VECTORS AND THEIR TRANSFORMATION

Vector types

- Small DNA molecule - ملهاش دخل بالحمض المووي تبعنا–capable of self replication that are used as cloning vehicle or carrier of DNA fragment.
- الها origin of self replicationيعني هي بتقدر تنقسم بمعزل عن البكتيريا وفيها جزء بقدر يحمل ال dna insert تبعنا بنسميها multiple cloning region
- Selection of the vector type depends on host used in the cloning and size of insert
  - *Plasmids*
  - *المشكلةانها ما بتقدر تحمل كم كبير من ال dna يعني حدها ١٠٠٠ bp يعني تقريباً ٣٠٠٠ وشوي amino acid*
  - *Phages*
  - *Hybrid vectors*
  - *Artificial chromosomes*

كل ما نزلنا لتحت بتكون بتحمل عدد اكبر من ال amino acids

Vector Characteristics

- Self replication, multiple copies.
- Replication origin site.
- Cloning site.
- Selectable marker gene.
  - عادةً بتكون مضاد حيوي وراح نحكي عنها بعدين وكيف نميز مين الي اخذ ال insertومين لاء
- Small size.
- Easily isolated & purified.
  - لانه شكلهم دائري فسهل اني احصلهم بعد ما نعمل lysis للخلية
- Easily transformed into host cell.
  - مع انه ال efficiencyالها مش كثير لكنها كافية لتطلع عدد من ال clones
- Control elements – promoter, operator, ribosome binding site.
  - بنشوفها بال expression بنحكي عنها بس نوصلها قدام

Types

- There are two types of vectors:
  - ***Cloning vectors:*** *DNA molecules that are used to "transport" cloned sequences between biological hosts -microorganisms - and the test tube*. Examples: Plasmids, Phage or Virus to get millions of copies.

  - بربط ال vectorمع ال insert ولازم يكونوا على شكل cercluar مشان ما تموت الخلية وبحطها في بكتيريا مشان تتكاثر وبعد ما اعمللها purification بكون حصل ملايين النسخ من الplasmids

Types

- .
  - ***Expression vectors:*** a plasmid or virus used to introduce a specific gene into a target cell, and can commandeer the cell's mechanism for protein synthesis to produce the protein encoded by the gene
  - *راح نشوف انه بعض الbiological drugs هي عبارة عن glycoproteins يعني لازم الmicroorganism بعد ما يصنع البروتين يعمله glycation ب sequence معين وهاي الميكانيزم مش موجودة في البكتيريا فيا بنستخدم eukaryotic cell يا بعدل على البكتيريا*

Cloning vectors

- **Cloning vectors** are used in genomic library, preparing probes and Genetic engineering experiments.
  - وممكن نصنع جينات ونحطه ببكتيريا واخزنها في جليسرول ٢٠-٤٠٪ وعلى درجة حرارة -٧٠

- Selection of cloning vector depends on :-
  - *Objective of cloning experiment*
  - *حسب شو بدنا نعمل اذا بدنا نكثر قطعة صغيرة من ال dna ممكن نستخدم ال e coli وممكن ال plasmid*
  - *Ease of working.بنقدر ندخل الجينات ونطلعها بسهولة*
  - *Knowledge existing about the vector.*
  - *Suitability.*
  - *Reliability اذا عدنا الشغل اكثر من مرة لازم يعطي نفس النتيجة*

Cloning vectors

- Cloning vectors share four common properties
- 1. Ability to promote autonomous(لوحده) replication.
  - انه بنفع ينقسم لحاله بدون ما يعتمد على اشي موجود بالخلية

2. Contain a genetic marker (usually dominant) for selection.
مثلاً بحط فيه جين لمقاومة الامبيسيلن مشان اميز الخلايا الي موجود فيها هذا ال vector فبنجيب خلايا مشكلة جزء في الجين المقاوم للامبسيلين وجزء لاء وبنحط عليها امبسيلين الخلايا الي ما بتموت هي الي بكون جواها الinsert

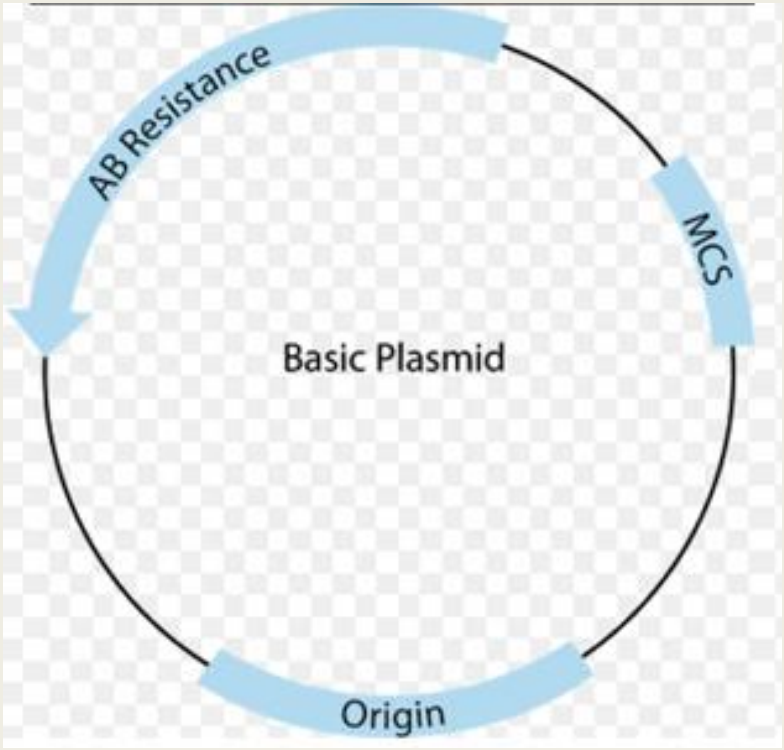
- . Unique restriction sites to facilitate cloning of insert DNA.
لازم يكون ال restrictions site لانزيم معين بتكرر مرة وحدة مشان يحافظ على شكل ال plasmid

4. Minimum amount of nonessential DNA to optimize cloning.

- ما يكون فيه وجود كبير لجينات ما الها داعي لانه بس يصيرلها expression راح يكونلي بروتينات ما الها داعي وراح تخربلنا البروتين وتغلبنا الي بدنا إياه مشان هيك لازم نتعلم من زملائنا العلماء واي شخص ما اله داعي بحياتك تطلعه منها لانه راح يغلبك لبعدين ويخربلك حياتك ....بمزح زملائي بس مشان تربطوها ☺

Plasmids

- Bacterial cells may contain extra-chromosomal DNA called plasmids.
- بتاخذ بشكل رئيسي من البكتيريا
- Plasmids are usually represented by small, circular double stranded DNA.
- Some plasmids are present in multiple copies in the cell
- In addition to bacteria, it may exist in the nuclei of some eukaryotic cells.
- They can replicate independently of the host cell. The size of plasmids ranges from a few kb 2-3kb to near 100 kb
- Can hold up to 10 kb fragments



Plasmid vectors
Origin of replication

- Plasmid vectors contain:
- **Origin of replication (Ori)** is a DNA segment recognized by the cellular DNA-replication enzymes.
- Without replication origin, DNA cannot be replicated in the cell
- a gene that permits selection,
- Here the selective gene is *ampr*; it encodes the enzyme b-lactamase, which inactivates ampicillin.
  - ممكن يكون selective لاكثر من نوع من الanti biotics في وقت واحد حسب شو الجين الي بنحطه جواه ومش شرط يكونوا b lactams ممكن يكونو اي جروب من المضادات
- Exogenous DNA can be inserted into the bracketed region .

Selective marker

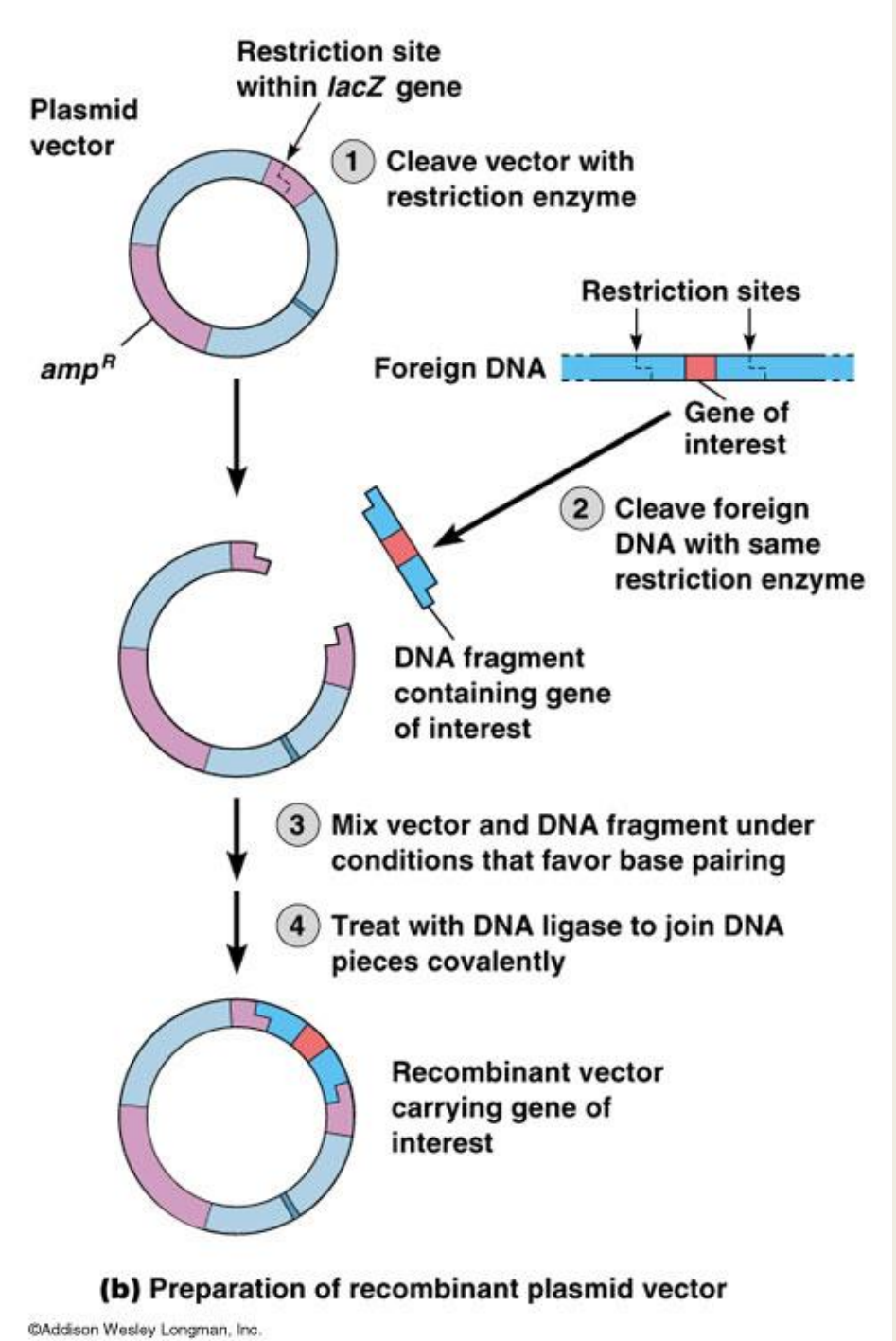
- **Selective marker** is required for maintenance of plasmid in the cell.
- Because of the presence of the selective marker the plasmid becomes useful for the cell.
- Under the selective conditions, only cells that contain plasmids with selectable marker can survive
- Genes that confer resistance to various antibiotics are used.
- Genes that make cells resistant to ampicillin, neomycin, tetracycline or chloramphenicol are used

Multiple cloning site

- Many cloning vectors contain a **multiple cloning site** or **polylinker**: a DNA segment with several **unique sites** for restriction endonucleases located next to each other
- Restriction sites of the polylinker are not present anywhere else in the plasmid.
- Cutting plasmids with one of the restriction enzymes that recognize a site in the polylinker does not disrupt any of the essential features of the vector

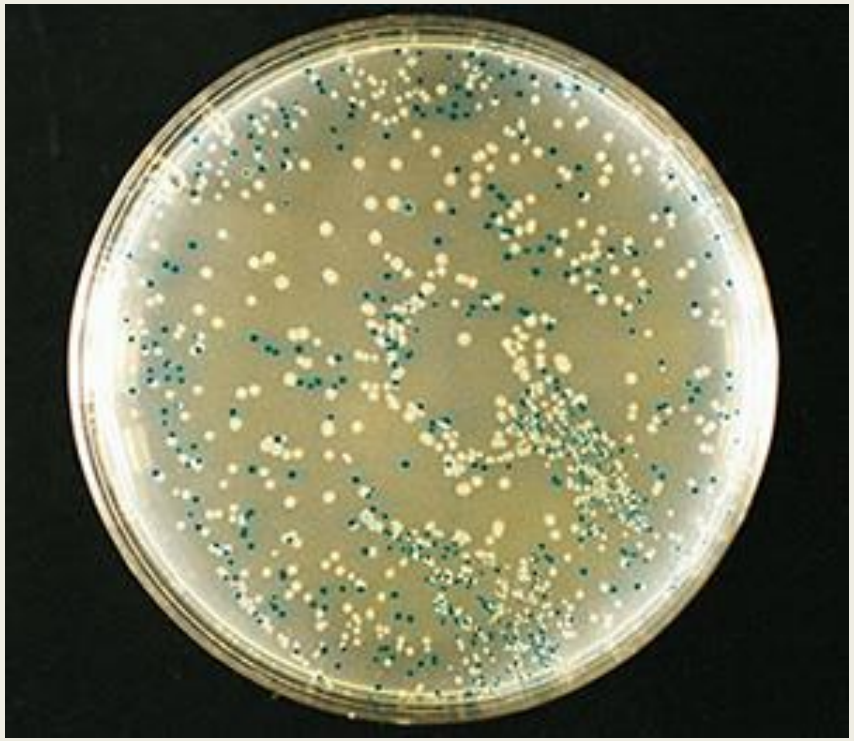
Multiple cloning site

- Gene to be cloned can be introduced into the cloning vector at one of the restriction sites present in the polylinker, transformed into bacteria
- After culture growth, the clone fragment can be recovered easily. The cells are lysed and the DNA is isolated and purified.
- A DNA fragment can be kept indefinitely in bacterial culture if mixed with glycerol in a –70 degrees C freezer.



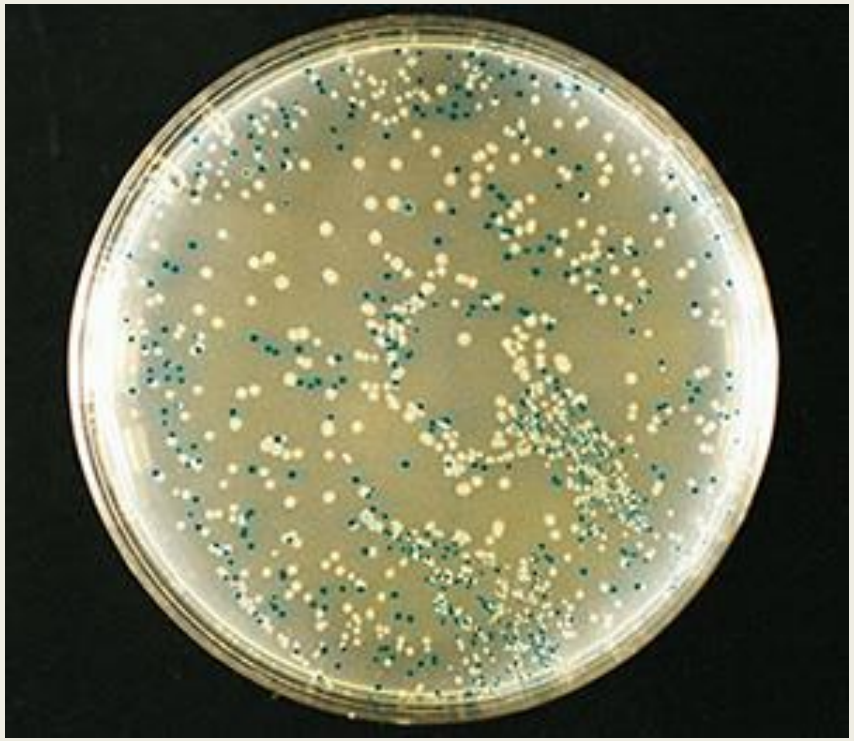
Plasmid Polylinkers and Marker Genes for Blue-White screening

الشرح في السلايد الي بعده



- Colonies with recombinant plasmids are white, and colonies with nonrecombinant plasmids are blue.
- Example: pUC19
- Resistant to ampicillin, has (amp^r gene)
- Contains portion of the lac operon which codes for beta-galactosidase.
- X-gal is a substrate of beta-galactosidase and turns blue in the presence of functional beta-galactosidase is added to the medium.

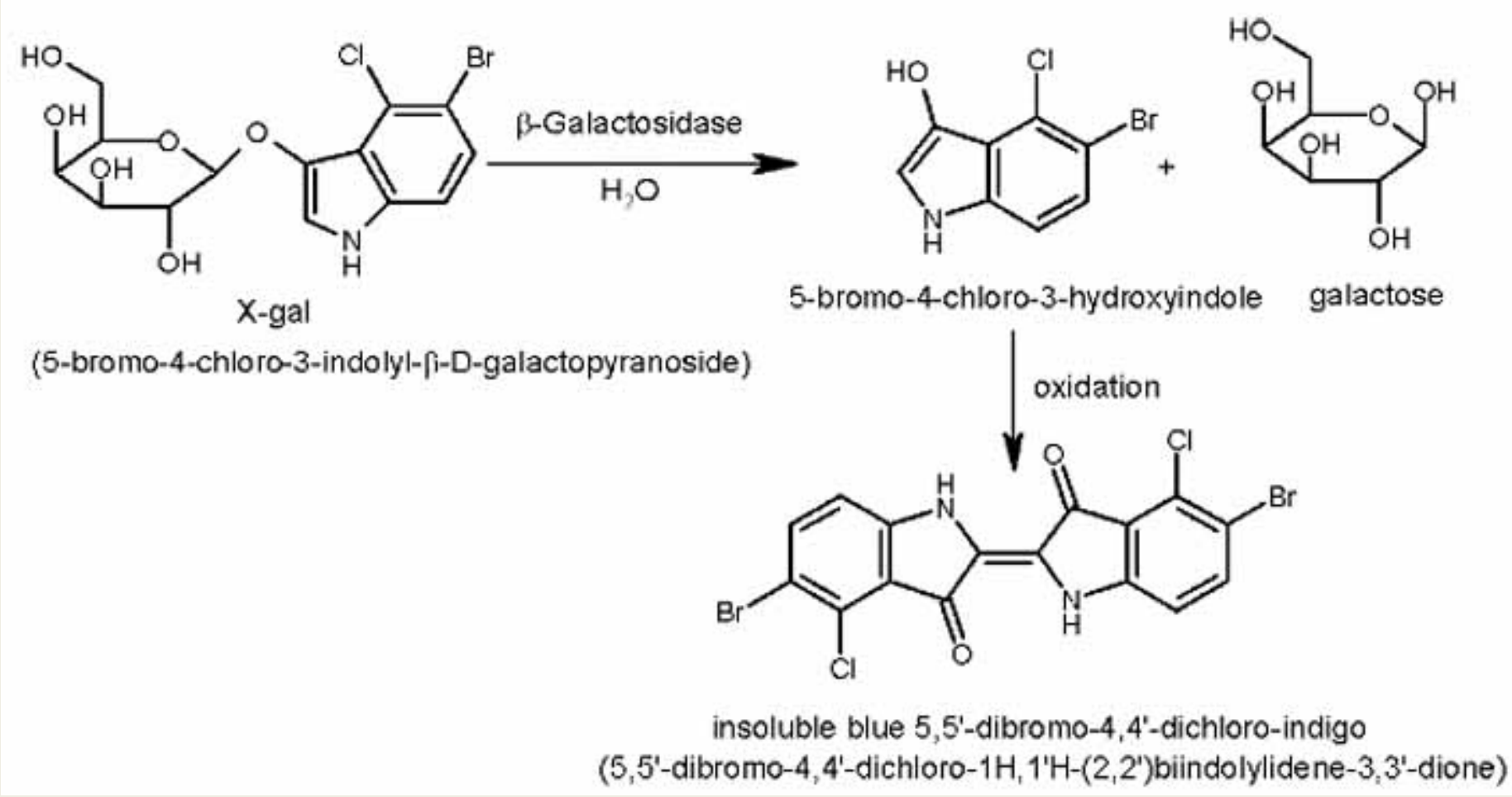
Plasmid Polylinkers and Marker Genes for Blue-White screening



- هسة في طريقة ثانية الي فهمته منها انه ممكن راح نحكيها لقدام بتفصيل اكثر في عنا في عنا جين خاص بالb galactosedase هذا بفرز بروتين بخرب أي رابطة بعملها الجلاكتوز زي لما يرتبط مع جلوكوز ويعمللنا لاكتوز فانا بدخل الجين تبعي داخل هذا الجين وبخربه وبشوف ال plasmidالي لسا بخرب اللاكتوز معناته الb galactosedase الي فيه شغال وما ارتبط بالinsert ويكون لون الcolony ابيض والي ما بخرب اللاكتوز معناته اربط فيه الinsert وبكون لون الcolony ابيض وبقدر استخدمه في شغلي طبعاً بس رجعت لشرح الدفع السابقة مشان افهم شولي بتحكيه الدكتورة هون اكتشفت انه الحكي هذا مش مشروح لاي دفعة قبلكو والدكتورة عازيتكو في بشكل خاص

*ممكن نضيف جالاكتوز مرتبط بصبغة اسمها x gal وبصير نفس الحكي فوق

X-Gal reaction



TYPES OF CLONING VECTORS
1. PLASMID VECTORS

- Plasmid vectors are used to clone DNA ranging in size from several base pairs to several thousands of base pairs (100bp -10kb).
- ColE1 based, pUC vehicles
  commercially available ones, eg pGEM3, pBlueScript, pET16

Plasmids advantages and disadvantages

- Advantages:
  - *Small size (easy to manipulate and isolate)*
  - *Circular (more stable)*
  - *Replication independent of host cell*
  - *لانه عنده origin of replication احفظوها زي اسمكم*
  - *Several copies may be present (facilitates replication)*
  - *Frequently have antibiotic resistance (detection easy)*
- Disadvantages:
  - *Cannot accept large fragments*
  - *Sizes range from 0- 10 kb*
  - *Standard methods of transformation are inefficient*
    - العملية مش سهلة ابداً ممكن نستخدم آلاف او حتى ملايين عشان يدخل ١٠-١٥inserts
    - لما بنحكي عن الviral بكون efficient اكثر عملية ال transformation