

1. úloha. Izolace restrikčních endonukleáz z bakteriálních buněk

Restrikční endonukleázy (RE) jsou součástí restrikčně 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. Lyza buněk. Buňky se zlyzují pomocí enzymů (někdy jen částečně nalyzují) 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 uhličitanu 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 pufru 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 pufru a provedeme purifikaci DNA (viz QIAquick PCR Purification Kit Protocol). Nakonec DNA rozpustíme v 30 μl elučního pufru 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 rozmrazit 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 $/37^{\circ}\text{C}$.
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 mikrofuze 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 mikrofuze 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 mikrofuze. 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.