

Plazmidy a izolace plazmidové DNA

Plazmidy jsou autonomní kovalentně uzavřené kružnicové dsDNA replikony, které se nachází v bakteriích. Spolu s chromozomální DNA tvoří genom bakteriální buňky a stabilně se dědí na potomstvo v extrachromozomálním stavu. Na rozdíl od chromozomální DNA jsou pro buňku postradatelné. Na každém plazmidu je specifické místo začátku replikace (*ori*), dále místo (*inc*), kterým se připojuje k membráně. Plazmidy nesou geny kódující enzymy, které se uplatňují při iniciaci replikace (např. endonukleázu štěpící v místě *ori* jeden polynukleotidový řetězec). Nejčastěji však nesou geny, kódující faktory rezistence k antibiotikům (např. ampicillinu, chloramfenikolu, tetracyklinu, kanamycinu apod), což jsou enzymy inaktivující antibiotika acetylací nebo adenylací, nebo je hydrolyzují (např. β -laktamáza hydrolyzuje penicilin nebo ampicilin). V bakteriální buňce se plazmidy nacházejí v jedné nebo více kopiích. Počet kopií v buňce je nepřímo úměrný velikosti plazmidu. Rozlišují se konjugativní a nekonjugativní plazmidy. Konjugativní plazmidy mají geny označované *tra* (transferové), které zprostředkovávají během konjugace přenos DNA z donorové do recipientní buňky. Geny *tra* ovlivňují fenotyp donorové buňky tím, že u donorové buňky kódují syntézu povrchových vláken nazývaných *pilusy*, které interagují s receptory v povrchu recipientní buňky a vytvoří takto můstek, jímž prochází DNA. Příkladem je F-plazmid u kmene *Escherichia coli* K12.

K přípravě vektorů jsou používány plazmidové DNA o nižší molární hmotnosti, neboť poskytují více kopií a snadněji se s nimi manipuluje. V současnosti jsou plazmidové vektory využívány ke klonování u bakterií např. *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas putida*.

Pro izolaci plazmidové DNA z buněk se používá řada různých metod. Všechny musí obsahovat tři základní kroky: růst bakteriální kultury, izolaci bakterií a jejich lyzi, izolaci a purifikaci plazmidové DNA.

Růst a množení bakteriální kultury obsahující plazmidový vektor

Plazmidy se obvykle izolují z bakteriální kultury rostoucí v médiu obsahující selekční faktor, kterým je nejčastěji antibiotikum. Vhodné je takové antibiotikum, které nepodporuje syntézu proteinů a buněčných komponent podílejících se na replikaci chromozomální dsDNA. Kultura pro izolaci DNA je čerstvě připravena inokulací jedné kolonie odpíchnuté z kultury na agarové plotně do živného bujonu nebo je inokulum nabráno ze suspenze kultury uchovávané při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Plazmidové vektory nejčastěji používané v současné době (např. pUC řada) se amplifikují jako vícekopiové replikony a je u nich možné dosáhnout vysokého výtěžku při izolaci z kultury, která rostla ve standardním živném médiu, např. Luria-Bertaniho (LB) bujonu, do logaritmické fáze růstu. Vektory dřívější generace (např. pBR322), které se nereplikují snadno, vyžadují selektivní amplifikaci prodlouženou kultivací kultury částečně rostoucí v médiu s chloramfenikolem. Chloramfenikol inhibuje syntézu

proteinů a tak zabraňuje replikaci velkého bakteriálního chromozómu, avšak replikace relaxovaných plazmidů pokračuje a počet jejich kopií se zvyšuje.

Lyze bakterií

Pelet bakterií je získán centrifugací a buňky jsou lyzovány jednou z mnoha metod zahrnujících působení detergentů, organických rozpouštědel, alkalického pH nebo tepla. Volba jedné z těchto metod závisí na velikosti plazmidu, bakteriálním kmeni a metodě, která bude následně použita pro purifikaci plazmidové DNA:

1. Velké plazmidy (> 15 kb), které jsou citlivé na poškození, by měly být izolovány metodou minimalizující působení fyzikálních sil (lyze dodecylsulfátem sodným).
2. Pro malé plazmidy je možné použít více metod. Po přidání EDTA a v některých případech lysozymu jsou buňky vystaveny působení detergentu a lyzovány varem nebo alkalicky. To způsobí denaturaci chromozomální DNA, která je obvykle již ve formě lineárních fragmentů. Naproti tomu vlákna plazmidové DNA, tvořená kovalentně uzavřenými molekulami se při denaturaci nerozcházejí.
3. Lyze varem není doporučována při izolaci plazmidů z bakteriálních kmenů produkujících endonukleázu A. Endonukleáza A není varem kompletně inaktivována a plazmidová DNA může být degradována během následných inkubací za přítomnosti Mg^{2+} . Tomuto problému lze předejít zařazením extrakce s fenol:chloroformem, protože vlákna plazmidové DNA jsou vzájemně propletená a mohou na rozdíl od lineárních fragmentů rychle renaturovat.

Izolace a purifikace plazmidové DNA

K oddělení plazmidové DNA od ostatních vysoko a nízkomolekulárních komponent se využívá skutečnosti, že dlouhá chromozomální DNA se spojí se zbytky zlyzovaných buněk a rychle klesá při centrifugaci na dno zkumavky. Kružnicová vlákna plazmidové DNA se při denaturaci nerozcházejí tolik jako chromozomální DNA a může rychle renaturovat. Proteiny odstraňujeme extrakcí směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a poté chloroform:isoamylalkohol (24:1). Precipitace DNA se provádí 96 % ethanolem po přidání 3M octanu sodného. RNA se odstraní působením pankreatickou RNázou. Vysoce čisté kovalentně uzavřené kružnicové DNA je možné získat po centrifugaci v gradientu CsCl-ethidiumbromid. Z dalších metod je možné použít pro purifikaci plazmidové DNA precipitaci polyetylglykolem, nebo komerční metody založené na afinitní chromatografii na kolonkách.

Obecně, během izolačních postupů je třeba dodržovat metodické postupy minimalizující degradaci DNA a omezující aktivitu endogenního působení nukleáz, tj. enzymů, které štěpí fosfodiesterovou vazbu nukleotidového řetězce. Proto je třeba správně volit iontovou sílu extrakčního a purifikačního roztoku a udržovat ji v průběhu celého experimentu. Udržovat optimální hodnotu pH

prostředí (většinou neutrální, tj. pH 7,0 až 7,5), neboť výrazně vyšší nebo nižší hodnoty pH způsobují denaturaci DNA.

To lze docílit následujícími kroky:

- prováděním izolace při nízké teplotě, obvykle chlazením na 4 °C, nebo manipulací na ledu.
- přidáním inhibitorů nukleáz, jako jsou např. EDTA, citronan sodný a jiné.
- zabráněním exogenní kontaminace mikroflórou používáním sterilního materiálu.

Rozpuštění a úchova izolované DNA

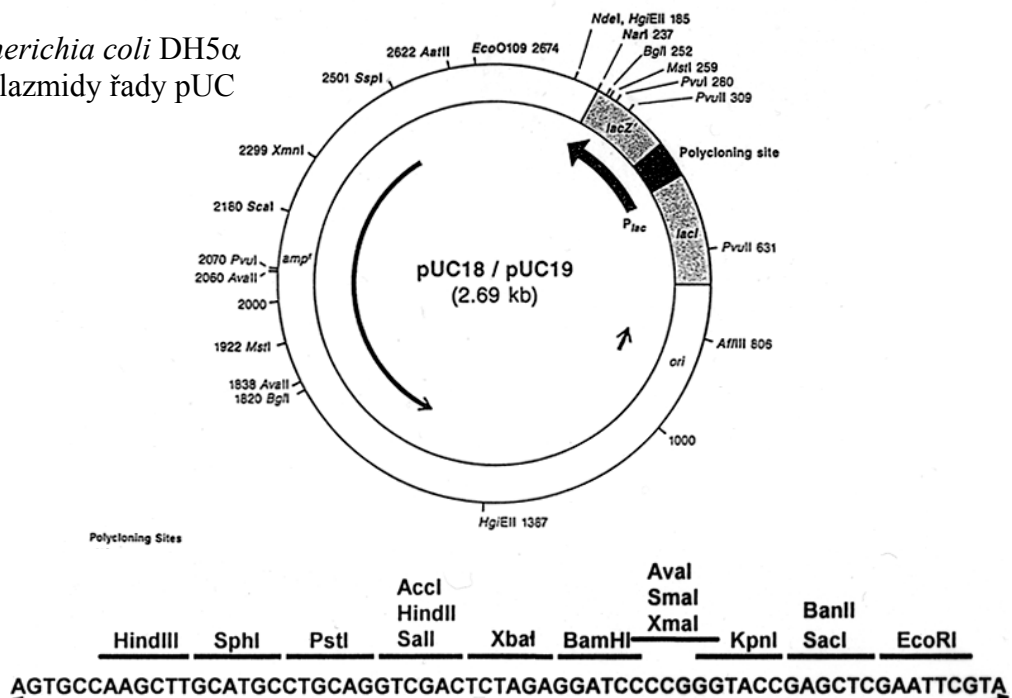
Izolovaná DNA se rozpouští v 10 mM Tris pufru, pH 7,0 – 8,0 přes noc při 4°C. Je vhodné rozpuštěnou DNA zahřát 10 minut při 65 °C, dochází k inaktivaci DNáz. Uchovává se při téže teplotě krátkodobě např. pro použití k transformaci. Plazmidová DNA se uchovává též při –20 °C dlouhodobě. Chromozomální DNA může být při této teplotě poškozena střížnými silami a tvorbou zlomů.

Využití plazmidů jako vektorů v genovém inženýrství.

Požadované vlastnosti plazmidových vektorů jsou:

- Autonomní replikace v bakteriální buňce a schopnost udržení cizorodé DNA při replikaci.
- Vhodné spektrum restričních míst
- Obsah genu kódujícího selektivní faktor např. Enzym štěpící glykan nebo znak rezistence k příslušnému antibiotiku.
- Plazmid nesmí být konjugativní tj. nesmí mít transferové geny, kódující pilusy.
- Co nejmenší velikost (2 –15 kb) a tvorba více kopií.

Kultura *Escherichia coli* DH5 α
Obsahující plazmidy řady pUC



POSTUP IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA u *E. coli* (pUC18) ALKALICKOU LYŽÍ

1.	Z 18hod. třepané kultury <i>E. coli</i> (pUC 18) narostlé v LB bujonu s ATB - (AMP 100 µg/ml) odebrat 1,5 ml suspenze do Eppendorf. mikrozkušavky.
2.	Centrifugujeme 12 000 rpm /5 min. Supernatant odlít pryč.
3.	Sediment resuspendujeme ve 100 µl chlazeného <u>roztoku A</u> (TEGLU-pufr), na vortexu nejprve důkladně promíchat, a pak teprve přidat lysozym na výslednou koncentraci 500 µg /ml a RNázu na výslednou koncentraci 10 µg /ml a opatrně promíchat- <i>ne na vortexu</i>
4.	Inkubace 5 min / 20 °C - (<i>vznik protoplastů</i>).
5.	Přidat 200 µl čerstvého <u>roztoku B</u> (NaOH+SDS), opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky. (<i>nesmí se míchat na vortexu</i>).
6.	Inkubace na ledu 5 min - (<i>dochází k lyzi buněk a denaturaci DNA</i>).
7.	Přidat 150 µl ledem vychlazeného <u>roztoku C</u> (K-acetát). Opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky.
8.	Inkubace na ledu 5 - 10 min – (<i>dochází k renaturaci plazmidové DNA</i>), chromozomální DNA vytváří komplex s proteiny a s SDS.
9.	Zcentrifugovat zbytky buněk a chromozomální DNA 12 000 rpm/5 min (<i>chlazený rotor</i>).
10.	Odebereme supernatant do čisté mikrozkušavky a odstraníme proteiny extrakcí stejným objemem směsi <u>fenol:chloroform</u> (1:1), promíchat převrácením, centrifugovat při 12 000 rpm/5 min (<i>chlazený rotor</i>), poté odebereme horní vodnou fázi a stejným způsobem ji zpracujeme chloroformem (tj. <u>Sevageovou směsí</u>), opět centrifugovat při 12 000 rpm /5 min (<i>chlazený rotor</i>).
11.	K horní vodné fázi přidat 1/10 objemu <u>3M octanu sodného</u> , promíchat a poté přidat 2 objemy vychlazeného <u>96% etanolu</u> , promíchat převrácením, nechat stát 10 min při - 70 °C) nebo 20-30 min při -20 °C.
12.	Centrifugace 12 000 rpm / 15 min/ 4 °C. Opatrně odstranit alkohol a k peletu přidat 1 ml <u>70% etanolu</u> , nechat stát 10 min při 20 °C.
13.	Opět zcentrifugujeme při 12 000 rpm/15 min/ 4 °C a rychle a opatrně odstranit alkohol. Plazmidový pelet v mikrozkušavce otočené dnem vzhůru nechat usušit, buď při pokojové teplotě, nebo dosušit ve vakuu (2 až 3 min.).
14.	Vysušenou DNA rozpustit ve 40 - 50 µl <u>TE pufru</u> (pH 8,0). Uchovat při -20 °C.

Složení roztoků:

Roztok A: 50mM glukóza, 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA (*chlazený*)

Roztok B: 0,2M NaOH, 1% SDS (*nutno připravit vždy čerstvý*)

Roztok C: 5M octan draselný, pH = 5,2 (*chlazený*)

Roztok 3M octanu sodného

TE pufr pH 8

Sevageova směs: chloroform : izoamylalkohol (24 : 1)

Media a roztoky používané při izolaci DNA plazmidů

LB - bujon (Luria-Bertani medium)

Složení na 1 000 ml:

Bacto tryptone	10 g	(1%)
Bacto yeast extract	5 g	(0,5%)
NaCl	10 g	(1%)

Rozpustit , upravit pH na 7,0 (pomocí 5M NaOH)

Autoklávkovat při 121 °C/15 - 20 min.

LB - agar (Luria-Bertani medium)

Složení na 1 000 ml:

Bacto tryptone	10 g	(1%)
Bacto yeast extract	5 g	(0,5%)
NaCl	10 g	(1%)
Agar	15 g	(1,5%)

Rozpustit , upravit pH na 7,0 (pomocí 5M NaOH)

Autoklávkovat při 121 °C/15 - 20 min.

Roztok A (TEGLU) -pufr (používat chlazený)

25 mM Tris-HCl (pH 8,0) S
10 mM EDTA (pH 8,0)
50 mM glukóza (m.v.= 180,16)

Autoklávkovat při 121 °C/15 min, úchova při 4 °C

Roztok B

0,2M NaOH
1% SDS (sodium dodecyl sulfáte)

Poznámka: připravuje se vždy čerstvý!

Roztok C (5M octanu draselného)

Složení na 100 ml:

5M octan draselný	60 ml
ledová kyselina octová	11,5 ml
deionizovaná voda	28,5 ml

Poznámka: před použitím je třeba roztok vychladit na ledu!

Sevageova směs:

Smíchat 24 díly chloroformu s1 dílem izoamylalkoholu.

70% Etylalkohol

Ředí se 96% etylalkohol příslušným množstvím destilované vody (nejlépe deionizované).

0,5M EDTA (Disodium ethylene diamine tetraacetate . 2H₂O)

Složení na 1000 ml:

Do 800 ml destilované vody (deionizované) přidat 186,1 g EDTA.

Na magnetické míchače důkladně rozmíchat.

Upravit pH na 8,0 přidáním asi 20 g pelet NaOH.

Sterilizovat autoklávkováním 121 °C/15 - 20 min

10% SDS (sodium dodecyl sulfáte)

Složení na 1 000 ml:

Rozpustit 100 g SDS v 900 ml destilované vody.

Zahřát na 68 °C. Upravit pH na 7,2 přidáním několika kapek koncentrované HCl.

Doplnit na výsledný objem 1 000 ml.

TE-pufr (Tris-EDTA)

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

IM TRIS-HCL

Složení na 1 000 ml:

Rozpustit 121,2 g Tris-base v 800 ml destilované vody. Upravit pH přidáním koncentrované HCl v množství dle požadované výsledné hodnoty pH:

pro pH 7,4 70 ml HCl

pro pH 7,6 60 ml HCl

pro pH 8,0 42 ml HCl

Po úpravě pH doplnit do výsledného objemu 1 000 ml. Sterilizace autoklávkováním při 121 °C/15 - 20 min.

Význam roztoků v procesu izolace plazmidu alkalickou lyzí:

Roztok A s glukózou je pufr, EDTA je inhibitor nukleáz a vychytává (váže) dvojmocné ionty Mg^{2+} , které působí jako kofaktory nukleáz.

Roztok B s NaOH je lyzační, zvyšuje pH směsi na 12 - 12,5, tím dochází k denaturaci fragmentované DNA, plazmidová DNA denaturuje částečně a reverzibilně.

SDS detergent dokončuje lyzi a účastní se odstranění proteinů

Roztok C s octanem draselným (K-acetátem) neutralizuje hydroxid, zdenaturovaná DNA renaturuje, tvoří komplex s proteiny a vysráží se. Aby sraženina zůstala v sedimentu a nezvyšovala se iontová síla vlastního lyzátu (supernatantu), je nutné pracovat při nízké teplotě.

směs fenol-chloroformu denaturuje proteiny, chloroform odstraňuje zbytky fenolu (fenol se může též odstranit dialýzou)

96% etanol sráží plazmidovou DNA a udrží ji vysráženou. V 70% etanolu se ve zbytkové vodě rozpustí všechny zbytky iontů solí.

Příprava roztoků.

Ampicilin: Navážka 100 mg/ml (rozpuští se v deionizované vodě) pro použití do LB-bujonu (10 μ l/10ml).

Lysozym: Navážka 10 mg/ml (rozpuští se v deionizované vodě) úchova při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (manipulace s pracovním roztokem na ledu).

Lysozym EC3.2.1.17; peptidoglykan N-acetylmuramoyl-hydroláza; muraminidáza. Enzym hydrolyzující β -1, 4-vazby mezi N-acetylmuraminovou kyselinou a 2-acetamido-2-deoxy-D-glukozovými zbytky v peptidoglykanových heteropolymerech (mukopolysacharid nebo muropeptid) stěny buněčné u prokaryot. Vyskytuje se v slzách a jiných exokrinních sekretech, ve velkém množství též v ptačím vaječném bílku. Antibakteriální účinky lysozymu spočívají v štěpení β (1-4) glykozidické vazby mezi střídajícími se jednotkami N-acetylmuraminové kyseliny a N-acetylglukozaminu, tvořících dlouhý řetězec peptidoglykanu. Existuje sedm typů lysozymu, označených A-G, všechny patří do rodiny laktalbumin/lysozymů.

RNáza: Navážka 10mg/ml (rozpuští se v deionizované vodě). Před použitím se zásobní roztok $10\times$ zředí na pracovní koncentraci 1 mg/ml. Úchova při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (manipulace s pracovním roztokem na ledu).