Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin



Inovace laboratorních úloh genetických předmětů metodikami pracujícími s ribonukleovými kyselinami pšenice

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

Vypracováno v rámci projektu FRVŠ MŠMT 1017/ 2011/ G4.

Ing. Milena Musilová, MVDr. Ing. Václav Trojan
2011

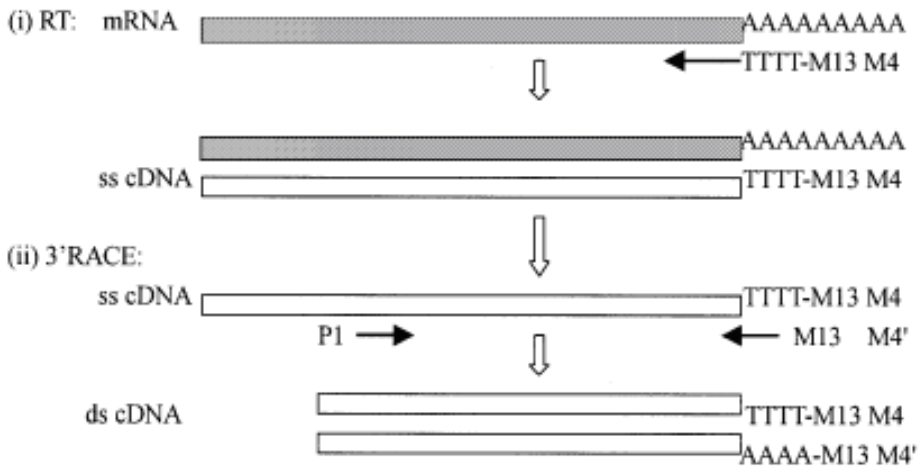
1. Princip metody RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends

Syntéza cDNA z mRNA o úplné délce není pomocí RT-PCR (zpětná transkripční polymerázová řetězová reakce) snadná, jelikož často není dostupná celá sekvence transkriptu. K usnadnění klonování cDNA o úplné délce je využívána metoda RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), neboli Rychlá amplifikace konců cDNA . Pomocí RACE se amplifikují kratší úseky od obou konců cDNA poté, co byla stanovena část sekvence cDNA jinými metodami (např. sekvenováním či *in silico* vyhledáváním v databázích). Metoda RACE umožňuje získat kompletní sekvence cDNA v poměrně krátkém čase. Pro použití RACE je nezbytná znalost části sekvence uvnitř molekuly mRNA, ve které je navržen specifický primer, který je orientován ve směru 3´ nebo 5´ a umožňuje produkci překrývajících se fragmentů cDNA.

Dělí se na 5´RACE a 3´RACE. 3´RACE (obr. 1) využívá výhody přirozeného poly(A)-konce na mRNA jako místa pro zahájení PCR amplifikace. Pro zpětnou transkripci od 3´konce se použije složený primer obsahující 17 zbytků oligo(dT) navázaných na 17-mer kotevní adaptor. Adaptor má vyšší teplotu tání (Tm – melting temperature) než oligo(dT). Pro PCR se pak použije primer komplementární k adaptoru a druhý, genově specifický primer navržený na střední části cDNA.

Při 5´RACE je cDNA syntetizována za použití genově specifického primeru GSP1 a zpětné transkriptasy. Reakční produkt zpětné transkripce je pak purifikován od nukleotidů a primerů a vybaven 3´-poly(dA)-koncem připojeným terminální transferasou. Úsek cDNA s napojeným koncem je pak amplifikován PCR s použitím vnějšího genově specifického primeru GSP2, složeného primeru oligo(dT) s kotevním adaptorem a *Taq* DNA-polymerasy.

Úspěšnost reakce je kontrolována elektroforeticky na 1,5% agarosovém gelu barveném ethidium bromidem. Produkty RACE je možné také dále vnést do vektoru, klonovat v bakteriích *Escherichia coli* a následně sekvenovat izolovanou plazmidovou DNA.



Obr. 1 Schématické znázornění reverzní transkripce metodou 3´RACE

2. 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 všech rušivých látek, které by stěžovali veškeré následné operace zbavíme. 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:

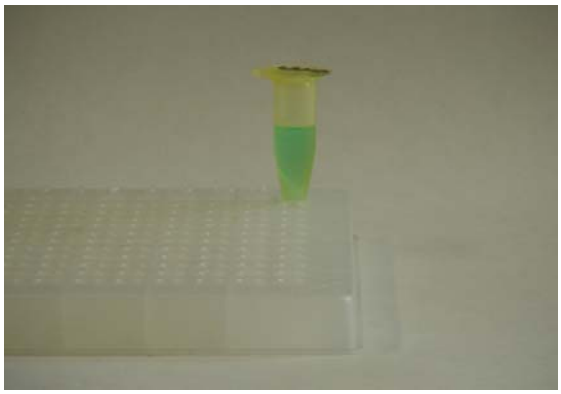
1. Na vychlazené třecí misce (obr. 2) rozetřít vzorek obilek (max. navážka 0,10 g) s 1 ml RNA Blue (obr. 3) a centrifugovat při 12 000 otáčkách/ 10 min.
2. Převézt supernatant do nové zkumavky a inkubovat 5 min. při pokojové teplotě
3. Přidat 200 µl chloroformu a 15 s protřepat inkubovat 5 min. při pokojové teplotě
4. Centrifugovat při 12 000 ot./ 10 min a vrchní fázi (obr. 4) 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. 5) 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.



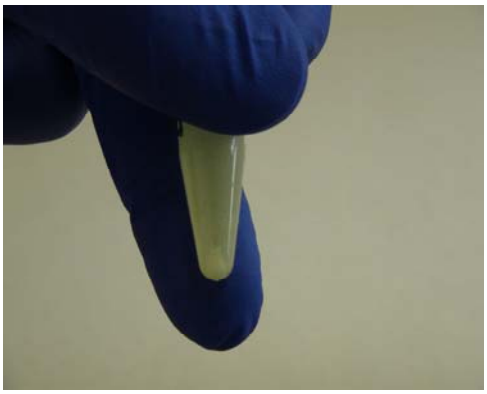
Obr. 2
Třecí miska s částečně homogenizovanou obilkou v RNA Blue



Obr. 3
Reagencie RNA Blue



Obr. 4
Zcentrifugovaná zkumavka (10 min, 12 tis ot.) obsahující zřetelně oddělenou vodní fázi supernatantu a sediment



Obr. 5
Mléčně bílá peleta před rozpuštěním v 70 µl RNase free vodě

„DNazování“

1. Příprava správné koncentrace k DNazování
2. Do zkumavky s naředěnou RNA přidat 1µl 10x TURBO DNase Buffer a

   1 µl TURBO DNase (obr. 6), jemně protřepat
3. Inkubovat 25 min. při teplotě 37°C (obr. 7)
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. 8)

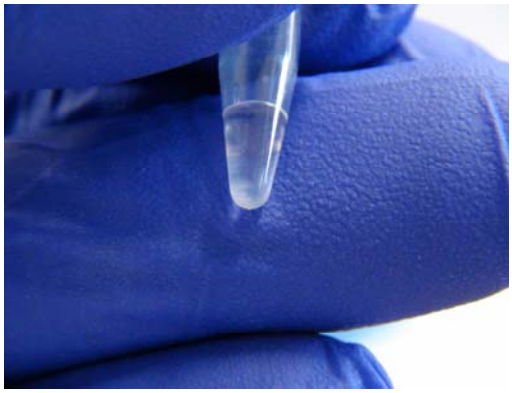


Obr. 6

Sada pro DNazování



Obr. 7
Termostat pro inkubaci vzorků



Obr. 8
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)

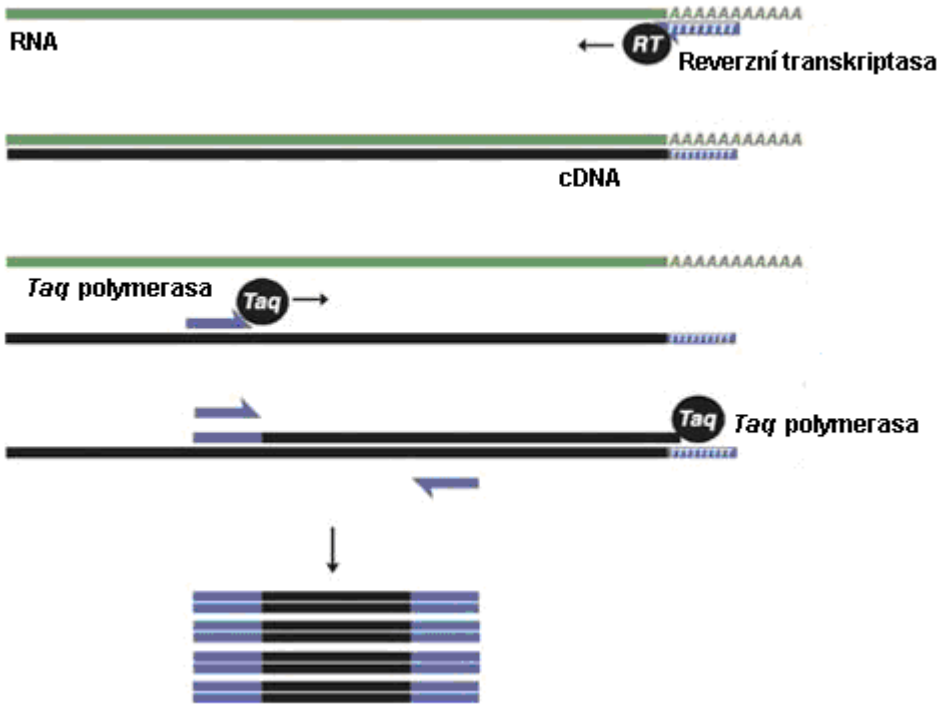
(GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT)

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

2. Přidat 1 µl DNazované RNA (o koncentraci 1 mg.ml-1) celkem 10 µl

3. Reakční komponenty promíchat, krátce centrifugovat a inkubovat 1 hod. při 37°C

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



Obr. 9 Schéma reverzní transkripce

4. Preamplifikace pomocí asymetrické PCR

Pomocí GSP – genově specifického primeru dojde k amplifikaci úseku, který odpovídá danému vybranému genu. V našem případě jde o gen enzymu z pozdní biosyntetické dráhy anthokyanů, – dihydroflavonol reduktasu (DFR).

Asymetrická PCR je modifikace PCR, která umožňuje preferenční syntézu jen jednoho vlákna z duplexu DNA tím, že jeden z primerů je v nadbytku.

Jako produkt PCR tak vzniká jednovláknová DNA (ssDNA) vhodná např. pro sekvenování.

A. Preamplifikační krok: Asymetrická PCR

genově specifický primer…..1,6 µl (10 µM) (TGAGAAGAACAAGCCGTTGCT)

dTNP…….…… .0,4 µl

10x PCR pufr ……....5 µl

ddH2O……. 15,2 µl

Taq polymerasa……...0,6 µl

cDNA …….0,4 µl

celkem 23 µl

5. Konečná PCR

Na závěr je potřeba daný úsek, charakteristický pro gen enzymu DFR amplifikovat klasickou polymerázovou řetezovou reakcí a provést kontrolu úspěšnosti horizontální elektroforezou na 1,5% agarosovém gelu.

PCR no anchor primer ……0,8 ul (10 µM)

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

dTNP……0,4 ul

10x PCR pufr…….. 5 ul

ddH2O…….15,2 ul

Taq polymerasa……0,6 ul

PCR produkt…… 0,4 ul

celkem 23 ul

Kontrola úspěšnosti reakce na 1,5% agarosovém gelu.