

Izolace restričních endonukleáz z bakteriálních buněk

- Úloha demonstrující přípravu hrubého extraktu proteinů z produkčního bakteriálního kmene
 - Kultivace bakteriálních buněk
 - Shromáždění, promytí a stanovení výnosu
 - Lyze buněk sonikací
 - Částečná purifikace hrubého lyzátu
 - Průkaz enzymatické aktivity

Poznámky k postupu

- Buňky centrifugujeme v rotoru 6× 50 ml zkumavkách; objem 500 ml je třeba centrifugovat na několikrát
- Množství lyzostafinu pro lyzi buněk dávkuje 15 μ l na 1 g buněk
- Během izolace nesmí teplota překročit 10 °C, při sonikaci chladíme v ledové lázni

Poznámky k bezpečnostním rizikům

- Práce s velkým objemem potenciálně patogenního organismu
- Práce s merkaptoetanolem – v digestoři
- Ultracentrifugace – nutno vyvážit zkumavky na předvážkách s přesností na 0,01 g
- Práce s ultrazvukem – bezpečnostní předpisy

Princip stanovení aktivity izolovaných restriktáz

- DNA fága 3A není štěpena restriktázou Sau3AI
- DNA fága 96 není štěpena restriktázou Sau96I
- Jiné fágové a bakteriální DNA jsou štěpeny oběma restriktázami
- Vybíráme optimální reakční pufr

Výsledky v protokolu

- Stanovení výtěžku buněk
- Izolovaný hrubý extrakt rozplněný do alikvotů
- Gel se štěpenými fágovými DNA
- Stanovení optimálního reakčního pufu

Modifikace konců DNA a klonování produktu PCR

- **Úloha demonstrující izolaci určitého genu z neznámého genomu s využitím degenerovaných primerů nesoucích restriční místa**
 - Příprava vektoru pBluescript
izolace plazmidu → štěpení dvojicí RE → izolace linearizovaného vektoru z gelu → elektroforéza → stanovení koncentrace DNA
 - Příprava inzertu
PCR → štěpení dvojicí RE → purifikace → elektroforéza → stanovení koncentrace DNA
 - Ligace a transformace
 - Skríníng klonů pomocí PCR nebo lyzí varem

Obecné poznámky k postupu

- K dispozici budou:
 - Připravené kompetentní buňky
 - Neštěpená purifikovaná DNA vektoru
- K zabránění znovuspojení konců plazmidu štěpíme dvojicí restriktáz
- V průběhu experimentu zařazujeme vhodné kontroly
- Práci s GMO evidujeme dle předpisů

Poznámky k postupu klonování

- PCR a štěpení inzertu a vektoru restriktázami
 - Příprava dostatečného objemu reakční směsi
 $4 \times 25 \mu\text{l}$
 - Před štěpením RE produkt nutno purifikovat
 - Výběr vhodného pufru společného pro obě restriktázy
 - Purifikaci po štěpení RE provádíme současně s
naštěpeným vektorem
 - Nenaštěpený vektor eliminujeme izolací
linearizovaného vektoru z gelu z LMT agarózy

Poznámky k ligaci

- Volba poměru inzertu a vektoru

$$\frac{\text{ng vektoru} \times \text{kb velikost inzertu}}{\text{kb velikost vektoru}} \times \text{molární poměr} \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}} = \text{ng inzertu}$$

- V případě, že neznáme koncentraci:

	inzert		
vektor	1:3	1:1	3:1
	1:5		5:1

- Používáme rychlý ligační pufr s 10% PEG

Poznámky k transformaci

- Z každé ligační směsi provádíme tři transformace (1, 3 a 5 μ l ligační směsi)
- Médium pro výsev:
LBA obsahující 100 μ g/ml ampicilinu,
40 μ g/ml Xgal a 0.1 mM IPTG
 - Zásobní roztoky: Ampicilin 100 mg/ml, Xgal 40 mg/ml, 0,1 M IPTG
- Kontroly:
 - Prázdný vektor = ověření frekvence transformace
 - Linearizovaný vektor = ověření, že nedochází k cirkularizaci bez inzertu
 - Bez DNA = ověření, že kompetentní buňky jsou citlivé k ampicilinu

Skríning rekombinantních vektorů

1. Přeočkování kolonií ve formě dlouhých čárek na misky
2. Izolace plazmidu lyzí varem
3. Štěpení DNA dvojicí restriktáz
4. Elektroforéza
5. Ověření inzertu sekvencováním

Výsledky v protokolu

- Kontrolní gely s inzertem a vektorem před a po štěpení
- Výsledky stanovení koncentrace inzertu a vektrom
- Výpočet složení ligační směsi
- Počty kolonií – modrobílý test
- Gel s rekombinantními vektromy
- Sekvence inzertu
- Zamražení řádně označených klonů

Klonování a exprese fágového lytického enzymu

- Úloha demonstrující expresní klonování a funkční test připraveného enzymu
 - Návrh sekvence primerů pro amplifikaci genu pro účely klonování v transkripčním fúzním vektoru
 - Příprava vektoru pSP72
izolace plazmidu → štěpení dvojicí RE → defosforylace → izolace linearizovaného vektoru z gelu → elektroforéza → stanovení koncentrace DNA
 - Příprava inzertu
vyštěpení dvojicí RE z pBluescript → izolace inzertu z gelu → elektroforéza → stanovení koncentrace DNA
 - Ligace a transformace
 - Přeočkování klonů na médium pro expresi a funkční test

Obecné poznámky k postupu

- K dispozici budou:
 - Připravené kompetentní buňky DE3
 - purifikovaná DNA vektoru pSP72
 - Purifikovaná DNA pBluescript s inzertem (endolyzin)
 - Usmrcené autoklávované buňky *S. aureus*
- K zabránění znovuspojení konců plazmidu štěpíme dvojicí restriktáz a defosforylujeme
- Vektor neumožňuje provést modrobílý test
- V průběhu experimentu zařazujeme vhodné kontroly, vektor i inzert izolujeme z gelu
- Postup ligace – viz předchozí experiment
- Selektivní médium po transformaci obsahuje pouze ampicilin

Výsledky v protokolu

- Kontrolní gely s inzertem a vektorem před a po štěpení
- Výsledky stanovení koncentrace inzertu a vektorem
- Výpočet složení ligační směsi
- Srovnání počtů kolonií po ligaci: samotný pSP72, pSP72 + inzert
- Gel s rekombinantními vektory
- Fotografie misky s funkčním testem
- Zamražení řádně označených klonů