

# Laboratoorne töö B

## Plasmiidse DNA restriksioonanalüüs

Eesnimi.....

Perekonnanimi.....

Rühm.....

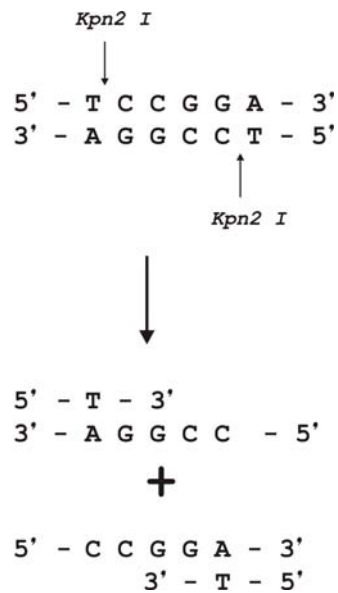
Klass.....

Kool.....

### Teoreetiline osa

Restriksioonilised endonukleaasid ehk restriктаasid leiavad äärmiselt laia kasutust biokeemia ja molekulaarbioloogia alases uurimistöös. Restriктаasid on ensüümid, mis hüdrolüüsivad fosfodiesteridemeid DNA molekulis, lõigates DNA molekuli kindla pikkusega fragmentideks. Enamik molekulaarbioloogias kasutatavaid restriктаase lõikavad DNA-d ainult teatud kindla nukelotiidse järjestuse juurest. Seetõttu tekitab DNA töötlemine restriктаasidega ehk restriksioon erineva järjestusega DNA molekulidest kindla pikkusega fragmendid. Tekkinud fragmentide pikkuse (aluspaarides) ja arvu järgi on tihti võimalik antud DNA molekuli identifitseerida.

Laboratoorse töö B käigus ongi teie ülesandeks kolme erineva DNA molekuli tuvastamine restriksiooni abil. DNA näol on töös B tegemist soolebakterist *Escherichia coli* eraldatud plasmiididega (tsirkulaarsed kaheaheelalised DNA molekulid). Restriктаasina kasutate te bakterist *Klebsiella pneumoniae* eraldatud restriksioonilist endonukleaasi *Kpn2 I*, mille tootjaks on Leedu biotehnoloogiafirma „Fermentas“. *Kpn2 I* lõikab kaheaheelalist DNA-d järgmise järjestuse juurest :



Restriktsioonil tekkinud DNA fragmendid lahutate te elektroforeesil 1 % agarosgeelis.

#### Vajaminevad reagentid

- Plasmiidse DNA alglahused (lahused A1 - A3) kontsentratsiooniga 0,05 µg/µl
- Restriktaas *Kpn2 I* kontsentratsiooniga 10 U/µl<sup>†</sup>
- Reaktsioonipuhvri 10x kontsentraat<sup>†</sup>
- DNA suurusmarker „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (Firma „Fermentas“)
- Destilleeritud H<sub>2</sub>O
- Agarosi pulber
- Tris-boraat-EDTA puhvri (TBE puhver) 10x kontsentraat
- Etiidumbromiid (EtBr) kontsentratsiooniga 10 mg/ml
- Elektroforeesi proovi laadimise puhvri („laadimispuhver“) 10x kontsentraat

**Comment [k1]:** Täheb - 10-kordne kontsentraat

<sup>†</sup> U ehk Unit. Restriktaasi aktiivsuse ühik. 1 Unit restriktaasi *Kpn2 I* lõikab 1h jooksul 37° C juures 1 µg faagi λ DNA-d

<sup>†</sup> 10x puhvri koostis : 33 mM Tris-OAc (pH = 7.9 37° C juures), 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 66 mM KOAc, 0.1 mg/ml härja seerumi albumiin

**Lisavahendid**

- Kummikindad
- Mikrotsentrifuugi tuubid mahuga 1,5 ml
- Pipetiotsikud
- Automaatpipetid järgmiste koguste pipeteerimiseks
  - P1 : 1 - 10  $\mu$ l
  - P2 : 2 - 20  $\mu$ l
- Mõõtsilindrid ruumalaga
  - 50 ml
  - 250 ml
- Agarosgeeli valamise nõus
- Elektroforeesi vann
- Lauatsentrifuug

**Restriksioonireaktsioon**

1. Igast DNA alglahusest teha vette 5  $\mu\text{l}$  lahjendust kontsentratsiooniga 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Lahus teha 1,5 ml mikrotsentrifuugi tuubi. Arvutage selle lahjenduse tegemiseks vajalik DNA alglahuse ja vee kogus mikroliitrites ning kandke tulemused tabelisse :

DNA alglahus	2	$\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	3	$\mu\text{l}$

**Lahenduskäik : Tähistame tehtava DNA lahjenduse lõppruumala  $V_L$ , DNA alglahuse kontsentratsiooni  $C_A$  ja DNA kontsentratsiooni valmistatavas lahuses  $C_L$ . Siis lahuse tegemiseks vajamineva DNA alglahuse koguse mikroliitrites leiame valemist**

$$V_L * \frac{C_L}{C_A} \quad (\text{Valem 1})$$

(Valem 1 tuleb tegelikult segamisristist. Segamisristi kohaselt peavad tehtava lahuse ruumala  $V_L$  ja otsitav ruumala  $x$  suhtuma nagu tehtava lahuse lõppkontsentratsioon  $C_L$  ja lahjendatava komponendi alglahuse kontsentratsioon  $C_A$  :

$$\frac{x}{V_L} = \frac{C_L}{C_A}$$

Avaldades siit  $x$ -i (DNA alglahuse ruumala), saamegi valemi 1)

Pannes valmisse 1 vajalikud väärtused  $V_L = 5 \mu\text{L}$ ,  $C_A = 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ja  $C_L = 0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , saame DNA alglahuse vajaminevaks koguseks 2  $\mu\text{l}$ . Et lahjenduse lõppruumala on

5 µl ja teisi komponente peale vee lahus ei sisalda, siis lisamegi 2 µl DNA alglahusele 3 µl vett.

2. Restriktaasi *Kpn2 I* alglahusest tehke mikrotsentrifuugi tuubi 20 µl lahjendust, kus reagentide kontsentratsioonid on sellised, nagu kirjas alljärgnevas tabelis. Arvutuste tulemused (kui palju ühte või teist reagentid võtta) kandke samasse tabelisse :

	Lõppkontsentratsioon	
<i>Kpn2 I</i> alglahus (10U/µl)	0,6 U/µl	1,2 µl
10 X restriktaasi puhver	1 x	2,0 µl
H <sub>2</sub> O		16,8 µl

Lahenduskaik : erinevalt etapist 1, kus lahjendatavaid komponente oli ainult 1 (DNA lahus), on selles lahuses 2 komponenti - ensüüm *Kpn2 I* ja ensüümi puhver. Mõlema komponendi alglahuse vajaminevad kogused leiame jällegi valemi 1 abil, kusjuures arvestame, et lahuse lõppruumala on nüüd 20 µl :

$$\text{Kpn2 I} - [20 (\mu\text{l}) * 0,6 (\text{U}/\mu\text{l})] : 10 (\text{U}/\mu\text{L}) = 1,2 \mu\text{l}$$

$$\text{Puhver} - [20 (\mu\text{l}) * 1] : 10 = 2,0 \mu\text{l}$$

$$\text{Vett jääb järgi} \rightarrow 20 \mu\text{l} - 1,2 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 16,8 \mu\text{l}$$

Comment [k2]: õigeks lugesime ka 17 µL

3. Igale etapil 1 valmistatud DNA lahjendusele lisage 5 µl *Kpn2 I* lahjendust ja segage lahust pipetiga sisse ja välja tõmmates.

4. Tuubid reaktsiooniseguga asetage termostaadile, mille temperatuur on 55<sup>o</sup> C (see on *Kpn2 I* optimumtemperatuur, kus ensüümi aktiivsus on kõige suurem).

5. Kuni restriksioon käib, tehke valmis 100 ml 1 % (mass/ruumala ehk w/v) agarooši suspensiooni 1 x TBE puhveris. See lahus tuleb teha kogu rühma peale. Vajalikud kogused arvutage ja kandke tulemused tabelisse :

Agarooš	1 g
10 x TBE puhver	10 ml
H <sub>2</sub> O	89 ml

Comment [k3]: õigeks lugesime ka 90 ml

Lahenduskäik : agarooši korral ei ole tegemist vesilahuse, vaid tahke ainega (pulber). Et aga agarooši tihedus jääb 1 g/cm<sup>3</sup> lähedale, võib teda praktilikas võrdsustada vedelikuga, mille tihedus on 1 g/cm<sup>3</sup>. Lahuse lõppruumala on siin 100 ml. 1 % sellest on järelikult 1 ml (= 1 cm<sup>3</sup>). Seega tuleb agarooši kaaluda 1 g. Ülejäänud lahuse komponentide arvutused on identsed eelmiste etappide omaga

Comment [k4]: seda punkti rõhutasime õpilastele vahetuslt praktikumi käigus

Kuumutage agarooši suspensiooni mikrolaineahjus, kuni kogu agarooš on lahustunud ja võtke lahus toatemperatuurile jahtuma.

6. Kui agarooši lahus on piisavalt jahtunud (seda määrab praktikumi juhendaja), lisage lahusele etiidiumbromiidi lõppkontsentratsioon 0,5 µg/ml. Etiidiumbromiidi lahust tuleb selleks võtta  
.....5..... µl

Lahenduskäik : Lõpplahuse ruumala on 100 ml. Et etiidiumbromiidi alglahuse kontsentratsioon on antud ühikutes mg/ml, tuleb siin kõigepealt ühikud ühtlustada. S.t. kas väljendada etiidiumbromiidi alglahuse kontsentratsioon i) ühikutes µg/ml või ii) etiidiumbromiidi lõppkontsentratsioon ühikutes mg/ml.

Kasutan praegu võimalust i. Etiidiumbromiidi alglahuse kontsentratsioon on 10 mg/ml = 10 000 µg/ml. Seega alglahust läheb vaja

$$[100 \text{ (ml)} * 0,5 \text{ (µg/ml)}] : 10\,000 \text{ (µg/ml)} = 0,005 \text{ ml}$$

$$0,005 \text{ ml} = 5 \text{ µl}$$

7. Valage agarooosi lahus geelivalamise nõusse ja oodake, kuni geel kõvastub
8. Tahkunud geel asetage elektroforeesi vanni ja lisage nii palju 1 X TBE puhvrit, et puhver ujutaks geeli üle
9. 20 min pärast restriksioonireaktsiooni alustamist võtke tuubid reaktsiooniseguga toatemperatuurile ning lisage neile 2 µl „laadimispuhvri“ 6 x kontsentraati
10. Pipeteerige kogu reaktsioonisegu agarosgeeli „hambasse“. Proovide pipeteerimise järjekord vasakult paremale :

**A1, A2, A3**

11. Lisage geeli 1 „hambasse“ 3 µl DNA suurusmarkerit
12. Asetage elektroforeesi vannile peale kate nii, et anoodi juhe satuks punase klemmi ja katoodi juhe musta klemmi otsa.
13. Keerake peale pinget 200 V. Nüüd hakkab DNA agarosgeelis liikuma. DNA liigub (tehke linnuke õige variandi järele) :

A - katoodi poole

B - anoodi poole

**Lahenduskäik :** Nagu tulemuste analüüsi käigus vihjatud sai, on DNA-l pH 7 juures negatiivne laeng. Seega liigub DNA positiivselt laetud elektroodi poole, milleks on anood

14. Forees kestab 2 h. Tulemuste analüüs toimub õhtul peale praktiliste tööde lõppu.



### Tulemuste analüüs

Analüüsi osas peate te tuvastama, milline plasmiid oli proovis A1, milline proovis A2 ja milline proovis A3. Plasmiidideks on ptBB, ptBsB ja p7XB. Plasmiidide restriksioonikaardid on toodud joonistel 1 - 3. Plasmiidi tuvastamiseks peate te lähtuma restriksiooni käigus tekkinud DNA fragmentide arvust ja nende pikkusest aluspaarides. Fragmendi pikkuse määramiseks peate teda võrdlema teadaoleva pikkusega fragmendi asukohaga geelis. Teadaoleva pikkusega DNA fragmendid on markeri rajal. **Tulemuste analüüsil lähtuge lk. 8 toodud joonisest - kui kõik läheb hästi, peavad ka teie tulemused sellised välja nägema.**

Restriksioonikaartidest lähtudes on tekkivad fragmendid järgmised (arvutage fragmentide pikkused ja kandke nad alljärgnevasse tabelisse) :

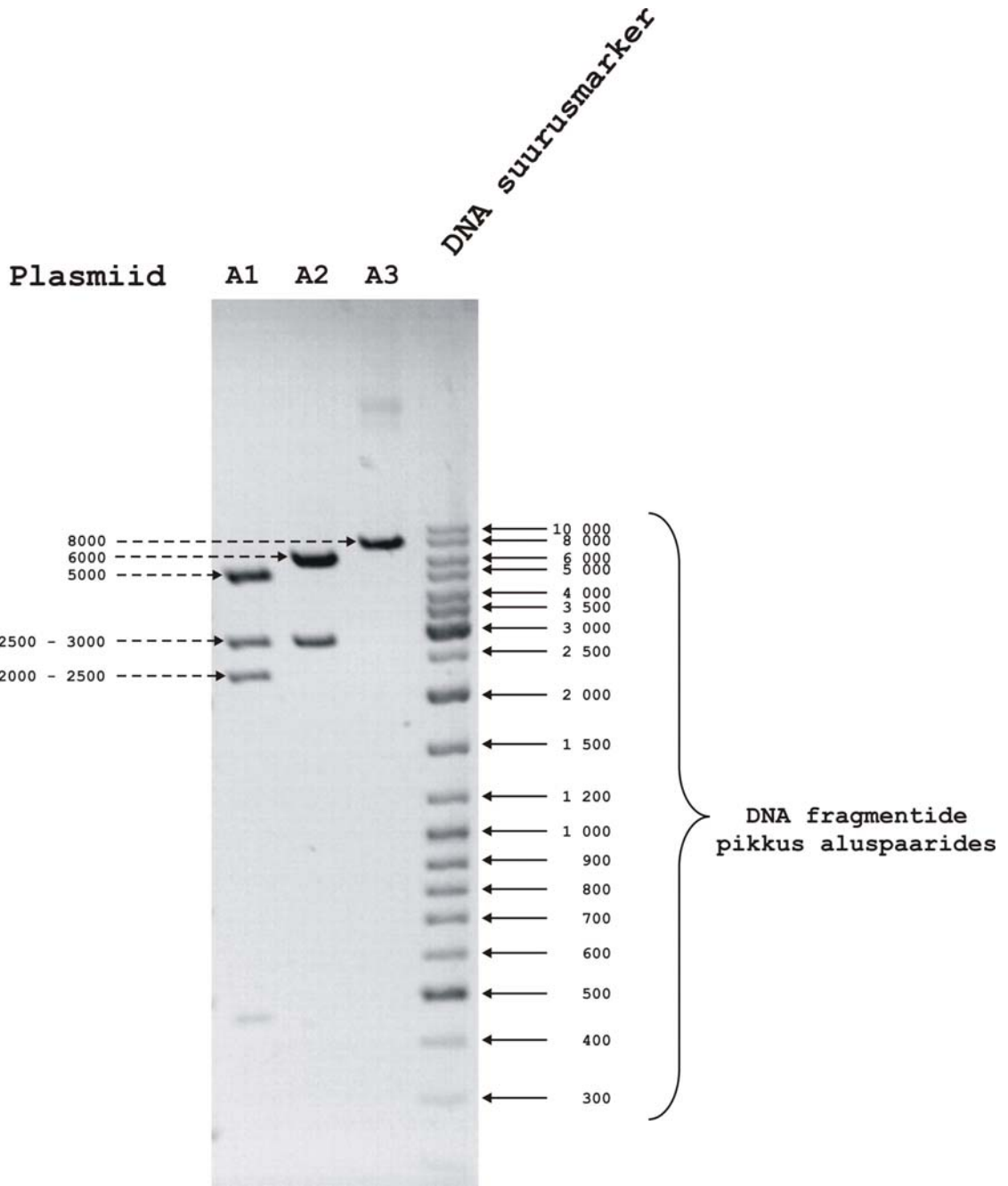
<b>ptBB (aluspaarides)</b>	<b>ptBsB (aluspaarides)</b>	<b>P7XB (aluspaarides)</b>
5000	6000	8000
2700	2700	
2300		

Milline DNA preparatsioon (A1-3) vastab millisele plasmiidile (ptBB, ptBsB, p7XB) :

A1 - .....ptBB.....

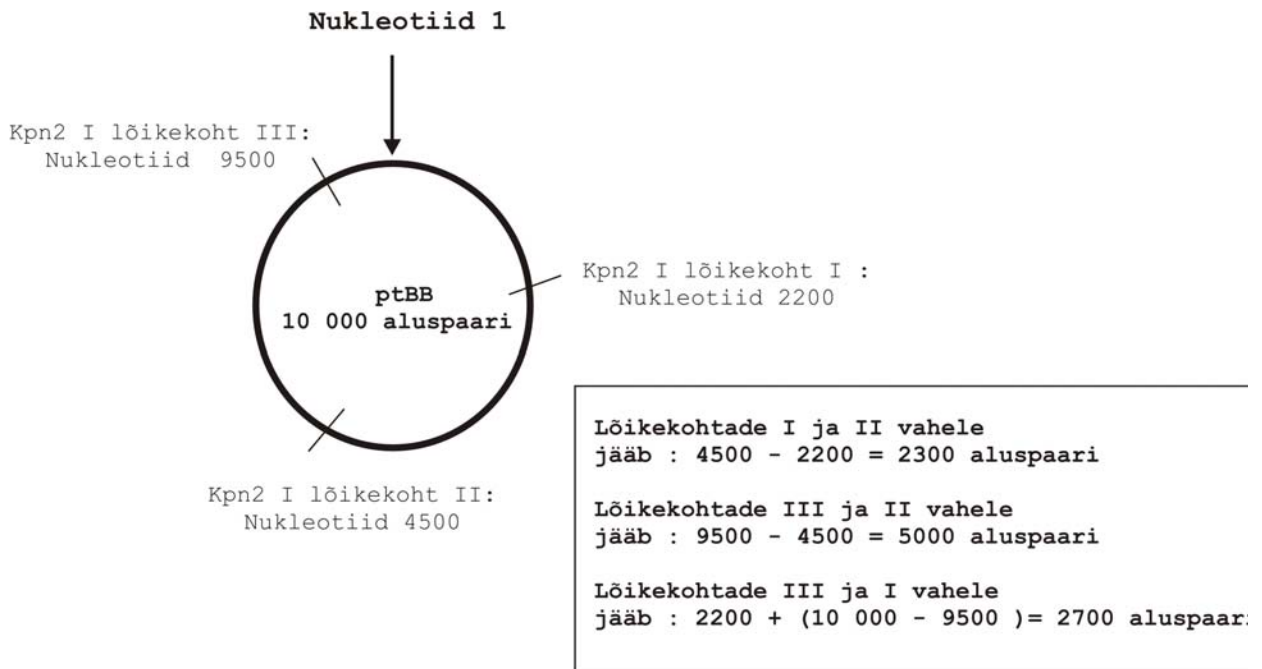
A2 - .....ptBsB.....

A3 - .....p7XB.....

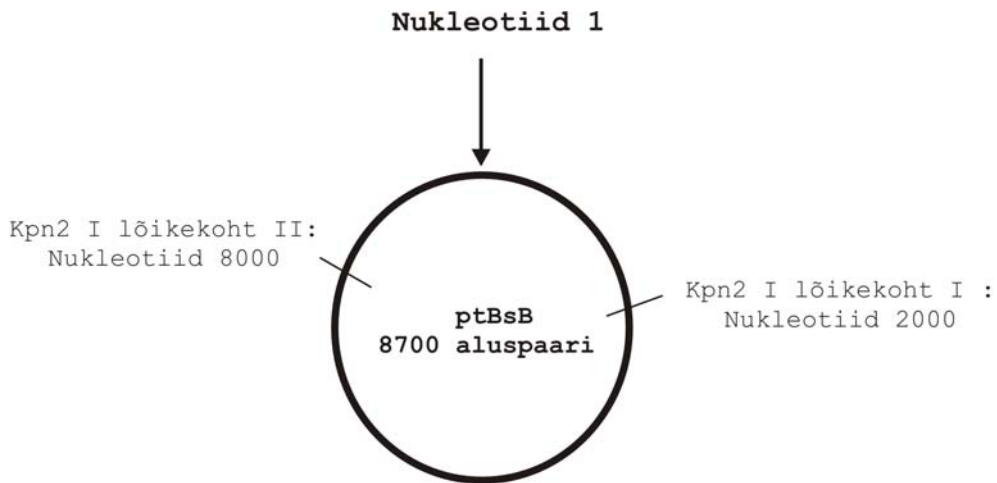


## Restriktsioonikaardid

## Plasmiid ptBB



## Plasmiid ptBsB

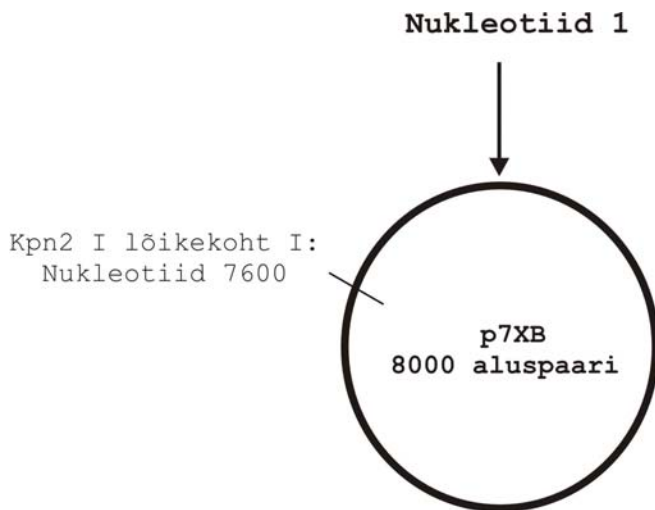


Lõikekohtade I ja II vahele  
jäab :  $2000 + (8700 - 8000) = 2700$  aluspaari

ja

Lõikekohtade I ja II vahele  
jäab :  $8000 - 2000 = 6000$  aluspaari

## Plasmiid p7XB



Kpn2 I lõikab 8000 aluspaari pikkuse tsirkulaarse plasmiidi ühest kohast katki - tekivad lineaarsed fragmendid ongi pikkusega 8000 aluspaari