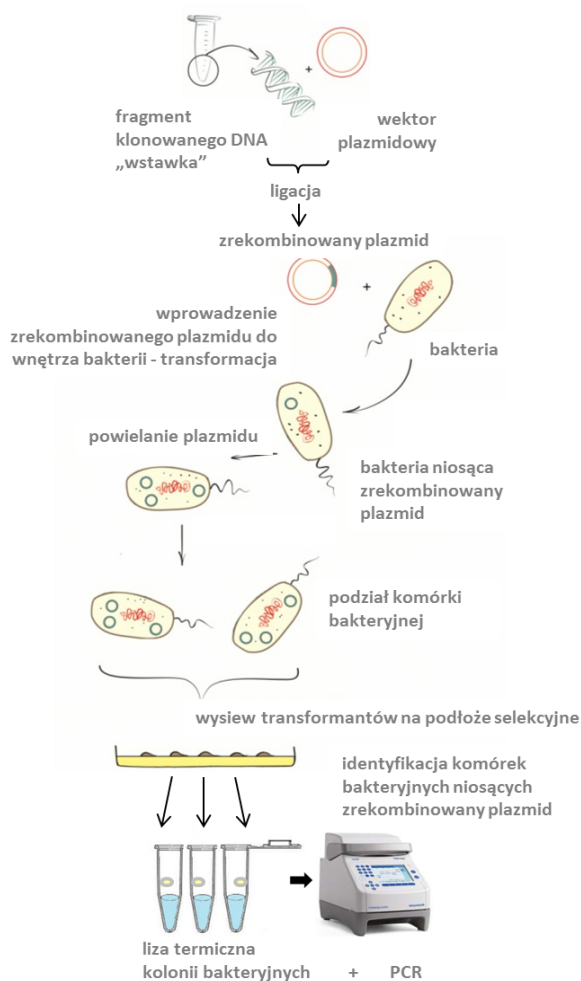


Ćwiczenia 2-4

KLONOWANIE DNA

Klonowanie DNA – jest podstawową techniką biologii molekularnej umożliwiającą powielenie określonego fragmentu DNA (najczęściej genu) w komórkach gospodarza np. bakteriach *Escherichia coli*, przy zastosowaniu odpowiedniego wektora. Proces ten polega na połączeniu cząsteczki wektora z badanym fragmentem DNA tzw. „wstawką” i wprowadzeniu takiej zrekombinowanej cząsteczki DNA do organizmu, w którym ulegnie ona powieleniu. Technikę tę stosuje się m.in. w celu zwiększenia liczby kopii klonowanego fragmentu DNA w komórce, w celu uruchomienia produkcji kodowanego przez ten gen białka, czy też w celu przeprowadzenia ukierunkowanej mutagenyzy.

Celem ćwiczeń 2-4 jest przeprowadzenie klonowania DNA z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej w warunkach laboratoryjnych. Ćwiczenia będą obejmowały konstrukcję zrekombinowanej cząsteczki DNA, jej wprowadzenie i powielenie w komórkach bakteryjnych oraz analizę otrzymanych klonów (**Ryc. 1**).



ĆWICZENIE NR 2

Przygotowanie „wstawki” oraz wektora w celu skonstruowania zrekombinowanej cząsteczki DNA

- trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi
- elektroforeza DNA w żelu agarozowym
- izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego z wykorzystaniem minikolumn ze złożem krzemionkowym

ĆWICZENIE NR 3

Otrzymanie zrekombinowanej cząsteczki DNA i wprowadzenie jej do komórki bakteryjnej

- pomiar stężenia DNA metodą fluorymetryczną
- ligacja
- transformacja

ĆWICZENIE NR 4

Analiza transformantów pod kątem obecności zrekombinowanej cząsteczki DNA

- liza kom. bakteryjnych pod wpływem wysokiej temp.
- łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)
- elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Ryc. 1 Schemat przebiegu doświadczeń realizowanych w ramach ćwiczeń 2-4 (zmodyfikowany z <http://www.e-biotechnologia.pl>).

Ćwiczenie 2 (23-27. 04. 2018)

Przygotowanie „wstawki” oraz wektora w celu skonstruowania zrekombinowanej cząsteczki DNA

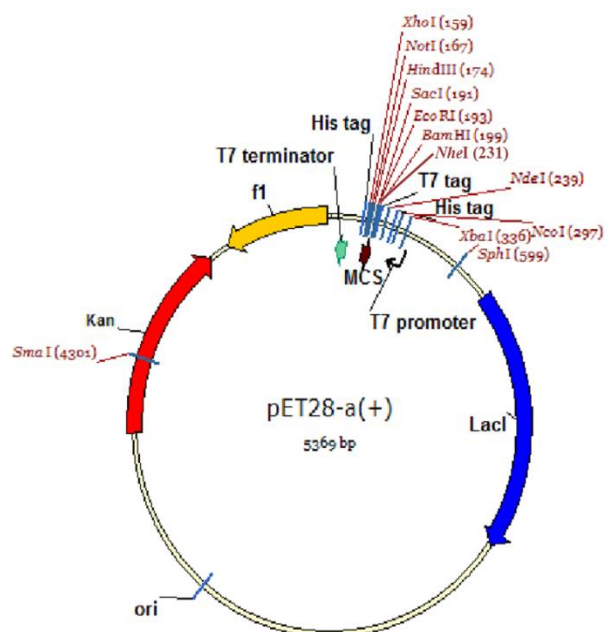
Prowadzący: mgr Aleksandra Dydecka, mgr Agnieszka Necel

2.1 Wstawka (inaczej insert) - fragment DNA, który zamierzamy powielić, pochodzący z dowolnego organizmu i często uzyskiwany przy użyciu techniki PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) czyli łańcuchowej reakcji polimerazy.

Na ćwiczeniach wykorzystywana jest wstawka, którą jest fragment DNA bakteriofaga λ o wielkości 201 pz, obejmujący otwartą ramkę odczytu *orf60a*. Fragment ten został zamplifikowany w reakcji PCR, przy użyciu starterów pF λ 60a oraz pR λ 60a umożliwiającym wprowadzenie miejsc cięcia dla enzymów restrykcyjnych *NheI* i *XhoI* (odpowiednio).

2.2 Wektor genetyczny – to replikująca się autonomicznie (czyli niezależnie od chromosomu gospodarza) cząsteczka DNA, skonstruowana w celu przenoszenia informacji genetycznej. Wektory są podstawowym narzędziem inżynierii genetycznej. Wektorami genetycznymi mogą być plazmidy, sztuczne chromosomy (YAC, BAC) lub wirusy (w tym bakteriofagi). Wyróżnia się wektory ekspresyjne, klonujące i bifunkcyjne (wahadłowe).

Na ćwiczeniach wykorzystywany jest ekspresyjny wektor plazmidowy pET28a posiadający m.in.: MCS (miejsce wielokrotnego klonowania), marker selekcyjny warunkujący oporność na kanamycynę, *origin* replikacji, promotor, miejsce wiązania rybosomu, oraz terminator transkrypcji (**Ryc. 2**). Plazmidowe DNA zostało namnożone w bakteriiach *E. coli* C600 a następnie wyizolowane przy użyciu zestawu kolumnkowego Plasmid Mini firmy A&A Biotechnology i poddane trawieniu enzymami restrykcyjnymi *NheI* oraz *XhoI* (zgodnie z opisem z pkt 2.3). W wyniku trawienia powstały dwa fragmenty wielkości 5296 i 73 pz, które zostały poddane elektroforetycznemu rozdzielowi w 1% żelu agarozowym. (pkt 2.4). Większy fragment DNA został wycięty z żelu i **Ryc. 2** Mapa wektora pET28a oczyszczony zgodnie z opisem z pkt. 2.5.



2.3 Trawienie enzymami restrykcyjnymi typu FastDigest

Enzymy restrykcyjne – (inaczej restryktazy, endonukleazy restrykcyjne, enzymy trawienne) są to białka przecinające wiązania fosfodiesterowe w łańcuchu DNA w taki sposób, że zostawiają grupę fosforanową na końcu 5', zaś grupę hydroksylową na końcu 3'. W wyniku cięcia enzymami restrykcyjnymi, powstają w DNA tępe lub lepkie końce. Tępe końce są efektem nacięcia obu komplementarnych nici w tym samym miejscu, natomiast lepkie końce powstają wskutek nacięcia nici DNA w dwóch różnych miejscach oddalonych od siebie o kilka nukleotydów (**Ryc 3**). Rozróżnia się trzy klasy enzymów restrykcyjnych, z czego największe znaczenie w procesie klonowania DNA mają enzymy zaliczane do klasy II, tj. zdolne do rozpoznawania specyficznych sekwencji w DNA, a także przecinania dwuniciowej cząsteczki DNA w dwóch miejscach w obrębie tej sekwencji, bądź w dokładnie zdefiniowanym miejscu w pewnej odległości od niej. Sekwencje rozpoznawane przez te enzymy są to zazwyczaj sekwencje palindromowe o długości od 4 do 8 pz. Enzymy restrykcyjne są naturalnie obecne w komórkach bakterii i sinic a ich zadaniem jest ochrona komórek gospodarza przed wniknięciem obcego DNA. Nazwy enzymów restrykcyjnych tworzy się od nazw organizmów, z których pochodzą. Literami (lub cyframi arabskimi) oznacza się szczepy bakterii/sinic, a cyframi rzymskimi kolejność izolacji enzymu. Przykładowo restryktaza *NheI* jest pierwszym enzymem wyizolowanym z *Neisseria mucosa heidelbergensis*, a *XhoI* jest pierwszym enzymem wyizolowanym z *Xanthomonas holcicola*.



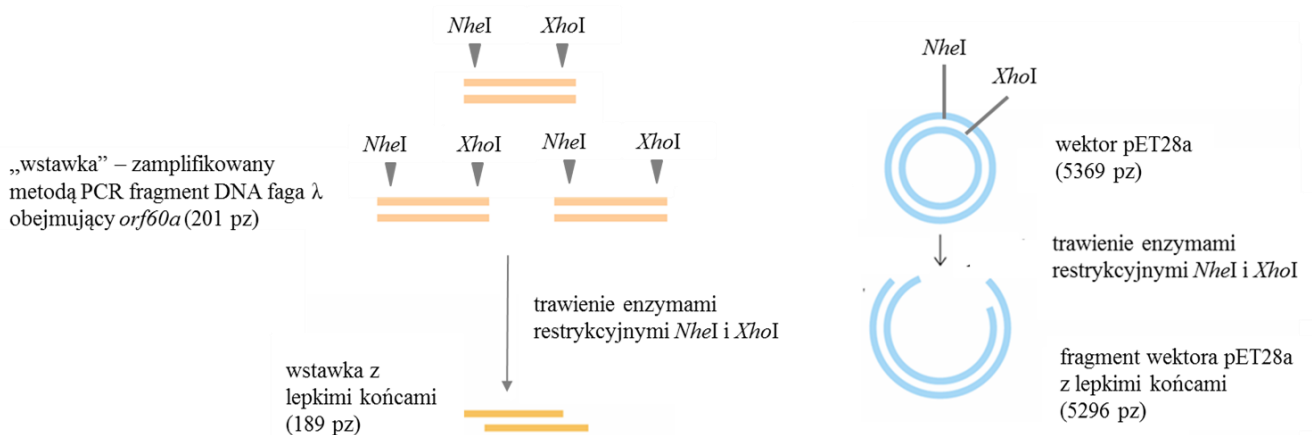
Ryc. 3 Przykłady enzymów dających lepkie (*NheI* i *XhoI*) oraz tępe (*EcoRV*) końce (zmodyfikowany z <https://www.sigmaaldrich.com>)

W przypadku klasycznych enzymów restrykcyjnych, warunki trawienia różnią się dla poszczególnych enzymów i są optymalizowane przez produkujące je firmy (np. New England Biolabs, Thermo Fisher Scientific, Nzytech). Stąd też zalecane jest stosowanie buforu wskazanego przez producenta danego enzymu. Aktywność enzymów restrykcyjnych zależy m.in. od zawartego w buforze stężenia NaCl. W zależności od rodzaju, niektóre enzymy wykazują maksimum swojego działania przy wysokim stężeniu chlorku sodu (np. 150mM), inne natomiast przy niskim. Temperatura reakcji zależy od wybranego enzymu, a jej zakres może być bardzo szeroki tj. od 37°C do nawet 60-65°C. Reakcja trawienia klasycznymi restryktazami wymaga minimum godzinnej inkubacji w określonej temperaturze. Od jakiegoś czasu alternatywą dla klasycznych enzymów restrykcyjnych są enzymy typu FastDigest, które wprowadzono w celu zredukowania czasu potrzebnego na przeprowadzenie reakcji trawienia restrykcyjnego oraz w celu ujednoczenia warunków tej reakcji. Trawienie enzymami FastDigest trwa zaledwie kilka, do kilkunastu minut (5-20 minut) i odbywa się w jednym i tym

samym buforze. Tak szybkie działanie enzymów typu FastDigest to m.in. efekt mutacji wprowadzonych w kodujące je sekwencje.

Cel doświadczenia:

W tym etapie ćwiczenia zastosowane zostaną te same enzymy restrykcyjne typu FastDigest: *NheI* oraz *XhoI*, do pocięcia DNA wektora oraz wstawki (Ryc. 4). Pod wpływem działania enzymów w obu cząsteczkach powstaną komplementarne względem siebie lepkie końce, dzięki którym możliwe będzie połączenie tych dwóch fragmentów w jedną zrekombinowaną cząsteczkę DNA, przy udziale ligazy, podczas ćwiczenia nr 3.



Ryc. 4 Schemat przebiegu trawienia DNA wstawki oraz wektora enzymami *NheI* oraz *XhoI*

Wykonanie:

Każda osoba z grupy przygotowuje własną reakcję trawienia.

1. W tym celu należy pobrać 16 μ l mieszaniny po reakcji PCR wykonanej w celu zamplifikowania fragmentu DNA λ *orf60a* (tj. wstawki) i umieścić w probówce typu Eppendorf o poj. 0,2 ml.
2. Następnie, do próbki dodać 2 μ l buforu do trawienia (10x stężonego NZYSpeedyBuffer Orange).
3. Dodać 1 μ l enzymu *NheI* oraz 1 μ l enzymu *XhoI*.
4. Całość delikatnie przepipetować w razie potrzeby krótko zwirować i inkubować 15 minut w temperaturze 37°C.

Sporządzając mieszaninę reakcyjną, należy pamiętać, że enzymy dodaje się zawsze na końcu i do tego czasu bezwzględnie muszą być trzymane w lodzie. Po zakończeniu pracy, enzymy należy schować do zamrażarki i przechowywać w temperaturze -20°C.

2.4 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

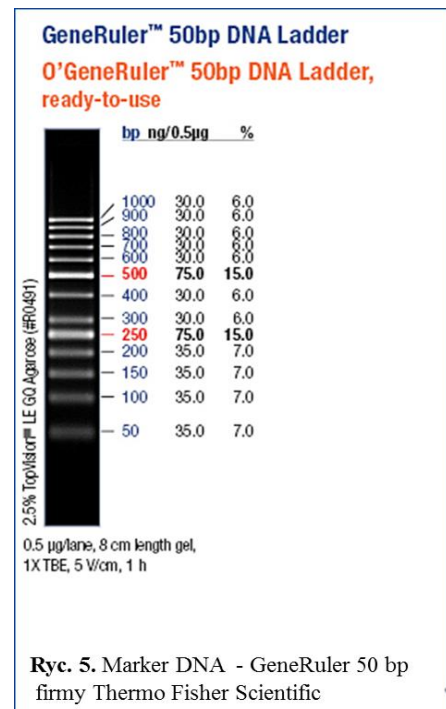
Jest to standardowa metoda pozwalająca rozdzielić, zidentyfikować lub oczyścić fragmenty DNA. Rozdział cząsteczek kwasów nukleinowych odbywa się w polu elektrycznym. Kierunek tego rozdziału uzależniony jest od ładunku. Kwasy nukleinowe w buforach o pH bliskim neutralnego obdarzone są ładunkiem ujemnym i poruszają się w stronę dodatniej anody. Szybkość poruszania się cząsteczek zależy przede wszystkim od ich masy i konformacji przestrzennej. Cząsteczki większe z zasady migrują wolniej, natomiast szybkość migracji cząsteczek o złożonej strukturze drugorzędowej nie zawsze jest proporcjonalna do ich wielkości. Wpływ na rozdział ma również stopień usieciowania, czyli wielkość porów ośrodka (w tym przypadku agarozy), w którym przemieszczają się cząsteczki, im wyższe stężenie, tym gęstsze usieciowanie, a tym samym dokładniejszy rozdział cząsteczek o zbliżonej masie.

Agarozę posiada obojętny ładunek i jest to naturalny polisacharyd będący polimerem pochodnych galaktozy, wyizolowany ze ściany komórkowej krasnorostów. Szybko rozpuszcza się w buforze do elektroforezy (np. TAE) pod wpływem ogrzewania a w temperaturze pokojowej odwracalnie tworzy żel. Porowatość żelu a przez to stopień rozdziału dostosowuje się do rozmiaru rozdzielanych cząstek, stosując różne stężenia agarozy. Aby zidentyfikować wielkość rozdzielonych cząsteczek DNA, na żel nakłada się standard wielkości (inaczej drabinka, marker) składający się z kilku/kilkunastu fragmentów DNA o ściśle zdefiniowanej wielkości i widocznych w postaci prążków. (Ryc. 5). Porównując fragmenty DNA z badanej próbki z prążkami standardu jesteśmy w stanie określić wielkość cząsteczek DNA w badanej próbce. W celu lepszej obserwacji postępu elektroforezy do badanej próby dodaje się bufor obciążający zawierający barwnik (np. niebieski Xylene cyanol, fioletowy Bromophenol blue lub pomarańczowy Orange G), który nadaje próbom zabarwienie i pozwala na śledzenie migracji fragmentów DNA podczas elektroforezy.

Oprócz barwników, bufor zawiera czynnik obciążający np. glicerol lub sacharozę, zwiększający gęstość próbki, dzięki czemu nie dyfunduje ona do buforu, w którym prowadzi się elektroforezę, lecz opada na dno studzienki. W celu uwidocznienia cząsteczek DNA w żelu, po rozdziale elektroforetycznym stosuje się barwienie związkiem interkalującym. Najpopularniejszym jest bromek etydyny, który wnika w głąb struktury DNA, a następnie pod wpływem światła UV świeci na pomarańczowo. Barwnik ten posiada silne właściwości mutagenne i kancerogenne dlatego też pracując z tym odczynnikiem należy zachować szczególną ostrożność, pracować w rękawiczkach i ochronnej odzieży laboratoryjnej.

Cel doświadczenia:

Celem tego etapu ćwiczenia jest przeprowadzenie rozdziału elektroforetycznego cząsteczek DNA powstałych po trawieniu enzymami restrykcyjnymi, analiza otrzymanych prążków przy użyciu markera wielkości GeneRuler 50bp oraz wycięcie z żelu prążka odpowiadającego wielkością fragmentowi DNA wstawki po trawieniu (189 pz). Etap ten przeprowadzany jest w celu usunięcia powstałych po trawieniu krótkich fragmentów DNA oraz



oczyszczenia posiadającego lepkie końce fragmentu DNA wstawki. W analogiczny sposób przygotowany został powstały po trawieniu fragment DNA wektora o wielk. 5296 pz.

Wykonanie

Przygotowanie 2,5% żelu agarozowego – 1 na grupę

1. Odważyć 2,5 g agarozy i rozpuścić w 100 ml 0,5 x stężonego buforu TAE (Tris-octan, EDTA) przez podgrzanie w kuchence mikrofalowej.
2. Lekko zamieszać i wylać płynną agarozę do uprzednio przygotowanych saneczek w statywie. Szerszą końcówką tipsa usunąć powstałe bąbelki, aby nie zakłócały odczytu.
3. Włożyć grzebień, który uformuje w żelu dołki (studzienki) do nakładania prób.
4. Poczekać aż żel stężeje, około 30 minut i wyjąć grzebień.
5. Przełożyć saneczki ze spolimeryzowanym żelem agarozowym do aparatu elektroforetycznego zawierającego bufor 0,5 x TAE. W razie potrzeby dolać buforu tak aby żel był w całości zanurzony.

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

1. Do pierwszej studzienki nałożyć 7 µl markera wielkości GeneRuler 50bp. W przypadku markerów oznaczonych jako ready-to-use nie ma konieczności dodawania buforu obciążającego gdyż zarówno barwnik, jak i czynnik obciążający zostały dodane przez producenta.
2. Do kolejnych studzienek nałożyć po 40 µl mieszanin reakcyjnych przygotowanych w pkt 2.3 (2 mieszaniny po 20 µl – od tego momentu pracujemy w parach). Nie ma konieczności dodawania buforu obciążającego do nakładanych mieszanin, gdyż barwnik oraz czynnik obciążający znajdują się w buforze użytym do trawienia NZYSpeedyBuffer Orange.
3. Rozdział elektroforetyczny prowadzić przy napięciu 100V przez 30 minut.
4. Po zakończeniu rozdzielania wyłączyć zasilacz i odłączyć aparat od źródła zasilania.
5. Wyjąć żel i wybarwić w roztworze bromku etydyny przez 15 minut.

Analiza

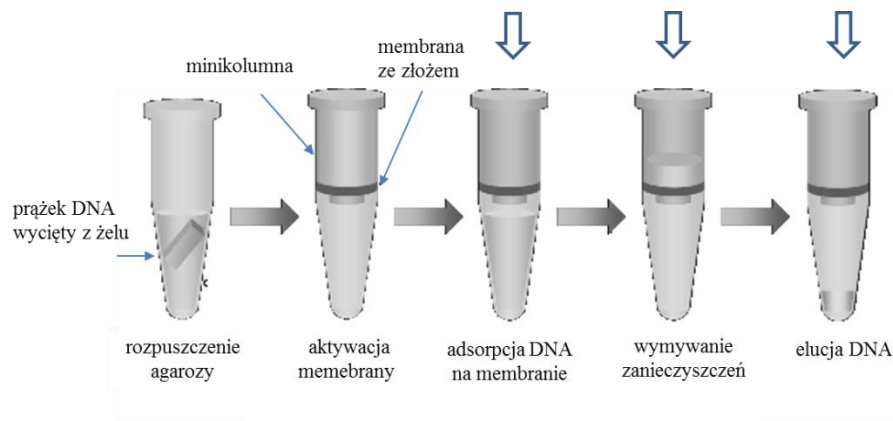
1. Po zakończonym barwieniu, umieścić żel na transiluminatorze UV i obserwować rozdzielone fragmenty DNA w świetle UV.
2. Przy użyciu markera GeneRuler 50bp (**Ryc. 5**) określić przybliżoną wielkość rozdzielonych fragmentów DNA w nałożonych próbach i zidentyfikować fragment o wielkości 189 pz odpowiadający fragmentowi DNA wstawki po trawieniu.
3. W pracy ze światłem UV należy zachować szczególną ostrożność i pracować w rękawiczkach i okularach ochronnych.

Wycięcie prążków z żelu agarozowego

1. Przy użyciu ostrego i czystego skalpela wyciąć zidentyfikowany fragment DNA o wielkości 189 pz w taki sposób, aby pobrać jak najmniej otaczającej prążek agarozy. Operację wycinania prążka DNA należy wykonać możliwie szybko, aby zminimalizować oddziaływanie promieniowania UV na izolowane DNA.
2. Przenieść wycięty bloczek agarozowy do probówki 1,5–2 ml, a następnie zważyć.

2.5 Oczyszczanie DNA z żelu agarozowego przy użyciu minikolumn ze złożem krzemionkowym

Procedura ta przeprowadzana jest z wykorzystaniem minikolumn wirowniczych, zawierających złożo krzemionkowe umożliwiające wydajne i selektywne wiązanie kwasów nukleinowych (**Ryc. 6**). W pierwszym etapie wycięty z żelu fragment DNA, inkubowany jest w buforze, który po podgrzaniu ułatwia rozpuszczanie agarozy i często zawiera barwnik umożliwiający śledzenie tego procesu. W kolejnym etapie, podczas krótkiego wirowania DNA wiąże się do membrany a agarozę i inne zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Dwuetapowe przemywanie minikolumny ma na celu usunięcie pozostałych zanieczyszczeń i/lub inhibitorów reakcji enzymatycznych. Oczyszczone DNA eluowane jest ze złoża minikolumny buforem niskosolnym, np.: zawierającym Tris-HCl, TE lub wodą destylowaną (pH 7,0–9,0) i gotowe jest do bezpośredniego wykorzystania w technikach biologii molekularnej m.in. w reakcji ligacji, która zostanie wykonana w ćwiczeniu nr 3.



Ryc. 6 Schemat metody oczyszczania DNA z żelu wykorzystującej membranę krzemionkową

Wykonanie

Niniejsze doświadczenie zostanie przeprowadzone z wykorzystaniem zestawu GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification firmy EURx, zgodnie z dostarczonym przez producenta protokołem.

Literatura

1. „Biologia molekularna – krótkie wykłady” - P. Turner, A. McLennan, A. Bates, M. White
2. „Genetyka – krótkie wykłady”- H. Fletcher, I. Hickey, P. Winter
3. „Genetyka molekularna” – P. Węgleński

EURX[®]

Molecular Biology Products



GenMATRIX to syntetyczne membrany nowej generacji wiążące DNA i RNA, wykorzystujące selektywne właściwości wiązania kwasów nukleinowych przez kompozycyjny SiO₂. W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufor wiążące i płuczające, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych membran. Zastosowanie gotowych do użycia membran, umieszczonych w kolumnkach wirowniczych (ang. Spin-format) w połączeniu ze specjalną konstrukcją naszych minikolumn, istotnie poprawia jakość uzyskanego preparatu DNA lub RNA. Celem monitorowania kompletnego wymieszania roztworów oraz ułatwienia procedury izolacji DNA, część roztworów wyznakowano barwnikami.

W etapie przekazyjnym w Państwa ręce zestawy składające się z nowych złożeń i buforów reakcyjnych, których użycie gwarantuje szybkie, proste, bezpieczne i jednocześnie wydajne otrzymanie ultraczystych kwasów nukleinowych. Uzyskane DNA lub RNA nadaje się bezpośrednio do zastosowań w technice biologii molekularnej, m.in.: trawienia enzymami restrykcyjnymi, detektorystyfosforylacji, ligacji, badań oddziaływania białko-DNA, sekwencjonowania, blottingu, transkrypcji *in vitro*, otrzymywania cDNA, hybrydizacji. Dodatkową zaletą zestawów jest powtarzalność właściwości zarówno membran jak i buforów wiążących, ponieważ przygotowanie komponentów odbywa się w EURX sp. z o.o.

GenMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit pozwala na szybkie oczyszczenie linitowych lub kolistych cząsteczek DNA o wielkości od ok. 100 pz do ponad 10 kbp, rozdzielanych na TAE- lub TBE-żelu agarozowym. Zabawiony bufor ułatwia śledzenie postępu rozpuszczania agarozy oraz jednoczesną pracę z wieloma próbkami. Poza usunięciem agarozy z próbki DNA efektywnie usuwane są zanieczyszczenia takie jak: bromek etyldyny, RNA, nukleotydy, primery, znaczniki radioaktywne i nieradioaktywne, detergeny, związki buforowe, sole, EDTA, inhibitory restrykcji i ligacji DNA, barwniki, enzymy i inne białka. Dodanie specjalnego buforu wywarza warunki do selektywnego wiązania DNA do membran **GenMATRIX**. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie DNA do membran, natomiast niezwiązana, rozpuszczona agarozą oraz inne zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości na membranie są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Użyte złoże jest zaprojektowane pod kątem skutecznego usuwania inhibitorów restrykcji i ligacji DNA. Elucję oczyszczonego DNA wykonuje się buforem niskosolnym, np.: zawierającym Tris-HCl, TE lub wodą destylowaną. Oczyszczony preparat DNA nadaje się do bezpośredniego użyciu. Nie wymaga dalszej precypitacji etanolem.

EURX[®]

Molecular Biology Products



GenMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit

Uniwersalny zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych

kat. nr E3540

Wersja zestawu 6.2

Styczeń, 2008

Uwaga 1: Po rozpakowaniu, zestaw do oczyszczania DNA należy przechowywać w temperaturze pokojowej. W przypadku krystalizacji komponentów przechowywanych buforów, roztwory należy podgrzać do 37°C, aż do całkowitego wykrywania.

Uwaga 2: Optymalne wyniki automatycznego sekwencjonowania DNA, oczyszczanego GeneAmp® Agarose-Out, uzyskuje się używając 0,3-0,6 pmola DNA (przykładowo 200-400 ng fragmentu DNA o długości 1 kb).

Uwaga 3: Bufory **Orange A** oraz **Wash A1** po kontakcie z kwasami mogą uwalniać toksyczne gazy. Używać wyłącznie zgodnie z przeznaczeniem, nie dodawać kwasów do pojemników zawierających pozostałości po użyciu zestawu.

Uwaga 4: Roztwory z zestawu do oczyszczania DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany siłzeń w wyniku parowania.

Uwaga 5: Zestaw jest przeznaczony do izolacji fragmentów DNA o wielkości od ok. 100 bp do 10 kb, zarówno z żeli buforowanych TAE jak i TBE. Możliwa jest izolacja większych fragmentów DNA (10 kb do ponad 20 kb). W tym zakresie obserwuje się jednak znaczną obniżoną wydajność izolacji.

Protokół

1. **Dodać 40 µl buforu aktywacyjnego Buffer A do mikrokolumny (nie wlewać).** Pozostawić w temperaturze pokojowej do momentu namiesienia rozpuszczonej agarozy na mikrokolumnę.

Uwaga 1: Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer A centralnie na powierzchnię membrany zapewnia kompletnie nasączenie membrany buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania DNA.

Uwaga 2: Aktywację należy wykonać przed rozpoczęciem procedury izolacji DNA.

2. **Wyciąć prążek DNA z żelu, tak aby jego waga nie przekroczyła 250 mg, a następnie umieścić wycięty fragment żelu w probówce typu Eppendorf.**

Uwaga 1: Istotne jest, aby bufor do elektroforezy nie był wielokrotnie używany, ze względu na zachodzące zmiany pH, które obniżają wydajność oczyszczenia DNA.

Uwaga 2: Prążek należy wyciąć w taki sposób, aby uniknąć nadmiaru otaczającej DNA, agarozy.

Uwaga 3: W przypadku, gdy waga fragmentu żelu przekracza 250 mg, należy pociąć żel na mniejsze fragmenty i użyć odpowiednio zwiększoną ilość mikrokolumn.

3. **Dodać 600 µl buforu Orange A i wymieszać poprzez 3-krotne odwracanie.**

4. **Inkubować w bloku grzejnym lub łaźni wodnej w temp. 55°C, mieszając przez 2-krotne odwracanie co 1-2 min, aż do całkowitego rozpuszczenia agarozy.** Uzyskanie jednorodnego roztworu o pomarańczowym kolorze świadczy o zakończeniu procesu.

Uwaga 1: Proces rozpuszczania trwa od 5 do 10 min, zależnie od siłżenia agarozy, użytego buforu oraz ilości wyciętego żelu.

5. **Wlać rozpuszczoną agarozę do mikrokolumny, znajdującej się w probówce odbierającej.**

6. **Wlewać w mikrowirowcę przez 1 min z prędkością 12000 rpm.**

7. **Wyciąć mikrokolumnę, wylać przesącz i umieścić mikrokolumnę z powrotem w probówce odbierającej.**

x2

8. **Dodać 500 µl buforu płuczącego Wash A1 do mikrokolumny i wlewać przez 1 min z prędkością 12000 rpm.**

9. **Wyciąć mikrokolumnę, wylać przesącz i umieścić mikrokolumnę z powrotem w probówce odbierającej.**

10. **Dodać 650 µl buforu płuczącego Wash AX2 i wlewać przez 1 min z prędkością 12000 rpm.**

11. **Wyciąć mikrokolumnę, wylać przesącz i umieścić mikrokolumnę z powrotem w probówce odbierającej.**

12. **Wlewać przez 2 min z prędkością 12000 rpm w celu usunięcia resztek buforu płuczącego.**

13. **Mikrokolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1,5-2 ml. Dodać 50-80 µl buforu Elution/ 30 µl wody**

Uwaga 1: Dodanie buforu elującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności oczyszczenia DNA. Należy unikać dotykania ścianek mikrokolumny mikropipetą, aby nie przerosć śladów DNA pomiędzy kolejnymi mikrokolumnami.

Uwaga 2: Do elucji większych fragmentów DNA (powyżej 5 kb) zwiększoną wydajność uzyska się stosując bufor elacyjny podgrzany do 80°C.

Uwaga 3: Do elucji DNA zaleca się użyć buforu Elution, który sporządzono na bazie ultra-czystej wody ze śladowym dodatkiem czynnika buforującego. Bufor Elution pozwala na uzyskanie najwyższej wydajności elucji oraz nie interferuje z późniejszym sekwencjonowaniem DNA, ligacją, trawieniem enzymami restrykcyjnymi oraz innymi aplikacjami biologii molekularnej.

Uwaga 4: Możliwe jest zmniejszenie objętości elucyjnej poniżej 50 µl (graniczna objętość 20 µl), powoduje to jednak stopniowe obniżenie wydajności oczyszczenia DNA.

Uwaga 5: Optymalne wyniki automatycznego sekwencjonowania DNA, oczyszczanego GeneAmp® Agarose-Out, uzyskuje się używając 0,3-0,6 pmola DNA (przykładowo 200-400 ng fragmentu DNA o długości 1 kb).

14. **Mikrokolumnę pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej.**

15. **Wlewać mikrokolumnę przez 1 min z prędkością 12000 rpm.**

16. **Usunąć mikrokolumnę, zamknąć probówkę.** DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C.

Ćwiczenie 3 (07-11. 05. 2018)

Otrzymanie zrekombinowanej cząsteczki DNA i wprowadzenie jej do komórki bakteryjnej

Prowadzący: mgr Aleksandra Dydecka, mgr Daria Lubomska

3.1 Pomiar stężenia dwuniciowego DNA metodą fluorymetryczną

W technice tej wykorzystywane są barwniki fluorescencyjne, emitujące światło po związaniu się z dwuniciową cząsteczką DNA. Metoda ta jest bardziej selektywna od prostego pomiaru absorbancji w spektrofotometrze przy dł. fali 260 nm, gdyż w przeciwieństwie do metody spektrofotometrycznej, pomiar stężenia dsDNA nie jest uzależniony od wpływu innych składników takich jak: sole, białka, pojedyncze nukleotydy, RNA czy jednoniciowy DNA. Z tego względu metoda fluorymetryczna charakteryzuje się wyższą czułością oraz dokładnością i zalecana jest w przypadku pomiaru niskich stężeń DNA.

Cel doświadczenia:

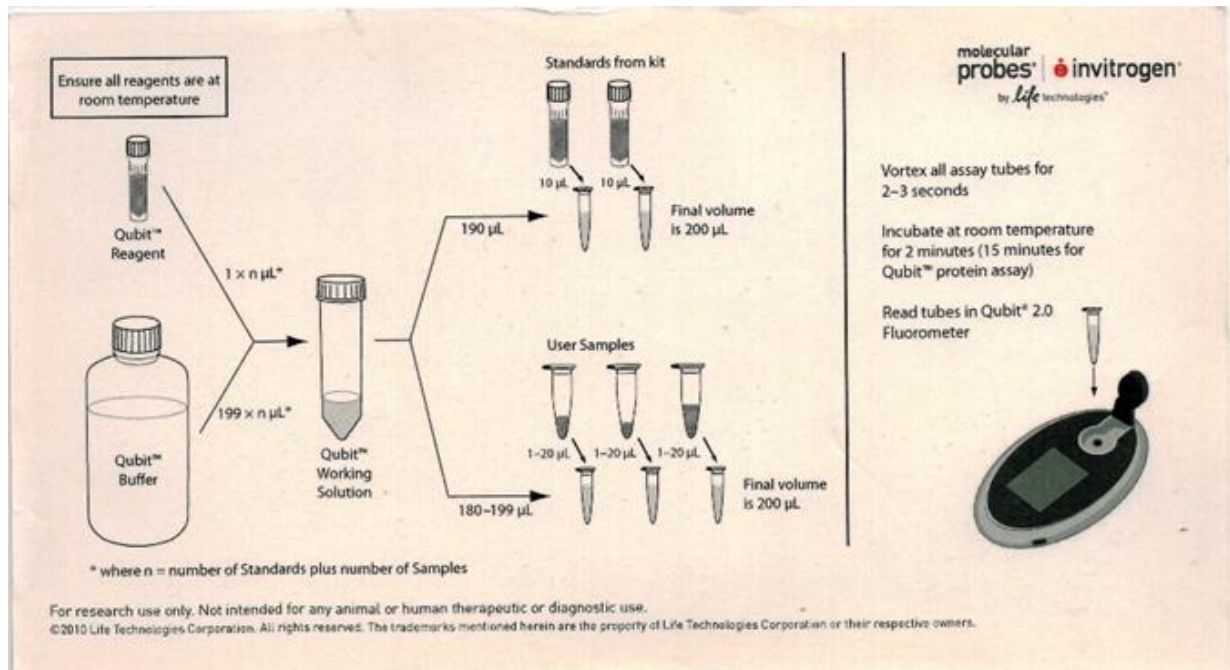
Oznaczone zostanie stężenie dwuniciowego DNA w próbach przygotowanych podczas ćwiczenia nr 2, zawierających oczyszczone fragmenty DNA wstawki o wielkości 189 pz.

Wykonanie:

Stężenie dsDNA oznaczone zostanie z użyciem fluorymetru Qubit i zestawu Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) umożliwiającym pomiar stężenia DNA w zakresie 0,2 – 100 ng. Pomiar stężenia DNA przeprowadzone zostaną w temperaturze pokojowej, w probówkach 0,5 ml i w odniesieniu do dwóch wchodzących w skład zestawu standardów, czyli prób o znanym stężeniu DNA. Pomiar zostanie wykonany zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta (**Ryc. 7**). Przed przystąpieniem do pomiarów zarówno badane próby, jak również odczynniki należy ogrzać do temperatury pokojowej.

1. W pierwszym etapie należy przygotować mieszaninę Working Solution. W tym celu należy zmieszać $n \times 199 \mu\text{l}$ buforu z $n \times 1 \mu\text{l}$ odczynnika zawierającego barwnik fluorescencyjny (Qubit Reagent) przyjmując, że n oznacza liczbę wszystkich badanych prób w grupie + dwa standardy.
2. Przygotować n probówek o poj. 0,5 ml.
3. Następnie przenieść po 190 μl przygotowanej mieszaniny Working Solution do dwóch 0,5 ml probówek i dodać po 10 μl każdego z dostarczonych w zestawie standardów 1 i 2.

4. Do pozostałych probówek przenieść po 198 μl mieszanki Working Solution i dodać po 2 μl badanych prób.
5. Wszystkie próbki krótko zworteksować i po 2 minutach inkubacji rozpocząć pomiar stężeń.



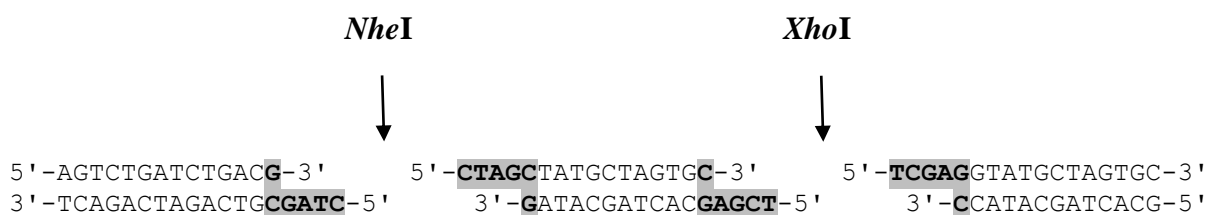
Ryc. 7. Schemat przygotowania próbek do pomiaru stężenia DNA z użyciem urządzenia Qubit.

6. W celu wykonania odczytu stężenia DNA należy włączyć urządzenie Qubit i z dostępnych opcji pomiaru wybrać **DNA** a następnie **dsDNA High Sensitivity**.
7. Następnie, po wyświetleniu się zapytania **Read New Standards?** wybrać **Yes**
8. Po pojawieniu się komunikatu **Insert Standard 1**, włożyć do urządzenia probówkę ze standardem nr 1, wybrać **Read**, poczekać aż urządzenie wykona odczyt i wyjąć probówkę.
9. W taki sam sposób wykonać odczyt dla standardu nr 2.
10. Po pojawieniu się komunikatu **Insert Assay Tube**, włożyć do urządzenia probówkę z pierwszą badaną próbą, wybrać **Read**, poczekać aż urządzenie wykona odczyt.
11. Wybrać **Calculate Stock Conc**, zmienić objętość na **2 μl** oraz jednostki na **ng/ μl** , zapisać podane stężenie i wyjąć probówkę.
12. Włożyć kolejną probówkę do urządzenia, wybrać **Read Next Sample** i w analogiczny sposób wykonać odczyt stężeń dla pozostałych próbek.

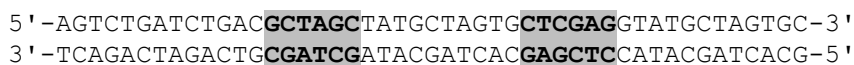
3.2 Reakcja ligacji

Ligaza DNA - enzym łączący wolne końce cząsteczek DNA. Łączenie DNA następuje poprzez wytworzenie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy grupą hydroksylową znajdującą się na końcu 3' a resztą fosforanową z końca 5' w sąsiadujących fragmentach dwuniciowego DNA, zakończonych tępo lub lekko. Łączenie to zachodzi w reakcji zależnej od ATP w przypadku ligazy bakteriofagowej lub eukariotycznej albo od NAD⁺ w przypadku ligazy bakteryjnej. Reakcja katalizowana przez enzym ligazę zwana jest **ligacją**. Efektem ligacji jest rekombinowane DNA, czyli cząsteczka, która powstała przez połączenie pochodzących z różnych źródeł fragmentów DNA, w tym wypadku wektora i wstawki.

Przykład działania ligazy (łączenie fragmentów DNA z lepkimi końcami):



Po ligacji powstaje:



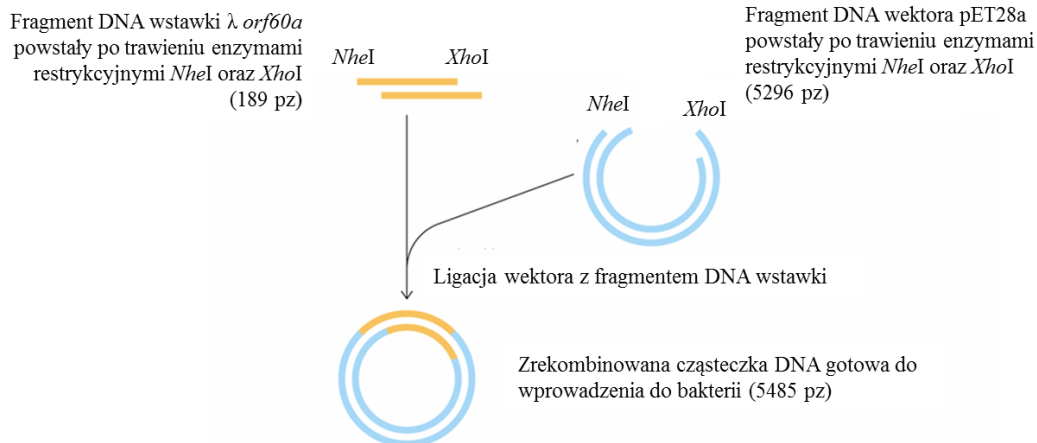
Ligacja lepkich końców DNA jest znacznie wydajniejsza od ligacji tępych końców. Dzieje się tak dlatego, że pomiędzy komplementarnymi jednoniciowymi fragmentami w obrębie lepkich końców cząsteczek DNA, oprócz wiązań fosfodiesterowych, tworzą się dodatkowo wiązania wodorowe. Wiązania te utrzymują oba końce w bliskiej odległości, co znacząco ułatwia reakcję ligacji. Ligacja fragmentów zakończonych tępymi końcami jest również możliwa aczkolwiek mniej wydajna ze względu na fakt, iż końce te zdecydowanie rzadziej znajdują się na tyle blisko aby ligacja i utworzenie nowego wiązania fosfodiesterowego było możliwe.

Cel doświadczenia:

Celem niniejszego etapu jest połączenie posiadających lepkie końce dwóch cząsteczek DNA:

1. powstałego w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi *NheI* i *XhoI* fragmentu DNA wektora pET28a o długości 5296 pz
2. oraz powstałego w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi *NheI* i *XhoI* fragmentu DNA wstawki *λ orf60a* o dł. 189 pz.

Reakcja ligacji zostanie przeprowadzona zgodnie ze schematem przedstawionym na **Ryc. 8** z uwzględnieniem zasady molowego nadmiaru ilości klonowanego fragmentu w stosunku do wektora. Do łączenia fragmentów DNA w reakcji ligacji wykorzystany zostanie enzym ligaza T4 DNA, pochodzący z bakteriofaga T4.



Ryc. 8. Schemat przebiegu reakcji ligacji wektora ze wstawką.

Wykonanie:

Każda para przygotowuje 1 reakcję ligacji. Mieszaninę reakcyjną należy przygotować w próbkach Epp. o poj. 0,2 ml.

1. Do próbki należy pobrać 1-2 μl wcześniej przygotowanego DNA wektora pET28a, tak aby jego końcowe stężenie w mieszaninie mieściło się w zakresie 7-9 ng.
2. W zależności od uzyskanego stężenia, dodać tyle μl DNA wstawki aby końcowe stężenie w mieszaninie wynosiło 27 ng. Obliczenia należy wykonać korzystając z uzyskanych w pkt 3.1 wartości stężeń [ng/ μl] i poniższej proporcji:

$$\begin{array}{rcl} \text{zmierzone w pkt 3.1 stężenie DNA wstawki [ng]} & \text{-----} & 1 [\mu\text{l}] \\ 27 [\text{ng}] & \text{-----} & x [\mu\text{l}] \end{array}$$

$$x = \dots\dots$$

3. Następnie dodać 2 μl buforu ligacyjnego zawierającego ATP.
4. Uzupełnić jałową wodą do 19,5 μl .
5. Dodać 0,5 μl enzymu ligazy T4 DNA.
6. Całość (20 μl) delikatnie przepipetować, w razie potrzeby krótko wirować i inkubować w termocyklerze przez 20 minut w temperaturze optymalnej dla działania enzymu tj. 22°C, a następnie przez 5 minut w temperaturze 70°C w celu inaktywacji enzymu (program o nazwie **LIG INAKTYWACJA**).

Sporządzając mieszaninę reakcyjną, należy pamiętać, że ligazę oraz bufor ligacyjny zawierający ATP należy trzymać w lodzie, a po zakończeniu pracy przechowywać w temperaturze -20°C.

3.3 Transformacja bakterii *E. coli* zrekombinowaną cząsteczką DNA

Transformacja bakterii polega na pobraniu egzogenego DNA ze środowiska i jego ustabilizowaniu w komórce. Proces ten umożliwia bakteriom nabycie nowych cech np. oporności na antybiotyki i obok koniugacji oraz transdukcji, jest jednym z mechanizmów horyzontalnego transferu genów. Zdolność komórek bakteryjnych do pobierania DNA w procesie transformacji określana jest stanem kompetencji. Niektóre gatunki bakterii (np. *Bacillus subtilis* czy *Haemophilus influenzae*) posiadają naturalną/spontaniczną zdolność do pobierania cząsteczek DNA ze środowiska w określonych warunkach. Inne, jak *Escherichia coli* nie posiadają naturalnie takiej zdolności i są wprowadzane w stan kompetencji na drodze indukcji czynnikami chemicznymi lub fizycznymi. Jedną z najpopularniejszych metod wprowadzania bakterii *E. coli* w stan kompetencji jest traktowanie zimnym 100 mM roztworem chlorku wapnia (CaCl_2). Jedną z hipotez wyjaśniającą mechanizm tego procesu zakłada, że dochodzi wówczas do zmian w przepuszczalności błony a jony wapnia dodatkowo maskują ujemny ładunek DNA, dzięki czemu DNA z łatwością się do niej przyłącza. Znajdujące się na powierzchni komórki egzogenne DNA, jest wprowadzane do jej wnętrza na skutek szoku termicznego. Sugeruje się, iż nagle podwyższenie temperatury powoduje powiększenie się porów w błonie, przez które cząsteczka DNA przenika do wnętrza komórki. Podczas inkubacji w pożywce bez czynnika selekcyjnego komórki, m.in. te które pobrały egzogenną cząsteczkę DNA, wracają do normalnego stanu fizjologicznego, intensywnie się dzielą i dochodzi do powielenia pobranej cząsteczki DNA. Etap ten umożliwia ustabilizowanie pobranej cząsteczki DNA w populacji bakterii. Selekcja komórek, które pobrały egzogenną cząsteczkę DNA opiera się na obecności w tej cząsteczce genu markerowego, który nadaje transformantom określony fenotyp np. oporność na antybiotyki.

Cel doświadczenia:

Celem niniejszego etapu jest wprowadzenie otrzymanej w reakcji ligacji zrekombinowanej cząsteczki DNA do kompetentnych komórek bakteryjnych *E. coli* i wysiew komórek na podłoże z antybiotykiem w celu wyselekcjonowania tych, które pobrały wektor.

Wykonanie:

Pracujemy w czteroosobowych zespołach.

Przygotowanie płytek z podłożem LA i antybiotykiem

1. W mikrofalówce rozgrzać 150 ml uprzednio przygotowanego, sterylnego podłoża LA które zrobiono poprzez rozpuszczenie 10 g tryptonu, 5 g ekstraktu drożdżowego, 10 g NaCl i 15 g agaru w 1 litrze wody.
2. Rozgrzane podłoże pozostawić do wystygnięcia a w międzyczasie przygotować 4 sterylne szalki Petriego
3. Do wystudzonego podłoża dodać 90 μl uprzednio rozmrożonego antybiotyku kanamycyny o stężeniu 50 mg/ml (końcowe stężenie kanamycyny będzie wówczas 30 $\mu\text{g/ml}$).

4. Tak przygotowane podłoże LA wylać na płytki Petriego i poczekać aż zastygnie, a następnie podsuszyć płytki z podłożem w cieplarni.

Przygotowanie komórek kompetentnych

Na potrzeby niniejszego ćwiczenia, komórki kompetentne *E. coli* MC1061 zostały przygotowane z wykorzystaniem zimnego 100 mM CaCl₂, zgodnie z poniższym protokołem.

1. Zaszczepić hodowlę nocną *E. coli* w płynnej pożywce LB i hodować przez noc w wytrząsarce, w temp. 37°C.
2. Odmłodzić nocną hodowlę bakteryjną w świeżej pożywce LB w stosunku 1:100
3. Prowadzić hodowlę w wytrząsarce, w temp. 37°C do osiągnięcia fazy logarytmicznego wzrostu (OD 600 nm w zakresie 0.2-0.3).
4. Przenieść po 40 ml hodowli do schłodzonych w lodzie 50 ml probówek wirówkowych i odwirować przy 4000 obr./min, w temp. 4°C, przez 10 min.
5. Zlać supernatant a osad zawiesić w 20 ml zimnego 100 mM CaCl₂.
6. Inkubować w lodzie przez minimum 1 godzinę, a najlepiej przez noc.
7. Powtórnie zwirować komórki przy 4000 obr./min, w temp. 4°C, przez 10 min.
8. Zlać supernatant i osad zawiesić w 4 ml mieszaniny chlorku wapnia z 10% glicerolem.
9. Rozporcjować zawiesinę komórek kompetentnych po 200 µl do jałowych probówek typu Eppendorf o poj. 1,5 ml, a następnie zamrozić i przechowywać w temp. -80°.

Komórki kompetentne są bardzo wrażliwe i należy się z nimi obchodzić bardzo delikatnie, zwłaszcza podczas wirowania i pipetowania. Wszystkie etapy preparatyki należy przeprowadzać w lodzie. Nie zaleca się wielokrotnego zamrażania/rozmarzania komórek kompetentnych. Niektóre szczepy bakteryjne są szczególnie zalecane w procesie transformacji ze względu na posiadane cechy. Przykładowo bakterie MC1061 to szczep bezplazmidowy (wrażliwy na antybiotyki, w tym kanamycynę) i posiadający nieaktywny system restrykcyjny (r-) co zapobiega degradacji obcego DNA. Innym szczepem o podobnych właściwościach jest szczep DH5α, który oprócz nieaktywnego systemu restrykcyjnego posiada również nieaktywny system rekombinacji (RecA-) co korzystnie wpływa na stabilność wprowadzonej do komórki egzogenne cząsteczki DNA.

Transformacja komórek kompetentnych z zastosowaniem szoku termicznego

1. Rozmrozić 4 probówki z komórkami kompetentnymi *E. coli* MC1061 na lodzie (przez minimum 15 minut).
2. Do pierwszej probówki dodać 20 µl mieszaniny ligacyjnej przygotowanej przez pierwszą parę z zespołu i delikatnie przepipetować.
3. Do drugiej probówki dodać 20 µl mieszaniny ligacyjnej przygotowanej przez drugą parę z zespołu i delikatnie przepipetować.
4. Do trzeciej probówki dodać 1 µl wyjściowego wektora pET28a i opisać jako kontrolę pozytywną (Kp)
5. Do czwartej probówki nic nie dodawać i opisać komórki kompetentne jako kontrolę negatywną (Kn).
6. Wszystkie probówki inkubować w lodzie przez 25 minut.

7. Ogrzać próby w temp. 42°C (termoblok) przez 2 minuty (szok termiczny).
8. Następnie szybko przełożyć probówki do lodu i inkubować przez 2 minuty.
9. Dodać 1 ml ogrzanej do 37°C pożywki LB bez antybiotyku.
10. Wyrząsać przez 40 minut w temp. 37°C przy 700 rpm (termomikser).
11. Zwirować przy 4000 obr./min, w temp. pokojowej, przez 3 min.
12. Ostrożnie zlać lub odpipetować supernatant pozostawiając jego niewielką ilość na dnie probówki w celu zawieszenia powstałego osadu.
13. Wziąć cztery uprzednio przygotowane i podsuszone płytki z podłożem LA i antybiotykiem i opisać w taki sposób, aby można je było łatwo zidentyfikować na kolejnych ćwiczeniach.
14. Zawartość probówek przenieść pipetą na odpowiednio opisane płytki, a następnie wetrzeć w podłoże za pomocą głaszczki rozprowadzając zawiesinę po całej powierzchni płytki. Należy pamiętać o wyjąłowieniu głaszczki pomiędzy kolejnymi próbami poprzez zanurzenie w alkoholu i opalenie w płomieniu palnika. Przed opaleniem usunąć nadmiar alkoholu z głaszczki. Alkohol należy trzymać z daleka od płomienia palnika i NIE WOLNO zanurzać w nim palącej się głaszczki!!!!
15. Płytki inkubować przez noc w temp. 37°C a następnie przenieść do chłodni i pozostawić do czasu kolejnego ćwiczenia.

Literatura

1. „Biologia molekularna – krótkie wykłady” - P. Turner, A. McLennan, A. Bates, M. White
2. „Genetyka – krótkie wykłady”- H. Fletcher, I. Hickey, P. Winter
3. „Genetyka molekularna” – P. Węgleński

Ćwiczenie 4 (14 -18. 05. 2018)

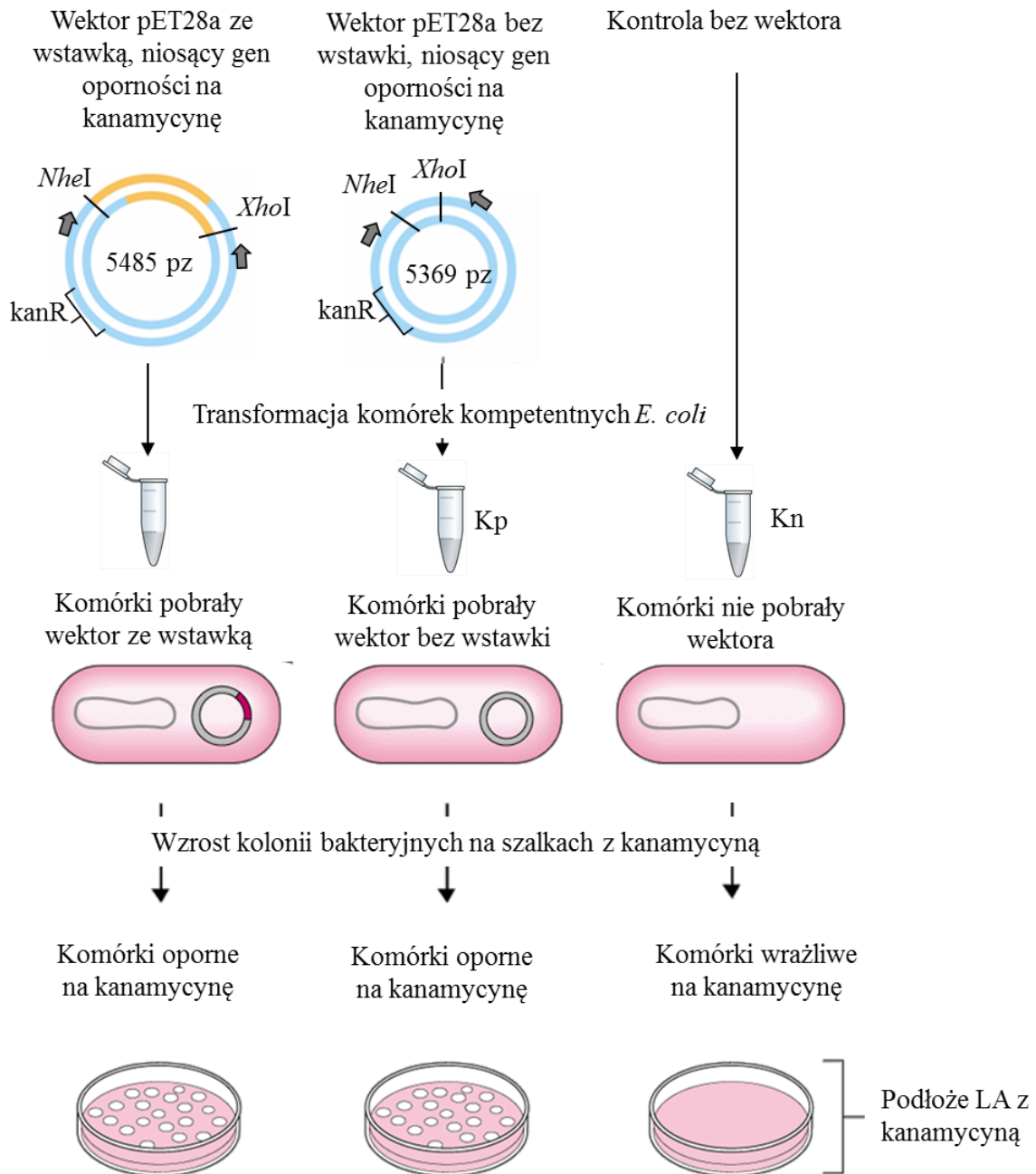
Analiza transformantów pod kątem obecności zrekombinowanej cząsteczki DNA

Prowadzący: mgr Krzysztof Kubiak, mgr Michał Grabski

Ostatnim etapem klonowania jest wyszukanie pojedynczego klonu zawierającego zrekombinowany wektor z interesującym nas fragmentem DNA (wstawką). Selekcja komórek, które w ogóle pobrały wektor możliwa jest, dzięki wykorzystaniu genu oporności na antybiotyki. Dodanie antybiotyku do pożywki uniemożliwi wzrost bakteriom bez wektora. Potwierdzeniem poprawnie przeprowadzonej selekcji na tym etapie jest brak kolonii na płytkach z kontrolą negatywną (Kn) procesu transformacji. Zadaniem kolejnego etapu jest rozróżnienie kolonii zawierających zrekombinowany DNA od tych, które zawierają niezmienioną cząsteczkę DNA wektora (bez wstawki). Obecność kolonii bakteryjnych na płytkach z kontrolą pozytywną (Kp) procesu transformacji świadczy o tym, iż doświadczenie transformacji zostało wykonane poprawnie, komórki kompetentne pobrały wektor, dzięki czemu uzyskały oporność na kanamycynę. Z kolei, wśród klonów pojawiających się po transformacji komórek kompetentnych mieszaniną ligacyjną wystąpić mogą zarówno te zawierające zrekombinowany wektor ze wstawką, jak i posiadające wyjściowy wektor bez wstawki (**Ryc. 9**). Obecność w tym wariantcie kolonii z pustym wektorem może świadczyć o nieefektywnym trawieniu restrykcyjnym wektora oraz wynikających z tego trudnościach w izolacji pożądanego fragmentu DNA wektora z żelu agarozowego. W celu rozróżnienia klonów niosących zrekombinowaną cząsteczkę DNA od tych posiadających pusty wektor, wybrane kolonie bakteryjne poddawane są lizie termicznej. W wyniku działania wysokiej temperatury z komórek uwolniony zostanie materiał genetyczny, który to z kolei służy jako matryca w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) umożliwiającej amplifikację wklonowanych wstawek i tym samym identyfikację klonów. O obecności klonowanego genu świadczy uzyskanie fragmentów DNA o określonej długości podczas rozdziału elektroforetycznego.

4.1 Liza komórek bakteryjnych pod wpływem wysokiej temperatury

W przypadku lizy termicznej (z ang. boiling lysis), czynnikiem denaturującym DNA jest wysoka temperatura. Metoda ta może być wykorzystywana do izolacji plazmidowego DNA jest zalecana do izolacji DNA na małą skalę. Uzyskane w ten sposób DNA nie jest pozbawione zanieczyszczeń (sole, białka w tym DNAzy) i bez wprowadzenia dodatkowych etapów oczyszczania nie nadaje się do dłuższego przechowywania. Z drugiej strony, metoda ta pozwala w bardzo szybki i niekosztowny sposób uzyskać DNA z wielu kolonii bakteryjnych jednocześnie i tym samym doskonale nadaje się do szybkiego przeszukiwania uzyskanych klonów. Izolacja DNA metodą lizy termicznej odbywa się podobnie jak w przypadku lizy alkalicznej. W warunkach krótkotrwałego gotowania komórek bakteryjnych dochodzi do denaturacji nici dsDNA. Wysoka temperatura powoduje denaturację genomowego DNA, natomiast plazmidowy DNA zostaje zdenaturowany jedynie na niewielkich odcinkach. W efekcie, po obniżeniu temperatury, fragmenty genomowego DNA tworzą nierozpuszczalną sieć, dzięki czemu można usunąć je przez wirowanie; natomiast DNA plazmidowe ulega specyficznej renaturacji i pozostaje w supernatancie.



Ryc. 9. Selekcja transformantów na podłożu z antybiotykiem. Transformanty rosnące na podłożu selekcyjnym mogą zawierać pusty wektor albo wektor ze wstawką.

Cel doświadczenia:

Celem niniejszego etapu jest uzyskanie lizatów bakteryjnych z pojedynczych kolonii i uwolnienie z komórek materiału genetycznego, który posłuży jako matryca w reakcji PCR.

Wykonanie:

Praca w parach z wykorzystaniem płytek z koloniami bakteryjnymi z ćwiczenia nr 3.

1. Przygotować trzy probówki typu Eppendorf o poj. 0,2 ml i dodać po 30 μ l jałowej wody.
2. Tipsem pobrać dowolną kolonię, z tych które wyrosły na płytce po transformacji komórek kompetentnych mieszaniną ligacyjną i przenieść do pierwszej probówki.
3. Z tej samej płytki, pobrać drugą kolonię i przenieść do kolejnej probówki.
4. Do ostatniej probówki przenieść kolonię z płytki z kontrolą pozytywną procesu transformacji (komórki kompetentne + wektor pET28a bez wstawki).
5. Probówki inkubować 5 minut w temperaturze 98°C (program LIZA 98C)
6. Następnie probówki wirować 1 minutę, przy 12 000 rpm, w temperaturze pokojowej.

4.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (z ang. Polymerase Chain Reaction, PCR)

Jest to technika umożliwiająca powielenie określonego fragmentu DNA i została opracowana przez Kary'ego Mullisa i współpracowników z kalifornijskiej firmy Cetus (1983 r.). Za to osiągnięcie Mullis otrzymał w 1993 r. Nagrodę Nobla.

Aby doszło do namnożenia fragmentu DNA należy skompletować wszystkie składowe reakcji PCR, którymi są:

- woda – jest dodawana do określonej objętości, dzięki czemu wszystkie pozostałe składniki reakcji pozostają w odpowiednich stężeniach
- bufor reakcyjny – jest specyficzny dla danej polimerazy i dodawany w celu zapewnienia odpowiedniego pH i optymalnych warunków dla aktywności polimerazy. Zwykle jest dostarczany razem z enzymem w postaci 10 x stężonego buforu.
- jony magnezu – ich stężenie ma kluczowe znaczenie w reakcji PCR i ustala się je eksperymentalnie. Optymalne stężenie jonów w reakcji mieści się w granicach 1-6 mM. Zbyt małe stężenie powoduje znaczny spadek wydajności reakcji, natomiast zbyt duże skutkuje powstawaniem produktów niespecyficznych oraz pomyłkami polimerazy w podstawianiu nukleotydów. Jony magnezu mogą być dodawane oddzielnie lub znajdować się w buforze reakcyjnym. Jeżeli bufor do PCR zawiera związki chelatujące jony dwuwartościowe (np. EDTA) stężenie Mg^{+2} należy proporcjonalnie zwiększyć.
- mieszanina nukleotydów dATP, dCTP, dGTP, dTTP (czyli trójfosforanów deoksyrybonukleozydów).
- startery, czyli krótkie oligonukleotydy DNA komplementarne do fragmentów sekwencji matrycy znajdujących się na obu końcach powielanego fragmentu DNA. Wyróżnia się dwa typy starterów: starter przedni (forward) – jego sekwencja jest taka sama jak sekwencja powielana; starter wsteczny (reverse) – jego sekwencja jest komplementarna do powielanej. Startery projektuje się tak, aby oflankowały amplifikowany fragment, a następnie syntetyzuje chemicznie. W większości przypadków projektowane są oligonukleotydy o długości 15-25 par zasad (najczęściej ok. 20 pz), przy czym ważne jest aby temperatury topnienia obu używanych starterów były takie same (lub zbliżone),

optymalnie w przedziale 50-60°C. Zalecane jest również aby startery zawierały 40-60% zasad G+C, nie tworzyły dimerów oraz struktur drugorzędowych. Robocze stężenie każdego ze starterów w mieszaninie reakcyjnej wynosi najczęściej od 0,2 do 0,5 μM.

- matrycowy DNA- dwuniciowy plazmidowy lub genomowy DNA, którego fragment ma być powielony.
- termostabilną polimerazę DNA. Używany do reakcji enzymem może być na przykład polimeraza *Taq* wyizolowana z bakterii *Thermus aquaticus* lub polimeraza *Pfu* pozyskana z archeoców *Pyrococcus furiosus*. W odróżnieniu od *Taq*, polimeraza *Pfu* wykazuje aktywność egzonukleazy 3'→5', co umożliwia korygowanie błędów wbudowywania nukleotydów (ang. proofreading). Aktywność egzonukleolityczna znacząco zmniejsza szybkość i wydajność reakcji PCR, dlatego też często stosuje się mieszaniny polimeraz np. *Taq* + *Pfu*. Dostępne są także inne polimerazy, będące z reguły modyfikacjami wyżej wymienionych.

Istotna jest kolejność wprowadzania poszczególnych składników, gdyż jej zmiana może być przyczyną pojawienia się produktów niespecyficycznych, a także obniżenia aktywności niektórych elementów mieszaniny. Stąd też, dodawanie składników rozpoczyna się od: wody, buforu, jonów magnezu, wolnych nukleotydów (dNTPs), starterów, a kończy najczęściej na DNA lub polimerazie. Przygotowując większą ilość reakcji PCR różniących się matrycowym DNA, można sporządzić jedną mieszaninę (tzw. mix) złożoną ze wszystkich składników, oprócz DNA, w większej, wyliczonej wcześniej, objętości. Tak przygotowaną mieszaninę rozpipetowuje się do probówek, a następnie do każdej z nich wprowadza określoną ilość DNA.

Gotową mieszaninę reakcyjną poddaje się właściwej amplifikacji metodą PCR, która jest przeprowadzana w termocyklerach – urządzeniach wyposażonych w blok grzejny z otworami na probówki. Urządzenia te umożliwiają zmiany temperatury zgodnie z ustalonym wcześniej programem. Łańcuchowa reakcja polimerazy polega na cyklicznym powtarzaniu trzech kolejnych etapów, które zachodzą w różnych temperaturach. Poszczególne etapy cyklu wymusza się bez ingerencji w skład mieszaniny, a jedynie przez zmianę temperatury mieszaniny w termocyklerze. Pojedynczy cykl składa się z następujących etapów:

- denaturacja jest pierwszym etapem cyklu, podczas którego w wysokiej temperaturze (zwykle 94-95°C) pękają wiązania wodorowe i dochodzi do rozplecenia podwójnej helisy matrycowego DNA. W celu uzyskania tego efektu podnosi się temperaturę mieszaniny reakcyjnej do wymaganych 94-95°C na 15-30 sekund.
- annealing jest etapem, w którym następuje hybrydyzacja starterów do komplementarnych sekwencji w matrycowym DNA. Etap ten trwa zwykle 15-30 sekund i zachodzi w niższej temperaturze, ściśle określonej dla danej pary starterów (najczęściej w zakresie 45-60°C) i umożliwiającą ich przyłączenie do matrycowego DNA.
- elongacja to etap, podczas którego zachodzi wydłużanie starterów przez polimerazę, czyli właściwa synteza DNA i tym samym amplifikacja pożądanego fragmentu DNA. Podwyższenie temperatury do około 72°C powoduje utworzenie się na matrycy, z przyłączonymi do niej starterami, kompleksu z polimerazą DNA i przy jej udziale rozpoczyna się wbudowywanie komplementarnych nukleotydów. Czas elongacji zależy od rodzaju użytej polimerazy oraz długości amplifikowanego fragmentu DNA. W przypadku polimerazy *Taq* zwykle przyjmuje się 1 minutę wydłużania na każde 1000 pb powstającego produktu.

Typowa reakcja PCR obejmuje 30-40 cykli. W każdym cyklu dochodzi do podwojenia wyjściowej liczby cząsteczek matrycowego DNA. Po ukończeniu wszystkich cykli następuje końcowe, zwykle 5 minutowe wydłużanie amplifikowanych fragmentów, w temp. 72°C, po czym próba poddawana jest rozdziałowi elektroforetycznemu w celu uwidocznienia powstałych w reakcji produktów.

Cel doświadczenia:

Celem tego etapu jest przeprowadzenie reakcji PCR na DNA uzyskanym metodą lizy termicznej z kolonii bakteryjnych oraz ze starterami zaprojektowanymi do sekwencji flankujących miejsce wstawienia wstawki w wektorze (zaznaczone strzałkami na ryc. 9). Rozróżnienie kolonii zawierających zrekombinowany DNA od tych, które zawierają niezmienioną cząsteczkę DNA wektora, będzie możliwe ze względu na fakt, iż dzięki tak zaprojektowanym starterom w analizowanych przypadkach powstaną w reakcji PCR produkty o różnej wielkości. Mniejszy produkt o wielkości 148 pz powstanie w przypadku DNA pozyskanego z klonu niosącego wektor bez wstawki, większy natomiast o wielkości 264 pz powstanie na matrycy DNA wyizolowanego z komórek bakteryjnych niosących wektor ze wstawką.

Wykonanie:

Praca w parach.

1. Przygotować cztery probówki typu Eppendorf o poj. 0,2 ml oraz jedną o poj. 1,5 ml.
2. W probówce o poj. 1,5 ml przygotować mix reakcyjny dla ilości prób większej o 1 od faktycznej ilości prób, zgodnie z poniższym schematem:

Składnik i jego wyjściowe stężenie	Końcowe stężenie składnika	Objętość na 1 reakcję [μl]	Objętość na 5 reakcji, czyli mix reakcyjny [μl]
Woda	-	17,75	88,75
10 x stężony bufor reakcyjny	1 x stężony	2,5	12,5
100 mM MgCl ₂	6 mM	1,5	7,5
dNTPs (4mM każdy)	0,2 mM każdy	1,25	6,25
10 μM starter 1	0,3 μM	0,75	3,75
10 μM starter 2	0,3 μM	0,75	3,75
Polimeraza DNA Taq 5U/μl (Bioron)	2,5 U	0,5	2,5

Sporządzając mieszaninę reakcyjną, należy pamiętać, aby polimerazę dodać na końcu i do tego czasu trzymać w lodzie. Po zakończeniu pracy, polimerazę należy przechowywać w temperaturze -20°C.

3. Przenieść po 23 μl mixu do każdej z przygotowanych probówek o poj. 0,2 ml.
4. Do trzech probówek przenieść po 2 μl zawierających DNA supernatantów uzyskanych w punkcie 4.1 i odpowiednio oznaczyć probówki.

5. Do czwartej probówki dodać 2 μ l jałowej wody. Probówkę oznaczyć jako Kn (kontrola negatywna).
6. Delikatnie przepipetować przygotowane mieszaniny i w razie konieczności krótko zwirować.
7. Reakcje prowadzić w termocyklerze z wykorzystaniem programu o nazwie orf60aspr2 (termocykler pok. A206, katalog Goście \rightarrow Ćwiczenia) i następujących ustawieniach:

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94°C	3 minuty	1
Denaturacja	94°C	20 sekund	} 36
Przyłączenie starterów (annealing)	60°C	20 sekund	
Wydłużanie starterów	72°C	20 sekund	
Wydłużanie końcowe	72°C	5 minut	1
Chłodzenie	4°C	-	-

Całkowity czas trwania programu 1 godzina 10 minut.

4.2 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

(Technika została opisana w pkt 2.4 niniejszej instrukcji)

Cel doświadczenia:

Celem niniejszego etapu będzie rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w celu uwidocznienia obecności cząstek DNA o wielkości 148 pz lub 264 pz, odpowiadającej wielkości fragmentu DNA pomiędzy starterami, w przypadku wektora bez i ze wstawką, odpowiednio. Analiza otrzymanych produktów reakcji PCR zostanie wykonana przy użyciu markera wielkości GeneRuler 50bp.

Wykonanie

Przygotowanie 2,5% żelu agarozowego – 1,5 na grupę

1. Odważyć 2,5 g agarozy i rozpuścić w 100 ml 0,5 x stężonego buforu TAE (Tris-octan, EDTA) przez podgrzanie w kuchence mikrofalowej.
2. Lekko zamieszać i wylać płynną agarozę do uprzednio przygotowanych saneczek w statywie. Szerszą końcówką tipsa usunąć powstałe bąbelki, aby nie zakłócały odczytu.
3. Włożyć grzebień, który uformuje w żelu dołki (studzienki) do nakładania prób (minimum 26 studzienek na grupę).
4. Począkać aż żel stężeje, około 30 minut i wyjąć grzebień.
5. Przełożyć saneczki ze spolimeryzowanym żelem agarozowym do aparatu elektroforetycznego zawierającego bufor 0,5 x TAE. W razie potrzeby dolać buforu aby żel był w całości zanurzony.

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

1. Do pierwszej studzienki nałożyć 7 µl markera wielkości GeneRuler 50bp. W przypadku markerów oznaczonych jako ready-to-use nie ma konieczności dodawania buforu obciążającego gdyż zarówno barwnik, jak i czynnik obciążający zostały dodane przez producenta.
2. Do kolejnych studzienek nałożyć po 15 µl mieszanin reakcyjnych PCR przygotowanych w pkt 4.2 i uprzednio zmieszanych z 4 µl buforu obciążającego 6 x Loading Dye (4 próbki na parę).
3. Rozdział elektroforetyczny prowadzić przy napięciu 100V przez 30 minut.
4. Po zakończeniu rozdziału wyłączyć zasilacz i odłączyć aparat od źródła zasilania.
5. Wyjąć żel i wybarwić w roztworze bromku etydyny przez 15 minut.

Analiza

1. Po zakończonym barwieniu, umieścić żel na transiluminatorze UV i obserwować rozdzielone fragmenty DNA w świetle UV.
2. Przy użyciu markera GeneRuler 50bp (**Ryc. 5**) określić przybliżoną wielkość rozdzielonych fragmentów DNA w nałożonych próbach i zidentyfikować fragmenty o wielkości 148 pz i 264 pz.
3. W pracy ze światłem UV należy zachować szczególną ostrożność i pracować w rękawiczkach i okularach ochronnych.

Gratulacje dla osób, którym udało się otrzymać klon zawierający zrekombinowaną cząsteczkę DNA! Co istotne, w celu uzyskania całkowitej pewności, iż udało się uzyskać właściwą cząsteczkę należałoby teraz ten zamplifikowany fragment zsekwencjonować.

Literatura

1. „Biologia molekularna – krótkie wykłady” - P. Turner, A. McLennan, A. Bates, M. White
2. „Genetyka – krótkie wykłady”- H. Fletcher, I. Hickey, P. Winter
3. „Genetyka molekularna” – P. Węgleński