

Inżynieria genetyczna

Wykład 3: podstawowe narzędzia i techniki inżynierii genetycznej

Tymon Rubel

Zakład Elektroniki Jądrowej i Medycznej
Instytut Radioelektroniki i Techniki Multimedialnych PW

Inżynieria genetyczna: etapy modyfikacji genetycznej organizmu



Inżynieria genetyczna: narzędzia i techniki

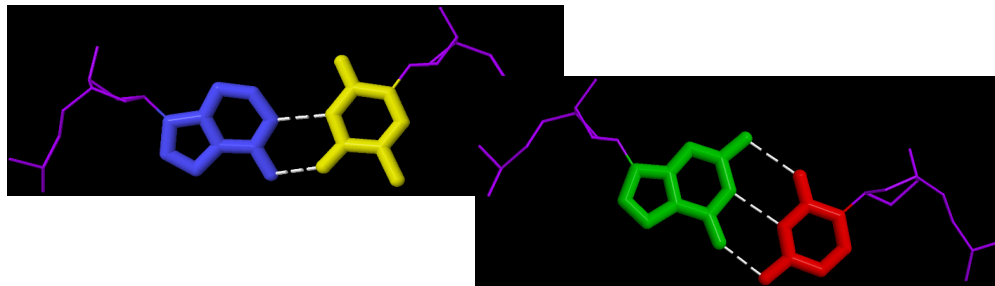
Inżynieria genetyczna korzysta z szeregu **technik manipulacji cząstkami DNA**, które służą m. in. do:

- **podziału** łańcuchów nukleotydów na krótsze odcinki;
- **rekombinacji**, czyli łączenia fragmentów pochodzących z różnych cząstek DNA;
- **edycji**, polegającej na modyfikacji sekwencji nukleotydów;
- **amplifikacji** (zwielokrotnienia liczby kopii) wybranych odcinków;
- **separacji** pod względem długości;
- **detekcji** cząstek o zadanej sekwencji;
- ustalania sekwencji nukleotydów tworzących cząstkę DNA (**sekwencjonowania**);
- **wprowadzania DNA do komórek.**

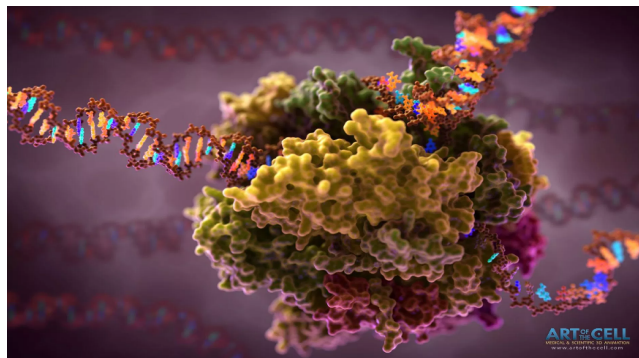
Inżynieria genetyczna: narzędzia i techniki

Techniki manipulacji DNA są nieustannie modyfikowane i rozwijane od lat 70. XX wieku, jednak u podstaw działania większości z nich niezmiennie leżą:

- **podstawowe cechy cząstek DNA:** istnienie reguł komplementarności nukleotydów, denaturacja pasm pod wpływem temperatury i ich samoistna hybrydyzacja;



- **właściwości enzymów białkowych (polimeraz, nukleaz i ligaz)** biorących udział w procesach zachodzących naturalnie w komórkach, np. w replikacji i naprawie DNA, czy też podczas degradacji kwasów nukleinowych;



- **wykorzystanie mechanizmów horyzontalnego transferu genów.**

Inżynieria genetyczna

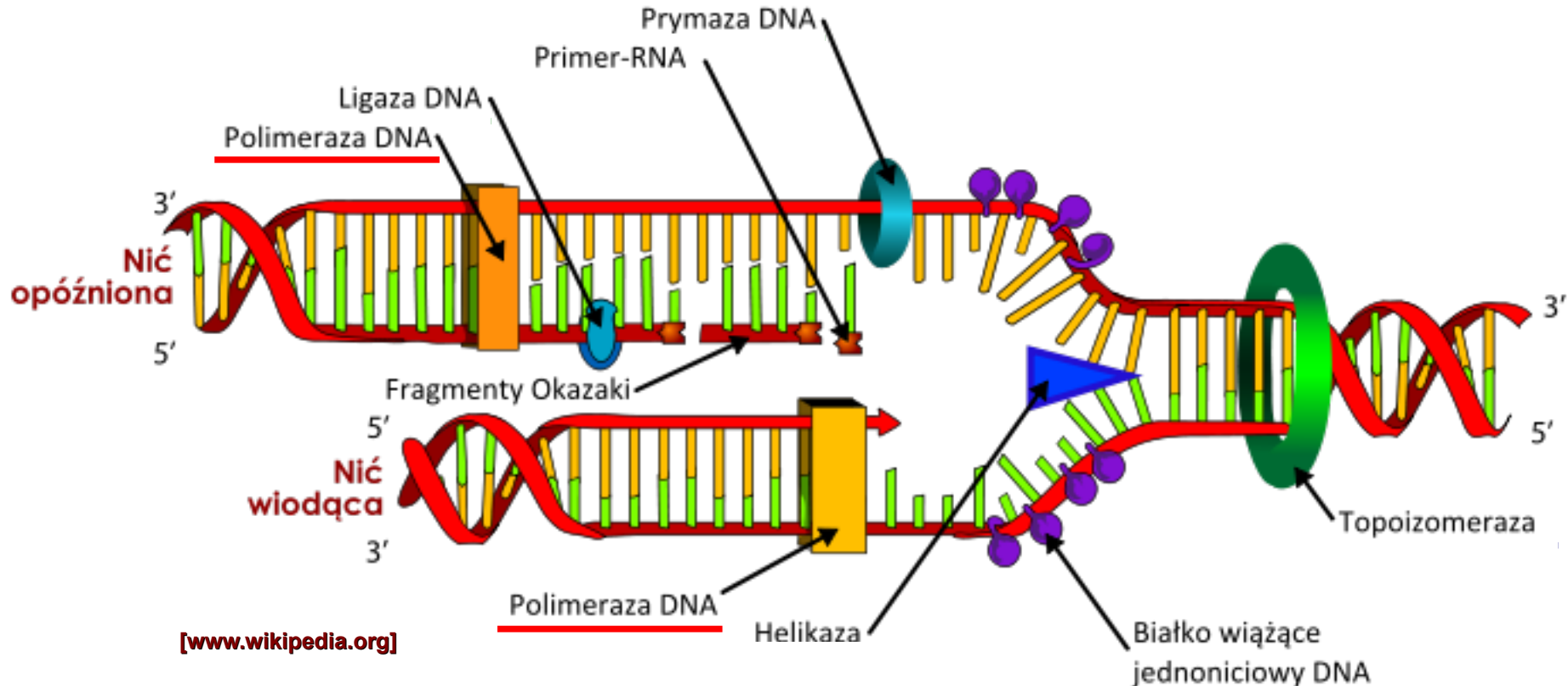
Wykład 3: enzymy służące do manipulacji cząstkami DNA

Tymon Rubel

Zakład Elektroniki Jądrowej i Medycznej
Instytut Radioelektroniki i Techniki Multimedialnych PW

Enzymy służące do manipulacji DNA: polimeraza DNA zależna od DNA

Polimeraza DNA zależna od DNA to enzym syntetyzujący nić DNA komplementarną do matrycy, którą stanowi jednoniciowe DNA. Występuje naturalnie w komórkach wszystkich organizmów żywych, gdzie bierze udział w **replikacji** i **naprawie DNA**.



W biologii molekularnej zwykle używa się oczyszczonych i zmodyfikowanych wersji polimeraz bakteryjnych. Wykorzystywane są one przede wszystkim do **amplifikacji** oraz podczas **sekwencjonowania**.

Enzymy służące do manipulacji DNA: polimeraza DNA zależna od DNA

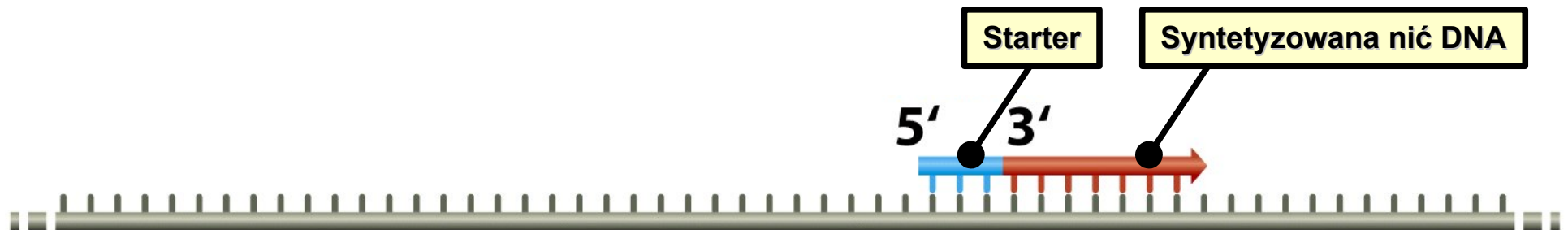
Najważniejsze właściwości polimerazy DNA:

- synteza nici DNA odbywa się w kierunku 5'→3' (kolejne nukleotydy dołączane są do końca 3' syntezowanej nici) zgodnie z regułą komplementarności wobec matrycy;



[T. A. Brown: *Genomy*. PWN, 2009]

- polimeraza DNA nie może rozpocząć syntezy na matrycy, która jest jednoniciowa na całej długości. Musi istnieć krótki odcinek dwuniciowy, powstający po dołączeniu do matrycy **startera (primera)** z wolnym końcem 3'. W komórce podczas replikacji DNA za utworzenie startera odpowiada polimeraza RNA (prymaza). W laboratorium funkcję primera pełni syntetyczny **oligonukleotydyd**, którego sekwencja decyduje o miejscu rozpoczęcia syntezy.

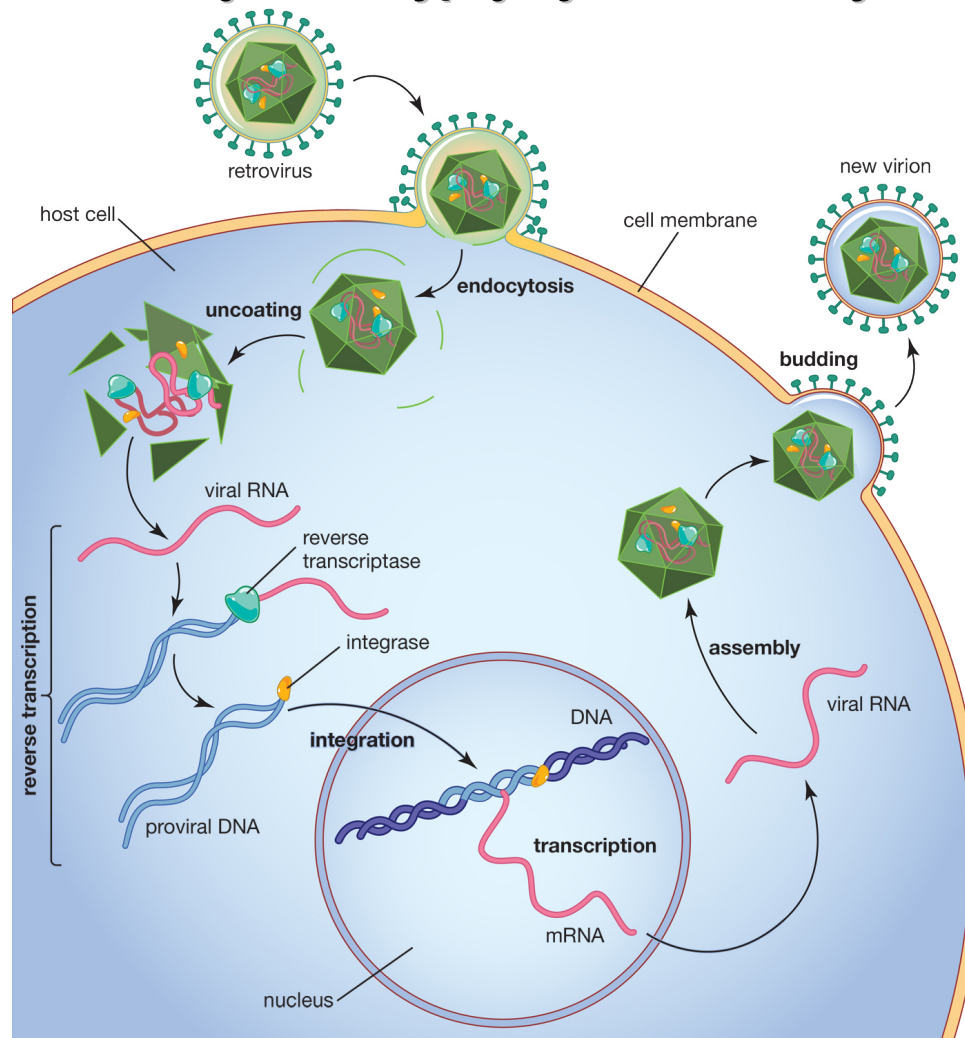


[T. A. Brown: *Genomy*. PWN, 2009]

Enzymy służące do manipulacji DNA: polimeraza DNA zależna od RNA

Polimeraza DNA zależna od RNA odpowiada za **odwrotną transkrypcję**, czyli syntezę nici DNA na matrycy RNA (stąd też jej inna nazwa: **odwrotna transkryptaza**).

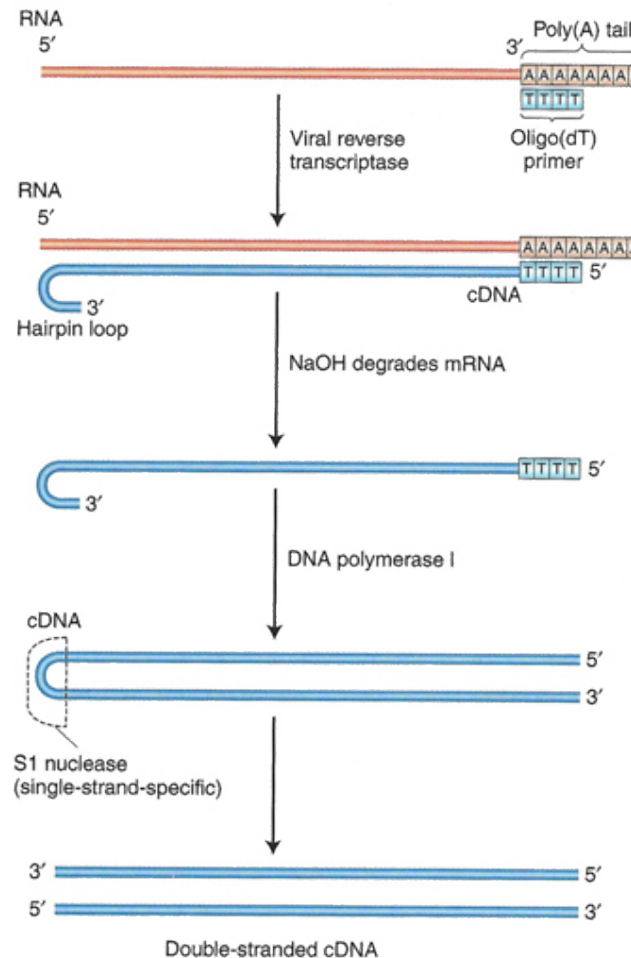
W warunkach naturalnych bierze udział w cyklach replikacyjnych retrowirusów (np. wirusa HIV), których genomy mają postać jednoniciowego RNA. Podczas infekcji RNA wirusa podlega odwrotnej transkrypcji i jest wbudowywane w DNA gospodarza.



Enzymy służące do manipulacji DNA: polimeraza DNA zależna od RNA

Odwrotna transkrypcja ma duże znaczenie laboratoryjne, gdyż może być użyta w procesie tworzenia dwuniciowych kopii DNA na podstawie transkryptów (cząstek mRNA). Kopie te nazywa się **komplementarnym DNA (cDNA, complementary DNA)**.

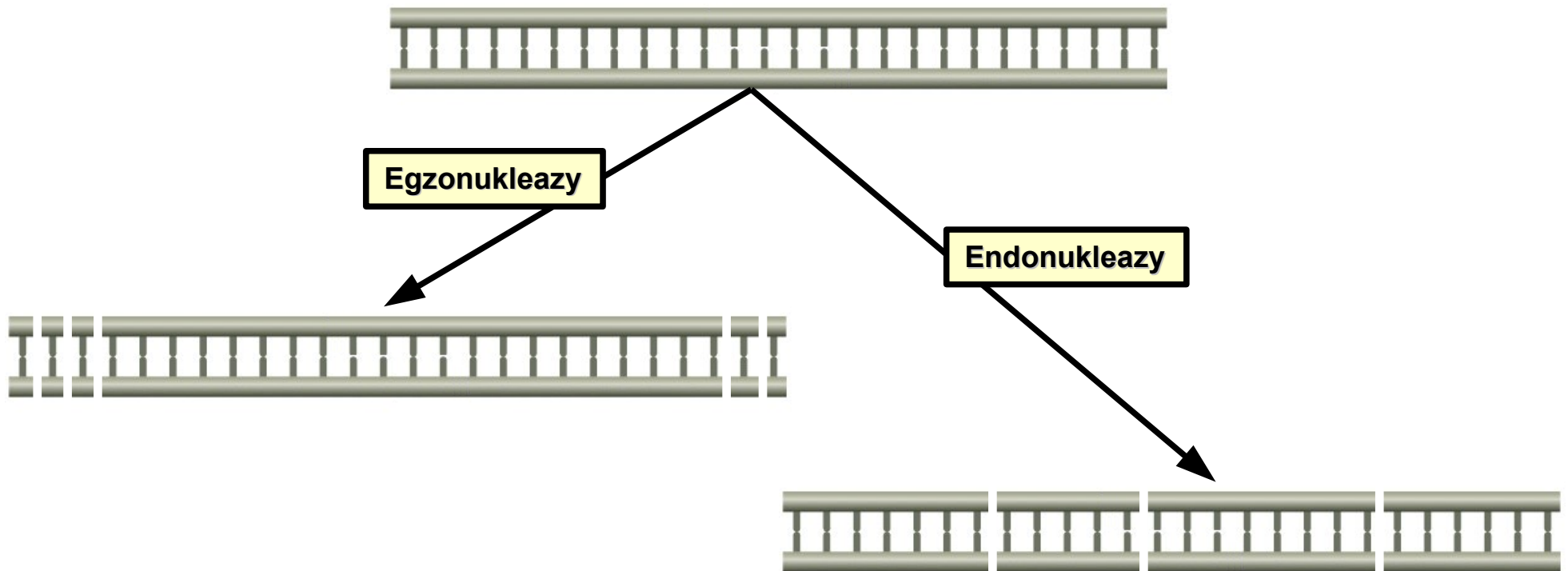
Zamiana mRNA na cDNA pozwala analizować transkrypty w taki sam sposób jak cząstki DNA. Dodatkową zaletą większa stabilność cDNA w porównaniu do mRNA.



Enzymy służące do manipulacji DNA: nukleazy

Nukleazy są enzymami, które degradują (trawią) kwasy nukleinowe rozrywając wiązania fosfodiesterowe łączące cukrowo-fosforanowe części nukleotydów:

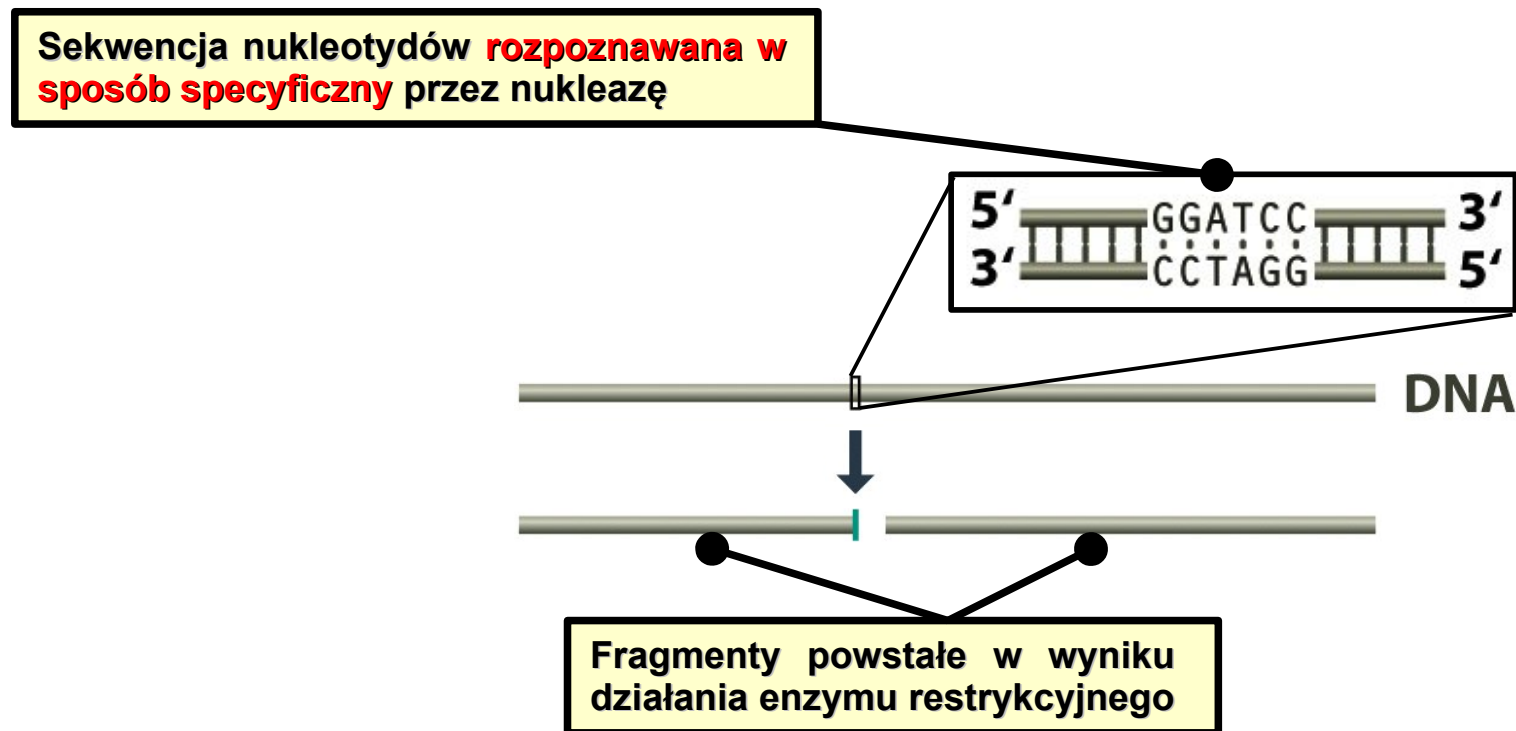
- **endonukleazy** tną wiązania wewnątrz cząstek;
- **egzonukleazy** usuwają pojedyncze nukleotydy z końców cząstek.



Enzymy służące do manipulacji DNA: nukleazy (enzymy restrykcyjne)

Istnieje wiele typów nukleaz, jednak z punktu widzenia procedur laboratoryjnych największe znaczenia mają **endonukleazy restrykcyjne**, które przecinają obie nici DNA tylko w bezpośrednim sąsiedztwie ściśle określonej sekwencji nukleotydów.

Różne rodzaje enzymów restrykcyjnych wykazują specyficzną do odmiennych sekwencji nukleotydów. Zwykle są one krótkie (od 4 do 8 nukleotydów) i często mają strukturę palindromu.

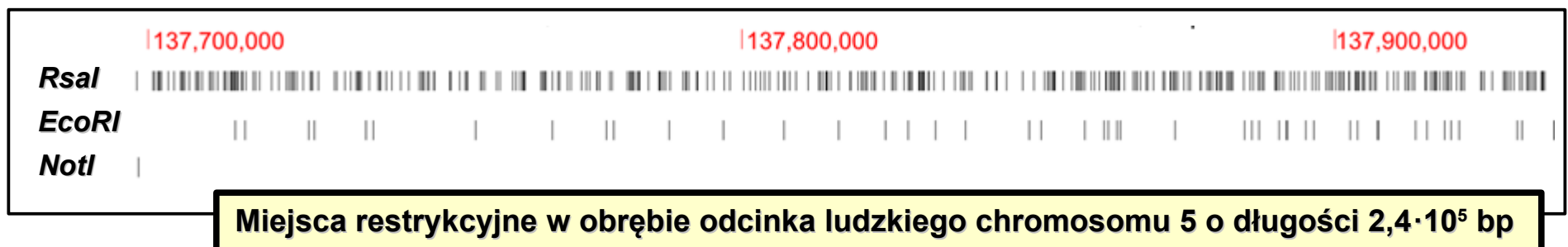


Enzymy służące do manipulacji DNA: nukleazy (enzymy restrykcyjne)

W praktyce laboratoryjnej wykorzystuje się obecnie kilkuset rodzajów endonukleaz restrykcyjnych pochodzenia bakteryjnego. Wybór konkretnego enzymu zależy od sekwencji badanej cząstki DNA oraz oczekiwanej długości fragmentów.

Enzym	Rozpoznawana sekwencja	Organizm	Enzym	Rozpoznawana sekwencja	Organizm
TaqI	5' TCGA 3' 3' AGCT 5'	Thermus aquaticus YT1	HindIII	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'	Haemophilus influenzae
RsaI	5' GTAC 3' 3' CATG 5'	Rhodospseudomonas sphaeroides	KpnI	5' GGTAAC 3' 3' CCATGG 5'	Klebsiella pneumoniae OK8
Sau3AI	5' GATC 3' 3' CTAG 5'	Staphylococcus aureus 3A	ClaI	5' ATCGAT 3' 3' TAGCTA 5'	Caryophanon latum
EcoRI	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'	Escherichia coli	BssHII	5' GCGCGC 3' 3' CGCGCG 5'	Bacillus stearothermophilus
BamHI	5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5'	Bacillus amyloliquefaciens H.	NotI	5' GCGGCCGC 3' 3' CGCCGGCG 5'	Nocardia otitidiscaviarum

Długości fragmentów powstałych wyniku działania enzymu restrykcyjnego zależą od jego specyficzności oraz sekwencji cząstki DNA.



Enzymy służące do manipulacji DNA: nukleazy (enzymy restrykcyjne)

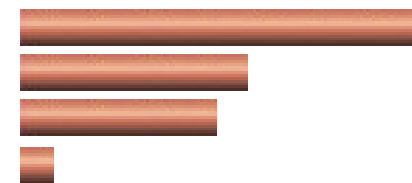
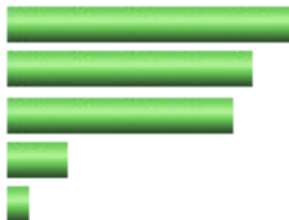
Przy zadanym enzymie wszystkie cząstki DNA jednego rodzaju zostaną pocięte na fragmenty o ściśle określonych długościach, zależnych od częstości występowania rozpoznawanej przez enzym sekwencji.



Cząsteczki DNA o odmiennej sekwencji, będą charakteryzować się innym rozlokowaniem miejsc, do których enzym wykazuje specyficzność. W efekcie wzorce cięcia w obu rodzajach cząsteczek będą się od siebie różniły.

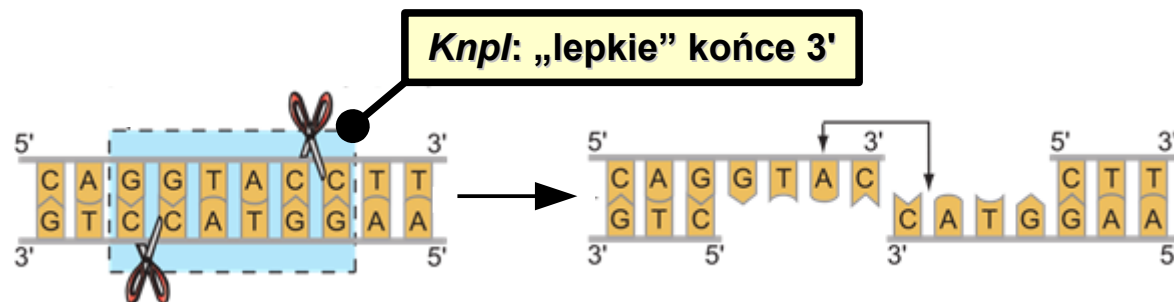
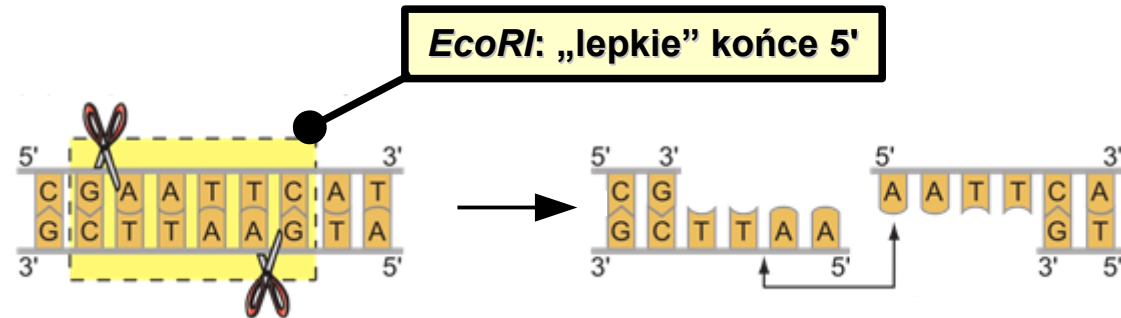
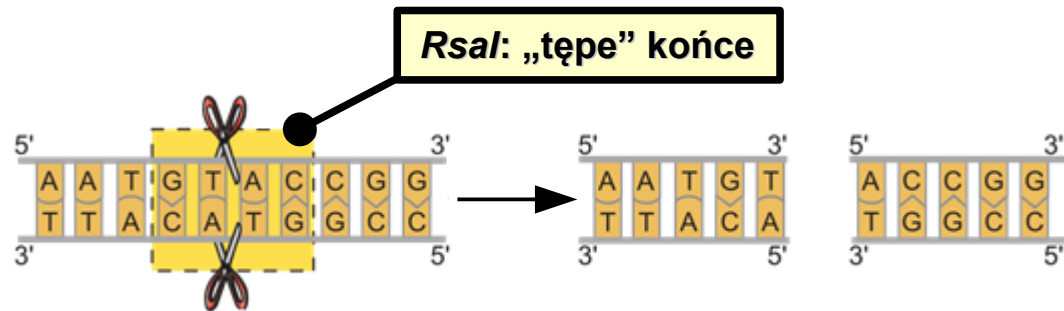


Uporządkowanie fragmentów pod względem długości (za pomocą omawianej dalej elektroforezy w żelu) pozwala rozróżnić różne rodzaje cząsteczek DNA na podstawie wzorów cięcia przez enzymy restrykcyjne.



Enzymy służące do manipulacji DNA: nukleazy (enzymy restrykcyjne)

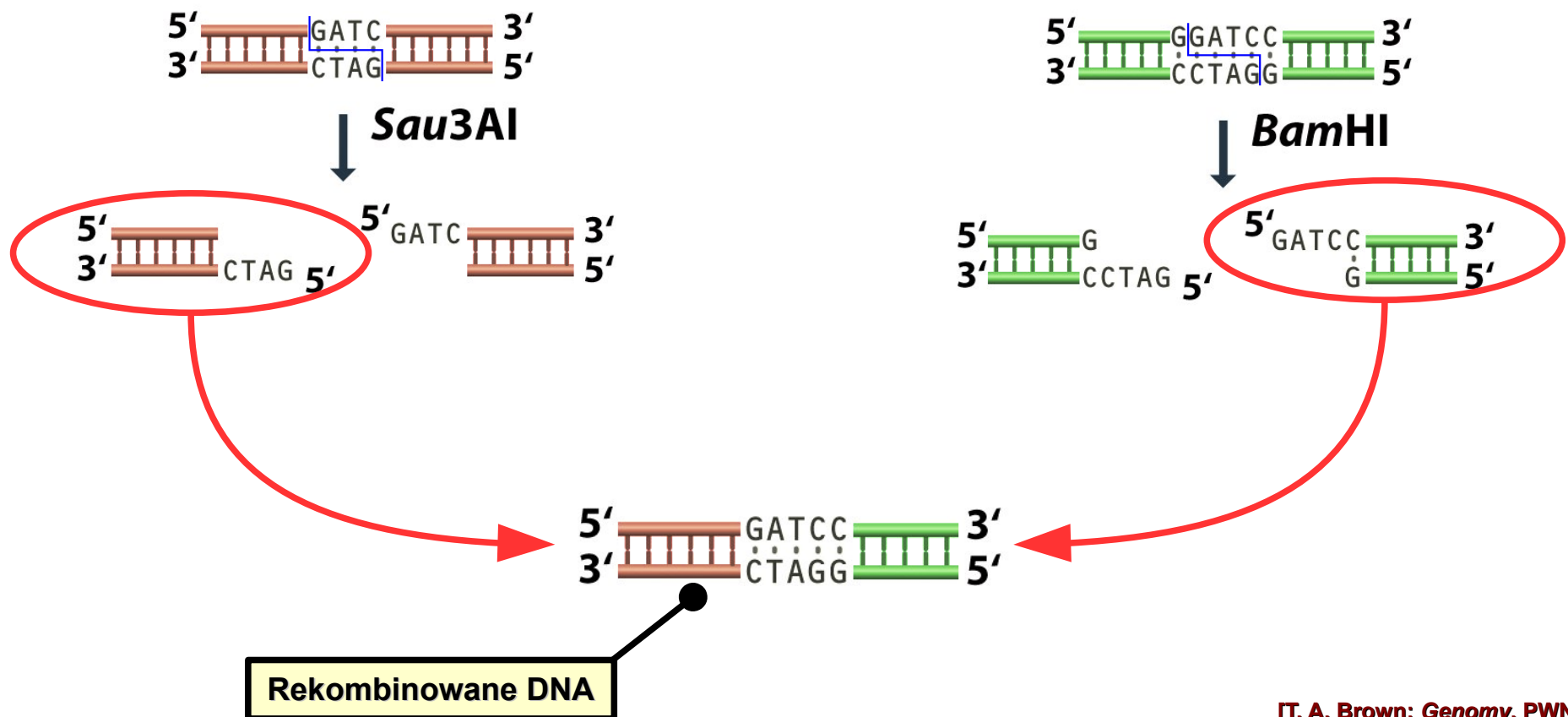
Szczególnie przydatne są enzymy restrykcyjne tnące obie nici DNA w nieco innych miejscach, powodując że powstałe fragmenty zakończone są krótkimi odcinkami jednoniciowego DNA (tzw. **lepki końcami**).



Enzymy służące do manipulacji DNA: nukleazy (enzymy restrykcyjne)

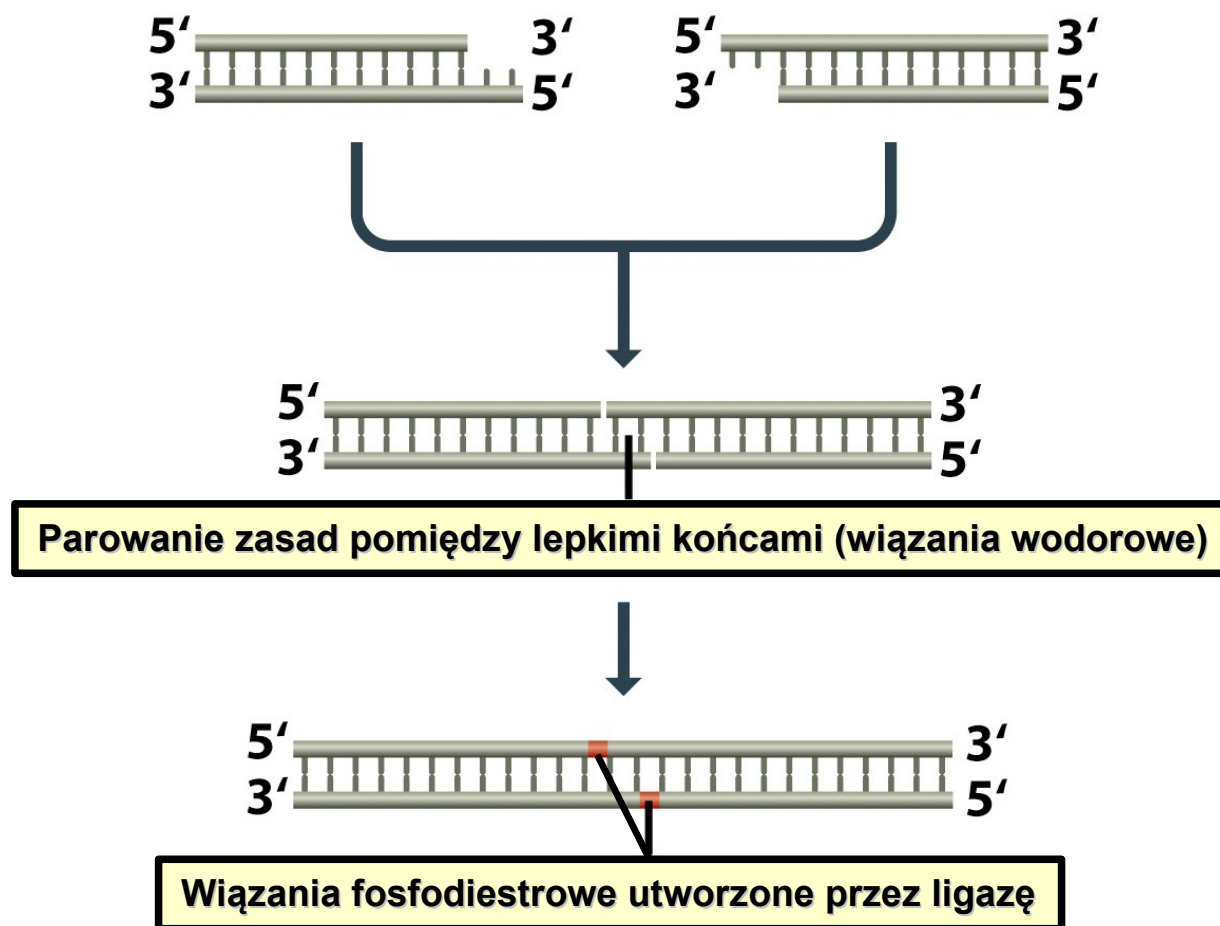
Komplementarność sekwencji lepkich końców fragmentów pochodzących z tej samej lub różnych cząstek DNA powoduje, że mogą one samoistnie łączyć się ze sobą za pośrednictwem wiązań wodorowych.

Rearanżacja DNA przez dzielenie i łączenie sekwencji różnych cząsteczek nazywane jest **rekombinacją**. Stanowi ona podstawę współczesnej inżynierii genetycznej.



Enzymy służące do manipulacji DNA: ligazy

Utrwalenie połączenia utworzonego przez lepkie końce dwóch fragmentów wymaga działania **ligazy**, czyli enzymu syntetyzującego wiązania fosfodiesterowe pomiędzy nukleotydami na końcach dwóch cząsteczek DNA.



Inżynieria genetyczna

Wykład 3: techniki manipulacji cząstkami DNA

Tymon Rubel

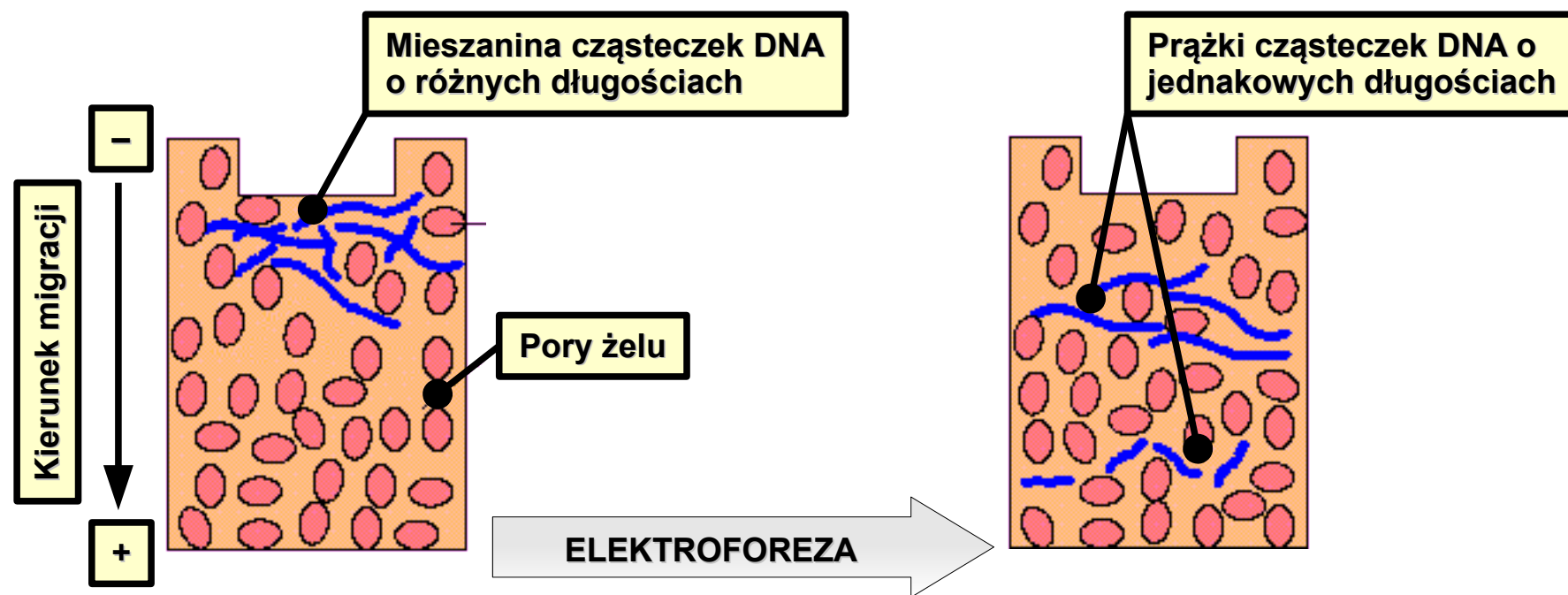
Zakład Elektroniki Jądrowej i Medycznej
Instytut Radioelektroniki i Techniki Multimedialnych PW

Techniki manipulacji DNA: elektroforeza w żelu

Elektroforeza w żelu pozwala rozdzielać obdarzone ładunkiem cząstki (w tym także DNA) poprzez wymuszenie ich migracji w polu elektrycznym.

Interakcje z siecią przestrzenną żelu powodują, że szybkość migracji analizowanych cząstek jest zależna od wielkości: krótkie łańcuchy DNA swobodniej przemieszczają się w żelu, dzięki czemu wędrują szybciej od dłuższych cząsteczek.

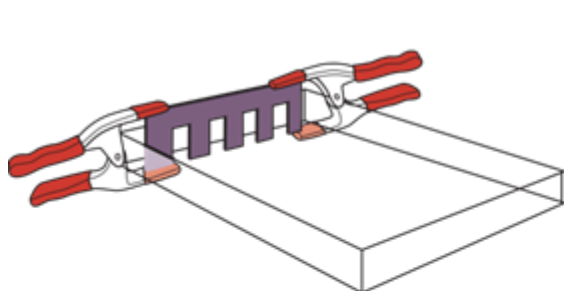
Efektom rozdziału elektroforetycznego jest powstanie w żelu szeregu prążków, z których każdy zawiera cząstki DNA o jednakowej długości (z pewną rozdzielczością, zależną od rodzaju żelu i zakresu długości rozdzielanych cząsteczek).



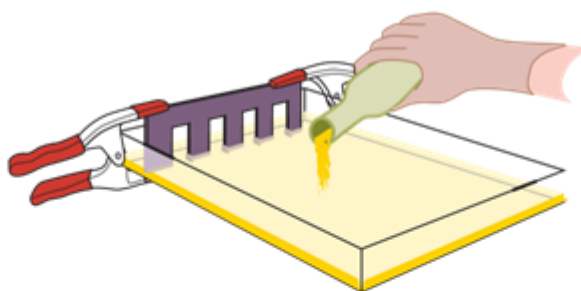
Techniki manipulacji DNA: elektroforeza w żelu

W elektroforezie cząstek DNA najczęściej stosuje się dwa rodzaje żeli:

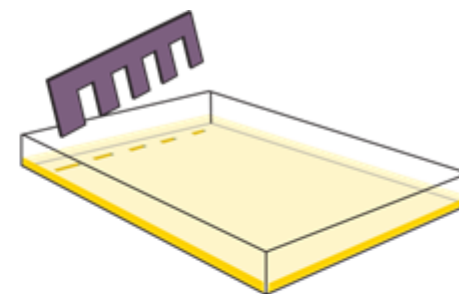
- **agarozowe** – do rozdzielenia długich fragmentów (niska rozdzielczość);
- **poliakrylamidowe** – do rozdzielenia krótkich fragmentów (wysoka rozdzielczość, która pozwala rozróżnić prążki cząstek różniących się długością o jeden nukleotyd).



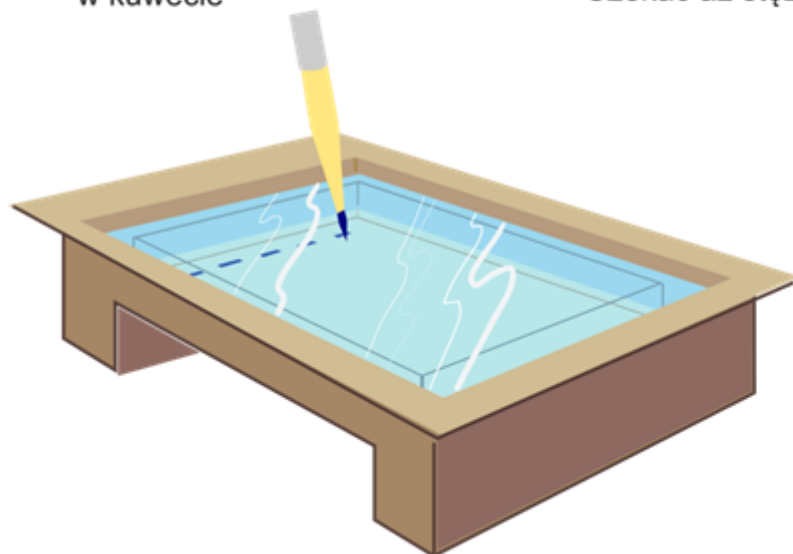
1. Ustabilizować grzebień w kuwecie



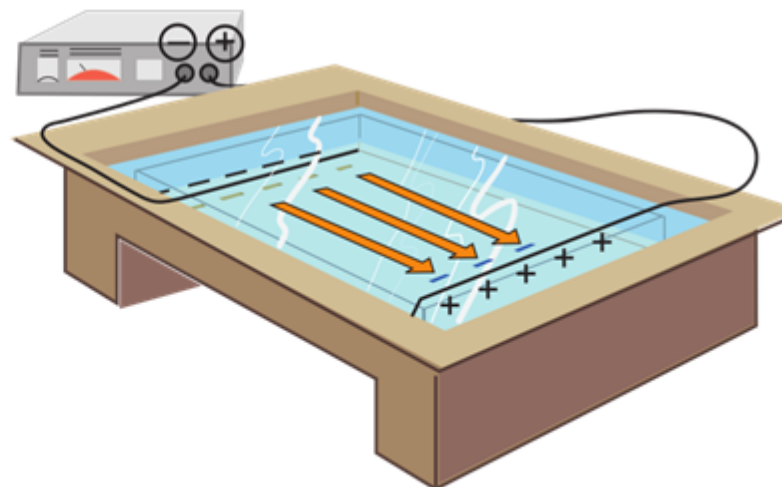
2. Wlać rozpuszczony roztwór agarozy. Czekać aż stężeje



3. Usunąć grzebień, usunąć żel z kuwety



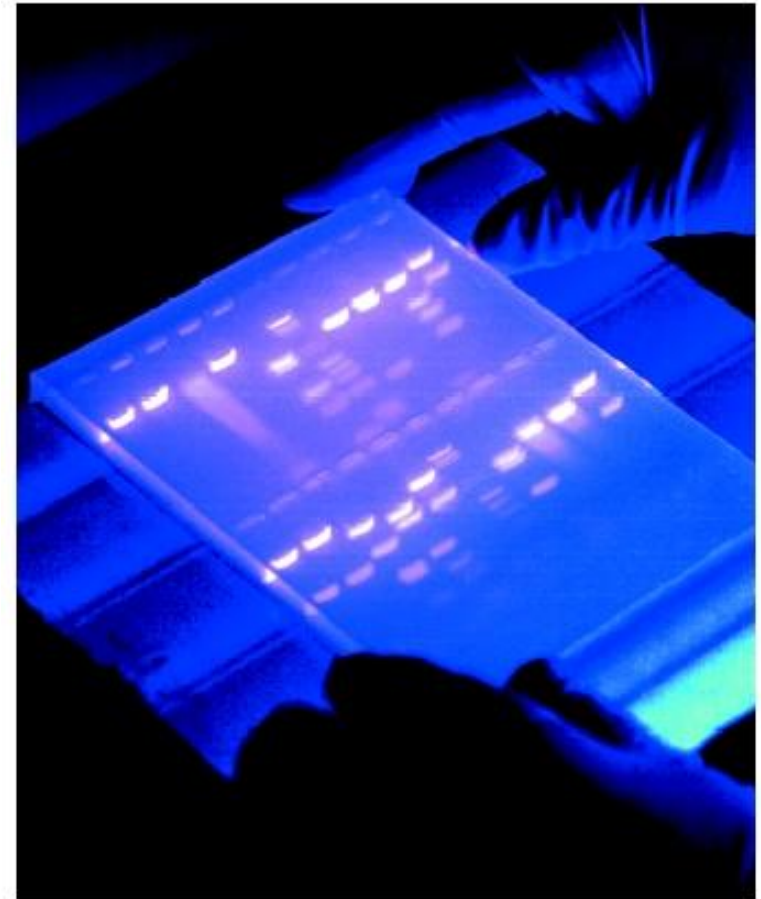
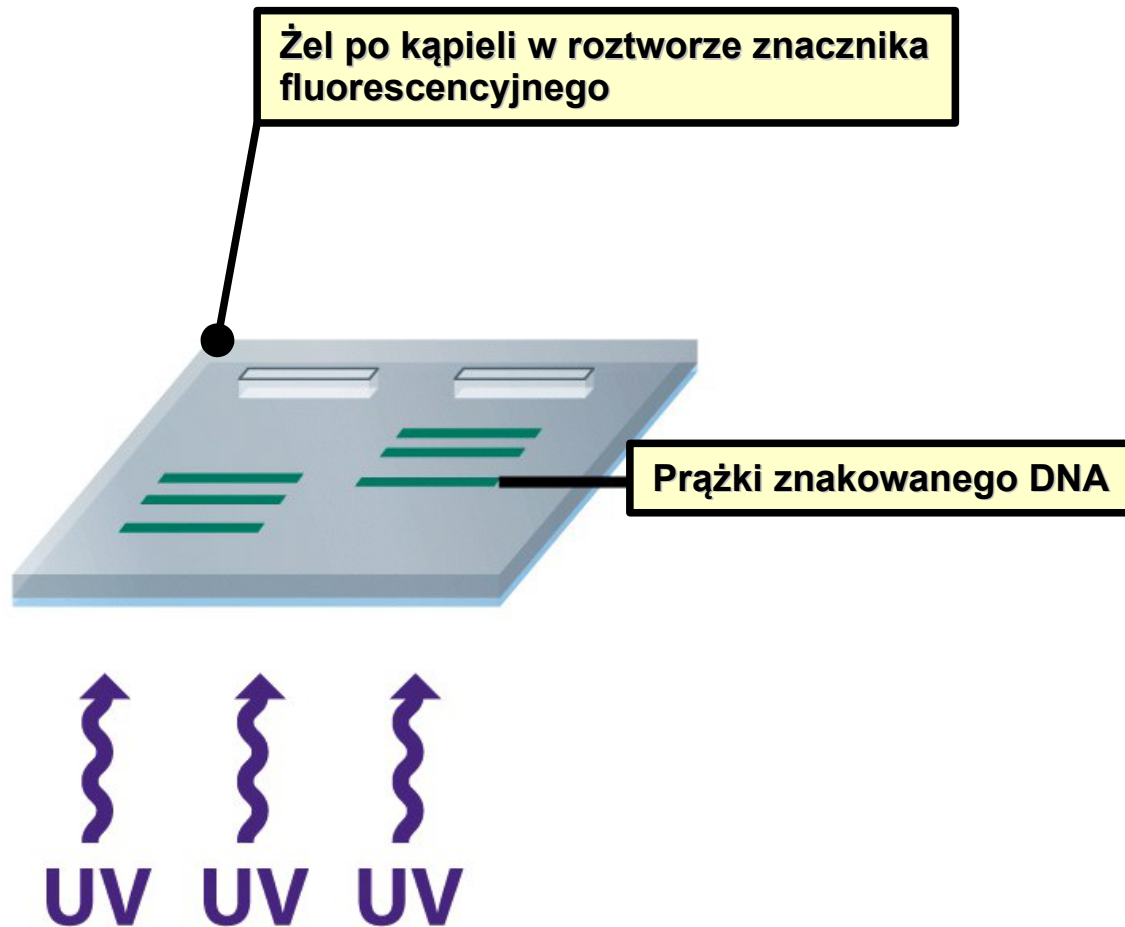
4. Zanurzyć żel w buforze, nałożyć próbkę



5. Przyłożenie napięcia - DNA jest naładowane ujemnie migruje w kierunku "+"

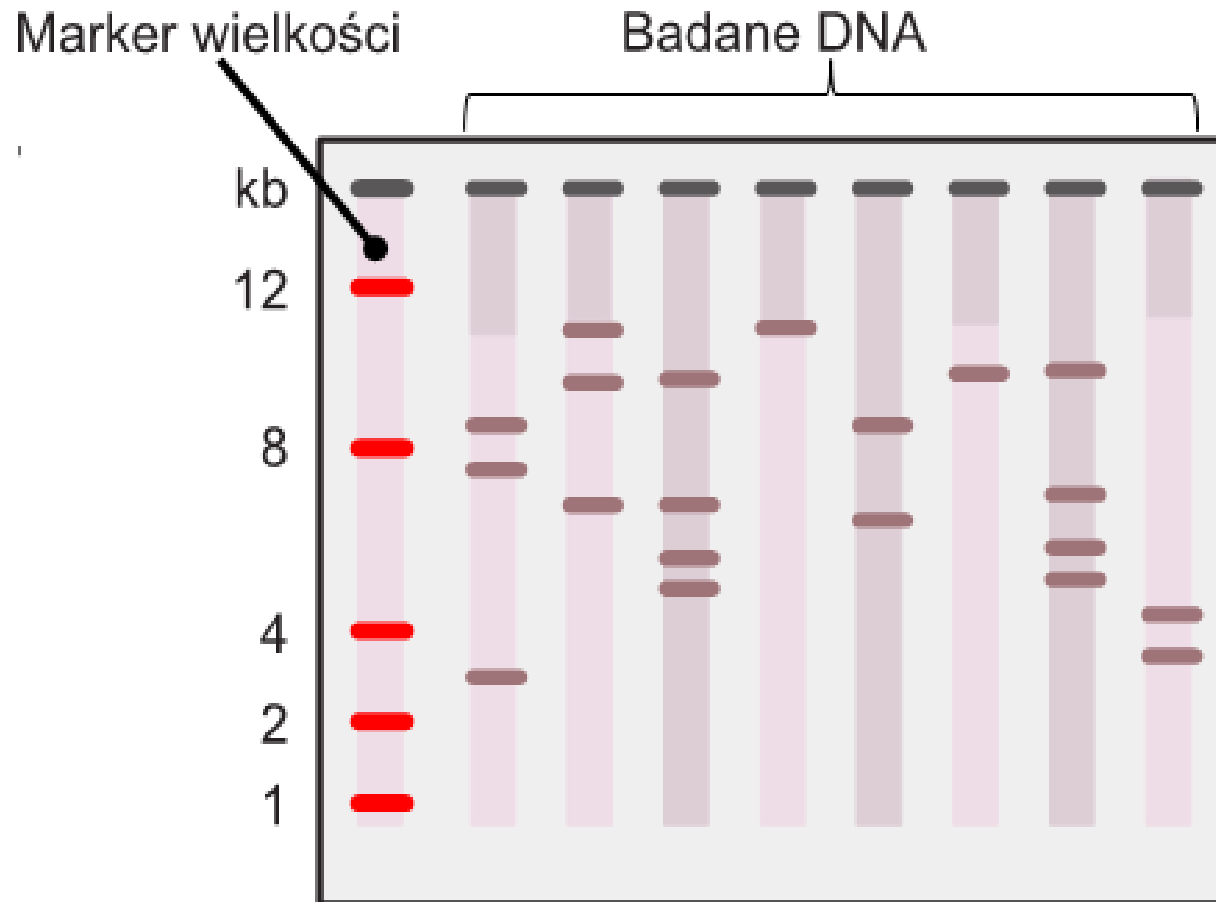
Techniki manipulacji DNA: elektroforeza w żelu

Powstałe w wyniku rozdziału prążki uwidacznia się przez odpowiednie **wybarwienie DNA za pomocą znaczników fluorescencyjnych** (np. bromku etydyny, GelGreen).



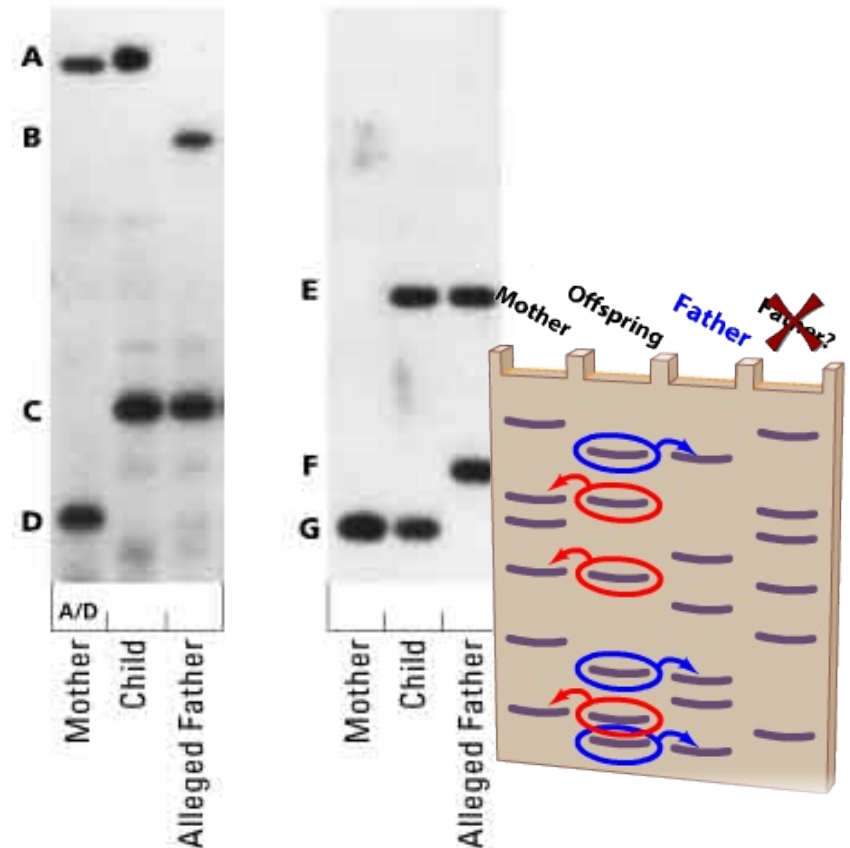
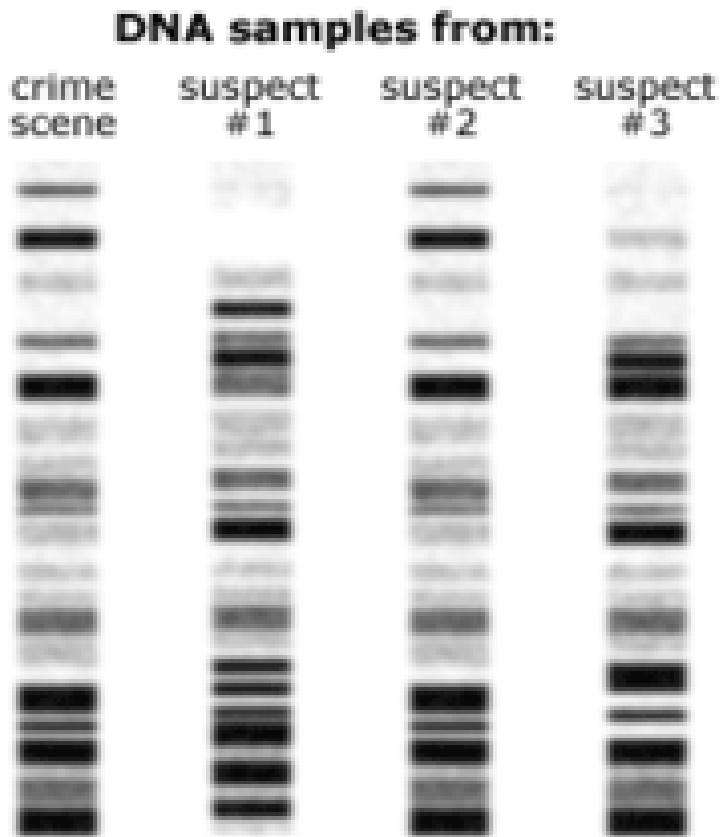
Techniki manipulacji DNA: elektroforeza w żelu

Wybranie do izolacji z żelu cząsteczek DNA o interesujących nas długościach jest możliwe dzięki zastosowaniu standardowych **markerów o znanej wielkości**.



Techniki manipulacji DNA: elektroforeza w żelu (mapy restrykcyjne)

Elektroforeza w żelu fragmentów DNA powstałych w wyniku działania enzymów restrykcyjnych pozwala utworzyć tzw. **mapy restrykcyjne**, na podstawie których możliwe jest rozróżnianie cząsteczek DNA nawet bez znajomości ich sekwencji.

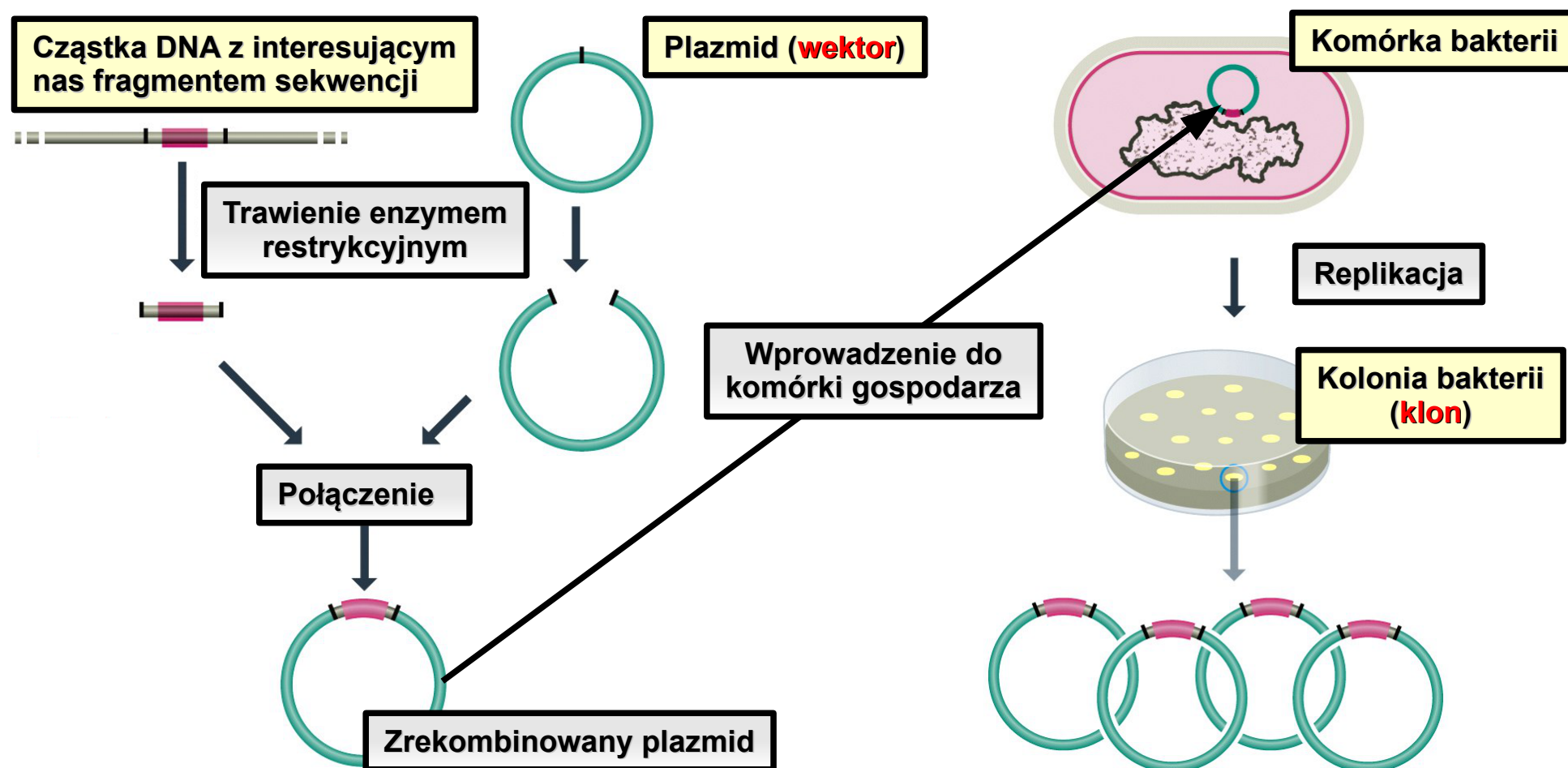


[<http://dna-fingerprinting.wikia.com>]

Do czasu upowszechnienia się technik sekwencjonowania mapy restrykcyjne były jedną z podstawowych metod identyfikacji i porównywania cząstek DNA.

Techniki manipulacji DNA: klonowanie molekularne

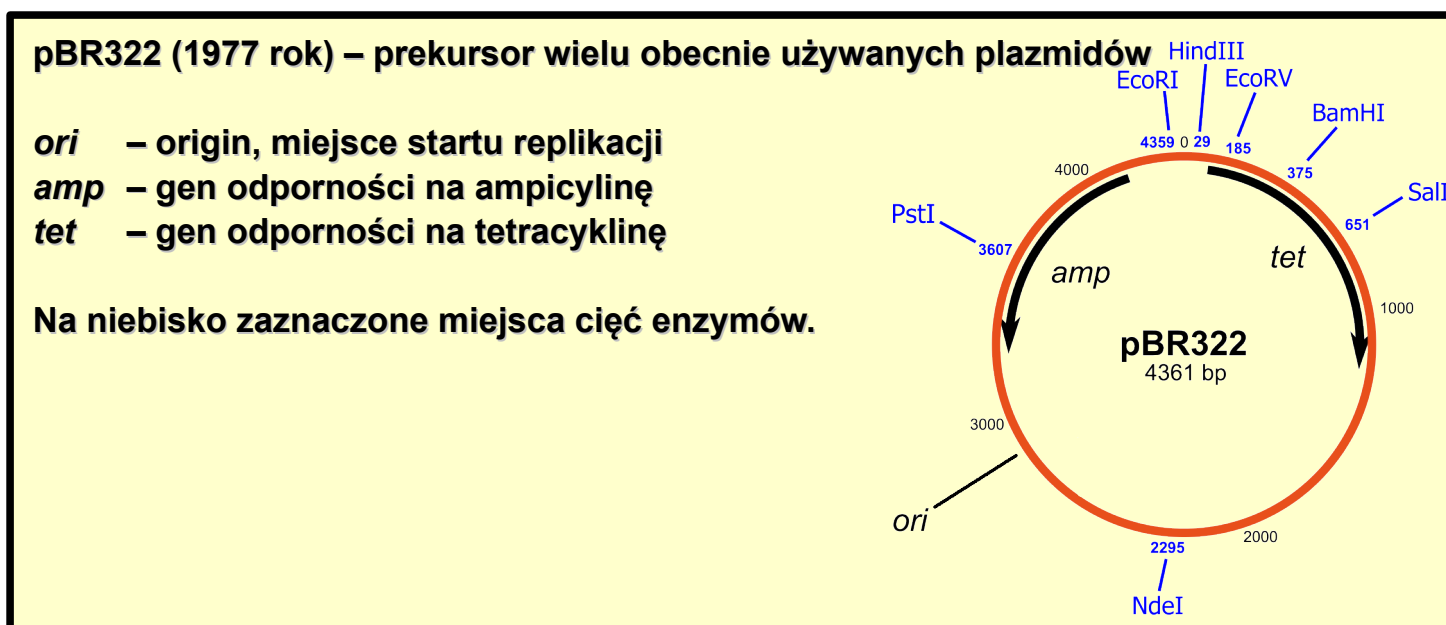
Klonowanie molekularne to procedura służąca do amplifikacji (zwiększania liczby kopii) DNA w organizmie gospodarza, najczęściej bakterii. Wymaga ona włączenia wybranego fragmentu DNA do **wektora**, czyli cząsteczki DNA posiadającej zdolność replikacji w komórce gospodarza (może nim być np. bakteryjny plazmid).



Techniki manipulacji DNA: klonowanie molekularne

Wektorami do klonowania często są **plazmidy**, czyli niewielkie koliste cząsteczki DNA występujące w komórkach bakterii poza głównym genomem.

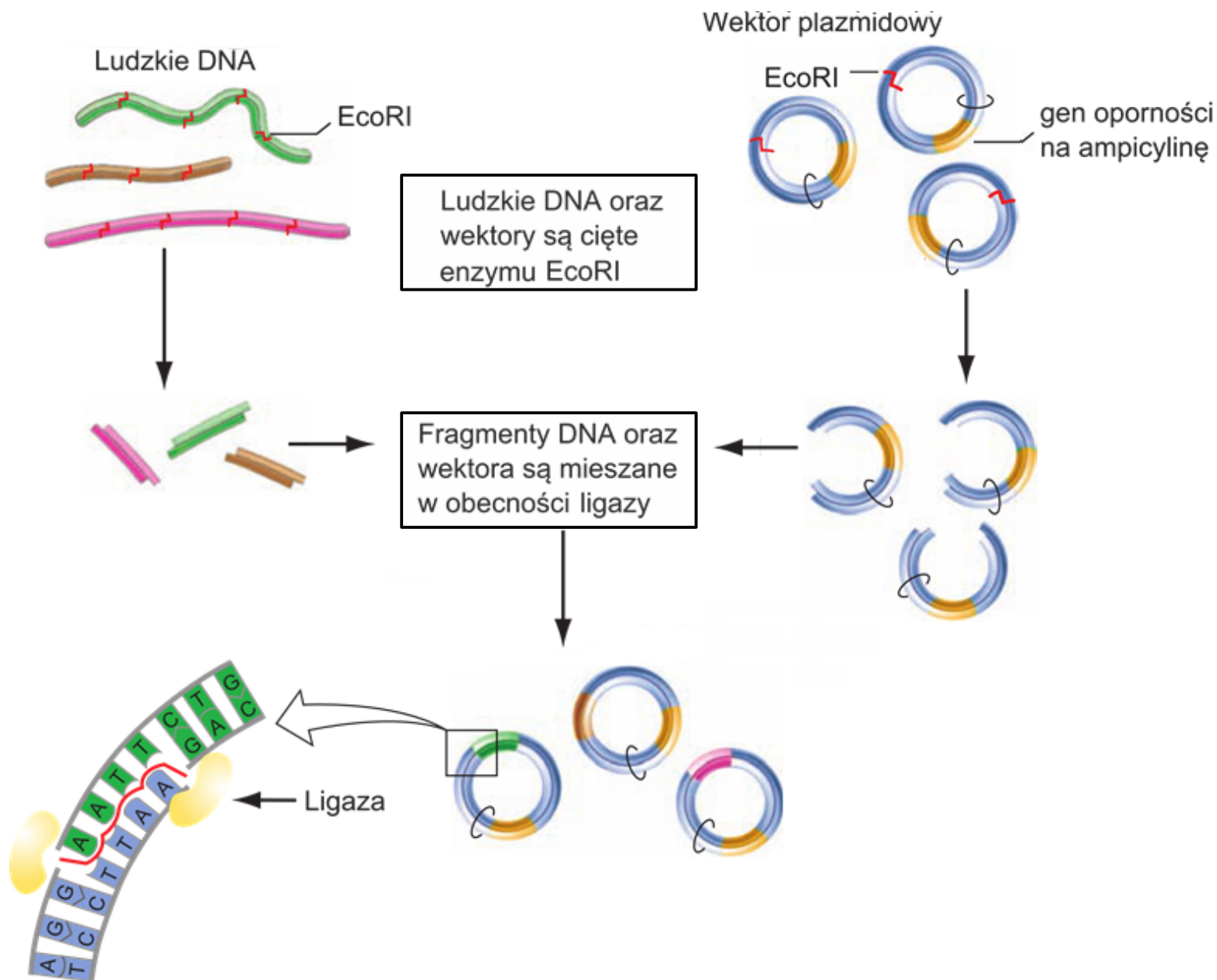
Sekwencje plazmidów są tak projektowane, aby zawierały pojedyncze **miejsca cięcia różnych enzymów restrykcyjnych** oraz **geny selekcyjne**, którymi zwykle są geny odporności na antybiotyki. Plazmidy mogą też umożliwiać ekspresję włączonego fragmentu DNA i produkcję odpowiadającego mu białka (tzw. **wektory ekspresyjne**).



Często stosowane są również wektory innego rodzaju, w tym m. in. **bakteriofagi** oraz **sztuczne chromosomy bakteryjne (BAC)**. Pozwalają one klonować dłuższe cząstki DNA, nawet do 350 kbp (wobec maksymalnie około 15 kpb w przypadku plazmidów).

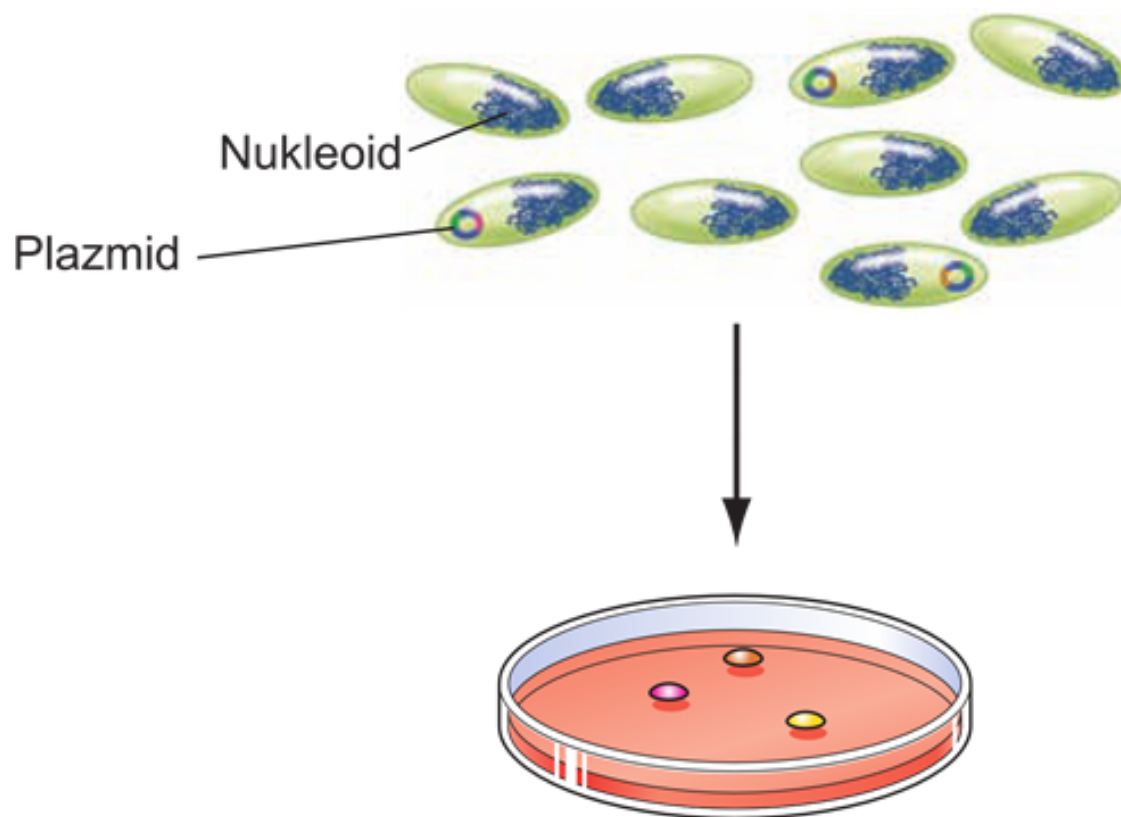
Techniki manipulacji DNA: klonowanie molekularne

W pierwszym etapie klonowania molekularnego stosuje się omawiane już wcześniej enzymy białkowe: endonukleazy restrykcyjne tworzące lepkie końce oraz ligazę.



Techniki manipulacji DNA: klonowanie molekularne

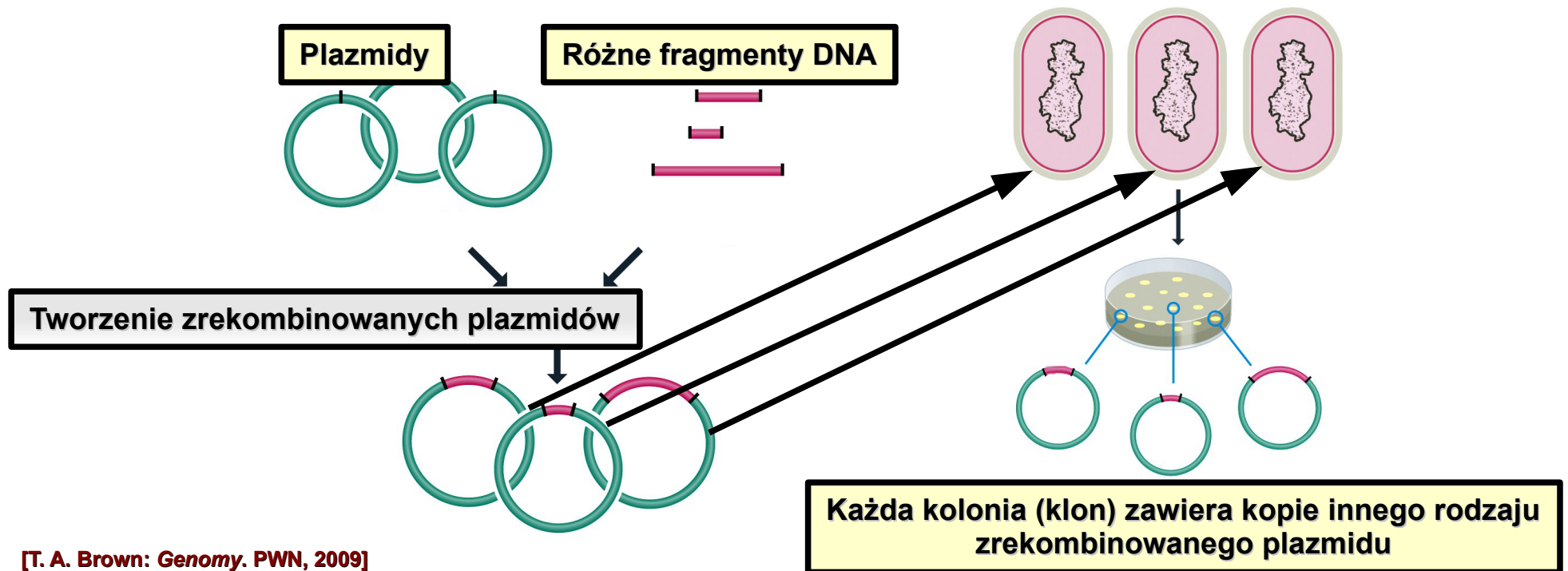
W następnej kolejności zrekombinowane plazmidy są wprowadzane do bakterii przy wykorzystaniu zjawiska **transformacji**, czyli przenikania DNA z otoczenia przez błonę komórkową. Transformacja może być indukowana szokiem termicznym, czynnikami chemicznymi lub elektroporacją błony komórkowej przez impulsy elektryczne.



Ostatecznie bakterie są wysiewane na **podłoże selekcyjne**, zawierające antybiotyki, w którym mogą rosnąć jedynie komórki (**klony**) posiadające plazmid.

Techniki manipulacji DNA: klonowanie molekularne (banki klonów)

Zwielokrotnienie procesu klonowania prowadzi do powstania **biblioteki (banku) klonów**, czyli zbiorów klonów zawierających różne zrekombinowane plazmidy.

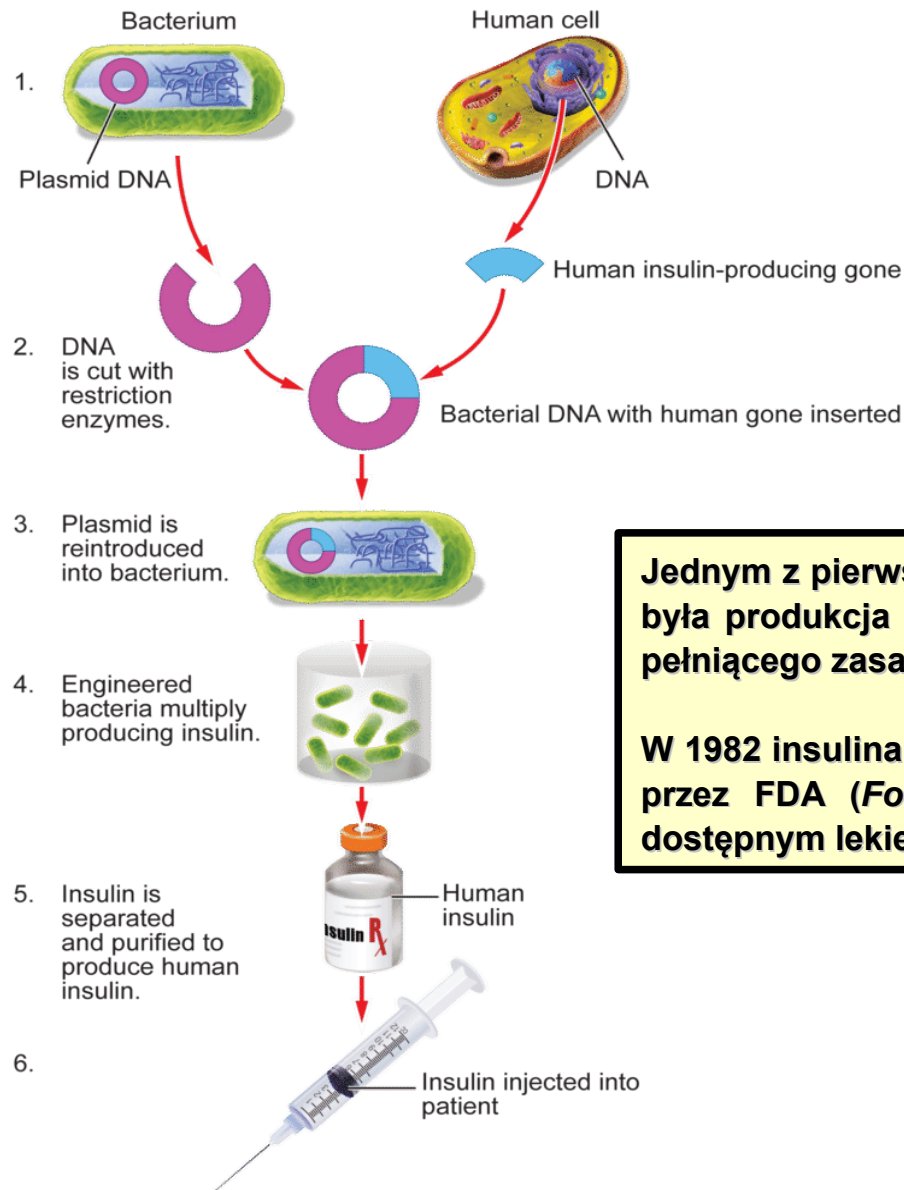


[T. A. Brown: *Genomy*. PWN, 2009]

Tworzenie bibliotek klonów jest standardowym krokiem podczas badania genomów, gdyż są one zbyt duże, aby analizować je w całości. Dlatego też są one dzielone na mniejsze fragmenty, które następnie są poddawane klonowaniu i przechowywane w **bibliotekach genomowego DNA**.

Techniki manipulacji DNA: klonowanie molekularne (produkcja białek)

Pierwotnym zastosowaniem klonowania była amplifikacja, ale możliwa jest również **produkcja białka kodowanego przez DNA umieszczone w wektorze**. Korzysta się przy tym z mechanizmów ekspresji genów w organizmie gospodarza.



Jednym z pierwszych komercyjnych zastosowań inżynierii genetycznej była produkcja w bakteriach ludzkiej insuliny, hormonu peptydowego pełniącego zasadniczą rolę w metabolizmie węglowodanów.

W 1982 insulina firmy Genetech została dopuszczona od użytku w USA przez FDA (*Food and Drug Administration*) stając się pierwszym dostępnym lekiem wyprodukowanym metodami inżynierii genetycznej.

Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR – Polymerase Chain Reaction) jest techniką amplifikacji wybranego fragmentu DNA, której przeprowadzenie wymaga:

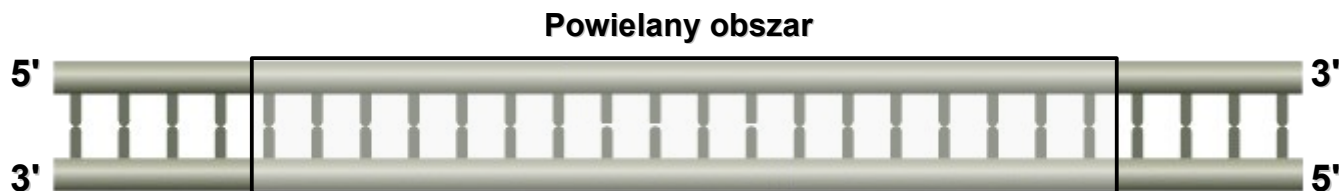
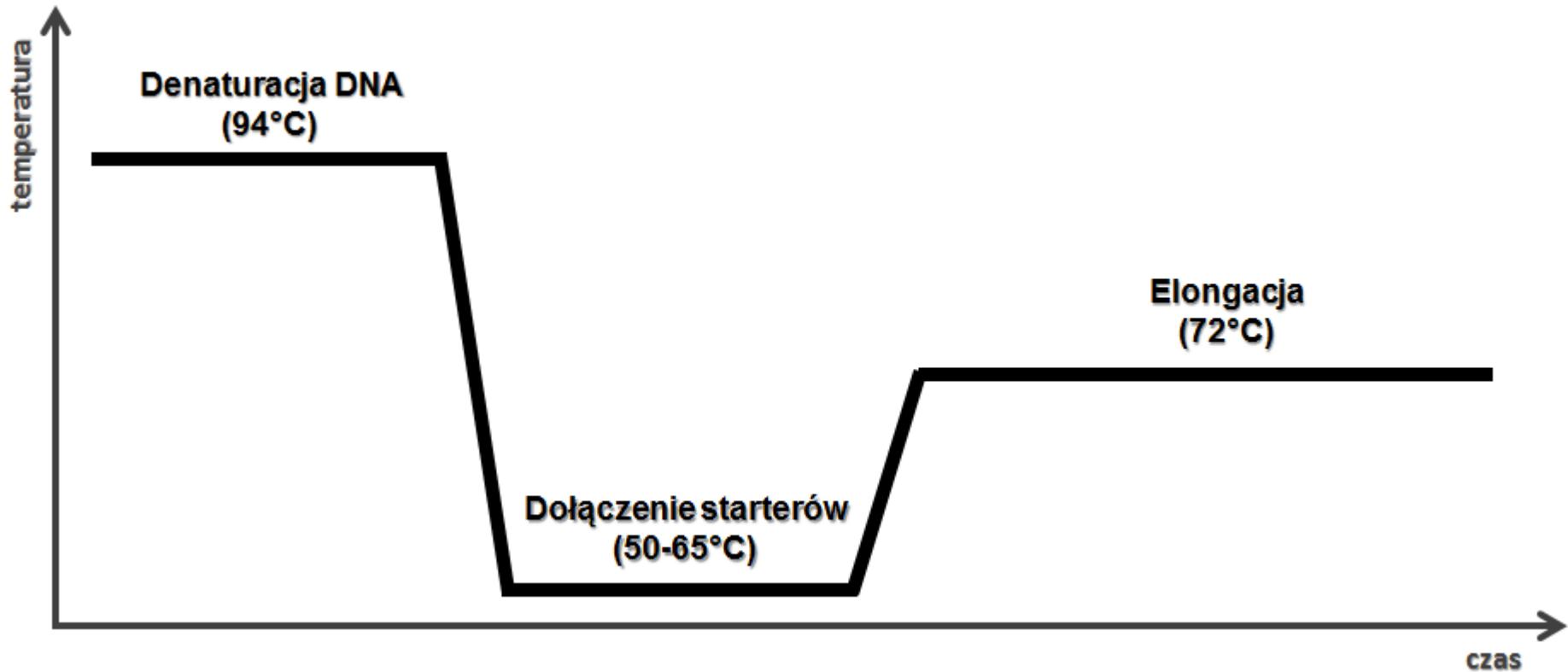
- cząstki DNA, której wybrany fragment będzie matrycą do syntezy nowych kopii;
- termostabilnej polimerazy DNA, np. z bakterii *Thermus aquaticus* (Taq);
- pary **starterów (primerów) oligonukleotydowych**, czyli dwóch krótkich odcinków jednoniciowego DNA o sekwencjach komplementarnych do rejonów otaczających powielany obszar;



- substratów reakcji, czyli czterech rodzajów trifosforanów deoksyrybonukleotydów: **dATP**, **dGTP**, **dCTP**, **dTTP**;
- termocyklera pozwalającego kontrolować i cyklicznie zmienić temperaturę, w jakiej zachodzą poszczególne etapy PCR.

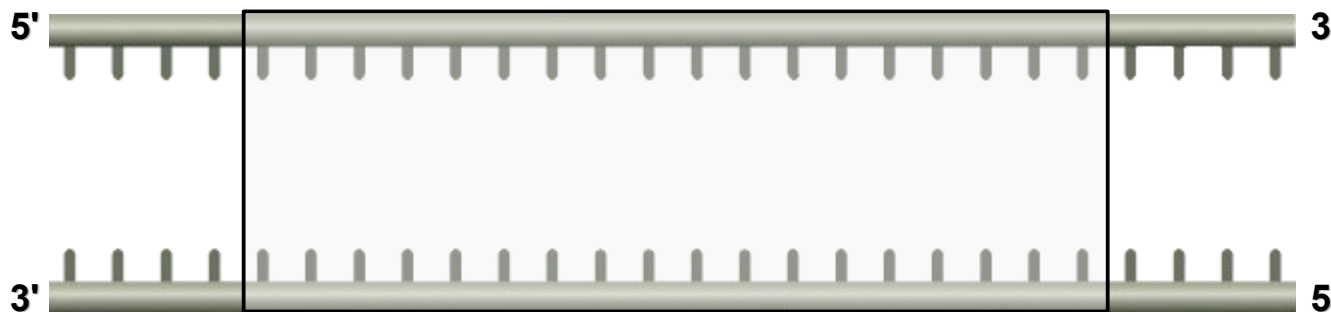
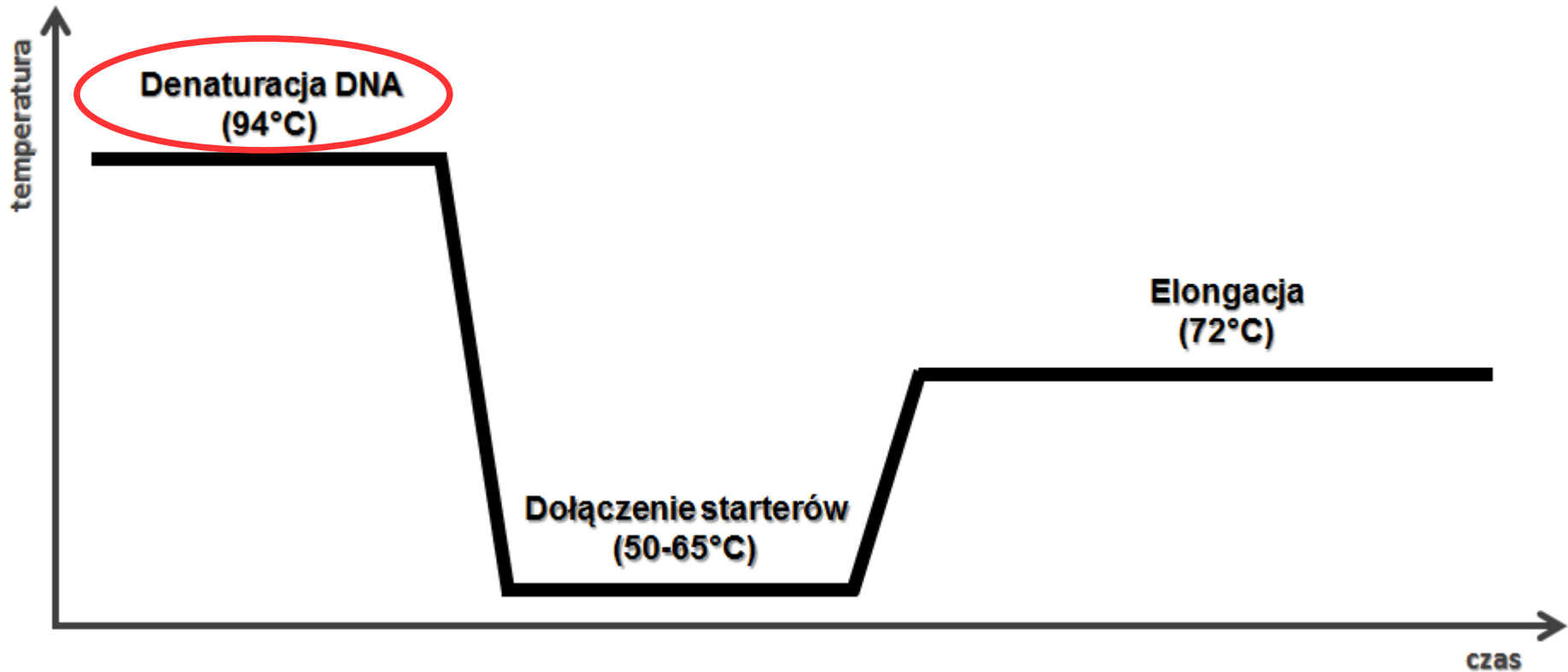
Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

Powielanie następuje w cyklach, składających się z trzech kolejnych faz: **denaturacji DNA** (w temperaturze **94° C**), **dołączenia starterów** (temp. \approx **50° C**) oraz **elongacji**, czyli syntezy nowych nici DNA przez polimerazę (temp. **72° C**).



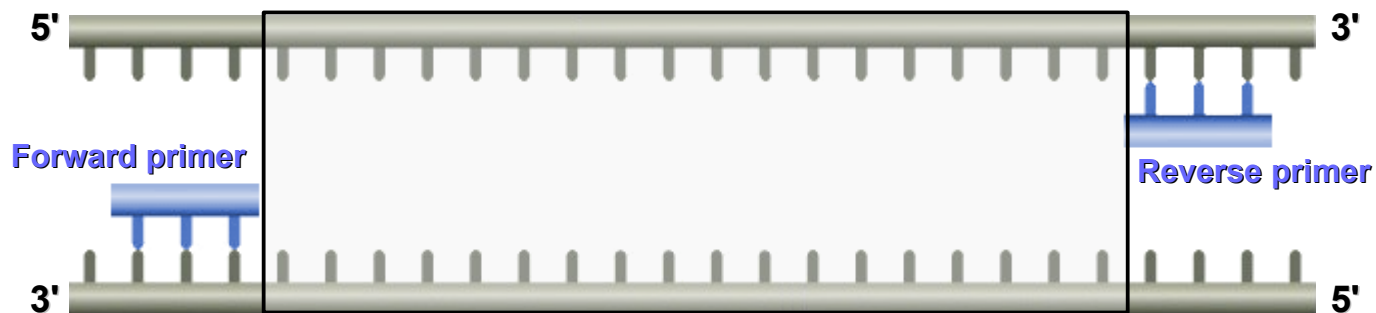
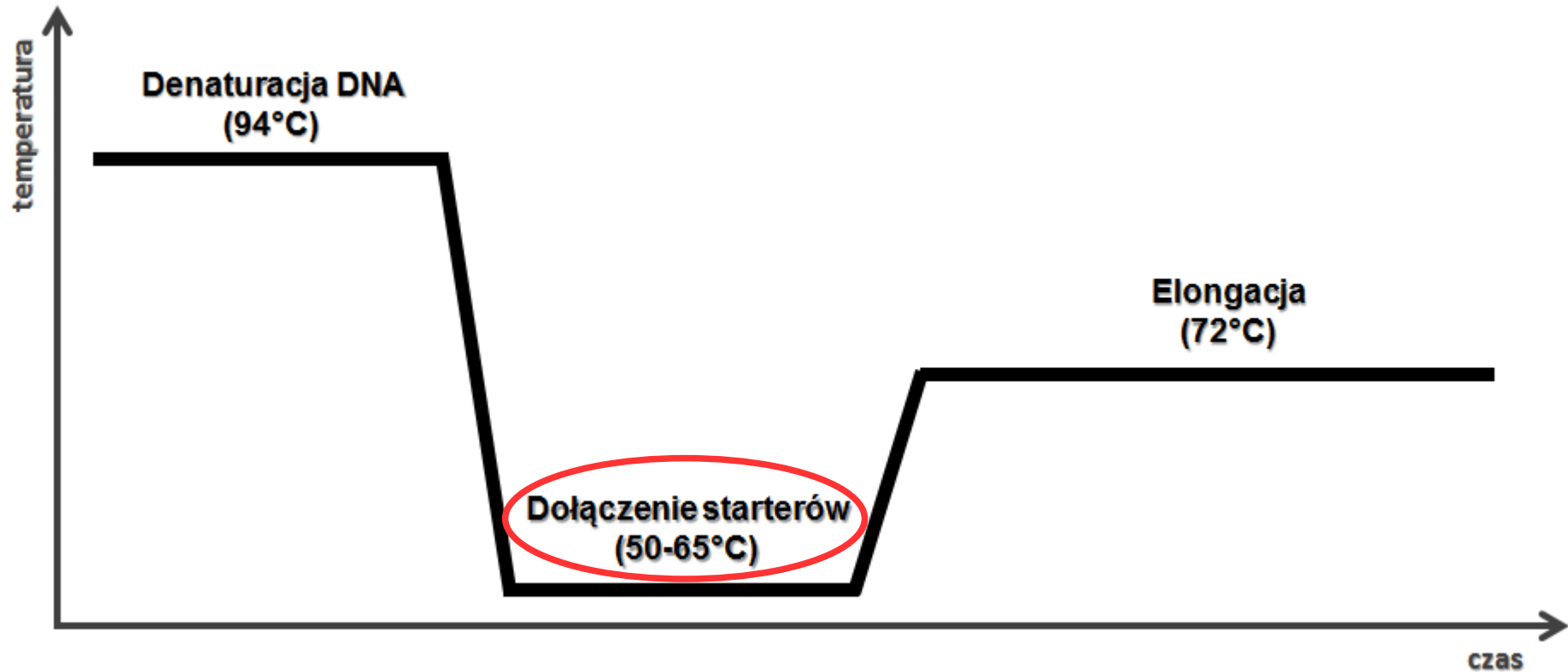
Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

Powielanie następuje w cyklach, składających się z trzech kolejnych faz: **denaturacji DNA** (w temperaturze **94° C**), **dołączenia starterów** (temp. \approx **50° C**) oraz **elongacji**, czyli syntezy nowych nici DNA przez polimerazę (temp. **72° C**).



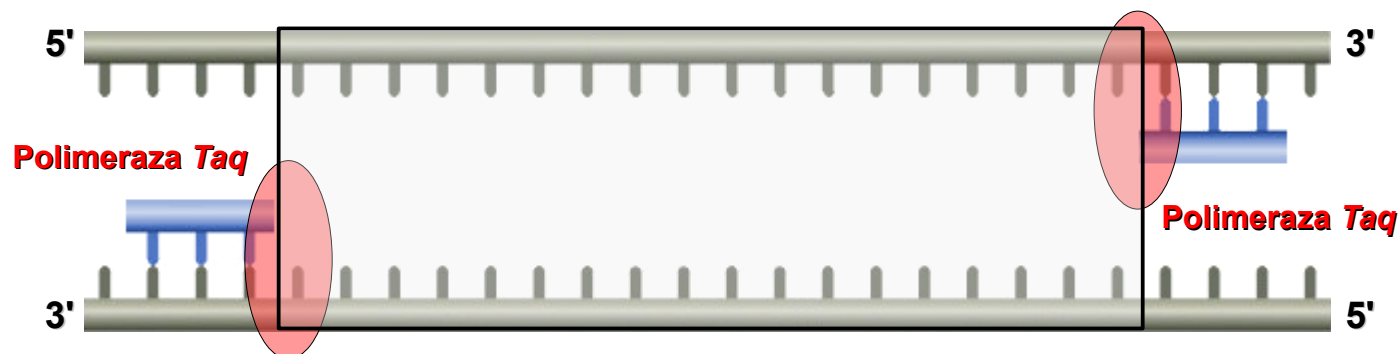
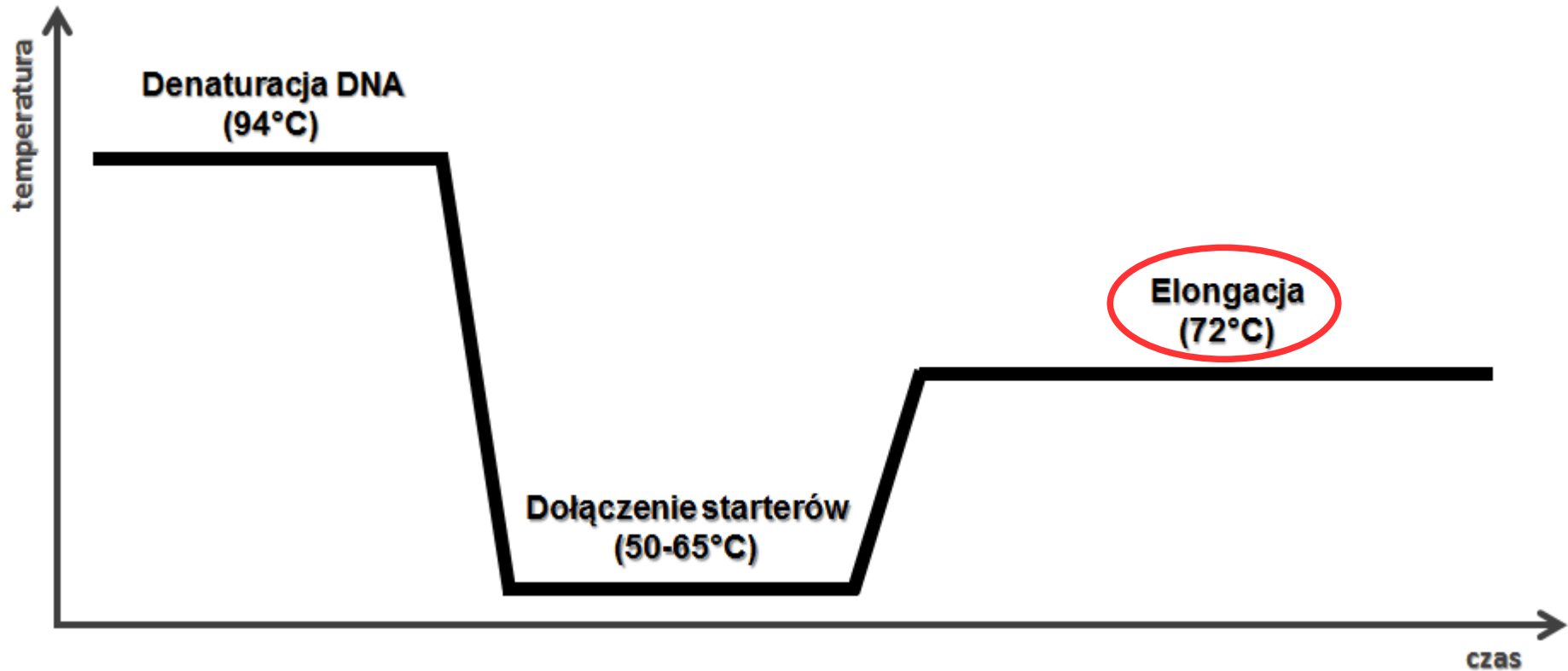
Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

Powielanie następuje w cyklach, składających się z trzech kolejnych faz: **denaturacji DNA** (w temperaturze **94° C**), **dołączenia starterów** (temp. \approx **50° C**) oraz **elongacji**, czyli syntezy nowych nici DNA przez polimerazę (temp. **72° C**).



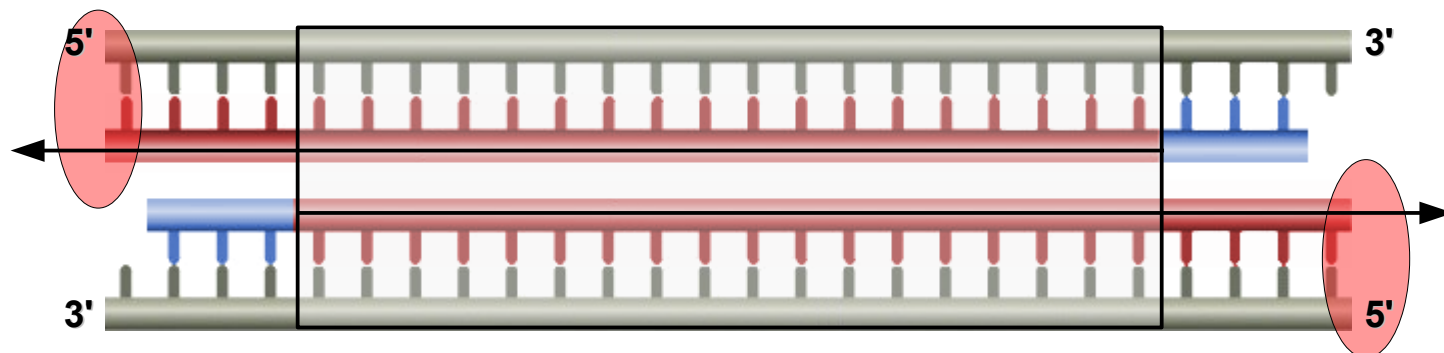
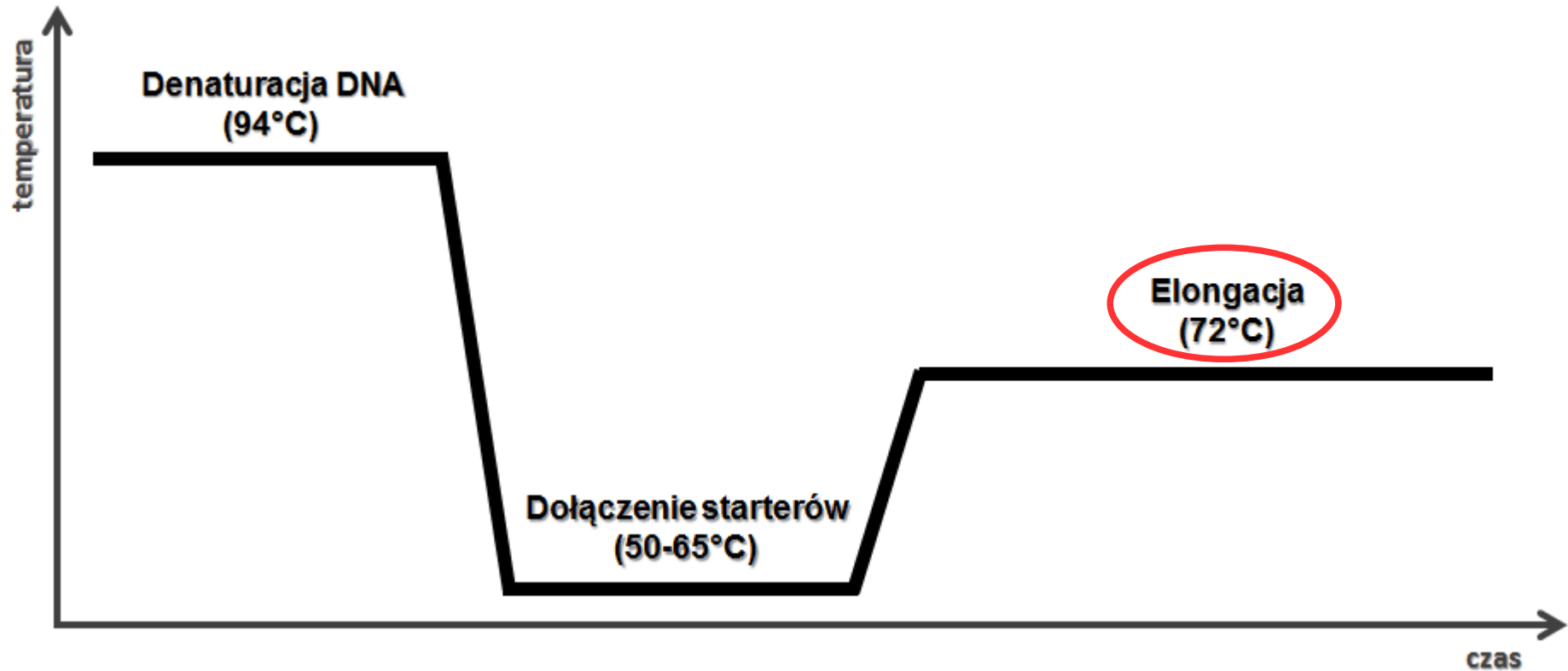
Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

Powielanie następuje w cyklach, składających się z trzech kolejnych faz: **denaturacji DNA** (w temperaturze **94° C**), **dołączenia starterów** (temp. \approx **50° C**) oraz **elongacji**, czyli syntezy nowych nici DNA przez polimerazę (temp. **72° C**).



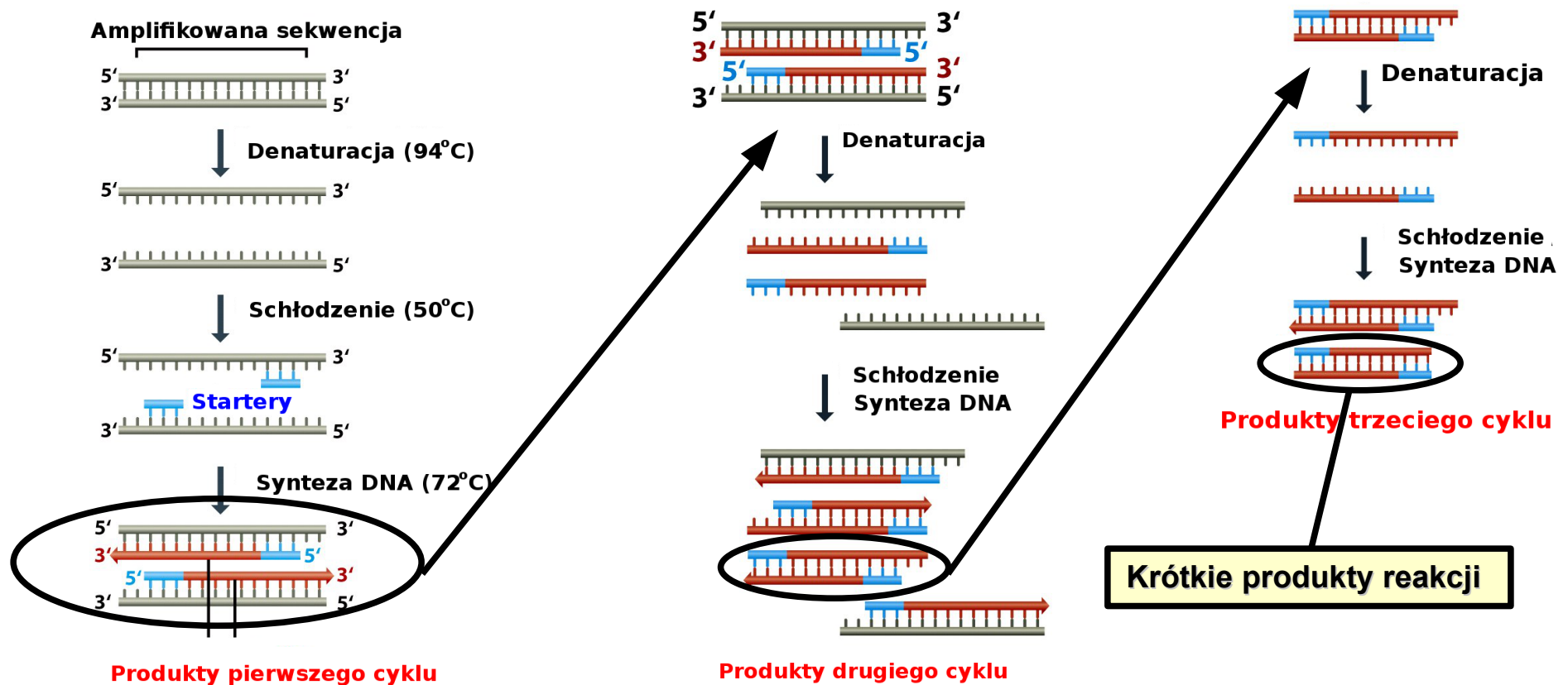
Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

Powielanie następuje w cyklach, składających się z trzech kolejnych faz: **denaturacji DNA** (w temperaturze **94° C**), **dołączenia starterów** (temp. \approx **50° C**) oraz **elongacji**, czyli syntezy nowych nici DNA przez polimerazę (temp. **72° C**).



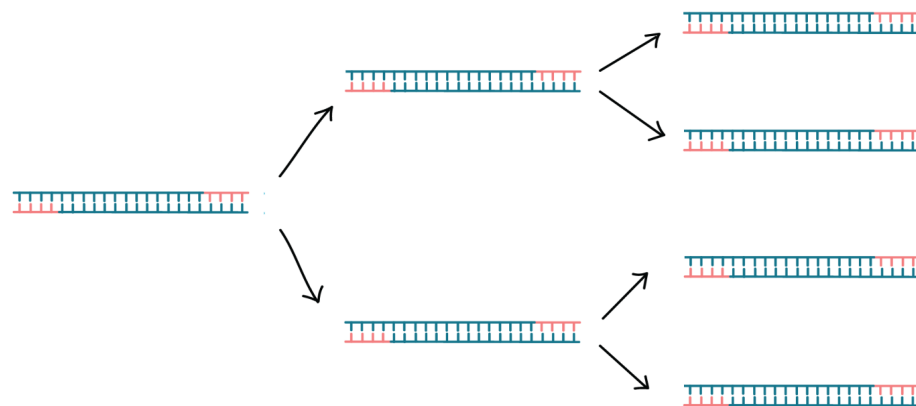
Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

Cykle PCR są powtarzane wielokrotnie. W trzecim cyklu powstają **krótkie produkty reakcji**, czyli dokładne kopie interesującego nas fragmentu DNA wraz ze starterami, które w kolejnych cyklach będą powielane wykładniczo.

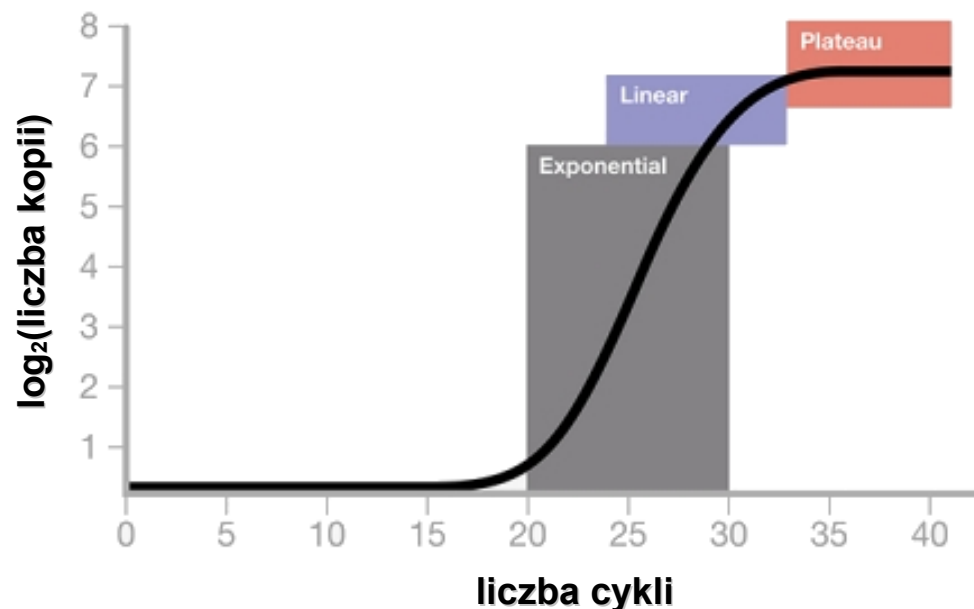


Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

W przypadku krótkich produktów każda z nici jest matrycą do syntezy identycznej cząstki w kolejnym cyklu. Stąd też teoretycznie po N cyklach liczba ich kopii będzie równa 2^N (np. po 30 cyklach otrzymuje się ponad miliard kopii cząsteczki).

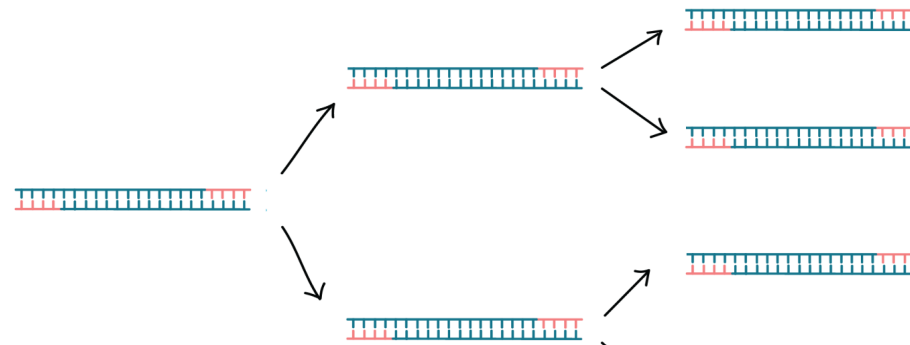


W praktyce, po początkowej **fazie wykładniczej** efektywność powielania spada (**faza liniowa**), aż wreszcie reakcja wygasa z powodu braku substratów (**faza plateau**).

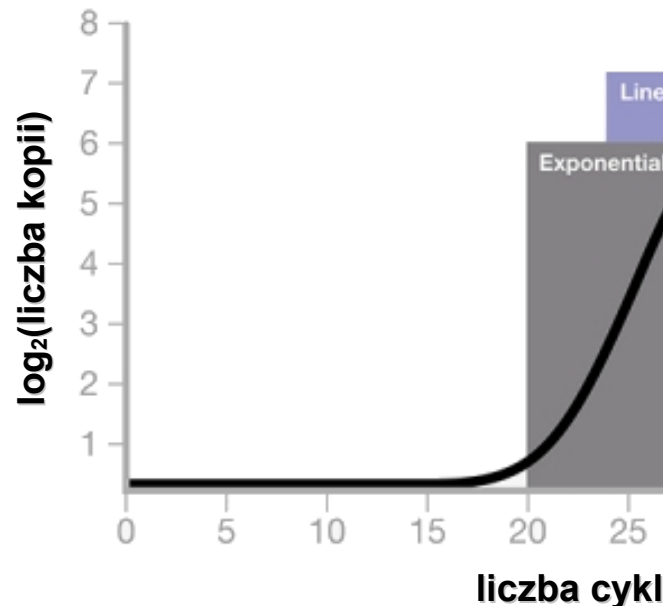


Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

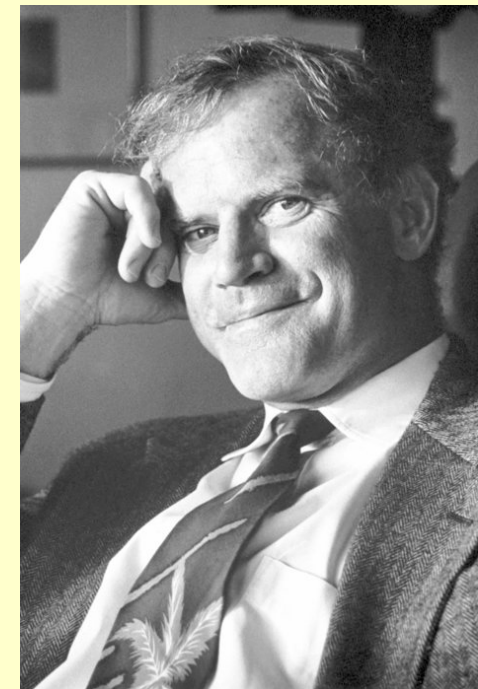
W przypadku krótkich produktów każda z nici jest matrycą do syntezy identycznej cząstki w kolejnym cyklu. Stąd też teoretycznie po N cyklach liczba ich kopii będzie równa 2^N (np. po 30 cyklach otrzymuje się ponad miliard kopii cząsteczki).



W praktyce, po początkowej **fazie wykładniczej** efekt jest **liniowy**), aż wreszcie reakcja wygasa z powodu braku



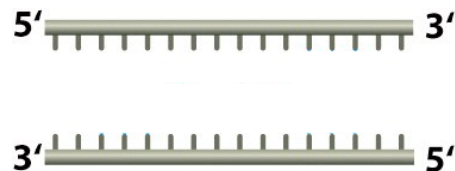
Kary Mullis: nagroda Nobla w dziedzinie chemii za wkład w opracowanie PCR (1993)



Techniki manipulacji DNA: reakcja łańcuchowa polimerazy

Podstawowym celem PCR jest amplifikacja DNA, jednak może być ona również użyta do **detekcji konkretnego rodzaju cząstek DNA**, gdyż wykładnicze powielanie nastąpi tylko gdy obie nici DNA zawierają sekwencje komplementarne wobec pary starterów.

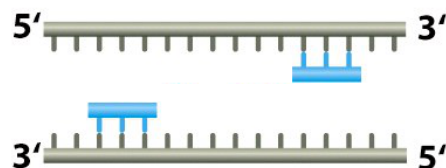
Brak miejsc komplementarnych wobec starterów → brak powielania



Startery komplementarne tylko do pojedynczej nici → brak powielania wykładniczego



Startery komplementarne do obu nici → powielanie wykładnicze



[T. A. Brown: *Genomy*. PWN, 2009]

Ta cecha PCR jest wykorzystywana m. in. w diagnostyce medycznej (do identyfikacji patogenów bakteryjnych lub wirusowych oraz przy badaniu mutacji) i kryminalistyce (do detekcji i identyfikacji DNA w materiale biologicznym z miejsca zbrodni).

Inżynieria genetyczna

Wykład 3: etapy modyfikacji genetycznej organizmu

Tymon Rubel

Zakład Elektroniki Jądrowej i Medycznej
Instytut Radioelektroniki i Techniki Multimedialnych PW

Inżynieria genetyczna: etapy modyfikacji genetycznej organizmu

WYBÓR GENU I DAWCY

(zidentyfikowanie w genomie dawcy genu o pożądanych cechach)

IZOLACJA GENU

(pobranie z genomu dawcy fragmentu DNA zawierającego gen)

UTWORZENIE KONSTRUKTU

(dodanie do genu sekwencji umożliwiających jego ekspresję)

WŁĄCZENIE KONSTRUKTU DO WEKTORA

(połączenie z nośnikiem służącym do wprowadzenia DNA do komórek)

WPROWADZENIE DO KOMÓREK

(włączenie DNA do genomu organizmu docelowego)

WERYFIKACJA

(potwierdzenie aktywności genu i badanie jej skutków)

Przykładowe techniki stosowane do izolacji genów:

- **wycięcie enzymami restrykcyjnymi;**
- **amplifikacja przy użyciu PCR;**
- **pozyskanie z istniejącej biblioteki klonów;**

Wyizolowany fragment DNA poddawany jest klonowaniu w celu zapewnienia odpowiedniej liczby jego kopii.

Inżynieria genetyczna: etapy modyfikacji genetycznej organizmu

WYBÓR GENU I DAWCY

(zidentyfikowanie w genomie dawcy genu o pożądanych cechach)

IZOLACJA GENU

(pobranie z genomu dawcy fragmentu DNA zawierającego gen)

UTWORZENIE KONSTRUKTU

(dodanie do genu sekwencji umożliwiających jego ekspresję)

WŁĄCZENIE KONSTRUKTU DO WEKTORA

(połączenie z nośnikiem służącym do wprowadzenia DNA do komórek)

WPROWADZENIE DO KOMÓREK

(włączenie DNA do genomu organizmu docelowego)

WERYFIKACJA

(potwierdzenie aktywności genu i badanie jej skutków)

Aby gen mógł ulegać ekspresji w organizmie docelowym konieczne jest **dołączenie sekwencji regulatorowych**, w szczególności **promotora** i **obszaru terminującego**.

Do utworzenia **konstrukt** używa się technik rekombinacji DNA: cięcia enzymami restrykcyjnymi i łączenia ligazą.

Inżynieria genetyczna: etapy modyfikacji genetycznej organizmu

WYBÓR GENU I DAWCY

(zidentyfikowanie w genomie dawcy genu o pożądanych cechach)

IZOLACJA GENU

(pobranie z genomu dawcy fragmentu DNA zawierającego gen)

UTWORZENIE KONSTRUKTU

(dodanie do genu sekwencji umożliwiających jego ekspresję)

WŁĄCZENIE KONSTRUKTU DO WEKTORA

(połączenie z nośnikiem służącym do wprowadzenia DNA do komórek)

WPROWADZENIE DO KOMÓREK

(włączenie DNA do genomu organizmu docelowego)

WERYFIKACJA

(potwierdzenie aktywności genu i badanie jej skutków)

Wektor to nośnik pozwalający wprowadzić obce DNA do komórek organizmu docelowego.

Przykładowymi wektorami są:

- **cząsteczki DNA**, podobne do tych używanych podczas klonowania molekularnego (np. plazmidy);
- **wirusy i bakteriofagi** zmodyfikowane tak, aby nie miały cech szkodliwych dla organizmu docelowego;
- inne **cząstki organiczne**, np. liposomy i polimery.

Istnieją również metody wprowadzania DNA do komórek bez wykorzystywania wektorów.

Inżynieria genetyczna: etapy modyfikacji genetycznej organizmu

WYBÓR GENU I DAWCY

(zidentyfikowanie w genomie dawcy genu o pożądanych cechach)

IZOLACJA GENU

(pobranie z genomu dawcy fragmentu DNA zawierającego gen)

UTWORZENIE KONSTRUKTU

(dodanie do genu sekwencji umożliwiających jego ekspresję)

WŁĄCZENIE KONSTRUKTU DO WEKTORA

(połączenie z nośnikiem służącym do wprowadzenia DNA do komórek)

WPROWADZENIE DO KOMÓREK

(włączenie DNA do genomu organizmu docelowego)

WERYFIKACJA

(potwierdzenie aktywności genu i badanie jej skutków)

Wprowadzenie DNA do komórek może wykorzystywać mechanizmy podobne do tych obserwowanych u bakterii podczas horyzontalnego transferu genów:

- **transformacja** – przeniknięcie DNA z otoczenia poprzez błonę komórkową. Najczęściej stosowana w przypadku bakterii, rzadziej dla komórek roślinnych i zwierzęcych (w przypadku tych ostatnich mówi się o **transfekcji**);
- **transdukcja** – wprowadzenie DNA za pośrednictwem wektora wirusowego;
- u roślin możliwe jest użycie bakterii ***Agrobacterium tumefaciens***, która poprzez **koniugację** bezpośrednio przekazuje komórce roślinnej plazmid mający zdolność włączania się do DNA jądrowego.

Innymi metodami wprowadzania DNA są np.:

- **mikrowstrzeliwanie („biolistyka”)** – wstrzeliwanie do komórek mikrokulek ze złota opłaszczonego DNA;
- **mikroiniekcja** – wstrzyknięcie pod mikroskopem DNA do jądra komórkowego;

UWAGA: w przypadku roślin i zwierząt wprowadzenie modyfikacji genetycznej do pojedynczych komórek nie jest wystarczające – konieczne jest jeszcze wyhodowanie z nich całego organizmu.