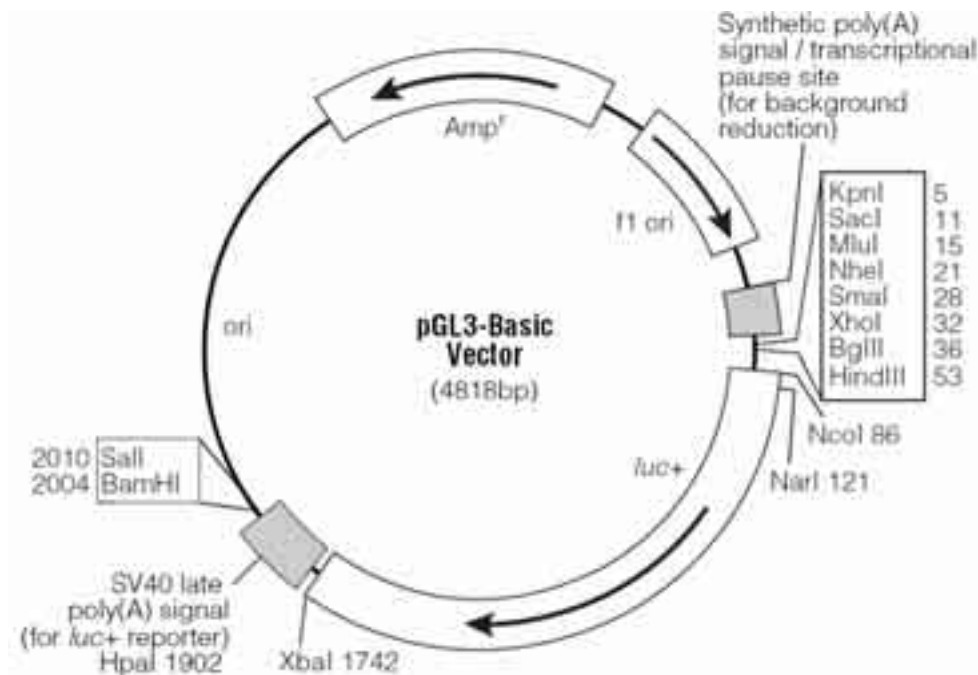


A pGL3-Basic vektor restriktós emésztése és gélelektroforézise

Elméleti háttér:

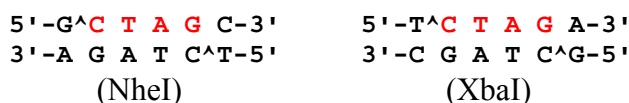
- plazmidok, vektorok biotechnológiai jelentősége: riporter gének, rekombináns fehérjék termelése
- restriktós endonukleázok működése
- a gélelektroforézis alapelvei

A pGL3-Basic vektor (<http://www.promega.com/tbs/tm033/tm033.pdf>) a génexpressziós vizsgálatok során gyakran használt luciferáz-riporterrendszer:



A luciferáz gén elé 5'-irányban, az 5-53. bázispárok területén, a feltüntetett restriktós hasítóhelyeknek megfelelően („multiple cloning site” vagy „polylinker”) tetszőleges promoter-szekvencia klónozzható, amelynek transzkripciósi aktivitása a vektor eukarióta sejtekbe történő transzfekciójával, majd a luciferáz-aktivitás meghatározásával mérhető. Az erős poliadenilációs szignál (1770-2004. bp.) a luciferáz-mRNS stabilitását biztosítja; az f1 origin-régió a vektor baktériumokban történő replikációját teszi lehetővé, míg az Amp^r gén az ampicillinnel szembeni rezisztenciáért (szelekció) felelős β-laktamáz enzimet kódolja.

A gyakorlat során egyrészt a plazmid egyszeres hasítása történik XbaI enzimmal (linearizálás), illetve a két enzimmal kettős emésztést végzünk, ami a luciferáz-cDNS plazmidból történő kimetszését eredményezi. A kettős emésztést az teszi lehetővé, hogy a két enzim hőmérséklet-, ionerősség- és pH-optimuma megegyezik. Mindkét enzim ragadós végeket hoz létre 3'-túlnyúlással, amelyek egymással komplementerek, azaz újra összeligálhatók:



A restrikciós emésztéseket 20 µl-es végtérfogóban hajtjuk végre az alábbiak szerint.

Egyszeres emésztés:

2 µl pGL3-Basic vektor (c = 0,1 µg/µl)

2 µl 10x tömény reakciópuffer (összetétele: 330 mM Tris-acetát pH 7,9; 100 mM magnézium-acetát, 660 mM kálium-acetát, 0,1 mg/ml BSA)

4 µl XbaI restrikciós endonukleáz (2 U/µl)

12 µl desztillált víz.

Kettős emésztés:

2 µl pGL3-Basic vektor

2 µl 10x tömény reakciópuffer

4 µl NheI restrikciós endonukleáz (2 U/µl)

4 µl XbaI restrikciós endonukleáz (2 U/µl)

8 µl desztillált víz.

A reakcióelegyet 60 percig inkubáljuk 37 °C-os vízfürdőben vagy thermoblockban, majd a DNS futtatása következik horizontális szubmerziós módszerrel, az előre elkészített 1%-os agaróz géleken. A mintákhoz nagy sűrűségű mintapuffert adunk, amely a futtatás nyomon követése miatt kétféle festéket is tartalmaz (60% glicerin pH 7,6; 0,03% brómfenolkék, 0,03% xilén-cianol). Összehasonlításképpen hasítatlan vektort, a molekulatömeg hozzávetőleges megállapítása céljából pedig DNS-markert is futtatunk, amely 14 különböző molekulatömegű DNS-fragmentum keveréke (250 bp – 10 kbp tartományban).

A futtatandó minták előkészítése:

emésztetlen DNS: 2 µl pGL3-Basic vektor + 14 µl víz + 4 µl mintapuffer

egyszeres ill. kétszeres emésztés: 20 µl reakcióelegy + 4 µl mintapuffer

Az így előkészített mintákból 20 – 20 µl-t, a készen kapott DNS-markerből pedig 6 µl-t pipetázunk a gélzsebekbe.

A futtatás 120V konstans feszültség mellett minimum 45 percet vesz igénybe. Ügyeljünk a polarításra, a DNS a pozitív pólus felé mozog! Időnként ellenőrizzük a festékcsíkok helyzetét!

A futtatás végeztével a gél UV-lámpa segítségével átvilágítjuk. A gél GR Safe DNS-festéket tartalmaz, amely a futtatás során megfesti a DNS-sávokat.

VIGYÁZAT!! A GR Safe a kettős spirál bázisai közé interkalálódó festékanyag, ezáltal potenciálisan mutagén. A közismert etídium-bromidnál azonban jóval hidrofilebb molekula, ezért bőrön keresztül sokkal kevésbé szívódik fel. Ennek ellenére a gél kizárólag gumikesztyűben szabad megfogni.

Az UV-fény károsítja a szemet, ezért a lámpát csak akkor szabad bekapcsolni, ha a fényszűrő plexilappal már leárnyékoltuk az átvilágítót. A gélt megtekintés után az erre a célra kijelölt edénybe dobjuk ki.

Figyeljük meg, hogy az emésztetlen vektor (cirkuláris plazmid) szupertekercse gyorsabban fut, mint az egyszerűen emésztett (linearizált) DNS. Az emésztetlen vektor gyakran két sávot ad, közülük a lassabban futó, látszólag sokkal nagyobb molekulatömegű az egyik polinukleotid-láncban nicket tartalmazó, nem szupertekercselt forma. A marker segítségével becsüljük meg az emésztéssel kapott fragmentumok méreteit, és vessük össze a vektortérkép alapján elméletileg várható hasítási termékek hosszúságával!

