

Transformace 1 - KLONOVÁNÍ

KLON soubor identických buněk (organizmů) pocházejících ze společného předka

KLONOVÁNÍ proces tvorby klonů



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

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**

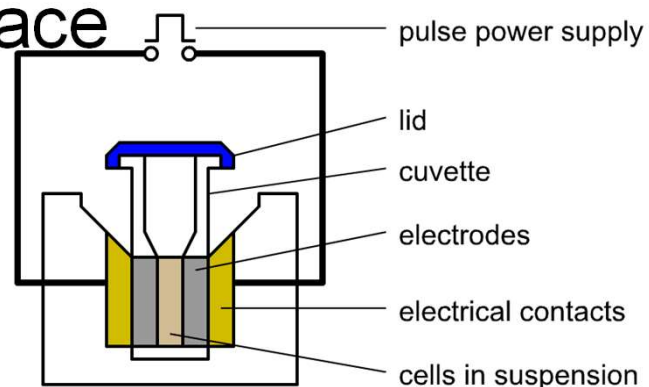
Původ (příprava) DNA

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

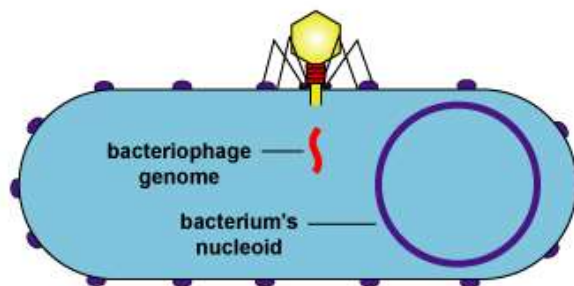
Metody přenosu DNA do prokaryotických buněk

Chemické – roztoky dvojmocných iontů solí
+ teplota

(Bio)Fyzikální – elektroporace



Pomocí virů



Metody přenosu DNA do eukaryotických buněk

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

(Bio)fyzikální – elektroporace



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 spíše nádorová transformace)

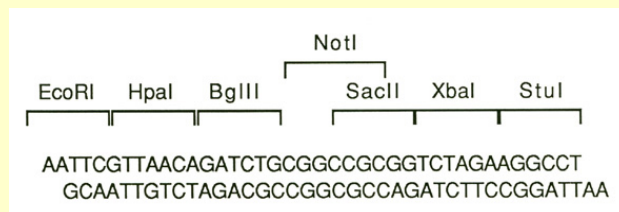
Transfekce. Přenos DNA do eukaryotických buněk (lipofekční činidla, elektroporace, viry ...)

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

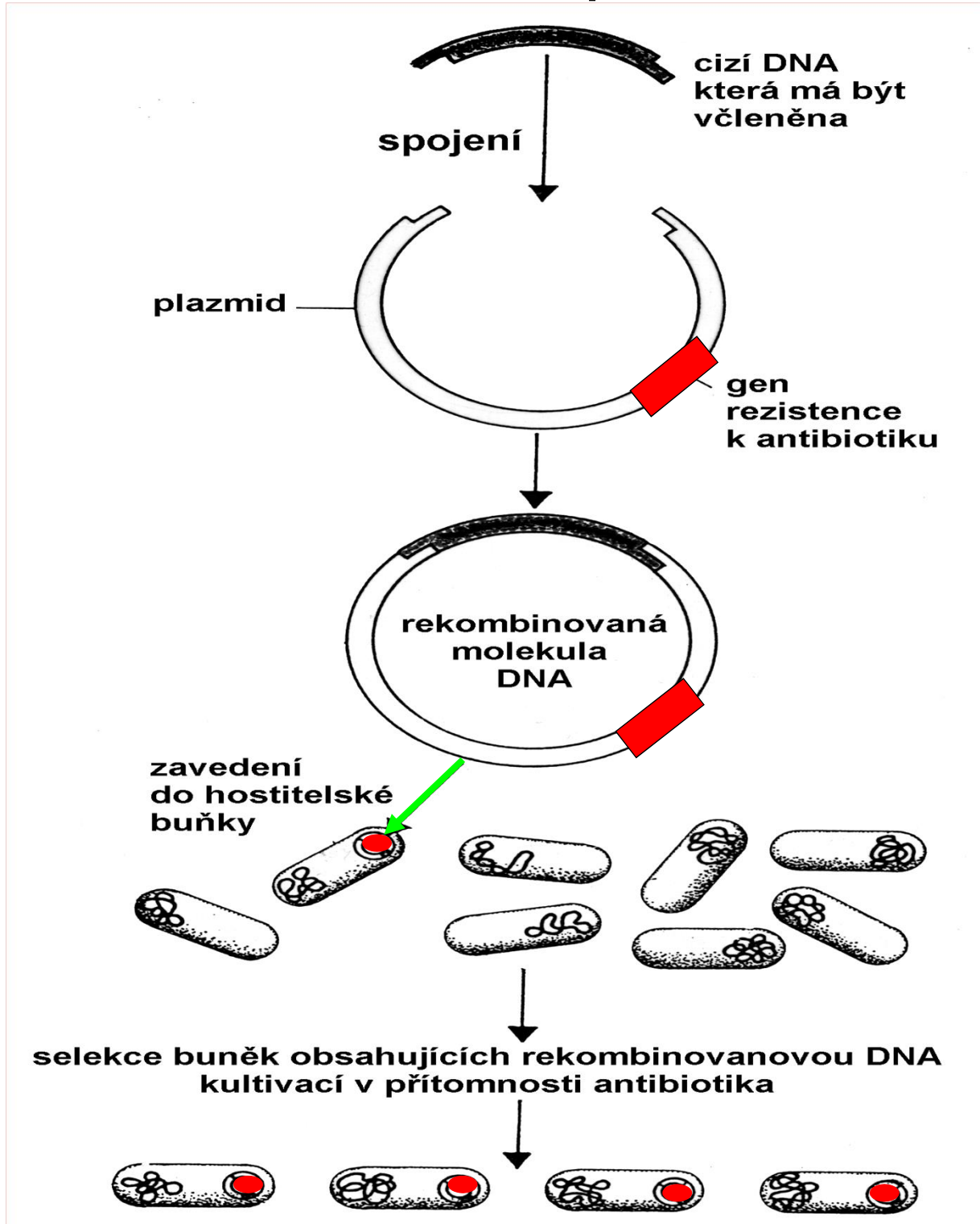
- beta-laktamáza → rezistence na ampicilin

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

Co nejmenší velikost

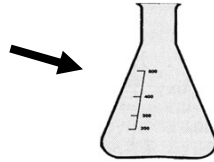
Vícekopiový

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 °C



centrifugace 10 minut při 3000 rpm/4 °C



← SUPERNATANT ODLÍT

sediment resuspendovat v polovině objemu ledového roztoku
0,05M CaCl₂ a ponechat na ledu (v lednici) přes noc



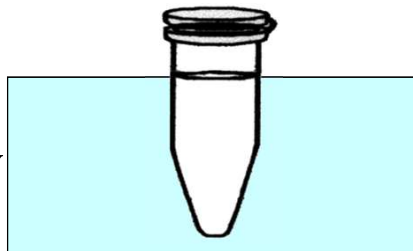
centrifugace 10 minut při 3000 rpm/4 °C

← SUPERNATANT ODLÍT

sediment resuspendovat v 1/10 výchozího objemu
(2 ml) ledového roztoku 0,05M CaCl₂



Kompetentní buňky



úchova na ledu nebo
při -70°C v glycerolu

TRANSFORMACE SCHÉMA

V Epp. mikrozkuhavce je 30 μ l kompet. buněk



Naředit 1 μ g DNA vektoru v 10 μ l TE

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

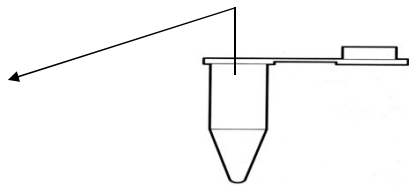


Transformace pokračování

Po inkubaci



centrifugace při 5 000 rpm/ 5 min



odlít supernatant

ve zbývajícím medium resuspendovat
sediment buněk



suspenzi vyočkovat na LB agar +
100 µg/ml **AMP**



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

Stanovení titru bakteriálních buněk

V mikroskopu je 30 μl kompet. buněk

- stejný postup jako předchozí

Ale:

- na začátku buňky naředit 10^5 , 10^6 , 10^7 krát
- místo DNA použijeme sterilní vodu
- na závěr buňky vysít na misky bez ampicilinu

**Hodnocení: odečet počet kolonií transformantů
stanovení titru kompetentních buněk
stanovení účinnosti transformace**