

Pracovní protokoly do předmětu Praktikum z molekulární biologie

(3. verze)

Zpracoval: Mgr. Tibor Botka, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta

Masarykova univerzita

Jméno:

Číslo vzorku:

1. Izolace a purifikace plazmidové DNA – příprava vektoru

A) Izolace DNA plazmidu metodou alkalické lyze:

Vysoké pH společně s lysozymem způsobí lyzi buněk a ireverzibilní denaturaci chromozomální DNA, která se vlivem mechanického poškození nachází v lyzované buňce především ve formě lineárních fragmentů. Naproti tomu plazmidová DNA zůstává ve formě kovalentně uzavřených kružnicových molekul, a protože jsou vlákna DNA vzájemně propletená v suprahelikální konformaci, mohou rychle renaturovat. Po odstranění RNA, proteinů a zbytků organických sloučenin využitých při extrakci, je plazmidová DNA precipitována koncentrovaným etanolem za přítomnosti nadbytku monovalentních iontů Na⁺. Takto ošetřená DNA se separuje centrifugací a po vysušení se rozpouští v TE pufru a skladuje při + 4°C.

Materiál:

Zdrojový kmen:

Plazmid:

1. Naočkovat jednu bakteriální kolonii do 2 ml LB media obsahujícího ampicilin (100 µg/ml). Inkubovat kulturu přes noc při 37 °C za intenzivního třepání.
2. Přenést 1,5 ml kultury do Epp. zkumavky. Centrifugovat při 12 000 rpm 5 minut při 4 °C.
3. Odsát médium tak, aby bakteriální pelet zůstal co nejsušší.
4. Resuspendovat bakteriální pelet ve 100 µl roztoku A s obsahem RNázy o výsledné koncentraci 10 µg/ml.

VÝZNAM:

5. Přidat lysozym do konečné koncentrace 500µg/ml. Promíchat a inkubovat 5 min / 37 °C.

VÝZNAM:

6. Přidat 200 µl čerstvě připraveného roztoku B. Promíchat a uložit zkumavku na ledu 5 min.

VÝZNAM:

7. Přidat 150 µl roztoku C předem vychlazeného na ledu.

VÝZNAM:

8. Promíchat několikerým převrácením zkumavky. Uložit zkumavku na ledu 5 -10 min.
9. Centrifugovat při 12 000 rpm /10 min/4 °C. Přenést supernatant do čisté zkumavky.
10. Přidat stejné množství fenol-chloroformu, promíchat min. 1 min a centrifugovat při 12 000 rpm/5 min/4 °C. Při manipulaci s fenolem použít vhodné ochranné pomůcky!

VÝZNAM:

12. Přenést horní vodnou fázi do čisté zkumavky. Přidat stejné množství Sevageovy směsi, promíchat min. 1 min a centrifugovat při 12 000 rpm/5 min/4 °C. Při manipulaci s chloroformem použít vhodné ochranné pomůcky!

VÝZNAM:

13. Přenést horní vodnou fázi do čisté zkumavky. Přidat min. 1/10 objemu 3 M octanu sodného pH 5,2, promíchat a vysrážet dsDNA min. dvěma objemy vychlazeného 96% ethanolu. Nechat směs stát 20 min při - 20 °C.

Jméno:

Číslo vzorku:

14. Centrifugovat vysráženou DNA při 12 000 rpm/15 min/4 °C. Odlít ethanol.
15. Promýt 1 ml 75% ethanolu bez porušení peletu, nechat stát 30s.
16. Odsát ethanol, odstranit všechny kapky ze stěn zkumavky a zkumavku nechat vyschnout v termobloku při teplotě 50 °C.
17. Rozpustit DNA v 40 µl TE pufru pH 8,0. Uchovávat při +4 °C.

B) Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Spektrofotometrické stanovení je založeno na poznatku, že roztoky DNA pohlcují UV záření. Záření je pohlcováno pyrimidinovými a purinovými bázemi DNA. Dochází k excitaci jejich chemických vazeb, což má za následek postupnou degradaci DNA. Množství pohlceného UV záření je přímo úměrné koncentraci DNA v roztoku a vyjadřuje se hodnotami absorbance:

$$A = \log I_0/I$$

kde I_0 je množství vcházejícího světla, a I je množství světla propuštěného. Nejpřesnější je stanovení absorbance v rozmezí od 0,1 do 1,0.

DNA vykazuje nejvyšší absorbanci při vlnové délce 260 nm. Výhodou spektrofotometrického stanovení je jeho přesnost a současná možnost posoudit čistotu preparátu. Čistotu DNA lze stanovit z poměrů absorbancí při různých vlnových délkách. Pro čistou DNA platí tyto hodnoty:

$$A_{260}/A_{280} = 1,80 \text{ až } 1,85$$

$$A_{260}/A_{230} = 2,00 \text{ až } 2,20$$

Pro čistou RNA platí poměr: $A_{260}/A_{280} = 2,0$.

Při výskytu reziduálních proteinů jsou vypočtené poměry absorbancí výrazně nižší a koncentraci DNA nelze přesně stanovit. Při výskytu reziduální RNA jsou hodnoty A_{260}/A_{280} vyšší než 1,9.

Pozn.: Při měření na Nanodropu lze hodnoty považovat za relevantní při koncentraci DNA nad 20 ng/µl.

1. Plazmidovou DNA nejprve dobře promíchat pomocí pipetování a provést mžikovou centrifugaci (max 6000 rpm/0).
2. Nastavit blank pomocí použitého elučního pufru.
3. Nastavit pipetu na 2,1 µl a změřit koncentraci.

C NEŘEDĚNÝ (ng/µl)	ředění	C ŘEDĚNÝ (µg/ml)	A260/A280	výtěžek (µg)

Výpočet výtěžku DNA (µg):

Závěr:

Jméno:

Číslo vzorku:

2. PCR – příprava inzertu

PCR umožňuje získat požadovanou specifickou sekvenci bez klonování. PCR využívá základních rysů replikace DNA: Jako templát slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec. K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA. Tím je vymezen úsek, který bude amplifikován. Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií), což vede k nesmírně rychlé amplifikaci původní molekuly. Množství DNA jakožto výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než 1 µg genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula (proto je nutné vyhnout se kontaminaci). Průběh reakce vyžaduje cyklické střídání teplot, ke kterému dochází v termocyklerech, většinou se provádí 25 - 60 cyklů. Jako polymeráza se používá *Taq* DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotě 94 °C.

Průběh jednoho cyklu:

1. denaturace 95 °C (VÝZNAM:.....)
2. připojení primerů (30 - 65 °C) teplota určuje specifičnost a závisí na sekvenci primeru. $T_a = T_m - 5$ °C
3. polymerační reakce (65 - 75 °C)
4. nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus

Amplifikace genu pro chaperon Hsp60

Složky reakční směsi	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství v 25 µl / 1 vzorek (doplňte)	Množství vµl / vzorků (doplňte)
Deionizovaná sterilní H ₂ O				
Pufř pro PCR s MgCl ₂	10 ×	1 ×		
MgCl ₂	25 mM	0 mM		
dNTP	2 mM	200 µM		
Primery: H279 H280	10µM	0,4 µM každý		
Taq DNA-polymeráza	5 U µl ⁻¹	1 U		
Templátová DNA	100 × řed. DNA <i>S. aureus</i>	50 ng		Rozplnit po 22 µl a přidat 3 µl DNA

Podmínky: poč. denaturace 95°C 30s; 30 cyklů: 94°C 30s, 54°C 30s, 72°C 50s; 72°C 3min

3. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami – linearizace vektoru

Restrikční endonukleázy (zkr. restriktázy, RE): sekvencně specifické endonukleázy štěpící fosfodiesterovou vazbu dsDNA v určité sekvenci nukleotidů. Původ: Převážně produkty bakterií. V laboratorní praxi se nejčastěji využívají restriktázy typu II, které mají na dsDNA shodné rozpoznávací místo s místem štěpení. Vznikají tak tři typy konců RE-fragmentů: tupé, přesahující 5'- konce a přesahující 3'- konce. Každý restrikční enzym vyžaduje optimální reakční podmínky. Hlavní faktory, které výrazně ovlivňují rychlost a specifičnost štěpení, jsou teplota a složení reakčního pufřu. Pokud nejsou dodrženy optimální reakční podmínky, může se u některých restrikčních endonukleáz projevit relaxovaná specifita, kdy dochází ke štěpení v sekvencích podobných místu rozpoznávanému za optimálních podmínek. Restrikční enzymy i pufřy se skladují při -20 °C, pufřy jsou obvykle dodávány jako 10× koncentrované zásobní roztoky. Reakce se obvykle provádí s 1 - 5 µg DNA v celkovém objemu 20 µl reakční směsi. Budou připraveny **dvě reakční směsi, jedna pro prázdný vektor (každý vlastní vzorek) a jedna pro rekombinantní vektor (jeden vzorek na pracovní skupinu)**.

1. Roztok DNA smíchat ve sterilní Epp. zkumavce se sterilní destilovanou vodou tak, aby v reakční směsi o objemu 16 µl bylo 5 µg pDNA.
2. Přidat 2 µl 10× koncentrovaného restrikčního pufřu a dobře promíchat.
3. Přidat 6 jednotek restrikčního enzymu *EcoRI* a dobře promíchat (obvykle 2 µl při konc. 3 U/µl)

Jednotka enzymu je obvykle definovaná jako množství enzymu vyžadované pro kompletní rozštěpení 1 µg DNA během jedné hodiny v doporučeném pufřu a při doporučené teplotě v 20 µl reakční směsi.

4. Inkubovat 37 °C/120 min.
5. Reakci zastavit zahřátím reakční směsi na 70 °C po dobu 10 min.

Jméno:

Číslo vzorku:

4. Gelová elektroforéza – ověření produktů RE štěpení a PCR

Metoda se používá k separaci, identifikaci a purifikaci molekul DNA. Jako nosič se nejčastěji používá agaróza a polyakrylamid. Elektroforéza DNA je používána jak k analytickým účelům, tak k preparativním účelům. Pohyb DNA během elektroforézy je ovlivněn řadou parametrů:

a) Velikost molekuly DNA: čím větší molekula, tím pomaleji se v gelu pohybuje. Molekuly DNA nad 20 kb nelze standardní elektroforézou navzájem oddělit; v těchto případech se používá pulzní gelová elektroforéza, kterou lze oddělit DNA až do velikosti několika Mb.

c) Rychlost pohybu je závislá na konformaci DNA. Různé formy DNA (ccc, oc a lineární) se pohybují různou rychlostí.

c) Intenzita elektrického pole (5 V/cm.): při nízkém napětí je rychlost pohybu přímo úměrná napětí. Zvyšování napětí vede k nelineárnímu zvýšení rychlosti pohybu a oblast efektivního rozdělení se snižuje.

d) Teplota a zastoupení bází v DNA. Elektroforetické chování DNA v agarózových gelech není významně ovlivněno zastoupením bází nebo teplotou. Nejčastěji se elektroforéza provádí při pokojové teplotě; při použití gelů o nízké koncentraci se teplota udržuje na nižších hodnotách (4 - 10 °C).

Příprava agarózového gelu

1. V Erlenmayerově baňce připravíme 1,2 % roztok agarózy v TAE pufru: K odměřenému množství pufru (změříme rozměry zařízení na nalévání gelu a vypočteme množství roztoku agarózy potřebného k přípravě gelu o výšce 0,5 cm) přidáme správné množství práškové agarózy. Agarózu necháme v tlakovém hrnci rozvařit 10 - 15 min.

3. Roztok zchladíme na 50 °C a nalejeme do zařízení na tvorbu gelu, které je umístěno na vodorovném podkladu. Zkontrolujeme, zda mezi podložkou a hřebínkem je 0,5 - 1 mm agarózy.

4. Necháme gel zchladnout 30 - 45 min (podle okolní teploty).

5. Gel přeneseme do elektroforetické vany.

6. Gel převrstvíme TAE pufrům tak, aby překrýval gel přibližně o 3 mm a opatrně vytáhneme hřebínek.

Nanesení vzorku do agarózového gelu a provedení elektroforézy

1. Nanášíme vzorky, které smícháme s 1/6 celkového objemu nanášecího pufru a nanese do jamky. Jamka musí být předem převrstvená TAE pufrům!

A) 10 µl neštěpené plazmidové DNA (vektor), c = 500ng / µl, každý svůj vzorek

B) 10 µl štěpené plazmidové DNA (vektor), c = 250ng / µl, každý svůj vzorek

C) 10 µl štěpené rekombinantní plazmidové DNA, c = 250ng / µl, 1 vzorek na pracovní skupinu

D) 5 µl PCR amplikonu, 1 vzorek na pracovní skupinu

E) 5 µl negativní kontroly, 1 vzorek na pracovní skupinu

2. Naneseme marker 2-log (5 µl).

3. Nastavíme hodnoty napětí a necháme probíhat elektroforézu tak dlouho, dokud barvivo neurazí vzdálenost alespoň 3/4 délky gelu.

4. Po ukončení elektroforézy přeneseme gel do barvicí lázně (TAE pufr obsahující 1 µg etidiumbromidu/ml) a barvíme 20 min. **! Etidiumbromid je mutagen. Při práci s ním dodržujeme zásady bezpečnosti !**

5. Gel opláchneme vodou a fotografujeme pod UV světlem 302 nm.

6. DNA má pod UV světlem barvu **! Při práci s UV zářením používat ochranný štít !**

Objem gelu =

Použité napětí U =

Závěr:

Do odevzdávnosti: Elektroforetogramy s popsanými drahami (jednotlivé vzorky), markerem a proužky (konformace plazmidové DNA a PCR amplikonu). Popisky umístit mimo obrázek gelu po jeho stranách. Použít výřez, na kterém jsou odpovídající dráhy i marker.

Jméno:

Číslo vzorku:

5. Ultracentrifugace

Ultracentrifugace je separační metoda používaná k identifikaci, izolaci, purifikaci a charakterizaci biomakromolekul, buněčných organel, virů apod. Ultracentrifugací se rozumí odstředování při vysokých otáčkách, tj. při 20 000 - 100 000 ot/min. Nutné je přesné vyvážení protilehlých centrifugačních zkumavek (řádově v jednotkách mg). Z hlediska účelu lze centrifugaci rozdělit na: a) preparativní, kdy cílem je izolace nebo purifikace biomakromolekul. b) analytická, kdy cílem je identifikace případně charakterizace dané částice (např. stanovení její velikosti (mol. hmotnosti), sedimentačního koeficientu, vznášivé hustoty apod.). Pokud mají být navzájem odděleny částice lišící se navzájem svou velikostí (molekulární hmotností), probíhá centrifugace většinou v tzv. sacharózových gradientech. Nejčastěji se používají lineární gradienty 5 - 20% sacharózy. Vzrůstající hustota roztoku a tím i jeho viskozita eliminují odstředivé zrychlení působící na částice, jehož hodnota se směrem od osy otáčení zvyšuje. Gradient tak zajišťuje konstantní rychlost sedimentace částic, podmiňuje jejich stabilitu a snižuje difúzi usazených částic do okolí. V případě, že mají být vzájemně odděleny částice na základě své odlišné specifické hustoty, používá se gradientů chloridu cesného. Roztoky CsCl se vyznačují vysokou hustotou a při centrifugaci samovolně vytvářejí koncentrační a tím i hustotní gradient. Biomakromolekuly, které se na počátku centrifugace promíchají s roztokem CsCl, se při centrifugaci usadí ve vrstvě roztoku (gradientu), odpovídající jejich vznášivé hustotě.

Přepočet rpm na RCF:

$$RCF = 1,119 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

n = počet otáček za minutu (rpm)

r = poloměr rotoru (vzdálenost od středu otáčení)

1. Připravte roztoky (50 ml) sacharózy ve vodě o koncentraci např. 5, 15, 25, 35 a 45 % (w/v).
2. Koncentraci takto připravených roztoků zkontrolujte refraktometricky (w/w, tzv. stupnice Brix).
3. Roztoky obarvěte (odlišně) např. safraninem nebo krystalovou violetí.
4. Do tabulky vyplňte hodnoty koncentrací a indexu lomu, zjištěných refraktometricky.

vzorek č.	koncentrace % (w/v)	koncentrace % (w/w)	index lomu n_D^{25}	hustota ρ_{25} (při 25°C)
1				
2				
3				
4				
5				

Vypočítat hustotu podle vztahu: $\rho_{25} = 10,8601 \times n_D^{25} - 13,4974$ [g/cm³]

Úspěšně byl proveden postup vrstvení gradientů:

a) převrstvováním b) podvrstvováním c) mezivrstvením d) kombinace

Jméno:
Číslo vzorku:

6. Klonování – ligace a transformace

Klonování úseku DNA se provádí jeho ligací do vektoru a následným přenosem do recipientních buněk. Pro tento účel musí být plazmidový vektor linearizován, a to v místě polylinkeru v genu pro beta-galaktosidázu. Začlenění inzertu pomocí T4 ligázy vede k inaktivaci tohoto genu, čehož se využívá při selekci úspěšně připravených transformantů modro-bílým testem. Plazmidové vektory musí splňovat následující podmínky:

1. Autonomní replikace v bakteriální buňce a tvorba více kopií
2. Vhodné spektrum restričních míst
3. Přítomnost jednoho nebo více markerů pro selekci hostitelské buňky (např. rezistence na antibiotikum)
4. Velikost by měla být co nejmenší (zvýšení účinnosti transformace)
5. Plazmid nesmí být konjugativní

Jako recipientních kmenů pro klonování cizorodé DNA se nejčastěji využívá kmenů *E. coli*, u kterých byl navozen stav kompetence, což spočívá v pomnožení buněk v tekutém živném mediu (např. LB bujonu) do exponenciální fáze růstu, převedení buněk do roztoku CaCl_2 , v němž se buňky ponechají několik hodin, během nichž dojde k jejich vyhladovění a určitým změnám v buněčné stěně, umožňujícím přijmout externí DNA. Takto připravené buňky se převedou do roztoku CaCl_2 s přidávkem glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na -70°C .

Vzorky a jejich množství:

vzorek A: 50 ng neštěpeného vektoru	Každý svůj vzorek
vzorek B: 50 ng rekombinantního vektoru	Každý jeden vzorek
vzorek C: 50 μl vody (negativní kontrola)	2x / sem. skupina

Transformace

1. Stanovit titr kompetentních buněk na plotnách s MPA bez antibiotika pro ředění 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} (triplikáty).
2. Do mikrozkušavky pipetovat 200 μl kompetentních buněk.
3. Zkušavku umístit do ledové lázně.
4. Ke kompetentním buňkám přidat celý objem ligační směsi/ kontroly.
5. Mix lehce promíchat a ponechat v ledové lázni 30 minut.
6. Buňky podrobit tepelnému šoku 42°C / 1 min.
7. Zkušavku přenést do ledové lázně a přidat 1 ml LB bujonu.
8. Inkubovat 37°C / 45 min v třepacím termobloku* (* v případě využití *amp* rezistence zkrátit na 15 min).
9. Buňky zcentrifugovat 1 min / 12 000 rpm.
10. Supernatant odlít a ponechat zbytek média – cca 100 μl .
11. Suspenzi vysít pomocí bakteriol. hokejky na agarové plotny (LB agar, 50-100 μg ampicilinu /ml, X-gal a IPTG).
12. Plotny se inkubují 24-48 hod při 37°C .

Hodnocení (*titr buněk = počet kolonií na misce x obrácená hodnota ředění x násobek do 1 ml*):

1. stanovení titru kompetentních buněk:

průměrný počet kolonií na misce: 1.ředění:....., 2.ředění:, 3.ředění:

titr = CPM/ml

2. stanovení titru transformantů:

kolonií na misce **vzorek A =** **vzorek B =** **vzorek C =**

titr (CPT/ml) **vzorek A =** **vzorek B =** **vzorek C =**

3. transformační indexy ($T_i = \text{CPT} : \text{CPM} = N, d \times 10^{-e}$):

$T_{iA} =$

$T_{iB} =$

Zhodnocení negativní kontroly (vzorek C):

Závěr: