

MATERIAŁY DO BLOKU INŻYNIERIA GENETYCZNA

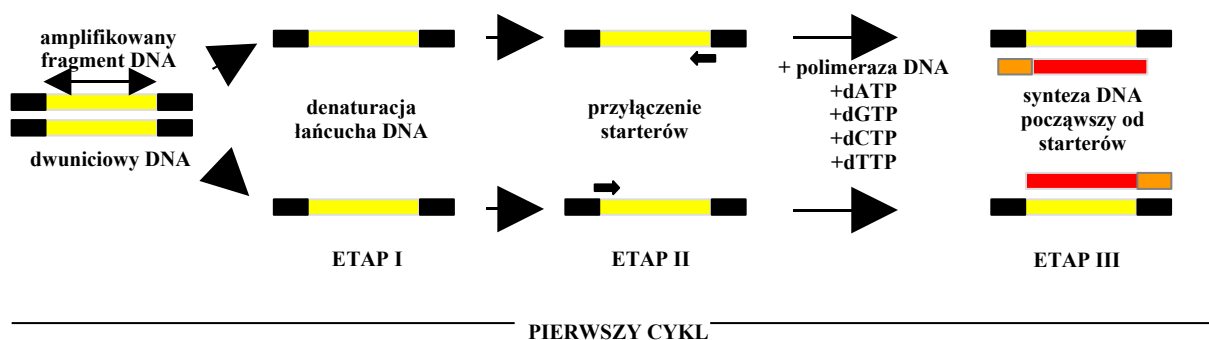
1. AMPLIFIKACJA FRAGMENTU DNA METODĄ PCR

Otrzymywanie dużej liczby kopii określonego fragmentu DNA możliwe jest przy zastosowaniu procedur klonowania lub znacznie mniej długotrwałej i pracochłonnej techniki PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Metoda ta opiera się na powielaniu (amplifikacji) zdefiniowanego odcinka DNA przez polimerazę DNA *in vitro*. Warunkiem przeprowadzenia reakcji PCR jest znajomość sekwencji krótkich odcinków DNA na końcach 5' i 3' fragmentu DNA, który ma być powielony.

Do reakcji PCR potrzebne są:

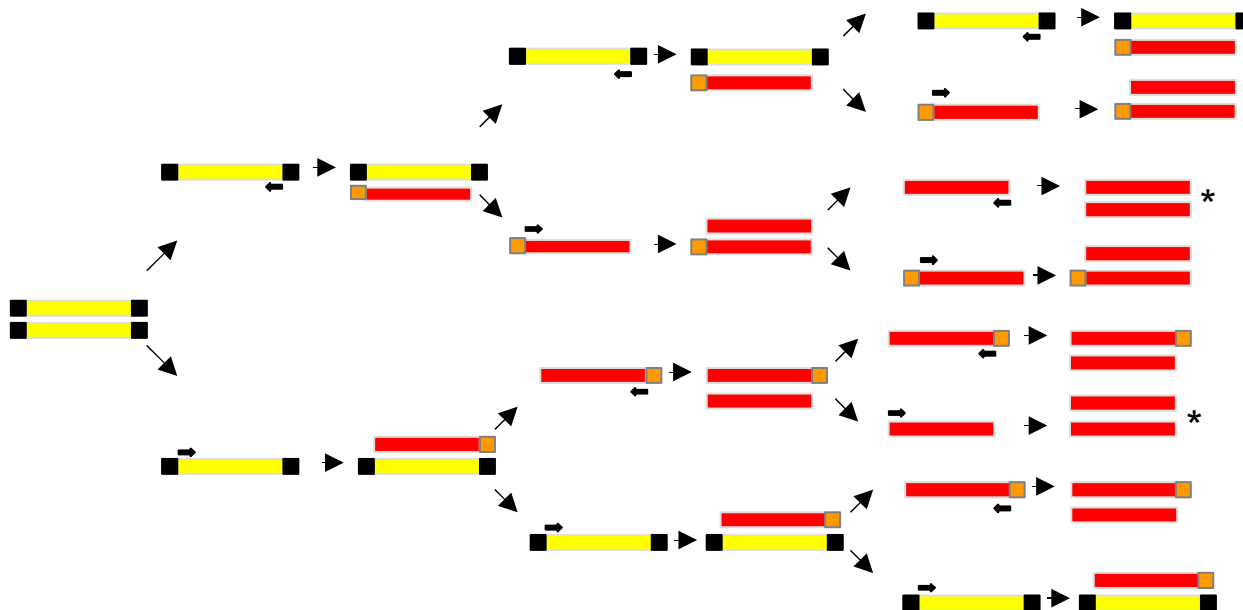
1. matryca - dwuniciowa cząsteczka DNA, której fragment chcemy powielić;
2. startery - zazwyczaj chemicznie syntetyzowane oligonukleotydy o długości ok.10-20 par zasad o sekwencji komplementarnej do matrycowego DNA;
3. termostabilna polimeraza DNA.

Schemat przebiegu pierwszego cyklu reakcji PCR przedstawiono na rys.1.



Rys. 1. Etapy cyklu amplifikacji DNA metodą PCR

Matrycą w reakcji PCR są jednoniciowe cząsteczki DNA, które powstają w wyniku ogrzewania dwuniciowego DNA do temperatury ok. 95°C (etap I). Do jednoniciowych cząsteczek matrycowego DNA przyłączane są następnie startery. Ich hybrydyzacja (ang. *annealing*) do każdej z nici DNA (etap II) umożliwia polimerazie DNA zapoczątkowanie replikacji, która przebiega na obydwu niciach w kierunkach 5' → 3' (etap III). W ten sposób w jednym cyklu amplifikacji powstają dwie potomne cząsteczki DNA. Cykl taki powtarza się wielokrotnie, a po n cyklach otrzymuje się teoretycznie 2^n dwuniciowych cząsteczek DNA będących kopiami sekwencji wyznaczonej przez położenie starterów na matrycy DNA (startery + sekwencja znajdująca się pomiędzy nimi) (Rys. 2).



Rys.2 Schemat przyrostu ilości amplifikowanego fragmentu DNA w kolejnych cyklach reakcji PCR; gwiazdką zaznaczono właściwy produkt reakcji.

Istotny przy planowaniu reakcji PCR jest dobór następujących parametrów:

1. odpowiednie startery do reakcji PCR. Należy dobrać je tak, aby:
 - zawierały ok. 50% par GC,
 - nie tworzyły struktur typu spinki do włosów (ang. *hairpin*),
 - nie zawierały fragmentów komplementarnych do drugiego startera,
 - temperatura topnienia wynosiła ok. 50-60°C;
2. rodzaj polimerazy; najczęściej używa się polimerazy z *Thermus aquaticus* - Taq polimeraza - lub innych termostabilnych polimeraz DNA, np. odznaczającej się większą wiernością kopiowania - polimerazę Pfu);
3. warunków samej reakcji - temperatury, przebiegu poszczególnych cykli itp.

2. KLONOWANIE GENÓW

Termin „klonowanie” w odniesieniu do pojedynczego fragmentu DNA oznacza namnożenie określonego odcinka DNA w komórkach gospodarza, najczęściej *Escherichia*

coli, przy zastosowaniu odpowiedniego wektora. Klonowanie DNA jest podstawową techniką biologii molekularnej. Stosuje się ją w celu odszukania i wyizolowania wybranego genu z genomu jakiegoś organizmu, namnożenia badanego fragmentu DNA, a także przeprowadzania manipulacji, na przykład ukierunkowanej mutagenezy, jak również uzyskiwania ekspresji genu, czyli produkcji kodowanego przez niego produktu. Aby skutecznie manipulować genami niezbędne są odpowiednie narzędzia, z których najważniejsze to **enzymy restrykcyjne**, **ligazy** oraz **wektory**.

2.1. Enzymy restrykcyjne (restryktazy)

Enzymy restrykcyjne zostały wyizolowane z wielu gatunków bakterii, w których pełnią funkcję obrony przed obcym DNA (np. wirusami). Są to enzymy należące do grupy **endonukleaz**, czyli enzymów przecinających nici DNA w środku cząsteczki. Dzięki ich obecności obcy DNA po znalezieniu się w komórce bakterii zostaje pocięty, natomiast DNA bakteryjny unika degradacji dzięki metylacji przez specyficzną metylazę.

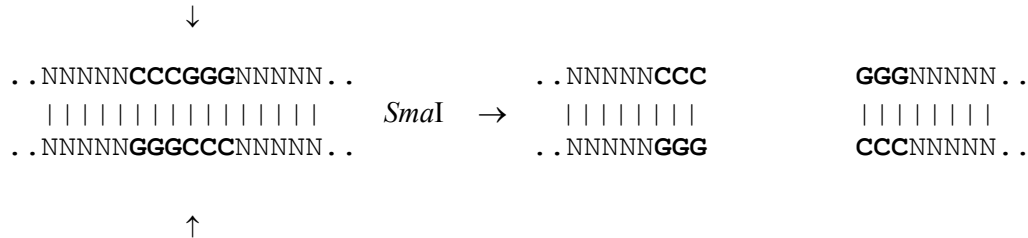
W inżynierii genetycznej wykorzystywane są głównie **enzymy restrykcyjne klasy II** czyli takie, które tną dwuniciowy DNA w obrębie lub w określonym miejscu w pobliżu rozpoznawanej sekwencji nukleotydowej. Rozpoznawane sekwencje są palindromowe i obejmują zwykle 4 lub 6 nukleotydów, ale znane są enzymy, które rozpoznają sekwencje 5, 7 lub 8 nukleotydów. Dany rodzaj enzymu przecina DNA zawsze w taki sam sposób. Używając enzymu „czwórkowego” (rozpoznającego sekwencję czterech nukleotydów) otrzymuje się niewielkie fragmenty DNA (statystycznie dana sekwencja czterech nukleotydów występuje w DNA raz na 256 zasad). Enzym „szóstkowy” tnie DNA na znacznie większe fragmenty (dana sekwencja sześciu nukleotydów występuje raz na 4096 zasad). Produkty trawienia enzymami restrykcyjnymi analizuje się zazwyczaj stosując rozdział elektroforetyczny w żelach agarozowych, wykorzystując ujemny ładunek cząsteczek DNA. DNA uwidacznia się poprzez barwienie bromkiem etydy, który świeci w świetle UV, a wielkość fragmentów określa poprzez porównanie z DNA wzorcowym.

W sekwencji nukleotydowej danej cząsteczki DNA znajdują się miejsca rozpoznawane przez określony zbiór enzymów restrykcyjnych. Wzajemne ułożenie tych miejsc to **mapa restrykcyjna**, a wielkość fragmentów uzyskiwanych po trawieniu wybranymi spośród tych enzymów stanowi **wzór restrykcyjny**. Każda cząsteczka DNA ma określoną mapę i wzór restrykcyjny.

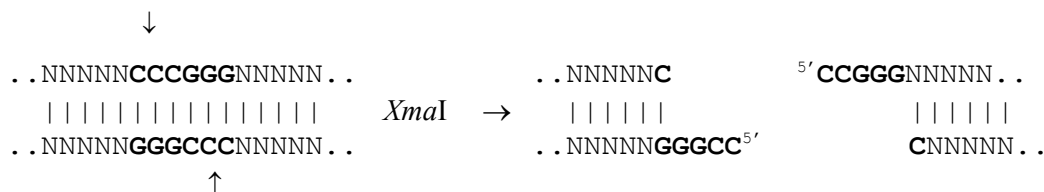
Miejsce cięcia przez enzym restrykcyjny obu nici DNA może znajdować się naprzeciwko lub z przesunięciem o kilka nukleotydów. W pierwszym przypadku powstają tak

zwane „**tępe**”, a w drugim „**lepkie**” końcu. Oto przykład trawienia DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi:

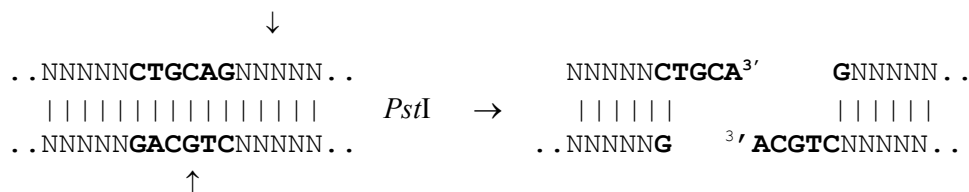
Enzym *SmaI* rozpoznaje sekwencję: 5'CCCGGG3' i pozostawia tępe końce:



Enzym *XmaI* również rozpoznaje sekwencję: 5'CCCGGG3', ale pozostawia lepkie końce:

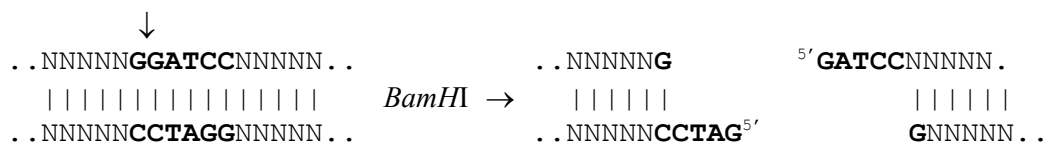


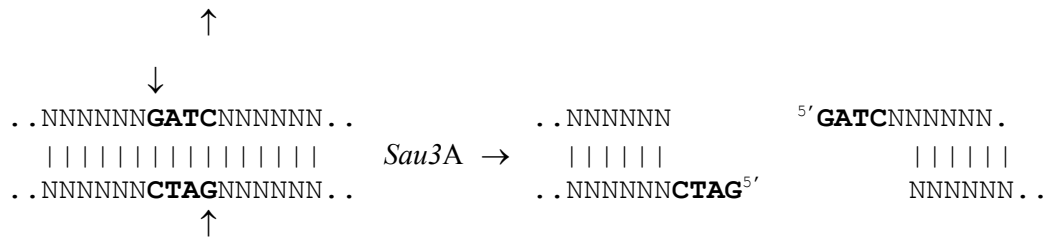
Enzymy *SmaI* i *XmaI* rozpoznają tę samą sekwencję nukleotydową są więc **izoschizomerami**. Po przecięciu DNA enzymem *XmaI* odcinek jednoniciowy wystaje w kierunku 5'. Istnieją enzymy, które pozostawiają lepkie końce wysunięte w stronę 3' (np. enzym *PstI*):



Rodzaj pozostawianych końców jest istotny przy manipulacjach przeprowadzanych przy klonowaniu, np. przekształceniu końców lepkich w tępe przez fragment Klenowa polimerazy DNA.

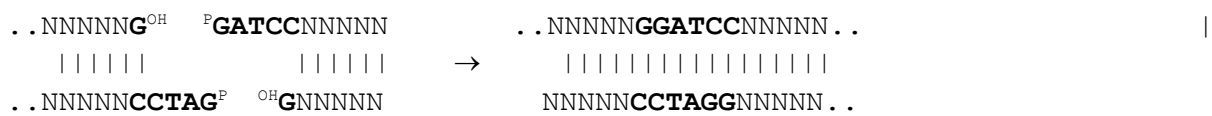
Niektóre enzymy pozostawiają takie same lepkie końce, mimo że rozpoznają różne sekwencje DNA. Często stosowaną przy klonowaniu DNA parą takich enzymów jest *BamHI*, który rozpoznaje sześci nukleotydową sekwencję GGATCC i *Sau3AI*, który rozpoznaje czteronukleotydową sekwencję GATC:





2.2. Ligazy

Ligazy DNA są enzymami łączącymi dwa fragmenty DNA poprzez tworzenie wiązań fosfodiesterowych między grupą 3'OH deoksyrybozy i grupą fosforanową (5'P) przy wykorzystaniu energii z hydrolizy ATP.



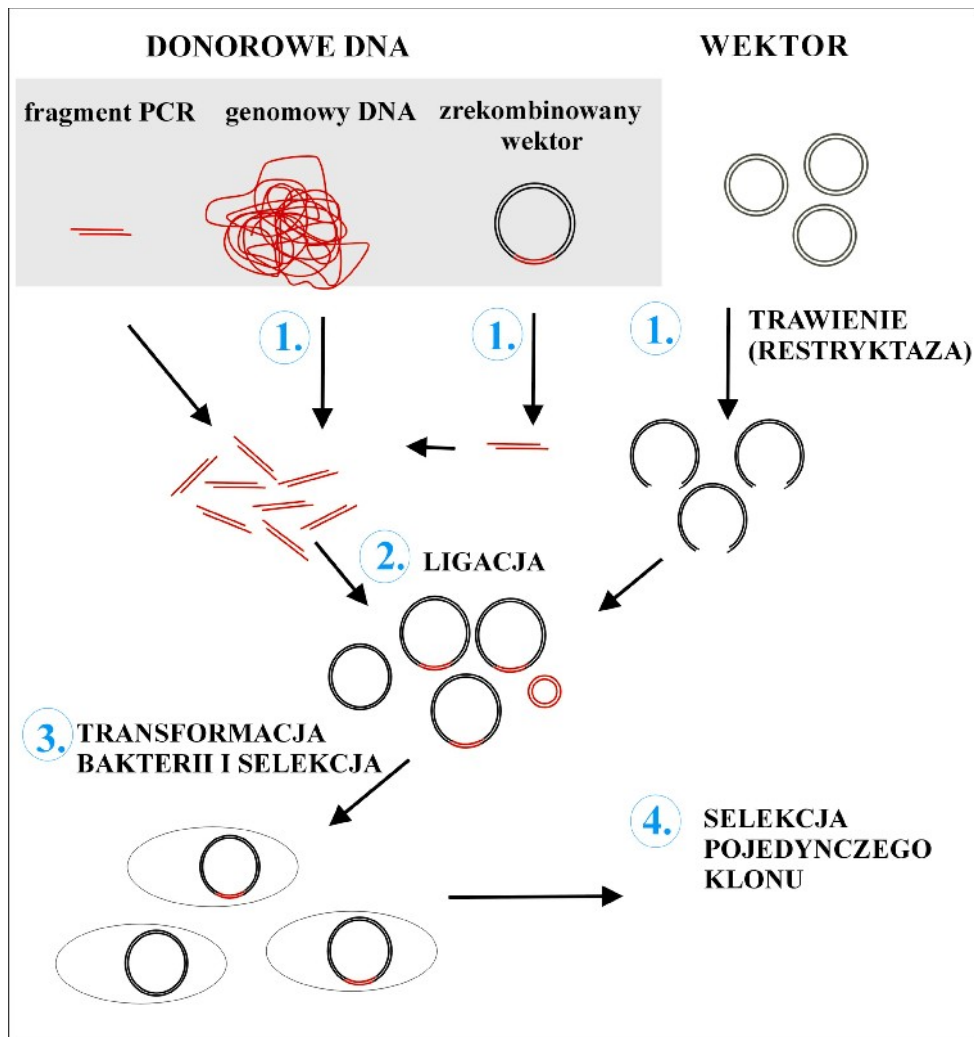
Ligacja lepkich końców DNA jest znacznie wydajniejsza od ligacji tępych końców. Dzieje się tak, dlatego że pomiędzy komplementarnymi jednoniciowymi fragmentami na lepkich końcach cząsteczek DNA tworzą się wiązania wodorowe. Wiązania te przytrzymują razem oba końce, co ogromnie ułatwia reakcję ligacji. Swobodne tępe końce rzadko znajdują się w tak blisko siebie, by ligacja stała się możliwa.

2.3. Klonowanie

Podstawowym elementem techniki klonowania są **wektory** - nośniki służące do wprowadzania i powielania fragmentów DNA w komórkach wybranego organizmu. Najczęściej stosowanymi wektorami są plazmidy, czyli koliste cząsteczki DNA zawierające elementy niezbędne do autonomicznej replikacji w komórce gospodarza. W najczęściej stosowanym systemie klonowania komórkami gospodarza są bakterie *E. coli*.

2.3.1. Klonowanie fragmentów DNA w *E. coli* na wektorze plazmidowym

Poniżej (Rys 3.) przedstawiono uproszczony schemat klonowania fragmentu DNA w *E. coli* na wektorze plazmidowym i omówiono poszczególne etapy tego procesu.



Rys 3. Schemat klonowania fragmentu DNA na plazmidzie:

1. DNA donorowy poddaje się trawieniu enzymem restrykcyjnym. Tym samym enzymem restrykcyjnym lub enzymem zostawiającym identyczne lepkie końce przecina się wektor.
 - W przypadku klonowania fragmentu DNA uzyskanego w reakcji PCR miejsce trawienia enzymem restrykcyjnym wprowadza się poprzez dodanie odpowiedniej sekwencji do starterów.
 - Trawienie DNA genomowego w celu wytworzenia banku genów jest omówione w rozdz. 2.4.
 - Jeżeli celem klonowania jest przeniesienie fragmentu DNA z jednego wektora na drugi, po strawieniu zrekombinowanego wektora zwykle izoluje się wstawkę DNA poprzez elektroforezę w żelu.
2. Przeprowadza się ligację wektora z fragmentami donorowego DNA. Aby zapobiec cyrkularyzacji wektora przed ligacją można usunąć grupy fosforanowe obecne na końcach 5' liniowego plazmidu, niezbędne w procesie ligacji, przy użyciu fostatazy. Po

defosforylacji jedynie wektor z dołączoną wstawką może ulec cyrkularyzacji. Reakcja defosforylacji nigdy nie zachodzi ze stuprocentową wydajnością. Po ligacji powstają zatem trzy klasy kolistych cząsteczek: odtworzony pusty wektor, zamknięte w kółko fragmenty donorowego DNA i wektor ze wstawką (czyli **plazmid zrekombinowany**).

3. Kolejnym etapem klonowania jest **transformacja**, czyli wprowadzenie DNA do komórek bakterii.

- Bakterie muszą być odpowiednio przygotowane na przyjęcie DNA – muszą być **kompetentne**. Komórki *E. coli* uzyskują kompetencję między innymi po potraktowaniu jonami wapnia w niskiej temperaturze (4°C), a następnie poddaniu szokowi cieplnemu (w temp. 37°C-42°C). Wniknięcie DNA do komórki bakteryjnej można również uzyskać przeprowadzając elektroporację, czyli zastosowanie silnego impulsu elektrycznego uszkadzającego błonę komórkową.
- Po transformacji bakterie wysiewa się na odpowiednie podłoże selekcyjne. Selekcja opiera się na obecności w wektorze **genu markerowego**, który nadaje transformantom określony fenotyp, np. oporność na antybiotyk (patrz poniżej). Transformanty rosnące na podłożu selekcyjnym będą zawierały pusty wektor albo wektor ze wstawką. **Zasada klonowania opiera się na założeniu, że do jednej komórki bakteryjnej wnika tylko jedna cząsteczka plazmidu.** Potomstwo takiego transformanta to **klon**, z którego, po jego namnożeniu, można wyizolować DNA plazmidowy.
- Na przedstawionym schemacie w przypadku DNA genomowego każdy zrekombinowany plazmid zawiera inną wstawkę. Jeżeli uzyskamy dostateczną liczbę klonów niosących zrekombinowane plazmidy, tak aby zawarte w nich wstawki reprezentowały cały genom, mówimy że klony te stanowią **bank genomowego DNA (lub bank genomowy lub bibliotekę genomową)** danego organizmu (patrz rozdz. 2.4).

4. Ostatnim etapem klonowania jest wyszukanie pojedynczego klonu zawierającego zrekombinowany plazmid z interesującym nas fragmentem DNA.

- Zwykle stosuje się wektory umożliwiające rozróżnienie plazmidu zrekombinowanego od niezrekombinowanego (patrz poniżej, 2.3.2.1)
- W przypadku klonowania pojedynczego fragmentu DNA większość klonów zrekombinowanych zawiera odpowiednią wstawkę DNA, co potwierdza się poprzez sporządzenie mapy restrykcyjnej plazmidu wyizolowanego z

transformantów albo reakcji PCR gdzie matrycą jest całkowity DNA w lizacie z bakterii.

- Strategie wyszukiwania odpowiedniego klonu z banku genów są bardzo różnorodne i opierają się na przykład na komplementacji mutacji i hybrydyzacji (patrz rozdz. 2.5).

2.3.2. Wektory bakteryjne

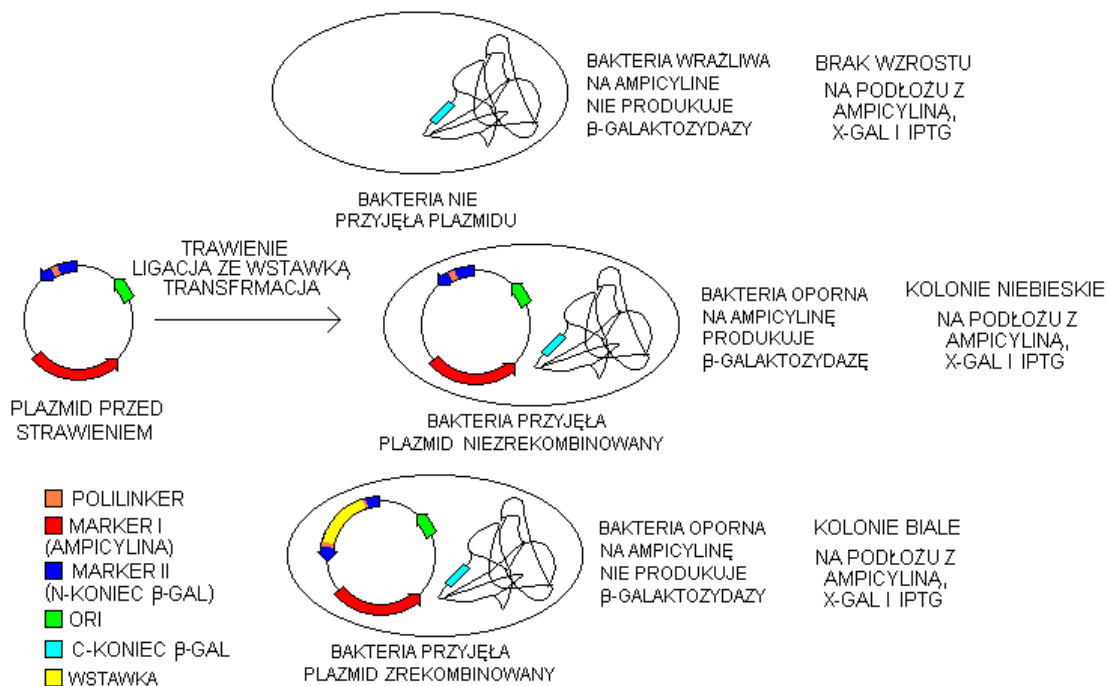
Pierwsze wektory do klonowania w oparciu o naturalnie występujące plazmidy bakteryjne, takie jak np. ColE1, skonstruowano w latach siedemdziesiątych. W miarę rozwoju genetyki wektory były udoskonalane poprzez wprowadzanie nowych elementów ułatwiających klonowanie. Wektory plazmidowe zawierają następujące, podstawowe elementy:

- **Ori** – miejsce inicjacji replikacji. Miejsce inicjacji replikacji jest specyficzne dla danej komórki gospodarza. Niektóre plazmidy bakteryjne niosą „silne” ori, dzięki czemu występują bardzo licznie w pojedynczej komórce – są to tak zwane plazmidy wysokokopijne.
- **Marker I** – znajdujący się na wektorze gen pozwalający odróżnić bakterie posiadające plazmid od takich, które go nie zawierają. Jako markery najczęściej stosuje się geny oporności na antybiotyki (np. ampicylinę lub tetracyklinę). Podczas transformacji tylko nieliczne bakterie przyjmują plazmid, ale tylko one będą w stanie wyrosnąć na pożywce z dodatkiem antybiotyku. Oczywiście szczep użyty do transformacji musi być wrażliwy na ten antybiotyk.
- **Marker II** – ten marker pozwala odróżnić bakterie, które pobrały plazmid bez wstawki, od takich, które otrzymały plazmid **zrekombinowany**, czyli zawierający wstawkę (patrz poniżej).
- **Polilinker** – jest to niewielki, sztucznie utworzony odcinek DNA, zawierający sekwencje rozpoznawane przez wiele enzymów restrykcyjnych. Są to na ogół pojedyncze miejsca cięcia w wektorze. Polilinker zazwyczaj wstawiony jest w obrębie drugiego markera.

2.3.2.1. Wykorzystanie markera II do wykrywania transformantów niosących zrekombinowany plazmid:

Cięcie enzymem restrykcyjnym musi być wykonane w obrębie markera II. Jeśli do wektora zostanie włączona wstawka, spowoduje to zniszczenie genu markerowego. W przypadku użycia jako markera II genu oporności na antybiotyki bakterie posiadające zrekombinowany plazmid będą wrażliwe na antybiotyki, tak więc dla uzyskania zrekombinowanych klonów wymagane jest zastosowanie techniki replik (selekcja negatywna).

Przesiewania bakterii można uniknąć stosując inny rodzaj markera – β -galaktozydazę. Na wektorze znajduje się N-końcowy fragment genu *lacZ* kodującego ten enzym (nazywany fragmentem Z' lub α) wraz z sekwencją promotorową, a w genomie szczepu biorcy znajduje się część C-końcowa wraz z sekwencjami niezbędnymi dla jej ekspresji. Po wprowadzeniu plazmidu do komórki biorcy produkty białkowe obydwu fragmentów genu *lacZ* łączą się tworząc funkcjonalny enzym. Jest to tak zwana **α -komplementacja**. Jeśli w obrębie fragmentu Z' wstawiony zostanie odcinek DNA, w komórce nie będzie powstawał aktywny enzym. Obecność β -galaktozydazy wykrywa się w komórkach *E. coli* poprzez dodanie do podłoża X-gal, który po przecięciu β -galaktozydazą przyjmuje niebieskie zabarwienie. Tak więc, po wysianiu transformowanych bakterii na podłoże z X-gal niebieskie zabarwienie przyjmą kolonie powstałe z komórek zawierających pusty wektor, a kolonie niezabarwione będą posiadały plazmidy ze wstawkami.



Rys 4. Schemat budowy wektora plazmidowego i działania markerów selekcyjnych.

2.3.3. Wektory bifunkcjonalne

Wektory bifunkcjonalne to wektory, które zawierają elementy umożliwiające ich powielanie i selekcję w komórkach dwóch gospodarzy, np. *E. coli* i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Większość wektorów bifunkcjonalnych zawiera elementy plazmidu bakteryjnego (Ori, markery, patrz wyżej) oraz początek replikacji i markery selekcyjne specyficzne dla drugiego gospodarza. Obecność sekwencji *E. coli* ułatwia izolację i manipulacje DNA (np. konstrukcję banku genów), a sekwencje drugiego gospodarza umożliwiają transformację drugiego gospodarza, np. w celu selekcji genów z banku poprzez komplementację mutacji lub badania funkcji genu.

W przypadku drożdży Ori pochodzi albo z chromosomu drożdżowego (ARS) albo z plazmidu drożdżowego 2 μ . Markerami są najczęściej geny kodujące enzymy ze szlaku biosyntezy aminokwasów lub nukleotydów, które można zastosować do transformacji odpowiednich mutantów pokarmowych *S. cerevisiae* (np. geny *LEU*, *TRP*, *HIS*, *URA*). Wektory z sekwencjami 2 μ występują w komórkach drożdży w wielu kopiach. Jeżeli chcemy wprowadzić do komórek tylko jedną kopię genu, możemy użyć plazmidu, który zawiera dodatkowo sekwencje centromerowe (CEN).

Skonstruowano również wektory w oparciu o sekwencje chromosomowe drożdży (ARS, CEN, telomery), które umożliwiają klonowanie bardzo dużych fragmentów DNA. Są to tzw. YAC (od ang. yeast artificial chromosomes), które okazały się bardzo przydatne do badania genomów wyższych eukariontów, między innymi człowieka.

2.3.4. Wektory ekspresyjne

Wektory ekspresyjne umożliwiają ekspresję wstawionej do nich sekwencji DNA kodującej białko. Wektory bakteryjne, które służą do otrzymywania białka eukariotycznego muszą posiadać dodatkowe elementy takie jak:

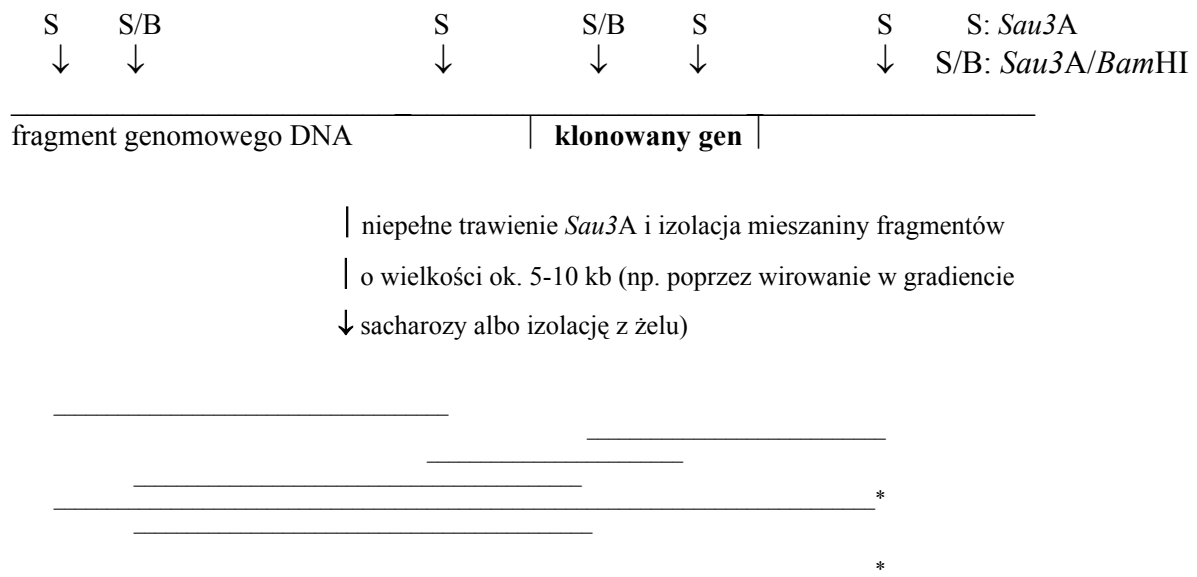
Sekwencja promotorowa – silny promotor umiejscowiony przed miejscem wprowadzenia sekwencji kodującej. Może być konstytutywny albo regulowany.

Sekwencja Shine-Dalgarno (SD=RBS) - miejsce wiązania rybosomów bakteryjnych. Sekwencja ATG może pochodzić ze wstawki albo również znajdować się na wektorze.

Terminator transkrypcji - za sekwencją kodującą.

2.4. Bank genów (bank/biblioteka genomowa) na wektorze plazmidowym

Ogólny schemat konstruowania banków genów jest przedstawiony powyżej. Etap istotny z punktu widzenia możliwości znalezienia w banku całych genów (oczywiście dotyczy to genów o stosunkowo małych rozmiarach - prokariotycznych i z niższych Eukaryota, np. drożdży) to sposób uzyskiwania fragmentów genomowego DNA. Użycie szóstkowego enzymu restrykcyjnego, który został zastosowany do linearyzacji wektora eliminuje możliwość klonowania pełnych genów, w obrębie których znajduje się miejsce cięcia dla tego enzymu. Aby uzyskać bardziej losową fragmentację wykorzystywane są dwa podejścia: 1) fragmentacja mechaniczna, a następnie dodanie na końcach adaptorów z odpowiednimi lepkiymi końcami i 2) niepełne trawienie enzymem czwórkowym, który daje takie same lepkie końce co enzym szóstkowy zastosowany do strawienia wektora (np. para enzymów *Sau3A/BamHI*, patrz wyżej). Strategia 2) jest zilustrowana poniżej:



Fragmenty zaznaczone gwiazdką zawierają cały gen.

Aby ocenić czy bank reprezentuje cały genom trzeba znać:

- 1) wielkość genomu badanego organizmu;
- 2) liczbę transformantów uzyskanych po transformacji bakterii mieszaniną ligacyjną;
- 3) udział transformantów niosących zrekombinowane plazmidy (zwykle określa się to w oparciu o dodatkowy marker na wektorze, w obrębie którego wstawia się klonowane fragmenty DNA, np. fragment β -gal, patrz wyżej);
- 4) średnią wielkość wstawki (np. poprzez ocenę wielkości próbki zrekombinowanych plazmidów wyizolowanych z transformantów).

Liczbę klonów wymaganych, aby każdy gen był reprezentowany w bibliotece z prawdopodobieństwem 0,99 można określić według wzoru:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

N = liczba klonów

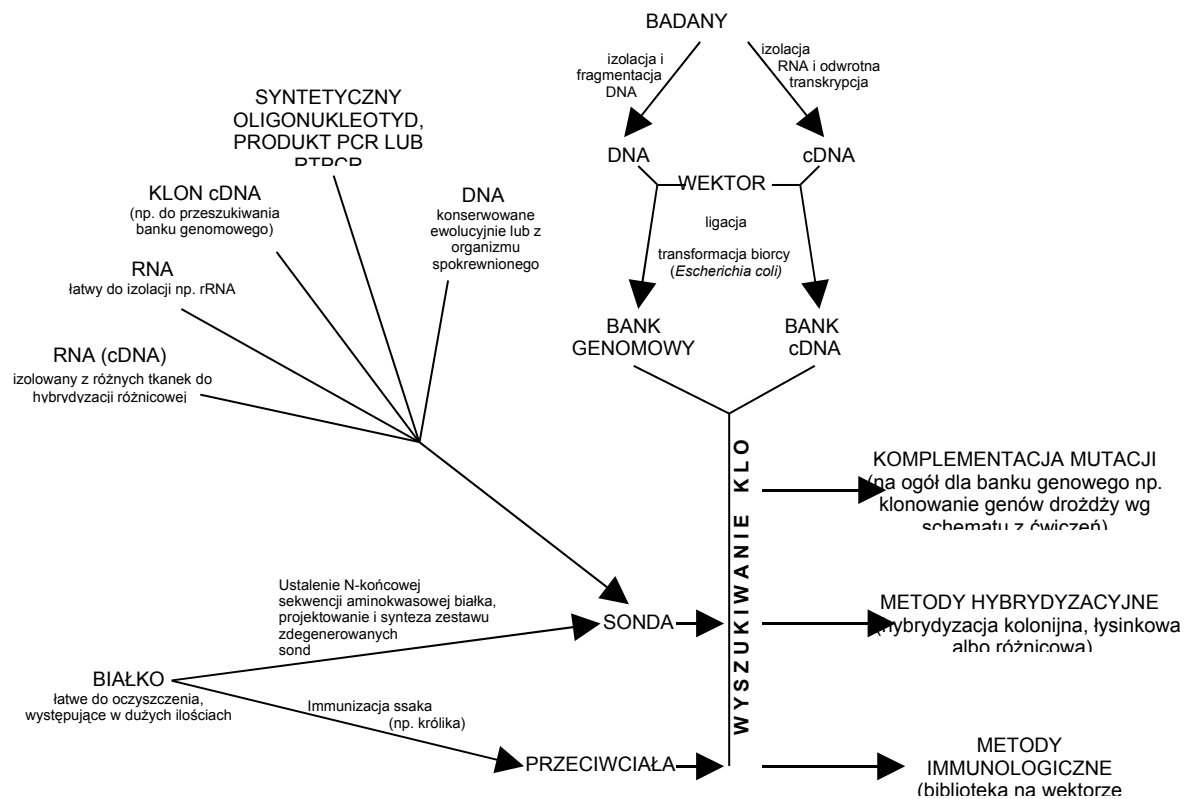
P = pożądane prawdopodobieństwo (0,99)

f = średnia wielkość wstawki/wielkość genomu

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 organizmu dawcy. Większe fragmenty (mniejsza liczba klonów wymagana dla pokrycia genomu) można klonować przy zastosowaniu specjalnych wektorów np. kosmidów, które łączą właściwości bakteriofagów i plazmidów oraz BAC (sztucznych chromosomów bakteryjnych, pochodnych plazmidu płciowego F).

2.5. IZOLOWANIE I BADANIE GENÓW WŹSZYCH EUKARYOTA

Poniżej przedstawiono schemat różnych strategii klonowania genów wyższych Eukaryota



3. SYSTEMY HETEROLOGICZNEJ EKSPRESJI BIAŁEK.

Poznanie funkcji oraz struktury białka jest ostatecznym celem większości prac prowadzonych metodami genetyki molekularnej. Głównym ograniczeniem tego typu badań jest znikoma ilość białka obecna zazwyczaj w badanym organizmie. Izolacja i dokładne oczyszczenie białka z dużej ilości materiału biologicznego jest w większości przypadków niemożliwe ze względu na dostępność materiału, a także zanieczyszczenia innymi białkami. Ogromnym postępowaniem w dziedzinie biologii molekularnej oraz biotechnologii ostatnich lat, było opracowanie metod pozwalających na otrzymanie dużych ilości białka z organizmów modelowych poprzez zastosowanie systemów heterologicznej ekspresji.

W zależności od rodzaju oraz skali produkcji białka, używane są różne systemy ekspresji heterologicznej w oparciu o różne organizmy - gospodarzy. Najwięcej systemów opiera się na bakteriach (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), drożdżach (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) oraz liniach komórek eukariotycznych (owadziach, ssaczych, roślinnych). Zaletą systemów prokariotycznych jest w łatwość hodowli i manipulacji genetycznych oraz duża ilość powstającego produktu.

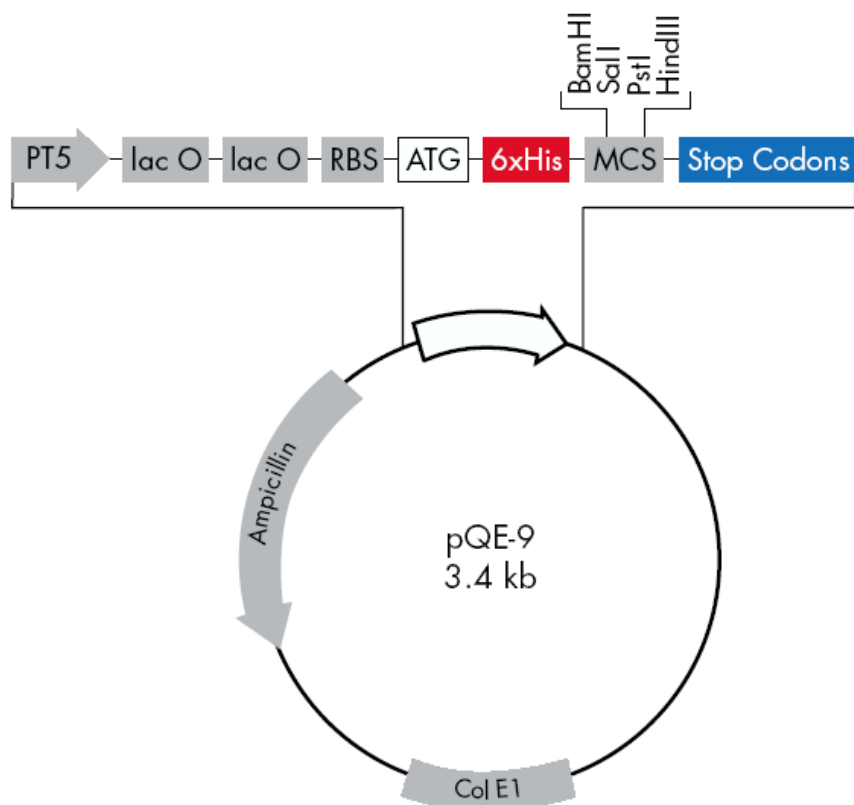
Kolejnym istotnym elementem wpływającym na decyzję wyboru odpowiedniego systemu ekspresji heterologicznej jest sposób oczyszczania produktu białkowego. Najbardziej rozpowszechnioną metodą stosowaną do tego celu jest chromatografia powinowactwa – najbardziej specyficzna ze sposobów frakcjonowania białek.

3.1. Systemy ekspresji heterologicznej w bakteriach *E. coli*

Opracowano różnorodne systemy służące do uzyskiwania ekspresji heterologicznej w bakteriach *E. coli*. Każdy z nich jest oparty na odpowiednich wektorach ekspresyjnych, do których wprowadza się sekwencję cDNA, kodującą heterologiczne białko i odpowiednio zmodyfikowanych szczepach gospodarza. Wektory mogą również umożliwiać dołączanie do badanego białka dodatkowych sekwencji aminokwasowych ułatwiających oczyszczanie, sekrecję albo zwiększające stabilność produktu.

Jednym z bakteryjnych systemów służących do heterologicznej ekspresji jest system oparty na elementach promujących transkrypcję i translację pochodzących z faga T5 (system QIAexpress, Qiagen). Rozpoznawany przez bakteryjną polimerazę RNA promotor faga T5 znajduje się pod kontrolą dwóch operatorów *lac*, co zapobiega niepożądanemu powstawaniu białka przed indukcją ekspresji. Ekspresja rekombinowanego białka kodowanego na wektorze ekspresyjnym jest silnie indukowana po dodaniu IPTG, które łączy się represorem *lac* inaktywując go. Umożliwia to endogennej bakteryjnej polimerazie RNA transkrypcję genu znajdującego się pod kontrolą promotora faga T5.

Terminacja transkrypcji jest determinowana dwoma terminatorami – pierwszy pochodzi z faga λ , drugi jest terminatorem *E. coli*. Zastosowanie podwójnego miejsca terminacji transkrypcji zapobiega powstawaniu nieprawidłowych transkryptów. Do genu kodującego wyrażane białko jest dołączona sekwencja kodująca 6 histydyn (znacznik HIS), dzięki czemu powstające białko jest łatwo oczyścić przy użyciu chromatografii powinowactwa za pomocą kolumny niklowej.



Rys. 5. Plazmid ekspresyjny pQE-9 (Qiagen)

4. ANALIZA TYPU SOUTHERN, NORTHERN I WESTERN

Powszechnie stosowanymi metodami służącymi do analizy kwasów nukleinowych i białek są techniki polegające na rozdziale elektroforetycznym, transferze na filtr i detekcji przy użyciu określonych sond. Są to techniki: Southern, Northern i Western, omówione pokrótce w poniższej tabelce.

Analiza typu:	Zastosowanie	Opis techniki
Southern	Detekcja DNA	1. Rozdział DNA w żelu agarozowym (zazwyczaj) lub

		<p>poliakrylamidowym.</p> <p>2. Kapilarny lub elektryczny transfer DNA z żelu na filtr nylonowy.</p> <p>3. Hybrydyzacja przeniesionego na filtr DNA z wyznakowanym (zazwyczaj radioaktywnie) fragmentem kwasu nukleinowego, komplementarnym do poszukiwanej cząsteczki DNA.</p>
Northern	Detekcja RNA	<p>1. Rozdział RNA w denaturującym żelu agarozowym lub poliakrylamidowym.</p> <p>2. Kapilarny lub elektryczny transfer RNA na filtr nylonowy.</p> <p>3. Hybrydyzacja przeniesionego na filtr RNA z wyznakowanym (zazwyczaj radioaktywnie) fragmentem kwasu nukleinowego, komplementarnym do poszukiwanej cząsteczki RNA.</p>
Western	Detekcja białek	<p>1. Rozdział białek w żelu poliakryloamidowym.</p> <p>2. Elektryczny transfer białek na filtr nitrocelulozowy.</p> <p>3. Wykrywanie danych białek za pomocą specyficznych przeciwciał i skierowanych przeciwko nim przeciwciał drugorzędowych, których obecność można wykryć przy użyciu odpowiednich systemów detekcji (np. poprzez aktywność enzymu dołączonego do przeciwciała).</p>

5. DYSRUPCJA GENÓW

Ostatecznym celem analizy genu jest poznanie funkcji jego produktu w organizmie. Dowodem na udział białka czy składnika rybonukleinowego w danym szlaku metabolicznym jest zaburzenie tego procesu spowodowane brakiem funkcji badanego czynnika.

U drożdży *S. cerevisiae* stosuje się wiele metod służących do „wyłączenia” ekspresji genu. Dla genów, których produkty są niezbędne do życia komórki można uzyskać mutanty warunkowe, na przykład temperaturowrażliwe (ts – temperature sensitive i cs – cold sensitive) lub geny te umieszcza się pod kontrolą promotorów reprimowalnych lub indukowalnych (na przykład promotorów galaktozowych i tetracyklinowych). Natomiast funkcja większości pozostałych genów jest badana w mutantach, w których dany gen został zinaktywowany przez delecję lub insercję.

Dysrupcję (rozbitcie) genu można uzyskać poprzez transformację dzikiego pod względem genu X szczepu drożdży liniowym fragmentem DNA zawierającym gen markerowy oflankowany sekwencją DNA odpowiadającą odcinkom leżącym po obu stronach otwartej ramki odczytu (ORF) genu X. Wolne końce liniowego fragmentu stymulują homologiczną rekombinację w badanym locus, w wyniku czego następuje wymiana ORF genu X na gen markerowy. Proces homologicznej rekombinacji jest w komórkach drożdży (w odróżnieniu od innych Eucaryota) bardzo wydajny.

Obecnie najczęściej stosowanym genem markerowym jest bakteryjny gen oporności na kanamycynę *kan^r* pod kontrolą działających w drożdżach sekwencji regulacyjnych z nitkowanego grzyba *Ashbya gossypii*. Produkt tego genu nadaje drożdżom oporność na pochodną kanamycyny-G418. Można również wykorzystać drożdżowe markery pokarmowe (np. geny *URA3*, *HIS 3*, *TRP1*, *LEU2*) wraz z odpowiednimi szczepami mutantów auktotroficznych *S.cerevisiae*.

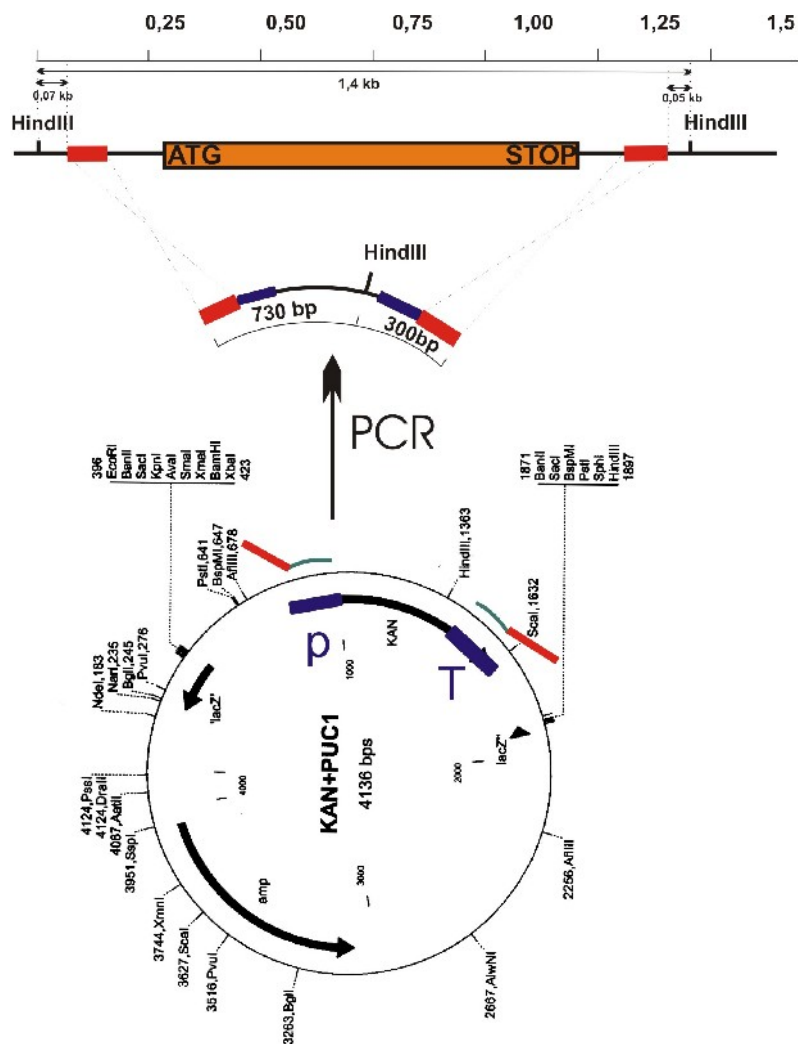
Kasetę do transformacji można przygotować dwoma sposobami:

- 1) poprzez przeprowadzenie reakcji PCR z zastosowaniem jako matrycy plazmidu zawierającego gen markerowy i syntetycznymi starterami, których jedna część odpowiada sekwencji markera, a druga część odcinkowi DNA flankującemu ORF genu X;
- 2) poprzez skonstruowanie plazmidu z kasetą do dysrupcji na drodze rekombinowania DNA z wykorzystaniem miejsc restrykcyjnych, a następnie wycięcie z tego plazmidu kasety jako liniowego fragmentu DNA.

Transformacji poddaje się na ogół dwa szczepy: szczep haploidalny i diploidalny. Użycie szczepu diploidalnego umożliwia uzyskanie integracji w locus w przypadku, kiedy produkt genu jest niezbędny dla przeżycia drożdży. Efekt letalny dysrupcji można stwierdzić analizując produkty mejozy w tetradach uzyskanych ze szczepu diploidalnego. Prawidłową zamianę fragmentów można potwierdzić metodą PCR albo hybrydyzacji Southerna, stosując startery lub sondy specyficzne dla badanego genu i genu markerowego.

Kolekcja szczepów z dysrupcją dla wszystkich ORF drożdży jest obecnie dostępna handlowo, między innymi z firmy Euroscarf (www.rz.uni-frankfurt.de).

Poniżej przedstawiono przykładowy schemat dysrupcji z zastosowaniem kasety *kan^r*



Rys. 6. Schemat dysrupcji genu u drożdży *S. cerevisiae*

Dysrupcje (nokauty) genów są stosowane do badania funkcji genów również w przypadku organizmów wyższych Eukaryota. W przypadku rośliny *Arabidopsis thaliana* transformacji dokonuje się za pomocą bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Bakteria posiada plazmid niosący geny kodujące białka *vir* odpowiedzialne za przenoszenie fragmentów DNA do komórek roślinnych oraz plazmid niosący gen oporności na antybiotyk oflankowany T-DNA (są to sekwencje włączające się z dużą częstotliwością do genomu roślinnego). Po infekcji zalążków następuje ekspresja białek *vir*, które przecinają jedną nić T-DNA, co powoduje rozplecenie plazmidu. Jedna z nici jest opłaszczana białkami *vir* i eksportowana do jądra komórkowego rośliny, gdzie jest włączana do genomu. Wstawienie T-DNA do genomu roślinnego nie jest specyficzne – T-DNA wstawia się „na chybił-trafił”. Przeciętnie jedna komórka przyjmuje 1-3 fragmenty T-DNA, które wbudowują się w różne miejsca genomu. Wykształcone nasiona są zbierane i wysiewane na pożywkę z antybiotykiem. Siewki odporne

na antybiotyki (kiełkuje od 0,1 do 1% nasion) przenosi się do doniczek z ziemią. Kolejnym krokiem jest doprowadzenie do homozygotyczności – analizuje się pokolenie potomne. Z siewek izoluje się DNA i ustala miejsce integracji T-DNA poprzez sekwencjonowanie przy użyciu startera komplementarnego do wstawionego T-DNA. Identyfikuje się w ten sposób gen, który został „znokautowany”.

Dysrupcje genów przeprowadzają firmy biotechnologiczne, od których można kupić wybrane linie roślinne. Bazy danych zawierające informacje o dostępnych zmutowanych liniach roślinnych, np. www.arabidopsis.org, przeszukuje się za pomocą programu BLAST przy użyciu sekwencji danego genu. Linie takie można kupić, ale firmy biotechnologiczne nie sprawdzają czy w danej linii został znokautowany tylko i wyłącznie interesujący nas gen. Najprostszym sposobem na zbadanie, czy dana linia roślinna jest mutantem w konkretnym genie jest wykonanie analizy hybrydacyjnej typu Southern.

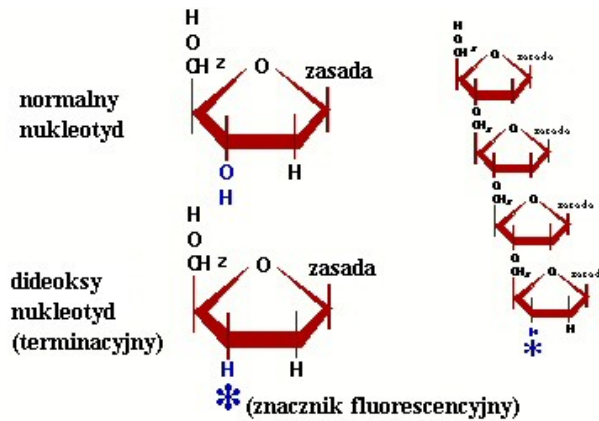
Często obecnie stosowaną metodą wyciszania ekspresji genów w komórkach albo organizmach wyższych Eukaryota jest technika RNAi (od ang. RNA interference). Technika ta polega na wprowadzeniu do komórek dwuniciowych sekwencji RNA lub wektorów kodujących takie sekwencje, komplementarnych do sekwencji badanego genu. Obecność w komórce dwuniciowego RNA prowadzi do specyficznej degradacji mRNA przez zastaw białek komórkowych uczestniczących w procesie RNAi.

6. USTALENIE SEKWENCJI NUKLEOTYDOWEJ FRAGMENTU DNA

Jedną z najczęściej obecnie stosowanych metod sekwencjonowania DNA jest metoda Sanger. Opiera się ona na przedwczesnej terminacji syntezy DNA, wynikającej z

przypadkowego włączenia przez polimerazę DNA dideoksynukleotydów (analogi nukleotydów bez grupy -OH w pozycji 3', Rys. 7).

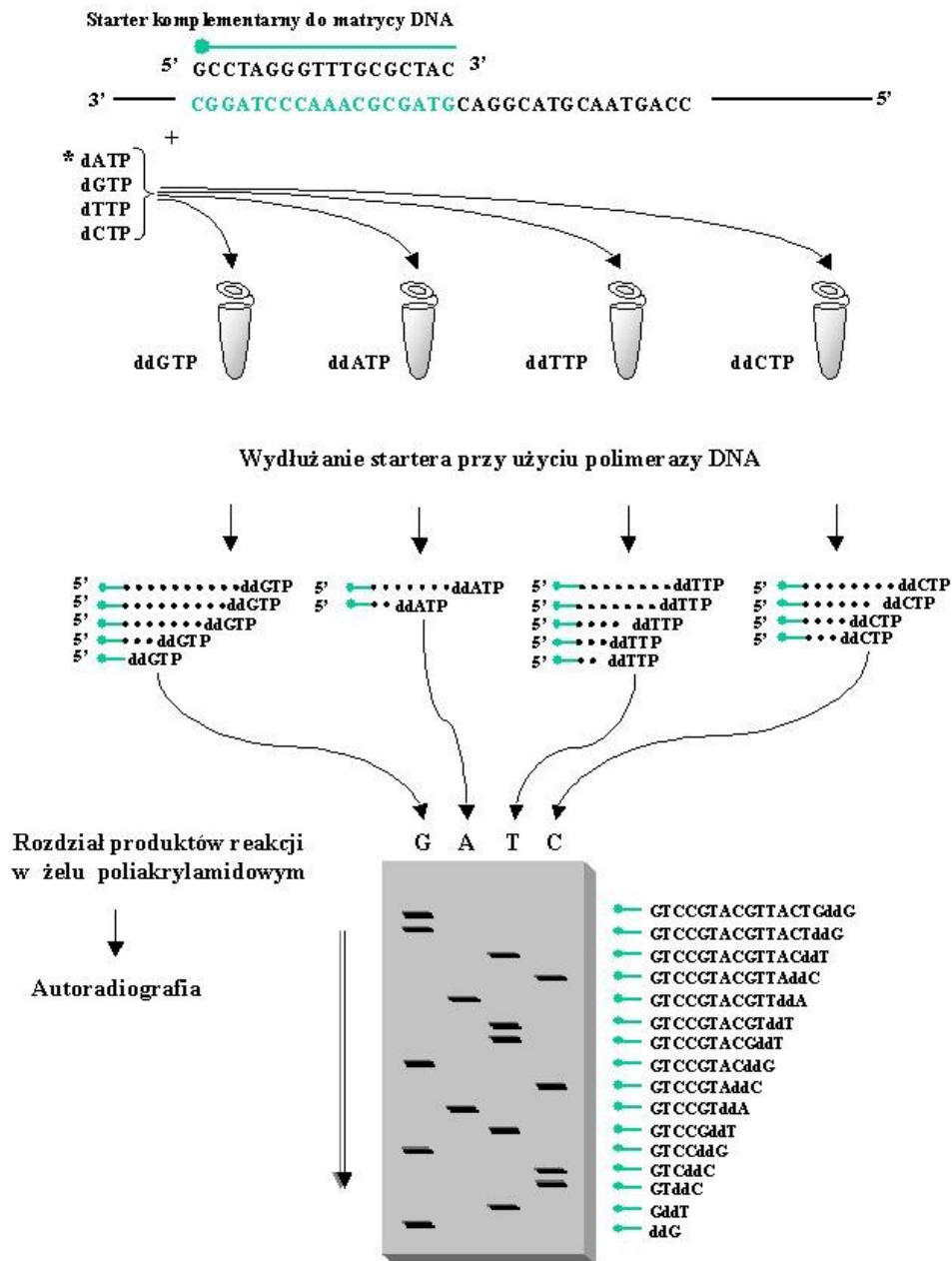
Przedstawiono również oligonukleotyd, którego synteza zakończyła się w wyniku wbudowania dideoksynukleotydu.



Rys. 7. Budowa deoksynukleotydu i wyznakowanego fluorescencyjnie dideoksynukleotydu
Przedstawiono również oligonukleotyd, którego synteza zakończyła się w wyniku wbudowania dideoksynukleotydu

Synteza DNA zapoczątkowana jest ze starterów komplementarnych do fragmentu DNA, którego sekwencję chcemy ustalić. Jeden z końców starterów znakuje się radioaktywnie lub fluorescencyjnie. W klasycznej metodzie sekwencjonowania prowadzi się jednocześnie 4 oddzielne reakcje, z których każda zawiera w mieszaninie reakcyjnej jeden z dideoksynukleotydów (dideoksy-ATP, -GTP, -CTP lub -TTP) oraz znaczną ilość czterech "normalnych" deoksynukleotydów. Inkorporacja dideoksynukleotydu do rosnącego łańcucha DNA powoduje zahamowanie dalszej jego syntezy, gdyż brak grupy hydroksylowej w pozycji 3' uniemożliwia przyłączenie kolejnego nukleotydu. Powstaje seria wyznakowanych fragmentów DNA, kończących się zasadą reprezentowaną przez dideoksynukleotyd występujący w danej mieszaninie reakcyjnej. Fragmenty te rozdzielają się ze względu na wielkość za pomocą elektroforezy. W przypadku znakowania starterów izotopami promieniotwórczymi obraz rozdzielonych fragmentów DNA uzyskuje się poprzez wykonanie autoradiografii na kliszy rentgenowskiej. Sekwencja DNA odpowiada kolejności fragmentów odczytanej z żelu.

Schemat sekwencjonowania DNA metodą Sangera

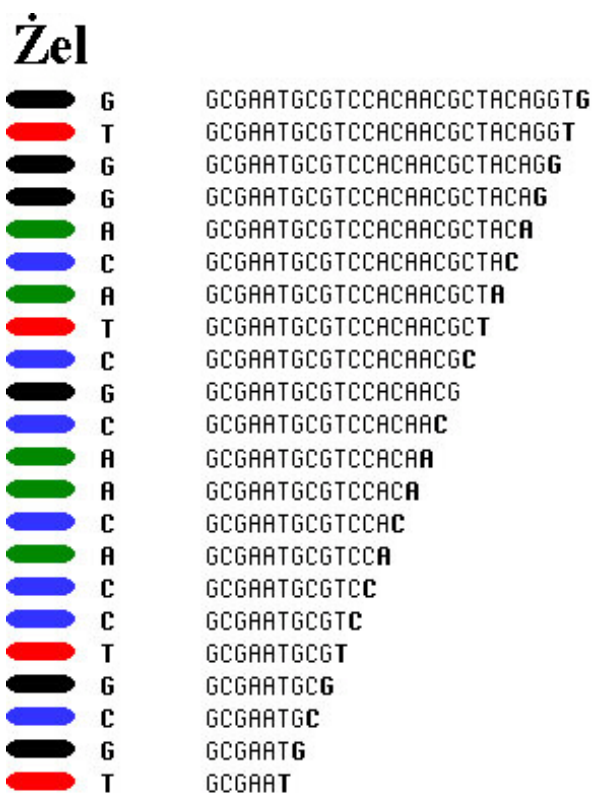


A-K Kaczorowska

Rys. 8. Sekwencjonowanie DNA wg. metody Sangera (dideoxy). Znakowanie syntetyzowanych fragmentów DNA uzyskuje się przez znakowanie starterów (przed rozpoczęciem reakcji sekwencjonowania) lub wbudowanie wyznakowanego deoksynukleotydu w czasie reakcji sekwencjonowania

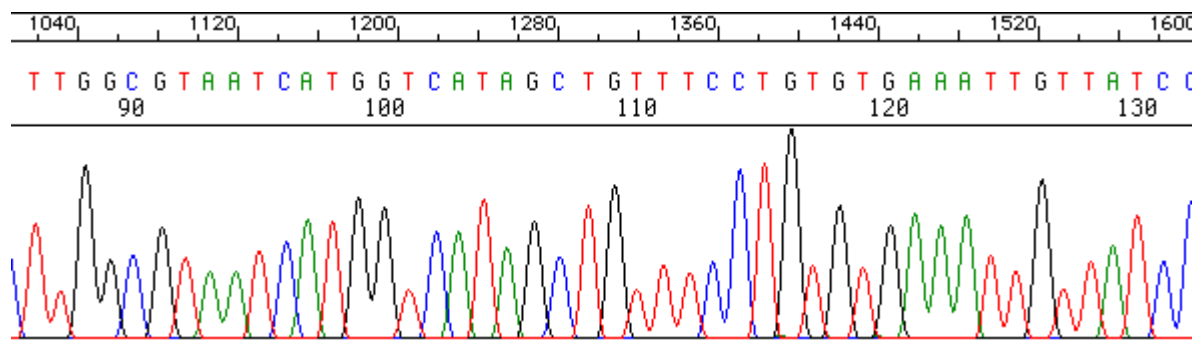
W systemach półautomatycznego sekwencjonowania stosowane są dideozynukleotydy wyznakowane fluorescencyjnie (Rys. 9). Ich wbudowanie do

syntetyzowanej nici DNA powoduje równocześnie jej wyznakowanie i terminację syntezy. Stosując cztery różne znaczniki fluorescencyjne uzyskuje się syntezę fragmentów DNA wyznakowanych odpowiednio do wbudowanego do nici dideoksynukleotydu. Dzięki temu oznaczając sekwencję nukleotydową fragmentu DNA można stosować jedną, a nie cztery niezależne reakcje sekwencjonowania. Prowadząc syntezę wielu nici i stosując równocześnie w reakcji wszystkie dezoksy- i dideoksynukleotydy otrzymuje się mieszaninę fluorescencyjnie wyznakowanych fragmentów DNA o długości równej długości startera + (1 do n). Zazwyczaj n nie przekracza 1000 par zasad. Elektroforetyczny rozdział fragmentów umożliwi ich uporządkowanie pod względem wielkości, a analiza światła emitowanego przez fluorescencyjny znacznik określa, jaki nukleotyd został wbudowany jako ostatni.



Rys. 9. Schematyczne przedstawienie rozdziału wyznakowanych fluorescencyjnie fragmentów DNA zsintetyzowanych w reakcji sekwencjonowania wraz z odczytem sekwencji.

W przypadku półautomatycznej analizy sekwencji nukleotydowej DNA uzyskany rozdział fragmentów przedstawiony jest w postaci chromatogramu.

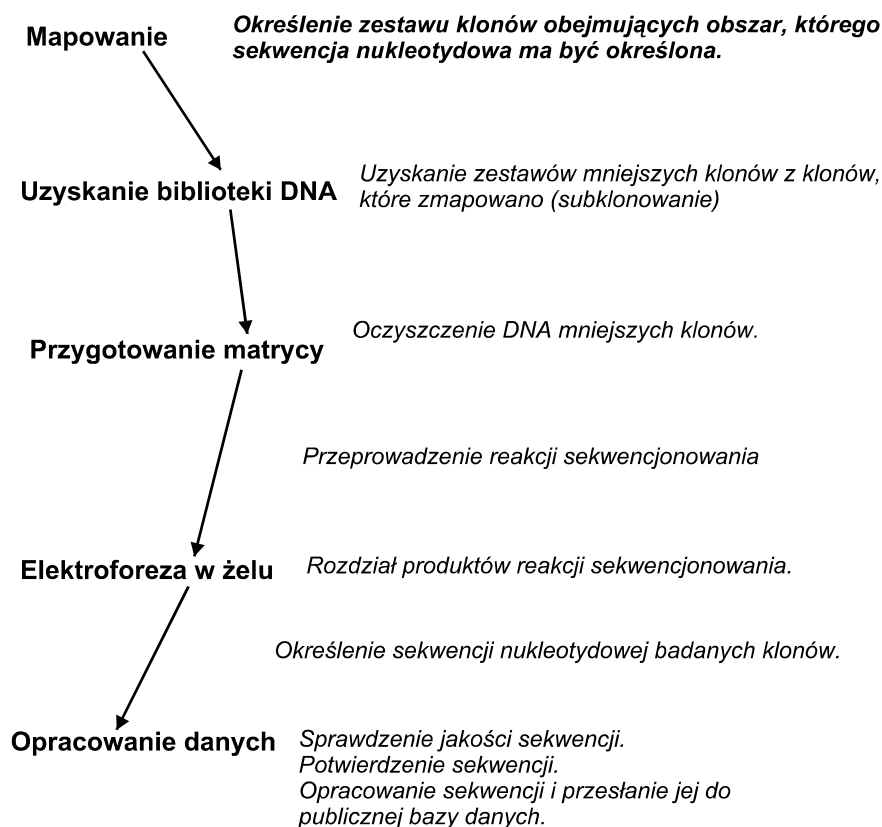


Rys. 10. Chromatogram z elektroforetycznego rozdziału wyznakowanych fluorescencyjnie fragmentów DNA otrzymanych w reakcji sekwencjonowania.

6.1 SEKWENCJONOWANIE GENOMÓW

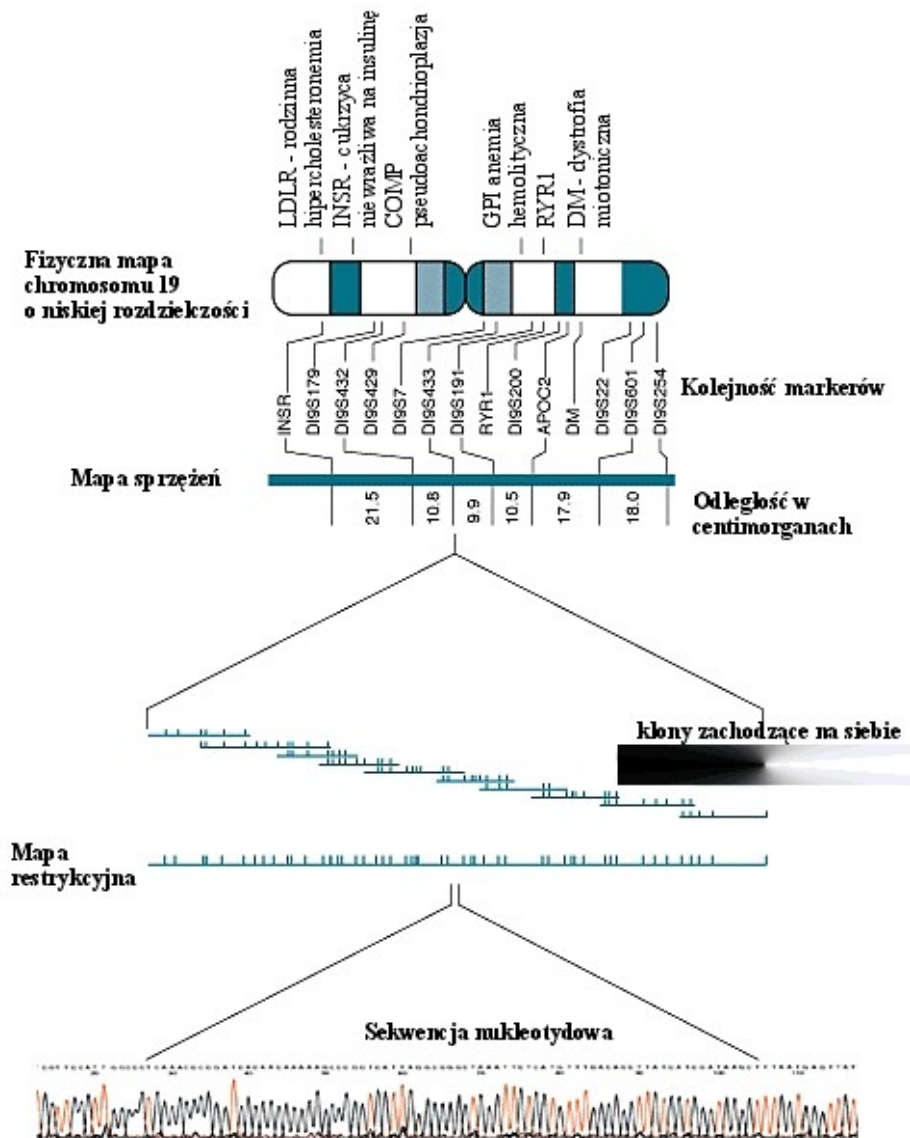
Obecnie dla wielu organizmów (w tym człowieka) znana jest pełna sekwencja genomu. Strategie ustalania sekwencji genomów są omówione pokrótce poniżej.

Sekwencjonowanie genomu

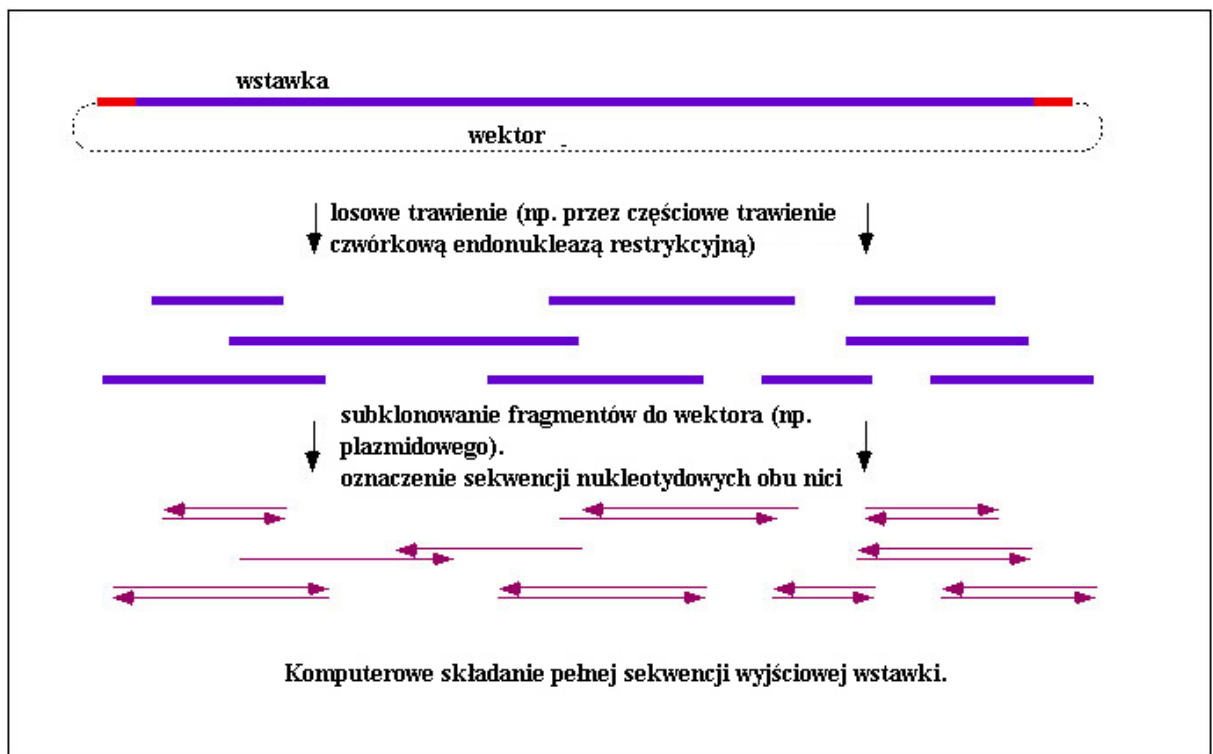


Sekwencjonowanie genomu może obejmować sortowanie chromosomów i konstrukcję banków genów specyficznych dla poszczególnych chromosomów. Kolejne etapy analizy sekwencji nukleotydowej chromosomu podano poniżej na przykładzie chromosomu 19. W pierwszym etapie konstruowane są biblioteki zachodzących na siebie fragmentów. W klonowaniu stosowane są wektory typu kosmid lub sztuczne chromosomy bakteryjne (BAC).

Następnie na podstawie hybrydyzacji są one porządkowane i przypisywane poszczególnym rejonom chromosomu (Rys. 11). Sekwencje nukleotydowe dużych wstawek przenoszonych przez kosmidy lub wektory BAC są ustalane po ich subklonowaniu do wektorów plazmidowych (losowe, zachodzące na siebie fragmenty), a następnie określeniu sekwencji nukleotydowych poszczególnych klonów. Sekwencje zachodzących na siebie obszarów są łączone *in silico* w dłuższe ciągi nazywane kontigami (Rys. 12).



Rys 11. Strategia sekwencjonowania DNA chromosomu 19.



Rys 12. Strategia sekwencjonowania dużego fragmentu DNA przenoszonego przez kosmid lub wektor typu BAC. Uzyskane fragmentaryczne sekwencje łączone są w dłuższe ciągi (kontigi) dzięki zachodzącym na siebie obszarom.

7. ZASTOSOWANIE GENÓW REPORTEROWYCH W BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Gen reporterowy - gen kodujący białko, którego obecność lub aktywność biochemiczną można w łatwy sposób oznaczyć w komórce (*in vivo*) poprzez wykorzystanie technik autoradiograficznych, spektrofotometrycznych lub bio- i chemiluminescencyjnych. Geny reporterowe łączy się w fuzje z sekwencjami, które chcemy scharakteryzować (np. otwartymi ramkami odczytu, regionami regulatorowymi), przy zastosowaniu technik inżynierii genetycznej. Geny reporterowe wprowadza się do badanych komórek lub organizmów na drodze transformacji (bakterie, drożdże) lub transfekcji (komórki hodowane w hodowli komórkowej), a efekt ich ekspresji może być stały lub przejściowy, w zależności od tego, czy ulegają one integracji do genomu biocy. Konkretny gen reporterowy można stosować w danym systemie badawczym pod warunkiem, że system ten jest pozbawiony w normalnych warunkach endogenego genu homologicznego. Niezbędne jest również zastosowanie takiego wektora ekspresyjnego, który umożliwi efektywne wyrażenie białka kodowanego przez gen reporterowy w badanym układzie.

7.1. Niektóre zastosowania genów reporterowych

- **ustalenie regionów promotorów odpowiedzialnych za regulację genów** – tworzenie fuzji fragmentów potencjalnego promotora z genem reporterowym → transfekcja komórek → szacowanie aktywności promotora na podstawie oznaczania aktywności białka kodowanego przez gen reporterowy. W analogiczny sposób można przeprowadzić analizę czasowej i/lub przestrzennej aktywności badanych promotorów w komórkach i tkankach.
- **ustalenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek** – tworzenie fuzji cDNA kodującego badane białko z genem reporterowym (najczęściej białkiem zielonej fluorescencji (*ang.* GFP) lub jego wariantem) i analiza mikroskopowa;
- **wykorzystanie genu *lacZ* jako reportera w drożdżowym systemie dwuhybrydowym** – w tym systemie wykrywa się interakcję między makrocząsteczkami poprzez ekspresję dwóch potencjalnie oddziaływujących cząsteczek w tej samej komórce drożdżowej i aktywację przez powstały kompleks białkowy ekspresji genu reporterowego (do jednego z białek dołączona jest domena wiążąca się do DNA, drugie białko jest syntetyzowane w fuzji z domeną aktywującą transkrypcję). Obecność białka reporterowego β -gal wykrywa się poprzez niebieskie zabarwienie komórek drożdży w obecności X-gal.

7.2. Najczęściej stosowane geny reporterowe (dla zainteresowanych)

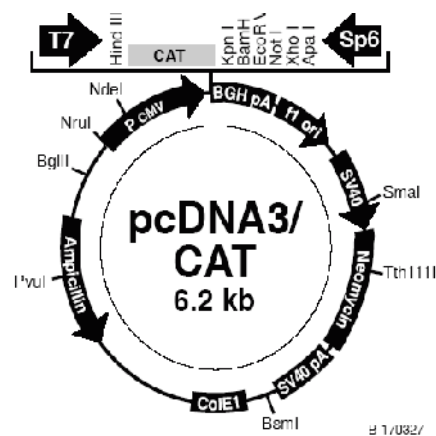
- **acetylotransferaza chloramfenikolu** (ang. chloramphenicol acetyltransferase; CAT) - prokariotyczny enzym, który katalizuje przenoszenie grup acetylowych z acetylokoenzymu A na chloramfenikol. Zaletą jego stosowania w komórkach eukariotycznych jest fakt, że komórki te praktycznie pozbawione są enzymów, które mogą z nim współzawodniczyć. Ponadto białko to jest bardzo stabilne – jego okres półtrwania w komórkach ssaków wynosi około 50 godzin. Jedną z metod oznaczania aktywności CAT przedstawiono na rysunku 2;
- **β -galaktozydaza (β -gal)** – enzym kodowany przez gen *lacZ*, pochodzący z *Escherichia coli*. Oznaczenie aktywności β -gal polega na użyciu jako substratu X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktozyd), który jest rozkładny do barwnego (niebieskiego) produktu, 4-chloro-3-bromo-indygo. Ilość tego barwnego produktu reakcji można w łatwy sposób zmierzyć kolorymetrycznie. Zabarwienie można również obserwować w komórkach, tkankach i narządach organizmów transformowanych wektorami z β -galaktozydazą.
- **lucyferazy** – enzymy kodowane przez geny *luc*, występujące między innymi u robaczka świętojańskiego *Photinus pyralis* (ang. firefly) lub jamochłona morskiego *Renilla reniformis* (ang. sea pansy) – oznaczane odpowiednio jako *Pp Luc* lub *Rr Luc*. Lucyferazy katalizują bioluminescencyjną reakcję przemiany substratu – lucyferyny, która w obecności ATP, jonów Mg^{2+} oraz tlenu cząsteczkowego ulega utlenieniu i przechodzi w stan wzbudzenia, a następnie – powracając do stanu wyjściowego – powoduje emisję światła. Emitowane fotony są zliczane przy pomocy luminometru. Całkowita emisja światła jest wprost proporcjonalna do aktywności lucyferazy w badanej próbce i pozwala na oszacowanie aktywności transkrypcyjnej genu reporterowego. Lucyferazy charakteryzują się szybkim tempem rozpadu w komórkach ssaczy ($t_{1/2} = \sim 3$ h);
- **β -glukuronidaza (GUS)** – enzym kodowany przez gen bakteryjny, często wykorzystywany w badaniu ekspresji genów roślin, ze względu na bardzo niskie tło, a co za tym idzie – obniżenie częstości fałszywych wyników. Co ciekawe, gen ten może być stosowany jako reporter mimo faktu występowania homologicznego genu w organizmach roślin – wynika to z faktu, że optymalne pH dla enzymu bakteryjnego jest znacznie wyższe niż w przypadku enzymu endogennego. Powszechnie stosowanym substratem w oznaczaniu aktywności biochemicznej GUS jest X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-glukuronid), a sama reakcja przebiega analogicznie,

jak w przypadku β -galaktozydazy. Ten system reporterowy zapewnia wysoką czułość ze względu na dużą stabilność enzymu w komórkach roślin;

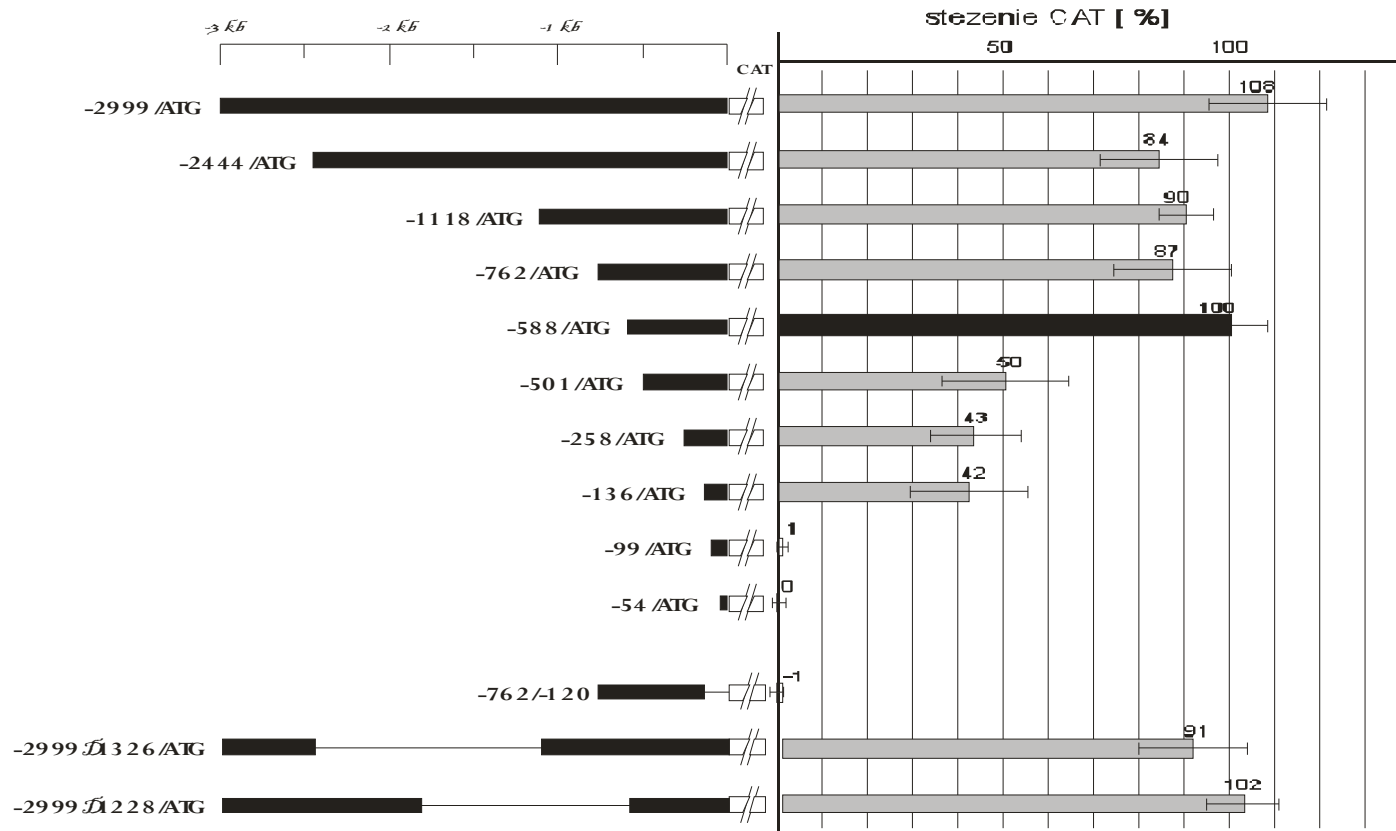
- **białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein; GFP)** – białko kodowane przez gen wyizolowany z meduzy *Aequorea victoria*. Normalnie fluoryzuje ono po dostarczeniu energii przez fotoproteinę aktywowaną jonami Ca^{2+} (ang. aequorin). Fluorescencję GFP można również zaindukować przy pomocy promieniowania nadfioletowego. Poprzez wykorzystanie techniki mutagenyzy udało się stworzyć pochodne GFP, które fluoryzują na niebiesko (CFP – cyan fluorescent protein) oraz żółto (YFP – yellow fluorescent protein).

7.3. Wykorzystanie genu *cat* jako reportera w badaniu sekwencji promotora ludzkiego genu *hSuv3* (wg. M. Minczuk, 2003, rozprawa doktorska, ZGUW) (dla zainteresowanych)

Ludzki gen *hSuv3* koduje mitochondrialną helikazę DNA i RNA. W celu określenia, który fragment DNA powyżej pierwszego ATG *hSUV3* ma aktywność promotora oraz w celu ustalenia, które obszary promotora są odpowiedzialne za regulację ekspresji genu, stworzono fuzje odcinków DNA różnej długości z końca 5' *hSUV3* z genem reporterowym. Promotor zawężano od końca 5' w zakresie od -2999 do -54 względem pierwszego ATG. Skonstruowano również mutanty delecyjne promotora. Odpowiednie konstrukty utworzono na bazie plazmidu *pcDNA3.1/CAT* (Rys. 13). Plazmid ten jest wektorem bifunkcyjnym, który koduje acetylotransferazę chloramfenikolu (CAT), pochodzącą z *E. coli* pod kontrolą promotora CMV. Promotor CMV zastępowano różnej długości fragmentami sekwencji powyżej pierwszego ATG otwartej ramki odczytu *hSUV3*.



Rys. 13. Uproszczona mapa plazmidu *pcDNA3/CAT* (Invitrogen)



Rys. 15. Analiza funkcjonalna mutantów delecyjnych promotora hSUV3. Czarne bloki symbolizują badane odcinki promotora; obszary zaznaczone przerywaną linią oznaczają delecje. Wartości przy prostokątach oznaczają długości odcinków względem pierwszego ATG genu. Obszary delecji zaznaczono pojedynczą poziomą linią (w przypadku fragmentów zawierających delecje zaznaczono również długość wyciętego odcinka). Wartości otrzymane z przynajmniej 3 niezależnych transfekcji standaryzowano przyjmując aktywność transkrypcyjną odcinka -588/ATG za 100%, a pusty wektor uznawano za 0%.