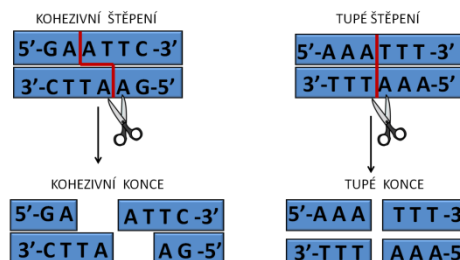
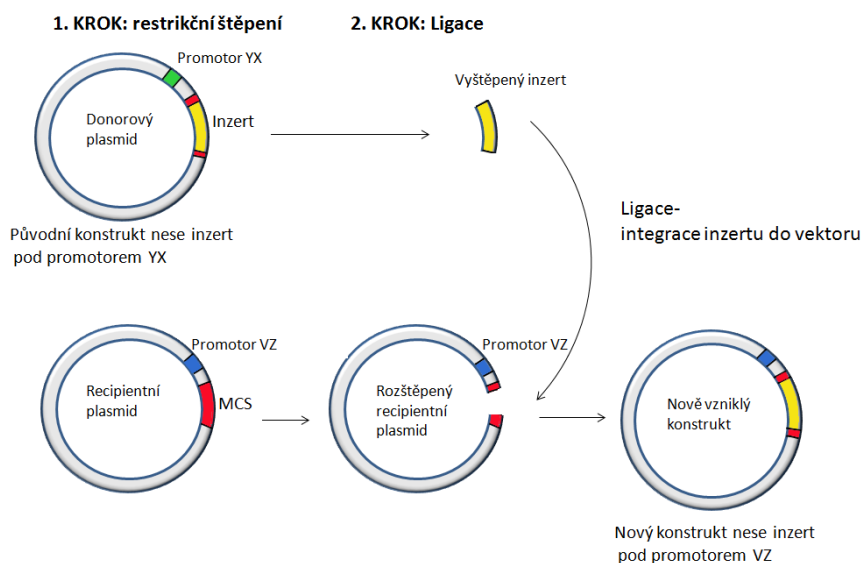


Metoda tradičního klonování (tzv. subklonování)

Pro vložení cizí DNA (tzv. insertu) do plazmidu nejprve plazmid linearizujeme (tj. rozštěpíme jeho kruhovou molekulu). Pro linearizaci se používají restriční endonukleázy, které štěpí v klonovacím místě vektoru (restriční štěpení). Tzn., plazmid rozštěpíme v klonovacím místě některou z restričních endonukleáz. V závislosti na restriktáze, vzniklé konce mohou být buď tupé („blunt ends“) nebo kohesivní („sticky ends“).



Konce takto linearizovaného plazmidu spojíme s konci vkládaného insertu, a to pomocí enzymu T4 DNA ligázy (proces je označován jako ligace DNA). Spojované konce musejí být vzájemně kompatibilní, tzn., že v případě kohesivních konců musí být konce vektoru štěpené stejným restričním enzymem jako konce insertu. Tupé konce se naproti tomu spojují s jakýmkoliv jinými tupými konci.



Důležité zásady při tradičním klonování:

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

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

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

PROTOKOL

Vyhnete se štěpení s použitím pouze jednoho typu restriktázy a raději štěpení provedte 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 zbytků 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.