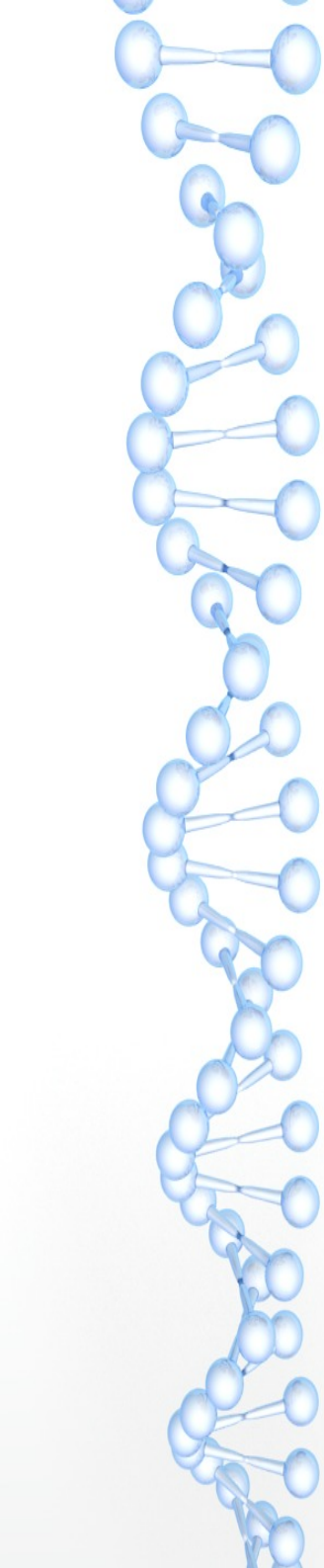


PCR

i

klonowanie molekularne

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy

(ang. *Polymerase Chain Reaction*)

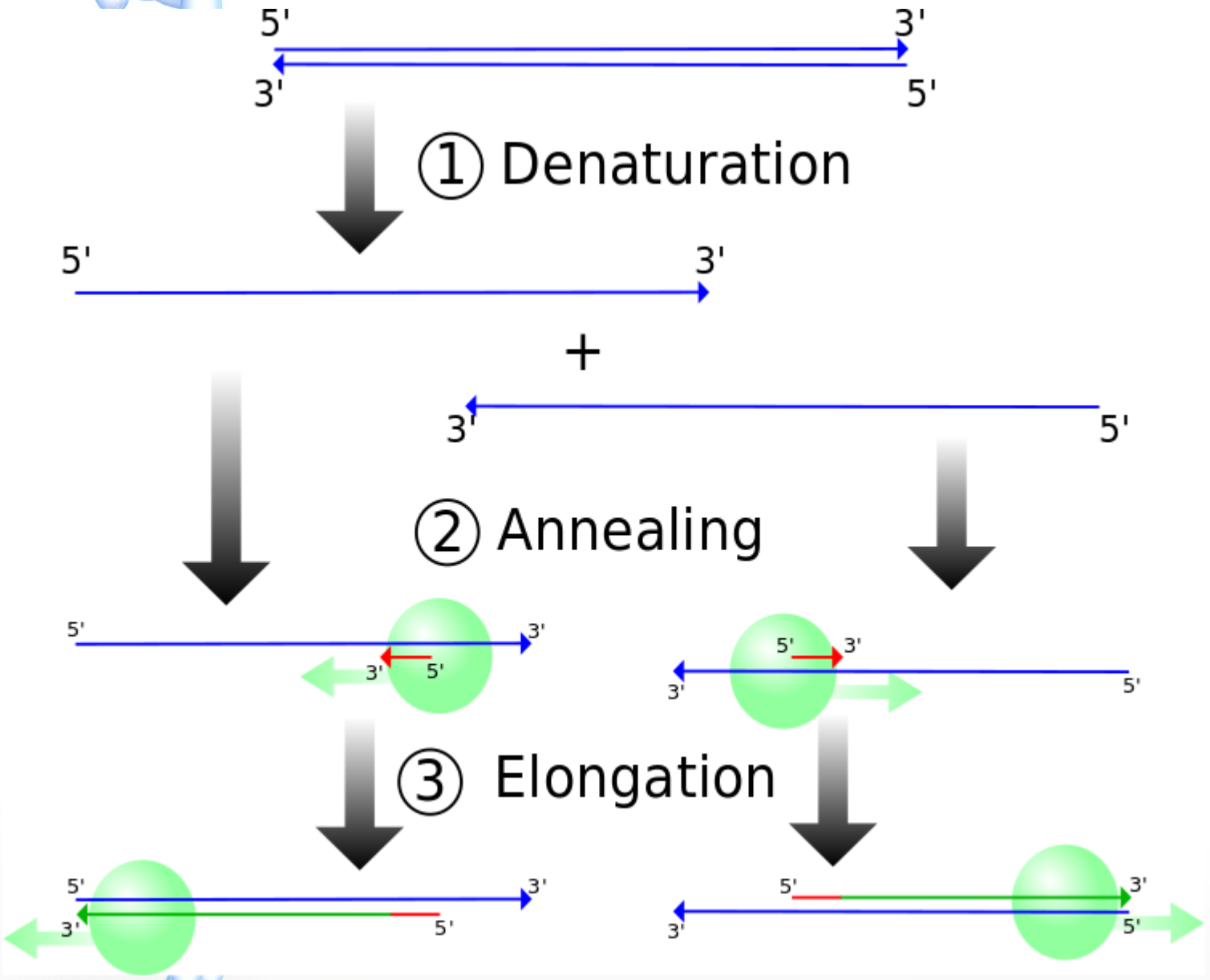
Służy amplifikowaniu wybranych fragmentów DNA

PCR został opracowany w 1983 r. przez Kary‘ego Mullisa

1993 r. - nagroda Nobla

Skład mieszaniny reakcyjnej

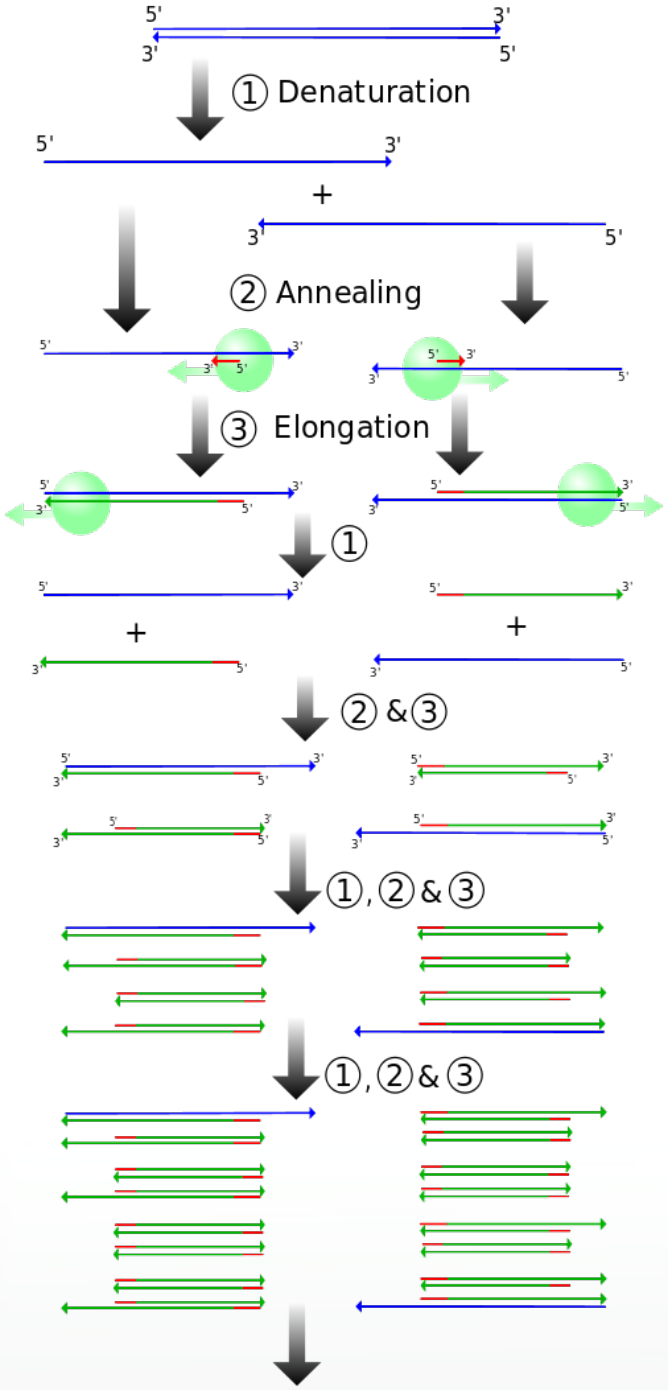
- matrycowe DNA (np. DNA genomowe, plazmidowe, cDNA)
- dNTP
- termostabilna polimeraza DNA zależna od matrycy (najczęściej polimeraza *Taq*)
- startery
- Mg^{2+}
- bufor reakcyjny



wg. wikipedia.org, Madprime

Każdy cykl obejmuje:

1) Denaturację DNA – temp. >90ºC
2) Przyłączanie starterów – temp 50-60ºC
3) Elongację – temp. 72ºC



Exponential growth of short product

wg. wikipedia.org, Madprime

Składa się zazwyczaj z 20-30 cykli.

W każdym cyklu liczba kopii podwaja się.

Termostabilne polimerazy DNA

Aktywność polimerazy 5‘-3‘

Mogą również posiadać następujące aktywności:

- 3‘-5‘ egzonukleazy (aktywność korekcyjna)
- 5‘-3‘ egzonukleazy

Polimeraza *Taq* – brak aktywności korekcyjnej
Polimeraza *Pfu* – posiada aktywność korekcyjną

Startery

- krótkie (ok. 20 nukleotydów), jednoniciowe oligonukleotydy
- decydują, jaka sekwencja jest amplifikowana
- obliczanie Tm startera (temp. anealingu):

Tm=(ilość zasad A+T) x 2°C + (ilość zasad G+C) x 4°C

Można również skorzystać z programów takich jak np. Oligo Calculator.

Projektowanie starterów

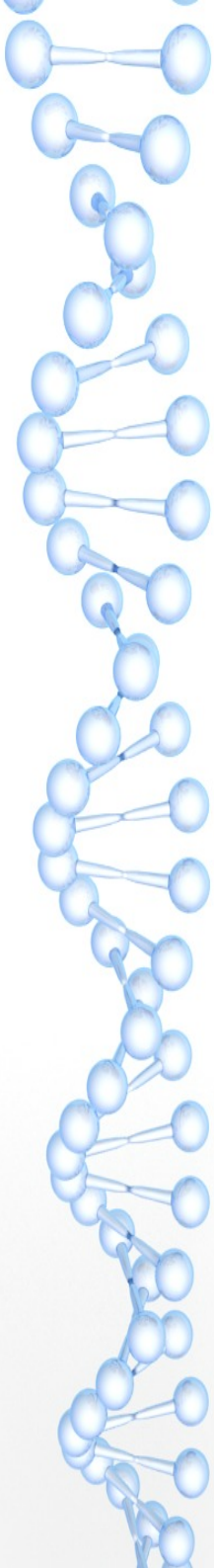
- zawartość GC: 40-60%
- zbliżona wartość Tm starterów z pary
- startery nie powinny tworzyć homo- i heterodupleksów oraz struktur drugorzędowych
- rozkład nukleotydów GC i AT powinien być zrównoważony
- można skorzystać z programów takich jak: Primer-Blast lub Primer3Plus

Optymalizacja PCRu

- temperatura anealingu
- stężenie Mg^{2+}

Zalety i ograniczenia PCR-u

- metoda jest prosta, a wyniki otrzymuje się stosunkowo szybko
- wymaga b. małej ilości matrycowego DNA
- konieczna jest znajomość sekwencji przynajmniej obszarów fankujących amplifikowany region
- standardowo można amplifikować fragmenty DNA o długości do 5 kb



Klonowanie molekularne

Enzymy restrykcyjne

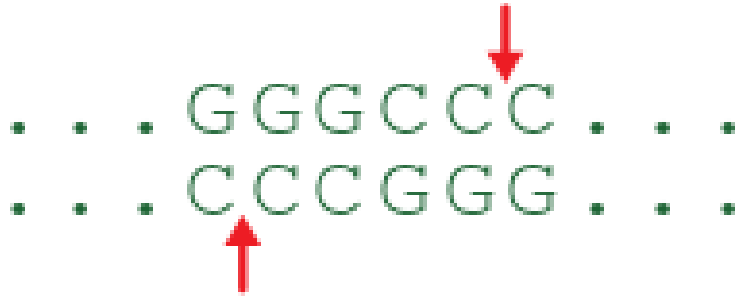
- endonukleazy
- rozpoznają określone sekwencje i trawią DNA w ich obrębie lub blisko niej (enzymy typu II)
- przeważnie rozpoznają sekwencje palindromowe
- w zależności od długości rozpoznawanej sekwencji wyróżniamy:

  tetracutter – 4 nukleotydy

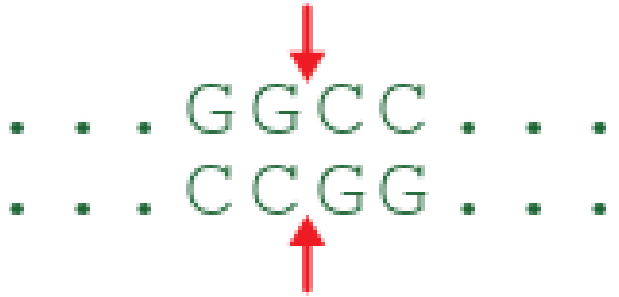
  hexacutter – 6 nukleotydów

  octacutter – 8 nukleotydów
- mogą generować tempe lub lepkie końce

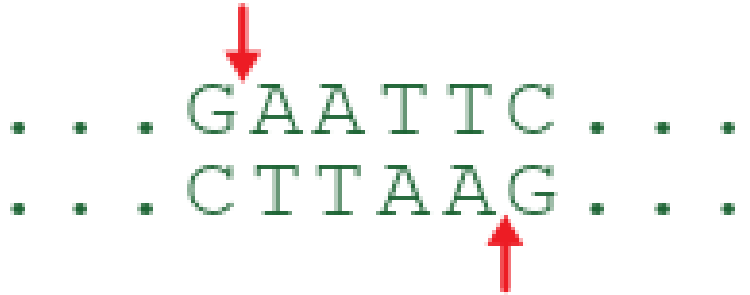
Apa I
(*Acetobacter pasteurianus*)



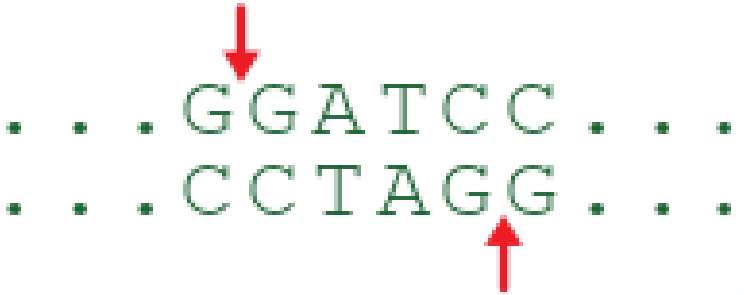
Hae III
(*Haemophilus aegyptius*)



EcoR I
(*Escherichia coli*)



BamH I
(*Bacillus amyloliquefaciens*)



Ligazy DNA

- łączą wolne końce cząsteczek DNA tworząc wiązanie fosfodiestrowe pomiędzy końcami 3‘ i 5‘
- wymagają obecności grupy fosforanowej na końcu 5‘ i hydroksylowej na końcu 3‘
- reakcja wymaga energii, dostarczanej przez dodanie ATP lub NAD do reakcji
- łączone mogą być zarówno lepkie jak i tempe końce, ale w przypadku lepkich końców ligacja zachodzi z większą wydajnością
- najczęściej wykorzystywana jest ligaza faga T4

Wektory do klonowania

- cząsteczki DNA zdolne do replikacji niezależnie od genomu gospodarza

- posiadają gen selekcyjny pozwalający odróżnić komórki gospodarza posiadające wektor od tych, które go nie mają

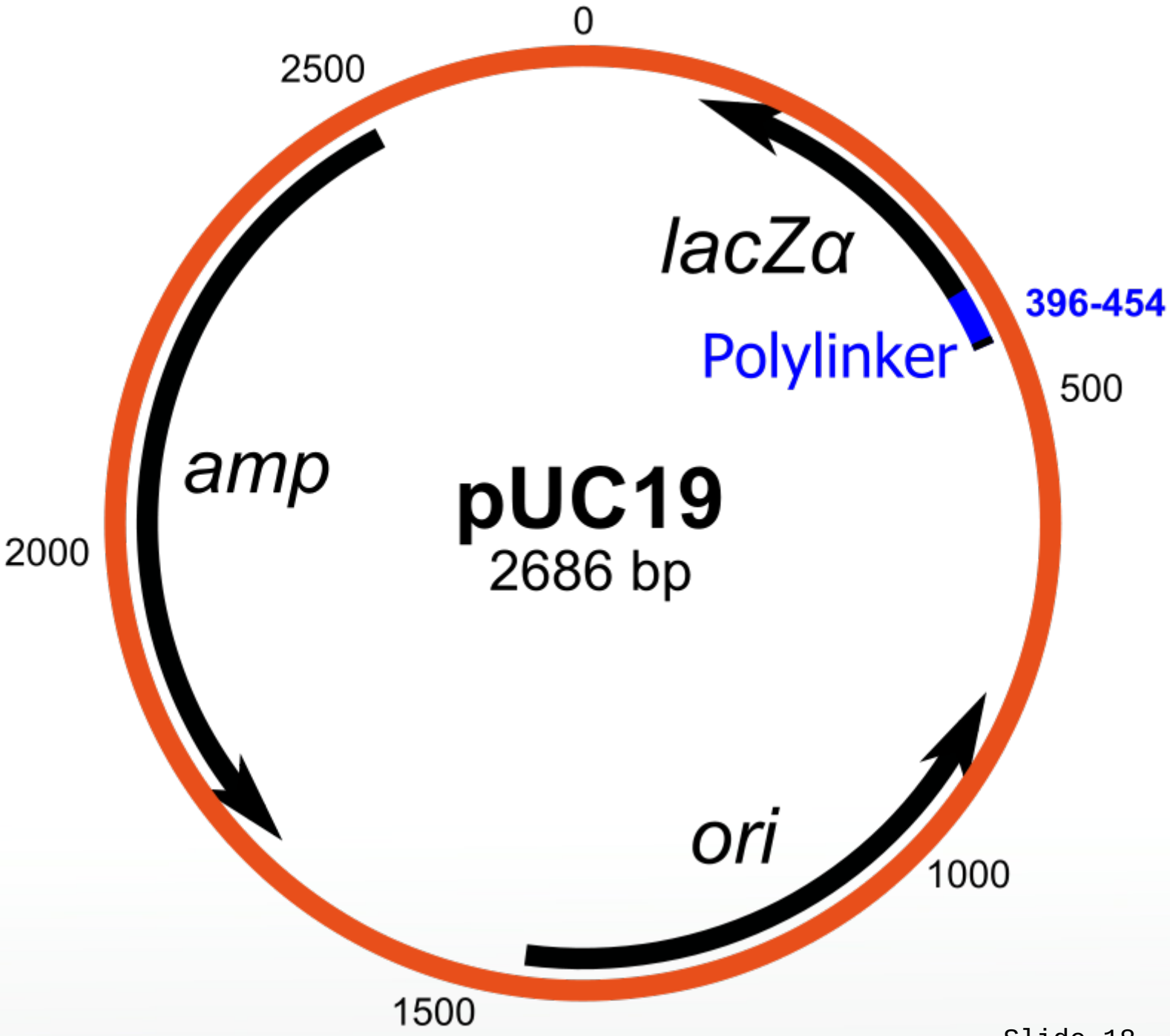
- rodzaje wektorów:
  wektory plazmidowe
  wektory fagowe
  kosmidy
  sztuczne chromosomy bakteryjne (BAC, ang. *bacterial artificial chromosome*)
  sztuczne chromosomy drożdżowe (YAC, ang. *yeast artificial chromosome*)
  i in.

Plazmidy

- małe, koliste, pozachromosomowe cząsteczki DNA
- występują w wieku kopiach w komórce
- replikują się niezależnie od genomu gospodarza
- występują gł. w komórkach bakteryjnych
- często niosą geny przydatne w określonych warunkach
- wielkość: od 2 do 200 kbp

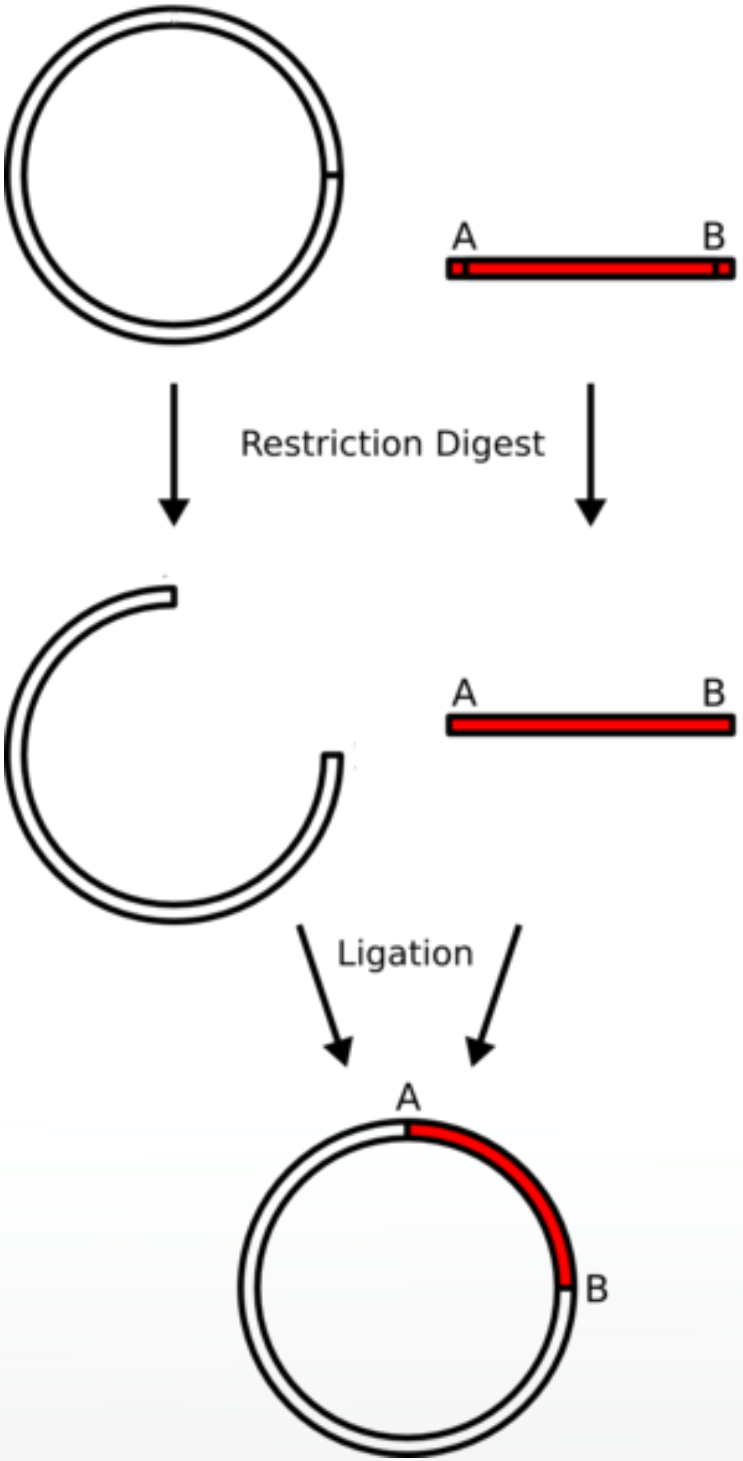
Wektory plazmidowe *Escherichia coli*

- posiadają sekwencję startu replikacji (ori, ang. *origin of replication*)
- gen oporności na antybiotyk (np. *amp*^{r} – oporność na ampicylinę, *tetA* – oporność na tetracyklinę) – pozwala na selekcję ztransformowanych komórek
- gen *lacZ'* lub inny gen pozwalający na selekcję komórek zawierających plazmid z insertem
- polylinker (MCS – ang. *multiple cloning site*)



wg. wikipedia.org, Yikrazuul

Klonowanie produktu PCR



wg. wikipedia.org, Takometer (zmienione)

Transformacja

- wprowadzanie zrekombinowanych plazmidów do komórek bakteryjnych
- wiele bakterii ma naturalne systemy transformacji
- u *E. coli* ten proces zachodzi z bardzo małą wydajnością
- wydajność można zwiększyć inkubując bakterie w hipotonicznym roztworze chlorku wapnia lub przez elektroporację
- konieczna jest selekcja komórek, które pobrały plazmid (gen oporności na anybiotyk)

Selekcja rekombinantów – gen *lacZ‘*

- podczas ligacji powstają plazmidy z insertami i bez
- gen *lacZ‘* koduje fragment enzymu β-galaktozydazy (pozostała część genu znajduje się w chromosomie bakteryjnym)
- MCS zdajduje się na obszarze tego genu *lacZ‘*
- ligacja insertu prowadzi do inaktywacji genu
- aktywność β-galaktozydazy jest łatwa do wykrycia – w obecności aktywatora (IPTG) enzym ten przekształca X-gal w niebieski produkt
- kolonie bakterii posiadających niezrekombinowany plazmid barwią się na niebiesko, a te mające plazmid z insertem pozostają białe