

# Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

---

Grupa.....

Wrocław,.....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

## Ćwiczenie nr 5.

### Izolacja plazmidowego DNA.

### Oznaczanie stężenia DNA.

**UWAGA! Praca z materiałem biologicznym! Proszę przynieść na zajęcia własne rękawice i okulary ochronne.**

#### Zadanie 1.

1. Do próbek zawierających osady komórek bakteryjnych dodać **100 µl Roztworu I** (0,05M glukoza, 0,01M EDTA, 0,025Tris-HCl, pH 8,0). Komórki bakteryjne dokładnie zawiesić w roztworze w celu otrzymania jednorodnej zawiesiny (pozostające w mieszaninie agregaty komórkowe są przyczyną obniżenia wydajności lizy komórek, co prowadzi do spadku wydajności izolacji DNA). Następnie dodać **1 µl indykatora pH**, wymieszać i inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
2. Dodać **200 µl Roztworu II** i dokładnie wymieszać przez pipetowanie aż do momentu, gdy całość roztworu będzie miała jednorodnie niebieskie zabarwienie. Lizę komórek bakteryjnych prowadzić przez 5 minut na lodzie.
3. Do próbki dodać **150 µl Roztworu III** (3M CH<sub>3</sub>COOK, 12% CH<sub>3</sub>COOH) w celu wytrącenia białek. Zawartość próbki dokładnie wymieszać przez energiczne wytrząsanie aż do momentu całkowitego zniknięcia niebieskiej barwy i pojawienia się strąconych białek w roztworze.
4. Probówki inkubować przez 5 minut na lodzie, a następnie wirować 5 minut przy 9 000 x g w temperaturze pokojowej lub niższej.
5. Supernatant z nad osadu przenieść do czystej próbki 1,5 ml (**unikać pobierania białek przy przenoszeniu roztworu!**)  
\*Opcjonalnie preparat można dodatkowo oczyszczać przy użyciu mieszaniny fenol: chloroform: alkohol izoamylowy (25:24:1). W tym celu do roztworu DNA należy dodać 400 µl mieszaniny f:ch:ai, dokładnie wymieszać na vortexie a następnie wirować 5 minut, przy 12 000 x g. Górną warstwę wodną przenieść do czystej próbki.
6. DNA strącać przy użyciu etanolu. W tym celu do roztworu DNA dodać **900 µl 96-99,8% etanolu**. Wymieszać, inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty a następnie wirować 5 minut przy 9 000 x g.
7. Supernatant z nad osadu zlać, a otwarte próbki umieścić „do góry nogami” na czystej ligninie lub ręczniku papierowym w celu usunięcia resztek roztworu.
8. Do próbki dodać **500 µl 70% roztworu etanolu**. Ważne aby **nie** zawieszać osadu w etanolu! Ponownie wirować w warunkach jak wyżej.

# Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

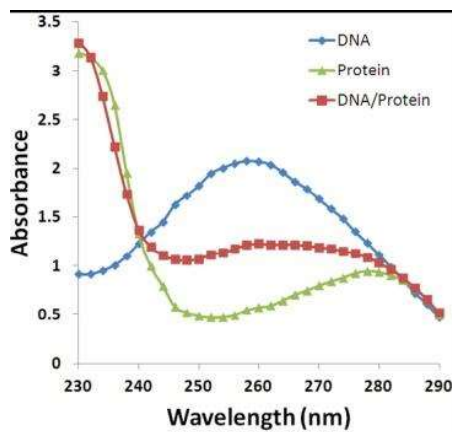
9. Supernatant delikatnie usunąć za pomocą pipety automatycznej (starać się pobrać całość roztworu bez naruszenia osadu). Osad plazmidowego DNA suszyć umieszczając probówkę (otwartą) w termobloku ustawionym na 37° C. Tak inkubować do momentu otrzymania tylko suchego osadu (brak nawet minimalnych ilości etanolu).

**WAŻNE: Z uwagi na możliwość obecności dużych ilości RNA w wyizolowanym materiale rekomendowane jest zawieszenie osadu DNA w roztworze RNazy A.**

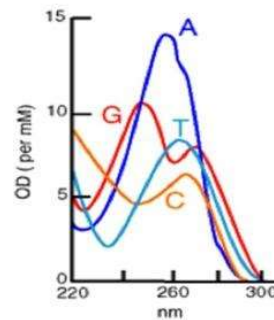
10. Osad DNA zawiesić w 30 µl roztworu RNazy A o stężeniu 20 µg/ml (rozcieńczonej wodą lub buforem TE). Inkubować w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po tym czasie probówki oddać do pokoju przygotowawczego w celu przechowania materiału do następnych ćwiczeń.

Produkty przechowywać w -20° C (do krótkotrwałego przechowywania- 4 ° C). **Dokładnie opisać probówki z materiałem, nr grupy i inicjały !!!**

## Zadanie 2. Oznaczenie stężenia DNA



UV Spectra for Individual DNA nucleosides



1. Do pomiaru stężenia DNA przygotowano roztwór 50 razy rozcieńczony. Oblicz stężenie wyjściowego roztworu DNA plazmidowego, jeżeli absorbancja przy 260 nm roztworu rozcieńczonego wynosiła 0,250.

2. Ile wynosiłoby stężenie RNA o takiej samej absorbancji jak w zadaniu 1?

3. Oceń czystość preparatu DNA, którego absorbancja przy 260 nm wynosi 0,250 a przy 280 nm 0,137.