

HARMONOGRAM PRAKTIK Z GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ 2010

DEN	ČAS	Úloha I. izolace restrikčních endonukleáz	Úloha II. Klonování v pBluescript	Úloha III. Klonování v pSP72	
pondělí 17.5.10	9:00-10:00		teorie, seznámení se s jednotlivými experimenty		
	10:00-10:30		založení PCR-HSP60 (modifikace konců inzertu)		
	10:30-11:00	Zahájení centrifugace buněk			
	11:00-11:30			založení štěpení vektorové DNA	založení štěpení vektorové DNA
			Zvážení výtěžku buněk	- prázdný pBluescript (EcoRI+BamHI)	- pBluescript s endolyzinem (KpnI+SacI) - expresní vektor pSP72 (KpnI+SacI)
	11:30-13:00	Částečné štěpení buněčné stěny Sonikace			
	13:00-14:00		centrifugace restriktáz		
			srážení DNA streptomycinem		
			příprava dialyzační hadice	příprava standardního agarózového gelu	příprava preparativního agarózového gelu
	OBĚD				
14:00-15:00			přečištění a štěpení produktu PCR (EcoRI+BamHI)		
		centrifugace vysrážené DNA		defosforylace pSP72	
	15:00-16:00		přečištění naštěpeného plazmidu a produktu PCR		
			přenesení restriktáz do dialyzační hadice		preparativní elektroforéza inzertu a vektoru
16:30-17:30		elektroforéza přečištěné DNA	izolace vektoru (pSP72) a inzertu z gelu		
úterý 18.5.10	8:00-9:00	výměna dialyzačního roztoku	příprava ligačních směsí úloha II	příprava ligačních směsí úloha III	
	8:45-9:15	dokončení izolace restrikčních endonukleáz			
	9:15-10:45	rozplnění do alikvot	transformace do buněk TOP10F'	transformace do buněk JM109(DE3)	
			nalítí misek LBA+Amp+IPTG+xGal	nalítí misek LBA+Amp	
			teplotní šok a inkubace	teplotní šok a inkubace	
	10:15-10:30		nanesení kontrolních gelů		
	10:45-11:00		výsev na selekční médium	výsev na selekční médium	
11:00-12:00	založení restrikčního štěpení fágové DNA				
čtvrtek 20.5.10	8:00-8:30	příprava agarózového gelu			
	8:30-9:40		přečárkování transformant na selekční půdu	založení funkčního testu=přerazítkování	
	9:40-10:00	elektroforéza naštěpené fágové DNA		transformant na půdu LBA+Amp+IPTG	
pátek 21.5.10	8:00-8:30		izolace metodou lyze varem	založení inkubace s chloroformem	
	8:30-10:00	vyhodnocení gelu a úspěšnosti izolace restriktáz	Vyštěpení inzertu EcoRI a BamHI elektroforéza DNA, výsledek bude k dispozici v Po	přelití ploten usmrcenými buňkami S.aureus vyhodnocení funkčního testu	