

ABSTRAKT

Purifikace plasmidu pOTB7 s kódovou sekvencí karbonylreduktasy 1 (CBR1) v buňkách *Escherichia coli* (*E. coli*) byla provedena metodou alkalické lýze. Sekvence CBR1 byla namnožena metodou polymerasové řetězové reakce (PCR) za přítomnosti navržených primerů. Levý primer obsahoval restrikční místo pro restrikční endonukleasu *NdeI* a pravý primer pro restrikční endonukleasu *XhoI*. Správnost výsledků prvního kroku byla potvrzena ověřením velikosti nasyntetizovaného fragmentu a následně restrikční analýzou pomocí restrikční endonukleasy *BamHI*.

Takto připravená kódová sekvence CBR1 byla ligována do vektoru Topo, který byl dále následně transformován do kompetentních buněk *E. coli*. Po namnožení *E. coli* byl vektor Topo obsahující kódovou sekvenci CBR1 purifikován metodou alkalické lýze. Úspěšnost druhého kroku byla ověřena porovnáním velikosti cyklického vektoru Topo bez vloženého insertu a vektoru Topo s kódovou sekvencí CBR1 na agarózovém gelu a následnou restrikční analýzou pomocí restrikční endonukleasy *BamHI*.

Posledním krokem byla subklonace kódové sekvence CBR1 z vektoru Topo do expresního vektoru pET15b.