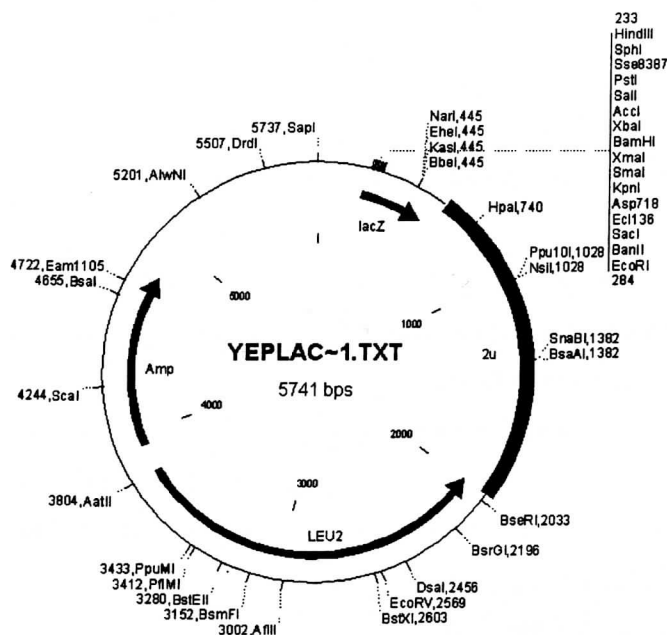


Inżynieria genetyczna: bank genów *Saccharomyces cerevisiae* w *Escherichia coli*

I. Bank genów drożdży *S. cerevisiae* w *E. coli* na wektorze bifunkcyjnym

A. Omówienie konstrukcji banku genów na wektorze YEplac181 wg materiałów w skrypcie. Mapa wektora:



Etapy klonowania:

1. Przygotowanie DNA

a) DNA wektorowy

- Trawienie wektora enzymem *BamHI*.
- Inaktywacja termiczna aktywności enzymu (*BamHI* jest termostabilny, wymaga wyższej temperatury, 85°C).
- Traktowanie wektora alkaliczną fostatazą.

b) DNA genomowy

- Trawienie enzymem *Sau3AI* - trawienie częściowe (inaktywacja termiczna enzymu w 65°C po czasie krótszym niż wymagany dla całkowitego strawienia).

2. Ligacja

3. Transformacja

a) Transformacja szczepu *E. coli* DH5: $F^- hsdR17 (r_k^-, m_k^+) \Delta (lacZYA-argF) [\phi 80\Delta lacZ]$

- *hsdR17* (r_k^- , m_k^+): mutacja restrykazy specyficznej dla *E. coli* (metylaza jest obecna)
- (*lacZYA-argF*): delecja β -galaktozydazy z genomu *E. coli*
- [$\phi 80\Delta lacZ$]: wstawiony do genomu *E. coli* fragment faga $\phi 80$ z C-końcowym fragmentem genu *lacZ*

b) Selekcja transformantów na podłożu z ampicyliną

4. Ocena jakości banku (omówiona w pkt. B)

Uwaga. Bank można przechowywać w trzech postaciach:

- pojedynczych kolonii zawierających jedynie zrekombinowane plazmidy (ten sposób jest niezwykle pracochłonny i rzadko stosowany).
- puli kolonii amp^r zebranych z szalek, którą w miarę potrzeb można ponownie wysiać na szalki aby otrzymać pojedyncze kolonie (część komórek zawiera plazmid niezrekombinowany).
- DNA wyizolowanego z puli bakterii, który można ponownie transformować do *E. coli* (część plazmidów to pusty wektor).

B. Ocena jakości banku

Zadaniem studentów jest określenie liczby kolonii, która będzie reprezentowała cały genom stosując wyliczenie według skryptu.

- określenie udziału plazmidów zrekombinowanych - test na aktywność β -galaktozydazy (α -komplementacja). Studenci otrzymują pożywkę z X-gal, na którą wysiano próbkę transformantów z banku (szalki w lodówce).
- określenie średniej wielkości plazmidów na podstawie migracji w 1% żelu agarozowym formy CCC nietrawionych plazmidów wyizolowanych z kilku białych kolonii (na żelu ścieżki 5-11). Markerami wielkości są plazmidy o znanej masie (ścieżka 1- wektor 5,7 kb; ścieżka 2 - 7,8 kb, ścieżka 3 - 9,4 kb; ścieżka 4 - 12,6 kb).
- wielkość genomu *S. cerevisiae* 12,1 Mb.