

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 T4

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

Вектора и их использование в молекулярном клонировании

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

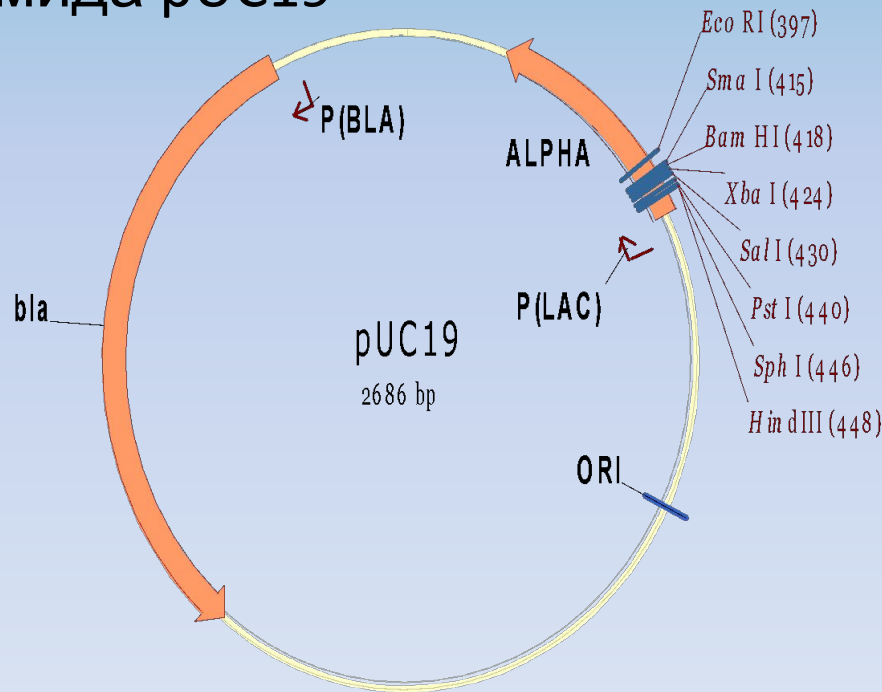
Плазмиды:

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

Protein Expression Strain Properties

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

(1) TE given are for high efficiency chemically competent strains. TE for electrocompetent strains are 1-4 × 10¹⁰ cfu/mg. TE for subcloning strains are >1 × 10⁶.

(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

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>NEB Turbo Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency) (NEB #C2984) <i>F' proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV gal</i> <i>R(zgb-210::Tn10) (Tet^S) endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Fastest growth—colonies visible after 6.5 hours ● Tight control/expression of toxic genes
<p>NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency) (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"> ● Versatile cloning strain ● DH5α™ derivative
<p>NEB 5-alpha F' <i>F</i>^q Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency) (NEB #C2992) <i>F' proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zgf::Tn10 (Tet^R) / 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"> ● Toxic gene cloning ● F' strain with extremely high transformation efficiency (TE)
<p>NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency) (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"> ● Large plasmid and BAC cloning ● DH10B™ derivative
<p><i>dam</i>⁻/<i>dcm</i>⁻ Competent <i>E. coli</i> (NEB #C2925) <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6</i> <i>hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet^S endA1 rspL136 (Str^R)</i> <i>dam13::Tn9 (Cam^R) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Dam/Dcm methyltransferase free plasmid growth

Штаммы для экспрессии белков:

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