Transformace 1 - KLONOVÁNÍ

KLON soubor identických buněk (organizmů) pocházejících ze společného předka

KLONOVÁNÍ proces tvorby klonů (stěžejní metoda molekulární biologie)

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 určená ke klonování se nazývá **klonovaná DNA**

Genová banka (knihovna) – kolekce naklonovaných DNA fragmentů, která představuje část nebo celý genom organizmu

Tři základní kroky klonování:

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

Původ DNA:

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

VLASTNOSTI PLAZMIDOVÝCH VEKTORŮ

1. Autonomní replikace v bakteriální buňce (schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci)
2. Vhodné spektrum restrikčních míst
3. Obsah genu se selektivním znakem
4. Plazmid nesmí být konjugativní tj. nesmí mít transferové geny (kódující pilusy)
5. Co nejmenší velikost
6. Vícekopiový

Metody přenosu DNAdo prokaryotických buněk

- Chemické – roztoky dvojmocných iontů solí + teplota
- Fyzikální – elektroporace
- Pomocí virů

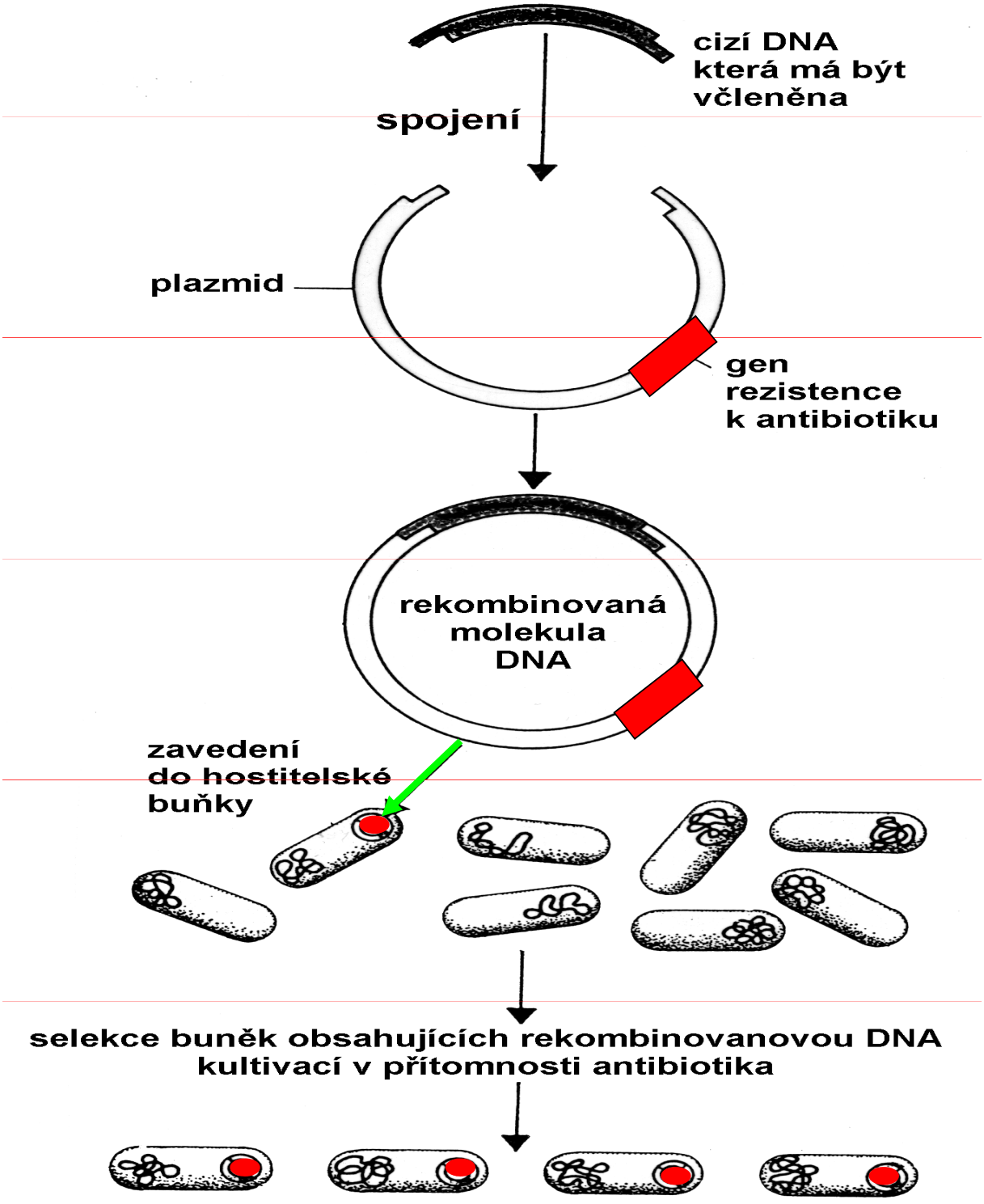
Způsoby přenosu DNA

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

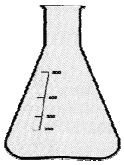
Transfekce. Přenos DNA do eukaryotických buněk (lipofekční činidla, elektroporace, viry …)

Transdukce. Přenos DNA – sekvence prostřednictvím viru z buňky donorové do recipientní, v jejímž fenotypu se může vnesená genetická informace projevit.

Klonování DNA v plazmidu



Příprava kompetentních buněk

Na třepačce →  kultura *E. coli* narostlá v 20 ml LB bujonu do OD_{600} = 0,3

ochladit na ledu 0 °C

↓

centrifugace 10 minut při 3000 rpm/4 °C

↓

← SUPERNATANT ODLÍT

↓

sediment resuspendovat v polovině objemu ledového roztoku 0,05M $CaCl_2$ a ponechat na ledu (v lednici) přes noc

↓

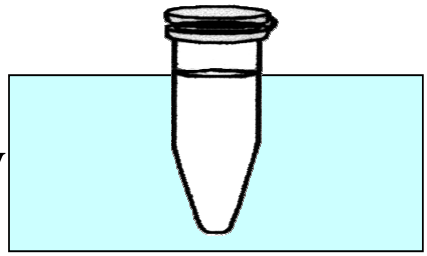
centrifugace 10 minut při 3000 rpm/4 °C

↓

← SUPERNATANT ODLÍT

↓

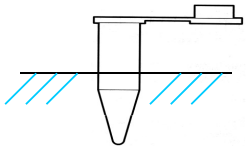
sediment resuspendovat v 1/10 výchozího objemu (2 ml) ledového roztoku 0,05M $CaCl_2$

Kompetentní buňky  úchova na ledu nebo při -70°C v glycerolu

TRANSFORMACE SCHÉMA

V Epp. mikrozkumavce je 200 µl kompet. buněk

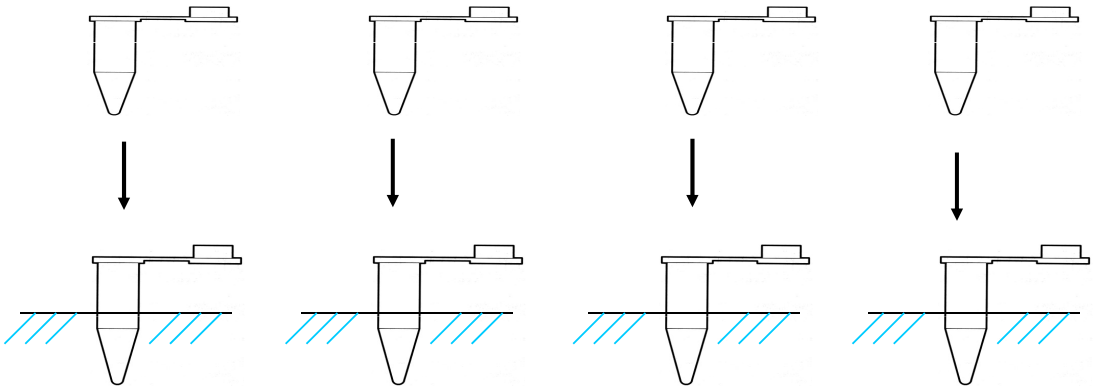
Na ledu



Stanovení titru komp. buněk u řed.10^{-5},10^{-6} a 10^{-7}

připravit DNA vektoru v **10 µl TE**

Kontrola bez DNA | 1 ng | 10 ng | 100 ng



Na ledu

K.B.

Opatrně promíchat, nechat stát v ledu 30 min

Teplotní šok

Umístit při 42 °C/90 sec nebo 37 °C/3,5 min

↓

Přidat 1 ml LB bujonu a na ledu nechat 2 min

↓

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

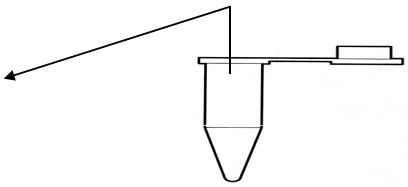
↓

Transformace pokračování

Po inkubaci

↓

centrifugace při 12 000 rpm/ 1 min



odlít supernatant

zbývající medium doplnit na 100 µl a
resuspendovat sediment buněk

↓

suspenzi vyočkovat na LBA +
50 – 100 µg/ml **AMP**

↓

Naočkované misky s LBA+AMP

inkubovat dnem vzhůru

při 37 °C/24 – 48 hod

Hodnocení: odečet kolonií transformantů

stanovení titru kompetentních buněk

Stanovení transformačního indexu