

PRAKTIKUM č. 23

RESTRIKČNÍ MAPOVÁNÍ

Konstrukce restriční mapy plazmidové DNA

Restrikční štěpení

- Do 3 označených zkumavek připravíme podle tabulky v protokolu 3 paralelní restrikční reakce (enzym vždy jako poslední)
- Promícháme a krátce zcentrifugujeme
- Inkubujeme 60-75 minut při 37 °C
- V mezičase připravíme elektroforetický gel

Příprava 1% agarózového gelu pro vzorky A-C restričního štěpení plazmidu pDS1

- 1 g agarózy smícháme se 100 ml TAE pufru a rozvaříme v mikrovlnné troubě po dobu 90 sekund
- Necháme zchladit na cca 50 °C a přidáme 5 µl Ethidium bromidu (POZOR TOXICKÝ – pracujeme v rukavicích)
- Poté nalijeme do elektroforetické vany, vložíme hřebínek a necháme zatuhnout

Nanášení vzorků

- Gel vložíme do elektroforetického aparátu a vyjmeme hřebínek
- Vyjmutím hřebíčku vznikají v gelu jamky, do kterých se nanáší vzorky
- Do 1. jamky nanese DNA marker – 1kb NEB (t.j. žebříček DNA fragmentů o známé délce)
- 10 μ l každého vzorku (A-D) smícháme s 2,5 μ l nanášecího pufru a nanese do příslušné jamky
- Přiklopíme aparát a aplikujeme napětí 130 V po dobu 20-30 minut

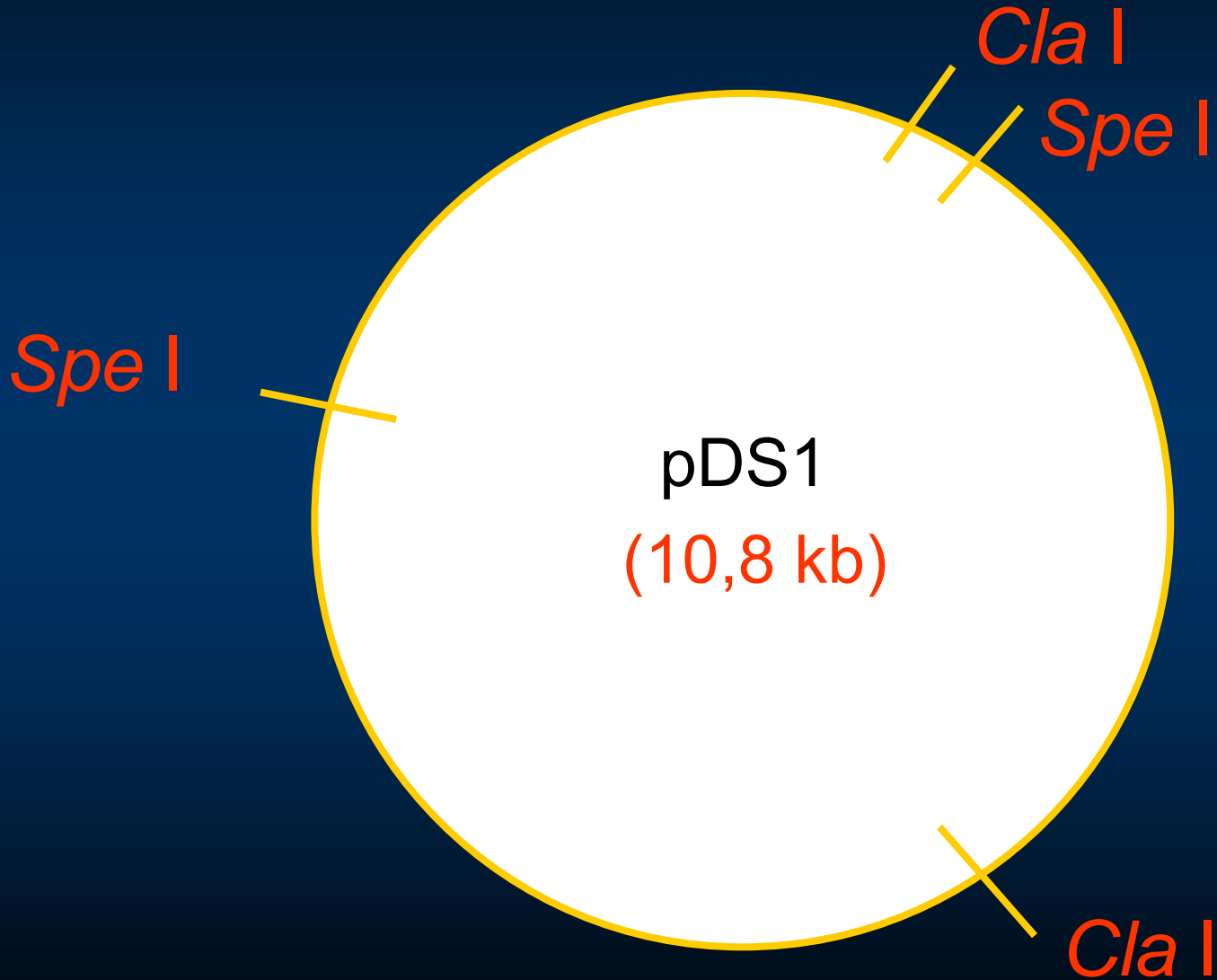
Orientace gelu v el. poli

- DNA je negativně nabitá a proto v el. poli putuje ke kladně nabitě elektrodě
- Při práci s elektroforetickým aparátem respektujeme barevná označení pro jednotlivé elektrody
- Červená \Rightarrow + pól
- Černá \Rightarrow - pól

Výsledek ELFO analýzy štěpení plazmidu pDS1



Závěr navržená mapa plazmidu



Odpovědi na otázky k řešení:

- 1. Klonovaný fragment má velikost 7,4 kb.
- 2. Po štěpení oběma enzymy současně vznikají fragmenty o velikosti:
 - 2,6 kb (*Cla* I a *Spe* I)
 - 3,4 kb (*Cla* I a *Spe* I)
 - 4,8 kb (*Cla* I a *Spe* I)
- 3. Existuje pouze jedna varianta mapy plazmidu.
- 4. Rozdíl délek představuje vzdálenost mezi místy *Cla* I a *Spe* I v MCS (42 bp), a takový fragment nelze na 1% gelu detegovat.

