

# 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**

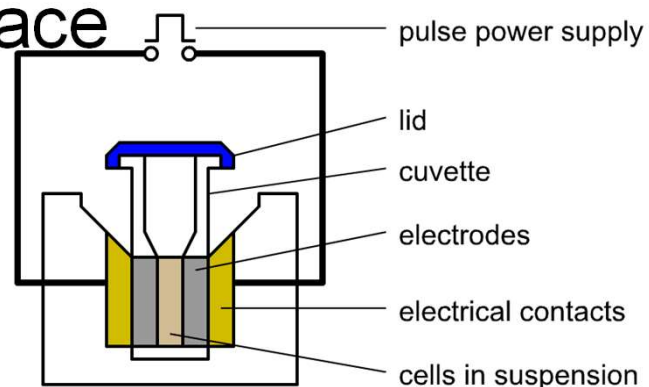
## **Původ (příprava) DNA**

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

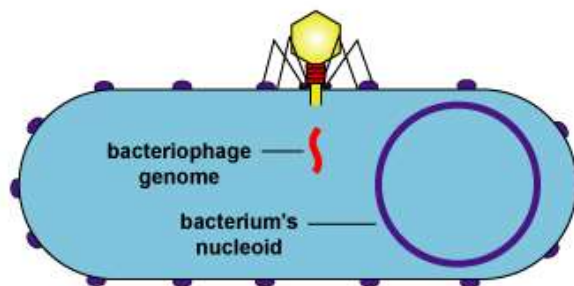
# Metody přenosu DNA do prokaryotických buněk

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 spíš nádorová transformace)

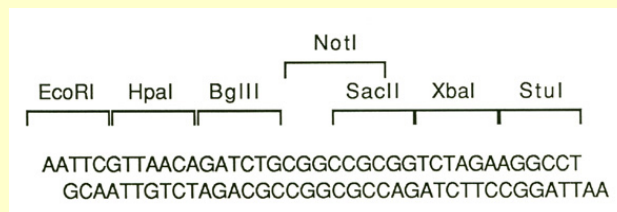
**Transfekce.** Přenos DNA do eukaryotických buněk (lipofekční činidla, elektroporace, viry ...)

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

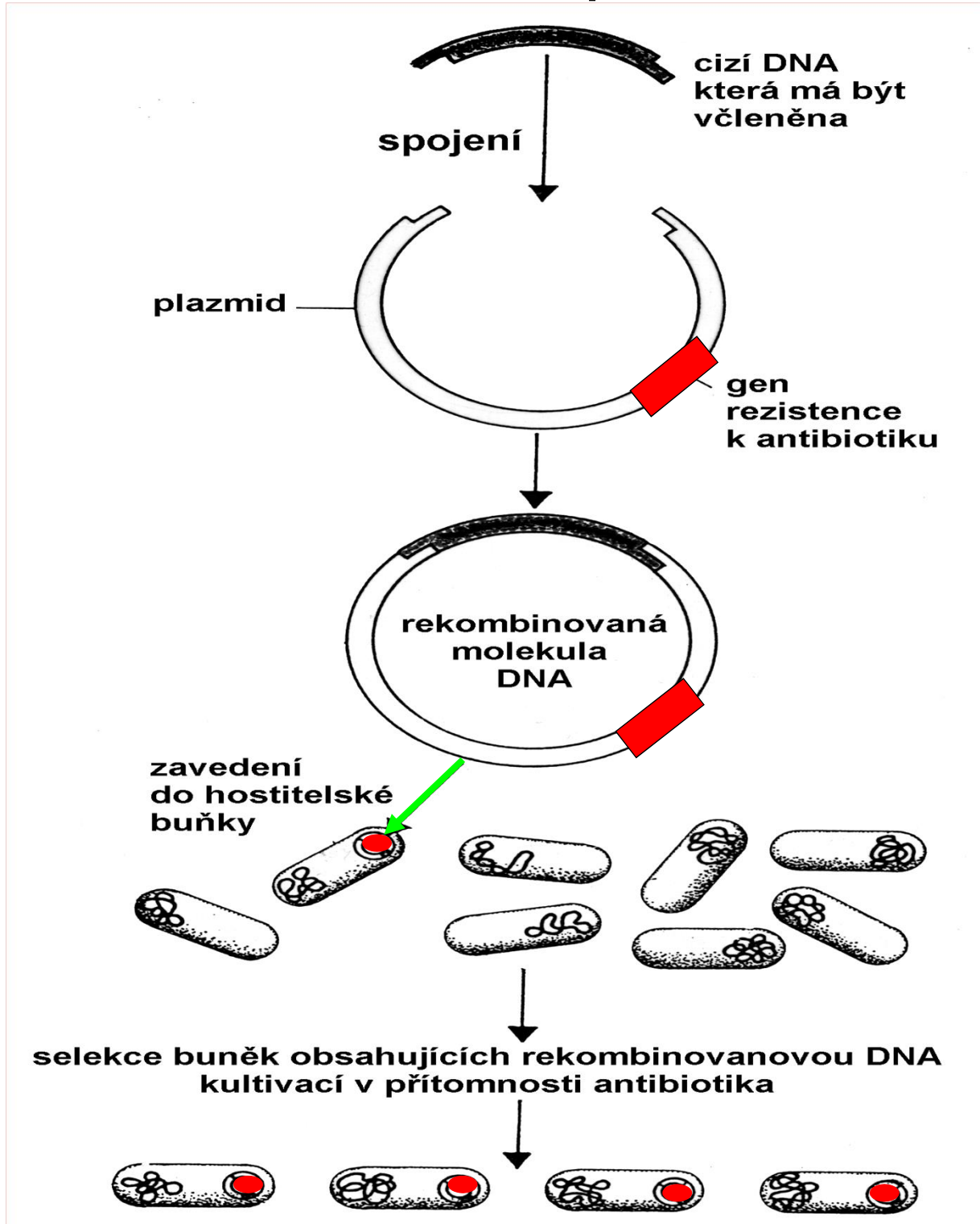
- beta-laktamáza → rezistence na ampicilin

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

**Co nejmenší velikost**

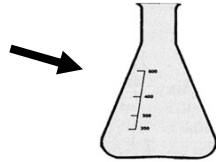
**Vícekopiový**

# 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 CaCl<sub>2</sub> a ponechat na ledu (v lednici) přes noc



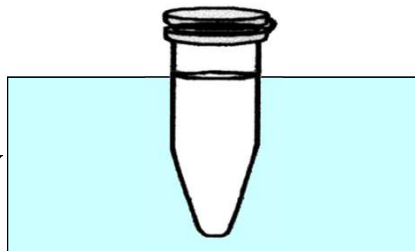
centrifugace 10 minut při 3000 rpm/4 °C

← SUPERNATANT ODLÍT

sediment resuspendovat v 1/10 výchozího objemu  
(2 ml) ledového roztoku 0,05M CaCl<sub>2</sub>



Kompetentní buňky



úchova na ledu nebo  
při -70°C v glycerolu



## TRANSFORMACE SCHÉMA

V Epp. mikrozkuhavce je 30  $\mu$ l kompet. buněk



Naředit 1  $\mu$ g DNA vektoru v 10  $\mu$ l TE

Přidat 30  $\mu$ 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

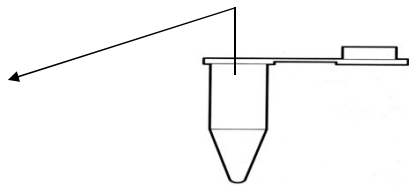


## Transformace pokračování

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  $\mu\text{l}$  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**