



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

مراحل، اصول و کاربردهای
استخراج پلاسمید از باکتری‌ها

اهداف

آشنایی با ساختار پلاسمیدها و اهمیت آنها در
تحقیقات ژنتیکی

یادگیری روش‌های استخراج پلاسمید از
باکتری‌ها

بررسی چالش‌ها و ملاحظات در استخراج
پلاسمید

تحلیل نتایج و بررسی کیفیت و کمیت پلاسمید
استخراج‌شده

مقدمه

پلاسمید چیست؟

پلاسمیدها DNA حلقوی و دو رشته‌ای هستند که به طور مستقل از کروموزوم اصلی در سلول‌های پروکاریوتی وجود دارند. آن‌ها می‌توانند ژن‌هایی را حمل کنند که به باکتری‌ها مزایای خاصی می‌دهند، مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یا توانایی تجزیه مواد خاص. پلاسمیدها در تحقیقات مولکولی برای کلونینگ ژن‌ها، ساخت و تولید پروتئین‌های نو ترکیب و مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند.

چرا استخراج پلاسمید مهم است؟

بدلیل استفاده در موارد زیر:

استفاده در کلونینگ ژن‌ها و انتقال ویژگی‌های جدید به باکتری‌ها

تولید پروتئین‌های نو ترکیب در سطح صنعتی

شبیه‌سازی و استفاده از پلاسمیدها در مدل‌های تحقیقاتی و بررسی ژنوم

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



وسایل، مواد و تجهیزات مورد نیاز

1. سانتریفیوژ – برای جداسازی رسوب و مایع
2. پیپت و سمپلر – برای اندازه‌گیری حجم دقیق مواد
3. بن‌ماری – برای انکوبه کردن نمونه‌ها
4. لوله‌های سانتریفیوژ – برای جداسازی اجزای مختلف
5. میکروسکوپ – برای بررسی وضعیت باکتری‌ها
6. لوازم استریل – برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی

مواد شیمیایی مورد نیاز

1. بافر TAE - TBE برای محلول‌های الکتروفورز
2. بافر – Lysis (NaOH/SDS) برای از بین بردن دیواره سلولی
3. فنل-کلروفرم – برای حذف پروتئین‌ها
4. ایزوپروپانول (100%) – برای رسوب‌دهی پلاسمید
5. اتانول 70% – برای شستشوی پلاسمید
6. Renase برای حذف RNA (اختیاری)

روش کار



روش کار

مرحله 1: کشت باکتری ها

1. یک کشت باکتری حاوی پلاسمید مورد نظر را در محیط کشت مایع مناسب (مانند LB broth) کشت دهید.

2. انکوبه کردن در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 12-16 ساعت تا باکتری ها به تعداد زیادی برسند.

3. مقدار 1-2 میلی لیتر از کشت را به لوله سانتریفیوژ منتقل کنید.

مرحله 2: سانتریفیوژ برای جمع آوری سلول ها

4. لوله را در سانتریفیوژ قرار دهید و با سرعت ۸,۰۰۰-۶,۰۰۰ دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید.

5. پس از سانتریفیوژ، فاز مایع را جدا کرده و سلول ها (رسوب باکتریایی) را در ته لوله جمع کنید.

مرحله 3: لیز سلولی و آزادسازی پلاسمید

6. به رسوب سلول ها بافر (Lysis معمولاً شامل NaOH و SDS) اضافه کنید تا دیواره سلولی باکتری ها شکسته شود و پلاسمید آزاد شود.

7. محلول را به آرامی مخلوط کنید و در بن‌ماری ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کنید.

این مرحله باعث از هم گسیختگی دیواره سلولی و آزاد شدن پلاسمید می‌شود.

مرحله 4: جداسازی پروتئین‌ها

8. به محلول حاوی پلاسمید فنل-کلروفرم (۱:۲۴:۲۵) اضافه کنید.

9. لوله را به آرامی مخلوط کنید و سپس در سانتریفیوژ با سرعت 8,000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه قرار دهید.

10. پس از سانتریفیوژ، دو فاز تشکیل می‌شود: فاز آبی (حاوی پلاسمید) و فاز آلی (حاوی پروتئین‌ها و مواد دیگر).

11. فاز آبی را با دقت به یک لوله جدید منتقل کنید.

مرحله 5: رسوبدهی پلاسمید

12. به فاز آبی ایزوپروپانول سرد (0.6 حجم ایزوپروپانول به حجم فاز آبی) اضافه کنید.

13. محلول را به آرامی مخلوط کنید و در فریزر به مدت ۳۰ دقیقه قرار دهید.

14. پس از انکوباسیون، لوله را سانتریفیوژ کنید (۸,۶-۰,۰۰,۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) تا پلاسמיד رسوب کند.

15. رسوب پلاسמיד را از محلول جدا کرده و در لوله جدیدی منتقل کنید.

مرحله 6: شستشوی پلاسמיד

16. رسوب پلاسמיד را با اتانول ۷۰٪ شستشو دهید.

17. دوباره سانتریفیوژ کنید تا اتانول اضافی از بین برود.

18. رسوب پلاسמיד را به مدت چند دقیقه در دمای محیط خشک کنید.

19. پلاسמיד استخراج شده را در بافر TE یا آب مقطر استریل حل کنید.

6. بررسی کیفیت و کمیت پلاسמיד

6.1. بررسی کیفیت پلاسמיד با استفاده از اسپکتروفتومتر

بعد از استخراج پلاسמיד، از اسپکتروفتومتر برای اندازه‌گیری نسبت 260/280 نانومتر استفاده کنید.

برای پلاسמיד خالص، نسبت 260/280 باید بین 1.8 تا 2.0 باشد.

برای بررسی وجود RNA در نمونه، از نسبت 260/230 نانومتر استفاده کنید که باید حداقل 2.0 باشد.

6.2. بررسی یکپارچگی پلاسمید با استفاده از ژل الکتروفورز

یک درصد ژل آگارز (1%) تهیه کرده و نمونه‌های پلاسمید را روی آن بارگذاری کنید.

پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز کنید.

پلاسمید با کیفیت خوب باید یک باند روشن و واضح نشان دهد که نمایانگر پلاسمید خالص و سالم است.

7. تحلیل نتایج

7.1. تحلیل کیفیت پلاسمید

اگر نسبت 260/280 کمتر از 1.8 باشد: احتمال وجود آلودگی پروتئینی یا شیمیایی است. این آلودگی‌ها را می‌توان با شستشوی بیشتر یا استفاده از فنل-کلروفرم اضافی رفع کرد.

اگر نسبت 260/230 کمتر از 2.0 باشد: احتمال وجود آلاینده‌های ارگانیک مانند فنل است که باید با شستشوی بیشتر با اتانول رفع شود.

اگر باندهای ژل الکتروفورز محو یا داغ باشند: نشان‌دهنده تخریب پلاسمید است که می‌تواند ناشی از دمای بالا در مراحل لیز یا آلودگی‌های شیمیایی باشد.

- 7.2. تحلیل کمیت پلاسمید
- غلظت مناسب پلاسمید برای استفاده در فرآیندهای بعدی مانند کلونینگ و ترانسفکشن باید بین 50 تا 200 نانوگرم در میلی لیتر باشد.
- در صورت نیاز به پلاسمید بیشتر، می توان حجم استخراج شده را افزایش داده یا از کشت های بیشتری استفاده کرد.