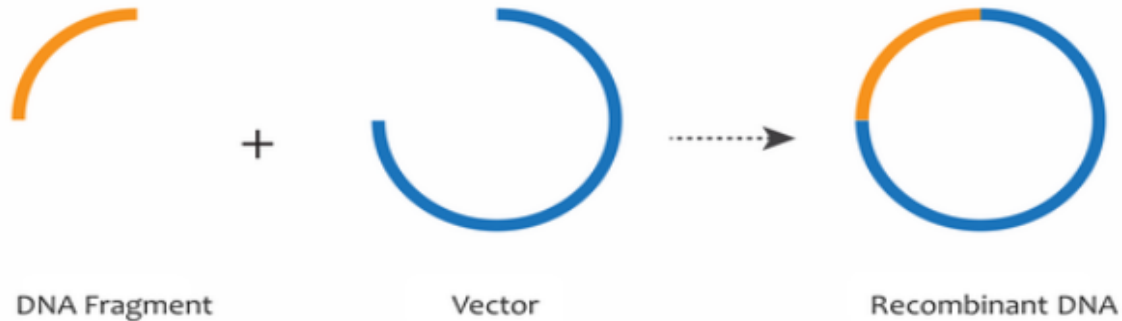


HAFTA VI

Plazmid Üretimi Ve Saflaştırılması 1
Koloni Toplanması
Bakteri Kültürünün Çoğaltılması
Plazmid DNA İzolasyonu (Miniprep)

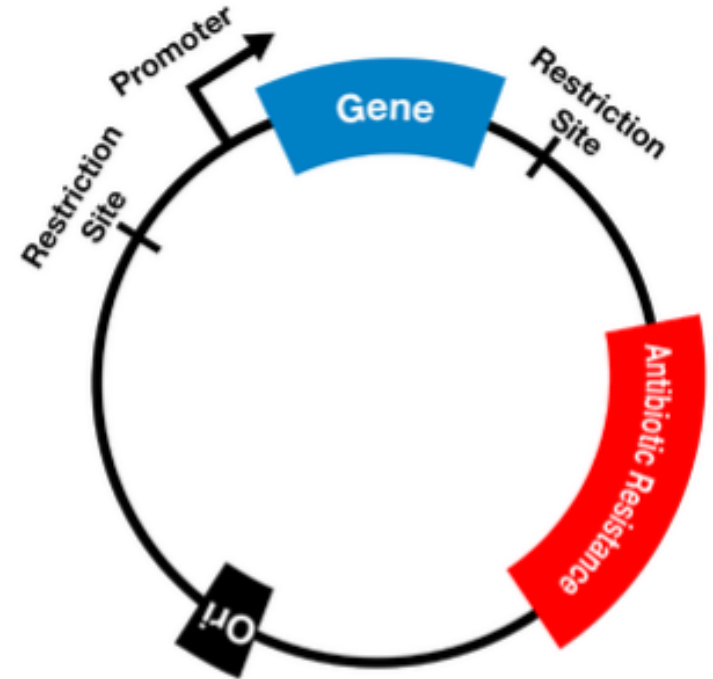
Plazmidler

- Joshua Lederberg 1952 yılında herhangi bir ekstrakromozomal kalıtsal determinanı referans olarak plazmid terimini icat etmiştir.
- Plazmidler, doğal olarak birçok bakteri tipinde bulunan küçük dairesel DNA parçalarıdır.. Bu diziler tipik olarak gen taşırlar ve kromozomal DNA'dan bağımsız olarak çoğalabilirler.
- Arkea ve ökartlarda da bulunmalarına rağmen, en önemli biyolojik rollerini horizontal gen transferi sayesinde bir bakteriden diğerine geçebilme yetisine sahip olduklarında oynarlar.
- Bu özellikleri sayesinde genellikle konak hücreye ,antibiyotik direnci kazandırmak gibi, fayda sağlarlar.
- Konak hücreye faydaları plazmidin içeriğine bağlıdır ve bu yüzden plasmitler konak hücre ile simbiotik ilişli içersindedirler.
- Bakteriyel kromozomal DNA gibi, plasmid DNAlar hücrenin bölünmesiyle birlikte çoğalır ve her yeni hücre en az bir kopya plazmid içerir.
- 1970lerde, restriksiyon enzimlerinin DNA ligaz ve jel elektroforez sisteminin keşfedilmesiyle birlikte, bilim insanları spesifik bir DNA dizisini bir kromozomdan bir plazmide aktarabilmeye başladılar. Rekombinant DNA teknolojisi adı altında önemli rol oynayan bu teknikler birbirine benzeyen birçok DNA fragmentinin oluşturulmasına olanak sağlamıştır.

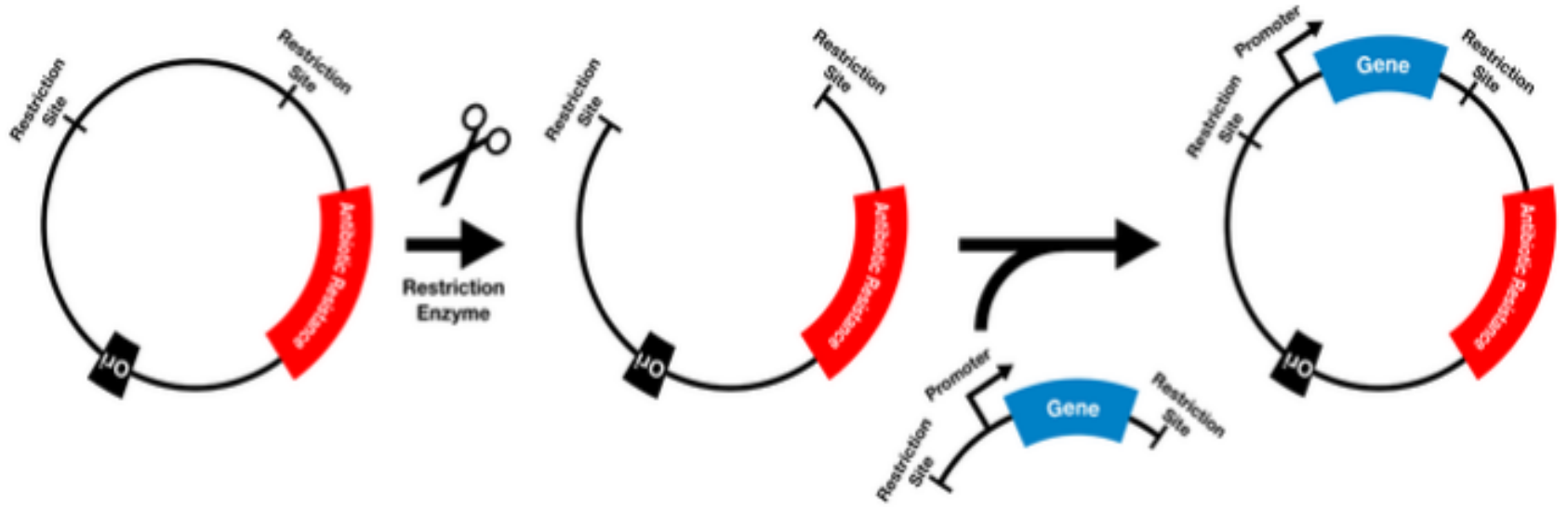


Plazmidler

- Plazmidler kolayca manipüle edilebildiklerinden dolayı çok çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere sentetik olarak geliştirilebilirler.
- Restriksiyon enzimleri sayesinde belirli bölgelerden plazmidler kesilir ve yeni DNA dizileri eklenebilir.



Plazmidler



Şekil: Özel DNA fragmentlerinin Plazmid içerisine restriksiyon enzimleri aracılığıyla yerleştirilmesi

Transformasyon

Bakteriyel Koloni Oluřturulması

- Yabancı DNA molekülünün hücre içersine sokulması sürecine transformasyon denir.
- Bakterilere plazmid transformasyonu, sadece bakterilerde yapılan çalışmalar açısından değil aynı zamanda bakterinin plazmidlerin replikasyonu için ortam sağlaması ve plazmidlerin depolanması açısından da büyük önem taşır.
- Bu sebeple, hemen hemen tüm plazmidler bakteriyel replikasyon orijini (ORI) ve antibiyotik direnç geni taşırlar. Taşıdıkları antibiyotik direnç geni bakterilerin kolaylıkla seçilmesini sağlar.
- Bilim insanları, kolayca tranforme olacak ve plazmid DNA'nın tekrar düzenlenmesine gerek kalmadan plazmidi idame ettirebilecek bakteri strainleri oluşturmak için birçok genetik modifikasyon yaptılar. Ek olarak transformasyon verimliliğini artırmak ve kompetent hücre olarak adlandırılan hücreleri geliştirmek için bir takım çalışmalar yapmışlardır.

Kompetent Hücre ve Koloni Oluřturulması

- Ticari olarak satılan kompetent hücreler olduğu gibi, araştırmacılar laboratuvarlarda para tasarrufu yapmak için kendi kompetent hücrelerini oluşturulabilir.
- Plazmid DNA transformasyonu kimyasal olarak ya da elektroporasyon tekniği kullanılarak yapılabilir.

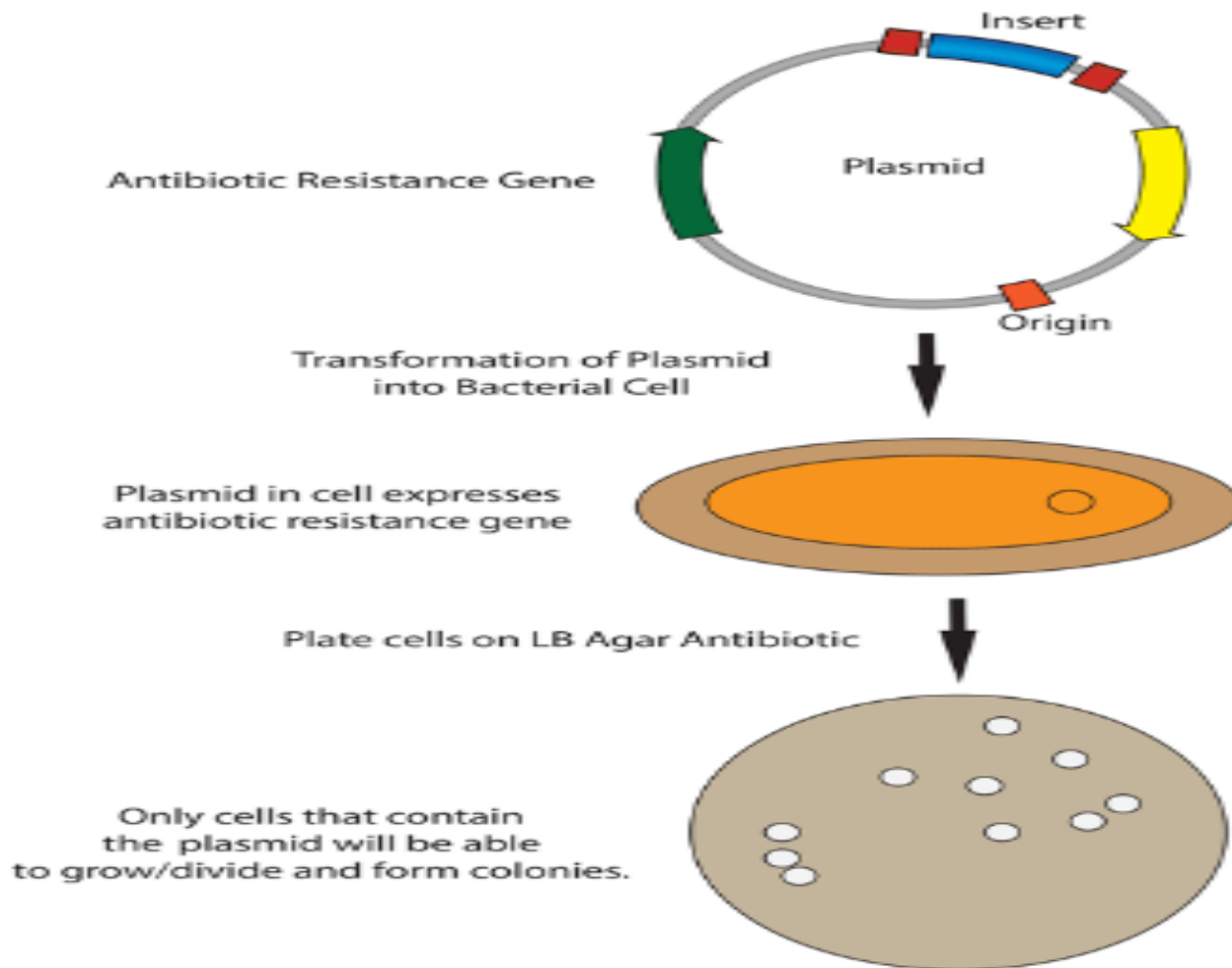
Kimyasal Transformasyon Protokolü

- Kompetent hücreler -86°C den çıkarılıp çözündürülür ve buz üstünde tutulur.
- 0.25 ng plasmid ependorf tüpe transfer edilir ve buz üstünde tutulur.
- 50 μl kompetent hücre solüsyonu DNA içeren tüpe eklenir ve 30 dk buz üstünde inkübe edilir.
- Su banyosu 42°C ye ısıtılır ve tüp 90 saniye süre ile ısı şokuna maruz bırakılır.
- 2 dakika buz üzerinde tutulur.
- 1ml antibiyotik içermeyen LB eklenir
- 45 dakika 37°C de inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası 100 μl petri pleytlere dağıtılır.

Elektroporasyon ile Transformasyon Protokolü

- Elektroporasyon küvetleri, DNA örnekleri ve tüpler buz üstünde soğutulur.
- LB agar pleytleri 37°C inkübatöre ısınmaları için yerleştirilir.
- Elektro-kompetent hücreler -86°C den çıkarılıp buz üstünde çözdürülür.
- Elektroporatör açılır ve voltaj 1.25 kV (1mm küvet) ya da 2.5 kV (2mm) ayarlanır.
- Kullanılacak DNA örneğinin tuz konsantrasyonuna bağlı olarak 1 ya da 2 µl DNA örneği hazırlanır.
- 50 µl elektro-kompetent hücre tüpe aktarılır.
- 950 µl SOC medyumu tüpe aktarılır.
- 1-2 µl DNA örneği son olarak tüpe aktarılır. Tüp pipet ucuyla yavaşça karıştırılır. PİPETAJ YAPILMAMALIDIR.
- Hücreler buza yerleştirilir ve soğukta korunduğundan emin olunmalıdır.
- Hücre DNA karışımı küvetlere aktarılır. PİPETAJ YAPILMAMALIDIR
- Küvetler elektroporatöre yerleştirilir ve elektrik akımı uygulanır.
- Küvetler elektroporatörün çemberinden alınır ve SOC medyumu eklenir. Bu aşama hücrelerin ölmesini engellemek için mümkün olduğunca hızlı yapılmalıdır.
- SOC-hücre karışımı önceden soğutulmuş ependorf tüplere aktarılır.
- 2 dakika buz üzerinde tutulur.
- Ependorf tüpler çalkalayıcı inkübatörde 37°C de 1 saat inkübe edilir.
- 1 saat sonrasında, 200 µl hücre-SOC karışımından önceden ısıtılmış uygun antibiyotikli LB-agar pleytlere ekilir.
- Pleyt bir gece transforme olan kolonilerin büyümesi için 37°C de inkübe edilir.

Transformasyon



Plazmid DNA İzolasyonu

- Bakteri hücrelerinden faz DNA'sı kromozomal DNA ve plazmid DNA olmak üzere üç farklı DNA izole edilebilir. Ekstrakromozomal bir yapı olan Plazmid DNA diğer DNA tiplerine kıyasla bakteri hücrelerinde her zaman bulunmayabilir. Plazmid DNA izolasyon yönteminin üç ana aşaması bulunmaktadır: Hücre parçalanması; Denatürasyon/Proteoliz ile DNA-Protein kompleksinin ayrılması ve DNA'nın çözünür hale getirilmesi; DNA'nın enzimatik/kimyasal yöntemlerle RNA, protein ve diğer alt moleküllerden ayrılması

Plazmid DNA İzolasyonu

Alkalen Lizis Protokolü

- Transforme edilen pozitif bakteriler uygun antibiyotik içeren LB medyum içerisinde 37°C de çalkalayıcı inkübatör içerisinde overnight büyütülür. Genel olarak 3ml hücre kültürü yeterlidir.
- Ertesi gün hücreler 1,5 ml ependorf tüplere alınır ve maksimum hızda santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır ve 100 µL resüspanسیون solüsyonu eklenir.
- Pelet çözünene kadar vortexlenir.
- 100 µL lizis solüsyonu eklenir ve tüp 5-6 defa baş aşağı edilerek yavaşça karıştırılır.
- 150 µL nötralize edici solüsyon eklenir ve tüp baş aşağı edilerek yavaşça karıştırılır. Bu aşamada bakteriyel DNA beyaz çökelti olarak gözlemlenir.
- Tüpler maksimum hızda 10 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde temiz 1,5 ml lik ependorf tüpe aktarılır.
- Süpernatantın 2,5-3 katı kadar soğuk etanol eklenir ve tüpler baş aşağı edilerek karıştırılır.
- Tüpler maksimum hızda 10 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırılır ve tüp kurumaya bırakılır.
- DNA peleti 50 µL TE tamponu ile resüspanse edilir. İçerisinde bulunan RNA moleküllerinin uzaklaştırılması için son hacimde 1mg/ml olacak şekilde Rnase eklenir.

Solüsyonlar

- LB Medyum
 - 1% Tripton
 - 0.5% Maya ekstraktı
 - 200 mM NaCl
- Resüspansiyon Solüsyonu
 - 50 mM glikoz
 - 10 mM EDTA
 - 25 mM Tris (pH: 8.0)
- Lizis Tamponu
 - 0.2 N NaOH
 - 1% SDS
- Nötralize edici Solüsyon (100 ml)
 - 3 M KOAc (pH: 6.0)
 - 60 ml 5M Potasyum Asetat
 - 11.5 ml Glasiyal Asetat
 - 28,5 ml H₂O
- TE
 - 1 mM EDTA
 - 10 mM Tris-HCl (pH: 8.0)