

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

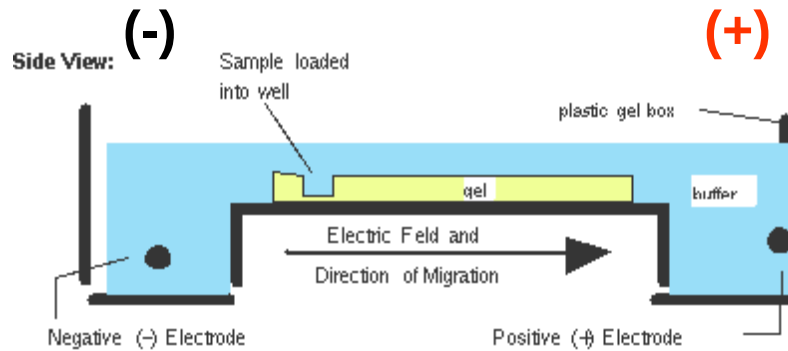
Inżynieria Genetyczna

ćw. 2

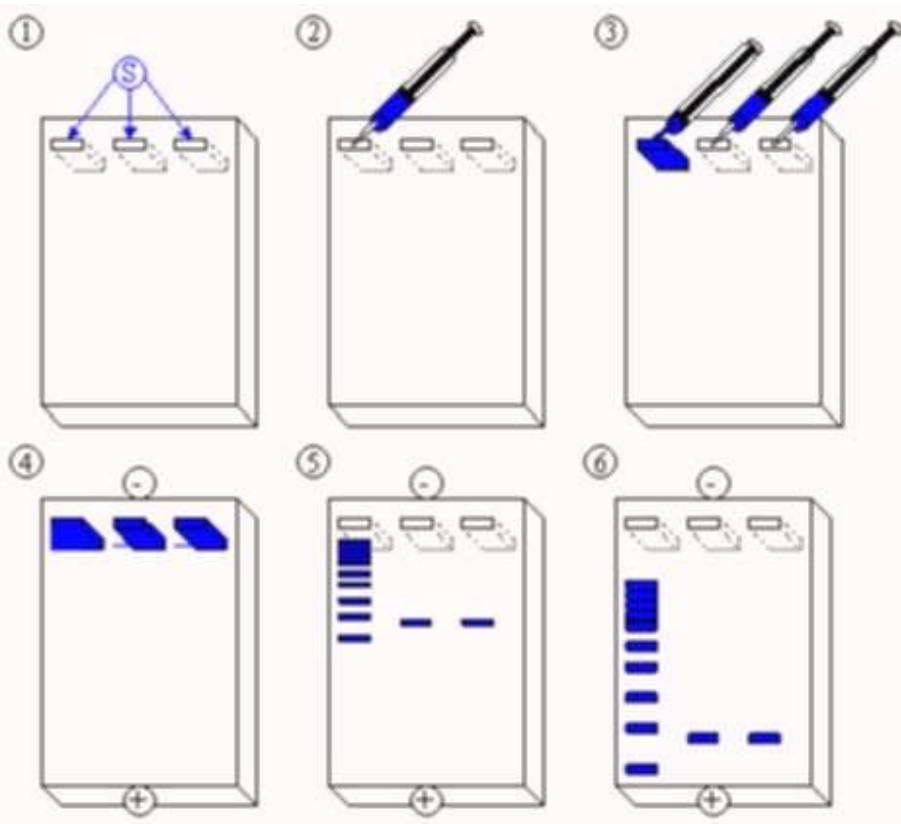
**Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii,
Uniwersytet Warszawski, rok akad. 2018/2019**

*Prosimy o nierozpowszechnianie materiałów bez
naszej zgody*

ELEKTROFOREZA DNA



- Agaroza rozpuszczona w buforze tworzy **żel**.
- Żel zanurzony w buforze przewodzącym prąd poddajemy działaniu **poła elektrycznego**.
- DNA** ma ładunek ujemny (-) i **migruje w kierunku elektrody dodatniej (+)** z szybkością zależną od wielkości i kształtu.
- Małe liniowe fragmenty** poruszają się **szybciej niż większe**, których ruch jest silniej hamowany przez sito molekularne żelu.
- Szybkość migracji** fragmentów DNA jest **odwrotnie proporcjonalna do ich masy cząsteczkowej**.



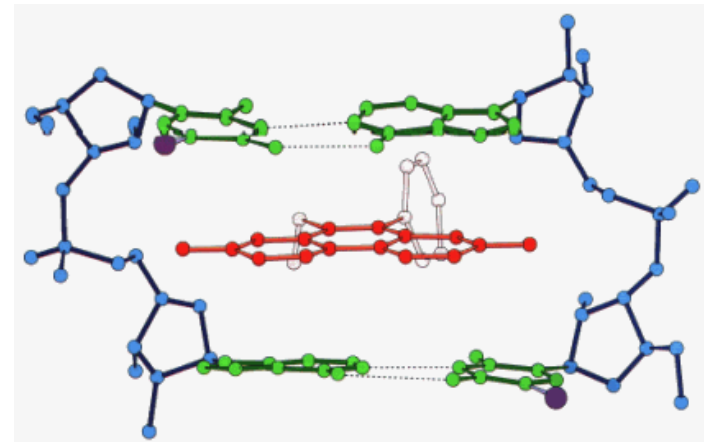
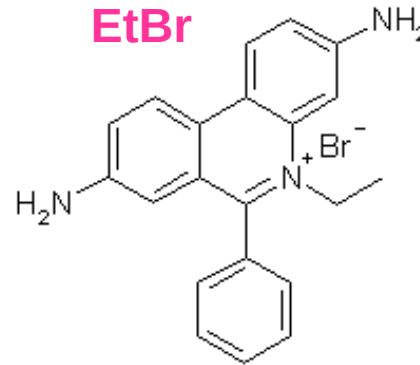
DETEKCJA DNA W ŻELU

Proces migracji DNA obserwujemy dzięki dodaniu do próbki odpowiedniego **barwnika** (np. **Oranż G**)

DNA obserwujemy w **świecie UV**, dzięki obecności w żelu **bromku etydyny**, interkalującego pomiędzy pierścienie aromatyczne w kwasie nukleinowym

Bromek etydyny wnikł w helisę DNA "świeci" w UV znacznie mocniej niż niewbudowany bromek w tle

Bromek etydyny zaburza strukturę DNA, jest **silnym mutagenem!!**



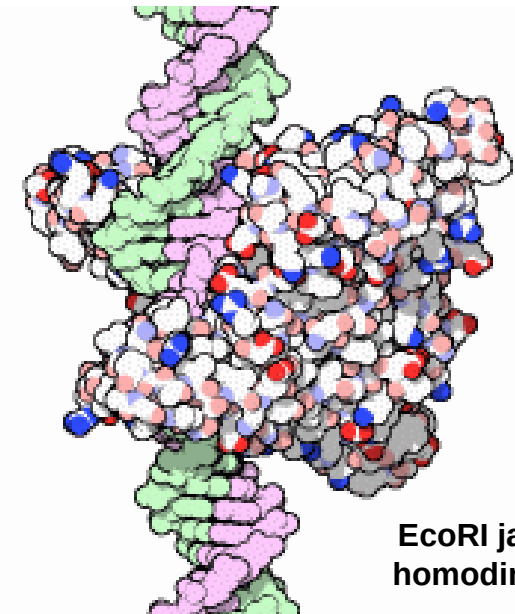
Analiza restrykcyjna DNA

- podstawowa technika biologii molekularnej, która umożliwia analizę sekwencji DNA

Enzym restrykcyjny należący do tzw. klasy II to nukleaza rozpoznająca i przecinająca DNA w obrębie ściśle zdefiniowanej sekwencji.

Mapa restrykcyjna danego fragmentu DNA to wzajemne ułożenie miejsc (sekwencji), które są rozpoznawane i przecinane przez określony zbiór enzymów restrykcyjnych.

<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5' TCGA 3' 3' AGCT 5'
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HhaI</i>	5' GCGC 3' 3' CGCG 5'
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5' CTNAG 3' 3' GANTC 5'
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	5' GAAGA (N) ₈ 3' 3' CTTCT (N) ₇ 5'
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5' GATATC 3' 3' CTATAG 5'
	<i>EcoRI</i>	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'
<i>Microcoleus</i>	<i>MstII</i>	5' COTNAGG 3' 3' GGANTCC 5'
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	<i>NotI</i>	5' GGGCCGC 3' 3' CGCCGGCG 5'



EcoRI jako homodimer

Izoschizomery – enzymy restrykcyjne izolowane z różnych bakterii rozpoznające tę samą sekwencję w DNA i wprowadzające identyczny typ cięcia.

HaeIII, BsuRI, BshFI, PfoI, BspI

GG↓CC

CC↑GG

Neoschizomery - enzymy restrykcyjne izolowane z różnych bakterii rozpoznające identyczną sekwencję w DNA, ale wprowadzające odmienny typ cięcia.

SmaI

CCC↓GGG

GGG↑CCC

XmaI

C↓CCGGG

GGGCC↑C

Acc65I

G↓GTACC

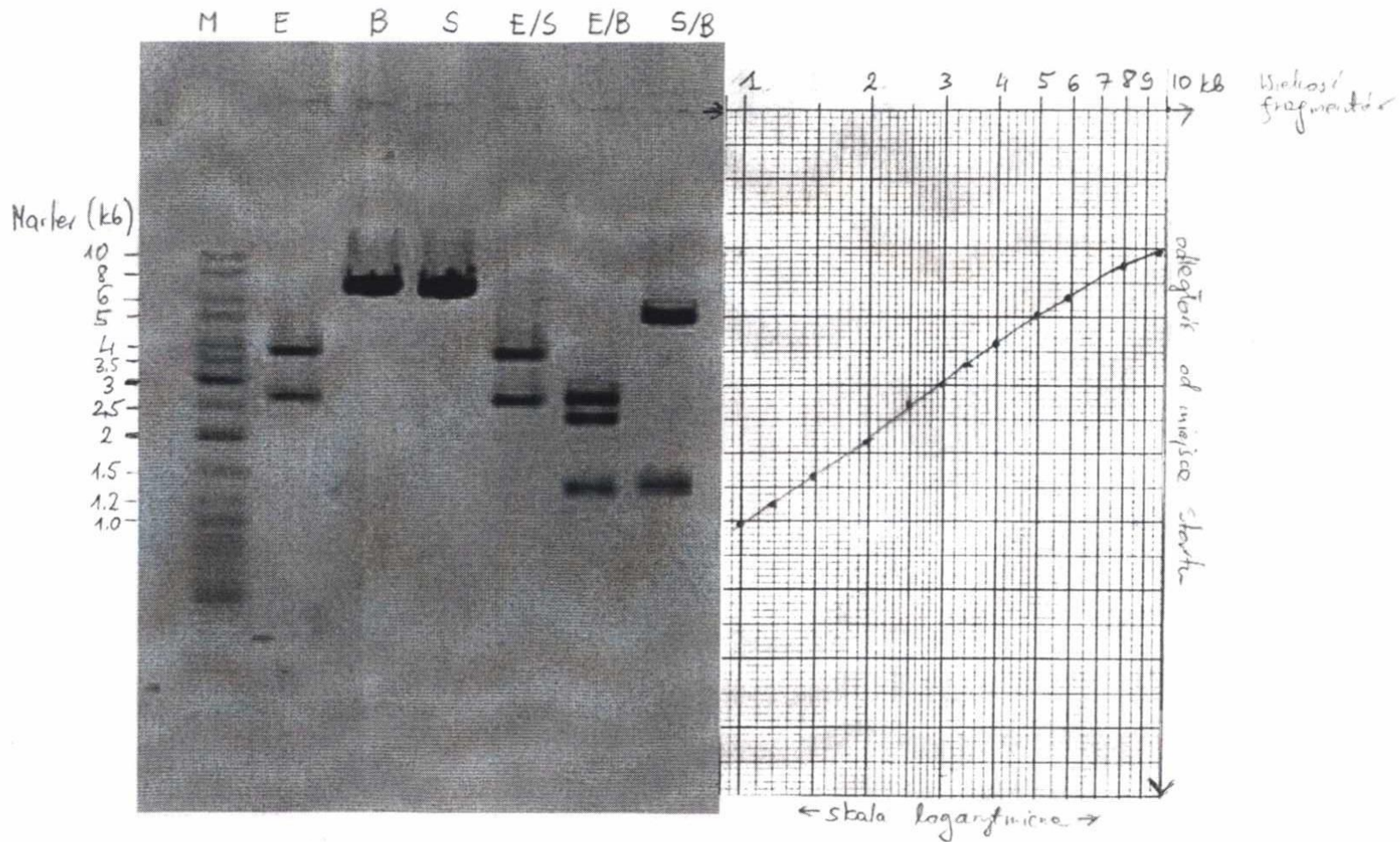
CCATG↑G

KpnI

GGTAC↓C

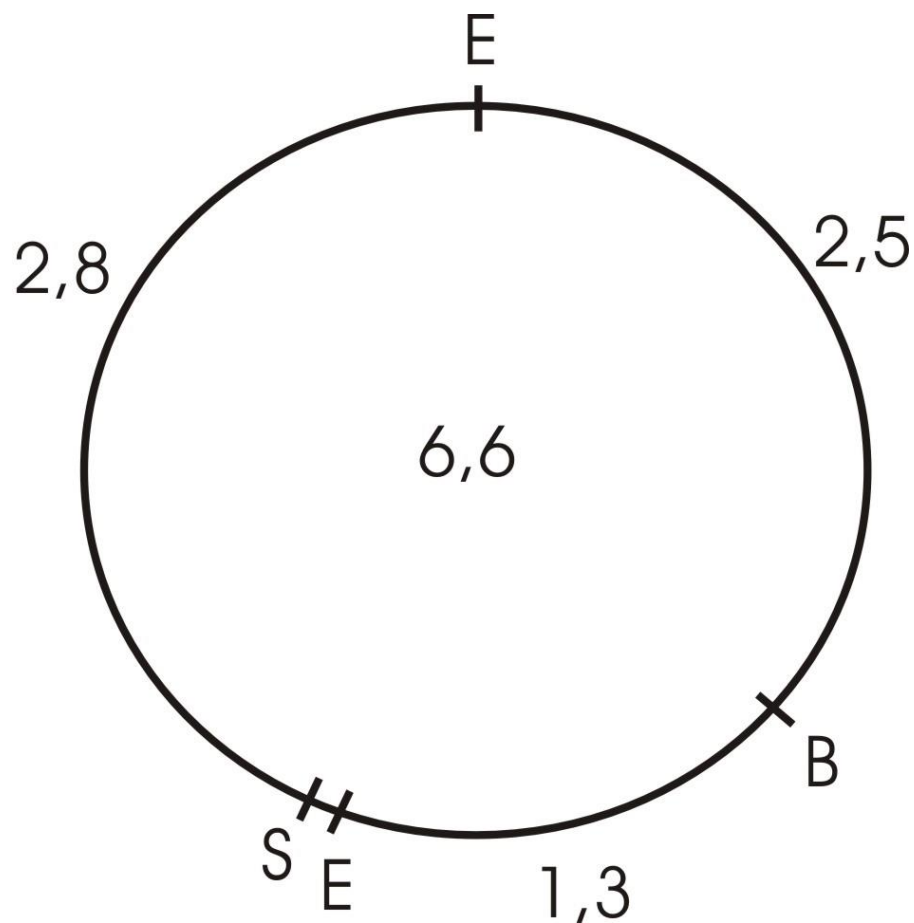
C↑CATGG

Analiza restrykcyjna

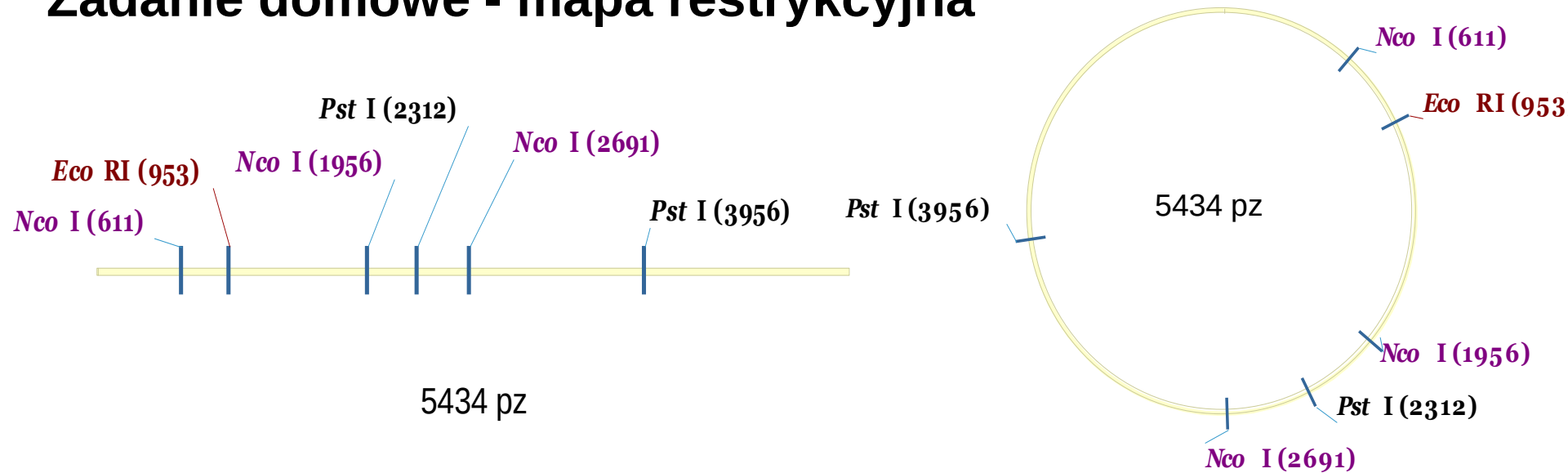


E - EcoRI
B - BglII
S - SalI

Mapa restrykcyjna



Zadanie domowe - mapa restrykcyjna



Jakiej długości powstaną fragmenty DNA po przecięciu powyższych cząsteczek DNA za pomocą enzymu/ów:

Enzym	Cząsteczka liniowa	Cząsteczka kolista
EcoRI		
PstI		
NcoI		
EcoRI/PstI		

Schemat mutagenезy 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 mutagenезy) i test PCR na obecność wektora i kasety delecyjnej w otrzymanych szczepach (kontrola molekularna mutantów)

Transformacja drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą LiOAc/PEG

Transformacja drożdży (szczepy z delecją genu *PET127*) wyizolowanymi z bakterii plazmidami niosącymi wprowadzoną na ćwiczeniach mutację genu *PET127* (*pet127-L392A*, *pet127-K364A*, *pet127-E364A* lub *pet127-D391A*).

Roztwór transformacyjny (PEG Mix):

ODCZYNNIK	OBJĘTOŚĆ (stężenie końcowe)
PEG 3350 50% [w/v]	42 μL (~40%)
LiOAc 1M	6 μL (~0.1 M)
Jednoniciowe nośnikowe DNA ze spermy łososa (carrier ssDNA) 10 mg/mL	2 μL
Końcowa objętość	50 μL

Komórki kompetentne zostały przygotowane wcześniej, rozporcjowane i zamrożone w -80°C . Zawieszone są w roztworze zawierającym 1xTE, 0,1 M LiOAc oraz 25% glicerol.

Transformacja drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą LiOAc/PEG

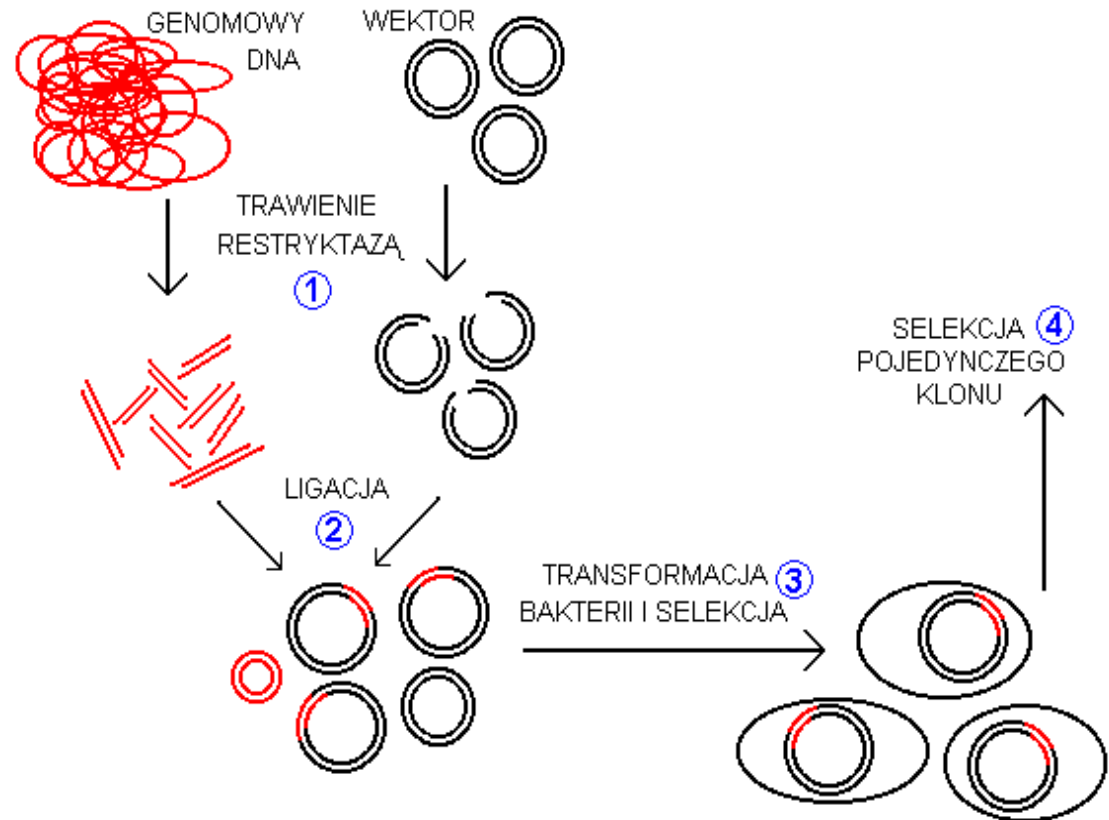
Transformacja drożdży (szczepy z delecją genu *PET127*) wyizolowanymi z bakterii plazmidami niosącymi wprowadzoną na ćwiczeniach mutację genu *PET127*.

Wykonanie:

1. Otrzymane komórki kompetentne krótko zwirować na niewielkich obrotach (2500 rpm przez 30 s. lub short). Supernatant usunąć pipetą nienaruszając pelletu.
2. Do probówki z drożdżami dodać 50 μ l roztworu transformacyjnego, a następnie 2 μ L DNA plazmidowego (w próbie kontrolnej zamiast DNA należy dodać 2 μ l sterylnej wody). Całość zawiesić poprzez pipetowanie.
3. Inkubować w 42°C przez 30 min (w termobloku lub łaźni wodnej).
4. Po inkubacji zebrać komórki przez krótkie i delikatne wirowanie (2500 rpm przez 30 s. lub short), supernatant usunąć, a pellet zawiesić w 50 μ l sterylnej wody lub soli fizjologicznej.
5. Całość wysiać na odpowiednią szalkę selekcyjną i inkubować przez 2-3 dni w temperaturze 30°C.

KLONOWANIE DNA

1. trawienie restryktazą wyizolowanego DNA, trawienie wektora.
2. ligacja wektora ze wstawką
3. transformacja bakterii
 - chemokompetentne
 - elektrokompetentne
4. selekcja (dzięki obecności na wektorze genów markerowych)
5. Wyszukanie pojedynczego klonu zawierającego zrekombinowany plazmid z interesującym nas fragmentem DNA



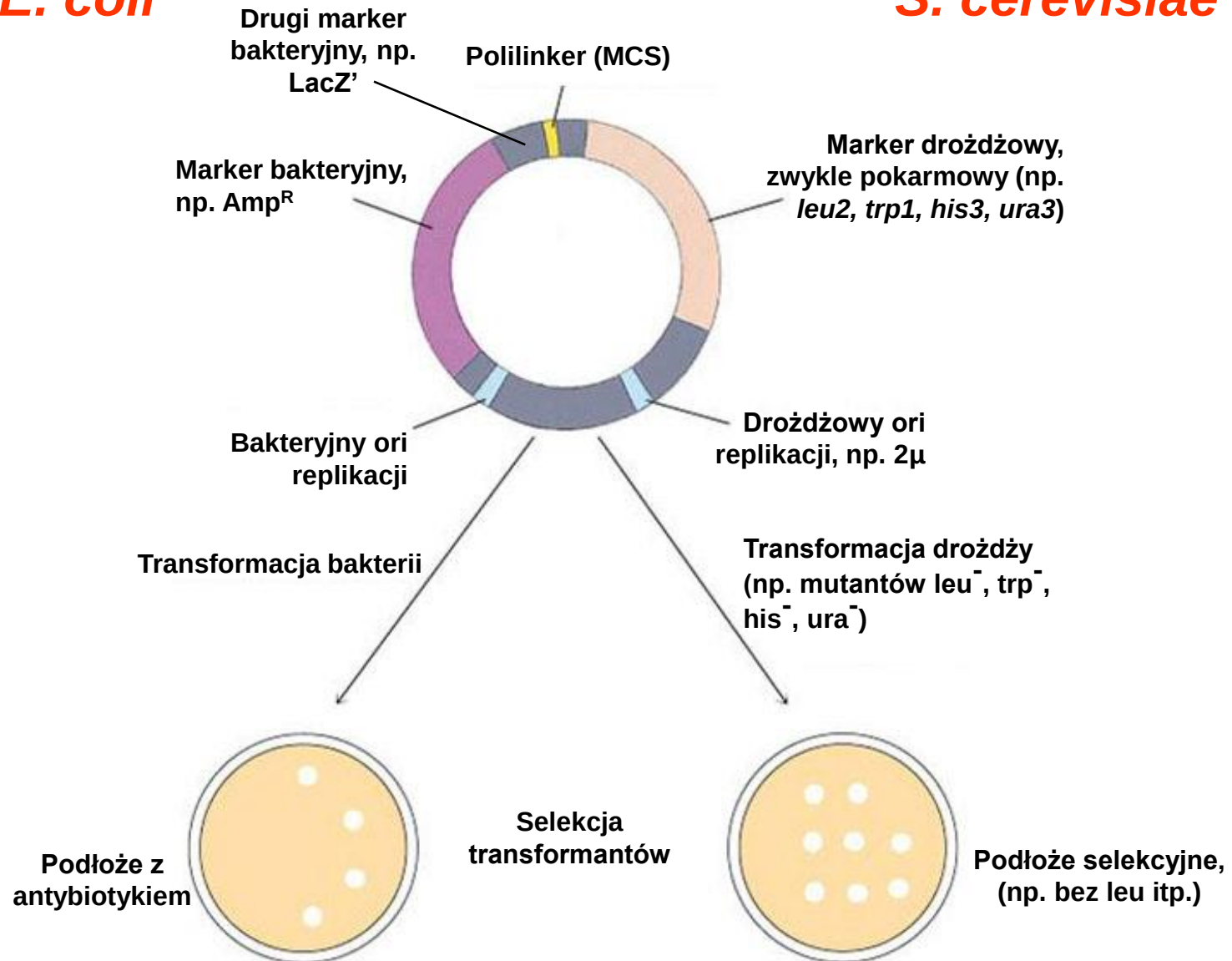
jeżeli uzyskamy dostateczną liczbę klonów, na tyle dużą, żeby zawarte w nich wstawki reprezentowały cały genom, klony te stanowią

BANK GENOMOWEGO DNA

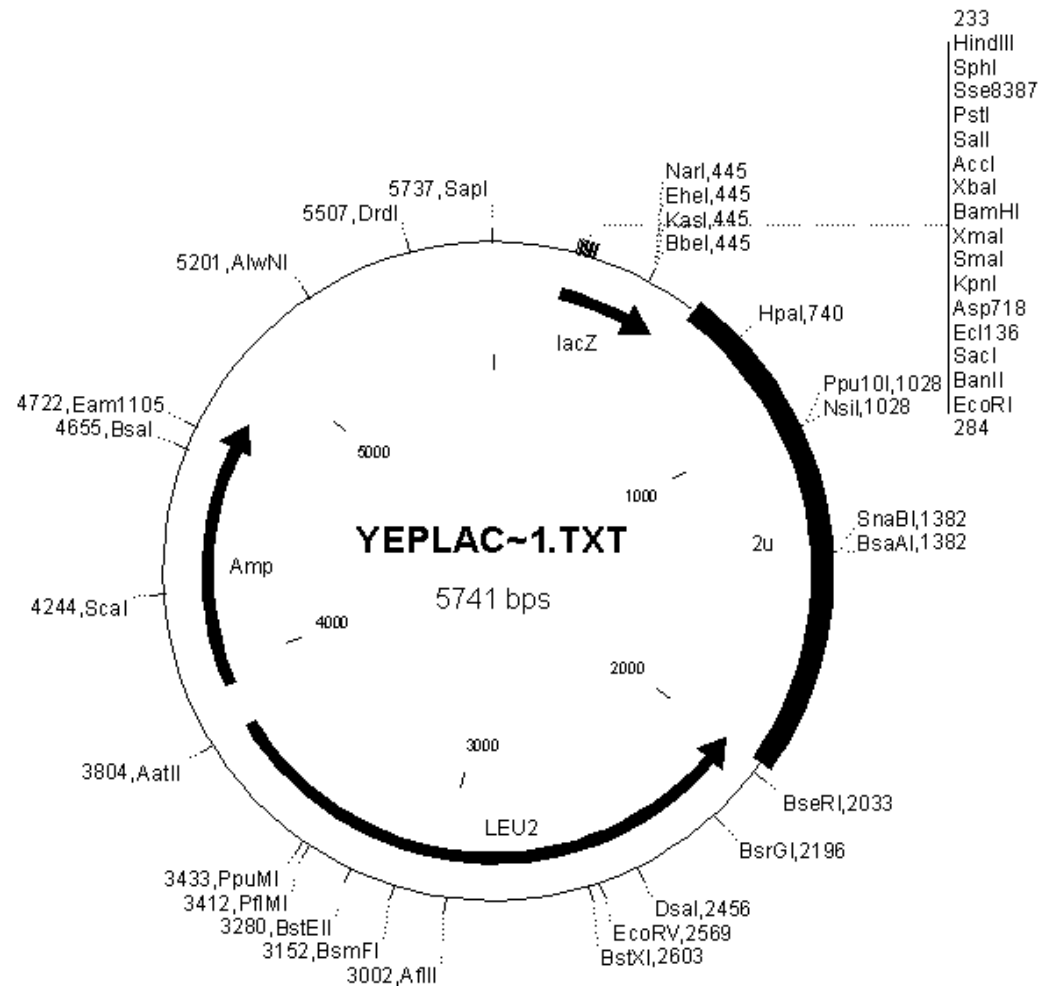
WEKTORY BIFUNKCJONALNE: **DWÓCH** GOSPODARZY, np.:

E. coli

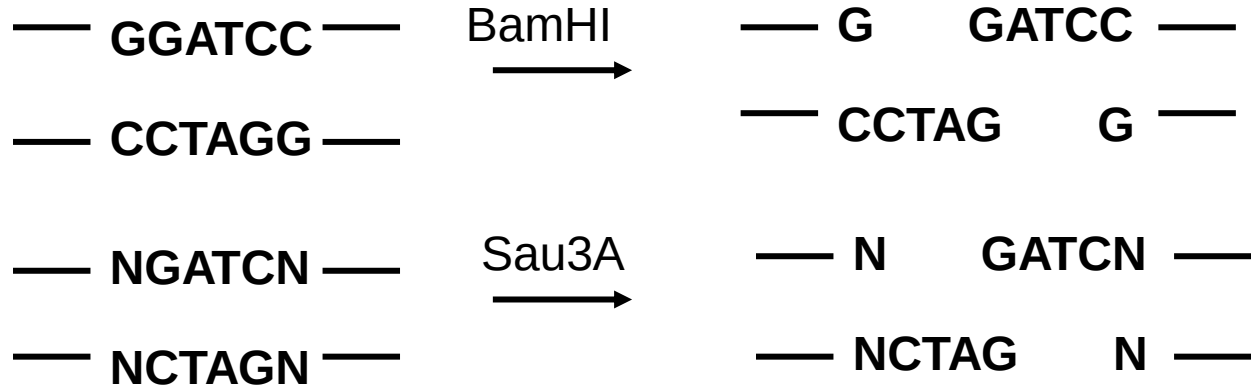
S. cerevisiae

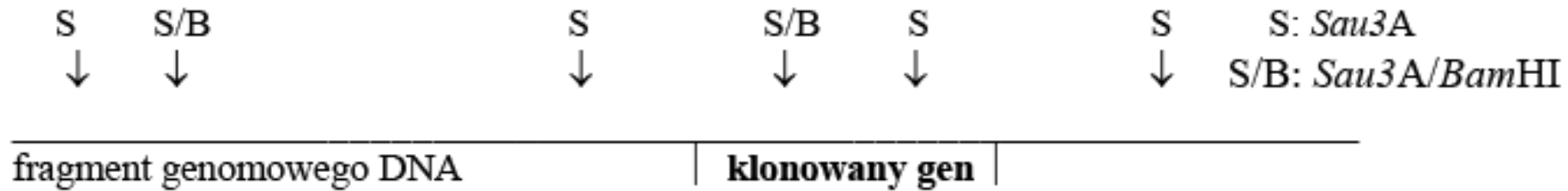


BANK GENÓW DROŻDŻY NA WEKTORZE BIFUNKCJONALNYM YEplac181

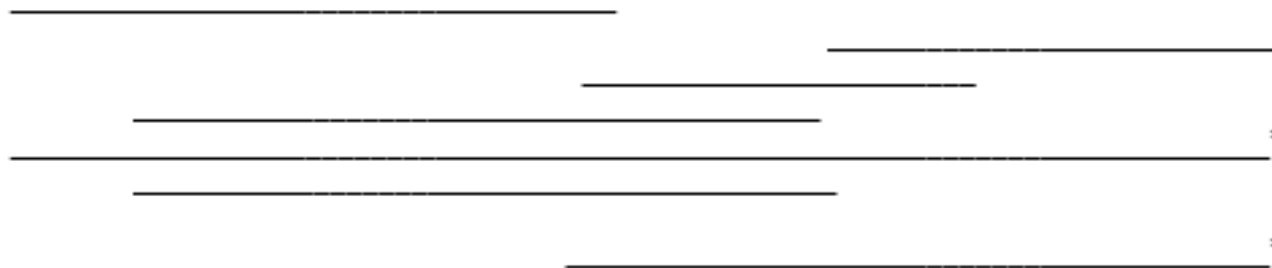


RÓŻNE ENZYMY MOGĄ ZOSTAWIAĆ TAKIE SAME KOŃCE:



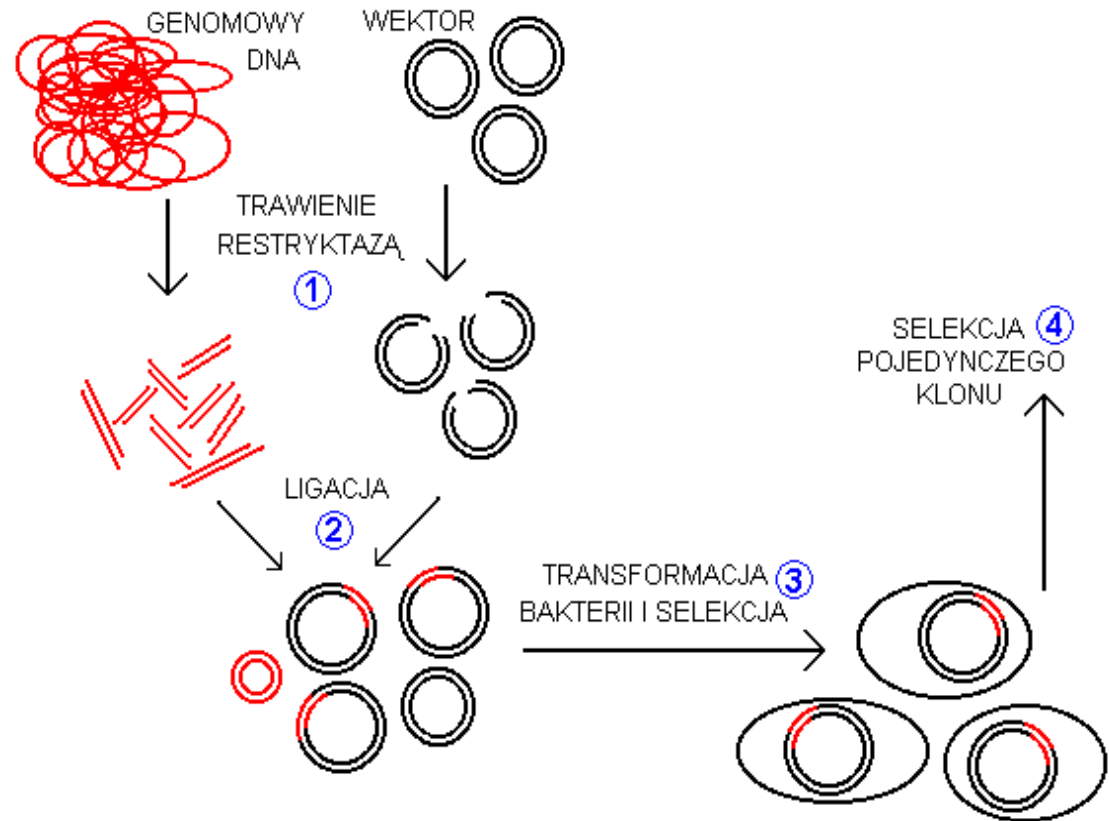


| niepełne trawienie *Sau3A* i izolacja mieszaniny fragmentów
 | o wielkości ok. 5-10 kb (np. poprzez wirowanie w gradiencie
 ↓ sacharozy albo izolację z żelu)



KLONOWANIE DNA

1. trawienie restryktazą wyizolowanego DNA, trawienie wektora.
2. ligacja wektora ze wstawką
3. transformacja bakterii
 - chemokompetentne
 - elektrokompentne
4. selekcja (dzięki obecności na wektorze genów markerowych)
5. Wyszukanie pojedynczego klonu zawierającego zrekombinowany plazmid z interesującym nas fragmentem DNA

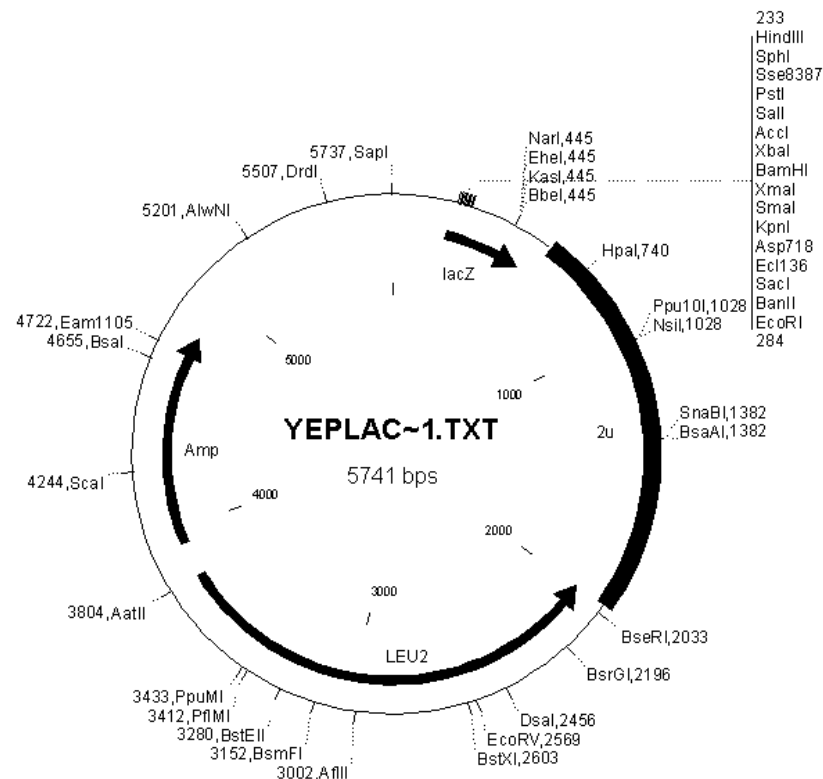


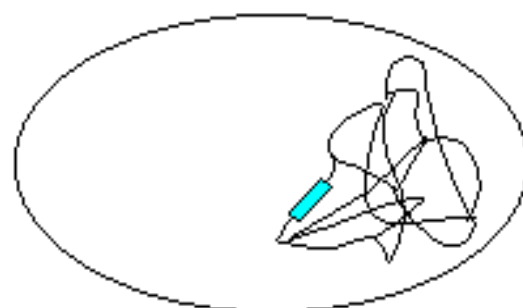
jeżeli uzyskamy dostateczną liczbę klonów, na tyle dużą, żeby zawarte w nich wstawki reprezentowały cały genom, klony te stanowią

BANK GENOMOWEGO DNA

DZIĘKI OBECNOŚCI DRUGIEGO MARKERA WYKRYWAMY BAKTERIE NIOŚĄCE ZREKOMBINOWANY PLAZMID

W przypadku wektorów pochodnych pUC19 (np. **YEPLAC**) do odróżnienia bakterii ze zrekombinowanym wektorem wykorzystujemy zjawisko α -komplementacji

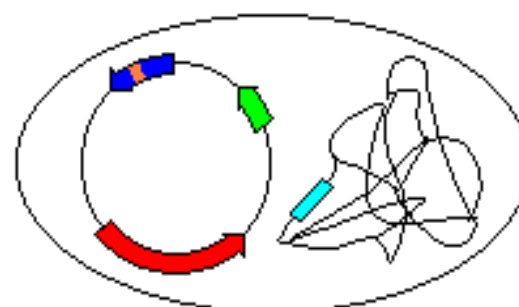




BAKTERIA NIE
PRZYJĘŁA PLAZMIDU

BAKTERIA WRAŻLIWA
NA AMPICYLINE
NIE PRODUKUJE
 β -GALAKTOZYDAZY

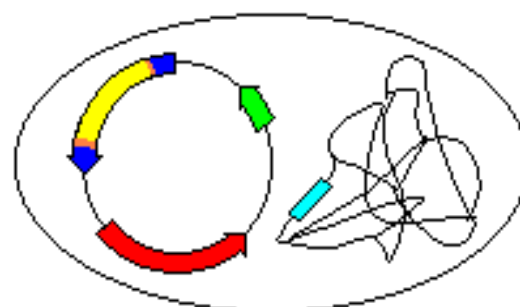
BRAK WZROSTU
NA PODŁOŻU Z
AMPICYLINĄ,
X-GAL I IPTG



BAKTERIA PRZYJĘŁA
PLAZMID NIEZREKOMBINOWANY

BAKTERIA OPORNA
NA AMPICYLINĘ
PRODUKUJE
 β -GALAKTOZYDAZĘ

KOLONIE NIEBIESKIE
NA PODŁOŻU Z
AMPICYLINĄ,
X-GAL I IPTG



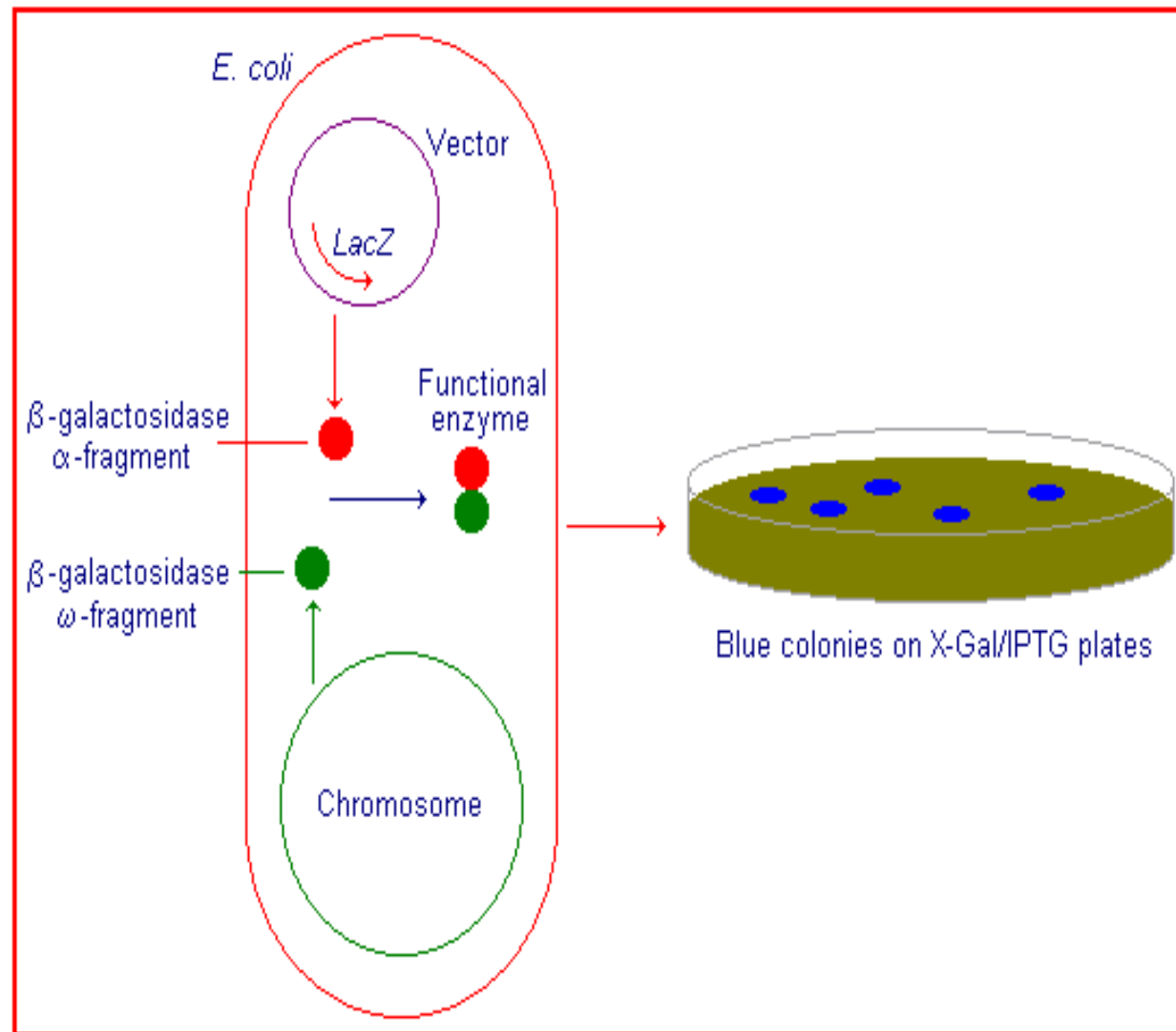
BAKTERIA PRZYJĘŁA
PLAZMID ZREKOMBINOWANY

BAKTERIA OPORNA
NA AMPICYLINĘ
NIE PRODUKUJE
 β -GALAKTOZYDAZY

KOLONIE BIAŁE
NA PODŁOŻU Z
AMPICYLINĄ,
X-GAL I IPTG

- POLILINKER
- MARKER I
(AMPICYLINA)
- MARKER II
(N-KONIEC β -GAL)
- ORI
- C-KONIEC β -GAL
- WSTAWKA

α -komplementacja



Reprezentatywność banku

Dane konieczne do oszacowania reprezentatywności banku genomowego:

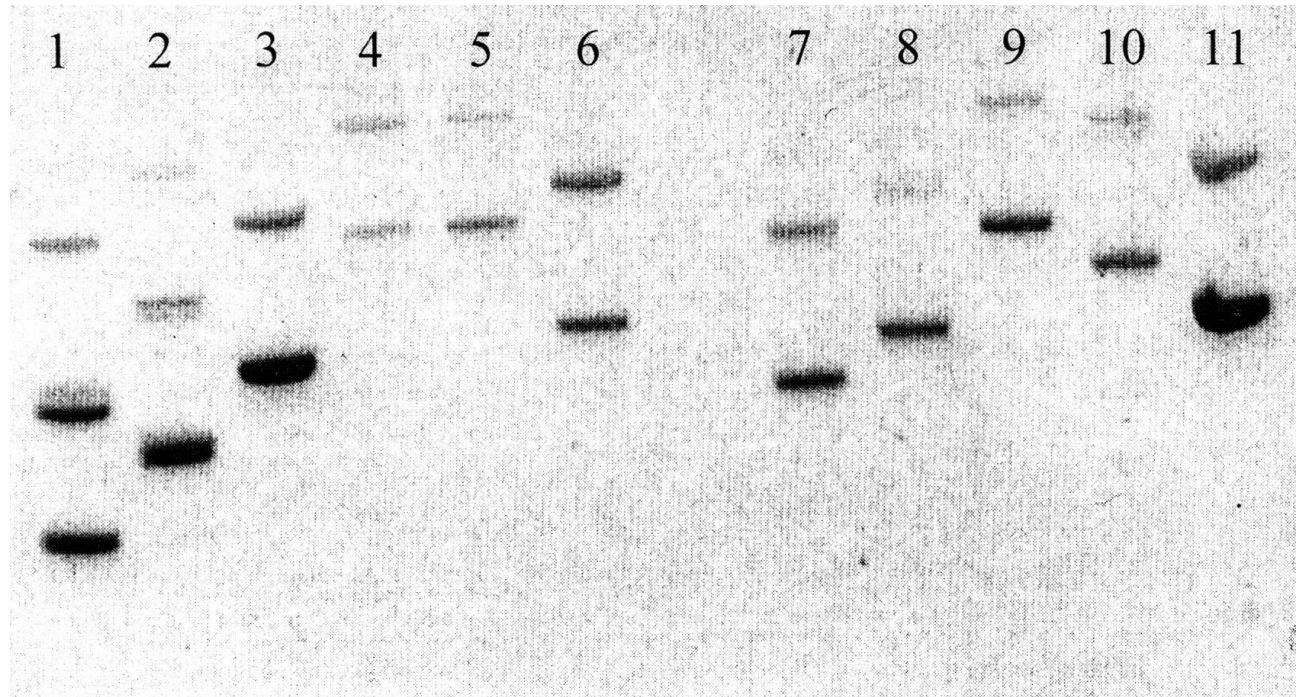
- **Wielkość genomu**
- **Liczba uzyskanych klonów**
- **% transformantów ze zrekombinowanym wektorem**
- **Średnia wielkość wstawki**

Dobry bank genów w *E. coli* na wektorze plazmidowym zwykle zawiera ponad 50% zrekombinowanych plazmidów, ze średnią wielkością wstawki ok. 10 kb i pokrywa kilkakrotnie genom

BANK GENÓW DROŻDŻY NA WEKTORZE BIFUNKCJONALNYM YEplac181

wstawka
trawiony wektor
ze wstawką
gDNA
trawiony gDNA

Oszacowanie wielkości wstawki (plazmidy nie trawione)



Wzorce masy cząsteczkowej 1-4:

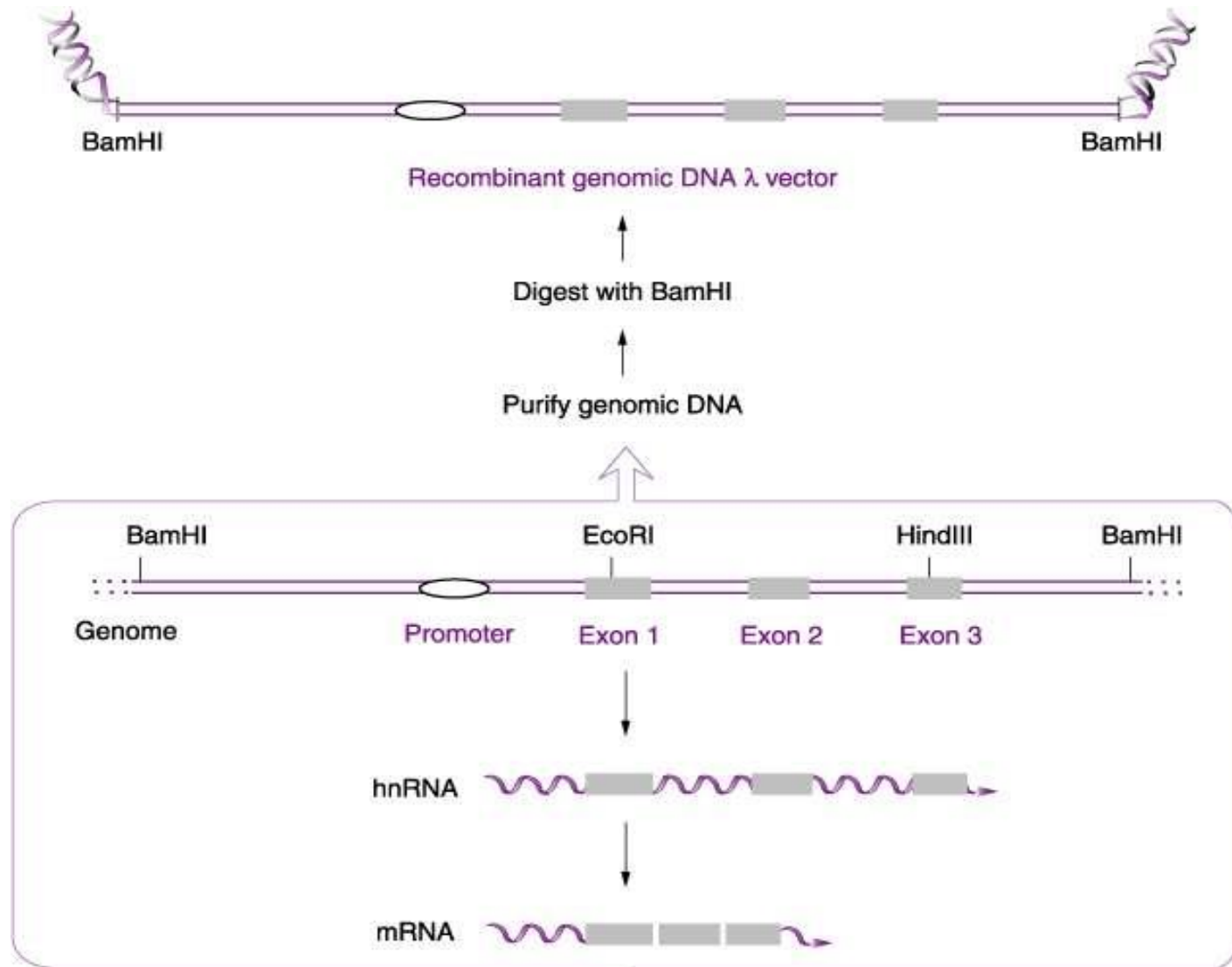
1. pusty wektor (5,7kb)
2. 7,8 kb
3. 9,4 kb
4. 12,6 kb

Wielkość genomu *S. cerevisiae* ~12,1 Mb

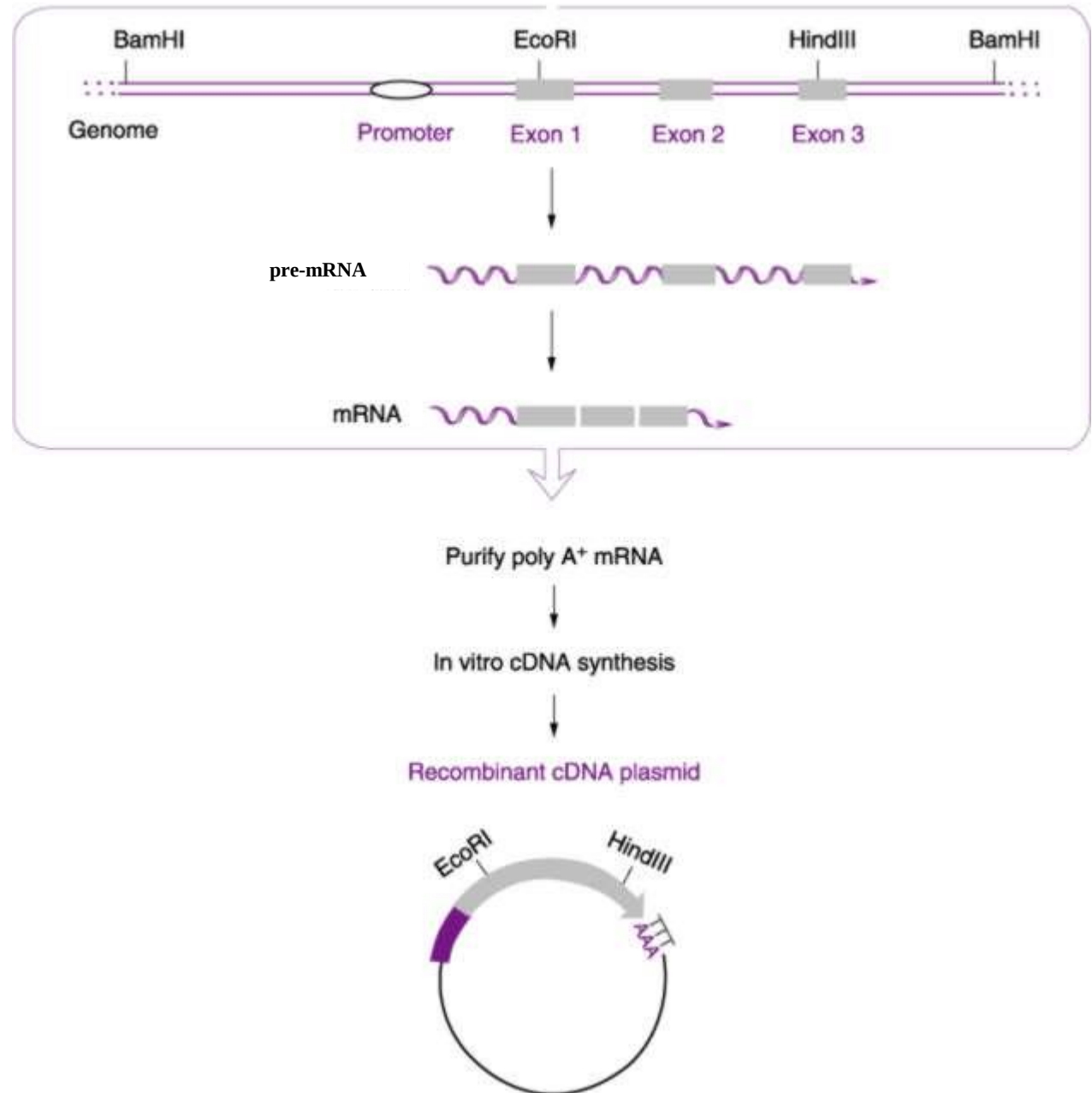
Wykorzystanie banku genomowego do klonowania genów

1. Jak sklonować bakteryjną sekwencję inicjacji replikacji (ori)?
2. Jak sklonować gen drożdżowy (i poznać jego sekwencję), którego mutacja odpowiada za auksotrofię (mutacja recesywna)
3. Jak sklonować gen drożdżowy (i poznać jego sekwencję), w którym zaszła mutacja dominująca?

Bank genomowy



Bank cDNA



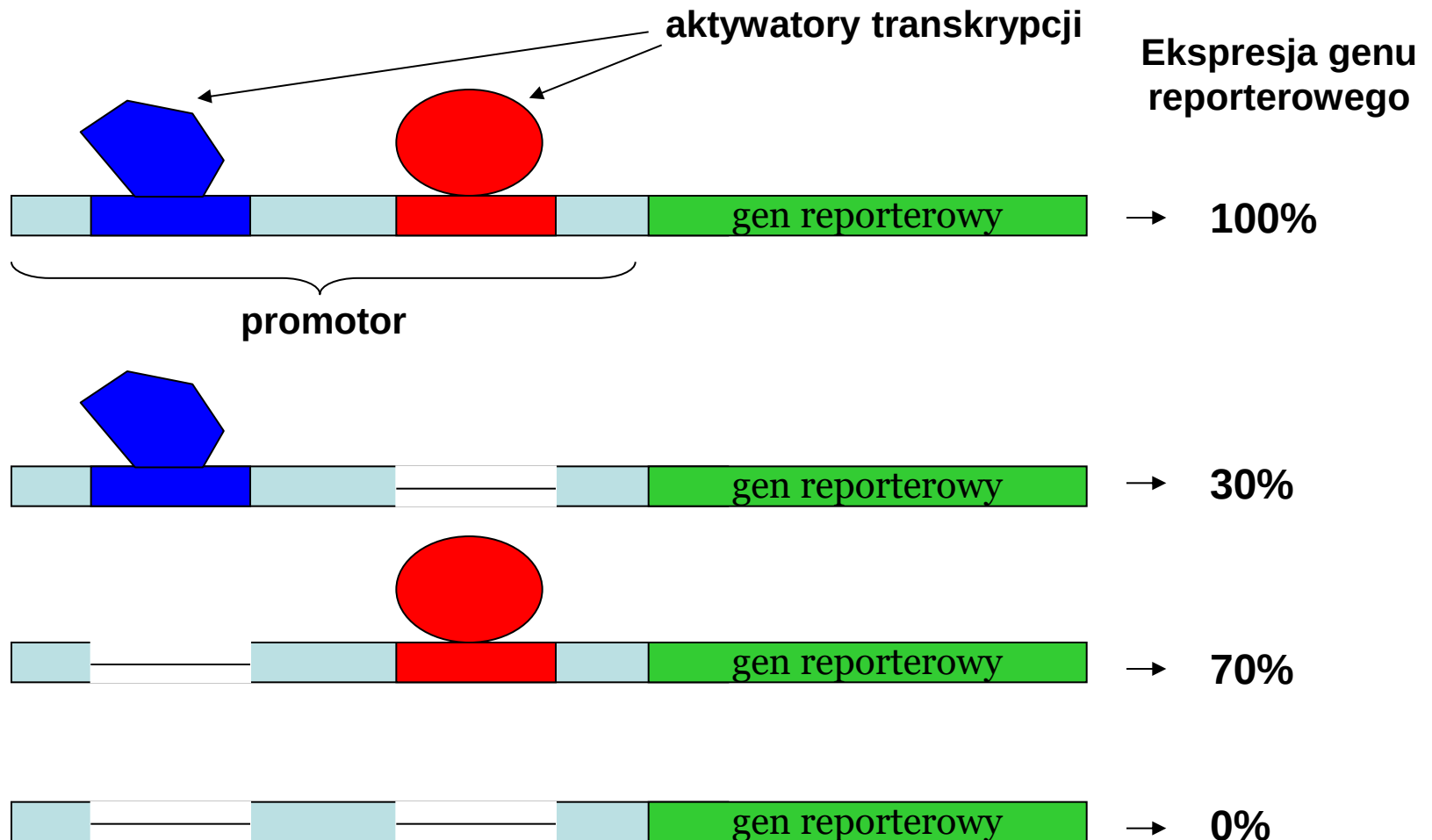
Geny reporterowe

- Badanie regionów promotora odpowiedzialnych za regulację ekspresji genu
- Badanie zmian ekspresji w wyniku działania czynników zewnętrznych
- Identyfikacja oddziaływań pomiędzy białkami
- Określenie lokalizacji badanego białka

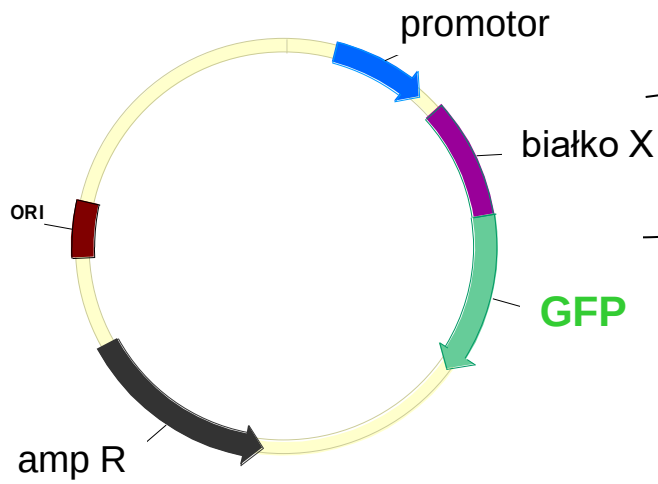
Przykładowe geny reporterowe

- β -galaktozydaza
- β -glukuronidaza (GUS)
- acetylotransferaza chloramfenikolu (CAT)
- fosfataza alkaliczna
- lucyferazy
- białko fluoryzujące na zielono (GFP)

Identyfikacja regionów promotora odpowiedzialnych za regulację transkrypcji



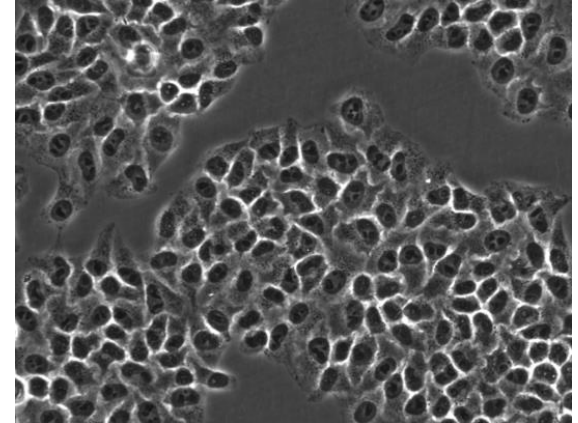
Lokalizacja białka



powstające białko



Hodowla komórek HeLa
(Kontrast fazowy)



transfekcja komórek

analiza mikroskopowa

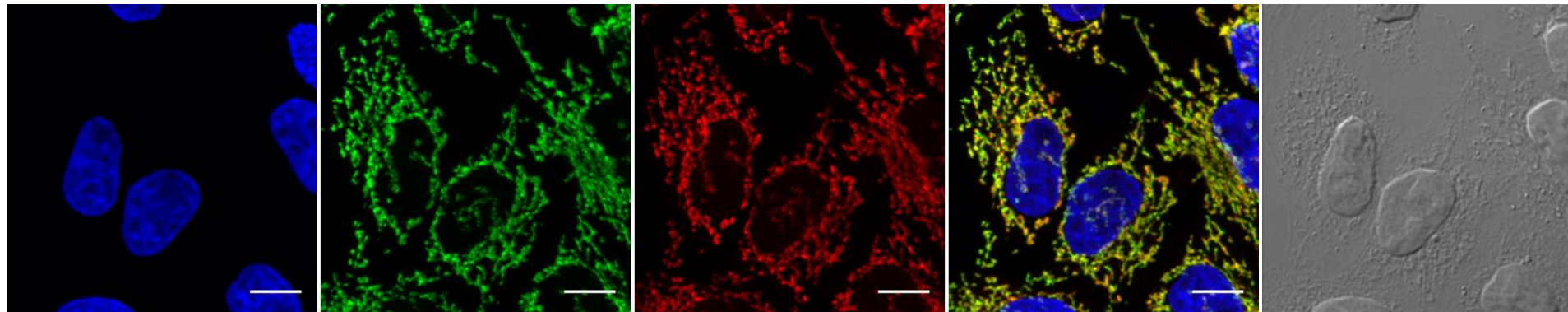
Jądra komórkowe
(Hoechst)

Białko X-EGFP

Mitochondria
(MitoTracker)

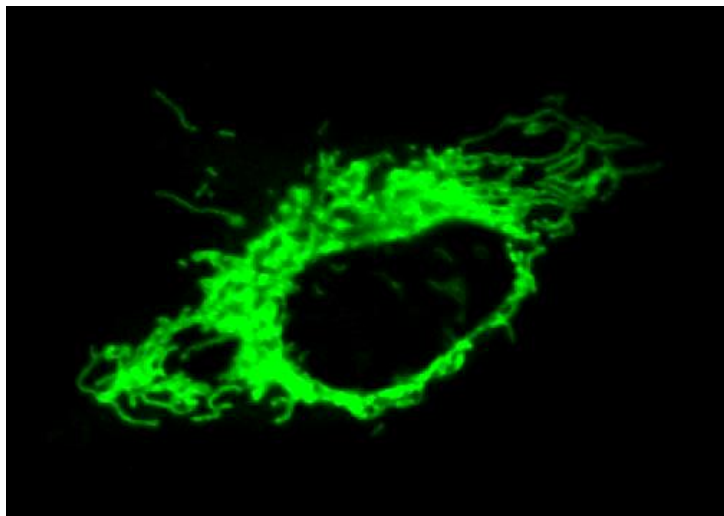
Złożenie

Kontrast
Nomarskiego

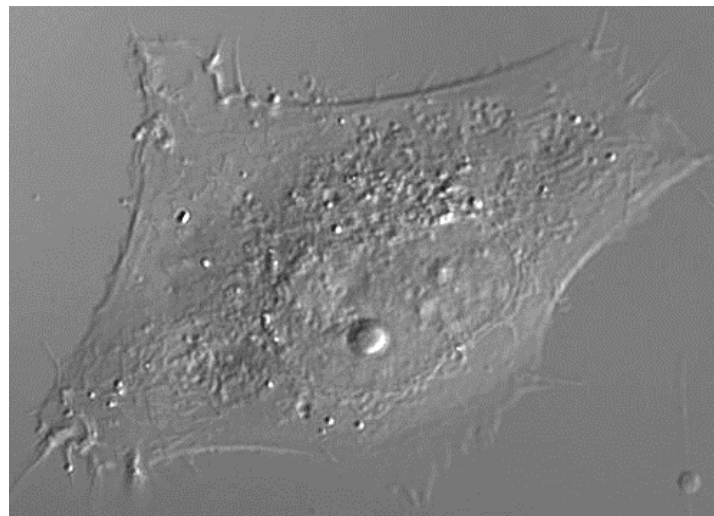


Lokalizacja białka

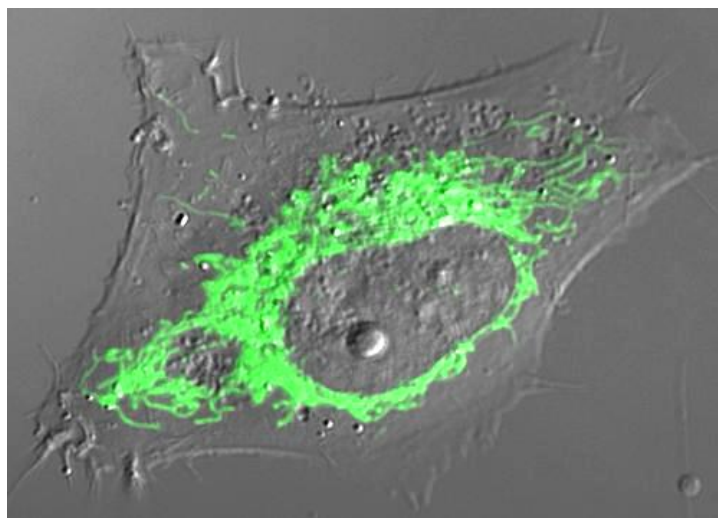
Białko X-EGFP



Kontrast Nomarskiego



Złożenie

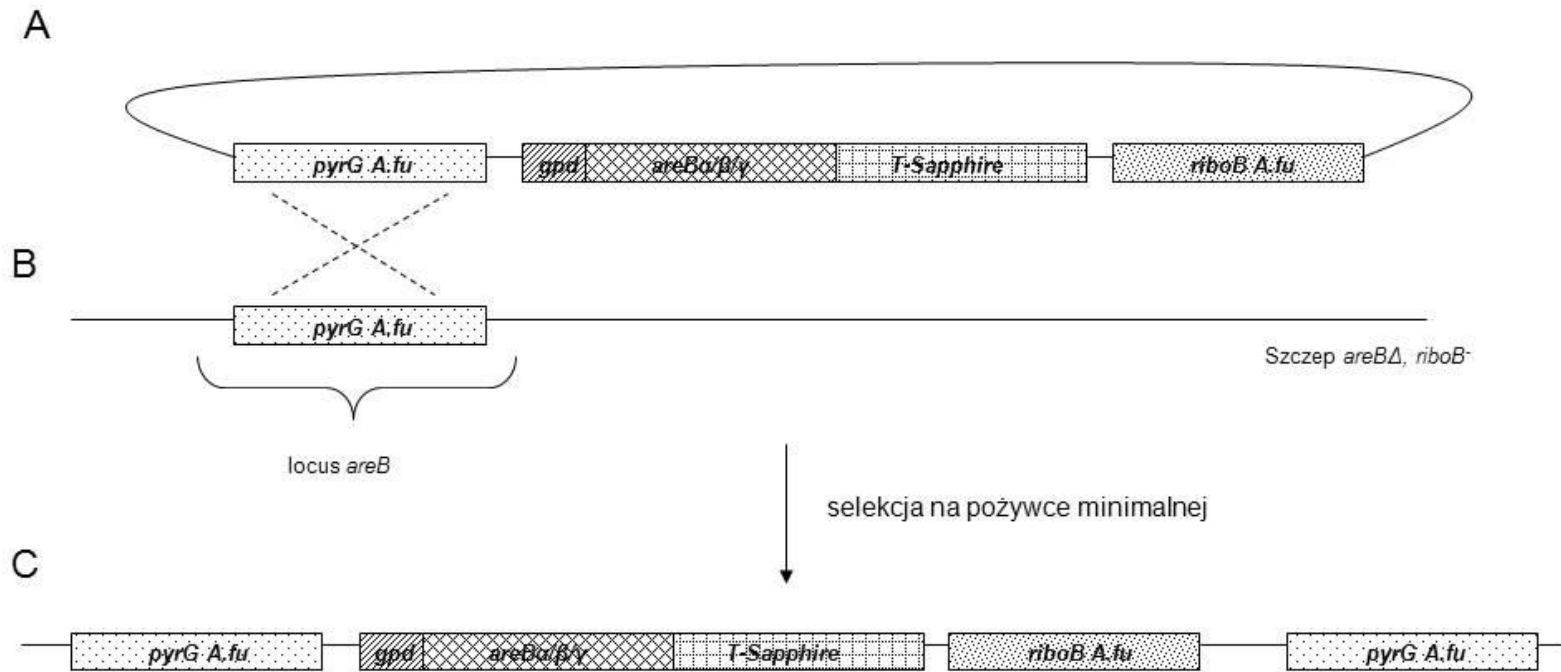


*Zdjęcia i filmy komórek -
Ł. S. Borowski*

Badanie lokalizacji w komórce czynnika transkrypcyjnego AREB u *Aspergillus nidulans* z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

- AREB – czynnik transkrypcyjny z rodziny GATA, rozpoznaje konkretne sekwencje w promotorach wielu genów
- Pełni rolę negatywnego regulatora transkrypcji (represor) w represji azotowej
- Lokalizacja wewnątrzkomórkowa zależy od statusu pokarmowego: zwykle jest w jądrze, częściowo w cytoplazmie. W przypadku głodzenia azotowego zwiększa się jeszcze jego obecność w jądrze
- Obserwacja lokalizacji możliwa jest dzięki fuzji AREB z białkiem T-Sappaphire („szafirowej fluorescencji”)
- Kontrolą w doświadczeniu jest histon H1 (białko jądrowe) w fuzji z RFP (białkiem „czerwonej fluorescencji”)

Schemat integracji do genomu *A. nidulans* konstrukt kodującego AREB w fuzji białkiem fluorescencyjnym T-Sapphire



pyrG A. fu – gen z *Aspergillus fumigatus*, wykorzystywany do rekombinacji homologicznej. Pozwala to uniknąć rekombinacji z dzikim *locus pyrG A. nidulans* (niska homologia obu genów)

gpd – promotor zapewniający wysoką, konstututywną ekspresję konstruktu.

riboB A. fu – selekcyjny marker pokarmowy, gen z *A. fumigatus* (też zabezpieczenie przed nieporządaną rekombinacją z genem *A. nidulans*)

Lokalizacja AREB zależy od statusu pokarmowego

Obecność AREB w jądrze wzrasta przy głodzeniu azotowym

G – glukoza; F- fruktoza; -N – głodzenie azotowe; -C – głodzenie węglowe

