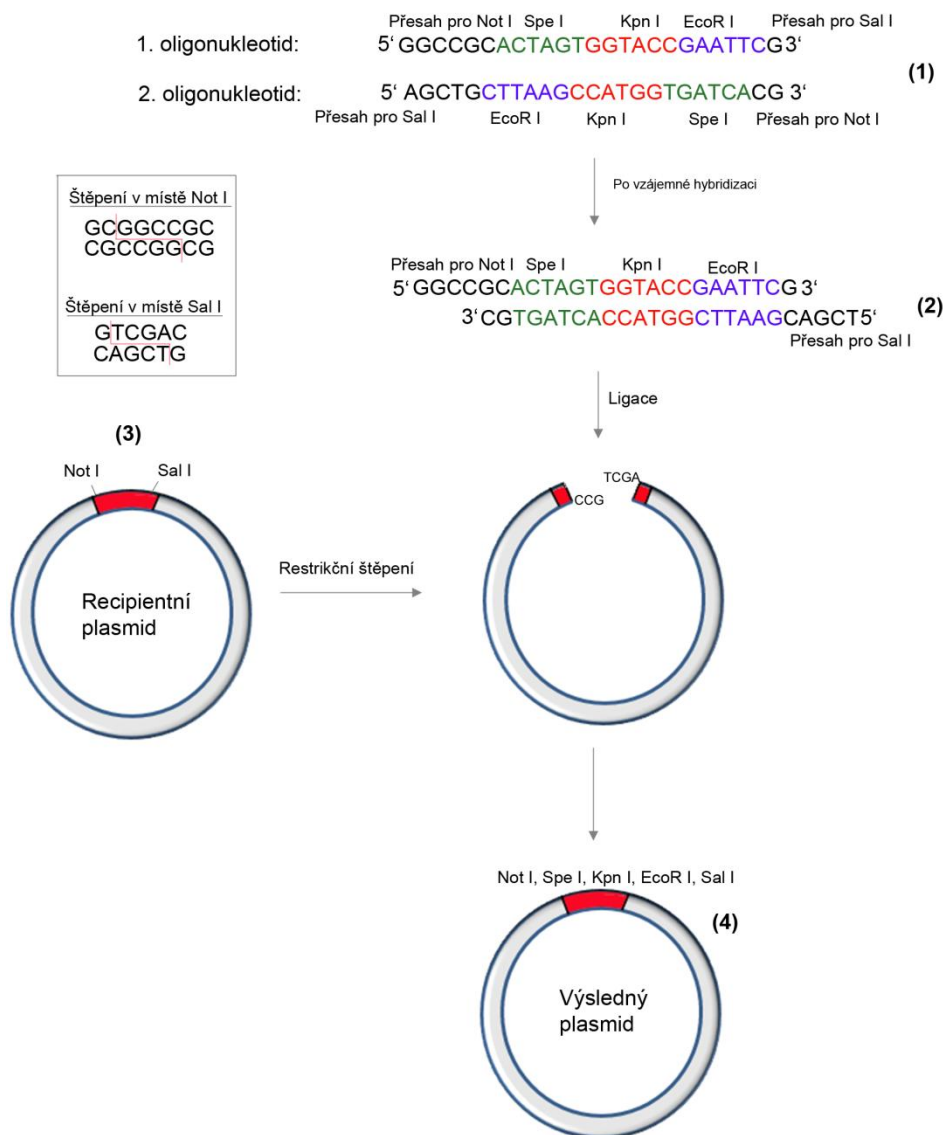


Oligo klonování

Oligo klonování slouží k inzerci krátkých oligonukleotidů do stávajících vektorů. Dejme tomu, že pokud máme nějaký náš oblíbený vektor, který ovšem nenesे dostatečná restrikční místa, můžeme MCS tohoto vektoru obohatit o nová restrikční místa právě oligo klonováním. Princip metody tkví v tom, že si necháme některou z dostupných firem vyrobit dva k sobě komplementární oligonukleotidy, které nesou potřebná restrikční místa. Oligonukleotidy ovšem musí na svých koncích obsahovat ještě krátkou dodatečnou sekvenci, která po vzájemné hybridizaci oligonukleotidů poskytne jednořetězcové převisy. Tyto jednořetězcové převisy musí být komplementární ke koncům cílového vektoru (vzniklých štěpením příslušnou restriktázou) a umožní tak integraci oligonukleotidu do tohoto vektoru.



Obr. Pro oligo klonování si necháme vyrobit krátké oligonukleotidy (1), které po vzájemné hybridizaci vytváří dvouřetězcovou molekulu s jednořetězcovými převisy na svých koncích (2). Jednořetězcové

převisy fungují jako komplementární sekvence s konci vektoru. Vektor je štěpen danými restrikčními enzymy (3) a je spojen s připraveným dvouřetězcovým oligonukleotidem (4).

Postup při oligo klonování

1. Navrhněte oligonukleotidy a nechte je vyrobit v některé z komerčních společností.
2. Dodané oligonukleotidy resuspendujte v hybridizačním pufru (10 mM Tris, pH 7,5 – 8,0, 50 mM NaCl, 1 M EDTA) a smíchejte v ekvimolární koncentraci, nejlépe 2 μg z každého oligonukleotidu v 50 μl objemu.
3. Směs zahřejte na 90 - 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 min, poté 45 min inkubujte při pokojové teplotě.
4. Ke 5 μl směsi nukleotidů přidejte 45 μl vody. Koncentrace by měla být cca 8 ng/ μl .
5. V poměru 4:3 až 6:1 smíchejte oligonukleotidy s vektorem, který byl předtím rozštěpen vybranými restriktázami. Tj., ke 100 ng vektoru přidejte 75 až 600 ng oligonukleotidů.
6. Přidejte T4 DNA ligázu a pufr. Ligační reakci proveďte standardně.