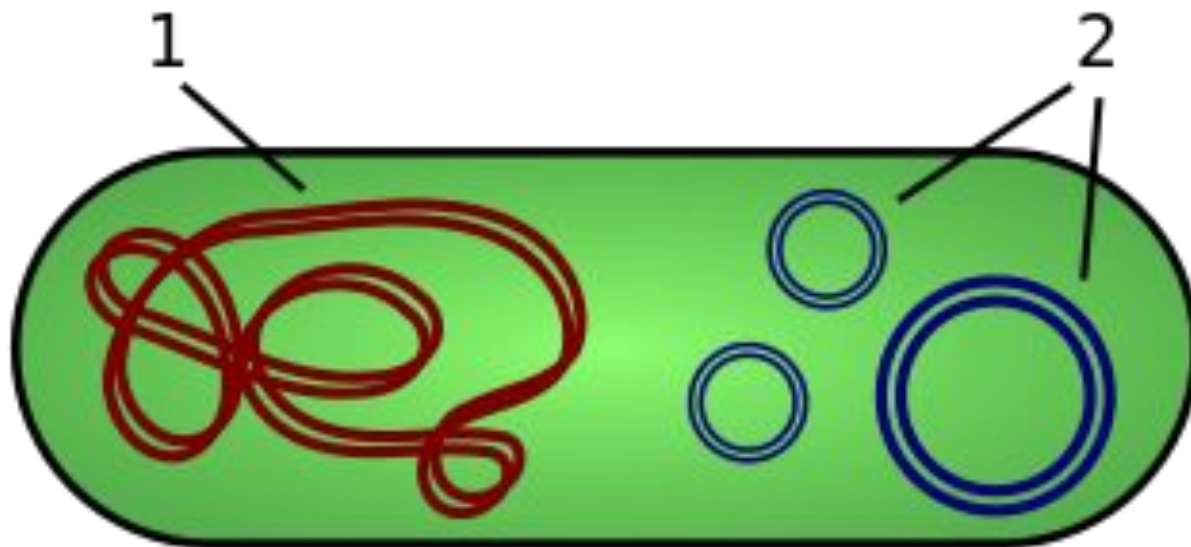


**Е. Coli бактериясынан
плазмидалық ДНҚ
молекуласын бөліп алу**

Мазмұн ы:

- Плазмидалық ДНҚ-ның анықтамасы
- Физикалық сипаттамасы
- Функциялары
- Қолдануы
- Плазмидалық ДНҚ-ны экстракциялау әдістері



**Хромосомалық ДНҚ (1) және плазмидалалар (2)
бактерияның жасушасында**

Плазмидалық ДНҚ-ның анықтамасы

- 1952 жыл, Дж. Ледербергпен «плазмида» термині енгізілді
- Плазмида – екі тізбекті **сақиналы ДНҚ молекуласы**, хромосаманың геномынан физикалық түрде бөлек тұратын және өз бетінше репликацияланатын кішкентай ДНҚ молекулалар.

Физикалық сипаттамасы

- Ковалентті супероралған екі тізбекті сақина
- 1 мыңнан 100 мыңға дейін жұп негіздерінен тұрады

Плазмидалар	Қожайын ағза	Плазмиданың мөлшері (мың жұп негіздері)	Плазмиданың геометриясы	Жасышаның ішіндегі плазмидалардың саны
pUB110	<i>Bacillus subtilis</i>	2,3	Кольцевая	20—50
ColEI	<i>Escherichia coli</i>	6,6	Кольцевая	10—30
lp25	<i>Borrelia burgdorferi</i>	24,2	Линейная	1—2
pNOB8	<i>Sulfolobus</i> sp. а (архея)	41,2	Кольцевая	2—40
F	<i>Escherichia coli</i>	99,2	Кольцевая	1—2
SCP1	<i>Streptomyces coelicolor</i>	350,0	Линейная	4
pSymA	<i>Sinorhizobiu</i>	1354,2	Кольцевая	2—3

Функциялары

- Гемолизин синтезі - *Hly*-плазмида
- Ауыр металдарға төзімділігі
- Антибиотикке төзімділік (*R*-плазмиды)
- Энтеретоксиннің синтезі - *Ent*-плазмида
- Ультракүлгін сәулесіне төзімділігі;
- Рестрикция-модификациялы жүйесі;

Плазмидалар	Қожайын ағза	Плазмиданың мөлшері (мың жұп негіздері)	Белгілі функциясы
pT181	Staphylococcus aureus	4,4	Устойчивость к тетрациклину
ColEI	Escherichia coli	6,6	Образование колицина и устойчивость к нему
pMB1	Escherichia coli	8,5	Система рестрикции-модификации
pGKL2	Kluyveromyces lactis	13,5	Плазмида-киллер
pAMpi	Enterococcus faecalis	26,0	Устойчивость к эритромицину
pSK41	Staphylococcus aureus	46,4	Множественная устойчивость
pBM4000	Bacillus megaterium	53,0	Оперон рРНК
pI258	Staphylococcus aureus	28,0	Устойчивость к ионам тяжёлых металлов
pSLT	Salmonella enterica ssp. typhimurium	93,9	Детерминанта вирулентности
pMT1	Yersinia pestis	101,0	Детерминанта вирулентности
pADP-1	Pseudomonas sp.	108,8	Катаболизм атразина (гербицид)
pWW0	Pseudomonas putida	117,0	Дегградация ароматических углеводов
pX01	Bacillus anthracis	181,7	Синтез энтеротоксинов
pSOL1	Clostridium acetobutylicum	192,0	Образование сольвента
pSymB	Sinorhizobium meliloti	1683,3	Множественные функции

Қолдануы

- Вектор ретінде гендерді тасылмалдау

Плазмидалық ДНҚ-ны экстракциялау әдістері

- Соңғы өнімнің тазалығына
- Экстракцияның жылдамдығына
- Үлкен көлемде бөлу «maxiprep», жақсы сапалы пДНҚ экстракциялау болады. Төмен бағалы және тез әдіс.
- Орташа көлемде бөлу «midiprep»
- Кішкентай көлемде бөліп алу «miniprep»

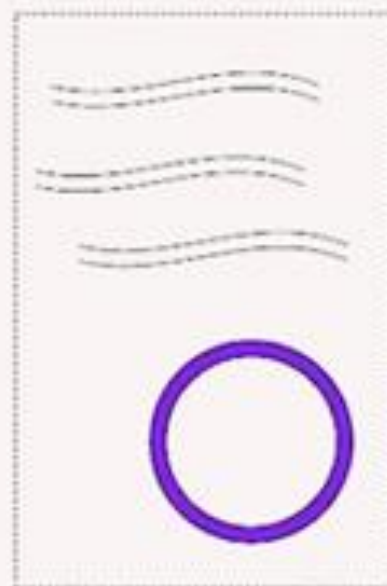
Плазмидалық ДНҚ-ны экстракциялау әдістері

- Жаңа бактериялардың культураны 150 мл ортада 3LB+Amp 7°C-та өсіреміз (20-24 сағат)
- Жасушаны лизиска ұшыру. **Қайнату арқылы лизистеу** (Holmes, Quigley, 1981) және **сілті арқылы лизистеу** (Birnboim, Doly, 1979), жоғары әсерлілігімен және аз плазмидаларға пайдалануға болатындығымен ерекшеленеді (≤ 10 kb) 2-3 мг/л. **ЭДТА** – сыртқы мембрананы босатып, нуклеаза лизоцимін ингибирлеп, клетка қабықшасын бұзады. **SDS** –тің әсерімен лизистеу (Godson, Varnek, 1973) салыстырмалы жұмсақ әрі үлкен плазмидаларда қолдануға болады (≥ 10 kb). SDS - цитоплазматикалық мембрананы бұзып, белоктарды денатурацияға ұшыратып, нуклеазаларды ингибирлейді.
- Сілтілі реагент ретінде 0.2 н NaOH қолданылады.

Плазмидалық ДНҚ-ны экстракциялау әдістері.

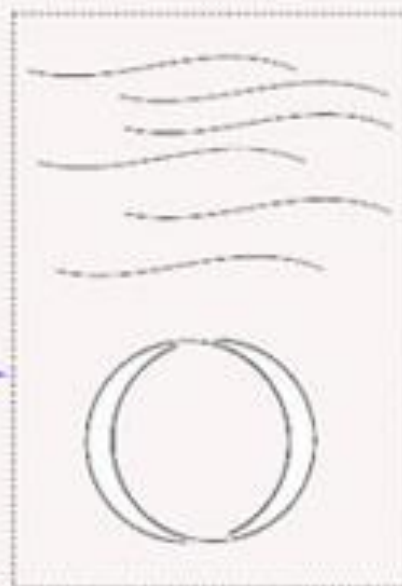
Сілтілі әдіс.

- Эксперимент кезінде геномдық және плазмидалық ДНҚ қоспасының рН-ты сілтілі жаққа өзгертеді. Осы кезде ДНҚ толығымен денатурацияға ұшырайды, бірақ плазмидалық ДНҚ өзгермейді. Оның себебі плазмидалық ДНҚ сақиналы болып келегендіктен арасындаығы байланыс сілтілі реагенттерге тұрақты болып келеді.



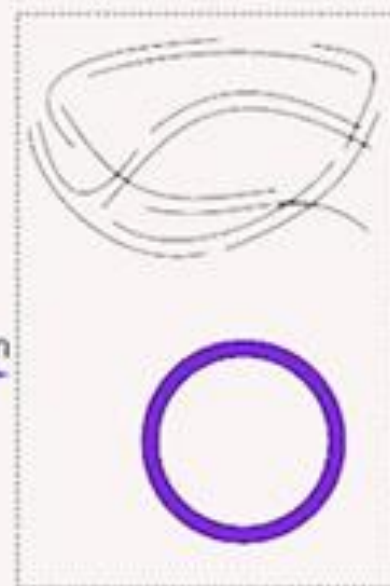
pH 8,0
Фрагменты
линейной ДНК
и кольцевая
плазмидная
ДНК

Denaturation



pH 12,0
Кольца
плазмидной ДНК
остаются
зацепленными
друг за друга

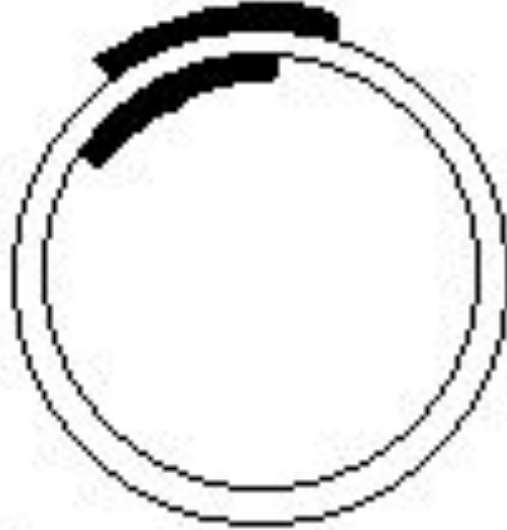
Renaturation



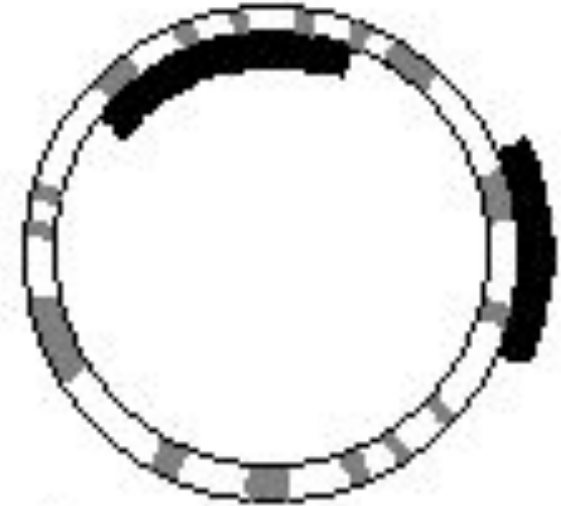
pH 8,0
Линейная ДНК
агрегирует,
кольцевая
восстанавливается



пДНҚ



Обратимая денатурация



Необратимая денатурация

Денатурация кезенінде пДНҚ бір тізбегі жылжып тұрақты қалпысына келеді. Қайтымсыз денатурацияланаған пДНҚ **сиквенске** қолдануға болады, бірақ **рестриктаза** ферменттері оны танымайды.

1. растить ночную культуру 20-24 часа в 100-500ml богатой среды: 37°C, 200-300rpm;
2. ЦФ 4°C, 10-15', слить среду;
3. ЦФ 4krpm, 1', отсосать остатки жидкости;
4. ресуспензировать в 10(5)ml раствора "I";
5. + 1(0.5)ml свежеприготовленного раствора лизоцима (10mg/ml в р-ре "I");
6. NT, 15';
7. + 20(10)ml раствора "II", вылить резко, смешать:
8. 0°C, 5';
9. + 10(5)ml холодного 10M AcONH₄ (добавлять 5 ml пипеткой по каплям), смешать;
10. 0°C, 5';
11. ЦФ 5krpm, 4°C, 10';
12. супер снять, разделить на 2 пробирки, добавить к каждой по 12.5 ml изопропанола. Делать это на весах, чтобы пробирки имели равный вес;
13. NT, 10';
14. ЦФ 5krpm, 4°C, 10', сбросить супер;
15. ЦФ NT, 3', отсосать остатки жидкости (не подсушивать);
16. суспендировать осадок в 800µl 2 M AcONH₄, объединить в одной 2ml пробирке;
17. NT, 5';
18. ЦФ NT, 10';
19. супер перенести в пробирку с 800µl изопропанола;
20. NT, 5';
21. ЦФ NT, 5';
22. сполоснуть 70% EtOH;
23. растворить в 0.2-1ml H₂O.

Выделение рDNA (максипреп - лизис щелочью).

1. растить ночную культуру 16-24 часа в богатой среде: 37°C, 200-300rpm;
2. 1.5ml ночной культуры поместить в 1.7ml пробирку, ЦФ 30", удалить супер;
3. п.2. - ещё 2 раза;
4. ЦФ 10" дополнительно, отсосать остатки среды;
5. ресуспензировать осадок в 200µl раствора "I", вортекс 5";
6. NT, 5';
7. + 400µl раствора "II", резко вылить, сразу же резко встряхнуть, перевернуть ~5 раз;
8. 0°C, 5' (не больше!!!);
9. + 200µl холодного 10M AcONH₄, ~5 раз перевернуть;
10. 0°C, 5';
11. ЦФ NT, 5';
12. супер перенести в пробирку с 500µl изопропанола, смешать;
13. NT, 10';
14. ЦФ NT, 10', сбросить супер;
15. ЦФ NT, 0.5-1', сбросить остатки изопропанола (не подсушивать);
16. + 100µl 2M AcONH₄, вортекс 20";
17. NT, 5';
18. ЦФ NT, 5', перенести супер в пробирку со 100µl изопропанола;
19. NT, 10';
20. ЦФ NT, 10';
21. сполоснуть осадок 70% EtOH (~200µl), подсушить
22. растворить в 25µl (H₂O или TE).

Выделение pDNA (минипреп - лизис щелочью).

пДНК экспресс-әдіспен бөлу

- Векторға енгізілген генді не фрагментті тексері үшін, не плазмиданың көлемін өлшеу үшін қолдануға болады.
- растить ночную культуру 16-24 часа в богатой среде: 37°C, 200-300rpm;
- 0.2ml ночной культуры поместить в 1.7ml пробирку;
- ЦФ 30", удалить супер;
- ресуспензировать осадок в 40µl 1x TE (или TAE), вортекс 5";
- добавить: 40µl Ф:Х,
4µl 10x SDS⁽⁺⁾-буфера для внесения;
- вортекс 20";
- ЦФ 5';
- 15-20µl водной фазы на фореz.

Экстрацияланған пДНК центрифугамен тазарту

1. Взять 0.2-1.0mg pDNA, довести объём до 540µl (H₂O или TE),
2. Добавить 0.800g CsCl;
60µl EtBr 10mg/ml;
3. Смешать, NT, 5';
4. ЦФ NT, 10';
5. Перенести водную фазу в полипропиленовую ультрацентрифужную пробирку для ротора TLS-55; наслоить поверх последовательно по 0.73ml растворов "ρ₂" и "ρ₁";
6. Уравновесить пробирки (вместе с бакетами) попарно на точных весах (с точностью до 1mg);
7. ЦФ на Optima TL-100 (Beckman) 55krpm, NT, >12h (лучше ~24h);
8. Собрать в 1-2ml шприц суперскрученную pDNA (нижняя полоса), перенести в 1.5ml пробирку;
9. Несколько раз (до исчезновения окраски) экстрагировать раствором "изопропанол /CsCl";
10. Очистка от CsCl:
11. Разбавить H₂O в 3 (а лучше в 6) раз и осадить 1x объёмом EtOH (мягко смешать, преципитат промыть 75% EtOH, дважды перенося типом в новую пробирку);
12. Подсушить, растворить в H₂O или TE, спектрофотометрически определить концентрацию.

Экстрацияланған пДНҚ центрифугамен тазарту

- пДНҚ хлорид цезиясымен (CsCl) және этидиум бромидпен (EtBr) аралысады.
- EtBr екі тізбекті ДНҚ молекуласына енеді (интеркаляцияға ұшырайды), осы кезде ДНҚның баусыздануы жүреді. EtBr интеркаляцияға байланысты ДНҚ тығыздығы азаяды, сондықтан тізбекті ДНҚмыз ковалентті байанысқан сақиналы ДНҚға қарағанда салмағы азаяды, өйткені EtBr сақиналы тізбекпен аз мөлшері ғана байланысады. Салмағынадағы айырмашылық болғандықтан екеуі бір бірінен ажырасылады. Интеркаляция процессі ДНҚ молекуласының геометриясын өзгертіп ақуыздардан босатуынан көмектеседі.

