# Ćwiczenie nr 8

# Kwasy nukleinowe

# I. Izolacja DNA z komórek prokariotycznych, trawienie enzymami restrykcyjnymi

# II. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

---

**WYKONANIE ĆWICZENIA:**

**I. Izolacja DNA z komórek prokariotycznych, trawienie enzymami restrykcyjnymi**
**Izolacja DNA**

1. Osad z nocnej hodowli bakterii (znajdujący się w probówkach) dokładnie zawiesić przez kilkukrotne pipetowanie w 200 µl roztworu do zawieszania L1.

2. Dodać 200 µl alkalicznego roztworu lizującego L2 i po wymieszaniu przez kilkukrotne odwracanie probówki pozostawić 3 min. w temperturze pokojowej.

   Uwaga! Po dodaniu roztworu L2 należy ostrożnie mieszać zawartość probówki aby nie spowodować fragmentacji chromosomalnego DNA. Zwykle wystarczy 5-6-cio krotne odwrócenie probówki. 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. Przenieść całość do probówki typu eppendorf.

4. Dodać 400 µl roztworu zobojętniającego GL3 i wymieszać przez kilkukrotne odwracanie probówki.

5. Wirować 10 minut przy 10 tys. RPM.

6. Ostrożnie przenieść pipetą supernatant do minikolumny do oczyszczania plazmidowego DNA, uważając by nie przenieść osadu powstałego po wirowaniu.

7. Wirować 1 minutę przy 10 tys. RPM.

8. Wyciągnąć minikolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie włożyć ją do probówki.

9. Dodać do kolumny 500 µl pierwszego roztworu płuczącego W.

10. Wirować 1 minutę przy 10 tys. RPM.

11. Wyciągnąć minikolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie włożyć kolumnę do probówki.
12. Dodać do kolumny 600 µl drugiego roztworu płuczącego A1.
13. Wirować 2 minuty przy 10 tys. RPM.
14. Osuszoną minikolumnę umieścić w nowej probówce 1.5 ml i do złoża znajdującego się na dnie kolumny dodać 80 µl ultraczystej wody DEPC.
15. Próbkę inkubować 3 minuty w temperaturze pokojowej.
16. Wirować 1 minutę przy 6 tys. RPM.
17. Po wirowaniu usunąć kolumnę i zmierzyć stężenie uzyskanego DNA.
18. Wynik umieścić w sprawozdaniu.

**Trawienie enzymami restrykcyjnymi**

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

| Próbka | DNA 200 ng | Bufor do enzymów restrykcyjnych | Enzym restrykcyjny I | Enzym restrykcyjny II | $H_2O$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 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 probówek inkubować w temperaturze 37°C przez 16 godzin.

**II. Elektrofereza DNA w żelu agarozowym**

**Przygotowanie żelu agarozowego (1%)**

1. Przygotować 400 ml buforu TBE (0,5x stężonego) z roztworu wyjściowego (10x stężonego).

2. Odważyć odpowiednią ilość agarozy i rozpuścić w 50 ml przygotowanego roztworu buforu TBE w łaźni wodnej.
3. Do ochłodzonego żelu (ok. 50°) dodać 50 µl roztworu bromku etydyny i dokładnie wymieszać. UWAGA! Bromek etydyny jest kancerogenem – założyć rękawiczki, pracować pod dygestorium!!!
4. 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 elektoroforezy.
2. Zalać aparat do elektorforezy przygotowanym wcześniej 0,5 x stężonym buforem TBE.
3. Ostrożnie usunąć grzebień z żelu.
4. Próbki po trawieniu enzymami restrykcyjnymi (ok. 8-10µl) wymieszać z buforem obciążającym zawierającym błękit bromotymolowy (ok. 2-4µl).
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.