

GL2: DNA PLASMIDIKOAREN PURIFIKAZIOA ETA ANALISIA II

AURKIBIDEA

1. Bigarren eguna
2. Ariketak

1. BIGARREN EGUNA

Aurreko egunean, *E. coli* bakterioen DNA plasmidikoaren (zehazki, pRL-TK plasmidoaren) erauzketa, purifikazioa, kuantifikazioa eta digestio entzimatikoa egin genituen.

Gaur, DNA zatien banaketa egingo dugu elektroforesiaren bidez **agarosazko gelean**. Behin hau eginda, EcoRI, BglII eta XbaI murrizte-entzimen konbinazio desberdinak erabiliz lortutako zatiak analizatuko ditugu, kasu bakoitzean zein murrizte-entzimak parte hartu duen jakiteko.

**Gogoratu (murrizte entzimak):*

- **EcoRI**: 649. posizioan mozten du.
- **Xba I**: 1971. posizioan mozten du.
- **Bgl2**: 1. posizioan mozten du.

Elektroforesian, DNA zatiak kargaren ondorioz mugituko dira, baina zatikiak haien artean bananduko dituen tamaina izango da. Izan ere, DNA zati txikia zati handiak baino errazago mugituko dira.

DNA zatien banaketa elektroforesiaren bidez agarosazko gelean

(1tik 5rako pausuak irakasleek egin zituzten)

1. **75 ml-ko agarosazko gela prestatu. Horretarako, %1,3-ko agarosazko disoluzioa prestatu TAE indargetzailean.**
2. **Disoluzioa irakin arte mikrouhin-labean berotu agarosa disolba dadin. Gela solidifikatu baino lehen 7,5 µl SybrSafe gehitu, ondo nahastu eta azpilean isuri astiro burbuilarik sortu gabe. 15 putzutarako orrazia jarri.**

Agarosa solidoa denez, berotu egin behar da disoluzio indargetzailean disolbatu dadin.

SybrSafe-ek fluoreszentzia ematen die DNA molekulei, horregatik oso garrantzitsua da gero bandak ikusi ahal izateko.

3. **Itxaron agarosa solidifikatu arte.**
4. **Orrazia geletik atera kontu handiz, putzuak ez apurtzeko.**
5. **Gela duen azpila TAE indargetzailea duen elektroforesi-kubetan ipini, putzuak katodo aldean (elektrodo negatiboa, beltza) kokatuz.**
6. **Laginak gelean aplikatzeko prestatu: lagin bakoitzari 4 µl DNAREN karga-tanpoi (x6) gehitu.**
 - Bi lagin izango ditugu bakoitza murrizketa entzima desberdinekin. Elektroforesian ikusten

dugunaren arabera erabilitako murrizpen entzimak identifikatu beharko ditugu, kontuan izanik ez dakigula zeintzuk diren.

- Eppendorf-ean guztira 20µl ditugu (%25 DNA disoluzio eta %75 erreakzio nahaste); beraz, gehitu ditugun karga tanpoiaren 4µl-ak 6 aldiz diluituko dira (4µl tanpoi 24µl disoluzioan = $4/24 = 1/6$).

7. 16 µl lagin aplikatu putzu bakoitzeko.

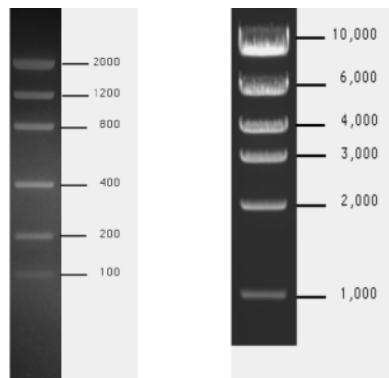
Putzuetan lagina aplikatzeko pipeta bertikalki sartu eta likidoan gaudenean putzuaren gainean, pipetaren lehenengo toperaino sakatuko dugu soilik (airea ez sartzeko), kontu handiz askatu eta agarosa gela ukitu gabe bota lagina, lagina kutsa ez dadin.

8. Gelean tamaina-markatzaile bakoitzaren 4 µl ere kargatu (Low eta High DNA Mass Ladder).

Bi markatzaile hauek gure DNA zatien tamainak estimatzeko erabiliko ditugu elektroforesia egiterako orduan. Gainera, putzuetako batean digeritu gabeko plasmido zirkularraren 4µl jarriko ditugu, bere mugimendua laginenarekin konparatzeko gero banden estimazioa egiteko.

9. Elektrodoak iturrian konektatu eta 140 V-ko korrante konstantea aplikatu frontea (bromofenol-urdina) gelaren amaierara hurbildu arte.

10. DNA-bandak DNA-gelen analisirako tresna batean ikusi (irakasleek egingo dute). Gelaren irudia eskuragarri dago eGelan.



Low DNA Mass Ladder (L) High DNA Mass Ladder (H)

2. ARIKETAK (datuak adibide moduan)

2.1 LEHENENGO ARIKETA

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

1. DNA plasmidikoaren kuantifikazioa + Putzuetan ageriko DNA plamidiko kopurua

→ Zein da DNA Plasmidikoaren kontzentrazioa mili-Q ureekin diluitu ostean?

Horretarako, disoluzio horren absorbantzia kalkulatu dugu: $A_{260} = 0,091$. Jakinda $A_{260} = 1$ denean DNA plasmidikoaren kontzentrazioa 50 µg/ml-koa dela, gure disoluzioaren kontzentrazioa ondorengo da:

$$0,091 \times 50\mu\text{g}/\text{ml}/1 = 4,55 \mu\text{g}/\text{ml}$$

Jakin beharrekoa azterketarako: A260 = 1 denean, 50µg/ml DNA.

→ Zein da DNA plasmidiko totalaren kopurua, mili-Q urarekin diluitu aurretiko disoluzioan; hau da, erazketan lortu ditugun azkeneko 50µl-tan?

Gogoratu 50 µl DNA horietatik 20 µl hartu + 780 µl mili-Q urarekin diluitu genituela:
20 µl DNA plasmidiko + 780 µl ur mili-Q = 800 µl. 40 biderrez handitu da.

Beraz jakinda disoluzioaren kontzentrazioa eta zenbat aldiz diluitu dugun, DNA plasmidiko totalaren kopurua jakin dezakegu, balioak biderkatuz:

4,55 µg/ml x 40 = 182 µg/ml da 50 µl-tan dagoen kontzentrazioa (diluitu aurretik)

→ Zein da putzuetan kargatutako DNAREN kopurua?

50 µl hauetatik 4 µl DNA plasmidiko hartuko ditugu. Badakigunez zenbat µg DNA plasmidiko dugun agarosan, kargatutako DNA kantitatea neurtu dezakegu hurrengo kalkuluekin:

4µl plasmido
+
16µl entzima
+
4µl karga tanpoi
GUZTIRA: 24 µl

1. $4\mu\text{l} \times \frac{1\text{ml}}{1000\mu\text{l}} = 0,004 \text{ ml plasmido}$

2. $0,004 \text{ ml} \times \frac{182\mu\text{g}}{1\text{ml}} = 0,728 \mu\text{g plasmido}$

3. Kalkulu hauek 24 µl-ren baitan egongo dira, baina guk, elektroforesi kubetan 16µl hartuko ditugunez, bertako proportzioa atera behar dugu.

$16\mu\text{l} \times \frac{0,728\mu\text{g}}{24\mu\text{l}} = 0,4853\mu\text{g}$

Hortaz, 0,4853 µg DNA plasmidiko dago putzuetan.

2. Dnaren purifikazio maila neurtu

Datuak:

A260=0,091 nm

A280=0,031nm

A280 ura= -0,02nm

A260/280 nm → $\frac{A_{260}}{A_{280} - A_{\text{ura280}}} = \frac{0,091}{0,031 - (-0,02)} = 1,78 < \text{lagina ez da purua, baina esperimenturako onartzen dugu.}$

- **>=1.8 (purua: proteinarik ez)**
- **1,7-1,8 artean onartzen dugu praktikorako, baina ez da purua**
- **1,7 ez da purua eta <1,7 ezta (ez erabili, kutsatua dago)**
- **DATU HAUEK JAKIN BEHAR DIRA**

2.2 BIGARREN ARIKETA

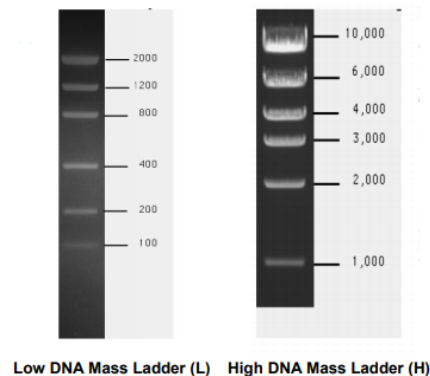
Agarosa-gelak emandako informazioa soilik erabiliz, eta markatzaileen banden posizioak kontuan hartuz, zure gelesko lagin guztietako DNA-zatien gutxi gorabeherako tamaina ondorioztatu.

Behean agertzen den argazkiarekin gure laginetan irten diren banden gutxibeherako tamaina kalkulatzeko gai garen aztertuko dugu. Horretarako markatzaileak jarriko ditugu, begi bistaz egiteko azterketa.

Putzuetan tamaina desberdineko markatzaileak jarri genituen: batean tamaina handikoa, bestean txikikoa eta bestean plasmidoa digeritu gabe.

Tamaina handiko markatzailearen (high markatzailea): zaitirik handiena 10 000 base bikoteetako izango da (gero 6 000, 4 000, 2 000).

Low markatzailean aldiz (tamaina txikikoa) zatirik handiena: 2 000 base bikoteetako, 1 200, 800...



Kontuan izan behar dugu **zatiak gero eta txikiagoak** izan, orduan eta **gehiago mugituko** direla gelean zehar.

pH=8-an gure DNA negatiboki kargatuta dago. Bi nukleotidoen artean fosfato talde bat dugu. Zati horren tamaina bikoizten bada karga ere bikoizten da baina karga dentsitatea, aldiz, berdina izango da, hau da, bi nukleotidoetatik beti izango dugu karga negatibo bat (fosfato taldea).

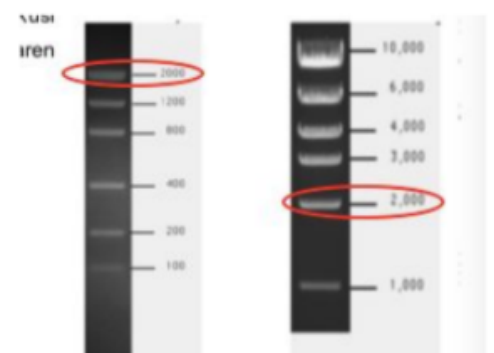
Korrontea aplikatzean dentsitatea bera denez, zatiak indar berarekin mugitu beharko lirateke. Dena den, gure gela **agarosarekin** (polimero bat) egin dugunez, honek nolabaiteko **sarea** eratuko du. Zati **txikiak** errazago pasako dira sare horretatik eta horregatik **urrutirago** mugituko dira, zati handiekin konparatuz. Gelak gero eta agarosa portzentaje handiagoa izan orduan eta gutxiago mugituko dira zati handiak. Gelaren kontzentrazioa %1-3koa da. Balio horrekin zatiak modu horretara banatzea lortzen dugu. **Portzentaje** hori **aldatuz**, **guk nahi ditugun zatiak igarotzea lor dezakegu**:

- %0,5 jaisten badugu adibidez, agarosa gutxiago izanda, zati handiak pasako dira.
- %3an adibidez, sarea estuagoa izanik, zati handiak ia ez ditugu desberdinduko, txikiak bai.

DNAREN masa = karga.

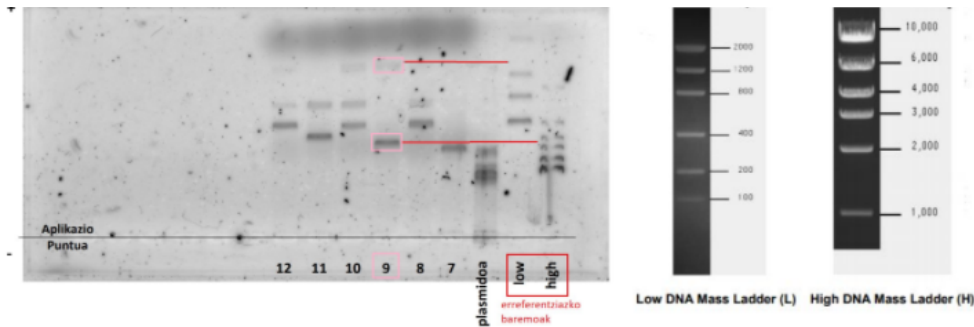
Agarosazko sarean laginak sartzean eta elektroforesian jartzean bandak sortuko dira eta honen arabera interpretatu dezakegu.

Akatsen bat gertatzen daiteke, adibidez, bi laginen kolapsoa ematea. Hau da, aplikazio puntuetan jartzen ditugun laginetako batzuk



besteekin nahastea. Hau gertatuz gero, bi banda oso gertu ikusiko lirateke.

Horrez gain, baliteke banda oso lodi eta handi bat agertzea (4 000 bikoteduna). Zergatik da hau? Plasmidoa zirkularra denez, biribilkatzen da (superbiribilkaketa) forma desberdinak lortuz. Hau gertatzen denean, karga negatibo guztiak ez dira libre egongo, batzuk gordeta egongo dira. Horregatik zirkularra denean ez da mugitzen (zati lineal bat balitz bezala) eta forma desberdinak hartzen dituenean, askoz handiagoa dela ematen du, agarosan asko mugitzen ez delarik. **Beraz, kontuan izan DNA zirkular bat ez dela DNA lineal bat bezain azkar mugitzen.**



2.3 HIRUGARREN ARIKETA

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 distantziak eta DNA tamainaren (base bikotetan) logaritmoarekin zuzen bat eraiki, zuek kargatutako laginetako DNA-zatiek migratutako distantzia zuzen horretan interpolatuz beren tamaina kalkulatu.

DNA lineala denean bere mugikortasun elektroforetikoa eta bere tamainaren logaritmoa, alderantzizko proportzionalak dira: geroz eta tamaina txikiagoa izan orduan eta gehiago mugituko da.

Guk erreferentziarako lagin batzuk ditugu: H eta L.

Hauekin zuzen bat eraikiko dugu. Nola?

- H edo L lagina aukeratu.
- Behin aukeratuta, banda hori zenbat desplazatu den ikusiko dugu erregela baten bidez, aplikazio puntutik bandaren erdiko gunera.
- Ondoren, cm-tan banda bakoitza zenbat mugitu den adieraziko digu.

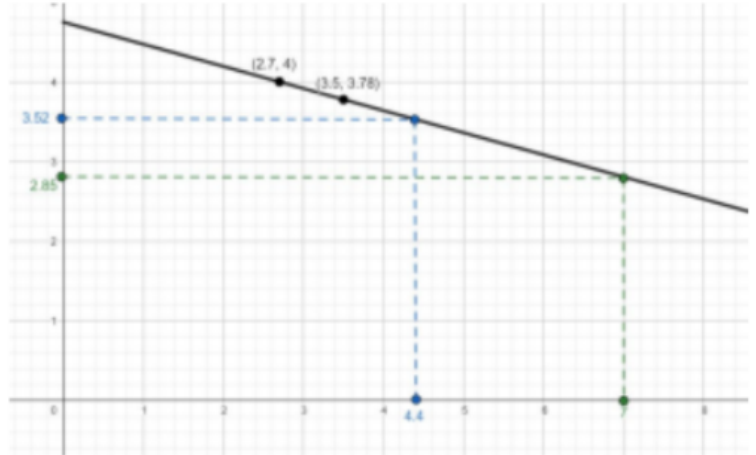
Datu hauek eskura izanda, grafiko bat egingo dugu banden logaritmoa kalkulatzeko.

- Y ardatzan: base bikoteen logaritmoa markatuko da

- X ardatzan: banda bakoitzean gelarekiko zenbat desplazatu den markatu.

Gure grafikan hainbat puntu izango ditugu, guztiak elkartuz zuzen bat sortuko dugu, erreferentziatzeko zuzena izango dena.

Hau eginda, gure banden arteko distantzia zein den kalkulatu eta zuzenaren arabera banda bakoitzaren logaritmoa aterako dugu (Honen benetako balioa: emaitza ber bi eginda aterako da).



Irudian Y ardatzean atera zaizkigun balioak 3,52 eta 2,85 dira. Hala ere, hauek bb logaritmoak direnez, alderantzizko eragiketa egingo dugu bb lortzeko, hau da, antilogaritmoa egingo dugu:

- $10^{3.52} = 3311$ bb
- $10^{2.85} = 708$ bb

2.4 LAUGARREN ARIKETA

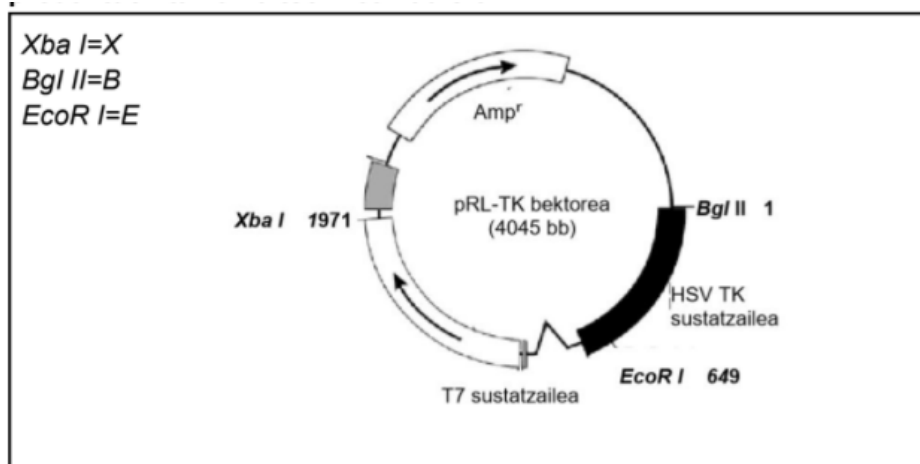
1. eta 3. ariketen emaitzak kontuan hartuz zuen laginen banda bakoitzaren DNA kopurua estimatu.

Imaginatuz 4 mikrolitro(μl)-ko banda bakarria dugula. Bi banda izango bagenitu eta horietako batek 1000 bb eta besteak 3000 bb badituzte, honako kalkulua egin beharko litzateke:

- $1000\text{bb} \times (0.4 \text{ mikrolitro}/4000\text{bb})=0.1 \mu\text{l}$
- $3000\text{bb} \times (0.4 \text{ mikrolitro}/4000\text{bb})=0.3 \mu\text{l}$

2.5 BOSTGARREN ARIKETA

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



Murrizte entzimak identifikatzeko lagin bakoitzean dauden bandak aztertuz nahikoa da.

Alde batetik, laginak banda bakarria badu, murrizte entzima bat duela esan genezake (DNA zirkularra behin moztuz banda bakarria izaten jarraitzen duelako). Murrizte entzima hori zein motatakoa den ezingo genuke zehazki esan. Bestetik, lagin batean bi banda baditugu, bata bestea baina handiagoa izanik, Eco R eta Bgl II entzimek moztuko dute (Xba I eta Bgl izango balira zati bakoitzak bb kopuru oso antzekoa edukiko luke).

Guk badakigu egon daitezkeen banda maximoak 3 direla. Horregatik ondoriozta dezakegu banda bakarrekin entzima bat egongo dela, bi bandekin 2 entzima eta 3 bandekin, berriz, 3 murrizte entzima.