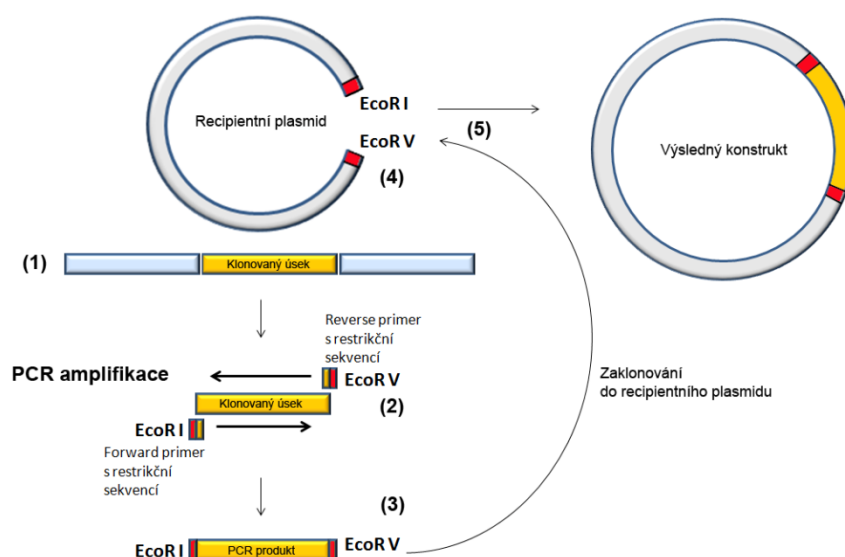


PCR klonování

PCR klonování je velmi versatilní a snadný způsob pro zaklonování fragmentu do téměř jakéhokoliv MCS bez téměř jakéhokoliv omezení. Prostřednictvím PCR amplifikujeme naši cílovou DNA s tím, že k jejím koncům pomocí vhodně navržených primerů přidáme potřebná restriční místa, která poté využijeme pro následnou ligaci. Podobným způsobem můžeme ke klonovanému úseku přidávat jakékoli další krátké sekvence, jako např. start kodon ATG nebo stop kodony.



Obr. Při PCR klonování navrhne ke koncům klonovaného úseku (1) primery s požadovanými restričními místy (2). Po PCR amplifikaci nese klonovaný úsek na svých koncích daná restriční místa (3). Cílový vektor (4) je rozštěpen restričním enzymem tak, že konce jsou kompatibilní s konci klonovaného úseku. Klonovaný úsek je zaligován do vektoru pomocí daných restričních míst (5).

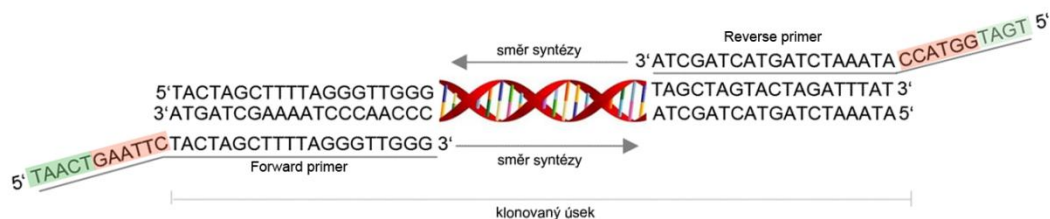
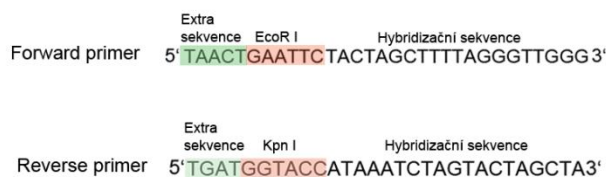
Primery pro PCR klonování

Primery pro PCR klonování jsou ve směru 5'-3' složeny z extra sekvence, restriční sekvence a hybridizační sekvence:

Extra sekvence – pokud rozpoznávací sekvence restričních enzymů leží přímo na konci molekuly DNA, často se stane, že enzym takovouto sekvenci neštěpí dostatečně účinně. Proto se doporučuje při navrhování primeru přidat na 5' konec primeru ještě dodatečnou, krátkou sekvenci (obvykle 3 - 6 bp). Složení sekvence je v podstatě libovolné, krom samozřejmě toho, že tato sekvence nesmí se sekvencí primeru formovat vlásenkovou strukturu.

Restriční sekvence – vhodná sekvence pro restriční štěpení

Hybridizační sekvence – sekvence primeru, která se váže k amplifikovanému úseku (obvykle 18 - 21 bp)



Obr. Primery jsou tvořeny z extra sekvence, požadovaným restriční místem a hybridizační sekvencí.

Postup při PCR klonování

1. Navrhněte primery.
2. Proveďte PCR s použitím buď genomové DNA, cDNA či plasmidu se zaklonovaným inzertem.
3. Se získaným PCR produktem proveďte ELFO, zkontrolujte správnou velikost PCR produktu.
4. Izolujte PCR produkt z gelu nebo můžete PCR produkt přečistit přímo z PCR reakce.
5. Proveďte restriční štěpení se zvolenou restriktázou. Pomocí ligační reakce zaklonujte do zvoleného vektoru, který byl linearizován stejnými restriktázami.

Případně zaklonujte PCR produkt pomocí TA klonování, poté produkt vyštípněte z daného vektoru vhodnou restriktázou.

Důležité zásady při PCR klonování:

Pro štěpení vyberte pouze taková restriční místa, aby ke štěpení došlo pouze v MCS, tedy ne v inzertu nebo v sekvenci plasmidu mimo MCS!

Někdy je třeba dbát na správnou orientaci („levo-pravou“) vkládaného inzertu. Jedná se o případy, kdy např. zaklonováváte gen k promotoru již zaklonovaném v daném plasmidu nebo vytváříte fúzní gen.

Pokud vytváříte konstrukt pro fúzní protein, tedy spojujete dva geny dohromady, je třeba dbát na správný čtecí rámec u obou genů.

Vyhnete se štěpení s použitím pouze jednoho typu restriktázy a raději štěpení proveďte s dvěma restriktázami tak, aby výsledná molekula linearizovaného plasmidu po štěpení nesla nekompatibilní konce. Pokud je použit jen jeden typ restriktázy, při ligaci dochází preferenčně k recirkularizaci plasmidu, tj. ke vzájemnému spojování konců plasmidu, aniž by došlo k integraci inzertu. Pokud není

zbytí a je třeba vektor štěpit pouze jednou restriktázou, je třeba takto rozštěpený vektor defosforylovat. Defosforylace zamezí recirkularizaci prázdného vektoru.

Pro účinnost ligace je výhodnější mít kohesivní konce, které se ligují účinněji než konce tupé.