

# En İyi Plazmid Pürifikasyonu: Veriminizin Düşük Olmasının 10 Nedeni

Plazmid izolasyonunda iyi verim almak hayati önem taşır. İyi bir plazmid verimi elde etmek için ön hazırlığınızı nasıl optimize edersiniz ve düşük verime ne neden olur? Bu soruları ve çok daha fazlasını aşağıda ele alıyoruz:

## Plazmid izolasyonu esnasında en iyi verim nedir?

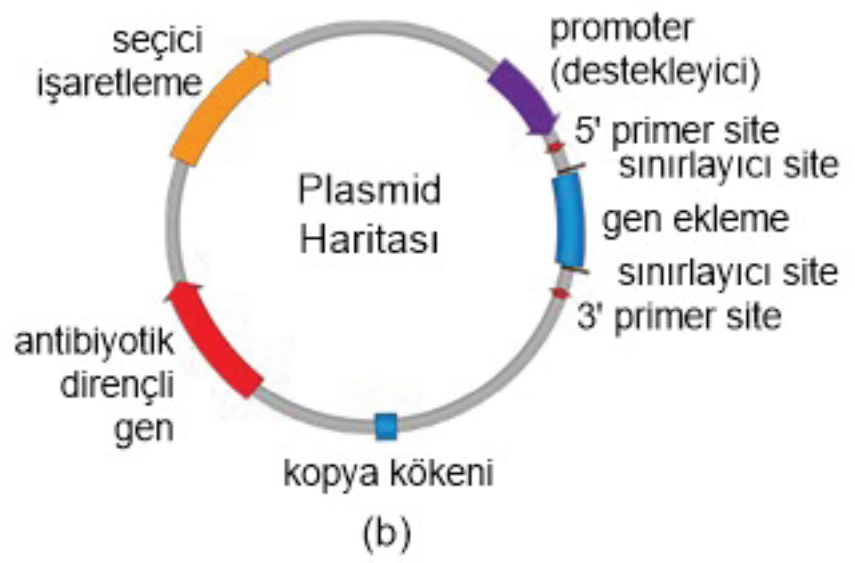
Üç ana plazmid hazırlığı türü vardır: mini, midi ve maks. Plazmid DNA miktarı protokoller ve kitler arasında değişiklik gösterir, ancak aşağıdaki tablo bu üç farklı hazırlama yöntemi için ortalama bir aralık sağlar.

| Prep Tipi | Plazmid DNA Geri Kazanım (µg) |
|-----------|-------------------------------|
| Mini Prep | 550                           |
| Midi Prep | 50-200                        |
| Maxi Prep | 200-1000                      |

\*\*Her iki numune aynı anda ve aynı şekilde işlendiğinde, bir numune iyi verim verirken diğer plazmid düşük verim verirse sorun ne olabilir? Sorusuna, pek çok şey plazmid hazırlıkları arasında verim farklılıklarına neden olabilir şeklinde cevap verebiliriz. Bu gizemi madde madde çözüm ve neler yapabileceğimizi gözden geçirelim.

## 1 SORUNLU INSERTLER

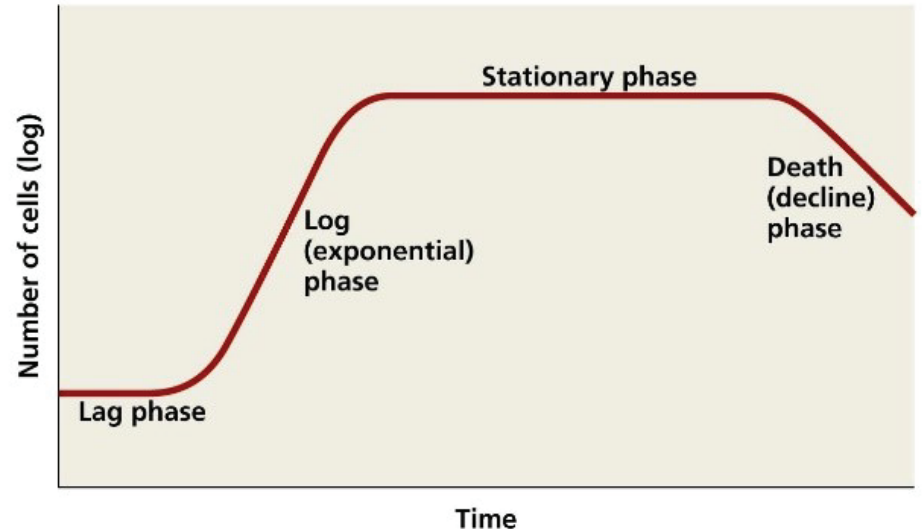
Aynı protokolü kullanarak aynı anda iki plazmid hazırladınız ve farklı verimler elde ettiniz. Plazmidler aynı "omurgaya" sahipse o zaman sebep, bir insert olabilir. Bazı insertler bakteri için sorunlu olabilir; örneğin bakterileri hasta eden bir protein veya tekrarlayan diziler gibi kararsız olabilir. Sorunun üstesinden gelmek için özel hücre hatları kullanmayı deneyebilirsiniz.



İkinci önemli nokta, insert boyutunun plazmidin kopya sayısını nasıl değiştirdiğidir. Büyük insertler, plazmidin kopya sayısını azaltacaktır, yani iyi bir verim elde etmek için daha fazla hücre büyütmeniz gerekecektir. Genler farklı vektörlere klonlanırsa, sorun plazmidlerin farklı hızlarda kopyalanması olabilir. Biri yüksek kopyalı bir plazmid olabilir, diğeri orta ve hatta düşük kopyalı bir plazmid olabilir.

## 3 KÜLTÜR DOYGUNLUĞU

Kültürü hazırlarken her zaman iyi sonuç alınır. Eski kolonilerden aşılama veya kültürün çok doymuş hale gelmesi plazmid verimini ciddi şekilde negatif olarak etkileyecektir. Kültürlerin geç gecikme evresinde olmasını ve aşırı doymuş olmasını istemeyiz.



## 4 ESKİ KOLONİLERİN KULLANILMASI

Başlangıç kültürleri oluşturulurken kullanılan petrinin yaşı önemlidir. Petriniz eskiyse güzel ve büyük bir koloni seçmiş olsanız bile hepsi canlı hücreler olmayacaktır. Bu nedenle en iyi sonucu elde etmek için başlama- dan önce yeni bir petride saflaştırın.

## 5 ANTİBİYOTİK SORUNLARI

Zayıf plazmidin bir diğer nedeni de antibiyotiklerdir. Bakteriler kültürde büyürken antibiyotığı parçalarlar. Yeterli antibiyotik eklenmediğinde veya stoklar eski ve güçleri yeterli değilse antibiyotik çok baskın olamayabilir bunun sonucunda antibiyotik içermeyen bir kültüre sahip olabilirsiniz.

## 6 LİZİS VE NÖTRALİZASYON PROBLEMLERİ

Lizis içeriğindeki bazı reaktifler çoğunlukla iyi ve stabildir. Ama havaya maruz kaldıklarında zamanla bozulabilirler ve ilk günkü kadar iyi çalışmayabilirler. Çalışanların plazmid izolasyonunda yaptıkları en büyük hatalarından biri ise parçalama işlemleridir. Protokoller normalde nazik olmanızı söylese de fazla hassas olmak çok da iyi bir durum değildir. Diğer bir yaygın sorun, lizisin çok uzun süre devam etmesine izin verilmesi ve bunun kalıcı olarak denatüre, olmuş sindirilemez DNA ile sonuçlanmasıdır.

## 7 İZOPROPANOL KALİTESİ

Birçok laboratuvar, yıl boyunca açılıp kapatılan büyük şişelerde izopropanol bulunur. Çöktürme basamağından iyi verim elde etmek istiyorsak kullanılan izopropanolün eski olmadığından emin olmalısınız.

## 8 PELETİ KAYBETMEK

İzopropanol peletleri camsı ve berraktır, görülmesi zordur. Bunla ilgili en iyi uygulama sabit açılı bir rotorda santrifüjlemeden sonra peletin oluşmasını beklediğiniz noktayı işaretlemek olabilir. Böylece izopropanolü döktüğünüzde plazmidi nerede bulacağınızı bilirsiniz. Sabit açılı bir rotor kullanırken peletinizin nerede olduğunu bilmenizi sağlamanın bir başka yolu da tüplerinizi hep aynı şekilde yüklemektir, bu durumda peletiniz her zaman aynı yerde olacaktır. !! Pek çok ticari kit üreticisinin bu sorun için geliştirdiği "çöktürücüler" veya silika disk filtreleri kullanılan kitler ürettiğini belirtmek isteriz. !! Yine küçük bir not; santrifüjleme süresini ve hızını optimize edilenden kısa tutmamanızı öneriyoruz. Santrifüjleme hızını arttıramıyorsanız süresini asla kısaltmayınız.



## 9 KOLONLARIN TIKANMASI

Kolonların tıkanmasından endişe ediyorsanız kolon basamağına geçmeden önce Whatman kağıdından süzün.

## 10 KOLONLARDAKİ KALAN DNA

Elüsyondan sonra DNA kolonlarda kalabilir. Kalan DNA'yı süzmek için ayrı bir elüsyon daha gerçekleştirin. 50°C civarında ısıtılmış elüsyon tamponu kullanmak da elüsyon verimini artırmaya yardımcı olabilir.

### Referanslar:

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. pp 545.

Begbie S. et al. (2005) The Effects of Sub-Inhibitory Levels of Chloramphenicol on pBR322 Plasmid Copy Number in Escherichia coli DH5?. Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI). 7:82-8.