

Cvičení z metod molekulární biologie (Bi6405)

Cílem tohoto cvičení je seznámit studenty se základními metodami manipulace s DNA. Konkrétně pak je cílem příprava vektorů pro expresi cizorodé DNA. Sled úloh je sestaven tak, aby jednotlivé úlohy na sebe logicky navazovaly a zahrnovaly veškeré kroky potřebné k dosažení uvedeného cíle. Během těchto cvičení se studenti seznámí s následujícími technikami: kultivace bakteriálních buněk, izolace plazmidové DNA, restriční štěpení, úprava přechýlujících konců DNA polymerázou a jejich defosforylace fosfatázou, agarózová elektroforéza molekul DNA a RNA, eluce DNA fragmentů z agarozového gelu, ligace fragmentů DNA, příprava kompetentních bakteriálních buněk a jejich transformace, polymerázová řetězová reakce, Izolace celkové RNA, RT-PCR.

Úlohy

1. Bezfenolová extrakce plazmidové DNA chromatografií na kolonách firmy Qiagen
2. Štěpení plazmidové DNA, úprava konců, agarózová elektroforéza a eluce fragmentů DNA z gelu
3. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5 α
4. Ligace a transformace
5. Skřínink transformantů a zamražení pozitivních klonů
6. Izolace RNA a zpětná transkripce

Úloha č.1

BEZFENOLOVÁ EXTRAKCE PLAZMIDOVÉ DNA Z BAKTERIÍ E. COLI DH5A CHROMATOGRAPHIÍ NA KOLONÁCH FIRMY QIAGEN

Úvod:

V současné době existuje celá řada postupů pro extrakci a purifikaci plazmidové DNA z bakterií. Všechny tyto postupy se skládají ze 3 základních kroků – růst bakteriální kultury, lyze bakterií a purifikace plazmidové DNA.

a) růst bakteriální kultury:

Izolace plazmidové DNA začíná inokulací jediné kolonie bakterií do malého objemu (několika ml) kultivačního média. Tato „startovací kultura“ může být použita k získání malého množství plazmidové DNA (výtěžek řádově v μg) nebo k inokulaci většího objemu (několika stovek ml) média a následnému zisku až několika mg DNA. Bakteriální kultury pěstujeme do pozdní logaritmické fáze a v přítomnosti antibiotika.

b) lyze bakteriálních buněk

Bakteriální buňky lze lyzovat mnoha způsoby. Mezi nejčastěji používané metody patří lyze detergenty, organickými látkami, zásadami nebo varem. Výběr vhodné metody závisí především na velikosti plazmidu, kmeni *E. coli* a na následné metodě purifikace plazmidové DNA. Například pro izolaci velkých plazmidů (>15kb), které jsou citlivé na poškození, se pro lyzi nejčastěji používá kombinace izoosmotického roztoku sacharózy, lysozymu, EDTA a SDS. U kmenů *E. coli* exprimujících endonukleázu A je nevhodné používat lyzi varem, protože při ní nedochází ke kompletní inaktivaci tohoto enzymu, což může mít za následek degradaci plazmidové DNA.

c) purifikace plazmidové DNA

Volba metody purifikace plazmidové DNA je určena především nároky, které na získanou plazmidovou DNA klademe z hlediska jejího dalšího použití. Za standard je dosud považována metoda purifikace pomocí gradientu CsCl, kterou lze získat vysoce čistou kovalentně uzavřenou formu plazmidové DNA. Takto připravená plazmidová DNA je vhodná například i pro mikroinjekce do savčích buněk. Mezi používané metody vedoucí k čisté plazmidové DNA vhodné k transfekci savčích buněk i k enzymatickým reakcím včetně sekvenování patří precipitace DNA polyethylenglykolem. V současné době jsou však nejpoužívanější komerčně dodávané kity, kde purifikace plazmidové DNA je založená na adsorbci DNA na chromatografickou kolonu. Při správném dodržení postupu je výsledná plazmidová DNA dostatečně kvalitní pro veškeré další aplikace.

Princip metody:

Metoda je založena na lýzi bakteriálních buněk roztokem NaOH/SDS. SDS solubilizuje fosfolipidy a proteiny buněčné membrány a způsobuje lýzi buněk, NaOH denaturuje proteiny, chromozomální a plazmidovou DNA. RNA je odbourána RNázou. Komplex proteinů a chromozomální DNA je poté vysrážen vysokou koncentrací solí a odstraněn centrifugací. Plazmidová DNA je schopná renaturace a může být zachycena na chromatografické koloně Qiagen. Po promytí od zbytků proteinů, RNA a sacharidů je plazmidová DNA uvolněna roztokem solí z kolony, vysrážena isopropanolem a zbytky solí odstraněny promytím v 70% ethanolu. Výsledná plazmidová DNA je vysušena a rozpuštěna v TE pufru.

Postup:

1. Inokulujte 1 kolonii *E. coli* DH5 α nesoucí požadovaný plazmid do 2 ml LB média obsahujícího 50 μ g/ml ampicilinu a kultivujte na třepačce při 37°C.
2. Po dosažení přiměřené hustoty bakteriální suspenze inokulujte touto suspenzí 500 ml média LB obsahujícího ampicilin a kultivujte přes noc na třepačce při 37°C.
3. Centrifugujte bakteriální suspenzi 6000g/10 minut/4°C.
4. Slijte supernatant a bakteriální pelet kompletně resuspendujte v 10 ml pufru P1 obsahujícím RNázu.
5. Přidejte 10 ml pufru P2, promíchejte několikerým převrácením zkumavky a inkubujte 5 minut při laboratorní teplotě. Bakteriální buňky lyzují a roztok se stává viskózním. Nevortexujte a nenechte reakci běžet déle než 5 minut.
6. Přidejte 10 ml vychlazeného roztoku P3, promíchejte jako v bodě 5. a inkubujte 20 minut v ledové lázni. Vytváří se sraženina komplexu proteinů a genomové DNA.
7. Centrifugujte 10000g/30 minut/4°C. Během centrifugace ekvilibrujte kolonu Qiagen 10 ml pufru QBT.
8. Čirý supernatant přefiltrujte na kolonu a nechte prokapat.
9. Promyjte kolonu 20 ml pufru QC.
10. Přeneste kolonu do čisté 50ml zkumavky a eluujte plazmidovou DNA 15 ml pufru QF.
11. Precipitujte plazmidovou DNA 10,5 ml isopropanolu při laboratorní teplotě.
12. Centrifugujte 10000g/30 minut/4°C.
13. Odstraňte důkladně supernatant a propláchněte vysráženou DNA 5 ml 70% ethanolu při pokojové teplotě.
14. Centrifugujte 10000g/5 minut/4°C.
15. Odstraňte 70% ethanol, vysušte plazmidovou DNA a rozpusťte ji v 500 μ l pufru TE.
16. Změřte koncentraci DNA a uložte ji při 4°C.

Složení roztoků:

Pufr P1: 50mM Tris-Cl, pH=8,0, 10mM EDTA, 100 μ g/ml RNázy A.

Pufr P2: 200mM NaOH, 1% SDS (w/v)

Pufr P3: 3M acetát draselný, pH=5,5

Pufr QBT: 750mM NaCl, 50mM MOPS pH=7,0; 15% izopropanol (v/v), 0,15% Triton X-100 (v/v)

Pufr QC: 1M NaCl, 50mM MOPS, pH=7,0; 15% izopropanol (v/v)

Pufr QF: 1,25M NaCl, 50mM Tris-Cl, pH=8,5; 15% izopropanol (v/v)

TE pufr: 10mM Tris-Cl, pH=8,0; 1mM EDTA

Úloha č.2

ŠTĚPENÍ DNA RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEÁZAMI, MODIFIKACE KONCŮ VZNIKLYCH FRAGMENTŮ, ELEKTROFOREZA A ELUCE FRAGMENTŮ Z AGAROVÉHO GELU

Úvod:

Při klonování cizorodé DNA do expresních vektorů se nejčastěji využívá vhodných restričních míst, která se nacházejí v klonovacím místě vektoru a na obou koncích cizorodé DNA. Jako ideální lze označit situaci, kdy lze jak cizorodou DNA tak i vektor štěpit současně 2 restriktázami, které tvoří komplementární konce. Tento postup výrazně omezuje možnost ligace vektoru bez začlenění cizorodé DNA a po ligaci a transformaci pak získáváme pouze klony obsahující vektor s cizorodou DNA začleněnou v požadované orientaci.

Tento postup však není vždy možný. V některých případech je zapotřebí začlenit do vektoru i cizorodou DNA, jejíž konce nejsou komplementární s konci linearizovaného vektoru. Ligaci pak lze provést pouze v tom případě, že se odstraní jednořetězcové přečnívající úseky DNA, čímž se konce dsDNA zatupí. Tento typ modifikace lze provést dvěma způsoby: 1) polymerázovou reakcí, kdy se chybějící úsek DNA dosyntetizuje nebo 2) nukleázovou reakcí, kdy se přečnívající jednořetězec odštěpí. Pro modifikaci přečnívajícího 5' konce lze použít obě techniky – zpravidla se používá Klenowův fragment DNA polymerázy I nebo nukleáza Mung Bean. Pro modifikaci přečnívajícího 3' konce lze použít pouze nukleázovou reakci. Nejčastěji používanými enzymy jsou T4 DNA polymeráza, Klenowův fragment DNA polymerázy I, nukleáza S1 nebo nukleáza Mung Bean.

Při ligaci cizorodé DNA do vektoru je žádoucí, aby počet rekombinantních konstruktů, tj. vektorových molekul se začleněnou cizorodou DNA, byl co nejvyšší. V případě, že jak cizorodá DNA tak linearizovaný vektor mají zatupené nebo komplementární ostré konce, získáme po ligaci a transformaci velké množství klonů obsahujících pouze vektorovou DNA postrádající cizorodý fragment. Abychom nechtěné recirkularizaci prázdného vektoru zabránili, je možné linearizovanou vektorovou DNA defosforylovat na 5' konci pomocí alkalické fosfatázy. Ligaci takto modifikované vektorové s cizorodou DNA vzniká otevřená kružnicová molekula, která je schopná transformovat *E. coli*.

Cílem této úlohy je ověření účinnosti klonování cizorodé DNA do vektoru s různě modifikovanými konci obou DNA molekul. Gen kódující *v-myb* bude vyštěpen z plazmidu pMT-*vMyb-CD4* enzymem *Xba*I. Expresní plazmid pMT-I-CD4 bude linearizován enzymem *Xba*I, respektive *Eco*RI. Účinnost klonování bude ověřována u následujících variant:

- I) *Xba*I fragment genu *v-myb* a vektor linearizovaný *Xba*I – oba bez modifikace konců
- II) jako v bodě I), u vektoru navíc defosforylace na 5' koncích
- III) *Xba*I fragment genu *v-myb* a vektor linearizovaný *Eco*RI – u obou zatupené konce pomocí Klenowova fragmentu DNA polymerázy I
- IV) jako v bodě III), u vektoru tupé konce navíc defosforylované na 5' koncích

Postup:

1. Připravte 20 ul reakční směsi, která obsahuje:
 - 2 ug DNA (vektor s genem *v-myb* nebo expresní vektor)
 - 2 ul 10x restrikčního pufru
 - 0,2 ul 100x BSA
 - 3 U restrikčního enzymu (*Xba*I nebo *Eco*RI)doplňte vodou do 20 ul
2. Inkubujte restrikční směs 60 minut při 37°C.
3. Otestujte, zda restrikční reakce byla dokončena elektroforézou v 1% agarózovém gelu: smíchejte 4 ul reakční směsi s 1 ul nanášecího pufru a naneste na gel.
4. Pokud byla reakce dokončena, proveďte zatupení konců u paralelek III a IV.
 - a) Přidejte 1 ul roztoku, obsahující všechny dNTP v 1 mM koncentraci.
 - b) Přidejte 1 jednotku Klenowova fragmentu DNA polymerázy I na každý ug DNA v reakci
 - c) Inkubujte reakční směs 15 minut při laboratorní teplotě.
 - d) Inaktivujte enzymy v reakci zahřátím na 75°C po dobu 10 minut.
5. U paralelek II a IV proveďte defosforylaci 5' konců přidáním 0,5 U alkalické fosfatázy a inkubujte 30 minut při 37°C.
6. Reakční směs smíchejte s nanášecím pufrům v poměru 5:1 a proveďte agarózovou elektroforézu. Dojde k separaci nenavázaných dNTP, restrikčních endonukleáz a alkalické fosfatázy od fragmentu DNA, který bude následně purifikován z gelu pomocí Qiaex gel extraction kitu.

Purifikace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí Qiaex gel extraction kitu

Pro purifikaci fragmentů DNA z agarózových gelů lze využít celou řadu různých metod. Mezi nejčastěji používané přístupy patří eluce DNA z gelu na membránu, následné uvolnění DNA z membrány do roztoku a její purifikace. Druhou možností je solubilizace části gelu obsahující fragment DNA a jeho následné přečištění.

Princip:

Metoda využívá vysokých koncentrací chaotropních solí (pufr QX1) k narušení vodíkových vazeb mezi cukernými zbytky v agarózovém gelu, čímž umožňuje jeho solubilizaci. Vysoká koncentrace solí navíc odstraňuje z fragmentů DNA navázané proteiny. Po solubilizaci jsou fragmenty DNA adsorbovány na povrch silica částic odkud jsou po promytí (pufr PE) uvolněny 10mM roztokem Tris-Cl, pH=8,5.

- 1) Rozdělte restrikční fragmenty DNA elektroforézou v agarózovém gelu tak, aby byly od sebe dostatečně vzdáleny. Skalpelem vyřízněte co nejmenší proužek gelu obsahující požadovaný fragment DNA a vložte jej do zkumavky. Přidejte 800 ul pufru QX1 a 10 ul QIAEX silica částic a promíchejte na vortexu.
- 2) Inkubujte při 50°C dokud nedojde k úplné solubilizaci agarózového gelu. Vortexujte každé 2 minuty.

- 3) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokožová teplota
- 4) Promyjte sediment 500 ul pufru QX1.
- 5) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokožová teplota
- 6) Promyjte 2x 500 ul pufru PE.
- 7) Vysušte sediment 10-15 minut dokud nezíská bílou barvu.
- 8) Resuspendujte pelet v 15 ul 10mM Tris-Cl, pH=8,5, inkubujte 10 minut při 50 °C.
- 9) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokožová teplota
- 10) Supernatant obsahuje čistou DNA vhodnou pro ligaci.

Úloha č.3

PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK *ESCHERICHIA COLI* DH5A

Úvod:

Byla popsána řada metod umožňující účinný přenos plazmidové DNA do buněk *E. coli*. Pomineme-li přenos metodou elektroporace (přenos DNA pomocí krátkých impulsů vysokého napětí) patří mezi nejpoužívanější metody navození kompetence bakteriálních buněk pomocí vychlazených roztoků dvojmocných iontů kovů. Tato metoda byla poprvé popsána již na počátku osmdesátých let Hanahanem a kol. a v různých modifikacích je používána dodnes. Pomocí této metody lze dosáhnout účinnosti transformace až 5×10^8 transformovaných kolonií/ug superhelikální plazmidové DNA. Účinnost transformace je výrazně ovlivňována čistotou použitých pufrů a laboratorního skla a také podmínkami pěstování bakteriální kultury.

Pro rutinní přípravu kompetentních buněk v laboratořích je dnes nejčastěji používána zjednodušená modifikace původní Hanahanovy metody publikovaná Cohenem a kol., která umožňuje dosáhnout účinnosti transformace 10^7 transformovaných kolonií/ug superhelikální plazmidové DNA, což je dostatečné pro klonování plazmidů v běžných aplikacích. Kompetentní buňky připravené touto metodou lze dlouhodobě uchovávat při -80°C

Cíl:

Navodit takový stav kompetence u bakteriálních buněk *E. coli* DH5 α , který by umožnil příjem cizorodé DNA s dostatečnou účinností.

Postup:

1. Naočkejte 1 kolonii buněk *E. coli* kmene DH5 α do 1 ml růstového média LB a kultivujte přes noc na třepačce při 37°C .
2. Druhý den použijte 0,5 ml této kultury pro inokulaci 100 ml LB. Inkubujte na třepačce při 37°C do dosažení $\text{OD}_{550} = 0,5$. Při měření absorbance použijte médium LB jako blank.
3. Po dosažení požadované hustoty kulturu promíchejte a ponořte do ledové lázně na 10 minut.
4. Centrifugujte po 25 ml při $2700\text{g}/10\text{ minut}/4^\circ\text{C}$ v 50 ml sterilních zkumavkách.
5. Opatrně odstraňte supernatant a suspendujte pelet v 5 ml vychlazeného 0,1 M roztoku MgCl_2 sterilní pipetou. Přeneste suspenzi do 15 ml sterilních zkumavek.
6. Centrifugujte při $2700\text{g}/10\text{ minut}/4^\circ\text{C}$.
7. Opatrně odstraňte supernatant a suspendujte pelet v 1 ml vychlazeného 0,1 M roztoku CaCl_2 . Přidejte dalších 5 ml vychlazeného 0,1 M roztoku CaCl_2 , opatrně promíchejte a inkubujte v ledové lázni 20 minut.
8. Centrifugujte při $2700\text{g}/10\text{ minut}/4^\circ\text{C}$.
9. Odstraňte supernatant a opatrně suspendujte pelet v 1,2 ml vychlazeného zamrazovacího pufru (22,5 ml 0,1M CaCl_2 plus 3,5 ml sterilního glycerolu)
10. Rozdělte po alikvotech 200 μl do sterilních mikrozkušavek a zamraďte v -80°C .

Úloha č. 4

LIGACE VEKTORU S CIZORODOU DNA A TRANSFORMACE *ESCHERICHIA COLI* DH5A

Úvod:

Tvorba fosfodiesterové vazby mezi 3'-OH a 5'-P fragmentů DNA nebo RNA za účasti kofaktorů (př. ATP) je katalyzovaná ligázami. Ligázy se *in vivo* účastní procesů replikace, rekombinace či DNA reparační. *In vitro* jsou pak využívány k tvorbě rekombinantních DNA molekul. Mezi nejčastěji používané ligázy patří ligázy produkované bakteriemi nebo bakteriofágy: např. T4 DNA ligáza, E. coli DNA ligáza, termostabilní DNA ligázy. V současné době existuje několik způsobů vyjádření ligázové aktivity. Komerční firmy obvykle jednotku definují jako množství ligázy, které je potřebné pro ligaci kohezních konců DNA při určité teplotě za určitý časový interval. Používají se však rovněž i další jednotky: např. Weissova jednotka = množství ligázy, které katalyzuje výměnu 1 nmol ³²P mezi pyrofosfátem a ATP za 20 minut při 37°C.

Postup:

Obecně platí, že ligační reakci provádíme vždy v co nejmenším objemu (obvykle 10 ul). Důležitým parametrem je **molární poměr** plazmidové a inzerované DNA, který by měl být 1:1. V případě, že molekula plazmidu má tupé nebo self-komplementární konce, by při nadbytku plazmidové DNA v ligační směsi mohl vzniknout nadbytek transformátů obsahujících pouze plazmidovou DNA bez inzertu.

1. Ligační směsi budeme připravovat podle skupin z Úlohy 2. Při ligaci je zapotřebí provádět i kontrolní reakce. V našem případě uděláme jednu reakci se všemi složkami, jednu reakci bez DNA inzertu a jednu bez ligázy.
2. Složení kompletní reakce:

10x ligační pufr (jiz obsahuje ATP)	1 ul
vektorová DNA	100 ng
DNA inzertu	10 ng
T4 DNA ligáza (400 U/ul)	0,1 ul
doplnit vodou do 10 ul	
3. Při pipetování postupujeme tak, že do mikrozkušavky napipetujeme nejprve vodu a DNA fragmenty, zahřejeme 5 minut na 45 °C, zchladíme na ledu a přidáme zbytek ligační reakce.
4. Inkubujte reakční směs hodinu při 20 °C (obvyklé je 16 °C přes noc).
5. Ligační směs použijte pro transformaci kompetentních buněk E. coli.

Transformace kompetentních buněk E. coli:

1. Na ledu pozvolna rozmraďte mikrozkušavku s kompetentními buňkami, přidejte 2 ul ligační směsi, promíchejte a inkubujte na ledu 30 minut.
2. Inkubujte směs 3 minuty při 37 °C a poté ji umístěte na 2 minuty opět na led.
3. Přidejte 1 ml růstového LB média a inkubujte 45 minut při 37 °C.
4. Směs centrifugujte 5000 rpm/5 minut/ 4°C.
5. Odlijte supernatant vyjma cca 40 ul, ve kterých resuspendujte bakteriální sediment.
6. Suspenzi přeneste na agarovou plotnu obsahující 50 µg/ml ampicilinu a rozetřete bakteriologickou hokejkou.
7. Inkubujte pře noc při 37 °C. Misky lze poté uchovat několik týdnů při 4 °C.

Úloha č.5

SKRÍNINK TRANSFORMANTŮ A ZAMRAŽENÍ POZITIVNÍCH KLONŮ

Úvod:

O úspěšnosti klonování genu *c-myb*, respektive *v-myb*, do expresního plazmidu pMT-I-CD4 se přesvědčíme po izolaci plazmidové DNA vybraných klonů následnou polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Primery pro detekci byly navrženy tak, aby sekvence forward primeru (accagcctcctccaagtc) byla komplementární k sekvenci promotoru, jež je součástí vektoru pMT-I-CD4. Sekvence reverse primeru (accgtatttctgcacgtgttc) je pak komplementární k sekvenci jež je společná pro gen *v-myb* i *c-myb*. V případě PCR vektoru pMT-cMyb-CD4 je očekávaná délka produktu 462 bp. Vzhledem k tomu, že gen *vMyb* je zkrácenou verzí genu *cMyb*, je v případě PCR vektoru pMT-vMyb-CD4 očekáván produkt o velikosti 282 bp. V případě samotného vektoru pMT-I-CD4 bez začleněného mybového genu nedojde při takto navržené PCR k vytvoření žádného produktu.

Postup:

Každá ze 4 skupin (viz. Úloha 2 a 3) bude analyzovat 5 různých bakteriálních kolonií získaných po transformaci *Escherichia Coli* DH5 α ligační směsí (viz. Úloha 3). Konečným výsledkem této úlohy bude stanovení frekvence bakteriálních kolonií obsahujících požadovaný plasmid pMT-vMyb-CD4, respektive pMT-cMyb-CD4. Tyto bakteriální klony budou následně zamrazeny.

Minipreparace plazmidové DNA metodou alkalické lyze

1. Naočkovat jednu bakteriální kolonii na agarovou misku obsahující ampicilin (100 mg/ml). Inkubovat přes noc při 37°C.
2. Přenést bakteriální kulturu plastikovou špičkou do mikrocentrifugační zkumavky obsahující 200 μ l pufru P1 s RNázou ve výsledné koncentraci 100 μ g/ml.
3. Přidat 200 μ l roztoku P2. Opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky. Inkubovat 5 minut (ne déle) při pokojové teplotě.
4. Přidat 200 μ l vychlazeného roztoku P3. Promíchat několikerým převrácením zkumavky. Uložit zkumavku na led na 15 minut.
5. Centrifugovat při 10 000 RPM/20 min/4 °C na mikrofuze. Přenést supernatant do čisté zkumavky.
6. Přidat 1 objem isopropanolu, promíchat a centrifugovat při 10 000 RPM/20 min/4 °C na mikrofuze
7. Promýt vysráženou plazmidovou DNA 0,5 ml 70 % ethanolu (nechat stát 5 min při pokojové teplotě).
8. Odsát supernatant pasterkou, odstranit všechny kapky ze stěn zkumavky a zkumavku nechat vyschnout v obrácené poloze na filtračním papíru při pokojové teplotě.
9. Rozpustit DNA ve 40 ml 10 mM Tris-Cl (pH 8,0).

Složení pufrů:

Pufr P1: 50 mM Tris-Cl (pH=8), 10 mM EDTA

Pufr P2: 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)

Pufr P3: 3 M acetát draselný (pH=5,5)

PCR detekce genu v-Myb, respektive c-Myb, ve vektoru pMT-IRES-CD4

Při pipetování PCR směsi se obvykle postupuje tak, že nejprve se zhotoví směs všech složek (mimo plazmidové DNA) spočítaná pro všechny vzorky + negativní kontrolu (PCR reakce bez plazmidové DNA) +1, přičemž jednotlivé složky se pipetují v uvedeném pořadí. Jednotlivé vzorky plazmidové DNA se napipetují do 0,5ml zkumavek a přidá se k nim odpovídající množství PCR směsi. Zkumavky s PCR směsí se poté umístí do termocykléru a spustí se daný program.

Složení PCR reakce:

destilovaná voda	14,5 ul
10x PCR pufr	2,5 ul
50mM MgCl ₂	1 ul
10mM směs dNTP	1 ul
20uM forward primer	2 ul
20uM reverse primer	2 ul
100 ng plazmidové DNA	1 ul
<u>Taq polymeráza (5U/ul)</u>	<u>1 ul</u>
celkem	25 ul

Průběh PCR reakce:

1. 94°C – 2 minuty
2. 94°C – 30 s
3. 55°C – 30 s
4. 72°C – 30 s
5. bod 2-4 opakuj 30x
6. 72°C – 7 minut
7. 10°C – 1 minut

O úspěšnosti RT-PCR se přesvědčte agarozovou elektroforézou.

Zamražení pozitivních klonů

1. Naočkovat pozitivní bakteriální klon do 3 ml LB média obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu a kultivovat na třepačce přes noc při 37°C.
2. K narostlé kultuře přidat 1 ml 50% glycerolu a promíchat na vortexu.
3. Přenést 2 ml do zamrazovací zkumavky a pro dlouhodobé uchování zamrazit na -80°C.

Úloha č.6

IZOLACE CELKOVÉ RNA Z EUKARYOTICKÝCH BUNĚK, GELOVÁ ELEKTROFORÉZA RNA A RT-PCR

Úvod:

Eukaryotická buňka obsahuje přibližně 10^5 ug RNA. Více než 80 % z toho tvoří ribozomální RNA (především 28S, 18S, 5.8S a 5S), 15-20% je tvořeno malými RNA (tRNA, malé jaderné RNA ...). Pouze 1-5% z celkového obsahu RNA v buňce je tvořeno mRNA. Mezi nejpoužívanější metody izolace celkové RNA z buněk patří metoda využívající směsné lyzační monofazické roztoky obsahující nejčastěji fenol a guanidin izothiokyanát. Guanidinové soli jsou chaotropní látky, které se uplatňují při denaturaci proteinů a inhibici RNáz.

Vzhledem k tomu že RNA ve srovnání s DNA nese hydroxylové skupiny na 2' i 3' pozici, je RNA mnohem více chemicky reaktivní než DNA. RNA je také velmi snadno degradována RNázami. Vzhledem k tomu, že RNázy se uvolňují během lýze buněk a vyskytují se rovněž na pokožce, je při práci s RNA nutno dodržovat taková opatření, abychom zabránili možné degradaci RNA. Oproti DNázám jsou RNázy mnohem odolnější vůči tepelné inaktivaci. RNázy rovněž nepotřebují pro svou enzymovou aktivitu bivalentní ionty kovů. Proto je jejich inaktivace velmi obtížná.

Zásady práce s RNA:

Pro práci s RNA vyčleňte materiál (sklo, pipety, roztoky, ...), který bude používán pouze pro práci s RNA. Používejte RNase-free mikrozkušavky a špičky. Přesto se doporučuje plastik před autokláfováním inkubovat s inhibitory RNáz (např. DEPC - diethylpyrokarbonát). Používejte rukavice.

Izolace celkové RNA

Postup:

1. 2×10^6 buněk BM2 přenést do mikrozkušavky a centrifugovat 5 minut/500g/RT.
2. Odsát supernatant a pelet resuspendovat v PBS a centrifugovat 5 minut/500g/RT.
3. Odsát supernatant, přidat 1 ml TRIZOLU (Invitrogen) a inkubovat 5 minut při RT. V tomto kroku dochází k lýzi buněk.
4. Přidat 0,2 ml chloroformu, vortexovat 15 s, inkubace 2 min RT. DNA a proteiny jsou extrahovány v organické fázi, zatímco RNA zůstává ve vodné fázi.
5. Centrifugace 15 minut/12000g/4°C.
6. K horní vodné fázi přidat 0,5 ml isopropanolu, inkubace 10 minut.
7. Centrifugace 10 minut/12000g/4°C.
8. Odsát supernatant a sediment opláchnout 1 ml 70% etanolu.
9. Centrifugace 5 minut/12000g/4°C.
10. Mírně vysušit sediment a rozpustit jej v 10 ul DEPC vody.

Měření koncentrace:

RNA: A260 = 1 odpovídá koncentraci 40 ug/ml
A260/A280 = 1,8-2,0 odpovídá čisté RNA

Materiál:

Veškeré roztoky připravovat z DEPC vody (PBS, 70% ethanol).

Příprava DEPC vody: 1 ml DEPC na 2 l redestilované vody. Míchat 2-3 hodiny a autoklávovat. Při autoklávování dochází k rozkladu DEPC.

Elektroforéza RNA

Formamidem denaturované molekuly RNA lze dělit podle velikosti na elektroforézou na agarózových gelech obsahující 2,2 M formaldehyd.

Příprava gelu (pracujeme v digestoři):

1. Rozvařit 1 g agarózy v 72 ml DEPC vody.
2. Vychladit na 55°C.
3. Přidat 18 ml 37% formaldehydu a 10 ml 10x running buffru.
4. Nalít gel.

Příprava vzorku:

1. 20 ug RNA
2. 4 ul formaldehydu
3. 2 ul running buffru
4. 1 ul ethidium bromidu (200 ug/ml)
5. 10 ul formamidu

zahřát 10 minut na 85°C, zchladit 10 minut na ledu, přidat 1 ul 10x nanášecího pufru, nanést na gel

Roztoky:

10x Running buffer: 0,2M MOPS (pH=7,0), 10mM EDTA, 0,1M Na-acetát, filtrovat a skladovat ve tmě

10x Nanášecí pufr: 50% glycerol, 10mM EDTA, 0,25% bromphenol blue, 0,25% xylene cyanol

RT-PCR

Úvod:

Pomocí RT-PCR lze amplifikovat cDNA kopie libovolné RNA. Lze ji také využít pro detekci mutací v transkribovaných sekvencích a rovněž ke stanovení úrovně exprese určitého genu. V prvním kroku dochází pomocí RNA-dependentní DNA polymerázy (reverzní transkriptázy) k enzymatické konverzi RNA do cDNA, která je následně amplifikována standardní

PCR. Výběr amplifikovaného úseku je podobně jako u standardní PCR dán sekvencí primerů. Při navrhování primerů je vhodné tyto umístit do rozdílných exonů, čímž snadno rozlišíme po amplifikaci produkty vzniklé kontaminací genomovou DNA v izolované RNA. Problémům s kontaminací genomovou DNA lze předejít rovněž inkubací vzorku RNA s RNase free DNázou. Každá RT-PCR reakce by měla zahrnovat rovněž pozitivní a negativní kontroly. Negativní kontroly by měly zahrnovat kompletní RT-PCR mix bez A) RNA templátu, B) reverzní transkriptázy, C) primerů. Tyto kontroly by měly odhalit zda vzorek RNA není kontaminován genomovou DNA či zda nedochází k tzv. self-primingu samotnou RNA.

Složení RT-PCR reakce:

RNase free voda	13,5 ul
10x RT-PCR pufr	2,5 ul
50mM MgCl ₂	1 ul
10mM směs dNTP	1 ul
20uM forward primer	2 ul
20uM reverse primer	2 ul
200 ng celkové RNA	1 ul
AMV reverzní transkriptáza	1 ul
<u>AMV-optimized Taq polymeráza</u>	<u>1 ul</u>
celkem	25 ul

Průběh RT-PCR reakce:

1. 42^oC – 15 minut
2. 94^oC – 1 minuta
3. 94^oC – 30 s
4. 55^oC – 30 s
5. 70^oC – 30 s
6. bod 3-5 opakuj 30x
7. 70^oC – 7 minut
8. 10^oC – 1 minuta

Sekvence primerů specifických pro gen *v-myb*: TGCTAAGCATTGGAAGGGAAGG a CAATTTCTGCCCATCTGTTTCC

RT-PCR produkty (primery vymezují úsek o velikosti 155 bp) vyhodnoťte elektroforézou na 2% agarozovém gelu.