

ÚVOD

Tento učební text je určen posluchačům Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně, kteří si zapsali cvičení „Biotechnologie léčiv“ nebo cvičení „Speciální praktikum z farmakogenomiky“, případně seminář „Metody molekulární biologie“ a všem ostatním studentům, kteří mají zájem se seznámit s praktickými aplikacemi biotechnologií ve farmaceutických oborech. Skripta budou využita také při vypracování diplomových prací na ústavech Farmaceutické fakulty Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Cílem skript je poskytnout návody k vybraným praktickým aplikacím a metodám užívaným v základním i aplikovaném výzkumu při vývoji molekulárních diagnostických metod a výrobě biotechnologických preparátů.

Jelikož se jedná o návody, ke konkrétním úlohám, které budou studenti provádět přímo v rámci praktických cvičení, je text, kromě v literatuře obvykle podávaných informací, doplněn i řadou praktických poznámek blíže osvětlujících provedení jednotlivých částí úlohy.

Na druhé straně je však řada kroků v pracovních postupech formulována tak, aby návod vedl studenty k jejich promyšlení a dopracování. Je proto nutné text v rámci přípravy důkladně prostudovat, vyhledat příslušné veličiny pro výpočet doplňkových příkladů a podrobně promyslet jednotlivé kroky návodu.

Pro úspěšné zvládnutí jak teoretických základů, tak i praktického provedení metody je nutné vždy prostudovat všechny pasáže příslušející k dané úloze. Nezbytnou podmínkou je také účast na příslušných přednáškách z „Biotechnologie léčiv“ a „Farmakogenomiky“ nebo na semináři „Metody molekulární biologie“. Co se týče znalostí a dovedností požadovaných pro provedení té které metody, jsou dosavadní laboratorní návyky studentů postačující. Pokud jsou v metodě používány speciální přístroje (například termocykler), budou studentům nezbytné kroky pro jejich ovládnutí vysvětleny přímo v laboratoři.

Metody uvedené ve skriptu jsou voleny a upraveny tak, aby jejich rozhodující část bylo možné zvládnout v rámci tří vyučovacích hodin. Proto jsou některé kroky oproti běžně používaným postupům při vědecko-výzkumné práci zjednodušeny a zkráceny.

OBSAH

Informační panel A – Tabulka standardního genetického kódu	4
Informační panel B – Základní data o nukleových kyselinách a proteinech.....	5
Cvičení č. 1 Izolace genomové DNA z krve	6
Cvičení č. 2 Izolace genomové DNA z rostlinných buněk	10
Cvičení č. 3 Izolace plasmidové DNA	14
Cvičení č. 4 Odhad koncentrace a čistoty DNA na agarózovém gelu.....	18
Cvičení č. 5 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky	22
Cvičení č. 6 Restrikční štěpení plasmidové DNA	24
Cvičení č. 7 Stanovení genetické modifikace ac2 u <i>Solanum tuberosum</i>	28
Cvičení č. 8 Detekce delece $\Delta 32$ v receptoru CCR5 metodou PCR	32
Cvičení č. 9 Detekce delece v genu pro angiotensin konvertující enzym metodou PCR	36
Cvičení č. 10 Detekce polymorfismu K469E v genu ICAM1	40
Cvičení č. 11 Detekce polymorfismu 1007fs v genu NOD2.....	44
Cvičení č. 12 Detekce polymorfismu v genu pro TMPT (thiopurin S-methyl transferáza) metodou real-time PCR.....	48
Cvičení č. 13 Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu	52
Cvičení č. 14 Izolace DNA z agarózového gelu.....	56
Cvičení č. 15 Izolace RNA z myší tkáně.....	58
Cvičení č. 16 Zpětná transkripce a příprava cDNA genu pro G3PDH.....	62
Cvičení č. 17 Příprava rekombinantního genu pro lidský leptin amplifikací.....	66
Cvičení č. 18 Simultánní štěpení amplikonu a vektoru	70
Cvičení č. 19 Ligace vektoru a naštěpené DNA.....	74
Cvičení č. 20 TA klonování amplifikačních produktů	78
Cvičení č. 21 Transformace bakteriálních buněk <i>Escherichia coli</i>	82
Cvičení č. 22 Exprese rekombinantního proinsulinu	88
Cvičení č. 23 Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	92
Cvičení č. 24 Western Blot.....	98
Cvičení č. 25 Výsledky příkladů	101

Informační panel A – Tabulka standardního genetického kódu

kodony					
první nukleotid	druhý nukleotid				třetí nukleotid
	U	C	A	G	
U	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	U
	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	C
	Leu (L)	Ser (S)	terminace	terminace nebo SeCys	A
	Leu (L)	Ser (S)	terminace	Trp (W)	G
C	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	U
	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	C
	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	A
	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	G
A	Ile (I)	Thr (T)	Ans (N)	Ser (S)	U
	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	C
	Ile (I)	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	A
	Met nebo iniciace	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	G
G	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	U
	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	C
	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	A
	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	G

Tučně jsou vyznačeny kodónové rodiny

Informační panel B – Základní data o nukleových kyselinách a proteinech

Počet částic v jednom molu = $6,023 \times 10^{23}$

Průměrná molekulová hmotnost páru bazí v DNA = 650

Průměrná molekulová hmotnost bazí v RNA = 360

Průměrná molekulová hmotnost aminokyseliny = 110

Pro dsDNA když $A_{260} = 1,0$ v 1 cm kyvetě, pak koncentrace dsDNA = $50 \mu\text{g/ml} = 0,15 \text{ mM}$

Pro ssDNA když $A_{260} = 1,0$ v 1 cm kyvetě, pak koncentrace ssDNA = $33 \mu\text{g/ml} = 0,10 \text{ mM}$

Pro ssRNA když $A_{260} = 1,0$ v 1 cm kyvetě, pak koncentrace ssRNA = $40 \mu\text{g/ml} = 0,11 \text{ mM}$

Molekulová hmotnost dsDNA = (počet bp) x 650

Počet molů konců dsDNA = $2 \times (\text{hmotnost DNA v gramech}) / (\text{molekulová hmotnost})$

Počet molů konců vytvořených restrikcí štěpení

a) kružnicová DNA = $2 \times (\text{moly DNA}) \times (\text{počet štěpných míst})$

b) lineární DNA = $2 \times (\text{moly DNA}) \times (\text{počet štěpných míst}) + 2 \times (\text{moly DNA})$

$1 \mu\text{g}$ DNA o délce 1 000 bp = $1,5 \text{ pmol} = 9,1 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA plasmidu pUC18/19 (délka 2 686 bp) = $0,57 \text{ pmol} = 3,4 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA plasmidu pBR322 (délka 4 361 bp) = $0,35 \text{ pmol} = 2,1 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA fága M13mp18/19 (délka 7 249 bp) = $0,21 \text{ pmol} = 1,3 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA fága λ (délka 48 502 bp) = $0,03 \text{ pmol} = 1,8 \times 10^{10}$ molekul

1 pmol DNA o délce 1 000 bp = $0,66 \mu\text{g}$

1 pmol DNA plasmidu pUC18/19 (délka 2 686 bp) = $1,77 \mu\text{g}$

1 pmol DNA plasmidu pBR322 (délka 4 361 bp) = $2,88 \mu\text{g}$

1 pmol DNA fága M13mp18/19 (délka 7 249 bp) = $4,78 \mu\text{g}$

1 pmol DNA fága λ (délka 48 502 bp) = $32,01 \mu\text{g}$

DNA o délce 1,0 kb má kódovací kapacitu 333 aminokyselin = protein o $M = 37\,000$

Protein o $M = 10\,000$ může být kódován DNA o velikosti 270 bp

Protein o $M = 50\,000$ může být kódován DNA o velikosti 1,55 kb

Izolace genomové DNA z krve

(cvičení č. 1)

Úvodní slovo

Metody izolace DNA sestávají obecně ze tří základních kroků:

- 1) Odbourání buněčné stěny a membrány, neboli lyze buněk
- 2) Oddělení DNA od ostatních nízké a vysokomolekulárních struktur
- 3) Úprava vzorku a jeho uchování

Při izolaci DNA ze živočišných buněk odpadá odbourávání buněčné stěny, což je naopak krok nejobtížnější například u rostlin či hub nebo u některých bakterií. Každé rozrušení buněčných stěn a membrán však musí být provedeno šetrně tak, aby docházelo k co nejmenšímu poškození nukleových kyselin. K lyzi buněk lidské krve postačuje působení detergentů, z nichž nejčastěji se používá dodecylsulfát sodný (SDS).

Odstranění proteinů se provádí působením proteáz, v některých laboratořích ještě dnes již poněkud zastaralé metody vytřepávání ve směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Ribonukleové kyseliny, které se v ethanolu nebo izopropanolu srážejí spolu s DNA, lze odstranit působením enzymu RNázy. Je možné též použít diferenciální precipitace v chloridu litném. Dodatečná purifikace může zahrnovat dělení nukleových kyselin na hydroxyapatitu nebo usazování jejich v gradientu chloridu cesného. Moderní metody purifikace DNA zahrnují použití různých sorbentních materiálů, které váží makromolekuly s různou afinitou. Tyto techniky jsou pak užívány ve většině dostupných komerčních souprav.

Ke krátkodobému uchování izolované DNA postačují teploty 4-8 °C, po dobu několika měsíců je možné DNA skladovat při -20 °C, k dlouhodobému uchovávání se doporučuje teplota -80 °C. Jako skladovací médium slouží voda, TE pufr nebo může být DNA uchovávána po vysrážení v 70% ethanolu.

Komerční souprava společnosti QIAGEN (QiaQuick Blood DNA Isolation Kit), která bude použita v tomto cvičení, je určena pro izolaci DNA z různých tělních tekutin. Je založena na principu vysoce účinné lyze proteázou, sarkosylem a chaotropními ionty. Uvolněná DNA je poté vázána na sorbentní materiál, ze kterého je po pročištění uvolněna působením roztokem s vysokou iontovou silou. Soupravou je možno z 200 µl plné krve získat 3-12 µg DNA. Spolu s DNA je současně izolována i RNA. Ta může interferovat v některých následných reakcích, ale není tomu tak při polymerázové řetězové reakci (PCR). Je-li pro další zpracování izolátu nutné odstranit RNA, je to možné provést působením RNázy A, která je součástí výše uvedené soupravy.

Cíl cvičení

Izolovat chromosomální DNA ze vzorku lidské krve.

Seznam přístrojů

- vodní lázeň nebo suchý blok
- třepačka Vortex
- centrifuga na 1,5ml mikrozkušavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)
- pikofuga na 1,5ml mikrozkušavky s otáčkami do 6 000 rpm
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 µl
- kuchyňské minutky

Vlastní pracovní postup

Odběr krve

Krev musí být odebrána do média, které obsahuje protisrážlivé látky, např. citrónan sodný nebo EDTA. Není možné použít heparin, který inhibuje PCR !

Než začnete izolaci

- nastavte teplotu ve vodní lázni nebo suchém bloku na 56 °C,
- vzorky krve temperujte na laboratorní teplotu (15 až 25 °C), při které probíhá izolace,
- otevřete krabičku s komerční soupravou a zkontrolujte neporušenost lahvíček
- vytemperujte pufr AE na laboratorní teplotu,
- připravte pufr AW1, AW2 a Proteázu podle instrukcí uvedených na příslušných lahvičkách,
- zkontrolujte pufr AL, případnou sraženinu rozpusťte při 56 °C.

Bezpečnostní opatření!

- po celou dobu izolace mějte nasazené jednorázové plastové rukavice, protože pracujete s potenciálně infekčním materiálem,
- dodržujte pravidla bezpečnosti práce předepsaná pro laboratoř,
- jakékoli zranění hlase vedoucímu cvičení.

Vlastní izolace

- 1) Na dno 1,5 ml mikrozkušavky napipetujte 20 µl QIAGEN Proteázy.
- 2) Přidejte 200 µl plné krve, plasmy, séra nebo jiné tělní tekutiny nebo asi 5×10^6 lymfocytů.
- 3) *Pokud je třeba odstranit RNA, přidejte 4 µl roztoku „RNase A stock solution“ (Koncentrace 100 mg/ml).*
- 4) Přidejte 200 µl pufru AL a dobře promíchejte vortexováním po dobu 15 s. Výsledná směs musí být homogenní, aby byla zajištěna dostatečná lyze buněk ve vzorku.
- 5) Inkubujte homogenát při 56 °C po dobu 10 min. V tomto kroku dochází k dokonalému rozložení všech buněčných struktur ve vzorku.
- 6) Zkušavku krátce centrifugujte na pikofuze, aby došlo k sedimentaci na víčku sražených vodních kapek. Mohly by způsobit kontaminaci vzorku při otevírání zkušavky.
- 7) Ke vzorku přidejte 200 µl ethanolu (96 - 100%) a dobře promíchejte vortexováním po dobu 15 s. Poté opět směs krátce centrifugujte na pikofuze, aby došlo k sedimentaci tekutiny usazené na víčku. Po přidání ethanolu dochází k vysrážení nukleových kyselin.
- 8) Přeneste směs na kolonku „QIAamp Spin Column“, která obsahuje sorbentní materiál pro zachycení vysrážené DNA. Kolonka je opatřena 2,0 ml sběrnou zkušavkou. Dávejte pozor, abyste se rukavicemi, špičkou pipety nebo jinak nedotkli okraje kolonky, mohli byste si zkontaminovat vzorek. Uzavřete kolonku víčkem a centrifugujte při 6 000 g (asi 8 000 rpm) po dobu 1 minuty. Při centrifugaci musí být kolonka uzavřena víčkem pro zabránění vzniku aerosolu.
- 9) Po centrifugaci odstraňte zkušavku s filtrátem a přeneste kolonku do nové čisté 2,0ml zkušavky.
- 10) Opatrně otevřete kolonku a napipetujte 500 µl pufru AW1 aniž byste se dotkli okraje kolonky. Uzavřete kolonku víčkem a centrifugujte při 6 000 g (asi 8 000 rpm) po dobu 1 min. Pufr AW1 obsahuje ethanol, který zabrání uvolnění vysrážené DNA z filtru, ostatní příměsi jsou pufr AW1 z filtru vymývány.
- 11) Po centrifugaci odstraňte zkušavku s filtrátem a přeneste kolonku do nové čisté 2,0 ml zkušavky.

- 12) Opatrně otevřete kolonku a napipetujte 500 µl pufru AW2 aniž byste se dotkli okraje kolonky. Uzavřete kolonku víčkem a centrifugujte při maximálních otáčkách (20 000 g, asi 14 000 rpm) po dobu 3 min. Pufr AW2 obsahuje podobně jako pufr AW1 ethanol, který zabrání uvolnění vysrážené DNA z filtru, ostatní příměsi jsou pufrem AW2 z filtru vymývány.
- 13) Po centrifugaci odstraňte zkumavku s filtrátem a přeneste kolonku do další nové čisté 2,0 ml zkumavky a ještě jedenkrát centrifugujte při maximálních otáčkách (20 000 g, asi 14 000rpm) po dobu 1 min. Centrifugací dojde k vysušení kolonky a k dokonalému odstranění pufru AW2, jehož zbytky by mohly v následujícím kroku kontaminovat izolát DNA a poté interferovat při následných manipulacích s DNA.
- 14) Po centrifugaci odstraňte zkumavku s filtrátem a kolonku umístěte do nové čisté 1,5 ml mikrozukavky.
- 15) Opatrně otevřete kolonku a napipetujte 200 µl elučního pufru AE, inkubujte při laboratorní teplotě po dobu 1 min. a poté centrifugujte při 6 000 g (asi 8 000 rpm) po dobu 1 min. V tomto kroku dojde k uvolnění DNA z filtru, a ta se objeví v roztoku na dně zkumavky. Odstraňte kolonku, uzavřete 1,5ml mikrozukavku a popište ji, obsahuje vámi izolovanou DNA.
- 16) Uskladněte izolovanou DNA při -20 °C. Její koncentraci je možné změřit na spektrofotometru a opticky zkontrolovat elektroforézou v agarózovém gelu. Poté může být použita k dalším manipulacím, například k provedení PCR.

Další informace k této problematice najdete v

Marmur 1961: A procedure for isolation of DNA from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3, 208-218.

Jedná se o první článek, ve kterém jsou popsány základní principy izolace DNA.

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Jedná se o laboratorní manuál, ve kterém jsou popsány základní metody molekulární biologie.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jestliže v jednom mililitru lidské krve je obsaženo přibližně 4 až 10 milionů leukocytů, kolik μg DNA je možno maximálně izolovat z 200 μl plné krve? Přitom jeden leukocyt obsahuje DNA o celkové délce 3,2 miliardy bp, a že průměrná molekulová hmotnost jednoho bp je 650.
- 2) Jakou hmotnost má lidský chromozóm č. 3, u něhož bylo zjištěno celkem 206,7 milionu párů nukleotidů?
- 3) Kolik molekul lidského chromozómu č. 1 by bylo obsaženo v 1 μg DNA? Délka tohoto největšího lidského chromozómu je přitom přibližně 223,7 milionu párů nukleotidů.
- 4) Jak dlouhý je v lineárním stavu lidský chromozóm č. 1? Připomeňme si, že vzdálenost mezi dvěma páry bazí je 0,34 nm.

Izolace genomové DNA z rostlinných buněk (cvičení č. 2)

Úvodní slovo

Při izolaci DNA z rostlinných buněk je zapotřebí kompletní a rychlé rozbití výchozího materiálu. To zajistí vysoké výtěžky DNA a její degradaci působením vnitrobuněčných nukleáz. K izolaci DNA je možno použít jakýkoli rostlinný materiál, nejvhodnější jsou však měkké tkáně, zejména rychle rostoucí klíčky rostlin, které obsahují velké množství genetického materiálu, mají méně polysacharidů a polyfenolů a buňky mají tenké buněčné stěny.

Rozbití buněčné stěny rostlinných buněk se provádí zpravidla mechanicky třením tkáně v třecí misce s přídavkem čistého mořského písku, použitím různých typů homogenizátorů nebo působením nárazů při protřepávání tkáně se skleněnými kuličkami (doporučený průměr kuliček je 5 mm). Existují také metody při kterých je buněčná stěna rozrušena působením celulolytických enzymů.

Mechanickou homogenizaci rostlinné tkáně je možné provést buďto v čerstvém stavu nebo po jejím zmrazení v tekutém dusíku. Po homogenizaci je materiál zpracován enzymy nebo chemikáliemi podobně jak je to uvedeno v návodu ke cvičení č. 1.

Komerční souprava společnosti QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit), která bude použita v tomto cvičení, je určena pro izolaci DNA ze všech typů rostlinných tkání včetně tvrdých semen a pro izolaci DNA z hub. Umožňuje izolaci až ze 20 mg suchého materiálu nebo 100 mg čerstvých tkaniv. Uvolněná genomová, mitochondriová a chloroplastová DNA je vázána na sorbentní materiál, ze kterého je po pročištění uvolněna působením roztoku s nízkým obsahem solí nebo vodou. Izolovaná DNA je fragmentovaná na úseky o velikosti až 40 kbp, převážně ale na fragmenty o velikosti 20-25 kbp. Maximální množství DNA, kterou lze tímto způsobem izolovat je 50 µg. Sorbentní materiál zajišťuje kompletní odstranění všech inhibitorů PCR a jiných enzymatických reakcí. DNA je použitelná pro PCR, RAPD, AFLP, RFLP, blotting, analýzu mikrosatelitní DNA, SNA-genotypizaci, real-time PCR.

Cíl cvičení

Izolovat celkovou DNA ze vzorku tkáně bramboru *Solanum tuberosum*.

Seznam přístrojů

- nádoba s tekutým dusíkem
- analytické váhy s přesností na mg
- třecí miska s tloučkem
- vodní lázeň nebo suchý blok
- nádoba s ledem
- třepačka Vortex
- centrifuga na 1,5ml mikrozkušavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)
- pikofuga na 1,5ml mikrozkušavky s otáčkami do 6 000 rpm
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 µl
- kuchyňské minutky
- referenční mikrozkušavka – zkušavka s vyznačenými objemy

Vlastní pracovní postup

Než začnete izolaci

- nastavte teplotu ve vodní lázni nebo suchém bloku na 65 °C,
- otevřete krabičku s komerční soupravou a zkontrolujte neporušenost lahvíček,
- vytemperujte pufr AE na laboratorní teplotu,
- pufr AW a AP3/E jsou dodávány jako koncentráty. Před prvním použitím k nim přidejte ethanol (96%) v množství předepsaném výrobcem,
- zkontrolujte pufr AP1 a AP3/E (před přidáním ethanolu), případnou sraženinu rozpust'ete při 65 °C. Po přidání ethanolu už není možno pufr AP3/E zahřívát !

Příprava rostlinného materiálu

- Pokud máte jako výchozí materiál čerstvé listy, pak je nastříhejte na co nejmenší části a navažte 100 mg do třecí misky
- Pokud jsou výchozím materiálem pro izolaci bramborové hlízy, resp. klíčky z hlíz, pak skalpelem nařežte a navažte 100 mg materiálu do třecí misky
- V případě suchého materiálu navažte pouze 20 mg vzorku

Pokud odeberete větší množství materiálu, nebude lyze účinná a výtěžek DNA bude oproti vašemu očekávání nižší. Menší odebrané množství znamená, že kapacita sorbentního materiálu nebude využita. Odebraný materiál můžete zmrazit v tekutém dusíku a skladovat při -80 °C. Podobně je možno při této teplotě skladovat i vzorky rostlinného materiálu v suchém stavu. Pokud chcete vzorky uchovávat při laboratorní teplotě 15-25 °C, pak musí být do 24 hodin po odebrání lyofilizovány.

Bezpečnostní opatření!

- pozor na tekutý dusík, jeho teplota je -195,8 °C ! Při manipulaci s ním použijte ochranné rukavice,
- po celou dobu izolace mějte nasazené jednorázové plastové rukavice, nukleázy z vašich rukou by mohly zničit izolovanou DNA,
- dodržujte pravidla bezpečnosti práce předepsaná pro laboratoř,
- jakékoli zranění hlase vedoucímu cvičení.

Vlastní izolace

- 1) Rozdrťte rostlinnou tkáň v tekutém dusíku za použití třecí misky s tloučkem.
- 2) Přeneste homogenizovanou tkáň do 1,5ml mikrozkušavky a nechejte tekutý dusík odpařit. Dříve než se tkáň rozpustí přejděte rychle k dalšímu kroku.
- 3) K homogenátu nepipetujte 400 µl pufru AP1 (obsahuje detergenty) a 4 µl roztoku RNázy A (100 mg/ml).
- 4) Intenzívně vortexujte. Ve zkumavce nesmíte vidět žádné shluky buněk, ty by v dalších krocích nebylo možno dobře zlyzovat v důsledku čehož byste získali menší množství DNA. Shluky buněk můžete rozbít také opakovaným protahováním suspenze špičkou pipety.
- 5) Inkubujte směs v suchém bloku při teplotě 65 °C po dobu 10 min. Během inkubace 2-3x promíchejte převrácením zkumavky. V tomto kroku dojde ke kompletní lyzi buněk.
- 6) Jestliže asi po 10 minutách inkubace nedošlo ke kompletní lyzi, centrifugujte lyzát při 20 000 g po dobu 5 min. a lyzát ve formě supernatantu přeneste do nové 1,5ml mikrozkušavky.
- 7) Přidejte 130 µl pufru AP2, promíchejte několikerým převrácením zkumavky a inkubujte 5 min. na ledu. V tomto kroku dojde k vysrážení detergentu, proteinů a polysacharidů.

- 8) Centrifugujte lyzát při 20 000 g po dobu 5 min. Některé druhy rostlinného materiálu tvoří velmi viskózní lyzáty a velká množství precipitátu. To má za následek lámání DNA v dalších krocích. Proto je vhodné odstranit sraženinu centrifugací.
- 9) Aplikujte lyzát na kolonku QIAshredder Mini Spin Column (má fialovou barvu) a centrifugujte při 20 000 g po dobu 2 min. Na kolonci dojde k zachycení většiny precipitátu a buněčných zbytků. Malé množství ale může protéct do jímací zkumavky, kde se usadí ve formě peletu na dně. Nezviřte tuto usazeninu během následujícího kroku.
- 10) Přeneste najímanou frakci do nové 1,5ml mikrozkuavky, aniž byste zviřili usazeninu. Zpravidla je možno odebrat 450 μ l lyzátu, objem změřte pomocí referenční mikrozkuavky.
- 11) Podle změřeného množství odebraného lyzátu přidejte 1,5 objemu pufru AP3/E a promíchejte pipetováním. Například ke 450 μ l odebraného lyzátu přidejte 675 μ l pufru AP3/E. V tomto kroku dochází působením ethanolu k vysrážení nukleových kyselin. Po smíchání může dojít ke vzniku sraženiny, která ale neovlivní další purifikační kroky.
- 12) Přeneste 650 μ l směsi z kroku 11) včetně případné sraženiny do kolonky DNeasy Mini Spin Column. Centrifugujte při více než 6 000 g po dobu 1 min. a odstraňte proteklou fázi. Jímací zkumavku použijte v dalším kroku. V tomto kroku se DNA naváže na membránu v kolonci.
- 13) Opakujte krok 12) se zbytkem lyzátu.
- 14) Umístěte kolonku DNeasy Mini Spin Column do nové jímací mikrozkuavky.
- 15) Do kolonky nalijte 500 μ l pufru AW, centrifugujte při více než 6 000 g po dobu 1 min. a odstraňte proteklou fázi. Jímací zkumavku použijte v dalším kroku.
- 16) Do kolonky nalijte 500 μ l pufru AW, centrifugujte při 20 000 g po dobu 2 min. Odstraňte proteklou fázi i jímací zkumavku. V tomto kroku dojde k vysušení membrány v kolonci. Vysušení membrány je nezbytné proto, aby byl odstraněn zbylý ethanol, který by interferoval s následnými reakcemi.
- 17) Umístěte kolonku DNeasy Mini Spin Column do nové jímací 1,5ml mikrozkuavky.
- 18) Do kolonky napipetujte 100 μ l pufru AE, pipetujte přímo na membránu.
- 19) Inkubujte při laboratorní teplotě (15-25 °C) po dobu 5 min. Tím dojde k nasycení membrány a uvolnění na ní navázané DNA.
- 20) Eluujte DNA centrifugací při více než 6 000 g po dobu 1 min. V tomto kroku dojde k uvolnění DNA z membrány. DNA se objeví v roztoku na dně zkumavky. Odstraňte kolonku, uzavřete 1,5ml mikrozkuavku a popište ji, obsahuje vámi izolovanou DNA.
- 21) Uskladněte izolovanou DNA při -20 °C.

Další informace k této problematice najdete v

QIAGEN 2004: DNeasy Plant Mini and DNeasy Plant Maxi Handbook. QIAGEN 01/2004.

Slater A., Scoty N. a Fowler M. 2003: Plant biotechnology. The genetic manipulation of plants. Oxford University Press.

Kontrolní otázky a příklady

1) Doplňte následující tabulku týkající se genomové DNA různých organismů

Organismus	Velikost DNA (bp)	Molární hmotnost	Hmotnost 1 molekuly	Počet molekul v 1 g
Člověk	$3,2 \times 10^9$			
<i>Drosophila</i>	$1,2 \times 10^8$			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,6 \times 10^7$			
<i>Escherichia coli</i>	$4,0 \times 10^6$			
Bakteriofág λ	48 514			
<i>Zea mays</i>	$3,9 \times 10^9$			

Poznámka

Molekulová hmotnost jednoho páru bazí M (1bp) = 660.

- 2) Genom buňky huseníčku, *Arabidopsis thaliana*, obsahuje v haploidní sadě $7,0 \times 10^7$ bazí. Jakou hmotnost má genom 100 000 diploidních buněk této rostliny ?
- 3) Jak dlouhý by byl chromozóm, který by obsahoval veškerou genomovou DNA tabáku (*Nicotiana tabacum*), která obsahuje $4,8 \times 10^9$ párů bazí? Připomeňme si, že vzdálenost mezi dvěma páry bazí je 0,34 nm.

Izolace plasmidové DNA (cvičení č. 3)

Úvodní slovo

Plasmidy jsou extrachromosomální kružnicové molekuly dvoušroubovicové DNA o velikostech 1 000 až 200 000 bp. Vyskytují se téměř ve všech bakteriálních rodech, jak gram pozitivních tak gram negativních, v kvasinkách i u některých vyšších eukaryot. Většinou jsou ale schopny se replikovat pouze v úzce vymezeném okruhu hostitelských buněk. Na rozdíl od chromozómů nesou pouze geny kódující druhotné znaky, např. rezistence k různým antibiotikům, které buňce pomáhají přežít za nestandardních podmínek. Jiné geny kódují rezistenci k toxickým látkám, produkci enterotoxinů, kolicinů, restričních a modifikačních enzymů, nebo schopnost degradovat komplexní organické sloučeniny. Plasmidy se replikují nezávisle na replikaci chromosomální DNA. Jejich replikační cyklus může, ale nemusí být s replikací bakteriálního chromozómu a s cyklem buněčného dělení synchronizován. V takovém případě může počet plasmidů v buňce dosáhnout až několika set kopií. Tyto plasmidy jsou vhodné pro genové inženýrství, protože mohou být z buněk izolovány ve velkých množstvích.

Všechny plasmidy, v současné době používané ke klonování, jsou oproti přirozeným plasmidům upravené. O tom, zdali je plasmid pro klonování vhodný, rozhoduje především velikost. Je-li plasmid malý, dokáže účinně transformovat buňku. Vedle toho musí být plasmid v buňce stabilní a vyskytovat se v buňce ve vysokém počtu kopií, což umožňuje dosáhnout dostatečně vysoký výtěžek.

Komerčně dostupné plasmidy používané v genovém inženýrství obsahují tři důležité sekvence:

a) **Počátek replikace**, místo *ori*, který je podmínkou produkce nových kopií. Kromě toho většina moderních plasmidů (ty, které se v buňce vyskytují v nízkém počtu kopií) nese také lokus *par*, který zajišťuje rozdělení jednotlivých kopií plasmidu do dceřinných buněk během dělení.

b) **Selekční znak**, který zajišťuje zvýhodněný růst transformovaných bakterií. I za optimálních podmínek je totiž plasmid vnesen pouze do malé části buněčné populace. Proto je třeba vyvinout selekční tlak pro podporu růstu těchto buněk. Pro tento účel bývá zpravidla použit gen, jenž se fenotypově projevuje jako dominantní rezistence k určitému antibiotiku. Nejčastěji se používají geny zodpovědné za rezistenci k ampicilinu.

c) **Klonovací místo**, umožňující vložit do plasmidu fragment cizorodé DNA. Klonovací místo je úsek DNA, umístěný mimo ostatní důležité sekvence a obsahuje rozpoznávací sekvenci pro jednu nebo více restričních endonukleáz (v tomto případě se označuje jako „polylinker“). Tato restriční místa jsou obsažena v plasmidu v jediném exempláři, což zaručuje možnost inserce dalšího úseku DNA, aniž by byl porušen některý jiný úsek důležitý pro replikaci plasmidu. V současné době jsou polyklonovací místa konstruována tak, aby byla zajištěna dostatečná flexibilita pro klonování různých fragmentů DNA. Navíc bývají v těsném sousedství polyklonovacích míst vloženy sekvence pro analýzu správnosti vložených fragmentů.

V závislosti na průběhu izolace je možno naizolovat různé formy plasmidové DNA: V nativním stavu v buňce se plasmid vyskytuje v nadšroubovicové formě označované jako **CCC-forma** (covalent closed circle). Pokud jsou všechny izolované molekuly v CCC-formě, pak byla izolace ideální. Pokud dojde k přerušení jednoho řetězce DNA, pak se plasmid

rozvine do podoby otevřené kružnice, tzv. **OC-formy** (open circle). Po přerušení obou řetězců vzniká linearizovaná molekula plasmidové DNA, tzv. **L-forma**. Protože se CCC-forma plasmidu chová v elektrickém poli jako tyčka, putuje tato forma nejrychleji ze všech uvedených. Pomaleji se pohybuje OC-forma a nejpomaleji forma linearizovaná. V praxi získáváme zpravidla při bezproblémovém průběhu izolace plasmidové DNA největší podíl CCC-forem a malé množství L-forem. Formu OC a L je na elektroforetickém gelu nesnadné rozlišit, pohybují se podobnou rychlostí. Často pozorujeme komplexy nadšoubovicových struktur a potom hovoříme o dimerech, tetrametrech atd. Ty se pochopitelně pohybují v elektrickém poli pomaleji než výše uvedené struktury. V izolátech plasmidů se vyskytují i zbytky chromosomální DNA, která nebyla dostatečně odstraněna. Výjimečně je možné pozorovat na gelu i denaturované molekuly plasmidové DNA. Ty se pohybují ještě rychleji než CCC-formy. K denaturaci plasmidové DNA ale dochází pouze v případě, že složení izolačních roztoků nebylo správně nastaveno, zejména při pH lyzačního roztoku vyšším než 12,45. Denaturovaná DNA je nevhodná pro další práci.

Standardní postup izolace plasmidové DNA sestává ze čtyř základních kroků:

- 1) V prvním jsou bakteriální buňky homogenizovány a je odstraněna jejich buněčná stěna působením vhodných enzymů, například lysozymu pro *Escherichia coli*, lysostaphinu pro stafylokoky, apod. Vedle toho se používá proteináza K, enzym, který rozkládá proteinovou složku buněčné stěny.
- 2) Ve druhém kroku dojde k lyzi cytoplasmatické membrány působením detergentů, zpravidla dodecylsulfátu sodného a uvolnění vnitřního obsahu buňky do vysoce alkalického prostředí. Alkalita roztoku, pH 12,45, zajistí denaturaci všech nukleových kyselin a proteinů.
- 3) Ve třetím kroku následuje prudké snížení pH na hodnoty kolem 7,0. Dojde k vysrážení proteinů a zbytků buněčných stěn. Dlouhá vlákna chromosomální DNA nestačí reasociovat a stanou se součástí této sraženiny. Naproti tomu malé molekuly plasmidové DNA zůstávají i při denaturaci v podmínkách pH = 12,45 vzájemně propojeny a při prudkém snížení pH znovu reasociují za vzniku kompaktních struktur.
- 4) V dalším kroku následuje oddělení sraženiny od reasociovaných molekul plasmidové DNA vysokoobrátkovou centrifugací. Plasmid je potom z výsledného roztoku purifikován na chromatografické koloně a vysrážen ethanolem.

Komerční souprava společnosti EPPENDORF (FastPlasmid Mini Kit), která bude použita v tomto cvičení, je určena pro izolaci plasmidové DNA z 1,5 až 3,0 ml buněčné suspenze bakterií *Escherichia coli*. V metodě jsou roztoky používané ve výše uvedených krocích jednotlivě spojeny do jednoho roztoku. Poté, co jsou buňky zlyzovány se plasmidy naváží na pevnou fázi, ze které je purifikovaná DNA po promytí izopropanolem eluována pufrům s nízkou iontovou silou. Izolovanou DNA je možné použít pro všechny následné metody genového inženýrství.

Cíl cvičení

Izolovat plasmidovou DNA z bakteriální suspenze *Escherichia coli*.

Seznam přístrojů

- nádoba s ledem
- třepačka Vortex
- centrifuga na 1,5ml mikrozkušavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 µl

Vlastní pracovní postup

Než začnete izolaci

- Před prvním použitím nové soupravy připravte promývací roztok přidáním izopropanolu do nádoby s nápisem „Wash Buffer“, množství isopropanolu přidejte podle zadání výrobce. Řádně protřepejte a označte, že v nádobě už je izopropanol.
- vychladte „Complete Lysis Solution“ na ledu. Pokud nebyl roztok skladován v lednici při 4 °C, chladte po dobu alespoň 15 min.

Bezpečnostní opatření!

- po celou dobu izolace mějte nasazené jednorázové plastové rukavice, nukleázy z vašich rukou by mohly zničit izolovanou DNA,
- dodržujte pravidla bezpečnosti práce předepsaná pro laboratoř,
- jakékoli zranění hlase vedoucím cvičení.

Vlastní izolace

- 1) Napipetujte 1,5 ml čerstvě narostlé bakteriální kultury do 2,0ml mikrozkušavky a centrifugujte buňky při 6 000 g při laboratorní teplotě po dobu 1 min.
- 2) Odstraňte supernatant pipetou tak, abyste nezvřítli sediment.
- 3) Osušte mikrozkušavku pomocí buničité vaty.
- 4) Přidejte 400 µl na ledu vychlazeného „Complete Lysis Solution“.
- 5) Řádně promíchejte vortexováním po dobu 30 sekund. Na konci vortexování musí být všechny buňky kompletně zlyzovány. Jakékoli nehomogenizované shluky buněk snižují výtěžek plasmidové DNA, protože se k nim nedostanou všechny chemikálie a lyze je neúplná.
- 6) Inkubujte lyzát při laboratorní teplotě po dobu 3 min. Lyzát se projasní a bude neviskózní.
- 7) Přepipetujte nebo přelijte lyzát do kolonky s filtrem „Spin Column Assembly“.
- 8) Centrifugujte při 14 000g při laboratorní teplotě po dobu 30 – 60 sekund.
- 9) Do kolonky „Spin Column Assembly“ napipetujte 400 µl promývacího roztoku „Wash Buffer“.
- 10) Centrifugujte při 14 000 g při laboratorní teplotě po dobu 30 – 60 sekund.
- 11) Se sběrné zkumavky vylijte proteklou tekutinu a vraťte „Spin Column Assembly“ zpět do sběrné zkumavky.
- 12) Centrifugujte při 14 000 g při laboratorní teplotě po dobu 1 min. Dojde k dokonalému vysušení kolonky „Spin Column Assembly“.
- 13) Přeneste kolonku do nové sběrné zkumavky.
- 14) Do středu filtru v kolonce „Spin Column Assembly“ napipetujte 50 µl elučního pufru („Elution Buffer“).
- 15) Centrifugujte při 14 000 g při laboratorní teplotě po dobu 30 – 60 sekund.
- 16) Odstraňte kolonku, eluovaná DNA je v roztoku.
- 17) Stanovte koncentraci DNA podle cvičení č. 3 nebo 4, proveďte elektroforézu podle cvičení č. 9, posuďte kvalitu izolované DNA. Uskladněte DNA při -20 °C.

Další informace k této problematice najdete v

EPPENDORF: FastPlasmid Mini. Manual.

QIAGEN 2003: QIAprep Miniprep Handbook.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jak se můžete přesvědčit o tom, která z forem plasmidu pozorovaná na vašem izolátu po elektroforéze je L-forma ?
- 2) Na uvedeném elektroforetickém snímku vyznačte různé formy plasmidu.



- 3) Co lze říci o průběhu izolace plasmidové DNA, jestliže je na elektroforetickém gelu vidět pruh denaturované DNA ?

Odhad koncentrace a čistoty DNA na agarózovém gelu (cvičení č. 4)

Úvodní slovo

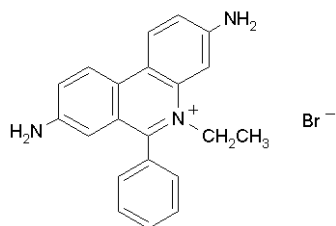
Ke stanovení koncentrace nukleových kyselin se používají dvě metody. Jednak je možné porovnat intenzitu záření vzorku DNA „obarvené“ ethidiumbromidem (metodiku barvení budete provádět ve cvičení č. 9) na agarózovém gelu s intenzitou záření DNA naředěného standardu. Toto stanovení umožňuje současně posoudit kvalitu izolované DNA, ale je výrazně ovlivněno subjektivní chybou experimentátora.

Molekuly ethidiumbromidu mají planární strukturu, podobně jako báze v nukleových kyselinách. Proto se mohou interkalovat do mezimolekulových prostorů, které existují mezi sousedícími bázemi. Po ozáření nukleových kyselin s interkalovaným ethidiumbromidem ultrafialovým světlem (UV) o vlnové délce 256, 302, 312 nebo 360 nm dochází k excitaci elektronů ve struktuře ethidiumbromidu a přechodu do vyšších energetických hladin. Energie se pak přenáší na atomy ve struktuře nukleové kyseliny a uvolňuje se v podobě viditelného záření o vlnové délce 590 nm (oranžové světlo). Ethidiumbromid vmezeřený v DNA září asi 80x intenzivněji než ve volném stavu.

Ozáření nukleové kyseliny obarvené ethidiumbromidem se provádí v roztoku nebo v agarózovém gelu na zařízení označovaném jako „transluminátor“. Intenzita záření je závislá na množství interkalovaného ethidiumbromidu. Množství interkalovaného ethidiumbromidu zase závisí jednak na délce nukleotidového řetězce (k delším molekulám se naváže více ethidiumbromidu) a na koncentraci nukleové kyseliny (čím vyšší koncentrace nukleové kyseliny, tím více interkalovaného ethidiumbromidu). Proto je možné při porovnání molekul o stejné velikosti odhadnout jejich vzájemnou koncentraci.

Při provedení metody v agarózovém gelu je možno kromě odhadu koncentrace provést i kontrolu kvality izolované DNA, posoudit obsah RNA, zkontrolovat různé formy DNA v případě izolované plasmidové DNA apod.

Strukturní vzorec ethidiumbromidu



Cíl cvičení

Odhadnout koncentraci a posoudit čistotu chromosomální a plasmidové DNA izolované ve cvičeních č. 1, 2 a 3.

Seznam přístrojů a standardů

- transluminátor
- sada pipet o objemech 10, 20 a 200 μ l
- hmotnostní standard fága λ
- hmotnostní standard plasmidu pUC18
- hmotnostní standard plasmidu pCR2.1

Vlastní pracovní postup

- 1) Připravte ředící řadu hmotnostního standardu DNA fága λ (zásobní koncentrace 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tak, že jednotlivé hodnoty konečných koncentrací budou 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 250 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ a 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$.
- 2) Podobně nařed'te hmotnostní standardy plasmidů pUC18 a pCR2.1.
- 3) Nařed'te vzorek vámi připravené chromosomální nebo plasmidové DNA v TE pufru v poměru 1:4, 1:9 a 1:99.

a) Odhad koncentrace kapkovou metodou

- 4) Nakapejte 5 μl každého hmotnostního standardu ve formě kapiček vedle sebe na parafilm a smíchejte s 1 μl roztoku ethidiumbromidu (zásobní koncentrace 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
- 5) Stejně nakapejte kapičky vámi připravených ředění chromosomální nebo plasmidové DNA.
- 6) Vložte parafilm s kapičkami na transluminátor a vyfotografujte zářící body.
- 7) Srovnáním intenzit záření v jednotlivých kapičkách odhadněte nejvíce shodné intenzity v řadě standardu a vaší DNA.
- 8) Stanovte koncentraci DNA ve výchozím vzorku (neředěném TE pufrem).
- 9) Porovnejte hodnotu s koncentrací stanovenou spektrofotometricky (viz cvičení č. 5)

b) Odhad koncentrace v agarózovém gelu

- 4) Připravte agarózový gel o koncentraci 0,8 % podle návodu uvedeném ve cvičení č. 10.
- 5) Smíchejte 5 μl každého hmotnostního standardu a naředěného vzorku s 1 μl nanášecího pufru (6 x GLB).
- 6) Naneste směsi do komůrek pod hladinu elektroforetického pufru.
- 7) Proveďte elektroforézu při 10 V/cm gelu po dobu 30 min.
- 8) Vyfotografujte výsledný elektroforetický gel.
- 9) Srovnajte intenzity záření v jednotlivých komůrkách, odhadněte nejvíce shodné intenzity v řadě standardu a vaší DNA.
- 10) Stanovte koncentraci DNA ve výchozím vzorku (neředěném TE pufrem).
- 11) Odhadněte kvalitu izolované chromosomální DNA, obsah RNA a popište formy plasmidu.
- 12) Porovnejte hodnotu s koncentrací stanovenou spektrofotometricky (viz cvičení č. 5)

Další informace k této problematice najdete v

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jaká byla původní koncentrace DNA ve vzorku, jestliže po jeho naředění v TE pufru v poměru 1:9 vykazoval stejnou intenzitu záření jako vzorek standardu o koncentraci 25 ng/μl ? Jak vzorku, tak standardu jste nanесли na gel 5 μl.
- 2) Jak naředíte vzorek DNA o koncentraci 600 μg/ml tak, aby při nanesení 10 μl na gel intenzita jeho záření odpovídala 5 μl standardu o koncentraci 100 ng/μl ?
- 3) Kolik molekul plasmidové DNA o velikosti 2 500 bp obsahuje 50 μl roztoku o koncentraci 100 ng/μl ?

Poznámky

Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky (cvičení č. 5)

Úvodní slovo

Rychlou a jednoduchou metodu stanovení koncentrace nukleových kyselin představuje proměření spektra v rozsahu 230 až 320 nm. Báze v nukleových kyselinách mají absorpční maximum při 260 nm. Obecně platí, že pokud je hodnota absorbance A_{260} v 1 cm kyvetě rovná 1,0, je koncentrace dvouřetězcové DNA v kyvetě 50 µg/ml. Pro jednořetězcovou DNA a RNA platí hodnota 38 µg/ml. Čistota DNA je nejčastěji odhadována na základě poměru absorpčních při různých vlnových délkách. Pro čistou DNA platí poměr:

$$A_{260}/A_{280} = 1,80$$

Tento parametr je nejdůležitější a v běžné praxi nejčastěji používaný. Pokud je hodnota jiná než 1,80, pak je vzorek DNA kontaminován proteiny nebo RNA.

Cíl cvičení

Stanovit koncentraci a posoudit čistotu chromosomální DNA izolované ve cvičení č. 1.

Seznam přístrojů

- UV-VIS spektrofotometr
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 µl

Vlastní pracovní postup

- 1) Zapněte spektrofotometr.
- 2) Do kyvety napipetujte 100 µl roztoku AE (eluční pufr ze cvičení č. 1) a proveďte nastavení nulového pozadí (tzv. blank).
- 3) DNA izolovanou ve cvičení č. 1 naředěte 10x tak, že k 10 µl DNA napipetujte 90 µl roztoku AE.
- 4) Naředěnou DNA napipetujte do kyvety a změřte hodnoty absorbance při 230, 260 a 280 nm.
- 5) Je-li naměřená hodnota A_{260} mimo hodnoty 0,1 až 0,3, opakujte ředění vzorku DNA. Jen v rozsahu hodnot 0,1 až 0,3 je závislost koncentrace na absorpční lineární a naměřené hodnoty jsou přesné.
- 6) Vyhodnoťte dosažené výsledky.

Další informace k této problematice najdete v

Manchester K.L. 1995: Calue of $A_{260/280}$ ratios for measurements of purity of nucleic acids. *BioTechniques* 19, 208-219.

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Kolik μl vzorku DNA nanese do reakce, potřebujete-li 2 ng a máte k dispozici roztok DNA o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$?
- 2) Kolik molekul DNA plasmidu pCR2.1 o velikosti 3 900 bp je obsaženo ve 100 μl vzorku o koncentraci DNA 50 $\mu\text{g/ml}$?
- 3) Kolikrát musíte naředit roztok DNA o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, aby byla jeho absorbance při 260 nm rovna hodnotě 0,2?
- 4) Kolik ředícího roztoku přidáte do 30 μl vzorku DNA o koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$ tak, aby koncentrace DNA po zředění klesla na 15 $\text{ng}/\mu\text{l}$?
- 5) Kolik molekul plasmidové DNA o velikosti 50 000 bp obsahuje 100 μl roztoku u něhož byla hodnota absorbance při 260 nm po 10 násobném zředění rovna 0,15?

Restriční štěpení plasmidové DNA (cvičení č. 6)

Úvodní slovo

Při genových manipulacích jsou geny přenášeny z jednoho organismu do druhého. Jedním ze způsobů, jak geny přenášet je jejich umístění, tzv. klonování, do plasmidu. Z toho důvodu jsou molekuly plasmidu rozštěpeny na přesně definovaných místech tak, aby byl proces klonování reprodukovatelný. Vedle vlastního plasmidu se podobně štěpí i geny.

Štěpení se provádí pomocí tzv. restričních enzymů neboli restriktáz. Restriktázy jsou enzymy, které se vyskytují u bakterií a ty je používají jako obranný systém při napadení fágy. Restriční endonukleáza, která rozpozná cizorodé DNA sekvence u fága vstupujícího do buňky, takovou DNA rozštěpí v přesně definovaných místech daných specifickou sekvencí bází. Této schopnosti využili genoví inženýři při manipulacích s geny.

Byly objeveny celkem čtyři skupiny restriktáz, všechny štěpí dvouřetězcovou DNA. Restriktázy typu I rozpoznávají specifickou sekvenci ale štěpí na jiném, nahodilém místě, restriktázy typu II rozpoznávají stejnou sekvenci, kterou následně štěpí, restriktázy typu III štěpí v definované vzdálenosti od rozpoznávané sekvence a restriktázy typu IV štěpí mimo rozpoznávanou sekvenci a to pouze modifikovanou DNA, jejíž báze mohou být methylované, hydroxymethylované a glukosy-hydroxymethylované. V genovém inženýrství našly uplatnění zejména restriktázy typu II. V praxi se nejčastěji používají restriktázy typu II uvedené v Tabulce 6.1:

Tabulka 6.1: Nejčastěji používané restriktázy typu II:

Název enzymu <i>Izolován z</i>	Rozpoznávaná sekvence	Výsledné produkty štěpení
EcoRI <i>Escherichia coli</i>G↓A-A-T-T-C.....C-T-T-A-A↑G.....	A-A-T-T-C..... G.....GC-T-T-A-A
Hind III <i>Haemophilus influenzae</i>A↓A-G-C-T-T.....T-T-C-G-A↑A.....	A-G-C-T-T..... A.....AT-T-C-G-A
BamHI <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>G↓G-A-T-C-C.....C-C-T-A-G↑G.....	G-A-T-C-C..... G.....GC-C-T-A-G
Hae III <i>Haemophyllus aegyptius</i>G-G↓C-C.....C-C↑G-G.....	C-C..... G-G.....G-GC-C
Sau3A I <i>Staphylococcus aureus</i>↓G-A-T-C.....C-T-A-G↑.....	G-A-T-C.....C-T-A-G
Not I <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>G-C↓G-G-C-C-G-C.....C-G-C-C-G↑G-C-G.....	G-G-C-C-G-C..... C-G.....G-CC-G-C-C-G-G

Restriktázy jsou označovány podle organismu, ze kterého byly izolovány. Dále se dělí podle délky DNA-sekvence, kterou štěpí. Nejčastěji štěpí restriktázy DNA-sekvence o délce 4, 6 nebo 8 bp. Vzhledem k tomu, že specifická posloupnost 8 nukleotidů se vyskytuje mnohem

méně často než specifická posloupnost 4 nukleotidů, je zřejmé, že restriktázy, které rozpoznávají posloupnost 4 nukleotidů, budou DNA štěpit častěji, než ty, co rozpoznávají posloupnost 8 nukleotidů. Pokud tedy chceme štěpit DNA na malé fragmenty, použijeme např. enzymy *Hae* III nebo *Sau*3A I, zatímco chceme-li získat větší fragmenty, použijeme např. *Eco*R I. Pro restriktázy typu II je také typické, že jimi rozpoznávané sekvence jsou symetrické (palindromické), takže štěpením vznikají fragmenty se stejným zakončením. Pokud se štěpení uskutečňuje mimo střed symetrie, vzniknou přesahující se konce s komplementárními bázemi. Takové konce označujeme jako lepivé, neboli kohezivní (např. po štěpení *Eco*R I nebo *Bam*H I). Proběhne-li štěpení ve středu symetrie, vzniknou konce, které neobsahují přesahující se sekvence. Pak je označujeme jako konce tupé (např. po štěpení *Hae* III).

Přehled všech restriktáz je možno najít na adrese „www.rebase.neb.com/rebase“.

Cíl cvičení

Připravit linearizovaný plasmid pUC18, který se používá jako vektor v genovém inženýrství. Plasmid linearizovat restriktázní endonukleázou *Eco*R I.

Seznam přístrojů

- sada pipet 0,5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl
- sada sterilních umělohmotných špiček na pipety
- sterilní umělohmotné Eppendorfky
- nádoba s ledem
- chladič bloček na -20 °C
- biologický termostat s nastavitelnou teplotou
- pikofuga

Vlastní pracovní postup

- 1) Z mrazáku -20 °C vyndejte plasmidovou DNA, vodu, pufr a všechny komponenty nechejte rozmrazit. Po rozmrazení krátce centrifugujte kapičky roztoků ze stěn mikrozkuvek na pikofuze a uložte do nádoby s ledovou tříští.
- 2) Dle „reakčního schématu“ napipetujte do mikrozkuvek jednotlivé komponenty reakce. Všimněte si, že připravujete dvě reakce, každou s různým množstvím plasmidové DNA. Pracujte rychle, ale velmi opatrně tak, abyste do reakce nezařadili žádné nečistoty, které by poškodily průběh reakce. Všechny roztoky uchovávejte stále v nádobě s ledovou tříští.
- 3) Po nanesení poslední komponenty směs jemně promíchejte špičkou pipety.
- 4) Komponenty promíchejte jemným pohybem vyndejte z mrazáku restriktázu a v mrazícím bločku ji přineste k ostatním komponentám. Restriktázu nechejte v bločku, nedávejte ji do ledové tříště.
- 5) Opatrně napipetujte restriktázu a výslednou směs jemně promíchejte špičkou pipety.
- 6) Restriktázu ihned uschovejte v mrazáku na -20 °C. Rovněž zbylou vodu, pufr, a DNA uložte zpět do -20 °C.
- 7) Reakční směs přeneste do termostatu vytemperovaného na 37 °C.
- 8) Inkubujte po dobu 1 hodiny.
- 9) Reakci zastavte přidáním 0,5M EDTA, pH 8,0 (1 µl na 50 µl reakční směsi).
- 10) Proveďte kontrolu štěpení v 0,8% agarózovém gelu (viz. cvičení č. 10).

Reakční schéma (objemy jsou uvedeny v μl):

Pokusný zásah	I	II
Voda	$50 - (5+X+1)$	$50 - (5+X+1)$
pufř	5	5
plasmid	X (500 ng)	X (200 ng)
restriktáza (20u/ μl)	1	1
Celkem	50	50

Další informace k této problematice najdete v

Roberts, R.J. 2003: A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research*, 31: 1805-1812.

Sambrook, J. a Russell, D. 2001: *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press

Poznámky k vypracování protokolu:

Zásobní koncentrace mého plasmidu byla:

Výsledné reakční schéma vypadalo následovně:

Pokusný zásah	I	II
Voda		
pufř	5	5
plasmid		
restriktáza (20 u/ μl)	1	1
Celkem	50	50

Fotografie elektroforézy a vyhodnocení restriktčního štěpení:

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jaké množství plasmidu (v μl) přidáte do reakční směsi, potřebujete-li štěpit 500 ng plasmidu a je-li jeho zásobní koncentrace 100 ng/ μl ?
- 2) Jedna jednotka restriční endonukleázy (značí se U) je množství enzymu, které rozštěpí 1 μg DNA fága λ za optimálních reakčních podmínek při 37 °C za 1 hodinu. Na molekule DNA fága je celkem 6 štěpných míst pro restriktázu *Hinf* I. Jaké množství plasmidu pUC18 rozštěpí 1 jednotka restriktázy *Hinf* I za jednu hodinu, jestliže je na tomto plasmidu jen jedno restriční místo ? Velikost plasmidu pUC18 je 2 686 bp.
- 3) Jak dlouho bude štěpit 1u restriční endonukleázy *Hind* III 200 ng plasmidu pUC18 ? Na tomto plasmidu je jediné restriční místo pro restriktázu *Hind* III.

Stanovení genetické modifikace *ac2* u *Solanum tuberosum* (cvičení č. 7)

Úvodní slovo

Geneticky modifikované organismy (GMO, transgenní organismy) se stávají reálnou součástí našeho života a jsou dnes běžně zaváděny do potravního řetězce člověka. Potravin vyrobené z GMO představují tzv. "potraviny nového typu". Do zemědělské praxe se začaly dostávat počátkem 90. let. V současné době je jimi oseto přes 60 milionů hektarů polí. Významnými pěstovanými GMO rostlinami jsou vedle sóji, kukuřice, řepky a bavlny také brambory.

Brambory (*Solanum tuberosum* L.) patří do čeledi Solanaceae. Z hlediska celkové produkce potravin se vedle obilovin jedná o nejdůležitější potravní zdroj člověka. Vedle toho se používají jako krmivo pro hospodářská zvířata a průmyslovou surovinu při výrobě škrobu, alkoholu a jiných důležitých produktů.

V oblasti genetických modifikací představují brambory vhodnou modelovou rostlinu, a to hned z několika důvodů. Z hlediska praktického využití nabízejí poměrně široké spektrum znaků a jako vegetativně se množící rostlina umožňují zachování příslušného znaku v delším časovém horizontu. Na druhou stranu mezi jejich nevýhody patří zejména nízká hladina exprese vložených genů, obtížná regenerace transformovaných rostlin mimo sterilní prostředí nebo výskyt morfologických změn, např. na hlízách.

Geneticky upravené brambory se připravují zejména za účelem zvýšení odolnosti těchto plodin vůči škůdcům, herbicidům nebo nepříznivým vlivům prostředí, pro zlepšení výživových vlastností nebo dokonce pro **produkci lékařsky významných látek, které by bylo možné používat jako vakcíny pro navození imunity proti různým chorobám u lidí**. Zajímavou skupinou jsou modifikované brambory produkující látky využitelné např. v průmyslu.

Genetická modifikace *ac2* byla získána transformací odrůdy Desiree pomocí vektoru pH22Kneo nesoucího gen *ac2* fungicidního peptidu ze semen amarantu (*Amaranthus caudatus* L.). Produktem genu *ac2* je protein Ac-AMP2, který se vyznačuje fungicidními a antibakteriálními účinky a předpokládá se proto jeho role v ochraně semen amarantu před napadením houbovými organismy. Proteiny Ac-AMP patří do skupiny peptidů s antimikrobními vlastnostmi, které jsou příbuzné rostlinným defenzinům. Důležitou vlastností rostlinných proteinů Ac-AMP je to, že na rozdíl od jiných defenzinů, negativně nepůsobí na savčí buňky. Výsledné geneticky modifikované rostliny bramboru jsou odolné vůči působení hub a některých gram pozitivních bakterií.

Cíl cvičení

Detekovat gen *ac2* z amarantu a gen *StTS1*, který je specifický pro druh *Solanum tuberosum*. Při amplifikaci geneticky modifikované brambory vznikají dva produkty: amplifikační produkt genu *ac2* má velikost 306 bp, amplifikační produkt specifického genu *StTS1* je dlouhý 554 bp. Při amplifikaci geneticky nemodifikované brambory vzniká pouze produkt specifického genu *StTS1*.

Seznam přístrojů

- termocykler PTC-100
- pikofuga
- sada pipet o objemech 10, 50 a 200 μ l

Použité primery

OWB40

5'- AAT TGG TAC CAG TCA AGA GTA TTA ATT AGG - 3'

OWB217

5'-CTA CTT TCA TGG ACT ACC AGC - 3'

TS1-F

5'- CTT GAG AAG GCG GTT CAA TC - 3'

TS1-R

5'- TCC TCT TGC AGC TTT CCT GT - 3'

Kombinací primerů OWB40/OWB217 je možné získat amplicon o velikosti 306 bp, který je specifický pro část genu *ac2*.

Kombinací primerů TS1-F/TS1-R je možné získat amplicon o velikosti 554 bp, který je specifický pro část genu *StTS1*.

Vlastní pracovní postup

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 μ l, 5 až 50 μ l, 0,5 až 10 μ l), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkumavky, stojánek.
- 2) Nasad'te si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro pět reakcí smícháním následujících komponent:

Komponenta	Objem v μ l	
	1 reakce	5 reakcí
HOTStar Taq Master Mix (QIAGEN)	10,0	50,0
Voda deionizovaná	7,6	38,0
Primer OWB40 (100pmol/ μ l)	0,1	0,5
Primer OWB 217 (100pmol/ μ l)	0,1	0,5
Primer TS1-F (25pmol/ μ l)	0,1	0,5
Primer TS1-R (25pmol/ μ l)	0,1	0,5

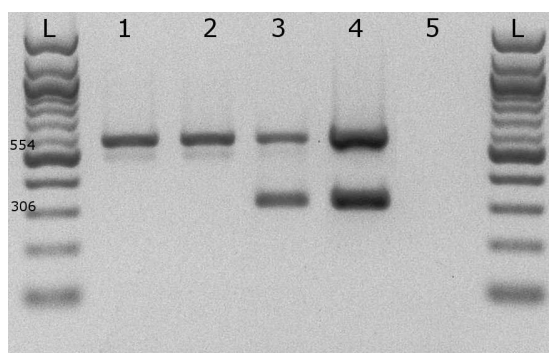
- 4) Směs rozdělte po 18 μ l do čtyř zkumavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 5 reakcí, ovšem v důsledku chyb při pipetování vám už asi na pátou reakci směs stačit nebude.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
A = 2 μ l izolované DNA z brambor o koncentraci přibližně 50 pg/ μ l,
B = 2 μ l izolované DNA z brambor o koncentraci přibližně 100 pg/ μ l,
K = 2 μ l pozitivní kontroly, směs plasmidů, které nesou naklonované části genů *ac2* a *StTS1*
N = 2 μ l deionizované vody.
Poznámka: Provedeme vyšetření vzorku ve dvou reakcích o různých koncentracích DNA. To proto, že PCR reakce je často inhibována různými látkami, které se nepodaří v průběhu izolace odstranit. Na inhibicích se podílí dokonce sama DNA.
- 6) Uzavřete zkumavky, řádně je popište a vložte do termocykleru.

7) Proved'te amplifikaci dle následujícího programu:

Krok č.	Teplota	Doba
1	96 °C	15 min.
2	96 °C	10 s
3	45 °C	10 s
4	72 °C	40 s
5	go to step 2	repeat 35x
6	72 °C	2 min.
7	10 °C	for ever
8		END

8) Po ukončení programu proved'te elektroforézu v 1,5% agarózovém gelu (viz cvičení č. 10).

Příklad analýzy



Amplifikační produkt genu *ac2* (GMO) má velikost 306 bp, fragment o délce 554 bp je výsledkem amplifikace specifického genu *StTS1* bramboru.

Dráha č. 1 – výsledek amplifikace negativního vzorku (není GMO)

Dráha č. 2 – výsledek amplifikace negativního vzorku (není GMO)

Dráha č. 3 – výsledek amplifikace pozitivního vzorku (je GMO)

Dráha č. 4 – výsledek amplifikace pozitivní kontroly PCR

Dráha č. 5 – výsledek amplifikace negativní kontroly PCR nebo negativní kontroly izolační

L – velikostní standard 100bp (Malamité, v.o.s., Česká republika)

Další informace k této problematice najdete v

Lapkova, N.S. et al. 2001: Isolation of genetically modified potato plant containing the gene of defensive peptide from *Amaranthus*. Prikl Biokhim Mikrobiol., 37(3):349-354.

Broekaert, W.F. et al. 1992: Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. Biochemistry 31(17):4308-4314.

Broekaert et al.: Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol. 108(4):1353-8.

Miguel et al. 1996: Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. Plant Mol Biol 31: 993-1008.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Limit detekce DNA na transluminátoru je přibližně 5 ng. Kolik cyklů PCR musí proběhnou, aby bylo možno detekovat amplifikační produkt mutantní alely StTS1 o délce 554 bp, jestliže na počátku reakce máte ve směsi pouze jedinou kopii alely?
- 2) *Taq* polymeráza připojuje nukleotidy rychlostí 150 nukleotidů/sekundu. Jak dlouho trvá tomuto enzymu, než nasyntetizuje fragmenty o délce 306 a 554 bp?
- 3) Jaké množství dNTP potřebujete dát minimálně do PCR reakce, abyste měli dostatek stavebního materiálu k amplifikaci obou fragmentů o délce 306 a 554 bp (za předpokladu, že v daných fragmentech je rovnoměrné zastoupení všech nukleotidů)? Předpokládejte, že chcete získat 200 ng každého z fragmentů a máte k dispozici zásobní roztok směsi všech čtyř nukleotidů, ve které má každý nukleotid koncentraci 25 mM.

Detekce delece $\Delta 32$ v receptoru CCR5 metodou PCR

(cvičení č. 8)

Úvodní slovo

Receptor CCR5 je zodpovědný za transport chemokinu CC a podílí se na vstupu virových částic viru lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1) do makrofágů.

Dle současných představ o vstupu viru HIV-1 do buněk dochází nejprve k připojení povrchového glykoproteinu 120 viru HIV-1 k povrchovému receptoru CD4. To má za následek konformační změnu CD4, po které jsou do procesu vstupu virionů zapojeny i receptory chemokinů. Většina primárních kmenů HIV využívá receptorů chemokinů CCR5 a CXCR4. Alelové varianty těchto receptorů mají vliv na množství receptorů vyjádřených na povrchu buňky a tudíž přímý vliv na pronikání viru. U genu CCR5 byly popsány dvě hlavní varianty, a to deleční alela CCR5- $\Delta 32$ a alela CCR5-G59029 s jednoduchou bodovou mutací v promotoru.

V případě mutace CCR5- $\Delta 32$ se jedná o delecii v délce 32 bp, v jejímž důsledku dochází k expresi zkrácené verze proteinu, který nemůže být transportován na povrch buněk a tudíž nemůže fungovat jako kofaktor transportu virových částic HIV-1. Osoby homozygotní v alele CCR5- $\Delta 32$ jsou proti infekci virem HIV-1 chráněny, protože vstup viru touto cestou je prakticky znemožněn. To bylo prokázáno i u vysoce promiskuitních jedinců. U heterozygotních jedinců (+/ $\Delta 32$) dochází ke zpomalení progresu virové infekce v průměru o 2 až 4 roky.

U bílých Evropanů a bělochů ze severní Ameriky je mutantní forma alely zastoupena u asi 10 % populace. Její přítomnost nebo absenci je možno stanovit metodou polymerázové reakce.

Cíl cvičení

Detekovat polymorfismus v genu pro CCR5 ve vzorku DNA z lidské krve izolované ve cvičení č. 1. Je možno použít DNA izolovanou též z plasmy, spermatu, a jiného biologického materiálu. Koncentrace DNA byla stanovena ve cvičení č. 4 nebo 5.

Seznam přístrojů

- termocykler PTC-100
- pikofuga
- sada pipet o objemech 10, 50 a 200 μ l

Použité primery

CCR5-UP:

5'-TGG TGG CTG TGT TTG CGT CTC-3'

CCR5-DOWN:

5'-AGC GGC AGG ACC AGC CCC AAG-3'

CCR5-DOWN2:

5'-CAG TAG CTC TAA CAG GTT GGA CCA A-3'

Kombinací primerů CCR5-UP/CCR5-DOWN je možné získat amplikony velikostí 162 bp pro normální variantu genu a nebo 130 bp pro mutantní variantu (CCR5 $\Delta 32$).

Kombinací primerů CCR5-UP/CCR5-DOWN2 je možné získat amplikony velikostí 373 bp pro normální variantu genu a nebo 341 bp pro mutantní variantu (CCR5 Δ32).

Vlastní pracovní postup

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 µl, 5 až 50 µl, 0,5 až 10 µl), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkušavky, stojánek.
- 2) Nasad'te si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro pět reakcí smícháním následujících komponent:

Komponenta	Objem v µl	
	1 reakce	5 reakcí
Taq Master Mix (QIAGEN)	20,0	100,0
Voda deionizovaná	17,8	89,0
Primer CCR5-UP (100 µM)	0,2	1,0
Primer CCR5-DOWN (100 µM)	0,2	1,0

- 4) Směs rozdělte po 38 µl do čtyř zkušavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 5 reakcí, ovšem v důsledku chyb při pipetování vám už asi na pátou reakci směs stačit nebude.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
A = 2 µl izolované DNA o koncentraci přibližně 50 pg/µl,
B = 2 µl izolované DNA o koncentraci přibližně 100 pg/µl,
K = 2 µl pozitivní kontroly,
N = 2 µl deionizované vody.
Poznámka: Provedeme vyšetření vzorku ve dvou reakcích o různých koncentracích DNA. To proto, že PCR reakce je často inhibována různými látkami, které se nepodaří v průběhu izolace odstranit. Na inhibicích se podílí dokonce sama DNA.
- 6) Uzavřete zkušavky, řádně je popište a vložte do termocykleru.
- 7) Proved'te amplifikaci dle následujícího programu:

Krok č.	Teplota	Doba
1	94 °C	5 min
2	94 °C	20 s
3	55 °C	20 s
4	72 °C	60 s
5	GO TO 2	34x
6	72 °C	5 min
7	10 °C	nekonečný čas
8	END	

- 8) Po ukončení programu proved'te elektroforézu v 2,5-3% agarózovém gelu (viz. cvičení č. 10).

Další informace k této problematice najdete v

Hersberger, M. et al. 2002: Rapid detection of the *CCR2-V64I*, *CCR5-A59029G* and *SDF1-G801A* polymorphisms by tetra-primer PCR. *Clinical Biochemistry* 35, 399-403.

Hoffman, T.L. et al. 1997: CCR5 Gynotypes in Sexually Active Couples Discordant for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Status. *The Journal of Infectious Diseases* 176, 1093-1096.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Limit detekce DNA na transluminátoru je přibližně 5 ng. Kolik cyklů PCR musí proběhnout, aby bylo možno detekovat amplifikační produkt mutantní alely CCR5 Δ 32 o délce 130 bp, jestliže na počátku reakce máte ve směsi pouze jedinou kopii genu pro CCR5 Δ 32?
- 2) Jak dlouhý amplikon může vzniknout na níže popsaném úseku DNA (je uveden pouze jeden z komplementárních řetězců) pokud má experimentátor k dispozici následující dvojici primerů?

Primer forward:

5' - ATG TGA GCG GTC TAC TGG - 3'

Primer reverse:

5' - GAT AGC TAG AAT TGA TAG - 3'

Sekvence na které probíhá amplifikace:

5' - ATG TGA GCG GTC TAC TGG AAA TGC AGT GCA TCA GTC AGC GAT GGG
TGA GTC ACC CCC GTC ACG TCA GAT TCA TGA CTA AGC GTC CGT GCT
TGA TCG AGT CTA TCA ATT CTA GCT ATC ATC ATG GTT GAC ATC - 3'

- 3) Jestliže alelu CCR5 Δ 32 označíme v místě delece na chromozómu kolečkem rozhodněte, která ze slečen má nejmenší pravděpodobnost infekce virem HIV. ●

Slečna A



Slečna B



Slečna C



Detekce delece v genu pro angiotensin konvertující enzym metodou PCR (cvičení č. 9)

Úvodní slovo

Angiotensin konvertující enzym (dipeptidyl karboxypeptidáza 1) je součástí systému renin-angiotensin (RAS), jehož jednotlivé komponenty, a to prorenin, angiotensinogen, angiotensin I, angiotensin II, renin a specifická vazebná místa pro angiotensin II byly nalezeny mimo jiné i v lidském oku. Protože je angiotensin II potenciálním vazokonstriktorem a angiogenním faktorem, je možné, že se místní RAS systém může podílet také na patogenezi proliferativní retinopatie, se kterou se setkáváme u některých diabetiků. Je známo, že prorenin zvyšuje množství tekutiny ve sklivci u pacientů, kteří jsou postiženi proliferativní diabetickou retinopatií. Tvorba angiotensinu II v oku diabetika tedy může být příčinným faktorem neovaskularizace. Z toho všeho vyplývá, že oční RAS systém se může účastnit proliferace krevních vlásečnic v sítnici a z toho plynoucího oslepnutí diabetiků.

Některými autory byl prokázán vztah polymorfismu v genu pro angiotensin konvertující enzym (ACE) a diabetickou retinopatií u pacientů s diabetem typu 2. Polymorfismus je založen na deleci v oblasti intronu 16 tohoto genu. Tento polymorfismus je možné detekovat jednoduchou PCR, která odliší jak heterozygotní, tak oba homozygotní stavy. Potom je možné studovat vztah přítomnosti určité alely ke konkrétnímu fenotypovému projevu. U jedinců s diabetickou retinopatií je ve zvýšené míře detekována alela s delecí.

Cíl cvičení

Detekovat polymorfismus v genu pro angiotensin konvertující enzym ve vzorku DNA z lidské krve izolované ve cvičení č. 1. Je možno použít DNA izolovanou též z plasmy, spermatu, a jiného biologického materiálu. Koncentrace DNA byla stanovena ve cvičení č. 4 nebo 5.

Seznam přístrojů

- termocykler PTC-100
- pikofuga
- sada pipet o objemech 10, 50 a 200 µl

Použité primery

ANG-F:

5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3'

ANG-R:

5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'

Kombinací primerů ANG-F/ANG-R je možné získat amplikony velikostí 190 bp pro deleční alelu a nebo 490 bp pro standardní variantu.

Vlastní pracovní postup

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 µl, 5 až 50 µl, 0,5 až 10 µl), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkušavky, stojánek.
- 2) Nasad'te si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro pět reakcí smícháním následujících komponent:

Komponenta	Objem v µl	
	1 reakce	5 reakcí
Taq Master Mix (QIAGEN)	20,0	100,0
Voda deionizovaná	17,8	89,0
Primer ANG-F (100 µM)	0,2	1,0
Primer ANG-R (100 µM)	0,2	1,0

- 4) Směs rozdělte po 38 µl do čtyř zkušavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 5 reakcí, ovšem v důsledku chyb při pipetování vám už asi na pátou reakci směs stačit nebude.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
A = 2 µl izolované DNA o koncentraci přibližně 50 pg/µl,
B = 2 µl izolované DNA o koncentraci přibližně 100 pg/µl,
K = 2 µl pozitivní kontroly,
N = 2 µl deionizované vody.
Poznámka: Provedeme vyšetření vzorku ve dvou reakcích o různých koncentracích DNA. To proto, že PCR reakce je často inhibována různými látkami, které se nepodaří v průběhu izolace odstranit. Na inhibicích se podílí dokonce sama DNA.
- 6) Uzavřete zkušavky, řádně je popište a vložte do termocykleru.
- 7) Proved'te amplifikaci dle následujícího programu:

Krok č.	Teplota	Doba
1	94 °C	5 min
2	94 °C	60 s
3	55 °C	60 s
4	72 °C	90 s
5	GO TO 2	34x
6	72 °C	10 min
7	10 °C	nekonečný čas
8	END	

- 8) Po ukončení programu proved'te elektroforézu v 1,5% agarózovém gelu (viz cvičení č. 10).

Další informace k této problematice najdete v

Matsumoto, A. et al. 2000: Detection of the association between a deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin I – converting enzyme and advanced diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practise* 50, 195-202.

Rigat, B. et al. 1992: PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Research* 20, 1433.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) *Taq* polymeráza připojuje nukleotidy rychlostí 150 nukleotidů/sekundu. Jak dlouho trvá tomuto enzymu, než nasyntetizuje fragmenty o délce 190 a 490 bp?
- 2) Jedna jednotka enzymu *Taq* polymerázy inkorporuje 10nmol nukleotidů za 30 minut při teplotě 72 °C. Přepočtěte tuto hodnotu na počet inkorporovaných nukleotidů za minutu.
- 3) Jestliže frekvence začlenění chybného nukleotidu činí u *Taq* polymerázy 285×10^{-6} , kolikrát může tento enzym chybovat při syntéze 200 ng amplikonu o délce 500 bp? Co můžete říct o počtu chybných amplikonů v takovém výsledném vzorku DNA?

Poznámky

Detekce polymorfismu K469E v genu ICAM1 (cvičení č. 10)

Úvodní slovo

V genu ICAM-1 bylo identifikováno nejméně dvacet jednoduchých nukleotidových polymorfismů. Pouze dva jsou však spojovány s Crohnovou chorobou. Polymorfismus v kodonu 241 (G/R241, Gly/Arg, exon 4) a kodonu 469 (K/E469, Lys/Glu, exon 6) (Papa et al. 2004). Polymorfismy způsobují změny v řetězcích aminokyselin na imunoglobulinových doménách proteinu ICAM-1, což způsobuje alterace jejich interakce se specifickými ligandy.

Polymorfismus K469E je nekonzervativní substitucí aminokyseliny lysinu za kyselinu glutamovou na páté imunoglobulinové doméně ICAM-1. Tato doména je důležitá pro adhezi a B-buněk a dendritických buněk, je prezentována jako imunodominantní epitop molekuly ICAM-1. Záměna aminokyseliny je způsobena nukleotidovou substitucí A za G (A/G).

Polymorfismus K469E vede k změně expresi výsledné adhezivní molekuly, což způsobuje alteraci interakce mezi LFA-1 (lymphocyte function antigen 1) a B-buňkami. Změna funkce proteinu ICAM-1 potenciálně přispívá ke genetickým predispozicím k zánětlivým a imunitním onemocněním.

Návrh metody detekce polymorfismu 469E vychází z práce Nejentsev et al. (2000).

Cíl cvičení

Detekovat polymorfismus v genu ICAM1 ve vzorku DNA z lidské krve izolované ve cvičení č. 1. Je možno použít DNA izolovanou též z plasmy, spermatu, a jiného biologického materiálu. Koncentrace DNA byla stanovena ve cvičení č. 4 nebo 5.

Seznam přístrojů

- termocykler PTC-100
- pikofuga
- sada pipet o objemech 0,5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl
- nádoba s ledem
- chladič bloček na -20 °C
- biologický termostat s nastavitelnou teplotou

Použité primery

ICAM-1 F

5' - GGA ACC CAT TGC CCG AGC - 3'

ICAM-1 R

5' - GGT GAG GAT TGC ATT AGG TC - 3'

S použitím těchto primerů lze získat amplikony o délce 223 bp.

Restrikční endonukleáza

Polymorfismus je možno detekovat restrikční endonukleázou *Bst*U I, která štěpí amplikon na dva fragmenty v případě nestandardní alely. Standardní alela není štěpena.

Pozice primerů v sekvenci lidského genomu

podle GenBank Accession Number – AC011511

```
98941 aagcttgacg tgagccaaga tcatgccact gcactccagc ctgggcaaca gagcaaaact
99001 gtgtgacctg aaccgggggc ggggctcact gtgtgcctat tccaggcttt ccggcgccca
99061 acgtgattct gacgaagcca gaggtctcag aagggaccga ggtgacagtg aagtgtgagg
99121 cccaccctag agccaagggtg acgctgaatg gggttccagc ccagccactg ggccccgagg
99181 cccagctcct gctgaaggcc accccagagg acaacgggcg cagcttctcc tgctctgcaa
99241 ccctggaggt ggccggccag cttatacaca agaaccagac ccgggagctt cgtgtcctgt
99301 gtgagtgggg ctgctggtca atggccccta tcccccaagg cccaatctcc ctgaaggtcc
99361 cataaggtct tgctccaag tcctgcccc acccacctcc atgtcatctc atcgtgtttt
99421 tccagatggc ccccgactgg acgagagggg ttgtccggga aactggacgt ggccagaaaa
99481 ttcccagcag actccaatgt gccaggcttg ggggaaccca ttgcccgagc tcaagtgtct
99541 aaaggatggc actttccac tgccatcgg ggaatcagtg actgtcactc gagatcttga
99601 gggcacctac ctctgtcggg ccaggagcac tcaaggggag gtcacccgcR aggtgaccgt
99661 gaatgtgctc tgtgagtgag ccggcgggca gagctgggtg ggggcagggg ccatggacct
99721 aatgcaatcc tcaccgcctg ttgtatcctc cccacagccc cccggtatga gattgtcatc
99781 atcactgtgg tagcagccgc agtcataatg ggcactgcag gcctcagcac gtacctctat
99841 aaccgccagc ggaagatcaa gaaatacaga ctacaacagg ccaaaaagg gacccccatg
99901 aaaccgaaca cacaagccac gcctccctga acctatccc ggacagggcc tcttcctcgg
99961 cttcccata ttggtggcag ttggtgccaca ctgaacagag tggaaagacat atgccatgca
```

Primer ICAM-1F

Primer ICAM-1R

Pozice polymorfismu (R = A/G)

Vlastní pracovní postup

Amplifikace

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 μ l, 5 až 50 μ l, 0,5 až 10 μ l), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkumavky, stojánek.
- 2) Nasadte si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro pět reakcí smícháním následujících komponent:

Komponenta	Objem v μ l	
	1 reakce	6 reakcí
Taq Master Mix (QIAGEN)	10,0	60,0
Voda deionizovaná	7,8	~ 47,0
primer ICAM-1F (100 μ M)	0,1 μ l	0,6
primer ICAM-1R (100 μ M)	0,1 μ l	0,6

- 4) Směs rozdělte po 18 μ l do čtyř zkumavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 5 reakcí, ovšem v důsledku chyb při pipetování vám už asi na pátou reakci směs stačit nebude.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
 - A = 2 μ l izolované DNA
 - B = 2 μ l DNA standardního homozygota
 - C = 2 μ l DNA nestandardního homozygota
 - D = 2 μ l DNA heterozygota
 - N = 2 μ l deionizované vody – slouží jako negativní kontrola
- 6) Uzavřete zkumavky, řádně je popište a vložte do termocyklu.

7) Proved'te amplifikaci dle následujícího programu:

Krok č.	Teplota	Doba
1	94 °C	5 min
2	94 °C	20 s
3	64 °C	50 s
4	72 °C	60 s
5	GO TO 2	30x
6	72 °C	5 min
7	12 °C	nekonečný čas
8	END	

8) Po ukončení programu proved'te elektroforézu v 1,5% agarózovém gelu (viz cvičení Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu).

Restrikční štěpení

- 1) Z mrazáku -20 °C vyndejte vodu, pufr a nechejte rozmrazit. Po rozmrazení krátce centrifugujte kapičky roztoků ze stěn mikrozkušavek na pikofuze a uložte do nádoby s ledovou tříští.
- 2) Dle „reakčního schématu“ napipetujte do mikrozkušavek jednotlivé komponenty reakce. Pracujte rychle, ale velmi opatrně tak, abyste do reakce nezanесли žádné nečistoty, které by poškodily průběh reakce. Všechny roztoky uchovávejte stále v nádobě s ledovou tříští.
- 3) Po nanesení poslední komponenty směs jemně promíchejte špičkou pipety.
- 4) Komponenty promíchejte jemným pohybem vyndejte z mrazáku restriktázu a v mrazícím bločku ji přineste k ostatním komponentám. Restriktázu nechejte v bločku, nedávejte ji do ledové tříště.
- 5) Opatrně napipetujte restriktázu a výslednou směs jemně promíchejte špičkou pipety.
- 6) Restriktázu ihned uschovejte v mrazáku na -20 °C. Rovněž zbylou vodu, pufr, a DNA uložte zpět do -20 °C.
- 7) Reakční směs přeneste do termostatu vytemperovaného na 60 °C.
- 8) Inkubujte po dobu 1 hodiny.
- 9) Reakci zastavte přidáním 6x GLB pufru (složení viz cvičení Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu) v poměru vzorek : 6 x GLB = 5 : 1
- 10) Proved'te kontrolu štěpení v 3,0% agarózovém gelu (viz cvičení Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu).

Reakční schéma (objemy jsou uvedeny v µl):

Komponenta	Množství
Voda	7,0 µl
NEB pufr 2 (10x)	2,0 µl
restriktáza <i>BstU</i> I (10 U/µl)	1,0 µl
PCR produkt (asi 100 ng/µl)	10,0 µl
Celkem	20,0 µl

Vyhodnocení

alela	počet fragmentů	bp
nestandardní homozygot EE	2	136 a 87
heterozygot EK	3	223, 136 a 87
standardní homozygot KK	1	223

Další informace k této problematice najdete v

Nejentsev S. et al. 2000: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) K469E polymorphism: no association with type 1 diabetes among Finns. *Tissue Antigens* 55: 568–570.

Papa A. et al. 2004: Prevalence of the K469E polymorphism of intercellular adhesion molecule 1 gene in Italian patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis.* 36 (8): 528-32.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Napište sekvenci nukleotidů v ampliconu získaného amplifikací standardní alely
- 2) Napište sekvenci nukleotidů v ampliconu získaného amplifikací nestandardní alely a vyznačte v ní pozici restrikčního místa pro restriktazu *BstU I*
- 3) Napište sekvenci aminokyselin v místě polymorfismu pro standardní a nestandardní alelu – vždy 3 aminokyseliny ve směru k N i C konci polypeptidového řetězce od místa polymorfismu

Detekce polymorfismu 1007fs v genu NOD2

(cvičení č. 11)

Úvodní slovo

Protein, který je kódován genem NOD2 patří do skupiny rozpoznávacích receptorů (PRRs) vrozené imunity. Tento receptor rozpoznává tzv. s patogenem asociované molekulární znaky (PAMP). Polymorfismem genu NOD2 je inserce cytosinu v pozici 3020 nukleotidové sekvence (odpovídá tripletu 1007). Jde tedy o posunovou mutaci (frame-shift mutation) v jejímž důsledku je porušen čtecí rámec a na ribosomech dochází k translaci nesprávné primární struktury proteinu. Polymorfismus se označuje 1007fs.

Spolu s dalšími dvěma mutacemi tvoří 81 % mutací, které souvisejí s Crohnovou chorobou. U heterozygotních forem je riziko vzplanutí Crohnovy choroby si 2 až 4x vyšší než u jedinců se standardní formou alely. U homozygotů je riziko dokonce 20 až 40x vyšší.

Cíl cvičení

Detekovat polymorfismus v genu pro NOD2 ve vzorku DNA z lidské krve izolované ve cvičení č. 1. Je možno použít DNA izolovanou též z plasmu, spermatu, a jiného biologického materiálu. Koncentrace DNA byla stanovena ve cvičení č. 4 nebo 5.

Seznam přístrojů

- termocykler PTC-100
- pikofuga
- sada pipet o objemech 0,5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl
- nádoba s ledem
- chladič bloček na -20 °C
- biologický termostat s nastavitelnou teplotou

Použité primery

N1007fs F

5' - CCT GCA GTC TCT TTA ACT GG- 3'

N1007fs R

5' - CTT ACC AGA CTT CCA GGA TG- 3'

S použitím těchto primerů lze získat amplikony o délce 168 bp. (respektive 169 pokud je přítomna inserce)

Restrikční endonukleáza

Polymorfismus je možno detekovat restrikční endonukleázou *NlaIV*, která štěpí amplikon na dva fragmenty v případě nestandardní alely. Standardní alela není štěpena.

Pozice primerů v sekvenci lidského genomu

Podle GenBank Accession Number - AJ303140

128521 atttgataaa ctcatctagt gaatggaaga gagacgggta catttcaactg atggtactga
128581 gcctttgttg atgagctcat tgggaatctc agacatgagc aggatgtgtc taaggacag
128641 gtgggcttca gtagactggc taactcctgc agtctcttta actggacagt tcaagagga
128701 aaaccaagaa tccttgaagc tcaccattgt atcttctttt ccaggttgc caataactgc
128761 atcacctacc taggggcaga agccctctg cagg~~X~~ccctg aaaggaatga caccatcctg
128821 gaagtctggt aaggcccctg ggcaggcctg ttttagctct ccgaacctca gttttctat
128881 ctgtaaatg gggtagcggg agagaggaat ggcagaattt tgaggatccc ttctgattct

N1007fs F

N1007fs R

Místo inserce X

Vlastní pracovní postup

Amplifikace

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 μ l, 5 až 50 μ l, 0,5 až 10 μ l), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkumavky, stojánek.
- 2) Nasad'te si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro pět reakcí smícháním následujících komponent:

Komponenta	Objem v μ l	
	1 reakce	6 reakcí
Taq Master Mix (QIAGEN)	10,0	60,0
Voda deionizovaná	7,8	~ 47,0
primer N1007fs F (100 μ M)	0,1 μ l	0,6
primer N1007fs R (100 μ M)	0,1 μ l	0,6

- 4) Směs rozdělte po 18 μ l do čtyř zkumavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 6 reakcí, ovšem v důsledku chyb při pipetování vám už asi na pátou reakci směs stačit nebude.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
A = 2 μ l izolované DNA
B = 2 μ l DNA standardního homozygota
C = 2 μ l DNA nestandardního homozygota
D = 2 μ l DNA heterozygota
N = 2 μ l deionizované vody – slouží jako negativní kontrola
- 6) Uzavřete zkumavky, řádně je popište a vložte do termocyklu.

7) Proved'te amplifikaci dle následujícího programu:

Krok č.	Teplota	Doba
1	94 °C	1 min
2	94 °C	20 s
3	45 °C	20 s
4	72 °C	30 s
5	GO TO 2	45x
6	72 °C	5 min
7	12 °C	nekonečný čas
8	END	

8) Po ukončení programu proved'te elektroforézu v 3,0% agarózovém gelu (viz cvičení Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu).

Restrikční štěpení

- 1) Z mrazáku -20 °C vyndejte vodu, pufr a nechejte rozmrazit. Po rozmrazení krátce centrifugujte kapičky roztoků ze stěn mikroskopických nádob na pikofuzy a uložte do nádoby s ledovou tříští.
- 2) Dle „reakčního schématu“ napipetujte do mikroskopických nádob jednotlivé komponenty reakce. Pracujte rychle, ale velmi opatrně tak, abyste do reakce nezařadili žádné nečistoty, které by poškodily průběh reakce. Všechny roztoky uchovávejte stále v nádobě s ledovou tříští.
- 3) Po nanesení poslední komponenty směs jemně promíchejte špičkou pipety.
- 4) Komponenty promíchejte jemným pohybem vyndejte z mrazáku restriktázu a v mrazicím bločku ji přineste k ostatním komponentám. Restriktázu nechejte v bločku, nedávejte ji do ledové tříště.
- 5) Opatrně napipetujte restriktázu a výslednou směs jemně promíchejte špičkou pipety.
- 6) Restriktázu ihned uschovejte v mrazáku na -20 °C. Rovněž zbylou vodu, pufr, a DNA uložte zpět do -20 °C.
- 7) Reakční směs přeneste do termostatu vytemperovaného na 37 °C.
- 8) Inkubujte po dobu 1,5 hodiny.
- 9) Reakci zastavte přidáním 6x GLB pufru (složení viz cvičení Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu) v poměru vzorek : 6 x GLB = 5 : 1
- 10) Proved'te kontrolu štěpení v 3,0% agarózovém gelu (viz cvičení Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu).

Reakční schéma (objemy jsou uvedeny v µl):

Komponenta	Množství
NEB pufr 4 (10x)	2,0 µl
BSA (10x)	2,0 µl
restriktáza <i>NlaIV</i> (10 U/µl)	1,0 µl
PCR produkt (asi 100 ng/µl)	15,0 µl
Celkem	20,0 µl

Vyhodnocení

alela	počet fragmentů	bp
nestandardní homozygot <i>3020insC/3020insC</i>	2	130 a 39
heterozygot <i>wild-type/3020insC</i>	3	168, 130 a 39
standardní homozygot <i>wild-type/wild-type</i>	1	168

Další informace k této problematice najdete v

Ogura Y. et al. 2001: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature 411: 603-606.*

Hugot J.-P. et al. 2001: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature 411: 599-603.*

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Napište sekvenci nukleotidů v ampliconu získaného amplifikací standardní alely
- 2) Napište sekvenci nukleotidů v ampliconu získaného amplifikací nestandardní alely a vyznačte v ní pozici restrikčního místa pro restriktazu *NlaIV*
- 3) Napište sekvenci aminokyselin v místě inserce a dále po směru translace pro standardní a nestandardní alelu. Porovnejte rozdíl.

Detekce polymorfismu v genu pro TMPT (thiopurin S-methyl transferáza) metodou real-time PCR (cvičení č. 12)

Úvodní slovo

TMPT se podílí na metabolismu thiopurinových léčiv (6-merkaptopurin, azathioprin) používaných jako cytostatika či imunosupresiva. Heterozygotní a homozygotní nositelé nestandardních alel mají sníženou aktivitu TMPT, která má za následek kumulaci aktivní látky v organismu a projevům netolerance při standardním dávkovacím schématu cytostatika. Homozygotní nositelé standardní alely mají zvýšenou (standardní - ovšem v literatuře se také objevuje spojení „standard or high“ existuje ale i alela TPMT*1A (C-178T), která má vyšší aktivitu než ta standardní) aktivitu TPMT a rychle odbourávají účinnou látku; to vede k riziku relapsu nádorového onemocnění.

Metoda využívá tzv. „real-time“ PCR, co je kombinované provádění DNA amplifikace a detekce cílové nukleové kyseliny současně v jedné zkumavce pomocí světelného signálu s fluoroforů. Fluorofory se navazují na amplikony nebo jsou jimi značeny hybridizační sondy. V reakci dokazující přítomnost polymorfismu (je přítomna sekvence standardní alely a sekvence nestandardní alely) je konkrétní alela asociována s fluorescencí konkrétního fluoroforu. Na základě přítomnosti signálů jednotlivých fluorescenčních látek (kvalitativní stanovení) je určen genotyp. Real-time PCR umožňuje také kvantitativní analýzu vzorku. Díky vztahu mezi intenzitou záření fluoroforu a množstvím k sondě komplementární DNA, která jej uvolní je, možné stanovit kvantitativní množství matrice vložené do reakce (kvantitativní PCR).

Cíl cvičení

Detekovat polymorfismus v genu pro TMPT ve vzorku DNA z lidské krve izolované ve cvičení č. 1. Je možno použít DNA izolovanou též z plasmu, spermatu, a jiného biologického materiálu. Koncentrace DNA byla stanovena ve cvičení č. 4 nebo 5.

Seznam přístrojů

- termocykler StepOne
- pikofuga
- sada pipet o objemech 0,5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl

Sekvence použitých sond

Sonda VIC 5' - CCAACTACACTGTGTCCCCGGTCTGCAAACCTGCATAAAATCATACATTTA - 3'

Sonda FAM 5' - CCAACTACACTGTGTCCCCGGTCTGGAAACCTGCATAAAATCATACATTTA - 3'

Vlastní pracovní postup

Amplifikace

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 μl , 5 až 50 μl , 0,5 až 10 μl), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkumavky, stojánek.
- 2) Nasad'te si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro pět reakcí smícháním následujících komponent:

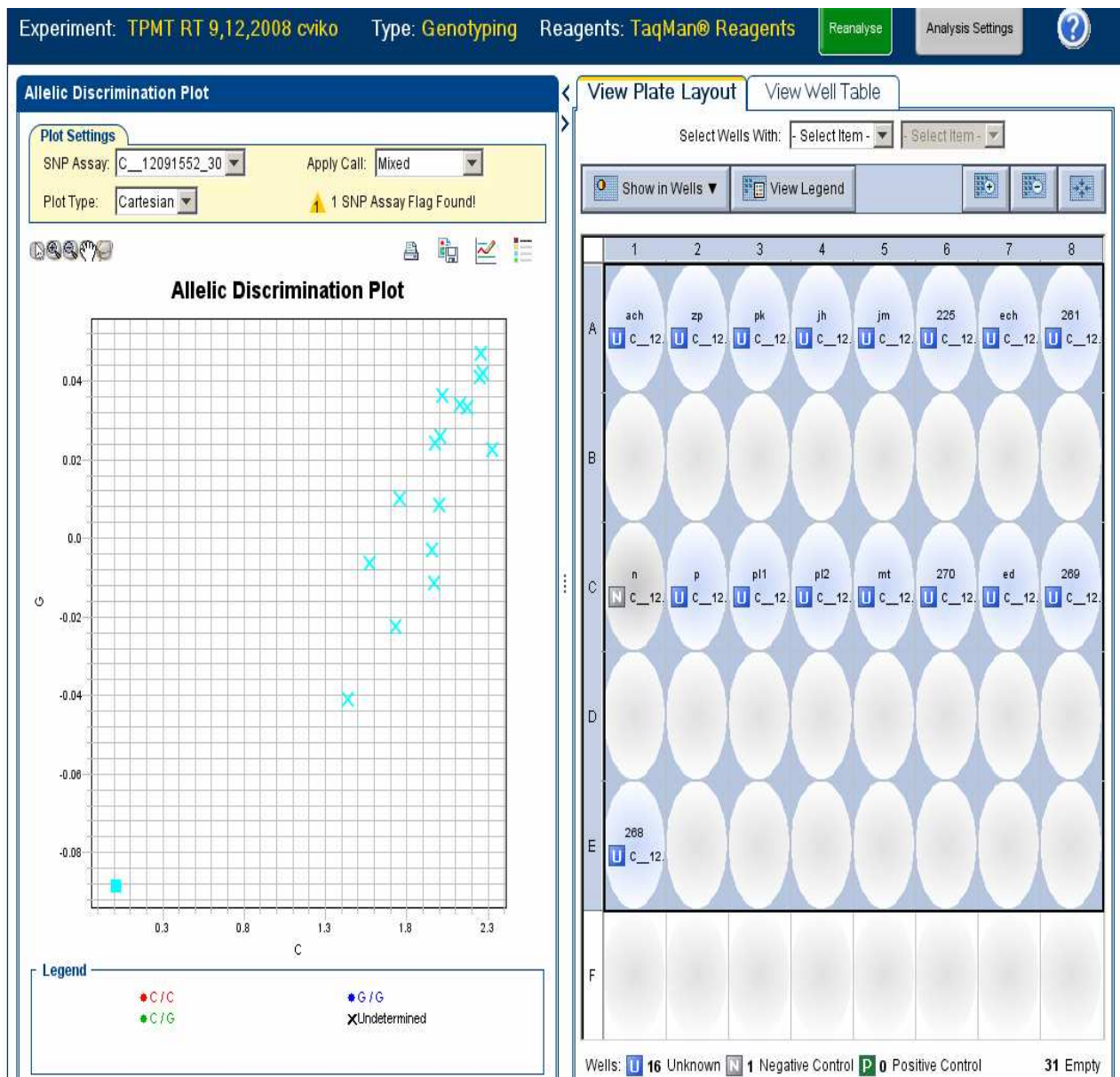
Komponenta	Objem v μl	
	1 reakce	6 reakcí
Master mix (2X)	10,0	60,0
H ₂ O	7,0	~ 47,0
Assay mix (20X)	1,0	0,6
DNA	2,0	0,6

- 4) Směs rozdělte po 18 μl do čtyř zkumavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 5 reakcí, ovšem v důsledku chyb při pipetování vám už asi na pátou reakci směs stačit nebude.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
 - A = 2 μl izolované DNA
 - B = 2 μl DNA standardního homozygota
 - C = 2 μl DNA nestandardního homozygota
 - D = 2 μl DNA heterozygota
 - N = 2 μl deionizované vody – slouží jako negativní kontrola
- 6) Uzavřete zkumavky a vložte je do Step-One termocykleru.
- 7) Proveďte amplifikaci dle následujícího programu:

Krok č.	Teplota	Doba
1	60 °C	30s
2	95 °C	10 min
3	95 °C	15 s
4	60 °C	1 min
5	GO TO 3	40x
6	60 °C	30 s
7	10 °C	nekonečný čas
8	END	

- 8) Po ukončení procesu amplifikace program vyhodnotí data a na základě fluorescence určí genotyp

Vyhodnocení



Další informace k této problematice najdete v

Yates C. R. et al.1997: Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: Genetic basis for azathiopurine and mercaptopurine intolerance. *Ann. Intern. Med.* 126: 608-614

Podrobný popis metodiky najdete na www.appliedbiosystems.com

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Popište základní princip kvalitativního a kvantitativního stanovení genotypu pomocí real-time PCR

Poznámky

Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu (cvičení č. 13)

Úvodní slovo

Elektroforéza v agarózovém gelu je standardní metoda pro dělení, identifikaci a purifikaci fragmentů DNA. Touto relativně jednoduchou metodou je možné rozdělit i komplexní směsi fragmentů DNA, které nelze rozdělit jinými způsoby, například centrifugací v hustotním gradientu. Kromě toho je při elektroforéze možné přímo sledovat jak polohu jednotlivých fragmentů a tím stanovit jejich velikost, tak díky fluorescenci po „obarvení“ ethidiumbromidem odhadnout i jejich koncentraci.

Princip elektroforézy spočívá v protlačování fragmentů DNA (nebo v principu jakýchkoli jiných makromolekul) rozpuštěných v tekutém prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli molekulovým sítem, který tvoří gel agarózy. Chemická struktura agarózy, to jsou střídající se zbytky D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-laktózy, vzájemně spojené střídavě vazbami β -1-4 a α -1-3.

Elektroforetickou pohyblivost ovlivňuje řada faktorů. Základní silou, která určuje pohyb DNA je skutečnost, že součástí struktury DNA jsou zbytky kyseliny fosforečné, které dávají molekule DNA celkový záporný náboj. Proto DNA putuje ve stejnosměrném elektrickém poli od záporného ke kladnému pólu. Rychlost pohybu DNA v elektrickém poli však není dána velikostí náboje, ale především jejími rozměry. Lineární fragmenty DNA se pohybují rychlostí, která je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Dalším důležitým faktorem je koncentrace agarózového gelu. Čím je vyšší koncentrace agarózy, tím hustší je síť, kterou musí fragmenty DNA procházet. Existují různé komerčně dostupné druhy agaróz, ale obecně platí, že na běžném agarózovém gelu (používají se koncentrace 0,6% až 3,0%) lze úspěšně rozdělit fragmenty o velikostech od 100 bp do 20 000 bp (20 kbp). Větší fragmenty vyžadují jiné uspořádání, tzv. pulsní gelovou elektroforézu. Rovněž konformace DNA má vliv na její pohyb. Jinou rychlostí se pohybují kompaktní struktury CCC plasmidové DNA, jinou její OC formy a jinou lineární fragmenty. Kromě toho je elektroforéza ovlivňována intenzitou elektrického pole, složením elektroforetického média (pufru) a teplotou. V tomto cvičení provedete elektroforézu ve 2% agarózovém gelu, v tris-borátovém pufru při laboratorní teplotě při napětí 10 V/cm gelu (optimální je 5 V/cm).

DNA je v gelu detekována po „obarvení“ ethidiumbromidem. Ethidiumbromid, který má planární strukturu se vmezeňuje mezi báze v nukleové kyselině. Po ozáření krátkovlnným ultrafialovým zářením fluoreskuje červeným světlem o vlnové délce 590 nm a to je možno zachytit fotografickým zařízením. Ethidiumbromid vmezeřený v DNA září asi 80x intenzivněji než ve volném stavu.

Cíl cvičení

Detekovat amplifikační produkty z předchozích cvičení.

Seznam přístrojů

- váhy s váživostí +/- 0,1 g
- aparatura pro elektroforézu
- mikrovlnná trouba
- sada pipet o objemech 10, 50 a 200 μ l

Příprava gelu

- 1) Připravte 1 litr 0,5xTBE pufru ze základního roztoku 5xTBE.
- 2) Změřte velikost gelu, jehož výška musí být 6 mm.
- 3) Spočítejte objem gelu a navážku agarózy na 2% gel.
- 4) Navážku agarózy vsypte do Erlenmeyerovy baňky o objemu alespoň 2x větším, než je uvažovaný objem gelu.
- 5) Odměřte objem 0,5xTBE pufru a nalijte do Erlenmeyerovy baňky s agarózou.
- 6) Vynulujte váhy s Erlenmeyerovou baňkou.
- 7) Dokonale rozvařte agarózu v mikrovlnné troubě, tzn. za průběžného míchání přivést 3 až 4x k varu. **Pozor na utajený var !**
- 8) Znovu zvažte Erlenmeyerovu baňku s rozvařenou agarózou a úbytek hmotnosti doplňte destilovanou vodou.
- 9) Zchlad'te rozvařenou agarózu na teplotu 50 až 60 °C (odhadem).
- 10) Přidejte roztok ethidium bromidu (0,15 mg/ml) v množství stanoveném podle objemu gelu. Platí, že množství přidaného objemu roztoku ethidiumbromidu v mikrolitrech musí být stejné jako objem gelu v mililitrech.
- 11) V průběhu zchlazování agarózy upevněte matrici pro tvorbu komůrek (hřebínek) do nalévací aparatury. Dolní okraj hřebínku se nesmí dotýkat dna - optimální je výška 1mm nad dnem. Nalévací aparatura musí být umístěna na vodorovné podložce.
- 12) Ochlazenou agarózu nalijte po opatrném ale důkladném zamíchání do nalévací aparatury, čistou špičkou odstraňte případné bubliny.
- 13) Nechte gel zatuhnout (asi 30 min.).
- 14) V průběhu tuhnutí nalijte elektroforetický pufr do elektroforetické vany.
- 15) Po zatuhnutí gelu vložte nalévací aparaturu včetně hřebínku do elektroforetické vany.
- 16) Tahem kolmo vzhůru vyjměte hřebínek.
- 17) Zkontrolujte neporušenost komůrek pro nanášení vzorku.
- 18) Zkontrolujte výšku hladiny pufru nad gelem – musí být alespoň 1mm nad gelem.

Nanesení vzorků, elektroforéza

- 1) Upravte polohu černé fólie pod nanášecí komůrky.
- 2) Do vzorku po PCR napipetujte koncentrovaný nanášecí pufr (6 x GLB) v poměru vzorek : 6 x GLB = 5 : 1.
- 3) Pipetou naneste 10 µl směsi do komůrek pod hladinu elektroforetického pufru.
- 4) Připojte elektroforetické kabely k vaně, zasuňte bezpečnostní kryt a připojte kabely ke zdroji - černý kabel k zápornému pólu, červený kabel ke kladnému pólu. Pozor na správnou orientaci vany. **DNA putuje od minus k plus pólu!**
- 5) Proveďte elektroforézu při 10 V/cm gelu.
- 6) Po 5 minutách zkontrolovat průběh elektroforézy, zejména správný směr pohybu detekční barvičky (bromfenolová modř) obsažené v 6 x GLB pufru.
- 7) Poté, co detekční barvička dosáhne asi 2/3 gelu (nebo uběhne předepsaná doba po kterou se má elektroforéza provádět, což je v našem případě asi 30 min.), ukončete elektroforézu.
- 8) Odpojte elektrické kabely od zdroje.
- 9) Nasad'te si rukavice.
- 10) Odsuňte bezpečnostní kryt z elektroforetické vany.
- 11) Přeneste gel na UV-transluminátor, proveďte vizuální kontrolu gelu, případně vyfotografujte na dokumentačním zařízení.

Další informace k této problematice najdete v

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Složení roztoků

5 x Tris-borátový pufr (5xTBE pufr)

(0,089M tris-borát/0,089M kyselina boritá/0,002M EDTA)

- 1) Navažte a postupně rozpustěte v 900 ml destilované vody 54 g trishydroxymethyl-aminomethanu a 27,5 g kyseliny borité.
- 2) Přidejte 20 ml 0,5M EDTA (pH 8,0).
- 3) Doplňte objem na 1 000 ml v analytické odměrné baňce.
- 4) Přelijte roztok do 1 000 ml láhve se šroubovacím uzávěrem.
- 5) Skladujte při 4 až 8 °C, při tomto způsobu skladování možno používat 6 měsíců.

Zásobní roztok ethidiumbromidu (10 mg/ml)

Ethidiumbromid je červená krystalická látka. **Je to mutagen a karcinogen, proto je nutné při jakékoli manipulaci s touto látkou nebo roztoky, které ethidiumbromid obsahují, pracovat v rukavicích a dodržovat zásady manipulace s mutageny a karcinogeny !**

- 1) Na analytických vahách navažte 100 mg krystalického ethidiumbromidu do umělohmotné zkumavky s uzávěrem.
- 2) Přidejte 10 ml destilované vody.
- 3) Po rozpuštění ethidiumbromidu skladujte roztok při laboratorní teplotě ve tmě, možno skladovat po dobu 5 let.

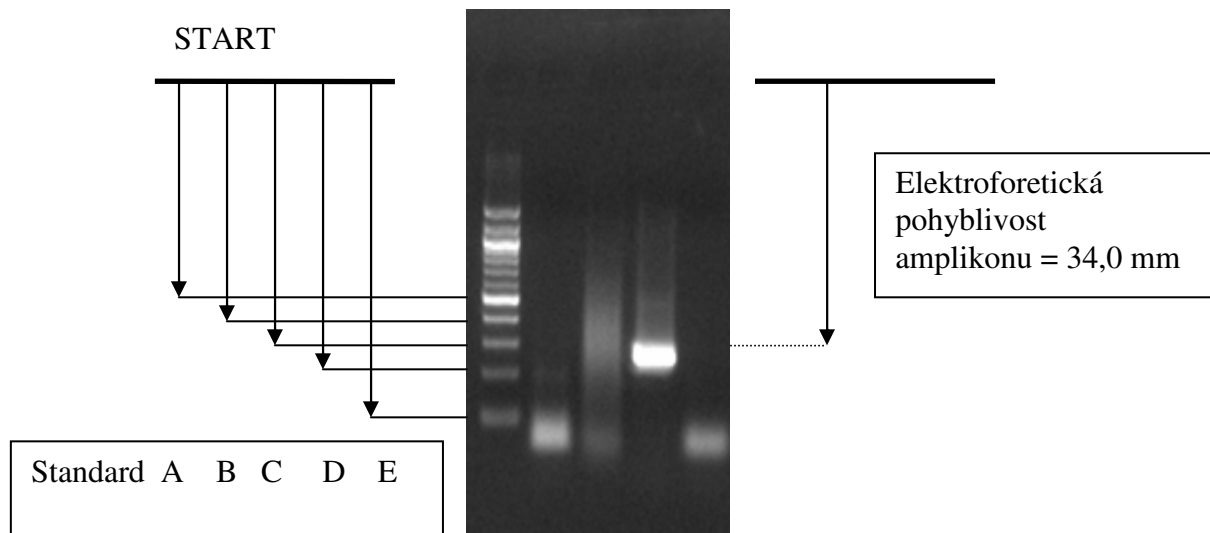
Nanášecí elektroforetický pufr s barvičkou (6 x GLB)

Pufr se připravuje v šestinásobném zahuštění, obsahuje detekční barvičku bromphenol blue.

- 1) Na analytických vahách navažte 0,5 g bromfenolové modři
- 2) Rozpusťte v 50 ml 1 x TBE pufru.
- 3) Přidejte 50 ml glycerolu.
- 4) Doplňte objem do 200 ml pomocí 1 x TBE pufru v analytické odměrné baňce.
- 5) Sterilizujte v přehřáté páře při 112 °C/30min.
- 6) Část roztoku po 1 ml sterilně rozpipetujte do sterilních 1,5 ml mikrozkupek typ „Eppendorf“.
- 7) Rozpipetované dávky a zbytek uskladněte při 4 až 8 °C, lze skladovat po dobu 10 let.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Závislost velikosti DNA na elektroforetické není lineární. V určitém zjednodušení může být vyjádřena logaritmickou funkcí. Stanovte délku amplifikačního produktu z obrázku výsledné elektroforézy.



Velikost standardů	Elektroforetická pohyblivost
A = 500 bp	29,0 mm
B = 400 bp	32,5 mm
C = 300 bp	35,5 mm
D = 200 bp	38,0 mm
E = 100 bp	45,0 mm

Návod řešení:

Vyneste hodnoty přirozeného logaritmu velikosti standardů a elektroforetické pohyblivosti do grafu a z něho pak odečtěte velikost amplikonu.

$$N = \ln X$$

kde

N = elektroforetická pohyblivost v cm

X = velikost DNA fragmentu v bp

- 2) Jaká je výsledná koncentrace ethidumbromidu ve Vámi připraveném agarózovém gelu?

- 3) Kolik ml zásobního roztoku ethidumbromidu (10mg/ml) použijete pro přípravu 100 ml roztoku o koncentraci 0,15 mg/ml?

Izolace DNA z agarózového gelu (cvičení č. 14)

Úvodní slovo

Během PCR reakce vznikají v malém množství i nespecifické amplikony. Pro některé aplikace (*in vitro* translace, klonování) je nutné získat potřebné úseky DNA ve velmi čisté podobě, bez příměsí nespecifických amplikonů a v roztoku, který by neinhiboval následné reakce. Po rozdělení produktů takové PCR reakce v agarózovém gelu, je možné požadovaný fragment DNA (amplikon) z gelu vyříznout a izolovat ho. K tomuto účelu byly vyvinuty komerčně dostupné soupravy, které to umožňují. Základem je pufr, který rozpustí agarózu a uvolní tak DNA do roztoku. Následuje navázání DNA na kolonku, její promytí a eluce do požadovaného roztoku. Takto izolovaný PCR fragment je velmi čistý, bez přítomnosti nespecifických produktů a solí.

Cíl cvičení

Izolovat PCR amplikon z agarózového gelu.

Seznam přístrojů

- sada pipet o objemech 10, 100 a 1000 μ l
- suchý termoblok
- centrifuga na 1,5 ml mikrozkušavky s otáčkami do 14.000 rpm (20.000 g)

Vlastní postup

1. Vyřízněte DNA fragment z gelu pomocí skalpelu. Odstraňte co nejvíce nadbytečné agarózy.
2. Zvažte kousek gelu v mikrozkušavce a přidejte 3 objemy QG pufru na 1 objem gelu (100 mg \approx 100 μ l).
3. Inkubujte 10 min. při 50 °C (nebo dokud se gel nerozpustí). Pro urychlení rozpouštění, vortexujte vzorek každé 2-3 min.
4. Až se gel rozpustí, přidejte 1 objem gelu (100 mg \approx 100 μ l) isopropanolu ke vzorku a zamíchejte (pokud má fragment velikost 500 až 4 000 bp, je možné tento krok přeskočit).
5. Naneste vzorek do kolonky a centrifugujte 1 min/ 10 000 g. Maximální kapacita kolonky je 800 μ l, pokud je objem vzorku větší, opakujte krok 5 se zbytkem vzorku na stejné kolonce.
6. Odstraňte proteklou fázi a vraťte kolonku zpět do sběrné zkumavky.
7. Přidejte 500 μ l QG pufru do kolonky a centrifugujte 1 min/ 10 000 g. V tomto kroku se odstraní veškeré zbytky agarózy.
8. Odstraňte proteklou fázi a vraťte kolonku zpět do sběrné zkumavky.
9. Přidejte 750 μ l PE pufru do kolonky a centrifugujte 1 min/ 10 000g.
10. Odstraňte proteklou fázi a vraťte kolonku zpět do sběrné zkumavky.
11. Centrifugujte 1 min/ při maximálních otáčkách pro odstranění reziduálního alkoholu z PE pufru.
12. Umístěte kolonku do čisté 1,5 ml mikrozkušavky.
13. Naneste 50 μ l EB pufru na střed membránky a centrifugujte 1 min/ 10 000 g.
14. Popište zkumavku a uchovejte vzorek s čistým PCR amplikonem.

Další informace k této problematice najdete v

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Spočítejte jaké přetížení působí na dně zkumavky na materiál, jestliže jste na vaší centrifuze použili maximální otáčky (krok 11. návodu), tj. 14 000 rpm. Poloměr rotoru je 7 cm.

Izolace RNA z myší tkáně (cvičení č. 15)

Úvodní slovo

Typická savčí buňka obsahuje přibližně desítky fg (femtogramů) RNA. Z toho 80-85 % tvoří ribozómová RNA (28S, 18S, 5,8S a 5S). Zbylých 15-20 % sestává z rozličných nízkomolekulárních druhů, tj. transferových RNA a malých jaderných RNA. Tyto druhy RNA jsou charakteristické definovanou velikostí a specifickými sekvencemi, proto je lze izolovat v poměrně čisté formě pomocí gelové elektroforézy, centrifugací v hustotním gradientu, iontoměničovou nebo vysokotlakou kapalinovou chromatografií.

Naproti tomu mediátorová RNA, mRNA, která tvoří 1 až 5 % celkové buněčné RNA představuje heterogenní skupinu molekul jak z hlediska velikosti (několik set až mnoho kilobází), tak sekvencí. Většina eukaryotické mRNA ale nese na svém 3'-konci úseky polyA díky kterým lze mRNA purifikovat afinitní chromatografií na oligo(dT) celulóze.

Protože ribóza obsahuje ve své struktuře hydroxylové skupiny v pozicích 2' a 3', je RNA chemicky mnohem reaktivnější než DNA a snadno se štěpí kontaminujícími RNázami. RNázy jsou enzymy, které hydrolyzují diesterové vazby spojující fosfát a zbytek ribózy. Protože jsou RNázy uvolňovány v průběhu lyze buňky a jsou také přítomny na kůži, je třeba být velmi opatrní při přípravě roztoků a pomůcek. RNázy jsou jednoduché enzymy složené z jediného polypeptidového řetězce, který navíc obsahuje několik intramolekulárních disulfidových můstků. Z těchto důvodů snadno renaturují a jsou proto velmi odolné vůči denaturaci varem nebo slabými denaturačními činidly. Nevyžadují jako kofaktory dvojmocné kationy a proto je, na rozdíl od DNáz, nelze inaktivovat pomocí chelatačních činidel, například ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). Nejspolehlivějším způsobem, jak se vyhnout problémům s RNázami, je vůbec jimi zpracováváný materiál nekontaminovat.

Přítomnost endogenních RNáz má za následek rychlou degradaci mRNA, proto je třeba odebírané tkáně co nejdříve zchladit, nejlépe na -70 °C. Rovněž při izolaci je třeba pracovat při snížené teplotě. Problémy s RNázami se řeší použitím inhibitorů RNáz. Existují tři druhy těchto inhibitorů:

- 1) Diethylpyrokarbonát (DEPC), alkylační činidlo, které se používá k inaktivaci RNáz v pufrách a pomůckách používaných k izolaci. Protože poškozuje i jiné proteiny a RNA, nelze jej použít při vlastní izolaci a purifikaci RNA a je nekompatibilní s některými puframi (například Trisem, ...).
- 2) Vanadyl ribonukleozidové komplexy, analogy které se vážou do aktivních míst mnoha RNáz a tím většinou kompletně inhibují jejich katalytickou aktivitu. Protože nemodifikují RNázy kovalentně musí být přítomny po celou dobu extrakce a purifikace RNA. Protože ale inhibují i RNA polymerázy a translaci *in vitro*, je nutné je před posledním krokem izolace odstranit (k tomu účelu se používá několikanásobná extrakce fenolem s přidávkem 0,1% hydroxychinolinu).
- 3) Proteinové inhibitory RNáz, proteiny o molekulové hmotnosti přibližně 50 000. Vyskytují se v cytoplasmě prakticky všech savčích tkání a ve velkém množství je lze izolovat z placenty. V podmínkách *in vivo* tyto proteiny fungují jako inhibitory proteinů patřících k superrodině pankreatických RNáz, zejména angiogeninu. Proteinové inhibitory RNáz působí specificky, neovlivňují jiné procesy v buňce a neinteragují s jinými složkami při izolaci RNA. Protože s RNázami netvoří kovalentní komplexy, nemohou být použity v přítomnosti denaturačních činidel, jako jsou SDS nebo guanidin, které se používají v prvních krocích izolace RNA, ve všech dalších krocích purifikace jsou už však účinné. Fenol je ničící.

Cíl cvičení

Izolovat mediátorovou RNA z různých tkání myši.

Seznam přístrojů

- laboratorní váhy
- třecí miska (sterilní, RNase-free)
- mikrozkušavky (sterilní, RNase-free)
- zvláštní sada pipet používaná pouze k izolaci RNA
- skalpel (sterilní, RNase-free)
- centrifuga na mikrozkušavky
- nádoba s ledem
- vortex

Příprava sterilního či RNase-free materiálu

Třecí misku 1x propláchněte roztokem RNaseZapu (Ambion, USA), 2x propláchněte destilovanou či DEPC vodou, usušte, zabalte do alobalu a sterilizujte v sušárně 2hod/200 °C.

Čistý skalpel 1x propláchněte roztokem RNaseZapu (Ambion, USA), 2x propláchněte destilovanou či DEPC vodou, usušte, zabalte do alobalu a sterilizujte v sušárně 2hod/200 °C

Vlastní pracovní postup

K izolaci použijte komerční soupravu RNeasy Mini Kit (QIAGEN).

- 1) Čerstvou tkáň či tkáň zmraženou na -70 °C vložte do nádoby s ledem, sterilním skalpelem uřízněte kousek potřebné velikosti (minimálně 0,5x0,5cm) a přeneste do mikrozkušavky.
- 2) Na laboratorních vahách předvažte prázdnou mikrozkušavku, vynulujte váhy, poté vyměňte za mikrozkušavku obsahující tkáň a zjistěte hmotnost kousku tkáně.
- 3) Tkáň přeneste do sterilní třecí misky a homogenizujte v prostředí tekutého dusíku.
- 4) Přidejte 350 µl lyzačního roztoku RLT s přísádkem β-merkapt ethanolu (10 µl β-merkapt ethanolu na 1ml roztoku RLT). Roztok obsahuje inhibitory RNáz.
- 5) Přeneste lyzát do kolony QIAshredder a centrifugujte po dobu při 14 000 g při laboratorní teplotě po dobu 2 min. Tím dojde k dokonalé homogenizaci vzorku.
- 6) Odstraňte kolonku a k lyzátu přidejte 350 µl 70% ethanolu, promíchejte pipetováním. Dojde k vysrážení RNA, kterou pak zachytíte na filtru (krok 7). Po přidání ethanolu se může vytvořit precipitát, na konečný výsledek to však nemá vliv.
- 7) Přeneste 700 µl vzorku, včetně případného precipitátu, na kolonku „RNeasy mini column“.
- 8) Centrifugujte při 8 000 g při laboratorní teplotě po dobu 15 sekund. Odstraňte fázi, která proteče na dno jímací zkumavky. Na filtru zachycenou RNA nyní promyjete několika roztoky.
- 9) Na filtr kolony napipetujte 700 µl pufru RW1 a centrifugujte při 8 000 g při laboratorní teplotě po dobu 15 sekund. Odstraňte fázi, která proteče na dno jímací zkumavky.
- 10) Přeneste kolonku do nové jímací zkumavky. Na filtr kolony napipetujte 500 µl pufru RPE a centrifugujte při 8 000 g při laboratorní teplotě po dobu 15 sekund. Odstraňte fázi, která proteče na dno jímací zkumavky. Upozornění! Při prvním použití pufru RPE do něj nezapomeňte přidat ethanol podle doporučení výrobce.

- 11) Opakujte promytí, tj. na filtr kolonky napipetujte 500 μ l pufru RPE a centrifugujte při 8 000 g při laboratorní teplotě, tentokrát po dobu 2 min. Odstraňte fázi, která proteče na dno jímací zkumavky.
- 12) Filtr v kolonce musí v kroku 11) dokonale vyschnout. Proto je vhodné vložit kolonku do nové jímací zkumavky a centrifugovat při 14 000g při laboratorní teplotě, tentokrát po dobu 1 min
- 13) Přeneste kolonku do nové zkumavky (RNase-free) a přímo na filtr napipetujte 30 až 50 μ l RNase-free vody. Centrifugujte při 8 000 g při laboratorní teplotě po dobu 1 min. RNA je na dně zkumavky, uskladněte ji při -70 °C.

Další informace k této problematice najdete v

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jedna savčí buňka obsahuje 100 fg RNA. Kolik je to ribonukleotidů? Jeden ribonukleotid má molekulovou hmotnost přibližně 360.
- 2) Koncentraci RNA lze podobně jako koncentraci DNA stanovit spektrofotometricky. Platí převodní vztah, že ssRNA má koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$, jestliže OD_{260} v 1 cm kyvetě je rovna 1,0. Přepočtěte tento údaj na molaritu.
- 3) Jaká je kódovací kapacita (uved'te v počtu aminokyselin) molekuly mRNA, která má molekulovou hmotnost 108 000. Předpokládejte, že všechny nukleotidy v molekule této mRNA se uplatní při tvorbě kodonů, zanedbejte regulační oblasti.

Zpětná transkripce a příprava cDNA genu pro G3PDH (cvičení č. 16)

Úvodní slovo

Zpětná transkripce pomocí oligo dT umožňuje přepis všech mRNA vláken do odpovídajících cDNA. Ke zjištění, zda zpětná transkripce proběhla, je třeba provést amplifikaci na některý housekeeping gen (vyskytuje se ve všech tkáních u velkého množství organismů). Jedním z takovýchto genů je gen pro G3PDH (glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza), který po amplifikaci dává fragment o velikosti 983 bp. V případě pozitivního výsledku na G3PDH lze předpokládat, že zpětná transkripce proběhla v pořádku a testované vzorky lze podrobit dalším pokusům.

Cíl cvičení

Připravit cDNA a amplifikovat G3PDH z celkové RNA izolované ve cvičení č. 11.

Seznam přístrojů

- vodní lázeň
- nádoba s ledem
- chladicí bloček na -20 °C
- pikofuga
- mikrozkušavky (sterilní, RNase-free)
- umělohmotné špičky na pipety (sterilní)
- termocykler

Vlastní pracovní postup

1. Příprava cDNA

K přípravě cDNA použijte komerční soupravu „Advantage RT-for-PCR Kit“ (Clontech)

- 1) Předehřejte vodní lázeň na 70 °C.
- 2) Připravte si vaničku s ledem.
- 3) Vytáhněte z mrazáku komponenty soupravy „Advantage RT-for-PCR Kit“, tedy DEPC-treated water, Oligo dT primer – 20 μM, 5x Reaction buffer, Recombinant Rnase inhibitor - 40 U/μl, dNTP mix (10 mM each), Control RNA – 1 μg/μl , uložte vše na led a nechejte rozmraznout.
- 4) Vytáhněte izolovanou RNA (rozpuštěnou ve vodě) z -70 °C, uložte na led a nechejte rozmraznout.
- 5) Po rozmrazení všech komponent je všechny krátce stočte na pikofuze a vraťte na led.
- 6) Do 0,5ml PCR zkumavky, označené V (jako VZOREK) napipetujte 0,2-1 μg RNA (celkový objem musí být 12,5 μl, chybějící množství doplňte vodou).
- 7) Do další zkumavky označené písmenem K (jako KONTROLA) napipetujte 1 μl „Control RNA“ a 11,5 μl vody. Tato zkumavka slouží jako pozitivní kontrola zpětné transkripce).

- 8) Do obou zkumavek přidejte 1 µl 20µM „Oligo dT primeru“, promíchejte pipetováním (špička s filtrem) a stočte případné kapky, které by vznikly na stěnách zkumavek.
- 9) Směs RNA s „Oligo dT primery“ zahřejte ve vodní lázni na 70 °C/2 min. a rychle přeneste zpět na led.
- 10) Dále přidejte: 4 µl 5x Reaction bufferu, 1 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl Recombinant RNase inhibitoru, promíchejte pipetováním (špička s filtrem) a stočte případné kapky, které by vznikly na stěnách zkumavek.
- 11) Z mrazáku vytáhněte „MMLV reverse transcriptase“ a udržujte ji na chladícím bločku.
- 12) Přidejte 1 µl „MMLV reverse transcriptase“ ke směsi a promíchejte pipetováním.
- 13) Reakční směsi vložte do termocykleru a spusťte program RT (inkubace 42 °C/1 hod., zahřátí 94 °C/5 min.)
- 14) Po skončení programu vyjměte reakční směsi a krátce stočte na pikofuze.
- 15) Zřed'te cDNA přidáním 80 µl DEPC vody a promíchejte pipetováním (špička s filtrem).
- 16) Rozpipetujte cDNA do malých PCR zkumavek po 10 µl, popište a uložte do -70 °C.
- 17) cDNA určenou k okamžitému použití ihned uložte na led.

2. Kontrola průběhu zpětné transkripce – příprava genu pro G3PDH amplifikací

Použité primery

Komerční primery ze soupravy „Advantage RT-for-PCR Kit“ (CLONTECH), primery poskytují amplikon o velikosti 983 bp.

Vlastní pracovní postup

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 µl, 5 až 50 µl, 0,5 až 10 µl), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkumavky, stojánek.
- 2) Nasad'te si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro čtyři reakce smícháním následujících komponent:

Komponenta	Objem v µl	
	1 reakce	4 reakce
Taq Master Mix (QIAGEN)	25,0	100,0
Voda deionizovaná	14,6	68,4
Primer F (100µM)	0,2	0,8
Primer R (100µM)	0,2	0,8

- 4) Směs rozdělte po 40 µl do čtyř zkumavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 4 reakce, potřebujete 3 reakce, zbytek směsi zůstane nevyužit.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
A = 10 µl cDNA ze vzorku V
B = 10 µl cDNA ze vzorku K
N = 10 µl deionizované vody.
- 6) Uzavřete zkumavky, řádně je popište a vložte do termocykleru.

7) Proveďte amplifikaci dle následujícího programu:

Krok č.	Teplota	Doba
1	94 °C	5 min
2	94 °C	45 s
3	60 °C	45 s
4	72 °C	2 min.
5	GO TO 2	25x
6	72 °C	7 min
7	10 °C	nekonečný čas
8	END	

8) Po ukončení programu proveďte elektroforézu v 1% agarózovém gelu (viz cvičení č. 10).

Další informace k této problematice najdete v

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Advantage RT-for-PCR Kit. Manuál firmy BD Biosciences, USA.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jedna jednotka zpětné transkriptázy z Moloney Murine Leukemia Viru (M-MuLV) inkorporuje 1 nmol dTTP do struktury DNA na RNA matrici za 10 minut při 37 °C. Za předpokladu, že podobnou rychlostí inkorporuje ostatní deoxyribonukleotidy stanovte rychlost v nukleotidech za sekundu.
- 2) S jakou četností se na nahodilé sekvenci mRNA může vyskytovat specifický hexanukleotid?
- 3) Uvažujte rychlost syntézy DNA zpětnou transkriptázou podle zadání v úloze č. 1. Kolik μl zpětné transkriptázy ze zásobního roztoku o koncentraci 20 000 U/ml použijete k přípravě molekul DNA o průměrné délce 500 nukleotidů tak, aby teoretický výtěžek při 10% účinnosti syntézy činil 500 ng DNA?

Příprava rekombinantního genu pro lidský leptin amplifikací (cvičení č. 17)

Úvodní slovo

Mechanismus, kterým je vyvažován příjem potravy a výdej energie, určuje, kdo bude obézní a kdo štíhlý. Jedním z hormonů, které regulují energetickou rovnováhu, je produkt genu ob - leptin. Název proteinu - leptin - pochází z řeckého slova *leptos* = *tenký*. Mutace v genu ob má u myši za následek extrémní obezitu a diabetes typu II jako součást syndromu, který se podobá morbidní obezitě u lidí.

Leptin je řazen mezi cytokiny s helikální strukturou skupiny TNF (tumor necrosis factor). Funguje v signální dráze vedoucí od adipózní tkáně do hypothalamu, kde působí na regulaci množství tělního tuku. Hlavním místem exprese leptinu je bílá tuková tkáň, velmi slabá exprese byla zjištěna v hnědé tukové tkáni. Leptin je dále exprimován v placentě, buňkách granulosa preovulačního folikulu, v ovocytu a v menší míře i v jiných tkáních.

Prvním a hlavním účinkem leptinu je působení přes specifické receptory umístěné v CNS (v hypothalamu) a v periferních tkáních. Leptin omezuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej, působí tedy jako lipostat. Leptin už dnes většina vědecké obce přijímá jako klíčovou komponentu lipostatu, teoretického fyziologického mechanismu, který kontroluje adipositu. Zjednodušeně řečeno, leptin signalizuje množství tukové tkáně centrálnímu nervovému systému. Přímě inhibuje koncentraci vnitrobuněčných tuků omezováním syntézy mastných kyselin a triglyceridů a současným zvyšováním oxidace lipidů. Leptin hraje úlohu také v reprodukci, regulaci nástupu puberty, při anorexii a bulimii a řadě poruch, které souvisí s výživou.

Gen pro lidský leptin byl objeven v roce 1994. Je lokalizován na chromozómu 7 v pozici 7q31.3, je dlouhý 650 kbp a obsahuje 3 exony oddělené 2 introny. První intron, dlouhý 10,6 kbp se nachází v nepřekládané oblasti na 5'-konci, 29 bp proti směru transkripce od iniciačního kodonu ATG. Druhý intron je dlouhý 2,3 kbp. Exony mají délku 29, 172 a 4039 bp. Oblast, na které dochází k iniciaci transkripce, se nachází 54-57 bp proti směru transkripce od iniciačního kodonu. Gen ob se přepisuje do hnRNA dlouhé 4,5 kb, která je postranskripčně upravována do mRNA dlouhé 504 bp. Alternativním sestřihem v místě glutamin +49 vznikají po translaci dvě varianty leptinu dlouhé 166 nebo 167 aminokyselin. Produkt translace má charakteristiky typické pro sekretované proteiny, po translaci je z pre-proteinu odštěpeno 21 aminokyselin signální sekvence.

Cíl cvičení

Připravit amplikon genu ob s připojenými restričními místy pro účely klonování do plasmidového vektoru.

Stanoveného cíle dosáhnete dvoukrokovou amplifikací. V prvním kroku připravíte tzv. primární amplikon, který přesahuje kódující sekvenci genu ob po obou stranách. Ve druhém kroku z tohoto amplikonu připravíte kratší úsek, tzv. sekundární amplikon, který vymezuje kódující sekvenci a má připojeny sekvence specifické pro dvě vybrané restriční endonukleázy. Amplikon získaný ve druhém kroku je výchozím materiálem pro klonování (cvičení č. 14).

Jako výchozí materiál bude použita cDNA z lidské tukové tkáně nebo lidské placenty dodávaná firmou CLONTECH. cDNA je také možno připravit z mRNA postupem popsáním ve cvičeních č. 11 a 12.

Seznam přístrojů

- termocykler PTC-100
- pikofuga
- sada pipet o objemech 10, 50 a 200 µl

Použité primery

LEP-2:

5′- CTT CTT GGG AAG GAA AAT GC - 3′

LEP-530:

5′- GTA GAC TTG CAG GAA GAG TG - 3′

Těmito primery je možno získat primární amplikon o velikosti 548 bp

HLEP81KPN:

5′-GCN NNG GTA CCC GTG CCC ATC CAA AAA GTC CA -3′

HLEP524XBA:

5′- GCN CTC TAG AGG TCA GCA CCC AGG GCT GAG GTC -3′

Těmito primery je možno získat sekundární amplikon o velikosti 462 včetně připojených restričních míst pro restriktázy *Kpn* I a *Xba* I.

Vlastní pracovní postup

Příprava primárního amplikonu

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 µl, 5 až 50 µl, 0,5 až 10 µl), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkumavky, stojánek.
- 2) Nasadte si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro čtyři reakce smícháním následujících komponent:

Komponenta	Objem v µl	
	1 reakce	4 reakce
Taq Master Mix (QIAGEN)	25,0	100,0
Voda deionizovaná	14,6	68,4
Primer LEP-2 (100µM)	0,2	0,8
Primer LEP-530 (100µM)	0,2	0,8

- 4) Směs rozdělte po 40 µl do čtyř zkumavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 4 reakce, potřebujete 3 reakce, zbytek směsi zůstane nevyužit.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
A = 10 µl cDNA ze vzorku V
B = 10 µl cDNA ze vzorku K
N = 10 µl deionizované vody.
- 6) Uzavřete zkumavky, řádně je popište a vložte do termocyklieru.

7) Proved'te amplifikaci dle následujícího programu:

Krok č.	Teplota	Doba
1	94 °C	5 min
2	94 °C	30 s
3	58 °C	30 s
4	72 °C	1 min.
5	GO TO 2	34x
6	72 °C	5 min
7	10 °C	nekonečný čas
8	END	

8) Po ukončení programu proved'te elektroforézu v 1,5% agarózovém gelu (viz cvičení č. 10).

Příprava sekundárního amplikonu

- 1) Připravte si mikropipety (rozsah 50 až 200 μ l, 5 až 50 μ l, 0,5 až 10 μ l), tři druhy špiček s filtrem, PCR zkumavky, stojánek.
- 2) Nasad'te si rukavice.
- 3) Namíchejte směs pro čtyři reakce smícháním následujících komponent:

Komponenta	Objem v μ l	
	1 reakce	4 reakce
Taq Master Mix (QIAGEN)	25,0	100,0
Voda deionizovaná	14,6	68,4
Primer HLEP81KPN (100 μ M)	0,2	0,8
Primer HLEP524XBA (100 μ M)	0,2	0,8

- 4) Směs rozdělte po 40 μ l do čtyř zkumavek.
Poznámka: Připravili jste směs na 4 reakce, potřebujete 3 reakce, zbytek směsi zůstane nevyužit.
- 5) Do jednotlivých směsí přidejte následující vzorky:
A = 5 μ l primárního amplikonu + 5 μ l deionizované vody
B = 10 μ l primárního amplikonu
N = 10 μ l deionizované vody.
- 6) Uzavřete zkumavky, řádně je popište a vložte do termocykleru.
- 7) Proved'te amplifikaci dle stejného programu jako pro získání primárního amplikonu:
- 8) Po ukončení programu proved'te elektroforézu v 1,5 % agarózovém gelu (viz cvičení č. 10).

Další informace k této problematice najdete v

Masuzaki H. et al. 1995: Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44, 855-858.

Zhang Y. et al. 1994: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) V uvedené sekvenci aminokyselin pre-proteinu pro leptin vyznačte sekvenci signálního peptidu. Kterou aminokyselinou pak začíná vlastní leptin?

MHWGTLGFL WLWPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS
VSSKQKVTGL DFIPGLHPIL TLSKMDQTLA VYQQILTSMP SRNVIQISND
LENLRDLLHV LAFSKSCHLP WASGLETLDS LGGVLEASGY STEVVALSRL
QGSLQDMLWQ LDLSPGC

- 2) Stanovte teplotu annealingu pro primery LEP2 a LEP530.

- 3) V uvedené sekvenci části genu ob vyznačte pozice primerů LEP2, LEP530, a částí primerů HLEP81KPN a LEP530XBA. Vyznačte také iniciační a terminační kodon.

```
1  gcttcttggg aaggaaaatg cattggggaa cctgtgceg attcttgtgg ctttggccct
61  atcttttcta tgtccaagct gtgccatcc aaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca
121 tcaagacaat tgtcaccagg atcaatgaca ttccacacac gtcagtctcc tccaaacaga
181 aagtcaccgg tttggacttc attcctgggc tccaccccat cctgacctta tccaagatgg
241 accagacact ggcagtctac caacagatcc tcaccagtat gccttccaga aacgtgatcc
301 aaatatccaa cgacctggag aacctccggg atcttcttca cgtgctggcc ttctctaaga
361 gctgccactt gccctgggcc agtggcctgg agaccttggg cagcctgggg ggtgtcctgg
421 aagcttcagg ctactccaca gaggtgggtg ccctgagcag gctgcagggg tctctgcagg
481 acatgctgtg gcagctggac ctcagccctg ggtgctgagg ccttgaaggt cactcttctc
541 gcaagactac gttaagggaa ggaacctggc ttcaggtatc tccaggattg aagagcattg
601 catggacacc cttatcagga ctctgtcaat tcctgactct ctag
```

Simultánní štěpení amplikonu a vektoru (cvičení č. 18)

Úvodní slovo

Jednou z možností, jak naklonovat gen do plasmidu, je rozštěpit plasmid a klonovaný gen restriční endonukleázou. Na obou molekulách pak vzniknou dva konce, které je následně možno spojit ligázou. Přitom z jednoho řetězce naštěpené molekuly vyčnívá fosfátová skupina, druhý řetězec obsahuje 3'-OH skupinu (viz obrázek 14.1).

Obrázek 14.1: Struktura konců plasmidu po rozštěpení restriktázou *EcoR* I:



Při použití jediného enzymu dochází při ligaci k přednostnímu znovuspojení konců na plasmidu a účinnost klonování je nízká. To se obchází použitím fosfatázy, která z konců vzniklých restričním štěpením odstraní fosfáty (viz obrázek 14.2), čímž recirkulaci znemožní.

Obrázek 14.2: Struktura konců plasmidu po rozštěpení restriktázou *EcoR* I a působení fosfatázy:



I takový způsob klonování má však nevýhodu spočívající v tom, že může dojít k naklonování fragmentu v obou orientacích, přičemž jen jedna zajišťuje správnou transkripci a následnou expresi rekombinantního proteinu.

Při tzv. orientovaném klonování je vektor naštěpen dvěma různými restriktázami se vzájemně nekompatibilními konci. Podobně je upraven fragment, který je do plasmidu vnášen. Tento způsob klonování zajistí, že plasmid nebude ligací recirkulován, a že gen bude naklonován ve správné orientaci.

Restriční štěpení dvěma restriktázami s sebou nese komplikaci v tom smyslu, že ne všechny restriktázy štěpí ve stejném pufru a za stejné teploty. Proto je nutné buďto zvolit takové restriktázy, které štěpí za stejných podmínek, potom je možné provést štěpení v jediné reakci. Pokud restriktázy štěpí za vzájemně nekompatibilních podmínek, je nutné provést postupné štěpení, nejprve jednou a po pročištění druhou restriktázou. Jako první se používá restriktáza, která štěpí v pufru s nižší koncentrací iontů.

O tom, že restriční štěpení proběhlo je nesnadné se přesvědčit. Velikost fragmentu před štěpením a po štěpení zůstává elektroforézou nerozlišitelná. Jak ale víme z úlohy č. 6, je elektroforézou možno odlišit CCC a L formu plasmidu. Proto budeme štěpit amplifikovaný fragment genu v jedné reakci s plasmidovou DNA. Rozštěpení plasmidu bude dobrým indikátorem funkce enzymu a je tedy pravděpodobné, že enzym rozštěpil i konce amplikonu.

Cíl cvičení

Spojit ligací vektor pTrxFus s amplikonem genu ob připraveným ve cvičení č. 13. Plasmid pTrxFus je jedním z vektorů používaných pro expresní klonování genů.

Seznam přístrojů

- sada pipet 0,5-10 μl , 5-50 μl , 20-200 μl
- sada sterilních umělohmotných špiček na pipety
- sterilní umělohmotné Eppendorfký
- vana s ledem
- chladičí bloček na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- biologický termostat s nastavitelnou teplotou
- pikofuga

Vlastní pracovní postup

- 1) Z mrazáku $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vyndejte plasmidovou DNA, vodu, pufr a všechny komponenty nechejte rozmrazit. Po rozmrazení krátce centrifugujte kapičky roztoků ze stěn mikrozkuvek na pikofuze a uložte do nádoby s ledovou tříští.
- 2) Dle „reakčního schématu“ napipetujte do mikrozkuvek jednotlivé komponenty reakce. Pracujte rychle, ale velmi opatrně tak, abyste do reakce nezanесли žádné nečistoty, které by poškodily průběh reakce. Všechny roztoky uchovávejte stále v nádobě s ledovou tříští.
- 3) Po nanesení poslední komponenty směs jemně promíchejte špičkou pipety.
- 4) Vyndejte z mrazáku restriktázy a v mrazícím bločku je přineste k ostatním komponentám. Restriktázu nechejte v bločku, nedávejte ji do ledové tříště.
- 5) Opatrně napipetujte restriktázy a výsledné směsi jemně promíchejte špičkou pipety.
- 6) Restriktázy ihned uschovejte v mrazáku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rovněž zbylou vodu, pufr, a DNA uložte zpět do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7) Reakční směsi přeneste do termostatu vytemperovaného na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 8) Inkubujte po dobu 1 hodiny.
- 9) Reakci zastavte přidáním 0,5M EDTA, pH 8,0 (1 μl na 50 μl restriktční směsi).
- 10) Proveďte kontrolu štěpení v 1,2% agarózovém gelu (viz cvičení č. 10).

Reakční schéma (objemy jsou uvedeny v μl):

	I. restriktáza	II. restriktáza	Směs restriktáz
Voda	$50-(11+X+Y)$	$50-(11+X+Y)$	$50-(12+X+Y)$
pufr	5	5	5
BSA 10x	5	5	5
plasmid	Y	Y	Y
amplikon	X	X	X
<i>Kpn</i> I (10u/ μl)	1	-	1
<i>Xba</i> I (10u/ μl)	-	1	1
Celkem	50	50	50

Y = zpravidla 5 μl

X = zpravidla 10-15 μl (za normálních okolností by počet molekul amplikonu mělo být zhruba 5x vyšší než počet molekul plasmidové DNA)

Poznámky pro vypracování protokolu:

Zásobní koncentrace mého plasmidu byla:

Koncentrace amplikonu byla:

Výsledné reakční schéma vypadalo následovně:

	I. restriktáza	II. restriktáza	Směs restriktáz
Voda			
pufr	5	5	5
BSA 10x	5	5	5
plasmid			
amplikon			
<i>Kpn</i> I (10 U/ μ l)	1	-	1
<i>Xba</i> I (10 U/ μ l)	-	1	1
Celkem	50	50	50

Fotografie elektroforézy a vyhodnocení restrikčního štěpení:

Další informace k této problematice najdete v

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Kolik molekul obsahuje 5 μl plasmidu pTrxFus (velikost 3 600 bp) jestliže jeho zásobní koncentrace je 100 $\mu\text{g/ml}$?
- 2) Kolik molekul obsahuje 10 μl amplikonu o velikosti 500 bp, jestliže jeho koncentrace je 250 $\mu\text{g/ml}$?
- 3) V jakém množství smícháte vektor pTrxFus a amplikon pro ligaci, jestliže zásobní koncentrace vektoru je 200 $\mu\text{g/ml}$ a koncentrace amplikonu je 600 $\mu\text{g/ml}$? Do reakce můžete vložit maximálně 5 μl směsi.

Ligace vektoru a naštěpené DNA (cvičení č. 19)

Úvodní slovo

Ligaci, neboli spojení 5'-fosfátového a 3'-OH konce DNA nebo RNA katalyzuje enzym ligáza. Tento enzym spojuje jak tupé tak kohezivní konce. Kromě toho působí při reparaci jednořetězcových zářezů v dsDNA, dsRNA nebo v hybridních molekulách DNA/RNA.

K ligaci se nejčastěji používá DNA ligáza z bakteriofága T4 (T4 DNA ligáza) nebo méně účinná DNA ligáza z *Escherichia coli*. T4 DNA ligáza využívá jako zdroj energie ATP, spojuje tupé i kohezivní konce, kdežto DNA ligáza z *Escherichia coli* využívá NAD a spojuje pouze konce kohezivní, je však při spojování konců přesnější. Oba enzymy mají reakční optimum při 14-16 °C.

Vedle dvou zmíněných ligáz se využívá termostabilní DNA ligáza izolovaná z *Thermus aquaticus*. Tento enzym spojuje dva oligonukleotidy, které jsou hybridizovány vedle sebe na komplementárním DNA řetězci. Její reakční optimum je mezi 45 °C až 65 °C, jako kofaktor vyžaduje NAD. V určitých aplikacích (ligase chain reaction, ligase detection reaction) se využívá k amplifikacím a nahrazuje metodu PCR.

Další z enzymů, T4 RNA ligáza, využívá jako substrát jednořetězcovou RNA, ssDNA a dinukleosid pyrofosfáty. Teplotní optimum má při 37 °C.

Při praktickém provedení je nutné mít na paměti, že ligace tupých konců je méně účinná, a proto je nutné při spojování tupých konců zvýšit koncentraci enzymu.

Poznámka: Jedna jednotka T4 DNA ligázy od firmy New England Biolabs je množství enzymu, které spojí 50% *Hind* III fragmentů DNA fága λ (koncentrace 5'-konců 0,12 μ M, 300 μ g/ml) ve reakci o objemu 20 μ l za 30 minut při 16 °C. Takto definovaná jedna jednotka je ekvivalentní 0,015 Weissovým jednotkám.

Cíl cvičení

Spojit ligací vektor pTrxFus s amplikonem genu ob připraveným ve cvičení č. 14. Plasmid pTrxFus je jedním z vektorů používaných pro expresní klonování genů.

Seznam přístrojů

- sada pipet 0,5-10 μ l, 5-50 μ l, 20-200 μ l
- sada sterilních umělohmotných špiček na pipety
- 0,5 ml PCR zkumavky
- vana s ledem
- chladič bloček na -20 °C
- vodní lázeň
- pikofuga
- termocykler PTC-100

Vlastní pracovní postup

- 1) Na termocykleru nastavte program pro ligaci.
- 2) Vytemperujte vodní lázeň na 60 °C.
- 3) Z -20 °C vyndejte naštěpenou plasmidovou DNA a DNA sekundárního amplikonu připravené ve cvičení č. 14. Dále vyndejte vodu, ligační pufr.
- 4) Všechny komponenty nechejte rozmrazit na ledu, poté krátce stočte na pikofuze a uchovávejte na ledu.
- 5) Ligázu uchovávejte v mrazícím bločku.
- 6) Zahřejte plasmid a amplikon 10 min. při 60 °C.
- 7) Připravte ligační směs dle schématu, napipetujte do 0,5 ml PCR zkumavek všechny příslušné složky, ligázu až nakonec.
- 8) Všechny komponenty promíchejte mícháním špičkou.
- 9) Zbylé komponenty uskladněte při -20 °C.
- 10) Ligační směsi stočte krátce na pikofuze a vložte do termocykleru. Nezapínejte vyhřívané víko!
- 11) Inkubujte při 16 °C po dobu 1 až 4 hodin.
- 12) Poté použijte ligační směs ke transformaci bakteriálních buněk - viz úloha č. 17.

Ligační směsi (objemy jsou uvedeny v µl):

Komponenty	Pokusné zásahy			
	1	2	3	K**
Ligace č.				
Voda	7	5	3	4
10x pufr	1	1	1	1
Fragment + vektor*	1*	3*	5*	5*
T4 DNA ligáza	1	1	1	-
Celkem	10	10	10	10

* množství směsi v ligaci se řídí kvalifikovaným odhadem na základě koncentrace DNA v restričních směsích po přečištění. Aby bylo dosaženo úspěšného klonování zkouší se více variant.

** K = kontrola bez přidání ligázy, v tomto pokusném zásahu by nemělo dojít ke spojení vektoru s klonovaným fragmentem a po provedení transformace by neměli vzniknout žádní transformanti.

Poznámka: Občas se může stát, že při použití kohezivních konců a nízké teplotě inkubace může dojít ke vzniku transformantů i v kontrole bez použití ligázy !

Další informace k této problematice najdete v

Engler, M. J. a Richardson, C. C. 1982: In P. D. Boyer (Ed.), The Enzymes Vol. 5 (p. 3). San Diego: Academic Press.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Kolika jednotkám T4 DNA ligázy od firmy New England Biolabs odpovídá 1 Weissova jednotka?
- 2) Jaká je hmotnost 1 μl DNA fága λ , jestliže je jeho koncentrace 1 pmol ? Velikost DNA fága λ je 48 502 bp. Molekulová hmotnost jednoho bp = 650.
- 3) Jaká je koncentrace 5'-konců lineární DNA fága λ (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) v 5 μl této DNA po jejím štěpení restriktázou *Hind* III, jestliže má tento enzym na této DNA 7 restričních míst?

Poznámky

TA klonování amplifikačních produktů (cvičení č. 20)

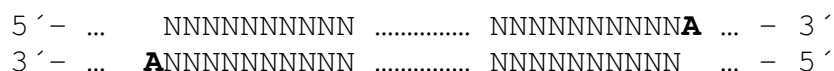
Úvodní slovo

Klonování genu je možno uskutečnit také jinými způsoby než je opracování jeho konců restričními endonukleázami, jak bylo uvedeno ve cvičení č. 14. Enzym *Taq* polymeráza používaná pro polymerázovou řetězovou reakci připojuje na 3'- konce ampliconů adenylátový zbytek ve formě přesahu. Tento přesah slouží jako háček, ke kterému se může připojit molekula vektoru upravená tak, že obsahuje na 3'-konci přesah ve formě thymidylového zbytku. Metoda, která uvedené vlastnosti *Taq* polymerázy využívá, se označuje jako TA-klonování.

Příkladem vektoru pro TA klonování je plasmid pCR2.1, který má v klonovacím místě následující sekvenci nukleotidů:

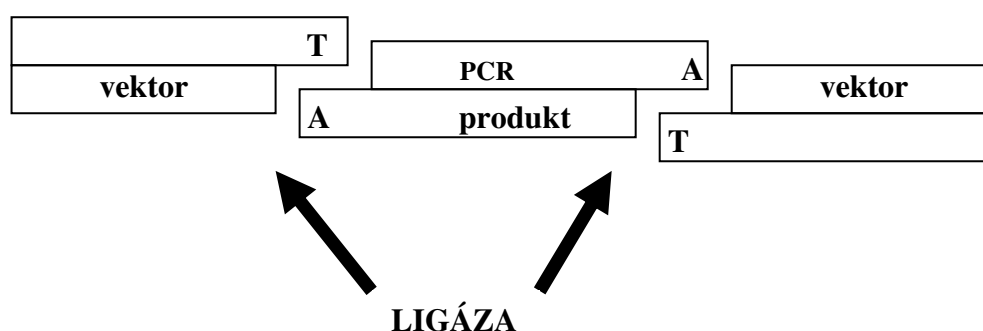


Tento vektor se nemůže uzavřít bez inzertu, neboť obsahuje nekompatibilní konce, ale může být použit pro přímou ligaci s produkty PCR získanými *Taq* polymerázou. Struktura ampliconu pro TA klonování vypadá obecně takto (N značí libovolný nukleotid):



Spojení vektoru pCR2.1 s produktem amplifikace zajišťuje DNA ligáza (viz obrázek 16.1).

Obrázek 16.1: Schéma spojení vektoru s fragmentem pomocí ligázy



Jiným způsobem propojení vektoru a ampliconu je využití topoizomerázy I, která kromě schopnosti vytvářet zlomy v DNA může tyto zlomy spojovat. Příkladem vektoru, který se takto používá je plasmid pCRII-TOPO. Reakce využívající topoizomerázu je velmi rychlá a k jejímu proběhnutí zpravidla stačí 0,5 až 5 minut, naproti několika hodinám při použití ligázy.

Cíl cvičení

Spojit ligací vektor pCR2.1 s amplikonem genu ob připraveným ve cvičení č. 14.

Seznam přístrojů

- sada pipet 0,5-10 μ l, 5-50 μ l, 20-200 μ l
- sada sterilních umělohmotných špiček na pipety
- 0,5ml PCR zkumavky
- vana s ledem
- chladičí bloček na -20 °C
- vodní lázeň
- pikofuga
- termocykler PTC-100

Vlastní pracovní postup

Použijte komponenty komerční soupravy „Original TA cloning kit“ firmy INVITROGEN.

- 1) Na termocykleru nastavte program pro ligaci.
- 2) Z -20 °C vyndejte všechny komponenty soupravy a DNA sekundárního ampliconu připravené ve cvičení č. 14.
- 3) Všechny komponenty nechejte rozmrazit na ledu, poté krátce stočte na pikofuze a uchovávejte na ledu.
- 4) Ligázu uchovávejte v mrazícím bločku.
- 5) Připravte ligační směs dle schématu, napipetujte do 0,5ml PCR zkumavek všechny příslušné složky, ligázu až nakonec.
- 6) Všechny komponenty promíchejte mícháním špičkou.
- 7) Zbylé komponenty uskladněte při -20 °C.
- 8) Ligační směsi stočte krátce na pikofuze a vložte do termocykleru. Nezapínejte vyhřívané víko!
- 9) Inkubujte při 16 °C po dobu 1 až 4 hodin.
- 10) Poté použijte ligační směs ke transformaci bakteriálních buněk - viz úloha č. 17.

Ligační směsi (objemy jsou uvedeny v μ l):

Komponenty	Pokusné zásahy			
	1	2	3	K**
Ligace č.				
Voda	5	3	1	2
10x pufr	1	1	1	1
čerstvý amplikon	1*	3*	5*	5*
vektor pCR2.1 (25 ng/ μ l)	2	2	2	2
T4 DNA ligáza	1	1	1	-
Celkem	10	10	10	10

* množství směsi v ligaci se řídí kvalifikovaným odhadem na základě koncentrace DNA v restrikčních směsích po přečištění. Aby bylo dosaženo úspěšného klonování zkouší se více variant.

** K = kontrola bez přidání ligázy, v tomto pokusném zásahu by nemělo dojít ke spojení vektoru s klonovaným fragmentem a po provedení transformace by neměli vzniknout žádní transformanti.

Další informace k této problematice najdete v

INVITROGEN 1982: Originál TA Cloning Kit. Manuál. www.invitrogen.com

Kontrolní otázky a příklady

- 1)) Kolik molekul představují *Hind* III fragmenty DNA fága λ (koncentrace 5'-konců 0,12 μ M, 300 μ g/ml) ?
- 2) Jaká je koncentrace 5'-konců lineární DNA plasmidu pCR2.1 (100 μ g/ μ l) v 5 μ l této DNA po jeho upravení do podoby T-vektoru? Velikost plasmidu pCR2.1 je 3 900 bp.
- 3) Ke klonování chromosomální DNA se v genovém inženýrství často používají fágy, například fág λ . Aby bylo možné účinně klonovat vybrané fragmenty, je při přípravě experimentů zapotřebí znát některé parametry. Mějme tedy linearizovanou dsDNA fága λ o koncentraci 50 μ g/ml.
 - a) Kolik molekul obsahuje 1 μ l tohoto roztoku?
 - b) Kolik je to molů v 1 μ l?
 - c) Jaká je molární koncentrace molekul dsDNA fága v roztoku?
 - d) Jaká je molární koncentrace konců molekul dsDNA fága v roztoku?

Transformace bakteriálních buněk *Escherichia coli* (cvičení č. 21)

Úvodní slovo

Jakmile je gen ligací spojen s vektorem, je třeba přenést tento vektor do živé buňky. Vnesení izolované molekuly DNA do bakteriální buňky se nazývá transformace. K tomuto procesu dochází i spontánně, u tzv. recipientních buněk ve stavu kompetence. Stav kompetence lze navodit i uměle, ale účinnost transformace je nízká, tzn. že pouze malé procento kompetentních buněk přijme cizí DNA. Proto genoví inženýři po transformaci podrobují buňky procesům tzv. selekce, kterými dosáhnou výběru jen těch buněk, které nesou transformovanou DNA. Vzhledem k tomu, že vektory jsou konstruovány s tímto cílem, nesou řadu selektivních znaků, zpravidla geny rezistence k antibiotikům.

Pro účinné vnesení DNA do bakteriálních buněk existuje několik metod. Nejúčinnějším postupem je tzv. elektroporace. Tato metoda je velmi rychlá, ale vyžaduje speciální, nákladné zařízení. Při této technice jsou buňky podrobeny silnému elektrickému šoku, který způsobí lokální změny a vznik pórů v buněčné stěně a membráně, kterými DNA vstupuje do buněk. Elektroporací lze dosáhnout frekvence transformace 10^9 - 10^{10} transformantů na $1\mu\text{g}$ plasmidové DNA. Elektroporace rozšířila aplikační možnosti přenosu DNA i na velké plasmidy a buňky, u nichž ostatní techniky selhávaly.

Další metodou je použití CaCl_2 pro přípravu kompetentních buněk. Vzhledem k jednoduchosti je tato metoda nejčastěji používaná, i když je její účinnost nižší. Pro tuto metodu je velmi důležité, aby byly použity buňky v optimálním fyziologickém stavu. Používají se mladé buňky z počátku exponenciální fáze růstu, kdy jsou jejich buněčné stěny tenké. Buňky se přenesou do hypotonického prostředí CaCl_2 při $4\text{ }^\circ\text{C}$, čímž se během 30 min. výrazně změní propustnost jejich buněčné stěny. Kladně nabitě vápenaté ionty vytvoří na povrchu buňky struktury, na které se záporně nabitě molekuly DNA snadno navážou. Je známo několik modifikací této metody, jako je použití Rb^+ , Mn^{2+} nebo K^+ iontů místo Ca^{2+} či přísady různých činidel, jako dithiothreitol nebo dimethylsulfoxid.

Buňky opracované CaCl_2 lze skladovat při $-70\text{ }^\circ\text{C}$ několik měsíců. Transformují se s využitím tzv. teplotního šoku, kdy se nejprve inkubují s DNA na ledu a poté se podrobí krátké teplotní změně na $42\text{ }^\circ\text{C}$ a opětovnému zchlazení. Následkem prudkých teplotních změn buňky cizorodou DNA přijmou. Po kultivaci v bohatém regeneračním médiu se v buňce obnoví její životní funkce (utlumené v procesu přípravy kompetentních buněk, skladováním při teplotě $-70\text{ }^\circ\text{C}$ a vlastním procesem transformace) a začnou se v ní množit transformované vektory.

Po transformaci narostou v selekčním médiu buňky s vektorem, který může a nemusí obsahovat fragment (inzert), který do něj byl klonován. Selekcce buněk, které přijaly vektory s cizorodou DNA, tzv. transformantů, se provádí na médiích s antibiotiky. Přítomnost naklonovaného fragmentu se pak ověřuje různými technikami. Nejčastěji se jedná o restriční analýzu plasmidové DNA po minipreparaci, tzv. inzerční inaktivaci, α -komplementaci, hybridizaci kolonií, testování s využitím PCR a nebo sekvenování.

Cíl cvičení

Transformovat produkty ligace připravené ve cvičení č. 15 nebo 16.

Seznam přístrojů

- sada pipet 0,5-10 μ l, 5-50 μ l, 20-200 μ l
- sada sterilních umělohmotných špiček na pipety
- mikroskopické zkušební zkumavky na 1,5ml
- vana s ledem
- chladič bloček na -20 °C
- mrazicí box na -80 °C
- vodní lázeň na 42 °C
- pikofuga
- biologický termostat s teplotou 37 °C
- rotátor
- centrifuga na mikroskopické zkušební zkumavky

Vlastní pracovní postup

Proveďte metodu transformace tepelným šokem.

- 1) Dejte temperovat médium SOC na teplotu 37 °C a vodní lázeň na 42 °C.
- 2) Příslušný počet dávek kompetentních buněk vyndejte z -80 °C a dejte rozpustit v nádobě s ledem.
- 3) K buňkám napipetujte po 3 μ l jednotlivých ligačních směsí nebo 3 μ l čisté plasmidové DNA (pozitivní kontrola) nebo 3 μ l vody (tuto variantu připravte dvakrát - negativní kontrola a kontrola vitality). Jemně promíchejte špičkou pipety.
- 4) Inkubujte 30 minut na ledu. V této fázi dochází k zachycení DNA na povrchu buněk.
- 5) Podrobte buňky tepelnému šoku ponořením do vodní lázně vyhřáté přesně na 42 °C po dobu 30 sekund při a dejte na 2 minuty na led. V této fázi dojde k průniku DNA dovnitř buněk.
- 6) Zastavte transformaci přidáním 800 μ l média SOC rozehřátého na teplotu 37 °C.
- 7) Inkubujte buňky na rotátoru v termostatu při 37 °C po dobu 45 až 60 minut podle typu použitých buněk. V tomto kroku buňky regenerují a dochází k expresi β -galaktozidázy a vyjádření rezistence k ampicilinu. Po uplynutí uvedené doby se začínají buňky dělit, proto je nutné je co nejdříve vyset na selekční médium.
- 8) Centrifugujte buňky na centrifuze při 12 000 rpm/3 min.
- 9) Odlijte většinu supernatantu a buňky resuspendujte ve zbytku tekutiny, která steče ze stěn zkumavky.
- 10) Vysejte buňky na misky LB s ampicilinem (50 μ g/ml). Pouze pokusný zásah „kontrola vitality“ vysejte na misky LB bez ampicilinu.
- 11) Kultivujte po dobu 16 hod. a spočítejte narostlé kolonie. Vyhodnoťte experiment.

Příprava roztoků

17.1. Příprava zásobního roztoku ampicilinu

- 1) Zásobní roztok ampicilinu se připravuje v koncentraci 100 mg/ml.
- 2) Vezměte jednu ampuli ampicilinu pro injekce (navážka 500 mg, Bristol-Myers-Squibb) a rozpusťte ji v 5 ml sterilní destilované vodě (AQUA pro injectione, Biotika).
- 3) Nechte prášek řádně rozpustit.
- 4) Rozpipetujte po 1ml do sterilních 1,5ml mikrozkrumavek typu Eppendorf.
- 5) Zamrazte roztok a skladujte při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Expirace takto připraveného roztoku ampicilinu je 1 rok.

17.2. Příprava LB agaru s ampicilinem (250 ml)

- 1) Navažte 10 g LB agaru (výrobce DIFCO).
- 2) Alternativně je možno použít následující komponenty
- Bacto Tryptone 2,5 g (výrobce DIFCO), Bacto Yeast Extract 1,25 g (výrobce DIFCO), Chlorid sodný 2,5 g (výrobce LACHEMA), Bacto agar 3,5 g (výrobce DIFCO)
- 3) Nasypte do 500 ml Erlenmeyerovy baňky.
- 4) Přelijte 250 ml destilované vody.
- 5) Sterilizujte v přehřáté páře při $120\text{-}125\text{ }^{\circ}\text{C}/20$ minut.
- 6) Vytemperujte na vodní lázni na $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7) Přidejte ampicilin do konečné koncentrace $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ a ihned rozlijte na misky – na jednu misku asi 20-25 ml půdy, z jedné 250 ml dávky je tedy možné připravit asi 10-12 misek.

Další informace k této problematice najdete v

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Poznámky k vypracování protokolu:

Typ použitých buněk:

Plasmid:

Ligace:

Transformační směsi:

1 = buňky + 3 μ l vody Negativní kontrola

2 = buňky + 3 μ l vody Kontrola vitality (vyšetřeno na médium bez antibiotika)

3 = buňky + 3 μ l plasmidu Pozitivní kontrola

4 = ligační směs

.

.

.

N = ligační směs

Kultivace od hod. do hod.

Celková doba kultivace:

Výsledky:

Transformační zásah	Počet kolonií
1	
2	
3	
4	
.	
.	
.	
N	

Závěry:

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jaký byl vkladový poměr (počet molekul plasmidu vložených na jednu kompetentní buňku) při transformaci jestliže ke 40 μl kompetentních buněk o hustotě 5×10^{10} buněk/ml jste přidali 3 μl u pUC18 (velikost 2 686 bp) o koncentraci 100 ng/ μl ?
- 2) Stanovte frekvenci transformace jako počet transformantů/ μg vloženého plasmidu, jestliže jste v pokusném zásahu, ve kterém jste transformovali 3 μl plasmidu pBR322 (velikost 4 361 bp) o koncentraci 100 ng/ μl , získali 150 transformantů.
- 3) Z výsledků uvedených v úloze č. 2 stanovte frekvenci transformace jako podíl molekul plasmidu, které účinně transformovaly buňky k celkovému počtu molekul plasmidu vložených do transformace.

Poznámky

Expresse rekombinantního proinsulinu

(cvičení č. 22)

Úvodní slovo

Rekombinantní proinsulin je produkován ve formě N-terminálního fúzního proteinu, obsahuje translační iniciační kodon ATG, šesti-histidinový fragment, umožňující purifikaci proteinu afinitní vazbou ke kovům a Xpress epitop, který dovoluje snadnou detekci proteinu specifickou protilátkou a místo pro enterokinázu.

Ve vektoru pCR T7/NT je rekombinantní gen pro proinsulin naklonován pod promotorem, který v buňkách *E. coli* TOP10F' není aktivní. Hladina exprese je tudíž minimální nebo až žádná.

Pro docílení silné exprese klonované DNA, a to až po indukci IPTG, je možné provést expresi v buňkách *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Tyto buňky nesou gen pro T7 RNA polymerázu s promotorem indukovatelným IPTG. Kromě toho tyto buňky obsahují plasmid pLys, který kóduje lysozym. Lysozym je přirozený inhibitor T7 RNA polymerázy. Protože T7 RNA polymeráza spouští transkripci z promotoru plasmidu pCR T7/NT, pak T7 lysozym po vazbě na T7 RNA polymerázu inhibuje transkripci cizorodé DNA. Funkcí T7 lysozymu je tedy zajistit nízkou nebo nulovou expresi v expresních buňkách do té doby, než nastanou vhodné podmínky pro produkci rekombinantního proteinu. Lysozym tedy např. zabraňuje předčasné expresi pro buňku toxických proteinů.

Vhodné podmínky pro expresi rekombinantního proteinu nastávají zpravidla v časně exponenciální fázi růstu (Goeddel, 1991). Po přidání IPTG do média kultury rostoucí v časně exponenciální fázi růstu dochází k indukci T7 RNA polymerázy, prudkému zvýšení hladiny transkriptů z plasmidu pCR T7/NT a tím i mRNA naklonovaného rekombinantního genu. Ať už je výsledný protein pro buňku toxický nebo ne, jsou jeho výtěžky obrovské a mohou dosahovat až 40 % celkového obsahu proteinů v buňce.

Cíl cvičení

Transformovat buňky *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS a exprimovat rekombinantní proinsulinu.

Seznam přístrojů

- Sada pipet o objemech 10 µl, 100 µl a 1000 µl
- Mikrozkuřavky
- Centrifuga na mikrozkuřavky
- Váhy s váživostí +/- 0,1 g
- Erlenmeyerovy baňky
- Třepačka Vortex
- Třepačka termostatovaná
- Kuchyňské minutky
- Nádořba s ledem
- Vodní lázeň
- UV-VIS spektrofotometr
- Termostat – biologický inkubátor

Chemikálie

- Buňky *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen)
- Plasmid pCR T7/NT-PROINS-17
- NaCl
- LB médium
- SOC médium
- Ampicilin (zásobní koncentrace 100 mg/ml)
- Chloramfenikol (zásobní koncentrace 17 mg/ml),
- Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) (zásobní koncentrace 100 mM)

Vlastní pracovní postup

Příprava materiálu

- 1) Připravte celkem 3 Erlenmeyerovy baňky. Do první si připravte 5 ml LB média, do druhé 60 ml LB média. Třetí baňka zůstane prázdná.
- 2) Všechny Erlenmeyerovy baňky (dvě s LB médiem a jednu prázdnou) sterilizujte autoklárováním při 120 °C/20min.
- 3) Připravte vodní lázeň vytemperovanou na 42 °C.
- 4) SOC médium zahřejte v termostatu vytemperovaném na 37 °C.
- 5) Připravte misku se směsí ledu, vody a soli (dále v textu značeno jako ledová lázeň).

Transformace buněk *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS

- 1) Z mrazáku (- 80 °C) vyndejte potřebné množství dávek kompetentních buněk *E.coli* BL21(DE3)pLysS (podle počtu transformací, které budete dělat) a plasmidoplasmid pCR T7/NT-PROINS-17 (uložený v mrazáku na - 20 °C) a nechte je krátce rozmrazit, poté hned umístěte na ledové lázni.
- 2) K rozmražené dávce buněk *E.coli* BL21 přidejte 1 μ l (asi 5 ng) plasmidové DNA - **jemně** zamíchejte (ne pipetováním!).
- 3) Inkubujte směs na ledu po dobu 30 min.
- 4) Proveďte transformaci teplotním šokem:
 - a) umístěte buňky *E.coli* BL21 do připravené vodní lázně (42 °C) a inkubujte po dobu 30 sekund
 - b) ihned poté vložte buňky zpět do ledové lázně
- 5) Bezprostředně poté, nejdéle však do 2 minut, přidejte k transformovaným buňkám 250 μ l SOC média vyhřátého na 37 °C (dále v textu označováno jako transformační směs **A**).
- 6) Transformační směs **A** třepejte v termostatu 30 min při 250 rpm/37 °C a mikrozkuhavku umístěte do téměř vodorovné polohy.
- 7) Ukliděte vodní lázeň a ledovou lázeň, připravte 5 ml sterilního LB média a rozmrazte zásobní roztoky ampicilinu – AMP (zásobní koncentrace 100 mg/ml) a chloramfenikolu – CP (zásobní koncentrace 17 mg/ml).
- 8) V laminárním boxu pokračujte (ještě dnes!) **noční kultivací**.

Noční kultivace

- 1) Do sterilní plastové zkuhavky (15 ml) přeneste 5 ml sterilního LB média a přidejte 5 μ l AMP a 10 μ l CP.
- 2) Toto médium inokulujte transformační směsí **A** (použijte 1/100 kultivačního objemu, tzn. 50 μ l transformační směsi **A**).

- 3) Plastovou zkumavku řádně popište „*E. coli* BL21 (pCR T7/NT-PROINS)-17, rr/mm/dd, XY“, kde rr = rok, mm = měsíc, dd = den, XY = zkratka Vašeho jména.
- 4) Zbytek transformační směsi uložte do ledničky a popište stejným způsobem.
- 5) Pokračujte v inkubaci inokulovaného média 16 hod. při 250 rpm/37 °C.
- 6) **Druhý den ráno** odeberte 100 µl LB média s antibiotiky (BLANK) a změřte optickou hustotu OD₆₀₀ noční kultury. Naměřené údaje zaznamenejte.

Expresa (druhý den ráno)

- 1) Do vysterilizované Erlenmeyerovy baňky (popsané výše uvedeným způsobem) s 60 ml LB média přidejte 60 µl AMP a 120 µl CP.
- 2) Inokulujte 1/100 kultivačního objemu, tedy 600 µl transformační směsi (noční kultury).
- 3) Pokračujte v inkubaci při 250 rpm/37 °C.
- 4) V časech 75 min. a dále každých 30 min. měřte optickou hustotu inkubované směsi (OD₆₀₀) a запиšte si naměřené údaje. V čase, kdy se bude optická hustota blížit hodnotě přibližně 0,5, rozmrazte potřebné množství induktoru IPTG.
- 5) Poté, co optická hustota dosáhne hodnoty přibližně 0,5, odeberte 1 ml frakci do prázdné mikrozkušavky a označte tuto mikrozkušavku jako T₀, je to neindukovaná kultura.
- 6) Sterilním postupem (tzn. v laminárním boxu a ožiháním hrdla obou baněk nad plamenem) rozdělte 60 ml bakteriální kultury na dvě stejné části, označení A a B.
- 7) K buněčné kultuře A přidejte 150 µl IPTG c = 100 mM. Kultura B slouží jako neindukovaná kontrola.
- 8) Obě kultury třepejte při 250 rpm/37 °C.
- 9) V 30 min. intervalech, tj. v časech T₁, T₂, T₃, a T₄ kontrolujte optickou hustotu obou kultur, hodnoty OD₆₀₀ zaznamenejte. Po změření OD₆₀₀ přeneste po 1 ml vzorku kultury A i B do mikrozkušavek. Zkušavky řádně popište.
- 10) Odebrané 1 ml frakce centrifugujte 5 min/11 300 g. Supernatant přepipetujte do další mikrozkušavky označené jako supernatant, jelikož pro proinsulin již není třeba.
- 11) Vzorky sedimentu dále použijte pro následnou elektroforetickou analýzu exprimovaných proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).

Zkoncentrování sedimentu

- 1) Pomocí trojčlenky vypočítejte objem vody potřebné k „zkoncentrování“ sedimentu na teoretickou OD₆₀₀ = 5 a hodnoty si запиšte.

Například:

$$\begin{array}{l} \text{Teoretická OD}_{600} \dots\dots\dots 5,000 \dots\dots\dots X \mu\text{l H}_2\text{O} \\ \text{Naměřená OD}_{600} \dots\dots\dots 0,521 \dots\dots\dots 1\,000 \mu\text{l média} \end{array}$$

$$X = 5,000 \times 1\,000 \mu\text{l} / 0,521$$

$$X = 104,2 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

Výše uvedený výpočet znamená, že při naměřené OD₆₀₀ = 0,521 musíme k sedimentu přidat 104,2 µl H₂O, aby byla konečná OD₆₀₀ = 5,0.

- 2) K jednotlivým vzorkům sedimentů nepipetujte vypočtený objem vody, sediment důkladně promíchejte.
- 3) Takto zkoncentrovaný sediment (i neupravený supernatant) lze přímo použít k analýze exprimovaných proteinů pomocí SDS-PAGE.

Další informace k této problematice najdete v

Invitrogen 2002: pCR T7 TOPO TA Expression Kits, Manuál společnosti Invitrogen. Verze 1, 48 s.

Goeddel D.V. 1991: Methods in enzymology: Gene expression technology. USA, California Academic press, Inc., ISBN 0-12-287045, 185, s. 681.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jaké jsou konečné koncentrace ampicilinu a chloramfenikolu v médiu použitém pro noční kultivaci ?
- 2) Jaká je konečná koncentrace IPTG přidaného jako induktor do média ?

Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (cvičení č. 23)

Úvodní slovo

Metoda elektroforézy v denaturačním polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) se používá k rozdělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. K rozdělování dochází, podobně jako při elektroforéze v agarózovém gelu, při pohybu molekul ve stejnosměrném elektrickém poli. Molekulární síto představuje polyakrylamid a vodivé prostředí mezi elektrodami je zajištěno tlumivým roztokem. Při SDS-PAGE dochází k denaturaci proteinů jejich hydrofobní vazbou na dodecylsulfát sodný. Množství navázaného SDS (asi 1,4 mg na 1 mg proteinu) je tak velké, že náboje postranních zbytků aminokyselin jsou zanedbatelné vůči náboji sulfátových skupin. SDS tedy uděluje proteinům uniformní záporný náboj a ty se pak všechny pohybují k anodě, přičemž pohyblivost je dána velikostí molekuly.

Cíl cvičení

Separovat exprimované proteiny metodou SDS-PAGE

Seznam přístrojů

- Sada pipet o objemech 10 µl, 100 µl a 1000 µl
- Mikrokumavky
- Váhy s váživostí +/- 0,1 g
- Odměrný válec (1000 ml, 100 ml)
- Erlenmayerovy baňky
- Suchý blok
- Třepačka Vortex
- Transiluminátor
- Třepačka
- Plastový nůž
- Kuchyňské minutky
- Celofánové fólie
- Plastový stojánek
- Sušící rámečky
- Držáky

Chemikálie

- Proteinový hmotnostní standard Dalton Mark VII-L (Molecular Weight Marker Kit, Sigma), Molecular Weight Range 14 200 - 66 000
- Aqua pro injectione (Biotika)
- Amoniumpersulfát (100%)
- TEMED Ultra Pure Grade (Amresco®)
- NEXT Gel™ 15% (Amresco®) A Ready-To-Pour acrylamide gel (Amresco®)
- NEXT Gel™ Running Buffer, 20x (Amresco®)
- NEXT Gel™ Sample Loading Buffer, 4x (Amresco®)
- Barvicí roztok (0,1 % Coomassie Blue, 50 % metanolu, 10 % kyseliny octové)

- Odbarvovací roztok č. 1 (50 % metanolu, 10 % kyseliny octové)
- Odbarvovací roztok č. 2 (12,5 % metanolu, 2,5 % kyseliny octové)
- Ekvilibrační roztok (25 % etanolu denaturovaného benzínem a 3 % glycerolu)
- Destilovaná voda

Vlastní pracovní postup

Příprava dvou polyakrylamidových gelů (sada BIORAD)

- 1) Sestavte aparaturu pro PAGE, tzn. do stojánku pro PAGE opatrně vložte sklíčka a tento stojánek upevněte v aparatuře. Pro přípravu jednoho gelu potřebujete dvě sklíčka a jeden hřebínek.
- 2) V mikrozkuhavce si připravte 1 ml 10% roztoku amonumpersulfátu (APS) (tzn. pro 1 ml: navážíte do mikrozkuhavky 100 mg APS, přidáte 1 ml vody aqua pro injectione a na vortexu důkladně promícháte (je možné připravit i menší objem navážením menšího množství APS a přidáním odpovídajícího množství vody).
- 3) Do Erlenmayerovy baňky si odměřte 15 ml NEXT Gel™ 15% (Amresco®) A Ready-To-Pour acrylamide gel.
- 4) Přidejte do baňky 90 µl 10% APS a směs promíchejte. Amonumpersulfát iniciuje polymerizaci.
- 5) Přidejte do baňky 9 µl TEMEDu (Amresco®) Ultra Pure Grade (TEMED katalyzuje polymerizaci).
- 6) Rychle tuto směs promíchejte špičkou pipety v Erlenmayerově baňce.
- 7) Rychle a pozorně napipetujte 1 ml roztoku z baňky a OPATRNĚ jej vypouštějte mezi 2 sklíčka. Špičku pipety dejte mezi sklíčka co nejnižší a při vypouštění roztoku opřete špičku o silnější sklíčko.
- 8) Po vyplnění téměř celého prostoru mezi sklíčky (těsně pod horní okraj) roztokem, umístěte mezi 2 sklíčka plastové hřebínky tak, aby se pod nimi nevytvořily bubliny.
- 9) Ubrouskem setřete přebytečné množství gelu, které vyteklo při nasazování hřebínků.
- 10) Nechte gely tuhnout přibližně 30 min.

Příprava vzorků

- 1) Zapněte suchý blok nastavený na 100 °C.
- 2) Popište potřebné množství mikrozkuhovek. Počet i popis odpovídá vzorkům odebraným při expresi proteinu v předchozím cvičení. Jedna mikrozkuhavka je určena pro proteinový standard Dalton Mark VII-L (Molecular Weight Marker Kit, Sigma).
- 3) Do každé mikrozkuhavky se vzorkem pipetujte 5 µl NEXT Gel™ Sample Loading Bufferu, 4x (Amresco®) a pro proteinový standard násobek objemu odpovídající počtu jeho použití.
- 4) Do připravených mikrozkuhovek pipetujte 15 µl jednotlivých vzorků, u proteinového standardu opět násobek objemu, které odpovídá počtu jeho použití.

Příprava vany pro elektroforézu

- 1) Ze sklíček s již zatuhlými gely odstraňte přebytečné zaschlé kousky a pečlivě vložte sklíčka do rámečků na elektroforézu tak, aby rámečky byly sklíčky z gely těsně ohraničené a nevznikly žádné mezery, kterými by mohl protékat pufr.
- 2) Vložte rámeček se sklíčky do elektroforetické vany.
- 3) Připravte elektroforetický pufr, tzn. do kádinky odměřte 40 ml NEXT Gel™ Running Bufferu, 20x (Amresco®), přidejte 760 ml destilované vody a promíchejte.
- 4) Nalijte promíchaný pufr do vnitřního prostoru mezi sklíčka tak, aby hladina pufru mírně přesahovala okraje tenčích sklíček a pufr se tak dostal i do nanášecích jamek.

- 5) Zbytek pufru nalijte do vnějšího prostoru a zkontrolujte těsnost celého systému (hladiny se nesmí měnit).
- 6) Nanášecí jamky propláchněte pomocí pipety elektroforetickým pufrům a špičkou pipety odstraňte v pufru bubliny.

Aplikace vzorků a samotná SDS-PAGE elektroforéza

- 1) Mikrozkušavky se vzorky a NEXT Gel™ Running Bufferem, 20x (Amresco®) vložte na 3 min. do suchého bloku vytemperovaného na 100 °C (vlivem vysoké teploty dojde k rozpadu buněčných stěn).
- 2) Naneste 15 µl směsi vzorku a NEXT Gel™ Running Bufferu, 20x (Amresco®) do jednotlivých nanášecích jamek v následujícím pořadí.

GEL 1: Kultura A (indukovaná)

číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
jamky:										
vzorek	PS	T ₀	AT ₁	AT ₂	AT ₃	AT ₄	BT ₁	BT ₂	BT ₃	BT ₄

GEL 2: Kultura B (neindukovaná)

číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
jamky:										
vzorek	PS	T ₀	AT ₁	AT ₂	AT ₃	AT ₄	BT ₁	BT ₂	BT ₃	BT ₄

PS = proteinový standard

- 3) Nasad'te víko elektroforetické vany s elektrodami, připojte ke zdroji elektrického napětí a zapněte.
- 4) Nastavte parametry elektroforézy 40 V/400 mA/15 min. Tím dojde k zkoncentrování vzorků v jamkách, čelo elektroforézy by mělo být po 15 min. elektroforézy za těchto podmínek rovné.
- 5) Nastavte konečné parametry elektroforézy 140 V/400 mA/80 min, spusťte elektroforézu a separujte proteiny dokud se čelo nedostane na konec gelu.

Barvení gelů

- 1) Do vaničky nalijte předem připravený barvicí roztok. Nezapomeňte na rukavice, i vaše ruce obsahují proteiny!
- 2) Z elektroforetické vany vyjměte stojánky se sklíčky a opatrně odlijte přebytečný pufr.
- 3) Pomocí plastového nože od sebe opatrně oddělte sklíčka.
- 4) Opatrně odřízněte gel po okrajích v místech nanášecích jamek a seříznutím jeho pravého rohu si označte orientaci gelu.
- 5) Opatrně přeneste gel pomocí nože do vaničky s barvicím roztokem a nechte barvit při cca 50 rpm po dobu 30 min.

Odbarvení gelů

- 1) Po uplynutí 30 min. přelijte barvicí roztok zpět do zásobní láhve. Barvicí roztok lze použít opakovaně.
- 2) Do prázdné vaničky s gelem přilijte odbarvovací roztok č. 1 a nechte odbarvovat při cca 90 rpm po dobu cca 60 min.
- 3) Znečištěný odbarvovací roztok č. 1 vylijte do odpadní láhve.
- 4) Do prázdné vaničky s gelem přilijte odbarvovací roztok č. 2 a nechte odbarvovat při cca 90 rpm po dobu cca 60 min.
- 5) Průběžně kontrolujte stupeň odbarvení gelu a případně vyměňte odbarvovací roztok č. 1, nebo 2. Na konci odbarvovacího procesu odlijte znečištěný odbarvovací roztok 2 do odpadní láhve a gel promyjte vodou.

Focení PAGE gelů

- 1) Z digitálního fotoaparátu sundejte filtr pro focení agarózových gelů v UV světle.
- 2) Digitální fotoaparát připojte k počítači a zapněte počítač i obrazovku.
- 3) Na desku světelného zdroje nastaveného na viditelné světlo umístěte správně orientovaný gel a zapněte zdroj.
- 4) Spusťte program pro fotografování. (AlphaDigiDoc)
- 5) Zaostřete a maximálně přiblížte gel
- 6) Optimalizujte intenzitu světla na světelném zdroji.
- 7) V programu nastavte uzávěrku na 50 ms.
- 8) Vyfoťte gel.
- 9) Změňte intenzitu světla, a pokud není vyhovující, focení opakujte, dokud nebude fotka optimální.
- 10) Po vyfocení lze v programu AlphaEaseFC ver. 4.0.0 (Alpha Innotech Corporation, Kalifornie) doladit jas, kontrast a gama funkci.
- 11) Uložte fotku pod jednoznačným názvem do adresáře s fotkami jako soubor jpg.
- 12) Bezpečně odpojte digitální fotoaparát, vypněte světelný zdroj a počítač.

Sušení gelů

- 1) Do velké plastové vany ze zásobní láhve nalijte připravený ekvilibrační roztok.
- 2) Po focení ponořte gel do vany s ekvilibračním roztokem na 30 min..
- 3) Na 5 min. vložte do ekvilibračního roztoku celofánové fólie (pozn. 2 fólie pro jeden sušený gel).
- 4) Na vyvýšenou podložku (plastový stojánek) položte sušící rámeček.
- 5) Na podložní sušící rámeček velice pečlivě narolujte celofánovou fólii tak, aby byla rovná a bez bublin.
- 6) Doprostřed celofánové folie umístěte gel a zalijte jej ekvilibračním roztokem.
- 7) Na první celofánovou folii a gel velice pečlivě narolujte druhou fólii, opět aby byla rovná a bez bublin.
- 8) Na druhou fólii položte vrchní sušící rámeček.
- 9) Důkladně obě fólie vypněte přes rámeček a fixujte držáky vždy na protilehlých stranách.
- 10) Gel v sušícím rámečku nechte volně schnout ve svislé poloze po dobu cca 24 hodin.

Další informace k této problematice najdete v

Westermeier R. 2001: Electrophoresis in Practise: A guide to Methods and Applications of DNA and Proteins Separations. 3rd ed., Weinheim: Wiley-VCH, s. 349.

AlphaInnotech: AlphaEaseTM FCStand Alone, Manuál společnosti AlphaInnotech. [CD-ROM], Verze 4.0.0, pro Windows 2000/XP

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jaká je konečná koncentrace amonumpersulfátu, kterou je zahajována polymerizace gelu ?
- 2) Napište strukturní vzorec akrylamidu, bisakrylamidu a znázorněte schématicky molekulární síto v polyakrylamidovém gelu.

Poznámky

Western Blot (cvičení č. 24)

Úvodní slovo

PAGE gely jsou tlustá, ale křehká média, přičemž tyto vlastnosti znesnadňují manipulaci s nimi. Proto se vyvinuly metody, které umožňují přemístit proteiny z gelu na pevnější membránu bez změny jejich vzájemné pozice. Tyto metody se souhrnně označují Westernův přenos (Westernblot). Pro tento přenos se nejčastěji používá metoda elektrotransferu – proteiny z gelu na membránu putují v elektrickém poli, které je kolmé na gel. Další možností je kapilární přenos nebo přenos pomocí vakua.

Nejběžnější membrány pro Westernův přenos jsou vyrobeny z nitrocelulózy nebo PVDF (polyvinyliden difluorid) a mají vysokou vazebnou schopnost pro proteiny. Po přenesení proteinů z gelu na membránu se volné vazebná místa na membráně blokují roztokem bovinního sérového albuminu (BSA), odtučněným mlékem nebo želatinou, čímž se zabrání nespecifické vazbě protilátek na tato místa. Pro vlastní detekci proteinů slouží specifické protilátky, které mohou být polyklonální nebo monoklonální a mohou být produkovány celou škálou organismů (myši, králíci, ovce,...). Na tyto takzvané primární protilátky se následně použijí sekundární protilátky, které rozpoznávají specifické struktury primární protilátky. Toto sendvičové uspořádání poskytuje vyšší citlivost než použití pouze jediné protilátky. Sekundární protilátka je konjugována s enzymem (křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza), který v přítomnosti konkrétního substrátu poskytuje detekovatelný signál. Ten je zaznamenán detekčním zařízením a archivován.

Cíl cvičení

Detekovat protein zájmu na nitrocelulóзовé membráně pomocí specifické protilátky.

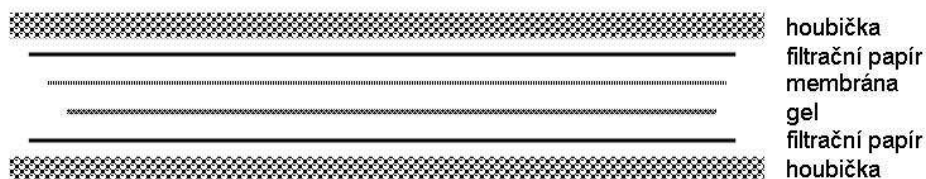
Seznam přístrojů

- sada pipet o objemech 10, 100 a 1000 μ l
- elektroforetická vana na blotování
- skalpel
- třepačka
- fotodokumentační zařízení

Vlastní postup

- 1) Do připravených malých misek nalijte Transfer Buffer a ponořte do nich 2 kusy filtračního papíru pro blotování, 1 kus nitrocelulóзовé membrány a 2 kusy houbičky.
- 2) Destilovanou vodou omyjte PAGE gel umístěný stále mezi skly, odstraníte tak zbytky SDS.
- 3) Opatrně odklopte jedno sklo a odřízněte koncentrační gel.
- 4) Na gel položte vlhký filtrační papír, tak aby gel byl přibližně uprostřed a jemně odstraňte případné bublinky.
- 5) Do velké misky nalijte Transfer Buffer aby hladina byla cca 7 cm vysoko.
- 6) Ve velké misce sestavte pod hladinou blotovací aparaturu následujícím způsobem:
 - 6.1. otevřete rámeček černou částí dolů
 - 6.2. na něj položte navlhčenou houbičku
 - 6.3. zkumavkou vyválcujte houbičku, abyste z ní odstranili co nejvíce bublin
 - 6.4. na houbičku položte filtrační papír s gelem tak, aby gel směřoval vzhůru

- 6.5. gel přikryjte druhým filtračním papírem a zkumavkou jemně odstraňte bubliny
- 6.6. nahoru položte další houbičku a opět jemně vyválcujte
- 6.7. zavřete rámeček



- 7) Sestavenou blotovací aparaturu dejte do elektroforetické vany, vložte formičku s ledem a zalijte Transfer Buffrem až po okraj.
- 8) Zapněte elektroforetický zdroj na 100 V / 60 min.
- 9) Po ukončení blotování, rozeberte blotovací aparaturu a membránu (jestli jste správně blotovali, poznáte podle toho, že na membráně bude vidět proteinový marker) postupně promyjte v:
 - 9.1. TBST (omyje membránu od Transfer Bufferu)
 - 9.2. Ponceau S (obarví proteiny na membráně)
 - 9.3. TBST (odstraní zbytky Ponceau S)
- 10) Obarvenou membránu přeneste do čisté misky a skalpelem opatrně odřízněte nepotřebné části membrány.
- 11) Membránu přeneste do roztoku 5% BSA v TBST a ponechte na třepačce 30 min. BSA zablokuje volná vazebná místa pro proteiny na membráně, čímž sníží pozadí pro následnou detekci.
- 12) Omyjte membránu destilovanou vodou.
- 13) Do čisté misky nebo zkumavky odměřte 10-20 ml 5% BSA v TBST (dle velikosti membrány) a ponořte do něj membránu.
- 14) Přidejte primární (specifickou) protilátku v poměru 1:1000 – 1:5000.
- 15) Inkubujte na třepačce přes noc při 4 °C.
- 16) 3× omyjte membránu v TBST 5 min.
- 17) Přeneste membránu do čisté misky nebo zkumavky s 10-20 ml 5% BSA v TBST a přidejte sekundární protilátku (s navázanou peroxidázou) v poměru 1:5000.
- 18) Inkubujte na třepačce při laboratorní teplotě 1 hod.
- 19) 5× omyjte membránu v TBST 5 min. a přeneste ji do čisté misky.
- 20) Smíchejte 1 ml Opti-4CN diluent s 9 ml destilované vody.
- 21) Přidejte 200 µl Opti-4CN substrate, dobře promíchejte a nalijte na membránu a na třepačce inkubujte 5-30 min. dokud se membrána dostatečně nevybarví.
- 22) Omyjte membránu destilovanou vodou a vyfotografujte na dokumentačním zařízení.

Další informace o této problematice najdete v

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bio-Rad. Instruction manual for Opti-4CN Substrate Kit.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Máte primární protilátku o koncentraci $220 \mu\text{g/ml}$. Kolik μl této protilátky musíte přidat k 10 ml pufru, abyste získali konečnou koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$?
- 2) Molekula IgG má molekulovou hmotnost přibližně $150\,000$. Kolik molekul IgG je obsaženo v $1 \mu\text{g}$?

Výsledky příkladů

Cvičení č. 1 Izolace chromosomální DNA z krve

- 1) 6,9 μg
- 2) 6,9 attogramů ($6,9 \times 10^{-18} \text{ g}$)
- 3) 4×10^{12} molekul
- 4) 76 milimetrů

Cvičení č. 2 Izolace genomové DNA z rostlinných buněk

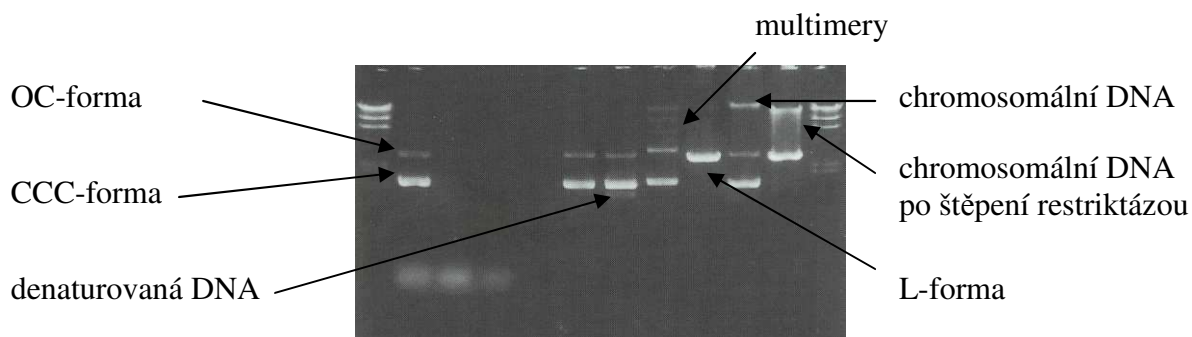
- 1)

Organismus	Velikost DNA (bp)	Molární hmotnost	Hmotnost 1 molekuly	Počet molekul v 1 g
Člověk	$3,2 \times 10^9$	$2,1 \times 10^{12}$	$3,49 \times 10^{-12} \text{ g}$	$2,87 \times 10^{11}$
<i>Drosophila</i>	$1,2 \times 10^8$	$7,7 \times 10^{10}$	$1,28 \times 10^{-13} \text{ g}$	$7,82 \times 10^{12}$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^{10}$	$1,66 \times 10^{-14} \text{ g}$	$6,02 \times 10^{13}$
<i>Escherichia coli</i>	$4,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^9$	$4,15 \times 10^{-15} \text{ g}$	$2,41 \times 10^{14}$
Bakteriofág λ	48 514	$3,1 \times 10^7$	$5,15 \times 10^{-17} \text{ g}$	$1,94 \times 10^{16}$
<i>Zea mays</i>	$3,9 \times 10^9$	$2,5 \times 10^{12}$	$4,15 \times 10^{-12} \text{ g}$	$2,41 \times 10^{11}$

- 2) 15 ng
- 3) 163 cm

Cvičení č. 3 Izolace plasmidplazmidové DNA

- 1) Rozštěpením plasmidové DNA restrikční endonukleázou, která štěpí plasmid jen 1x. Všechny formy se přemění formu lineární.
- 2) Na uvedeném elektroforetickém snímku vyznačte různé formy plasmidu.



- 3) Že lyze buněk probíhala příliš dlouho nebo za vysokého pH (vyššího než 12,45)

Cvičení č. 4 Odhad koncentrace a čistoty DNA na agarózovém gelu

- 1) 250 ng/μl
- 2) V poměru 1 díl DNA : 11 dílům pufru
- 3) $1,85 \times 10^{12}$ molekul

Cvičení č. 5 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

- 1) 1 μl
- 2) 1×10^{12} molekul
- 3) 10 x
- 4) 90 μl
- 5) $1,4 \times 10^{11}$ molekul

Cvičení č. 6 Restrikční štěpení plasmidové DNA

- 1) 5 μl
- 2) 0,31 μg
- 3) 37,6 minut

Cvičení č. 7 Stanovení genetické modifikace ac2 u *Solanum tuberosum*

- 1) Je zapotřebí alespoň 33 cyklů
- 2) 2,06 sekundy a 3,69 sekundy
- 3) 3 μl

Cvičení č. 8 Detekce delece Δ32 v receptoru CCR5 metodou PCR

- 1) 36 cyklů
- 2) 117 bp
- 3) C

Cvičení č. 9 Detekce delece v genu pro angiotenzin konvertující enzym metodou PCR

- 1) 1,27 sekundy a 3,27 sekundy
- 2) Jedna jednotka enzymu *Taq* polymerázy inkorporuje 200×10^{12} nukleotidů za minutu
- 3) 105 milionů ampliconů bude chybných

Ve skutečnost bude počet chybných ampliconů vyšší, protože chyba v prvních cyklech se přenesla i do dalších ampliconů.

Cvičení č. 10 Detekce polymorfismu K469E v genu ICAM1

- 1) Sekvence nukleotidů v ampliconu získaného amplifikací standardní alely

```
ggaaccca ttgcccgagc tcaagtgtct aaaggatggc actttcccac tgcccatcgg ggaatcagtg  
actgtcactc gagatcttga gggcacctac ctctgtcggg ccaggagcac tcaaggggag gtcaccgca  
aggtgaccgt gaatgtgctc tgtgagtgag ccggcgggca gagctgggtg ggggcagggg ccatggacct  
aatgcaatcc tcacc
```

- 2) Sekvence nukleotidů v ampliconu získaného amplifikací nestandardní alely

```
ggaaccca ttgcccgagc tcaagtgtct aaaggatggc actttcccac tgcccatcgg ggaatcagtg  
actgtcactc gagatcttga gggcacctac ctctgtcggg ccaggagcac tcaaggggag gtcacccgcg  
aggtgaccgt gaatgtgctc tgtgagtgag ccggcgggca gagctgggtg ggggcagggg ccatggacct  
aatgcaatcc tcacc
```

Pozice restričního místa pro restriktázu *Bst*I je vyznačena **tučně, podtržené**

- 3) Sekvence aminokyselin

- pro standardní alelu

gtc - acc - cgc - **aag** - gtg - acc - gtg

Val - Thr - Arg - **Lys** - Val - Thr - Val

- pro nestandardní alelu

gtc - acc - cgc - **gag** - gtg - acc - gtg

Val - Thr - Arg - **Glu** - Val - Thr - Val

Cvičení č. 11 Detekce polymorfismu 1007fs v genu NOD2

1) Sekvence nukleotidů v ampliconu získaného amplifikací standardní alely

cctgc agtctcttta actggacagt ttcaagagga aaaccaagaa tccttgaagc tcaccattgt
atcttctttt ccaggttgtc caataactgc atcacctacc taggggcaga agccctctg caggcccttg
aaaggaatga caccatcctg gaagtctggt aag

v takto vyznačeném místě dojde v nestandardní alele ke vzniku místa pro restriktázu *NlaIV*

2) Sekvence nukleotidů v ampliconu získaného amplifikací nestandardní alely

cctgc agtctcttta actggacagt ttcaagagga aaaccaagaa tccttgaagc tcaccattgt
atcttctttt ccaggttgtc caataactgc atcacctacc taggggcaga agccctctg
caggcccttg aaaggaatga caccatcctg gaagtctggt aag

pozice restriktčního místa pro restriktázu *NlaIV* vyznačena

3) Sekvence aminokyselin pro standardní alelu

Q-STOP-L-H-H-L-P-R-G-R-S-P-P-A-G-P-**STOP-K-E-STOP-H-H-P-G-S-L-V-X**

Sekvence aminokyselin pro nestandardní alelu

Q-STOP-L-H-H-L-P-R-G-R-S-P-P-A-G-P-**L-K-G-M-T-P-S-W-K-S-G-K**

Cvičení č. 12 Detekce polymorfismu v genu pro TMPT (thiopurin S-methyl transferáza) metodou real-time PCR

1) Podívejte se na www.farmakogenomika.cz

Cvičení č. 13 Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu

- 1) 257 bp
- 2) 150 ng/ml
- 3) 1,5 ml

Cvičení č. 14 Izolace DNA z agarózového gelu

$$1) RCF = 1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r = 1,119 \times 10^{-5} \times 14\,000^2 \times 7 = 15\,352 \text{ g}$$

Cvičení č. 15 Izolace mediátorové RNA z myší tkáně

- 1) $1,67 \times 10^8$ ribonukleotidů
- 2) 0,11 mM
- 3) 100 aminokyselin

Cvičení č. 16 Zpětná transkripce a příprava cDNA genu pro G3PDH

- 1) 1×10^{12} deoxyribonukleotidů / sekundu
- 2) Jedenkrát za $4^6 = 4\,096$ nukleotidů
- 3) asi 0,9 μ l

Cvičení č. 17 Příprava rekombinantního genu pro lidský leptin amplifikací

- 1) Sekvence signálního peptidu. Leptin začíná valinem.

MHWGTLGFL WLWPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS
VSSKQKVTGL DFIPGLHPIL TLSKMDQTLA VYQQILTSMP SRNVIQISND
LENLRDLLHV LAFSKSCHLP WASGLETLDS LGGVLEASGY STEVVALSRL
QGSLQDMLWQ LDLSPGC

- 2) LEP2 = 5'- CTT CTT GGG AAG GAA AAT GC - 3' = $(9 \times 4) + (11 \times 2) = 58$ °C
LEP530 = 5'- GTA GAC TTG CAG GAA GAG TG - 3' = $(10 \times 4) + (10 \times 2) = 60$ °C

- 3) Pozice primerů LEP2, LEP530, a částí primerů HLEP81KPN a LEP530XBA. Iniciační a terminační kodon.

```
1 gcttcttggg aaggaaaatg cattggggaa ccctgtgagg attcttgtgg ctttggccct
61 atcttttcta tgtccaagct gtgcccatec aaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca
121 tcaagacaat tgtcaccagg atcaatgaca ttccacacac gtcagtctcc tccaaacaga
181 aagtcaccgg tttggacttc attcctgggc tccaccccat cctgacctta tccaagatgg
241 accagacact ggcagtctac caacagatcc tcaccagtat gccttcacaga aacgtgatcc
301 aaatatccaa cgacctggag aacctccggg atcttcttca cgtgctggcc ttctctaaga
361 gctgccactt gccctgggccc agtggcctgg agaccttga cagcctgggg ggtgtcctgg
421 aagcttcagg ctactccaca gaggtggtgg ccctgagcag gctgcagggg tctctgcagg
481 acatgctgtg gcagctggac ctacagccctg ggtgctgagg ccttgaaggt cactcttctt
541 gcaagactac gttaagggaa ggaacctggc ttcaggtatc tccaggattg aagagcattg
601 catggacacc cttatcagga ctctgtcaat tcctgactct cttag
```

Cvičení č. 18 Simultánní štěpení amplikonu a vektoru

- 1) $1,29 \times 10^{11}$ molekul
- 2) $4,63 \times 10^{12}$ molekul
- 3) Smícháme 1 μ l vektoru a 5 μ l amplikonu.

Cvičení č. 19 Ligace vektoru a naštěpené DNA

- 1) 67
- 2) 32,01 μ g
- 3) $2,56 \times 10^{-13}$ molů

Cvičení č. 20 TA klonování amplifikačních produktů

- 1) $7,2 \times 10^{16}$ molekul
- 2) 8×10^{-13} molů
- 3)
 - a) $9,71 \times 10^8$
 - b) $1,61 \times 10^{-9}$ molů
 - c) 1,61 nM
 - d) 3,22 nM

Cvičení č. 21 Transformace bakteriálních buněk *Escherichia coli*

- 1) 50 molekul plasmidu na jednu buňku
- 2) 5×10^8 transformantů/ μg
- 3) $2,3 \times 10^{-9}$

Cvičení č. 22 Expresce rekombinantního proinsulinu

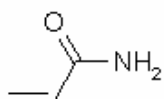
- 1) Ampicilin = ($5\mu\text{l}$ o koncentraci 100 mg/ml na 15ml média) = $500\mu\text{g}/15\text{ ml} = \mathbf{33\mu\text{g/ml}}$
Chloramfenikol = ($10\mu\text{l}$ o koncentraci 17 mg/ml na 15ml média) = $170\mu\text{g}/15\text{ml} = \mathbf{11\mu\text{g/ml}}$
- 2) Např. při objemu kultury 15ml
IPTG = ($150\mu\text{l}$ o koncentraci 100mM) = ředění 15 000/150 (100x) = **1mM**

Cvičení č. 23 Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu

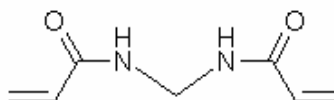
1) 90 μ l 10% amoniumpersulfátu na přibližně 15 ml gelu, ředění je tedy 15 000/90x, tedy výsledná koncentrace = **0,06%**

2) Strukturní vzorce

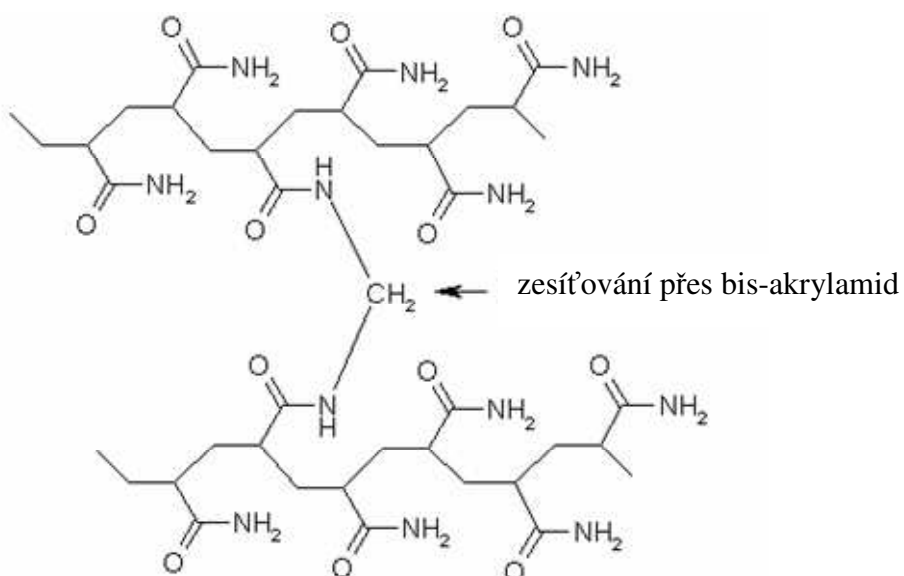
Akrylamid



Bisakrylamid



Polyakrylamid



Cvičení č. 24 Western Blot

1. 45,45 μ l
2. 4×10^{12} molekul/ μ g