

Ćwiczenie nr 8

Kwasy nukleinowe – izolacja DNA z komórek prokariotycznych

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Celem ćwiczenia jest:

- zapoznanie się z metodami izolacji plazmidowego DNA z komórek prokariotycznych
- zapoznanie się z metodami rozdziału elektroforetycznego wyizolowanego DNA

Kwasy nukleinowe to długie liniowe polimery, których zadaniem jest przenoszenie informacji genetycznej. Polimery te zbudowane są z pojedynczych monomerów w skład których wchodzi: zasada azotowa, cukier i kwas fosforowy.

W kwasie deoksyrybonukleinowym (DNA) występuje cukier deoksyryboza, a w kwasie rybonukleinowym (RNA) ryboza. Cukry w kwasach nukleinowych połączone są wiązaniami fosfodiesterowymi i często są określane jako rdzeń kwasu nukleinowego. W DNA występują cztery rodzaje zasad: adenina i guanina (zasady purynowe) oraz cytozyna i tymina (zasady pirymidynowe). W RNA zamiast tyminy występuje uracyl. Zasady te łączą się ze sobą w ściśle określony sposób: tymina z adeniną za pośrednictwem dwóch wiązań wodorowych, oraz cytozyna z guaniną za pośrednictwem trzech wiązań wodorowych. Takie łączenie się zasad w pary jest określane mianem tworzenia się komplementarnych par zasad. Dzięki temu powstaje stabilny przestrzennie układ determinujący strukturę kwasów nukleinowych.

Plazmidy to pozachromosomowe elementy genetyczne, występujące u wielu organizmów prokariotycznych, a także u niektórych eukariontów, zdolne do autonomicznego, niezależnego od DNA chromosomowego namnażania się, a także fizycznie od niego odrębne.

Enzymy restrykcyjne (restryktazy) stanowią klasę enzymów z grupy endonukleaz naturalnie występującą u bakterii i sinic. Mają zdolność do specyficznego rozpoznawania krótkich sekwencji DNA i rozcinania kwasu w ich obrębie. Dzięki temu znajdują szerokie zastosowanie w biologii molekularnej. Enzymy restrykcyjne po trawieniu dwuniciowego DNA pozostawiają grupę fosforanową na końcu 5', a grupę hydroksylową na końcu 3'.

Elektroforeza to metoda analizy i rozdziału naładowanych cząstek w polu elektrycznym. Elektroforeza jest jedną z głównych metod rozdzielania, identyfikacji i oczyszczania kwasów nukleinowych. Do rozdziału fragmentów DNA najczęściej stosuje się elektroforezę w żelu

agarozowym. Agarozą to polisacharyd, łatwo rozpuszczający się w wodzie i pozostający w stanie płynnym do temperatury ok. 40°C. Poniżej tej temperatury zestala się i tworzy porowaty żel, który po umieszczeniu go w odpowiednim buforze i przyłożeniu odpowiedniego pola elektrycznego pozwala na migrację ujemnie naładowanych fragmentów kwasów nukleinowych w kierunku dodatniej anody.

Zasada metody

Technika izolacji DNA opiera się na zdolności wiązania się tego kwasu nukleonowego do ziół krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. W pierwszym etapie bakterie poddawane są lizie alkalicznej, a następnie lizat zobojętniany jest odpowiednim buforem. Bufor ten powoduje precypitację chromosomalnego DNA i białek, pozostawiając jednocześnie plazmidowe DNA w roztworze. Po odwirowaniu próbki, supernatant zawierający plazmidowe DNA наносzony jest na minikolumnę ze specjalnym złożem krzemionkowym. DNA przechodząc przez złożę osiada na nim, podczas gdy zanieczyszczenia przechodzą do roztworu. Po wypłukaniu z kolumny resztek zanieczyszczeń, oczyszczone plazmidowe DNA wymywane jest z niej buforem TE lub wodą i nadaje się do dalszych analiz bez konieczności precypitacji.

Procedura – część I

Izolacja DNA

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

Uwaga! Po dodaniu roztworu L2 należy ostrożnie mieszać zawartość próbówki aby nie spowodować fragmentacji chromosomalnego DNA. Zwykle wystarczy 5-6-cio krotne odwrócenie próbówki. 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 µl roztworu zobojętniającego GL3 i wymieszać przez kilkukrotne odwracanie próbówki.
4. Wirować 10 minut przy 10 tys. RPM.
5. Ostrożnie wlać supernatant do minikolumny do oczyszczania plazmidowego DNA.
6. Wirować 1 minutę przy 10 tys. RPM.

7. Wyciągnąć minikolumnę z próbki, wylać przesącz i ponownie włożyć ją do próbki.
8. Dodać do kolumny 500 µl pierwszego roztworu płuczącego W.
9. Wirować 1 minutę przy 10 tys. RPM.
10. Wyciągnąć minikolumnę z próbki, wylać przesącz i ponownie włożyć kolumnę do próbki.
11. Dodać do kolumny 600 µl drugiego roztworu płuczącego A1.
12. Wirować 2 minuty przy 10 tys. RPM.
13. Osuszoną minikolumnę umieścić w nowej próbce 1.5 ml i do złoza znajdującego się na dnie kolumny dodać 60 µl ultraczystej wody DEPC.
14. Próbkę inkubować 3 minuty w temperaturze pokojowej.
15. Wirować 1 minutę przy 6 tys. RPM.
16. Po wirowaniu usunąć kolumnę i zmierzyć stężenie uzyskanego DNA.
17. Wynik umieścić w sprawozdaniu.

Trawienie enzymami restrykcyjnymi

1. Przygotować i podpisać trzy próbki odpowiednimi oznaczeniami oraz nazwą grupy
2. Do przygotowanych próbek odpipetować odczynniki według poniższej tabelki:

Próbka	DNA 200 ng	Bufor do enzymów restrykcyjnych	Enzym restrykcyjny I	Enzym restrykcyjny II	H ₂ O
1. µl	1 µl	1 µl		do 10 µl
2. µl	1 µl		1 µl	do 10 µl
3. µl	1 µl	1 µl	1 µl	do 10 µl

3. Zawartość próbek inkubować w temperaturze 37°C przez 16 godzin.

Procedura – część II

Przygotowanie żelu agarozowego (1%)

2. Przygotować 400 ml buforu TBE (0,5x stężonego) z roztworu wyjściowego (10x stężonego).
3. Odważyć odpowiednią ilość agarozy i rozpuścić w 50 ml przygotowanego roztworu buforu TBE w łaźni wodnej.
4. Do ochłodzonego żelu (ok. 50°) dodać 50 μ l roztworu bromku etydyny i dokładnie wymieszać. UWAGA! Bromek etydyny jest kancerogenem – założyć rękawiczki, pracować pod dygestorium!!!
5. Tak przygotowany żel wylać do przygotowanej podstawki z grzebieniem i pozostawić do zastygnięcia (ok. 30 minut)

Elektroforeza w żelu agarozowym

1. Po zastygnięciu żelu usunąć ograniczniki, a podstawkę z żelem umieścić w aparacie do elektroforezy.
2. Zalać aparat do elektroforezy przygotowanym wcześniej 0,5 x stężonym buforem TBE.
3. Ostrożnie usunąć grzebień z żelu.
4. Próbkę po trawieniu enzymami restrykcyjnymi (ok. 8-10 μ l) wymieszać z buforem obciążającym zawierającym błękit bromotymolowy (ok. 2-4 μ l).
5. Do studzienek w żelu agarozowym nałożyć przygotowane próbki oraz marker wielkości prążków.
6. Aparat zamknąć i podłączyć do prądu. Zachować ostrożność!!!
7. Warunki rozdziału:
 - napięcie: 100V
 - czas rozdziału: 45-60 minut
8. Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym wyniki oglądać na transiluminatorze w świetle UV. UWAGA! Chronić oczy przed UV!!!
9. Wyniki uzyskane w trakcie rozdziału umieścić w sprawozdaniu.