

Klonování ve vektorech řady pUC

Příprava kompetentních buněk pro transformaci

Jako recipientních kmenů pro klonování cizorodé DNA se nejčastěji využívá kmenů *E. coli*, které byly mutacemi a metodami genového inženýrství upraveny tak, aby byly schopny s vysokou účinností přijímat externí DNA (většinou plazmidovou), umožňovaly její replikaci a udržovaly její původní strukturu (tj. nezpůsobovaly vyštěpování naklonované DNA) a dovolovaly selekci rekombinantních plazmidů. Podrobná charakteristika těchto kmenů (zejména jejich genotyp) bývá uváděna v katalogích firem a praktických příručkách.

Vlastní navození kompetence spočívá v pomnožení buněk příslušného kmene *E. coli* v tekutém živném mediu (např. LB bujonu) do exponenciální fáze růstu, převedení buněk do roztoku CaCl_2 , v němž se buňky ponechají několik hodin, během nichž dojde k jejich vyhladovění a určitým změnám v buněčné stěně, umožňujícím přijmout externí DNA.

Takto připravené buňky lze použít buď bezprostředně, nebo se převedou do roztoku CaCl_2 s přísadkou glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na -70°C a použít později (takto připravené buňky lze uchovávat několik měsíců nebo i déle).

Organismy: Bakteriální kmen *E. coli* DH5 α

Materiál: LB bujon, sterilní roztok 0,05 M CaCl_2 , sterilní centrifugační zkumavky, kolorimetr s příslušenstvím, chlazená centrifuga T23

Postup

1. 20 ml LB bujonu v Erlenmayerově baňce naočkujeme 2 ml bujonové kultury (18 hod/ 37°C) a inkubujeme při 37°C na vodní třepací lázni do hustoty suspenze $\text{OD}_{600} = 0,3$.
2. Buněčnou kulturu vytemperujeme na 0°C v ledové vodní lázni a centrifugujeme 10 min/3000 ot/min při 4°C . Od této chvíle nesmí teplota překročit 4°C !
3. Sediment buněk resuspendujeme v polovině objemu ledového roztoku CaCl_2 a ponecháme v lednici při 4°C přes noc.
4. Buňky zcentrifugujeme jako v bodě 2) a sediment resuspendujeme ve 2 ml (obecně v 1/10 výchozího objemu kultury) roztoku CaCl_2 .
5. Takto připravené kompetentní buňky lze používat přibližně jeden týden. Pro dlouhodobé uchování se k buněčné suspenzi přidá 1/10 objemu sterilního glycerolu (4°C !) a suspenze se zmrazí na -70°C .

Příprava plazmidového vektoru pBluescript M13+ ke klonování

Jedním z běžně používaných vektorů pro klonování v *E. coli* je bakteriální plazmidový vektor pBluescript (viz obr.). Jeho polylinker (obsahuje cílová místa pro 16 restričních endonukleáz) je umístěn v části genu lacZ kódující proximální část polypeptidu beta-galaktosidázy, což umožňuje použití k odlišení rekombinantních a nerekombinantních plazmidů alfa-komplementace. Gen pro rezistenci k ampicilinu je využíván pro selekci transformant.

Jako hostitelské kmeny pro tento plazmidový vektor jsou používány kmeny *E. coli*. Pro klonovací experimenty je nutné použít kmenů, které jsou schopny alfa-komplementace (tj. nesoucí mutaci lacZ M15), např. *E. coli* DH5 α , JM83, JM101, NM522 aj.

K izolaci DNA vektoru je možné použít několika metod, poskytujících DNA o různém množství a čistotě. Optimální je připravit DNA purifikovanou přes gradient CsCl-Etidiumbromidu. Je možné však vycházet i z preparátů, připravených některou z mikrometod, při nichž se získá DNA v množství několika μg s dobrou citlivostí ke štěpení restričními endonukleázami a účinně spojovaná ligázou. Jednou z těchto metod je metoda lyze varem, kterou zavedli Holmes a Quigley (1981).

Izolace DNA vektoru pBluescript metodou lyze varem

Organismus: *E. coli* (pBluescript) - nárůst kultury na Petriho misce (LB agar + 100 μg AMP/ml)

Materiál: Eppendorfovy zkumavky, mikrocentrifuga, automatické pipety, špičky, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor, restriční endonukleázy, štěpící pufr, sterilní destil. voda, TE pufr, 70% a 100% etanol.

STET Pufr: 0,1 M NaCl, 10 mM TRIS.Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 5% Triton X-100

Lysozym: 10 mg/ml (ve vodě)

2,5 M Na-acetát (pH 5,2)

Izopropanol

Postup:

1. Z nárůstu kultury na Petriho misce odebereme párátkem asi 1-2 mm³ a resuspendujeme v 350 μl STET pufru v epp. zkumavce. Odběr kultury párátkem provedeme tak, abychom neodebrali i část agaru.
2. Přidáme 25 μl roztoku lysozymu a dobře promícháme (protřepeme).
3. Zkumavku umístíme do lázně s vroucí vodou přesně na 1 minutu.
4. Zkumavku přeneseme do ledové vodní lázně.
5. Bakteriální lyzát zcentrifugujeme v mikrofuzi 10 min. při max. ot. a pokojové teplotě.
6. Sterilním párátkem odebereme viskózní sediment

7. K supernatantu přidáme 40 μ l 3M Na₃-acetátu a 420 μ l izopropanolu. Promícháme několikerým obrácením zkumavky. Zkumavku ponecháme 5 min při pokojové teplotě.

8. Obsah centrifugujeme 5 minut v mikrofuzi při max. otáčkách a 4°C. Supernatant odebereme pasterkou - je nutno odstranit veškerou tekutinu.

9. Přidáme 1 ml 70% etanolu, protřepeme a zcentrifugujeme 1 min v mikrofuzi. Supernatant odebereme, sediment opláchneme 100% etanolem (případně znovu zcentrifugujeme, jestliže se sediment uvolnil) a necháme oschnout v obrácené poloze při pokojové teplotě.

10. Sediment rozpustíme v 50 μ l TE pufru.

Poznámky:

Uvedeným postupem lze připravit asi 5 μ g DNA. Původní předpis vychází z tekuté výchozí kultury - pokud však použijeme plotny s kvalitním agarem, je čistota získané DNA dostatečná.

Roztok DNA se uchovává při -20°C, nebo krátkodobě při 4°C.

Naštěpení vektoru restriční endonukleázou

2 μ g DNA vektoru pBluescript naštěpíme v objemu 20 μ l reakční směsi příslušnou RE (2 hod).

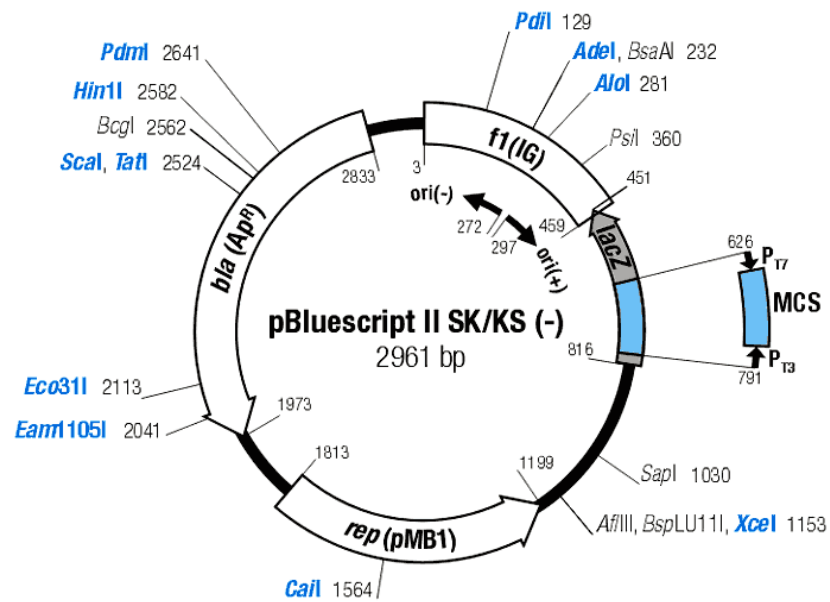
2 μ l reakční směsi nanese na agarozový gel a zkontrolujeme, zda je naštěpení vektoru úplné.

K reakční směsi přidáme 30 μ l TE pufru a provedeme purifikaci DNA (viz úloha č. 5). Nakonec DNA rozpustíme v 10 μ l TE pufru a uložíme při -20°C.

Příprava cizorodé DNA pro klonování ve vektoru pDmguetkr v

Jako cizorodou DNA lze pro klonování použijeme PCR produkt štěpený příslušnou restriční endonukleázou, jejíž štěpné místo se nachází v polylinkeru (velikost restričních fragmentů, které lze naklonovat je max. asi 10 kbp).

K naklonování lze použít DNA, která byla štěpena buď jednou RE, nebo dvěma různými RE - v tomto případě dojde k tzv. orientovanému začlenění restričního fragmentu do vektoru, což má řadu výhod, např. umožňuje restriční mapování a sekvencování z definovaného konce. Použití DNA štěpené dvěma enzymy zabraňuje její cirkularizaci a zvyšuje pravděpodobnost vzniku rekombinantních plazmidů při ligaci vektorové a cizorodé DNA.



M13/pUC sequencing primer (-20), 17-mer T7 promoter T7 transcription start

5' G TAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT **GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG** CGA ATT

3' C ATT TTG CTG CCG GTC ACT TAA CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC GCT TAA

LacZ ← Val Val Ala Leu Ser Asn Tyr Tyr Ser Glu Ser Tyr Pro Ser Asn

653 Acc65I KpnI Eco0109I ApaI Bsp120I XhoI HincII SalI XmiI Bsu15I HindIII EcoS2I EcoRI PstI Cfr9I SmaI BamHI BcuI XbaI EcoS2I NotI BstXI Cfr42I DsaI OflI Ecl136II SacI **760**

CGG TAC CGG GCC CCC CCT CGA GGT CGA CGG TAT CGA TAA GCT TGA TAT CGA ATT CCT GCA GCC CGG GGG ATC CAC TAG TTC TAG AGC GGC CGC CAC CGC GGT GGA GCT CCA

CCC ATG GCC CGG GGG GGA GCT CCA GCT GCC ATA GCT ATT CGA ACT ATA GCT TAA GGA CGT CGG GCC CCC TAG GTG ATC AAG ATC TCG CCG GCG GTG GCG CCA CCT CGA GGT

Pro Val Pro Gly Gly Arg Ser Thr Ser Pro Ile Ser Leu Ser Ser Ile Ser Asn Arg Cys Gly Pro Pro Asp Val Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Ala Thr Ser Ser Trp

GCT TTT GTT **CCC TTT AGT GAG GGT TAA TTC** CGA GCT TGG CGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'

CGA AAA CAA **GGG AAA TCA CTC CCA ATT AAG** GCT CGA ACC GCA TTAGTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'

T3 transcription start T3 promoter M13/pUC reverse sequencing primer (-26), 17-mer

Ser Lys Asn Gly Lys Thr Leu Thr Leu Glu Ser Ser Pro Thr Ile Met Thr **Met**

QIAquick PCR Purification Kit Protocol

using a microcentrifuge

This protocol is designed to purify single- or double-stranded DNA fragments from PCR and other enzymatic reactions (see page 8). For cleanup of other enzymatic reactions, follow the protocol as described for PCR samples or use the new MinElute Reaction Cleanup Kit. Fragments ranging from 100 bp to 10 kb are purified from primers, nucleotides, polymerases, and salts using QIAquick spin columns in a microcentrifuge.

Notes:

- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifuge steps are at 13,000 rpm (~17,900 $\times g$) in a conventional tabletop microcentrifuge.

1. **Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the PCR sample and mix. It is not necessary to remove mineral oil or kerosene.**

For example, add 500 μ l of Buffer PB to 100 μ l PCR sample (not including oil).

2. **Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.**

3. **To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.**

4. **Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube.**

Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.

5. **To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.**

6. **Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube. Centrifuge the column for an additional 1 min.**

IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.

7. **Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.**

8. **To elute DNA, add 50 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or H₂O to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 μ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge.**

IMPORTANT: Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48 μ l from 50 μ l elution buffer volume, and 28 μ l from 30 μ l elution buffer.

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at -20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

Ligace vektorové a cizorodé DNA

Nejsnadněji se klonují DNA-restrikční fragmenty, získané štěpením DNA dvěma různými RE. Pokud se liguje DNA po štěpením jednou RE, je vhodné provést defosforylaci vektoru, která podstatně snižuje jeho recirkularizaci a zvyšuje výtěžek rekombinantních molekul. Pokud se defosforylace neprovede, je možné výtěžek rekombinantních molekul zvýšit nastavením optimálního poměru koncentrací vektorové a cizorodé DNA - tento poměr se mění v závislosti na velikosti vektoru a klonovaného restrikčního fragmentu. Výpočet pro přesné stanovení koncentrací obou DNA je uveden v řadě příruček. Prakticky lze vyjít z poměru koncentrací 1:1, 3:1 a 1:3, kde je značná pravděpodobnost, že některá z těchto směsí obsahuje poměr blížíící se optimálnímu.

K ligaci se nejčastěji používá T4-DNA-ligáza (případně i DNA-ligáza z *E. coli*, která však nespojuje tupé konce). V reakční směsi o celkovém objemu se kombinuje obvykle 100-500 ng vektorové DNA se 100-500 ng cizorodé DNA. Ligační pufr je dodáván výrobcem jako 10x koncentrovaný roztok (jeho složkou je TRIS, DTT, BSA, ATP a Mg^{++}). Vlastní ligační reakce má teplotní optimum při 37°C - při této teplotě jsou však konce nestabilní (s tendencí k denaturaci), proto se ligace obvykle provádí při teplotách 16-25°C, kdy je soudržnost konců vyšší.

Výsledek ligační reakce je možné demostrovat elektroforeticky: po ligaci se vytvoří kromě rekombinantních plazmidových molekul rovněž vysokomolekulární frakce DNA, kterou lze na gelu dobře rozpoznat: je důkazem, že enzym je aktivní.

Materiál: DNA vektoru pBluescript štěpená RE, cizorodá DNA štěpená RE, T4-DNA-ligáza, 10x ligační pufr, mikrozkušavky, aut. pipety, špičky, termostat na 16°C, mikrofuga

Postup

1. Připravíme ligační směsi obsahující různé poměry vektorové a cizorodé DNA. Každá směs obsahuje v celkovém objemu 20 ul :
 - 100-500 ng vektorové DNA
 - 100-500 ng cizorodé DNA
 - destil. sterilní vodu (ad 20 ul).
2. Směs zahřejeme 5 minut na 45°C - dojde k rozvolnění kohezních konců. Zchladíme na 4°C.
3. Přidáme:
 - 2 μl 10x ligačního pufu
 - 0,1 Weissovy jednotky T4-DNA-ligázy
4. Po promíchání inkubujeme 4 hod (případně přes noc) při 16°C.
5. Odebereme 2 μl a nanese na 0,7% agrozový gel, na nějž nanese paralelně 2 ul vektorové a 2 ul cizorodé DNA.
6. V případě, že došlo k ligaci, pozorujeme rozdíly v elektroforetické mobilitě vzorků DNA.

Transformace kompetentních buněk *E. coli* rekombinantní DNA

Postup:

1. Do mikroskopické zkumavky se napipetuje 200 μ l kompetentních buněk. (V případě, že se používají buňky zmrazené na -70°C , nechají se pozvolna rozmrazit při pokojové teplotě.)
2. Zkumavka se umístí do ledové lázně.
3. Přidá se DNA (obvykle se 1-5 μ l liguční směsi smíchá s TE pufrům do celkového objemu 10 μ l, který se pak přidá ke kompetentním buňkám).
4. Lehce se promíchá a ponechá v ledové lázni 30 minut.
5. Buňky se podrobí tepelnému šoku ponořením zkumavky na 1 min do vodné lázně 42°C , nebo 3 min / 37°C .
6. Zkumavka se přenesse do ledové lázně a přidá se 1 ml LB bujony.
7. Následuje inkubace 1 hod při 37°C na vodní třepací lázni.
8. Buňky se zcentrifugují 5 min při 1500 ot/min (nebo 1 min při 6000 ot/min).
9. Supernatant se sleje - většinou však zůstane ve zkumavce asi 100 μ l supernatantu, ve kterém lze buňky resuspendovat.
10. Suspenze se vyseje pomocí bakteriologické hokejky na agarové plotny (LB agar, obsahující 50-100 μ g ampicilinu /ml). Pokud se použijí plotny obsahující navíc X-gal a IPTG, lze přímo odlišit podle zbarvení kolonie obsahující rekombinantní nebo nerekombinantní plazmid.
11. Plotny se inkubují 24-48 hod při 37°C .

Poznámky:

1. Účinnost transformace kolísá v závislosti na použitém kmeni *E. coli*, na pracovním postupu při přípravě kompetentních buněk a na koncentraci DNA použité k transformaci. Platí, že nejvyšší účinnosti transformace se dosáhne při použití velmi nízkých koncentrací DNA, nepřesahujících 10 ng/jednu transformační směs (optimální konc. je pod 1 ng DNA).
2. Je vhodné sledovat nárůst kolonií na plotnách: někdy se stává, že v okolí transformantů se postupně objevují (dorůstají) drobné kolonie, které nejsou transformanty a nejsou tudíž rezistentní k ampicilinu: rostou v okolí rezistentních kolonií, které ampicilin rozkládají.
3. Vyrostlé kolonie je vhodné přepasážovat na čisté plotny a založit klony z jednotlivých nově vyrostlých kolonií.