

Εργαστηριακές ασκήσεις ΜΒ

Άσκηση 5

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Θεωρία

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA είναι μια σχεδόν καθημερινή πειραματική διαδικασία σε εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας καθώς γίνεται προκειμένου:

- ❖ Να απομονώσουμε DNA από πλασμίδια-φορείς που θα χρησιμοποιηθούν για ανασυνδυασμό και μετασχηματισμό (transformation) βακτηριακού ξενιστή
- ❖ Να ανιχνεύσουμε ανασυνδυασμένα πλασμίδια από έναν πληθυσμό βακτηριακών αποικιών μετά από μετασχηματισμό
- ❖ Να μελετήσουμε το DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες
- ❖ Να προσδιορίσουμε την πρωτοδιάταξη ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA



Τα βασικά στάδια της διαδικασίας απομόνωσης πλασμιδιακού DNA είναι:

- λύση των βακτηριακών κυττάρων που φέρουν τα πλασμίδια
- διαχωρισμός του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά
- κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με αιθανόλη

Μέθοδος της αλκαλικής λύσης.

- ❖ Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση αλκαλικού διαλύματος NaOH και SDS προκειμένου να γίνει λύση των βακτηριακών κυττάρων και αποδιάταξη τόσο του χρωμοσωμικού DNA (και των πρωτεϊνών που το συνοδεύουν) όσο και του πλασμιδιακού DNA.
- ❖ Εξουδετέρωση του διαλύματος με οξικό κάλιο επιτρέπει την αναδιάταξη των δύο αλυσίδων του κυκλικού πλασμιδιακού DNA (που έχουν παραμείνει ενωμένες μεταξύ τους) αλλά όχι και των μακριών αλυσίδων του χρωμοσωμικού DNA που σχηματίζουν ένα αδιάλυτο ίζημα μαζί με τις πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα βακτηριακά υπολείμματα.
- ❖ Η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA (και του βακτηριακού RNA) παραμένει διαλυτή και μπορεί να παραληφθεί μετά από φυγοκέντρηση από το υπερκείμενο.
- ❖ Ακολουθεί εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

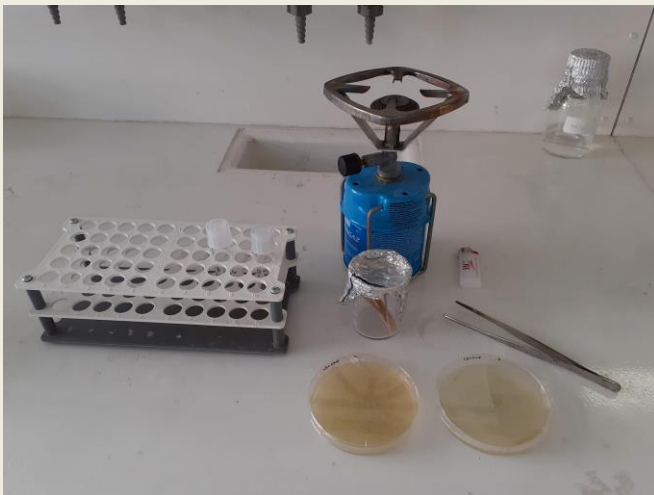
Στον πάγκο



Πειραματική διαδικασία

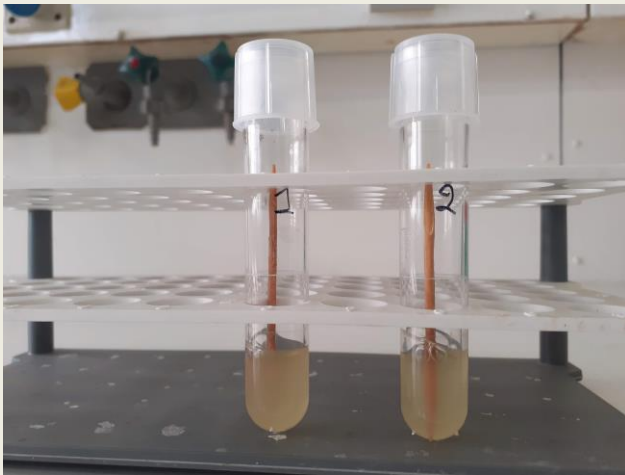
1. Εμβολιασμός 2 ml θρεπτικού μέσου LB στο οποίο έχει προστεθεί 100 $\mu\text{g/ml}$ αμπικιλίνη με μια μονή άσπρη αποικία από τα τρυβία. Επώαση στους 37° C, για 16 ώρες περίπου, υπό ανακίνηση.

Το πλασμίδιο pUC18 περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Έτσι, η παρουσία του αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο απαγορεύει την ανάπτυξη βακτηρίων που δεν περιέχουν το πλασμίδιο.



Την επόμενη μέρα

2. Μεταφορά σε σωλήνα φυγοκέντρου τύπου errendorf 1.5 ml κορεσμένης βακτηριακής καλλιέργειας.
3. Φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο errendorf 3 min.



4. Αφαίρεση του υπερκειμένου και διατήρηση του βακτηριακού ιζήματος σε πάγο. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl παγωμένου διαλύματος GET (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris.HCl pH 8.0). Η αναδιάλυση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια vortex (για 1 min περίπου). Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

Το EDTA δεσμεύει δισθενή κατιόντα από την κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να την αποσταθεροποιεί. Επίσης, αναστέλλει τη δράση των νουκλεασών. Η γλυκόζη διατηρεί το διάλυμα ισότονο με τα κύτταρα ώστε να μη συμβεί απότομη ρήξη αυτών.



5. Προσθήκη 200 μ l από πρόσφατα παρασκευασμένο αλκαλικό διάλυμα (0.2 N NaOH, 1% SDS). Ήπια ανάδευση του σωλήνα. ΠΡΟΣΟΧΗ: όχι vortex. Επώαση στον πάγο για 5 min.

Πραγματοποιείται λύση της κυτταρικής μεμβράνης και χαλάρωμα του κυτταρικού τοιχώματος οπότε απελευθερώνονται και τα πλασμίδια. Το NaOH αποδιατάσσει το DNA.



6. Προσθήκη 150 μ l παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου pH 4.8. Ήπια ανάδευση του σωλήνα. Επώαση σε πάγο για 5-10 min.

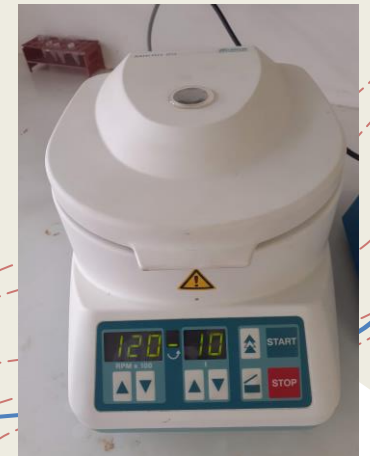
Εξουδετέρωση του διαλύματος. Το κυκλικό πλασμιδιακό DNA αναδιατάσσεται και παραμένει διαλυτό, αντίθετα από το χρωμοσωμικό που σχηματίζει ένα αδιάλυτο ίζημα. Το SDS παρουσία ΚΑc κατακρημνίζεται (σχηματίζει αδιάλυτο ΚDS).

7. Φυγοκέντρηση για 5 min.

Με τη φυγοκέντρηση το χρωμοσωμικό DNA, το ΚDS και τα βακτηριακά υπολείμματα πέφτουν στο ίζημα ενώ το πλασμιδιακό DNA παραμένει στο υπερκείμενο.

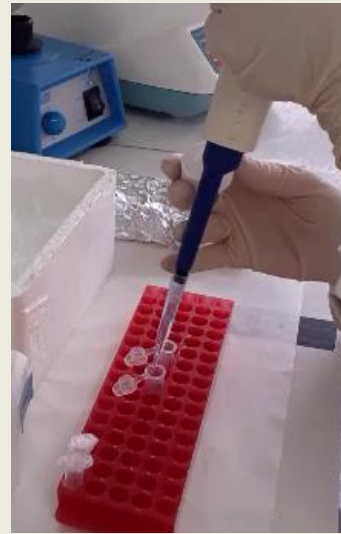
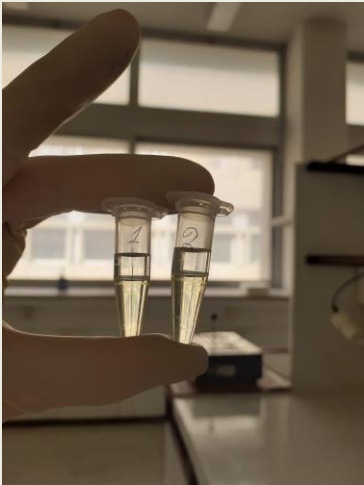


8. Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καθαρό σωλήνα με πιπέτα Pasteur. Προσθήκη 0.5 ml διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου 1:1. Vortex για 10 sec. Φυγοκέντρηση για 2 min. Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων από πρωτεΐνες και λιπίδια (βλ. άσκηση 2-RNA).



9. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό σωλήνα. Προσθήκη 1 ml αιθανόλη 95% (2 όγκους), Ανάδευση και επώαση για 5 min στον πάγο.

Κατακρήμνιση πλασμιδιακού DNA (και RNA) (βλ. άσκηση 1). Εδώ το μέγεθος των μορίων και η αναμενόμενη ποσότητα DNA-RNA (από 1,5 ml καλλιέργεια) δεν απαιτεί την παραμονή του σωλήνα στον πάγο για τη δημιουργία συμπλεγμάτων αλλά δεν επιτρέπει και το σχηματισμό ορατού ιζήματος. Έτσι, για την παραλαβή του ιζήματος απαιτείται φυγοκέντρηση.



10. Φυγοκέντρηση για 5 min. Απόρριψη υπερκειμένου.

11. Προσθήκη 0.5 ml 70% αιθανόλη στο ίζημα. Vortex και επανάληψη του βήματος 10.

12. Στέγνωμα ιζήματος στον αέρα για 10 min.

Αναδιάλυση σε 20 μ l TE (10 mM Tris.HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

