Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin



Využití techniky RACE
(Rapid amplification of complementary DNA ends)
pro identifikaci genů pro metalothioneiny

Metodické návody pro laboratorní cvičení z předmětu
Genetika rostlin (GERO)
a Molekulární analýzy rostlinného genomu (MARG)
Vypracováno v rámci projektu FRVŠ MŠMT 2252/2010/ G4.

ing. Eva Nevrtalová

2010

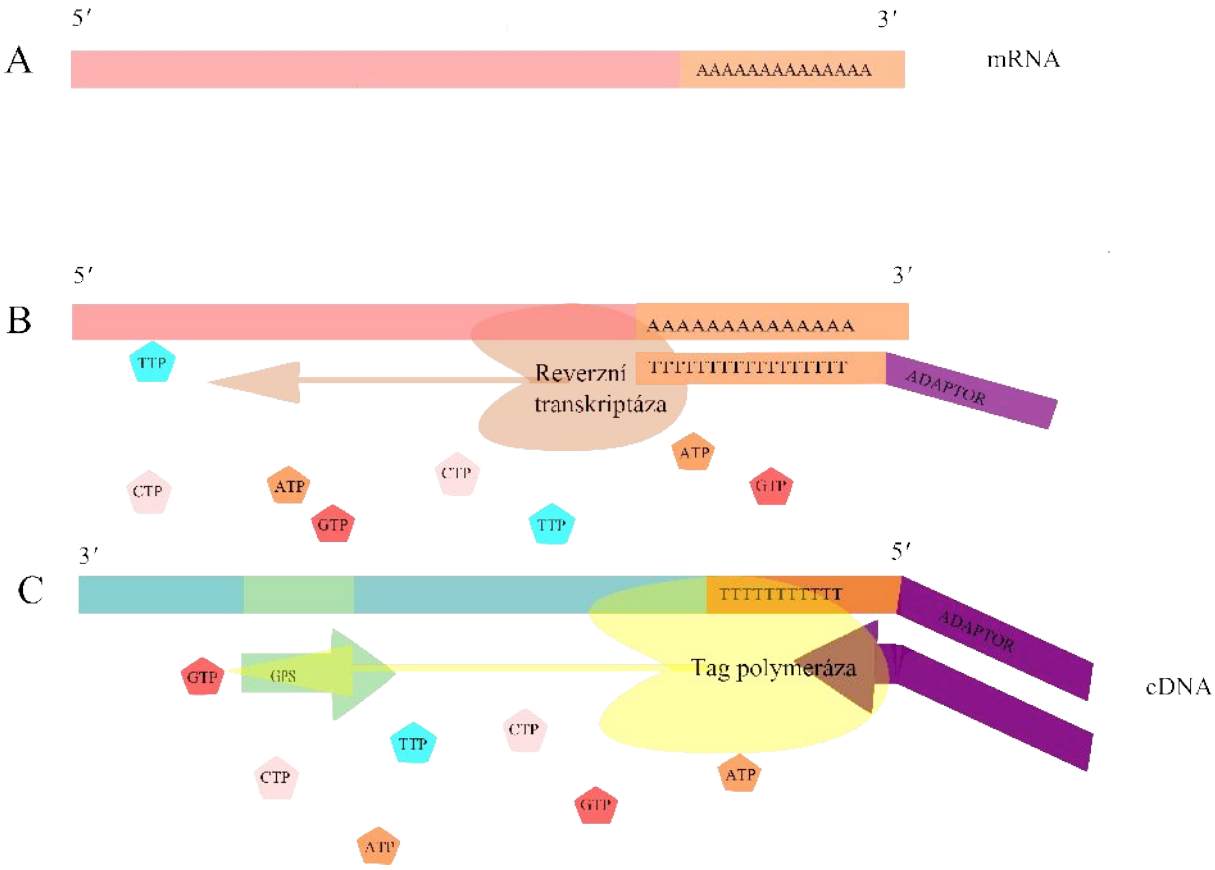
RACE PCR
Rapid **A**mplification of **c**DNA

Rapid Amplification of cDNA (Rychlá amplifikace konců cDNA) je metodou molekulární biologie sloužící k vyhledávání celých transkriptů nacházejících se v buňce. Podstatou metody je převést mRNA na cDNA pomocí reverzní transkripce a posléze pomocí PCR amplifikovat daný transkript, který následně může být klonován, sekvenován a bioinformaticky analyzován. Pro použití RACE je nezbytná znalost části sekvence uvnitř molekuly mRNA, ve které je navržen primer orientovaný ve směru 3´nebo 5´ umožňující produkci překrývajících se fragmentů cDNA. Dle primeru rozlišujeme tedy 3´RACE PCR nebo 5´ RACE PCR (obr.1).

3´-RACE využívá přirozeného poly(A)-konce na mRNA. Nejprve se syntetizuje cDNA reverzní transkripcí z mRNA a jako primer se použije oligomer (dT_n) s navázaným adaptorem. Oligo dT_n je komplementární k poly (A) konci mRNA. Adaptor má vyšší Tm než oligo(dT). Při následné PCR amplifikaci se použije primer komplementární k adaptoru a druhý, genově specifický primer (*GSP*) designovaný na známou střední část genu. Vzhledem k nespecifičnosti adaptoru je vhodné selektovat vzniklé transkripty. První možností je další PCR – nested PCR nebo semi-nested PCR. Druhou možností je provést asymetrickou PCR s genově specifickým primerem, který určuje specifičnost reakce a leží uvnitř zkoumaného genu.

Podstatou 5´-RACE je přepis z mRNA do cDNA pomocí genově specifického primeru (reverzního), templát vzniká ve směru 3' → 5', tato cDNA je specifická. Po reverzní transkripci jsou pomocí enzymu terminální deoxynukleotidyl transferasy (TdT) dodány na 3'- konec transkriptu stejné nukleotidy, tento konec se označuje jako homopolymerický. Pomocí genově specifického primeru a oligo dN primeru, který má na konci umístěn adaptor je provedena první PCR a druhá PCR se provádí s primerem komplementárním k adaptoru a *GSP* primerem.

Úspěšnost reakce je kontrolována elektroforeticky na 1,5% agarozovém gelu s ethidium bromidem (1%) a daný produkt může být ligován do vektoru a klonován v *E.coli*, extrahovaný plazmid je posléze sekvenován.



Obr. 1 Obecné schéma znázorňující 3' RACE experiment. Mediátorová RNA (A) je přepsána pomocí dT_n primeru (B) a vzniká cDNA, která je použita jako templát (C) ke generování RACE produktů.

3´RACE

A: Izolace celkové RNA z rostlinného pletiva

Při izolaci RNA je nutné postupovat tak, aby nedošlo k degradaci RNA všudypřítomnými RNAzami, které jsou odolné vůči teplotě, detergentům a nevyžadují pro svou aktivitu žádné kofaktory. Je důležité si uvědomit, že hlavním zdrojem RNáz je především izolovaný vzorek. Ve vzorku můžeme předejít degradaci RNA použitím nízké teploty (-70°C) během zpracováním vzorku před umístěním do lyzačního pufru. Lyzační pufry jsou většinou složeny z chaotropních činidel (guanidium chlorid, guanidium thiokyanát), které RNázy inaktivují. Při odstranění těchto pufrů hrozí další nebezpečí degradace RNA, jedná se o fázi precipitace RNA ethanolem nebo isopropanolem. Po precipitaci je RNA peleta rozpuštěna ve vhodném pufru nebo deionizované vodě a tyto musí

být RNáz prosté, neboť bychom si mohli degradovat finální produkt a znehodnotit celý izolační postup. Během další manipulace s izolovanou RNA je nezbytné zamezit případné kontaminaci vzorku RNázami. Eventuálními zdroji mohou být ruce experimentátora, bakteriální kontaminace roztoků a laboratorního materiálu. Ošetření laboratorního materiálu umožňujícího degradovat RNázy spočívá v žíhání skleněných pomůcek za vysoké teploty (180°C 8 hod), nebo ošetření pomůcek chloroformem. Odstranění RNáz z vody je možné přidáním diethylpyrokarbonátu, jež inkubujeme přes noc a posléze degradujeme autoklávováním. Povrchy laboratorních přístrojů a pracovních ploch je možné ošetřit specielními detergenty ničící RNázy (RNaseZap Sigma). Samozřejmostí je používaní ochranných rukavic, dodržování čistoty, minimalizace času při zpracování vzorku a hlavně využívání jednorázového plastu, který je certifikován jako RNáz prostý.

Celkovou RNA můžeme izolovat pomocí fenol-chloroformová extrakce nebo adsorpcí na silikát.

Fenol-chloroformová metoda extrakce ponechává RNA rozpuštěnou ve vodném prostředí (pufru) a odstraňuje ostatní složky lyzátu, především proteiny. K lyzátu je přidána směs guanidinium thiokyanát-fenol-chloroformu (komerčně dodávana jako TRIzol, TRI Reagent, RNA blue). Chloroform je organické rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou. Intenzivním třepáním se fáze mísí a fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Místo chloroformu může být použit 2-merkaptoethanol. Po protřepání je roztok centrifugován, aby došlo k dokonalému oddělení fází. Na rozhraní mezi fázemi se obvykle objeví bílý prstenec sražených proteinů. Horní vodná fáze obsahuje RNA a tuto přemístíme do nové čisté zkumavky. Získaný roztok obsahuje všechny typy RNA, kontaminující DNA můžeme odstranit působením DNázy.



Obr.2 a)Izolace RNA pomocí TRIzolu, b) vzorec guanidinium thiokyanatu

Druhá často používaná izolační metoda je založena na zjištění, že RNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí adheruje na silikátový povrch.

Tradiční fenol-chloroformová extrakce je pracnější a je používána obvykle pro práci s větším množstvím RNA nebo v některých speciálních postupech. Výhodou metody založené na adsorpci na silikát je rychlost a pohodlnost, proto jsou na ní založeny komerční soupravy (kity) pro rutinní extrakce RNA. Kity jsou optimalizovány pro použití na konkrétní typ a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Pohodlnost použití kitů je dále zvýšena tím, že obvykle používají nástavce do mikrozkumavek. Zpracování vzorku pak probíhá tak, že jsou roztoky promývány přes kolonku (filtr se zachycenými částicemi). Namísto tradičního silikátu kity často využívají speciální pryskyřice a mají různě upravené složení pufrů tak, že např. preferují při adsorpci molekuly RNA určitého velikostního rozpětí.



Obr. 3 Izolace celkové RNA pomocí kitu (převzato: http://www.bioke.com/webshop)

Izolace RNA

(pomocí kitu NucleoSpin® RNA Plant – MACHEREY – NAGEL)

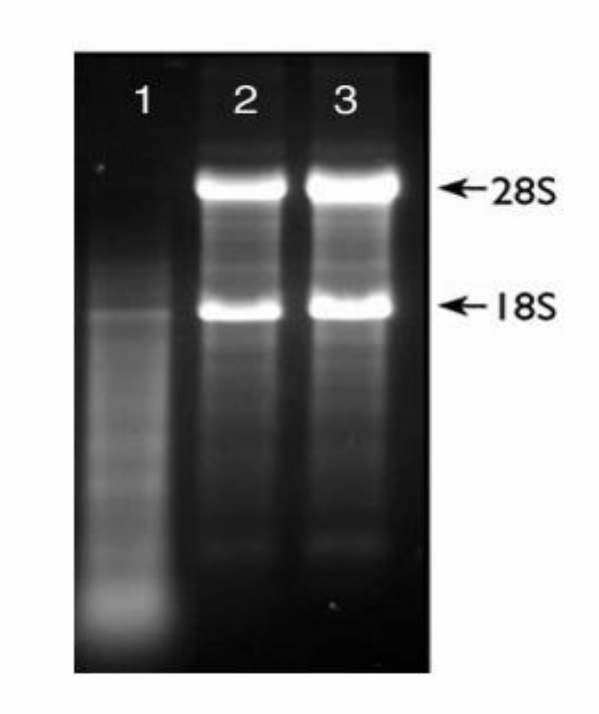
Příprava roztoků před izolací RNA

- K lyofilizované rDNaze přidej vodu (dle zakoupeno kitu k obsahu velikosti C přidat 230 µl H_2O) a inkubuj 1 min při pokojové teplotě opatrně promíchej, rozdělit na alikvoty a skladuj při -18 °C.
- K 5 ml RA3 pufru přidej 20 ml ethanolu.

1. **Homogenizace** - drtit 100 mg rostlinného materiálu v tekutém dusíku
2. **Buněčná lyze** – k nadrcenému materiálu přidej 350 µl pufru RA1 a 3,5 µl ß-merkaptoethanolu a důkladně promíchej.
3. **Filtrace lyzátu** – buněčný lyzát přenes na kolonku (s fialovým kroužkem), centrifuguj 1 min při 11 000 × g, supernatant opatrně přemísti do 1,5ml zkumavky a neporuš při přenosu pelet tvořený zbytkem buněk na dně 2ml zkumavky.
4. **Úprava podmínek pro navázaní RNA** - k filtrátu přidej 350 µl 70% ethanolu a 5× promíchej opakovaným nasátím pipetou.

5. **Navázání RNA** – vezmi kolonku (s modrým kroužkem) a přenes na ni filtrát s ethanolem, centrifuguj 30 sec při 11 000 × g (maximální kapacita kolonky je 750 µl)
6. **Odsolení silikagelové membrány** – na kolonku přidej 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) a centrifuguj 1 min při 11 000 × g, odsolení je velmi důležité pro další krok zahrnující enzymatickou reakci, vylij centrifugát ze zkumavky a centrifuguj znovu 30 sec na maximální otáčky (max. 11 000 × g).
7. **DNazování** - přidej 95 µl DNAzového reakčního mixu přímo doprostřed kolonky. Inkubuj 15 min při pokojové teplotě. (příprava reakčního mixu: 10 µl rDNasy a 90 µl reakčního pufru)
8. **Promytí a vysušení silikagelové membrány**
    a. přidej 200 µl RA2 pufru a centrifuguj 30 sec 11 000 × g (RA2 inaktivuje rDNasu), centrifugát vyhoď
    b. přidej 600 µl RA3 pufru a centrifuguj 30 sec 8 000 × g, centrifugát vyhoď
    c. přidej 250 µl RA3 pufru a centrifuguj 2 min 11 000 × g, přemísti kolonku do 1,5ml zkumavky
9. **Eluce RNA** – doprostřed kolonky napipetuj 60 µl RNase-free vody a centrifuguj 1 min 11 000 × g

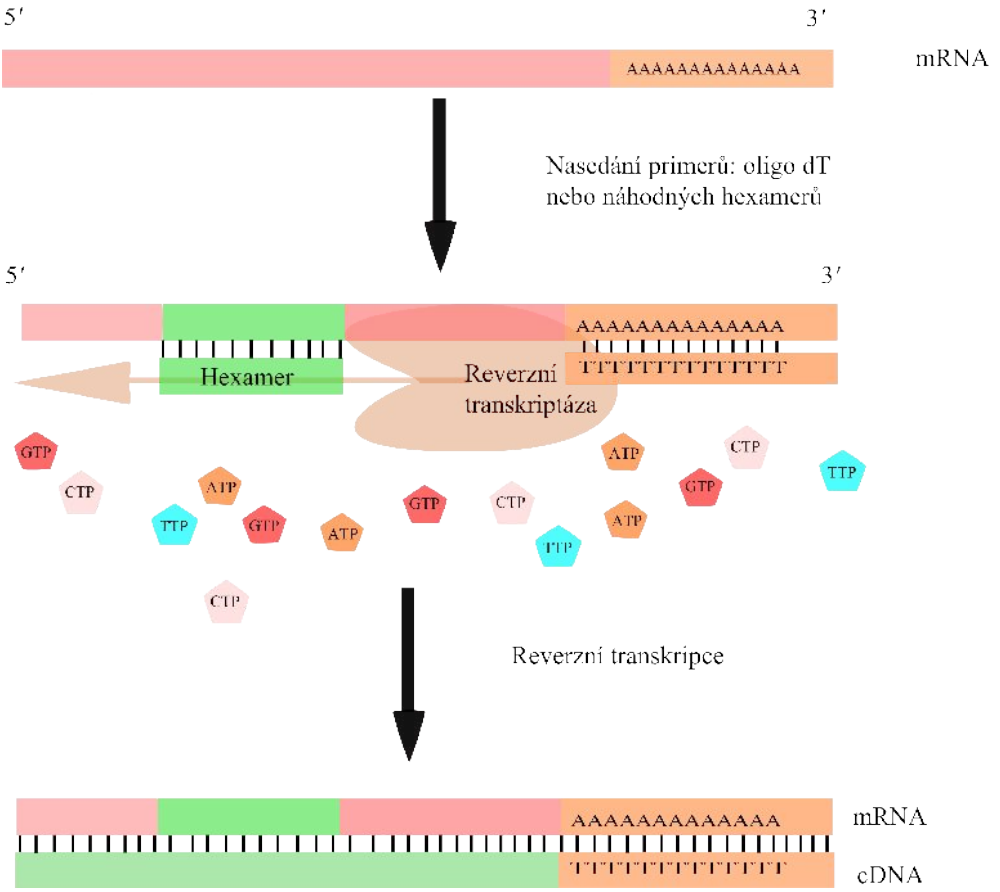
Celistvost RNA a její kontaminace DNA jsou kontrolovány elektroforeticky na 1% agarozovém gelu s ethidium bromidem (1%) (obr.4).



Obr. 4 Kontrolní elektroforéza extrahované RNA (1) degradovaná, 2) a 3) intaktní RNA)

B. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém je přepisována genetické informace z ribonukleové kyseliny (RNA) do deoxyribonukleové (DNA). V postatě jde o obrácený postup, než jaký probíhá v naprosté většině případů přenosu genetické informace – při transkripci, kdy se genetická informace přepisuje z DNA do RNA. Při reverzní transkripci dochází k úpravě genetické informace a napadená buňka a její potomci provádějí jinou činnost, než je její obvyklá – např. produkci toxinů nebo přímo virů, které buňku původně napadly. Schopnost používat reverzní transkripci mají v přírodě retroviry (podskupina RNA virů), u kterých se proces podporován enzymem reverzní transkriptázou. Reverzní transkriptáza je enzym, který se účastní syntézy DNA, a proto patří mezi DNA polymerázy. Enzym reverzní transkriptázu si osvojily zejména různé viry. Na druhou stranu i lidská telomeráza je ve své podstatě reverzní transkriptáza. Pro transkripci in vitro se používá jako primer oligo dT nebo jiný hexametr popřípadě genově specifický primer (obr.5).



Obr. 5 Reverzní transkripce. Pro přepis RNA je možno použít různé druhy primerů, od kterých se začíná syntetizovat nové vlákno cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy.

Reverzní transkripce

Při této reverzní transkripci budou generovány cDNA, jejichž 5' konec je charakterizován adaptorem, jenž slouží jako hybridizační místo pro nasedání primerů.

Smíchat 4 µl vody

1 µl RNA o koncentraci 1 $mg.ml^{-1}$

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) (GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTV-A,C nebo G)

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

---

celkem 10 µl

Reakční komponenty extenzivně promíchat, krátce stočit a reakční směs inkubovat při 37 °C 1 hod. Inaktivovat M-MLV při 70 °C po dobu 10 min.

C. RACE PCR amplifikace cDNA:

1. Preamplifikační krok: Asymetrická PCR

Genově specifický primer v reakcí slouží k amplifikaci PCR produktů, které jsou charakteristické pouze pro hledaný gen (gen pro metalothionein – *MT3*).

Připravíme:

cDNA …….0,4 ul

genově specifický primer…..1,6 ul (10 µM) (CATTTTACCTATAAATACCAACC)

dTNP……..……. .0,4 ul

Taq polymeráza…….…...0,6 ul

10x PCR pufr ……...2 ul

ddH_2O……. 15,2 ul

---

celkem 20 ul

Připravit si mix a jako poslední komponentu přidat cDNA

2. PCR

Na jednu reakci smíchat:

PCR produkt…… 0,4 ul

PCR anchor primer ……..…0,8 ul (10 μM) (GACCACGCGTATCGATGTCGAC)

genově specifický primer.... 0,8 ul (10 μM)

dTNP……0,4 ul

Taq polymeráza……0,6 ul

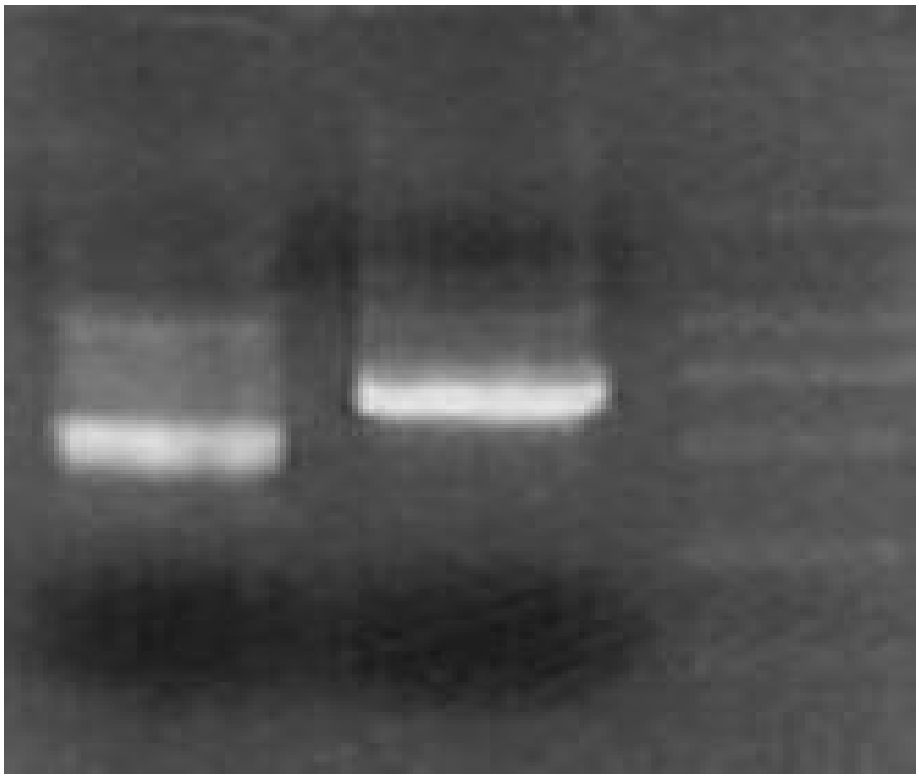
10x PCR pufr…….. 2 ul

ddH_2O…….15,2 ul

---

celkem 20 ul

Kontrola úspěšnosti reakce na 1,5% agarozovém gelu.



Obr. 6 RACE produkty MT3 genů ze dvou odlišných ekotypů S. vulgaris