



Εργαστηριακές ασκήσεις ΜΒ 2021

Άσκηση 4

Μετασχηματισμός βακτηρίων με
ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Θεωρία

Μετασχηματισμός (transformation)

Η διαδικασία με την οποία ένας οργανισμός-ξενιστής μπορεί να προσλάβει DNA από το περιβάλλον.

- Στη φύση: γενετική επιδεκτικότητα (genetic competence) – όχι όλα τα βακτήρια (σύζευξη)
- Στο εργαστήριο: επεξεργασία βακτηρίων ώστε να γίνουν δεκτικά (competent) (μετασχηματισμός)

Κλωνοποίηση DNA (DNA cloning)

Η κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA και η διατήρησή τους μέσα σε κύτταρα.

- Η παραγωγή πανομοιότυπων αντιγράφων DNA από ένα αρχικό μόριο μέσω της αναπαραγωγής των κυττάρων-ξενιστών (που φέρουν αυτό το DNA), τα οποία σχηματίζουν έναν κλώνο, δηλαδή μια αποικία γενετικώς όμοιων κυττάρων (που περιέχουν το DNA που μας ενδιαφέρει).

Αναςυνδυασμένα πλασμίδια

Πλασμίδια που έχουν ενσωματώσει μια οποιαδήποτε ξένη αλληλουχία DNA

Βασικά Εργαλεία:

Πλασμίδιο - Φορέας κλωνοποίησης
Περιοριστικά ένζυμα
T4 DNA λιγάση

Πλασμίδια - φορείς

Κυκλικά μόρια DNA μικρού μεγέθους (~3kb)

Προέρχονται από φυσικά εξωχρωμοσωμικά cDNA που απαντώνται κυρίως σε βακτήρια

Συχνά φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

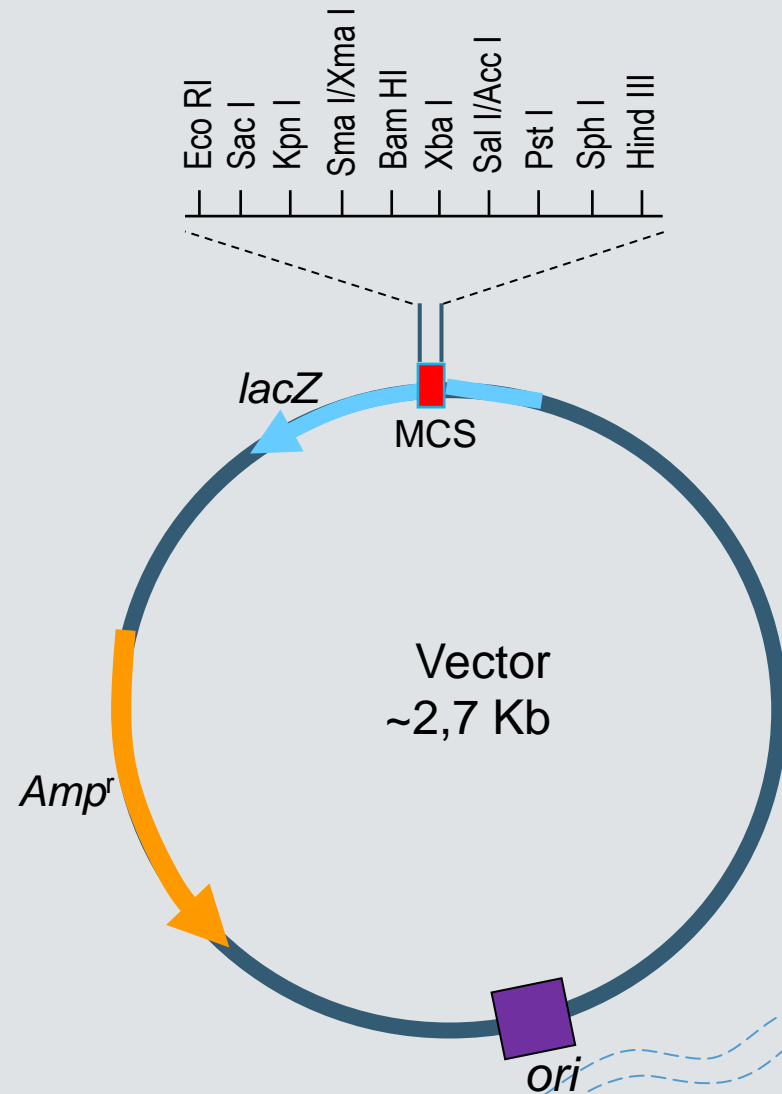
- Αναπαράγονται ανεξάρτητα (πολλά αντίγραφα ανά κύτταρο)
- Φέρουν έναν επιλέξιμο δείκτη

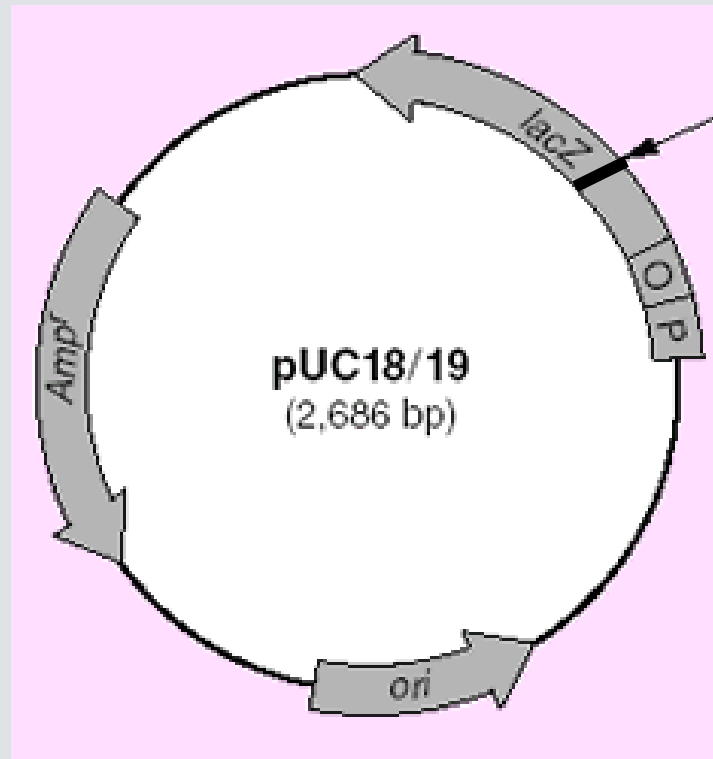
Amp^r : Γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (υδρολύει αμπικιλίνη).

ori: σημείο έναρξης της αντιγραφής του DNA (origin of replication)

Πολυσύνδεσμος (MCS): αλληλουχία που περιέχει μοναδικές θέσεις για συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η οποία παρεμβάλλεται στο γονίδιο *lacZ* στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης

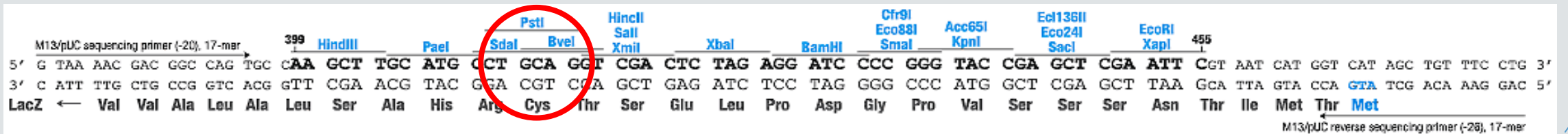
lacZ : Γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Το προϊόν του γονιδίου *lacZ* συμβάλλει στην εμφάνιση μπλε χρώματος στις βακτηριακές αποικίες όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει η ουσία X-gal.



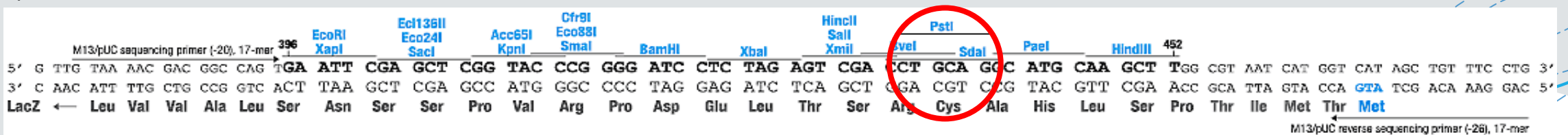


Πολυσύνδεσμος (MCS, multi-cloning site)

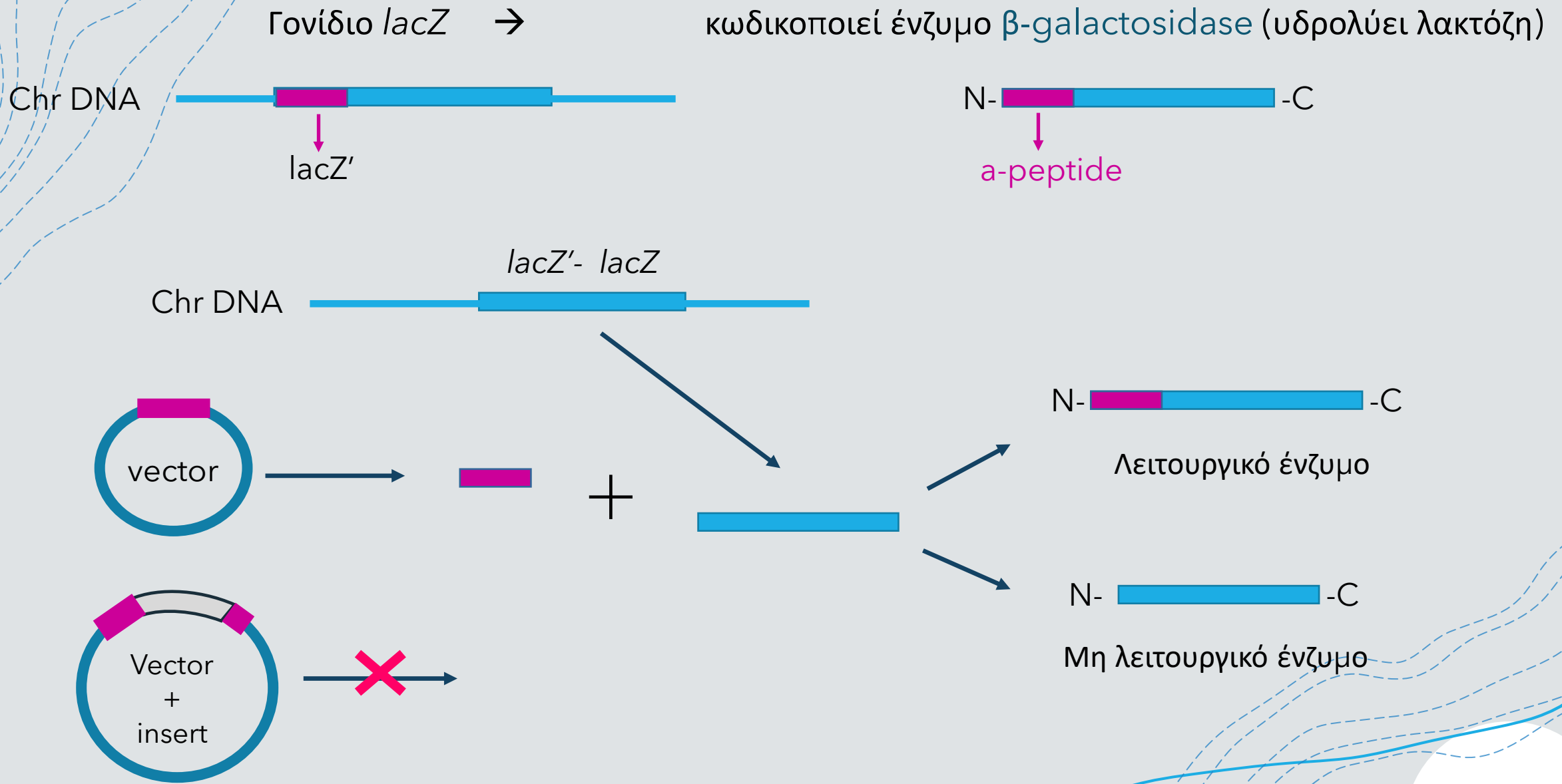
pUC18



pUC19

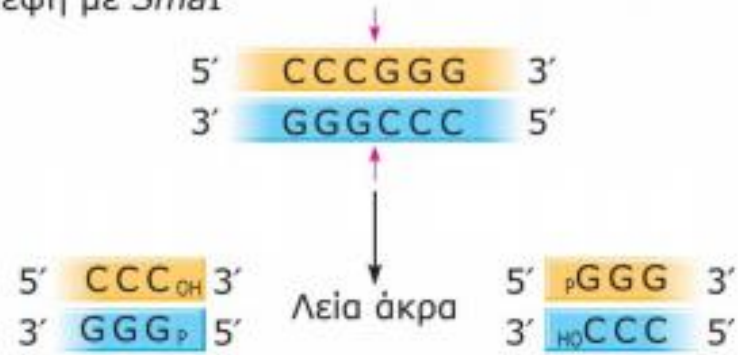


α-συμπληρωματικότητα

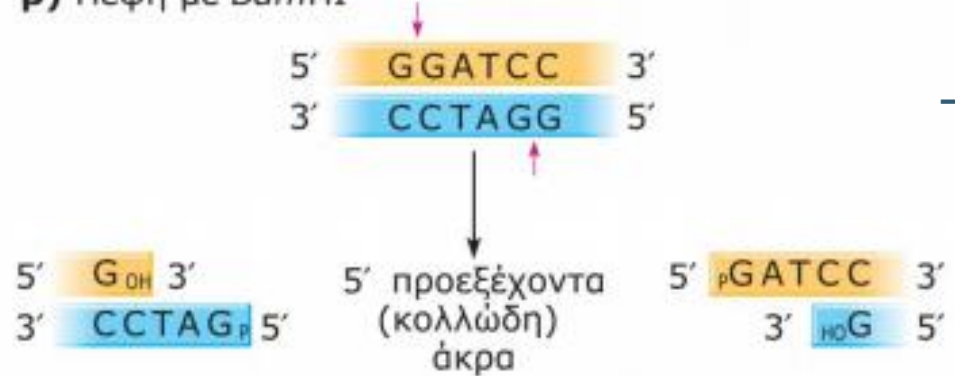


Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

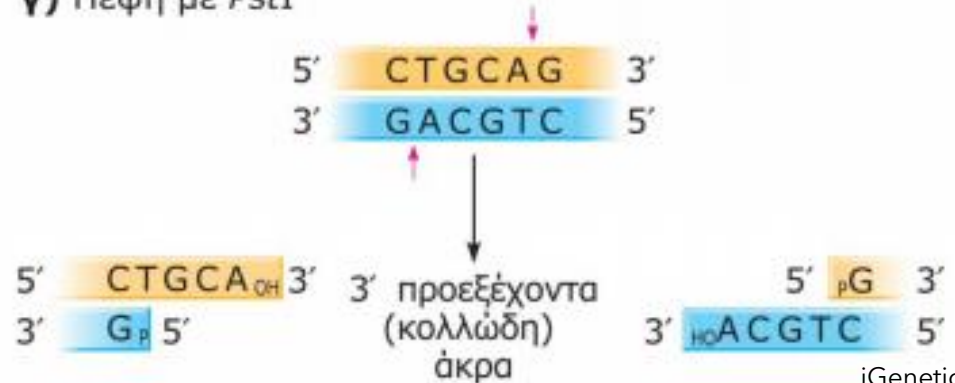
α) Πέψη με *Sma*I



β) Πέψη με *Bam*HI



γ) Πέψη με *Pst*I



→ Η πέψη αφήνει στα άκρα 5' P και 3' OH

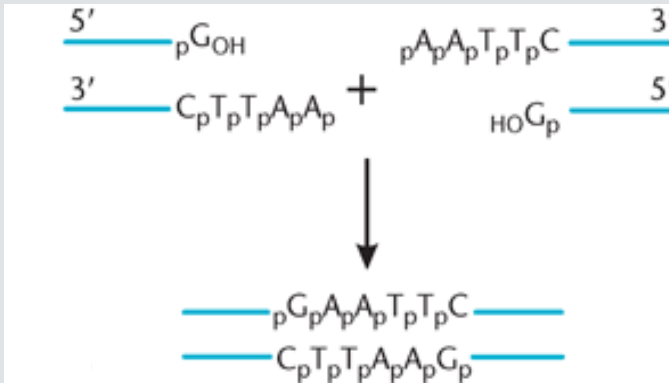
Προσοχή στη μεθυλίωση!

DAM μεθυλάση: GATC

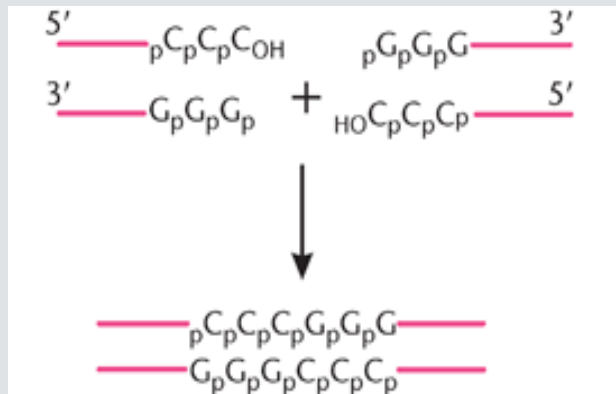
DCM μεθυλάση: CAGG ή CCTGG

T4 DNA ligase

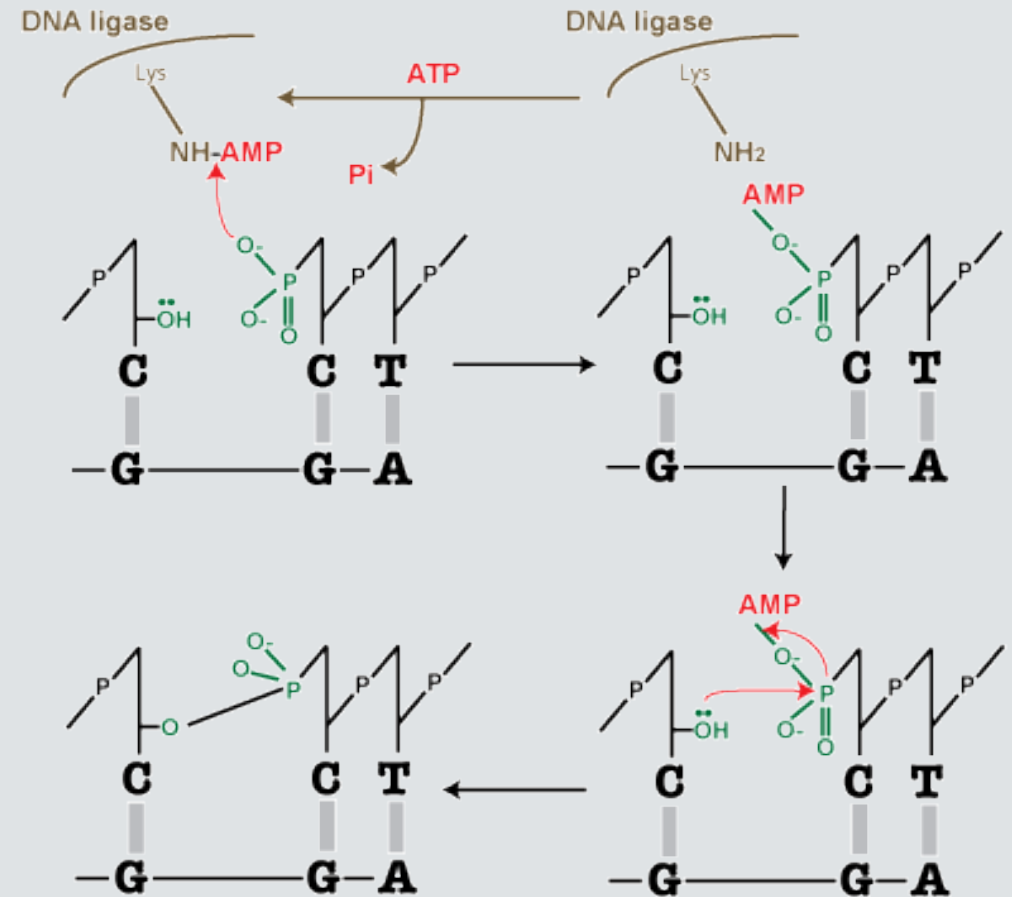
ενώνει συμπληρωματικά...



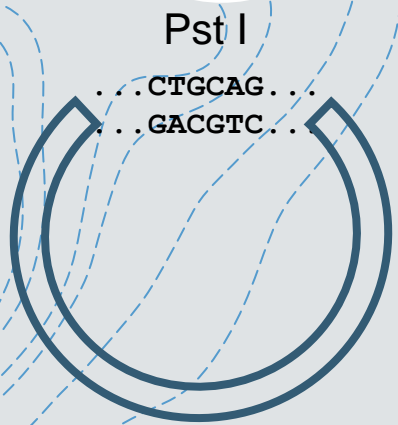
... και ευθύγραμμα άκρα



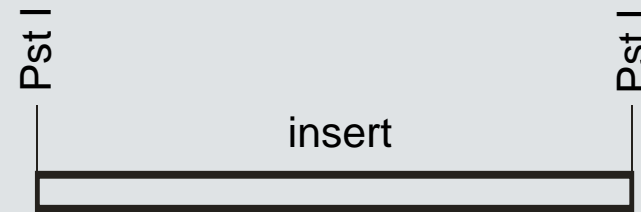
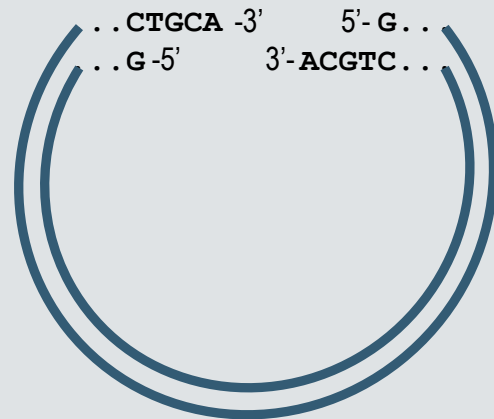
και δημιουργεί σταθερά μόρια .



Αντίδραση σύνδεσης (ligation) του τμήματος DNA (insert) με άκρα Pst I με τον πλασμιδιακό φορέα:



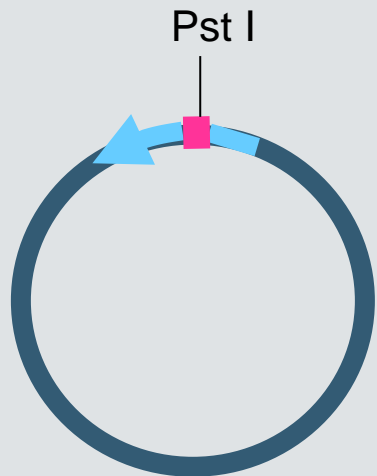
Πέψη με Pst I



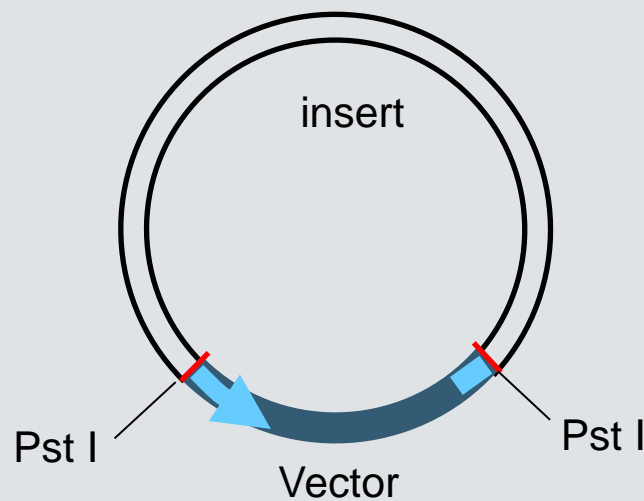
Τμήμα DNA με άκρα Pst I

Μετά την αντίδραση σύνδεσης προκύπτουν 3 πληθυσμοί κυκλικών μορίων:

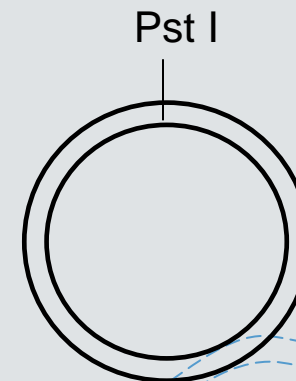
Μη ανασυνδεδασμένα πλασμίδια
(επανασύνδεση άκρων πλασμιδίου)



Ανασυνδεδασμένα πλασμίδια



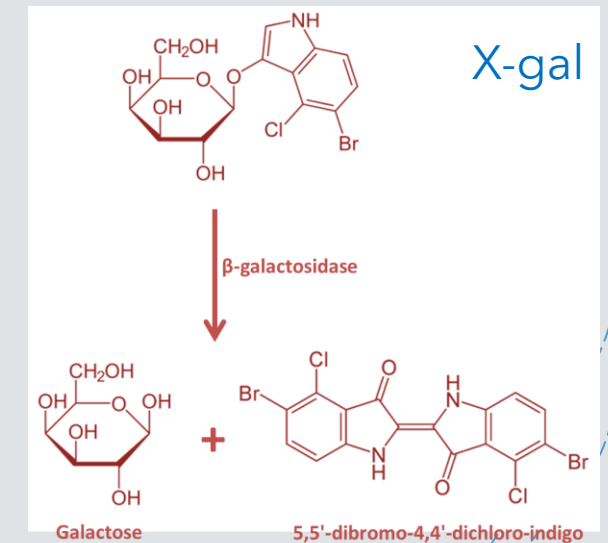
Κυκλοποιημένα μόρια insert



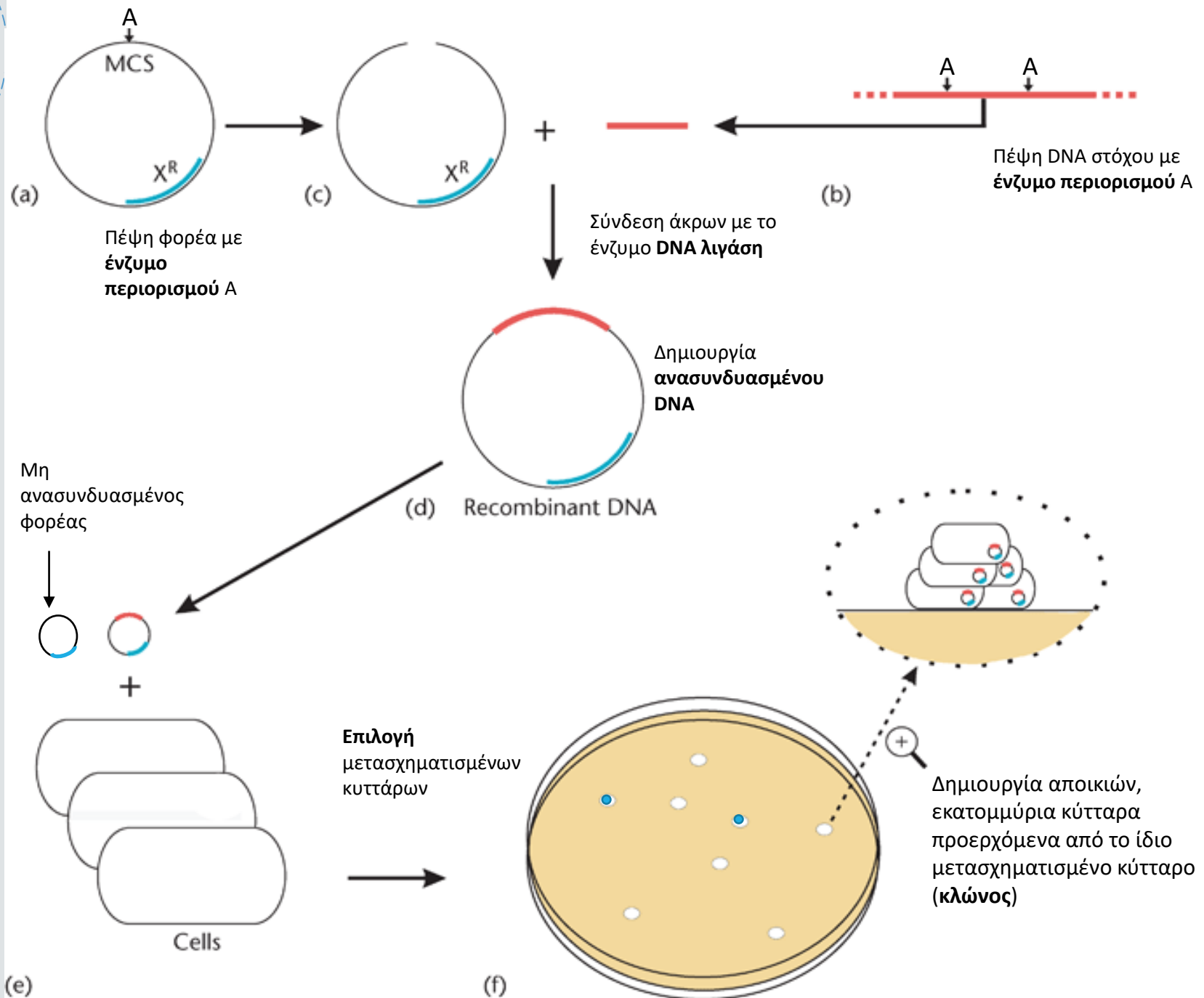
Μετασχηματισμός

- Δημιουργία δεκτικών κυττάρων (κατεργασία με διαλύματα CaCl_2 ή και άλλων δισθενών κατιόντων)
- Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων με το μίγμα της αντίδρασης ligation
- Ανάπτυξη βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει **amp** και **X-gal** (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)
- Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Βακτήρια	Ανάπτυξη σε θρεπτικό με amp	Χρώμα αποικιών παρουσία X-gal
Μη μετασχηματισμένα	—	—
Μετασχηματισμένα με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	+	Μπλε
Μετασχηματισμένα με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	+	Άσπρο



Αποφυγή επανασύνδεσης του φορέα με απομάκρυνση των ακραίων φωσφόρων (φωσφατάση)



Στον πάγκο

- ✓ Αντίδραση σύνδεσης άκρων:
Insert ~7 Kb με άκρα PstI
Vector ~3 Kb κομμένος με PstI, *amp*, *lacZ'*
- ✓ Δημιουργία δεκτικών κυττάρων
κυτταρική σειρά DH5α, *E. coli*
- ✓ Μετασχηματισμός



Στείρες συνθήκες (αποστειρωμένα υλικά, λύχνος)
Απόρριψη θρεπτικών και υλικών (πιπέτες, σωληνάκια) με βακτήρια σε **απολυμαντικό**

Αντίδραση σύνδεσης άκρων (Ligation)

Συστατικά	Τελικές ποσότητες/συγκεντρώσεις	Όγκος (μl)
Insert: ~7 Kb (100 ng/μl)	350 ng	
Vector: ~3 Kb (10 ng/μl)	50 ng	
10X buffer	1X	
T4 DNA ligase (90 u/μl)	6 u/μl	
H ₂ O		
Τελικός όγκος		30 μl

$$\frac{\text{moles } (i)}{\text{moles } (v)} = \frac{3}{1} \Leftrightarrow \text{moles } (i) = 3 \text{ moles } (v) \Leftrightarrow \frac{m(i)}{Mr(i)} = 3 \frac{m(v)}{Mr(v)} \Leftrightarrow \frac{m(i)}{7 \text{ Kb} \cdot 660} = 3 \frac{m(v)}{3 \text{ Kb} \cdot 660} \Leftrightarrow m(i) = 7 \cdot m(v) \Leftrightarrow m(i) = 7 \cdot 50 \text{ ng}$$

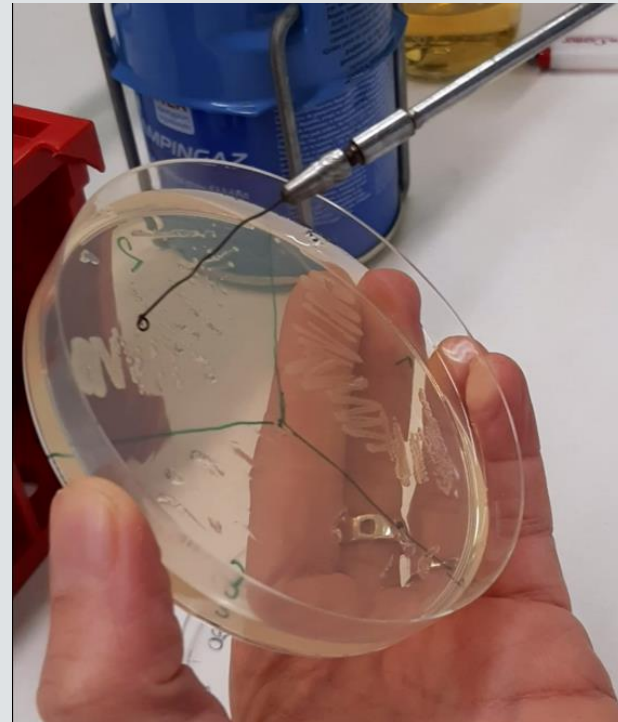
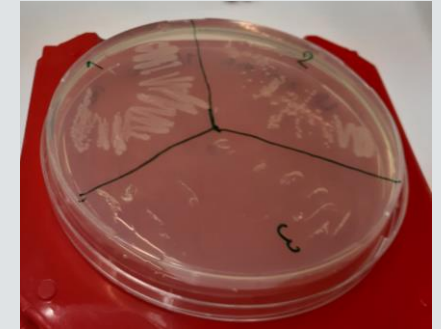
1 **bp** (ζεύγος βάσεων) \approx 660 Da (ενσωματωμένο σε δίκλωνο DNA ή RNA)

MB (δίκλωνου DNA) \approx αριθμός ζευγών βάσεων (bp) x 660 Da

Δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells)

Μέρα 1^η: starter culture

Εμβολιασμός θρεπτικού μέσου με μια αποικία βακτηρίων DH5α και επώαση για περίπου 16h (ο/ν).

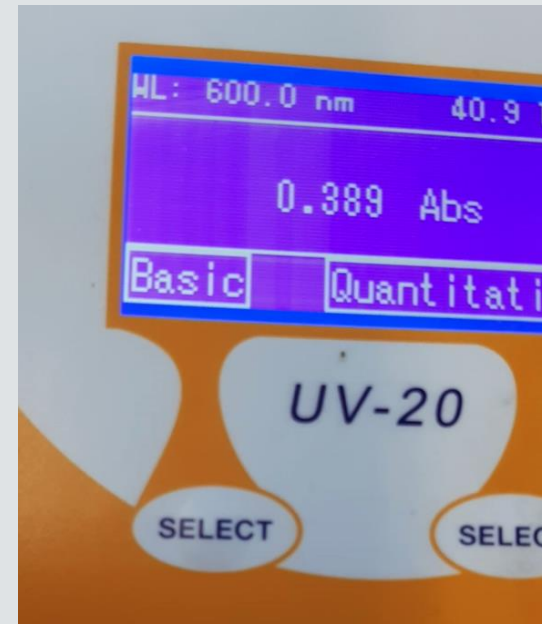


Μέρα 2^η:

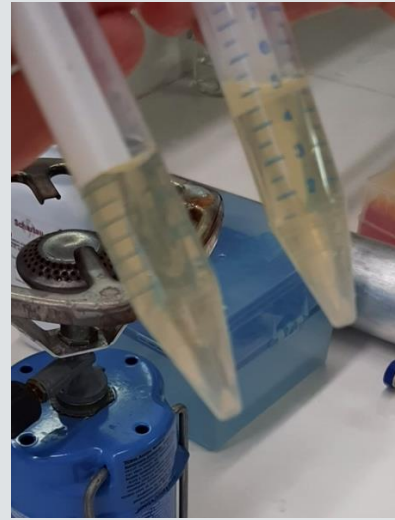
1. Εμβολιάζουμε θρεπτικό μέσο LB με 0.1 ml από την ο/η καλλιέργεια του στελέχους DH5α. Επωάζουμε στους 37°C για 1.5-2 ώρες έως ότου η οπτική πυκνότητα (O.D) της νέας καλλιέργειας να έχει τιμή 0.3 - 0.5 (δηλαδή τα κύτταρα να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης).



Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D) της νέας καλλιέργειας στα 600 nm.



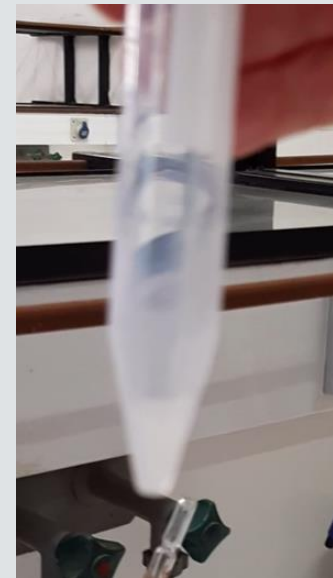
2. Μοιράζουμε από 5 ml σε αποστειρωμένους σωλήνες (των 10ml) και φυγοκεντρούμε στις 4000 grm, στους 4° C για 10 min.



3. Αδειάζουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό. Στο ίζημα προσθέτουμε 1 ml αποστειρωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 και επαναδιαλύουμε ήπια.
4. Φυγοκεντρούμε στις 4000 grm, στους 4°C για 5 min.



5. Αδειάζουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό. Στο ίζημα προσθέτουμε 200 μ l αποστειρωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 . Διατηρούμε τα δεκτικά κύτταρα στον πάγο.



Μετασχηματισμός (Transformation)

6. Στα 200 μ l δεκτικά κύτταρα, προσθέτουμε 1-200 ng DNA σε μέγιστο τελικό όγκο 10 μ l. Επωάζουμε 25 min στον πάγο.
7. Επωάζουμε 2 min στους 42°C (θερμικό σοκ) και αμέσως τα βάζουμε στον πάγο.
8. Προσθέτουμε 1 ml LB και επωάζουμε για 45 min στους 37°C.



Προετοιμασία τρυβλίων: Επίστρωση X-gal στα τρυβλία που ήδη περιέχουν LB+amp



Προσθήκη 50 μ l x-gal
από stock 20 mg/ml



Αποστείρωση ράβδου
επίστρωσης



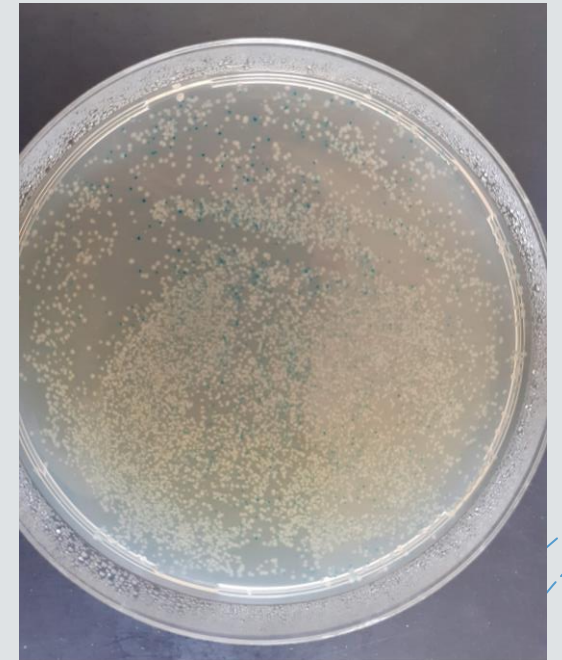
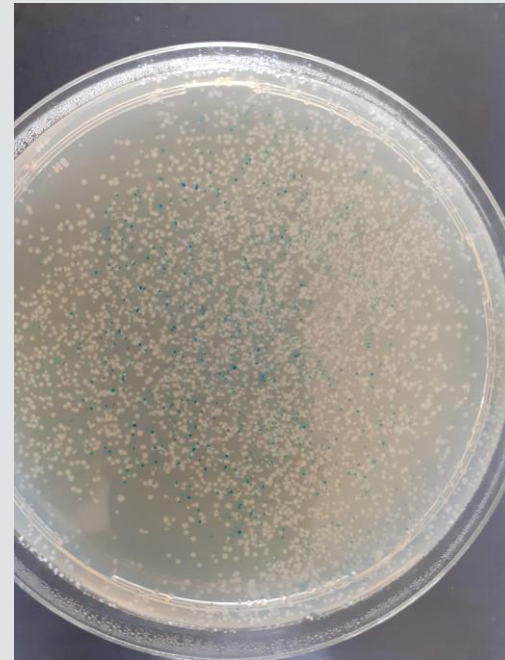
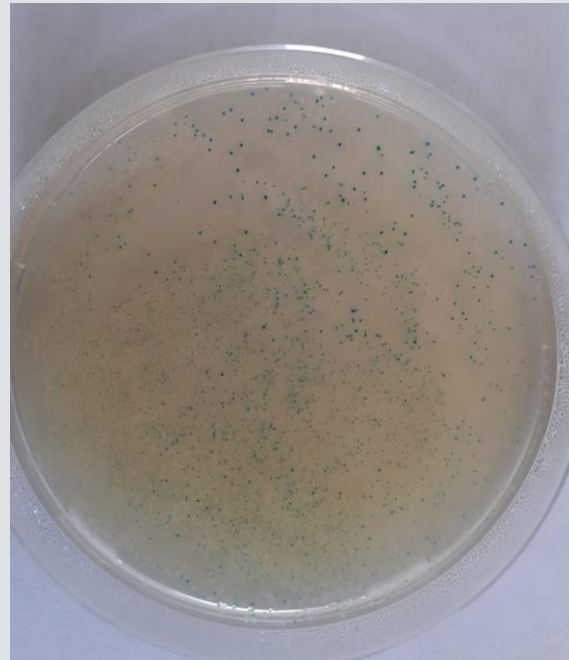
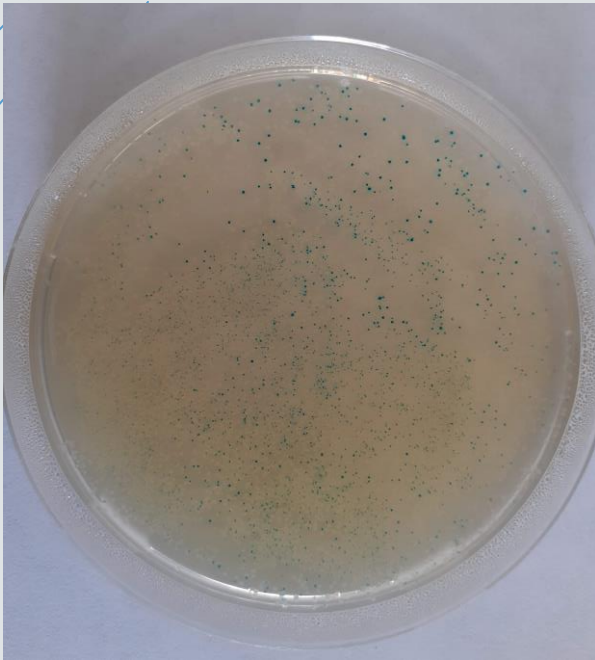
Επίστρωση σε όλη την
επιφάνεια του τρυβλίου

9. Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 3 min. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό και αναδυσάλουμε το ίζημα σε 100 μl LB.
10. Επιστρώνουμε τα βακτήρια σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB-άγαρ που περιέχει αμπικιλίνη και X-gal. Επιάζουμε στους 37°C για 16 ώρες περίπου.



Μέρα 3^η

11. Την επόμενη μέρα ελέγχουμε τα τρυβλία για την εμφάνιση μπλε και άσπρων αποικιών.
Αποθηκεύουμε τα τρυβλία στους 4° C.



Απόδοση μετασχηματισμού: αριθμός μετασχηματισμένων βακτηρίων/μg πλασμιδιακού DNA

Για εξάσκηση: αντίδραση σύνδεσης άκρων (ligation)

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση ή ποσότητα	Όγκος (μl)
Vector: 3 Kb (10 ng/μl)	30 ng	
Insert: 1 Kb (10 ng/μl)	? ng	
Buffer (5X)	1X	
T4 DNA ligase (120 u/μl)	6 u/μl	
H ₂ O		
Τελικός όγκος αντίδρασης		20 μl

Όγκος αντίδρασης (final reaction volume): 20 μl

Μοριακή Αναλογία (molar ratio) insert:vector = 2:1