

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

Inżynieria Genetyczna

ćw. 3

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

*Prosimy o nierozpowszechnianie materiałów bez
naszej zgody*

Kontrola szczepów w mutagenезie PET127 - reakcja PCR

PCR diagnostyczny PET127 (kontrola genotypów)

Nazwa programu w termocyklerze : **PCRPET19**

Czas programu: **3h 15 min**

Rodzaj PCR: **PCR multiplex**

95°C – 5 min

95°C – 30 sek

60°C – 30 sek

72°C – 3 min

72°C – 10 min

8°C – ∞

} 35 cykli

PCR Reakcja:

•PCR Mix

(zawiera 2 pary starterów - multipleks)

•Matryca DNA

Vol.

18 µl

2 µl

Objętość końcowa reakcji

20 µl

PCR Reakcja (kontrola negatywna): **Vol.**

•PCR Mix

18 µl

(zawiera 2 pary starterów - multipleks)

•Woda

2 µl

Objętość końcowa reakcji

20 µl

•PCR Mix (1 reakcja):

Vol. 18 µl

Bufor polimerazy (10x)

2,0 µl

dNTP 10 mM

0,4 µl

polimeraza - DreamTaq

(ThermoScientific):

0,2 µl

woda

13,4 µl

Startery (multipleks) po 4 pM w reakcji:

2,0 µl

Pet127 up

Pet127 down

Pet127 forward

Pet127 reverse

Matryce DNA:

Vol. 2 µl

•Pet 127 WT (całkowity DNA z dziką genomową wersją PET127)

•Δ PET 127 (całkowity DNA bez genomowej wersji PET127)

•Δ PET 127 + WT (całkowity DNA bez genomowej wersji PET127, ale z dziką wersją PET127 na plazmidzie) – KONTROLA pozytywna

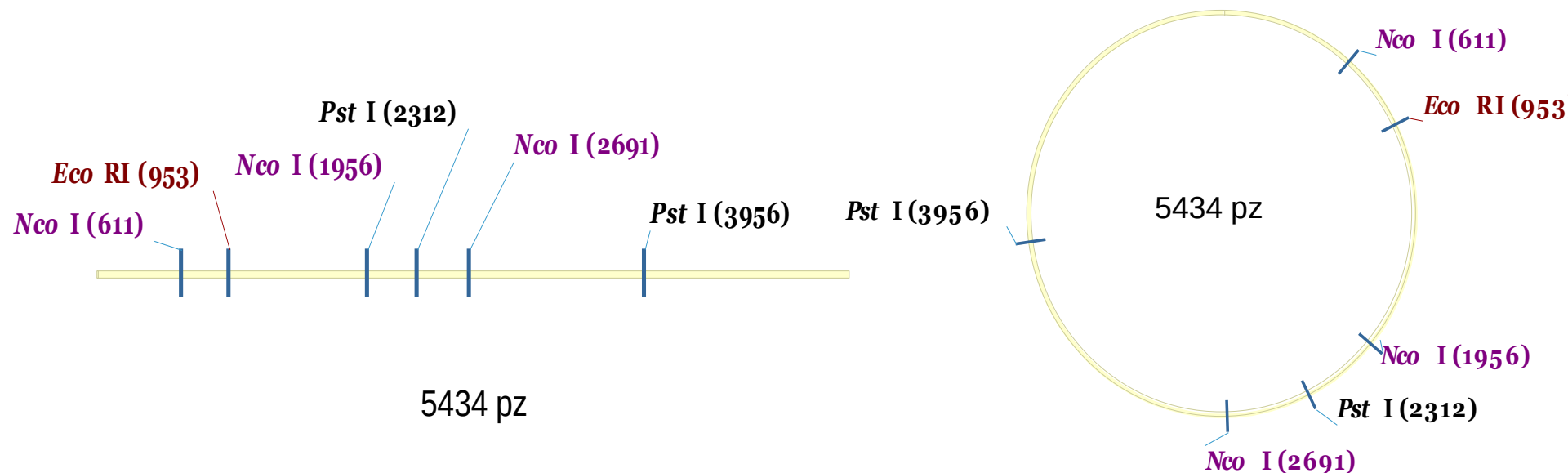
•Δ PET 127 + L392A (całkowity DNA bez genomowej wersji PET127, ale ze zmutowaną wersją PET127 na plazmidzie)

•Δ PET 127 + K393A (całkowity DNA bez genomowej wersji PET127, ale ze zmutowaną wersją PET127 na plazmidzie)

•Δ PET 127 + D391A (całkowity DNA bez genomowej wersji PET127, ale ze zmutowaną wersją PET127 na plazmidzie) **x2**

•Δ PET 127 + E346A (całkowity DNA bez genomowej wersji PET127, ale ze zmutowaną wersją PET127 na plazmidzie) **x2**

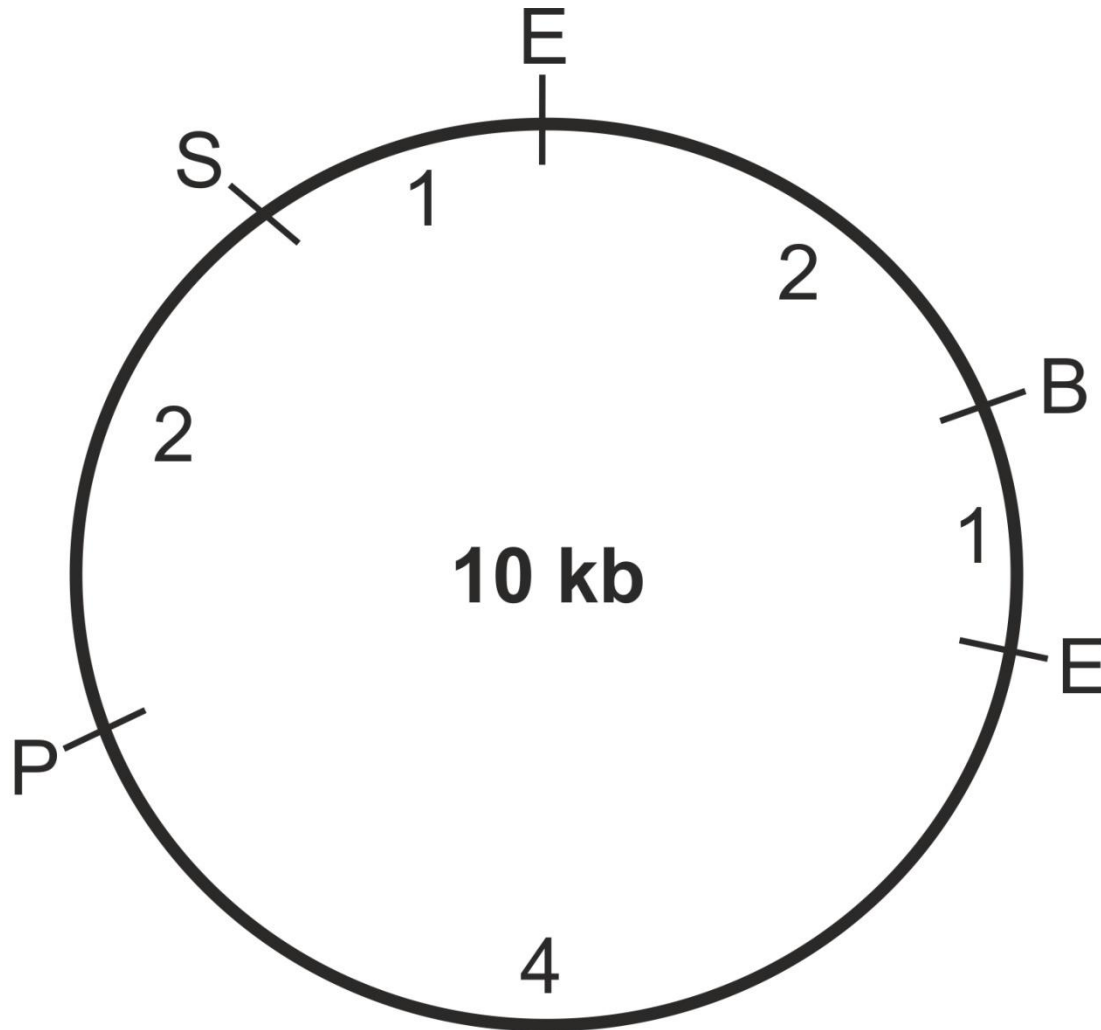
Zadanie domowe - mapa restrykcyjna



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

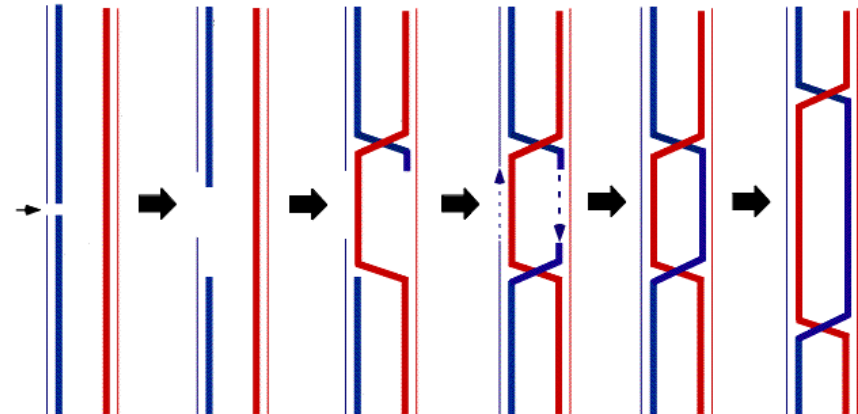
Enzym	Cząsteczka liniowa	Cząsteczka kolistą
EcoRI	4482, 952	5434
PstI	2311, 1644, 1479	3790, 1644
NcoI	2744, 1345, 735, 610	3354, 1345, 735
EcoRI/PstI	1644, 1479, 1359, 952	2431, 1644, 1359

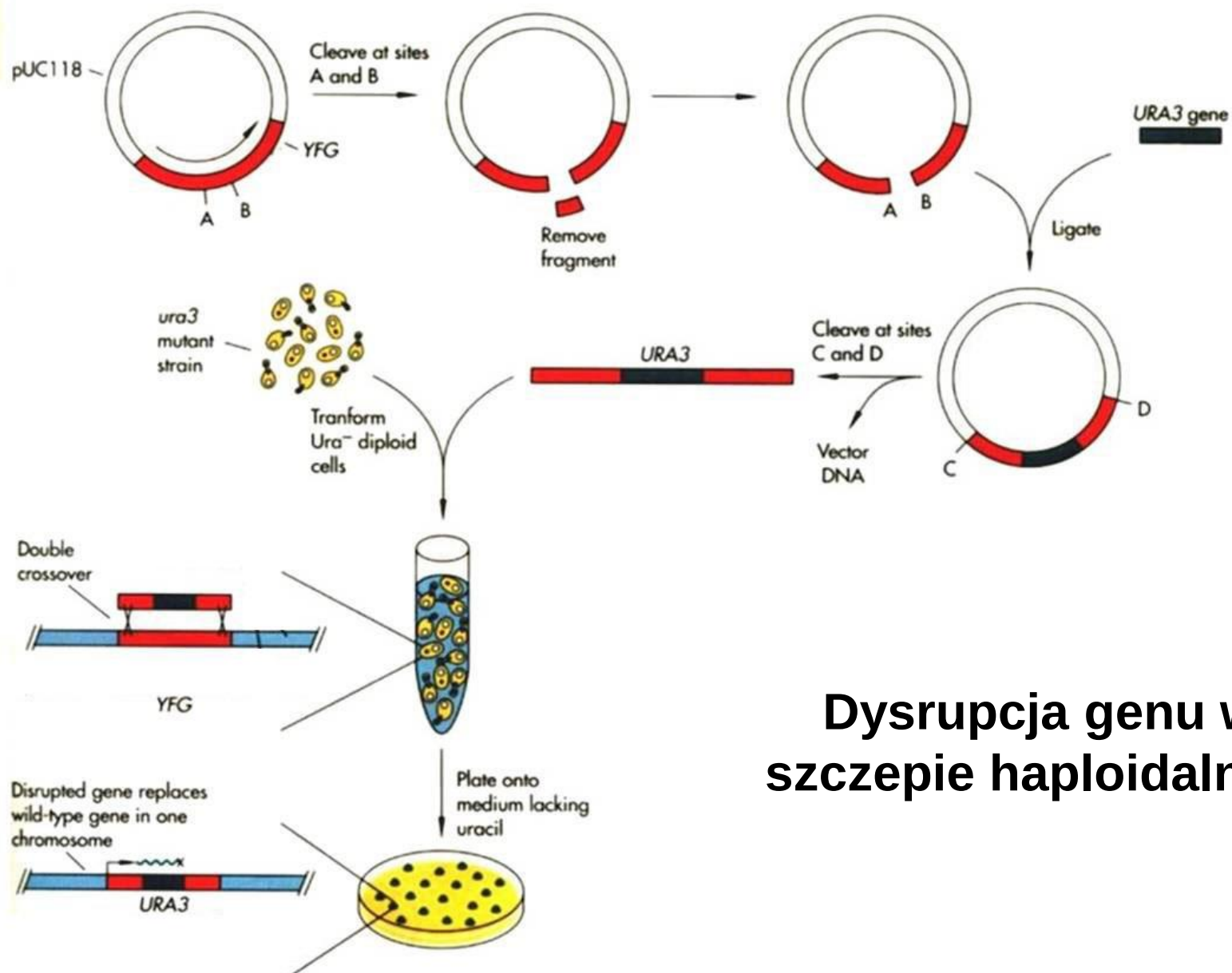
Zadanie domowe dodatkowe – trudna mapa restrykcyjna



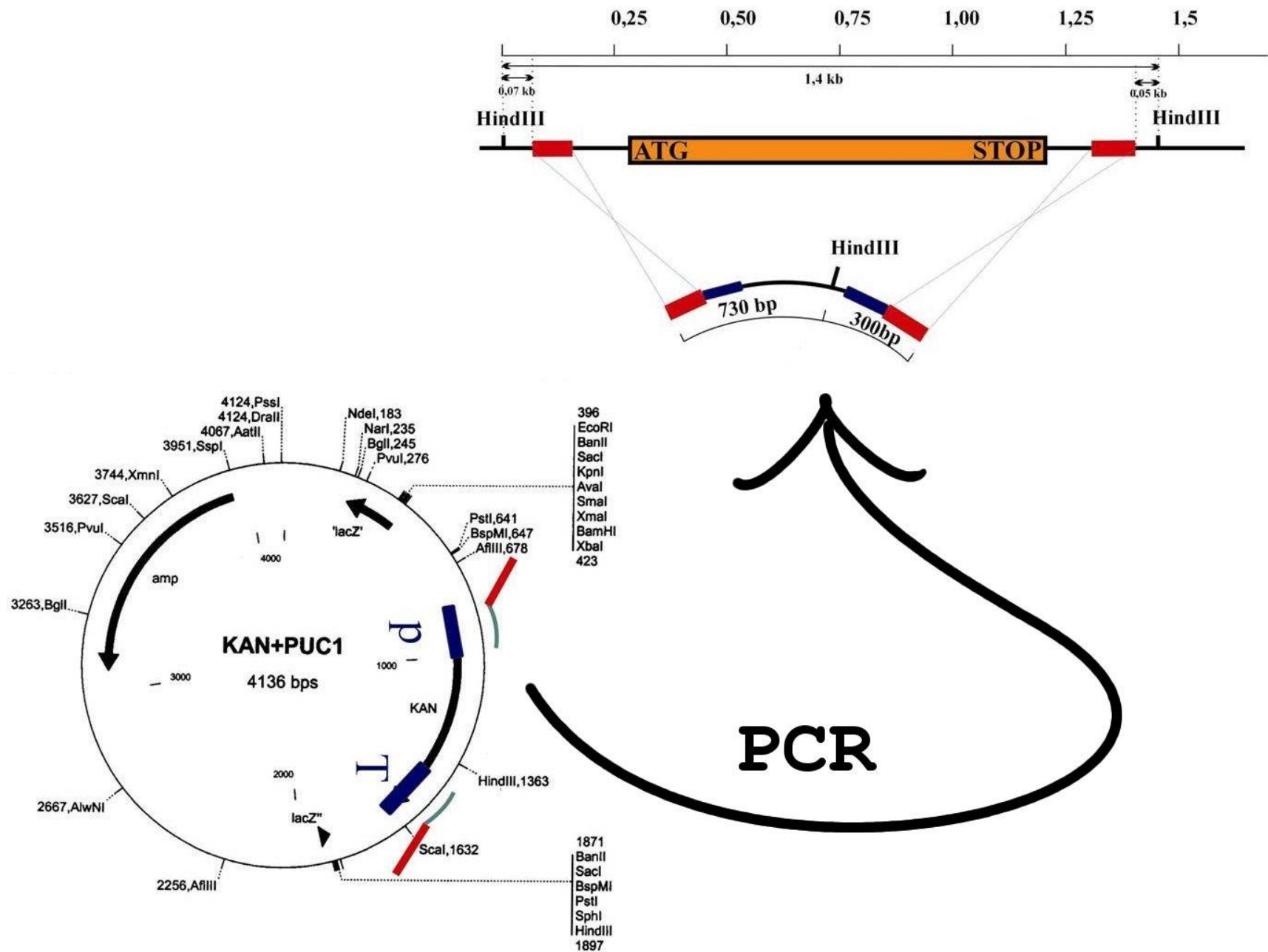
Dysrupcja genów w drożdżach

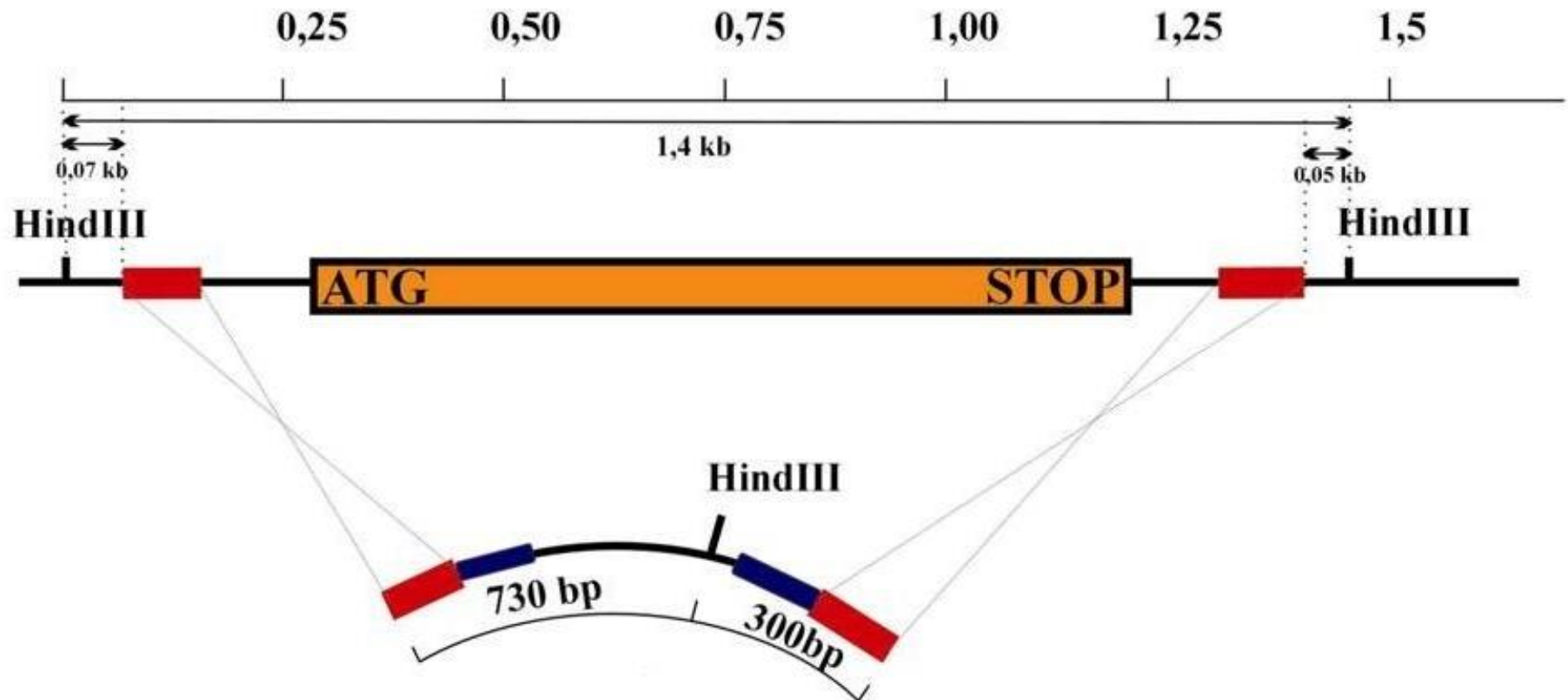
- U drożdży występuje bardzo wydajna **rekombinacja homologiczna**.
- Zjawisko to polega na wymianie fragmentów nici DNA o podobnej sekwencji. Mechanizm ten stanowi podstawę ***crossing-over***.
- Rekombinacja homologiczna jest stosowana jako narzędzie przy tworzeniu **dysrupcji i delecji genów u drożdży** (tworzenie nowych szczepów).



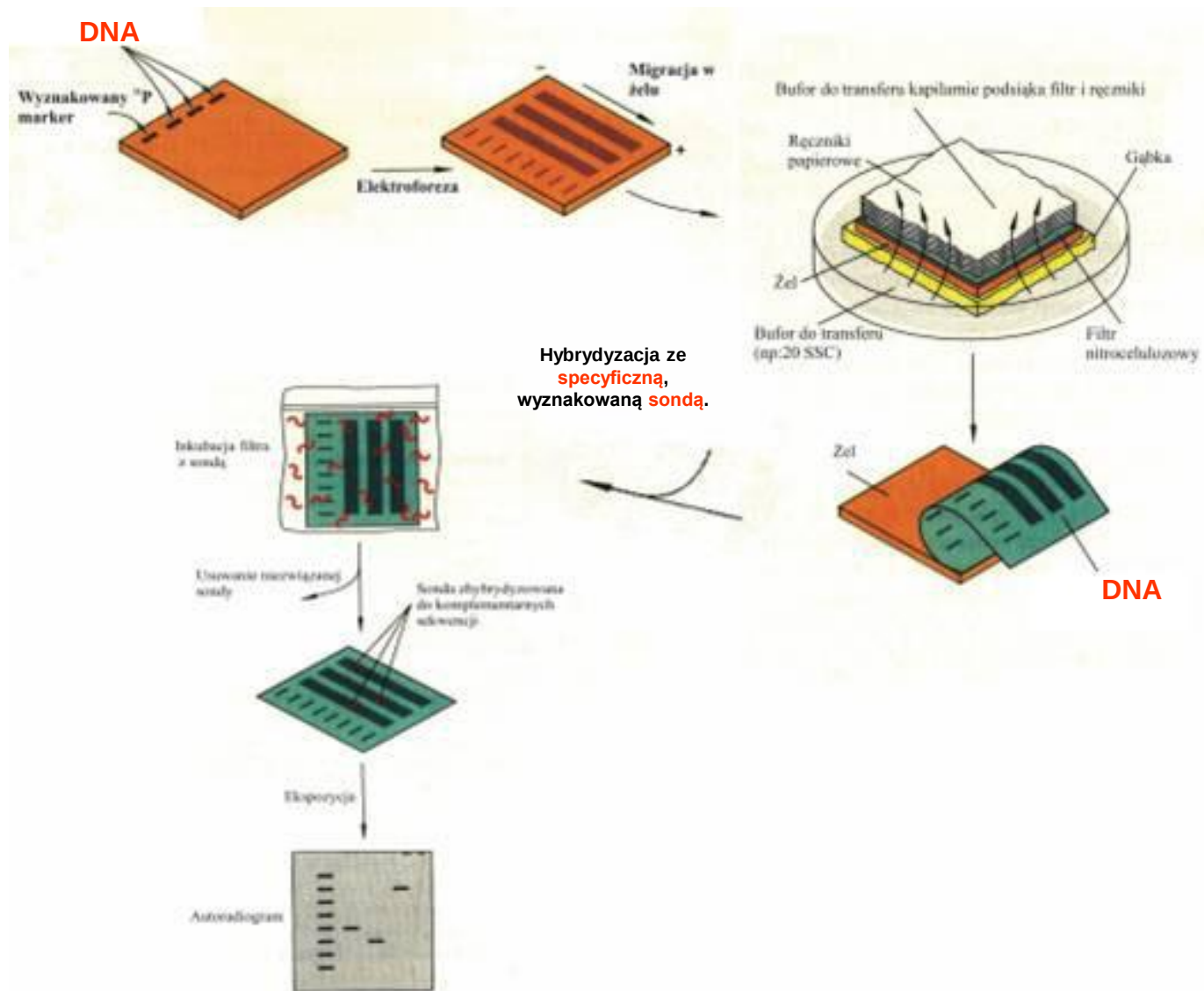


Dysrupcja genu w szczepie haploidalnym

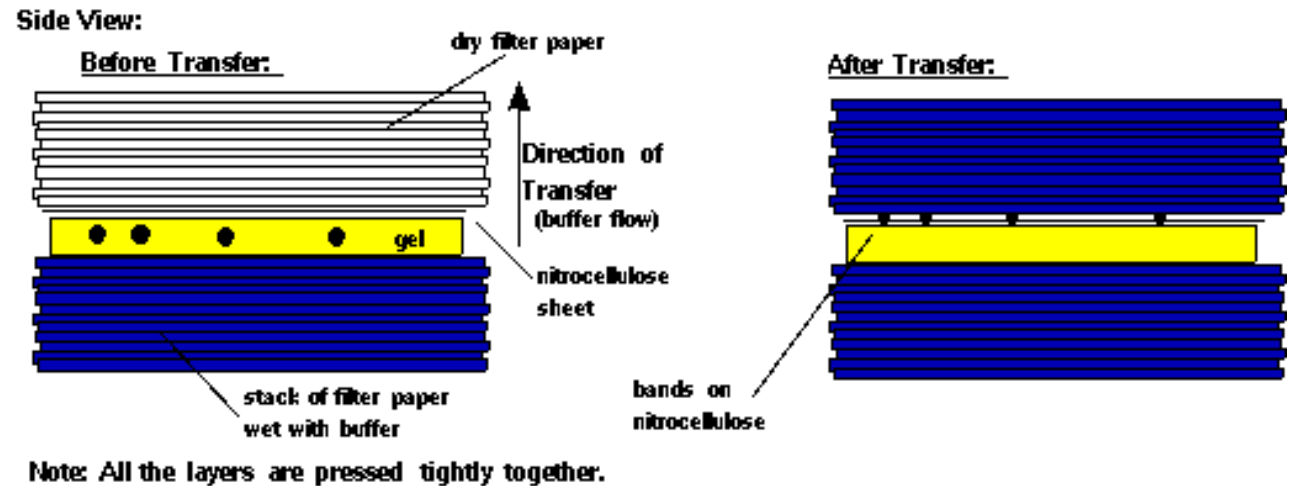




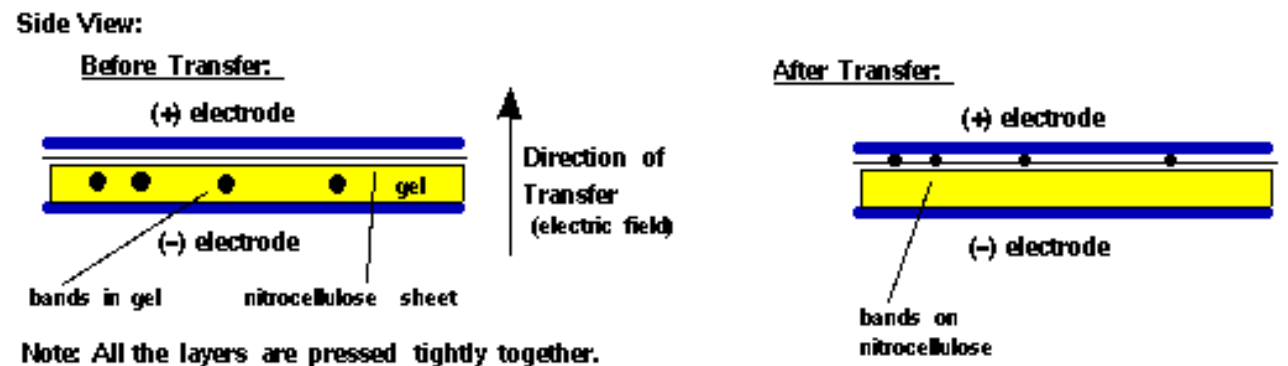
Technika *Southern-blot*: rozdział i detekcja DNA



Transfer kapilarny



Transfer w polu elektrycznym

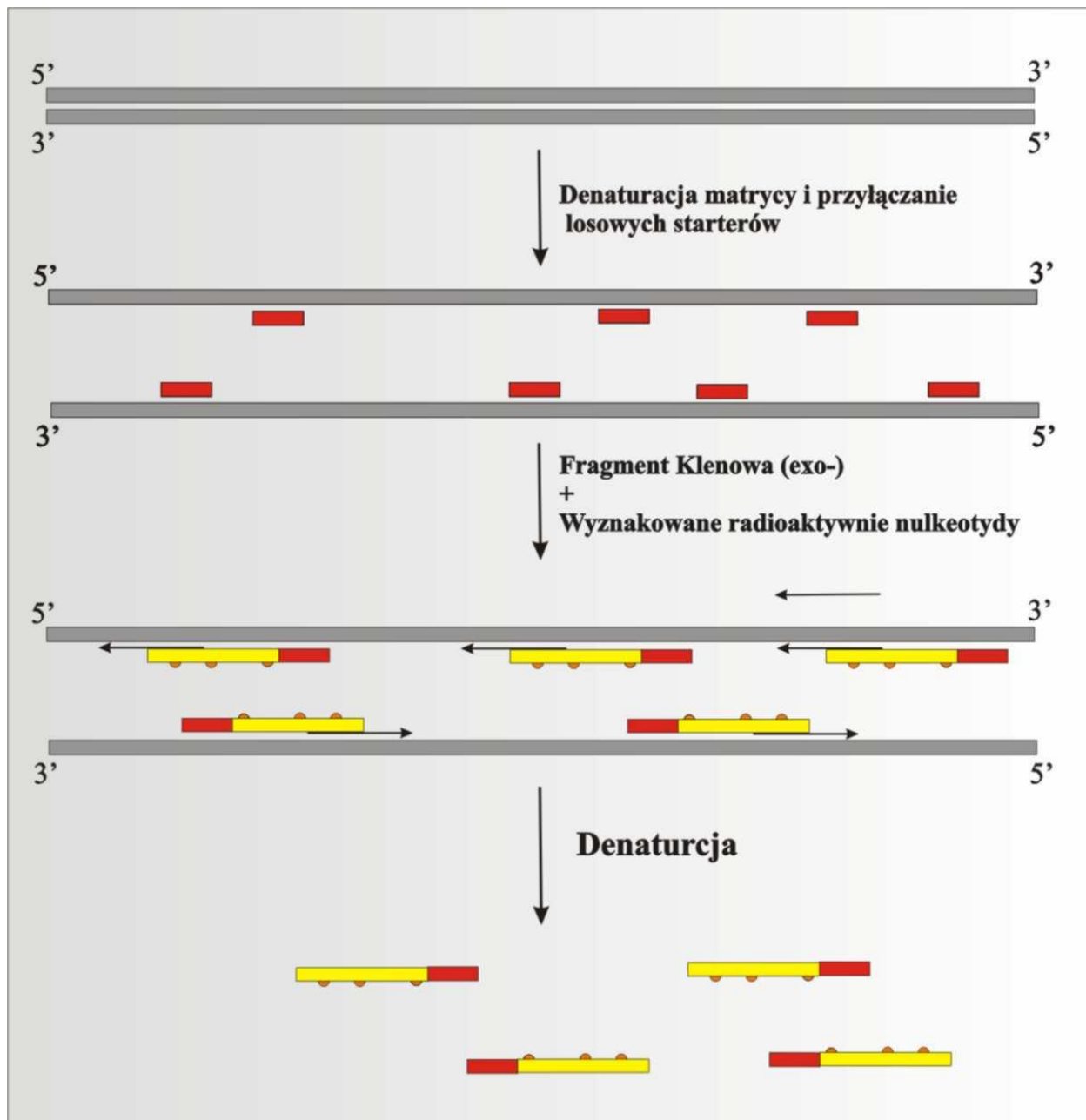


sondy

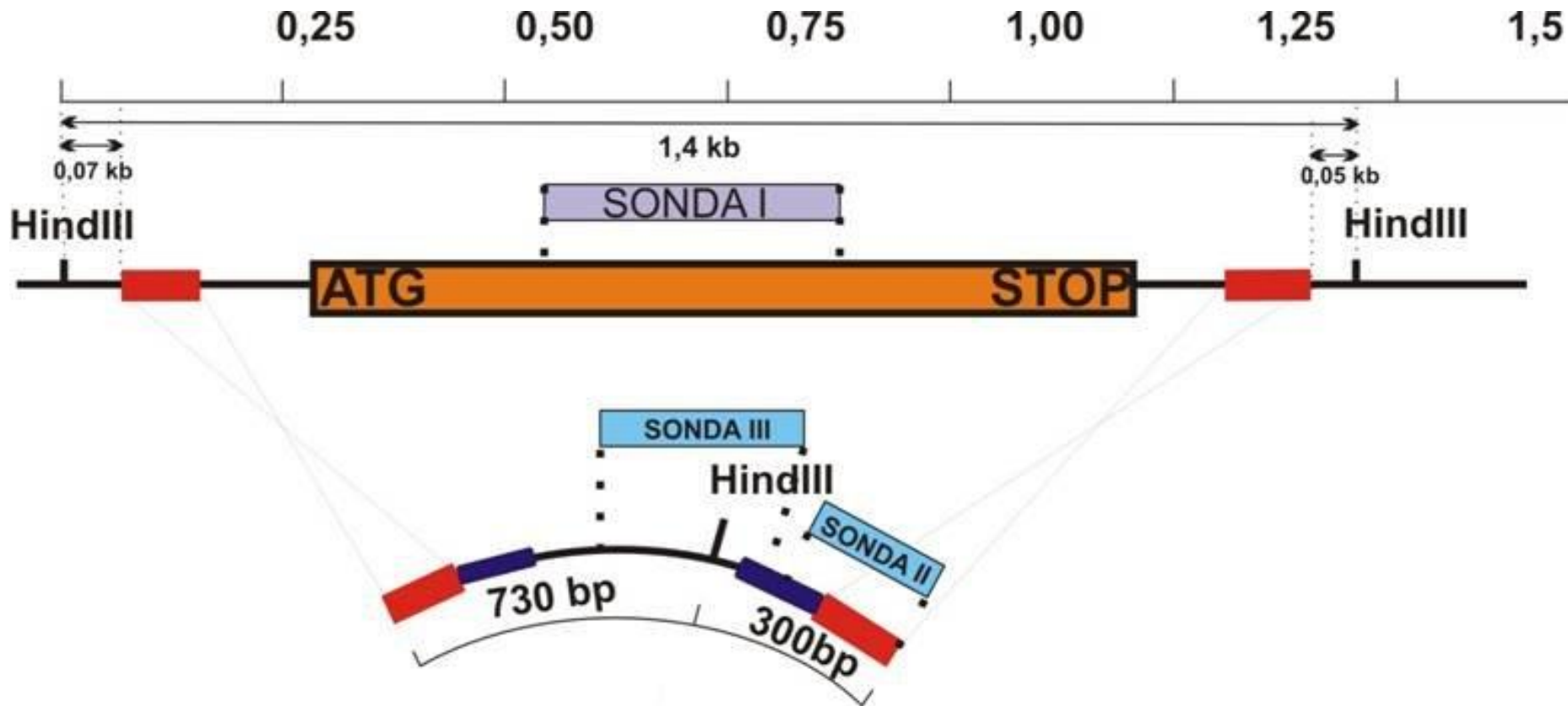
**Sonda molekularna -
komplementarny kwas
nukleinowy**

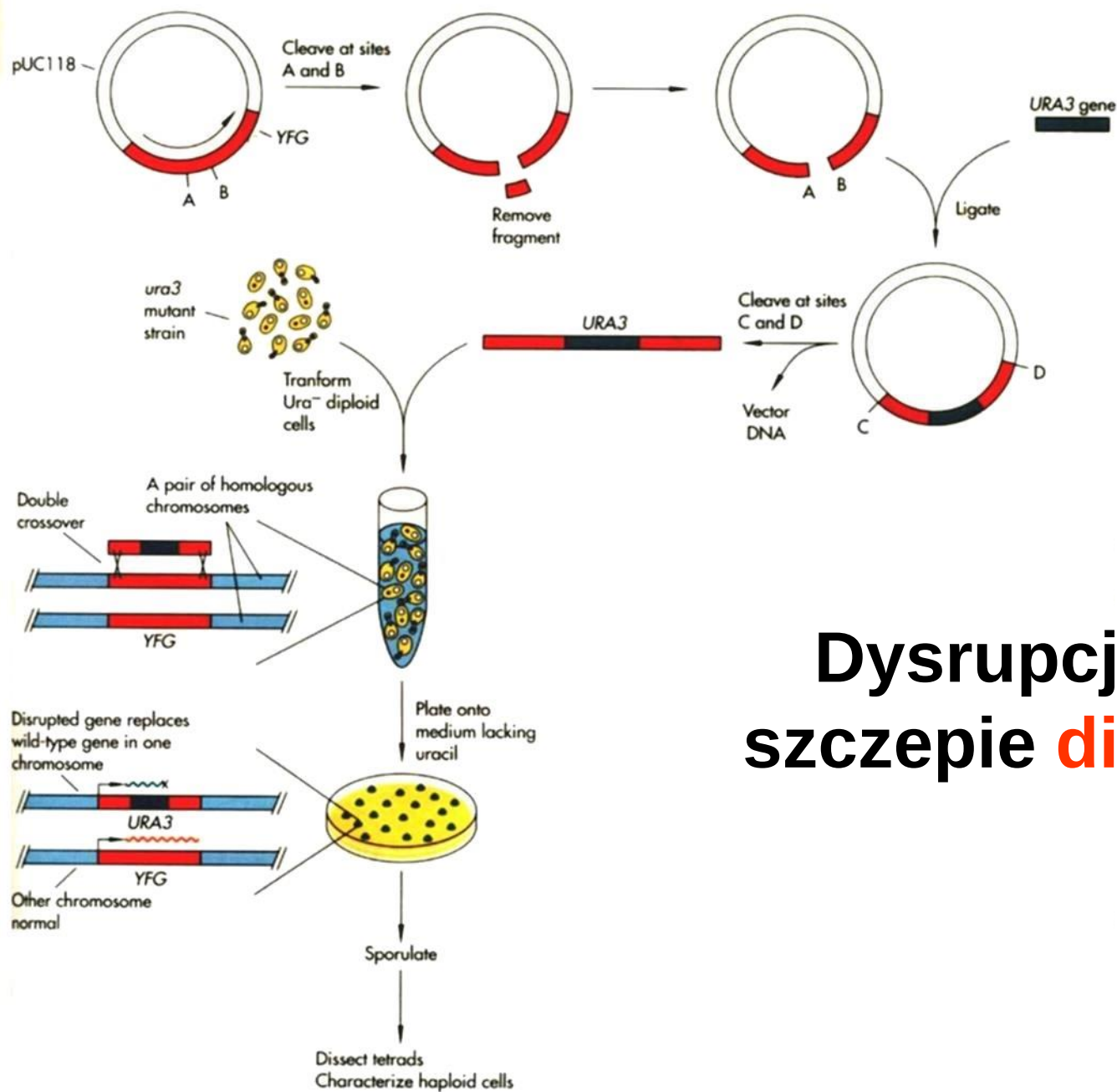
← **Znakowanie metodą
„random-priming”
produktu PCR lub
fragmentu wyciętego z
wektora z
wykorzystaniem $\alpha^{32}\text{P}$ -
dATP (synteza)**

Lub znakowanie końców 5' kinazą
polinukleotydową (PNK) i $\gamma^{32}\text{P}$ -
ATP (np. jednoniciowych
nukleotydów)



Kontrola dysrupcji przez hybrydyzację Southerna

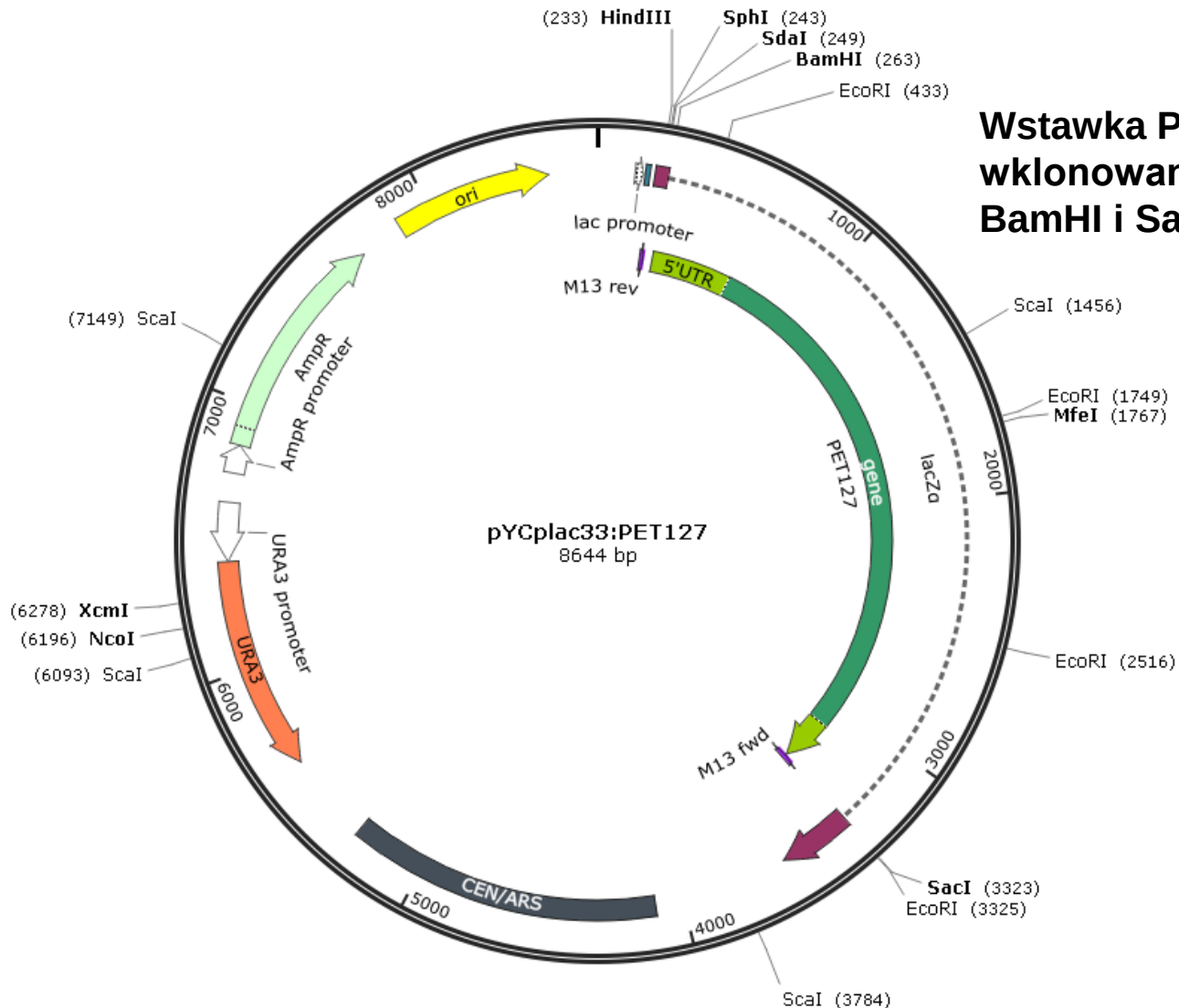




Dysrupcja genu w szczepie **diploidalnym**

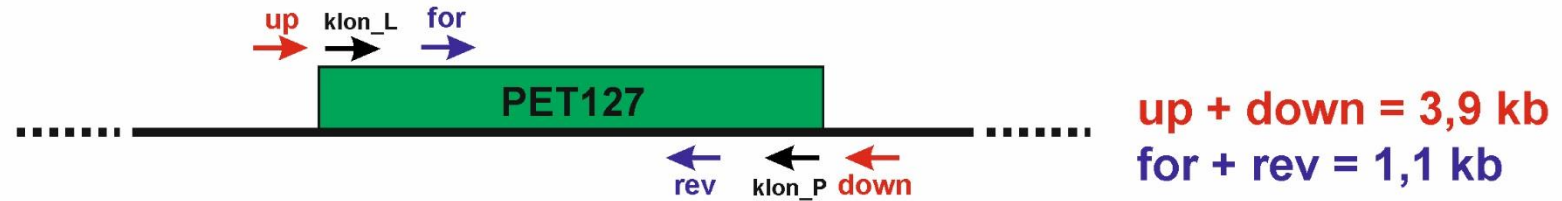
Wektor bifunkcyjny, bakteryjno-drożdżowy ze sklonowanym genem PET127

Created with SnapGene®

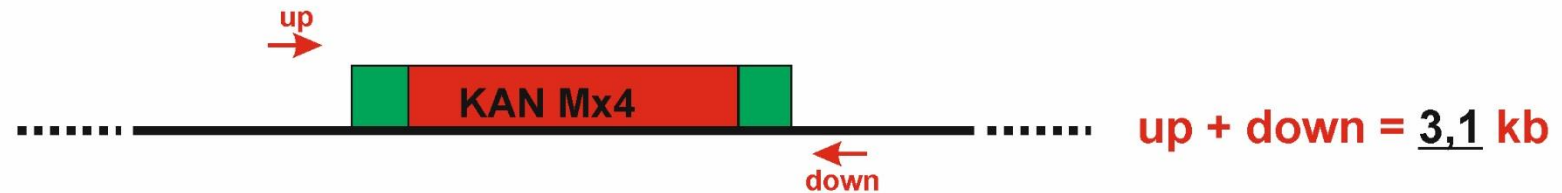


Kontrola szczepów w mutagenезie PET127 – schemat PCR

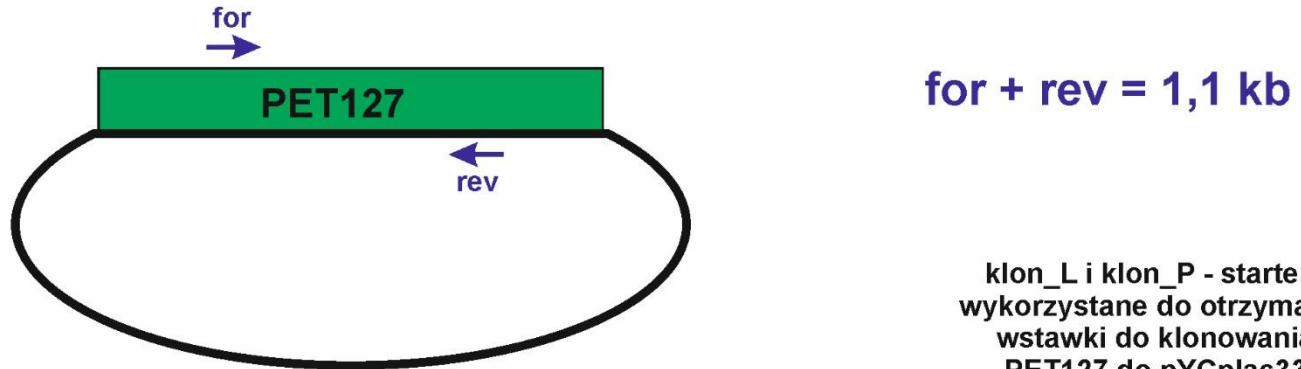
wt *locus* PET127



locus PET127 Δ



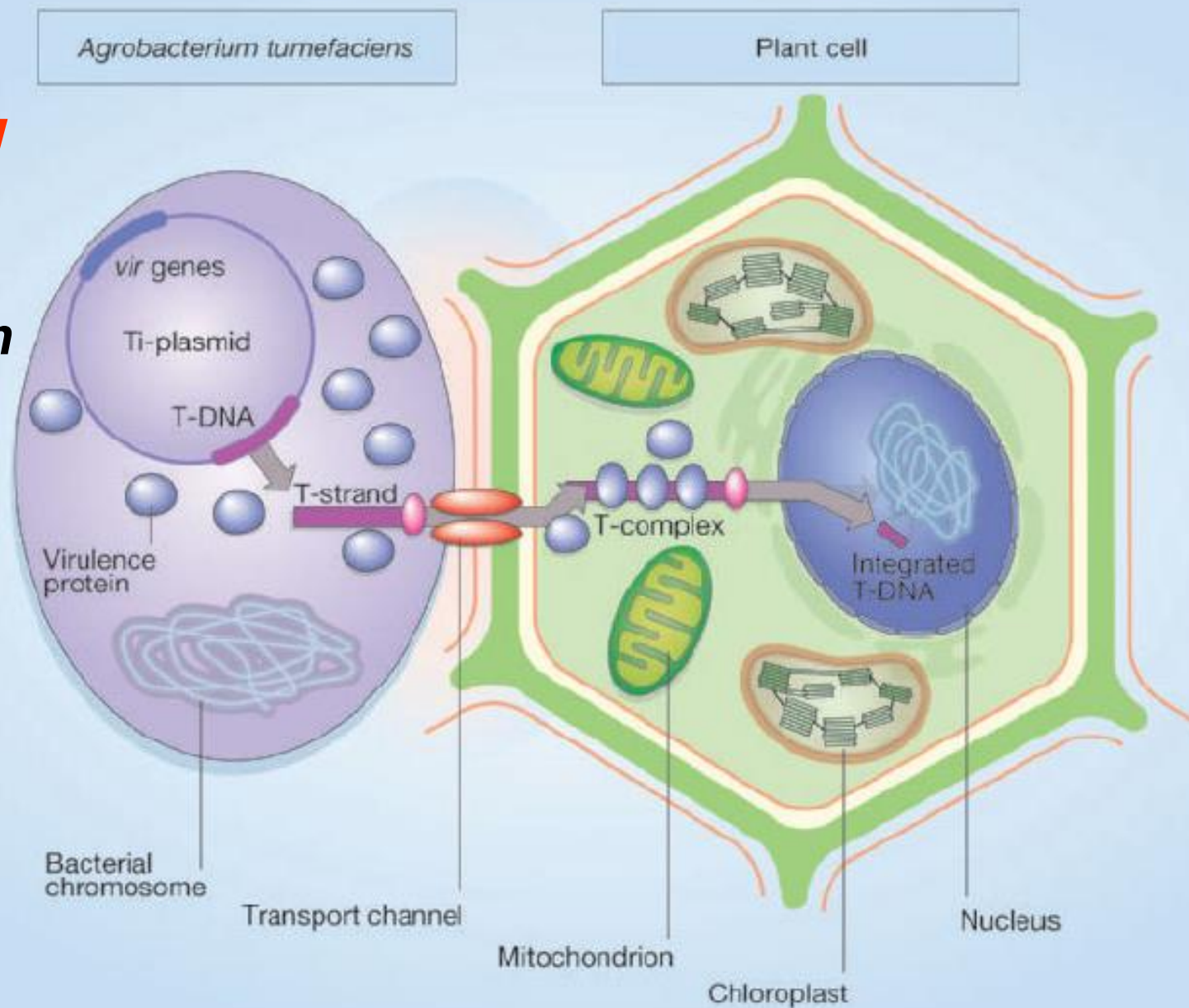
pYCplac33::PET127



klon_L i klon_P - startery
wykorzystane do otrzymania
wstawki do klonowania
PET127 do pYCplac33

Dysrupcje w roślina

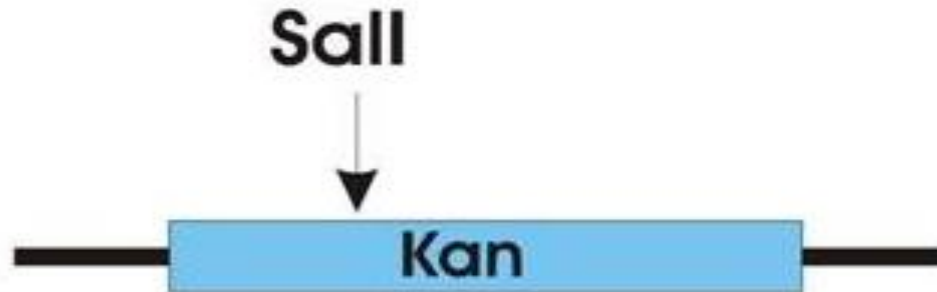
Agrobacterium tumefaciens

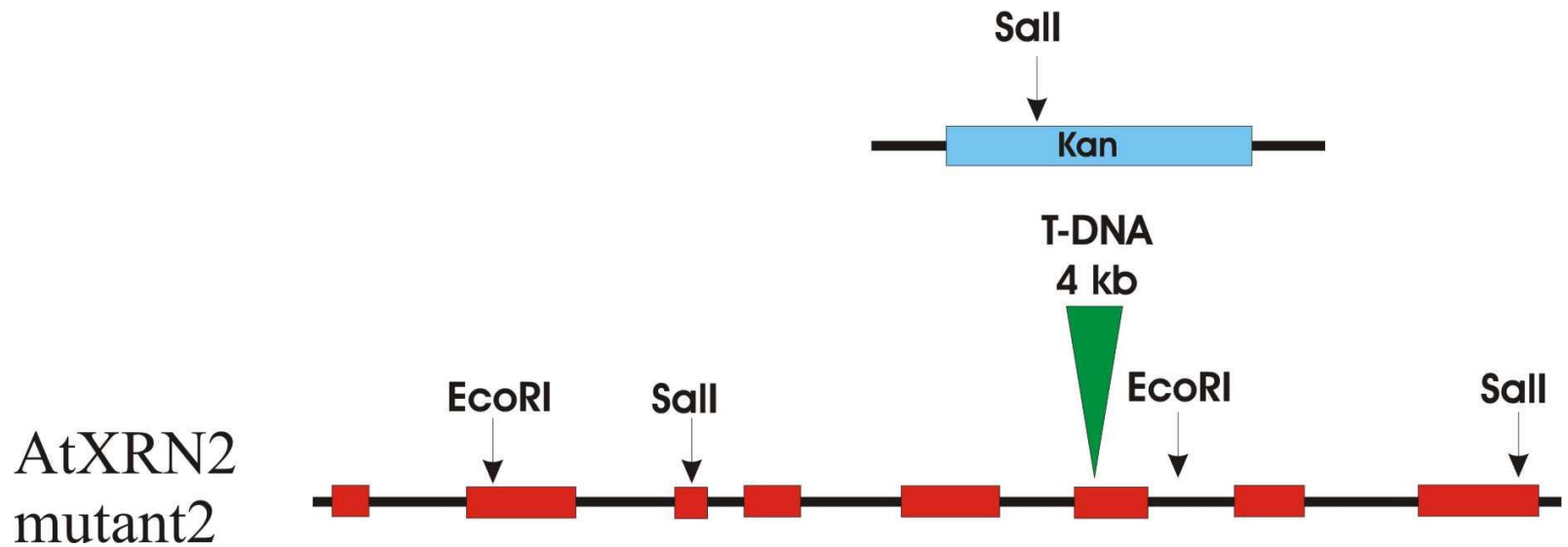
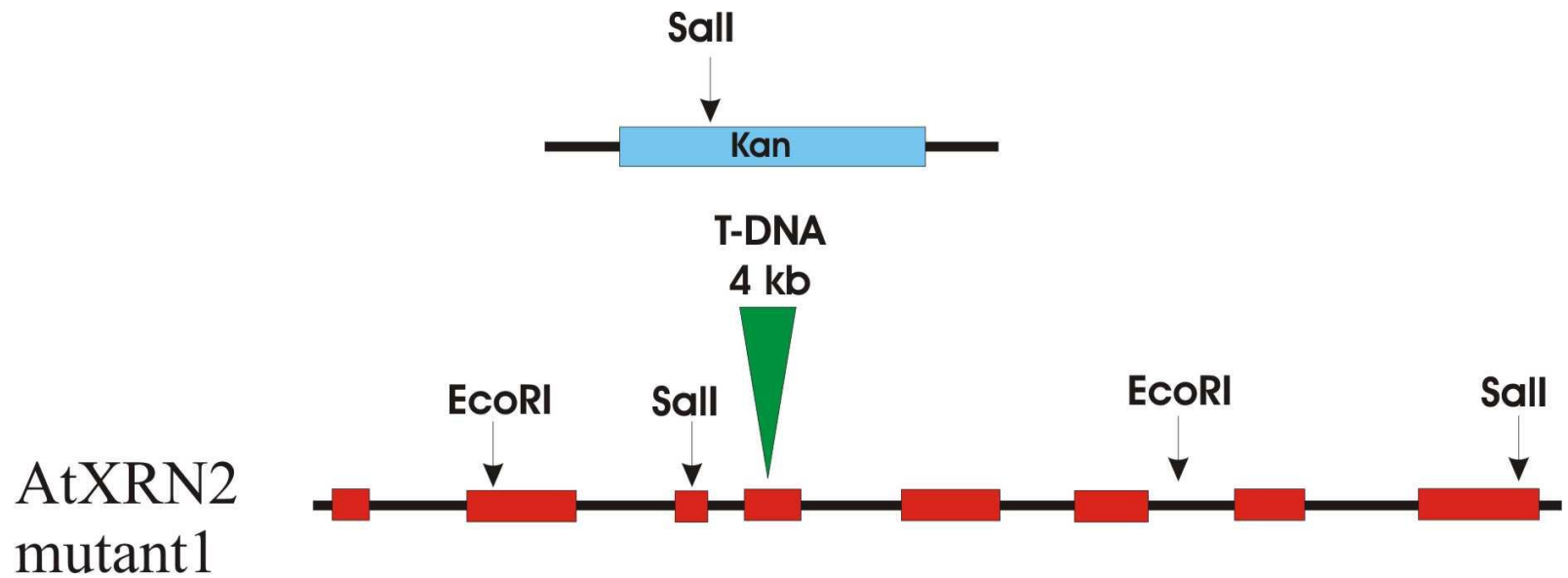


Cel i kasetta dysrupcyjna



EcoRI/SalI 3kb; 2kb; 1kb
EcoRI 4kb
SalI 5kb

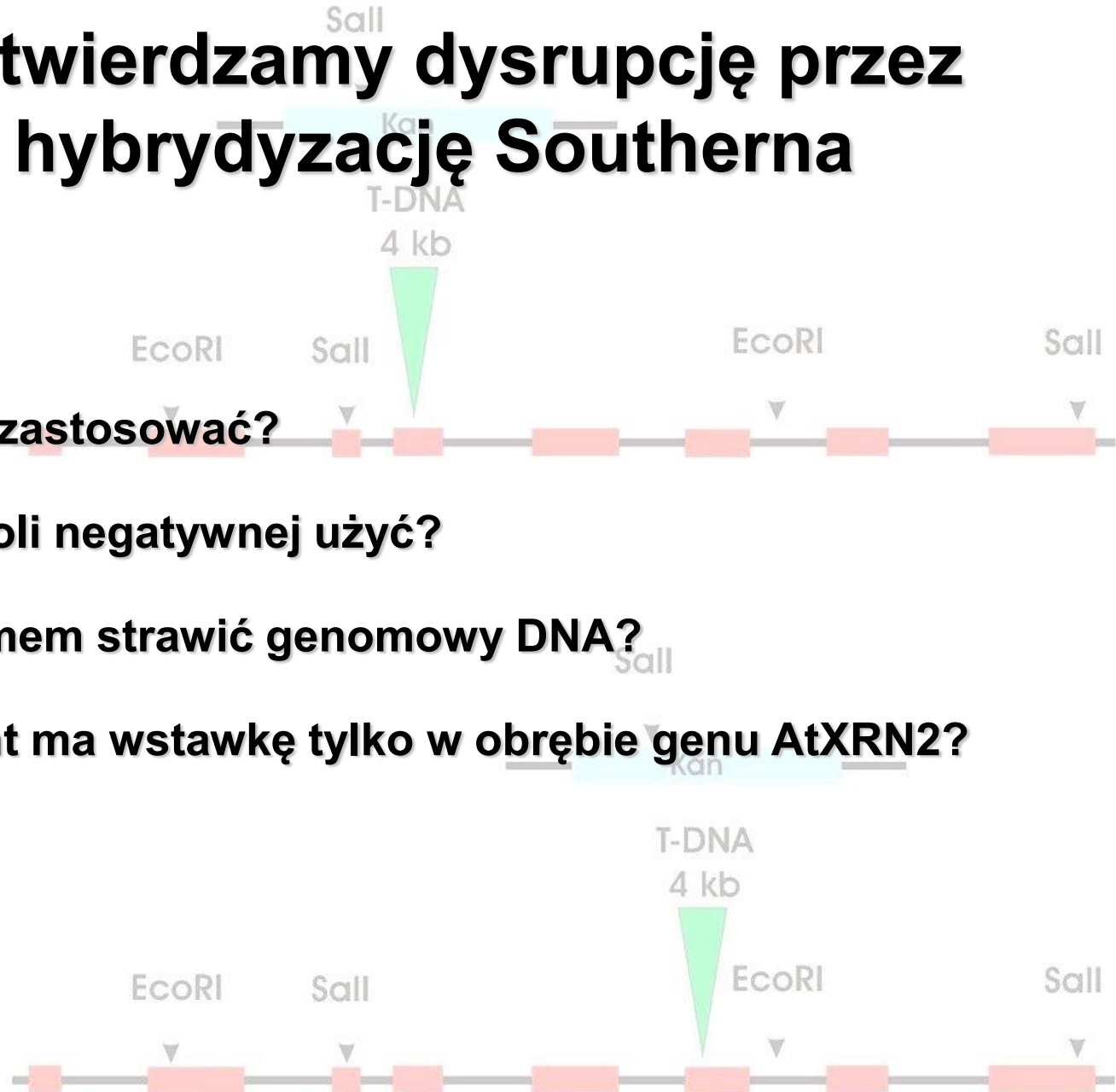




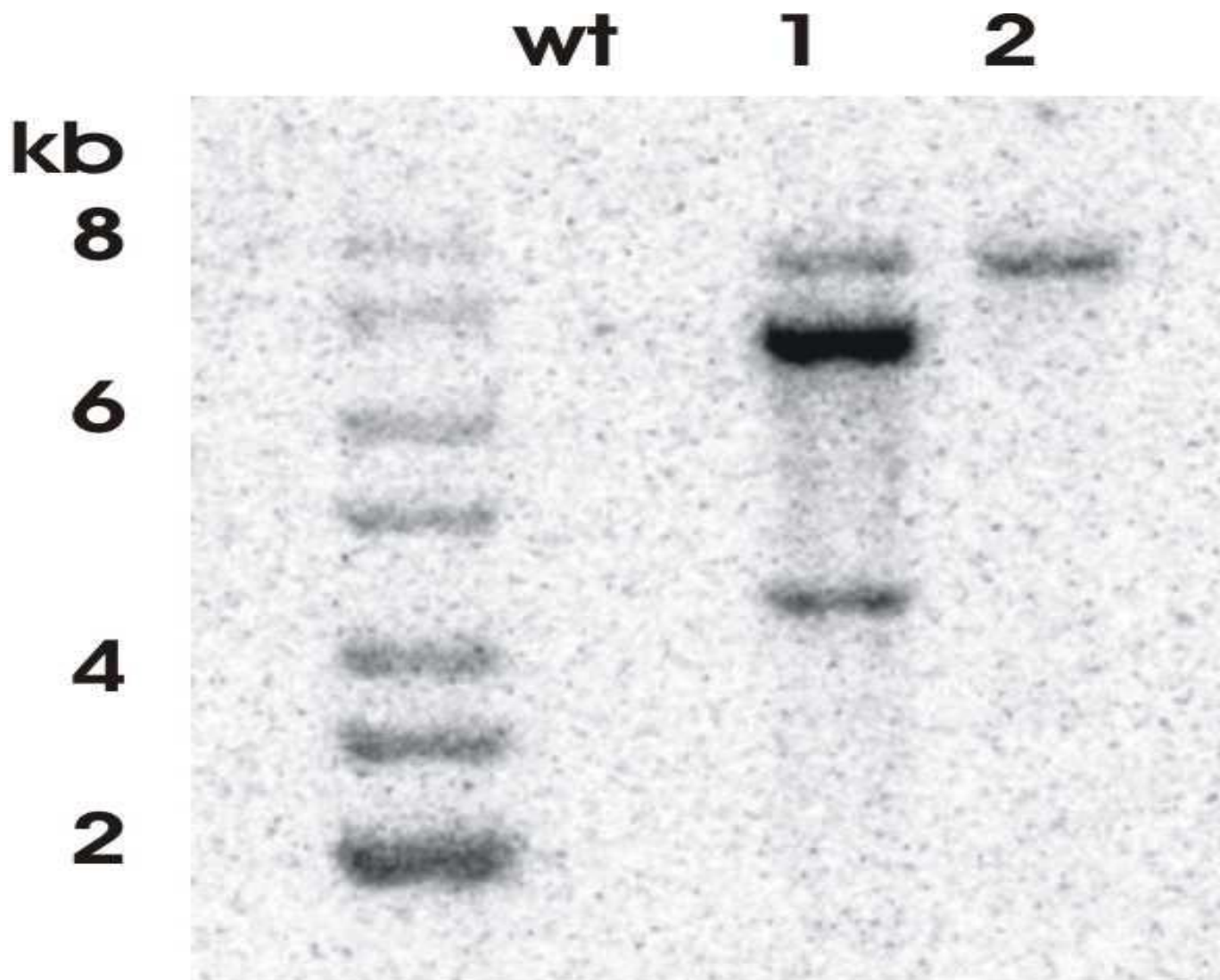
Potwierdzamy dysrupcję przez hybrydyzację Southerna

1. Jaką sondę zastosować?
2. Jakiej kontroli negatywnej użyć?
3. Jakim enzymem strawić genomowy DNA?
4. Który mutant ma wставку tylko w obrębie genu *AtXRN2*?

AtXRN2
mutant2

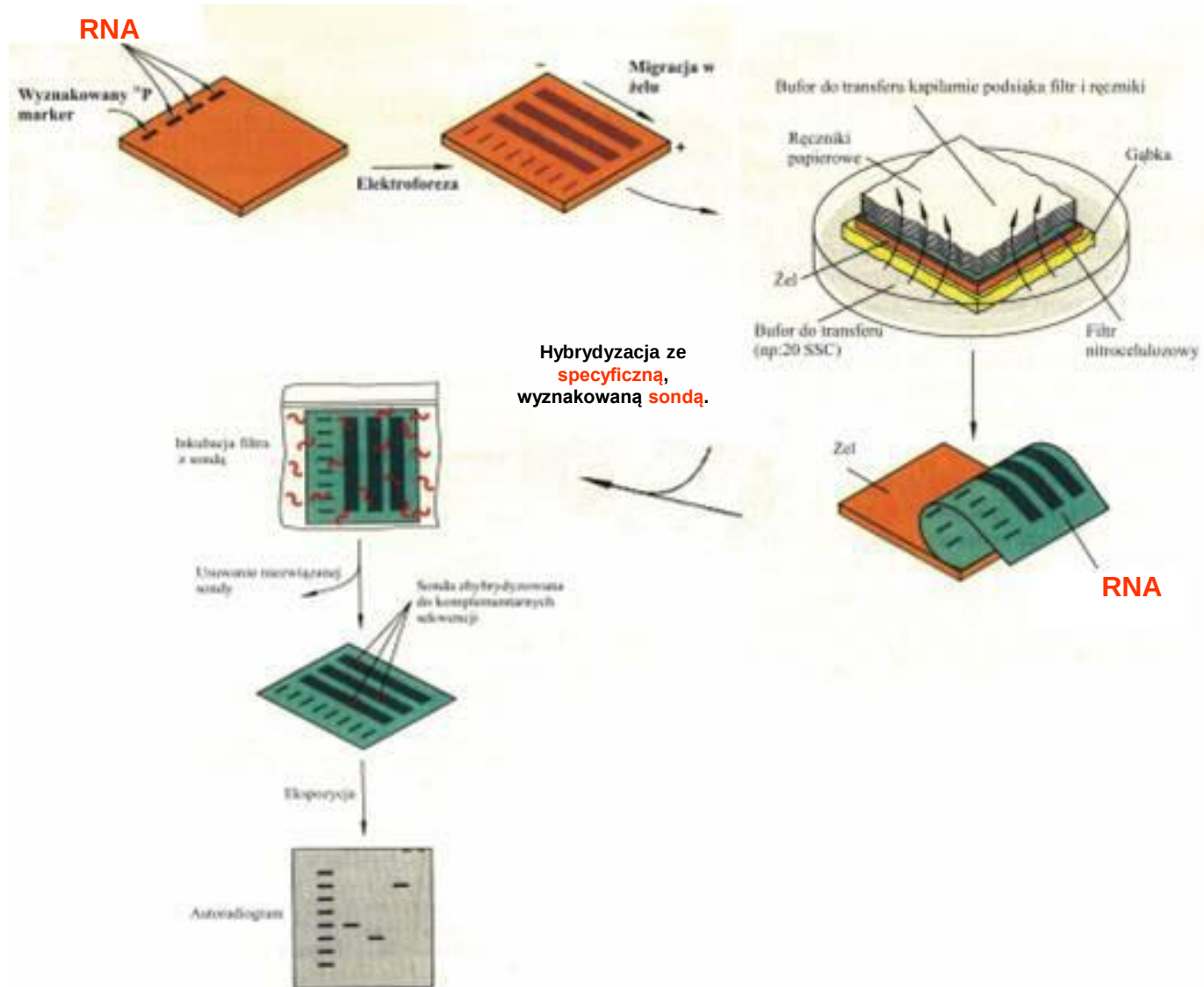


Wynik Southerna



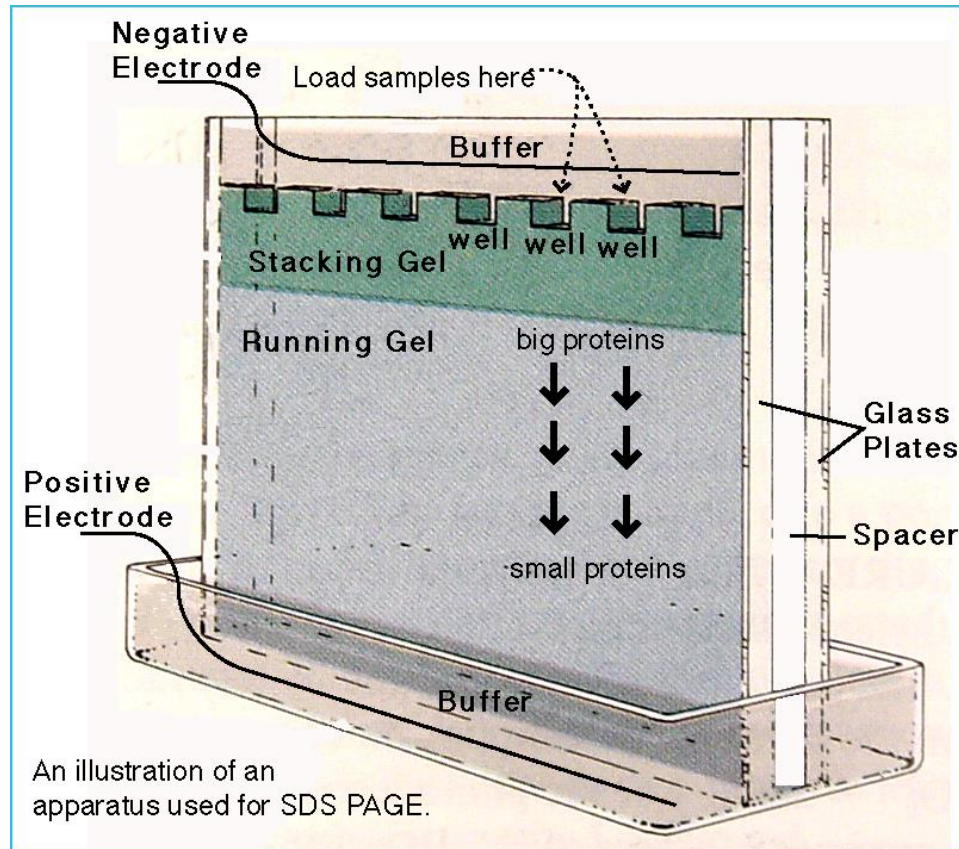
Autoradiogram hybrydyzacji z sondą do genu oporności na kanamycynę

Technika *northern-blot*: rozdział i detekcja RNA

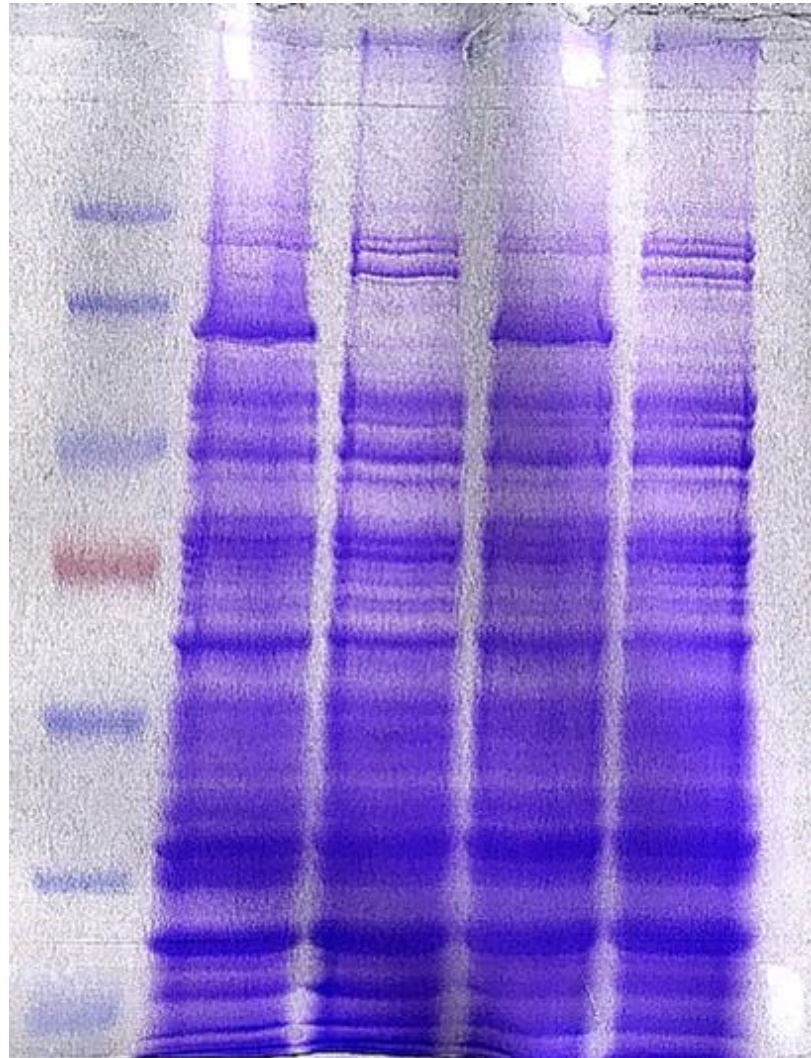


Elektroforeza białek: SDS-PAGE

- SDS nadaje białkom jednolity ładunek ujemny
- białka migrują w żelu poliakrylamidowym z prędkością zależną od wielkości

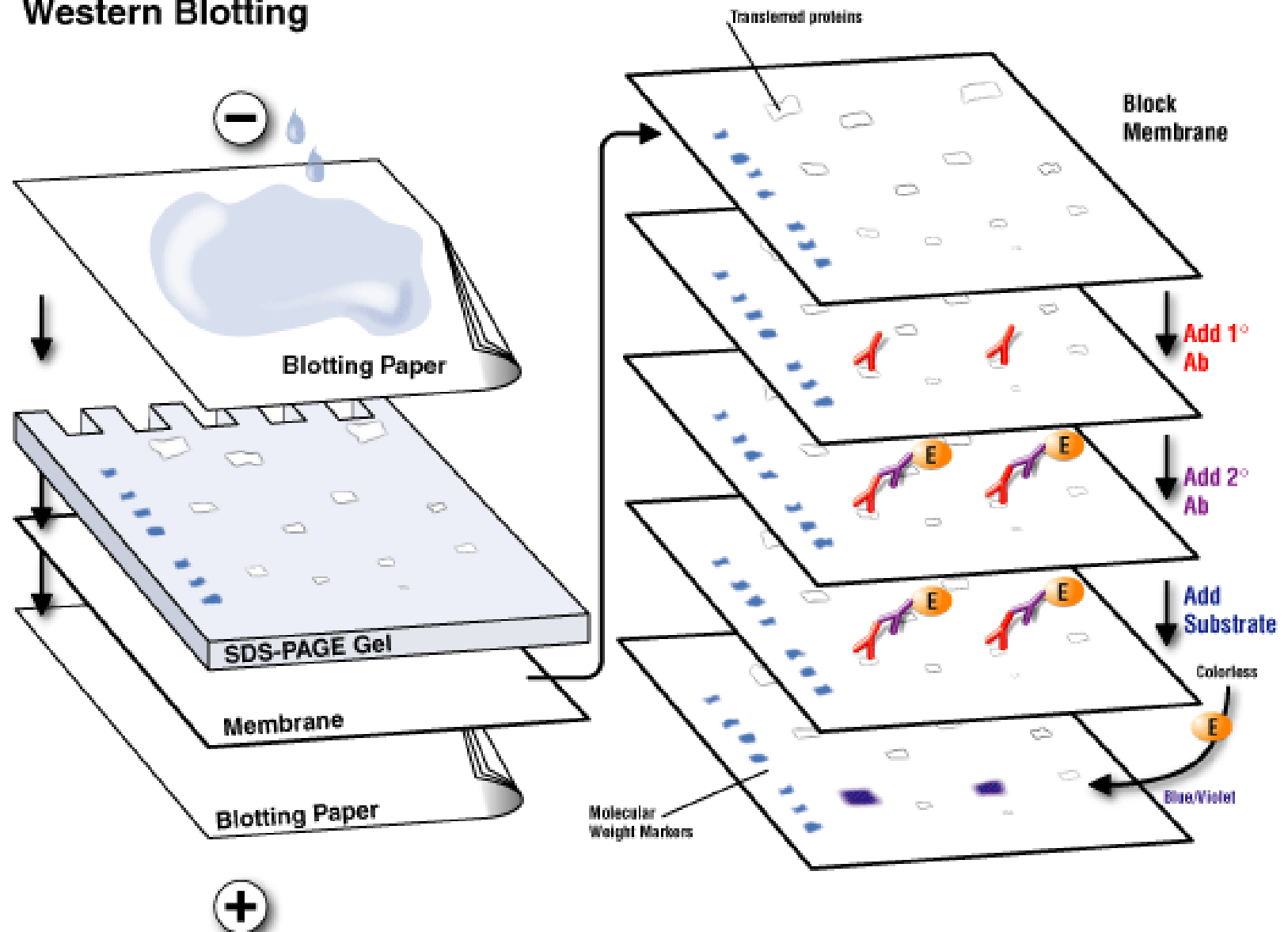


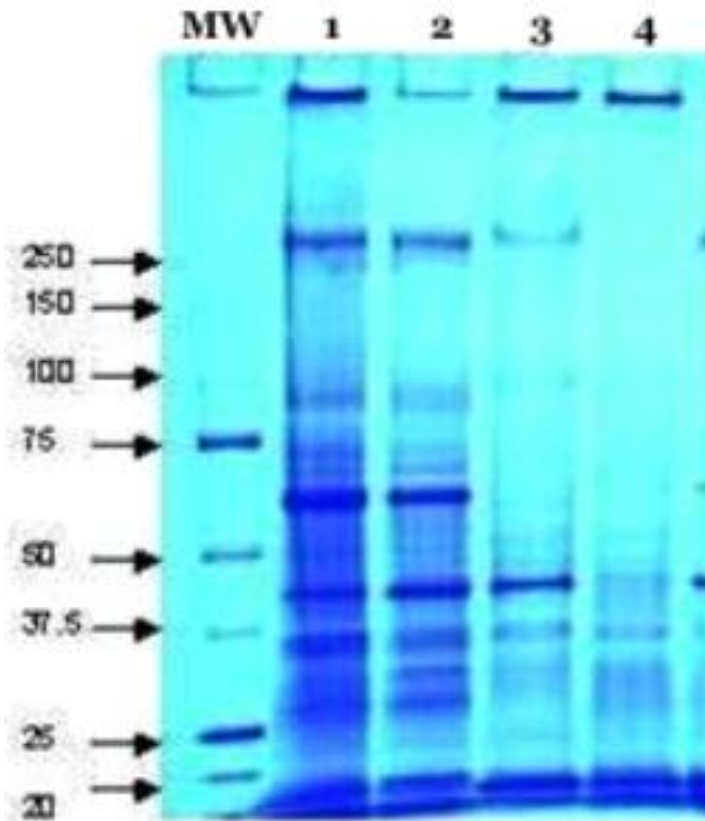
Coomassie Brilliant Blue



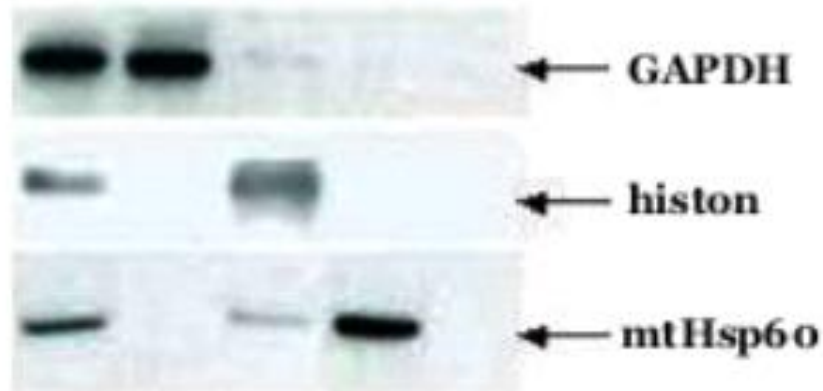
Technika *western-blot*

Western Blotting



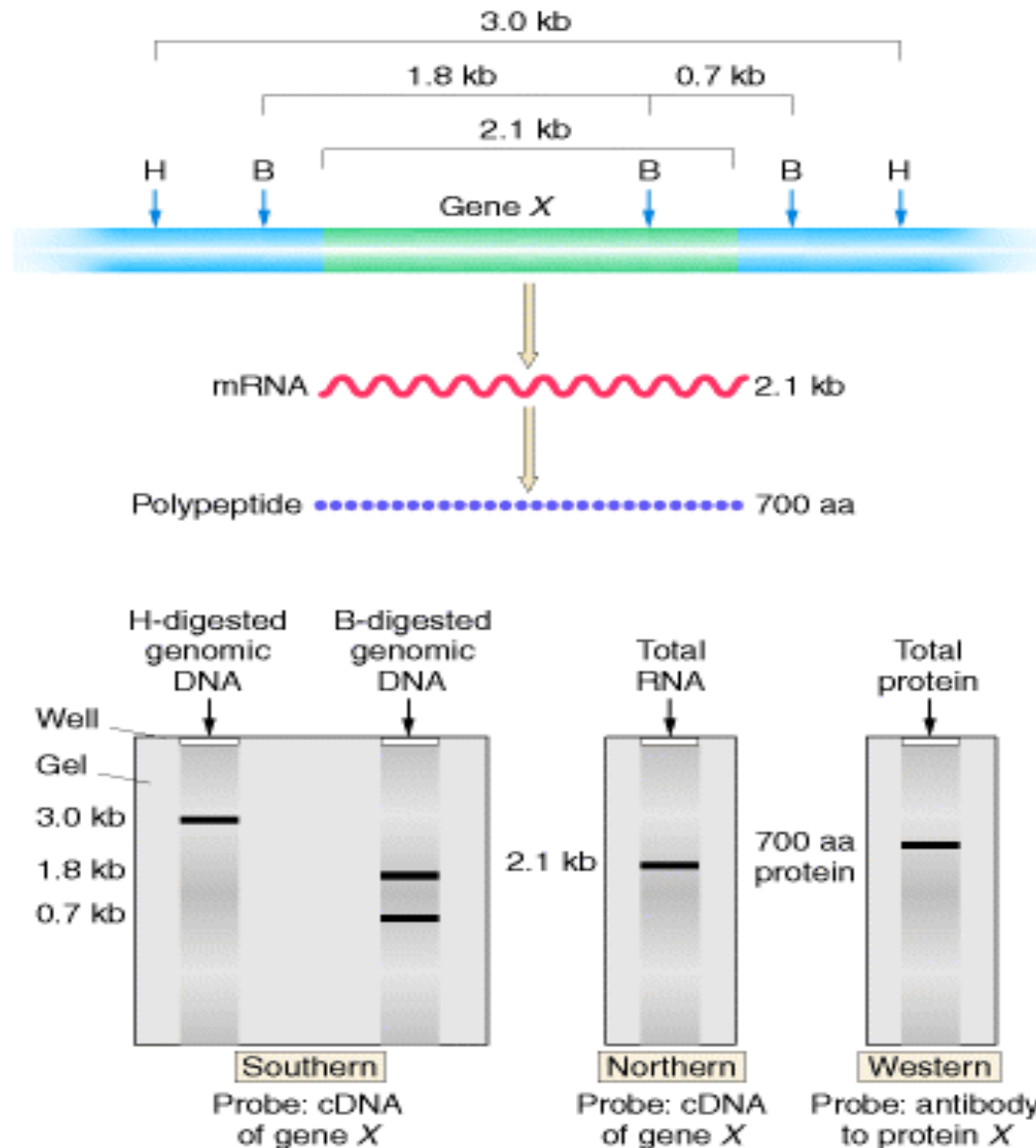


SDS-PAGE

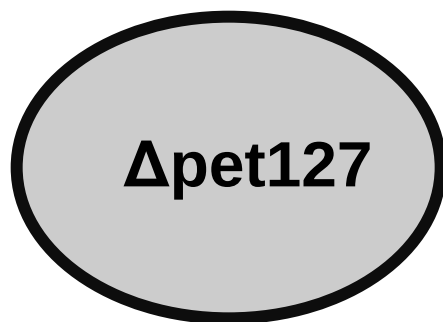


Western blot

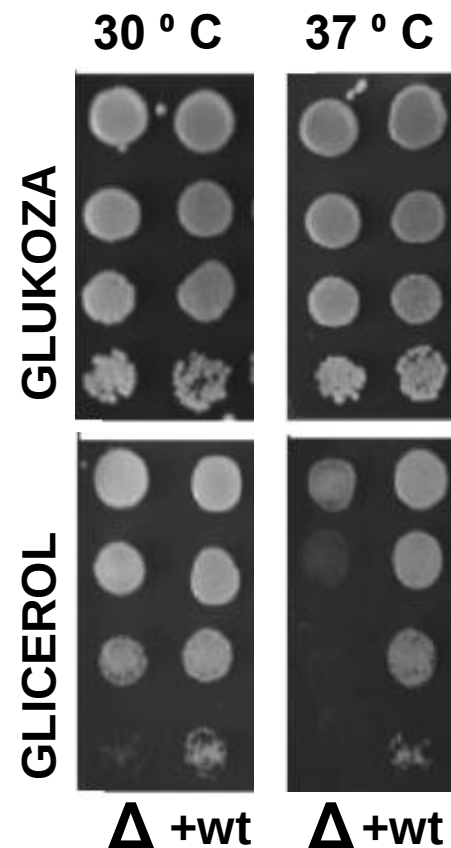
Southern, northern i western



Testy kropkowe mutantów w PET127 – kontrola fenotypów oddechowych – sprawdzenie zdolności transformantów drożdżowych do oddychania tlenowego



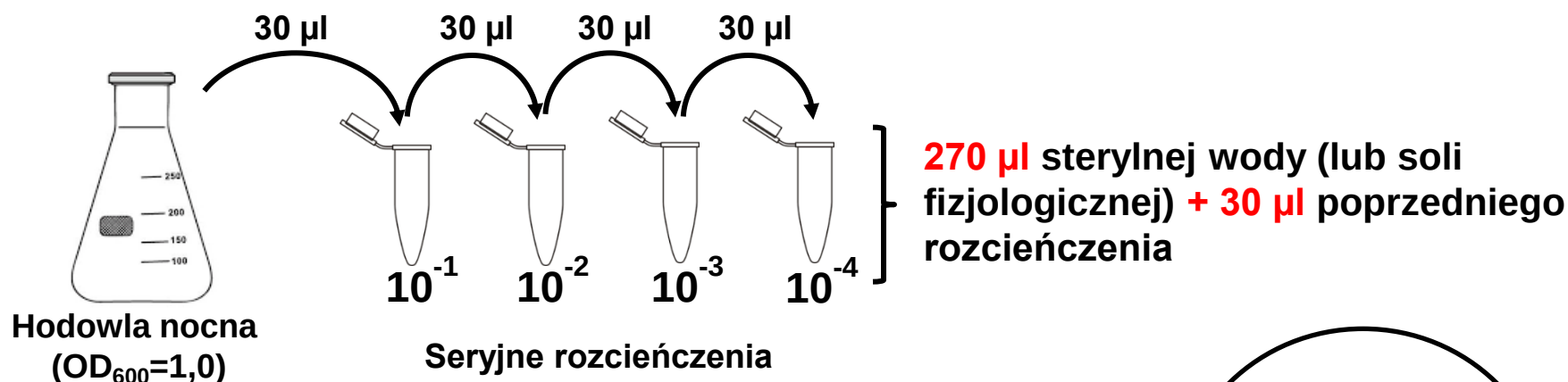
Pusty wektor
PET127 (WT)
PET127 (D $\rightarrow$ A)
PET127 (E $\rightarrow$ A)



Glicerol – niefermentowalne źródło węgla, na którym wydajnie rosną tylko drożdże posiadające zdolność do oddychania tlenowego.

Testy kroplowe mutantów w *PET127* – kontrola fenotypów oddechowych – wykonanie

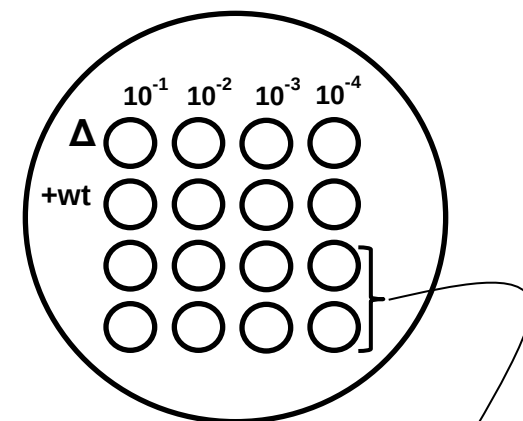
1. Przygotowanie odpowiednich rozcieńczeń drożdży do testu wzrostowego.



2. Oznaczenie szalek w zależności od temperatury inkubacji (30° i 37°C) i źródła węgla (glukoza i glicerol) = 4 szalki na parę.

3. Nakropić na szalki po 6 μ l rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-4} zgodnie ze wzorem.

4. Szalki inkubować w cieplarni w odpowiedniej temperaturze przez 3 dni.



PET127 (D $\rightarrow$ A)
PET127 (E $\rightarrow$ A)