

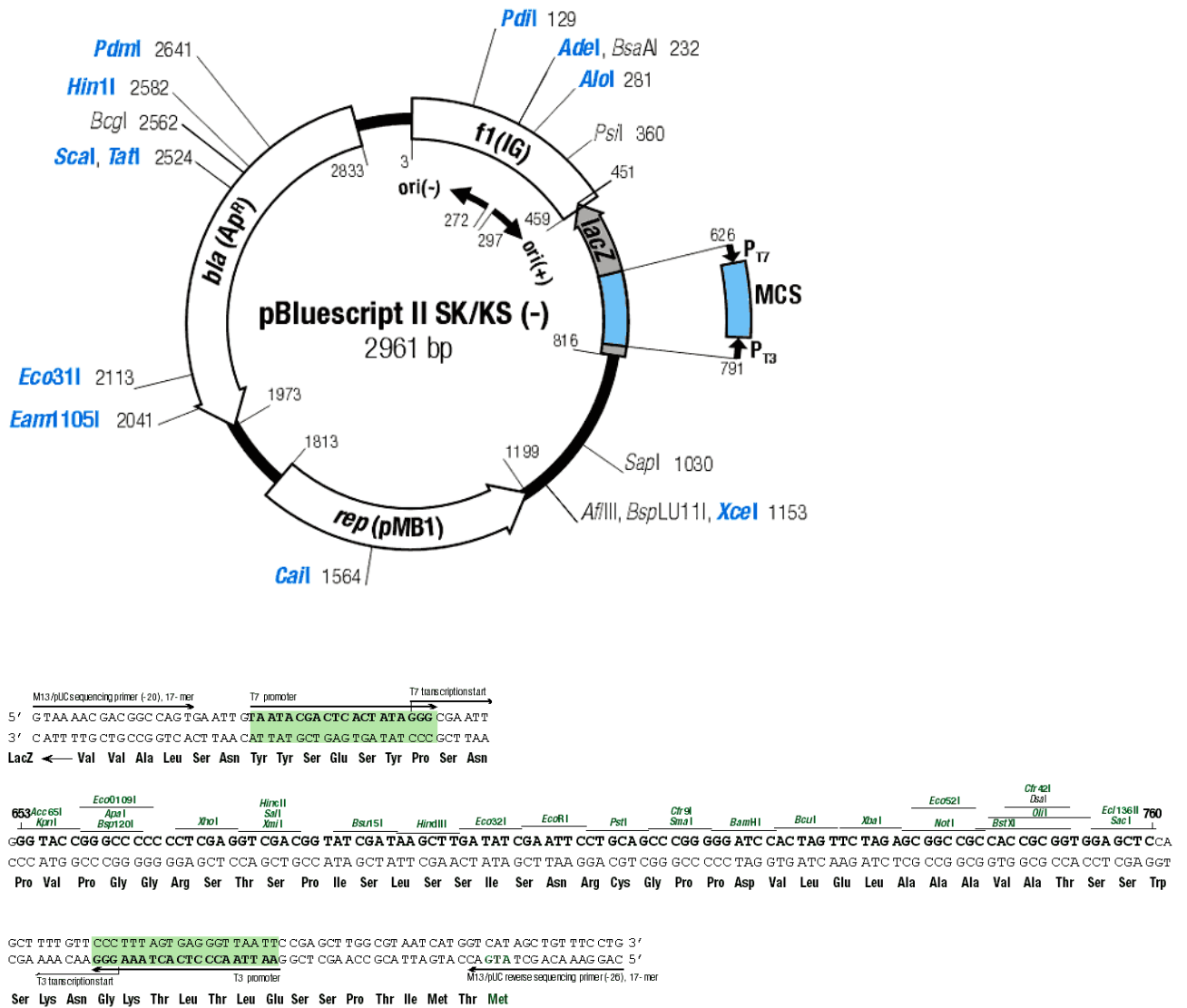
# Klonování ve vektorech řady pUC

## ÚVOD:

### Plazmidový vektor pBluescript M13+

Jedním z běžně používaných vektorů pro klonování v *E. coli* je bakteriální plazmidový vektor pBluescript (viz obr. 1). Jeho polylinker (obsahuje cílová místa pro 16 restričních endonukleáz) je umístěn v části genu *lacZ* kódující proximální část polypeptidu beta-galaktosidázy, což umožňuje použít k odlišení rekombinantních a nerekombinačních 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 $\alpha$ , JM83, JM101, NM522 aj.



**Obrázek 1.** Mapa vektroou pBluescript II SK/KS (-)

### **Naštěpení vektoru restriční endonukleázou**

2 µg DNA vektoru pBluescript naštěpíme v objemu 20 µl reakční směsi příslušnou RE (2 hod).

2 µl reakční směsi nanese na agarózový gel a zkontrolujeme, zda je naštěpení vektoru úplné.

K reakční směsi přidáme 30 µl TE pufru a provedeme purifikaci DNA (viz úloha č. 5).

Nakonec DNA rozpustíme v 10 µl TE pufru a uložíme při -20°C.

### **Příprava cizorodé DNA pro klonování ve vektoru pBluescript**

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.

Přístroje: váha, DRY blok, vortex, skalpel, nerezová špachtle, etanol na, brýle, štít

Chemikálie: QIAGEN kit, nanášecí pufr, marker 2-log, T4 ligáza + pufr

### **POSTUP PRÁCE – Příprava vektoru a inzertu pro klonování**

1. Ve sterilní Eppendorfově zkumavce připravte restriční štěpení vektoru a inzertu s použitím restričních endonukleáz *EcoRI* a *BamHI* (viz. Cvičení 2)  
Vektor: pBluescript SK-  
Inzert: 500 bp fragment genu hsp60 (60 kDa chaperonin *S. aureus*)  
Objem směsi: 50 µl
2. Štěpení provádějte 2 hodiny při 37 °C a reakci zastavte přidáním 0.8 µl 0.5M EDTA.
3. Proveďte elektroforézu vzorků DNA na agarózovém gelu (viz Cvičení 3)
4. Agarózový gel obarvíte ethidiumbromidem..

**Tato část úlohy (body 1-4) bude předem připravena vyučujícím.**

5. Fragменты DNA vyřízněte skalpelem z agarózového gelu a DNA vyčistěte s použitím kitu QIAquick gel extraction kit (Návod viz níže).

# QIAquick Gel Extraction Kit Protocol

## using a microcentrifuge

This protocol is designed to extract and purify DNA of 70 bp to 10 kb from standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffer. Up to 400 mg agarose can be processed per spin column. This kit can also be used for DNA cleanup from enzymatic reactions (see page 8). For DNA cleanup from enzymatic reactions using this protocol, add 3 volumes of Buffer QG and 1 volume of isopropanol to the reaction, mix, and proceed with step 6 of the protocol. Alternatively, use the new MinElute Reaction Cleanup Kit.

- Notes:**
- The yellow color of Buffer QG indicates a pH  $\leq 7.5$ .
  - Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
  - Isopropanol (100%) and a heating block or water bath at 50°C are required.
  - All centrifugation steps are carried out at  $\geq 10,000 \times g$  (~13,000 rpm) in a conventional table-top microcentrifuge.
  - 3 M sodium acetate, pH 5.0, may be necessary.

- 1. Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.**  
Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.
- 2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QG to 1 volume of gel (100 mg ~ 100  $\mu$ l).**  
For example, add 300  $\mu$ l of Buffer QG to each 100 mg of gel. For >2% agarose gels, add 6 volumes of Buffer QG. The maximum amount of gel slice per QIAquick column is 400 mg; for gel slices >400 mg use more than one QIAquick column.
- 3. Incubate at 50°C for 10 min (or until the gel slice has completely dissolved). To help dissolve gel, mix by vortexing the tube every 2–3 min during the incubation.**  
**IMPORTANT:** Solubilize agarose completely. For >2% gels, increase incubation time.
- 4. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose).**  
If the color of the mixture is orange or violet, add 10  $\mu$ l of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.  
The adsorption of DNA to the QIAquick membrane is efficient only at pH  $\leq 7.5$ . Buffer QG contains a pH indicator which is yellow at pH  $\leq 7.5$  and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.
- 5. Add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix.**  
For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100  $\mu$ l isopropanol. This step increases the yield of DNA fragments <500 bp and >4 kb. For DNA fragments between 500 bp and 4 kb, addition of isopropanol has no effect on yield. Do not centrifuge the sample at this stage.

6. **Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.**
7. **To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column, and centrifuge for 1 min.**  
The maximum volume of the column reservoir is 800  $\mu$ l. For sample volumes of more than 800  $\mu$ l, simply load and spin again.
8. **Discard flow-through and place QIAquick column back in the same collection tube.**  
Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.
9. **(Optional): Add 0.5 ml of Buffer QG to QIAquick column and centrifuge for 1 min.**  
This step will remove all traces of agarose. It is only required when the DNA will subsequently be used for direct sequencing, in vitro transcription or microinjection.
10. **To wash, add 0.75 ml of Buffer PE to QIAquick column and centrifuge for 1 min.**  
**Note:** If the DNA will be used for salt sensitive applications, such as blunt-end ligation and direct sequencing, let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE, before centrifuging.
11. **Discard the flow-through and centrifuge the QIAquick column for an additional 1 min at  $\geq 10,000 \times g$  (~13,000 rpm).**  
**IMPORTANT:** Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.
12. **Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.**
13. **To elute DNA, add 50  $\mu$ l of Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or H<sub>2</sub>O to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min at maximum speed. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30  $\mu$ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min.**  
**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  $\mu$ l from 50  $\mu$ l elution buffer volume, and 28  $\mu$ l from 30  $\mu$ l.  
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  $-20^{\circ}\text{C}$  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.

## POSTUP PRÁCE – Příprava ligačních směsí

1. Připravte 2 ligační směsi obsahující poměry vektorové a cizorodé DNA 1:1 a 1:3. Každá směs se připravuje ve finálním objemu 20  $\mu$ l a obsahuje :

- 100-500 ng vektorové DNA
- 100-500 ng cizorodé DNA
- destilovanou sterilní vodu

2. Směs zahřejeme 5 minut na 45°C - dojde k rozvolnění kohezních konců. Zchladíme na 4°C.

3. Přidáme:

- 2  $\mu$ l 10x ligačního pufru
- 0,1 Weissovy jednotky T4-DNA-ligázy

4. Po promíchání inkubujte 4 hod při pokojové teplotě.

	<b>Ligace 1 (20 <math>\mu</math>l)</b>	<b>Ligace 2 (20 <math>\mu</math>l)</b>
Voda		
T4 DNA ligázový pufr (10x)		
T4 DNA ligáza		
Vektor		
Inzert		