

Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA



Σε μία αντίδραση σύνδεσης, ο μοριακός λόγος DNA/πλασμιδίου (δηλαδή ο λόγος των ενθεμάτων DNA προς τα μόρια του πλασμιδίου) θα πρέπει να είναι 1:1 έως 3:1. Η ποσότητα του DNA που κλωνοποιείται υπολογίζεται από τον τύπο: $\text{ng DNA} = \text{ng πλασμιδίου} \times a \times b$, όπου a ο μοριακός λόγος DNA/πλασμιδίου και b ο λόγος μεγέθους DNA/πλασμιδίου.

$$\text{ng DNA} = \text{ng πλασμιδίου} \times \frac{\text{μέγεθος DNA}}{\text{μέγεθος πλασμιδίου}} \times \text{μοριακός λόγος}$$



Πόσο DNA θα προσθέσουμε (σε ng) από ένα ένθεμα 500 bp σε 100 ng ενός φορέα 3.0 kb σε μια αντίδραση σύνδεσης εάν επιθυμώ μοριακό λόγο ενθέματος/φορέα 3:1; Τι ποσότητες (σε μl) θα βάλετε στην αντίδραση;



Ξέρουμε ότι έχουμε 200 ng/μl DNA φορέα και 100 ng/μl DNA ενθέματος



2. Αντίδραση σύνδεσης με τη χρήση T4 DNA λιγάσης

Υπολογίστε τις ποσότητες φορέα-ενθέματος που θα χρησιμοποιήσετε, αν θέλετε μοριακό λόγο 3:1, και ετοιμάστε τις αντιδράσεις 1 και 2.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 1			Αντίδραση 2		
	Ποσότητες	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητες	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
DNA φορέα		50 ng/μl	50 ng		50 ng/μl	50 ng
(1) PCR Γονιδιωματικού DNA					---	---
(2) PCR cDNA		---	---			
Ρυθμιστικό διάλυμα		10X	1X		10X	1X
T4 DNA λιγάση		5 u/μl	5 unit		5 u/μl	5 unit
H ₂ O						
Τελικός όγκος	10 μl			10 μl		



- PCR genomic DNA: 1650 bp
- PCR cDNA: 850 bp
- Φορέας PBS-SK: 3 kb



- Αντίδραση σύνδεσης PCR genomic DNA/Φορέας PBS-SK:

ng DNA =

- Αντίδραση σύνδεσης PCR cDNA/Φορέας PBS-SK:

ng DNA =