

13. vaja – Izolacija DNA iz bakterij in agarozna elektroforeza

VEKTORJI

→ molekule, ki prenašajo tujo informacijo v gostiteljske celice

Po izvoru delimo vektorje na:

- **plazmide** in iz njih izvedene vektorje
- bakteriofag λ in iz njega izvedene vektorje
- nitaste fage in iz njih izvedene vektorje

Po namenu uporabe so vektorji:

- **klonirni**
- **ekspresijski** (citoplazemski, periplazemski, sekrecijski)

VEKTORJI

• **Klonirni vektorji** se v celici razmnožujejo ter s tem ustvarjajo kopije lastne in vključene DNA.

Klonirni vektor mora imeti:

- zaporedje, ki omogoča razmnoževanje v gostiteljski celici (zaporedje **ori**)
- klonirno mesto za vnos želenega fragmenta
- zapis za selekcijski marker

• **Ekspresijski vektor** mora poleg treh zgoraj naštetih imeti še:

- promotor
- zaporedje Shine-Dalgarno (RBS) mesto kamor se veže RNA polimeraza
- terminatorsko regijo (kjer RNA preneha prepisovati)
- lahko ima še posebne lastnosti: operatorske regije, fuzijske partnerje

VEKTORJI

Kategorije vektorjev:

- **plazmidi**: sprejmejo 0,1 kb -10 kb tuje DNA
- bakteriofagi = fagi: do 8 kb - 20 kb tuje DNA
- kozmidi, fagmidi, fozmidi: do 35-50 kb tuje DNA
- umetni kromosomi kvasovk (YAC): 100 kb - 1000 kb tuje DNA
- bakterijski umetni kromosomi (BAC): 75 kb -300 kb tuje DNA

Za izbor vektorja je odločilna dolžina fragmenta, ki ga želimo klonirati.

IZOLACIJA PLAZMIDOV

1. Ločitev celic od gojišča

2. Razbijanje (liza) celic

2. a Alkalna liza

Glavni komponenti sta NaDS in NaOH.

Prvi raztopi lipidni dvosloj in denaturira proteine, drugi pa denaturira nukleinske kisline. Po nevtralizaciji se plazmidna DNA renaturira, kromosomska pa obori.

2. b Encimska liza

Glavni komponenti sta Lizocim in Triton X-100. Prvi razgraja peptidoglikansko celično steno, drugi pa raztaplja lipidni dvosloj.

3. Obarjanje plazmidne DNA

4. Raztapljanje plazmidne DNA

ENCIMI V TEHNOLOGIJI REKOMBINANTNE DNA

Standardni encimi v tehnologiji rDNA so:

- restriktaze**: rezanje dsDNA na mestih s palindromnim zaporedjem
- ligaze**: povezovanje fragmentov DNA s fosfodiestrsko vezjo
- polimeraze**: podaljševanje verige na osnovi matrice
- Rnaze**

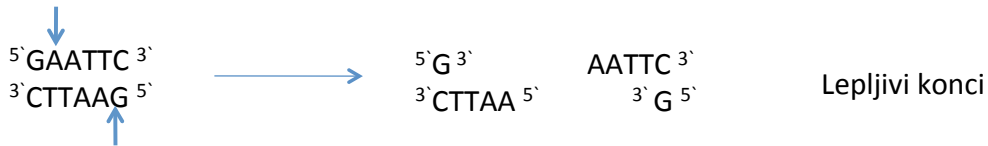
Redkeje uporabljamo tudi:

- fosfataze (odcep končnega fosfata z DNA)
- polinukleotid-kinaze (vezava fosfata; npr. pri radioaktivnem označevanju)
- reverzne transkriptaze
- eksonukleaze (postopno odcepljanje nukleotidov s konca verige)
- metilaze (dodajanje Met- na DNA)

RESTRIKTAZE

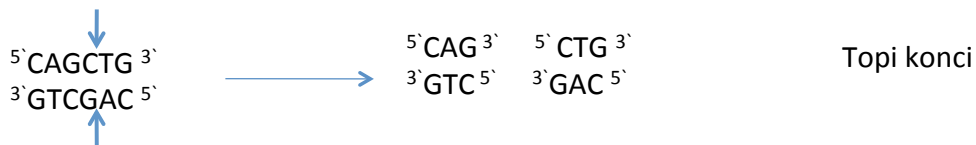
Restriktaze prepoznajo palindromno zaporedje 4, 6, 8, ali več nukleotidov; daljša ko je prepoznavna regija, redkeje reže neko dolgo tarčno DNA.

Restriktaza EcoRI



Animacija: http://www.wehi.edu.au/education/wehitv/restriction_enzyme_ecor1/

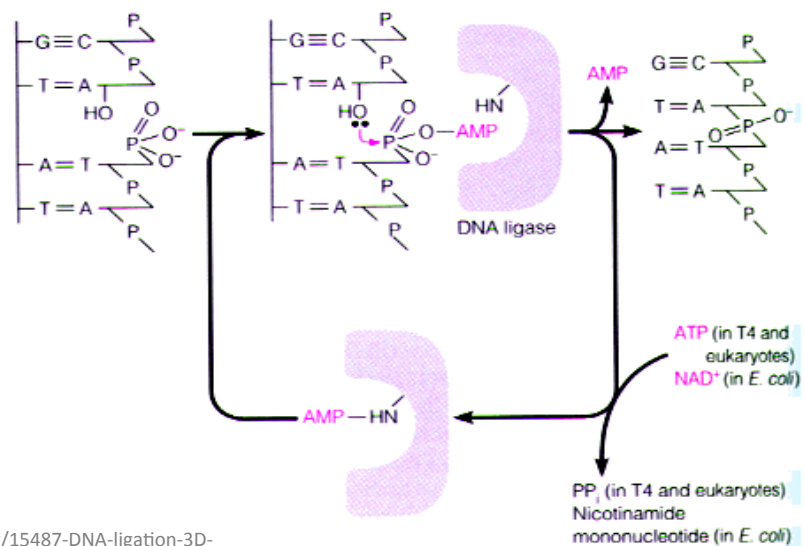
Restriktaza PvuII



LIGAZE

DNA-ligaze povezujejo fragmente DNA med seboj: **prosti 5'-fosfat povežejo s prosto sosednjo 3' -OH skupino.**

ligaze so od ATP (T4) ali NAD⁺ (*E. coli*) –odvisne



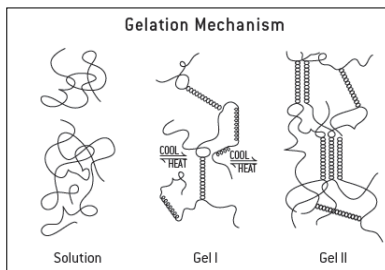
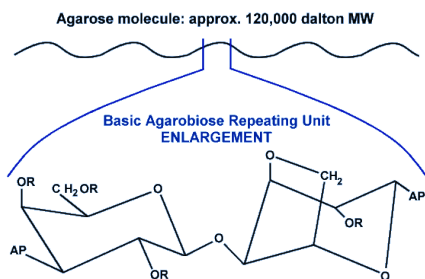
Animacija: <http://www.dnalc.org/view/15487-DNA-ligation-3D-animation-with-no-audio.html>

ELEKTROFOREZNE METODE AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA:

Lastnosti agaroze

agaroz: polisaharid iz rdečih alg (*Gracillaria*, *Gelidium*):

1,3- β -D-galaktopiranoza + 1,4- 3,6-anhidro- α -L-galaktopiranoza = agarobioza
agarobioza polimerizira v dolge verige s povpr. M \sim 120.000 (400 enot)



zamreženost



Koncentracija določa območje ločevanja - tabele (odvisno od čistosti agaroze); običajna agarozna: 0,5 % - 2 % delovna koncentracija (ločuje v območju 150 bp - 25.000 bp).

gel območje ločevanja (linearna dsDNA)

0,5 % 25 kb do 1,0 kb

0,7 % 12 kb do 0,8 kb

1,0 % 10 kb do 0,5 kb

1,2 % 7 kb do 0,4 kb

1,5 % 3 kb do 0,2 kb

ELEKTROFOREZNE METODE AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA:

Puferski sistem za ločevanje DNA:

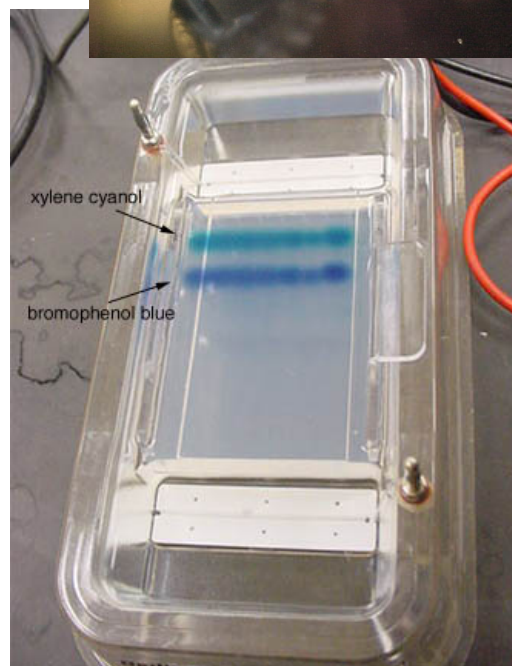
- AGE: TAE (Tris-acetat-EDTA)

Izvedba AGE

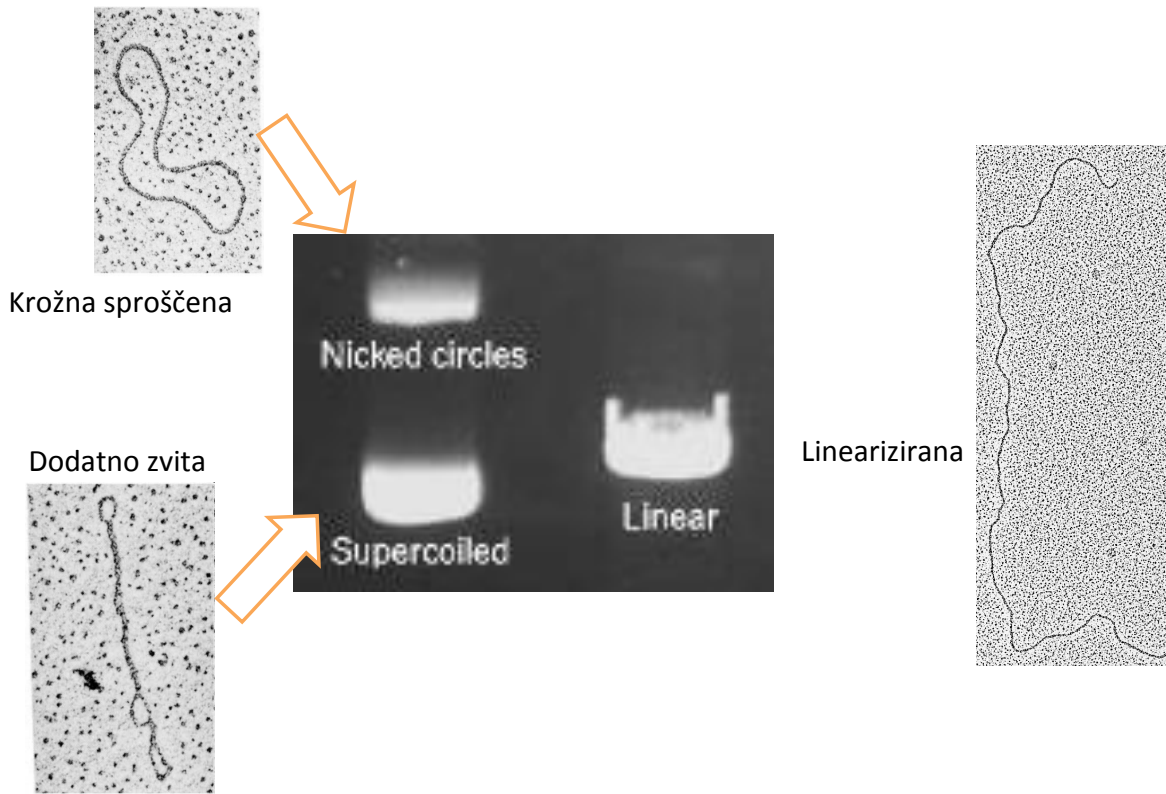
- agarozo segrejemo v elektroforeznem pufri, da se stali
- nekoliko ohladimo, nalijemo v model, kjer polimerizira
- vzorcu DNA dodamo nanašalni pufer, ki vsebuje tudi obtežilno substanco (glicerol, saharozo ali fikol) in markerska barvila (1 ali več), npr. bromfenolmodro, ksilencianol
- gel mora biti potopljen
- naneseemo vzorce
- 5-8 V/cm; za >10 kb 1-2 V/cm

Načini za **izolacijo DNA iz gela**: gelaze, vezava na nosilce, ekstrakcija,...

Animacija: <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

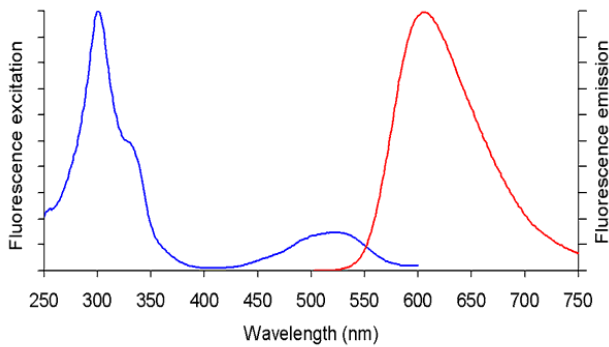
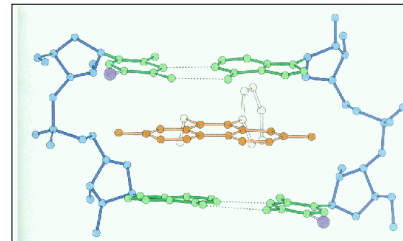
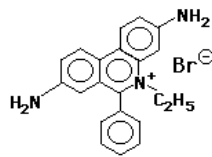
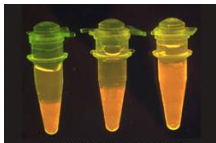


ELEKTROFOREZNE METODE
AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA:

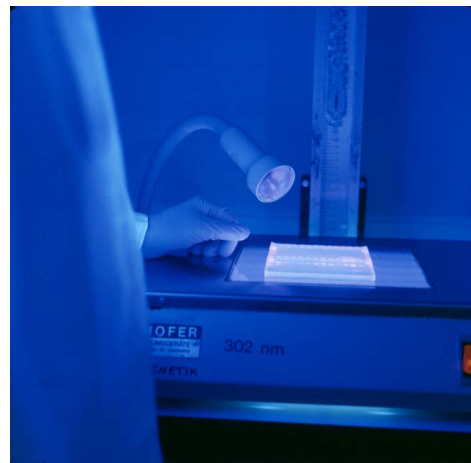


ELEKTROFOREZNE METODE
DETEKCIJA NUKLEINSKIH KISLIN V GELU:

- etidijev bromid: >5 ng DNA (302 nm/590 nm)



Etidijev bromid absorbira pri 302nm in emitira pri 590nm



fluoresc. barvila in UV so mutagena sredstva

ELEKTROFOREZNE METODE SISTEMI ZA ANALIZO:

