

DEN 1

IZOLACE ROSTLINNÉ DNA, PCR, PRÁCE S DATABÁZEMI MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝCH INFORMACÍ

Úvod

Jednou z metod studia genomu je amplifikace krátkých úseků DNA pomocí PCR. V laboratoři si osvojíte rychlou metodu izolace DNA z rostlinného materiálu a založíte několik PCR reakcí. Amplifikovat budeme úsek DNA pro použití jako sondu v pozdější hybridizaci a oblast inzerce cizí DNA (transpozonu En-1, dSpm a T-DNA) v genech AHP4, ARR4 a ARR21.

Časový harmonogram

8:00 Úvod k praktické části, příprava materiálu (Jan Hejátko)

9:00 IZOLACE DNA (Jan Hejátko)

10:00 DATABÁZE (Jan Hejátko)

12:00 OBĚD

13:00 ZALOŽENÍ PCR (Jan Hejátko)

14:00 DATABÁZE-dokončení (Jan Hejátko)

Přehled

Úvod k praktické části

- Úvod do metodologie praktika
 - obecné zásady práce s DNA a sterilními roztoky
 - schéma experimentu
 - navržení postupu pro identifikaci inzerčního mutanta a zjištění jestli se jedná o homo- nebo heterozygotní stav, vlastní provedení

Praktická část

1. Izolace DNA
2. Založení PCR

Metoda 2A

Rychlá izolace DNA pro PCR

1. Homogenizovat jeden střední list vychlazenou skleněnou tyčinkou v 1,5ml zkumavce (eppendorfka) ve stojánku.
2. Přidat **400 µl** extrakčního pufru, vortexovat **5 s** a nechat stát při laboratorní teplotě **60 min**.
3. Centrifugovat při 14000 otáčkách **30 min**, 4°C.
4. Přenést **300 µl** supernatantu do nové 1,5ml zkumavky a přidat **300 µl** izopropanolu, 4-6 krát překlopit. Nechat stát **10 min** při laboratorní teplotě.
5. Centrifugovat **20 min**, 4°C. Odstranit supernatant, DNA vysrážená izopropanolem bude v peletu.
6. Přidat **500 µl** 70% etanolu. Centrifugovat při 14000 otáčkách **2 min**. Odstranit etanol. Nechat vysušit (SpeedVac, cca **10-15 min**).
7. Pelet rozpustit ve **100 µl** sterilní ddH₂O. Genomovou DNA uchovávat na ledu nebo v lednici.

Extrakční pufř

Tris/HCl (200mM, pH7.5)

NaCl (250mM)

EDTA (25mM)

SDS (0.5%)

Metoda 2B

Založení PCR

Do 0.5 ml zkumavek pro PCR napipetovat postupně vodu, pufř, dNTP, templát, primery a Taq polymerázu podle schématu:

PCR směs:	10x pufř	dNTP	prim1	prim2	Taq pol.	templ. DNA	H ₂ O	celk. 50 ul
	5 ul	4 ul	1 ul	1 ul	2 ul	5 ul	32 ul	

primery AHP4 spec.:	Sim612, Sim 799 –	212 bp
primery ARR21 spec.:	16kon, 16new –	340 bp
primery ARR4 spec.:	ARR4N, ARR4S –	137 bp
primer transpozon	8130, Sim 799 –	250 bp
	8130, 16new –	390 bp
	d11, ARR4N –	195 bp

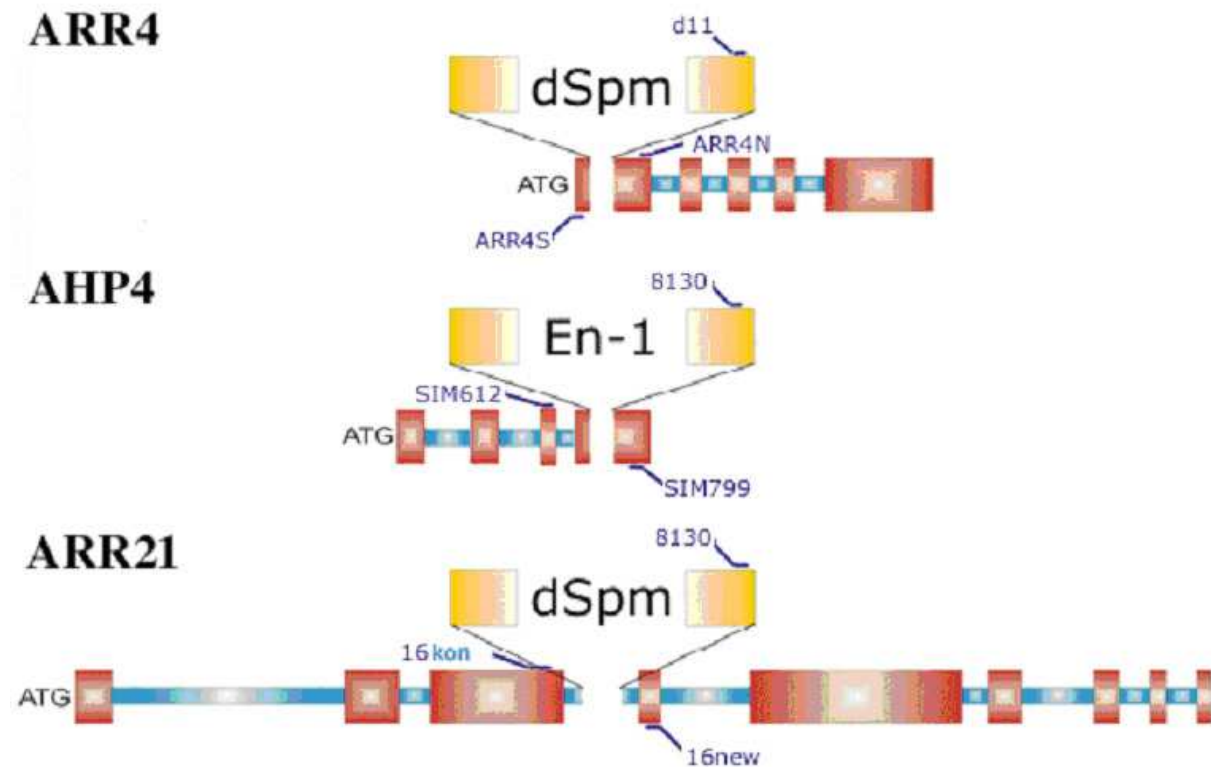
Navrhňte vhodnou kombinaci primerů a to tak, aby jste byli pomocí výsledků PCR reakce schopni identifikovat inerčního mutantu ve vašem genu a zjistit, zda se jedná o jedince homozygotního nebo heterozygotního pro danou inzerční alelu. Využijte schéma na straně 4:

Kombinace primerů pro jednotlivé typy templátů (viz také schéma na následující straně):

	primery	templátová DNA
AHP4		
1a
2a
3a
4a
ARR21		
1b
2b
3b
4b
ARR4		
1c
2c
3c
4c

Na základě přiložených výsledků analýzy použitých primerů pomocí programu Oligo navrhnete vhodné podmínky PCR pro dané reakce:

Cyklus: <u>94°C</u>s
45 cyklů:
94°C s
58°C s
<u>72°C</u>s
72°C min
4°C ∞



Úkoly (příklad):

1. Vyhledejte jeden bakteriální a jeden rostlinný gen Glu-6-P izomerázy v databáze Genbank
2. Vyhledejte geny cheY a cheA u *E. coli*
3. Určete nejbližší homolog cheY (*E. coli*) u *Arabidopsis* pomocí algoritmů BLAST a FASTA.
4. Najděte tři různé regulátory odezvy nebo histidin kinázy u *Arabidopsis*.
5. Určete u libovolného genu v úkolu 4 polohu v genomu *Arabidopsis* (chromosom, polohu v publikované sekvenci daného chromosomu).
6. Vyberte si jeden gen z úkolu 4 a určete oblast 1000 bází v oblasti promotoru genu. Ukončete sekvenci na ATG. Analyzujte na přítomnost vazebních míst transkripčních faktorů pomocí hledání v databázi TRANSFAC.
7. Srovnajte libovolné sekvence z *Arabidopsis* s homologii větší než 30% a menší než 100% pomocí algoritmu CLUSTALW.
8. Vyhledejte nejméně jednu EST sekvenci Glu-6-P izomerázy (hledání homologie nebo podle klíčového slova).

Šablona k protokolům: Izolace DNA a PCR

Jméno:

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky:

Závěr:

DEN 2

IDENTIFIKACE PCR PRODUKTU NA GELU, ZNAČENÍ SONDY PRO HYBRIDIZACI, PŘENOS DNA Z GELU NA MEMBRÁNU

Úvod

Další způsob identifikace genů je hybridizace se značenou sondou. Ta je připravena z DNA známé sekvence a označena tak, aby byla detekovatelná po navázání na homologní případně heterologní sekvenci DNA, která je imobilizovaná na membráně. Ta se přenesou na membránu z gelu spontánním kapilárním sáním. Pokud se přenáší na membránu genomová DNA, mluvíme o metodě Southern blotting.

Ve cvičení připravíme agarózový gel umožňující elektroforetické rozdělení PCR produktů podle velikosti. Z gelu přeneseme DNA na nylonovou membránu v alkalickém prostředí. Přítomnost specifické DNA na membráně prokážeme hybridizací se sondou značenou alkalickou fostatázou zprostředkující chemiluminiscenční signál.

Časový harmonogram

- 8:00 PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU, NAPIPETOVÁNÍ VZORKŮ, ELEKTROFORÉZA
- 9:00 STRUČNÝ ÚVOD K IDENTIFIKACI FRAGMENTŮ HYBRIDIZACÍ SE ZNAČENOU SONDOU (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)
- 10:00 IDENTIFIKACE PCR PRODUKTŮ NA AGARÓZOVÉM GELU (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)
- 11:00 KAPILÁRNÍ TRANSFER (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)
- 12:00 OBĚD
- 13:30 ZNAČENÍ SOND A HYBRIDIZACE (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)

Přehled metod

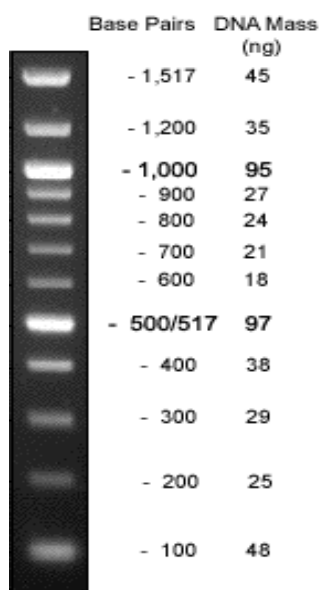
1. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu
2. Detekce na UV transiluminátoru
3. Kapilární transfer (Southern blotting)
4. Přečištění PCR produktu
5. Určování koncentrace DNA
6. Značení sondy
7. Hybridizace

Metoda 3A

Příprava agarózového gelu, elektroforéza PCR produktů a jejich detekce.

1. Ve 250 ml láhvi svařit 100 ml 1x TBE pufru a 1,5 g agarózy. Po rozpuštění agarózy přidat 2 μ l etidium bromidu, který bude sloužit k vizualizaci DNA.
2. Připravit formu pro gel, vsadit hřeben a nalít do formy vrstvu tekuté agarózy 5 - 8 mm. Nechat ztuhnout.
3. Formu s gelem vložit do elektroforézové vany, zalít puftrem a vyjmout hřeben.
4. Napipetovat délkový a hmotnostní standard a vzorky:
 - délkový a hmotnostní standard (NEB): 10 μ l (0,5 μ g)
 - vzorek: 10 μ l PCR (zbytek ponechat pro přípravu sondy) + 1 μ l nanášecího pufru
5. Spustit elektroforézu při 80 V po dobu 60 min (aby bromfenolová modř, která putuje s nejkratšími fragmenty neopustila gel).
6. Pozorovat proužky DNA v procházejícím UV světle a výsledek elektroforézy dokumentovat; bude později porovnáván se signály na hybridizační membráně. Tento gel bude použit pro Southern blotting.

Délkový a hmotnostní standard: 100 bp DNA ladder (0,5 μ g)



Metoda 3B

Kapilární přenos v alkalickém prostředí

1. Po fotodokumentaci odstranit část gelu nad starty a pravý horní roh gelu. Dále změřit výšku a šířku gelu. Gel umístit do vaničky s destilovanou vodou a krátce opláchnout.
2. Vylít destilovanou vodu, přidat až 10 objemů přenosového roztoku (1,5M NaCl/0,5M NaOH),

- umístit na kývací platformu a míchat 30 až 40 min.
3. Během této doby sestavit aparaturu pro přenos DNA:
 - a. Přes čistou vaničku položit skleněnou desku.
 - b. Ustříhnout obdélník filtračního papíru Whatman 3MM takových rozměrů, aby po přiložení přes skleněnou desku nepřesáhl šířku vaničky a zasahoval oběma užšími konci až na dno vaničky. Toto je první vrstva knotu, který bude sát roztok.
 - c. Ustříhnout 3 obdélníky filtračního papíru Whatman 3MM takové velikosti, aby přesahovaly výšku i šířku gelu asi o 1 cm na každé straně a další 3 obdélníky velikosti gelu.
 - d. Nastříhat jednotlivé vrstvy buničiny o rozměrech gelu. Mělo by jich být tolik, aby po zatížení byla jejich výška 7-8 cm.
 - e. Ustříhnout nylonovou membránu Hybond N+ velikosti gelu.
 - f. Naplnit vaničku přenosovým roztokem a část ponechat v petriho misce.
 - g. Smočit nejdelší filtrační papír Whatman 3MM a umístit na skleněnou desku. Pomocí skleněné pipety nebo tyčinky se zbavíme všech případných bublin mezi sklem a papírem.
 - h. Smočit 3 větší filtrační papíry Whatman 3MM a postupně vrstvit do středu aparatury tak, aby nevznikaly vzduchové bubliny.
 - i. Vyjmout gel z přenosového roztoku a přiložit opatrně vrchní stranou do středu vrchního filtračního papíru; odstranit všechny vzduchové bubliny.
 - j. Opatrně umístit nylonovou membránu na gel (od středu ke krajům). Okamžitě vzniká těsný kontakt s gelem. Při chybné manipulaci se nesnažit o opětovné umístění membrány na gel – v takovém případě použít novou membránu.
 - k. Smočit postupně poslední tři filtrační papíry Whatman 3MM a vrstvit je na membránu. Odstranit případné vzduchové bubliny.
 - l. Nakonec přiložit vrstvu buničiny, zatížit suchou petriho miskou, kterou dále zatížíme odměrnou baňkou naplněnou asi 200 ml vody. Nádobu zabezpečíme úchytkou na stojanu.
 4. Zkontrolovat kontakt jednotlivých vrstev a pomocí proužků parafilmu umístěných těsně kolem gelu zamezit nežádoucímu kontaktu vrstev. Tak se veškerý přenosový roztok může do horních vrstev dostávat pouze přes gel a nebude „obtékat“. V opačném případě by se účinnost a stejnoměrnost přenosu snižovala.
 5. Přenos nechat probíhat 4 hodiny, potom aparaturu rozebrat, membránu opláchnout v roztoku 2 x SSC a nechat uschnout mezi dvěma filtračními papíry. V alkalickém prostředí se mezi nylonovou membránou a DNA vytvořily kovalentní vazby, a není proto nutné DNA imobilizovat dalšími postupy.

Metoda 3C

Izolace PCR produktu z agarózového gelu pomocí komerční soupravy Qiagen

1. Na nový agarózový gel nanést 35 μ l PCR směsi + 3,5 μ l nanášecího pufru.
2. Po elektroforéze z agarózového gelu vyříznout daný proužek, aby bloček agarózy byl co nejmenší.
3. Určit jeho hmotnost.
4. Přidat 3x objem pufru QG (tj. 100 mg gelu – 100 μ l QG).
5. Zahřát na teplotu 50°C po dobu 10 min nebo dokud se agaróza nerozpustí. Průběžně 2-3x promíchat.
6. Přidat 1x objem (gelu) izopropanolu, promíchat a vše dát do kolonky.
7. Centrifugovat při 14000 otáčkách 30s, odstranit protečený roztok.
8. Do kolonky přidat 750 μ l pufru PE a centrifugovat při 14000 otáčkách 30s, odstranit protečený roztok. Centrifugovat ještě jednou bez pufru. Kolonku umístit do čisté zkumavky.

9. Na střed kolonky napipetovat 30 μ l sterilní ddH₂O, nechat stát 5 min při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 min.

Metoda 3D

Měření koncentrace DNA spektrofotometricky

1. V čisté zkumavce naředit DNA 100x v objemu 200 μ l.
2. Do kyvety napipetovat 200 μ l sterilní ddH₂O, vynulovat absorbanci.
3. Odstranit vodu z kyvety, napipetovat naředěnou DNA a změřit absorbanci.
4. Vypočítat koncentraci podle vzorce: $OD_{260} = 1,0 \Rightarrow \text{konc. DNA} = 50\text{ng}/\mu\text{l}$.

Metoda 3E

Příprava značené sondy

1. Naředit DNA na koncentraci 10 ng/ μ l.
2. Umístit 10 μ l této DNA do zkumavky a denarovat 5 min ve vroucí vodě.
3. Okamžitě umístit DNA na led a 5 min chladit (po schlazení – asi 2 až 3 min. - rychle stočit, aby se zkondenzovaná kapalina dostala na dno)
4. Přidat : 10 μ l reakčního pufru
2 μ l značícího činidla
10 μ l pracovní koncentrace „cross-linkeru“ (činidla, které zprostředkovává kovalentní vazbu enzymu na DNA).
5. Vše promíchat, stočit a inkubovat 30 min/ 37°C.

Sonda se může použít ihned nebo může být skladována na ledu 2 hodiny.

Metoda 3F

Hybridizace

1. Předehřát požadovaný objem hybridizačního roztoku na požadovanou teplotu (55°C); objem pufru: 0,25 ml pufru /cm² membrány.
2. Umístit membránu do hybridizačního válce s pufrem a prehybridizovat nejméně 30 min/55°C.
3. Přidat značenou sondu a hybridizovat přes noc.

Literatura

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1987, 1st Volume, Preparation and analysis of DNA.

Úkoly

Vypracování protokolu: přiložit a popsat zdokumentované výsledky, zdůvodnit případné nejasnosti.

Šablona k protokolům: Kapilární přenos DNA a hybridizace se značenou sondou

Jméno:

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky

Závěr:

DEN 3

FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

Úvod

Cílem práce je určit velikost jednotlivých fragmentů DNA ze tří různých rostlin *Arabidopsis thaliana* získaných PCR reakcemi se dvěma páry primerů a na základě této kvantifikace rozhodnout, zda se jedná o divoký typ, homozygotní či heterozygotní rostlinu. Studenti provedou PCR reakce s fluorescenčně značenými primery, z jejich produktů připraví vzorky pro fragmentační analýzu na automatickém genetickém analyzátoru ABI PRISM 310, kvantifikují fragmenty a interpretují výsledky analýzy.

V další části práce se studenti seznámí s možnostmi vícebarevného značení fragmentů při studiu mikrosatelitů.

Časový harmonogram

9:00 PROMÝVÁNÍ MEMBRÁN PO HYBRIDIZACI (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)

10:15 FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA (Eva Paděrová)

12:00 OBĚD

13:30 FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA (Eva Paděrová)

DETEKCE HYBRIDIZACE (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)

Přehled

Automatický genetický analyzátor ABI PRISM 310 je založen na principu kapilární elektroforézy fluorescenčně značených DNA fragmentů. Má využití jednak pro sekvenování DNA, jednak pro fragmentační analýzu. Jednotlivé DNA fragmenty jsou elektroforézou v kapiláře rozděleny a postupně detekovány laserovým detektorem.

Při fragmentační analýze připravíme fragmenty DNA PCR reakcí s jedním nebo několika páry primerů, kdy jeden primer z každého páru je fluorescenčně značený. V průběhu jediného běhu pak můžeme současně analyzovat několik různých fragmentů za předpokladu, že se navzájem liší svou délkou nebo jsou označeny různými fluorescenčními barvami. Spolu s každým vzorkem běží interní délkový standard, který umožní přesnou kvantifikaci jednotlivých fragmentů. Je možné využít až pět různých fluorescenčních značek, přičemž pátá je pak vyhrazena pro délkový standard.

Metoda 4A

Příprava fluorescenčně značených DNA fragmentů

Pro tuto úlohu využíváme genomovou DNA z rostlin *Arabidopsis thaliana* izolovanou v předchozích dnech.

Pro každou z nich připravíme dvě PCR reakce .

Objemy pipetujeme do PCR zkumavek podle následujícího postupu:

5 ul dNTP mix
5 ul PCR buffer
2 ul Taq polymerasa
37 ul ddH₂O
1 ul DNA
2,0 ul každý z primerů

Příklad dvojice primerů pro mutant AHP4

- | | |
|-------------------------------------|-------------------|
| 1. PCR zkumavka: <i>Mutant AHP4</i> | *Sim 799; Sim-612 |
| 2. PCR zkumavka: <i>Mutant AHP4</i> | *Sim 799; 8130 |
| 3. PCR zkumavka: <i>WT</i> | *Sim 799; Sim-612 |
| 4. PCR zkumavka: <i>WT</i> | *Sim 799; 8130 |

Příklad dvojice primerů pro mutant ARR21

- | | |
|--------------------------------------|---------------|
| 1. PCR zkumavka: <i>Mutant ARR21</i> | *16new; 16kon |
| 2. PCR zkumavka: <i>Mutant ARR21</i> | *16new; 1830 |
| 3. PCR zkumavka: <i>WT</i> | *16new; 16kon |
| 4. PCR zkumavka: <i>WT</i> | *16new; 8130 |

Příklad dvojice primerů pro mutant ARR4

- | | |
|-------------------------------------|---------------|
| 1. PCR zkumavka: <i>Mutant ARR4</i> | *ARR4N ARR4S2 |
| 2. PCR zkumavka: <i>Mutant ARR4</i> | *ARR4N d11 |
| 3. PCR zkumavka: <i>WT</i> | *ARR4N ARR4S2 |
| 4. PCR zkumavka: <i>WT</i> | *ARR4N d11 |

Obsah protřepeme na Vortexu a stočíme na centrifuze.

PCR cykler nastavíme takto:

HOLD	CYCLE		HOLD	HOLD
2 min	20 sec	30 sec	60 sec	8 min
94 C	94 C	57 C	70 C	72 C
				hold
				4 C

Příprava vzorků pro genetický analyzátor

1. Do vialky určené pro analyzátor pipetujeme pro každého testovaného jedince:

0,5 ul PCR produktu u *Arabidopsis*
1.0 ul délkového standardu TAMRA 500
12 ul formamidu

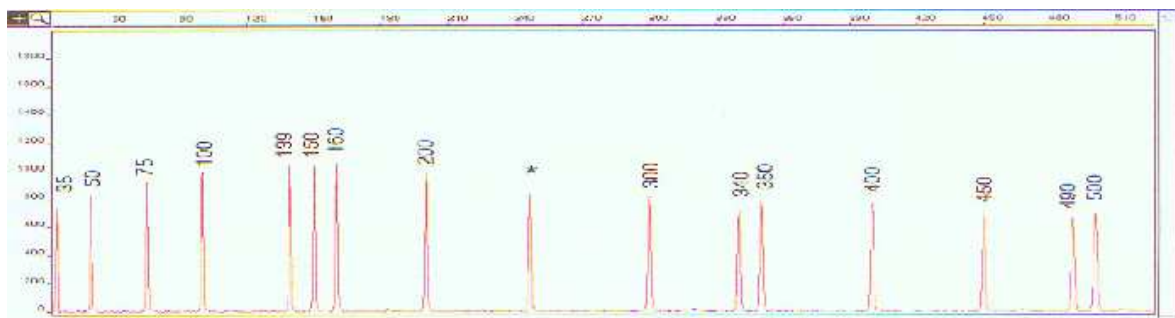
2. Protřepeme na Vortexu.
3. Denaturujeme 3 min při 95 C.
4. Rychle zchladíme na ledu.

Fragmentační analýza na ABI PRISM 310

Analýzu provádíme na křemíkové kapiláře dlouhé 41 cm (efektivní délka 30 cm) za použití polymeru POP4 na bázi polyakrylamidu. Vzorky umístíme do automatického dávkovače a vyplníme seznam vzorků, pořadí nástřiků a parametry analýzy podle pokynů vyučujícího. Píky jednotlivých fragmentů kvantifikujeme vzhledem k předem vyhodnocenému délkovému standardu.

Interpretace dat fragmentační analýzy *Arabidopsis*

Porovnáme velikosti jednotlivých fragmentů ze tří jedinců. Na jejich základě určíme, kdy se jedná o heterozygotní či homozygotní rostlinu nebo divoký typ.



Metoda 4B

Posthybridizační stringentní promývání

1. Předehřát primární promývací pufr na 60°C. Použitý objem: 2-5 ml/ cm² membrány.
2. Opatrně přenést membránu do válce s tímto roztokem a promývat 4 x 5 min při 60°C.
3. Promývat 2 x 5 min druhým promývacím roztokem při laboratorní teplotě.
4. Membránu vložit do misky s druhým promývacím roztokem a nechat stát 10-15 min.

Chemifluorescenční detekce signálu za použití ECF substrátu

1. Membránu umístit na čistý neabsorpční povrch a napipetovat rovnoměrně po celém jejím povrchu ECF substrát (25 µl/ cm² membrány); inkubovat 1 min.
2. Přiložit vrchní část detekční folie, odsát přebytek substrátu a zatavit.
3. Inkubovat ve tmě při laboratorní teplotě. První detekci provést přibližně po 2 hodinách.

Detekce chemifluorescenčního signálu

1. 0,5 h před detekcí zapnout STORM.
2. Na detekční plotnu přistoje kápnout trochu EtOH. Na toto místo přiložit folii s membránou (lépe přilne k povrchu a eliminují se bubliny).
3. Skenovat pro chemifluorescenci při rozlišení 100 mikronů.

DEN 4

VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ FRAGMENTAČNÍ ANALÝZY.

Šablona k protokolům: Fragmentační analýza

Jméno:

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky (s přiloženými spektry):

Závěr:

Určit, zda jde o homozygota či heterozygota a proč (zdůvodnit).

