



Zakład Biologii Molekularnej
Materiały do ćwiczeń z przedmiotu:
„BIOLOGIA MOLEKULARNA”

Zakład Biologii Molekularnej
Wydział Farmaceutyczny, WUM
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa



IZOLACJA DNA Z HODOWLI KOMÓRKOWEJ. REAKCJA PCR. ELEKTROFOREZA W ŻELU AGAROZOWYM

Uwagi wstępne:

Praca z kwasami nukleinowymi wymaga zachowania szczególnej czystości, ponieważ kwasy nukleinowe łatwo ulegają degradacji.

Miejsce do izolacji kwasów nukleinowych przemywamy 70% etanolem

Wszystkie czynności wykonujemy w czystych rękawiczkach, które przemywamy 70% etanolem

1. Izolacja DNA z hodowli komórkowej

Przygotowanie materiału i protokół izolacji DNA

- Pelet z komórek (ok. 1×10^6 komórek) dokładnie zawiesić (przepipetować) w 100 μ l buforu Tris
- Dodać 200 μ l uniwersalnego buforu lizującego LT
- Dodać 20 μ l roztworu Proteinazy K
- Całość wymieszać i inkubować w temp. 37°C (20 min)
- Przenieść próbkę do 75°C i inkubować 5 min.
- Próbkę intensywnie worteksować 20 s
- Wirować 3 min przy 12 tys. RPM
- Pobrać supernatant i nanieść na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA
- Wirować 1 min. przy 10-15 tys. RPM
- Wyjąć minikolumnę usunąć przesącz z dolnej probówki. Kolumnę umieścić ponownie w tej samej dolnej probówce. Do kolumny dodać 500 μ l roztworu płuczącego A1 (DNA znajduje się na minikolumnie)
- Wirować 1 min. przy 12 tys. RPM
- Usunąć przesącz z dolnej probówki i dodać do minikolumny 400 μ l roztworu płuczącego A1 (DNA znajduje się na minikolumnie)
- Wirować 2 min. przy 12 tys. RPM
- Osuszoną minikolumnę umieścić w nowej probówce 2 ml (probówka bez wieczka) i do złoża znajdującego się na dnie kolumny dodać 200 μ l buforu Tris uprzednio ogrzanego do temp. 75°C
- Inkubować próbkę przez 5 min. w temp. pokojowej
- Wirować 1 min. przy 12 tys. RPM

- Minikolumnę usunąć, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przenieść do eppendorfa przetrzymywać w lodówce do czasu dalszych analiz lub użyć od razu do reakcji PCR.

2. Wykonanie reakcji PCR

1.2. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

- Należy wykonać tzw. mix reakcyjny na 4 reakcje (1 miks na 4 osoby)
Skład mieszaniny reakcyjnej

	1 reakcja	4 reakcje
Bufor 10x	2 μ l	
dNTP	1 μ l	
starter F	0,5 μ l	
starter R	0,5 μ l	
polimeraza	1 μ l	
matryca	----	
H ₂ O	uzupełnić do 18 μ l	

Na każdą próbę każda osoba indywidualnie dodaje 2 μ l matrycy (DNA) i 18 μ l z przygotowanego miksu reakcyjnego.

2.2. Po przygotowaniu mieszaniny reakcyjnej i po dodaniu do niej matrycy w odpowiedniej ilości jak zamieszczono powyżej należy wykonać reakcję PCR.

PCR wykonujemy w termocyklerze, który umożliwia płynną zmianę temperatury.

Etapy reakcji PCR

1. **Denaturacja**. - pierwszym etapem jest rozplecenie podwójnej helisy matrycowego DNA. W wysokiej temperaturze (zwykle około 95 °C) pękają wiązania wodorowe i podwójna helisa DNA rozdziela się na dwa pojedyncze łańcuchy. W celu uzyskania tego efektu podnosi się temperaturę mieszaniny reakcyjnej do wymaganych 95° na 15 sekund.
2. **Annealing** – hybrydyzacja odcinków starterowych. Polega na tworzeniu odcinków dwuniciowych, składających się z przygotowanych starterów - cząsteczek DNA komplementarnych do sekwencji DNA oskrzydlaających gen mający ulec namnożeniu - z



matrycową cząsteczką DNA. Etap ten zachodzi w temperaturze niższej, ściśle określonej dla danej pary starterów (**pomiędzy 45-60 °C**), przyłączają się one do matrycy..

3. **Elongacja** – Na tym etapie zachodzi właściwa synteza DNA i tym samym amplifikacja pożądanego genu. Podwyższenie temperatury do około **72 °C** powoduje utworzenie się na matrycy, z przyłączonymi do niej starterami, kompleksu z polimerazą DNA, wskutek czego rozpoczyna się synteza nici komplementarnej do matrycy. Reakcja ta trwa zwykle 30 sekund.

Próbki po wyjęciu z termocyklera należy wymieszać, krótko zworteksować a następnie Po zakończonej reakcji nanieść próbkę na żel agarozowy

3. Elektroforeza produktów reakcji PCR

Produkt reakcji identyfikujemy rozdzielając uzyskany materiał w żelu agarozowym. Równocześnie z badanym genem nanosimy na żel standardy masowe - fragmenty DNA o znanych masach cząsteczkowych wyrażonych w ilości par zasad. Na podstawie położenia badanego genu w stosunku do standardów masowych określamy jego wielkość.

Potrzebne materiały i odczynniki:

- Bufor do elektroforezy TAE 1x (10x TAE: 40mM Tris, 0,12 % kwas octowy, 1mM EDTA pH 8,0,)
- Agaroz
- Bromek etydyny
- Obciążnik (10x obciążnik: 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol, 20% ficoll typ 400)
- Saneczki, grzebień i komora elektroforetyczna
- Wzmacniacz prądu
- Kuchenka mikrofalowa

UWAGA!!! Bromek etydyny jest silnym kancerogenem! Należy bezwzględnie pracować w rękawiczkach!

Przygotowanie 1,5 % żelu agarozowego

1. Saneczki włożyć w formę i wyważyć jej równowagę
2. W saneczki włożyć grzebień
3. Przygotować żel agarozowy 1,5% w objętości 70 ml

Miejsce na obliczenia

1. Odpowiednią naważkę agarozy rozpuścić na gorąco w buforze TAE 1x
2. Klarowny roztwór agarozy ochłodzić do temp ok 50°C
3. Pod wyciągiem, do roztworu agarozy dodać 4 µl bromku etydyny, zamieszać
4. Wylać żel na saneczki, uważając by nie pojawiły się bąble powietrza
5. Żel zastyga ok 20 min

Elektroforeza RNA w żelu agarozowym

1. Z żelu wyciągnąć grzebień i przenieść saneczki do komory elektroforetycznej
2. Napęlić komorę buforem TAE 1x, w ilości, która zapewni pokrycie żelu
3. Próby RNA należy inkubować w temp 70°C przez 1 min, a następnie umieścić na lodzie
4. nałożyć na żel: **3 µl markera wielkości**
5. Przygotować próby do nałożenia na żel: **10 µl próby + 3 µl obciążnika**, wymieszać i nałożyć na żel
6. Elektroforezę prowadzić przez 30-40 min / 100 V
7. Po zakończonej elektroforezie przeanalizować wynik w świetle UV