



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

DEN 1

VYBRANÉ METODY VYUŽÍVANÉ KE STUDIU GENOMU *ARABIDOPSIS THALIANA* A K PROVÁDĚNÍ CÍLENÝCH ZMĚN, SYNTÉZA A PURIFIKACE OLIGONUKLEOTIDŮ

Úvod

Dopolední část bude věnována analýze aktivity promotorů pomocí transkripční fúze a chemicky indukovatelného transkripčního aktivačního systému a dále praktickému osvojení softwaru pro design sekvence oligonukleotidů OLIGO 6 včetně návržení sekvence PCR primerů. Odpolední část zahrne vlastní syntézu, purifikaci a kontrolu kvality PCR primer a přípravu experimentu pro tranzientní expresi proteinů v tabákových rostlinách.

Časový harmonogram¹

- 7:45 Sraz v učebně C02/1.21
7:50 Zahájení semináře (Jan Hejátko), UKB, Kamenice 5, budova C02, místnost 1.21
8:00 PŘÍPRAVA MATERIÁLŮ (Jan Hejátko), laboratoř 334
8:15 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE (Jan Hejátko)
1. Teoretický úvod
2. Zahájení barvení
9:00 DEXAMETAZONEM INDUKOVATELNÝ TRANSKRIPČNÍ AKTIVAČNÍ SYSTÉM (Markéta Šámalová), laboratoř 334
1. Teoretický úvod
2. Zahájení indukce dexametazonem
10:05 DESIGN SEKVENCE PCR PRIMERŮ (Hana Konečná), místnost 1.21
11:00 Kontrola barvení
11:15 DESIGN SEKVENCE PCR PRIMERŮ (Hana Konečná), místnost 1.21
11:45 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE
3. Kontrola GUS barvení/zahájení odbarvování
11:45 - 12:45 OBĚD
12:45 SYNTÉZA OLIGONUKLEOTIDŮ (Hana Konečná), Centrální laboratoř 342
14:00 ANALÝZA BUNĚČNÉ LOKALIZACE PROTEINŮ (Markéta Šámalová), laboratoř 334
Infiltrace listů tabáku
16:00 UKONČENÍ PROGRAMU 1. DNE

¹ jednotlivé časy se mohou měnit podle potřeby a rychlosti zvládnutí jednotlivých metod



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Příprava materiálu

Pro práci v laboratoři se seznámíme s organizací práce, přístroji a připravíme materiál a roztoky.

Práce v laboratoři

- Bezpečnost
- Zdroje vody
- Základní chemikálie
- Odměřování a pipetování
- Skladování
- Odpady a použitý materiál
- Sterilizace

Presvědčte se, že máte k dispozici následující chemikálie a materiály:

- ddH₂O (sterilní, 50ml)
- 70% etanol / 100% etanol
- Špičky/zkumavky (sterilní)
- Pinzetu
- Barvicí pufr a destičky
- Tužky, fixy, popisovací nálepky

Komponenty PCR reakce. V krabici označené číslem vaší skupiny jsou uloženy následující chemikálie:

- Taq DNA polymeráza
- 10x koncentrovaný PCR pufr s MgCl₂
- dNTP
- primery

Analýza genové exprese pomocí transkripční fúze 1

Analýza aktivity promotoru pomocí transkripční fúze s reportérovým genem *uidA* (GUS)

- 1) Rozpipetujte si připravený barvicí roztok do barvicí destičky (2 ml)
- 2) Vložte připravené semenáčky (cca 10-15 kusů) pomocí jemné pinzety do barvicího pufru
- 3) Proveďte infiltraci v exsikátoru (15 min.)
- 4) Vložte do termostatu (37 °C).
- 5) V cca dvouhodinových intervalech provádějte kontrolu barvení pomocí stereomikroskopu.
- 6) Barvení zastavte pomocí 80 % etanolu, ve kterém ponechte semenáčky odbarvovat při pokojové teplotě do druhého dne.
- 7) Vyměňte etanol a opět nechte odbarvovat (2. den, úterý).
- 8) Proveďte projasňování semenáčků (4. den, čtvrtek).
- 9) Opatrně přeneste projasněné semenáčky na sklíčka a připravte preparáty pro automatickou mikroskopii (4. den, čtvrtek).
- 10) Spuštění automatického mikroskopu (přes noc; 4. den, čtvrtek).
- 11) Vyhodnocení výsledků barvení (5. den, pátek).



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Použité transgenní linie:

ProCYCB1:GUS (sk. 1+4)

ProARR5:GUS (sk. 2+5)

ProAHK4:GUS (sk. 3+6)

Složení barvicího roztoku:

X-Glc	0,01% (w/v)
Triton X100	0,1% (v/v)
Pi pufr, pH 6,9	0,1M
K ₃ [Fe(CN) ₆]/ K ₄ [Fe(CN) ₆]	0.5 mM

X-Glc

– navažuje se ráno před cvičením

Triton X100

- 200 μ l 1% tritonu na jamku, nebo
- 20 μ l 10% tritonu na jamku

Pi pufr

- 2 ml 0,1M Pi na jamku

komponenta A - 6,899 g **NaH₂PO₄·H₂O** v 100 ml H₂O

komponenta B - 8,889 g **Na₂HPO₄·2H₂O** v 100 ml H₂O

7,8 ml komponenty A + 12,2 ml komponenty B + 80 ml H₂O = 100 ml Pi pufru (lednice)

Fe soli

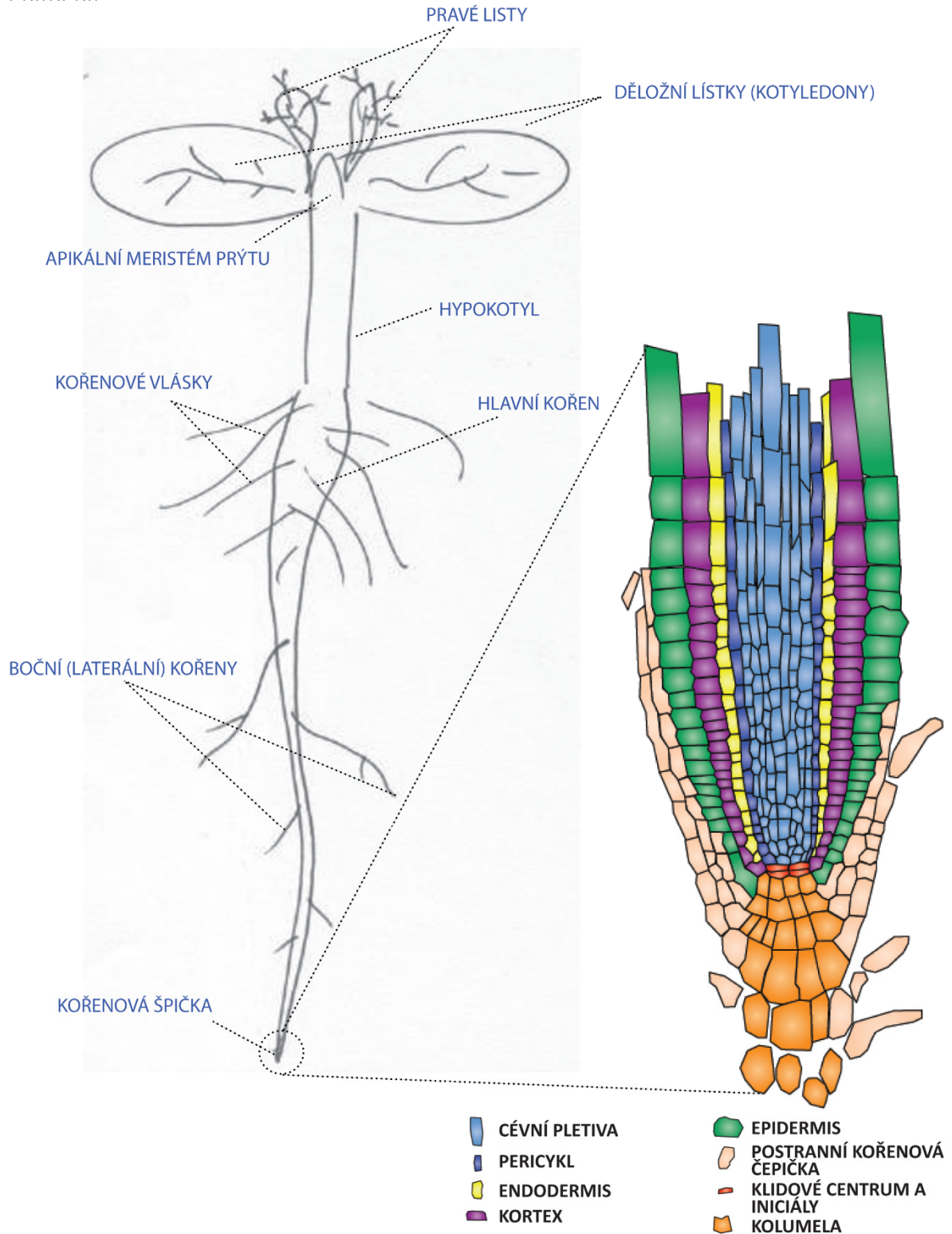
- 20 μ l zásobního roztoku na jamku

1,646 g K₃[Fe(CN)₆] + 2,112 g K₄[Fe(CN)₆] + 50 ml H₂O = 50 mM zásobní roztok

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Schéma nejdůležitějších morfologických a anatomických částí semenáčku *Arabidopsis thaliana*.





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Šablona k protokolům: Analýza aktivity promotoru pomocí transkripční fúze² a dexametazonem indukovatelný transkripční aktivační systém.

Jméno:

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky:

Závěr:

² Do protokolu zejména uveďte: název genu analyzovaného promotoru, stručný popis principu metody, zda se podařilo identifikovat místa specifické aktivity daného promotoru (uveďte stručný výčet barvených pletiv) a co lze z tohoto výsledku uzavřít, příp. pro co jej dále použít.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

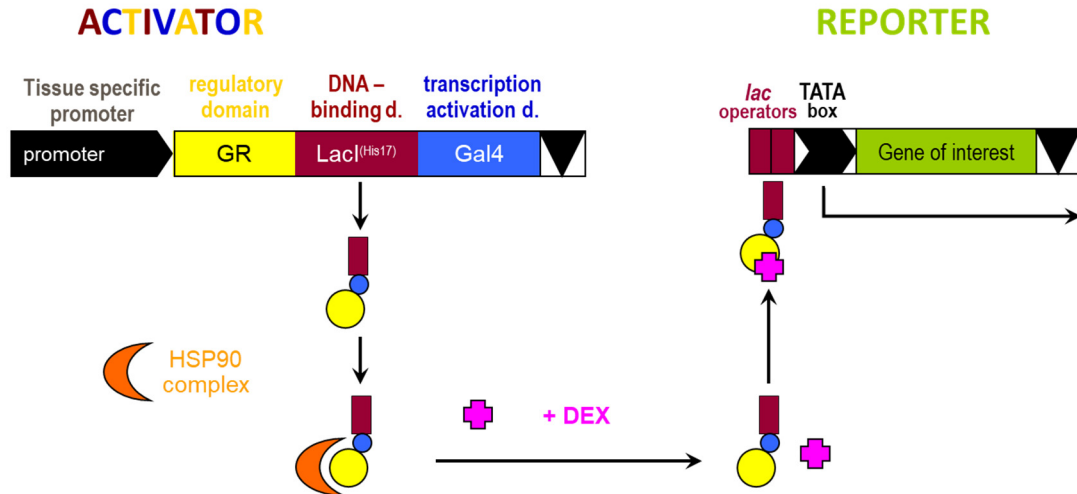
Dexametazonem indukovatelný transkripční aktivační systém 1

Dexametazonem indukovatelný transkripční aktivační systém

Použití chemicky indukovatelných systémů pro expresi transgenů je zásadním požadavkem moderního biologického výzkumu (nejen) rostlin. V našem experimentu použijeme přísně regulovaný a vysoce citlivý genový expresní systém pOp6/LhGR (Samalova *et al.*, 2005, Plant J 41: 919-935), který je indukovatelný dexametazonem. Tento systém obsahuje transkripční aktivátor LhGR a chimérický promotor pOp, který se skládá z lac operátorů naklonovaných před minimálním promotorem CaMV35S. Po indukci se aktivátor LhGR naváže na pOp promotor a indukuje z něj expresi požadovaného cílového genu (viz obr. 1).

Bylo vyvinuto několik chemicky indukovatelných systémů (viz přehled Moore *et al.*, 2006, Plant J 45: 651-683). Avšak pro ideální systém je zapotřebí řady vlastností, jako jsou velmi nízké hladiny bazální (neindukované) exprese, vysoká indukovatelnost, specifita a dynamický rozsah odezvy vůči induktoru, žádoucí je také rychlá odpověď a indukce různými metodami. Ideální systém by měl fungovat u několika druhů organismů a neměl by vyvolávat žádné nežádoucí fyziologické účinky, sám o sobě nebo jeho induktor. Pro induktor je dále požadováno, aby pro transgen vykazoval vysokou specifitu, vysokou účinnost při nízkých koncentracích a nesmí být nalezen v cílových orgánech, a proto jsou složky pro tyto systémy obvykle odvozeny z nepříbuzných druhů.

Obr. 1



- 1) Opatrně umístěte semenáčky (přibližně 10-15 kusů) z dané Petriho misky do roztoku, který buď obsahuje dexametazon nebo kontrolní rozpouštědlo (DMSO).
- 2) Nechte indukci pokračovat po dobu 24 hodin na pracovním stole nebo v rostlinném inkubátoru.
- 3) Následující den proveďte GUS barvení a analýzu jako v metodě Analýza genové exprese pomocí transkripční fúze 1.
- 4) Pro vypracování protokolu:
 - a) Vyhodnoťte výsledky barvení.
 - b) Popište výhody používání indukovatelných systémů nad konstitutivními promotory.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Transientní exprese v tabáku 1

Infiltrace agrobakterií do listů tabáku *Nicotiana benthamiana*

Listy tabáku *Nicotina benthamiana* jsou vhodným rostlinným systémem pro transientní expresi fúzních proteinů, u kterých chceme studovat jejich vzájemné interakce a lokalizaci uvnitř rostlinné buňky. K transformaci listu využijeme přenos T-DNA z *Agrobacterium tumefaciens*. Studované geny jsou naklonovány do expresní kazety uvnitř T-DNA oblasti binárního plasmidu a takto připravené konstrukty pro expresi fúzních proteinů (s GFP, RFP, YFP-N, YFP-C apod.) jsou transformovány do kmenu GV3101 pMP90. Vzniklé kmeny agrobakterií potom kultivujeme a ve formě suspenze je pomocí injekční stříkačky (bez jehly) vtláčíme skrze průduchy na spodní straně listu do mezofylového prostoru. Následně dojde k přenosu mnoha kopií T-DNA do jádra buněk. Pro transkripci vnesených genů není nutné začlenění T-DNA do chromozomů. Pokud před infiltrační směsí smícháme kmeny nesoucí různé konstrukty, dojde s velkou pravděpodobností k jejich koexpresi, protože jedna buňka je zpravidla transformována mnoha agrobakteriemi současně. Avšak k dosažení koordinované exprese dvou proteinů je výhodnější spojit je peptidem se samo-štěpícími se vlastnostmi, jako je např. 2A peptid izolovaný z FMDV (Samalova *et al.*, 2006, Traffic 7: 1701-1723). Transientní exprese proteinů je většinou velmi silná kvůli velkému počtu transkripčně aktivních kopií T-DNA v jádře, ale během několika dnů (3-4) odezní.

Každá skupina si vezme 2 zkumavky s narostlou agrobakteriální kulturou podle následujícího rozpisu:

Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	Skupina 4	Skupina 5	Skupina 6
2A 9-3	2A 4-2	2A 3-2	2A 8-3	2A 3-5	2A 2-4
2A 2-4	2A 8-3	2A 3-5	2A 3-2	2A 9-3	2A 4-2

1. Přeneste 1,5 ml od každé kultury do eppendorfové zkumavky (nezapomeňte ji označit!).
2. Centrifugujte zkumavky rychlostí 4000 ot/min po dobu 5 minut.
3. Během centrifugace připravte 25 ml infiltračního pufru (IB):

Infiltrační pufr (25 ml)	
10x IB	2.5 ml
destilovaná voda	do 25ml
1M Acetosyringon	5 µl

4. Supernatant odsajte pipetou.
5. Přidejte 1 ml připraveného IB do buněk a znovu je resuspendujte.
6. Centrifugujte zkumavky při 13000 ot/min po dobu 45-60 s a odsajte supernatant.
7. Zopakujte krok promývání (body 5 a 6).
8. Resuspendujte buňky v 1 ml IB.
9. Nařeďte 1/5 (200 µl buněk v 800 µl IB) v kyvetě pro spektrofotometr.
10. Změřte OD₆₀₀ a připravte 1 ml směsi OD₆₀₀ = 0,2 pro infiltrační tabáku.

Požadované OD₆₀₀ x 1000 = µl 1/5 zředění se přidá do 1 ml IB
OD₆₀₀ 1/5 zředění



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Infiltrujte suspenze pomocí injekční stříkačky o objemu 1 ml (bez jehly) přes spodní stranu listu do připravených tabákových rostlin.
Vezměte rostliny do skleníku. Za 2-3 dny proveďte konfokální mikroskopii epidermis na abaxiální straně listu (viz metoda Transientní exprese v tabáku 2).

Design a syntéza PCR primeru

Určení optimální sekvence PCR primeru na základě úseku DNA z *Arabidopsis thaliana* pomocí programu OLIGO 7

Praktické seznámení se základními pojmy a menu na počítači
Aktuální oligo. Typy primerů (forward, reverse). Volná energie. Dimer versus duplex. Interní stabilita. Vlásoky. Účinnost primeru. Terminální stabilita. Teplota tání T_m . Vložení sekvence úseku DNA z *Arabidopsis thaliana* do databáze. Specifikace parametrů navrhované dvojice primerů, výběr optimální dvojice pro PCR amplifikaci studovaného úseku DNA. **Finální výstup v tištěné podobě přiložte k protokolu.**

Syntéza PCR primeru na syntetizátoru Expedite 8909

Vložení sekvence primeru do databáze. Výtisk Volba parametrů syntézy (ON vs. OFF, rozsah syntézy), volba vhodné kolony, vlastní syntéza. Sledování účinnosti jednotlivých kroků syntézy (**výtisk histogramu přiložte k protokolu**). Odštěpení produktu z kolonky amoniolýzou. Tepelná deprotektce. Vakuové sušení v koncentračním systému Speedvac.

Purifikace primeru: Odsolení gelovou filtrací na molekulovém sítu

Odstranění nízkomolekulárních nečistot se provádí etanolovou precipitací nebo gelovou filtrací na kolonce Sephadexu G-25. Pokud je pro některé aplikace nutné odstranit kratší nedosyntetizované řetězce (např. pro antisense hybridizace), používá se purifikace na OPC (Oligonucleotide Purification Cartridge). Nejúčinnějším, ale finančně nejnáročnějším způsobem čištění je HPLC.

Odsolení na CENTRI-SPIN 10 kolonce (Princeton Separations, Inc.).

Vysušený vzorek primeru rozpustíme v 50 μ l deionizované vody. Krátce necháme stát, protřepeme příp. asi na minutu zahřejeme na 65 °C a nakonec krátce zcentrifugujeme.

Hydratace kolonky CENTRI-SPIN 10

Sklepat suchý gel do spodní části kolonky, otevřít horní zátku a nanést 650 μ l deionizované vody, zavřít a asi 5 s třepat na vortexu. Poklepáním se ještě zbavit posledních bublin. Poté nejméně 30 min nechat při pokojové teplotě probíhat hydrataci Sephadexu. Otevřít horní i spodní zátku kolonky a tuto vložit do připravené mikrozkušavky bez víčka (wash-tube). Centrifugovat 2 min při 750g (odpovídá 2700 otáčkám na centrifuze Eppendorf 5415C). Po skončení centrifugace je v mikrozkušavce voda, tj. odpad. Osušíme poslední kapky na kolonce. Ta je nyní připravena k vlastní aplikaci vzorku, která by měla proběhnout během několika minut po skončení hydratace.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Vlastní odsolení vzorku

Kolonku vložte do mikrozkušavky s víčkem, víčko označte číslem skupiny (sample-tube) a opatrně do centra gelu po kapkách naneste automatickou pipetou předem 50 μl připraveného vzorku. Následuje centrifugace 2 min při 750g (2700 otáčkách). Po skončení centrifugace přidejte k odsolenému primeru v mikrozkušavce 950 μl deionizované vody, protřepte. Ve stojánku je připravena jedna mikrozkušavka označená na víčku UV (pro měření výtěžku) obsahujícíμl vody a jedna prázdná označená QC (pro chromatografickou kontrolu kvality). Do UV mikrozkušavky přidejte μl odsoleného primeru na měření absorbance a do QC mikrozkušavky napipetujte 50 μl odsoleného primeru.

Určení výtěžku.

Stanovení absorbance zředěného vzorku měřením při 260 nm (spektrofotometr HELIOS). Definice jednotky OD. Výpočet výtěžku syntézy v jednotkách OD a převody do jiných jednotek. Vypočtete, v jakém objemu vody je třeba rozpustit výtěžek, abyste dostali zásobní roztok o koncentraci 500 μM. **Výtisk protokolu o syntéze s doplněným výtěžkem surového a odsoleného produktu přiložte k protokolu ze cvičení.**

Kontrola kvality.

Stručné seznámení s výhodami perfúzní chromatografie na přístroji BioCAD 700E (Applied Biosystems). Výběr vhodné kolony a vhodné analytické metody. Manuální nástřik 20 μl surového a odsoleného PCR primeru. Porovnání chromatogramů. **Výtisk obou chromatogramů ve zvoleném modu (Tile, Overlay) přiložte k protokolu.**

Úkoly

Doplňte následující protokol – pouze jeden pro dvojici

PROTOKOL

Číslo skupiny:

Jména:

Datum:

Úloha: SYNTÉZA A PURIFIKACE OLIGONUKLEOTIDŮ

Cíl: Seznámit se se současnými možnostmi při automatické syntéze oligonukleotidů, s dostupnými modifikacemi a aplikacemi. Porozumět základním zásadám pro navrhování PCR primeru. Pochopit základní princip syntézy oligonukleotidu a umět se zorientovat v jednotkách, ve kterých se vyjadřuje výtěžek. Umět vysvětlit základní rozdíl v čistotě produktu po jednotlivých typech purifikací.

Návrh sekvence primeru

Přiložte výstup ze software OLIGO 7, primery označte číslem skupiny, stručně zhodnoťte kvalitu nalezených primerů.

Syntéza

Přiložte histogram ze syntézy a protokol ze syntézy s doplněným výtěžkem vyjádřeným v jednotkách



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

OD, μg a v jednotce molární koncentrace. Uveďte výpočet objemu nutného pro přípravu zásobního roztoku primeru o koncentraci $500 \mu\text{M}$.

Odsolení

Přiložte výstup z chromatografu obsahující chromatogramy surového a odsoleného vzorku. Jednou větou zhodnoťte, zda je pozorovatelný rozdíl a vysvětlete.

Rozšiřující literatura dostupná v Centrální laboratoři

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1987.

Aktuální verze „OLIGO“, Primer Analysis Software. User Manual. Version 7, MBI, 2008.

PCR Primer, A Laboratory Manual. Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, 2003.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

DEN 2

IZOLACE ROSTLINNÉ DNA, PCR, PRÁCE S DATABÁZEMI A NÁSTROJI PRO ZPRACOVÁNÍ 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 oblast inzerce cizí DNA (transpozonu En-1, dSpm a T-DNA) v genech AHP4, ARR4 a ARR21. Také se seznámíte s genomickými databázemi a užitečnými nástroji pro genomiku.

Časový harmonogram

8:30 DEXAMETAZONEM INDUKOVATELNÝ TRANSKRIPČNÍ AKTIVAČNÍ SYSTÉM
(Markéta Šámalová), laboratoř 334

3. Zahájení barvení

8:45 IZOLACE DNA (Markéta Žďárská), laboratoř 334

10:00 DATABÁZE (Jan Skalák)

12:00 OBĚD

13:00 ZALOŽENÍ PCR (Markéta Žďárská), laboratoř 334

14:00 DATABÁZE-dokončení (Jan Skalák)

15:30 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE (Jan Hejátko),
laboratoř 334

4. Výměna etanolu, uložení vzorků na 4 °C

15:45 DEXAMETAZONEM INDUKOVATELNÝ TRANSKRIPČNÍ AKTIVAČNÍ SYSTÉM
(Markéta Šámalová), laboratoř 334

4. Kontrola GUS barvení/zahájení odbarvování

16:00 UKONČENÍ PROGRAMU 2. DNE

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Praktická část

1. Izolace DNA
2. Založení PCR

Analýza genové exprese pomocí transkripční fúze 2

Odbarvování preparátů pro analýzu genové exprese pomocí transkripční fúze

1. Proved'te výměnu 80 % etanolu a umístěte semenáčky na 4 °C, kde je ponecháte do 4. dne (čtvrtek).

Genotypování pomocí PCR 1

Rychlá izolace DNA pro PCR

1. Homogenizovat jeden střední vymražený list vychlazenou skleněnou tyčinkou v 1,5ml zkumavce (ependorfka) ve stojánku.
2. Přidat **400 µl** extrakčního pufru, vortexovat **5 s** a nechat stát při laboratorní teplotě **10 min**.
3. Centrifugovat při 14000 otáčkách **10 min**, 4°C.
4. Přenést **300 µl** supernatantu do nové 1,5ml zkumavky a přidat **300 µl** izopropanolu, 4-6 krát překlomit. Nechat stát **5 min** při laboratorní teplotě.
5. Centrifugovat **10 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 **5-10 min; na stole**).
7. Pelet rozpustit ve **100 µl** sterilní ddH₂O. Genomovou DNA uchovávat na ledu nebo v lednici.

Extrakční pufr

Tris/HCl (200mM, pH7.5)
NaCl (250mM)
EDTA (25mM)
SDS (0.5%)

Založení PCR

Do 0.2 ml zkumavek pro PCR napipetovat postupně vodu, pufr, dNTP, templát, primery a Taq polymerázu podle schématu:

PCR směs:	10x pufr	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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

primery ARR4 spec.:	ARR4N, ARR4S –	137 bp
primer transpozon	8130, Sim 799 –	250 bp
	8130, 16new –	390 bp
	d11, ARR4N –	195 bp

Navrhněte vhodnou kombinaci primerů a to tak, abyste byli pomocí výsledků PCR reakce schopni identifikovat inerčního mutanta ve vašem genu a zjistit, zda se jedná o jedince homozygotního nebo heterozygotního pro danou inzerční alelu.

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

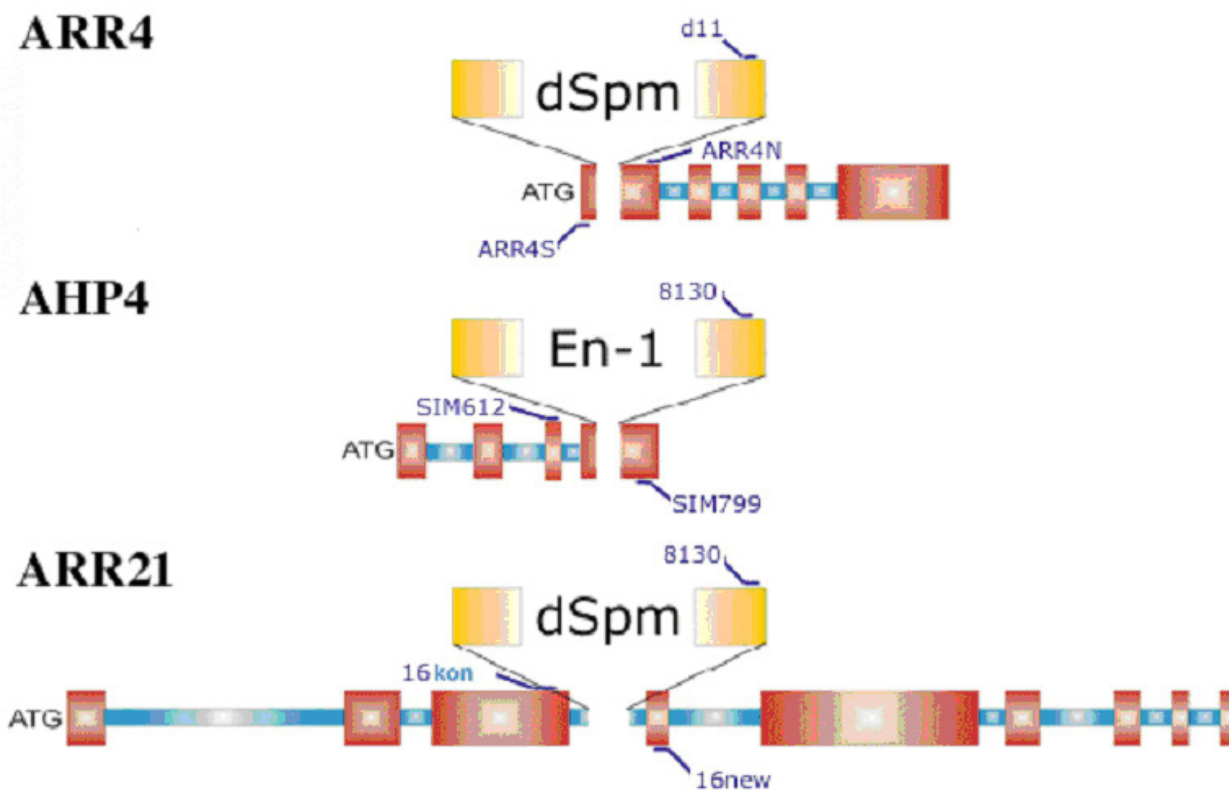
	primery	templátová DNA
AHP4:		
1a
2a
3a
4a
ARR21:		
1b
2b
3b
4b
ARR4:		
1c
2c
3c
4c

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

Cyklus: <u>94°C</u>s 30 cyklů: 94°C s 58°C s <u>72°C</u>s 72°C min 4°C ∞

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY



Databáze

Stručná charakteristika:

Vyhledání genové, proteinové sekvence genu zájmu. Seznámení se s dohledáváním důležitých informací vztahujících se ke genu zájmu. Určení podobných genů a následná fylogenetická analýza vybraných genů. Vyhledávání promotorových oblastí a analýza vazebných míst pro transkripční faktory. Analýza a zpracování obrazových dat.

Databáze:

NCBI – Databáze a nástroje shromažďující genomické a biomedicínské informace

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

EMBL-EBI – Databáze a nástroje shromažďující genomické a biomedicínské informace

<https://www.ebi.ac.uk/>

TAIR – Databáze shromažďující informace pro práci s *Arabidopsis thaliana*.

www.arabidopsis.org



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Genevestigator – Databáze shromažďující informace o expresi genů u rostlin a v biomedicínské praxi
<https://genevestigator.com/gv/index.jsp>

Nástroje:

Omic tools - Databáze bioinformatických nástrojů pro genomiku

<https://omictools.com/genomics2-category>

Plant Image Analysis – Databáze nástrojů pro zobrazovací analýzu rostlin

<http://plant-image-analysis.org/>

Alibaba2 (Transfac) – nástroj pro vyhledávání vazebných míst v promotorové oblasti genů

<http://www.gene-regulation.com/login>

ImageJ – Nástroj s širokým využitím pro manuální a zautomatizovanou analýzu a zpracování obrazových dat na pozadí Java

<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

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. Identifikujte gen podle zjištěné sekvence pomocí algoritmů BLAST.
5. Najděte tři různé regulátory odezvy nebo histidin kinázy u *Arabidopsis*.
6. Určete u libovolného genu v úkolu 4 polohu v genomu *Arabidopsis* (chromosom, polohu v publikované sekvenci daného chromosomu).
7. Vyberte si jeden gen z úkolu 4 a určete oblast 1000 bazí v oblasti promotoru genu. Ukončete sekvenci na ATG. Analyzujte na přítomnost vazebných míst transkripčních faktorů pomocí hledání v databázi TRANSFAC.
8. Srovnajte libovolné sekvence z *Arabidopsis* s homologii větší než 30% a menší než 100% pomocí algoritmu CLUSTAL Omega.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Šablona k protokolům: Izolace DNA a PCR

Jméno:

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky:

Závěr³:

³ Uveďte zejména, zda jste identifikovali inzerčního mutanta a zda se jedná o homozygota nebo o heterozygota pro danou inzerční alelu a proč.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

DEN 3

IDENTIFIKACE PCR PRODUKTU V GELU, qPCR METODA

Úvod

PCR produkty rozdělíme pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a představíme si metodu kvantitativní real-time PCR (qPCR), což je moderní technika molekulární biologie umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA.

Časový harmonogram

- 9:00 DEXAMETAZONEM INDUKOVATELNÝ TRANSKRIPČNÍ AKTIVAČNÍ SYSTÉM (Markéta Šámalová, 334)
Výměna etanolu, uložení vzorků na 4 °C
- 9:15 TEORETICKÝ ÚVOD KE qPCR (Markéta Žďárská), laboratoř 334
- 9:30 PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU, NAPIPETOVÁNÍ VZORKŮ, ELEKTROFORÉZA (skupina 1-3, laboratoř 333) / PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ PŘÍMKY A VZORKŮ PRO ANALÝZU POMOCÍ qPCR (skupina 4-6, laboratoř 334, 329) (Markéta Žďárská)
- 10:45 PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU, NAPIPETOVÁNÍ VZORKŮ, ELEKTROFORÉZA (skupina 4-6, laboratoř 333) / PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ PŘÍMKY A VZORKŮ PRO ANALÝZU POMOCÍ qPCR (skupina 1-3, laboratoř 334, 329) (Markéta Žďárská)
- 12:00 IDENTIFIKACE PCR PRODUKTŮ V AGARÓZOVÉM GELU (laboratoř 333) (Markéta Žďárská)
- 12:30 OBĚD
- 14:00 qPCR vyhodnocení (Markéta Žďárská)
- 16:00 UKONČENÍ PROGRAMU 3. DNE

Přehled metod

1. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu
2. Detekce fragmentů v UV světle
3. qPCR

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

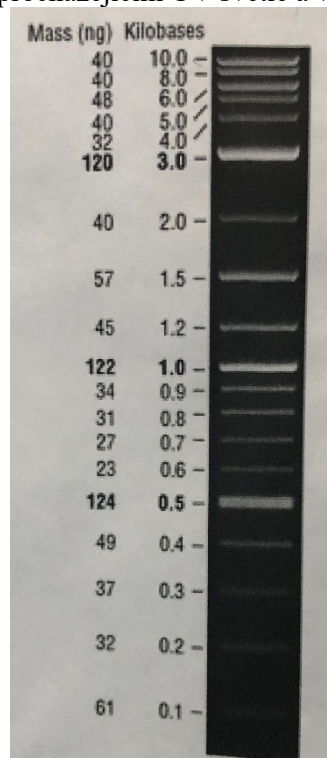
TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Genotypování pomocí PCR 2

Příprava agarózového gelu, elektroforéza PCR produktů a jejich detekce.

1. Připravit 400 ml 1,5% agarózy v 1x TBE pufru a rozvařit. Po rozpuštění agarózy přidat MidoriGreen, která 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 pufrům a vyjmout hřeben.
4. Napipetovat délkový a hmotnostní standard a vzorky:
 - délkový a hmotnostní standard (2-Log): 1 μ g
 - vzorky: 10 μ l PCR + 2 μ l 6x konc. nanášecího pufru
5. Spustit elektroforézu při 80 V po dobu 60 min.

Pozorovat proužky DNA v procházejícím UV světle a výsledek elektroforézy dokumentovat.



Délkový a hmotnostní standard: 2-Log DNA ladder (0,1 – 10,0 kb; 1 μ g)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Analýza genové exprese pomocí qPCR

Příprava kalibrační přímky pro qPCR a analýza genové exprese ARR5

Real-time PCR je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR) přímo během reakce (tzv. „v reálném čase“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace. Real-time PCR se provádí s pomocí přístrojů zvaných **cyklery**, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR.

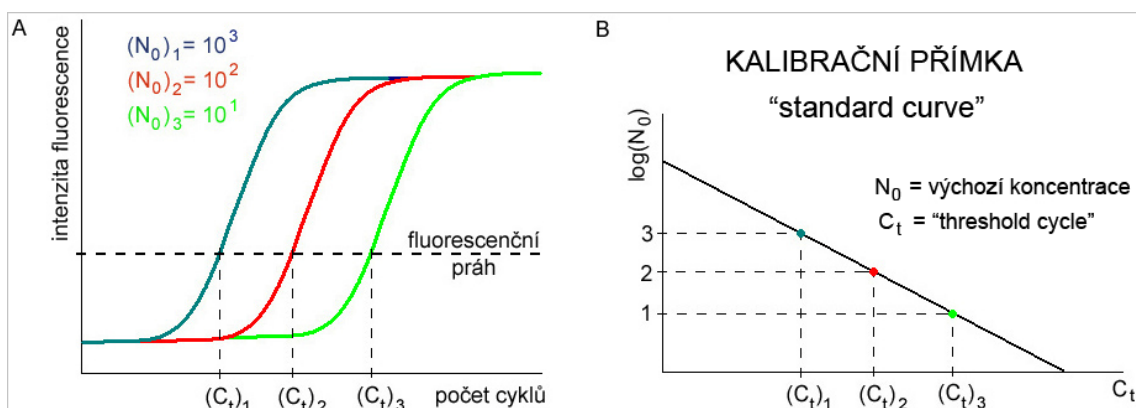
Real-time PCR kvantifikace

Používané matematické modely pracují s hodnotou zvanou C_T („threshold cycle“), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí zmíněný fluorescenční práh umístěný do počátku exponenciální fáze reakce.

Absolutní kvantifikace, která se používá např. při detekci specifických mikroorganismů, přímo určuje výchozí počet kopií cílových molekul. Je založena na zjištění, že existuje lineární vztah mezi logaritmem výchozího počtu kopií templátové DNA a C_T příslušné amplifikační křivky. Pokud tedy amplifikujeme vzorek o neznámé koncentraci společně s diluční sérií standardů o známé koncentraci, získáme kalibrační přímku („standard curve“), ze které lze odečíst výchozí koncentraci neznámého vzorku.

Relativní kvantifikace, která se používá ke stanovení míry genové exprese, zpravidla nevyžaduje sestavení kalibrační přímky. Porovnává se relativní změna genové exprese (*relativní expresní poměr*) v testovaném vzorku oproti kontrolnímu vzorku, kterým může být např. mRNA neovlivněných buněk a pod. C_T amplifikační křivky daného genu se vždy normalizuje oproti C_T tzv. housekeeping genu.

Při **kvantifikaci mRNA** (*měření genové exprese*) se před vlastní PCR provádí reverzní transkripce - prepis mRNA do tzv. cDNA (RT), která je následně amplifikována pomocí PCR (RT qPCR).





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

1. Připravte master mix (MM) pro **kalibrační přímku** genu *Q10/ARRx* a k MM vždy přidejte 4 μ l cDNA nebo neg. kontrolu.

Celkový objem qPCR mixu pro 1 reakci je 20 μ l, která obsahuje 16 μ l MM a 4 μ l cDNA nebo 4 μ l neg. kontroly. Pro kalibrační přímku si připravte cDNA s ředěním 1x, 10x, 100x, 1000x a 10000x. Každou reakci připravte pro danou cDNA 2x ~ 2 technická opakování.

MM pro 1 reakci/16 μ l (na 1 vzorek cDNA/4 μ l)

- a. 10 μ l Fast SYBR Green Master
- b. 0.6 μ l primer F
- c. 0.6 μ l primer R
- d. 4.8 μ l H₂O

Připravte MM pro reakcí (.... vzorků cDNA),

- a. μ l Fast SYBR Green Master
- b. μ l primer F
- c. μ l primer R
- d. μ l H₂O

2. Připravte master mix (MM) pro analýzu **exprese genu** *Q10/ARRx* v daných dvou vzorcích a k MM vždy přidejte 4 μ l cDNA nebo neg. kontrolu.

Celkový objem qPCR mixu pro 1 reakci je 20 μ l, která obsahuje 16 μ l MM a 4 μ l cDNA nebo 4 μ l neg. kontroly. Každou reakci připravte pro danou cDNA 3x ~ 3 technická opakování.

MM pro 1 reakci/16 μ l (na 1 vzorek cDNA/4 μ l)

- a. 10 μ l Fast SYBR Green Master
- b. 0.6 μ l primer F
- c. 0.6 μ l primer R
- d. 4.8 μ l H₂O

Připravte MM pro reakcí (.... vzorků cDNA),

- a. μ l Fast SYBR Green Master
- b. μ l primer F
- c. μ l primer R
- d. μ l H₂O

3. **qPCR analýza pomocí přístroje QIAGEN Rotor-Gene® Q + vyhodnocení**

Cyklus pro *Q10/ARRx*:

95°C 7 min

.... cyklů:

95°C 15 s

56°C 30 s

72°C 20 s

72°C 1 min



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Šablona k protokolům: **qPCR**

Jméno:

Datum:

Popis výsledků:

Závěr:



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

DEN 4

BUNĚČNÉ LOKALIZACE PROTEINŮ

Úvod

Schopnost interagovat s dalšími proteiny je jednou ze základních charakteristik bílkovin jakožto základního kamene živých organismů. Protein-proteinová interakce je nutným předpokladem i pro přenos informace v signálních drahách. Informace se obvykle předává v podobě fosfátové skupiny mezi kinázou a jejím proteinovým substrátem, který je specificky rozpoznáván, anebo je prostřednictvím protein-proteinové interakce přímo ovlivňována aktivita interakčního partnera. Jednou z prvních otázek, které si klademe při funkční analýze genů signálních drah, je ta, se kterými dalšími signálními elementy studovaný protein interaguje. Další důležitou otázkou je, ve kterém buněčném kompartmentu je protein lokalizován, případně ve kterém buněčném kompartmentu spolu dva proteiny interagují. S použitím transienční exprese proteinů po infiltraci listů tabáku *Nicotiana benthamiana* suspenzí *Agrobacterium tumefaciens* a s pomocí skenovací laserové konfokální mikroskopie, můžeme tyto otázky zodpovědět.

Časový harmonogram

8:30 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE I, skupiny 1-3 (Markéta Šámalová), laboratoř 334
/ ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE I, skupiny 4-6 (Jan Hejátko)

11:30 OBĚD

12:30 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE II, skupiny 4-6 (Markéta Šámalová), laboratoř 334
/ ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE II, skupiny 1-3 (Jan Hejátko)

15:30 AUTOMATICKÁ MIKROSKOPIE (Jan Hejátko)

16:00 UKONČENÍ PROGRAMU 4. DNE

Přehled metod

1. Konfokální mikroskopie
2. Automatická mikroskopie

Transientní exprese v tabáku 2

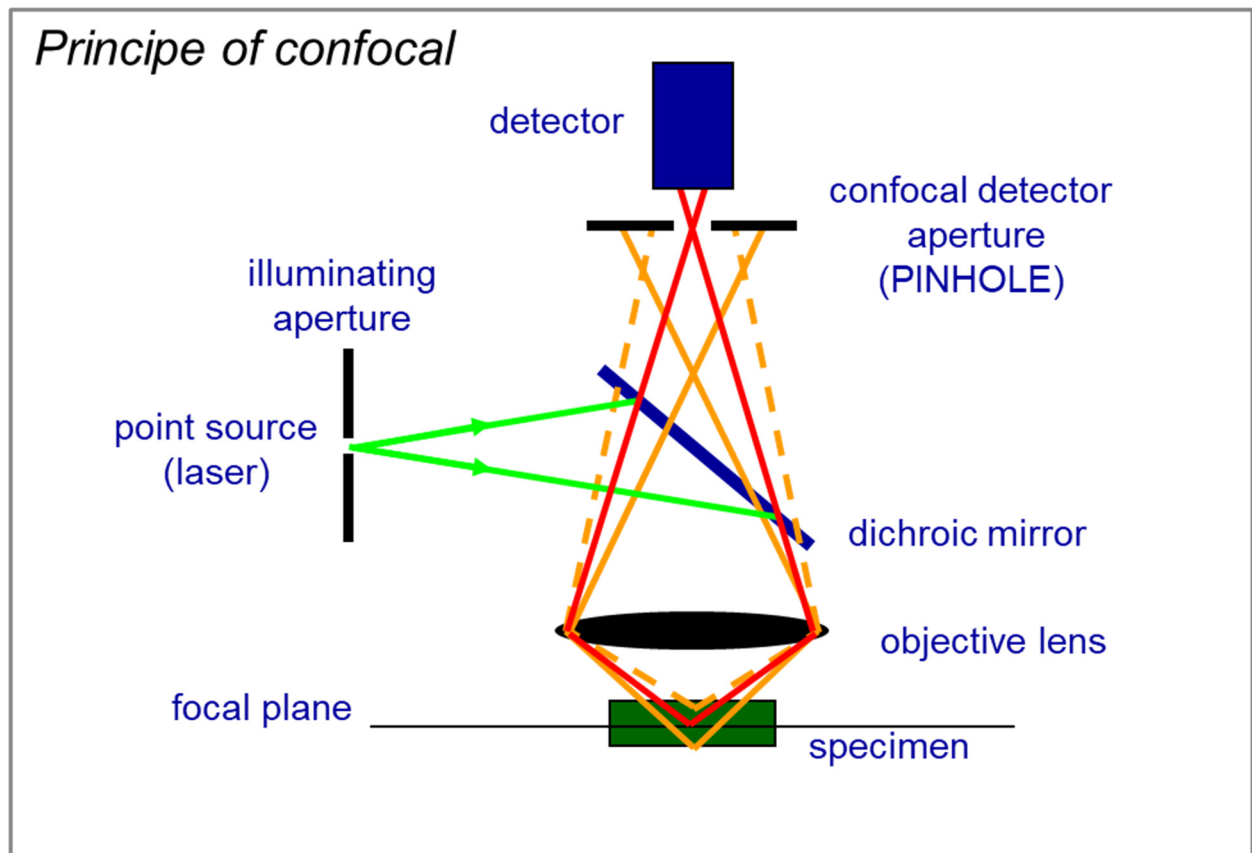
Rastrovací konfokální mikroskopie (Confocal laser-scanning microscopy, CLSM)

Jedná se mikroskopickou metodu umožňující snímat fluorescenční signál s velmi vysokým rozlišením. Jako bodového zdroje excitačního světla používáme lasery o různé vlnové délce. Laserový paprsek prochází konfokální clonkou a prostřednictvím objektivu je fokusován do malého bodu na preparátu, kde dojde k excitaci fluorescenčních barviček, nebo proteinů. Emitovaná fluorescence

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

prochází zpět objektivem a skrze další konfokální clonku (pinhole) na fotonásobič, kde je světelný signál převeden na elektrické impulsy. Konfokální clonka zajišťuje, že se na detektor dostane pouze světlo z excitovaného bodu v rovině ostrosti použitého objektivu. Světlo přicházející z oblastí nad a pod rovinou ostrosti je clonkou odfiltrováno. Posunu ohniska skrz celé zorné pole objektivu je dosaženo plynulým pohybem zrcátka skenovacího zařízení. Protože rychlost jeho pohybu je mnohem nižší než rychlost světla, jsme schopni pomocí softwaru zrekonstruovat obraz s vysokým rozlišením a zobrazit ho na monitoru počítače.



Buněčné lokalizace proteinů

1. Připravte si 100 μ l pipetu, destilovanou vodu, krycí a podložní sklíčka, která popište.
2. Na střed podložního sklíčka kápněte 100 μ l vody.
3. Z listu tabáku infiltrovaného v pondělí vystříhnete přibližně čtvercový tvar o ploše 1-2 cm^2 a umístíte ho na kapku tak, aby spodní strana listu směřovala vzhůru.
4. Na spodní stranu listu naneste 100 μ l kapku vody, přiklopte krycím sklíčkem.
5. Jemným poklepáním zajistíte dosednutí krycího sklíčka a odstraníte vzduchové bubliny.
6. Zpevněte sklíčka k sobě pomocí lepicí pásky.
7. S připravenými preparáty se přesuňte ke konfokálnímu mikroskopu.
8. Pomocí rastrovací konfokální mikroskopie sledujte fluorescenční signál a jeho lokalizaci uvnitř buněk.
9. Vyhodnoťte výsledky pozorování a vypracujte protokol, ve kterém zpracujete všechny body uvedené v šabloně.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Šablona k protokolům: Analýza buněčné lokalizace pomocí fluorescenčních reportérů

Jméno: (uved'te rovněž číslo své skupiny):

Datum:

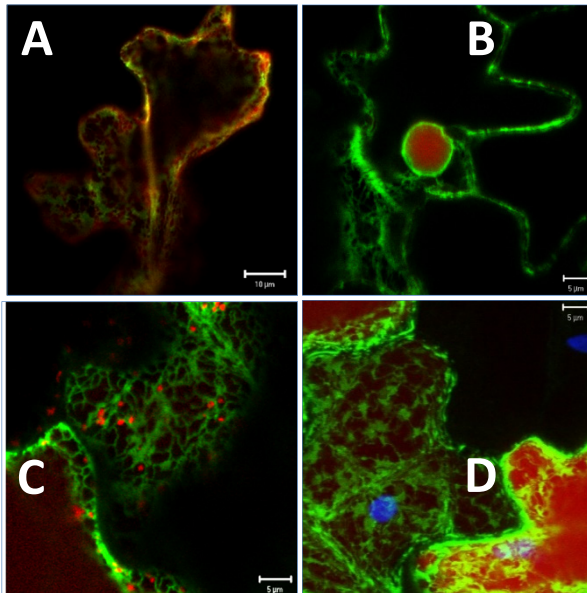
Cíl:

Úloha:

Jaké buněčné kompartmenty (zelené and červené) vidíte na obrázku A-D?

Který z 2A konstruktů použila vaše skupina?

(ST_NRFP-2A-GFP_{HDEL}, YFP-2A-GFP_{HDEL}, nlsRFP-2A-GFP_{HDEL})



Postup:

Uved'te stručný popis postupu při infiltraci tabákových listů (viz. Metoda Transientní exprese v tabáku 1). Proč je součástí infiltračního média acetosyringon?

Závěr:

Vyhodno'te interakce a lokalizace proteinů, které vaše skupina zkoumala a shrňte výsledky kolegů z dalších dvou skupin.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Analýza genové exprese pomocí transkripční fúze 3 a Dexametazonem indukovatelný transkripční aktivační systém 2

Příprava preparátů pro automatickou mikroskopii

Proveďte projasnění odbarvených semenáčků podle následujícího protokolu:

- 1) Opatrně odpipetujte 80% etanol a přidejte 1 ml 0,25M HCl / 20% MetOH, inkubace 15min při 53 °C⁴. Roztok opatrně odsát pipetou.
- 2) 1 ml 7% NaOH / 60% EtOH, inkubace 15 min při rt⁵. Roztok opatrně odsát pipetou.
- 3) 1 ml 40% EtOH, 10 min, rt.
- 4) Přidejte 1 ml H₂O = 20% EtOH, 10 min, rt. Roztok odsát.
- 5) 1 ml 10% EtOH, 10 min, rt.
- 6) +1 ml 50% glycerolu = 5% EtOH / 25% glycerol, 15-30min, rt (on, 4 °C). Roztok odsát.
- 7) 1 ml 50% glycerol.

Analýza genové exprese pomocí transkripční fúze 4 a Dexametazonem indukovatelný transkripční aktivační systém 3

Automatická mikroskopie

- 1) Vložte preparáty do automatického mikroskopu a nechte snímat pře noc.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

DEN 5

8:00 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE (Jan Hejátko) /
DEXAMETAZONEM INDUKOVATELNÝ TRANSKRIPČNÍ AKTIVAČNÍ SYSTÉM
5. Vyhodnocení výsledků automatické mikroskopie

10:00 kolokvium (C2/2.11)