

# **TEHNOLOGIJA DNA**

## **Seminarske vaje**

asist. dr. Helena S. elešnik

Govorilne ure: ob torkih po 12 uri  
Telefon: (01) 2419 486  
E-mail: [helena.celesnik@fkkt.uni-lj.si](mailto:helena.celesnik@fkkt.uni-lj.si)

[Domov](#) » [Podatki o fakulteti](#) » [Organizacijske enote](#) » Katedra za biokemijo

## Katedra za biokemijo

### 1. Sedež katedre

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo  
[Katedra za biokemijo](#)  
Cesta v Mestni log 88a  
1000 Ljubljana

faks: 01/2419 487

predstojnica: prof. dr. Brigita LENARČIČ

### 2. Osebj katedre

prof. dr. Brigita Lenarčič [2419 484], predstojnica  
izr. prof. dr. Marko Dolinar [2419 480], namestnik predstojnice  
doc. dr. Gregor Gunčar [2419 482]  
asist. dr. Vera Župunski, univ. dipl. kem. [2419 486]  
asist. dr. Marko Novinec, univ. dipl. kem. [2419 488]  
asist. dr. Miha Pavšič, univ. dipl. biokem. [2419 488]  
asist. dr. Nejc Jelen, univ. dipl. biokem. [2419 486]  
asist. Marina Klemenčič, univ. dipl. biokem. [2419 488]  
asist. Matevž Korenč, univ. dipl. biokem. [2419 488]

Nataša Lindič, univ. dipl. mikrobiol., mlada raziskovalka [2419 486]  
Sara Drmota, univ. dipl. biokem., mlada raziskovalka [2419 488]  
Katja Hrovat Arnež, univ. dipl. mikrobiol., mlada raziskovalka [2419 488]  
Tilen Vidmar, univ. dipl. biokem., mladi raziskovalec [2419 488]  
Vid Puš, mladi raziskovalec [2419 488]

dr. Helena Sabina Čelešnik, univ. dipl. mikrobiol. [2419 486]  
dr. Petra Prijatelj Žnidaršič, univ. dipl. kem. [2419 486]  
Matjaz Ivanec, univ. dipl. inž. kem. tehnol. [2419 486]

Upokojena profesorja:  
izred. prof. dr. Metka Renko [2419 484]

Učitelji s krajšim delovnim časom:  
prof. dr. Tamara Lah Turnšek [Nacionalni inštitut za biologijo, tel. 2412 972]  
izred. prof. dr. Kristina Djinović Carugo  
prof. dr. Roman Jerala  
prof. dr. Igor Križaj  
prof. dr. Janez Plavec  
prof. dr. Boris Turk

Podatki o fakulteti
Študijski programi
Informacije za dijake
Raziskovalna dejavnost
Fakultetno osebje
Študijske zadeve
Vstop v VIS
Študenti študentom
Oglasna deska
Spletna učilnica
Druge dejavnosti
Pomembnejše povezave
Alumni UL FKKT
Dogodki
Informacije za zaposlene

# Seminarske vaje:

- Ob sredah od 12:00 do 13:30.
  - Vaj ne bo v sredo, 20. novembra 2013
  - Prisotnost obvezna, podpisovanje
- 
- 2. in 9. oktober: razumevanje vektorjev v tehnologiji DNA
  - Od 16. oktobra naprej vaši seminarji

## **Izbor teme za seminarsko**

Teme bodo razporejene po tednih, tako da bodo sovpadale s predavanji

## **VSEBINA PREDAVANJ IZ TEHNOLOGIJE DNA:**

1. Uvod. Primerjava DNA-tehnologije in sintezne biologije: metode in cilji.
2. Dvohibridni sistemi
3. DNA v forenzičnih analizah.
4. Analize DNA v diagnostiki.
5. Analize DNA v sistematiki in ekologiji.
6. Uporaba rekombinantnih mikroorganizmov in biomase v biotehnologiji
7. Gensko spremenjene rastline. Rekombinantne bakterije v agronomiji.
8. Gensko spremenjena hrana. Rastline v molekularni biotehnologiji.
9. Transgenske živali. Tehnologija izbijanja genov. Utišanje genov z RNAi.
10. Izvirne celice, njihovo gensko spreminjanje in uporaba.
11. Kloniranje sesalcev.
12. Projekt Človekov genom in nadaljnje analize razlik v genomih. Določanje zaporedij drugih genomov.
13. Genomike in proteomika.
14. Rekombinantna DNA v medicini. Gensko zdravljenje.
15. Zakonsko urejanje dela z rekombinantno DNA.
16. Patentiranje DNA in novih tehnologij, povezanih z DNA
17. Novi pristopi v DNA-tehnologiji.

# Teme za seminarske naloge bodo objavljene na WikiFKKT

Kazali BMP - Wiki FKKT  
<http://wiki.fkkt.uni-lj.si>

10/1/13 1:00 PM

## Main Page

From Wiki FKKT

### Wiki Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Dobrodošli na glavni strani wikija FKKT UL (<http://www.fkkt.uni-lj.si/>) !

Namen tega wikija (<http://sl.wikipedia.org/wiki/Wiki>) je, da učiteljem in študentom omogoči interaktivno sodelovanje pri vsebinah, ki sodijo v sklop kemije, biokemije, kemijskega inženirstva in tehnologije. Wiki lahko uporabljate za opise študijskih predmetov in vsebin, za leksikone posameznih področij, za opise tehnik in tehnologij, za laboratorijske priručnike in dnevnike in še marsikaj drugega.

Za vpisovanje novih podatkov in ustvarjanje novih strani se morate najprej registrirati. Registracija je ročna, vpisane registracijske podatke pa administrator (<mailto:wiki.sysop@fkkt.uni-lj.si>) preverja.

Wiki FKKT UL poganja Mediawiki (<http://en.wikipedia.org/wiki/MediaWiki>), ki je verjetno najbolj znano programje v svetu wikijev in ki ga uporablja tudi Wikipedija ([http://sl.wikipedia.org/wiki/Glavna\\_stran](http://sl.wikipedia.org/wiki/Glavna_stran)). O njegovi uporabi boste zlahka našli vse tiste informacije, ki so potrebne za osnovno delo z wikijem; nekaj jih je zbranih na strani Pomoč (<http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Help:Contents>).

Želimo vam veliko veselja z uporabo novega wikija!

### Povezave do kazal po področjih:

- **Kemija**
- Biokemija in molekularna biologija
- **Kemijsko inženirstvo in tehnologija**
- Tehniška varnost

### Študijski predmeti po bolonjskih stopnjah

V študijskem letu 2009/10 se začne študij po bolonjskih načelih za 1. letnike študija na FKKT in to na 1. in 3. stopnji, medtem ko se bo prenovljeni študij na 2. stopnji začel v študijskem letu 2012/13.

- 1. stopnja
- 2. stopnja
- 2. stopnja
- stari dodiplomski program
- Biomedicina

Biokem-2 - Wiki FKKT

Za vpis v razpored seminarjev se boste morali registrirati

### 1. semester

- Tehnologija DNA in seminarji
- Metode določanja 3D strukture makromolekul
- Biofizikalna kemija I
- izbirni predmet 1 (1)
- izbirni predmet 2 (1)
- uvod v raziskovalno delo

# Objava novic za predmet Tehnologija DNA tudi v spletni učilnici FKKT

UL FKKT - Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

10/ 1/ 13 11:52 AM



✉ Zemljevid strani



Iskani niz  →

Podatki o fakulteti
Študijski programi
Informacije za dijake
Raziskovalna dejavnost
Fakultetno osebje
Študijske zadeve
Vstop v VIS
Študenti študentom
Ogledna učilnica
<b>Spletna učilnica</b>
Druga dejavnost
Pomembnejše povezave
Alumni UL FKKT
Dogodki
Informacije za zaposlene



## Obvestila

[Ta teden na UL FKKT .. »](#)

[Microsoftova programska orodja MSDNAA .. »](#)

[Obvestilo vsem študentom o predavanju za varno delo .. »](#)

[Simbioza vabi k prijavi .. »](#)

[Prodaja osebne varovalne opreme za študente .. »](#)

[Razpis za nagrade in priznanje Maksa Samca za leto 2013 .. »](#)

[Simbioza povezuje tudi v letu 2013 .. »](#)

[Razpis tem za Prešernove nagrade UL za študijsko leto 2013/2014 .. »](#)

[Prikaži vsa .. »](#)

[Arhiv .. »](#)

## Fakultetni utrip

[Tanja Žakeli zmagovalka svetovnega pokala .. »](#)

[Igrajmo se znanost – Kemijske čarovnije .. »](#)

[Uspešna slovenska ekipa na kemijski olimpiadi v Moskvi .. »](#)

[Zaključek poletne šole kemijskih znanosti 2013 .. »](#)

[Nadaljuje se delo Poletne šole kemijskih znanosti 2013 .. »](#)

[Drugi dan poletne šole kemijskih znanosti 2013 .. »](#)

[Začela se je poletna šola kemijskih znanosti 2013 .. »](#)

[Prikaži vsa .. »](#)

[Arhiv .. »](#)

# Seminarji

- Raziskovalni članki s področja DNA tehnologije
- Naslednji teden si izberete temo in datum predstavitve
- Za svojo temo predlagate članek (v roku do 14 dni pred predstavitvijo).
- Članek mora biti objavljen v letu 2013
- Pri iskanju članka se osredotočite predvsem na uporabljene metode in tehnike.
- Asistentka članek odobri (če predlagani članki niso optimalni za predstavitev posameznih metod, lahko asistentka študentu članek dodeli)



# Seminarji

- povzetek seminarja na spletu (WikiFKKT)
- predstavitev seminarja v predavalnici (PPT):
  - 8-10 minut predavanja (striktno)
  - 10 minut diskusije
  -
- Seminar v pisni obliki
- študent, ki predstavlja članek, mora razumeti opisane tehnike in metode. Te bo v diskusiji po potrebi natančno obrazložil.

# SEMINARJI

**Povzetek (600 - 700 besed)**, objavite na strani WikiFKKT v petek pred sredinimi seminarji

**Poročilo (1300 - 1400 besed)**, pošljete asistentki po e-pošti v petek pred sredinimi seminarji

**Poročilo :** 1. Uvod (zakaj so temo sploh preučevali, zakaj je pomembna, kaj je že znano

na področju in kaj oni na novo opisujejo)

2. Strnite materiale & metode ter rezultate (pri tem obrazložite, zakaj so se

odločili narediti nek eksperiment, kaj so hoteli z njim ugotoviti, ter na kratko opišite eksperiment in izsledke)

3. Diskusija, pomembnost rezultatov, pomanjkljivosti dela

*(V primeru izostanka pri seminarjih: izberete enega od člankov, ki so ga predstavili v vaši odsotnosti – napišete poročilo tega članka: 3000 besed)*

# **Končna ocena predmeta Tehnologija DNA:**

seminar 20 %

sodelovanje pri seminarjih 10 % (ocenjeno z 0-10)

odgovori na izpitna vprašanja 70 %

(Ocena pri seminarjih je končna).

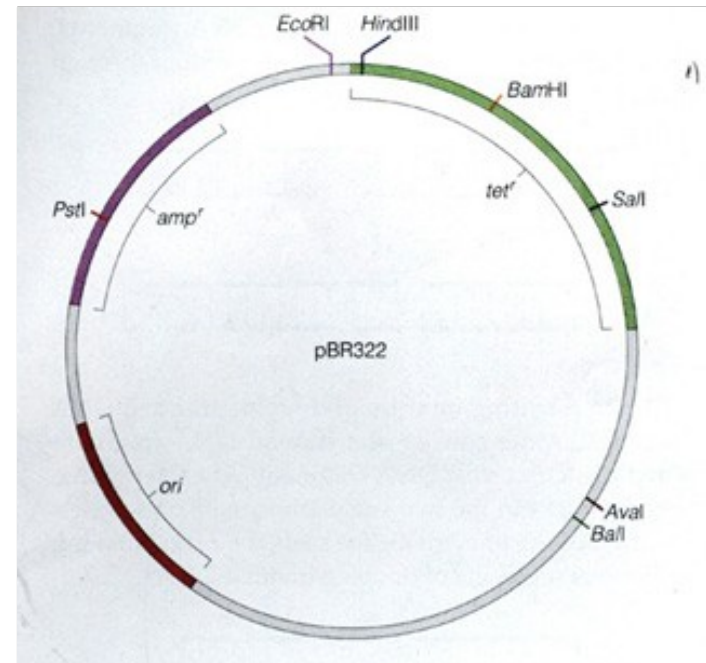
# **Razumevanje vektorjev v tehnologiji DNA**

# KAJ JE VEKTOR?

Vektor je molekula DNA, s katero prenesemo fragment tuje DNA v gostiteljsko celico. V gostiteljski celici proizvede mnogo lastnih kopij in kopij tuje vstavljene DNA.

Klonirni vektor: vektor, ki se uporablja za reprodukcijo DNA fragmentov

Ekspresijski vektor: vektor, ki se uporablja za izražanje izbranega gena - zanima nas produkt gena (protein)

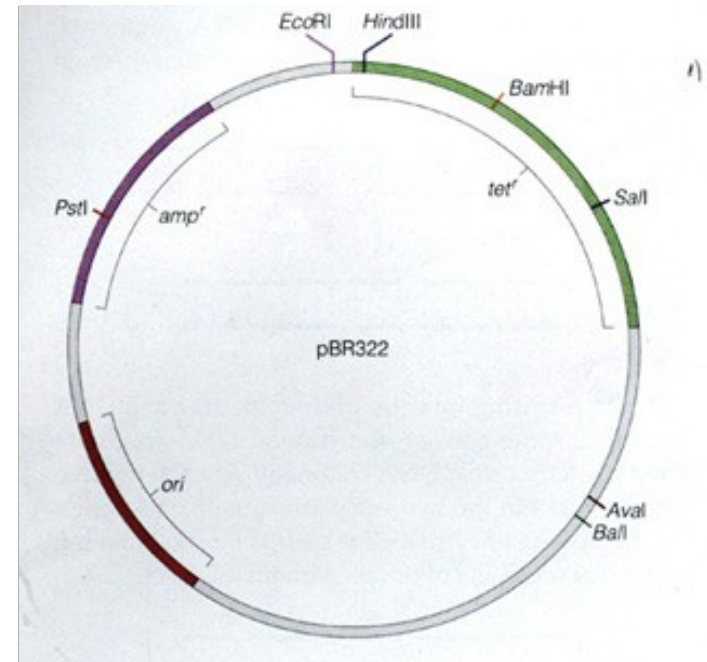


## Koraki v rekombinantni DNA tehnologiji:

- Izolacija našega gena
- Insercija gena v vektor (najpogosteje s cepitvijo z RE in povezovanjem z encimom ligazo)
- Prenos nastale rekombinantne DNA v gostiteljsko celico (bakterije ali kvasovke)
- Selekcija celic, ki so sprejele konstrukt (seleksijski markerji)
- Namnožitev konstrukta v celicah
- Izolacija konstrukta
- Uporaba konstrukta v drugih celicah

# TRI LASTNOSTI VSEH KLONIRNIH VEKTORJEV:

1. Sekvence, ki omogoajo propagacijo vektorja v bakteriji (lahko tudi v kvasovkah), *ori*
2. Klonirno mesto, v katero vstavimo tujo DNA (pogosto je to polinukleotidno mesto, ki skupaj vsebuje mesta za več različnih restrikcijskih encimov)
3. Metoda za selekcijo celic, ki so sprejele vektor (npr. selekcijski markerji za odpornost na antibiotike)



# **TIPI KLONIRNIH VEKTORJEV:**

**Plazmidni:** kloniranje 0.1-10 kb fragmentov.

**Fagni:** kloniranje 8-25 kb fragmentov.

**Kozmidi:** kloniranje 35-50 kb fragmentov.

**BAC (Bacterial Artificial Chromosomes):** kloniranje 75-300 kb fragmentov.

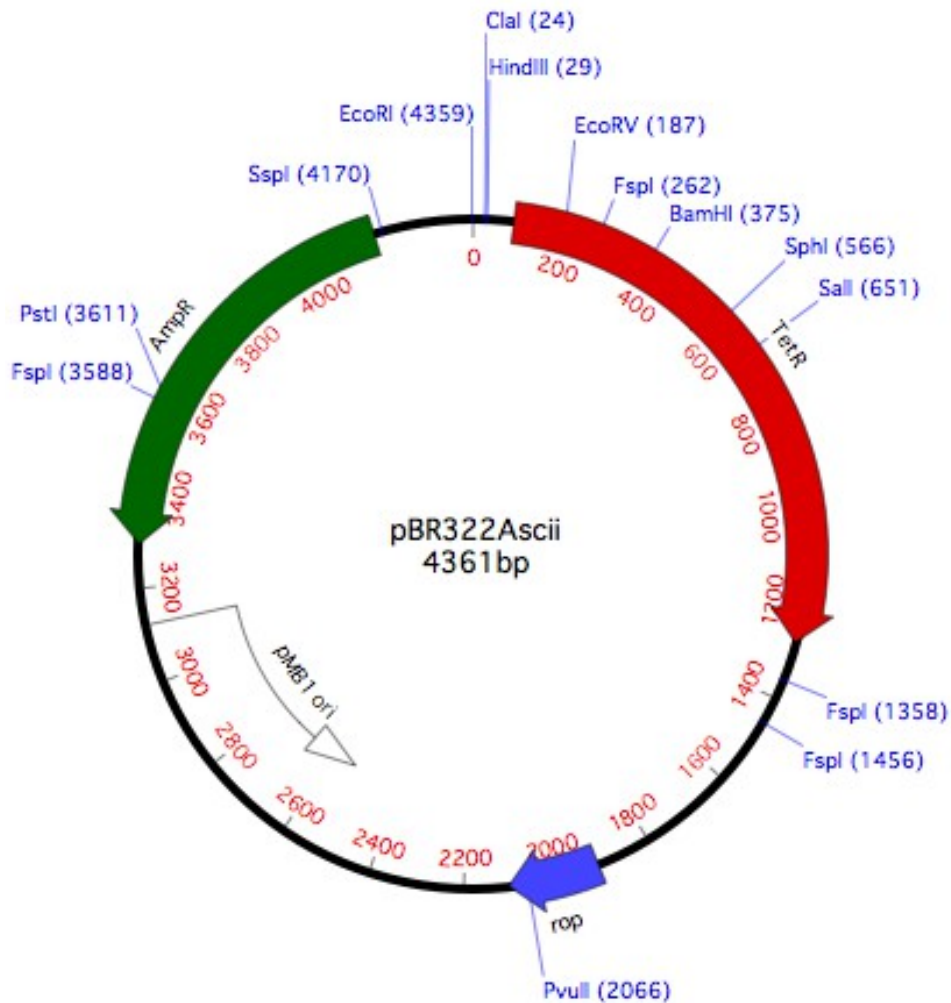
**YAC (Yeast Artificial Chromosomes):** kloniranje 100-1000 kb fragmentov.



## Plazmidni klonirni vektorji:



- Plazmidi so krožne, dvovertižne DNA (velike od nekaj kb do ~100 kb)
- Nahajajo se v bakterijah ter jedrih nekaterih evkariontskih celic
- Lahko se podvajajo neodvisno od gostiteljske celice
- Vanje vstavljamo do ~10 kb fragmente
- Plazmidni vektorji imajo *ori*, antibioti ni selekcijski marker, ve edinstvenih mest za restrikcijo
- Vektor ima ponavadi polilinker, kjer se nahaja ve edinstvenih restrikcijskih mest (za lažje kloniranje različnih DNA fragmentov)
- Plazmidni vektor se pripravi iz naravnega vektorja (odstrani se nepotrebne sekvence, doda se nujne sekvence, npr. selekcijski marker)



## pBR322:

- Velikost
- Številčenje (za etek pri mestu za encim EcoRI)
- RE mesta
- Seleksijski markerji
- *ori* od plazmida pMB1
- Rop protein (vpliva na *ori* in s tem na število kopij plazmida)
- Ni označeno: promotorji (-35, -10), terminatorji, RBS, ATG

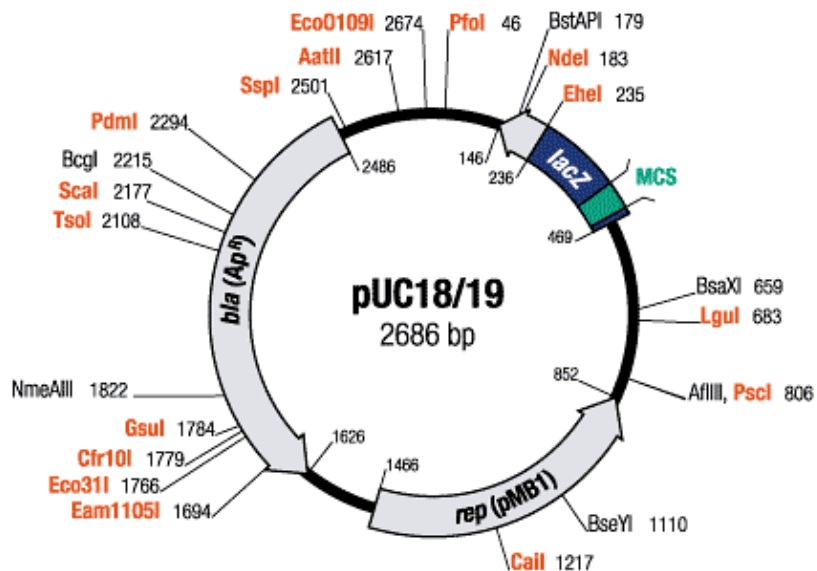
## ORI (origin)

- Je DNA zaporedje, ki signalizira za etek replikacije DNA, bogat je z A-T pari
- *ori* kromosoma *E. coli* (*oriC*): 250 nt (3x13-meri + 4x9-meri)
- Glede na *ori*:
  - Lahko ima plazmid širok ali ozek spekter gostiteljskih celic (broad ali narrow host range)
  - Je število kopij plazmida veliko ali majhno (high/low copy number)
- *Ori* pMB1: protein Rop in število kopij plazmida:
  - e sta *ori* in gen za Rop neokrnjena, je plazmida na celico ~20 kopij. e v zaporedju *ori* naredimo mutacijo 1 nt ter izbrišemo gen za Rop, bo plazmida ~500 kopij na celico

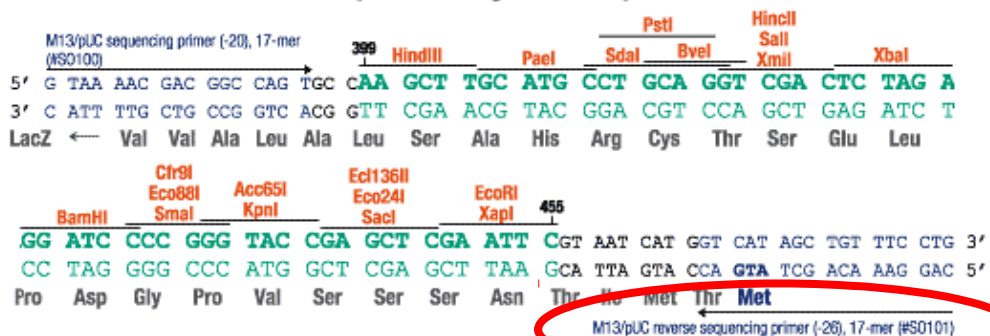
- Posamezni plazmidi v isti celici imajo razli na mesta *ori* (kompatibilnostne skupine plazmidov)

<i>ori</i>	plazmid	St. kopij plazmida
pMB1	pBR322 in izpeljanke (npr. pET)	15-20
Mutiran pMB1	pUC	500-700
p15A	pACYC in izpeljanke	10-12
pSC101	pSC101 in izpeljanke	~ 5
ColE1	ColE1	15-20
SV40	Za replikacijo v evk celicah	

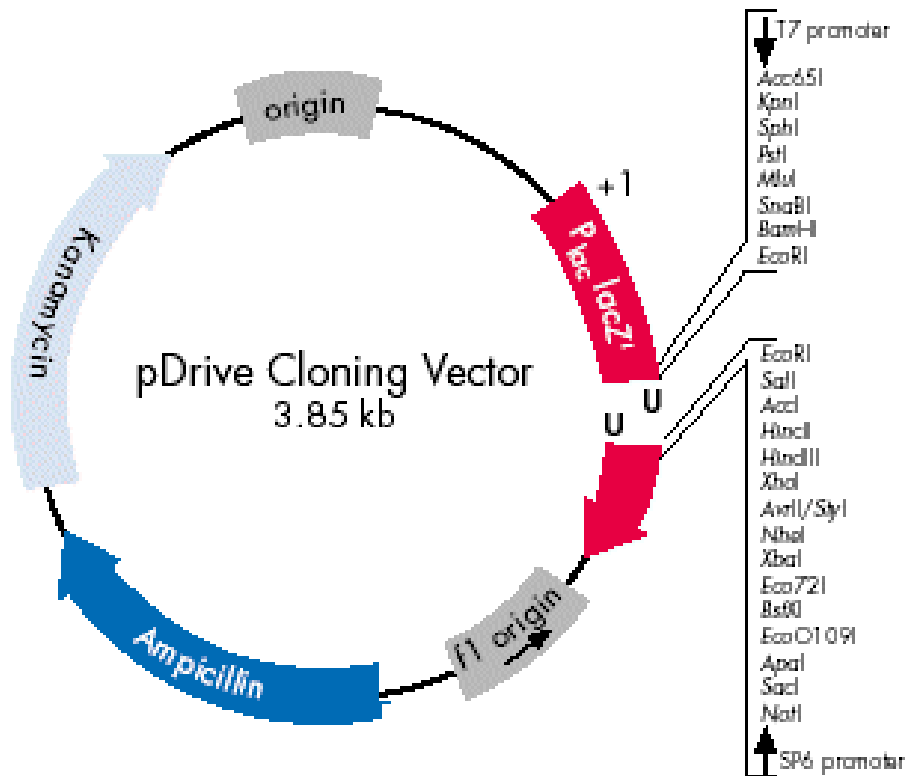
# Modro-bela selekcija (Blue-White screening)



## Multiple cloning sites of pUC18



- Vsebuje del operona lac, ki kodira encim beta-galaktozidazo ( $\beta$ -gal)
- X-gal, substrat beta galaktozidaze, v prisotnosti  $\beta$ -gal spremeni barvo (modre kolonije)
- Uspešna insercija tuje DNA v polilinker (oz. MCS) uni i lac operon,  $\beta$ -gal postane nefunkcionalna, kolonije so zato bele



- **U-A hibridizacija (ne potrebujemo RE):**

Vektor je lineariziran, ima U “overhang” na 3’ koncu

+

Zligiramo s PCR produkti, ki jih pripravimo s polimerazo Taq ali drugimi nonproofreading polimerzami (nimajo 3’-5’ popraviljanja).

Ti PCR prod. imajo “A overhang”

- **e zelimo, lahko uporabimo RE**

- **Promotorji za *in vitro* transkripcijo: bakteriofagni T7, SP6** (reakcija vsebuje templet + fagno T7 polimerazo + NTPs)

- **F1 *ori* iz bakteriofaga f1** poleg osnovnega *ori*-ja

# TIPI KLONIRNIH VEKTORJEV:

Plazmidni

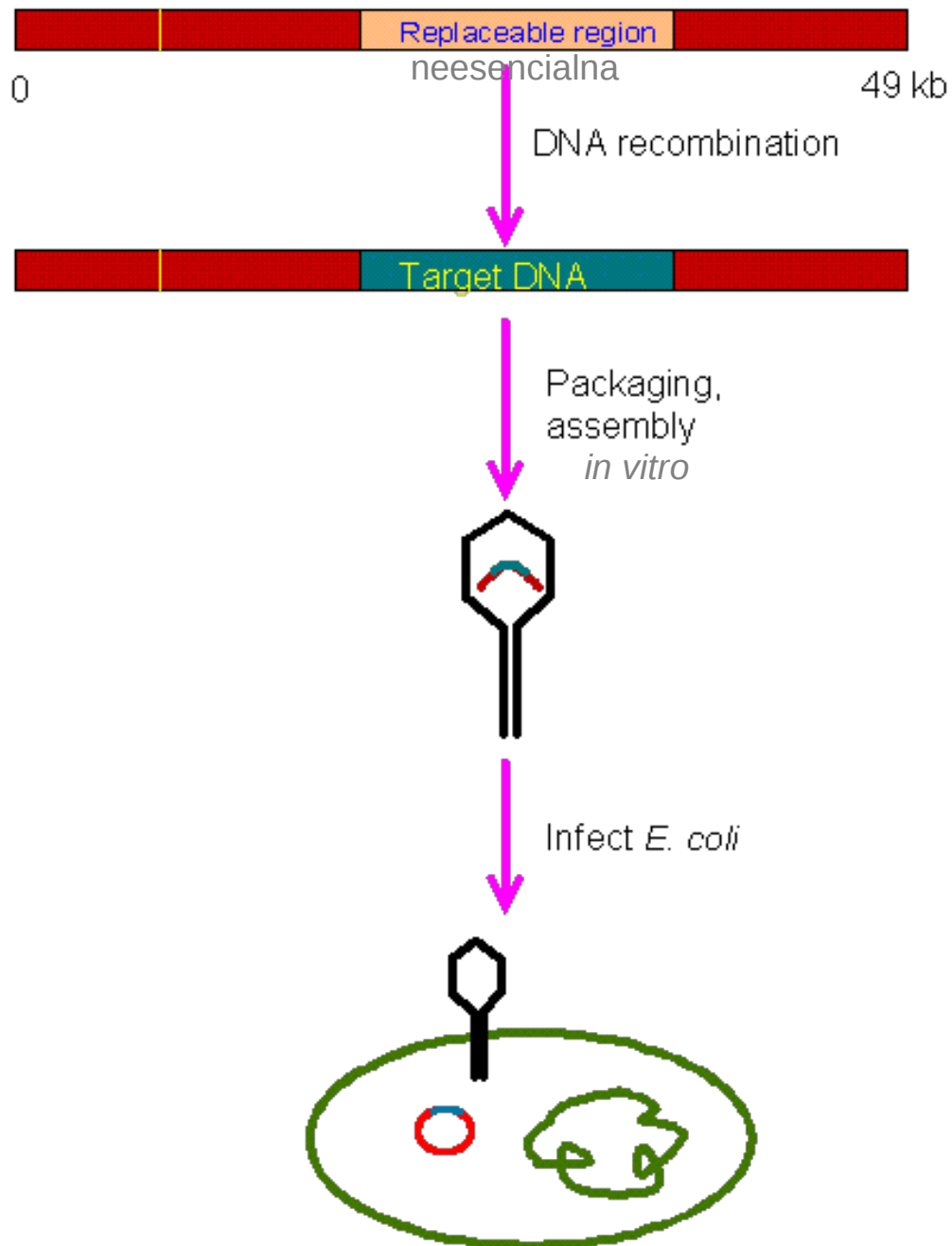
Fagni

Kozmidi

BAC (Bacterial Artificial Chromosomes)

YAC (Yeast Artificial Chromosomes)

## $\lambda$ -Phage genome

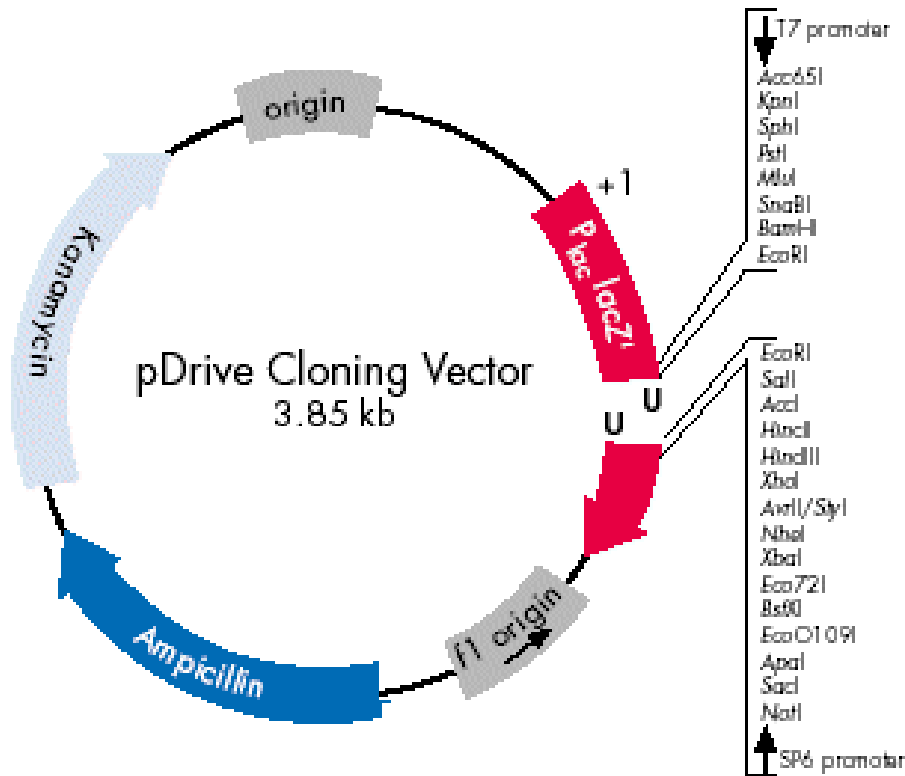


**Fagni:** izpeljani iz bakterijskega virusa (bakteriofaga) lambda.

Linearne DNA molekule, dele lambda DNA zamenjamo s tujo DNA, ne da bi zmotili življenjski cikel faga.

Prednost uporabe faga:  
1000x boljša transformacijska u inkovitost kot pri plazmidnih vektorjih

Vstavimo lahko do 25 kb tuje DNA



## F1 *ori* iz bakteriofaga f1 poleg osnovnega *ori*-ja

- klonirni plazmidi, ki vsebujejo f1 *ori* se imenujejo **fagmidi**
- fagmid se lahko podvaja kot plazmid (*ori* za dsDNA replikacijo) ali pa se zapakira kot ssDNA v virusne delce (f1 *ori* za ssDNA replikacijo in pakiranje):

bakterijo, ki vsebuje fagmid, okužimo s fagom M13K07, ki ima virusne komponente, ki omogočijo ssDNA replikacijo in pakiranje fagmidne DNA v fagne delce.



# TIPI KLONIRNIH VEKTORJEV:

Plazmidni

Fagni

Kozmidi

BAC (Bacterial Artificial Chromosomes)

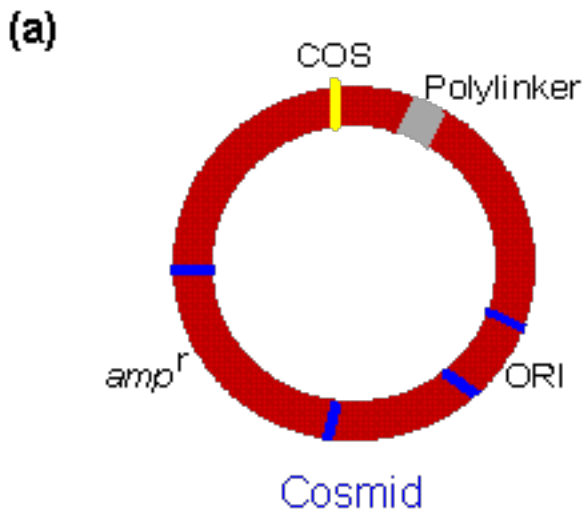
YAC (Yeast Artificial Chromosomes)

## Kozmid:

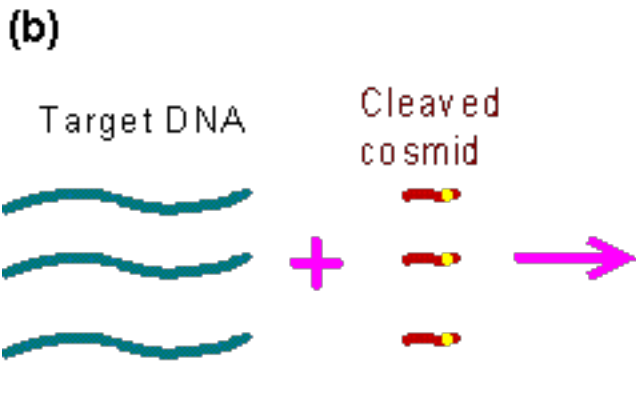
ekstrakromosomalna krožna DNA,

ki vsebuje kombinacijo lastnosti fagnih in plazmidnih vektorjev.

Kloniranje 35-50 kb fragmentov. Visoka transformacijska u inkovitost.



Obnašajo se kot plazmidi. Vanje vstavimo tujo DNA preko restrikcijskih mest in tako rekombinantno DNA vstavimo v lambda kapsido, da se injicira v bakterijo.



Kozmid se v bakteriji obnaša kot krožni plazmid.

# TIPI KLONIRNIH VEKTORJEV:

Plazmidni

Fagni

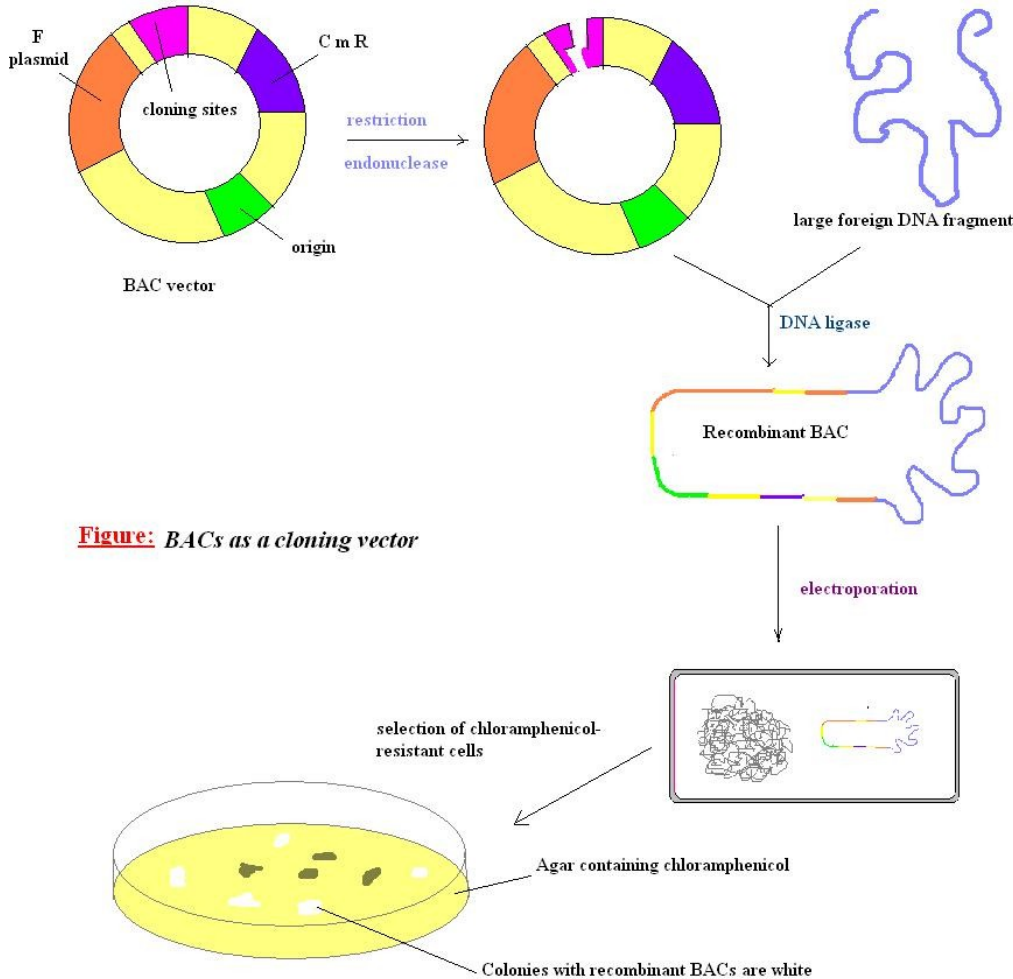
Kozmidi

**BAC (Bacterial Artificial Chromosomes)**

YAC (Yeast Artificial Chromosomes)

# BAC (Bacterial Artificial Chromosomes):

temeljiijo na konjugativnih F plazmidih. Kloniranje 75-300 kb fragmentov.



**Figure:** BACs as a cloning vector

F-plazmid (Functional fertility plasmid) vsebujejo par (partition) gene, ki zagotavljajo enakomerno porazdelitev plazmida v h erinske celice.

BAC se uporablja za sekvenciranje genomov (del DNA organizma namnožimo v BACu in nato sekvenciramo)

# TIPI KLONIRNIH VEKTORJEV:

Plazmidni

Fagni

Kozmidi

BAC (Bacterial Artificial Chromosomes)

YAC (Yeast Artificial Chromosomes)

## YAC (Yeast Artificial Chromosomes):

umeten kromosom (DNA kvasovk ligirana z bakterijskim plazmidom)

YAC vsebuje telomere, *ori*, centromerno regijo kvasovk, selekcijski marker.

ARS (autonomous replication sequence) - vsebuje *ori* kvasovk

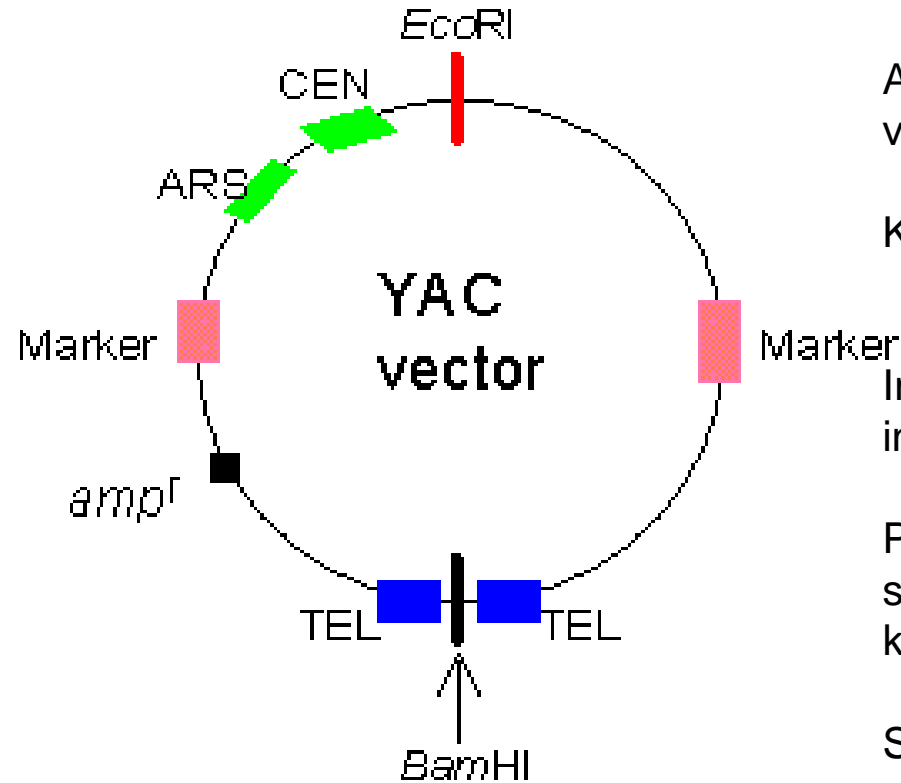
Kloniranje 100-1000 kb fragmentov.

Ima tudi *ori* in antibiotični marker za amplifikacijo in selekcijo v *E. coli*

Prednost tega vektorja:

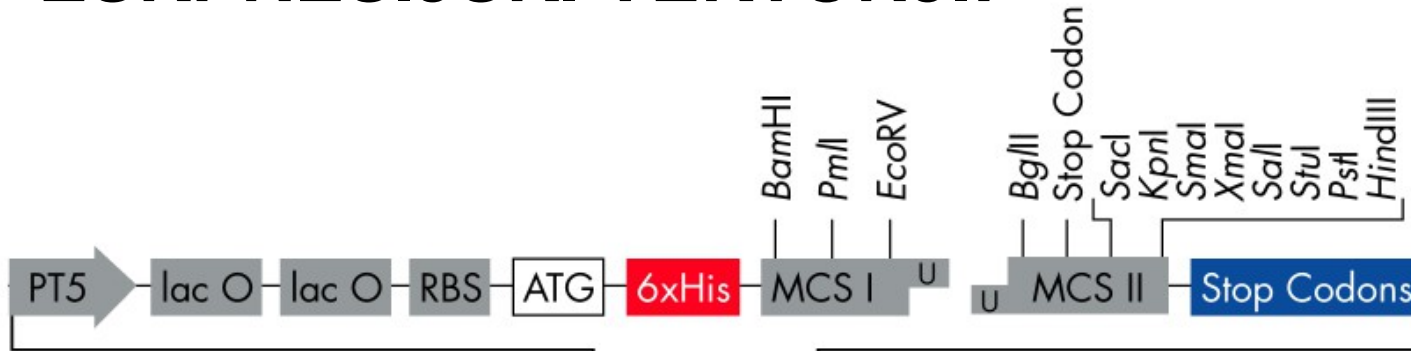
se lahko uporabi za ekspresijo evk. proteinov, ki potrebujejo posttranslacijske modifikacije.

Slabost: ni stabilen vektor, 2 YACa se lahko zrekombinirata in dobimo udne rezultate, del inserta se lahko izgubi (delecija) ipd.



—

# ESKPRESIJSKI VEKTORJI:



Namen uporabe eksp. vektorjev

Promotor PT5 (močen fagni promotor, ki ga prepozna RNA polimeraza iz *E. coli*)

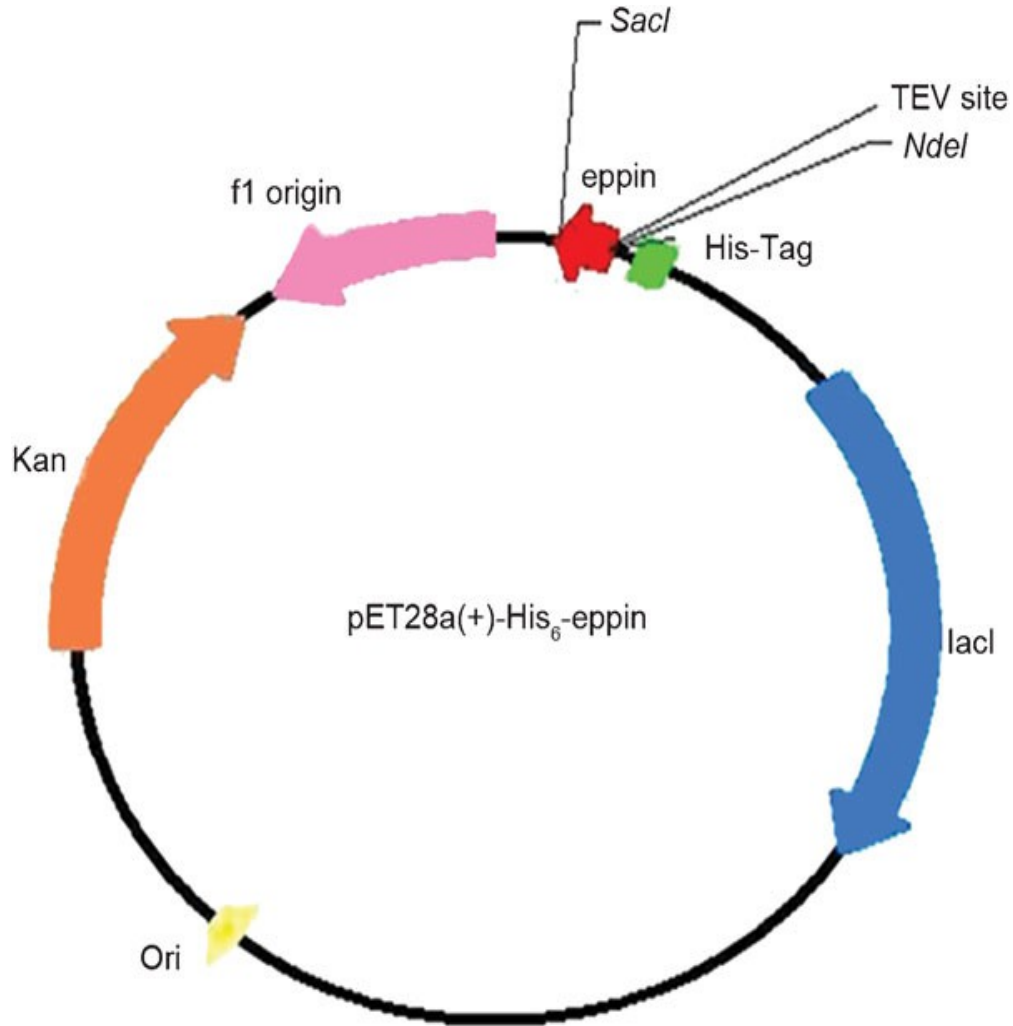
2X lac operator (indukcija izražanja)

RBS, ATG, stop kodoni (v vseh 3 bralnih okvirjih)

6xHis tag (heksahistidinska oznaka za ainitetno izolacijo)

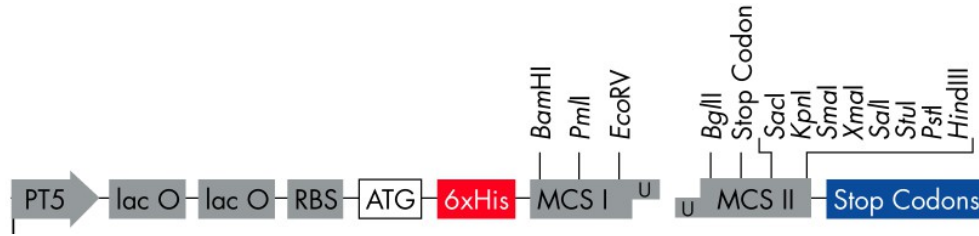
(oznako lahko dobimo tako, da jo vnesemo v primerje ali tako, da vstavimo insert za His v vektorju)

Da dobimo nativni protein, lahko cepimo His-oznako s proteazami (npr. TEV). Mesto za proteazo v vektorju.

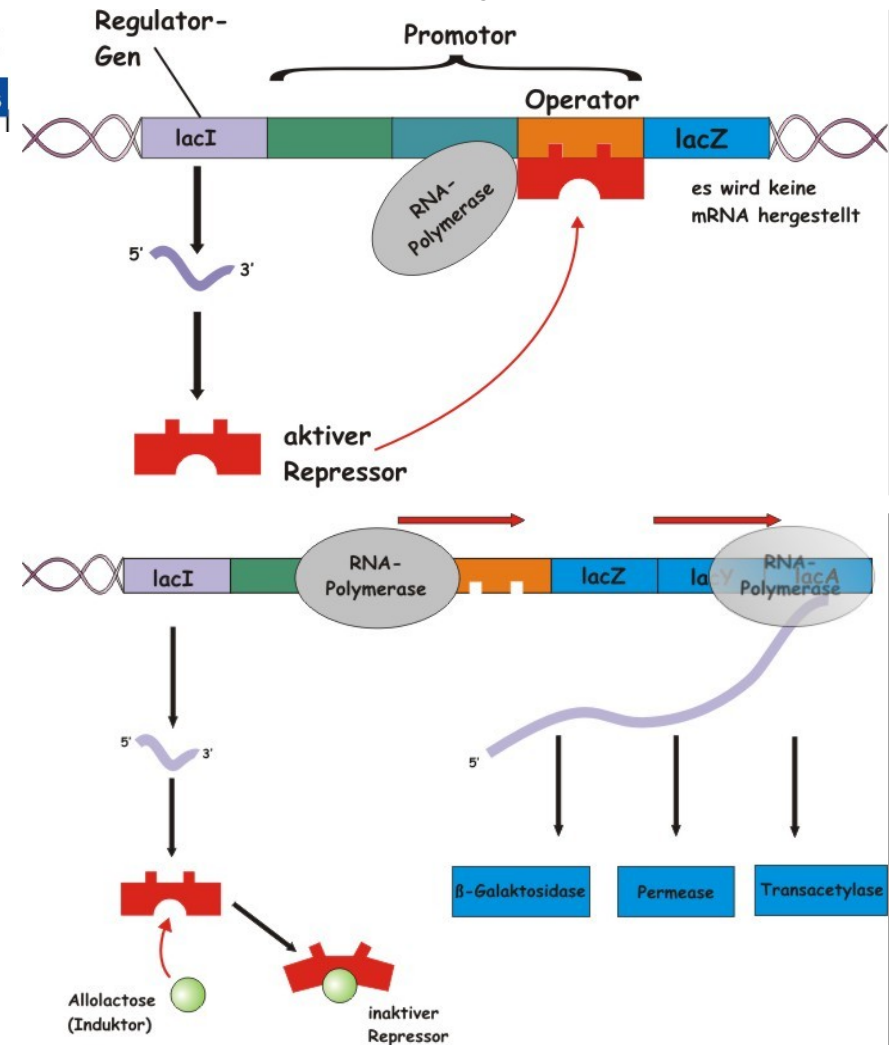




# Operator *lac* v ekspresijskih vektorjih



## Lac operon bakterije *E. coli*



**Dodatek IPTG gojišču s celicami inducira izražanje našega proteina**

(IPTG je analog alolaktoze in ga celice ne morejo hidrolizirati)

# PROBLEM NEŽELENEGA IZRAŽANJA ŠE PRED INDUKCIJO (leaky promoter):

Problematično, če je produkt inserta citotoksičen

Vzamemo *E. coli* s plazmidom pLysS:

***E. coli* BL21(DE3) pLysS** : F<sup>-</sup> *ompT hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm*  
λ(DE3) pLysS (Cm<sup>r</sup>) ( λ(DE3): *lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5* )

pLysS nosi Cm- rezistenco ter fagni lizocim T7, ki uinkovito atenuira aktivnost T7 RNA polimeraze. Tako dobimo boljšo inhibicijo neželenega izražanja pred dodatkom induktorja

# Kako brati bakterijski genotip

npr. Genotip F- recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) thi-1 gyrA462

**F-** = Nima konjugacijskega F-plazmida

**recA1** = za manjšo frekvenco neželene rekombinacije pri kloniranju; te celice so občutljive na UV; imajo okvaro pri popravljanju DNA.

**endA1** = za preprečevanje nespecifične razgradnje DNA s strani endonukleaze I (uporabno za boljšo izolacijo DNA, boljša kvaliteta za nadaljnje postopke)

**hsdR17 (rk-, mk+)** ; **rK+/-** = prisotnost/odsotnost restrikcijskega sistema v sevu  
**mK+/-** = prisotnost/odsotnost metilacijskega sistema v sevu

**hsdS** = restrikcijski + metilacijski sistem za določena zaporedja sta odstranjena (Pozor: DNA iz teh celic bi v divjem tipu celic razgradile restriktaze)

**hsdR** = za učinkovito transformacijo klonirane DNA iz reakcij PCR (ker je nemetilirana)

**Thi-1** = potrebuje tiamin

**gyrA462** = mutacija v genu za DNA girazo, celice zato odporne na toksin CcdB

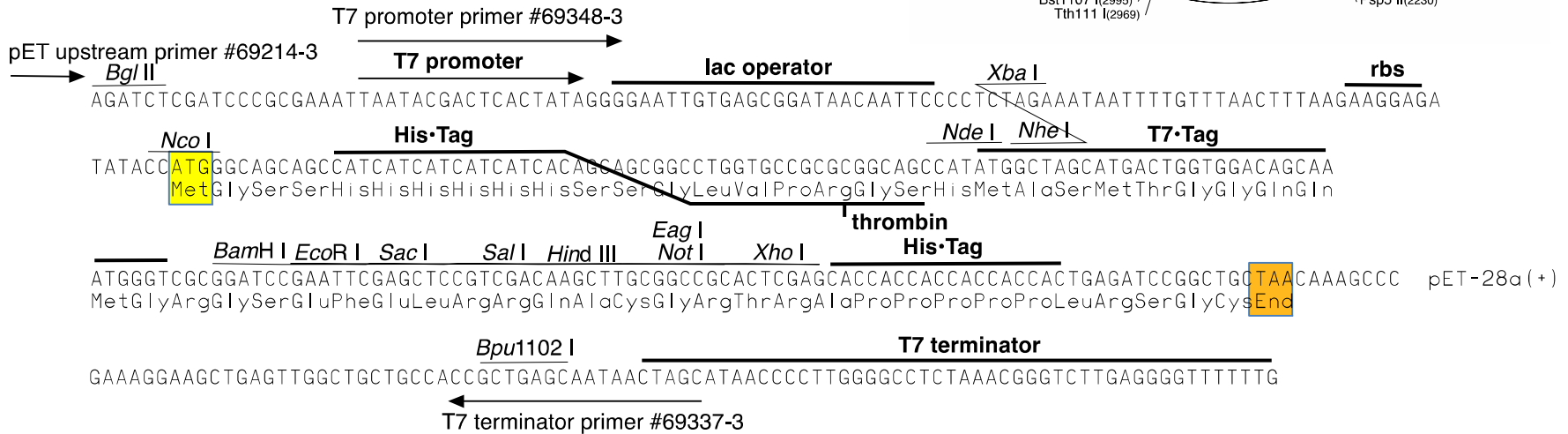
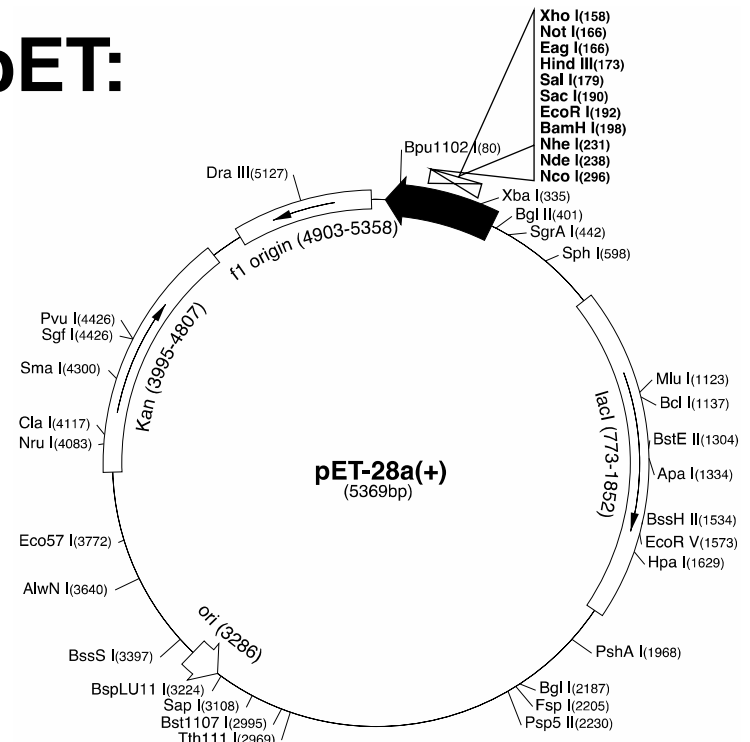
**dam** = metilacija A v zaporedjih GATC obstaja; visoka učinkovitost rekombinacije; popravljanje DNA je aktivno

**dcm** = metilacije drugega C v zaporedjih CCWGG

**dam dcm** = celice nimajo teh metilacijskih mehanizmov

# ESKPRESIJSKI VEKTORJI pET:

- **DE3** = *E. coli* celice, ki izražajo fagno RNA polimerazo T7 na kromosomu.  
Uporaba: za ekspresijo genov na vektorju, ki se izražajo s promotorja T7
- Velikost kon nega proteina – upoštevati je treba velikosti oznak

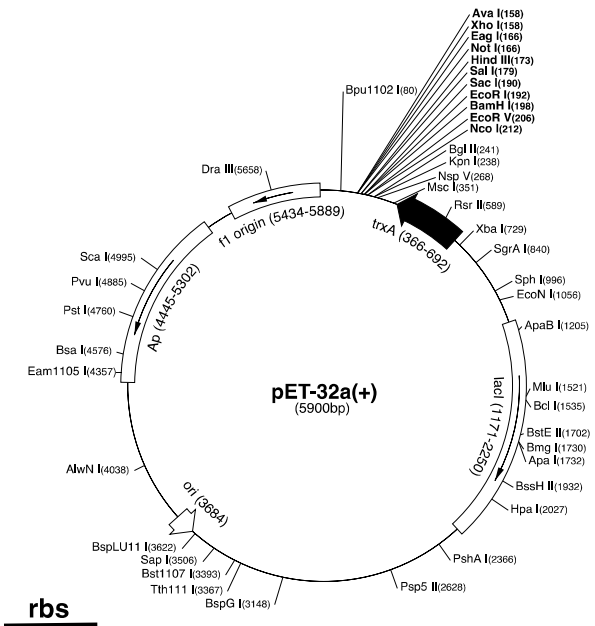


pET-28a-c(+) cloning/expression region

# ESKPRESIJSKI VEKTORJI pET:

## Uporaba proteinskih oznak:

- Za afinitetno izolacijo proteinov (His, GST, idr.)
- Za detekcijo (npr. za W. blot, za imunofluorescenco)
- Za boljšo topnost proteinov (oznake, ki imajo veliko nabityh in polarnih a.k. ostankov, npr. Trx, S); rekombinantni proteini s Trx se manj nalagajo v inkluzijskih telescih, manj precipitirajo)



**T7 promoter** → **lac operator** *Xba I* **rbs**

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA

**Trx·Tag** *Msc I* **His·Tag**

TATACATATGAGC...315bp...CTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCTTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCT  
MetSer 105aa...LeuAlaGlySerGlySerGlyHisMetHisHisHisHisHisHisSerSerSerGlyLeuValProArgGlySer

**S·Tag** *Nsp V* **S·Tag primer #69945-3** *Bgl II* *Kpn I* **thrombin**

GGTATGAAAAGAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAG  
GlyMetLysGluThrAlaAlaAlaLysPheGluArgGlnHisMetAspSerProAspLeuGlyThrAspAspAspAspLys

**pET-32a(+)** *Nco I* *EcoR V* *BamH I* *EcoR I* *Sac I* *Sal I* *Hind III* *Eag I* *Not I* *Ava I* *Xho I* **His·Tag** **enterokinase**

GCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA  
AlaMetAlaAspIleGlySerGluPheGluLeuArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProProLeuArgSerGlyCysEnd

GCCATGGCGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA **pET-32b(+)**  
AlaMetAlaIleSerAspProAsnSerSerSerValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisEnd

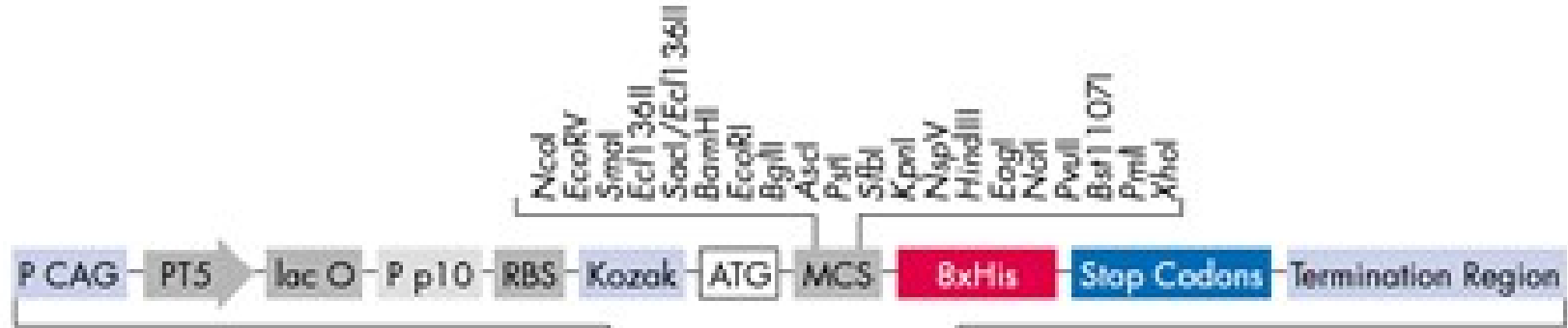
GCCATGGGATATCTGTGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA **pET-32c(+)**  
AlaMetGlyTyrLeuTrpIleArgIleArgAlaProSerThrSerLeuArgProHisSerSerThrThrThrThrThrThrGluIleArgLeuLeuThr

*Bpu1102 I* **T7 terminator**

CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTT  
LysProGluArgLysLeuSerTrpLeuLeuProProLeuSerAsnAsnEnd

← T7 terminator primer #69337-3  
**pET-32a-c(+) cloning/expression region**

# Ekspresijski vektor za izražanje v *E. coli*, v sesalskih celicah in insektnih celicah (shuttle vektor: je vektor, ki se uporablja za propagacijo v različnih gostiteljih)

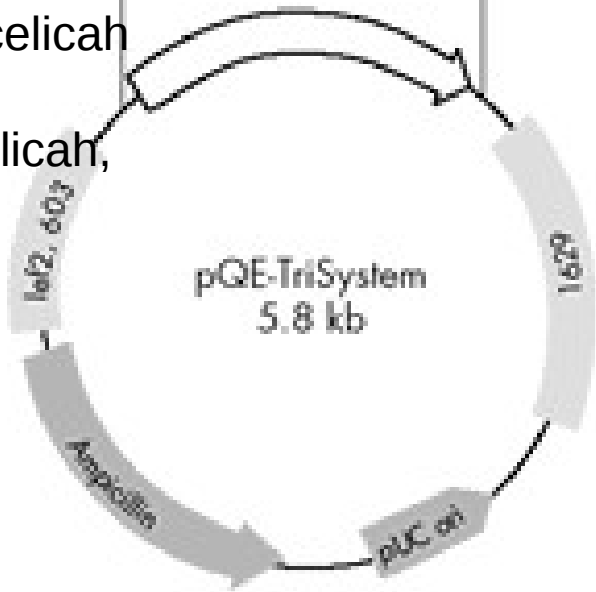


## Promotorji:

- P CAG** – za izražanje v sesalskih celicah
- PT5** – za izražanje v *E. coli*
- P p10** – za izražanje v insektnih celicah, ki smo jih okužili z bakulovirusom

## Iniciacija translacije:

- RBS
- Kozak
- ATG



lef2, 603/1629: robne sekvence bakulovirusa; uporaba za generacijo rekombinantnih bakulovirusov, s katerimi bomo okužili insektne celice

Mammalian expression vector: sesalske celice stabilno integrirajo tujo DNA v svoj genom

## **Zakaj bi izražali proteine v sesalskih ali insektnih celicah?**

- **v evk. celicah dobimo tudi posttranslacijske modifikacije**
- **lahko proizvajamo citoplazemske proteine, proteine, ki se izločajo itd.**

**Slabosti teh sistemov:**

**Nivo izražanja je slabši kot pri bakterijskem izražanju in običajno dobimo le malo celičnega materiala**

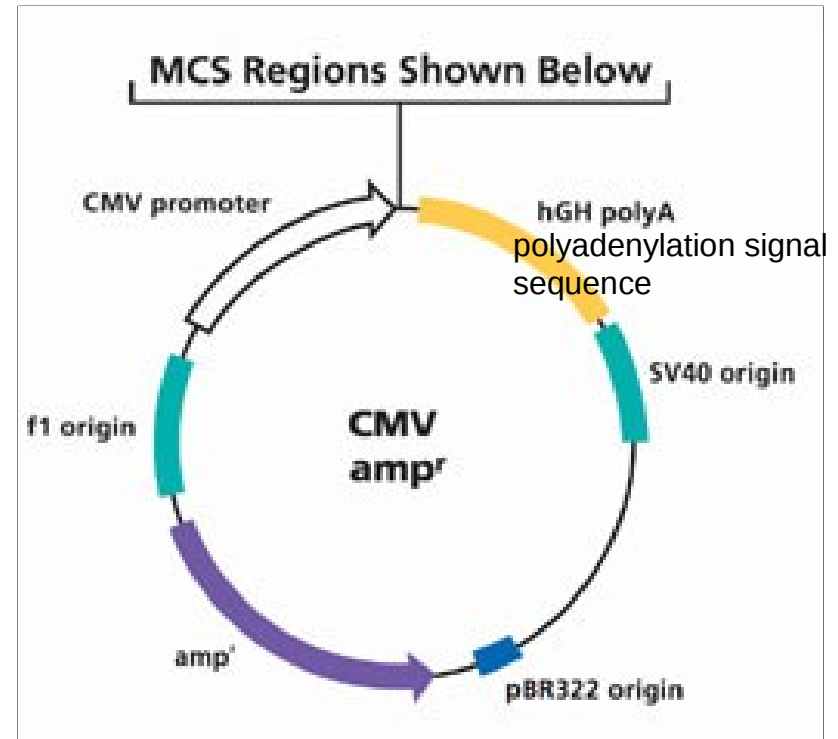
# Izražanje v sesalskih celicah

(npr. CHO, HEK, COS):

S transfekcijo vnesemo vektorje v celice. Tuja DNA se lahko integrira v genom s homologno rekombinacijo (to je **STABILNA TRANSFEKCIJA**) ali pa celice **TRANSFECIRAMO TRANZIENTNO**.

Pogosti promotorji: CMV, SV40  
Selekcijski markerji: neomicin, blastocidin, zeocin, higromicin

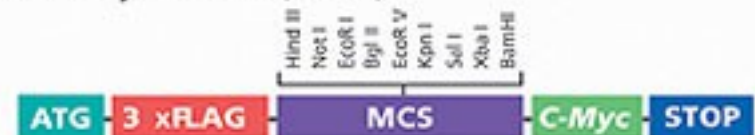
## Tranzientni ekspresijski vektor



pFLAG-CMV-5.1 (4.7 kb)

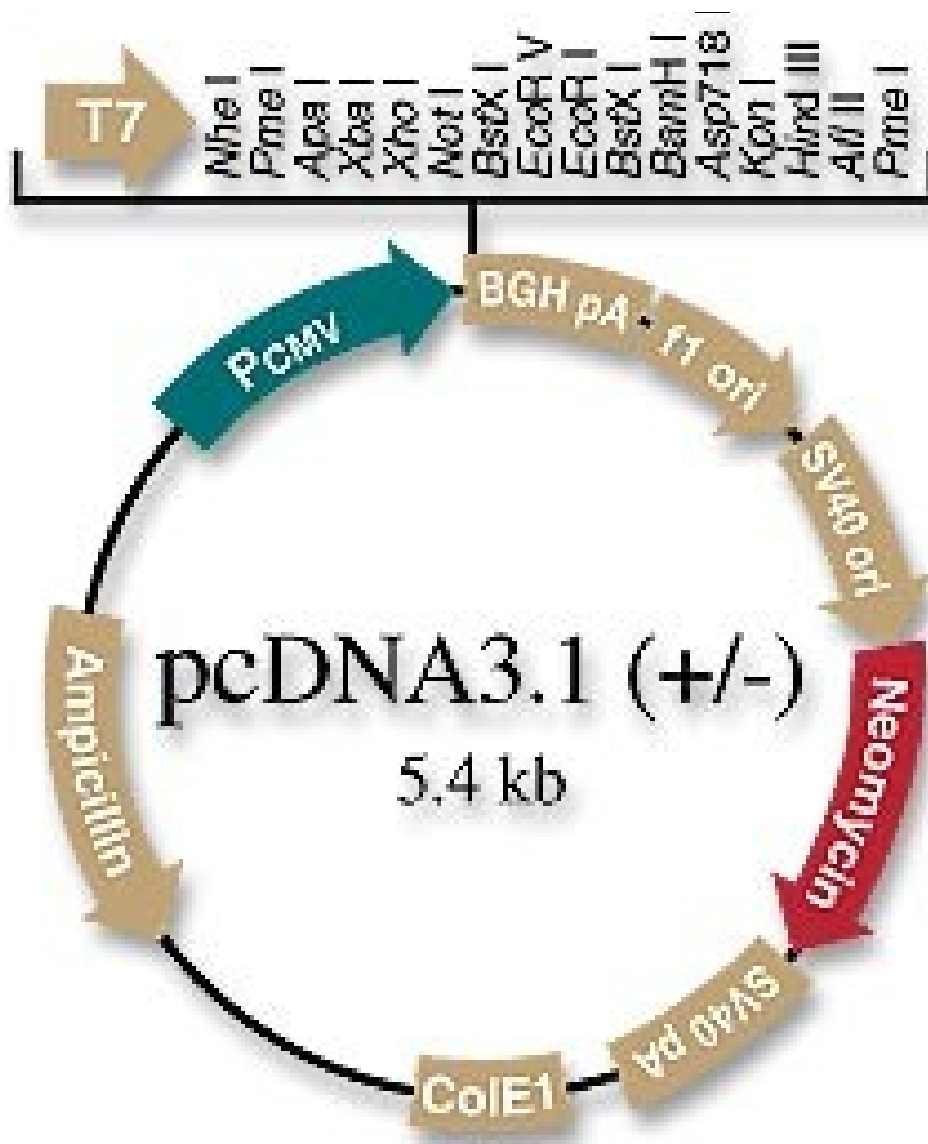


p3xFLAG-Myc-CMV-24 (4.8 kb)





# zražanje v sesalskih celicah



- CMV promotor za dobro ekspresijo
- T7 promotor
- MCS
- BGH poliadenilacijski signal in zaporedje za transkripcijsko terminacijo; omogočata boljso stabilnost mRNA
- SV40 origin
- neomicinska rezistenca za selekcijo v sesalskih celicah
- ampicilinska rezistenca za selekcijo v *E. coli*.

# KLONIRANJE Z METODO GATEWAY (Invitrogen):

<http://www.lifetechnologies.com/>

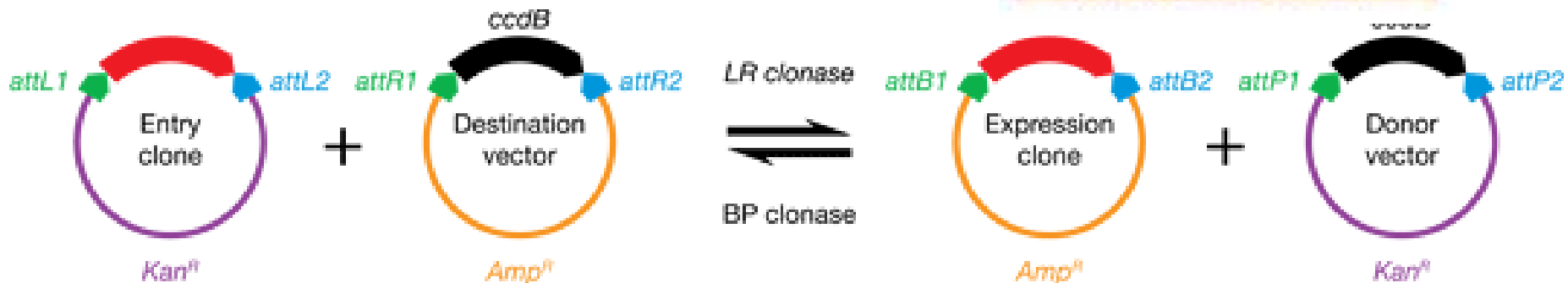
Temelji na rekombinaciji:

- uporaba kratkih Gateway rekombinacijskih mest *att* ter encimske mešanice Clonase (BP/LR Clonase; reverzibilne reakcije)

(ni potrebna uporaba RE in ligaz: ena omejitev klasičnega kloniranja z RE je namreč, da lahko RE režejo naš gen)

- Omogoča kloniranje večjih insertov, >5kb

Combining L x R gives B and P



Izrezanje DNA inserta iz klona Entry in integracija v destinacijski vektor

# Osrednji vektor sistema Gateway je klon ENTRY

- transkripcijsko neaktiven (silent)
- možno vanj klonirati kakršnokoli DNA, tudi toksi ne inserte
- Iz tega vektorja nato lahko prenašamo insert v množico že pripravljenih destinacijskih vektorjev (npr. v že pripravljene vektorje za izražanje proteinov)  
Ohranjena orientacija in bralni okvir

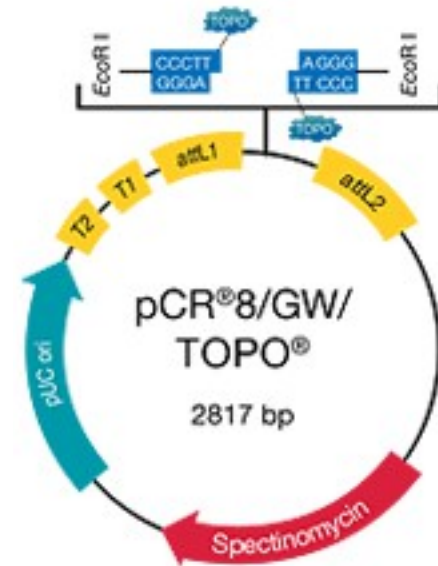


# ZACETNA DNA, KI JO VSTAVLJAMO V KLON ENTRY:

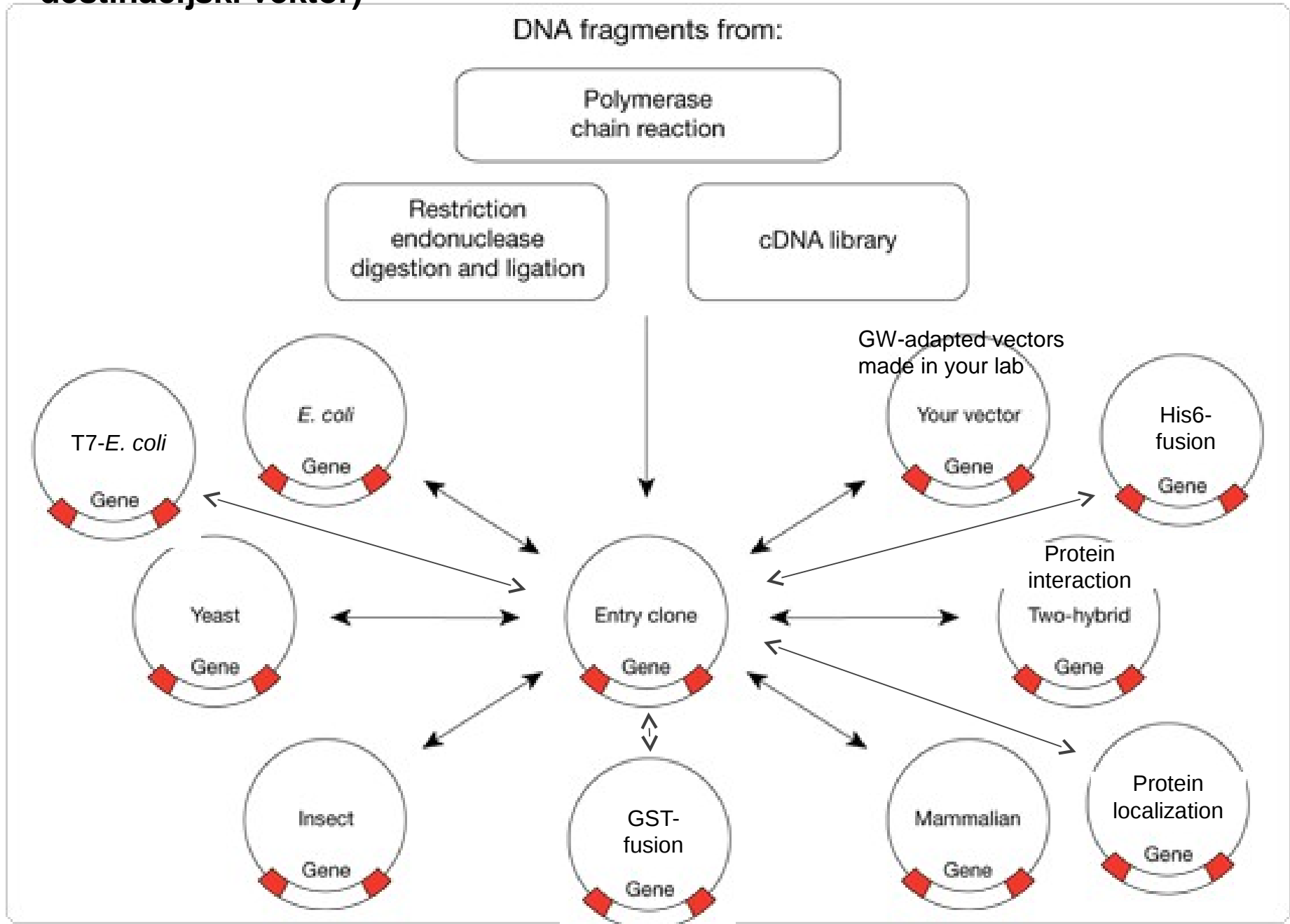
- DNA insert lahko namnožimo s PCR primerji, katerim dodamo mesta *attB*
- DNA insert (PCR produkt) lahko prenesemo v klon TOPO-ENTRY (princip AT hibridizacija; ligacija s topoizomerazo I, ki deluje kot restrikcijski encim in kot ligaza)
- V klon ENTRY, rezan z RE, lahko vstavimo DNA insert, prav tako rezan z RE
- DNA insert lahko dobimo s sintezo
- V klonu ENTRY lahko konstruiramo cDNA knjižnice

Cloning

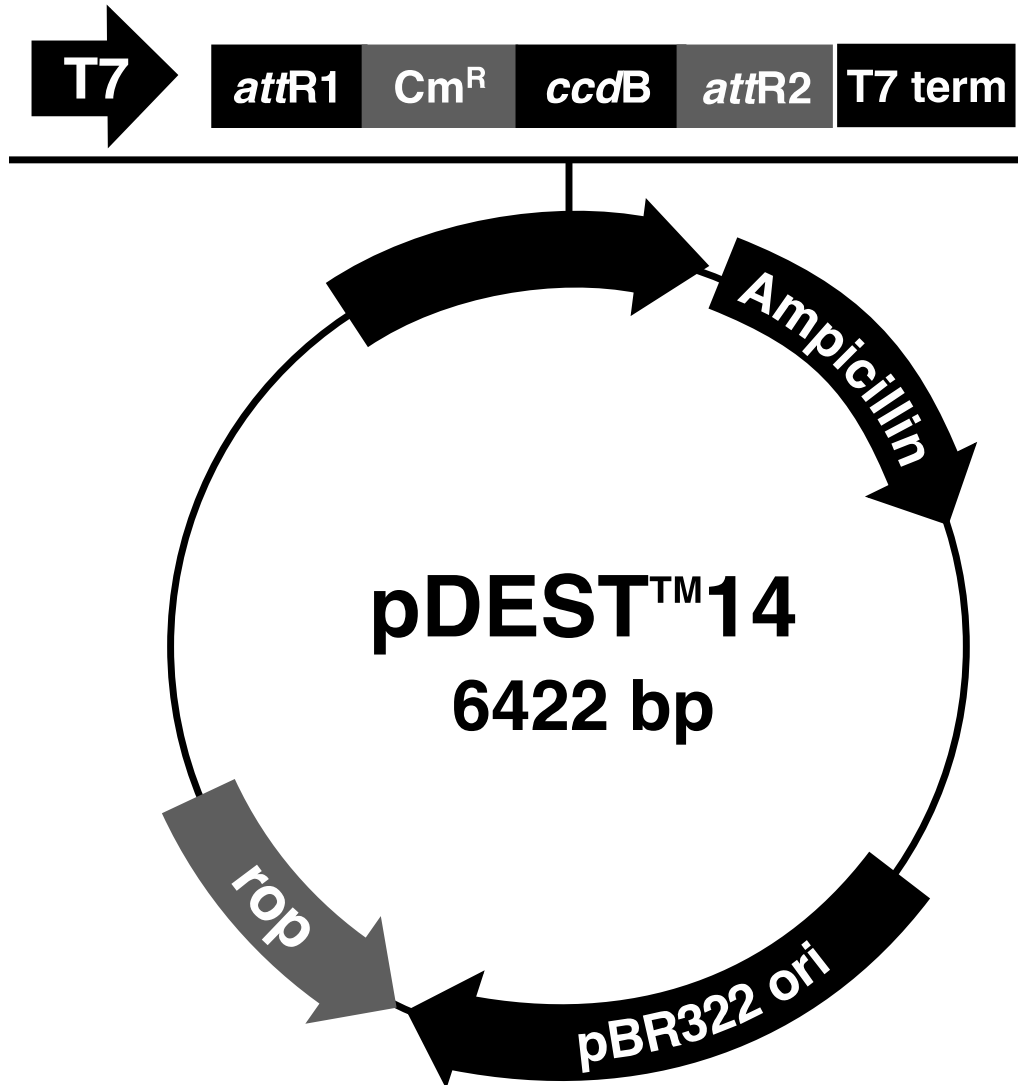
10/7/13 11:57 AM



# Enostavno premikanje DNA inserta iz enega vektorja Gateway v drugega (v destinacijski vektor)



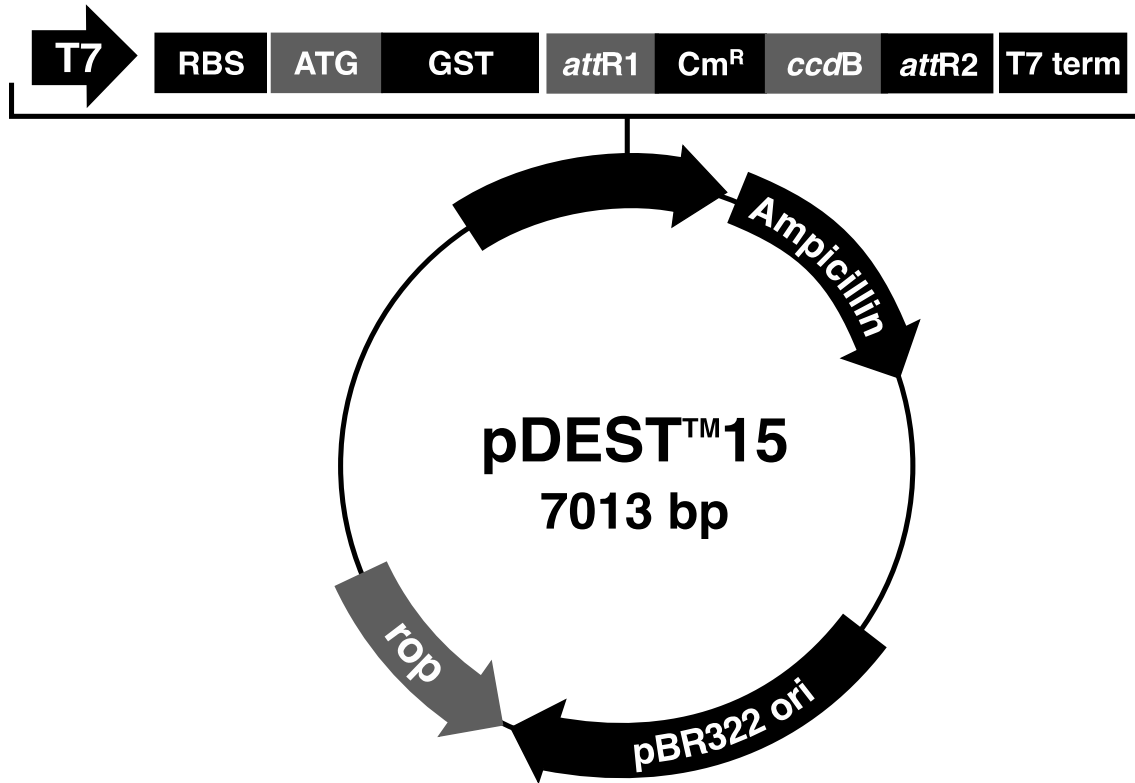
## Primer destinacijskega vektorja:



T7 promotor  
*attR1* rekombinacijsko mesto  
Kloramfenikolska rezistenca  
Gen za toksin *ccdB*  
*attR2* rekombinacijsko mesto  
terminator

Rop: dolo anje kopij plazmida

# Primer destinacijskega vektorja za izražanje proteinov:

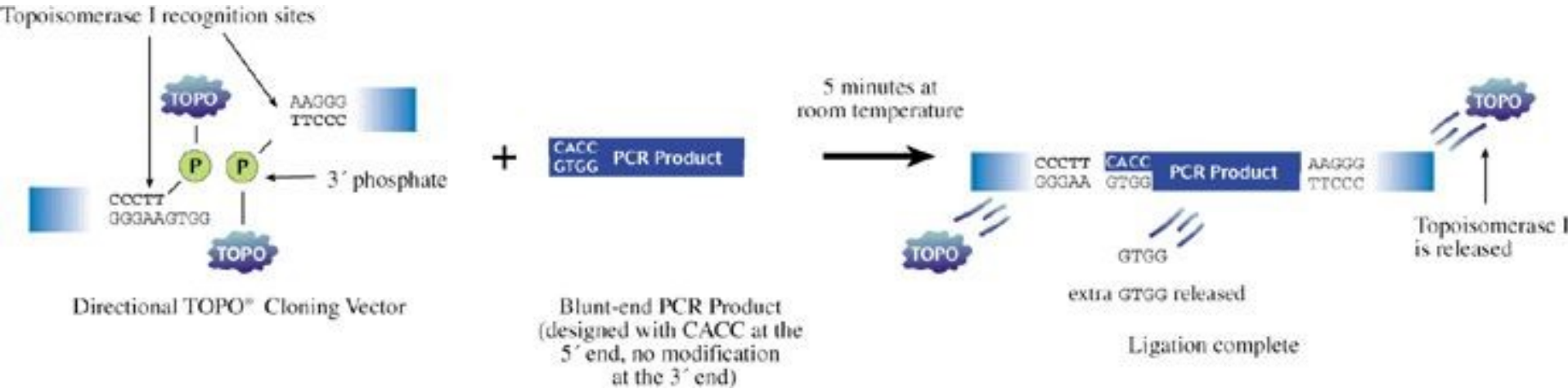


# Enostavno kloniranje multiplih fragmentov hkrati

- v izbrani orientaciji in zaporedju
- za rekonstrukcijo metabolnih poti; za hkratno izražanje in regulacijo večih genov; za študije proteinskih interakcij

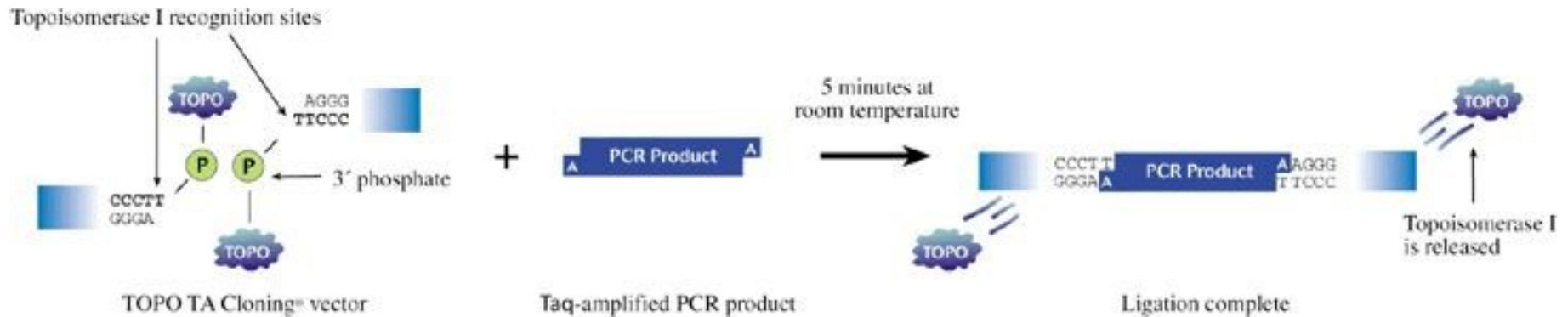


# Kloniranje fragmentov v izbrani orientaciji z metodo TOPO-kloniranje



topoizomeraza prepozna zaporedje 5'CCCTT3' in tvori kovalentno vez s fosfatom n 3' T

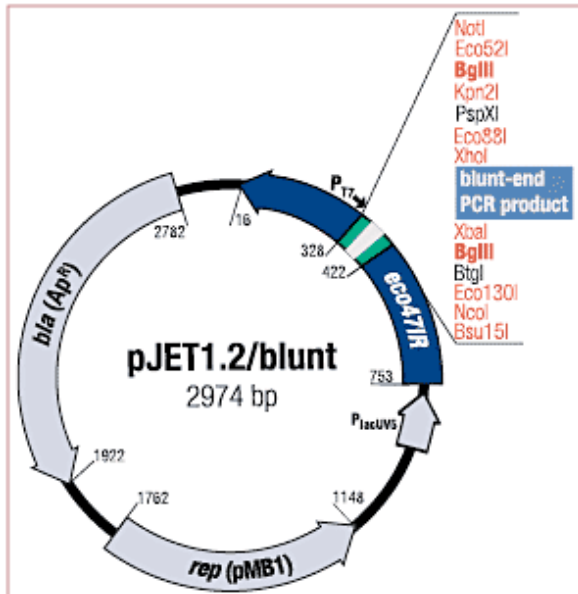
**e orientacija ni pomembna, uporabimo TA-kloniranje ali kloniranje s topimi konci:**



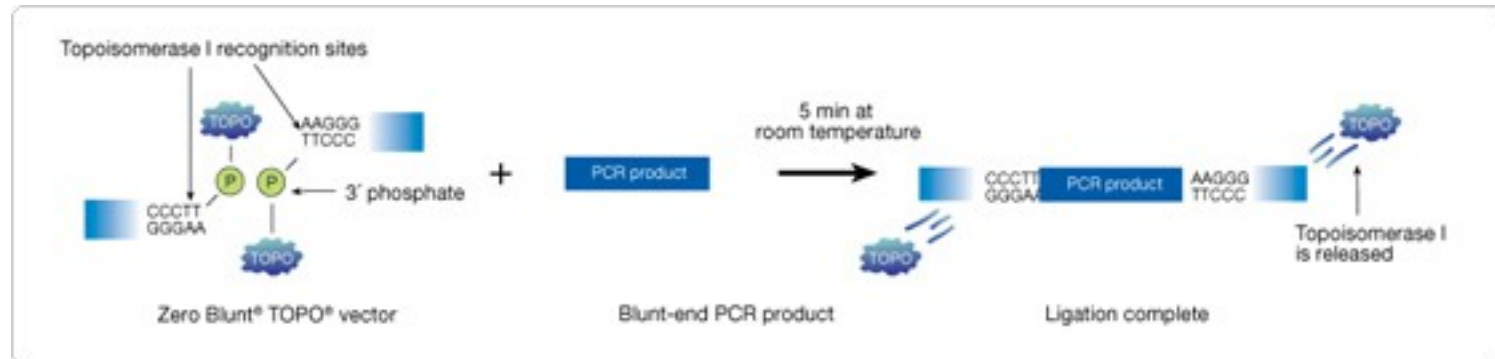
## Kloniranje s topimi konci:

Uporabimo PCR produkte, ki smo jih pripravili s polimerazama Pfx ali Pfu, ki ne dodajata nukleotidov na koncih

A

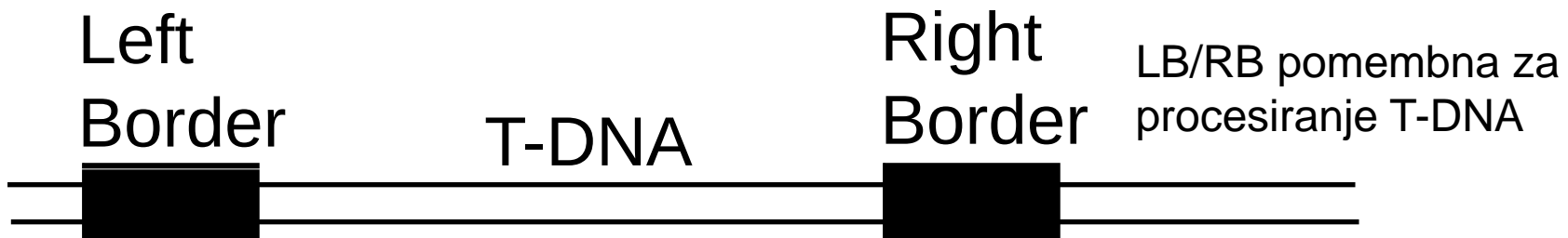
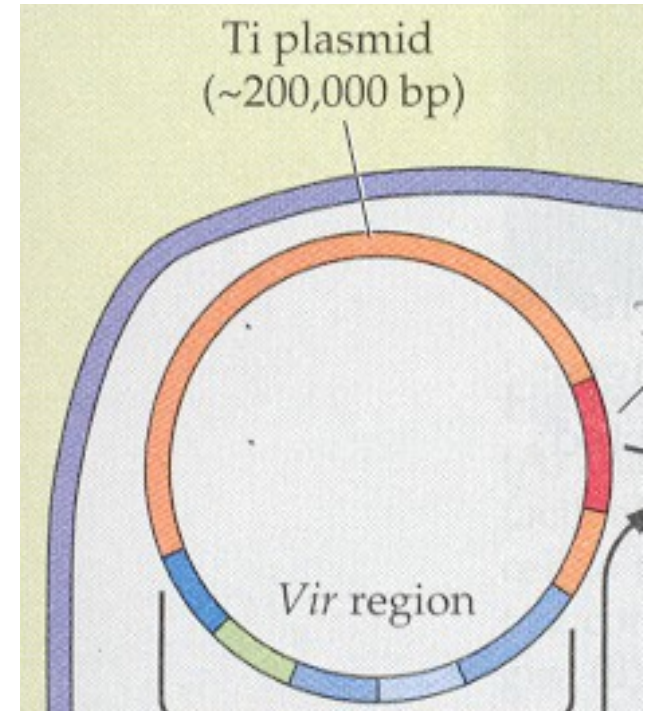


B

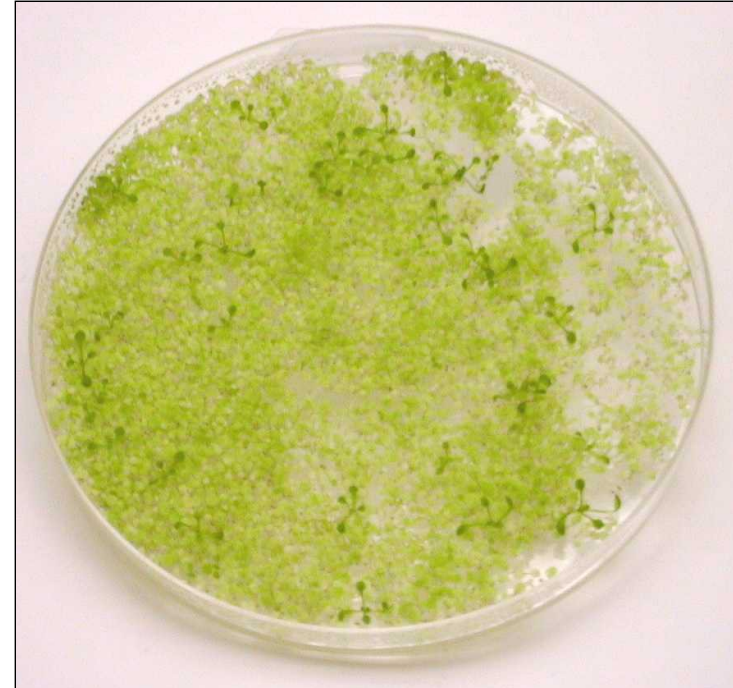
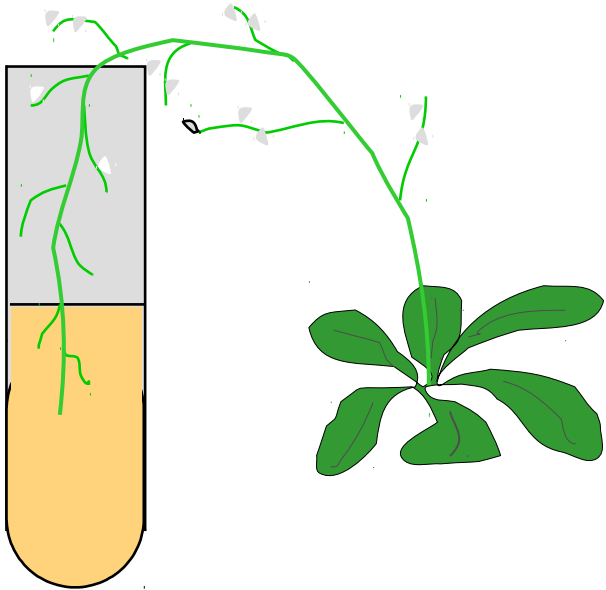


# RASTLINSKI VEKTORJI

- Temeljijo na uporabi bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, ki povzroča tumorje pri nekaterih rastlinah
- Virulentne *A. tumefaciens* naravno vsebujejo 200-kb **Ti (tumor-inducing) plazmid**
- Bakterije v rastlinske celice prenesejo del plazmida (T-DNA)
- Za prenos je nujna plazmidna regija *vir* in nekateri kromosomski geni
- T-DNA se stabilno in naključno vgradi v genom rastline
- Izražanje genov s T-DNA povzroča prekomerno rast in tumorje



## ***Agrobacterium tumefaciens* lahko uporabimo za vnos tuje DNA v rastlinske celice**

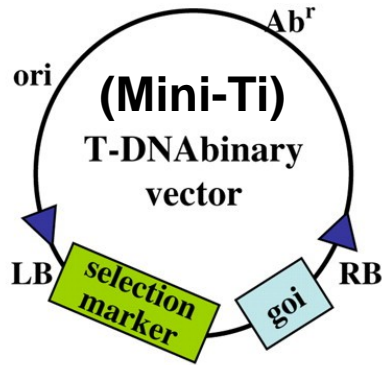


Cvetove rastline *Arabidopsis* potopimo v suspenzijo bakterije *A. tumefaciens*, ki nosi naš konstrukt

Poberemo seme in ga kalimo na gojišču s selekcijskim markerjem

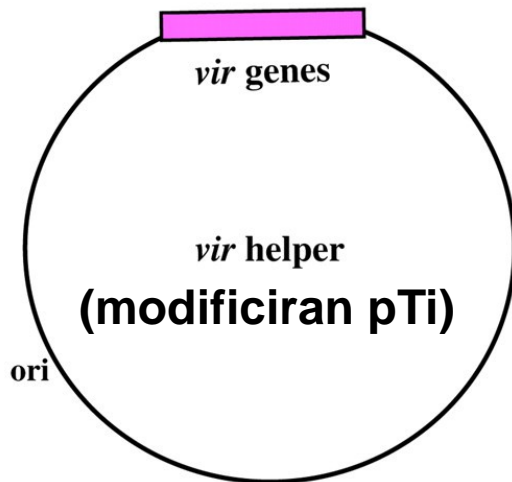
DNA se je integrirala v genom *Arabidopsis*a. Ker ima *Arabidopsis* diploiden genom, to ni letalno.

# T-DNA BINARNI SISTEM, ki temelji na plazmidu Ti



## Binarni vektor:

- LB in RB (left/right border)
- goi = gene of interest
- selekcijski marker
- Polilinker
- ori



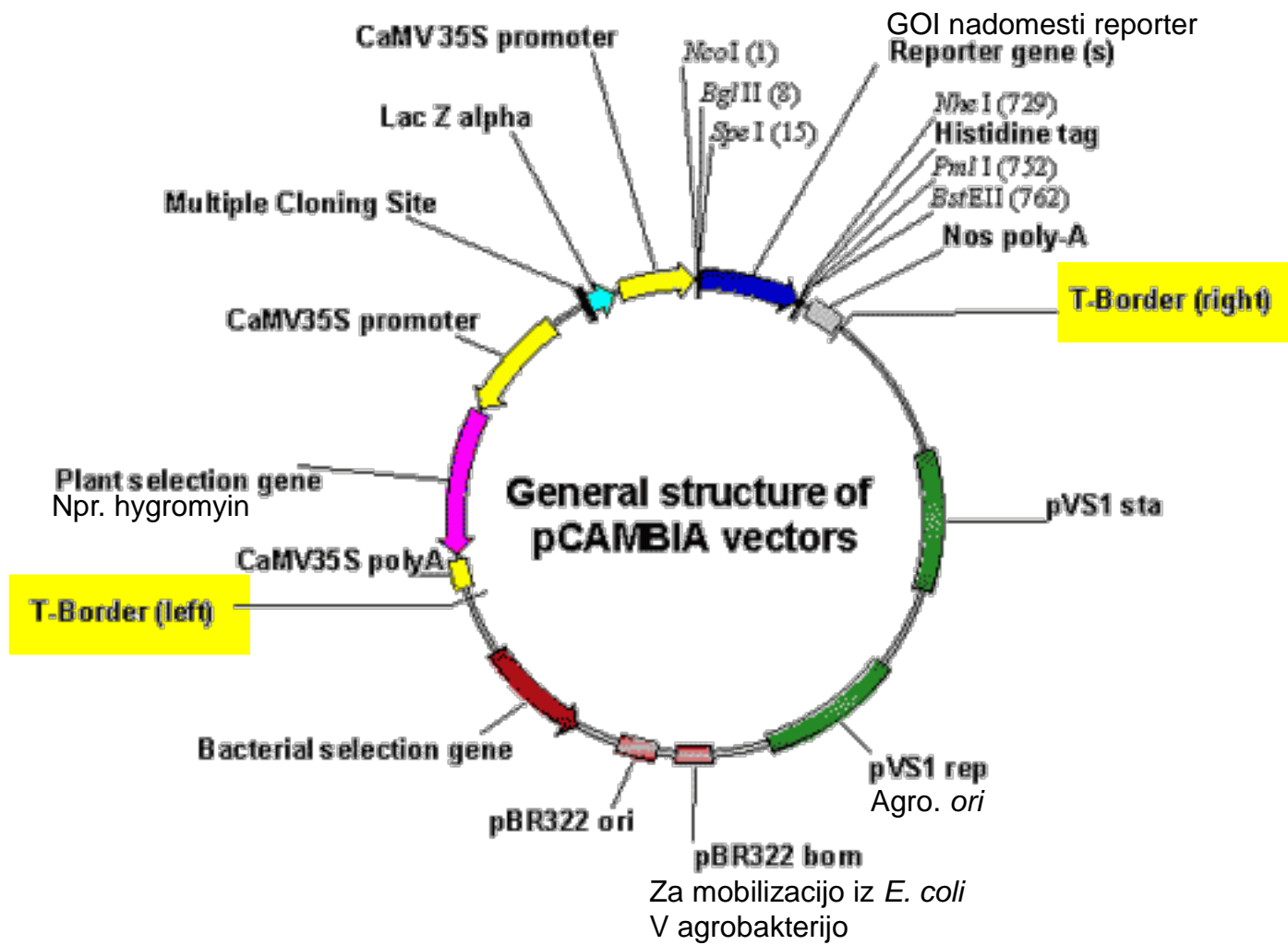
## Modificiran pTi:

- vsebuje *vir* gene za mobilizacijo in prenos DNA
- Izbrisana regija T-DNA

## Metoda:

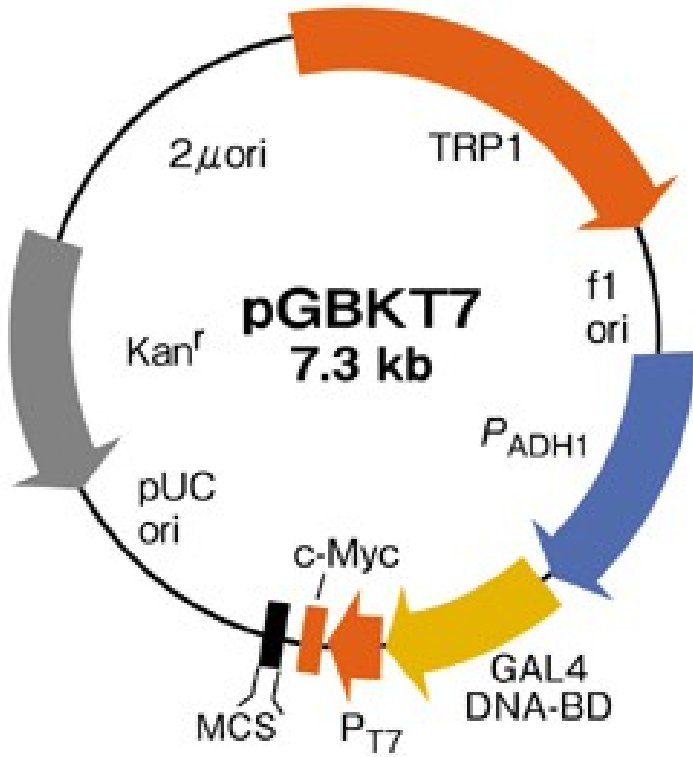
V *E. coli* se skonstruira Mini-Ti. Nato se ga prenese v *A. tumefaciens*, ki vsebuje modificiran pTi. S to bakterijo se potem okuži cvet rastline. Seme se poseje na gojiš e s selekcijskim markerjem.

# pCAMBIA binarni vektor:



# DVOHIBRIDNI SISTEM yeast two-hybrid (proteinske interakcije)

### Bait Vector



### Library Vector

