

DELÉCIA RESTRIKČNÝCH MIEST NA 5-KONCOVÝCH EXTENZIÁCH POMOCOU MUNG BEAN NUCLEASE

Reagencie:

Štiepený plazmid – 0,4 ug

Mung Bean Nuclease Reaction Buffer 10X – 2 ul

Mung Bean Nuclease – 0,5 U

H₂O – do 20 ul

Postup:

1. Premiešajte reagencie aby vznikol 1X reaction buffer, nukleázu pridávame ako poslednú! Znova premiešame, shortspin – aby na skúmavke neostali kvapky.
2. Inkubácia 30 °C/30 min
3. Pridanie SDS do kocnentrácie 0,01 %.
4. Prečistenie konštruktú etanolovou precipitáciou alebo PCR purification kitom.

PRECIPITÁCIA DNA ETANOLOM

Reagencie:

Mungo-zmes (alebo akákoľvek DNA zmes vhodná na prečistenie)

Na₃-acetát (3M, pH = 5,2)

Etanol 96%

Etanol 70%

TE buffer (pH = 8)

Postup:

1. Pridajte k DNA zmesi 1/10 objemu Na₃-acetátu, premiešajte.
2. Pridajte 3 objemy 96% etanolu, premiešajte.
3. Inkubujte na ľade/15 min
4. Centrifugujte 14 000G/15 min
5. Odstráňte supernatant, DNA pelet môže a nemusí byť viditeľný okom.
6. Prevrstevte 70% etanolom, centrifugujte 14 000G/10 min.
7. Nechajte vyschnúť v digestori (cca 20 min), alebo vo vákuovej odparke (5 min), rozpustite v 10 ul TE pufri.

BLUNT-END LIGÁCIA

Reagencie:

Mungom-ošetrovaný naštípený plazmid – 50 ng

Ligation Buffer 10X – 2 ul

Ligáza – 4 weiss unit (0,67 ul)

H₂O – do 20 ul

Postup:

1. Premiešajte reagencie aby vznikol 1X reaction buffer, ligázu pridávame ako poslednú! Znova premiešame, shortspin – aby na skúmavke neostali kvapky.
2. Inkubácia 16 °C/cez noc.