

Grupa

Data:.....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 2.

Izolacja plazmidowego DNA z komórek *E.coli*

Pomiar stężenia DNA. Detekcja genu *ampC* za pomocą PCR.

UWAGA! Praca z materiałem biologicznym proszę przynieść na zajęcia własne rękawice.

Odczynniki:

Roztwór I (0,05M glukoza, 0,01M EDTA, 0,025Tris-HCl, pH 8,0)

Roztwór II (1%SDS, 0,2M NaOH, robiony na świeżo)

Roztwór III (3M CH₃COOK, 12% CH₃COOH)

Indykator pH

Roztwór RNAzy A w wodzie (20µg/ml)

96% etanol

70% etanol

Lód

Polimeraza Taq (rozcieńczona 10x polimeraza o stęż. 5U/µl w 1 x stęż. buf. B, Eurx)

Bufor C

Sterylna woda

Plazmidowe DNA wyizolowane na poprzednich ćwiczeniach

Startery, 5µM

dNTPs, 2mM

Sprzęt:

Miniwirówka

Vortex

Termocykler

Zadanie 1. Izolacja plazmidowego DNA

PAMIĘTAJ O PODPISANIU PROBÓWEK TAK, ABY MÓC JE ROZPOZNAĆ ZA TYDZIEŃ!

1. Do probówek zawierających osady komórek bakteryjnych dodać **100 µl Roztworu I**. 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**, zamieszać 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 probówki dodać **150 µl Roztworu III** w celu wytrącenia białek. Zawartość probówki dokładnie wymieszać przez energiczne wytrząsanie, aż do momentu całkowitego zniknięcia niebieskiej barwy i pojawienia się strąconych białek w roztworze.

4. Probówki należy inkubować przez 5 minut na lodzie, a następnie wirować 5 minut przy 9 000 x g w temperaturze pokojowej lub niższej.
 5. Supernatant znad osadu przenosić do czystej probówki 1,5 ml. Unikać pobierania białek przy przenoszeniu roztworu.
 6. DNA strącać przy użyciu etanolu. W tym celu do roztworu DNA dodać **900 µl 96 lub 99,8% etanolu**. Wymieszać, inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty a następnie wirować 5 minut przy 9 000xg.
 7. Supernatant znad osadu zlać a otwarte probówki umieścić „do góry nogami” na czystej ligninie lub ręczniku papierowym w celu usunięcia resztek roztworu.
 8. Do probówki dodać **500 µl 70% roztworu etanolu**. Ważne, aby **nie** zawieszać osadu w etanolu! Ponownie wirować w warunkach jak wyżej.
 9. Supernatant delikatnie usunąć za pomocą pipety automatycznej (WAŻNE: 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 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**. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 15 minut.

Zadanie 2. Pomiar stężenia DNA

Wykonać z pomocą prowadzącego spektrofotometryczny pomiar stężenia i czystości wyizolowanego DNA. Otrzymane wyniki zapisać poniżej.

Produkty przechowywać w -20°C. Do krótkotrwałego przechowywania używać 4 °C .

Spektrofotometryczny pomiar DNA plazmidowego w celu oznaczenia stężenia i czystości DNA.

Stężenie DNA.....

Zanieczyszczenia białkiem....., A260/A280=.....

Zadanie 3. Wykonanie rozcieńczenia DNA

Na podstawie wyznaczonego stężenia DNA obliczyć objętość potrzebną do pobrania **40 ng DNA**. Jeśli obliczona objętość jest mniejsza niż 0,5 µl wykonać dodatkowo rozcieńczenie (np. 10x) materiału DNA w wodzie, w sterylnej probówce.

Wymagane/Przygotowane rozcieńczenie-krotne

.....(opisz jak przygotowano rozcieńczenie)

Objętość potrzebna do pobrania 40 ng DNA.....

Zadanie 4. PCR

1. Do sterylnej, podpisanej probówki o pojemności **0,2 ml** dodać odczynniki zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli **1-Próbka PCR (kolejność dodawania istotna)**.

Jeden zespół na grupę (wskazany przez prowadzącego) zamiast próbki PCR przygotowuje reakcję kontrolną NC bez matrycy DNA – kontrola czystości odczynników. Wszystkie czynności wykonywać trzymając probówkę cały czas na lodzie.

Tabela 1. (Objętość końcowa próbki 10 µl)

Odczynnik	Stężenie końcowe	Próbka PCR	Próbka NC
Woda (DEPC)	-	oblicz	6,5 µl
10x Pol Buffer C	1x	1 µl	1 µl
Starter AmprF (5 µM)	0,25 µM	0,5 µl	0,5 µl
Starter AmprR (5 µM)	0,25 µM	0,5 µl	0,5 µl
dNTPs (2 mM każdy)	0,2 mM	1 µl	1 µl
Plazmidowe DNA (40 ng)	4ng/µl	Oblicz (zad.3)	-
Polimeraza Taq (0,5U/ µl)	0,25U	0,5 µl	0,5 µl

2. Po dodaniu wszystkich składników, zawartość probówki delikatnie wymieszać przez pipetowanie i zwirować, tak aby całość znalazła się na dnie probówki. Ponownie umieścić probówkę w lodzie.
3. Zaprogramować termocykler na następujący profil termiczny (Tenover et al. 1994, J Clin Microbiol. 32(11): 2729-2737):
 Wstępna denaturacja: 5 min- 94°C
 Cykl:
 Denaturacja: 1 min.- 94°C
 Przyłączanie starów: 1 min.- 57°C
 Synteza nici: 1 min.- 72°C
 Ilość cykli: 30
 Dodatkowa elongacja 5 min.-72°C
4. Umieścić probówkę w termocyklerze i uruchomić program.
5. Pozostały materiał plazmidowego DNA przekazać do pokoju przygotowawczego (będzie jeszcze potrzebny do wykonania ćwiczenia 4).
6. Plazmidowe DNA i produkty PCR przechowywać w -20°C. Unikać częstego rozmrażania/zamrażania materiału.