

4. úloha. Restrikční mapování DNA

Mapování restrikčních fragmentů DNA lze s řadou výhod provádět po jejich naklonování do vektorů, obsahujících polylinkery se štěpnými místy pro různé restriktázy. Restrikční místa polylinkeru pak vymezují konce restrikčního fragmentu a kombinovaným štěpením jednotlivými restriktázami lze poměrně snadno sestavit restrikční mapu fragmentu. Jedním z vhodných vektorů je plazmid pUC18.

K vlastnímu mapování můžeme použít různé strategie, zvláště vhodnou je kombinované štěpení DNA několika různými RE

Materiál: Rekombinantní plazmid pUC18 nesoucí 5 kb (4992 bp) inzert cizorodé DNA (ve formě DNA), plazmid pUC18 (ve formě DNA), zařízení pro elektroforézu a vyhodnocování elektroforetických gelů, standardy molekulové hmotnosti (např. DNA fága lambda štěpená EcoRI/HindIII + HindIII), restrikční endonukleázy EcoRI, PstI, PvuII, NdeI, SnaBI a XhoI štěpicí pufr, mikrozkuřavky, pipety, špičky, vodní lázeň, termostat

Postup:

1. Provedeme izolaci rekombinantního plazmidu pUC18 obsahujícího *Eco* RI inzert cizorodé DNA.

2. Stanovíme velikost inzertu (naklonovaného restrikčního fragmentu) štěpením rekombinantního plazmidu RE *Eco* RI, který(é) byl (y) použit(y) ke klonování

3. Rekombinantní plazmid štěpíme vybranými restriktázami: EcoRI, PstI, PvuII, NdeI, SnaBI a XhoI

- jednotlivě

- současně EcoRI a další (případně třemi)

3. Stanovíme velikost vzniklých restrikčních subfragmentů

4. Hodnoty získané v bodě 1) a 3) uspořádáme do tabulky a logickou úvahou uspořádáme restrikční místa na restrikčním fragmentu, případně nakreslíme restrikční mapu.

Příklad:

do restrikčního místa *Eco*RI vektoru pBR322 byl naklonován restrikční fragment. K mapování bylo použito *Pst*I, jejíž štěpné místo je vzdáleno od *Eco*RI místa 764 bp.

Postup: provedeme následující štěpení:

1 - pBR322/*Eco*RI

2 - pBR322+inzert/*Eco*RI

3 - pBR322+inzert/*Pst*I + *Eco*RI

Pufry pro štěpení 2 enzymy současně volíme podle přiložené tabulky. V případě nutnosti následného štěpení použijeme jako první pufr s nižším obsahem solí.

Velikost DNA fragmentů se stanoví z elektroforetogramu na základě srovnání s mobilitou standardních DNA fragmentů. Z velikostí jednotlivých fragmentů se sestaví restrikční mapa.