FOND ROZVOJE VYSOKÝCH ŠKOL

Využití techniky RACE *(Rapid amplification of complementary DNA ends)* pro identifikaci genů pro metalothioneiny

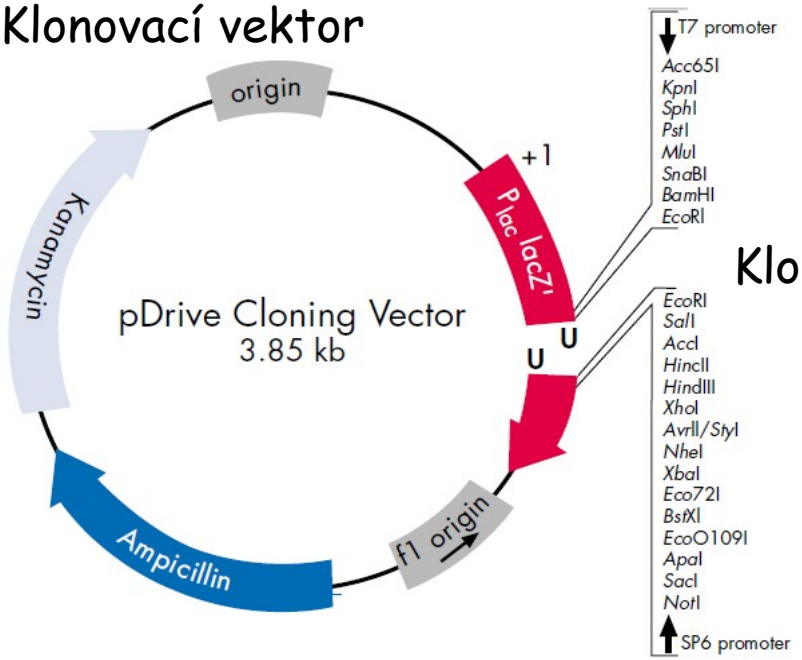
Vypracováno v rámci projektu FRVŠ MŠMT 2252/2010/ G4.

Klonování RACE produktů v plazmidu

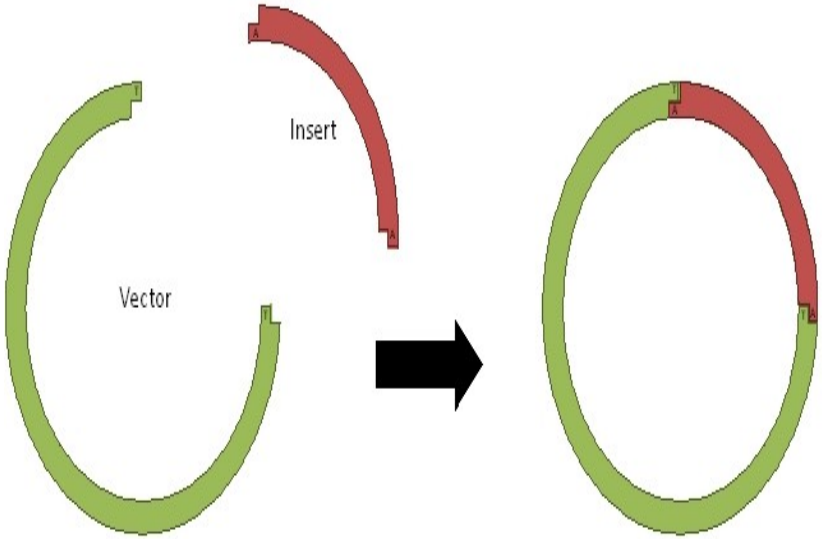
1. Ligace do vektoru

Ligace

Klonovací vektor



Klonovací místo

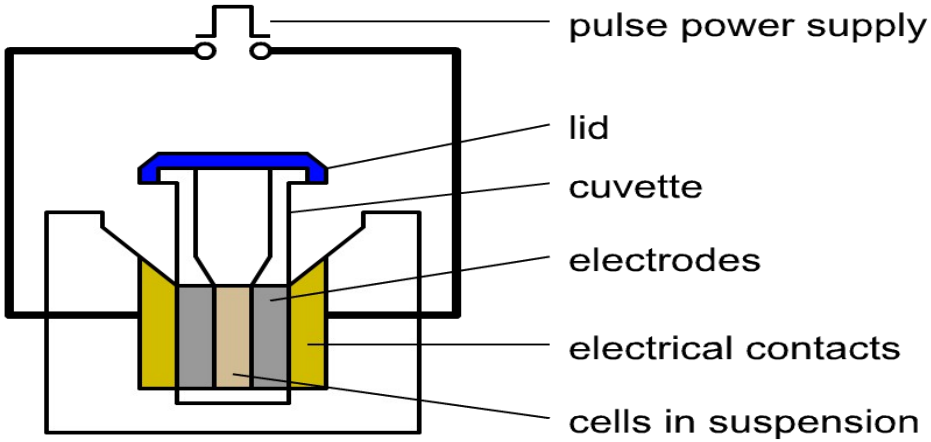


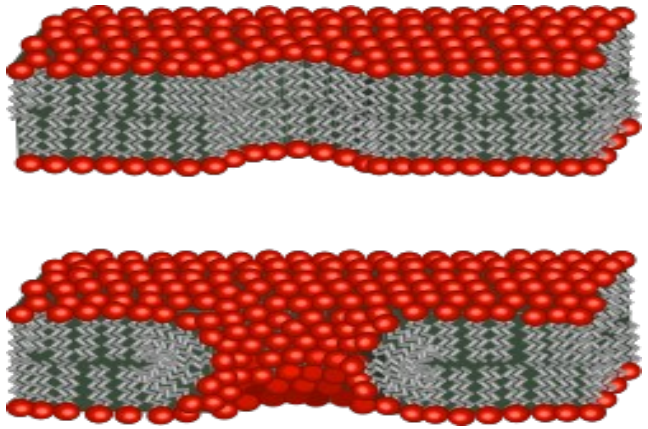
Převzato:http://www.di.uq.edu.au/proj4aproc

http://www.qiagen.com/literature/pdrive/pcr_cloning21.pdf

Transformace bakterií E .coli

- Heat shock (tepelný šok)
- Kompetentní buňky se vystaví po krátkou dobu teplotnímu šoku a jsou schopné přijmout plazmid
- Elektroporace

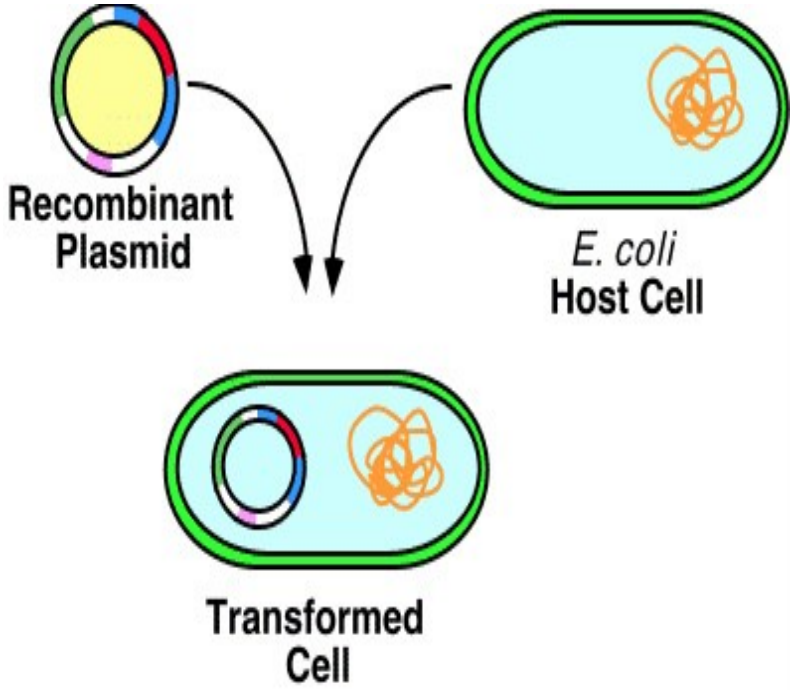


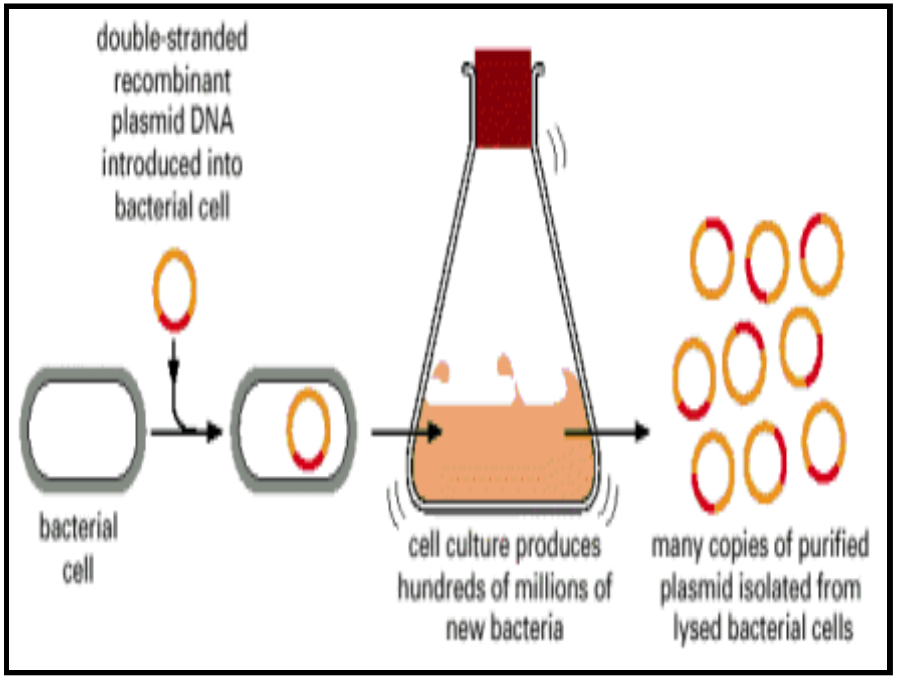


http://en.wikipedia.org/wiki/Electroporation

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electroporation_Diagram.png

Množení rekombinatního plazmidu ve vektoru

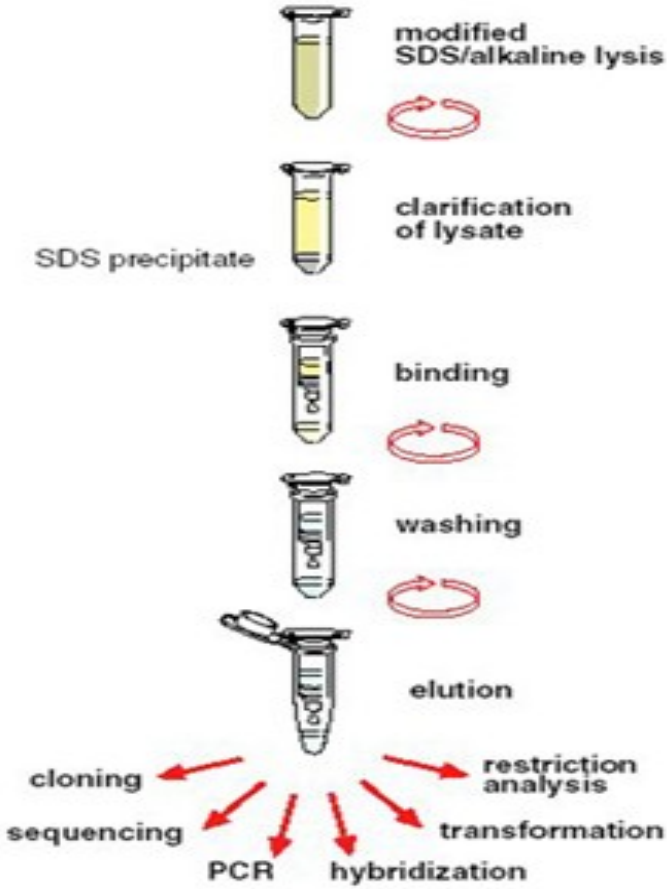




http://www.flickr.com/photos/biotechnology/2978049157/

Selekce netransformovaných bakterií na základě ampicilinové rezistence

Izolace rekombinatního plazmidu pomocí kitu NucleoSpin Plasmid

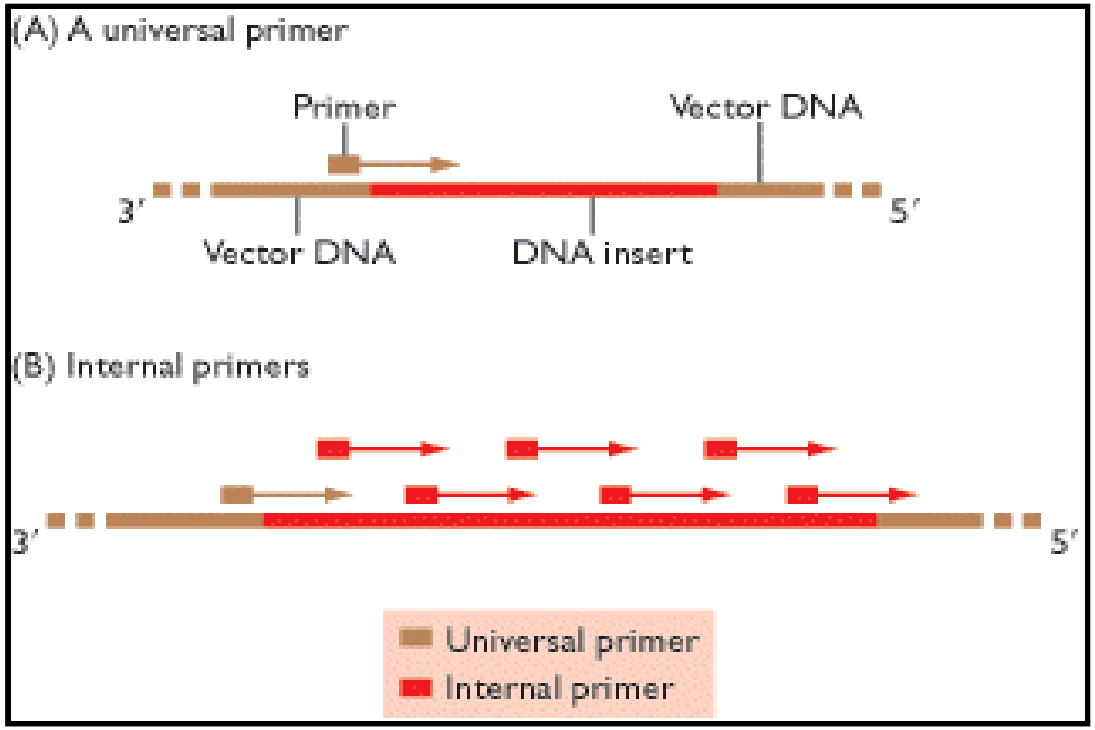


http://www.bioke.be/webshop/productpage/68.html?wp=efosccrsxky,a177,a9,a55,a61,a165,c8

Sekvenace DNA

- Určení primární struktury vloženého insertu
- Založena na PCR, využívá se znalosti sekvence vectoru (primery SP6 nebo T7, M13)

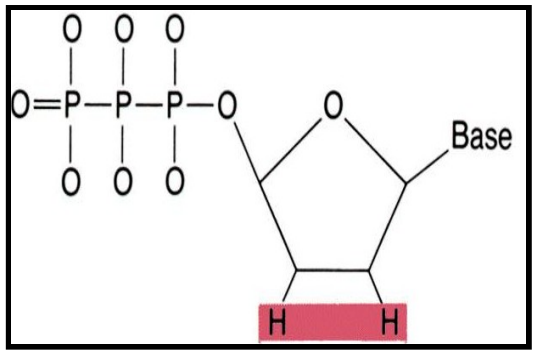
Dideoxy metoda + Automatizace

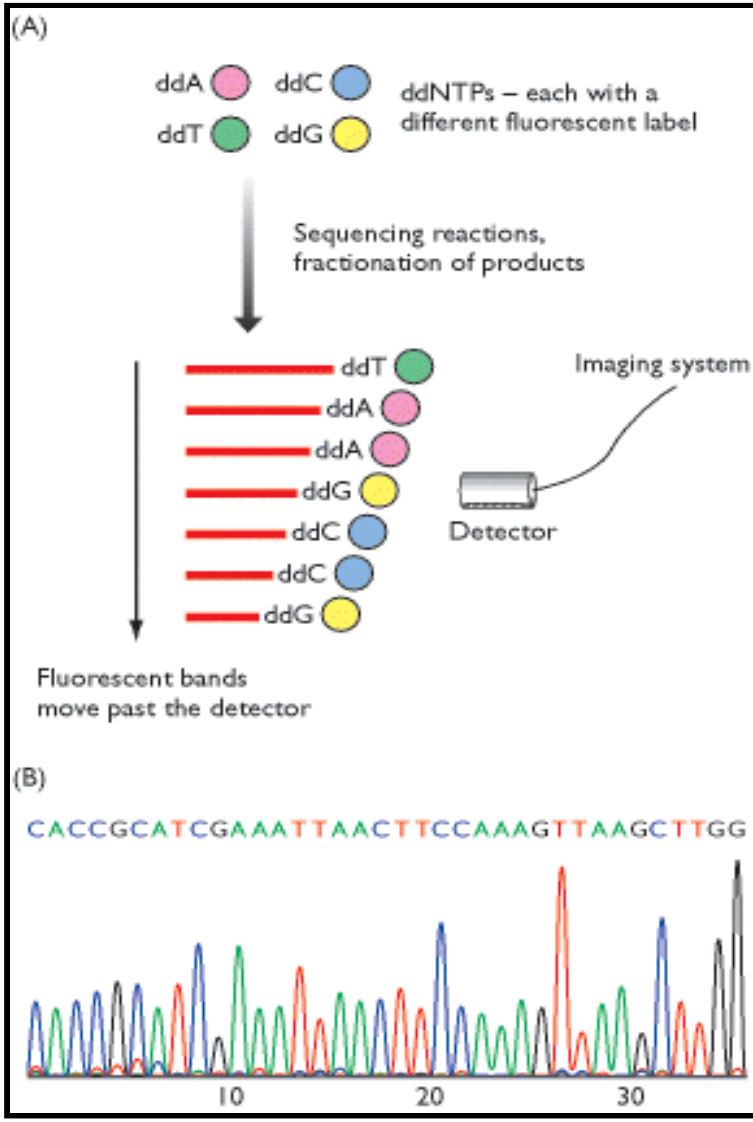


is.cuni.cz/studium/predmety/index.php?do=down&did=7902

Dideoxy metoda

- Inkorporace flourescenčně značeného dideoxynukleotidu blokuje syntézu řetězce DNA





Děkuji za pozornost!