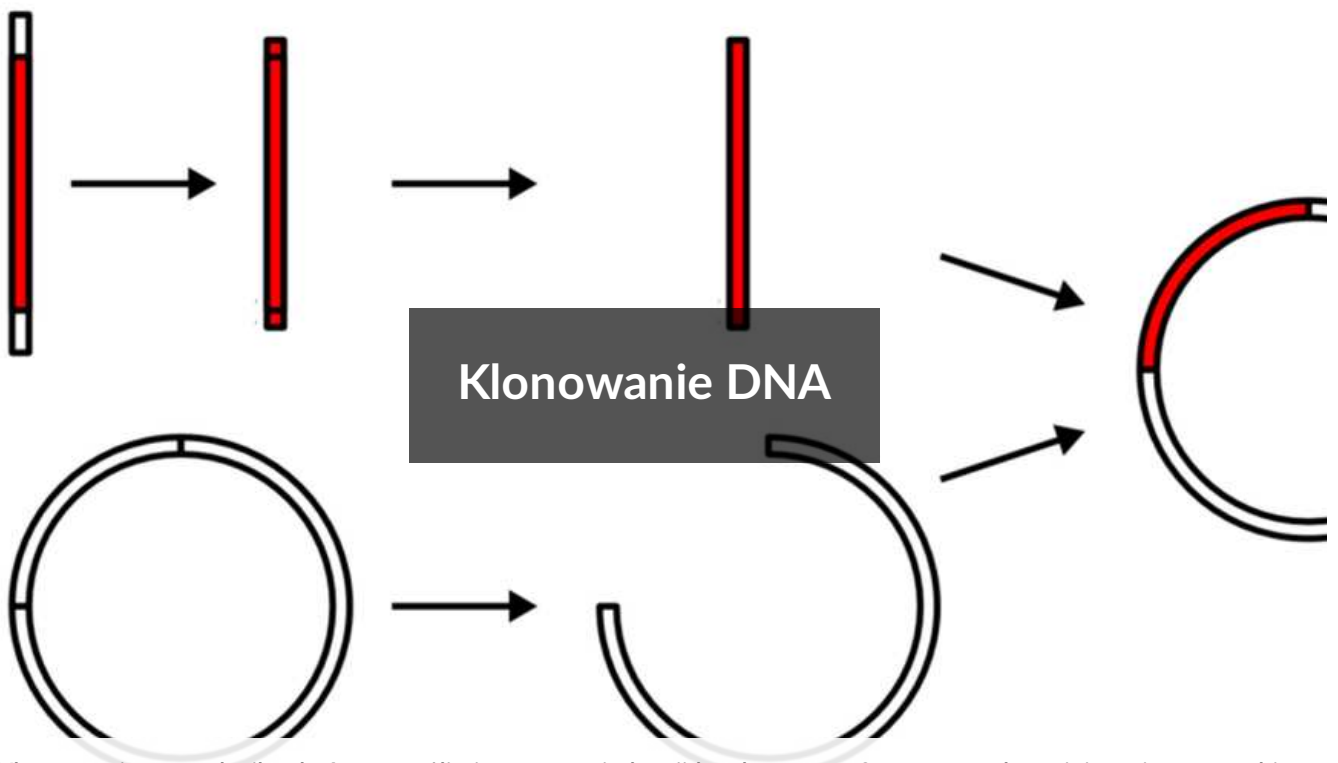




Klonowanie DNA

- [Wprowadzenie](#)
- [Przeczytaj](#)
- [Animacja](#)
- [Sprawdź się](#)
- [Dla nauczyciela](#)



Klonowanie to technika, która umożliwia tworzenie kopii konkretnego fragmentu dwuniciowej cząsteczki DNA.

Źródło: Takometer, Wikimedia Commons, licencja: CC BY 2.5.

Transformacja genetyczna komórki, czyli wprowadzenie do niej nowego genu, jest możliwa po wcześniejszym powieleniu genu na drodze **klonowania DNA**.

Twoje cele

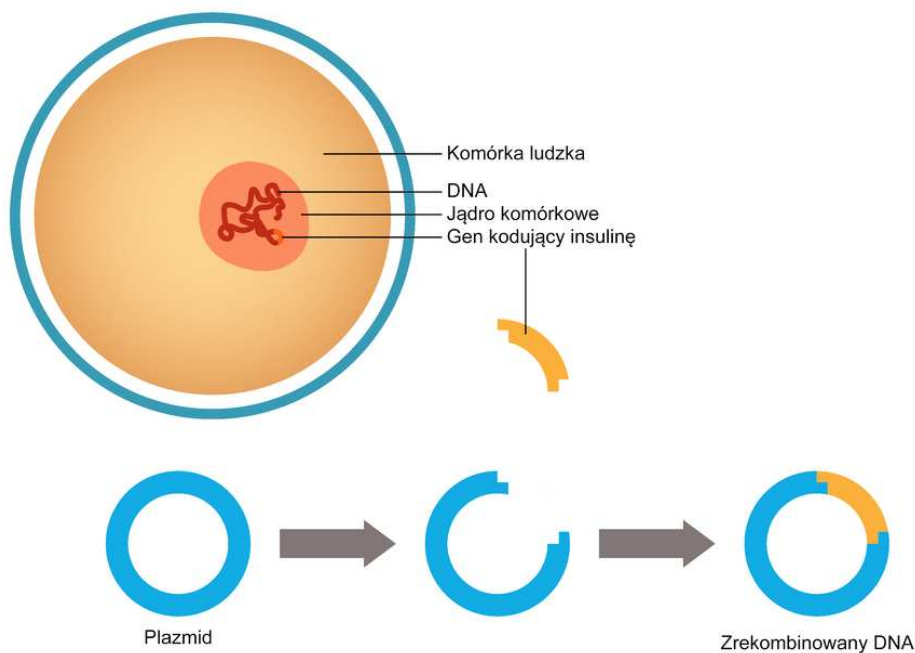
- Określisz cel klonowania DNA.
- Przedstawisz istotę techniki klonowania DNA.
- Wskażesz znaczenie procesu klonowania DNA.

Przeczytaj

Klonowanie DNA

Klonowanie DNA to proces polegający na namnożeniu (powieleniu) kopii danego fragmentu DNA w komórkach biorcy (gospodarza), zwykle bakterii *Escherichia coli*, przy zastosowaniu specjalnego nośnika DNA – **wektora genetycznego**.

Wektor połączony z docelowym fragmentem DNA (najczęściej zawierający konkretny gen lub geny) tworzy [cząsteczkę zrekombinowanego DNA](#).



Schemat powstawania wektora plazmidowego.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Do przeprowadzenia klonowania DNA niezbędne są:

- docelowy fragment DNA zawierający gen, który ma zostać powielony (sklonowany) do komórki;
- wektor genetyczny – służący jako nośnik fragmentu DNA przeznaczonego do sklonowania;
- enzymy restrykcyjne – służące do wycięcia wybranego fragmentu DNA z genomu organizmu, z którego zostanie pobrany, oraz przecięcia wektora, np. plazmidu; enzymy te rozpoznają swoiste sekwencje w dwuniciowej cząsteczce DNA, nazywane miejscami restrykcyjnymi, i przecinają DNA w danym miejscu;
- ligaza – enzym umożliwiający połączenie wyciętego fragmentu DNA z DNA wektora;
- [gen reporterowy](#) – znacznik pokazujący, czy procedura się powiodła.

Główne klasy enzymów restrykcyjnych

Enzymy restrykcyjne ze względu na: typ rozpoznawanych sekwencji, sposób rozcinań DNA oraz strukturę enzymu dzieli się na trzy klasy. W klonowaniu DNA stosuje się głównie **enzymy klasy II**, ponieważ rozcinają cząsteczkę DNA dokładnie w rozpoznawanym miejscu – w przeciwieństwie do enzymów I i III klasy, które rozcinają DNA w innych miejscach niż rozpoznawana sekwencja, co prowadzi do powstania losowego zbioru fragmentów.

Więcej informacji na temat enzymów restrykcyjnych znajdziesz w e-materiale [Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej](#).

Gen reporterowy

Gen reporterowy to dobrze poznany gen, którego produkty (RNA lub białko) mogą być mierzone dokładnie i w prosty sposób. Monitorując zmiany w poziomie produktu tego genu, można łatwo obserwować zmiany w jego ekspresji.

Najczęściej stosowanymi genami reporterowymi są geny kodujące: beta-galaktozydazę (beta-gal) oraz beta-glukuronidazę (**GUS**) z bakterii *Escherichia coli*, lucyferazę (Luc) ze świetlika *Photinus pyralis*, białko zielonej fluorescencji (**GFP**) z meduzy *Aequorea victoria* oraz acetylotransferazę chloramfenikolu (CAT) z występującego w *E. coli* transpozonu Tn9.

- **Beta-gal** katalizuje hydrolizę beta-galaktozydów, natomiast **GUS** hydrolizuje glukuronidy. W wyniku hydrolizy substratów stosowanych w oznaczaniu beta-gal i GUS powstają produkty, które mogą być mierzone ilościowo za pomocą spektrofotometru.
- **Lucyferaza** jest enzymem utleniającym lucyferynę, w wyniku czego powstaje fluorescencyjny produkt, którego ilość można oznaczyć przez rejestrację uwolnionego światła.
- **GFP** to naturalnie fluoryzujące białko, które może być wykrywane bezpośrednio w żywych komórkach.
- Enzym **CAT** katalizuje acetylację chloramfenikolu, w której donorem grupy acetylowej jest acetylo-CoA. Acetylowany chloramfenikol można mierzyć m.in. za pomocą chromatografii cienkowarstwowej lub testu immunoenzymatycznego.

Genem reporterowym może być również gen oporności bakterii na określony antybiotyk. Na podłożu z antybiotykiem wyrosną jedynie te bakterie, które pobrały wektor. Gen reporterowy może też powodować pojawienie się jakiejś cechy, np. barwy na skutek wytworzenia barwnika.

Jak duży gen można wprowadzić do wektora?

O wielkości wprowadzonego DNA decyduje **pojemność wektora**.

Pojemność wektora zależy od jego rodzaju. Do klonowania DNA wykorzystuje się wektory genetyczne zdolne do przeniesienia materiału genetycznego z komórki dawcy do komórki biorcy. Różne rodzaje wektorów służą do klonowania odcinków DNA o różnej wielkości. Wektory dzieli się na:

- **prokariotyczne**, do których należą wektory plazmidowe, kosmidy, wektory fagowe i sztuczny chromosom bakteryjny;
- **eukariotyczne**, do których należą pochodne wirusów, wektory drożdżowe, sztuczny chromosom ludzki i plazmid Ti.

Więcej informacji o wektorach znajdziesz w e-materiale [Wektory genetyczne](#).



Etapy klonowania DNA

Uproszczony schemat klonowania DNA.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Ostatnim etapem klonowania DNA jest **selekcja**, czyli wyodrębnienie bakterii, które przyjęły zrekombinowany plazmid wraz z genem reporterowym zapewniającym oporność na antybiotyk, od tych, które go nie mają. Po przeprowadzonej transformacji bakterie posiewa się na płytce z podłożem selekcyjnym z antybiotykiem. Bakterie bez plazmidu zginą; te zaś, które zyskały dzięki nowym genom antybiotykooporność, będą rosnąć na pożywkach odżywczych z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku, tworząc małe **kolonie**. Każda z nich będzie zawierać taki sam zrekombinowany plazmid z klonowanym fragmentem DNA.

Aby się upewnić, że uzyskane kolonie mają plazmid o prawidłowej strukturze, sprawdzane są pod kątem obecności zrekombinowanego genu. W tym celu wykorzystuje się [reakcję PCR](#) przeprowadzaną na wyizolowanych plazmidach z kilku kolonii lub trawienie za pomocą odpowiednich enzymów restrykcyjnych. O obecności klonowanego DNA świadczy uzyskanie fragmentów DNA o określonej długości.

Więcej informacji o reakcji PCR znajdziesz w e-materiale [Łańcuchowa reakcja polimerazy](#).

Zastosowanie klonowania molekularnego

Techniki klonowania molekularnego są powszechnie stosowane w badaniach DNA, genów, ich funkcji oraz ekspresji. Dzięki nim możliwe stały się **identyfikacja oraz**

izolacja genów, które są odpowiedzialne za występowanie różnych chorób. Stanowi to podłoże do zastosowania terapii genowej. Co więcej, sama terapia genowa wykorzystuje techniki klonowania DNA poprzez dostarczenie funkcjonalnych fragmentów DNA do komórek pacjentów.

Klonowanie DNA pozwala także na **uzyskanie organizmów transgenicznych** do produkcji ludzkich białek, np. bakterii produkujących ludzkie hormony wzrostu czy insulinę. Wykorzystywane jest również w produkcji szczepionek, które uzyskuje się poprzez **tworzenie odpowiednich białek.**

Ponadto klonowanie umożliwia tworzenie bibliotek genomowych i bibliotek cDNA. Więcej informacji na ten temat znajdziesz w e-materiale [Biblioteki genomowe i cDNA](#).

Słownik

Amp

gen oporności na ampicylinę

gen reporterowy

gen, którego aktywność można łatwo badać, wykorzystując np. metody histochemiczne lub fluorymetryczne; służący w biologii molekularnej do oceny poziomu ekspresji kontrolowanego przez badaną sekwencję regulatorową (np. promotor) w różnych tkankach, stadiach rozwoju lub w odpowiedzi na różne czynniki

GFP

(ang. *green fluorescence protein* – białko zielonej fluorescencji) białko, które pochodzi z meduzy *Aequoria victoria*; emituje zielone światło w wyniku wzbudzenia światłem niebieskim lub UV

MCS

(ang. *multiple cloning site* – **miejsce wielokrotnego klonowania**) polilinker, odcinek DNA wektora genetycznego, w którym znajdują się liczne

sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne

ori

(ang. *origin* – początek) miejsce inicjacji replikacji

para zasad, pz

jednostka długości podwójnej nici DNA lub RNA; „para” oznacza dwie komplementarne zasady na dwóch niciach

PCR

(ang. *polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy) metoda powielania łańcuchów DNA polegająca na łańcuchowej reakcji polimerazy DNA w wyniku wielokrotnego podgrzewania i oziębiania próbki w warunkach laboratoryjnych

plazmid

kolista cząsteczka DNA oddzielona od chromosomu i replikująca się niezależnie od niego

sekwencja nukleotydowa

kolejność ułożenia czterech rodzajów nukleotydów w cząsteczce DNA lub RNA

zrekombinowana cząsteczka DNA

cząsteczka DNA, która została wytworzona *in vitro* z fragmentów DNA pochodzących z różnych źródeł, np. po ligacji (połączeniu) sekwencji restrykcyjnych DNA szczura z plazmidami *E. coli*

zrekombinowany plazmid

plazmid, do którego został wprowadzony obcy fragment DNA

Wystąpił błąd

Klonowanie DNA

Film dostępny pod adresem </preview/resource/RsiuRGxNzfHGp>

Klonowanie DNA.

Źródło: reż. Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Film pod tytułem: Klonowanie DNA.

Polecenie 1

Polecenie 2

Sprawdź się

Pokaż ćwiczenia:   

Ćwiczenie 1



Ćwiczenie 2



Ćwiczenie 3



Ćwiczenie 4



Ćwiczenie 5



Ćwiczenie 6



Ćwiczenie 7



Ćwiczenie 8



Dla nauczyciela

Autor: Anna Juwan

Przedmiot: biologia

Temat: Klonowanie DNA

Grupa docelowa: uczniowie III etapu edukacyjnego – kształcenie w zakresie rozszerzonym

Podstawa programowa:

Zakres rozszerzony

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

XV. Biotechnologia. Podstawy inżynierii genetycznej. Uczeń:

4) przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej (hybrydyzacja DNA, analiza restrykcyjna i elektroforeza DNA, metoda PCR, sekwencjonowanie DNA);

Kształtowane kompetencje kluczowe:

- kompetencje cyfrowe;
- kompetencje osobiste, społeczne i w zakresie umiejętności uczenia się;
- kompetencje matematyczne oraz kompetencje w zakresie nauk przyrodniczych, technologii i inżynierii.

Cele operacyjne (językiem ucznia):

- Określisz cel klonowania DNA.
- Przedstawisz istotę techniki klonowania DNA.
- Wskażesz znaczenie procesu klonowania DNA.

Strategie nauczania:

- konstruktywizm;
- konektywizm.

Metody i techniki nauczania:

- z użyciem komputera;
- ćwiczenia interaktywne;
- ćwiczenia laboratoryjne.

Formy pracy:

- praca indywidualna;
- praca w parach;
- praca w grupach;
- praca całego zespołu klasowego.

Środki dydaktyczne:

- komputery z głośnikami, słuchawkami i dostępem do internetu;
- zasoby multimedialne zawarte w e-materiale;
- tablica interaktywna/tablica, pisak/kreda;
- telefony z dostępem do internetu.

Przed lekcją:

1. Uczniowie zapoznają się z treścią w sekcji „Przeczytaj”.

Przebieg lekcji

Faza wstępna:

1. Nauczyciel wyświetla zawartość sekcji „Wprowadzenie”. Uczniowie wspólnie z nauczycielem omawiają cele lekcji i określają kryteria sukcesu.
2. **Wprowadzenie do tematu.** Nauczyciel prosi, by uczniowie w parach opracowali mapy myśli związane z tematem. Wybrane pary przedstawiają swoje propozycje, ochotnik zapisuje je na tablicy. Pozostali uczniowie odnoszą się do odnotowanych sugestii, uzupełniając je o swoje pomysły.

Faza realizacyjna:

1. **Praca z multimedium („Animacja”).** Uczniowie zapoznają się z animacją, a następnie rozwiązują indywidualnie polecenie nr 1 („Na podstawie animacji scharakteryzuj wektor plazmidowy”) oraz polecenie nr 2 („Zaproponuj, jak sprawdzić, czy klonowanie DNA zakończyło się pomyślnie”). Swoje odpowiedzi porównują z osobą z pary. Wybrani uczniowie przedstawiają rozwiązania na forum klasy.
2. **Praca z treścią e-materiału.** Uczniowie dzielą się na zespoły i na podstawie przeczytanego tekstu oraz informacji zawartych w animacji układają pytania quizowe dla innych grup. Nauczyciel wraz z uczniami określa zasady rywalizacji i punktowania dobrych odpowiedzi (np. gra na czas lub na liczbę poprawnych odpowiedzi). Przeprowadzenie gry w klasie. Nauczyciel lub wybrany uczeń dba o prawidłowy przebieg quizu zgodnie z wcześniejszymi ustaleniami. Nauczyciel ogłasza zwycięską drużynę.
3. **Utrwalenie wiedzy i umiejętności.** Uczniowie samodzielnie wykonują ćwiczenie nr 7 („Wyjaśnij, dlaczego organizmem powszechnie wykorzystywanym jako biorca materiału

genetycznego jest bakteria *Escherichia coli*") z sekcji „Sprawdź się”. Następnie w 4-osobowych grupach omawiają prawidłowe rozwiązanie. Po upływie wyznaczonego czasu wskazany przez nauczyciela przedstawiciel grupy prezentuje odpowiedź wraz z jej uzasadnieniem. Klasa ustosunkowuje się do niej. Nauczyciel udziela uczniom informacji zwrotnej.

4. Uczniowie w parach wykonują ćwiczenie nr 8 („Uzasadnij, że bakteriofagi mogą być wektorami przenoszącymi DNA pomiędzy komórkami bakterii”) z sekcji „Sprawdź się”. Następnie porównują swoje odpowiedzi z najbliższymi siedzącymi sąsiadami. Nauczyciel w razie trudności naprowadza podopiecznych na właściwe rozwiązania lub wyjaśnia wątpliwości.

Faza podsumowująca:

1. Nauczyciel prosi uczniów o rozwinięcie zdań: „Dziś nauczyłem/nauczyłam się...”, „Zrozumiałem/zrozumiałam, że...”, „Zaskoczyło mnie...”, „Dowiedziałem/dowiedziałam się...”.
2. Nauczyciel wyświetla temat lekcji i cele zawarte w sekcji „Wprowadzenie”, podsumowuje omawiany na lekcji materiał, wyjaśnia wątpliwości uczniów.

Praca domowa:

1. Wykonaj ćwiczenia od 1 do 6 z sekcji „Sprawdź się”.

Materiały pomocnicze:

- Jane B. Reece i in., „Biologia Campbella”, tłum. K. Stobrawa i in., Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2021.
- „Encyklopedia szkolna. Biologia”, red. Marta Stęplewska, Robert Mitoraj, Wydawnictwo Zielona Sowa, Kraków 2006.

Wskazówki metodyczne opisujące różne zastosowania animacji:

Nauczyciel może wykorzystać animację do pracy przed lekcją. Uczniowie zapoznają się z jej treścią i przygotowują do pracy na zajęciach w ten sposób, żeby móc samodzielnie rozwiązać zadania.