

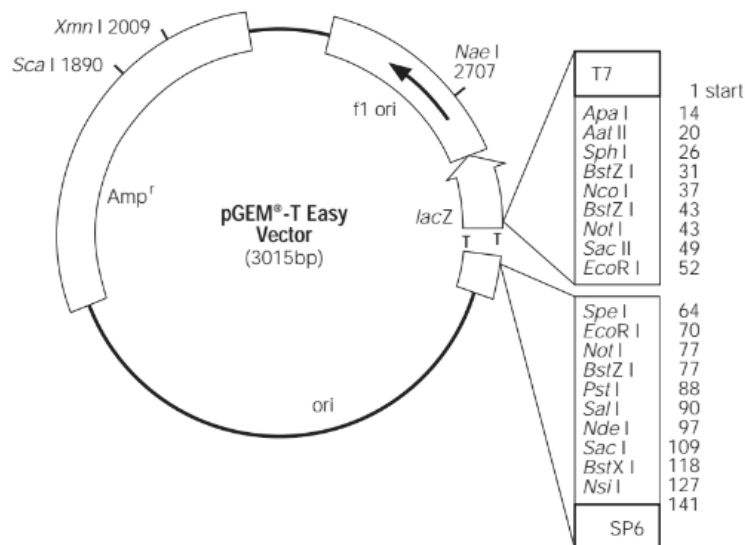
Jméno a uço:	Datum:
--------------	--------

ÚLOHA C

Klonování PCR produktu do plasmidu

TEORETICKÝ ÚVOD

Při klonování PCR produktů do plasmidů se využívá vlastnosti Taq polymerasy, a jiných non-proofreading polymeras, přidávat na konec nově syntetizovaného řetězce jednu bázi (adenin) navíc. Klonovací vektor je poté v lineární formě, kdy na každém konci nese jednu bázi (thymin nebo uracil) navíc. Za optimálních podmínek poté dochází k hybridizaci a ligaci PCR fragmentu do vektoru (Obrázek 1). PCR fragment hybridizuje do tzv. MCS (multicloning site) místa, které poté umožňuje použití širokého spektra restriktáz pro jeho případné vyštěpení z vektoru a re-klonování do jiného vektoru. MCS místo se nachází uvnitř genu lacZ kódujícího galaktosidasu, takže úspěšné včlenění PCR produktu do vektoru má za následek ztrátu aktivity, která tak může být využita pro selekci úspěšných transformátů pomocí barevného substrátu X-gal. Vektor rovněž nese rezistenci na jedno nebo dvě antibiotika (obvykle na ampicilin) a obsahuje T7 a SP6 promotor pro případnou produkci klonovaného PCR produktu.



Obr. 1: Schéma klonovacího vektoru pGEM-T Easy (Promega)

Před vlastním klonováním je většinou nutné PCR produkt přečistit pomocí agarózové elektroforézy, abychom se vyhnuli klonování případných vedlejších produktů PCR reakce

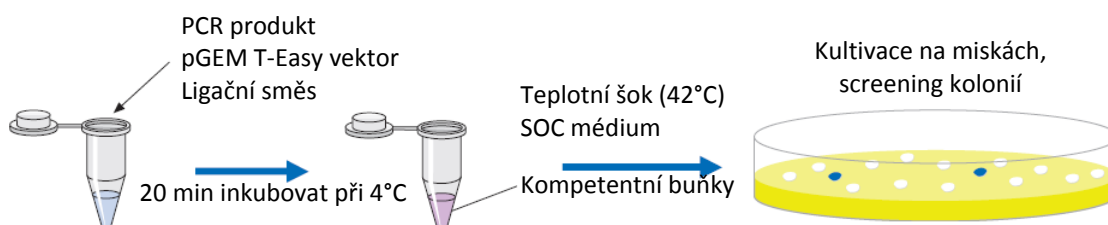
Úloha C - Klonování PCR produktu do plasmidu

(dimery primerů, nespecifické produkty). Množství PCR produktu (ng) při ligaci se poté spočítá na základě vzorce:

$$\frac{\text{Množství vektoru (ng)} \times \text{délka PCR produktu (kb)}}{\text{délka vektoru (kb)}} \times \text{molární poměr} \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}}$$

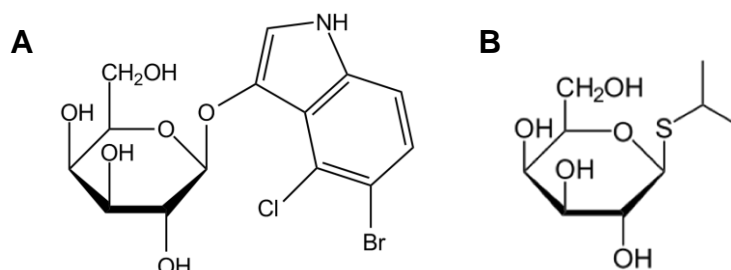
Ligační reakce většinou poté probíhá při pokojové teplotě po dobu 1-2 hodin nebo při 4°C přes noc. Poté dochází ke vložení ligovaného vektoru do kompetentních buněk. V našem případě budou použity termo-kompetentní buňky E. Coli HB101.

Kompetentní buňky jsou skladovány při -70°C a využívá se jejich schopnosti po rozmrazení a vystavení krátkému teplotnímu šoku přijmout DNA. Po teplotním šoku je k buňkám obvykle přidáno SOC médium a jsou 2 hodiny inkubovány při 37°C. Poté jsou vyočkovány na misku s příslušným selekčním antibiotikem a následující den je pozorován počet úspěšných transformantů.



Obr. 2: Schéma transformace buněk E. Coli HB101

Protože může docházet i k ligaci vektoru bez vloženého PCR produktu, je do média na kultivačních miskách přidán barevný substrát X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) s induktorem IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), kdy v případě ligace samotného vektoru dochází k růstu modrých kolonií (enzym galaktosidasa je aktivní) a v případě úspěšné ligace PCR produktu do vektoru k růstu bílých kolonií (enzym galaktosidasa je inaktivován vloženým PCR produktem).



Obr. 3: Chemická struktura X-Gal (A) a IPTG (B)

POSTUP PRÁCE

Amplifikace vybraného genu (PR5 nebo PI-1 nebo EF1α)

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

FW+REV Primer (5 uM)	2 µl
RedTaq Mix 2x konc	10 µl
PCR voda	6 µl
Templát (cDNA)	2 µl

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2:30 min	
95°C	30 s	} 45x
60°C	30 s	
72°C	20 s	
72°C	5:00 min	

Analýza PCR produktu a jeho přečištění pomocí Wizard Gel Extraction Kit (Promega)

1. Připravte 1,5% agarózový gel.
2. Na gel naneste 20 µl PCR produktu smíchaného s 3 µl DNA nanášecího pufru do jedné jamky a 2.5 µl délkového markeru (GeneRuler 100 bp) do druhé jamky.
3. Spusťte elektroforézu: 150 V, 20 minut.
4. Po skončení elektroforézy vynulujte váhu na 1,5 ml zkumavku.
5. Dejte gel na transiluminátor a vyřežte PCR produkt (poznamenejte si jeho velikost).
6. Proužek přeneste do 1,5 ml zkumavky a zvažte.
7. Do zkumavky přidejte Binding buffer v poměru 10 µl roztoku na 10 mg gelu.
8. Inkubujte směs 10 minut při 60°C, kdy průběžně zkumavku vortexujte, abyste urychlili rozpuštění gelu.
9. Poté přeneste celou směs na kolonku (pokud je směsi více jak 800 µl tak nadvakrát).
10. Stočte kolonku 1 min při 14 000 x g.
11. Vylijte proteklý roztok a přidejte na kolonku 700 µl roztoku Wash Buffer.
12. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
13. Vylijte proteklý roztok a přidejte na kolonku 500 µl roztoku Wash Buffer.
14. Centrifugujte 5 min při 14 000 x g.
15. Vyhodte zkumavku, kolonku přeneste do nové 2.0 ml zkumavky a centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
16. Vyhodte zkumavku, kolonku přeneste do nové 1,5 ml zkumavky a na její střed napipetujte 25 µl PCR vody.
17. Centrifugujte 1 min při 10 000 x g, PCR produkt je přečištěn, změřte jeho koncentraci na NanoFotometru.

Úloha C - Klonování PCR produktu do plasmidu

Klonování PCR produktu do plasmidu pGEM-TEasy a jeho následná transformace do buněk *E. coli* HB101

1. Rozmrazte 2x Ligation Master Mix, pGEM-TEasy klonovací vektor a PCR vodu.
2. Připravte ligační směs:

pGEM-TEasy klonovací vektor	1 μ l
PCR produkt	1-4 μ l (vypočtete na základě vzorce)
Ligation buffer, 2x	5 μ l
T4 DNA Ligasa	1 μ l
PCR voda	do 10 μ l
3. Jemně ligační směs promíchejte, krátce stočte a inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě.
4. Rozmrazte potřebný počet alikvotů kompetentních buněk HB101 na ledě a předejte SOC medium na pokojovou teplotu.
5. Do zkumavky s kompetentními buňkami přidejte 2 μ l ligační směsi, opatrně promíchejte a inkubujte 20 minut na ledě.
6. Poté umístěte zkumavku do termostatu na 42°C přesně na 40s a poté ji vraťte na 2 minuty do ledu.
7. Přidejte 450 μ l SOC media a inkubujte za třepání (1000 rpm) 1 hodinu.
8. Od tohoto bodu provádějte všechny činnosti v laminárním boxu a sterilně.
9. Poté si připravte nalitou LB misku s ampicilinem (100 μ g/ml) a X-gal/IPTG
10. Napipetujte na připravenou misku 100 μ l SOC media s kompetentními buňkami a důkladně medium rozetřete bakteriologickou hokejkou.
13. Nechte z misek odpařit zbytek rozetřeného média, misky zavřete a umístěte dnem vzhůru do termostatu na 37°C.
14. Následující den popište výsledek.

Zaočkování kolonie pro izolaci plasmidu

Ze selekční misky vyberte jednu kolonii nesoucí plasmid s inzertem a pomocí malé špičky ji přeneste do 2 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) a inkubujte na třepačce při 37°C 12-16 hodin.

Izolace plasmidu z kultury *E. coli* pomocí kitu **UltraClean® 6 Minute Min Plasmid Prep** (MoBio)

1. Přeneste 1.8 ml bakteriální kultury do 2.0 ml zkumavky a centrifugujte 30s při 14 000 x g.
2. Odstraňte veškerý supernatant a přidejte 50 μ l Roztoku 1 a resuspendujte pelet na vortexu.
3. Přidejte 100 μ l Roztoku 2 a opatrně promíchejte převrácením. Nevortexujte!
4. Přidejte 325 μ l Roztoku 3 a převrácením směs ve zkumavce pořádně promíchejte. Nevortexujte!
5. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.

Úloha C - Klonování PCR produktu do plasmidu

- Supernatant opatrně přeneste na kolonku umístěnou ve zkumavce.
- Centrifugujte 30 s při 10 000 x g.
- Odstraňte proteklý roztok a na kolonku napipetujte 300 μ l Roztoku 4.
- Centrifugujte 30 s při 14 000 x g.
- Odstraňte proteklý roztok a na kolonku a znovu centrifugujte 30 s při 14 000 x g.
- Přeneste kolonku do nové zkumavky, přidejte 40 μ l Elučního pufru a nechte 1 min inkubovat na stole.
- Centrifugujte 30 s při 10 000 x g.
- Plasmidová DNA je připravena k použití, změřte její koncentraci a čistotu na NanoFotometru.

Měření koncentrace a čistoty izolované DNA pomocí Nano-fotometru

- Na fotometru nastavte měření koncentrace dsDNA.
- Na čočku měřící kyvety napipetujte 3 μ l PCR vody a zakryjte vrškem s faktorem 10.
- Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku (BLANK).
- Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3 μ l vzorku DNA.
- Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (SAMPLE).
Vytisknete hodnoty čistoty $A_{260/280}$, $A_{230/260}$ a naměřené spektrum.

Příprava plasmidu o definované koncentraci

- Na základě znalosti velikosti plasmidu s PCR produktem (přibližně 3200 bp) a střední molekulové hmotnosti 1 páru bazí DNA (650 g/mol) vypočítejte koncentraci plasmidové DNA při následujícím počtu kopií:

1 000 kopií/ μ l
10 000 kopií/ μ l
100 000 kopií/ μ l
1000 000kopií/ μ l
- Na základě vypočtených hodnot zřeďte plasmidovou DNA PCR vodou na požadovanou koncentraci v celkovém objemu 100 μ l.

VYHODNOCENÍ

- Uveďte celkový počet kolonií po transformaci a jejich zbarvení.
- Uveďte kvantitu a čistotu vyizolované plasmidové DNA.
- Uveďte vypočítané hodnoty koncentrací plasmidové DNA pro jednotlivý počet kopií/ μ l.