

Materiál na úlohy z GI (BLOKOVÉ PRAKTIKUM LETNÍ SEMESTR)

Izolace restriktáz

1. 4× 20 ml MPB v Erlenkách 100
2. 4× 500 ml MPB v Erlenkách 1000
3. V pátek naočkovat do 20 ml MPB *S. aureus* PS3A a *S. aureus* PS96 (krabice 26)
4. V neděli naočkovat 5 ml do 500 ml MPB a dát třepat při 37° C
5. sterilní kádinky 25 ml překryté alobalem (6×)
6. sterilní kádinky 50 ml překryté alobalem (6×)
7. sterilní válec 100 ml (2×)
8. sterilní ultracentrifugační zkumavky NALGENE 10 ml (15 ks)
9. 500 ml promývacího pufru do 1L lahve s modrým uzávěrem
 - 25 ml 1 M Tris.Cl pH 7,4
 - 13,3 g citran sodný
 - doplnit H₂O na 500 ml
 - autoklávovat
10. 3000 ml sonikačního pufru do 5L lahve s modrým uzávěrem
 - 30 ml 1 M Tris.Cl pH 7,5
 - 2970 ml H₂O
 - autoklávovat ve varně ve velkém autoklávu
 - po vychlazení přidat 2,34 ml 2-merkaptoetanolu (v digestoři, rukavice, respirátor)
11. 4 polystyrénové vaničky na led
12. 50× TAE, agaróza, DNA fágů (3A, 96, 53, lambda), restriční pufr A,M,H,uni.
13. sterilní Eppendorfký
14. sterilní deion. H₂O v Eppendorfkách 5×

Modifikace konců DNA a klonování

1. DNA 4 koaguláza negativních stafylokoků naizolovat týden před praktikem:
Staphylococcus succinus CCM 7314, *Staphylococcus* sp. CCM 2994, *Staphylococcus* sp. CCM 2995, *Staphylococcus* sp. CCM 3835
2. degenerované primery s RE místy pro HSP60: 10× ředěné H279 a H280
3. materiál na PCR: dNTP, deion. H₂O, pufr, Taq-poly
4. QiaQuick PCR Purification Kit
5. DNA vektoru pBluescript (4×80 μl)
6. DNA vektoru pBluescript štěpená současně *EcoRI* a *BamHI* (4× 25 μl) a přečištěná
7. materiál na ligaci: ligační pufr, T4-ligáza, deion. H₂O
8. **kompetentní buňky *E. coli* TOP10F' (60 × 200 μl)**
9. LB agar 8× 300 μl
10. IPTG 12 ml zásobního 0,1M roztoku, zamrazit -20°C
11. X-gal 6 ml zásobního roztoku 20 mg/ml v dimethylformamidu! , zamrazit -20°C
12. Ampicilin 100 mg/ml (4× 1 ml)
13. plastové Petriho misky
14. sterilní párátko
15. STET pufr na izolaci plazmidu (100 ml v lahvi s modrým uzávěrem)
16. Izopropanol
17. 10M NH₄-acetát
18. 50× TAE, restriktázy *EcoRI* a *BamHI*, RE pufry, agaróza

Klonování a exprese genu pro bakteriofágový endolyzin

1. Kompetentní buňky *E. coli* JM109(DE3) produkující T7 RNAPolymerázu (**40 × 200** µl)
2. DNA vektoru pSP72 (4×80 µl)
3. DNA 4 rekombinantních vektorů
 - a. pBluescript SK- (812F1endo)
 - b. pBluescript SK- (812endo)
 - c. pBluescript SK- (311endo)
4. Restriktázy *KpnI* a *SacI*, *PvuI*, Alkalická fosfatáza, Rapid ligation pufr, T4 DNA-ligáza
5. Low melting agaróza, preparativní agaróza (Gibco BRL)
6. QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
7. SM pufr (5,5 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 50 ml 1M Tris-Cl pH 7,4, doplnit do 1 l vodou, autoklávovat)
8. bakteriologické hokejky – sterilní
9. usmrcené buňky *Staphylococcus aureus* SA812, čerstvě připravené
10. vodní agar 0,4% rozplněný po 3 ml do Wasrman. zkumavek, 40 ks, autoklávovat
11. LB agar (4 × 300 ml)
12. YT médium + 0,3 g glukózy + 1,5 mg thiaminchloridu (2× 300 ml)
13. 2YT médium (4× 20ml)
14. IPTG (0,1 M roztok)
15. ampicilin (roztok 100 mg/ml).