

## Лабораторная работа №4

### Выделение плазмидной ДНК методом щелочной экстракции

**Принцип метода:** При изменении рН раствора, содержащего геномную и плазмидную ДНК, на щелочную, ДНК денатурирует, однако цепи двухцепочечной плазмидной ДНК при этом остаются связанными друг с другом, поскольку плазмиды имеют кольцевую форму. При дальнейшей ренатурации, которая инициируется изменением рН раствора до первоначального, длинные цепи геномной ДНК, успев разойтись в растворе при денатурации, образуют плотный неструктурированный комок, а цепи плазмидной ДНК успешно восстанавливают исходную структуру. Далее плазмидная ДНК легко отделяется от геномной ДНК центрифугированием. Для очистки ДНК используют метод фенол-хлороформной экстракции. В результате центрифугирования менее плотная водная фаза, содержащая нуклеиновые кислоты (а также соли, сахара и пр.), располагается над органической фазой (фенол:хлороформ), в которой находятся белки и гидрофобные липиды. После этого для концентрирования ДНК и ее очистки проводят спиртовое осаждение.

**Реактивы:** фенол (забуференный), хлороформ, изопропанол, этанол 70 %, РНКаза А (водный раствор 10 мг/мл).

Раствор I: 8% глюкоза, 20 мМ трис-HCl (рН 8.0), 100 мМ ЭДТА (рН 8.0).

Раствор II – 0,2 М NaOH, 1% SDS

3М ацетат натрия (рН 5.2) – приготовление: к навеске ацетата натрия • 3Н<sub>2</sub>О (408,3 г)

добавить 800 мл Н<sub>2</sub>О, довести рН ледяной уксусной кислотой, довести объем до 1 л.

ТЕ буфер – 10 мМ трис, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0.

**Расходные материалы:** Одноразовые пластиковые наконечники 200 мкл, 1000 мкл, эппендорфы 1,6 см<sup>3</sup>.

**Оборудование:** термостат твердотельный настольный, автоматические дозаторы переменного объема 0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, миницентрифуга Eppendorf, холодильник

**Биологический материал:**

3 мл ночной культуры лабораторного штамма *E.coli*, трансформированного плазмидой.

**Ход работы:**

1. Посеять одиночную трансформированную плазмидной ДНК колонию в 3 мл LB-среды с добавлением ампициллина (50 мкг/мл) и выращивать в течение ночи при 37 °С.
2. Перенести 1,5 мл культуры в эппендорф. Осадить клетки в течение 1 мин при 10000 об/мин на настольной центрифуге, супернатант удалить.

3. Осадок клеток тщательно ресуспендировать пипеткой в 100 мкл раствора I;
4. Добавить 15 мкл РНКазы (10 мг/мл) и инкубировать 5-10 мин при 37 °С;
5. Добавить 200 мкл раствора II, аккуратно перемешать переворачиванием, инкубировать при 0 °С до прозрачности (не более 5 мин);
6. Добавить 200 мкл холодного 3 М ацетат натрия (рН 5.2), интенсивно перемешать переворачиванием (не использовать вортекс!) до образования творожистой взвеси не более 5 мин);
7. Центрифугировать 5 мин при 12000 об/мин. Супернатант аккуратно перенести в чистый эппендорф;
8. Добавить 400 мкл фенола и 400 мкл хлороформа, перемешать переворачиванием, центрифугировать 10 мин при 10000 об/мин
9. Отобрать водную фазу, добавить 400 мкл изопропанола, перемешать переворачиванием и инкубировать 10-20 мин при минус 20 °С;
10. Центрифугировать 10 мин при 12000 об/мин. Аккуратно, но максимально удалить супернатант (не захватывая прозрачный осадок на стенке пробирки);
11. К осадку прилить 1 мл 70 % этанола. Центрифугировать 5 мин при 12000 об/мин, удалить супернатант;
12. Поместить пробирку с открытой крышкой в термостате и инкубировать 5-10 минут при 37 °С (до исчезновения запаха спирта и капель влаги).
13. Растворить осадок, содержащий ДНК, в 20-30 мкл ТЕ буфера или воды.

**Интерпретация результатов:**

Контроль выделенной ДНК проводят методом электрофореза в 1 % агарозном геле. На электрофореграмме должно выявляться две полосы, соответствующие суперскрученной и кольцевой формам плазмиды.