

## Praktická úloha: Restrikční štěpení a elektroforéza DNA v agarosovém gelu

### Teorie:

**Elektroforéza DNA v agarosovém gelu** je jednou ze základních technik k rozdělení směsi DNA fragmentů na základě jejich mobility (pohyblivosti) v elektrickém poli. Lze ji použít jak pro detekci jednotlivých fragmentů (jejich počtu, velikosti), tak pro jejich následnou izolaci a další použití. Slouží tak jako analytická i preparativní technika.

### Zadání:

Na plasmidu pETR25d byla pro účely úpravy plasmidu prováděna mutageneze. Vedlejším účinkem mutageneze je vznik *druhého* restrikčního místa pro *NotI*. Využijte štěpení pomocí *NotI* k identifikaci mutantů, víte-li, že vzdálenost mezi oběma restrikčními místy je 750 bp.

### Materiál:

vstupní vzorek DNA (izolované plasmidy z různých kolonií), enzym *NotI*, reakční pufr (10x koncentrovaný), sterilní voda, 1x koncentrovaný TBE pufr, agarosa, barvivo GelRed, DNA standard pro elektroforézu.

mikropipety a plastové špičky (sterilní), mikrozkušavky, termoblok, elektroforetická souprava

### Postup – Štěpení:

1. Roztoky obsahující plasmidy a reakční pufr necháme pomalu rozmrznout na ledu.
2. Do mikrozkušavky pipetujeme roztoky v pořadí a objemech dle tabulky. ***NotI*** přidáváme jako poslední, z mrazicího boxu (-20°C) ji **vytahujeme až těsně před použitím** (i pod bodem mrazu se jedná o roztok) **a ihned poté vracíme!**
3. Směs v mikrozkušavce dobře ale opatrně promícháme opakovaným pipetováním a zkumavku dobře uzavřeme.
4. Zkušavku/zkušavky vložíme do termobloku, ten uzavřeme a víčko utěsníme otáčením šroubu v naznačeném směru.
5. Vybereme vhodný program a spustíme.
6. Pokud získaný produkt nepoužijeme ihned pro další práci, krátkodobě jej můžeme uchovat při 4°C, dlouhodobě při -20°C.
7. Příprava vzorku pro elektroforézu: k 50 ul směsi přidáme 5 ul 10x koncentrovaného vzorkového pufru a promícháme na vortexu.

### *Složení směsi pro štěpení:*

Složka	Objem [ul]
sterilní voda	14
reakční pufr (10x koncentrovaný)	5
vstupní DNA (plasmid)	30
<i>NotI</i>	1

*Štěpení:*

Teplota [°C]	Doba [s]

Postup – elektroforéza:

1. Do baňky odvážíme 0,5 g agarosy, přilijeme 50 ml TBE pufru a zahřejeme v mikrovlné troubě k varu (Pozor, roztok velmi snadno vzkypí! Ihned po objevení prvních bublin je třeba zahřívání zastavit.), zamícháme a znovu zahřejeme k varu. Po úplném rozpuštění agarosy nalijeme mezi plastové zarážky zasunuté do formy pro přípravu agarosového gelu a necháme ztuhnout.
2. Po dokonalém ztuhnutí gelu (cca 20 – 30 min) převrstvíme gel elektrodovým (TBE) puftrem a poté vytáhneme hřebínek.
3. Do vzniklých otvorů naneseeme vzorky a standard. Pořadí vzorků si poznačíme do protokolu.
4. Soupravu pro elektroforézu uzavřeme, připojíme ke zdroji el. napětí a spustíme ( $U = 80 \text{ V}$ ).
5. Poté, co modrá barva dosáhne druhého konce gelu (cca 30 – 40 min), odpojíme zdroj el. napětí.
6. Gel přeneseme na transiluminátor a vyhodnotíme.

Otázky:

- 1) Ke které elektrodě se budou pohybovat fragmenty DNA při elektroforéze?
- 2) Jaký standard byl použit při elektroforéze DNA v agarosovém gelu?
- 3) Jaký konkrétní program byl použit pro štěpení (teploty a časy)?

Teplota [°C]	Doba [s]

**Fotografie gelu po elektroforéze.**

Uveďte číslo svého vzorku, vyznačte na fotografii a okomentujte výsledek.