

Izolace plasmidové DNA (cvičení č. 3)

Úvodní slovo

Plasmidy jsou extrachromosomální kružnicové molekuly dvoušroubovicové DNA o velikostech 1 000 až 200 000 bp. Vyskytují se téměř ve všech bakteriálních rodech, jak grampozitivních tak gramnegativních, v kvasinkách i u některých vyšších eukaryot. Většinou jsou ale schopny se replikovat pouze v úzce vymezeném okruhu hostitelských buněk. Na rozdíl od chromozómů nesou pouze geny kódující druhotné znaky, např. rezistenci k různým antibiotikům, které buňce pomáhají přežít za nestandardních podmínek. Jiné geny kódují rezistenci k toxickým látkám, produkci enterotoxinů, kolicinů, restrikčních a modifikačních enzymů nebo schopnost degradovat komplexní organické sloučeniny. Plasmidy se replikují nezávisle na replikaci chromosomální DNA. Jejich replikační cyklus může, ale nemusí být s replikací bakteriálního chromozómu a s cyklem buněčného dělení synchronizován. V takovém případě může počet plasmidů v buňce dosáhnout až několika set kopií. Tyto plasmidy jsou vhodné pro genové inženýrství, protože mohou být z buněk izolovány ve velkých množstvích.

Všechny plasmidy v současné době používané ke klonování, jsou oproti přirozeným plasmidům upravené. O tom, zdali je plasmid pro klonování vhodný, rozhoduje především velikost. Je-li plasmid malý, dokáže účinně transformovat buňku. Vedle toho musí být plasmid v buňce stabilní a vyskytovat se v buňce ve vysokém počtu kopií, což umožňuje dosáhnout dostatečně vysoký výtěžek.

Komerčně dostupné plasmidy používané v genovém inženýrství obsahují tři důležité sekvence:

- a) **Počátek replikace**, místo *ori*, který je podmínkou produkce nových kopií. Kromě toho většina moderních plasmidů (ty, které se v buňce vyskytují v nízkém počtu kopií) nese také lokus *par*, který zajišťuje rozdělení jednotlivých kopií plasmidu do dceřiných buněk během dělení.
- b) **Selekční znak**, který zajišťuje zvýhodněný růst transformovaných bakterií. I za optimálních podmínek je totiž plasmid vnesen pouze do malé části buněčné populace. Proto je třeba vyvinout selekční tlak pro podporu růstu těchto buněk. Pro tento účel bývá zpravidla použit gen, který se fenotypově projevuje jako dominantní rezistence k určitému antibiotiku. Nejčastěji se používají geny zodpovědné za rezistenci k ampicilinu.
- c) **Klonovací místo**, umožňující vložit do plasmidu fragment cizorodé DNA. Klonovací místo je úsek DNA, umístěný mimo ostatní důležité sekvence, který obsahuje rozpoznávací sekvenci pro jednu nebo více restrikčních endonukleáz (v tomto případě se označuje jako „polylinker“). Tato restrikční místa jsou obsažena v plasmidu v jediném exempláři, což zaručuje možnost inserce dalšího úseku DNA, aniž by byl porušen některý jiný úsek důležitý pro replikaci plasmidu. V současné době jsou polyklonovací místa konstruována tak, aby byla zajištěna dostatečná flexibilita pro klonování různých fragmentů DNA. Navíc bývají v těsném sousedství polyklonovacích míst vloženy sekvence pro analýzu správnosti vložených fragmentů.

V závislosti na průběhu izolace je možno naizolovat různé formy plasmidové DNA: V nativním stavu v buňce se plasmid vyskytuje v nadšroubovicové formě označované jako

CCC-forma (covalent closed circle). Pokud jsou všechny izolované molekuly v CCC-formě, pak byla izolace ideální. Pokud dojde k přerušení jednoho řetězce DNA, plasmid se rozvine do podoby otevřené kružnice, tzv. **OC-formy** (open circle). Po přerušení obou řetězců vzniká linearizovaná molekula plasmidové DNA, tzv. **L-forma**. CCC-forma plasmidu putuje v elektrickém poli nejrychleji ze všech uvedených. Pomaleji se pohybuje OC-forma a nejpomaleji L-forma. V praxi získáváme zpravidla při bezproblémovém průběhu izolace plasmidové DNA největší podíl CCC-forem a malé množství L-forem. Formu OC a L je na elektroforetickém gelu nesnadné rozlišit, pohybují se podobnou rychlostí. Často pozorujeme komplexy nadšoubovicových struktur a potom hovoříme o dimerech, tetrametrech atd. Ty se pochopitelně pohybují v elektrickém poli pomaleji než výše uvedené struktury. V izolátech plasmidů se vyskytují i zbytky chromosomální DNA, která nebyla dostatečně odstraněna.

Výjimečně je možné pozorovat na gelu i denaturované molekuly plasmidové DNA. Ty se pohybují ještě rychleji než CCC-formy. K denaturaci plasmidové DNA ale dochází pouze v případech, že složení izolačních roztoků nebylo správně nastaveno, zejména při pH lyzačního roztoku vyšším než 12,45. Denaturovaná DNA je nevhodná pro další práci.

Standardní postup izolace plasmidové DNA sestává ze čtyř základních kroků:

- 1) V prvním kroku jsou bakteriální buňky homogenizovány a je odstraněna jejich buněčná stěna, a to působením vhodných enzymů, například lysozymu pro *Escherichia coli*, lysostaphinu pro stafylokoky, apod. Vedle toho se používá proteináza K, enzym, který rozkládá proteinovou složku buněčné stěny.
- 2) Ve druhém kroku dojde k lyzi cytoplasmatické membrány působením detergentů, zpravidla dodecylsulfátu sodného (SDS) a uvolnění vnitřního obsahu buňky do vysoce alkalického prostředí. Alkalita roztoku, pH 12,45, zajistí denuraci všech nukleových kyselin a proteinů.
- 3) Ve třetím kroku následuje prudké snížení pH na hodnoty kolem 7,0. Dojde k vysrážení proteinů a zbytků buněčných stěn. Dlouhá vlákna chromosomální DNA nestačí reasociovat a stanou se součástí této sraženiny. Naproti tomu malé molekuly plasmidové DNA zůstávají i při denaturaci v podmínkách pH = 12,45 vzájemně propojeny a při prudkém snížení pH znovu reasociují za vzniku kompaktních struktur.
- 4) V dalším kroku následuje oddělení sraženiny od reasociovaných molekul plasmidové DNA vysokoobrátkovou centrifugací. Plasmid je potom z výsledného roztoku purifikován na chromatografické koloně a vysrážen ethanolem.

Komerční souprava společnosti JETQUICK (Plasmid Miniprep spin Kit), která bude použita v tomto cvičení, je určena pro izolaci plasmidové DNA z 1 až 3 ml (výjimečně 5ml) buněčné suspenze bakterií *Escherichia coli*. Izolovanou DNA je možné použít pro všechny následné metody genového inženýrství.

Cíl cvičení

Izolovat plasmidovou DNA z bakteriální suspenze *Escherichia coli*.

Seznam přístrojů

- nádoba s ledem
- třepačka Vortex
- centrifuga na 1,5 ml mikrozkuřavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 µl

Vlastní pracovní postup

Než začnete izolaci

- Před prvním použitím nové soupravy připravte promývací roztok přidáním ethanolu 96-100% do lahvičky s roztokem GX a G4, množství ethanolu přidejte podle pokynů výrobce. Řádně protřepejte a označte, že v nádobě už je ethanol.
- Před prvním použitím nové soupravy připravte také roztok G1 přidáním přiložené RNázy A. Řádně protřepejte a označte, že byla přidána RNáza A. Pokud nebyl roztok G1 skladován v lednici při 4 °C, vychladte G1 na ledu po dobu alespoň 15 min.
- Všechny centrifugace se provádějí při > 12,000 x g !

Bezpečnostní opatření!

- po celou dobu izolace mějte nasazené jednorázové plastové rukavice, nukleázy z vašich rukou by mohly zničit izolovanou DNA,
- dodržujte pravidla bezpečnosti práce předepsaná pro laboratoř,
- jakékoli zranění hlase vedoucímu cvičení.

Vlastní izolace

- 1) Napipetujte 1,8 ml čerstvě narostlé suspenzní bakteriální kultury do 2,0 ml mikrozkušavky a centrifugujte buňky při laboratorní teplotě po dobu 2 - 3 min
- 2) Odstraňte supernatant pipetou tak, abyste nezvířili sediment.
- 3) Osušte mikrozkušavku pomocí buničité vaty.
- 4) Přidejte 250 µl na ledu vychlazeného (nebo z lednice 4 °C) G1 s RNázou A.
- 5) Řádně promíchejte vortexováním po dobu nejméně 30 s. Na konci vortexování musí být obsah zkumavky homogenní. Jakékoli nehomogenizované shluky buněk snižují výtěžek.
- 6) Přidejte 250 µl lyzačního pufru G2. Šetrně promíchejte tak, že zkumavku převracíte, dokud není roztok homogenní - nevortexovat! V tomto kroku dojde k denaturaci DNA.
- 7) Inkubujte lyzát po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
- 8) Přidejte 350 µl neutralizačního pufru G3. Okamžitě promíchejte tak, že zkumavku převracíte dokud není roztok homogenní - nevortexovat! V tomto kroku dojde k renaturaci plasmidové DNA a vysrážení jaderné DNA.
- 9) Lyzát centrifugujte při pokojové teplotě 10 min.
- 10) Vložte kolonku JETQUICK do 2,0 ml mikrozkušavky.
- 11) Přepipetujte supernatant lyzátu do kolonky. Zamezte kontaktu s peletou, která obsahuje jadernou DNA.
- 12) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 1 min.
- 13) Vylijte obsah zkumavky, který protekl kolonkou a kolonku vraťte zpět do zkumavky
- 14) Do kolonky napipetujte 500 µl promývacího roztoku G4
- 15) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 1 min.
- 16) Vylijte obsah zkumavky, který protekl kolonkou a kolonku vraťte zpět do zkumavky.
- 17) Centrifugujte ještě jednou při laboratorní teplotě po dobu 1 min.
- 18) Odstraňte zkumavku. Kolonku přeneste do čisté 1,5 ml mikrozkušavky.
- 19) Do kolonky napipetujte 75 µl elučního TE pufru nebo vody a centrifugujte po dobu 2 min.
- 20) Odstraňte kolonku, eluovaná DNA je v roztoku.
- 21) Stanovte koncentraci DNA podle cvičení č. 4 nebo 5, proveďte elektroforézu podle cvičení č. 13 a posuďte kvalitu izolované DNA. Uskladněte DNA při -20 °C.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

JETQUICK, 2005 březen. JETQUICK Plasmid Miniprep spin Kit protocol