

Laboratorium z biochemii

DLA STUDENTÓW BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA

Praca zbiorowa pod redakcją *Antoniego Polanowskiego*
Poprawki do wydania III wprowadzone pod redakcją
Justyny Ciuraskiewicz i Elżbiety Gocek

7. TECHNIKI BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Autorzy: Teresa Olczak, Magdalena Wołoszyńska (ed. Elżbieta Gocek)

7.1	Izolacja całkowitego DNA z liści fasoli	2
7.1.1	Trawienie całkowitego DNA enzymem <i>Eco RI</i>	3
7.2	Izolacja RNA z liści	6
7.2.1	Elektroforeza RNA	7
7.3	Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR	7
7.3.1	Projektowanie starterów	11
7.3.2	Startery do metody PCR z dołączonymi niekomplementarnymi fragmentami	11
7.3.3	Amplifikacja mitochondrialnego genu <i>atpA</i> na matrycy całkowitego DNA	11
7.4	Klonowanie produktu PCR do wektora sekwencyjnego	12
7.4.1	Wektory plazmidowe	13
7.4.2	Ligacja	15
7.4.2.1	Przygotowanie komórek kompetentnych metodą Inoue	16
7.4.2.2	Transformacja – wprowadzenie plazmidowego DNA do bakterii <i>E.coli</i>	16
7.4.2.3	Izolacja plazmidowego DNA z <i>E.coli</i> (zestaw firmy Macherey-Nagel)	17

7.1 IZOLACJA CAŁKOWITEGO DNA Z LIŚCI FASOLI

Vallejos C.E., Sakiyama N.S., Chase C.D. (1992) *Genetics* **131**, 733-740.

Zasada metody

Przedstawiona metoda służy do izolacji całkowitego DNA z liści roślin, a więc w otrzymanym preparacie znajduje się DNA jądrowy, chloroplastowy i mitochondrialny. Do preparacji wykorzystuje się młode liście, ponieważ w młodych tkankach zawartość DNA w stosunku do białek jest korzystna, a zatem z nich właśnie najłatwiej otrzymać względnie czysty DNA z dobrą wydajnością.

Pierwszym etapem preparacji jest homogenizacja liści w ciekłym azocie poprzez ich ucieranie w moździerzu. Drugi etap preparacji to liza komórek, która zachodzi pod wpływem buforu lizującego (zawierającego detergent) w temperaturze 65°C. W trzecim etapie zostaje usunięta większość zanieczyszczeń białkowych przez ekstrakcję równą objętością chloroformu. Po wirowaniu powinien wystąpić charakterystyczny układ faz: na górze znajduje się faza wodna, a pod nią faza organiczna, na ich granicy zbiera się kożuszek z resztek liści. Czwarty etap preparacji polega na precypitacji kwasów nukleinowych za pomocą izopropanolu. Do czystej zlewki należy wlać taką objętość izopropanolu o temperaturze pokojowej, która równa się 2/3 objętości fazy wodnej uzyskanej po ekstrakcji, a następnie wlać szybkim ruchem fazę wodną. Jest ważne, aby najpierw wlać alkohol, a dopiero do niego dodać od razu całą fazę wodną! Już po chwili w zlewce powinien być widoczny biały kłębuszek (DNA), wraz z upływem czasu staje się on coraz bardziej zwarty. Po zakończeniu precypitacji, DNA zawieszają w buforze TE, a następnie dodaje się RNazę i inkubuje w temp. 37°C. Jest to piąty etap preparacji, którego celem jest usunięcie RNA. W szóstym etapie ponownie ekstrahuje się preparat równą objętością chloroformu, by wreszcie w etapie siódmym zagęścić DNA przez precypitację po dodaniu 2 objętości 97% etanolu i 1/6 objętości 5 M NaCl. Następnie (etap 8) należy odwirować preparat przy 20 000 × g przez 20 minut – są to standardowe warunki wirowania po precypitacji DNA. Supernatant należy wylać, a osad wysuszyć na powietrzu. Wygląd osadu świadczy o jakości otrzymanego DNA, idealny jest osad przezroczysty i opalizujący. Do próbówki należy dodać bufor TE, w którym rozpuści się DNA. Po pewnym czasie, (jeśli nie ma pośpiechu, to następnego dnia) należy przenieść preparat do próbówki Eppendorfa. Preparat DNA na tym etapie nie jest jeszcze wystarczająco czysty, aby poddać go trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Dlatego wykonuje się dodatkową ekstrakcję fenolem i chloroformem, a następnie precypitację DNA (etapy 9 i 10).

Postępowanie

1. 4 g liści włożyć do schłodzonego moździerza i utrzeć w ciekłym azocie na gładki proszek. Dodać 14 ml buforu lizującego, przenieść do próbówki wirówkowej o pojemności 28 ml.
2. Inkubować przez 45 minut w temp. 65°C. Schłodzić próby.
3. Homogenat ekstrahować równą objętością chloroformu mieszając bardzo delikatnie! Oddzielić fazę wodną przez wirowanie (28 000 × g, 20 minut).
4. Precypitować DNA wlewając fazę wodną do małej zlewki (najlepiej o pojemności 25 ml), w której przygotowano 2/3 objętości izopropanolu o temperaturze pokojowej. Zlewkę przykryć folią aluminiową i pozostawić na 30 minut.
5. Za pomocą pipety pasteurowskiej z pętelką przenieść DNA do czystej próbówki wirówkowej, w której przygotowano 3 ml buforu TE oraz 60 µg RNazy. Próbę inkubować 15 minut w temp. 37°C.
6. Ponownie ekstrahować roztwór równą objętością chloroformu i odwirować (15 000 × g, 20 minut).
7. Fazę wodną przenieść do czystej próbówki wirówkowej i precypitować DNA dodając 1/6 objętości 5 M NaCl i 2 objętości 97% etanolu. Próbówkę pozostawić 1 godz. w lodówce.
8. Próbówkę odwirować przy 20 000 × g przez 20 minut, supernatant wylać, a osad suszyć na powietrzu. Do próbówki dodać 500 µl buforu TE i pozostawić ją w takiej pozycji, aby bufor obmywał osad. Preparat przenieść do próbówki Eppendorfa.
9. Preparat ekstrahować równą objętością fenolu, a następnie chloroformu delikatnie mieszając. Wirować przy 15 000 × g, 10 minut.
10. DNA precypitować dodając 1/6 objętości 5 M NaCl i 2 objętości 97% etanolu. Próbę pozostawić w lodówce, a następnie wirować przy 20 000 × g przez 20 minut. Osad zawiesić w 50 µl buforu TE.

Materiały i odczynniki

- bufor lizujący: 133,0 mM Tris, 6,7 mM EDTA, 0,95 M NaCl, 4% Sarcosyl, pH 7,8; tuż przed użyciem należy dodać 1,33 ml β -merkaptioetanolu na 100 ml buforu
- TE: 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0
- fenol (o czystości wymaganej w biologii molekularnej)
- izopropanol
- RNAza
- 5 M NaCl
- 97% etanol
- chloroform

7.1.1 Trawienie całkowitego DNA enzymem *Eco* RI

Węgleński P. *Genetyka molekularna*. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.

Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Third Edition 2001.

Zasada metody

Enzymy restrykcyjne (restryktazy, endonukleazy) zostały odkryte w latach sześćdziesiątych XX w. przez Wernera Arbera, Hamiltona Smitha i Daniela Nathansa. Enzymy te rozpoznają i przecinają określone sekwencje nukleotydowe w cząsteczce DNA. Sekwencje rozpoznawane przez restryktazy zawierają od 4 do 8 nukleotydów. Miejsce przecięcia cząsteczki DNA znajduje się w obrębie sekwencji rozpoznawanej lub w określonej odległości od niej.

Enzymy restrykcyjne występują u bakterii i sinic i stanowią antywirusową broń tych organizmów. Bakterie i sinice modyfikują sekwencje rozpoznawane przez restryktazy w swoim własnym materiale genetycznym chroniąc go w ten sposób przed działaniem restryktaz.

Działanie enzymów restrykcyjnych polega na hydrolizie wiązań fosfodiesterowych w obu niciach DNA. Miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne są palindromami, a miejsca przecięcia nici DNA są usytuowane symetrycznie (Rys. 7.1). Sekwencje palindromowe (*palindrom* – gr. „biegać tam i z powrotem”) to sekwencje nukleotydowe, które są identyczne, jeśli są czytane z obu nici w tym samym kierunku np. 5'→3'. Przecięcie nici następuje albo dla tej samej pary zasad i powstają wtedy cząsteczki DNA o tzw. „tępym” końcach, albo z przesunięciem o 1 lub 2 zasady – powstają cząsteczki o „lepkich” końcach (Rys. 7.1).

Enzymy restrykcyjne są wykorzystywane do identyfikacji i porównywania organizmów (Rys. 7.2), do izolacji fragmentów DNA z genomów oraz do konstruowania map restrykcyjnych (Rys. 7.3). Mapa restrykcyjna to obraz cząsteczki DNA, na którym zaznaczono miejsca rozpoznawane przez różne enzymy restrykcyjne z uwzględnieniem odległości między nimi wyrażonej liczbą nukleotydów.

Postępowanie

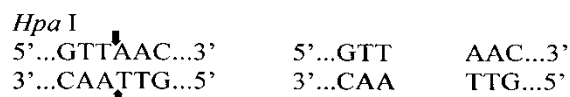
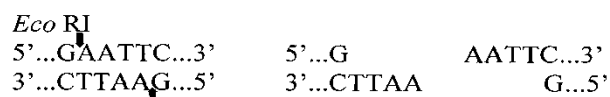
Uwaga! Enzym *Eco* RI dodawany jest do mieszaniny reakcyjnej porcjami, ponieważ wówczas trawienie jest bardziej efektywne. Enzym dodawany jest do mieszaniny reakcyjnej jako ostatni składnik i powinien być wyjmowany z zamrażarki tuż przed dodaniem do mieszaniny, przez cały czas powinien znajdować się na lodzie. W mieszaninie znajduje się również właściwy dla enzymu bufor (dostarczany łącznie z enzymem w stężeniu 10 razy większym od optymalnego dla reakcji). Reakcja jest prowadzona w temp. 37°C. Przed każdym dodaniem nowej porcji enzymu należy przez chwilę zwirować zawartość probówki z mieszaniną reakcyjną.

1. Przygotować mieszaninę reakcyjną:
 - całkowity DNA X μ l (5 μ g)
 - woda 44 μ l – X μ l
 - bufor 5 μ l
 - *Eco* RI 1 μ l
2. Po 1 godzinie inkubacji dodać kolejną porcję 0,5 μ l enzymu.
3. Po 2 godzinach inkubacji dodać kolejną porcję 0,5 μ l enzymu.

4. Po 3 godzinach inkubacji dodać kolejną porcję 0,5 µl enzymu.
5. Mieszaninę inkubować jeszcze przez około 2 godziny, a następnie nanieść na 0,8% żel agarozowy (rozdział 6.2.5)

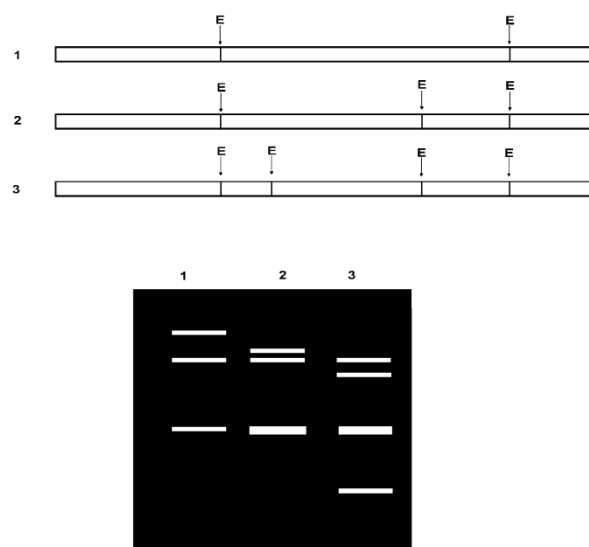
Materiały i odczynniki

- enzym restrykcyjny *Eco* RI 10 J/µl z buforem



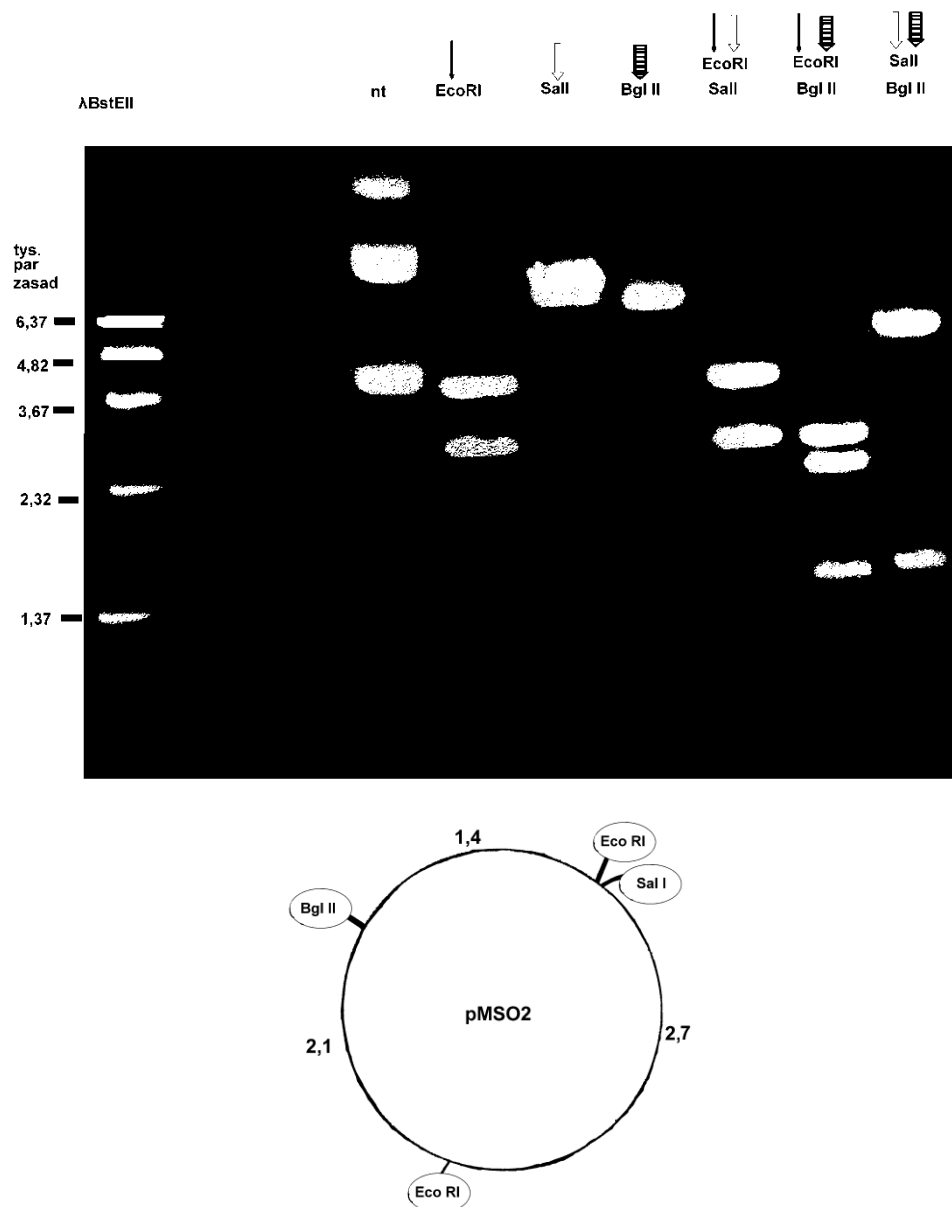
Rys. 7.1 Sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne *Eco* RI, *Hpa* I, *Fok* I oraz *Mfl* I

Strzałkami zaznaczono miejsca, w których enzymy rozcinają nici DNA. Częsteczki uzyskane po trawieniu mogą mieć tępe (*Hpa* I) lub lepkie (*Eco* RI) końce



Rys. 7.2 Identyfikacja i rozróżnianie cząsteczek DNA przez trawienie restryktazą i rozdział elektroforetyczny

Rysunek zmodyfikowany na podstawie Węgleński P. (patrz Piśmiennictwo)



Rys. 7.3 Rozdział elektroforetyczny cząsteczek plazmidu pMSO2 trawionych pojedynczymi lub parą enzymów restrykcyjnych

Na żel naniesiono także plazmid, który nie był trawiony enzymatycznie (nt). Poniżej przedstawiono mapę restrykcyjną pMSO2, którą opracowano na podstawie uzyskanych wzorów restrykcyjnych. Rysunek zmodyfikowany na podstawie Węgleński P. (patrz Piśmiennictwo)

7.2 IZOLACJA RNA Z LIŚCI

Chomczynski P. (1993) *BioTechniques* **15**, 532-537.

Chomczynski P., Sacchi N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Zasada metody

Izolacja RNA z liści będzie prowadzona z wykorzystaniem odczynnika TRI Reagent firmy Sigma, który jest mieszaniną tiocyjanianu guanidyny i fenolu rozpuszczającą kwasy nukleinowe i białka podczas homogenizacji tkanki. Po dodaniu chloroformu mieszanina rozdziela się na trzy fazy: wodną zawierającą RNA, interfazę zawierającą DNA oraz fazę organiczną zawierającą białka. Każda z tych substancji może być oczyszczana po rozdzielaniu faz. Zastosowanie tej procedury pozwala na oczyszczenie cząsteczek RNA różnych typów o wielkości od 0,1 do 15 kpz.

Postępowanie

1. Fragment liścia (200 mg) utrzeć w moździerzu z ciekłym azotem. Proszek przenieść do probówki Eppendorfa i dodać 1 ml odczynnika TRI. Zawiesinę pipetować wielokrotnie w celu ułatwienia dokładnej lizy komórek.
2. Zawiesinę pozostawić na 5 minut w temp. pokojowej – w tym czasie następuje dysocjacja kompleksów tworzonych przez białka i kwasy nukleinowe.
3. Dodać 200 μ l chloroformu, mieszać intensywnie przez 30 s i pozostawić na 20 minut w temp. pokojowej.
4. Wirować w następujących warunkach: 12 000 $\times$ g, 15 minut, 4°C.
5. Górną bezbarwną fazę wodną przenieść do czystej probówki i dodać 500 μ l izopropanolu, zamieszać i pozostawić w temp. – 80°C do następnych ćwiczeń.
6. Wirować w następujących warunkach: 12 000 $\times$ g, 15 minut, 4°C.
7. Usunąć supernatant a osad RNA przemyć 1 ml 75% etanolu o temperaturze – 20°C.
8. Wirować w następujących warunkach: 15 000 $\times$ g, 15 minut, 4°C.
9. Usunąć supernatant, osad osuszyć przez 10 minut.
10. Osad zawiesić w 20 μ l wody.

Materiały i odczynniki

- TRI Reagent firmy Sigma
- chloroform
- izopropanol
- 75% etanol

7.2.1 Elektroforeza RNA

Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Third Edition 2001.

Zasada metody została przedstawiona w rozdziale 6.2.4.

Postępowanie

Przygotowanie żelu

1. Zważyć 0,33 g agarozy i rozpuścić ją w 21,8 ml wody, ogrzewając 3–4 minuty w kuchence mikrofalowej.
2. Do ostudzonej agarozy dodać 6,9 ml 5 $\times$ stężonego buforu do elektroforezy RNA i 6,3 ml formaldehydu.

3. Wylać żel w małym aparacie. **Uwaga!** Nie wdychać oparów unoszących się z nad żelu, wylewać go i nanosić próbki w okularach ochronnych.
4. Elektroforezę prowadzić w 5-krotnie rozcieńczonym buforze.

Przygotowanie próbek (pod dygestorium) i warunki rozdzielu elektroforetycznego

1. Przygotować mieszaninę: 4,5 μ l RNA, 2,0 μ l 5 $\times$ stężonego buforu do elektroforezy RNA, 3,5 μ l formaldehydu, 10 μ l formamidu.
2. Próbki inkubować przez 15 minut w 65°C, przenieść je na lód i zwirować. Dodać po 2 μ l buforu obciążającego i po 0,5 μ l bromku etydyny.
3. Żel zalać buforem i przed naniesieniem próbek na 5 minut podłączyć aparat do zasilacza (5 V/cm odległości między elektrodami).
4. Naniesić próbki, elektroforezę prowadzić przy napięciu 3–4 V/cm.

Materiały i odczynniki

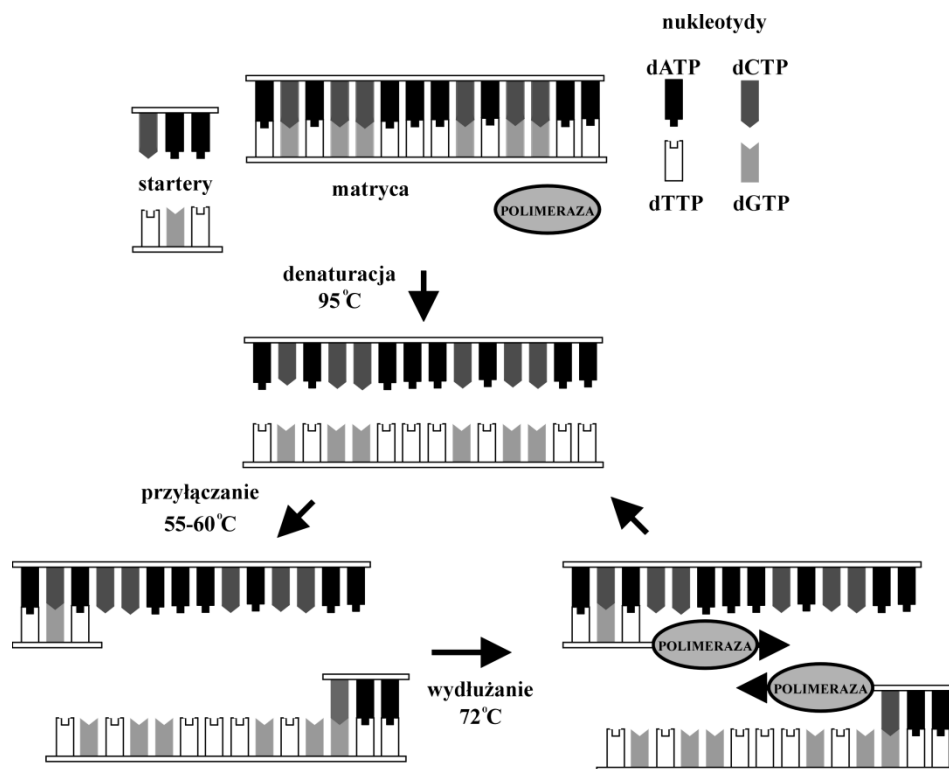
- 5 $\times$ stężony bufor do elektroforezy RNA: 0,1 M MOPS o pH 7,0, 40 mM octan sodu, 5 mM EDTA
- bufor obciążający: 50% glicerol, 1mM EDTA o pH 8,0, 0,25% błękit bromofenolowy
- agaroz
- formaldehyd
- formamid

7.3. AMPLIFIKACJA FRAGMENTU DNA METODĄ PCR

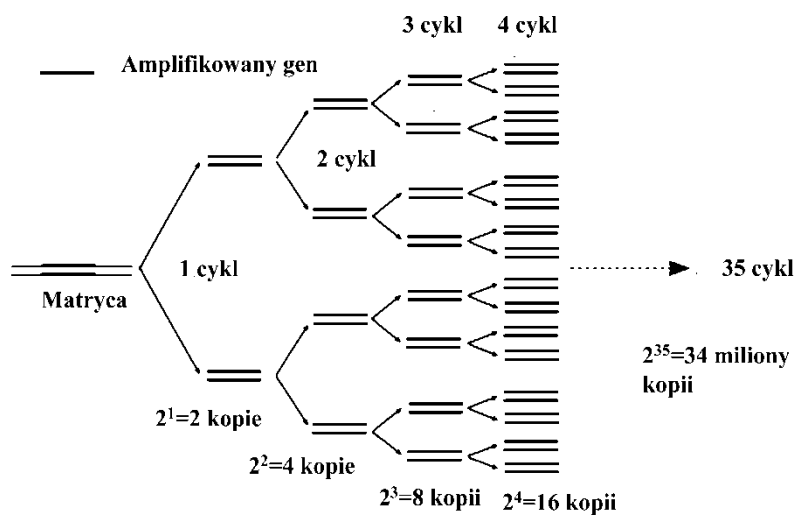
Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Third Edition 2001.

Zasada metody

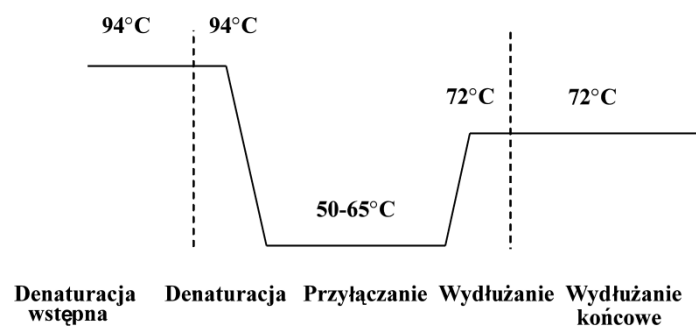
Metoda PCR (ang. *polymerase chain reaction*, czyli reakcja łańcuchowa polimerazy) pozwala na powielanie cząsteczek DNA. Polega ona na amplifikacji *in vitro* fragmentów DNA przy zastosowaniu termostabilnej polimerazy. Jest to proces analogiczny do replikacji zachodzącej *in vivo*. Pierwszym etapem reakcji PCR jest denaturacja, czyli oddzielenie od siebie komplementarnych nici DNA, które są matrycą do amplifikacji nowych cząsteczek DNA. Podwójna nić DNA denaturuje w temperaturze, która zależy od zawartości G+C (im większa zawartość G+C, tym wyższa temperatura jest potrzebna do rozdzielenia nici DNA). Im dłuższa nić DNA, tym dłuższy czas jest potrzebny do ich rozdzielenia. Matrycą może być nawet jedna cząsteczka DNA jedno- lub dwuniciowego. Odpowiednio przygotowane specyficzne oligonukleotydy (startery), zwykle o długości 18–25 nukleotydów, stosowane są w stężeniu 0,1–0,5 μ M każdy (6×10^{12} – 3×10^{13} cząsteczek – jest to ilość wystarczająca na przynajmniej 30 cykli amplifikacji fragmentu o wielkości 1 kbp). Startery przyłączają się do przeciwnych końców nici DNA od strony 3'. Temperatura przyłączania starterów (T_a) powinna być niższa o 3–5 stopni od temperatury topnienia (T_m) starterów. Za wysoka temperatura jest przyczyną braku lub słabego przyłączania starterów, a zbyt niska temperatura przyczynia się do powstawania niespecyficznych produktów. Następnie polimeraza dobudowuje komplementarne nukleotydy do już istniejących nici. Polimerazy różnią się powinowactwem, wydajnością oraz zdolnością do syntezy długich fragmentów DNA. Rutynowo stosowana jest polimeraza *Taq* (0,5–2,5 jednostek na standardową reakcję prowadzoną w objętości 25–50 μ l). Podczas etapu polimeryzacji stosuje się temperaturę optymalną dla danej polimerazy (dla polimerazy *Taq* 72–78°C). Polimeraza *Taq* dobudowuje około 2 000 nukleotydów na minutę. Wydłużanie prowadzi się zwykle przez 1 minutę na 1 000 nukleotydów produktu. Podstawowe składniki, z których powstaje nowa nić DNA to trifosforany nukleozydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), które stosowane są w równomolarnych ilościach w stężeniu 200–250 μ M każdy. Reakcja PCR przebiega w buforze o pH 8,3–8,8. Siła jonowa buforu jest głównie utrzymywana przez stężenie jonów K^+ . Jony Mg^{2+} (stosowane w stężeniu 1–4 mM) kontrolują specyficzność przyłączania starterów. (Rys 7.4, Rys. 7.5, Rys 7.6).



Rys. 7.4 Schemat reakcji PCR



Rys. 7.5 Powielanie cząsteczek DNA podczas reakcji PCR



Rys. 7.6 Schemat przebiegu reakcji PCR

Warunki reakcji PCR przedstawiono w tabeli poniżej.

etap reakcji PCR	temperatura	czas trwania
denaturacja wstępna	92–98°C	30 s–8 min
denaturacja	94°C	15 s–1 min
przyłączanie	50–65°C	15 s–1 min
wydłużanie	68–78°C	30 s–4 min (1–1,5 kpz/min)
końcowe wydłużanie	72°C	2 min–30 min
liczba cykli	20–40	

Polimerazy to enzymy z klasy transferaz, przenoszące reszty nukleotydowe na tworzące się łańcuchy polinukleotydowe. W poniższej tabeli zgromadzono informacje na temat najczęściej stosowanych polimeraz (Tab. 7.1).

Tab. 7.1 Najczęściej stosowane polimerazy DNA

	Taq	Tfu	Arrow	Pyra	Pfu	Vent	Tgo
5'–3' egzonukleaza	+	–	+	–	–	–	–
3'–5' egzonukleaza	–	+	+	–	+	+	+
współczynnik błędu	$8\text{--}13 \times 10^{-6}$	$4,5 \times 10^{-6}$	8×10^{-6}	2×10^{-5}	$1,3 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-6}$	$4,9 \times 10^{-7}$
termostabilność w 95°C	40 min 50%	5 h 40%	40 min 50%	5 h 70%	2 h 50%	7 h 50%	2,5 h 50%
najdłuższy amplikon [kpz]	7	10	21	21	15	13	10
dodawanie A na końcach 3'	+	–	–	+	–	–	–
pochodzenie	Thermus aquaticus	Thermococcus fumicolans	mieszanina polimeraz Taq i Tfu	Pyrococcus abyssi	Pyrococcus furiosus	Thermococcus litoralis	Thermococcus gorgonarius

7.3.1. Projektowanie starterów

Przykładowa sekwencja DNA amplifikowana metodą PCR:

5' ATGTTTTCTCAAGGATTGGGCGCGCTCTGTCGCGTTCTTCTCGCGTTAAAAATTTGTTGCACGGTG
ATTCGAGATTGGGGGCGCTTTCTGGAGTTCCGCGAATAGATGTCTATTCTGAGGGTGTGAAGGGG
GGTTAGGGTTTTTCAGGGGTTACGTATCTTCTCAGTAGCTCGCAATAATGGTTTTGTTTCTAATTTG
TCTGGTTTTAAATCTGTTGCTGGAACCCTAGGTTTCTTCGCTTGTTTTCCAGCGAAGCCCCAAAGA
GAAGAATTATGAGAACTTTTATCAAGGGACAGAGAAGTACCTAAGGGGGTGAAAGAATGAGTCTA
AAGAGGATCCAAGTCAACACAGAATCAAGGTGGTTTCAAGAAGCCTTCATGAAGCAATTTCAAAG
TTTTCTCACCCATTGTTGGTGTGGGGCTATTTCTGCGGCTATAAGCCTAGCCCGTATCGCTAGCAAT
TCTAG 3'

Startery do metody PCR:

Starter początkowy (ang. *forward primer*): 20 nt; $T_m = 56^\circ\text{C}$; G + C = 40%

5'-ATGTTTTCTCAAGGATTGGG-3'

Starter końcowy (ang. *reverse primer*): 20 nt; $T_m = 54^\circ\text{C}$; G + C = 45%

5'-CTAGAATTGCTAGCGATACG-3'

7.3.2. Startery do metody PCR z dołączonymi niekomplementarnymi fragmentami

Starter początkowy (ang. *forward primer*):

5'-NNNAAGCTTATGTTTTCTCAAGGATTGGG-3'

AAGCTT – miejsce rozpoznawania i cięcia przez enzym restrykcyjny *Hind* III

Starter końcowy (ang. *reverse primer*):

5'-NNGGTACCCTAGAATTGCTAGCGATACG-3'

GGTACC – miejsce rozpoznawania i cięcia przez enzym restrykcyjny *Kpn* I

N – dodatkowe zasady dodawane na końcach sekwencji w celu ułatwienia trawienia przez enzymy restrykcyjne, które są endonukleazami.

7.3.3. Amplifikacja mitochondrialnego genu *atpA* na matrycy całkowitego DNA

Postępowanie

1. Mitochondrialny gen *atpA* będzie amplifikowany na matrycy całkowitego DNA wyizolowanego wcześniej z liści fasoli (rozdział 7.1). W reakcji zostaną wykorzystane startery homologiczne do sekwencji zlokalizowanych na 5' i 3' końcach genu.
2. Otrzymany produkt odpowiadający całemu genowi *atpA* powinien mieć wielkość 1,1 kbp.
3. Każda podgrupa przygotowuje dwie próbki: badaną oraz kontrolę negatywną zawierającą wszystkie składniki oprócz DNA. Kontrolę negatywną przygotowuje się, aby sprawdzić czy używane odczynniki są wolne od zanieczyszczeń DNA.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

1. Rozmrozić na lodzie odczynniki: bufor do polimerazy DNA, dNTP (mieszanina nukleotydów), startery.
2. Umieścić na lodzie i oznaczyć dwie probówki (kontrola negatywna i próba badana) o pojemności 0,2 ml.
3. Przygotować próby o składzie podanym poniżej:

składniki mieszaniny	próba badana [μl]	kontrola negatywna [μl]
woda	40	41
bufor	5	5
dNTP (10 mM każdy)	1	1
starter 1 (10 μM)	1	1
starter 2 (10 μM)	1	1
DNA (100 ng/μl)	1	–
polimeraza DNA	1	1

Program reakcji PCR i sekwencje starterów

1. Probówki z mieszaniną reakcyjną należy wstawić do termocyklera i uruchomić następujący program:

denaturacja wstępna	94°C, 5 min	30 cykli
denaturacja	94°C, 10 s	
przyłączanie	55°C, 30 s	
wydłużanie	72°C, 1 min	
końcowe wydłużanie	72°C, 5 min	

2. Sekwencje starterów:

Starter 1: 5' – ATG GAA TTC TCT TCC AGA GC – 3'

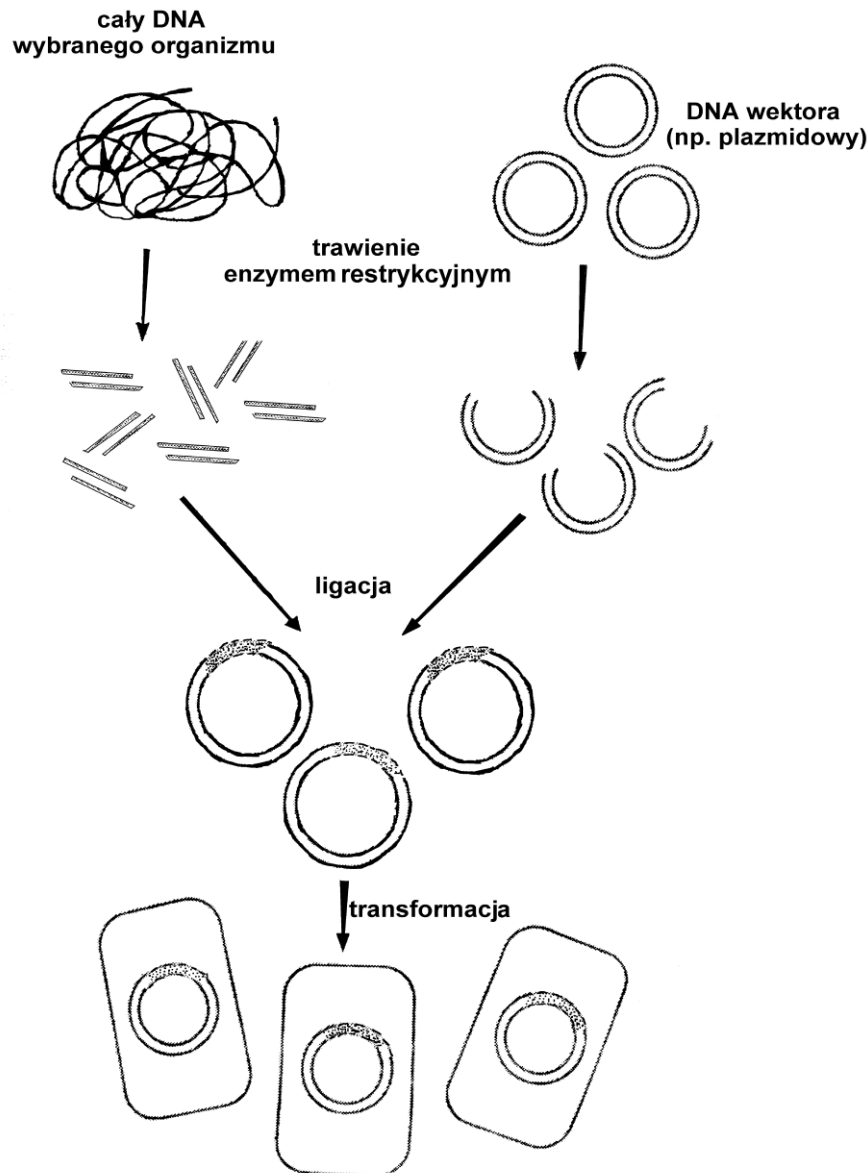
Starter 2: 5' – ATA GCA GGT CTA ATT CCG CG – 3'

Materiały i odczynniki

- bufor 10 × stężony (odpowiedni dla danej polimerazy) zawierający 15 mM MgCl₂
- nukleotydy dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; mieszanina nukleotydów o stężeniu 10 mM każdy)
- startery: 10 μM każdy
- matryca (np. DNA plazmidowy, całkowity genomowy DNA)
- woda destylowana sterylna
- polimeraza *Taq*

7.4. KLONOWANIE PRODUKTU PCR DO WEKTORA SEKWENCYJNEGO

Fragment DNA przeznaczony do klonowania można uzyskać za pomocą reakcji PCR lub w wyniku trawienia DNA wybranego organizmu enzymem restrykcyjnym (Rys. 7.7). Klonowanie fragmentu DNA polega na jego połączeniu z wektorem (np. pCR4-TOPO Sequencing Vector firmy Invitrogen), a następnie na wprowadzeniu tak otrzymanej zrekombinowanej cząsteczki DNA do komórki (Rys. 7.7). Wektor posiada cechy zapewniające replikację, a w niektórych przypadkach, również ekspresję klonowanego fragmentu DNA w komórce gospodarza.



Rys. 7.7 Klonowanie fragmentów genomu wybranego organizmu z zastosowaniem kolistego wektora DNA

Rysunek zmodyfikowany na podstawie Gajewski W. i Węgleński P. (patrz Piśmiennictwo)

7.4.1. Wektory plazmidowe

Plazmidy to koliste cząsteczki DNA występujące w komórkach bakterii i niektórych innych organizmów, replikujące się niezależnie od replikacji chromosomów. Wektory plazmidowe są wykorzystywane do wprowadzania fragmentów DNA do bakterii. Podobnie jak naturalnie występujące plazmidy, posiadają one zdolność do autonomicznej replikacji w bakteriach, dzięki której zapewniają powielanie wprowadzonego fragmentu DNA.

Każdy wektor powinien posiadać następujące cechy:

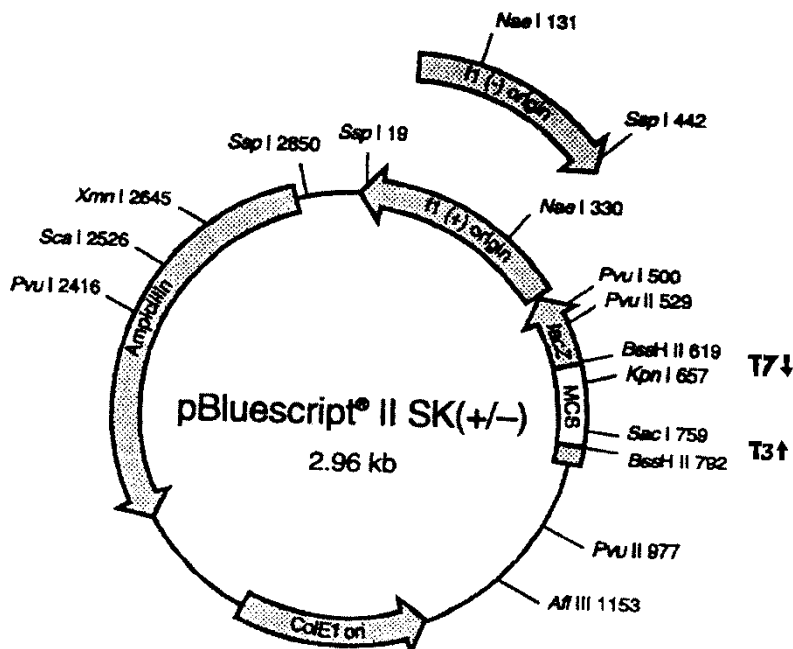
1. Sekwencję odpowiedzialną za inicjację replikacji, tzw. sekwencję *ori*. Od tej sekwencji zależy specyficzność wektora, czyli to, w jakich komórkach może on ulegać replikacji.
2. Geny markerowe – geny odpowiedzialne za łatwo wyróżnialne cechy fenotypowe pozwalające odróżnić komórki, które zawierają wektor od tych, które go nie przyjęły. Mogą to być geny warunkujące oporność na antybiotyki:
 - gen *bla* lub *amp^r* kodujący enzym β -laktamazę, która rozkłada antybiotyki penicylinowe, np. ampicylinę.

- ## Przykłady wektorów plazmidowych i genów markerowych

-
- Plasmid Map (Top):** A circular map showing restriction enzyme sites and their positions (in base pairs):
- Top:** *EcoR* I 4361, *Cla* I 23, *Hind* III 29, *EcoR* V 185, *Nhe* I 229, *Bam* H I 375, *Ban* II 471, *Ban* II 485, *Sph* I 562, *Eco* N I 622, *Sal* I 651, *Hinc* I 651, *Acc* I 651, *Psh* A I 712, *Eag* I 939, *Nru* I 972, *Bsp* M I 1000, *Ph* M I 1315, *Bsm* I 1353, *Sly* I 1369, *Ph* M I 1364, *Ava* I 1425, *Ppu* M I 1480, *Msc* I 1444, *Ppu* M I 1480, *Bsg* I 1650, *Bsp* M II 1664, *Bsa* B I 1668.
 - Left:** *Eco* S7 I 4048, *Xmn* I 3961, *Hinc* II 3905, *Sca* I 3844, *Pvu* I 3733, *Pst* I 3607, *Ase* I 3537, *Bsa* I 3433, *Hgr* E II 3054, *Eco* S7 I 3000, *Alw* N I 2884, *Drd* I 2575, *Afl* III 2473, *Ear* I 2351, *Sap* I 2350, *Nde* I 2295, *Hgr* E II 2293, *Xca* I - *Acc* I 2244, *Bsa* A I 2225, *Tth* III 2217, *Drd* I 2175, *Eso* 3 I 2122, *Pvu* II 2064, *Xmn* I 2029.
 - Bottom:** *Eco* RI, *Pst* I, *Ap*^r, *Tc*^r, *Sal* I.
- ORI:** Origin of Replication, indicated by an arrow pointing clockwise.
- pBR322 Map (Middle):** A simplified circular map showing the *Ap*^r (ampicillin resistance) and *Tc*^r (tetracycline resistance) markers, and the *pBR322* plasmid name.
- Transformation Results (Bottom):** Three possible outcomes of a transformation experiment:
- Left:** komórki niestransformowane, wrażliwe na tet. i amp. (non-transformed cells, sensitive to tetracycline and ampicillin).
 - Middle:** komórki transformowane plazmidem niezrekombinowanym, odporne na tet. i amp. (transformed cells with non-recombined plasmid, resistant to tetracycline and ampicillin).
 - Right:** komórki transformowane plazmidem zrekombinowanym, odporne na amp. i wrażliwe na tet. (transformed cells with recombined plasmid, resistant to ampicillin and sensitive to tetracycline).

Na rysunku przedstawiono strategię pozwalającą na rozróżnienie bakterii, które nie uległy transformacji od bakterii transformowanych pustym wektorem oraz wektorem zawierającym klonowany fragment DNA. Rysunek zmodyfikowany na podstawie Gajewski W. i Węgleński P. (patrz Piśmiennictwo)

- **Wektor pBluescript** (Rys. 7.9) także posiada dwa geny markerowe. Gen warunkujący oporność na ampicylinę pozwala na rozpoznanie komórek, które przyjęły wektor. Na wyselekcjonowanie kolonii bakteryjnych zawierających wektor z insertem pozwala obecność genu β -galaktozydazy, w obrębie którego znajduje się miejsce klonowania. W odpowiednich warunkach β -galaktozydaza katalizuje reakcję, której produkt nadaje koloniom bakteryjnym niebieską barwę. Wprowadzenie insertu niszczy ciągłość genu, nie powstaje wówczas β -galaktozydaza i kolonie bakteryjne są białe.



Rys. 7.9 Wektor pBluescript II SK (+/−)

f1 – fragment pochodzący z genomu faga *f1*, *ColE1 ori* – sekwencja odpowiedzialna za inicjację replikacji, *Ampicillin* – gen kodujący β -laktamazę nadającą oporność na ampicylinę, *lacZ* – 5' końcowy fragment genu *lacZ* kodujący N-końcowy fragment β -galaktozydazy, *MCS* – polilinker

- **Wektor pCR4-TOPO** (firma Invitrogen) jest przygotowany w formie liniowej z pojedynczymi resztami tymidyny (T) przy każdym 3' końcu nici DNA. Połączenie zasad A występujących w produkcie reakcji PCR i zasad T plazmidowego DNA pozwala na specyficzną ligację produktu PCR oraz wektora. Ligacja zachodzi przy udziale topoizomerazy I, która przylacza się do podwójnej nici DNA w specyficznych miejscach oraz hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe za sekwencją 5'-CCCTT w pojedynczej nici DNA. Polimeraza *Taq* posiada aktywność terminalnej transferazy, czyli przylaczania pojedynczych reszt adeniny (A) do każdego końca amplifikowanego produktu podczas reakcji PCR.

7.4.2. Ligacja

Ligacja to łączenie fragmentów DNA wiązaniami kowalencyjnymi. W reakcji ligacji powstaje wiązanie fosfodiesterowe pomiędzy grupą hydroksylową przy węglu 3' jednego nukleotydu a resztą fosforanową przy węglu 5' innego nukleotydu. Z ligacją łączy się pojęcie rekombinowanego DNA, czyli cząsteczki, która powstała przez połączenie fragmentów DNA pochodzących z różnych źródeł. Do łączenia fragmentów DNA w reakcji ligacji stosuje się enzym ligazę T4 DNA (pochodzącą z bakteriofaga T4). Ligacja jest jedną z reakcji wykorzystywanych do klonowania DNA.

Postępowanie

Wykonanie doświadczenia zgodnie z załączonym protokołem.

Materiały i odczynniki

- gotowy zestaw

7.4.2.1. Przygotowanie komórek kompetentnych metodą Inoue

Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990) *Gene* **96**, 23–28.

Postępowanie

1. Pobrać pojedynczą kolonię bakteryjną z płytki inkubowanej przez 16–20 godz. w temp. 37°C i zawiesić w 25 ml pożywki LB. Inkubować przez 6–8 godz. w temp. 37°C, wytrząsając hodowlę przy 250 rpm.
2. Do 3 kolb stożkowych zawierających po 25 ml pożywki SOB dodać odpowiednio po 1 ml, 0,4 ml oraz 0,2 ml hodowli i inkubować przez noc w temp. 18–22°C z umiarkowanym wytrząsaniem.
3. Kontynuować hodowlę do uzyskania absorbancji $A_{660} = 0,55$ ($l=1$ cm) w jednej z kolb. Przenieść hodowlę na lód i inkubować 10 minut.
4. Zawiesinę bakterii odwirować przy $2\,500 \times g$ przez 10 minut w temp. 4°C.
5. Odrzucić supernatant i delikatnie zawiesić komórki w 8 ml zimnego buforu Inoue.
6. Odwirować przy $2\,500 \times g$ przez 10 minut w temp. 4°C.
7. Odrzucić supernatant i delikatnie zawiesić komórki w 2 ml zimnego buforu Inoue.
8. Dodać 0,15 ml roztworu DMSO i delikatnie zamieszać. Inkubować na lodzie przez 10 minut.
9. Bardzo szybko odpipetować po 100 μ l zawiesiny komórek do zimnych probówek Eppendorfa i natychmiast przenieść próbki do ciekłego azotu. Tak przygotowane komórki kompetentne przechowywać w temp. –70 do –80°C.

Materiały i odczynniki

- pożywka LB: 10 g tryptonu, 5 g ekstraktu drożdżowego, 10 g NaCl; uzupełnić wodą do 1 litra; autoklawować
- pożywka SOB: 20 g tryptonu, 5 g ekstraktu drożdżowego, 0,5 g NaCl; dodać 10 ml 250 mM roztworu KCl (1,86 g KCl rozpuścić w 100 ml wody); doprowadzić do pH 7,0 za pomocą 5 M NaOH (~0,2 ml); uzupełnić wodą do 1 litra; autoklawować; bezpośrednio przed użyciem dodać do 1 litra pożywki 5 ml sterylnego roztworu 1 M $MgCl_2$ (19 g $MgCl_2$ rozpuścić w 90 ml wody, a następnie uzupełnić wodą do 100 ml; autoklawować)
- pożywka SOC (jest to pożywka SOB z dodatkiem 20 mM glukozy): do uprzednio przygotowanej pożywki SOB (1 litr) dodać 20 ml sterylnego roztworu 1 M glukozy (rozpuścić 18 g glukozy w 90 ml wody, a po rozpuszczeniu uzupełnić do 100 ml; sterylizować za pomocą filtracji przez filtr 0,22 μ m)
- 0,5 M bufor PIPES o pH 6,7: rozpuścić 15,1 g PIPES (kwas piperazyno-1,2-di[etanosiiarkowy]) w 80 ml wody; doprowadzić do pH 6,7 za pomocą 5 M KOH i uzupełnić wodą do 100 ml; sterylizować poprzez filtrację przez filtr 0,45 μ m; przechowywać w temp. –20°C
- bufor Inoue: rozpuścić w 80 ml wody składniki podane poniżej w tabeli i uzupełnić wodą do 100 ml; uzyskany roztwór sterylizować poprzez filtrację przez filtr 0,45 μ m; przed użyciem bufor oziębnić na lodzie; przechowywać w temp. –20°C.

składnik	ilość na 100 ml	końcowe stężenie
$MnCl_2 \times 4 H_2O$	1,09 g	55 mM
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,22 g	15 mM
KCl	1,86 g	250 mM
0,5 M PIPES o pH 6,7	2 ml	10 M

7.4.2.2. Transformacja – wprowadzenie DNA plazmidowego do bakterii *E. coli*

Zasada metody

Większość komórek bakteryjnych nie jest zdolna do przyjmowania obcego DNA do wnętrza komórki. Aby to było możliwe, błonę bakteryjną należy odpowiednio zmodyfikować. Stosuje się dwie podstawowe metody: transformację typu *heat shock* i elektroporację. Pierwsza metoda polega na inkubacji komórek bakteryjnych na lodzie i ich chemicznym traktowaniu za pomocą jonów, a następnie krótkiej inkubacji w temperaturze 42°C. Druga metoda polega na traktowaniu bakterii ładunkiem elektrycznym. Obydwie metody prowadzą do destabilizacji błony bakteryjnej, co pozwala na wnikanie obcego DNA do wnętrza komórki.

Postępowanie

1. Rozmrozić komórki kompetentne *E. coli* na lodzie (ok. 10 minut).
2. Dodać 2 µl mieszaniny ligacyjnej do 100 µl zawiesiny komórek kompetentnych i delikatnie wymieszać.
3. Inkubować na lodzie przez 15–30 minut.
4. Ogrzać próby w temp. 42°C (łaźnia wodna) przez 30 s.
5. Inkubować na lodzie przez 2 minuty.
6. Dodać 250 µl pożywki SOC.
7. Wytrząsać przez 30–60 minut w temp. 37°C przy 220 rpm.
8. Wysiać po 50 µl i 300 µl zawiesiny komórek po transformacji na dwie sterylne płytki Petriego z LB agarem (10 g tryptonu, 5 g ekstraktu drożdżowego, 10 g NaCl, 15 g agaru; uzupełnić wodą do 1 litra; autoklawować) i ampicyliną (końcowe stężenie ampicyliny 100 µg/ml).
9. Inkubować przez noc w temp. 37°C.

Materiały i odczynniki

- komórki kompetentne *E.coli*
- mieszanina ligacyjna (rozdział 7.4.2)
- pożywka SOC (rozdział 7.4.2.1)
- pożywka LB (rozdział 7.4.2.1)
- ampicylina

7.4.2.3. Izolacja DNA plazmidowego z bakterii *E. coli* (zestaw firmy Macherey-Nagel)

Zasada metody

Zasada izolacji DNA plazmidowego z wykorzystaniem gotowego zestawu firmy Macherey-Nagel jest podobna jak w metodzie izolacji DNA plazmidowego za pomocą lizy alkalicznej (rozdział 6.3.2). W odróżnieniu od metody lizy alkalicznej, w tej metodzie DNA plazmidowy jest wiązany do odpowiedniego złoża znajdującego się w kolumnie. Zestaw firmy Macherey-Nagel pozwala na oczyszczanie do 40 µg plazmidowego DNA z 1–8 ml hodowli. Typowa hodowla bakterii w pożywce LB o objętości 2–5 ml pozwala na uzyskanie 5–6 µg DNA/ml hodowli.

Postępowanie

1. Hodowlę bakterii (warunki hodowli: 37°C, wytrząsanie przy 220 rpm, 16 godz.) odwirować przez 1 minutę przy 5 000 rpm, a uzyskany osad zawiesić w 250 µl buforu **A1**.
2. Dodać 250 µl buforu **A2**, delikatnie wymieszać przez odwracanie probówki.
3. Dodać 300 µl buforu **A3**, delikatnie wymieszać przez odwracanie probówki.
4. Odwirować przez 10 minut przy 12 000 rpm.
5. Włożyć kolumnkę do probówki o objętości 2 ml i nanieść na nią supernatant po odwirowaniu prób.
6. Odwirować przez 1 minutę przy 12 000 rpm.
7. Odrzucić przesącz i włożyć kolumnkę do tej samej probówki o objętości 2 ml.
8. Do kolumnki dodać 600 µl buforu **A4** i odwirować przez 1 minutę przy 12 000 rpm.
9. Odrzucić przesącz i powtórzyć wirowanie.
10. Włożyć kolumnkę do czystej probówki Eppendorfa o objętości 1,5 ml. Do kolumnki dodać 50 µl sterylnej wody destylowanej, inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 minutę.
11. Odwirować przez 1 minutę przy 12 000 rpm.
12. Zachować przesącz z kolumnki do analizy (zawiera on plazmidowy DNA).

Materiały i odczynniki

- instrukcja firmy Macherey-Nagel z opisem odczynników w załączeniu
- bufor **A1** (przed pierwszym użyciem dodać RNazę A do buforu; po dodaniu RNazy przechowywać w temp. 4°C)
- bufor **A2** (przechowywać w temp. pokojowej)
- bufor **A3** (przechowywać w temp. pokojowej)

- bufor **A4** (przed pierwszym użyciem dodać 96% etanol według instrukcji; przechowywać w temp. pokojowej)

W opracowaniu rozdziału Techniki biologii molekularnej korzystano z następujących źródeł:

Gajewski W., Węgleński P. *Inżynieria genetyczna*. Państwowy Instytut Wydawnictw Naukowych, Warszawa 1980.

Kłyszajko-Stefanowicz L. *Ćwiczenia z biochemii*. Praca zbiorowa. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1999.

Sambrook J., Russel, D.W. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Third Edition 2001.

Stryer L. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Węgleński P. *Genetyka molekularna*. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.

Protokoły dołączone do gotowych zestawów laboratoryjnych.