

Design shRNA a gRNA

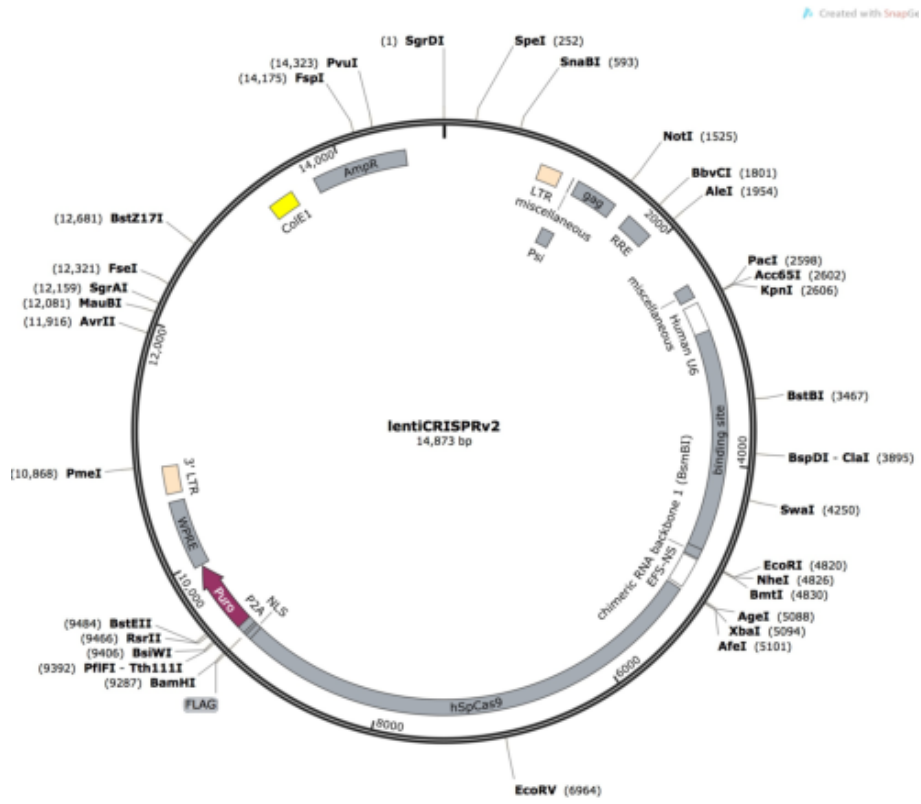
Teoretický úvod ke cvičení a veškeré potřebné informace pro design shRNA a gRNA sekvencí byl podán na úvodní přednášce, která je součástí studijních materiálů k předmětu Bi6405 Metody molekulární biologie - cvičení. Jako modelový případ byl vybrán lidský gen MYBL2 (Gene ID 4605, B-MYB).

Kodující sekvence genu MYBL2 s vyznačenými cílovými sekvencemi pro shRNA (žlutě) a gRNA (modře).

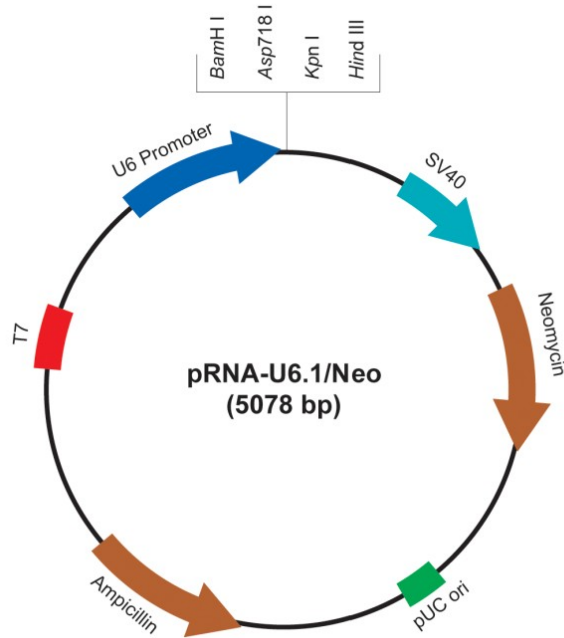
```
atgtctcggcggacgcgctgcgaggatctggatgagctgcactaccaggacacagattcagatgtgccggagcag
agggatagcaagtgcaaggtcaaattggacccatgaggaggacgagcagctgagggccctggatgagcagtttggg
cagcaggactggaagttcctggccagccacttccctaaccgcactgaccagcaatgccagtacaggtggctgaga
gttttgaatccagaccttgtcaaggggccatggaccaaagaggaagacccaaaagtcatcgagctggttaagaag
tatggcacaagcagtggaactgattggccaagcacctgaagggccggctggggaagcagtgccgtgaacgctgg
cacaaccacctcaaccctgaggtgaagaagtcttggctggaccgaggaggaccgcatcatctgagggccac
aaggtgctgggcaaccgctgggcccagatcgccaagatggtgccagggaggacagacaatgctgtgaagaatcac
tggaaactctaccatcaaaaggaaggtggacacaggaggcttcttgagcagtgccaaagactgcaagccccagtg
tacttgctgctggagctcgaggacaaggacggcctccagagtgcccagcccacggaaggccagggaagtcttctg
accaactggccctccgtccctcctaccataaaggaggaggaaaacagtgaggaggaacttgcagcagccaccaca
tcgaaggaacaggagcccacgttacagatctggacgcagtgccaacaccagagccctggaggaattcccgaag
cgtgaggaccaggaaggtccccaccagaaacgagcctgccttacaagtgggtggaggagcagtaacctcctc
atccctgctgtgggttctagcctctctgaagccctggacttgatcgagtcggaccctgatgcttgggtgacctg
agtaaatgtgacctccctgaggaacctctgcagaggacagtatcaacaacagcctagtgcagctgcaagcgtca
catcagcagcaagtcctgccaccccgccagccttccgccctgggtgccagtgtagccgagtagccctggatggc
cacaccatctcagacctgagccggagcagccggggcgagctgatccccatctccccagcactgaagtcggggggc
tctggcattggcacaccgcccctctgtgctcaagcggcagaggaagagggcgtgtggctctgtcccctgtcactgag
aatagcaccagctctgtccttccctggattcctgtaacagcctcacgccaagagcacacctgttaagaccctgccc
ttctcgccctcccagtttctgaacttctggaacaaacaggacacattggagctggagagcccctcgctgacatcc
accccagtggtgcagccagaaggtgggtgggtcaccacaccactgcaccgggacaagacaccctgcaccagaaacat
gctgcgtttgtaaccccagatcagaagtaactccatggacaacactccccacacgccaaccccgttcaagaacgcc
ctggagaagtacggaccctgaagcccctgccacagaccccgcacctggaggaggacttgaaggaggtgctgctgct
tctgaggctggcatcgaactcatcatcgaggacgacatcaggcccgagaagcagaagaggaagcctgggctgctgg
cggagccccatcaagaaagtccggaagtctctggctcttgacattgtggatgaggatgtgaagctgatgatgtcc
aactgcccagtgctctatccttggcgacaactgccccttcaaacctctccagcctcaccctgtcaggtatcaaa
gaagacaacagcttgctcaaccagggcttcttgcaggccaagcccgagaaggcagcagtgggcccagaagccccga
agccacttcacgacacctgcccctatgtccagtgccctggaagacgggtggcctgcccgggggaccagggaccagctt
tcatgcaggagaaagcccggcagctcctgggcccgcctgaagcccagccacacatctcggaccctcatcttgtcc
tga
```

Používané plazmidy

lentiCRISPRv2



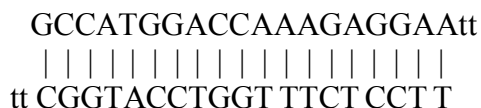
pRNA-U6.1/Neo



Příprava klonované sekvence gRNA a shRNA

shRNA:

siRNA proti sekvenci lidského genu *B-myb*



Konstrukt pro shRNA *B-myb*, pro vklonování do pRNA U6.1/Neo plazmidu

Oligonukleotid A:

5' GATCCGGCCATGGACCAAAGAGGAATTCAAGAGATTCTCTTTGGTCCATGGCTTTTTT GG AAA3
| Antisense | Loop | Sense | Termination Signal

Oligonukleotid B:

5' AGCTTTTCCAAAAAAGCCATGGACCAAAGAGGAATCTCTTGAAATTCCTCTTTGGTCCATGGCCG 3'

BamHI

5' -GATCCGGCCATGGACCAAAGAGGAATTCAAGAGATTCTCTTTGGTCCATGGCTTTTTT GGAAA
GCCGTACCTGGTTTCTCCTTAAGTTCTTAAGGAGAAACCAGGTACCGAAAAAACCTTTTCGA - 5'
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 štěpeném *BamHI/HindIII*.

gRNA:

cílová sekvence v lidském genu *B-myb*

TCTGGATGAGCTGCACTACCAGG

Oligonukleotidy:

CACCGTCTGGATGAGCTGCACTACC a AAACGGTAGTGACGCTCATCCAGAC

Jednotlivě nasyntetizované řetězce oligonukleotidů, které jsou k sobě komplementární, je potřeba spojit ve dvouřetězec, který je následně ligován do vektoru lentiCRISPRv2 štěpeném *Esp3I*.

5' - CACCGTCTGGATGAGCTGCACTACC - 3'

```
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
3' - CAGACCTACTCGACGTGATGGCAA - 5'
```

Postup (stejný pro shRNA i gRNA oligonukleotidy):

1. Připravte 20 µl reakční směsi, která obsahuje:
 - 2 µl (1 µg) oligonukleotidu A
 - 2 µl (1 µg) oligonukleotidu B

1 μ l 20x SSC
doplnit vodou do 20 μ l

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 30 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 restričními endonukleázami

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 restriktázami, 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 restričním 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*.

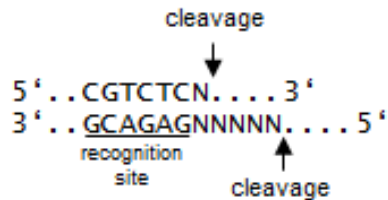
Různé restriční endonukleázy většinou poskytují taková zakončení fragmentů, která nejsou vzájemně kompatibilní a jejich spojení ligací není možné. Ligaci pak lze provést pouze v tom případě, že se odstraní jednořetězcové přečnávající úseky DNA, čímž se konce dsDNA zatupí. Tento typ modifikace lze provést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

Pro modifikaci přečnávajícího 5' konce lze použít obě techniky – zpravidla se používá Klenowův fragment DNA polymerázy I nebo nukleáza Mung Bean. Pro modifikaci přečnávajícího 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.

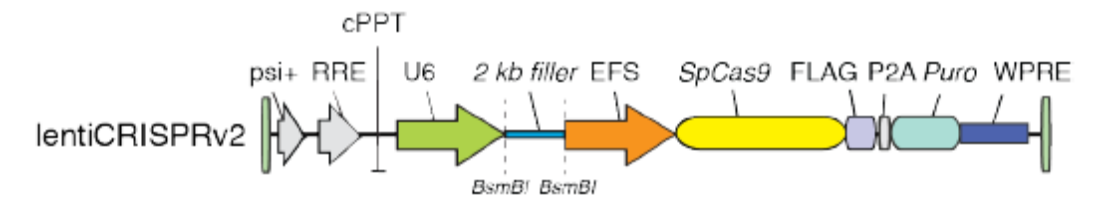
V našem případě byl postup navržen tak, aby odpovídal ideální situaci popsané výše (tučný text). Tedy, při klonování do pRNA_U6.1/Neo plazmidu jsou *Bam*HI a *Hind*III konce nekomplementární a k ligaci tak může dojít pouze po začlenění inzertu kodujícího shRNA.

V případě klonování do vektoru lentiCRISPRv2 je situace poněkud odlišná. Enzym *Esp3I* (levnější izoschizomer enzymu *BsmBI*) štěpí mimo svou rozpoznávací sekvenci.

***Esp3I*:**



Klonovací místo vektoru lentiCRISPRv2 však obsahuje 2 rozpoznávací místa pro *Esp3I* mezi kterými je jedinečná sekvence. Po štěpení tohoto plazmidu tak dojde k vyštěpení této sekvence a vznikne lineární plazmid, který nemá komplementární konce. K ligaci tak může dojít pouze po začlenění inzertu kodujícího gRNA



Postup:

1A (shRNA). Připravte 30 μ l reakční směsi, která obsahuje:

1 μ g plazmidu pRNA_U6.1/Neo

3 μ l 10x restrikčního pufru

2 x 1 μ l restrikčního enzymu (BamHI a HindIII)

doplňte vodou do 30 μ l

analogicky připravte i neštěpenou kontrolu a kontroly pouze s jedním enzymem

1B (gRNA). Připravte 30 μ l reakční směsi, která obsahuje:

1 μ g plazmidu lentiRISPRv2

3 μ l 10x restrikčního pufru

1,5 μ l restrikčního enzymu (*Esp3I*)

doplňte vodou do 30 μ l

analogicky připravte i neštěpenou kontrolu

2. Inkubujte restrikční směsi 75 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 kitu pro extrakci DNA z agarózového gelu

Celou řadu různých metod lze využít pro purifikaci fragmentů DNA z agarózových 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 agarózovém gelu, čímž umožňuje jeho solubilizaci. Vysoká koncentrace solí navíc odstraňuje z DNA fragmentů DNA-vazebné 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. Pro purifikaci fragmentů DNA z gelu bude využit QIAEX gel extraction kit (Qiagen).

Postup (stejný pro shRNA i gRNA):

- 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 μ l pufru QX1 a 10 μ l QIAEX silica částic a promíchejte na vortexu.
- 2) Inkubujte při 50 °C dokud nedojde k úplné solubilizaci agarózového gelu. Vortexujte každé 2 minuty
- 3) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokožová teplota
- 4) Promyjte sediment 500 μ l pufru QX1
- 5) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokožová teplota
- 6) Promyjte 2x 500 μ l pufru PE
- 7) Vysušte sediment 10-15 minut dokud nezíská bílou barvu
- 8) Resuspendujte pelet v 15 μ l 10mM Tris-Cl, pH=8,5, inkubujte 10 minut při 50 °C (lentiCRISPRv2 15 minut).
- 9) Centrifugujte 10000g/1 minutu/pokožová teplota
- 10) Supernatant obsahuje čistou DNA (štěpený plazmid, spojené oligonukleotidy) vhodnou pro ligaci.

Ligace vektoru s cizorodou DNA

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 rekombinatních 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 (stejný pro shRNA i gRNA):

Obecně platí, že ligační reakci provádíme vždy v co nejmenším objemu (obvykle 10 µl). Důležitým parametrem je molární poměr plazmidové a inzertované DNA, který by měl být 1:1. V případě, že molekula plazmidu má tupé nebo komplementární konce, by při nadbytku plazmidové DNA v ligační směsi mohl vzniknout nadbytek transformátů obsahujících pouze plazmidovou DNA bez zašleňované klonované molekuly DNA. V našem případě však by takovéto molekuly DNA měly vzniknout jen ojediněle.

1. Při ligaci je zapotřebí provádět i kontrolní reakce. Obvyklou kontrolou je reakce s našleňovanou DNA bez začleňované DNA a také reakce bez DNA ligázy.
2. Složení kompletní reakce:

10x ligační pufr (jiz obsahuje ATP)	1 µl
vektorová DNA	100 ng
začleňovaná DNA	10 ng
T4 DNA ligáza (400 U/µl)	0,1 µl
doplnit vodou do 10 µl	
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 (lépe však 16 °C přes noc)
5. Transformujte kompetentní buňky *E. coli*.

Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5α

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 5×10^8 transformovaných kolonií/ μg 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, která umožňuje dosáhnout účinnosti transformace 10^7 transformovaných kolonií/ μg superhelikální plazmidové DNA, což je dostatečné pro klonování plazmidů v běžných aplikacích. Kompetentní buňky připravené touto metodou lze dlouhodobě uchovávat při -80°C .

Postup:

1. Naočkujte 1 kolonii buněk *E. coli* kmene DH5α 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 $2700\text{g}/10$ 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 $2700\text{g}/10$ 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 $2700\text{g}/10$ 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 mikrozkmavek a zamraďte při -80°C .

Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Pro klonování cizorodé DNA se využívá kmenů *E. coli*, které byly metodami genového inženýrství upraveny tak, aby byly schopny s vysokou účinností přijímat cizorodou DNA, umožňovaly její replikaci a udržovaly její původní strukturu (tj. nezpůsobovaly vyštěpování či rekombinaci naklonované DNA) a dovolovaly selekci rekombinantních plazmidů. Vlastní navození kompetence (schopnosti přijmout cizorodou DNA) spočívá ve vystavení buněk příslušného kmene *E. coli* v exponenciální fázi růstu vychlazeným roztokům dvojmocných iontů (CaCl_2 , MgCl_2). Promývání a inkubace buněk v těchto roztocích vede ke změnám v metabolismu buněk a složení jejich buněčné stěny, které jim umožňují přijmout cizorodou DNA (viz. postup přípravy kompetentních buněk *E. coli*).

Postup (stejný pro shRNA i gRNA):

1. Na ledu pozvolna rozmraďte mikrozkušavku s kompetentními buňkami, přidejte 2 μL ligační směsi, promíchejte a inkubujte na ledu 30 minut.
2. Inkubujte směs 30 sec minuty při 42 °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 6000 rpm/1 minuta/RT.
5. Odlíjete supernatant vyjma cca 40 μl , ve kterých resuspendujte bakteriální sediment.
6. Suspenzi přeneste na agarovou plotnu obsahující 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu a rozetřete bakteriologickou hokejkou.
7. Inkubujte přes noc při 37 °C.
8. Druhý den přeočkejte jednotlivé rezistentní kolonie křížovým roztěrem na nové agarové plotny s příslušným antibiotikem a inkubujte opět přes noc při 37 °C.
9. Misky lze poté uchovat několik týdnů při 4°C.

Izolace plazmidové DNA metodou alkalické lyze (miniprep)

Z narostlé bakteriální kultury na agarové plotně izolujeme plazmidovou DNA pomocí následujícího postupu.

Postup (stejný pro shRNA i gRNA):

1. Přenést bakteriální kulturu opakovaně plastovou špičkou do mikrocentrifugační zkumavky obsahující 200 μl pufru P1 s RNAzou ve výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g/mL}$.
2. Přidat 200 μl roztoku P2. Opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky. Inkubovat 5 minut (ne déle) při pokojové teplotě.
3. Přidat 200 μl ledově vychlazeného roztoku P3. Promíchat několikerým převrácením zkumavky. Zkumavku ponechat 10 minut na ledu.
4. Centrifugovat při 15 000 RPM/15 min/4 °C.

5. Supernatant přenést do čisté mikrozkušavky, přidat 900 μ l etanolu, promíchat opakovaným převrácením zkumavky a umístit na 15 minut do -80°C .
6. Centrifugovat při 15 000 RPM/10 min/ 4°C .
7. Opláchnout sediment 1 ml 70% etanolu.
8. Sediment vysušit a rozpustit ve 40 μ l 10mM Tris, pH=8..
9. Koncentraci a čistotu izolované DNA změřit na Nanodropu.

Použité roztoky:

P1 - 50mM glukóza, 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA

P2 - 0,2M NaOH, 1% SDS

P3 - 5M octan draselný, pH = 5,2

Ověření začlenění klonované sekvence do vektoru

O tom, že se nám podařilo připravit požadovaný plazmid se následně přesvědčíme pomocí sekvenace. Pro sekvenaci používáme primer doporučený výrobcem daného vektoru. Vzhledem k nízkým cenám sekvenčních reakcí a rychlosti dodání výsledků dnes většinou využíváme služeb komerčních firem. Před odesláním vzorků danému komerčnímu subjektu, se lze o úspěšném začlenění klonované sekvence do vektoru přesvědčit i jiným způsobem – restričním štěpením či pomocí PCR. Druhou variantu si ukážeme na příkladu klonování sekvence shRNA pro B-Myb.

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

Princip:

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 350 bp.

Postup:

Složení PCR reakce:

destilovaná voda	16,5 μ L
10x PCR pufr	2,5 μ L
10mM směs dNTP	0,5 μ L
20 μ M forward primer	2 μ L
20 μ M reverse primer	2 μ L
100 ng plazmidové DNA	1 μ L
<u>Taq polymeráza (5U/ μL)</u>	<u>0,5 μL</u>
celkem	25 μ L

Průběh PCR reakce:

1. 94°C – 2 minuty
2. 95°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.

Máme-li ověřeno, že se nám podařilo připravit správný plazmid, můžeme přistoupit k otestování jeho účinku v eukaryotických buňkách. Pro tento účel jsme zvolili myší nádorovou buněčno linii 4T1.

Transfekce plazmidů metodou lipofekce do buněčné linie 4T1

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 nabitě plazmidové DNA s kationickým lipidovým činidlem. Takto vytvořené komplexy jsou schopny pronikat přes lipidovou membránu do eukaryotických buněk.

V reálné situaci bychom do buněk přenášeli výše připravené vektory. Abychom ale v rámci cvičení již druhý den mohli vyhodnotit úspěšnost transfekce, budeme do buněk přenášet plazmid pcDNA3.1 (Invitrogen, kontrola), respektive plazmid pcDNA3.1-GFP, který nese gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Druhý den tak budeme moci vyhodnotit úspěšnost transfekce pod fluorescenčním mikroskopem, případně pomocí průtokové cytometrie.

Postup:

1. Do 2 mikrozkušavek napipetovat 200 μ l média OPTI-MEM (Invitrogen). Do jedné přidáme 2,5 μ g plazmidové DNA a 5 μ l činidla Lipofectamine Plus (Invitrogen). Do druhé mikrozkušavky napipetujeme 5 μ l činidla Lipofectamine LTX (Invitrogen).
2. Obě směsi inkubujeme 5 minut při RT, poté je smícháme a ponecháme 30 minut při pokojové teplotě.
3. Přikapeme tuto směs k buňkám 4T1 a umístíme je na 24 hodin do CO₂ inkubátoru. Po 5 hodinách vyměníme médium (odstranění komplexů Lipofectamine-DNA sníží cytotoxicitu).
4. Po 24 hodinách vyhodnotit účinnost transfekce pomocí fluorescenčního mikroskopu/průtokového cytometru a následně buňky sklídit a připravit buněčné lyzáty pro SDS-PAGE.

Elektroforéza proteinů a imunobloting

V případě postranskripčního umlčování genů pomocí siRNA/shRNA vyhodnocujeme expresi cílového genu na úrovni proteinu obvykle 24-96 hod po transfekci. Tento čas je mimo jiné závislý na tom, jak je daný protein v buňce „stabilní“, tedy za jak dlouho po syntéze na ribozomu dochází k jeho degradaci. V případě mutagenese pomocí CRISPR/Cas9 selektujeme po transfekci buňky na rezistenci k antibiotiku (v našem případě puromycinu). Rezistentní buňky následně klonujeme metodou limitního ředění do 96-jamkových destiček, abychom získali klony vzniklé z jedné jediné buňky. Tyto klony expandujeme a expresi cílového proteinu stanovíme pomocí SDS-PAGE a imunoblotingu.

Postup:

Příprava vzorků:

Buňky 4T1 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 merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit (vzorky lze poté uchovávat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Změřit koncentraci proteinů ve vzorcích DC Protein Assay kitem (Biorad). Vzorky upravit na stejnou koncentraci, smíchat s kompletním 2xCSB pufrům v poměru 1:1 a nanést na SDS-PAGE.

Měření koncentrace proteinů (DC Protein Assay Kit):

Na mikrodestičku pipetovat 5 μl každého vzorku ve třech opakováních. Ke vzorkům přidat 25 μl roztoku A' (obsahuje 20 μl roztoku S na 1 mL roztoku A). Přidat 200 μl roztoku B, zbavit vzorky bublin a ponechat 15 minut stát. Analogicky připravit i vzorky standardu (BSA o koncentracích 0,1; 0,5; 1; 1,5; a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm a pomocí koncentrační řady BSA vypočítat koncentrace proteinů v připravených lyzátech. Na závěr určit 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 μl vzorku (množství závisí na koncentraci proteinů v buněčných lyzátech).
3. Připojíme aparaturu ke zdroji. Pro průchod horním gelem aplikujeme 80 V, poté zvýšíme napětí na 120 V.
4. Elektroforézu zastavíme v momentě, když hrana barvičky opouští gel.

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. Plastickou 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 3MM 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 plastické 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-B-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 konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou 1:10000 v TBS-Tween při pokojové teplotě.
5. Promyjeme dvakrát TBS-Tween a dvakrát TBS.
6. Opláchneme membránu v destilované vodě a osušíme ubrouskem.
7. Připravíme 2 ml ECL substrátu (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate) a nakapeme jej na membránu.
8. Po 5 minutách membránu osušíme a signály exponujeme na film v temné komoře.
9. Nakonec membránu obarvíme na proteiny inkubací s roztokem amidoblacku a následně odbarvit odbarvovacím roztokem.

Použité roztoky

Transferový pufr:

48 mM Tris
39 mM glycin
20% **methanol**

TBS:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0
57,6 ml 5M NaCl
doplňnit vodou do 2 litrů

TBS-Tween:

přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS

Odbarvovací roztok:

500 ml **metanolu**
400 ml destilované vody
100 ml kyseliny octové

Tris-glycin elektroforetický pufr (pH=8,3):

25 mM Tris
250 mM glycine
0,1% (w/v) SDS

Pufr pro alkalickou fosfatázu:

1ml 1M Tris-CL, pH=9
200 µl 5M NaCl

50 μ l 1M MgCl₂
doplnit destilovanou vodou do 10ml

Barvicí roztok: (barvení proteinů na membráně)
0,1% amidoblack v odbarvovacím roztoku

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

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 μ l **beta-merkптоethanolu** k 900 μ l 2x CSB

Protilátky:

králičí monoklonální anti-B-Myb protilátka (sc-724, Santa Cruz)
anti-králičí IgG konjugovaná s HRP (A4914, Sigma Aldrich)

Po ověření, že po přechodné transfekci plazmidem exprimujícím požadovanou shRNA došlo k utlumení exprese cílového genu, můžeme následně přistoupit k fenotypové charakterizaci buněk pro posouzení významu utlumeného genu na námi studovaný fenotyp. V případě mutagenese pomocí metody CRISPR/Cas9 získáme v ideálním případě výše uvedeným postupem klony buněk, které neexprimují námi studovaný protein. V dalším kroku je zapotřebí přesně popsat mutace, které v tomto klonu vznikly po transfekci B-Myb-lentiCRISPRv2 plazmidu. Nejprve tedy musíme tento klon expandovat a izolovat genomovou DNA. K tomu využijeme GenELUTE Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit od firmy Sigma.

Izolace genomové DNA

Postup:

- 1) 5×10^6 buněk MDA-MB-231 promýt v PBS a inkubovat cca 1 min s roztokem trypsin/1mM EDTA.
 - 2) Buňky přenést do 15mL zkumavky a centrifugovat 400g/5 min. Odsát supernatant, suspendovat sediment v 200 μ l Resuspension solution.
 - 3) Přidej 20 μ l roztoku Rnázy A a inkubuj 2 minuty při pokojové teplotě.
 - 4) Přidej 20 μ l roztoku proteinázy K a 200 μ l lyzačního roztoku C, vortexuj 15 sekund a inkubuj 10 minut při 70 °C.
 - 5) Přenes 500 μ l Column Preparation Solution do GenElute kolonky a centrifuguj 12000g/1 min.
 - 6) K lyzátu přidej 200 μ l etanolu, vortexuj 10 s.
 - 7) Přenes lyzát na GenElute kolonku. Centrifuguj 6500g/1 min.
 - 8) Promyj kolonku 500 μ l promývacího roztoku obsahujícím etanol, centrifuguj 6500g/1 min.
 - 9) Promyj kolonku 500 μ l promývacího roztoku obsahujícím etanol, centrifuguj 12000g/3 min a přenes kolonku do čisté zkumavky.
-
- 10) Přenes 200 μ l elučního pufru do centra kolonky, ponech stát 5 min při pokojové teplotě a poté centrifuguj 6500g/1 min.
 - 11) Změř koncentraci genomové DNA na Nanodropu.
-

Analýza mutačního statutu genu B-Myb

Po izolaci genomové DNA musíme pomocí PCR namnožit úsek DNA s primery ohraničujícími místo, kde očekáváme vznik mutace (obvykle 3-4 nukleotidy před sekvencí PAM). Na 5' konce těchto primerů připojíme rozpoznávací místa pro restriční endonukleázy, které následně využijeme pro klonování do vybraného plazmidu. Použit můžeme libovolný plazmid, který má vhodné restriční místa a ze kterého můžeme následně sekvenovat klonovaný úsek genomové DNA cílového genu. Pro náš modelový případ použijeme primery

GAGCCTCGAGAAGTGAAGCAGAAGTGCCTATG
GAGCAAGCTTACCTCCTAGCAGTCAAAAGGC

Podtržené sekvence jsou komplementární ke genomové DNA genu B-Myb, barevně označené jsou rozpoznávací sekvence pro restriční endonukleázy *XhoI* a *BamHI*. PCR produkt po přečištění v agarozovém gelu štěpíme současně oběma enzymy a klonujeme do plazmidu pGL3 (Promega), který rovněž štěpíme těmito enzymy. Takto připravené plazmidy následně sekvenujeme. Vždy sekvenujeme více plazmidů získaných z téhož klonu buněk, ve kterých jsme provedli mutagenézi, neb každý gen je v buňkách přítomný ve dvou alelách (pozor, např. nádorové buněčné linie jsou často polyploidní a mohou tedy mít více alel cílového genu) a abychom tedy pokryly celé spektrum vzniklých mutací (alel). Na závěr ověříme význam zjištěných mutací pro syntézu funkčního polypeptidu (např. pomocí <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>, viz. úvodní přednáška ke cvičení). Buněčné klony s vhodným spektrem mutací následně použijeme pro fenotypové analýzy.

Lokalizace cílového místa pro náš navržený CRISPR v genomové sekvenci genu MYBL2 (modře) - primery jsou označeny podtrženě, exon je šedě, nebarevně jsou introny):

```
aagtgaagcagaagtgccctatgtcttataaaagaagaaaaagtaagagcctctctccccagacctttccctaggg  
tgggctggccgctgcctacacgttctccattatgtaaaacatatggacacaccatccttgacccttggcctgctt  
tccccatagcgaggatcttggatgagctgcactaccaggacacagattcagatgtgccggagcagagggatagcaa  
gtgcaaggtcaaattggacccatgaggaggtgagtgccatggggaagagaggggttgatggcagctgggggctgtcc  
agaggaactgagcctggagtgtatgtgatgtctcatcagatgggatgaagaggaggagccggtgaaggaagggat  
gggtcctctgattgtcctcatgcctcttctcagagcattctgggggattctcaattttgaggactcagtgggtgg  
gaaggggatgtgtgcctagacctcagggcccattgtgtctcctgagcagctgccatgttctatgtcatggacat  
tgattgtgctttttgccttttgactgctaggagggtttggccaaatctgtaactccccccaccctttttttttt  
tttttttgagacagagtttcgctcttctcaccaggctagagggcaatggcataatctcagctcactgcaacctc
```