**Labjournaal praktijk 6-12-2017**

**Doel:**

Dit labjournaal is van toepassing op: ‘het verkrijgen van DNA uit verschillende plantensoorten’.

**Materiaal:**

* Homogenizatie buffer 100 mM NaCl, 200 mM Sucrose, 10 mM EDTA, 330 mM Tris-HCl

(pH 8.0)

* Lysis buffer 250 mM EDTA, 2.5% SDS, 500 mM Tris (pH 9.2)
* 3 M K-acetaat (pH 4.7) Voeg 14.72 gram KAc toe aan 20 mL steriel water, langzaam en

genoeg azijnzuur toevoegen om 45 mL te maken. pH controleren en aanvullen tot een eindvolume van 50 mL met steriel water.

* Binding Buffer (BB) 2 M guanidine hydrochloride in 95% EtOH
* Buffer PE (wasbuffer) 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 met 80% Ethanol
* Buffer EB (elutie buffer) 10 mM Tris-HCl, pH 8.5

*Deze buffers kunnen na filtersterilizatie worden bewaard bij kamertemperatuur*

* RNase 100 mg/mL in Tris-HCl (pH 8.0). Bewaren bij 4°C

**Pipetteerschema:**

Extractiebuffer maken:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Extractiebuffer | Homogenizatiebuffer | Lysisbuffer | RNase |
| 403 ql 🡪 200 ql + 200 ql + 3 ql | | | |

* Herhaal dit 2x

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Extractiebuffer | plantenmateriaal | 3M Kalium-acetaat |
| 403 ql + 0,3 g + 130 ql | | |

* Herhaal dit 2x

|  |  |
| --- | --- |
| Supernatant | Binding buffer |
| 450 ql + 675ql | |

* Herhaal dit 2x

|  |
| --- |
| Collection tube + 30 ql voorverwarmd steriele elutiebuffer |

* Herhaal dit 2x

**Bevindingen:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Epje | 1 | 2 |
| Plantenmateriaal (mg) | 0,3 | 0,3 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Epje | 3 | 4 |
| Supernatant (ql) | 450 | 450 |

**Berekeningen:**

Berekening binding buffer:

450ql supernatant \* 1,5 = 675 ql binding buffer.

**Resultaten:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Epje | OD260/OD280 | Concentratie |
| 5 | 1,732 | 11,000 |

**Discussie:**

Er zijn tijdens de labpraktijk een paar fouten gemaakt:

* Bij het pipeteren is er lucht opgezogen i.p.v. het extractiebuffer
* We hebben de elutiebuffer te laat voorverwarmd waardoor de elutiebuffer geen 65 graden is geweest.

Aanpassing aan het protocol:

Voordat het practicum begon moest er eerst aanpassing gedaan worden aan het protocol:

100 mg plantenmateriaal is 300 mg plantenmateriaal geworden.

**Conclusie**:

De conclusie volgt na lab praktijk 1.4.