

Základy molekulární biologie

Cvičení 4

Polymerázová řetězová reakce
DNA klonování - Transformace

Klonování

- **KLONOVÁNÍ** proces vytváření identických kopií (jedinců/buněk)
- **KLON** soubor geneticky identických buněk /jedinec identický s „předlohou“
- **Klonování** je základem genového inženýrství, tj., vytváření pozměněných nebo nových genů a jejich zavádění do genomu organismů.



Klonování DNA (molekulární klonování)

- Metoda umožňující namnožení určitého úseku DNA (za pomoci enzymatických systémů živých buněk)
- **DNA klon - molekulární klon** = segment DNA vektorem přenesený do hostitelské buňky, kde se replikuje
- **vektor** – molekula DNA, která obsahuje všechny sekvence potřebné ke vstupu, přežití a množení v určité hostitelské buňce
- **Cizorodá DNA** spojená s vektorem = **rekombinantní 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

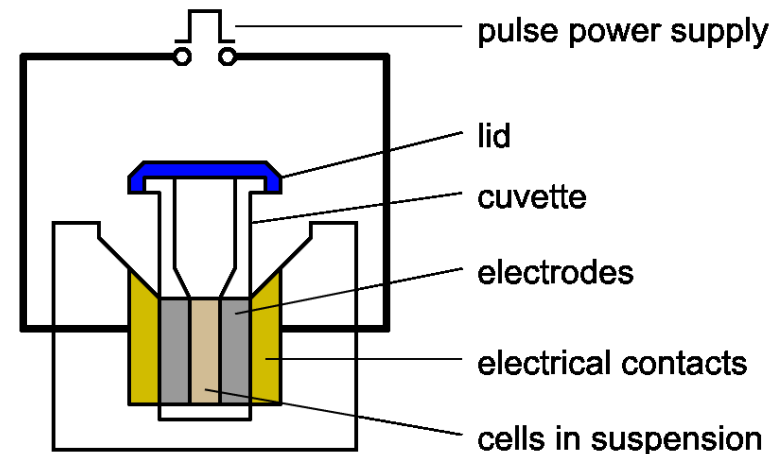
Zdroj DNA ke klonování:

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

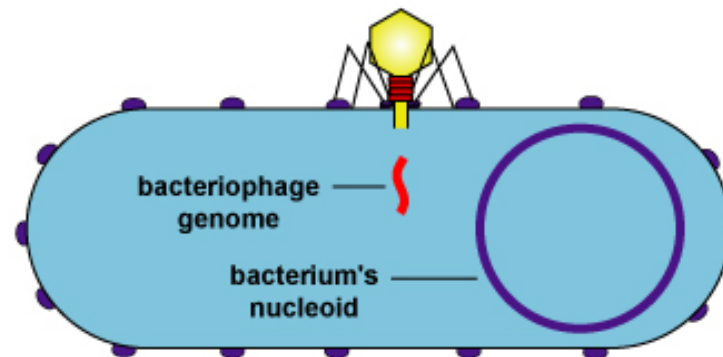
- Množství zdrojové DNA je většinou nedostatečné a je potřeba před samotným klonováním do vektoru namnožit (PCR)

Metody přenosu DNA do prokaryotických buněk

- Chemické – roztoky dvojmocných iontů solí + teplota
- (Bio)Fyzikální – elektroporace



- Pomocí virů (bakteriofágy)



Metody přenosu DNA do eukaryotických buněk

- Chemické – lipofekce, DEAE dextran, fosforečnan vápenatý
- (Bio)Fyzikální – elektroporace, nastřelování

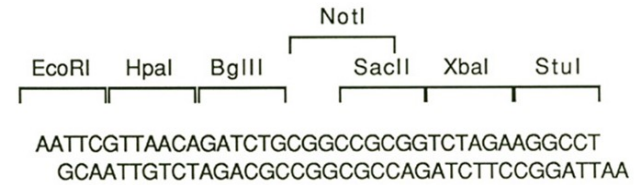


- Viry – (lentiviry) !!!!! Bezpečnost !!!!!

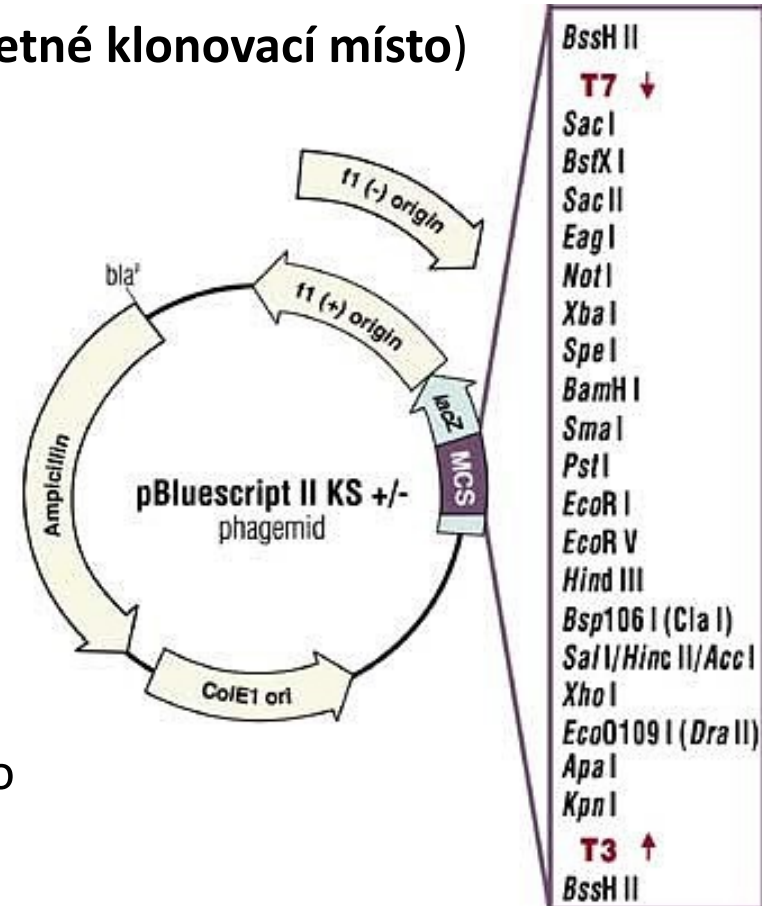
Způsoby přenosu DNA

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

Vlastnosti plazmidových vektorů

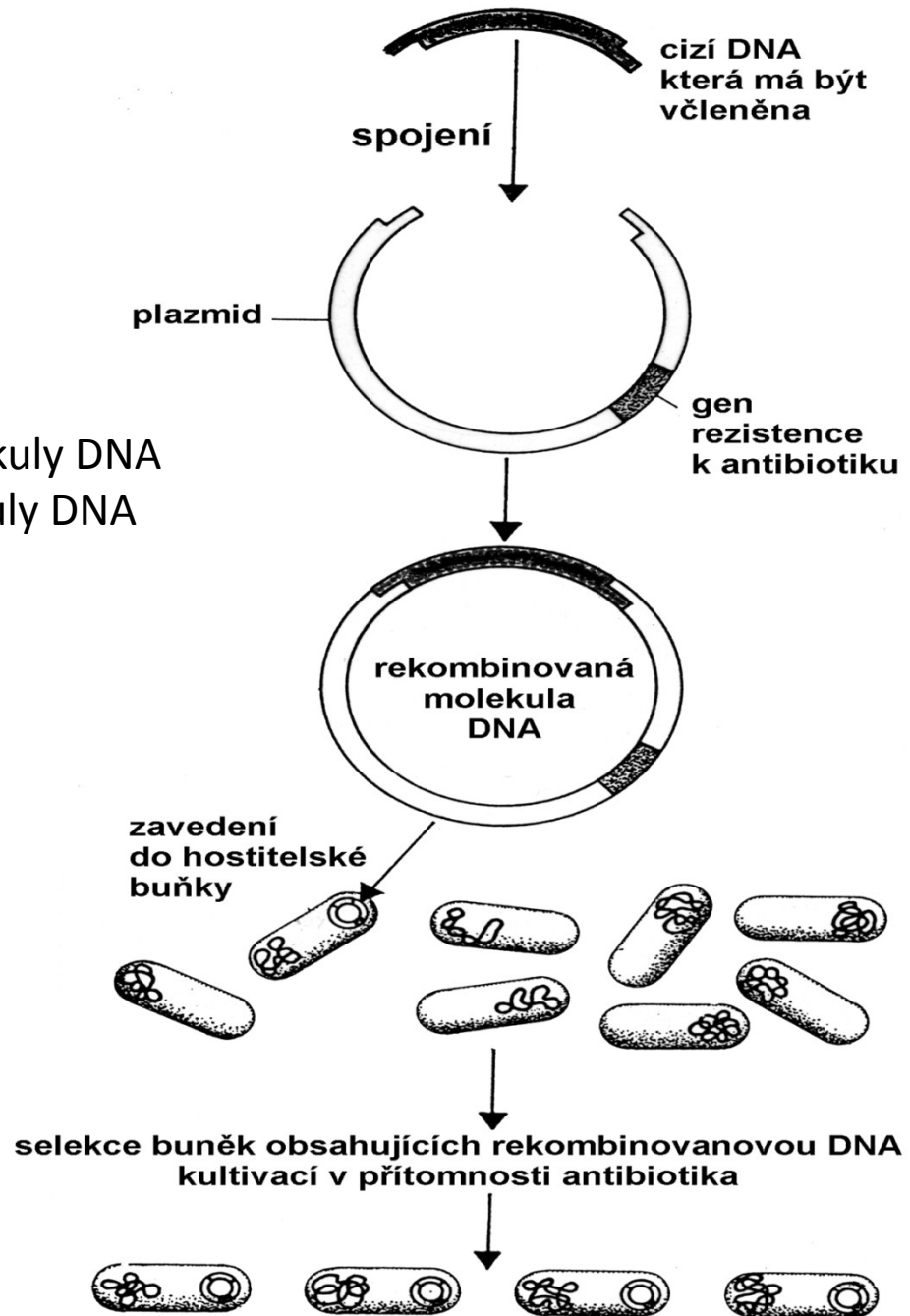


- Schopnost autonomní **replikace** v bakteriální buňce - místo *ori*, které rozpoznává DNA-polymeráza hostitelské buňky
(schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci)
- Vhodné spektrum restričních míst (**mnohočetné klonovací místo**)
- Gen se **selektivním znakem**
 - beta-laktamáza → rezistence na ampicilin
- Plazmid **nesmí být konjugativní** tj. nesmí mít transferové geny (kódující pilusy)
- Co nejmenší velikost
- **Vícekopiový** – schopnost perzistovat v jedné buňce ve více kopiích
- Schopny pojmout molekulu DNA o velikosti do 10-15kb



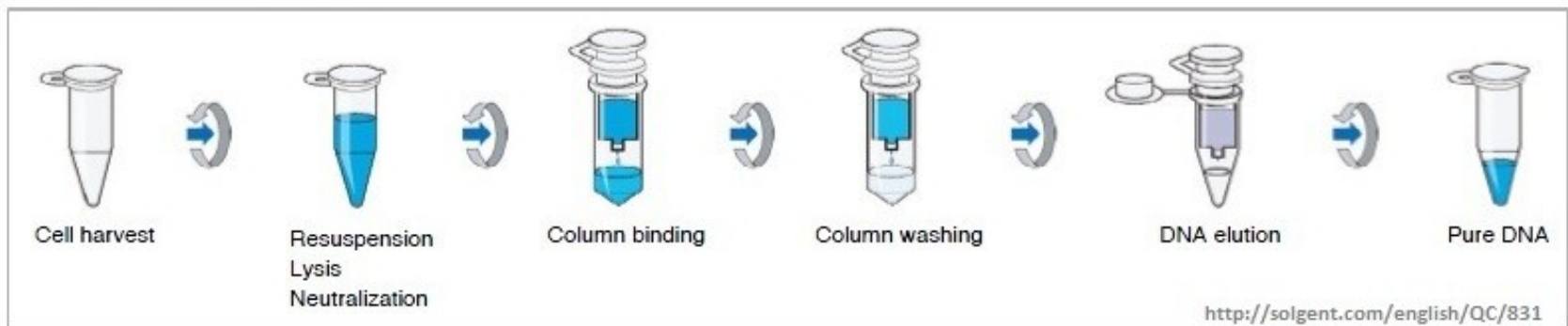
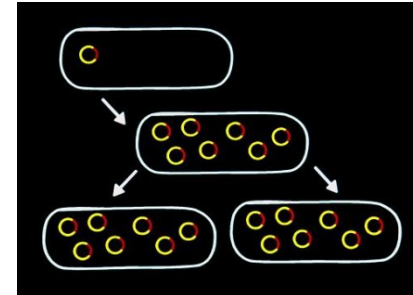
Klonování DNA v plazmidu

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

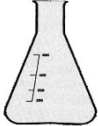


Transformace bakteriálních buněk

- Přímý přenos rekombinantní DNA přes cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu do recipientní buňky
- Kompetentní buňky
 - schopné přijmout cizorodou DNA
 - mají prostupnou buněčnou stěnu
- K destabilizaci plazmatické membrány během transformace dochází pomocí teplotního šoku a Ca^{2+} iontů
- Vhodné kultivační podmínky se selekčním činidlem zajistí namnožení plazmidu v bakteriích
- Namnoženou plazmidovou DNA lze vyizolovat k dalšímu použití



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



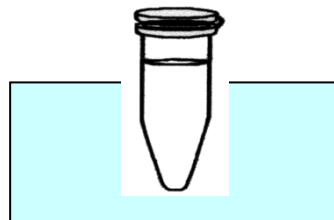
centrifugace 10 minut při 3000 rpm/4 °C

← SUPERNATANT ODLÍT



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

Kompetentní
buňky



úschova na ledu nebo
při -70°C v glycerolu

Stanovení titru bakteriálních buněk a transformačního indexu

1. Ze suspenze kompetentních buněk připravíme ředění 10^5 , 10^6 , 10^7 krát
2. Provést transformaci podle návodu
 - místo DNA použijeme sterilní vodu !
 - buňky naočkovat na misky bez ampicilinu !!
3. Hodnocení:
 - Odečíst počet kolonií transformantů
 - Stanovit titer kompetentních buněk
 - Stanovit transformační index