

OPRAVNÝ LÍSTEK K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Příprava lentivirového expresního vektoru s reportérovým genem

Ondřej Skořepa

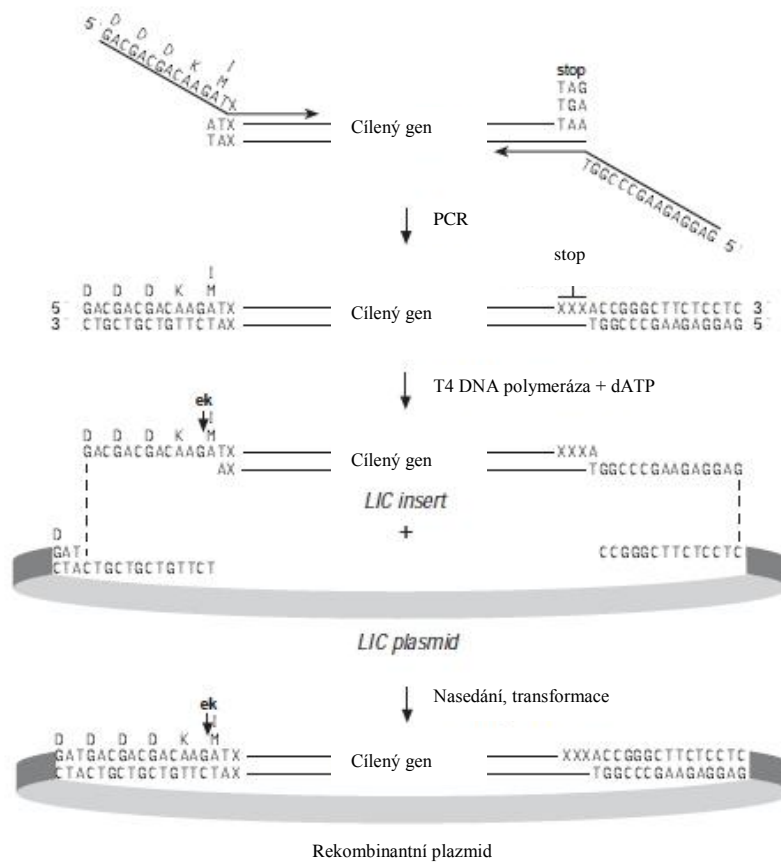
Praha, 2014

Do kapitoly 1 Teoretický úvod vkládám následující kapitolu a obrázek:

1.8 KLONOVÁNÍ NEZÁVISLÉ NA LIGÁZE

Metoda klonování nezávislé na ligáze (LIC, z anglického ligation independent cloning) byla vyvinuta pro klonování PCR produktů bez nutnosti použití restričních enzymů a DNA ligázy. Pro linearizaci plazmidu je možné použít PCR namísto restričního štěpení. LIC vektory jsou konstruovány tak, aby obsahovaly LIC sekvenci. Tato sekvence o délce okolo 15 bází je ukončena nukleotidem, který se jinde v LIC sekvenci nevyskytuje. Primery pro amplifikaci cíleného genu obsahují část specifickou pro gen a druhou část, která je komplementární k LIC sekvenci vektoru.

Sekvence amplifikovaného genu a linearizovaného vektoru jsou poté upraveny reakcí s T4 DNA polymerázou za přítomnosti pouze jednoho vybraného typu deoxyribonukleotidu v reakční směsi. T4 polymeráza vykazuje 3'-5' exonukleázovou aktivitu a odštěpuje nukleotidy, dokud nenarazí na nukleotid v sekvenci, který je přítomen v reakční směsi. V tu chvíli převládne její 5'-3' polymerázová aktivita a k dalšímu štěpení již nedochází. Takto jsou vytvořeny jednovláknové komplementární přesahy. Těmito přesahy na sebe gen a vektor nasedají (Obr. 20). Kovalentní spojení vektoru a genu zajistí opravný systém hostitelské buňky po transfekci, použití DNA ligázy proto není nutné. [36]



Obr. 20: Schéma klonování nezávislého na ligáze

Cílený gen je amplifikován pomocí vhodně navržených primerů, PCR produkt je poté přečištěn. Gen i linearizovaný vektor jsou štěpeny T4 DNA polymerázou za přítomnosti jednoho typu deoxyribonukleotidu v reakční směsi. LIC vektor a gen jsou spojeny pomocí komplementárních přesahů. Takto jsou připraveny pro transformaci.

Převzato a upraveno z [36]

Do kapitoly 8 Seznam použité literatury vkládám následující citaci:

[36] NOVY, E. R., YAEGER, K. W., KOLB, K. M.: *Ligation Independent Cloning: Efficient Directional Cloning of PCR Products*. InNovations 5, Novagen, Inc. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z: <http://compbio.korea.ac.kr/wiki/images/9/9c/LICnovagen.pdf>