

ISOLERING AF CROMOSOMALT DNA

fra *B. subtilis*

Kenneth Buchwald Johansen

september 2008

Tema: Genteknologi

31aba0808

1 Formål

At isolere og oprense cromosomalt DNA fra en *B. subtilis*-kultur. Cromosomalt DNA er nogle store molekyler og isoleringen kan derfor bekræftes ved hjælp af gelelektroforese.

2 Princip og metode

Bacillus subtilis er en grampositiv bakterie, hvilket betyder, at cellevægene kan ødelægges med lysosym. Lysosym spalter nemlig murein, som G+ bakteriers cellevæg består af.

Der laves oprensning ved "håndværksmetoden" og ved at bruge et oprensningskit.

Fremgangsmåden ved håndværksmetoden er som følger:

1. Cellehøst ved nedcentrifugering.
2. Cellevask med TE-buffer.
3. Lyse af cellevæg med lysosym.
4. Lyse af cellemembran med SDS.
5. Fenolekstraktion (proteiner fjernes).
6. DNA-fældning ved nedcentrifugering.
7. DNA-vask med ethanol.
8. Kontrol ved hjælp af gelelektroforese.

Ved kit-oprensningen bliver der brugt nogle buffere, hvor indholdet kun kendes af fabrikken, der har fremstillet kittet. Til gengæld kan der fortælles, at der under oprensningen bruges proteinase K, RNase, og at der vaskes med ethanol.

3 Resultater

Gelen kan ses i figur 1 på den følgende side.

Koncentrationen bestemmes ved at bedømme lysintensiteten af de fremkomne streger på gelen

og sammenligne med markøren. Derefter kan ligningen

$$c_{\text{prøve}} = \frac{c_{\text{markør}} \cdot V_{\text{markør}} \cdot \text{bp}_{\text{markør}}}{V_{\text{prøve}} \cdot \sum \text{bp}_{\text{markør}}}$$

bruges.

Markøren (λ -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 cromosomalt DNA samme lysintensitet som det bånd på markøren, der ligger andenlængst mod højre - dvs. det bånd, der har en længde på 2027bp. Der blev påsat $6 \mu\text{L}$ fortyndet markør og $5 \mu\text{L}$ prøve. Med disse oplysninger kan koncentrationen bestemmes:

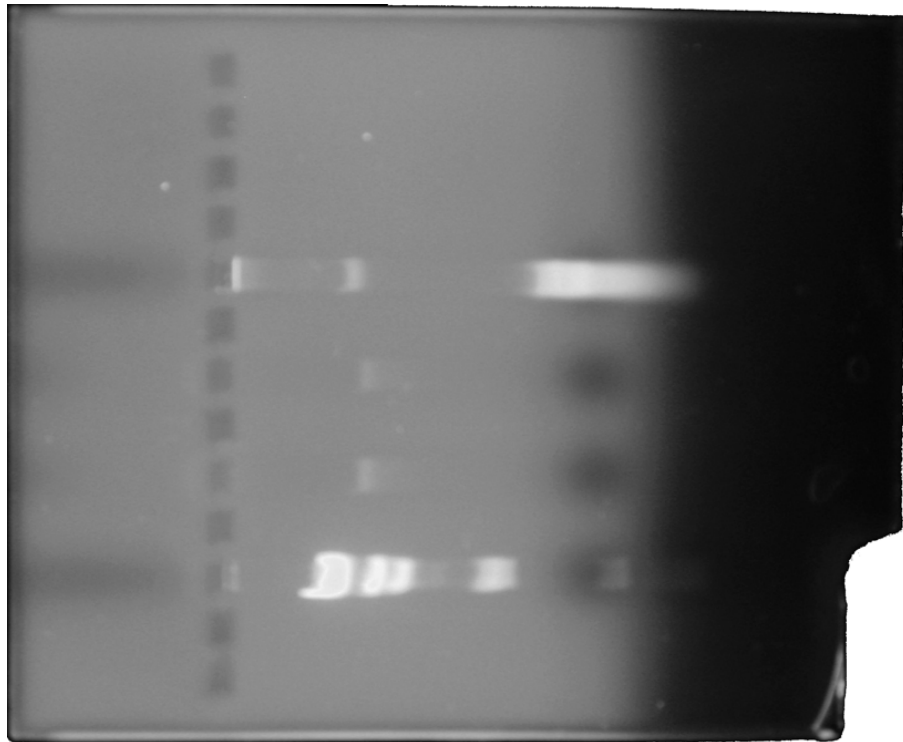
$$\begin{aligned} c_{\text{prøve}} &= \frac{0,167 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \cdot 6 \mu\text{L} \cdot 2027\text{bp}}{5 \mu\text{L} \cdot 48502\text{bp}} \\ &= 0,008375 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \approx 8,38 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}. \end{aligned}$$

4 Kommentarer

Som det kan ses af gelen, er det lykkedes lykkedes af isolere cromosomalt DNA ved håndoprensningen. Der er nemlig et stort tungt bånd, der ikke er nået videre end brønden. Bånd nr. 2 i lane 1 kunne evt. være et plasmid fra *B. subtilis*. Det store "smear" i lane 1 er en samling af RNA i mange forskellige størrelser. Der er jo ikke tilsat RNase under håndoprensningen, og derfor måtte man forvente at kunne se RNA på gelen.

Kit-oprensningerne er til gengæld ikke gået så godt. Der må have været sket en fejl under oprensningen, for der er absolut intet cromosomalt DNA at se på gelen. Til gengæld har RNasen virket, da der heller ikke er noget "smear" på gelen. På alle tre prøver ses der et bånd ved det, der svarer til markørens 9416bp-bånd (bånd nr. 2).

Det er altså lykkedes at isolere og oprense cromosomalt DNA ved håndoprensningsmetoden. Koncentrationen heraf er ikke overvældende, men dog acceptabelt.



Figur 1: Kontrol af cromosomalt DNA ved gelelektroforese. Lane 1 (øverst) viser båndene for håndoprenset DNA. Lane 2 og 3 er kit-oprensningen, og lane 4 er markøren λ -DNA HindIII Digest.