

E. coli transzformálás plazmid DNS-sel

Elméleti bevezetés:

Baktériumok plazmidjai

A plazmidok a kromoszómától függetlenül, önállóan replikálódni képes cirkuláris DNS molekulák, amelyek nagyon sok baktériumfajban természetes módon előfordulnak. Általában olyan, különleges tulajdonságokat kódoló géneket hordoznak, amelyek a környezethez való jobb alkalmazkodást segítik, de nem szükségesek minden körülmények között a gazdaszervezet életben maradásához (nehézfém rezisztencia, toxin termelés, antibiotikum rezisztencia, speciális anyagcsereutak, restriktív-modifikációs rendszerek, patogenitás és szimbiózis...).

Kettős szálú, gyűrű alakú DNS molekulák, melyek a nyitott gyűrűvel egyensúlyt tartó szuperhelikális formát is felvehetnek. A baktériumok természetes plazmidjainak nagysága 3-20 kB, az *E. coli* kromoszómájának 3 millió bázisához képest annak mindössze ezredrésze. Kis mérete miatt viszonylag könnyű a sejtekből láncszakadás, összetöredezés nélkül kinyerni.

Egy plazmidból általában több példány, akár több száz kópia is lehet egy sejtben. Vannak kis és nagykópia számú plazmidok. Általában igaz az, hogy a nagy plazmidok kis kópiaszámúak. Többféle plazmid is lehet ugyanabban a sejtben.

Napjainkban számtalan, in vitro rekombináns DNS technikával mesterségesen "összeállított" plazmid létezik. A génizolálás, a DNS szekvenálás, a génexpresszió vizsgálata, fehérjék termeltetése terén egyaránt hasznos eszközök.

A plazmidok térképe

A plazmid-térkép részletessége a részletek vázlatos jelölésétől a konkrét bázissorrendeket is feltüntető részletességig terjedhet. Az egyszerűsített térkép jelöli az origót, a marker géneket, és a marker génekbe hasító restriktív endonukleázok felismerési helyeit. A plazmid nevét, mely mindig kis „p” betű után további, általában nagy betűket és számokat tartalmaz, a plazmid közepébe szokták beírni. A név képzése tetszőleges, a kis „p” a plazmid rövidítése, azután a plazmidot fejlesztő kutató intézet, vagy kutató személy kezdőbetűit jelentheti, a szám pedig legtöbbször a módosításokat is jelölő felmenő számozás.

A transzformáció

A transzformáció a mikrobiológus, a bakteriológus számára azt a folyamatot jelenti, amikor a DNS kívülről, a baktériumot körülvevő közegből átkerül a baktérium sejt falán és membránján és bekerül a sejt citoplazmájába. Ez egy természetes, a baktériumok ivaros folyamatától eltérő folyamat, mely mind lineáris DNS-fragmentumokkal, mind pedig plazmidokkal megtörténhet. Ezt a természetes folyamatot optimálja a géntechnikus a sejt, a közeg és a felveendő DNS, valamint e három kölcsönhatásait figyelembe véve.

Baktériumok transzformációja plazmid DNS-sel

A kompetens baktériumot olyan fiziológiai állapotba kell hozni, hogy a külső térből való plazmid felvétele maximális legyen. Ezt úgy érhetjük el, hogy a szaporítás megfelelő szakaszába hozzuk

és olyan pufferoldatban szuszpedáljuk, ami a plazmid sejtbe lépését elősegíti. A plazmid alakja, mérete, koncentrációja a közegben szintén jelentős faktor.

Mandel és Higa (1970) megfigyelték, hogy kalcium jelenlétében sokszorosára növekszik az *E. coli* DNS felvétele. A kalcium hidakat képez a sejt felületének makromolekulái és a DNS között. A sejt felületére kötött DNS molekulák bejutásának nagyobb a valószínűsége, mint a közegben oldott és statisztikus eloszlást mutató molekuláké.

A membránon való átjutást a membrán adekvát módon történő fellazítása, fluiditásának megnövelése segíti. A membránt felépítő lipidek szénhidrogénláncait a hőmérséklet emelésével lehet fluiddá, folyóssá és emiatt átengedőbbé tenni. A hősokk néhány percig tartó hőfokemelés jelent, az optimális 30 °C-ról 42-43 °C-ra. Ekkor a sejt felületére tapadt plazmidok hőmozgásuk és a megfolyt membrán miatt nagyobb valószínűséggel lépik át a membránt és kerülnek a sejt belsejébe.

A sejtek néhány órás, tápanyagdús közegben történő növekedés során regenerálódnak, a transzformálódott sejtek szelektív táptalajon tenyésztve izolálhatóak. Például a pRB322 plazmiddal transzformált sejtek antibiotikum (ampicillin vagy tetraciklin) tartalmú táptalajon szelektálhatóak.

Gyakorlat:

1. A transzformációhoz használt törzsek fenntartása

A transzformációhoz DH1 és HB 101 nevű *E. coli* törzseket használunk. A törzsek fenntartása ferde agaron történik. A felhasznált táptalajok összetétele a következő:

LB tápagar:

10 g	pepton /tripton	
5 g	élesztőkivonat	
10 g	NaCl	
17 g	agar	
1000 cm ³	desztvíz	pH 7.5

2. Oldatok

50 mM-os CaCl₂-oldat
Sterilizés autoklávban

Trafó puffer (1 l-re)
1.214 g Trisz
11.1 g CaCl₂
0.95 g MgCl₂ pH 7
Sterilizés autoklávban.

TE oldat plazmid hígításhoz

1.21 g Trisz
0.37 g EDTA-Na
100 cm³ deszt. víz pH 8
Sterilizés autokláv.

Antibiotikum oldatok

Ampicillin 3.5-4 mg Amp/ml deszt. víz
Sterilizés membránszűrővel.

3. Transzformáció menete

1. 37 °C-on egy éjszakán átszaporítjuk az *E. coli* törzseket (DH1, HB101) LB tápoldatban.
2. A tenyészet 1 cm³-vel beoltunk 25 cm³ LB tápoldatot és 37 °C-on 2 órán át inkubáljuk a sejteket. A sejteknek logaritmusos szaporodási fázisban kell lenniük: ez a feltétel 0.3-0.5 ODE-nál (550nm) valósul meg.
3. A tenyészetet 10 percig centrifugáljuk 8000 rpm-mel. A felülúszót leöntjük.
4. 2 cm³ 0 °C-os 50 mM-os CaCl₂-oldatban óvatos vortexeléssel felszuspendáljuk a sejteket és 15 percig 0 °C-on inkubáljuk. A CaCl₂ elősegíti a plazmid sejtfalhoz kötődését.
5. A plazmid DNS-t (pBR322 vagy pGLO plazmid) a trafó puffert és az 1-4 pontban leírtaknak megfelelően előállított *E. coli* sejtszuszpenziót összemérjük a következő sorrendben és arányban:

1. 5-10 µl plazmid oldat (az oldat koncentrációja 0.02 µg plazmid/ µl TE oldat)
2. A plazmid oldatot 100 µl-re egészítjük ki trafó pufferrel.
3. 200 µl sejtszuszpenzió

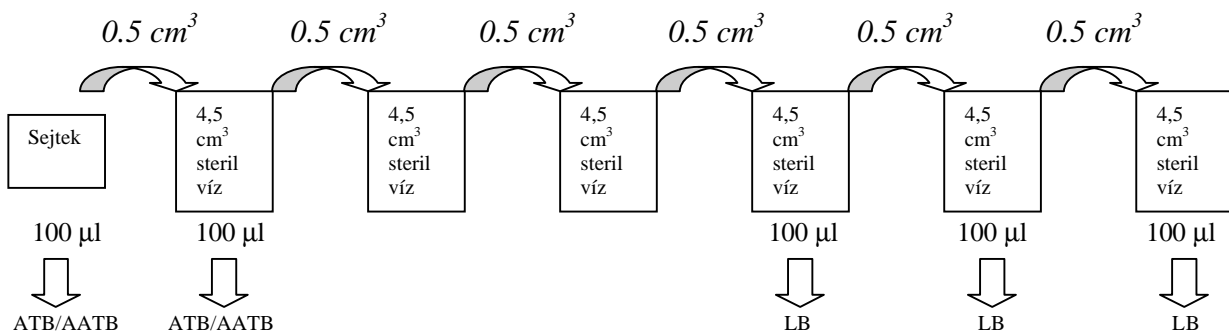
összesen: 300 µl oldat

6. Az 5. pontban előállított sejtszuszpenziót 30 percig 0 °C-on inkubáljuk, utána 50 másodpercig 40-42 °C-on tartjuk, majd visszatesszük 0 °C-ra 2 percre. A hősokk a membrán fluiditását növelve lehetővé teszi a plazmid bejutását a sejtbe.
7. A sejtekre 1 cm³ LB tápoldatot töltünk, 37 °C-on 45-60 percig inkubáljuk.
8. LB tápagarból lemezeket öntünk. Minden transzformáláshoz 5 lemezre van szükség amiből 2 db tartalmaz antibiotikumot 3 db pedig nem. Az antibiotikus lemezek öntésekor ügyelni kell az agar hőfokára ugyanis 60 °C-nál magasabb hőmérsékleten az oxy-tetraciklin

elbomlik. Az antibiotikus lemez készítése a következő módon történik: 10 cm^3 felolvasztott $60\text{ }^\circ\text{C}$ -ra hűtött LB agarhoz $100\text{ }\mu\text{l}$ antibiotikumot adunk (az antibiotikum oldat koncentrációja $c_{\text{OTC}}: 1.25\text{-}1.5\text{ mg/ml}$, $c_{\text{Amp}}: 3.5\text{-}4\text{ mg/ml}$). A szükséges antibiotikum a transzformációhoz használt plazmidnak megfelelő.

8/a. A pGLO plazmidon található Green Fluorescens Protein génje a táptalajhoz való arabinóz hozzáadással kapcsolható be. Ennek vizsgálatához 2 db $100\text{ }\mu\text{l}$ ampicillint ($c_{\text{Amp}}: 3.5\text{-}4\text{ mg/ml}$) és $100\text{ }\mu\text{l}$ arabinózt ($c_{\text{Ara}}=0,75\text{ g/ml}$) tartalmazó és 1 db csak ampicillint tartalmazó lemezt öntünk.

9. A transzformált sejtuszpenzióból hígítási sort készítünk az ábrán látható módon, majd az ábrának megfelelően történik a 8. pontban előállított lemezekre a szélesztés.



ATB – antibiotikum tartalmú LB táptalaj

AATB – arabinóz és ampicillin tartalmú LB táptalaj

LB – LB táptalaj

10. A transzformáció értékelése 48 óra múlva történik a telepek megszámlálásával.

Beadandó jegyzőkönyv

A transzformációhoz használt törzs neve, plazmid neve és térképe. A transzformáció lépései.

Hígítási terv. A különböző hígításhoz tartozó telepek száma.

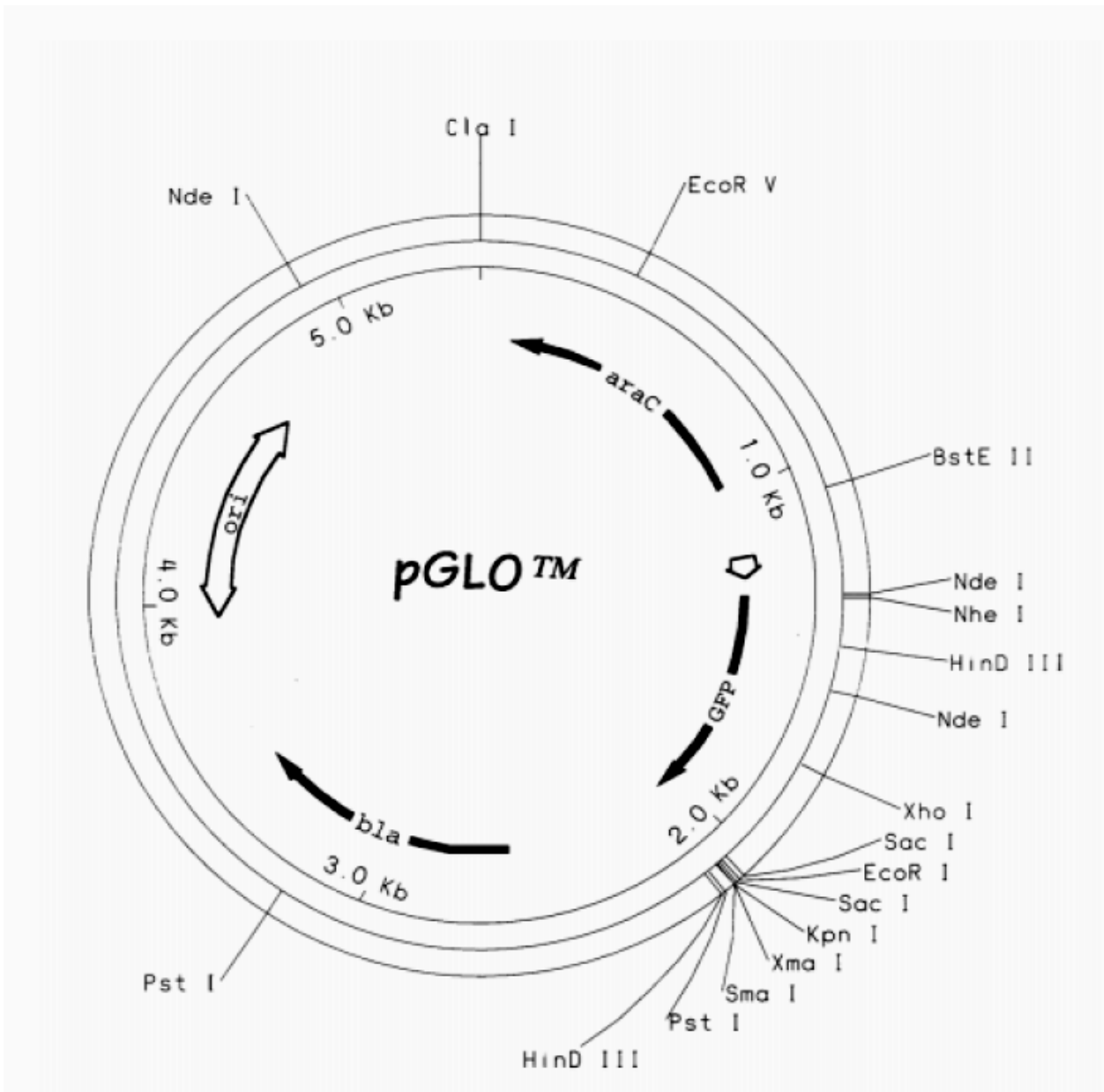
A lemezen számolni:

1. Élő sejtszámot.
2. Transzformálódott sejtek számát.

Kiszámítani:

1. Minden hányadik sejt transzformálódott?
2. $1\text{ }\mu\text{g}$ plazmidból keletkezett transzformánsok számát.

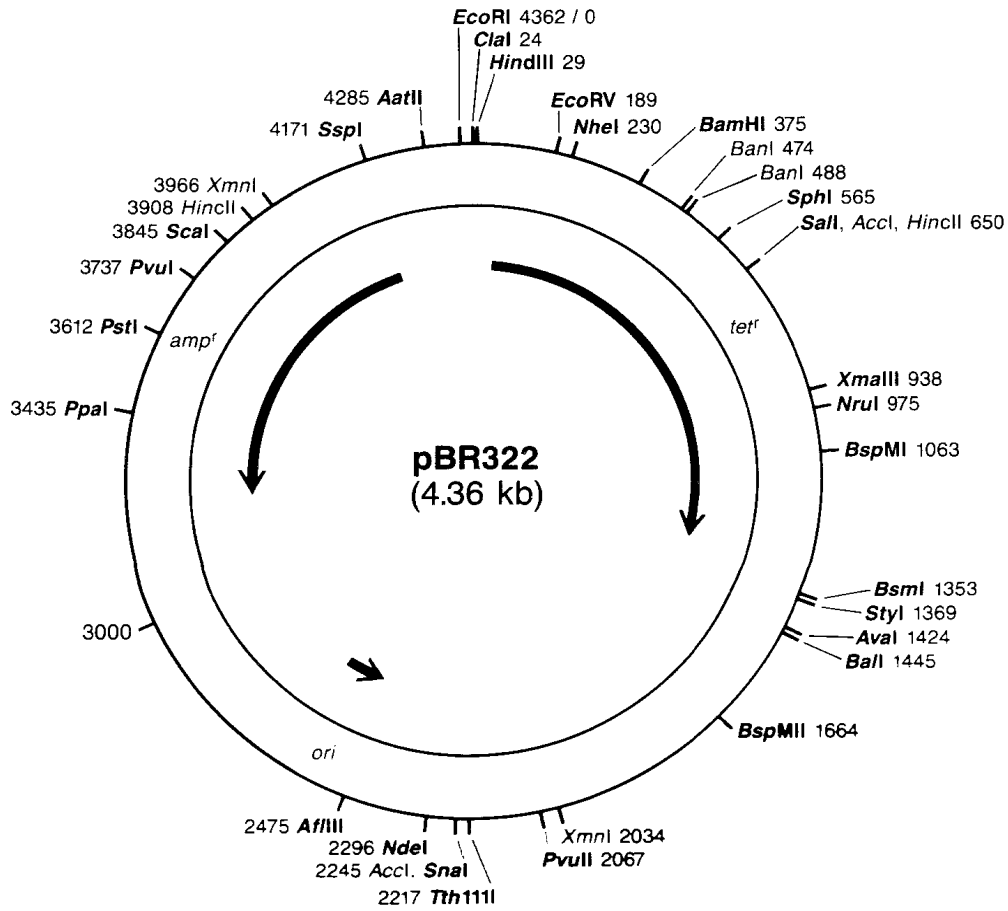
Melléklet – plazmid térképek



A pGLO plazmid térképe

ori: replikációs origó, **bla**: béta-laktamáz gén, **gfp**: green fluorescent protein gén

A pGLO plazmidon megtalálható a Green Fluorescent Protein (GFP), azaz zöld fluoreszkáló fehérje génje. Ennek eredeti forrása a biolumineszcens *Aequorea victoria* medúza. A pGLO plazmid a GFP génje mellett ampicillin rezisztencia gént is tartalmaz. A GFP gén speciális szabályozó rendszer által kapcsolható be arabinóz hozzáadásával a táptalajhoz. A pGLO-val transzformált sejtek ampicillin tartalmú táptalajon szelektálhatóak, arabinóz nélküli táptalajon fehér, arabinóz tartalmú táptalajon fluoreszcens zöldessárga színűek.



A pBR322 plazmid térképe

ori: replikációs origó, **amp:** ampicillin rezisztencia gén, **tet:** tetrán rezisztencia gén