

Plazmid izolálás

Bevezetés:

A plazmidokkal történő in vitro manipulációhoz, nem elég a sejtben felszaporítani, de onnan ki is kell nyerni a plazmidokat. Baktériumok plazmidjainak kinyerésére igen egyszerűen kivitelezhető eljárások alakultak ki. A plazmidot meg kell tisztítani a sejttermelékétől, a kromoszómális DNS-től, az RNS-ektől és a fehérjéktől.

Plazmid kinyerése *E. coli* sejtekből:

Az *E. coli*t antibiotikum tartalmú táptalajon szaporítjuk, ezzel a szelekciós nyomást biztosítjuk, hogy a plazmid-replikáció és az antibiotikum rezisztencia gén expressziója fennmaradjon a sejtben. A felszaporított sejteket centrifugálással elválasztjuk és roncsoljuk, hogy beltartalmukhoz hozzáférjünk. A sejtek lízisét forralással vagy lúgos kezeléssel oldhatjuk meg, mindkét esetben lizozimos kezeléssel kombinálva.

Sejtek roncsolása forralással:

500 ml tenyészetből centrifugált sejtömeget felfuszpendáljuk 10 ml STET oldatban (NaCl, Tris, EDTA, Triton-X keveréke), majd 10 ml friss lizozim oldatot (20 mg/ml Tris) teszünk hozzá. A sejtszuszpenziót felmelegítjük és 40 másodpercig forrpontra tartjuk, folyamatos rázás közben. Ezután 5 percre jég hideg vízbe tesszük. A lombik viszkózus tömegét 25000 rpm fordulatszámmal 30 percig ultracentrifugáljuk 4 °C-on, majd egyensúlyi cézium klorid - etídium bromid gradiens centrifugálással tisztítjuk.

Sejtek roncsolása lúgos kezeléssel:

500 ml tenyészetből centrifugált sejtömeget felfuszpendáljuk 10 ml glükóz, Tris, EDTA oldatban, mely 5 mg/ml lizozim enzimet is tartalmaz. 5 perc állás után 20 ml NaOH - SDS oldatot teszünk a sejtszuszpenzióhoz. Az NaOH - SDS szétroncsolja a sejteket és csapadékot képez a nagymolekulájú sejtalkotókkal. Ebből a csapadékból a viszonylag kis molekulású plazmid visszaoldható (renaturálható) 4,8 pH-jú K-acetát oldattal és centrifugálással a felülúszóban lévő plazmid elválasztható a csapadékban feldúsult nagyobb DNS és fehérjemolekuláktól. A felülúszóban oldott plazmidot izopropil-alkoholos kicsapással és centrifugálással nyerjük ki. A plazmid ily módon történt dúsítása és szelektív kinyerése után a kisebb méretű DNS, RNS és fehérjeszennyeződéstől utólagos tisztítással, vagy ultracentrifugálással szabadíthatjuk meg a plazmidot.

Plazmid tisztítása:

A szennyező fehérjéktől fenol-kloroformos mosással szabadíthatjuk meg a plazmidot, a kisebb molekulású RNS-ektől RNázos kezeléssel. A preparatív gélelektroforézis és UC mindentől megtisztítja.

A gyakorlat leírása:

A gyakorlat során **pBR 322**, **pBR 329** és **pGLO** plazmidokat tartalmazó **DH1** és **HB 101** jelű *Escherichia coli* törzset használunk. A plazmidokat kinyerjük a sejtéből, majd elválasztjuk a nagymolsúlyú RNS-ektől, a fehérjéktől és a kromoszomális DNS-től. Teljesen tiszta plazmidot preparatív ultracentrifugás módszerrel nyerhetnénk, az alábbi módszer a plazmid feldúsulását és részleges tisztítását teszi lehetővé. A sejtek roncsolásához a nátrium-dodecil-szulfátos módszert használjuk. A kinyert plazmid kimutatása gélelektroforézissel történik.

Sejtek előkészítése plazmid kinyeréshez:

1. Inokulum: Inokulumként késő logaritmikus szaporodási fázisban lévő sejtek szolgálnak.
2. Szaporítás: A sejtek szaporítása antibiotikumot tartalmazó LB (Luria-Bertani) tápoldatban 37 °C-on történik egy éjszakán át OD=0,4-ig. Az így felszaporított sejteket használjuk plazmid kinyeréshez. (A 25 cm³ LB tápoldathoz 250–300 µl c_{amp}=3,5–4 mg/ml ampicillin oldatot adunk.)

LB tápoldat: 10 g pepton /tripton
5 g élesztőkivonat
10 g NaCl
1000 cm³ deszt. víz pH 7.5
Sterilizés autoklávban.

Ampicillin oldat: 3,5-4 mg Amp/ml deszt. víz
Sterilizés membránszűrővel.

Megjegyzések: A táptalaj antibiotikum tartalma biztosítja a szelekciós nyomást, mely a plazmidok szaporodásához vezet. Antibiotikum nélkül az osztódó sejtek nem szintetizálnak plazmid DNS-t. Plazmid amplifikálására több kutató javasolja a szaporodás utolsó néhány órájában chloramphenicol alkalmazását, mely leállítja a kromoszomális DNS szintézisét, de a plazmid szintézisét nem befolyásolja. Így a plazmid DNS / kromoszomális DNS arány előnyösen megnő a plazmid izoláláshoz.

Az izolálás menete:

1. Sejtek centrifugálása: 1,5 cm³ baktérium kultúrát a szaporodás exponenciális szakaszában Eppendorf csőbe töltünk, majd 5000 rpm-mel 15 percig centrifugáljuk. A plazmid kinyerés sikerességének biztosítása érdekében a felülúszó leöntése után újabb 1 cm³ baktérium szuszpenziót bemérünk a lecentrifugált sejteket tartalmazó Eppendorf csövünkbe és a centrifugálást megismételjük.

2. A sejtek kinyerése: Az üledéket (baktérium sejtek) 0,4 ml TE oldatban szuszpendáljuk, jól elkeverjük.

TE oldat: 21 g Trisz
0.37 g EDTA-Na
100 cm³ deszt. víz pH 8
Sterilizés autoklávban.

3. A sejtek roncsolása: 0,4 ml Na-laurilszulfát oldatot (0,2 M NaOH, 1 % SDS) adunk, enyhén elkeverjük, majd 10 percig 0 °C-on tartjuk.

Összetétel – Kémcsőben összemérni: 2,8 ml víz + 0,4 ml 10 % SDS + 0,8 ml 1 M NaOH, ebből

kell 0,4 ml-t kivenni. A NaOH a pH-t 12,4-re értékre tolja el, az SDS komplexet képez a nagymolsúlyú RNS-sel, a kromoszómális DNS-sel és a fehérjékkel.

4. Plazmid renaturálása: 0,3 ml 3M NaOAc oldatot (pH=4,8) adunk az elegyhez óvatosan megfordítjuk kétszer keverés céljából és további 5 percre 0 °C-ra tesszük. Az óvatos keverés lehetővé teszi, hogy a NaOAc oldat renaturálja plazmidot a csapadékból, tehát a plazmid a felülúszóba kerül.

5. Elválasztás: Az oldatban lévő plazmidot a kicsapott fehérjétől, RNS-től és kromoszómális DNS-től centrifugálással választjuk el, 15 perc; 12 000 rpm.

Szükség esetén a fehérjék eltávolítására két út lehetséges: a fenolos fehérjementesítés (5a), vagy a CsCl-etídium-bromid gradiensben való egyensúlyi centrifugálás.

5a. A centrifugálás után a felülúszót (kb. 0,6 ml) azonos térfogat (0,6 ml) fenollal (TRIS-szel telített) kirázzuk. Max. 1 perc Wortex, majd 5 perc centrifugálás 12 000 rpm-mel.

Utána a felülúszót (vizes fázis) kb. 0,6 ml-t, fele-azonos mennyiségű 0,3 ml kloroformmal kirázzuk. Max. 1 perc Wortex, majd 5 perc centrifugálás 12 000 rpm-mel

Az alsó fázist eldobni és a kloroformos kirázást az előbb említett módon még egyszer megismételni.

6. Plazmid kicsapása: A felülúszó oldatban lévő plazmidból 0,4 ml-t egy új centrifugacsőbe téve, 0,8 ml -20 °C-os 96 %-os etanollal lecsapjuk, 20 percig -20 °C-on tartjuk.

7. Plazmid csapadék centrifugálása és mosása: 15 perces 12 000 rpm centrifugálás után a kicsapódott plazmidról a felülúszót leöntjük, a plazmidot megszáritjuk 70 %-os etanollal mossuk (200 µl csövenként, 5 perc centrifugálás).

8. Plazmid oldása: A kapott plazmidot 10 µl TE pufferben feloldjuk, teszünk hozzá 3 µl STOP keveréket és -20 °C-on tároljuk. (Ha a kinyert plazmidot transzformációhoz fogjuk használni, akkor 15 µl TE pufferben oldjuk fel, ebből 7 µl-hez 3 µl STOP keveréket adunk és -20 °C-on tároljuk, 8 µl-t félreteszünk a transzformációhoz.)

9. A plazmid izolálás sikerességét agaróz gél elektroforézissel ellenőrizhetjük.

Beadandó jegyzőkönyv:

1. Az izoláláshoz használt törzs és az izolált plazmid neve.
2. A felcseppentési terv és az elektroforézis eredménye rajzon, magyarázat.
3. A kontroll és az izolált plazmid csíkjának/csíkjainak távolsága a zsebtől.
4. A plazmid becsült mérete a DNS marker alapján.
5. Az eredmények kiértékelése.