

Vektorji

→ molekule, ki prenašajo tujo informacijo v gostiteljske celice

Po izvoru delimo vektorje na:

- plazmide in iz njih izvedene vektorje
- bakteriofag λ in iz njega izvedene vektorje
- nitaste fage in iz njih izvedene vektorje

Po namenu uporabe so vektorji:

- klonirni
- ekspresijski (citoplazemski, periplazemski, sekrecijski)
- transkripcijski, mutagenezni, za določanje zaporedja insertov...
[\(CABRI\)](#): 35 kategorij vektorjev)

[CABRI](#): Common Access to Biological Resources and Information - konzorcij več evropskih zbirk mikroorganizmov, vektorjev in postopkov

Vektorji /2

- **Klonirni vektorji** vnašajo tujo DNA v gostiteljsko celico in se v celici razmnožujejo ter s tem ustvarjajo kopije lastne in vključene DNA.
- Klonirni vektor mora imeti:
 - zaporedje, ki omogoča razmnoževanje v gostiteljski celici
 - klonirno mesto za vnos želenega fragmenta
 - zapis za selekcijski marker
- **Ekspresijski vektor** mora imeti še:
 - promotor
 - Shine-Dalgarnovo zaporedje (RBS)
 - terminatorsko regijo
 - lahko ima še posebne lastnosti: operatorske regije, fuzijske partnerje,... (*več v sklopu predavanj o izražanju*)

Vektorji /3

Kategorije vektorjev:

- plazmidi: sprejmejo 0,1 kb -10 kb tuje DNA
- bakteriofagi = fagi: do 8 kb - 20 kb tuje DNA
- kozmidi, fagmidi, fozmidi: do 35-50 kb tuje DNA
- umetni kromosomi kvasovk (YAC): 100 kb - 1000 kb
- bakterijski umetni kromosomi (BAC) in umetni kromosomi na osnovi faga P1 (PAC): 75 kb -300 kb
- virusi / retrovirusi / bakulovirusi
- transpozoni

Za izbor vektorja je odločilna dolžina fragmenta, ki ga želimo klonirati.

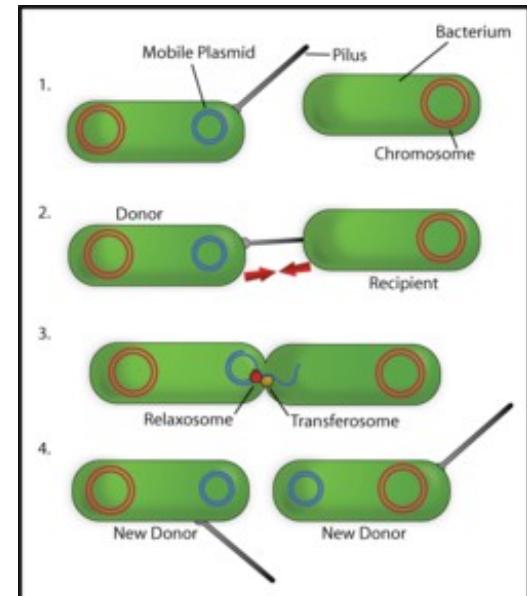
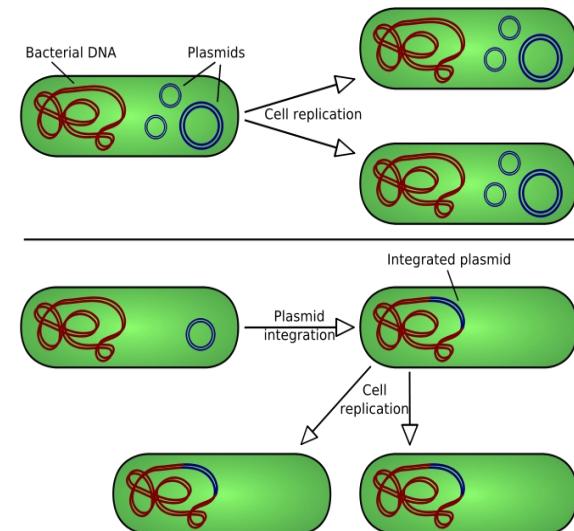
Nekateri tipi vektorjev samo posredujejo pri vključitvi tuje DNA v gostiteljski kromosom.

visoko število kopij / nizko število kopij vektorja (meja ~20 kopij):
število kopij v posamezni celici je odvisno od replikatorja

Plazmidi

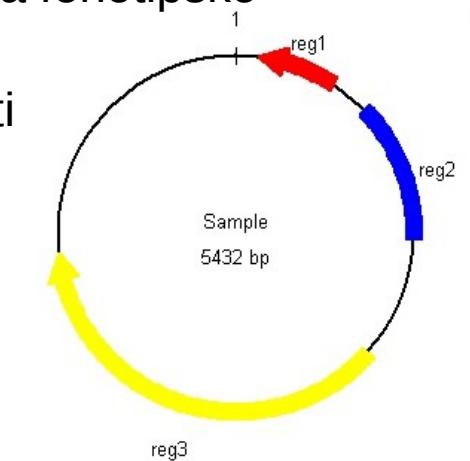
krožna izvenkromosomska DNA,
ki se v celici samostojno podvojuje

- Naravni plazmidi so lahko dolgi do >200 kb in so integracijski ali neintegracijski. Skoraj vsi so krožni, kot dsDNA.
- Konjugativni plazmidi lahko prehajajo v druge bakterije s konjugacijo (geni *tra*), npr. F-plazmidi.
- F-plazmidi vsebujejo >100 genov s skupno dolžino >95 kb in so v celicah samo v 1 kopiji. Zapisujejo tudi za F-pilus, na katerega se vežejo nitasti fagi (npr. M13).
- Pogosto omogočajo biosintezo antibiotikov, enterotoksinov ali kolicinov, odpornost proti antibiotikom, razgradnjo ksenobiotikov.



Plazmidi / 2

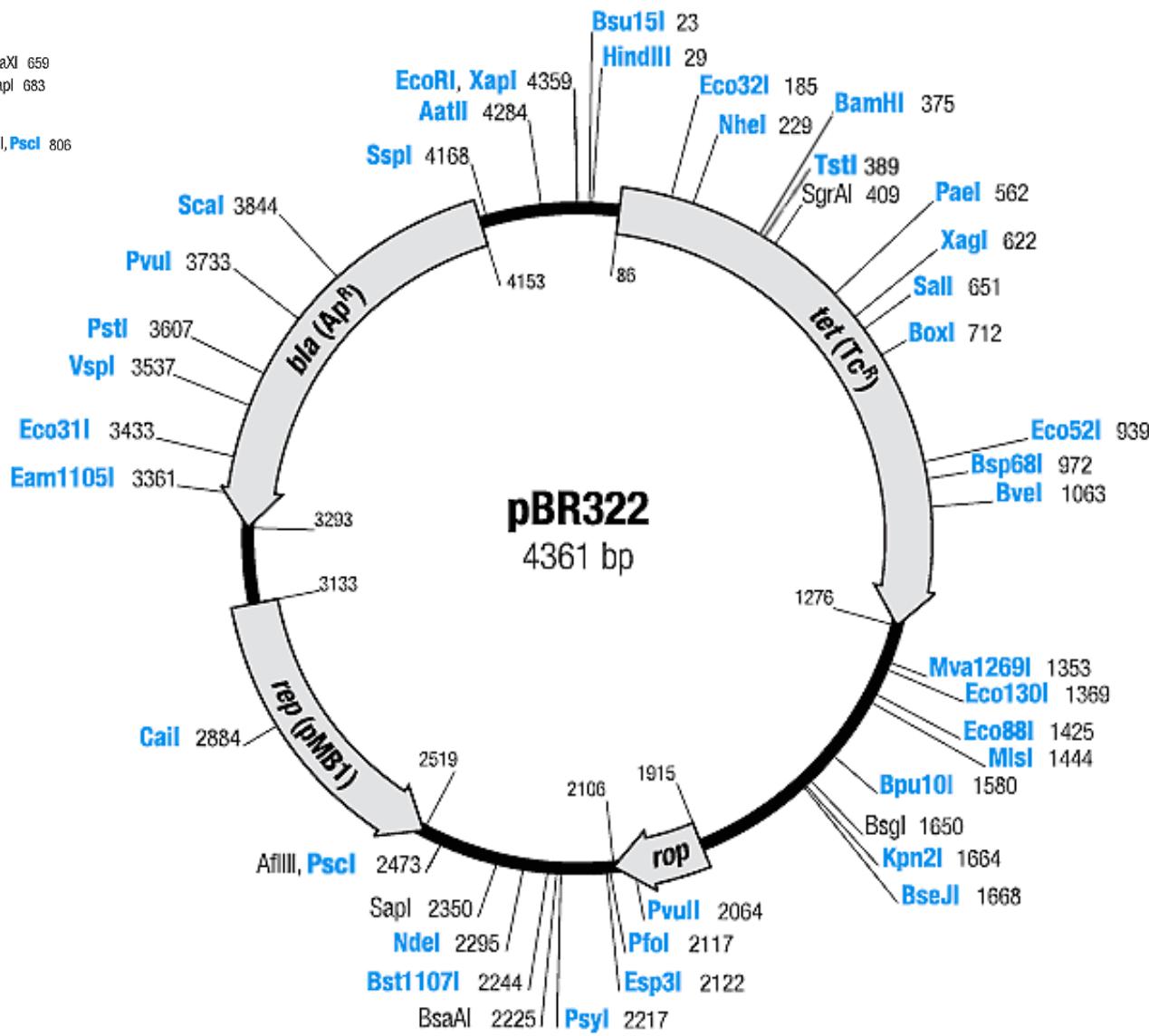
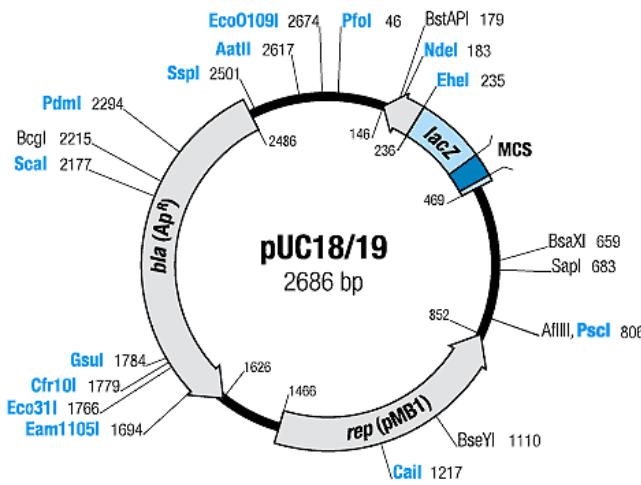
- Laboratorijski plazmidi so neintegracijski, večinoma z zapisom za odpornost proti antibiotiku (amp, tet, kan, cam...), s klonirnim mestom (pogosto polilinker) in vsaj 1 mestom *ori* (replikatorska regija) in sorazmerno majhni.
- Izolacija takih laboratorijskih plazmidov je preprosta in hitra.
- Običajno vsebujejo še dodatna zaporedja, pomembna za specifično uporabo vektorja.
- Pogosto uporabljeni klonirni plazmidi so v celicah v velikem številu kopij (replikatorja pMB ali ColE1: >15; mutacije v regiji *ori* → do 3000).
- V celici je lahko hkrati več kot 1 tip plazmida, biti pa morajo kompatibilni (imeti morajo različno regulacijo podvojevanja).
- Klonirno mesto je lahko v povezavi z zapisom, ki omogoča fenotipsko ločevanje transformant (npr. α -komplementacija).
- Plazmidna karta je grafična ponazoritev značilnih lastnosti plazmida.

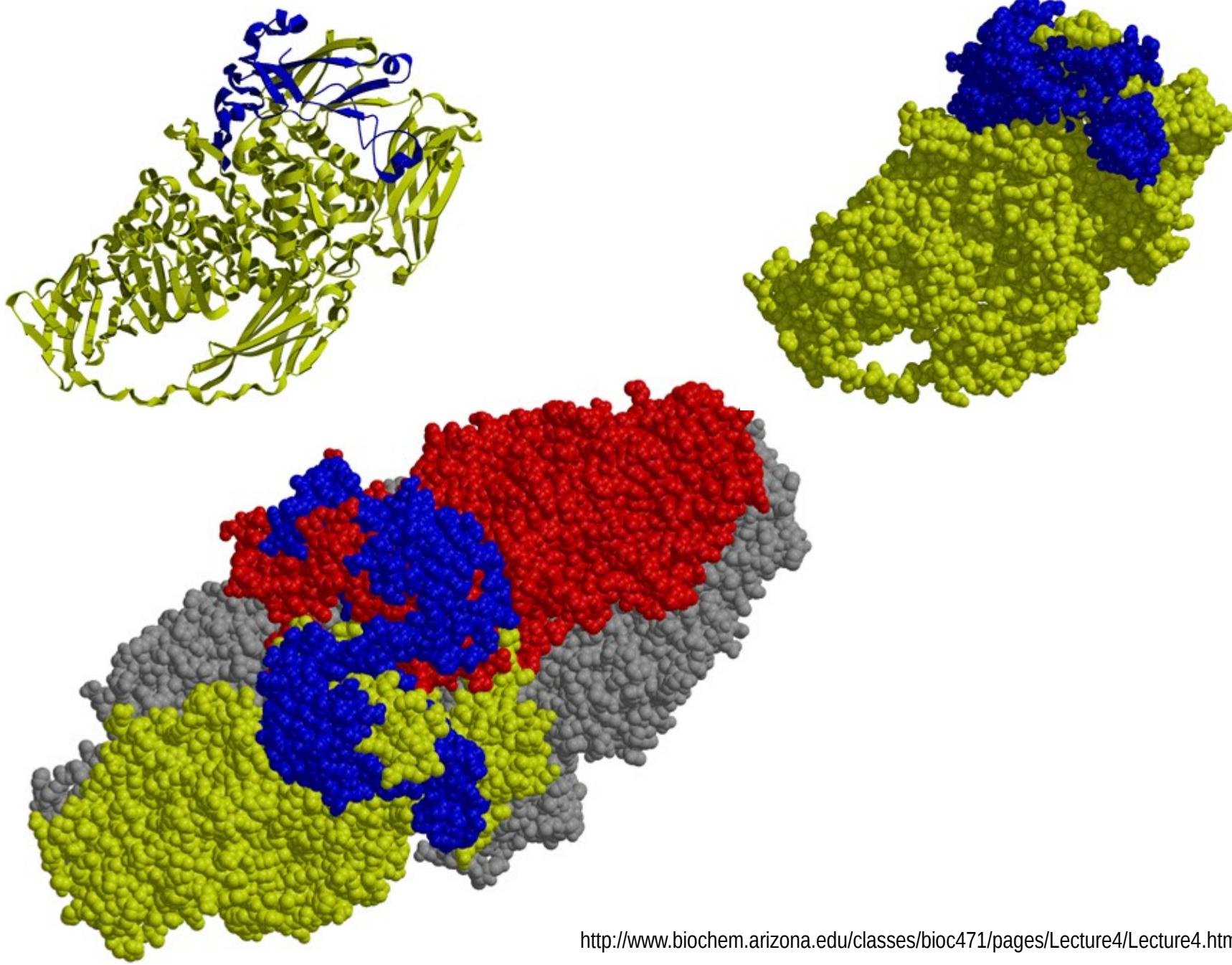


Plazmidi /3

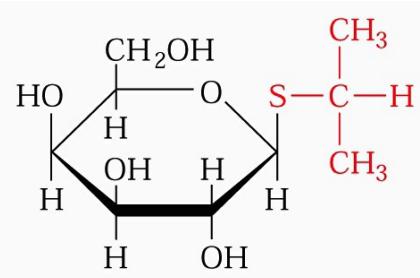
nekateri tipi plazmidnih vektorjev:

- za pripravo ssDNA
- za vnos dolgih insertov (→ iz plazmidov izvedeni vektorji)
- za izražanje zapisov v velikih množinah
- za povezavo z reporterskim sistemom
- vektorji za kvasovke
- vektorji za pripravo rekombinantnih proteinov v insektnih ali sesalskih celičnih kulturah
- plazmidi za redkeje uporabljane bakterije

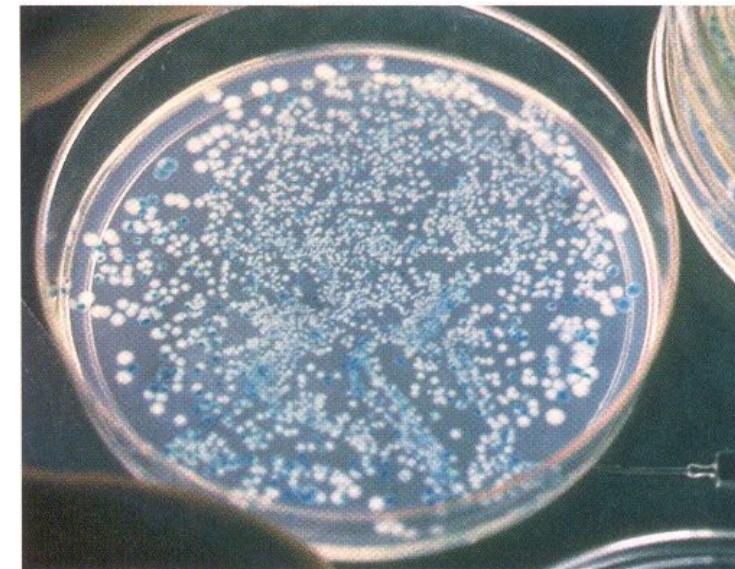




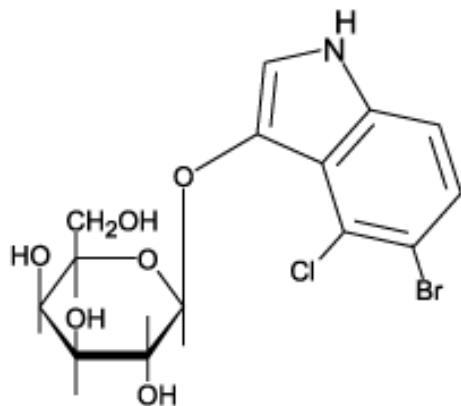
α -komplementacija



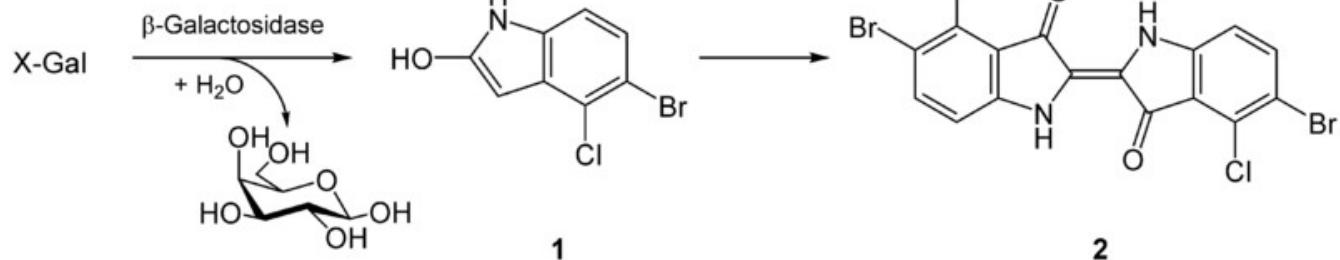
IPTG = izopropiltio- β -D-galaktozid



www.mun.ca/biology/scarr/Fg15_08.htm



X-gal = 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galaktozid



1

2

Plazmidi: kriteriji za izbor

- velikost vektorja
- število kopij / celico
- sestava polilinkerja
- možnost posredne detekcije prisotnosti inserta

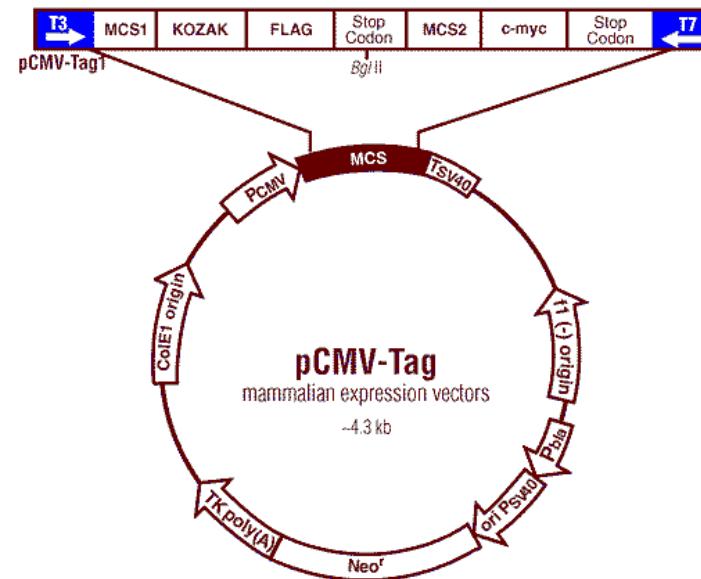
pri **ekspresijskih** vektorjih upoštevamo tudi:

- končni ciljni organizem
- konstitutivno/inducibilno izražanje
- možnosti za regulacijo izražanja
- močni/šibki promotorji
- lokalizacija rekombinantnega proteina
- fuzije za lažjo detekcijo in izolacijo
- Plazmidi z >15 kb so zaradi velikosti manj primerni za transformiranje celic in jih težje izoliramo kot manjše (mali vektorji: 3 kb - 5 kb).
- Izberemo takia klonirna mesta, da ne nastopajo v fragmentu, ki ga želimo vstaviti, uporabna interna mesta (v fragmentu) pa se ne pojavljajo v vektorju.
- Upoštevamo posebne zahteve pri kasnejšem delu (npr. priprava ssDNA, testiranje translacije, preverjanje nukleotidnega zaporedja,...)

Plazmidi s posebnimi lastnostmi /1

Plazmidi za izražanje v sesalskih celicah:

- dosežemo lahko prehodno izražanje ali pa ustvarimo stabilne celične linije
- za prehodno izražanje celice transficiramo s plazmidom, ki nima posebnih selekcijskih markerjev in se ne podvaja; celice analiziramo po 1 - 4 dneh
- za pripravo stabilnih transgenskih linij rabimo vektorje s selekcijskimi markerji
- po transfekciji celic seleкционiramo seve,
ki izražajo vneseni selekcijski marker
(odpornost proti neomicinu ali
nekaterim drugim antibiotikom)
- nekateri sistemi vključujejo
plazmidne vektorje v kombinaciji z
virusi / retrovirusi



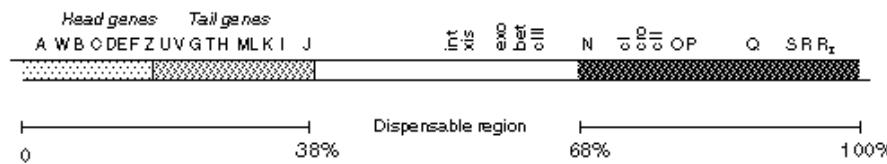
Plazmidi s posebnimi lastnostmi /2

Plazmidi za delo z nestandardnimi bakterijami:

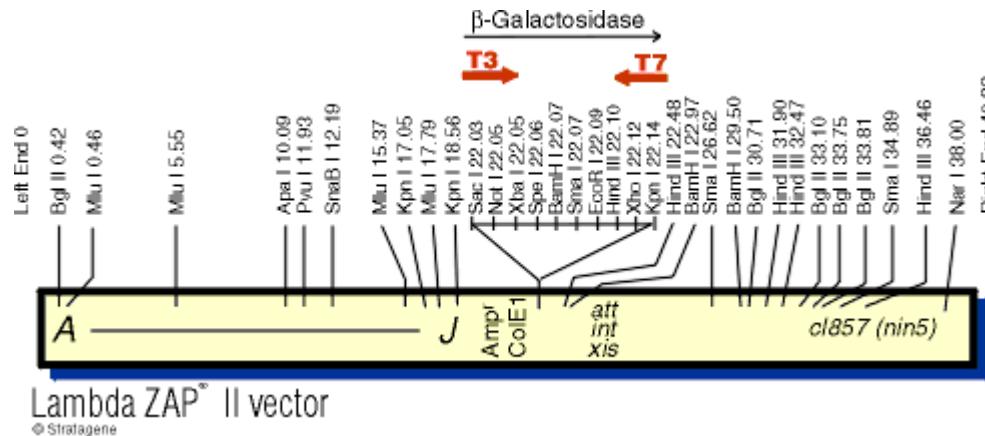
- mnogi plazmidi za *E. coli* so neprimerni, ker imajo nekompatibilne replikatorje
- primerni so replikatorji za širok spekter gostiteljev (RK2, RSF1010).
- antibiotiki za selekcijo morajo biti preverjeno učinkoviti
- nekaterih vrst ne moremo transformirati s kemijsko modifikacijo ali elektroporacijo, zato tujo DNA vnašamo s konjugacijo - rabimo dodatne proteine, ki so običajno na pomožnem plazmidu.

Fag λ in izvedeni vektorji

- wt λ (48 kb):



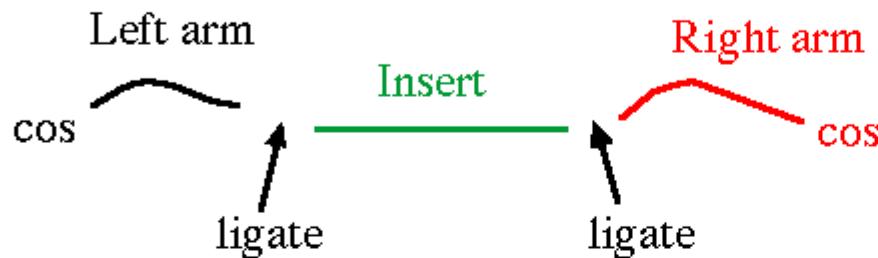
- geni za lizogeno rast in imunska regija (skupaj ~30 % celotne DNA) niso potrebni za litični cikel in jih lahko nadomestimo z drugo DNA
- vektorje, izvedene iz λ , lahko pakiramo v fagne glave *in vitro* (~10 % učinkovitost)
- za pakiranje mora biti skupna dolžina konstrukta 78 % - 105 % dolžine wt λ DNA
- izvedeni vektorji imajo vnesena klonirna mesta na delih, kjer se sicer začnejo nadomestljive regije λ
- nadomestljive regije izrežemo, izoliramo levo in desno ročico, nato ligiramo insert
- vektorje na osnovi bakteriofaga λ uporabljamo za pripravo genomskeh knjižnic



Lambda cloning vector methodology

1. Ligate foreign DNA inserts and lambda arms into a concatemeric (multi-genome) segment

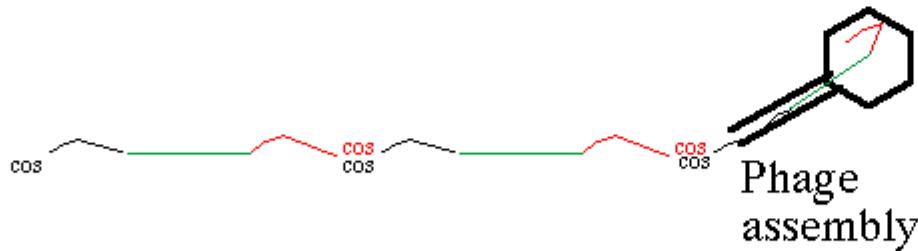
Detail of one lambda genome:



Overall picture:

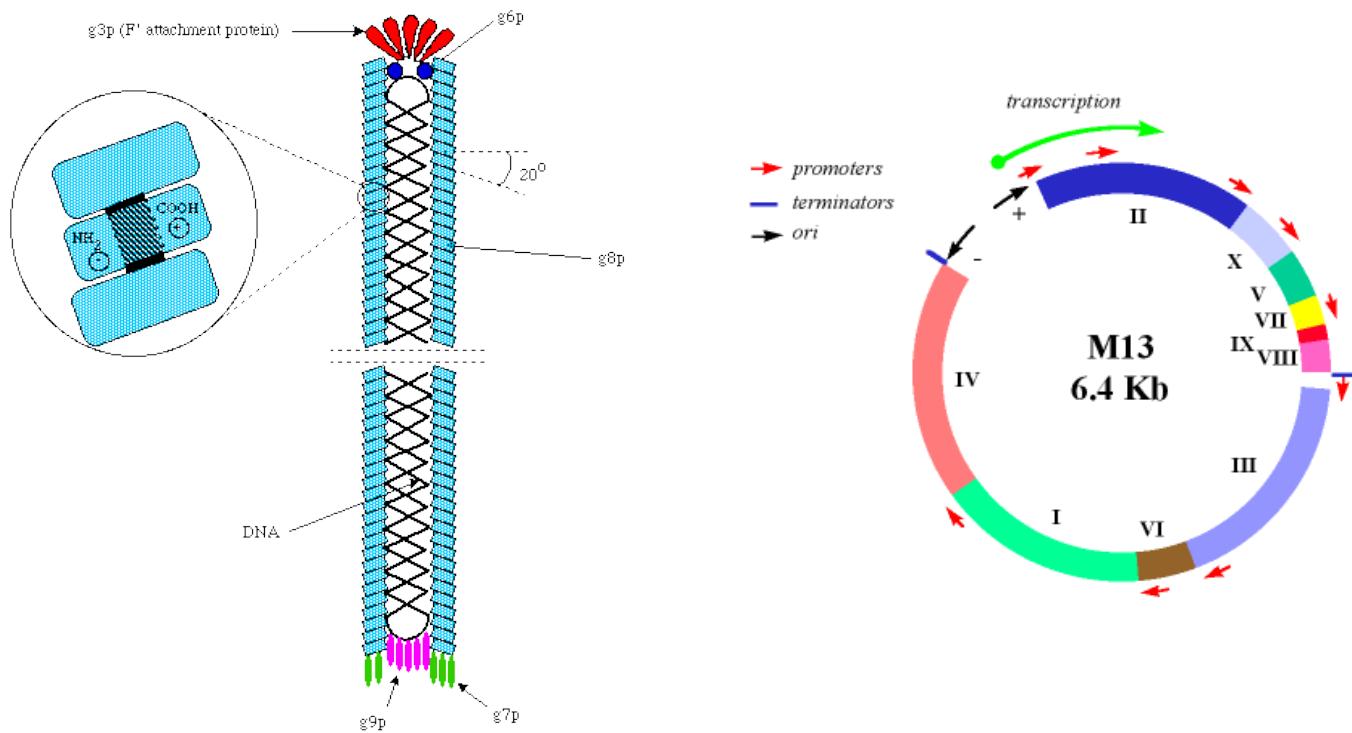


2. Package into phage heads (capsids) in vitro.



Nitasti fagi in izvedeni vektorji

- wt M13:

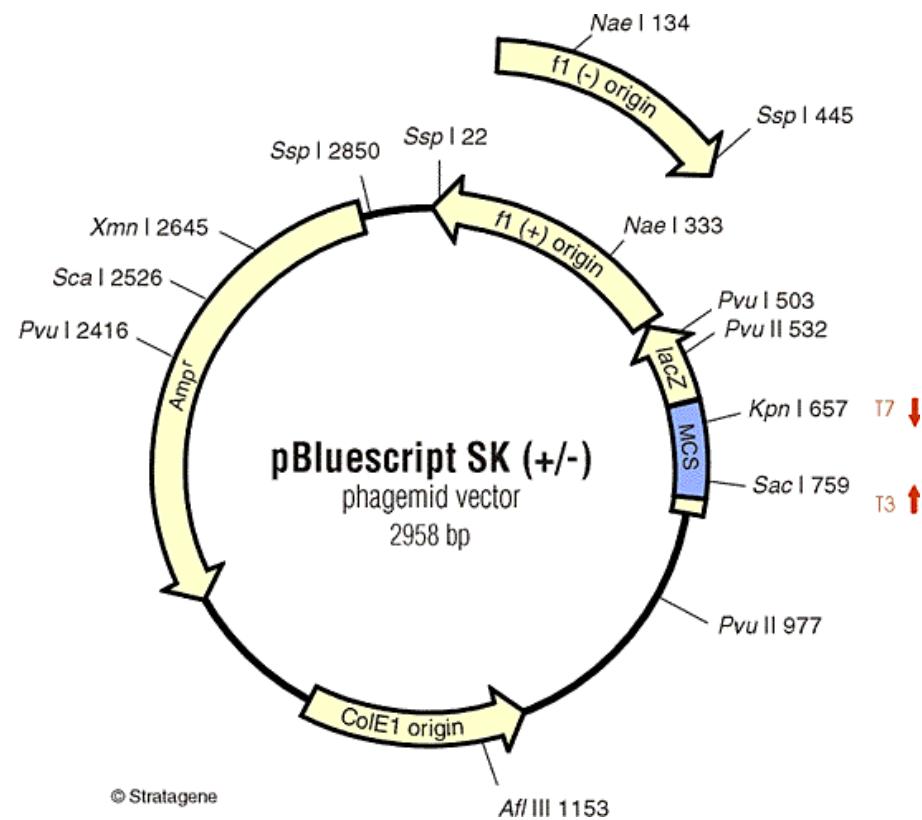


- M13, f1, fd ~ 6,4 kb; okužijo samo seve F+, F' ali Hfr
- obstajajo v obliki dsDNA (v celici 20-40 kopij) in ssDNA (sprošča se brez liziranja celic:100-200/h)
- transformacija bakterij in izolacija dsDNA sta kot pri plazmidih
- iz M13 izvedeni vektorji imajo gen za odpornost proti antibiotiku ter fagni in plazmidni *ori*; ssDNA dobimo šele po infekciji s pomožnim wt fagom
- vektorje na osnovi nitastih fagov uporabljamo za pripravo ssDNA in za predstavitev rekombinantnih proteinov na površini fagov

Iz plazmidov izvedeni vektorji

FAGMIDI:

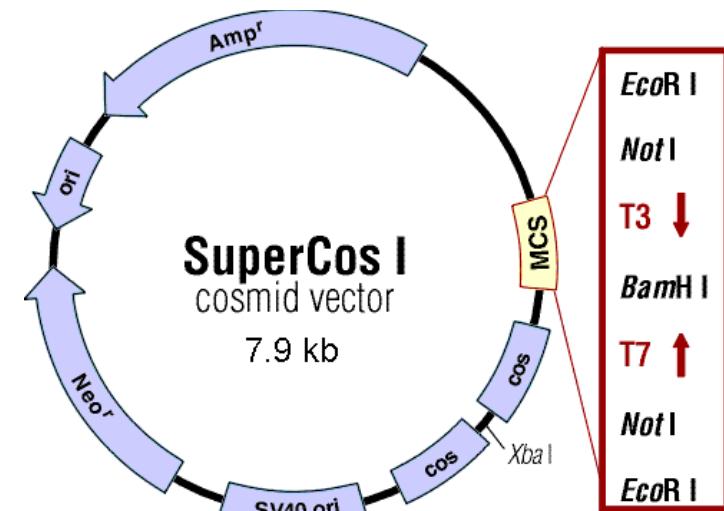
- plazmidi z dodatnim mestom *ori*, ki izhaja iz nitastih fagov (f1)
- celice gojimo enako kot tiste, ki so transformirane s plazmidom
- fagmidno dsDNA izoliramo kot običajne plazmide
- po infekciji celic, ki vsebujejo fagmid, z divjim pomožnim fagom (*wt helper phage*) se aktivira fagni *ori*, kar povzroči sintezo ssDNA, ki se nato izloča iz celic v gojišče
- fagmidi obstajajo v (+) in (-) verziji z različno orientiranim mestoma *ori*, kar omogoča sintezo ssDNA z ene ali druge verige
- ssDNA občasno rabimo za določanje nukleotidnega zaporedja in za mutagenezo.



Iz plazmidov izvedeni vektorji /2

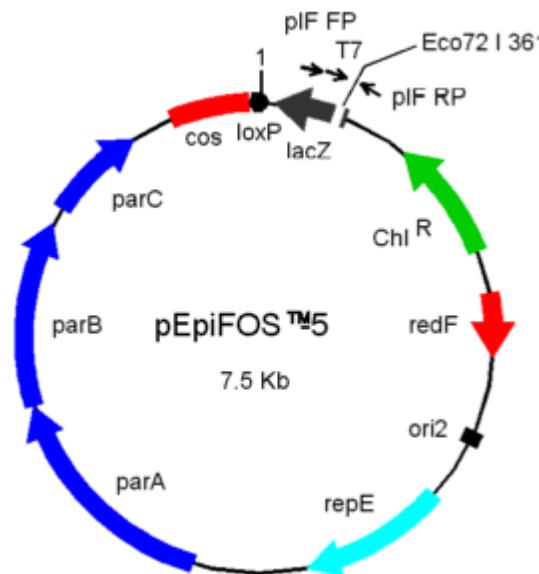
KOZMIDI:

- plazmidi, ki vsebujejo mesto cos iz bakteriofaga λ
- v celici so v velikem številu kopij (replikator ColE1)
- lahko jih pakiramo v glave bakteriofagov I (pod pogojem, da je med mestoma cos 40 kb - 50 kb velik insert)
- uporabljamo jih za pripravo genomskeh knjižnic
- v *E. coli* včasih izgubljajo dele insertov

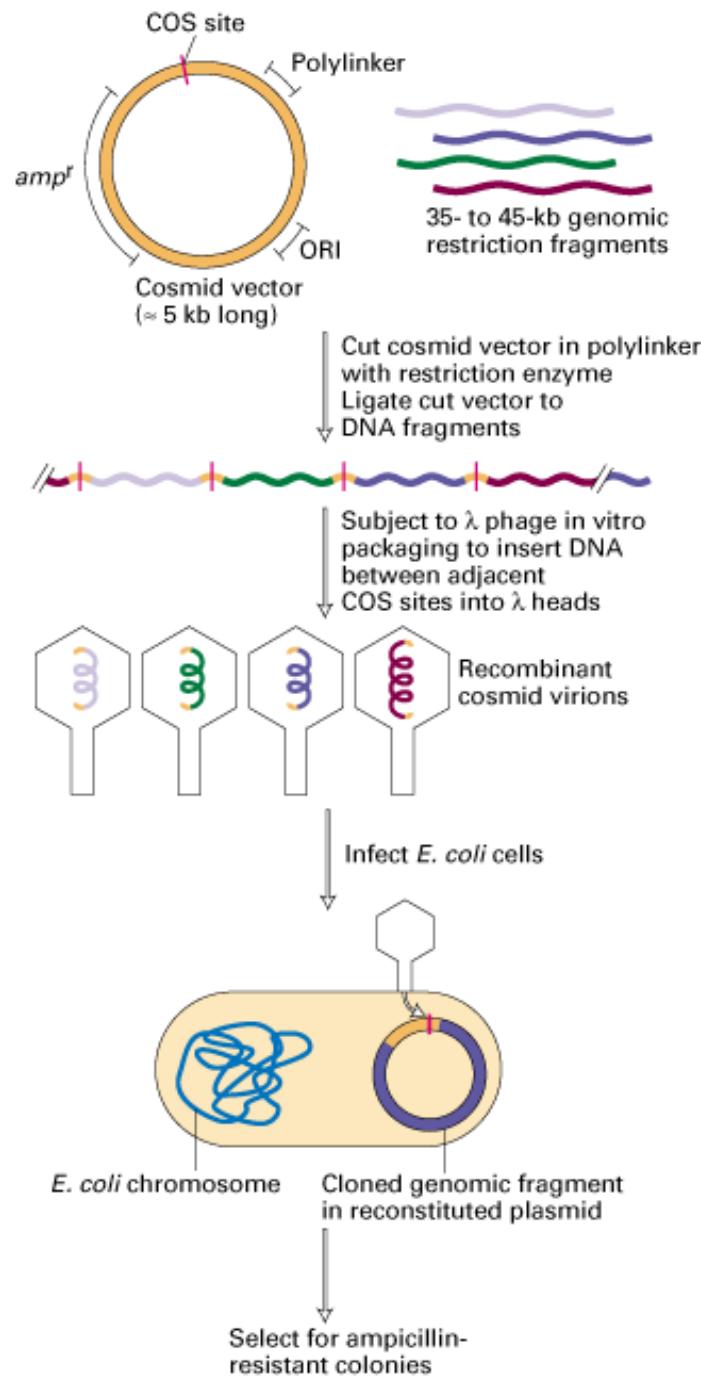


FOZMIDI:

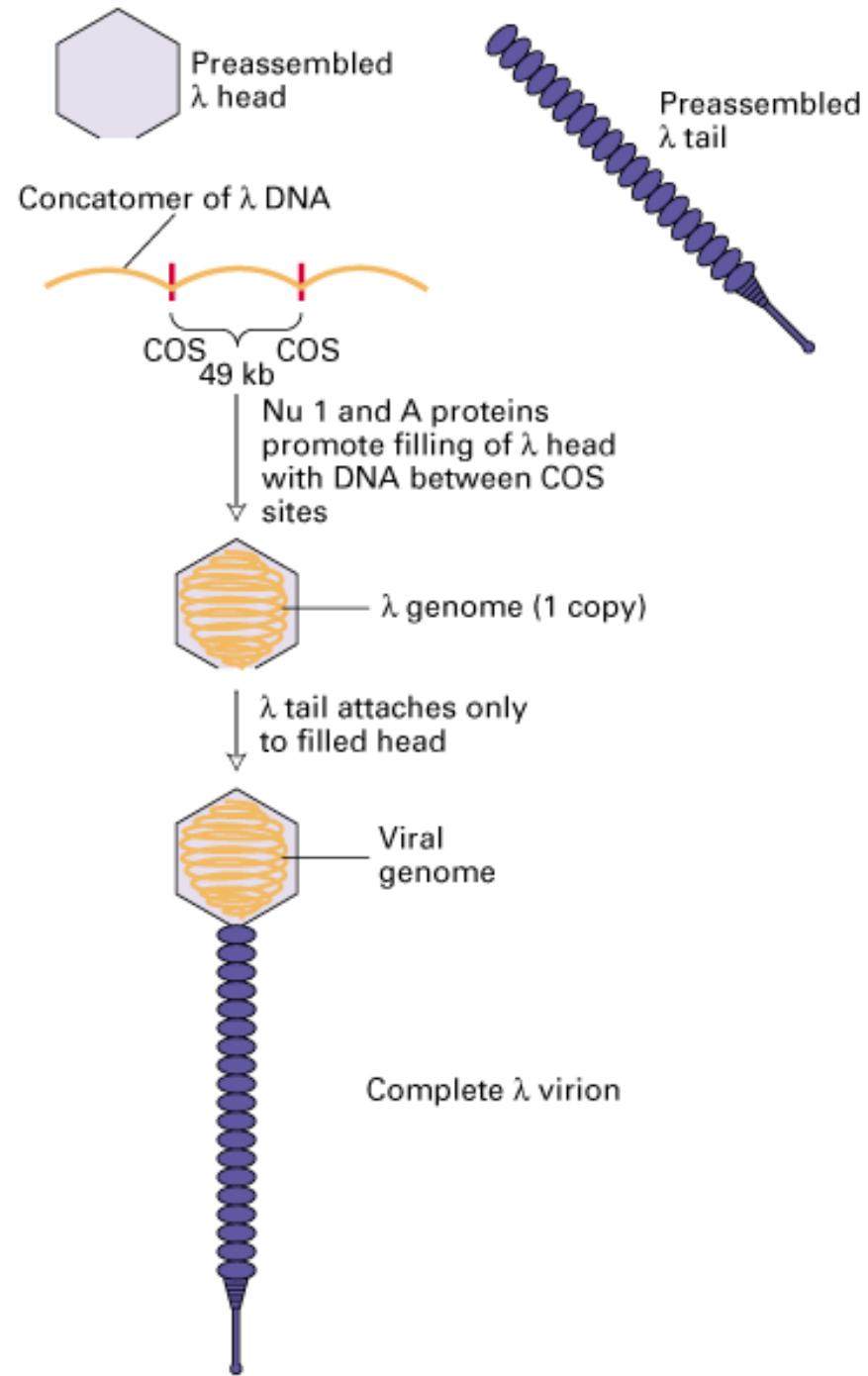
- kozmidi, ki imajo namesto ori ColE1 mesto ori iz bakteriofaga
- v bakterijski celici so v 1-2 kopijah
- ne izgubljajo delov inserta



Kloniranje s posredovanjem kozmidov



Pakiranje bakteriofagne DNA



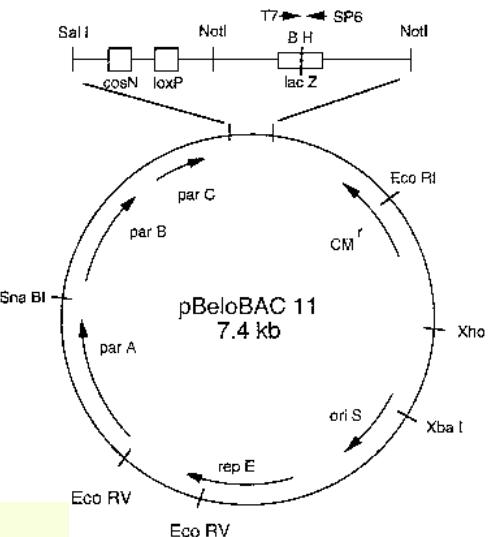
Iz plazmidov izvedeni vektorji /3

BAC (umetni bakterijski kromosomi):

- plazmidi z dodanim replikatorjem F-faktorja in prilagojeni za vgradnjo zelo dolgih fragmentov DNA (100 kb - 500 kb); 1-2 kopiji/celico

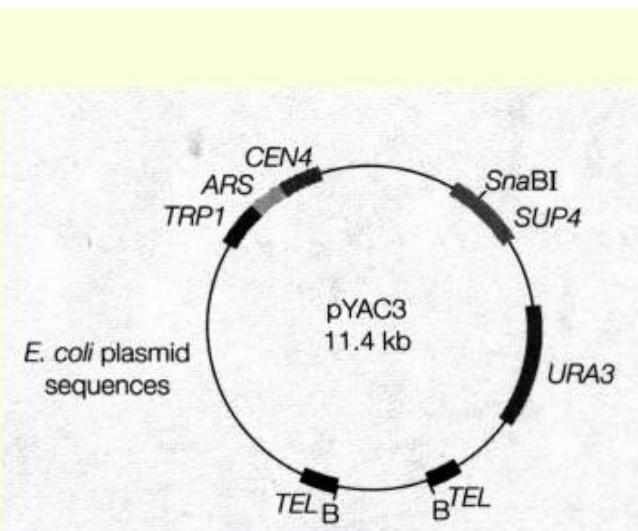
YAC (umetni kromosomi kvasovk):

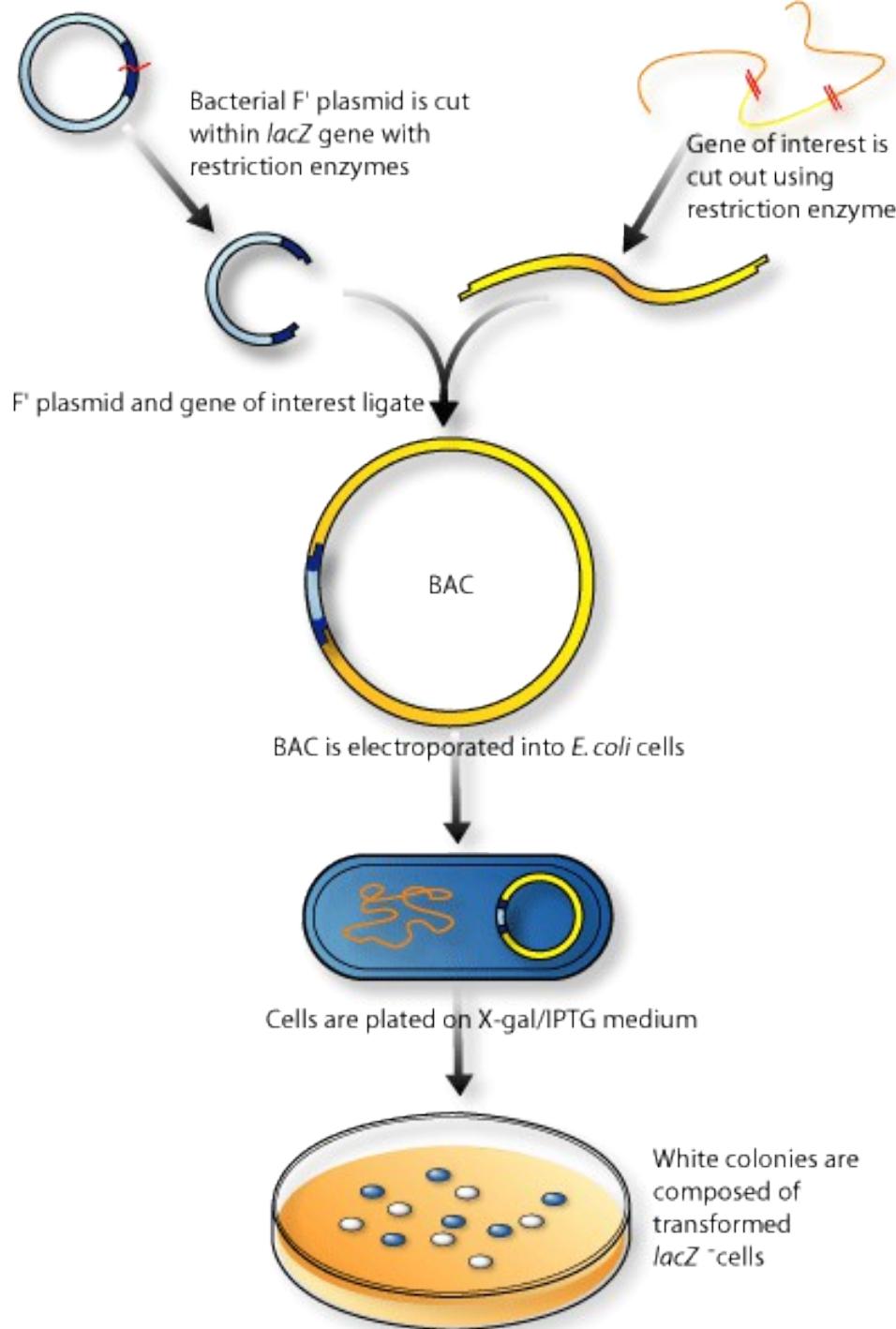
- kot BAC, a za delo v kvasovkah; do 1 Mb
- manj stabilni konstrukti kot BAC, zato jih opuščajo

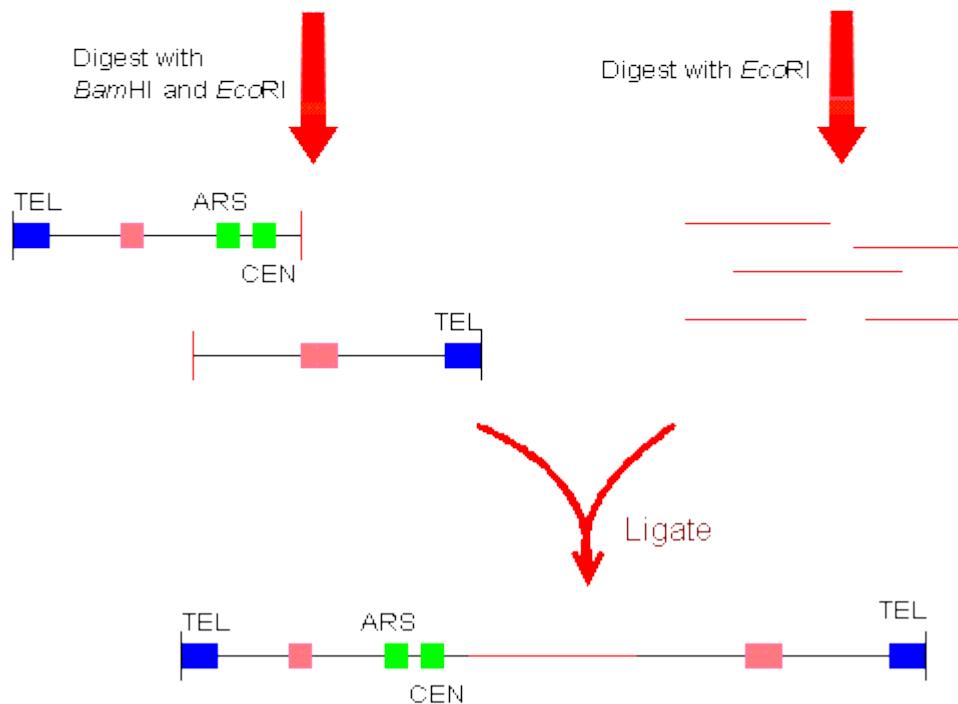
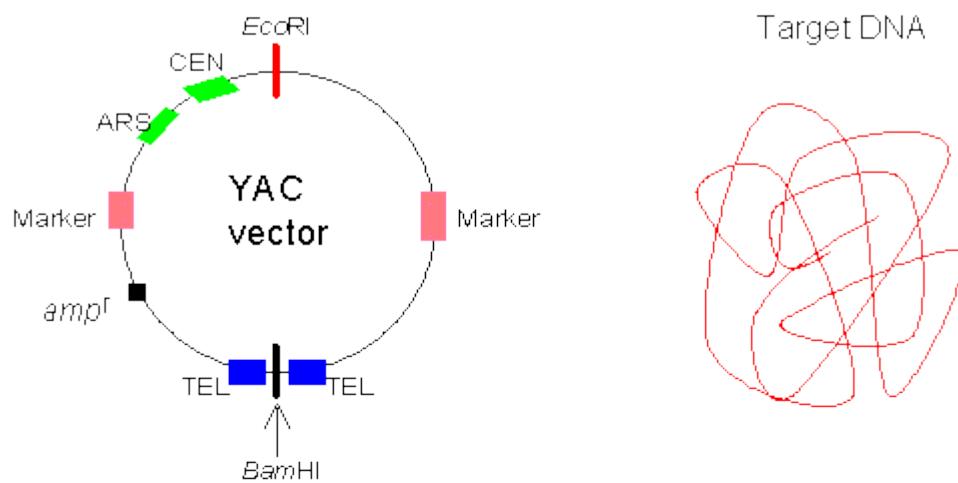


Important yeast sequences

- for chromosomal DNA replication
 - TEL: segment of telomeric DNA sequence
 - CEN4: centromere sequence (chromosome 4)
 - ARS: autonomously replicating sequence (similar to *ars*)
- for selection of recombinants
 - TRP1, URA3: yeast selectable markers
 - SUP4: insertionally inactivated in recombinants



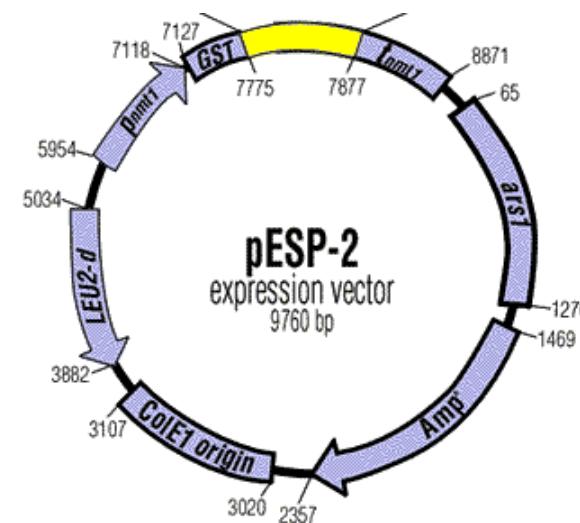




Iz plazmidov izvedeni vektorji /4

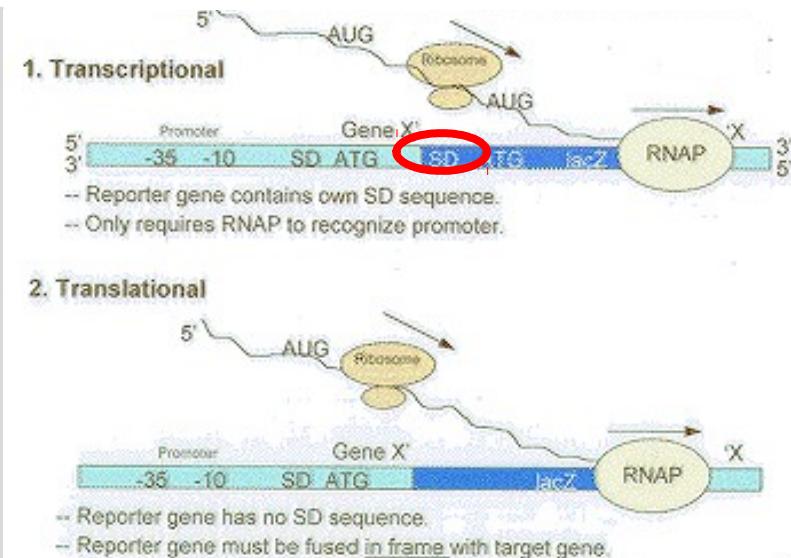
Plazmidi za delo s kvasovkami:

- kot replikator uporabljamo predvsem ARS (avtonomno podvajajoča se zaporedja), ki izhajajo iz genoma kvasovke in replikator iz naravnega kvasovkinega plazmida 2μ .
- v celicah je 10-30 kopij
- pogosto uporabljamo vektorje, ki jih lahko kloniramo tudi v *E. coli* (prenosljivi /shuttle/ vektorji) in imajo torej 2 replikatorja
- integracijski vektorji nimajo kvasovkinega replikatorja; služijo le za vnos želenega zapisa + selekcijskega markerja v genom kvasovke
- selekcijski markerji komplementirajo okvarjeno biosintežno pot (npr *URA3* v sevih, ki so *ura3*-)

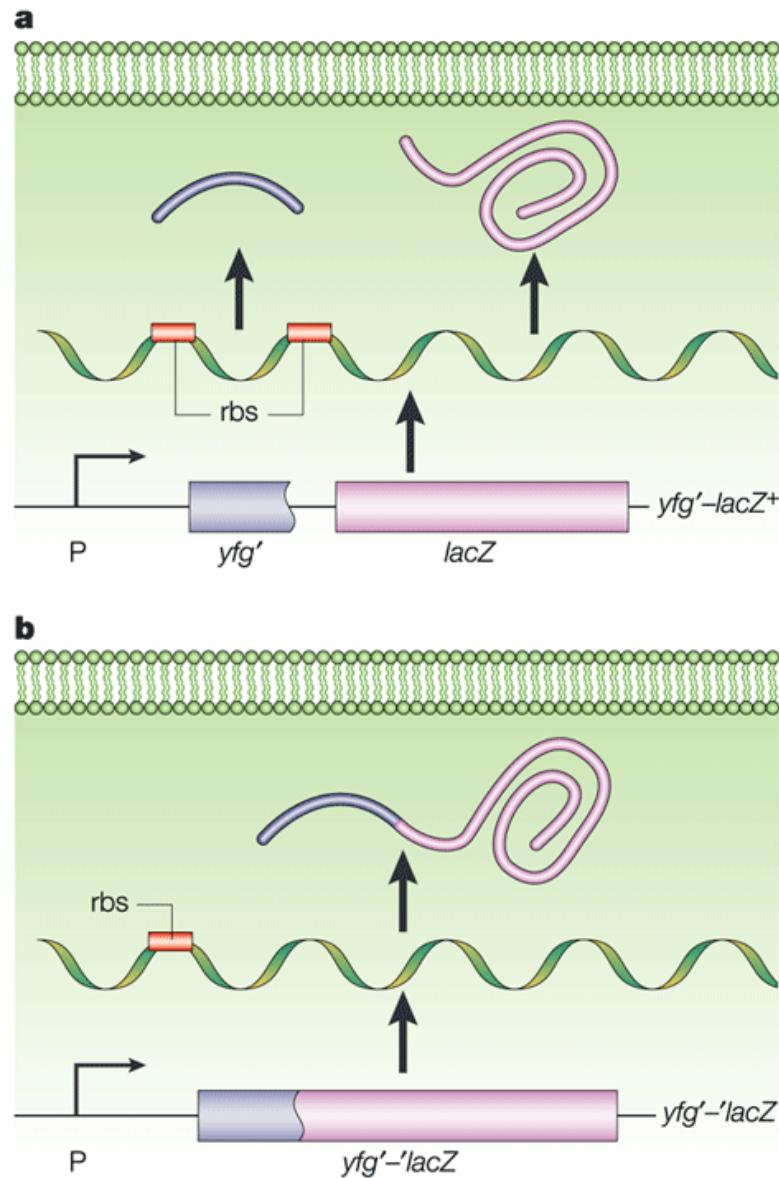


Reporterski sistemi

- Transkripcijske fuzije:
SD-zaporedje je tudi na reporterskem delu – na ravni proteina zaznamo samo reporter.
- Translacijske fuzije:
na 5'-koncu so regulatorna zaporedja (5'-UTR) in ATG (lahko pa celotno kodirajoče zaporedje), ki pripadajo zapisu, ki ga preučujemo, sledi pa zapis za reporter v istem bralnem okviru – nastane fuzijski protein z reporterjem.
- GFP (zeleni fluorescirajoči protein)
- luciferaza
- CAT (kloramfenikol-acetiltransferaza)
- β -galaktozidaza

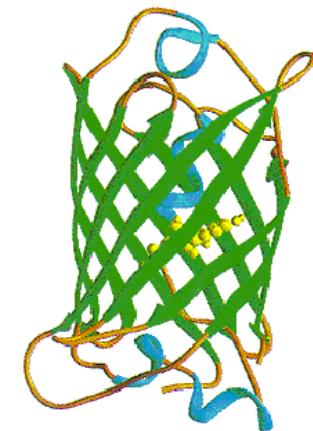


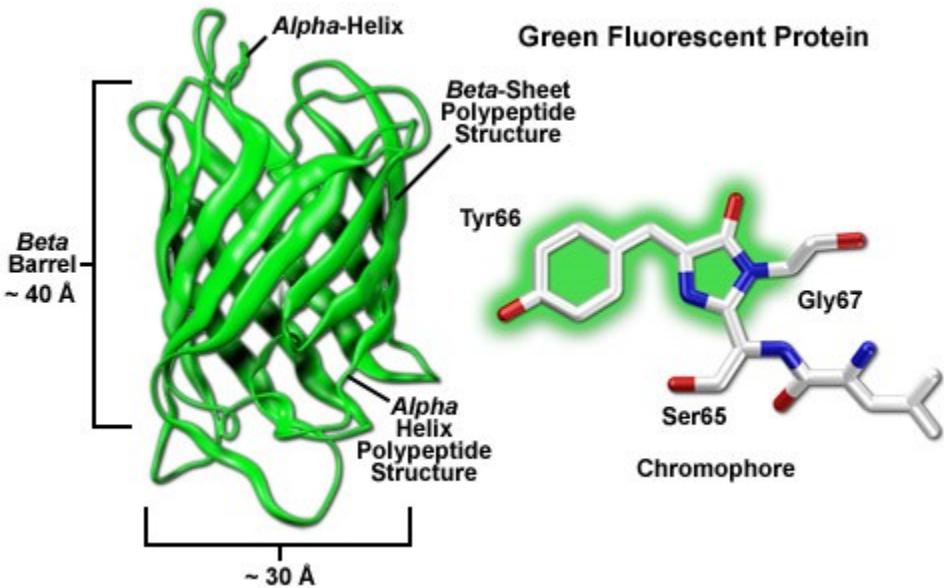
Two types of LacZ fusion. The target gene *yfg* ('your favourite gene') is transcribed from its promoter (P). **a** | a 5' fragment of the target gene (*yfg'*) is fused to a wild-type *lacZ⁺* gene to make a transcriptional fusion. In this construct, the transcription of *lacZ⁺* is driven by the *yfg* promoter. The polycistronic mRNA that is produced is translated by ribosomes that bind independently to the ribosome-binding sites (rbs) that are located immediately upstream of each open reading frame to produce an amino-terminal fragment of Yfg and wild-type β-galactosidase. **b** | a 5' fragment of the target gene (*yfg'*) is fused in the correct translational reading frame to a large 3' fragment of *lacZ* ('*lacZ*') to produce a translational fusion. Transcription of this hybrid gene is driven by the *yfg* promoter (P), and the mRNA that is produced is translated from the *yfg* rbs to produce a hybrid protein with amino-terminal sequences of Yfg and a large functional carboxy-terminal fragment of β-galactosidase.



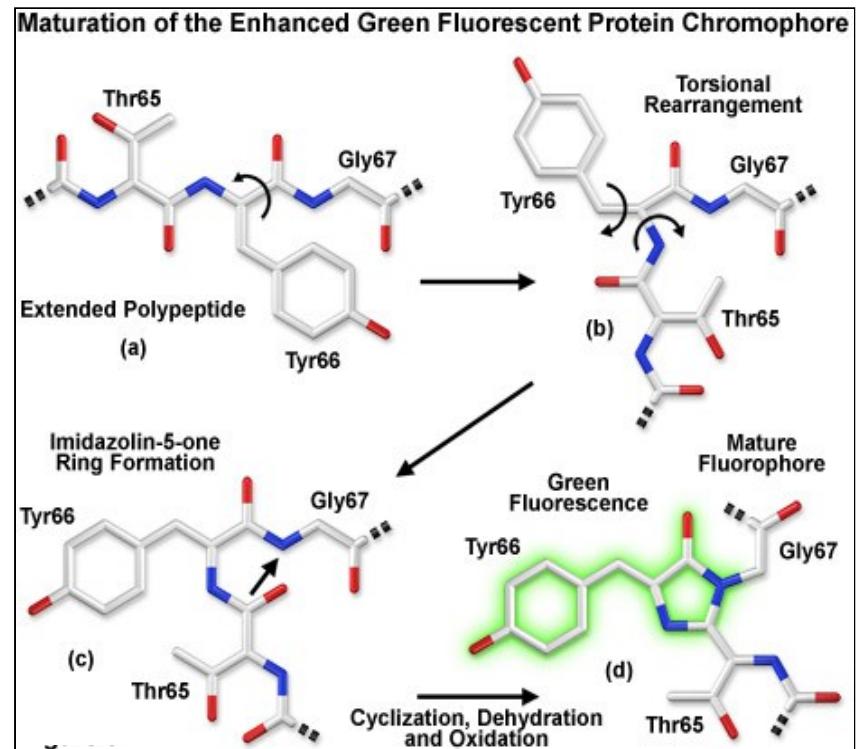
Reporterski sistemi /2

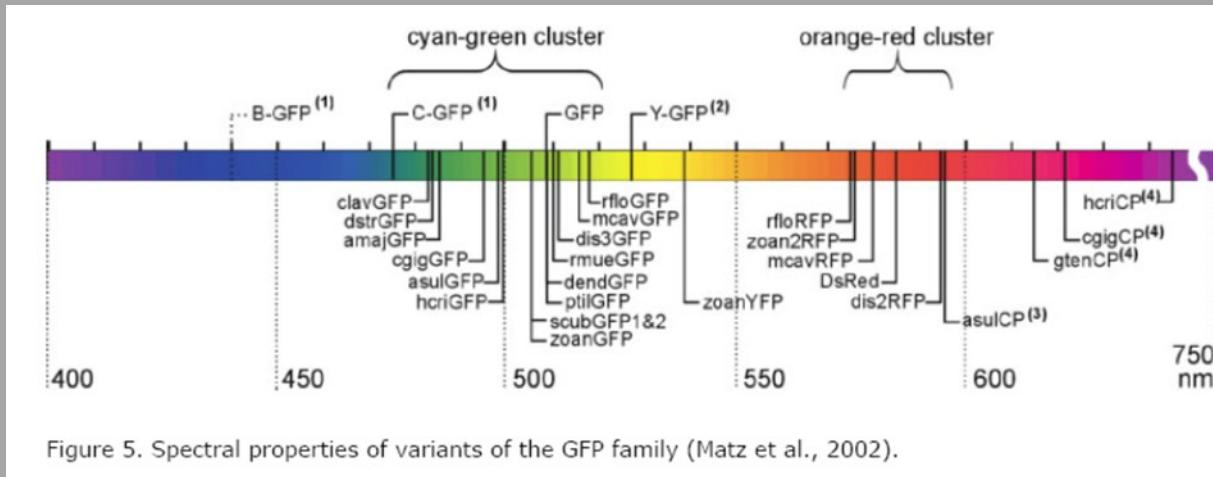
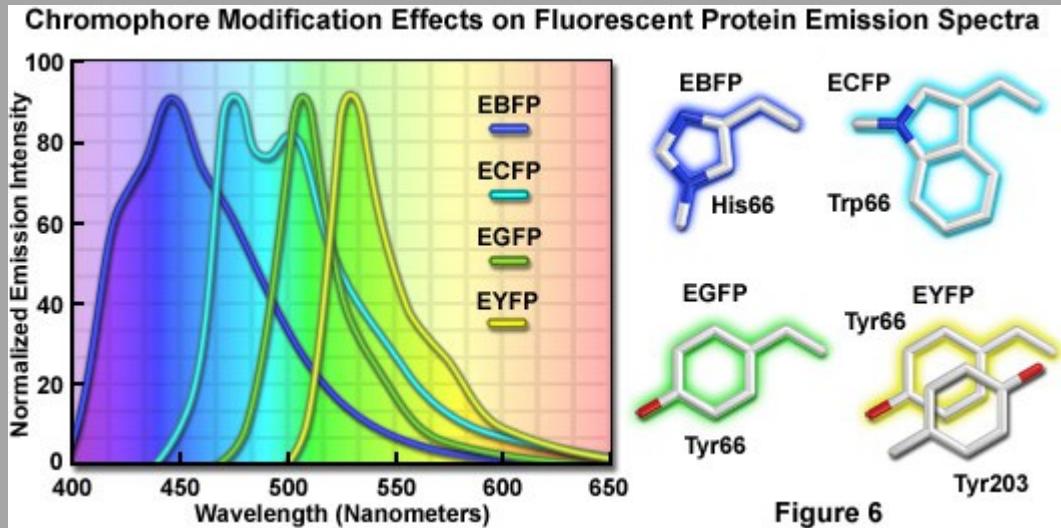
- **GFP** iz meduze *Aequorea victoria*, fluorescira v spodnjem zelenem delu vidnega spektra. Detektiramo oddano svetlubo. Omogoča zasledovanje izražanja poljubnega označenega zapisa *in vivo*. Obstajajo mutanti, ki močneje fluorescirajo in/ali fluorescirajo v drugih delih spektra (BFP, YFP, RFP). Uporabljajo ga za lokalizacijo označenih proteinov v celicah, lahko tudi spremljajo gibanje označenih proteinov v realnem času.
- **luciferaza** iz kresnic, bakterij ali drugih organizmov: v prisotnosti kisika in ATP povzroči razgradnjo luciferina (različne strukture, odvisno od organizma) v oksiluciferin, pri čemer nastane svetloba.
- **CAT** je bakterijski encim, ki inaktivira kloramfenikol s tem, da ga acetilira. Raven izražanja določamo s testom aktivnosti, v katerem detektiramo fluorescenčno ali radioaktivno označen produkt.
- **β -gal**: produkt gena *lacZ*. Aktivnost merimo s pomočjo sintetičnih substratov, ki nosijo kromofor. Kvantificiramo spektrofotometrično. Manj uporabno zaradi celicam lastne galaktozidazne aktivnosti.





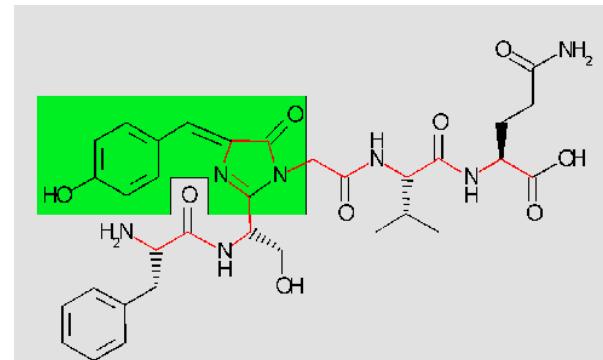
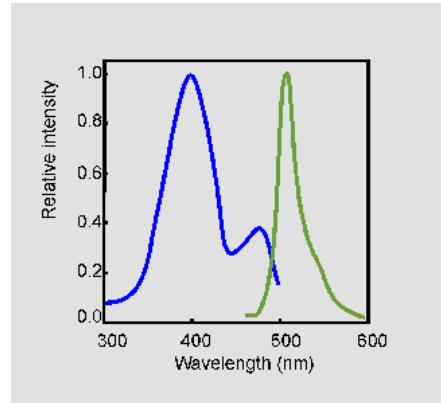
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>





Fluorescirajoči proteini

- **GFP (28 kDa):**
 $\lambda_{\text{exc}} = 395 \text{ nm}, 470 \text{ nm} // \lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$
- pri GFP je kromofor v resnici na tripeptidu Ser-dehidroTyr-Gly → imidazolidonski obroč
- variante GFP: raba kodona, prilagojena preiskovanemu organizmu, ojačanje signala (eGFP)
- druge barve: YFP, CFP, BFP - omogočajo kolokalizacijske študije



<http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/index.htm>

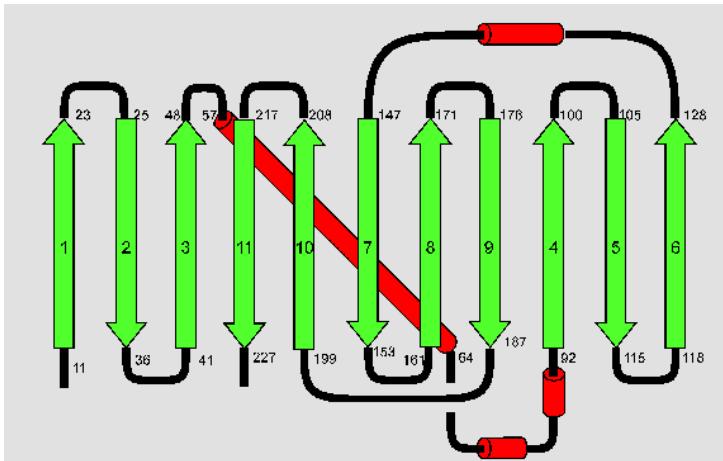
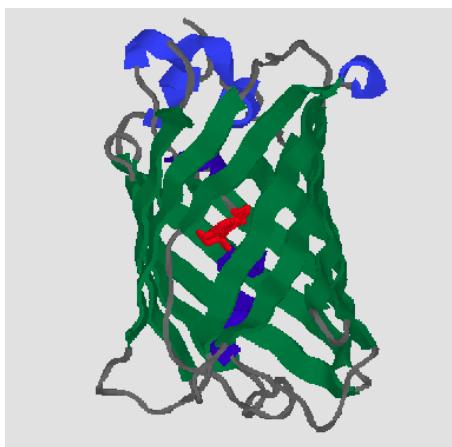
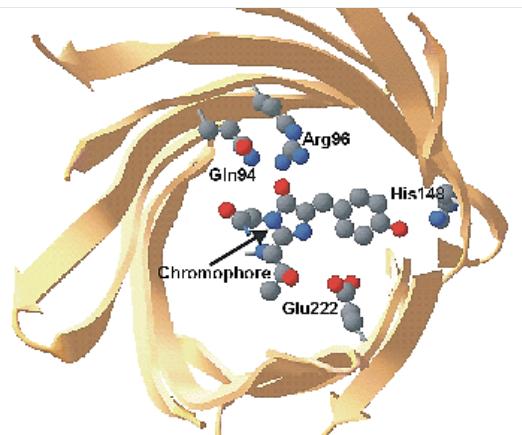
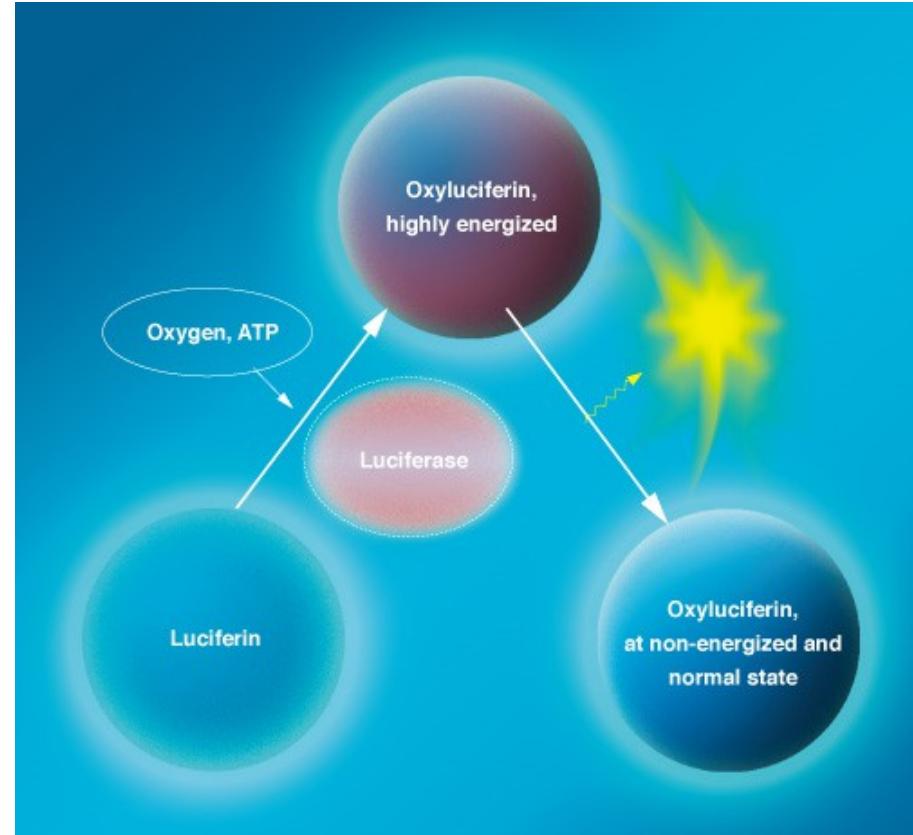
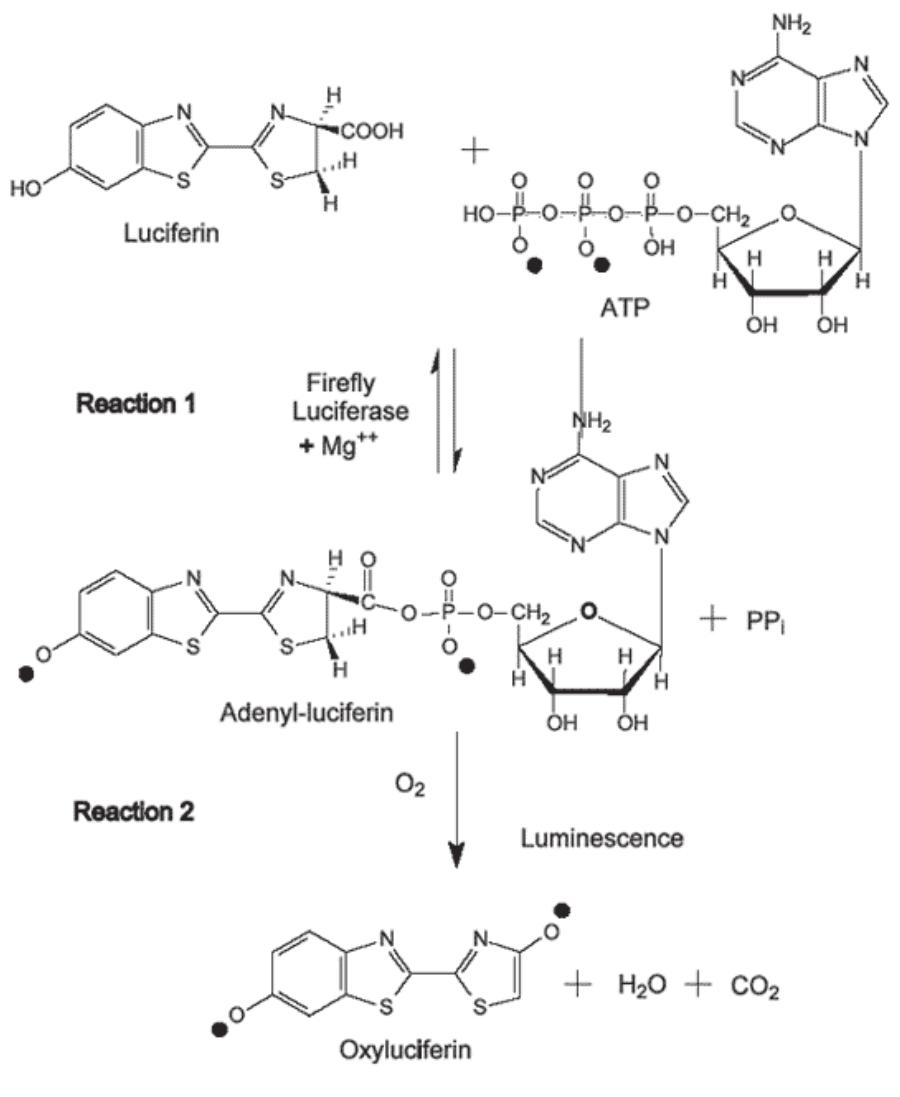


Table 1 | Properties of the best FP variants^{a,b}

Class	Protein	Source laboratory (references)	Excitation ^c (nm)	Emission ^d (nm)	Brightness ^e	Photostability ^f	pKa	Oligomerization
Far-red	mPlum ^g	Tsien (5)	590	649	4.1	53	<4.5	Monomer
Red	mCherry ^g	Tsien (4)	587	610	16	96	<4.5	Monomer
	tdTomato ^g	Tsien (4)	554	581	95	98	4.7	Tandem dimer
	mStrawberry ^g	Tsien (4)	574	596	26	15	<4.5	Monomer
	J-Red ^h	Evrogen	584	610	8.8*	13	5.0	Dimer
	DsRed-monomer ^h	Clontech	556	586	3.5	16	4.5	Monomer
Orange	mOrange ^g	Tsien (4)	548	562	49	9.0	6.5	Monomer
	mKO	MBL Intl. (10)	548	559	31*	122	5.0	Monomer
Yellow-green	mCitrine ^j	Tsien (16,23)	516	529	59	49	5.7	Monomer
	Venus	Miyawaki (1)	515	528	53*	15	6.0	Weak dimer ^j
	YPet ^g	Daugherty (2)	517	530	80*	49	5.6	Weak dimer ^j
	EYFP	Invitrogen (18)	514	527	51	60	6.9	Weak dimer ^j
Green	Emerald ^g	Invitrogen (18)	487	509	39	0.69 ^k	6.0	Weak dimer ^j
	EGFP	Clontech ^l	488	507	34	174	6.0	Weak dimer ^j
Cyan	CyPet	Daugherty (2)	435	477	18*	59	5.0	Weak dimer ^j
	mCFPm ^m	Tsien (23)	433	475	13	64	4.7	Monomer
	Cerulean ^g	Piston (3)	433	475	27*	36	4.7	Weak dimer ^j
UV-excitable green	T-Sapphire ^g	Griesbeck (6)	399	511	26*	25	4.9	Weak dimer ^j

^aAn expanded version of this table, including a list of other commercially available FPs, is available as **Supplementary Table 1**. ^bThe mutations of all common ACPs relative to the wild-type protein are available in **Supplementary Table 3**. ^cMajor excitation peak. ^dMajor emission peak. ^eProduct of extinction coefficient and quantum yield at pH 7.4 measured or confirmed (indicated by *) in our laboratory under ideal maturation conditions, in (mM · cm)⁻¹ (for comparison, fluorescein at pH 7.4 has a brightness of about 69 (mM · cm)⁻¹). ^fTime for bleaching from an initial emission rate of 1,000 photons/s down to 500 photons/s ($t_{1/2}$; for comparison, fluorescein at pH 8.4 has $t_{1/2}$ of 5.2 s); data are not indicative of photostability under focused laser illumination. ^gBrightest in spectral class. ^hNot recommended (dim with poor folding at 37 °C). ⁱCitrine YFP with A206K mutation; spectroscopic properties equivalent to Citrine. ^jCan be made monomeric with A206K mutation. ^kEmerald has a pronounced fast bleaching component that leads to a very short time to 50% bleach. Its photostability after the initial few seconds, however, is comparable to that of EGFP. ^lFormerly sold by Clontech, no longer commercially available. ^mECFP with A206K mutation; spectroscopic properties equivalent to ECFP.



<http://www.nikon.com/about/feelnikon/horizons/vol9/02.htm>

Firefly luciferase (Photinus-luciferin:oxygen 4-oxireductase[EC1.13.12.7]) is a 61kD protein (monomer) that catalyzes the mono-oxygenation of the substrate D-luciferin as shown in Figure 1 below.

