

# Úloha D - Stanovení změny hladin transkriptů PR genů

Jméno a UČO:

Datum:

## ÚLOHA D Stanovení změny hladin transkriptů PR genů

### 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

# Úloha D - Stanovení změny hladin transkriptů PR genů

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  $\Delta\Delta Ct$  metoda. Základním předpokladem při srovnávací  $\Delta\Delta Ct$

# Úloha D - Stanovení změny hladin transkriptů PR genů

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 vložte ji do kapalného dusíku. Po vymražení zasuňte vložku do pouzdra a asi minutu třepejte.
3. Poté vyjměte zkumavku z vložky, otevřete ji, pomocí pinzety vyjměte olůvko a přidejte 1 ml Tri Reagentu. Inkubujte zkumavku přibližně 5 minut při pokojové teplotě.
4. Přidejte 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l.
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.

## Úloha D - Stanovení změny hladin transkriptů PR genů

13. Rozpusťte RNA v 10  $\mu\text{l}$  formamidu.

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

Do dvou zkumavek napipetujte 9  $\mu\text{l}$  DEPC vody. Do jedné přidejte 1  $\mu\text{l}$  formamidu (BLANK) a do druhé 1  $\mu\text{l}$  vyizolované RNA. Promíchejte zkumavky na vortexu a krátce stočte.

1. Na fotometru nastavte měření koncentrace RNA a ředící koeficient 10x.
2. Na čočku měřicí kyvety napipetujte 3  $\mu\text{l}$  DEPC vody s formamidem a zakryjte vrškem s faktorem 10
3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku.
4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3  $\mu\text{l}$  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 PR1 $\alpha$ , PR2, PR5 a EF1 $\alpha$ pomocí RealTime PCR

## Úloha D - Stanovení změny hladin transkriptů PR genů

1. Připravíme si reakční směs vztaženou na 1 vzorek dle následující tabulky, kdy k amplifikaci využijeme primery pro geny PR1a nebo PR2 nebo PR5 a EF1a:

2x Go Taq qPCR M. Mix	7.5 $\mu$ l
F+R primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Voda	5.5 $\mu$ l

2. Reakční směs napipetujeme do destičky, promícháme, krátce stočíme a přidáme 1.5  $\mu$ l cDNA vzniklé po reverzní transkripci nebo kvantifikačních standardů. Vložte destičku do termocykleru 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

- Uvedte 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 (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.