University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

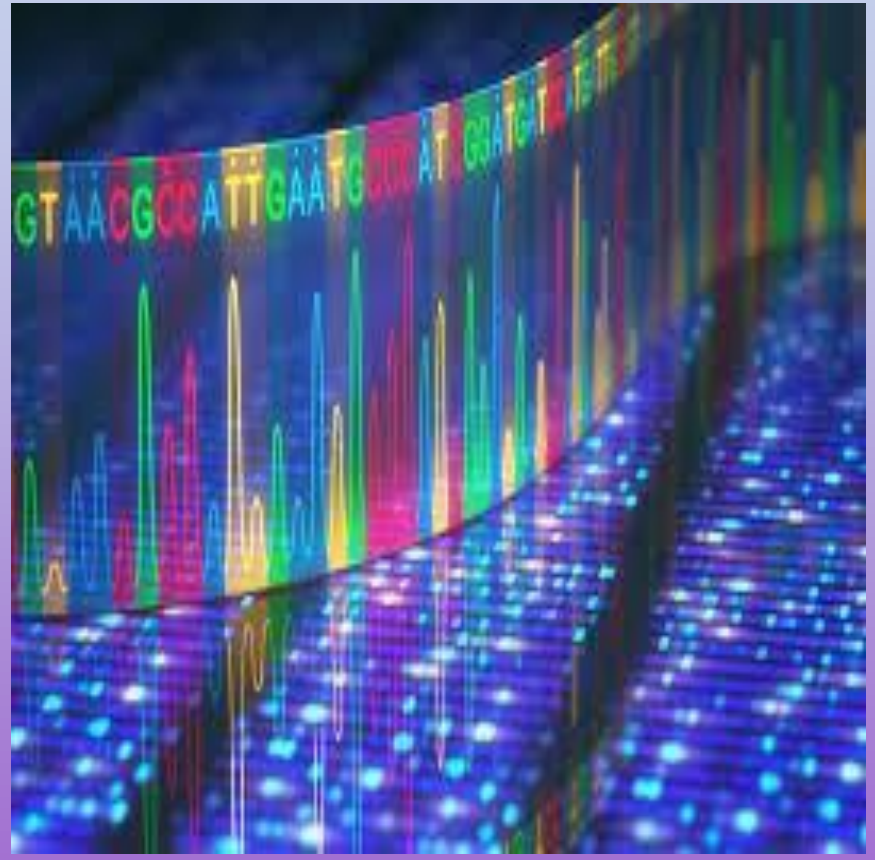
Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

انتقال DNA پلاسمیدی به باکتری‌های مستعد
Transformation

Farzaneh Forouharfar

اهداف آزمایش

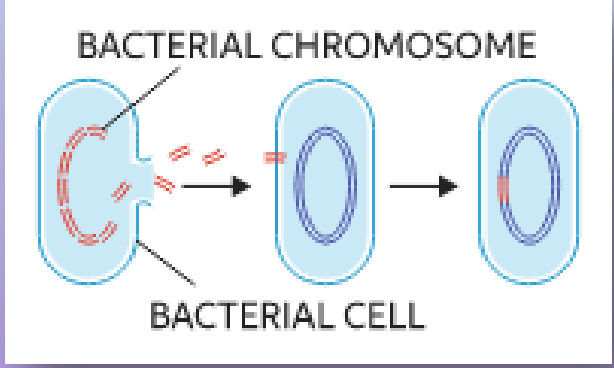


- ✓ تهیه ی سلول‌های باکتریایی مستعد (Compotent)
- ✓ انتقال DNA پلاسمیدی به باکتری‌های مستعد (Transformation)
- ✓ تکثیر DNA پلاسمیدی

Farzaneh Forouharfar

مقدمه:

- پس از اینکه حامل (پلاسمید) مناسب انتخاب شد و DNAخارجی وارد حامل شد می‌توانیم DNAنوترکیب حاصل را وارد سلول میزبان نماییم. برای این کار روش‌های متعددی وجود دارد که در ذیل توضیح داده می‌شود. لازم به ذکر است این روش صرفا در رابطه با باکتری‌های نمی‌باشند و از بعضی روش‌ها جهت انتقال DNAبه سلول‌های یوکاریوتی هم استفاده می‌شود.

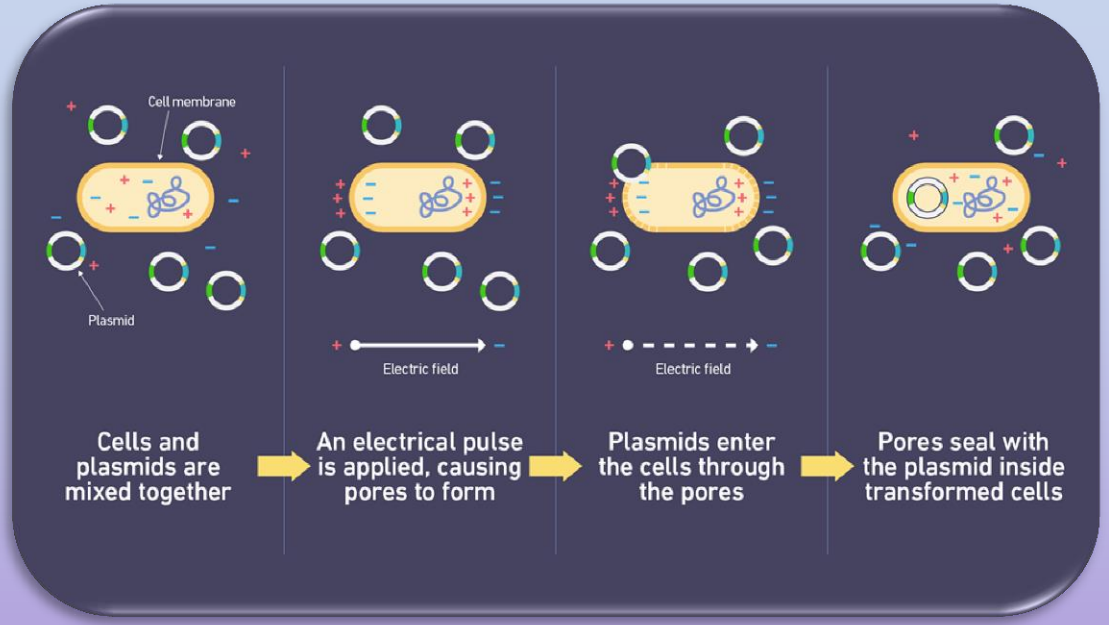


- **انواع روش‌های انتقال DNAبه سلول‌های میزبان (باکتری)**
- **۱_ ترانسفورمیشن با یون‌های دو ظرفیتی (Transformation):**
- در این روش با استفاده از غلظت‌های مناسب یون‌های دوظرفیتی مانند (Ca2+) از محلول کلرور کلسیم (CaCl2) که در مجاورت باکتری قرار داده می‌شود نفوذپذیری غشای سلولی شده افزایش می‌یابد. برای اینکار DNA نوترکیب (پلاسمید) را با باکتری مجاور کرده و غلظت‌های مناسب CaCl2به محیط،افزوده می‌شود، یون‌های +Ca2بر روی غشا باکتری اثر گذاشته و فرآیند انتقال DNAرا تشهیل می‌کنند. این روش یکس از ساده‌ترین و متدوال‌ترین روش‌های انتقال DNAمی‌باشد. البته در این روش از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) نیز استفاده می‌شود که باعث افزایش میزان برخورد DNA با غشای سلول میزبان می‌گردد.

Farzaneh Forouharfar

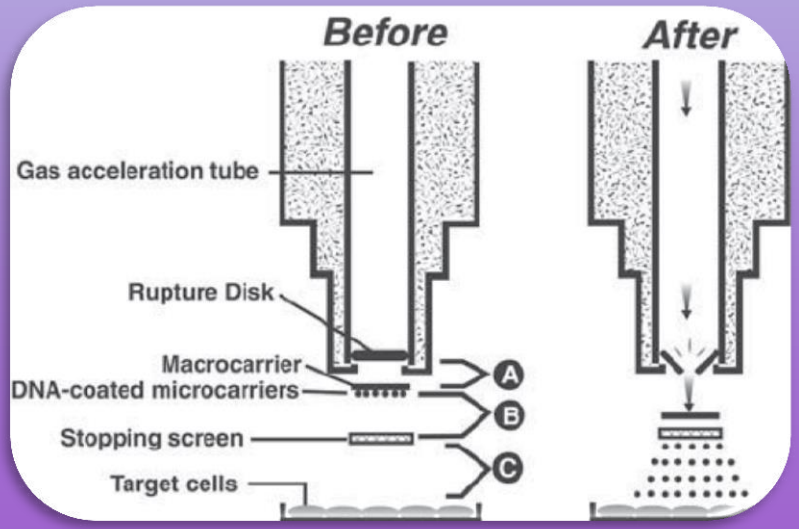
- **۲- الکتوروپوریشن (Electroporation)**

- در این روش به جای استفاده از تأثیر یون‌های دوظرفیتی از جریان (شوک) الکتریکی استفاده می‌شود. جریان الکتریکی باعث اسجاد منافذ بسیار ریزی در غشای سیتوپلاسمی می‌شود که از این طریق قطعات DNA به داخل سلول میزبان وارد می‌شوند.



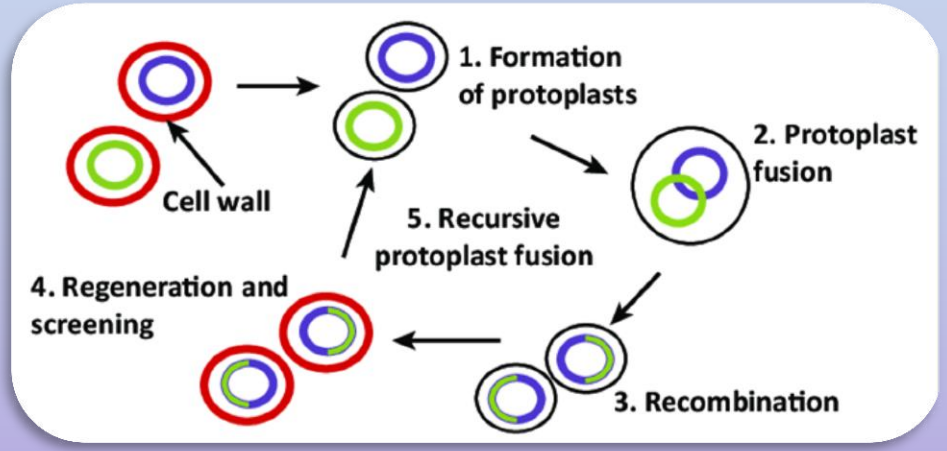
- **۳- تفنگ اسید نوکلئیک (Nucleic acid gun)**

- اساس، در این روش با استفاده از تفنگ‌های میکروسکوپی با گلوله ی طلا که بر روی آن مولکول‌های DNA قرار گرفته می‌باشد و DNA نوترکیب به داخل سلول میزبان شلیک می‌شود.



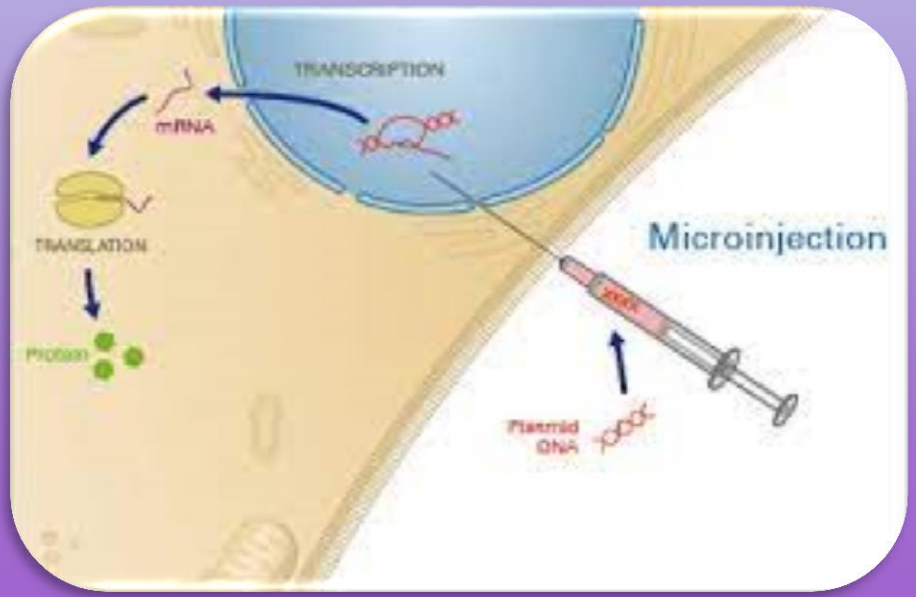
Farzaneh Forouharfar

- **۴- اتصال پروتوپلاسمی (Protoplasm Fusion)**



- این روش بیشتر در مورد سلول‌های گیاهی و مخمر به کار می‌رود. در این روش ابتدا با روش‌های مکانیکی یا آنزیمی دیواره ی سلولی باکتری‌ها یا مخمر یا سلول‌های گیاهی حذف شده و سپس سلول‌های بدون دیواره که حامل ژن مورد نظر می‌باشند با سلول‌های دیگر در محیط مناسب مجاور ترکیب می‌شوند. ادغام سلول‌ها با همدیگر منجر به انتقال خصوصیات و ایجاد سلول‌های جدید می‌گردد.

- **۵- تزریق با سرنگ میکروسکوپی (Microinjection)**



- در این روش (ریزتزریقی) محلول حاوی DNA در مقیاس تزریق بسیار کم به وسیله ی یک سرنگ میکروسکوپی به داخل سلول میزبان تزریق می‌شود. عملیات فوق با کمک میکروسکوپ‌های متصل به سرنگ‌های تزریق که برای این منظور ساخته شده‌اند انجام می‌گردد.

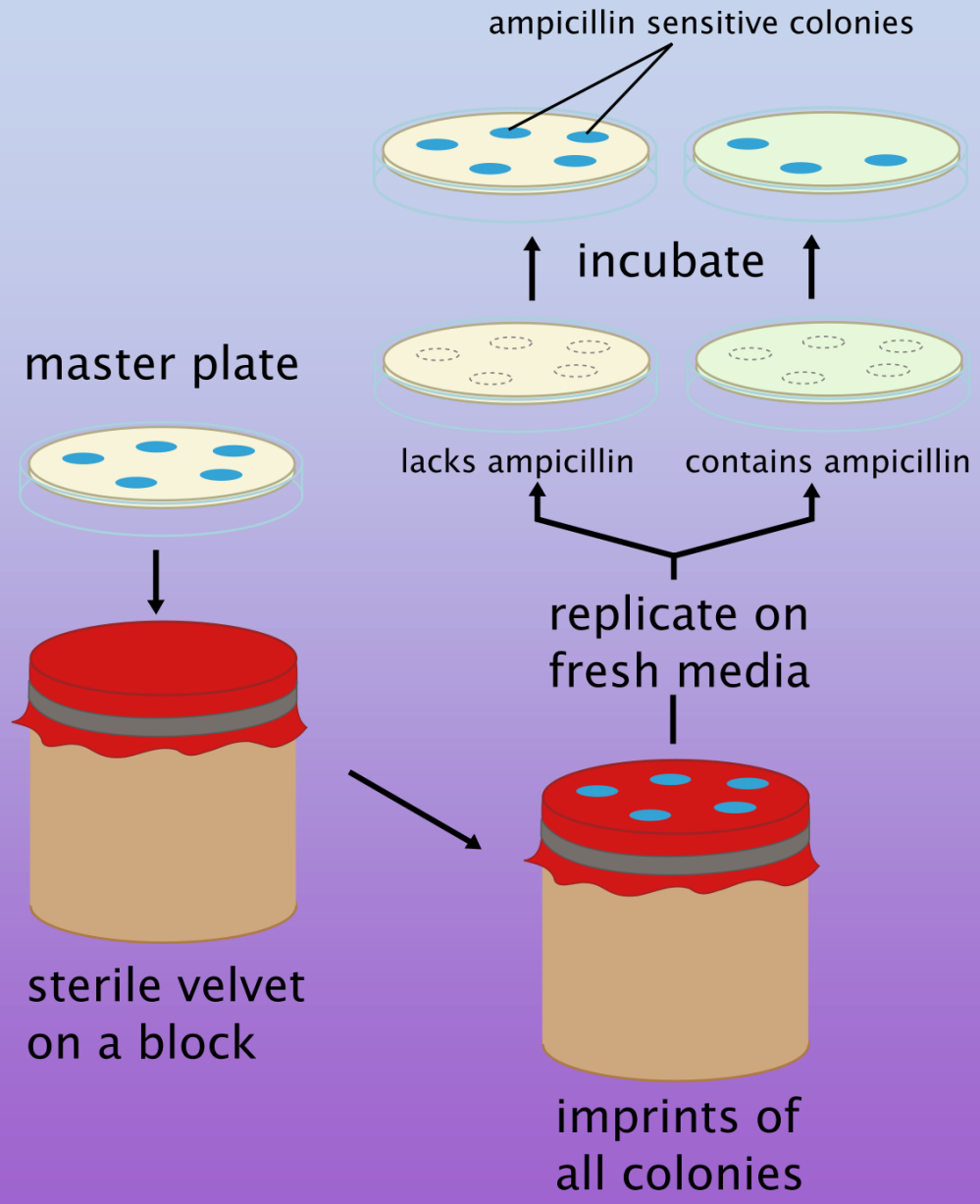
Farzaneh Forouharfar

- **چگونگی انتخاب سلول‌های باکتری حاوی پلاسمید از باکتری‌های ترانسفورم نشده**
- **۱- روش آبی/سفید (blue/white method):**
- یکی از راه‌های انتخاب استفاده از شاخص‌های انتخابی موجود بر روی حامل‌هاست. مثلا توانایی مصرف مواد که پرمصرف‌ترین مورد استفاده ژن بتا_گالاکتوزیداز می‌باشد. این ژن سنتز آنزیمی به همین نام را کد می‌کند که پیوند بتا_گالاکتوزیدی بین گالاکتوز و گلوکز را می‌شکند.
- در این روش از پلاسمیدهایی نظیر PUC19 استفاده می‌شود که دارای ژن یک زیرواحد A آنزیم بتا گالاکتوزیداز می‌باشند. این پلاسمیدها زانی که وارد میزبان ی که ژن زیرواحد B آنزیم بتاگالاکتوزیداز را دارد می‌شود، در اثر کامل شدن (Complementation) آنزیم فعال ایجاد می‌گردد. پس از انجام عمل ترانسفورمیشن مخلوط باکتریایی را (حاوی باکتری ترانسفورم شده و ترانسفورم نشده) بر روی محیط کشت حاوی ماده W-gal کشت می‌دهند. این ماده در حضور آنزیم بتاگالاکتوزیداز شکسته شده و تولید گالاکتوز و ماده ی رنگی ۵-برومو ۴- کلروایندول می‌کند که رنگ آبی دارد. بنابراین بر روی پلیت X-gal آگار، کلنی حاوی پلاسمید موردنظر (ترانسفورم شده) به رنگ آبی و کلنی های باکتری میزبان (ترانسفورم نشده) بدون حامل به رنگ سفید دیده می‌شوند. بدین وسیله می‌توان باکتری‌های ترانسفورم شده را انتخاب نمود.

Farzaneh Forouharfar

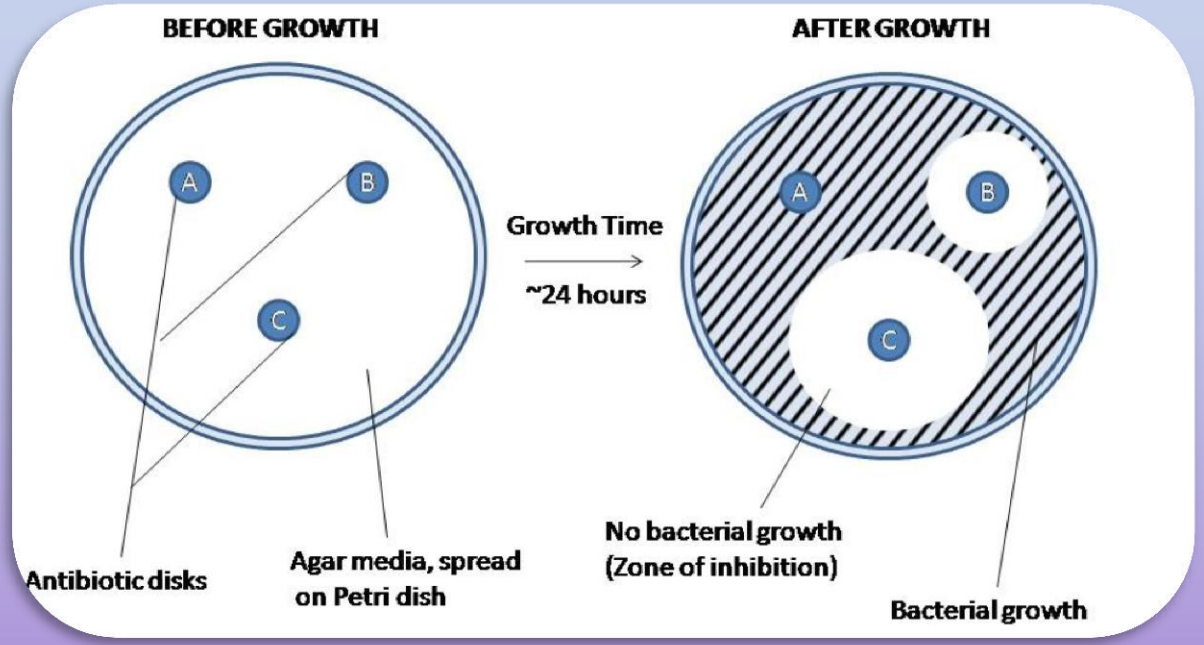
- **۲- روش پلیت‌های همانندسازی (Replica plating)**

- یکی دیگر از روش‌های انتخای کلنی‌های حاوی پلاسمید موردنظر (ترانسفورم شده) ایجاد پلیت‌های همانندسازی می‌باشد. به این ترتیب که باکتری‌های مورد بررسی را بر روی یک پلیت رشد می‌دهند، سپس توسط یک پارچه مخمل یا یکی صفحه کاغذ نیتروسلولز مناسب استریل که بر روی یک استوانه کشیده شده است کلنی‌های رشد یافته را از پلیت اول جدا و به دو پلیت مختلف انتقال می‌دهند که یکی از این دو پلیت انتخابی و دیگری کامل است. با رشد کلنی‌ها روی این دو پلیت می‌توان کلنی‌های تغییریافته را انتخاب و حتی نسبت آن‌ها را به کلنی‌های تغییر نیافته تعیین کرد.

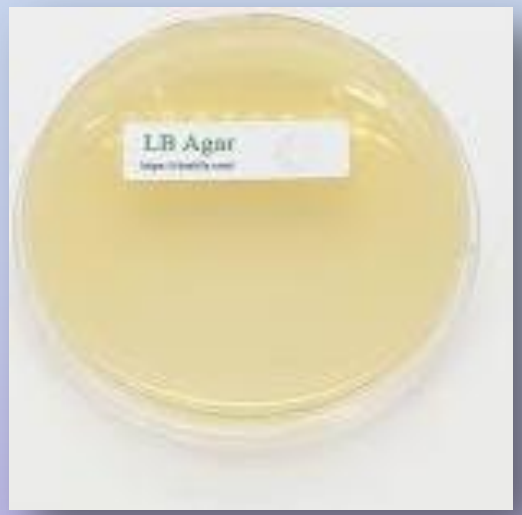


Farzaneh Forouharfar

- **۳- روش انتخاب آنتی‌بیوتیک (Antibiotic Selection)**



- در این روش از ویژگی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود. برحسب وجود نوع ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در پلاسمید موردنظر، آنتی‌بیوتیک مصرفی در محیط کشت انتخاب می‌گردد.
- بنابراین تنها باکتری‌های حاوی پلاسمید در محیط انتخابی واجد آنتی‌بیوتیک مناسب رشد می‌نمایند.
- در این جلسه با روش ترانسفورماسیون با استفاده از یون‌های دو ظرفیتی و تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد (Component) و همچنین تکثیر DNAپلاسمیدی آشنا می‌شوید. همچنین از روش انتخاب آنتی‌بیوتیک جهت تشخیص سلول‌های واحد پلاسمید استفاده خواهد شد.



مواد و محلول‌های مورد نیاز:

- کلرو کلسیم ۰.۱ مولار (دما ۴ درجه سانتی گراد، سرد)
- محیط کشت LBاستریل
- DNAپلاسمیدی مناسب (PUC19یا PBR322)
- استوک باکتری اشرشیاکلای سویه ی HB101
- پلیت‌های LBآکار با آمپی‌سیلین

Farzaneh Forouharfar

وسایل موردنیاز

- سانتریفیوژ با دور ۴ هزار جهت رسوب باکتری‌ها
- میکروسانتریفیوژ
- لوله‌های شیشه ای ۱۵ میلی‌لیتری استریل
- بن ماری ۴۲ درجه سانتی‌گراد
- بن ماری ۳۷ درجه ی سانتی‌گراد
- پیپت‌های ۰.۵ و ۱ میلی‌لیتری استریل
- اپندرف استریل (تعدادی)
- شعله ی آتش
- سمپلرهای ۲۰۰، ۵۰۰ و سمپلرهای متغییر و سرسمپلر استریل

Farzaneh Forouharfar

روش کار:

۱- محلول باکتری‌ها را که روز قبل با تلقیح یک کلنی در ۵ میلی‌لیتر محیط LBاستریل کشت داده‌اید تا ODمناسب به دست آید جهت انجام مراحل بعدی آماده کنید.

۲- باکتری‌ها را در دور ۴ هزار دور در دقیقه (RPM) به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده و محیط رویی را دور بریزید.

۳- سلول‌ها را روی یخ به مدت ۵ دقیقه انکوبه کرده و سپس رسدب باکتریایی را در ۲ میلی‌لیتر کلرور کلسیم ۰.۱ مولار سرد به طور کامل مخلوط کنید. (چند دقیقه ورتکس نمایید)

۴- سوسپانسیون سلولی را در دور ۴ هزار به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید، چند دقیقه لوله‌ها را داخل یخ نگه دارید و محلول رویی را دور بریزید.

۵- مراحل ۳ و ۴ را تکرار کنید. رسوب را با کمی از محلول رویی توسط سمپلر خارج و به اپندرف سرد منتقل کرده و با مختصری سانتریفیوژ در دور ۶۰۰ RPMسلول‌ها را رسوب دهید و محلول رویی را با سمپلر خارج کنید.

۶- سلول‌ها را در ۲۰۰ میکرولیتر کلرور کلسیم سرد حل کنید. سپس به مدت ۱ سلعت روی یخ انکوبه نمایید. (در صورت کمبود وقت، زمان را به نیم ساعت کاهش دهید. پس از این مدت سلول‌ها آماده ی پذیرش DNAپلاسمیدی هستند.)

Farzaneh Forouharfar

۷- ۱ میکرولیتر از DNAپلاسمیدی (۱۰۰ نانوگرم) به سلول‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه نمایید.

۸- سلول‌ها را به بن ماری ۴۲ درجه مناقل نموده و ۳ دقیقه شوک حرارتی دهید.

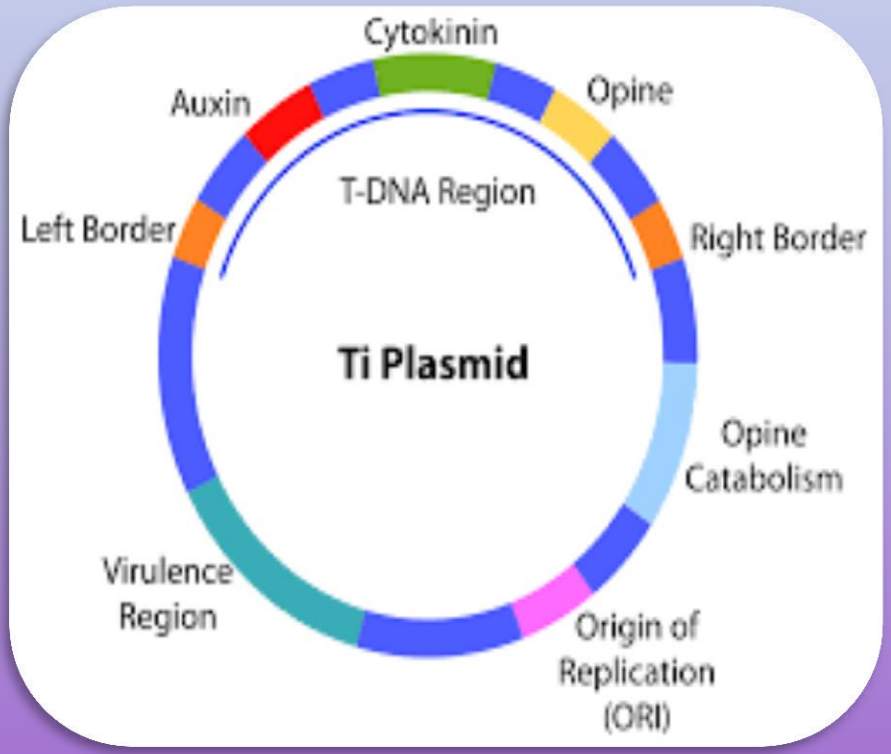
۹- سلول‌ها را بلافاصله به ظرف یخ منتقل نموده و ۲ دقیقه انکوبه کنید.

۱۰- به سلول‌های ۰.۵ الی۱ میلی‌لیتر محیط LBاستریل بدون آنتی‌بیوتیک اضافه نمایید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید. هرازچندگاه با تکان دادن لوله‌ها سلول را در محلول به صورت سوسپانسیون نگه دارید.

۱۱- سلول‌ها را با سانتریفیوژ مختصر (۱ دقیقه در دور ۶ هزار RPM) در ته اپندرف جمع نموده و سپس به ظرف‌های کشت حاوی LBآگار با آمپی‌سیلین منتقل نموده و خوب گسترش دهید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید تا کلنی‌های باکتریایی ظاهر شوند.

***توجه: قبل از انتقال باکتری‌ها، پلیت‌های آگار حاوی آمپی‌سیلین را از یخچال خارج نموده و چند دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا گرم شوند.**

۱۲- پس از ظهور کلنی‌های مجزا، پلیت‌ها را از آون خارج نموده و بصورت وارونه در یخچال قرار دهید و تا هفته ی آینده نگهداری کنید.


Cytokinin
Auxin
Opine
T-DNA Region
Left Border
Right Border
Ti Plasmid
Opine
Catabolism
Virulence
Region
Origin of
Replication
(ORI)