

1. BAKTERIO PATOGENOEN DNAREN ERAUZKETA

Bakterioen DNA erazteko hainbat metodo existitzen dira. Metodo batzuk beste batzuk baino konplexuagoak dira eta denbora gehiago behar dute protokoloa egiteko, baina lortzen den DNAREN kalitatea ere desberdina da. Atal honetan bi metodo deskribatuko ditugu DNA kromosomikoa erazteko: irakite-metodoa, oso azkarra eta purutasun txikikoa, baina hainbat prozedurarako nahikoa (PCRa), eta CTAB metodoa, luzeagoa baina purutasun handikoa, beharrezkoa beste teknika batzuk egiketo, hala nola murrizte-entzimen bidezko digestio. Horretaz gain, DNA plasmidikoa erazteko protokolo komertzial bat sartu dugu, *Acinetobacter baumannii*-ri egokituta.

1.1. IRAKITE- METODOA

Materialak

- Bakterioen hazkuntza agar plaka batean
- Ereite uztaia
- Estufa 37 °Ctan
- 1,5 ml-ko eppendorf hodi esterilak
- Pipetak eta erabili eta botatzeko punta esterilak
- 100°Cak hartzen dituen plaka beroemailea
- Zentrifuga

Disoluzioak

- Ur molekularra autoklabatuta



**MATERIALAK
ETA
DISOLUZIOAK**

Protokoloa

1. Lagin bakoitzeko eppendorf esteril bat prestatu, eta 100 µl ur molekular autoklabatuta gehitu
2. Ereite uztai batekin kolonia batzuk hartu agar plakatik eta eppendorfean sartu ereite uztaia ur molekularrean astinduz. Pipeta bat erabili esekidura homogeenoa bat lortzeko .
3. 100°Ctara berotu 15 minutuz.
4. 900 µl ur molekular esterila gehitu eppendorf bakoitzera eta homogeneizatu
5. Zentrifugatu 5 minutu 12.000 rpm-tan
6. Gainjalkina batu eppendorf esteril batean.

PCR erreakzio bakoitzeko gainjalkin honen 1-5 µl erabiltzen dira.

1.2. DNA KROMOSOMIKO PURUEN ERAUZKETA

Materialak

- Kultur bakterianoa agar plaka batean
- Ereite uztaia
- Pipetak eta erabili eta botatzeko punta esterilak
- 1,5 ml-ko eppendorf esterilak
- Zentrifuga

Disoluzioak

- kloroformo: isoamilalkohola: kloroformo eta isoamilalkohola nahastu 24:1 proportzioan
- Fenol/ kloroformo: isoamilalkohola: Nahastu 1: 1 proportzioan fenol neutro saturatua eta kloroformo: isoamilalkohola (24:1) (b/b) diluzioa.
- CTAB/NaCl: Hexadecyltrimethylammonium Bromide %10ean eta 5M NaCl nahastu 1:1 proportzioan. Giro-tenperaturan gorde.
- RNAsa-ren disoluzioa (10 mg/ ml): Disolbatu agitazioan 100 mg RNAsa 10 ml ur destilatuan. Berotu 90 °Ctan 10 minutu DNAsak desaktibatzeko. Alikuotan banatu eta gorde – 20 °Ctan.
- K Proteinaren diluzioa (20 mg/ ml): Disolbatu agitazioan 100 mg K proteinasa 5 ml ur destilatuan. Alikuotan banatu eta gorde– 20 °Ctan

- TE pH 8.0: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA. Autoklabatu eta giro-temperaturan gorde.
- %10 SDS (p/b): 10 g SDS disolbatu 100 ml ur destilatuan. Giro-temperaturan gorde.
- 5M NaCl: 292.2 g NaCl disolbatu litro bateko bolumen osoan. Autoklabatu.
- Ur molekularra autoklabatuta



Protokoloa

1. ereite uztaiarekin kolonia batzuk hartu agar plaka batetik eta 500 μ l TE-n eseki eta homogeneizatu esekidura homogeneo bat lortzeko.
2. %10 SDS 30 μ l gehitu eta ondo nahastu
3. K proteinasa (20 mg/ml) 3 μ l gehitu eta inkubatu 60 minutu 37 °Ctan
4. 5 M NaCl 100 μ l gehitu eta nahastu aparra sortzen; gero CTAB/NaCl 80 μ l gehitu eta nahastu saiodiari buelta eman. Inkubatu 10 minutu 65 °Ctan
5. fenol/kloroformo:isoamilalkohola (25/24:1) disoluzioaren bolumen bat gehitu, nahastu eppendorfari buelta eman eta zentrifugatu 5 minutu 8000 rpm-tan. Goiko fasea batu interfasea ikutu barik.
6. errepikatu 5. urratsa
7. RNAsa gehitu 50 μ g/ml bukaerako kontzentrazio batera; inkubatu 30 minutu 37 °Ctan

8. errepikatu 5. urratsa
9. kloroformo: isoamilalkohol (24:1) disoluzioaren bolumen berdina gehitu; eppendorafari buelta eman, zentrifugatu eta goiko fasea batu. Lortzen den bolumena kontutan hartu behar da.
10. Prezipitatu 1/10 bolumen azetato sodiko eta 2 bolumen etanol izoztua gehituz. Prezipitatzen da -20° Ctan gau osoan eta -80° Ctan ordu batean.
11. Zentrifugatu 12.000 rpm-tara 20 minutu.
12. Etanola batu eta baztertu, eta lehortzen utzi 37 °Ctan.
13. Eseki 50-200 µl TE-n eta -20 °Ctan gorde.

DNA hori erabiltzeko kuantifikatu eta purutasunaren gradua aztertu behar da (arazo eta soluzioen gida ikusi).

1.3. DNA PLASMIDIKOAREN ERAUZKETA (“Plasmid Mini Kit Qiagen”
Protokoko komertziala *Acinetobacter baumannii*-rentzako egokituta.

Materialak

- Bakterio-kultura saldan
- Ereite uztaia
- Estufa 37 °Ctan
- 1,5 ml Eppendorf esterilak
- Pipetak eta erabili eta botatzeko punta esterilak
- 100°C-ak hartzen dituen plaka beroemailea
- Zentrifuga
- Plasmidoak erauzteko Kit komertziala (QUIAGEN Plasmid Midi kit)

Disoluzioak

- Ur molekularra autoklabatuta
- % 9 NaCl soluzio salinoa
- TES: 0.01M Tris pH7.8, 0.05M EDTA, %0,5 SDS
- K Proteinasa (stock 50mg/ml ur destilatuan)
- TE: 10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1mM EDTA

1. Bakterioen ereinketa.

1.1. Kolonia 1 erein 10 ml salda aberats batean, eta inkubatu 37 °Ctan gau osoa 140–300rpm-ko mugimenduarekin

2. Zelulen bilketa eta garbiketak.

2.1. kulturaren 10 ml zentrifugatu (10000 rpm - 10 min) eta gainjalkina bota.

2.2. Garbitu zelulen bilketa (*pellet*) 5 ml gatz-disoluzioarekin. Zentrifugatu (10000 rpm - 10 min), gainjalkina bota eta errepikatu garbiketa

3. Pelletaren tratamendua TESarein eta K proteinasarekin:

3.1. 1 ml TES gehitu eta *pelleta* eseki. 0.5 µl K proteinasa gehitu eta inkubatu 30 min 37° Ctan. Zentrifugatu (12000 rpm -10 min) eta gainjalkina baztertu.

4. Kit Qiagen. Fabrikatzailearen gomendioak.

4.1. *Pelleta* eseki 300µl P1* tanpoian.

4.2. P2* tanpoiaren 300 µl gehitu, gogor nahastu eppendorfari bueltak emanaz 4-6 aldiz, eta inkubatu 5 minutu giro-tenperaturan.

4.3. P3* tanpoiaren 300µl gehitu, gogor nahastu eppendorfari bueltak emanaz 4-6 aldiz, eta inkubatu 5 minutu izotzan.

4.4. Zentrifugatu (10000–13000 rpm - 10 min) eta DNA plasmidikoa duen gainjalkina batu.

4.5. Kit-ak daukan zutabea orekatu 1 ml QBT* tanpoiarekin. Grabitatez zeharkatuko du zutabea.

4.6. Gehitu 4.4 atalean lortutako gainjalkina zutabera. Batzen den likidoa baztertu

4.7. Garbitu zutabea 2 x 2ml QC* tanpoiarekin, eta batzen den likidoa baztertu.

4.8. Zutabetik DNA erauzi 800µl QF* tanpoiarekin.

4.9. Lortu den DNA prezipitatu 0.7 bolumen isopropanol gehituz giro tenperaturan. Nahastu eta zentrifugatu (10000 rpm-30 min). Gainjalkina poliki hartu etz baztertu.

4.10. DNA *pelleta* garbitu % 70 etanol ml batekin eta zentrifugatu (10000 rpm - 10 min)

4.11. Gainjalkina poliki hartu eta baztertu eta *pelleta* lehortzen utzi giro tenperaturan behar den denbora etanol guztia lurrundu arte

4.12. *Pelleta* diluitu poliki-poliki (DNA ez apurtzeko) TE* pH 8.0 tanpoiarekin

*** Kiteko bufferren osagaiak.**

Buffer	Konposizioa	Gordetzeko kondizioak
P1Buffer (esekitzeko tanpoia)	50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100µg/ml RNase A	2-8°C, RNase A gehitu eta gero
P2 Buffer (lisiaren tanpoia)	200 mM NaOH, 1%SDS(p/b)	15-25°C
P3Buffer (neutralizatzeko tanpoia)	3.0M potasio azetatoa pH5.5	15-25°C o 2-8°C
QBT Buffer (orekatzeko tanpoia)	750mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7.0 ; %15 isopropanol(b/b); %0,15 Triton X-100(b/b)	15-25°C
QC Buffer (garbiketarak egiteko tanpoia)	1.0mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7.0; %15 isopropanol(b/b)	15-25°C
QF Buffer (erauzteko tanpoia)	1.25 M NaCl; 50mM Tris-Cl, pH 8.5;15% isopropanol(b/b)	15-25°C eta erabiltzeko orduan 65 °C pisu molekular altuko plasmidoak erauzteko.
TE	10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1mM EDTA	15-25°C