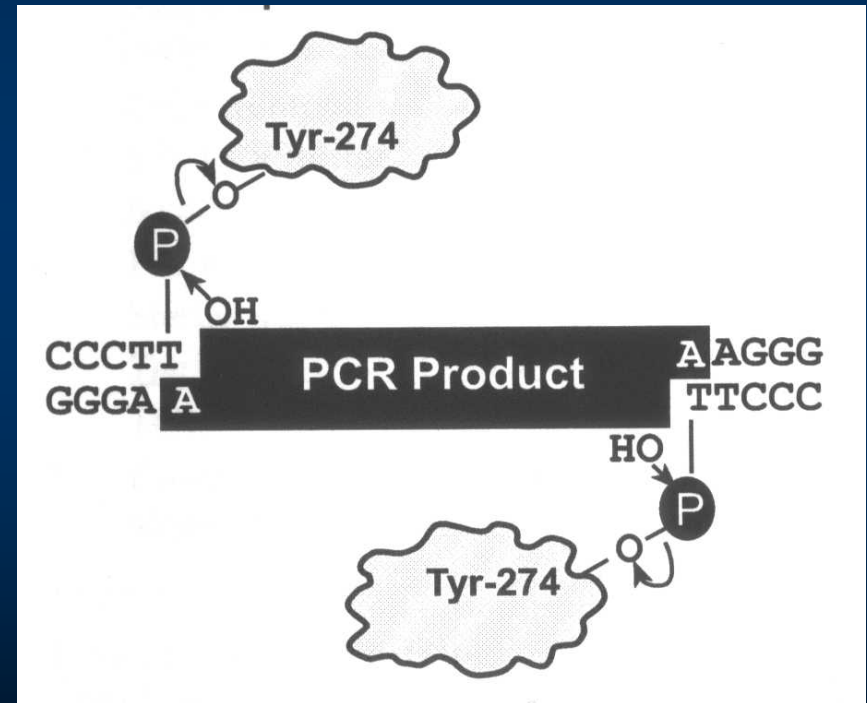
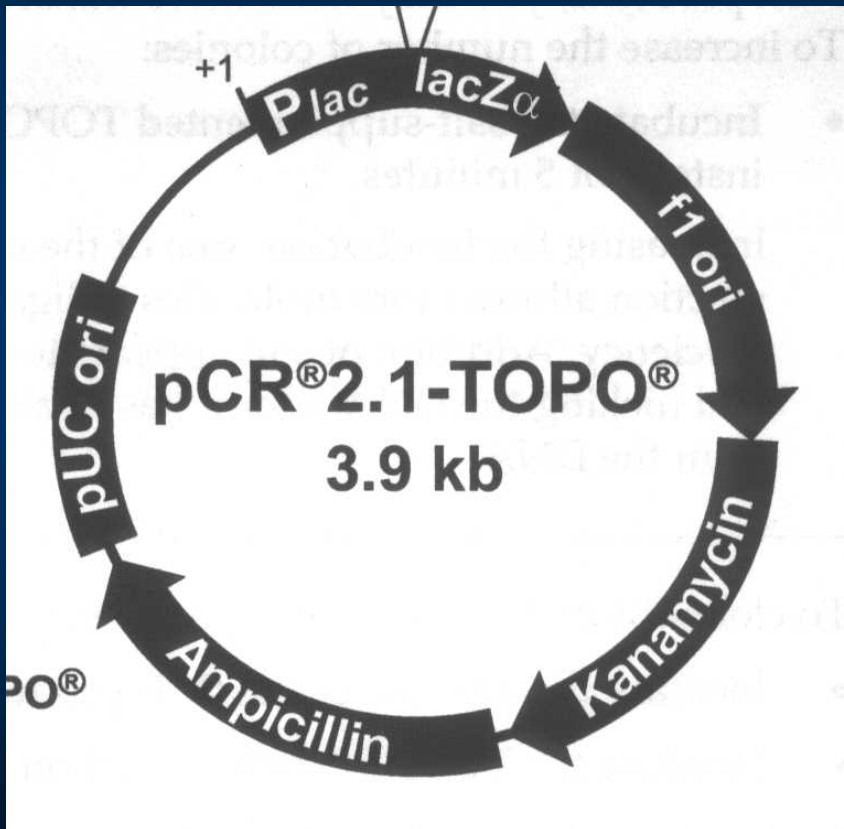


PRAKTIKUM č. 24

KLONOVÁNÍ DNA

**Základy genového inženýrství:
Klonování PCR produktu
do vektoru a transformace *E. coli***

Komerčně dostupný vektor pCR[®]2.1-TOPO a princip TOPO klonování (Invitrogen)

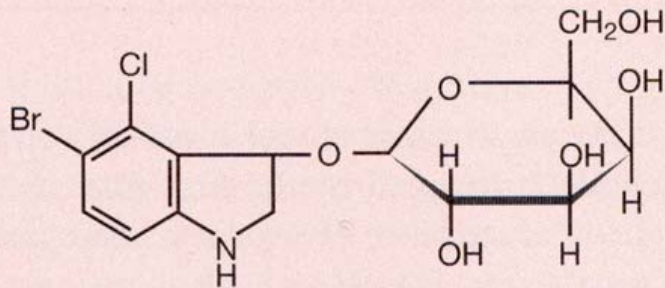


Klonují se PCR produkty mající A přesah – amplifikované Taq polymerázou

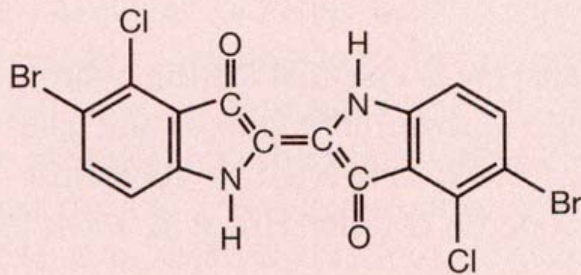
Vektor pCR[®]2.1-TOPO

- Obsahuje fragment genu *lacZa*, který kóduje část enzymu β -galaktozidázy
- Chromosom hostitelské bakterie obsahuje fragment Ω
- Kombinací těchto fragmentů vzniká aktivní β -galaktozidáza
- Aktivitu tohoto enzymu lze detegovat
- Přidáním derepresoru *lac*-promotoru (IPTG) do media dosáhneme exprese fragmentu genu *lacZa* z vektoru
- V případě přítomnosti chromogenního substrátu (X-gal) v mediu, je tato bezbarvá látka aktivitou β -galaktozidázy přeměněna na barevný produkt

5-bromo-4-chloro-indoyl β -D galactoside



β -galactosidase



5-bromo-4-chloro-indigo

X-gal

β -galaktozidáza

Modrý produkt

Klonování PCR produktu

- Voda pro mol. biologii 2 μ l
- Komerčně dostupný klonovací vektor pCR[®] 2.1-TOPO 0,3 μ l
- Klonovaný PCR produkt
(připravený ve cvičení č. 22) 2 μ l

- Inkubace 5 minut při lab. teplotě
- Inkubace 2 minuty na ledu
- Následuje transformace vzniklého konstruktů

Příprava ploten pro transformaci

- Budeme mít k dispozici agarové plotny obsahující ampicilin (konc. 100 $\mu\text{g/ml}$)
- Pro vyvinutí barevné reakce musíme přidat IPTG (derepresor exprese z *lac*-promotoru) a chromogenní substrát X-gal
- Na jejich povrch rozetřeme hokejkou 50 μl roztoku IPTG a 50 μl roztoku X-gal
- Po půl hodině jsou misky připraveny k vysetí transformačních směsí

Transformace vzniklého konstruktů do buněk *E. coli*

- Do zkumavky na ledu přidáme 50 μ l kompetentních buněk (= schopných přijmout cizorodou DNA)
- Paralelní zkumavka bude obsahovat 50 μ l kompetentních buněk a 1 μ l cirkulárního plazmidu pCR 2.1 TOPO
- Obě zkumavky inkubujeme 20 minut na ledu a podrobíme teplotnímu šoku ve vodní lázni \Rightarrow 42 °C po dobu 90 sekund
- Znovu inkubujeme na ledu po dobu 10 minut a vysejeme na plotny s ampicilinem, IPTG a X-gal