

TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA

NAVODILA ZA VAJE

študijsko leto 2006/2007
8. semester univerzitetnega študija biokemije

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani
Katedra za biokemijo

doc. dr. Marko Dolinar

ime in priimek študenta: _____

UVOD

Vaje iz tehnologije rekombinantne DNA so izbrane tako, da dajejo pregled nekaterih osnovnih tehnik in postopkov. Iz praktičnih razlogov vaje ne morejo vključevati zelo kompleksnih in zamudnih poskusov, kakor tudi ne uporabe dragih aparatov in reagentov. Tehnike, ki jih boste uporabljali, so uveljavljene v raziskovalnih in razvojnih laboratorijih in so pogosto take, kakršne boste rabili pri svojem diplomskem ali podiplomskem delu ali pa na delovnem mestu.

Nekatere od obravnavanih postopkov na vajah bodo v laboratorijih, v katerih boste morda delali kdaj kasneje, izvajali drugače. Nikoli ne obstaja en sam način, kako priti do končnega rezultata, obstajajo pa ustaljeni in preizkušeni postopki, ki jim je pametno slediti. Laboratoriji in skupine raziskovalcev imajo svoje zakonitosti in pogosto uporabljajo metode, za katere so v letih eksperimentiranja ugotovili, da dajejo najbolj zanesljive rezultate, pa čeprav to ni vedno najnovejši in najkrajši postopek. Nekateri laboratoriji si lahko privoščijo delo z dragimi, vnaprej pripravljenimi kompleti reagentov, ki omogočajo hitrejše delo, večjo ponovljivost rezultatov in večje izkoristke. Drugi pa so ugotovili, da se da s preprostimi rešitvami izvesti tudi zelo zapletene postopke.

Namen teh vaj je, da se spoznate s praktičnim delom na področju tehnologije DNA in da razumete nekatere osnovne tehnike, ne pa da preprosto izpeljete postopke kot iz kuharske knjige. Marsikaj je napeljšano tako, da poskusite sami priti do zaključkov in marsikdaj bodo rezultati manj vzpodbudni, kot jih bi pričakovali. Delali boste z majhnimi količinami labilnih vzorcev in z živimi organizmi, torej s sistemi, ki se odzivajo na naše napake. Potrudite se, da boste delali čimbolj zavzeto in da bo napak čim manj.

Skoraj vse vaje vključujejo praktično delo z gensko spremenjenimi organizmi (GSO), to pa je zakonsko urejeno in je pri njem treba upoštevati ustrezna pravila. Praktično to pomeni, da morate biti dobro seznanjeni z delovnimi postopki in s potencialnimi nevarnostmi takega dela. Pred vsako vajo se boste morali vpisati v »Seznam osebja« in s podpisom potrditi, da ste se na vajo pripravili in da razumete naravo dela z GSO v zaprtih sistemih.

Večino vaj boste izvajali v skupinah po 2. Skupine, ki delajo na posameznem pultu, bodo uporabljale samo pipete, centrifugo in elektroforezne naprave, ki bodo namenjene njim, ne pa skupinam s sosednjega pulta. Upam, da bomo težave reševali skupaj in z nekaj dobre volje. Pri pripravi in izvedbi vaj sodelujeva tehnik Matjaž Malavašič in asistent Marko Dolinar.

Vaša naloga je, da si pred vsako vajo preberete, kaj je tema poskusov, da razumete teoretično ozadje dela in postopek, ki je pred vami. Poskušajte razumeti postopek kot celoto – ne glejte ga kot zaporedje ročnih spretnosti, ki jih morate približno upoštevati samo zato, da vajo opravite. Med vajo si spremembe v postopku, preračune in dodatne razlage, če so potrebne, zapišite. Po končanem delu pa napišite poročilo v skladu za navodili.

Upam, da vam bodo vaje ne samo obveznost na poti do diplome, pač pa vsaj malo tudi v veselje in da se boste na njih naučili česa koristnega za kasneje.

Marko Dolinar

LABORATORIJSKA VARNOST IN LABORATORIJSKI RED

Upoštevajte laboratorijski red, ki je izobešen pri tabli ob vhodu v laboratorij. Varnostni listi so zbrani v mapi, ki je na voljo pri tehniku; na teh listih so opisane naprave, postopki in reagenti, ki so pri posamezni vaji lahko nevarni. O varnostnih vidikih dela z GSO pa vas bom seznanil na prvi vaji, čeprav sem o tem govoril že na predavanjih. Razen napisanih pravil je treba upoštevati tudi zdravo pamet. V laboratoriju je seveda prepovedano uživati hrano, pijačo, prepovedano je tudi kajenje in nanašanje kozmetičnih sredstev. Roke si je treba umiti po vsakem stiku z mikroorganizmi in reagenti, najmanj pa po koncu vaje.

Pred prvo vajo si oglejte, kje visi gasilni aparat, kje sta umivalnika, kje papirnate brisače in kje zasilni izhod. Pri delu z dražječimi in mutagenimi snovmi obvezno uporabljajte zaščitne rokavice. Uporaba (zapete) halje in zaščitnih očal je pri delu obvezna na vseh vajah, ki jih opravljate na FKKT. Oblečila puščajte v garderobnih omaricah pred laboratorijem, dragocene predmete pa imejte raje v laboratoriju. Osebnih predmetov ne postavljajte na delovni pult.

Pazite na pravilno odlaganje pipet: nikoli jih ne puščamo v raztopinah in nikoli jih ne obračamo tako, da je nastavek višje kot prožilo. Natančno pipetiranje je ena od osnovnih spretnosti v laboratoriju; če dvomite v svojo natančnost ali pravilnost dela, si vzemite čas in se ob pomoči tehnika ali asistenta izpopolnite v pipetiranju - najboljše s pomočjo tehtnice. Pri delu tudi pazite, da čimbolj zmanjšate nastajanje aerosolov. Pipetiranje enakih vzorcev lahko vedno opravite z istim nastavkom vse dokler se z nastavkom niste dotaknili kakšne druge raztopine ali predmeta. Majhne volumne pipetirajte na stene mikrocentrifugirke, nato pa raztopine s kratkim centrifugiranjem spravite na dno. Tako se izognete menjavanju nastavkov za vsak naslednji vzorec. Po vsakem centrifugiranju reakcijskih mešanic je treba mikrocentrifugirko pretresti s prsti, da se snovi z različnimi gostotami (encimi so pogosto shranjeni v glicerolu) med seboj premešajo.

Vse steklenice in druge posode, ki imajo pokrov ali zamašek, naj bodo odprte čim krajši čas. Enako velja za škatle s sterilnimi nastavki za pipete.

Encime, nukleotide in začetne oligonukleotide hranimo zunaj zmrzovalnika oziroma hladilnika čim krajši čas, pa še takrat jih imamo do uporabe postavljene na ledu. Po uporabi jih tehnik ali asistent takoj vrne v hladilnik.

Ob vsakršnih dvomih glede ravnanja z aparaturami, reagenti in vzorci, vprašajte asistenta ali tehnika.

RAVNANJE V PRIMERU RAZLITIJ REAGENTOV ALI MIKROBNIH KULTUR

Če se razlije katera od nenevarnih snovi (vodne raztopine soli), jo popivnjajte s papirnato brisačo, mokre brisače pa odvrzite v običajne smeti. Če je treba, površino še sperite z vodo in nato obrišite do suhega.

Pri razlitju močnih kislin, baz ali organskih spojin, ki so lahko nevarne za zdravje, o razlitju takoj obvestite asistenta ali tehnika. Ukrepajte z glavo; majhne količine poskusite vsaj za silo popivnati in pazite, da s snovjo ne pride v stik tudi kolega, ki razlitja morda ni opazil. Če je treba, takoj začnite z zračenjem laboratorija.

Razlite kulture, ki vsebujejo žive mikroorganizme, je treba popivnati, brisače pa dati v odpad za avtoklaviranje. Površino nato pobrišite z razkužilom in obrišite do suhega. Za razkuževanje pultov uporabite 70-odstotni etanol, za večje količine pa 1-odstotno raztopino Virkona-S.

O razbiti steklovini prav tako obvestite tehnika ali asistenta, da jo nadomestimo. Pazite na drobce stekla! Razbito steklovino zbiramo ločeno od ostalega odpada.

OZNAČEVANJE VZORCEV IN RAZTOPIN

Vsak vzorec, ki ga pripravite, mora biti označen, da ga bo mogoče kadarkoli nedvoumno identificirati. To velja za raztopine, celične kulture in ostalo. Oznaka mora vsebovati kratek opis, datum in ime osebe, ki je vzorec pripravila. Le tako se lahko izognemo zamenjavam, ki bi privedle do uporabe napačnih vzorcev in neuspešnih poskusov.

Petrijevke z gojišči označujemo z vodoodpornim flomastrom na spodnji strani (kjer je agar), ker jih inkubiramo obrnjene na pokrov. Na petrijevko napišite vrsto gojišča, oznako seva, ki ste ga nacepili, datum in vaše začetnice ali drugo nedvoumno identifikacijsko oznako.

Nekatere mikrocentrifugirke imajo matirano polje, namenjeno za pisanje. Izogibajte se označevanju pokrovčkov, ker jih boste pogosto pritiskali ob zapiranju in s tem zbrisali napis.

ODPADNI VZORCI IN REAGENTI

Vse vzorce, ki niso več uporabni, vsebujejo pa mikrobiološki material, ki bi se bil sposoben razmnoževati, je treba sterilizirati kemično ali termično. Uničujemo tudi ostanke DNA in antibiotikov, ki so termolabilni. Trdne odpadke za sterilizacijo zbiramo v avtoklavirni vreči, tekoče pa v čaši. Za mikrocentrifugirke, nastavke in druge drobne trdne odpadke uporabite drugo temu namenjeno plastično čašo.

Gele, ki so obarvani z etidijevim bromidom, zavijte v folijo za gospodinjstvo in zavrzite v običajne smeti. Tudi plastiko za enkratno uporabo, ki ni bila v stiku z mikroorganizmi, DNA ali nevarnimi organskimi topili, odvržemo med običajne smeti.

Ostanke organskih topil (razen alkoholov) zbiramo v za to določeno posodo v digestoriju. Za odstranjevanje teh kemikalij je odgovoren tehnik.

Kadar koli ste v dvomu glede ravnanja z odpadnimi snovmi, vprašajte asistenta ali tehnika.

POGOSTI POSTOPKI

Postopki, ki jih boste pogosto uporabljali, so: pipetiranje (tudi zelo majhnih volumnov), tehtanje in tariranje, merjenje pH, centrifugiranje, precepljanje in gojenje mikroorganizmov, priprava elektroforeznih gelov, izvajanje elektroforez vključno z detekcijo obarvanih nukleinskih kislin ali proteinov, obarjanje DNA. Precej teh postopkov poznate z vaj iz predhodnih let študija in v teh navodilih niso posebej obravnavane. Nekaj postopkov pa je na kratko razloženih v dodatku na koncu navodil.

Pri centrifugiranju pogosto ni posebej navedeno, katero centrifugo uporabite in pri katerih obratih. Kadarkoli imate vzorce v količinah, manjših od 1,5 ml in delate poskus v mikrocentrifugirkah, uporabite ustrezno mikrocentrifugo (v laboratoriju sta trenutno dve različni proizvajalca Eppendorf) s standardnim rotorjem. Če ni drugače navedeno, centrifugirate pri polnih obratih oz. pri 14.000 obr./min.

Pri centrifugiranju morajo biti vzorci, ki si v rotorju ležijo nasproti, uravnoteženi. Mikrocentrifugirke postavimo v rotor vedno tako, da je repek, s katerim je pritrjen pokrovček, obrnjen navzgor. Tako vemo, kje je usedlina, tudi če je ta prozorna ali je je tako malo, da je ne moremo videti s prostim očesom.

STERILIZACIJA

Vse snovi, ki bodo v stiku z živimi mikroorganizmi, in vse snovi, ki vsebujejo žive mikroorganizme, pa jih ne rabimo več, steriliziramo. Prav tako steriliziramo raztopine, v katerih bi se lahko naselili mikroorganizmi iz okolja in steklovino, ki jo uporabljamo pri delu z mikroorganizmi. Najpogostejši način sterilizacije je s paro pri povišanem tlaku (avtoklaviranje). Steklovino lahko steriliziramo v suhem sterilizatorju, nekatere raztopine, ki so nestabilne pri visoki temperaturi, pa steriliziramo s filtracijo skozi pore premera 0,20 µm. Za sterilizacijo skrbi tehnik. Vzorci za sterilizacijo morajo biti označeni: material za avtoklaviranje z avtoklavirnim trakom, za suho sterilizacijo in filtriranje pa z nalepljeno oznako, ki se jo da zlahka odstraniti tik pred sterilizacijo.

Steriliziranje cepilnih zank poteka s prežarevanjem, steklene triangle (spatule po Drigalskem) za razmaz kulture pa steriliziramo v 70-odstotnem etanolu, ki ga nad plamenom zažgemo. Pri sterilizaciji je treba paziti na to, da se zanke in triangleri ohladijo na temperaturo gojišča, preden se dotaknete živih celic. Plamen iz gorilnika v sterilni komori mora biti zmanjšan to take mere, da ne more škodovati sterilnemu filtru, če je ta nad delovno površino.

Vratove steklenic z gojišči in erlenmajeric s kulturami pred odpiranjem in zapiranjem ožgemo nad gorilnikom, da uničimo mikroorganizme, ki bi se tam zadrževali in da ustvarimo tok toplega zraka navzgor, s čimer preprečimo padanje kontaminant v posodo z gojiščem ali kulturo.

DOKONČANJE DELA

Vzorci, ki jih shranjujete do naslednje vaje in ki jih je treba inkubirati, sterilizirati, zamrzniti... oddajte tehniku ali asistentu. Preverite, da so nedvoumno označeni.

Delovni pult mora biti po koncu dela pobrisan, steklovina, ki ni bila v stiku z mikroorganizmi, pa sprana. Operite si roke. Aparature bo izključil asistent.

ODGOVORNOST ZA RAVNANJE

Tudi študenti po zakonu odgovarjajo za posledice lastne malomarnosti; te odgovornosti nase ne more prevzeti ne asistent ne fakulteta.

POROČILA O VAJI

Po opravljeni vaji napišite poročilo, ki naj bo pripravljeno smiselno in naj na kratko pokaže, kaj ste v poskusu naredili ter da razumete obravnavano snov.

Kratko poročilo napišite za posamezne zaključene poskuse – seznam in roki so navedeni na spletni strani vaj – naslov je na naslednji strani. *Oddati jih morate najkasneje do petka istega tedna do 12^h (lahko po e-pošti) - za pripravo poročila imate torej več kot 2 dni časa.*

Poročilo sestavlja naslednje: Ime in priimek študenta, naslov vaje, namen dela (če se le da v enem stavku), rezultate in razpravo.

Pri vajah, za katere ste reagente pripravili sami, izjemoma vključite tudi poglavje Materiali in/ali Metode, v katerem napišite, kako ste pripravili (zatehtali, razredčili, sterilizirali...) kateri reagent. Pri vajah, kjer ste sami sestavili reakcijo (torej ni v celoti napisana v navodilih), napišite tudi shemo pipetiranja. Vseeno

pa prosim, da praviloma ne opisujete postopka vaje, metode, teoretičnih osnov itd., ki so opisane v navodilih za vaje.

Rezultati so vsi podatki, ki ste jih dobili med vajo, tudi vsa opažanja, ki prispevajo k razjasnitvi naloge.

Razprava vsebuje razlago rezultatov. Če niste prišli do pričakovanega rezultata, poskušajte razložiti, kaj je temu razlog (ali je bila predpostavka napačna, ali so bili reagenti neustrezni, ali je prišlo do napake - katere? - v izvedbi postopka...).

Predlagam vam, da poročilo, po tem, ko ste ga napisali, ponovno preberete in popravite napake, ki ste jih naredili pri pisanju. Včasih poročila vsebujejo razen pravopisnih napak tudi neverjetne izjave, ki bi jih (upam) opazili, če bi poročilo vsaj enkrat prebrali. Na domači strani vaj boste našli povezavo (http://bio.ijs.si/Katedra/TrDNAv_citati1.html) do nekaterih čudnih in napačnih izjav iz poročil preteklih let, ki so lahko dobra osnova za preverjanje razumevanja tem.

Poročil mi verjetno ne bo uspelo popravljati sproti, jih bom pa vsekakor preden pridete na kolokvij. Ni vam treba pisati poprav poročil ali česa podobnega; kar bom označil kot nepravilno, nelogično, čudno napisano..., naj vam bo samo vodilo za pisanje naslednjih poročil in v pomoč pri učenju.

V navodilih se na koncu opisov nalog večkrat pojavljajo vprašanja, ki so samo pripomoček za vaše lastno preverjanje razumevanja. Nanje ni treba odgovarjati pisno v poročilu.

OCENJEVANJE

Poročila z vaj bom tudi ocenil. Povprečje ocen poročil bo prispevalo 25 % končne ocene vaj. Poročila, ki jih bom dobil z zamudo, bodo ocenjena z odbitkom 0,5 do 2 ocen (npr. poročilo, napisano za 9, dobi oceno 7) in to tako, da poročila, ki jih dobim z zamudo 1-3 ur ocenim 0,5 ocene nižje kot sicer, poročilo z zamudo 3-72 ur z eno oceno nižje in z zamudo več kot 72 ur 2 oceni nižje.

Poročila mi lahko prinesete v sobo B408 na Institutu "Jožef Stefan", ali pa mi jih pošljite po e-pošti na naslov marko.dolinar@fkkt.uni-lj.si. Po e-pošti mi pošiljajte poročila kot priložene datoteke v formatih RTF, DOC ali PDF. Ko bom poročilo, ki mi ga pošiljate po e-pošti, odprl in preveril, ali je priloga čitljiva, vam bom na naslov, ki ga imate določenega za odgovore (najpogosteje je ta kar enak naslovu, s katerega pošiljate), poslal kratek odgovor OK. To pomeni, da sem poročilo dobil. Če tega odgovora ne dobite, potem mi prosim pošljite kopijo vašega izvirnega poročila, iz katere bo razvidno, kdaj ste poslali original. To boste lahko naredili le, če boste kopije sporočil vsaj nekaj časa shranjevali v svojem predalu. Vseh poročil seveda ne bom mogel preveriti v petek točno opoldne, zato se lahko zgodi, da boste potrdilo o prejemu dobili šele v petek zvečer.

Poročila morate pisati samostojno. Nič ni narobe, če slike ali preglednice pripravite skupaj. Vseeno pa besedilo napišite sami. Če bom pri pregledovanju poročil ugotovil, da so deli poglavij pri več kolegih zelo podobni, bom ocene soavtorjev znižal za od 1 do 3 ocen, odvisno od obsega prepisanih (ali soustvarjenih) poročil. Če bo šlo za prepisane dele iz poročil iz preteklih let, bom seveda odbitek lahko pripisal samo vam.

Po končanih vajah bo kolokvij (~45 min). Na kolokvij lahko pride le, kdor je oddal vsa poročila. Za kolokvij se vnaprej dogovorite z mano, da razpišem posebej za vas rok na e-šudentu in vas nanj tudi sam prijavim. Ocena kolokvija predstavlja 75 % končne ocene.

Kolokvij sestavljata dva dela: eno vprašanje je naloga, ki jo rešujete pisno in je tipa Kako bi... (npr. sestavili reakcijo pomnoževanja ali rezanja z restriktazo, načrtali oligonukleotide za vnos v vektor), drugi del pa so (ustna) vprašanja / odgovori o delu na vajah, kjer razložite postopke, komentirate rezultate ipd. Naloga prinese 45 % celotne ocene, odgovori na vprašanja iz dela pa 30 % skupne ocene iz vaj.

Enake eksperimentalne vaje (brez računalniške vaje in z več uvoda v vaje) bomo izvedli tudi za študente 4. letnika Kemije, ki so vpisali predmet Biokemija II. Te vaje bodo potekale v ponedeljek in sredo dopoldne in jih bo vodila asistentka Petra Prijatelj.

ODSOTNOST Z VAJ

Prisotnost na vajah je obvezna, razen v primeru višje sile (hujša bolezen), kar pa morate dokazati s potrdilom. Manjkajoče poskuse bo treba nadomestiti po koncu semestra individualno.

ROKI ZA ODDAJO POROČIL

Napisati in oddati boste morali 5 poročil. Poročila oddajte vsakič najkasneje do 12. ure v petek, ki sledi zadnjemu poskusu znotraj posameznih nalog:

- Primerjava metod za izolacijo plazmidov iz bakterijskih celic (2 dneva)
- Izolacija večjih količin plazmidov iz bakterijskih celic (2 dneva)
- Kloniranje DNA (4 dnevi)
- Indukcija izražanja zapisa za rekombinantni protein (4 dnevi)
- Določanje polimorfizma kratkih tandemskih ponovitev (STR) (2 dneva)

Primer: Če vajo II dokončamo 17.4. (torek), potem je rok za oddajo poročil za to vajo 20.4. ob 12. uri, če pa bi zadnjo analizo za to vajo izvajali šele na naslednji laboratorijski vaji (23.4.), pa bi bil rok 27.4. ob 12. uri.

Za nekaj krajših vaj, ki jih bomo obravnavali, poročil ni treba napisati. Natančen razpored rokov za oddajo poročil je na spletni strani, namenjeni vajam.

Spletni naslovi:

Katedra za biokemijo: <http://bio.ijs.si/Katedra/katedra.html>

Vaje iz tehnologije rekombinantne DNA: <http://bio.ijs.si/Katedra/TrDNAvaje1.html>

Predavanja iz tehnologije rekombinantne DNA: <http://bio.ijs.si/Katedra/TrDNA1.html>

Kontaktne podatki:

Marko.Dolinar@fkkt.uni-lj.si	01/477 3765
Matjaz.Malavasic@ijs.si	01/ 241 9486
Petra.Prijatelj@ijs.si	01/477 3544

SEZNAM NALOG

I: Uporaba računalnika v tehnologiji rekombinantne DNA

II: Primerjava metod za hitro izolacijo plazmidov iz bakterijskih celic

II.1. Izolacija vektorja pJET po metodi z alkalno lizo

II.2. Izolacija vektorja pJET po metodi z encimsko lizo

II.3. Agarozna gelska elektroforeza: vpliv zamreženosti in prisotnosti etidijevega bromida

III: Izolacija večjih količin plazmidov iz bakterijskih celic

IV: Kloniranje DNA

IV.1. Rezanje plazmidov z restrikcijskimi endonukleazami

IV.2. Izolacija DNA iz agaroznega gela

IV.3. Ligacija

IV.4. Priprava kompetentnih celic

IV.5. Transformacija bakterij

IV.6. Analiza transformant

V. Izražanje zapisa za kokošji cistatin v *E. coli*

V.1. Indukcija ekspresije

V.2. Priprava celičnih frakcij

V.3. Ugotavljanje nivoja ekspresije, topnosti oz. lokalizacije rekombinantnega proteina

V.4. Analiza aktivnosti rekombinantnega proteina

VI: Določanje polimorfizma kratkih tandemskih ponovitev (STR)

VI.1. Izolacija genomske DNA iz majhnega števila človeških celic

VI.2. Pomnoževanje regije na 3. kromosomu s PCR

VI.3. Ločevanje produktov PCR s PAGE

VII: Določanje nukleotidnega zaporedja

VIII: Prenos fragmentov DNA z gela na membrano

Na računalniški vaji bomo izvedli vse tiste korake, ki so značilni za začetek dela z novimi vektorji in zapisi za proteine kasneje v laboratoriju. Pri drugi nalogi bomo spoznali dve osnovni metodi za izolacijo plazmidov v malem merilu ter se odločili, katera je bolj primerna za delo na vajah. Videli bomo tudi, koliko vpliva zamreženost agaroze na ločevanje nukleinskih kislin. To bo uvod v osrednji del vaj, ki ga predstavljajo naloge III – V.

V III. nalogi bomo izolirali dva plazmida, od katerih eden nosi zapis za kokošji cistatin, drugi pa je ekspresijski vektor. Nato bomo v IV. nalogi iz prvega plazmida izolirali fragment, ki nosi zapis za cistatin, ekspresijski vektor pa bomo razrezali s enakima encimoma, da bomo v nadaljevanju vanj lahko vstavili izolirani fragment. Rekombinantni vektor, ki bo nosil zapis za cistatin, bomo vnesli v bakterijske celice, ki jih bomo predhodno pripravili kompetentne. V V. nalogi bomo testirali, ali transformante proizvajajo rekombinantni protein in če ga, koliko, kje je lociran, je topen ali ne in ali je aktiven.

Kratki demonstracijski vaji VI in VIII sta namenjeni spoznavanju z nekaterimi tehnikami, za katere na vajah iz tega ali onega razloga ni mogoče izvesti celotnega poskusa. Vaja VII pa ponazarja pristop k določanju razlik med posamezniki na ravni DNA, saj bomo analizirali variabilnost kratkega segmenta na 3. kromosomu.

I. Uporaba računalnika v tehnologiji rekombinantne DNA

S pomočjo programov na javno dostopnih strežnikih si lahko olajšamo delo pri genetskem inženirstvu in na drugih področjih biokemije in molekularne biologije. Obstaja več naslovov, na katerih najdemo povezave do posameznih strežnikov. Običajno so povezave urejene po področjih dela. Ena najpogostejše uporabljenih zbirk povezav je "CMS Molecular biology resource" na spletnem naslovu:

<http://www.biochem.uwo.ca/rt/ResTools/cmshp.html>. Poglavja na tej strani so: Analiza in biokemija proteinov, Analiza DNA in molekularna biologija, Biomolekulsko modeliranje, Bioinformatika in računalniška biologija, Splošni viri s področja filogenije, Splošna biokemija, Splošni viri s področja bioznanosti, Biotehnologija.

Pri tehnologiji rekombinantne DNA bomo predvsem uporabljali povezave iz poglavja Analiza DNA in molekularna biologija. Zbrane so v naslednjih podpoglavjih: Analize homologij in struktur, Fizikalno-kemijske lastnosti in analize, Zbirke zaporedij in struktur, Genomske zbirke po organizmih, Zbirke restriksijskih encimov, Raziskovalne tehnike in protokoli.

Razen javno dostopnih strežnikov obstaja tudi več komercialnih programov za delo z zaporedji. Nekateri so zelo dragi (več 1000 EUR), nekateri so napisani samo za določene operacijske sisteme, drugi zelo kompleksni in zahtevajo dobro poznavanje ukazov in možnosti. Za osnovno delo pa niso nujno potrebni, kar boste videli tudi na današnji vaji.

Pred nami je več nalog:

- najti nukleotidno zaporedje vektorja pUC19
 - najti nukleotidno zaporedje mRNA za kokošji (*Gallus gallus*) lizocim
 - izvesti restriksijsko analizo tega zaporedja in določiti, katera mesta so primerna za vnos v vektor pUC19
 - v urejevalniku besedila vstaviti zaporedje zapisa za lizocim v vektor pUC19
 - načrtati taka oligonukleotida za pomnoževanje zapisa za lizocim, da bomo zapis lahko vnesli v vektor pET22b med točno določeni restriksijski mesti
 - načrtati mutageni oligonukleotid za pripravo mutanta kokošjega lizocima T51Q
-

Izvedba vaje po stopnjah:

Poiščite nukleotidno zaporedje vektorja pUC19 in ga shranite kot datoteko v mapo, namenjeno vam (npr. E:\documents\TrDNA).

Poiščite tudi plazmidno karto tega vektorja in določite njegove lastnosti!

Kakšne vrste vektor je to: ali ga lahko pridobimo kot ssDNA? Ali lahko z njegovo pomočjo izrazimo rekombinantne proteine? Je uporaben za modro-beli test? Kam se vežeta sekvenčna oligonukleotida?

Zaporedja DNA so shranjena v zbirkah zaporedij. Za vektorje obstaja več zbirk, ki pa so večinoma nepopolne in ne vsebujejo nekaterih najpogostejše uporabljenih vektorjev, ki so jih razvila biotehnološka podjetja. V splošnih zbirkah nukleotidnih zaporedij pa se pojavljajo imena priljubljenih vektorjev tako pogosto, da je število zadetkov preveliko za racionalno iskanje.

Dokler je bilo število vektorjev sorazmerno majhno, so obstajale posebne zbirke podatkov o njih, vendar jih niso redno obnavljali in so postopno postale neuporabne. Zato poskusite najti nukleotidno zaporedje vektorja pUC19 v eni od splošnih zbirk nukleotidnih zaporedij. Začetek iskanja naj bo na strani DBGET na naslovu <http://www.genome.ad.jp/dbget/dbget.html>.

Iščite med zaporedji DNA v zbirki EMBL, ki ne vključuje zaporedij EST, GSS, itd. (*kaj pomenijo te kratice – za katera zaporedja gre?*). Rezultat iskanja bo več kot 20 različnih zaporedij, seveda pa jih večina ne predstavlja zaporedja, ki ga iščemo. Poiščite med zadetki pravi zapis (*pravilno zaporedje ima oznako M77789*).

Na koncu označite celotno nukleotidno zaporedje in ga prenesite v urejevalnik besedila ter shranite v za to določeni mapi kot datoteko z imenom pUC19seq.doc.

Iz nukleotidnega zaporedja je nemogoče razbrati, kje so nameščene posamezne regije. Zato poiščimo na Internetu plazmidno karto tega vektorja!

Žal ni na voljo nobene zbirke plazmidnih kart, zato moramo vsak plazmid poiskati posebej pri proizvajalcu ali pa iščemo po celotnem spletu, kar ni vedno učinkovito. Vektor pUC19 je bil vrsto let eden najpogostejše uporabljenih klonirnih vektorjev in prodajale so ga različne biotehnološke firme.

Med katalogi proizvajalcev je verjetno najpogostejše uporabljan katalog proizvajalca NewEngland BioLabs, ker ima veliko tehničnih podatkov, med njimi tudi plazmidne karte, slike polilinkerskih regij in sezname restrikcijskih mest na vektorjih. Spletni katalog tega proizvajalca najdete na naslovu <http://www.neb.com/>.

Do podatkov o vektorjih pridete tako, da najprej odprete seznam izdelkov in na levi kliknete na Tehnični podatki (»Technical Reference«), potem pa poiščete poglavje »DNA sequences and maps«. V razpredelnici poiščite vektor pUC19 in si oglejte plazmidno karto (»Restriction Map«) in tabelo restrikcijskih mest (»Location of Sites«).

Zdaj lahko odgovorite na vprašanja na začetku tega poglavja. Izpišite si tudi zaporedje restrikcijskih mest v polilinkerski regiji – samo ta mesta namreč pridejo v poštev za vnos fragmenta. Za odgovor na vprašanje o mestu vezave sekvenčnih oligonukleotidov pa si boste morali pomagati s katalogom in predhodno shranjenim nukleotidnim zaporedjem celotnega vektorja.

V nalogi morate v vektor pUC19 ligirati cDNA za kokošji (*Gallus gallus*) lizocim.

Po kakšnem postopku bi iz tkiva dobili cDNA? Katero tkivo bi bilo najprimernejše za izolacijo mRNA?

V eksperimentu bi torej naprej izolirali mRNA, to prevedli v cDNA in ligirali v vektor. Da bi se lahko odločili, katera mesta so primerna za vnos v vektor, morate najprej vedeti, katera mesta so neuporabna – tista, ki se pojavljajo znotraj cDNA ali na vektorju, a izven polilinkerske regije. *Zakaj?*

Poiščite torej nukleotidno zaporedje celotne cDNA za kokošji lizocim in ga shranite kot datoteko v programu Word. Potem izvedite restrikcijsko analizo kodirajočega zaporedja in primerjajte ugotovljena mesta z mesti na vektorju pUC19!

Nukleotidna zaporedja iščemo običajno v zbirkah GenBank ali EMBL. Začnite spet na strani <http://www.genome.ad.jp/dbget/dbget.html> in poiščite zaporedje v zbirki GenBank. Verjetno boste dobili več zadetkov, med njimi pa morate poiskati tisto, ki vsebuje zaporedje celotne cDNA za lizocim. Zaporedje shranite kot datoteko .doc in si oglejte njegove značilnosti v opisu nad nukleotidnim zaporedjem. Včasih kodirajoča regija zajema samo del predstavljenega zaporedja, zato je treba paziti na meje regij.

Orodje za restrikcijsko analizo boste našli na strani <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>. Nukleotidno zaporedje kokošnjega lizocima prenesite v ustrezno okno in opravite restrikcijsko analizo z encimi, ki prepoznajo zaporedje, dolgo vsaj 6 bp, in ki režejo vsaj enkrat, a ne več kot dvakrat.

Dobljeno restrikcijsko karto prenesi v datoteko, kjer je že shranjeno nukleotidno zaporedje lizocima.

Poglej zadetke na restrikcijski karti in določi tista mesta, ki jih ne moremo uporabiti za vnos zapisa za lizocim v vektor pUC19, nato pa še tista, ki bi bila uporabna!

Na vrsti je virtualno ligiranje v Wordu!

Glede na izbor restrikcijskih mest, ki pridejo v poštev za vnos v vektor pUC19, zapis za kokošji lizocim vstavite v zaporedje pUC19. Zaporedje shranite pod novim imenom.

Naravna nukleotidna zaporedja imajo redko konce, ki so primerni za ligiranje brez predhodne prilagoditve. Običajno konce spremenimo s PCR, tako da na oba pomnoževalna oligonukleotida dodamo zaporedja, ki jih prepoznajo restriktaze. Če ne gre drugače, pa lahko fragmente vstavimo preko topih koncev. Najdite jih v polilinkerski regiji pUC19 in izvedite 'ligiranje', na vrhu zapisa za rekombinantni plazmid pa napišite, katera mesta ste uporabili, da boste zaporedje oziroma konstrukt lažje razumeli tudi čez nekaj mesecev (ali let, ko bo treba poskus razložiti kakšnemu kolegu).

Načrtajte taka oligonukleotida za pomnoževanje zapisa za lizocim, da boste zapis lahko vnesli v vektor pET22b med mesti *Bam*HI in *Hind*III!

Naloga ima več delov: najprej je treba izvedeti čimveč o vektorju – poiščite torej podatke o njem; predvsem vam bo prišla prav plazmidna karta. Vektor je razvila in ga prodaja družba Novagen. Spomnite se splošnih napotkov za sestavo začetnih oligonukleotidov za PCR! Delu, ki se hibridizira s ssDNA na koncih zapisa za lizocim morate dodati zaporedje, ki zapisuje za prepoznavno regijo za obe restriktazi, pri tem pa morate paziti na bralni okvir, saj je vektor pET22b fuzijski vektor!

Poskusite si sestaviti torej približno 20 nt dolga oligonukleotida, ki imata vsaj 50 % zaporedja, ki se prilega zapisu za lizocim, preostanek pa zapisuje za prepoznavni regiji. Na 5'-koncu dodajte eno ali dve bazi, ki izenačujeta razmerje med bazami G+C in A+T, pomembna pa sta predvsem, da olajšata kasnejšo vezavo restriktaz in hkrati nekoliko ščitita nujna zaporedja na oligonukleotidu pred delovanjem eksonukleaz.

Nekatere restriktaze učinkovito režejo šele, če je pred ali za prepoznavno regijo še ena ali več baz. Več o tem najdete v katalogu firme NewEngland BioLabs (<http://www.neb.com/>). Do pravih informacij pa se morate najprej prebiti: Technical reference / Restriction endonucleases / Cleavage close to the end of DNA fragments.

Pri sestavljanju pazite na bralni okvir! Ta se ne sme spremeniti, vendar se ob tem lahko zgodi, da bo konstrukt zato daljši, kar pomeni, da bo rekombinantni protein na N-koncu imel kakšno aminokislino več. Izbor te dodatne aminokisline je stvar posebnega razmisleka – glede na naravo fuzije je treba misliti na to, da bo proteaza (če je konstrukt take vrste) fuzijski del še vedno lahko odcepljala.

Kadar ne načrtujete oligonukleotidov za kasnejše ligiranje v fuzijske vektorje, pa problem ne nastaja zaradi bralnega okvira, pač pa moramo pri načrtovanju paziti, da ne pozabimo na začetni ATG (AUG - >Met), kjer se bo začela biosinteza proteina. Prav tako je pomembna razdalja med mestom za vezavo ribosoma in startnim ATG, pa tudi možnost nastajanja sekundarnih struktur mRNA na začetku zaporedja, kar običajno privede do znižanja ravni izražanja.

Ko imate prvi načrt za oligonukleotid pripravljen, pod nukleotidno zaporedje napišite še aminokislinsko in preverite prehod med vektorjem in insertom. Pazite tudi, da ob načrtovanju ni kje prišlo do vstavitve stop-kodonov ali pa do nastanka neželenih restrikcijskih mest na prehodu med zaporedjema lizocima in vektorja!

Prvi načrt morate zdaj preveriti, da ugotovite, kakšna je za načrtani oligonukleotid T_m , delež posameznih baz, verjetnost za nastajanje zank ali dimerov. Vse to lahko bistveno vpliva na učinkovitost PCR. Za preverjanje lastnosti oligonukleotidov je na voljo več programov. Nekaj najpreprostejših je na voljo tudi na Internetu.

Enostaven program je na naslovu <http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>; izračuna tudi absorpcijske lastnosti oligonukleotida. Na strežniku Medicinske fakultete Univerze Northwestern (ZDA) pa je nekoliko resnejši program za računanje T_m na naslovu:

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. Prednost tega programa je, da lahko upošteva koncentracijo NaCl, ki vpliva na izračunano vrednost, vrne pa tudi podatek o možnih homodimerih. Drug zahtevnejši program je na naslovu <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>. Preverite, kako dobro ste načrtali oligonukleotida. Če je treba, lahko dodate ali odvzamete kakšno bazo na koncih. Pri analizi dimerizacije upoštevajte, da so predvsem nevarni tisti dimeri, ki se prilegajo na 3'-koncih, zato lahko stanje izboljšamo s podaljševanjem ali krajšanjem tega konca.

Načrt za oligonukleotida shranite v mapo pod imenom oligi4.doc !

Predpostavimo, da ste zapis za lizocim uspeli ligirati v ekspresijski vektor in da se protein izraža v zadostni meri, da ga je mogoče izolirati v miligramskih količinah. Da bi razumeli vlogo posameznih aminokislin pri delovanju in stabilnosti encima ste se na osnovi znane kristalne strukture odločili, da zamenjate treonin na mestu 51 z glutaminom. Treba bo torej izvesti mestno-specifično mutagenezo. Na voljo imamo več metod (*katere?*), vsekakor pa bomo morali načrtati mutageni oligonukleotid.

Načrtajte mutageni oligonukleotid za pripravo mutante lizocima T51Q!

Aminokislinsko zaporedje kokošjega lizocima C najdete v zbirki SwissProt na naslovu <http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>, strukturo pa si na hitro lahko ogledate preko programa Rasmol ali podobnega. Povezave do podatkov o prostorski zgradbi najdete s pomočjo iskalnika na <http://www.imb-jena.de/cgi-bin/pdbILq.pl>.

Preglejte podatke o proteinu v prvem delu izpisa aminokislinskega zaporedja; povedo marsikaj o odkrivanju, zgradbi in delovanju tega encima. Navedene so tudi razlike med objavljenimi zaporedji, meje med regijami in razmestitev disulfidnih mostičkov. Zaporedje prenesite v datoteko, kjer imate že shranjeno nukleotidno zaporedje.

Da bi lažje določili, kje na nukleotidnem zaporedju je mesto, ki ga moramo mutirati, nukleotidno zaporedje najprej prevedemo v aminokislinsko in ga primerjamo s tistim iz zbirke SwissProt. Za prevajanje zaporedij obstaja več programov, priročen je na primer tisti na naslovu <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>, saj omogoča izpis v različnih formatih. Tudi ta izpis prenesite v datoteko z zaporedji.

Za določitev zaporedja mutagenega oligonukleotida moramo imeti na razpolago še seznam kodonov po aminokislinah. Tabela je na <http://algoart.com/help/softstep/alldocs/aatable.htm>. Poglejte, kateri triplet zapisuje za Thr51 in kateri tripleti kodirajo aminokislino glutamin! Za mutacijo je smiselno, da je razlika med zaporedji na enem samem mestu, če pa je treba zamenjati dva nukleotida, naj bosta to dva sosednja. Navzgor in navzdol od zamenjane baze naj bo na mutagenem oligonukleotidu 10 baz, ki se prilegajo, če pa ste morali zamenjati dve bazi, pa 12-14 baz.

Če imamo na razpolago več različnih zamenjav, se odločamo po dveh kriterijih. Prva je 'raba kodona': pri izražanju genov imajo za posamezne aminokislinske ostanke organizmi (vrste) pogostejše in redkeje uporabljane triplete. Obstajajo preglednice pogostosti rabe kodonov za večino analiziranih organizmov. Zbrane so na naslovu <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Uporabimo tisti triplet, ki ga organizem pogostejše uporablja in se s tem izognemo težavam z nizkimi ravni izražanja.

Drugo pravilo, ki pa ga ne moremo vedno upoštevati, je, da z uvedbo mutacije poskusimo v zaporedje vnesti ali izbrisati restriksijsko mesto, ki bi bilo uporabno pri detektiranju mutacije. Ker so izpleni

postopkov za mutagenezo največkrat manjši od 50 %, si na ta način lahko prihranimo nekaj časa in dela in določimo nukleotidno zaporedje samo tistih konstruktov, za katere na podlagi restrikcijske analize lahko ugotovimo, da imajo uvedeno mutacijo. Vseeno pa moramo nukleotidno zaporedje dobljenih klonov na koncu preveriti, saj so napake mogoče tudi na mestih v bližini koncev mutagenih oligonukleotidov, pa tudi drugje, če smo mutagenezo izvajali s pomočjo PCR.

Možnost vnosa ali izbrisa restrikcijskih mest lahko preverimo s programom WebCutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>), kjer takoj pod oknom, v katero smo kopirali zaporedje mutirane regije, označimo, da želimo izvesti 'tiho mutagenezo'. Na območju mutacije preverimo, ali je mogoče uvesti kakšno novo mesto ali pa, če kakšno mesto lahko izbrišemo. Najbolje bi bilo, da do spremembe pride že z zamenjavo baze, ki povzroči tudi zamenjavo aminokislina. Če to ne gre, pogledamo še sosednja mesta, bistveno dalj navzgor ali navzdol pa običajno ne, saj bi s podaljševanjem regije, ki se ne hibridizira na matrico (divji tip), morali podaljšati tudi mutageni oligonukleotid.

Napišite torej v datoteko, katera zamenjava je (teoretično) možna in katera je smiselna, da boste vedeli za kasneje.

S tem je računalniška vaja končana. Podoben postopek je treba izvesti vsakič, ko se lotimo dela z novim proteinom ali zapisom zanj. Pogosto pa bi, predvsem če delamo s proteini iz človeka ali miši, preden se lotimo izolacije mRNA in pretvorbe v cDNA, še preverili, ali ni mogoče zaporedja, ki nas zanima, dobiti v kakšni zbirki klonov. Za akademske ustanove so stroški bistveno manjši kot reagenti, ki bi bili potrebni za pripravo cDNA in iskanje pravega zaporedja. Izhodišče za iskanje je lahko zbirka dbEST, ki jo najdete na naslovu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>, z identifikacijsko oznako klonov pa potem iščemo po straneh inštitucij, ki skrbijo za hranjenje in razpošiljanje klonov. Ker zaporedja večinoma niso v celoti preverjena, se lahko zgodi, da naročeni klon nima pričakovanega zaporedja, zato običajno naročamo po dva neodvisna klona za vsako zaporedje in pred delom z njim natančno preverimo restrikcijsko sliko in nukleotidno zaporedje inserta, s katerim bomo delali.

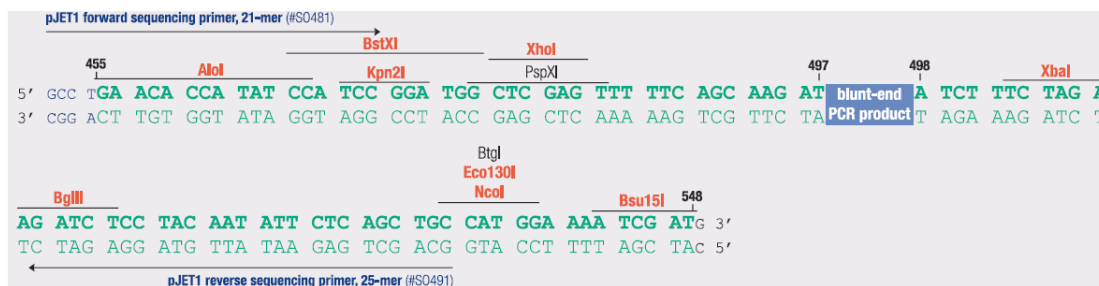
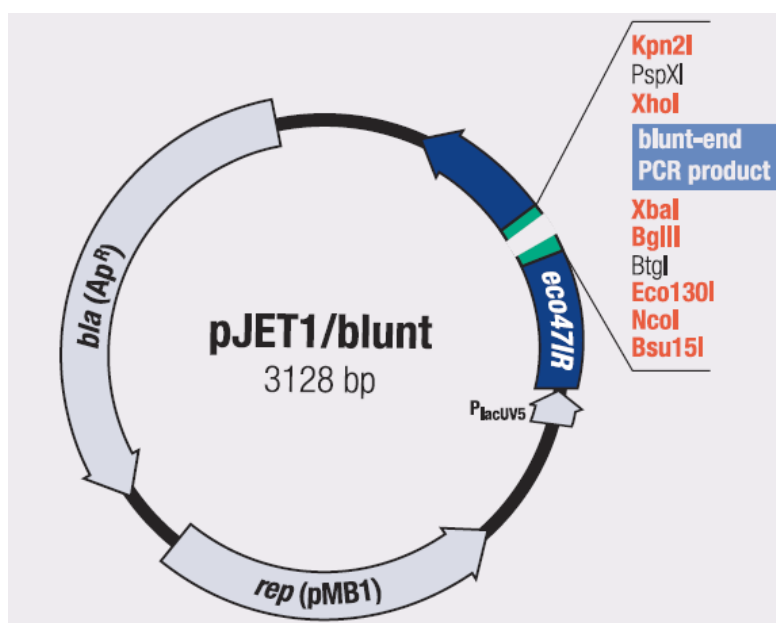
II: Primerjava metod za izolacijo plazmidov iz bakterijskih celic

Že pri vajah iz splošne biokemije in molekularne genetike ste spoznali preproste metode za izolacijo mikrogramskih količin plazmidov (mini-preparacije). Današnja vaja vam bo omogočila spoznati razlike v pristopu, izvedbi in rezultatih različnih metod.

Prekonočne kulture bakterijskih celic smo pripravili že vnaprej, tako da boste na vaji izvedli zapored dve različni izolaciji: izolacijo z alkalno lizo in izolacijo z encimsko lizo (včasih jo imenujemo tudi metoda z vretjem). Pri metodi z vretjem boste preverili, ali dodatna obdelava z LiCl, CTAB ali PEG izboljša kvaliteto preparacije, pri metodi z alkalno lizo pa boste preverili delovanje RNaze pri dveh različnih koncentracijah. Za vse te poskuse boste morali izolirati plazmide po vsaki od dveh metod v dveh paralelkah. Po končani izolaciji boste dobljene preparate nanесли na agarozni gel in po elektroforezi ocenili razlike v kvaliteti in količini.

Celice, iz katerih boste izolirali plazmide, so *Escherichia coli* DH5 α , ki vsebujejo plazmid pJET1 – to je sicer vektor za vstavljanje produktov PCR (slika II.1) vanj pa smo predhodno vstavili fragment cDNA dolžine približno 300 bp z zapisom za del imunoglobulina G.

Slika II.1: Plazmidna karta vektorja pJET1 (3128 bp) in njegova polilinkerska regija.
(Vir: Fermentas).



II.1. Izolacija z alkalno lizo:

vsaka skupina izvaja ta postopek v duplikatu!

- Prelijte 1,5 ml prekonočne kulture bakterij v mikrocentrifugirko.
- Centrifugirajte 1 min. pri 10.000 obr./min. in s pipeto odstranite supernatant.
- V mikrocentrifugirko dodajte še 1,5 ml kulture in centrifugirajte kot prej.
- K usedlini dodajte 200 µl pufra GTE, resuspendirajte in inkubirajte pri sobni temperaturi 3 min.
- Dodajte 400 µl mešanice NaOH/NaDS, obrnite vzorec 5-krat in inkubirajte na ledu 5 min.
- Dodajte 300 µl raztopine K-acetata, premešajte na vibracijskem mešalniku (5 s) in inkubirajte 5 min. na ledu.
- Centrifugirajte 3 min.
- Prenesite supernatant v svežo mikrocentrifugirko.
- Dodajte 0,6 ml izopropanola, obrnite 5-krat in inkubirajte 2 min pri sobni temperaturi.
- Centrifugirajte 3 min.
- Supernatant zavržite. Usedlini dodajte 0,4 ml 70 % etanola in dobro premešajte.
- Centrifugirajte 3 min.
- Supernatant zavržite, usedlino pa posušite na zraku ter resuspendirajte v 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 9. *Z naslednjim delom vaje začnite medtem, ko se usedlina suši.*

II.2. Izolacija z encimsko lizo:

vsaka skupina izvaja ta postopek v duplikatu!

- Prelijte 1,5 ml prekonočne kulture bakterij v mikrocentrifugirko.
- Centrifugirajte 1 min. pri 10.000 g in odpipetirajte supernatant.
- Dodajte 300 µl pufra STET, 20 µl raztopine lizocima in resuspendirajte (2 min na vibracijskem mešalu).
- Vzorce prekuhajte (75 s, 100 °C) v vreli vodni kopeli.
- Centrifugirajte 10 min.
- Odpipetirajte supernatant v svežo mikrocentrifugirko in dodajte 1 V izopropanola.
- Centrifugirajte 5 min.
- Supernatant zavržite. Usedlini dodajte 0,4 ml 70 % etanola in dobro premešajte.
- Centrifugirajte 3 min.
- Supernatant zavržite, usedlino pa posušite na zraku ter resuspendirajte v 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 9.

Reagenti:

GTE: 50 mM glukoza, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA. Avtoklaviraj in hrani v hladilniku.

NaOH/NaDS: 0,2 M NaOH, 1 % NaDS (zmešaj tik pred uporabo iz 2x založnih raztopin)

K-acetat: 5 M K-acetat pH 4,8 (za 100 ml zmešaj 29,5 ml očetne kisline, KOH do pH 4,8, dopolni z vodo)

STET: 8 % saharoza, 5 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 0,1 M NaCl

10 mM Tris/HCl pH 9,0

lizocim: 10 mg/ml v 10 mM Tris/HCl pH 9,0

izopropanol, 70-odstotni etanol



Preden končni vzorec raztopite v 10 mM pufru Tris/HCl, mora biti usedlina suha (običajno postane bolj belkasta). Če ni suha (torej še vsebuje etanol), bo DNA slabše topna, raztopina pa vam pri elektroforezi (naslednji poskus) ne bo lepo padla v žepček, pač pa bo splavala iz žepka v pufer. Prisotnost etanola lahko vpliva tudi na encimske reakcije, ki bi jih izvajali s tako izoliranim plazmidom – spremenila bi se aktivnost in specifičnost.

II.3. Ugotavljanje vloge dodatkov: RNaza, LiCl, CTAB, PEG

RNaza:

Vzorci plazmidne DNA, ki jo dobimo z mini-preparacijskimi postopki pogosto vsebujejo še precej nizkomolekularne RNA (predvsem tRNA). Da bi se je rešili, inkubiramo grobe preparate z RNazo A, nato pa vzorce DNA oborimo. Kratki fragmenti RNA in ribonukleotidi ostanejo topni, plazmid pa se obori. Testirali bomo, koliko RNaze je potrebne, da razgradi RNA v vzorcu (0,25 µg ali 2 µg). RNaza A je po izvoru iz govejega pankreasa in je bila očiščena kromatografsko.

K po 10 µl preparata, dobljenega po metodi z alkalno lizo, dodajte enkrat 35 µl vode in 5 µl RNaze, drugič pa samo 40 µl RNaze s koncentracijo 50 mg/ml. Inkubirajte 15 min pri 37 °C, nato pa oborite iz etanola ob dodatku Na-acetata (k 50 µl vzorca dodajte 5 µl 3 M Na-acetata in 125 µl etanola, sperite pa s 100 µl 70-odstotnega etanola) – *več o obarjanju DNA v Dodatku.*

Na koncu DNA raztopite v 10 µl pufra TE (10 mM Tris/HCl pH 8,5, 1 mM EDTA). *Ne pozabite, da rabite tudi 1 alikvot (10 µl) vzorca, ki mu dodate samo 40 µl pufra TE in izvedete obarjanje iz etanola tako kot z vzorcema, ki ste ju obdelali z RNazo – to je slepi vzorec, ki bo pokazal, kakšen je preparat, če ga ne obdelamo z RNazo.*

LiCl:

Nekateri postopki za čiščenje plazmidov vključujejo stopnjo obarjanja RNA z LiCl brez dodatka alkohola. Obarja se predvsem RNA z več kot 300 nt. Preverili bomo, ali je tak postopek po učinkovitosti podoben kot razgradnja z RNazo.

K 10 µl preparata, dobljenega po postopku s kuhanjem, dodajte 10 µl ledenomrzlega 5 M LiCl. Premešajte, inkubirajte 10 min na ledu in nato centrifugirajte 5 min. Supernatant prenesite v svežo mikrocentrifugirko, oborite z 20 µl izopropanola (opisano zgoraj in v Dodatku), sperite s 70 % etanolom (50 µl) in posušite. Na koncu raztopite v 10 µl pufra TE.

PEG:

S polietilenglikolom (PEG) lahko oborimo DNA, nekaterih kontaminant v grobih preparatih DNA pa ne.

K 10 µl preparata, dobljenega po postopku s kuhanjem, dodajte 10 µl 13 % raztopine PEG 6000 v 1,6 M NaCl. Premešajte, inkubirajte 15 min na ledu in centrifugirajte 5 min. Supernatant zavržite, usedlino pa raztopite v 30 µl TE ter oborite z dodatkom 3,3 µl 3 M Na-acetata (pH 5,2) ter 75 µl absolutnega etanola. Centrifugirajte 5 min, supernatant zavržite, usedlino pa sperite s 70 % etanolom (če se je usedlina odlepila z dna, ponovno centrifugirajte 3 min), etanol odpipetirajte, usedlino pa posušite. Na koncu raztopite v 10 µl pufra TE.

CTAB:

Heksadeciltrimetilamonijev bromid (CTAB) je kationski detergent, ki se v prisotnosti nizke koncentracije NaCl veže na nukleinske kisline in jih obarja. Kompleks nato razbijemo s povečanjem koncentracije NaCl. S tem se znebimo proteinskih in saharidnih kontaminant v vzorcih plazmidne DNA, delno pa tudi RNA.



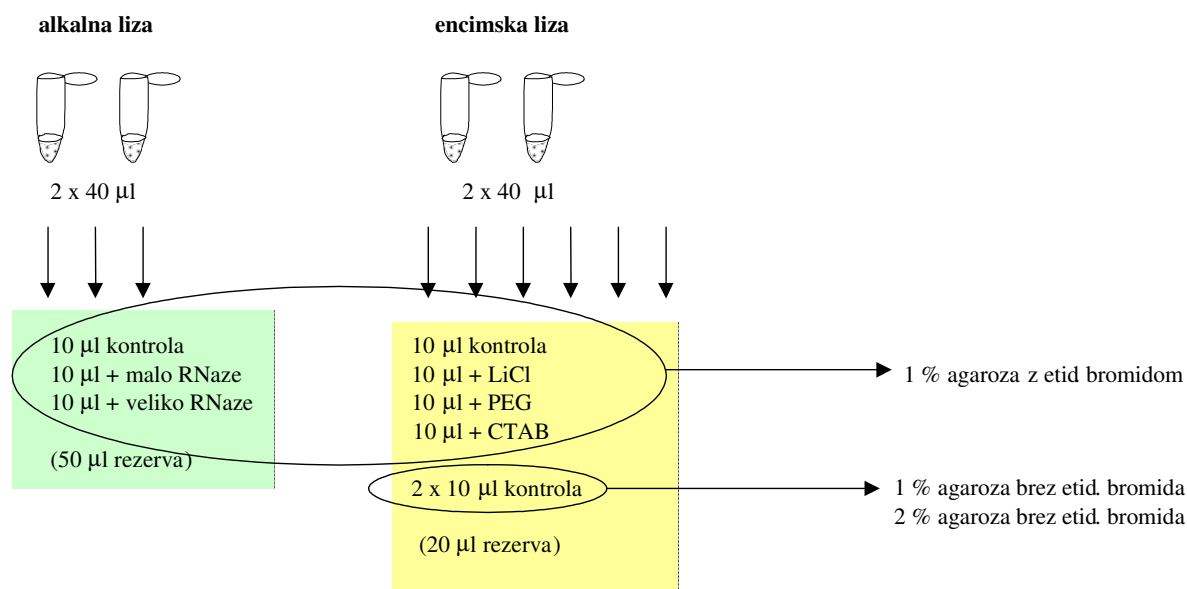
Po obarjanju s CTAB so nečistoče v supernatantu – delo nadaljujete z usedlino!

K 10 µl preparata, dobljenega po postopku s kuhanjem, dodajte 120 µl destilirane vode in 10 µl 2,5 % CTAB. Premešajte, da se nekoliko zamotni, nato centrifugirajte 5 min. Supernatant zavržite, usedlino pa raztopite v 200 µl 1,2 M NaCl. Dodajte 500 µl absolutnega etanola, premešajte in centrifugirajte 8 min. Usedlino sperite s 70 % etanolom (kot je opisano pri PEG) in na koncu raztopite v 10 µl pufra TE.

Reagenti:

Reagenti so navedeni v tekstu.

Slika II.2: Shema uporabe izolirane plazmidne DNA:



II.4. Elektroforeza na agaroznem gelu

Čeprav to metodo v osnovi že poznate, si bomo tokrat praktično ogledali, kako na potovanje molekul nukleinskih kislin vpliva zamreženost in prisotnost barvila. Poznavanje te metode je pomembno, saj jo uporabljamo v laboratoriju vsakodnevno. Elektroforezo bomo danes praktično uporabili za analizo plazmidne DNA s prejšnje vaje. V eni od naslednjih vaj pa bomo iz agaroznega gela izolirali DNA, ob tem pa tudi ocenili, koliko DNA ustreza posamezna lisa v gelu.

Vaja ima dva dela; v prvem bomo na različno zamreženih gelih zasledovali hitrost potovanja DNA, v drugem pa bomo analizirali kvaliteto izolirane DNA in vlogo dodatkov pri izolaciji – hkrati bomo rezultate kontrolnih vzorcev primerjali z rezultati na prvih dveh gelih in poskušali ugotoviti, ali je vidna kakšna razlika v potovanju konformacijskih oblik plazmida.

V prvem delu vaje bomo analizirali potovanje plazmidov v različno zamreženih gelih. Pripravite 1 % in 2 % agarozni gel brez etidijevega bromida (EtdBr). Po končani elektroforezi bodite pozorni na prepotovano dolžino posameznih oblik plazmidnih molekul v odvisnosti od koncentracije agaroze. Primerjajte pa tudi razporeditev lis v gelu, ki je imel EtdBr dodan že ob pripravi (2. del analize)!

1. elektroforeza: vpliv zamreženosti gela

Z vaje II.2 vam je ostalo še 20 µl plazmida, izoliranega po postopku s kuhanjem. K po 10 µl DNA dodajte po 2 µl nanašalnega pufra in po en vzorec nanosite na vsakega od gelov. Zapomnite si, kateri vzorec je vaš. Elektroforeza naj teče na vseh gelih enako dolgo (1 h). Po končanem ločevanju gela, ki nista vsebovala etidijevega bromida, pobarvajte in analizirajte hitrost potovanja (oz. prepotovano dolžino pri enakih nastavitvah usmernika) ter razporeditev lis.

2. elektroforeza: vpliv dodatkov

Izolirane in obdelane plazmide boste v drugem delu vaje nanесли na 1 % agarozni gel z EtdBr in to v logičnem vrstnem redu, da boste lahko opazovali razliko med vzorci, ki so bili izolirani brez in z dodatki.

Predlagam, da jih nanesete takole:

- 1 – vzorec, pridobljen z alkalno lizo, brez dodatka RNaze
- 2 – vzorec, pridobljen z alkalno lizo, obdelan z malo RNaze
- 3 – vzorec, pridobljen z alkalno lizo, obdelan z veliko RNaze
- 4 – vzorec, pridobljen s kuhanjem, brez dodatkov
- 5 – vzorec, pridobljen s kuhanjem, obdelan z LiCl
- 6 – vzorec, pridobljen s kuhanjem, obdelan s PEG
- 7 – vzorec, pridobljen s kuhanjem, obdelan s CTAB

Agarozni gel pripravite tako, da v čašo zatehtate potrebno količino agaroze za 60 ml gela (80 ml za večjo kadičko). Dodate pufer TAE do 60 ml oz. 80 ml (označite višino raztopine) in prekuhate. Izhlapevanje mora biti čim manjše, vretje pa počasno. Občasno premešajte raztopino, da se bodo drobna zrnca agaroze hitreje raztopila. Če je treba, dopolnite z vodo do oznake, premešajte in počakajte, da se ohladi do pribl. 60 °C, nato pa nalijte v model, postavljen v kadičko brez pufra. Vstavite glavnička na dveh višinah in počakate, da se gel strdi. Medtem pripravite vzorce. *Priprava gelov je opisana tudi v Dodatku in je za naslednje vaje ne bomo več opisovali posebej.*

Vzorcem pred nanosom dodajte 2 µl nanašalnega pufra in premešajte. Zapišite si vrstni red nanosov (če je drugačen od predlaganega) in si zapomnite, kateri vzorci so vaši!

Po končani elektroforezi (hitrejše barvilo naj prepotuje pribl. 2/3 poti) gel prenesemo v posodo za barvanje in ga prelijemo z raztopino etidijevega bromida (pozor: mutageno sredstvo!). Po nekaj minutah prenesemo na transiluminator in analiziramo potovanje lis. V poročilo napišite, ali je bila kakšna razlika med različnimi preparacijami in zakaj menite, da je do razlik prišlo. Pomembne so razlike v količini DNA, številu lis, prisotnosti kromosomske DNA, intenziteti lise, ki predstavlja nizkomolekularno RNA in ali je plazmidna DNA morda razgrajena.

Medtem, ko teče prva elektroforeza, pripravite po 400 ml gojišča LB. Med drugo elektroforezno analizo pa rešite nalogo iz načrtovanja oligonukleotidov iz Dodatka – uporabite znanje z računalniške vaje I!

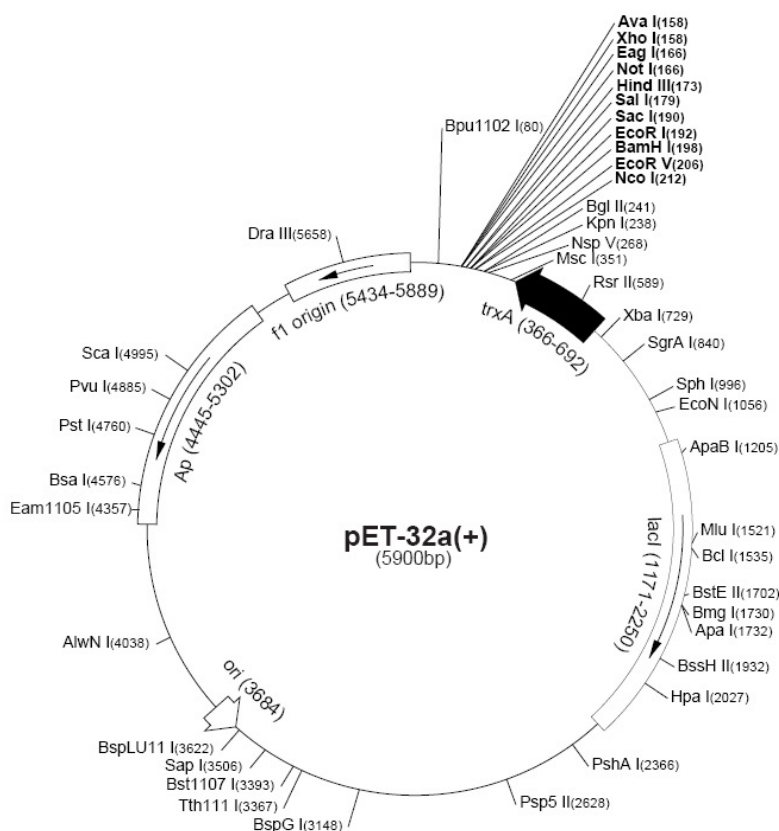
Na elektroforezne gele nismo nanesli standardov velikosti DNA. Ali bi to bilo smiselno? Zakaj?

III. Izolacija večjih količin plazmidov iz bakterijskih celic

Postopki za pripravo večjih količin plazmidov (nekaj deset do nekaj sto μg) so v osnovi podobni postopkom za izolacijo le nekaj mikrogramov plazmidov, vendar je izvedba drugačna zaradi večjih volumnov, ki so zato potrebni. Običajno so zahteve po čistosti večje kot pri mini-izolacijah, zato pogosto uvedemo dodatne stopnje čiščenja – nekatere smo spoznali že pri prejšnji vaji.

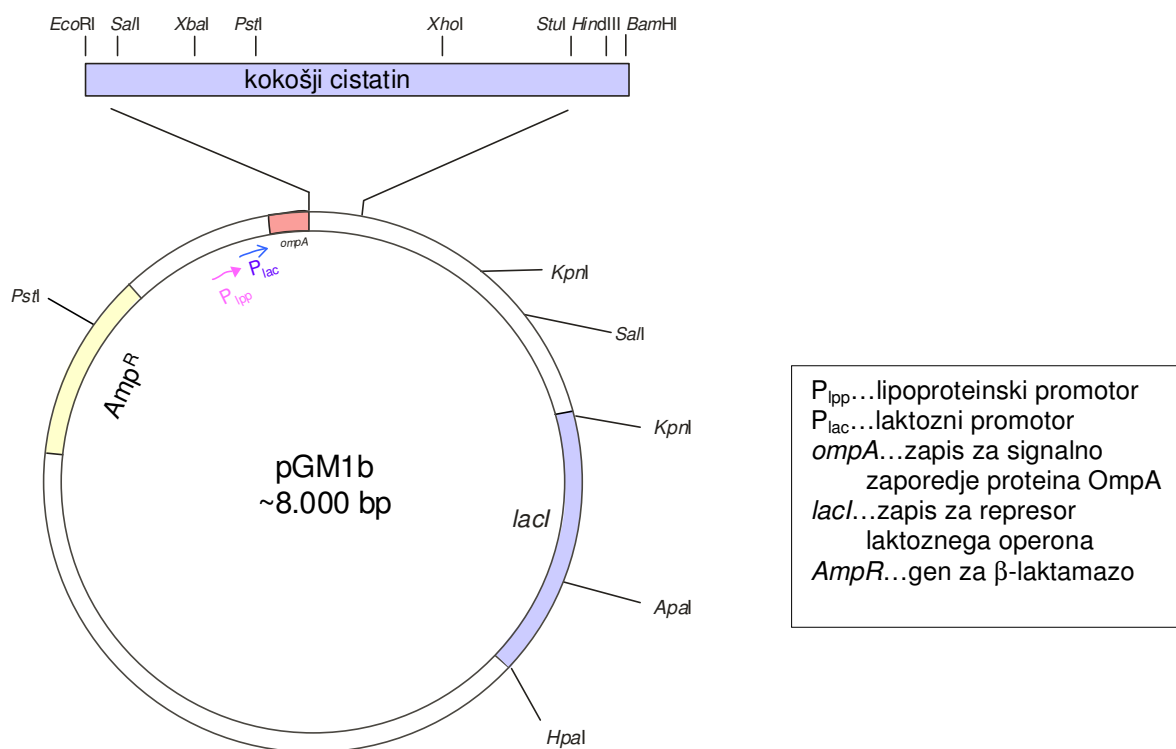
Izolirali bomo dva plazmida, ki ju bomo uporabili za poskus prenosa fragmenta v močan ekspresijski vektor (vaja IV). Prvi plazmid se imenuje pET32a – gre za prokariotski fuzijski ekspresijski vektor s promotorjem T7 (glej sliko – poskusi opisati vse lastnosti tega vektorja), drugi pa pGM1b – vektor na osnovi pIN-III-ompA z zapisom za varianto kokošjega cistatina (glej sliko). Prvi plazmid je tisti, v katerega boste pri naslednji vaji vstavili kodirajoči fragment iz drugega plazmida, zato končni preparat, kar ga ne boste porabili za analize, skrbno označite (ime plazmida, vaše ime in datum) in shranite. Plazmid pGM1b je sicer ekspresijski vektor, pri katerem je zapis za cistatin uveden tik za zaporedjem, ki zapisuje signalni peptid. Bakterije izražajo inhibitor v periplazmi, vendar so količine sorazmerno majhne. S prenosom zaporedja v vektor pET32a bi lahko pridobili večje količine rekombinantnega inhibitorja v fuzijski obliki z možnostjo odcepa fuzijskega dela s trombinom ali enterokinazo.

Slika III.1: Plazmidna karta vektorja pET32a in zaporedje njegove polilinkerske regije – na naslednji strani. (Novagen)



T7 promoter → lac operator Xba I rbs
 TAATACGACTCACTATAGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGA
 Trx-Tag Msc I His-Tag
 TATACATATGAGC...315bp...CTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCTTCTTGGTCTGGTGGCAGCGGTTCT
 MetSer 105aa...LeuAlaGlySerGlySerGlyHisMetHisHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySer
 S-Tag Nsp V S-Tag primer #69945-3 thrombin
 GGTATGAAAGAAACGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCACATGGACAGCCAGATCTGGTACCGACGACGACGACAAG
 GlyMetLysGluThrAlaAlaAlaLysPheGluArgGlnHisMetAspSerProAspLeuGlyThrAspAspAspAspLys
 pET-32a(+) enterokinase
 Nco I EcoR V BamH I EcoR I Sac I Sal I Hind III Eag I Ava I Xho I His-Tag
 GCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA
 AlaMetAlaAlaSerAspProAsnSerSerSerValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisHisEnd
 pET-32b(+)
 GCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA
 AlaMetAlaAlaSerAspProAsnSerSerSerValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisHisEnd
 pET-32c(+)
 GCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA
 AlaMetGlyIyrLeuTrpIleArgIleArgAlaProSerThrSerLeuArgProHisSerSerThrThrThrThrThrThrGluIleArgLeuLeuThr
 Bpu1102 I T7 terminator
 CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGACCAATACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTTG
 LysProGluArgLysLeuSerTrpLeuLeuProProLeuSerAsnAsnEnd
 T7 terminator primer #69337-3

Slika III.2: Shematski prikaz vektorja pGM1b:



Nukleotidni zaporedji 5'- in 3'-konca inserta v pGM1 sta:

/EcoRI /HindIII /BamHI
 5'-GAATTCATGGAAGAC...(SalI)...(XbaI)...(PstI)...(BglII)...(XhoI)...TAAGCTTTAACTAGTGGATCC-3'
 GluPheMetGluAsp-----kokoški cistatin-----
 (2)

Zapis za kokošji cistatin je bil v osnovi spremenjen tako, da je kodon za prvi naravni aminokislinski ostanek zamenjan z Met. Uvedeni Met je edini v zaporedju, zato so rekombinantni fuzijski protein, ki so ga izolirali iz citoplazme, lahko cepili s CNBr in tako sprostili kokošji cistatin. Kasneje so zapis prenesli v ekspresijski vektor pIN-III-ompA tik za zapisom za signalni peptid ompA, ta vektor pa je bil nato osnova za pripravo pGM1. V pGM1 je 3'-konec zapisa spremenjen tako, da vsebuje zapis za prepoznavno mesto za specifično endopeptidazo, ki mu sledi kratka polilinkerska regija. Ta vektor omogoča pripravo fuzijskih proteinov z lokalizacijo v periplazmi.

Za pripravo večjih količin plazmida (predvidoma 50 µg – 100 µg vsakega) smo izbrali razbijanje celic z ionskim detergentom v alkalnem (v osnovi je to metoda z alkalno lizo, kot smo jo spoznali pri prejšnji vaji), saj je alternativna metoda razbijanja z lizocimom in neionskim detergentom s kuhanjem manj primerna prav zaradi stopnje prekuhavanja večjih volumnov vzorcev.

Vsaka skupina (par) bo izvajala izolacijo samo enega plazmida.

Postopek:

1. Pripravite prekonočno kulturo *E. coli* z izbranim plazmidom. Uporabite medij LB s potrebnim antibiotikom (to bo za vas pripravil asistent).
2. Prekonočno kulturo razredčite 1:100 v ~70 ml ustreznega medija. Stresajte čez noč v 1-litrski erlenmajerici pri 37 °C in 250 obr./min (tudi to bo naredil asistent).
3. Naslednji dan odcentrifugirajte celice (10 min pri 6000 g in RT).
4. Resuspendirajte usedlino v 1 ml pufra GTE (50 mM glukoza, 25 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA).
5. Dodajte 250 µl lizocima (20 mg/ml); inkubirajte 10 min pri RT.
6. Dodajte 2,5 ml sveže pripravljenega 0,2 M NaOH, 1 % NaDS; premešajte in inkubirajte na ledu 10 min.
7. Dodajte 1,9 ml 3 M K-acetata, premešajte in inkubirajte na ledu 10 min.
8. Centrifugirajte 20 min. pri 10.000 g in 4 °C.
9. Supernatant prenesite v svežo centrifugirko, dodajte 15 µl RNaze A (50 mg/ml) in inkubirajte 15 min pri 37 °C.
10. Dodajte 0,6 V izopropanola; nekajkrat obrnite in inkubirajte pri RT 5 min.
11. Centrifugirajte 15 min pri 9.000 g in RT.
12. Sperite usedlino z 0,5 ml 70 % EtOH; kratko centrifugirajte pri 15.000 g, odsesajte EtOH in usedlino posušite na zraku.
13. Usedlino raztopite v 300 µl 10 mM pufra Tris/HCl pH 9. Odcentrifugirajte neraztopljeni material (3 min pri polnih obratih) ter ga shranite za analizo, raztopino pa prenesite v označeno svežo mikrocentrifugirko ter shranite.

Raztopine:

puffer GTE (za 100 ml): 10 g glukoze, 2,5 ml 1 M Tris/HCl pH 8, 2 ml 0,5 M EDTA, voda do 100 ml.

NaDS/NaOH: 250 µl 10 % SDS, 250 µl 2 M NaOH, 2 ml dH₂O.

3 M K-acetat: 29,4 g K-acetata, 5 ml očetne kisline, voda do 100 ml.

TE: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA

Analize:

Na 1 % agaroznem gelu (pripravite ga medtem, ko se centrifugirajo vzorci):

- preverite čistost preparacij
- ocenite koncentracijo
- ugotovite, kaj je v neraztopljenem vzorcu

Na gel nanesite po 2 μ l in 6 μ l vsakega plazmida, ki ste ga izolirali, ter dopolnite z vodo do 10 μ l. Za ugotavljanje, kaj je v neraztopljenem vzorcu, končni usedlini dodajte 100 μ l pufra TE, resuspendirajte in nanesite 9 μ l suspenzije (vzorec se ne sme posesti).

Naloga:

Ob primerjavi s standardom in ob pomoči asistenta ocenite intenziteto posameznih lis, ki predstavljajo plazmid. Primerjajte relativne količine plazmidne DNA, RNA in kromosomske DNA v preparatih.

Ali se vzorec, ki predstavlja slabo topni material, v čem razlikuje od topnega vzorca? Kaj to pomeni?

Ali je za oceno količine DNA v vzorcu potrebno izvesti elektroforezo?

Kako drugače bi še lahko določili približno koncentracijo DNA?

Ali prisotnost proteinov lahko moti ocenjevanje koncentracije nukleinskih kislin?

IV: Kloniranje DNA

V naslednjih poskusih bomo izhajali iz obeh vektorjev, ki smo ju pripravili na prejšnjih vajah in bomo ustvarili rekombinantno vektorsko molekulo. Ker ste pri prejšnji vaji izolirali le enega od plazmidov, se dogovorite s sosednjo skupino, da si izmenjate potrebne količine vzorcev, tako da današnji poskus opravite z vektorsko molekulo in s plazmidom, ki nosi zapis za inhibitor proteinaz. Zapis za kokošji cistatin bomo z dvema restriktazama izrezali iz vektorja pGM1b in ga s pomočjo ligaze vstavili v vektor pET32a, ki ga bomo predhodno obdelali z istima dvema restrikcijskima endonukleazama. S tem pa DNA še nismo klonirali; dobljeni ligacijski produkt moramo vstaviti v bakterijske celice v procesu transformacije.

IV.1. Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami

Gre za encimsko reakcijo, ki je skupaj z ligacijsko reakcijo omogočila prve uspešne korake v tehnologiji rekombinantne DNA. V tej vaji boste z istim parom encimov razrezali ekspresijski plazmid in plazmid, ki nosi zapis za kokošji cistatin. Plazmida ste izolirali v tretji vaji.

Za reakcijo vzamemo po 0,5 pmol vektorja pET32 in po 2 pmol pGM1 (za preračun količin upoštevajte, da 1 bp ustreza 650 Da). Iz praktičnih razlogov izvajamo reakcijo v majhnih volumnih, najbolje med 15 in 50 μ l. Pomembno je, da volumen encimov v reakciji ne presega 10 % celotnega volumna, saj so encimi shranjeni v 50 % glicerolu, ta pa v koncentracijah >5 % lahko vpliva na specifičnost delovanja restrikcijskih endonukleaz. V reakciji je vedno prisoten tudi reakcijski pufer, ki ga proizvajalci encimov pripravljajo v 10x končni koncentraciji in ga moramo torej v reakcijo dodati 10 % končnega volumna.

Koliko encima potrebujemo, je odvisno od njegove aktivnosti (navedena je na etiketi), števila prepoznavnih mest na DNA, ki jo režemo, ter temperature in časa cepitve. Običajno reakcija teče 1 uro pri 37 °C (obstajajo pa tudi encimi, ki so učinkoviti le pri nižjih ali višjih temperaturah: npr. *Sma*I pri 25 °C, *Taq*I pri 75 °C). Za analitske poskuse, pri katerih pride le do linearizacije plazmida ali izreza enega fragmenta, zanima pa nas le elektroforezna slika, reakcijo običajno izvedemo z do 1 μ g plazmida in z 1 μ l encima, kar v veliki večini primerov zadošča, da reakcija poteče v celoti. Kadar pa imamo v reakciji večje količine DNA, moramo potrebno količino encima izračunati. Pri izračunu upoštevamo definicijo encimske aktivnosti (glej priloženo deklaracijo ali podatke iz kataloga proizvajalca), velikost plazmida, ki ga cepimo in število restrikcijskih mest.

Enota encimske aktivnosti je za večino restrikcijskih encimov definirana kot množina encima, ki v 1 uri v celoti razreže 1 μ g bakteriofaga λ . Ker encimi cepijo fag λ na različnem številu mest, to bistveno vpliva na izračun. Razpredelnice z encimi in številom mest, ki jih cepijo na fagu λ najdete v prilogi. Npr. encim *Eco*RI cepi fag λ na 5 mestih. Tako torej v celoti razreže v 1 uri 1 μ g faga λ (48.502 bp) 5 x. Ker analiziramo plazmide, ne pa faga, moramo najprej preračunati, koliko bo isti encim cepil precej manjših molekul plazmida. Najbolj logično je, da preračunamo molarna razmerja. 1 pmol faga λ je 48.502 x 0,65 kDa = 31,53 MDa, torej 1 pmol ustreza 31,53 μ g. 1 μ g pa predstavlja torej 1/31,53 ali 0,0317 pmol.

Račun je torej naslednji:

- 1 U *Eco*RI cepi v 1 h pri 37°C na 5 mestih 0,0317 pmol DNA
- če je samo 1 mesto cepitve, bo encim torej razrezal 5x več DNA, to je 0,16 pmol DNA
- za cepitev 1 pmol plazmida pUC19 (navajam kot primer) na 1 mestu bi torej potrebovali 1/0,16 U = 6,25 U encima *Eco*RI. Plazmid pUC19 ima dolžino 2.686 bp, kar pomeni, da bomo s to količino encima lahko razrezali 2.686 bp x 0,65 ng/bp = 1,75 μ g DNA.

Zaradi kompaktnosti dodatno zvite DNA veliko encimov te konformacije ne more cepiti enako uspešno kot iztegnjene. V katalogih proizvajalcev moramo poiskati podatek o tem, kako učinkoviti so encimi, ko delujejo na dodatno zvito DNA in to upoštevati pri preračunih potrebnih količin. Nekaj podatkov najdete tudi v Dodatku.

Kadar moramo razrezati večje količine plazmida, običajno naredimo preračun potrebnih količin encimov za enourno reakcijo. Ker pa ne moremo natančno vedeti, ali ni morda našemu encimu aktivnost padla zaradi večkratnega zamrzovanja/tajanja, starosti,... in kako čista je v resnici DNA, ki jo cepimo, navadno čas delovanja encima podaljšamo na 2 uri. Če se izkaže, da je potrebna količina encima za cepitev v 1 h velika (tu gre za subjektivno oceno, ki je odvisna od cene encima, volumna reakcije, itd.), naredimo preračun za delovanje encima 2 h, inkubiramo pa v resnici 4 ure. Encimi so pri 37°C različno stabilni, tako da po nekaj urah delovanja tudi njihova aktivnost že precej upade. Stabilnost pa je od encima do encima različna; nekateri proizvajalci so stabilnost posameznih encimov določili v poskusu in te podatke navajajo (običajno v prilogah h katalogu).

Kadar moramo DNA rezati samo z enim encimom, zadošča izračun potrebnih količin, izbor najprimernejšega pufra in izvedba reakcije. Če pa moramo DNA razrezati z dvema različnima encimoma, moramo ugotoviti, ali sta med seboj kompatibilna glede pufra. Največji proizvajalci restriktaz so pripravili kompatibilnostne tabele, ki nam povedo, kako aktivni so encimi v posameznih standardnih reakcijskih pufrih in kateri pufer priporočajo za hkratno rezanje s posameznimi pari encimov. Restriktaze se glede reakcijskih pogojev med seboj ne razlikujejo pretirano, tako da lahko za večino encimov uporabimo enega izmed 4-6 standardnih pufrov (odvisno od proizvajalca). Za nekatere encime obstajajo specialni pufri, ker imajo v standardnih star-aktivnost.

Najbolj zanesljivo je rezati z vsakim encimom v pogojih, ki so zanj optimalni, kar pomeni, da DNA razrežemo s prvim encimom v priporočenem pufru, potem pa DNA oborimo ali očistimo preko posebnih nosilcev. V drugi stopnji DNA raztopimo v vodi in dodamo pufer, ki je optimalen za drugi encim, ter drugo restriktazo. Po prvi stopnji je pametno odvzeti alikvot vzorca in z elektroforezo preveriti, ali je res prišlo do popolnega rezanja.

Kadar nismo prepričani, ali smo za rezanje izbrali prave pogoje ali pa dvomimo, ali je DNA, ki jo režemo, dovolj čista, da ne bo motila encimske aktivnosti, izvedemo navzkrižno rezanje. DNA razdelimo na dva alikvota in vsak alikvot režemo z enim od encimov v pogojih, ki smo si jih izbrali. Po končanem rezanju alikvot naneseemo na agarozni gel in izvedemo elektroforezo. Če dokažemo, da je vsak encim v celoti rezal DNA v izbranih pogojih, lahko pri teh pogojih izvedemo tudi reakcijo z drugim encimom.

V našem primeru bomo rezali vso določeno količino najprej s prvim encimom, potem pa še z drugim (torej ne bo šlo za navzkrižno rezanje). Po prvem rezanju bomo učinkovitost preverili z elektroforezo in če bomo ugotovili, da se je mobilnost DNA spremenila in potuje vsa v obliki ene lise, bomo nadaljevali z rezanjem z drugim encimom. Če bo na gelu še opaziti ostanke drugih konformacijskih oblik, bomo dodali še nekaj prvega encima in nadaljevali z reakcijo.

Encimi so na voljo najpogosteje v koncentracijah 10 U/ μ l, včasih tudi 5 U/ μ l ali 20 U/ μ l. Za današnji poskus preračunajte, koliko encima potrebujete, potem pa si pripravite reakcijsko shemo. Preden izvedete reakcijo, pokažite izračun količin asistentu, da ga pregleda!

Reakcijska shema za 1. stopnjo rezanja:

plazmid pET32a	μg	μl	plazmid pGM1b	μg	μl
reakcijski pufer (10x)		μl	reakcijski pufer (10x)		μl
<i>EcoRI</i>	U	μl	<i>EcoRI</i>	U	μl
voda		μl	voda		μl
skupaj		μl	skupaj		μl
koncentracija DNA		ng/μl	koncentracija DNA		ng/μl
reakciji bosta tekli 1 h pri 37°C					

Ko teče reakcija, pripravite 1 % agarozni gel.

Po 1 uri odzimate toliko reakcijske mešanice, da bo vsebovala 400 ng DNA, dopolnite z vodo do 8 μl in dodajte 2 μl nanašalnega pufera ter nanesite na agarozni gel. Kot kontrolo nanesite še ustrezno količino nerazrezanega plazmida (iz vaje III), na robu vsake vrste nanosov pa naj bo standard velikosti. Tako bo torej vsak imel 4 vzorce (2 nerazrezana in 2 razrezana plazmida), na robu pa bo še standard.

Tako, zdaj smo oba plazmida šele linearizirali. Poskus bomo nadaljevali z rezanjem istih plazmidov še z drugim encimom, tako da se bo iz pGM1 sprostil fragment, ekspresijski vektor pa bo pripravljen za vnos tega fragmenta.

Kadar sta prvi in drugi encim kompatibilna glede pufera, lahko s poskusom nadaljujemo tako, da samo dodamo drugi encim in po potrebi dopolnimo s pufrom in vodo. Ne pozabite, da encimov ne sme biti več kot 10 % skupnega volumna reakcijske mešanice. Če pa prvi in drugi encim nimata kompatibilnih pufrov, je treba med obema reakcijama DNA oboriti ali kako drugače očistiti (na primer z uporabo 'steklenega mleka' – to je preko vezave DNA na steklo v prahu v pogojih visoke ionske moči). V našem primeru oba encima delujeta v pufru, ki je prirejen za *EcoRI* (preprečuje star-aktivnost), zato pufera ne bo treba zamenjati.

Reakcijska shema za 2. stopnjo rezanja:

plazmid 1			plazmid 2		
ostanek reakc. meš. iz 1. stopnje		μl	ostanek reakc. meš. iz 1. stopnje		μl
<i>HindIII</i>	U	μl	<i>HindIII</i>	U	μl
reakcijski pufer (10x)		μl	reakcijski pufer (10x)		μl
voda		μl	voda		μl
skupaj		μl	skupaj		μl

Izpolnjeni reakcijski shemi vključite v poročilo!

Po drugi stopnji cepitve vzorcem dodajte potrebno količino nanašalnega pufera in shranite do naslednje vaje v hladilniku.

Medtem, ko teče 1. restriksijska reakcija, pripravite en 1 % in en 2 % agarozni preparativni gel s širokimi žepki. Med 2. stopnjo reakcije pa nacepite seva DH5α in BL21[DE3] v 50 ml medija LB (v 500 ml erlenmajericah z zažemami) in ju stresajte pri sobni temperaturi čez noč. Za celotno skupino sta dovolj po 2 alikvota po 50 ml posamezne kulture. Naslednji dan bomo pripravili kompetentne celice – celice, pripravljene za transformiranje z rekombinantnim plazmidom.

IV.2. Izolacija DNA iz agaroznega gela

Za izolacijo DNA iz agaroznega ali poliakrilamidnega gela obstoja več različnih metod. Za večje količine visokomolekularne DNA je primerna elektroelucija, pri kateri košček gela z DNA prenesemo v dializno črevo skupaj s svežim elektroforeznim pufrom. Električni tok nato povzroči potovanje nabite DNA iz gela v pufer, DNA pa na koncu oborimo z etanolom. V zadnjem času najpogosteje uporabljamo komercialne komplete reagentov, ki večinoma temeljijo na principu vezave DNA na stekleni prah (v suspenziji 'stekleno mleko') v pogojih visoke ionske moči. Po spiranju in zamenjavi pufera se DNA sprostí s stekla in preide v vodno fazo. Redkeje uporabljamo vezavo DNA na pozitivno nabite membrane, ki jih vstavimo v gel tik pred liso, ki predstavlja želeno DNA. DNA nato eluiramo s pufrom z visoko ionsko močjo. Izolacija iz LMP-agaroze (*low melting point*), ki se stali pri temperaturi, nižji od denaturacijske temperature DNA, je še ena od možnosti, prav tako kot nekatere preproste metode. Taka je na primer metoda 'zmrzni in stisni' (freeze-and-squeeze), pri kateri rezino agaroze zamrzujemo in nato stisnemo, da se iz nje izcedi pufer, ki vsebuje tudi DNA. Obstajajo tudi encimi, ki razgradijo agarozo (gelaze), tako da DNA ostane v pufru brez gela.

Vzorci iz poskusa IV.1 nanesite na 1,2 % agarozni gel (oziroma 1 % za pripravo vektorja in 2 % za pripravo inserta); na robu nanesite standard velikosti. Če je volumen vzorcev po restrikcijski reakciji prevelik, DNA predhodno oborite (postopek je v Dodatku, sicer pa ga poznate že s prve laboratorijske vaje) ali skoncentrirajte z butanolom (tudi ta tehnika je opisana v Dodatku), ki bo iz raztopine DNA odvzel nekaj vode – posvetujte se z asistentom.

Ko so fragmenti na elektroforeznem gelu dovolj ločeni, ločevanje zaustavite in gel na kratko obarvajte. Barvanje in opazovanje gela z UV-svetlobo naj bo čimkrajše, da zmanjšamo možnost uvedbe mutacij v DNA. Opazujte tako, da gel ostane na mizici iz pleksi-stekla. Nato s spatulo izrežite čim ožji košček agaroze, ki vsebuje tista fragmenta DNA, ki ju bomo v nadaljevanju ligirali, torej zapis za kokošji cistatin (dolga je približno 370 bp) in linearizirani ekspresijski vektor.

Za izolacijo DNA bomo uporabili metodo vezave na zdrobljeno steklo po spodnjem postopku. *Na koncu ocenite koncentracijo izolirane DNA, če je izkoristek izolacije iz gela 70 %.*

Postopek za izolacijo DNA iz agaroznega gela z uporabo kompleta reagentov NucleoTrap

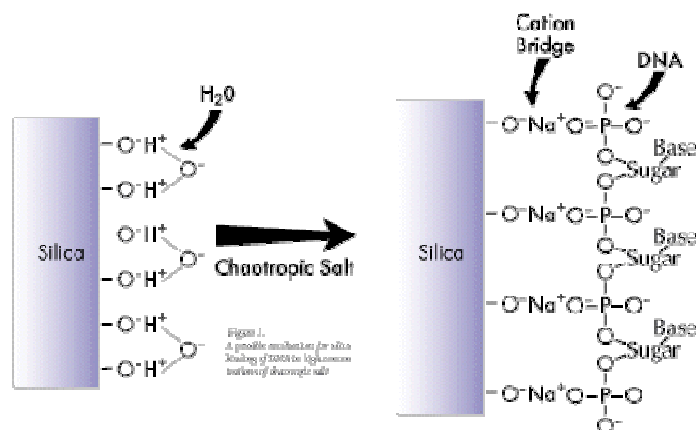
(opis na osnovi navodil proizvajalca Macherey-Nagel, Rev.1, sept. 2005)

Komplet reagentov vsebuje:

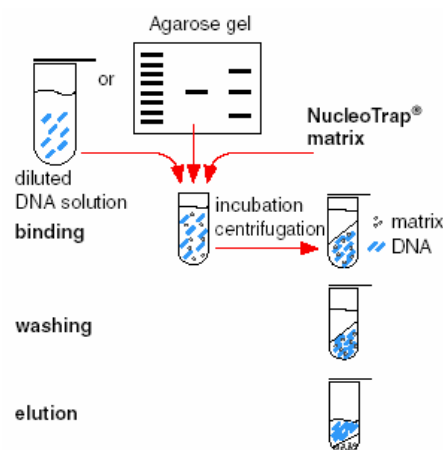
- pufer NT1 (vsebuje kaotropne soli in sredstvo za raztapljanje agaroze)
- pufer NT2 (vsebuje kaotropne soli)
- pufer NT3 (raztopina za spiranje nečistoč; vsebuje 80 % etanola)
- pufer NE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5)
- suspenzijo NucleoTrap

Princip:

DNA se v prisotnosti kaotropnih soli veže na aktivirane silikatne delce. Nečistoče speremo, DNA pa eluiramo z nosilca z rahlo alkalnim pufrom.



<http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/lauren/page3-silica.gif>



Uporaba:

Reagente uporabljamo za izolacijo DNA iz agaroznih elektroforeznih gelov v pufrih TAE ali TBE.

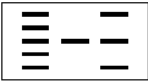
Pričakovani izkoristki izolacije so odvisni od dolžine DNA. Kapaciteta nosilca je 0,6 µg DNA / µl suspenzije. DNA eluiramo v 20 µl – 50 µl raztopine; uporabimo lahko tudi pufer TE ali destilirano vodo. Isti komplet reagentov lahko uporabimo tudi za odstranjevanje encimov, soli, nukleotidov ali označevalcev iz raztopine DNA ali za koncentriranje razredčenih raztopin DNA.

size of fragment	average recovery
20 bp	50%
40 bp	68%
120 bp	78%
200 bp	85%
520 bp	87%
2.5 kbp	88%
5.3 kbp	86%
8.7 kbp	80%
19.4 kbp	74%

Postopek dela:

1. Stehtajte prazno označeno mikrocentrifugirko.
2. Ocenite količino DNA v lisi, ki jo nameravate izrezati.
3. Na mizici iz pleksi-stekla na transiluminatorju izrežite agarozo s fragmentom DNA na tak način, da vsebuje čimmanj agaroze, a vso DNA. Rezino prenesite v stehtano mikrocentrifugirko.
4. Določite težo rezine in za vsakih 100 mg agaroze dodajte 300 µl pufera NT1.
5. Na vibracijskem mešalniku dobro premešajte suspenzijo s silikatnim nosilcem.
6. Za 1 µg DNA dodajte vzorcu 4 µl nosilca, vendar ne manj kot skupaj 10 µl.
7. Inkubirajte pri 50 °C dokler se rezina agaroze ne raztopi v celoti (5-10 min.). Vsaki 2 minuti premešajte.

8. Centrifugirajte 30 s pri 10.000 g in v celoti odstranite supernatant.
9. Nosilcu dodajte 500 µl pufra NT2 in na kratko premešajte (1. spiranje).
10. Ponovite točko 8
11. Nosilcu dodajte 500 µl pufra NT3 (2. spiranje).
12. Ponovite točko 8.
13. Ponovite točko 11 (3. spiranje).
14. Ponovite točko 8.
15. Posušite nosilec pri RT ali 37 °C (10-15 min.) – s tem odstranite etanol, ki bi sicer motil nadaljnje reakcije.
16. Dodajte 25 µl (če je nosilca veliko: do 50 µl) elucijskega pufra NE.
17. Resuspendirajte na vibracijskem mešalniku in inkubirajte pri RT 10-15 min.; medtem 3-krat premešajte. Fragmente, ki so daljši od 5 kb, eluiramo pri 55 °C.
18. Centrifugirajte 30 s pri 10.000 g in supernatant prenesite v svežo označeno mikrocentrifugirko. [Izkoristek lahko povečate za ~10 %, če ponovite točke 16-18 in supernatanta združite.]

1 NucleoTrap® - Excise DNA fragment		
2 NucleoTrap® - Gel lysis NucleoTraP®CR - Adjust binding conditions	300 µl NT1 / 100 mg 	
3 Bind DNA	4 µl silica matrix / µg DNA 50°C 5-10 min 30 s 10,000 x g  	
4 Wash silica matrix	1st 500 µl NT2 2nd 500 µl NT3 3rd 500 µl NT3 30 s, 10,000 x g 30 s, 10,000 x g 30 s, 10,000 x g  	
5 Dry silica matrix	RT or 37°C 10-15 min	
6 Elute DNA	25-50 µl NE RT 10-15 min 30 s 10,000 x g  	

IV.3. Ligacija

V reakciji, ki jo katalizira ligaza, moramo razen obeh fragmentov DNA, ki ju želimo povezati, imeti še encim in pufer. Pufer je že pripravljen v 10x končni koncentraciji. Potrebno količino encima lahko izračunate na osnovi definicije ene encimske enote in količine DNA (koncev), ki jih boste imeli v reakciji. Za čimboljši izkoristek naj bo končna koncentracija DNA v reakciji $>25 \mu\text{g/ml}$. [Pri ligiranju topih koncev je optimalna koncentracija DNA 100x nižja kot pri povezovanju lepljivih koncev.] Pufer je sestavljen tako, da že vsebuje ATP (1 mM končna koncentracija), Tris/HCl pH 7,5, MgCl_2 , BSA (stabilizira proteine) in DTT. Za povezovanje lepljivih koncev je potrebna ~50x manjša količina encima kot za tope konce ali konce s samo 1 lepljivo bazo, tako da za standardno reakcijo rabimo manj kot 1 U encima.

Ligacijska reakcija:

vektorska DNA	μl	μg	pmol
DNA inserta	μl	μg	pmol
ligazni pufer	μl		
ligaza	μl	U	
dH ₂ O	μl		
skupaj	μl	μg	
koncentracija DNA		$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	μM
koncentracija DNA koncev		μM	

Ko boste odpipetirali posamezne komponente (majhne volumne pipetirajte na rob mikrocentrifugirke, nato pa na kratko centrifugirajte in rahlo pretresite, postavite dobro označeno reakcijo v stiroporni plošček in inkubirajte čez noč pri $\sim 16^\circ\text{C}$.

Definicije encimskih enot so različne. Najpogosteje uporabljamo t.i. Weissove enote, vendar nekateri proizvajalci vseeno uporabljajo druge enote. Encim, ki ga bomo uporabili, ima enote podane kot 'ligacijske enote za kohezivne konce'; 1 NEB U = 0,015 Weissove U (razmerje je 1:67). Za reakcijo z analitskimi količinami lepljivih koncev torej rabimo ~50 NEB U, kar ustreza ~0,15 μl raztopine originalnega encima. Zaradi lažjega pipetiranja bomo encim prej razredčili v ligacijskem pufru do koncentracije 50 U/ μl .

Potrebno koncentracijo substrata (DNA) v reakciji bolj pravilno določimo z izračunom prostih 5'-koncev, ki jih želimo ligirati. Upoštevati je treba, da imamo ob povezovanju fragmentov dvakrat več 5'-koncev kot DNA. Optimalna koncentracija 5'-koncev DNA je 0,1 μM do 1 μM .

Razen T4 DNA-ligaze lahko kupimo tudi več drugih vrst ligaz: T4 RNA-ligazo uporabljamo npr. za označevanje 3'-koncev RNA, DNA-ligazo iz E. coli uporabljamo pri kloniranju cDNA po klasični metodi (Okayama in Berg, 1982; ta encim uporablja kot vir energije NAD, ne ATP!), Taq-ligazo pa rabimo pri mutagenezi s pomočjo PCR. Zaradi podobnosti imen je treba paziti, da smo vsakič izbrali tisti encim, ki ga za dano reakcijo res potrebujemo.

IV.4. Priprava kompetentnih celic

Za pripravo kompetentnih celic *E. coli* obstoja več različnih postopkov, v zadnjem času pa se je uveljavil postopek, ki ga je 1990 opisal Inoue s sodelavci (Gene 96, 23-28), saj je preprost in hiter. Tako kot vse

ostale recepture je tudi pri tem postopku ključna stopnja spiranje celic v pufru, ki vsebuje CaCl_2 . Od drugih postopkov pa se ta razlikuje po tem, da celice rastejo pri nižji temperaturi in je zato njihova celična stena manj kompaktna ter torej bolj prepustna za molekule krožne DNA.

Asistent je že prejšnji dan nacepil seva *E. coli* DH5 α in BL21[DE3] v gojišče LB. Kulturo smo stresali pri 250 obr./min. pri 20 °C, tako da je do začetka vaje $A_{550} \sim 0,7$.

- Odcentrifugirajte vsak po 5 ml kulture v sterilni 13 ml centrifugirki (6000 g, 10 min).
- Supernatant odlijte v erlenmajerico za odpadke, ostanke pa popivnajte tako, da centrifugirke postavite z odprtino navzdol na 3 sloje vpojnega papirja.
- Celicam dodajte 1,6 ml ledeno hladnega pufru TB, na hitro resuspendirajte in pustite stati na ledu 10 min.
- Ponovno centrifugirajte in resuspendirajte celice v 0,4 ml TB, nato pa počasi dodajte DMSO do končne 7 % koncentracije.
- Inkubirajte na ledu 10 min, nato pa celice prenesite v 2 mikrocentrifugirki (2 x 400 μl).
- En alikvot shranite pri -80 °C, enega pa boste takoj uporabili za določanje frekvence transformacije (naslednja vaja) – obdržite ga na ledu.

V pravem poskusu bi pripravili seveda več kompetentnih celic, običajno toliko, kot računate, da jih boste porabili v naslednjih 2 mesecih. Kompetentne celice so namreč stabilne pri -70°C vsaj toliko časa, so pa občutljive za tajanje in ponovno zmrzovanje, tako da jih zamrzujemo v alikvotih za enkratno uporabo. Preden bi kompetentne celice postavili v zmrzovalnik, bi jih hipno zamrznili v tekočem dušiku, da se ne bi posedle na dno mikrocentrifugirke. Laboratoriji, ki pogosto uporabljajo več različnih sevov, imajo na zalogi kompetentne celice vseh takih sevov, saj si s tem prihranijo vsakokratnih nekaj ur dela. V originalnem postopku celice rastejo pri 18 °C, kar pa je pogosto težko doseči, saj zahteva uporabo hladilnega termostata, pa tudi celice rastejo zelo počasi in so običajno v primerni fazi rasti šele po 2 dneh stresanja.

Pufer TB vsebuje: 10 mM Pipes, 55 mM MnCl_2 , 15 mM CaCl_2 , 250 mM KCl; pH 6,7. Pripravljen je vnaprej in je sterilno filtriran. Hraniti ga je treba v hladilniku.

IV.5. Transformiranje bakterijskih celic in določanje frekvence transformacije

Po tem, ko smo v procesu ligacije pripravili rekombinantni plazmid, bomo v tem poskusu izvedli kloniranje v pravem pomenu besede. Rekombinantne plazmide bomo vstavili v kompetentne bakterijske celice, ki se bodo delile in hkrati namnožile plazmid, ki so ga sprejele vase. Zaradi selekcijskega pritiska (antibiotika v gojišču) bodo rasle samo tiste celice, ki vsebujejo plazmid.

Po ena skupina bo transformirala kompetentne celice z izhodnima plazmidoma pET32a in pGM1b.

Hkrati s transformiranjem celic z ligacijskim produktom boste določali tudi frekvenco transformacije s plazmidom pUC19. Podatek o frekvenci transformacije vam bo povedal, kako dobro ste pripravili kompetentne celice.

Standardni postopek za transformacijo celic *E. coli*, pripravljenih po prejšnjem postopku, je:

- 200 μl kompetentnih celic odtajamo pri sobni temperaturi, nato postavimo na led
- dodamo do 5 μl raztopine plazmida (10 ng – 100 ng)
- inkubiramo na ledu 30 min z občasnim mešanjem
- izvedemo toplotni šok: 40 s v vodni kopeli z 42 °C in takoj vrnemo na led
- po 2 min dodamo 800 μl medija LB in stresamo pri 37 °C 200 rpm

- po 1 h stresanja razmažemo na gojišče z antibiotikom: označite petrijevko z imenom seva in vektorja, ki ste ga uporabili za transformacijo (lig. produkt, kontrola pET32a, kontrola pGM1b)
- naslednji dan preštejemo transformante in jih nekaj precepimo na svežo ploščo za kasnejšo izolacijo plazmidov

Frekvenca transformacije nam pove, kako dobre so kompetentne celice. Izražamo jo s številom cfu (kolonijskih enot) na pmol vektorja. Nekateri raziskovalci uporabljajo enoto cfu/ μ g vektorja, kar pa je manj natančno. *Zakaj? Kakšno je razmerje med cfu/pmol in cfu/ μ g pri vektorju pLITMUS 28, ki ima dolžino 2823 bp in kakšno pri prenašalnem vektorju pHIL-S1 z dolžino 8300 bp?*

Poskus, v katerem bomo določili frekvenco transformacije, moramo izvesti z majhno količino vektorja, saj pri večjih količinah (okrog 0,01 pmol) pride do nasičenja in so zato preračunane vrednosti (na pmol) manjše, kot jih dobimo s količino plazmida pod nasičenjem. Vir plazmida za določanje frekvenca naj bi bil zelo čista preparacija nekega standardnega plazmida, pogosto je to pUC19 ali kateri od podobnih majhnih klonirnih vektorjev. Mali vektorji namreč lažje vstopajo v celice kot veliki in so tako frekvence višje kot pri uporabi velikih vektorjev.

Frekvenca transformacij je odvisna od postopka za pripravo, pa tudi od uporabljenega bakterijskega seva; sevi na osnovi izhodnega seva B (pogosto te seve uporabljamo pri ekspresiji, ker imajo tudi manj endogenih proteinaz, ki bi lahko razgradili rekombinantni protein) imajo drugačno sestavo celične stene in jih težje transformiramo kot seve, ki izhajajo iz seva K-12. Tudi če uporabljamo enak postopek in vedno isti sev celic pa se nam lahko zgodi, da bodo celice različno kompetentne. Vpliva namreč temperatura gojenja, faza rasti (fiziološko stanje v trenutku, ko smo celice poželi) in drugi dejavniki.

Frekvence transformacij so pomembne predvsem, ko pripravljamo genske knjižnice. Če smo pripravili še tako dobro izvorno DNA in jo še tako uspešno ligirali v plazmid, knjižnica ne bo uporabna, če na koncu zbirke rekombinantnih vektorjev ne bomo uspeli spraviti v bakterijske celice in namnožiti. Kot zelo dobre lahko štejemo kompetentne celice s frekvencami transformacij blizu 10^{10} /pmol plazmida. Take celice je mogoče kupiti, pripraviti v lastnem laboratoriju pa skoraj nemogoče. Za rutinske transformacije so še vedno uporabne tudi celice s frekvenco transformacije okrog 10^6 /pmol, dobre 'domače' celice najboljših sevov pa pridejo s frekvencami v red velikosti 10^8 /pmol pUC19.

Za poskus, v katerem boste določili frekvenco transformacije, je pomembno, da razmažete na ploščo tako število celic, da jih bo na plošči mogoče brez težav prešteti, ne pa premalo. Najbolje je, če bi bilo celic na posamezni plošči med 50 in 200. Ker pa na začetku ne vemo, kako dobre celice smo pripravili, moramo pripraviti več razredčin, ki pričakovano frekvenco zaokrožijo, torej računamo, kot da je kompetentnih celic morda do 10x več ali do 100x manj kot to metoda dopušča. V našem primeru si pripravite razredčine tako, da boste lahko analizirali frekvence med 10^4 in 10^7 /pmol vektorja. *Računanje lahko opravite že doma, sicer pa medtem, ko se bodo celice regenerirale (pred razmazom na plošče).*

Za določanje frekvenca transformacije bomo uporabili plazmid pUC19, ki j podoben vektorju, ki ste ga izolirali pri I. vaji, le da smo ga naknadno še prečistili preko posebnih nosilcev, da ne vsebuje proteinskih primesi in ostankov pufrov iz postopka izolacije. Koncentracijo smo prilagodili tako, da boste celicam dodali po 5 μ l DNA, kar ustreza 3 fmol vektorja. *Koliko ng je to?*

Na začetku naslednje vaje preštejte kolonije in določite frekvenco transformacije za svoje kompetentne celice. Izrazite jo v cfu/pmol in cfu/ μ g!

IV.6. Analiza transformant in prenos vektorja v ekspresijski bakterijski sev

Po transformaciji celic z rekombinantnim konstruktom (pET32/zapis za kokošji cistatin) bodo na plošči LB z ampicilinom zrasle kolonije. Izberemo si 4 kolonije in izvedemo mini-preparacijo plazmidne DNA po postopku iz vaje II: vretje + CTAB. Skicirajte si postopek od odvzema celic do končnega spiranja po obarjanju:

Izolirano plazmidno DNA bomo razrezali z encimom *Bam*HI. Natančno si oglejte plazmidni karti obeh izhodnih vektorjev, skicirajte si karto rekombinantnega plazmida in ocenite, kakšen rezultat pričakujemo po rezanju z *Bam*HI in elektroforezi.

Kako zamrežen agarozni gel je treba pripraviti? Kaj se bo zgodilo z vektorji, ki niso sprejeli inserta? Kako je mogoče, da bi taki vektorji sploh bili prisotni v bakterijah po transformaciji z ligacijskim produktom?

Identificirajte plazmide s fragmentom pričakovane velikosti in z 1 µl preparacije transformiraj celice BL21[DE3] po postopku, opisanem v poglavju IV.4! Celice *E. coli* BL21[DE3] imajo preko profaga v kromosom vnesen zapis za RNA-polimerazo virusa T7. Ta polimeraza edina lahko katalizira sintezo RNA po zaporedju navzdol od promotorja T7, ki ga imamo na vektorju pET32.

Vaja je na videz kratka, a je časovno vendarle zahtevna, saj ponovi postopka dveh predhodnih vaj. Če ne gre drugače, jo bomo izvedli v dveh delih in povezali s katero od krajših preostalih vaj. Če bo kolonij malo, bo analizo izvedel asistent v času po vajah.

V. Izražanje zapisa za kokošji cistatin v bakterijah *Escherichia coli*

Vaša naloga je, da v bakterijah *E. coli* seva BL21[DE3] inducirate izražanje zapisa za kokošji cistatin, ki ste ga predhodno vnesli v vektor pET32. Hkrati moramo izvesti tudi kontrolni poskus (ena skupina v vsakem turnusu), ki bo vseboval sistem z izhodnim vektorjem pET32 – torej brez zapisa za cistatin.

Če katera od skupin v vaji IV ne bo dobila transformant, bo izvajala poskus z vektorjem pGM1. V tem sistemu pričakujemo izražanje zapisa v periplazmi, zato je postopek za nadaljnje delo nekoliko drugačen – vsakič upoštevajte opis vaje pod naslovom Alternativni poskus!

Ko pripravljamo poskus, v katerem želimo prvič ugotoviti, ali se nek zapis v sistemu sploh izraža, moramo paziti na to, da imamo v paralelnem eksperimentu tudi kontrolni sev, transformiran z vektorjem brez zapisa, ki ga želimo izraziti. Če sev z ekspresijskim vektorjem ni na voljo, si lahko pomagamo z netransformiranim sevom, vendar moramo v tem primeru biti pri interpretaciji rezultatov bolj previdni kot sicer. Prav tako pazimo, da odvzamemo vzorec kulture pred dodatkom induktorja; analiza tega alikvota nam bo povedala, kako učinkovita je bila indukcija oziroma ali nastaja rekombinantni protein tudi brez dodatka induktorja. Bogata gojišča namreč pogosto vsebujejo ostanke medijev in snovi, ki lahko delujejo kot induktorji operona *lac* - efekt imenujemo 'puščanje promotorja'. Proti temu se lahko borimo na dva načina: da uporabimo sistem z zapisom za *lacI^q* – varianto represorja, ki se izraža v večjih količinah, ali pa da v gojišče dodajamo glukozo.

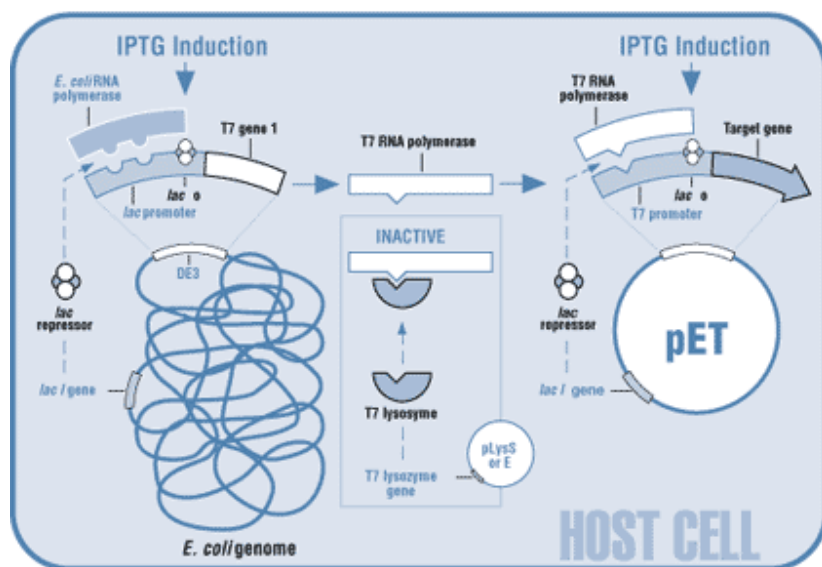
Eksperimente, v katerih želimo pripraviti rekombinantni protein v bakterijah, lahko izvajamo v analitskem merilu, torej z volumni kultur, ki nam omogočajo le nekaj preprostih analiz, ali pa v preparativnem merilu, ko smo s predhodnimi poskusi že pokazali, da je izražanje učinkovito, pa nato želimo pripraviti večje količine rekombinantnih proteinov. Preparativni poskusi lahko potekajo tudi v fermentorjih, medtem ko analitske izvajamo kar v epruvetah ali v stresalnih erlenmajericah z volumni kultur med 5 ml in 20 ml.

Ko prvič analiziramo transformante z ekspresijskim vektorjem, običajno izvedemo analitsko indukcijo z več kloni, lahko pa tudi testiramo vlogo seva in gojišča. Tako bi na primer z ekspresijskim sevom transformirali več sevov *E. coli* z različnimi lastnostmi (npr. okvaro v zapisu za proteaze) in jih gojili v bogatih in definiranih gojiščih, nato pa preverili, ali je po indukciji nastal rekombinantni protein in ali so v nivojih izražanja kakšne razlike. Za preparativni poskus bi potem izbrali kombinacijo, ki je dala najboljše rezultate.

Raven izražanja lahko preverimo na več načinov. Najpogosteje izvedemo analizo celotnih bakterijskih proteinov z NaDS-PAGE. Primerjamo vzorec seva brez zapisa za iskani protein in seva z zapisom, na osnovi pričakovane velikosti identificiramo dodatno liso in iz njene intenzitete sklepamo na nivo ekspresije. Če gre za izražanje proteina z znano biološko aktivnostjo in pričakujemo, da bo rekombinantni protein pravilno zvit, lahko preverimo njegovo aktivnost v lizatu. Pri tem moramo upoštevati možnost, da se je protein vezal na druge bakterijske proteine in se inaktiviral, ter oceniti mejo detekcije. Rekombinantni proteini, ki se odlagajo v obliki netopnih inkluzijskih telesc, niso primerni za analizo aktivnosti, elektroforezna analiza pa je vseeno mogoča, saj so inkluzijska telesa topna v NaDS in reducentu, ki sta v nanašalnem pufu. Vseeno lahko v celici del rekombinantnega proteina ostane v topni obliki, kar lahko preverimo elektroforezno, če pa je topni protein tudi pravilno zvit, pa lahko preverimo s testom aktivnosti.

V.1. Indukcija izražanja

Ekspresijski sistem T7 je eden bolj zapletenih, saj indukcija ekspresije rekombinantnega gena ne poteka direktno, pač pa posredno, preko RNA-polimeraze bakteriofaga T7. Sistem opisuje skica na naslednji strani. Z dodatkom IPTG pride do konformacijske spremembe represorja *lac*, ki se posledično ne more več vezati na operatorsko regijo. Zato bakterijska RNA-polimeraza začne prepisovati RNA-polimerazo faga T7 s kromosoma *E. coli* BL21[DE3]. Ko na ribosomih pride do sinteze polimeraze T7, se ta veže na promotor T7 na plazmidu pET32 in začne prepisovati zapis za kokošji cistatin (oziroma fuzijski protein – glej plazmidno karto pri vaji III).



Postopek za analitsko indukcijo ekspresije (torej delo z majhnimi volumni kultur) je naslednji:

- Posamezno kolonijo BL21[DE3] (pET32/kc) precepimo v 3 ml medija LB z ampicilinom (100 µg/ml) in stresamo čez noč pri 200 obr./min.
- Naslednje jutro prekonočno kulturo redčimo 1:25 v svež medij z ampicilinom (7 ml v 20 ml epruvetah) in stresamo pri 250 obr./min. dokler A_{550} ne doseže 0,4-0,7. Odvzamemo en alikvot celic (1,5 ml), ostanku pa dodamo IPTG do končne 0,4 mM koncentracije.
- Nadaljujemo z gojenjem še 3-4 ure, nato določimo A_{550} in odvzamemo celice za analizo (celotnega bakterijskega lizata ter ločeno topne in netopne celične frakcije).

Alternativni poskus: Izražanje v periplazmi

Skupine, ki ne bodo dobile transformant z rekombinantnim vektorjem na osnovi pET32, bodo zapis za kokošji cistatin izrazile v *E. coli* s pomočjo vektorja pGM1. Tudi tu lahko izražanje induciramo z dodatkom IPTG, ki je analog substrata in veže represor *lac*, tako da RNA-polimeraza *E. coli* lahko začne s prepisovanjem zapisa, ki se nato prevaja v protein (primerjaj plazmidno karto pGM1b v poglavju III).

Izražanje običajno induciramo, ko celice dosežejo logaritemsko fazo rasti, to je (odvisno od seva) med $A_{550}=0,4$ in $A_{550}=0,8$. V primeru, ko je rekombinantni produkt citotoksičen, pa se raje odločimo za indukcijo tik preden celice dosežejo stacionarno fazo rasti. Na ta način zaradi več biomase še lahko dosežemo ravni izražanja, ki omogočajo detekcijo in izolacijo rekombinantnega proteina.

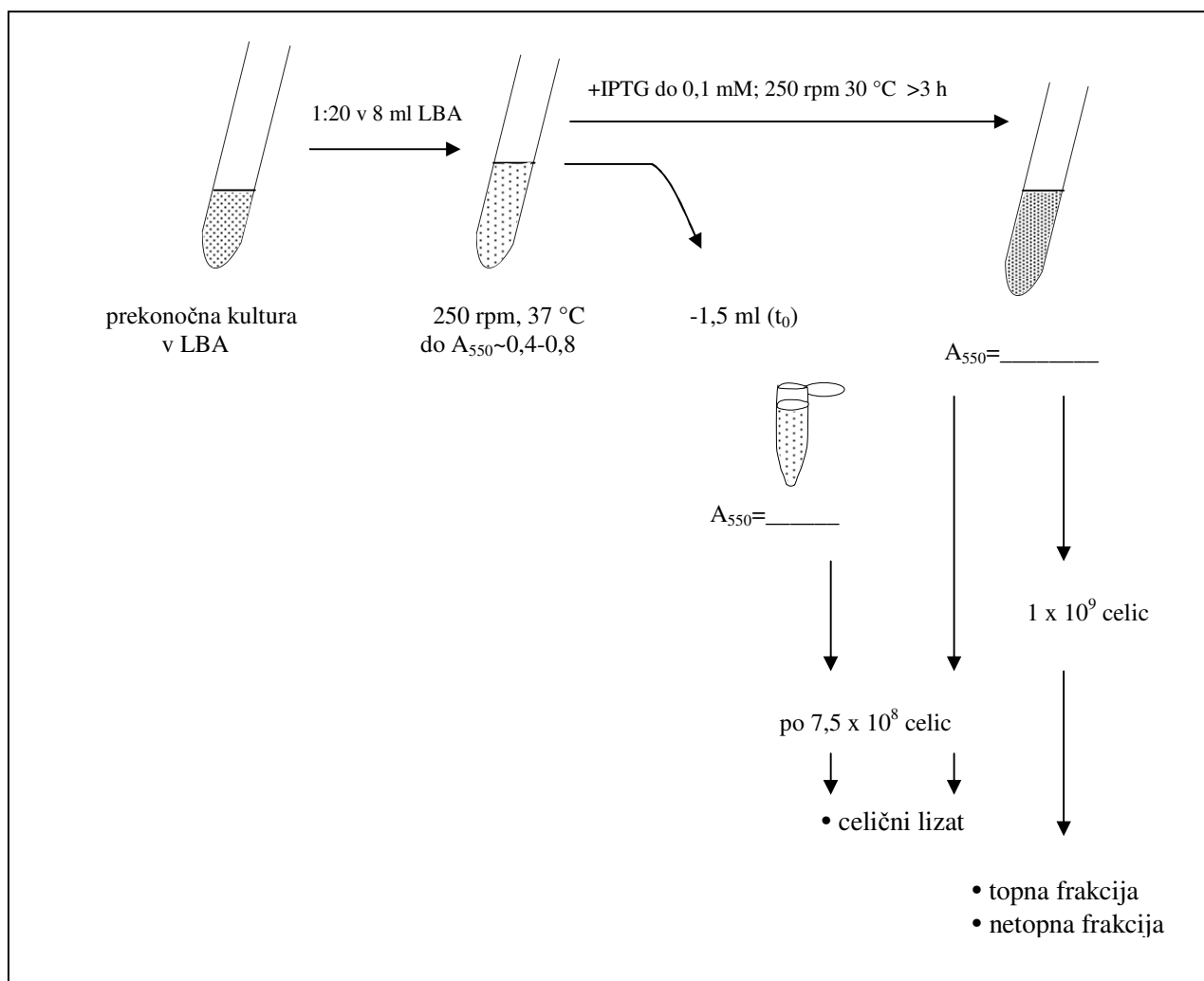
Na današnji vaji bomo inducirali izražanje kokošjega cistatina v 7 ml merilu v epruvetah.

- Posamezno kolonijo ekspresijskega seva precepimo v 5 ml medija LB z ampicilinom (100 µg/ml) in stresamo čez noč pri 200 obr./min. in 37 °C.
- Naslednje jutro [vajo začnemo tu →] prekonočno kulturo redčimo 1:20 v svež medij z ampicilinom (7 ml v 20 ml epruveti) in stresamo pri 250 obr./min. dokler A_{550} ne doseže 0,4-0,8. Odvzamemo en alikvot celic (1,5 ml), ostanku pa dodamo IPTG do 1 mM končne koncentracije.
- Nadaljujemo z gojenjem pri 30°C čez noč, nato določimo A_{550} in odvzamemo 1×10^8 celic za elektroforezno analizo celotnega bakterijskega lizata, del preostanka pa uporabimo za izolacijo periplazemskih proteinov.

V.2. Analiza indukcije

Če nas zanima samo količina proizvedenega rekombinantnega proteina, ne pa tudi lokalizacija, izvedemo NaDS-PAGE celotnih lizatov, pri čemer kot kontrolo nanesemo lizat celic pred indukcijo in lizat celic, ki so bile inducirane, a nosijo samo ekspresijski vektor brez inserta. Na podlagi razlik v proteinski sliki lahko ocenimo, ali je prišlo do proizvodnje rekombinantnega proteina in kakšni so nivoji proizvodnje.

V primeru, ko moramo določiti, ali je rekombinantni protein prisoten v topni obliki ali pa morda v netopni – torej kot inkluzijska telesca, pa moramo ločeno analizirati topno in netopno frakcijo bakterijskega lizata. Za takšno analizo običajno izhajamo iz dvakratne količine celic (2×10^8), kot je sicer običajna, ko analiziramo celotne bakterijske proteine. Z ultrazvokom razbijemo celice in netopni del lizata odcentrifugiramo. Supernatant predstavlja topno frakcijo. Usledni dodamo nekaj pufru in nanašalni pufer, ki vsebuje NaDS. Po prekuhanju vzorcev se bodo raztopili tudi prej netopni proteinski agregati. Na elektroforezni gel nanesemo celotni lizat, netopno in topno frakcijo in po elektroforezi in obarvanju določimo, koliko proteina pričakovane velikosti je topnega, koliko pa ga je bilo agregirane.



Shema poskusa indukcije in analize v primeru izražanja v citoplazmi (osnovni poskus)

Priprava celotnega celičnega lizata za elektroforezo:

Celični lizat pripravi iz celic pred in po indukciji.

Na podlagi izmerjene vrednosti A_{550} iz tabele odčitajte gostoto celic in v svežo centrifugirko odpipetirajte volumen, ki ustreza $7,5 \times 10^8$ celicam.

- Odcentrifugirajte celice (1 min pri 11 krpm).
- Odpipetirajte supernatant in ga zavržite.
- Usedlini dodajte 50 μ l pufra TE.
- Razbijajte z ultrazvokom 3 x 10 s na ledu (to naj naredi asistent – zaradi majhnega volumna lahko hitro pride do pretiranega penjenja in poškodbe mikrosonde).
- Odvzemite 10 μ l suspenzije razbitih celic, prenesite jih v novo mikrocentrifugirko in dodajte 2 μ l (6x) nanašalnega pufra.
- Pred nanosom kuhajte 3 min in nato centrifugirajte 10 min.
- Na elektroforezni gel nanesite samo topni del vzorca.

Priprava topne in netopne frakcije za elektroforezo:

Najprej pripravite celični lizat iz celic po indukciji, nato pa ločite topni del lizata od netopnega.

Na podlagi izmerjene vrednosti A_{550} iz tabele odčitajte gostoto celic in v svežo centrifugirko odpipetirajte volumen, ki ustreza 1×10^9 celicam.

- Odcentrifugirajte celice (1 min pri 11 krpm).
- Odpipetirajte supernatant in ga zavržite.
- Usedlini dodajte 50 μ l pufra TE.
- Razbijajte z ultrazvokom 3 x 10 s na ledu (to naj naredi asistent – zaradi majhnega volumna lahko hitro pride do pretiranega penjenja in poškodbe mikrosonde).
- Odvzemite 10 μ l suspenzije razbitih celic in jih prenesite v novo mikrocentrifugirko.
- Centrifugirajte 2 min pri polnih obratih.
- Supernatant prenesite v novo mikrocentrifugirko in mu dodajte 2 μ l (6x) nanašalnega pufra. Ta vzorec predstavlja topno frakcijo.
- Usedlino po zadnjem centrifugiranju resuspendirajte v 10 μ l pufra TE in dodajte 2 μ l (6x) nanašalnega pufra. Ta vzorec predstavlja netopno frakcijo.
- Pred nanosom kuhajte oba vzorca 3 min in nato centrifugirajte 10 min.
- Na elektroforezni gel nanesite samo topni del vzorca.

Analizirajte dobljene frakcije z NaDS-PAGE (17,5 %). V prvi analizi ugotovite, ali se da iz celotnega celičnega lizata ugotoviti, ali je prišlo do izražanja kokošjega cistatina in ali je koncentracija kokošjega cistatina po indukciji izražanja kaj narasla. [Na prvi gel nanesite torej vzorec celic pred indukcijo in po indukciji.] Druga analiza pa bo pokazala, ali (in če, koliko) rekombinantnega proteina je prisotnega v topni, koliko pa v netopni obliki. [Na drugi gel torej nanesite zapored topno in netopno frakcijo celic po indukciji.]

Ali je po indukciji prišlo do proizvodnje proteina z velikostjo, ki jo pričakujemo za fuzijski protein s kokošjim cistatinom? Ali je do proizvodnje prišlo že pred dodatkom IPTG? Zakaj bi do proizvodnje lahko prišlo že pred dodatkom induktorja?

Ugotovite, ali je rekombinantni protein v celicah po indukciji prisoten pretežno v topni ali netopni obliki! Na osnovi intenzitete proteinske lise poskusite oceniti, koliko proteina je topnega in koliko netopnega! Kakšen bi bil postopek za izolacijo inkluzijskih telesc iz večje količine bakterijskega lizata? Kako bi inkluzijska telesa raztopili in kakšni so postopki za renaturacijo tako raztopljenih proteinov?

Alternativni poskus: Izolacija periplazemske frakcije bakterij in analiza izoliranih proteinov

Ekspresijski vektor pGM1 je konstruiran tako, da vsebuje pred zapisom za kokošji cistatin signalno zaporedje ompA (outer membrane protein A), kar pomeni, da pričakujemo rekombinantni protein v periplazemskem prostoru. Periplazma je sicer prostorsko majhen celični razdelek, vendar je za pripravo rekombinantnih proteinov primeren vsaj iz dveh razlogov: ker je v periplazmi redoks okolje bolj primerno za ustvarjanje disulfidnih mostičkov in ker je v periplazmi manj proteaz kot v citoplazmi. Kokošji cistatin vsebuje 4 cisteinske ostanke, ki so v naravni molekuli povezani z 2 disulfidnima mostičkoma. Periplazma je zato zelo primerno okolje za izražanje tega proteina v *E. coli*. Nadaljnja prednost periplazme pred citoplazmo je, da je v njej manj proteinov in je zato čiščenje rekombinantnega proteina iz periplazemske frakcije lažje.

Pri izolaciji periplazemske frakcije celice iz kulture najprej odcentrifugiramo, nato pa resuspendiramo v izotoničnem pufru (vsebuje 20 % saharozo in soli). Celice nato odcentrifugiramo in resuspendiramo v večji količini pufra brez saharoze in intenzivno stresamo na ledu. Ob tem bodo bolj rigidne zunanje bakterijske stene popokale, notranja membrana pa je bolj fleksibilna in ostane intaktna. Vsebina periplazme se bo tako sprostila v pufer in po odcentrifugiranju sferoplastov ostala v supernatantu.

Dobra periplazemska frakcija vsebuje vsaj 10x manj proteinov kot citoplazma iz enakega števila celic in razporeditev lis po velikosti na elektroferogramu jasno kaže, da gre pretežno za proteine, ki jih v citoplazmi ni. Če smo pri delu preveč agresivni, nam bodo popokale tudi notranje membrane in periplazemska frakcija bo onesnažena s citoplazemskimi proteini. Če pa delamo preveč nežno, bo preveč celic ostalo intaktnih in periplazme bodo v usedlini po zadnjem centrifugiranju, kar pomeni, da bo 'periplazemska frakcija' vsebovala zelo malo proteinov. Ker je periplazemska frakcija dokaj čista, lahko merimo vsebnost proteinov spektrofotometrično in tako ocenimo, koliko vzorca moramo nanesti na elektroforezni gel.

Zaradi velike količine pufra, ki ga potrebujemo, da dosežemo osmozni šok, je koncentracija proteinov v tej frakciji lahko prenizka za takojšen nanos na elektroforezni gel. V tem primeru je treba vzorce prej skoncentrirati. Najpreprostejša je uporaba vakuumskega koncentratorka, če pa je koncentracija proteinov $>0,1$ mg/ml pa vzorec lahko skoncentriramo tudi z obarjanjem. Najpogosteje uporabljamo trikloroocetno kislino (TCA), lahko pa tudi aceton.

Priprava celotnega celičnega lizata za elektroforezo:

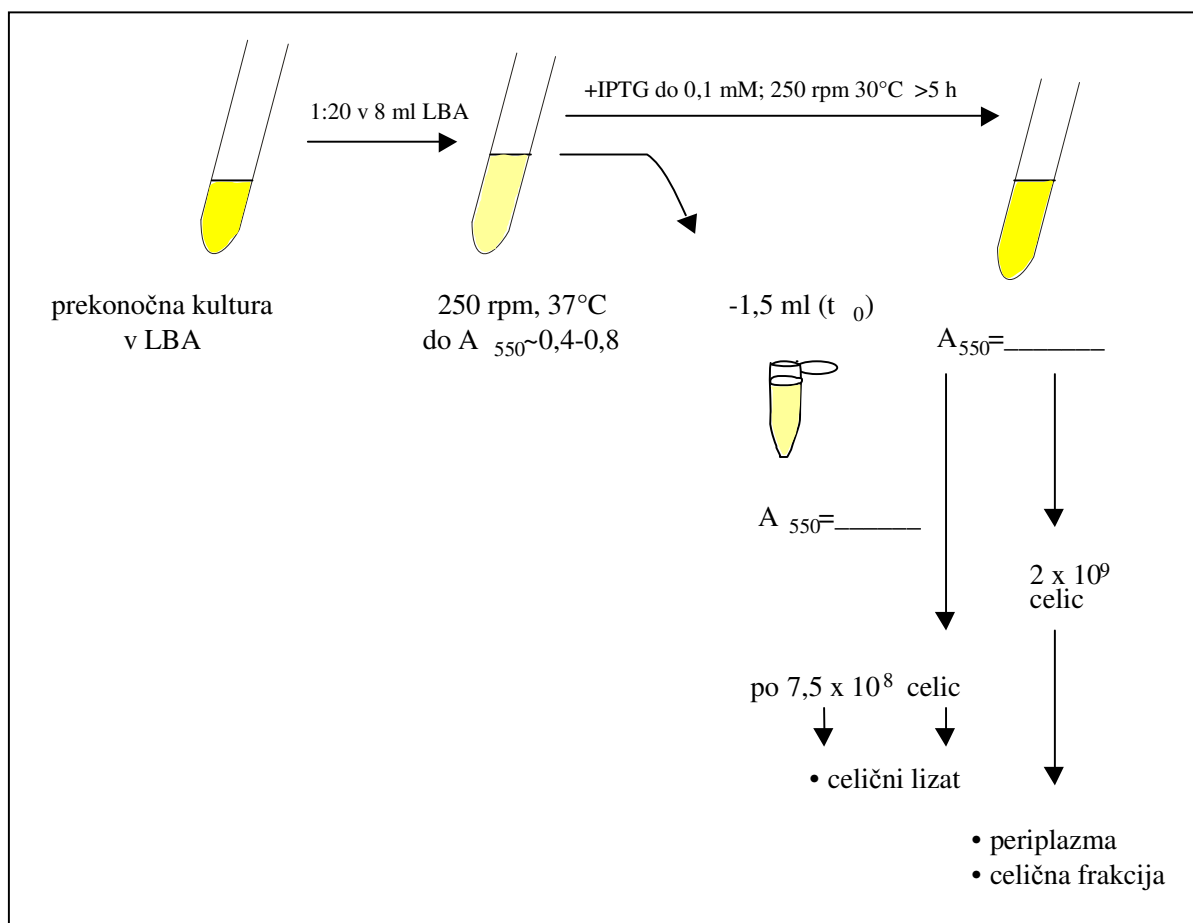
Celični lizat pripravi iz celic pred in po indukciji.

Na podlagi izmerjene vrednosti A_{550} iz tabele odčitajte gostoto celic in v svežo centrifugirko odpipetirajte volumen, ki ustreza $7,5 \times 10^8$ celicam.

- Odcentrifugirajte celice (1 min pri 11 krpm).
- Odpipetirajte supernatant in ga zavržite.
- Usedlini dodajte 50 μ l pufra TE.
- Razbijajte z ultrazvokom 3 x 10 s na ledu (to naj naredi asistent – zaradi majhnega volumna lahko hitro pride do pretiranega penjenja in poškodbe mikrosonde).
- Odvzemite 10 μ l suspenzije razbitih celic, prenesite jih v novo mikrocenrifugirko in dodajte 2 μ l (6x) nanašalnega pufra.
- Pred nanosom kuhajte 3 min in nato centrifugirajte 10 min.
- Na elektroforezni gel nanesite samo topni del vzorca.

Postopek izolacije periplazemske frakcije:

- Odcentrifugirajte 2×10^9 induciranih celic in jih resuspendirajte v 0,5 ml pufra TES (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 0,2 M EDTA, 25 % (w:v) saharoze).
- Postavite na led za 10 min. in pretresite vsako minuto.
- Celice odcentrifugirajte (kot zgoraj) in ostanek pufra odpivajte.
- Takoj dodajte 0,75 ml hladnega pufra TE, postavite na led in izmenično intenzivno stresajte (15 s) in inkubirajte na ledu (45 s), skupaj 10 min.
- Odcentrifugirajte celično frakcijo, supernatant (periplazemsko frakcijo) pa shranite ločeno od preostanka celic.



Shema poskusa indukcije in analize v primeru izražanja v periplazmi (alternativni poskus)

Priprava celične frakcije za elektroforezno analizo:

- Odcentrifugirane ostanke celic resuspendirajte v 70 μ l pufra TE.
- Sonificirajte 3 x 10 s na ledu (pri tem nosite zaščitne slušalke).
- Odvzemite toliko suspenzije, da ustreza $2,5 \times 10^8$ celicam, prenesite v svežo mikrocentrifugirko, če je treba, dopolnite do 10 μ l z vodo in dodajte 2 μ l (6x) nanašalnega pufra.
- Pred nanosom kuhajte 3 min in nato centrifugirajte 10 min.
- Nanesite samo topni del vzorca.

Priprava periplazemske frakcije za elektroforezno analizo:

Določite A_{280} izolirane frakcije in izračunajte koncentracijo proteinov (ob upoštevanju $A=1$ ustreza 1 mg/ml). Za nanos rabite ~40 μ g proteinov; če je za to potreben volumen >15 μ l, oborite proteine s TCA.

- K 1 V periplazemske frakcije dodajte 0,11 V 100 % TCA (w:v), pretresite in inkubirajte na ledu 15 min.
- Centrifugirajte 10 min; supernatant zavržite.
- Usedlino sperite s 100 μ l mešanice etanol:eter (1:1).
- Centrifugirajte 3 min pri polnih obratih, supernatant odpipetirajte do zadnje kapljice in zavržite (v za to predvideno erlenmajerico).
- Usedlino posušite v digestoriju.
- Rastopite v 10 μ l vode in dodajte 2 μ l (6x) nanašalnega pufra.
- Pred nanosom kuhajte 3 min in nato centrifugirajte 5 min.

Analizirajte dobljene frakcije z NaDS-PAGE (17,5 %). V prvi analizi ugotovite, ali se da iz celotnega celičnega lizata ugotoviti, ali je prišlo do izražanja kokošjega cistatina in ali je koncentracija kokošjega cistatina po indukciji izražanja kaj narasla. [Na prvi gel nanesite torej vzorec celic pred indukcijo in po indukciji.] Druga analiza pa bo pokazala, ali je rekombinantni kokošji cistatin prisoten v periplazmi in koliko približno ga je; hkrati bomo kontrolirali tudi kvaliteto preparacij periplazme. [Na drugi gel torej nanesete vzorec periplazemske frakcije in sferoplastov.] Na robu vsakega gela pustite dve mesti prosti za standarde velikosti in za vzorec celic brez rekombinantnega vektorja.

Ali je po indukciji prišlo do proizvodnje proteina z velikostjo, ki jo pričakujemo za kokošji cistatin? Ali je do proizvodnje prišlo že pred dodatkom IPTG? Ali bi to sploh bilo mogoče? Zakaj?

Na osnovi intenzitete proteinske lise poskusi oceniti, koliko proteina so bakterije proizvedle na liter kulture!

Ali bi v primeru, da bi izražanje izvedli v citoplazmi, pričakovali več ali manj produkta? Od česa je to odvisno?

V.3. Test aktivnosti na substrat BANA

Če je rekombinantni protein topen, je smiselno preveriti, ali je morda tudi aktiven. Ker smo poskušali proizvesti inhibitor cisteinskih proteinaz, bi lahko izvedli preprost test aktivnosti na encim papain (*zakaj bi izbrali ta encim?*) z uporabo kromogenega substrata BANA. (Podoben test poznate že z vaj iz splošne biokemije.) Če ste zaznali inhibitorno aktivnost, v kontrolnem poskusu pa ne, je zelo verjetno, da je aktivnost posledica pravilno zvitega kokošjega cistatina. Če pa ste zaznali aktivnost tudi v kontrolnem poskusu (sev z vektorjem brez inserta), potem gre za aktivnost endogenega inhibitorja in ne za aktivnost rekombinantnega proteina.

Testirajte dva različna volumna topne frakcije [v alternativnem poskusu: periplazemske frakcije] na papain s substratom BANA! Primerjaj s kontrolnim vzorcem (brez dodanega inhibitorja) in slepim vzorcem (brez dodanega encima).

Alikvot topne frakcije (25 µl) razredčite 1:10 s pufrom TE in analizirajte aktivnost na papain z dvema količinama v testu po spodnji tabeli. V alternativnem poskusu analizirajte nerazredčeno periplazmo.

Dopolnite shemo pipetiranja in izvedite poskus!

	vzorec 1	vzorec 2	kontrolni vz.	slepi vzorec
periplazemska frakcija	50 µl	200 µl		
papain (20 µg/ml)	50 µl			
pufer TE	150 µl			
cistein v testnem pufru	250 µl			
<i>inkubirajte 5 min pri 37° C - občasno pretresite</i>				
BANA	50 µl			
<i>inkubirajte 10 min pri 37° C - občasno pretresite</i>				
prekinjevalni reagent	550 µl			
<i>inkubirajte 5 min pri sobni T – občasno pretresite</i>				
<i>izmerite A₅₂₀ proti slepemu vzorcu</i>				

Izmerjene vrednosti:

kontrolni vzorec:

vzorec 1:

vzorec 2:

Ali je bilo mogoče določiti inhibitorno aktivnost periplazemskih frakcij?

Ali lahko ugotovite iz rezultatov vseh skupin, ali gre za aktivnost endogenega inhibitorja ali za aktivnost rekombinantnega proteina?

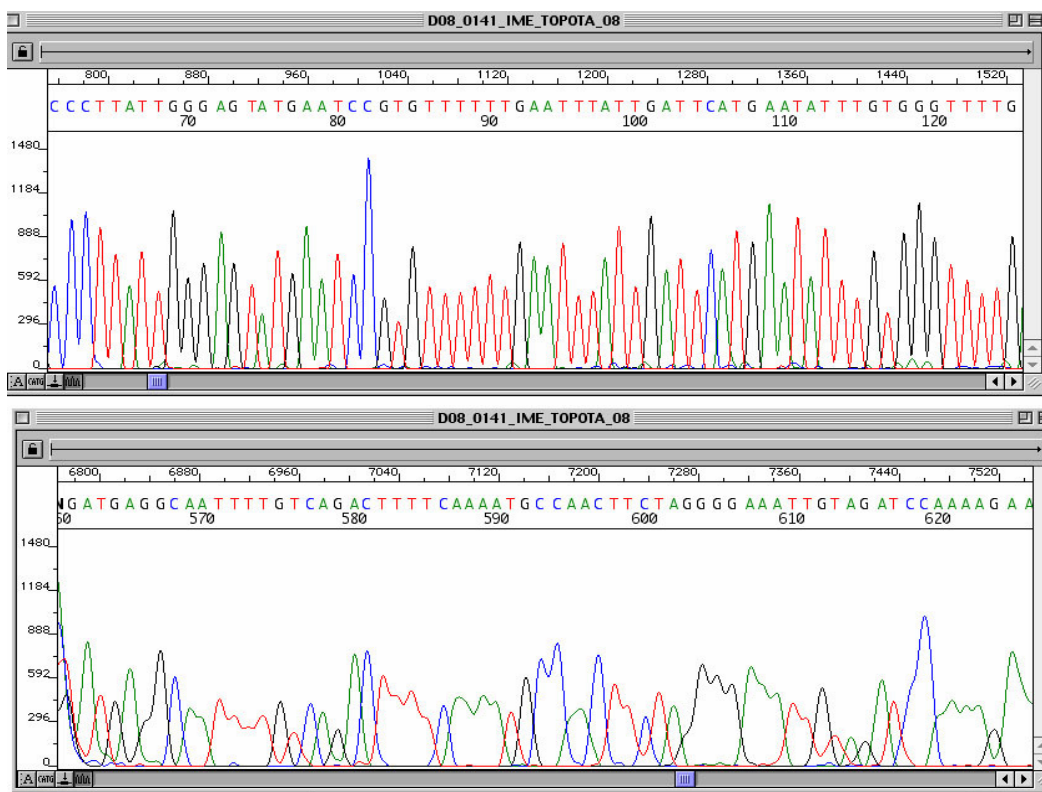
Kaj bi lahko rekli o testu/vzorcu v primeru, da ne bi uspeli dokazati inhibitorne aktivnosti?

VI. Določanje nukleotidnega zaporedja

Za določanje nukleotidnega zaporedja po dideoksi-metodi so dolgo uporabljali radioaktivno označevanje produktov T7-polimeraze. Različno dolge produkte so ločevali na tankih dolgih denaturacijskih poliakrilamidnih gelih, ki so bili z ene strani termostatirani. Po sušenju gela, iz katerega je bilo treba predhodno eluirati ureo, smo na gel položili občutljiv film in eksponirali nekaj dni, preden smo film razvili in prebrali zaporedje v obliki lestvice 4 ločenih nukleotidov.

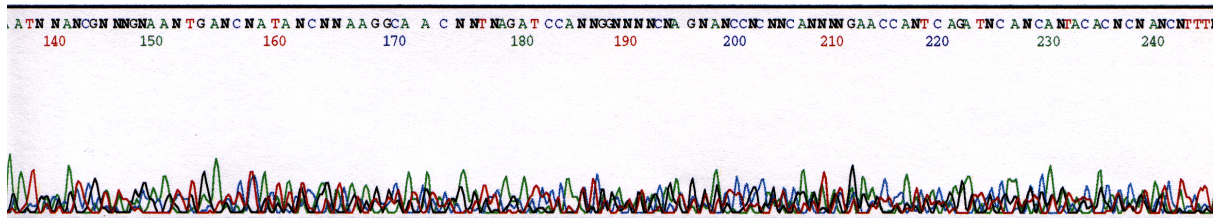
V zadnjem času pa se je razmahnila uporaba kapilarne elektroforeze in fluorescenčno označenih vzorcev. Fluorescentne oznake uvedemo v nastajajočo verigo s poenostavljeno (enosmerno) PCR. Razsoljen vzorec nato nanese na avtomatizirano napravo za določanje nukleotidnega zaporedja. Ločevanje in analiza potekata nekaj ur, izpis pa je v obliki elucijskega diagrama z barvno označenimi 4 nukleotidi. Običajno lahko preberemo zaporedja, ki so od začetnega oligonukleotida oddaljena >40 nukleotidov, dolžina ločene regije pa je 350-550 nukleotidov.

Računalniški program že prevede elucijski diagram v enočrkovno prikazano zaporedje, ki je nadpisano grafu, vendar pa je natančnost avtomatskega branja omejena, predvsem v začetnem delu, na mestih ponovitev iste baze in proti koncu učinkovitega ločevanja.

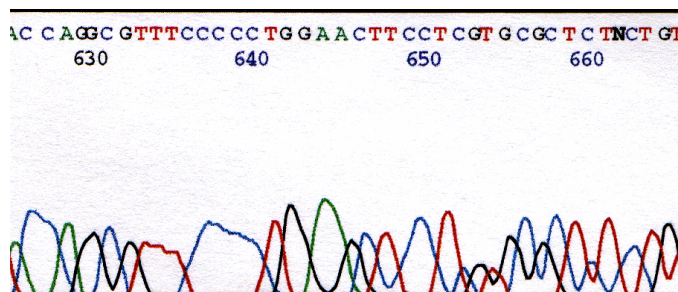


Pri določanju ali preverjanju nukleotidnega zaporedja je ključnega pomena izbor začetnih oligonukleotidov. Vedeti moramo, na katero verigo se bodo vezali, in izbrati primerno razdaljo od regije, ki jo določamo. Pri preverjanju znanih zaporedij si pogosto pomagamo z regijami, kjer se zaporedje istega nukleotida ponovi štirikrat ali večkrat, nato pa beremo zaporedje od tega mesta navzgor ali navzdol.

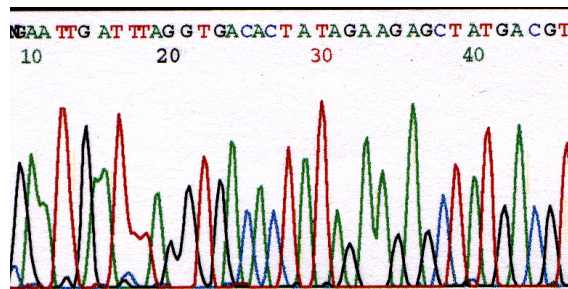
Pri šibkih signalih se vrhovi lahko izgubijo v ozadju, kar onemogoča avtomatsko branje, pa tudi ročno branje je zelo otežkočeno. Program bo na mesta, kjer ne more določiti prave baze, vpisal N.



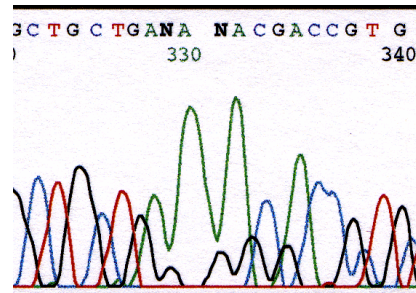
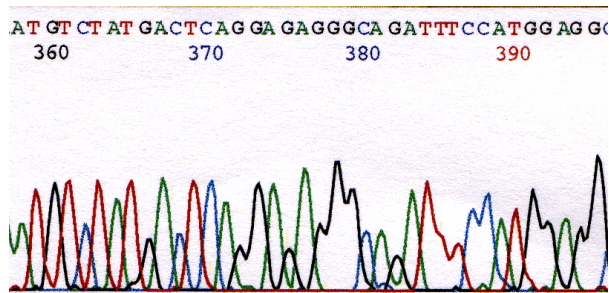
Proti koncu regije, ki jo analiziramo, se lahko pojavi navidezna insercija ene baze. Do tega pride zaradi razširjenih elucijskih vrhov (lis) v območju znižane ločljivosti. Po drugi strani lahko pride tudi do navideznih delecij, ko se vrhovi s šibkim signalom skrijejo pod razširjeni vrh. Na spodnji sliki je na primer navidezno podvojen A na mestu 645, na tem mestu pa je program spregledal bazo G. Podvojen je tudi T 648.



Na začetku analizirane regije na izpisih pogosto zasledimo navidezno delecijo ene baze, do česar pride zaradi kompresij vrhov – na sliki npr. A za G14. Podobne 'delecije' se včasih pojavljajo tudi v sredini območja, ki ga analiziramo.



Naslednja pogosta težava pri branju sekvenčnih izpisov je sorazmerno šibak signal za G, ki sledi bazi A. Program take nizke vrhove včasih tudi spregleda.

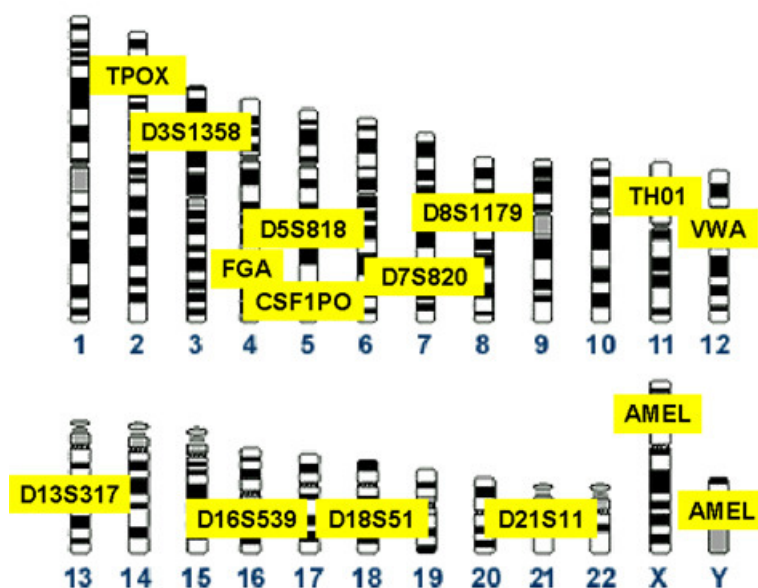


VII. Določanje polimorfizma kratkih tandemskih ponovitev (STR)

Čeprav je zaporedje nukleotidov v genomu dveh ljudi 99,9 % identično, so v preostalem 0,1 % zaporedja lahko razen točkastih mutacij tudi širša območja, ki so variabilna. Te razlike s pridom izkoriščajo v forenziki, kjer na osnovi primerjave vzorcev DNA, ki jih najdejo na kraju zločina in DNA osumljencev izločijo ali potrdijo identiteto domnevnih storilcev. Tako lahko tudi potrdimo ali ovržemo sorodstvene odnose med preiskovanci, določamo očetovstvo in podobno.

Z analizami DNA v forenziki so začeli konec osemdesetih let prejšnjega stoletja. Sprva so analizirali polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov, v zadnjem času pa standardno analizirajo tandemске ponovitve nekaj nukleotidov, ki se pojavljajo na različnih kromosomih. Za vzorce razgrajene DNA, kakršni so na primer arheološki vzorci ali vzorci trupel iz obdobja svetovnih vojn, analizirajo zaporedja na mitohondrijski DNA, ki je krožna in zato bolj stabilna, v celicah pa je prisotna v večjem številu kopij.

Forenzični laboratoriji v svetu rutinsko analizirajo tisoče vzorcev DNA dnevno. Dobljene podatke analiz STR na primer agencija FBI za vse obsojence v Združenih državah Amerike shranjuje v zbirki CODIS, ki zajema značilnosti 13 regij s ponovitvami (regija AMEL [amelogenin] je za določevanje spola).



Na vajah je naša naloga, da pridobimo vzorec (lastne) genomske DNA iz celic ustne sluznice, potem pa to DNA uporabimo kot matrico za pomnoževanje enega od polimorfnih segmentov s PCR. Vajo opravlja vsak zase (ne v skupinah po 2 kot ostale).

VII.1. Izolacija genomske DNA iz majhnega števila človeških celic

Za analize, ki vključujejo PCR, potrebujemo manj kot 0,1 ng DNA, za kar nam zadošča nekaj celic, v skrajnem primeru tudi ena sama (diploidna celica pri človeku vsebuje ~7 pg DNA). To je še posebej pomembno pri forenzičnih preiskavah. Če potrebujemo človeško DNA, jo lahko dobimo iz celic brez agresivnih posegov (odvzem krvi, puljenje las) z izpiranjem celic ustne sluznice. Nevarnost pri tem pa je,

da bo v izpirku tudi veliko bakterijskih celic, zato moramo pri analizi rezultatov, dobljenih s tako DNA biti previdni. Če pomnožujemo s specifičnimi oligonukleotidi, ki se vežejo na zaporedja, znana samo v genomu višjih organizmov, pa nevarnosti lažnih rezultatov skorajda ni.

Pri izolaciji bomo uporabili reagent Chelex, ki je tržno ime za polistiren-divinilbenzen-iminodiacetat. Gre za kelacijsko sredstvo, ki ga ne smemo prenašati v reakcije, ki zahtevajo prisotnost dvovalentnih kovinskih ionov, saj bi jih nosilec vezal in s tem preprečil potek reakcije. Reagent Chelex uporabljajo tudi kot ionski izmenjevalec.

Postopek izolacije:

- V ustih temeljito (~30 s) prežvrkljajte 10 ml 0,9 % NaCl. Izpljunite v čašo.
- Premešajte vsebino čaše in takoj odpipetirajte 1 ml tekočine v mikrocentrifugirko.
- Centrifugirajte pri 10 krpm 1 min.
- Supernatant previdno odpipetirajte in zavržite, nato k celicam na dnu dodajte 30 µl 0,9 % NaCl.
- Premešajte na vibracijskem mešalu in dodajte še 100 µl 10 % suspenzije nosilca Chelex. Nosilec premešajte tik pred odvzemom; uporabite spodaj odrezan nastavek, sicer se kroglic Chelexa ne da odpipetirati.
- Dobro premešajte.
- Inkubirajte v vreli vodni kopeli 10 min, nato ohladite na ledu.
- Centrifugirajte pri polnih obratih 5 min.
- Odvzemite 25 µl bistrega supernatanta in prenesite v svežo mikrocentrifugirko.
- Do uporabe shranite v hladilniku ali zamrznite.

VII.2. Pomnoževanje specifične regije na 3. kromosomu s PCR

Na današnji vaji bomo pomnoževali le eno od 13 regij, ki jih analizira FBI, to je območje D3S1358, znotraj katerega variira število ponovitev zaporedja GATA med 12 in 19 (najkrajša dolžina pomnoženega fragmenta je 114 bp, najdaljša pa 142 bp). Gre za območje na kromosomu 3p; v delovni verziji zaporedja človeškega genoma (GenBank) je na odseku z naslednjimi značilnostmi:

```
LOCUS      NT_022517                65931213 bp    DNA        linear    CON 17-OCT-2003
DEFINITION Homo sapiens chromosome 3 genomic contig.
ACCESSION  NT_022517
```

Na sliki je prikazano zaporedje s 15 ponovitvami (skupna dolžina 127 bp).

(Vir obeh slik pri tej vaji: National Institute of Standards and Technology, STR Internet DataBase)

5'	11	21	31	41	
1	ACTGCAGTCC TGACGTGAGG	AATCTGGGTG TTAGACCCAC	ACAGAGCAAG TGTCTCGTTC	ACCCTGTCTC TGGGACAGAG	ATAGATAGAT TATCTATCTA
51	AGATAGATAG TCTATCTATC	ATAGATAGAT TATCTATCTA	AGATAGATAG TCTATCTATC	ATAGATAGAT TATCTATCTG	AGATAGATAG TCTGTCTATC
101	ATACATGCAA TATGTACGTT	GCCTCTGTTG CGGAGACAAAC	ATTTGAT TAAAGTA		

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

V verižni reakciji s polimerazo potrebujemo: matrično DNA, prebitek dNTP, termostabilno polimerazo, ustrezen pufer in dodatke (Mg^{2+}) ter končna oligonukleotida. Encim dodamo na koncu, ko DNA in oligonukleotide že denaturiramo s kuhanjem (3 min, 100°C). Starejše aparature za PCR nimajo termostatiranega pokrova, zato moramo preprečiti izhlapevanje tekočine. Vzorec v tem primeru prekrijemo s plastjo mineralnega olja. Novejše aparature imajo ogrevan pokrov, zato do izhlapevanja ne prihaja.

Standardni volumen reakcije je 50 µl, zato lahko uporabimo mikrocentrifugirke z volumnom 200 µl (za starejše aparature 0,5 ml), nekateri pa izvajajo reakcijo le še v 20 µl in lahko uporabljajo mikrotitrne ploščice, čemur mora biti prirejen tudi Peltierjev člen PCR-aparature.

Med pomnoževanjem se izmenjujejo trije procesi, ki tečejo pri različnih temperaturah: denaturacija dsDNA (92 °C – 94 °C), pripenjanje oligonukleotidov (37 °C – 55 °C, odvisno od sestave, dolžine in želene specifičnosti vezave) in polimerizacija (72 °C). Uporabljamo termostabilne polimeraze, najpogostejše polimerazo Taq, ki sicer spada v skupino manj natančnih polimeraz (nima aktivnosti kontrolnega branja), je pa manj občutljiva za nečistoče v reakciji in za nepopolno prileganje oligonukleotidov na matrično DNA.

Sestava reakcijske mešanice:

PCR-pufer (10x)	5 µl
mešanica dNTPs (vsak 2,5 mM)	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
začetni oligonukleotid (5 µM)	2,5 µl
končni oligonukleotid (5 µM)	2,5 µl
matrična DNA	3 µl
dH ₂ O	29 µl

Inkubirajte 3 min. pri 100 °C, nato na hitro (da se raztopina ne ohladi pod 80 °C) dodajte 1 µl (1,5 U) polimeraze Taq in takoj vrnite v aparaturo ter startajte cikel pomnoževanja.

Iz praktičnih razlogov – ker bo poskus potekal v številčni skupini – bomo po denaturaciji pri 100 °C termostat nastavili na 80 °C in šele, ko boste vsi dodali encim, startali nadaljevanje reakcije, torej ohlajanje na temperaturo pripenjanja.

Program pomnoževanja naj bo takle: 30 x (30 s 94 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C). Medtem, ko bo potekalo pomnoževanje, pripravite poliakrilamidni gel za kasnejše ločevanje produktov PCR.

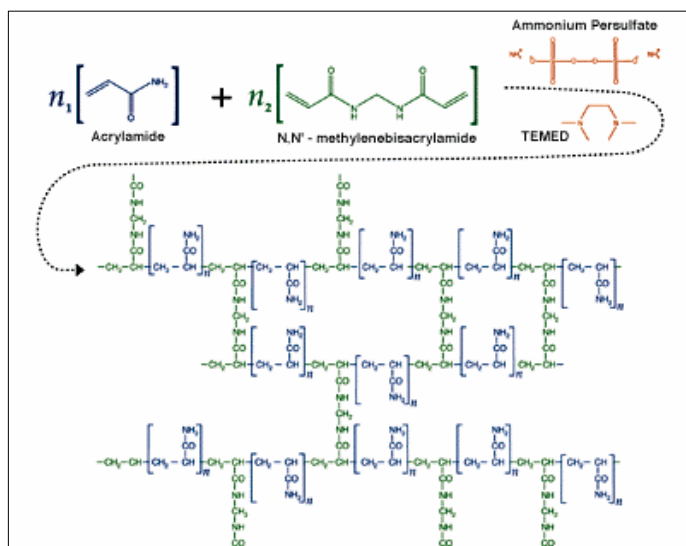
VII.3. Ločevanje produktov PCR s PAGE

Pripravite 8 % poliakrilamidni gel v pufru TBE. Skupaj pripravite 2 gela - razdelite se na dve skupini in sodelujte s kolegom, ki bo pripravljal gel. Gel pripravite po navodilih v Dodatku.

Pozor! Akrlamid je v nepolimerizirani obliki škodljiv za zdravje. Draži oči, kožo in dihala, verjetno pa deluje tudi na živčni sistem in je kancerogen. Obvezno je delo z rokavicami in očali. Tudi po polimeriziranju lahko ostane nekaj akrilamida v prosti, torej strupeni obliki.

Za ločevanje DNA uporabljamo kontinuirni elektroforezni sistem s pufrom TBE, ki ima dobro pufrsko kapaciteto in ga lahko uporabljamo tudi pri ločevanju, ki teče dalj časa in kljub segrevanju. TBE je oznaka za Tris-borat (89 mM, pH 8,3) z Na₂EDTA (2 mM).

Da bi dosegli ločevanje v obliki tankih lis, mora biti vzorec za nanos čimbolj skoncentriran. (Zakaj? Kako lahko to rešimo pri ločevanju proteinov?)



Slika: zgradba poliakrilamidnega matriksa (vir: katalog National Diagnostics)

Koncentriranje DNA z obarvanjem

Po končanju PCR skoncentrirajte produkt z obarvanjem iz etanola v prisotnosti Na-acetata. K 50 μ l produkta (prenesite ga v 1,5 ml mikrocentrifugirko) dodajte 5,5 μ l (ustreza 0,1 V vodne faze) 3 M Na-acetata (pH 5,2) in 140 μ l (2,5 V vodne faze) absolutnega etanola. Po dodatku etanola dobro premešajte in inkubirajte v zmrzovalniku 10 min, nato pa centrifugirajte 10 min pri polnih obratih mikrocentrifuge in 4°C. DNA se obori, vendar je količina tako majhna, da oborina običajno ni vidna s prostim očesom. Odpipetirajte supernatant do zadnjih sledov, na kratko posušite na zraku in dodajte 7 μ l pufra TBE (1x) in 1 μ l nanašalnega pufra, ki vsebuje tudi barvili ksilencianol in bromfenolmodro – ti nam bosta služili za oceno prepotovane poti produktov PCR. Dobro premešajte na vibracijskem mešalu.

Spolimeriziran gel namestite v vertikalno elektroforezno kadičko, nalijte nad obe elektrodi pufer 1x TBE in sperite žepke s pipeto, da odstranite ostanke akrilamida. Elektroforeza naj teče najprej brez vzorcev ~20 min pri 8 V/cm, toliko da se gel segreje (a ne nad 70 °C). Nato nanosite vzorec svojega produkta PCR in startajte elektroforezo, ki naj teče pri 5 V/cm oziroma pri napetosti <10 V/cm, ki pa ne sme povzročiti pregrevanja gela (temperatura plošče naj ostane <70 °C, sicer pride do denaturacije DNA in do izrazitega 'smejalnega učinka', pri katerem vzorci v srednjih nanosih potujejo hitreje kot enako veliki vzorci na robovih).

Na levi strani na vsakem gelu nanosite standard velikosti (lestvico 100 bp; 4 μ l raztopine fragmentov DNA) – tako lažje orientirate gel in najdete svoj nanos, hkrati pa lahko določite približno velikost fragmentov na gelu.

Po končanem ločevanju, to je, ko se bromfenolmodro približa spodnjemu robu gela, prenesite gel iz steklenega sendviča v raztopino etidijevega bromida (1 μ g/ml; *pozor, lahko povzroča mutacije!*) in barvajte 10 min ob občasnem mešanju. Splaknite v vodi in si gel oglejte na transiluminatorju. Meja

detekcije DNA v poliakrilamidu je višja kot v agarози; zaznamo lahko >15 ng DNA (teoretično). *Kako bi lahko detektirali manjše količine DNA?*

Rezultate skicirajte in označite svoj vzorec. Ker ste vzorce analizirali na 2 gelih, poskušajte izenačiti hitrosti potovanja s pomočjo poravnave označevalcev velikosti in obeh indikatorskih barvil v gelu.

Analiza rezultatov

Ugotovite, koliko različno velikih fragmentov se je pomnožilo v celi skupini! Nekateri vzorci DNA so ob pomnoževanju dali dve lisi, drugi eno liso – koliko je katerih in kaj pomeni prisotnost več lis?

Na osnovi rezultatov cele skupine poskušajte ugotoviti, kakšna je pogostost posameznih ponovitev v populaciji!

VIII. Prenos fragmentov DNA z gela na membrano in detekcija fragmentov na membrani

To je demonstracijska vaja, kjer si bomo na kratko ogledali, kako je treba pripraviti 'sendvič' za prenos in kako bi potekala kasnejša detekcija specifičnih zaporedij DNA na membrani.

Najenostavnejši način prenosa je s pasivno difuzijo (ki si ga bomo ogledali), prenos pa bi lahko izvedli tudi podobno, kot to delamo s proteini. Gel in membrano bi namestili v električno polje in DNA bi potovala z agaroznega gela na membrano, ki bi jo položili na pravo stran.

DODATEK

To poglavje vsebuje praktične napotke za delo, pomoč pri preračunavanju, naloge za preverjanje razumevanja snovi in postopke za pogosto uporabljane tehnike.

NAPOTKI ZA DELO IN KRATKE NALOGE

Vaja II:

Naloga:

Izračunajte maso vseh plazmidov pUC19 v 3 ml kulture z gostoto 1×10^9 celic/ml, če je v vsaki celici v povprečju 40 kopij plazmida! Minipreparacijski postopki dajo običajno okrog 1 µg plazmidne DNA na ml izhodne kulture (s kompleti reagentov tudi do 5-krat več). Kakšen je torej izkoristek take izolacije?

Vaja IV:

Preračuni količin:

Plazmid pGM1 je dolg 8000 bp. Molska masa je $8000 \times 650 \text{ Da} = 5,20 \text{ MDa}$. 1 pmol pa ustreza 5,20 µg. Plazmid pET32a ima 5900 bp in je torej njegova molska masa 3,84 MDa. 1 pmol torej ustreza 3,84 µg.

Naloga:

Izračunajte, koliko enot encima *PstI* rabite za cepitev 5 µg neznanega plazmida dolžine 5430 bp, če veste, da cepi ta plazmid na 3 mestih. Ena enota *PstI* cepi fag λ na 28 mestih. Koliko je to mikrolitrov, če ima encim koncentracijo 20 U/µl. Kako bi izvedli reakcijo, če ima plazmid koncentracijo 0,1 µg/µl, za analizo pa ga rabite 1,5 µg?

KRATKI PROTOKOLI

Obarjanje DNA iz etanola in izopropanola

1 V raztopine DNA (ne manj kot 10 µl, sicer dopolnite z vodo)
0,11 V 3 M Na-acetata pH 5,2
2,5 V absolutnega etanola
premešajte
centrifugirajte 10 min pri 14.000 g.
odpipetirajte supernatant in ga zavrzi
usedlino sperite z 1 V 70 % etanola (ne manj kot 50 µl)
močno stresajte
centrifugirajte 3 min pri 14.000 g
odstranite supernatant
usedlino posušite na zraku (10 min) ali v koncentradorju (1 min)

Enako učinkovit je postopek z izopropanolom: namesto 2,5 V etanola v zgornjem postopku vzamete 0,7 V izopropanola. Pozor: izopropanol ne sme biti mrzel, sicer se obarjajo tudi soli.

Za obarjanje kratkih fragmentov dsDNA (<100 bp) ali ssDNA uporabite etanol iz zmrzovalnika. Pred centrifugiranjem inkubirajte 10 min (bolje: čez noč) pri –20 °C in centrifugirajte po možnosti v hlajeni centrifugi 20 min.

Postopek deluje dobro za običajne izhodne koncentracije DNA. Če je DNA zelo razredčena (nekaj deset ng/ml), obarjajte po postopku za kratke fragmente dsDNA.

Spiranje s 70 % etanolom lahko izvedemo s poljubno količino etanola; več soli ko pričakujemo v vzorcu, večji volumen 70 % etanola vzamemo. Stopnjo spiranja lahko tudi ponovimo. Po dodatku etanola stresamo na vibracijskem mešalu; usedlina se včasih loči s stene centrifugirke, včasih pa ne. Tudi če smo obarjali z izopropanolom, spiramo soli na koncu z etanolom.

XX

Koncentriranje vodnih raztopin nukleinskih kislin z butanolom

Butanol, ki ga dodamo vodni raztopini, bo vezal nekaj vode in s tem zmanjšal volumen vodne faze. Koliko vode bo vezal, je odvisno od tega, kako svež je (koliko vode je že vezal iz zraka) in kako intenzivno mešamo vodno in organsko fazo, zato ni mogoče podati natančnih količin butanola, ki jih je potrebno dodati, da odvezamemo nek določen volumen vode. Ravnanje je treba empirično.

Butanol je lažji od vode in bo zato po centrifugiranju (zadošča 1 min pri polnih obratih mikrocentrifuge) nad vodno fazo. Zato ga lahko po centrifugiranju odpipetiramo in če je potrebno, dodamo svež butanol ter ekstrakcijo ponovimo. Ko smo prišli do zelenega volumna raztopine DNA, butanol kvantitativno odstranimo, da nam ne bo motil naslednjih encimskih reakcij, ki vključujejo DNA ali nanašanja na gel (ker je butanol lažji od vode, bo del vzorca splaval iz žepka kljub temu, da mu dodate nanašalni pufer, ki vzorec obteži).

Pri koncentriranju z butanolom je treba upoštevati, da se hkrati s koncentriranjem DNA koncentrirajo tudi soli in da se vam te lahko oborijo iz raztopine. Če boste dodali preveč butanola, se vam lahko zgodi, da vodne faze ne boste več videli, soli in DNA pa se vam bodo oborile. V tem primeru odstranite butanol in usedlino resuspendirajte v zahtevanem volumnu vode. Upoštevajte, da morda DNA v raztopini, ki ste jo dobili, ne bo dobro topna! Zato je koncentriranje z butanolom primerno predvsem za odzemanje manjših volumnov vode iz raztopine, ki ne vsebuje veliko soli. V vseh ostalih primerih je bolje izvesti obarjanje DNA iz etanola ali izopropanola pod pogoji, pri katerih se soli ne obarjajo. Obarjanje je časovno nekoliko bolj dolgotrajno, vendar boste z oborjeno in ponovno raztopljeno DNA imeli manj težav kot z DNA, ki ste jo skoncentrirali z butanolom.

XX

APS (amonijev persulfat): Zatehtajte svežega - pripravite 10 ml (150 mg APS, dH₂O do 10 ml), ostanek shranite v zmrzovalniku (obstojno ~ 1 mesec).

TEMED: Smrdi, zato stekleničko takoj po odpipetiranju zaprite.

Priprava delovne raztopine:

Odpipetirajte potrebne volumne raztopin (glej tabelo). Premešajte pred in po dodatku TEMED, ki inducira polimerizacijo. Takoj nalijte v vnaprej pripravljen stekleni sendvič in pazite, da v tekočino med nalivanjem ne pridejo mehurčki. Spodnji (ločevalni) del gela, ki ga nalijete kot prvega, prekrijte s plastjo vode (pribl. 5 x 0,2 ml; pipetirajte previdno, ob robovih). Polimeriziran gel lahko shranite čez noč v hladilniku in nalijete nanašalni del gela naslednje jutro. Pri vstavljanju glavnička pazite na mehurčke, ki se radi ujamejo pod žepki.

Elektroforezni pufer (10x):

Za 1 l zmešajte 30,3 g TRIS-baze + 144 g glicina + 10 g SDS. Ne nastavljajte pH (nekateri protokoli imajo napačen podatek, da mora biti pH 8,3). Pred uporabo razredčite 1:10.

Nanašalni pufer (reducirajoč) (5x):

Za 20 ml zmešajte 0,73 g TRIS-baze, 5 ml glicerola, 5 ml 2-merkaptetanola in 2 g NaDS. pH naj bi bil 8,8 (nastavite s HCl). Dodajte za konico spatule bromfenolmodrega.

Raztopina za barvanje:

Za 500 ml zmešajte 2,5 g Servablau (ustreza barvilu Coomassie Brilliant Blue), 50 ml očetne kisline, 200 ml metanola in dopolnite z vodo do končnega volumna.

Raztopina za razbarvanje:

Za 1 l rabite 100 ml očetne kisline, 400 ml metanola in 500 ml vode. Raztopino po uporabi regenerirajte preko filtra z ogljem (pazite, da oglje ne prehaja v filtrirano raztopino!).

Za **ločevanje DNA** uporabimo kontinuirni gel v pufrskem sistemu TBE. 1liter (10x) pufera **TBE** vsebuje: 108 g TRIS-baze, 55 g borove kisline in 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8).

Potovanje indikatorskih barvil (ekvivalent ds DNA s podano dolžino).

Izberemo tako koncentracijo akrilamida, da potuje analizirani fragment DNA med obema barviloma.

koncentr.	ksilencianol	bromofenolmodro
3,5 %	460	100
5,0 %	260	65
8,0 %	160	45
12,0 %	70	20
15,0 %	60	15
20,0 %	45	12

(Podatki: Promega)

Priprava enofaznega 8 % gela (količine za 2 gela = 14 ml):

raztopina	ločevalni gel
akrilamid (37,5:1)	2,9 ml
dest. voda	8,9 ml
TBE (10x)	1,4 ml
1,5 % APS	0,80 ml
TEMED	0,008 ml

Previdno premešajte in nalijte med očiščeni plošči. Takoj vstavite glavniček in počakajte, da gel polimerizira. Vstavite v elektroforezno napravo, nalijte pufer (1x TBE), odstranite glavniček in sperite žepke. Elektroforeza teče pri 6 V/cm - 8 V/cm. Občasno preverite temperaturo stekelc in zmanjšajte tok, če prihaja do prekomernega gretja.

Barvajte v raztopini etidijevega bromida (0,5 µg/ml), najbolje skupaj s stekelcem, na katerem je obstal gel po razklenitvi sendviča. Pozor: gel je zelo občutljiv in se hitro raztrga! Po ~10 min sperite gel z vodo in prenesite na transiluminator. Pri prenašanju si lahko pomagata s prozorno folijo za gospodinjstvo.

Opisani postopek je primeren za ločevanje kratkih fragmentov dsDNA. Za ločevanje ssDNA mora biti v gelu prisotna urea (7 M), vzorec pa denaturiran v formamidu. Povišana temperatura pomaga pri preprečevanju nastanka sekundarnih struktur, ki bi vplivale na potovanje DNA.

XX

Gojišča:

LB: 1 % triptona (ali kazein-hidrolizata ali podobne mešanice aminokislin), 0,5 % kvasnega ekstrakta, 1 % NaCl. Za 400 ml zatehtajte 4 g triptona, 2 g kvasnega ekstrakta in 4 g NaCl ter raztopite v vodi. pH naj bi bil 7,4 (običajno ga ne nastavljam). Avtoklavirajte. Hranite pri sobni temperaturi do nekaj tednov.

Podobno gojišče je **YT:** 0,8 % triptona, 0,5 % kvasnega ekstrakta, 0,5 % NaCl. Včasih pripravimo 2YT (dvojne koncentracije vseh sestavin).

Gojišče **TB** pa vsebuje še glicerol: 1,2 % tripton, 2,4 % kvasni ekstrakt, 0,4 % glicerol; raztopite v 90 % končnega volumna, avtoklavirajte, nato dodajte 0,1 M K-fosfata (0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4), ki ste ga avtoklavirali ločeno.

Gojišče **BY** vsebuje mesni ekstrakt (3 %), kvasni ekstrakt (1,5 %) in K_2HPO_4 (0,5 %).

Za agarne plošče dodajte še agar do 1,5 % - 2 % (w:v) končne koncentracije.

XX

Napotki za uporabo centrifug

V laboratoriju uporabljamo tri tipe centrifug proizvajalca Eppendorf. Za delo z mikrocentrifugirkami (1,5 ml plastične posode s pokrovčki) uporabljamo hlajeno centrifugo na pultu nasproti naprave za FPLC ali malo namizno centrifugo, ki ni hlajena. Za večje volumne bomo uporabljali hlajeno centrifugo 5810R, ki stoji ob čisti komori na pultu ob steni.

Male centrifuge omogočajo centrifugiranje pri do ~15.000 g. Če v protokolih ni napisano, pri katerih obratih ali katerih vrednosti g moramo centrifugirati vzorce, je to običajno 14.000 g ali več – to velja vsaj pri delu z DNA v malem merilu. Obe mali centrifugi uporabljamo samo s po enim rotorjem, zato ni nevarnosti, da bi izbrali napačen rotor ali poskušali centrifugirati pri vrednostih, ki bi presegale kapaciteto centrifuge oz. rotorja.

Večja centrifuga ima dva rotorja. Rotor s fiksnim kotom (F-34-6-38) uporabljamo za 50-mililitrske centrifugirke s koničastim dnom. Največja hitrost centrifugiranja, ki jo omogoča rotor, je sicer 12.000 obr./min., kar ustreza 18.500 g, vendar pa centrifugirke takšnih vrednosti ne dopuščajo in lahko pri takšnih obremenitvah počijo. S 50-mililitrskimi centrifugirkami ne smemo centrifugirati pri več kot 8000 g. Rotor s spremenljivim nagibom A-4-81 uporabljamo samo za volumne med 50 ml in 300 ml z ustreznimi adapterji. Tega rotorja sami na vajah ne boste uporabljali.

Pri centrifugiranju je treba predvsem paziti na uravnoteženost vzorcev, ki so v rotorju postavljeni na nasprotnih mestih. Pri mikrocentrifugah tariramo na <50 µl natančno in če nimamo ustreznega protivzorca, uporabimo ustreznega izmed vnaprej pripravljenih (so v stojalu nad hlajeno centrifugo). Pri večji centrifugi tariramo na tehtnici na +/- 0,5 % mase vzorca s centrifugirko vred. Če je masa 50 g, je lahko razlika med nasproti si postavljenima vzorcema kvečjemu 250 mg.

Hitrost centrifugiranja lahko nastavimo v obr./min. ali kot končno vrednost g. Za preklap med obema prikazoma uporabimo kombinacijo dveh tipk.

XX

Sterilizacija:

- suho steriliziranje: 200 °C 2 h
- ne steriliziramo plastičnih posod in zamaškov, ne označujemo s papirnim avtoklavirnim trakom
- suho steriliziramo samo prazno steklovino in kovinsko orodje (pincete, škarje)

- v pari (avtoklaviranje): 1,2 bar, 121°C, 20 min
- posode morajo biti priprte, da ima para dostop in so tlaki izenačeni
- primerno za raztopine, ki zdržijo povišane temperature
- avtoklaviranje orodja in steklovine (pa tudi odpadnih reagentov in nepatogenih kultur): 2 bar, 135 °C, 10 min

- steriliziranje občutljivih reagentov: sterilno filtriranje skozi filtre s porami 0,2 µm

XX

Antibiotiki:

ampicilin

konc. založne raztopine 100 mg/ml v etanolu

končna konc. v gojišču 50-200 µg/ml

deluje na ravni sinteze bakterijske stene – samo na rastoče celice

mehanizem odpornosti: periplazemska β-laktamaza cepi β-laktamski obroč

kanamicin

konc. založne raztopine 10 mg/ml v vodi

končna konc. v gojišču 10 µg/ml - 30 µg/ml

deluje na ravni translacije

mehanizem odpornosti: aminoglikozid-fosfottransferaza inaktivira antibiotik

kloramfenikol

konc. založne raztopine 25 mg/ml v etanolu

končna konc. v gojišču 25 µg/ml - 150 µg/ml

deluje na ravni translacije

mehanizem odpornosti: acetiltransferaza inaktivira antibiotik

tetraciklin

konc. založne raztopine 12,5 mg/ml v etanolu – hrani na temnem

končna konc. v gojišču 12,5 µg/ml

deluje na ravni translacije

mehanizem odpornosti: modifikacija celične membrane onemogoči transport antibiotika v celice

Tabelarni prikaz genetskega koda:

		Second position				
		U	C	A	G	
First position (5'-end)	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U
		UUC }	UCC }	UAC }	UGC }	C
		UUA } Leu	UCA }	UAA } STOP	UGA } STOP	A
		UUG }	UCG }	UAG } STOP	UGG Trp	G
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U
		CUC }	CCC }	CAC }	CGC }	C
		CUA }	CCA }	CAA } Gln	CGA }	A
		CUG }	CCG }	CAG }	CGG }	G
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U
		AUC }	ACC }	AAC }	AGC }	C
		AUA }	ACA }	AAA } Lys	AGA } Arg	A
		AUG Met	ACG }	AAG }	AGG }	G
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U
		GUC }	GCC }	GAC }	GGC }	C
		GUA }	GCA }	GAA } Glu	GGA }	A
		GUG }	GCG }	GAG }	GGG }	G
						Third position (3'-end)

Fizikalno-kemijske značilnosti nukleinskih kislin:

1pmol fragmenta DNA s 1.000 bp = 0,66 µg

1pmol vektorja pUC18/19 (2686 bp) = 1,77 µg

1pmol bakteriofaga lambda DNA (48.502 bp) = 32,01 µg

1µg DNA dolžine 1.000 bp = 1,52 pmol

1µg vektorja pUC18/19 (2.686 bp) = 0,57 pmol

1µg of bakteriofaga lambda (48.502 bp) = 0,03 pmol

1 A₂₆₀ of dsDNA = 50 µg/ml

1 A₂₆₀ of ssDNA = 33 µg/ml

1 A₂₆₀ of ssRNA = 40 µg/ml

povprečna M enega deoksiribonukleotida: 333 Da

povprečna M enega ribonukleotida: 340 Da

povprečna M enega baznega para DNA: 650 Da

Restriksijske endonukleaze in njihova prepoznavna mesta:

AatII	GACGT/C	BpmI	CTGGAG (16/14)
Acc65I	G/GTACC	BsaAI	YAC/GTR
AccI	GT/MKAC	BsaBI	GATNN/NNATC
AciI	CCGC (-3/-1)	BsaHI	GR/CGYC
AciI	(-1/-3) GCGG	BsaI	(5/1) GAGACC
AclI	AA/CGTT	BsaI	GGTCTC (1/5)
AfeI	AGC/GCT	BsaJI	C/CNNGG
AflIII	C/TTAAG	BsaWI	W/CCGGW
AflIII	A/CRYGT	BsaXI	(9/12) ACNNNNNCTCC (10/7)
AgeI	A/CCGGT	BsaXI	(7/10) GGAGNNNNNGT
AhdI	GACNNN/NGTC	BseRI	(8/10) CTCCTC
AluI	AG/CT	BseRI	GAGGAG (10/8)
AlwI	(5/4) GATCC	BsgI	(14/16) CTGCAC
AlwI	GGATC (4/5)	BsgI	GTGCAG (16/14)
AlwNI	CAGNNN/CTG	BsiEI	CGRY/CG
ApaI	GGGCC/C	BsiHKA I	GWGCW/C
ApaLI	G/TGCAC	BsiWI	C/GTACG
ApoI	R/AATTY	BslI	CCNNNNN/NNGG
AscI	GG/CGCGCC	BsmAI	(5/1) GAGAC
AseI	AT/TAAT	BsmAI	GTCTC (1/5)
AvaI	C/YCGRG	BsmBI	CGTCTC (1/5)
AvaII	G/GWCC	BsmBI	(5/1) GAGACG
AvrII	C/CTAGG	BsmFI	GGGAC (10/14)
BaeI	(10/15) ACNNNNGTAYC (12/7)	BsmFI	(14/10) GTCCC
BaeI	(7/12) GRTACNNNNGT	BsmI	GAATGC (1/-1)
BamHI	G/GATCC	BsmI	(-1/1) GCATTC
BanI	G/GYRCC	BsoBI	C/YCGRG
BanII	GRGCY/C	Bsp1286I	GDGCH/C
BbsI	GAAGAC (2/6)	BspCNI	CTCAG (9/7)
BbsI	(6/2) GTCTTC	BspCNI	(7/9) CTGAG
BbvCI	CCTCAGC (-5/-2)	BspDI	AT/CGAT
BbvCI	(-2/-5) GCTGAGG	BspEI	T/CCGGA
BbvI	GCAGC (8/12)	BspHI	T/CATGA
BbvI	(12/8) GCTGC	BspMI	ACCTGC (4/8)
BceAI	ACGGC (12/14)	BspMI	(8/4) GCAGGT
BceAI	(14/12) GCCGT	BsrBI	CCGCTC (-3/-3)
BcgI	(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)	BsrBI	(-3/-3) GAGCGG
BcgI	(10/12) GCANNNNNNTCG	BsrDI	(0/2) CATTGC
BciVI	(5/6) GGATAC	BsrDI	GCAATG (2/0)
BciVI	GTATCC (6/5)	BsrFI	R/CCGGY
BclI	T/GATCA	BsrGI	T/GTACA
BfaI	C/TAG	BsrI	ACTGG (1/-1)
BfrBI	ATG/CAT	BsrI	(-1/1) CCA GT
BglI	GCCNNNN/NGGC	BssHII	G/CGCGC
BglIII	A/GATCT	BssKI	/CCNGG
BlpI	GC/TNAGC	BssSI	CACGAG (-5/-1)
BmrI	ACTGGG (5/4)	BssSI	(-1/-5) CTCGTG
BmrI	(4/5) CCCAGT	BstAPI	GCANNNN/NTGC
BpmI	(14/16) CTCCAG	BstBI	TT/CGAA

BstEII	G/GTNACC	Hpy188I	TCN/GA
BstF5I	(0/2)CATCC	Hpy188III	TC/NNGA
BstF5I	GGATG(2/0)	Hpy99I	CGWCG/
BstNI	CC/WGG	HpyCH4III	ACN/GT
BstUI	CG/CG	HpyCH4IV	A/CGT
BstXI	CCANNNNN/NTGG	HpyCH4V	TG/CA
BstYI	R/GATCY	KasI	G/GCGCC
BstZ17I	GTA/TAC	KpnI	GGTAC/C
Bsu36I	CC/TNAGG	MboI	/GATC
BtgI	C/CRYGG	MboII	GAAGA(8/7)
BtrI	CACGTC(-3/-3)	MboII	(7/8)TCTTC
BtrI	(-3/-3)GACGTC	MfeI	C/AATTG
BtsI	(0/2)CACTGC	MluI	A/CGCGT
BtsI	GCAGTG(2/0)	MlyI	(5/5)GACTC
Cac8I	GCN/NGC	MlyI	GAGTC(5/5)
ClaI	AT/CGAT	MnlI	CCTC(7/6)
DdeI	C/TNAG	MnlI	(6/7)GAGG
DpnI	GA/TC	MscI	TGG/CCA
DpnII	/GATC	MseI	T/TAA
DraI	TTT/AAA	MslI	CAYNN/NNRTG
DraIII	CACNNN/GTG	MspA1I	CMG/CKG
DrdI	GACNNNN/NNGTC	MspI	C/CGG
EaeI	Y/GGCCR	MwoI	GCNNNNN/NNGC
EagI	C/GGCCG	NaeI	GCC/GGC
EarI	CTCTTC(1/4)	NarI	GG/CGCC
EarI	(4/1)GAAGAG	NciI	CC/SGG
EciI	GGCGGA(11/9)	NcoI	C/CATGG
EciI	(9/11)TCCGCC	NdeI	CA/TATG
EcoNI	CCTNN/NNNAGG	NgoMIV	G/CCGGC
EcoO109I	RG/GNCCY	NheI	G/CTAGC
EcoRI	G/AATTC	NlaIII	CATG/
EcoRV	GAT/ATC	NlaIV	GGN/NCC
FauI	CCCGC(4/6)	NotI	GC/GGCCGC
FauI	(6/4)GCGGG	NruI	TCG/CGA
Fnu4HI	GC/NGC	NsiI	ATGCA/T
FokI	(13/9)CATCC	NspI	RCATG/Y
FokI	GGATG(9/13)	PacI	TTAAT/TAA
FseI	GGCCGG/CC	Paer7I	C/TCGAG
FspI	TGC/GCA	PciI	A/CATGT
HaeII	RGCGC/Y	PflFI	GACN/NNGTC
HaeIII	GG/CC	PflMI	CCANNNN/NTGG
HgaI	GACGC(5/10)	PleI	(5/4)GACTC
HgaI	(10/5)GCGTC	PleI	GAGTC(4/5)
HhaI	GCG/C	PmeI	GTTT/AAAC
HincII	GTY/RAC	PmlI	CAC/GTG
HindIII	A/AGCTT	PpuMI	RG/GWCCY
HinfI	G/ANTC	PshAI	GACNN/NNGTC
HinPII	G/CGC	PsiI	TTA/TAA
HpaI	GTT/AAC	PspGI	/CCWGG
HpaII	C/CGG	PspOMI	G/GGCCC
HphI	GGTGA(8/7)	PstI	CTGCA/G
HphI	(7/8)TCACC	PvuI	CGAT/CG

PvuII	CAG/CTG
RsaI	GT/AC
RsrII	CG/GWCCG
SacI	GAGCT/C
SacII	CCGC/GG
SalI	G/TCGAC
SapI	(4/1) GAAGAGC
SapI	GCTCTTC (1/4)
Sau3AI	/GATC
Sau96I	G/GNCC
SbfI	CCTGCA/GG
ScaI	AGT/ACT
ScrFI	CC/NGG
SexAI	A/CCWGGT
SfaNI	(9/5) GATGC
SfaNI	GCATC (5/9)
SfcI	C/TRYAG
SfiI	GGCCNNNN/NGGCC
SfoI	GGC/GCC
SgrAI	CR/CCGGYG
SmaI	CCC/GGG
SmlI	C/TYRAG
SnaBI	TAC/GTA
SpeI	A/CTAGT
SphI	GCATG/C
SspI	AAT/ATT
StuI	AGG/CCT
StyI	C/CWWGG
SwaI	ATTT/AAAT
TaqI	T/CGA
TfiI	G/AWTC
TliI	C/TCGAG
TseI	G/CWGC
Tsp45I	/GTSAC
Tsp509I	/AATT
TspRI	CASTGNN/
Tth111I	GACN/NNGTC
XbaI	T/CTAGA
XcmI	CCANNNNN/NNNTGG
XhoI	C/TCGAG
XmaI	C/CCGGG
XmnI	GAANN/NTTC

prirejeno iz kataloga New England BioLabs, ZDA

Enočrkovne oznake nukleotidov:

B = C, G ali T
 D = A, G ali T
 H = A, C ali T
 K = G ali T
 M = A ali C
 N = G, A, T ali C
 R = G ali A;
 S = C ali G
 V = A, C ali G
 W = A ali T
 Y = C ali T

EcoRI: 1 U cepi v 1 h pri 37 °C 1 µg faga λ 5x
za cepitev dodatno zvite DNA je potrebnega 2,5x več
encima kot za linearno DNA

BamHI: 1 U cepi v 1 h pri 37 °C 1 µg faga λ 5x
za cepitev dodatno zvite DNA je potrebnega 2x več
encima kot za linearno DNA

HindIII: 1 U cepi v 1 h pri 37 °C 1 µg faga λ 7x
za cepitev dodatno zvite DNA je potrebnega 5x več
encima kot za linearno DNA

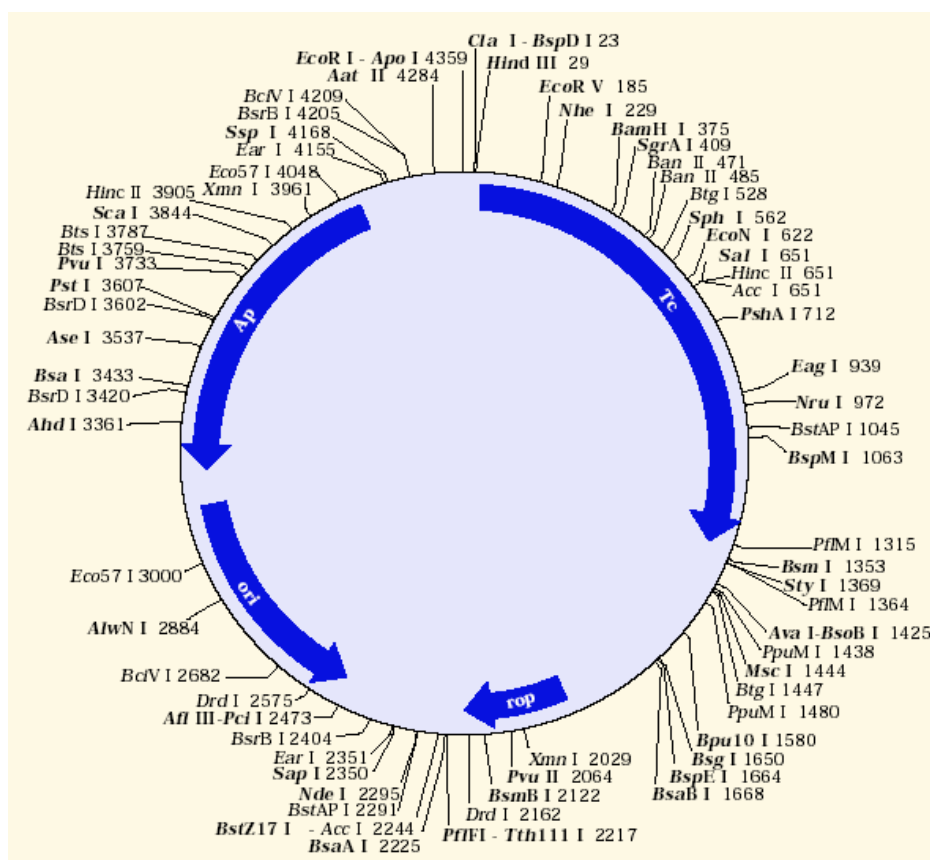
NALOGA: NAČRTOVANJE OLIGONUKLEOTIDOV

V vektor pBR322 želite vstaviti fragment DNA, dolg 360 bp, ki ima interna mesta *Hind*III (mesto 122), *Pvu*I (mesto 176) in *Sal*I (mesto 235). Načrtajte oligonukleotide za pomnoževanje s PCR, ki bodo omogočali vnos produkta v vektor na tak način, da bo rekombinantni sev rezistenten na ampicilin oziroma tetraciklin (načrtati morate torej dva para ustreznih oligonukleotidov).

Nukleotidno zaporedje fragmenta DNA je:

ATGCCAACCGACGTTTGTAGT.....(*Hind*III)...(*Pvu*I)...(*Sal*I).....CATATAGCACAGTCGCGGTGA

Pomagajte si s plazmidno karto vektorja pBR322 (4.361 bp; iz kataloga New England BioLabs, ZDA):



Izmed množice označenih restrikcijskih mest so uporabna predvsem mesta *Eco*RV, *Bam*HI, *Ava*I, *Pst*I in *Eco*RI, saj so encimi sorazmerno poceni in delujejo zanesljivo.

Glede na izbrana restrikcijska mesta na pomnoževalnih oligonukleotidih tudi določite, kako bi preverili, ali se je fragment res vgradil v vektor. Uporabite lahko tudi interna mesta! Napišite, kakšna bo dolžina fragmentov po cepitvi s *Hind*III, *Sal*I, *Pvu*I+*Eco*RI.

Možnih rešitev je več, pač odvisno od tega, katera mesta izberete za vnos fragmenta.

Ker v laboratoriju nimamo dostopa do interneta z več računalnikov hkrati, tokrat ne moreš preveriti, ali so oligonukleotidi optimalno konfigurirani glede na njihove fizikalno-kemijske lastnosti. Paziti morate torej le, da so smiselno izbrani restrikcijska mesta, dolžina oligonukleotida in delež prilegajočega se zaporedja. Paziti je treba, da se oligonukleotida prilegata na različni verigi (zakaj?) in da v neprilegajoči del 5'-oligonukleotida pomotoma ne vstavimo stop-kodona.

Kako bi izvedli selekcijo, ki bi omogočala identifikacijo klonov z vključenim fragmentom v vektorju?

Katere so prednost in slabosti selekcije na ampicilin oz. tetraciklin?

VPIS REŠITEV:

Zaporedje 5'-oligonukleotida za pripravo vektorja, ki bo določal rezistenco na ampicilin:

Zaporedje 3'-oligonukleotida za pripravo vektorja, ki bo določal rezistenco na ampicilin:

Zaporedje 5'-oligonukleotida za pripravo vektorja, ki bo določal rezistenco na tetraciklin:

Zaporedje 3'-oligonukleotida za pripravo vektorja, ki bo določal rezistenco na tetraciklin:

—

Dolžine restrikcijskih fragmentov po delovanju encima *HindIII*:

Dolžine restrikcijskih fragmentov po delovanju encima *SalI*:

Dolžine restrikcijskih fragmentov po hkratnem delovanju encimov *PvuI* in *EcoRI*:

NALOGA: PRERAČUNAVANJE POTREBNE KOLIČINE ENCIMOV

Plazmid pEFU2 vsebuje zapis za rastni faktor. Vaša naloga je, da izolirate insert iz 5 pmol vektorja. pEFU je dolg 3.890 bp, insert pa je vstavljen preko mest *SaII* in *MscI* (mesti se pojavljata na vektorju samo po enkrat). Koliko μl posameznega encima boste rabili za izvedbo reakcije v 1 h pri 37 °C ob upoštevanju naslednjih podatkov:

SaII: koncentracija encima 5 U/ μl ; na fagu λ sta 2 prepoznavni mesti; za cepitev dodatno zvite DNA rabimo 10x več encima kot za linearno DNA

MscI: konc. encima 10 U/ μl ; na fagu λ je 18 prepoznavnih mest; za cepitev dodatno zvite DNA rabimo 3x več encima kot za linearno DNA

Račun:

Kako bi sestavili reakcijsko mešanico, če je koncentracija vektorja 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, z obema encimoma pa lahko režemo v enakem pufru?

DNA	μl
<i>SaII</i>	μl
<i>MscI</i>	μl
pufer (10x)	μl
voda	μl

skupaj	μl
koncentr. DNA:	

Kako bi izvedli preparativno elektroforezo na agaroznem gelu? V žepku je prostora za 20 μl vzorca!

