

Лабораторная работа №3

Выделение плазмидной ДНК методом щелочной экстракции

Принцип метода: При изменении pH 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 pH 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.

Среды и пробирки для культивирования должны быть стерильны!

Реактивы (квалификации ОСЧ или Molecularbiologygrade):

хлорид натрия, глюкоза, трис, ацетат натрия, гидроксид натрия, уксусная кислота, ЭДТА, фенол, хлороформ, этанол 96%, изопропанол (можно заменить этанолом), SDS, RNКаза А (водный раствор 10 мг/мл), соляная кислота.

Расходные материалы:

Одноразовые пластиковые наконечники 200 мкл, 1000 мкл, эппендорфы 1,5 мл

Оборудование:

pH-метр, термостат твердотельный настольный, автоматические дозаторы переменного объема 0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, миницентрифуга Eppendorf, холодильник

Приготовление растворов:

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

Раствор II – 0,2 М NaOH, 1% SDS

3М ацетат натрия (pH 5.2) – приготовление: к навеске ацетата натрия • 3H₂O (408,3 г)

добавить 800 мл H₂O, довести pH ледяной уксусной кислотой, довести объем до 1 л.

TE буфер – 10 мМ трис, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

96% этанол (изопропанол), 70% этанол

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°C.

2. Осадить клетки в течение 1 мин при 10000 об/мин на настольной центрифуге, супернатант удалить, осадок клеток тщательно ресуспендировать в 100 мкл раствора I;
3. Добавить 15 мкл РНКазы (10 мг/мл) и инкубировать 5-10 мин при 37⁰С;
4. Добавить 200 мкл раствора II, аккуратно перемешать переворачиванием, инкубировать 0⁰С 5 мин (не более, до прозрачности);
5. Добавить 200 мкл холодного 3М ацетат натрия (рН 5.2), интенсивно перемешать переворачиванием (не использовать вортекс!) до образования творожистой взвеси (~5 мин);
6. Центрифугировать 5 мин при 12000 об/мин. Супернатант аккуратно отобрать в чистый эппендорф;
7. Добавить 400 мкл фенола и 400 мкл хлороформа, центрифугировать 10 мин при 10000 об/мин
8. Отобрать водную фазу в новую пробирку, добавить 400 мкл хлороформа, центрифугировать 10 мин при 10000 об/мин;
9. Отобрать водную фазу, добавить 1 объем изопропанола или 2-2,5 объема 96% этанола, перемешать переворачиванием и инкубировать 20 мин при минус 20⁰С;
10. Центрифугировать 10 мин при 12000 об/мин. Аккуратно, но максимально удалить супернатант (не захватить прозрачный осадок на стенке пробирки);
11. Осадок промыть 1 мл 70% этанола (Центрифугировать 5 минут при 12000 об/мин, удалить супернатант), подсушить осадок с открытой крышкой (можно в термостате при 37⁰С) до исчезновения запаха спирта и капель влаги.
12. Растворить в 20-30 мкл TE буфера или воды.

Интерпретация результатов:

Контроль выделенной ДНК проводят электрофорезом в 1,2 % агарозном геле. На электрофореграмме должно выявляться две полосы соответствующие суперскрученной и кольцевой формам плазмиды.

*Дополнительно можно провести рестрикцию выделенной плазмиды.