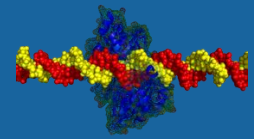


Tehnici de Biologie Moleculară

20.11.2024 – 12-14

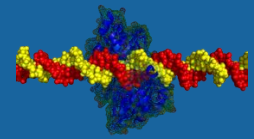
Curs 2 – *Escherichia coli* ca organism model. Vectori utilizați în Biologia Moleculară



Tehnici de biologie moleculară

Cele mai comune tehnici de biologie moleculară:

- **Electroforeza** – procesul de separarea a acizilor nucleici sau proteinelor funcție de dimensiune;
La ce este utilă dimensiunea unei molecule?
- **Amplificarea in vitro a acizilor nucleici** (PCR, *polymerase chain reaction*) – procesul de replicare/sinteză *in vitro* a acizilor nucleici prin care se pot sintetiza cantitățile de acizi nucleici necesare pentru manipulările ulterioare;
- **Digestia cu enzime de restricție** – procesul de tăiere a moleculelor de ADN în fragmente cu ajutorul unor enzime ce recunosc o anumită secvență de nucleotide;
- **Ligarea** – procesul de lipire a 2 fragmente de ADN diferite cu formarea de legături covalente de tip fosfo-diesteric.
- **Blot-ul** – o tehnică de identificare specifică a biomoleculelor după ce acestea au fost separate prin electroforeză. Moleculele de interes sunt identificate cu ajutorul unei sonde marcată specific (catenă complementară în cazul acizilor nucleici) sau anticorp specific în cazul proteinelor.
- **Clonarea** – tehnica prin care se introduce o genă nouă într-un organism gazdă. Clonarea se poate realiza cu scopul de a **testa efectul respectivei gene asupra organismului în care a fost introdusă, cu scopul de a folosi organismul gazdă pentru a produce cantități mari din gena sau proteina codificată, sau pentru a studia amplasare celulară/tisulară a produsului genei** respective. Inserarea de material genetic nou într-o celulă bacteriană se numește **transformare**, inserarea de material genetic nou într-o celulă EK se numește **transfecție**. Dacă pentru inserarea materialului genetic se utilizează un virus, procesul se numește **transducție**.



Tehnici de biologie moleculară

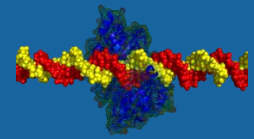
Termenul de clonare este utilizat și pentru a descrie producerea de celule sau organisme identice din punct de vedere genetic. În sensul său strict **clonarea reprezintă însă producerea de copii identice ale unei molecule de ADN în număr foarte mare.**

Procesul de clonare constă în principiu în 4 etape distincte:

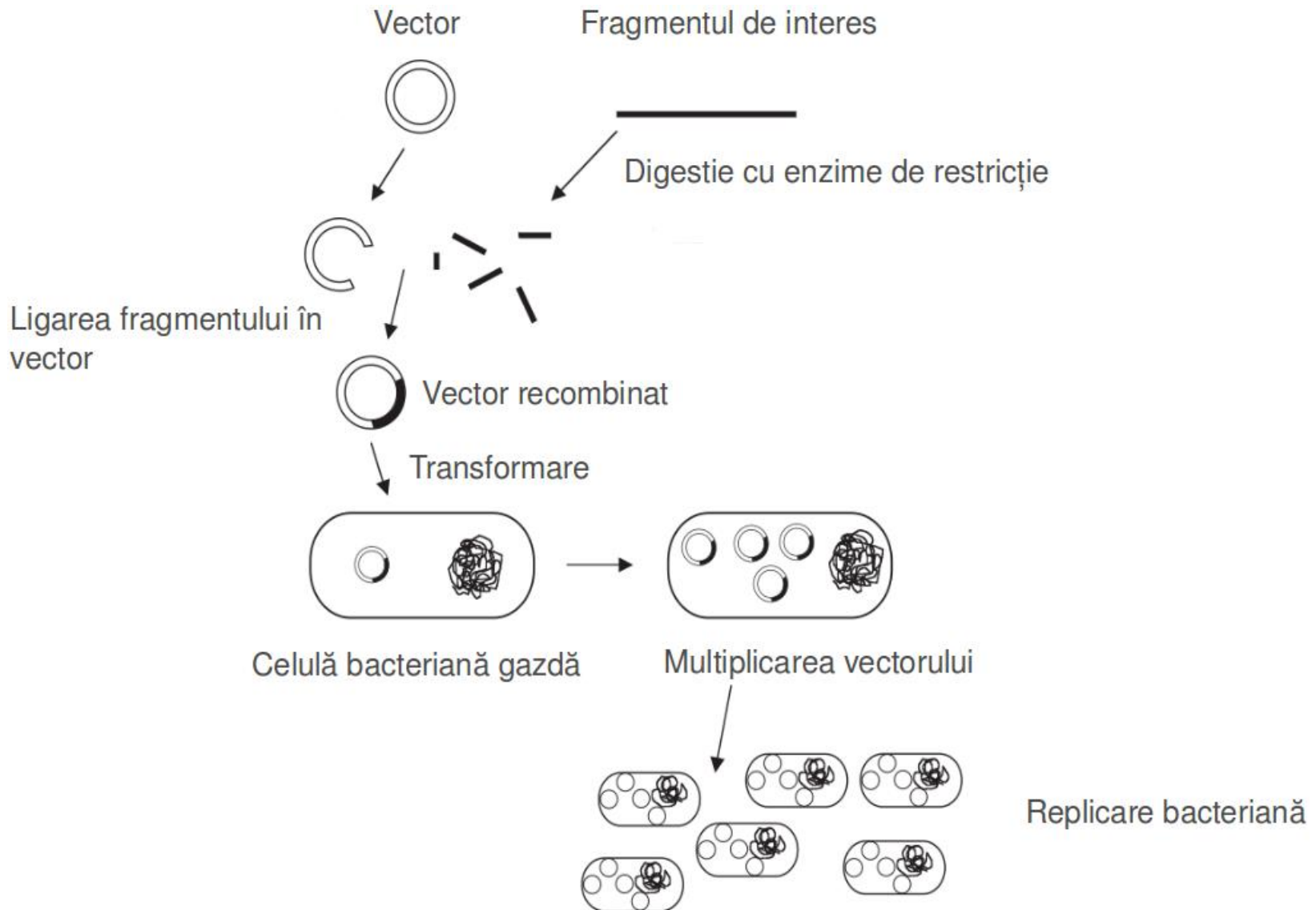
1. **izolarea** fragmentelor de interes (inclusiv prin PCR) și **digestia** lor cu enzime de restricție;
2. **ligarea** celor două fragmente și obținerea moleculei recombinante;
3. **transformarea** celulelor de *E.coli* cu noile molecule recombinante;
4. **selectia** celulelor ce au fost transformate cu succes și care conțin noua moleculă de ADN recombinat.

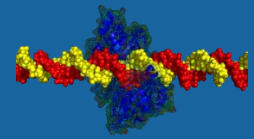
Pentru a putea parcurge cele 4 etape și a realiza așadar clonarea unei gene sunt însă absolut necesare două elemente:

- **un vector** - o moleculă de ADN capabilă să se autoreplice independent. Secvența de clonat este inserată în interiorul vectorului și se replică odată cu acesta;
- **o tulpină gazdă** în care vectorul să se replice – aproape întotdeauna tulpini de *Escherichia coli*.



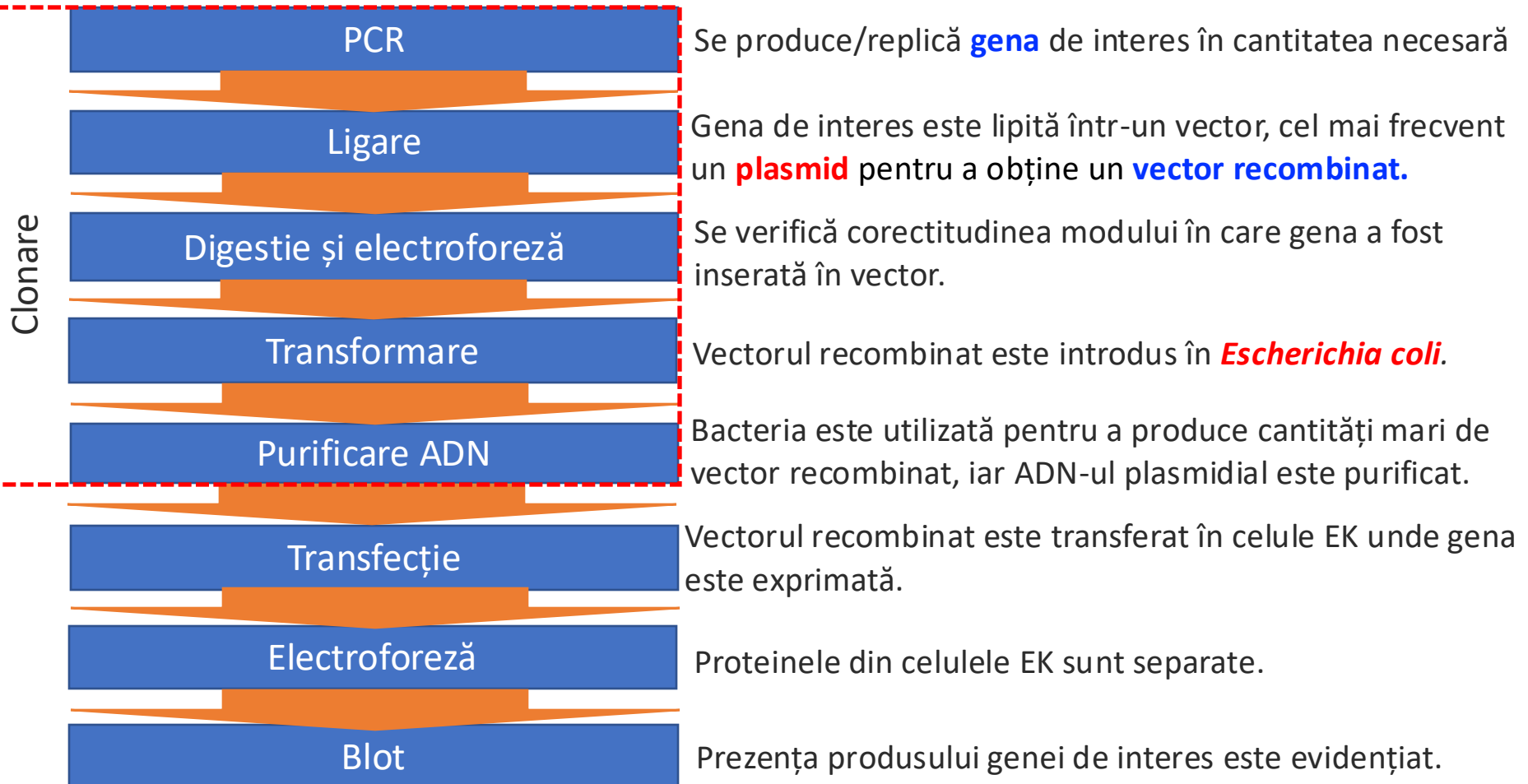
Tehnici de biologie moleculară

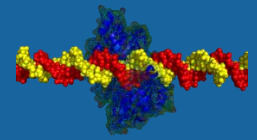




Cea mai curentă abordare în BM

Metodele prezentate nu sunt utilizate individual, ci sunt cuplate între ele sau cu diverse alte tehnici pentru a putea răspunde la o anumită întrebare de interes. Un exemplu tipic de combinare a tehnicilor este:

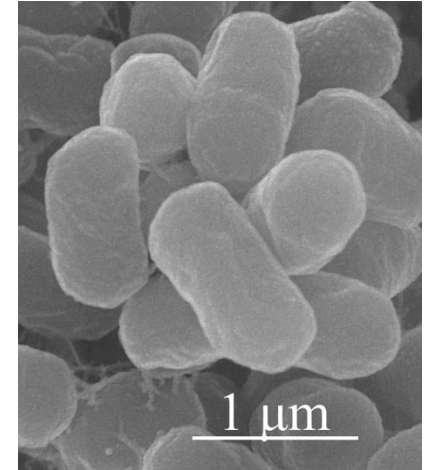


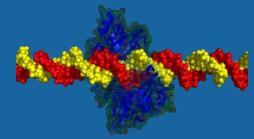


Escherichia coli și utilitatea sa

Escherichia coli

- descoperită în anul 1885 de către medicul Theodor Escherich;
- **bacil Gram negativ;**
- dimensiuni: **2 μm lungime și 0,25 - 1 μm diametru;**
- cromozom circular format conținând **4,6 milioane** perechi de baze, **4288 gene** ce codifică proteine organizate în **2584 operoni, 7 operoni** pentru sinteza ARNr și **86 gene** pentru sinteza ARNt;
- facultativ **anaerob** și **nesporulat;**
- se dezvoltă în intestin, face parte din microbiota normală, natural intestinală, jucând roluri importante: sursă de vitamine B12 și K; împiedică colonizarea intestinului cu bacterii patogene;
- poate deveni patogenă: atunci când contaminează tractul urinar (este cea mai importantă bacterie în etiologia infecțiilor urinare); când trece prin peretele intestinal și pătrunde în abdomen; în situația pătrunderii în organism a unor tulpini virulente.

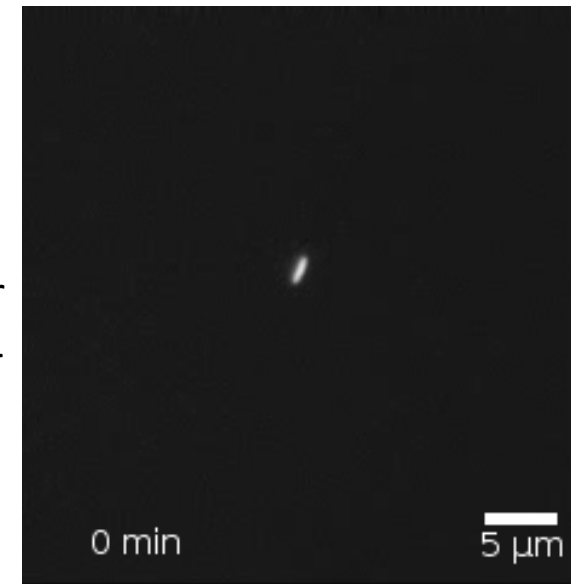


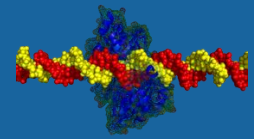


Escherichia coli și utilitatea sa

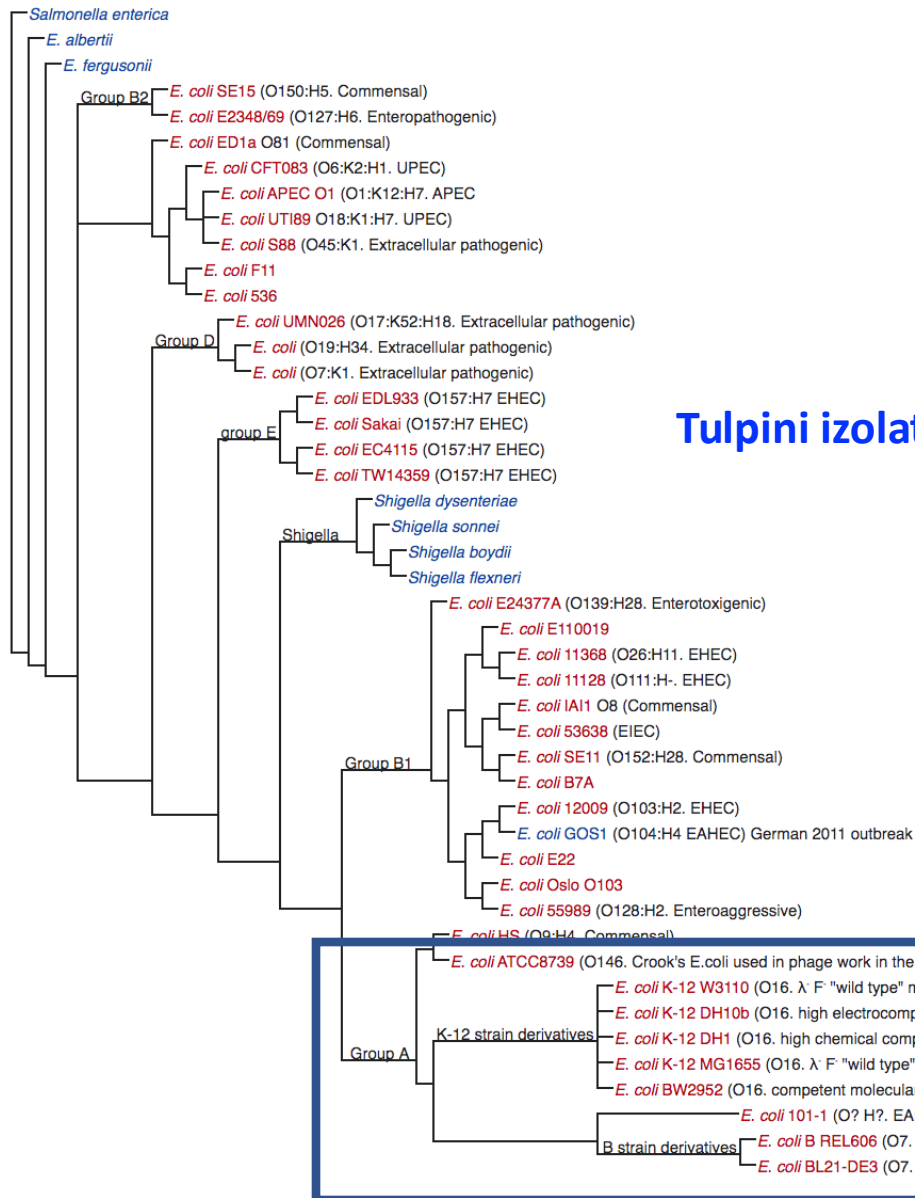
Escherichia coli – este utilizată intens în prezent atât în laborator cât și la nivel industrial pentru obținerea unor cantități mari de ADN, proteine sau metaboliți. Bacteriile *E. coli* utilizate în laborator și industrie nu sunt identice cu cele ce se găsesc în mod natural în intestin, ci sunt tulpini de *E. coli* selectate și modificate de-a lungul timpului pentru ușurința în utilizare pentru cercetare. Din tulpina naturală, au fost desprinse 4 tulpini majore ce sunt **utilizate ca organism model**: *E. coli* K-12, *E. coli* B, *E. coli* C și *E. coli* W. Dintre acestea, tulpinile *E. coli* K-12 și *E. coli* B sunt cel mai frecvent utilizate în laborator deoarece:

1. Se pot cultiva pe medii ieftine, inclusiv medii minimale (o sursă de C și energie precum glucoza și săruri minerale ca sursă de N și P);
2. Au pierdut capacitatea de a se dezvolta în intestin;
3. Au un ritm extrem de rapid de creștere în laborator (1 generație la aproximativ 20 min față de 1 generație la 12-24 h în intestin pentru tulpina inițială);
4. Genomul este complet secvențiat și majoritatea mecanismelor de reglaj genetic sunt cunoscute;
5. Sunt competente – pot prelua din mediu molecule de ADN.



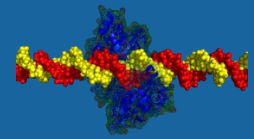


Escherichia coli – relații filogenetice între tulpini



Tulpini izolate din diverse probe, unele patogene

Tulpini utilizate în laborator

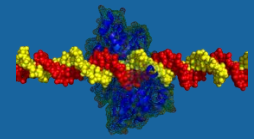


Escherichia coli – tulpini utilizate în laborator

Majoritatea tulpinilor utilizate în laborator provin așadar din două tulpini principale: *E.coli* K-12 și *E. coli* B. Aceste 2 tulpini diferă una de cealaltă în principal prin comportamentul față de ADN-ul exogen datorat sistemelor diferite de metilare-restricție active :

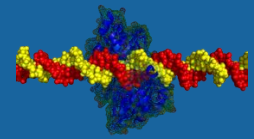
- **tulpina *E.coli* K-12** conține **sistemul de metilare-restricție *EcoKI*** și va distruge ADN-ul care nu este metilat la adenina din secvența AA*C[N6]GTGC sau GCA*C[N6]GTT. ADN-ul izolat din această tulpina va fi în consecință metilat în aceste poziții.
- **tulpina *E. coli* B** conține **sistemul de metilare-restricție *EcoBI*** și va distruge ADN-ul nemetilat la nivelul adeninei din secvența TGA*[N8]TGCT sau AGCA*[N8]TCA.

Plecând de la aceste două sușe, cercetătorii au creat numeroase tulpini cu utilizare precisă, aducând modificări specifice la nivelul genelor cromozomiale sau introducând material genetic extra-cromozomial suplimentar. Pentru a putea caracteriza foarte complet fiecare din aceste tulpini este necesară precizarea în mod explicit a modificărilor și îmbunătățirilor aduse la nivelul genomului. Pentru aceasta **se consideră că toate genele din microorganism sunt normale, exceptând pe cele care sunt în mod explicit precizate ca fiind mutante. Un Δ înaintea unei gene înseamnă ca respectiva genă lipsește (deleție)**. Notațiile standard pentru cele mai frecvente mutații și manifestărilor lor fenotipice la tulpinile de *E.coli* cu utilizare în laborator sunt:



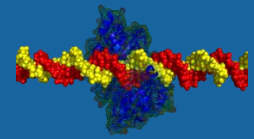
Escherichia coli – tulpini utilizate în laborator

Notare	Manifestare fenotipică
F ⁻	nu conține plasmidul conjugativ F
F ⁺	conține plasmidul conjugativ F. Celulele pot realiza procesul de conjugare și transfera plasmidul la celulele F ⁻
F' []	conține un plasmid conjugativ F în care au fost integrate gene cromozomiale. Celulele pot realiza procesul de conjugare și transfera plasmidul la celulele F ⁻ . Genele cromozomiale integrate în plasmid sunt reprezentate între paranteze pătrate
rB/K ^{+/-}	indică linia celulară. Semnele +/- indică dacă tulpina prezintă sau nu sistemele de restricție specifice pentru <i>E. coli</i> active
mB/K ^{+/-}	indică linia celulară. Semnele +/- indică dacă tulpina prezintă sau nu sistemele de metilare a ADN-ului specifice pentru <i>E. coli</i> active
hsdS	sisteme de metilare și restricție pentru anumite secvențe sunt inactivate. Dacă ADN-ul izolat de la aceasta tulpina este transferat în tulpini sălbatice de <i>E. coli</i> , acesta va fi degradat. hsdR = pentru transformarea eficientă cu ADN ne-metilat, de exemplu obținut prin reacția de amplificare in vitro (PCR)
INV()	inversare la nivel cromozomial între locațiile indicate
ahpC	mutație la nivelul genei alchil-hidroperoxid reductazei ce conferă enzimei și capacitatea de a reduce legăturile disulfidice
ara-14	nu poate metaboliza arabinoza
araD	mutație la nivelul genei pentru L-ribulozo-4- fosfat epimeraza ce blochează metabolismul arabinozei
cycA	mutație la nivelul sistemului de transport al alaninei, tulpina nu poate utiliza alanina ca sursa de C
dapD	mutație la nivelul genei ce codifică succinil-diaminopimelat-transferaza ce duce la inactivarea acesteia. Tulpina are nevoie de acid succinic sau lizină și metionină în mediu pentru a se dezvolta
Δ()	deleția la nivel cromozomial a genelor cuprinse între pozițiile dintre paranteze
dam	metilarea adeninei din secvența GATC este activă; sistemul de reparare a ADN-ului este activ
dcm	metilarea C din poziția a doua în secvența CCWGG este activă. În general cele două proprietăți – dam și dcm sunt prezente și nu sunt precizate în mod explicit. Lipsa lor însă este întotdeauna precizată sub forma notațiilor dam⁻ și dcm⁻
deoR	expresia constitutivă a genelor responsabile de sinteza deoxiribozei; permite transformarea celulelor cu plasmide de dimensiuni mari



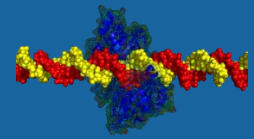
Escherichia coli – tulpini utilizate în laborator

Notare	Manifestare fenotipică
dut1	activitatea dUTP-azică este inactivată, ducând la creșterea concentrației de dUTP și incorporarea U în loc de T în ADN
endA 1	endonucleaza I este inactivată ceea ce permite o mai ușoară izolare a ADN-ului
galE	mutație asociată în general cu o competență crescută și rezistentă la 2-deoxygalactoza (9)
galk	tulpina nu poate metaboliza galactoza și este rezistentă la 2-deoxy-galactoza
galU	tulpina nu poate metaboliza galactoza
gor	mutație la nivelul glutation-reductazei; îmbunătățește formarea legăturilor di-sulfidice
gyrA96	mutație la nivelul genei ce codifica ADN giraza, rezistență la acid nalidixic
gyrA462	mutație la nivelul genei ce codifica ADN giraza; rezistență la colicina ccdB
$\Delta(\text{lac})\text{X74}$	deleția întregului operon lac și a zonelor adiacente
lacIq sau lacIQ	supra-producția proteinei represor lac; regiunea -35 în promotorul din fața lacI este modificat din GCGCAA în GTGCAA
lacIQ1	supra-productia proteinei represor lac; conține o deleție de 15 pb pentru a crea o regiune -35 optimă în promotorul din fața lacI
lacY	tulpina este deficientă în transportul și metabolizarea lactozei datorită deleției genei pentru lactoz-permează
lacZ Δ M15	deleția parțială a genei lacZ ceea ce permite α complementarea genei pentru β -galactosidază; necesar pentru realizarea selecției alb/albastru pe baza fenomenului de complementare alfa folosind plăci cu Xgal
leuB	necesită leucină în mediu pentru a se dezvolta
Δ lon	deleția proteazei lon
malA	tulpina nu poate metaboliza maltoza
mcrA	mutație ce elimină sistemul de restricție a ADN-ului metilat la nivelul secvenței CmCGG
mcrB	mutație ce elimină sistemul de restricție a ADN-ului metilat la nivelul secvenței RmC
metB	necesită metionină în mediu pentru a se dezvolta
metC	necesită metionină în mediu pentru a se dezvolta
mrr	mutație ce elimină sistemul de restricție a ADN-ului metilat la nivelul secvenței CmAG sau GmAC



Escherichia coli – tulpini utilizate în laborator

Notare	Manifestare fenotipică
mtIA	nu poate metaboliza manitolul
mutS	mutație ce inhibă procesul de reparație a ADN-ului
nupG	identic cu deoR
ompT	mutație la nivelul genei ce codifică proteaza extracelulară VII, reducând astfel proteoliza proteinelor supraexprimate
(P1)	conține profagul P1. Tulina exprimă sistemul de restricție P1
(P2)	conține profagul P2
PlysS	conține plasmidul pLysS ce codifică rezistența la cloramfenicol și atenuează activitatea T7 RNA polimerazei
proA/B	necesită prolină în mediu pentru creștere și dezvoltare
recA1	tulpină sensibilă la radiația UV, sistemul de reparație al ADN-ului este deficitar
recBCD	mutații la nivelul Exonucleazei V; mutația la nivelul genelor RecB sau RecC ce reduce frecvența proceselor recombinatoriale de 100 de ori; tulpină sensibilă la radiația UV, sistemul de reparație al ADN-ului este deficitar
relA	fenotip relaxat, sinteza ARN-ului este permisă în lipsa sintezei proteice
rha	metabolismul ramnozei este blocat
rnc	conține RN-aza III
rne	codifică RN-aza E
rpsL	mutație la nivelul proteinei ribosomale S12 ce duce la rezistență la streptomycină
sr1	metabolismul sorbitolului este blocat
supE	glnV
supF	tyrT
thi	necesită tiamină în mediu pentru creștere și dezvoltare
thyA	necesită timină în mediu pentru creștere și dezvoltare
Tn10	conține transpozonul 10 ce codifică în mod normal și rezistența la tetraciclină
Tn5	transpozon ce codifică în mod normal și rezistența la kanamicină
tonA	mutație la nivelul unei proteine din membrana externă ce conferă rezistență la fagul T1 și T5
traD	mutație ce inactivează factorul de transfer, celulele nu pot iniția sau accepta transferul plamidului F



Escherichia coli – tulpini utilizate în laborator

Notare	Manifestare fenotipică
trxB	mutație la nivelul tioredoxin reductazei, îmbunătățește formarea punților disulfidice în citoplasmă
tsx	mutație la nivelul unei proteine din membrana externă ce conferă rezistență la T6 și la colicina K
ung1	permite încorporarea uracilului în ADN-ul plasmidial
xyl-5	metabolismul xilozei este blocat
SmR	rezistență la streptomycină

E. coli BL21

- *F⁻ dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal [malB+]K-12(λS)*

- regiunea "malB" a fost transferată de la tulpina K-12.

E. coli BL21(DE3)

- *F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])*

- tulpină derivată din *E. coli* B ce conține DE3 - un λ profag conținând genele pentru ARN polimeraza T7 și *lacIq*

- utilizată în special ca gazdă pentru expresia de proteine recombinante;

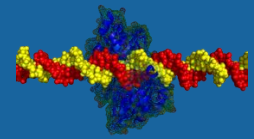
E. coli DH1

- *endA1 recA1 gyrA96 thi-1 glnV44 relA1 hsdR17(rK- mK+) λ-*

- tulpină derivată din sușa Hoffman-Berling 1100

- permite o transformare eficientă a plasmidelor de dimensiuni mari (40-60Kb)

- rezistentă la acid nalidixic;



Escherichia coli – tulpini utilizate în laborator

E. coli DH5α

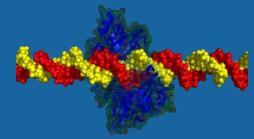
- *F* *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK⁻mK⁺), λ⁻*
- tulpină derivată din suşa *E. coli* DH1
- rezistentă la acid nalidixic
- una dintre cele mai utilizate gazde pentru vectori.

E. coli Rosetta(DE3)pLysS

- *F* *ompT hsdSB(RB⁻mB⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (CamR)*
- tulpină derivată din an *E. coli* B ce conţine DE3, un λ profag conţinând genele pentru ARN polimeraza T7 şi lacIq
- conţine plasmidul pLysSRARE. Acesta permite utilizarea în *E. coli* a codonilor rari AGG, AGA, AUA, CUA, CCC şi GGA deoarece codifică genele ARNt pentru *argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL, metT, thrT, tyrU, şi thrU*.

E. coli XL1-Blue (Stratagene)

- *endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK⁻mK⁺)*
- rezistentă la acid nalidixic şi la tetraciclină
- folosită ca gazdă pentru propagarea şi izolarea plasmidelor, dar si pentru expresia de proteine;



Escherichia coli – tulpini utilizate în laborator

E. coli XL2-Blue (Stratagene)

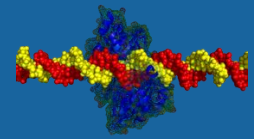
- *endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+lacIqΔ(lacZ)M15 Amy CmR] hsdR17(rK-mK+)*
- rezistentă la acid nalidixic și la tetraciclină;
- rezistentă la cloramfenicol, concentrații mai mici de 40 mg/ml, sensibilă la cloramfenicol concentrații mai mari de 100 mg/ml;
- folosită ca gazdă pentru propagarea și izolarea plasmidelor, dar și pentru expresia de proteine

E. coli XL1-Red (Stratagene)

- *F- endA1 gyrA96(nalR) thi-1 relA1 lac glnV44 hsdR17(rK-mK+) mutS mutT mutD5 Tn10*
- rezistentă la acid nalidixic și la tetraciclină;
- tulpină ce acumulează foarte frecvent mutații. ADN-ul transferat este foarte instabil;

E. coli XL10-Gold (Stratagene)

- *endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetRF'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetRAmy CmR)]*
- rezistentă la acid nalidixic, tetraciclină și cloramfenicol;
- fenotipul *hte* permite transformarea cu plasmide de dimensiuni foarte mari.



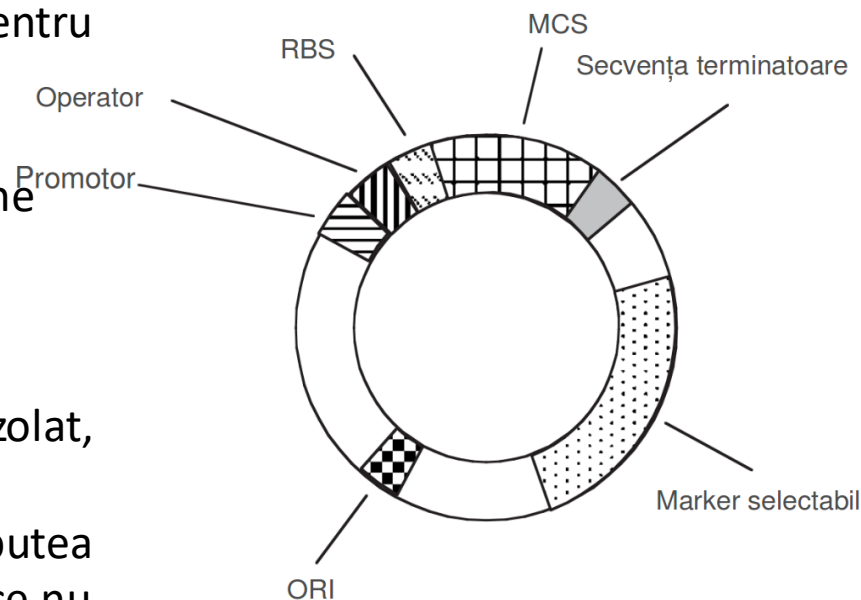
Vectori plasmidiali frecvent utilizați

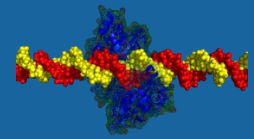
Principalele caracteristici necesare unui vector pentru a fi utilizabil în *E. coli* sunt:

- **capacitatea de autoreplicare independentă** de cromosomul bacterian – trebuie să conțină o origine de replicare compatibilă cu celula gazdă. Cel mai frecvent, la pentru plasmidele replicabile în *Escherichia coli* se folosește originea OriC.
- **dimensiuni mici** – pentru a putea fi simplu de izolat, manipulat și transferat în celula gazdă;
- **să conțină un marker selectabil**, pentru a putea diferenția ușor celulele ce conțin vectorul de cele ce nu îl conțin.

Cel mai frecvent acest marker este rezistența la antibiotice codificată de gene aflate pe plasmid. Când celulele bacteriene sunt etalate pe medii ce conțin antibiotice, doar celulele ce conțin plasmidul ce codifică rezistența vor supraviețui, realizându-se astfel o selecție.

Primii vectori plasmidiali apăruti au fost o serie de vectori simpli, ce conțineau o origine de replicare, o genă a unui marker selectabil și câteva situsuri de recunoaștere pentru enzime de restricție amplasate aleator. Utilizarea acestora în clonarea genelor a fost dificilă și prin urmare au fost dezvoltați **vectori de clonare** specializați, care conțineau pe lângă elementele amintite și o zonă redusă ca dimensiuni cu numeroase situsuri de restricție foarte frecvent utilizate. Zona respectivă a primit numele de **situs multiplu de clonare (multiple cloning site, MCS)**.



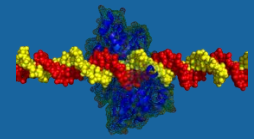


Vectori plasmidiali frecvent utilizați

În vederea expresiei genelor clonate în *E. coli* sunt necesari un alt tip de vectori: **vectori de expresie**. Aceștia trebuie să permită atât clonarea genelor cât și expresia lor. De aceea conțin suplimentar, pe lângă elementele enumerate la vectorii de clonare și elementele necesare expresiei reprezentate din:

- **un promotor** puternic sub controlul căruia este pusă gena de interes. Cel mai frecvent utilizați promotori sunt: promotorul bacteriofagului λ PL , promotorul *trp-lac* sau promotorul bacteriofagului T7. În aval de promotor se află MCS.
- **gena operatoare** specifică promotorului utilizat
- **situs-ul de legare a ribosomului (RBS)**
- **zona de semnalizare a sfârșitului transcripției**.

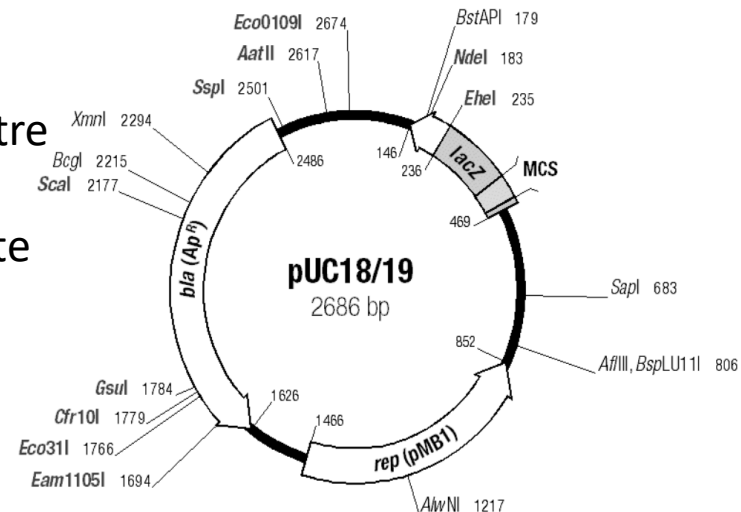
Situsul multiplu de clonare este întotdeauna amplasat după situs-ul de legare a ribosomului, în așa fel încât prin clonarea genei de interes aceasta să fie pusă sub controlul promotorului. Plasmidele de expresie mai pot conține de asemenea și alte sisteme de control strict al expresiei (Ex. În cazul sistemului de expresie folosind promotorul bacteriofagului T7 foarte frecvent în plasmid este și gena pentru lizozim din fagul T7, un inhibitor al ARN-polimerazei T7, care elimina expresia constitutivă a acesteia).



Vectori plasmidiali frecvent utilizați

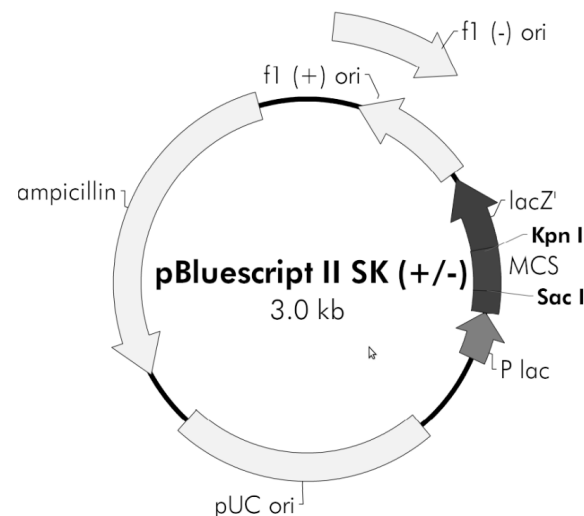
pUC18 și pUC19

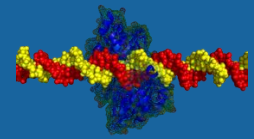
- vectori de clonare de dimensiuni mici (2,7 kb) ce diferă între ei doar prin secvența situsului de clonare
- secvența completă a plasmidului se găsește în baza de date GenBank/EMBL cu indicativul L09137;
- număr mare de copii în celulă
- conține gena responsabilă de rezistența la ampicilină



pBluescript II SK (+/-)

- un vector de clonare plasmidial al cărui origine de replicare provine de la un fag
- codifică rezistența la ampicilină
- comercializat de Stratgene

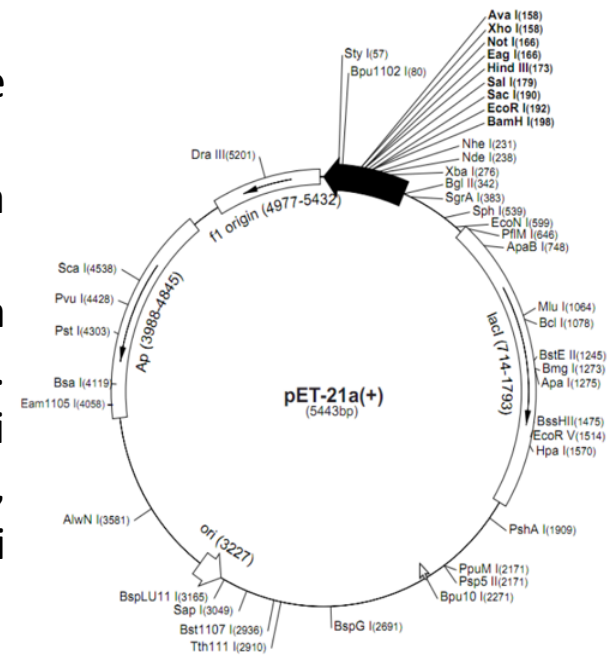




Vectori plasmidiali frecvent utilizați

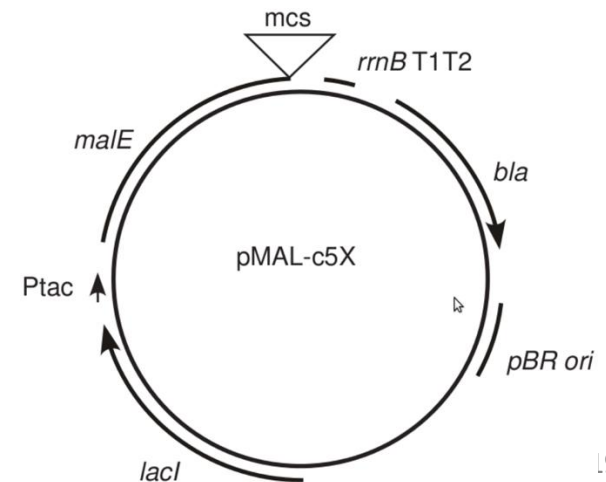
pET-21a

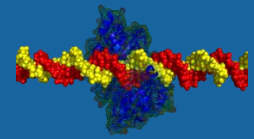
- vector de clonare și expresie având dimensiunea de 5,4 kb
- expresia proteinei se induce prin adăugarea în mediu a lactozei sau a unui derivat al acesteia (IPTG);
- proteina produsă este recombinată având un la capătul N terminal 6 resturi de histină și o coadă T7. Resturile de histidină permit purificarea proteinei produse prin cromatografie de afinitate pentru metale, iar coada T7 permite purificarea proteinei prin tehnici imuno-cromatografice.
- comercializat de Novagen



pMAL-c5x

- vector de clonare și expresie
- proteina clonată este pusă sub controlul promotorului tac, expresia putând fi indusa prin adăugarea în mediu a lactozei sau a unui derivat al acesteia (IPTG)
- proteina produsă este una fuzionată cu MBP (maltose binding protein, proteina din *E.coli* cu afinitate pentru maltoză), oferind astfel o modalitate simplă de purificare prin cromatografie de afinitate





Alți vectori utilizați în ingineria genetică

A. Bacteriofagii

Bacteriofagul λ este un virus capabil să infecteze celule de *E. coli* și a injecteze propriul său ADN de 48502 pb în celula bacteriană. Fagul a fost modificat și a devenit un vector eficient de transfer a fragmentelor mari de ADN în celulele de *E. coli*. Utilizarea sa ca vector se bazează pe două aspecte cheie:

1. Aproximativ o treime din genomul fagului este neesențial și poate fi înlocuit cu ADN străin;
 2. ADN-ul fagului este împachetat într-o particulă virală funcțională doar dacă are dimensiunea cuprinsă între 40,000 și 53,000 pb;
- Cercetătorii au creat astfel vectori bacteriofagici ce pot fi clivați în 3 fragmente distincte: două fragmente ce conțin gene esențiale și care au împreună 30000 pb și un al treilea fragment „de umplură”, amplasat între fragmentele esențiale și care poate fi înlocuit cu succes cu orice alt fragment de ADN.

Vectorii bacteriofagici permit clonarea unor fragmente de până la 23,000 bp. Între cele două fragmente esențiale poate fi astfel ligat fragmentul ADN „nou/străin” pentru a produce fragmente de ADN fagic recombinat. După ce fragmentele esențiale sunt ligate cu ADN-ul străin, amestecul de ligare este introdus într-un extract complet de celule de *E. coli* ce conține toate componentele necesare pentru a reface particula virală printr-un proces numit **împachetare *in-vitro***. Însă, doar acele molecule de ADN ce conțin fragmentele esențiale și ADN-ul de interes vor și împachetate în particule virale complete și deci vor fi capabile să infecteze noi celule de *E. coli*.

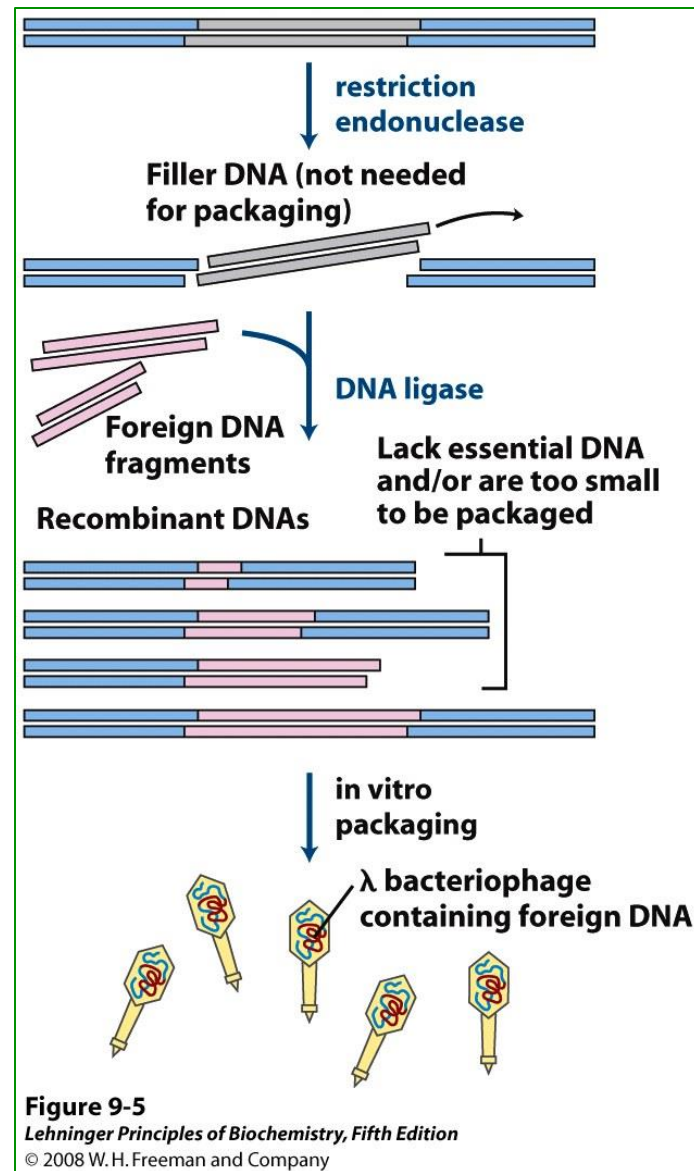
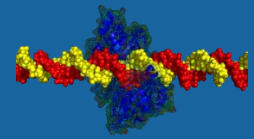


Figure 9-5
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



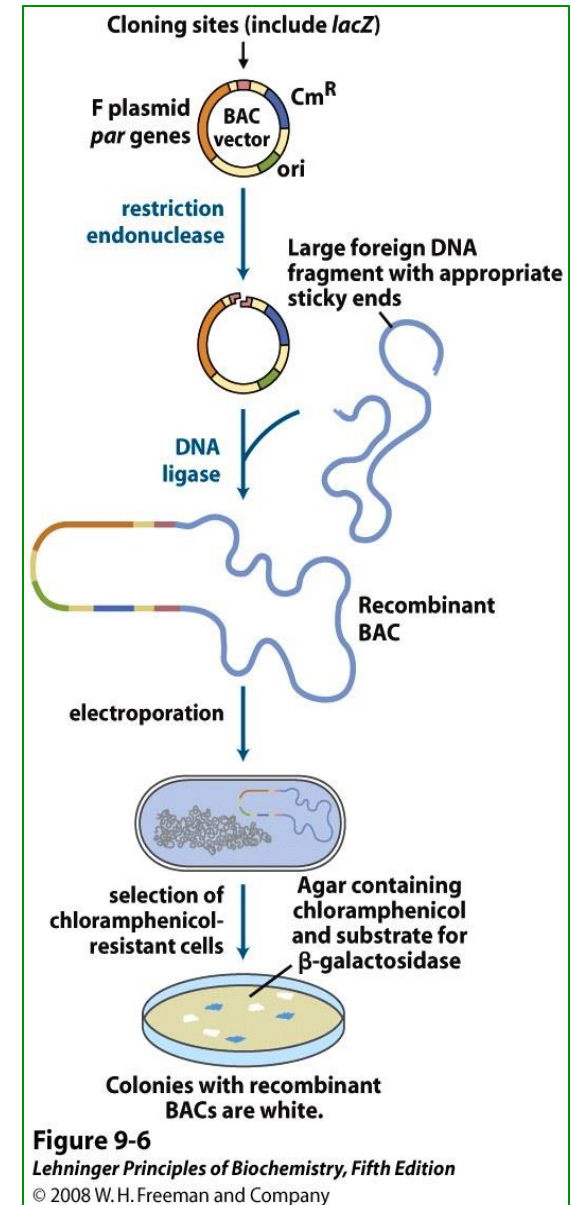
Alti vectori utilizați în ingineria genetică

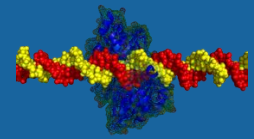
C. Cromozomii bacterieni artificiali (BAC, Bacterial Artificial Chromosome)

BAC sunt plasmide create special pentru a permite clonarea de fragmente foarte lungi de ADN, în general între 100000 și 300000 pb. În general acești vectori includ markeri de selecție cum ar fi rezistența la antibioticul cloramfenicol (*cmR*) și o origine de replicare ce menține plasmidul în o copie/ celulă (asemănător cromozomului bacterian).

D. Cromozomii artificiali pentru drojdii (YACs, Yeast Artificial Chromosomes)

Vectorii YACs conțin toate elementele necesare pentru a funcționa ca un cromozom eucariot în nucleul unei celule de drojdie: o origine de replicare ce funcționează în drojdie, doi markeri de selecție și secvențe specializate derivate din telomeri și centromer. Înainte de a fi utilizat în drojdie, un vector YAC este replicat ca o plasmidă circulară în bacterii. Printr-o digestie cu endonucleaze, din molecula de ADN circular se obțin două fragmente de ADN numite „brațe” ce au fiecare câte un marker selectabil și propriile secvențe telomerice. Fragmente de ADN de clonat, de dimensiuni până la 2×10^6 pb sunt amestecate cu brațele vectorului și ligate, amestecul de ligare fiind apoi utilizat pentru a transforma celule de drojdie. Pe medii ce conțin ambele antibiotice vor crește astfel doar acele celule ce conțin YACs cu brațele flankând ADN-ul de interes. Stabilitatea de lungul generațiilor a YAC crește odată cu dimensiunea, comportându-se asemănător unor cromosomi normali.





YACs

