2. Phage Cloning Vectors

- Fragments up to 23 kb can accommodated by a phage vector
- Lambda and M13 are most common phages

ال lamdaيعتبر الاكثر شهرة

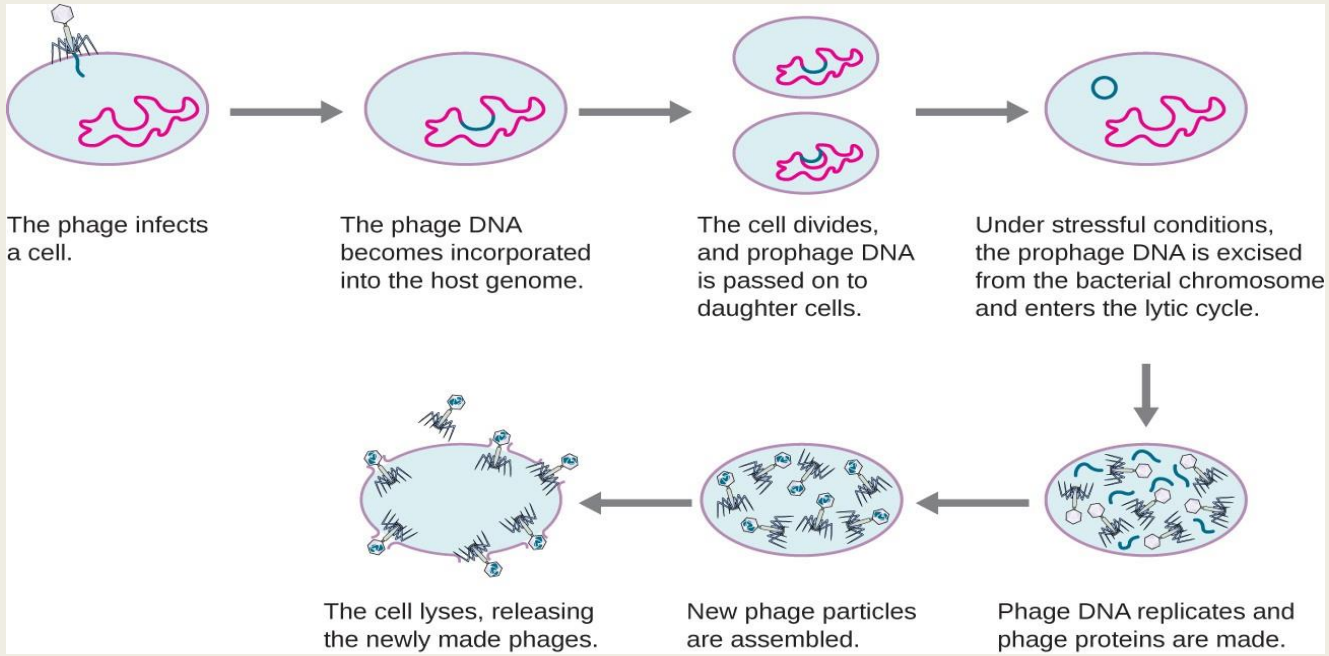
- 60% of the genome is needed for lytic pathway.
- Segments of the Lambda DNA is removed and a stuffer fragment is put in.
- The stuffer fragment keeps the vector at a correct size and carries marker genes that are removed when foreign DNA is inserted into the vector.
- Example: Charon 4A Lambda
- When Charon 4A Lambda is intact, beta-galactosidase reacts with X-gal and the colonies turn blue.
- When the DNA segment replaces the stuffer region, the lac5 gene is missing, no beta-galactosidase is formed, and the colonies are white.

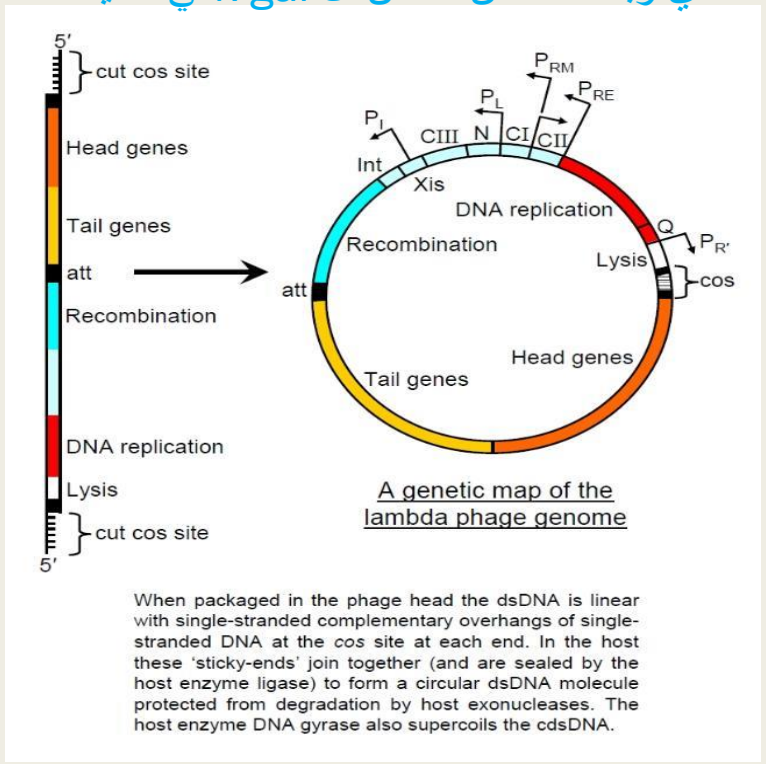
Bacteriophage lambda

- **Phage lambda** is a **bacteriophage** or **phage**, i.e. bacterial virus, that uses *E. coli* as host.
- Its structure is that of a typical phage: **head, tail, tail fibres.**
- **Lambda viral genome:** 48.5 kb linear DNA with a 12 base ssDNA "sticky end" at both ends; these ends are complementary in sequence and can hybridize to each other (this is the **cos** site: **co**he**s**ive ends).
  - هذا بسهل عملية انه يصير circular لانه كل end بتكون complementary للثانية فبكون برا الخلية بتصرف كانه جين فايروس وبس يدخلها بتصرف كأنه بلازميد
- **Infection:** lambda tail fibres adsorb to a cell surface receptor, the tail contracts, and the DNA is injected.
- The DNA circularizes at the **cos** site, and lambda begins its life cycle in the *E. coli* host.
  - لإنه الفايروس بصيرله circulation وفي عنا cohisve end بنربطوا ببعض بس يصير circulation بنسميهم ال co sites

Bacteriophage lambda

أول اشي يلتصق الفايروس بخلية ال e coli بعدين بعمل injectionللdnaتبعه جوا الخلية ويرتبط بالحمض النووي للخلية وبتبلش تنقسم الخلية وبعدين ينفصل على شكل زي ال plasmedوبعدين **ببلش** يصنع البروتينات **والاعضاء** تبعته بصنع ال shellاول اشي و بعدين بصنع ال rnaتبعه وبعدين بعمل lysisللخلية ويطلع كل الفايروسيز الموجودات ويعملوا infictionلخلايا ثانية هذاالوضع العادي بأي infictionلاي فايروس **بس** احنا مشان نستفيد من الموضوع ما بدنا إياه يعمل lysisللخلية لانه خلايانا بتعز علينا وما بدنا نخسرها فنتوقف دائماً عند المرحلة الخامسة بصيرله multiplicationبس ما يخليه يصنع بروتينات اله تحلل الخلية و**وبيتم** هالحكي لما نشيل لحد ٦٠ %من ال genomفبطلل يفرز الانزيمات الي يتحلل الخلية وبالمناسبة مشان هيك هو بحمل أكثر من ال plasmedالعادي وبنعمله نفس فحص ال x galالي حكينا المحاضرة الماضية اذا ما ال**جين** تبعنا موجود راح يصير اللون ابيض





هسة في عنا عدة طرق لندخل ال vectorsللخلايا اعزائي يا اما بال infectionالي ذكرناها يا اما بعرضه ل heat shockبتكون الخلية محطوطة بالثلج وبعدين بنحطها في درجة 42cوبيعدين بنرجعها على الثلج ساعتها بتتفتح ال poresالي في ال cell wallوغالبا بتكون هاي الطريقة مش efficientوممكن نفتح ال poresب elictric shockوبعدين بدخل البلازميد لكن الطريقة الاكثر فاعلية هي ال infiction

Cosmid Cloning Vectors

Cosmidيا دكاترة جاي من كلمتين cohesive and plasmidفبتجمع بين الخاصيتين ال infiction and plasmid system

- Fragments from 30 to 46 kb can be accommodated by a cosmid vector.
- Cosmids combine essential elements of a plasmid and Lambda systems.
- Cosmids are extracted from bacteria and mixed with restriction endonucleases عملية معالجة.
- Cleaved cosmids are mixed with foreign DNA that has been cleaved with the same endonuclease.
  - بعدين بضيفوله الinsert
- Recombinant cosmids are packaged into lambda capsids
  - بصير عنا فايروس بس الي جواه مش ال dnaتبعه dnaالي انا دخلته (cosmid)
- Recombinant cosmid is injected into the bacterial cell where the cosmid arranges into a circle and replicates as a plasmid. It can be maintained and recovered just as plasmids.
  - بمجرد ما بلش يتصرف انه فايروس وعمل injectionلل cosmidداخل الخلية بصيرله circulationبتصرف كأنه بلازميد

Cosmid vector

- Thus, have some advantages of Lambda as Cloning Vehicle:
- Strong selection for cloning of large inserts
- Infection process rather than transformation for entry of chimeric DNA into *E. coli* host
- Maintain Cosmids as phage particles in solution
- **But** Cosmids are Plasmids:
  so cloning proceeds via *E. coli* colony formation
- Its behave as a plasmid when it is inside the cell
- فالتعامل معاه بكون كبلازميد طالما جوة الخلية

انا باخذ ال cosmidوباخذ الجين الي بدي ادخله فيه وبقصهم الثنين ب restriction enzymesوبعدين بربطهم ببعض وبخليهم بالشكل المفرود ما بنعمللهم circulationهو بصيرله لحاله بس يدخل الخلية او البكتيريا بعدين بدخل الكوزميد المربوط بال insertبال shellتبعط الفايروس وبعدين بتعمل infectionلل e coli مثلا مجرد ما فات بنعمله . circulation طبعا في في عنا الفحوصات زي ال white blueوال anti biotics

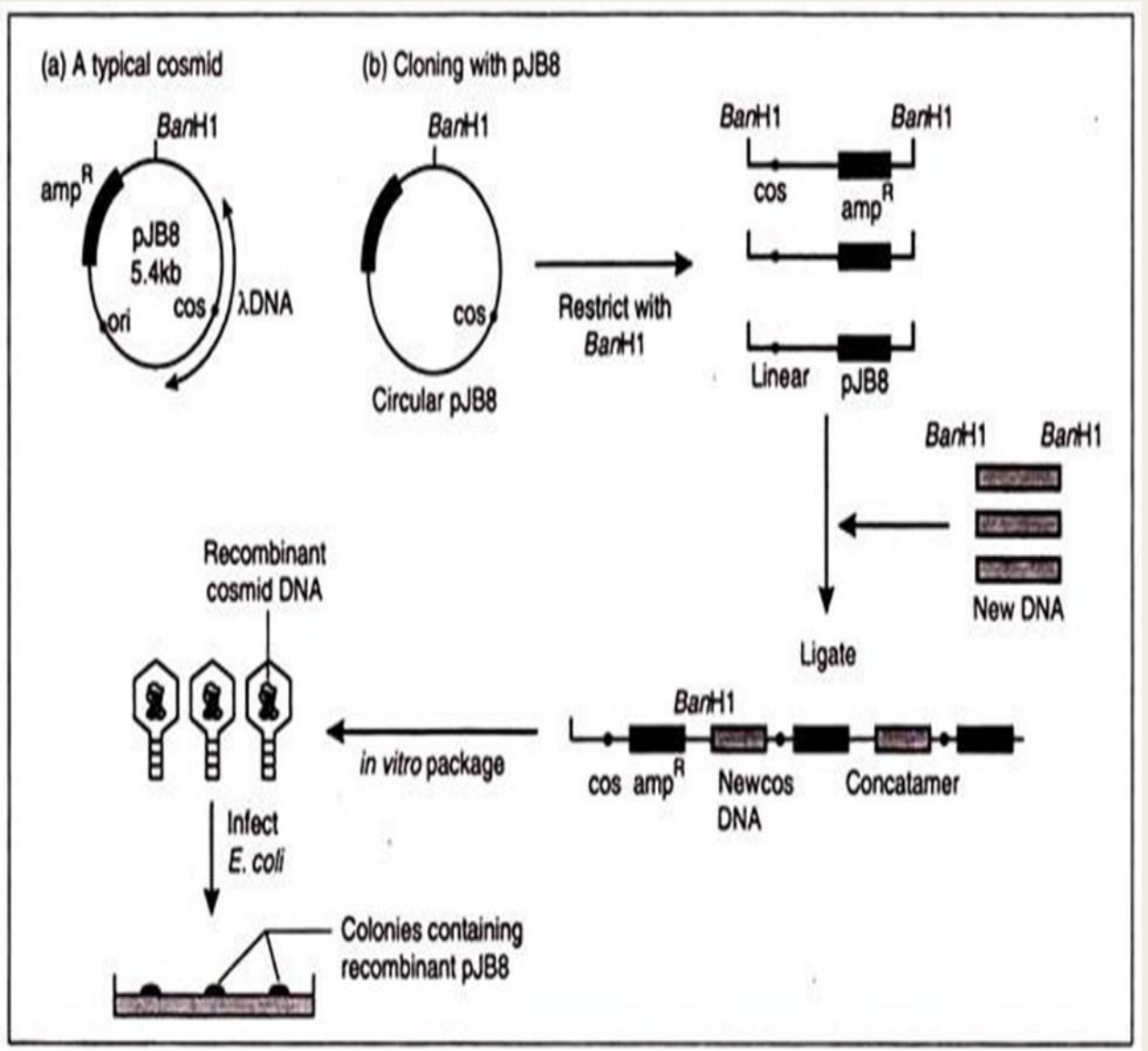


Fig. 4.38: A typical Cosmid vector and the way it is used to clone long fragments of DNA

Yeast Artificial Chromosomes

- **Purpose:**
- Cloning vehicles that propagate in eukaryotic cell hosts as eukaryotic Chromosomes
- Clone **very** large inserts of DNA: 100 kb - 10 Mb
- بس الحجم هذا كثير كبير احنا بنحكي عن كروموسومز فاحنا بنستخدمها أعزائي الدكاترة بس ندرس جينات حجمها كبير
- **Features:**
  YAC cloning vehicles are plasmids
  Final chimeric DNA is a linear DNA molecule with telomeric ends
- ال telomiric endبتكون خاصة بالكروموسومات وعدها كمان بكون centromereالبتنقسم من عنده كل تصرفاتها وشكلها بتكونزي الكروموسوم بس بتكون اصغر شوي من الكروموسومات - mini chromosome–
- Often have a selection for an insert
- YAC cloning vehicles often have a bacterial origin of DNA replication (**ori**) and a selection marker for propogation of the YAC through bacteria.
- The YAC can use both yeast and bacteria as a host
- ال yeast mainly بستخدملها ال yacبس البكتيريا بستخدملها بشكل رئيسي BAC(bacterial artificial chromosome)بس بقدر بشكل عام استخدم ال yacللبكتيريا وال yeast

Yeast Artificial Chromosomes (YAC)

بطون شكلها زي ال plasmidلما تكون جوا ال yeastبعدين بناخذها وبنقطعها وبنربط فيها الجين تبعنا في ال sticky endsاللي همط مفسهم ال telomeresوممكن يوصل حجم الجين الي بدنا نضيفه ل 10000kbوبنخليها مفرودة وبندخلها الخلية عن طريق electrical shock

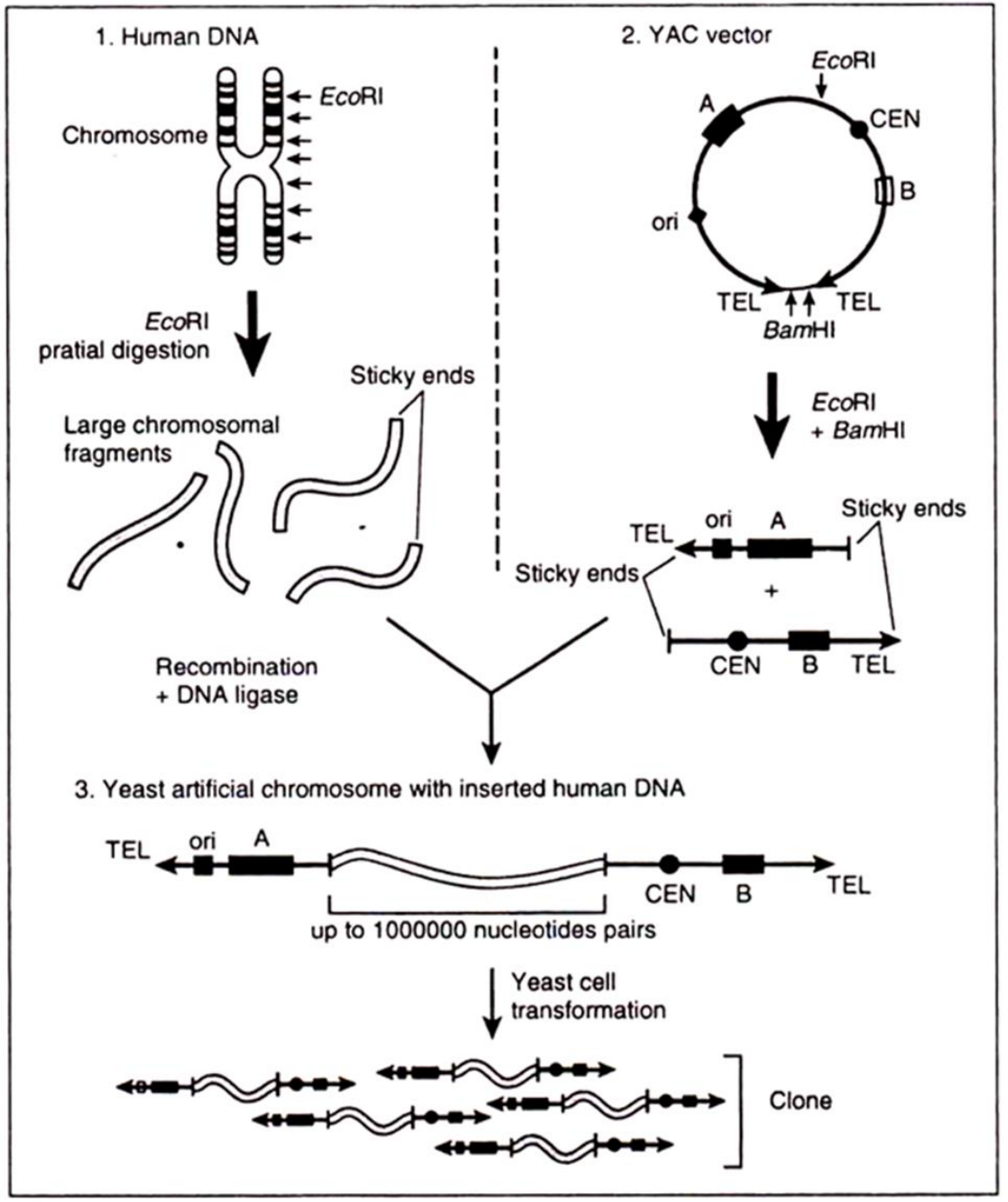


Fig. 4.45: The steps involved in cloning a large segment of human DNA in YAC

Yeast Artificial Chromosomes (YAC)

- YACs are designed to replicate as plasmids in bacteria when no foreign DNA is present. Once a fragment is inserted, YACs are transferred to cells, they then replicate as eukaryotic chromosomes.
- YACs contain: a yeast centromere, two yeast telomeres, a bacterial origin of replication, and bacterial selectable markers.
- YAC plasmid→Yeast chromosome
- DNA is inserted to a unique restriction site, and cleaves the plasmid with another restriction endonuclease that removes a fragment of DNA and causes the YAC to become linear. Once in the cell, the rYAC replicates as a chromosome, also replicating the foreign DNA.

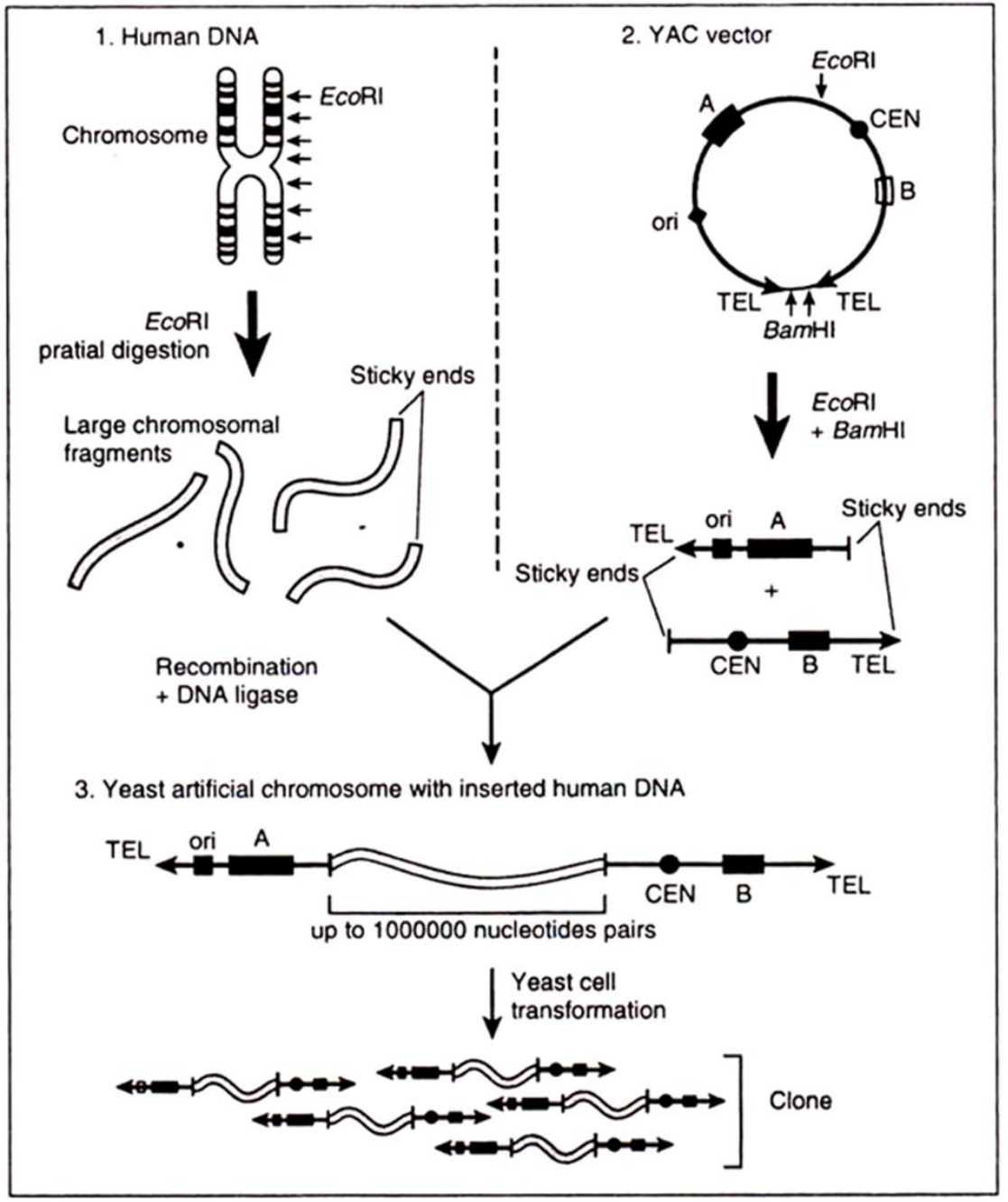


Fig. 4.45: The steps involved in cloning a large segment of human DNA in YAC

Bacterial Artificial Chromosomes(BACs) and Yeast Artificial Chromosomes(YACs)

- BACs can hold up to 300 kbs.
- The F factor (felament gene)of E.coli is capable of handling large segments of DNA.
- Recombinant BACs are introduced into E.coli by electroportation (a brief high-voltage current). Once in the cell, the rBAC replicates like an F factor.
- Example: pBAC108L
- Has a set of regulatory genes, OriS, and repE which control F-factor replication, and parA and parB which limit the number of copies to one or two.
- A chloramphenicol resistance gene, and a cloning segment.

- اقل من الyeast
- هذا الجين بتحمل يشيل قطعة كبيرة من ال dnaلحد 300kb
- وبتتشارك بكل الأمور مع البلازميد والكوزميد زي ال origin of replicationوال anti biotic resestanceوال b galactosedaseوهي المرشحة غالبا

Human Artificial Chromosomes (HAC)

- A human artificial chromosome (HAC) is a mini-chromosome that is constructed artificially in human cells. That is, instead of 46 chromosomes, the cell could have 47 with the 47th being very small, roughly 6-10 mega-bases in size, and able to carry new genes introduced by researchers.
- المفروض يصير down syndrome لما يصير 47كروموسوم بدل 46لكن بنشتغل هيك في المختبر بس
- Using its own self-replicating and segregating systems, a HAC can behave as a stable chromosome that is independent of the chromosomes of host cells.

Retroviral Vectors

Mainly used in gene therapy

بندخلها عن طريق ال infectionعلى اي خلية حيوانية ،بنشيل ال pathological partوبنحط الinsert

- Retroviral vectors are used to introduce new or altered genes into the genomes of human and animal cells.
- Retroviruses are RNA viruses.
- The viral RNA is converted into DNA by the viral reverse transcriptase and then is efficiently integrated into the host genome
- Any foreign or mutated host gene introduced into the retroviral genome will be integrated into the host chromosome and can reside there practically indefinitely.
- Retroviral vectors are widely used to study oncogenes and other human genes.

Expression vectors

llows a cloned segment of DNA to be translated into protein inside a bacterial or eukaryotic cell.

- Vectors will contain the:

(a) in vivo promoterمحفز

ITTG(isopropyl بنستخدمله plasmids موجود بعدة lac z زي ال
promoterك thiogalactoside)

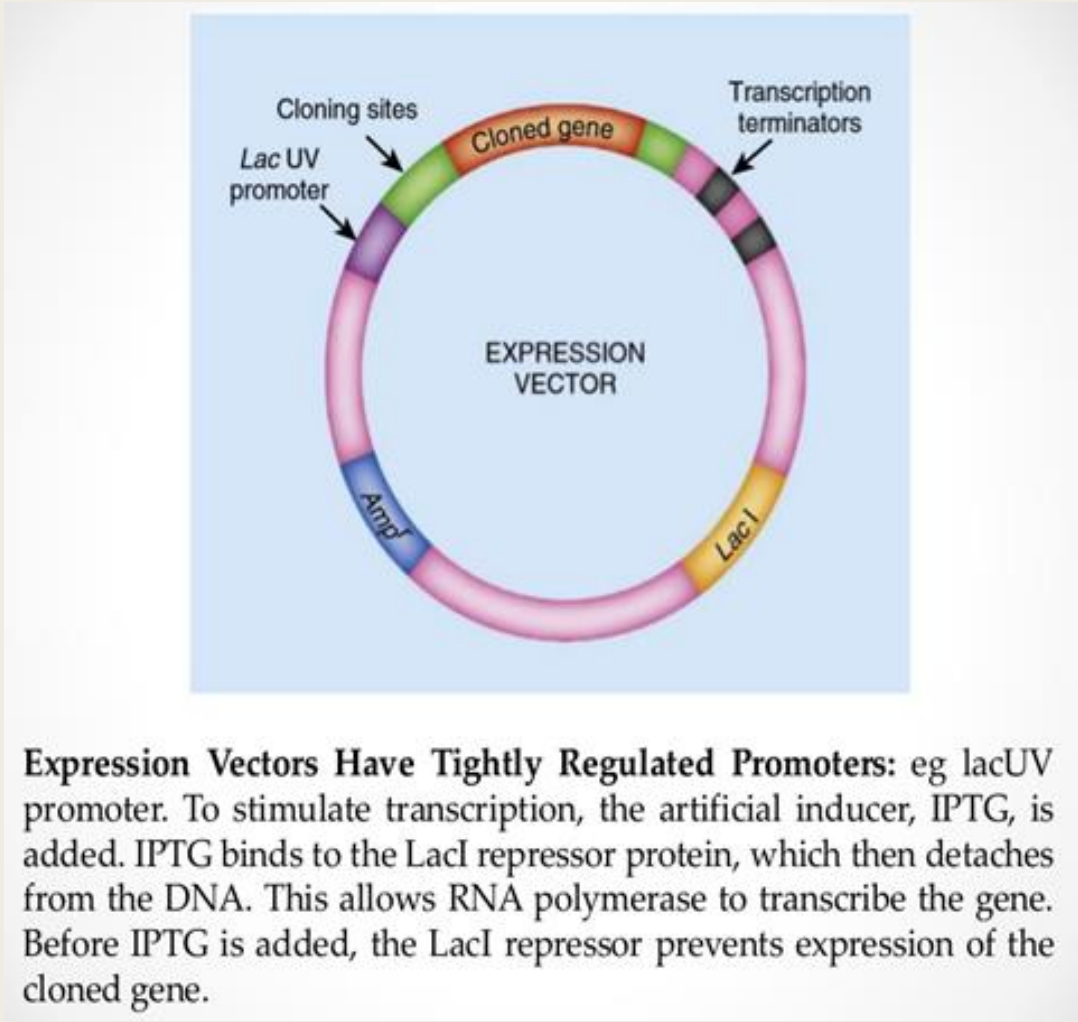
(b) Ampicillin selection

لازم انا اميز اذا هذا البلازميد اخذ الinsertتبعي

(c) Sequencing primers

مشان نتأكد انه ال sequanceلآخر اشي دخلته صحيح

راح نوضحه اكثر بعدين



Expression Vectors Have Tightly Regulated Promoters: eg lacUV promoter. To stimulate transcription, the artificial inducer, IPTG, is added. IPTG binds to the LacI repressor protein, which then detaches from the DNA. This allows RNA polymerase to transcribe the gene. Before IPTG is added, the LacI repressor prevents expression of the cloned gene.

Types of expression systems

- Bacterial: plasmids, phages
- Yeast: plasmids, YACs
- Insect cells: baculovirus, plasmids
- Mammalian:
  - *viral expression vectors (gene therapy):*
    - زي ما حكينا انه احنا ممكن ناخذ الجين وندخله في ال virus shellونهليه يعمل infectionللخلايا
      - SV40
      - vaccinia virus
      - adenovirus
      - retrovirus
  - *Stable cell lines (CHO, HEK293)*

احنا غالبا بنستخدم في البيوتكنولوجي normal cells اكثر من cancer cellsمشان نزرعه في جسم الانسان ما ننشر جينات الخلايا السرطانية في الجسم

Important features of gene expression

- The presence of regulatable promoters. اقدر اتحكم فيه
- The number of copies of cloned genes.
- لازم يكون بتكاثر جوا الخلية فيطلع اكثر من نسخة فراح تكون الكمية أكبر
- The location of the cloned genes whether inserted into a plasmid or integrated into host genome.
- مكانها لازم يكون محدد عشان اعرف عملية ال expresionاذا صار فيها خلل وين المشكلة الي صارت
- The translation efficiency of the host.
- هسة مثلا نقلناها على بكتيريا هل ribosomesالبكتيريا شغالة نفس ال ribosomesتبعة خلايانا ؟!لاء طبعا مشان هيك لازم نتأكد من ال translationهل هي نفسها ولا لاء وغالبا احنا بنستخدم بكتيريا معدلة جينيا مشان تشابه وظائف الخلايا تبعتنا
- The cellular location of the foreign protein and its stability in the host cell.
- مرات بنلقاهم بستخدموا mammalian cellsبدل البكتيريا لتصنيع بعض الهرمونات مع انها اغلى لانه موقع تكوين الهرمون في البكتيريا بكون جوا الخلية فعملي purificationبتكون بتشمل تكسير البكتيريا نفسها وبالتالي راح تكون مكلفة أكثر بينما في ال mammallian cellsبعمل افراز للحرمون برا الخلية بس بستخرجة وبفلتره

Regulatable promoter

- The presence of a strong regulatable promoter sequence is essential for an effective expression of a cloned gene.
- This is achieved by employing the promoters of E. coli lac (lactose) operon or trp (tryptophan) operon promoted by tryptophan amino acid.
- These promoters have strong affinity for RNA polymerase, and consequently the downstream region (of cloned gene) is transcribed.
  - وبالتالي ال massenger rnaممكن ينتج منهم اسرع وبعطينا البروتين بشكل أنقى
- The promoters thus provide a switch for turning on or turning off the transcription of a cloned gene
  - زي مبدأ كبسة الضو لما يكون فيه promoterبكون فيه expressionولما ما يكون فيه ما بكون فيه expression

Expression vectors

- Produces large amounts of a specific protein زي الانسولين وهرمون النمو
- Permits studies of the structure and function of proteins
  - في بعض الأحيان بنعمل expressionللبروتين بس مشان نشوف ال functionتبعته
- Can be useful when proteins are rare cellular components or difficult to isolate
  - لما يكون اللروتين كميته قليلة أو صعب افصله بنروح بنعمل expressionللجين مشان ينتج كميات اكبر

Common problems with bacterial expression systems

- Low expression levels:
  - change promoter بكون ما بحفز
  - change plasmid
  - change cell type لما يكون الخلية الي بنستخدمها مش مناسبة
  - add rare tRNAs for rare codons on second plasmid

مثلا لو كان الجلايسين بنتجه gcat,gccta وواحد منهم البكتيريا مش متعرفة عليه فبدله rna على البكتيريا بتعرف عليه مشان يترجمها

- Severe protein degradation:
  - *use proteasome inhibitors and other protease inhibitors*
  - *try induction at lower temperature مشان نقلل كمية البروتين الي بخرب*
  - *او بنستخدم بكتيريا ال protease مشيول منها*
- Missing post-translational modification: co-express with kinases etc.
  - في عنا بعض البرروتينات بصيرلها phosforelation مشان يكون فعال فاحنا بنحطلها جين ال kinase وبنعمله co expression معه فبصيرله activation وبتنحل المشكلة

Common problems with bacterial expression systems

- Glycosylation will not be carried out:
  - *use yeast or mammalian expression system*
    - *هذا مش موجود بال prokariotic فمنحول ال eukariotic اذا كان عنا glycoprotein*
- Misfolded protein (inclusion bodies):
  - *co-express with GroEL, a chaperone*
    - *بساعد بعملية ال folding للبروتين*
  - *try refolding buffers*

بنضيف uria على البروتين بعمللها denaturation وبخرب ال structure تبعها بعدين بنسحب ال uria شوي شوي فبرجع يعمل refolding بالطريقة الصحيحة