

Transformace 1 - KLONOVÁNÍ

KLON soubor identických buněk (organizmů)
pocházejících ze společného předka

KLONOVÁNÍ proces tvorby klonů



DNA Klonování je základem genového inženýrství,
tj., vytváření pozměněných nebo nových genů
a jejich zavádění do genomu organizmů.

DNA klon: molekulární klon = segment DNA
vektorem přenesený do hostitelské buňky
a v ní se replikuje.

Cizorodá DNA spojená s vektorem = **rekombinantní
DNA**

Rekombinantní DNA, která je určena ke klonování se
nazývá **klonovaná DNA**

Tři základní kroky klonování DNA

- 1. příprava rekombinantní molekuly DNA**
- 2. přenos rekombinantní molekuly DNA do
hostitelské buňky**
- 3. selekce klonů obsahujících rekombinantní
DNA**

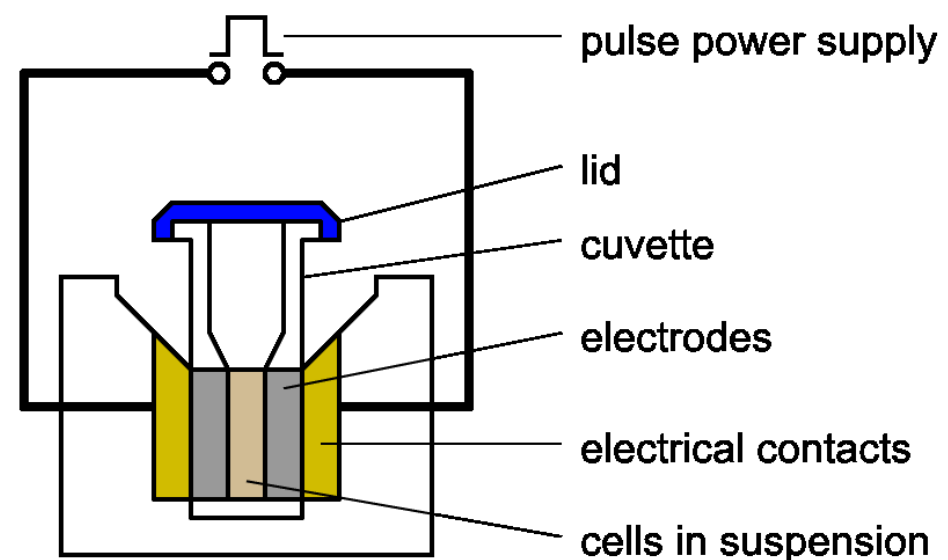
Původ (příprava) DNA

- izolovaná z donorového organismu**
- komplementární (cDNA připravená zpětnou
transkripcí z mRNA)**
- připravená uměle chemickou syntézou**

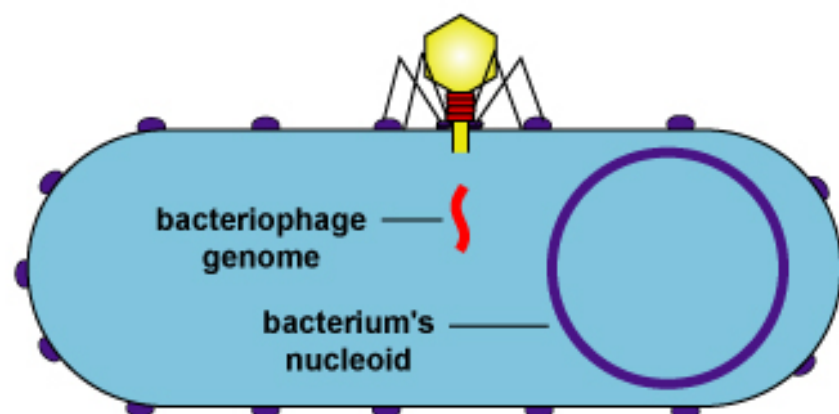
Metody přenosu DNA do prokaryotických buněk

Chemické – roztoky dvojmocných iontů solí
+ teplota

(Bio)Fyzikální – elektropor



Pomocí virů



Metody přenosu DNA do eukaryotických buněk

Chemické – lipofekce, DEAE dextran, fosforečnan vápenatý, ...

(Bio)fyzikální – elektroporace, biolistika, mikroinjekce



Viry – !!!!! Bezpečnost !!!!!

Způsoby přenosu DNA

Transformace. Přímý přenos DNA izolované z donorové buňky přes cytoplazmatickou membránu do buňky recipientní, v jejímž fenotypu se může vnesená genetická informace projevit. Termín se používá pro prokaryotické buňky (u eukaryot je spíš nádorová transformace)

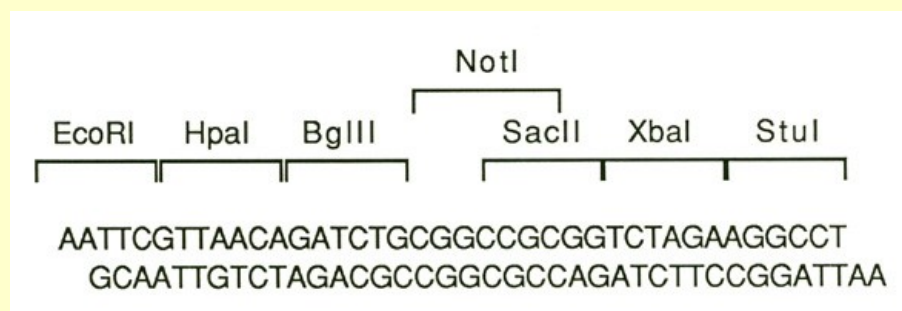
Transfekce. Přenos DNA do eukaryotických buněk (lipofekční činidla, elektroporace, viry ...)

Transdukce. Přenos DNA – sekvence prostřednictvím viru z buňky donorové do recipientní, v jejímž fenotypu se může vnesená genetická informace projevit (opět termín spíše pro prokaryota)

VLASTNOSTI PLAZMIDOVÝCH VEKTORŮ

Autonomní replikace v bakteriální buňce
(schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci)

Vhodné spektrum restričních míst



Gen se selektivním znakem

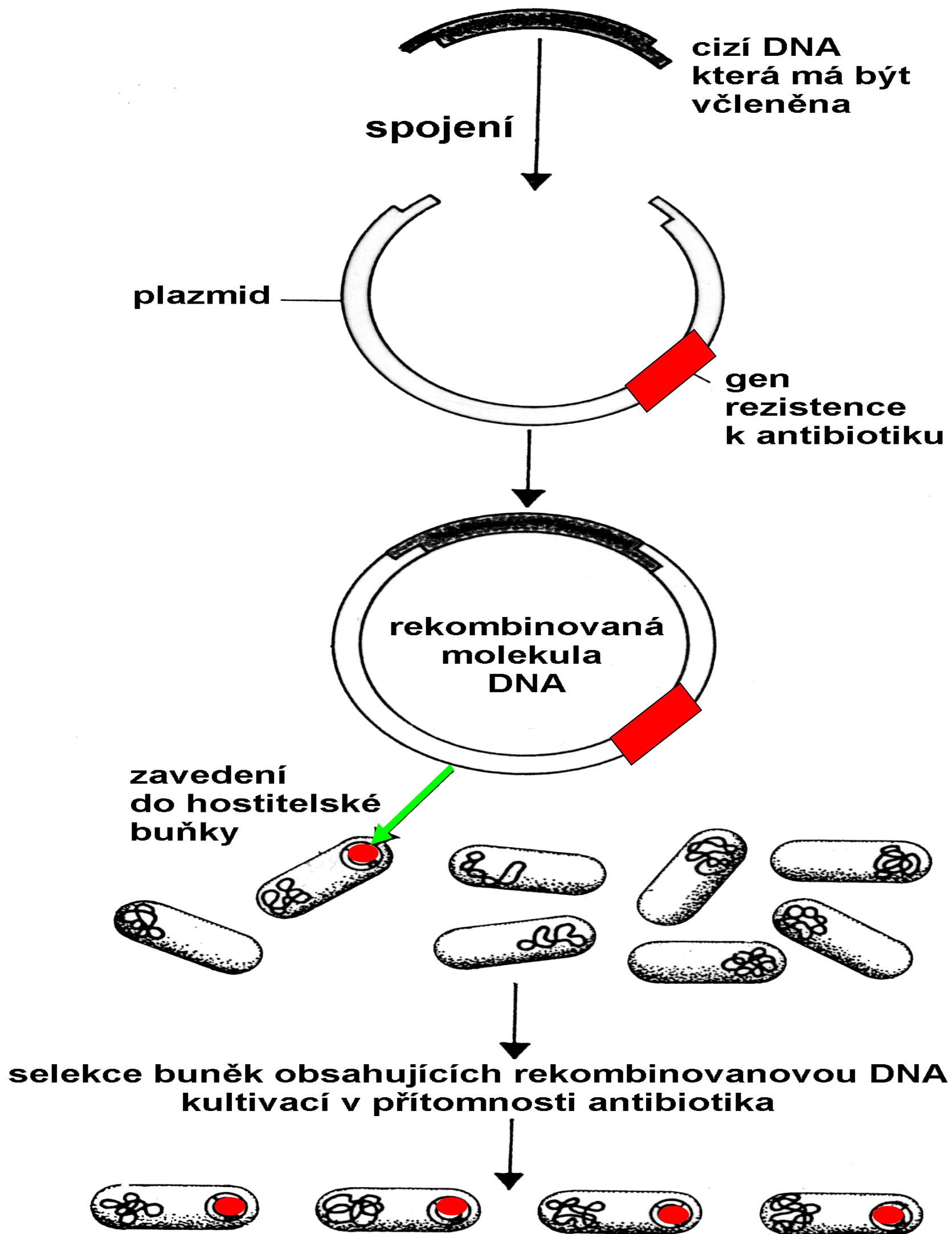
- beta-laktamáza → rezistence na ampicilin

Plazmid nesmí být konjugativní tj. nesmí mít transferové geny (kódující pilusy)

Co nejmenší velikost

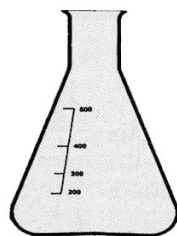
Vícekopiový

Klonování DNA v plazmidu



Příprava kompetentních buněk

Na třepačce



kultura *E. coli* narostlá v 20 ml
LB bujony do $OD_{600} = 0,3$

ochladit na ledu $0\text{ }^{\circ}\text{C}$



centrifugace 10 minut při 3000 rpm/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$



← SUPERNATANT ODLÍT

sediment resuspendovat v polovině objemu ledového roztoku
 $0,05\text{M CaCl}_2$ a ponechat na ledu (v lednici) přes noc



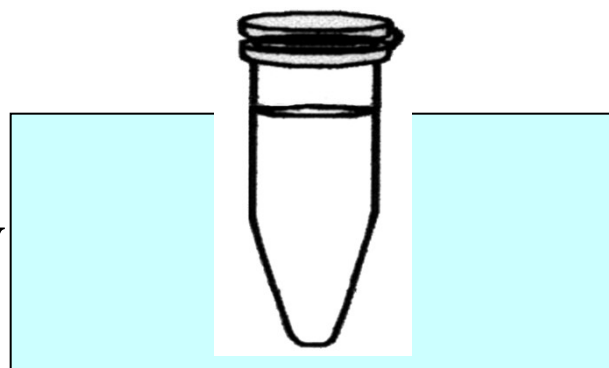
centrifugace 10 minut při 3000 rpm/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

← SUPERNATANT ODLÍT

sediment resuspendovat v $1/10$ výchozího objemu
(2 ml) ledového roztoku $0,05\text{M CaCl}_2$



Kompetentní buňky



úchova na ledu nebo
při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v glycerolu

TRANSFORMACE SCHÉMA

V Epp. mikrozkuhavce je 30 μ l kompet. buněk



Naředit DNA vektoru na 10 ng/ μ l v TE

K 1 μ l přidat 30 μ l kompetentních buněk

Opatrně promíchat, nechat stát v ledu 30 min

Teplotní šok

Umístit při 42 °C/40 sec nebo 37 °C/3 min

↓
Na ledu nechat 2 min, přidat 1ml LB bujónu

↓
Inkubace ve vodní třepací lázni při 37°C/45min

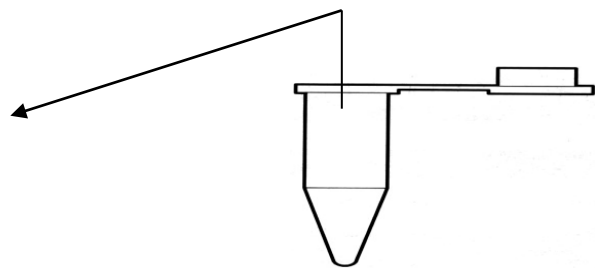


Transformace pokračování

Po inkubaci



centrifugace při 5 000 rpm/ 5 min



odlít supernatant

ve zbývajícím medium resuspendovat
sediment buněk



suspenzi vyočkovat na LB agar +
100 $\mu\text{g/ml}$ **AMP**



Naočkované misky
inkubovat dnem vzhůru
při 37 °C/24 hod

Stanovení titru bakteriálních buněk

V mikrozkuhavce je 30 μl kompet. buněk

- stejný postup jako předchozí

Ale:

- buňky naředit 10^4 , 10^5 , 10^6 x
- místo DNA použijeme sterilní vodu
- na závěr buňky vysít na misky bez ampicilinu

**Hodnocení: odečet počet kolonií transformantů
stanovení účinnosti transformace**