

---

# Zestaw dydaktyczny umożliwiający przeprowadzenie izolacji plazmidowego DNA

## ZASADA EKSPERYMENTU

---

Proponowany zestaw dydaktyczny ma na celu zapoznanie studentów z metodami izolacji i oczyszczania plazmidowego DNA na przykładzie metody lizy alkalicznej wykorzystującej zdolność wiązania się DNA do ziół krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Izolaty poddawane są następnie elektroforezie w żelu agarozowym w celu porównania wielkości cząsteczek, wydajności izolacji i czystości wyizolowanych próbek DNA z wzorcowym plazmidowym DNA.

## 1. PRZEBIEG ĆWICZENIA

### A. IZOLACJA PLAZMIDOWEGO DNA

Procedura izolacji plazmidowego DNA przeprowadzana jest z wykorzystaniem minikolumn wirowniczych, zawierających odpowiednie złożo, wydajnie i selektywnie wiążące kwasy nukleinowe. W pierwszym etapie izolacji dochodzi do łagodnej lizy alkalicznej, w wyniku której DNA zostaje uwolnione z komórki i ulega denaturacji i fragmentacji. Po dodaniu buforu neutralizującego plazmidowe DNA ulega szybkiej renaturacji, przechodząc do roztworu. Po odwirowaniu próbki plazmidowe DNA, zawarte w supernatancie, zostaje przeniesione do minikolumny ze złożem. Dwuetapowe przemywanie DNA związanego do złoża ma na celu usunięcie pozostałych zanieczyszczeń i/lub inhibitorów reakcji enzymatycznych. Oczyszczone plazmidowe DNA eluowane jest z minikolumny buforem o niskiej sile jonowej (Elution Buffer) i jest gotowe do bezpośredniego wykorzystania w technikach biologii molekularnej, m. in. trawienie enzymami restrykcyjnymi.

#### PRZED PRYZYSTĄPIENIEM DO IZOLACJI

1. Każdy z odczynników zestawu należy wymieszać.
2. W przypadku wytrącenia osadu w buforach Neutralization Buffer, Lysis Buffer, Binding Buffer lub Wash Buffer, butelkę z roztworem należy ogrzać do temp. 50–60°C (Neutralization Buffer) lub 37°C (Lysis Buffer, Wash Buffer) i inkubować, aż do całkowitego rozpuszczenia osadu, mieszając co kilka minut, a następnie schłodzić do temp. pokojowej.
3. Można ogrzać odpowiednią ilość buforu elucyjnego do temp. 70°C.
4. Należy pamiętać, żeby wszystkie etapy izolacji przeprowadzać w temperaturze pokojowej.

#### PROCEDURA

Każdy student przeprowadza dwie izolacje plazmidowego DNA (z osadu bakterii *Escherichia coli* transformowanych plazmidem A oraz plazmidem B) według poniższej procedury:

1. Osad bakteryjny dokładnie zawiesić w 250  $\mu$ l buforu Resuspension Buffer.
  - ⚠ Niedokładne zawieszenie osadu może spowodować znaczne obniżenie wydajności izolacji.
2. Dodać 250  $\mu$ l buforu Lysis Buffer i delikatnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie próbki.
  - ⚠ Należy delikatnie wymieszać zawartość próbki, aby zapobiec fragmentacji chromosomalnego DNA. Nie worticować!
  - ⚠ Po dodaniu Lysis Buffer próbka powinna być całkowicie klarowna, w przeciwnym razie należy inkubować próbkę w temp. pokojowej 1–2 min. Nie należy inkubować próbki dłużej niż 5 minut w celu uniknięcia uszkodzenia superzwinętej formy CCC plazmidu.

3. Dodać 350  $\mu$ l buforu neutralizującego **Neutralization Buffer** i delikatnie wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie probówki.
  - Δ Należy delikatnie mieszać próbkę. Nie worteksować!
  - Δ Zmętnienie roztworu lub wytrącenie białego osadu jest efektem precypitacji białek i chromosomalnego DNA.
4. Wirować 10 min przy 10-12 tys. rpm (11-15 tys. x g).
5. Nie naruszając osadu ostrożnie przenieść supernatant do minikolumny ze złożem, umieszczonej w probówce odbierającej i wirować 1 min przy 10-12 tys. rpm (11-15 tys. x g).
  - Δ Należy uważać, aby przenieść do minikolumny jedynie supernatant zawierający plazmidowe DNA i nie naruszyć osadu zawierającego chromosomalne DNA i pozostałości komórkowe.
6. Przenieść minikolumnę do nowej probówki odbierającej (2 ml).
7. Dodać do minikolumny 600  $\mu$ l buforu płuczącego **Wash Buffer** i wirować przez 30 s przy 10-12 tys. rpm (11-15 tys. x g).
8. Wylać przesącz z probówki odbierającej i umieścić w niej ponownie minikolumnę.
9. Powtórzyć pkt. 7. i 8. Protokołu izolacji.
10. Wirować 2 min przy 12-14 tys. rpm (15-21 tys. x g).
  - Δ Etap „wirowania na sucho” ma na celu całkowite usunięcie resztek etanolu, który może powodować inhibicję niektórych reakcji enzymatycznych.
11. Ostrożnie wyjąć suchą minikolumnę z probówki odbierającej i umieścić ją w jałowej probówce 1,5 ml typu Eppendorf.
12. Nanieść 60  $\mu$ l **Elution Buffer** uprzednio ogrzanego do 70° C centralnie na złożę w minikolumnie.
13. Inkubować minikolumnę z buforem przez 2 min w temp. pokojowej.
14. Wirować 1 min przy 10-12 tys. rpm (11-15 tys. x g)
15. Minikolumnę usunąć, a wyizolowane DNA przechowywać w +4° C lub -20° C do czasu dalszych analiz.

## B. PRZYGOTOWANIE 1% ŻELI AGAROZOWYCH

### UWAGA!!!

Wszystkie operacje należy wykonywać w rękawiczkach nitylowych, stanowiących ochronę przed bromkiem etydyny (czynnik rakotwórczy).

1. Należy przygotować 1x stężony bufor TAE poprzez 50-krotne rozcieńczenie buforu 50x TAE. Na przykład dla przygotowania 1000 ml buforu 1x TAE należy do naczynia o odpowiedniej wielkości nalać 20 ml 50x TAE i 980 ml wody.
2. Następnie 0,5 g agarozy należy rozpuścić w 50 ml buforu 1x TAE. Do kolbki wsypujemy odmierzoną ilość agarozy, zalewamy buforem 1x TAE, i następnie podgrzewamy w mikrofalówce lub nad palnikiem laboratoryjnym. Gdy roztwór zacznie wrzeć, należy zamieszać kolbką i sprawdzić, czy agarozą rozpuściła się całkowicie (roztwór powinien być klarowny).

3. Po schłodzeniu roztworu żelu do temp. około 70°C należy dodać 5 µl roztworu bromku etydyny o stężeniu 1 mg/ml i dokładnie zamieszać.
4. Wylać zawartość kolbki do tacki do wylewania żeli z osadzonym odpowiednio grzebieniem lub grzebieniami. Należy zwrócić uwagę, aby w żelu nie było pęcherzyków powietrza (można je usunąć np. przy pomocy tipsa). Gdy żel jest za bardzo schłodzony i zaczyna polimeryzować w kolbce, należy rozpuścić go ponownie.
5. Po zastygnięciu żelu należy wyjąć grzebienie w taki sposób, aby nie uszkodzić studzienek. Wstawić żel do komory aparatu do elektroforezy poziomej i załać buforem 1x TAE, aby całkowicie wypełnił komory elektrodowe i pokrył powierzchnię żelu.

### C. ELEKTROFOREZA AGAROWAZOWA PLAZMIDOWEGO DNA.

Po zakończeniu izolacji plazmidowego DNA należy nanieść odpowiednie próbki do studzienek w żelu agarowym. Można to zrobić wg poniższej tabeli:

Nr studzienki	Nazwa próbki	Ilość próbki	Ilość barwnika 6x Green
1	Plazmid kontrolny A	5 µl	1 µl
2	Wyizolowany plazmid A (StudentI)	10 µl	2 µl
3	Wyizolowany plazmid B (StudentI)	10 µl	2 µl
4	Wyizolowany plazmid A (StudentII)	10 µl	2 µl
5	Wyizolowany plazmid B (StudentII)	10 µl	2 µl
6	Wyizolowany plazmid A (StudentIII)	10 µl	2 µl
7	Wyizolowany plazmid B (StudentIII)	10 µl	2 µl
8	Wyizolowany plazmid A (StudentIV)	10 µl	2 µl
9	Wyizolowany plazmid B (StudentIV)	10 µl	2 µl
10	Plazmid kontrolny B	5 µl	1 µl

- Rozdział elektroforetyczny należy prowadzić przez 0,5-1 h, przy napięciu 7-10 V/cm długości żelu (80-110 V).
- Należy zwrócić uwagę, aby odpowiednio podłączyć elektrody do zasilacza. DNA migruje od elektrody (-) do elektrody (+). Bromek etydyny migruje w odwrotnym kierunku, dlatego podczas długiego czasu prowadzenia elektroforezy zaczyna wychodzić z żelu, w konsekwencji czego dolna część żelu przestaje świecić i w tej części prążki DNA są coraz mniej widoczne.
- Małe fragmenty DNA poruszają się szybciej niż większe, których ruch jest silnie hamowany przez plątanie włókien agarozy tworzących żel. Szybkość z jaką przesuwa się w żelu cząsteczka DNA jest odwrotnie proporcjonalna do jej masy cząsteczkowej. Dodany barwnik (najczęściej bromek etydyny) także migruje i jego ruch pozwala na śledzenie przebiegu elektroforezy. Barwnik ten, po związaniu z DNA fluoryzuje w świetle UV.
- Po zakończonej elektroforezie żel należy analizować w świetle UV transiluminatora.

#### 4. WSTĘP TEORETYCZNY

Plazmidy są to autonomiczne, pozachromosomowe elementy genetyczne występujące (zwykle w postaci kolistych lub rzadziej liniowych cząsteczek DNA) u bardzo wielu organizmów prokariotycznych oraz u niektórych eukariotów.

Ich najbardziej charakterystyczną cechą jest fizyczna odrębność od chromosomu gospodarza oraz zdolność do trwałego utrzymywania się (ang. maintenance) w komórce i replikowania się w niej w kontrolowany sposób.

Większość plazmidów to kolisty cząsteczki dwuniciowego DNA tworzące strukturę tzw. CCC-DNA (ang. covalently closed circle), która wykazuje negatywne superskręcenie (wyjątkiem są plazmidy izolowane z hypertermofilnych Archaea, u których udokumentowano pozytywne superskręcenie cząsteczek DNA plazmidowego, co jak się wydaje jest jednym z elementów ich przystosowania do funkcjonowania w temperaturach powyżej 100°C).

Nie wszystkie jednak plazmidy są kolisty, pierwsze liniowe plazmidy wykryto na początku lat 80. u drożdży *Kluyveromyces lactis*, a wkrótce także u bakterii, np. u przedstawicieli rodzajów *Streptomyces*, *Borrelia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*. Widoczne czasem w preparatach mikroskopii elektronowej lub w obrazach elektroforetycznych, formy OC i liniowe towarzyszące klasycznej postaci CCC-DNA, są najczęściej wynikiem przekształceń formy CCC w wyniku zerwania (pęknięcia) jednego lub dwóch naprzeciwległych wiązań fosfodiesterowych w cząsteczce kolistej.

Wielkość plazmidów jest bardzo zróżnicowana i zawiera się w granicach od około 1000 pz (1 kpz) do nawet około 1,7 Mpz. Najmniejsze plazmidy, o wielkości nieznacznie przekraczającej 1 kpz, zidentyfikowano w *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* spp. i *Helicobacter pylori* (kompletne sekwencje tych plazmidów znajdują się w bazie danych NCBI). Z kolei plazmidy o górnej granicy podanej wielkości, zwane megaplazmidami, zostały zidentyfikowane wśród przedstawicieli *Rhizobium* i są to często plazmidy odpowiedzialne za proces symbiotycznego wiązania azotu przez gospodarza. Dolna wartość wielkości plazmidu wyznaczana jest minimalną ilością informacji genetycznej potrzebnej do kodowania funkcji absolutnie niezbędnych do jego powielenia (replikacji), nie pozostawiając praktycznie miejsca na kodowanie żadnych dodatkowych cech fenotypowych.

Znając wielkość plazmidu łatwo jest w przybliżeniu oszacować ile średniej wielkości białek może być kodowanych przez jego genom, czyli określić tzw. teoretyczną pojemność kodującą plazmidu (przyjmujemy, że gen kodujący średniej wielkości białko, ok. 30 kDa, zajmuje 1 kpz). Takie szacunki dają nam wyobrażenie jaki procent całkowitej, niesionej przez komórkę informacji genetycznej, „przypada” na informację niesioną przez plazmid. Wartość ta dla modelowego układu: komórka *E. coli* niosąca plazmid F (czyli szczep F+) wynosi ok. 2%, ale może osiągać wartości nawet do kilkudziesięciu procent w przypadku bardzo dużych lub wysokokopijnych plazmidów.

Wykrywanie plazmidów poprzez stwierdzenie fizycznej obecności DNA plazmidowego w puli totalnego DNA komórkowego następuje w kilku etapach, z których każdy może być realizowany wieloma sposobami. Pierwszy etap to łagodna liza hodowli bakteryjnej w wyniku której otrzymujemy tzw. surowy lizat, z którego następnie usuwamy możliwie dużo DNA chromosomowego, aby DNA plazmidowy, stanowiący zwykle niewielki procent całkowitego DNA był łatwiejszy do uwidocznienia. Większość obecnie stosowanych metod opiera się na klasycznej metodzie tzw. lizy alkalicznej, w której krytycznym momentem jest przeprowadzenie lizy komórek przy użyciu lizozymu i SDS-u przy pH 12,5. W tym etapie następuje także fragmentacja i denaturacja DNA chromosomowego, podczas gdy znacznie mniejsze cząsteczki DNA plazmidowego zachowują swą strukturę i po zwirowaniu masy DNA chromosomowego i pozostałych elementów wielocząsteczkowych mogą być odzyskane z supernatantu.

Powszechnie stosowana do celów identyfikacyjnych jest wersja powyższej metody zwana potocznie „mini-lizą alkaliczną”. Analizujemy wtedy niewielką objętość hodowli (1,5 ml), a analizę lizatu, po wstępnym oczyszczeniu, prowadzimy metodą elektroforezy w żelu agarozowym, która pozwala nam uwidocznić obecne w lizacie plazmidy, a także określić ich liczbę i przybliżoną wielkość. Głównym ograniczeniem tej metody jest jej przydatność do identyfikacji jedynie niezbyt dużych plazmidów kolistych (takich jednak jest większość). Duże plazmidy (ponad 100 kbp) mogą nie być w tych warunkach wykrywane, gdyż podczas preparatyki ulegają łatwo mechanicznemu uszkodzeniu, a ich DNA przechodzi do frakcji DNA liniowego. Identyfikacja dużych plazmidów możliwa jest przy zastosowaniu metod, w których liza komórek przeprowadzana jest bezpośrednio w żelu agarozowym, co minimalizuje niekontrolowane uszkodzanie ich cząsteczek lub przy zastosowaniu analizy elektroforetycznej typu PFGE (ang. pulsed field gel electrophoresis), przystosowanej do analizy dużych cząsteczek DNA. Także plazmidy liniowe nie są w warunkach lizy alkalicznej wykrywane, gdyż ulegają, podobnie jak liniowe fragmenty chromosomu, nieodwracalnej denaturacji. W przypadku plazmidów liniowych wymagane jest przeprowadzanie preparatyki w warunkach neutralnych (niedenaturujących).

Obecnie wiele firm biotechnologicznych oferuje gotowe zestawy do izolacji DNA plazmidowego; zwykle opierają się one na klasycznej metodzie lizy alkalicznej, lecz dzięki zastosowaniu różnego typu ułatwień technicznych, znacznie upraszczają i przyspieszają procedurę, a także dostarczają preparat DNA plazmidowego o wysokim stopniu czystości.

Aby jednak preparat taki charakteryzował się stopniem czystości odpowiednim do przeprowadzania jego dalszej charakterystyki molekularnej, należy zastosować procedury usuwające z preparatu pozostałości DNA chromosomowego, towarzyszące białka, RNA, potencjalne inhibitory reakcji enzymatycznych itp.

Techniką powszechnie stosowaną do otrzymywania dużych ilości czystego DNA plazmidowego była przez lata procedura ultrawirowania w gradiencie gęstości chlorku cezu z bromkiem etydylnym, w której separacja DNA plazmidowego od

chromosomowego opiera się na zróżnicowaniu i stopniu inkorporacji bromu etydyny (CsCl+EtBr) przez koliste plazmidowe formy, formy OC i liniowe chromosomowe (po celowej fragmentacji natywnych chromosomów) cząsteczki DNA, co prowadzi do zróżnicowania ich gęstości pławnej umożliwiającej rozdział w gradiencie. Obecnie, opisana technika ultra wirowania jako dość pracochłonna, długotrwała i droga, ustępuje w popularności stosowaniu korzystaniu z licznych komercyjnych zestawów do oczyszczania DNA. Dysponując czystym preparatem DNA plazmidowego możemy zaplanować zgodną z naszymi potrzebami jego dalszą charakterystykę.

### wielkość plazmidu

Określić ją możemy poprzez: (A) porównanie tempa migracji w żelu agarozowym naturalnej formy badanego plazmidu z tempem migracji wzorcowych plazmidów o znanej wielkości; (B) zsumowanie wielkości liniowych fragmentów restrykcyjnych otrzymanych po trawieniu DNA plazmidu jednym lub kilkoma enzymami restrykcyjnymi, (C) zmierzenie tzw. długości konturowej plazmidu z użyciem mikroskopii elektronowej i przyrównanie do obecnej w tym samym preparacie cząsteczki DNA o znanej długości, (D) zsekwencjonowanie całej cząsteczki DNA plazmidu. Ostatnią metodą uzyskujemy najdokładniejszy wynik, jednak niezbyt często kompletne sekwencjonowanie jest uzasadnione na etapie wstępnej charakterystyki plazmidu.

### analiza restrykcyjna

Przeprowadzając analizę restrykcyjną DNA plazmidowego z wykorzystaniem kilku enzymów restrykcyjnych możemy skonstruować mapę restrykcyjną, będącą unikatowym opisem tegoż plazmidu. Mapa taka jest niezmiernie przydatna w planowaniu bardziej szczegółowej analizy molekularnej plazmidu (np. w identyfikacji modułów strukturalnych i funkcjonalnych).

### liczba kopii

Każdy plazmid, w swoim naturalnym gospodarzu, występuje w określonej, charakterystycznej dla siebie liczbie kopii. Mówimy o plazmidach (A) jednokopijnych (np. plazmid F), kiedy to na komórkę, a precyzyjnie mówiąc na jeden ekwiwalent chromosomu przypada jedna cząsteczka plazmidu, (B) niskokopijnych, gdy liczba kopii plazmidu określana w analogiczny sposób wynosi 3–8 cząsteczek (np. pSC101) lub (C) wysokokopijnych (np. ColE1), dla którego typowa liczba kopii wynosi 15–20, lub R6K z liczbą kopii około 30.

Plazmid w innym gospodarzu może występować w innej liczbie kopii, a ponadto w warunkach laboratoryjnych jesteśmy w stanie zaburzać systemy regulujące replikację chromosomu i plazmidu doprowadzając do nagromadzenia się w komórce nawet kilkuset kopii plazmidu (np. amplifikacja plazmidów typu ColE1 poprzez hodowanie gospodarza w obecności chloramfenikolu). Celowo „zwiększana jest też „kopijność” niektórych wektorów plazmidowych, co ma znaczenie przy maksymalizacji odzyskania ilości klonowanego w takim wektorze egzogenego DNA.

## Literatura

- Kur. J., Podstawy Inżynierii Genetycznej, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2004.
- Couturier M., Bex F., Beergquist P. L., Mass W. K., Identification And Classification Of Bacterial Plasmids. *Microbiol. Rev.* 52, 375–395 (1988).
- Datta N., Plasmid Classification: Incompatibility Grouping. [W:] *Plasmid Of Medical, Environmental And Commercial Importance*. Elseviers/North Holland Publishing Co., Amsterdam, 3–12 (1979).
- Smalla K., Osborn M., Wellington E.M.H., Isolation And Characterization Of Plasmids From Bacteria. [W:] *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids And Gene Spread*. Harwood Academic Reading, Uk, 207–248 (2000).
- Summers D., *The Biology Of Plasmids*. Blackwell Science (1996).