

DEVELOPMENT OF T-VECTOR FOR DIRECT CLONING OF PCR PRODUCTS

Gritsenko D.A.^{1,2*}, Kenzhebekova R.T.¹, Deryabina N.D.³, Galiakparov N.N.^{1,2}

¹*Institute of plant biology and biotechnology
Timiryazevstreet, 45, Almaty, 050040, Kazakhstan*

²*Institute of plant protection and quarantine
Kazybekbistreet, 1, Almaty, 050000, Kazakhstan*

³*Al-Farabi Kazakh National Universit,
Al-Farabi Street, 71, Almaty, 050000, Kazakhstan*

* *d.kopytina@gmail.com*

ABSTRACT

Thermostable enzymes that lack 3' to 5' exonuclease activity are able to add deoxyadenosine residues to 3'-overhangs in PCR-amplified products, thereby allowing direct cloning of PCR products into T-vectors. A T-vector for cloning of amplified products was created by inserting two *Eam1105I* restriction sites in the multiple cloning site of the plasmid pGEM-3zf(+). The 'excess' *Eam1105I* restriction site within the β -lactamase gene was deleted by point mutation while maintaining the amino acid sequence. Addition of a spacer (282 nucleotides) between the *Eam1105I* sites increased the cleavage efficiency of the enzyme. The developed T-vector reduces the time and cost for cloning PCR products as compared to other methods involving T-vector preparation with enzymatic addition of deoxythymidine to 3'-ends, primer design with suitable restriction sites, and restriction enzyme digestion of PCR products. The developed vector was used to clone the open reading frames of different sizes of grapevine virus A.

Keywords: T-vector, PCR products, cloning.

УДК 577.29

СОЗДАНИЕ Т-ВЕКТОРА ДЛЯ ПРЯМОГО КЛОНИРОВАНИЯ ПЦР-ПРОДУКТОВ

Гриценко Д.А.^{1,2*}, Кенжебекова Р.Т.¹, Дерябина Н.Д.³, Галиакпаров Н.Н.^{1,2}

¹*Институт биологии и биотехнологии растений
ул. Тимирязева, 45, Алматы, 050040, Казахстан*

²*Институт защиты и карантина растений
ул. Казыбек би, 1, Алматы, 050000, Казахстан*

³*Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби
ул. Аль-Фараби, 71, Алматы, 050000, Казахстан*

* *d.kopytina@gmail.com*

АБСТРАКТ

При использовании в полимеразной цепной реакции (ПЦР) термостабильных ферментов без 3'-5'-экзонуклеазной активности продукты амплификации имеют на 3'-концах обеих цепей ДНК неспаренный и неспецифичный дезоксирибонуклеотид, в основном дезоксиаденозин. Эта особенность некоторых полимераз добавлять некодируемый дезоксиаденозин дает возможность прямого клонирования продуктов ПЦР в так называемый Т-вектор. Т-вектор для клонирования амплифицированных продуктов был создан путем вставки двух рестрикционных сайтов *Eam1105I* в сайт множественного клонирования плазмиды pGEM3zf(+). «Лишний» рестрикционный сайт *Eam1105I* в гене β -лактамазы удален путем точечной мутации, с сохранением аминокислотной последовательности. Расщепление по сайтам *Eam1105I* оставляет свободные дезокситимидины на 3'-концах ДНК вектора, что дает возможность

напрямую клонировать ПЦР-продукты. Внесение спейсера– 282 пары нуклеотидов ДНК – между сайтами Eam1105I повышает эффективность расщепления их ферментом. Сконструированный Т-вектор сокращает время и затраты клонирования ПЦР-продуктов по сравнению с другими методами, требующими подготовку Т-вектора, путем ферментативного добавления дезокситимидинов на 3'-концы, дизайн праймеров с подходящими рестрикционными сайтами и расщепления ПЦР-продуктов рестриктазами. Полученный вектор использовался для клонирования открытых рамок считывания вируса А винограда разного размера.

Ключевые слова: Т-вектор, ПЦР-продукты, клонирование.

ВВЕДЕНИЕ

Клонирование ДНК используется во многих областях молекулярной биологии, а именно в получении рекомбинантных белков, создании геномных библиотек, генной терапии, в создании трансгенных растений и так далее. Клонирование ДНК в нужный вектор может осуществляться путем использования соответствующих рестрикционных сайтов, путем прямого клонирования ПЦР-продуктов, либо используя лигазонезависимый метод. В случае использования соответствующих рестрикционных сайтов фрагмент ДНК для клонирования расщепляется необходимыми эндонуклеазами, которые имеются как в ДНК, так и в векторе, в который будет внедрен фрагмент ДНК. Клонирование может осуществляться как по «липким», так и по «тупым» концам в зависимости от того, как расщепляет эндонуклеаза молекулу ДНК. Данный метод очень удобен для субклонирования, когда необходимый фрагмент ДНК переносится из одного вектора в другой. Например, в случае переноса из вектора для клонирования в вектор для экспрессии генов. Для клонирования ПЦР-продуктов данный метод имеет ряд недостатков. Прежде всего, необходимо вносить рестрикционные сайты в праймеры, если рестрикционные сайты находятся рядом с концами амплифицированной молекулы ДНК, их эффективность расщепления намного снижается [1]. Внесение рестрикционных сайтов в праймеры может повлечь за собой проблемы амплификации нужного фрагмента ДНК. Лигазонезависимый метод при клонировании ПЦР-продуктов требует наличия дополнительных 10-12 неспаренных нуклеотидов на 3'-концах амплифицированной молекулы ДНК. Данные неспаренные концы в дальнейшем отжигаются с комплементарными концами соответствующего вектора. Недостатками данного метода для клонирования ПЦР-продуктов является необходимость синтеза очень длинных праймеров и модифицированных методов амплификации [2]. 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. Использование данного метода возможно благодаря Taq-полимеразе, которая добавляет дезоксиаденозины на 3'-концах ПЦР-продуктов. Клонирование амплифицированных продуктов осуществляется в Т-вектор, который имеет на 3'-концах свободные дезокситимидины. Существует несколько стратегий создания Т-векторов, одна из них использует рестрикцию вектора, с образованием тупых концов и с последующим ферментативным добавлением дезокситимидинов на 3'-концы с помощью Taq-полимеразы или терминальной трансферазы [3]. Также получение Т-вектора возможно путем использования эндонуклеаз AhdI, BciVI, BfiI, HphI, MnlI, TaaI и XcmI [4-7], после расщепления которыми на 3'-концах остаются свободные дезокситимидины.

Первый метод широко используется, но имеет ряд недостатков, которые включают такие факторы как: получение большого количества колоний, не несущих целевого ПЦР-фрагмента в векторе ввиду неполного расщепления всех молекул плазмиды, неравномерного добавления на 3'-концы дезокситимидинов, требование тщательной очистки плазмиды перед клонированием. Преодоление данных проблем стало возможным благодаря использованию второго метода. Неполное расщепление вектора стало возможным визуализировать и преодолеть благодаря внесению между сайтами вышеупомянутых эндонуклеаз спейсеров. Известно, что близкорасположенные сайты рестрикции не полностью расщепляются из-за плохого узнавания сайтов ферментами, внесение дополнительных вставок между ними повышает эффективность расщепления [8]. После расщепления такими эндонуклеазами, в частности Eam1105I, дезокситимидины присутствуют на обоих 3'-концах вектора, что в разы повышает эффективность клонирования. Создание Т-вектора дает возможность быстро отбирать нужные амплифицированные продукты и использовать их в дальнейших целях. В случае клонирования разных открытых рамок считывания вируса А винограда в созданный Т-вектор дается возможность модифицировать геном вируса путем внесения дополнительных последовательностей ДНК, а также изменить последовательность гена, кодирующего белок оболочки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и вектора

В работе был использован штамм бактерий *Escherichiacoli* DH5. Для создания T-pGEM-3zf(+)-вектора использовалась плазмида pGEM3zf+. Амплификация открытых рамок считывания вируса А винограда осуществлялась при использовании вектора pCASS-GVA, несущего полный геном инфекционного клона данного вируса.

Среды

Была использована среда Лурия-Бертани(ЛБ) Sigma-Aldrich, концентрация антибиотика ампициллина составляла 100 ug/ml.

Реактивы

Все реактивы, использованные в работе, были производства Sigma-Aldrich, ThermoScientific с категорией чистоты «Для молекулярной биологии».

Удаление сайта Eam1105I из гена, кодирующего β-лактамазу в плазмиде pGEM3zf(+)

Ген, реализующий устойчивость к ампициллину, кодирующий β-лактамазу в плазмиде pGEM3zf(+), содержит рестрикционный сайт Eam1105I, как это показано на рисунке 1. Удаление сайта проводилось ПЦР-методом с помощью специфичных праймеров, которые изменяли последовательность Eam1105I сайта без изменения аминокислотной последовательности β-лактамазы. Амплификация проводилась в 25 мкл реакционной смеси, состоящей из 2.5 мкл 10X Pfuбуфера (200 мМ TrisHCl, pH 8.8, 100мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ KCl, 1 мг/мл BSA, 1% TritonX-100), 2.5 мМ MgSO₄, 0.2мМ дНТФ, 2 мМ каждого праймера (5'-tgctgggacccccctagtgtagataac-3' и 5'-actatggatgaacgaatagacagatc-3'), 2,5 ед. Pfu полимеразы и 30 нг плазмиды pGEM3zf(+).

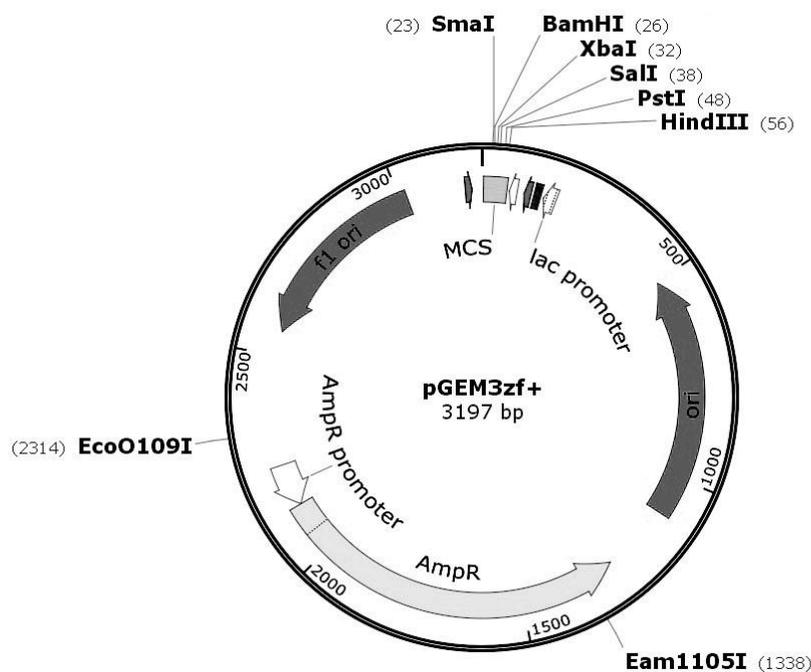


Рис. 1.ИзображениевекторарGEM3zf+

Fig. 1. Image of pGEM 3zf+vector

Амплификацию проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C в течение 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[8]. 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(ThermoScientific), 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 1хТ4 буфера лигазы (ThermoScientific), 150 нг очищенного ПЦР-продукта и 5 ед. Т4 ДНК лигазы (ThermoScientific). Реакционная смесь, после инкубации при +4°C в течение 14 часов, использовалась для трансформации бактерий. Полученная плазмида с удаленным Eam1105I сайтом в гене β-лактамазы маркирована как m-pGEM 3zf(+).

Внесение рестрикционных сайтов Eam1105I в область множественного клонирования плазмиды m-pGEM 3zf(+)

Два праймера, 5'-tcgaccgaccttgagtctctagagacctaactcag-3' и 5'-gatcctgacgttaggtctctagagacctaaggtcgg-3', по 2мМ каждого, в присутствии 75 мМ TrisHCl, 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 рестрикционный 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[9]. Полученные клоны были проверены на наличие вставленной последовательности рестрикцией по сайтам BamHI и SalI и секвенированием. Плазмида m-pGEM3zf(+), содержащая рестрикционные сайты Eam1105I, была названа T-3zf(+).

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

Проверка эффективности полученного T-вектора

Для проверки эффективности клонирования ПЦР-продуктов в созданный T-вектор использовались фрагменты генома вируса А винограда размером 2500 п.н (участок 2-5 ОРС), 750 п.н (ОРС4), 400 п.н (ОРС5), синтезированные с помощью специфичных праймеров (таблица 1). Амплификацию этих фрагментов проводили в 25 мкл, содержащих буфер полимеразы (20 мМ TrisHCl, pH 8.8, 10мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ KCl, 1 мг/мл BSA, 0,1% TritonX-100), 2,5 мМ MgSO₄, 0,2 мМ дНТФ, 2 мМ каждого праймера, 2,5 ед. Taq-полимеразы 40 нг вектора pCASS-GVA, несущего полный геном вируса А винограда. Амплификацию проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C в течение 2 мин, 30 циклов состоящих из денатурации при 94°C – 20 сек., отжига 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 элонгации при 72°C – от 30 до 90 сек., в зависимости от размера продукта, после 30 циклов финальная инкубация при 72°C – 15 мин.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов для амплификации участков генома вируса А винограда различных размеров

Table 1. The sequences of oligonucleotides for the amplification of the grapevine virus A genome

Размер продукта ПЦР, пар нуклеотидов	Последовательность праймеров
The size of PCR product, base pairs	The sequence of the primers
400	5'-actgtgatacaggctatgca-3'
	5'-ctcatcgtctgaggtttcta-3'
750	5'-gaagacatatggcacactacgccaag-3'
	5'-aaacgtggatcccccgcgagaacg-3'
2500	5'-atatagacgtcgtgctcagcaag-3'
	5'-ctcatcgtctgaggtttcta-3'

Очистка амплифицированных последовательностей осуществлялась из агарозного геля с помощью кита GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisherScientific). Лигирование продуктов ПЦР в плазмиду T-pGEM-3zf(+) проводили в 10 мкл, содержащих 1хбуфер Т4-ДНК лигазы (ThermoScientific), 300 нг очищенного ПЦР продукта, 100 нг вектора, порезанного по сайтам Eam1105I, 5 ед. Т4-ДНК лигазы (ThermoScientific). Реакционная смесь инкубировалась при +4°C 16 часов с последующей трансформацией клеток *E.coli* штамм DH5α.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

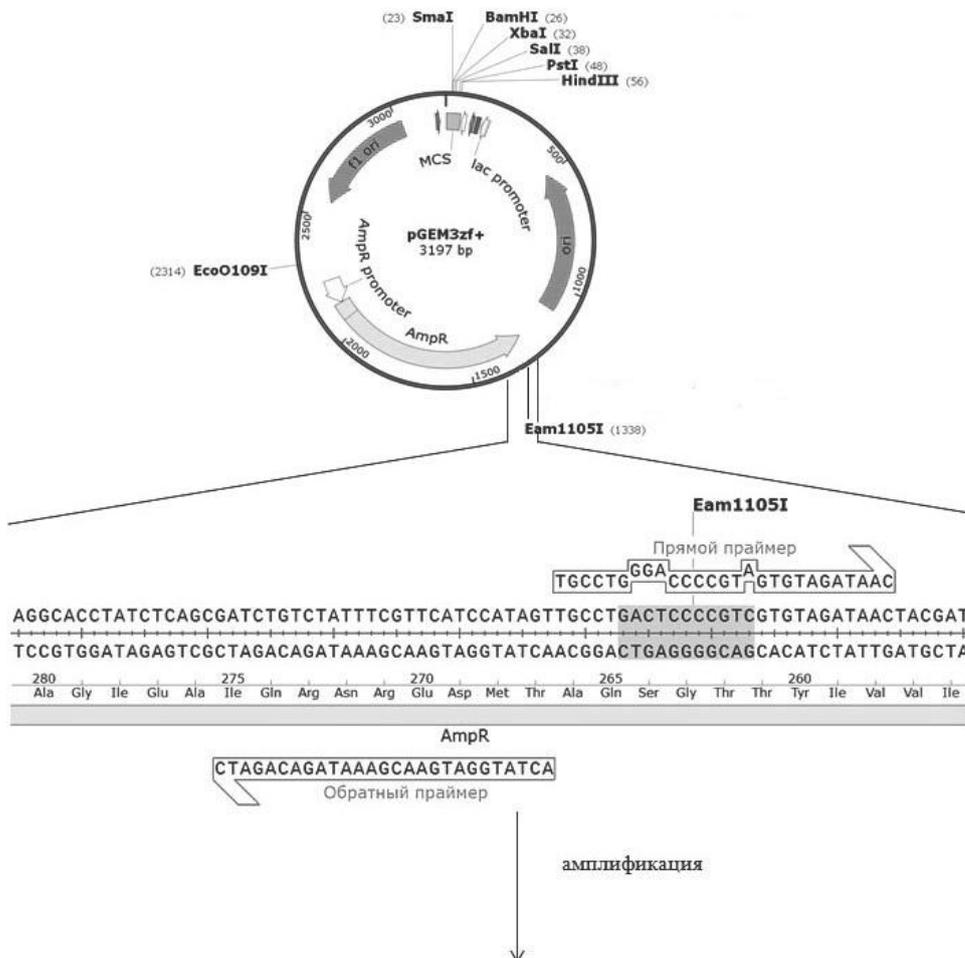
Создание T-вектора было осуществлено в три этапа: удаление сайта Eam1105I из гена, кодирующего β-лактамазу; внесение сайтов Eam1105I в область множественного клонирования плазмиды pGEM 3zf(+); внесение спейсера между сайтами Eam1105I. На рисунке 2 изображена нуклеотидная последовательность распознавания ферментом Eam1105I.



Рис. 2. Изображение нуклеотидной последовательности, распознаваемой эндонуклеазой Eam1105I

Fig. 2. Image of nucleotide site recognized by Eam1105I

На рисунке 3 изображена стадия удаления сайта Eam1105I из гена, кодирующего β-лактамазу, с помощью точечных мутаций четырех нуклеотидов. После удаления сайта Eam1105I из гена β-лактамазы аминокислотная последовательность фермента сохранена прежней.



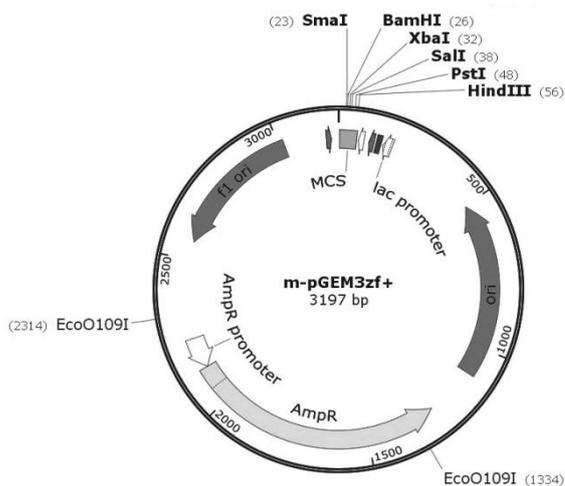


Рис. 3. Иллюстрация получения m-pGEM3zf+вектор

Fig.3. The illustration of obtaining of m-pGEM3zf+vector

На рисунке 4 приведена схема полученного Т-вектора, содержащего спейсер между сайтами Eam1105I.

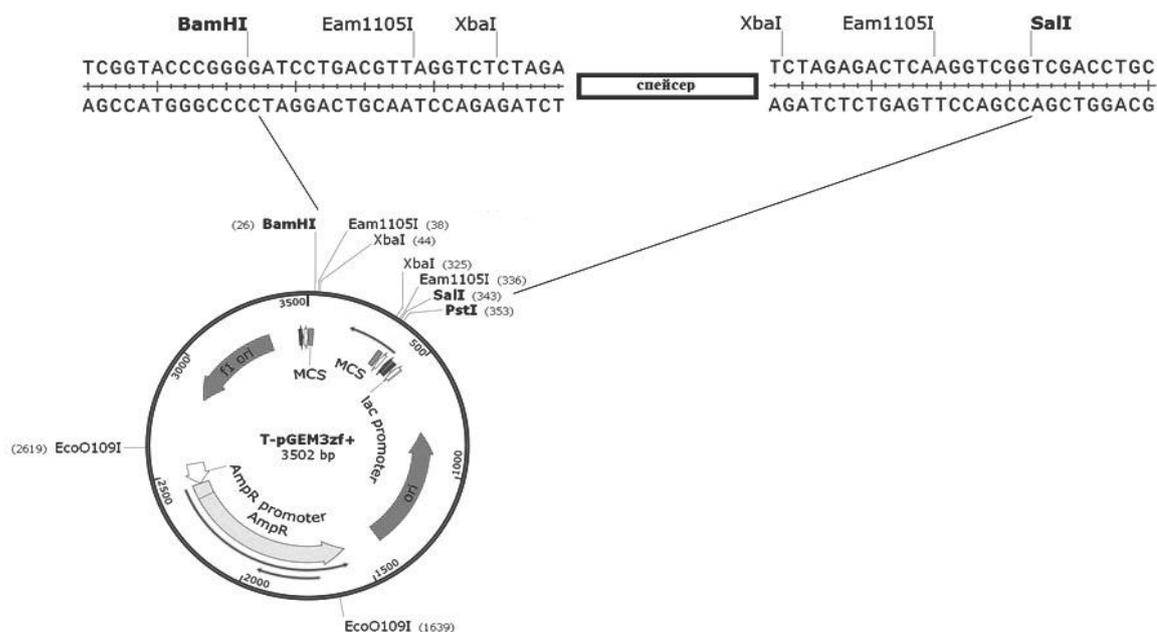
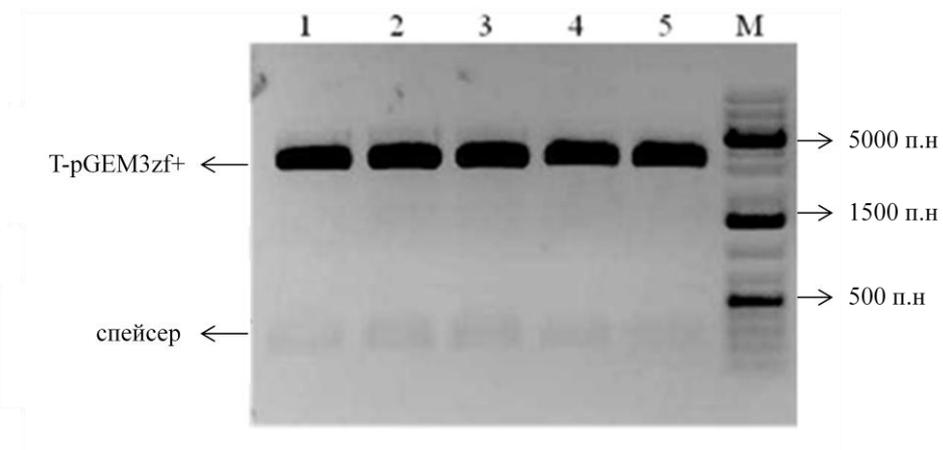


Рис.4. Иллюстрация вектора T-pGEM3zf+

Fig.4. The illustration of T-pGEM3zf+vector

Внесенная олигонуклеотидная последовательность в 49 п.н с Eam1105I сайтами в сайт множественного клонирования вектора m-pGEM3zf(+) была анализирована секвенированием с использованием T7-прайма и BigDye Terminator v3.1 на генетическом анализаторе ABI Prism 310. Анализ вставки спейсера между Eam1105I сайтами по сайту XbaI проводился рестрикцией по сайтам EcoRI и HindIII, для работы был отобран 1-й клон (рис.5).



M – маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder; 1-5 – клоны Т-вектора со вставкой по сайту XbaI

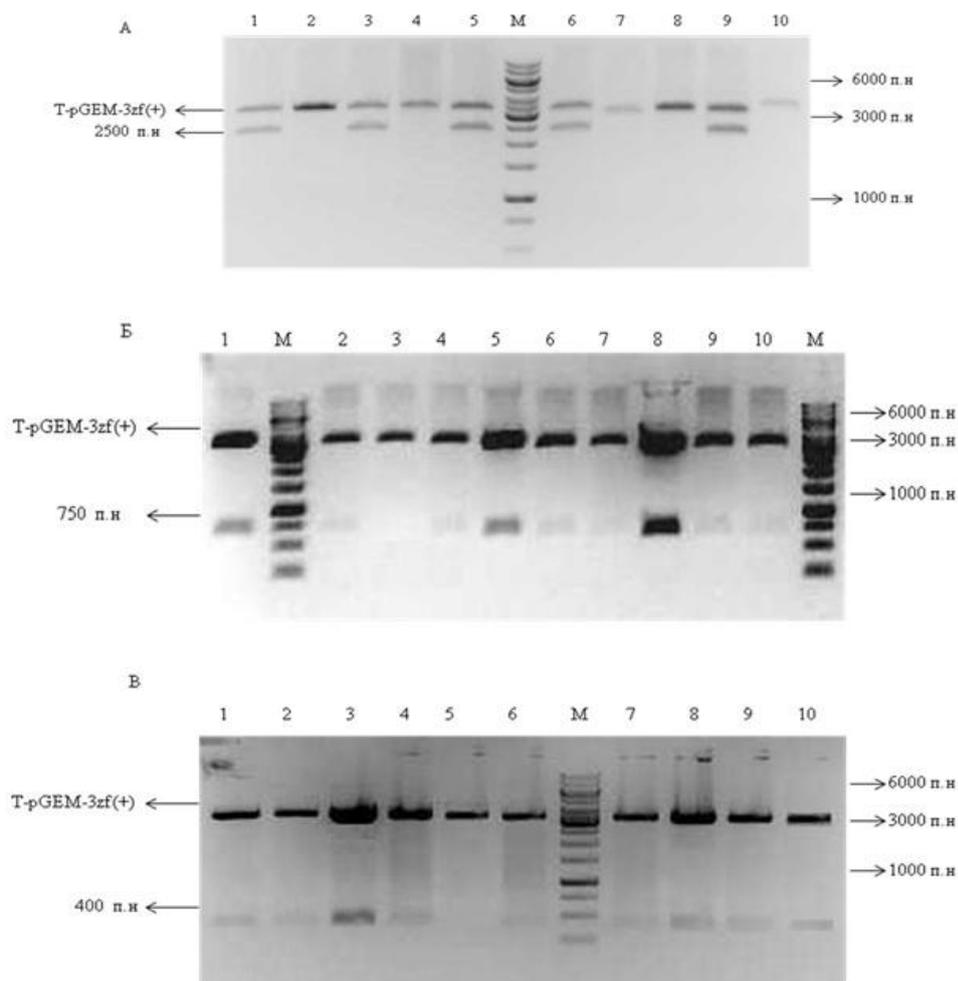
Рис.5. Изображение гель-электрофореза расщепления Т-вектора по сайтам EcoRI и HindIII

M–marker (GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder); from 1 to 5 – clones of T-vector that contain the spacer between Eam1105I sites

Fig.5. Gel electrophoresis analysis of the cleavage of T- vector with HindIII and EcoRI sites

После полного расщепления отобранного клона Т-вектора по сайтам Eam1105Iлинеаризованный вектор с неспаренными дезокситимидинами на 3'-концах элюировался из геля с помощью GeneJETGelExtractionKit и использовался для клонирования последовательностей 2500 п.н. (участок 2-5 ОРС вируса А винограда), 750 п.н. (ОРС4), 400 п.н. (ОРС5).

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 (рис.6).



А. 1-10 –плазмиднаяДНК,выделеннаяиз 10 колоний (Т-рGEM-3zf(+)+ 2500 п.н); Б. 1-10 – плазмиднаяДНК,выделеннаяиз 10 колоний (Т-рGEM-3zf(+)+ 750 п.н); В. 1-10 –плазмиднаяДНК,выделеннаяиз 10 колоний (Т-рGEM-3zf(+)+ 400 п.н); М–маркерGeneRuler 1 kb DNA Ladder

Рис. 6. Изображение гель-электрофореза расщепления рекомбинантного Т-вектора по сайтам EcoRI и HindIII

А. 1-10 – plasmid DNA was isolated from 10 colonies (T-pGEM-3zf (+) + 2500 bp);Б. 1-10 – plasmid DNA was isolated from 10 colonies (T-pGEM-3zf (+) + 750 bp); В. 1-10 – plasmid DNA was isolated from 10 colonies (T-pGEM-3zf (+) + 400 bp); М – marker (GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder)

Fig. 6. Gel electrophoresis analysis of the cleavage of the recombinant T-vector with HindIII and EcoRI sites

На рисунке 6 блок А видно наличие вставки размером 2500 пар нуклеотидов в пяти клонх из 10. Для ПЦР продуктов размером 400 и 750 пар нуклеотидов соотношение позитивных клонов к негативным составило 9:1. Таким образом эффективность клонирования для 2500 нуклеотидов составила 50%, а для 750 и 400 п.н– 90%. ПЦР-продукты, клонированные в полученный вектор, могут быть секвенированы с использованием универсальных M13 прямой, M13 обратный, T7 или SP6 праймеров. Так же, без модификаций могут быть использованы для синтеза РНК с помощью T7 или SP6 РНК полимераз для использования *in vitro* трансляции или в качестве РНК проб, например, для норзернблота.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование Т-векторов в рекомбинантных технологиях в настоящий момент является одним из эффективных методов клонирования ПЦР-продуктов. Для создания Т-вектора использовался мутагенез β-лактамазы методом ПЦР, а также внесение двух Eam1105I сайтов в область множественного клонирования плазмиды pGEM3zf+. Кроме того, внесенный спейсер между сайтами рестрикции Eam1105I дал возможность визуализировать результат расщепления Т-вектора по сайтам Eam1105I. Созданный Т-вектор использовался для клонирования ДНК фрагментов разных размеров с эффективностью для фрагментов 400, 750 п.н. – 90%, а для фрагмента размером 2500 п.н. – 50.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта «Разработка вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях» (1334/ГФ4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaufman D.L., Evans G.A. Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products // *Biotechnology*. – 1990. – Vol.9. – P. 306.
2. Holton T.A., Graham M.W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – Vol.19. – P.1156.
3. Cha J., Bishai W., Chandrasegaran S. New vectors for direct cloning of PCR products // *Gen.* – 1993. – Vol. 136. – P.369-370.
4. Jo C., Jo S.A. A simple method to construct T-vectors using Xcm I cassettes amplified by nonspecific PCR // *Plasmid*. – 2001. – Vol.45. – P.37-40.
5. Kovalic D.J., Kwak H., Weisblum B. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – Vol.19.
6. Yaofeng Zhao. Construction of a High Efficiency PCR Products Cloning T Vector Using pGEM-5zf (+) // *Avicenna J Med Biotechnol.* – 1991. – Vol.1. – P. 37-39.
7. Shu-Ye Jiang, Jeevanandam Vanitha, Yanan Bai, Srinivasan Ramachandran. A Novel Binary T-Vector with the GFP Reporter Gene for Promoter Characterization // *PLoS One.* – 2014. – Vol.9. – P.1-11.
8. Lacks S., Greenberg B. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation // *J. Mol. Biol.* – 1977. – Vol.114. – P. 153-168.
9. Froger A. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method // *J Vis Exp.* – 2007. – Vol. 2007. – P. 253.

Патенты

1. Ли Яньпин. 种构建t载体的方法 [T-vector construction method]. CN101948862A, 2012.
2. Чжоу Хай Мэн, Ван Хуэчен. Т-载体及其构建方法 [T-vector and its construction method]. CN 100494384 C, 2009.
3. Corinna Herrnstadt, Joseph M. Fernandez, Lloyd Smith, David A. Mead. Direct cloning of PCR amplified nucleic acids. US 5487993 A, 1996.
4. David A. Mead, Ronald Godiska, Thomas W. Schoenfeld, Spencer Hermanson. Vectors, kits and methods for cloning dna. US 20080166773 A1, 2008.

REFERENCES

1. Kaufman D.L., Evans G.A. Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechnology*, 1990, vol.9, pp. 306-311.
2. Holton T.A., Graham M.W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol.19, pp.1156-1161.
3. Cha J., Bishai W., Chandrasegaran S. New vectors for direct cloning of PCR products. *Gene*, 1993, vol. 136, pp.369-370.
4. Jo C., Jo S.A. A simple method to construct T-vectors using Xcm I cassettes amplified by nonspecific PCR. *Plasmid*, 2001, vol.45, pp. 37-40.
5. Kovalic D.J., Kwak H., Weisblum B. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol.19, pp.1886-1891.
6. Yaofeng Zhao. Construction of a High Efficiency PCR Products Cloning T-vector Using pGEM-5zf (+). *Avicenna J Med Biotechnol*, 1991, vol.1, pp. 37-39.

7. Shu-Ye Jiang, JeevanandamVanitha, Yanan Bai, Srinivasan Ramachandran. A Novel Binary T-vector with the GFP Reporter Gene for Promoter Characterization. *PLoS One*, 2014, vol.9, pp.1-11.10.1371/journal.pone.0107328.

8. Lacks S., Greenberg B. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J. Mol. Biol.*, 1977, vol.114, pp. 153-168.20509.

9. Froger A. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *J Vis Exp*, 2007, vol. 2007, pp. 253.18997900.

ПТР ӨНІМДЕРІН ТУРА КЛОНДАУ ҮШІН Т-ВЕКТОРЫН ЖАСАУ

Д.А. Гриценко^{1,2*}, Р.Т. Кенжебекова¹, Н.Д. Дерябина³, Н.Н. Галиакпаров^{1,2}

*Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Тимирязева к-сі,
45, Алматы, 050040, Қазақстан*

*Өсімдіктер карантині және қорғау институты, Қазыбек би к-сі, 1, Алматы, 050000,
Қазақстан*

*Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Әл-Фараби к-сі, 71, Алматы, 050000,
Қазақстан*

**d.kopytina@gmail.com*

ТҮЙІН

Полимеразді тізбек реакциясында (ПТР) термотұрақты 3'-5'-экзонуклеазалық белсендіксіз ферменттерді пайдаланған жағдайда, амплификация өнімдерінде ДНҚ-ның екі тізбегінің 3'-аяғында көбінесе дезоксиаденозин жұптаспаған және спецификалық емес дезоксинуклеотид пайда болады. Кейбір полимеразалардың кодталмайтын дезоксиаденозинді қосу ерекшелігі, аталған Т-векторға ПТР өнімдерін тұра клондау мүмкіндігін береді. Амплификация өнімдерін клондау үшін, екі Eam1105I рестрикциялық сайттарды pGEM 3zf(+) плазмиданың көптеген клондау сайтына енгізу арқылы Т-векторы жасалынды. «Артық» Eam1105I рестрикциялық сайты β-лактомазаның генінде аминқышқылдық ретін сақтай отырып, нүктелік мутациямен жойылған. Eam1105I сайттарында ажырауы ДНҚ вектордың 3'-аяғында бос дезокситимидиндерді қалдырады, яғни ПТР өнімдерін тура клондау мүмкіндігін береді. Eam1105I сайттардың арасына ДНҚ 282 нуклеотид жұптан тұратын спейсердің енгізуі фермент арқылы ажырау тиімділігін көбейтеді. Т-векторды дайындау, дезокситимидиндерді ферменттік жолмен 3'-аяғына қосу, қолайлы рестрикциялық сайттармен праймерлердің дизайны, ПТР өнімдерін рестриктазалармен ажырауды қажет ететін басқа әдістерге қарағанда, құрастырылған Т-вектор ПТР өнімдерін клондауға арналған уақыт пен шығындарды үнемдейді. Алынған вектор жүзімнің А -вирусының әртүрлі өлшемдерін ашық түрде оқу және клондау жұмыстарында пайдаланылды.

Негізгі сөздер: Т- вектор, ПТР-өнім, клондау