

Enkonduko al klonado de DNA-fragmento

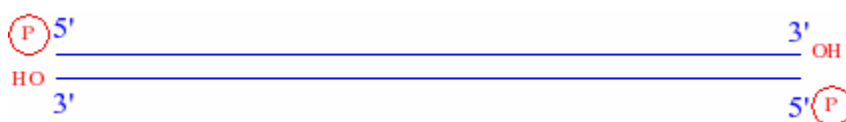
*Kiel obligi DNA-fragmenton en bakterio?
Kiel enigi fremdan DNA en prokariotan ĉelon?*

Verkita de Fabien TSCHUDY (Strasbourg, Francio).

Aprilo 2005

Klonado estas enbakteria DNA-amplifa tekniko.

Klonadvektoro estas DNA kiu havas propran repliko-originon kaj kiu povas obligi aŭtonome en la uzata mikroorganismo.

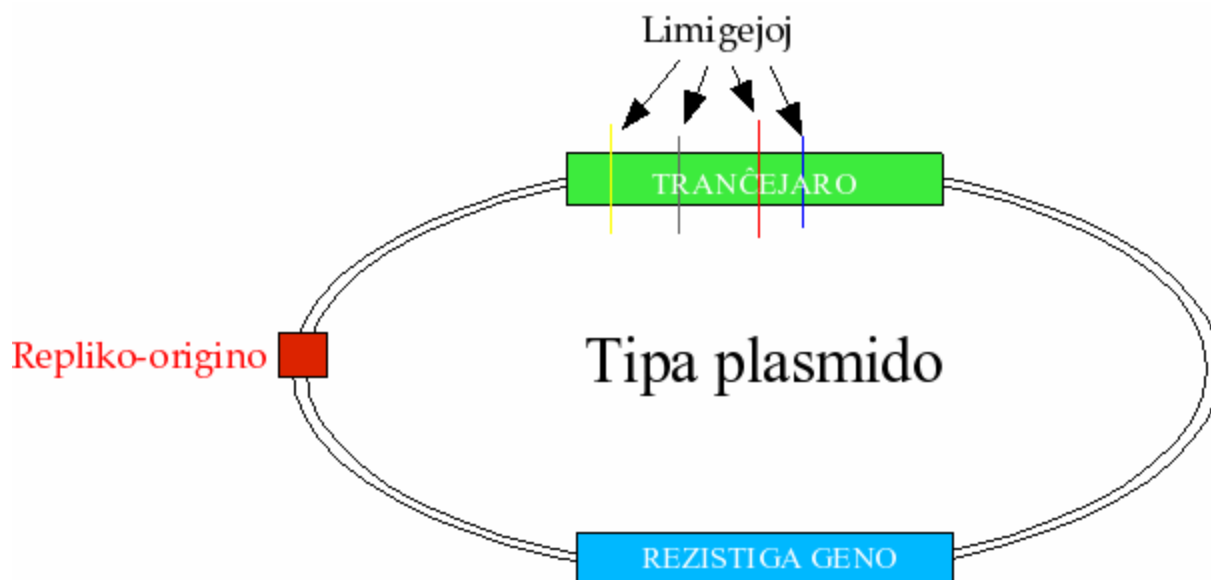


Ekzemplo:

- dufadena cirkla bakteria plasmido (klonadvektoro)
- en bakterio *Eŝeriŝia Kolio* (klonadgastiganto)

Kion enhavas klonadvektoro?

Almenaŭ:



-repliko-originon: ebligas mem-replikiĝon

-tranĉeblan lokaron: tranĉejo estas ejo-kolekto ĉe DNA specife tranĉebla per apartaj tranĉaj enzimoj. Oni nomas tiujn tranĉejojn « limigejojn ». La enzimo pritraktita estas entranĉazo

(endonukleazo) kiu tranĉas DNA laŭsinsekve. Ne devas esti alia samsinsekva limigejo aliloke ĉe la

plasmido ĉar tiukaze, plasmido-tranĉado naskos 2 (aŭ pli laŭ la samlimigejo-nombro) plasmiderojn dum oni nur celas havi unufoje tranĉitan plasmidon.

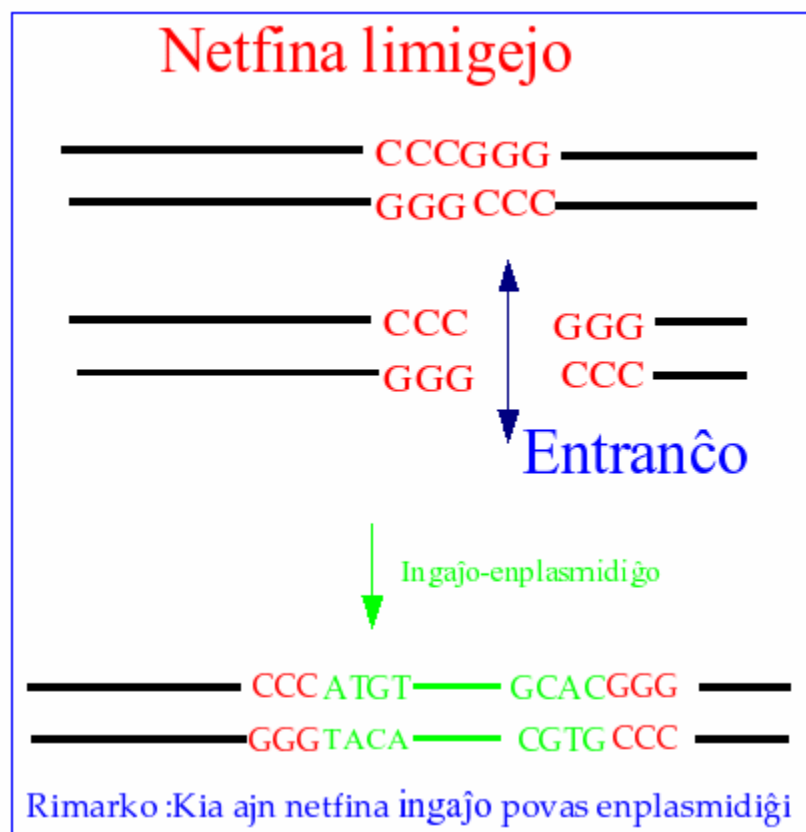
-selekta geno: Ebligas selekti bakteriojn kiuj trafe enĉeligis la taŭgan DNA-konstruaĵon.

-rezistiga geno: La sintezita gena produktaĵo de tiu geno ebligas bakteriojn postvivi ekzemple okaze de ties almetado kun antibiotiko.

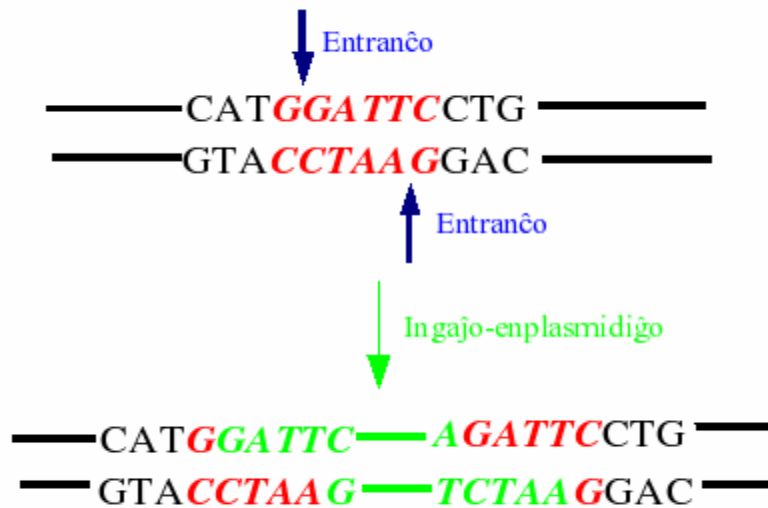
-diskriminacia geno: en tiu ekzemplo, ebligas kolori bluen bakteriojn kiuj ne enĉeligis la taŭgan vektoran konstruaĵon uzante la blank-bluan kribadsistemon (vidu pli suben).

Vektoro-digestado:

Dum tiu etapo, oni malfermas la vektoron (niakaze plasmido) por ĝin pretigi al enbonvenigo de la interesa DNA-fragmento (ingaĵo). Oni uzas por tion fari tranĉ-enzimon (entranĉazo) kiu specife tranĉas apartan DNA-sinsekvon de la tranĉejaro. Iuj entranĉazoj tranĉas naskante « kunteniĝajn finaĵojn » dum aliaj tranĉas naskante « netfinaĵojn ». Laŭ la maniero kiel oni volas tranĉi kaj laŭ la sinsekvo kiun oni volas trafi, oni povas elekti unu aŭ alian enzimon (SmaI, EcoRI...).

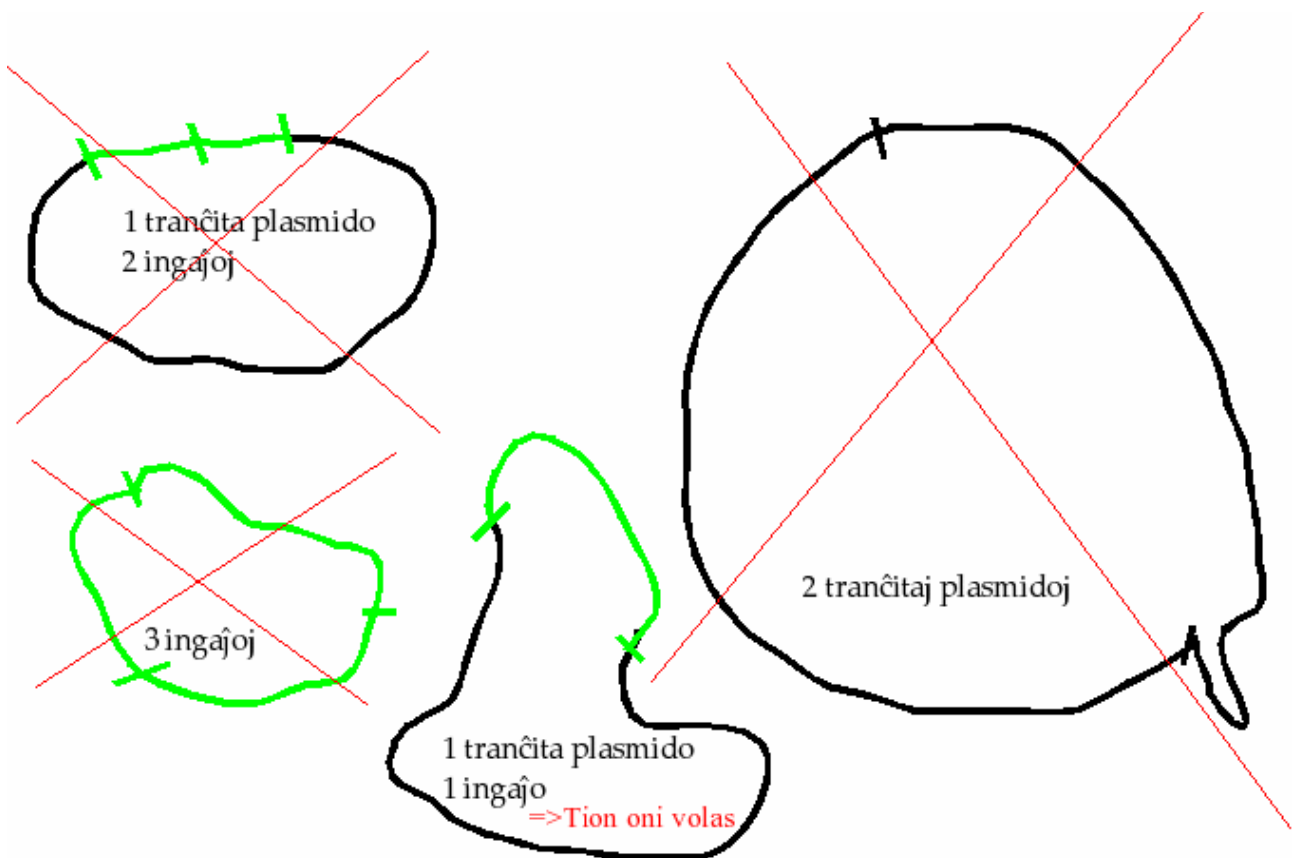


Kunteniĝa limigejo



Rimarko: La kunteniĝaj ingaĵo-finaĵoj devas havi apartajn sinsekvojn por enplasmidiĝi.

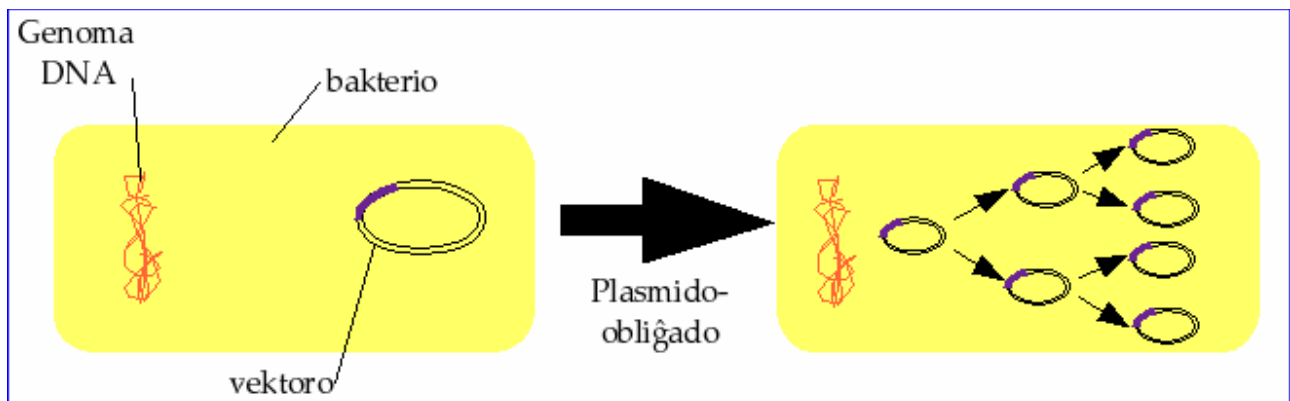
Unufoje la vektoro malfermita de tranĉa enzimo, ĝi pretas por bonvenigi la ingaĵon. Ambaŭ DNA-molekuloj (tranĉita plasmido kaj ingaĵo) estas miksitaj en sama solvaĵo en kiu oni aldonas ligazon, enzimo kiu ligas DNA-molekulojn. Hazarde, diversaj DNA-molekulaj kombinaĵoj formiĝas, kies plejparto estas rubaĵoj ĉar ne korespondas al la celita DNA-konstruaĵo.



Ligazo ligas hazarde DNA-molekulojn inter si sed nur kelkaj maloftaj kombinaĵoj estas la dezirata DNA-konstruaĵo.

Transformado:

Transformi ĉelon estas enĉeligi fremdan DNA-molekulon en prokariotan ĉelon dum transdoni per viruso fremdan genan materialon al eŭkariota ĉelo, en esperanto nomiĝas « **transfekto** ».



Kondiĉo: Maksimume unu vektoro eniras la bakterion.

Oblig-povo: Obliginta plasmidoj-nombro povas atingi 700 kopiojn.

- Ĉeloj-kompetentigo:

Estas du manieroj por kompetentigi ĉelon:

-Bakteria kulturo estas ĉesigita dum ties eksponenciala kreskofazo. Tiam, la bakteriaj ĉelmembranoj senĉese rearanĝiĝas kaj estas pli rompiĝemaj.

-Per kemia atako per CaCl_2 , oni rompiĝemigas ĉelmembranojn.

- DNA-enigo:

Ĉiaj kombinaĵoj eniras ĉelojn, ankaŭ la ne-dezirataj. Post la eniĝo, ties esprimiĝo donos al ĉeloj apartan fenotipon (antibiotiko-rezistecon, koloron) kiu ebligas selekti ĉelojn kiuj trafe enĉeligis la taŭgan konstruaĵon.

Du ĉefaj manieroj ekzistas por enigi DNA enĉelen:

-Elektroporigado

Oni trapasigas elektran kurenton tra ĉeloj provokante poro-formiĝadon en la ĉela membrano tra kiuj DNA povas penetri la ĉelon.

-Varmo-ŝoko

Post kalcia atako, varmo-ŝoko sekvigas DNA-eniron en la ĉelojn.

Kiel selekti kolonion kies bakterioj trafe bonvenigis la celitan DNA-konstruaĵon?

Ĉe la plasmido troviĝas geno ebliganta rezisti kontraŭ antibiotiko. Ĉiuj disvolviĝantaj kolonioj en antibiotik-enhavanta medio estas tiuj kiuj almenaŭ posedas la plasmidon kiu povas esti sen-ingaĵa plasmido.

Kiel fari por specife selekti la bakteriojn kiuj enhavas kaj la plasmidon kaj la ingaĵon?

Dank al la blank/blua kribadsistemo!!

Kio estas tio?

Unue kelkaj kromaj sciindaj nocioj:

Operono estas grupo de apudaj genoj kies esprimiĝo dependas de samaj promotoraj sinsekvoj kaj de samaj reguligaj sinsekvoj por ties transskribado.

La operono kiu nin koncernas estas la laktozo-operono.

Tiu laktozo-operono kodas por β -galaktozidazo kiu transformas laktozon en glukozon+galaktozon.



β -galaktozidazo povas ankaŭ transformi laktozon en alolaktozon. La esprimiĝo de la laktozo-operono estas induktebla.

Se oni kreskigas bakterion SEN laktozo, la laktozo-operono esprimiĝas baznivele. (≈ 5 molekuloj de β -galaktozidazo por ĉiu bakterio).

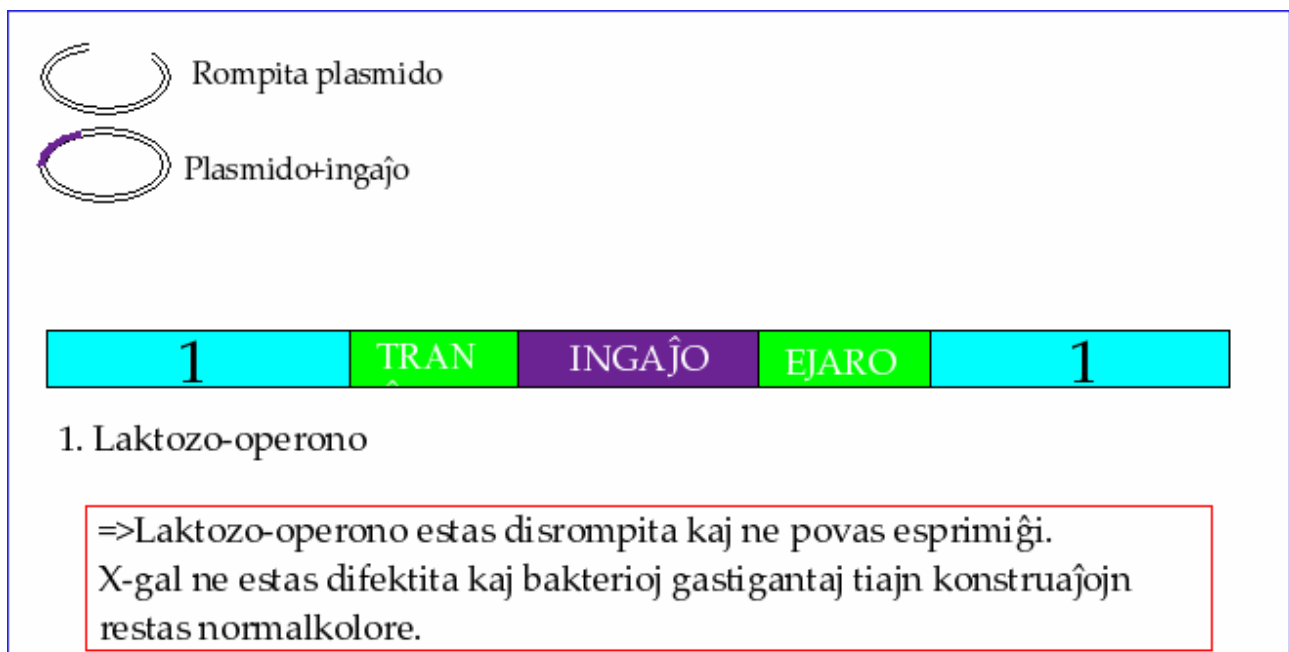
Se oni kreskigas bakterion KUN laktozo: la laktozo-operono esprimiĝas maksimume. La esprimiĝo-nivelo obliĝas per 1000 (de 5 molekuloj oni nun havas 5000 molekulojn). La vera induktajo de la laktozo-operono estas alolaktozo sed tiu molekulo ankaŭ estas substrato de la β -galaktozidazo kaj pro tio, ties kvanto malkreskas laŭmezure kiam la enzimo difektas ĝin. Alia esprimo-induktaĵo estas IPTG (IzoPropil TioGalaktozido). Male al alolaktozo, ĝi pluigas induktadon pro ties ne-difektebleco.

Alia ne-natura substrato de β -galaktozidazo estas X-gal kies difekto rezultas el galaktozo kaj el X kiu kolorigas bakteriojn bluen.

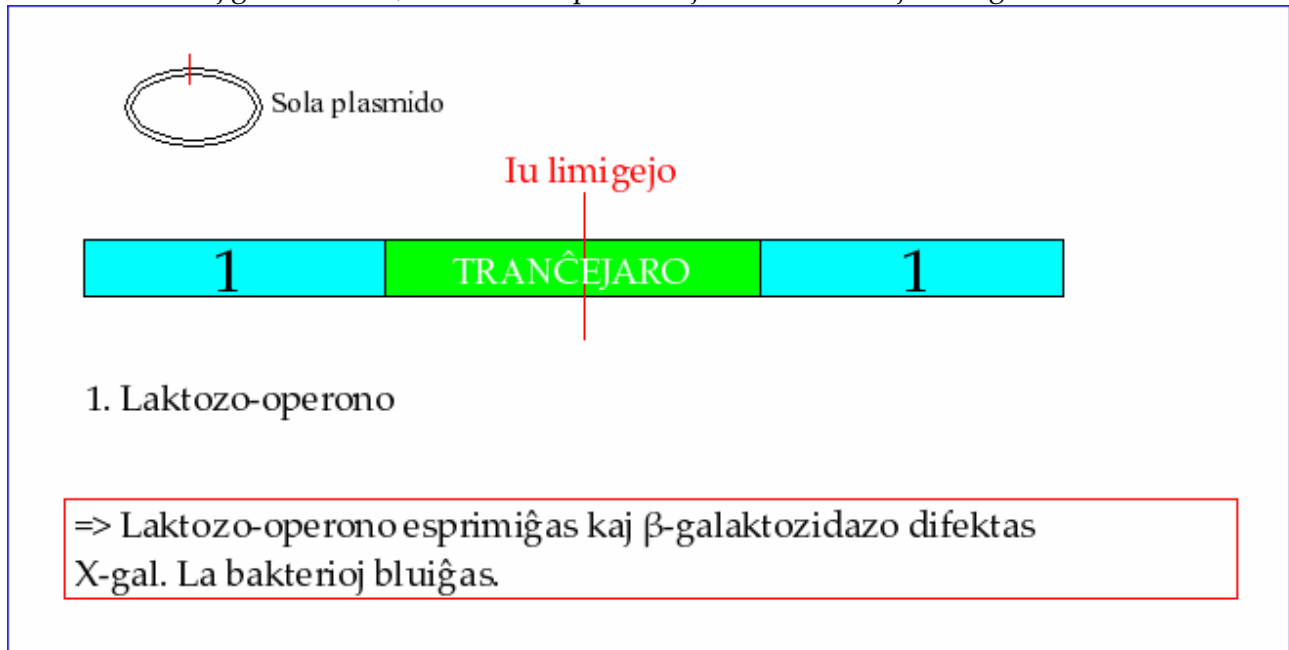


La plasmida tranĉejo troviĝas en la geno de la β -galaktozidazo. La tranĉejo-sinsekvo estas 3-multoblo tiel, sen ingaĵo-enplasmidiĝo, transskribado laŭlegkadre povas preterlegi la β -galaktozidazo-sinsekvon.

Tio sekvigas ke se la β -galaktozidazo-operono estas disrumpita de ingaĵo, β -galaktozidazo ne plu estos produktita kaj ne povos difekti X-galaktozidon aldonita al kulturmedio. Pro tio, X kiu estas bluaĵo ne produktiĝas kaj la bakterioj gastigantaj tiun ne-disrumpitan konstruaĵon estos normalkoloraj (blankaj).



Se la β -galaktozidazo-operono ne estas disruptita, β -galaktozidazo esprimiĝas kaj X-gal estas difektita en X kaj galaktozidon, X estas blua produktaĵo do la bakterioj koloriĝas bluen.



Kompreneble, la bakterioj-kolonioj kiuj interesas nin estas la blankaj.

Per antibiotiko-rezisteco kaj koloriĝo oni povas do selekti la mikroorganismajn koloniojn kiuj enhavas la celitan DNA-konstruaĵon. La bakterioj de tiuj kolonioj povas esti krome kultivitaj kaj ties plasmidoj elĉeligitaj per apartaj eksperimentaj protokoloj kiel DNA-ekstratadaj teknikoj.

Alia DNA-amplifa tekniko kiu envitre ebligas DNA-obligadon estas ĈPR (ĉenpolimeriĝa reakcio).