

Gibsonovo klonování

Jedná se o účinnou a jednoduchou metodu klonování, při kterém v rámci jedné isotermální reakce (za použití tří různých enzymů, ale konstantní teploty) můžeme najednou pospojovat několik dvouřetězcových fragmentů DNA v jeden úsek.

- Metoda je založena na PCR přípravě fragmentů se vzájemně překrývajícími se konci. Délka překrytí by měla být cca 30 bp.
- Při následné reakci jsou tyto konce štěpeny T5 Exonukleázou, která na těchto koncích vytváří 3' jednořetězcové převisy. Vzhledem k identické sekvenci, které konce dvou daných fragmentů mají, po štěpení T5 Exonukleázou vznikají na koncích fragmentů komplementární úseky, které umožní svou vzájemnou hybridizaci a tedy spojení dvou fragmentů v jeden celek za účasti T4 DNA ligázy, která fragmenty spojí a Phusion polymerázy, která doplní vzniklé mezery.

Postup při Gibsonově klonování:

1. krok – PCR: Ke koncům klonovaných úseků jsou navrženy primery, které docílí překrytí konců dvou fragmentů, které chceme spojit. Délka primeru by měla být cca 60 bp, přičemž prvních cca 30 bazí od 5' konce pokrývá sekvenci druhého fragmentu. Reakcí získáme fragmenty, které mají vzájemně se překrývající se konce.

2. krok – příprava roztoků

Příprava 5X ISO pufu

- 3 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5
- 150 μ l 2 M $MgCl_2$
- 60 μ l 100 mM dGTP
- 60 μ l 100 mM dATP
- 60 μ l 100 mM dTTP
- 60 μ l 100 mM dCTP
- 300 μ l 1 M DTT
- 1.5 g PEG-8000
- 300 μ l 100 mM NAD
- doplňte vodou do 6 ml, důkladně promíchejte, alikvotujte po 100 μ l a skladujte při -20 °C.

Příprava reakční směsi:

- 320 μ l 5X ISO buffer
- 0.64 μ l 10 U/ μ l T5 exonukleáza
- 20 μ l 2 U/ μ l Phusion polymeráza
- 160 μ l 40 U/ μ l Taq ligáza
- dodejte vodu do 1.2 ml,
- alikvotujte po 15 μ l a skladujte při -20 °C.

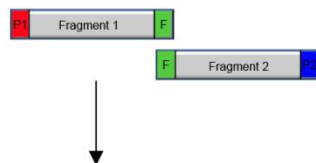
Tato reakční směs může být skladována při -20 °C nejméně jeden rok. Enzymy zůstávají aktivní nejméně po 10 rozmrazovacích/zamrazovacích cyklech.

3. krok - samotná isotermální reakce

- Na reakci použijeme 5 μ l směsi klonovaných fragmentů, které jsou zastoupeny v ekvimolárním množství. Celkové množství DNA by mělo být 20-20 ng.
- K DNA přidáme 15 μ l reakční směsi.
- Směs inkubujeme při 50°C 15- 60 min.

Provedeme transformaci do bakterií.

1. krok: Vytvoření překryvů pomocí PCR s vhodně navrženými primery



- P1** překryv fragmentu 1 s plasmidem
- F** překryv jednoho z fragmentů s druhým z fragmentů
- B1** překryv fragmentu 2 s plasmidem

2. krok: tři reakce v jedné zkumavce -
štěpení T5 exonukleázou, doplnění Phusion polymerázou
a ligace T4 DNA ligázou

