

# Молекулярное клонирование: основные вектора и штаммы

Это раздел молекулярной биологии, имеющий отношение к получению клонов (чаще всего *E.coli*), несущих рекомбинантную ДНК с целью, например, ее амплификации, наработки.

Ген (фрагмент ДНК, ... ) + Вектор (плазмида, ВАС, космида...)

=

Рекомбинантная ДНК (хозяин - *E.coli*, чаще всего)

# Историческая справка

## Основные открытия:

Работы Кемпбелла с бактериофагом лямбда. Эксцизия с кусками хозяйской ДНК – «клонирование» (60-е годы)

60-е и 70-е гг – открытие и изучения явления Рестрикции-Модификации. (Лурия, Арбер, Янг)

открытие эндонуклеаз рестрикции

Классификация. Три типа

Тип II – наше все. Номенклатура.

EcoRI:

E(scherichia) co(li) R – 1

Открытие полимеразной цепной реакции

## Клонирование шаг за шагом:

- Выбор штамма-хозяина
- Выбор и приготовление вектора
- Приготовление ДНК для клонирования
- Создание рекомбинантной ДНК
- Введение рекомбинантной ДНК в штамм-хозяин
- Селекция клонов (организмов), содержащих рекомбинантную ДНК
- Скрининг клонов на наличие нужной ДНК

# Используемые ферменты нуклеинового обмена в молекулярном клонировании

Термофильная ДНК-полимераза

Полимеразная цепная реакция

Обратная транскриптаза

ДНК-лигаза – второй ключевой фермент в молекулярном клонировании.

Особенность ДНК-лигазы фага Т4

Реже используемые: фосфатаза, киназа, ДНК-полимераза...

# Вектора и их использование в молекулярном клонировании

Vector	Basis	Size limits of insert	Major application
<b>Plasmid</b>	Naturally occurring multicopy plasmids	$\leq 10$ kb	Subcloning and downstream manipulation, cDNA cloning and expression assays
<b>Phage</b>	Bacteriophage $\lambda$	5–20 kb	Genomic DNA cloning, cDNA cloning, and expression libraries
<b>Cosmid</b>	Plasmid containing a bacteriophage $\lambda$ <i>cos</i> site	35–45 kb	Genomic library construction
<b>BAC (bacterial artificial chromosome)</b>	<i>Escherichia coli</i> F factor plasmid	75–300 kb	Analysis of large genomes
<b>YAC (yeast artificial chromosome)</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> centromere, telomere, and autonomously replicating sequence	100–1000 kb (1 Mb)	Analysis of large genomes, YAC transgenic mice
<b>MAC (mammalian artificial chromosome)</b>	Mammalian centromere, telomere, and origin of replication	100 kb to $> 1$ Mb	Under development for use in animal biotechnology and human gene therapy

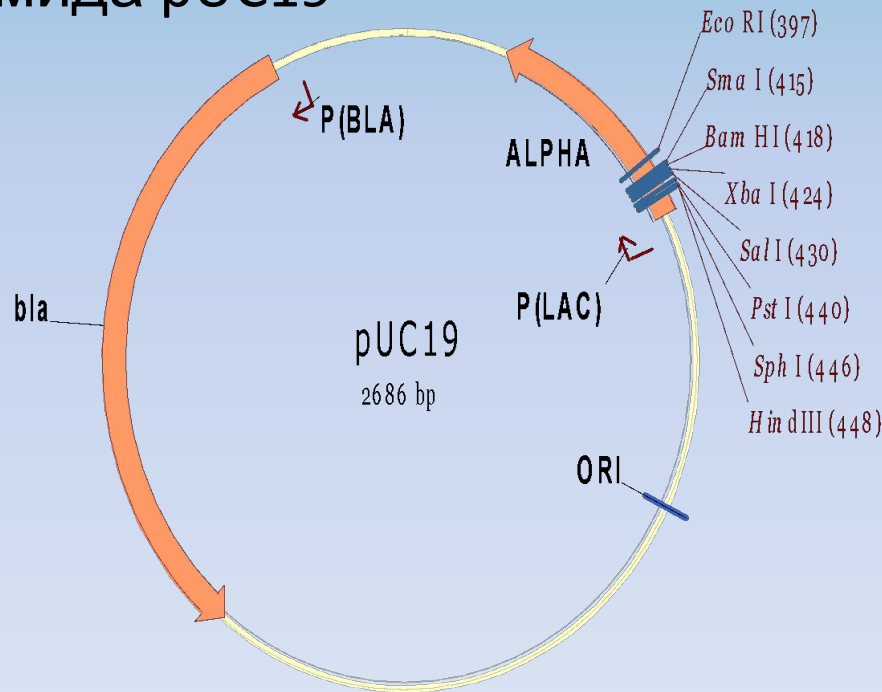
# Плазмиды:

Селекция (антибиотики)

Фенотипическая селекция (альфа-комплементация, белые-синие)

Отбор клонов: выделение и рестрикция, ПЦР-скрининг, гибридизация.

Пример, плазмида pUC19



В качестве примера. Клонирование в плазмиде pUC19.

-Выбор штамма-хозяина.

*E.coli* с генотипом *lacZ'* Δ*M15* – дефектная бета-галактозидаза.

фенотипическая селекция (альфа-комплементация)

-Выбор и приготовление вектора

Полилинкер – набор возможных рестриктаз. Гидролиз с последующей очисткой.

- Приготовление ДНК для клонирования

ДНК, с липкими концами как у вектора

- Создание рекомбинантной ДНК

«сшивка» вектора и ДНК для клонирования

- Введение рекомбинантной ДНК в штамм-хозяин

приготовление компетентных клеток *E.coli* соответствующего штамма  
трансформация лигазной смесью компетентные клетки

- Селекция клонов (организмов), содержащих рекомбинантную ДНК

антибиотик – ампициллин, фенотипическая селекция «белые-синие»

- Скрининг клонов на наличие нужной ДНК

рестрикционный анализ, гибридизация с зондами, ПЦР-скрининг

Плазмиды, в зависимости от целей клонирования могут нести множество специальных

районов. Это, например, терминаторы, промоторы, последовательности Козака, полилинкеры, вспомогательные гены и другие..



## Cloning Strain Properties

Strain Properties	NEB#	Transform Efficiency (cfu/μg) <sup>(1)</sup>	Strain	T1 Phage Resistant	Library Construction <sup>(2)</sup>	Cloning/ Subcloning	Blue/ White Screening	<i>lacZ</i>	<i>lysY</i>	Endo-nuclease I Deficient <sup>(3)</sup>	Protease <sup>(4)</sup> Deficient	F <sup>-</sup>	RecA <sup>-</sup>	T7 RNA Polyme-rase	Cytoplasmic disulfide bond formation <sup>(5)</sup>	Drug Resistance <sup>(6)</sup>
NEB Turbo	C2984	1-3×10 <sup>9</sup>	K12	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	-	-	nit
NEB 5-alpha	C2987	1-3×10 <sup>9</sup>	K12	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	-	-	✓	-	-	none
NEB 5-alpha F <sup>'</sup>	C2992	1-3×10 <sup>9</sup>	K12	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-	-	tet
NEB 10-beta	C3019	1-3×10 <sup>9</sup>	K12	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	-	-	✓	-	-	str
<i>dam-/dcm-</i>	C2925	1-3×10 <sup>6</sup>	K12	✓	✓	✓	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	cam, str, nit

## Protein Expression Strain Properties

NEB Express	C2523	0.6-1×10 <sup>9</sup>	B	✓	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	-	-	-	nit
NEB Express F <sup>'</sup>	C3037	0.6-1×10 <sup>9</sup>	B	✓	✓	-	-	✓	-	✓	✓	-	-	-	-	cam, nit
T7 Express	C2566	0.6-1×10 <sup>9</sup>	B	✓	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	-	✓	-	nit
T7 Express F <sup>'</sup>	C3016	0.6-1×10 <sup>9</sup>	B	✓	✓	-	-	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-	cam, nit
T7 Express <i>lysY</i>	C3010	0.6-1×10 <sup>9</sup>	B	✓	✓	-	-	-	✓	✓	✓	-	-	✓	-	cam, nit
T7 Express <i>lysY/F<sup>'</sup></i>	C3013	0.6-1×10 <sup>9</sup>	B	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	-	cam, nit
T7 Express Crystal	C3022	0.6-1×10 <sup>9</sup>	B	✓	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	-	✓	-	nit
SHuffle	C3025	1 × 10 <sup>6</sup>	K12	✓	-	-	-	✓	-	-	-	✓	-	-	✓	str, spec
SHuffle T7	C3026	1 × 10 <sup>6</sup>	K12	✓	-	-	-	✓	-	-	-	✓	-	✓	✓	str, spec
SHuffle T7 <i>lysY</i>	C3027	1 × 10 <sup>6</sup>	K12	✓	-	-	-	✓	✓	-	-	-	-	✓	✓	cam, str, spec
SHuffle Express	C3028	1 × 10 <sup>7</sup>	B	✓	-	-	-	✓	-	✓	✓	-	-	-	✓	spec
SHuffle T7 Express	C3029	1 × 10 <sup>7</sup>	B	✓	-	-	-	✓	-	✓	✓	-	-	✓	✓	spec <sup>(7)</sup>
SHuffle T7 Express <i>lysY</i>	C3030	1 × 10 <sup>7</sup>	B	✓	-	-	-	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	cam, spec <sup>(7)</sup>
BL21	C2530	1-5×10 <sup>7</sup>	B	✓	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	-
BL21(DE3)	C2527	1-5×10 <sup>7</sup>	B	✓	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	-	-
NiCo21(DE3)	C2529	1-5×10 <sup>7</sup>	B	✓	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	-	-
Lemo21(DE3)	C2528	1-3×10 <sup>7</sup>	B	✓	-	-	-	-	✓	-	✓	-	-	✓	-	cam

(1) TE given are for high efficiency chemically competent strains. TE for electrocompetent strains are 1-4 × 10<sup>10</sup> cfu/mg. TE for subcloning strains are >1 × 10<sup>6</sup>.

(2) Restriction-deficient strain.

(3) Important for plasmid preparation.

(4) Lacks Lon and OmpT protease activity.

(5) Constitutively expresses a chromosomal copy of the disulfide bond isomerase DsbC.

(6) nit = nitrofurantoin, tet = tetracycline, cam = chloramphenicol, str = streptomycin, spec = spectinomycin

(7) Resistance to low levels of streptomycin may be observed.



Требования к E.coli штаммам-реципиентам для молекулярного клонирования.

Список мутаций можно посмотреть, например, в фирмах, продающих клетки:

[http://www.neb.com/nebecomm/tech\\_reference/competent\\_cells/genetic\\_markers.asp](http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/competent_cells/genetic_markers.asp)

Важно знать какие мутации нужны в каких экспериментах.

Можно составить список штаммов с их свойствами. Например:

# Штаммы для клонирования:

Strains for CLONING and SUBCLONING	Characteristics
<p><b>NEB Turbo Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C2984)  <i>F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV gal</i>  <i>R(zgb-210::Tn10) (Tet<sup>S</sup>) endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Fastest growth—colonies visible after 6.5 hours</li> <li>● Tight control/expression of toxic genes</li> </ul>
<p><b>NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C2987)  <i>fhuA2 D(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 f80D(lacZ)M15 gyrA96 recA1</i>  <i>relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Versatile cloning strain</li> <li>● DH5α™ derivative</li> </ul>
<p><b>NEB 5-alpha F' <i>F</i><sup>q</sup> Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C2992)  <i>F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 zff::Tn10 (Tet<sup>R</sup>) / fhuA2Δ(argF-</i>  <i>lacZ)U169 phoA glnV44 f80 D(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1</i>  <i>thi-1 hsdR17</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Toxic gene cloning</li> <li>● F' strain with extremely high transformation efficiency (TE)</li> </ul>
<p><b>NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C3019)  <i>araD139 Δ(ara,leu)7697 fhuA lacX74 galK16 galE15 mcrA</i>  <i>f80d(lacZΔM15)recA1 relA1 endA1 nupG rpsL rph spoT1Δ(mrr-</i>  <i>hsdRMS-mcrBC)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Large plasmid and BAC cloning</li> <li>● DH10B™ derivative</li> </ul>
<p><b><i>dam</i><sup>-</sup>/<i>dcm</i><sup>-</sup> Competent <i>E. coli</i></b> (NEB #C2925)  <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6</i>  <i>hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet<sup>S</sup> endA1 rspL136 (Str<sup>R</sup>)</i>  <i>dam13::Tn9 (Cam<sup>R</sup>) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Dam/Dcm methyltransferase free plasmid growth</li> </ul>

# Штаммы для экспрессии белков:

Strains for PROTEIN EXPRESSION	Characteristics
<b>NEB Express Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C2523) <i>fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 D(mcrC-mrr)114::IS10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Versatile non-T7 expression strain</li> <li>• Protease deficient</li> </ul>
<b>NEB Express <sup>lacI</sup> Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C3037) MiniF <i>lacI<sup>q</sup></i> (Cam <sup>R</sup> ) / <i>fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control of IPTG induced expression from <i>Plac</i>, <i>Ptac</i> and <i>Ptrc</i></li> <li>• Protease deficient</li> </ul>
<b>T7 Express Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C2566) <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 D(mcrC-mrr)114::IS10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Most popular T7 expression strain</li> <li>• Protease deficient</li> </ul>
<b>T7 Express <sup>lacI</sup> Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C3016) MiniF <i>lacI<sup>q</sup></i> (Cam <sup>R</sup> ) / <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 D(mcrC-mrr)114::IS10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T7 expression</li> <li>• Protease deficient</li> <li>• Reduced basal expression</li> </ul>
<b>T7 Express <i>lysY</i> Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C3010) MiniF <i>lysY</i> (Cam <sup>R</sup> ) / <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 D(mcrC-mrr)114::IS10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T7 expression</li> <li>• Protease deficient</li> <li>• Better reduction of basal expression</li> </ul>
<b>T7 Express <i>lysY/lacI<sup>q</sup></i> Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C3013) MiniF <i>lysY,lacI<sup>q</sup></i> (Cam <sup>R</sup> ) / <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T7 expression</li> <li>• Protease deficient</li> <li>• Highest level of expression control</li> </ul>
<b>T7 Express Crystal Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)</b> (NEB #C3022) <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 metB1 D(mcrC-mrr)114::IS10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T7 expression</li> <li>• Protease deficient</li> <li>• SeMet labeling for protein crystallography</li> </ul>