

Etidiy bromidli CsCl - gradientida plazmid DNK sini tozalash.

Material va asbob uskunalari. 1 mashg'ulot. Ikkita talaba uchun: 0,1 ml etidiy bromid eritmasi (5 mg/ml); refraktometr; 1, 20, 200 mkl li avtomat pipetkalar; 50 Ti rotori uchun sentrifuga poliallomer probirkalari qopqoqlari bilan; 5 ml vazelin yog'i; 5 ml li shprits.

Guruh uchun: 1 g seziy xlor, 1 ml TES – buferi, sentrifuga tarozisi, Bekman ultratsentrifugasi, 50 Ti – rotori.

2 – mashg'ulot. Guruh uchun: ximeskop; 2-3 ta fen; J2-21 B "Bekman" sentrifugasi; 7 g agaroz; 1 l elektroforez buferi; -20° S haroratli muzlatgich; elektroforez apparati; doimiy tok manbai; refraktometr; 3 ml zichligi $1,772 \text{ g/sm}^3$ va 3 ml zichligi $1,446 \text{ g/sm}^3$ bo'lgan CsCl eritmalari.

Ikkita talaba uchun: shisha himoya ko'zoynagi; 5 ml li shprits; 10 ml li shisha sentrifuga probirkalari; 1 ml li avtomat pipetkalar; 4 ta parafilm plenka (2x2 sm); 25-50 ml li shisha stakan; 2 ml distillangan suv; 5 ml butanol; 0,7 ml 3 M li natriy atsetat (rN 6,0); 50 mkl TE-buferi.

Tushuntirish. Makromolekulalar va viruslarning fizik-kimyoviy tahlilida CsCl gradienti zichligida ultratsentrifugalash usuli samarali foyda beradi. Tahlil qilinayotgan material CsCl eritmasi bilan aralashtrilib, aralashma sedimentatsion – diffuzion muvozanat hosil bulgunicha sentrifugalanishi, CsCl gradienti zichligining shakllanishining keng tarqalgan usuli hisoblanadi. Burchak rotorlardan foydalanilganda DNK ning suzish zichligida bo'linishi uchun sentrifugalash vaqti 36-50 soatni tashkil etadi. Teng miqdorli gradient zichligi tezda shakllansa ham lekin asosiy vaqt DNK molekulasiga teng og'irlikdagi qatoriga yig'ilishiga sarf bo'ladi. Tahlil qilinayotgan material CsCl ning yuqori yoki pastki qatlamiga qatlanmaydigan zinasimon gradientning shakllanishi sentrifugalash vaqtini 12 soatga qisqarishini ta'minlash mumkin. Zinasimon gradient usulini qo'llab vertikal rotorlardan foydalanilganda esa sentrifugalash vaqtini 2 soatga qisqartirish mumkin. Burchak rotorlarida DNK ning suzish zichligi bo'yicha tez bo'linishining usullari ishlab chiqilgan (6 soatda) [2]. SHu maqsadda, CsCl ning uch qatlamli-o'rta qatlamning ya'ni arifmetik zichligi yuqori va pastki qatlamlarning zichligiga muallaq bo'lgan gradienti shakllantiriladi va tahlil qilinayotgan material o'rta qatlamga joylashtiriladi. Bunda makromolekularining teng og'irligidagi zichlikkacha migratsiya masofasi qisqarishi hisobiga makromolekular ajralishi tezlashadi.

Ishning maqsadi: Har bir juft talabalar oldingi darslarda ajratilgan plazmid DNK lari bilan ishlaydi (1-ishni bajarishda). Sentrifuga probirkasiga uch qatlamli CsCl gradienti shakllantiriladi. Gradient sentrifugalanib plazmid DNK si fraksiyasi shprits yordamida tortib olinadi. Etidiy bromid butanolda ekstraksiya qilinadi, tozalangan plazmid DNK si etanolda cho'ktiriladi, cho'kma TES-buferida eritiladi va agarozali gelda elektroforez qilinadi.

Ishning borishi. 1-mashg'ulot. CsCl gradientini tayyorlash va sentrifugalash.

Avvalgi darslarda olingan 1 g CsCl li DNK preparatiga (0,9 ml) 0,1 ml etidiy bromid eritmasi (TES-buferida 5 mg/ml) solinadi. Etidiy bromid kuchli kanserogen bo'lganligi sababli teriga tushishiga yo'l qo'ymaslik kerak. Refraktometr yordamida

eritmaning zichligi aniqlanadi, bunda refraktometr ko'rsatkichini 1,391 ga etkazish uchun quruq CsCl yoki TES-buferi solinadi. Refraktometr ko'rsatkichi 0,003 ga farqlanishi mumkin. CsCl ning hamma eritmaları TES-buferida tayyorlangan bo'lib, tarkibida 0,5 mg/ml etidiy bromid bo'lishi kerak. Pastki qatlamning zichligi 1,77 (1,406); o'rta qatlam zichligi 1,610 (1,391); yuqori qatlam zichligi 1,446 (1,376) g/sm³ ga teng bo'lishi kerak (qavs ichida eritmaların refraksiya ko'rsatkichlari ko'rsatilgan). Zichligi 1,772, 1,610 va 1,446 g/sm³ bo'lgan eritmalar uch qatlamli gradient shakllantirish uchun asta sekinlik bilan zichligiga mos ravishda sentrifuga probirkasiga avtomat ptpetkalar yordamida qatlamlanadi. Tahlil qilinayotgan material o'rta qatlamiga solingan bo'ladi. CsCl qatlamlarining pastki, o'rta va yuqori qatlamlarining miqdori: ml da 3:1:3 nisbatda bo'lishi kerak. Eritmalarni qatlamlashda har xil zichlikdagi eritmaların aralashib, bir-biriga o'tib ketishiga yo'l qo'ymaslik kerak. Sentrifuga poliallomer probirkasi tagiga 3 ml zichligi 1,772 g/sm³ bo'lgan CsCl eritmasi, ustiga zichligi 1,610 g/sm³ bo'lgan tarkibida DNK preparati bor ikkinchi eritma qatlamlanadi va uning ustiga 3 ml zichligi 1,446 g/sm³ CsCl eritmasi asta-sekinlik bilan solinadi. Gradient shakllangandan so'ng probirkalarni juda ehtiyotlik bilan chayqatib yubormasdan qopqoqlar bilan yopiladi va shprints yordamida qopqoq teshiklari orqali vazelin yog'i bilan to'ldiriladi. Probirkalar juft-juft qilib sentrifuga tarozida vazelin yog'i yordamida tenglashtiriladi, qopqoq teshiklari vintlar bilan burab yopiladi va rotorga bir-biriga qarama-qarshi qo'yiladi. 42000 ayl/daqiqqa 18° S haroratda 6-8 soat davomida sentrifugalanadi.

Sentrifugalash tugashi bilan gradientdan plazmid DNK sini olish kerak, agar buning iloji bo'lmasa kecha davomida sentrifugalanadi.

2-mashg'ulot. Plazmid DNK si fraksiyalarini CsCl gradientidan olish va etidiy bromiddan tozalash.

Sentrifuga to'xtaganidan so'ng gradient ximeskopda (to'lqin uzunligi 254 nm bo'lgan qisqa to'lqinli ultrabinafsha nurlari yordamida yoritiladi) ko'riladi. UB-nurlari manbai bilan ishlaganda albatta himoya ko'zoynagidan foydalanish kerak. Sentrifuga probirkasida normal bo'linish yuzaga kelganda ikkita chiziq ko'rinishi kerak: yuqori chizig'ida xromosoma DNK si va to'g'ri shaklli plazmid DNK si joylashgan, pastki chizig'ida esa xlaqa shakldagi kovalent birlashgan plazmid DNK si joylashgan. Ochiq xalqa shaklli plazmid DNK si xromosoma DNK si bilan bir chiziqda yoki sal pastroqda joylashgan bo'ladi. Sentrifuga probirkalaridan markaziy vintlar olinib, shprints yordamida plazmid DNK si so'riladi va 10 ml li sentrifuga shisha probirkasiga solinadi so'ngra plazmid DNK si preparati etidiy bromiddan butanol yordamida ekstraktsiya qilinib tozalanadi. Buning uchun DNK eritmasiga teng miqdorda butanol qo'shiladi (5 M CsCl bilan to'yintirilgan bo'lsa yanayam yaxshi), probirka og'zi parafilm yoki shisha tiqin bilan yopiladi va qo'lda probirkani to'nkarish va asl holiga qaytarish yo'li bilan aralashtiriladi. 1-2 daqiqadan so'ng aralashma qatlamlarga ajraladi, yuqorigi faza (etidiy bromidli butanol) avtomat pipetka orqali olib tashlanadi. Pastki faza (DNK ning CsCl eritmasi) rangsizlangunga qadar bu muolaja 3-4 marta qaytariladi. DNK eritmasi etidiy bromiddan tozalangandan so'ng unga teng hajmda distillangan suv, 1/10 hajm 3 M rN 6,0 natriy atsetat va 2 hajm sovuq etanol aralashtirib, muzlatgichga -20° S ga 1-

2 soatga qo'yiladi. DNK 3000 ayl/daq. tezlikda 15-20 daqiqa davomida past haroratda sentrifugalanib cho'ktiriladi. Etanol xidini yo'qotish uchun probirkani vakuum eksikatoriga 10-15 daqiqaga qo'yiladi. Agar buning iloji bo'lmasa probirkani 10-15 daqiqa to'nkarib qo'yish mumkin. Qurigan DNK cho'kmasi 40 mkl TE-buferida eritiladi va Eppendorf probirkasiga olinadi.

Olingan eritmalaridan 3 mkl dan olinib agarozali gel elektroforezda tekshiriladi. Plazmid DNK si preparatlarni -20°C haroratda muzlatgichlarda saqlash mumkin.