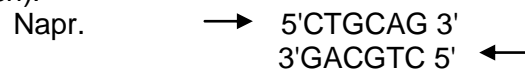
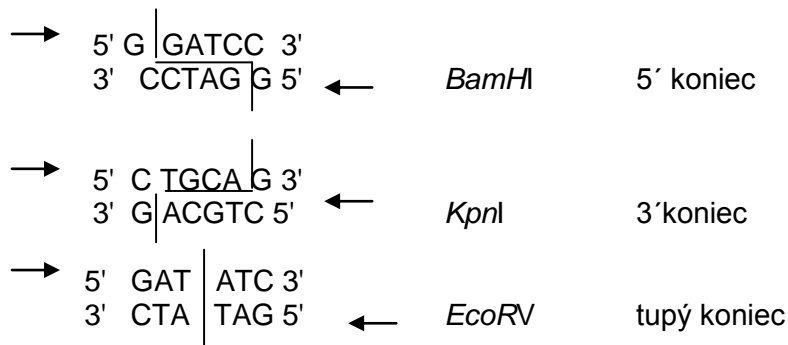


Téma: KLONOVANIE A MAPOVANIE DNA

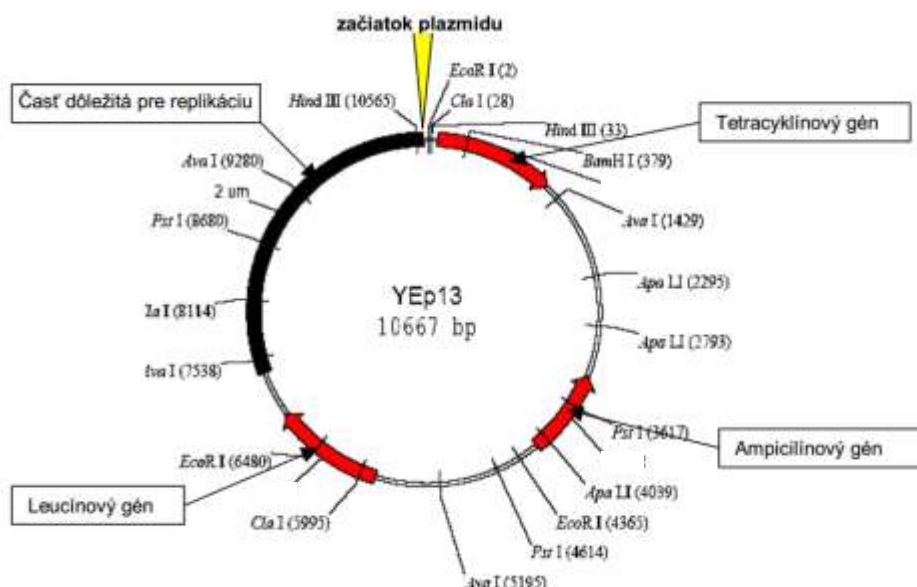
1. Klonovanie DNA znamená vytvorenie rekombinantnej DNA a vloženie tejto molekuly do baktérie, kde sa za krátky čas vegetatívne namnoží a vytvorí množstvo identických kópií. Na prípravu rekombinantnej DNA potrebujeme nosičovú DNA (najčastejšie plazmid) a DNA, ktorú chceme klonovať. Obe tieto DNA opracujeme špeciálnymi enzýmami, ktorým hovoríme restriktčné endonukleázy. Restriktčné endonukleázy sú súčasťou restriktčno-modifikačného systému baktérií, ktorý slúži na degradáciu a označenie cudzej DNA v bunke. Takto sa baktéria bráni preniknutiu cudzej DNA do bunky. Enzýmy štiepia dvojvláknovú DNA na miestach so symetrickou palindrómovou sekvenciou (sekvencia rovnako čítaná z dvoch strán v protíľahlých reťazcoch).



Restriktčné endonukleázy môžu zanechávať 5' alebo 3' prečnievajúce konce, alebo tupé konce. Kompatibilné konce sú dôležité pri spájaní (ligovaní) rekombinantných DNA molekúl, pretože sa môžu komplementárne spárovať iba pri použití rovnakého restriktčného enzýmu.



1.1. Schéma molekuly DNA s vyznačenými restriktčnými miestami sa nazýva restriktčná mapa. Na obrázku máte restriktčnú mapu plazmidu Yep13. Niektoré enzýmy majú svoje restriktčné miesta prítomné len raz, niektoré viackrát. Plazmid obsahuje časť, ktorá je potrebná pre jeho replikáciu a časť, ktorú môžeme nahradiť cudzou DNA, ktorá nesie cieľový gén, ktorý chceme klonovať. V plazmide sú prítomné 2 markerové gény pre rezistenciu na dve rôzne antibiotiká ampicilín a tetracyklín. Markerové gény slúžia na odlišenie baktérií, do ktorých sa plazmid dostane od ostatných. Bunky s plazmidom budú rásť na pôde s antibiotikom a vytvoria kolónie, teda klony a bunky bez plazmidu zahynú.



A. Ktorý restričný enzým by ste použili ako miesto na klonovanie tak aby ste neporušili potrebné časti plazmidu a prečo? Ako budete selektovať bunky s rekombinantnou DNA?

.....

B. Koľko fragmentov vznikne po štiepení restričným enzýmom *AvaI* a aká bude ich veľkosť?

Počet fragmentov.....

Veľkosti fragmentov.....

C. Koľko fragmentov vznikne po štiepení restričnými enzýmami *BamHI* a *EcoRI* spolu v jednej reakcii a aká bude ich veľkosť?

Počet fragmentov.....

Veľkosti fragmentov.....

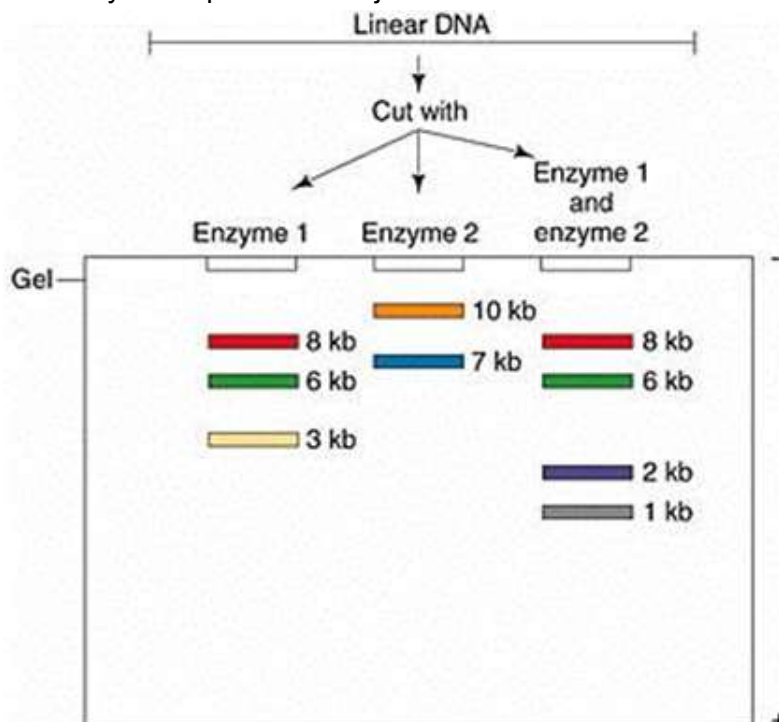
1.2. Restričný enzým *EcoRI* štiepi dvojláknovú DNA nasledovne:



Ktorý z nasledovných fragmentov sa môže viazať na *EcoRI* restričné miesto?

- | | | | |
|----------|----------|----------|----------|
| (A) | (B) | (C) | (D) |
| ..CG | AATTCG.. | ..TGAATT | GT.. |
| ..GCAATT | GC.. | ..AC | TTAACA.. |

2. Nie vždy máte k dispozícii DNA, v ktorej sú identifikované miesta pre restričné enzýmy. Pokiaľ chcete takúto DNA klonovať, musíte zmapovať miesta pre restričné enzýmy, ktoré by ste mohli použiť na klonovanie. Na restričné mapovanie musíte použiť niekoľko enzýmov a urobiť jednoduché aj dvojité štiepenia. Na základe veľkostí fragmentov, ktoré dostanete po štiepeniach viete lokalizovať restričné miesta a určiť aj ich vzájomné vzdialenosti. Na obrázku máte schému takých štiepení lineárnej DNA.



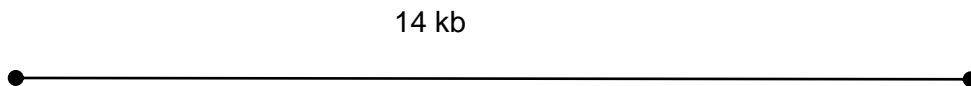
2.1. Určte počet restričných miest pre oba enzýmy a ich poradie. Nakreslite restričnú mapu lineárnej DNA tak, že na schéme nižšie vyznačíte polohu jednotlivých miest a ich vzdialenosti

Počet miest:

Enzým 1 _____

Enzým 2 _____

Restričná mapa:



2.2. Pri štiepení kruhového plazmidu pBIO sme dostali nasledovné fragmenty:

HindIII 3,82 kbp, 0,18 kbp

BamHI 2,35 kbp, 1,65 kbp

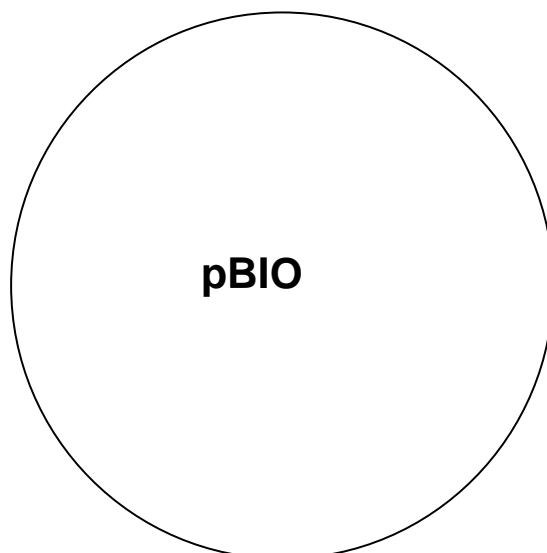
EcoRI 3,0 kbp, 1,0 kbp

HindIII + BamHI 2,35 kbp, 1,2 kbp, 0,27 kbp, 0,18 kbp

HindIII + EcoRI 1,87 kbp, 1,0 kbp, 0,95 kbp, 0,18 kbp

BamHI + EcoRI 1,6 kbp, 1,4 kbp, 0,75 kbp, 0,25 kbp

Zakreslite polohu jednotlivých restričných miest do schémy kruhového plazmidu aj so vzdialenosťami medzi restričnými miestami.



Určte veľkosť plazmidu.....

Autor: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.,
Recenzia: Bc. Jaroslav Ferenc
Redakčná úprava: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.
Slovenská komisia Biologickej olympiády
Vydal: IUVENTA Slovenský inštitút mládeže, Bratislava 2015