

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

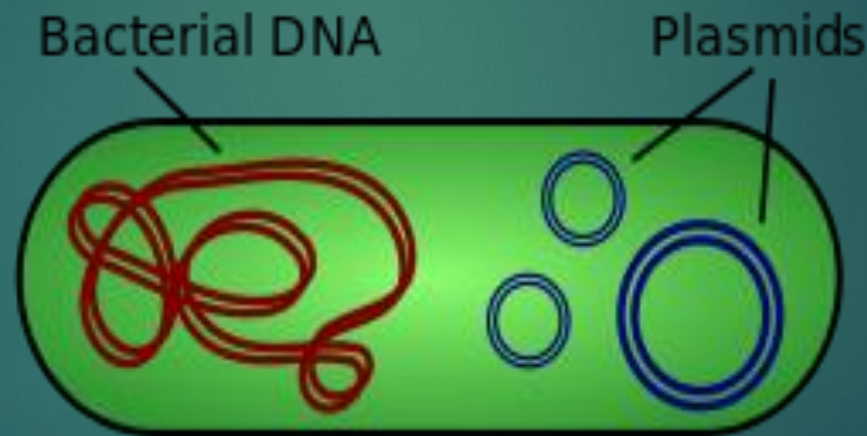


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

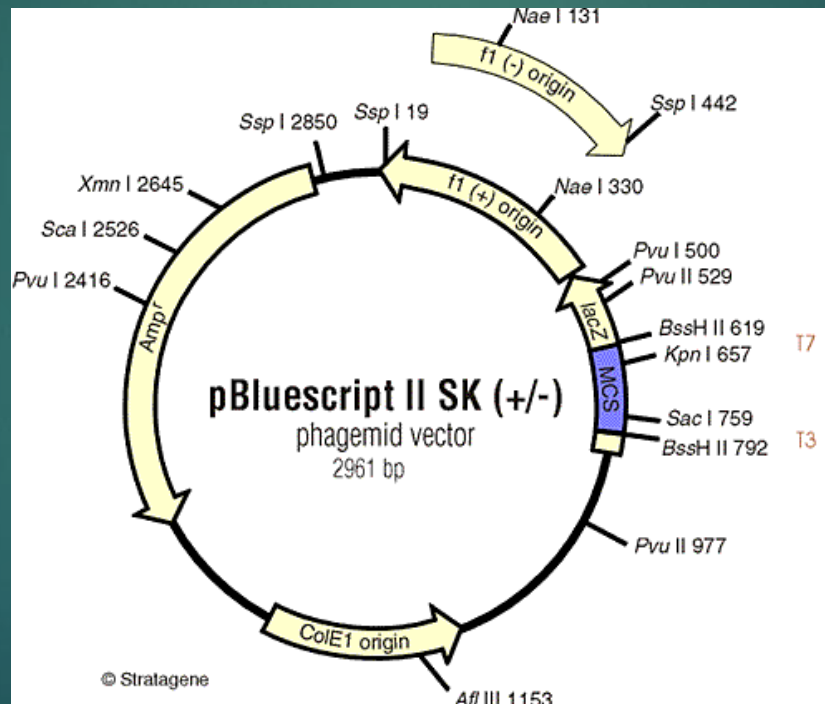
- ▶ Εκτός από το χρωμοσωμικό DNA, στα περισσότερα βακτήρια, αλλά και σε ορισμένα αρχαία και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία, τα **πλασμίδια**.



ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

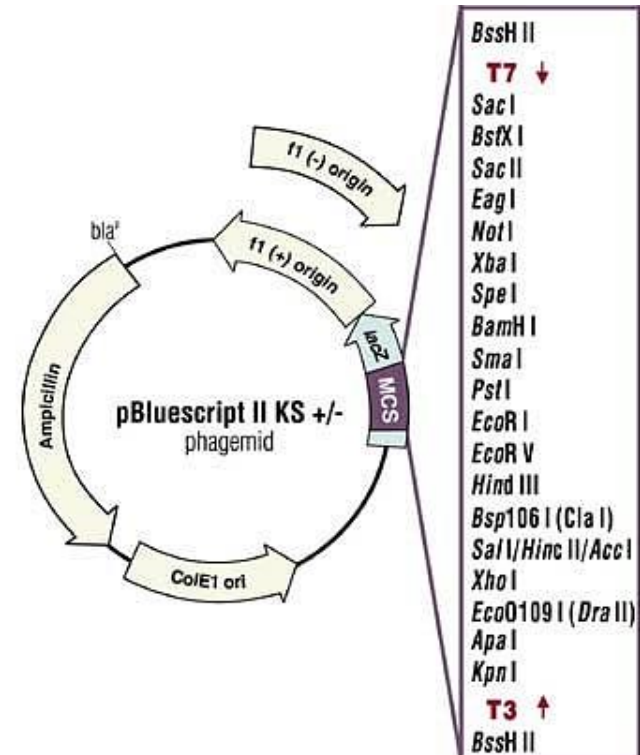
- ▶ Πρόκειται για δίκλινα κυκλικά μόρια DNA.
- ▶ Είναι συνήθως μικρότερα από το χρωμοσωμικό DNA.
- ▶ Περιέχουν στην αλληλουχία τους, πληροφορίες που ρυθμίζουν τον διπλασιασμό τους και το διαχωρισμός του στα νέα βακτήρια που προκύπτουν μετά την κυτταρική διαίρεση.
- ▶ Κάποια πλασμίδια περιέχουν γονίδια και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες που ελέγχουν την μεταφορά τους από ένα βακτήριο σε ένα άλλο.
- ▶ Μπορούν να περιέχουν γονίδια που σχετίζονται με την παθογόνο δράση των βακτηρίων πχ η παραγωγή βακτηριακών τοξινών
- ▶ Μπορούν να περιέχουν ένα ή περισσότερα γονίδια που παράγουν πρωτεϊνικά προϊόντα τα οποία προστατεύουν τα βακτήρια από τη δράση αντιβιοτικών ή και τοξινών.

- ▶ Τα πλασμίδια αποτελούν χρήσιμο εργαλείο στις διάφορες τεχνικές κλωνοποίησης που χρησιμοποιούνται στα πειράματα γενετικής μηχανικής.
- ▶ τα **συνθετικά πλασμίδια** που χρησιμοποιούνται έχουν υποστεί γενετικές τροποποιήσεις στην αλληλουχία τους, που τους προσδίδουν χρήσιμες ιδιότητες που φυσιολογικά δεν είχαν.

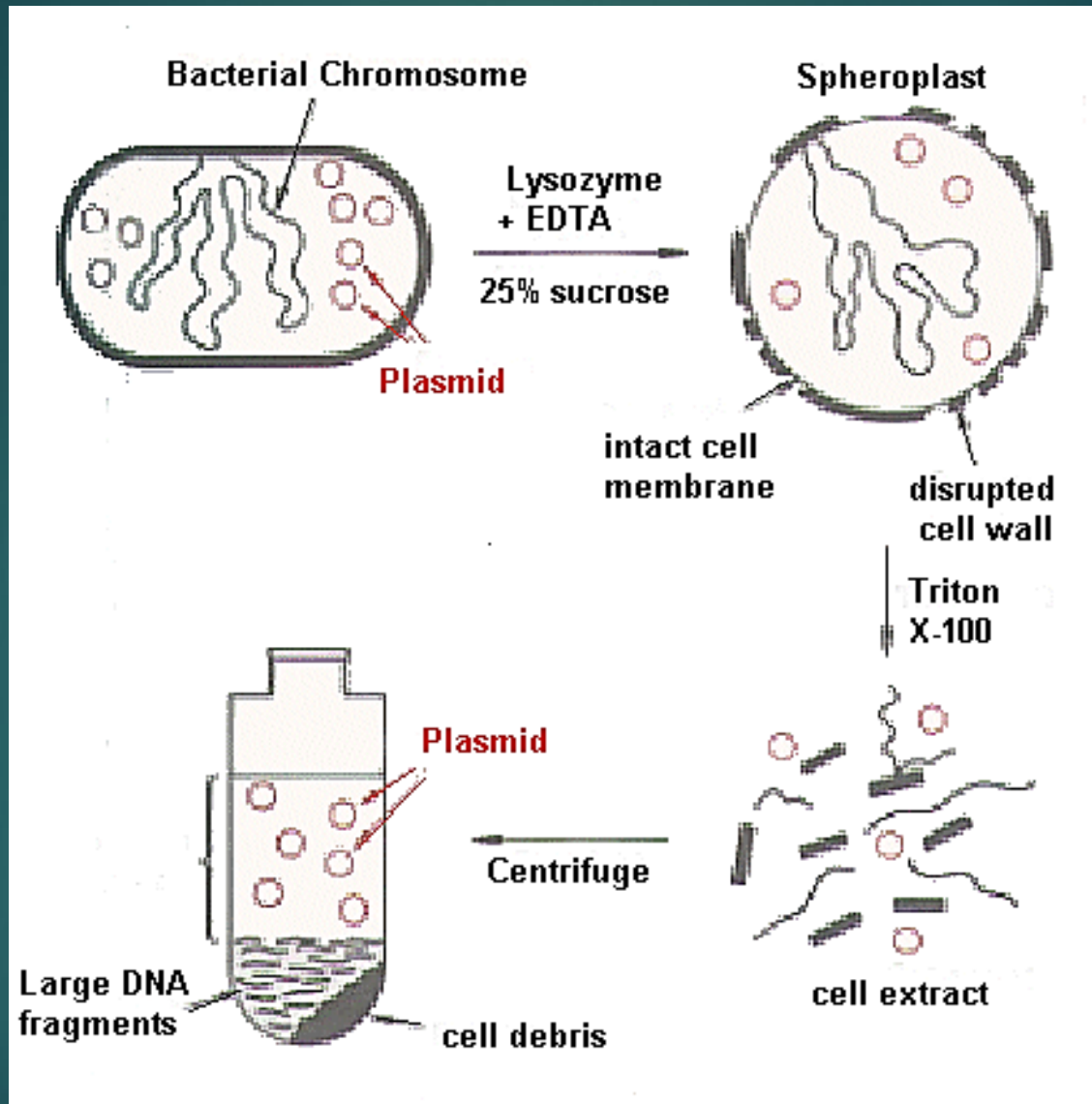


Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pBluescript (Πηγή: Stratagene).

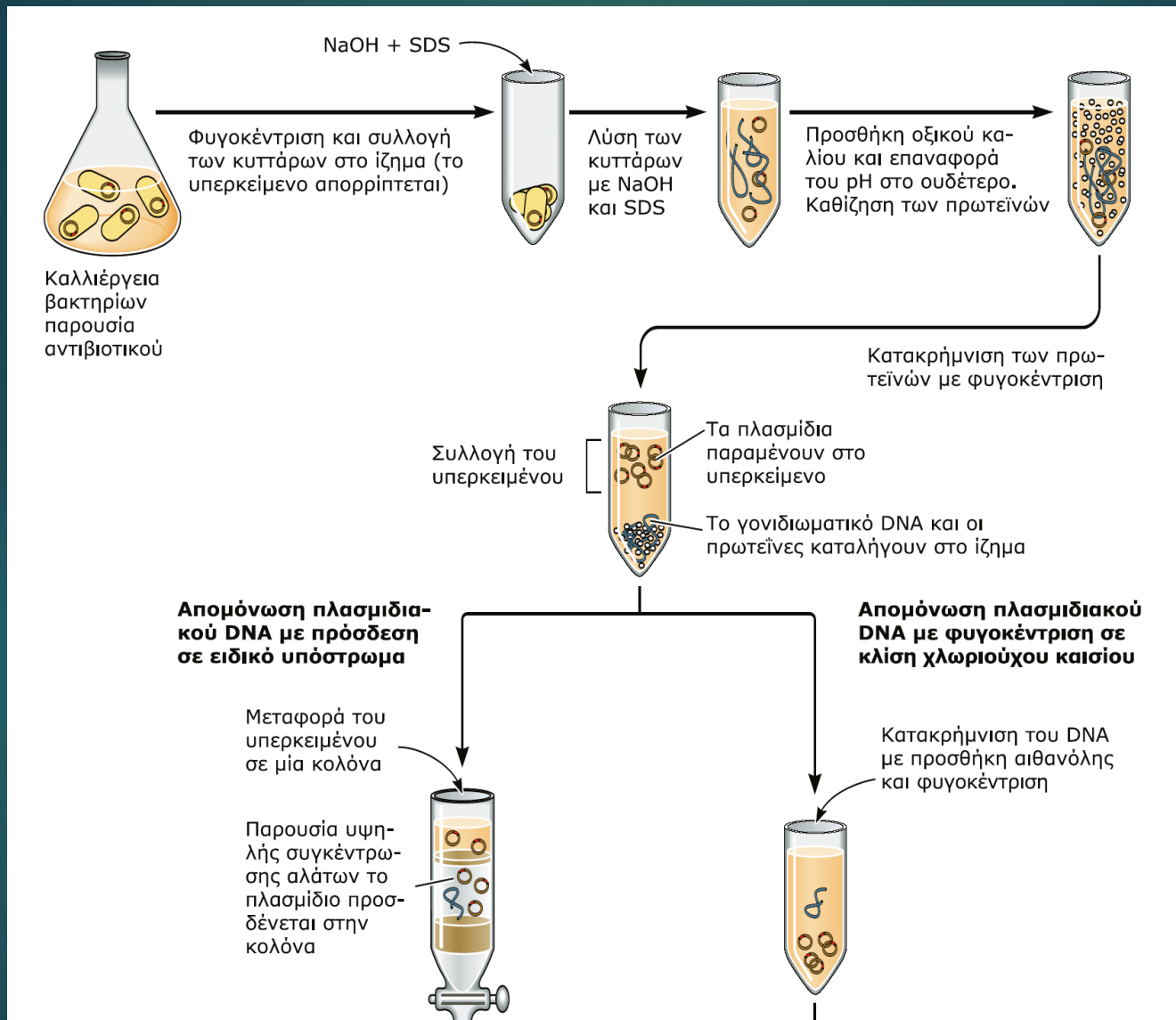
- ▶ Η θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS) περιέχει τις αλληλουχίες αναγνώρισης πολλών διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων, για την διευκόλυνση των κλωνοποιήσεων.
- ▶ Το πλασμίδιο περιέχει γονίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη,
- ▶ καθώς και το γονίδιο *lacZ* το οποίο κωδικεύει την παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση.

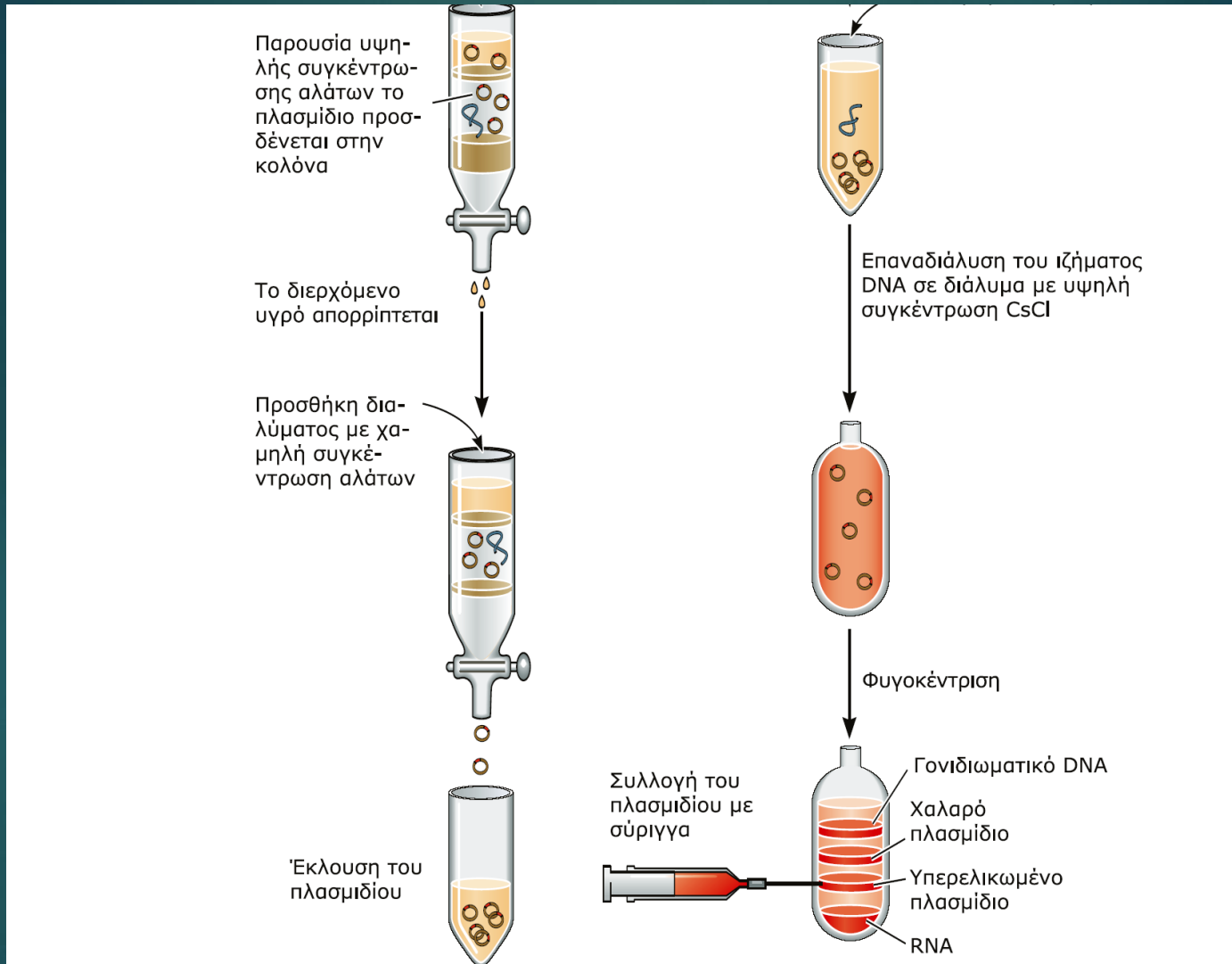


ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA



Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από *Escherichia coli*.





Πειραματικό μέρος

Όργανα – Υλικά

- ▶ Καλλιέργεια *E. coli*
- ▶ Αυτόματες μικροπιπέττες ακριβείας (20-200 μl , 100-1000 μl)
- ▶ Σωληνάκια erpendorf
- ▶ Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- ▶ Ακροφύσια (tips) διαφόρων ποσοτήτων
- ▶ Υδατόλουτρο 65°C
- ▶ Υδατόλουτρο 37°C
- ▶ Γάντια

Διαλύματα

- ▶ **Διάλυμα I:** T.E. pH 8.0
- ▶ **Διάλυμα II:** 0.2 N NaOH (freshly diluted from a 10 N stock) , 1% SDS
- ▶ **Διάλυμα III:** 5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml , H₂O 28.5 ml
- ▶ Χλωροφόρμιο Ισοαμυλική
- ▶ Αιθανόλη απόλυτη
- ▶ Αιθανόλη 70%
- ▶ Διάλυμα TE ή SDW (Sterile Distilled Water)

Ρόλος διαλυμάτων

I) Διάλυμα I: T.E.

- ▶ 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
- ▶ 10mM EDTA

II) Διάλυμα αλκαλικής λύσης :

- ▶ 0.2 N NaOH (freshly diluted from a 10 N stock)
- ▶ 1% SDS

Οι αλκαλικές συνθήκες επιδρούν και στη δομή του DNA, αποδιατάσσοντάς το. Επειδή το χρωμοσωματικό DNA είναι πολύ μεγάλο σε μέγεθος, όταν λύονται τα κύτταρα, σπάει, ενώ **το μικρού μεγέθους πλασμιδιακό DNA παραμένει ανέπαφο**. Επίσης, όταν τα πλασμίδια αποδιατάσσονται οι δύο κλώνοι παραμένονν συνδεδεμένοι (όπως οι κρίκοι μιας αλυσίδας).

III) Διάλυμα Οξικού καλίου

- ▶ 5 M Οξικό κάλιο (potassium acetate)
- ▶ glacial acetic acid
- ▶ H₂O

Οι υδρογονοδεσμοί επανασχηματίζονται.

Οι πλασμιδιακές αλυσίδες DNA βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, λόγω της σύνδεσης τους, οπότε οι βάσεις θα ζευγαρώσουν πολύ γρήγορα και θα σχηματίσουν ένα δίκλωνο πλασμίδιο.

Οι χρωμοσωματικοί όμως κλώνοι δεν βρίσκονται κοντά στους συμπληρωματικούς τους και για αυτό όταν το διάλυμα εξουδετερωθεί, δεν θα ζευγαρώσουν σ' ολόκληρο το μήκος του, αλλά κατά τμήματα.

Η μεγάλη συγκέντρωση άλατος (εξ αιτίας της προσθήκης του οξικού καλίου) προκαλεί τη δημιουργία ιζήματος, το οποίο κατακρημνίζεται. Αυτό το πλέγμα SDS-πρωτεϊνών παγιδεύει το χρωμοσωματικό DNA και στη συνέχεια απομακρύνεται με τη φυγοκέντρηση.

Πειραματική Διαδικασία

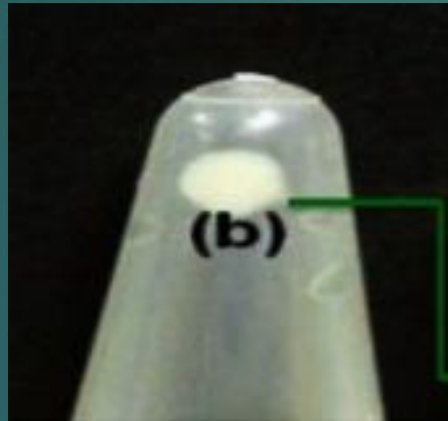
Προσοχή: Γάντια απαιτούνται καθ' όλη τη διάρκεια της άσκησης γιατί το χλωροφόρμιο είναι τοξική ουσία.

1. Τοποθετούμε 1.5ml βακτηριακής καλλιέργειας σε σωληνάριο Eppendorf και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση σε maximum στροφές/λεπτό για 1 min.
2. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με πιπέτα.
3. Προσθέτουμε 100 μl Διάλυμα I και αναδεύουμε δυνατά με το ειδικό όργανο ανάδευσης (vortex), μέχρι να πετύχουμε πλήρη επαναδιάλυση.




4. Προσθέτουμε 200 ml **Διάλυμα II**. Κλείνουμε το σωληνάριο και αναδεύουμε πέντε φορές με το χέρι (δεν χρησιμοποιούμε vortex).
5. Επωάζουμε στον **πάγο για 5 λεπτά**.
6. Προσθέτουμε 150 ml **Διάλυμα III**. Αναδεύουμε με το χέρι για 10-20 δευτερόλεπτα.
7. Επωάζουμε **στον πάγο για 5-15 λεπτά**.
8. Πραγματοποιούμε φυγοκέντρωση σε maximum στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε φρέσκο σωληνάριο.
9. Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου. Αναδεύουμε με τη χρησιμοποίηση της συσκευής vortex και πραγματοποιούμε φυγοκέντρωση σε maximum στροφές/λεπτό για 10 λεπτά.

8. Προσθέτουμε 700μl παγωμένης αιθανόλης ή ισοπροπανόλης (περίπου τριπλάσιο όγκο).
9. Επωάζουμε για 20 λεπτά στους -20°C .
Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά maximum στροφές/λεπτό στους 4°C .
9. Το DNA θα πρέπει να εμφανιστεί με τη μορφή λευκού ιζήματος στον πυθμένα του σωλήνα.

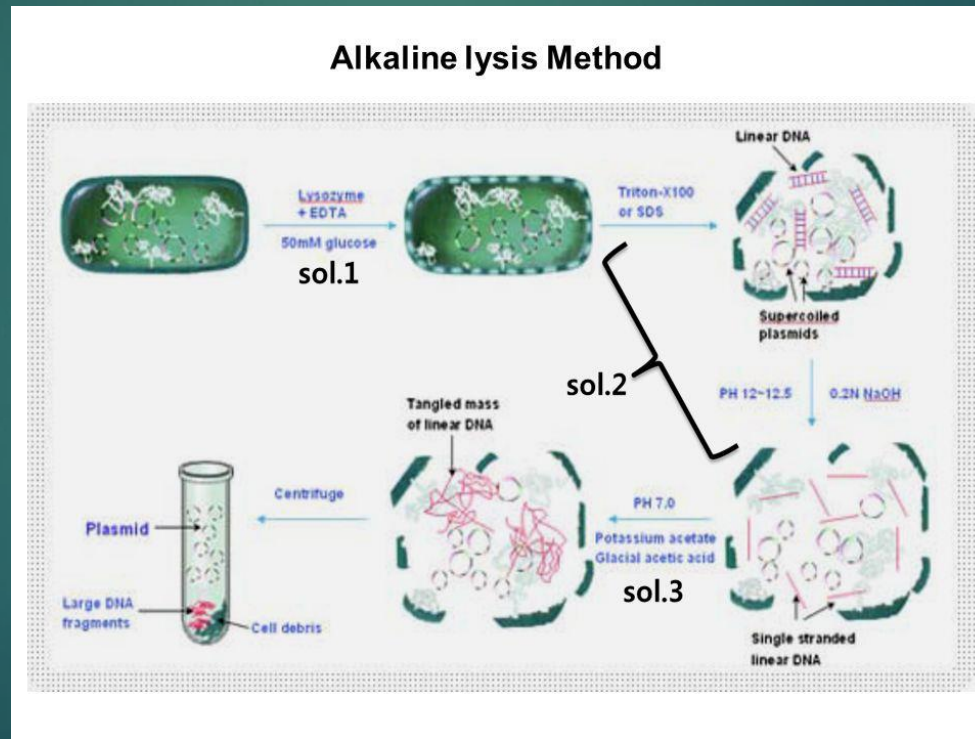


DNA ίζημα (pellet)

- 
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και «ξεπλένουμε» το DNA σε 200μl 70% αιθανόλη.
 10. Φυγοκεντρούμε σε maximum στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
 11. Ξηραίνουμε το DNA στο ειδικό δοχείο κενού για 2-3 λεπτά και το διαλύουμε ανάλογα με την ποσότητά του σε:
 - TE διάλυμα (περίπου 50-100 μl), αν πρόκειται να αποθηκευτεί στους -30°C για μεγάλο χρονικό διάστημα
 - Αποστειρωμένο νερό (περίπου 50-100 μl) αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σύντομα για περαιτέρω ανάλυση

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=8xEDEJ0DHFA>



Βιβλιογραφία

1. Andreou L.V. (2013). Isolation of Plasmid DNA from Bacteria. *Methods in Enzymology*, Vol. 529. Elsevier Inc. pp. 135-142.
2. Holmes D. S., Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114, 193–197.
3. Holmes R.K., Jobling M.G. (1996). “Medical Microbiology”. University of Texas Medical Branch at Galveston. Galveston, Texas. ISBN-10: 0-9631172-1.1.
4. Singer M., Berg P. (1991). “Genes and Genomes”. University Science Books. Mill Valley, California. ISBN 0-632-02879-3.