

**Masarykova univerzita  
Přírodovědecká fakulta**

**Ústav experimentální biologie**

**Bi4020c**

**Molekulární biologie - cvičení**

# 2. cvičení

- Stanovení koncentrace a čistoty DNA
  - Štěpení vektoru a inzertu
- Sacharózový gradient pro ultracentrifugaci
  - Horizontální gelová elektroforéza

# Příprava vzorku DNA k měření

DNA se nejprve dobře promíchá a mžikově centrifuguje.

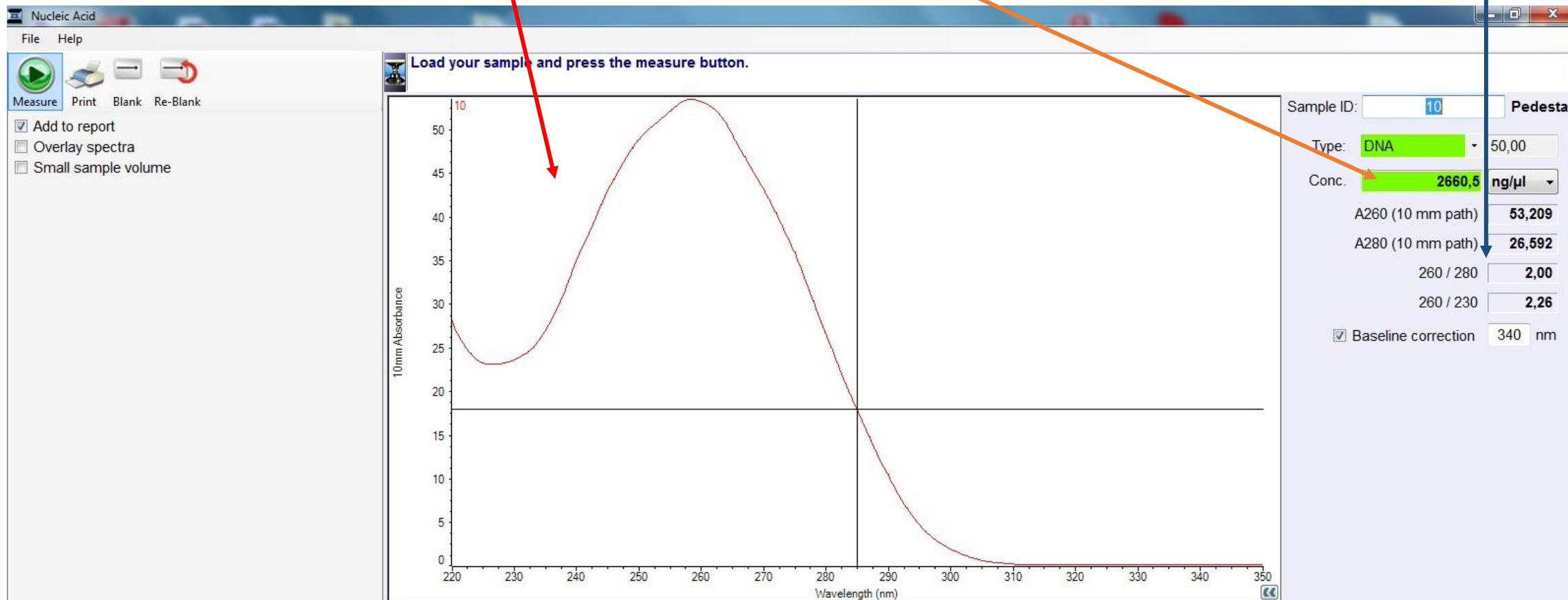
Pomůcky:

- Odpovídající pipeta, špičky
- Buničitá vata na osušení optiky  
Nanodropu
- Destilovaná voda k očištění optiky  
Nanodropu
- Deionizovaná sterilní voda / TE pufr pro stanovení blanku (podle toho, co bylo použito jako rozpouštědlo)



# Výstup měření:

křivka absorbance pro různé vlnové délky, hodnota koncentrace a specifické poměry absorbancí



- Home
- Measure Nucleic Acid
- Reports
- My Data
- Oligo Calc
- Options

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	1	MU	24.3.2020 15:15	2144,4	ng/μl	42,888	20,173	2,13	2,28	DNA	50,00
2	2	MU	24.3.2020 15:16	3918,0	ng/μl	78,360	36,912	2,12	2,31	DNA	50,00
3	3	MU						0	1,33	DNA	50,00
4	5	MU						3	1,29	DNA	50,00
5	6	MU						9	2,24	DNA	50,00
6	7	MU	24.3.2020 15:18	2623,2	ng/μl	52,464	25,055	2,09	2,27	DNA	50,00
7	10	MU	24.3.2020 15:19	2660,5	ng/μl	53,209	26,592	2,00	2,26	DNA	50,00

Záznamy jednotlivých měření



mezi měřeními vždy očistit optické plochy !

Po ukončení měření aplikovat **5 $\mu$ L deionizované destilované vody** na spodní rameno, přiklopit horní rameno a nechat působit 2 – 3 minuty  
**Otřít čistou buničinou**

# Příprava štěpící směsi

## Postup:

1. do sterilní Epp. zkumavky připravit **50  $\mu$ l** štěpící směsi, promíchat pipetováním, nevortexovat!
2. mžiková centrifugace
3. inkubace při **37 °C / >30 min.**
4. skladovat při +4°C

**Jednotka enzymu** = množství, které rozštěpí 1  $\mu$ g dsDNA fága  $\lambda$  za 1 hod. při optimální teplotě a podmínkách.

**A) Štěpící směs pro vektor (každý svůj vzorek):**    **B) Štěpící směs pro inzert (1x na prac. sk.):**

**43  $\mu$ l DNA (c = 100  $\mu$ g/ml)**

**43  $\mu$ l DNA (c = 50  $\mu$ g/ml)**

**5  $\mu$ l restrikčního pufru rCutSmart**

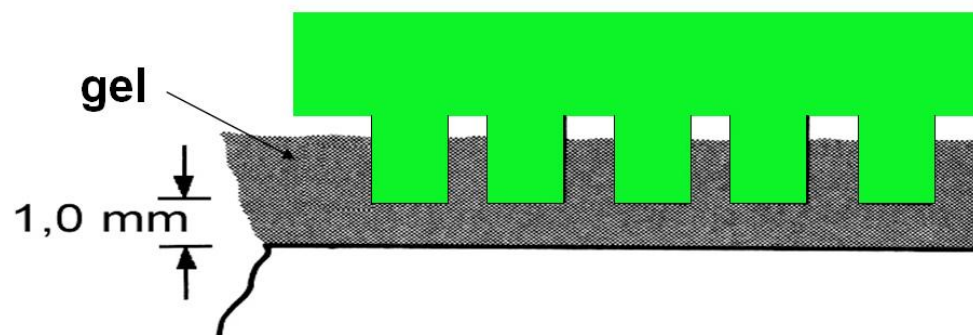
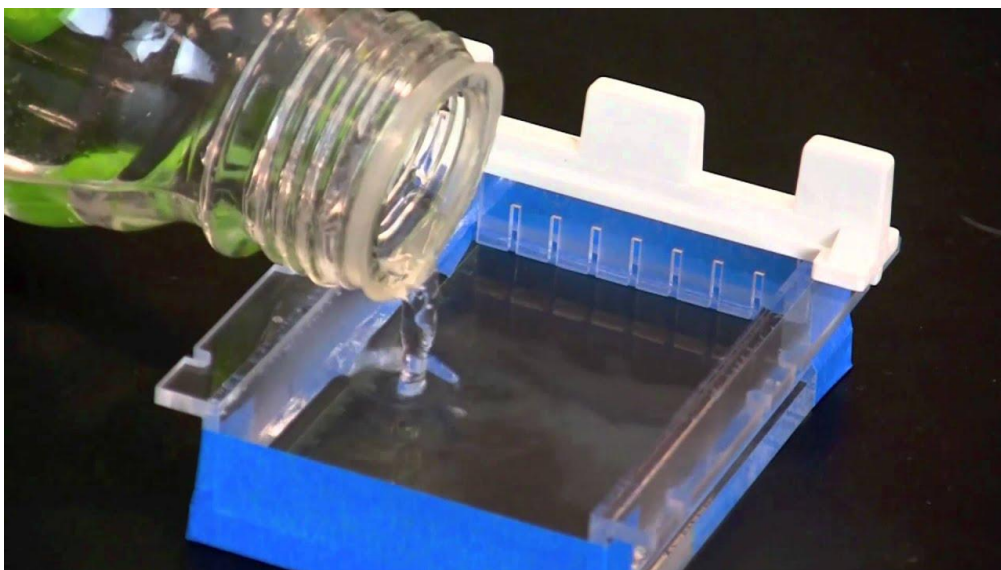
**5  $\mu$ l restrikčního pufru rCutSmart**

**1  $\mu$ l *EcoRI*-HF a 1  $\mu$ l *BamHI*-HF (c = 20 U/ $\mu$ l)**

**1  $\mu$ l *EcoRI*-HF a 1  $\mu$ l *BamHI*-HF (c = 20 U/ $\mu$ l)**

# Příprava gelu pro ELFO

1. **Vypočítat objem gelu (výška gelu  $\geq 5$  mm)**
2. Připravit 500 ml 1×TAE pufr ze zásob. roztoku konc. 50×
3. Navážit agarózu a smíchat s 1×TAE pufrém tak aby vznikl 1,5% gel
4. Rozvařit agarózu 10 min/100°C
5. Opatrně promíchat, vytemperovat na 50 °C
6. **Nalít do vyrovnaného tvořítka tak, aby nevznikly bubliny**
7. **Nechat gel ztuhnout (30 min)**



# Příprava sacharóзовého gradientu pro ultracentrifugaci

- **Hmotnostní koncentrace (w/v):**

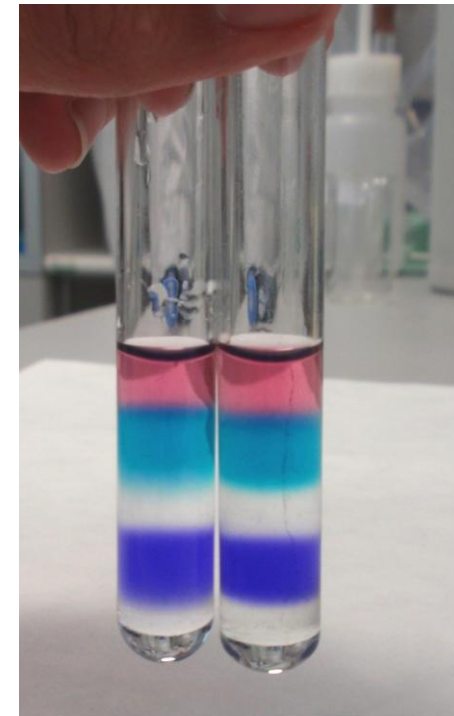
podíl **hmotnosti** rozpuštěné látky k **objemu** roztoku, jednotka např. mg/ml

- **Hmotností zlomek (w/w):**

podíl **hmotnosti** zkoumané látky na **hmotnosti celého roztoku**. Bezrozměrná veličina.

VZORKY	převrstvování	podvrstvování	mezivrstvení
5%	4	4	4
15%	3	3	1
25%	2	1	3
35%	1	2	2

Vrstvit po 1 ml



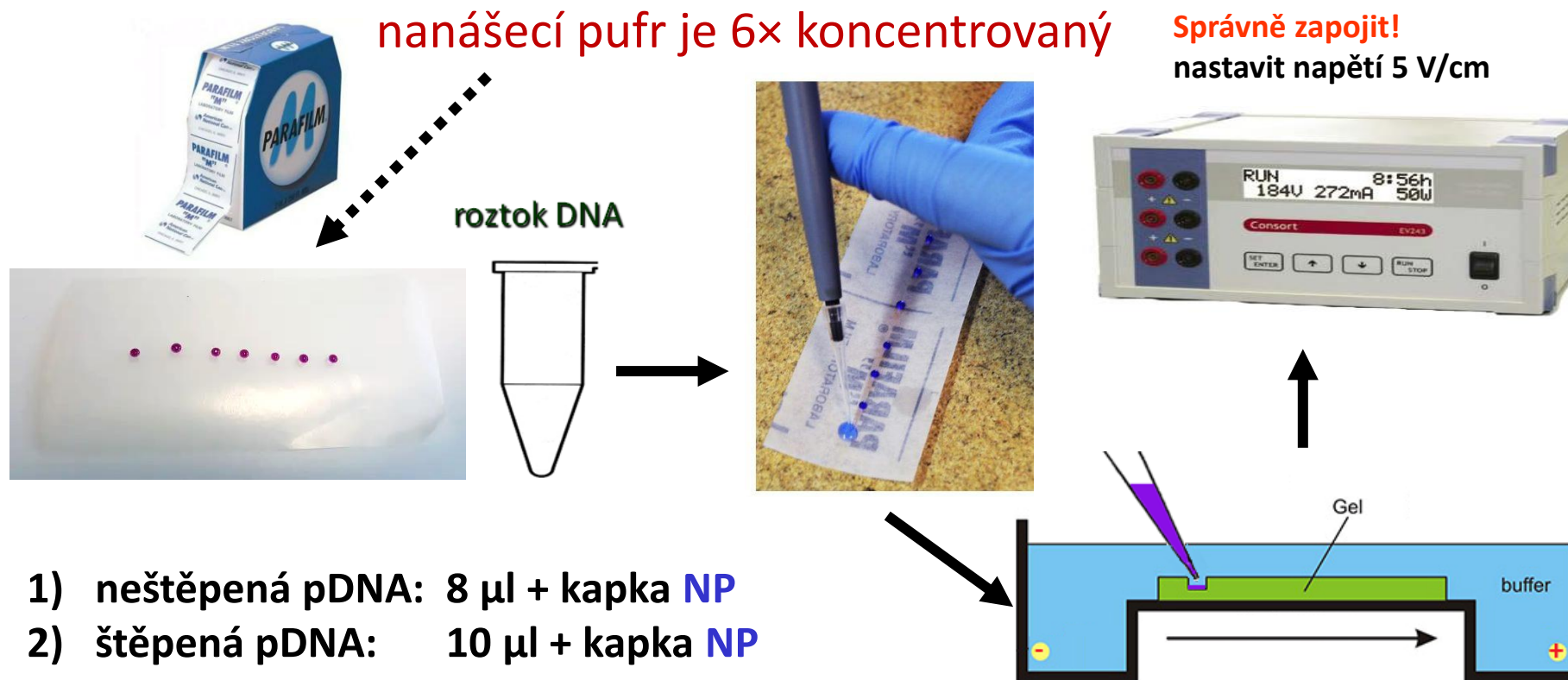


# ELFO - pokračování

- > přenést gel i s formou do ELFO vany, hřebínek u katody (-)
- > přelít 1x TAE pufrem, hladina cca 3 - 5 mm nad gelem
- > po přelití pufrem vytáhnout hřebínek kolmo nahoru

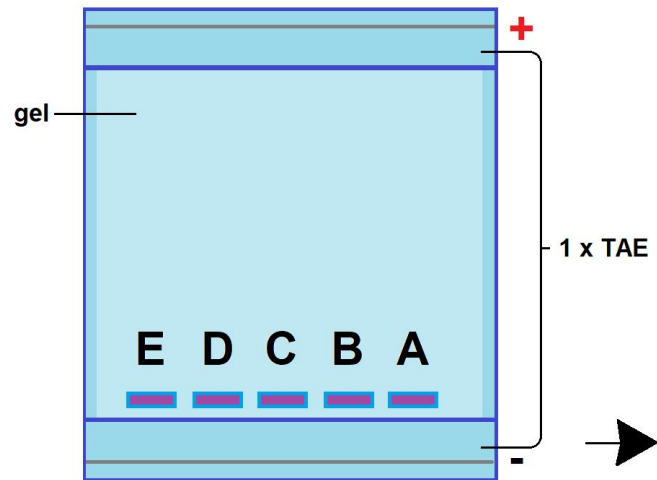


# Příprava vzorku DNA pro nanášení do gelu

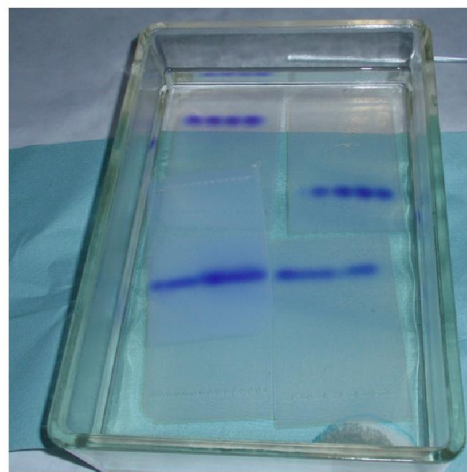


- 1) neštěpená pDNA: 8  $\mu$ l + kapka NP
- 2) štěpená pDNA: 10  $\mu$ l + kapka NP

- nanášet vzorky s nanášecím pufrm
  - špička pod hladinou 1× TAE pufru
  - vhodný marker (4  $\mu$ l)
- ZAPSAT SI POŘADÍ!**



**NANESENÍ**



**BARVENÍ**

20 min v roztoku **RedGel**



**DOKUMENTACE**



**HODNOCENÍ**