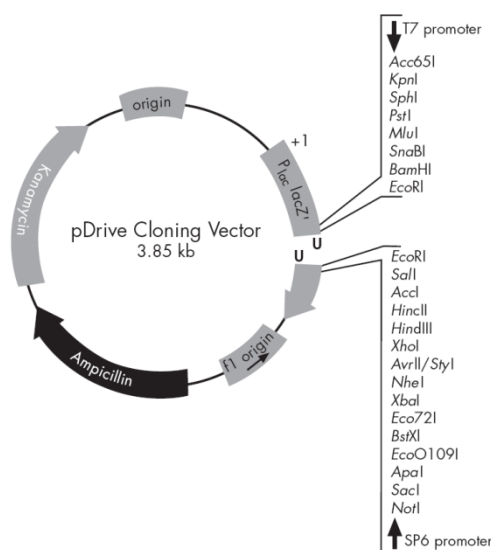


Klonování PCR produktu do plasmidu

TEORETICKÝ ÚVOD

Při klonování PCR produktů do plasmidů se využívá vlastnosti Taq polymerasy, a jiných non-proofreading polymeras, přidávat na konec nově syntetizovaného řetězce jednu bázi – adenin- navíc. Klonovací vektor je poté v lineární formě, kdy na každém konci nese jednu bázi – thymin nebo uracil - navíc. Za optimálních podmínek poté dochází k hybridizaci a ligaci PCR fragmentu do vektoru (Obrázek 1). PCR fragment hybridizuje do tzv. MCS (multicloning site) místa, které poté umožňuje použití širokého spektra restriktáz pro jeho případné vyštěpení z vektoru a re-klonování do jiného vektoru. Dále se MCS místo nachází uvnitř genu lacZ kódujícího galaktosidasu, kdy poté úspěšné včlenění PCR produktu do vektoru má za následek ztrátu aktivity, která tak může být využita pro selekci úspěšných transformátů pomocí barevného substrátu X-gal. Vektor rovněž nese rezistenci na jedno nebo dvě antibiotika (obvykle na ampicilin) a obsahuje T7 a SP6 promotor pro případnou produkci vklonovaného PCR produktu.



1

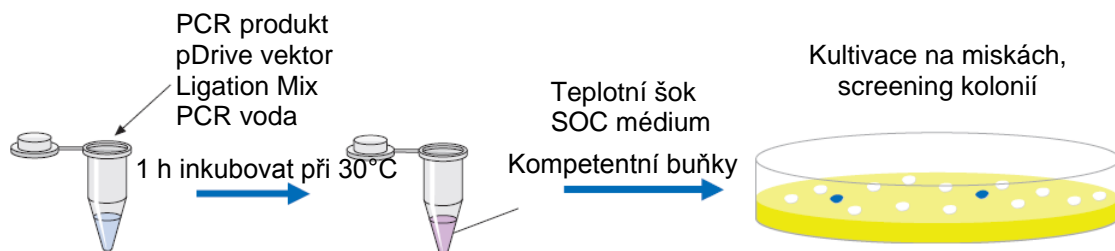
Obrázek 1. Schéma klonovacího vektoru pDRIVE (Qiagen)

Před vlastním klonováním je vždy nutné PCR produkt přečistit na agarózovém gelu, abychom se vyhnuli klonování případných vedlejších produktů PCR reakce (dimery primerů, nespecifické produkty). Poměr množství PCR produkt:vektoru při ligaci se poté spočítá na základě vzorce:

$(\text{množství vektoru} \times \text{délka PCR produktu (bp)} \times \text{molární poměr}) / \text{délka vektoru (bp)}$

Ligační reakce většinou poté probíhá při pokojové teplotě nebo 4°C po dobu 1-2 hodin. Poté dochází ke vložení ligovaného vektoru do kompetentních buněk. V našem případě budou použity termo-kompetentní buňky.

Kompetentní buňky jsou skladovány při -70°C a využívá se jejich schopnosti po rozmrazení a vystavení krátkému teplotnímu šoku přijmou DNA. Po teplotním šoku je k buňkám obvykle přidáno SOC médium a jsou 2 hodiny inkubovány při 37°C . Poté jsou vyočkovány na misku s antibiotikem (ampicilinem) a následující den je pozorován počet úspěšných transformantů. Protože může docházet i k ligaci vektoru bez vloženého PCR produktu, je do média na kultivačních miskách přidán barevný substrát X-gal s induktorem IPTG, kdy v případě ligace samotného vektoru dochází k růstu modrých kolonií (enzym galaktosidasa je aktivní) a v případě úspěšné ligace PCR produktu do vektoru k růstu bílých kolonií (enzym galaktosidasa je inaktivován vloženým PCR produktem).



Obrázek 2. Schéma transformace buněk JM109

POSTUP PRÁCE

Amplifikace vybraného obraného genu (PR1a nebo PR5a nebo PAL nebo EF1a)

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

FW Primer (5 uM)	1,5 μl
Rev Primer (5 uM)	1,5 μl
Kapa 2G Mix 2x konc	10 μl
<u>PCR voda</u>	<u>5 μl</u>
Templát	2 μl

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2,5min	
95°C	30s	
60°C	30s	40x
72°C	20s	

Analýza PCR produktu a jeho přečištění

Přečištění bude prováděno pomocí Wizard Gel Extraction Kit (Promega)

1. Připravte 1,5% agarózový gel.
2. Na gel naneste 20 μ l PCR produktu smíchaného s 3 μ l Nanášecího pufru a do jedné jamky a 2.5 μ l délkového markeru (GeneRuller 50 bp) do druhé jamky.
3. Spusťte elektroforézu: 200V, 20 minut.
4. Po skončení elektroforézy vynulujte váhu na 1,5 ml zkumavku.
5. Dejte gel na transiluminátor a vyřežte ze dvou drah proužek o velikosti 250 bp.
6. Oba proužky přeneste do 1,5 ml zkumavky a zvažte.
7. Do zkumavky přidejte Binding buffer v poměru 10 μ l roztoku na 10 mg gelu.
8. Inkubujte směs 10 minut při 55°C, kdy průběžně zkumavku vortexujte, abyste urychlili rozpuštění gelu.
9. Poté přeneste celou směs na kolonku (pokud je směsi více jak 800 μ l tak na dvakrát).
10. Stočte kolonku 1 min při 14000 x g.
11. Vylijte proteklý roztok a přidejte na kolonku 700 μ l roztoku Wash Buffer.
12. Centrifugujte 1 min při 14000 x g.
13. Vylijte proteklý roztok a přidejte na kolonku 500 μ l roztoku Wash Buffer.
14. Centrifugujte 1 min při 14000 x g.
15. Vyhodte zkumavku, kolonku přeneste do nové 2.0 ml zkumavky a centrifugujte 5 min při 14000 x g.
16. Vyhodte zkumavku, kolonku přeneste do nové 1,5 ml zkumavky a na její střed napipetujte 30 μ l PCR vody.
17. Centrifugujte 1 min při 14000 x g, PCR produkt je přečištěn, změřte jeho koncentraci na NanoFotometru.

3

Klonování PCR produktu do plasmidu pGEM-TEasy a jeho následná transformace do buněk *E. coli* JM109

1. Rozmrazte 2x Ligation Master Mix, pGEM-TEasy klonovací vektor a PCR vodu.
2. Připravte ligační směs:

pGEM-TEasy klonovací vektor	1.0 μ l
PCR produkt	1-4 μ l (vypočtete na základě vzorce)
Ligation buffer, 2x	5 μ l
ImProm II Ligáza	1 μ l
PCR voda	do 10 μ l
3. Jemně ligační směs promíchejte, krátce stočte a inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě.
4. Rozmrazte potřebný počet alikvotů kompetentních buněk JM109 na ledě a předehejte SOC medium na pokojovou teplotu.
5. Do zkumavky s kompetentními buňkami přidejte 2 μ l ligační směsi, opatrně promíchejte a inkubujte 20 minut na ledě.
6. Poté umístěte zkumavku do termostatu na 42°C přesně na 40s a poté ji vraťte na 2 minuty do ledu.
7. Přidejte 950 μ l SOC media a inkubujte za třepání (250 rpm) 2 hodiny.
8. Od tohoto bodu provádějte všechny činnosti v laminárním boxu a sterilně.

9. Poté si připravte nalité LB misky s ampicilinem (100 µg/ml) a X-gal/IPTG
10. Napipetujte na připravené misky 100 µl SOC media s kompetentními buňkami a důkladně medium rozetřete bakteriologickou hokejkou.
13. Nechte z misek odpařit zbytek rozetřeného média, misky zavřete a umístěte dnem vzhůru do termostatu na 37°C.
14. Následující den popište výsledek.

Zaočkování kolonie pro izolaci plasmidu

Ze selekční misky vyberte jednu kolonii nesoucí plasmid s inzertem a pomocí malé špičky ji přeneste do 2 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a inkubujte na třepačce při 37°C 12-16 hodin.

Izolace plasmidu z kultury *E. coli*

1. Přeneste 600 µl bakteriální kultury do 1.5 ml zkumavky.
2. Přidejte 100 µl Cell Lysis pufru a převrácením šestkrát směs ve zkumavce promíchejte (vzorek by měl celý zmodrat).
3. Ihned přidejte 350 µl vychlazeného Neutralizačního roztoku a převrácením směs ve zkumavce pořádně promíchejte (vzorek by měl celý zežloutnout).
4. Centrifugujte 3 min při 14 000 x g.
5. Supernatant opatrně přeneste na kolonku umístěnou ve zkumavce.
6. Centrifugujte 15 s při 14 000 x g.
7. Odstraňte proteklý roztok a na kolonku napipetujte 200 µl Endotoxin Removal Wash pufru.
8. Centrifugujte 15 s při 14 000 x g.
9. Odstraňte proteklý roztok a na kolonku napipetujte 400 µl Wash pufru.
10. Centrifugujte 15 s při 14 000 x g.
11. Přeneste kolonku do nové zkumavky, přidejte 30 µl Elučního pufru a nechte 1 min inkubovat na stole.
12. Centrifugujte 15 s při 14 000 x g.
13. Plasmidová DNA je připravena k použití, změřte její koncentraci a čistotu na NanoFotometru.

Příprava roztoku plasmidu o definované koncentraci

1. Na základě znalosti velikosti plasmidu s PCR produktem (přibližně 3200 bp) a střední molekulové hmotnosti 1 páru bazí DNA () vypočítejte koncentraci plasmidové DNA při následujícím počtu kopií:

100 kopií/µl
1 000 kopií/µl
10 000 kopií/µl
100 000 kopií/µl
1000 000kopií/µl

2. Na základě vypočtených hodnot zředte plasmidovou DNA PCR vodou na požadovanou koncentraci v celkovém objemu 100 μ l.

VYHODNOCENÍ

- Uvedte celkový počet kolonií po transformaci.
- Uvedte kvantitu a čistotu vyizolované plasmidové DNA.
- Uvedte vypočítané hodnoty koncentrací plasmidové DNA pro jednotlivý počet kopií/ μ l.

Identifikace jednotlivých druhů Václavek ze vzorku půdy

TEORETICKÝ ÚVOD

V současné době je na světě rozlišováno přes 40 druhů václavek (rod *Armillaria*), které se vyskytují na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Poprvé byl rod václavka identifikován v 18. století, ale až v roce 1973 objevení bifaktoriálního sexuálního inkompatibilitního systému umožnilo spolehlivě identifikovat jednotlivé druhy václavek. V Evropě bylo do současnosti identifikováno sedm druhů václavek, *Armillaria borealis*, *cepistipes*, *ectypa*, *gallica*, *mellea*, *ostoyae* a *tabescens* [2]. Václavky se vyskytují téměř na všech druzích porostů, mezi něž patří především listnaté a jehličnaté lesy, ovocné sady a parky. Výskyt jednotlivých druhů je omezen jednak klimatickými a geografickými podmínkami a na druhé straně výskytem vhodných hostitelů [2]. Václavky se v lese podílejí na rozkladu odumřelé dřevní hmoty, čímž v mnohém připomínají chování mykorhizních hub. V mnoha případech však přechází k nekrotrofnímu parazitizmu, resp. saproparazitizmu, na celé škále dřevin, především pak na smrku, borovici a dubu. Byly však pozorovány i na nahosemenných a krytosemenných rostlinách, na celé řadě bylin, na obilninách nebo na okrasných rostlinách. Každoročně pak způsobují obrovské škody na lesních porostech [1,2]. Některé druhy mohou být obligátními saprotrofy, avšak všechny druhy jsou schopné napadat stresem oslabené hostitele. Některé druhy dále produkují antibiotické látky, které jim pomáhají udržet kontrolu nad infikovaným hostitelem [2]. Jednotlivé druhy václavek se liší jednak svou patogenitou a také spektrem napadaných hostitelů. Proto je z hlediska lesního hospodářství velmi důležité odlišovat od sebe jednotlivé druhy.

V současné době jsou k identifikaci jednotlivých druhů václavek nejvíce používány párové testy objevené Hinkitou v roce 1973, avšak v poslední době se k identifikaci začínají používat molekulárně–biologické metody, mezi něž především analýza restrikčních fragmentů ribozomální DNA.

Restrikční analýza.

Restrikční endonukleasy jsou enzymy, které rozpoznávají ve dvoušroubovicové DNA specifickou sekvenci složenou obvykle ze 4 až 6 párů bazí a v tomto místě DNA specificky štěpí. Většina rozpoznávaných sekvencí restrikčními enzymy má dokonalou dvojčetnou rotační symetrii. Tyto sekvence jsou známy jako tzv. palindromy. Celá řada restrikčních enzymů (např. *Hinf I*, *Mbo I*) katalyzuje štěpení dvou vláken DNA v polohách symetricky rozmístěných okolo středu palindromové sekvence. Vznikají tak fragmenty s kohezními či lepivými konci. U některých restrikčních enzymů (*Alu I*) naopak místo štěpení prochází přímo dvojčetnou osou palindromu. Vznikají pak fragmenty se zarovnanými či tupými konci [18].

Polymorfie délky restrikčních fragmentů (RFLP) poté poskytuje cenné informace o rozdílech mezi sekvencemi u jednotlivých druhů organismů a je v současné době jednou z nejpoužívanějších metod v taxonomii a fylogenezi.

Identifikace na základě ribozomální RNA

Geny kódující ribozomální RNA jsou z hlediska taxonomického a fylogenetického velmi často používané. ITS oblast rDNA je velmi polymorfní, čímž se stává pro taxonomické a fylogenetické studie velmi výhodnou. Tato oblast leží mezi malou jadernou rDNA a velkou jadernou rDNA a je 5.8S rDNA rozdělena na oblasti ITS 1 a ITS 2 [3]. Pro amplifikaci této oblasti u hub byly navrženy primery ITS 1 a ITS 4 (obrázek 1).



Obrázek 1: Umístění ITS oblasti a primerů ITS 1, ITS 4, ARM1 a ARM2 na rDNA [3]

Detekce václavek na základě RFLP analýzy ITS oblasti

Pro specifickou detekci václavek poté byly navrženy primery ARM1 a ARM2 ležící na okrajích oblastí ITS1 a ITS2 (obrázek 1). Tyto primery se používají pro specifickou amplifikaci všech sedmi evropských druhů václavek. Pro dosažení velmi vysoké citlivosti metody pro identifikaci václavek se vzorků půdy se využívá tzv. nested PCR, při které dochází k amplifikaci požadované oblasti pomocí dvou párů primerů. První pár, tzv. externí, se většinou vyznačuje nižší specifitou a slouží k před-množení požadované oblasti. Druhý pár, tzv. interní, je poté vysoce specifický a používá se k namnožení požadované oblasti z již před-množeného vzorku. Při identifikaci václavek ze vzorků půdy lze využít jako externí pár primerů primery ITS1 a ITS4 a jako interní pár primerů ARM1 a ARM2.

Pro určení konkrétního druhu václavky se poté využívá RFLP analýza oblasti namnožené pomocí primerů ARM1 a ARM2 využívající restriční endonukleázy *Hin*I a *Al*I. Délky restričních fragmentů pro jednotlivé druhy václavek jsou uvedeny v tabulce níže.

Izolát	Délka amplikonu (bp) ITS/AR	Restriční fragmenty <i>Hin</i> I (bp)	Restriční fragmenty <i>Al</i> I (bp)
<i>A. borealis</i> A1 ^a	868/711	293, 172, 56, 31, 75, 68	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. cepistipes</i> 204 ^b	868/711	293, 227, 43, 132	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. gallica</i> 147 ^b	868/711	294, 227, 43, 63, 69	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. mellea</i> 184 ^b	882/724	148, 159, 401	40, 47, 97, 149, 214, 325
<i>A. ostoyae</i> C2 ^a	870/713	294, 228, 31, 75, 69	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. tabescens</i> T3 ^a	847/690	295, 125, 93, 32, 129	35, 70, 96, 138, 181, 327

Literatura

1. Jankovský L. 1997. Biologie Václavek, Dizertační práce MZLU, Brno.
2. Shaw C.G., Kile, G.A. 1991. Armillaria Root Disease, Agriculture Handbook 691, Department of Agriculture. Washington D.C., United States
3. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications: 315-322, Academic Press, Inc.

POSTUP PRÁCE

Izolace DNA z půdy pomocí izolačního kitu **PowerSoil DNA**

1. Do třecí misky navažte přibližně 250 mg vzorku půdy a rozetřete s trochou mořského písku a směs přeneste do připravených rozbíjecích zkumavek. Promíchejte opatrným vortexováním.
2. Přidejte 60 μ l roztoku C1 a několikrát promíchejte obracením zkumavky nebo vortexujte.
3. Umístěte rozbíjecí zkumavky vodorovně a vortexujte maximální rychlostí 10 minut.
4. Centrifugujte 30 sekund při 10 000 x g.
5. Přeneste supernatant do čisté 2 ml mikrozkušavky.
Poznámka: Očekávejte 400 až 500 μ l směsi. Směs může stále obsahovat určité množství půdních částic.
6. Přidejte 250 μ l roztoku C2 a vortexujte 5 sekund. Inkubujte 5 minut při 4°C.
7. Centrifugujte 1 minutu při pokojové teplotě a při 10 000 x g.
8. Přeneste do čisté 2 ml mikrozkušavky (přiložena) maximálně 600 μ l supernatantu.
9. Přidejte 200 μ l roztoku C3 a krátce vortexujte. Inkubujte 5 minut při 4°C.
10. Centrifugujte 1 minutu při pokojové teplotě při 10 000 x g.
11. Přeneste do čisté 2 ml mikrozkušavky (přiložena) maximálně 750 μ l supernatantu.
12. Přidejte 1200 μ l roztoku C4 a vortexujte 5 sekund.
13. Přeneste přibližně 675 μ l do kolonky a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě. Vylijte přefiltrovanou kapalinu a přidejte dalších 675 μ l směsi do kolonky a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě. Přidejte do kolonky zbytek směsi a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě.
Poznámka: Každý vzorek je nutné rozdělit na tři dávky.
14. Přidejte 500 μ l roztoku C5 a centrifugujte 30 sekund při 10 000 x g při pokojové teplotě.
15. Vylijte proteklou kapalinu.
16. Centrifugujte znovu 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě.
17. Opatrně přeneste kolonku do čisté 2 ml mikrozkušavky (přiložena). Zabraňte potřísnění kolonky roztokem C5.
18. Přidejte 80 μ l roztoku C6 doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky a centrifugujte 30 sekund při pokojové teplotě při 10 000 x g.
19. Vyjměte kolonku. DNA ve zkumavce je nyní připravena pro další použití.

Měření čistoty izolované DNA pomocí **Nano-fotometru**

1. Na fotometru nastavte měření koncentrace dsDNA.
2. Na čočku měřící kyvety nepipetujte 3 μ l PCR vody a zakryjte vrškem s faktorem 10.
3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku (BLANK).
4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3 μ l vzorku DNA.
5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (SAMPLE)
6. Vytisknete hodnoty čistoty $A_{260/280}$, $A_{230/260}$ a naměřené spektrum.

Příprava 1. Reakční směsi nested-PCR

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Primer ITS1 (1 uM)	1,5 µl
Primer ITS4 (1 uM)	1,5 µl
Kapa 2G Mix 2x konc	15 µl
<u>PCR voda</u>	<u>10 µl</u>
DNA	2 µl

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2,5min	
95°C	30s	
55°C	30s	35x
72°C	20s	

Příprava 2. Reakční směsi nested-PCR

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Primer ARM1 (5 uM)	1,5 µl
Primer ARM2 (5 uM)	1,5 µl
Kapa 2G Mix 2x konc	10 µl
<u>PCR voda</u>	<u>5 µl</u>
1 PCR reakce	2 µl

9

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2,5min	
95°C	30s	
60°C	30s	40x
72°C	20s	

Restrikční analýza PCR produktu

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

PCR reakční směs	16 µl
10 x Reakční pufr	2 µl
Enzym Hinf I	2 µl

Reakční směs jemně promíchejte, krátce stočte a inkubujte 1,5h při 37°C.

Analýza Restrikčních fragmentů pomocí agarózové elektroforézy

Připravte 2% agarosový gel – navažte 0,7 g agarózy, přidejte 35 ml 1x TBE pufru a agarosu důkladně rozvařte v mikrovlnné troubě. Poté zchladte agarosu na cca. 70°C, přidejte 1 µl ethidium bromidu, promíchejte a nalijte do připravené vaničky s hřebínkem. Nechte asi 15 minut tuhnout.

Poté vložte nalitý gel do elektroforetické vaničky s cca 200 ml 1x TBE pufru a vyndejte hřebínek. K restrikčním směsím a ke zbytku PCR reakce přidejte 2 µl Nanášecího pufru. Naneste vzorky na gel v následujícím pořadí:

Délkový marker – PCR produkt - RA *Hinfl* – RA *AluI*

Analýza Restrikčních fragmentů pomocí HPLC

Do insertu napipetujte 15 µl směsi po restrikční analýze a 10 µl PCR vody. Insert vložte do HPLC přístroje HP 1100 Series a spusťte následující metodu, ve které je použita TSK-gel DEAE NPR kolona a průtok činí 1 ml/min:

Roztok A	Roztok B
10 mM Tris-HCl (pH = 9.0); 0.8 M NaCl	10 mM Tris-HCl (pH = 9.0)
Gradient	
T (min)	% B
0	62.5
0.1	50
0.11	50
3	35
10	25
10.5	0
11.5	0
11.51	0
11.70	62.5
14.50	62.5

Na kolonu nastříkněte 20 µl vzorku.

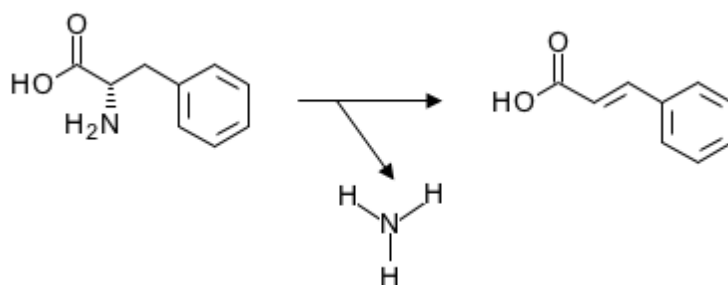
VYHODNOCENÍ

- Uveďte koncentraci a na základě naměřených dat zhodnoťte čistotu izolované DNA
- Na základě délky amplifikátu a výsledku restrikční analýzy určete, jaký druh václavky obsahoval váš vzorek půdy, výsledek zdůvodněte.

Měření aktivity phenylalaninamoniak lyasy

TEORETICKÝ ÚVOD

V rostlinné buňce existují tři základní regulační enzymy účastníci se syntézy fytoalexinů, phenylalaninamoniak lyasa (PAL), 5-epiaristolochen syntasa (EAS) a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductasa (HMGR). Aktivace enzymu PAL (EC: 4.3.1.5) je spojena s akumulací fenylopropanoidních látek a se syntézou důležité signální molekuly, kyseliny salicylové. PAL katalyzuje reakci přeměny aminokyseliny L-phenylalaninu na kyselinu trans-skořicovou:



Aktivita PAL se dá velmi dobře měřit nárůstem absorbance kyseliny trans-skořicové při 290 nm.

11

POSTUP PRÁCE

Jednotlivé skupiny si rozdělí izolaci z listů po aplikaci cryptogeinu a kontrolních listů po aplikaci vody sesbíraných v časových intervalech 0h, 6h a 24h po aplikaci.

Izolace enzymu phenylalaninamoniak lyasy

Roztoky:

Izolační pufr (0,1 M Borát (pH= 8.8), 17 mM β-merkapt ethanol, 1 % PVP)

0,3 g tkáň vložte do třecí misky, zmrazte v tekutém dusíku a rozetřete v 1.5 ml izolačního pufru. Homogenát nepipetujte do 2.0 ml zkumavky. Centrifugujte 20 minut při 15 000 x g při 4°C. Poté přepipetujte supernatanty do 1.5 ml zkumavky a uchovávejte na ledu.

Měření aktivity enzymu phenylalaninamoniak lyasy

Roztoky:

0,1M Borátový pufr (pH = 8.8)

12 mM L-Phenylalanine

Měření se bude provádět v triplicátu. Do tří 1.5 ml zkumavek napipetujeme jednotlivé složky reakční směsi:

0,1M Borátový pufr (8.8) 150 μ l
12 mM L-Phenylalanin 150 μ l

Jako blank použijeme následující reakční směs:

0,1M Borátový pufr (8.8) 150 μ l
12 mM D-Phenylalanin 150 μ l

Poté přidejte do každé zkumavky 125 μ l enzymového extraktu a inkubujte 30 minut při 30°C. Následně reakci zastavíme přidáním 150 μ l 0,1M TCA. Směs důkladně promíchejte na vortexu a do každé zkumavky přidejte 125 μ l vody a směs centrifugujte 10 minut při 15 000 x g. Odsajte supernatant, přepipetujte ho do UV semi-mikro kyvety a změřte absorbanci při 290 nm oproti blanku (reakční směs s D-phenylalaninem).

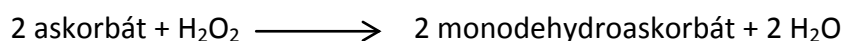
VYHODNOCENÍ

- Spočítejte aktivitu PAL v čase 0h, 6h a 24h po aplikaci cryptogeinu a kontrolního vzorku (vody).
- Výsledky vynesete do grafu, kde budou srovnány změny aktivity PAL po aplikaci cryptogeinu ve srovnání s kontrolou (voda) v závislosti na čase.
- Výsledek zdůvodněte.

Detekce aktivity askorbát peroxidasy v polyakrylamidovém gelu

TEORETICKÝ ÚVOD

Askorbát peroxidasa (APX) je enzym zodpovědný za detoxifikaci peroxidu vodíku u rostlin. U rostlin se vyskytují tři izoenzymové formy lišící se lokalizací v buňce. Všechny askorbát peroxidasy katalyzují reakci:



Role askorbát peroxidasy při obranné reakci byla podpořena pozorováními, že její aktivita narůstá při aplikaci různých enviromentálních stresů. V některých případech však můžeme po infekci rostliny patogenem pozorovat drastický pokles její aktivity, který poté potencuje nekrózu buněk způsobenou převážně oxidačním stresem.

Využití nativní polyakrylamidové elektroforézy pro stanovování aktivit celé řady enzymů má převážně největší význam při studiu aktivace jednotlivých izoenzymových forem. Toto stanovení aktivity APX je založeno na schopnosti askorbátu redukovat nitro-blue tetrazolium (NBT) v přítomnosti N,N,N',N'-tetraethylendiaminu (TEMED) na nerozpustný barevný formazan. V přítomnosti H₂O₂ je APX schopna zabránit tvorbě formazanu díky velmi rychlé oxidaci askorbátu. Proto je aktivita APX pozorována na gelu jako achromatický proužek.

13

POSTUP PRÁCE

Jednotlivé skupiny si rozdělí izolaci z listů po aplikaci cryptogeinu a kontrolních listů po aplikaci vody sesbíraných v časových intervalech 0h, 6h a 24h po aplikaci.

Izolace askorbát peroxidasy

Roztoky:

Izolační pufr (100 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 5 mM askorbát, 1 mM EDTA)

0,3 g tkáň vložte do třecí misky, zmrazte v tekutém dusíku a rozetřete v 0,6 ml izolačního pufru. Pufr přeneste do 1.5 ml zkumavky a centrifugujte při 12 000 x g 5 min při 4°C. Supernatant přeneste do nové 1.5 ml zkumavky a opět centrifugujte při 20 000 x g 40 min při 4°C. Odsajte supernatant a uchovávejte ho na ledu.

Příprava polyakrylamidového gelu

Roztoky:

Elektroforetický pufr (Tris-Glycin (pH=8.8), 2 mM askorbát)

Nalítý gel propláchněte vodou a vložte do elektroforetické vaničky. Nalijte do vaničky elektroforetický pufr obsahující 2 mM askorbát a spustte elektroforézu na 30 minut při konstantním proudu 15 mA/gel. Elektroforézu provádějte při 4°C.

Příprava a nanesení vzorků

Smíchejte 60 µl enzymového izolátu s 12 µl nanášecího pufru. Na gel nanášejte 15 µl a 30 µl jednotlivých izolátů v následujícím pořadí:

Gel č.1 (15 µl izolátu): voda 0h, voda 6h, voda 24 h, mezera, cry 0 h, cry 6 h, cry 24h

Gel č.2 (30 µl izolátu): voda 0h, voda 6h, voda 24 h, mezera, cry 0 h, cry 6 h, cry 24h

Elektroforézu provádějte při konstantním proudu 15 mA/gel po dobu 2 hodin při 4 °C.

Detekce aktivity askorbát peroxidasy v gelu

Roztoky:

Ekvilibrační pufr I (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 2mM askorbát)

Ekvilibrační pufr II (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 4mM askorbát)

Promývací pufr (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0))

Detekční pufr (50 mM fosfátový pufr (pH=7.8), 28 mM TEMED, 2.45 mM NBT)

Všechny následující kroky budou prováděny při pokojové teplotě. Ekvilibrujte gel 30 min v ekvilibračním pufru I, který každých 10 minut vyměňte. Poté inkubujte gely 20 minut v ekvilibračním pufru II, do kterého přidejte 4,5 µl peroxidu vodíku. Poté gel promyjte + min v promývacím pufru a ponořte ho do detekčního pufru. Aktivita askorbát peroxidasy bude detekována jako achromatický proužek na tmavém pozadí.

14

VYHODNOCENÍ

- Srovnajte změny aktivity askorbát peroxidasy po aplikaci cryptogeinu ve srovnání s kontrolou (voda) v závislosti na čase.
- Výsledek zdůvodněte.

Stanovení změny exprese genů pro pathogenesis related (PR) proteiny u rostlin tabáku

TEORETICKÝ ÚVOD

Na počátku byly PR (pathogenesis related) proteiny identifikovány jako proteiny, které se nevyskytují ve zdravých rostlinách a po infekci patogenem dochází k jejich masivní akumulaci. Do dnešní doby je známa celá řada PR proteinů, které byly rozděleny do 14 tříd, jak je uvedeno v tabulce níže. Každá třída může být dále dělena na kyselé a bazické homology. Syntéza kyselých forem PR proteinů je obvykle spojena s infekcí patogenem a u rostlin jejich syntéza vyvolává tzv. systémově navozenou rezistenci (SAR – systemic acquired resistance). Na druhé straně syntéza bazických forem PR proteinů je spojena s poškozením nebo napadením rostliny herbivorním hmyzem. Jejich syntéza je poté spojena s tzv. rezistencí proti herbivornímu hmyzu (IRH - induced resistance against herbivores).

Třída	Název	Funkce
PR-1	PR-1 Tabák	neznámá
PR-2	PR-2 Tabák	β -1,3-glukanasa
PR-3	P, Q Tabák	chitinasa
PR-4	`R' Tabák	chitinasa
PR-5	S Tabák	podobný thaumatinu
PR-6	Inhibitor I Rajče	proteinasový-inhibitor
PR-7	"P" Rajče	endoproteinasa
PR-8	Chitinasa Okurka	chitinasa
PR-9	`lignin-forming peroxidase' Tabák	peroxidasa
PR-10	`PR1` Pšenice	podobný ribonuclease
PR-11	třída V Tabák	chitinasa
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	thionin
PR-14	LTP4 Pšenice	lipid-transfer protein

15

Literatura

1. Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L.: Biochemistry & molecular biology
2. Edreva A. (2005): Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. Gen. Appl. Plant Physiology 31(1-2), 105-124.
3. Mikeš V., Milat M-L., Ponchet M., Ricci P., Blein J-P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. FEBS Letters 416, 190-192.

POSTUP PRÁCE

Izolace celkové RNA z listu tabáku

Jednotlivé skupiny si rozdělí izolaci celkové RNA z listů po aplikaci cryptogeinu a kontrolních listů po aplikaci vody sesbíraných v časových intervalech 0h, 8h a 24h po aplikaci.

1. Odeberte 100 mg tkáně a vložte ji do 2.0 ml zkumavky společně s drtícím olůvkem.
2. Vložte zkumavky do drtící vložky, zašroubujte vložku víčkem a vhoďte ji do kapalného dusíku. Po vymražení zasuňte vložku do pouzdra a asi minutu třepejte.
3. Poté vyjměte zkumavku z vložky, otevřete ji, pomocí pinzety vejměte olůvko a přidejte 1 ml TRI reagentu. Inkubujte zkumavku přibližně 5 minut při pokojové teplotě.
4. Přidejte 200 μ l chloroformu, vortexujte 15 s a nechte stát 5-10 minut při pokojové teplotě
5. Horní vodnou fázi přeneste do čisté zkumavky a přidejte 1/10 objemu isopropanolu
6. Opatrně promíchejte a nechte stát při pokojové teplotě po dobu 5-10 minut
7. Centrifugujte při 12 000xg po dobu 10 minut při 4°C.
8. Odsajte supernatant a přidejte k němu zbývající množství isopropanolu, aby celkový přidaný objem isopropanolum byl 500 μ l.
9. Opatrně promíchejte a nechte stát při pokojové teplotě po dobu 5-10 minut
10. Centrifugujte při 12 000xg po dobu 10 minut při 4°C.
11. Odstraňte supernatant a vysráženou RNA promyjte 1 ml 75% ethanolu
12. Centrifugujte při 7500xg po dobu 5 minut při 4°C
13. Odstraňte supernatant a RNA nechte asi 10-15 minut vyschnout
14. Rozpusťte RNA ve formamidu předehřátém na 55°C.

16

Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované RNA pomocí Nano-fotometru

Do dvou 1.5 ml zkumavek napipetujte 9 μ l DEPC vody. Do jedné přidejte 1 μ l formamidu (BLANK) a do druhé 1 μ l vyizolované RNA. Promíchejte zkumavky na vortexu a krátce stočte.

1. Na fotometru nastavte měření koncentrace RNA a ředící koeficient 10x.
2. Na čočku měřící květy nepipetujte 3 μ l DEPC vody s formamidem a zakryjte vrškem s faktorem 10
3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku (BLANK).
4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3 μ l ředěného vzorku RNA.
5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (SAMPLE)
6. Vytisknete koncentraci a hodnoty čistoty $A_{260/280}$, $A_{230/260}$ a naměřené spektrum.

Elektroforéza vyizolované RNA

Příprava gelu:

1. Zahřejte 1.75 ml formaldehydu a 3 ml 10x MOPS pufru na 55°C.
2. Rozpusťte 0.4 g agarosu v 25 ml vody.
3. Zchladíte agarosu na 55°C a přidejte formaldehyd, 10x MOPS pufr a 15 µl EtBr.
4. Nalijte gel

Připravte vzorek podle následující tabulky:

RNA	3.0 µl
formaldehyd	2.25 µl
formamid	7.5 µl
10x MOPS	0.75 µl
Voda	1.0 µl
Celkový objem	15.0 µl

Inkubujte vzorek 15 minut při 55°C. Po denuraci přidejte 1.5 µl 10x nanášecí barvičky, promíchejte a naneste vzorek na gel. Jako elektroforetický pufr použijte 1x MOPS pufr.

Reverzní transkripce izolované RNA

Naředte vyizolovanou RNA na koncentraci 0.2 µg/µl a umístěte ji na led. Připravte reakční směs:

5 x RT ImPromII buffer	2.0 µl
25 mM MgCl ₂	2.2 µl
dNTPs	1.0 µl
Random Hexamers	0.5 µl
Voda	2.6 µl
Reverse transcriptase	0.5 µl
RNasin	0.1 µl

Přidejte do reakční směsi 1 µl naředěné RNA o koncentraci 0.2 µg/µl. Vložte zkumavku do termocyklu a nastavte následující program:

25°C	10 min
42°C	45 min
72°C	15 min
4°C	hold

Amplifikace cDNA genu pro PR1a protein pomocí RealTime PCR

Připravíme si reakční směs vztaženou na 1 vzorek dle následující tabulky, kdy k amplifikaci využijeme primery pro geny PR1a nebo PR5a nebo PAL nebo EF1a:

2 x KAPA SYBR Mix	7.5 μ l
F primer (10 μ M)	0.5 μ l
R primer (10 μ M)	0.5 μ l
Voda	5.0 μ l

Reakční směs promícháme, krátce stočíme a přidáme 1.5 μ l cDNA vzniklé po reverzní transkripci nebo kvantifikačních standardů. Vložte zkumavku do termocycleru a nastavte následující program:

95°C	2 min
95°C	20 s
60°C	40 s (odečet fluorescence) 40x

VYHODNOCENÍ

- Uveďte koncentraci a na základě naměřených dat zhodnoťte čistotu izolované RNA
- Na základě výsledku RealTime PCR vypočítejte metodami absolutní nebo relativní kvantifikace za použití delta Ct metody, zdali dochází po přidání kryptogeinu ve sledovaných časových intervalech (8 a 24h) ke zvýšení exprese vybraných PR proteinů a o jak velké zvýšení se jedná.
- Dále na základě vypočtených výsledků porovnejte metodiky relativní a absolutní kvantifikace.

Identifikace glykoproteinů krevního séra pomocí SDS-PAGE a Western blot analýzy

TEORETICKÝ ÚVOD

SDS-PAGE je velmi efektivní analytická pomůcka pro separaci proteinové směsi, k analýze čistoty proteinu a jeho přibližné molekulové hmotnosti, ale neposkytuje nám žádná data na základě, kterých bychom mohli provést identifikaci nabarveného proteinu. Barvení stříbrem nebo coomasie nám poskytuje pouze důkaz o přítomnosti molekulové hmotnosti proteinu. Při provádění podrobnějších analýz separovaných proteinů se obvykle setkáváme s problémem málo přístupné a husté matrice polyakrylamidového gelu pro celou řadu detekčních činidel. Proteiny z SDS-PAGE gelu tak mohou být přeneseny (přeblovány) z gelu na tenkou matici (blotovací membránu), na které jsou daleko více přístupné pro chemická činidla nebo biochemické reagenty. Pokud je přenos proteinů spojen s vysoce specifickou a citlivou detekcí pomocí imunometod, je tento proces nazýván Western-Blottingem. Western blotting má celou řadu výhod zahrnující malou spotřebu reagentů, krátký čas zpracování, nenáročný vybavení a velmi vysokou efektivitu.

V současné době se používají tři základní blotovací matrice: nitrocelulosoová, nylonová a PVDF (polyvinylidifluoridová). Vazba proteinů na matrice je ne-kovalentní, kdy k nejsilnější interakci dochází u PVDF membrány. Ze všech typů membrán se potom PVDF membrána vyznačuje největší pevností a velmi nízkým pozadím při barvení. Pro přenos proteinů z gelu na membránu využijeme metodu semi-dry elektroblottingu, kdy je gel s membránou umístěn mezi dvě elektrody a dochází k přenosu proteinů pomocí aplikovaného elektrického pole. K vlastní detekci proteinů na membráně se při imunodetekci používají většinou dvě protilátky. Primární protilátka je specifická pro náš protein zájmu. Druhá, sekundární, protilátka je většinou protilátka proti IgG protilátce použité v prvním kroku a je konjugována s enzymem, nejčastěji křenuvou peroxidasou nebo alkalickou fosfatase. Pokud se poté přidá k membráně detekční roztok, enzym konjugovaný se sekundární protilátkou katalyzuje barevnou reakci dávající barevný proužek na membráně.

V našem případě budeme specifickou skupinu proteinů, glykoproteiny, identifikovat pomocí lektinů, které se specificky váží na cukerné zbytky. Lektiny jsou třídou proteinů vyskytujících se u bakterií a rostlin schopné vázat se na cukerné zbytky glykoproteinů. V našem experimentu použijeme lektin z fazole Konkanavalin A (Con A), který má velmi vysokou afinitu k α -D-manosylovým zbytkům. Tento Con A je konjugován s biotinem. Jako sekundární protilátku pak použijeme streptavidin konjugovaný s peroxidasou, která poskytne po přidání substrátu 4-chloro-1-naftolu/peroxidu vodíku barevnou reakci.

Jako vzorek bude použito lidské sérum

POSTUP PRÁCE

SDS-PAGE elektroforéza

Roztoky:

Proteinový marker – 14-160 kDa

Elektroforetický pufr (25 mM Tris-Cl, pH 8,3, 150 mM glycin, 0.1%SDS)

Nanášecí pufr

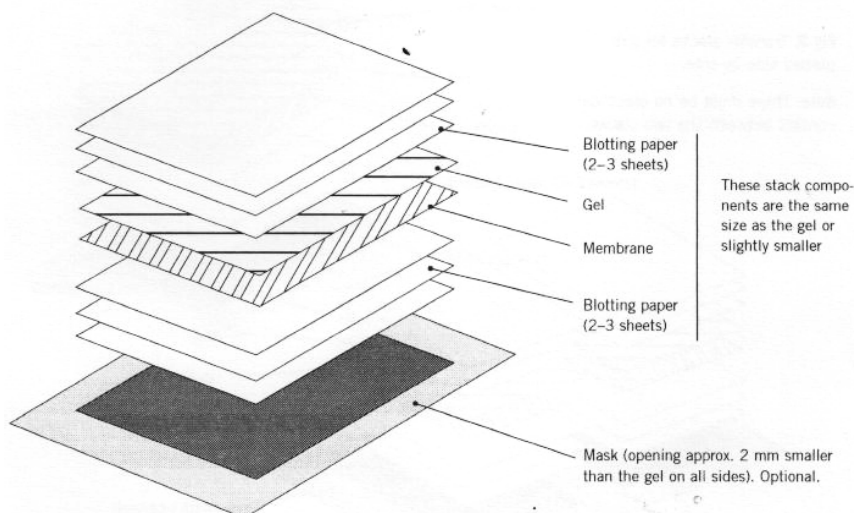
1. K 30 μ l vzorku krevního séra přidejte 6 μ l nanášecího pufru, promíchejte a inkubujte 5 min při 100°C v termostatu
3. Následně zkumavky zchlaďte na ledu
4. Poté naneste na 3 gely po 10 μ l krevního séra, 10 μ l albuminu a 5 μ l hmotnostního markeru
5. Spusťte elektroforézu, podmínky separace: konstantní proud 30 mA/gel, 40 minut
6. Po elektroforéze první gel propláchněte 15 minut v MiliQ vodě a následně ponořte do 50 ml barvy koloidní coomasie BioSafe, s druhým a třetím gelem proveďte blotting.
7. Gel ponořený do koloidní coomasie po dvou hodinách vyjměte a propláchněte vodou a naskenujte.

Semi-Dry Blotting

Roztoky:

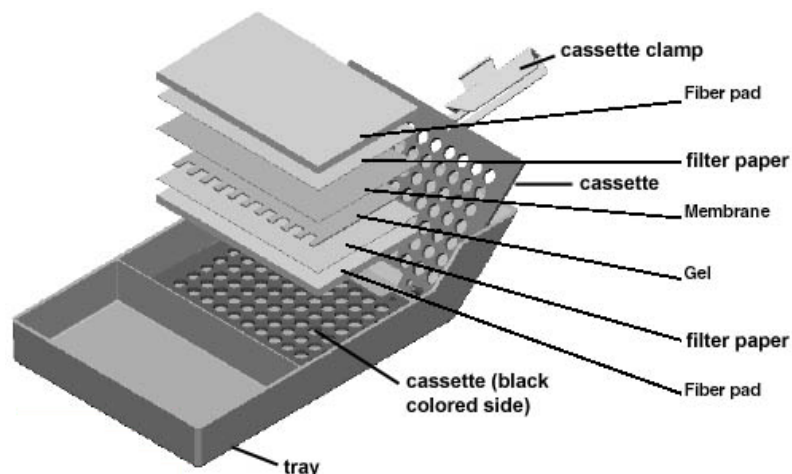
Přenosový pufr (25 mM Tris-Cl, pH 8,3, 150 mM glycin, 20 % metanol, 0.1%SDS)

1. Připravte si dvě membrány PVDF a 8 papírů Whatman 3MM o rozměrech 7x5 cm.
2. Ponořte PVDF membrány na 20 s do MeOH (snížení hydrofobicity membrány) a poté je inkubujte 5 min v přenosovém pufru společně s 8 papíry Whatman 3MM
3. Sestavte sandwich dle obrázku níže.
4. Spusťte semi-dry elektro transfer. Provádějte přenos 1 h při konstantním napětí 30V
5. Po skončení blotting vyndejte membrány a ponořte je na 5 min do barvičky Ponceau S.
6. Poté je opláchněte ve vodě a pomocí propisky zaznačte marker.



Wet Blotting

1. Připravte si dvě membrány PVDF a 8 papírů Whatman 3MM o rozměrech 7x5 cm.
2. Ponořte PVDF membrány na 20 s do MeOH (snížení hydrofobicity membrány) a poté je inkubujte 5 min v přenosovém pufru společně s 8 papíry Whatman 3MM
3. Sestavte sandwich dle obrázku níže a umístěte ho do aparatury Mini-Protean 3.
4. Provádějte přenos 1 h při konstantním napětí 30V
5. Po skončení blotting vyndejte membrány a ponořte je na 5 min do barvičky Ponceau S.
6. Poté je opláchněte ve vodě a pomocí propisky zaznačte marker.



21

Detekce pomocí Con A – biotin a Streptavidin - HRP

Roztoky:

TBST pufr (20 mM Tris-Cl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 0,1 % Tween-20)

Roztok substrátu (20 ml roztoku 4-chloro-1-naftol-methanolu, 10 μ l 30% H₂O₂)

Detekce

1. Nevazebná místa blokujte v 20 ml roztoku 1 x TBST obsahujícím albumin po dobu 30 minut
2. Dvakrát membránu promyjte 20 ml 1 x TBST pufru po dobu 5 minut
3. Inkubujte membránu ve 20 ml TBST pufru s 50 μ l Con A-biotin konjugátu po dobu 2 hodin.
4. Dvakrát membránu promyjte 20 ml TBST pufru po dobu 5 minut
5. Inkubujte membránu ve 20 ml TBST pufru s 50 μ l Streptavidin-HRP konjugátu po dobu 1 hodiny
6. Dvakrát membránu promyjte 20 ml TBST pufru po dobu 5 minut
7. Inkubujte membránu ve 20 ml roztoku substrátu po dobu 10-15 minut, až se začnou objevovat modrofialově zbarvené proužky. Roztok substrátu si připravte těsně před použitím přidáním 10 μ l 30% H₂O₂ do 20 ml roztoku 4-chloro-1-naftol-methanolu
8. Poté zastavte reakci promytím v Mili-Q vodě
9. Membránu nechejte volně uschnout na vzduchu

VYHODNOCENÍ

- Uveďte výsledek elektroforézy a blottingu (výsledný obarvený gel a membránu).
- Okomentujte pozorované rozdíly.
- Na základě hmotnostního markeru sestrojte kalibrační křivku a odečtěte hmotnosti proteinů detekovaných na membráně.