

TA klonování

TA klonování je jednoduchým způsobem klonování, které je využíváno při zaklonovávání PCR produktů a využívá komplementarity mezi adeninem a thyminem.

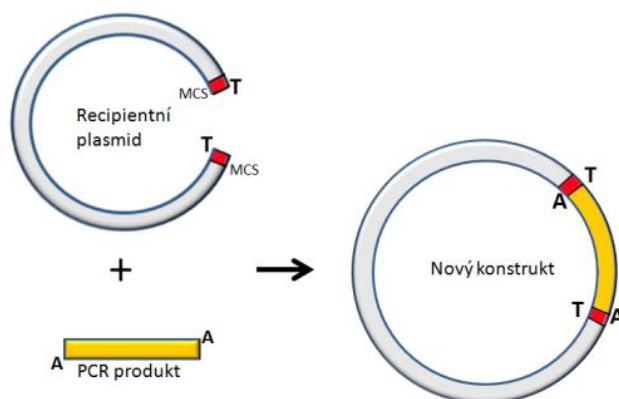
Většina Taq polymeráz postrádá 3' → 5' exonukleázovou ("proofreading") aktivitu a s velkou pravděpodobností na 3' konci PCR produktu zanechává adenin. Takže výsledkem je PCR produkt, který má na svém 3' konci převis jednoho adeninu. Tohoto převisu je využíváno právě při TA klonování, kdy se jako vektor využívá linearizovaný plasmid nesoucí na svých 5' koncích převis jednoho thyminu. Pro zvýšení pravděpodobnosti adeninového převisu na 3' konci PCR produktu je doporučováno použít primery s guaninem na 5' koncích. Pro TA klonování je třeba zkontrolovat, zda dostupná Taq polymeráza nemá silnou 3' → 5' exonukleázovou aktivitu, která by bránila tvorbě 3' adeninových převisů.

Základní postup při TA klonování:

1. Připravíme PCR reakci s primery k cílovému úseku
2. Získaný PCR produkt ověříme elektroforetickou separací, produkt přečistíme.
3. Provedeme standardní ligační reakci.

Získaný plasmid se zaklonovaným PCR produktem můžete dále použít pro subklonování, kdy využijete restričních míst v MCS daného plasmidu.

Pro TA klonování jsou na trhu dostupné příslušné vektory, tj. s převisy T.



Obr. Při TA klonování jsou zaklonovávány PCR produkty (nesoucí adeniny na svých koncích) do vektorů s převisy thyminů.