Farzaneh Forouharfar
University of Isfahan
Faculty of Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

عنوان:

استخراج DNAپلاسمیدی از باکتری‌ها به روش Miniprep

Extraction of plasmic DNA by miniprep

Farzaneh Forouharfar

اهداف آزمایش

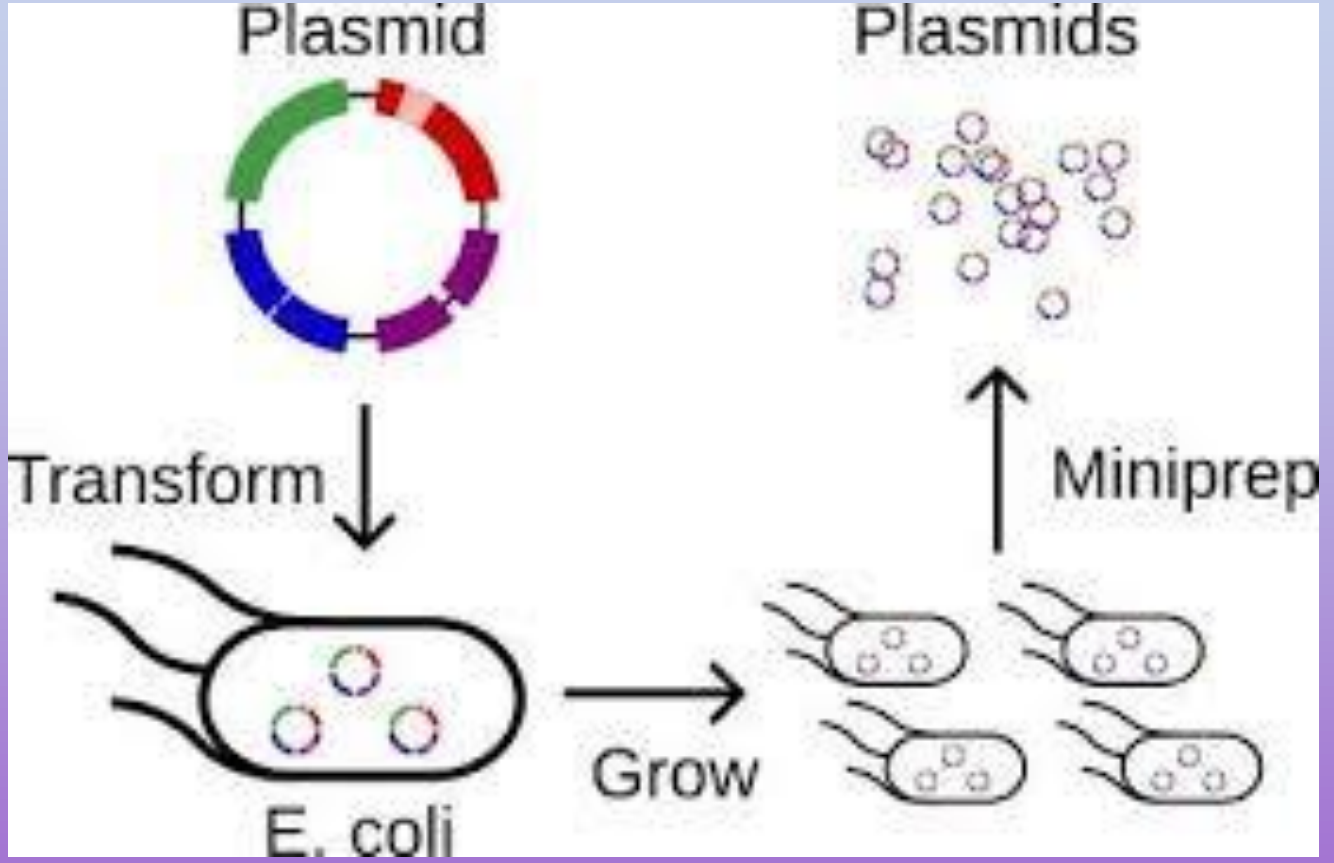
رسوب باکتری‌های کشت‌یافته

شکستن باکتری‌ها و استخراج DNAپلاسمیدی

- **مقدمه:**

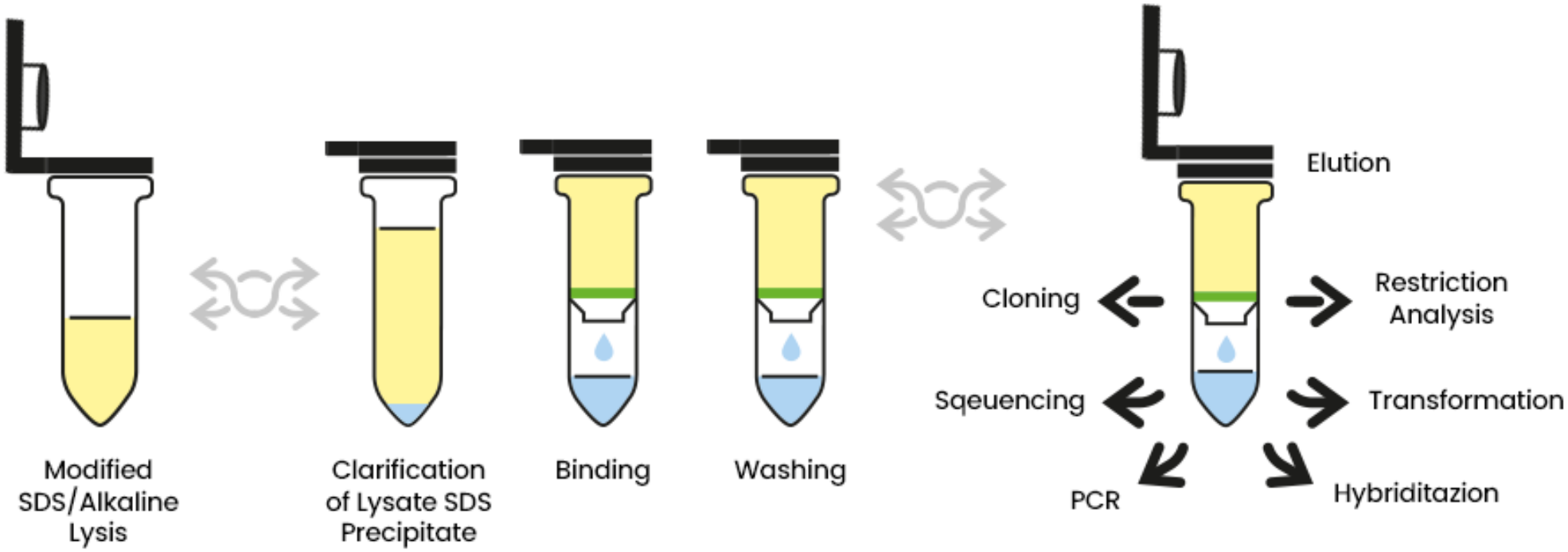
- DNAپلاسمیدی جهت تکثیر و کلونینگ به سلول‌های باکتریایی میزبان منتقل می‌شود. در سلول‌های باکتریایی، پلاسمیدها مستقل از ژنوم میزبان تکثیر یافته و با افزایش توده ی باکتریایی بر تعداد پلاسمیدها نیز اضافه می‌گردد. بطوریکه پس از مدت کوتاهی مقدار قابل ملاحظه ای از DNAپلاسمیدی ایجاد می‌شود. به منظور استخراج DNAپلاسمیدی، سلول‌های باکتریایی می‌بایست به طریقی شکسته شوند، که DNAژنومی آزاد نشود. روش‌های مختلفی برای شکستن باکتری جهت استخراج DNAپلاسمیدی ابداع شده اند که متداول‌ترین آنها روش لیز قلیایی و جوشاندن (Boiling) می‌باشند. در روش قلیایی دیواره سلولی در حضور مواد قلیایی نظیر هیدروکسید سدیم (NaOh) تخریب می‌شود. در صورتیکه در روش جوشاندن از حرارت برای تخریب دیواره سلولی استفاده می‌شود. در این جلسه چگونگی استفاده از روش قلیایی جهت استخراج DNAپلاسمیدی مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

- اصطلاحا به روش تهیه ی DNAپلاسمیدی از باکتری‌ها در مقیاس کم Minipreپو در مقیاس بالا Maxiprepگفته می‌شود. در روش Minipreپهدف این است که مشخص شود آیا در کلونی‌ها پلاسمید وجود دارد و بعد از اطمینان یافتن از نتیجه Miniprep آنگاه Maxiprepانجام می‌شود. و نهایتا DNAپلاسمیدی تخلیص شده را می‌توانیم سال‌ها در دمای مناسب نگهداری و جهت آزمایشات ژنتیک مولکولی استفاده نماییم.



Farzaneh Forouharfar

- پس از کلونینگ از آنجا که ممکن است روی محیط کشت تعدادی کلنی تک داشته باشیم که از لحاظ ژنتیکی با هم متفاوت باشند، برای هر کدام از کلونی‌ها بایستی یک Miniprepانجام شود تا کلنی مورد نظر را از سایر کلونی‌ها مشخص شود و بعد از اطمینان از صحت کلونی موردنظر Maxiprepانجام می‌شود که همه ی مراحل آن مشابه Miniprepاست ولی با نسبت بیش‌تری انجام می‌گیرد. DNAاستخراج شده می‌تواند بوسیله ی اولتراسانتریفیوژ در شیب غلظت کلرید سزیم (CsCl) از RNAو پروتئین‌ها جداسازی و تخلیص گردد. البته پلاسمید استخراج شده در روش Miniprepعموما به اندازه کافی خالص می‌باشد و همچنین مناسب، جهت کلونینگ (Cloning)، PCRو تعیین توالی (Sequencing) است. کیت‌های تجاری نیز برای استخراج و تخلیص DNAپلاسمیدی وجود دارند که در مدت کوتاهی ۱-۲ ساعت می‌توان مقدار مناسبی DNAتهیه نمود



Farzaneh Forouharfar

مواد و محلول‌های موردنیاز

- محیط LBاستریل حاوی آمپی سیلین
- محلول ۱(گلوکز، تریس، EDTA)
- محلول ۲(سود، SDS)
- محلول ۳(استات پتاسیم)
- اتانل ۹۵٪ سرد (در یخچال در ۲۰- درجه سلنتی‌گراد نگهداری شود.)
- اتانل ۷۰٪ سرد (در یخچال در ۲۰- درجه سلنتی‌گراد نگهداری شود.)
- آب مقطر استریل
- یخ
- بافرTE (Trice, EDTA)

Farzaneh Forouharfar

Farzaneh Forouharfar

- **طرز تهیه محلول‌ها**
- **محلول ۱:**
- ۲۵ میلی مولار تریس هیدروکلراید (Trice-HCl, PH=8)، ۵۰ میلی مولار گلوکز و ۱۰ میلی مولار EDTA
- **محلول ۲:**
- ۰.۲ مولار NaOHو ۱٪SDS (محلول فوق از سود ۲ مولار و ۱۰٪SDS هنگام مصرف تهیه شود.)
- **محلول ۳:**
- اساستات پتاسیم ۳ مولار، اسید استیک ۵ مولار (PH=5). جهت تهیه محلول، به صورت زیر عمل کنید:
- ۲۹.۴ گرم استات پتاسیم (وزن مولکولی= ۹۸.۱۴) را در ۱۱.۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال حل کنید و به آن آب مقطر اضافه نموده و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

Farzaneh Forouharfar

- ***توجه:** جهت دقت در ساخت محلول‌های فوق بهتر است محلول‌های استوک به شرح زیر تهیه شوند:
- **محلول‌های استوک جهت ساخت محلول ۱:**
- ۱- محلول ۱ مولار تریس-هیدروکلراید
- برای ساخت ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فوق مقدار ۱۱۲. گرم پودر تریس را در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و PHآن را با HCl۱ نرمال روی ۸ تنظیم نمایید و سپس با افزودن آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.
- ۲- محلول ۱ مولار گلوکز
- برای تهیه ی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فوق مقدار ۱۸.۰۱۶ گرم پودر گلوکز را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید.
- ۳- محلول EDTA ۰.۵ مولار
- برای تهیه ی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فوق مقدار ۱۸.۶ گرم از پودر EDTAرا در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. PHرا روی ۸ تنظیم و سپس حجم را به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.
- در نهایت جهت ساخت ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول شماره ۱، ۲.۵ میلی‌لیتر تریس ۱ مولار، ۵ میلی‌لیتر گلوکز ۱ مولار و ۲ میلی‌لیتر EDTA ۰.۵ مولار را با ۹۰.۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط نمایید.

- **محلول‌های استوک جهت ساخت محلول ۲:**
- ۱-محلول ۲ مولار سود
- برای تهیه ی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فوق ۸ گرم سود را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید.
- ۲-محلول ۱۰٪ SDS
- ۱۰ گرم SDSرا در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید.
- جهت ساخت ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۲ هنگام مصرف، ۱۰ میلی‌لیتر سود ۲ مولار را با ۱ میلی‌لیتر SDS۱۰٪ و ۸۹ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط نمایید
- **محلول استوک جهت ساخت محلول ۳:**
- برای تهیه ی ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ۳، ۱۴۰.۷۲ گرم از پودر استات پتاسیم را در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و PHآن را با استیک اسید روی ۵ تنظیم نمایید و به حجم ۵۰ میلی‌لیتر برسانید.

وسایل موردنیاز

- لوله‌های شیشه‌ای ۱۵ میلی‌لیتری استریل
- لوله‌های اپندرف ۱.۵ میلی‌لیتری استریل (هر گروه به ۲ اپندرف نیاز دارد)
- پیپت ۵ میلی‌لیتری استریل
- سمپلرهای ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری و سرسمپلر استریل
- دستگاه میکروسانتریفیوژ (۱۳ هزار دور در ثانیه)
- دستگاه سانتریفیوژ (۴ هزار دور در ثانیه)

- **روش کار:**

- ۱-در یک لوله آزمایش، یک کلونی از باکتری‌های ترانسفورم شده در آزمایش قبل را در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت LBحاوی آمپی سیلین تلقیح نمایید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت (در طول شب) در انکوباتور انکوبه نمایید.

- ۲- ۱.۵ میلی‌لیتر از شلول‌های باکتریایی را در یک لوله اپندرف استریل به مدت ۵ دقیقه در دور ۶ هزار میکروسانتریفیوژ نمایید (این عمل را بار دیگر تکرار کنید تا حجم باکتری‌های رسوب یافته افزایش یابد.)

- ۳- فاز محلول را دور ریخته و باکتری ها را در ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ بطور کامل حل کنید و ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه نمایید.

- ۴- نمونه‌ها را چند دقیقه ورتکس نمایید.

- ۵- به لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۲ اضافه نموده و با چرخاندن لوله بطور کامل و آرام مخلوط نمایید. در این مرحله محلول حالت لزج مانندی پیدا می کند.

- ۶- به لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۳ اضافه نموده و با تکان دادن کاملا مخلوط نمایید. چند دقیقه ورتکس نمایید، در این مرحله اجسام باکتریایی به همراه DNAژنومی بصورت سفید رنگ رسوب می‌کنند.

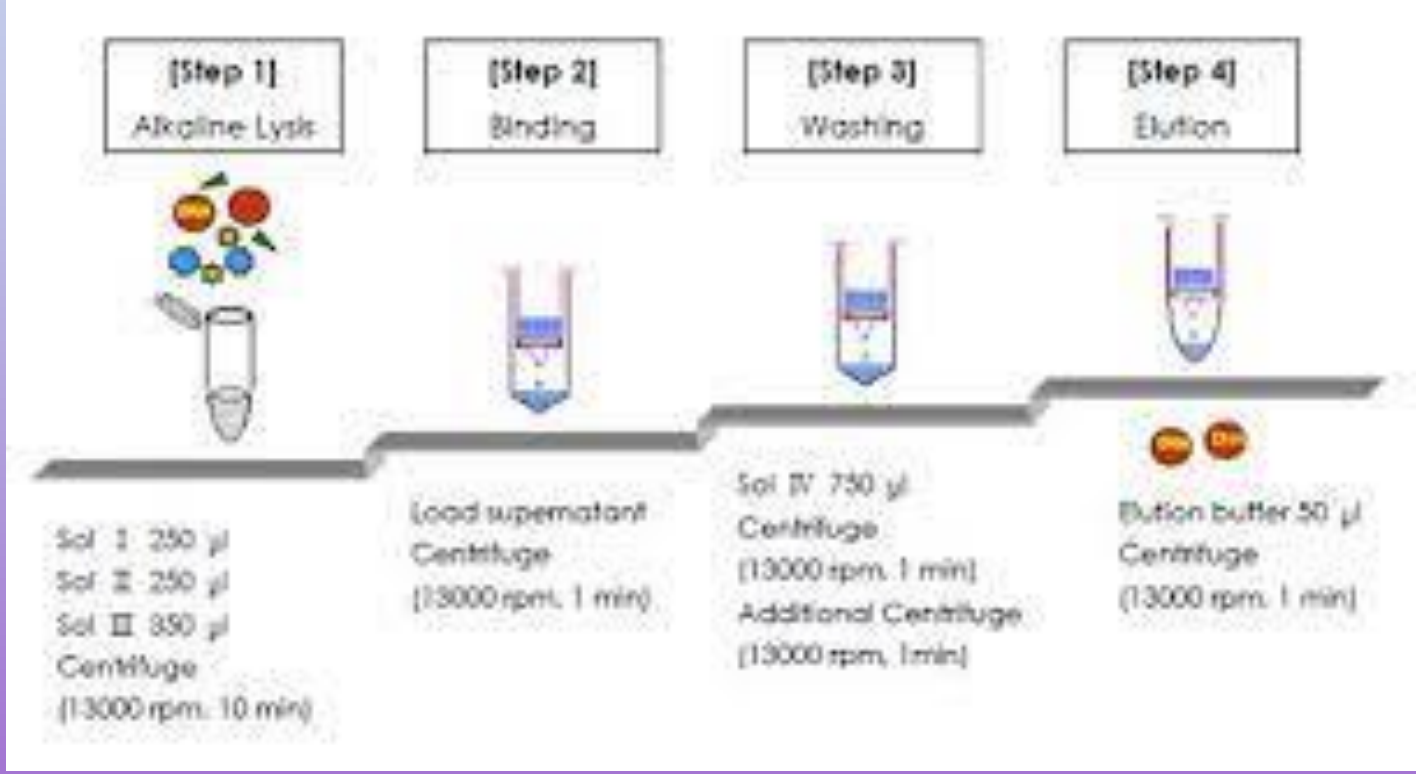
- ۷- لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه روس یخ انکوبه کنید.
- ۸- لوله‌ها را ۵ دقیقه در دور ۱۲ هزار سانتریفیوژ نمایید.
- ۹ط با دقت ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی را بدون بر هم زدن فاز رسوب به لوله‌های های اپندرف جدید منتقل نمایید و به آن ۱ میلی‌لیتری اتانل ٪۹۵ سرد اضافه نموده و مخلوط نمایید، رشته ی DNAدر محلول بصورت شناور دیده می‌شود. حدود ۱۰ دقیقه اپندرف‌ها را در یخچال در قسمت جایخی نگه دارید.
- ۱۰- لوله‌ها را ۵-۱۰ دقیقه در میکروسانتریفیوژ در دور ۱۲ هزار سانتریفیوژ کنید.
- ۱۱- فاط الکلی را دور ریخته و به رسوب، ۱ میلی‌لیتر اتانل ٪۷۰ اضافه نموده و مخلوط کنید. (این مرحله اختیاری است.)
- ۱۲- لوله‌ها را به مدت ۲ دقیقه در میکروسانتریفیوژ در دور ۱۲ ازار سانتریفیوژ نمایید. فاز الکلی را دور ریخته و رسوب را در دمای محیط خشک نمایید.

- DNAپلاسمیدی تهیه شده حاوی مقدار زیادی RNAمی‌باشد که در صورت نیاز به حذف می‌تون از آنزیم RNAaseاستفاده نمود.

- ۱۳- DNAاستخراج شده را در ۵۰ میکرولیتر بافر TEیا آب مقطر استریل حل نمایید. برای حل شدن سریع‌تر حدود ۱ ساعت اپندرف‌ها را در حمام آب گرم ۶۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهید.

- DNAمزبور برای هضم آنزیمی و تفکیک بر روی ژل آگارز آماده است. این محلول می‌تواند برای مدت کوتاه (یک ماه) در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی در فریزر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. از این DNAدز جلسات چهارم و ششم استفاده خواهد شد.

- ***توجه:** محصول DNAبا روش Miniprepحدود ۲-۵ میکروگرم است اما با این حال بسته به نوع و اندازه ی DNA پلاسمیدی مقدار آن می‌تواند متفاوت باشد



Farzaneh Forouharfar