

Gensko inženirstvo: TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA

Tehnologija rekombinantne DNA

- **Gensko inženirstvo** je tehnologija, ki omogoča **sestavljanje umetnih molekul DNA**.
- **Rekombinantna DNA** je **v laboratoriju pripravljena DNA**, ki združuje genetski material iz različnih virov (organizmov).
- **Molekularno kloniranje** je **pridobivanje veliko kopij rekombinantne DNA**.
 - Običajno pride do molekularnega kloniranja **znotraj plazmidov**, ki se **samostojno podvojujejo**.
- Če v gostiteljsko celico vstavimo zapis za protein, ki je pod kontrolo promotorja, bo v gostiteljski celici nastal **rekombinantni protein**.

Tehnologija rekombinantne DNA

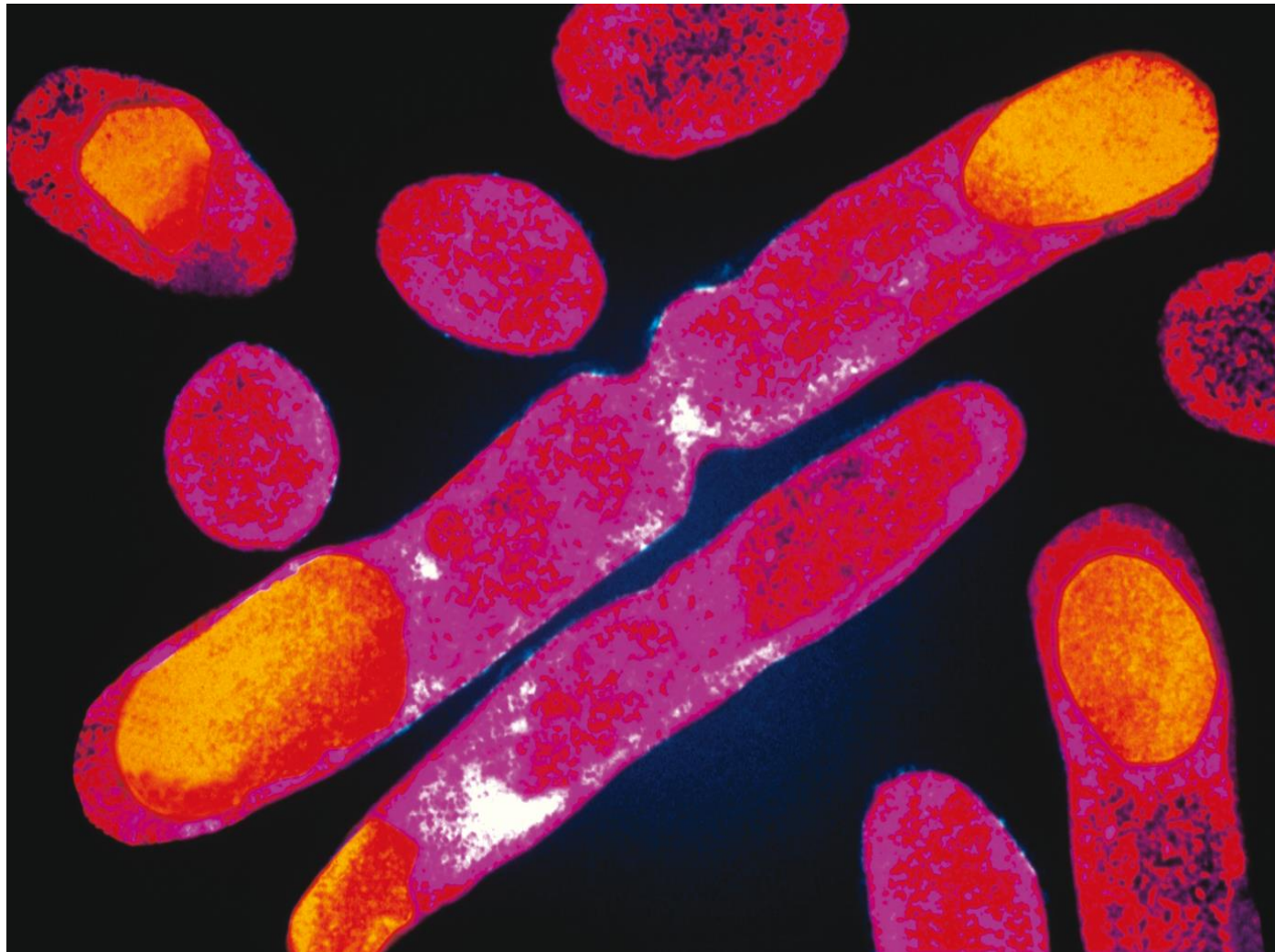
- **Gensko spremenjeni organizmi (GSO)** ali **transgeni organizmi** so organizmi, ki **vsebujejo tuje gene**, ki so bili v njihov genom vstavljeni z metodami genskega inženirstva.
- **Tehnologija rekombinantne DNA** prinaša mnoge možnosti za izboljševanje lastnosti organizmov, hkrati pa prinaša nova tveganja in etične probleme.

Primeri proizvodov, pridobljenih z genskim inženiringom

Proizvod	Gensko spremenjeni organizem, ki proizvod izdeluje	Uporaba
Človeški insulin	bakterija	zdravljenje sladkorne bolezni
Človeški rastni hormon	bakterija	zdravljenje motenj rasti
Goveji rastni hormon	bakterija	pospeševanje rasti goveda
Celulaza iz bakterij ali gliv	bakterija	razgradnja celuloze za krmila ali pridobivanje bioetanola
Taksol (strup iz drevesa tise)	bakterija	zdravljenje raka
Cepivo proti hepatitisu B	kvasovka	preprečevanje okužbe z virusom
Eritropoetin (EPO)	celice sesalcev	zdravljenje anemije (slabokrvnosti)
Faktor VIII	celice sesalcev	zdravljenje hemofilije
Tkivni aktivator plazminogena (TPA)	celice sesalcev	zdravljenje srčnih napadov ⁴

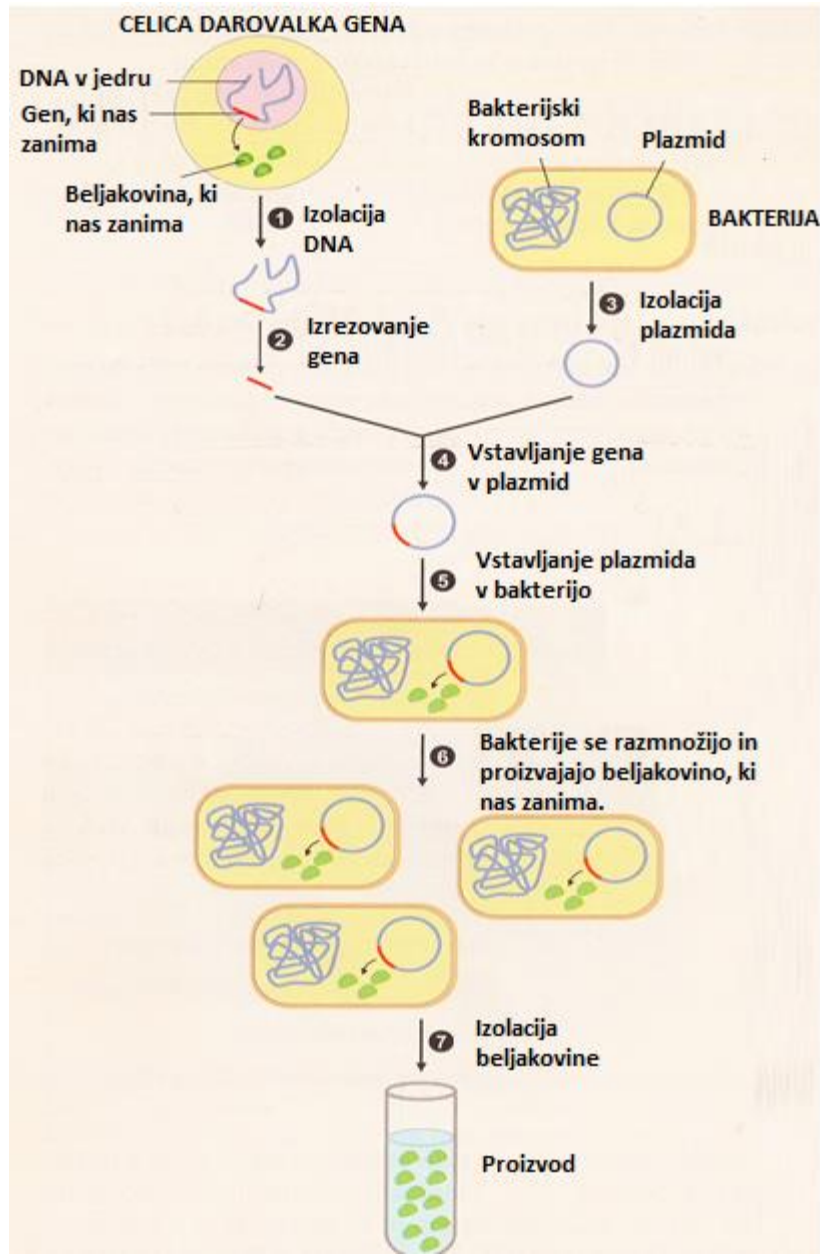
Bakterije, ki izdelujejo človeški insulin

- Leta **1973** so znanstveniki ustvarili **prvi gensko spremenjeni organizem** (bakterijo).
- Leta **1982** so **začeli uporabljati** beljakovinski hormon **insulin**, ki so ga izdelali z uporabo gensko spremenjenih organizmov.
 - Insulin povzroča privzem glukoze iz krvi v jetrne in mišične celice, kjer se glukoza uskladišči v obliki glikogena.
 - Insulin si kot zdravilo vbrizgavajo sladkorni bolniki, katerih telo izdelava premalo ali nič insulina.
 - Pred razvojem metod genskega inženirstva so insulin pridobivali iz trebušnih slinavk živali, predvsem goveda, prašičev in konj.
- **Danes** v svetovnem merilu **izdelajo** približno **70% insulina** z uporabo **gensko spremenjenih bakterij** z vstavljenim genom za človeški insulin.



Proizvodnja insulina (oranžna barva) v bakteriji *E. Coli*.

Princip vnosa tujega gena v bakterijsko celico



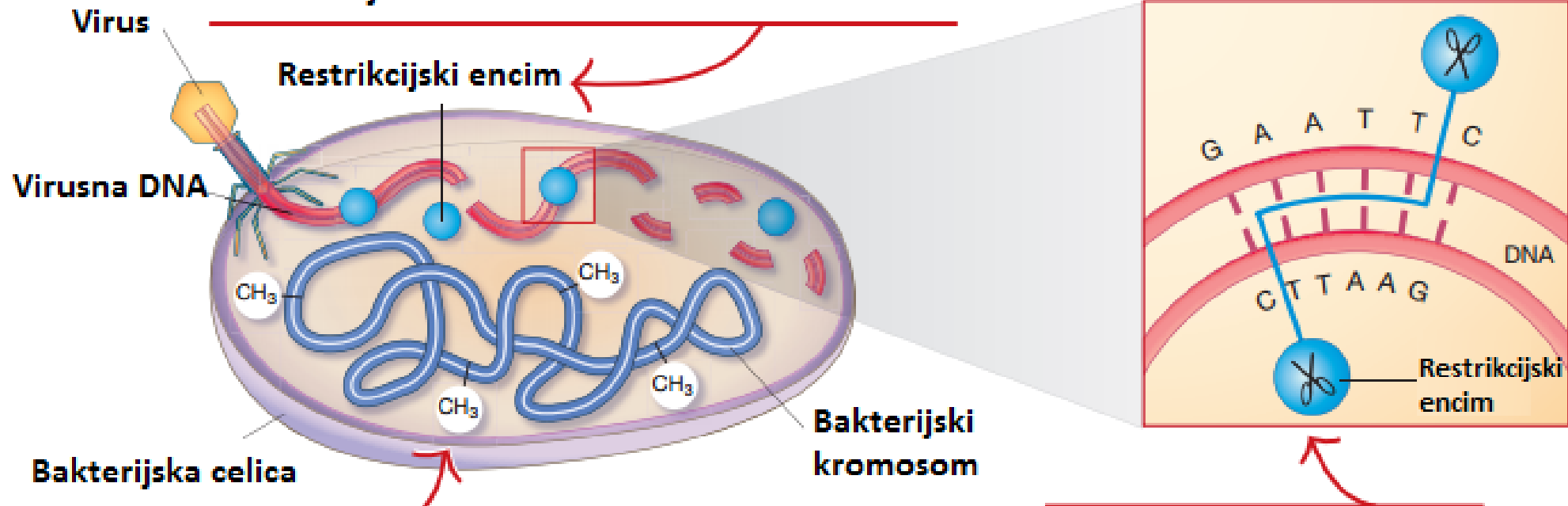
- Iz evkariontskih celic izoliramo molekule DNA, iz katerih **izrežemo gen**, ki nas zanima.
- Iz bakterije izoliramo **plazmid** (vektor) in **vanj vstavimo tuji gen**.
- Nato **plazmide z vstavljenim genom** vnesemo v bakterijske celice.
- **Bakterije** se začnejo v gojišču **razmnoževati** in **proizvajati** tudi **tujo beljakovino**, ki je zapisana v tujem genu.
- Ko se bakterije dovolj namnožijo in proizvedejo dovolj tuje beljakovine, iz njih to **beljakovino izoliramo**.

Postopek izrezovanja in vstavljanja genov v vektorje

- Za rezanje molekul DNA na specifičnih mestih uporabljajo znanstveniki **restriksijske encime**.
 - Restriksijski encimi so naravne molekule, ki jih celice uporabljajo za obrambo pred virusi (restriksijski encimi namreč razrežejo tujo DNA).
 - Različne vrste bakterij izdelujejo različne restriksijske encime.
- Danes poznamo na stotine različnih restriksijskih encimov.
- Vsak **restriksijski encim** „prepozna“ določeno **kratko zaporedje nukleotidov** v molekuli DNA, običajno **dolgo od 4 do 8 nukleotidnih parov**.

Palindromna zaporedja

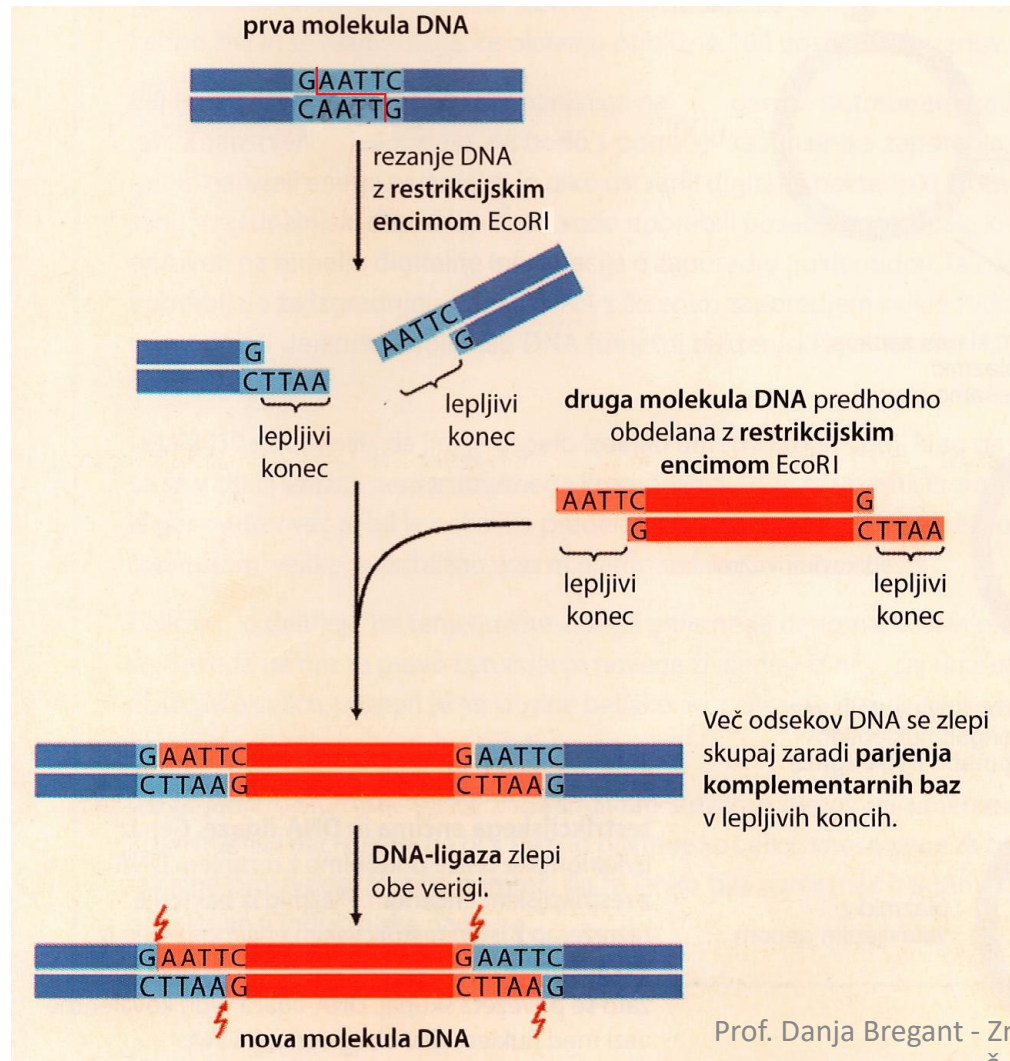
Velika večina restrikcijskih encimov prepozna **palindromna zaporedja**, t.j. zaporedja, ki se lahko berejo v obeh smereh.



Bakterija zaščiti svoja palindromna zaporedja z **metilacijo DNA** (dodatkom metilnih skupin -CH₃).

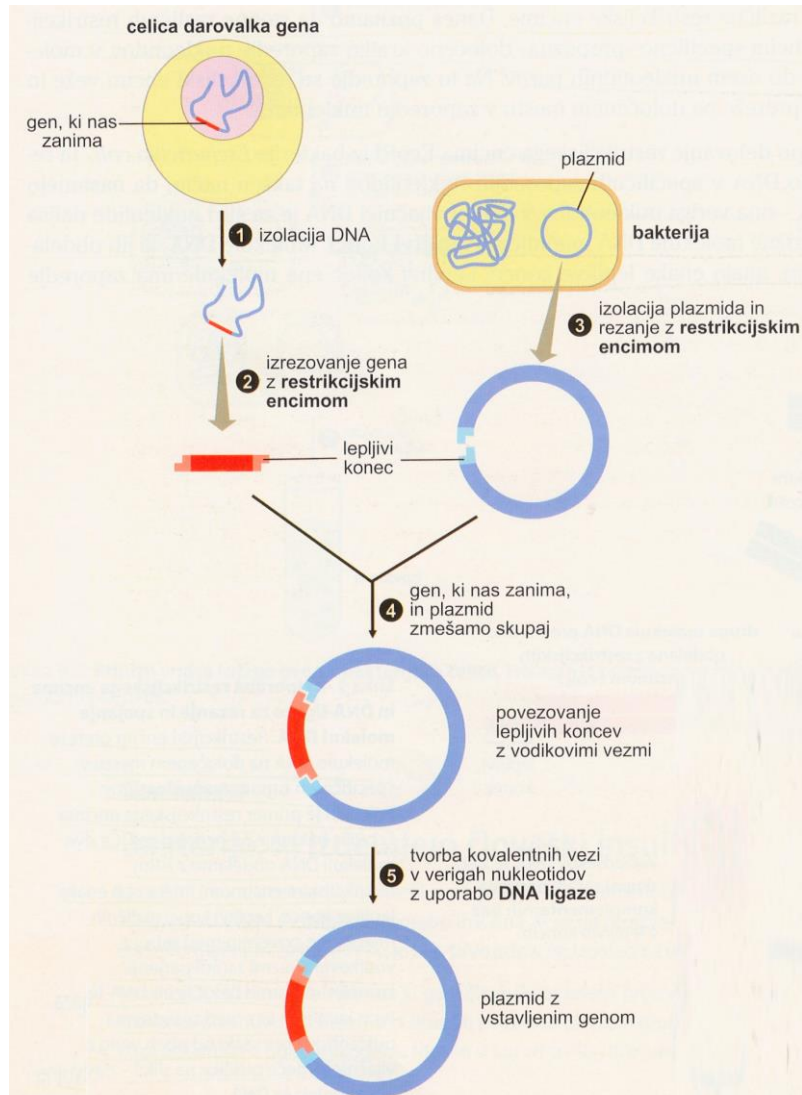
Restrikcijski encim *Eco* RI ima palindromno tarčno zaporedje **GAATTC** (ki se na komplementarni verigi bere v nasprotni smeri).

Delovanje restrikcijskega encima *Eco* RI iz bakterije *Escherichia coli*.



- Restrikcijski encim razreže molekulo DNA tako, da nastaneta stopničasta konca, ki jima pravimo **lepljiva konca**.
- Če **dve molekuli DNA** obdelamo z istim restrikcijskim encimom, **imata** obe **enaka lepljiva konca**.
- **Lepljiva konca** različnih molekul **se povežeta** med seboj z vodikovimi vezmi zaradi **parjenja komplementarnih baz**.
- **DNA ligaza** zlepi obe verigi (rdeče puščice na sliki).

Vstavljanje gena v plazmid z uporabo restrikcijskega encima in DNA-ligaze



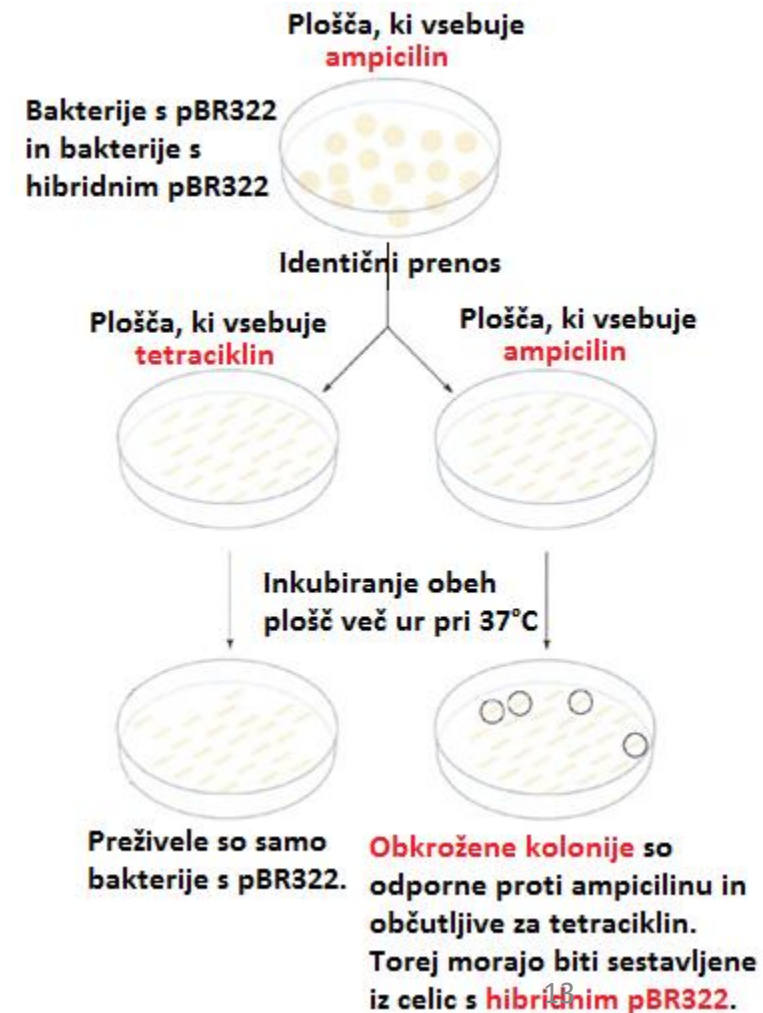
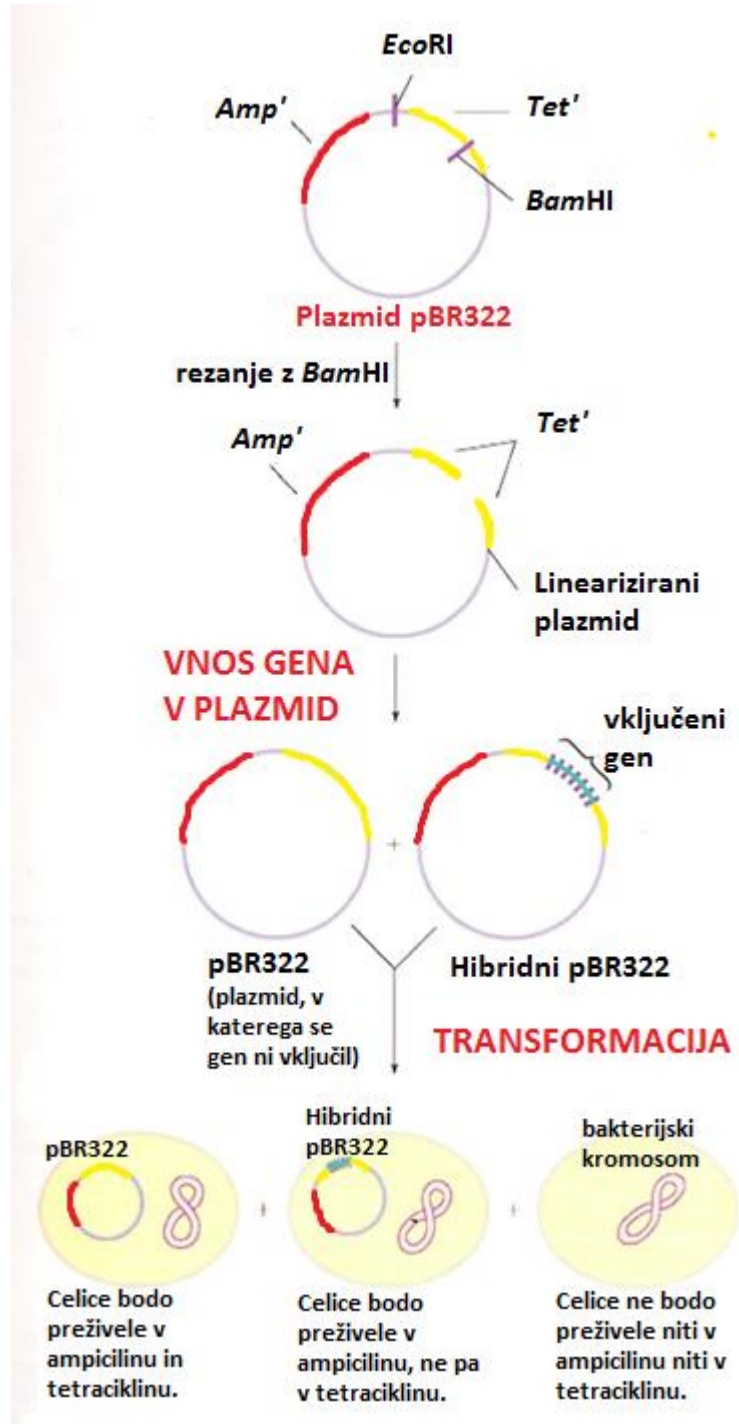
- Iz celice darovalke gena **izoliramo DNA**.
- **Izberemo** tak **restrikcijski encim**, ki iz DNA **izreže celoten gen**.
- S pomočjo restrikcijskega encima **izrežemo** želeni **gen**.
- Z istim restrikcijskim encimom **prerežemo plazmid**.
- Izrezani **gen** in prerezani **plazmid** prenesemo **v isto epruveto**.
- **Lepljivi konci se povežejo** z vodikovimi vezmi.
- V epruveto **dodamo DNA-ligazo**, ki tvori kovalentne vezi med sosednjimi nukleotidi.
- Uspešno se vključi le nekaj genov.

Vključitev plazmida v bakterijo (transformacija)

- Bakterije in plazmide damo v isto epruveto, kjer bo potekala **transformacija** (=vnos tuje DNA v kompetentne bakterijske celice).
- Bakterijo je treba ustrezno obdelati, da postane sposobna za transformacijo (**kompetentna**).
- V ta namen **izvedemo elektroporacijo**: epruveto s suspenzijo celic in plazmidov izpostavimo **električnemu polju** ustrezne jakosti in trajanja, ki povzroči **nastanek por v bakterijski membrani**, skozi katere lahko vstopi plazmid.
- Dodamo še **CaCl₂**, ki pospešuje vstop plazmida v bakterijo.
- **Uspešno se vključi le nekaj** plazmidov.
- Po transformaciji vstavimo bakterije v gojišče, kjer se bodo razmnoževale in proizvajale želeno beljakovino.

Testiranje učinkovitosti transformacije

- Za vnos gena v bakterijo uporabimo **plazmid pBR322**, ki vsebuje gena za odpornost proti **ampicilinu** in **tetraciklinu**.
- Uporabimo restrikcijski encim **BamHI**, ki **prereže** plazmid **znotraj** gena za odpornost na **tetraciklin**.
- **Vključimo gen** v plazmid.
- Izvedemo **transformacijo**.
- Bakterije s **pBR322** bodo rasle v obeh gojiščih.
- Bakterije s **hibridnim pBR322** bodo preživele v gojišču z ampicilinom, ne pa v gojišču s tetraciklinom.
- Bakterije, ki **niso transformirale**, ne bodo preživele ne v ampicilinu, ne v tetraciklinu.



Priprava rekombinantne DNA (povzetek)

1. Priprava gena za prenos:

- izrezovanje z restrikcijskim encimom
- ali prepis mRNA z reverzno transkriptazo
- ali sinteza iz nukleotidov.

2. Izbor in izolacija plazmida (ali drugega **vektorja**) za prenos v bakterijo.

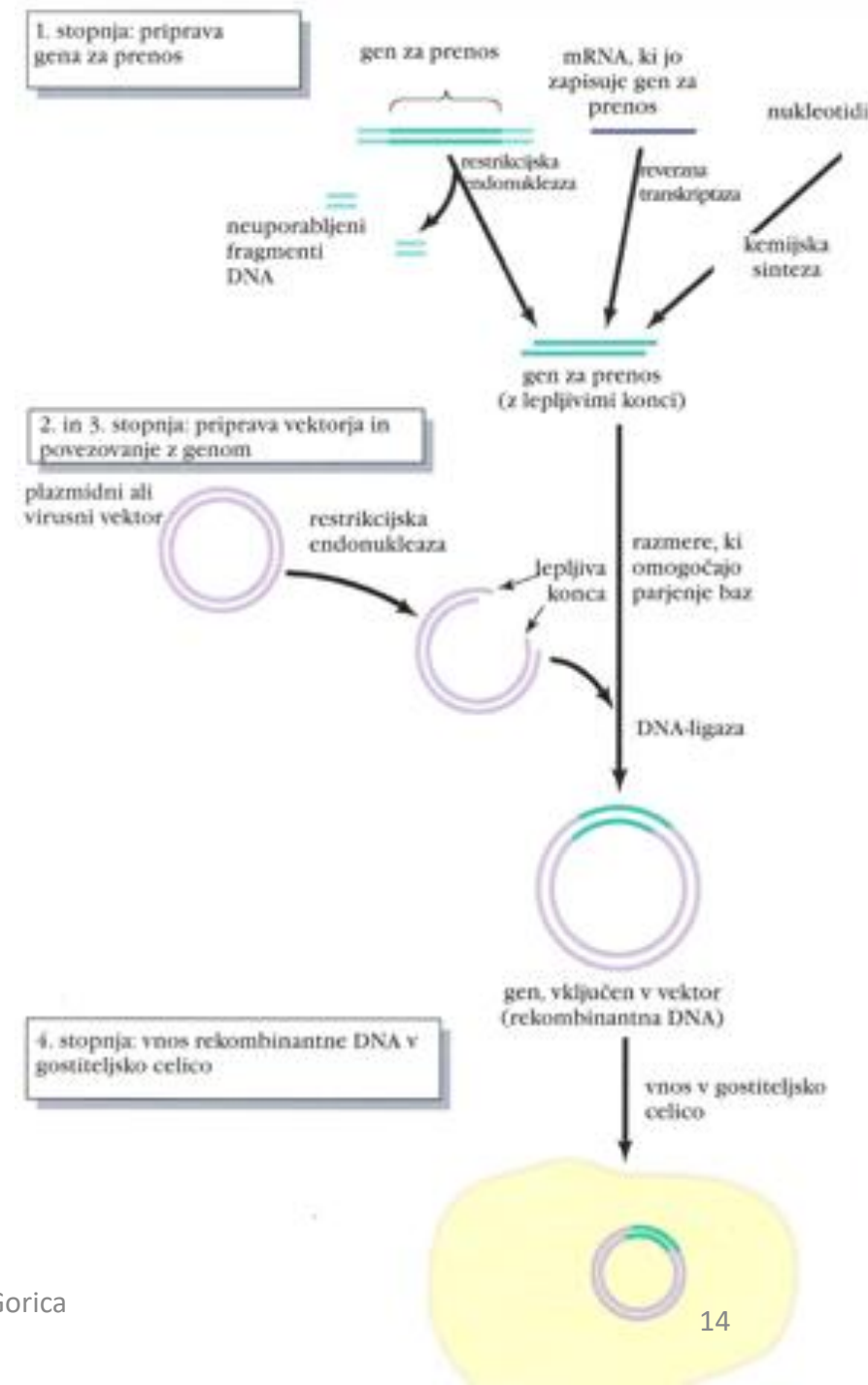
- **Rezanje vektorja** z restrikcijskim encimom.

3. Vstavitev fragmenta tuje DNA v vektor – nastane **rekombinantna** ali **hibridna DNA**.

4. Vnos hibridne DNA v bakterijo (**transformacija**).

5. Postavitev bakterij v **gojišče s hranilnim agarjem**.

6. **Razvoj metode** za **pregledovanje** bakterij s **hibridno DNA**.



Izbira gostiteljskih celic

- Idealne lastnosti gostiteljskih celic so sledeče:
 - hitra rast,
 - prehranjevanje s cenovno ugodnimi hranili ,
 - nepatogenost,
 - sposobnost transformacije,
 - stabilnost.
- Mikroorganizmi s temi lastnostmi so:
 - *E. coli*,
 - *Bacillus subtilis*
 - *Saccaromyces cerevisiae*.

Kloniranje rekombinantne DNA

- Rekombinantno DNA kloniramo s pomočjo **klonirnih vektorjev**.
- **Izbira klonirnih vektorjev** je **odvisna** od **velikosti fragmenta DNA**, ki ga hočemo klonirati.

KLONIRNI VEKTORJI

- Plazmidi
- Bakteriofagi
- Kozmidi
- Umetni kromosomi bakterij (BAC)
- Umetni kromosomi kvasovk (YAC)

VELIKOST FRAGMENTA DNA

do 10.000 *bp*
do 21.000 *bp*
do 45.000 *bp*
do 300.000 *bp*
nad 1.000.000 *bp*.

Plazmidi

- Plazmidi so **majhne krožne molekule**.
- Običajno **nosijo gene za odpornost proti antibiotikom**.
- Vsebujejo **mesta za restrikcijske encime**.
- V bakterijski celici **se samostojno razmnožujejo**.
- Njihov **način podvojevanja** je lahko:
 - **omejen**: samo nekaj kopij v celici
 - **sproščen**: tudi do 200 kopij v celici; lahko nastane tudi do 2000 ali 3000 kopij.
- Lahko **sprejmejo vključke do 10.000** baznih parov.

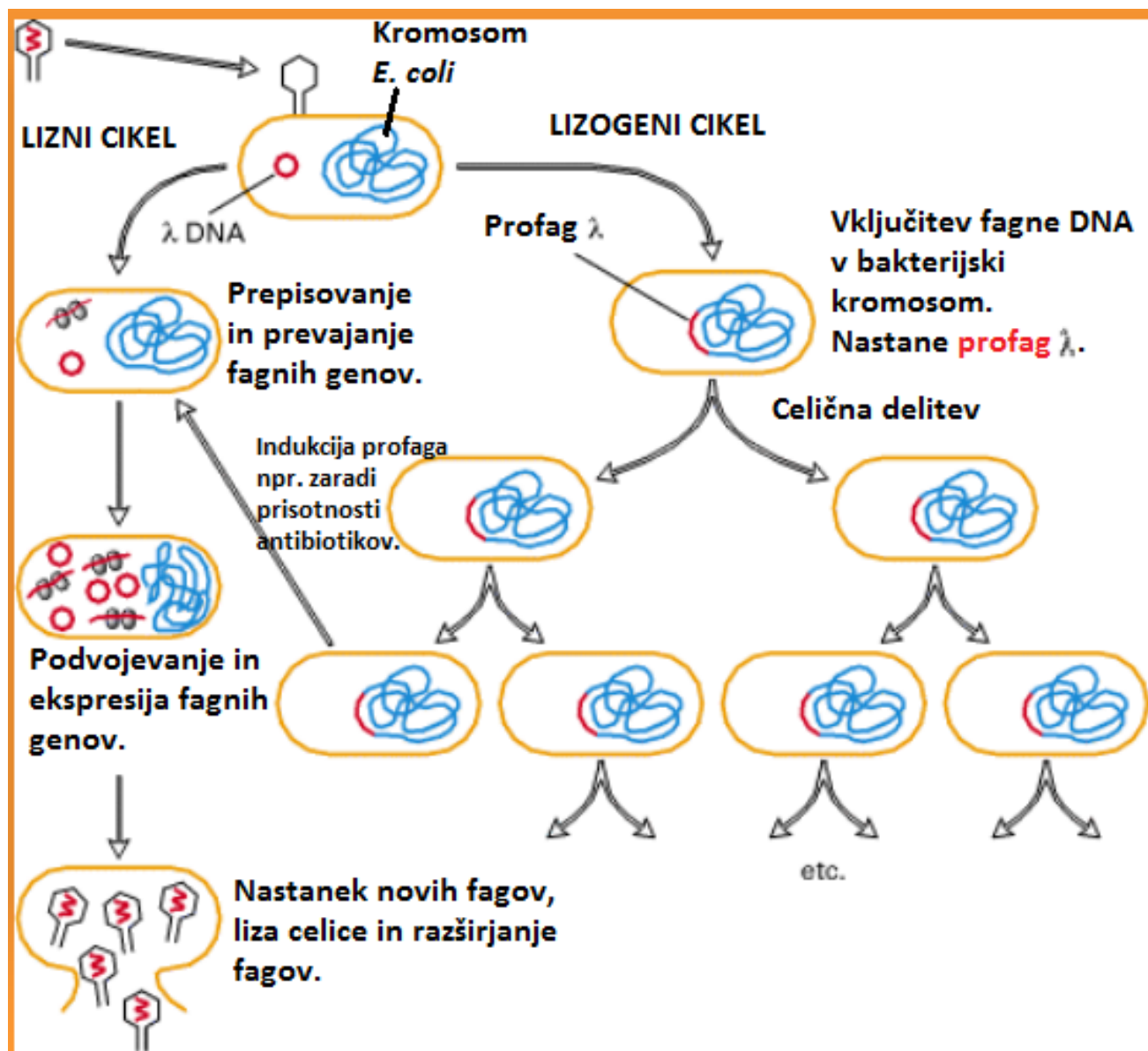
Idealni plazmidni klonirni vektor

- Podvojevanje na sproščen način.
- Biti mora majhen
 - lažja ločitev od velike kromosomske DNA
 - lažja obdelava brez poškodb
- Vsebovati mora markerje (označevalce) za odpornost proti antibiotikom (za testiranje učinkovitosti molekulskega kloniranja)
- Imeti mora le eno cepitveno mesto za določeno restrikcijsko endonukleazo.

Bakteriofagi

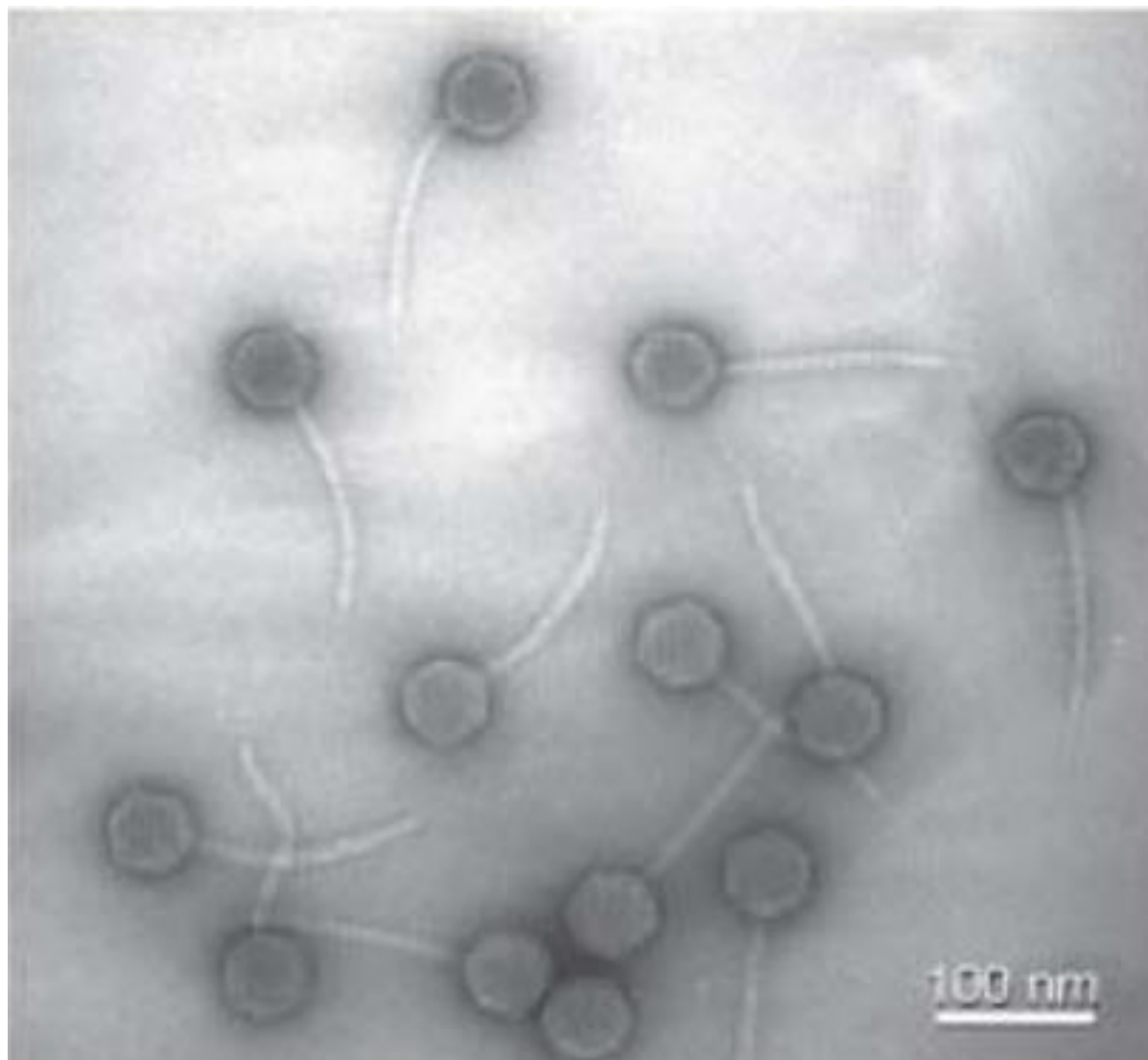
- Bakteriofage kot vektorje uporabljamo za molekulsko kloniranje daljših fragmentov DNA.
- Najpogosteje uporabljeni klonirni vektor te skupine je **fag λ** , molekula DNA s približno **50.000 baznimi pari**.
- Prednosti:
 - **Fag λ je večji** od plazmidne DNA – primeren za **vnos daljših fragmentov evkariontske DNA** (8.000 do 20.000 bp).
 - **Rekombinantna fagna DNA** se lahko učinkovito **pakira v fagne glave**.
 - **V bakteriji** je možna namnožitev **mного kopij** rekombinantne DNA.
 - Možna je **preprosta identifikacija** rekombinantne fagne DNA.

Lizni in lizogeni cikel faga λ



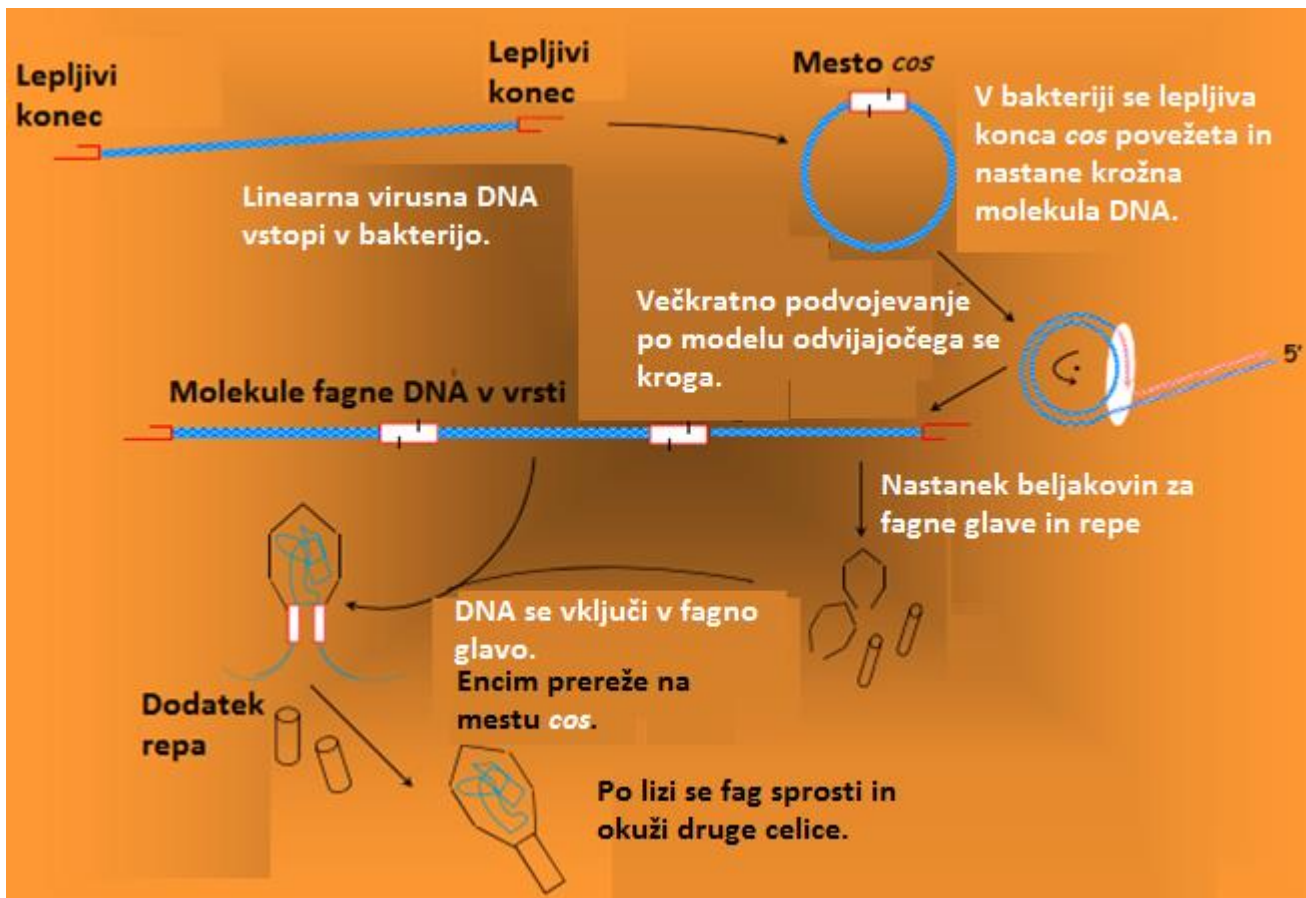
Kapaciteta fagne glave

- DNA faga λ je sestavljen iz **50.000 bp** z enoverižnima zaporedjema **cos** na obeh straneh.
 - Mesti **cos** sta sestavljeni iz **12 nukleotidov**, ki so med sabo komplementarni.
- V fagno glavo pa se lahko pakirajo tudi malo krajše ali malo daljše molekule DNA in sicer **od 38.000 do 51.000 bp**.
- Pri manipulaciji fagne DNA moramo upoštevati, da **fagu moramo pustiti 30.000 bp**, ki so esencialni za njegovo razmnoževanje.
- Na to DNA lahko povežemo **gen dolžine od 8.000 do 21.000 bp**.



Bakteriofag λ

Podvojevanje fagne DNA in njeno pakiranje v fagne glave



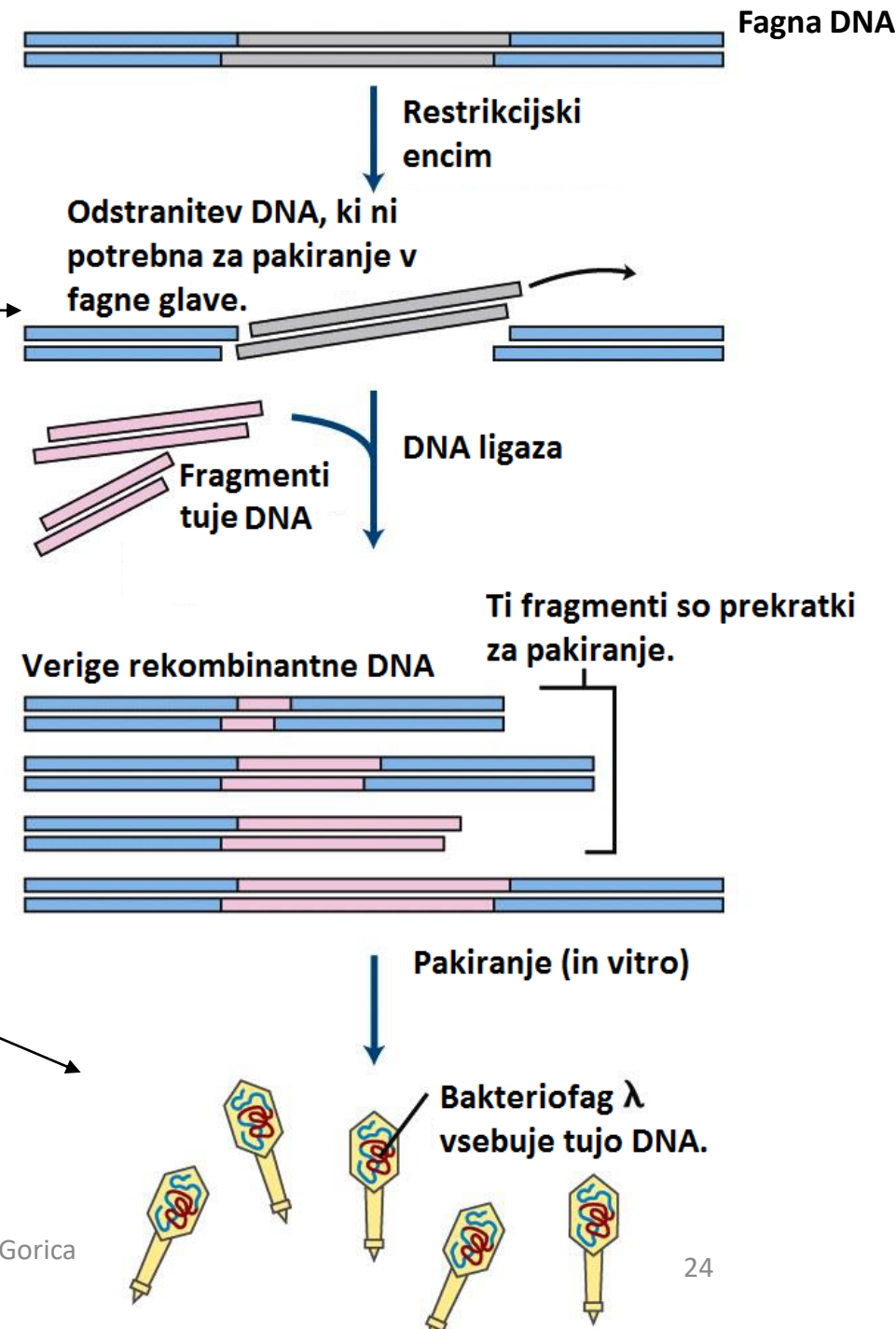
- Ko **vstopi fag v bakterijo**, se dve **mesti *cos*** **povežeta**.
- Tako nastane **krožna molekula**, ki je **varna** pred **eksonukleazami**.
- Krožna molekula se začne **podvojevati po modelu odvijajočega se kroga**.
- Nastane **dolga veriga DNA**, sestavljena iz zaporedja fagnih genomov.
- Na **mestih *cos*** jo **encim prereže**, tako da se lahko DNA **pakira v fagne glave**.

KLONIRANJE REKOMBINANTNE DNA

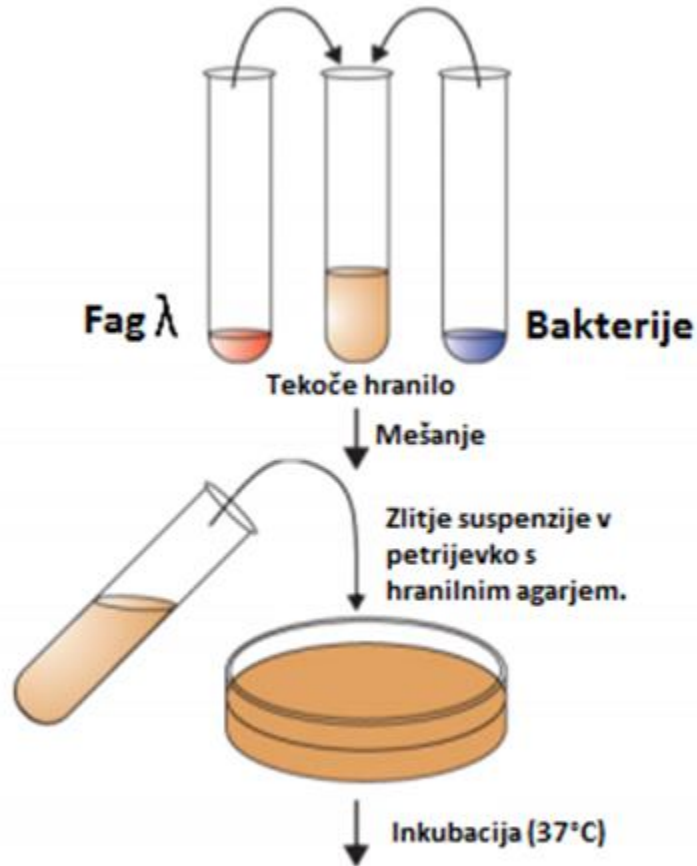
1. Pakiranje gena v fagno glavo

- Približno **1/3 bakteriofagne DNA** je **neesencialne** in jo lahko **nadomestimo z insertom** od 8.000 do 21.000 bp.
- Za vezanje uporabimo **DNA ligazo**.
- Dobimo verige **rekombinantne DNA**, ki jih vstavimo **v lizat*** bakterij, tako da se ***in vitro* spakirajo v virusne delce**.

*Lizat bakterij = suspenzija, ki vsebuje ostanke bakterij po lizi. V lizatu so prisotni tudi fagni delci (kapside, repi,...)



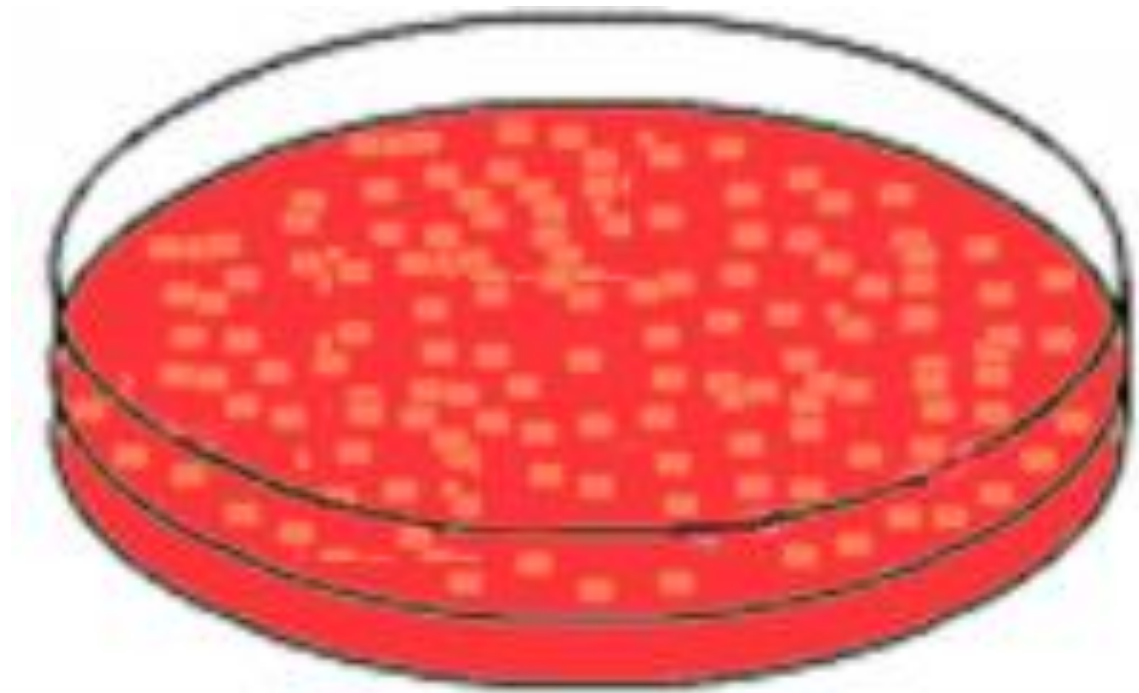
2. Vstop faga λ v bakterije



Razmnoževanje faga povzroči lizo celic, kar je razvidno s pojavom liznih plakov na trdnem gojišču.

- V epruveto s tekočim gojiščem damo fage λ in bakterije *E. coli*.
- Suspenzijo zlijemo na trdno gojišče v petrijevki in inkubiramo za 12-16 ur pri 37°C.
- Fagi λ vstopijo v bakterijske celice.
- Na gojišču bomo opazili prozorne plake, ki pričajo o lizi bakterijskih celic.
- Iz plakov lahko izoliramo fage z rekombinantno DNA.

Nastanek plakov v bakterijski kulturi



- **Plaki*** na trdnem gojišču so znak za bakterijsko lizo.
- Tu je **velika gostota fagov** z **rekombinantno DNA**.

***Plak** ali **razbistritev** je okrogla, transparentna čistina v bakterijski kulturi, ki nastane zaradi lize z virulentnim virusom.

3. Testiranje prisotnosti rekombinantnih fagov

- Uporabljamo kolonije bakterij *Lac Z*⁻, ki so nesposobne metabolizirati laktozo, ker ne proizvajajo encima β -galaktosidaze.
- V fagno DNA vključimo tudi gen *Lac Z*, ki bo povzročil nastanek encima β -galaktosidaze.

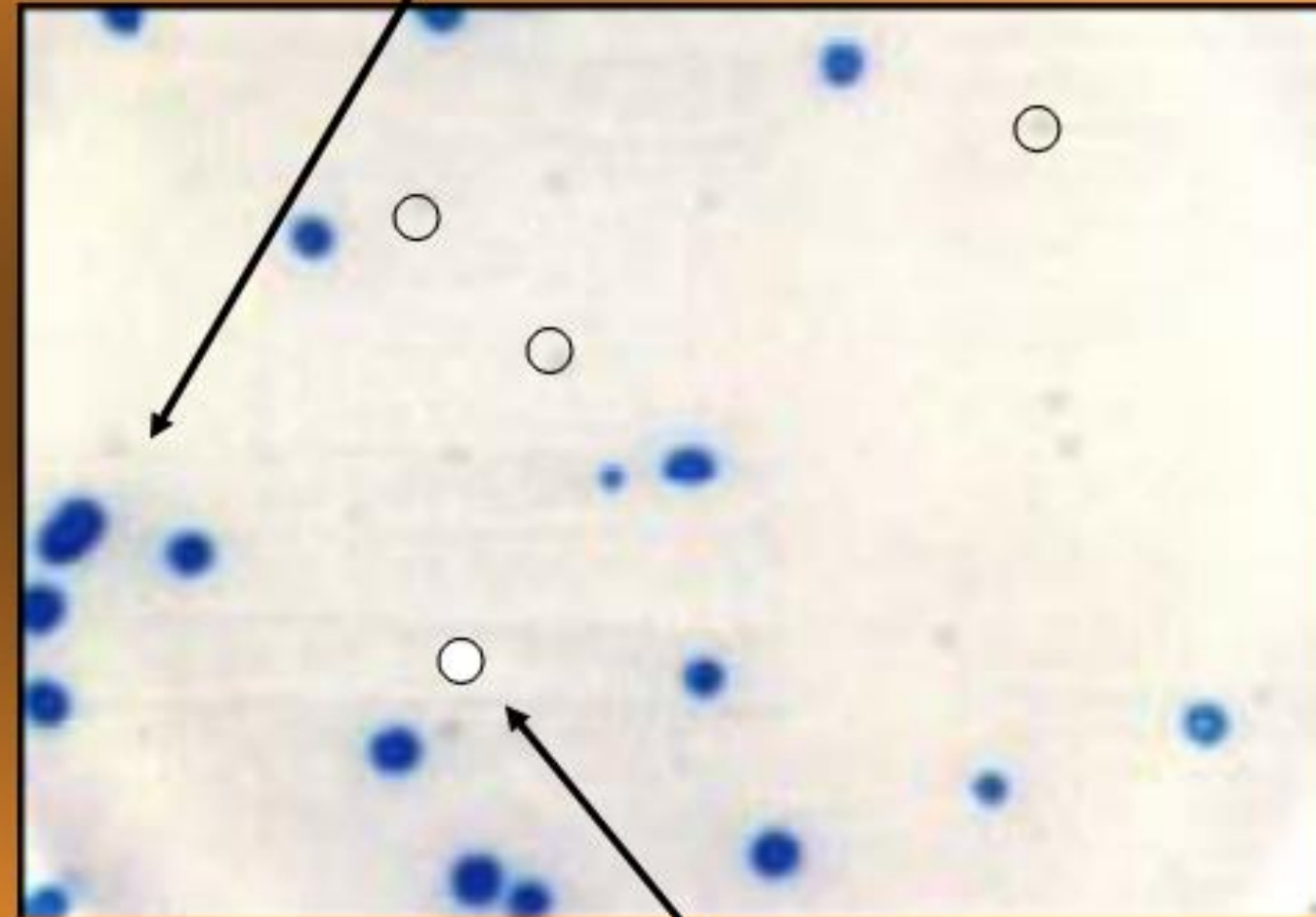


- Po okužbi s fagom bodo bakterije postale *Lac Z*⁺ in bodo torej proizvajale β -galaktosidazo.
- Z uporabo ustreznega indikatorja, ki se obarva modro v prisotnosti β -galaktosidaze, evidentiramo plake *Lac Z*⁺ (v katerih so rekombinantni fagi).

**MODRI PLAKI =
REKOMBINANTNI FAGI**

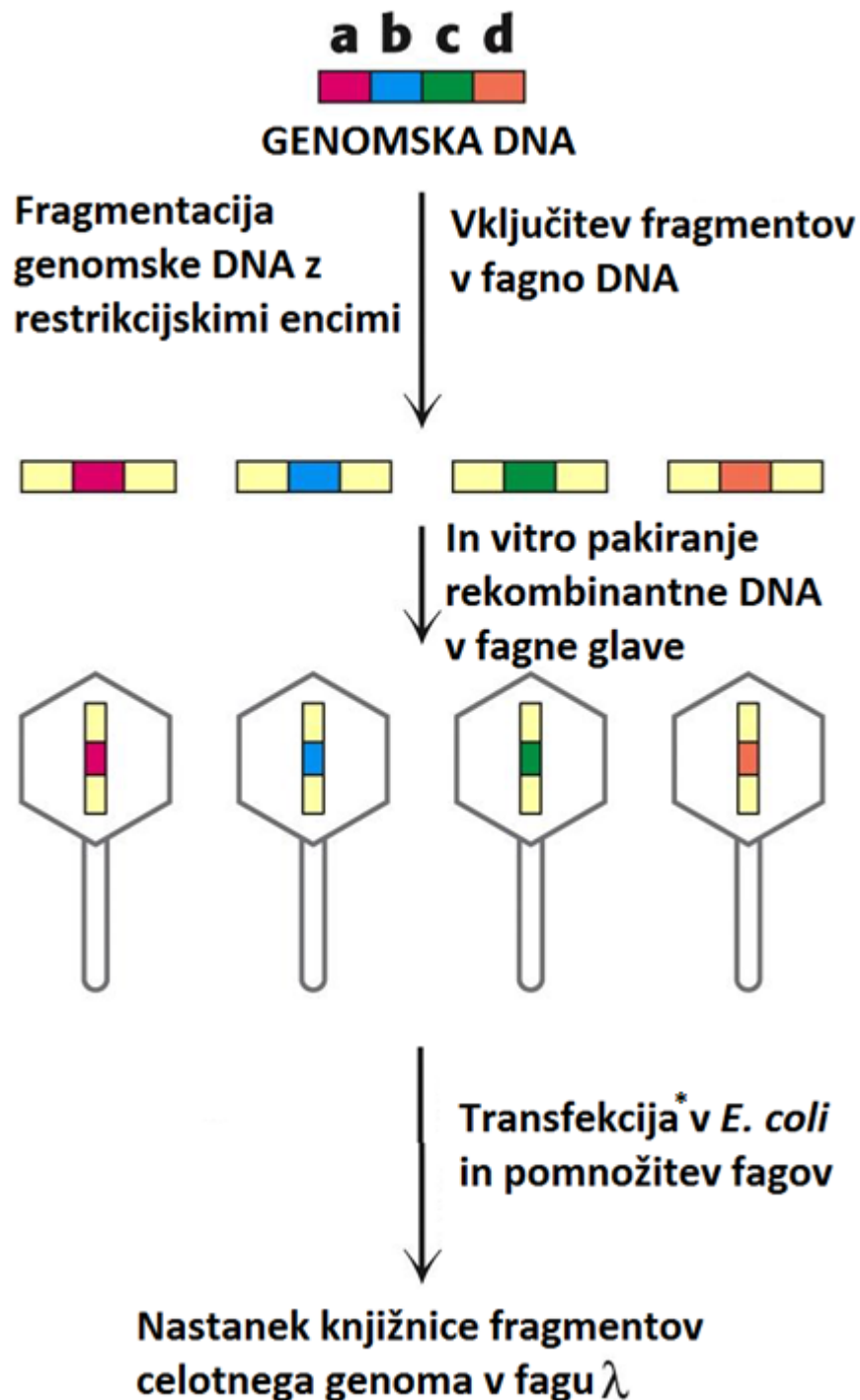
**BELI PLAKI =
NEREKOMBINANTNI FAGI**

**DNA IZOLIRAMO IZ MODRIH
PLAKOV.
BELI PLAKI NE VSEBUJEJO
INSERTA.**



Modri plaki (LacZ+)

Beli plaki (LacZ-)



Ustvarjanje knjižnice fragmentov celotnega genoma

- Z uporabo bakteriofagnih vektorjev lahko ustvarimo knjižnico fragmentov celotnega genoma nekega organizma. Postopek:
 1. Z restrikcijskimi endonukleazami **razrežemo genomsko DNA na več 1000 fragmentov** – naključna populacija fragmentov.
 2. Z **gelsko elektroforezo ločimo** fragmente **po velikosti**. Za evidentiranje fragmentov agarozni **gel obarvamo**.
 3. Iz gela **izrežemo posamezne frakcije** in jih **izoliramo**.
 4. **Fragmente** ustreznih velikosti (cca.15kb) **vstavimo v bakteriofagno DNA**.
 5. Vstop fagov v bakterije.
 6. ***Transfekcija** (=vključitev tujega gena) v bakterije.
 7. Pomnožitev fagov.
 8. Nastanek knjižnice fragmentov celotnega genoma v fagu.

Gelska elektroforeza

- Gelska elektroforeza je postopek, s katerim ločimo molekule DNA po velikosti.
- Elektroforeza temelji na dejstvu, da v električnem polju električno nabiti delci potujejo proti polu z nasprotnim nabojem.
- V vodnem okolju imajo molekule DNA negativni naboj, saj vsebujejo veliko negativno nabitih fosfatnih skupin.
- Zato molekule DNA potujejo proti pozitivnemu polu.
- Fragmenti DNA se ločijo glede na molekulsko maso.
- Najmanjše molekule potujejo najhitreje in dosežejo pozitivni pol, največje molekule potujejo počasneje in ostanejo v bližini negativnega pola.

Gelska elektroforeza - postopek

- Najprej pripravimo agarozni* gel; to je pravokotna ploščica s posebnimi vdolbinami (žepki), v katere lahko vnesemo vzorec.

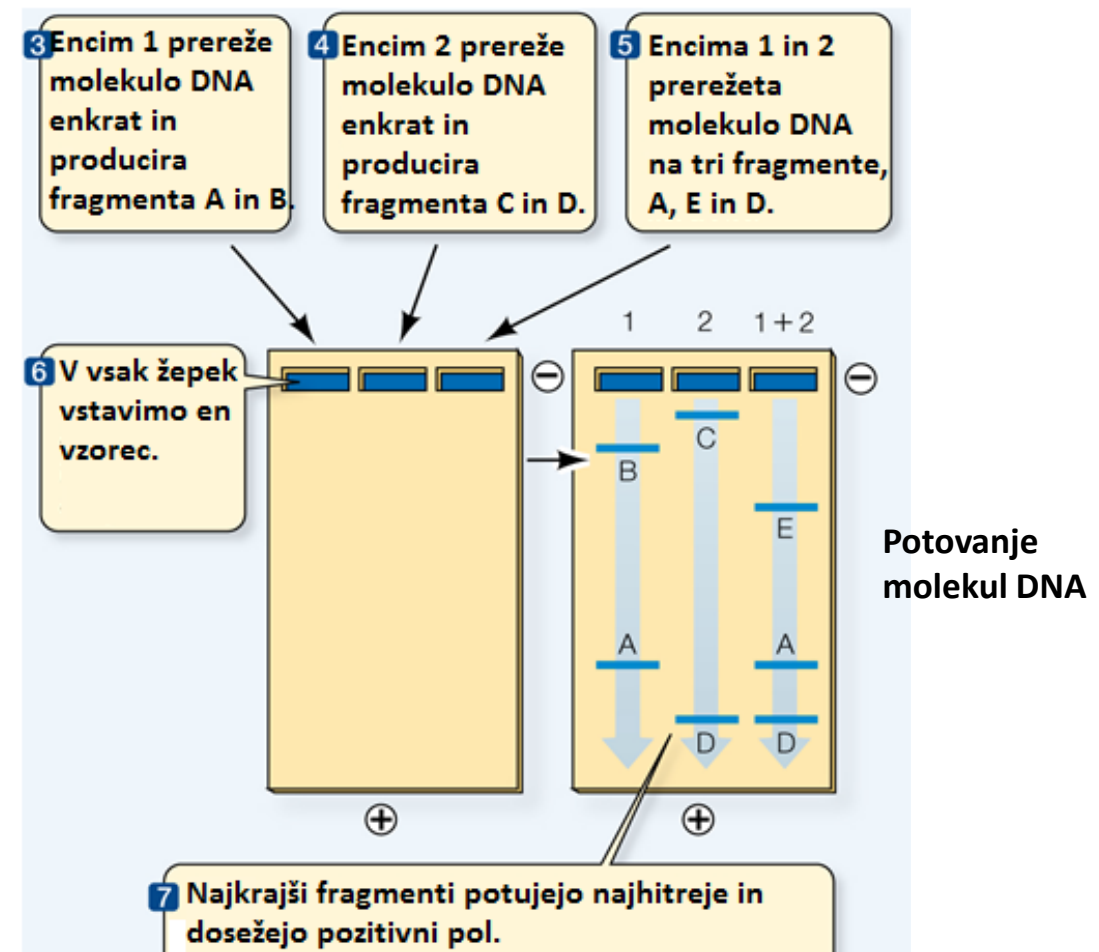
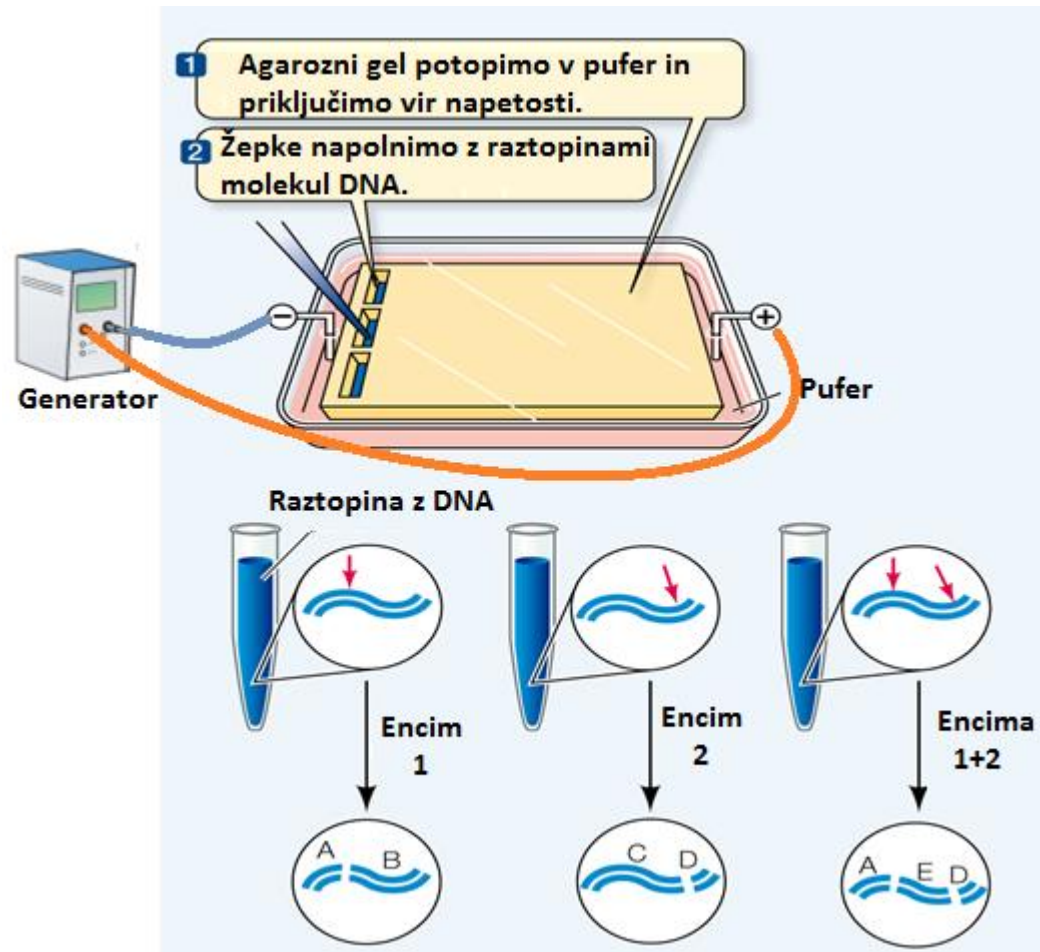
*Agaroza je polisaharid, ki ga pridobivamo iz alg.

- Gel potopimo v pufer, ki bo ohranjal negativne naboje na DNA.
- V žepke naneseemo vzorce z molekulami DNA.
- S priklopom na vir napetosti v gelu vzpostavimo električno polje.
- Negativni pol je pri vzorcih DNA, pozitivni pa na nasprotnem koncu gela.
- Negativno nabite molekule DNA začnejo potovati proti pozitivnemu polu.

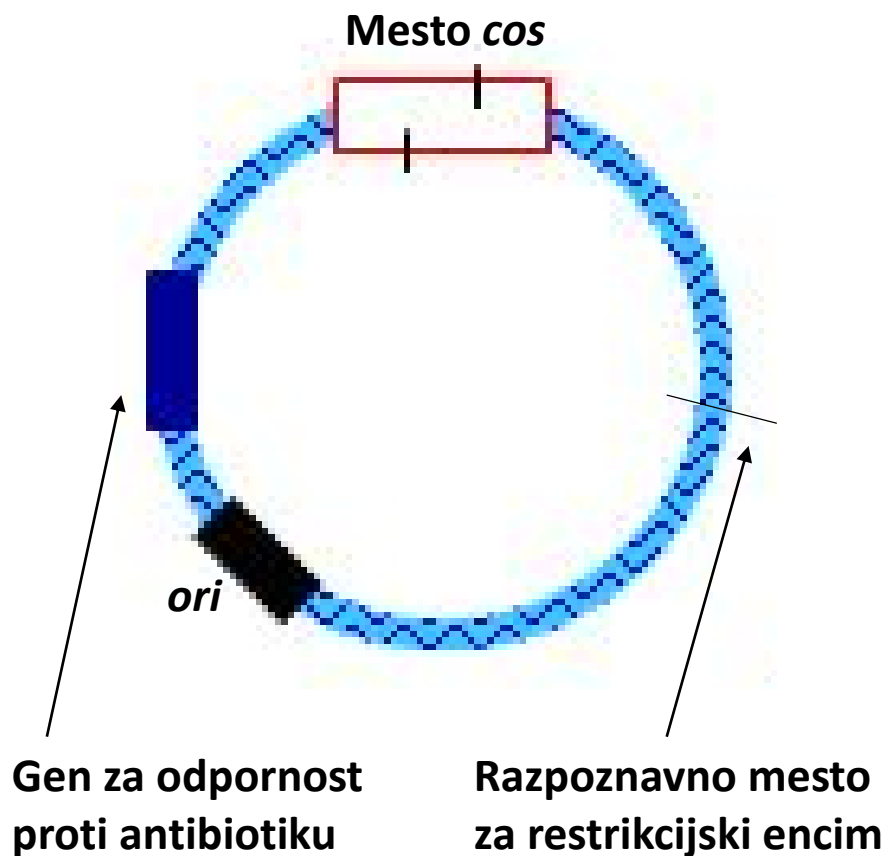
Gelska elektroforeza - postopek

- Molekule agaroze tvorijo gosto prepleteno mrežo.
- Mreža agaroze bolj ovira potovanje daljših molekul DNA, kot krajših.
- Zato daljše molekule DNA potujejo počasneje kot krajše.
- Molekule DNA se ločujejo po velikosti.
- Po določenem času vir napetosti izključimo.
- Ker so molekule DNA brezbarvne, jih moramo obarvati, da jih lahko vidimo.
- Skupek enako velikih molekul DNA vidimo kot podolgovato liso na gelu.

Gelska elektroforeza



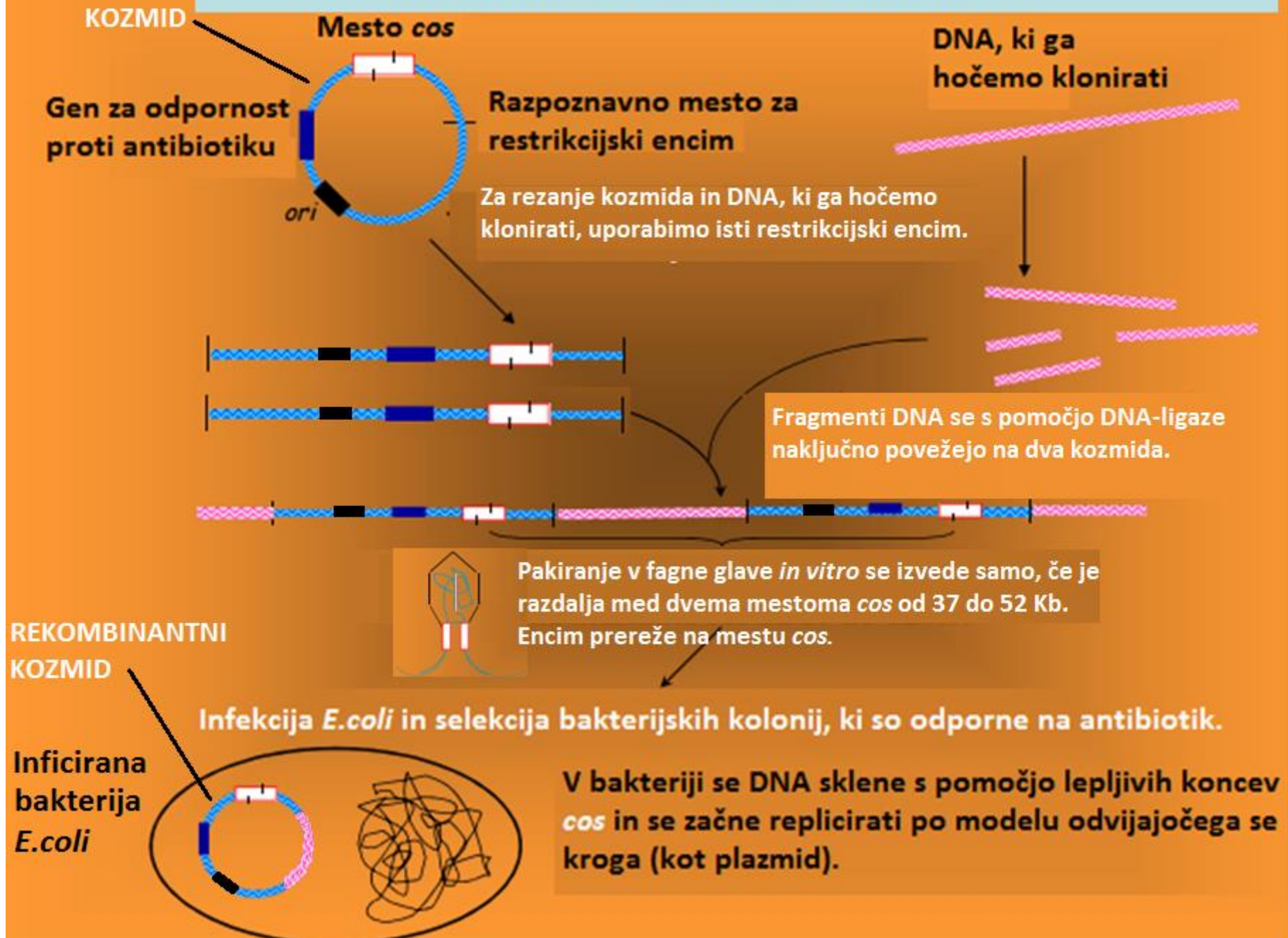
Kozmidi



KOZMID

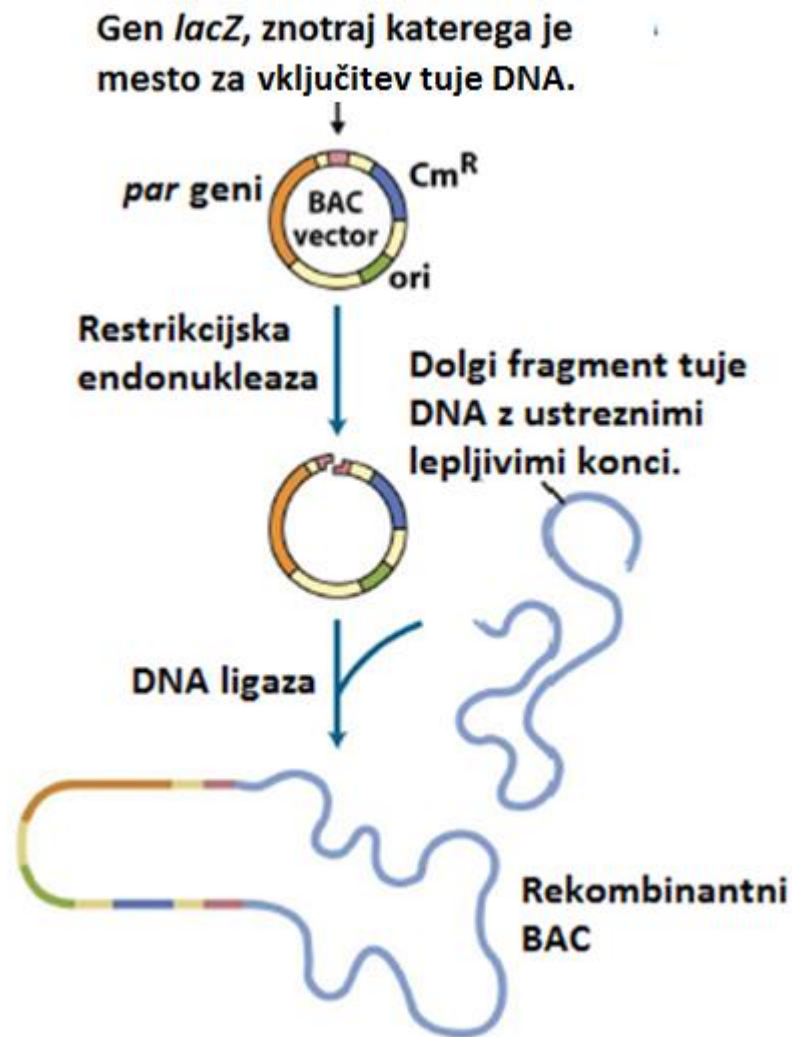
- Kozmidi so umetni **plazmidi**, primerni za **kloniranje** **dolgi** fragmentov evkariontske DNA.
- Kozmidi imajo značilnosti **plazmidov** in **bakteriofagov**.
- Zgradimo jih tako, da **v plazmid vcepimo** lokus ***cos* faga λ** , (\rightarrow "cosmid"), ki omogoči pakiranje kozmida v kapsido.
- **Kozmidno DNA** je zato možno **obdati s fagovim ovojem *in vitro***.
- Take fage lahko uporabimo za **transfekcijo** (=vključitev tujega gena) v ***E. coli***.
- **Prednost** uporabe faga je tudi ta, da so **fagi veliko stabilnejši od plazmidov**: v njih lahko ohranimo rekombinantno DNA za dolga obdobja (genoteka ali genomsko knjižnica).

KLONIRANJE DNA Z UPORABO KOZMIDOV



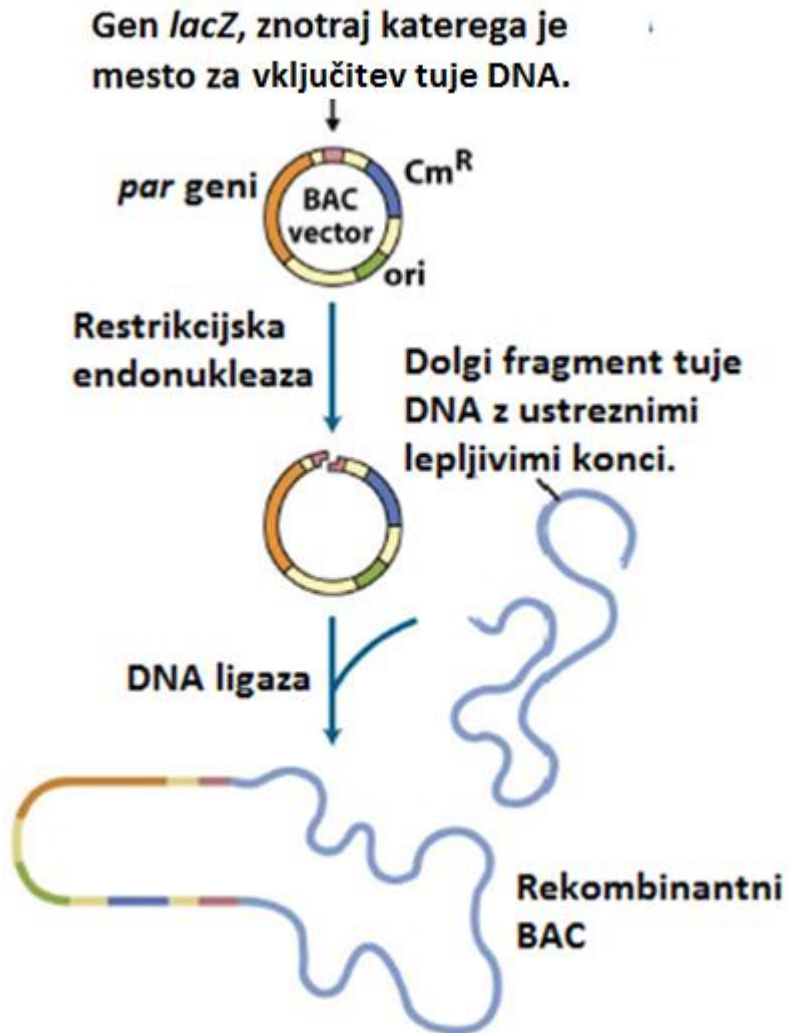
Bakterijski umetni kromosom - BAC

(*Bacterial Artificial Chromosome*)



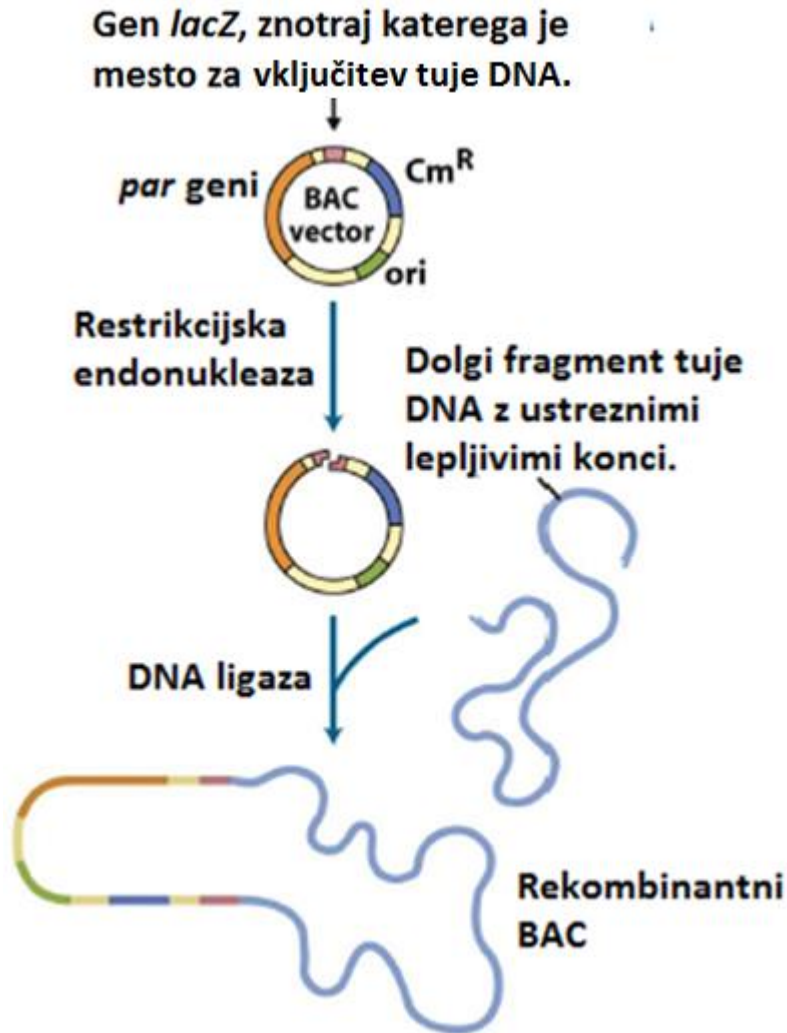
- BAC je sintetični vektor, prirejen za **vnos dolgih fragmentov DNA –100.000 do 300.000 bp.**
- BAC vsebuje:
 - mesto ***ori***, ki omogoča **replikacijo v bakterijah.**
 - ***par* gene**, ki so normalno prisotni v plazmidu F bakterije E.coli in omogočajo **enakomerno porazdelitev plazmidov med hčerinski celici pri delitvi.**
 - ***Cm^R***–zapis za **rezistenco za kloramfenikol.**
 - ***lac Z***– gen za **β -galaktosidazo**, ki omogoča **selekcijo rekombinantnih bakterij.**
 - Znotraj gena *lac Z* je mesto za vključitev tuje DNA.

Kloniranje z bakterijskim umetnim kromosomom - BAC



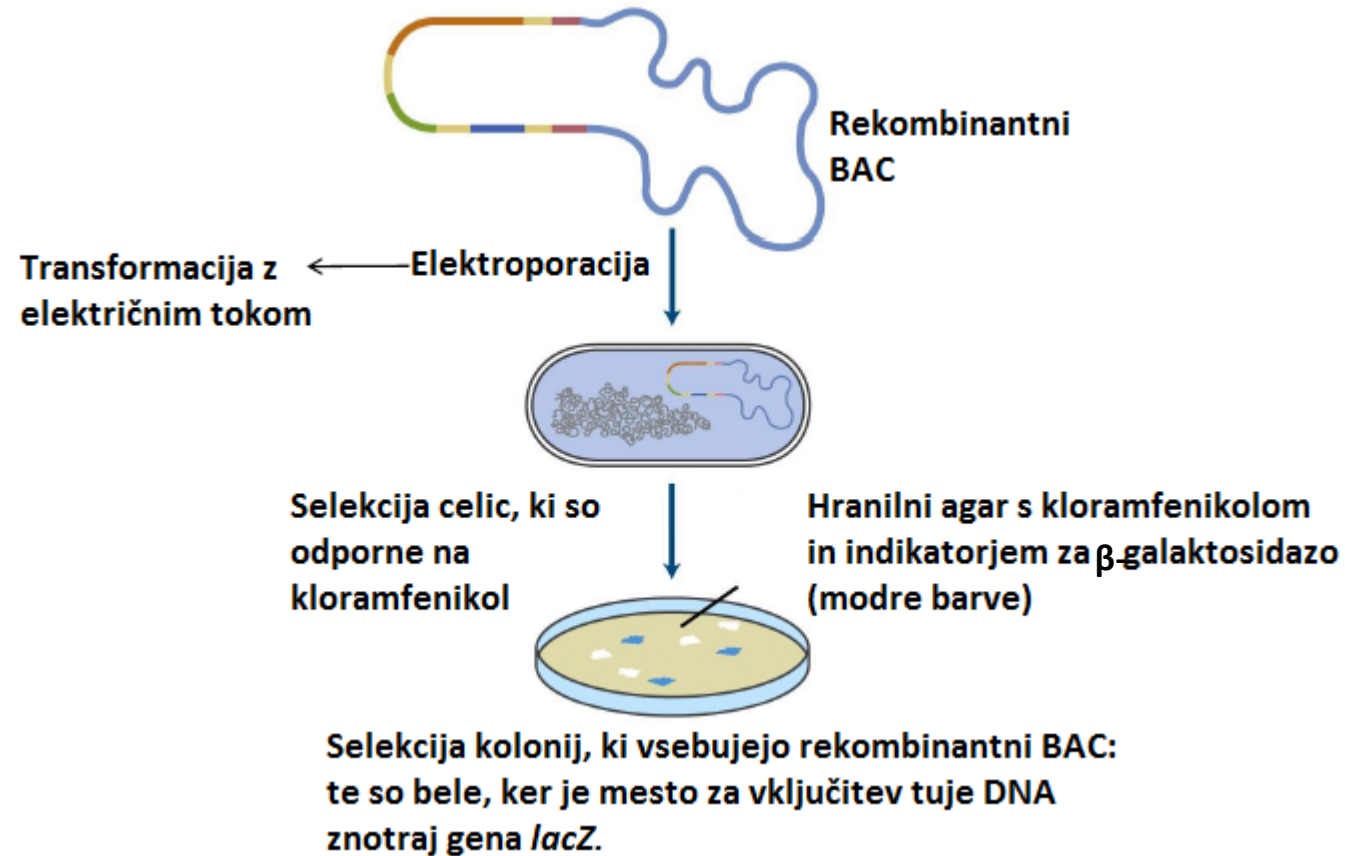
- V vektor BAC (znotraj gena *lac Z*) vključimo fragment DNA, ki ga hočemo klonirati. Dobimo rekombinantni BAC.
- Z elektroporacijo vključimo rekombinantni BAC v kolonijo bakterij.
- Bakterije morajo biti:
 - *Lac Z⁻* (nesposobne metabolizirati laktozo, ker ne proizvajajo encima β -galaktosidaze);
 - *Cm^r* (občutljive na kloramfenikol).
- Zlijemo suspenzijo bakterij v petrijevko s hranilnim agarjem, s kloramfenikolom in z indikatorjem za β -galaktosidazo.

Kloniranje z bakterijskim umetnim kromosomom - BAC

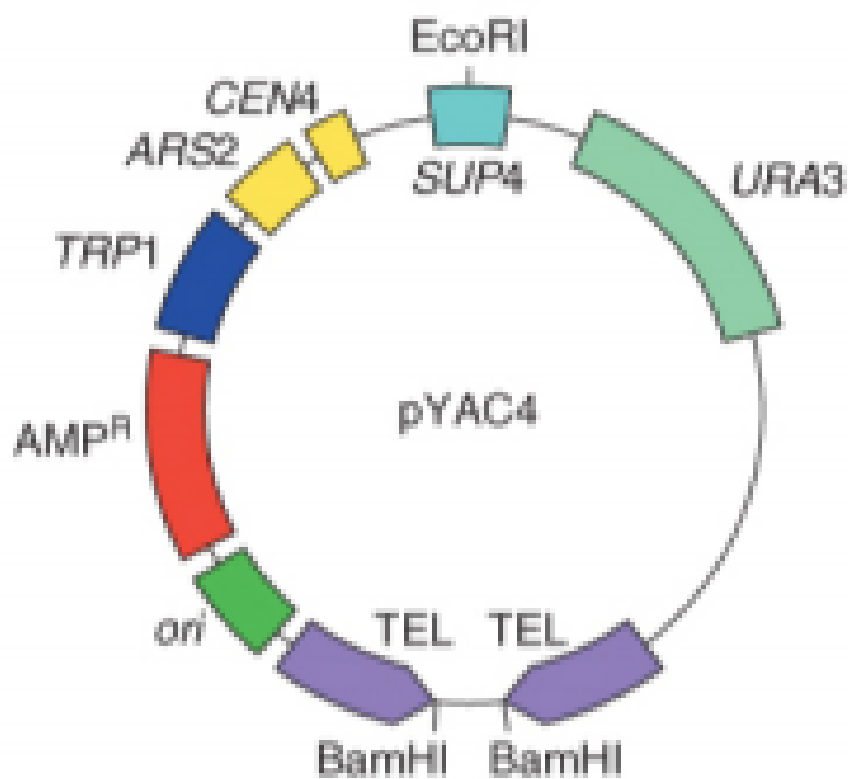


- Bakterije, v katere se BAC ni vključil, ne preživijo v prisotnosti kloramfenikola.
- Bakterije, v katere se je vključil samo fragment DNA, tudi ne preživijo v prisotnosti kloramfenikola.
- Preživita samo 2 vrsti bakterijskih kolonij:
 - Bakterije, v katere se je vključil BAC brez fragmenta DNA, preživijo in so modre barve, ker gen *lacZ* ni bil prekinjen.
 - Bakterije, v katere se je vključil rekombinantni BAC, preživijo in so bele barve, ker je bil gen *lacZ* prekinjen.

Bakterijski umetni kromosom - BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)_β



Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



- Med vsemi vektorji lahko **YAC sprejme najdaljše fragmente DNA (nad 1.000.000 bp)**, kar je zelo pripravno za **kloniranje človeškega genoma**, vendar je njegova **spodobnost transformacije** v kvasovke **zelo nizka**.
- Druga **pomanjkljivost** je ta, da je **vektorje YAC težko manipulirati**, ker so **zelo labilni** in v gostitelju **težijo k rekombinaciji**.
- Vektorji YAC **se razmnožujejo** bodisi v **bakterijah**, kot v **kvasovkah**.
- **Ohranjamo** jih v bakterijah ***E.coli***.

Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)

- Rekombinantni YAC kloniramo:

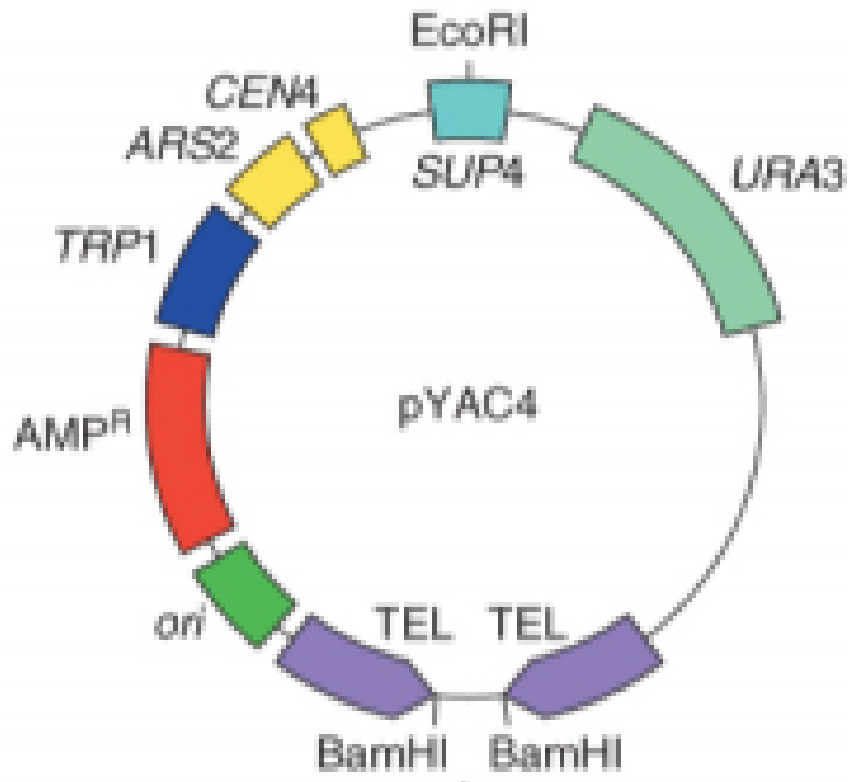
- v bakterijah z mutacijo *amp^r* (niso odporne na ampicilin);

- v kvasovkah s sledečimi mutacijami:

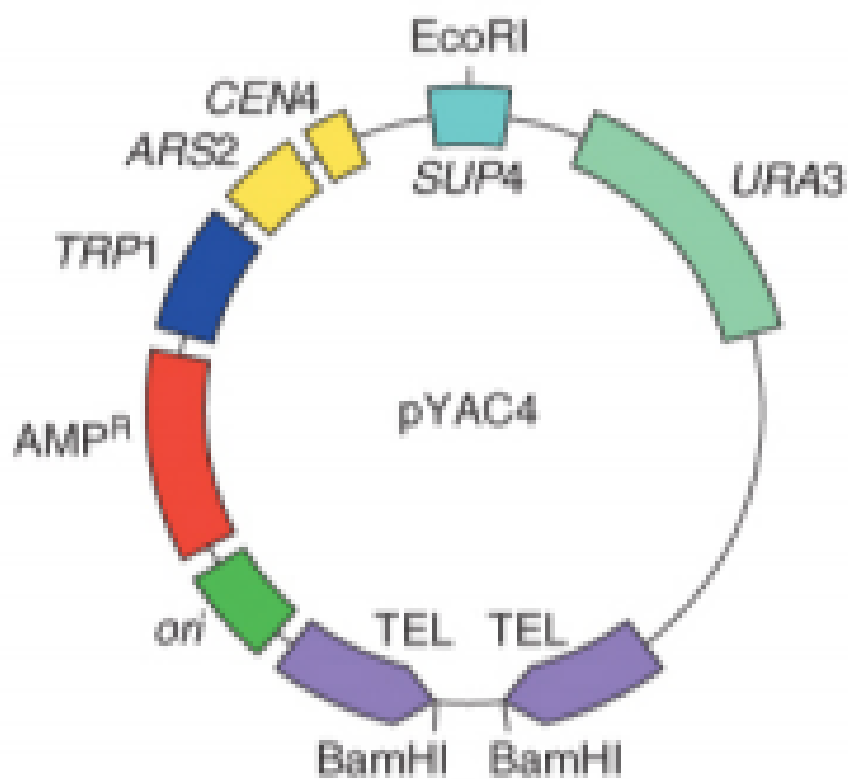
- *Trp⁻* (niso sposobne sintetizirati triptofana);

- *Ura⁻* (niso sposobne sintetizirati uracila);

- *Ade⁻* (niso sposobne sintetizirati adenina in so rdeče).

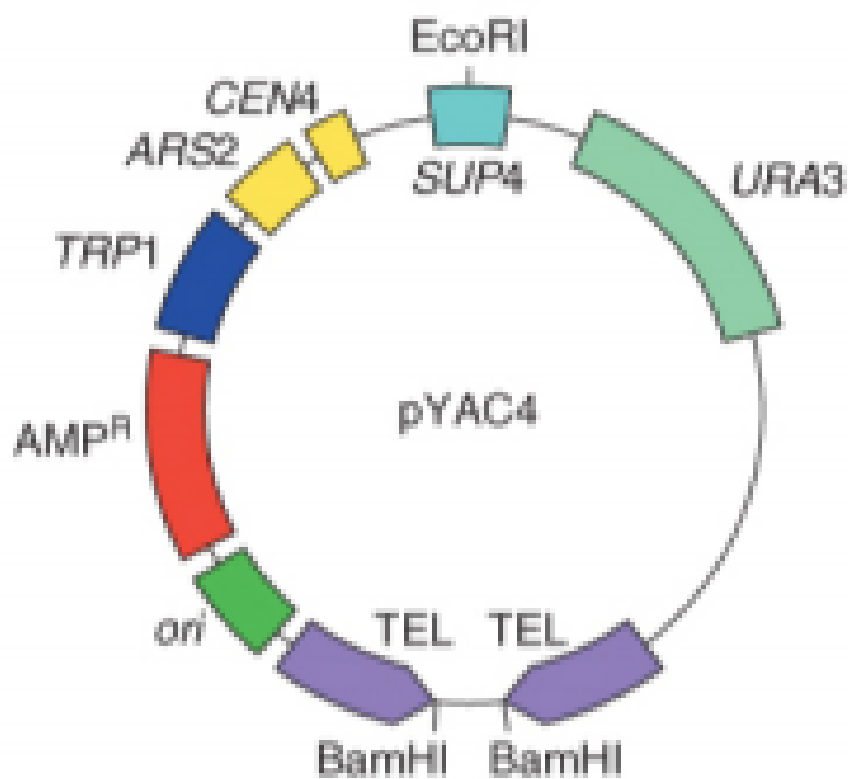


Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



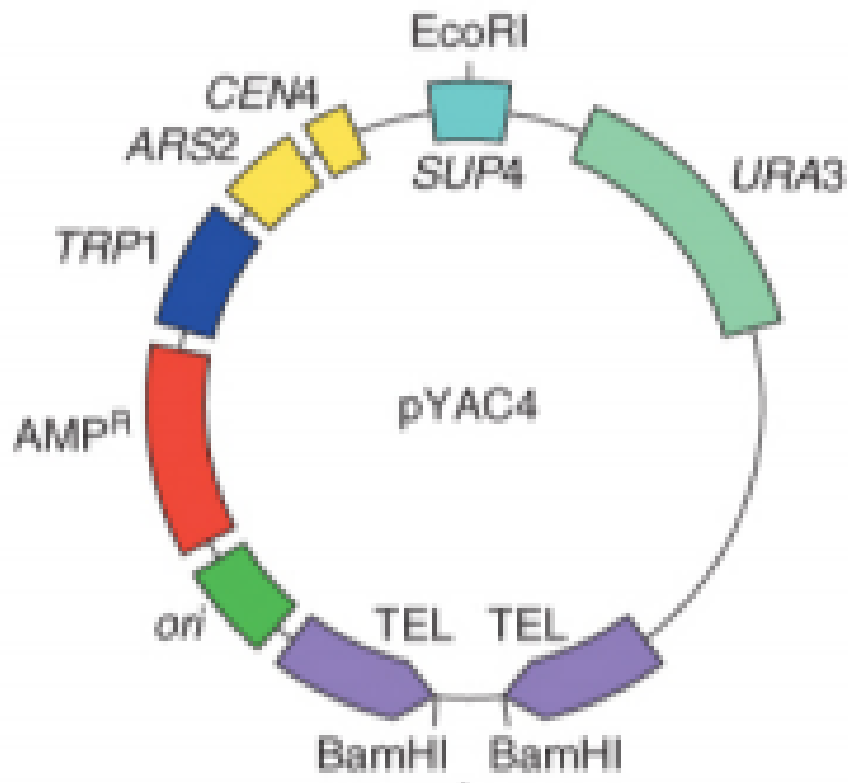
- Umetni kromosom YAC ima **značilnosti**, ki so skupne vsem **evkariontskim kromosomom** in sicer:
 - **2 telomera (TEL)**, ki stabilizirata vektor
 - **centromer (CEN)**, ki omogoča pravilno ločevanje vektorja med mitozo
 - **izhodišče za replikacijo (ARS)**.

Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



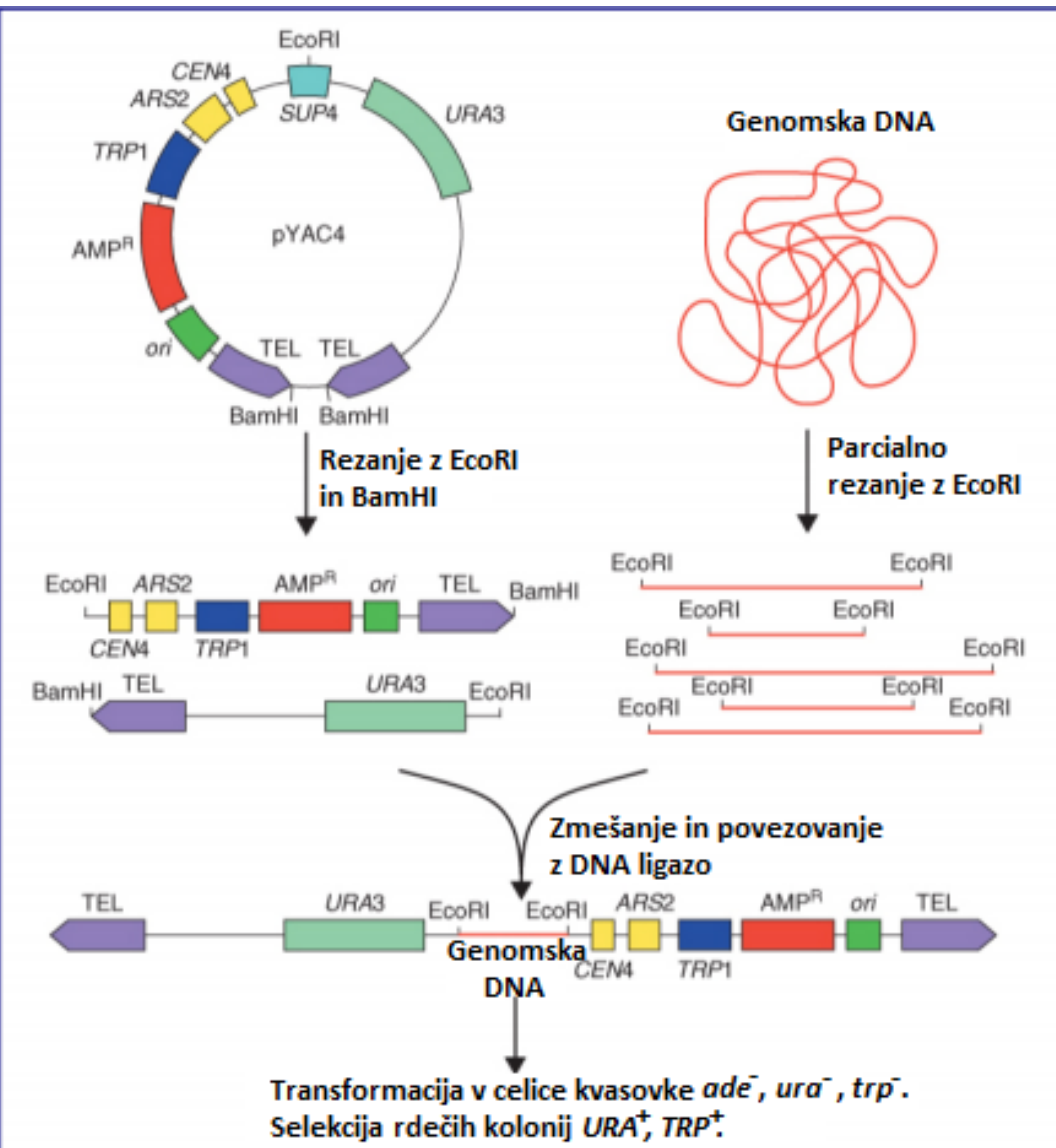
- Ostale značilnosti:
 - Eno prepoznavno mesto za **EcoRI** in dve mesti za **BamHI**.
 - Mesto **ori**, ki omogoča **replikacijo v bakterijah**.
 - **AMP**: gen za **odpornost proti ampicilinu** (genski marker za **selekcijo rekombinantnih bakterij**).
 - **TRP, URA, SUP**: **genski markerji** za selekcijo **rekombinantnih celic kvasovk**.

Umetni kromosom kvasovke – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)



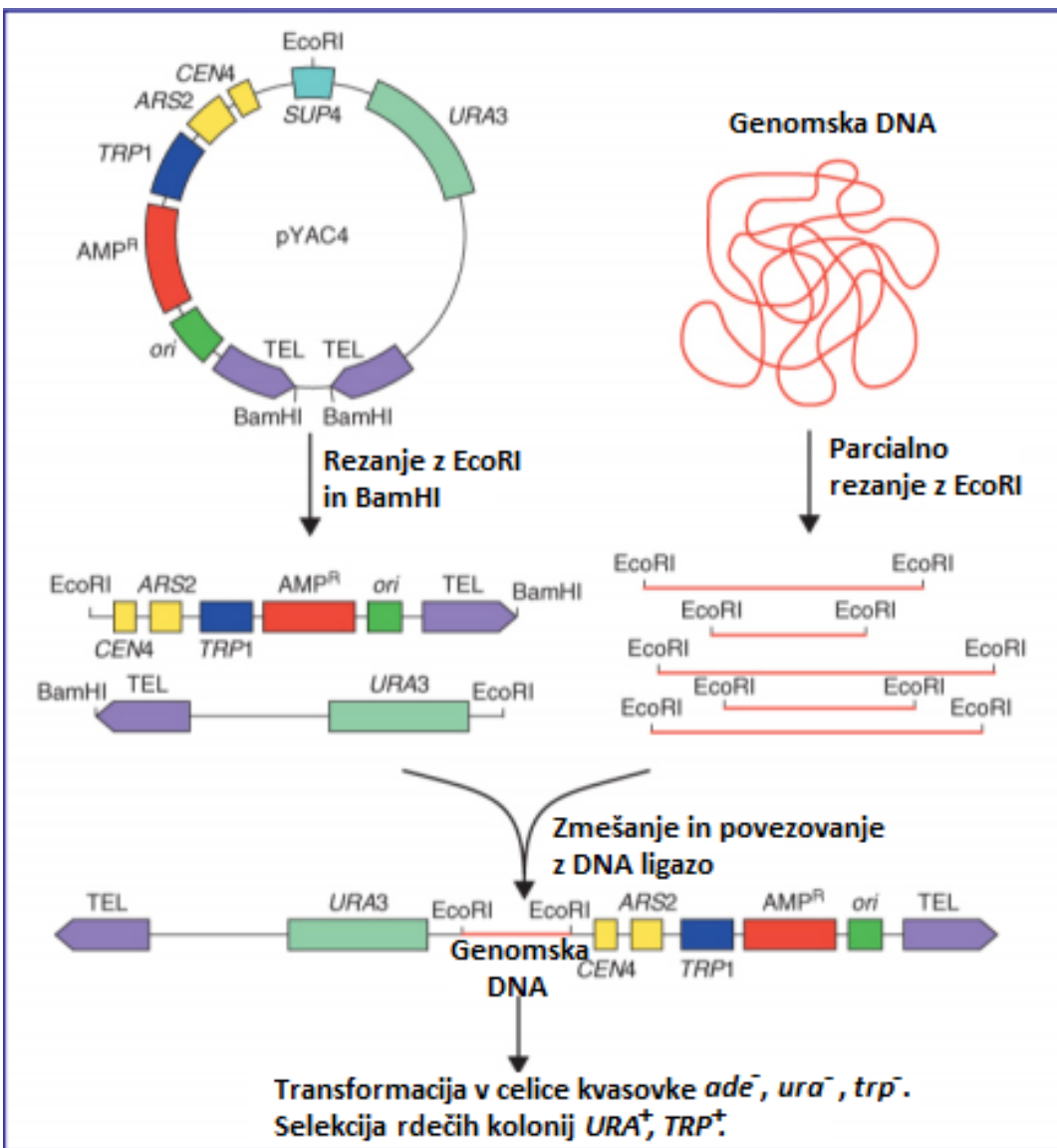
- Gen **TRP** omogoča biosintezo triptofana v kvasovkah *trp⁻*.
- Gen **URA** omogoča biosintezo uracila v kvasovkah *ura⁻*.
- Gen **SUP** prepreči tvorbo rdečega barvila, zato so v njegovi prisotnosti kolonije bele barve.

Postopek kloniranja z vektorjem YAC



1. **Parcialno rezanje** genomske **DNA** z encimom **EcoRI**.
2. **Ločitev dveh vej** vektorja **YAC** z encimoma **EcoRI** in **BamHI**.
 - Na **eni veji** je gen **TRP**, ki omogoča biosintezo **triptofana**.
 - Na **drugi veji** je gen **URA**, ki omogoča biosintezo **uracila**.
3. **Vezava obeh vej** vektorja z insertom genomske DNA (**DNA ligaza**).

Postopek kloniranja z vektorjem YAC



3. Transformacija v kvasovke *ade⁻*, *ura⁻*, *trp⁻* na terenu brez uracila in triptofana.

4. **Selekcija** rekombinantnih kvasovk:

- Kolonije kvasovk, ki vsebujejo **kompleten vektor** (obe veji, z genomsko DNA v sredini) **so rdeče** barve (ker se gen SUP inaktivira zaradi vključitve genomске DNA) in **preživijo v terenu brez uracila in triptofana**.
- (Kolonije kvasovk, ki vsebujejo vektor YAC brez genomске DNA tudi preživijo, vendar so bele, ker je ostal gen SUP cel).

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

- V nekaterih genetskih raziskavah ali v sodni medicini imamo ponavadi na razpolago zelo majhne količine DNA, npr. dedni material ene same celice, človeškega lasu, biopsiranega tkiva itd.
- **Verižna reakcija s polimerazo (PCR) omogoča pomnoževanje *in vitro* določenega zaporedja DNA, ki ga hočemo analizirati.**
- S tem **ga** dejansko **ojačamo** in ga **lažje določimo** ali **kloniramo**.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

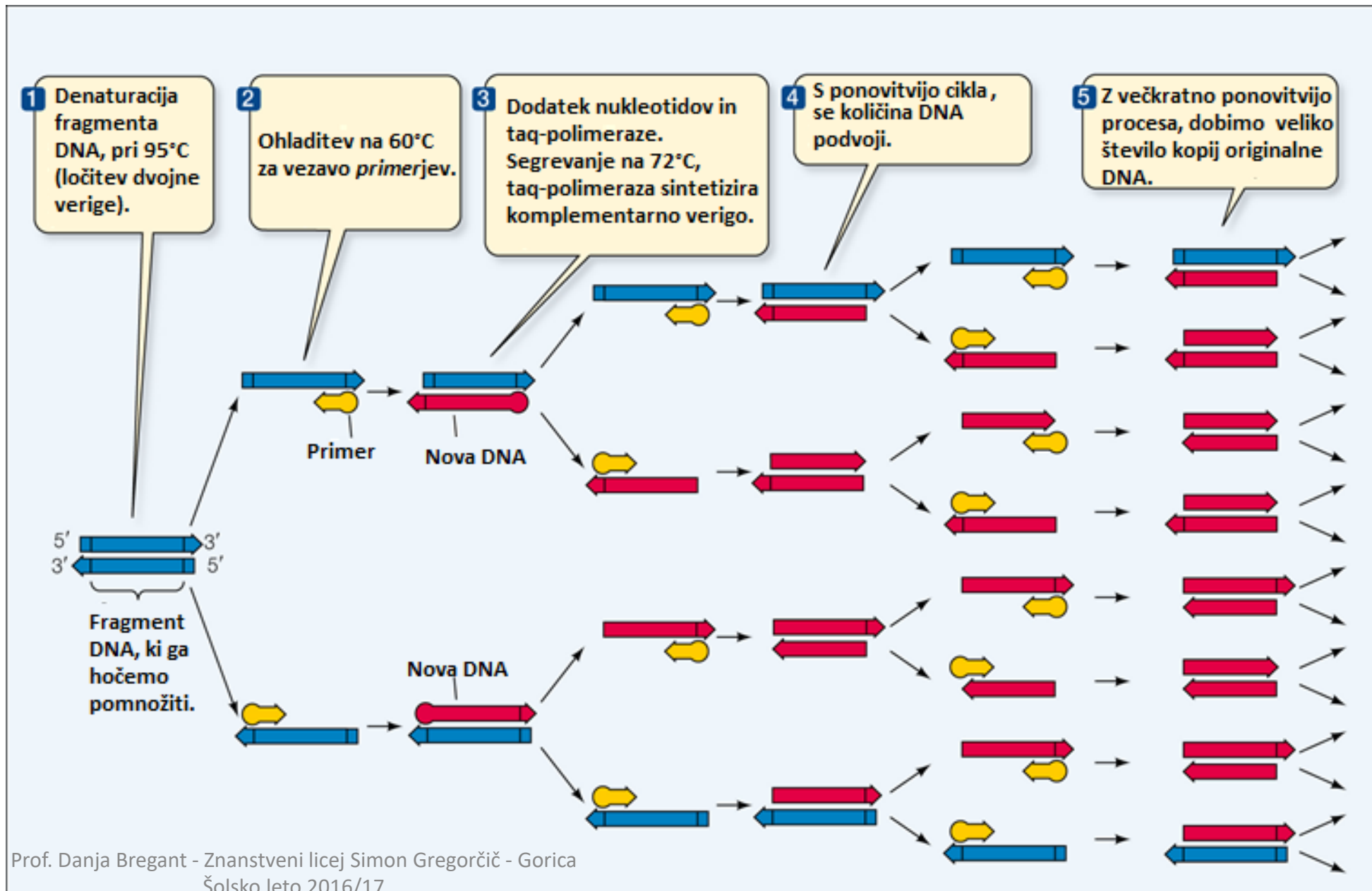
Nobelova nagrada 1993: ameriški biokemik Kary Mullis

- V verižni reakciji s polimerazo (PCR) se **ciklično ponavljajo** sledeče **3 stopnje**:
 1. **Denaturacija** (=ločitev verig) izvirne **DNA**, ki jo želimo pomnožiti, pri **95 °C** (30 s).
 2. **Ohladitev na 50 – 65 °C** za **vezavo** dveh sintetičnih oligonukleotidov (**primer**) na mesto 5' vsakega fragmenta DNA.
 3. **Segrevanje na 72 °C**: **polimerizacija** DNA v smeri 5' – 3' (**1000 nukleotidov/min**).
- V 1-3 urah dobimo **milijardkratno pomnožitev DNA**.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

- Postopek je avtomatiziran, v reakcijo moramo poleg naštetih materialov dodati še **vse 4** deoksiribonukleozidtrifosfate **dNTP**, in sicer dATP, dGTP, dCTP in dTTP ter **ustrezen pufer**.
- Uporabiti moramo termostabilno **taq DNA polimerazo**.
 - Taq DNA polimeraza je značilna DNA polimeraza **termofilne bakterije *Thermus aquaticus*** in je **optimalno aktivna pri temperaturah 70-80°C**.

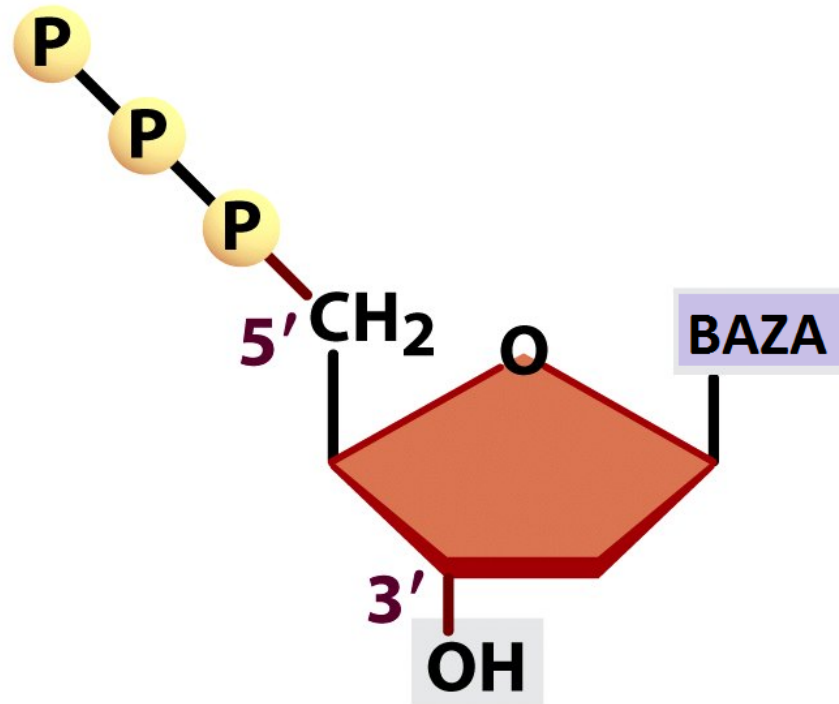
Verižna reakcija s polimerazo (PCR)



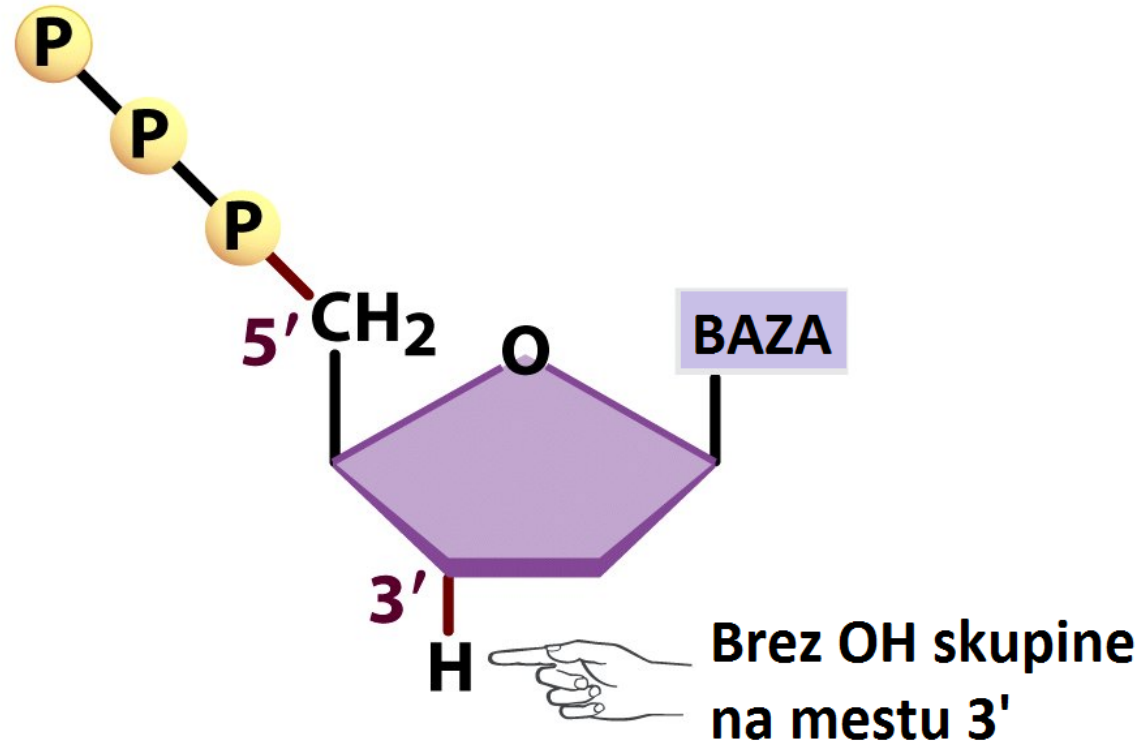
Določanje nukleotidnega zaporedja: Sangerjeva metoda

1. Pomnožimo fragment DNA z metodo PCR in ga denaturiramo (93-94°C).
2. Vzamemo 4 epruvete in jih označimo s črkami G, T, A, C.
3. V vsako epruveto damo denaturirani DNA, *primer*, nukleotide (dNTP) in DNA polimerazo.
 - V epruveto G dodamo še ddGTP (dideoksi G nukleotid)
 - V epruveto T dodamo še ddTTP (dideoksi T nukleotid)
 - V epruveto A dodamo še ddATP (dideoksi A nukleotid)
 - V epruveto C dodamo še ddCTP (dideoksi C nukleotid)
 - Razmerje med ddNTP in dNTP je 1 : 100.
 - Vsak ddNTP je markiran z različnim fluorokromom, molekulo, ki oddaja različno barvo fluorescentne svetlobe.

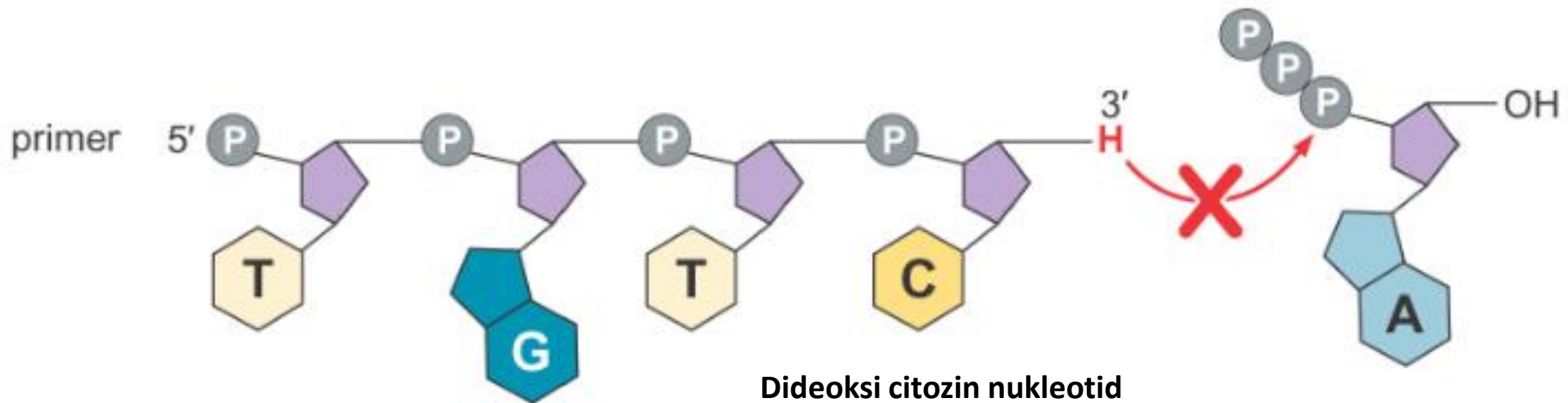
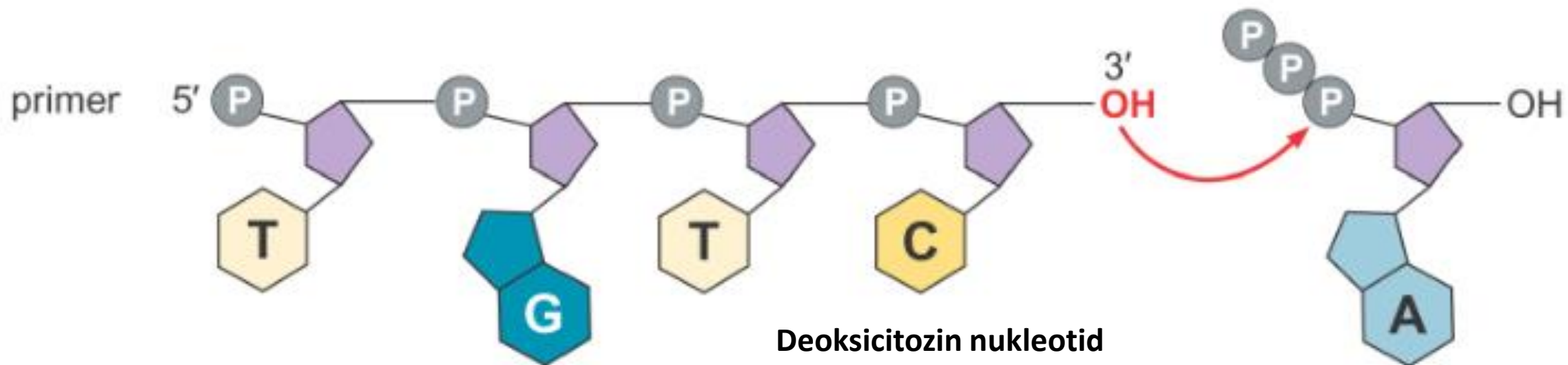
Nukleotid ddNTP onemogoča nadaljevanje sinteze DNA



**dNTP omogoča
podaljševanje
verige DNA**



**ddNTP onemogoča
podaljševanje
verige DNA**

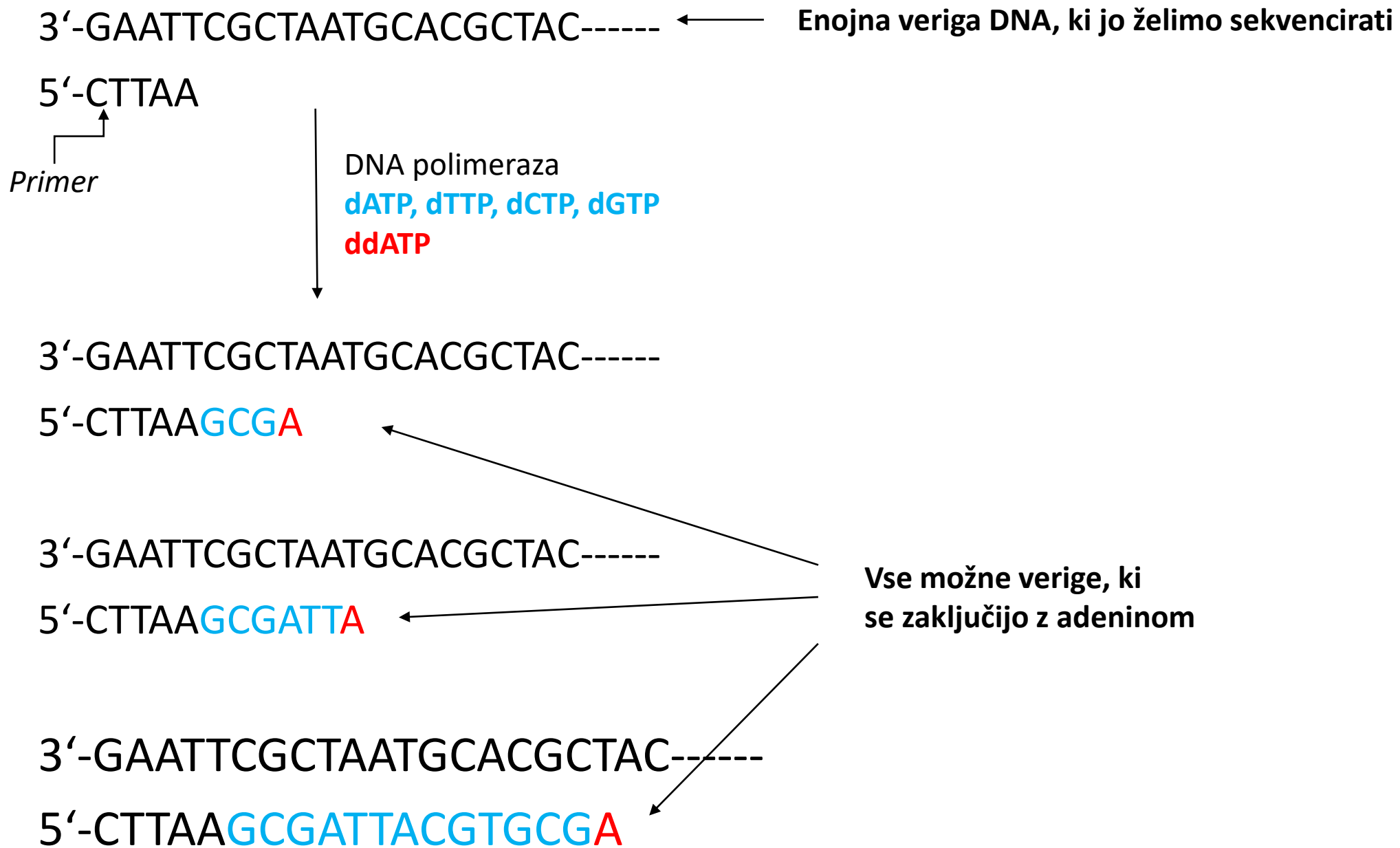


Določanje nukleotidnega zaporedja

Sangerjeva metoda

4. V vsaki epruveti se sintetizirajo različno dolgi fragmenti DNA: sinteza se prekine, ko se na verigo naključno poveže ddNTP, ki onemogoči vezavo naslednjega nukleotida.
- V epruveti G bodo nastali vsi možni fragmenti, ki se končajo z G.
 - V epruveti T bodo nastali vsi možni fragmenti, ki se končajo s T.
 - V epruveti A bodo nastali vsi možni fragmenti, ki se končajo z A.
 - V epruveti C bodo nastali vsi možni fragmenti, ki se končajo s C.

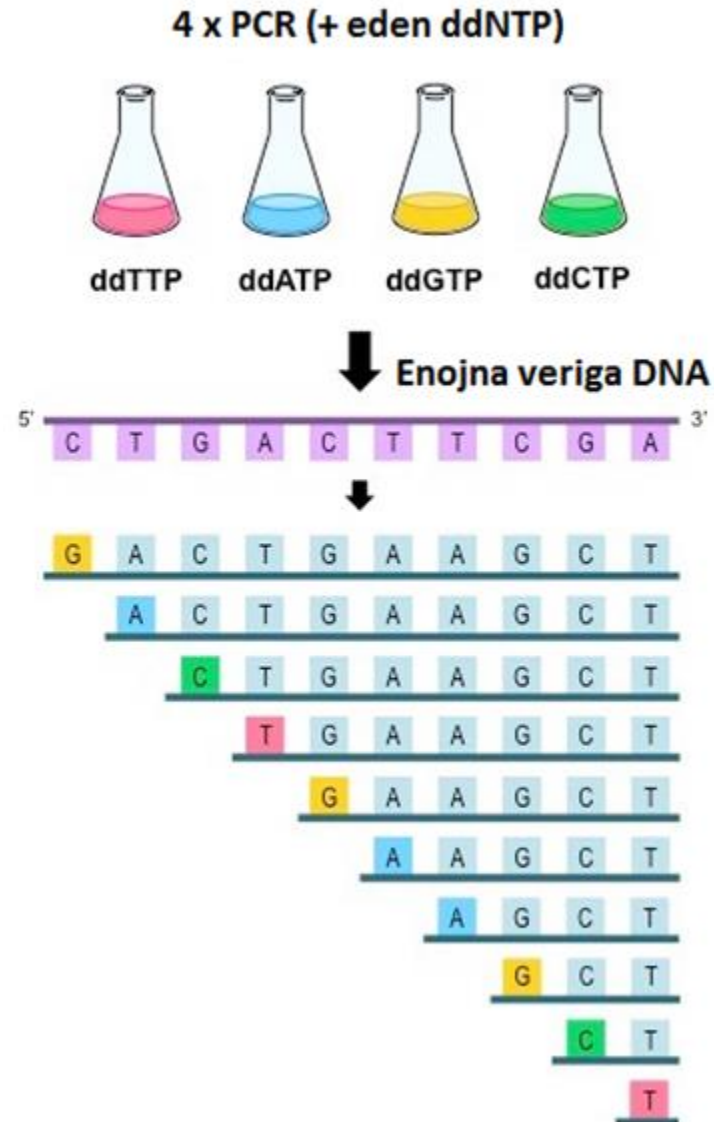
PRIMER SINTEZE FRAGMENTOV V EPRUVETI **A**



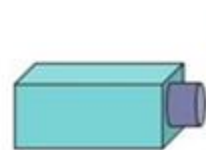
Določanje nukleotidnega zaporedja

Sangerjeva metoda

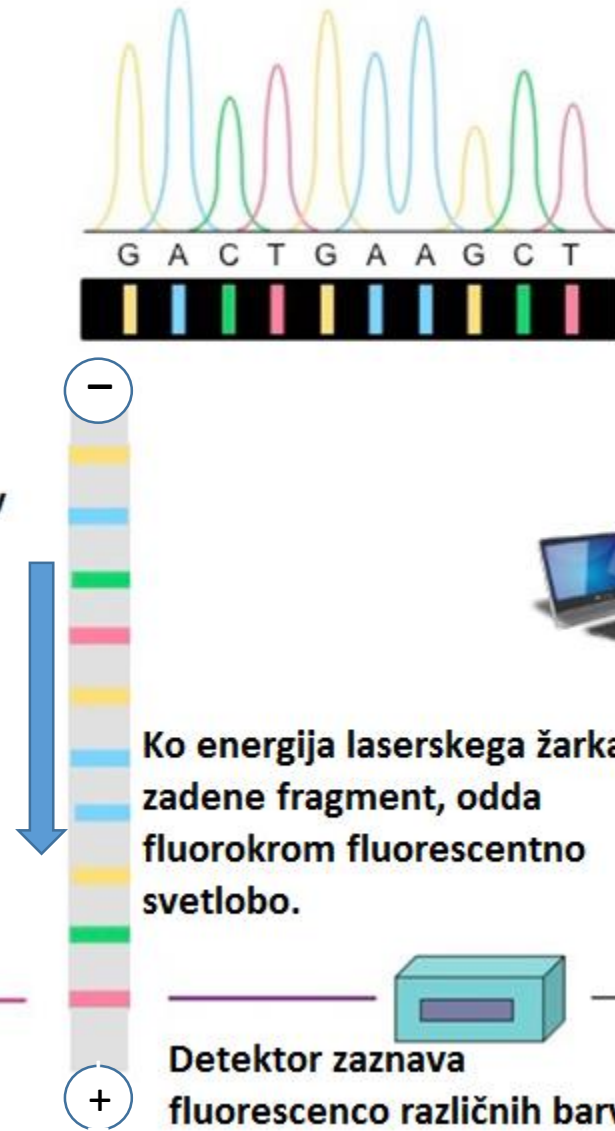
5. Pripravimo gel za elektroforezo in ga vstavimo v stekleno kapilaro.
6. Vse dobljene fragmente damo v kapilaro z gelom in izvedemo kapilarno elektroforezo. Fragmenti se bodo ločili po velikosti.



**Ločevanje fragmentov
po velikosti s
kapilarno gelsko
elektroforezo**



**Laserski
žarek**



**Računalnik pretvori
sosledico barv v
kromatogram.**

Aparatura za PCR



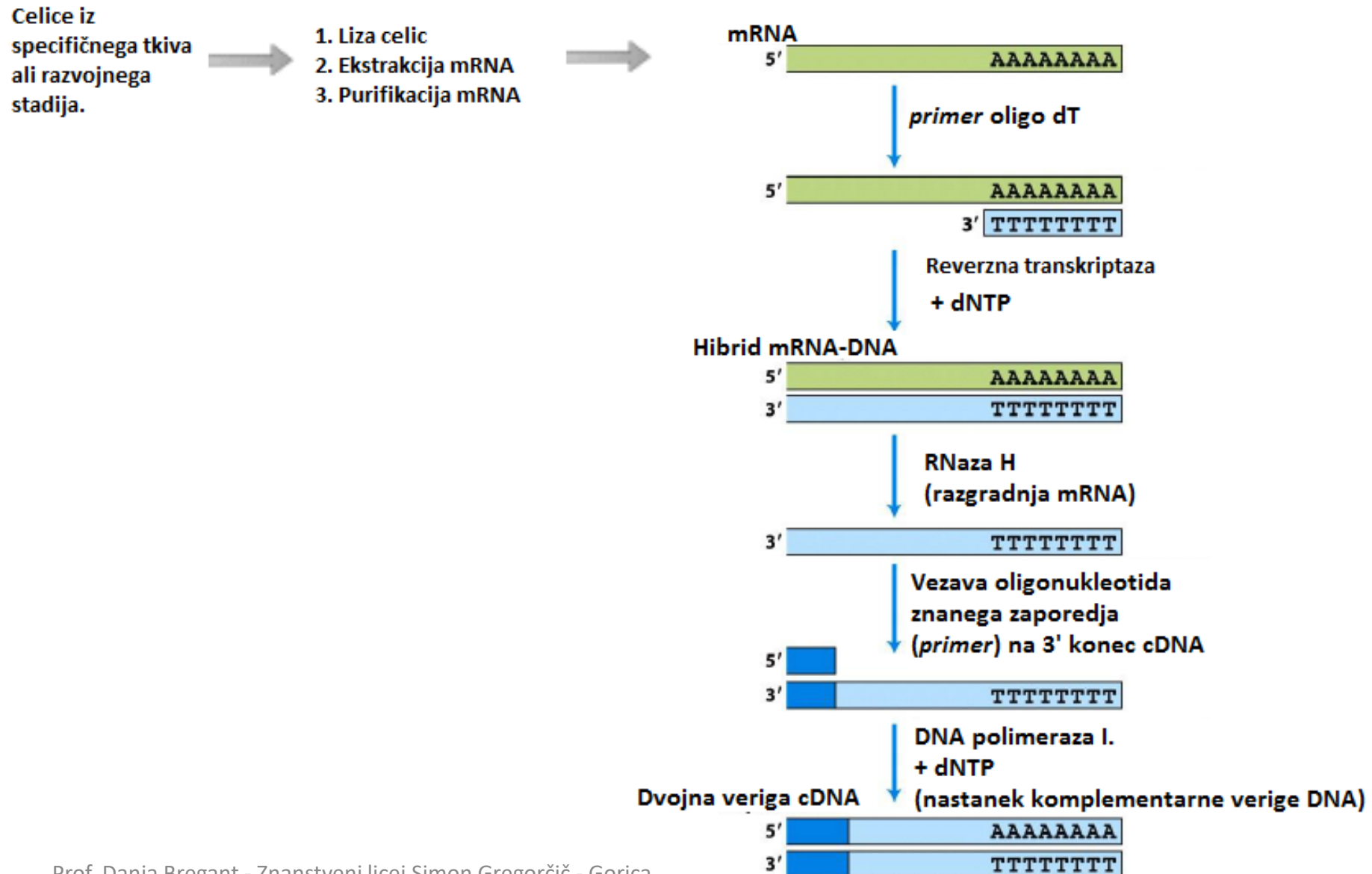
cDNA knjižnice

- **cDNA** molekule so molekule DNA, ki so komplementarne mRNA.
- **cDNA** molekule **ne vsebujejo intronov**, zato so **bolj uporabne** pri molekulskem kloniranju zapisov za proteine **kot genomska DNA**.
- **cDNA knjižnice** so **zbirke** molekul **cDNA** in so zelo **koristne** za ekspresijo **specifičnih genov posameznih tkiv**.

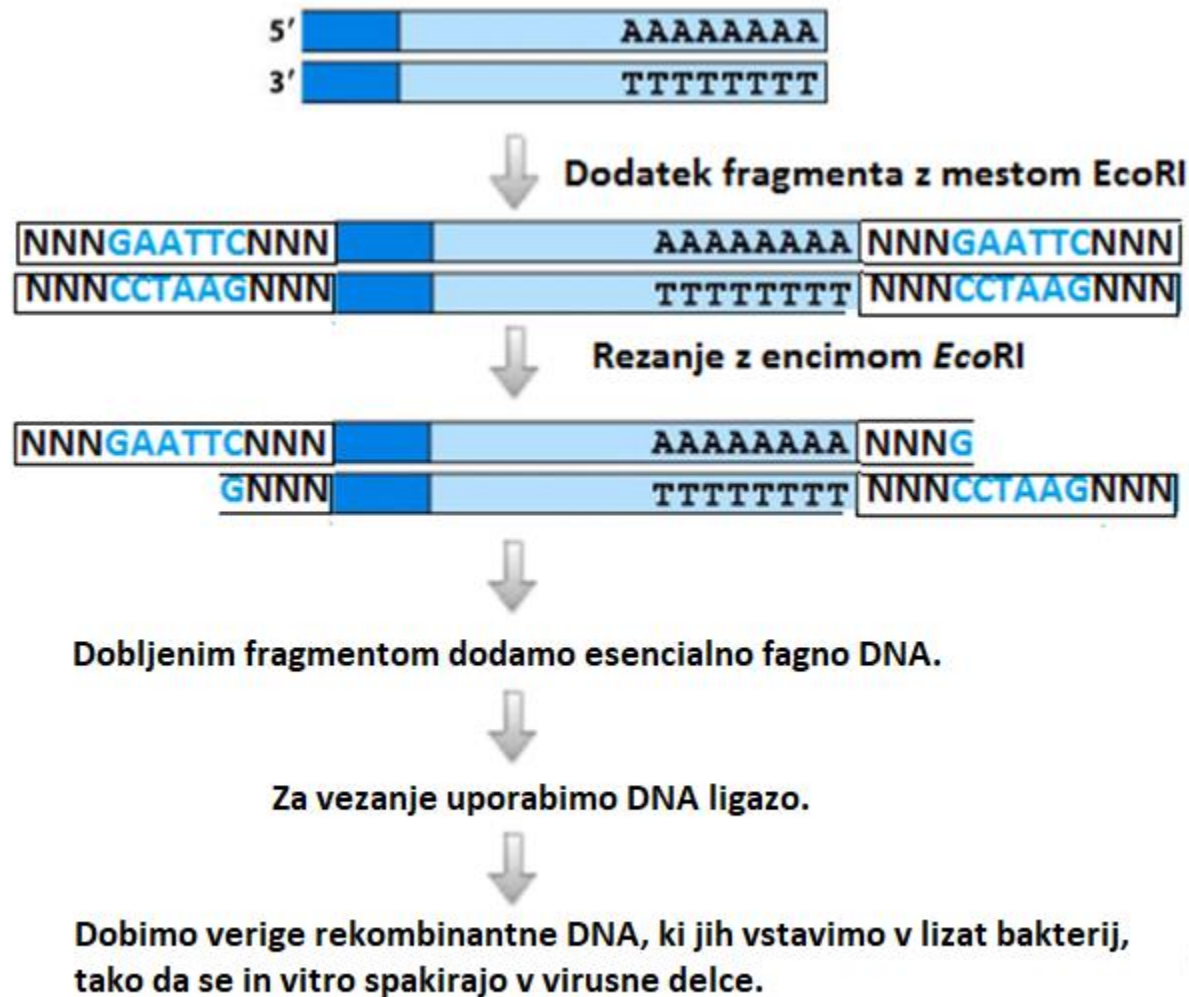
Sinteza cDNA

- Evkariontske mRNA se lahko ločijo od ostalih molekul RNA, ker imajo **rep poli A**.
- Da se RNA lahko prepíše v dvoverižno DNA, potrebujemo encim **reverzno transkriptazo**.
- Temu encimu kot matrica služi RNA, potrebuje pa tudi začetni oligonukleotid (**primer**).
- Najprej pride do nastanka **hibrida mRNA-DNA**.
- Potem **RNaza H** (encim, ki cepi samo RNA v hibridu z DNA) **razgradi RNA verigo**.
- Dodatek *primerja* na 3' konec cDNA.
- Sledi **sinteza komplementarne DNA** s **polimerazo DNA I**.

Sinteza cDNA

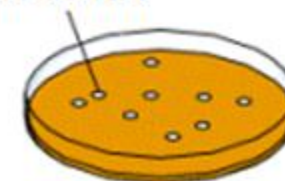


Kloniranje cDNA v vektorju (npr. v fagu λ)



Vključitev cDNA v fag λ in inficiranje *E.coli*.
Prenos na plošče s hranilnim agarjem.

Klon λ cDNA



Izolacija klonov v liznih plakih.