

Pracovní protokoly do předmětu Praktikum z molekulární biologie

Zpracoval: Mgr. Tibor Botka, Ph.D.

Korektura: Ing. Sylva Koudelková, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta

Masarykova univerzita

Jméno:

Číslo vzorku:

1. Příprava a purifikace plazmidu (vektoru) a PCR produktu (inzertu)

A) Izolace DNA plazmidu metodou alkalické lyze:

Vysoké pH společně s SDS 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 isopropanolem či etanolem za přítomnosti nadbytku monovalentních iontů. Oproti etanolu lze srážení isopropanolem provádět při pokojové teplotě, což minimalizuje srážení solí, které narušují následné aplikace. Takto ošetřená DNA se separuje centrifugací a po vysušení se rozpouští v TE pufru a skladuje při +4 °C.

Materiál:

Zdrojový kmen:

Plazmid:

1. Připravit kulturu zdrojového kmene v 1,5 ml LB media s **ampicilinem** (100 µg/ml), inkubace přes noc při 37 °C za intenzivního třepání.

Pozn.: všechny centrifugační kroky ve všech úlohách provádět na centrifuze Eppendorf® MiniSpin plus.

2. Centrifugovat při 12 000 rpm 1 minutu. Odsát médium tak, aby bakteriální pelet zůstal co nejsušší.

3. Zcela resuspendovat bakteriální pelet ve 200 µl roztoku A (50mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA, RNáza A 10 µg/ml; +4 °C).

4. Přidat 200 µl roztoku B (0,2M NaOH, 1% SDS), ihned promíchat převrácením zkumavky (4-5×), nevortexovat!

5. Inkubace při pokojové teplotě 2 min. (delší inkubace vede k vyššímu reziduu chromozomální DNA).

6. Přidat 200 µl roztoku C (3M octan draselný, pH = 5,5), ihned promíchat převrácením zkumavky (4-5×), nevortexovat!

7. Centrifugovat při 12 000 rpm 10 minut. Přenést supernatant do nové zkumavky. Vyhnout se kontaminaci peletem.

8. Pro vysrážení plazmidové DNA přidat 1 objem isopropanolu, promíchat převrácením zkumavky (4-5×) a při pokojové teplotě inkubovat 5 min.

9. Centrifugovat při 12 000 rpm 5 min. Odstranit supernatant. Pozor, abyste neodstranili i pelet!

10. K peletu přidat 500 µl 70% ethanolu (bez narušení peletu). Centrifugovat 12 000 rpm 5 min. při pokojové teplotě.

11. Opatrně odstranit supernatant pipetou a proužky sterilního filtračního papíru. Vložit otevřené zkumavky do termobloku vyhřátého na 50 °C, aby se odpařil veškerý zbytkový alkohol (pelet nesmí přeschnout!)

12. K peletu přidat 30 µl TE pufru. Nechat rozpustit při +4 °C do dalšího cvičení.

Jméno:

Číslo vzorku:

B) PCR – příprava inzertu

PCR umožňuje získat požadovanou specifickou sekvenci bez klonování. Jako templát slouží ssDNA (vzniklá denurací), podle níž je syntetizován komplementární řetězec. K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA. Primery se navrhují tak, aby se připojovaly k místům ohraničujícím z obou stran amplifikovaný úsek. Teoreticky lze amplifikaci získat 2^n řetězců (kopií), kdy n je počet cyklů PCR. Vstupní množství DNA 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 - 30 cyklů. Jako polymeráza se obvykle používá *Taq* DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotě 94 °C.

Nastavení termocycleru:

- Počáteční denaturace: 94 °C / 30 s
- Denaturace: 94 °C / 30 s
- Připojení primerů: 60 °C / 40 s
- Tvorba komplementárního řetězce: 68 °C / 40 s
- Závěrečná syntéza: 68 °C / 5 min
- Chlazení: 4 °C

Počet cyklů: 30

Příprava reakční směsi:

Amplifikace genu *hsp60* pro bakteriální chaperon

Složky reakční směsi	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Reakční směs (master mix) [μl]
Deionizovaná sterilní H_2O			37,5
OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer*	2 ×	1 ×	62,5
Primery: hsp60_SA_BamHI-F Hsp60_SA_EcoRI-R	10 μM	0,4 μM každý	5 5

* obsahuje pufr, hořčičnaté ionty, nukleotidy a *Taq* polymerázu

- Do malé PCR zkumavky namíchat reakční směs pro 5 reakcí do výsledného objemu 110 μl (bez DNA).
- Amplifikovaný vzorek: Do dvou PCR zkumavek přenést po 44 μl master mixu a přidat 6 μl DNA *Staphylococcus aureus*. Označit svým číslem a písmenem „I“ (inzert).
- Negativní kontrola: Ke zbylému objemu 22 μl reakční směsi přidat 3 μl DNA *Escherichia coli*. Zkumavku označit svým číslem a písmenem „N“ (negativní).
- Dobře uzavřené zkumavky umístit do PCR cycleru a spustit odpovídající program.
- Po dokončení PCR vzorky analyzovat pomocí horizontální gelové elektroforézy. Studenti obdrží elektroforetogram pro zhodnocení vlastní práce.
- Pozitivní vzorky sloučit a přečistit pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), nebo NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Závěr:

Jméno:

Číslo vzorku:

2. 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:

$$A_{260}/A_{280} = 1,75 \text{ až } 2,00 \text{ (ideálně } \sim 1,80)$$

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

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/ μ l.

-
1. DNA nejprve dobře promíchat pomocí pipetování a provést mžikovou centrifugaci (max 6000 rpm/0).
 2. Nastavit blank pomocí použitého elučního pufru (TE pufr).
 3. Nastavit pipetu na 2 μ l a změřit koncentraci.

C NEŘEDĚNÝ (ng/ μ l)	A260/A280	výtěžek (μ g)

Výpočet výtěžku DNA (μ g):

Závěr:

Jméno:

Číslo vzorku:

3. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami – úprava inzertu a linearizace vektoru

Restrikční endonukleázy (zkr. restriktázy, RE): sekvenčně specifické endonukleázy štěpící fosfodiesterovou vazbu dsDNA v určité sekvenci nukleotidů. Původ: Převážně produkty bakterií. V současné době je známo více než 3000 restriktáz, které rozpoznávají cca 150 různých sekvencí. Rozeznáváme tři základní typy restriktáz, přičemž 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, které jsou uváděny výrobcem v katalogu, nebo jsou uvedeny v literatuře. Hlavní faktory, které výrazně ovlivňují rychlost a specifčnost štěpení, jsou teplota a složení reakčního pufru. Zatímco požadavky na teplotu jsou většinou dosti vyhraněné, rozdíly ve složení pufrů bývají často malé. Proto lze pro určitou skupinu restrikčních enzymů používat stejného pufru. 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 pufrы se skladují při -20 °C, pufrы jsou obvykle dodávány jako 10× koncentrované zásobní roztoky.

Štěpení PCR amplikonu (inzertu) – každá prac. skupina připraví jeden vzorek:

1. Připravit roztok PCR amplikonu o koncentraci 50 µg/ml a objemu 43 µl.
2. Přidat 5 µl 10× koncentrovaného restrikčního pufru rCutSmart® (NEB).
3. Přidat 1 µl restriktázy *EcoRI*-HF (R3101S) a 1 µl *BamHI*-HF (R3136S) (NEB) (c = 20 U/µl).
4. Dobře promíchat pipetováním, nevortexovat!
5. Mžikově stočit.
6. Inkubovat 37 °C/ >30 min.
7. Skladovat při +4 °C.

Štěpení plazmidu (vektoru) – každý student štěpí svůj vzorek:

1. Připravit roztok plazmidové DNA o koncentraci 100 µg/ml a objemu 43 µl.
2. Přidat 5 µl 10× koncentrovaného restrikčního pufru rCutSmart® (NEB).
3. Přidat 1 µl restriktázy *EcoRI*-HF (R3101S) a 1 µl *BamHI*-HF (R3136S) (NEB) (c = 20 U/µl).
4. Dobře promíchat pipetováním, nevortexovat!
5. Mžikově stočit.
6. Inkubovat 37 °C/ >30 min.
7. Skladovat při +4 °C.

Pozn.: Inaktivace restrikční směsi proběhne během elektroforézy přidáním 6× koncentrovaného nanášecího pufru (disociuje restriktázu od DNA) a před ligací přečištěním.

Jméno:

Číslo vzorku:

4. Gelová elektroforéza – ověření RE štěpení vektoru

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.

d) 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.

e) 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 připravit 1,2% roztok agarózy v TAE pufru: K odměřenému množství pufru (změřit rozměry zařízení na nalévání gelu a vypočítat množství roztoku agarózy potřebného k přípravě gelu o výšce 0,5 cm) přidat správné množství práškové agarózy. Agarózu nechat v tlakovém hrnci rozvařit 10 - 15 min.

2. Zkontrolovat, zda mezi podložkou a hřebínkem je 0,5 - 1 mm mezera. Roztok zchladit na 50 °C a nalít do zařízení na tvorbu gelu, které je umístěno na vodorovném podkladu.

3. Nechat gel zchladnout 30 - 45 min (podle okolní teploty).

4. Gel přenést do elektroforetické vany.

5. Gel ve vaně převrstvit TAE pufrům tak, aby překrýval gel přibližně o 3 mm a opatrně vytáhnout hřebínek.

Nanesení vzorku do agarózového gelu a provedení elektroforézy

1. Do jamky nanést vzorky smíchané s kapkou nanášecího pufru (smíchat na parafilmu) o objemu uvedeném níže. Jamka musí být předem převrstvená TAE pufrům!

A) 8 μ l neštěpená plazmidová DNA

B) 10 μ l štěpená plazmidová DNA

2. Nanést marker (4 μ l). Jedna dráha na gel. Zaznamenat typ markeru:

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

4. Po ukončení elektroforézy přenést gel do barvicí lázně (TAE pufr obsahující interkalační barvivo RedGel) a barvit 20 min. **! RedGel je derivátem etidiumbromidu, což je mutagen. Při práci s ním dodržujeme zásady bezpečnosti !**

5. Gel opláchnout vodou a fotografovat pod UV světlem 302 nm.

Objem gelu =

Použité napětí U =

Závěr:

Elektroforetogramy budou dostupné v Interaktivní osnově. Do odevzdávacího: Elektroforetogramy s popsanými drahami (jednotlivé vzorky, jméno studenta), markerem a proužky. Popisky umístit mimo obrázek gelu po jeho stranách.

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 $100\,000 - 1\,000\,000 \times g$. 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 roztoku 5 – 20% sacharózy. Vznášivost 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 promíchávají 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. Připravit roztoky (100 ml) sacharózy ve vodě o koncentraci např. 5, 15, 25 a 35 % (w/v).
2. Roztoky obarvit (odlišně) např. safraninem nebo krystalovou violetí (1 kapka na 3 ml).
3. Vytvořit gradient těchto roztoků ve zkumavce a) převrstvováním b) podvrtvováním c) mezivrstvením d) kombinací

Závěr:

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 přídatkem glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na -70°C .

1. Smíchat všechny zcela linearizované vzorky vektoru v pracovní skupině (min. dva). Vzniklý vzorek purifikovat pomocí kitu (viz PŘÍLOHA 1).
2. Smíchat vzorky štěpeného inzertu všech pracovních skupin a purifikovat pomocí kitu (viz PŘÍLOHA 1).
3. Stanovit koncentraci DNA pomocí přístroje NanoDrop.
4. **Provést ligaci (každý student připravuje vlastní ligační směs):**

a) Smíchat DNA vektoru a inzertu s beznukleázovou vodou dle tabulky tak, aby **výsledný objem byl 10 μl** .

inzert : vektor (molární poměr)	inzert : vektor (hmotnostní poměr)
3:1	35 ng inzert + 50 ng vektor

hmotnost inzertu (ng) = požadovaný molární poměr inzert/vektor \times hmotnost vektoru (ng) \times poměr délek inzert/vektor

- b) Přidat **10 μl** promíchaného **2x ligačního pufru** a **1 μl T4 DNA ligázy** (Quick Ligation Kit, M2200L, NEB).
- c) Promíchat pipetováním a mžikově stočit.
- d) Inkubovat 5 min při laboratorní teplotě, poté dát na led.

5. Transformaci provést následujícím způsobem:

- a) Umístit zkumavky (viz tabulka níže) s 200 μl kompetentních buněk na led.
- b) Do jednotlivých zkumavek s 200 μl kompetentních buněk přidat celý objem daného vzorku (viz tabulka níže), jemně promíchat a nechat 20 minut na ledu.

Vzorek	Objem	Počet
Vzorek A: Ligovaný plazmid a inzert (3:1) z předešlého kroku	20 μl	každý student 1x
Vzorek B: neštěpený plazmid (prázdný vektor bez inzertu)	25 ng ve 20 μl	Každý student 1x
Vzorek C (pozitivní kontrola): rekombinantní vektor	25 ng ve 20 μl	2x na seminární skupinu
Vzorek D (negativní kontrola): voda	20 μl	2x na seminární skupinu

- c) Buňky podrobit tepelnému šoku 42°C / 1 min a pak přenést do ledové lázně.
- d) Přidat 1 ml LB bujonu o laboratorní teplotě a inkubovat 37°C / 20 – 30 min*.
- e) Buňky centrifugovat 1 min / 12 000 rpm.
- f) Supernatant odlít a ponechat zbytek média (cca 100 μl), v něm resuspendovat pelet.
- g) Suspenzi vysít pomocí bakteriologické hokejky na agarové plotny obsahující ampicilin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), X-gal (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 1mM IPTG.
- h) Plotny se inkubují 24-48 hod při 37°C .

* Během inkubace stanovit CFU/ml kompetentních buněk na miskách s MPA bez antibiotika.

Jméno:

Číslo vzorku:

PŘÍLOHA 1:

Purifikace kitem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

1. Smíchejte vybrané vzorky štěpící směsi inzertu / plazmidu, které se dle ELFO podařilo zcela linearizovat
2. Přidejte 2 objemy NTI pufru ke štěpící směsi a promíchejte.
3. Do 2ml sběrné zkumavky umístěte kolonu NucleoSpin a do ní naneste vzorek. Centrifugujte 30 s/11tis x g.
4. Odlijte tekutinu ze sběrné zkumavky a vraťte kolonu do sběrné zkumavky.
5. Pro promytí přidejte 700 µl NT3 pufru a centrifugujte 30 s/11tis x g.
6. Odlijte tekutinu ze sběrné zkumavky a vraťte kolonu do sběrné zkumavky. Centrifugujte nasucho 30 s/11tis x g.
7. Umístěte kolonu NucleoSpin do čisté 1,5 ml zkumavky.
8. Pro eluci DNA přidejte 30 µl pufru NE (5 mM Tris · Cl, pH 8,5; 70°C) na střed membrány kolony NucleoSpin, nechte stát 5 minut při 25°C a poté centrifugujte 60 s/11tis x g.
9. Stanovte koncentraci a čistotu purifikované DNA na Nanodropu. Vzorek uložte při 4°C.

Purifikace kitem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)

1. Smíchejte vybrané vzorky štěpící směsi plazmidu / inzertu.
2. Přidejte 2 objemy Binding pufru (č. 2) ke štěpící směsi a promíchejte.
3. Do 2ml sběrné zkumavky umístěte kolonu High Pure a do ní naneste vzorek. Centrifugujte 60 s/8tis x g.
4. Odlijte tekutinu ze sběrné zkumavky a vraťte kolonu do sběrné zkumavky.
5. Pro promytí přidejte 700 µl Wash pufru (č. 4) a centrifugujte 60 s/8tis x g.
6. Odlijte tekutinu ze sběrné zkumavky a vraťte kolonu do sběrné zkumavky. Centrifugujte nasucho 30 s/8tis x g.
7. Umístěte kolonu High Pure do čisté 1,5 ml zkumavky.
8. Pro eluci DNA přidejte 30 µl elučního pufru č. 5 (10 mM Tris · Cl, pH 8,5; 70°C) na střed membrány kolony, nechte stát 5 minut při 25°C a poté centrifugujte 60 s/8tis x g.
9. Stanovte koncentraci a čistotu purifikované DNA na Nanodropu. Vzorek uložte při 4°C.