



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



UNIVERSITAS
OSTRAVIENSIS

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**MODERNÍ BIOFYZIKÁLNÍ METODY:
POKROČILÉ PRAKTICKÉ VZDĚLÁVÁNÍ V EXPERIMENTÁLNÍ
BIOLOGII**

**Operační program Vzdělávání pro konkurenceschopnost
Číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/09.0046**

Praktický kurz pokročilých metod experimentální biologie

konaný

na Katedře biologie a ekologie Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity v
Ostravě

v termínu 10. 9. – 14. 9. 2012

Program praktického kurzu

	Pondělí	Úterý	Středa	Čtvrtek	Pátek
9 - 10	přednáška	přednáška	přednáška	přednáška	přednáška
dopoledne	Mutageneze řízená Oligonukleotidem : PCR, štěpení DNA restrikční endonukleázou.	Elektronová mikroskopie	Interakce s látkami reagujícími s cukrfosfátovou páteří, s bázemi. Využití reparačních enzymů k detekci poškození DNA. Gelová elektroforéza.	Fluorescenční mikroskopie, konfokální mikroskopie – Olympus.	Interakce DNA s proteiny.
odpoledne	Mutageneze řízená oligonukleotidem: transformace mutovaného plasmidu do buňky	Mutageneze řízená oligonukleotidem – izolace plasmidové DNA z kolonií, ověření mutace.	Transformace buněk plasmidovou DNA. Alfa komplementační test.	PCR kolonií.	Vyhodnocení výsledků, hodnocení kurzu účastníky.

PCR kolonií

Princip:

Polymerázová řetězová reakce je metoda, která umožňuje namnožit požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech.

Princip metody je založen na replikaci nukleových kyselin.

Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA prostřednictvím **termostabilní** DNA-polymerázy.

Požadovaný úsek DNA je vymezen dvěma oligodeoxyribonukleotidy (primery) o délce cca 18-25 nt. Tyto primery jsou navrženy tak, aby se po denuraci dsDNA vázaly na protilehlé řetězce a vytvořily startovací místa pro syntézu DNA.

Po přidání DNA-polymerázy a dNTP probíhá syntéza nových vláken na obou templátových řetězcích protisměrně.

K syntéze DNA se používají termostabilní DNA-polymerázy izolované z termostabilních mikroorganismů. Tyto enzymy zůstávají v nativním stavu i za teplot, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby se syntéza DNA cyklicky opakovala.

Průběh PCR lze rozdělit na tři cyklicky se opakující děje s odlišnými nároky na teplotu:

- a) Denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94°C)
- b) Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65°C)
- c) Syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65-75°C)

Polymerázová řetězová reakce probíhá v zařízení nazývaném termocykler. V něm se automaticky podle předem zvoleného programu mění teplota v daných časových intervalech.

Postupným opakováním jednotlivých cyklů dochází k amplifikaci zvoleného úseku DNA.

Počet molekul roste vzhledem k počtu cyklů exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů), výsledkem může být až miliarda kopií vybraného úseku DNA.

Použití polymerázové řetězové reakce není omezeno na izolovanou DNA, byly vyvinuty techniky, které umožňují amplifikovat zvolený úsek bez předchozí separace nukleových kyselin. Toho se využívá například při tvorbě rekombinantních plasmidů při detekci jednotlivých klonů. Další využití této techniky spočívá v přímé identifikaci bakteriálních kmenů pomocí specifických primerů.

Při PCR kolonií z agarové plotny sterilní špičkou odebereme dobře narostlou a oddělenou kolonie, rozsuspendujeme ji v destilované vodě a přeneseme do sterilní PCR zkumavky do směsi pro PCR včetně termostabilní DNA-polymerázy. První denaturační krok při PCR vyvolá lýzi bakterií a uvolněná DNA může být amplifikována. Výtěžek je nižší než při použití izolované DNA, ale dostatečný pro detekci jednotlivých klonů.

Materiál a chemikálie:

- Plasmidová DNA (pBS, pPGM1)
- 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Taq DNA polymeráza + pufr
- Primery
- Termocykler
- Pipety, špičky
- Ledová lázeň
- Termostat
- Rukavice
- Agarosový gel, pufr
- Elektroforetická aparatura
- Zdroj napětí

- Dokumentační systém

Pracovní postup:

- 1 Z agarové plotny setřeme sterilní špičkou dobře narostlou kolonii a suspendujeme v 10 μ l destilované vody. Ze suspenze odebereme 1 μ l, který přidáme ke směsi PCR. Složení směsi a množství jednotlivých komponent uvádí tabulka.
 - 2 Zkumavky vložíme do termocykleru.
 - 3 Termocykler naprogramujeme na následující hodnoty:
 - a. Krok 1:

i. denaturace	94°C	120 sec
ii. počet cyklů		1
 - b. Krok 2:

i. Denaturace DNA	94°C	30 sec
ii. Hybridizační primerů s templářovou DNA	65°C	30 sec
iii. Syntéza nových řetězců	72°C	60 sec
iv. Počet cyklů		30
- Spustíme start.
- 4 Po skončení amplifikace zkontrolujeme výtěžek namnoženého úseku pomocí gelové elektroforézy. Na agarosový gel nanese po 5 μ l reakční směsi vzorků. Délku získaných fragmentů určíme porovnáním polohy signálů s polohou fragmentů markerové DNA o známé velikosti. Výtěžek odhadneme z intenzity fluorescence srovnáním s fluorescencí známého množství DNA.
 - 5 Z délky získaných fragmentů

Pozn.:

1) V případě odlišných koncentrací výchozích komponent je třeba příslušné objemy přepočítat. Pokud produkty PCR použijeme pouze jako kontrolní vzorky pro gelovou elektroforézu a našim cílem není dosáhnout vysokého výtěžku, můžeme snížit objemy všech látek 5-10 x, tj. PCR provádíme v 10-20 μ l. Snížení spotřeby primerů, templátové DNA i enzymu vede k finančním úsporám. Abychom mohli pracovat v tak malých objemech, je nezbytné mít modernější přístroj s vyhříváním víkem. U cyklerů první generace, u kterých vyhřívané víko není běžnou součástí, hrozí při příliš malých objemech vypaření vzorků a jejich kondenzace na víčku mikrozukavky.

Nedoporučuje se provádět PCR v objemech větších než 100 μ l, protože u velkých objemů je potřeba delších inkubačních časů, aby bylo dosaženo stejné teploty ve všech částech vzorku. Protože i termostabilní DNA-polymeráza v průběhu opakovaných cyklů PCR postupně ztrácí svou aktivitu, při prodloužení inkubačních časů bychom museli do reakční směsi přidat více enzymu.

2) PCR je velmi citlivá metoda, pomocí které dokážeme mnohonásobně zmnožit vybraný úsek DNA, nacházející se ve vzorku ve velmi malém množství. Odvrácenou tvář obrovské citlivosti této metody je možnost vzniku falešně-pozitivních výsledků nebo nespecifických produktů v případě sebemenší kontaminace ať už přímo vzorku nebo prostřednictvím pipet, špiček, přidávaných roztoků apod. Z tohoto důvodu musíme při PCR dbát zvýšené opatrnosti, veškeré roztoky pipetujeme sterilními špičkami, pracovní plochu předem důkladně vyčistíme a při manipulaci se vzorky nikdy nepracujeme bez rukavic.

Detekce poškození DNA - detekce jednořetězcových zlomů v plasmidové DNA, detekce modifikace bází

DNA, jako nositelka genetické informace, je v buňce vystavena častým interakcím s látkami, které ji mohou negativně ovlivnit. Tyto látky, které mohou pocházet z buněčného metabolismu nebo z vnějšího prostředí, můžeme zjednodušeně rozdělit do dvou základních skupin:

- 1) Látky štěpící cukr-fosfátovou kostru
- 2) Látky modifikující báze

Do první skupiny látek, řadíme především radikály a také oxidační činidla. Reakce těchto látek s DNA vede většinou k jedno nebo dvou-řetězcovým zlomům.

Radikály jsou „vedlejším produktem“ metabolismu a jsou v buňce velmi časté. Jsou to velmi reaktivní sloučeniny a s DNA v buňce reagují poměrně často. Proto je v poslední době často zmiňována důležitost antioxidantů, které s radikály a jim podobnými látkami v buňce reagují a chrání tak nejen DNA před často ireverzibilním poškozením.

Zlomy v DNA jsou snadno detekovatelné pomocí gelové elektroforézy. Přerušení řetězce DNA vede ke změně její elektroforetické mobility. Plasmidová DNA je totiž ve své nativní formě v tzv. superhelikální – nadšroubovicové konformaci (scDNA). Tato forma se vyznačuje velkou kompaktností (molekula DNA zaujímá při stejné hmotnosti menší objem oproti tzv. otevřené kružnicové ocDNA), proto migruje agarozovým gelem rychleji. Při přerušení jednoho z řetězců dvoušroubovice dojde k přechodu z kompaktní scDNA do rozměrnější ocDNA.

Změnu si můžeme představit jako rozmotání klubka s bavlnkou a snahu protáhnout kompaktní klubko, nebo nekompaktní shluk stejně velkým otvorem malých rozměrů.

Do látek poškozujících (modifikujících) báze spadá poměrně velká a různorodá skupina chemikálií. Nejčastější modifikace vyvolávají látky s oxidačním, případně alkylačním mechanismem působení. Zvláště v případě methylačí mohou být fyziologické důsledky velmi vážné, protože nativní methylace DNA hraje významnou úlohu v epigenetických regulačních procesech.

Buňky mají pro opravu poškozené DNA vyvinut poměrně rozsáhlý aparát enzymů. Proces opravy probíhá zpravidla podle schématu rozpoznání modifikace → vystřížení modifikované báze (nukleotidu) → doplnění chybějící báze (nukleotidu) podle komplementárního řetězce → ligace přerušného řetězce (pokud k přerušení došlo).

Chceme-li využít reparačních enzymů pro detekci poškození DNA, vynecháváme poslední dva kroky. Vystřížení modifikovaného nukleotidu vede zpravidla k přerušení cukrfosfátové páteře DNA a tedy k přechodu do ocDNA.

Pro vytvoření volných radikálů v laboratorních podmínkách nejčastěji využíváme tzv. Fentonovy reakce:



Ve cvičení bude ke štěpení DNA použit roztok manganistanu draselného, jako druhé štěpící agens použijeme hydroxylové radikály, generované měďnatými ionty (analogie klasické Fentonovy reakce).

Pro detekci modifikace bází DNA využijeme dimethylsulfát (methylace guaninu) a reparační enzym Endonukleáza III.

Materiál:

- Roztok měďnatých iontů (50mM)

- Zásobní roztok KMnO_4 (0,1M)
- Fosfátový pufr pH 7,4 (0,2M)
- Plasmidová DNA (pBlueskript (SK⁻))
- TAE (50x)
- Peroxid vodíku (H_2O_2)
- Dimethyl sulfát 1% (DMS)
- Endonukleáza III + pufr
- 3M octan sodný
- 96%, 70% ethanol
- Agaróza
- Nanášecí pufr
- Minicentrifuga
- Termostat
- Aparatura pro gelovou elektroforézu
- Chemické sklo
- Mikrozkušavky
- Automatické pipety, špičky
- Destilovaná voda

Pracovní postup:

A) Vliv oxidačních činidel

- 1) Připravíme si koncentrační řadu roztoku manganistanu draselného v koncentracích: 100 mM, 50 mM a 10 mM.
- 2) Do mikrozkušavek 1-4 napipetujeme dle tabulky
- 3) Krátce zcentrifugujeme (5 s, pomocí tlačítka „shortspin“)
- 4) Vše necháme inkubovat na 37°C po dobu 30 min.
- 5) Do všech mikrozkušavek napipetujeme 5 μl nanášecího pufru.
- 6) Celý objem reakční směsi nanese na připravený agarozový gel.

Tab. 1 – Rozpis pipetování pro KMnO_4

	Zkušavka 1	Zkušavka 2	Zkušavka 3	Zkušavka 4 (kontrola)
DNA (200ng/ μl)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Fosfátový pufr (200 mM)	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
KMnO_4	2 μl (100 mM)	2 μl (50 mM)	2 μl (10 mM)	-
H_2O	12 μl	12 μl	12 μl	14 μl

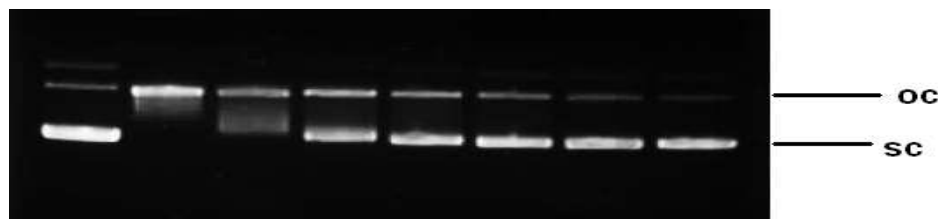
B) Vliv volných radikálů

- 1) Připravený roztok měďnatých iontů zředíme na 10 mM.
- 2) Roztok peroxidu zředíme na 0.3%
- 3) V mikrozkušavce smícháme:

	Zkušavka 5	Zkušavka 6	Zkušavka 7
DNA (200ng/μl)	1 μl	1 μl	1 μl
Cu ²⁺	2 μl	2 μl	-
H ₂ O ₂	2 μl	-	2 μl
H ₂ O	15 μl	17μl	17μl

- 4) Krátce zcentrifugujeme (5 s, pomocí tlačítka „shortspin“)
- 5) Inkubujeme po dobu 30 minut při 37°C.
- 6) Do všech mikrozkušavek napipetujeme 5μl nanášecího pufru
- 7) Nanese na připravený agarozový gel.
- 8) Do osmého startu nanese 3 μl standardu (generuler)

1 2 3 4 5 6 7 8



Obr.1: Poškození plasmidové DNA působením manganistanu draselného. (1) Kontrola DNA, (2) DNA + 12 mM KMnO₄, (3) DNA + 6 mM KMnO₄, (4) DNA + 3 mM KMnO₄, (5) DNA + 2 mM KMnO₄, (6) DNA + 1 mM KMnO₄, (7) DNA + 0,1 mM KMnO₄, (8) DNA + 0,01 mM KMnO₄.

C) Detekce modifikace bází

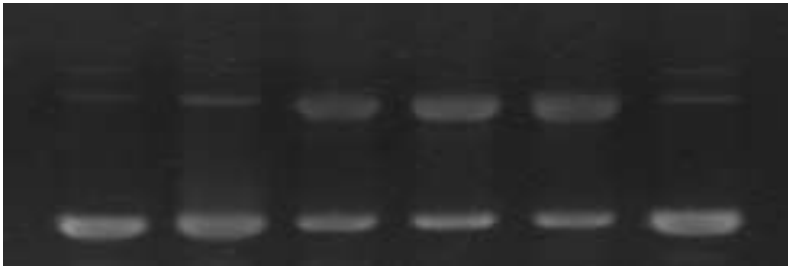
- 1) V mikrozkušavce smícháme
 - 5μl DNA
 - 2μl fosfátového pufru
 - 2μl 1% DMS
 - 11μl H₂O
- 2) Pro negativní kontrolu připravíme stejnou směs, roztok DMS nahradíme dest. vodou
- 3) Směs necháme inkubovat 30min při 37°C
- 4) Do obou zkumavek přidáme 5μl 3M octanu sodného a 80 μl 96% ethanolu
- 5) Zkušavky necháme inkubovat 20min na -80°C
- 6) Centrifugujeme 30min při 14500 x g
- 7) Odpipetujeme obsah zkumavky a necháme minutu schnout dnem vzhůru na filtračním papíru (ubrousku)
- 8) Přidáme 80 μl 70% ethanolu a centrifugujeme 15min při 14500 x g

- 9) Odpipetujeme obsah zkumavky, necháme minutu schnout dnem vzhůru a vložíme na 5min do exikátoru
- 10) Do obou zkumavek přidáme 30 μ l dest. vody, chvíli protřepeme na vortexu

Body 4-10 slouží k tzv. srážení DNA, pomocí tohoto postupu se DNA v organickém prostředí usadí jako sraženina na dně zkumavky a zbytek reakční směsi je odstraněn. V tomto případě provádíme srážení, abychom si byli jisti, že z reakční směsi odstraníme nezreagovaný DMS, který by mohl inhibovat činnost reparačních enzymů, které použijeme v dalším kroku.

- 11) Z obou zkumavek odebereme 15 μ l směsi a přeneseme do dvou čistých eppendorfek
- 12) K oběma novým zkumavkám přidáme 2 μ l pufru pro Endo III a 3 μ l roztoku enzymu (naředěného na koncentraci 1u/ μ l)
- 13) Směs necháme inkubovat 30min při 37°C
- 14) Připravíme si 1% agarozový gel
- 15) Ke směsím přidáme vždy 1/6 objemu nanášecího pufru
- 16) Nanese tak, aby dvojice vzorků (s enzymem a bez enzymu) byly na gelu vedle sebe.

1 2 3 4 5 6



Obr.2: Detekce modifikace bazí za využití Endo III – dráhy 1) Kontrolní DNA 2) DNA + 0.1%DMS 3) DNA + 0.1%DMS + 1U EndoIII 4) DNA + 0.1%DMS+3U EndoIII 5) DNA + 0.1%DMS + 5U Endo III 6) DNA + 5U Endo III

Mutagenese řízená oligonukleotidem

Metody místně řízené mutagenese nám dovolují zavést *in vitro* mutaci přímo do zvoleného místa. S rozvinutím těchto metod již nejsme odkázáni na náhodnou tvorbu mutantů a jejich zdoluhavé testování, zda se mutace nachází ve zvoleném místě.

Místně řízenou mutagenesi lze provádět několika způsoby. Můžeme např. z DNA restričních endonukleáz vyštěpit určitý úsek a ten nahradit uměle připraveným úsekem s mutací v požadovaném místě. Další možností je využít skutečnosti, že při nižší teplotě spolu hybridizují i nukleové kyseliny, které v malém procentu nukleotidů nejsou spolu komplementární. Při tomto způsobu použijeme dostatečně dlouhý oligonukleotid, který obsahuje požadovanou mutaci a ten necháme hybridizovat s jednořetězcovou DNA obsahující cílové místo pro oligonukleotid. Oligonukleotid slouží jako promer pro dosyntetizování druhého řetězce vektoru. Tím máme mutaci zavedenou do jednoho vlákna, které je třeba izolovat a použít pro syntézu vlákna komplementárního. Tento způsob se často používá v případě, že vektorová DNA je odvozena od fága M13, jehož DNA se v závislosti na životním cyklu fága nachází v jednořetězcové nebo dvouřetězcové formě.

Druhý způsob mutagenese lze v některých případech značně zjednodušit a zavést mutaci do obou vláken současně. Postup je následující: K plasmidové DNA přidáme dvojici komplementárních oligonukleotidů, které obsahují mutaci v požadovaném místě a s těmito oligonukleotidy, které slouží jako primery, provedeme PCR, při které je hybridizační teplota snížena tak, aby se oligonukleotidy vázaly na patřičná místa plasmidu. K syntéze dostatečného množství DNA s mutací zcela postačuje 12-15 cyklů. Po skončení PCR máme ve směsi (1) DNA obsahující oba původní řetězce, (2) hybridní DNA s jedním řetězcem původním a druhým řetězcem syntetizovaným ve zkumavce a obsahujícím mutaci a konečně (3) molekuly DNA, jejichž oba řetězce obsahují požadovanou mutaci. Nyní potřebujeme rozlišit a oddělit molekuly (1) a (2) od molekul (3). To provedeme zcela jednoduše přidáním restriční endonukleázy *DpnI*. Restriční endonukleáza *DpnI* štěpí uvnitř čtyřnukleotidové sekvence 5'-Gm⁶ATC-3'. Je specifická pro metylovanou a hemimetylovanou DNA. Protože DNA syntetizovaná pomocí PCR neobsahuje žádné metylované adeniny, degraduje *DpnI* specificky pouze ty molekuly, které obsahují aspoň jedno vlákno původní, tj. bez mutace. Molekuly DNA s oběma mutovanými řetězci štěpeny nebudou. Tím je zajištěno, že pro transformaci buněk budou použity a v buňkách se budou ampolifikovat pouze plasmidové molekuly obsahující mutaci.

Princip metody je znázorněn na obr. 1.

Krok 1
Příprava plasmidu



Krok 2
PCR s mutagenními primery



Mutagenní primery



Krok 3
Štěpení mateřské (původní, nemutované) plasmidové DNA



Mutovaný plasmid
(obsahuje nikované kružnicové řetězce)

Krok 4
Transformace mutovaného plasmidu do bakteriálních buněk



Obr. 1: Postup při mutagenезi řízené oligonukleotidem

Pracovní postup:

Místně řízenou mutagenезi provedeme v restriční místě pro *EcoRI*.

PŮVODNÍ SEKVENCE:

5'-GCT TGA TAT CGA **ATT** CCT GCA GCC CGG GGG-3'

3'-CGA ACT ATA GCT **TAA** GGA CGT CGG GCC CCC-5'

MUTOVANÁ SEKVENCE:

5'-GCT TGA TAT CGA **AGT** CCT GCA GCC CGG GGG-3'

3'-CGA ACT ATA GCT **TCA** GGA CGT CGG GCC CCC-5'

1. Pro PCR připravíme podle tabulky sadu zkumavek, které se budou lišit množstvím templátové DNA:

Vzorek č.: Pozn.	1	2	3	4
Plasmid (10 µg/ml)	0,5	1	2	5
Mutagenní primer SDM (10 µM)	1,5	1,5	1,5	1,5
Mutagenní primer SDM-com (10 µM)	1,5	1,5	1,5	1,5
Směs dNTP (10 mM)	1	1	1	1
10 x reakční pufr	5	5	5	5
dest. voda	40,5	49	39	36

2. Do všech zkumavek přidáme 1 µl Pfu DNA polymerázy (2-3 U/ µl).
3. Na PCR termocyklu nastavíme následující parametry pro amplifikaci:
Krok 1 – denaturace: 95°C 30 sec 1 cyklus
Krok 2 – amplifikace: 95°C 30 sec
55°C 1 minuta
68°C 3 minuty (1 minuta/kb délky plasmidu)
12 cyklů
4. Po skončení amplifikace umístíme zkumavky na dvě minuty do ledové lázně, abychom reakční směs ochladili na ≤37°C.
5. Přidáme 1 µl restriční endonukleázy *DpnI* (10 U/µl) přímo do každé zkumavky s amplifikovaným plasmidem. Jemně, ale pečlivě promícháme špičkou reakční směs (nevortexujeme).
6. Stočíme reakční směs v mikrocentrifuze 1 minutu a vložíme zkumavky do termostatu na 37°C na 1 hodinu. *DpnI* rozštěpí původní (nemutovanou) DNA, ale ne amplifikovanou DNA. Důvodem je, že původní DNA, izolovaná z bakterií, je v cílových místech pro *DpnI* (Gm⁶ATC) metylována (postreplikační modifikace), což je nezbytné pro rozpoznání a štěpení dané sekvence. DNA syntetizovaná polymerázovou řetězovou reakcí metylace postrádá.
7. Opatrně rozmrazíme kompetentní buňky v ledu. Pro každou kontrolu nebo vzorek pro transformaci použijeme alikvot 40 µl ve vychlazené 1,5 ml zkumavce.

8. Přeneseme 1 μ l DNA z každého vzorku do oddělených alikvotů kompetentních buněk. Jemně transformační reakce promícháme a inkubujeme v ledu 30 minut.
9. Zkumavky vložíme na 45-60 sekund do lázně vyhřáté na 42°C a potom je umístíme na 2 minuty do ledu.
10. Přidáme 250 μ l LB (SOC) média vytemperovaného na 42°C a za mírného třepání (225-250 rpm) inkubujeme při 37°C po dobu 1 hodiny.
11. Na agarovou plotnu s ampicilínem nanese 250 μ l transformovaných buněk a inkubujeme při 37°C po dobu \geq 16 hodin.

Izolace a ověření účinnosti mutagenese:

Ověřit účinnost mutagenese můžeme několika způsoby. Nejpřesnější způsob je sekvenace DNA v místě předpokládané mutace. To je však náročné buď na vybavení nebo čas, případně obojí. Abychom šetřili materiál a finance, nejdříve provedeme selekci vzorků a z nich osekvenujeme (příp. necháme sekvenovat) pouze ty, u nichž předběžné testy poskytly pozitivní výsledek.

Pokud mutagenese proběhla v místě rozpoznávaném a štěpeném restriční endonukleázou, lze mutaci detekovat štěpením izolované DNA příslušnou restriktázou. Změna v cílovém místě se projeví změnou štěpení danou restriktázou. Obdobně můžeme restriktázu použít i v případě, že mutací vzniklo nové restriční místo.

Další možností je provést PCR kolonií se specifickými primery.

Izolace plasmidové DNA pomocí centrifugačních kolonek

Princip:

Pro izolaci plasmidové DNA je možné použít nejen kolonky, u kterých je k přečištění a uvolnění zachycené plasmidové DNA využíváno přirozené gravitační pole. Na trhu jsou k dispozici izolační kity, které využívají odstředivou sílu vznikající při centrifugami. Princip izolace je obdobný jako v případě gravitačních kolonek. Použití vyššího přetížení nám však umožňuje zkrátit čas potřebný pro izolaci na 20-30min. Na druhé straně centrifugační kolonky mají nižší kapacitu, izolací proto získáme menší množství DNA.















Pracovní postup:

1. Z agarové plotny přeneseme pomocí sterilní špičky (mikrobiologické kličky, párátko) dobře narostlou kolonii do 3 ml LB média s ampicilinem. Inkubujeme ~ 3 hodiny při 37°C za mírného třepání.
2. V centrifuze stočíme 1-5 ml bakteriální kultury kultivované v LB médiu. Centrifugami provádíme 30 sekund při 11 000 x g. Odstraníme supernatant, pokud možno kompletně.
3. Přidáme 250 µl pufru A1. Resuspendujeme buněčný pelet na vortexu. Pro účinnou izolaci je nutné, aby v suspenzi nezůstaly viditelné shluky buněk.
Přidáme 250 µl pufru A2. Promícháme převrácením zkumavky dnem vzhůru a zpět 6-8x. Nevortexujeme! Inkubujeme při pokojové teplotě 5 min.
Přidáme 300 µl pufru A3. Opět jemně zamícháme převrácením zkumavky (6-8x). Nevortexujeme!
4. Centrifugujeme 5 – 10 min při 11 000 x g při pokojové teplotě.
5. Vložíme NucleoSpin®Plasmid kolonu do 2 ml sběrné zkumavky a nanese supernatant z bodu 3 na kolonu. Centrifugujeme 1 min při 11 000 x g. Odstraníme proteklý roztok.
6. Vložíme NucleoSpin®Plasmid kolonu zpět do sběrné zkumavky a přidáme 600 µl pufru A4. Centrifugujeme 1 min při 11 000 x g. Rostok prošlý kolonou odstraníme.
7. Abychom dostatečně vysušili membránu, na které je plasmidová DNA navázána, vložíme NucleoSpin®Plasmid kolonu zpět do prázdné sběrné zkumavky a centrifugujeme další 2 min při 11 000 x g. Tento krok zabezpečí odstranění zbytků etanolu, který je součástí promývacího pufru A4. Etanol může inhibovat enzymatické reakce, ke kterým může být izolovaná DNA použita.
8. Vložíme NucleoSpin®Plasmid kolonu do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a přidáme 50 µl pufru AE. Inkubujeme 1 min při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min při 11 000 x g.
Opakováním tohoto kroku můžeme dosáhnout zvýšení výtěžku o 15-20%. Eluce může být prováděna destilovanou vodou nebo TE pufrem.

Plasmid DNA Purification

Mini

NucleoSpin®
Plasmid

1	Cultivate and harvest bacterial cells	 			30 s 11,000 x g
2	Cell lysis	 	Buffer A1	250 µl	
			Buffer A2	250 µl	
			Buffer A3	300 µl	
3	Clarification of lysate	 			5 - 10 min 11,000 x g
4	Bind DNA	 		load supernatant	1 min 11,000 x g
5	Wash silica membrane	 	(optional: Buffer AW 500 µl)	Buffer A4 600 µl	1 min 11,000 x g
6	Dry silica membrane	 			2 min 11,000 x g
7	Elute highly pure DNA	 		50 µl buffer AE	RT 1 min 1 min 11,000 x g

Obr. 2: Izolace plasmidové DNA pomocí centrifugačních kolonek

Ověření mutageneze:

Plasmid budeme štěpit restriční endonukleázou EcoRI. Jako kontrolu vezmeme původní plasmid, který jsme použili pro mutagenezi. Výsledky restričního štěpení nanese na 1% agarosový gel. Původní DNA by měla být převedena z sc formy na lineární formu, mutovaný plasmid by restriční endonukleázou neměl být štěpen (mutace proběhla v cílovém místě pro EcoRI).

- 1) Do mikrozkušavky napipetujeme 3 μl naizolovaného plasmidu (cca 0,5 μg), přidáme 2 μl 10x koncentrovaného pufru pro EcoRI, destilovanou vodu a EcoRI (cca 1-2 U). Výsledný objem činí 20 μl . Jako kontrolní vzorek použijeme plasmidovou DNA s původní nemutovanou sekvencí.
- 2) Vzorky vložíme do termostatu na 37°C a necháme 60 minut inkubovat.
- 3) Mezitím si připravíme 1% agarosový gel v 1x TAE. Po vychladnutí gel zalijeme elektroforetickým pufrům (1x TAE).
- 4) Vzorky vyjmeme z termostatu, přidáme k nim 4 μl 6x koncentrovaného nanášecího pufru. Na gel nanese po 10 μl .
- 5) Elektroforézu provádíme 60 minut při 120 V.
- 6) Po skončení elektroforézy gel obarvíme v roztoku ethidiumbromidu (rukavice!), promyjeme v destilované vodě a zdokumentujeme na dokumentačním systému.
- 7) Porovnáme výsledky štěpení mutovaných vzorků se vzorkem kontrolním.

Příprava kompetentních buněk a transformace plasmidové DNA do bakterií

Princip:

V laboratoři často nastává situace, kdy je třeba uměle upravenou DNA vpravit do bakteriálních buněk, kde se pomnoží. Bylo vypracováno několik technik, které se liší použitými pufrů, způsobem přenosu DNA do buněk a v neposlední řadě i účinností.

Nejčastěji používanou technikou je transformace. Ta vyžaduje tzv. kompetentní buňky, které se připravují inkubací bakteriálních buněk v přítomnosti např. vápenatých iontů při 0°C. Po krátkém zahřátí na 42°C DNA vstupuje do bakterií.

Další metodou je elektroporace, při které je roztok, v němž jsou bakterie spolu s DNA, vystaven krátkému elektrickému impulsu o vysokém napětí. Impuls vytvoří v bakteriální stěně póry, kterými se DNA dostane dovnitř buněk.

Materiál:

- plotny s narostlými koloniemi bakteriálního kmene, který chceme použít k transformaci
- 0,1 M CaCl₂
- MgCl₂-CaCl₂ (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂)
- LB médium (případně SOB)
- SOC médium
- agarové plotny s SOB médiem, 20 mM MgSO₄, selekčním antibiotikem
- centrifuga
- sterilní polypropylenové kyvety 50 ml
- sterilní mikrozkušavky
- vodní lázeň 42°C
- termostat 37°C
- pipety
- rukavice
- sterilní špičky

Pracovní postup:

a) příprava kompetentních buněk kalciovou metodou

- 1) Z agarové plotny setřeme oddělenou, dobře narostlou kolonii a přeneseme ji do 100 ml LB média. Inkubujeme kulturu při 37°C do dobu 2-3 hodin za intenzivního třepání. Nádoba, ve které kultivace probíhá, má mít objem minimálně 5 x větší než je objem média.
- 2) Přelijeme bakteriální kulturu do sterilních vychlezených 50 ml velkých polypropylenových zkumavek. Uložením kultury do ledové lázně na 10 minut ji vychladíme na 0°C.
- 3) Centrifugací při 4000 rpm a 4°C po dobu 10 minut shromáždíme bakteriální buňky na dně centrifugační kyvety.
- 4) Opatrně slijeme supernatant. Postavíme kyvety dnem vzhůru na filtrační papír nebo buničinu a necháme je v této poloze 1 minutu, abychom se zbavili posledních zbytků kultivačního media.
- 5) Bakterie v každé 50 ml kyvetě resuspendujeme jemným třepáním v 30 ml vychlazeného (0°C) roztoku MgCl₂-CaCl₂.
- 6) Zkušavky vložíme na 10 minut do ledové lázně.

- 7) Centrifugujeme při 4000 rpm, 4°C po dobu 10 minut.
- 8) Slijeme supernatant z kyvet. Obrátíme zkumavky dnem vzhůru a postavíme je na filtrační papír nebo buničinu. V této poloze je necháme po dobu 1 minuty, aby vytekly zbytky supernatantu.
- 9) Pelet v každé kyvetě resuspendujeme ve 2 ml 0,1 M CaCl₂ vychlazeného v ledové lázni.
- 10) Bakterie v CaCl₂ rozdělíme po 50-200 µl do sterilních mikrozskumavek. Jednotlivé alikvoty můžeme použít přímo k transformaci nebo je můžeme zamrazit na -70°C. Pokud s buňkami nemůžeme pracovat ihned, můžeme je v tomto stadiu 1-2 dny uchovávat při 4°C. Účinnost transformace u těchto buněk během 12-24 hodin vzroste 4-6 x, potom se vrací na svou původní hodnotu.

b) transformace bakteriálních buněk

- 1) K 200 µl bakterií ve vychlazeném 0,1 M CaCl₂ přidáme DNA (maximálně 50 ng v objemu 10 µl nebo menším). Jemně zamícháme a inkubujeme 30 minut v ledu.
- 2) Přeneseme zkumavky do vodní lázně temperované na 42°C. Ponecháme je v lázni přesně 90 sekund.

Teplotní šok je kritický krok celého postupu. Pro účinnou transformaci je třeba dodržet co možná přesně teplotu i čas. Při kratších časech je účinnost transformace snížena, při delších časech nastává odumírání bakterií.
- 3) Rychle přeneseme zkumavky zpět do ledové lázně na 1-2 minuty.
- 4) Do každé mikrozskumavky přidáme 800 µl SOB média. Vzorky inkubujeme 45 minut při 37°C, abychom bakteriím umožnili se vzpamatovat a obnovit svou bakteriální stěnu.
- 5) Na agarovou plotnu obsahující SOB médium s 20 mM MgCl₂ a antibiotikem, proti němuž transformací bakterie získaly resistenci, vysejeme 100-200 µl transformovaných kompetentních buněk. Kulturu pomocí sterilní, zahnuté skleněné tyčinky rovnoměrně rozetřeme po celém povrchu plotny.
- 6) Plotny ponecháme při pokojové teplotě, dokud není veškerá kapalina absorbována.
- 7) Obrátíme plotny dnem vzhůru a inkubujeme při 37°C. Kolonie transformovaných bakterií se objeví za 12-16 hodin.

Pozn.: Jak příprava kompetentních buněk, tak transformace musí probíhat sterilním způsobem, aby nedošlo ke kontaminaci.

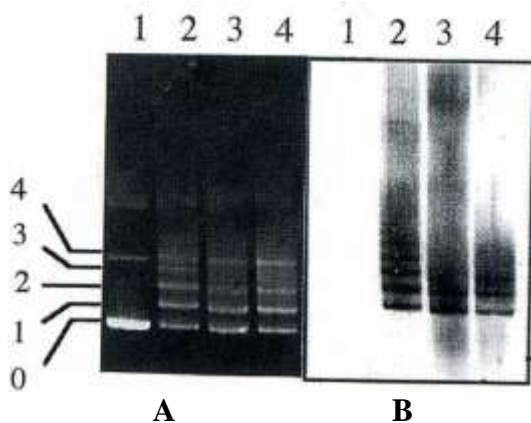
Interakce DNA-protein

Princip:

Genetická informace je v buňkách uložena v DNA, k replikaci DNA a exprese genů je kromě DNA zapotřebí molekul, jejichž funkce spočívá v realizaci těchto pochodů na základě informace obsažených v DNA. Realizátory replikace DNA a exprese genů jsou proteiny, které se vážou na DNA, replikují ji, přepisují jednotlivé geny, odbourávají nukleové kyseliny, opravují poškozené úseky, svou vazbou aktivují nebo deaktivují specifické oblasti DNA, účastní se regulace buněčného cyklu apod.

Abychom byli schopni porozumět účasti a role specifických proteinů v buněčných procesech, je nezbytné poznat a pochopit mechanismy interakce těchto proteinů s nukleovými kyselinami. Účelem prováděných experimentů je identifikovat sekvenci a strukturu oblastí DNA, ke kterým se daný protein váže, specifikovat vazebné domény proteinu, pomocí nichž dochází k vazbě na DNA, poznat podmínky *in vitro* a *in situ*, které jsou vyžadovány pro vznik účinné vazby.

Kromě jiných způsobů můžeme interakci DNA-protein zkoumat pomocí gelové elektroforézy nebo tzv. „footprintingu“. V prvním případě do reakční směsi k testované DNA přidáme zkoumaný protein, necháme inkubovat a na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu zjišťujeme, zda se mezi použitou DNA a proteinem vytvořila dostatečně pevná vazba. Interakce se projeví snížením elektroforetické mobility komplexu DNA-protein ve srovnání s mobilitou samotné DNA. Jde tedy o detekci interakce na úrovni celé molekuly DNA, význam této metody spočívá v testování, zda použitá DNA obsahuje sekvenci nebo strukturu nezbytnou pro vazbu proteinu, můžeme ji použít ke stanovení ostatních faktorů nezbytných pro vazbu proteinu na DNA, např. pH, iontová síla, přítomnost nebo absence specifických iontů, oxidačně-redukční stav proteinu, specifické modifikace aminokyselin v proteinu, vazba mutantních proteinů apod.



Obr.11.1: (A) Agarosový gel ukazující vazbu proteinu p53 na superhelikální DNA. V dráze jedna je kontrola - DNA bez proteinu p53, dráhy 2-4 zobrazují komplexy DNA-p53 za různých experimentálních podmínek. Vazba proteinu p53 na DNA se projeví snížením elektroforetické pohyblivosti DNA. Více elektroforetických proužků v drahách je způsobeno vazbou různého množství molekul proteinu p53 na molekulu DNA.

(B) Imunologické vyhodnocení experimentu po přenesení proteinu p53 z gelu na membránu.

Materiál a chemikálie:

- DNA
- Protein p53
- vazebný pufr
- ledová lázeň
- Agarosa
- 0,33 x TBE
- elektroforetická aparatura
- zdroj napětí
- mikrokumavky, špičky, pipety

Pracovní postup: vazba proteinu p53 na superhelikální DNA a lineární DNA

1. Do zkumavky napipetujeme 0,2 μg DNA, 2 μl 10 x koncentrovaného vazebného pufru a 0,1 μg proteinu p53. Vodou doplníme na objem 20 μl .
2. Vzorky necháme 20 minut inkubovat v ledové lázni.
3. Ke vzorkům přidáme 4 μl 6 x koncentrovaného nanášecího pufru a nanese na 1 % agarosový gel s 0,33 x BBE puftrem.
4. Gelovou elektroforezu provádíme ve vychlazeném pufru. Podmínky elektroforézy: 0,33 x TBE, 4°C, 120 V, 3 hodiny.
5. Po skončení elektroforézy gel obarvíme v roztoku EtBr o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$, vymyjeme EtBr nenavázaný na DNA a zobrazíme pod UV světlem.
6. Výsledky zaznamenáme a uložíme v dokumentačním systému.
7. Po vyfocení gel použijeme pro vakuový proteinový přenos na nitrocelulosovou membránu.