

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin

**Inovace praktických cvičení molekulárně-biologických předmětů o
sekvenční úlohy**

**PRACOVNÍ PROTOKOL PRO PŘEDMĚT METODY MOLEKULÁRNÍ A
BUNĚČNÉ BIOLOGIE**

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

Ing. Eva Konečná

Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.

2012

Název úlohy: Sekvenční analýza ITS oblasti jaderné DNA u tabáku

Použité přístroje:

horizontální elektroforéza se zdrojem
Proffesional Basic Gradient Thermocycler (Biometra)
gelový dokumentační systém (GDS)
spektrofotometr Picodrop (Easy Port)
elektroporátor EasyjecT (EquiBio)

Pracovní pomůcky:

jednokanálové pipety Nichiryo
spotřební plast – špičky, mikrozkuhavky pro PCR

Použité chemikálie: Promega GO Taq-polymeráza s pufrem, směs dNTPs (Serva), oligonukleotidy pro specifickou PCR amplifikaci jaderné DNA (ITS), genomová DNA *Nicotiana benthamiana* izolovaná kitem DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen), potřeby pro agarózovou elektroforézu (agaróza, TAE pufr, roztok ethidium bromidu), velikostní marker Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (NEB), pGEM-T Vector System (Promega), T4 DNA ligáza a 10x koncentrovaný pufr pro T4 DNA ligázu (TaKaRa)

Použité programy:

BioEdit- <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

Pracovní postup:

PCR s templátovou DNA tabáku pro ITS oblast nDNA

1. Namíchat reakční směs dle tabulky. Všechny komponenty, které byly zamrazeny, vyjma polymerázy, je potřeba po rozmrazení promíchat pomocí vortexu:

1 x 50 µl	1 reakce (µl)
Ultračistá voda	33
Pufr pro Green Taq (Promega)	10
dNTPs (10 mM od každé báze)	0,6
Primer F (10 pmol/µl)	2
Primer R (10 pmol/µl)	2
Taq DNA-polymeráza (5U/µl) (Promega)	0,4
Templátová DNA	(2)
	48

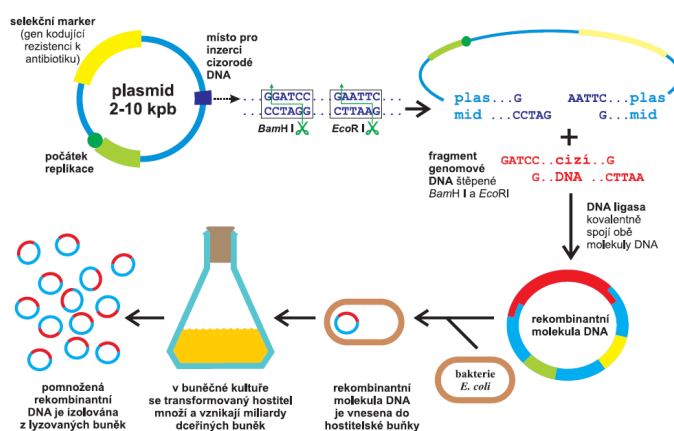
- Promíchat reakční směs pomocí vortexu.
- Rozdělit reakční směs po 48 μl do zkumavek pro PCR (0,2 ml).
- Přidat do zkumavek po 2,0 μl DNA.
- Zkumavky vložit do termocykleru a spustit program:

Cyklus č.	Počet opakování	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Čas (m:s)
1	1	94	3:00
2	30	94	0:30
		55	0:30
		72	0:45
3	1	72	10:00
		4	∞

- Po skončení programu aplikovat 2 μl vzorku na agarózový gel a otestovat úspěšnost PCR pomocí horizontální elektroforézy.
- Gel nasnímat pomocí GDS.
- Purifikace PCR produktu pomocí Invisorb[®] Fragment CleanUp dle návodu výrobce. Půlku purifikovaného PCR produktu použít na přímé sekvenování, druhou půlku na ligaci.

Klonování do vektoru p GEM-T

Pod pojmem molekulové klonování si představujeme především pomnožení specifického (často cizorodého) fragmentu DNA v hostelském organismu schopném jej efektivně několikanásobně namnožit a vytvářet identické kopie této DNA (klony) **Obr. 1**. DNA klon lze připravit např. množením rekombinantních molekul DNA v hostelské buňce *in vivo* nebo polymerázovou řetězovou reakcí *in vitro*.



Obr. 1 Schéma klonování DNA v bakteriích

A) Ligace

K ligaci se používají enzymy; buď DNA ligasa z bakteriofága T4 nebo méně účinná DNA ligasa *E. coli*. DNA ligasa z bakteriofága T4 je jediným dostupným enzymem, který účinně spojuje jak fragmenty s přesahujícími, komplementárními konci, tak i fragmenty s konci bez přesahů.

1. Namíchat reakční směs podle tabulky. Všechny komponenty, které byly zamrazeny (vyjma T4 DNA ligázy), je potřeba po rozmrazení promíchat pomocí vortexu:

1x10 μ l	1 reakce
Ultračistá voda	7,0 μ l
10 x konc. pufr pro T4 DNA ligázu (TaKaRa)	1,0 μ l
pGEM-T vektor (25 ng)	0,5 μ l
T4 DNA ligáza	0,5 μ l
Purifikovaný zředěný* PCR produkt	(1,0 μ l)

2. Namíchat komponenty reakce do mikrozkušavky pro PCR (0,2 ml).
3. Promíchat směs pomocí vortexu.
4. Zkušavky inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě.
5. Ligační směs purifikovat pomocí Invisorb® Fragment CleanUp dle návodu výrobce.

* optimální poměr vektoru a inzertu pro ligační reakci je 1:3 (počet molekul). Vektor má v našem případě 3 kb a do reakce je ho přidáváno 25 ng. Optimální množství inzertu v ng vypočítáme tedy jako jeho velikost (v kb) vynásobený 25.

B) Elektroporace kompetentních buněk *Escherichia coli*

Při elektroporaci jsou buňky podrobeny velmi silnému elektrickému šoku, který způsobí lokální změny v membráně a tím vznik pórů, jimiž DNA prochází do buněk.

1. Zkušavky (80 μ l) elektrokompetentních buněk *E. coli* kmen Top 10 uchovávaných dlouhodobě při -70 °C nechat rozmrazit na ledu.
2. K buňkám *E. coli* přidat 10 μ l purifikované ligační směsi a promíchat.
3. Vzorek přenést do sterilní elektroporační kyvety a elektroporovat při 12,5 Kv/cm, 25 μ F, 400 Ω .
4. Ke vzorku přidat 1 ml SOC média a přenést do 15 ml sterilní zkušavky.
5. Kultivovat 30 minut na orbitální třepačce při 60 rpm a teplotě 37 °C.

Zbytek ligační směsi (cca 15 µl) rozdělit na gelu pomocí agarózové elektroforézy a výsledný gel nasnímat.

C) Výsev buněk *E. coli* na misky se selekčním médiem

1. Misky s pevným LB médiem a selekcí na ampicilin (100 µg/ml) a komponenty pro modro-bílou (blue/white) selekci (Xgal – 20 µg/ml, IPTG 0,1 mM), nechat 20 minut odvětrat ve flow boxu.
2. Na misky aplikovat po 100 µl SOC kultury.
3. Suspenzi buněk rozetřít skleněnou tyčinkou, uzavřít misky, zapáskovat a označit je.
4. Misky otočit dnem vzhůru a nechat kultivovat přes noc.

D) Testování rekombinantních pGEM-T vektorů pomocí PCR s primery T7 a SP6

Bakterie, do nichž byl přenesen plazmid bez inzertu, tvoří aktivní β-galaktosidázu, jejíž tvorbu lze prokázat přidáním umělého substrátu **X-gal** (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid) do tuhého LB media. Tento substrát je bezbarvý, ale v případě, že na medium naočkujeme bakterie, které obsahují funkční beta-galaktosidasu, budou X-gal štěpit a jejich kolonie se zbarví zřetelně modře. Úspěšným začleněním inzertu do mnohočetného klonovacího místa dochází k inaktivaci aminotermálního fragmentu enzymu a kolonie zůstanou bílé. Kódující sekvence *lacZ* byla přerušena, proto se netvoří funkční β-galaktosidasa.

1. Přenést část bílé kolonie *E. coli* sterilním párátkem do 50 µl roztoku 50 mM MgCl₂ / 50 mM Tris pH 7.0 a promíchat pomocí vortexu.
2. Namíchat reakční směs podle tabulky. Všechny komponenty, které byly zamrazeny, vyjma DNA-polymerázy, je potřeba po rozmrazení promíchat pomocí vortexu. Jako templátu použít 1 µl resuspendované kolonie *E. coli* v roztoku 50 mM MgCl₂ / 50 mM Tris pH 7.0:

1 x 15 µl	1 reakce (µl)
Ultračistá voda	10,2
Pufr pro Green <i>Taq</i> (Promega)	3,0
dNTPs (10 mM od každé báze)	0,1
Primer T7 (10 pmol/µl)	0,3
Primer SP6 (10 pmol/µl)	0,3
<i>Taq</i> DNA-polymeráza (5U/µl) (Promega)	0,1
Templátová DNA – část resuspendované kolonie	(1,0)
	14 µl

3. Promíchat reakční směs pomocí vortexu.
4. Rozdělit reakční směs do 10 zkumavek pro PCR (0,2 ml).

5. Přidat 1 μ l vzorku suspenze *E. coli*.
6. Zkumavky vložit do termocykleru a spustit program:

Cyklus č.	Počet opakování	Teplota	Čas
1	1	94 °C	5 min
2	32	94 °C	30 sec
		55 °C	30 sec
		72 °C	45 sec
3	1	72 °C	5 min
		16 °C	∞

7. Po skončení programu rozdělit produkty PCR pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu.
8. Gel nasnímat pomocí GDS.
9. Podle velikosti PCR produktu identifikovat pozitivní kolonie (fragment je ve srovnání s kontrolou delší = velikost amplifikovaného zbytku plazmidu + velikost klonovaného PCR produktu).

E) Purifikace plazmidové DNA pomocí GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit

1. Naočkovat 1,5 ml tekutého media (LB + amp) jednou kolonií *E.coli* a kultivovat přes noc za stálého třepání při 37 °C.
2. Přemístit kulturu bakterií do 1,5 mikrozkušavky. Centrifugace 1 min při 12 000 x g.
3. Pomocí pipety dokonale odstranit supernatant a resuspendovat pelet v 250 μ l Resuspension Solution pomocí vortexu.
4. Přidat 250 μ l Lysis Solution a promíchat 4-6 x převrácením zkumavky.
5. Přidat 350 μ l Neutralization Solution a promíchat 4-6 x převrácením zkumavky.
6. Centrifugovat 5 minut při 12 000 x g.
7. Supernatant přemístit do GeneJET™ spin kolony, centrifugovat 1 minutu a odstranit filtrát ze zásobní zkumavky.
8. Na kolonu přidat 500 μ l Wash Solution, centrifugovat 1 minutu při 12 000 x g a odstranit filtrát ze zásobní zkumavky. Tento krok opakovat ještě jednou.
9. Centrifugovat prázdnou kolonu 1 minutu při 12 000 x g.
10. Kolonu přemístit do nové mikrozkušavky 1,5 ml, na kolonu aplikovat 50 μ l Elution Buffer, inkubovat 2 minuty a centrifugovat 2 minuty při 12 000 x g.
11. Provést agarózovou elektroforézu s 2 μ l plazmidové DNA.
12. Gel nasnímat pomocí GDS.
13. Podle velikosti plazmidu ověřit zda je rekombinantní (rekombinantní plazmid je ve srovnání s kontrolou - prázdný plazmid - delší).

14. Purifikovaný roztok plazmidu uchovávat při -20 °C.

Rekombinantní purifikované plazmidy společně se zbytkem purifikovaného PCR produktu odeslat na sekvenční. Porovnat sekvence z přímého sekvenování Obr. 2 se sekvencemi klonovanými do vektoru p GEM-T Obr. 3.

Sekvenční analýza

Posouzení kvality sekvencí

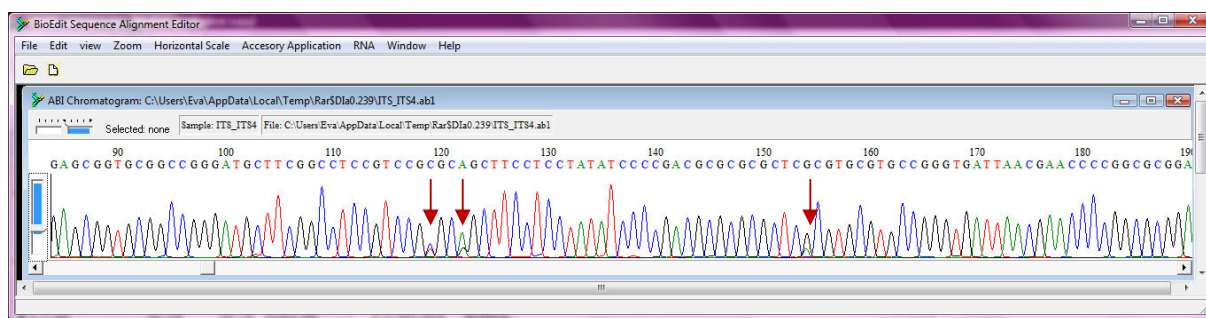
- Otevřít *.zip soubor se sekvencemi a postupně zkontrolovat, zda jsou všechny elektroforetogramy čitelné a vyhodnotitelné.
- Sekvence v antisense orientaci převést do sense orientace. Sekvenci v *.AB1 formátu otevřít pomocí programu BioEdit a v nabídce „view“ zatrhnout „Reverse Complement“. Následně sekvenci uložit v nabídce „File“ vybrat „Export as Fasta“.
- U vyhodnotitelných souborů (píky jsou zřetelně čitelné bez výrazných překryvů **Obr. 2** a **Obr. 3**) sloučit sekvence ve formátu FASTA do jediného souboru (k jednomu z *.txt souborů přikopírovat postupně všechny ostatní tak, aby každá z položek začínala na samostatném řádku znakem ">").

Multiple alignment a editace sekvencí

- Spustit program BioEdit a v nabídce „File“ vybrat „Open“ a otevřeme vytvořený sloučený FASTA soubor v *.txt (je vhodné, aby v názvu souboru a v řádcích za znakem ">" byly jen běžné znaky, ne tečky, hvězdičky, mezerníky, lomítka a pod.)
- V nabídce „Accessory Application“ vybrat „ClustalW Multiple alignment“, odkliknout „Run ClustalW“ a potvrdit tlačítkem „OK“. Počkat, až program srovnává sekvence a otevře nové okno s alignmentem sekvencí **Obr. 4**.
- Nastavit Mode na „Edit“ a editovat sekvence.
- Postupně procházet sekvence a porovnávat je s elektroforetogramy (*.ab1), které otevíráme také v programu BioEdit a opravujeme případné chyby a nesrovnalosti v režimu „Overwrite“ či „Insert“.
- Opravené sekvence zarovnat odstraněním nečitelných sekvencí na začátku a konci (vybrat do bloku a odstranit pomocí klávesy „Delete“).
- Uložit editovanou sekvenci v nabídce „File“ „Save As“: „Fasta“.

- Provést opět multiple alignment v nabídce „Accessory Application“ (viz výše).
- Výsledný soubor *.ALN představuje surová data pro statistické vyhodnocení genetické podobnosti.

Obr. 2 Ukázka výsledného elektroforeogramu ITS oblasti po přímém sekvenování s vyznačenými překryvy



Obr. 3 Ukázka výsledného elektroforeogramu klonovaného produktu ITS oblasti s vyznačenými místy, kde byly dříve překryvy



Obr. 4 Multiple alignment ITS oblasti s vyznačenými SNPs- Single Nucleotid Polymorphisms

