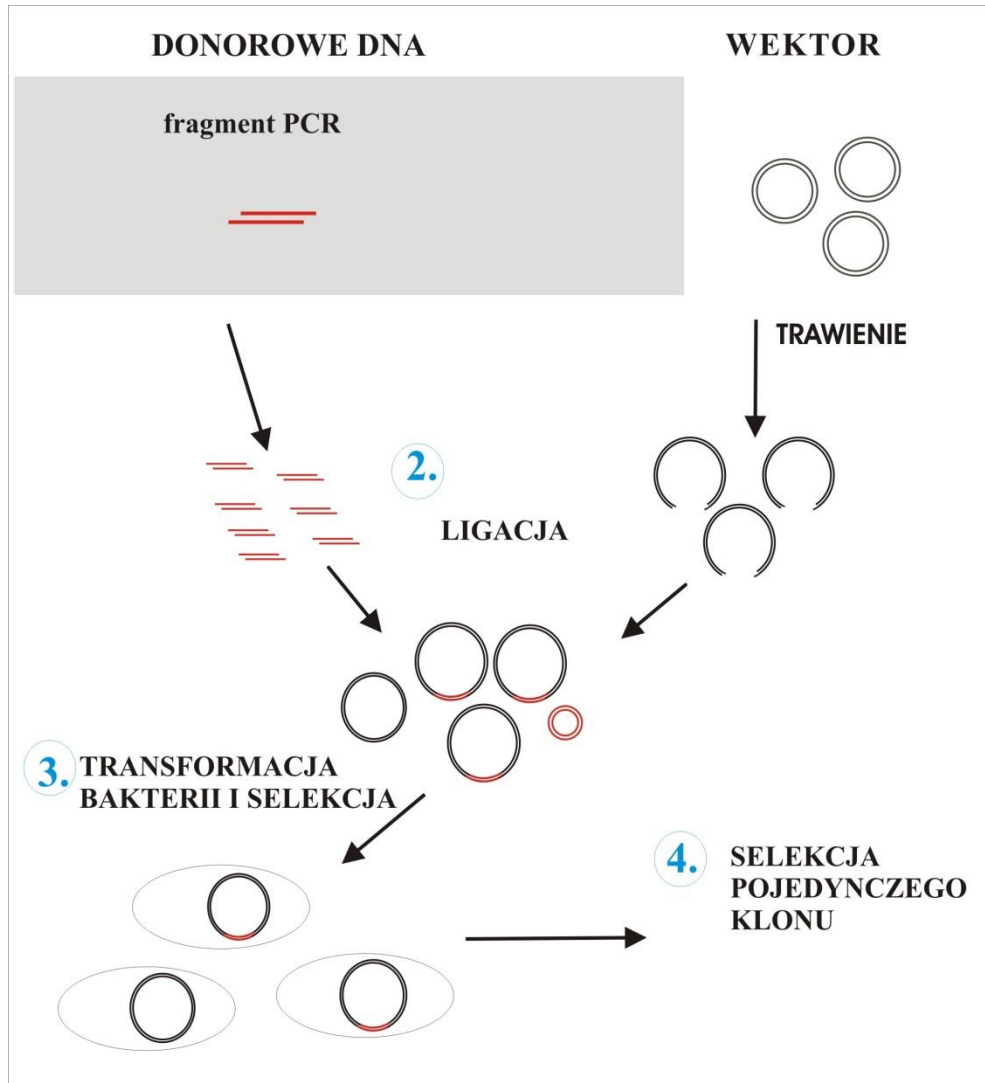
Trawienie matrycy. Po skończeniu reakcji PCR dodać **2,0 μ l** enzymu restrykcyjnego DpnI. Inkubować w 37°C, **15 min.** a następnie wstawić mieszaninę reakcyjną na lód.

Klonowanie fragmentu PCR na bakteryjnym wektorze plazmidowym



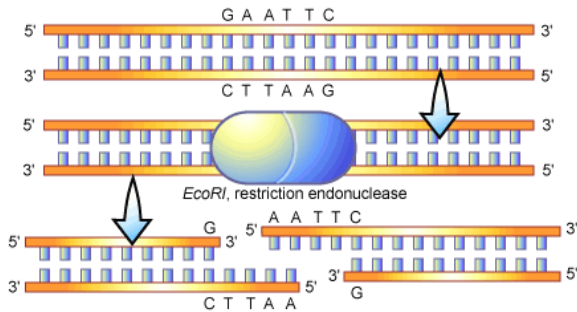
1. Reakcja PCR na matrycy całkowitego DNA drożdżowego
2. Trawienie produktu PCR i wektora (pUC19) EcoRI i BamHI
3. Ligacja
4. Transformacja bakterii chemokompetentnych
5. Selekcja pojedynczego klonu (α -komplementacja)

Klonowanie fragmentu PCR na bakteryjnym wektorze plazmidowym

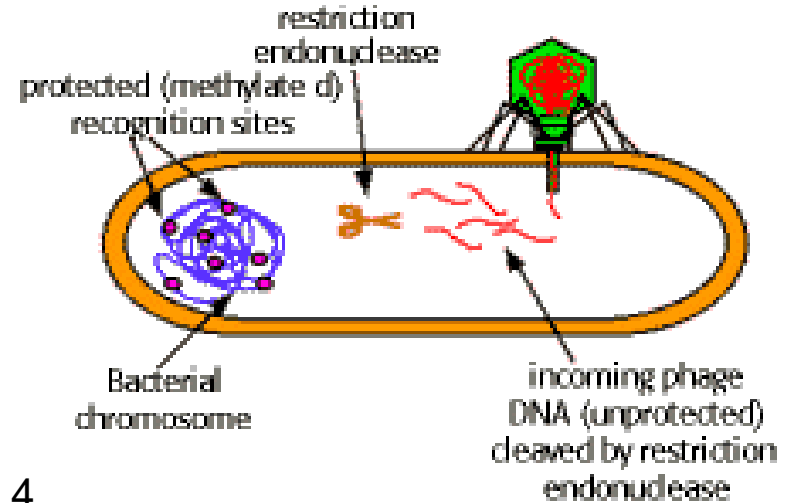


1. Reakcja PCR na matrycy całkowitego DNA drożdżowego
2. Trawienie produktu PCR i wektora (pUC19) EcoRI i BamHI
3. Ligacja
4. Transformacja bakterii chemokompetentnych
5. Selekcja pojedynczego klonu (α -komplementacja)

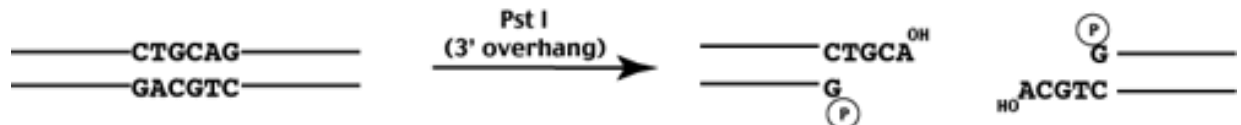
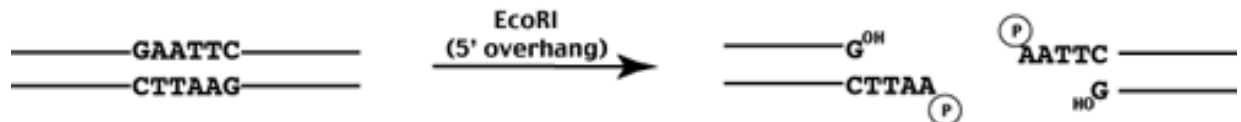
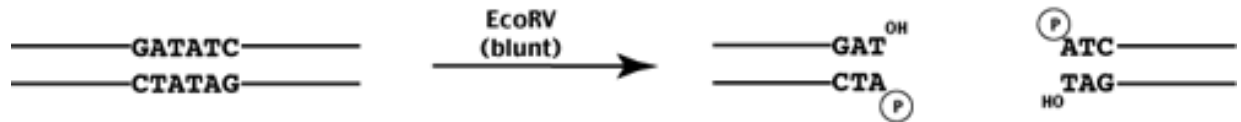
ENZYMY RESTRYKCYJNE



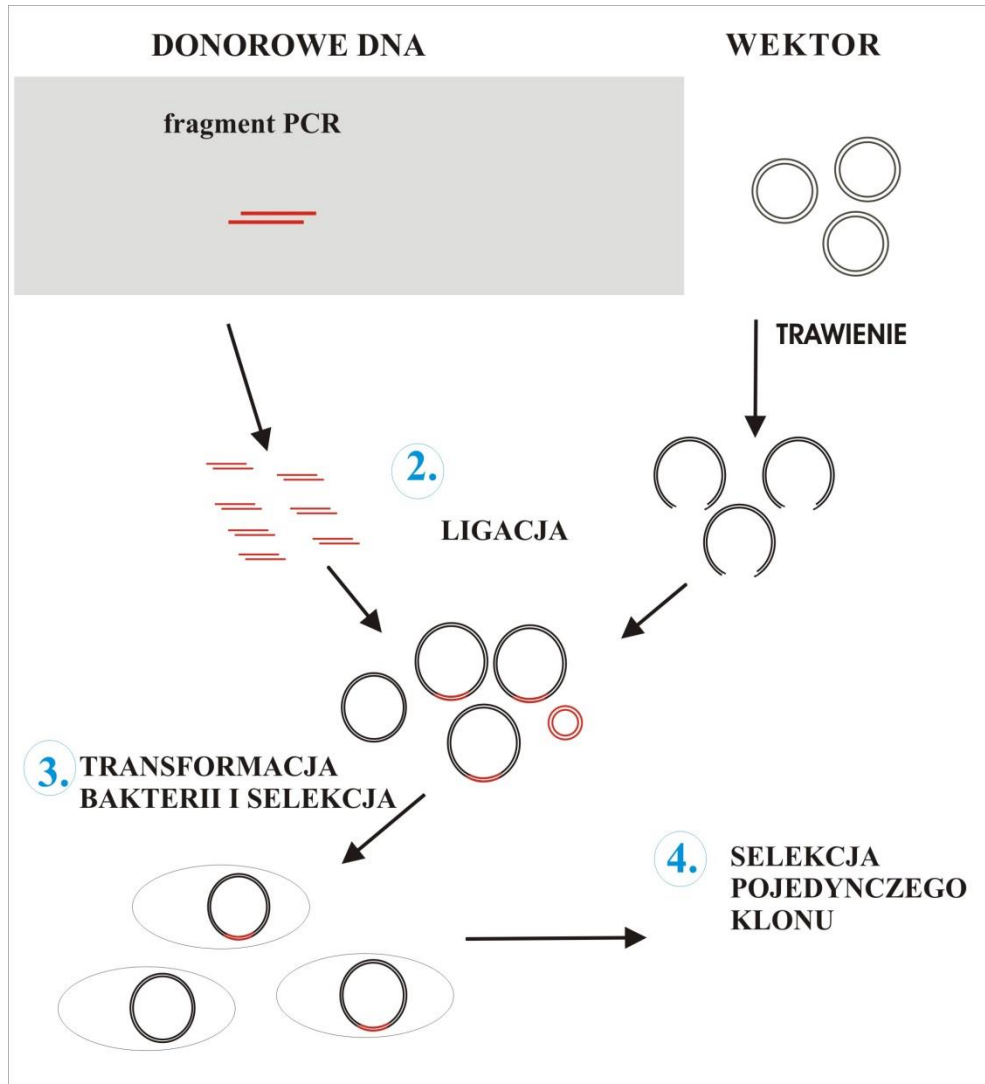
1. W bakteriach pełnią funkcje obrony przed wirusami
2. Enzymy restrykcyjne klasy II tną dwuniciowe DNA w obrębie lub poblizu określonej sekwencji
3. Rozpoznawane sekwencje są palindromowe, zwykle 4 lub 6 nukleotydowe



Po cięciu enzymem restrykcyjnym powstają fragmenty DNA z "lepkimi" lub "tępymi końcami."



Klonowanie fragmentu PCR na bakteryjnym wektorze plazmidowym

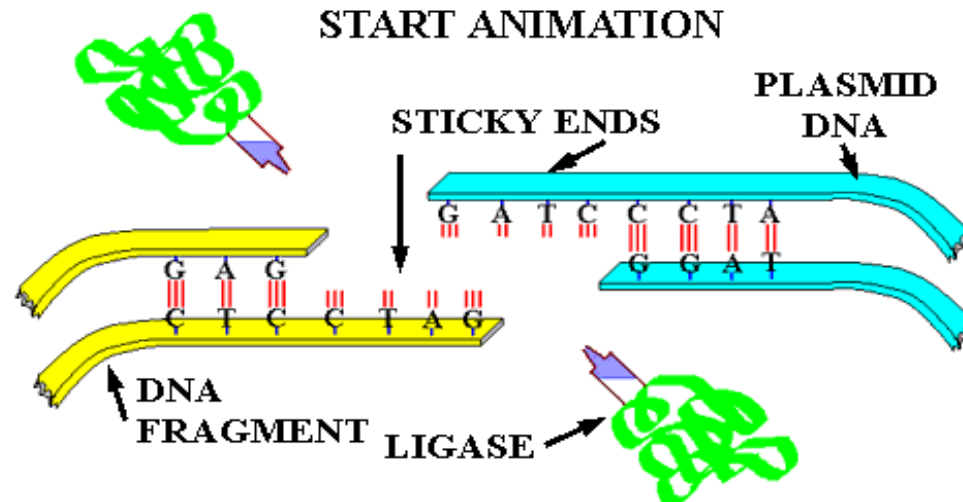


1. Reakcja PCR na matrycy całkowitego DNA drożdżowego
2. Trawienie produktu PCR i wektora (pUC19) EcoRI i BamHI
3. Ligacja
4. Transformacja bakterii chemokompetentnych
5. Selekcja pojedynczego klonu (α -komplementacja)

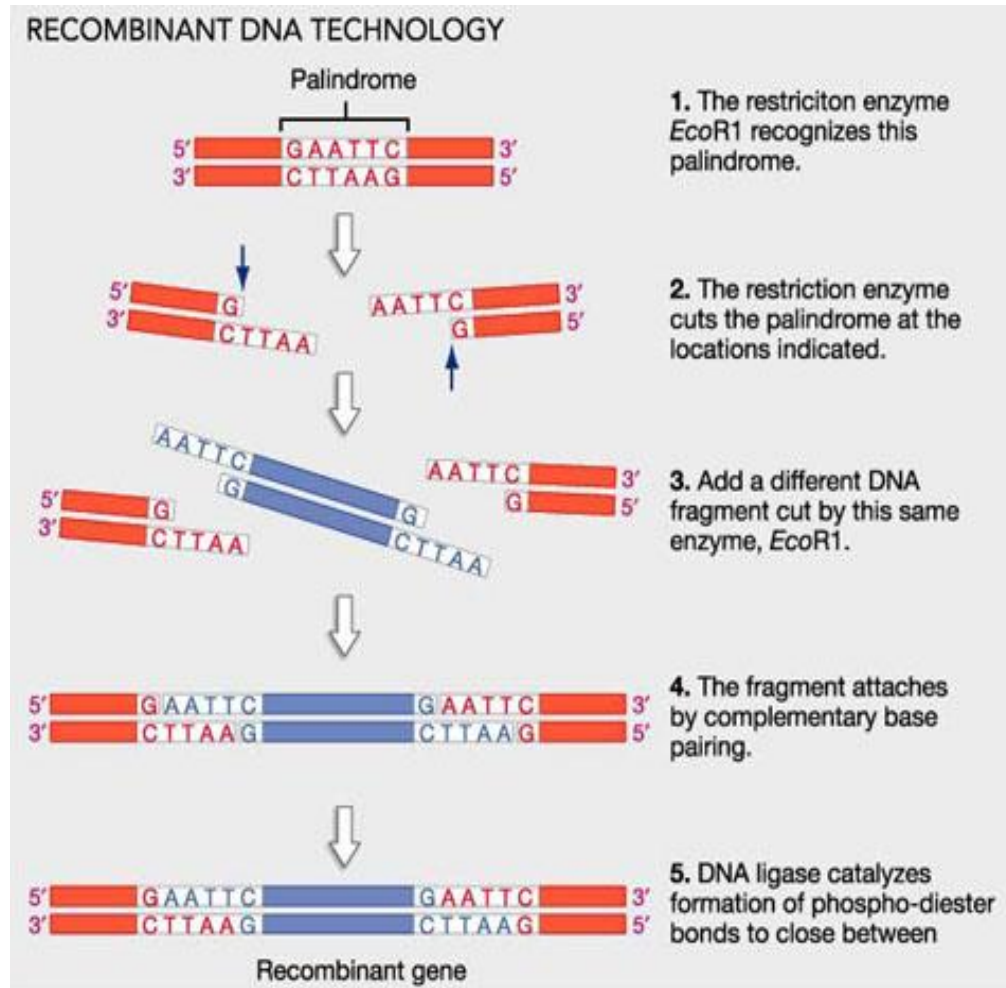
LIGAZA "SKLEJA" DNA

Ligazy łączą dwa fragmenty DNA

Ligaza tworzy wiązania fosfodiesterowe między grupą 3' OH deoksyrybozy, a grupą fosforanową



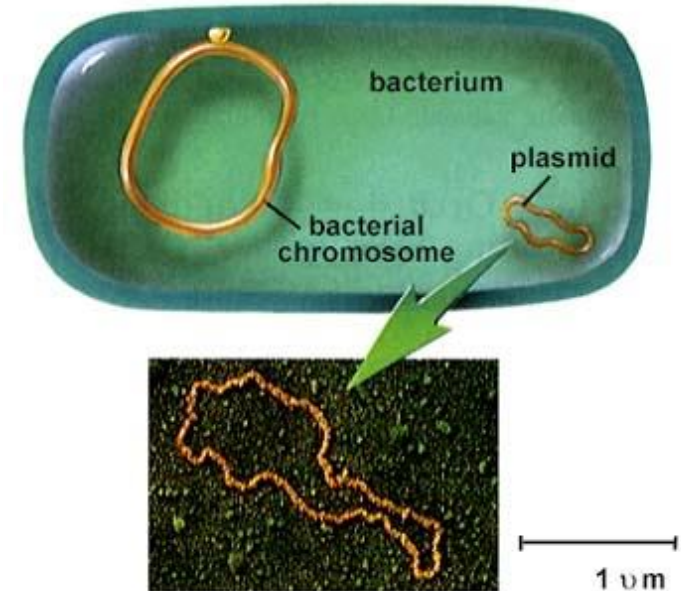
LIGACJA WEKTORA ZE WSTAWKĄ



Po ligacji plazmidu ze wstawką powstają 3 rodzaje cząsteczek!!!

WEKTORY- PODSTAWOWE NARZĘDZIE W TECHNICIE KLONOWANIA

1. Najczęściej stosowanymi wektorami są **plazmidy**
2. Plazmidowe wektory bakteryjne powstały na bazie plazmidów naturalnie występujących w komórkach bakterii.
3. Dostępne wektory plazmidowe zawierają pewne podstawowe elementy:



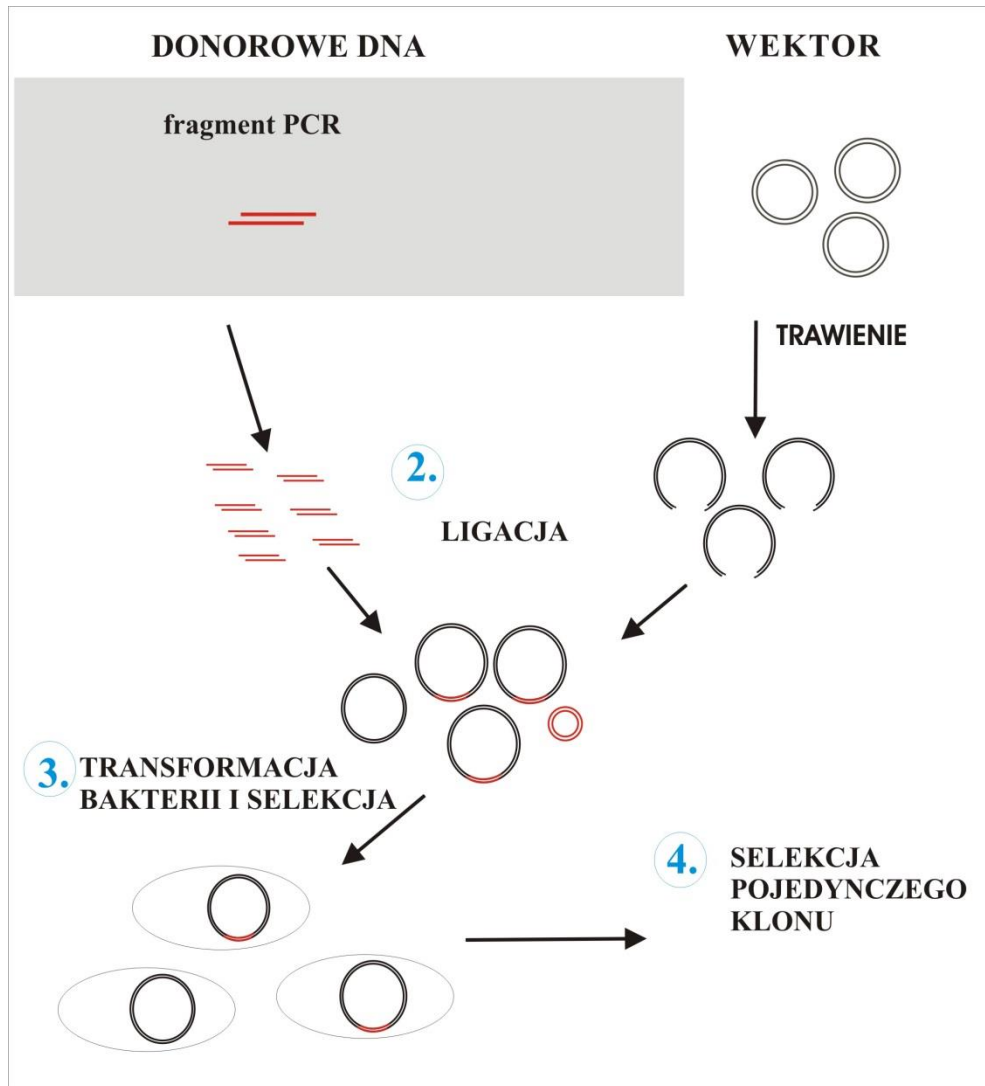
ORI- miejsce inicjacji replikacji. Specyficzne dla gatunku bakterii, od specyfiki tego miejsca zależy liczba kopii plazmidu w komórce, plazmid może zawierać kilka *ori* specyficznych dla różnych organizmów.

POLILINKER- sztucznie wytworzony odcinek DNA zawierający sekwencje rozpoznawane przez wiele enzymów restrykcyjnych.

MARKER I- pozwala odróżnić bakterie posiadające plazmid, od tych które go nie pobrały

MARKER II- pozwala odróżnić bakterie które pobrały plazmid ze wstawką, od tych które pobrały "pusty" plazmid

Klonowanie fragmentu PCR na bakteryjnym wektorze plazmidowym



1. Reakcja PCR na matrycy całkowitego DNA drożdżowego
2. Trawienie produktu PCR i wektora (pUC19) EcoRI i BamHI
3. Ligacja
4. Transformacja bakterii chemokompetentnych
5. Selekcja pojedynczego klonu (α -komplementacja)

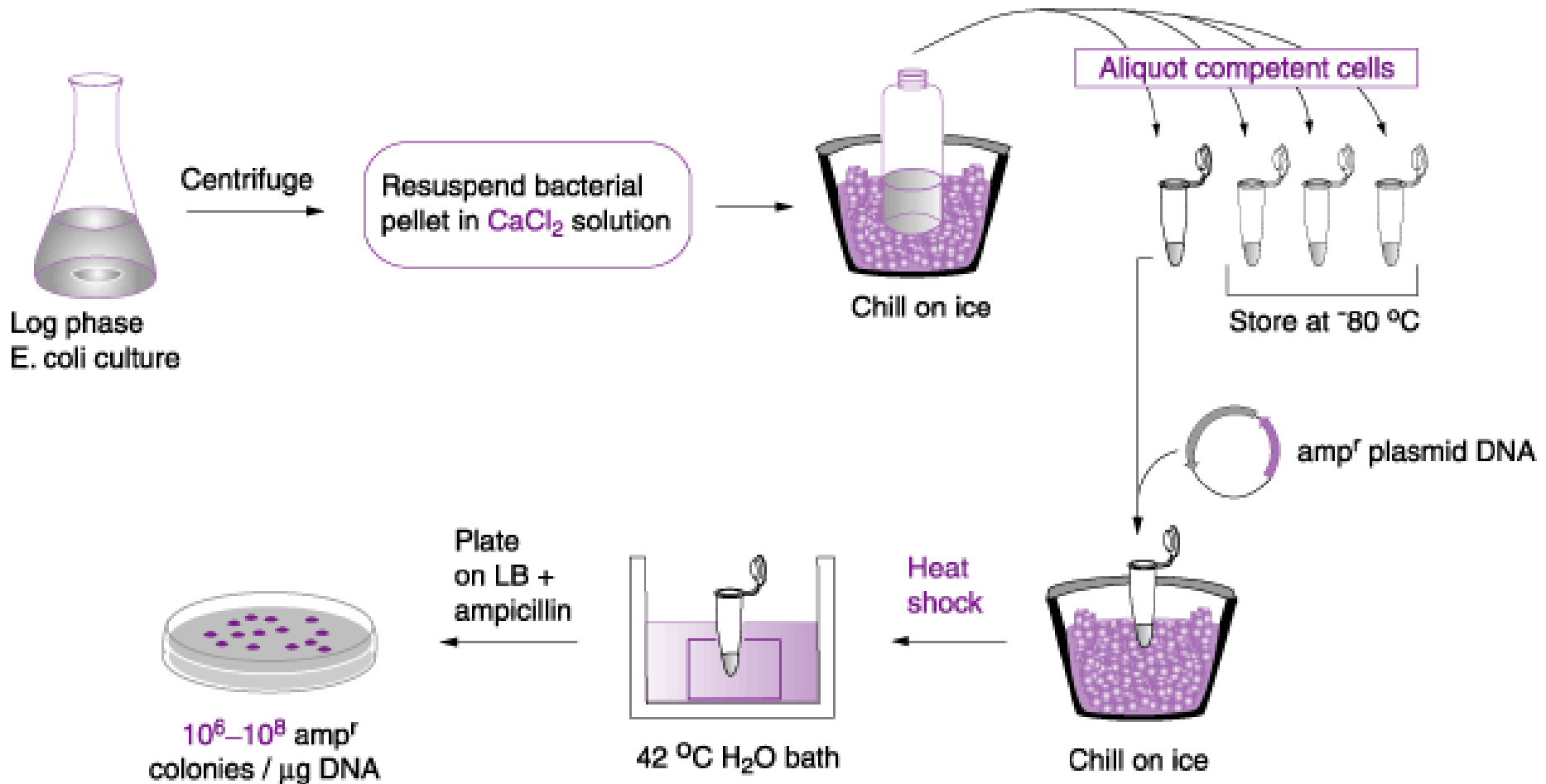
Komórki **biorcy** do transformacji są odpowiednio **przygotowane genetycznie**

W celu zwiększenia wydajności replikacji obcego DNA, szczepy bakterii wykorzystywanych do klonowań posiadają uszkodzone systemy:

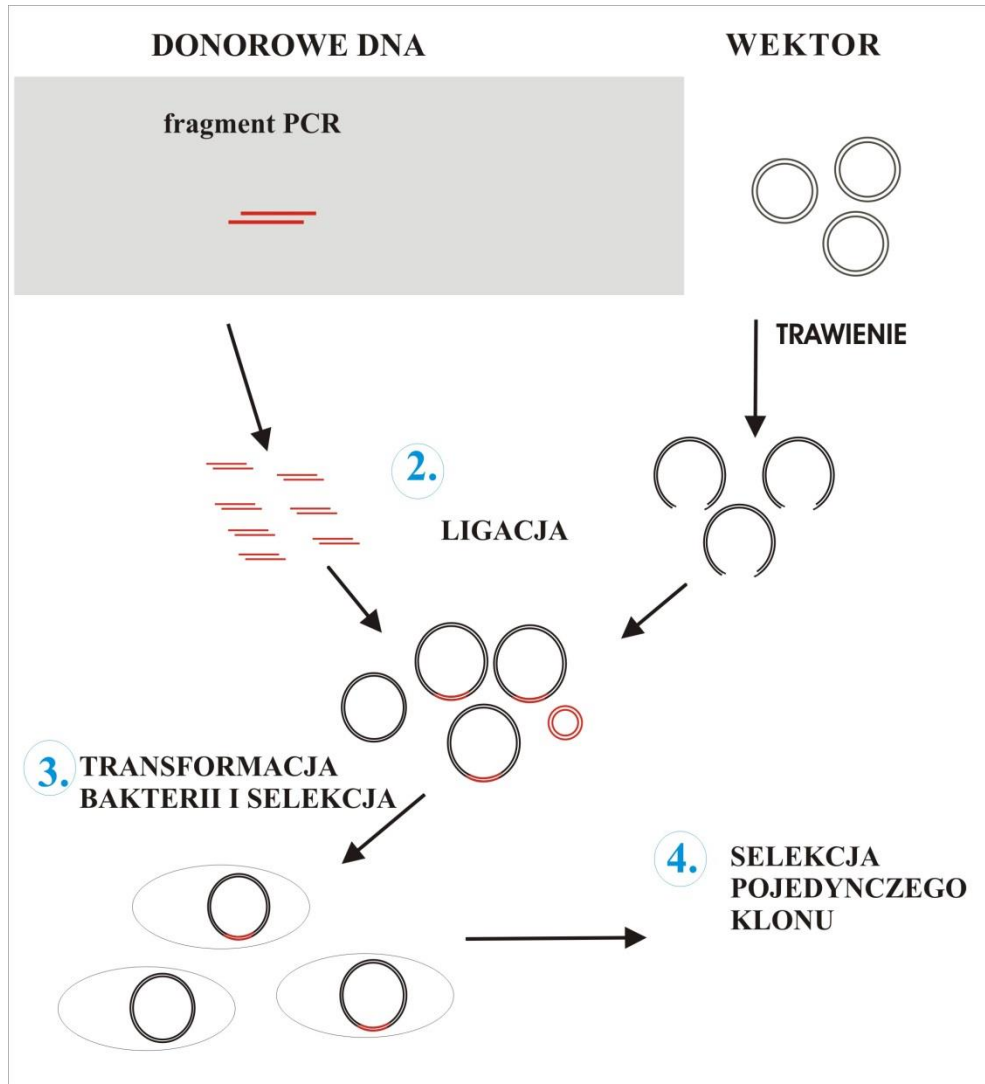
- **restrykcji i modyfikacji**
- **rekombinacji homologicznej ($recA^-$)**



Transformacja bakterii chemokompetentnych



Klonowanie fragmentu PCR na bakteryjnym wektorze plazmidowym



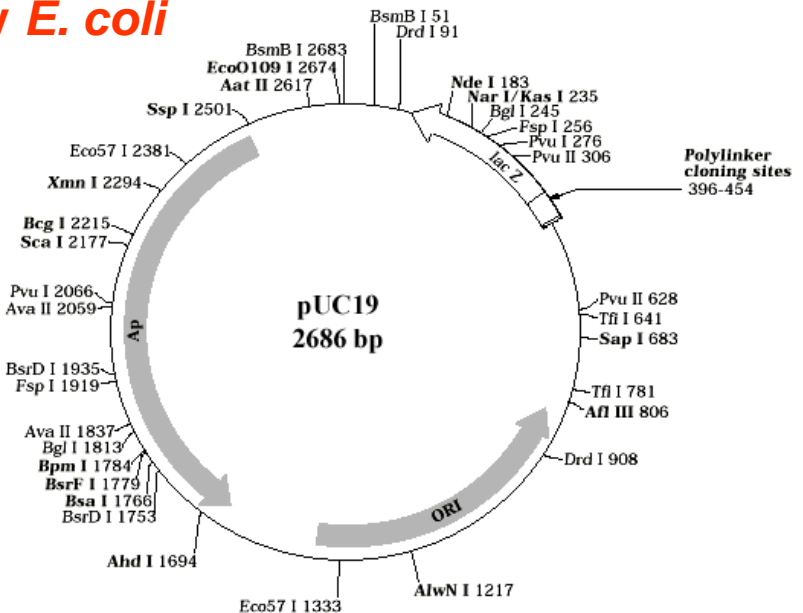
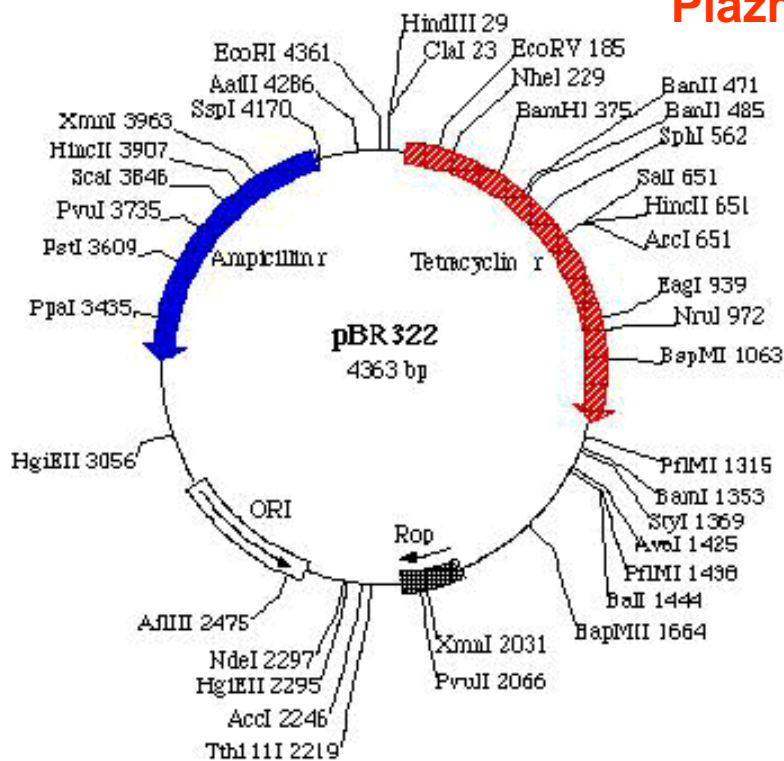
1. Reakcja PCR na matrycy całkowitego DNA drożdżowego
2. Trawienie produktu PCR i wektora (pUC19) EcoRI i BamHI
3. Ligacja
4. Transformacja bakterii (chemokompetentne)
5. Selekcja pojedynczego klonu (α -komplementacja)

DZIĘKI OBECNOŚCI DRUGIEGO MARKERA WYKRYWAMY BAKTERIE NIOŚĄCE ZREKOMBINOWANY PLAZMID

W przypadku pBR322, bakterie niosące zrekombinowany wektor nie będą rosły na podłożu z tetracykliną

W przypadku pUC19 do odróżnienia bakterii ze zrekombinowanym wektorem wykorzystujemy aktywność β -galaktozydazy („biało-niebieskie”)

Plazmidy *E. coli*

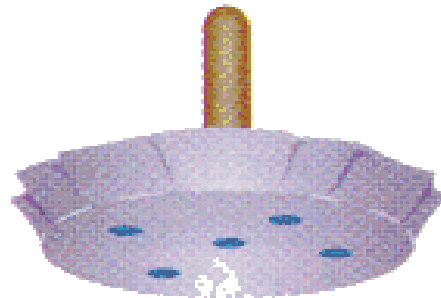


polylinker region

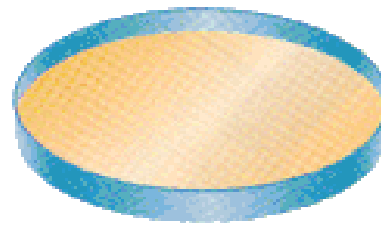
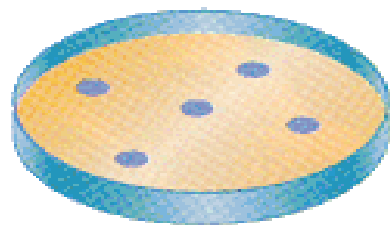


SELEKCJA REKOMBINANTÓW

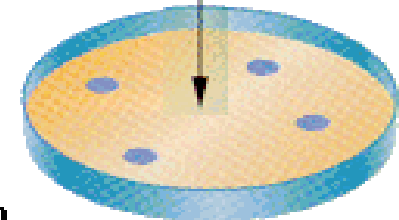
Cells from each colony are transferred to surface of velvet



The colony indicated by arrow did not grow on tetracycline plate, and contains a recombinant insert.



overnight incubation



Master plate

Transformed cells grown on medium with ampicillin. Only cells containing plasmids will form colonies.

Replica plate

This plate contains tetracycline. If cloned inserts are present in plasmid, no colony will form.

It therefore contains a copy of the gene of interest

The corresponding colony on the master plate is identified and used for further analysis.

Ćwiczenie praktyczne 1

cz. 3 – transformacja *E. coli*

Transformacja bakterii chemokompetentnych *E. coli*. Do probówki zawierającej 100 μl chemokompetentnych komórek *E. coli* szczepu MH2 dodać **10 μl** mieszaniny reakcyjnej.

Próby inkubować 10 minut na lodzie, a następnie przenieść na **dokładnie 90 sek** do temp. **42°C**.

Natychmiast przenieść próby na lód i inkubować przez 2 min. Po inkubacji dodać **900 μl** pożywki SOB i wysiać **100 μl** mieszaniny na szalkę LB z dodatkiem 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicyliny. Wstawić szalki do ciepłarki i inkubować przez noc w 37°C.