

GL1: BIOLOGIA MOLEKULARREKO TEKNIKAK

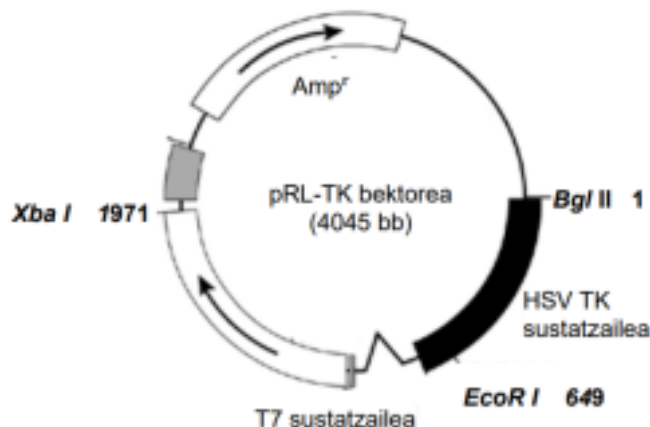
AURKIBIDEA

1. Helburuak
2. Zer egingo dugu
3. Bakterioen kultura (aurretik eginda)
4. DNA plasmidikoaren erauzketa eta purifikazioa (MiniPrep)
5. DNA plasmidikoaren kuantifikazioa
6. Plasmidoaren digestio entzimatikoa

1. HELBURUAK

- **pRL-TK plasmidoa purifikatzea** Escherichia coli bakterio eraldatuen kultura batetik.
- **EcoRI, BglII eta XbaI murrizte-entzimen bitartez lortutako digestioaren produktuak analizatzea.**

Hurrengo irudian pRL-TK plasmidoaren mapa erakusten da. Bertan murrizte-entzimen mozketa-guneak agertzen dira:



2. ZER EGINGO DUGU?

Bakterio kultura batetik abiatuta **DNA plasmidikoa erauzi, purifikatu eta kuantifikatu** dugu, horrez gain, **DNA plasmidiko horren digestioa martxan jarriko** dugu murrizte entzimeki. Hurrengo praktikan digestioaren emaitzak aztertuko ditugu elektroforesiaren bidez.

Erabiliko dugun bakterioa E.coli da, ez da patogenoa izango, ez da inoiz ezer gertatu, baina ziurtasuna bermatzeko eskularruak erabiliko ditugu eta bakterioekin kontaktuan dagoen material guztia libxara bota behar dugu.

3. BAKTERIOEN KULTURA (aurretik eginda)

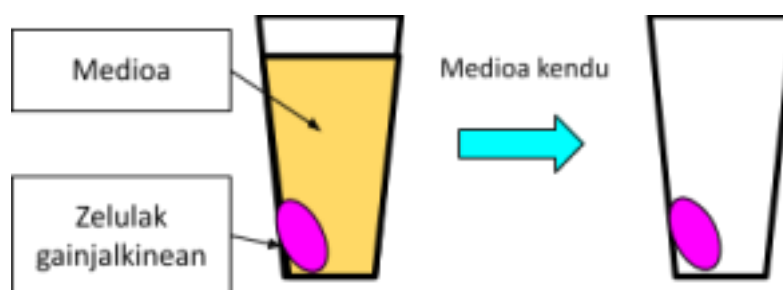
Aurretik pRL-TK plasmidoarekin eraldatutako E. coli bakterioak izango ditugu. Bakterioak LB kulturamedioan hazten dira. Medioak 50 µg/ml anpizilina antibiotikoa darama; pRL-TK plasmidoan anpizilinarekiko erresistentzia ematen duen gene bat dagoenez plasmidoa daramaten bakterioak baino ez dira haziko. Kultura 37 °C-tan eta mugimenduan mantentzen da gau osoan zehar. Esperimentuaren egunean 1,4 ml hartu eta eppendorf hodi batean ipiniko da.

4. DNA PLASMIDIKOAREN ERAUZKETA ETA PURIFIKAZIOA (MiniPrep)

Plasmidoaren eskala txikiko erauzketa eta purifikazioa egingo dugu Qiaprep Spin Plasmid Kit-a erabiliz. Prozedura osoa giro-tenperaturan egiten da eta zentrifugazio-urrats guztiak 13.000 rpm-tan (16.200 g) egingo dira mikrozentrifugan.

**Kontuan izan laginak identifikatu (zenbakia jarri) behar ditugula, besteekin ez nahasteko.*

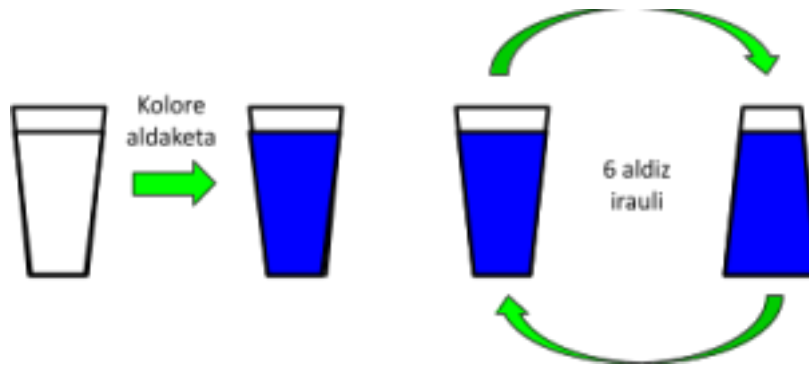
1. Lehenengo zelulak desizoztu behar ditugu (guk desizoztuta ditugu). Suspentsio zelularra 3 minutuz zentrifugatuko dugu. Horrela zelulak jalkinean (izkina batean) izango ditugu (interesatzen zaigun DNA plasmidikoa dutenak) eta medioa (goikaldean). Medioa dekantazioz kenduko dugu eta geratu daitezkeen azken tantak pipetarekin, jalkina ahalik eta lehorren uzteko.



Ondoren plasmidoaren purifikazioari ekingo diogu 1tik 6ra ordenatuta dugun kita erabiliz, ez dakizkigu osagai guztiak, baina gehienak bai, komertziala delako (disoluzioak prestatuta datoz).

2. D1-en RNAsa egongo da eta honek bakterioaren RNA degradatuko du (guri DNA interesatzen zaigu, horrela RNAREN kontaminazioa eliminatzen da). D1 erabili baino lehen gogor astindu, bere osagaietako batzuk jalkitzeko joera dutelako. D1 250 µl gehitu bakterioen jalkinari. Ondo nahasi pipeta erabiliz (likidoa hartu eta jalkinari bota zenbait aldiz nahaste homogenea lortu arte, aire burbuilak ahalik eta gutxien sortuz, horretarako ez sakatu pipeta gora arte).

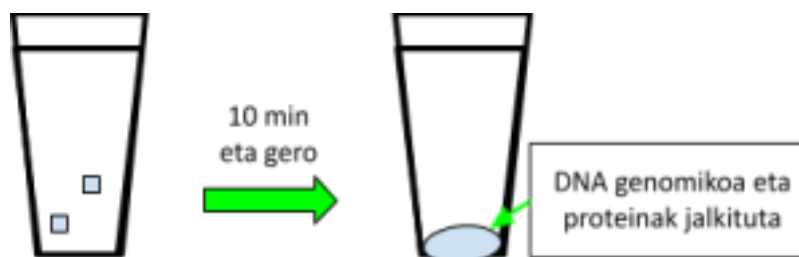
3. 250 μ l **D2** gehitu lisi alkalinoa egiteko eta horrela bakterioen pareta eta mintz guztiak apurtzeko. Disoluzioa gehitzean urdin jartzen dela ikusiko dugu (laginaren arabera urdin intentsoagoa edo gutxiagoa izango da), pH-ren markatzailea delako (alkalino). Ondo nahastu hodia 6 aldiz irauliz astiro eta irabiagailua erabili gabe. Giro-tenperaturan inkubatu 3 minutuz, **zehatzak** izanda. Denbora horretan mintza disolbatzen dagoelako pH alkalinoagatik.



4. 350 μ l **D3** gehitu eta berehala nahastu, 6 aldiz irauliz astiro eta irabiagailua erabili gabe. D3 gehitzean **neutralizazioa** gertatuko da, kolore urdina desagertuko da. Nahastea **uherra** bihurtuko da, urrats honetan DNA genomikoa oso handia denez, prezipitatzen da (algodoi bola baten antzekoa ikusiko da disoluzioan); DNA plasmidikoa ordea, oso txikia denez, disoluzioan mantenduko da. Hau da, interesatzen ez zaigun DNA genomikoa jalkiko da eta interesatzen zaigun DNA plasmidikoa mantenduko da disoluzioan.



5. 10 minutuz zentrifugatu. Horrela zelulen proteinak eta DNA genomikoa prezipitatuko dira. DNA plasmidikoa gainjalkinean egongo da.



Hemendik aurrera DNA plasmidikoaren purifikazioa (horretarako zutabe bat erabiliko dugu kitean datorrena) egingo dugu berez teknika **kromatografia** bat izanik:

6. Gainjalkina (DNA plasmidikoduna) kit-aren zutabera (hodi urdina) pasatu dekantazioz.

Minutu batez zentrifugatu. Hodi biltzailean jasotako eluatoa bota (baina EZ BOTA HODIA). Zutabeak erresina moduko mintza du iragazki funtzioa egiten duena, horrela DNA plasmidikoa hor geratuko da.

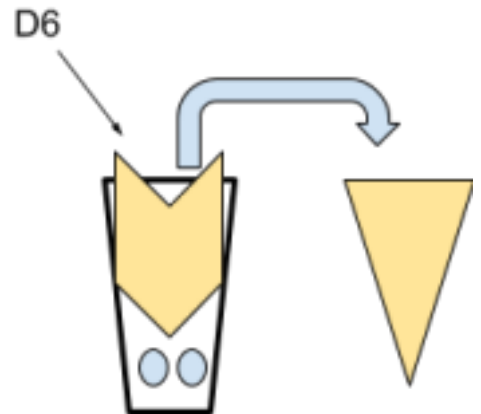


*Gogoratu eluatoa zutabetik ateratzen dena dela. Hurrengo pausuak garbiketa egiteko dira:

7. Hodi biltzailea berriro zutabearen azpian ipini. Zutabea garbitzeko 0,5 ml **D4** gehitu eta minutu batez zentrifugatu. Eluatoa bota (EZ BOTA HODIA).
8. Hodi biltzailea berriro zutabearen azpian ipini. Zutabea garbitzeko 0,75 ml **D5** gehitu eta minutu batez zentrifugatu. Eluatoa bota, eta hodi biltzailea berriz ipini zutabearen azpian. Ondoren, modu berean zentrifugatu berriro baina disoluziorik gehitu gabe, zutabearen gera daitezkeen etanol hondarrak kentzeko. Izan ere, D5 disoluzioak etanola dauka eta honek murrizte-entzimen aktibitatea inhibi dezake.
9. Purifikazioaren azken puntua **DNA plasmidikoaren eluzioa** da. Horretarako zutabea hodi biltzailetik atera eta 1,5 ml-ko eppendorf hodi garbi batean sartu. Aurretik:

- Eppendorf hodiari tapoia moztu baina tapoia gorde gerorako.

DNA zutabetik eluitzeko, 50 μ l **D6** gehitu (DNA plasmidikoa zutabetik eluitzeko tanpoi bat da) zutabearen zentroan, zutabearen erretxina likidoarekin bustitzen dela ziurtatuz (horrela ziurtatuko gara erretxina disolbatuko duela). Minutu batez inkubatu giro tenperaturan eta ondoren minutu batez zentrifugatu. DNAREN eluzioa gertatuko da berriro, eluatoa kasu honetan eppendorf hodian lortuko dugu DNA plasmidikoaren 50 μ l izango dira .



10. Eppendorf hodian jasotako DNA plasmidikoaren kontzentrazioa neurtu, kuantifikazioa.

5.DNA PLASMIDIKOAREN KUANTIFIKAZIOA

Eppendorf hodi bat daukagu, tapoia moztu diogu baina tapoia berriz jarri diogu (50 μ l DNA plasmidikoarekin).

DNAREN kontzentrazioa kalkulatzeko **espektrofotometria** erabiliko dugu. **Izpi ultramoreak**

irakurri behar ditugu, beraz **kolorimetro berezia** erabili behar da. Ultramorea neurtzen dugunean, plastikozko kubetek ez dute balio, kuartzozkoak erabili behar ditugu.

Neurketa egiteko **disoluzio** bat presatu behar da. Horretarako beste hodi bat daukagu, **miliQ ura** daukana, ur destilatu eta desionizatua, hau da, purutasun handiagoduna.

Eppendorf berri batean 780µl ur destilatu jarriko ditugu, eta, jarraian, gure disoluziotik 20µl hartuko ditugu. Gure disoluziotik geratu diren 30µl-ak EZ BOTA, hau murrizte entzimen bidez digestioak egiteko erabiliko dugu .

Lagina zenbat aldiz diluitu dugun jakiteko:

- $800 \text{ (ura+lagina edo bolumen osoa)}/20(\text{lagina})= 40$ aldiz.

Kolorimetroan 2 uhin luzeratan neurtu behar ditugu:

- **260 nm**-tan **azido nukleikoek** argia xurgatzen dute
- **280nm**-tan **proteinek** xurgatuko dute argia. Purifikazio prozesuan kontaminazioak gertatu ahal dira eta modu honetan gure lagina ondo dagoen ala ez ikusiko dugu.

Espektrofotometriaren zuria neurtzeko ura erabiliko dugu. Zuria egiten da neurketan eragina izan dezaketen baina gure interesekoak ez diren substantzien absorbatzia baztertzeko.

Pausuak:

1. Espektrofotometroan λ 0nm-tan finkatu.
2. Espektrofotometroan λ 260nm-tan finkatu.
3. Kuartzozko kubetan milli-Q ur esterila gehitu eta zuria egin (absorbantzia 0).
4. Espektrofotometroan λ 280nm-tan finkatu eta milli-Q uraren absorbantzia anotatu (gure kasuan -0,020nm gutxi gorabehera).
5. Eppendorf hodi berrian egindako disoluzioa (780µl milli-Q ur esteril eta 20µl DNA-lagin) hartu
6. Absorbantzia 260nm-tan eta 280nm-tan neurtu (280nm-tan zuria egiteko 4. urratsean lortutako milli-Q uraren absorbantzia erabili).

5

7. Jatorrizko DNA-disoluzioaren kontzentrazioa kalkulatu, egindako diluzioa kontuan hartuz.

	λ 260nm	λ 280nm
Zuria milq urarekin	0	-0,020
Lagina	X	Z

- **A 260nm** denean egindako neurketak disoluzioaren kontzentrazioa jakiteko balio digu.

A 260nm (Disoluzioaren absorbantzia)= 1 denean **DNA kontzentrazioa= 50 µg/ml**
-koa izango da (datua azterketarako jakin).

Datu honetatik aterako dugu prestatu dugun disoluzio honen kontzentrazioa. Ondoren, jatorrizko disoluzioaren kontzentrazioa kalkulatu behar dugu (diluzioaren kontzentrazioa x40).

- **A 280 nm** denean lortutako neurketak erabiliko ditugu DNAREN purutasuna aztertzeko. Horretarako zatiketa bat egin behar dugu.

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = \frac{\text{Laginaren absorbantzia}_{260} - \text{zuriaren absorbantzia (0)}}{\text{Laginaren absorbantzia}_{280} - \text{zuriaren absorbantzia (-0,022)}}$$

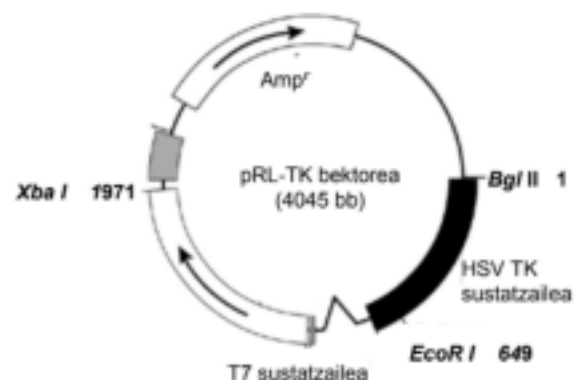
Zatiketaren emaitzak:

- **≥1,8** bada purifikazioa ondo joan da, ez dago kutsatuta. (Oso altua bada, adibidez 2'3, kutsatuta egongo da DNA genomiko asko izango dugulako)
- **1,8-1,7** tartean, purifikazioa onartu daiteke.
- **<1,7** bada, lagina ezin da erabili purifikazioa txarto egin delako. DNA genomikoarekin kontaminazioa

6. PLASMIDOAREN DIGESTIO ENTZIMATIKOA

Talde bakoitzak 2 hodi txiki pare izango ditu (adibidez: 1, 1') 16µl murrizte entzimekin. kasu bakoitzean egon daitezken murrizte-entzimak:

- Entzima bakarra egon daiteke (zati bat ikusiko da emaitzetan mapan, ezin da jakin zein entzima den)
- 2 entzima egon daitezke (2 zati ikusiko dira emaitzetan mapan)
- 3 entzima egon daitezke (3 zati ikusiko dira emaitzetan mapan)



Galderak (boluntarioak azterketarako, emaitzak ikusita erantzun)

1. Lortutako DNA plasmidiko totalaren kopurua kalkula ezazu. A260/A280 zatikia kontuan hartuta, arrazoitu lagina proteinekin kutsatuta dagoen. Putzuetan kargatutako DNAREN kopurua kalkula ezazu.

2. Agarosa-gelak emandako informazioa soilik erabiliz, eta markatzaileen banden posizioak kontuan hartuz, zure gelesko lagin guztietako DNA-zatien gutxi gorabeherako tamaina ondorioztatu.

3. Elektroforesiaren gelaren argazkian banda bakoitzak migratutako luzera neurtu, putzutik bandaren erdigunera, tamaina ezaguneko DNA molekulen (H eta L markatzaileen) bandak barne. DNA linealaren mugikortasun elektroforetikoa eta bere tamainaren logaritmoa alderantziz proportzionalak dira. Markatzaileen neurtutako distantziekin eta DNA tamainaren (base bikotetan) logaritmoarekin zuzen bat eraiki, zuek kargatutako laginetako DNA-zatiek migratutako distantzia zuzen horretan interpolatuz beren tamaina kalkulatu.

4. 1. eta 3. ariketen emaitzak kontuan hartuz zuen laginen banda bakoitzaren DNA kopurua estimatu.

5. Ondorioztatu zuen geleko lagin bakoitzean erabilitako murrizte-entzima(k) plasmidoaren digestiorako. Lagin bakoitzaren digestioaren ondoriozko produktuen tamaina teorikoak adierazi.