

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT - cvičení

podzim 2018

Bakteriální RNA

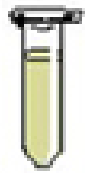
Adéla Indráková

indrakova.a@gmail.com

Časový pořad

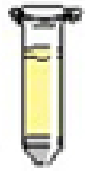
1. Organizace cvičení
2. Odběry Infikované kultury
3. Izolace RNA
4. Ošetření DNázou
5. Izolace plazmidů – dokončení experimentu
6. PFGE štěpení
7. Přepis do cDNA
8. PCR

Izolace plazmidové DNA



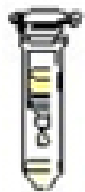
buňky *S. aureus* promýváme v PBS

lyze

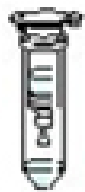


Precipitace

Vyčeření lyzátu



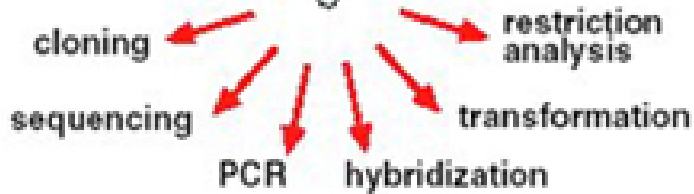
Vazba na kolonku



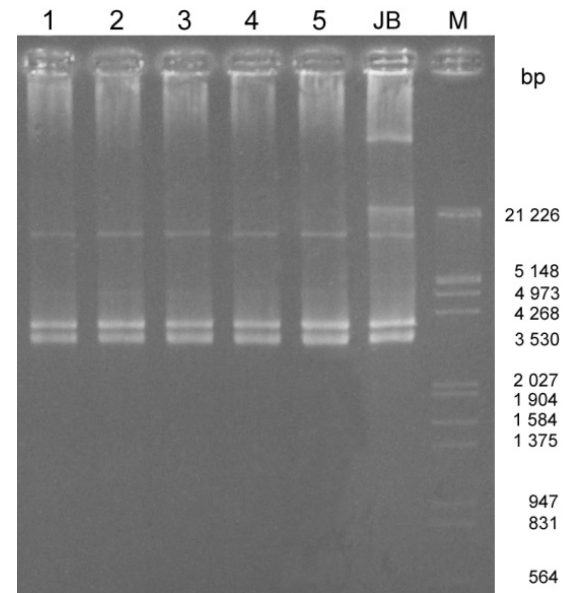
promývání



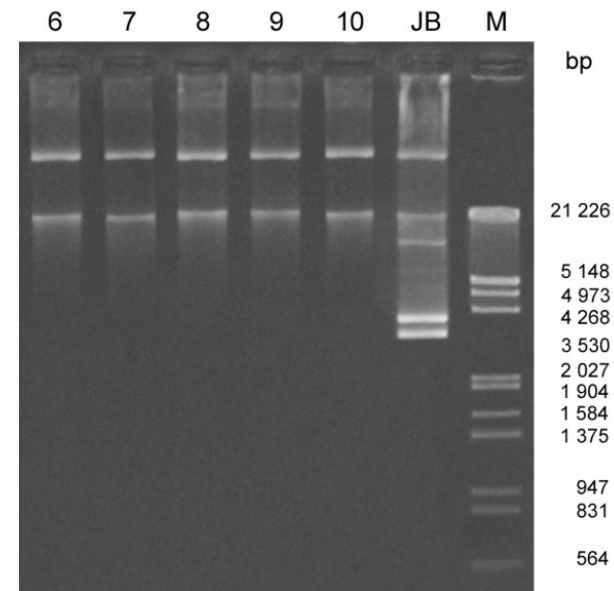
Eluce



tetracyklin



kadmium



Elektroforetická mobilita od nejnižší po nejvyšší:

- **Štěpená, otevřená cirkulární forma (nicked):** štěpena v jednom z řetězců DNA - **NEJPOMALEJŠÍ**
- **Lineární forma (linear):** linearizovaná forma, vznik rozštěpením obou řetězců.
- **Uvolněná cirkulární forma (relax circular):** oba řetězce DNA jsou neštěpené, k relaxaci dochází enzymaticky
- **Superspiralizovaná forma (supercoiled):** jedná se o spiralizovanou kružnicovou molekula - **NEJRYCHLEJŠÍ**

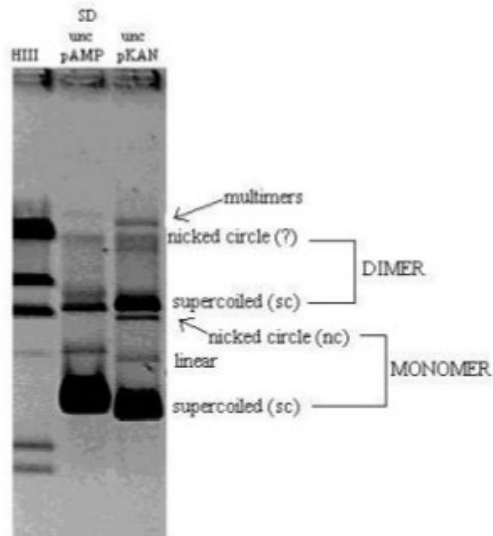
Nicked Open Circular
(slowest)

Linear

Relaxed Circular

Supercoiled Denatured

Supercoiled (fastest)



RŮZNÉ KONFORMACE PLASMIDŮ

Uvolněná,
štěpená cirkulární forma



Uvolněná, kovalentně uzavřená
cirkulární forma



Superspiralizovaná forma

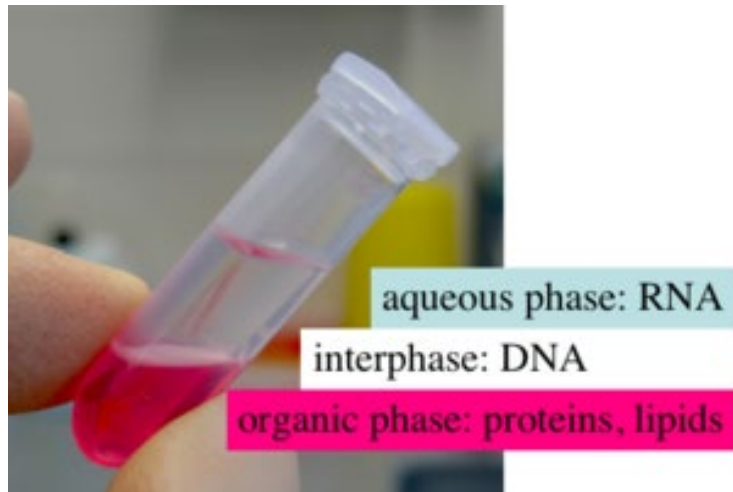


Lineární forma



Detekce sestřihu endolyzinu

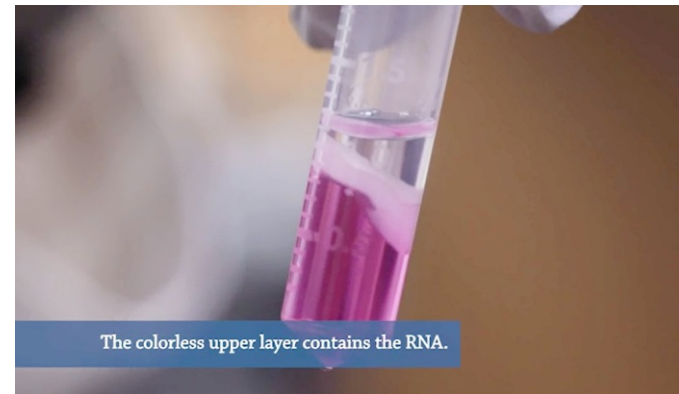
1. Infekce bakteriální kultury fágem
2. Odběry v čase 0; 5; 10; 15 a 20 min
3. Izolace RNA TRizolem



4. Odstranění genomové DNA
5. Přepis do cDNA

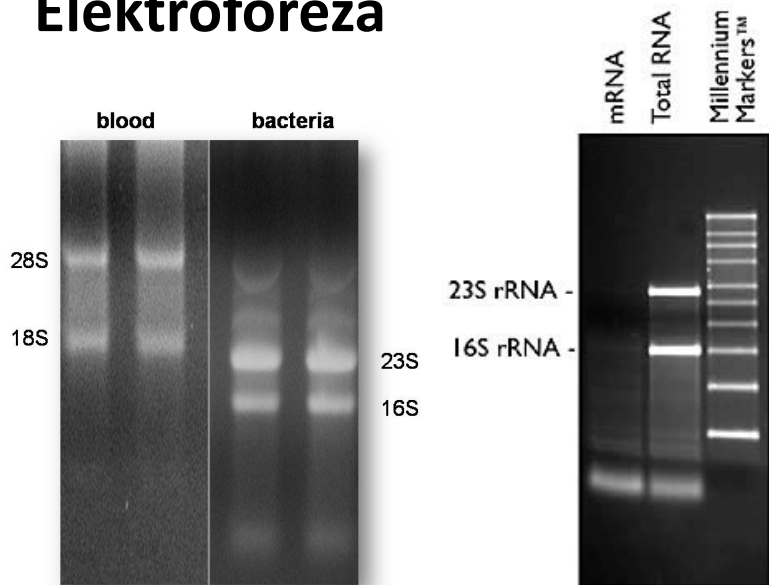
Zásady práce s RNA:

- pracujeme v rukavicích
- pracujeme v prostředí bez RNáz; inhibitory RNáz, RNase free plastic
- sada pipet na práci s RNA, oddělené pracovní místo a ELFO pro práci s RNA
- DEPC voda



Ověření kvality RNA

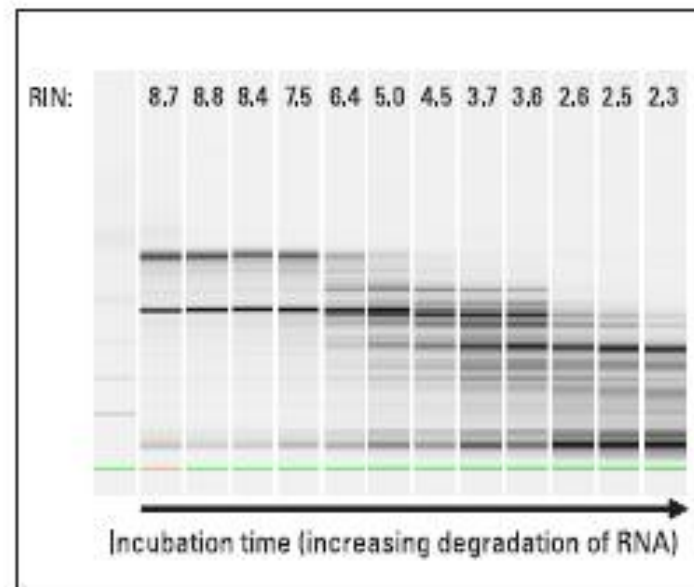
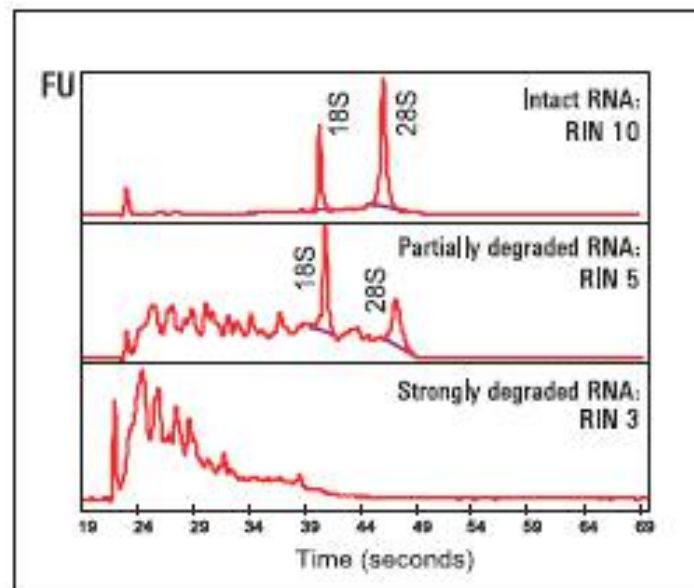
Elektroforéza



pracujeme s reagensii „Rnase free“
gel složení: 50×TAE, 60% formamid, DEPC
voda, 1,2% agarózy, 1/10 EtBr
pufř složení: 10×TAE

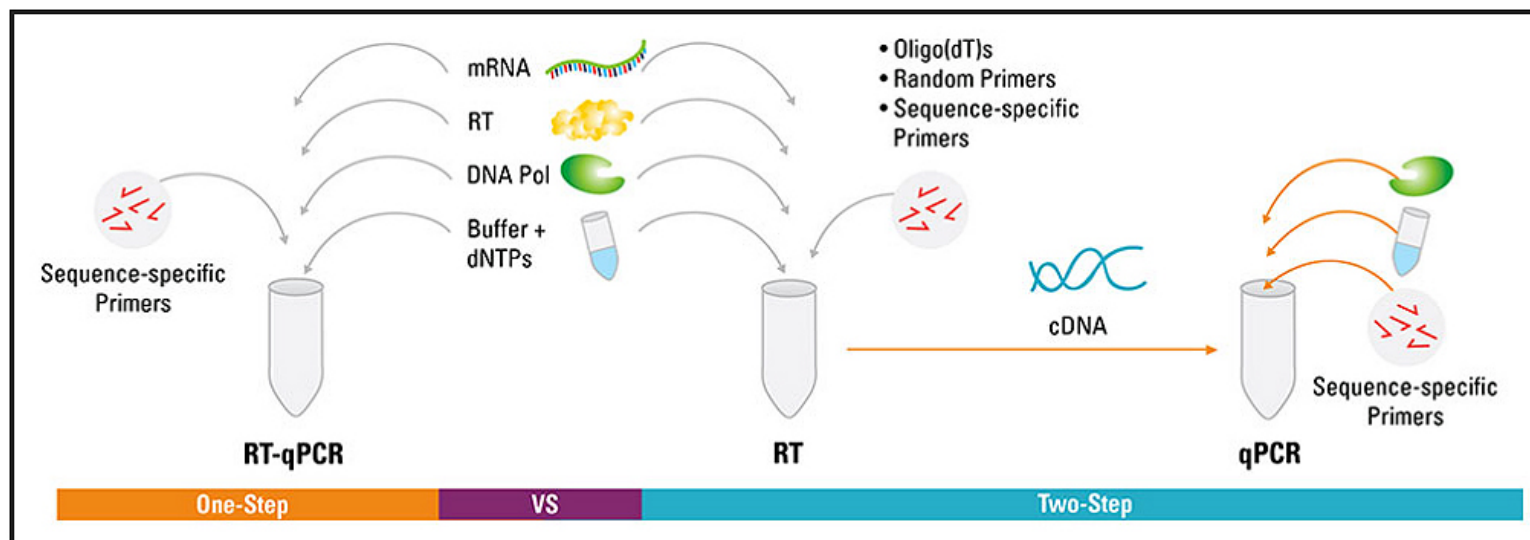
vzorek: denaturace RNA 65-70 °C/15 min.

RIN



Reverzní transkripce, RT-PCR

Jednokroková versus dvoukroková RT-PCR



Primery pro RT

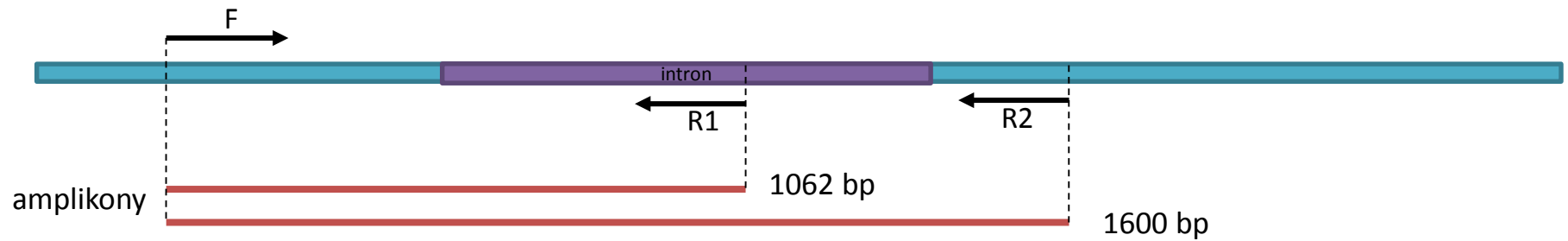
Primery	Výhody	Nevýhody
Oligo-dT	Celá cDNA z polyA	Jen polyA mRNA, bias 3' konců
Náhodné hexamery	Všechny druhy RNA, sekundární struktury nevadí	Může snížit podíl mRNA signálu, zkrácené cDNA
Sekvenčně specifické	Specifické, vyšší sensitivita, lze použít reverse PCR primer	Jen gen zájmu

Jaké potřebujeme kontroly pro reverzní transkripci?

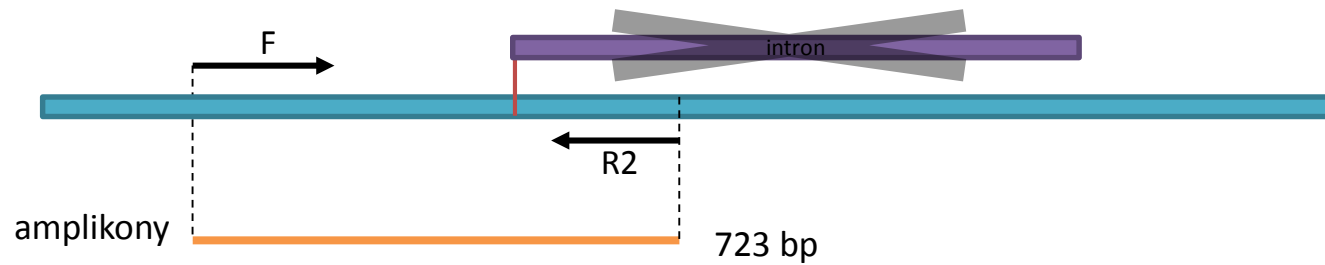
Design primeru pro detekci sestřihu

1. Primer nasedá za oblast intronu

Nesestřižená RNA



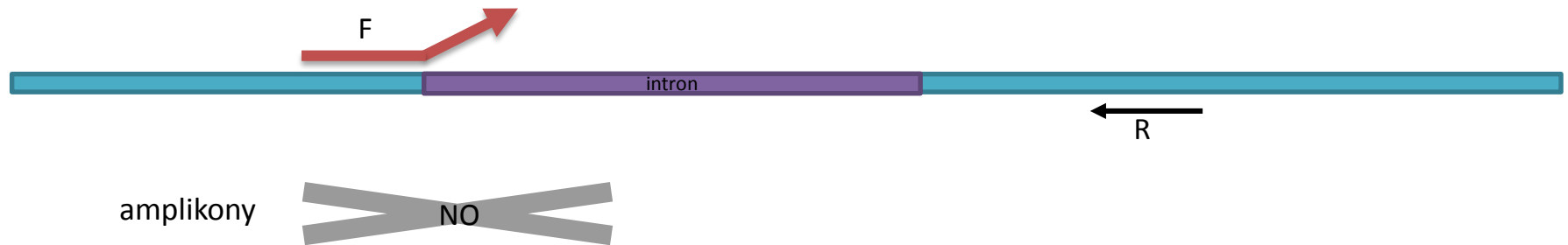
Sestřižená RNA



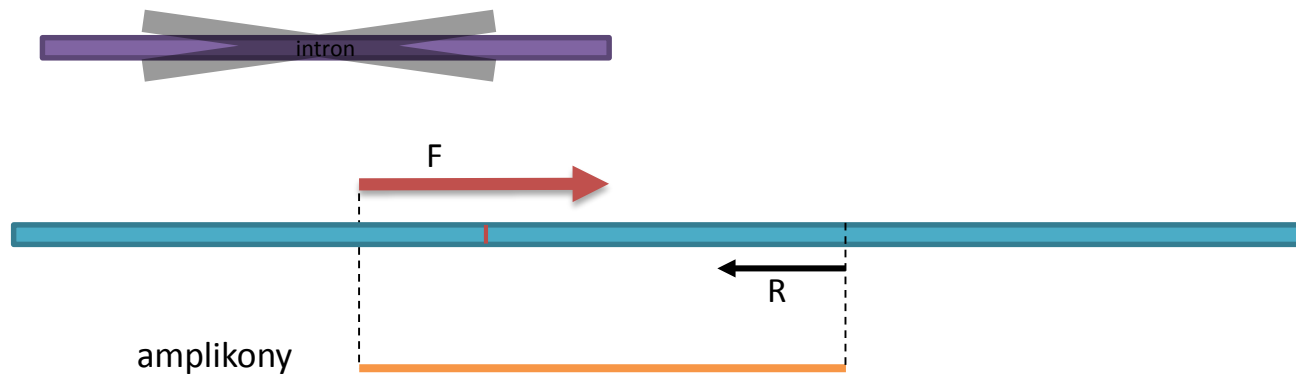
Design primeru pro detekci sestřihu

1. Primer nasedá za oblast intronu
2. Primer překlene hranici exon-intron-exon

Nesestřižená RNA



Sestřižená RNA



Využití RT-PCR

1. Analýza genové exprese
2. Validace RNAi
3. Diagnostika patogenů
4. Diagnostika genetických onemocnění
5. Výzkum nemocí

