

ĆWICZENIE NR 5

Nowoczesna biotechnologia w kosmetologii

Izolacja DNA

1. Osad z 1.5 - 3 ml nocnej hodowli bakterii dokładnie zawiesić przez pipetowanie lub worteksowanie w 200 μ l roztworu do zawieszania L1.
2. Dodać 200 μ l alkalicznego roztworu lizującego L2 i po wymieszaniu przez kilkukrotne odwracanie próbki pozostawić 3 min. w temperaturze pokojowej.

Uwaga! Po dodaniu roztworu L2 należy ostrożnie mieszać zawartość próbki aby nie spowodować fragmentacji chromosomalnego DNA. Zwykle wystarczy 5-6-cio krotne odwrócenie próbki. Po 3 minutach inkubacji lizat powinien być całkowicie klarowny. Jeżeli nie jest należy odwrócić lizat kilka razy i przedłużyć czas inkubacji o dalsze 3 minuty.

3. Dodać 400 μ l roztworu zobojętniającego GL3 i wymieszać przez kilkukrotne odwracanie próbki.
4. Wirować 10 minut przy 10 - 15 tys. RPM.
5. Ostrożnie wlać supernatant do minikolumny do oczyszczania plazmidowego DNA.
6. Wirować 1 minutę przy 10 - 15 tys. RPM.
7. Wyciągnąć minikolumnę z próbki, wylać przesącz i ponownie włożyć ją do próbki.
8. Dodać do kolumny 500 μ l pierwszego roztworu płuczącego W.
9. Wirować 1 minutę przy 10-15 tys. RPM.
10. Wyciągnąć minikolumnę z próbki, wylać przesącz i ponownie włożyć kolumnę do próbki.
11. Dodać do kolumny 600 μ l drugiego roztworu płuczącego A1.
12. Wirować 2 minuty przy 10-15 tys. RPM.
13. Osuszoną minikolumnę umieścić w nowej probówce 1.5 ml i do złoza znajdującego się na dnie kolumny dodać 60 μ l utraczonej wody DEPC.
14. Próbkę inkubować 3 minuty w temperaturze pokojowej.
15. Wirować 1 minutę przy 10-12 tys. RPM.
16. Po wirowaniu usunąć kolumnę i zmierzyć stężenie uzyskanego DNA.
17. Wynik umieścić w sprawozdaniu.

Trawienie enzymami restrykcyjnymi, elektroforeza w żelu agarozowym, analiza wyników