

# GENSPLEJSNING

## Kloning af $\lambda$ -DNA fragmenter i *E. coli*

Kenneth Buchwald Johansen

september 2008

Tema: Genteknologi

3laba0808

### 1 Formål

Fremstilling af et  $\lambda$ -DNA kloningsbibliotek i plasmidvektoren pUC19. Skærringen af  $\lambda$ -DNA og pUC19 konfirmeres ved gelelektroforese. Der laves en ligering mellem  $\lambda$ -DNA-fragmenterne og pUC19, og disse ligeringer indsættes i kompetente *E. coli*-celler. Der laves plasmidoprensning efter et oprensings-kit, plasmiderne skæres og skærringen køres på gel. Herved kan længden af de indsatte  $\lambda$ -DNA-fragmenter bestemmes.

### 2 Princip og metode

pUC19 og  $\lambda$ -DNA skæres med restriktionsenzymet *Bam*H I, således at både vektor- og donor-DNA har det samme skærringsmønster, så de kan liggeres sammen. *Bam*H I skærer pUC19 i polylinkeren, som er placeret i LacZ-genet. Ved ligering med  $\lambda$ -DNA vil LacZ-genet derfor blive ødelagt, og pUC19 mister altså egenskaben til at danne  $\beta$ -galactosidase, der kan spalte X-gal (kolonier vil altså blive hvide i stedet for blå). Altså

**pUC19 med insert** vil give laktose $\div$  kolonier, og

**pUC19 uden insert** vil give laktose+ kolonier.

Fremgangsmåden er som følger:

1. **Skæring** med restriktionsenzym. Der skæres med *Bam*H I, som åbner pUC19 i polylinkeren.  $\lambda$ -DNA bliver skåret i 8 fragmenter.
2. **Gelelektroforese** for at bestemme, om skærringen er vellykket. pUC19 vil efter skærringen vandre gennem gelen til det, der for markøren svarer til 2686bp, som er pUC19's længde.  $\lambda$ -DNA vil blive skåret i 8 fragmenter, men det er normalt kun de 6, der kan ses på gelen.
3. **Ligering** af pUC19 og  $\lambda$ -DNA. Vektor- og donor-DNA "limes" sammen.

4. **Fremstilling af kompetente celler.** *E. coli* opformeres og klargøres, så cellerne er klar til at modtage plasmider.

5. **Transformation.** Ligeringen og kontroller (pUC19 og "ingenting") blandes, så plasmiderne trænger ind i *E. coli*'s celler. De tre blandinger kommer i LB-medium og inkuberes. Herved sker der en fænotypisk ekspression. Det vil sige at i de to rør, hvori der er *E. coli* med pUC19, vil der ske reaktionen  $\text{DNA} \rightarrow \text{mRNA} \rightarrow \text{protein}$  (i form af et enzym, der kan nedbryde ampicillin). Der udpodes på LB+amp+IPTG+X-gal-plader.

6. **Plade-screening.** Kontrollen, hvori der kun er *E. coli*, vil ikke kunne nedbryde ampicillin, og vil derfor ikke kunne vokse på pladerne. Denne kontrol bruges altså til at undersøge, om ampicillin virkelig har den ønskede hæmmende effekt.

De kolonier, der indeholder "ren" pUC19 kan danne  $\beta$ -lactosidase, som kan spalte X-gal og lave blå kolonier. Denne kontrol bruges altså til at undersøge, om cellerne er blevet kompetente og om transformationen er blevet gennemført.

Kolonier, hvori der er et  $\lambda$ -DNA-insert i pUC19 vil ikke kunne spalte  $\beta$ -lactosidase og vil derfor lave hvide kolonier.

7. **Replikation.** Hvide kolonier podes videre på plader for at konfirmere, at der var tale om hvide kolonier. Disse podes også over i LB-amp-medium. Derved kan der arbejdes videre med en kultur, man er sikker på indeholder pUC19 med insert.

8. **Oprensning af plasmid.** Plasmiderne isoleres vha. et søjle-oprensings-kit. Herefter kan der måles optisk densitet og derved bestemmes koncentration og renhed.

9. **Skærring af plasmid.** En del af det oprensede plasmid skæres igen med *Bam*H I.

10. **Gelelektroforese** for at finde længden af  $\lambda$ -DNA fragmenterne, der var insat i pUC19

inden skærringen. Som kontrol bruges den uskårede plasmid for at se, om skærringen var vellykket. Der bruges også "ren" uskåret pUC19 for at se, om den uskårede ligering er tungere (og altså går kortere på gelen) end pUC19.

### 3 Resultater

Ved kontrollen af, om skærringen er vellykket fremkom gelen i figur 1 på den følgende side.

Ved plade-screeningen blev der ikke fundet nogle kolonier på de plader, hvorpå der var E.coli uden pUC19. Pladerne, hvorpå der skulle være E.coli med pUC19 viste heller ikke nogle kolonier, hvilket tyder på en fejl under udpodningen. På de plader, hvor ligeringen blev udpodet, blev der til gengæld både fundet blå og hvide kolonier. Antallet heraf kan ses i tabel 1.

Plade nr.	blå kolonier	hvide kolonier
1	148	8
2	144	3
3	83	1
4	103	5

**Tabel 1:** Kolonier på LB+amp+IPTG+X-gal-plader

OD-målingerne for plasmidoprensningen har givet resultaterne i tabel 2.

Bølgelængde	OD <sub>fortyndet</sub>	FF	OD
260	0,505	4	2,020
280	0,266	4	1,064

**Tabel 2:** OD-målinger for plasmidoprensning

Forholdet mellem den optiske densitet for de 2 bølgelængder skal være større end 1,8 for at sikre en renhed  $\geq 90\%$ .

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = \frac{2,020}{1,064} \approx 1,9.$$

Koncentrationen kan også beregnes:

$$c = A_{260} \cdot 50 \cdot FF = 2,02 \cdot 50 = 101 \mu\text{g/mL}.$$

Endelig kan størrelsen af  $\lambda$ -DNA-insertet ses af gelen i figur 2 på næste side.

### 4 Kommentarer

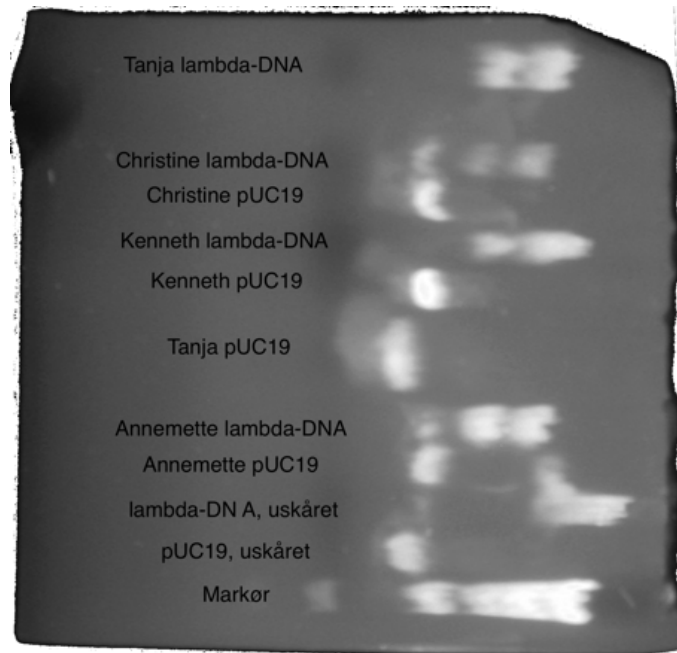
På figur 1 på den følgende side ses det, at pUC19 er blevet skåret korrekt. Den har nemlig vandret kortere gennem gelen end den uskårede pUC19, hvilket betyder, at den er blevet lineær (2686bp).  $\lambda$ -DNA ser også ud til at være blevet skåret idet der ser ud til at være flere fragmenter og de vandrer længere end ved den uskårede.

Efter plasmidoprensningen blev der beregnet et mål for renheden, som blev 1,9. Dette er temmelig højt så der kan godt være forurening i oprensning. Koncentrationen blev beregnet til  $101 \mu\text{g/mL}$ , hvilket også er lidt højt (koncentrationen ved oprensning med håndværksmetoden var  $27,1 \mu\text{g/mL}$ ).

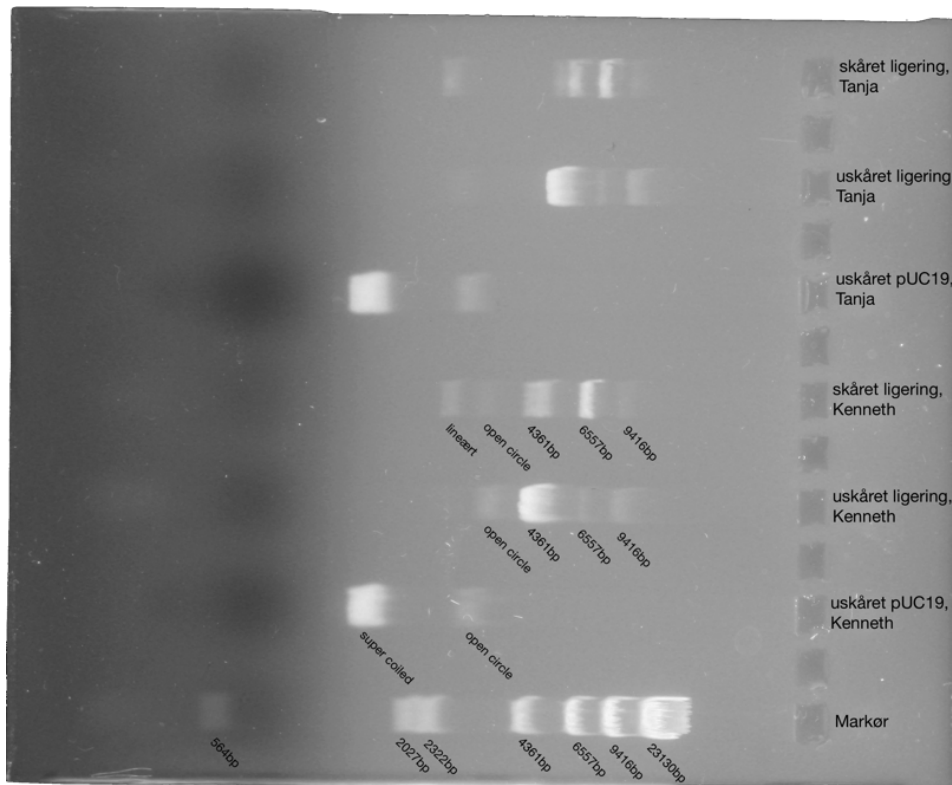
Sluttelig kan figur 2 på næste side betragtes. Ligeringen viser sig at indeholde lineært og open circle pUC19, hvori der har været  $\lambda$ -DNA-fragmenter af størrelserne 4316bp, 6557bp og 9461bp.

Undertegnede synes desuden det er værd at bemærke hvor stor forskel, der er på gelerne. Den eneste forskel der er på fremstillingen af gelerne er, at gel nr. 2 har stået i køleskab natten over. Det er altså åbenbart en fordel at bruge en kold gel. Det er endda muligt at se 564bp-båndet for markøren!

Alt i alt må det siges at have været et vellykket kloningsforsøg. Der fremkom trods alt hvide kolonier, så kloningen er lykkedes.



**Figur 1:** Gel 1. Konfirmering af skærring.



**Figur 2:** Gel 2. Længdebestemmelse af  $\lambda$ -DNA-insert.