

Příprava inzertu kódujícího shRNA

Jednou z možností, jak cíleně snížit expresi vybraného genu, je použití syntetických siRNA. Principem je jev zvaný RNA interference, kdy dlouhé dvouřetězcové molekuly RNA jsou *in vivo* nejprve ribonukleázou *Dicer* rozštěpeny na krátké interferující RNA (siRNA). Tyto pak spolu s proteiny tvoří komplex RISC, jehož součástí je rovněž helikáza, která odvíjí protismyslný řetězec siRNA ke komplementární cílové mRNA, která je následně v buňkách štěpena. siRNA lze připravit synteticky a transfekovat do buněk, čímž lze dosáhnout krátkodobého umlčení exprese libovolného genu. Pro dlouhodobý účinek lze využít shRNA. Jedná se vlastně o strukturu, kde v plazmidu s promotorem RNA polymerázy III je sekvence v níž dva komplementární řetězce (odpovídající sekvenci cílového genu) jsou spojeny za sebou ve formě obrácené repetice a oddělené několika nukleotidy (*spacer*). Po přepisu této struktury do RNA vzniká krátká vlásenková RNA (shRNA), která je schopna umlčet expresi cílového genu.

V současné době existuje celá řada algoritmů pro návrh efektivních siRNA, celá řada již ověřených účinných siRNA je rovněž komerčně dostupná (např. www.ambion.com, www.qiagen.com, www.genscript.com).

siRNA proti sekvenci lidského genu *c-myb* (zdroj www.ambion.com)

```
GGGGAGAAUUGGAAAACAAtt
tt CCCCUCUUAACCUUUUGUU
```

Konstrukt pro shRNA proti lidskému genu *c-myb*, pro vklonování do pRNA U6.1/Neo

Oligonukleotid A:

BamHI

```
5' GATCCG TGTGTTTCCAATTCTCCCTTCAAGAGA GGGGAGAATTGGAAAACAA TTTTTT GG AAA3' 64
| Antisense | Loop | Sense | Termination Signal
```

Oligonukleotid B:

```
5' AGC TTT T CC AAA AAA TGTGTTTCCAATTCTCCCTCTCTT GAA GGGGAGAATTGGAAAACAA CG 3' 64
Hind III
```

Jednotlivě nasyntetizované řetězce oligonukleotidů, které jsou k sobě komplementární, je potřeba spojit ve dvouřetězec, který je následně ligován do vektoru pRNA_U6.1/Neo.

Postup:

1. Připravte 20 ul reakční směsi, která obsahuje:

- 2 ug oligonukleotidu A
 - 2 ug oligonukleotidu B
 - 1 ul 20x SSC
- doplnit vodou do 20 ul

analogicky připravte i kontrolní reakce kde bude pouze jeden ze dvou oligonukleotidů

2. Inkubujte směs 5 minut při 94°C.

3. Nechte reakční směs chladnout 40 min při pokojové teplotě – probíhá renaturace a spojení komplementárních oligonukleotidů do dvouřetězce

4. Reakční směs smíchejte s nanášecím pufrem v poměru 5:1 a proveďte agarózovou elektroforézu na 3 % gelu.

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Úvod:

Při ligaci cizorodé DNA do vektoru je žádoucí, aby frekvence vektorových molekul obsahující začleněnou cizorodou DNA byla co nejvyšší. Ideální je situace, kdy lze jak cizorodou DNA tak i vektor štěpit současně 2 restrikázami, po jejichž štěpení nevznikají komplementární konce. V tomto případě po ligaci a transformaci získáváme prakticky pouze klony obsahující vektor s cizorodou DNA začleněnou v požadované orientaci.

V případě, že jak cizorodá DNA tak linearizovaný vektor mají zatupené konce nebo komplementární konce po restrikčním štěpení, získáme po ligaci a transformaci velké množství klonů obsahujících vektorovou DNA bez začleněné cizorodé DNA. Abychom zabránili této „self-ligaci“ vektoru, je možné linearizovanou vektorovou DNA defosforylovat na 5' konci pomocí alkalické fosfatázy. Ligací takto modifikované vektorové DNA s cizorodou DNA vzniká otevřená kružnicová molekula, která je schopná transformace do E. coli.

Různé restrikční endonukleázy většinou poskytují taková zakončení fragmentů, která nejsou vzájemně kompatibilní a jejich spojení ligací není možné. Ligaci pak lze provést pouze v tom případě, že se odstraní jednořetězcové přečnívající úseky DNA čímž se konce ds DNA zatupí. Tento typ modifikace lze provést dvěma způsoby: 1) polymerázovou reakcí, kdy se chybějící úsek DNA dosyntetizuje nebo 2) nukleázovou reakcí, kdy se přečnívající jednořetězec odštěpí.

Pro modifikaci přečnívajícího 5' konce lze použít obě techniky – zpravidla se používá Klenowův fragment DNA polymerázy I nebo nukleáza Mung Bean. Pro modifikaci přečnívajícího 3' konce lze použít pouze nukleázovou reakci. Nejčastěji používanými enzymy jsou T4 DNA polymeráza, Klenowův fragment DNA polymerázy I, nukleáza S1 nebo nukleáza Mung Bean.

V našem případě byl postup navržen tak, aby odpovídal ideální situaci popsané výše (tučný text)

Postup:

1. Připravte 20 ul reakční směsi, která obsahuje:
 - 2 ug DNA
 - 2 ul 10x restrikčního pufru
 - 0,5 ul restrikčního enzymu
 - doplnit vodou do 20 ul
2. Inkubujte restrikční směs 60 minut při 37°C.
3. Reakční směs smíchejte s nanášecím pufrům v poměru 5:1 a proveďte agarózovou elektroforézu.

PURIFIKACE FRAGMENTŮ DNA Z AGARÓZOVÉHO GELU POMOCÍ QIAEX GEL EXTRACTION KITU

Celou řadu různých metod lze využít pro purifikaci fragmentů DNA z agarozových gelů. Mezi nejčastěji používané metody patří eluce DNA z gelu na membránu, následné uvolnění DNA z membrány do roztoku a její purifikace. Druhou možností je solubilizace části gelu obsahující fragment DNA a jeho následné přečištění běžnými postupy.

Princip:

Metoda využívá vysokých koncentrací chaotropních solí (pufr QX1) k narušení vodíkových vazeb mezi cukernými zbytky v agarozovém gelu, čímž umožňuje jeho solubilizaci. Vysoká koncentrace solí navíc odstraňuje z DNA fragmentů DNA-váží proteiny. Po solubilizaci jsou fragmenty DNA adsorbovány na povrch silica částic odkud jsou po promytí (pufr PE) uvolněny 10mM roztokem Tris-Cl, pH=8,5.

- 1) Rozdělte restriční fragmenty elektroforézou dokud nejsou od sebe dostatečně odděleny. Vyřízněte pomocí skalpelu co nejmenší proužek gelu obsahující požadovaný fragment DNA a vložte jej do zkumavky. Přidejte 800 ul pufru QX1 a 10 ul QIAEX silica částic a promíchejte na vortexu.
- 2) Inkubujte při 50°C dokud nedojde k úplné solubilizaci agarozového gelu. Vortexujte každé 2 minuty.
- 3) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokojoová teplota
- 4) Promyjte sediment 500 ul pufru QX1.
- 5) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokojoová teplota
- 6) Promyjte 2x 500 ul pufru PE.
- 7) Vysušte sediment 10-15 minut dokud nezíská bílou barvu.
- 8) Resuspendujte pelet v 15 ul 10mM Tris-Cl, pH=8,5, inkubujte 10 minut při 50 °C.
- 9) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokojoová teplota
- 10) Supernatant obsahuje čistou DNA vhodnou pro ligaci.

LIGACE VEKTORU S CIZORODOU DNA A TRANSFORMACE *ESCHERICHIA COLI* DH5A

Úvod:

Tvorba fosfodiesterové vazby mezi 3'-OH a 5'-P fragmentů DNA nebo RNA za účasti kofaktorů (př. ATP) je katalyzovaná ligázami. Ligázy se *in vivo* účastní procesů replikace, rekombinace či DNA reparace. *In vitro* jsou pak využívány k tvorbě rekombinantních DNA molekul. Mezi nejčastěji používané ligázy patří ligázy produkované bakteriemi nebo bakteriofágy: např. T4 DNA ligáza, E. coli DNA ligáza, termostabilní DNA ligázy. V současné době existuje několik způsobů vyjádření ligázové aktivity. Komerční firmy obvykle jednotku definují jako množství ligázy, které je potřebné pro ligaci kohezních konců DNA (určitý čas, teplota a určitá DNA štěpená určitou restriktázou). Používají se však rovněž i další jednotky: např. Weissova jednotka = množství ligázy, které katalyzuje výměnu 1 nmol ³²P mezi pyrofosfátem a ATP za 20 minut při 37°C.

Postup:

Obecně platí, že ligační reakci provádíme vždy v co nejnižším objemu (obvykle 10 ul). Důležitým parametrem je molární poměr plazmidové a inzertované DNA, který by měl být 1:1. V případě, že molekula plazmidu má tupé nebo self-komplementární konce, by při nadbytku plazmidové DNA v ligační směsi mohl vzniknout nadbytek transformátů obsahujících pouze plazmidovou DNA bez inzertu.

1. Při ligaci je zapotřebí provádět i kontrolní reakce. V našem případě uděláme jednu reakci se všemi složkami, jednu reakci bez DNA inzertu a jednu bez ligázy.
2. Složení kompletní reakce:

10x ligační pufr (jiz obsahuje ATP)	1 ul
vektorová DNA	100 ng
DNA inzertu	10 ng
T4 DNA ligáza (400 U/ul)	0,1 ul
doplnit vodou do 10 ul	
3. Při pipetování postupujeme tak, že do mikrozkušavky napipetujeme nejprve vodu a DNA fragmenty, zahřejeme 5 minut na 45 °C, zchladíme na ledu a přidáme zbytek ligační reakce.
4. Inkubujte reakční směs hodinu při 20 °C (obvyklé je 16 °C přes noc).
5. Transformujte kompetentní buňky E. coli.

Transformace kompetentních buněk E. coli:

1. Na ledu pozvolna rozmraďte mikrozkušavku s kompetentními buňkami, přidejte 2 ul ligační směsi, promíchejte a inkubujte na ledu 30 minut.
2. Inkubujte směs 3 minuty při 37°C a poté ji umístěte na 2 minuty opět na led.
3. Přidejte 1 ml růstového LB média a inkubujte 45 minut při 37°C.
4. Směs centrifugujte 5000 rpm/5 minut/ 4°C.
5. Odlijte supernatant vyjma cca 40 ul, ve kterých resuspendujte bakteriální sediment.
6. Suspenzi přeneste na agarovou plotnu obsahující 50 µg/ml ampicilinu a rozetřete bakteriologickou hokejkou.
7. Inkubujte přes noc při 37°C. Misky lze poté uchovat několik týdnů při 4°C.

Minipreparace plazmidové DNA metodou alkalické lyze

Z ampicilin rezistentních kolonií následně izolujeme plazmidovou DNA pomocí kitu QIAGEN Miniprep.

1. Naočkovat jednu bakteriální kolonii na agarovou misku obsahující ampicilin (100 mg/ml). Inkubovat přes noc při 37°C.
2. Přenést bakteriální kulturu plastikovou špičkou do mikrocentrifugační zkumavky obsahující 250 µl pufru P1 s RNAzou ve výsledné koncentraci 100 µg/ml.
3. Přidat 250 µl roztoku P2. Opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky. Inkubovat 5 minut (ne déle) při pokojové teplotě.
4. Přidat 350 µl roztoku N3. Promíchat několikerým převrácením zkumavky.
5. Centrifugovat při 10 000 RPM/15 min/4 °C.
6. Supernatant přenést na chromatografickou kolonku. Centrifugovat při 10 000 RPM/1 min/4 °C.
7. Odstranit proteklou frakci. Kolonku propláchnout 0,5 ml pufru PB. Centrifugovat při 10 000 RPM/1 min/4 °C.
8. Odstranit proteklou frakci. Kolonku propláchnout 0,75 ml pufru PE. Centrifugovat při 10 000 RPM/1 min/4 °C.
9. Odstranit proteklou frakci. Znovu centrifugovat při 10 000 RPM/1 min/4 °C.
10. Umístí kolonku do 1,5ml zkumavky a na střed kolonky nakapej 40 µl 10 mM Tris-Cl (pH 8,0).
11. Po 1 minutě inkubace centrifugovat při 10 000 RPM/1 min/4 °C.

PCR detekce inzerce sekvence pro shRNA do vektoru pRNA-U6.1 neo

Princip:

O tom, zda se nám podařilo začlenit shRNA do vektoru se následně přesvědčíme pomocí PCR. Primery pro detekci byly navrženy tak, aby sekvence forward primeru byla komplementární k sekvenci U6 promotoru, jenž je součástí vektoru pRNA-U6.1 neo. Sekvence reverse primeru je pak komplementární k sekvenci, jež je lokalizovaná za klonovacím místem *HindIII-BamHI*. V případě PCR pro samotný vektor pRNA-U6.1 neo je očekávaná délka produktu 282 bp. V případě, že došlo k začlenění sekvence pro shRNA do vektoru je očekáván produkt o velikosti 354 bp.

Postup:

Složení PCR reakce:

destilovaná voda	14,5 ul
10x PCR pufr	2,5 ul
50mM MgCl ₂	1 ul
10mM směs dNTP	1 ul
20uM forward primer	2 ul
20uM reverse primer	2 ul
100 ng plazmidové DNA	1 ul
<u>Taq polymeráza (5U/ul)</u>	<u>1 ul</u>
celkem	25 ul

Průběh PCR reakce:

1. 94°C – 2 minuty
2. 94°C – 30 s
3. 55°C – 30 s
4. 72°C – 30 s
5. bod 2-4 opakuj 30x
6. 72°C – 7 minut
7. 10°C – 1 minuta

Při pipetování PCR směsi se obvykle postupuje tak, že nejprve se zhotoví směs všech složek (mimo plazmidové DNA) spočítaná pro všechny vzorky + negativní kontrolu (PCR reakce bez plazmidové DNA) +1, přičemž jednotlivé složky se pipetují ve výše uvedeném pořadí. Jednotlivé vzorky plazmidové DNA se napipetují do 0,5ml zkumavek a přidá se k nim odpovídající množství PCR směsi. Zkumavky s PCR směsí se poté umístí do termocykléru a spustí se daný program.

Pozn. Taq polymerázu a dNTP je třeba při pipetování uchovávat na ledu.

Transfekce pCDNA3-c-Myb a pRNAU6.1-c-Myb lipofekcí do MDA-MB-231

Úvod:

V současné době existuje velké množství metod pro přenos DNA (RNA) do eukaryotických buněk. Volba použité metody závisí na typu buněk, požadované účinnosti transfekce a v neposlední řadě také na možnostech laboratoře. Při lipofekci dochází nejprve k vytvoření komplexů záporně nabitých plazmidové DNA s kationickým lipidovým činidlem. Takto vytvořené komplexy jsou schopny pronikat přes lipidovou membránu do eukaryotických buněk.

V našem případě budeme do buněk karcinomu prsu MDA-MB-231 přenášet

- A) pcDNA3-c-Myb + pRNAU6.1-shRNA - GFP
- B) pcDNA3-c3Myb + pRNAU6.1-shRNA - c-Myb

Postup- lipofekce:

1. Do 2 mikrozkušavek napipetovat po 250ul média OPTI-MEM a přidat do každé 4 ul transfekčního činidla Lipofectamine2000 a nechat 5 minut při pokojové teplotě.
2. Do dalších 2 mikrozkušavky napipetovat po 1 ug pcDNA3-c-Myb a pRNAU6.1-c-Myb respektive pRNAU6.1-GFP.
3. Smíchat směs s Lipofectaminem se směsí s DNA a inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
4. Přikapat tuto směs k buňkám MDA-MB-231 a inkubovat v CO₂ inkubátoru do druhého dne.
5. Buňky sklídit na immunobloting.

ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ A IMMUNOBLOTING

SDS elektroforéza proteinů:

- dělení proteinů dle jejich molekulové hmotnosti (pro určení MW využití markeru)
- migrace ovlivněna i modifikacemi proteinů (př. glykosylace ...)
- nejčastěji se používá diskontinuální systém (rozdílné pH a iontová síla elektroforetického pufru, horního a dolního gelu)
- horní a dolní gel (na jejich rozhraní dochází k zakoncentrování proteinů ze vzorku)
- gel: polyakrylamid – polymerace akrylamidu, kroslinkováno N,N'-metylen-bis-akrylamidem
- dělení proteinů dle MW – koncentrace gelu, počet kroslinek

Elektroforetický pufr:

Akrylamid a bisakrylamid – neurotoxin (pracujeme v rukavicích)

SDS, Tris pufr

Ammonium persulfát – poskytuje radikály pro polymerizaci

TEMED (tetramethylethyléndiamin) – akceleruje polymeraci akrylamidu

Vzorek:

SDS se váže na proteiny – ty pak mají záporný náboj

Redukční činidlo (merkapt ethanol, dihydrotreitol) – disociace proteinových komplexů na podjednotky

Barvení proteinů:

Soli stříbra (nejcitlivější), Coomassie brilliant blue – nespecifická vazba na proteiny

Westernův přenos: - polosuchý, ponořený

Membrány: nitrocelulóza, PVDF, nylonové membrány

- liší se kapacitou vazby proteinů, vážou různě různé proteiny
- lze na ní i barvit proteiny (Ponceau S, India Ink, Amido Black ...)

Protilátky:

Primární – monoklonální, polyklonální

Sekundární – konjugované s enzymy (HRP, AP ...), biotinylované ...

Substráty:

Chromogenní, chemiluminiscence

Příprava vzorků:

Buňky MDA-MB-231 24h po transfekci promýt v PBS a inkubovat cca 1 min s 1mM EDTA v PBS. Poté buňky přenést do 15ml zkumavky a centrifugovat 400g/5 min. Odsát supernatant, suspendovat sediment v 1 ml PBS a znovu centrifugovat při 400g/5 min. Odsát dokonale supernatant a sediment lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkapt ethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při -20 °C. Změřit koncentraci proteinů ve vzorcích DC Protein Assay kitem (Biorad). Ke vzorkům přidat alespoň dvojnásobek kompletního 2xCSB pufru tak, aby výsledná koncentrace proteinů v takto naředěných vzorcích byla stejná.

Měření koncentrace proteinů (DC Protein Assay Kit):

Na mikrodestičku pipetovat 5ul každého vzorku ve třech opakováních. Ke vzorkům přidat 25 ul roztoku A' (obsahuje 20 ul roztoku S na 1 ml roztoku A). Přidat 200 ul roztoku B, zbavit vzorky bublin a ponechat 15 min stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat

vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo naneseno stejné množství proteinů od každého vzorku.

Příprava gelu:

1. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout vodou, opláchnout ethanolem a utřít.
2. Sestavit skla se spacersy a sevřít je svorkami.
3. Připravit roztok pro dolní gel, jemně promíchat a nalít mezi připravená skla asi do 2/3. Převrstvit gel slabou vrstvou destilované vody. Nechat polymerovat 30 minut.
4. Slít horní vrstvu destilované vody, připravit roztok pro horní gel, nalít jej na dolní gel, vsunout hřebínek a nechat polymerizovat 45 minut.

Nanášení vzorků a elektroforéza:

1. Skla s gelem umístíme do elektroforetické aparatury, dolijeme elektroforetický pufr a opatrně vytáhneme hřebínky.
2. Na gel nanášíme 10-20 ul vzorku (množství závisí na koncentraci proteinů v buněčných lyzátech).
3. Připojíme aparaturu ke zdroji. Pro průchod horním gelem aplikujeme 80V, poté zvýšíme napětí na 120V.
4. Elektroforézu zastavím v momentě, když hrana barvičky opouští gel.

Barvení gelu na proteiny:

1. Gel ponoříme do barvicího roztoku a ponecháme na kývačce 1 hod.
2. Odlijeme barvicí roztok a gel zalijeme roztokem odbarvovacím. Odbarvujeme opět na kývačce. Odbarvovací roztok měníme co 20-30 minut. Po odbarvení gel vysušíme na sušičce gelů.

Sestavení blotovací aparatury:

1. Nastříháme 4 kusy papíru Whatman 3MM a nitrocelulóзовou membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. Navlhčíme papíry Whatman a pórezní podložky v transferovém pufru.
3. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrem černou plochou dolů. Na ní položíme pórezní podložku a vytlačíme bubliny.
4. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
5. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně navlhčenou nitrocelulóзовou membránu.
6. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
7. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastikové svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrem a chladítkem.
8. Blotujeme 1 hod při 100 V.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu promyjeme nitrocelulóзовou membránu v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween po dobu 30 minut při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
2. Inkubujeme membránu s primární protilátkou anti-c-Myb ředěnou 1:1000 v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
3. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 7 minut každé promytí).
4. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou alkalickou fosfatázou (anti-mouse IgG ředěná 1:10000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme dvakrát TBS-Tween a dvakrát TBS.
6. Opláchneme membránu v destilované vodě.
7. Připravíme 10 ml vyvolávacího roztoku – 33 ul roztoku **NBT**, 83 ul roztoku **BCIP (pozor toxický – pracujeme v rukavicích)** v 10 ml pufru pro alkalickou fosfatázu.
8. Inkubujeme membránu s vyvolávacím roztokem dokud nebude signál zřetelný.
9. Reakce zastavíme ponořením membrány do destilované vody.

10. Nakonec membránu osušíme na ubrousku (část membrány lze obarvit nespecificky na proteiny inkubací s roztokem amidoblacku a následně odbarvit odbarvovacím roztokem).

Použité roztoky

<u>Transferový pufr:</u> 48 mM Tris 39 mM glycín 20% methanol	<u>TBS:</u> 50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0 57,6 ml 5M NaCl doplňt vodou do 2 litrů	<u>TBS-Tween:</u> přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS
-------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

<u>Odbarvovací roztok:</u> 500 ml metanolu 400 ml destilované vody 100 ml kyseliny octové	<u>Tris-glycín elektroforetický pufr (pH=8,3):</u> 25 mM Tris 250 mM glycine 0,1% (w/v) SDS
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------

<u>Pufr pro alkalickou fosfatázu:</u> 1ml 1M Tris-CL, pH=9, 200 ul 5M NaCl 50 ul 1M MgCl ₂ doplňt destilovanou vodou do 10ml	<u>Barvicí roztok: (barvení proteinů na gelu)</u> 2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku <u>Barvicí roztok: (barvení proteinů na membráně)</u> 0,1% amidoblack v odbarvovacím roztoku
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<u>Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)</u> H ₂ O 4,9 ml 40% Akrylamid 2,4 ml 1,5M Tris-Cl (pH=8,8) 2,5 ml 10% SDS 0,1 ml Ammonium persulfate 75 ul TEMED 7,5 ul	<u>Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)</u> H ₂ O 5,62 ml 40% Akrylamid 0,79 ml 1,5M Tris-Cl (pH=6,8) 0,94 ml 10% SDS 75 ul Ammonium persulfate 30 ul TEMED 10 ul
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2xCSB lyzační pufr
6,9 ml H₂O
2 ml glycerol
1,2 ml 1M Tris pH=6,8
0,4 ml 0,2% Bromfenolová modř v 1M Tris pH=6,8
2 ml 20% SDS
+ před použitím přidat 100 ul **beta-merkaptoethanolu** k 900 ul 2x CSB

NBT – 100mg/ml v 70% **dimethylformamidu**

BCIP – 20 mg/ml ve 100% **dimethylformamidu**

Protilátky:
myší monoklonální anti-Myb protilátka (hybridom)
anti-myší IgG konjugovaná s AP (Sigma Aldrich)

PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK *ESCHERICHIA COLI* DH5A

Úvod:

Byla popsána řada metod umožňující účinný přenos plazmidové DNA do buněk *E. coli*. Pomineme-li přenos metodou elektroporace (přenos DNA pomocí krátkých impulsů vysokého napětí) patří mezi nejpoužívanější metody navození kompetence bakteriálních buněk pomocí vychlazených roztoků dvojmocných iontů kovů. Tato metoda byla poprvé popsána již na počátku osmdesátých let (Hanahan, J Mol Biol 1983:166,557-580) a v různých modifikacích je používána dodnes. Pomocí této metody lze dosáhnout účinnosti transformace až 5×10^8 transformovaných kolonií/ug superhelikální plazmidové DNA. Účinnost transformace je výrazně ovlivňována čistotou použitých pufrů a laboratorního skla a také podmínkami pěstování bakteriální kultury.

Pro rutinní přípravu kompetentních buněk v laboratořích je dnes nejčastěji používaná zjednodušená modifikace původní Hanahanovy metody publikovaná Cohenem et al., PNAS 1972:69,2110-2114, která umožňuje dosáhnout účinnosti transformace 10^7 transformovaných kolonií/ug superhelikální plazmidové DNA, což je dostatečné pro klonování plazmidů v běžných aplikacích. Kompetentní buňky připravené touto metodou lze dlouhodobě uchovávat při -80°C

Cíl:

Navodit takový stav kompetence u bakteriálních buněk *E. coli* DH5 α , který by umožnil příjem cizorodé DNA s dostatečnou účinností.

Postup:

1. Naočkejte 1 kolonii buněk *E. coli* kmene DH5 α do 1 ml růstového média LB a kultivujte přes noc na třepačce při 37°C .
2. Druhý den použijte 0,5 ml této kultury pro inokulaci 100 ml LB. Inkubujte na třepačce při 37°C do dosažení $\text{OD}_{550} = 0,5$. Při měření absorbance použijte médium LB jako blank.
3. Po dosažení požadované hustoty kulturu promíchejte a ponořte do ledové lázně na 10 minut.
4. Centrifugujte po 25 ml při 2700g/10 minut/ 4°C v 50 ml sterilních zkumavkách.
5. Opatrně odstraňte supernatant a suspendujte pelet v 5 ml vychlazeného 0,1 M roztoku MgCl_2 sterilní pipetou. Přeneste suspenzi do 15 ml sterilních zkumavek.
6. Centrifugujte při 2700g/10 minut/ 4°C .
7. Opatrně odstraňte supernatant a suspendujte pelet v 1 ml vychlazeného 0,1 M roztoku CaCl_2 . Přidejte dalších 5 ml vychlazeného 0,1 M roztoku CaCl_2 , opatrně promíchejte a inkubujte v ledové lázni 20 minut.
8. Centrifugujte při 2700g/10 minut/ 4°C .
9. Odstraňte supernatant a opatrně suspendujte pelet v 1,2 ml vychlazeného zamrazovacího pufru (22,5 ml 0,1M CaCl_2 plus 3,5 ml sterilního glycerolu)
10. Rozdělte po alikvotech 200 μl do sterilních mikrozkuvek a zamraďte v -80°C .

IZOLACE GENOMOVÉ DNA ZE SAVČÍCH BUNĚK

Princip:

Tato metoda zahrnuje lyzi buněk pomocí detergentu SDS. Proteiny jsou následně degradovány proteinázou K a odstraněny extrakcí z fenolem. Vše probíhá v prostředí s EDTA, která působí jako inhibitor DNáz. RNA je degradována působením RNáz. Vzhledem k mechanickým silám, které při izolaci na molekuly genomové DNA působí je níže uvedená metoda vhodná k izolaci molekul o velikosti 100-150 kb. V případě potřeby izolace vysokomolekulárních molekul genomové DNA (>200 kbp) je potřeba využít alternativné metody (agarózové bločky, formamid, ...).

Postup:

1. Kultivujte MDA-MB-231 buňky na 10ml misce do 80% konfluence. Odsajte kultivační médium a inkubujte cca 1 min s 2 ml 1mM EDTA v PBS. Poté buňky přeneste do 15ml zkumavky a centrifugujte 400g/5 min
2. Odsajte supernatant, suspendujte sediment v 1 ml PBS a znovu centrifugujte při 400g/5 min.
3. Odsajte supernatant a suspendujte buňky v 500 μ l lyzačního pufru [10 mM Tris, 1 mM EDTA 200 μ g/ml pankreatické RNázy a 0.5% (w/v) SDS; pH 8.0] a inkubujte 1 hodinu při 37°C. Následně přidejte proteinázu K do výsledné koncentrace 1mg/ml a inkubujte přes noc při 37°C.
4. Extrahujte směs fenolem, následně směsí fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1) a nakonec směsí chloroform:izoamylalkohol (24:1).
5. Přidejte 1/10 objemu roztoku 5M NaCl a vysrážejte genomovou DNA 2 objemy 96% ledového etanolu. Centrifugujte 10000 RPMI/4 °C/10 minut.
6. Opláchněte sediment 70% etanolem, vysušte a rozpustěte v 50 μ l TE pufru.
7. Čistotu a koncentraci genomové DNA lze následně změřit spektrofotometricky.