



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) **KZ** (13) **U** (11) **4583**
(51) *C12N 15/00* (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2019/0689.2

(22) 19.10.2017

(45) 27.12.2019, бюл. №52

(72) Галиакпаров Нурбол Нурпатович; Гриценко Диляра Александровна; Дерябина Нина Дмитриевна

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Институт биологии и биотехнологии растений" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) Holton TA, Graham MW. (1991) A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.*; 19, 1156

(54) **Т-ВЕКТОР ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ПЦР ПРОДУКТОВ РАЗНОГО РАЗМЕРА**

(57) Полезная модель относится к области молекулярной биологии и генной инженерии. Описан Т-вектор (Т- рGEM-3zf(+)) для прямого клонирования ПЦР продуктов разного размера. Разработка Т-вектора основывалась на

модификации плазмиды рGEM 3zf + путем внесения двух рестрикционных Eam1105I сайтов в сайт множественного клонирования. Расщепление по сайтам Eam1105I приводит к образованию на 5'-концах вектора свободных дезокситимидинов необходимых для клонирования ПЦР продуктов, которые содержат на своих 3'-концах свободные дезоксиаденозины добавленные Taq- полимеразой в процессе амплификации. Для оценки эффективности расщепления по Eam1105I сайтам, между данными сайтами была внесена нуклеотидная последовательность, размер которой составил 282 пары нуклеотидов. Данный вектор был апробирован путем клонирования последовательностей разного размера (2500 п.н., 750 п.н., 400 п.н.). Разработанный вектор может быть использован в клонировании амплифицированных продуктов без дополнительных модификаций с высокой эффективностью.

(19) **KZ** (13) **U** (11) **4583**

Полезная модель относится к генной инженерии, молекулярной биологии и может быть использована для клонирования ПЦР продуктов для целей экспрессии генов, создания геномных библиотек, разработки вирусных векторов, секвенирования и так далее.

Уровень техники

В настоящий момент известны следующие векторы-аналоги для прямого клонирования амплифицированных нуклеотидных последовательностей (ПЦР - продуктов):

1. Векторы, созданные путем внесения свободных дезокситимидинов на 3'-концы Т-вектора ферментативным путем (Holton TA, Graham MW. (1991) A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.*; 19, 1156). Векторы, на своих 3'-концах имеют свободные дезокситимидины как и в заявленном векторе и используются для прямого клонирования ПЦР-продуктов со свободными дезоксиаденозинами без дополнительных модификаций. Недостатками данных векторов-аналогов является длительность создания и низкая эффективность клонирования.

2. ТОРО-ТА векторы компании Термофишер саинтифик (ThermoFisher scientific).

Коммерческие векторы содержат на своих 3'-концах свободные дезокситимидины и используется для прямого клонирования ПЦР-продуктов как и заявленный вектор. Недостатком данных векторов-аналогов является высокая стоимость для рутинного клонирования.

Отличие созданного Т-вектора от аналогов заключается в том, что для визуализации эффективности расщепления по рестрикционным сайтам Eam1105I с целью образования свободных дезокситимидинов на 3'-концах вектора, был внесен спейсер размером в 282 п.н.

Сущность полезной модели

Разработанный Т-вектор предназначен для прямого клонирования амплифицированных нуклеотидных последовательностей методом полимеразной цепной реакции. В настоящий момент, клонирование нуклеотидных последовательностей, в том числе генов, является рутинным методом молекулярной биологии и используется в получении рекомбинантных белков, создании геномных библиотек, генной терапии, в создании трансгенных растений и так далее. Клонирование в разработанный вектор осуществляется за счет наличия свободных дезокситимидинов на 3'-концах вектора и свободных дезоксиаденозинов на 3'-концах ПЦР-продуктов. Добавление свободных дезоксиаденозинов осуществляется Таq-полимеразой в процессе ПЦР. Для создания Т-вектора со свободными дезокситимидинами, в сайт множественного клонирования плазмиды pGEM3zf+ было добавлено два рестрикционных сайта Eam 1105I (Jo C., Jo S.A. (2001) A simple method to construct T-vectors using Xcm I cassettes amplified by nonspecific PCR. *Plasmid.*, 45, 37-40; Kovalic D.J., Kwak H, Weisblum B. (1991) General method for direct

cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*,19). Расщепление по данным сайтам приводило к образованию свободных дезокситимидинов на 3'-концах вектора. Для анализа расщепления по сайтам Eam1105I, между данными сайтами была внесена нуклеотидная последовательность размером в 282 п.н. (Lacks S., Greenberg B. (1977) Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J. Mol. Biol.*, 114, 153-168). Прямое клонирование ПЦР-продуктов является удобным способом получения нужных рекомбинантных молекул для дальнейшего анализа амплифицированных продуктов без дополнительных их модификаций и считается рутинным методом в рекомбинантных технологиях.

В настоящей полезной модели ставилась техническая задача создания Т-вектора для прямого клонирования ПЦР-продуктов разного размера.

Поставленная задача была решена путем: разработки Т-вектора (Т- pGEM-3zf(+)) путем внесения двух рестрикционных сайтов Eam1105I в сайт множественного клонирования плазмиды pGEM-3zf(+) и спейсера между данными сайтами для визуализации результатов расщепления; амплификации нуклеотидных последовательностей размерами 2500 пар нуклеотидов, 750 пар нуклеотидов и 500 пар нуклеотидов и клонировании их в Т-вектор.

Техническим результатом полезной модели является клонирование амплифицированных нуклеотидных последовательностей разного размера в Т-вектор. Данный результат может быть достигнут путем: а) разработки Т-вектора; б) амплификации нуклеотидных последовательностей разного размера; в) клонировании амплифицированных последовательностей в Т-вектор.

Апробация созданного вектора путем клонирования амплифицированных нуклеотидных последовательностей размерами в 2500 п.н., 750 п.н и 500 п.н показала пригодность вектора с эффективностью в 50%, 90% и 90% соответственно. Использование данного вектора позволяет уменьшить время, затрачиваемое на эксперимент, а также уменьшить стоимость экспериментов. Данный вектор универсален: его можно использовать для работы с последовательностями ДНК разных размеров.

Перечень фигур чертежей и иных материалов

Рисунок 1. Иллюстрация разработанного вектора Т-pGEM3zf+

Спейсер был внесен между двумя рестрикционными Eam1105I сайтами. Размер спейсера составил 282 п.н.

Фигура 2. Изображение геле-электрофореза расщепления рекомбинантного Т-вектора по сайтам EcoRI и HindIII. А- 1-10 - плазмидная ДНК выделенная из 10 колоний (Т-pGEM-3zf(+)+ 2500 п.н); Б-1-10 - плазмидная ДНК выделенная из 10 колоний (Т- pGEM-3zf(+)+ 750 п.н); В-1-10 - плазмидная ДНК выделенная из 10 колоний (Т-pGEM- 3zf(+)+ 400 п.н). М- маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления полезной модели

Пример 1. Разработка Т-вектора (Т-pGEM-3zf(+))

Для разработки вектора была использована стратегия, включающая внесение Eam1105I рестриционных сайтов в плазмиду pGEM3zf+. После внесения Eam1105I рестриционных сайтов, между ними была внесена нуклеотидная последовательность (спейсер) размером в 282 п.н. с целью проверки качества расщепления по сайтам Eam1105I, фигура 1. При расщеплении Т-вектора по сайтам Eam1105I на его 3-концах остаются свободные дезокситимидины. Использование данной стратегии возможно благодаря Taq-полимеразе, которая добавляет дезоксиаденозины на 3'-концах ПЦР-продуктов. Клонирование амплифицированных продуктов осуществляется в Т-вектор по липким концам, а именно, комплементарное спаривание дезоксиаденозинов (ПЦР продукт) и дезокситимидинов (Т-вектор).

Удаление сайта Eam 1105I из гена, кодирующего Р-лактамазу в плазмиде pGEM 3zf(+).

Ген, реализующий устойчивость к ампициллину, кодирующий β-лактамазу в плазмиде pGEM 3zf(+) содержит рестриционный сайт Eam1105I, как это показано на фигуре 1. Удаление сайта проводилось ПЦР-методом с помощью специфичных праймеров, которые изменяли последовательность Eam 1105I сайта без изменения аминокислотной последовательности β-лактамазы. Амплификация проводилась в 25 мкл реакционной смеси состоящей из 2.5 мкл 10X Pfu Буфера (200 мМ Tris HCl, pH 8.8, 100мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ KCl, 1 мг/мл BSA, 1% Triton X-100), 2.5 мМ MgSO₄, 0.2 мМ дНТФ, 2 мМ каждого праймера (5'-tgcctgggaccccgtagttagataac-3' и 5'-actatggatgaacaaatagacagatc-3'), 2,5 ед. Pfu полимеразы и 30 нг плазмиды pGEM 3zf(+). Амплификацию проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C в течении 2 мин, 25 циклов состоящих из денатурации при 94°C - 20 сек., отжига праймеров при 54°C - 30 сек. и элонгации при 72°C - 4 мин., после 25 циклов инкубация при 72°C - 15 мин.

После амплификации, 2 мкл реакционной смеси наносили в 1% агарозный гель для анализа продуктов амплификации. Оставшуюся реакционную смесь подвергали гидролизу эндонуклеазой DpnI. Эндонуклеаза рестрикции DpnI гидролизует последовательность 5'-GATC-3' только при наличии метилированного основания гуанидина. Отсутствие метилирования в продукте ПЦР, препятствует расщеплению ДНК, но происходит расщепление плазмиды, которая выступала в роли матрицы. Реакцию проводили в 30 мкл реакционной смеси содержащей буфер DpnI, 23 мкл ПЦР продукта, 5 ед. эндонуклеазы DpnI при 37°C в течение 1 часа, с последующей инактивацией фермента при 80°C в течение 20 минут. Интактная ДНК ПЦР продукта очищалась и подвергалась самолигированию в 10 мкл реакционной смеси содержащей 1x Т4 буфера лигазы, 150 нг очищенного ПЦР продукта и 5 ед. Т4 ДНК лигазы. Реакционная смесь, после инкубации при +4С в

течение 14 часов, использовалась для трансформации бактерий. Полученная плазида с удаленным Eam 11051 сайтом в гене β-лактамазы маркирована как m-pGEM 3zf(+).

Внесение рестриционных сайтов Eam 1105I в область множественного клонирования плазмиды m-pGEM 3zf(+).

Два праймера, 5'-tcgaccgaccttgagtctctagagacctaacgtcag-3' и 5'-gatcctgacgttaggtctctagagactcaagtcgg-3', по 2мМ каждого, в присутствии 75 мМ Tris HCl, pH 8.8, 20мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 2,5 мМ MgCl₂, в общем объеме 25 мкл нагревались до 94°C в течение 2 минут, далее медленно остужались до 20°C. Полученная двухцепочечная ДНК имела на обоих 5'-концах по четыре не спаренных нуклеотида, соответствующих остаткам после расщепления ферментами BamHI и SalI. Двухцепочечная часть ДНК содержит два сайта Eam1105I и один рестриционный сайт XbaI, между ними. 5 мкл из смеси было взято для лигирования с плазмидой m-pGEM3zf(+), расщепленной по сайтам BamHI и SalI и последующей трансформации бактерий E.coli штамма DH5. Полученные клоны были проверены на наличие вставленной последовательности рестрицией по сайтам BamHI и SalI и секвенированием. Плазида m-pGEM 3zf(+), содержащая рестриционные сайты Eam1105I, была названа Т-3zf(+).

Для эффективной рестрикции ферментом Eam1105I и лучшей визуализации на агарозном геле результата расщепления, по рестриционному сайту XbaI, между сайтами Eam1105I, внесен фрагмент ДНК (спейсер) размером в 282 пар нуклеотидов. Клонирование проводили в 10 мкл лигазной смеси содержащей 1x буфер Т4 ДНК лигазы (Thermo Scientific), 60 нг спейсера, 80 нг дефосфорилированного Т-3zf(+), расщепленного по XbaI сайту и 5 ед. Т4 ДНК лигазы. Реакционная смесь инкубировалась при +4°C в течение 16 часов с последующей трансформацией бактерий E.coli штамма DH5. Анализ на наличие спейсера проводился рестрицией по сайтам Eam1105I. Вектор Т-3zf(+) со спейсером между сайтами Eam1105I назван Т-pGEM3zf+ (Т-вектор).

Пример 2. Клонирование ПЦР продуктов разного размера в Т- вектор Клонирование ПЦР продуктов разного размера в Т- вектор реализуется поэтапно:

1- этап: амплификация целевой нуклеотидной последовательности с использованием Taq-полимеразы и при соблюдении соответствующего режима полимеразной цепной реакции. Подготовка ПЦР продуктов для клонирования. Подготовка включает очистку ПЦР продукта нужного размера.

Выбранные нуклеотидные последовательности для амплификации и прямого клонирования в Т-вектор являлись фрагментами генома вируса А винограда. 2500 п.н (участок 2-50PC), 750 п.н (OPC4), 400 п.н (OPC5) были амплифицированы с помощью специфичных праймеров. Прямой праймер -5'-aTaTagacgtcgtactcagcaag-3' и обратный праймер -5'-ctcatcgtctgaggtttcta-3' для последовательности размером 2500 п.н. Прямой

праймер -5'-gaagacatatggcacactacgccaag-3' и обратный праймер -5'-aaacgtggatccaccgagagaacg-3' для последовательности размером 750 п.н. Прямой праймер -5'-actgtgatacaggctatgca-3' и обратный праймер -5'-ctcatcgtctgaggtttcta-3' для последовательности размером 400 п.н. Амплификацию данных последовательностей проводили в 25 мкл содержащих буфер полимеразы (20 mM Tris HCl, pH 8.8, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 1 мг/мл BSA, 0,1% Triton X-100), 2.5 mM MgSO₄, 0.2 mM дНТФ, 2 mM каждого специфичного праймера, 2,5 ед. Taq-полимеразы и 40 нг матрицы.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C в течение 2 мин, 30 циклов, состоящих из денатурации, отжига праймеров и элонгации финальная инкубация при 72°C - 15 мин. Денатурация проводилась при 94°C - 20 сек., отжиг праймеров - в течение 30 сек. при 50°C, 56°C и 47°C для 2500 п.н., 750 п.н. и 400 п.н., соответственно, и элонгация - при 72°C - от 30 до 90 секунд, в зависимости от размера продукта.

2- этап: расщепление Т-вектора эндонуклеазой Eam1105I. Проверка качества расщепления вектора методом гель-электрофореза в агарозном геле. Очистка расщепленного Т-вектора. Расщепленный Т-вектор Eam1105I эндонуклеазой был очищен из агарозного геля методом сорбции на силики при наличии гуанидина тиоционата.

3- этап: клонирование очищенного ПЦР продукта в расщепленный по Eam1105I сайтам Т-вектор.

Очистка амплифицированных последовательностей осуществлялась из агарозного геля с помощью кита GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Лигирование продуктов ПЦР в Т-вектор проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1x буфер Т4-ДНК лигазы, 300 нг очищенного ПЦР продукта, 100 нг вектора, порезанного по сайтам Eam1105I, 5 ед. Т4-ДНК лигазы. Реакционная смесь инкубировалась при +4°C в 16 часов с последующей трансформацией клеток E.coli штамм DH5α.

Пример 3. Анализ эффективности клонирования ПЦР-продуктов разного размера в Т-вектор

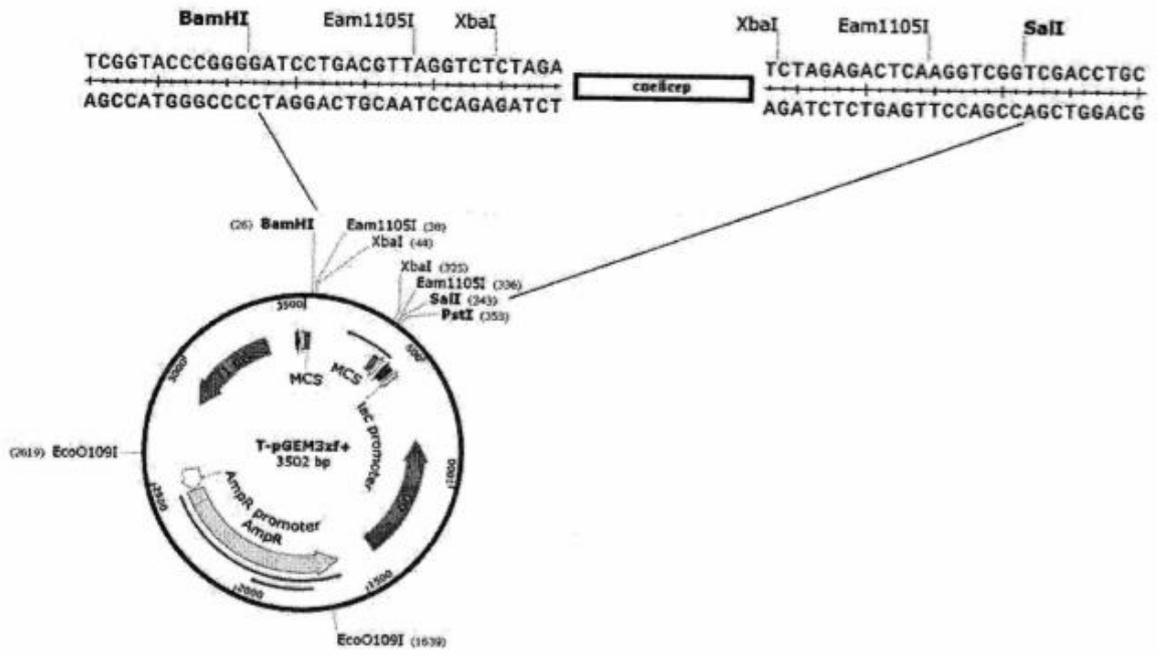
Эффективность клонирования определялась по количеству клонов со вставкой из общего количества выделенных плазмид. Для каждого размера ПЦР продукта, выделялись плазмиды из 10 рандомизированно отобранных колоний трансформированных бактерий. Наличие вставки проверялось рестрикцией ферментами EcoRI и HindIII и последующим разделением в агарозном геле (фигура 2). Из фигуры 2 видно наличие вставки размером 2500 пар нуклеотидов в пяти клонах из 10. Для ПЦР продуктов размером 400 и 750 пар нуклеотидов соотношение позитивных клонов к негативным составило 9 к 1, что видно на фигуре 1 в блоках Б и В.

Таким образом эффективность клонирования для 2500 нуклеотидов составила 50% а для 750 и 400 п.н - 90%.

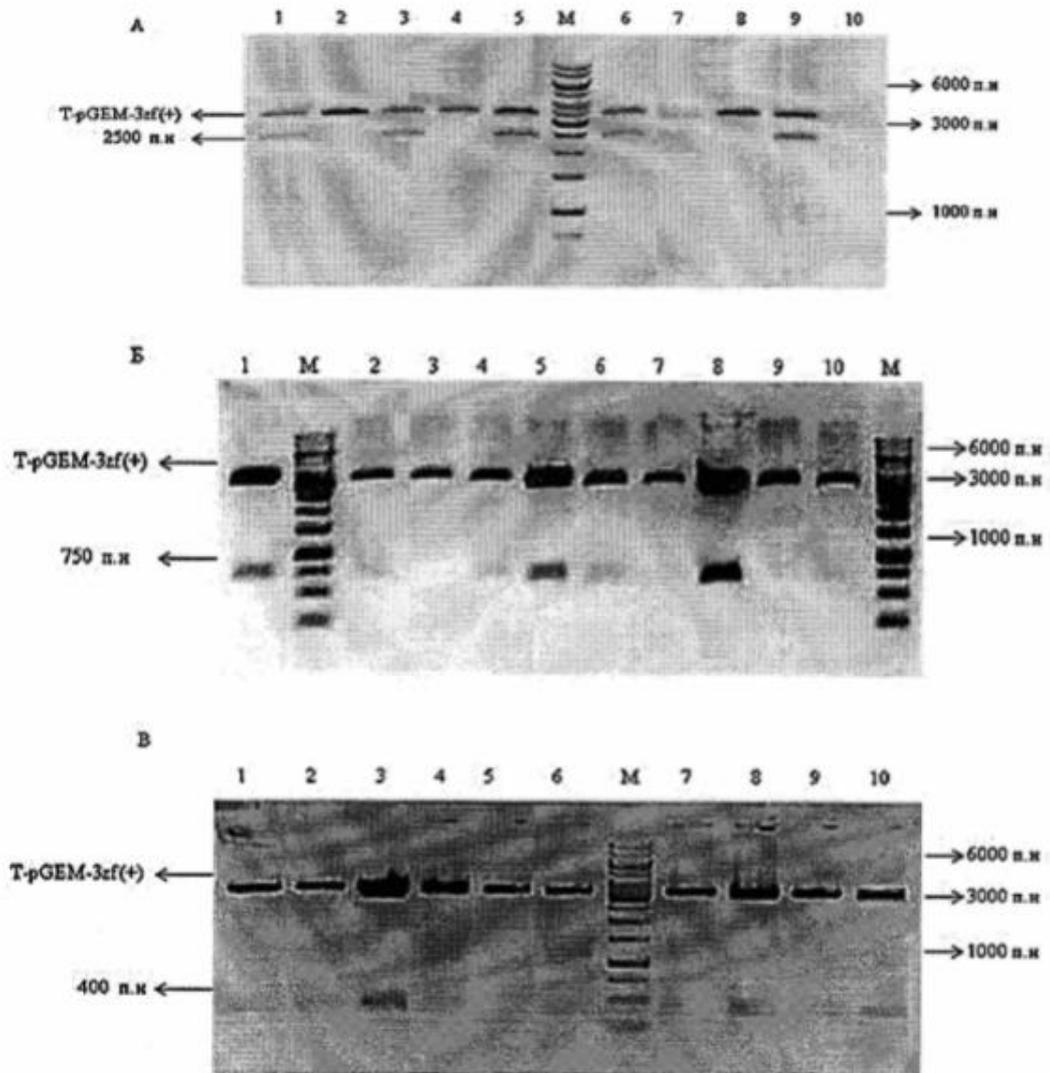
Полученный вектор со вставкой ПЦР продукта без дополнительных модификаций могут быть использованы для синтеза РНК с помощью T7 или SP6 РНК полимераз для использования в *in vitro* трансляции или в качестве РНК проб, например для норзерн блота. Клонирование различных фрагментов в Т- вектор позволяет быстро отбирать нужные амплифицированные рекомбинантные продукты и использовать их в дальнейших целях без дополнительных модификаций.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Т-вектор со свободными дезокситимидинами на 3-х концах для прямого клонирования ПЦР продуктов разного размера, полученных при амплификации с помощью ДНК-полимеразы и имеющих свободные дезоксиаденозины, *отличающийся* тем, что свободные дезокситимидины в векторе образуются благодаря расщеплению по двум рестрикционным Eam1105I сайтам, внесенных в сайт множественного клонирования плазмиды pGEM3zf+.



Фиг. 1



Фиг. 2