

# OPRENSNING AF PLASMIDER

## Håndoprensning af plasmider fra *E. coli*-koloni

Kenneth Buchwald Johansen

september 2008

Tema: Genteknologi

3laba0808

### 1 Formål

Håndoprensning af plasmider fra transformeret *E. coli*-koloni med konfirmation ved gelelektroforese.

### 2 Princip og metode

Der oprenses på plasmid fra en transformeret *E. coli*-koloni. De isolerede plasmider analyseres på gel mod en "fabriks-plasmid" (pUC19), for at undersøge om det er plasmid, der er blevet isoleret.

Håndoprensningen foregår som følger:

1. Cellerne isoleres og opslemmes i bla. EDTA, som hæmmer DNase. Der tilsættes også RNase for at få ødelagt RNA'en.
2. Der tilføjes base og SDS, hvorved lyseringen finder sted og pH hæves. Altså bliver DNA'et mere polært.
3. Der tilsættes eddikesyre og kaliumhydroxid, så opløsningen bliver neutraliseret og det kromosomale DNA bliver denatureret.
4. Efter centrifugering er det kromosomale DNA blevet isoleret på bunden af centrifugeglasset og plasmiderne flyder rundt i væsken. Supernatanten overføres til et nyt eppen-dorfrør.
5. Der tilsættes fenol og chloroform for at fjerne proteiner. Det er fenolen, der står for adskillelsen, mens chloroform giver en mere tydelig faseadskillelse.
6. Plasmiderne vaskes med ethanol og opløses i vand.
7. Renheden bestemmes ved hjælp af OD-målinger.
8. Plasmid, indkøbt pUC19 og markør sættes på en gel og analyseres. Det er altså ikke

nødvendigt at skære plasmiderne, da der er en kontrol af pUC19, som er supercoiled.

### 3 Resultater

Ved OD-målingerne blev der fundet værdierne i tabel 1.

Abs <sub>260</sub>	0,625
Abs <sub>280</sub>	0,317

Tabel 1: OD-målinger

Ud fra OD-målingerne, kan renheden bedømmes:

$$\frac{\text{Abs}_{260}}{\text{Abs}_{280}} = \frac{0,625}{0,317} = 1,9.$$

Denne værdi skal være  $\geq 1,8$  for at sikre en renhed på >90%.

På grund af tekniske problemer med gel-fotografiapparatet, er det ikke blevet til et særlig tydeligt billede af gelen, men trods alt kan den ses i figur 1 på side 3.

Koncentrationen beregnes:

$$c = \frac{\text{Abs}_{260}}{20 \cdot 1\text{cm}} = \frac{0,625}{20} \\ = 0,03125\text{mg/mL} \approx 31,3\mu\text{g/mL}.$$

Koncentrationen kan også bestemmes ved at bedømme lysintensiteten af de fremkomne streger på gelen og sammenligne med markøren. Derefter kan ligningen

$$c_{\text{prøve}} = \frac{c_{\text{markør}} \cdot V_{\text{markør}} \cdot b_{\text{pmarkør}}}{V_{\text{prøve}} \cdot \sum b_{\text{pmarkør}}}$$

bruges.

Markøren ( $\lambda$ -DNA HindIII Digest) blev fortyndet 3 gange ved påsætningen. Det betyder at markørens koncentration er  $0,500\mu\text{g}/\mu\text{L} \cdot \frac{1}{3} = 0,167\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . På gelen havde den skårede plasmid samme lysintensitet som bånd nr. 2 på markøren - dvs. det bånd, der

har en længde på 6557bp. Der blev påsat  $6\mu L$  fortyndet markør og  $5\mu L$  prøve. Med disse oplysninger kan koncentrationen af plasmid bestemmes:

$$c_{\text{prøve}} = \frac{0,167 \frac{\mu g}{\mu L} \cdot 6\mu L \cdot 6557\text{bp}}{5\mu L \cdot 48502\text{bp}}$$
$$= 0,0271 \frac{\mu g}{\mu L} = 27,1 \frac{\mu g}{mL}.$$

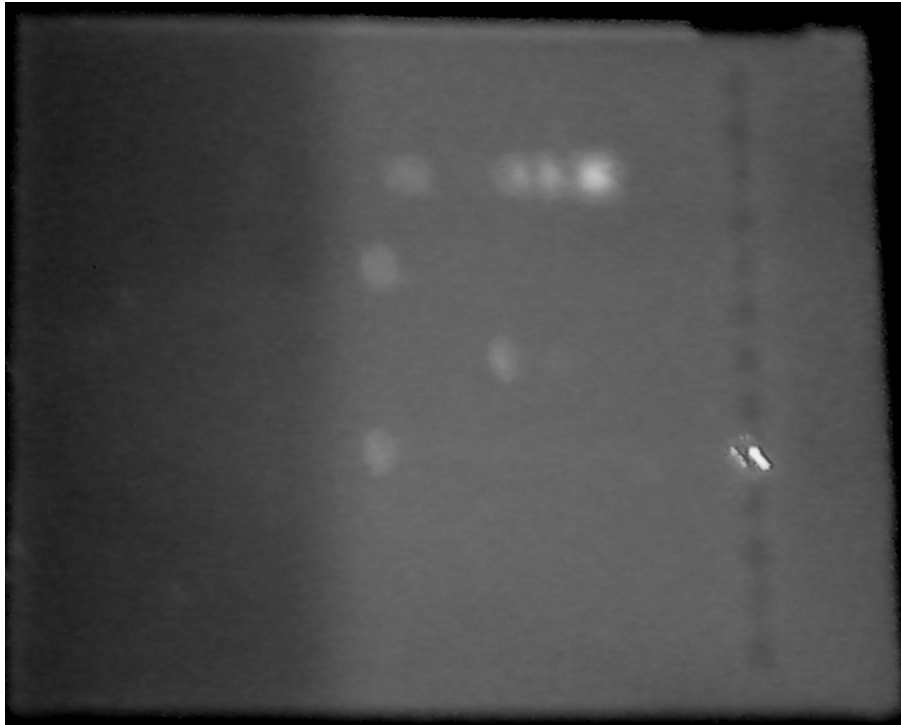
## 4 Kommentarer

Renhedskvotienten er for stor, så man kan ikke regne med, at der er en renhed  $>90\%$ . Der må være sket en forurening et sted.

Som det kan ses på gelen, er den oprensede plasmid ikke løbet så langt som fabriksplasmidet. Det kunne tyde på, at selvom der er blevet udpodet en blå koloni (en koloni, der kan nedbryde  $\beta$ -lactosidase, dvs. E.coli med pUC19 men uden insert), har der nok alligevel været insert i pUC19. Plasmidet løber kortere på gelene og må altså være større end pUC19. Der ses desuden en anden mere uklar streg, som kunne tolkes som urenhed i prøven.

Om koncentrationen er rimelig, er ikke til at bedømme, da det kræver noget mere erfaring (altså noget at sammenligne med). Det kan dog konkluderes, at de to forskellige måder at beregne koncentrationen på giver et nogenlunde ens resultat, til trods for at metoden med lysintensitet bygger på vurdering.

Det må antages, at det er lykkedes at oprense plasmider, selvom de ikke havde den forventede størrelse.



**Figur 1:** Gel. Lane 1 (øverst) er markøren  $\lambda$ -DNA HindIII Digest. Lane 2 er indkøbt pUC19. Lane 3 er Kenneths oprensede plasmid og lane 4 er Tanjas oprensede plasmid.