

**Р А Н**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

**Институт фундаментальных проблем биологии**

Российской академии наук

(ИФПБ РАН)

---

Методическое руководство для школы молодых ученых

Международная конференция Photosynthesis research for sustainability Пущино 2016

**ПРАКТИКУМ**

"Выделение плазмидной ДНК и ее анализ методом горизонтального электрофореза в агарозном геле

Составил: д.б.н., в.н.с. Васильева ЛГ

2016

**Содержание практикума** – Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток методом щелочного лизиса с последующей визуализацией и анализом полученной ДНК с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле.

### **Суть метода щелочного лизиса.**

Большинство методов выделения плазмид основаны на том, что плазмиды имеют ковалентно замкнутую кольцевую форму (ССС) и гораздо меньшие размеры, чем бактериальная хромосома. Бактериальные клетки собирают центрифугированием и лизируют с помощью ЭДТА, разрушающего клеточную стенку. Метод щелочного лизиса основан на том, что в щелочных условиях при  $\text{pH} \sim 12$  происходит денатурация только линейных молекул ДНК (двухцепочечной геномной ДНК клетки-хозяина), плазмидные же ССС-молекулы не денатурируют. При нейтрализации клеточного экстракта в присутствии солей высокой концентрации денатурированная хромосомная ДНК выпадает в осадок, поскольку реассоциация длинных линейных одноцепочечных молекул ДНК происходит в этих условиях одновременно во множестве участков с образованием нерастворимых комплексов. Часть клеточной РНК и белков тоже осаждаются вследствие того, что при осаждении используется детергент додецил-сульфат натрия. Дополнительно для удаления РНК используют РНК-азу, а для расщепления белков используют щелочную протеазу. После удаления осадка геномной ДНК, РНК и белков путем центрифугирования, проводят дальнейшую очистку плазмидной ДНК. В нашем практикуме дополнительная очистка будет проводиться на кремниевых мембранах фирмы Promega, обратимо связывающих ДНК. Мембраны с ДНК промывают буфером, содержащим этанол и затем снимают очищенную плазмидную ДНК с мембран водой или буфером.

### **Суть метода агарозного электрофореза ДНК.**

Электрофорез ДНК - один из основных инструментов в молекулярной биологии. Метод используется для:

- разделения молекул ДНК и РНК по их размеру и определение размера по маркеру
- определения примерного количества ДНК по яркости свечения

- вырезания нужной ДНК из геля и использовать в дальнейшем
- анализа результатов проведения ПЦР, а также для других целей

Разделение фрагментов ДНК происходит из-за наличия у них заряда. Фосфатные остатки у нуклеотидов придают всей ДНК негативный заряд. Это делает ее растворимой в воде и заставляет двигаться под действием тока к положительному электроду. Чтобы ДНК двигалась медленнее, ее помещают в вязкую среду, в агарозный гель. Увеличение концентрации агарозы в геле уменьшает скорость миграции ДНК и позволяет разделять малые ее фрагменты.

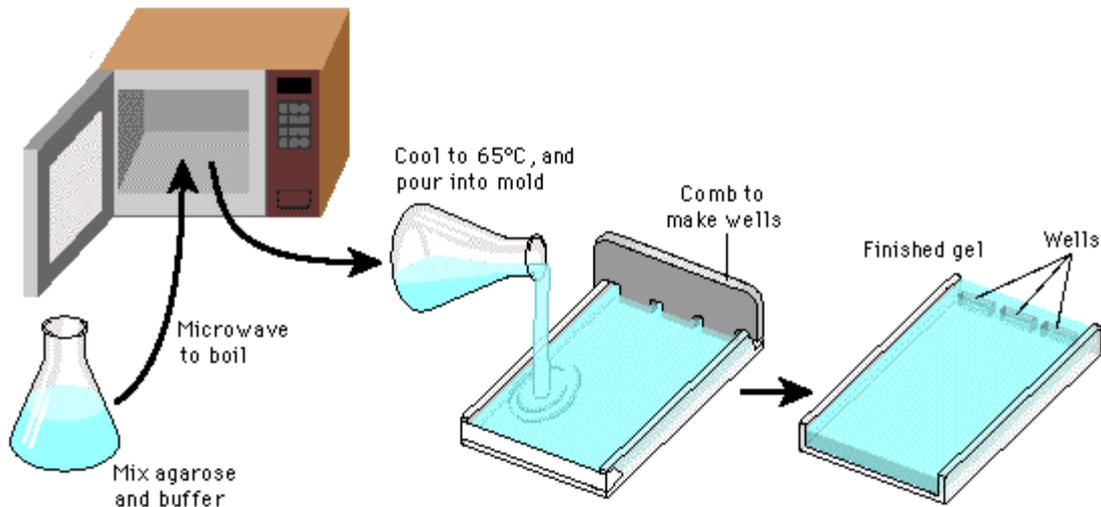
## Протокол:

### Выделение и очистка плазмидной ДНК

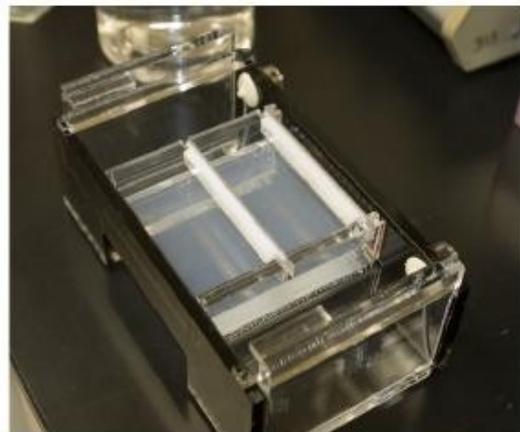
- 1) Вырастить ночную культуру 16-24 часа в богатой среде: 37° С, 200-300 об/мин
- 2) 1.5ml ночной культуры поместить в 1.7 мл пробирку, ЦФ 30", удалить супер;
- 3) Повторить п.2. ещё 2 раза
- 4) убрать остатки среды – опрокинуть пробирку с осадком, промокнуть на фильтровальную бумагу
- 5) ресуспензировать осадок в 250 мкл буфера для ресуспендирования, (Promega Wizard Plus Minipreps Plasmid purification system), перемешать вортексе 5 мин
- 6) Добавить 250 мкл буфера для лизиса, закрыть и осторожно перевернуть пробирку 4 раза
- 7) Добавить 10 мкл раствора щелочной протеазы, оставить на 5 мин при комнатной температуре
- 8) Добавить 350 мкл нейтрализующего раствора, закрыть и осторожно перевернуть пробирку 4 раза
- 9) Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин, 10 мин
- 10) Вставить колонки с мембранами в пустые пробирки
- 11) Перенести надосадочную жидкость в колонки
- 12) Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин, 1 мин
- 13) Вылить прошедшую через мембраны жидкость, снова вставить колонки с мембранами в опорожненные пробирки
- 14) Добавить 750 мкл промывочного раствора. 13000 об/мин, 1 мин
- 15) Повторить п. 13
- 16) Повторить п. 14 с 250 мкл промывочного раствора
- 17) Перенести колонку в стерильную 1.5 мл пробирку
- 18) Добавить 100 мкл стерильной воды или буфера, 13000 об/мин, 1 мин
- 19) Колонку утилизировать, ДНК использовать или хранить при -20 ° С.

## Анализ полученной ДНК, агарозный электрофорез

### 1) Готовим 1% агарозу

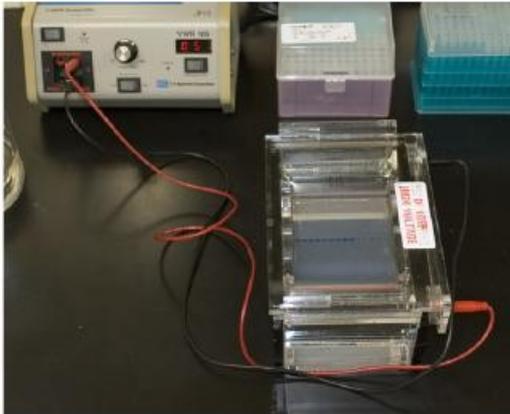


Pour agarose and let harden (30 min)

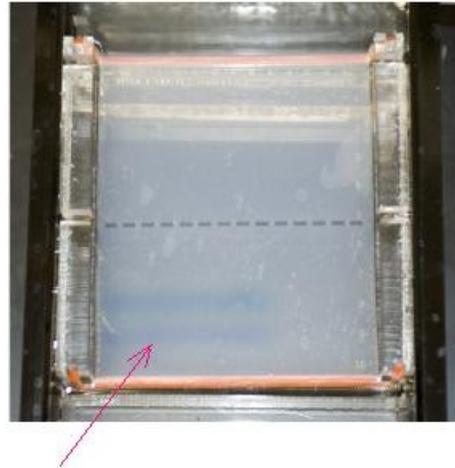


Hardened gel is ready to be loaded

- 2) Смешиваем образец с краской и наносим образец в лунки
- 3) Включаем ток, 120В 15-30 мин
- 4) Выключаем прибор, вытаскиваем гель. Просматриваем гель в проходящем УФ-свете на трансиллюминаторе, фотографируем. На фоне темно-синей подсветки УФ в геле должны быть видны полосы красного цвета - флуоресценция этидиум-бромида, который связался с ДНК.
- 5) Анализируем результаты, сравниваем разные плазмиды.



To start electrophoresis  
attach gel box leads  
to power supply



Stop electrophoresis when  
tracking dyes have migrated  
sufficiently



ДНК в проходящем УФ

#### ССЫЛКИ:

[http://ru.wikipedia.org/wiki/Электрофорез\\_ДНК](http://ru.wikipedia.org/wiki/Электрофорез_ДНК)

[http://ru.wikipedia.org/wiki/Бромистый\\_этидий](http://ru.wikipedia.org/wiki/Бромистый_этидий)

[http://www.labx.narod.ru/documents/gel\\_electrophoresis\\_dna.html](http://www.labx.narod.ru/documents/gel_electrophoresis_dna.html)

[http://molbiol.edu.ru/protocol/07\\_01.html](http://molbiol.edu.ru/protocol/07_01.html)

<http://biohack.ru/?cat=8>

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

<http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>

<http://beadle.rutgers.edu/MBB/315/Lec/Figs/AgaroseGelTutorial.pdf>

<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html>

<http://www.molecularstation.com/agarose-gel-electrophoresis/>

[http://molbiol.ru/protocol/04\\_01.html](http://molbiol.ru/protocol/04_01.html)

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/manual%20RUS/UM%20Rus-S5.pdf>

## **Видео**

<http://youtu.be/UYAGhRi30oM>

<http://youtu.be/YoKUiTWjy18>

<http://youtu.be/2UQIoYhOowM>

[http://youtu.be/U2-5ukpKg\\_Q](http://youtu.be/U2-5ukpKg_Q)

<http://youtu.be/VWAMz6WLwM0>

<http://youtu.be/6mQGNDnOyH8>