

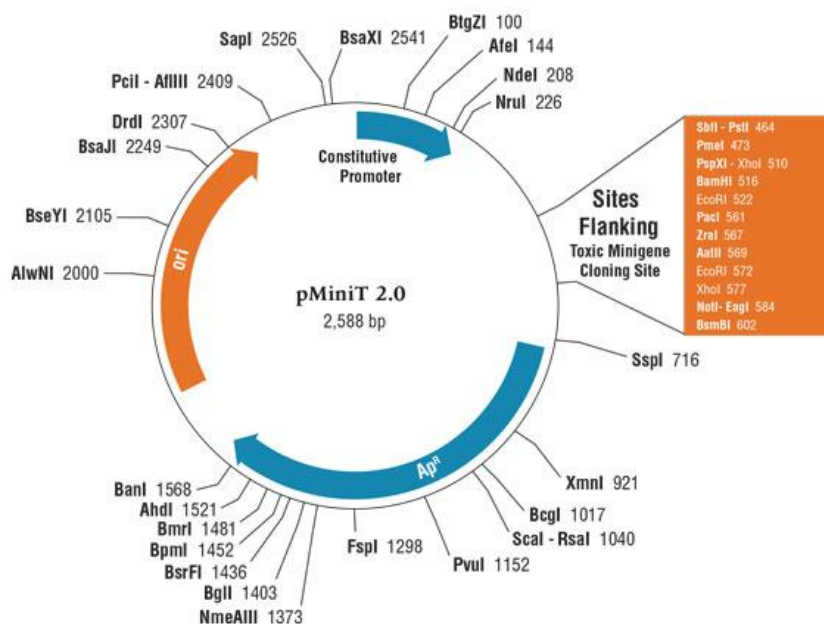
Jméno a uço:

Datum:

ÚLOHA C Klonování PCR produktu do plasmidu

TEORETICKÝ ÚVOD

Při klonování PCR produktů do plasmidů se obvykle využívá vlastnosti Taq polymerasy, a jiných non-proofreading polymeras, přidávat na konec nově syntetizovaného řetězce jednu bázi (adenin) navíc. Klonovací vektor je poté v lineární formě, kdy na každém konci nese jednu bázi (thymin nebo uracil) navíc a je tak k řetězci komplementární. V našem případě však využijeme speciální ligační kit, který v případě absence přesahující báze, automaticky bázi doplní a za optimálních podmínek poté umožní hybridizaci a ligaci PCR fragmentu do vektoru pMiniT 2.0 (NEB) (Obrázek 1). PCR fragment hybridizuje do tzv. MCS (multicloning site) místa, které poté dovoluje použití širokého spektra restriktáz pro jeho případné vyštěpení z vektoru a re-klonování do jiného vektoru. MCS místo se nachází uvnitř tzv. toxic genu, který jak název napovídá, je pro bakterii toxický a tlumí její růst. Úspěšné včlenění PCR produktu do vektoru má za následek ztrátu schopnosti expimace tohoto genu, čímž je umožněna selekce viabilních transformovaných kolonií. Vektor rovněž nese rezistenci na jedno nebo dvě antibiotika (obvykle na ampicilin) a obsahuje T7 a SP6 promotor pro případnou produkci klonovaného PCR produktu.



Obrázek 1: Schéma klonovacího vektoru pMiniT 2.0 (NEB)

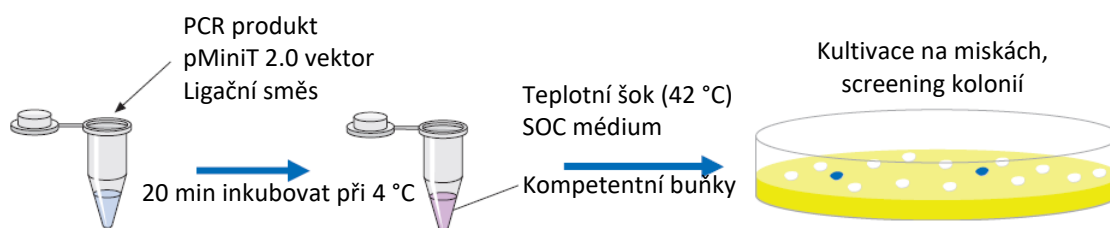
Úloha C - Klonování PCR produktu do plasmidu

Před vlastním klonováním je většinou nutné PCR produkt přečistit pomocí agarózové elektroforézy, abychom se vyhnuli klonování případných vedlejších produktů PCR reakce (dimery primerů, nespecifické produkty). Množství PCR produktu (ng) při ligaci se poté spočítá na základě vzorce:

$$\frac{\text{Množství vektoru (ng)} \times \text{délka PCR produktu (kb)}}{\text{délka vektoru (kb)}} \times \text{molární poměr} \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}}$$

Ligační reakce většinou poté probíhá při pokojové teplotě po dobu 15 – 60 minut nebo při 4 °C přes noc. Poté dochází ke vložení ligovaného vektoru do kompetentních buněk. V našem případě budou použity termo-kompetentní buňky *E. Coli* HB101.

Kompetentní buňky jsou skladovány při –70 °C a využívá se jejich schopnosti po rozmrazení a vystavení krátkému teplotnímu šoku přijmout DNA. Po teplotním šoku je k buňkám obvykle přidáno SOC médium a jsou 2 hodiny inkubovány při 37 °C. Poté jsou vyočkovány na misku s příslušným selekčním antibiotikem a následující den je pozorován počet úspěšných transformantů.



Obrázek 2: Schéma transformace buněk *E. Coli* HB101

Protože může docházet i k ligaci vektoru bez vloženého PCR produktu, musíme být schopni nějakým způsobem odlišit kolonie bakterií obsahující vektor s vloženým inzertem od kolonií s *prázdným* vektorem. Typicky se využívá genu *lacZ*, kdy úspěšné včlenění PCR produktu do vektoru má za následek ztrátu jeho aktivity, která tak může být využita pro selekci úspěšných transformantů pomocí barevného substrátu X-gal. V případě ligace samotného vektoru dochází k růstu modrých kolonií (enzym galaktosidasa je aktivní) a v případě úspěšné ligace PCR produktu do vektoru k růstu bílých kolonií (enzym galaktosidasa je inaktivován vloženým PCR produktem).

V našem případě včleněním inzertu je znemožněna expimace dříve zmíněného toxic genu, který by jinak kompletně inhiboval růst bakterie. Jenom úspěšná ligace s inzertem tedy vede k růstu kolonií.

POSTUP PRÁCE

Amplifikace vybraného genu (PR1 nebo PR2 nebo PR5 nebo EF1α)

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

FW+REV Primer (5 uM)	2 µl
RedTaq Mix 2x konc	10 µl
<u>PCR voda</u>	<u>6 µl</u>
Templát (cDNA)	2 µl

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2:30 min	
95°C	30 s	}45x
60°C	20 s	
72°C	30 s	
72°C	5:00 min	

Analýza PCR produktu a jeho přečištění pomocí **MinElute Gel extraction Kit (Qiagen)**

1. Připravte 1.5% agarózový gel.
2. Na gel naneste 20 µl PCR produktu smíchaného s 3 µl DNA nanášecího pufru do jedné jamky a 2.5 µl délkového markeru (GeneRuler 100 bp) do druhé jamky.
3. Spusťte elektroforézu: 150 V, 20 minut.
4. Po skončení elektroforézy vynulujte váhu na 1,5 ml zkumavku.
5. Dejte gel na transiluminátor a vyřežte PCR produkt (poznamenejte si jeho velikost).
6. Proužek přeneste do 1,5 ml zkumavky a zvažte.
7. Do zkumavky přidejte QG pufr v poměru 300 µl roztoku na 100 mg gelu.
8. Inkubujte směs 10 minut při 55°C, kdy průběžně zkumavku vortexujte, abyste urychlili rozpuštění gelu.
9. Po rozpuštění gelu zkontrolujte barvu roztoku, jestli je žlutá a přidejte isopropanol v poměru 100 µl izopropanolu na 100 mg gelu a zvortexujte.
10. Poté přeneste celou směs na kolonku (pokud je směs více jak 800 µl tak nadvakrát).
11. Stočte kolonku 1 min při 14 000 x g.
12. Vylijte proteklý roztok a přidejte na kolonku 500 µl QG pufru.
13. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
14. Vylijte proteklý roztok a přidejte na kolonku 750 µl roztoku PE.
15. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
16. Vyhodte zkumavku, kolonku přeneste do nové 2.0 ml zkumavky a centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
17. Vyhodte zkumavku, kolonku přeneste do nové 1,5 ml zkumavky a na její střed napipetujte 11 µl EB pufru.
18. Centrifugujte 1 min při 10 000 x g, PCR produkt je přečištěn, změřte jeho koncentraci na NanoFotometru nebo Qubit.

Úloha C - Klonování PCR produktu do plasmidu

Klonování PCR produktu do plasmidu pMiniT 2.0 a jeho následná transformace do buněk E.coli HB101

1. Rozmrazte Cloning Mix 1 a 2, pMiniT 2.0 klonovací vektor a PCR vodu.
2. Připravte ligační směs:

pMiniT 2.0 klonovací vektor	1 μ l
PCR produkt	1-4 μ l (vypočtete na základě vzorce)
Cloning Mix 1	4 μ l
Cloning Mix 2	1 μ l
PCR voda	do 10 μ l

3. Jemně ligační směs promíchejte, krátce stočte a inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
4. Rozmrazte potřebný počet alikvotů kompetentních buněk HB101 na ledě a předejte SOC medium na pokojovou teplotu.
5. Do zkumavky s kompetentními buňkami přidejte 2 μ l ligační směsi, opatrně promíchejte a inkubujte 20 minut na ledě.
6. Poté umístěte zkumavku do termostatu na 42 °C přesně na 30 s a poté ji vraťte na 2 minuty do ledu.
7. Přidejte 450 μ l SOC media a inkubujte za třepání (1000 rpm) 1 hodinu.
8. Od tohoto bodu provádějte všechny činnosti v laminárním boxu a sterilně.
9. Poté si připravte nalitou LB misku s ampicilinem (100 μ g/ml)
10. Napipetujte na připravenou misku 100 μ l SOC media s kompetentními buňkami a důkladně medium rozetřete bakteriologickou hokejkou.
13. Nechte z misek odpařit zbytek rozetřeného média, misky zavřete a umístěte dnem vzhůru do termostatu na 37 °C.
14. Následující den popište výsledek.

Zaočkování kolonie pro izolaci plasmidu

Ze selekční misky vyberte jednu kolonii nesoucí plasmid s inzertem a pomocí malé špičky ji přeneste do 2 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) a inkubujte na třepačce při 37°C 12-16 hodin.

Izolace plasmidu z kultury E. coli pomocí kitu Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

1. Přeneste 2.0 ml bakteriální kultury do 2.0 ml zkumavky a centrifugujte 30s při 14 000 x g.
2. Odstraňte veškerý supernatant, do zkumavky opět přeneste 2.0 ml bakteriální kultury a centrifugujte 30s při 14 000 x g.
3. Odstraňte veškerý supernatant a přidejte 250 μ l Cell Resuspension roztoku a resuspendujte pelet na vortexu.

Úloha C - Klonování PCR produktu do plasmidu

4. Přidejte 250 μ l Cell Lysis roztoku a opatrně promíchejte převrácením. Nevortexujte!
5. Přidejte 10 μ l Alkaline Protease roztoku a převrácením (4x) směs ve zkumavce pořádně promíchejte. Nevortexujte! Inkubujte 5 min. na stole.
6. Přidejte 350 μ l Neutralizačního roztoku a převrácením (4x) směs ve zkumavce pořádně promíchejte. Nevortexujte!
7. Centrifugujte 10 min při 14 000 x g.
8. Supernatant opatrně přeneste na kolonku umístěnou ve zkumavce.
9. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
10. Odstraňte proteklý roztok a na kolonku napipetujte 700 μ l Promývacího roztoku.
11. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
12. Odstraňte proteklý roztok a na kolonku napipetujte 250 μ l Promývacího roztoku.
13. Centrifugujte 2 min při 14 000 x g.
14. Odstraňte proteklý roztok a na kolonku a znovu centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
15. Přeneste kolonku do nové zkumavky, přidejte 50 μ l Elučního pufru a nechte 1 min inkubovat na stole.
16. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
17. Plasmidová DNA je připravena k použití, změřte její koncentraci a čistotu na NanoFotometru.

Měření koncentrace a čistoty izolované DNA pomocí Nano-fotometru

1. Na fotometru nastavte měření koncentrace dsDNA.
 2. Na čočku měřicí kyvety napipetujte 3 μ l PCR vody a zakryjte vrškem s faktorem 10.
 3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku (BLANK).
 4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3 μ l vzorku DNA.
 5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (SAMPLE).
- Vytisknete hodnoty čistoty $A_{260/280}$, $A_{230/260}$ a naměřené spektrum.

Příprava plasmidu o definované koncentraci

1. Na základě znalosti velikosti plasmidu s PCR produktem (přibližně 3200 bp) a střední molekulové hmotnosti 1 páru bazí DNA (650 g/mol) vypočítejte koncentraci plasmidové DNA při následujícím počtu kopií:

10 000 kopií/ μ l
100 000 kopií/ μ l
1 000 000 kopií/ μ l
10 000 000kopií/ μ l

2. Na základě vypočtených hodnot zřeďte plasmidovou DNA PCR vodou na požadovanou koncentraci v celkovém objemu 100 μ l.

VYHODNOCENÍ

- Uvedte celkový počet kolonií po transformaci.
- Uvedte kvantitu a čistotu vyizolované plasmidové DNA.
- Uvedte vypočítané hodnoty koncentrací plasmidové DNA pro jednotlivý počet kopií/ μ l.