Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin

Inovace praktických cvičení molekulárně-biologických předmětů o sekvenční úlohy

Metodické návody pro laboratorní cvičení z předmětu
Genetika rostlin (GERO)
a Molekulární analýzy rostlinného genomu (MARG)

Vypracováno v rámci projektu FRVŠ MŠMT 447/ 2012/ F4a.

Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.
Ing. & Ing. Jana Ondroušková
2012

1. Izolace celkové RNA z obilek pšenice seté (*Triticum aestivum* L.)

První fází většiny molekulárně biologickým metod je extrakce DNA nebo RNA z buněk a jejich oddělení od ostatních buněčných složek. Kvalita izolovaného materiálu často rozhoduje o úspěšnosti všech navazujících postupů. Cílem izolace je získat nukleovou kyselinu v nativním stavu v dostatečném množství a čistotě.
Metody izolace nukleových kyselin využívají:

a) rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul

b) adsorpce na pevný podklad nebo

c) ultracentrifugace v gradientních roztocích

Rostlinná pletiva se většinou rozmělňují v tekutém dusíku na jemný prášek, v našem případě byl zvolen způsob rozmělňování vstupního materiálu na vymražené třecí misce, a to z důvodu práce s již zmraženou pšeničnou obilkou. Co se týče izolace RNA, ta je náročnější nežli izolace DNA a vyžaduje specifické podmínky, např. použití vody upravené inhibitorem transferasy (0,1% diethylpyrokarbonátem). Je to dáno především tím, že molekuly RNA jsou mnohem méně stabilní než molekuly DNA. Při izolaci obecně jsou pro odstranění proteinů využívány fenolové sloučeniny. Tyto sloučeniny bývají součástí směsí dodávaných v podobě komerčních kitů nebo jako směsi k homogenizaci (RNA Blue). Při přípravě vzorku se řídíme max. možnou navážkou, doporučenou výrobcem komerčního kitu (0,10 g). U vzorků obsahujících vysoké množství škrobu, jiných polysacharidů a flavonoidů se doporučuje zařadit centrifugaci za homogenizaci a lyzi buněk ve fenolové směsi. Tímto krokem se zbavíme všech rušivých látek, které by stěžovali veškeré následné operace. Oddělení jednotlivých fází se provádí chlazenou centrifugací a přidáváním organických rozpouštědel (chloroform, isopropylalkohol) se postupně zbavujeme nepotřebných frakcí. Samotná RNA se sráží etanolem a uchovává se v podobě roztoku s vodou prostou RNas při -70°C. Kontaminující DNA je odstraněna DNasou zbavenou RNas dle postupu doporučeného výrobcem kitu pro DNasovaní.

Postup izolace RNA:

1. Na vychlazené třecí misce (obr. 1) rozetřít vzorek obilek (max. navážka 0,10 g) s 1 ml RNA Blue (obr. 2) a centrifugovat při 12 000 otáčkách/10 min.

2. Převézt supernatant do nové zkumavky a inkubovat 5 min. při pokojové teplotě

3. Přidat 200 µl chloroformu a 15 s protřepat inkubovat 5 min. při pokojové teplotě

4. Centrifugovat při 12 000 ot./ 10 min a vrchní fázi (obr. 3) převézt do nové zkumavky

5. Přidat 500 µl isopropylalkoholu, inkubace 10 min. při +4°C a centrifugovat

6. Odstranit supernatant, přidat 1ml 75% ethanolu a důkladně protřepat a centrifugovat

7. Odstranit supernatant, nechat 5 min. sušit na vzduchu

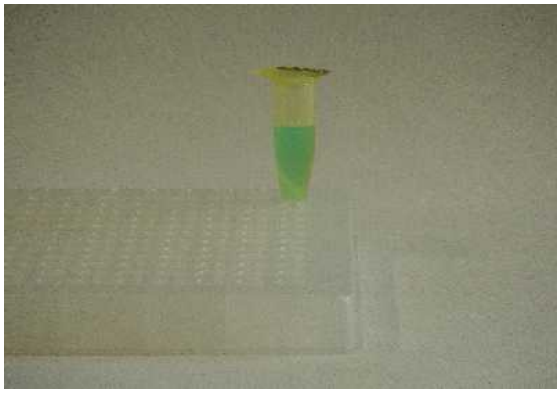
8. Na mléčně bílou peletku (obr. 4) přidat 70 µl RNase free vody

9. Rozpustit peletku (protřepat, zahřát na 50 – 55°C po dobu 5 min.)

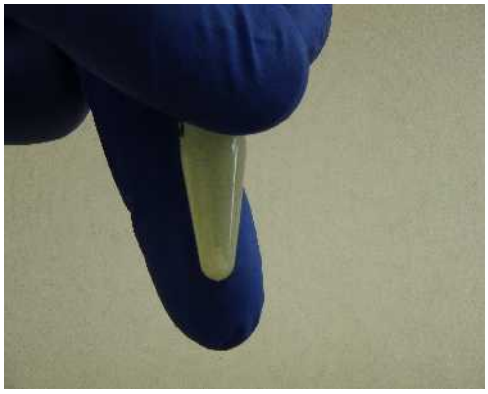
10. Změřit koncentraci izolované RNA na přístroji Picodrop.

Obr. 1
Třecí miska s částečně homogenizovanou obilkou v RNA Blue

Obr. 2
Reagencie RNA Blue



Obr. 3
Zcentrifugovaná zkumavka (10 min, 12 tis ot.) obsahující zřetelně oddělenou vodní fázi supernatantu a sediment



Obr. 4
Mléčně bílá peleta před rozpuštěním v 70 µl RNase free vodě

2. „DNazování“

1. Příprava správné koncentrace k DNazování
(200/ celková RNA) = počet µl templátu RNA (Picodrop)
1 - počet µl templátu RNA = počet µl DNase free vody

Př.
Koncentrace celkové RNA odečtené z picodropu 550 ng.µl^{-1}
200/ 550 = 0,36 zaokrouhleno 0,4 µl RNA x 50 = **20 µl**
1 – 0,4 = 0,6 µl DNase free vody x 50 = **30 µl**

2. Do zkumavky s naředěnou RNA přidat 1µl 10x TURBO DNase Buffer a 1 µl TURBO DNase (obr.5), jemně protřepat

3. Inkubovat 25 min. při teplotě 37°C

4. K roztoku přidat 1 µl DNase Inactivation reagent, řádně protřepat

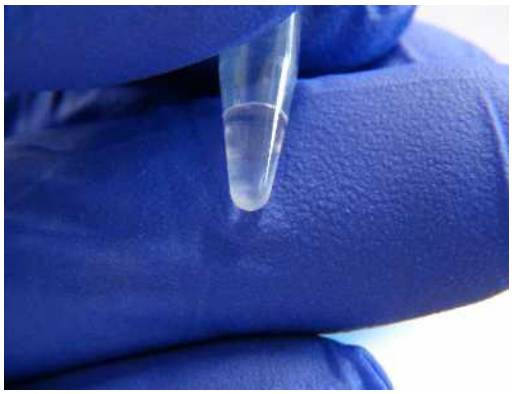
5. Za občasného protřepávání inkubovat při pokojové teplotě 5 min.

6. Centrifugovat při 10 000ot/1,5 min.

7. Čirý supernatant převést do nové zkumavky (obr. 6)

Obr. 5

Sada pro DNazování



Obr. 6

Zkumavka s dvěma fázemi – supernatant s vyčištěnou RNA, sediment s nečistotami

3. Zpětná transkripce

Zpětná PCR neboli RT-PCR (*Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction*) je metoda určená pro amplifikaci molekul RNA a hraje důležitou roli v aktivitách některých typů virů. RNA však nemůže sloužit jako templát pro PCR a proto se produkty tvoří pouze tehdy, jestliže je izolovaná RNA nejdříve převedena do cDNA retrovirovou zpětnou transkriptasou a následně amplifikována PCR se dvěma specifickými primery standardním postupem. Reverzní transkriptasa je enzym tvořící molekulu DNA na základě přepisu informace uložené v RNA (RNA-dependentní DNA polymerasy), tedy opačným postupem než při běžné buněčné transkripci. V našem případě je součástí přepisovacího kitu M-MLV RT (*Maloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*). Součástí reakční směsi pro přepis RNA do podoby cDNA je navíc dithiotreitol, což je látka používaná pro inhibici oxidace.

Reverzní transkripce – příprava cDNA

1. Příprava reakční směsi:

4 µl vody

1 µl 100mM DTT (konečná koncentrace 10 mM)

2 µl 5× koncentrovaného M-MLV reakčního pufru

0,5 µl 10mM dNTP Mix (konečná koncentrace 2 mM)

0,5 µl Oligo dT anchor primer (konečná koncentrace 2,5 µM)

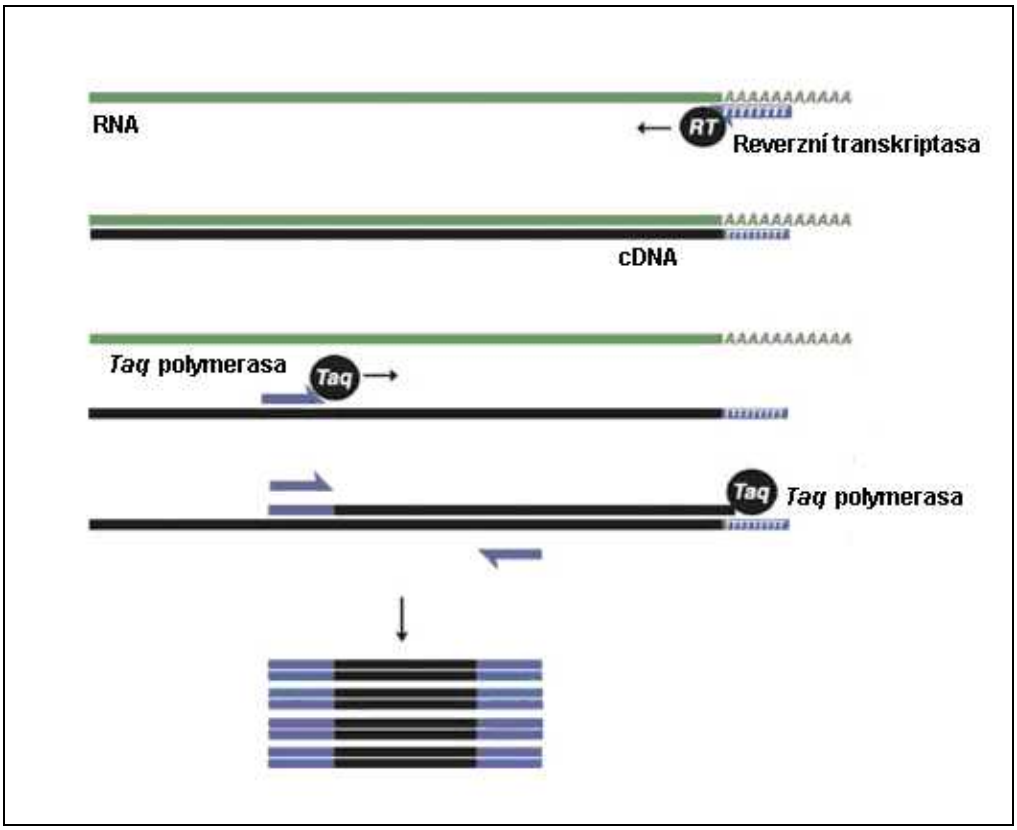
(GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTT)

1 µl (25 U) M-MLV RT (po naředění zásobního roztoku M-MLV (1:8) v 1 ×M-MLV reakčním pufru.

2. Přidáme 1 µl DNazované RNA (o koncentraci 1 mg.ml^{-1}) celkem 10 µl

3. Reakční komponenty promícháme, krátce stočíme a inkubujeme 1 hod. při 37°C

4. Inaktivujeme M-MLV při 70°C po dobu 10 min.



Obr. 7 Schéma reverzní transkripce

4. PCR vybrané kandidátní oblasti genomu pšenice

Pro praktickou část cvičení byly vybrány dvě kandidátní oblasti z biosyntetické dráhy anthokyanů zodpovědných za nestandardní zbarvení obilky pšenice: CHI (chalkon isomerasa) a DFR (dihydroflavon reduktasa).

a) *Složení mastermixu na jednu reakci:*

voda	16,8 µl	R primer	1 µl
purf	5 µl	Taq	0,1 µl
dNTP	0,1 µl	DNA	1 µl
F primer	1 µl	suma	25 µl

b) *Podmínky PCR reakce:*

CHI			DFR		
počáteční denaturace	94˚C	5 minut	počáteční denaturace	94˚C	5 minutt
denaturace	94˚C	60s	denaturace	94˚C	60s
anneling	57˚C	120s	anneling	53˚C	120s
elongace	72˚C	120s	elongace	72˚C	120s
celkový počet cyklů:	35x		celkový počet cyklů:	35x	

5. Purifikace PCR produktu a příprava vzorku pro sekvenaci

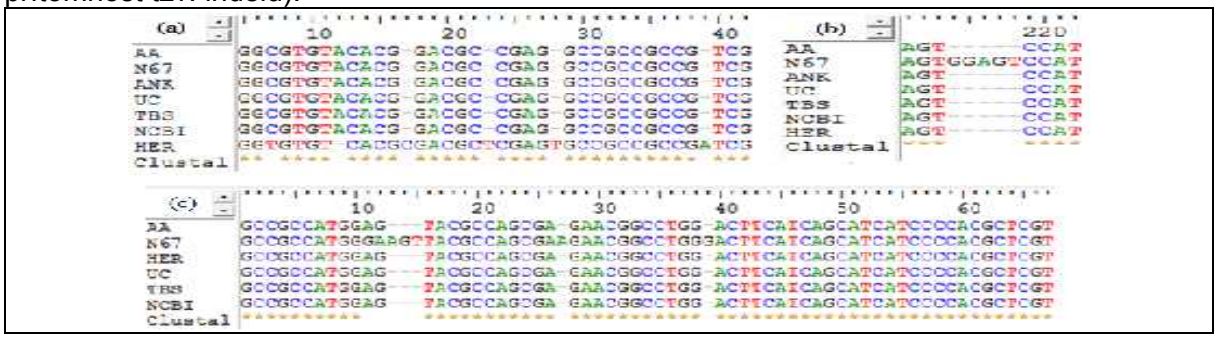
Po PCR reakci na detekci kandidátní sekvence pro gen enzymu CHI a DFR je nutné provést purifikaci PCR produktu jako nutný krok úspěšného čtení sekvencí.

Postup purifikace:

1. Pipetovat 20 µl PCR produktu do 0,6 ml mikrozkumavek (při menším objemu přidat ultračitou vodu, při větším objemu přidat adekvátně větší množství dalších komponentů).
2. Přidat 3,5 µl 3M octanu sodného, 74 µl 96% etanolu a 17,2 µl ultračisté vody, zavřít mikrozkumavku, protřepat na vortexu
3. Nechat stát 15 minut při laboratorní teplotě
4. Centrifugovat při 13 000 rpm/20 minut
5. Ihned po centrifugaci odebrat špičkou všechen supernatan
6. Přidat 296 µl 70% etanolu a protřepat na vortexu
7. Centrifugovat při 13 000 rpm/5 minut
8. Opět rychle vysušit supernatan, vzorky vysušit na vzduchu (cca 3 minuty)
9. Pelet rozpustit v ultračisté vodě na objem 35 µl
10. změřit koncentraci (Picodrop) a zamrazit vzorky (-70°C)

Databáze a programy pro vyhodnocení sekvenační analýzy

Získané sekvence srovnat pomocí níže uvedených programů (obr. 8) a vyhodnotit stupeň podobnosti a variabilní místa s sekvencích (SNP – Single Nucleotid Polymorphism a přítomnost tzv. indelů).



Obr. 8 Ukázka srovnání sekvencí pomocí programu BioEdit
(a+b) sekvence CHI, (c) sekvence DFR

Databáze NCBI - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Výchozí sekvence pro srovnání s dosaženými sekvencemi:
sekvence pro CHI: označení AB187026.1 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB187026.1
sekvence pro DFR: označení AB162138 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB162138

Použité programy:
ClustalW - http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
BioEdit - http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html