



## Biblioteki genomowe i cDNA

- Wprowadzenie
- Przeczytaj
- Audiobook
- Sprawdź się
- Dla nauczyciela

### Bibliografia:

---

- Źródło: *Insulina* - Karolina Podsiadły, tekst dostępny online: <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/insulina>.



## Biblioteki genomowe i cDNA

Ogólnoświatowe banki genów gromadzą dane o milionach genów. Część tych organizacji kolekcjonuje tylko geny wybranych grup organizmów, niektóre przechowują informacje także o genomach ludzkich. Japoński bank DNA specjalizuje się w gromadzeniu materiału genetycznego roślin i zwierząt.

Źródło: unsplash.com, domena publiczna.

W biotechnologii powielone geny są cennym materiałem do badań nad ich strukturą, funkcjami i ekspresją. W pracach nad genomem danego gatunku najpierw tworzy się jego bibliotekę genomową – zbiór wektorów, z którymi połączone są fragmenty całego genomu organizmu. Rozszerzeniem bibliotek genomowych są biblioteki cDNA (komplementarne DNA) powstające jako połączenie wektorów z mRNA przepisany na DNA. Są one szczególnie ważne w porównywaniu ekspresji genów między organizmami oraz tkankami w danym organizmie. Biblioteki genomowe i cDNA znacznie ułatwiają pracę w dziedzinie genetyki molekularnej.

### Twoje cele

- Scharakteryzujesz cechy bibliotek genomowych i cDNA.
- Porównasz biblioteki genomowe i cDNA.
- Przedstawisz cele tworzenia bibliotek genomowych.
- Omówisz zasady tworzenia bibliotek genomowych i cDNA.

# Przeczytaj

---

W bibliotekach genowych, nazywanych też bankami genowymi, przechowywane są zestawy sklonowanych fragmentów DNA składających się na kompletny genom danego organizmu lub pełny zestaw produktów [transkrypcji](#). Banki genowe dzieli się na:

- **biblioteki genomowe** obejmujące zbiór fragmentów genomu organizmu powstały w wyniku klonowania DNA chromosomalnego i DNA organelarnego w [wektorach genetycznych](#),
- **biblioteki cDNA** zawierające fragmenty cDNA, czyli fragmenty DNA powstające po przepisaniu informacji ze wszystkich wyizolowanych cząsteczek mRNA ([transkryptomy](#)) na DNA przy pomocy enzymu o nazwie odwrotna transkryptaza.

Bank genów jest miejscem do poszukiwania i izolacji genu. Istnieją także komercyjne banki genowe specjalizujące się w przechowywaniu DNA ludzkiego.

## Tworzenie bibliotek genomowych

Tworzenie biblioteki genomowej rozpoczyna izolacja DNA genomowego (gDNA) danego organizmu. Wyizolowane gDNA zostaje poddane trawieniu restrykcyjnemu za pomocą [enzymów restrykcyjnych](#). Wolne końce uzyskanych w ten sposób fragmentów DNA łączone są z wektorem genetycznym – enzymem ligazą DNA. Następnie stworzone wektory wprowadzane są do komórek bakteryjnych lub drożdżowych. Komórki te, dzieląc się, powielają wprowadzony do nich fragment DNA. Bardzo ważne jest, aby dany wektor zawierał wyłącznie jeden fragment DNA genomowego – jednak ze względu na losowość cięcia enzymami restrykcyjnymi fragmenty DNA w różnych komórkach mogą się na siebie nakładać.

Wybór wektora genetycznego użytego do konstrukcji biblioteki genomowej zależy od wielkości genomu. Jest to spowodowane ograniczoną pojemnością wektorów. Przy tworzeniu biblioteki dla organizmu o dużym genomie niezbędne jest użycie wektora o dużej pojemności, dzięki czemu cały genom będzie zawarty w mniejszej liczbie klonów. Pojemność wektora zapisuje się zazwyczaj w [kbp](#), czyli tysiącach par zasad.

Rodzaj wektora	Pojemność wektora (kbp)
<a href="#">Plazmidy</a>	do 10
<a href="#">Fag lambda</a>	do 25
<a href="#">Kosmidy</a>	do 45
Bakteriofag P1	od 70 do 100
Sztuczny chromosom P1	od 130 do 150
<a href="#">Sztuczny chromosom bakteryjny</a>	od 120 do 300
<a href="#">Sztuczny chromosom drożdżowy</a>	od 250 do 2000

Schemat tworzenia biblioteki genomowej DNA człowieka w komórkach bakteryjnych. Na podstawie:

<http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Tkocz04>.

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

## Biblioteka genomowa

Biblioteka genomowa, która obejmuje cały materiał genetyczny danego gatunku, nosi nazwę [reprezentatywnej](#). Jest to zbiór zrekombinowanych wektorów zawierających fragmenty całego genomu organizmu. Wektory te, wyposażone w wydzielone geny, są doskonałym materiałem do klonowania DNA. Wystarczy wprowadzić zrekombinowany



wektor do komórki (w komórkach bakteryjnych metodą [transformacji](#), w eukariotycznych – [transfekcji](#)), a włączony do niego fragment DNA zostanie powielony (plazmidy są zdolne do samoreplikacji). Powstaną wówczas liczne kopie genu, czyli jego klony.

Na świecie działa ponad 1700 różnych banków genów, w których przechowywanych jest około 7,5 miliona obiektów.

Źródło: <https://pixabay.com>, domena publiczna.

Stworzenie biblioteki genomowej jest o wiele łatwiejsze, jeżeli organizm ma mały genom. Po trawieniu restrykcyjnym można bowiem rozdzielić jego fragmenty za pomocą elektroforezy DNA. Pozwala to na klonowanie każdego z fragmentów pojedynczo. Bardzo ważny jest również dobór wektora. Przy próbie utworzenia biblioteki genomowej genomu człowieka (złożonego z około 3,2 miliarda par zasad) z użyciem wektora faga lambda potrzeba ok. 700 tysięcy klonów, aby z niemal całkowitą pewnością mieć cały genom w bibliotece.

## Tworzenie bibliotek cDNA

Tworzenie biblioteki cDNA przebiega podobnie do tworzenia bibliotek genomowych, jednak wymaga innego przygotowania materiału do klonowania. W pierwszej kolejności niezbędna jest izolacja RNA z komórek, tkanek lub całego organizmu. Najważniejszą frakcją stanowi mRNA, na bazie którego dochodzi do syntezy białek. Możliwe jest oddzielenie frakcji mRNA z całości otrzymanego RNA poprzez modyfikację potranskrypcyjną, polegającą na dodaniu tzw. ogonka poliA do mRNA. Ze względu na brak możliwości bezpośredniego połączenia wyizolowanego RNA z DNA wektorów, niezbędne jest przepisanie mRNA na cDNA. Można tego dokonać dzięki enzymowi – odwrotnej transkryptazie – zdolnemu do syntezy nici DNA na bazie mRNA.

Uzyskaną w ten sposób mieszaninę poddaje się działaniu enzymu RNAzy, który degraduje znajdujące się w próbce mRNA. Następnie odwrotna transkryptaza syntezuje jednoniciowe DNA. Synteza drugiej nici zachodzi dzięki polimerazie DNA.

Tak otrzymane dwuniciowe DNA poddaje się trawieniu restrykcyjnemu. Kolejne etapy przebiegają analogicznie jak przy tworzeniu bibliotek genomowych.



Schemat syntezy dwuniciowego cDNA na matrycy mRNA.

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

## Biblioteka cDNA

Biblioteki cDNA stanowią zgromadzone w wektorach i umieszczone w komórce bakterii cDNA, które ogranicza się wyłącznie do genów aktywnych transkrypcyjnie. Ze względu na bardzo dynamiczny charakter frakcji mRNA w komórce – aktywność genów jest regulowana m.in. przez stadium rozwoju lub czynniki środowiskowe – biblioteki cDNA mogą się znacznie różnić w obrębie jednego organizmu.

Fragmenty cDNA są krótkie, zawierają do ok. 10 kbp, dlatego częstym wektorem w tworzeniu bibliotek cDNA są plazmidy. Fragmenty cDNA nie zawierają [intronów](#), dlatego tworzone wektory mogą być wykorzystywane w procesach klonowania genów eukariotycznych.

## Cele bibliotek genomowych

## Słownik

### **bakteriofag lambda**

wirus DNA zdolny do infekcji bakterii *E. coli*; jego materiał genetyczny ulega integracji z genomem gospodarza

### **biblioteka reprezentatywna**

biblioteka genomowa zawierająca całkowity genom danego organizmu na wektorach genetycznych

### **cDNA**

komplementarne DNA uzyskane za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem enzymu – odwrotnej transkryptazy, na matrycy mRNA

### **egzony (eksony)**

odcinki genu złożonego (a także pierwotnego produktu jego transkrypcji), które nie są usuwane z sekwencji mRNA w procesie składania RNA

### **enzym restrykcyjny**

klasa enzymów zdolnych do cięcia nici DNA w rozpoznawanych przez siebie specyficznych sekwencjach

### **ekspresja genów**

zespół procesów odpowiedzialnych za przekształcanie informacji genetycznej zawartej w genie w funkcjonalne białko lub RNA

### **introny**

niekodujące fragmenty genów; odcinki genów, które zostają usunięte w wyniku składania RNA i nie występują w mRNA podlegającym translacji

### **kosmidy**

sztucznie wytworzone wektory genetyczne powstałe na skutek połączenia plazmidów z fragmentem genomu bakteriofaga lambda

### **kpz**

kilo (tysiąc) par zasad

### **plazmidy**

autonomiczne, pozachromosomalne, najczęściej koliste cząsteczki DNA zdolne do replikacji

### **sztuczny chromosom bakterijny**

zrekombinowany DNA bazujący na genomie bakterii *E. coli*

### **sztuczny chromosom drożdżowy**

zrekombinowany chromosom drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

### **transfekcja**

wprowadzenie do komórek eukariotycznych obcego DNA przez wytworzenie porów w błonie komórkowej za pomocą prądu elektrycznego, bombardowanie komórek kulkami ze złota lub wolframu opłaszczonymi DNA bądź wstrzykiwanie obcego DNA za pomocą cienkich kapilar

### **transformacja**

zmiana cech dziedzicznych danego szczepu bakterii pod wpływem pobranego z otoczenia DNA

### **transkrypcja**

proces syntezy RNA na matrycy DNA zachodzący dzięki enzymom – polimerazom RNA

## **transkryptom**

ogół cząsteczek mRNA występujący w komórce, tkance lub organizmie w danym momencie

## **wektory genetyczne**

cząsteczki DNA plazmidów, wirusów, sztuczne chromosomy zdolne do wnikania i autonomicznej replikacji w danym typie komórki

# Audiobook

---

## Polecenie 1

Zapoznaj się z audiobookiem, a następnie wyjaśnij, czym są biblioteki genomowe i w jaki sposób są tworzone.

Audiobook można wysłuchać pod adresem: <https://zpe.gov.pl/b/P4Y8Ypc5Z>

---

## Biblioteki genomowe i cDNA

Rozwój technik inżynierii genetycznej pozwolił zsekwencjonować materiał genetyczny wielu organizmów oraz zidentyfikować geny odpowiedzialne za rozwój chorób genetycznych. Naukowcy często wykorzystują wiedzę dotyczącą budowy DNA w badaniach genetycznych: porównują DNA różnych organizmów, określają ich pokrewieństwo ewolucyjne czy identyfikują mutacje w genomie. By było to możliwe, informacje na temat sekwencji DNA organizmów muszą być zgromadzone w postaci baz danych dostępnych dla naukowców z całego świata. Tworzone są również specjalne biblioteki fragmentów DNA danego organizmu, które mogą być wykorzystane w prowadzonych badaniach. Nazywa się je bibliotekami genomowymi i cDNA.

Biblioteki cDNA, w odróżnieniu od bibliotek genomowego DNA, gromadzą zestawy sekwencji mRNA poszczególnych organizmów. Zawierają one fragmenty DNA stanowiące kopie genów ulegających ekspresji w danych warunkach, czyli cDNA. Biblioteki DNA są bardziej przydatne w ustalaniu struktury całych genomów, natomiast cDNA wykorzystuje się w badaniach ekspresji i funkcji genów.

W bibliotekach genomowych zgromadzone są fragmenty chromosomowego i organellarnego DNA danego organizmu, które umieszczono w określonych wektorach. Chromosomowe i organellarne DNA określa się jako DNA genomowe. Wektorami, które niosą fragmenty DNA genomowego, mogą być plazmidy, bakteriofagi, kosmidy czy sztuczne chromosomy bakteryjne i drożdżowe. Dobór wektora zależy od wielkości genomu, który ma znaleźć się w bibliotece genomowej. Jeśli wyhoduje się bakterie zawierające na plazmidach różne fragmenty DNA donorowego danego organizmu, to ich wspólna populacja tworzy bibliotekę genomową tego organizmu. Natomiast biblioteka cDNA obejmuje zbiór kopii mRNA w formie cDNA, również zgromadzonego na wektorach i umieszczonego w komórce bakterii. Komplementarne do DNA cDNA

obejmuje sekwencje kodujące różne białka. W celu tworzenia kopii cDNA z komórek danego organizmu izoluje się mRNA. Następnie w warunkach laboratoryjnych przeprowadza się odwrotną transkrypcję i uzyskuje w ten sposób cDNA. W odróżnieniu od pierwotnego DNA jest ono pozbawione intronów i zawiera wyłącznie sekwencję kodującą danego genu. Tak otrzymane sekwencje umieszcza się w wektorach i wprowadza do komórek bakterii również w procesie transformacji.

Ze względu na mniejszy rozmiar fragmentów cDNA w porównaniu do fragmentów genomowego DNA wektorami w bibliotekach cDNA są najczęściej plazmidy. Biblioteki cDNA wykonuje się głównie w przypadku organizmów eukariotycznych. Jest to spowodowane występowaniem w ich genomach wielu sekwencji niekodujących i pozagenowych, co znacznie utrudnia badanie sekwencji kodujących. Stworzenie biblioteki cDNA ułatwia tym samym analizę ekspresji genów. Z kolei genom organizmów prokariotycznych obejmuje głównie sekwencje kodujące, co znacznie ułatwia ich analizę. Jednak mRNA prokariotów jest bardzo niestabilny – z tego względu nie tworzy się bibliotek cDNA dla tych organizmów.

Biblioteki genomowe i cDNA są wykorzystywane przez naukowców do porównywania całych genomów i pojedynczych genów różnych organizmów. Biblioteki cDNA zawierają wyłącznie kopie eksonów, czyli genów ulegających ekspresji. Na ich podstawie można stwierdzić, które geny są aktywne w danym typie komórek i tkanek. Do badania ekspresji genów wykorzystuje się tzw. mikromacierze cDNA. Technologię mikromacierzy DNA wykorzystuje się w diagnostyce medycznej, m.in. w onkologii. Zastosowanie mikromacierzy DNA przekłada się przede wszystkim na możliwość porównania np. tkanki zdrowej i zaatakowanej przez nowotwór pod względem wszystkich znanych onkogenów. Mikromacierze umożliwiają też sprawdzenie reakcji badanych genów na zastosowane leki lub wykrycie genów, które odpowiadają za lekooporność. Są również przydatne w badaniu wpływu toksyn na zmiany genetyczne w komórkach. Warto dodać, że technologia ta służy do jednoczesnego pomiaru ekspresji dużej liczby genów (do kilkuset tysięcy) – o ich liczbie decyduje liczba komplementarnych do nich sond obecnych na danej mikromacierzy. Na różnice w transkrypcji genów wpływa nie tylko to, czy tkanka jest zdrowa czy chora i czy została poddana działaniu leku lub toksyny, ale i to, z jakiego stadium rozwojowego pochodzi. Dlatego banki cDNA wykorzystuje się również do porównywania transkryptów z różnych stadiów rozwojowych określonego organizmu, np. embrionalnej i niemowlęcej tkanki pochodzącej z mózgu.

Biblioteki cDNA można zastosować do produkcji określonych białek. Umieszczenie genów na wektorach genetycznych pozwala na przykład na produkcję insuliny człowieka przez mikroorganizmy. Biblioteki genomowe nie mogą zostać wykorzystane

w tym celu, ponieważ zawierają duże fragmenty DNA, obejmujące również sekwencje niekodujące i pozagenowe. Komórki prokariotyczne, które miałyby ulec transformacji z wykorzystaniem wektorów, nie mają możliwości obróbki potranskrypcyjnej. Stanowi to przeszkodę dla uzyskania w ten sposób funkcjonalnych białek.

---

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

## **Polecenie 2**

Wyjaśnij, czym się różni biblioteka cDNA od biblioteki genomowej.

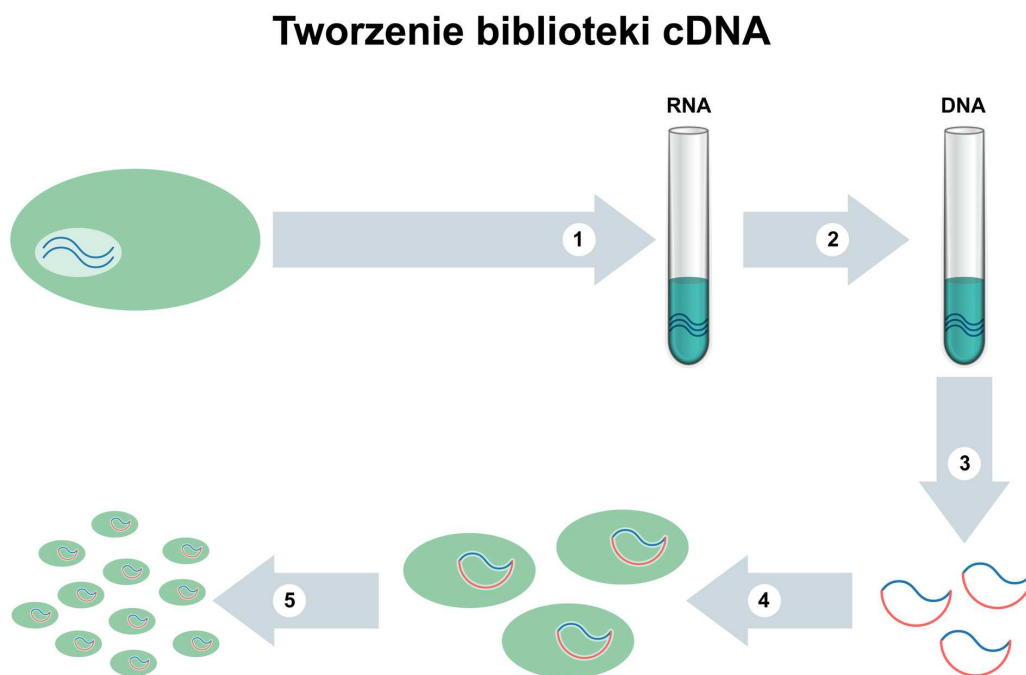
# Sprawdź się

Pokaż ćwiczenia:   

## Ćwiczenie 1



Na rysunku przedstawiono schemat tworzenia biblioteki cDNA. Przyporządkuj cyfrom 1-5 odpowiadający im etap jej powstawania.



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

## Ćwiczenie 2



## Ćwiczenie 3



## Ćwiczenie 4



## Ćwiczenie 5



## Ćwiczenie 6



## Ćwiczenie 7



” Ze względu na pochodzenie insuliny dzielimy ją na:

1. Zwierzęcą (...)

2. Ludzką – wytwarzaną od lat osiemdziesiątych dzięki osiągnięciom metod inżynierii genetycznej, z zastosowaniem bakterii *Escherichia coli* i drożdży piekarskich. W warunkach laboratoryjnych do komórek bakterii lub drożdży wprowadza się wyizolowany wcześniej ludzki gen odpowiedzialny za wytwarzanie insuliny. Mikroorganizmy zaczynają wytwarzać, oprócz własnych białek, także insulinę ludzką, która jest stosowana z powodzeniem w leczeniu cukrzycy.

Źródło: *Insulina* - Karolina Podsiadły, tekst dostępny online: <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/insulina>.

## Ćwiczenie 8



# Dla nauczyciela

---

**Autor:** Anna Juwan

**Przedmiot:** Biologia

**Temat:** Biblioteki genomowe i cDNA

**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):**

- Scharakteryzujesz cechy bibliotek genomowych i cDNA.
- Porównasz biblioteki genomowe i cDNA.
- Przedstawisz cele tworzenia bibliotek genomowych.
- Omówisz zasady tworzenia bibliotek genomowych i cDNA.

**Strategie nauczania:**

- konstruktywizm;
- konektywizm.

**Metody i techniki nauczania:**

- z użyciem komputera;
- ćwiczenia interaktywne;
- metoda kuli śniegowej;

- praca z audiobookiem;
- mapa myśli;
- praca z filmem;
- gra dydaktyczna.

### **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;
- arkusze papieru, flamastry.

### **Przed lekcją:**

1. **Przygotowanie do zajęć.** Nauczyciel loguje się na platformie i udostępnia uczniom e-materiał „Biblioteki genomowe i cDNA”. Prosi uczestników zajęć o zapoznanie się z tekstem w sekcji „Przeczytaj” i multimedium w sekcji „Audiobook”, tak aby podczas lekcji mogli w niej aktywnie uczestniczyć i rozwiązywać zadania.

### **Przebieg lekcji**

#### **Faza wstępna:**

1. Nauczyciel wyświetla na tablicy temat lekcji oraz cele zajęć, omawiając lub ustalając razem z uczniami kryteria sukcesu.
2. **Rozmowa wprowadzająca.** Uczniowie, na podstawie e-materiału, z którym mieli się zapoznać przed lekcją, odpowiadają na pytania nauczyciela:
  - Czym są biblioteki genomowe?
  - W jaki sposób są tworzone?
  - Czym są biblioteki cDNA?

#### **Faza realizacyjna:**

1. **Praca z filmem.** Jeśli to konieczne, nauczyciel odtwarza ponownie film z sekcji „Przeczytaj”, z którym uczniowie mieli się zapoznać w ramach przygotowania do zajęć.
2. **Mapa myśli.** Nauczyciel dzieli uczniów na grupy i rozdaje im arkusze papieru A1 oraz flamastry. Omawia zasady tworzenia mapy myśli: uczniowie mają na podstawie

e-materiału w graficzny sposób uporządkować oraz zapisać informacje dotyczące bibliotek genomowych i cDNA. Nauczyciel kontroluje pracę grup, w razie potrzeby wyjaśnia wątpliwości uczniów. Po upływie wyznaczonego czasu chętne osoby prezentują mapy myśli wykonane przez swoją grupę.

**3. Kula śniegowa.** Uczniowie rozwiązują ćwiczenia od 6 do 8 z sekcji „Sprawdź się” metodą kuli śniegowej.

Nauczyciel objaśnia wspomnianą wyżej metodę i wynikające z niej kolejne etapy pracy:

1) najpierw uczniowie będą indywidualnie opracowywać odpowiedzi na polecenia;

2) potem połączą się w pary i porównają swoje propozycje, a na osobnej kartce zapiszą wspólne odpowiedzi;

3) kolejnym krokiem będzie połączenie się par w czwórki, które – jak poprzednio – skonfrontują swoje odpowiedzi;

4) na koniec uczniowie utworzą 8-osobowe zespoły i znów porównają swoje propozycje.

**4. Utrwalenie wiedzy i umiejętności.** Nauczyciel dzieli klasę na 4-osobowe grupy.

Uczniowie rozwiązują ćwiczenia interaktywne od 3 do 5 z sekcji „Sprawdź się”, od najłatwiejszego do najtrudniejszego. Grupa, która poprawnie rozwiąże zadania jako pierwsza, wygrywa.

#### **Faza podsumowująca:**

1. Nauczyciel prosi uczniów, aby w grupach skonstruowali tabelę porównującą biblioteki genomową i cDNA. Grupy prezentują wykonane przez siebie tabele.

2. Nauczyciel wyświetla temat lekcji i cele zawarte w sekcji „Wprowadzenie”, podsumowuje omawiany na lekcji materiał, wyjaśnia wątpliwości uczniów.

#### **Praca domowa:**

1. Wykonaj ćwiczenie nr 3 i przygotuj podobne zadanie (typu „prawda-falsz”) dla osoby z pary: wymyśl trzy prawdziwe lub fałszywe zdania dotyczące tematu lekcji i na kolejnej lekcji daj je do rozwiązania koledze lub koleżance.

#### **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.

#### **Dodatkowe wskazówki metodyczne:**

- Multimedia zamieszczone w sekcji „Audiobook” można wykorzystać w fazie wstępnej zajęć, w celu wzbudzenia zaciekawienia uczniów.