

# ISOLERING AF DNA FRA GÆR

## samt undersøgelser på intakt DNA

Kenneth Buchwald Johansen

september 2008

Tema: Genteknologi

31aba0808

### 1 Formål

Isolering af DNA fra gærceller. Koncentrationen og graden af denaturering for det isolerede DNA bestemmes vha. OD-måling.

### 2 Princip og metode

Analysen forløber på følgende måde:

1. Gærets celler destrueres mekanisk ved hjælp af sand og en morter.
2. SDS tilsættes for at ødelægge cellemembranerne, inhibere enzymer og denaturere nogle proteiner.
3. Suspensionen opvarmes for at denaturere proteiner.
4. Der tilsættes natriumperchlorat som proteinfældende reagens.
5. Isoamylalkohol tilsættes for at udfælde proteiner.
6. Efter centrifugering dannes der en vase med sand og gærrester, en vandfase med DNA, et proteinlag og en alkoholfase. Der prikkes hul på proteinfasen og vandfasen isoleres.
7. Der tilsættes ethanol og DNA udfældes.
8. Efter endnu en centrifugering findes DNA'et som en pellet i bunden af centrifugeglasset.
9. DNA'et opløses i saltvand.
10. Måling af optisk densitet samt spektrafremstilling. Der måles på en fortyndet prøve (nativt DNA) og på en prøve tilsat KOH (denatureret DNA). KOH denaturerer nemlig DNA'en.

### 3 Resultater

For de to tilfælde er målt følgende absorptions-

Prøve	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>
DNA	0,534	0,297
DNA + KOH	0,604	0,327

**Tabel 1:** Absorbanser for udfældet DNA og for denatureret DNA. I begge tilfælde er der en fortyndingsfaktor på  $FF = 3000/70 = 42,86$ .

Renheden kan da bedømmes:

$$\frac{Abs_{260}}{Abs_{280}} = \frac{0,534}{0,297} = 1,798 \approx 1,8.$$

Det vurderes altså, at renheden er  $\geq 90\%$ .

Som bilag findes et absorptionsspektrum (220nm-330nm) for det udfældede DNA samt for det denaturerede DNA (med KOH). Fra bilagene er fundet værdierne i tabel 2.

	Abs <sub>max</sub>
Nativt DNA	0,54
Denatureret DNA	0,62

**Tabel 2:** Hyperchromt skift-værdier. Aflest fra bilag.

Herved kan det hyperchrome skift beregnes:

$$\text{Hyperchromt skift} = \frac{0,62 - 0,54}{0,62} \cdot 100\% \approx 13\% < 39\%.$$

Koncentrationen af DNA kan beregnes ud fra Lambert-Beers lov:

$$A_{260} = 20 \frac{\text{mL}}{\text{mg}\cdot\text{cm}} \cdot c \cdot l.$$

Derved beregnes koncentrationen med

$$c = \frac{A_{260}}{20 \frac{\text{mL}}{\text{mg}\cdot\text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}}$$
$$= \frac{0,534 \cdot 42,86}{20 \frac{\text{mL}}{\text{mg}\cdot\text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}}$$

$$= 1,14 \text{ mg/mL}.$$

Koncentrationen kan også beregnes ud fra det denaturerede DNA:

$$\begin{aligned}c &= \frac{A_{260, \text{denatureret}}}{33 \frac{\text{mL}}{\text{mg}\cdot\text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} \\ &= \frac{0,604 \cdot 42,86}{33 \frac{\text{mL}}{\text{mg}\cdot\text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} \\ &= 0,784 \text{ mg/mL}.\end{aligned}$$

## 4 Kommentarer

Renhedskoefficienten blev 1,8, hvilket betyder at renheden er meget høj ( $\leq 90\%$ ).

Det hyperchrome skift er forholdsvist lav, så DNA'en er altså denatureret en del. Behandlingen af DNA'en har altså været for hård, eller også er prøven blevet forurennet med DNaser.

Ved begge koncentrationsberegninger er koncentrationen meget høj. Dette må skyldes den store mængde celler, der var til rådighed.

At de to koncentrationer ligger så langt fra hinanden, må skyldes den store denaturering, der er sket under oprensningen, men skal man vælge, må koncentrationen beregnet på det denaturerede DNA være mest pålideligt.

Det må konkluderes at gær er let at arbejde med og at der er mere end rigeligt celler til rådighed (der skulle fortyndes meget ved OD-målingerne). Det har været nemt at isolere DNA fra gær.