



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

DEN 1

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

Úvod

Dopolední část bude věnována analýze aktivity promotoru pomocí transkripční fúze a praktickému osvojení software pro design sekvence oligonukleotidů OLIGO 6 včetně navržení sekvence PCR primerů, odpolední část zahrne vlastní syntézu, purifikaci a kontrolu kvality PCR primeru.

Časový harmonogram¹

- 7:30 PŘÍPRAVA MATERIÁLU (Jan Hejátko), laboratoř 334
7:45 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE (Jan Hejátko)
1. Teoretický úvod
2. Zahájení barvení
9:00 ANALÝZA BUNĚČNÉ LOKALIZACE PROTEINŮ A PROTEIN-PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ (Jakub Horák), laboratoř 334
a) Naočkování kultur agrobakterií
9:45 DESIGN SEKVENCE PCR PRIMERŮ (Hana Konečná), místnost 211
11:45 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE
3. Kontrola GUS barvení/zahájení odbarvování

12:00 OBĚD
13:00 SYNTÉZA OLIGONUKLEOTIDŮ (Hana Konečná), Centrální laboratoř 342
16:00 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE
4. Zahájení odbarvování vzorků

16:15 ANALÝZA BUNĚČNÉ LOKALIZACE PROTEINŮ A PROTEIN-PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ (Jakub Horák), laboratoř 334
b) Infiltrace listů tabáku
18:15 UKONČENÍ PROGRAMU 1. DNE

Příprava materiálu

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

Práce v laboratoři

- Bezpečnost

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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

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

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

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

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

Metoda 1A

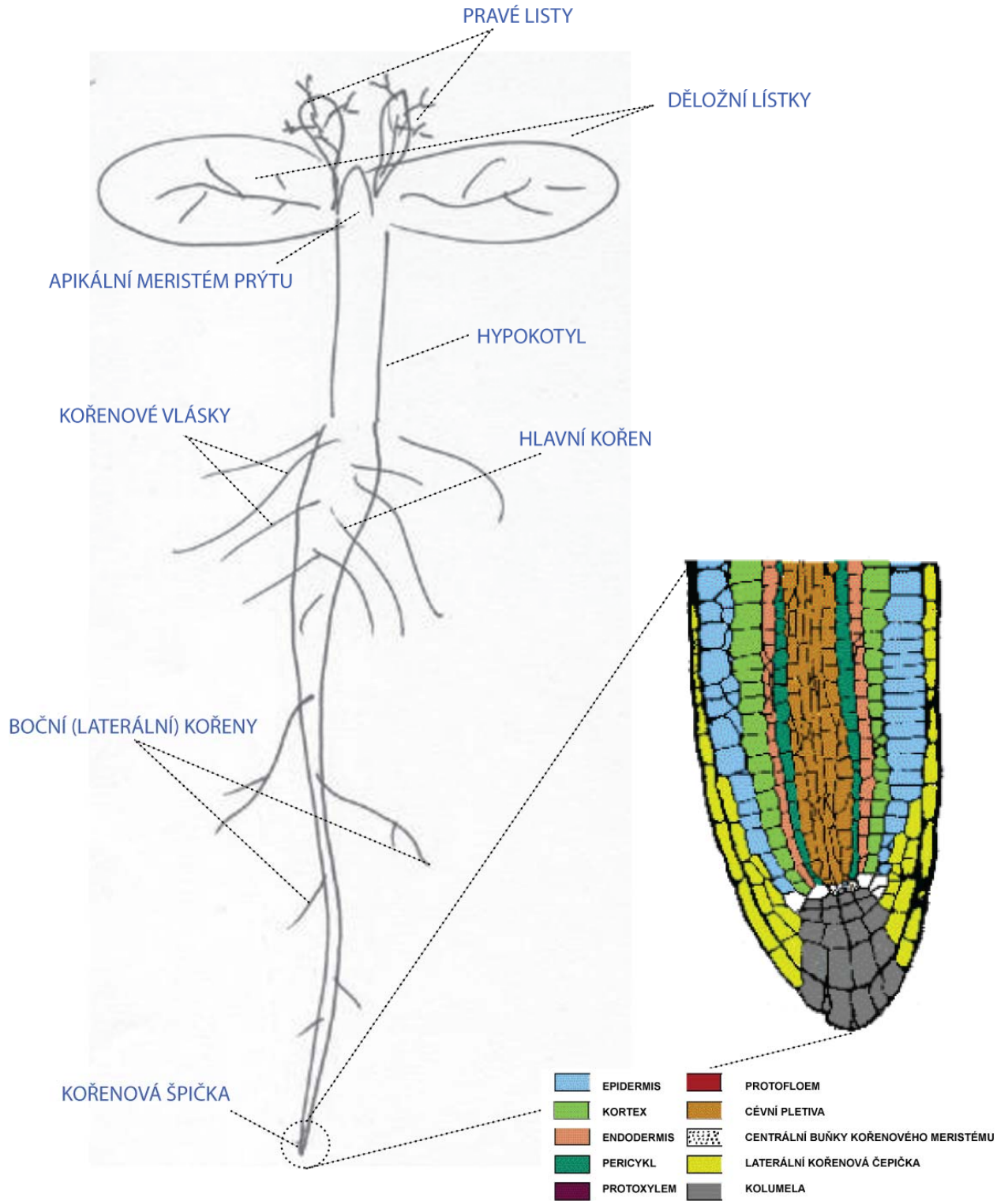
Analýza aktivity promotoru pomocí transkripční fúze s reportérovým genem *uidA* (GUS)

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

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Šablona k protokolům: Analýza aktivity promotoru pomocí transkripční fúze

Jméno:

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky:

Závěr²:

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Metoda 1B

Infiltrace agrobakterií do listů tabáku *Nicotiana benthamiana*

Listy tabáku *Nicotina benthamiana* jsou vhodným rostlinným systémem pro transientní expresi fúzních proteinů, u kterých chceme studovat jejich vzájemné interakce a lokalizaci uvnitř rostlinné buňky. K transformaci listu využijeme přenos T-DNA z *Agrobacterium tumefaciens*. Studované geny jsou naklonovány do expresní kazety uvnitř T-DNA oblasti binárního plasmidu a takto připravené konstrukty pro expresi fúzních proteinů (GFP, RFP, YFP-N, YFP-C apod.) jsou transformovány do kmenu GV3101 pMP90. Vzniklé kmeny agrobakterií potom kultivujeme a ve formě suspenze je pomocí injekční stříkačky (bez jehly) vtláčíme skrze průduchy na spodní straně listu do mezofylového prostoru tak, že suspenze vyplní celý list. Následně dojde k přenosu mnoha kopií T-DNA do jádra buněk. Pro transkripci vnesených genů není nutné začlenění T-DNA do chromozomů. Pokud před infiltrací smícháme kmeny nesoucí různé konstrukty, dojde s velkou pravděpodobností k jejich koexpresi, protože jedna buňka je zpravidla transformována mnoha agrobakteriemi současně. Transientní exprese proteinů je velmi silná kvůli velkému počtu transkripčně aktivních kopií T-DNA v jádře, ale během několika dnů odezní. K udržení vysoké hladiny transientní exprese obvykle používáme koexpresi studovaných proteinů s virovými proteiny inhibujícími buněčné mechanismy posttranskripčního umlčování – například protein p19 viru TBSV (Tomato Bushy Stunt Virus).

1. Každá skupina si vezme 4 zkumavky s narostlou agrobakteriální kulturou podle následujícího rozpisu.

Skupina 1 a 4		Skupina 2 a 5		Skupina 3 a 6	
kmen	rezistence	kmen	rezistence	kmen	rezistence
AHP2-YFP ^N	Rif, Gent, Kan	AHP2-YFP ^N	Rif, Gent, Kan	ERS1-RFP	Rif, Gent, Spec
AHP4-YFP ^N	Rif, Gent, Kan	AHP4-YFP ^N	Rif, Gent, Kan	ΔTM-ETR2-GFP	Rif, Gent, Spec
CKII RD -YFP ^C	Rif, Gent, Kan	CKII-YFP ^C	Rif, Gent, Kan	CKII-GFP	Rif, Gent, Spec
p19	Rif, Gent, Kan	p19	Rif, Gent, Kan	p19	Rif, Gent, Kan

2. Pro každý kmen připravte do plastové zkumavky 4 ml YEB média s odpovídajícím antibiotikem. Podle tabulky s koncentracemi antibiotik vypočítejte objem, který napipetujete do zkumavek a promíchejte.

antibiotikum	zásobní roztok	koncentrace v YEB médiu
Rifampicin	50 mg/ml	100 µg/ml
Gentamycin	20 mg/ml	40 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml	100 µg/ml

3. Do každé zkumavky napipetujte 1 ml kultury.
4. Uzavřete zkumavky a inkubujte za stálého třepání při 28 °C / 200 rpm / 4 – 6 hodin.
5. Zcentrifugujte narostlé kultury při 4000 rpm / 22 °C / 15 min.
6. Během centrifugace si připravte 25 ml AS média.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

AS médium (25 ml)	
1 M MES pH 5,6	250 μ l
3M MgCl ₂	83 μ l
150 mM Acetosyringon	25 μ l
destilovaná voda	do 25 ml

- Odlíjete médium a zkumavky znovu krátce zcentrifugujte.
- Pipetou odsajte ze zkumavek zbytky média.
- Napipetujte do zkumavek 3,2 ml AS média a resuspendujte pelet.
- Změřte OD600 na spektrofotometru.
- Přidáním vypočítaného objemu AS média upravte agrobakteriální suspenze na OD600 = 0,8.
- Do 2 ml zkumavek připravte směsi agrobakterií v odpovídajícím poměru podle následujícího rozpisu.

Skupina 1 a 4		Skupina 2 a 5		Skupina 3 a 6	
kombinace	poměr	kombinace	poměr	kombinace	poměr
AHP2-YFP ^N + CK11 RD -YFP ^C + p19	1 : 1 : 1	AHP2-YFP ^N + CK11-YFP ^C + p19	1 : 1 : 1	Δ TM-ETR2-GFP + ERS1-RFP + p19	1,5 : 0,5 : 1
AHP4-YFP ^N + CK11 RD -YFP ^C + p19	1 : 1 : 1	AHP2-YFP ^N + CK11-YFP ^C + p19	1 : 1 : 1	CK11-GFP + p19	1 : 1

- Inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.
- Infiltrujte suspenze pomocí 1 ml injekční stříkačky (bez jehly) skrze spodní stranu listu do připravených rostlin tabáku.
- Odnesete rostliny do skleníku. Konfokální mikroskopii epidermis na abaxiální straně listu provádíme za 2 – 3 dny (viz. Metoda 4A).
- Do protokolu k metodě 4A uveďte stručný popis pracovního postupu infiltrace tabákových listů, ve kterém vysvětlíte, proč infiltrační AS médium obsahuje acetosyringon a proč vždy koinfiltrujeme s kmenem p19.

Metoda 1C

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

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Syntéza PCR primeru na syntetizátoru Expedite 8909

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

Purifikace primeru: Odsolení gelovou filtrací na molekulovém sítu

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

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

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

Hydratace kolonky CENTRI-SPIN 10

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

Vlastní odsolení vzorku

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

Určení výtěžku.

Stanovení absorbance zředěného vzorku měřením při 260 nm (spektrofotometr HELIOS). Definice jednotky OD. Výpočet výtěžku syntézy v jednotkách OD a převody do jiných jednotek. Vypočtete, v jakém objemu vody je třeba rozpustit výtěžek, abyste dostali zásobní roztok o



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

koncentraci 500 μM . **Výtisk protokolu o syntéze s doplněným výtěžkem surového a odsoleného produktu přiložte k protokolu ze cvičení.**

Kontrola kvality.

Chromatografie na ionexovém perfúzním sorbentu Poros HQ 10 (Applied Biosystems). Stručné seznámení s výhodami perfúzní chromatografie na přístroji BioCAD 700E (Applied Biosystems). Výběr vhodné kolony a vhodné analytické metody. Manuální nástřik 20 μl surového a odsoleného PCR primeru. Porovnání chromatogramů. **Výtisk obou chromatogramů ve zvoleném modu (Tile, Overlay) přiložte k protokolu.**

Úkoly

Doplňte následující protokol – pouze jeden pro dvojici

PROTOKOL

Číslo skupiny:

Jména:

Datum:

Úloha: SYNTÉZA A PURIFIKACE OLIGONUKLEOTIDŮ

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

Návrh sekvence primeru

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

Syntéza

Přiložte histogram ze syntézy a protokol ze syntézy s doplněným výtěžkem vyjádřeným v jednotkách OD, μg a v jednotce molární koncentrace. Uveďte výpočet objemu nutného pro přípravu zásobního roztoku primeru o koncentraci 500 μM .

Odsolení

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

Rozšiřující literatura dostupná v Centrální laboratoři

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

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

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

DEN 2

IZOLACE ROSTLINNÉ DNA, PCR, PRÁCE S DATABÁZEMI MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝCH INFORMACÍ

Úvod

Jednou z metod studia genomu je amplifikace krátkých úseků DNA pomocí PCR. V laboratoři si osvojíte rychlou metodu izolace DNA z rostlinného materiálu a založíte několik PCR reakcí. Amplifikovat budeme úsek DNA pro použití jako sondu v pozdější hybridizaci a oblast inzerce cizí DNA (transpozonu En-1, dSpm a T-DNA) v genech AHP4, ARR4 a ARR21.

Časový harmonogram

- 8:30 Úvod k praktické části (Tereza Kolouchová)
- 8:45 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE (Tereza Kolouchová)
 - c) Výměna etanolu, uložení vzorků na 4 °C
- 9:00 IZOLACE DNA (Tereza Kolouchová)
- 10:00 DATABÁZE (Tereza Kolouchová)
- 12:00 OBĚD
- 13:00 ZALOŽENÍ PCR (Tereza Kolouchová)
- 14:00 DATABÁZE-dokončení (Tereza Kolouchová)

Přehled

Úvod k praktické části

- Úvod do metodologie praktika
 - obecné zásady práce s DNA a sterilními roztoky
 - schéma experimentu
 - navržení postupu pro identifikaci inzerčního mutanta a zjištění jestli se jedná o homo- nebo heterozygotní stav, vlastní provedení

Praktická část

1. Izolace DNA
2. Založení PCR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Metoda 2A

Odbarvování preparátů pro analýzu genové exprese pomocí transkripční fúze

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

Metoda 2B

Rychlá izolace DNA pro PCR

1. Homogenizovat jeden střední list vychlazenou skleněnou tyčinkou v 1,5ml zkumavce (eppendorfka) ve stojánku.
2. Přidat **400 µl** extrakčního pufru, vortexovat **5 s** a nechat stát při laboratorní teplotě **60 min**.
3. Centrifugovat při 14000 otáčkách **30 min**, 4°C.
4. Přenést **300 µl** supernatantu do nové 1,5ml zkumavky a přidat **300 µl** izopropanolu, 4-6 krát překlomit. Nechat stát **10 min** při laboratorní teplotě.
5. Centrifugovat **20 min**, 4°C. Odstranit supernatant, DNA vysrážená izopropanolem bude v peletu.
6. Přidat **500 µl** 70% etanolu. Centrifugovat při 14000 otáčkách **2 min**. Odstranit etanol. Nechat vysušit (SpeedVac, cca **10-15 min**).
7. Pelet rozpustit ve **100 µl** sterilní ddH₂O. Genomovou DNA uchovávat na ledu nebo v lednici.

Extrakční pufr

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

Metoda 2B

Založení PCR

Do 0.5 ml zkumavek pro PCR napipetovat postupně vodu, pufr, dNTP, templát, primery a Taq polymerázu podle schématu:

PCR směs:	10x pufr	dNTP	prim1	prim2	Taq pol.	templ. DNA	H ₂ O	celk. 50 ul
	5 ul	4 ul	1 ul	1 ul	2 ul	5 ul	32 ul	

primery AHP4 spec.:	Sim612, Sim 799 –	212 bp
primery ARR21 spec.:	16kon, 16new –	340 bp
primery ARR4 spec.:	ARR4N, ARR4S –	137 bp
primer transpozon	8130, Sim 799 –	250 bp
	8130, 16new –	390 bp
	d11, ARR4N –	195 bp



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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

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

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

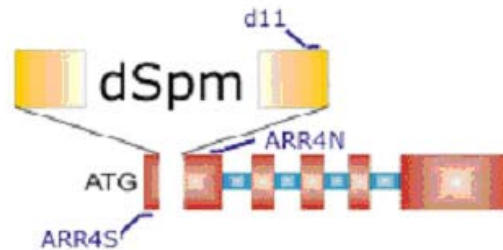
Na základě přiložených výsledků analýzy použitých primerů pomocí programu Oligo navrhněte vhodné podmínky PCR pro dané reakce:

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

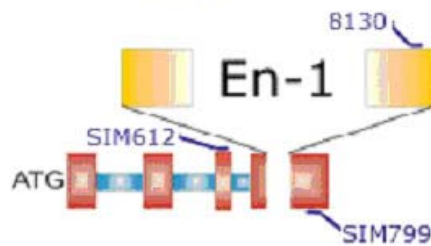
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

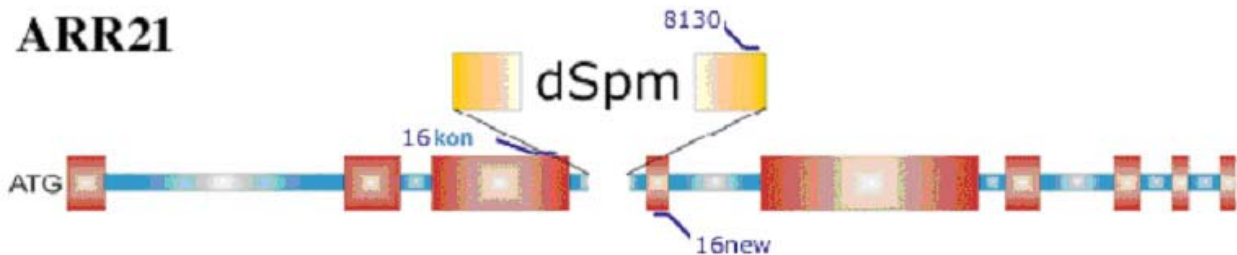
ARR4



AHP4



ARR21



Úkoly (příklad):

1. Vyhledejte jeden bakteriální a jeden rostlinný gen Glu-6-P izomerázy v databáze Genbank
2. Vyhledejte geny cheY a cheA u *E. coli*
3. Určete nejbližší homolog cheY (*E. coli*) u *Arabidopsis* pomocí algoritmů BLAST a FASTA.
4. Najděte tři různé regulátory odezvy nebo histidin kinázy u *Arabidopsis*.
5. Určete u libovolného genu v úkolu 4 polohu v genomu *Arabidopsis* (chromosom, polohu v publikované sekvenci daného chromosomu).
6. Vyberte si jeden gen z úkolu 4 a určete oblast 1000 bází v oblasti promotoru genu. Ukončete sekvenci na ATG. Analyzujte na přítomnost vazebních míst transkripčních faktorů pomocí hledání v databázi TRANSFAC.
7. Srovnajte libovolné sekvence z *Arabidopsis* s homologii větší než 30% a menší než 100% pomocí algoritmu CLUSTALW.
8. Vyhledejte nejméně jednu EST sekvenci Glu-6-P izomerázy (hledání homologie nebo podle klíčového slova).



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Šablona k protokolům: Izolace DNA a PCR

Jméno:

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky:

Závěr³:

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

DEN 3

IDENTIFIKACE PCR PRODUKTU V GELU, ZNAČENÍ SONDY PRO HYBRIDIZACI, PŘENOS DNA Z GELU NA MEMBRÁNU

Úvod

Další způsob identifikace genů je hybridizace se značenou sondou. Ta je připravena z DNA známé sekvence a označena tak, aby byla detekovatelná po navázání na homologní případně heterologní sekvenci DNA, která je imobilizovaná na membráně. Ta se přenesou na membránu z gelu spontánním kapilárním sáním. Pokud se přenáší na membránu genomová DNA, mluvíme o metodě Southern blotting.

Ve cvičení připravíme agarózový gel umožňující elektroforetické rozdělení PCR produktů podle velikosti. Z gelu přeneseme DNA na nylonovou membránu v alkalickém prostředí. Přítomnost specifické DNA na membráně prokážeme hybridizací se sondou značenou alkalickou fosfatázou zprostředkující chemiluminiscenční signál.

Časový harmonogram

- 8:00 PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU, NAPIPETOVÁNÍ VZORKŮ, ELEKTROFORÉZA
- 9:00 STRUČNÝ ÚVOD K IDENTIFIKACI FRAGMENTŮ HYBRIDIZACÍ SE ZNAČENOU SONDOU (Alena Kuderová)
- 10:00 IDENTIFIKACE PCR PRODUKTŮ V AGARÓZOVÉM GELU (Markéta Pernisová)
- 11:00 KAPILÁRNÍ PŘENOS (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)
- 12:00 OBĚD
- 13:30 ZNAČENÍ SOND A HYBRIDIZACE (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)

Přehled metod

1. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu
2. Detekce rozdělených fragmentů v UV
3. Kapilární přenos (Southern blotting)
4. Přechištění PCR produktu
5. Určování koncentrace DNA
6. Značení sondy
7. Hybridizace



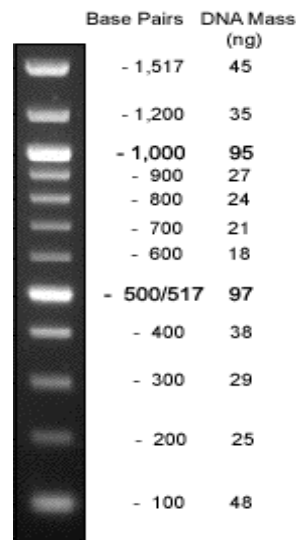
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Metoda 3A

Příprava agarózového gelu, elektroforéza PCR produktů a jejich detekce.

1. V 500 ml láhvi přivést k varu 6 g agarózy ve 400 ml 1x TBE pufru. Po rozpuštění agarózy přidat etidium bromid (10 μ l/100 ml), který bude sloužit k vizualizaci DNA.
2. Připravit formu pro gel, vsadit hřeben a nalít do formy vrstvu tekuté agarózy 5 - 8 mm. Nechat ztuhnout.
3. Formu s gelem vložit do elektroforézové vany, zalít pufrům a vyjmout hřeben.
4. Napipetovat délkový a hmotnostní standard a vzorky:
 - délkový a hmotnostní standard (NEB): 10 μ l (0,5 μ g)
 - vzorky: 10 μ l PCR (zbytek ponechat pro přípravu sondy) + 2 μ l 5x konc. nanášecího pufru
5. Spustit elektroforézu při 80 V po dobu 60 min (aby bromfenolová modř, která putuje s nejkratšími fragmenty neopustila gel).
6. Pozorovat proužky DNA v procházejícím UV světle a výsledek elektroforézy dokumentovat; později bude porovnáván se signály na hybridizační membráně (fotografie gelu a výtisk membrány)



by měly být 1:1). Tento gel bude použit pro Southern blotting.

Délkový a hmotnostní standard: 100 bp DNA ladder (0,5 μ g)

Metoda 3B

Kapilární přenos v alkalickém prostředí

1. Po fotodokumentaci odstranit část gelu nad starty a pravý horní a spodní roh gelu. Dále změřit délku a šířku gelu. Gel umístit do vaničky s destilovanou vodou a krátce opláchnout.
2. Vylít destilovanou vodu, přidat až 10 objemů denaturačního/přenosového roztoku (1,5M NaCl/0,5M NaOH), umístit na kývací platformu a míchat 30 až 40 min.
3. Během této doby sestavit aparaturu pro přenos DNA:
 - a. Přes čistou vaničku položit skleněnou desku.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

- b. Ustříhnout obdélník filtračního papíru Whatman 3MM takových rozměrů, aby po přiložení přes skleněnou desku nepřesáhl šířku vaničky a zasahoval oběma užšími konci až na dno vaničky. Toto je první vrstva knotu, který bude sát roztok.
 - c. Ustříhnout 3 obdélníky filtračního papíru Whatman 3MM takové velikosti, aby přesahovaly délku i šířku gelu asi o 1 cm na každé straně a další 3 obdélníky velikosti gelu.
 - d. Nastříhat jednotlivé vrstvy buničiny o rozměrech gelu. Mělo by jich být tolik, aby po zatížení byla jejich výška 7-8 cm.
 - e. Ustříhnout nylonovou membránu Hybond N+ velikosti gelu.
 - f. Naplnit vaničku přenosovým roztokem a část ponechat v petriho misce.
 - g. Smočit nejdelší filtrační papír Whatman 3MM a umístit na skleněnou desku. Pomocí skleněné pipety nebo tyčinky se zbavíme všech případných bublin mezi sklem a papírem.
 - h. Smočit 3 větší filtrační papíry Whatman 3MM a postupně vrstvit do středu aparatury tak, aby nevznikaly vzduchové bubliny.
 - i. Vyjmout gel z přenosového roztoku a přiložit opatrně vrchní stranou do středu vrchního filtračního papíru; odstranit všechny vzduchové bubliny.
 - j. Opatrně umístit suchou nylonovou membránu na gel (od středu ke krajům). Okamžitě vzniká těsný kontakt s gelem. Při chybné manipulaci se nesnažit o opětovné umístění membrány na gel – v takovém případě použít novou membránu.
 - k. Smočit postupně poslední tři filtrační papíry Whatman 3MM a vrstvit je na membránu. Odstranit případné vzduchové bubliny.
 - l. Nakonec přiložit vrstvu buničiny, zatížit suchou petriho miskou, kterou dále zatížíme odměrnou baňkou naplněnou asi 200 ml vody. Nádobu zabezpečíme úchytkou na stojanu. Nedotahujeme úplně na těсно. Mezi hrdlem baňky a úchytkou by měl zůstat volný prostor
4. Zkontrolovat kontakt jednotlivých vrstev a pomocí proužků parafilmu umístěných těsně kolem gelu zamezit nežádoucímu kontaktu vrstev nad membránou a pod gelem. Tak se veškerý přenosový roztok může do horních vrstev dostávat pouze přes gel a nebude „obtékát“. V opačném případě by se účinnost a stejnoměrnost přenosu snižovala.
 5. Přenos nechat probíhat 3 hodiny, potom aparaturu rozebrat, membránu opláchnout v roztoku 2 x SSC a nechat uschnout mezi dvěma filtračními papíry. V alkalickém prostředí se mezi nylonovou membránou a DNA vytvořily kovalentní vazby, a není proto nutné fixovat DNA dalšími postupy.

Metoda 3C

Izolace PCR produktu z agarózového gelu pomocí komerční soupravy Qiagen

1. Do startu nového agarózového gelu nanést 35 μ l PCR směsi + 7 μ l nanášecího pufru.
2. Po elektroforéze z agarózového gelu vyříznout daný proužek, aby bloček agarózy byl co nejmenší.
3. Určit jeho hmotnost.
4. Přidat 3x objem pufru QG (tj. např. 300 mg gelu/100 mg vyříznutého agarózového bločku).
5. Zahřívat při teplotě 50°C po dobu 10 min nebo dokud se agaróza nerozpustí. Průběžně 2-3x promíchat.
6. Přidat 1x objem (gelu) izopropanolu (tj. např. 100 μ l/100 mg gelu),, promíchat a vše dát do kolonky.
7. Centrifugovat při 14000 otáčkách 30s, odstranit protečený roztok.
8. Do kolonky přidat 750 μ l pufru PE a centrifugovat při 14000 otáčkách 30s, odstranit protečený



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

roztok. Centrifugovat ještě jednou bez pufru. Kolonku umístit do 1,5 ml čisté zkumavky s víčkem.

9. Na střed kolonky napipetovat 30 μ l sterilní ddH₂O, nechat stát 5 min při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 min.

Metoda 3D

Měření koncentrace DNA spektrofotometricky

Změřit absorbanci a spočítat koncentraci DNA ($OD_{260} = 1,0 \Rightarrow \text{konc. DNA} = 50\text{ng}/\mu\text{l}$) nebo odhadnout koncentraci DNA z gelu podle intenzity EtBr fluorescence porovnáním se standardem.

Metoda 3E

Příprava značené sondy

1. Naředit DNA na koncentraci 10 ng/ μ l.
2. Umístit 10 μ l ředěné DNA do nové zkumavky a denaturovat 5 min ve vroucí vodě.
3. Okamžitě umístit DNA na led a 5 min chladit (v průběhu chlazení – asi po 2 až 3 min. - rychle stočit, aby se z kondenzovaná kapalina dostala na dno)
4. Přidat : 10 μ l reakčního pufru (RP)
2 μ l značícího činidla (ZČ)
10 μ l pracovní koncentrace „cross-linkeru“ (CL) (činidla, které zprostředkovává kovalentní vazbu enzymu na DNA).
5. Vše promíchat, stočit a inkubovat 30 min/ 37°C.

Sonda se může použít ihned nebo může být skladována na ledu 2 hodiny.

Metoda 3F

Hybridizace

1. Předehřát požadovaný objem hybridizačního roztoku na požadovanou teplotu (55°C);
objem pufru: 0,25 ml pufru /cm² membrány.
2. Umístit membránu do hybridizačního válce s pufrem a prehybridizovat nejméně 30 min/55°C.
3. Přidat značenou sondu a hybridizovat přes noc.

Literatura

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1987, 1st Volume, Preparation and analysis of DNA.

Úkoly

Vypracování protokolu: Přiložit a popsat zdokumentované výsledky, zdůvodnit případné nejasnosti.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Šablona k protokolům: Kapilární přenos DNA a hybridizace se značenou sondou.

Jméno:

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky:

Závěr:



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

DEN 4

ANALÝZA PROTEIN-PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ A BUNĚČNÉ LOKALIZACE PROTEINŮ

Úvod

Schopnost interagovat s dalšími proteiny je jednou ze základních charakteristik bílkovin jakožto základního kamene živých organismů. Protein-proteinová interakce je nutným předpokladem i pro přenos informace v signálních drahách. Informace se obvykle předává v podobě fosfátové skupiny mezi kinázou a jejím proteinovým substrátem, který je specificky rozpoznáván, anebo je prostřednictvím protein-proteinové interakce přímo ovlivňována aktivita interakčního partnera. Jednou z prvních otázek, které si klademe při funkční analýze genů rostlinných signálních drah, je ta, se kterými dalšími signálními elementy studovaný protein interaguje. Dalším důležitou otázkou je, ve kterém buněčném kompartmentu je protein lokalizován, případně ve kterém buněčném kompartmentu spolu dva proteiny interagují. S použitím transienční exprese proteinů po infiltraci listů tabáku *Nicotiana benthamiana* suspenzí *Agrobacterium tumefaciens* a s pomocí skenovací laserové konfokální mikroskopie (viz. Metoda 1B), můžeme tyto otázky zodpovědět.

Časový harmonogram

- 8:00 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE I, skupiny 1-3 (Jakub Horák) / ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE I, skupiny 4-6 (Jan Hejátko)
- 10:30 PROMÝVÁNÍ MEMBRÁN PO HYBRIDIZACI (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)
- 11:30 OBĚD
- 12:30 DETEKCE HYBRIDIZACE (Alena Kuderová, Markéta Pernisová)
- 14:00 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE II, skupiny 4-6 (Jakub Horák) / ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE II, skupiny 1-3 (Jan Hejátko)
- 16:30 AUTOMATICKÁ MIKROSKOPIE
- 17:00 UKONČENÍ PROGRAMU 4. DNE

Přehled metod

Bimolekulární fluorescenční komplementace (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC)

Proteiny, jejichž interakci chceme studovat, transienčně exprimujeme v listech tabáku. Fluorescenční protein YFP je rozdělen na dvě poloviny (YFP^N a YFP^C, tedy N- a C- terminální část



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

proteinu) a každá polovina je fúzována s jedním ze studovaných proteinů. Pokud spolu proteiny interagují, dojde k rekonstituci YFP, kterou sledujeme konfokálním mikroskopem jako obnovení fluorescence YFP. Protože metodu BiFC provádíme v rostlinných buňkách, je možné rozpoznat, ve kterém kompartmentu buňky k interakcím našich proteinů dochází.

Test zprostředkované vazby na membránu (Membrane Recruitment Assay, MeRA)

Pro analýzu interakcí mezi membránovým proteinem a cytosolickými proteiny můžeme použít testu zprostředkované vazby na membránu (Membrane Recruitment Assay, MeRA). Membránový protein je spojen s červeným fluorescenčním proteinem RFP, zatímco cytosolický protein je fúzován s GFP fluoreskujícím zeleně. Při interakci takovýchto fúzních proteinů dochází k asociaci GFP signálu s membránou, což je možno jednoznačně potvrdit analýzou fluorescence rostlinných buněk koexprimujících oba proteiny prostřednictvím konfokální mikroskopie, která umožňuje jasně rozlišit membránový a cytosolický kompartment.

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

Jedná se mikroskopickou metodu umožňující snímat fluorescenční signál s velmi vysokým rozlišením. Jako bodového zdroje excitačního světla používáme lasery o různé vlnové délce. Laserový paprsek prochází konfokální clonkou (pinhole) a prostřednictvím objektivu je fokusován do malého bodu na preparátu, kde dojde k excitaci fluorescenčních barviček, nebo proteinů. Emitovaná fluorescence prochází zpět objektivem a skrze další konfokální clonku na fotonásobič, kde je světelný signál převeden na elektrické impulsy. Konfokální clonka zajišťuje, že se na detektor dostane pouze světlo z excitovaného bodu. Světlo přicházející z oblastí nad a pod rovinou ostrosti je clonkou odfiltrováno. Posunu ohniska skrz celé zorné pole objektivu je dosaženo plynulým pohybem zrcátka skenovacího zařízení. Protože rychlost jeho pohybu je mnohem nižší než rychlost světla, jsme schopni pomocí softwaru zrekonstruovat obraz s vysokým rozlišením a zobrazit ho na monitoru počítače.

Metoda 4A

Analýza protein-proteinových interakcí a buněčné lokalizace proteinů

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Šablona k protokolům: Analýza protein-proteinových interakcí a buněčné lokalizace

Jméno: (uved'te rovněž číslo své skupiny)

Datum:

Úloha:

Cíl:

Postup a výsledky⁴:

Závěr⁵:

⁴ Uved'te stručný popis postupu při infiltraci tabákových listů (viz. Metoda 1B). Proč je součástí infiltračního AS média acetosyringon? Proč je infiltrační suspenze agrobakterií obsahuje vždy kmen p19? Jaké jsou charakteristické rysy jádra, cytoplasmy, endoplasmatického retikula a plasmatické membrány, na jejichž základě byste byli schopni tyto kompartmenty jednoznačně rozpoznat pomocí rastrovací konfokální mikroskopie? Zpracujte do přehledné tabulky.

⁵ Vyhodno'te podrobně interakce a lokalizace proteinů, které vaše skupina zkoumala a stručně shrňte výsledky kolegů z dalších dvou skupin.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Metoda 4B

Příprava preparátů pro automatickou mikroskopii

Proveďte projasnění odbarvených semenáčků podle následujícího protokolu:

- 1) Opatrně odpipetujte 80% etanol a přidejte 1 ml 0,25M HCl / 20% MetOH, inkubace 15min při 53 °C⁶. Roztok opatrně odsát pipetou.
- 2) 1 ml 7% NaOH / 60% EtOH, inkubace 15 min při rt⁷. Roztok opatrně odsát pipetou.
- 3) 1 ml 40% EtOH, 10 min, rt.
- 4) Přidejte 1 ml H₂O = 20% EtOH, 10 min, rt. Roztok odsát.
- 5) 1 ml 10% EtOH, 10 min, rt.
- 6) +1 ml 50% glycerolu = 5% EtOH / 25% glycerol, 15-30min, rt (on, 4 °C). Roztok odsát.
- 7) 1 ml 50% glycerol.

Metoda 4C

Posthybridizační stringentní promývání

1. Předehřát primární promývací pufr na 60°C. Použitý objem: 2-5 ml/ cm² membrány.
2. Opatrně přenést membránu do válce s tímto roztokem a promývat 4 x 5 min při 60°C.
3. Promývat 2 x 5 min druhým promývacím roztokem při laboratorní teplotě.
4. Membránu vložit do misky s druhým promývacím roztokem a nechat stát 10-15 min.

Chemifluorescenční detekce signálu za použití ECF substrátu

1. Membránu umístit na čistý neabsorpční povrch a napipetovat rovnoměrně po celém jejím povrchu ECF substrát (25 µl/ cm² membrány); inkubovat 1 min.
2. Přiložit vrchní část detekční folie, odsát přebytek substrátu a zatavit.
3. Inkubovat ve tmě při laboratorní teplotě. První detekci provést přibližně po 2 hodinách.

Detekce chemifluorescenčního signálu

1. 0,5 h před detekcí zapnout STORM.
2. Na detekční plotnu přístroje kápnout trochu EtOH. Na toto místo přiložit folii s membránou (lépe přilne k povrchu a eliminují se bubliny).
3. Skenovat pro chemifluorescenci při rozlišení 100 mikronů.

Metoda 4D

Automatická mikroskopie (Tereza Kolouchová)

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

⁶ hybridizační pec

⁷ rt, pokojová teplota



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

DEN 5

8:00 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍ FÚZE (Jan Hejátko, Tereza Kolouchová)

5. Vyhodnocení výsledků automatické mikroskopie