

## LIGÁCIA VEKTOROVEJ DNA S INZERTOM

---

### Vektorová DNA:

12,5 ng DNA na 1000 bp vektoru [pJOEd (7500bp) = 93,75 ng, pCU510 (5500bp)= 68,75 ng]

### DNA inzertu:

Molárny pomer (na základe počtu bp) vektoru k inzertu 1:1 až 1:6 (závisí experimentálne)

Inzert oligo = 24 bp (0,6-1,8 ng/reakcia)

Inzert Cas = 4180 bp (53 - 106 ng/reakcia)

**Ligation buffer:** 2 ul

**Ligáza:** 0,335 ul (400U/ul)

Doplniť H<sub>2</sub>O do 20 ul

*Premiešame, necháme inkubovať pri pokojovej teplote 1-1,5 hodiny. Inaktivujeme zahriatím 65 °C/10 min. Pozor – ligation buffer obsahuje BSA, skontrolovať či sa úplne rozpustil. Ak nie, zahriať v ruke alebo pri 50 °C a premiešať do rozpustenia.*

*Pri blunt-end ligácii pridávame 0,7-1 ul ligázy (400 U/ul), ligujeme pri 16 °C cez noc (pri pokojovke min 2 hodiny).*

## TRANSFORMÁCIA E. COLI HEAT-SHOCKOM

---

1. Kompetentné bunky necháme rozmraziť na ľade
2. 5 ul ligačnej zmesi premiešame s 5 ul TE pufru (pH = 8.0) a pridáme ku kompetentným bunkám.
3. Premiešame poklepaním po spodku epinky, nemiešame špičkami a určite nevortexujeme!
4. Necháme 30 min na ľade.
5. Epiny dáme do plaváku, umiestnime do 42°C horúcej vodnej lázne na 1 min.
6. Schladíme 2 min na ľade.
7. Pridáme 1 ml LB/kompetentné bunky a premiešame v ruke.
8. Inkubujeme 1 hod/37 °C a 390 rpm.
9. Stočíme 6000g/4min
10. Odlejeme supernatant – na spodu ostane vplyvom povrchovej energie kvapka – asi 100 ul – v nej pelet rozsuspendujeme pipetou.
11. Vysejeme na selekčné misky rozhojkovaním.
12. Druhý deň pozorujeme jednotlivé kolónie transformantov, pár ich vyberieme a prečiarkujeme na nové selekčné misky.

### Kontroly:

pozitívna – ľubovoľný prázdny plazmid, kontrolujeme či funguje transformačný protokol plus kompetentné bunky

Negatívna – ligačná zmes s vektorom, bez inzertu. Uvidím pozadie spôsobené samozligovaným vektorom plus nenaštiepeným vektorom.

Kontrola ligácie – ligačná zmes s vektorom, naštiepeným len jednou restričnou endonukleázou. Takýto vektor by mal ebz problému ligovať a následne transformovať sa do buniek. Ak nerastú kolónie, nedochádza k ligácii.