

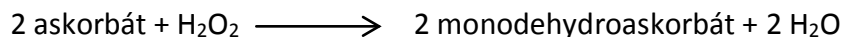
Jméno a UČO:	Datum:
--------------	--------

# ÚLOHA A.

## Detekce aktivity askorbát peroxidasy v polyakrylamidovém gelu

### TEORETICKÝ ÚVOD

Askorbát peroxidasa (APX) je enzym zodpovědný za detoxifikaci peroxidu vodíku u rostlin. U rostlin se vyskytují tři izoenzymové formy lišící se lokalizací v buňce. Všechny askorbát peroxidasy katalyzují reakci:



Role askorbát peroxidasy při obranné reakci byla podpořena pozorováními, že její aktivita narůstá při aplikaci různých environmentálních stresů. V některých případech však můžeme po infekci rostliny patogenem pozorovat drastický pokles její aktivity, který poté potencuje nekrózu buněk způsobenou převážně oxidačním stresem.

Využití nativní polyakrylamidové elektroforézy pro stanovování aktivit celé řady enzymů má převážně největší význam při studiu aktivace jednotlivých izoenzymových forem. Toto stanovení aktivity APX je založeno na schopnosti askorbátu redukovat nitro-blue tetrazolium (NBT) v přítomnosti N,N,N',N'-tetraethylendiaminu (TEMED) na nerozpustný barevný formazan. V přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je APX schopna zabránit tvorbě formazanu díky velmi rychlé oxidaci askorbátu. Proto je aktivita APX pozorována na gelu jako achromatický proužek.

### POSTUP PRÁCE

Jednotlivé skupiny si rozdělí izolaci z listů po aplikaci cryptogeinu a kontrolních listů po aplikaci vody sesbíraných v časových intervalech 0h, 12h a 24h po aplikaci.

#### **Izolace askorbát peroxidasy**

1. 0,3 g tkáně vložte do třecí misky, zmrazte v tekutém dusíku a rozetřete v 0,6 ml izolačního pufru (100 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 5 mM askorbát, 1 mM EDTA).
2. Homogenát přeneste do 1.5 ml zkumavky a centrifugujte při 12 000 x g 5 min při 4°C.
3. Supernatant přeneste do nové 1.5 ml zkumavky a opět centrifugujte při 20 000 x g 40 min při 4°C.
4. Odsajte supernatant a uchovávejte ho na ledu.

### **Příprava polyakrylamidového gelu**

1. Gel propláchněte vodou, vložte do elektroforetické vaničky a přilijte elektroforetický pufr obsahující 2 mM askorbát.
2. Spusťte elektroforézu na 30 minut při konstantním proudu 15 mA/gel. Elektroforézu provádějte při 4°C.

### **Příprava a nanesení vzorků**

1. Smíchejte 60  $\mu$ l enzymového izolátu s 12  $\mu$ l nanášecího pufru.
2. Na gel nanášejte 15  $\mu$ l jednotlivých izolátů v následujícím pořadí:

Gel č.1: (15  $\mu$ l izolátu): voda 0h, voda 12h, voda 24 h, mezera, cry 0 h, cry 12 h, cry 24h

3. Elektroforézu provádějte při konstantním proudu 15 mA/gel po dobu 2 hodin při 4 °C.

### **Detekce aktivity askorbát peroxidasy v gelu**

Všechny následující kroky budou prováděny při pokojové teplotě.

1. Ekvilibrujte gel 5 minut v 20 ml ekvilibračního pufru I (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 2mM askorbát).
2. Poté inkubujte gely 10 minut v 20 ml ekvilibračního pufru II, do kterého přidejte 6  $\mu$ l peroxidu vodíku.
3. Poté gel promyjte 1 minutu v 20 ml promývacího pufru (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0)) a ponořte ho do detekčního pufru(50 mM fosfátový pufr (pH=7.8), 28 mM TEMED, 2.45 mM NBT). Aktivita askorbát peroxidasy bude detekována jako achromatický proužek na tmavém pozadí.

### **VYHODNOCENÍ**

- Srovnajte změny aktivity askorbát peroxidasy po aplikaci cryptogeinu ve srovnání s kontrolou (voda) v závislosti na čase.
- Výsledek zdůvodněte.

Jméno a uço:

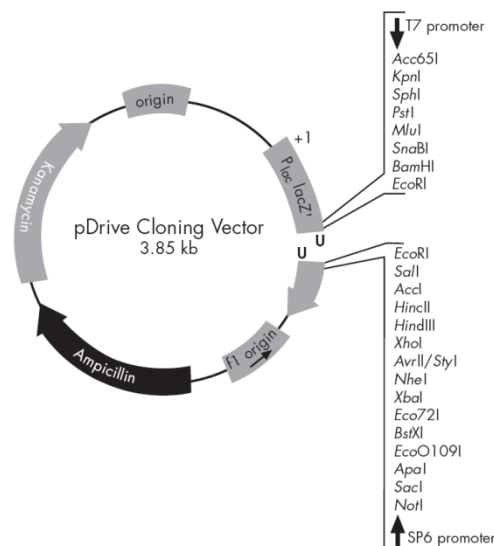
Datum:

## ÚLOHA C.

### Klonování PCR produktu do plasmidu

#### TEORETICKÝ ÚVOD

Při klonování PCR produktů do plasmidů se využívá vlastnosti Taq polymerasy, a jiných non-proofreading polymeras, přidávat na konec nově syntetizovaného řetězce jednu bázi – adenin - navíc. Klonovací vektor je poté v lineární formě, kdy na každém konci nese jednu bázi – thymin nebo uracil - navíc. Za optimálních podmínek poté dochází k hybridizaci a ligaci PCR fragmentu do vektoru (Obrázek 1). PCR fragment hybridizuje do tzv. MCS (multicloning site) místa, které poté umožňuje použití širokého spektra restriktáz pro jeho případné vyštěpení z vektoru a re-klonování do jiného vektoru. MCS místo se nachází uvnitř genu lacZ kódujícího galaktosidasu, takže úspěšné včlenění PCR produktu do vektoru má za následek ztrátu aktivity, která tak může být využita pro selekci úspěšných transformátů pomocí barevného substrátu X-gal. Vektor rovněž nese rezistenci na jedno nebo dvě antibiotika (obvykle na ampicilin) a obsahuje T7 a SP6 promotor pro případnou produkci vklonovaného PCR produktu.



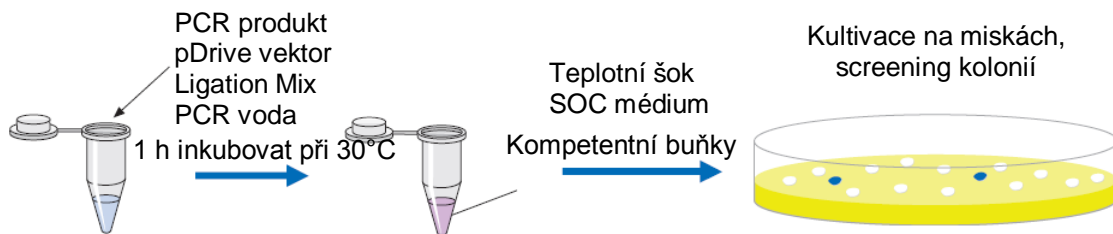
Obr. 1: Schéma klonovacího vektoru pDRIVE (Qiagen)

Před vlastním klonováním je vždy nutné PCR produkt přečistit na agarózovém gelu, abychom se vyhnuli klonování případných vedlejších produktů PCR reakce (dimery primerů, nespecifické produkty). Množství PCR produktu (ng) při ligaci se poté spočítá na základě vzorce:

(množství vektoru (ng) x délka PCR produktu (bp) x molární poměr) / délka vektoru (bp)

Ligační reakce většinou poté probíhá při pokojové teplotě nebo 4°C po dobu 1-2 hodin. Poté dochází ke vložení ligovaného vektoru do kompetentních buněk. V našem případě budou použity termo-kompetentní buňky.

Kompetentní buňky jsou skladovány při -70°C a využívá se jejich schopnosti po rozmrazení a vystavení krátkému teplotnímu šoku přijmout DNA. Po teplotním šoku je k buňkám obvykle přidáno SOC médium a jsou 2 hodiny inkubovány při 37°C. Poté jsou vyočkovány na misku s antibiotikem (ampicilinem) a následující den je pozorován počet úspěšných transformantů. Protože může docházet i k ligaci vektoru bez vloženého PCR produktu, je do média na kultivačních miskách přidán barevný substrát X-gal s induktorem IPTG, kdy v případě ligace samotného vektoru dochází k růstu modrých kolonií (enzym galaktosidasa je aktivní) a v případě úspěšné ligace PCR produktu do vektoru k růstu bílých kolonií (enzym galaktosidasa je inaktivován vloženým PCR produktem).



Ob. 2: Schéma transformace buněk JM109

## POSTUP PRÁCE

### Amplifikace vybraného obraného genu (PR1a nebo PR5a nebo PAL nebo EF1a)

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

FW Primer (5 uM)	1,5 µl
Rev Primer (5 uM)	1,5 µl
GoTaq qPCR M. Mix 2x konc	10 µl
PCR voda	5 µl
Templát	2 µl

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2:30 min	
95°C	30 s	} 40x
60°C	30 s	
72°C	20 s	
72°C	7:00 min	

### Analýza PCR produktu a jeho přečištění

Přečištění bude prováděno pomocí Wizard Gel Extraction Kit (Promega)

1. Připravte 1,5% agarózový gel.
2. Na gel naneste 20 µl PCR produktu smíchaného s 3 µl Nanášecího pufru a do jedné jamky a 2.5 µl délkového markeru (GeneRuller 50 bp) do druhé jamky.
3. Spusťte elektroforézu: 200 V, 20 minut.
4. Po skončení elektroforézy vynulujte váhu na 1,5 ml zkumavku.
5. Dejte gel na transiluminátor a vyřežte ze dvou drah proužek o velikosti 250 bp.
6. Oba proužky přeneste do 1,5 ml zkumavky a zvažte.
7. Do zkumavky přidejte Binding buffer v poměru 10 µl roztoku na 10 mg gelu.
8. Inkubujte směs 10 minut při 55°C, kdy průběžně zkumavku vortexujte, abyste urychlili rozpuštění gelu.
9. Poté přeneste celou směs na kolonku (pokud je směsi více jak 800 µl tak nadvakrát).
10. Stočte kolonku 1 min při 14000 x g.
11. Vylijte proteklý roztok a přidejte na kolonku 700 µl roztoku Wash Buffer.
12. Centrifugujte 1 min při 14000 x g.
13. Vylijte proteklý roztok a přidejte na kolonku 500 µl roztoku Wash Buffer.
14. Centrifugujte 1 min při 14000 x g.
15. Vyhodte zkumavku, kolonku přeneste do nové 2.0 ml zkumavky a centrifugujte 5 min při 14000 x g.

16. Vyhodíte zkumavku, kolonku přeneste do nové 1,5 ml zkumavky a na její střed napipetujte 30 µl PCR vody.
17. Centrifugujte 1 min při 14000 x g, PCR produkt je přečištěn, změřte jeho koncentraci na NanoFotometru.

### Klonování PCR produktu do plasmidu pGEM-TEasy a jeho následná transformace do buněk E. coli JM109

1. Rozmrazte 2x Ligation Master Mix, pGEM-TEasy klonovací vektor a PCR vodu.
2. Připravte ligační směs:

pGEM-TEasy klonovací vektor	1 µl
PCR produkt	1-4 µl (vypočtete na základě vzorce)
Ligation buffer, 2x	5 µl
ImProm II Ligasa	1 µl
PCR voda	do 10 µl

3. Jemně ligační směs promíchejte, krátce stočte a inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě.
4. Rozmrazte potřebný počet alikvotů kompetentních buněk JM109 na ledě a předehejte SOC medium na pokojovou teplotu.
5. Do zkumavky s kompetentními buňkami přidejte 2 µl ligační směsi, opatrně promíchejte a inkubujte 20 minut na ledě.
6. Poté umístěte zkumavku do termostatu na 42°C přesně na 40s a poté ji vraťte na 2 minuty do ledu.
7. Přidejte 950 µl SOC media a inkubujte za třepání (250 rpm) 2 hodiny.
8. Od tohoto bodu provádějte všechny činnosti v laminárním boxu a sterilně.
9. Poté si připravte nalité LB misky s ampicilinem (100 µg/ml) a X-gal/IPTG
10. Napipetujte na připravené misky 100 µl SOC media s kompetentními buňkami a důkladně medium rozetřete bakteriologickou hokejkou.
13. Nechte z misek odpařit zbytek rozetřeného média, misky zavřete a umístěte dnem vzhůru do termostatu na 37°C.
14. Následující den popište výsledek.

### Zaočkování kolonie pro izolaci plasmidu

Ze selekční misky vyberte jednu kolonii nesoucí plasmid s inzertem a pomocí malé špičky ji přeneste do 2 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a inkubujte na třepačce při 37°C 12-16 hodin.

### Izolace plasmidu z kultury E. coli

1. Přeneste 600 µl bakteriální kultury do 1.5 ml zkumavky.
2. Přidejte 100 µl Cell Lysis pufru a převrácením šestkrát směs ve zkumavce promíchejte (vzorek by měl celý zmodrat).

3. Ihned přidejte 350  $\mu$ l vychlazeného Neutralizačního roztoku a převrácením směs ve zkumavce pořádně promíchejte (vzorek by měl celý zežloutnout).
4. Centrifugujte 3 min při 14 000 x g.
5. Supernatant opatrně přeneste na kolonku umístěnou ve zkumavce.
6. Centrifugujte 15 s při 14 000 x g.
7. Odstraňte proteklý roztok a na kolonku napipetujte 200  $\mu$ l Endotoxin Removal Wash pufru.
8. Centrifugujte 15 s při 14 000 x g.
9. Odstraňte proteklý roztok a na kolonku napipetujte 400  $\mu$ l Wash pufru.
10. Centrifugujte 15 s při 14 000 x g.
11. Přeneste kolonku do nové zkumavky, přidejte 30  $\mu$ l Elučního pufru a nechte 1 min inkubovat na stole.
12. Centrifugujte 15 s při 14 000 x g.
13. Plasmidová DNA je připravena k použití, změřte její koncentraci a čistotu na NanoFotometru.

#### Příprava roztoku plasmidu o definované koncentraci

1. Na základě znalosti velikosti plasmidu s PCR produktem (přibližně 3200 bp) a střední molekulové hmotnosti 1 páru bazí DNA (650 g/mol) vypočítejte koncentraci plasmidové DNA při následujícím počtu kopií:

100 kopií/ $\mu$ l	.....
1 000 kopií/ $\mu$ l	.....
10 000 kopií/ $\mu$ l	.....
100 000 kopií/ $\mu$ l	.....
1000 000kopií/ $\mu$ l	.....

2. Na základě vypočtených hodnot zředte plasmidovou DNA PCR vodou na požadovanou koncentraci v celkovém objemu 100  $\mu$ l.

### **VYHODNOCENÍ**

- Uvedte celkový počet kolonií po transformaci.
- Uvedte kvantitu a čistotu vyizolované plasmidové DNA.
- Uvedte vypočítané hodnoty koncentrací plasmidové DNA pro jednotlivý počet kopií/ $\mu$ l.

Jméno a UČO:

Datum:

## Úloha D.

### Stanovení změny exprese genů pro pathogenesis related (PR) proteiny u rostlin tabáku

#### TEORETICKÝ ÚVOD

Na počátku byly PR (pathogenesis related) proteiny identifikovány jako proteiny, které se nevyskytují ve zdravých rostlinách a po infekci patogenem dochází k jejich masivní akumulaci. Do dnešní doby je známa celá řada PR proteinů, které byly rozděleny do 17 tříd, jak je uvedeno v tabulce níže. Každá třída může být dále dělena na kyselé a bazické homology. Syntéza kyselých forem PR proteinů je obvykle spojena s infekcí patogenem a u rostlin jejich syntéza vyvolává tzv. systémově navozenou rezistenci (SAR – systemic acquired resistance). Na druhé straně syntéza bazických forem PR proteinů je spojena s poškozením nebo napadením rostliny herbivorním hmyzem. Jejich syntéza je poté spojena s tzv. rezistencí proti herbivornímu hmyzu (IRH - induced resistance against herbivores).

Třída	Typický zástupce	Funkce
PR-1	PR-1 (tabák)	neznámá
PR-2	PR-2 (tabák)	$\beta$ -1,3-glukanasa
PR-3	P, Q (tabák)	chitinasa
PR-4	`R' (tabák)	chitinasa
PR-5	S (tabák)	podobný thaumatinu
PR-6	Inhibitor I (rajče)	proteinasový-inhibitor
PR-7	P <sub>69</sub> (rajče)	endoproteinasa
PR-8	Chitinasa (okurka)	chitinasa
PR-9	`lignin-forming peroxidase' (tabák)	peroxidasa
PR-10	`PR1' (petržel)	podobný ribonuklease
PR-11	chitinasa třídy V (tabák)	chitinasa
PR-12	Rs-AFP3 (ředkvička)	defensin
PR-13	THI2.1 ( <i>Arabidopsis</i> )	thionin
PR-14	LTP4 (ječmen)	lipid-transfer protein
PR-15	OxOa (ječmen)	oxalát oxidasa
PR-16	OxOLP (ječmen)	podobný oxalát oxidase
PR-17	PRp27 (tabák)	neznámá



## RT-qPCR:

V praxi se často setkáváme s potřebou provést kvantifikaci transkriptu vybraného genu. V současné době se ke kvantifikaci transkriptů vybraných genů využívá především metoda reverzní transkripce ve spojení s metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR).

### Reverzní transkripce

V prvním kroku je nejprve provedena reverzní transkripce izolované celkové RNA. Reverzní transkripce (RT) je enzymatický proces, při kterém je podle templátové RNA syntetizována cDNA. RT je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou (RNA-dependentní DNA polymeráza). Pro průběh reakce je tedy nezbytná přítomnost RNA, reverzní transkriptázy, směsi deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP), reakčního pufru a primerů. Zpravidla se pro tyto účely využívají tři typy primerů:

- oligo dT primery – používají se v případě mRNA obsahující polyA 3'-konec, v případě dlouhých transkriptů nemusí dojít k úplnému přepisu
- směs náhodných hexaoligonukleotidů – nasedají náhodně na templátovou RNA, jsou vhodné zejména pro přepis celkové RNA a delších transkriptů
- sekvenčně specifické primery

### qPCR

V následujícím kroku je poté přepsaná cDNA specificky namnožena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Principem qPCR je kvantifikace množeného produktu v každém jednotlivém cyklu PCR. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Obvykle se používají interkalační barviva nebo specifické sondy.

### Vyhodnocení

Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je úměrná množství nově vzniklé DNA. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikační křivky a hodnoty Ct (Cycle threshold), při které došlo k překročení nastavené hladiny fluorescence. Pro vyhodnocení real-time PCR se může použít buď relativní, nebo absolutní kvantifikace. Absolutní kvantifikace umožňuje přímo určit výchozí počet kopií cílových molekul. Pro stanovení je třeba sestavit kalibrační křivku pro sérii standardů a z této křivky se pak odečítá koncentrace neznámého vzorku. Relativní kvantifikace popisuje relativní změnu exprese genu vůči vnitřnímu standardu. Jako vnitřní standard se využívá tzv. house-keeping gen, jehož hladina exprese je za podmínek experimentu konstantní. Pro výpočet exprese cílového genu ve vztahu k odpovídajícímu house-keeping genu je možno použít několik metod. Metody používané pro výpočet relativní kvantifikace jsou buď již zmíněná metoda kalibračních křivek, nebo častěji používaná srovnávací Ct metoda. Základním předpokladem při srovnávací  $\Delta\Delta Ct$  metodě je, že amplifikace cílového i house-keeping genu probíhá se stejnou účinností. K výpočtu celkového množství cílového genu se poté používá vztah:

$$R=2^{-\Delta\Delta Ct}$$

kde:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  testovaného vzorku -  $\Delta Ct$  kontrolního vzorku

$\Delta Ct$  testovacího vzorku = Ct cílového genu - Ct house-keeping genu

## Literatura

1. Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L.: Biochemistry & molecular biology
2. Edreva A. (2005): Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. Gen. Appl. Plant Physiology 31(1-2), 105-124.
3. Mikeš V., Milat M-L., Ponchet M., Ricci P., Blein J-P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. FEBS Letters 416, 190-192.
4. van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J.(2006): Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44, 135-162

## POSTUP PRÁCE

### **Izolace celkové RNA z listu tabáku**

Jednotlivé skupiny si rozdělí izolaci celkové RNA z listů po aplikaci cryptogeinu a kontrolních listů po aplikaci vody, sesbíraných v různých časových intervalech po aplikaci.

1. Odeberte 100 mg tkáně a vložte ji do 2.0 ml zkumavky společně s drtícím olůvkem.
2. Vložte zkumavky do drtící vložky, zašroubujte vložku víčkem a vhoďte ji do kapalného dusíku. Po vymražení zasuňte vložku do pouzdra a asi minutu třepejte.
3. Poté vyjměte zkumavku z vložky, otevřete ji, pomocí pinzety vejměte olůvko a přidejte 1 ml Tri Reagentu. Inkubujte zkumavku přibližně 5 minut při pokojové teplotě.
4. Přidejte 200 µl chloroformu, vortexujte 15 s a nechte stát 15 minut při pokojové teplotě.
5. Centrifugujte 15 minut při 12 000 x g.
6. Horní fázi přeneste do čisté zkumavky, přidejte 1/10 izopropanolu, promíchejte a nechte stát 7 minut při pokojové teplotě.
7. Centrifugujte 10 minut při 12 000 x g.
8. Supernatant přeneste do nové zkumavky a přidejte takové množství izopropanolu, aby celkový přidaný objem isopropanolu byl 500 ul.
9. Promíchejte zkumavky a nechte stát 7 minut při pokojové teplotě.
10. Centrifugujte 10 minut při 12 000 x g.
11. RNA pelet promyjte 1 ml 75% ethanolu a centrifugujte 10 minut při 12 000 x g.
12. Odstraňte ethanol a nechte RNA pelet vyschnout.
13. Rozpusťte RNA v 10 µl formamidu.

### **Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované RNA pomocí Nano-fotometru**

Do dvou zkumavek napipetujte 9 µl DEPC vody. Do jedné přidejte 1 µl formamidu (BLANK) a do druhé 1 µl vyizolované RNA. Promíchejte zkumavky na vortexu a krátce stočte.

1. Na fotometru nastavte měření koncentrace RNA a ředící koeficient 10x.
2. Na čočku měřící květy napipetujte 3 µl DEPC vody s formamidem a zakryjte vrškem s faktorem 10
3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku (modré).
4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3 µl ředěného vzorku RNA.

5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (zelené)
6. Vytisknete koncentraci a hodnoty čistoty  $A_{260/280}$ ,  $A_{230/260}$  a naměřené spektrum.

### **Reverzní transkripce izolované RNA**

1. Naředte vyizolovanou RNA na koncentraci 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a umístěte ji na led. Připravte reakční směs:

5 x RT ImPromII buffer	2.0 $\mu\text{l}$
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.2 $\mu\text{l}$
dNTPs	1.0 $\mu\text{l}$
Random Hexamers	0.5 $\mu\text{l}$
Voda	2.6 $\mu\text{l}$
Reverse transcriptase	0.5 $\mu\text{l}$
RNasin	0.1 $\mu\text{l}$

2. Přidejte do reakční směsi 1  $\mu\text{l}$  naředěné RNA o koncentraci 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Směs jemně promíchejte a krátce stočte. Vložte zkumavku do termocycleru a nastavte následující program:

25°C	10 min
42°C	45 min
72°C	15 min
4°C	hold

### **Amplifikace genu pro PR1a, PR5, PAL a EF1 $\alpha$ pomocí RealTime PCR**

1. Připravíme si reakční směs vztaženou na 1 vzorek dle následující tabulky, kdy k amplifikaci využijeme primery pro geny PR1a nebo PR3 nebo PR5a nebo PAL a EF1a:

2x Go Taq qPCR M. Mix	7.5 $\mu\text{l}$
F primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{l}$
R primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{l}$
Voda	5.0 $\mu\text{l}$

2. Reakční směs promícháme, krátce stočíme a přidáme 1.5  $\mu\text{l}$  cDNA vzniklé po reverzní transkripci nebo kvantifikačních standardů. Vložte zkumavku do termocycleru a nastavte následující program:

95°C	2:30	} 45 x
95°C	0:20	
60°C	0:40	
95°C	0:15	
60°C	0:30	
95°C	0:15	

## **VYHODNOCENÍ**

- Uveďte koncentraci a na základě naměřených dat zhodnoťte čistotu izolované RNA
- Na základě výsledku RealTime PCR vypočítejte metodami absolutní nebo relativní kvantifikace za použití delta Ct metody, zdali dochází po přidání cryptogeinu ve sledovaných časových intervalech (8 a 24h) ke zvýšení transkriptů vybraných PR proteinů a o jak velké zvýšení se jedná.
- Dále na základě vypočtených výsledků porovnejte metodiky relativní a absolutní kvantifikace.

<b>Jméno a UČO:</b>	<b>Datum:</b>
---------------------	---------------

## Úloha E

# Identifikace jednotlivých druhů Václavek ze vzorku půdy

### TEORETICKÝ ÚVOD

V současné době je na světě rozlišováno přes 40 druhů václavek (rod *Armillaria*), které se vyskytují na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Poprvé byl rod václavka identifikován v 18. století, ale až v roce 1973 objevení bifaktoriálního sexuálního inkompatibilního systému umožnilo spolehlivě identifikovat jednotlivé druhy václavek. V Evropě bylo do současnosti identifikováno sedm druhů václavek, *Armillaria borealis*, *cepistipes*, *ectypa*, *gallica*, *mellea*, *ostoyae* a *tabescens* [2]. Václavky se vyskytují téměř na všech druzích porostů, mezi něž patří především listnaté a jehličnaté lesy, ovocné sady a parky. Výskyt jednotlivých druhů je omezen jednak klimatickými a geografickými podmínkami a na druhé straně výskytem vhodných hostitelů [2]. Václavky se v lese podílejí na rozkladu odumřelé dřevní hmoty, čímž v mnohém připomínají chování mykorhizních hub. V mnoha případech však přechází k nekrotrofnímu parazitizmu, resp. saproparazitizmu, na celé škále dřevin, především pak na smrku, borovici a dubu. Byly však pozorovány i na nahosemenných a krytosemenných rostlinách, na celé řadě bylin, na obilninách nebo na okrasných rostlinách. Každoročně pak způsobují obrovské škody na lesních porostech [1,2]. Některé druhy mohou být obligátními saprotrofy, avšak všechny druhy jsou schopné napadat stresem oslabené hostitele. Některé druhy dále produkují antibiotické látky, které jim pomáhají udržet kontrolu nad infikovaným hostitelem [2]. Jednotlivé druhy václavek se liší jednak svou patogenitou a také spektrem napadaných hostitelů. Proto je z hlediska lesního hospodářství velmi důležité odlišovat od sebe jednotlivé druhy.

V současné době jsou k identifikaci jednotlivých druhů václavek nejvíce používané párové testy objevené Hinkitou v roce 1973, avšak v poslední době se k identifikaci začínají používat molekulárně–biologické metody, mezi něž především analýza restričních fragmentů ribozomální DNA.

### Restriční analýza.

Restriční endonukleasy jsou enzymy, které rozpoznávají ve dvoušroubovicové DNA specifickou sekvenci složenou obvykle ze 4 až 6 párů bazí a v tomto místě DNA specificky štěpí. Většina rozpoznávaných sekvencí restričními enzymy má dokonalou dvojčetnou rotační symetrii. Tyto sekvence jsou známy jako tzv. palindromy. Celá řada restričních

enzymů (např. *Hinf* I, *Mbo* I) katalyzuje štěpení dvou vláken DNA v polohách symetricky rozmístěných okolo středu palindromové sekvence. Vznikají tak fragmenty s kohezními či lepivými konci. U některých restrikčních enzymů (*Alu* I) naopak místo štěpení prochází přímo dvojčetnou osou palindromu. Vznikají pak fragmenty se zarovnanými či tupými konci [18].

Polymorfie délky restrikčních fragmentů (RFLP) poté poskytuje cenné informace o rozdílech mezi sekvencemi u jednotlivých druhů organismů a je v současné době jednou z nejpoužívanějších metod v taxonomii a fylogenezi.

### Identifikace na základě ribozomální RNA

Geny kódující ribozomální RNA jsou z hlediska taxonomického a fylogenetického velmi často používané. ITS oblast rDNA je velmi polymorfní, čímž se stává pro taxonomické a fylogenetické studie velmi výhodnou. Tato oblast leží mezi malou jadernou rDNA a velkou jadernou rDNA a je 5.8S rDNA rozdělena na oblasti ITS 1 a ITS 2 [3]. Pro amplifikaci této oblasti u hub byly navrženy primery ITS 1 a ITS 4 (obrázek 1).



Obrázek 1: Umístění ITS oblasti a primerů ITS 1, ITS 4, ARM1 a ARM2 na rDNA [3]

### Detekce václavek na základě RFLP analýzy ITS oblasti

Pro specifickou detekci václavek poté byly navrženy primery ARM1 a ARM2 ležící na okrajích oblastí ITS1 a ITS2 (obrázek 1). Tyto primery se používají pro specifickou amplifikaci všech sedmi evropských druhů václavek. Pro dosažení velmi vysoké citlivosti metody pro identifikaci václavek se vzorků půdy se využívá tzv. nested PCR, při které dochází k amplifikaci požadované oblasti pomocí dvou párů primerů. První pár, tzv. externí, se většinou vyznačuje nižší specifitou a slouží k před-množení požadované oblasti. Druhý pár, tzv. interní, je poté vysoce specifický a používá se k namnožení požadované oblasti z již před-množeného vzorku. Při identifikaci václavek ze vzorků půdy lze využít jako externí pár primerů primery ITS1 a ITS4 a jako interní pár primerů ARM1 a ARM2.

Pro určení konkrétního druhu václavky se poté využívá RFLP analýza oblasti namnožené pomocí primerů ARM1 a ARM2 využívající restrikční endonukleázy *Hinf*I a *Alu*I. Délky restrikčních fragmentů pro jednotlivé druhy václavek jsou uvedeny v tabulce níže.

Izolát	Délka amplikonu (bp) ITS/AR	Restrikční fragmenty <i>Hinf</i> I (bp)	Restrikční fragmenty <i>Alu</i> I (bp)
<i>A. borealis</i> A1 <sup>a</sup>	868/711	293, 172, 56, 31, 75, 68	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. cepistipes</i> 204 <sup>b</sup>	868/711	293, 227, 43, 132	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. gallica</i> 147 <sup>b</sup>	868/711	294, 227, 43, 63, 69	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. mellea</i> 185 <sup>b</sup>	882/724	148, 159, 401	40, 47, 97, 149, 214, 325
<i>A. ostoyae</i> C2 <sup>a</sup>	870/713	294, 228, 31, 75, 69	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. tabescens</i> T4 <sup>a</sup>	847/690	295, 125, 93, 32, 129	35, 70, 96, 138, 181, 327

### **Literatura**

1. Jankovský L. 1997. Biologie Václavěk, Dizertační práce MZLU, Brno.
2. Shaw C.G., Kile, G.A. 1991. Armillaria Root Disease, Agriculture Handbook 691, Department of Agriculture. Washington D.C., United States
3. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications: 315-322, Academic Press, Inc.

## **POSTUP PRÁCE**

### **Izolace DNA z půdy pomocí izolačního kitu PowerSoil DNA**

1. Do třecí misky navažte přibližně 250 mg vzorku půdy a rozetřete s trochou mořského písku a směs přeneste do připravených rozbíjecích zkumavek. Promíchejte opatrným vortexováním.
2. Přidejte 60  $\mu$ l roztoku C1 a několikrát promíchejte obracením zkumavky nebo vortexujte.
3. Umístěte rozbíjecí zkumavky vodorovně a vortexujte maximální rychlostí 10 minut.
4. Centrifugujte 30 sekund při 10 000 x g.
5. Přeneste supernatant do čisté 2 ml mikrozkušavky.  
**Poznámka:** Očekávejte 400 až 500  $\mu$ l směsi. Směs může stále obsahovat určité množství půdních částic.
6. Přidejte 250  $\mu$ l roztoku C2 a vortexujte 5 sekund. Inkubujte 5 minut při 4°C.
7. Centrifugujte 1 minutu při pokojové teplotě a při 10 000 x g.
8. Přeneste do čisté 2 ml mikrozkušavky (přiložena) maximálně 600  $\mu$ l supernatantu.
9. Přidejte 200  $\mu$ l roztoku C3 a krátce vortexujte. Inkubujte 5 minut při 4°C.
10. Centrifugujte 1 minutu při pokojové teplotě při 10 000 x g.
11. Přeneste do čisté 2 ml mikrozkušavky (přiložena) maximálně 750  $\mu$ l supernatantu.
12. Přidejte 1200  $\mu$ l roztoku C4 a vortexujte 5 sekund.
13. Přeneste přibližně 675  $\mu$ l do kolonky a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě. Vylijte přefiltrovanou kapalinu a přidejte dalších 675  $\mu$ l směsi do kolonky a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě. Přidejte do kolonky zbytek směsi a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě.  
**Poznámka:** Každý vzorek je nutné rozdělit na tři dávky.
14. Přidejte 500  $\mu$ l roztoku C5 a centrifugujte 30 sekund při 10 000 x g při pokojové teplotě.
15. Vylijte proteklou kapalinu.
16. Centrifugujte znovu 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě.
17. Opatrně přeneste kolonku do čisté 2 ml mikrozkušavky (přiložena). Zabraňte potřísnění kolonky roztokem C5.
18. Přidejte 80  $\mu$ l roztoku C6 doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky a centrifugujte 30 sekund při pokojové teplotě při 10 000 x g.
19. Vyjměte kolonku. DNA ve zkumavce je nyní připravena pro další použití.

### **Měření čistoty izolované DNA pomocí Nano-fotometru**

1. Na fotometru nastavte měření koncentrace dsDNA.
2. Na čočku měřicí kyvety napipetujte 3  $\mu$ l PCR vody a zakryjte vrškem s faktorem 10.
3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku (BLANK).
4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3  $\mu$ l vzorku DNA.
5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (SAMPLE).
6. Vytisknete hodnoty čistoty  $A_{260/280}$ ,  $A_{230/260}$  a naměřené spektrum.



### Příprava 1. Reakční směsi nested-PCR

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Primer ITS1 (1 uM)	1,5 µl
Primer ITS4 (1 uM)	1,5 µl
Kapa 2G Mix 2x konc	15 µl
<u>PCR voda</u>	<u>10 µl</u>
DNA	2 µl

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2,5min	
95°C	30s	} 35x
55°C	30s	
72°C	20s	

### Příprava 2. Reakční směsi nested-PCR

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Primer ARM1 (5 uM)	1,5 µl
Primer ARM2 (5 uM)	1,5 µl
Kapa 2G Mix 2x konc	10 µl
<u>PCR voda</u>	<u>5 µl</u>
1 PCR reakce	2 µl

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2,5min	
95°C	30s	} 40x
60°C	30s	
72°C	20s	

## Restrikční analýza PCR produktu

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

PCR reakční směs	16 $\mu$ l
10 x Reakční pufr	2 $\mu$ l
Enzym Hinf I (AluI)	2 $\mu$ l

Reakční směs jemně promíchejte, krátce stočte a inkubujte 15 min při 37°C.

## Analýza Restrikčních fragmentů pomocí **agarózové elektroforézy**

Připravte 2% agarosový gel – navažte 2 g agarózy, přidejte 100 ml 1x TBE pufru a agarosu důkladně rozvařte v mikrovlnné troubě. Poté nechte zchladnout agarosu na cca. 70°C, přidejte 2  $\mu$ l Midori green DNA stain (<http://www.nippongenetics.eu/dnarna-electrophoresis/dna-stains/midori-green-dna-stain/>), promíchejte a nalijte do připravené vaničky. Vložte hřebínek a nechte asi 20 minut tuhnout.

Opatrně vytáhněte hřebínek, vložte nalitý gel do elektroforetické aparatury a zalijte TBE puftrem tak, aby byl gel cca 3mm pod úrovní hladiny (na aparatuře je značka maxima). K tomu si připravte cca 400ml 1x TBE pufru.

Na parafilm naneste po kapkách nanášecí pufr, kapku smíchejte se 4  $\mu$ l restrikčních směsí a ke zbytku PCR a naneste do jamky.

Naneste vzorky na gel v následujícím pořadí:

Délkový marker – **PCR produkt - RA HinfI – RA AluI**

Elektroforézu provádějte při 100V cca 20 minut (čas je proměnlivý).

## VYHODNOCENÍ

- Uveďte koncentraci a na základě naměřených dat zhodnoťte čistotu izolované DNA
- Na základě délky amplifikátu a výsledku restrikční analýzy určete, jaký druh václavky obsahoval váš vzorek půdy, výsledek zdůvodněte.

Jméno a učo:

Datum:

## ÚLOHA F

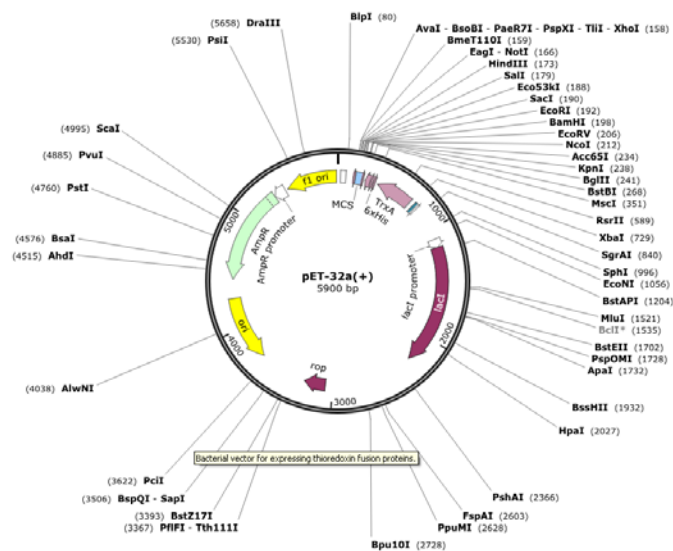
# Expres a purifikace rekombinantních proteinů

### Teoretická část

Pomocí různých expresních systémů je možné vytvořit rekombinantní protein odvozený od konkrétního genu, nebo části genu. Expresní systémy lze rozdělit do dvou hlavních tříd, prokaryotní a eukaryotní. Nejznámější a nejpoužívanější systém pro expresi proteinů je bakteriální expresní systém (*E. coli*). Výhodou tohoto systému je především jeho jednoduchost, vysoký výtěžek exprimovaného proteinu a v neposlední řadě jeho nízká časová a finanční náročnost. Na druhou stranu bakteriální systém neumožňuje posttranslační modifikace (možné ovlivnění terciární struktury proteinu) a je schopen exprese proteinů omezené velikosti (maximálně kolem 150 kDa). Typ exprese (cytosol nebo inkluzní tělíska) nelze ovlivnit a závisí zejména na struktuře proteinu.

Lineární molekula DNA obsahující gen pro daný protein (inzerť) nese na svých koncích restriční místa kompatibilní s vektorem, která jsou potřebná pro tvorbu ligačních přesahů a začlenění inzertu do vektoru. Dále také obsahuje start a stop kodon a signální sekvenci usnadňující purifikaci výsledného proteinu.

Inzerť se pomocí ligázy začleňuje do expresního vektoru. Každý expresní vektor obsahuje specifické sekvence potřebné pro integraci inzertu, selekci bakteriálního klonu a expresi proteinu (obr. 1).



Obr. 1: Vektor pET32 (<http://www.snapgene.com>)

- *T7 promotor* – sekvence, na kterou specificky nasedá T7 RNA polymeráza. Tato polymeráza pochází z bakteriofága  $\lambda$ , což zajišťuje vazebnou specifitu pouze na daném úseku expresního vektoru.
- *T7 počátek transkripce* – v tomto místě začíná T7 RNA polymeráza syntetizovat mRNA
- *His Tag sekvence* – sekvence kódující polyhistidinovou kotvu (His Tag). Pokud His Tag nepotřebujeme, je možné jej z vektoru vyštěpit.

- *Klonovací místo* – do tohoto místa lze vložit inzert. Obsahuje několik specifických sekvencí pro různé restriční endonukleázy, plní tak funkci univerzálního klonovacího místa.
- *T7 terminátor* – ukončuje transkripci inzertu
- *LacI sekvence* – kóduje lac represor, který se bez přítomnosti IPTG váže do blízkosti T7 promotoru a blokuje tak činnost T7 RNA polymerázy. V přítomnosti IPTG se lac represor váže na tyto molekuly, T7 RNA polymeráza nasedá na promotor a zahajuje transkripci.
- *pBR322 počátek replikace* – nutné pro replikaci vektoru během kultivace bakteriální kultury
- *AmpR sekvence* – kóduje rezistenci k ampicilinu (nutné pro selekci klonů se zabudovaným vektorem)

Vektor s inzertem je poté potřeba vložit do tzv. kompetentních buněk. To jsou takové buňky, které jsou schopny přijmout DNA z prostředí. *E. coli* cizorodou DNA za normálních okolností nepřijímá, proto se kompetence buněk navozuje narušením buněčné stěny a membrány chloridem vápenatým. Nejčastěji se používají kompetentní buňky BL21 DE3, což jsou geneticky upravené klony *E. coli* umožňující cíleně ovlivnit a načasovat expresi proteinu (exprese se indukuje přidavkem IPTG). Transformované buňky se kultivují v LB (Luria-Bertani) médiu za standardních podmínek (37°C; 200 - 250 rpm) za přítomnosti antibiotika a IPTG. Nejvyšší hladiny exprese buňky dosahují ve stacionární fázi (4 - 6 h). Po překročení této doby začínají v médiu docházet živiny, hromadí se odpadní látky, buňky se přestávají dělit a postupně odumírají. V této fázi také klesá exprese proteinu, který může být navíc poškozen stresovým stavem umírajících buněk.

Po expresi proteinu následuje purifikace, která zajišťuje odstranění všech nečistot a získání čistého produktu. Při purifikaci se uplatňují afinitní značky (tagy) připojené k proteinu (His Tag, c-myc, aj.), které umožňují jednoduchou jedнокrokovou adsorpční purifikaci. Tyto tagy ovšem nesmí ovlivňovat terciární strukturu proteinu ani jeho biologickou aktivitu. Zároveň se musí dít snadno a specificky odstranit od nativního proteinu. Nejběžněji používaným tagem při purifikaci proteinů je polyhistidinová kotva (His<sub>6</sub>). Jde o metalafinitní metodu, při které dochází k poměrně silné interakci mezi imobilizovanými ionty kovů (Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) a histidinovými zbytky. Po důkladném odmytí nenavázané proteinové frakce a nečistot následuje uvolnění polyhistidinové kotvy pomocí imidazolu, který má vyšší afinitu vůči částicím kovu než histidinové zbytky.

Purifikovaný produkt je na závěr potřeba charakterizovat, tzn. potvrdit identitu, zjistit čistotu a koncentraci proteinu. Identita proteinu se nejčastěji určuje imunoanalýzou na western-blotu nebo pomocí hmotnostní spektrometrie. Ke stanovení čistoty proteinů ve většině případů postačuje denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza.

#### **Literatura:**

1. Chong S., et al., Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*. 1997, roč. 192, s. 271-281.
2. Takacs, Bela J. a GIRARD, Marie-Françoise. Preparation of clinical grade proteins produced by recombinant DNA technologies. *Journal of Immunological Methods*. 1991, roč. 143, s. 231-240
3. SHIH, Yan-Ping, et al. High-throughput screening of soluble recombinant proteins. *Protein Science*. 2002, roč. 11, s. 1714-1719

## Postup práce

### Příprava, růst kultury a sklizení kultury

1. Do sterilní 250 ml Erlenmeyerovy baňky nalijte 30 ml autoindukčního média (Overnight Express™ Instant LB Medium – Novagen); 30 µl ampicilinu (100 mg/ml) a 750 µl předpěstované noční kultury.
2. Baňky dejte na třepačku a inkubujte přes noc při 37°C.
3. Připravte si dvě sterilní mikrozkušavky a do každé odeberte 700 µl narostlé kultury.
4. Centrifugujte 2 min při pokojové teplotě a při 5 000xg.
5. Odeberte supernatant, pelet použijte v dalších krocích.

### Příprava hrubého lyzátu

1. Pelet v první mikrozkušavce rozsuspendujte ve 100 µl lyzačního pufru (50 mM fosfátový pufr pH 8; 0,3 M NaCl; 0,2 mg/ml lysozym; 0,1% triton).
2. Inkubujte 10 min na ledu.
3. Přidejte 10 µl DNase pufru a 5 µl DNAsy.
4. Inkubujte 10 min při 37°C.
5. Centrifugujte 10 min při 4°C a při 20 000xg.
6. Odeberte supernatant a uchovejte pro další použití.

### Purifikace proteinu

1. Pelet ve druhé mikrozkušavce rozsuspendujte v 700 µl HEPES pufru.
2. Přidejte 70 µl FastBreak™ Reagent/DNase I pufru a 75 µl HisLink™ pryskyřice.
3. Inkubujte 30 minut na třepačce při laboratorní teplotě.
4. Přeneste lyzát s pryskyřicí na kolonku. Jestliže v mikrozkušavce zůstane zbytek pryskyřice, přidejte 100 µl HisLink™ Binding/Wash pufru a přeneste na kolonku.
5. Centrifugujte 5 s při pokojové teplotě a při maximálních otáčkách.
6. Vylijte proteklost kapalinu, umístěte kolonku zpět do mikrozkušavky a přidejte 500 µl HisLink™ Binding/Wash pufru.
7. Centrifugujte 5 s při pokojové teplotě a při maximálních otáčkách.
8. Opakujte promytí 500 µl HisLink™ Binding/Wash pufrům.
9. Centrifugujte 5 s při pokojové teplotě a při maximálních otáčkách.
10. Vyjměte kolonku, opatrně ji otřete, abyste zajistili odstranění zbytků HisLink™ Binding/Wash pufru a vložte do nové, čisté mikrozkušavky.
11. Na kolonku naneste 200 µl HisLink™ Elution pufru, kolonku zavřete, dobře promíchejte a inkubujte 3 min při pokojové teplotě.
12. Centrifugujte 1 min při pokojové teplotě a při 10 000xg.

## SDS PAGE

1. Podle uvedené tabulky připravte 12% SDS polyakrylamidový gel.

Koncentrační gel (5%)		Separační gel (12%)	
30% akrylamid	850 $\mu$ l	30% akrylamid	4 ml
1M Tris(pH6.8)	625 $\mu$ l	1,5M Tris(pH8.8)	2,5 ml
10% amonium persulfát	50 $\mu$ l	10% amonium persulfát	100 $\mu$ l
10% SDS	50 $\mu$ l	10% SDS	100 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	TEMED	4 $\mu$ l
Voda	3,4 ml	Voda	300 $\mu$ l
		glycerol	3 ml

2. Mezi připravená skla nalijte nejprve separační gel, pak ihned přilijte koncentrační gel a mezi skla zasuňte hřebínek.
3. Gel nechte tuhnout 20 minut.
4. Tuhý gel umístěte do elektroforetické vany a přilijte elektroforetický pufr (25 mMTris-Cl; 150 mM glycin; 0.1%SDS).
5. K 15  $\mu$ l hrubého lyzátu a k 15  $\mu$ l purifikovaného proteinu přidejte 4  $\mu$ l nanášecího pufru a naneste vzorky na gel v následujícím pořadí:  
délkový marker – hrubý lyzát – purifikovaný protein
6. Spusťte elektroforézu, podmínky separace: konstantní proud 30 mA/gel, 40 minut.
7. Po elektroforéze první gel propláchněte 15 minut v MiliQ vodě a následně ponořte do 50 ml barvy koloidní coomasieBioSafe, s druhým gelem proveďte blotting.
8. Gel ponořený do koloidní coomasie po dvou hodinách vyjměte a propláchněte vodou a naskenujte.

## Vyhodnocení

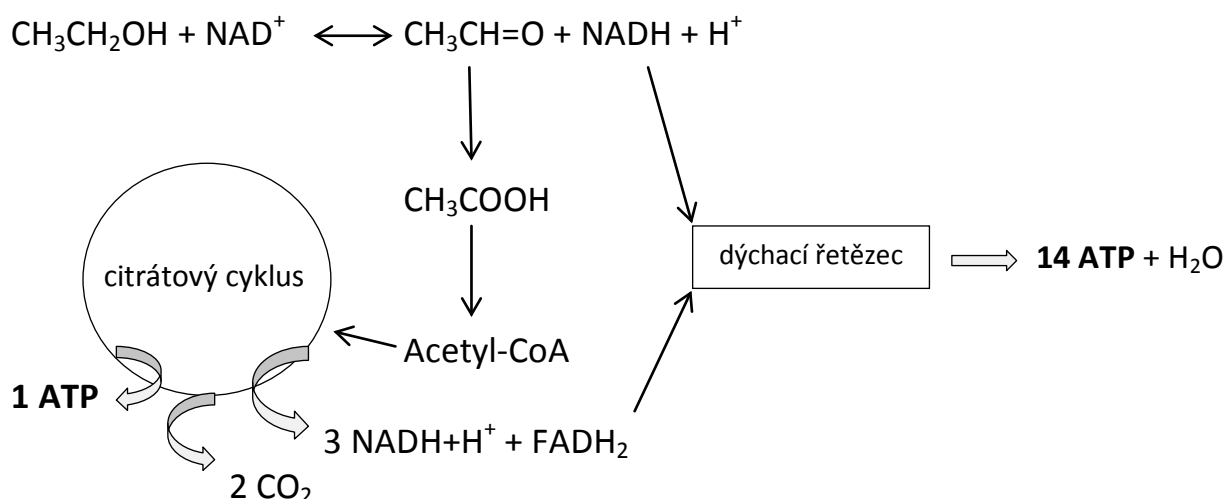
Jméno a UČO:	Datum:
--------------	--------

## Úloha G.

# Vliv polymorfismu v genu pro alkoholdehydrogenázu na její aktivitu

### TEORETICKÝ ÚVOD

Alkoholdehydrogenáza je enzym oxidující primární a sekundární alkoholy a dioly. Zřejmě nejvýznamnějším z těchto alkoholů je ethanol, jehož metabolismus je lokalizován v gastrointestinálním traktu, především v játrech (až 98 %). Zde dochází účinkem ADH ve spolupráci s koenzymem  $\text{NAD}^+$  k oxidaci ethanolu na acetaldehyd. Vznikající acetaldehyd je pak dále oxidován aldehyddehydrogenázou (ALDH) na acetát, který ve svalové tkáni vstupuje do citrátového cyklu jako acetyl-CoA a je postupně přeměněn na  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  a energii v podobě 15 molekul ATP (obr. 1). Existuje několik typů ADH a ALDH enzymů, které jsou kódovány různými geny. Ukázalo se, že tyto různé varianty mohou u lidí ovlivňovat riziko vzniku závislosti na alkoholu. Přepokládá se, že mechanismus vzniku závislosti spojených s výskytem určitých forem ADH a ALDH je způsoben lokálním zvýšením obsahu acetaldehydu vyplývajícím buď z rychlé oxidace ethanolu, nebo pomalejší oxidace acetaldehydu.



**Obr. 1:** Metabolismus ethanolu

U lidí bylo identifikováno sedm různých genů pro ADH (*ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7*) nacházejících se na chromosomu 4. Jednotlivé formy ADH byly pak na základě podobného obsahu aminokyselin a kinetických parametrů rozděleny do pěti tříd. Třída I obsahuje geny pro *ADH1A*, *ADH1B* a *ADH1C*, které mají hlavní podíl na oxidaci ethanolu v játrech. Do třídy II patří gen pro *ADH4*, který se uplatňuje při oxidaci ethanolu až při vyšších koncentracích. Gen pro *ADH5* patří do třídy III kóduje enzym zvaný formaldehyddehydrogenáza a vyznačuje se velmi nízkou

afinitou pro ethanol. mRNA *ADH6* (třída IV) byla izolována z jater plodu i z jater dospělých jedinců, tento enzym však doposud nebyl z tkáně vyizolován a je o něm známo jen málo. Do poslední rodiny V patří *ADH7*, který se podílí na oxidaci retinolu a v menší míře také na oxidaci ethanolu.

U genů pro *ADH1B* a *ADH1C* bylo objeveno několik SNPs ovlivňujících kinetické vlastnosti těchto enzymů. Například polymorfismus nacházející se v kódující oblasti *ADH1B* genu, který vede k záměně aminokyseliny argininu v pozici 48 za histidin (*ADH1B\*48H*) nebo polymorfismus v genu *ADH1C* vyznačující se záměnou valinu v pozici 350 za izoleucin (*ADH1C\*350I*). Tyto substituce mají za následek produkci atypických forem enzymů s mnohonásobně zvýšenou  $V_{\max}$  pro oxidaci etanolu na acetaldehyd oproti formám klasickým (zvýšení až o 70%). Výsledky řady analýz ukazují, že polymorfismy *ADH1B\*48H* a *ADH1C\*350I* se právě vyskytují u osob s nadměrnou konzumací alkoholu. Příčná souvislost mezi polymorfismy a alkoholismem však doposud nebyla potvrzena.

### **Restrikční analýza**

Restrikční endonukleasy jsou enzymy, které rozpoznávají ve dvoušroubovicové DNA specifickou sekvenci složenou obvykle ze 4 až 6 párů bazí a v tomto místě DNA specificky štěpí. Většina rozpoznávaných sekvencí restrikčními enzymy jsou tzv. palindromy. Některé restrikční enzymy katalyzují štěpení dvou vláken DNA v polohách symetricky rozmístěných okolo středu palindromové sekvence (*HhaI*); vznikají tak fragmenty s kohezními či lepivými konci. Jiné restrikční enzymy naopak štěpí řetězec přímo ve středu palindromu (*SspI*). Vznikají pak fragmenty se zarovnanými či tupými konci.

K analýze jednotlivých polymorfismů se využívá restrikční analýza pro *ADH1B* s využitím restriktasy *HhaI* a pro *ADH1C* *SspI*. Jako materiál pro analýzu slouží vzorek lidské krve, ze kterého se amplifikuje část oblasti genu obsahující daný polymorfismus a následně se provede restrikční analýza. Pro amplifikaci části genu *ADH1B* je potřeba pro zanesení restrikčního místa použít mismatchový primer.

Restrikční místo pro <i>HhaI</i> : G CG C	Restrikční místo pro <i>SspI</i> : AAT ATT
C GC G	TTA TAA

Záměna Arg/Val v genu *ADH1B* je výsledkem jednonukleotidové substituce G/A, přičemž pouze G podléhá štěpení *HhaI*. Obdobně záměna Val/Ile v genu *ADH1C* je výsledkem téže jednonukleotidové substituce G/A, kdy štěpení *SspI* podléhá A.

### **Aktivita ADH**

Aktivita ADH se měří kolorimetrickou metodou využívající redukcí N,N-dimethyl-4-nitrosoanilinu (NDMA) a ethanolu jako substrátu. Výrazně žlutý NDMA je v přítomnosti  $\text{NADH}+\text{H}^+$  enzymaticky redukován na bezbarvý hydroxylaminový derivát. Jde tedy o recyklaci koenzymu, který se redukuje při oxidaci ethanolu a následně se opět oxiduje při redukcí NDMA. Změna zbarvení reakční směsi se pozoruje při 440 nm.

### **Odběr kapilární krve**

Kapilární krev se používá v případech, kdy je třeba jen malé množství vzorku. Hlavní zásady při odběru:



- prohřátím místa vpichu (bříško prstu, ušní boltec, u kojenců pata) zabezpečit dobré prokrvení (přiložit teplý vlhký obklad 3 min před vlastním odběrem)
- místo vpichu dezinfikovat
- vpich směřovat ze strany do bříška prstu, kde je lepší prokrvení než ve středu
- po nabodnutí lancetou první kapku otřít (příměs tkáňového moku), další tvorbu kapek podpořit lehkým tlakem (při silném vymačkávání je v krvi příměs tkáňového moku)
- krev se obvykle odebírá do speciálních kapilárních krevních zkumavek nebo do malých plastových či skleněných zkumavek. U proužkových testů se kapka krve aplikuje přímo.
- po odběru přiložit na místo vpichu vatu smočenou dezinfekčním prostředkem

### **Zpracování krve**

Krev odebraná bez použití protisrážlivých prostředků se po kratší době sráží, v důsledku přeměny rozpustného fibrinogenu na vláknitou síť fibrinu. Odstředěním (10 min., 10 000xg, pokojová teplota) sražené krve se získá sérum. Doba srážení musí být dostatečná (při pokojové teplotě po 15–30 min). Předčasné oddělení séra od krevních elementů však může vést k dodatečné tvorbě fibrinu a koagulaci séra.

### **Postup práce:**

#### **Odběr vzorku krve**

Odběr kapilární krve se provádí z boku špičky prstu (toto místo je nejméně citlivé na bolest)

1. Připravte si sterilní, jednorázovou autolancetu – odšroubujte sterilní čepičku a nastavte hloubku vpichu.
2. Otřete prst kapesníčkem s alkoholem a vyčkejte, dokud prst nebude úplně suchý.
3. Uchopte jednorázovou autolancetu mezi ukazováčkem, prostředníčkem a palcem. Přitiskněte autolancetu pevně z boku ke špičce prstu (toto místo je nejméně citlivé na bolest) a palcem stiskněte spoušť na doraz.
4. První malou kapku otřete a další tvorbu kapek podpořte jemným masírováním prstu směrem ke konečku.
5. Krev odeberte do sterilní mikrozkušavky. Odeberte vzorek pro PCR a zbytek krve nechte srážet 30 min.

#### **PCR**

1. Smíchejte 4 µl odebrané krve se 4 µl 5 nM EDTA.
2. Připravte reakční směsi dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Reakční směs Hhal		Reakční směs Sspl	
krev	2,5 µl	krev	2,5 µl
Hhal F primer (10 µM)	1,5 ul	Sspl F primer (10 µM)	1,5 ul
Hhal R primer (10 µM)	1,5 ul	Sspl R primer (10 µM)	1,5 ul
Kapa MasterMix B	12,5 µl	Kapa MasterMix B	12,5 µl
DMSO	1,3 µl	DMSO	1,3 µl
PCR voda	5,7 µl	PCR voda	5,7 µl

3. Reakční směsi jemně promíchejte, krátce stočte a vložte do termocycleru. Na termocycleru nastavte následující program:

95°C	5 min	
95°C	30 s	} 40x
55°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

### **Restrikční analýza**

1. Připravte reakční směsi dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

<i>Reakční směs HhaI</i>		<i>Reakční směs SspI</i>	
PCR produkt	10 µl	PCR produkt	10 µl
10x reakční pufr	2 µl	10x reakční pufr	2 µl
Enzym <i>HhaI</i>	1 µl	Enzym <i>SspI</i>	1 µl
PCR voda	7 µl	PCR voda	7 µl

2. Reakční směs promíchejte, krátce stočte a inkubujte 20 min při 37°C.
3. Připravte si 1,5% agarosový gel.
4. K 10 µl restrikční směsi a 10 µl PCR reakce přidejte 2 µl DNA nanášecího pufru a naneste vzorky na gel v následujícím pořadí:

Délkový marker – PCR produkt – RA *HhaI* – RA *SspI*

### **Aktivita ADH**

1. Sraženou krev centrifugujte 10 min při pokojové teplotě při 10 000 x g.
2. Opatrně odeberte sérum a přeneste do sterilní mikrozkušavky.
3. Připravte reakční směsi dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

<i>Vzorek</i>		<i>Reference</i>	
Sérum	12,5 µl	Sérum	12,5 µl
Reakční pufr	37,5 µl	Reakční pufr	36,5 µl
		Pyrazol (0,5 M)	1 µl

4. Reakční směs promíchejte, krátce stočte a inkubujte 20 min při 25°C. Reakci ve vzorku bez pyrazolu zastavte přidávkem 5 µl 0,5 M pyrazolu.
5. Změřte rozdíl absorpance při 440 nm.

### **Vyhodnocení**

- Na základě výsledku restrikční analýzy určete, zda váš vzorek krve obsahoval některý z polymorfismů v genu pro ADH
- Vypočtete aktivitu ADH ( $\epsilon_{440} \text{NDMA} = 34 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )