

1. úloha. Izolace restričních endonukleáz z bakteriálních buněk

Restriční endonukleázy (RE) jsou součástí restričně modifikačních systémů řady bakteriálních druhů. Jednou z jejich funkcí je degradace cizorodé DNA. Izolace RE z bakteriálních buněk je poměrně jednoduchá a obecně ji lze rozdělit do následujících kroků:

1. Kultivace bakteriálních buněk. Baktérie se pomnoží v tekutém živném mediu do exponenciální až pozdně exponenciální fáze růstu (růstové podmínky - tj. složení živného média a teplota - se zvolí podle konkrétního organismu).
2. Shromáždění buněk. Buňky se zcentrifugují při nízkých otáčkách a promyjí vhodným pufrům.
3. Lýza buněk. Buňky se zlyžují pomocí enzymů (někdy jen částečně nalyžují) a rozbijí. K lyzi buněk se nepoužívají detergenty (denaturace proteinů). K rozbití buněk se používá několika způsobů, z nichž nejčastější jsou:
 - osmotický šok
 - drcení buněk (balotina, skleněný prášek, oxid hlinitý aj.)
 - sonikace (představuje univerzální a nejpoužívanější způsob rozbití buněk)
4. Přečištění lyzátu. Lyzát se zbaví zbytků buněčných stěn a ribozómů centrifugací při vysokých otáčkách.
5. Odstranění nukleových kyselin (před odstraněním jsou NK substrátem řady nespecificky působících nukleáz a vedou ke zvýšení relativního podílu RE). NK se odstraňují vysražováním se streptomycinsulfátem nebo polyetyléniminem. Vzniklý precipitát se odstraní centrifugací. Zbytky streptomycinsulfátu a nízkomolekulární látky se odstraní dialýzou, případně promytím lyzátu na chromatografické koloně (např. heparin-agaróze). Takto lze RE rovněž zakoncentrovat.
7. Uchovávání extraktů. RE lze skladovat buď bez purifikace a zakoncentrování při 4°C (jako tzv. hrubý lyzát), nebo po pročištění a zakoncentrování ve vhodném pufru s 50% glycerolem při -20°C.

Poznámky k izolaci:

1. Během izolace nesmí teplota překročit 10°C (inaktivace RE!)
2. Sonikační roztok obsahuje merkaptoetanol, který je zdraví škodlivý!
3. Je vhodné k práci použít sterilní materiál; kontaminace mikroorganismy může vést k degradaci RE.
4. Při práci s ultrazvukem je třeba dodržovat bezpečnostní předpisy.

Izolace restričních endonukleáz *Sau3AI* a *Sau96* z buněk *S. aureus*

Organismy: Bakteriální kmen *Staphylococcus aureus* PS 3A a *S. aureus* PS96.

Fág 3A, 96, lambda (nebo jejich DNA).

Materiál: Živný bujon (500 ml), promývací pufr (0,05 M TRIS.Cl, 0,015 M Na₃citrát, pH 7,4), lyzostafin (200 U/ml), sonikační pufr (0,01 M TRIS.Cl, 0,01 M 2-merkaptoetanol), streptomycinsulfát (10% zás. roztok v sonikačním pufru), dialyzační hadice, agaróza, TAE elektroforetický pufr, nanášecí barvivo pro elektroforézu.

Přístroje: termostat, centrifuga T23, ultracentrifuga UP65, ultrazvukový sonikátor, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor.

Postup

1. 500 ml bujonu naočkujeme 25 ml 18h/37 °C bujonové kultury příslušného bakteriálního kmene a necháme inkubovat přes noc při 37 °C.
2. Buňky zcentrifugujeme v centrifuze T23 při 6000 ot/min při 4°C, 10 min. Sediment buněk zvážíme (očekávaná hmotnost 2-3 g, minimální požadovaná hmotnost 1,5 g).
3. Sediment promyjeme promývacím pufr (1×) a zcentrigujeme jako v bodě 2) a resuspendujeme v 10 ml promývacího roztoku.
4. Přidáme roztok lyzostafinu do výsledné koncentrace 5U/ml a inkubujeme 15 min při 37 °C za občasného promíchání. Nesmí dojít k úplné lyzi - kontrolujeme vizuálně.
5. Buňky zcentrifugujeme 10 min při 5000 ot/min a 4 °C a sediment resuspendujeme v 10 ml sonikačního pufru.
6. Buněčnou suspenzi vychladíme v ledové vodní lázni (5 min) a buňky rozbijeme ultrazvukem (10× 30-sekundových intervalů - průběžně chladíme tak, aby teplota nepřekročila 10 °C !)
7. Buněčné zbytky a ribozomy odstraníme centrifugací 1 hod při 35 000 ot/min , 4 °C v centrifuze UP65 (rotor 8x11 ml).
8. K supernatantu přidáme roztok streptomycinsulfátu do výsledné koncentrace 1% a ponecháme 1 hod při 4 °C. Sraženinu zcentrifugujeme 10 min při 30 000 ot/min, 4 °C na centrifuze UP65 (rotor 8× 11 ml).
9. Supernatant přeneseme do připravené dialyzační hadice (vařit 10 min. v roztoku uhličitany sodného a potom 2× v destilované vodě) a dialyzujeme proti sonikačnímu pufru přes noc (4°C, 3× 500 ml pufru).
10. Jemný precipitát odstraníme centrifugací (5000ot/10 min, 4°C) a supernatant přeneseme do sterilní zkumavky a rozdělíme do několika alikvotních částí. Takto připravený hrubý extrakt uchováváme při 4°C (zůstává aktivní po dobu nejméně 1 roku).
11. Stanovíme aktivitu restričních enzymů přítomných v hrubém extraktu.

Stanovení aktivity restričních endonukleáz *Sau3AI* a *Sau96*

Restriční endonukleázy *Sau3A* a *Sau96I* štěpí DNA fága lambda a rovněž DNA stafylokokových bakteriofágů, které byly propagovány na kmenech *S. aureus* nesoucích restričně modifikačními (RM) systémy odlišné od RM systémů přítomných v kmenech PS3A a PS96. Těto skutečnosti lze využít k důkazu endonukleolytické aktivity enzymů přítomných v hrubých extraktech připravených v úloze č. 1.

Materiál: Hrubé extrakty připravené v úloze č. 1, DNA fága lambda (1 mg/ml), DNA stafylokokových fágů 3A, 96 a 71 (konc. 200-500 µg/ml), 50× konc. TAE elektroforetický pufr, agaróza, štěpící pufr 10× koncent., 6× konc. nanášecí barvivo,

Přístroje a zařízení: mikrocentrifuga, termostát, Eppendorfovy zkumavky, automatické pipety a špičky, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor, fotoaparát.

Postup

1. Do Eppendorfovy zkumavky napipetujeme:
 - 10 µl sterilní destil. vody
 - 5 µl roztoku DNA fága (lambda, případně některého ze stafylokokových fágů) (asi 1 µg)
 - 3 µl hrubého extraktu izolovaných RE
 - 2 µl 10× konc. štěpícího pufru (aktivitu ověřujeme v pufrch A, M a MULTI-CORE)Současně založíme reakční směs, v níž je hrubý extrakt nahrazen destil. vodou
2. Směs dobře promícháme pipetou a zcentrifugujeme 1 min.
3. Inkubujeme 2 hod při 37 °C.
4. Zahřejeme 5 min při 56 °C a necháme pomalu ochladit na pokojovou teplotu
5. Přidáme 3 ml nanášecího barviva a dobře promícháme pipetou
6. 20 ml roztoku nanese na 0,7 % agarozový gel a provedeme elektroforetické rozdělení (3-4 hod při 40 mA)
7. Gel přeneseme do barvicí lázně (TAE pufr obsahující 1 mg etidumbromidu/ml) a necháme barvit 0,5 hod.
8. Gel opláchneme destil. vodou (5 min) a pozorujeme pod UV světlem. Pořídíme fotografický záznam.

Poznámky:

1. Etidumbromid je mutagen - pracujeme v rukavicích a na vyhrazeném místě.
2. Při práci s UV světlem chráníme oči a pokožku

3. úloha. Úprava konců DNA prostřednictvím PCR a klonování ve vektorech řady pBluescript

Příprava kompetentních buněk pro transformaci

Jako recipientních kmenů pro klonování cizorodé DNA se nejčastěji využívá kmenů *E. coli*, které byly mutacemi a metodami genového inženýrství upraveny tak, aby byly schopny s vysokou účinností přijímat externí DNA (většinou plazmidovou), umožňovaly její replikaci a udržovaly její původní strukturu (tj. nezpůsobovaly vyštěpování naklonované DNA) a dovolovaly selekci rekombinantních plazmidů. Podrobná charakteristika těchto kmenů (zejména jejich genotyp) bývá uváděna v katalogích firem a praktických příručkách.

Vlastní navození kompetence spočívá v pomnožení buněk příslušného kmene *E. coli* v tekutém živném mediu (např. LB bujonu) do exponenciální fáze růstu, převedení buněk do roztoku CaCl_2 , v němž se buňky ponechají několik hodin, během nichž dojde k jejich vyhladovění a určitým změnám v buněčné stěně, umožňujícím přijmout externí DNA.

Takto připravené buňky lze použít buď bezprostředně, nebo se převedou do roztoku CaCl_2 s přídavkem glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na -70°C a použít později (takto připravené buňky lze uchovávat několik měsíců nebo i déle).

Organismy: Bakteriální kmen *E. coli* DH5 α

Materiál: LB bujon, sterilní roztok 0,05 M CaCl_2 , sterilní centrifugační zkumavky, kolorimetr s příslušenstvím, chlazená centrifuga T23

Postup

1. 20 ml LB bujonu v Erlenmayerově baňce naočkujeme 2 ml bujonové kultury (18 hod/ 37°C) a inkubujeme při 37°C na vodní třepací lázni do hustoty suspenze $\text{OD}_{600} = 0,3$.
2. Buněčnou kulturu vytemperujeme na 0°C v ledové vodní lázni a centrifugujeme 10 min/3000 ot/min při 4°C . Od této chvíle nesmí teplota překročit 4°C !
3. Sediment buněk resuspendujeme v polovině objemu ledového roztoku CaCl_2 a ponecháme v lednici při 4°C přes noc.
4. Buňky zcentrifugujeme jako v bodě 2) a sediment resuspendujeme ve 2 ml (obecně v 1/10 výchozího objemu kultury) roztoku CaCl_2 .
5. Takto připravené kompetentní buňky lze používat přibližně jeden týden. Pro dlouhodobé uchování se k buněčné suspenzi přidá 1/10 objemu sterilního glycerolu (4°C !) a suspenze se zmrazí na -70°C .

Příprava plazmidového vektoru pBluescript ke klonování

Jedním z běžně používaných vektorů pro klonování v *E. coli* je bakteriální plazmidový vektor pBluescript. Jeho polylinker (obsahuje cílová místa pro 16 restrikčních endonukleáz) je umístěn v části genu *lacZ* kódující proximální část polypeptidu beta-galaktosidázy, což umožňuje použití k odlišení rekombinantních a nerekombinantních plazmidů alfa-komplementace. Gen pro rezistenci k ampicilinu je využíván pro selekci transformant.

Jako hostitelské kmeny pro tento plazmidový vektor jsou používány kmeny *E. coli*. Pro klonovací experimenty je nutné použít kmenů, které jsou schopny alfa-komplementace (tj. nesoucí mutaci *lacZ* M15), např. *E. coli* DH5 α , JM83, JM101, NM522 aj.

K izolaci DNA vektoru je možné použít několika metod, poskytujících DNA o různém množství a čistotě. Optimální je připravit DNA purifikovanou přes kolonku (spin columns) s využitím některého komerčního kitu. Je možné však vycházet i z preparátů, připravených některou z mikrometod, při nichž se získá DNA v množství několika μg s dobrou citlivostí ke štěpení restrikčními endonukleázami a účinně spojovaná ligázou.

Naštěpení vektoru restrikční endonukleázou

Materiál: Eppendorfovy zkumavky, mikrocentrifuga, automatické pipety, špičky, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor, restrikční endonukleázy, štěpící pufr, sterilní destil. voda, TE pufr, 70% a 100% etanol, QiaQuick PCR purification kit, purifikovaná DNA vektoru pBluescript, restrikční endonukleázy *EcoRI* a *BamHI*.

Nejdříve stanovíme orientačně koncentraci vektoru: 2 μl roztoku DNA smícháme s 48 μl TE puffru a stanovíme absorbanci při 260 nm. Z naměřené hodnoty odhadneme koncentraci DNA.

6 μg DNA vektoru pBluescript naštěpíme v objemu 40 μl reakční směsi příslušnou dvojicí RE (2 hod), abychom zabránili znovuspojení přečnávajících konců.

2 μl reakční směsi nanese na agarozový gel a zkontrolujeme, zda je naštěpení vektoru úplné.

K reakční směsi přidáme 40 μl TE puffru a provedeme purifikaci DNA (viz QIAquick PCR Purification Kit Protocol). Nakonec DNA rozpustíme v 30 μl elučního puffru a uložíme při -20°C .

Příprava cizorodé DNA pro klonování ve vektoru pBluescript

Jako cizorodou DNA lze pro klonování v pBluescript vektorech použít DNA z jakéhokoliv organismu za předpokladu, že je tato DNA nativní a lze ji štěpit některou z restrikčních endonukleáz, jejíž štěpné místo se nachází v polylinkeru (velikost restrikčních fragmentů, které lze naklonovat, je max. asi 10 kbp). DNA, která není žádnou z těchto RE štěpena, by bylo nutné nejdříve upravit tak, aby její konce byly s některou z RE kompatibilní - např. připojením spojek, adaptoru nebo modifikací konců prostřednictvím PCR.

K naklonování lze použít DNA, která byla štěpena buď jednou RE, nebo dvěma různými RE - v tomto případě dojde k tzv. orientovanému začlenění restrikčního fragmentu do vektoru, což má řadu výhod, např. umožňuje restrikční mapování a sekvencování z definovaného konce. Použití DNA štěpené dvěma enzymy zabraňuje její cirkularizaci a zvyšuje pravděpodobnost vzniku rekombinantních plazmidů při ligaci vektorové a cizorodé DNA.

Materiál: DNA vyizolovaná z bakterií *Staphylococcus nepalensis*; kmeny: CCM7045, CCM2433, CCM7317 a NRL04/522.

- restrikční endonukleázy EcoRI a BamHI, štěpící pufr 10× konc., destil. voda
- primer H279 nesoucí EcoRI-místo (5'-**GAATTC**GAIIIGCIGGIGAYGGIACIACIAC-3') a primer H280 nesoucí BamHI-místo (5'-CGCG**GGATCC**YKIYKITCICCRAAICCIGGIGCYTT 3'), o koncentraci 10 pmol/ul, 10× konc. roztok dNTP, *Taq* DNA-polymeráza a příslušný reakční pufr, 50 mM MgCl₂,
- automatické pipety, špičky, eppendorfky, mikrofuga, spektrofotometr, termocykler
- zařízení pro elektroforézu a vyhodnocování gelů

Postup

1. Provedeme amplifikaci genu pro 60 kDA chaperonin Cpn60 s primery, jejichž konce nesou rozpoznávací sekvence pro restrikční endonukleázy *EcoRI* a *BamHI* (viz protokol PCR).
2. Provedeme purifikaci PCR-produktu (viz QIAquick PCR Purification Kit Protocol) a výsledný vzorek ověříme na agarózové gelové elektroforéze, současně odhadneme koncentraci DNA.
3. Provedeme štěpení purifikovaného amplikonu restrikčními endonukleázami *EcoRI* a *BamHI*:
V eppendorf. zkumavce smícháme:
 - 1-2 µg DNA (x ul roztoku DNA)
 - 45 - x µl H₂O
 - 5 ul 10x konc. štěpícího pufru
 - 5 jednotek restrikťázy (asi 1 µl)Obsah zkumavky dobře promícháme a krátce zcentrifugujeme v mikrofuzi. Inkubujeme 2 hod při teplotě doporučené pro příslušné restrikťázy.
4. Zkumavku zahřejeme 5 minut na 56°C a necháme zchladit na pokojovou teplotu
5. Opět provedeme purifikaci naštěpeného PCR-produktu (viz QIAquick PCR Purification Kit Protocol). Rozpustíme ve 30 µl elučního pufru.
6. Rozštěpenou DNA uložíme při -20°C.

Ligace vektorové a cizorodé DNA

Nejsnadněji se klonují DNA-restrikční fragmenty, získané štěpením DNA dvěma různými RE. Pokud se liguje DNA po štěpením jednou RE, je vhodné provést defosforylaci vektoru, která podstatně snižuje jeho recirkularizaci a zvyšuje výtěžek rekombinantních molekul. Pokud se defosforylace neprovede, je možné výtěžek rekombinantních molekul zvýšit nastavením optimálního poměru koncentrací vektorové a cizorodé DNA - tento poměr se mění v závislosti na velikosti vektoru a klonovaného restrikčního fragmentu. Výpočet pro přesné stanovení koncentrací obou DNA je uveden v řadě příruček. Prakticky lze vyjít z poměru koncentrací 1:1, 3:1 a 1:3, kde je značná pravděpodobnost, že některá z těchto směsí obsahuje poměr blížíci se optimálnímu.

K ligaci se nejčastěji používá T4-DNA-ligáza (případně i DNA-ligáza z *E. coli*, která však nespojuje tupé konce). V reakční směsi o celkovém objemu se kombinuje obvykle 100-500 ng vektorové DNA se 100-500 ng cizorodé DNA. Ligační pufr je dodáván výrobcem jako 10x koncentrovaný roztok (jeho složkou je TRIS, DTT, BSA, ATP a Mg^{++}). Vlastní ligační reakce má teplotní optimum při 37°C - při této teplotě jsou však konce nestabilní (s tendencí k denaturaci), proto se ligace obvykle provádí při teplotách 16-25°C, kdy je soudržnost konců vyšší.

Výsledek ligační reakce je možné demostrovat elektroforeticky: po ligaci se vytvoří kromě rekombinantních plazmidových molekul rovněž vysokomolekulární frakce DNA, kterou lze na gelu dobře rozpoznat: je důkazem, že enzym je aktivní.

Materiál: DNA vektoru pBluescript štěpená RE, cizorodá DNA štěpená RE, T4-DNA-ligáza, 10x ligační pufr, mikrozkušavky, aut. pipety, špičky, termostat na 16°C, mikrofuga

Postup

1. Připravíme ligační směsi obsahující různé poměry vektorové a cizorodé DNA (1:1, 3:1, 5:1, 1:3 a 1:5). Každá směs obsahuje v celkovém objemu 20 ul :
 - 100-500 ng vektorové DNA
 - 100-500 ng cizorodé DNA
 - destil. sterilní vodu (ad 20 ul).
2. Směs zahřejeme 5 minut na 45°C - dojde k rozvolnění kohezních konců. Zchladíme na 4°C.
3. Přidáme:
 - 2 μl 10x ligačního pufru
 - 0,1 Weissovy jednotky T4-DNA-ligázy
4. Po promíchání inkubujeme 4 hod (případně přes noc) při 16°C.
5. Odebereme 2 μl a nanese na 0,7% agrozový gel, na nějž nanese paralelně 2 ul vektorové a 2 ul cizorodé DNA.
6. V případě, že došlo k ligaci, pozorujeme rozdíly v elektroforetické mobilitě vzorků DNA.

Transformace kompetentních buněk *E. coli* rekombinantní DNA

Postup:

1. Do mikroskopické zkumavky se napipetuje 200 μ l kompetentních buněk. (V případě, že se používají buňky zmrazené na -70°C , nechají se pozvolna rozmraznout při pokojové teplotě.)
2. Zkumavka se umístí do ledové lázně.
3. Přidá se DNA (obvykle se 1, 3 a 5 μ l liguční směsi smíchá s TE pufrům do celkového objemu 10 μ l, který se pak přidá ke kompetentním buňkám).
4. Lehce se promíchá a ponechá v ledové lázni 30 minut.
5. Buňky se podrobí tepelnému šoku ponořením zkumavky na 1 min do vodné lázně 42°C , nebo 3 min / 37°C .
6. Zkumavka se přenesse do ledové lázně a přidá se 1 ml LB bujony.
7. Následuje inkubace 1 hod při 37°C na vodní třepací lázni.
8. Buňky se zcentrifugují 5 min při 1500 ot/min (nebo 1 min při 6000 ot/min).
9. Supernatant se sleje - většinou však zůstane ve zkumavce asi 100 μ l supernatantu, ve kterém lze buňky resuspendovat.
10. Suspenze se vyseje pomocí bakteriologické hokejky na agarové plotny (LB agar, obsahující 50-100 μ g ampicilinu /ml). Pokud se použijí plotny obsahující navíc X-gal a IPTG, lze přímo odlišit podle zbarvení kolonie obsahující rekombinantní nebo nerekombinantní plazmid.
11. Plotny se inkubují 24-48 hod při 37°C .

Poznámky:

1. Účinnost transformace kolísá v závislosti na použitém kmeni *E. coli*, na pracovním postupu při přípravě kompetentních buněk a na koncentraci DNA použité k transformaci. Platí, že nejvyšší účinnosti transformace se dosáhne při použití velmi nízkých koncentrací DNA, nepřesahujících 10 ng/jednu transformační směs (optimální konc. je pod 1 ng DNA).
2. Je vhodné sledovat nárůst kolonií na plotnách: někdy se stává, že v okolí transformantů se postupně objevují (dorůstají) drobné kolonie, které nejsou transformanty a nejsou tudíž rezistentní k ampicilinu: rostou v okolí rezistentních kolonií, které ampicilin rozkládají.
3. Vyrostlé kolonie je vhodné přepasážovat na čisté plotny a založit klony z jednotlivých nově vyrostlých kolonií. Přítomnost rekombinantního plazmidu se ověří izolací metodou lyze varem.

Izolace DNA rekombinantních vektorů pBluescript (potenciálních klonů) metodou lyze varem (Holmes a Quigley, 1981).

Organismus: *E. coli* (rekombinantní pBluescript) - nárůst kultury na Petriho misce (LB agar + 100 ug AMP/ml)

Materiál: Eppendorfovy zkumavky, mikrocentrifuga, automatické pipety, špičky, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor, restriční endonukleázy, štěpící pufr, sterilní destil. voda, TE pufr, 70% a 100% etanol.

STET Pufr (0,1 M NaCl, 10 mM TRIS.Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 5% Triton X-100); Lysozym: 10 mg/ml (ve vodě); 2,5 M Na-acetát (pH 5,2); Izopropanol

Postup:

1. Bílé kolonie přeočkujeme na misky LBA s ampicilinem, IPTG a X-Gal ve formě dlouhých proužků.
2. Druhý den z nárůstu kultury na Petriho misce odebereme párátkem asi 1-2 mm³ a resuspendujeme v 350 ul STET pufru v epp. zkumavce. Odběr kultury párátkem provedeme tak, abychom neodebrali i část agaru.
3. Přidáme 25 µl roztoku lysozymu a dobře promícháme (protřepeme).
4. Zkumavku umístíme do lázně s vroucí vodou přesně na 1 minutu.
5. Zkumavku přeneseme do ledové vodní lázně.
6. Bakteriální lyzát zcentrifugujeme v mikrofuzi 10 min. při max. ot. a pokojové teplotě.
7. Sterilním párátkem odebereme viskózní sediment
8. K supernatantu přidáme 40 µl 3M Na₃-acetátu a 420 µl izopropanolu. Promícháme několikerým obrácením zkumavky. Zkumavku ponecháme 5 min při pokojové teplotě.
9. Obsah centrifugujeme 5 minut v mikrofuzi při max. otáčkách a 4°C. Supernatant odebereme pasterkou - je nutno odstranit veškerou tekutinu.
10. Přidáme 1 ml 70% etanolu, protřepeme a zcentrifugujeme 1 min v mikrofuzi. Supernatant odebereme, sediment opláchneme 100% etanolem (případně znovu zcentrifugujeme, jestliže se sediment uvolnil) a necháme oschnout v obrácené poloze při pokojové teplotě.
11. Sediment rozpustíme v 50 ul TE pufru.
12. Výsledek izolace ověříme na elektroforéze.

Poznámky:

Uvedeným postupem lze připravit asi 5 ug DNA. Původní předpis vychází z tekuté výchozí kultury - pokud však použijeme plotny s kvalitním agarem, je čistota získané DNA dostatečná. Roztok DNA se uchovává při -20°C, nebo krátkodobě při 4°C.

2. 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.

4. úloha. Přenos DNA na hybridizační membránu (Southernův přenos)

A. Příprava gelu pro kapilární přenos

1. Agarozový gel obsahující rozdělené restriční fragmenty DNA se ponoří do roztoku 0,25 M HCl a inkubuje se za mírného třepání 15 minut při pokojové teplotě. Dochází k depurinaci DNA a tím k fragmentaci restričních fragmentů na kratší úseky, které se snadněji přenáší.
2. Roztok HCl se nahradí denaturačním roztokem (0,4 N NaOH, 0,6 M NaCl) a gel se inkubuje 30 min při pokojové teplotě za mírného třepání.
3. Denaturační roztok se nahradí neutralizačním roztokem (1,5 M NaCl, 0,5 M TRIS.Cl, pH 7,5) v němž se gel inkubuje dalších 30 min za mírného třepání.

B. Příprava membrány pro přenos DNA z gelu (při práci s membránou pracujeme v rukavicích)

- a) Ustříháme membránu o velikosti gelu, namočíme ji v destilované vodě a poté přeneseme na 15 min do roztoku 10xSSC.
- b) Připravíme můstek (tj. 2-3 pruhy filtračního papíru Whatman 3) pro přenos pufry z rezervoáru na gel. Velikost můstků se řídí rozměrem gelu a použitého zařízení pro přenos. Můstek se namočí do roztoku 10xSSC, poté podle nákresu přiloží na podpurné sklo a pipetou se odstraní vzduchové bubliny.
- c) Na můstech se položí gel a odstraní se vzduchové bubliny
- d) Okraje gelu se obloží parafilmem nebo polyetylenovou folií, aby se zamezilo falešnému nasávání pufry.
- e) Na gel se přiloží membrána a popisovačem se označí polohy jamek a orientace membrány.
- f) Na membránu se položí 2-3 vrstvy filtračního papíru Whatman o velikosti gelu a dále pak vrstva savého materiálu (např. buničitá vata), zatíží se sklem a závažím o hmotnosti asi 1 kg.
- g) Přenos probíhá 16-24 hodin; podle potřeby je možné doplňovat roztok 10xSSC v rezervoáru a měnit vrstvu buničité vaty.
- h) Po ukončení přesávky odstraníme buničitou vatu a filtrační papír a membránu sejmeme
- i) Membránu ponoříme na 30 sec do 0,4 M NaOH (denaturace) a poté do roztoku 0,2 M TRIS.Cl, 2xSSC (neutralizace).
- j) Membránu mírně osušíme na filtračním papíru a ozáříme 3 min na transiluminátoru (strana obsahující přenesenou DNA směřuje k UV lampám). Jen u membrán Boehringer.
- k) Membránu můžeme nechat uschnout nebo pokračujeme hybridizací.

Hybridizace DNA se značenou sondou

1. Neradioaktivní naznačení DNA digoxigeninem.

- a) Stanoví se koncentrace DNA, určené k přípravě sondy.
- b) DNA se denaturuje 10 min při 100°C ve vodní lázni a rychle se zchladí na ledě s NaCl.
- c) Připraví se směs pro značení DNA (v Eppendorfově zkumavce):
 - 1 µg čerstvě zdenaturované DNA sondy
 - 2 µl směsi hexanukleotidů (směs náhodných oligonukleotidů - primerů)
 - 2 µl směsi dNTP a Dig-dUTP
 - x µl destil. sterilní vody, kterou se směs doplní do 19 ml
 - 1 µl Klenowovy polymerázy
- d) Obsah zkumavky se krátce zcentrifuguje a inkubuje přes noc při 37°C
- e) Reakce se zastaví přidáním 2 µl 0,2 M EDTA
- f) Naznačená DNA se vysráží přidávkem 2,5 µl 4M LiCl a 75 µl 96% EtOH (vychlazený na -20°C). Dobře promíchat a ponechat 30 min při -70°C nebo 2 hod při -20°C.
- g) Zcentrifugovat 15 min při 12 000 g, promýt 70% EtOH, osušit 96% EtOH, rozpustit v 50 µl TE.
- h) Uchovávat při -20°C.

2. Hybridizace

(Uvedené objemy roztoků jsou vypočteny na 100 cm³ membrány).

- a) Membrána se prehybridizuje ve 20 ml standardního hybridizačního roztoku při 68°C nejméně 1 hod. (vysycení míst na membráně, na něž není navázána DNA).
- b) Hybridizace při 68°C ve 20 ml hybridizačního roztoku s přidávkem sondy (10-100 ng DNA/ml roztoku).
- c) Promytí membrány (odstranění nespecificky navázané sondy)
 - 2 x 5 minut při pokojové teplotě (asi 100 ml roztoku 2xSSC, 0,1% SDS)
 - 2 x 15 minut při 68°C (asi 100 ml roztoku 0,1xSSC, 0,1% SDS)
- d) Imunologická detekce navázané sondy
všechny reakce se provádějí při pokojové teplotě
 - a) membrána se promyje 1 min promývacím roztokem (0,1 M Kys. maleionová, 0,15 M NaCl, 0,3% Tween 20, pH 7.5)
 - b) membrána se inkubuje 30 minut v blokovacím roztoku (0,1 M Kys. maleionová, 0,15 M NaCl, 1% blokovací reagens)
 - c) Anti-Dig konjugát (zásobní koncentrace 750 U/ml) se rozpustí v blokovacím roztoku (objem podle velikosti membrány) do konečné koncentrace 150 mU/ml (stačí pouze 1 µl). Membrána se v tomto roztoku inkubuje 30 min.
 - d) Membrána se promyje promývacím roztokem 2 x 15 minut a poté se přenesne na 2 minuty do detekčního roztoku (100 mM TRIS.Cl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)
 - f) Barevná reakce: Membrána se umístí do polyetylenového sáčku nebo do vhodné vany. Přidá se 5 ml detekčního roztoku obsahujícího 22,5 µl NBT a 17,5 µl X-fosfátu. Odstraní se bubliny, sáček se zataví a ponechá bez třepání ve tmě. K barevné reakci dochází během 30 minut (lze ponechat 12 hod).
 - g) Reakce se zastaví ponořením membrány do TE pufru (membránu udržujeme vlhkou pro případnou rehybridizaci).
 - h) Membrána se vyfotografuje a vyhodnotí.