

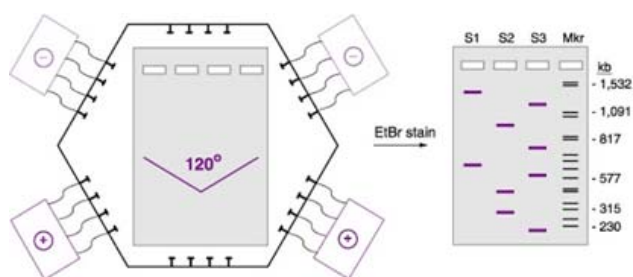
Úloha 2: Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) a izolace bakteriální DNA pro PFGE

Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) je elektroforetická metoda umožňující na rozdíl od klasické elektroforézy efektivní dělení molekul DNA větších než 15 kb (až do velikosti několika Mb).

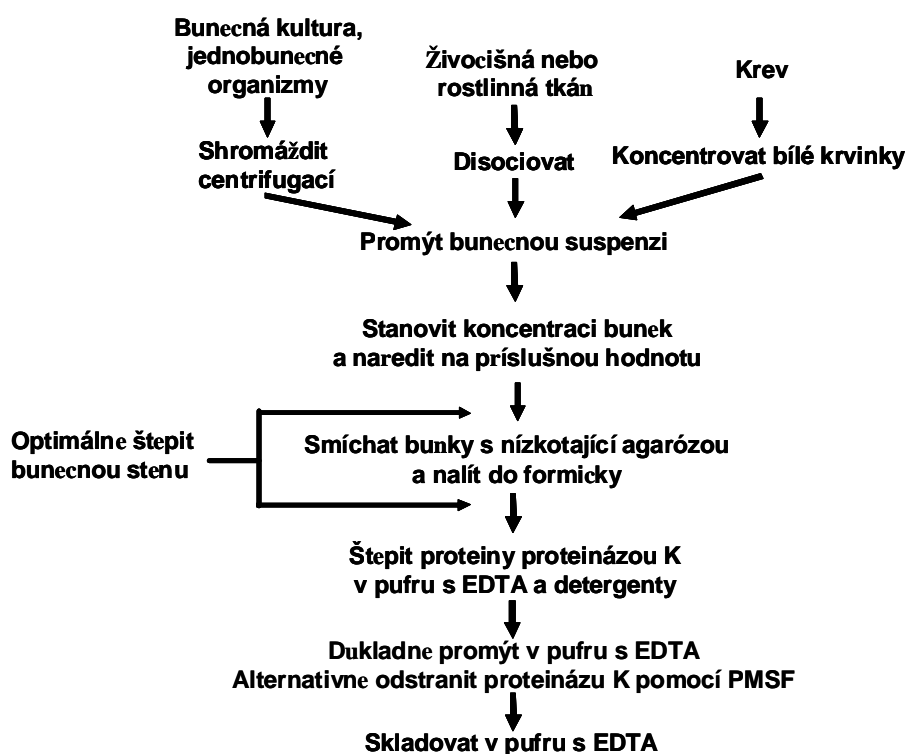
Při pulzní elektroforéze se periodicky mění orientace elektrického pole (Obr.1). Molekuly DNA v agaróze se relaxují při odstranění jednoho pole a zauímají určitou konformaci při působení nového pole. Tento proces reorientace je závislý na velikosti molekul.

Při přípravě vzorků větších než 500 kb je nutné molekuly DNA chránit před mechanickým poškozením (působení střížných sil) a před nukleolytickou degradací během izolace. Proto se používá speciální metoda izolace, při které jsou buňky nejprve fixovány v nízkotající agaróze a teprve potom je prováděna lyze a purifikace DNA (Obr. 2).

Obr. 1: PFGE: elektrické pole se periodicky mění ve třech směrech (a) směrem od středu gelu, (b, c) v úhlu 60° po obou stranách gelu.



Obr. 2: Obecné schéma přípravy vzorků pro PFGE



Postup izolace DNA pro PFGE ze stafylokoků kultivovaných v tekutém médiu

Seznam materiálu:

- Bakteriální kultura inkubovaná v 2×YT médiu při 37°C/18h.
- 37°C inkubátor, vortex.
- Skleněné 10 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem.
- Vodní lázeň předehřátá na 55°C.
- SeaKem Gold agaróza (Lonza), Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad)
- TE pufr (10 mM Tris. Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0), 0,5M EDTA, promývací roztok (10 mM TrisCl, 10 mM EDTA, 10mM EGTA, 1M NaCl, pH 7,5), lyzostafin (0,5 mg/ml), lyzační roztok (6 mM Tris. Cl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5% Brij 58, 0,2% Na-deoxycholát, 0,5% laurylsarkosin, pH 7,6), deproteinizační roztok (25 mM EDTA, 20 mM EGTA, 1% laurylsarkosin, pH 9,0), lysozym (50mg/ml), proteináza K (10 mg/ml)
- Vhodné restrikční enzymy (pro *S. aureus* používáme *Sma*l).
- Sterilní deionizovaná voda, mikrozkušavky.

Postup:

1. den:

1. Zaočkovat kulturu do 20 ml 2× YT média a inkubovat 18 h při 37 °C

2. den:

2. Odebrat 10 ml kultury, přidat 100 µl 0,5 M EDTA a chladit kulturu 10 min. při 4 °C.
3. Centrifugovat 10 min. při 4 °C a 4000 ot./min.
4. Dvakrát promýt v 5 ml promývacího roztoku zchlazeného na ledu.
5. Naředit promývacím roztokem na hodnotu optické hustoty $OD_{600} = 0,2 - 0,3$.
6. Centrifugovat 10 min. při 4 °C a 4000 ot./min., slít supernatant a odsát zbytky roztoku, tak, aby nedošlo k porušení peletu
7. Sediment resuspendovat ve 100 µl promývacího roztoku a přenést do mikrozkušavek.
8. Mikrozkušavky se suspenzí postupně zahřívát 2-3 min. na 55 °C.
9. Přidat 10 µl lyzostafinu (zásobní koncentrace 0,5 mg/ml), přidat 110 µl 2% agarózy s nízkým bodem tání (roztok v 50 mM Tris. Cl, 5 mM EDTA, pH 8,0) předem vytemperované na 55 °C a promíchat pipetou, aby nevznikly bubliny.
10. Suspenzi přepipetovat po 200 µl do komůrek tvořítka a uložit na 20-30 min. do lednice.
11. Vzniklé agarózové bločky přenést do lyzační směsi, která obsahuje 1 ml lyzačního roztoku a 20 µl lyzostafinu (zásobní koncentrace 0,5 mg/ml), a inkubovat je za mírného třepání ve vodní lázni o teplotě 37 °C pro dobu 2 až 3 hodin.

Pozn.: Lyzační roztok připravujeme do skleněných zkumavek se šroubovacím uzávěrem.

Jednotlivé roztoky dále jen vyměňujeme a s bločky nemanipulujeme.

Pokud nedojde v tomto kroku k projasnění bloček, ponecháme lyzovat přes noc při 4 °C.

12. Lyzační směs vyměnit za směs deproteinizační, která obsahuje 1 ml deproteinizačního roztoku a 25 µl proteinázy K (zásobní koncentrace 20 mg/ml), a inkubovat bločky za mírného třepání ve vodní lázni o teplotě 55 °C po dobu 12 hodin (roztok vyměnit po šesti hodinách).

Pozn.: Předem vyhřát lázeň na 55°C.

3. den:

13. Bločky promýt alespoň 5× v 10 ml 1× TE pufru při 4 °C, TE pufr vyměňovat po 1,5 hodinách, průběžně chladit na 8 °C.
14. Bločky lze po důkladném promytí štěpit restriční endonukleázou (nejčastěji štěpíme přes noc).

Pozn.: nenaštěpené bločky je možné je skladovat po dobu 1 roku v lednici (TE pufr vyměňovat jednou za měsíc).

Restriční štěpení (postup)

- Pro restriční štěpení uřízneme z bločku vzorek o velikosti cca 1×1×5 mm.
- S bločky manipulujeme sterilně pomocí nerezových špachtlí, které sterilizujeme v etanolu a následným ožhnutím nad plamenem.
- Bločky řežeme pomocí ostrého skalpelu, nejlépe na sterilní Petriho misce, kterou si můžeme podložit tmavou podložkou pro lepší manipulaci.
- Vlastní štěpení:
 - Do mikrozkuřavky namíchat restriční směs (na 1 vzorek: 10 µl 10× restričního pufru, 85 µl vody a 5-10 U restričního enzymu). Inkubujeme při požadované teplotě několik hodin nebo přes noc.

4.-5. den:

15. Vlastní provedení PFGE.

Příprava gelu a nastavení elektroforézy (poznámky)

- Připravit 1,2% agarózový gel v 1×TAE pufru. Vychladit 2000 ml 1×TAE pufru v elektroforetické vaně.
- Připravit 0,8% low-melting agarózu v 1×TAE pufru vytemperovanou na 45°C pro zalití bloček do gelu.
- Jednotlivé bločky vkládáme pomocí nerezové špachtle do jamek připraveného gelu (mezi jednotlivými vzorky špachtli sterilizujeme).
- Jamky s bločky zakápnout připravenou 0,8% low-melting agarózou.
- Podmínky elektroforézy pro rozdělení *SmaI* fragmentů chromozomální DNA *S. aureus*:
 - Pulzní časy 1 – 70s, lineární vzestup
 - Teplota 14°C.
 - Napětí 6 V/cm.
 - Čas cca 24 h. pro gel délky 14 cm.