

## IZOLACE DNA PGEM-T PLAZMIDU A STANOVENÍ VELIKOSTI LIGOVANÉHO SEGMENTU

---

**QIAprep Spin Miniprep Kit** firmy Quiagen umožňuje rychlou, jednoduchou a nákladově efektivní izolaci plazmidu z bakteriálních buněk. Je určena pro rychlé a pohodlné zpracování 1-24 vzorků současně za méně než 30 minut. Plazmidová DNA purifikovaná soupravami QIAprep Miniprep je okamžitě připravena k použití.

Postup izolace plazmidové DNA je založen na alkalické lýzi bakteriálních buněk, adsorpci DNA na oxid křemičitý v přítomnosti chaotropní soli, promývání a eluci plazmidové DNA.

Bakteriální buňky jsou lyzovány NaOH-SDS pufrům (P2), optimálně za přítomnosti RNázy A. SDS rozpouští komplexy fosfolipidů a proteinů, NaOH denaturuje chromozomální a plazmidovou DNA a proteiny. Dodržení optimální délky lýze je důležité pro uvolnění plazmidové DNA bez jaderné DNA a minimalizuje vystavení plazmidové DNA denaturačním podmínkám.

Lyzát je neutralizován pomocí octanu draselného (N3). Vysoká koncentrace solí způsobuje vysrážení detergentu (SDS), precipitaci denaturovaných proteinů, precipitaci chromozomální DNA a zbytků buněk. Plazmidová DNA, která je menší a kovalentně uzavřená kruhová molekula zůstává v roztoku.

Precipitát je odstraněn centrifugací nebo filtrací. Vysoká koncentrace solí, pH a vazebné vlastnosti křemíkaté membrány QIAprep spin kolony zajišťují, že se na ni váže pouze plazmidová DNA, zatímco degradovaná RNA, buněčné proteiny a metabolity kolonou protékají.

Endonukleázy jsou efektivně odstraněny promytím PB pufrům a soli následným promytím PE pufrům. Plazmidová DNA je eluována pomocí EB pufru nebo deionizované vody.

**Klonovací vektory odvozené z bakteriálních plazmidů** jsou kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace v hostitelských buňkách. Tyto vektory musí nést selekční geny (např. geny pro rezistenci k antibiotikům), které umožní na základě fenotypových projevů selektovat plazmidem transformované buňky. Nesou klonovací místo (MCS, 'polylinker'), tj. jedinečná restrikční místa, do kterých vkládáme (ligujeme) segment DNA. Klonovací místo se obvykle nachází v reportérovém genu (gen kódující beta-laktamázu, modrobílá selekce), který umožní rozlišit plazmidem transformované buňky nesoucím ligovaný segment DNA nebo ne.

### **Purifikace plazmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu (cvičení I)**

Tento protokol je optimalizován pro purifikaci až 20 µg plazmidové DNA (pGem-T) z 1 až 5 ml přesnoční kultury *Escherichia coli* v LB (Luria-Bertani) mediu.

**Postup** (pozn. všechny kroky musí být prováděny při pokojové teplotě)

1. Resuspendujte sedimentované bakteriální buňky v 250 µl pufru P1 a přemístěte do mikrocentrifugační zkumavky.

Sedimentované bakteriální buňky získáme centrifugací kultury *E. coli* (5000 rpm/5 min)

2. Přidejte 250 µl pufru P2 a okamžitě promíchejte převrácením zkumavky (4-6 krát).

*Promíchejte opatrně překlápěním zkumavky. Nevortexujte, aby nedošlo k poškození genomické DNA. Pokud je zapotřebí, pokračujte v překlápění, dokud není roztok viskózní a téměř průhledný. Lýzujte maximálně po dobu 5 minut!*

3. Přidejte 350 µl pufru N3 a ihned promíchejte převrácením zkumavky (4-6 krát).

*Abyste zabránili lokálnímu srážení, promíchejte roztoky důkladně a okamžitě pro přidání pufru N3. Větší objemy si mohou vyžádat četnější převrácení (až 10krát). Roztok se zakaluje.*

4. Centrifugujte při 13 000 rpm/10 min ve stolní centrifuze.

*Vytváří se bílý pelet.*

$RCF (x g) = 11,15 \times 10^{-6} \times r \times n^2$  (kde RCF je relativní centrifugační síla,  $n$  je počet otáček rotoru za minutu,  $r$  je poloměr rotoru v centimetrech)

5. Aplikujte supernatant z kroku 4 na QIAprep spin kolonu pomocí dekantování nebo přepipetováním.

6. Centrifugujte 30-60 s. Vylijte to, co proteče.

7. Promyjte QIAprep spin kolonu přidáním 0.5 ml pufru PB a centrifugací po dobu 30-60s.

Vylijte to, co proteklo.

*Tento krok je nezbytný pro odstranění zbytkové nukleázové aktivity při použití kmenů endA<sup>+</sup>, jako např. JM, HB101 a jejich derivátů nebo divokých kmenů, které vykazují vysokou nukleázovou aktivitu nebo vysoký obsah uhlovodíků. Kmeny jako např. XL-1 Blue a DH5alfa tento krok nevyžadují.*

8. Promyjte QIAprep spin kolonu přidáním 0.75 ml pufru PE a centrifugací po dobu 30-60s.

9. Vylijte to, co proteklo a centrifugujte znovu další 1 min, aby se odstranil zbytkový promývací pufr.

*Zbytkový promývací pufr nebude kompletně odstraněn, pokud nebude odstraněno to, co proteklo v předchozím kroku. Zbytkový etanol z PE pufru může inhibovat následné enzymatické reakce.*

10. Umístěte QIAprep kolonu do čisté 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Pro vymytí DNA přidejte 50 µl pufru EB (10mM Tris-HCl, pH 8.5) do středu každé kolony (nedotkněte se membrány), nechte stát 1 min a centrifugujte po dobu 1 min.

Zkumavku s izolovaným plazmidem řádně popište. Izolovaný plazmid jemně vortexujte a změřte spektrofotometricky koncentraci DNA (Spektrofotometr Shimadzu, Nanodrop). Stanovte poměr absorbcí při 260 a 280 nm a určete míru znečištění (proteiny).

Do protokolu uveďte koncentraci izolovaného plazmidu, množství izolovaného plazmidu a množství izolovaného plazmidu z 1 ml bakteriální suspenze.

### **Stanovení velikosti ligovaného segmentu v plazmidu pGem-T/pGemT-Easy (Cvičení II)**

Skutečnost, že klonovaný fragment odpovídá svojí velikosti předpokladům, můžeme stanovit štěpením restričního místa odpovídajícími restričními endonukleázami. Následně pomocí elektroforézy v agarozovém gelu stanovíme velikost vštěpeného fragmentu. Pokud jeho velikost odpovídá velikosti ligovaného fragmentu + fragmentům klonovacího místa, předpokládáme, že se podařilo ligovat a naklonovat daný fragment např. PCR produkt.

Druhou možností kontroly klonovaného fragmentu je amplifikace klonovacího místa primery M13f/M13r.

1. Amplifikace klonovacího místa pomocí primerů M13f/m13r – příprava PCR reakční směsi.

Složení reakční směsi vypočtete podle použité termostabilní polymerázy (uveden je příklad pro Go Taq® DNA Polymerázu).

GoTaq® DNA Polymerase	M13f/r		Pipetuj	1 test
	Koncentrace prac. roztoku	Konečná koncentrace		
Pufř	5 x	1 x		5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0 mM		0,0 µl
Voda				14,75 µl
dNTP	2 mM	200 µM		2,5 µl
f primer	20 pmol/µl	0,2 µM		0,25 µl
r primer	20 pmol/µl	0,2 µM		0,25 µl
Taq pol	5 U/µl	1,25 U/reakc e		0,25 µl
<b>CELKEM</b>				23 µl
<b>Objem reakce</b>		25 µl	<b>Rozpipetuj po</b>	
<b>VZOREK</b>	2 µl			

2. Teplotní program PCR reakce.

Počáteční denaturace	94 °C	2 min
30 cyklů denaturace	94 °C	30 s
nasedání primerů (anealing)	55 °C	30 s
syntéza DNA (elongace)	72 °C	30 s
Konečná elongace	72 °C	7 min

3. Stanovení velikosti PCR produktu pomocí gelové elektroforézy.

Velikost PCR produktu stanovte elektroforeticky v 1,0% agarózovém gelu v TAE pufru. Použijte standard molekulové váhy GeneRuler 100 bp DNA Ladder (2 µl na dráhu). Fluorescenční barvivo GoodView přidávejte do rozvařeného agarózového gelu (2 µl na 50 ml). Separaci proveďte při 80 V po dobu 30 – 40 minut.

4. Velikosti ligovaného segmentu vypočtete podle fyzické mapy klonovacího plazmidu.

	pGEM®-T	pGEM®-T Easy
T7 RNA Polymerase transcription initiation site:	1	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site:	126	141
T7 RNA Polymerase promoter:	2984-3	2999-3
SP6 RNA Polymerase promoter:	124-143	139-158
multiple cloning site:	10-113	10-128
lacZ start codon:	165	180
lac operon sequences:	2824-2984, 151-380	2836-2996, 166-395
lac operator:	185-201	200-2016
b-lactamase coding region:	1322-2182	1337-2197
phage f1 region:	2368-2823	2380-2835
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer:	2941-2957	2949-2972
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer:	161-177	176-197

