



The Biotechnology Education Company ©

EdvoKit 204: ADSKILLELSE AF DNA og RNA

Søjlekromatografisk adskillelse af RNA og DNA

Hele kittet opbevares i køleskab

*Oversat og bearbejdet af Birgit Sandermann Justesen, Nærum Gymnasium ,
september 2012*

Søjlekromatografisk adskillelse af RNA og DNA

Opbevaring:

Alle kittets dele opbevares i køleskab.

Formål med forsøget

At introducere søjlekromatografi som en metode til at adskille RNA og DNA på baggrund af molekylernes størrelse og form

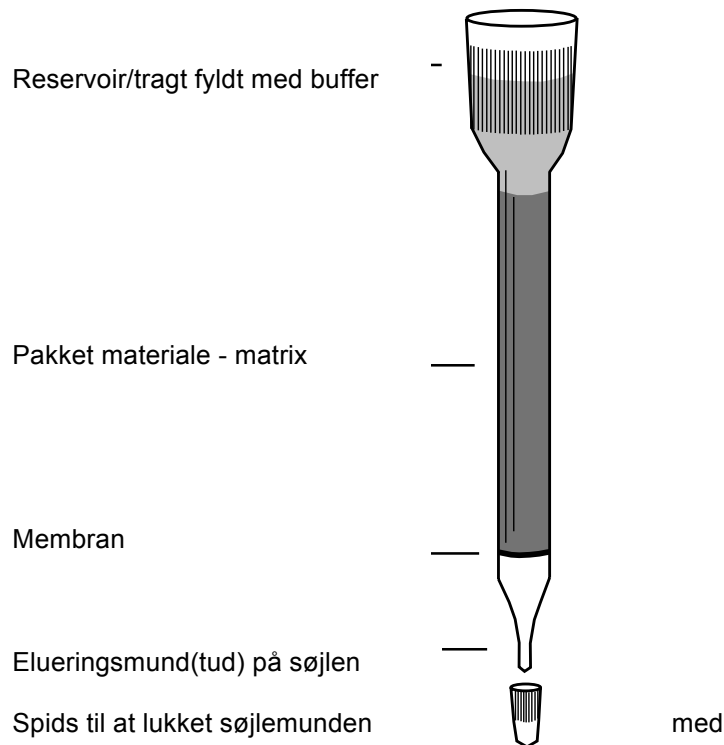
Indhold i kittet

- A LyphoSample™ (frysetørret prøve indeholdende RNA, DNA og farve)
- B Dry Matrix
- C Koncentreret elueringsbuffer

10x Gel Loading Solution
Practice Gel Loading Solution
UltraSpec-Agarose™
50x elektroforesebuffer (TAE)
FlashBlue™ farve
Kromatografisøjler
1 mL pipette
Transferpipetter
Mikrocentrifugerør

Nødvendigt udstyr

Elektroforeseudstyr til vandret elektroforese
Strømforsyning til elektroforeseapparaterne
Lysbord
Mikropipetter med tilhørende spidser
6 holdere/stativudstyr til søjlerne
6 x5 mL eller 10 mL pipetter
500-1000 mL målebægre
6 bægerglas e.l. (25 mL)
12 bægerglas til søjleelueringsvæsken og buffer
Demineraliseret vand



Teori

Søjlekromatografi er en metode, hvor molekylerne adskilles efter størrelse og form. Ved søjlekromatografi føres opløsningen med det eller de ønskede produkter gennem en søjle. Opløsningen kaldes den mobile fase og søjlematerialet kaldes den stationære fase. Eftersom forskellige stoffer ikke bindes lige stærkt til søjlematerialet, kan man adskille de pågældende stoffer. Metoden benyttes ofte til at adskille proteiner, polysaccharider og nukleinsyrer. Søjlematerialet, kaldet matrix, er det, der adskiller stofferne. I bunden af søjlen, lige inden tuden findes en lille membran eller porøs plade, der sikrer at matrix forbliver i søjlen, mens elueringsbuffer og opløste stoffer kan passere.

Når man skal benytte søjlen skal den først pakkes. Matrix opløses i en buffer og denne 'grød' hældes forsigtigt ned i søjlen, så man ikke får bobler, men pakkes godt. Når først søjlen er pakket skal den holdes fugtig, således at søjlematerialet ikke revner. Hvis først det sker, skal søjlen pakkes om.

Gelfiltreringsmaterialet, matrix, består af mikroskopiske små perler med porer og kanaler. Jo større molekyler desto sværere vil de have ved at passere gennem materialet, - derimod passerer de udenom perlerne. Små molekyler derimod trænger ind i perlernes porer og kanaler. Det betyder, at store molekyler elueres først.

Ud over størrelsen har molekylernes form også betydning for hvor hurtigt de passerer gel-materialet, idet de mest kompakte molekyler vil passere hurtigst.

EdvoKit nr. 204: Søjlekromatografisk adskillelse af RNA og DNA

Formålet med dette forsøg er ved gelfiltreringskromatografiens hjælp at oprense plasmidDNA fra en blanding, som er kontamineret med RNA. Plasmidet er et rundt DNA-molekyle med en molekylvægt på 2 millioner. RNA består af forskellige stumper af mRNA, rRNA og tRNA, som har molekylvægt indenfor 30.000 og 100.000. I prøven er der også to farvestoffer med forskellig molekylvægt, som vil gøre det muligt, at følge adskillelsen. Som helhed er matrix beregnet til at adskille nukleinsyrer mellem 20.000 og 5 millioner.

Efter kromatografien vil elueringsprodukterne blive analyseret ved hjælp af gelelektroforese. Agarose adskiller ligeledes nukleinsyrer efter deres form og størrelse. Men ved elektroforesen er man i stand til at adskille meget små mængder. I agarosegelen er der en masse små porer og molekylerne vil bevæge sig gennem disse mod den positive pol.

Læs mere om søjlekromatografi i bl.a. Kim Bruun m.fl.: *'Grundbog i Bioteknologi 2'* side 57 ff, Gyldendal 2012

Gelmaterialer

Der findes en lang række søjlematerialer som har forskellige egenskaber.

Søjlematerialet består grundlæggende af en matrix, et porøst fast stof, som helst ikke skal påvirke proteinets struktur. De mest brugte søjlematerialer er polysaccharider som dextran, agarose eller cellulose eller syntetiske polymerer som fx polyacrylamid (PAA) og polystyren.

Man kan binde forskellige molekyler, ligander, til gelmaterialet ved elektronparbindinger, hvorved gelen kan binde proteiner forskelligt.

Gelfiltrering: Proteinerne adskilles udelukkende ved deres størrelse. De største proteiner vandrer hurtigst gennem gelen fordi de vandrer gennem de største porer imellem søjlematerialet. De mindre proteiner vandrer gennem de mindre porer i selve gelmaterialet. Derfor får de en længere vej gennem gelen.

Elevvejledning

Materialer og udstyr pr. gruppe:

1 stativ med holdere
1 søjle
12 mikrocentrifugerør
2 engangspipetter
1 bægerglas
1 5 eller 10mL pipette
1 pipettehjælper
1 bægerglas med 5 mL matrix
1 bægerglas med 50 mL elueringsbuffer
1 mikrocentrifugerør med 0,12 mL prøve
1 mikrocentrifugerør med 0,5 mL vand – eller man aflæser selv, hvor 0,5 mL er på et mikrocentrifugerør
Elektroforeseudstyr

Søjlerne pakkes

Sæt søjlen fast i et stativ
Bland matrix grundning ved at røre og hvirvle
Med en 5 eller 10 mL pipette pipetteres al matrix forsigtigt over i søjlen. Lad det glide roligt ned langs tragten på søjlen.
Hvis flowet af matrix stopper pga. en luftboble eller lignende stoppes fyldningen. Der bankes på søjlen indtil luftboblen er væk og matrix atter glider.
Med en 5 eller 10 mL pipette tilsættes cirka 5 mL elueringsbuffer til tragten
Stil et tomt bægerglas under søjlen
Fjerne spidsen fra søjlens munding
Lad bufferen flyde gennem søjlen i ca. 10 minutter. Matrix vil pakkes
Sæt spidsen på igen
Matrix er færdigt med at pakkes, når det har 'sat sig'. Alt i alt vil der være cirka 3 mL pakket materiale.

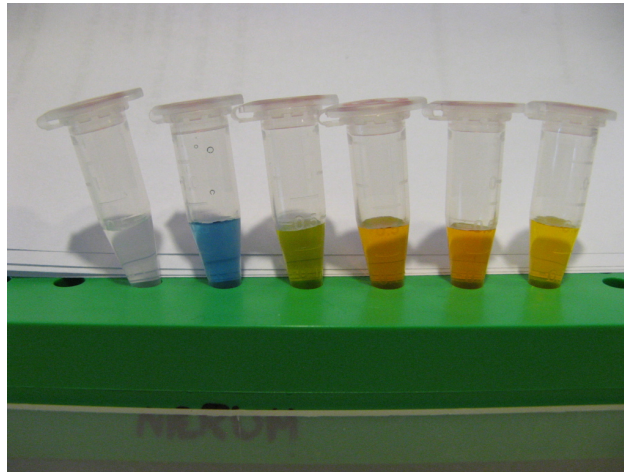


Forsøget kan stoppes midlertidigt her. **Det er vigtigt at sikre, søjlerne ikke tørrer ud.** Sørg for at der er buffer i tragten og dæk søjlen med plastikfolie.

Fraktionerne opsamles

Mærk 6 mikrocentrifugerør med 1-6 og jeres initialer
Fjern forsigtigt bufferen, der står over det pakkeede materiale. Undgå at forstyrre matrix. Overfladen af det pakkeede skal være tør

Tilsæt indholdet af 'sample' til tragten over det pakkede materiale. Lad det dryppe ned langs søjlens væg
Stil et bægerglas under søjlen
Fjern spidsen fra søjlens munding. Materiale vil nu gå ind i det pakkede materiale. Når **alt** er trængt ind sættes spidsen på igen.
Tilsæt drypvis buffer til tragten indtil den er næsten fuld
Undersøg, hvor meget 0,5 mL er i et mikrocentrifugerør.
Hold røret, der er mærket '1', under søjlen. Fjern spidsen. Lad røret fylde med 0,5 mL af det, der kommer ud af søjlen.
Skift til rør '2' og lad dette fylde med 0,5 mL fra søjlen. Fortsæt på tilsvarende vi med rør 3-6.
Efterhånden som farten deler søjlen op tilsættes mere buffer til tragten, så der hele tiden er et konstant flow.
Når alle 6 rør er fyldt, sættes spidsen på igen.



Forsøget kan stoppes her og de 6 fraktioner fryses indtil elektroforesen køres.

Der gøres klar til elektroforesen

Mulighed I:

Alle fraktioner analyseres i elektroforesen

Mærk 6 mikrocentrifugerør 1-6.

Overfør 50µL fra hver fraktion til det tilsvarende mærkede mikrocentrifugerør

Husk at skifte pipettespids mellem fraktionerne

Tilsæt 5µL 10x Gel loading solution til hver prøve. Bland godt ved at knipse på rørene

De 6 fraktioner er nu klar til elektroforesen

Mulighed II:

Kun peak-fraktionerne analyseres i elektroforesen

Mærk 2 mikrocentrifugerør med hhv. 'X' og 'Y'

Find den fraktion der er mest blå ved at holde rørene med fraktionerne op mod en lys hvid baggrund

Overfør 50µL af den mest blå fraktion til rør 'X'

Find den fraktion der er mest orange ved at holde rørene med fraktionerne op mod en lys hvid baggrund

Skift pipettespids og overfør 50µL af den mest blå fraktion til rør 'Y'

Tilsæt 5µL 10x Gel loading solution til hver prøve. Bland godt ved at knipse på rørene

Prøverne er nu klar til elektroforesen



Forsøget kan stoppes her og de klargjorte prøver fryses indtil elektroforesen køres. Husk at sikre at alle grupper har mærket deres rør tydeligt.

Elektroforese og tolkning

Støbning af geler:

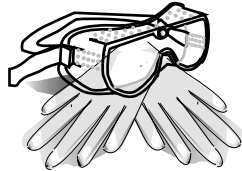
- Forsegl enderne af gel-holderen enten med de tilhørende dele eller med malertape. Vær sikker på at tapen er tæt og glat. Sørg for at gel-holderen står vandret.
- Sæt kammen i ca. 2cm fra den ene ende.
- Beregn hvor meget agaroseopløsning der skal bruges - bemærk gelen skal være så tyk, at kammen når ca. 1 mm ned i gelen.
- Fremstil en 1 % agaroseopløsningen ved at afvejen fx 0,5g agarose i 50 mL elektroforesebuffer*. Opvarm i mikrobølgeovnen - ca. 1/2 minut ad gangen indtil væsken er helt klar (og koger)
- Lad væsken afkøle til ca. 60°C – dvs. så det er muligt at holde på flasken
- Hæld den varme gel op og lad den størkne i ca. 20 minutter.
- Fjern forsigtigt kammen fra gelen ved at vippe den frem og tilbage, mens den løftes **lodret** op.
- Fjern støbeenderne/tapen.
- Sæt gel-holderen med gelen i elektroforesekarret.

Elektroforesen startes

- Fyld elektroforesebuffer i karret
- Load prøverne – sørg for at brøndene fyldes helt op - dvs. load ca. 30 µL
- Noter hvad der er i hvilken brønd!
- Start elektroforesen – og kørs fx 55 minutter ved 125V

EdvoKit nr. 204: Søjlekromatografisk adskillelse af RNA og DNA

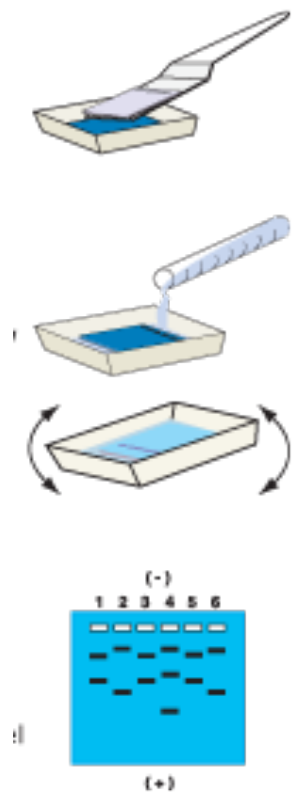
- Når elektroforesen er færdig slukkes strømforsyningen og ledningerne tages ud.
- Flyt gelen fra elektroforesekarret til et lille kar til farvning (evt 14x14 cm vegebåd). Gelen dækkes med ca. 75 mL 1xFlashBlue™farve. Hæld mere farve i, hvis gelen ikke er helt dækket



Brug handsker og sikkerhedsbriller ved farvningen

Farvning med FlashBlue™ og tolkning:

- Lad gelen stå i 5 minutter i FlashBlue farven.
- Flyt gelen til et nyt lille kar (evt. 14x14 cm vegebåd) og fyld godt op med destilleret/demineraliseret vand. Bevæg karret jævnlige – brug eventuelt vippebord.
- Lad gelen stå i 20 minutter. Mørkeblå DNA-bånd vil langsomt dukke frem i takt med, at farven vaskes ud af gelen. Skift eventuelt skyllevand et par gange undervejs.
- Placer gelen på et lysbord. Analyser resultatet. Tag et billede af gelen



* Der kan benyttes TAE-buffer eller TBE-buffer. Man skal sikre sig, at der benyttes den samme buffer til gelstøbningen som til selve elektroforesen. I dette kit fra Edvotek benyttes **TAE-buffer**.

Arbejdsspørgsmål:

Hvorfor elueres det meste af det blå farvestof sammen med plasmidDNA?

Hvorfor elueres RNA efter DNA?

Kom med forslag til metoder, der kan forbedre separationen af RNA og DNA