

Úloha: Izolace plazmidové DNA z transduktant a elektroforéza plazmidů v agarózovém gelu

Plazmidy jsou autonomní kovalentně uzavřené kružnicové replikony tvořené dsDNA, které se stabilně dědí v extrachromozomálním stavu a jsou pro buňku, na rozdíl od chromozomální DNA, postradatelné. Nesou geny, které nejčastěji kódují rezistenci k antibiotikům. Počet kopií v buňce je nepřímo úměrný velikosti plazmidu. K přípravě vektorů jsou používány plazmidové DNA o nižší molekulové hmotnosti, neboť poskytují více kopií a snadnější manipulaci. V současnosti jsou plazmidové vektory využívány ke klonování v *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* aj.

Pro izolaci plazmidové DNA z buněk se používá řada různých metod. Všechny musí obsahovat čtyři základní kroky:

(a) Růst bakteriální kultury. Plazmidy se nejčastěji izolují z bakteriální kultury (rostoucí v médiu obsahující příslušné antibiotikum), která byla inokulována jednou kolonií odpíchnutou z agarové plotny. Většina plazmidových vektorů používaných v současné době (např. pUC řada) se replikuje jako vícekopiové vektory a je u nich možné dosáhnout vysokého výtěžku při izolaci z kultury, která rostla ve standardním LB médiu do logaritmické fáze růstu. Avšak vektory dřívější generace (např. pBR322), které se nereplikují tak snadno, vyžadují selektivní amplifikaci několikahodinovou inkubací částečně rostoucí kultury v médiu s chloramfenikolem, který inhibuje syntézu proteinů a tak zabraňuje replikaci bakteriálního chromozómu, avšak replikace relaxovaných plazmidů pokračuje a počet jejich kopií se zvyšuje.

(b) Izolace bakterií a jejich lyze. Bakterie jsou získány centrifugací a 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. Velké plazmidy (> 15 kb), které jsou citlivé na poškození, by měly být izolovány metodou minimalizující působení fyzikálních sil (lyze dodecylsulfátem sodným). Pro malé plazmidy je možné použít více metod.

(c) Oddělení plazmidové DNA od ostatních vysoko a nízkomolekulárních komponent. Po přidání EDTA a v některých případech lyzačních enzymů jsou buňky vystaveny působení detergentu a lyzovány varem nebo alkalicky. To způsobí denaturaci chromozomální DNA, která je obvykle již ve formě lineárních fragmentů a během renaturace se spojí se zbytky lyzovaných buněk a rychle klesá při centrifugaci na dno zkumavky. Naproti tomu vlákna plazmidové DNA, tvořená kovalentně uzavřenými molekulami se při denaturaci nerozcházejí, protože jsou v důsledku nadšrubovicové struktury vzájemně propletená a mohou na rozdíl od lineárních fragmentů rychle renaturovat. Lyze varem není doporučována při izolaci z 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.

(d) Purifikace plazmidové DNA a stanovení koncentrace a čistoty. Proteiny odstraňujeme extrakcí směsí fenol-chloroform. Precipitaci DNA provádíme 96 % ethanolom po přidání jednomocných iontů. Odstranění RNA provádíme působením pankreatickou RNázou. Vysoce čisté kovalentně uzavřené kružnicové DNA je možné získat po centrifugaci v gradientu CsCl-ethidium bromid. Z dalších metod je možné použít pro purifikaci plazmidové DNA precipitaci polyetylén glykolem, chromatografii a komerční metody využívající adsorpci na silikagelovou kolonku.

Obecně během izolačních postupů je třeba dodržovat následující zásady:

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). Výrazně vyšší nebo nižší hodnoty pH způsobují denaturaci DNA.

Zabránit působení nukleáz, tj. enzymů, které degradují nukleové kyseliny:

To lze docílit:

(a) prováděním izolace při nízkých teplotách

(b) přidáním inhibitorů nukleáz (např. EDTA, citronan sodný aj.)

(c) zabráněním exogenní kontaminace mikroflórou, tzn. pracovat se sterilním materiálem

Materiál:

- 18-ti hodinové bakteriální kultury (donorový kmen Jevons B, transduktanty)
- Komerční kity pro izolaci plazmidové DNA (pro PCR, klonování, sekvenování, *in vitro* transkripce) :
 - High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) nebo NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)
- Plastové špičky, pipety, mikrozkušavky, PBS, lyzostafin, kónické 15 ml zkumavky.
- SERVA agaróza, elektroforetická vana a příslušenství, velikostní marker.

I. Izolace plazmidové DNA

Kit je určen pro izolaci plazmidové DNA metodou založenou na alkalické lyzi u E. coli a s níže uvedenou modifikací u druhu S. aureus.

Postup:

1. den

1. Naočkovat stafylokokovou bakteriální kulturu s příslušným plazmidem, inkubovat 18h/37 °C ve 20 ml MPB.

2. den

Pracujeme v laminárním boxu, sterilně

2. Centrifugovat cca 7 ml bakteriální kultury při 4500 rpm/15 min.
3. Odstranit supernatant, promýt v 5 ml PBS, resuspendovat pelet.
4. Centrifugovat při 4500 rpm/15 min., odstranit veškerý supernatant.
5. Připravit lyzační směs: 235 µl suspenzní pufr (součást kitu: Roche roztok č. 1, Macherey-Nagel roztok A1), 15 µl lyzostafinu.
6. Pelet důkladně resuspendovat v předem připravené lyzační směsi (250 µl), přepipetovat do Eppendorfovy mikrozkušavky a inkubovat při 37 °C do lyze buněk (projasnění, zvýšení viskozity) cca 30 min. – 2 h.

Pracujeme na stole podle návodu výrobce kitu

7. Přidat 250 µl lyzačního pufru (Roche roztok č. 2, Macherey-Nagel roztok A2), promíchat pomalým převrácením zkumavky, inkubovat 5 min/pokožová teplota.
8. Přidat 250 µl (roztok č. 3, Roche) nebo 300 µl (roztok A3, Macherey-Nagel) vazebného pufru. U kitu Roche inkubovat na ledu 5 min a roztok č. 3 předem vychladit. Zkumavku opatrně promíchat, abychom dosáhli co nejvyšší výtěžek plazmidové DNA bez chromozomální DNA.
9. Centrifugovat 10 min při max. otáčkách.

10. Supernatant přenést na filtr kolonky umístěné do sběrné zkumavky. Navázání DNA na filtr centrifugací max. rpm/1 min.
11. Promývat DNA podle doporučení výrobce kitu.
Roche: 500 µl roztok č. 4, centrifugovat při max. rpm/1 min; 700 µl roztok č. 5, centrifugovat při max. rpm/1 min (dvakrát po sobě, odstranění veškerého roztoku)
Macherey-Nagel: 450 µl pufru AQ, centrifugovat při max. rpm/3 min (odstranění veškerého roztoku).
12. Eluovat DNA. Opatrně odstranit sběrnou zkumavku a umístit kolonku do sterilní mikrozkušavky pro uchování DNA.
Roche: napipetovat na střed filtru 50-100 µl elučního pufru, centrifugovat při max. rpm/1 min, pro vyšší výtěžek eluční pufr zahřát na 60 °C a nechat stát 10 min. při lab. teplotě.
Macherey-Nagel: napipetovat na střed foltru 50 µl elučního pufru AE, inkubovat 1 min. při laboratorní teplotě, centrifugovat při max. rpm/1 min.
13. Stanovit čistotu a koncentraci DNA.
14. DNA uchovávat v mikrozkušavkách při -20 °C.

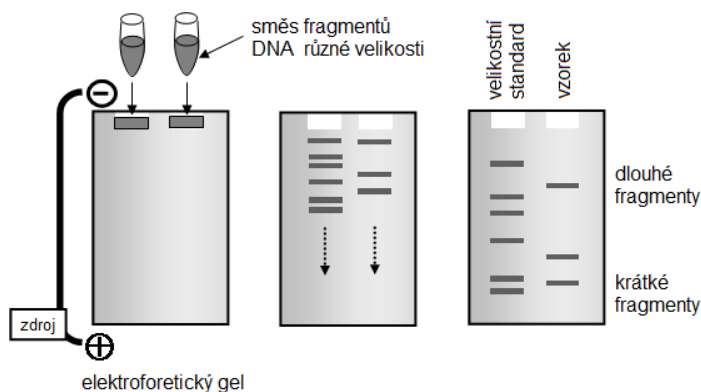
II. Elektroforéza (ELFO) v agarózovém gelu

Fragmenty nukleových kyselin lze dle jejich velikosti rozdělit elektroforézou (**Obr. 1**). Elektroforéza využívá rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů danou právě jejich rozdílnou velikostí. Nukleová kyselina nese díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje od záporného pólu (katody) ke kladnému (anodě).

ELFO je jedna ze separačních technik využívaná při izolaci a analýze nukleových kyselin. Principem ELFO separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě - anodě. Rychlost pohybu molekul DNA v gelu (elektroforetická pohyblivost) je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Konvenční elektroforézou v agarózovém gelu lze separovat molekuly nukleových kyselin o velikosti od 100 bp do cca 50 kb. Gely o nižší hustotě (0,7-1,2 % agaróza) jsou používány k separaci velkých fragmentů (tisíce bází), gely o vyšší hustotě (1,5-3 % agaróza) jsou používány k separaci malých fragmentů (stovky až desítky bází). Standardně se používá napětí 5 - 8 V/cm.

Molekuly nukleových kyselin v gelu je nutné vizualizovat barvením. Nejčastěji je používán etidiumbromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA (resp. RNA) a vytváří s nimi komplex, který po osvětlení UV světlem červeně fluoreskuje.

Obr. 1: Schématické znázornění rozdělení DNA pomocí metody ELFO

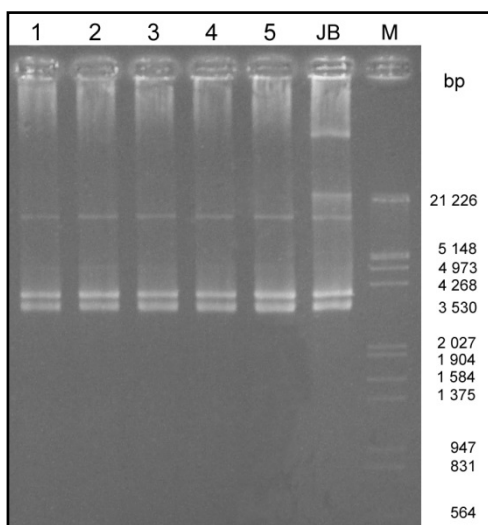


Postup:

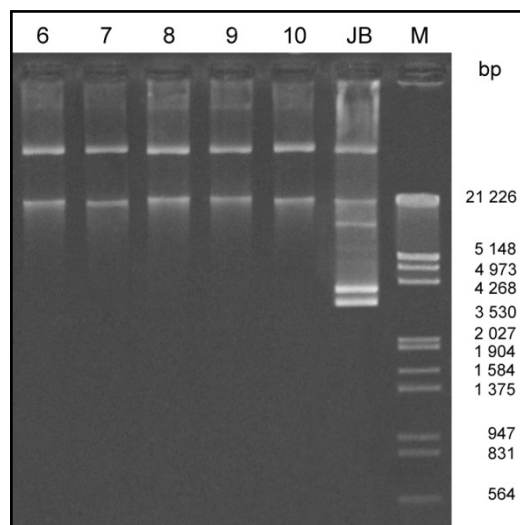
- Navázat potřebné množství (podle požadované hustoty gelu) agarózy SERVA do nádoby o vhodném objemu
 - použité sklo musí být čisté, nesmí obsahovat zbytky mycího prostředku*
 - Přidat potřebné množství 1xTAE pufru
 - nejlépe použít pufr ze stejné várky ředění jako bude v ELFO vaně, aby byl zajištěn shodný obsah iontů a tím stejnoměrné vedení elektrického napětí během ELFO*
 - 1xTAE se připravuje ředěním ze zásobního 50x koncentrovaného roztoku TAE.
 - Potřebný objem přidávaného 1xTAE pufru zjistíme následujícím výpočtem:
 $V = \text{šířka gelu} \times \text{délka gelu} \times \text{výška gelu}$ (vždy 0,5 cm)
 - Agarózu rozpuštěnou v 1xTAE pufru rozvaňujeme opatrně v mikrovlnné troubě (1 – 3 min. podle výkonu zvoleného spotřebiče)
 - agarózový gel opatrně promícháme (pozor na utajený var)
 - nechat vytemperovat na 55 °C
 - nalít do připravené formy, která je vyvážená pomocí vodováhy do roviny
 - 1xTAE pufr v ELFO vanách je nutno vyměňovat po cca 4 cyklech běžné délky (1-2 h) nebo po každém dlouhém cyklu (3 h a více)
 - Nanášení vzorků:
 - k vzorku, který chceme nanášet na připravený gel přidáme malé množství nanášecího pufru, na gel nanášíme cca 10 μ l vzorku s nanášecím pufrům, nezapomínáme na pozitivní a negativní kontroly a velikostní standard.
 - optimální velikost elektrického napětí při elektroforéze se udává jako 5-8 V/cm
 - Gel barvíme cca 30 min v lázni s ethidiumbromidem o konc. 1 μ g/ml (zás. roztok 10 mg/ml) tj. 60 μ l EtBr do 600 ml 1xTAE.
 - Nabarvený gel opláchnout v destilované vodě. Focení gelu.
9. Veškerou práci s EtBr je nutno provádět v **NITRILOVÝCH RUKAVICÍCH!!!** Pokud dojde ke kontaminaci EtBr, je nutné tuto plochu ošetřit dekontaminačním roztokem.

Obr. 2: Výsledky izolace plazmidové DNA z transduktant

A: selekce transduktant na tetracyklinu



B: selekce transduktant na kadmiu



M – velikostní standard (DNA Marker III); **JB** – donorový kmen Jevons B; **1-5** – transduktanty selektované na tetracyklinu (plazmid 4,4 kbp), **6-10** – transduktanty selektované na kadmiu (plazmid 28 kbp)