

Priimek in ime:.....smer študija:.....skupina:.....

Izolacija DNA iz bakterij in agarozna elektroforeza

(Teorija je v skriptih na straneh 84-90 in 94-100)

Namen vaje: Spoznati nekatere tehnike rekombinantne DNA in izolirati genomsko DNA iz bakterij.

Uvod: Po eno bakterijsko kolonijo (*Escherichia coli*) smo prenesli v tekoče gojišče, da so se bakterije preko noči namnožile. Iz prekonočne kulture bomo izolirali genomsko DNA in jo z agarozno elektroforezo analizirali.

Potek dela:

1. 1,5 mL tekoče kulture seva bakterije *E. coli*, centrifugiraj 1 min pri 15000 g (14000 vrt./min) v centrifugi Eppendorf.
2. Odlij supernatant in odstrani preostalo tekočino tako, da pritisneš mikrocentrifugirko na pivnik oz. brisačko. Bakterije resuspendiraj v 0,5 mL pufru STET (8% saharoza, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.0) s pomočjo vibracijskega mešala (vorteksa).
3. Dodaj 25 μ L raztopine lizocima (10 mg/mL v 10 mM Tris-HCl, pH 8,0), kratko premešaj (vorteksiraj) in inkubiraj 10 min pri 37 °C.
4. Proteine denaturiraj z inkubacijo 5 min v vreli vodi.
5. Centrifugiraj 8 min pri 14000 vrt./min.
6. Oborino odstrani z zobotrebcem, raztopini dodaj 50 μ L 3 M Na-acetata in 400 μ L 2-propanola. Premešaj z obračanjem mikrocentrifugirke.
7. Centrifugiraj 10 min pri 14000 vrt./min.
8. Supernatant previdno odlij in odpivnaj na brisački ter s pipeto ali kapalko popolnoma odstrani preostalo raztopino (pazi, da ne odstraniš usedline!). Lahko še kratko centrifugiraš, da se raztopina s sten zbere na dnu mikrocentrifugirke. Preostalo raztopino odstrani s kapalko ali pipeto. Oborino raztopi v 16 μ L dH₂O.
9. Asistent pripravi 0,8 % agarozni gel. Suspenzijo agaroze v pufru TAE (40 mM Tris, 20 mM acetat, 1 mM EDTA) segrejemo do vrelišča, da se agarozna popolnoma raztopi. Ohlajeni raztopini dodamo etidijev bromid do končne koncentracije 0,5 μ g/mL in gel vlijemo v pripravljen kalup z glavničkom. Ko se agarozna strdi, gel položimo v elektroforezno kadičko, prelijemo s pufrom TAE in odstranimo glavniček. Gel mora biti prekrit s pufrom.
10. Vzorcju dodaj 3 μ L modrega barvila (zmes bromfenol-modrega, ksilen-cianola in 30% saharoze) in ga nanesi v žepek na gelu. Na gel nanesimo še velikostni standard.
11. Prikluči napetost (proti kateri elektrodi potujejo vzorci?). Elektroforezo ustavi, ko hitrejša barva (bromfenol-modro) prepotuje dve tretjini gela.
12. Gel si oglej pod UV-svetilko pri 310 nm (transiluminator prekrij z zaščitnim steklom!).

Rezultati:

1. V pravokotnik nariši, kar si videl na gelu!



2. Komentiraj rezultate!

Odgovori na vprašanja:

1. Zakaj pri izolaciji DNA uporabljamo pufer STET in lizocim?
2. Kako lahko detektiramo nukleinske kisline po elektroforezi?
3. Kaj je vektor? Naštej tri vrste vektorjev!
4.so geni v plazmidu, ki omogočajo preživetje tistih gostiteljskih celic, ki nosijo plazmide.
5. Restrikcijske endonukleaze ali restriktaze so....., ki cepijo DNA molekule na (obkroži) poljubnem / specifičnem mestu (obkroži) s konca / v sredini verige.