

A gyakorlat célja az alapvető DNS technikák gyakorlása és egy látványos fehérje expressziós kísérlet elvégzése. A hallgatók párosával végzik a gyakorlatot.

Feladatok:

1. **A gyakorlaton szükséges eszközök és anyagok elkészítése**
2. **Kompetens sejt készítés, transzformálás, a kompetencia mértékének meghatározása**
3. **DNS konstrukció készítés**
4. **Rekombináns fehérje termeltetés és izolálás**

1. A gyakorlaton szükséges eszközök és anyagok elkészítése, elvégzendő hétfőn

A gyakorlaton felhasznált eszközök sterilizálása:

4 db (+ páronként 1 db) 100 ml-es Erlenmeyer, 100, 1000 és 5000-es pipettahegyek, fogpiszkáló, eppendorf csövek, 30 db rövid üveg kémcső műanyag kupakkal, 50 ml-es Falcon-csövek.

Szükséges oldatok – sterilizve:

50 ml deszt víz; 500 ml LB; 200 ml 0,1 M $MgCl_2$; 50 ml 0,1 M $CaCl_2$; ~10 ml 80%-os glicerín (a glicerint mérlegesen mérjük be 50 ml-es oldatba, majd számított térfogatú vizet adunk hozzá);

500 ml LB-agar

Nem kell sterilizni: 1 L 1x TAE, 200 ml 1%-os agaróz

Készen van: 100 mg/ml-es ampicillin

Anyagok

LB-tápleves: 5 g tripton
2,5 g YE (élesztő kivonat)
2,5 g NaCl
500 ml deszt. víz

0,1M $MgCl_2$: 1,9 g $MgCl_2$ (vízmentes)
200 ml deszt. víz

autokláv sterilizált

0,1 M $CaCl_2$: 0,55 g $CaCl_2$ (vízmentes)
50ml deszt. víz

autokláv sterilizált

lemezek: 5 g tripton
2,5 g YE
2,5 g NaCl
7,5 g agar
500 ml deszt. víz

kb 50-55 fokra lehűlés után az oldathoz 500 μ l ampicillint adunk és 16-18 db lemezt öntünk.

TE puffer:	10 mM Tris 1 mM EDTA pH=8 autokláv sterilizált
Ni-bind puffer:	6,5 g Na ₂ HPO ₄ 0,7 g NaH ₂ PO ₄ (össz.: 50 mM foszfát, pH=8) 17,55 g NaCl (300 mM) 1L-ig DV
Ni-elute puffer:	Ni-bind + 250 mM imidazol
80 %-os glicerin:	40 ml 50 ml-re kiegészítve deszt. vízzel filter sterilizált

2. Kompetens sejt készítés, transzformálás, a kompetencia mértékének meghatározása (hétfő-kedd-szerda)

Valamennyi kompetens sejt készítési módszer titka, hogy a lépéseket végig steril eszközökkel, és steril vegyszerekkel jégen végezzük!! Természetesen nagyon fontos a gyors munka!

1. Előkészítés

- **hétfőn** délután az előzőleg elkészített lemezekről leoltunk 2 DH5αF` és 2 BL21star (DE3) telepet 3 ml LB-be és O/N növesztjük 37 °C-on, 200 rpm rázás közben.

2. Növesztés

- **kedd** reggel 100 ml-es Erlenmeyerbe mért 25 ml LB-hez adunk 500 µl telített kultúrát
- azonnal kiveszünk 3 ml-t turbiditás méréshez - ez a 0 perces érték (a turbidimétert bevisszük a gyakorlóba a sejtek növesztésének idejére)
- a sejteket növesztjük 37 °C-on, 200 rpm rázás közben – 30, majd 20 percenként veszünk mintát turbiditásméréshez
- a növesztést 3-4 MF egységig folytatjuk

IDŐ (perc)	MF			
	Dh5α 1	Dh5α 2	BL21star (DE3) 1	BL21star (DE3) 2
0				
30				
60				
90				
110				
130				
150				
170				
190				

3. Sejtek kémiai kezelése

- A sejteket 15 percig jégbe hűtjük.
- A felnövesztett sejtszuszpenziót 10 perc alatt 4 °C-on 4000 rpm-mel lefugáljuk,
- a pelletet 12,5 ml jéghideg 0,1 M-os MgCl₂-oldatban felszuszpendáljuk, 20 percig állni hagyjuk jégen.
- 10 perc 4 °C 4000 rpm fugálás után a pelletet 1 ml jéghideg, 100 mM-os CaCl₂-oldatban felszuszpendáljuk, egy órán át állni hagyjuk jégen.
- Hozzáadunk annyi 80%-os glicerint, hogy a végkoncentráció 20%-os legyen.
- A sejtszuszpenziót 100 µl-enként jéghideg, steril Eppendorf csövekbe mérjük, majd folyékony nitrogénben lefagyasztjuk, és -80 °C-on tároljuk.

4. DH5α sejtek transzformálása a kompetencia mértékének meghatározásához

- 100 µl sejthez adunk 10 µl 10 ng/ul koncentrációjú (pl. pBluescript II KS- vagy más, aminek tudjuk a koncentrációját és Amp-rezisztens) plazmidot, 15 perc jégen
- hősokk (42 °C 60 sec.)
- 5 perc jégen
- +0,5 ml LB
- 200 µl-nyit szélesztünk ampicillines lemezre
- a szélesztést elvégezzük 10-szeres és 100-szoros hígítású sejt kultúrával is
- inkubálás 37 °C-os termosztátban O/N

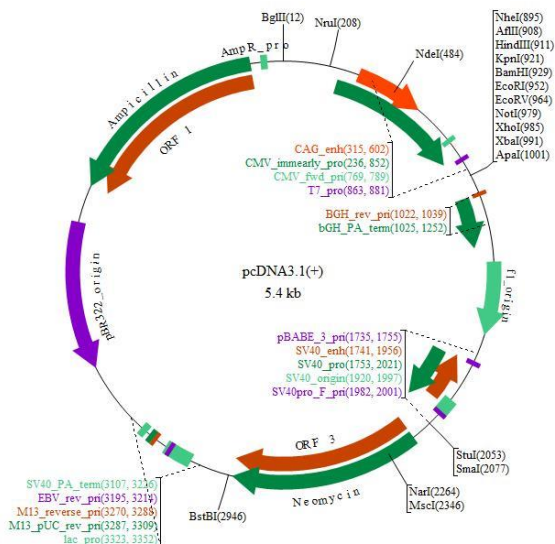
5. A kompetencia mértékének meghatározása

Másnap számoljuk meg a telepeket!

A bemért DNS mennyiség és a hígítások ismeretében adjuk meg a kompetencia mértékét kolónia/µg DNS egységben!

3. Rekombináns DNS konstrukció készítés (hétfő-csütörtök)

A gyakorlaton a pcDNA3.1-S100A4 rekombináns DNS konstrukciót fogjuk elkészíteni. A klónozni kívánt S100A4 fehérjét (Uniprot azonosító: P26447) kódoló DNS szakaszt (inszertet, ~ 300 bp) PCR reakcióval állítjuk elő. A felamplifikált inszertet restriktions enzimek és DNS ligáz segítségével építjük be az eukarióta expressziós rendszerekben használt pcDNA3.1 DNS vektorba. Az inszert hasítását és a vektor felnyitását BamHI és KpnI restriktions enzimekkel végezzük. A pozitív klónokat PCR screeneléssel választjuk ki. Ezek felszaporítását követően izolálható az elkészült rekombináns plazmid.



enhancer region (3' end)

689 CATTCAGCTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CCAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG

749 TAACAACTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT

809 AAGCAGACT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC

869 GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC TTAAGCTTGG TACCGAGCTC

929 GGATCCACTA GTCCAGTGTG GTGGAATTCT GCAGATATCC AGCACAGTGG CGGCCGCTCG

989 AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCTTCT AGTTGCCAGC

1049 CATCTGTTT TTGCCCTCC CCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCAGT

1109 TCCTTCCCTA ATAAATGAG GAAATTGCAT

A gyakorlaton hordozóként alkalmazott pcDNA3.1 vektor plazmid „vektortérképe” a poliklónozó hely és az azt körülvevő szekvenciák feltüntetésével.

I. Inszert DNS előkészítése (Hétfő)

1. A klónozni kívánt DNS szakasz amplifikálása PCR reakcióval:

- A reakcióelegy összetétele (50 µl):
- Taq puffer (10x) 5 µl
 - dNTP (2 mM) 5 µl
 - primer 1 (10 µM) 1,5 µl
 - primer 2 (10 µM) 1,5 µl
 - templát DNS (peGFP-N1-S100A4 vektor) 1 µl
 - MgCl₂ (25 mM) 3 µl
 - desztillált víz 32,5 µl
 - Taq polimeráz 0,5 µl

A reakció hőprofilja:

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Idő (s)	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	95	180	1
Denaturáció	95	30	35
Anneláció	60 (T _m -5)	30	
Extenzió	72	60s/1kb	
Végső extenzió	72	120	1

2. A keletkezett PCR termék tisztítása nukleinsav tisztító kittel (BioBasic EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit) a gyártó protokollja szerint.

A tisztított PCR terméket 1%-os agaróz gélen futtatjuk meg, valamint lemérjük a DNS-koncentrációját Biotek Microplate spektrofotométerben. Az egyes mintákból 2-2 µl-t viszünk fel a microvolume plate-re.

3. **Kedd:** Restriktációs emésztés BamHI és KpnI enzimekkel (az enzimek 1 µg DNS-t emésztenek meg ennyi idő alatt optimálisan, ezért az emésztett DNS mennyiségénél figyelembe kell venni az inszert/vektor erősségét is):

A reakcióelegy összetétele (20 µl):	- univerzális puffer (10x)	2 µl
	- BamHI enzim	1 µl
	- KpnI enzim	1 µl
	- tisztított PCR termék	5-10 µl
	- deszt.víz	kiegészítve 20 µl-re

A reakcióelegyet 37°C-on 30 percig inkubáljuk, majd 5 perc 80°C-os vízfürdőn inaktiváljuk az enzimeket.

II. A vektor előkészítése

1. Miniprep készítés

Elsőként **hétfőn** a használni kívánt pcDNA3.1 plazmid vektort *E. coli* DH5α kompetens sejtek segítségével felszaporítjuk.

- 100 µl *E. coli* DH5α kompetens sejthez adunk 1 µl plazmidot. 15 percig jégen inkubáljuk.
- hősokk (42 °C 60 sec.)
- 5 perc jégen
- +0,5 ml LB
- 4.4 ml LB+Amp-be pipetázunk az elegyet
- inkubálás 37 °C-os rázó termosztátban (200 rpm) O/N

Másnap (**kedd**) a sejteket centrifugáljuk, majd a plazmidizoláló kit (BioBasic EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit) protokollja alapján elvégezzük a Miniprep izolálást. Az izolált plazmidokat 1%-os agaróz gélen megfuttatjuk, koncentrációjukat megmérjük (microplate reader).

2. Restriktációs emésztés BamHI és KpnI enzimekkel:

A plazmid emésztése az inszert előkészítésénél ismertetett módon történik (a pcDNA3.1 egy magas kópiaszámú plazmid, ezért nem érdemes túl sokat emésztetni belőle (~ 5 µl), mert nem fog teljesen megemésztődni).

III. Emésztett plazmid és inszert tisztítása

Az emésztett vektor és inszert DNS-t tisztítása nukleinsav tisztító kittel (BioBasic EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit) a gyártó protokollja szerint.

A DNS-koncentrációk lemerését követően kiszámoljuk, hogy mennyi vektor és inszert szükséges a ligáláshoz (Kb. 50 ng vektorra van szükség, az inszert mennyisége pedig legyen molárisan(!) a vektor mennyiségének 3-szorosa. vektor: 5400 bp, inszert: 300 bp).

IV. Ligálás

- Reakcióelegy:
- ligáz puffer 2 µl
 - inszert és vektor 3:1 arányban (molárisan!)
 - T4 DNS ligáz 1 µl
 - deszt. vízzel kiegészítve 20 µl-re

Kontroll-ligálást is végzünk, melynél az inszert helyett vizet adunk az elegyhez.

A reakcióelegyet 1 órán keresztül szobahőn inkubáljuk.

V. Transzformálás – DH5α törzsbe

- 10 µl ligátumot hozzáadunk 100 µl DH5α kompetens sejthez.
- inkubálás 15 perc jégen
- 1 perc, 42 °C –os hősokk
- 5 perc jégen
- 0,5 ml LB táptalajt adunk a sejtekhez
- Kikenjük a két előkészített LB-amp lemezre
- 37 °C-os termosztátban O/N inkubáljuk a lemezeket

VI. Telepek screenelése PCR-rel

Másnap (**szerda**) a kontroll-ligátumos és ligátumos lemezt összehasonlítjuk. A ligátumos lemezen kinőtt sejtpopulációból 8-10 telepet kiválasztunk, ezek lesznek a PCR reakció templátjai. A reakcióban egy vektor- és egy inszertspecifikus primert használunk (vektorspecifikus: N201 primer, ami a CMV promóterre tapad, inszertspecifikus: az S100A4 3' végére tapad), ezért a keletkező termék az inszert sikeres beépülésére utal.

A reakcióelegy összetétele (100 µl mesteroldat, 9 telephez):

- Taq puffer (10x)	10 µl
- dNTP (2 mM)	10 µl
- primer 1 (10 µM)	3 µl
- primer 2 (10 µM)	3 µl
- MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
- desztillált víz	62 µl
- Taq polimeráz	1 µl

A mesteroldatot 9,5 µl-enként PCR-csővekbe mérjük szét, ezután adjuk hozzá a templátot (telepekhez pipettahegyet vagy steril fogpiszkálót érintünk óvatosan, majd rövid időre a PCR-csővekbe állítjuk, végül eltávolítjuk).

A reakció hőprofilja:

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Idő (s)	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	95	180	1
Denaturáció	95	30	25
Anneláció	55 (T _m -5)	30	
Extenzió	72	60s/1kb	
Végső extenzió	72	180	1

Az elkészült PCR termékeket 1%-os agaróz gélen futtatjuk meg.

VII. Miniprep készítés

3 pozitív telepről Miniprepet készítünk a korábban ismertetett módszerrel (**szerda**: leoltás, **csütörtök**: plazmid izolálás kittel).

7. Rekombináns fehérje termeltetés és izolálás (hétfő-csütörtök)

I. Fehérjeexpresszió:

Hétfő: A gyakorlatvezetőtől kapott kompetens BL21(DE3)Star sejteket transzformáljuk pET-EGFP és pET20b-DsRed plazmidokkal. Az EGFP és DsRed fluoreszcens fehérjék 6xHis-taget tartalmaznak az egyik terminálisukon, ezért Ni-NTA affinitás kromatográfiával tisztíthatóak.

100 µl kompetens sejthez 1 µl plazmidot adunk. A plazmid amp^R. A transzformálás menetét ld. fent. A sejteket O/N 37 °C-on növesztjük LB-Amp tápagarlemezén.

Kedd:

- a lemezekén nőtt telepeket belemossuk 50 ml LB-Amp tápoldatba
- rázatás szobahőn, O/N, 150 rpm-mel
- **Szerda** reggel: 10 perc 4000 rpm centrifugálás
- a tápoldat leöntése után a sejteket jégen 30 ml Ni-bind pufferben felszuszpendáljuk
- fugálás 10 perc, 4000rpm
- a leülepedett sejteket újabb 30 ml Ni-bind pufferben felszuszpendáljuk
- szonikálás 3-4 percig a sejtek teljes feltárása és a DNS feldarabolása céljából
- 15 perc centrifugálás 20000 rpm-en
- a felülúszóval dolgozunk tovább

II. A felülúszó tisztítása Nikkel-NTA affinitás kromatográfia segítségével

3 ml (50 %-os) Ni-NTA gyantát (oszloptöltetet) mérünk egy kis oszlopba (az oszloptérfogat 1,5 ml)
ekvibrálás (mosás) 2x3 ml Ni-bind pufferrel
5 ml sejtextraktum (fenti felülúszó) rátöltése
mosás 2x3 ml Ni-bind pufferrel
elúció: 4x1ml Ni-elute pufferrel (imidazolt tartalmazó Ni-bind puffer
a frakciókat külön kémcsövekbe szedjük, a GFP-t és DsRed-et tartalmazó frakció(ka)t összegyűjtjük.

Az oszlop regenerálása,

az oszlopot mossuk:

5 ml Ni-elute pufferrel

5 ml Ni-bind pufferrel

5 ml 20%-os etanollal

a gyantát 20%-os etanolban felszuszpendáljuk és a gyűjtő Falcon csőbe mossuk.

III. Fehérjeparátum tisztaságának ellenőrzése spektrofotometriával

A Ni-oszlopos tisztítás elúciós frakciójának 200-600 nm hullámhossztartományban mért elnyelését vizsgáljuk (ha kell, hígítsuk a mintát). Hasonlítsuk össze a kapott spektrumokat! Az expresszált EGFP és DsRed fehérjék abszorpciós maximumai 488 és 586 nm. A fehérjék koncentrációját számítsuk ki a 280 és 320 nm-en mért elnyelések és a Lambert-Beer törvény alapján.

(Opcionális: A minták SDS-gélen futtatása a gyakorlatvezető protokollja alapján.)