

Harmonogram výuky

čtvrtek 13:00 – 16:50 D36/216

07.04.2022		BOZP a teorie k izolaci plazmidové DNA
14.04.2022		1. izolace plazmidové DNA
21.04.2022	01_2	2. stanovení čistoty a koncentrace pDNA, RE štěpení, PCR
28.04.2022	(L. Kuntová)	3. horizontální gelová elektroforéza, příprava sacharózového gradientu
05.05.2022		4. klonování, přenos pDNA pomocí transformace
12.05.2022		5. vyhodnocení modro-bílého testu a zápočet



1. příprava vektoru
- izolace pUC18
- restriční štěpení

2. příprava inzertu
- PCR

3. ligace

4. transformace

5. selekce
- modro-bílý test

ověření
- ELFO

Vyhodnocení a vypracování protokolu

spojené molekuly cizorodé DNA = **rekombinantní DNA**

vektor obsahující inzert cizorodé DNA = **rekombinantní vektor**

rekombinantní DNA určená ke klonování se nazývá **klonovaná DNA**

Původ klonované DNA:

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

Transgenní organizmy obsahují **cizorodé geny** a vyznačují se novými vlastnostmi.

Způsoby přenosu DNA

Transformace:

Přímý přenos DNA izolované z donorové buňky přes cytoplazmatickou membránu do bakteriální recipientní buňky, v jejímž fenotypu se může vnesená genetická informace projevit.

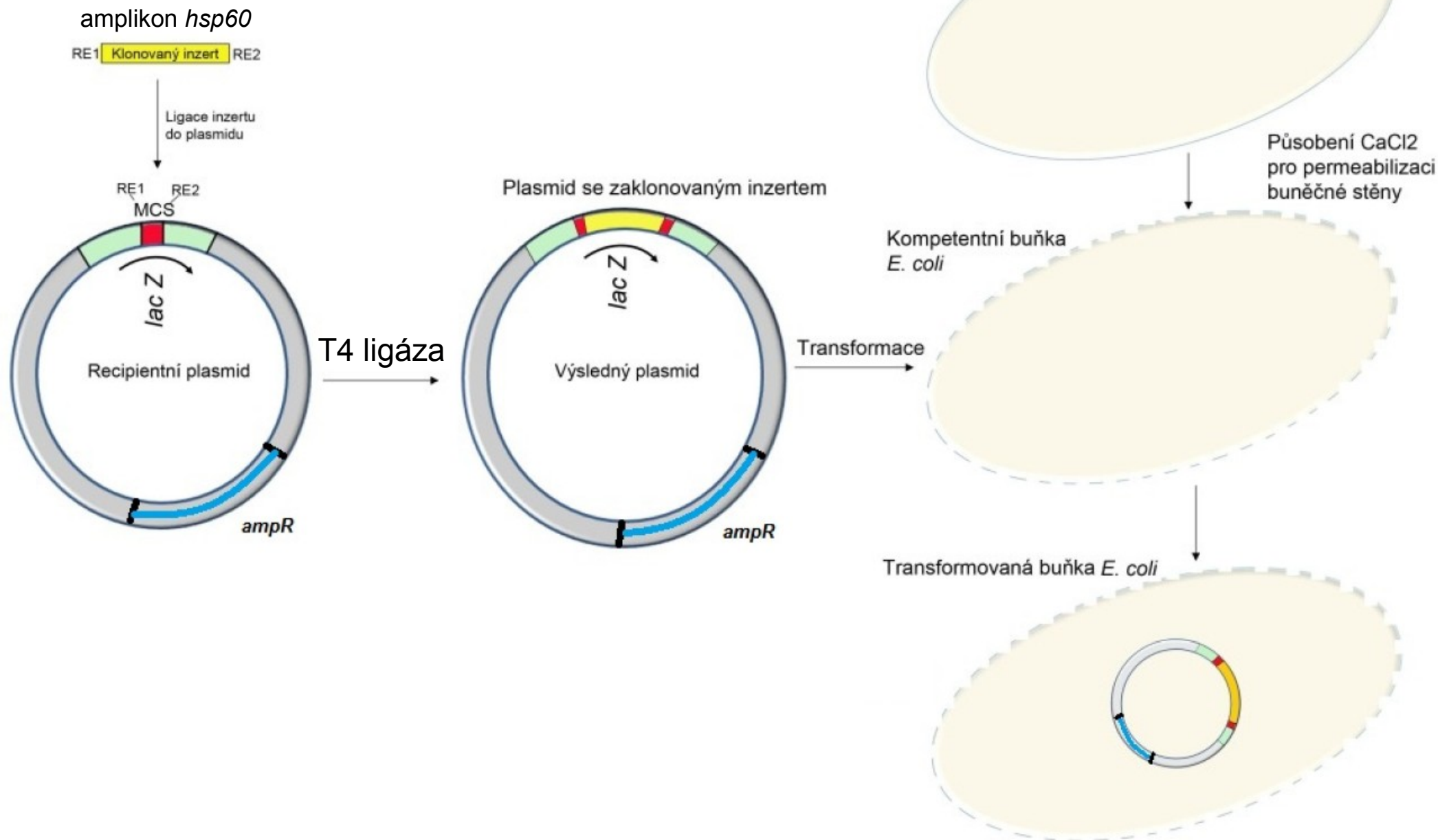
Transdukce:

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

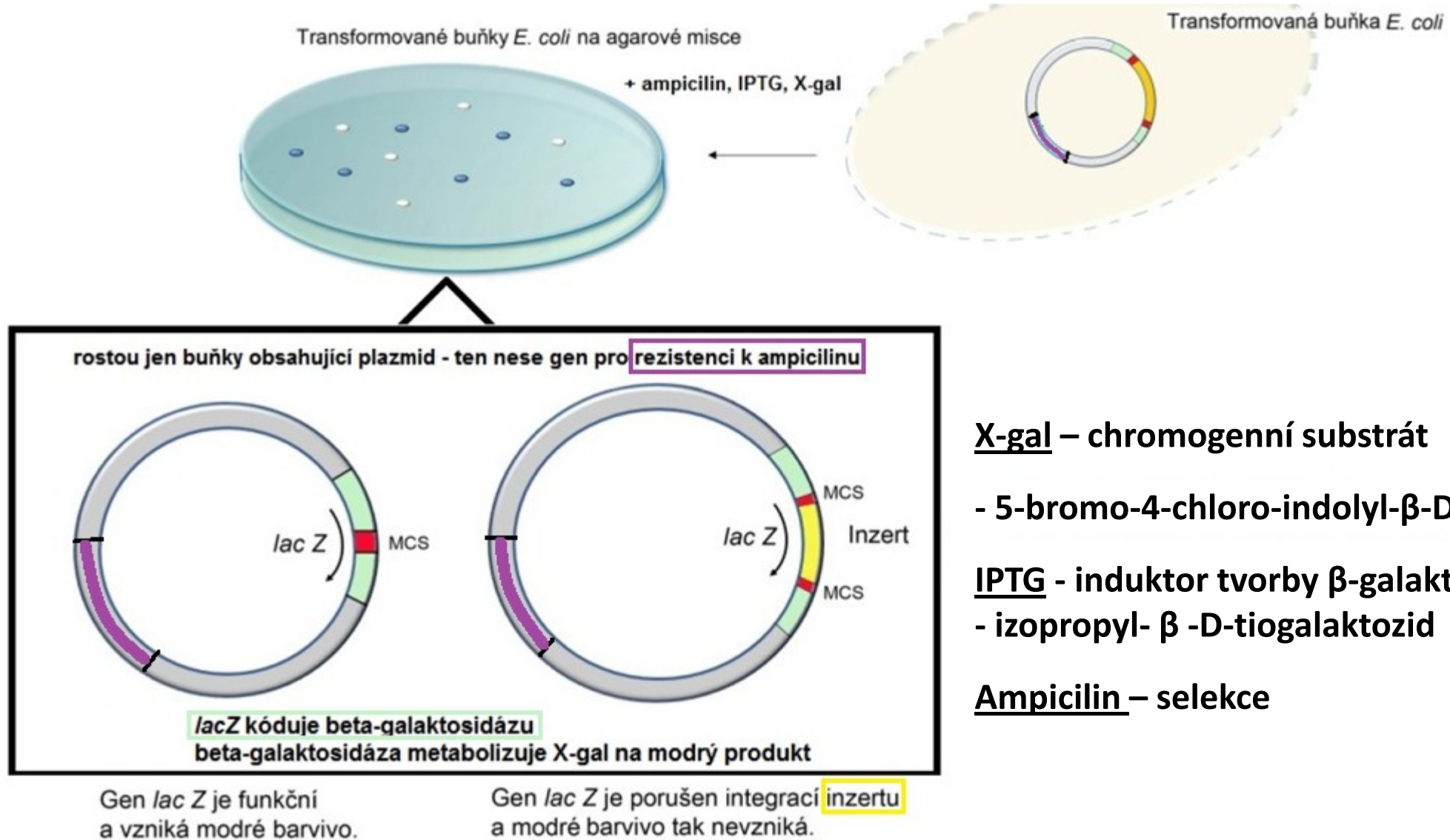
Transfekce:

Přenos DNA do živočišných buněk. Pomocí **virů** eukaryot (adenoviry, retroviry), **elektroporací**, **chemickými činidly** (polyaminy, lipidy), **mikroinjekčně**.

KLONOVÁNÍ



Inaktivace syntézy β -galaktozidázy



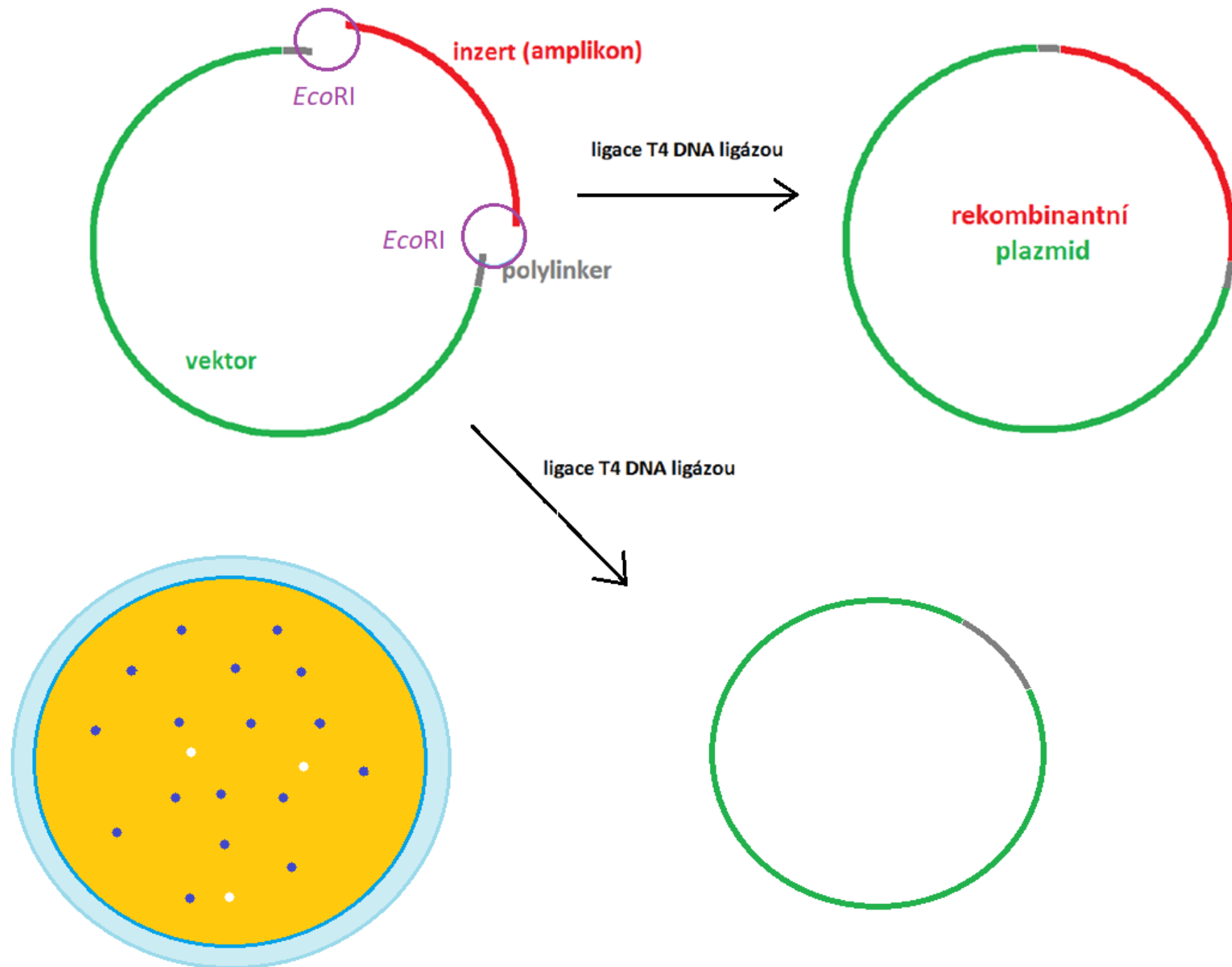
X-gal – chromogenní substrát

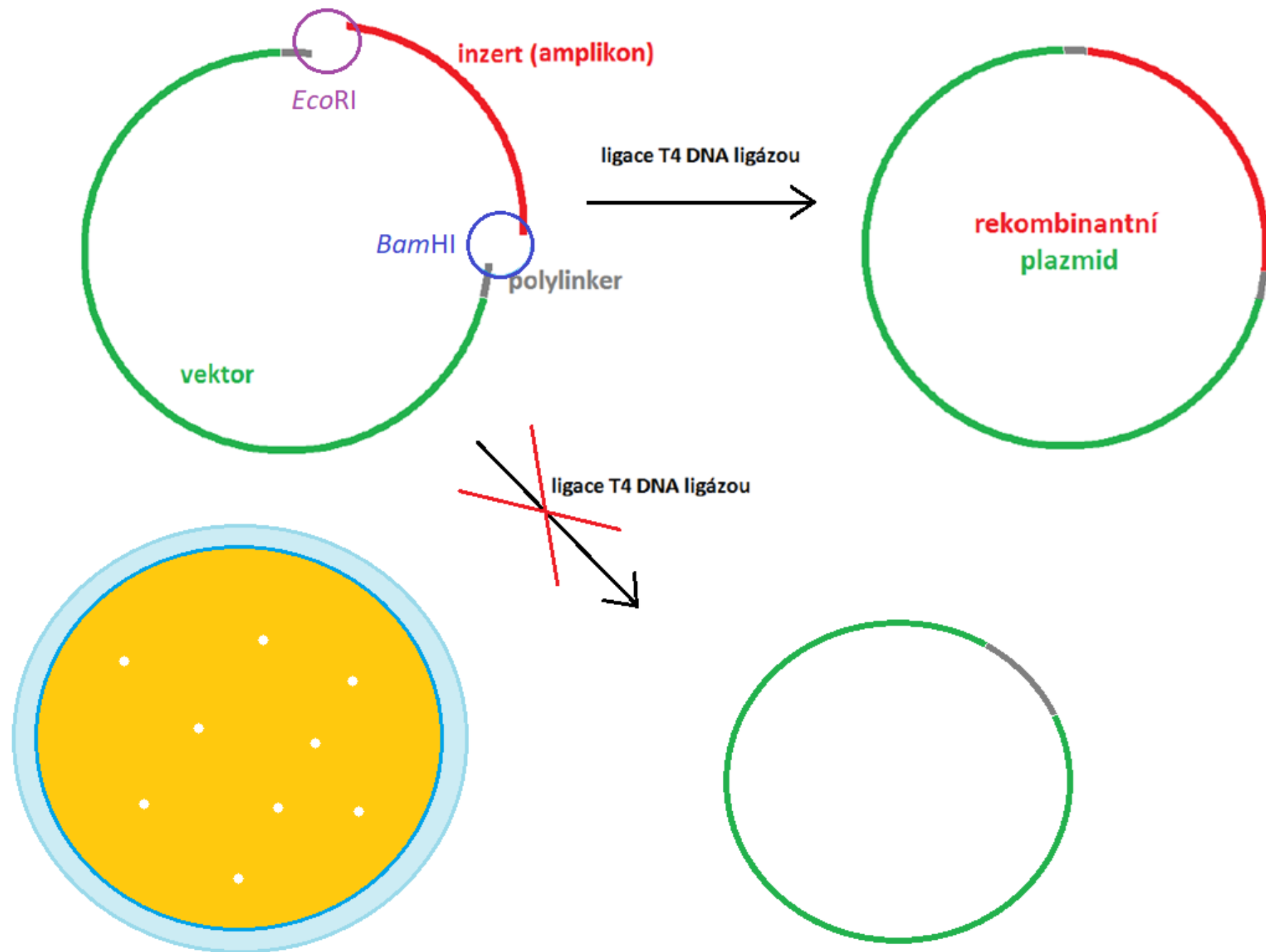
- 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galaktozid

IPTG - induktor tvorby β -galaktozidázy

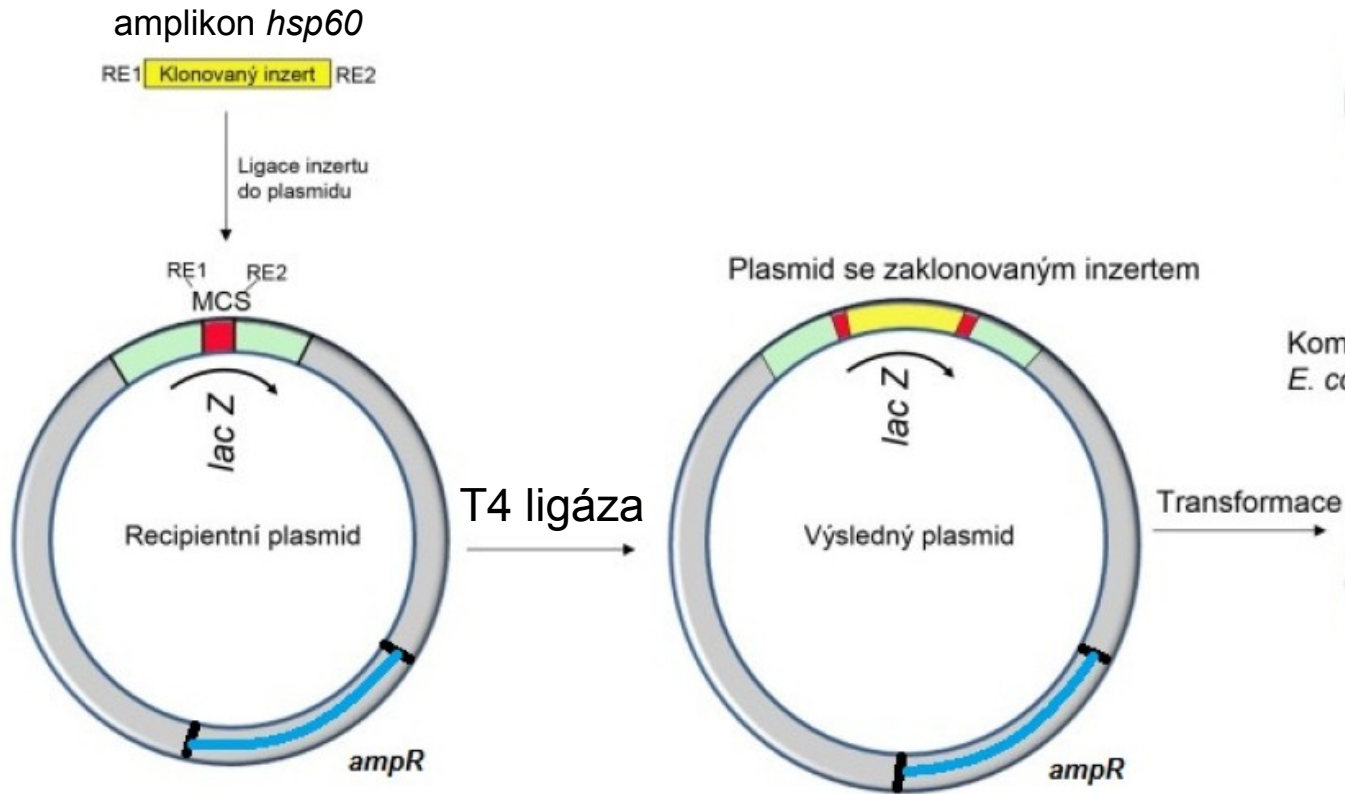
- izopropyl- β -D-tiogalaktozid

Ampicilin – selekce





KLONOVÁNÍ



Buňka *E. coli*

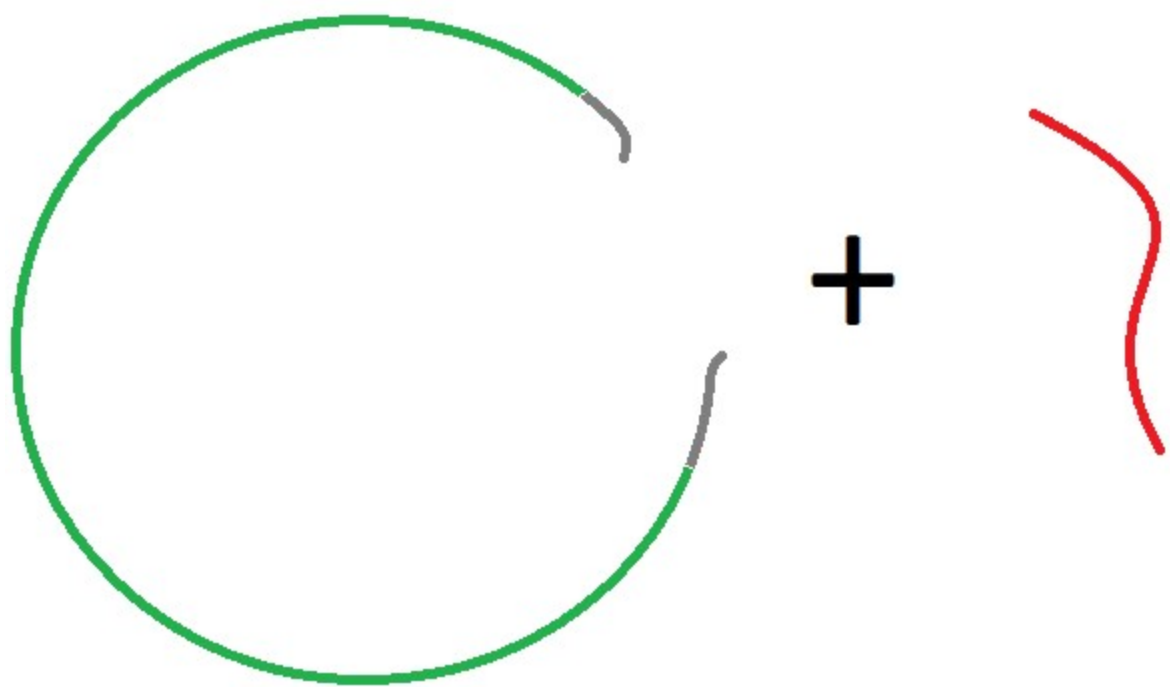
Působení CaCl₂
pro permeabilizaci
buněčné stěny

Kompetentní buňka
E. coli

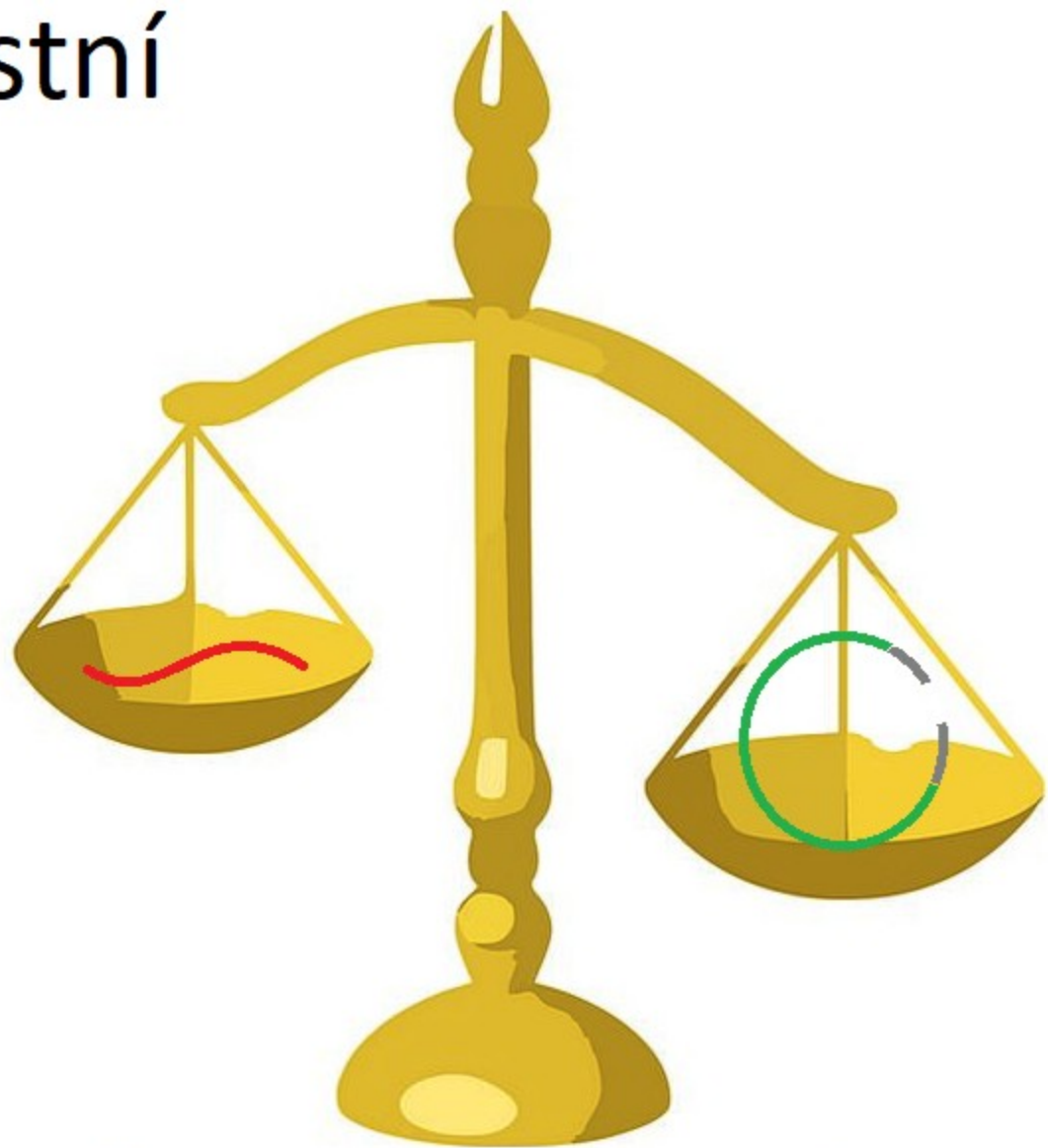
Transformovaná buňka *E. coli*

inzerť : vektor (molární poměr)	inzerť : vektor (hmotnostní poměr)
5:1	60 ng inzerť + 50 ng vektor
3:1	35 ng inzerť + 50 ng vektor
1:1	12 ng inzerť + 50 ng vektor

Molární vs. hmotnostní poměr

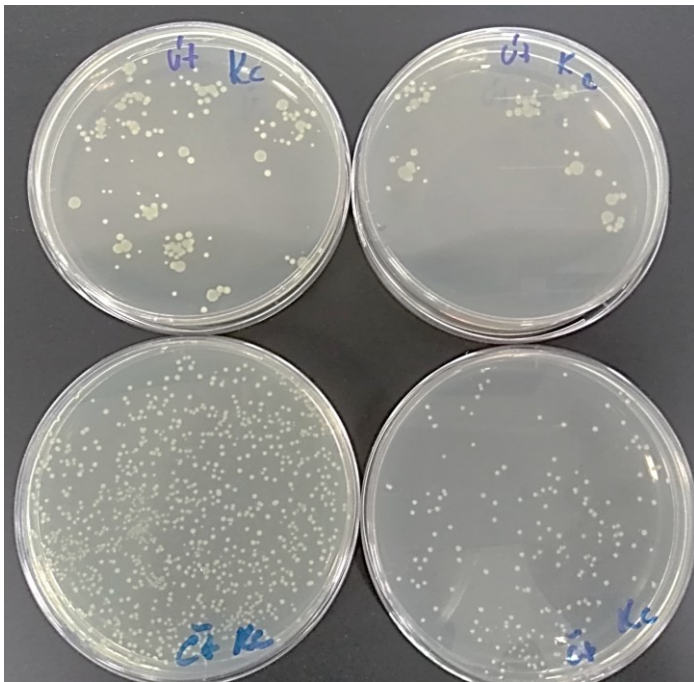


1 : 1



1 : 5

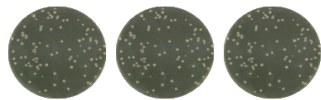
Příprava kompetenčních buněk



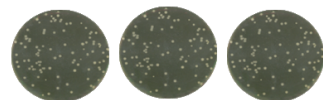
Pozor na správné
pipetování !

Stanovení titru kompetentních buněk

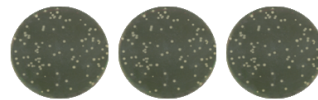
Ze tří misek součet kolonií/3 (počet musí být dobře počítatelný a > 10)



10^{-5}



10^{-6}



10^{-7}

Desítkovou řadou naředit KB v MPB nebo fyziol. roztoku.

Z každého ředění vyočkovat po 0,1ml na 3 misky **MPA bez antibiotika**.

Inkubace při 37 °C/18 hod



kultura *E. coli* narostlá v 20 ml
LB bujony do $OD_{600} = 0,3$

ochladit na ledu 0 °C

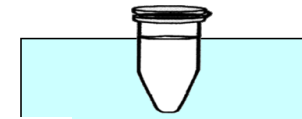
centrifugace 10 minut při 3000 rpm/4 °C

sediment resuspendovat v ledovém roztoku 0,05M $CaCl_2$ a
ponechat na ledu přes noc

centrifugace 10 minut při 3000 rpm/4 °C

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

Kompetentní buňky

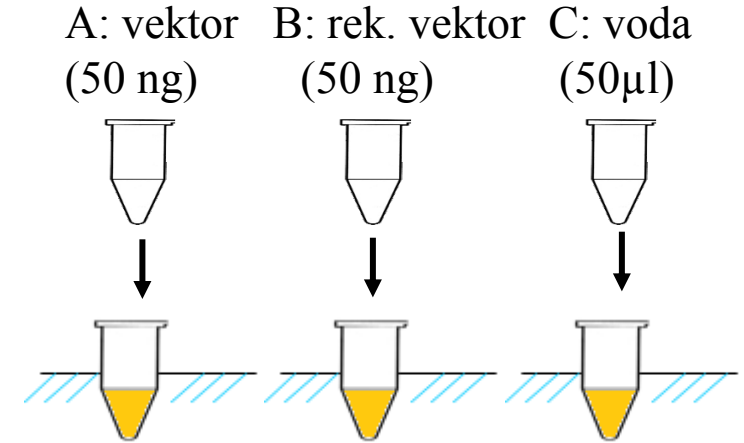


úchova na ledu nebo
při -70°C v glycerolu

TRANSFORMACE

Vzorky naředíme tak, aby v 50 μl roztoku bylo 50 ng DNA, tj. $c = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 3 vzorky:

A: 50 ng neštěpeného vektoru - každý
B: 50 ng rekombinantního vektoru - každý
C: 50 μl vody (negativní kontrola) – 2x na sem. sk.

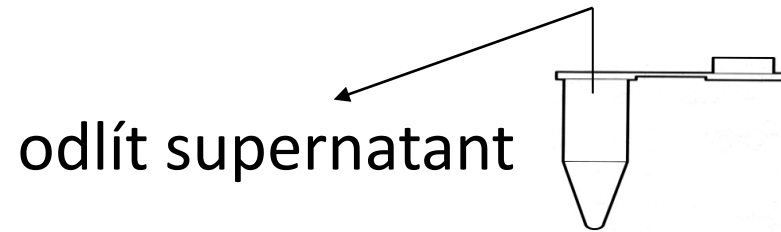


V mikrozkuhavce na ledu je **200 μl** kompetentních buněk

1. Vzorek opatrně promíchat s KB, nechat stát na ledu 30 min
2. Teplotní šok 42 C/60-90s
3. Na ledu přidat 1 ml LB bujonu a nechat 2 min stát
4. Inkubace 37 C/45-60 min



centrifugace při 12 000 rpm/ 1 min



odlít supernatant



resuspendovat sediment buněk ve zbytkovém médiu
(cca 100 μ l)



suspenzi vyočkovat na LBA + **AMP + IPTG + X-gal**
misky dopředu popsat na dno! nechat vsáknout



inkubovat dnem vzhůru při 37 C/24 – 48 hod

Titry:

Titr KB: Kompetentní buňky vysety ve **100 μl** =>

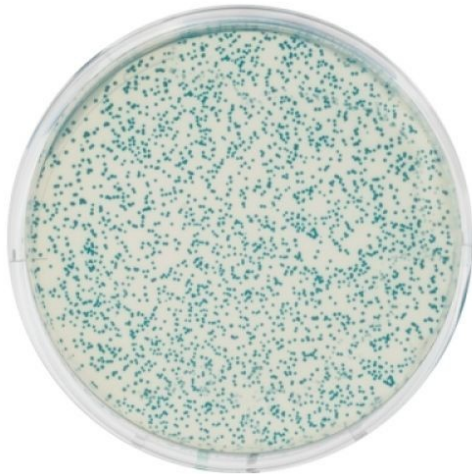
titr (CFU/ml) = počet buněk obrácená hodnota ředění **10**

Titr transformantů: Kompetentní buňky v počátečním objemu **200 μl** =>

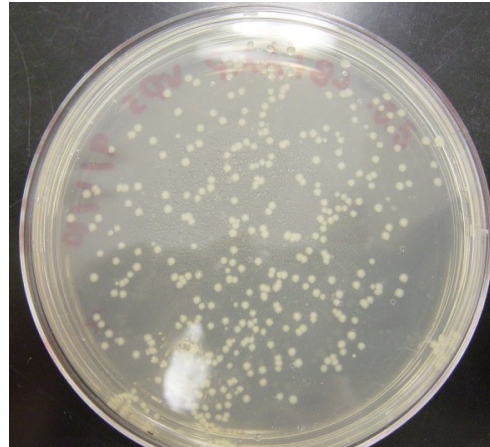
titr (CFU/ml) = počet buněk **5**

CFU – colony forming unit

A/ neštěpený vektor



B/ rekombinantní vektor



C/ voda



Hodnocení

1. stanovení titru kompetentních buněk **CPM/ml**

2. odečet kolonií transformantů a stanovit jejich titr:

CPT_A /ml

CPT_B /ml

CPT_C /ml

3. Transformační index pro poměry **5:1** a **3:1** a kontrolu **C** vyjádřen poměrem titru transformantů k titru kompetentních buněk:

$$Ti = CPT : CPM = N_{,d} \times 10^{-e}$$

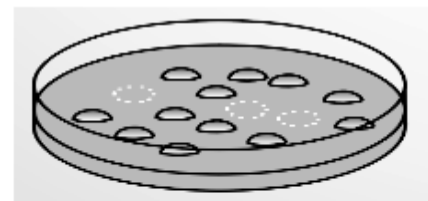
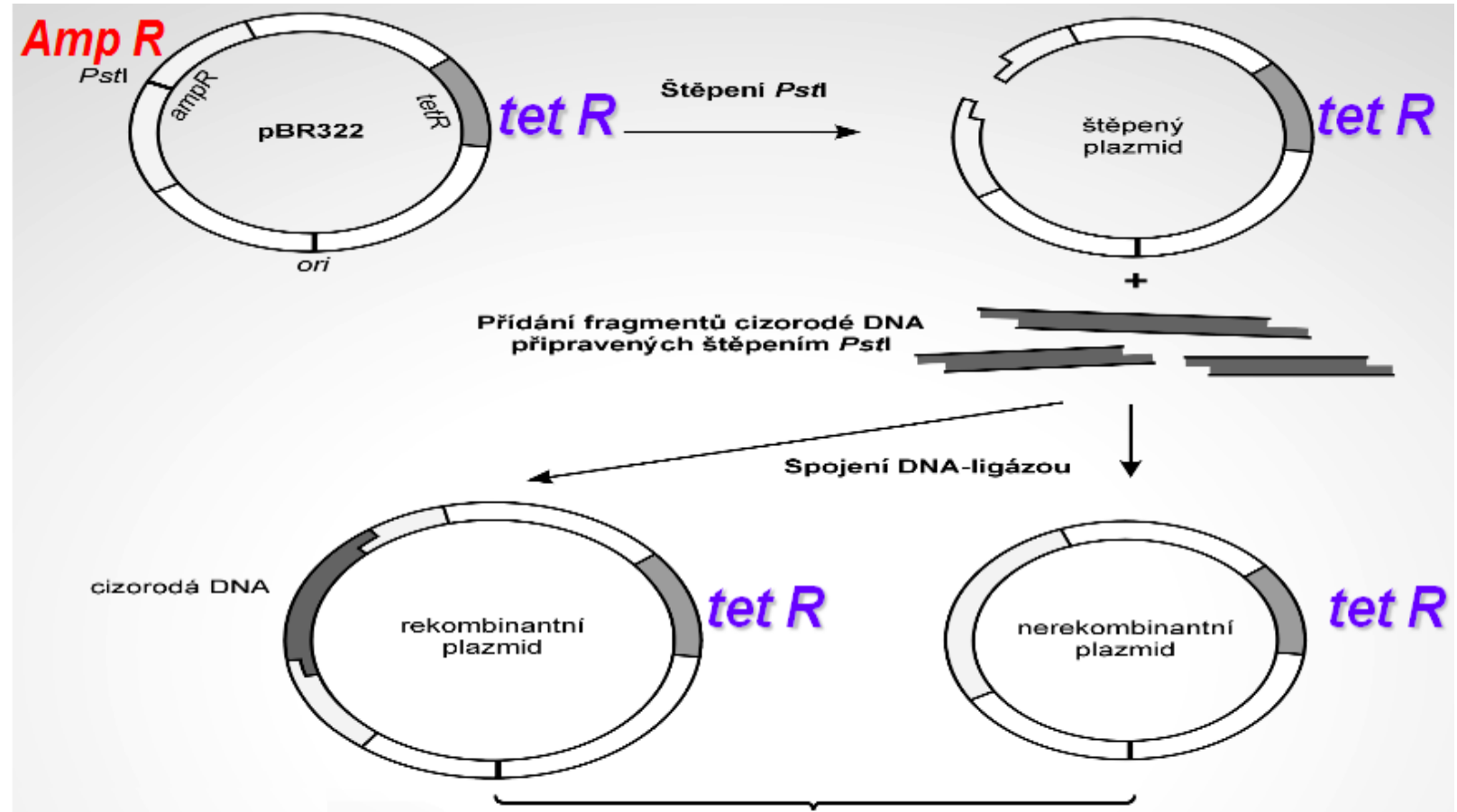
Zápis do protokolu

Titration of cells: $7,3 \times 10^9/\text{ml}$ - **správně**
 $726 \times 10^7/\text{ml}$ - nesprávně

T_{index} $T_{i_{1:1}} = N, d \times 10^{-e}$ - **správně**
 $T_{i_{1:1}} = N \%$ - nesprávně

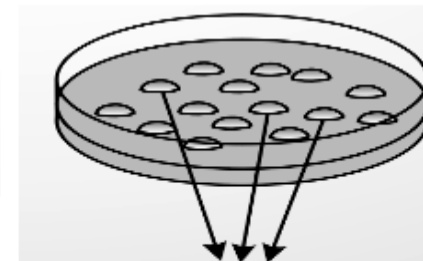
Inzerční inaktivace genu pro rezistenci k antibiotiku:

- Po vložení inzertu do genu pro rezistenci k ampicilinu je tento gen nefunkční
- Transformované buňky jsou necitlivé k tetracyklinu
- K ampicilinu jsou necitlivé jen buňky bez inzertu – s funkčním genem *ampR*
- Hledáme kolonie rezistentní k tetracyklinu, ale citlivé k ampicilinu
- razítkovací metoda



Půda s ampicilinem

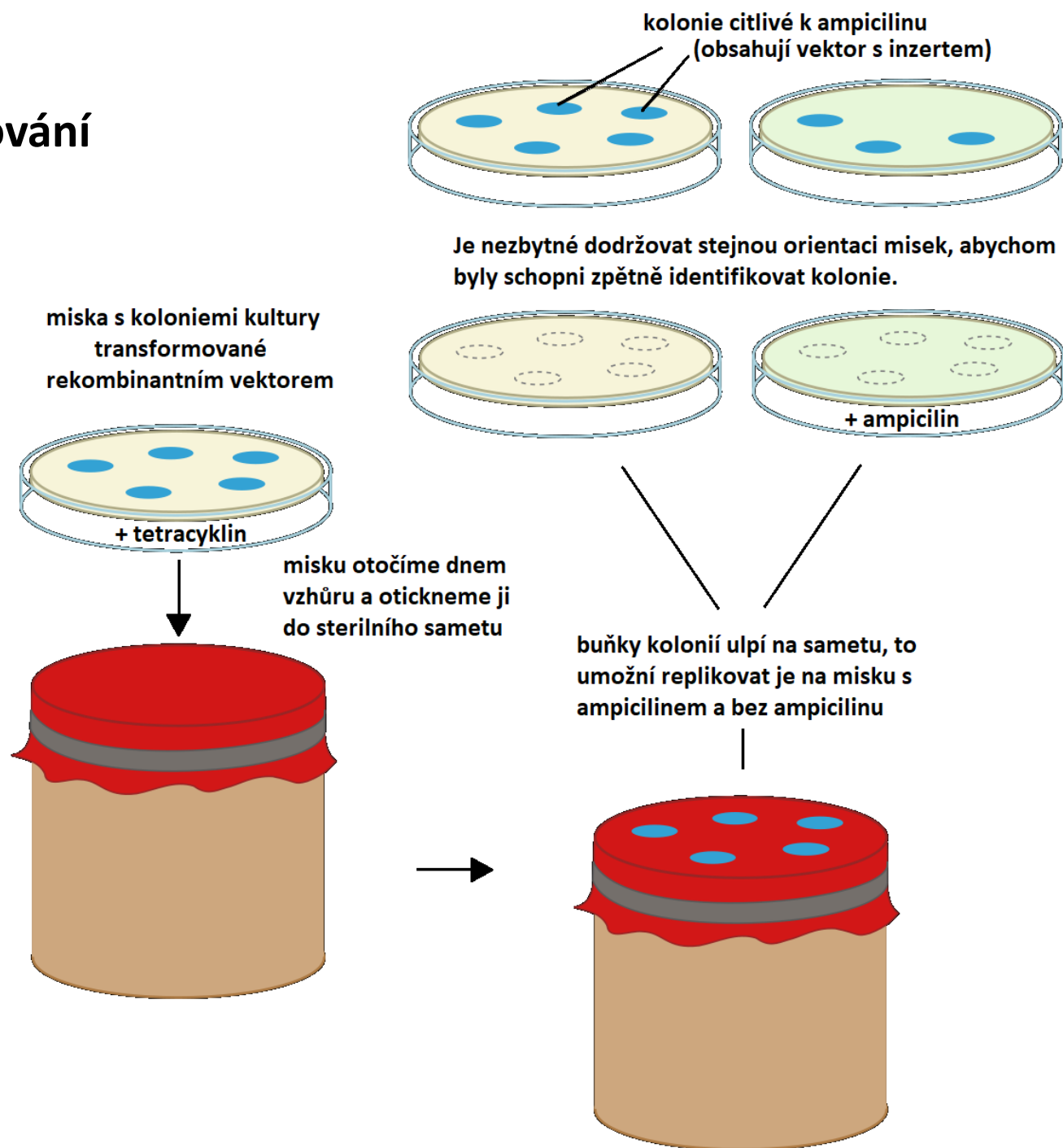
Přerazítkování na plotny s ampicilinem



kolonie s klonovanou DNA

Půda s tetracyklinem

Razítkování



Úlohy k vypracování – sam. práce

Procentuální koncentrace může mít tři základní vyjádření:

Hmotnostní procenta (w/w): množství látky (v gramech) ve 100 g výsledného roztoku.

Objemová procenta (v/v): počet mililitrů látky na 100 ml výsledného roztoku.

Hmotnostně-objemová procenta (w/v %): počet gramů látky na 100 ml výsledného roztoku.

Výpočty

pro skupiny 01_1, 01_2, 02_1:

1. Určete množství lysozymu o koncentraci 50 mg/ml, které se přidá do reakční směsi o objemu 100 μ l tak, aby byla jeho výsledná koncentrace 500 μ g /ml.
2. Určete, jaké množství zásobního roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml se musí přidat do 20 ml LB bujonu, aby byla jeho výsledná koncentrace 100 μ g/ml.
3. Kolika procentní roztok (w/v %) představuje 10M HCl ($M_r = 36$)? Popište, jak byste z hlediska bezpečnosti postupovali v přípravě tohoto roztoku.
4. Kolik g sacharózy a kolik vody je třeba k přípravě 20 g 10% roztoku (w/w=hmotnostní procenta)?
5. Kolik g NaCl ($M_r = 58,0$) použijete na přípravu 50 ml 2M roztoku NaCl?