

AppliChem

№11

Клонирующие векторы pBARN – положительная селекция рекомбинантов



Принцип систем для клонирования фрагментов, полученных при ПЦР, по тупым концам BARN 1 и 2 основан на нарушении экспрессии летального гена, кодирующего барназу, путем клонирования фрагментов, полученных при ПЦР, в области множественного клонирования (ОМК) вектора pBARN. Клетки *E.coli*, содержащие нерекомбинантный вектор, погибают при посеве. Следовательно, для этой системы не требуется разделения синих и белых колоний. В противоположность другим системам клонирования с положительной селекцией, использование BARN-1/2 не ограничивается специфическими штаммами *E.coli* или несколькими участками рестрикции для лигирования вставок. Иными словами, клонирующие векторы pBARN обладают преимуществами систем клонирования с положительной селекцией и не имеют присущих им недостатков.

AppliChem

Ключевые слова

Молекулярный
клонирование вектор
Клонирование продуктов
ПЦР по тупым концам
Положительная селекция
Барназа

Введение

Сегодня при работе со многими клонирующими векторами для выявления клонов с успешной вставкой фрагмента используют разделение белых и синих колоний. Фрагменты ДНК (например, продукты ПЦР или фрагменты генома) встраивают в область множественного клонирования (ОМК) плазмидного ДНК-вектора. Затем трансформированные компетентные клетки *E.coli* культивируют в присутствии X-gal. Если вставка была успешной, бактериальная колония приобретает белый цвет, в противном случае – синий. Этот традиционный метод, разработанный в конце семидесятых годов, в дальнейшем претерпевал усовершенствования и упрощения. Однако ему до сих пор свойственны два основных недостатка: низкая эффективность отбора белых/синих колоний и высокая стоимость клонирования. Кроме того, часто обнаруживаются ложноположительные клоны, что делает необходимым проведение субклонирования и последующего длительного исследования колоний, включающего, например, расщепление с помощью ферментов рестрикции или секвенирование.

Для упрощения и повышения эффективности клонирования при большом объеме работы было разработано несколько систем клонирования с положительным отбором (Табл. 1). Принцип клонирования с положительной селекцией довольно прост. Лигирование фрагментов ПЦР с ОКМ вектора нарушает экспрессию/активность летального гена, поэтому после трансформации растут только положительные рекомбинанты (до 100%). Клетки *E.coli*, содержащие нерекомбинантный вектор, погибают сразу после посева.

- Недостатки известных систем клонирования, в которых также используется принцип положительной селекции рекомбинантов, включают: (i) Положение полилинкера (ОМК) в середине летального гена. Это ограничивает выбор рестрикционных ферментов, а также использование „универсальных праймеров для секвенирования“. (ii) Ограниченное число бактериальных штаммов, пригодных для использования. (iii) Ограниченный размер вставок ДНК. (iv) В некоторых случаях требуется очень трудоемкая работа.

Система клонирования продуктов ПЦР по тупым концам pBARN

Простая в применении, быстрая и высокоэффективная система с положительной селекцией для клонирования фрагментов с тупыми или затупленными концами. Фрагменты, полученные с помощью Taq-пол-



Рис. 1: Модель строения барназы из *Bacillus amyloliquefaciens* (по Wilton *E.coli.* (2009) *Biophys. J.* 97,1482-90). Барназа катализирует расщепление одноцепочечной РНК в две стадии.

имеразы или других ДНК-полимераз без проверки активности, требуют затупления концов для оптимальной эффективности клонирования. Система клонирования продуктов ПЦР по тупым концам pBARN основана на свойствах продукта гена барназы, небольшой, высокоактивной рибонуклеазы микроорганизма *Bacillus amyloliquefaciens* (Yazyzin *E.coli.* 1996; Yazyzin *E.coli.*, 1999; Рис. 1). Клонирование векторы pBARN-1 и -2 (3,4 и 3,2 kb, соответственно), основной компонент этих систем, дают возможность непосредственной селекции рекомбинантов за счет подавления экспрессии летального гена барназы. Данный вектор содержит ген барназы под контролем промотора *LacZ*, N-конец которого соединен с искусственной последовательностью, включающей область множественного клонирования (ОМК). Вставка продукта ПЦР нарушает экспрессию/инактивирует ген барназы, делая возможным рост только положительных рекомбинантов после трансформации (рис. 2). Клетки *E.coli*, содержащие нерекомбинантный вектор, погибают сразу после посева. Следовательно, для этой системы не требуется разделения синих/белых колоний. Система клонирования по тупым концам BARN обеспечивает высокую, 85 – 100% эффективность клонирования и позволяет быстро анализировать клонированные продукты ПЦР. Какой-либо очистки или модификации вектора и фрагмента не требуется. Система ПЦР-клонирования по тупым концам pBARN-1 и -2 может применяться с большинством обычно используемых бактериальных штаммов.

Совместимые штаммы бактерий

Бактериальные штаммы, не экспрессирующие *lac*-репрессор или экспрессирующие его в незначительной степени, подходят для работы с клонирующими векторами BARN. Ниже см. выбор трех штаммов *E. coli*, подходящих для работы с клонирующими векторами pBARN-1/2. В норме основной активности *lac*-промотора достаточно для гибели обычных бактериальных штаммов. Однако для штаммов *E.coli* с высоким уровнем экспрессии *lac*-репрессора необходима стимуляция с помощью ИПТГ. Исследования показали, что для индукции экспрессии достаточно 20 мкл 0,1 М маточного раствора ИПТГ.

DH5a: D80lacZM15 (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*rk⁻, mk⁺*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*.

TOP10: *mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC)* D80DlacZM15 *lacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*.

NEB 5-alpha: *fhuA2D(argF-lacZ)*U169 *phoA glnV44f80D (lacZ)*M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

Вектор содержит несколько уникальных участков рестрикции (мест разрезания). Участки *EcoRI* ограничивают участок вставки продукта ПЦР с краев для вырезания вставок, что облегчает проведение рестрикционного анализа рекомбинантных плазмид. Кроме того, вектор содержит последовательности промотора T3 и SP6 (pBARN-1) или T7 и SP6 (pBARN-2), что делает возможной транскрипцию клонированных продуктов ПЦР *in vitro*, ПЦР колоний, а также секвенирование с помощью стандартных праймеров для секвенирования. Кроме того, векторы pBARN-1/-2 для клонирования по тупым концам содержат точку начала репликации фага f1, что позволяет получать одноцепочечные ДНК. Карты клонирующих по тупым концам векторов pBARN-1/-2 показаны на рис 3, а последовательности областей множественного клонирования - на рис. 4, соответственно.

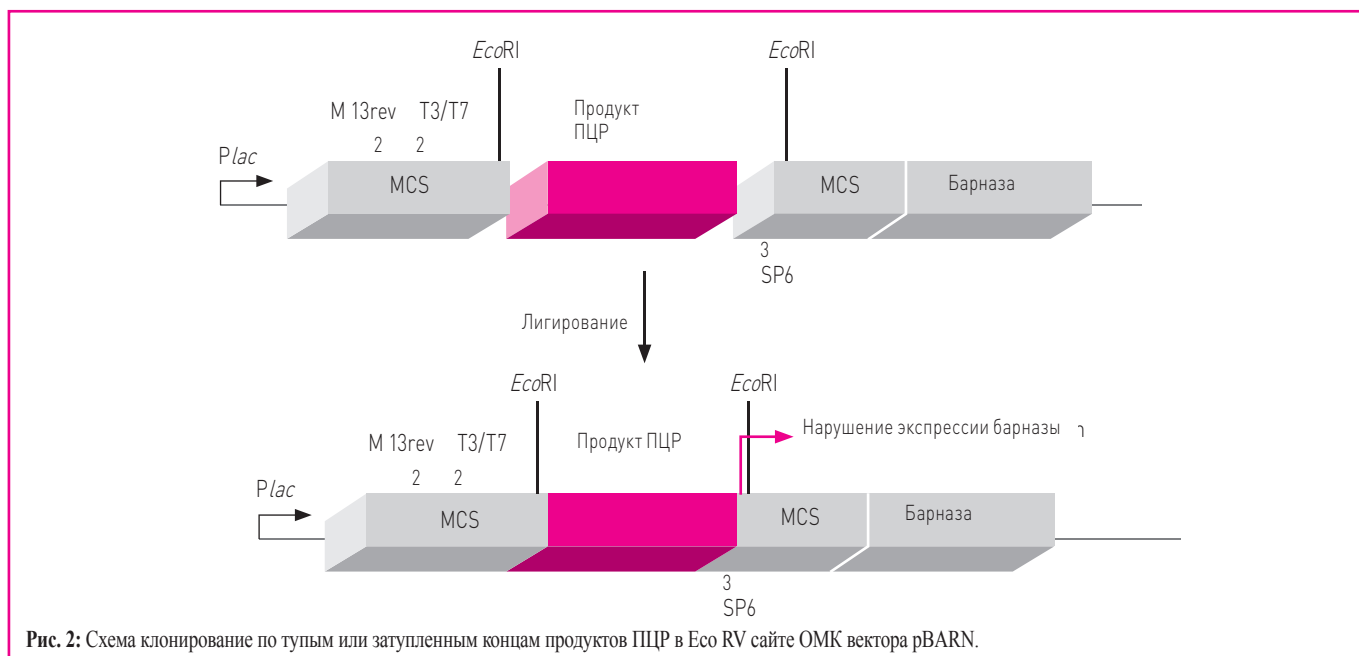


Рис. 2: Схема клонирования по тупым или затупленным концам продуктов ПЦР в *EcoRI* сайте Омк вектора pBARN.

Табл. 1. Сравнение разных клонирующих систем с положительной селекцией

Описание	Поставщик	Летальный ген	Характеристики
Набор для клонирования продуктов ПЦР (тупые концы)	Roche	cpr	Ограничение участков рестрикции и праймера, без точки начала репликации f1
Набор для ПЦР-клонирования CloneJet™	Fermentas	Eco47IR	Ограничение участков рестрикции и праймера, без точки начала репликации f1
Система клонирования продуктов ПЦР TOPOTM	Invitrogen	ccdB	ограничение по бактериальным штаммам (только F- штаммы), ограничение по размеру фрагментов ДНК
Набор StabyCloning™	Eurogentec	ccdB/ccdA-	ограничение по бактериальным штаммам
Набор для клонирования продуктов ПЦР по тупым концам BARN-1/-2	AppliChem	барназа	Система [специальный бактериальный штамм для клонирования CYS21] разные участки связывания праймеров (T3/T7, SP6, M13), вставки ДНК до 8 kb, совместимы со всеми распространенными штаммами E.coli

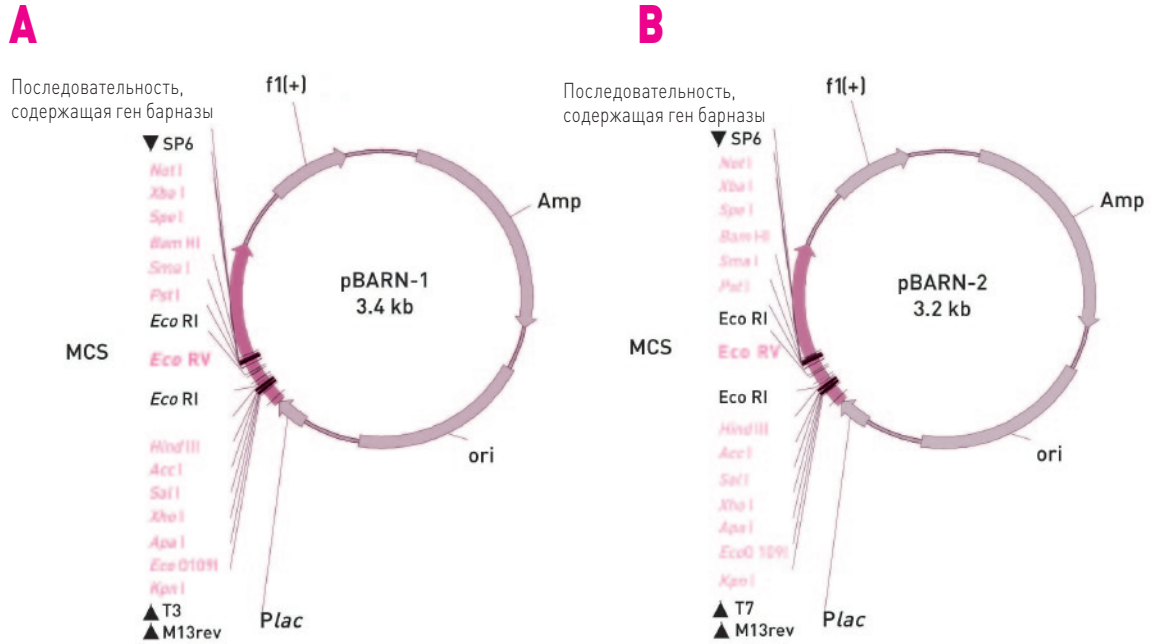


Рис. 3. Карты клонирующих по тупым концам векторов pBARN-1 (А) и pBARN-2 (В). Показаны положения разных элементов и уникальные области распознавания эндонуклеазы рестрикции в векторах.

pBARN-1



pBARN-2



Рис. 4. Область множественных участков рестрикции клонирующего вектора pBARN-1 и -2. С каждой стороны области клонирования располагаются уникальные участки распознавания эндонуклеазы рестрикции. Указано расположение элементов в клонирующем векторе pBARN-1/-2. Также показаны частичная аминокислотная последовательность пептида LacZa и первые 15 аминокислот барциназы. Показаны положения участков промоторов T3 (pBARN-1), T7 (pBARN-2) и SP6, последовательности участков связывания обратного праймера M13, а также участки расщепления уникальными эндонуклеазы рестрикции.



Коротко о преимуществах pBARN

- Клоны без вставок активно исключаются – принцип «гибели всего остального».
- Отсутствие ложноположительных клонов
- Не требуется разделение белых и синих колоний, а также X-Gal и IPTG
- Совместимы с большинством штаммов E. coli
- Высочайшая эффективность (до 100% положительных клонов)
- Не требуется обработки фрагмента после ПЦР
- Быстрое лигирование за 5 минут
- Вставки ДНК длиной до 8 т.п.о.
- Гибкое соотношение вставки/вектора
- Выбор сдвига рамки
- Простой анализ фрагментов ПЦР (области промотора T3/SP6 или T7/SP6)
- Поставляются в виде готовой к использованию линейной плазмидной ДНК
- Транскрипция in vitro

Литература

- 1.) Yazynin, S., Deyev, S., Jucivic, M. & Hartley, R.W. (1996) Gene 169(1), **131-132**. A plasmid vector with positive selection and directional cloning based on a conditionally lethal gene.
- 2.) Yazynin, S., Lange, H., Mokros, T., Deyev, S. & Lemke, H. (1999) FEBS Lett. 452(3), **351-354**. A phagemid vector for positive selection of recombinants -based on a conditionally lethal barnase gene.
- 3.) Wilton, D., Kitahara, R., Akasaka, K., Pandya, M., Williamson, M. (2009) Biophys. J. 97(5), **1482-1490**. Pressure-Dependent Structure Changes in -Barnase on Ligand Binding Reveal Intermediate Rate Fluctuations.

AppliChem предлагает широкий ассортимент маркеров молекулярной массы для гель-электрофореза, как в готовом к использованию виде, так и в форме лиофилизированной ДНК. Подробнее см. в нашей полной брошюре.

Получите бесплатную копию @ www.applichem.com

Описание	№ продукта	Количество	
Клонирующий вектор pBARN-1 (линейный)	A8867,0020	20 реакций	Последовательности промотора T3 и SP6
Набор для клонирования продуктов ПЦР по тупым концам BARN-1	A8883,0010 A8883,0040	10 reactions 40 reactions	pBARN-1 Kit incl. vector, ligase and reaction buffer
Клонирующий вектор pBARN-2 (линейный)	A8872,0020	20 reactions	Последовательности промотора T7 и SP6
Набор для клонирования продуктов ПЦР по тупым концам BARN-2	A8890,0010 A8890,0040	10 reactions 40 reactions	Набор pBARN-2, включая вектор, лигазу и реакционный буфер

