***aπομόνωση πλασμιδίων***

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά μόρια dsDNA συνήθως πολλαπλασιαζόμενα ανεξάρτητα των χρωμοσωμάτων, υποκείμενα όμως σε κάποιον ατελή έλεγχο πολαπλασιασμού των και κατανομής των στα θυγατρικά κύτταρα ματά την διαίρεση του κυττάρου. Συναντώνται και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως όμως σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, για τους οποίους έχουν αναπτυχθή και οι περισσότεροι μέθοδοι απομονώσεως. Πλασμίδια πού συναντώνται σε λιγότερο από 15 αντίτυπα ανά κύτταρο θεωρούνται χαμηλού αριθμού αντιτύπων.

**Η μέθοδος της αλκαλικής λύσεως**

1. Τα βακτηρίδια καλλιεργούνται σε 2-5 ml υγρoύ καλλιεργητικού μέσου μέχρι να φθάσουν σε στατική φάση.

*Το θρεπτικό μέσο και η διάρκεια και θερμοκρασία καλλιέργειας εξαρτώνται από το βακτηρίδιο. Παραδείγματος χάριν, η Ε. Coli χρειάζεται 8-16 ώρες καλλιέργειας στους 37οC σε LB ή YT, το αγροβακτηρίδιο και ο Rhodococcus fascians 2 μέρες σε LB ή PA ή ΥΕΒ στους 28οC μέχρις η απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm (OD600 ) να είναι 0.7-0.8. Στην περίπτωση της Ε. Coli, στη στατική φάση περιέχονται περί τα 109 βακτηρίδια ανά ml καλλιεργητικού μέσου και η καλλιέργεια δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 16 h διότι αρχίζει η αποσύνθεση σημαντικού αριθμού κυττάρων. Τα περισσότερα πλασμίδια της E. Coli είναι μεγέθους 3 kbp και σε 100-200 αντίτυπα ανά κύτταρο. Για πλασμίδια χαμηλού αριθμού αντιτύπων είναι καλά να χρησιμοποιούνται πλούσια καλλιεργητικά μέσα, όπως Terrific Broth. Ορισμένες φυλές της E.Coli (παραδείγματος χάριν η ΝΜ 554), συνθέτουν την Mg++-εξαρτώμενη ενδονουκλεάση Α, ένα περιπλασμικό ένζυμο 12 kDa πού η συγκέντρωσή του αυξάνεται 300 φορές κατά την λογαριθμική φάση και διασπά σημαντικό αριθμό πλασμιδίων κατά την διαδικασία απομόνωσής των. Για απομόνωση πλασμιδίων προτιμούνται επομένως φυλές με την μετάλλαξη endA1 (DH5a, JM109, XL1-Blue), οι οποίες στερούνται της ενδονουκλεοτικής αυτής δράσεως. Η καλλιέργεια των βακτηρίων μπορεί να χρησιμοποιηθή κατ΄ευθείαν για απομόνωση πλασμιδίων ή μπορεί να πολλαπλασιασθή περαιτέρω, όπως περιγράφεται στο επόμενο στάδιο.*

2. Όλη ή μέρος της καλλιέργειας μεταφέρεται σε 100-πλάσιο έως 500-πλάσιο όγκο του ιδίου καλλιεργητικού μέσου, το οποίον κατόπιν καλλιεργείται υπό τις ίδιες συνθήκες μέχρις της λογαριθμικής φάσης.

3. Τα βακτηρίδια καθιζάνουν από τις καλλιέργειες, είτε του σταδίου1 είτε του σταδίου 2, με φυγοκέντρηση στά 2.000-10.000 xg επί 2-10 min.

4. Επαναιωρούνται σε 1/10-1/50 του αρχικού όγκου 10-50 mM Tris-HCl, pH 8, 2-50 mM EDTA, 1-2 μg/μl λυσοζύμη, 20-50 mM γλυκόζη ή σουκρόζη και επαφίονται στους 0οC-37οCγια 5 min έως 1h. *Κατά την διάρκεια του χρόνου αυτού η λυσοζύμη καταστρέφει μερικώς το εξωτερικό περίβλημα των βακτηρίων και διευκολύνει την ακολουθούσα διάρηξή των. Η διεργασία αυτή είναι ταχύτερη στις υψηλότερες θερμοκρασίες και ο απαιτούμενος χρόνος επώασης εξαρτάται από το βακτηρίδιο. Για την E. Coli επαρκούν 10 min στους 37οC* *ενώ για το αγροβακτηρίδιο προτιμούνται 20 min στην ίδια θερμοκρασία. Η λυσοζύμη μπορεί να υποκατασταθή με μουτανολυσίνη για βακτηρίδια θετικά κατά Gram (Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, mycoplasmas, κτλ). Για καλλίτερη διάλυση των τοιχωμάτων, στην περίπτωση του Αγροβακτηριδίου προστίθεται και προνάση σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Η προνάση πρέπει να έχει επωασθή προηγουμένως στούς 37οC για 1 h. Η γλυκόζη και σουκρόζη διατηρούν το ωσμοτικό δυναμικό του διαλύματος σε επίπεδα πού δεν συμβάινει διάρηξη των παραγομένων πρωτοπλαστών μετά την απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος από την λυσοζύμη. Σε ορισμένες μεθόδους προστίθεται στο στάδιο αυτό και RNάση Α σε συγκέντρωση 100-500 μg/ml, ώστε να καταστραφή το βακτηριακό RNA πού έχει ήδη απελευθερωθή από κατεστραμένα κύτταρα καθώς και αυτού πού θα ελευθερωθή κατά την ακολουθούσα διάρηξη των κυττάρων. Η RNάση Α πρέπει να είναι ελέυθερη DNάσης και αυτό επιτυχγάνεται με προηγηθείσα επώαση της RNάσης στους 100οC επί 15 min. Η απομάκρυνση του RΝΑ μπορεί να γίνη και μετά την απομόνωση του πλασμιδίου.*

5. Προστίθεται ένας ίσος όγκος 200 mM NaOH, 1% SDS και το παρασκεύασμα επαφίεται στούς 0οC-25οC επί 5-10 min. *Το διάλυμα NaOH/SDS πρέπει να είναι φρέσκο. Το pH του είναι 11-12. Στις αλκαλικές αυτές συνθήκες, το DNA αποφυσιώνεται (αποχωρίζονται τα δύο νήματά του). Το SDS χρησιμεύει για την διάρηξη των κυττάρων. Για πολύ συγκεντρωμένα παρασκευάσματα βακτηρίων, η αλκαλοποίηση μπορέι να γίνη με δύο όγκους NaOH/SDS αντί ενός.*

6. Προστίθεται ακόμη ένας όγκος 3Μ οξικό κάλιο pH 5.5, ίσος πρός τον προστιθέντα όγκο NaOH/SDS, και τo παρασκεύασμα επαφίεται στους 0οC για 5 min. *Κατά τον χρόνο αυτό, η γρήγορη ουδετεροποίηση του παρασκευάσματος με οξικό κάλιο προκαλεί επαννένωση των συμπληρωματικών νημάτων των DNA. Στις χρωμοσωμικό όμως DNA, η επανένωση συμβαίνει και μεταξύ περιοχών διαφορετικών μορίων DNA (διαφορετικών χρωμοσωμάτων), τα οποία σχηματίζουν διαδικτυωμένα συσσωματώματα μεγάλου μεγέθους περιέχοντα επίσης SDS, πρωτεϊνες και οξικό κάλιο. Αντιθέτως στα πλασμίδια, λόγω του μικρού μεγέθους των και της σχετικής μοναδικότητας των ακολουθιών βάσεων στο DNA των, επανένωση ακολουθιών πού ανήκουν σε διαφορετικά μόρια είναι σπάνια και ο υβριδισμός είναι πλήρης καθόλη την έκταση των δύο νημάτων του κυκλικού DNA των, αναγεννόντας έτσι το αρχικό dsDNA του πλασμιδίου. Η ουδετεροποίηση μπορέι να γίνη και με 2 Μ Tris-HCL pH 7, ή με 3 Μ οξικό νάτριο pH 4.5*

7. Φυγοκέντρηση στα 8.000-12.000 xg επί 5-15 min καθιζάνει το βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA αφήνοντας τα πλασμίδια στο υπερκείμενο.

8. Οι πρωτεϊνες απομακρύνονται από το υπερκείμενο με εκχύληση με φαινόλη. *Για πλασμίδια μεγάλου μεγέθους (50-200 kbp), τα οποία κινδυνεύουν να διασπασθούν σε τεμάχια κατά την εκχύληση με φαινόλη, το στάδιο αυτό παραλείπεται και τα πλασμίδια παραλαμβάνονται μετά από καθίζησή των με προσθήκη PEG, όπως περιγράφεται στο επόμενο στάδιο.*

9. Τα πλασμίδια υφίστανται συσσωμάτωση στους 0οC έως -20οC για 30 min-1h, μετά από προσθήκη ενός όγκου κρύας (-20οC) ισοπροπανόλης και παραλαμβάνονται ως ίζημα ματά από φυγοκέντρηση στα 10.000 xg επί 10 min. *Προς αποφυγήν καθίζησης πολυσακχαριτών επίσης, μπορεί αντί της ισοπροπανόλης να χρησιμοποιηθούν δύο όγκοι 95% αιθανόλης θερμοκρασίας δωματίου για 1-2 ώρες. Με την μέθοδο αυτή της αιθανόλης, τα DNA και RNA μεγέθους 200-4.000 bp καθιζάνουνσε ποσοστό άνω του 90%. Σημαντική απώλεια μικροτέρων νουκλεϊνικών οξέων συμβαίνει. Προς αποφυγή τυχόν απομενόντων RNA μπορεί να χρησιμοποιηθή 1/2 όγκος ισοπροπανόλης.*

 *Για πλασμίδια μεγάλου μεγέθους (50-200 kbp), τα οποία κινδυνεύουν να διασπασθούν σε τεμάχια κατά την εκχύληση με φαινόλη, η καθίζησή των επιτυγχάνεται με προσθήκη PEG 600-800 σε τελική συγκέντρωση 10-15% w/v, MgCl2,σε τελική συγκέντρωση 25 mM (μη απόλυτα απαραίτητο) και NaCl σε τελική συγκέντρωση 500 mM (μη απόλυτα απαραίτητο). Μετά από 30 min έως 16 h στους 0οC έως 4οC το πλασμιδιακό DNA παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση στα 10.000 xg επί 10 min. Για ορισμένες χρήσεις πού απαιτείται η απομάκρυνση των καταλοίπων PEG, πρέπει να ακολουθήση φυγοκέντρηση σε CsCl.*

10. Το τελικό ίζημα του πλασμιδιακού DNA διαλύεται σε 50-500 μl TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA) ή ΤES (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) ή σε αποστειρωμένο νερό.

*Na αποφεύγεται το πλήρες στέγνωμα του ιζήματος των πλασμιδίων πρίν την επαναδιάλυσή του για αποθήκευση. Μη διαλυτό ίζημα μπορεί να δημιουργηθή.*

**Η μέθοδος του βρασμού**

1. Προχωρούμε όπως στην μέθοδο της αλκαλικής λύσεως μέχρι του σταδίου 4 του επωασμού με λυσοζύμη.

2. Το παρασκεύασμα τίθεται εντός αναβράζοντος ύδατος για 1-2 min. *Κατά το στάδιο αυτό συμβαίνει διάρηξη των μεμβρανών και απαλευθέρωση των πλασμιδίων και του RNA. Το χρωμοσωμικό DNA παραμένει προσδεδεμένο στά τεμάχια των μεμβρανών. Το όλο παρασκεύασμα είναι ιζώδους υφής.*

3. Οι μεμβράνες με το προσκεκολημένο χρωμοσωμικό DNA καθιζάνουν στα 10.000-15.000 xg επί 15-30 min.

4. Προστίθεται RNάση Α σε τελική συγκέντρωση 0.1-1 μg/ml. *Τα ίχνη RNA καταστρέφονται σε 30 min έως 2 h.*

5. Οι πρωτεϊνες απομακρύνονται με δύο εκχυλήσεις φαινόλης/χλωροφορμίου.

5. Τα πλασμίδια καθιζάνουν στα 10.000xg επί 10 min, μετά από προσθήκη 1/2 όγκου κρύας ισοπροπανόλης και επώαση στούς -200 C επί 30 min έως 1 h.

6. Το ίζημα επαναιωρείται σε 100-500 μl TE. *Η απόδοση διαφέρει αναλόγως το πλασμιδίου και του οργανισμού. Για την E. Coli είναι 1-5 μg DNA ανά 5 ml καλλιέργειας.*