

Ćwiczenie nr 3

Nowoczesna biotechnologia w kosmetologii

I. 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 temperaturze 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 płuczającego 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 płuczającego 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, elektroforeza w żelu agarozowym, analiza wyników