

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 6.

Trawienie plazmidowego DNA przy użyciu nukleaz.

Zadanie 1. Trawienie DNA przy użyciu DNazy I.

1. Na podstawie oznaczonego stężenia plazmidowego DNA, otrzymanego na poprzednim ćwiczeniu, oblicz **Y - objętość DNA**, jaką należy dodać do próbki, tak aby ilość DNA wynosiła 1µg. Oblicz **X - objętość wody**, jaką należy dopełnić próbkę, aby jej końcowa objętość wynosiła 10 µl. Uzupełnij Tabelę 1 i 2.
2. Każdy zespół przygotowuje 2 opisane próbówki o **obj. 1,5 ml**. Do każdej próbówki należy dodać odczynniki zgodnie z opisem w tabeli poniżej (**UWAGA! Ważna kolejność dodawania odczynników**). *1U DNazy I (ok. 0,3 jedn. Kunitz'a) trawi 1µg plazmidowego DNA w ciągu 10 minut.*

Tabela 1.

Probówka	1	2
Woda [µl]	X=	X=
10x Bufor I [µl]	1	1
Plazmidowe DNA (1 µg) [µl]	Y=	Y=
DNaza I (1U/µl) [µl]	-	1
Objętość końcowa [µl]	10	10

3. Zawartość próbek dokładnie wymieszaj i zwróć tak, aby całość mieszaniny reakcyjnej znajdowała się na dnie próbek. Probówki umieść w termobloku o temperaturze **37° C** i **inkubuj przez 15 minut**.
4. Reakcję przerwać dodając 5 µl 60 mM EDTA i umieszczając próbki w termobloku o temperaturze min. **65° C** na 10 minut. Po tym czasie próbki przekazać do pokoju przygotowawczego w celu przechowania materiału do kolejnych ćwiczeń. **Dokładnie podpisać oddawane próby, nr grupy i inicjałami !!!**

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Zadanie 2. Trawienie plazmidowego DNA przy użyciu endonukleazy restrykcyjnej Pvu II.

1. Przygotuj mieszaninę reakcyjną zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli 2 (**UWAGA! kolejność dodawania odczynników jest istotna**). Pamiętaj o zachowaniu zasad sterylności. Enzymy koniecznie trzymaj na lodzie lub w tzw. chłodzikach.

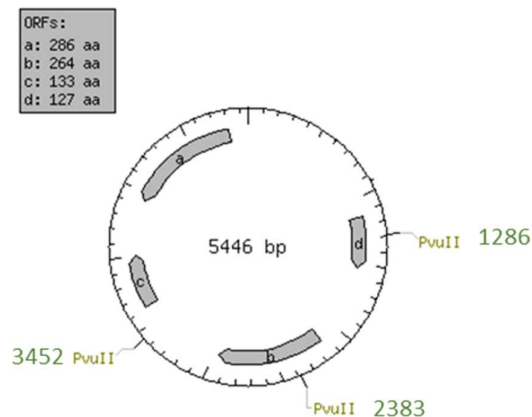
Tabela 2.

Odczynnik:	Objętość:
Woda [μ l]	X =
10 x Bufor Fast Digest [μ l]	1
Plazmidowe DNA (1 μ g) [μ l]	Y =
Pvu II [μ l]	1
Objętość końcowa [μ l]	10

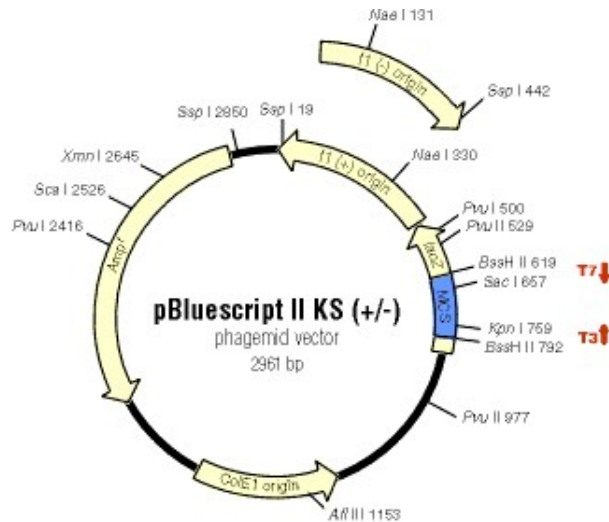
2. Zawartość probówki dokładnie wymieszaj i zwiruj tak, aby całość mieszaniny reakcyjnej znajdowała się na jej dnie. Trawienie plazmidu pcDNA3 (Rys. 1) przeprowadź **inkubując 15 min.** w termobloku o **temperaturze 37° C** (patrz tabela 2).
3. Po tym czasie probówki z produktami reakcji oddaj do pokoju przygotowawczego w celu ich przechowania do kolejnych zajęć. Materiał przechowywać w -20° C do następnych ćwiczeń.

Rys. 1. Mapa restrykcyjna cięcia plazmidu pcDNA3 przez enzym PvuII.

Zadanie 3: W oparciu o mapę restrykcyjną wektora plazmidowego pBluescript SK+ podaną poniżej oblicz jakie będą produkty trawienia tego wektora podanymi enzymami:



Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji



1. *KpnI*
2. *PvuI*
3. *PvuII*
4. *BssHI*

Na podstawie informacji o polilinkerze (MCS) w wektorze pBluescript KS, umieszczonych w tabeli poniżej, wskaż enzymy tworzące lepkie i tępe końce.

Endonukleaza restrykcyjna	Rozpoznawana sekwencja i miejsce cięcia (↓)	Pozycja cięcia w wektorze
<u>SacII</u>	<pre> 5' G A G C T C 3' 3' C T C G A G 5' ↑ </pre>	664
<u>NotI</u>	<pre> 5' G C G G C C G C 3' 3' C G C C G G C G 5' ↑ </pre>	670
<u>EagI</u>	<pre> 5' C G G C C G 3' 3' G C C G G C 5' ↑ </pre>	670

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

<u>XbaI</u>	5' T C T A G A 3' ↓ 3' A G A T C T 5' ↑	677
<u>BamHI</u>	5' G G A T C C 3' ↓ 3' C C T A G G 5' ↑	689
<u>SmaI</u>	5' C C C G G G 3' ↓ 3' G G G C C C 5' ↑	697
<u>XmaI</u>	5' C C C G G G 3' ↓ 3' G G G C C C 5' ↑	695
<u>PstI</u>	5' C T G C A G 3' ↓ 3' G A C G T C 5' ↑	705
<u>EcoRI</u>	5' G A A T T C 3' ↓ 3' C T T A A G 5' ↑	707
<u>EcoRV</u>	5' G A T A T C 3' ↓ 3' C T A T A G 5' ↑	715
<u>HindIII</u>	5' A A G C T T 3' ↓ 3' T T C G A A 5' ↑	719
<u>Clal</u>	5' A T C G A T 3' ↓ 3' T A G C T A 5' ↑	726
<u>SalI</u>	5' G T C G A C 3' ↓ 3' C A G C T G 5' ↑	734
<u>XhoI</u>	5' C T C G A G 3' ↓ 3' G A G C T C 5' ↑	740
<u>ApaI</u>	5' G G G C C C 3' ↓ 3' C C C G G G 5' ↑	753
<u>KpnI</u>	5' G G T A C C 3' ↓ 3' C C A T G G 5' ↑	759

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Tępe końce generują enzymy:

Lepkie końce generują enzymy: