

Koloni-PCR

Metoden er en PCR metode, hvor man fremstiller et mastermix af dNTP, Taq-polymerase, buffer og primere, og tilsætter lidt af en bakteriekoloni, som indeholder template-DNA. Metoden er tidsbesparende, idet man ikke først skal oprense DNA fra bakterien og fordi mange kolonier hurtigt kan screenes.

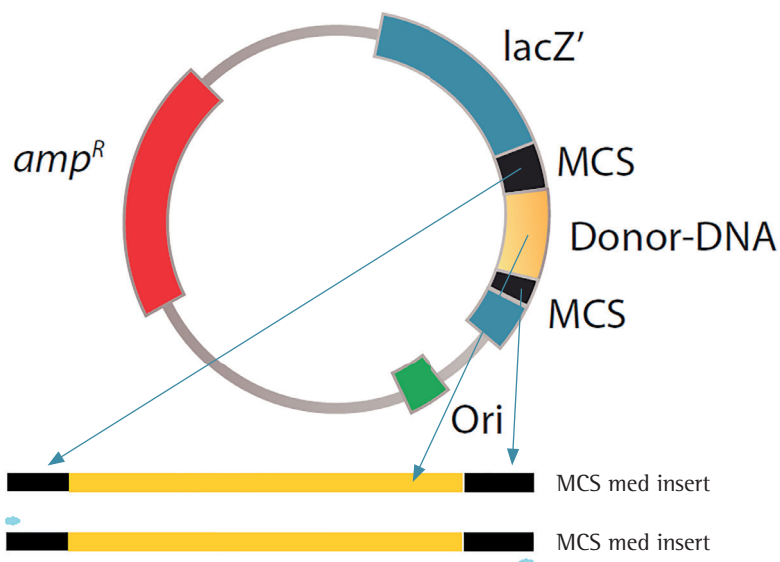
Koloni-PCR kan bl.a. anvendes til at bestemme om en *E. coli* stamme er rekombinant. Man undersøger, om den indeholder plasmid-DNA med et insert af donor-DNA i Multiple Cloning Site (MCS), og i så fald, hvor stort det er, målt i antal basepar.

Template-DNA er plasmidet (vektoren), og metoden fungerer, selvom der også er kromosomt DNA fra bakterierne i PCR røret.

Bakteriecellerne lyses i PCR programmets Hot Start. Hermed bliver cellernes DNA tilgængeligt, og DNA-området, som primerne afgrænser kopieres ved PCR.

I det viste eksempel med kloningsvektorer som pUC18/19 er de to primere komplementære til DNA-sekvenser i yderområderne af MCS (se figur 1 og 2) i plasmidet. Hermed kan det undersøges om der er indsat donor-DNA ved kloningen.

På nedenstående figur (figur 1) er vist et rekombinant plasmid.

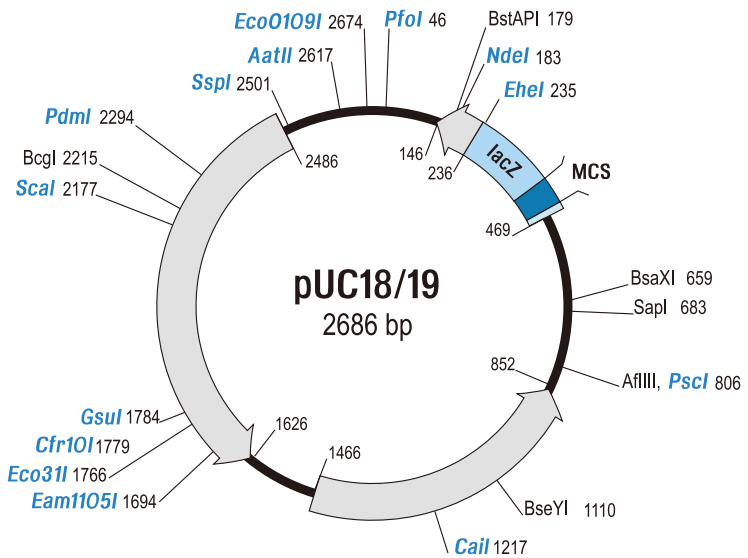


Figur 1: pUC18/19 med insert
Primernes bindingssteder er markeret med blå pile.

Hvis plasmidet ikke har indsat donor DNA (tom vektor), vil PCR produktet blive på størrelse med MCS.

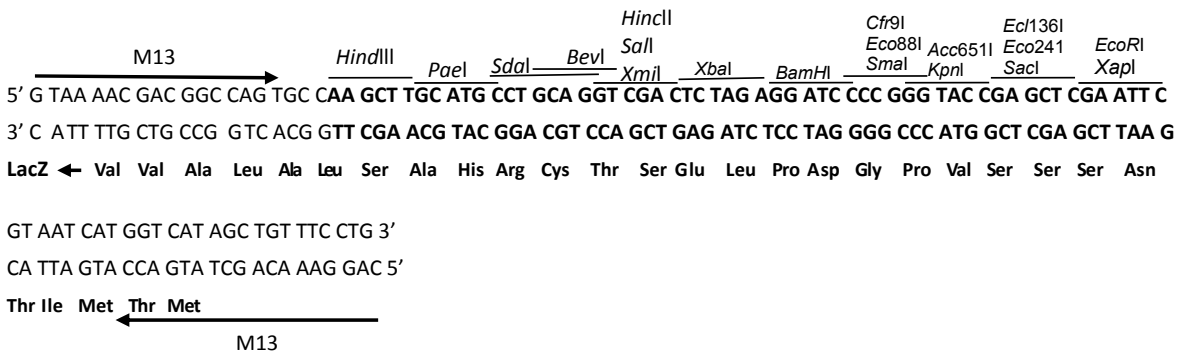
Hvis plasmidet indeholder et insert, vil PCR produktets størrelse blive insertets størrelse plus en del af MCS.

Her er vist kloningsvektoren pUC 18 (figur 2), med opbygningen af Multiple Cloning Site og bindingen af primerne M13, forward og reverse, som bl.a. kan anvendes ved koloni-PCR.



Figur 2: Kloningsvektoren pUC 18 (kilde: www.genscript.com).

MCS – i detaljer



På figur 2 ses DNA-sekvensen i MCS i begge strenge, og genkendelsesites for restriktionsenzym er vist. M13 er sekvenser fra bakteriofag M13, som er indsat i plasmidet. Disse M13 sekvenser kan bl.a. anvendes til binding af primere ved koloni PCR, så man får kopieret hele MCS med eller uden donor-DNA.

Efter PCR udføres agarose gelelektroforese for at bestemme størrelsen af PCR produktet.