

Skrypt do ćwiczeń

Biologia Molekularna Roślin



Pracownia Biologii Molekularnej Roślin
UW/IBB PAN

Warszawa, 2002

Spis treści

Komputerowa analiza sekwencji.....	6
Izolacja plazmidowego DNA z bakterii.	6
Enzymy restrykcyjne. Mapy restrykcyjne.....	8
Izolacja DNA z żelu agarozowego.....	9
Ligacja DNA.....	10
Transformacja roślin.....	11
Otrzymywanie DNA z roślin.....	12
Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR.....	13
Hybrydyzacja kwasów nukleinowych metodą Southerna.....	14
Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS.....	15
Western.....	17
Detekcja GUSa.....	18

WPROWADZENIE

Tegoroczne ćwiczenia pomyślane są jako całościowy eksperyment. Mamy nadzieję że taki układ ćwiczeń pozwoli wam lepiej poznać praktyczne zastosowania omawianych technik biologii molekularnej.

Ćwiczenia oparte będą na analizie genu AtSWI3B (At2G33610) Jest to jedno z białek którego badaniem zajmuje się nasza pracownia. Białko to jest składnikiem chromatyny, a jego funkcja nie jest do końca poznana. Mutacje w genie kodującym to białko są letalne w *Arabidopsis*.

Większość proponowanych przez nas w tym roku ćwiczeń da się wpisać w schemat eksperymentu mającego na celu analizę promotora genu AtSWI3B przy zastosowaniu genu reporterowego GUS (patrz schemat 1). Eksperyment taki pozwala poznać wzór ekspresji badanego genu, to znaczy zobaczyć w jakich częściach rośliny nasze białko występuje. Informacja taka jest bardzo istotna dla planowania dalszych eksperymentów. Wynik takiego eksperymentu często pozwala postawić hipotezę na temat funkcji badanego białka. Na przykład jeżeli nasze białko pojawia się dopiero w starzejących roślinach to możemy wnioskować, że odpowiada ono za kontrole starzenia roślin.

Podobne wyniki można także uzyskać stosując inne metody, jak northern czy ilościowy RT-PCR. Każda z tych metod ma swoje wady i zalety. Analiza za pomocą genu reporterowego GUS ma następujące zalety:

- jest stosunkowo prosta,
- jest bardzo czuła,
- pozwala jednocześnie analizować ekspresję danego genu zarówno na poziomie całej rośliny jak i tkankowym,
- pozwala na łatwą analizę ekspresji w różnych warunkach fizjologicznych.

Główną wadą tej metody jest to że analizujemy najczęściej sam promotor bez enhancera, 3'UTRa i innych elementów regulatorowych np. położonych w intronach.

Eksperyment nasz można podzielić na kilka etapów przedstawionych na schemacie 1.

Na **pierwszych** ćwiczeniach spróbujemy zidentyfikować *in silico* promotor genu AtSWI3B i zaprojektować jego przeklonowanie z plazmidu pAtSWI3B do plazmidu pCAM1381Z. W celu uzyskania plazmidu pAtSWI3B::GUS. W dalszej części ćwiczenia zajmiemy się trochę samym genem AtSWI3B. Poszukamy znanych homologów z innych organizmów – być może o którymś wiadomo coś więcej.

Spróbujemy także scharakteryzować domeny tego białka. Zrobimy analizę filogenetyczną rodziny białek typu SWI3 z *Arabidopsis thaliana*.

Na **drugich** ćwiczeniach wyizolujemy z bakterii plazmid pAtSWI3B niosący sklonowany promotor genu AtSWI3B oraz plazmid pCAM1381Z. Za pomocą zaplanowanych na poprzednich ćwiczeniach

enzymów restrykcyjnych z uzyskanego plazmidu pAtSWI3B wytrawimy promotor AtSWI3B oraz zlinearyzujemy plazmid pCAM1381Z.

W trakcie **trzecich** ćwiczeń wyizolujemy z żelu i zligujemy (połączymy) zlinearyzowany plazmid z promotorem AtSWI3B. Następnie stransformujemy mieszaniną ligacyjną bakterie *Escherichia coli*.

Na kolejnych **czwartych** ćwiczeniach będziemy transformować rośliny *Arabidopsis thaliana* uzyskanym uprzednio plazmidem *via Agrobacterium tumefaciens*.

Uzyskane z transformacji nasiona wysiejemy na pożywkę z odpowiednim antybiotykiem, co pozwoli wyselekcjonować rośliny transgeniczne. Następnym etapem naszego eksperymentu będzie potwierdzenie transgeniczności uzyskanych roślin. W tym celu na **piątym** ćwiczeniu wyizolujemy DNA genomowe z uzyskanych roślin. Posłuży ono (ćwiczenie **szóste**) do potwierdzenia transgeniczności metodą PCR.

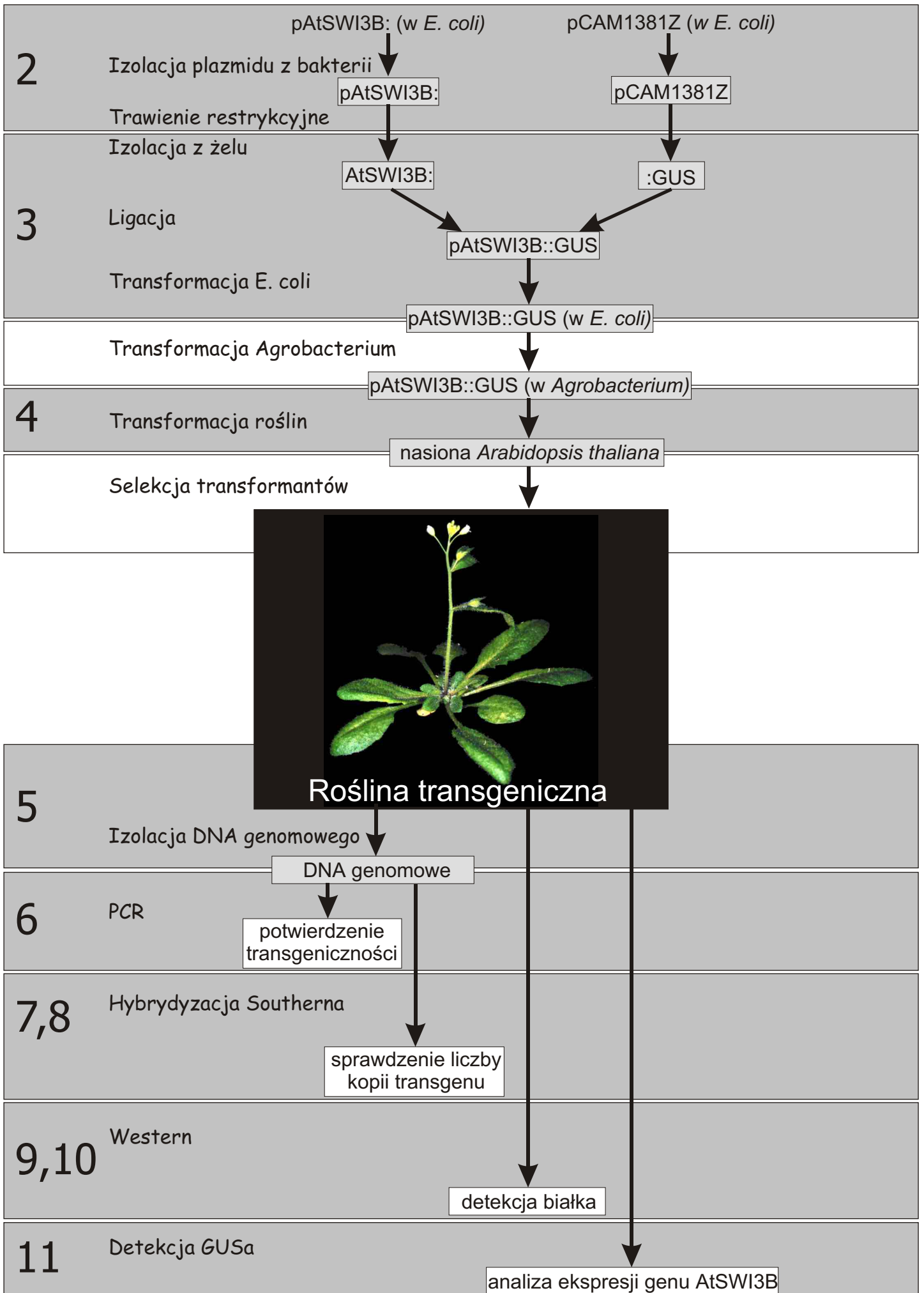
Następnym etapem naszych ćwiczeń będzie analiza uzyskanych roślin za pomocą techniki hybrydacji Southerna (ćwiczenia **siódme** i **ósme**). Technika ta pozwala nie tylko na potwierdzenie lub wykluczenie transgeniczności badanej rośliny ale pozwala także ustalić, liczbę kopii transgenów wintegrowanych w genom naszej rośliny transgenicznej.

Na ćwiczeniach **dziewiątych** i **dziesiątych** wyizolujemy białka z *Arabidopsis* i rozdzielimy w żelu oraz zrobimy western używając przeciwciał skierowanych przeciwko białku AtSWI3B.

Na ćwiczeniach **jedenastych** przeprowadzimy detekcje GUSa w wytypowanych roślinach transgenicznych. Detekcja ta polega na barwieniu histochemicznym z użyciem odpowiednich substratów. Barwienie to przeprowadzimy na całych roślinach. Zapoznamy się również z podstawami analizy fenotypu *Arabidopsis*. Jest to bardzo potężne narzędzie poznawania funkcji badanego genu, niestety rzadko doceniane.

Dwunaste ćwiczenie będzie przeznaczone na podsumowanie całego eksperymentu.

Prosimy, aby w czasie ćwiczeń każdy prowadził dziennik laboratoryjny i notował w nim wszystkie wykonywane czynności oraz uzyskane wyniki. Notatki te posłużą do napisania krótkiego opisu przeprowadzonego eksperymentu.



KOMPUTEROWA ANALIZA SEKWENCJI

Współczesna biologia dostarcza ogromnej ilości informacji, których przechowywanie i obróbka możliwa jest wyłącznie przy pomocy komputerów. Najistotniejszym obecnie narzędziem jest przeszukiwanie publicznych baz sekwencji DNA i białkowych. Bazy te zawierają wszystkie opublikowane sekwencje w tym te pochodzące z projektów sekwencjonowania genomów. Przeszukanie baz sekwencji pozwala na stawianie hipotez na temat funkcji nowo sklonowanego genu. Przeszukiwanie bazy sekwencji polega na porównaniu zadanej sekwencji ze wszystkimi w bazie i wybraniu grupy najpodobniejszych. Istnieje wiele algorytmów porównujących, spośród których najpowszechniej stosowane są BLAST (szybki, ale mało czuły) oraz FASTA (wolniejszy i bardziej czuły).

Wielu informacji może dostarczyć analiza samej sekwencji. Istnieją narzędzia pozwalające na identyfikację domen białkowych w sekwencji. Potężnym narzędziem jest analiza filogenetyczna.

Eksperyment na którym oparte są nasze tegoroczne ćwiczenia polega na analizie promotora genu AtSWI3B. Niestety analiza komputerowa promotorów jest bardzo skomplikowana i mało miarodajna. Dlatego sekwencje promotora zanalizujemy tylko pod kontem przeklonowania promotora do konstruktu z sekwencją kodującą genu GUS. Następnie spróbujemy powiedzieć coś o funkcji genu AtSWI3B analizując jego domeny i robiąc wstępną analizę filogenetyczną.

Wykonanie:

1. odnalezienie promotora genu AtSWI3B w bazie danych GenBank.
 - arete.ibb.waw.pl wybrać „GenBank DNA sequences”
 - wpisać „accession number” naszego genu (AT2G33610)
 - wybrać pozycje zawierającą chromosom z naszym genem,
 - zanalizować dokładnie rejon przed miejscem inicjacji translacji naszego genu i okoliczne sekwencje kodujące.
2. planowanie ligacji
 - zrobić mapę restrykcyjną znalezionego promotora
 - zrobić mapę restrykcyjną plazmidu docelowego pCAMBIA-1381Z (jego sekwencje ściągnąć w opisany wyżej sposób z GenBanku) w tym celu wkleić znalezione sekwencje (po jednej) w okienko na stronie <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html> (nie zmieniać parametrów programu)
 - zanalizować wyniki przeszukiwań, wybrać enzymy do użycia przy przeklonowaniu
3. analiza genu AtSWI3B
 - połączyć się z serwisem BLASTP – przeszukiwanie bazy białek sekwencją białkową (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), wkleić sekwencję w przeznaczonym do tego polu, rozpocząć przeszukiwanie
 - dokładnie przeanalizować kilka najpodobniejszych białek, zwrócić uwagę na wielkość i jakość podobieństwa sekwencji, ustalić przypuszczalną funkcję genu
 - na stronie <http://smart.embl-heidelberg.de/> wkleić sekwencję genu AtSWI3B do okienka i rozpocząć analizę
 - połączyć się z serwisem DART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), wkleić sekwencję

w przeznaczonym do tego polu, rozpocząć przeszukiwanie,

- sprawdzić, jakie domeny obecne są w zadanej sekwencji, przyjrzeć się genom o podobnym układzie domen,
- 4. analiza filogenetyczna
 - jeszcze raz przeszukać GenBank przy użyciu programu BlastP wybierając tym razem w polu “select from:” “Arabidopsis thaliana”.
 - kilka sekwencji znalezionych w punkcie pierwszym zapisać w jednym pliku w formacie Fasta
 - otworzyć plik z sekwencjami w programie ClustalX (dostępny z <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/>)
 - stworzyć multiple alignment
 - obliczyć drzewo filogenetyczne sekwencji
 - obejrzeć drzewo programem NJplot
 - dokładnie przeanalizować otrzymane drzewo pamiętając, że jest to drzewo nie ukorzenione

IZOLACJA PLAZMIDOWEGO DNA BAKTERII

Opracowano szereg metod oczyszczania plazmidowego DNA, z których każda obejmuje trzy etapy:

- hodowlę bakterii (i ewentualnie amplifikację plazmidu),
- lizę bakterii,
- oczyszczanie plazmidowego DNA.

Plazmidy izoluje się najczęściej z hodowli płynnych, w których podłoże uzupełnione jest odpowiednim antybiotykiem. Wysokopijne wektory plazmidowe (np. serii pUC), otrzymywane są z hodowli znajdującej się w późnej fazie logarytmicznej wzrostu, podczas gdy wektory nisko- i średniopijne (np. pBR322) powinny być przed izolacją amplifikowane. Do częściowo wyrośniętej hodowli dodaje się w tym celu chloramfenikol, który selektywnie zapobiega replikacji chromosomu bakteryjnego.

We wszystkich metodach izolacji plazmidowego DNA wykorzystuje się dwie istotne różnice pomiędzy DNA genomowym a DNA plazmidowym bakterii:

- DNA genomowy jest wielokrotnie większy od DNA plazmidu,
- podczas procedury izolacji DNA plazmidowego DNA genomowy zostaje trwale zniszczony, podczas gdy DNA plazmidowy pozostaje w postaci form CCC (ang. *covalently closed circle*).

Odwirowane komórki bakteryjne poddawane są lizie. Bakterie ulegają lizie pod wpływem niejonowych lub jonowych detergentów (SDS, Sarkozyl, Triton X-100), rozpuszczalników organicznych, roztworów alkalicznych (liza alkaliczna) lub wysokiej temperatury (liza termiczna). Stosowany może być również lizozym - enzym trawiący ścianę komórkową bakterii (nie działa w pH<8.0). W metodzie lizy alkalicznej bufor o wysokim pH zawierający NaOH i SDS powoduje całkowitą lizę komórki jak również denaturację genomowego DNA, natomiast plazmidowy DNA w formie CCC zostaje zdenaturowany jedynie na niewielkich odcinkach. W przypadku otrzymywania plazmidowego DNA metodą termiczną, czynnikiem denaturującym jest wysoka temperatura, w której DNA genomowy i plazmidowy zachowują się podobnie jak w wysokim pH.

Następny etap oczyszczania DNA polega na oddzieleniu DNA od białek. Zwykle stosuje się do tego celu nasycony buforem roztwór fenolu lub jego mieszaninę z chloroformem.

mem i alkoholem izoamylowym. Białka można również usunąć przez trawienie ich proteinazami (zwykle proteinazą K). Usunięcie RNA przeprowadza się enzymatycznie, inkubując próbki z RNazą (wolną od DNaz), przez sączenie molekularne lub wirowanie w gradiencie gęstości (*patrz dalej*). W metodzie lizy alkalicznej, kiedy liniowe cząsteczki DNA ulegają denaturacji, natomiast superzwinięte formy CCC plazmidu są po denaturacji nadal splecione, neutralizacja pH roztworami o wysokim stężeniu soli (np. octan amonu) prowadzi do renaturacji jedynie DNA plazmidowego, podczas gdy DNA genomowy wraz z RNA i białkami wytrąca się w postaci serowatego osadu.

Z odbiałczonych próbek DNA wytrącany jest alkoholem etylowym lub izopropanolem w obecności octanu potasowego, sodowego lub amonowego.

Wszystkie metody otrzymywania plazmidowego DNA, z wyjątkiem lizy alkalicznej, wymagają oddzielenia tego DNA od DNA genomowego w gradiencie chlorku cezu w obecności bromku etydyliny. Wykorzystuje się tu fakt, że bromek etydyliny intensywniej interkaluje do zdenaturowanego DNA genomowego niż do DNA plazmidowego, powodując częściowe rozwiniecie helisy DNA i wydłużenie cząsteczki, co powoduje zmniejszenie jej gęstości plawnej. Różnica w gęstości pomiędzy formą CCC a liniową i kolistą OC (ang. *open circle*) wynosi około 0.04 g/ml i jest wystarczająca do oddzielenia superzwiniętego DNA podczas wirowania w gradiencie gęstości chlorku cezu w obecności bromku etydyliny. Pasma superzwiniętego DNA układają się poniżej pasma utworzonego przez liniowe fragmenty chromosomowego DNA oraz formy liniowej i OC plazmidu. Cząsteczki RNA mają największą gęstość i zbierają się na dnie próbki wirowniczej, zaś białka pozostają w górnej warstwie roztworu.

Oczyszczanie plazmidowego DNA przeprowadzić można również metodą wirowania lizatów komórkowych w gradiencie alkalicznej sacharozy (w środowisku alkalicznym formy liniowe i OC ulegają rozdzielaniu na pojedyncze nici i sedimentują 3-4 razy wolniej niż niezdenaturowana superzwinięta forma CCC), stosując wymiennicze jonowe (np. kolumnienki *Qiagen*) lub filtrację na żelach.

Otrzymywanie DNA plazmidowego na małą skalę (minilizaty)

Odczynniki i aparatura:

- pożywka LBamp płynna
- pożywka LBamp stała
- RNaza (10 mg/ml)
- roztwór I: 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM glukoza, 10 mM EDTA
- roztwór II: 0.2 M NaOH, 1 % SDS (przygotować tuż przed użyciem)
- roztwór III: 7.5 M octan amonu
- etanol 96 %
- etanol 70 %
- bufor TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)
- agarozą,
- bromek etydyliny (10 mg/ml),
- bufor TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA),
- barwnik do elektroforezy,
- próbki szklane (10 ml),
- próbki Eppendorfa,
- mikrowirówka,
- SpeedVac,

- aparat do elektroforezy.

Wykonanie:

- poprzedniego dnia, bakterie z wybranych kolonii bakteryjnych zaszczyć do 3 ml pożywki płynnej LBamp. Hodować przez noc w 37°C, z wytrząsaniem,
- rozlać hodowlę bakteryjną do probówek Eppendorfa i zwirować bakterie w mikrowirówce przez 1 minutę (2 x 1.5 ml),
- odsączyć pipetą pożywkę do sucha,
- zawiesić osad końcówką do pipety w 100 ul roztworu I, dodać 5 ul RNazy,
- inkubować przez 5 minut w temperaturze pokojowej,
- do próbki Eppendorfa dodać 200 ul świeżo przygotowanego roztworu II,
- zamieszać BARDZO delikatnie i wstawić do lodu na 5 minut,
- dodać 150 ul zimnego (z lodówki) roztworu III, dwukrotnie BARDZO SILNIE wstrząsnąć i wstawić do lodu na 10 minut,
- zwirować 15 minut,
- zebrać klarowny supernatant (można zwirować go powtórnie),
- dodać 900 ul etanolu 96 % i inkubować co najmniej 20 minut w temperaturze -20°C,
- zwirować 15-20 minut w mikrowirówce,
- zlać etanol, osad przemyć 1 ml etanolu 70 %, zwirować,
- wysuszyć na SpeedVacu (do 5 minut),
- osad zawiesić w 50 ul buforu TE
- przygotować 0.8 % żel agarozowy w buforze TBE (dodać bromku etydyliny do stężenia 0.5 ug/ml),
- nanieść na żel 5 ul preparatu z 1 ul barwnika do elektroforezy,
- prowadzić elektroforezę w buforze TBE przy napięciu nie przekraczającym 5 V/cm,
- sfotografować żel na transiluminatorze w świetle UV (ocenić jakość i ilość DNA w preparacie).

Bardzo szybka metoda otrzymywania DNA plazmidowego bakterii (UWAGA! Metoda nie używana na ćwiczeniach)

Odczynniki i aparatura:

- pożywka LBamp stała,
- roztwór I: 9 objętości barwnika do elektroforezy + 11 objętości wody + 40 objętości mieszaniny 0.2 M NaOH i 1 % SDS (przygotować tuż przed użyciem),
- roztwór II: 3 M octan potasu, 1.8 M kwas mrówkowy,
- agarozą,
- bufor TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA),
- bromek etydyliny (10 mg/ml),
- barwnik do elektroforezy,
- próbki Eppendorfa,
- mikrowirówka,
- aparat do elektroforezy.

Wykonanie:

- wybrane kolonie przeszczyć na szalkę LBamp. Hodować przez noc w 37°C,
- odpipetować do probówek Eppendorfa po 16 ul roztworu I,
- zebrać końcówką do pipety połowę kolonii i zawiesić w przygotowanym roztworze I,

- dodać 3 ul roztworu II,
- zwirować 5 minut w mikrowirówce,
- supernatant nanieść bezpośrednio na 1% żel agarozowy (bufor TBE, bromek etydyny w żelu: stężenie końcowe 0.5 ug/ml),
- prowadzić elektroforezę w buforze TBE przy napięciu nie przekraczającym 5 V/cm,
- sfotografować żel na transiluminatorze w świetle UV.

Uwaga! Bromku etydyny należy dodawać w rękawiczkach !

Uwaga! Należy przestrzegać zasad pracy z transiluminatorem !

ENZYMY RESTRYKCYJNE. MAPY RESTRYKCYJNE

Enzymy restrykcyjne (ang. *restriction enzymes*) są enzymami izolowanymi z bakterii, zdolnymi do rozpoznawania specyficznych sekwencji w DNA i przecinania dwuniciowej cząsteczki DNA. Enzymy restrykcyjne typu II wymagają jako substratu dwuniciowej cząsteczki DNA, zawierającej co najmniej jedną sekwencję rozpoznawaną przez dany enzym, oraz jonów magnezu. DNA zostaje przecięte w obrębie lub w okolicy sekwencji rozpoznawanej.

Większość enzymów restrykcyjnych typu II rozpoznaje palindromowe (posiadające oś symetrii) sekwencje cztero- lub sześci nukleotydowe (tzw. enzymy czwórkowe lub szóstkowe). Nacięcia w obu niciach mogą leżeć naprzeciwko siebie i wówczas powstają tzw. "tępe końce", np. enzym *HaeIII* z *Haemophilus aegypticus* rozpoznaje i przecina następującą sekwencję:

5' GGCC 3'
3' CCGG 5'

w wyniku czego powstają "tępe końce":

5' GG i CC 3'
3' CC i GG 5'

Z kolei enzym *EcoRI* ze szczepu *E.coli* RY13 rozpoznaje sześci nukleotydową sekwencję:

5' GAATTC 3'
3' CTTAAG 5'

przecinając obie nici DNA tak, że powstają tzw. "lepkie końce" w postaci jednoniciowych czteronukleotydowych końców 5':

5' G i AATTC 3'
3' CTTAA G 5'

Niektóre enzymy produkują "lepkie końce" 3'. Wszystkie natomiast pozostawiają grupę fosforanową na końcu 5', a grupę hydroksylową na końcu 3'.

"Lepkie końce" mają duże znaczenie przy klonowaniu genów: sekwencje "lepkich końców" powstałych w wyniku działania tego samego enzymu są komplementarne. W obecności enzymu ligazy można takie cząsteczki ponownie połączyć ze sobą kowalencyjnie.

Nazewnictwo enzymów restrykcyjnych opiera się na literowych skrótach, w których pierwsza litera pochodzi od rodzaju bakterii, a druga i trzecia od gatunku. Następna litera oznacza szczep lub typ, a kolejne enzymy z danego typu lub szczepu otrzymują liczby rzymskie.

Enzymy pochodzące z różnych szczepów, ale rozpoznające te same sekwencje DNA, nazywają się **izoschizomerami**.

Zdarza się, że dwa enzymy wytwarzają takie same "lepkie końce", mimo że rozpoznają różne sekwencje DNA. Enzym

BamHI produkuje końce GATCC (rozpoznaje sekwencję GGATCC), zaś enzym *BglII*, wytwarzający takie same "lepkie końce", rozpoznaje sekwencję AGATCT. Umożliwia to klonowanie DNA strawionego *BamHI* w wektorze strawionym *BglII*, ale sklonowany odcinek DNA nie będzie mógł być wycinany enzymem *BglII* ani *BamHI*.

Do pojedynczej reakcji trawienia używa się zwykle 0.2 - 1 ug DNA w roztworze o objętości 20 ul lub mniejszej. Bufory do trawień przygotowuje się w postaci 10-krotnie stężonych roztworów różniących się między sobą zawartością soli. Jeżeli DNA ma być strawiony dwoma enzymami wymagającymi różnych buforów, najpierw przeprowadza się trawienie w buforze o niższej soli, a następnie podwyższa się stężenie soli w mieszaninie przez dodanie odpowiedniej objętości stężonego NaCl.

Incubację preparatów DNA z enzymami restrykcyjnymi prowadzi się w temperaturze 37°C w czasie 1 godziny lub dłużej. Przerwanie reakcji (zwykle niekonieczne) można przeprowadzić przez termiczną inaktywację enzymu (15 minut, 65°C) lub dodając EDTA pH 8.0 do końcowego stężenia 10 mM (chelatacja jonów magnezu).

Źródłem informacji o enzymach restrykcyjnych (ich termostabilności i wymaganiach co do stężenia soli) są katalogi firm produkujących te enzymy (np. *New England Biolabs*, *Promega*).

Jednostka enzymu restrykcyjnego to taka jego ilość, która trawi kompletnie 1 ug DNA wzorcowego (np. *fa* λ) w czasie 1 godziny w temperaturze optymalnej.

Podstawową cechą produktów trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi jest to, że otrzymywane fragmenty DNA dają się rozdzielić na żelach w taki sposób, że w każdym prążku na żelu znajdują się cząsteczki DNA o tej samej masie. Fakt ten pozwala na precyzyjną obróbkę DNA, m.in. konstruowanie **map restrykcyjnych** badanego DNA (mapa restrykcyjna wskazuje miejsca cięte przez enzymy restrykcyjne). Analizując na żelach produkty trawienia danego DNA różnymi enzymami restrykcyjnymi, stosowanymi pojedynczo i w kombinacjach, można ustalić wzajemne położenie i odległości pomiędzy sekwencjami rozpoznawanymi przez te enzymy. Oprócz tego, DNA pocięty enzymami restrykcyjnymi można poddawać ligacji z wektorem i tworzyć zrekombinowane (zawierające sklonowany DNA) plazmidy.

Sporządzanie mapy restrykcyjnej plazmidu poprzedzone jest kalibracją żelu. Przeprowadza się ją w oparciu o zasadę, że droga migracji liniowej cząsteczki DNA w żelu agarozowym jest odwrotnie proporcjonalna do logarytmu dziesiętnego jej masy cząsteczkowej. Aby wyznaczyć wielkość nieznanych fragmentów DNA, stosuje się standardy wielkości (cząsteczki DNA o znanej wielkości, poddawane elektroforezie w tym samym żelu co cząsteczki badane).

Trawienie plazmidów *pAtSWI3B* oraz *pCAM1381Z* enzymami restrykcyjnymi oraz sporządzenie mapy restrykcyjnej.

Odczynniki i aparatura:

- plazmidy *pATSWI3B* i *pCAM1381Z* o stężeniu ok. 1 mg/ml,
- standard wielkości DNA,
- enzymy *EcoRI* i *BamHI*
- bufony do trawień,

- agaroz,
- bromek etydyny (10 mg/ml),
- bufor TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA),
- barwnik do elektroforezy,
- probówki Eppendorfa,
- mikrowirówka,
- łaźnia wodna na 37°C,
- aparat do elektroforezy.

Wykonanie:

- strawić DNA plazmidowy enzymami *EcoRI* i *BamHI* pojedynczo i w kombinacjach,
- przygotować 1% żel agarozowy w buforze TBE (dodać bromku etydyny do żelu do stężenia 0.5 ug/ml)
- do strawionych próbek oraz do markera wielkości DNA dodać 1/10 objętości barwnika do elektroforezy,
- nanieść próbki na żel przy pomocy pipety automatycznej (Uwaga! Minimalna ilość DNA, którą widać na żelu w postaci prążka, wynosi około 10 ng. Nie należy przekraczać 200 ng DNA w prążku),
- prowadzić elektroforezę w buforze TBE przy napięciu nie przekraczającym 5 V/cm,
- sfotografować żel na transiluminatorze w świetle UV,
- wyciąć z żelu prążek DNA i zamrozić go w - 20° C,
- wykresić na papierze półlogarytmicznym krzywą kalibracyjną żelu,
- oszacować na podstawie krzywej wielkości trawionych fragmentów DNA i narysować mapę restrykcyjną plazmidu.

Uwaga! Bromku etydyny należy dodawać w rękawiczkach !

Uwaga! Należy przestrzegać zasad pracy z transiluminatorem !

IZOLACJA DNA Z ŻELU AGAROWEGO

Procedura klonowania genów wymaga umiejętności oczyszczania cząsteczek DNA o ściśle określonej wielkości. W tym celu przeprowadza się elektroforezę w żelu agarozowym, wycina prążek o odpowiedniej mobilności i następnie oczyszcza DNA od agarozu.

Żel agarozowy zawiera substancje mogące negatywnie wpływać na reakcje enzymatyczne z udziałem DNA, dlatego skuteczność oczyszczenia ma kluczowe znaczenie dla powodzenia przeprowadzanych później manipulacji. Szczególnie wrażliwe na zanieczyszczenia są ligacja i sekwencjonowanie DNA.

Istnieje wiele sposobów izolacji DNA z żelu agarozowego. Najskuteczniejsze wydają się zestawy oferowane przez dostawców materiałów laboratoryjnych. Działają one najczęściej według następującego schematu: rozpuszczenie żelu, adsorbacja DNA, przemywanie, elucja DNA. Można również izolować DNA z żelu bez wykorzystania kosztownych zestawów przy użyciu DEAE-celulozy lub elektroelucji do woreczków dializacyjnych.

Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego za pomocą komercyjnego zestawu

Odczynniki i aparatura:

- aparat do elektroforezy

- zestaw do izolacji DNA z żelu
- łaźnia wodna lub heat-block
- skalpel
- mikrowirówka
- agaroz
- bufor TBE (45mM Tris-boran, 1mM EDTA)
- bromek etydyny 10 mg/ml
- izopropanol
- etanol 96%
- barwnik do elektroforezy

Wykonanie:

- przygotować 1% żel agarozowy z 0,5µg/ml bromku etydyny, nałożyć DNA zmieszane z barwnikiem, prowadzić elektroforezę aż prążki należycie się rozdziela,
- na transiluminatorze skalpelem wyciąć kawałek żelu zawierający odpowiedni prążek,
- izolację z żelu przeprowadzić ściśle według zaleceń producenta zestawu,
- sprawdzić skuteczność izolacji puszczając część oczyszczonego preparatu na żelu agarozowym.

Izolacja fragmentu DNA z użyciem DEAE-celulozy

Metoda izolowania DNA z użyciem DEAE-celulozy polega na "złapaniu" migrującego w żelu DNA na umieszczonej w żelu membranę z DEAE-celulozą. Membranę z DNA odplukuje się od zanieczyszczeń buforem o niskiej sile jonowej, a następnie eluuje się DNA (bufor o wysokiej sile jonowej). DNA o długości od 500 bp do 5 kb odzyskiwane jest z dużą wydajnością, a jego czystość jest bardzo wysoka. Z membran nie eluuje się jednak jednonicjowe DNA (*ssDNA*) oraz fragmenty powyżej 15 kb.

Odczynniki i aparatura:

- DNA do izolacji,
- papierki z DEAE-celulozą (preparat handlowy),
- 10 mM EDTA (pH 8.0),
- 0.5 M NaOH,
- agaroz,
- bufor TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA),
- bromek etydyny (10 mg/ml),
- barwnik do elektroforezy,
- bufor A: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA (pH 8.0),
- bufor B: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.0 M NaCl, 10 mM EDTA (pH 8.0),
- mieszanina fenol : chloroform : alkohol izoamylowy (25:24:1) pH 8.0,
- 3 M octan sodu,
- etanol 96 %,
- etanol 70 %,
- bufor TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA),
- aparat do elektroforezy,
- skalpel lub żyłotka,
- probówki Eppendorfa,
- łaźnia wodna lub heat-block na 65°C,
- mikrowstrząsarka Vortex,
- mikrowirówka.

Wykonanie:

- pasek z DEAE-celulozą zanurzyć na 5 minut w roztworze 10 mM EDTA (pH 8.0),

- pasek przenieść na 5 minut do roztworu 0.5 M NaOH,
- przepłukać 6-krotnie sterylną bidestylowaną wodą (*tak przygotowana DEAE-celuloza może być przechowywana w lodówce w sterylnej wodzie przez kilka tygodni*),
- przygotować żel agarozowy w buforze TBE (dodać bromku etydyny do stężenia 0.5 ug/ml), prowadzić elektroforezę do czasu, gdy prążek DNA, który ma być izolowany, stanie się widoczny,
- używając ostrego skalpela lub żyłki, naciąć agarozę tuż przed prążkiem DNA, który ma być izolowany; nacięcie powinno być szersze niż prążek o około 2mm z obu stron,
- umieścić w nacięciu papierek z DEAE-celulozą tak, aby nie znalazły się razem z nim pęcherze powietrza,
- kontynuować elektroforezę (5 V/cm) do czasu, aż całe izolowane DNA znajdzie się na papierku,
- zatrzymać elektroforezę, wyjąć papierek i przepłukać w 5 - 10 ml buforu A,
- przenieść papierek do eppendorfówki i dodać buforu B tak, aby papierek był całkowicie przykryty,
- wstawić próbkę na 30 minut do 65°C,
- zwirować 5 minut, supernatant przenieść do nowej próbki,
- do papierka dodać drugą objętość buforu B i inkubować kolejne 15 minut w 65°C,
- połączyć ze sobą dwie objętości buforu B, dodać równą objętość mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy, zamieszać na vortexie, zwirować 5 minut,
- przenieść fazę wodną (górną) do nowej próbki,
- dodać 1/10 objętości 3 M octanu sodu i 2.5 objętości zimnego etanolu 96 %, wstawić do -20°C na 15 do 30 minut,
- zwirować co najmniej 15 minut w mikrowirówce,
- osad przemyć 70 % etanolem, wysuszyć i zawiesić w buforze TE,
- sprawdzić ilość odzyskanego DNA na żelu agarozowym.

Elektroelucja do woreczków dializacyjnych

Elektroelucja do woreczków dializacyjnych jest najmniej wygodną ze stosowanych technik, ale okazała się najefektywniejsza w izolowaniu dużych fragmentów DNA (powyżej 5 kb), mało wydajnie izolowanych innymi metodami.

Odczynniki i aparatura:

- woreczki dializacyjne przygotowany w następujący sposób: gotować woreczki 10 minut w dużej objętości NaHCO₃ i 1 mM EDTA (pH 8.0), przepłukać wodą bidestylowaną, gotować 10 minut w 1 mM EDTA (pH 8.0), schłodzić (*tak przygotowane woreczki mogą być przechowywane w lodówce w sterylnej wodzie przez kilka tygodni*),
- agarozę,
- bufor TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA),
- bromek etydyny (10 mg/ml),
- barwnik do elektroforezy,
- 3 M octan sodu,
- etanol 96 %,
- etanol 70 %,
- bufor TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA),
- aparat do elektroforezy,
- skalpel lub żyłka,
- próbki Eppendorfa,
- mikrowirówka.

Wykonanie:

- przygotować żel agarozowy w buforze TBE (dodać bromku etydyny do stężenia 0.5 ug/ml), prowadzić elektroforezę do czasu, gdy prążek DNA, który ma być izolowany, stanie się widoczny,
- używając ostrego skalpela lub żyłki, wyciąć z żelu prążek DNA, które ma być izolowany,
- umieścić fragment agarozy w woreczku dializacyjnym w jak najmniejszej objętości buforu 0.5 x TBE i zamknąć woreczek tak, aby nie pozostały w środku pęcherze powietrza,
- umieścić tak przygotowany woreczek w aparacie do elektroforezy i prowadzić elektroforezę przy napięciu 5 V/cm,
- po 1 godzinie odwrócić bieguny i prowadzić elektroforezę przez około 1 minutę (uwolnienie DNA ze ścian woreczka),
- otworzyć woreczek, wyjąć fragment agarozy i starannie przenieść bufor do próbki Eppendorfa,
- woreczek przemyć małą ilością buforu 0.5 x TBE i przenieść bufor do próbki Eppendorfa,
- dodać 1/10 objętości 3 M octanu sodu i 2.5 objętości zimnego etanolu 96 %, wstawić do -20°C na 15 - 30 minut,
- zwirować co najmniej 15 minut w mikrowirówce,
- osad przemyć 70 % etanolem, wysuszyć i zawiesić w buforze TE,
- sprawdzić ilość odzyskanego DNA na żelu agarozowym.

LIGACJA DNA

Łączenie (ligacja) cząsteczek DNA jest jedną z podstawowych technik biologii molekularnej. Ligacja DNA jest reakcją enzymatyczną. Reakcja ta jest bardzo wrażliwa na błędy, na tym właśnie etapie klonowania genów ujawniają się wszelkie popełnione wcześniej pomyłki.

Warunki w jakich przeprowadza się reakcję ligacji zależą przede wszystkim od tego czy łączy się lepkie czy tępe końce DNA. W zależności od potrzeb można zmieniać temperaturę i czas trwania reakcji oraz stężenie łączonego DNA.

Jeśli produktem ligacji jest plazmid, mieszaniną ligacyjną bezpośrednio transformuje się bakterie. Wynikiem są wtedy kolonie bakterii noszących zamknięty plazmid. Transformuje się bakterie *Escherichia coli*. Zawsze należy sprawdzić poprawność ligacji trawieniem restrykcyjnym lub sekwencjonowaniem.

Odczynniki i aparatura:

- łaźnia wodna lub termostat,
- elektroporator,
- kuwety do elektroporacji,
- ligaza DNA,
- bakterie elektrokompetentne,
- pożywka LB płynna,
- szalki z pożywką LB z odpowiednim antybiotykiem,
- 0,5M EDTA pH 8
- woda sterylna,

Wykonanie:

- przygotować reakcję mieszając wodę, bufor ligazy (dostarczany zawsze z ligazą), DNA i ligazę; przygotować również kontrolę bez ligazy,
- prowadzić reakcję przez 60 minut w 23°C,

- inkubować mieszaninę 10 minut w 65°C i dializować na krążku przez 20 minut
- połowę mieszaniny ligacyjnej zmieszać ze 100µl wody i dodać do 40µl bakterii elektokompetentnych,
- transformować bakterie w elektroporatorze (2500V, 5mA), bezpośrednio potem dodać 700µl pożywki LB bez antybiotyków i inkubować w 37°C przez 45 lub 90 minut w zależności od oporności jaką niesie plazmid,
- wysiać bakterie na szalki z pożywką LB z odpowiednim antybiotykiem i hodować przez noc w 37°C.

TRANSFORMACJA ROŚLIN

Wprowadzenie obcego DNA do genomu organizmów jest niezwykle istotne zarówno w celach poznawczych, jak i użytkowych. Rośliny niezwykle trudno poddają się procedurze transformacji z powodu obecności ścian komórkowych oraz aktywnych mechanizmów obronnych.

Istnieją bezpośrednie techniki transformacji polegające na fizycznym umieszczeniu obcego DNA w komórce roślinnej (na przykład strzelba genowa). Obecnie stosowane są one tylko w sytuacjach szczególnych.

Najpowszechniej stosowana jest technika transformacji roślin przy pomocy bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Bakterie te występują naturalnie w glebie i pasożytują na roślinach. Wykorzystując naturalnie posiadaną zdolność transformacji roślin, wprowadza do genomu żywiciela geny odpowiedzialne za syntezę substancji, które stanowią później pożywienie bakterii.

Aby wykorzystać *Agrobacterium* do transformacji roślin wybraną przez nas sekwencją DNA, wystarczy obszar naturalnie wprowadzany do roślin podstawić naszą sekwencją. Istnieją specjalne plazmidy, do których wlgowuje się żadaną sekwencję. Konstrukt taki wprowadza się następnie do odpowiedniego szczepu *Agrobacterium* i bez żadnych dalszych manipulacji można transformować rośliny.

Istotnym elementem procedury transformacji jest odróżnienie komórek transformowanych od nie transformowanych i następnie odtworzenie całej rośliny. Komórki transformowane odróżnia się przez selekcję na antybiotyku. Dlatego transformując zawsze trzeba wprowadzać gen oporności na antybiotyki. Odtworzenie całej rośliny odbywa się przez regenerację z kallusa lub embriogenezę somatyczną. Procedura regeneracji nie dość że jest długotrwała i trudna, to często powoduje powstawanie nie zamierzonych zaburzeń genetycznych. Dla tego obecnie najpowszechniej stosuje się technikę transformacji *in planta* w której transformacji ulega gametofit. Procedura polega na zanurzeniu kwiatów w zawiesinie bakterii. Wśród uzyskanych z tych kwiatów nasion pewna część jest transgeniczna, selekcji dokonuje się kielkując nasiona na pożywce z antybiotykiem.

W czasie ćwiczeń transformować będziemy *Arabidopsis thaliana* otrzymanym przez nas plazmidem pAtSWI3B::GUS.

Transformacja Arabidopsis thaliana metodą in planta

Odczynniki i aparatura:

- komora fitotronowa,
- hodowla nocna *Agrobacterium*

- wirówka,
- próbówki wirówkowe,
- roztwór do infiltracji (0,5x sole MS; 1x witaminy B5; 5% sacharoza; 0,05% MES; 44mg/l BAP; 0,02% Silwet L-77; pH 5,7)
- eksykator i pompa próżniowa,
- folia spożywcza
- szalki z pożywką MS z kanamycyną (100 mg/l) i wankomycyną (500 mg/l)

Uwaga! Należy przestrzegać zasad pracy z organizmami transgenicznymi.

Wykonanie

- hodować *Arabidopsis thaliana* w fotoperiodzie 8/16h dzień/noc z regularnym nawożeniem aż wykształcą się duże rozetki,
- przenieść do fotoperiodu 16h/8h dzień/noc i hodować aż pojawią się kwiatostany,
- uciąć kwiatostany i hodować aż boczne kwiatostany będą miały długość 5 do 10 cm,
- 200 ml hodowli nocnej *Agrobacterium tumefaciens* zwirować w 5000 rpm przez 10 min., zawiesić w 200 ml roztworu do infiltracji,
- zanurzyć kwiatostany w zawiesinie bakterii,
- umieścić w ekcykatorze i poddać działaniu próżni przez 2 minuty,
- przez noc trzymać rośliny w ciemności przykryte folią,
- hodować w fotoperiodzie 16h/8h aż luszczynki zaczną się otwierać,
- wstrzymać podlewanie i zbierać nasiona,
- nasiona wysuszyć trzymając w suchym pomieszczeniu przez tydzień i następnie trzymać przez tydzień w 4°C,
- wysiać na pożywkę MS kan van.

Wersja uproszczona

- hodować *Arabidopsis thaliana* z regularnym nawożeniem do momentu zakwitnięcia,
- 200 ml hodowli nocnej *Agrobacterium tumefaciens* zwirować w 5000 rpm przez 10 min., zawiesić w 200 ml 5% sacharozy i dodać 60 µl Silwet L-77,
- zanurzyć kwiatostany w zawiesinie bakterii na około 10 sekund,
- przez noc trzymać rośliny w ciemności przykryte folią,
- hodować aż luszczynki zaczną się otwierać,
- wstrzymać podlewanie i zbierać nasiona,
- nasiona wysuszyć trzymając w suchym pomieszczeniu przez tydzień i następnie trzymać przez tydzień w 4°C,
- wysiać na pożywkę MS kan van.

Transformacja siewek tytoniu

Odczynniki i aparatura:

- komora fitotronowa,
- hodowla nocna *Agrobacterium*
- wirówka,
- próbówki wirówkowe,
- 10mM MgSO₄
- sterylne 2-3 tygodniowe siewki tytoniu,
- eksykator i pompa próżniowa,
- sterylna bibuła i pęseta,
- pożywka MS,
- pożywka MS z claforanem (500 mg/l), kanamycyną (100 mg/l) i hormonami (1 mg/l BAP; 0,1 mg/l NAA),

-pożywka MS claf kan.

Wykonanie

- 30 ml nocnej hodowli *Agrobacterium* wirować 5000 rpm przez 10 min.,
- zawiesić w 20 ml 10mM MgSO₄, płukanie powtórzyć dwa razy,
- siewki tytoniu zalać zawiesiną bakteryjną,
- zaaplikować próżnię przez 5 minut,
- rośliny odsączyć od bakterii na sterylnej bibule i rozłożyć na szalce z pożywką MS na 3 dni (kokultywacja w 26°C, fotoperiod 16h/8h dzień/noc),
- roślinki przenieść na pożywkę MS z dodatkiem hormonów i antybiotyków
- hodowlę prowadzić w warunkach podanych wyżej, eksplantaty przenosić na nowe podłoże co 7 dni,
- regenerujące pędy o długości około 1 cm odcinać od kalusa i przenosić na podłoże MS z antybiotykami,
- po ukorzenieniu rośliny można przenieść do ziemi.

IZOLACJA GENOMOWEGO DNA Z ROŚLIN

Pierwszym etapem izolacji genomowego DNA z komórki roślinnej jest pozbycie się ściany komórkowej. Utarcie w moździerz, wcześniej zamrożonego w ciekłym azocie materiału roślinnego, pozwala na mechaniczne uszkodzenia ściany komórkowej. Następny etap to rozpuszczenie błon komórkowych. Detergenty takie jak SDS (sodium dodecyl sulfat) lub CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) zawarte w buforach do ekstrakcji DNA umożliwiają rozpuszczenie błon. EDTA chelatująca jony magnezu – naturalne kofaktory większości nukleaz, chroni uwolniony DNA przed działaniem endogennych enzymów o aktywności nukleolitycznej. Zwykle otrzymany preparat DNA zawiera duże ilości RNA. Aby pozbyć się zanieczyszczającego RNA preparat poddajemy trawieniu RNazą A wolną od DNaz. Jeśli uzyskany preparat zanieczyszczony jest białkami, można potraktować go proteinazą K i przeprowadzić ekstrakcję fenolem.

Otrzymany wysokocząsteczkowy całkowity DNA należy chronić przed zbyt częstym zamrażaniem i rozmrażaniem, ponieważ DNA ulega fragmentacji i preparat traci na jakości. W trakcie preparatyki najlepiej stosować odczynniki i materiały świeżo przygotowane, tak aby podczas preparatyki nie wprowadzić obcego DNA, który może przeszkadzać w dalszej analizie otrzymanego DNA (np. analiza metodą PCR może dać błędne wyniki).

Całkowity roślinny DNA otrzymamy dwoma metodami:

- z użyciem CTAB
- za pomocą zestawu firmy Sigma

Izolacja DNA metodą z CTAB

Odczynniki i aparatura:

- moździerz i tłuczek porcelanowy, probówki wirówkowe, probówki typu Corex, probówki Eppendorfa, końcówki do pipet,
- 2xCTAB (100mM Tris pH 8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA pH 8.0, 2% CTAB, 0.2% β-merkaptotanol);
- mieszanina chloroform:alkohol izoamylowy (24:1);

- izopropanol,
- roztwór II (76% etanol, 10mM octan amonu);
- TE pH 7.5 (10mM Tris, 1mM EDTA).

Wykonanie:

- 1 gram tkanki roślinnej zamrozić w ciekłym azocie i utrzyć w moździerz,
- dodać 5 ml roztworu 2xCTAB,
- próbki inkubować w 60°C przez 30 minut, w trakcie inkubacji kilkakrotnie mieszać,
- dodać równą objętość mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24:1), mieszać łagodnie przez 15 minut,
- mieszaninę przenieść do probówek typu Corex i wirować przy 10000 obrotów/min przez 15 minut w rotorze SS34 (wirówka Sorvall),
- przenieść fazę wodną do nowych probówek, dodać 0.7 objętości zimnego izopropanolu, (-20°C), mieszać bardzo delikatnie aż pojawi się wytrącony DNA,
- przenieść DNA do probówki Eppendorfa, dodać 500 µl roztworu II, pozostawić na 15 min. w lodzie,
- probówki zwirować w mikrowirówce, usunąć roztwór, osad lekko wysuszyć,
- osad zawiesić w TE pH 7.5.
- prowadzić elektroforezę przy napięciu 5V/cm, w buforze TBE, stężenie bromku etydyny powinno wynosić nie więcej niż 0.5 µg/ml żelu.

Metoda szybkiej izolacji DNA na małą skalę

Materiały:

- bibuła, probówki Eppendorfa, tłoczki do ucierania tkanek, końcówki do pipet,
- bufor do ekstrakcji (200 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS), izopropanol, etanol 70%, roztwór TE pH 7,5 (10mM Tris, 1mM EDTA)

Wykonanie:

- 100mg tkanki roślinnej (wycinamy krążek z liścia za pomocą wieczka probówki Eppendorfa, najlepiej na bibule).
- Następnie utrzyć za pomocą tłoczka na jednolitą masę ok. 15 sekund.
- Dodać 400µl buforu do ekstrakcji i mieszać na vorteksie przez 5 sekund.
- (taka mieszanina może stać 1h)
- Wirować 13000 obr/min przez 1min. (w mikrowirówce)
- Następnie przenieść 300µl supernatantu do nowej probówki i zmieszać z 300µl izopropanolu pozostawiając na 2 min w temp. pokojowej.
- (mieszać delikatnie)
- Wirować 13000 obr/min przez 5min.
- Osad płukać 70% etanolem i zwirować jak poprzednio.
- Osad wysuszyć próżniowo.
- Zawiesić osad w 100µl TE pH 7,5
- Tak otrzymane DNA można przechowywać przez 1 rok w 4°C.

AMPLIFIKACJA FRAGMENTU DNA METODĄ PCR

Technika PCR (ang. *polymerase chain reaction*), opracowana w latach 80-ych, zrewolucjonizowała genetykę molekularną, umożliwiając otrzymywanie dużej liczby kopii unikalnych fragmentów DNA bez konieczności stosowania żmudnych i długotrwałych procedur klonowania.

Metoda PCR oparta jest na replikacji DNA *in vitro*: polimeraza DNA, wykorzystując jednoniciowe DNA (ang. *single-stranded DNA*, *ssDNA*) jako matrycę do syntezy nici komplementarnej, wymaga również krótkich fragmentów dwuniciowych, aby zapoczątkować syntezę nowej nici w kierunku 5' - 3'. W praktyce laboratoryjnej jednoniciowe DNA uzyskuje się ogrzewając DNA dwuniciowe (ang. *double-stranded DNA*, *dsDNA*) do temperatury bliskiej 100°C, zaś jako startery służą dodawane oligonukleotydy (tzw. primery) wiążące się specyficznym (hybrydującym) z określonym miejscem na jednoniciowej matrycy. Oligonukleotydy (primery) hybrydują z miejscami na obydwu niciach. Dobiera się je tak, aby oskrzydlały odcinek DNA, który ma być zreplikowany.

Replikacja rozpoczyna się od primerów na każdej nici i zachodzi na obu niciach w dwóch przeciwnych kierunkach. Na nowosyntetyzowanych niciach powstają zatem nowe miejsca wiązania primerów. Po zakończeniu replikacji nici są rozdzielane (denaturacja), aby ponownie umożliwić wiązanie znajdujących się w nadmiarze primerów (tzw. *annealing*), syntezę DNA i kolejne rozdzielanie nici. Cykl taki powtarza się wielokrotnie, a po *n* cyklach otrzymuje się teoretycznie 2ⁿ dwuniciowych cząsteczek DNA będących kopiami sekwencji zawartej pomiędzy primerami.

Typowy schemat reakcji PCR jest więc szeregiem cykli złożonych z następujących etapów: 1) denaturacji DNA (2-5' 90-95°C), 2) hybrydyzacji (*annealingu*) primerów (1-2' 40-60°C), 3) elongacji (syntezy DNA)(1-3' 70-75°C). W każdym cyklu liczba cząsteczek syntetyzowanego DNA jest podwajana. Efektem replikacji DNA techniką PCR jest więc **amplifikacja** specyficznego obszaru DNA.

Amplifikacja DNA metodą PCR znajduje szereg zastosowań w diagnostyce i terapii, m.in. do mapowania mutacji, monitorowania leczenia nowotworów, wykrywania infekcji bakteryjnych i wirusowych, ustalania płci w badaniach prenatalnych i in.

PCR daje się stosunkowo łatwo zastosować jako technika laboratoryjna. Materiałem wyjściowym do amplifikacji jest DNA zawierający interesującą nas sekwencję. Ponieważ sekwencja ta określona jest przez primery użyte do reakcji, nie jest konieczne izolowanie samej sekwencji. Ilość DNA stosowanego do PCR jest bardzo mała (teoretycznie wystarczy jedna cząsteczka DNA). Do mieszaniny reakcyjnej, oprócz DNA, dodaje się nadmiar primerów (dwa rodzaje primerów określających miejsce startu replikacji na każdej nici), polimerazę DNA, odpowiedni bufor zawierający magnez oraz mieszaninę 4 prekursorów DNA, tj. dezoksyrybonukleotydów (dNTP). Powodzenie reakcji PCR wymaga właściwego doboru następujących parametrów:

1) starterów reakcji amplifikacji (primerów). Projektując startery reakcji PCR, należy je dobrać tak, aby:

- starter zawierał około 50% par GC,
- starter był wysoko specyficzny dla danej sekwencji,
- odległość między starterami w amplifikowanym DNA wynosiła 0.1 do 3 kb (o ile używana jest *Taq* polimeraza),
- startery nie tworzyły struktur typu *hairpin* lub konkatamerów,
- długość primerów wynosiła około 20-30 zasad, a temperatura ich topnienia 50-60°C,
- startery nie powinny zawierać w 3' końcowej części fragmentów komplementarnych do siebie samych oraz do drugiego startera,

2) parametrów reakcji amplifikacji (stężenia dNTP, polimerazy, starterów, magnezu). Do reakcji PCR używa się polimerazy z *Thermus aquaticus* (*Taq* polimeraza) lub inne termostabilne polimerazy DNA (np. *Pfu*, *Pwo*, *VenI*). Mają one tę przewagę nad innymi polimerazami DNA, że są stabilne nawet w 94°C (optimum temperaturowe wynosi 72°C), a więc mogą być dodane jednorazowo na samym początku reakcji PCR, nie ulegając dezaktywacji w trakcie kolejnych cykli podgrzewania,

3) warunków samej reakcji PCR (temperatury, czasu trwania cykli itp). Optymalne temperatury *annealingu* dla starterów można dobrać wykorzystując m.in. program OLIGO. Czasy i temperatury w dużym stopniu zależą od wielkości produktów otrzymywanych w procesie amplifikacji oraz sekwencji i długości starterów.

Reakcję prowadzi się w objętości 10-50 µl pod warstwą oleju parafinowego lub wosku, zapobiegającą parowaniu. Probówki z PCR umieszcza się w specjalnym aparacie (ang. *thermal cycler*), w którym programuje się czas trwania i liczbę cykli oraz temperaturę poszczególnych etapów reakcji. Zwykle stosuje się 25-35 cykli.

W ramach ćwiczeń będziemy amplifikować fragment DNA obejmujący część promotora genu *AtSWI3B* i genu *GUS*. Jako matrycy użyjemy DNA genomowe z ćwiczenia V. Jeśli powstanie produkt o odpowiedniej wielkości, będzie to pierwszy dowód na transgeniczność uzyskanych przez nas roślin.

Sekwencje starterów:

BAFprom_U: 5' CTC CTC ACC TTT TAT CTC TCC C 3'

Gus+bafl_L: 5' TGC CAG TTC AGT TCG TTG TTC 3'

Warunki reakcji PCR:

1 × 5 min. 95°C

30 × 30sec. 95°C; 30sec 53°C; 2min.10sec. 72°C

1 × 6 min. w 72°C

Odczynniki i aparatura:

- bufor do *Taq* polimerazy (10x stężony),
- primery (stężenie 50 µM),
- genomowe DNA *A.thaliana*
- mieszanina dNTP (10x stężone),
- *Taq* polimeraza (0.5 U/µl),
- standard wielkości DNA,
- agarozę,
- bufor TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA),
- bromek etydy (10 mg/ml),

- barwnik do elektroforezy,
- sterylne probówki Eppendorfa 0.5 ml,
- aparat do elektroforezy,
- aparat do PCR.

Wykonanie:

- odpipetować do probówek eppendorfa: 1×dNTP ; bufor do *Taq* (1x), starter I (0.5 μM), starter II (0.5 μM), DNA genomowe, dopełnić wodą do 45 μl, (podano stężenia końcowe),
- odpipetować do:
 - probówki kontrolnej I: wszystko oprócz starterów,
 - probówki kontrolnej II: wszystko oprócz matrycy DNA,
- dodać 2,5 U polimerazy *Taq*
- ustawić odpowiedni program
- produkt amplifikacji zanalizować na żelu agarozowym wobec standardu wielkości.

HYBRYDYZACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH METODĄ SOUTHERNA

Metoda Southern polega na hybrydyzacji wyznakowanej sondy do fragmentów DNA rozdzielonych w żelu agarozowym, a następnie przeniesionych na filtr nylonowy lub nitrocelulozowy.

W celu potwierdzenia obecności transgenu i zbadania ilości jego kopii należy strawić DNA genomowy odpowiednio dobierając enzymy restrykcyjne. Do doświadczenia wykorzystamy strawiony genomowy DNA z ćwiczenia V, oraz jako kontrolę produkt PCRu z ćwiczenia VI. W DNA genomowym znajduje się dużo miejsc rozpoznawanych przez enzym, z tego powodu należy prowadzić reakcje przez długi czas (przez noc) i przy użyciu dużej ilości enzymu.

Po rozdzielaniu na żelu, DNA zostaje zdenaturowany pod wpływem NaOH, a następnie poddaje się go działaniu roztworu neutralizującego o pH 7.4 (wysokie pH uniemożliwia wiązanie się DNA z filtrem). Następnie przenosi się fragmenty DNA z żelu na filtr, umożliwia to siła ssąca bibuły. Przeniesienie DNA z żelu na filtr nazywamy transferem. Transfer fragmentów DNA powyżej 5 tysięcy par zasad zachodzi z małą wydajnością. Aby pofragmentować DNA w żelu należy poddać je depurynacji (podać działaniu kwasu). DNA zostaje związane z filtrem przez zapiekanie w 80°C lub przez naświetlanie światłem UV.

Sondy można znakować przy użyciu różnych metod (np. PCR) i czynników znakujących. Jedną z bardziej popularnych i czułych metod jest znakowanie przy użyciu radioaktywnych nukleotydów. Na naszych ćwiczeniach użyjemy jednak metody nie radioaktywnej z wykorzystaniem digoksygeniny. Detekcja opiera się na wykorzystaniu przeciwciał skierowanych przeciw digoksygeninie. Przeciwciała są skoniugowane z enzymem (alkaliczną fosfatazą), który w wyniku reakcji daje barwny produkt.

Transfer DNA z żelu agarozowego na filtr nylonowy (Southern blot)

Materiały :

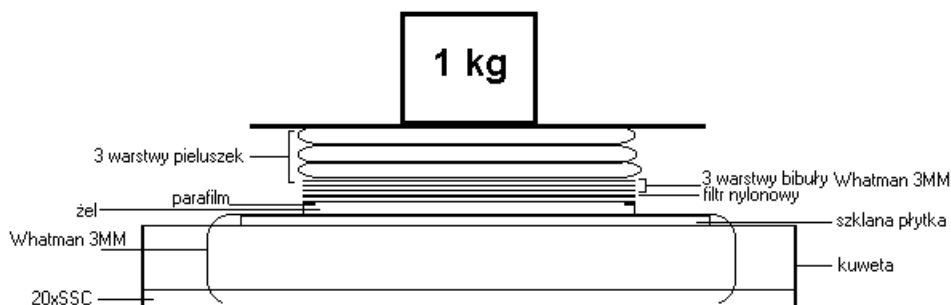
- filtr nylonowy, bibuła Whatman 3MM, szklana płytka, kuweta, folia spożywcza, pieluszki higieniczne jednorazowego użytku, parafilm.
- roztwory :

1.denaturujący	1.5M NaCl, 0.5M NaOH
2.neutralizujący	1M Tris (pH 8.0), 1.5M NaCl
3.20xSSC	3M NaCl, 0,3M cytrynian sodu, pH 7.0

Wykonanie :

- rozdzielić fragmenty DNA na żelu agarozowym, zabarwić bromkiem etydydy, przez odcięcie jednego z rogów zorientować żel, ułożyć wzdłuż ścieżek linijkę i sfotografować żel,
- żel umieścić w kuwecie z roztworem denaturującym, a kuwecę ustawić na kolysce laboratoryjnej,
- po 1 godzinie przepłukać żel wodą destylowaną i umieścić w roztworze neutralizującym na 40 minut,
- żel przepłukać wodą destylowaną i ponownie umieścić w roztworze do neutralizacji na 40 minut, - następnie przepłukać wodą destylowaną i umieścić w roztworze 20xSSC na około 15 minut.
- W trakcie neutralizacji żelu należy wyciąć filtr nylonowy i 3 kawałki bibuły Whatman 3MM o wymiarach żelu,
- filtr nylonowy wypłukać w wodzie, a następnie w roztworze 20xSSC (bibułę wystarczy zamoczyć w roztworze 20xSSC).
- na kuwecie umieścić szklaną płytkę, na której ułożyć warstwę bibuły Whatman 3MM, tak aby brzegi bibuły dotykały do dna kuwety, bibułę zmoczyć roztworem 20xSSC, tak aby między bibułą a płytką nie było pęcherzy powietrza, ten sam roztwór wlać do kuwety,
- na bibule położyć żel; pod żelem nie mogą znajdować się pęcherze powietrza; wzdłuż żelu ułożyć paski parafilmu, tak aby zachodziły na żel około 2mm,
- na żel położyć wcześniej przygotowany filtr nylonowy i 3 warstwy mokrej bibuły Whatman 3MM: **nie pozostawiać pęcherzy powietrza !**
- na bibule umieścić 2 warstwy pieluszek higienicznych i przycisnąć je 1 kg ciężarkiem; transfer prowadzić przez noc,
- usunąć górne warstwy przykrywające żel, na filtrze zaznaczyć długopisem kieszonki i odcięty róg żelu,
- wilgotny filtr położyć na transiluminatorze i zapiekać przez 2 minuty,
- filtr pozostawić do wyschnięcia.

Znakowanie sondy za pomocą DIG DNA



Labelling Kit Roche

Wykonanie

Przygotować roztwór DNA, który ma zostać wyznakowany:

3ul DNA do znakowania (0,5 – 3 ug)
12 ul wody

zdenaturować DNA (ogrzać w 100°C przez 10 minut)
wstawić do lodu na 2 minuty a następnie dodać pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej:
2ul mieszaniny heksanukleotydów
2ul mieszaniny nukleotydów zawierającej DIG-11-dUTP
1ul enzymu Klenowa

Mieszaninę inkubować w temperaturze 37°C przez 60 minut. Następnie zatrzymać reakcję dodając 2ul 0,2M EDTA (pH 8,0). Teraz należy usunąć pozostałe w reakcji w wyznakowane nukleotydy. W tym celu dodać do reakcji 1/10 objętości 4M LiCl i 3 objętości zimnego (-20°C) etanolu 96%. Wymieszać i umieścić na 30 minut w temperaturze -20°C. Zwirować w mikrowirówce przez 15 minut. Usunąć supernatant a osad przepłukać 70% etanolem, wysuszyć i zawiesić w 50ul buforu TE.

Hybrydyzacja

Jeśli sonda jest w 100% homologiczna do poszukiwanego DNA, hybrydyzację należy prowadzić w 65°C.

- prehybrydyzację prowadzić w 65°C co najmniej przez 2 godziny:

roztwór do prehybrydyzacji:
0,25M Na₂HPO₄ (pH 7,2)
1mM EDTA
20% SDS

0,5% odczynnik blokujący,

- po zakończeniu prehybrydyzacji wymienić roztwór na nową porcję zawierającą wyznakowaną sondę.

- hybrydyzację prowadzić przez noc w temperaturze 68°C,
- po hybrydyzacji płukać filtr 3 razy w temperaturze 68°C w roztworze zawierającym:

20mM Na₂HPO₄
1mM EDTA
1% SDS

-następnie przepłukać krótko w temperaturze pokojowej buforem do płukania II:

0,1M kwas maleinowy (pH 8,0)
3M NaCl
0,3% Tween20

Wywołanie

Przeciwciała skierowanie przeciwko digoksygeninie skoniugowane z alkaliczną fosfatazą rozcieńczyć w stosunku 1:10 000 w buforze blokującym (bufor do płukania II plus 0,5% odczynnik blokujący). Przygotować 10 ml powyższego roztworu na jedną membranę. Membranę inkubować przez 1 godzinę mieszając a następnie przepłukać trzy razy buforem do płukania II. Membranę zrównoważyć w buforze substratowym dla alkalicznej fosfatazy (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂). Dodać po

20ul substratów kolorymetrycznych (NBT i BCIP) do 10 ml buforu substratowego. **UWAGA – substraty są toksyczne.** Czekać na pojawienie się prążków.

ELEKTROFOREZA BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym jest techniką powszechnie stosowaną w analizie białek.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym – typ SDS PAGE służy do rozdzielania białek ze względu na ich wielkość, wykluczając inne właściwości fizykochemiczne polipeptydów.

Jeśli zrozumiesz nazwę SDS PAGE, zrozumiesz zasadę działania tej metody rozdzielania białek.

SDS

Wiadomo, że na prędkość poruszania się obiektu w środowisku wpływa zarówno jego wielkość jak i kształt. Jeśli chcemy rozdzielić mieszaninę białek, które różnią się między sobą kształtem i wielkością, przede wszystkim chcemy uzyskać warunki, w których poszczególne cząsteczki białkowe zostaną pozbawione swojej drugo-, trzecio- i czwartorzędowej struktury (chcemy, aby wszystkie polipeptydy miały ten sam liniowy kształt). Aby nadać wszystkim białkom ten sam liniowy kształt używamy SDS-u (siarczan dodecyłu sodu, ang. **Sodium Dodecyl Sulfate**). SDS jest detergentem, który rozpuszcza hydrofobowe cząsteczki i jednocześnie posiada ujemny ładunek. W związku z tym, jeśli przeprowadzimy inkubację komórki w roztworze SDS-u, błony komórkowe zostaną rozpuszczone, a zdenaturowane białka zostaną pokryte ujemnymi ładunkami. Po zadziałaniu SDS wszystkie białka będą posiadały jedynie strukturę pierwszorzędową, oraz wszystkie cząsteczki będą ujemnie naładowane, co po przyłożeniu pola elektrycznego spowoduje ich migrację w stronę dodatniego bieguna.

PAGE

Jeśli zdenaturowane białka umieścimy w polu elektrycznym wszystkie przemieszczą się w stronę dodatniego bieguna z tą samą prędkością, niezależnie od swojej wielkości.

Aby białka mogły poruszać się z prędkością zależną od wielkości cząsteczki rozdziela się je w poliakrylamidzie, który jest polimerem zbudowanym z monomerów akrylamidowych. W trakcie polimeryzacji, monomery akrylamidowe tworzą żel poliakrylamidowy, który staje się środowiskiem rozdzielania białek po przyłożeniu pola elektrycznego, stąd nazwa – ang. **PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)**. Poliakrylamid zbudowany jest z sieci labiryntów o korytarzach różnej średnicy. W tak skonstruowanym środowisku małe cząsteczki szybciej osiągną dodatni biegun niż większe cząsteczki białka.

Ten typ elektroforezy jest obecnie najczęściej stosowany i może być użyty jako oddzielna metoda analityczna lub stanowić element szeregu dalszych, bardziej skomplikowanych badań (np. elektroforeza dwuwymiarowa, preparatywna, Western blotting).

Standardowo SDS PAGE jest używana w wersji tzw. *disc electrophoresis* (ang. *discontinuous pH*), umożliwiającej maksymalne wykorzystanie zdolności rozdzielczych tej metody. W praktyce ta „nieciągłość” dotyczy zarówno żelu, który

składa się jakby z dwóch warstw, jak również buforu zastosowanego do przygotowania żelu: innego dla górnej i innego dla dolnej warstwy żelu. Próbkę nakładane na żel w tym układzie mogą mieć stosunkowo dużą objętość, ponieważ w czasie przechodzenia przez górną warstwę żelu zostają zagęszczane do wąskiego pasma, które w dolnym żelu rozdziela się na pojedyncze, „ostre” prążki.

W rzeczywistości białka rozdzielane są w SDS PAGE na zasadzie filtracji, analogicznie do metody chromatograficznej sączenia molekularnego.

Ponieważ frakcjonowanie zachodzi w zależności od długości łańcucha polipeptydowego, można ustalić masę danego białka przez porównanie z odpowiednimi standardami. Jest to metoda pozwalająca na oznaczenie masy białka z dokładnością, do 5-10%, ale niestety nie każdy polipeptyd można w ten sposób scharakteryzować (jednym z wyjątków są białka histonowe).

Ćwiczenie będzie zawierało następujące elementy:

- krótkie wprowadzenie w techniki elektroforezy białek,
- nauka wylewania żelu poliakrylamidowego,
- prosta ekstrakcja białek z materiału roślinnego,
- prowadzenie elektroforezy w układzie z SDS,
- wybarwienie części żelu po zakończeniu elektroforezy,
- wykonanie westernu z pozostałą częścią żelu.

Izolacja białek z materiału roślinnego

Metody stosowane przy izolacji i oczyszczaniu białek są bardzo różnorodne i ich wybór zależy m.in. od właściwości danego białka. Poniżej podana została procedura pozwalająca na mało selektywną ekstrakcję szeregu białek z liści roślin (tu: tytoniu).

Wykonanie

- ok. 1g liści tytoniu zamrozić w ciekłym azocie i utrzeć w mrożeniu na proszek
- proszek przenieść do zlewki na 50ml i zalać 6ml buforu 10mM Tris-Cl pH 8
- zawiesinę przenieść do homogenizatora Pottera-Elvehjema i „homogenizować” kilkakrotnie przesuując tłoczek
- z roztworu należy pobrać próbki o różnej objętości (podane poniżej) do naniesienia na żel

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać w temp. 0 do 4°C. Roztwór do homogenizacji powinien zawierać fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF) w stęż. 1mM.

Przygotowanie żelu do SDS PAGE

Roztwory potrzebne do przeprowadzenia elektroforezy:
- mieszanina monomerów (30% akrylamid, 0.8% bisakrylamid) przefiltrowana przez filtr 0.45 µm; roztwór należy przechowywać w lodówce w ciemnej butelce

Uwaga! Roztwór akrylamidu jest silną neurotoksyną!

- 1.5M Tris-Cl pH 8.8
- 0.5M Tris-Cl pH 6.8
- 10% SDS
- TEMED
- 10% nadsiarazan amonu (APS)
- bufor do elektroforezy (25mM Tris, 192mM glicyna, 0.1% SDS pH 8.3); przygotowano bufor 5×stężony

- bufor do próbek (60mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.025% Bromophenol Blue)
- roztwór do barwienia (0.2% Coomassie Brilliant Blue G-250, 40% metanol, 10% kwas octowy)
- roztwór do odbarwiania (10% metanol, 7% kwas octowy)

Wylewanie żelu

Idealnie czyste szyby należy złożyć, umieszczając między nimi przekładki (ang. spacers) o odpowiedniej grubości i uszczelnić zestaw. Szyby powinny być ściśnięte spinaczami lub umieszczone w specjalnym statywie do wylewania żeli (w zależności od zestawu).

Aby wylać żel poliakrylamidowy, należy zmieszać składniki w następujących proporcjach:

- dla 12% żelu rozdzielającego:

- 6ml mieszaniny monomerów
- 3.6ml 1.5M Tris-Cl pH 8.8
- 150µl 10% SDS
- 5.25 ml wody
- 50µl 10% APS

10µl TEMEDu (objętość końcowa ok.15ml)

Zwykle przed dodaniem katalizatorów (APS i TEMED) zaleca się odpowietrzenie mieszaniny. Roztwór APS należy przygotować na świeżo. Katalizatory dodaje się tuż przed wylaniem mieszaniny pomiędzy szyby. Od razu po dodaniu katalizatorów polimeryzacji roztwór należy wymieszać i przy pomocy pipetki nalać między szyby (pamiętając o zostawieniu miejsca na żel zatężający). Na wierzchu żelu nałożyć cienką warstwę (kilkaset µl) n-butanolu wysyconego wodą.

- dla żelu zatężającego:

- 0.65ml mieszaniny monomerów
- 1.2ml 0.5M Tris-Cl pH 6.8
- 120µl 10% SDS
- 3ml wody
- 25µl 10% APS
- 5µl TEMED (objętość końcowa ok. 5ml)

Po spolimeryzowaniu żelu rozdzielającego należy osuszyć jego górną część przy pomocy bibuły, a następnie wylać żel zatężający. Grzebień trzeba umieścić w żelu zatężającym tak, by w studzienkach nie było pęcherzyków powietrza. Żel zostawić na noc (ew.- jeśli nie mamy tyle czasu - tak długo, jak to jest możliwe)

Przed elektroforezą żel (pomiędzy szybami) umiesza się w aparacie i zalewa buforem elektrodowym. Po ostrożnym wyjęciu grzebień z żelu nie można zapomnieć o przepłukaniu studzienek i „wygonieniu” pęcherzy powietrza pomiędzy szyb w dolnej części żelu.

Przygotowanie próbek do naniesienia na żel

Wykonanie

- do ponumerowanych probówek Eppendorfa dodać ekstrakt z liści tytoniu, wodę i bufor do próbek w/g schematu:

	ekstrakt [µl]	woda [µl]	bufor [µl]	obj.calk. [µl]
1.	2	8	10	20
2.	5	5	10	20

3.	10	-	10	20
4.	20	-	20	40

- do każdej próbki dodać po 1ul 2-merkaptoetanolu
 - próbki należy zamieszać i zwirować (5 sekund) w mikrowirówce
 - inkubować preparaty przez 4 minuty w 95°C
 - nanieść próbki na żel i rozpocząć elektroforezę
- W razie potrzeby w analogiczny sposób można przygotować próbki ze standardem wielkości białek.

Elektroforeza

Warunki natężenia i napięcia, przy których prowadzona jest elektroforeza, są zależne od grubości i długości żelu oraz naszych oczekiwań co do jakości i czasu rozdzielania białek.

Zwykle zalecane jest stałe natężenie prądu w granicach 12-30 mA / 1mm grubości żelu.

Barwienie prążków na żelu

Spośród wielu metod barwienia białek po SDS PAGE wybrano najpowszechniej stosowaną (choć nie najczulszą) metodę barwienia Coomassie Brilliant Blue.

Wykonanie

- po zakończeniu elektroforezy należy rozmontować aparat i delikatnie rozdzielić szyby
- odciąć część żelu i umieścić w roztworze barwnika i zostawić na kolysce laboratoryjnej na 0.5 do 1 godziny
- po tym czasie zlać barwnik do butelki (może być używany wielokrotnie) i żel inkubować w roztworze odbarwiającym aż do uzyskania prawie przezroczystego tła i wyraźnych prążków białek
- żel po odbarwieniu może być długo przechowywany w roztworze 7% kwasu octowego

Należy pamiętać o tym, że jakość rozdzielania w SDS PAGE zależy od poprawnego i solidnego wykonania szeregu prostych czynności. Dlatego też mimo, iż technika nie jest skomplikowana, może zajmować sporo czasu, kilkakrotnie więcej niż elektroforeza agarozowa służąca do rozdzielania preparatów DNA.

WESTERN

"Western Blot" to technika wykorzystująca przeciwciała do analizy białek rozdzielonych uprzednio w żelu poliakrylamidowym. Technika Western blot jest najczęściej używana w połączeniu z metodą SDS-PAGE i opiera się na specyficznej reakcji antygeny z przeciwciałem. W metodzie tej można wyróżnić kilka etapów:

- transfer rozdzielonych w żelu białek na specjalną membranę
 - Istnieje kilka stosowanych metod transferu białek z żelu na membranę. Jedną z nich jest transfer pół-suchy (semi-dry). W metodzie tej wykorzystuje się przepływ prądu w poprzek żelu i membrany, co powoduje przejście białek z żelu i związanie na powierzchni membrany.
- blokowanie membrany
 - Etap blokowania membrany polega na zablokowaniu/wysyceniu przez dodane przez nas białko

(np.: kazeinę) wszystkich pozostałych jeszcze na membranie miejsc wiązania białka.

- inkubacja membrany z tak zwanym przeciwciałem pierwszorzędowym
 - Membranę inkubuje się z przeciwciałem pierwszorzędowym, które rozpoznaje na membranie szukane białko i przylączy się do niego.
- inkubacja membrany z tak zwanym przeciwciałem drugorzędowym
 - Membranę inkubuje się z roztworem zawierającym przeciwciała drugorzędowe które skierowane są przeciwko fragmentom stałym (Fc) przeciwciał pierwszorzędowych. Dodatkowo przeciwciała te są sprzężone z enzymem np. z alkaliczną fosfatazą, co umożliwi łatwą lokalizację powstałego kompleksu epitetop-przeciwciała pierwszorzędowe-przeciwciała drugorzędowe.
- wywołanie Westernu
 - Membranę inkubuje się z substratami dla enzymu sprzężonego z użytym przeciwciałem.

Odczynniki:

- Bufor Anodowy I (0.3 M Tris, pH 10.4, 10% (v/v) metanol),
- Bufor Anodowy II (25 mM Tris, pH 10.4, 10% (v/v) metanol),
- Bufor Katodowy (25 mM Tris, 40 mM glicyna, 10% (v/v) metanol, pH 9.4)
- bufor TBS (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl)
- Bufor substratowy (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50mM MgCl₂)
- BCIP 50mg/ml w 100% DMF
- NBT 100mg/ml w 70% DMF

Wykonanie:

UWAGA: Wszystkie czynności związane z układaniem i wywołaniem Westernu wykonujemy w rękawiczkach.

Delikatnie otworzyć szybki w których rozwijano żel, zmierzyć rozmiar części żelu rozdzielającego przeznaczonej do transferu.

Żel rozdzielający namoczyć minimum 15 minut w buforze katodowym

Wyciąć sześć kawałków bibuły Wathman 3MM i jeden kawałek membrany Immobilon-P o wymiarach żelu.

Namoczyć:

- trzy kawałki bibuły Wathmana w buforze katodowym
 - dwa kawałki bibuły Wathmana w buforze anodowym I
 - jeden kawałek bibuły Wathmana w buforze anodowym II
- Wyciętą membranę Immobilon-P moczyć w metanolu przez 15 sekund,
- następnie przekładamy do pojemnika z wodą destylowaną i moczymy 2 minuty, membranę przelożyć do buforu anodowego II i inkubować minimum 5 minut

Ułożyć kanapkę jak na rysunku.

Wyliczyć natężenie według wzoru 4mA na cm² żelu

Transfer prowadzić 15 minut przy natężeniu 4mA na cm² żelu.

Rozebrać kanapkę żel wyrzucić a membranę Immobilon-P moczyć 10 sekund w metanolu.

Membranę suszyć na czystym kawałku bibuły Whatman około 15 minut.

Wysuszoną membranę inkubować z rozcieńczonym 1:1000 w buforze (5% mleko odtłuszczone w TBS) przeciwciałem pierwszorzędowym. Inkubację prowadzić 30 minut w temperaturze pokojowej na bujawce.

Membranę przepłukać 2 razy TBS'em i inkubować z rozcieńczonym 1:10 000 w buforze (5% mleko odtłuszczone w TBS) przeciwciałem drugorzędowym. Inkubację prowadzić 30 minut w temperaturze pokojowej na bujawce. Membranę delikatnie przepłukać 3 razy TBS'em i zalać uprzednio przygotowanym i ogrzanym do temp. około 37°C buforem substratowym z dodatkiem 45 µl BCIP i 45 µl NBT.

Po pojawieniu się prążków reakcję zatrzymać płucząc membranę w wodzie.

DETEKCJA GUSa

Barwienie histochemiczne GUS to technika powszechnie stosowana nie tylko w badaniach roślin. Metoda ta opiera się na detekcji kolorowego (ciemnoniebieski) produktu działania enzymu β-glucuronidazy (GUS). Reakcja barwienia jest bardzo prosta i polega na zanurzeniu roślin ekspresujących gen GUS w roztworze barwiącym i potraktowaniu zanurzonych roślin próżnią co przyspiesza wnikanie roztworu barwiącego do wnętrza tkanek. Roztwór barwiący zawiera bezbarwny substrat X-głuc. Infiltrowane rośliny pozostawia się w roztworze barwiącym w 37°C na 1,5h do 12h. Następnie często usuwa chlorofil

podczas dodatkowej inkubacji w 70% Et-OH w 37°C przed dwa dni lub w 50°C przez 1h.

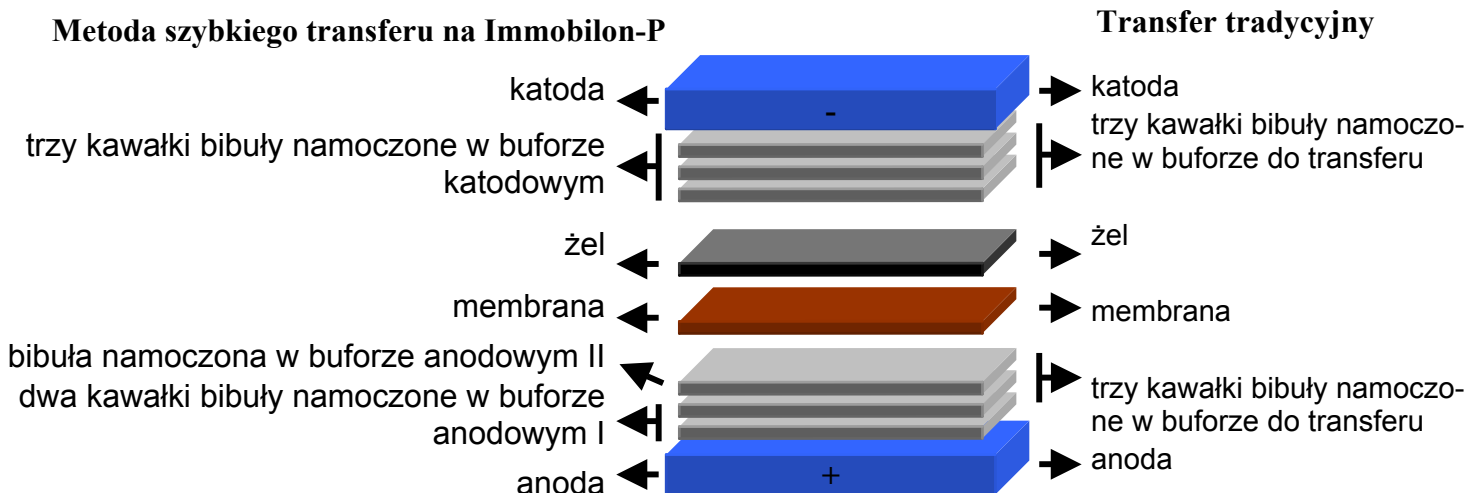
Metoda barwienia GUS'a wykorzystuje bardzo dużą odporność GUS'a na działanie czynników degradujących (endogenne proteazy) i denaturujących białko. Istnieją modyfikacje tej metody pozwalające na barwienie GUS'a na skrawkach uzyskanych z utrwalonego materiału.

Wykonanie

Na poprzednich ćwiczeniach uzyskaliście rośliny ekspresujące ten enzym w tkankach wykazujących ekspresję genu AtSWI3B.

- Obcięte kawałki roślin długości nie więcej niż 1cm zanurzamy w roztworze barwiącym i całość wkładamy do eksykatora.
- Zalączamy próżnię na 2-3 minuty, pięć razy.
- Infiltrowane rośliny inkubujemy w 37°C przez 1,5h.
- Rośliny przekładamy do 70% ET-OH i inkubujemy w 50°C przez 1h.

Należy dokładnie obejrzeć rośliny pod binokulem, zwracając uwagę czy we wszystkich roślinach wzór barwienia jest identyczny.



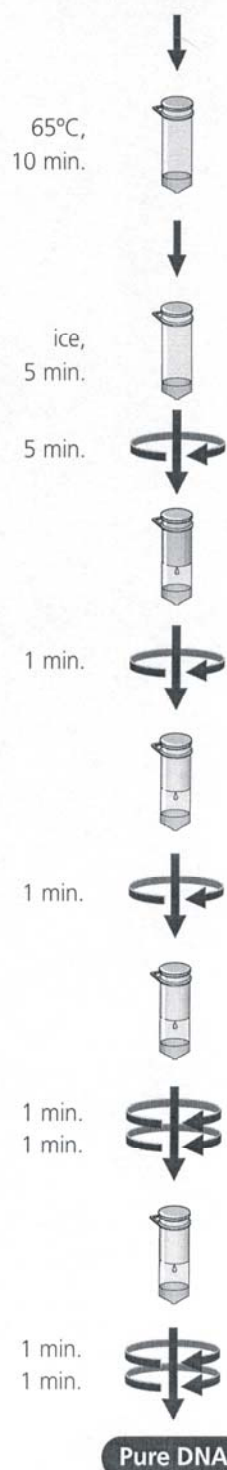
G2N 350

G2N 70

G2N 10

GENELUTE PLANT GENOMIC DNA KIT

Plant Tissue



All spins at $\geq 12,000 \times g$

1 Release DNA from tissue

- Grind plant tissue in liquid nitrogen.
- Lyse up to 100 mg ground plant tissue with 350 μl of lysis solution (Part A) + 50 μl of lysis solution (Part B). Vortex & invert to mix thoroughly.
- Incubate at 65 °C for 10 min.

2 Remove debris

- Add 130 μl precipitation solution. Invert to mix. Incubate on ice 5 min.
- Pellet debris 5 min.

Prepare binding column

- Add 500 μl Column Preparation Solution to column and centrifuge 1 min. Discard flow trough.

3 Bind DNA to column

- Add 700 μl binding solution to filtrate. Mix thoroughly by inversion.
- Transfer 700 μl of mixture to binding column. Spin 1 min. Discard flow through.
- Repeat with remainder of mixture. Transfer column to new collection tube.

4 Wash to remove contaminants

- Add 500 μl wash solution to column. Spin 1 min. Transfer column to new collection tube.
Note: Ethanol must be added to wash solution concentrate before first use.
- Add second 500 μl wash solution to column. Spin 1 min.

5 Elute purified DNA

- Transfer column to new collection tube.
- Add 100 μl elution solution (pre-warmed to 65 °C) to column. Spin 1 min.
- Repeat elution.