

Ekofizjologia molekularna roślin

Skrypt do ćwiczeń

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin

Warszawa 2015

Autorzy:

Paweł Sowiński1

Alicja Sobkowiak1

Maciej Jończyk1

Danuta Solecka1

Bożenna Maciejewska1

Andrzej Podstolski1

Paweł Siedlecki3

Rafał Archacki3

Katarzyna Grelewska4

Anna Linkiewicz4

Magdalena Żurawska-Zajfert4

Redakcja

Paweł Sowiński1

1Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin

Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski

3Laboratorium Kontroli GMO, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

4Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin

Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski

REGULAMIN PRACY W LABORATORIUM

1. Podczas pracy w laboratorium konieczny jest fartuch i odpowiednie obuwie.
2. Wszystkie prace potencjalnie niebezpieczne lub wymagające sterylności należy wykonywać w rękawiczkach.
1. W pracowni nie wolno jeść, pić ani palić.
2. Ubranie wierzchnie należy pozostawić w szatni, natomiast torby, siatki, itp. składać w miejscu do tego przeznaczonym.
3. Każda grupa ma wyznaczone miejsce pracy, za którego czystość jest odpowiedzialna.
4. Przed przystąpieniem do pracy należy zapoznać się z obsługą używanej aparatury.
5. Alkohol używany w pracowni jest skażony substancją toksyczną w dawce niebezpiecznej dla zdrowia.
6. Prace z ciekłym azotem należy wykonywać ze szczególną ostrożnością – ciekły azot może spowodować trudno gojące się oparzenia.
7. Bromek etydyny używany do wywoływania żeli jest mutagenny i kancerogeny..
8. Światło UV, w którym jest oglądany wynik PCR jest szkodliwe dla skóry i oczu.
9. Mając do czynienia z silnie trującymi związkami zachować szczególną czystość rąk i miejsca pracy.
10. Pracować ze stężonymi kwasami, zasadami oraz innymi substancjami żrącymi można tylko w wyznaczonych miejscach. Szczególną ostrożność należy zachować przy ich odmierzaniu. Skórę oparzoną kwasem lub zasadą należy spłukać dokładnie wodą bieżącą, następnie przemyć 5% Na_2HCO_3 (kwas) lub 2% CH_3COOH (zasada). W przypadku stężonych kwasów skórę należy przed spłukaniem osuszyć.
11. **Przy każdym, nawet drobnym wypadku (np. skaleczeniu) należy zaalarmować asystenta prowadzącego ćwiczenie.**

Wstęp	5
Ćwiczenie I. Zmiany ekspresji wybranych genów pod wpływem stresów abiotycznych	
I.1. Część teoretyczna	7
I.2. Część laboratoryjna	12
I.2.2. Analiza zmian ekspresji wybranych genów	12
I.2.3. Zmiany aktywności PAL i poziomu fenoli w liściach kukurydzy poddanych działaniu chłodu	24
I.2.4. Zmiany aktywności peroksydazy w liściach kukurydzy pod wpływem chłodu	26
Ćwiczenie II. Krioprezerwacja	
II.1. Część teoretyczna	29
II.2. Część laboratoryjna	31
Ćwiczenie III. Wykrywanie programowanej śmierci komórkowej na poziomie DNA	
III.1. Część teoretyczna	40
III.2. Część laboratoryjna	41
Ćwiczenie IV. Wykrywanie organizmów modyfikowanych genetycznie (GMO)	
IV.1. Część teoretyczna	48
IV.2. Część eksperymentalna	54
Ćwiczenie V. Podstawy bioinformatyki	
V.1. Część teoretyczna	62
V.2. Pracownia komputerowa	63
Ćwiczenie VI. Analiza zmian transkryptomu u roślin z użyciem techniki mikromacierzy	
VI.1. Część teoretyczna	64
VI.2. Część laboratoryjna	67
VI.3. Pracownia komputerowa	70
Ćwiczenie VII. Analiza poziomu wybranych transkryptów za pomocą metody real-time RT-qPCR	
VII. 1. Część teoretyczna	78
VII.2. Część laboratoryjna	80
Dodatek A. Elektroforeza kwasów nukleinowych	87
Dodatek B. PCR	90
Dodatek C. Procedura hybrydyzacji do mikromacierzy	94

Ekofizjologia jest dziedziną nauki zajmującą się badaniem zależności między reakcjami roślin i zwierząt na czynniki zewnętrzne lub we wzajemnych powiązaniach biocenozy i biotopu czy wreszcie w oddziaływaniu organizmów na biotop. W szczególności, ekofizjologia zajmuje się oceną wpływu warunków środowiskowych, zwłaszcza czynników fizycznych i chemicznych, takich jak temperatura, wilgotność, zasolenie na funkcjonowanie organizmów żywych. Ekofizjologia również ewolucyjne powstawanie przystosowań, np. fizjologicznych, morfologicznych i behawioralnych (adaptacjach).

Wzajemne oddziaływania między środowiskiem i roślinami są domeną **ekofizjologii roślin**, która w ostatnich latach rozwija się bardzo dynamicznie. Postęp w tej dyscyplinie, związany z rozwojem nowych technik eksperymentalnych na poziomie molekularnym spowodował powstanie nowej dziedziny badawczej, **ekofizjologii molekularnej roślin** (Luttge i in., 1995). Nowe podejście badawcze umożliwiło lepsze zrozumienie funkcjonowania roślin i przebiegających w nich procesów oraz pozwoliło głębiej i lepiej poznać mechanizmy regulacji tych procesów z uwzględnieniem oddziaływań zmieniającego się środowiska. Ekofizjologia molekularna roślin ma duże zastosowanie w praktyce, m.in. w rolnictwie np. przy określaniu odporności roślin uprawnych na stesy biotyczne oraz abiotyczne i opracowywaniu metod selekcji nowych odmian. Metody biologii molekularnej są wykorzystywane również dla wykrywania organizmów modyfikowanych genetycznie, których stosowanie jest regulowane prawnie, jako potencjalne zagrożenie dla środowiska. Ponadto, ekofizjologia molekularna roślin daje podstawy teoretyczne dla szeregu technologii stosowanych w przechowalnictwie żywności i w bankach genów.

Proponowany przedmiot ma na celu przedstawienie Państwu wybranych zagadnień ekofizjologii molekularnej roślin. Opracowany zestaw ćwiczeń obejmuje wachlarz technik molekularnych i wykorzystanie ich do opisu procesów fizjologicznych zachodzących w roślinach, m.in. do określania zmian ekspresji genów pod wpływem stresów biotycznych i abiotycznych, wykrywania programowanej śmierci komórkowej oraz identyfikacji organizmów genetycznie modyfikowanych.

Fakultet obejmie następujące zagadnienia:

I. Zmiany ekspresji wybranych genów pod wpływem stresów abiotycznych

Teoria: molekularne mechanizmy reakcji roślin na stesy środowiskowe.

Laboratorium: izolacja i czyszczenie RNA z roślin. Badanie ekspresji wybranych genów metodą półilościowego RT PCR oraz oznaczanie aktywności odpowiadających im enzymów.

II. Krioprezerwacja

Teoria: mrozoodporność roślin, przebieg zamarzania wody w tkankach, banki genów.

Laboratorium: badanie przebiegu zamarzania wody w nasionach i ocena uszkodzeń,

przemrażanie tkanek do temperatury ciekłego azotu, ocena skuteczności różnych krioprotektantów i schematów schładzania i rozmrażania, przechowywanie próbek RNA i DNA.

III. Wykrywanie programowanej śmierci komórki na poziomie DNA

Teoria: rola programowanej śmierci komórki w rozwoju roślin i ich reakcji na stresy.

Laboratorium: izolacja i oczyszczanie DNA z ziarniaków *Z. mays* na różnym etapie rozwoju i z liści *Z. mays* poddanych działaniu chłodu. Elektroforeza w żelu agarozowym.

IV. Wykrywanie organizmów roślinnych modyfikowanych genetycznie

Teoria: Organizmy modyfikowane genetycznie, wprowadzenie do prawodawstwa unijnego i krajowego dotyczącego GMO.

Laboratorium: izolacja DNA z soi transgenicznej i typu dzikiego. Wykrywanie GMO z użyciem RT PCR. Wykrywanie GMO z użyciem testu polowego metodą ELISA.

V. Podstawy bioinformatyki

Teoria: Podstawowe techniki bioinformatyczne, przegląd zasobów sieciowych.

Pracownia komputerowa: przeszukiwanie baz danych, porównywanie sekwencji, budowa drzew filogenetycznych, projektowanie starterów.

VI. Zastosowanie mikromacierzy do analizy zmian transkryptomu u roślin pod wpływem stresu

Teoria: Mikromacierze cDNA, oligo i białkowe i ich zastosowanie w ekofizjologii molekularnej roślin.

Laboratorium: pokaz procedury. Pracownia komputerowa: analiza statystyczna i merytoryczna wyników, programy do analizy wyników eksperymentów mikromacierzowych.

VII. Analiza poziomu wybranych transkryptów za pomocą metody real-time RT-qPCR

Teoria: Podstawy metody

Laboratorium: oznaczenie poziomu transkryptu kilku genów w roślinach typu dzikiego i mutancie SALK_030046 *Arabidopsis thaliana*

Polecana literatura

Bioinformatyka. Baxevanis A.D., Ouellette B.F.F. (red). PWN, Warszawa, 2005.

Prasad M.N.V. Plant Ecophysiology. J. Wiley & Sons, New York. Turner P.C., 1996.

McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.H. Biologia Molekularna. PWN, Warszawa, 2007.

Ćwiczenie I. Zmiany ekspresji wybranych genów pod wpływem stresów abiotycznych

Paweł Sowiński, Maciej Jończyk, Andrzej Podstolski, Danuta Solecka, Alicja Sobkowiak,

Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin, UW

I.1. Część teoretyczna

Cechą charakterystyczną środowiska, w jakim bytują organizmy żywe jest jego zmienność. Dotyczy to m.in. temperatury otoczenia, dostępności wody i substancji odżywczych oraz światła. Część z tych zmian ma charakter naturalnych fluktuacji cyklicznych lub losowych. Te pierwsze niosą często informację wykorzystywaną przez organizmy dla dostosowywania swojego metabolizmu do zmieniającego się środowiska. Np. w przypadku roślin wieloletnich z rejonów klimatu umiarkowanego, skracający się jesienią dzień wraz z obniżającą się stopniowo temperaturą są sygnałem do wchodzenia w okres spoczynku zimowego połączonym z hartowaniem do mrozu. Pewne zmiany środowiska mogą być jednak na tyle duże, że prowadzą do ograniczenia funkcji życiowych, a nawet do poważnych uszkodzeń czy wręcz do śmierci organizmu.

Ekofizjologia, jako dziedzina nauki zajmująca się m.in. zjawiskami i procesami związanymi z działaniem niekorzystnych warunków środowiska na organizmy żywe, opisuje je w kilku podstawowych definicjach. Definicje te odnoszą się do wszystkich organizmów żywych, jednak dalszy wywód będzie dotyczył tylko świata roślin

Niekorzystne czynniki środowiska są określane mianem stresorów:

stresor - abiotyczny lub biotyczny czynnik środowiska ograniczający procesy życiowe organizmu.

Do abiotycznych stresorów zaliczamy wysoką i niską temperaturę, suszę i nadmiar wody w podłożu, słabe i silne światło, deficyt mineralny i zasolenie, itp. Do biotycznych stresorów zaliczamy choroby wirusowe, bakteryjne, grzybowe, atak owadów roślinożernych, spasanie zwierzętami roślinożernymi, oddziaływanie ze strony innych roślin, itp.

Reakcja organizmu żywego na stresor jest nazywana stresem:

stres - zmiana funkcji organizmu w odpowiedzi na czynnik stresowy uzależniona od czasu trwania i natężenia bodźca.

Wszystkie organizmy żywe są przystosowane do bytowania w typowym dla siebie środowisku. Zespół tych przystosowań jest określany mianem adaptacji:

adaptacja - odziedziczalna modyfikacja cech organizmów danego gatunku, rasy, odmiany lub populacji pozwalająca przetrwać im w danym środowisku oraz przekazać te cechy potomstwu.

Jako przykład adaptacji można podać kompleks cech anatomicznych i fizjologicznych charakteryzujących sukulentę, roślinę bytującą w środowisku suchym.

Adaptacja organizmu do danego środowiska jest możliwa dzięki dwóm zjawiskom, unikaniu i tolerancji:

unikanie - zapobieganie lub opóźnianie ustalenia się równowagi termodynamicznej z czynnikiem stresowym dzięki barierom fizycznym, chemicznym lub rozwojowym.

tolerancja - zapobieganie skutkom działania stresu w komórce lub tolerowanie tych skutków.

W przypadku zwierząt mechanizm unikania jest tożsamy z reakcją ucieczki, w przypadku roślin, a więc organizmów osiadłych, mechanizm unikania przejawia się m.in. w dostosowaniu cyklu rozwojowego do zmian sezonowych środowiska. Przykładem jest występowanie w klimacie umiarkowanym licznych roślin uprawnych (pomidor w uprawach polowych, kukurydza, proso zwyczajne) i chwastów (*Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crus-galli*) pochodzących z tropików i subtropików. Ich cykl życiowy zamyka się w okresie kilku miesięcy (maj - sierpień), gdy temperatura jest wystarczająco wysoka dla bytowania tych ciepłolubnych roślin. Przykładem zjawiska tolerancji jest zdolność przeżycia roślin ze środowisk suchych przy niskim potencjale wodnym gleby i powietrza.

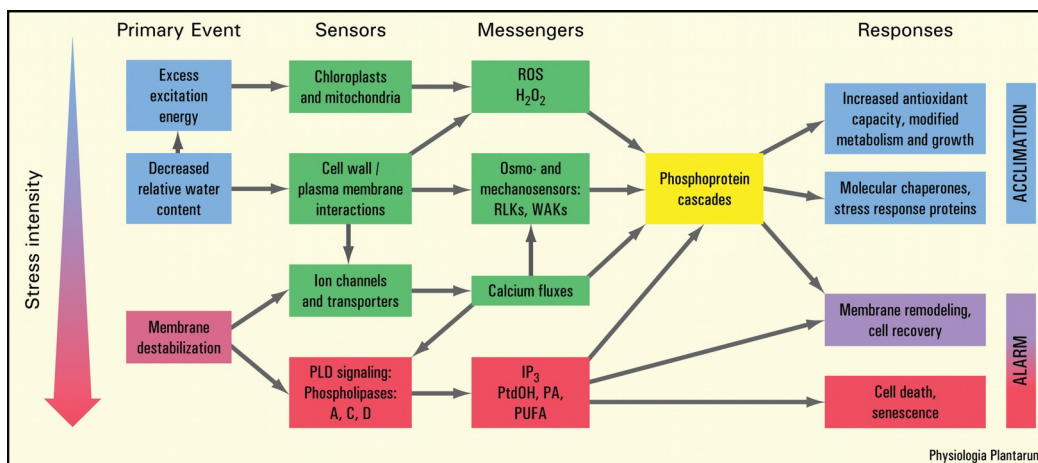
Przystosowanie do niekorzystnych warunków środowiska może obejmować także zmiany w metabolizmie lub budowie anatomicznej zwiększającej zdolność przeżycia stresu. Takie zjawisko jest określane terminem aklimatyzacji:

aklimatyzacja - niedziedziczna zmiana struktury i funkcji organizmu zachodząca w reakcji na czynnik stresowy lub wyprzedzające przygotowanie rośliny do niekorzystnych warunków środowiska.

Przykładami aklimatyzacji są: zwiększenie aktywności enzymów anty-oksydacyjnych w reakcji na szereg stresów powodujących zaburzenie równowagi oksydo-redukcyjnej (m.in. nadmiar światła i chłód), synteza substancji toksycznych lub odstrasających owady, a także hartowanie mrozowe, a więc zdolność zwiększania naturalnej tolerancji mrozu (temperatury poniżej punktu zamarzania tkanki) przez rośliny wieloletnie z rejonów klimatu umiarkowanego i polarnego pod wpływem chłodu (temperatury z zakresu 2 - 8°C).

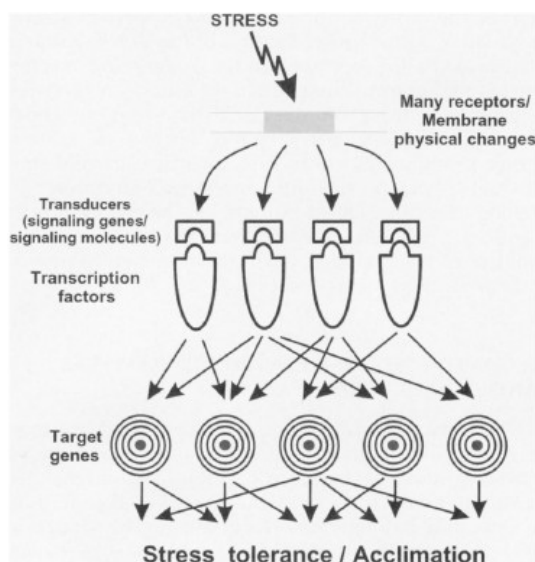
Wśród zagadnień, jakimi zajmuje się ekofizjologia molekularna roślin, jednym z ważniejszych jest określenie wspólnych mechanizmów odpowiedzi roślin na stresy różnego typu. Wspólną odpowiedzią tkanek roślinnych na różne czynniki stresowe (np. atak patogenów, promieniowanie UV, deficyt wody, zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura, jony metali ciężkich) może być zakłócenie równowagi między wytwarzaniem i usuwaniem reaktywnych form tlenu, co prowadzi do wystąpienia stresu oksydacyjnego. Powstające reaktywne formy tlenu (ROS) mogą uszkadzać lipidy błon (peroksydacja), zmieniając jej strukturę i stan fizyczny i zakłócając funkcję. Uszkadzają również białka (zwłaszcza enzymatyczne, zawierające w centrum aktywnym żelazo i/lub siarkę) i DNA. W roślinach działają enzymatyczne i nieenzymatyczne systemy antyoksydacyjne, które "wymiatając" (ang. *scavenging*) reaktywne formy tlenu zapobiegają powstawaniu stresu oksydacyjnego. Katalazy i peroksydazy, zawierające żelazo hemowe, zaangażowane są w usuwanie nadtlenu wodoru. Enzymy te biorą udział w wielu reakcjach zachodzących w komórkach, a także chronią organizmy, zarówno zwierzęce jak i roślinne, przed szkodliwym działaniem rodników nadtlenkowych.

Innym ważnym zagadnieniem ekofizjologii molekularnej roślin jest transdukcja sygnału o stresie, tzn. ciąg procesów obejmujący odbiór (recepcję) sygnału, wzmocnienie i przekazanie sygnału w komórce oraz indukcję odpowiedzi rośliny. Szlak transdukcji sygnału na poziomie fizjologicznym i komórkowym jest przedstawiony na Rys. I.1.1.



Rys. I.1.1. Uproszczony schemat szlaków transdukcji sygnałów u roślin w zależności od siły stresu. Za: Kacperska A. (2004).

Sygnały o stresie mają różny charakter, może to być zmiana potencjału oksydo-redukcyjnego lub wodnego, a także zmiany w błonach komórkowych. W zależności od rodzaju sygnału, w recepcji sygnału biorą udział różne struktury komórkowe: chloroplasty i mitochondria, błona komórkowa i ściana komórkowa. Podobnie, różne mogą być wtórne przekaźniki informacji (ang. *messengers*): aktywne formy tlenu (w szczególności nadtlenek wodoru), wolne jony wapnia w cytozolu lub fosfolipidy. Odpowiedź rośliny na stres może być realizowana bądź poprzez zmiany aktywności różnych enzymów, co jest inicjowane za pośrednictwem kaskad kinaz białkowych lub w wyniku indukcji ekspresji/represji specyficznych genów, w czym biorą udział liczne czynniki transkrypcyjne (Rys. I.1.2).



Rys. I.1.2. Schemat szlaków transdukcji sygnału prowadzących do zmian ekspresji genów. Za: Pastori i Foyer (2002).

Efektom tego jest generalna zmiana metabolizmu rośliny skutkująca zwiększeniem tolerancji na stres. Szlaki transdukcji sygnałów dla różnych typów stresów mogą być

wspólne, co powoduje, że działanie jednym rodzajem stresu indukuje tolerancję rośliny na inne. Jako przykład można podać indukcję ekspresji genów związanych z atakiem patogenów przez ozon (Rao i Davies, 2001) lub genów związanych ze stresem mechanicznym przez UV (Jansen i in., 1998). Zjawisko to jest zwane odpornością krzyżową (cross-tolerance).

Przykładem szlaku metabolicznego ulegającego istotnym modyfikacjom pod wpływem różnych stresów jest szlak biosyntezy związków fenolowych o strukturze fenylopropenu). Związki te znajdują się zarówno w ścianie komórkowej (np. kwas ferulowy i kumarowy, ligniny, jak i m.in. w wakuoli (antocyjaniny, flawonoidy, kumaryny). Liczne spośród tych dwu ostatnich grup związków są fitoaleksynami. Kluczowym enzymem regulatorowym rozpoczynającym szlak biosyntezy związków fenolowych o strukturze fenylopropenu jest amoniakolizaza L-fenyloalaniny (PAL). Aktywność PAL jest regulowana przez czynniki środowiskowe, głównie światło i temperaturę, a także stresory biotyczne – patogenne grzyby i bakterie oraz mechaniczne, jak zranienie tkanki (Dixon i in., 2002). Część PAL składa się z 4 podjednostek o m.c. 77 do 83 kDa, które są kodowane przez rodzinę genów i ekspresjonowane w zależności od rodzaju indukującego bodźca. Skutkuje to pojawianiem się innych izoform PAL niż te ekspresjonowane konstytutywnie, w odpowiedzi na np. zranienie tkanki, stres temperaturowy czy infekcję patogenami.

Literatura

- Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.-J., Reddy M.S., and Wang L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defense: A genomic perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3: 371-390
- Jansen M.A.K., Gaba V., Greenberg B.M. (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3: 131 – 135.
- Kacperska A. (2004) Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiol. Plant.* 122: 159 – 168.
- Pastori G.M., Foyer C.H. (2002) Common components, network, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “Redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129: 46 – 468.
- Rao J.E., Davis K.R. (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta.* 213: 682 – 690.

I.2. Część laboratoryjna

Celem ćwiczenia jest określenie poziomu ekspresji genu kodującego amoniako-liazę L-fenylalaniny (PAL), aktywności tego enzymu i poziomu fenoli w liściach siewek kukurydzy poddanych działaniu niskiej temperatury. Ponadto, w tych samych roślinach, będzie zbadana ekspresja genów kodujących peroksydazy (związane z aktywnością anty-oksydacyjną) oraz metylesterazę pektyn, enzymu związanego z funkcjami ścian komórkowych. Geny te są indukowane przez chłód zarówno u roślin chłodoodpornych jak i chłodowrażliwych.

I.2.1. Materiał roślinny:

Materiał roślinny wykorzystywany w ćwiczeniach stanowią siewki dwóch linii wsobnych kukurydzy o różnym stopniu wrażliwości na chłód: linia S68911 – chłodotolerancyjna oraz S160 – chłodowrażliwa. Rośliny hodowano na płynnej pożywce Hoagland'a w komorze fitotronowej (fotoperiod dzień/noc: 24/22°C, światło: 250 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), do momentu całkowitego rozwoju trzeciego liścia, a następnie część z nich przenoszono do chłodu umiarkowanego (14/12°C).

I.2.2. Analiza zmian ekspresji wybranych genów

I.2.2.1. Izolacja i oczyszczanie RNA.

Materiał badawczy

Środkowy fragment trzeciego liścia kukurydzy, pobierany z roślin kontrolnych oraz po 38 h działania chłodu umiarkowanego.

Sprzęt i aparatura:

- sterylne moździerze i tłuczki;
- sterylna szpatułka metalowa;
- sterylna pęseta;
- sterylne nożyczki;
- rękawice kuchenne;
- pojemnik na azot;
- wirówka;
- wstrząsarka typu worteks;

- statywy na probówki;
- pipety automatyczne o pojemności 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l;

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- zestaw do izolacji i oczyszczania RNA (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen);
- β -merkaptotoetanol;
- etanol 96%;
- woda (sterylna, wolna od RN-azy);
- probówki 2,0 ml, sterylne;
- probówki 1,5 ml, sterylne;
- sterylne końcówki wymienne (tipsy) z filtrem do pipet automatycznych;
- rękawiczki (bez pudru, sterylne);
- probówki 50 ml (falkony);
- etanol 96% skażony acetonem.

Wykonanie ćwiczenia:

Uwaga: RNA jest bardzo podatny na degradację przez endo- i egzogenne RN-azy. Pierwsze uwalniają się podczas ucierania materiału, drugie mogą się dostać do próbek np. z naskórka rąk. Dlatego podczas izolacji RNA należy pamiętać o tym, aby próbki nie uległy rozmrożeniu oraz zanieczyszczeniu.

1. Przygotować bufor do ekstrakcji:

skład buforu dla 1 próbki:

- 350 μ l buforu RA1,
- 3,5 μ l β -merkaptotoetanolu.

2. Utrzeć tkankę roślinną (środkową część blaszki trzeciego liścia) w moździerz w ciepłym azocie.

3. Ok. 100 mg utartej tkanki przenieść za pomocą szpatułki do zmrożonych sterylnych probówek 2,0 ml.

4. Dodać 350 μ l buforu ekstrakcyjnego.

5. Wytrząsać na wortexie przez 15-20 s w celu rozbicia grudek tkanki;

6. Całość przenieść na kolumnienki z fioletowym pierścieniem (NucleoSpin filter).

•Zwirować 1 min. przy 11000 rpm.;

•Pobrać supernatantu (ostrożnie, aby nie poruszyć osadu z dna) do nowych sterylnych

próbówek 1,5 ml;

- Dodać 350 µl etanolu 70%;
- Całość wymieszać poprzez kilkukrotne pipetowanie (nie worteksować);
- Całość przenieść na kolumnienki z niebieskim pierścieniem (NucleoSpin RNA Plant Column);
- Zwirować 1 min. przy 11000 rpm.;
- Wylać z próbówki przesącz;
- Na kolumnienkę nanieść 350 µl buforu MDB;
- Zwirować 1 min. przy 11000 rpm.; Wylać z próbówki przesącz.
- Przygotować mix DNasy w nowej próbówce 1,5ml:

skład mixu dla 1 próbki:

- 90 µl Reaction Buffer for rDNase,
- 10 µl reconstituted rDNase.
- Na kolumnienkę nanieść 95 µl mixu DNasy; pozostawić na 15 min w temp. pokojowej;
- Płukanie:
 - Na kolumnienkę nanieść 200 µl buforu RAW2;
 - Zwirować 1 min. przy 11000 rpm.;
 - Przenieść kolumnienkę do nowej próbówki 2,0 ml;
 - Na kolumnienkę nanieść 600 µl buforu RA3;
 - Zwirować 1 min. przy 11000 rpm.;
 - Wylać z próbówki przesącz;
 - Na kolumnienkę nanieść 250 µl buforu RA3;
 - Zwirować 2 min. przy 11000 rpm.;
- Przenieść niebieską kolumnienkę do nowej próbówki 1,5 ml;
- Elucję przeprowadzić z użyciem 60 µl sterylnej wody (wodę nanosić centralnie na membranę kolumnienki, tak aby nie uszkodzić jej tipsem);
- Zwirować 1 min. przy 11000 rpm.;
- Tak wyizolowane RNA zamrozić w -20°C.

I.2.2.2.1. Ocena ilościowa RNA

Ocena ilościowa wyizolowanego RNA jest dokonywana poprzez pomiar stężenia RNA w próbce w ng/ μ l oraz określenie czystości próbki RNA poprzez wyznaczenie stosunku absorbancji A260/280. Dla czystego RNA A260/280 wartość ta wynosi 2 i ulega zmniejszeniu w obecności zanieczyszczeń (DNA, fenol, białka).

Sprzęt i aparatura:

- spektrofotometr
- pipeta automatyczna 10 μ L;

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- woda (sterylna, wolna od RNA-az);
- sterylne końcówki wymienne (tipsy) do pipet automatycznych (ew. z filtrem);
- rękawiczki (wolne od RNA-az).

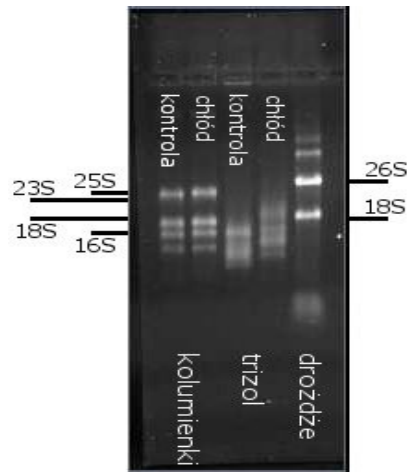
Wykonanie ćwiczenia:

Ocenę ilościową wyizolowanego RNA wykonuje się za pomocą spektrofotometru (np. Nanodrop ND-1000). Aby dokonać pomiaru należy wyzerować aparat, wyzerowanie jest wykonywane przez nakropienie na soczewkę aparatu 1,5 μ l sterylnej wody i wybranie w menu funkcji „initialize”, a następnie „blank”. Po przetarciu soczewki ręcznikiem papierowym, 1,5 μ l wyizolowanego RNA nakropić na soczewkę aparatu. Po zamknięciu komory pomiarowej wybrać funkcję „measure”. Pomiar należy wykonać 2 razy w celu zminimalizowania błędów pomiaru i pipetowania.

* Blankujemy roztworem, użytym do elucji – w tym przypadku wodą.

I.2.2.2.2. Ocena jakościowa RNA

Ocenę jakościową RNA wykonuje się za pomocą elektroforezy w warunkach denaturujących (żel agarozowy z formaldehydem, por. Dodatek A). O dobrej jakości wyizolowanego RNA świadczy obecność wyraźnych prążków rRNA, cząsteczki mRNA mają szerokie spektrum wielkości i są widoczne jako słabo świecąca smuga (ang *smear*). Obraz elektroforetyczny RNA jest odmienny dla różnych gatunków i tkanek.



Fot. I.2.1. Obraz rozdziału całkowitego RNA z kukurydzy na 1% żelu agarozowym
Zaznaczono wielkości rRNA

Material badawczy:

wyizolowane RNA z liści kukurydzy.

Sprzęt i aparatura:

- aparat do elektroforezy z zasilaczem;
- system obrazowania żeli Chemi-doc;
- statywy na probówki;
- pipety automatyczne o pojemności 10 µl, 100 µl;
- waga;
- kuchenka mikrofalowa;
- rękawice kuchenne;
- wytrząsarka typu worteks;
- butelki ze szkła hartowanego 250 ml z zakrętką.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- 10X bufor MOPS (200 mM MOPS, 50 mM octan sodu, 10 mM EDTA, pH 7,0);
- agaroz;
- woda sterylna;
- nadtlenek wodoru 30%;
- formamid;
- formaldehyd;
- glicerol 80%;
- bromophenol blue;

- xylene cyanol;
- bromek etydyny
- próbówki 0,2 ml, sterylne
- tipsy sterylne z filtrem;
- rękawiczki (bez pudru, sterylne).

Wykonanie ćwiczenia:

1. Wymoczyć aparat do elektroforezy wraz z dodatkami w 3% wodzie utlenionej przez minimum 10 min. przed użyciem. Aparat i dodatki zostały wcześniej umyte roztworem detergentu, wypłukane wodą dejonizowaną i osuszone etanolem 60%.

2. Przygotować płytkę do wylewania żeli i grzebień (osuszyć). Umieścić w statywie do polimeryzacji zastawki. Statyw ustawić na płaskiej, równej powierzchni i wypoziomować go.

3. Przygotowanie żelu (1%):

- do butelki odważyć 600 mg agarozy;
- rozpuścić w 45 ml wody sterylnej;
- mieszaninę podgrzać w kuchence mikrofalowej ok. 2 min sporadycznie mieszając aż do momentu całkowitego rozpuszczenia agarozy (przy pracy z gorącą agarozą **zachować szczególną ostrożność!!!**);
- schłodzić mieszaninę do temp. 60°C pod bieżącą wodą;
- dodać 5,1 ml 10X MOPS;
- dodać 1,5 ml formaldehydu (**pod wyciągiem!!!**);
- wylać schłodzoną agarozę do przygotowanego wcześniej pojemnika (**pod wyciągiem!!!**), sprawdzić czy nie utworzyły się pęcherzyki powietrza – jeśli są, przesunąć je na skraj żelu za pomocą tipsa;
- po zastygnięciu żelu ostrożnie wyjąć rynienkę z żelem i umieścić je w aparacie;
- włączyć do aparatu bufor elektrodowy w takiej ilości, aby całkowicie przykrył żel (3 mm);
- ostrożnie wyjąć grzebień z żelu; wyjęcie grzebienia pod warstwą buforu zapobiega zapadaniu się i sklejeniu studzienek wytworzonych przez ząbki grzebienia;
- UWAGA: opary wydobywające się z żelu są trujące – nie wdychać!!!**

4. Przygotowanie próbki:

- w próbówce 1,5 ml zrobić mix do elektroforezy o składzie wymienionym poniżej i całość wymieszać na wortexie:

składniki reakcji:	ilość na 7 próbe:	ilość na x prób
formamid	37,5 μ l	
10X MOPS	7,5 μ l	
formaldehyd	12 μ l	
woda sterylna	5,0 μ l	
glicerol (80%)	5,0 μ l	
bromophenol blue 10% (w/v)	1,0 μ l	
bromek etydyny	7,1 μ l	

-pobrać 1 μ l RNA do probówki 0,2 ml;

-dodać 9,0 μ l mixu do elektroforezy;

-10 μ l nanieść do studzienek na żelu;

5. Elektroforezę prowadzić przy napięciu 80V przez 90 min stosując jako bufor elektrodowy 1X MOPS.

6. Gdy bromophenol blue osiągnie 2/3 długości żelu, wyłączyć zasilacz i odłączyć kable od aparatu.

7. Po zakończonej elektroforezie żel obejrzyć w świetle UV i sfotografować.

I.2.2.3. Półilościowy PCR.

Półilościowy PCR jest metodą, w której porównuje się ilość mRNA w dwóch lub więcej próbach uzyskanych np. w różnych wariantach eksperymentalnych. Ilość transkryptu szacuje się na podstawie ilości produktu PCR powstałego na matrycy cDNA. Aby możliwe było oszacowanie poziomu ekspresji, w porównywanych reakcjach PCR musi się znajdować ta sama ilość cDNA. Liczba cykli w półilościowym PCR musi być ustawiona tak, aby zachować liniowość przyrostu produktów w kolejnych cyklach. Wartość tę ustala się eksperymentalnie.

Pierwszym etapem półilościowego PCR jest reakcja odwrotnej transkrypcji, tj. synteza nici komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy mRNA prowadzona przez enzym odwrotną transkryptazę. Właściwa reakcja półilościowego PCR następuje dopiero po reakcji odwrotnej transkrypcji. Jest to konieczne z uwagi na to, że RNA nie może być matrycą dla termostabilnych polimerazy DNA używanych w reakcji PCR.

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzi się najczęściej przy użyciu startera (primera) oligo(dT), który jest komplementarny do fragmentu poliA na 3'-końcu cząsteczek mRNA. Zastosowanie startera oligo(dT) pozwala na uzyskanie puli cDNA odpowiadającej całemu mRNA znajdującemu się w komórce. Do oceny jakości uzyskanego cDNA służy reakcja

kontrolna PCR z użyciem starterów specyficznych. Możliwe jest również zastosowanie roztworu losowych heksamerów (primerów o długości 6 nt), samych lub razem z primerem oligo(dT). Trzecią opcją jest zastosowanie pary primerów specyficznych dla badanego genu, użycie tak uzyskanego cDNA jest ograniczone do badania właśnie tego jednego genu. Do oceny jakości uzyskanego cDNA służy reakcja kontrolna PCR z użyciem starterów specyficznych dla badanego genu.

Drugim etapem półilościowego PCR jest amplifikacja analizowanych sekwencji na drodze reakcji PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy). Reakcja ta stanowi cykl trzech etapów, które zachodzą w różnych temperaturach: denaturacji (rozplatanie nici DNA) w temperaturze 95°C, przyłączenia (annealing) starterów (oligonukleotydy o długości ok. 20 nukleotydów najczęściej w temperaturze ok. 58-60°C (w zależności od parametrów starterów) oraz elongacji w temperaturze ok. 72°C.

I.2.2.3.1. Synteza cDNA za pomocą RevertAid First Strand Synthesis Kit (Fermentas)

Material badawczy:

wyizolowane wcześniej RNA

Sprzęt i aparatura:

- statywy na probówki;
- probówki 0,2 ml, sterylne;
- pipety automatyczne o pojemności 10 µl, 100 µl, 1000 µl;
- tipsy sterylne z filtrem;
- termocykler.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- 10X reaction buffer with MgCl₂;
- woda sterylna;
- DNA-za I (deoksyrybonukleaza I);
- EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy);
- starter oligo(dT);
- 5X reaction buffer;
- 10mM mix dNTP;
- lód;
- rękawiczki (wolne od RNA-az).

Wykonanie ćwiczenia

Wszystkie odczynniki rozmrozić na lodzie i zworteksować. Enzymy (DN-azę I, Inhibitor RN-az, odwrotną transkryptazę) wyjąć z zamrażarki tuż przed użyciem (są w roztworze glicerolu)

1. Trawienie RNA DNA-azą:

- do probówki na 0,2 ml odpipetować po 1 µg naszej próby (**wyliczyć potrzebną ilość µl**);
- dodać 1 µl buforu (10X reaction buffer with MgCl₂);
- uzupełnić mieszaninę do 9 µl wodą sterylną (DEPC);
- dodać 1 µl DN-azy I (objętość końcowa mieszaniny 10µl).

Mieszaninę inkubować w termocyklerze przez 30 min w temp. 37°C;

2. Dodać 1 µl EDTA (objętość końcowa mieszaniny 11µl);

Mieszaninę inkubować w termocyklerze przez 10 min w temp. 65°C;

3. Do mieszaniny dodać 1 µl oligo(dT) oraz 0,5 µl sterylnej wody;

Mieszaninę inkubować w termocyklerze przez 5 min w temp. 65°C;

4. Całość wstawić na lód na 10 s;

5. Do mieszaniny dodać:

- 4 µl buforu RTreakcyjnego (5x stężony);
- 2 µl 10mM mix dNTP;
- 0,5 µl inhibitora RN-az (RiboLock) rybonukleazy;
- 1 µl odwrotnej transkryptazy (M-MuLV RevertAid);

objętość końcowa mieszaniny 20µl.

6. Mieszaninę inkubować w termocyklerze przez 60 min w temp. 42°C a następnie 10 min w temp. 70°C.

7. Otrzymane cDNA można przechowywać w temperaturze -20°C.

Zsyntetyzowane cDNA posłuży jako matryca do amplifikacji analizowanych sekwencji metodą półilościowego PCR. Do reakcji PCR użyjemy matrycy cDNA rozcieńczonej w stosunku 1:50.

I.2.2.3.2. Amplifikacja analizowanych sekwencji

Material badawczy:

uzyskane wcześniej cDNA (rozcieńczone 50X)

Sprzęt:

- statywy na probówki;
- pipety automatyczne o pojemności 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l;
- butelka ze szkła hartowanego 250 ml;
- termocykler;
- worteks;
- wirówka.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- 2,5 mM mix dNTP (dCTP, dGTP, dATP, dTTP);
- 10X Bufor *Taq* bez MgCl₂;
- 25 μ M MgCl₂;
- polimeraza *Taq*;
- primery Forward (Fw) i Reverse (Rv);
- matryca cDNA;
- woda sterylna;
- oranż G;
- agaroza;
- 1X bufor TAE;
- marker wielkości 100 bp.;
- rękawiczki (bez pudru, sterylne);
- probówki typu falkon na 50 ml;
- probówki 0,2 ml, sterylne;
- probówki 1,5 ml, sterylne;
- tipsy sterylne z filtrem;
- lód.

Tab. I.2.1. Charakterystyka starterów używanych w reakcji PCR

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	
Sekwencja Fv	5' TTCGTGGACCGTGCTTC 3'
Sekwencja Rv	5' CGTTGATGTTTCGTGTCGTTG 3'
pectin methylesterase (PME)	

Sekwencja Fv	5' ATCTACCACAACGCCAAGGA 3'
Sekwencja Rv	5' TCCATCGTGCCAGTCATCT 3'
phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	
Sekwencja Fv	5' CGGAGGAGAAGAGGAAAATACA 3'
Sekwencja Rv	5'CCAATACAACCAAAAAGTCAACG3'
peroxidase (PER)	
Sekwencja Fv	5' AGCCCTCCGTCTTCTCCA 3'
Sekwencja Rv	5'CTTGCCGTCCCCTCCTT3'

Wykonanie ćwiczenia:

Wszystkie odczynniki rozmrozić na lodzie i zworteksować. Polimerazę *Taq* wyjąć z zamrażarki tuż przed użyciem (jest w roztworze glicerolu).

1. Przygotować mix do reakcji PCR wg schematu

Skład mix-u	Na 1 reakcję:
10X Bufor <i>Taq</i> bez MgCl ₂	5 µl
2,5 mM mix dNTP	4 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
Primer Fw	1 µl
Primer Rv	1 µl
Matryca cDNA	1 µl
Polimeraza <i>Taq</i>	1 µl
Woda sterylna	32 µl (razem 50 µl)

2. Reakcję przeprowadzić wg podanego profilu temperaturowego:

94°C 30 sek
58°C 30 sek X 35

72°C 30 sek

7min 72°C

3. Po zakończeniu reakcji ilościowego PCR, produkty reakcji rozdzielić na 2% żelu agarozowym. W tym celu:

- do mieszaniny reakcyjnej (50 µl) dodać po 4 µl oranżu G;
- 10 µl nałożyć na wcześniej przygotowany żel agarozowy;
- do skrajnych studzienek dodać po 6 µl roztworu markera wielkości (2 µl markera wielkości, 1 µl oranżu G, 3 µl wody wolnej od RN-az).

Przygotowanie żelu agarozowego 2%:

1. Przygotować płytkę do wylewania żeli i grzebień (osuszyć). Umieścić w statywie do polimeryzacji.

2. Przygotowanie żelu:

- Odważyć 1,2 g agarozy;
- Rozpuścić w 60 µl buforu SB/TAE;
- Mieszaninę podgrzać w kuchenke mikrofalowej przez 2 min sporadycznie mieszając do momentu całkowitego rozpuszczenia agarozy;
- dodać 3 µl barwnika Midori Green i ostrożnie zamieszać agarozę;
- wylać schłodzoną agarozę do przygotowanego pojemnika;
- wlać do aparatu bufor elektrodowy 1X TAE w takiej ilości, aby przykrył żel warstwą ok. 3-5 mm;
- ostrożnie wyjąć grzebień z żelu; grzebień można usunąć z żelu wcześniej, jednak jego wyjęcie grzebienia pod warstwą buforu zapobiega zapadaniu się i sklejeniu studzienek wytworzonych przez ząbki grzebienia.

4. Nałożyć do studzienek żelu wcześniej przygotowane próbki

5. Elektroforezę prowadzić przy napięciu 120V przez 40 min; następnie położyć żel na podświetlaczu transiluminatora UV oraz wykonać zdjęcie.



K C K C K C K C K C K C K C K C

Fot. **I.2.2.** Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji dla dwóch linii wsobnych kukurydzy: S160 i S68911 dla 3 różnych par starterów. Podpis nad żelem identyfikuje linie (numer) i wariant eksperymentalny (C – chłód, K – kontrola).

1. Amoniakoliza L-fenylalaniny (PAL).
2. Peroksydaza (PER)
3. Metyloesteraza pektyn (PME).
4. GAPDH – gen kontrolny.

I.2.3. Zmiany aktywności PAL i poziomu fenoli w liściach kukurydzy poddanych działaniu chłodu

Material badawczy:

Trzeci liść kukurydzy pobierany z roślin kontrolnych lub po 38 h działania chłodu umiarkowanego.

Sprzęt i aparatura :

- moździerz porcelanowe 10 szt.;
- wirówka z chłodzeniem;
- pipety automatyczne;
- cieplarka 40 °C;
- spektrofotometr;
- wstrząsarka typu wortex;
- waga.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- 0,1 M bufor Tris/HCL pH 8,8 – 250 ml;
- 0,2 M bufor boranowy, pH 8,8 – 100 ml
- 0,1 M roztwór L-fenylalaniny w 0,1 M buforze Tris/HCL pH 8,8 - 10 ml,
- 0,1 N odczynnik Folina - 50 ml;
- 7,5% roztwór Na₂CO₃ - 50 ml;
- ciekły azot.

Wykonanie ćwiczenia:

Pobranie materiału roślinnego

Z roślin chłodzonych i kontrolnych wyciąć wybrane fragmenty liści i odważyć porcje po ok. 1 g.

Przygotowanie ekstraktu enzymatycznego PAL

Zważone wycinki liści z danej grupy roślin należy pociąć nożyczkami na kilkumilimetrowe fragmenty, umieścić w moździerzu porcelanowym, zalać ciekłym azotem (**UWAGA - WSZYSTKIE CZYNNOSCI NALEŻY WYKONYWAĆ W RĘKAWICZKACH OCHRONNYCH !!**) i dokładnie rozetrzeć na proszek. Następnie dodać 4 ml 0.1 M buforu Tris/HCl pH 8,8 i starannie rozcierać przez około 10 min., tak, aby wyekstrahować rozpuszczalne białka. Następnie, posługując się pipetą Pasteura przenieść homogenat do probówek wirówkowych (podpisać probówki!). Analogicznie przygotować homogenaty z drugiej porcji liści i wirować przy 11 000 rpm przez 15 min. Supernatanty odpipetować do czystych probówek Eppendorfa. Supernatant stanowi ekstrakt enzymatyczny PAL (przechowywać w lodówce lub w lodzie).

Oznaczanie aktywności PAL

Wykonać 3 powtórzenia dla każdej próby biologicznej - ekstraktu z roślin kontrolnych i po działaniu chłodu.

Do probówek dodać:

- 2250 μ l 0.2 M buforu boranowego, pH 8.8
- 500 μ l 0.1 M roztworu fenyloalaniny w buforze
- 250 μ l ekstraktu z liści

Probówki inkubować 2 godziny w temperaturze 37°C. Ilość powstałego kwasu *t*-cynamonowego mierzyć spektrofotometrycznie przy $\lambda = 290$ nm. Obliczyć aktywność enzymatyczną przyjmując zależność: zmiana o 0.01 jedn. absorb. = 3.4 nmola kwasu *t*-cynamonowego.

Oznaczanie zawartości związków fenolowych metodą Folina-Ciocolteu'a

Z przygotowanych ekstraktów odpipetować po 0.25 ml i rozcieńczyć 4 x wodą destylowaną do objętości 1,0 ml. Z rozcieńczonego ekstraktu odpipetować do 3 probówek szklanych po 0,1 ml i dodać po 0,5 ml 0,1 N odczynnika Folina – natychmiast wymieszać i po 5 minutach dodać 0,6 ml 7,5 % roztworu Na₂CO₃, wymieszać i pozostawić na 30 min. Równoległe przygotować w ten sam sposób 2 próby ślepe, gdzie zamiast ekstraktu z roślin używamy 0,1 ml H₂O dest. Po upływie 30 minut zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali 750 nm

wobec próby ślepej.

Wynik końcowy:

Aktywność PAL podać w nmolach kwasu *t*-cynamonowego na 1 g świeżej masy oraz na 1 mg białka/godz. w grupach z warunków ciepła oraz chłodu i zestawić w tabelce. Wyliczyć średnią arytmetyczną.

Zawartość związków fenolowych na 1 g świeżej masy obliczyć z zależności, że przyrost absorbancji o 0,1 odpowiada 1 μg wzorcowego związku fenolowego (kwas galusowy) Uzyskane wyniki wstawić odpowiednio do tabeli ze zmianami aktywności PAL. Wyciągnąć wnioski z przeprowadzonego doświadczenia i przedstawić je w formie krótkiego opisu.

I.2.4. Zmiany aktywności peroksydazy w liściach kukurydzy pod wpływem chłodu

Material badawczy:

Trzeci liść kukurydzy pobierany z roślin kontrolnych lub po 38 h działania chłodu umiarkowanego.

Sprzęt i aparatura:

- spektrofotometr Shimadzu 160A;
- homogenizator Ultraturax;
- wirówka Eppendorf 5408R;
- pipety automatyczne 10 μl , 50 μl , 200 μl , 1000 μl ;
- probówki wirówkowe typu Falcon 15 ml.

Odczynniki i materiały:

- bufor Tris-HCl, pH 7,0;
- 0.1 M bufor octanowy, pH 5.0;
- odczynnik Bradford;
- akrylamid;
- bufor do prób;
- gwajakol;
- benzydyna;
- pirogallol;

- perhydrol.

Wykonanie ćwiczenia:

Otrzymywanie ekstraktów białek cytoplazmatycznych.

Liście z roślin kontrolnych i poddanych działaniu niskiej temperatury (2 x 1 g) homogenizować w 5 ml 0,1 M buforu Tris-HCl pH 7.0 (zawierającego 1 mM PMSF) schłodzonego do 4°C. Homogenat przenieść do probówek wirówkowych. Próby wirować przy 14000 g w temp. 4°C przez 20 min. Supernatant zlać. Pobrać 0,5 ml z każdej próby do oznaczenia zawartości białek.

Oznaczanie zawartości białka rozpuszczalnego metodą Bradford

Z każdego supernatantu pobrać 50 µl (w 3 powtórzeniach) dodać 2 ml odczynnika Bradford, wytrząsać. Po 2 min zmierzyć absorpcję przy $\lambda = 595$ nm wobec próby ślepej (50 µl buforu i 2 ml odczynnika Bradford). Absorpcję przeliczyć na µg białka, korzystając z krzywej wzorcowej dla różnych stężeń albuminy.

Oznaczanie aktywności peroksydaz.

Oznaczanie aktywności *in vitro*:

Do probówek dodać:

- 940 µl 0.1 M buforu octanowego, pH 5.0,
- 2 µl guaiakolu (końcowe stężenie 10 mM),
- 50 µl ekstraktu z liści.

Zmierzyć absorbancję mieszaniny przy $\lambda = 436$ nm (start). Dodać 10 µl H₂O₂ (rozpoczęcie reakcji), wymieszać i natychmiast mierzyć przyrost absorbancji, co 20 sekund przez 3 minuty. Wykonać 3 powtórzenia chemiczne dla każdej próby biologicznej. Aktywność peroksydaz wyrazić jako zmianę absorbancji w czasie pomiaru na 1 mg białka.

Oznaczanie aktywności na żelu poliakrylamidowym:

Otrzymane wcześniej ekstrakty zawierające białko połączyć w stosunku 1:1 z buforem do prób o następującym składzie: 3,1 ml buforu Tris-HCl 1M, pH 6.8, 5 ml glicerolu, 0,5 ml 1% błękitu bromofenolowego i 1,4 ml wody destylowanej.

UWAGA! Akrylamid działa toksycznie na układ nerwowy – zachować szczególną ostrożność!!!

Przygotowane próby nanieść na 10% żel poliakrylamidowy mikropipetą zaopatrzoną w końcówkę z kapilarą, w ilości 30 μ l na każdą studzienkę. Do jednej ze studzienek nanieść mieszaninę wzorców białek. Po naniesieniu prób ustawić natężenie prądu na 70 mA. Elektroforeza trwa około 1,5 godziny. Kiedy barwnik znajdzie się na końcu płytki, wyłączyć zasilacz. Wyjąć płytki z żelem z aparatu, ostrożnie zdjąć żele z płytek i przenieść do szalek Petriego z odpowiednimi substratami:

benzydyna

2 ml roztworu benzydyny w kwasie octowym + 9 ml H₂O + 11 ml 1% wody utlenionej. Roztwór sporządzić tuż przed użyciem (**wszystkie prace wykonywać w rękawiczkach - benzydyna jest rakotwórcza**). Żel zanurzyć w roztworze na około 30 sek. - 1 min. Obserwować pojawienie się błękitnych prążków w miejscu obecności peroksydazy.

pirogallol

5% pirogallol (5 ml) + 1% woda utleniona (2,5 ml) + 0.1M bufor octanowy pH 5,0 (2,5 ml)

Żel zanurzyć w roztworze aż do pojawienia się brązowych prążków (**wszystkie prace wykonywać w rękawiczkach - pirogallol jest trujący**).

Ćwiczenie II. Krioprezerwacja

Danuta Solecka

Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin, UW

II.1. Część teoretyczna

Głównym zagrożeniem wywołanym działaniem niskiej temperatury (mrozu) na żywe tkanki i komórki jest krystalizacja wody. Jeśli kryształy powstają na terenie komórki (krystalizacja wewnątrzkomórkowa), następuje zniszczenie ultrastruktury cytoplazmy i organelli komórkowych, co można obserwować po rozmrożeniu materiału. Ryzyko powstania kryształów lodu na terenie protoplastu jest mniejsze, gdy komórka zawiera niewielką ilość "wolnej" wody, a także, gdy obecne w komórce cukry czy inne substancje "wiążące" wodę (oddziaływujące z polarnymi cząsteczkami wody) powodują obniżenie punktu zamarzania wody. Jeśli jednak kryształy lodu powstają na zewnątrz protoplastu (pozakomórkowo), pociąga to za sobą migrację wody z wnętrza komórki do jej środowiska, zgodnie z gradientem stężenia pary wodnej (małe jej stężenie nad lodem). Wówczas dochodzi do odwodnienia protoplastu, skurczu komórek, zwiększenia stężenia jonów różnych soli na terenie cytoplazmy i innych efektów odwodnienia. Odwodnienie wywołane pozakomórkową krystalizacją wody może spowodować różne uszkodzenia struktur komórkowych, w tym błon i organelli komórkowych, a także uszkodzenia białek enzymatycznych niezwiązanych z błonami. Uszkodzenia te są obserwowane na ogół po odtajaniu komórek. Zakres uszkodzeń zależy nie tylko od zakresu temperatury, do której komórki zostały przemrożone (a więc od stopnia odwodnienia wywołanego wymarzaniem coraz większych ilości wody), ale i od szybkości rozmrażania (tj. od szybkości wnikania wody do protoplastu), a także od obecności na terenie komórek substancji, które chronią struktury komórkowe przed skutkami odwodnienia (niektóre drobnocząsteczkowe białka, aminokwasy, cukry i polialkohole).

Niektóre typy tkanek, charakteryzujące się niską zawartością wody i zwartą strukturą, pozbawioną przestrzeni międzykomórkowych (np. pąki kwiatowe, zarodki nasion, niektóre typy miększu liściowego, promienie rdzeniowe) mogą osiągnąć wysoki poziom odporności na niską temperaturę unikając zamarzania wody. Stan ten osiągają w wyniku trwałego przechłodzenia wody w tkankach (tzn. utrzymania wody w stanie płynnym w temperaturach niższych niż punkt zamarzania roztworów wodnych). Z drugiej strony zamarzanie wewnątrzkomórkowe głęboko przechłodzonej wody prowadzi do letalnych skutków, co jest przyczyną eliminacji niektórych gatunków na terenach, gdzie temperatura spada okresowo do

-30pC lub poniżej. Na zakres i trwałość przechłodzenia wpływają różne czynniki, np. obniżenie potencjału wody w komórkach. W nasionach możliwość osiągnięcia stanu głębokiego przechłodzenia zależy dodatkowo od okrywy nasiennej: frakcja wody znajdująca się w okrywie i pod nią ulega wcześniej krystalizacji, natomiast woda w komórkach zarodka ulega przechłodzeniu i zamarza dopiero w niższej temperaturze.

Punkt (temperaturę) krystalizacji wody określa się na podstawie emisji ciepła krystalizacji, metodą **różnicowej analizy termicznej** (DTA). W celu dokonania pomiaru jedną z końcówek termopary przytwierdza się do badanej tkanki parafilmem i umieszcza w próbówce, drugą końcówkę (termoparę odniesienia) owija się parafilmem, wkłada do innej próbówki i umieszcza w tych samych warunkach. Różnica temperatur pojawiająca się na końcówkach termopary podczas krystalizacji jest rejestrowana w postaci piku tzw. egzotermi. U niektórych roślin obserwuje się 2 egzotermi, występujące w temperaturze stosunkowo wysokiej (tzw. HTE) i w temperaturze niskiej (np. -30pC i niżej), tzw. LTE.

Krioprezerwacja (ang. *cryopreservation*), czyli długotrwałe przechowywanie materiału roślinnego (nasion, ziaren pyłku, merystemów wierzchołkowych, cebul, bulw czy pąków spoczynkowych) w bardzo niskiej temperaturze (w zakresie od -150p do -196pC) bez utraty żywotności, jest jedną z metod przechowywania materiału genetycznego gatunków rzadkich i zagrożonych lub cennych dla uprawy. Stosuje się też ją w celu zachowania materiału badawczego (np. linii komórkowych stosowanych w biotechnologii czy komórek transgenicznych). Przechowywanie materiału o wysokiej aktywności metabolicznej lub dużej zawartości wody wymaga stosowania specjalnych procedur podczas zamrażania. Jedynie tkanki tzw. powietrznie suche (np. organy przetrwalnikowe lub nasiona) nie wymagają stosowania takich metod.

Materiał roślinny, zawierający komórki aktywne metabolicznie, o stosunkowo dużej zawartości wody, może być przechowywany w temperaturze ciekłego azotu pod warunkiem, że zawarta w nich woda ulegnie „witryfikacji”, tzn. zeszkleniu w formie niekrystalicznej, (co zachodzi w wyniku bardzo szybkiego ochłodzenia do temperatury ciekłego azotu). Uwodnione komórki należy wstępnie częściowo odwodnić, aby uniemożliwić przypadkową wewnątrzkomórkową krystalizację wody podczas bardzo szybkiego schładzania. W tym celu należy poddać komórki dehydratacji albo w roztworach hipertonicznych (np. mannitolu, sorbitolu, sacharozy) lub przemrażając je powoli do około -30pC (co prowokuje częściowe wymarzenie wody na zewnątrz komórki), a dopiero potem przenosić je do temperatury ciekłego azotu.

Prawdopodobieństwo przeżycia działania ultraniskiej temperatury zwiększa obecność związków ochronnych, tzw. krioprotektantów. Należą do nich niskocząsteczkowe związki

rozpuszczalne wnikające do komórek, takie jak cukry, aminokwasy lub alkohole poliwdorotlenowe, jak również polimery nieprzenikające przez błonę komórkową. Krioprotektanty mogą działać w różny sposób. Związki te, wiążąc się z białkami, mogą stabilizować ich strukturę a zatrzymując wodę w komórce - przeciwdziałać zateżaniu elektrolitów wewnątrz komórek. Związki niewnikające do komórki, poza oddziaływaniem na plazmolemę, mogą również działać ochronnie modyfikując strukturę powstających kryształów wody.

Literatura:

- Sakai A, Matsumoto T, Hirai D, Charoensub R. 2002. Survival of Tropical Apices Cooled to -196pC by Vitrification. W: *Plant Cold Hardiness* (Li PH, Palva JP, red.), str. 109-119.
- Sakai A, Larcher W. 1987. *Frost Survival of Plants*, Springer-Verlag, Berlin:
- The Freezing Process in Plants, str. 21-38.
 - Results of Freezing Injury and Chances of Recovery, str. 54-58.
 - Supercooling as a Survival Mechanism, str. 70-85.
 - Survival at Ultralow Temperatures, str. 91-96.

II.2. Część laboratoryjna

Celem ćwiczenia jest:

- porównanie przeżywalności nasion powietrznie suchych i nasion napęczniałych w wodzie po przemrożeniu ich do temperatury ciekłego azotu,
- temperatury krystalizacji wody w całych nasionach słonecznika i wyizolowanych z nich zarodkach,
- wykazanie możliwości przechowania metabolicznie aktywnych tkanek roślinnych w temperaturze ciekłego azotu

II.2.1. Przeżywalność nasion a ich uwodnienie

Material badawczy:

Nasiona rzepaku, fasoli azuka oraz ziarniaki pszenicy i kukurydzy

Sprzęt i aparatura:

- termopary z rejestratorami
- pojemnik na azot;

- łaźnia wodna.
- próbówki Cryovial;
- szalki Petriego.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- folia aluminiowa;
- bibuła filtracyjna;
- ciekły azot.

Wykonanie ćwiczenia:

II.2.1.1. Przygotowanie materiału

Przygotować po 80 nasion rzepaku, fasoli, pszenicy i kukurydzy. Na 18 godzin przed rozpoczęciem doświadczenia połowę nasion namoczyć w dwukrotnej objętości wody destylowanej. Namoczone i suche nasiona podzielić na porcje: rzepaku po 10 sztuk, fasoli, pszenicy i kukurydzy po 5 sztuk. Każdą porcję włożyć do próbówki Cryovial. Dwie próbówki z nasionami rzepaku oraz po cztery z nasionami fasoli lub ziarniakami pszenicy i kukurydzy (osobno ziarniaki namoczone i suche) owinąć razem folią aluminiową i wyraźnie podpisać. Pozostałą część nasion (kontrola), przechowywać w lodówce.

II.2.1.2. Przemrażanie nasion w temperaturze ciekłego azotu

Zapakowane w folię próbówki z nasionami włożyć ostrożnie do pojemnika z ciekłym azotem i pozostawić na 30 minut. Po tym czasie ostrożnie wyjąć pakiety i szybko wrzucić do łaźni wodnej o temperaturze nie wyższej niż 40°C, inkubować przez 10 minut (sprawdzić dokładnie temperaturę!).

Nasiona kontrolne (nieprzemrażane) i przemrożone w ciekłym azocie wykładać po 20 sztuk na dokładnie podpisane szalki Petriego, wyłożone podwójną warstwą bibuły filtracyjnej i zwilżone 4 ml wody. Szalki przechować w cieplarni o temperaturze 20pC do następnego tygodnia. Policzyc skielkowane nasiona, obliczyc procent przeżycia przemrażanych nasion (suchych i namoczonych) w odniesieniu do nieprzemrażanej kontroli. Wyniki przedstawic w formie tabel lub diagramów.

Wyciągnąć wnioski na temat:

- a) zależności między uwodnieniem tkanek a ich odpornością na bardzo niskie temperatury
- b) ewentualnych różnic w odporności badanych nasion

II.2.2. Różnicowa analiza termiczna (DTA)

Material badawczy:

Nasiona słonecznika

Sprzęt i aparatura:

- szalki Petriego;
- termopary z rejestratorami;
- MiniCool (aparat do ultraszybkiego schładzania prób).

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- błękit Evansa;
- ciekły azot;
- alkohol etylowy;
- probówki typu Eppendorff

Wykonanie ćwiczenia:

Przygotowanie nasion

Przygotować 20 nasion słonecznika, przemywając nasiona krótko (10 min) alkoholem etylowym. Przetrzeć palce alkoholem i z połowy nasion zdjąć łupinę. Nasiona i wyizolowane zarodki przechowywać na szalkach Petriego wyłożonych zwilżoną bibułą.

Przeprowadzenie różnicowej analizy termicznej

Do jednej probówki Eppendorffa włożyć ziarno słonecznika z termoparą przytwierdzoną do niego parafilmem, termoparę odniesienia owinać samym parafilmem i umieścić w drugiej probówce. Podobnie postąpić z wyizolowanym zarodkiem. Termopary podłączyć do rejestratorów.

Termopary umieścić w komorze aparatu Minicool. Włączyć program 6 (schładzanie od temperatury 0°C do -35°C z szybkością 1°C/min). Obserwować rejestratory. Po wystąpieniu drugiej egzotermii przerwać schładzanie i wyłączyć MiniCool.

Ocena stopnia przeżycia nasion - barwienie błękitem Evansa

Nasiona i zarodki kontrolne (nieprzemrażanych) oraz poddane przemrażaniu wyłożyć na małe szalki i zalać roztworem 0,25% błękitu Evansa na 25 minut (**Uwaga: Prace z**

barwnikiem prowadzić w rękawiczkach!). Roztwór zlać, zarodki przepłukać dużą ilością wody destylowanej (ok. 20-30 ml). Zaobserwować miejsca wnikania barwnika do uszkodzonych komórek (wnikanie barwnika oznacza zniszczenie struktury błon). Zanotować obserwacje.

Wyciągnąć wnioski na temat:

- a) roli okrywy nasiennej w odporności nasion na mróz,
- b) możliwości wykorzystania DTA do wyznaczania odporności tkanek na mróz,

II.2.3. Krioprezewacja zawiesiny komórkowej

Materiał badawczy:

Zawiesina komórek tytoniu BY2 (pochodząca z kalusa) i zawiesina embriogeniczna komórek goryczki (*Gentiana* spp.)

Sprzęt i aparatura:

- MiniCool (aparat do ultraszybkiego schładzania prób).
- spektrofotometr Shimadzu 160A;
- pojemnik na ciekły azot;
- łaźnia wodna
- próbówki Cryovial.

Odczynniki i materiały:

- mieszanina 10% DMSO i 12% glicerolu
- 1 ml odczynnika tetrazoliowego;
- etanol 96%
- próbówki Cryovial;
- ciekły azot;

Wykonanie ćwiczenia:

Przygotowanie materiału.

Komórki zawiesiny odsączyć z pożywki i przepłukać wodą destylowaną. Materiał podzielić na 2 części: jedną z nich zalać 30 ml wody destylowanej a drugą 30 ml krioprotektantu (mieszanina 10% DMSO i 12% glicerolu) i przez 1 godzinę inkubować na wytrząsarce, w temperaturze pokojowej.

Zamrażanie i rozmrażanie materiału

Komórki zawiesiny wymieszać i rozdzielić materiał z każdego wariantu doświadczenia do 15 próbek Cryovial (po 50 mg odpowiedniej zawiesiny), pozostawić w lodówce po 5 próbek jako kontrolę, a resztę przemrażać w różnych warunkach:

- a) bezpośrednio w ciekłym azocie (po 5 próbek z każdego wariantu)
- b) dwuetapowo (również po 5 próbek): schłodzić w MiniCool'u powoli (1p/min.) do temperatury -35°C , pozostawić na 15 minut, a następnie przenieść próby bezpośrednio do ciekłego azotu .

Po 30 min przechowywania w ciekłym azocie połowę prób rozmrozić szybko w łaźni wodnej w temperaturze 40°C , drugą połowę ogrzać stopniowo w temperaturze pokojowej.

3. Ocena żywotności komórek metodą tetrazoliową

Próby kontrolne i przemrażane odsączyć pipetą, a następnie zalać po 1 ml odczynnika tetrazoliowego. Żywotność komórek ocenić na podstawie ilości czerwonego barwnika (formazanu), powstającego w komórkach w wyniku redukcji chlorku tetrazoliowego (TTC) po 20 godz. inkubacji w temperaturze pokojowej. Ekstrakcję przeprowadzać etanolem, w łaźni wodnej o temperaturze 70°C . Spadek zawartości tego związku jest proporcjonalny do stopnia uszkodzenia komórek. Za miarę żywotności komórek przyjmuje się zmiany zawartości formazanu w stosunku do kontroli przechowywanej w 4°C , której wartość przyjmuje się za 100%.

Wyniki przedstawić w postaci diagramów. Określić czynniki warunkujące możliwość przechowywania materiału w ultraniskich temperaturach.

Ćwiczenie III. Wykrywanie programowanej śmierci komórkowej na poziomie DNA

Bożenna Maciejewska,

Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin, UW

III.1. Część teoretyczna

Śmierć komórek może mieć podłoże patologiczne lub być elementem programu genetycznego realizowanego podczas rozwoju i morfogenezy organizmu. Programu, który kontroluje liczbę komórek organizmu, usuwa komórki uszkodzone i niezdolne do spełniania właściwych sobie funkcji i takich, które mogą być potencjalnie szkodliwe. Tę formę eliminacji komórek z organizmu nazwano programowaną śmiercią komórek (*programmed cell death*, PCD).

Zmiany towarzyszące programowanej śmierci komórek u roślin nie są tożsame z obserwowanymi podczas apoptozy u zwierząt, chociaż szereg badań wskazuje, że szlaki apoptotyczne w komórkach roślinnych i zwierzęcych są podobne z morfologicznego i biochemicznego punktu widzenia (Reape i McCabe, 2008). Wiele cech charakterystycznych dla apoptozy u zwierząt jest także obserwowana podczas PCD u roślin, chociaż nie znaleziono dotąd markerów biochemicznych, wspólnych dla wszystkich form programowanej śmierci komórek. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych markerów jest internukleosomalna fragmentacja DNA katalizowana przez endogenne endonukleazy, która prowadzi do powstania początkowo dużych (50-300kbp), a następnie małych (180bp) fragmentów DNA. Ostateczna faza śmierci komórki roślinnej, podobnie jak zwierzęcej, jest także zależna od specyficznych proteinaz cysteinowych. Programowana śmierć komórek obserwowana jest u roślin w różnych fazach rozwoju, zaangażowana jest zarówno w morfogenezę tkanek embrionalnych, jak i homeostazę dojrzałych organów. Uczestniczy m.in. w usuwaniu komórek spełniających swe funkcje jedynie tymczasowo, np. kiedy degeneracji na drodze PCD ulegają komórki wieszadełka (*suspensora*); towarzyszy także różnicowaniu elementów naczyniowych ksylemu czy uruchamiana jest w odpowiedzi na niekorzystne, stresowe warunki środowiska (np. wysoka lub niska temperatura). Obserwuje się ją również w komórkach warstwy aleuronowej i bielma kielkujących nasion zbóż, których komórki ulegają degradacji wkrótce po tym, jak zmagazynowane w nich rezerwy pokarmowe ulegną mobilizacji na potrzeby rozwijającego się zarodka. Podczas kielkowania ziarniaków zbóż gibereliny wydzielane przez rozwijający się zarodek aktywują w warstwie aleuronowej enzymy hydrolityczne (alfa- amylazy, nukleazy i proteinazy) degradujące zawarte w komórkach bielma zapasy. Proces ten jest regulowany w czasie tak, żeby zmagazynowane

rezerwy wystarczyły siewce do osiągnięcia stadium samowystarczalności i na jej dalszy prawidłowy rozwój. Na tym etapie, komórki warstwy aleuronowej, których funkcja została zakończona wkraczają na drogę PCD.

Obok programowanej śmierci pojedynczych komórek lub całych zespołów komórek obserwuje się także śmierć patologiczną określaną terminem nekroza (martwica). Zachodzi ona w sposób przypadkowy i nie jest związana z programem rozwojowym organizmu a następuje zwykle w wyniku mechanicznego uszkodzenia komórki lub działania silnych czynników stresowych (np. atak patogena).

Literatura

Reape T.J., McCabe P.F. (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist*. 180: 13 - 26

III.2. Część laboratoryjna

Celem ćwiczenia jest obserwacja programowanej śmierci komórek w pęczniejących ziarniakach kukurydzy, a także w liściach kukurydzy pochodzących z roślin poddanych stresowi niskiej temperatury oraz wykazanie, charakterystycznej dla PCD, fragmentacji DNA.

III.2.1. Wizualizacja obszarów żywych i martwych komórek w ziarniakach kukurydzy z zastosowaniem barwień przyżyciowych – błękitu Evansa i chlorku trójfenylotetrazoliowego – TTC

Material badawczy:

Napęczniałe (48 godz.) ziarniaki kukurydzy.

Sprzęt i aparatura:

- skalpel;
- szkiełko zegarkowe;
- binokular z kamerą i komputerem;
- cieplarka.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- chlorek trójfenylotetrazoliowy (TTC),
- błękit Evansa.

Wykonanie ćwiczenia:

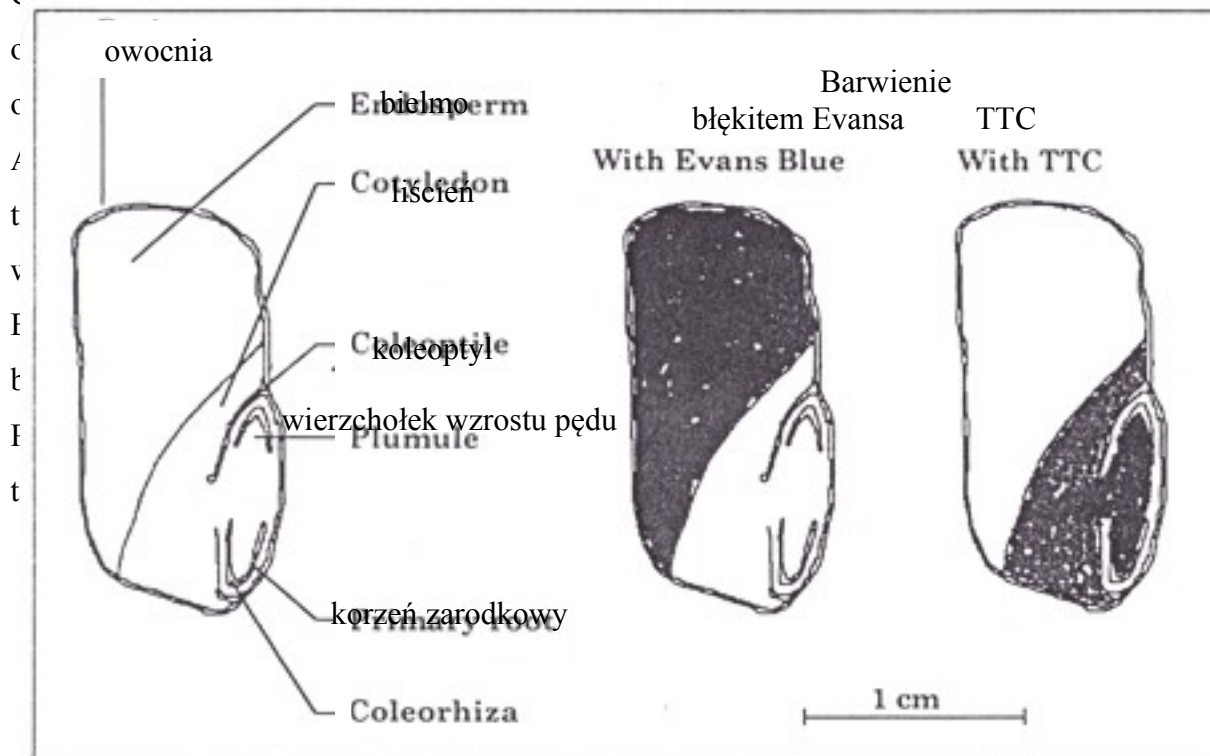
Otrzymane ziarniaki kukurydzy należy podzielić na dwie części według schematu zamieszczonego na rysunku III.2.1.

Rys. III.2.1. Rozdzielenie ziarniaka kukurydzy na część bielmową i zarodkową

Otrzymane „połówki” ziarniaków należy następnie umieścić odpowiednio w roztworach:

- część zarodkową nasienia płaszczyzną cięcia umieścić w temperaturze pokojowej (lub np. 30 0 C) na szkiełku zegarkowym w 1 % TTC na 10- 20 minut;
- część „bielmową” ziarniaka płaszczyzną cięcia umieścić w temperaturze pokojowej na szkiełku zegarkowym z kilkoma kroplami 0,1% roztworu błękitu Evansa. Po ok. 1 minucie usunąć ziarniaki z roztworu barwnika i delikatnie spłukać wodą destylowaną jego pozostałość;
- dodatkowo wykonać barwienie części zarodkowej w błękitie Evansa i części „bielmowej” w roztworze TTC.

Chlorek trójfenylotetrazoliowy (TTC) jest barwnikiem powszechnie stosowanym do



Rys. III.2.2. Barwienie części zarodkowej i „bielmowej” ziarniaków kukurydzy TTC i błękitem Evansa

Opisać i zinterpretować uzyskane wyniki.

III.2.2. Wykrywanie programowanej śmierci komórek (PCD) na poziomie DNA w kielkujących ziarniakach kukurydzy (*Zea mays* L.) i w liściach kukurydzy poddanych stresowi niskiej temperatury.

Materiał badawczy:

Napęczniałe przez 48 godz. ziarniaki kukurydzy. Liście kukurydzy pochodzące z roślin hodowanych w warunkach kontrolnych (por. ćwiczenie 1) i poddane 24 godzinnemu działaniu temperatury 80C.

Sprzęt i aparatura:

- sterylne moździerzki i tłuczki;
- sterylna szpatułka metalowa;
- sterylna pęseta;
- sterylne nożyczki;

- rękawice kuchenne;
- pojemnik na azot;
- probówki wirówkowe;
- blok grzejny;
- binokular;
- wirówka;
- aparaty do elektroforezy;
- pipety automatyczne o pojemności 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l.

III.2.2. Wykrywanie programowanej śmierci komórkowej (PCD) na poziomie DNA w kiełkujących ziarniakach kukurydzy i liściach kukurydzy (*Zea mays* L.) poddanych stresowi niskiej temperatury.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

A. Odczynniki do izolacji DNA

1. bufor do izolacji DNA (2xCTAB):

- a. 100mM Tris/HCl, pH 8,0
- b. 1.4 M NaCl
- c. 20 mM EDTA, pH 8,0
- d. 2% CTAB (cetyltrimetylamonium bromide)
- e. 0.2% β -merkaptoetanol
- f. 3% PVPP

2. roztwór CTAB/NaCl

- a. 10% (w/v) CTAB roztwór mieszać w temp. 650C
- b. 0.7M NaCl

3. bufor do wytrącania DNA

- a. 1% (w/v) CTAB
- b. 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
- c. 10mM EDTA, pH 8,0

4. bufor do elucji DNA (z wysokim stężeniem soli)

- a. 10mM Tris/HCl, pH 8,0
- b. 0.1mM EDTA, pH 8,0
- c. 1,0mM NaCl

5. bufor do elucji DNA
 - a. 10mM Tris/HCl, pH 8,0
 - b. 1.0 mM EDTA, pH 8,0
6. mieszanina- chloroform:alkohol izoamylowy (24:1)
7. izopropanol (przechowywać w zamrażarce)
8. 80% etanol
9. alkohol absolutny

2. Odczynniki do elektroforezy DNA

1. 1% agarozą: przygotować 50ml agarozy w buforze do elektroforezy DNA
2. bufor migracyjny do elektroforezy DNA w żelu agarozowym (10x stężony)
 - a. 54g Tris
 - b. 27.5g kwas borowy
 - c. 20ml 0.5 M EDTA (pH8,0)
3. bufor do zawieszania prób (6x stężony)- próby mieszamy 4x DNA:1x bufor
 - a. 0.25% błękit nitrobromofenolowy (NTB)
 - b. 40% sacharoza
4. probówki typu Eppendorf (2,0 ml i 1,5 ml- sterylne)
5. końcówki do pipet sterylne

III.2.2.1 Izolacja DNA metodą CTAB

1. Z otrzymanych spęczniałych ziarniaków kukurydzy usunąć łupinę nasienną i następnie ostrożnie wyizolować zarodki (500 mg) oraz tkankę bielma (500 mg).
2. Usunąć 3-liść z roślin kukurydzy wyhodowanych w warunkach kontrolnych i poddanych działaniu niskiej temperatury
3. Uzyskany materiał (bielmo, zarodki, liście) przenieść do schłodzonego moździerza i rozetrzeć w ciekłym azocie na proszek
4. W sterylnej probówce Eppendorf o poj. 1,5 ml, umieścić 500µl ogrzanego do 650C buforu do izolacji DNA [**bufor 1**] (2xCTAB), dodać PVPP do osiągnięcia stężenia 3% oraz 10µl β-

merkaptoetanolu, a następnie do probówki dodać proszek (ok.500 mg) uzyskany z materiału roślinnego.

5.Probówki umieścić na 30 min w temperaturze 650C, w bloku grzejnym. Próby delikatnie, regularnie mieszać.

6.Następnie do każdej próby dodać równą objętość mieszaniny[**bufor 6**] chloroform:alkohol izoamyłowy (24:1) i delikatnie mieszać przez obracanie prób.

7.Następnie próby odwirować przy 10000 obrotów/min (7500xg) przez 5 min.w temp. pokojowej. Górną fazę odpipetować do nowej, sterylnej probówki i ponownie dodać mieszaninę [**bufor 6**] chloroform: alkohol izoamyłowy. Próby odwirować j.w.

8.0.1 objętości roztworu CTAB/NaCl [**bufor 2**] ogrzanego do 650C dodać do górnej fazy uzyskanej w pkt.7 i umieszczonej w nowej sterylnej pożywce.i delikatnie mieszać przez obracanie. Do roztworu dodać równą objętość mieszaniny [**bufor 6**] chloroform:alkohol izoamyłowy (24:1) i delikatnie zmieszać, a następnie próby odwirować przy 10000 obrotów/min (7500xg) przez 5 min.w temp. pokojowej. Ten etap powtórzyć dwukrotnie.

9.Jedną objętość buforu do wytrącania DNA [**bufor 3**] dodać do supernatantu uzyskanego w pkt. 8. Powstały osad odwirować przy 2700 obrotów/min (500 x g) przez 5 min w temp. pokojowej. Ostrożnie zlać uzyskany supernatant. DNA pozostaje w probówce w postaci osadu.

10.Osad DNA rozpuścić w 500μl buforu do elucji DNA z wysokim stężeniem soli [**bufor 4**].

11.Następnie wytrącić DNA przez dodanie 0.6 objętości (300 μl) zimnego izopropanolu [**bufor 7**], próby delikatnie wymieszać a następnie odwirować 15 min przy 10000 obrotów/min (7600 x g)

12.Zlać supernatant a osad przemyć 80% etanolem a następnie etanolem absolutnym.

13. Po wysuszeniu osadu rozpuścić go w buforze do elucji DNA [**bufor 5**]

14. Uzyskany DNA zawiesić w buforze do zawieszania prób (bufor 6x rozcieńczyć) w stosunku 20μl DNA 5μl buforu.

15. Przeprowadzić elektroforezę uzyskanego DNA w żelu agarozowym

III.2.2.2. Elektroforeza DNA:

1. Przygotować 1% roztwór agarozy w buforze do elektroforezy. Na 2 min roztwór umieścić w kuchence mikrofalowej i po rozpuszczeniu agarowy roztwór wystudzić i wylać na przygotowane „saneczki” tak, aby grubość żelu nie przekraczała 0,5 cm.
2. W żelu umieścić grzebień na wykonanie kieszonek. Po spolimeryzowaniu żelu usunąć grzebień.

3. Do aparatu nalać buforu do elektroforezy.
4. W kieszonkach umieścić po 15 μl przygotowanego wcześniej preparatu DNA, w jednej kieszonce umieścić wzorzec DNA.
5. Elektroforezę prowadzić przy napięciu 100 V i natężeniu 50 mA, zakończyć kiedy czoło barwnika znajdzie się 1 cm przed końcem płytki.
6. Usunąć ostrożnie żel i umieścić na około 10 minut w roztworze bromku etydyny (!!!) o stężeniu 0.5 $\mu\text{g/ml}$.
7. Obejrzeć żel w świetle UV, sfotografować. Wyciągnąć wnioski.

Ćwiczenie IV. Wykrywanie organizmów modyfikowanych genetycznie (GMO)

Magdalena Żurawska-Zajfert, Katarzyna Grelewska, Anna Linkiewicz

Laboratorium Kontroli GMO, IHAR Radzików

IV.1. Część teoretyczna

W ciągu ostatnich dziesięcioleci rozwój technik biologii molekularnej i genetyki oraz biotechnologii roślin umożliwił klonowanie genów i przenoszenie ich do żywych komórek, z których możliwe jest odtworzenie całego organizmu – rośliny, mikroorganizmu lub zwierzęcia, określanego jako Organizm Zmodyfikowany Genetycznie (GMO).

W roślinach zidentyfikowano i zmieniono wiele genów. Metody klasycznej hodowli wsparte technikami inżynierii genetycznej doprowadziły do powstania roślin GM z cechami odporności na owady czy wirusy, tolerancyjności herbicydów, zmienionym składzie aminokwasowym lub kompozycji kwasów tłuszczowych, obniżonym poziomie niekorzystnych substancji jak nikotyna. Rośliny GM w 2008 roku uprawiano na świecie w 25 krajach, na powierzchni ponad 125 milionów hektarów.

Jednocześnie w społeczeństwie pojawiły się wątpliwości dotyczące stosowania produktów GM w łańcuchu żywnościowym człowieka i zwierząt oraz obecności tych organizmów w środowisku. Należy pamiętać, że stosowanie GMO regulują szczegółowe przepisy na poziomie prawa międzynarodowego, Unii Europejskiej oraz prawa poszczególnych krajów. Przepisy wymagają bardzo szczegółowego badania każdego GMO na poszczególnych etapach prowadzących do wydania zgody na jego użycie. Wymagają też późniejszego monitorowania GMO i w przypadku wystąpienia realnych zagrożeń pozwalają na natychmiastową reakcję. Regulacje dotyczące stosowania i znakowania produktów GM zapewniają konsumentowi możliwość świadomego wyboru pomiędzy różnymi typami produkcji. Regulacje prawne Unii Europejskiej dotyczące GMO zakładają rozwój wiarygodnych i czułych metod wykorzystywanych do detekcji GMO. W celu wykrycia i ilościowej oceny obecności GMO opracowywane są metody specyficznej identyfikacji transgenicznego DNA lub białek. Od 2002 roku funkcjonuje w Unii Europejskiej Sieć Laboratoriów GMO (ENGL - European Network of GMO Laboratories) <http://engl.jrc.it/>, która jako organ Komisji Europejskiej zajmuje się problemami związanymi z GMO w całej zjednoczonej Europie.

Metody wykrywania genetycznie zmodyfikowanych organizmów (GMO)

Metody wykrywania GMO opisane w opracowaniu dotyczą wykrywania organizmów transgeniczných w materiale roślinnym a także w produktach żywnościowych i paszach pochodzenia roślinnego. Dwie główne grupy metod detekcji i oznaczania ilościowego GMO, używane powszechnie, stanowią metody oparte na analizie DNA oraz metody analizujące białka.

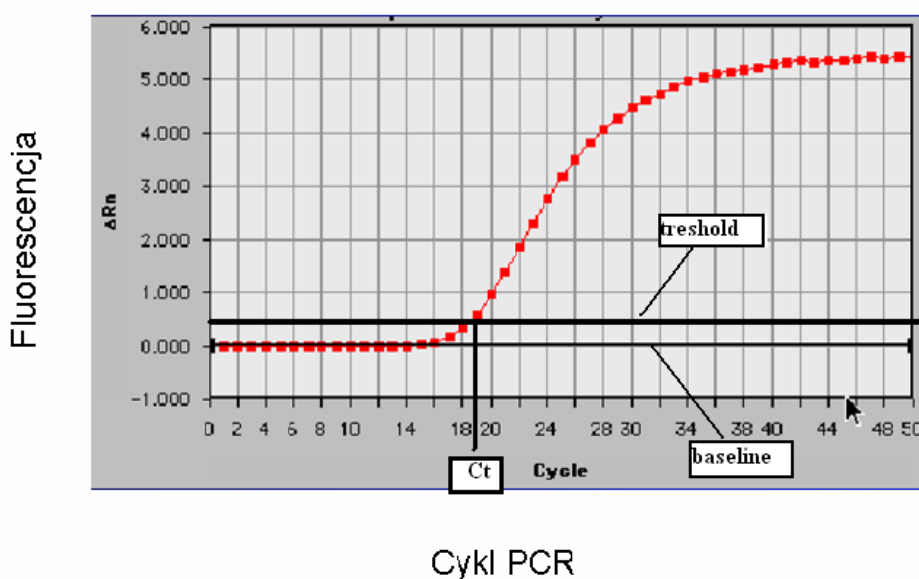
PCR

W Europie najczęściej stosowana jest metoda oparta na reakcji PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy). Pozwala ona na powielenie wybranego fragmentu DNA w bilionach kopii. Do reakcji PCR niezbędne są startery (oligonukleotydy komplementarne do fragmentów DNA na skrajach powielanej sekwencji, o długości ok. 20 par zasad), polimeraza DNA, odpowiednie środowisko reakcji, jony magnezu niezbędne do działania polimerazy oraz deoksynukleotydy (por. dodatek A). Reakcja PCR składa się z trzech etapów: denaturacja DNA zachodząca w 95°C, przyłączanie starterów (temp ok. 60°C) i synteza DNA przez polimerazę (temp. ok. 72°C). Powieleniu ulega fragment sekwencji leżący pomiędzy miejscami przyłączenia starterów. Podczas wielokrotnego powtarzania tego cyklu ilość produktu rośnie w tempie wykładniczym. Po 20 cyklach otrzymuje się około milion razy więcej kopii danego fragmentu niż na początku pierwszego cyklu. Metoda ta wykorzystywana jest do jakościowego oznaczania zawartości GMO.

Real Time PCR

Analiza ilościowa kwasów nukleinowych metodą PCR w czasie rzeczywistym, czyli Real Time PCR umożliwia określenie ilości danej modyfikacji DNA w badanej próbce. Technika ta, dzięki zastosowaniu specyficznych barwników fluorescencyjnych lub wyznakowanych odpowiednimi fluorochromami sond molekularnych, umożliwia obserwację zmian w stężeniu produktu PCR w czasie trwania reakcji. W metodzie stężenie amplifikowanego DNA jest monitorowane w każdym cyklu reakcji poprzez pomiar intensywności fluorescencji, która jest proporcjonalna do ilości produktu. Barwniki fluorescencyjne wykorzystywane w tej metodzie działają na dwa sposoby. Pierwsza strategia działania to wiązanie się barwników bezpośrednio do podwójnej nici DNA (np. SYBR Green). Druga, droższa od poprzedniej, ale bardziej specyficzna, wykorzystuje sondy znakowane barwnikami fluorescencyjnymi (np. sondy typu TaqMan, Molecular Beacons, Scorpion). Fluorescencja emitowana przez barwnik jest rejestrowana przez kamerę i przekazywana do komputera. Dzięki temu wynik reakcji Real Time PCR jest widoczny na

monitorze w postaci krzywej amplifikacji, która oddaje zależność natężenia fluorescencji w stosunku do czasu trwania reakcji PCR. W początkowych cyklach powolne powielanie produktu rejestrowane jako niski poziom fluorescencji tła (ang. *background*). W późniejszych etapach wzrastające stężenie produktów reakcji powoduje przyrost fluorescencji. Cykl w którym fluorescencja przekracza poziom tła nazywamy cyklem progowym – Ct (ang. *threshold cycle*). Cykl Ct charakteryzuje początek wczesnej fazy logarytmicznej PCR. Określenie cykli progowych dla badanych prób pozwala na porównanie ich pod względem zawartości sekwencji rozpoznawanych przez oligonukleotydy wykorzystane w reakcji PCR. Im więcej modyfikacji genetycznej w próbce tym we wcześniejszym cyklu fluorescencja przekroczy poziom tła i pojawi się krzywa amplifikacji produktu.



Rys. IV.1.1. Krzywa amplifikacji reakcji Real-Time PCR

W wyniku analizy GMO metodą Real Time PCR otrzymuje się wiele danych. Aby je zinterpretować muszą one zostać zebrane przy pomocy tabel a do obliczenia zawartości GMO wykorzystuje się metody graficzne i analizę statystyczną.

W reakcji Real Time PCR wykorzystuje się dwa zestawy starterów (i sond), jeden dla szukanej modyfikacji, drugi dla genu referencyjnego. Dzięki temu możliwe jest ilościowe oznaczenie tej modyfikacji. Gen referencyjny jest to sekwencja gatunkowo-specyficzna, występująca w pojedynczej kopii w genomie haploidalnym. Gen ten powinien być reprezentatywny dla różnych linii czy odmian w ramach gatunku oraz powinien być powielany podczas analizy w taki sam sposób jak modyfikacja genetyczna.

Są dwie główne metody oznaczania zawartości GMO w badanej próbce. W obu tych metodach wykorzystuje się materiały odniesienia, czyli takie materiały, w których znana jest procentowa zawartość danej modyfikacji genetycznej. Na podstawie materiałów odniesienia w pierwszej metodzie konstruowana jest krzywa wzorcowa. Wynik C_t uzyskany dla próbki odnosi się bezpośrednio do wartości z krzywej standardowej. Druga metoda tzw. metoda porównawcza $\Delta\Delta C_t$ wykorzystuje znormalizowane względem genu referencyjnego wartości C_t dla genu GMO. Dlatego $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ próbki nieznannej – ΔC_t genu referencyjnego. Metoda ta pozwala wyliczyć względną różnicę poziomu ekspresji badanego genu między próbkami nieznanymi a próbkami referencyjnymi. Warunkiem stosowania metody porównawczej są zbliżone efektywności reakcji powielenia sekwencji badanej i genu referencyjnego.

Ilość GMO w badanej próbce określa się jako procent danej modyfikacji genetycznej w odniesieniu do danego składnika np. 0,8% DNA soi Roundup Ready w soi.

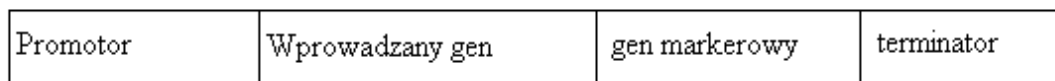
W procesie transformacji do rośliny wprowadzane są nowe fragmenty DNA. Kasetę transformacyjną wklonowaną do odpowiedniego wektora zawiera zazwyczaj następujące elementy:

Promotor - element niezbędny do ekspresji genu. Jest to sekwencja rozpoznawana przez polimerazę RNA zależną od DNA, biorącą udział w transkrypcji. Wyróżniamy kilka rodzajów promotorów: tkankowo specyficzne (promują ekspresję genu tylko w specyficznych tkankach np. liściach, pyłku, korzeniach), czasowo specyficzne (działają tylko w określonych okresach cyklu życiowego rośliny np. wykształcanie kwiatów lub dojrzewanie owoców), promotory indukowane (ekspresja genów następuje pod wpływem specyficznych warunków środowiskowych np. światło, susza, temperatura, lub pod wpływem określonych sygnałów komórkowych np. pod wpływem zranienia rośliny). Do ostatniej grupy należą promotory uniwersalne, które pozostają czynne niezależnie od tkanki, fazy cyklu życiowego rośliny i innych czynników. Należy do nich promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora (ang. *cauliflower mosaic virus* - CaMV), który jest bardzo często używany w konstrukcjach genetycznych używanych do transformacji roślin.

Wprowadzany gen - najczęściej wprowadzane sekwencje to geny odporności na herbicydy (geny *EPSPS* i *pat*), geny odporności na szkodniki (rodzina genów *cry*), geny warunkujące odporność na wirusy np. geny białek płaszcza wirusa papai (PRSV), oraz poprawiające cechy jakościowe roślin (np. *cordapA* zwiększający zawartość lizyny w kukurydzy, czy *BayTE* podnoszący zawartość kwasu laurynowego w nasionach rzepaku).

Gen markerowy - Transformacja roślin jest bardzo nisko wydajnym procesem. Dlatego zawsze potrzebny jest system pozwalający na odróżnienie tkanek ztransformowanych od pozostałych. Umożliwiają to geny markerowe obecne w wektorach używanych do transformacji. Należą do nich: geny odporności na antybiotyki (np. *nptIII*- odporność na kanamycynę)- selekcja odbywa się na pożywkach z antybiotykiem; geny odporności na herbicydy np. fosfotrycynę (*pat*). Do genów markerowych należą również geny reporterowe, umożliwiające ocenę wizualną przebiegu transformacji np. gen białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*), gen β -glukuronidazy (*gus*)- enzym kodowany przez ten gen rozkłada bezbarwne glukuronidy do barwnych produktów.

Terminator - sekwencja nukleotydowa będąca sygnałem końca transkrypcji. Najczęściej w konstrukcjach do GMO używany jest terminator syntazy nopolinowej z *Agrobacterium tumefaciens* (*T-nos*).



Rys. IV.1.2. Schemat typowej kasety transformacyjnej.

Metody detekcji GMO oparte na reakcji PCR ze względu na specyficzność dzieli się na:

1. Metody „skriningowe” (ang. *screening*)- inaczej metody przesiewowe. Pozwalają na wykrycie dużej ilości linii transgenicznych roślin bez identyfikacji konkretnego zdarzenia transformacyjnego. Najczęściej oznacza się obecność promotora 35S lub terminatora *nos*, które są najczęściej spotykanymi elementami genetycznymi w roślinach transgenicznych.
2. Metody specyficzne dla genu- oznaczana jest obecność transgenu
3. Metody specyficzne dla konstruktów (ang. *construct specific*)- amplifikowany jest fragment sekwencji DNA charakterystyczny dla wektora użytego do transformacji.
4. Metody specyficzne dla zdarzenia transformacyjnego (ang. *event specific*)- pozwalają na wykrycie konkretnej linii transgenicznej. W reakcji PCR amplifikowany jest fragment na styku DNA genomowego i konstruktów użytych do transformacji.

ELISA - test immunoenzymosorbcyjny

Najbardziej popularną z metod oznaczania GMO opartych na detekcji białek jest metoda ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*- test immunoenzymosorbencyjny). Metoda wykorzystuje reakcję immunologiczną pomiędzy przeciwciałami i antygenami. Przeciwciała to klasa białek wytwarzanych w organizmach kręgowców. Mają one zdolność do wiązania cząstek obcych dla organizmu (antygenów) i biorą udział w mechanizmach obronnych. Ich właściwości zostały wykorzystane do specyficznego wykrywania związków organicznych np. obecnych w transgenicznych roślinach.

W metodzie ELISA przeciwciała specyficzne dla wykrywanego antygeny są immobilizowane na tzw. immunosorbencie, którym może być np. pasek z tworzywa sztucznego lub ścianka studzienki w plastikowej płytce. Do przeciwciała wiąże się antygen, jeżeli jest obecny w analizowanej próbce, a następnie do innego epitopu (miejsce wiązania przeciwciała) antygeny wiąże się drugorzędowe przeciwciała. To przeciwciała jest skoniugowane z enzymem (np. peroksydaza chrzanowa), który katalizuje reakcję barwną. Dzięki temu po dodaniu substratu możliwa jest obserwacja zmiany zabarwienia, jeżeli próbka zawiera poszukiwany antygen. W innym systemie detekcji zamiast enzymu stosowane są nanocząsteczki złota o czerwonej barwie.

W testach ELISA do oznaczania GMO wykrywanym antygenem jest białko- produkt transgeny np. białka EPSPS, Cry. Jakościowe testy ELISA, w postaci pasków z tworzywa sztucznego (tzw. *Lateral flow strip*- paski z przepływem bocznym), pozwalają na określenie czy w próbce jest obecne szukane białko. Za pomocą testów ilościowych możliwe jest oznaczenie procentowej zawartości GMO w próbce. Intensywność zabarwienia próbki po barwnej reakcji jest wprost proporcjonalna do ilości antygeny. Zawartość GMO jest obliczana na podstawie porównania absorbancji badanych próbek po reakcji barwnej do absorbancji standardów o znanej zawartości GMO.

Analizy oparte na wykrywaniu białek nie są polecane dla mocno przetworzonych produktów żywnościowych ze względu na małą stabilność białek. Innym ograniczeniem tej metody jest uzależnienie wyniku od poziomu ekspresji białka w roślinie, który może się różnić w zależności od cyklu życiowego rośliny czy tkanki.

Rys. IV.1.3. Schemat działania testu ELISA

IV.2. Część eksperymentalna

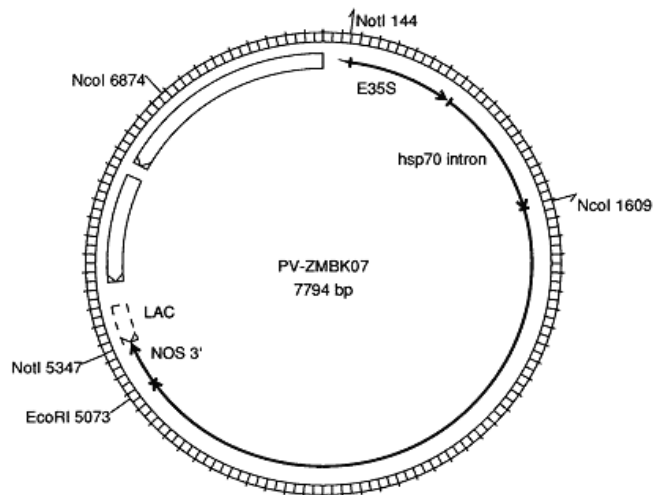
Celem ćwiczenia jest zidentyfikowanie próbek transgeniczných poprzez nastawienie reakcji PCR specyficznej dla promotora 35S. Każda para sprawdzi dwie wcześniej wyizolowane próbki, transgeniczną (zawierającą kukurydzę MON810) i konwencjonalną. Przeprowadzenie reakcji PCR z użyciem starterów specyficznych dla promotora 35S umożliwi identyfikację kukurydzy MON810 i odróżnienie jej od kukurydzy konwencjonalnej.

Detekcja GMO – identyfikacja kukurydzy MON810

Material badawczy:

Kukurydza MON810 jest rośliną transgeniczną dopuszczoną do uprawy w Unii Europejskiej. Odmiana ta jest odporna na najważniejszego szkodnika kukurydzy - omacnicę prosowiankę (*Ostrinia nubilalis* L.) dzięki wprowadzonemu genowi *cry1Ab* z bakterii *Bacillus thuringensis*. Białko Cry1Ab wiąże się specyficznie do receptorów obecnych w przewodzie pokarmowym gatunków z rzędu motyle (*Lepidoptera*) i powoduje zaburzenia w przepływie jonów, perforacje błony przewodu pokarmowego, a w konsekwencji śmierć owada. Białko Cry1Ab znajduje się pod kontrolą zmienionego promotora 35S z wirusa mozaiki tytoniu CaMV wraz z wzmacniaczem (enhancerem -E35S).

Geny są regulowane przez sekwencje promotorowe i terminatory. Najczęściej wykorzystywaną sekwencją regulatorową, w konstrukcjach używanych do transformacji jest promotor 35S pochodzący z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV) oraz terminator *nos* pochodzący z genu syntazy nopaliny z bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Identyfikacja jednej z tych sekwencji w badanej próbce może oznaczać obecność modyfikacji genetycznej.



agbios.com

Rys IV.2.1. Konstrukt plazmidowy użyty do transformacji kukurydzy MON810.

IV.2.1. Izolacja i oczyszczanie DNA

Izolacja DNA z żywności pochodzenia roślinnego, przy użyciu kitu **GeneMATRIX Food-Extract DNA Purification Kit**.

W trakcie izolacji DNA próbka zostaje dokładnie rozdrobniona, a następnie pozostałości struktur tkankowych i komórkowych są solubilizowane poprzez lizę w specjalnym buforze, który zapewnia integralność i ilościowy odzysk DNA. Proteinaza K degraduje białka komórkowe, w tym białka wiążące DNA i nukleazy. Dodanie wyspecjalizowanego roztworu umożliwia precypitację organicznych i nieorganicznych substancji, m.in.: białek, pozostałości komórkowych, inhibitorów enzymatycznych. Następnie DNA zawarte w lizacie jest wiązane do minikolumny w obecności buforu zawierającego sole chaotropowe i etanolu. Zanieczyszczenia związane do złoża są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Elucję oczyszczonego DNA wykonuje się buforem niskosolnym, np.: zawierającym Tris-HCl, TE lub wodą destylowaną. Oczyszczony preparat DNA jest gotowy do bezpośredniego użytku. Nie wymaga dalszej precypitacji etanolem.

Material badawczy:

Materiałem badawczym są ziarniaki transgenicznej kukurydzy MON810 oraz kukurydzy konwencjonalnej

Sprzęt i aparatura:

- sterylne moździerze i tłuczki;
- sterylna szpatułka metalowa;
- sterylna pęseta;
- sterylne nożyczki;
- rękawice kuchenne;
- pojemnik na azot;
- wirówka;
- worteks;
- statywy na probówki;
- pipety automatyczne o pojemności 10 µl, 100 µl, 1000 µl;
- łaznia wodna;
- termoblok.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- Zestaw do izolacji DNA z pasz (GeneMATRIX Food-Extract DNA Purification Kit)
- 96% etanol;
- rękawiczki (wolne od RN-az);
- probówki 2,0 ml, sterylne;
- probówki 1,5 ml, sterylne;
- tipsy sterylne z filtrem.

Wykonanie ćwiczenia

1. Nakropić 40 µl buforu aktywacyjnego (**Buffer FE**) **centralnie** na membranę kolumny (nie wirować). Pozostawić w temperaturze pokojowej.
2. Homogenizacja materiału:
 - zamrozić 100 mg pobranego materiału w ciekłym azocie, a następnie dokładnie rozdrobnić, używając do tego celu wcześniej schłodzonego moździerza i tłuczka. - -
 - umieścić utarty materiał w sterylnej 2 ml probówce.
3. Dodać 750 µl buforu **Res FE** i dokładnie wymieszać.
4. Dodać 60 µl buforu **Lyse FE** i 10 µl **Proteinase K**.
5. Dokładnie wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie probówki.
6. Całość inkubować 30 min w 65°C (podczas inkubacji wymieszać dwukrotnie przez odwracanie).

7. Wirować przez 5 min z prędkością 12 000 rpm.
8. Przenieść 400 µl supernatantu do nowej, sterylnej probówki.
9. Dodać 400 µl buforu **PR**. (bufor PR umożliwia precypitację organicznych i nieorganicznych substancji, m.in.: białek, pozostałości komórkowych, inhibitorów enzymatycznych).
10. Worteksować przez 5 sekund i inkubować przez 5 min. w lodzie.
11. Wirować przez 1 min z prędkością 14000 rpm.
12. Przenieść 600 µl supernatantu do nowej, sterylnej probówki o pojemności 2 ml.
13. Dodać 600 µl buforu **Sol FE**.
14. Dodać 600 µl **96% etanolu** i dokładnie wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie probówki.
15. Zwirować przez kilka sekund z prędkością 12000 rpm.
16. Przenieść 600 µl supernatantu na kolumnę.
17. Wirować przez 30 sekund z prędkością 12 000 rpm.
18. Wyjąć kolumnę, wylać przesącz i umieścić kolumnę z powrotem w probówce.
19. Powtórzyć kroki 16-18 procedury izolacji DNA.
20. Przenieść pozostałość supernatantu na kolumnę.
21. Wirować przez 1 min z prędkością 12 000 rpm celem przefiltrowania pozostałości lizatu przez złoże.
22. Wyjąć kolumnę, wylać przesącz i umieścić kolumnę z powrotem w probówce.
23. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash FEX** do kolumny i wirować przez 1 min z prędkością 12 000 rpm.
24. Wyjąć kolumnę, wylać przesącz i umieścić kolumnę z powrotem w probówce.
25. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash FEX** do kolumny i wirować przez 2 min z prędkością 12 000 rpm.
26. Kolumnę umieścić w nowej, sterylnej probówce.
27. Dodać 60 µl buforu **Elution** (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ogrzanego do temperatury 70°C.
28. Kolumnę pozostawić na 5 min w temperaturze pokojowej.
29. Wirować przez 30 sekund z prędkością 12 000 rpm.
30. Wyizolowane DNA znajduje się w przesączu. Zmierzyć stężenie DNA w próbce z użyciem spektrofotometru Nanodrop.
31. Otrzymane DNA może być przechowywane w temperaturze 2 - 8°C lub zamrożone w -20°C.

IV.2.2. Wykrywanie promotora 35S w DNA kukurydzy metodą PCR

Material badawczy:

Uzyskane wcześniej izolaty DNA z kukurydzy transgenicznej MON810 oraz kukurydzy konwencjonalnej

Sprzęt i aparatura:

- spektrofotometr Nanodrop;
- termocykler;
- aparat do elektroforezy;
- wirówka;
- mikrofalówka;
- waga;
- statywy na probówki;
- pipety automatyczne o pojemności 10 µl, 100 µl, 1000 µl.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- probówki 1,5 ml, sterylne;
- sterylne końcówki wymienne (tipsy) do pipet automatycznych (ew. z filtrem);
- rękawiczki wolne od RN-az.

Tabela IV.2.1. Charakterystyka starterów p35S-3 i p35S-6 używanych w reakcji PCR na obecność promotora 35S.

<hr/> p35S-3 <hr/>	
Sekwencja	5' GACAGTGGTCCCAAAGATGG 3'
Długość	20
Masa mol. (g/mol)	6172,0
Temp. topnienia * (G/C)	55.0
<hr/>	
p35S-6 <hr/>	
Sekwencja	5' GTCTTGCGAAGGATAGTGGG 3'
Długość	20
Masa mol. (g/mol)	6234,0

Temp. topnienia * (G/C) 55.0

*w oparciu o $[Na^+] = 50 \text{ mM}$

Wykonanie ćwiczenia

IV.2.2.1. Nastawianie reakcji PCR

Przygotowanie mastermixu

Obliczyć niezbędną ilość każdego z odczynników dla serii 4 próbek (2 próbki badane, kontrola negatywna (ntc) oraz uwzględnić błąd pipetowania). Postępować zgodnie z poniższą procedurą, według której objętość wszystkich reagentów w reakcji wynosi 25 μl .

- przygotować 1,5 ml probówkę,
- dodać odczynniki zgodnie z Tabelą IV.2.2:

Tabela IV.2.2 Przygotowanie p35S-3/p35S-6 Mastermixu

	Końcowa koncentracja	Mastermix dla 1 próbki	Mastermix dla 4 próbek
Sterylna, dejonizowana woda		 μl
10x PCR bufor	1x	 μl
25 mM MgCl_2	2,0 mM	 μl
10 mM dNTPs	0,1 mM	 μl
20 μM starter p35S-3	1 μM	 μl
20 μM starter p35S-6	1 μM	 μl
5U/ μl <i>Taq</i> DNA polimeraza	1U/25 μl	 μl
RAZEM		20 μl + 5 μl DNA μl

- wymieszać delikatnie p35S-3/p35S-6 mastermix przez pipetowanie „górze – dół” i krótko zwirować,
- odpipetować po 20 μl mastermixu do czterech 0,2 ml probówek PCR,
- dodać po 5 μl roztworu DNA o stężeniu 20ng/ μl do przygotowanych probówek z mastermixem,
- wymieszać delikatnie i krótko zwirować,
- umieścić probówki reakcyjne w termocyklerze i rozpocznij program STUDENT.

Tabela IV.2.3. Program STUDENT

	Temperatura	Czas
Początkowa denaturacja	95°C	10 min
Denaturacja	95°C	15 sec
Przyłączanie	60°C	15 sec
Wydłużanie	72°C	15 sec
Liczba cykli	50	
Końcowe wydłużanie	72°C	7 min
	4°C	∞

IV.2.2.2. Elektroforeza

Po zakończonej reakcji PCR wyjąć próbki z termocyklera i nałożyć ja na żel. Rozpocząć elektroforezę. Postępować zgodnie z poniższą procedurą:

- naważyć odpowiednią ilość agarozy tak, aby otrzymać 2% żel w 150 ml buforu 1x TA;
- podgrzać agarozę w mikrofalówce tak, aby otrzymać całkowicie rozpuszczony roztwór;
- schłodzić roztwór agarozy do 50-60°C i dodać 3 µl barwnika Midori Green (10mg/ml)
- przygotować tackę do elektroforezy i umieścić w niej grzebień;
- wylać roztwór agarozy na tackę i poczekać ok. 20 minut aby zastygł;
- wyjąć grzebień i nałożyć próbki na żel, zapisać kolejność;
- nałożyć marker wielkości DNA.

Wynik pozytywny: prążek DNA o wielkości 147 par zasad

Ćwiczenie V. Podstawy bioinformatyki

Paweł Siedlecki

Zakład Biologii Molekularnej Roślin, UW

V.1. Część teoretyczna

Analiza bioinformatyczna stała się już dawno nieodłącznym elementem badań molekularnych i fizjologicznych. Wiedza zgromadzona w bazach danych pozwala badaczom na coraz bardziej skomplikowane analizy wyników eksperymentalnych i projektowanie kolejnych badań na ich podstawie. Współczesne bazy to już nie tylko zbiory sekwencji – to cenne źródło anotacji (informacji charakteryzujących sekwencje), odnośników do literatury oraz wiedzy jaką udało się zgromadzić badaczom. Wiele ośrodków naukowych utrzymuje własne, specyficzne repozytoria np. dla konkretnego organizmu (np. SGD, PlasmoDB), a nawet konkretnego typu enzymów, szlaku bądź procesu. Istnieją również bardziej wszechstronne bazy – prawie wszystkie znane sekwencje nukleotydowe przechowywane przez trzy duże ośrodki NCBI (USA), EMBL (Europa) oraz DDBJ (Japonia). Z kolei konsorcjum UniProt utrzymuje bazy sekwencji aminokwasowych oraz doskonałych jakościowo anotacji. Bazy danych można przeszukiwać na kilka sposobów, używając słów kluczowych zawartych w opisach, wykorzystując samą sekwencję aminokwasową, nukleotydową bądź bardziej skomplikowane zapytania takie jak profile czy motywy.

Jednym z problemów z którymi stykają się badacze pracując z biologicznymi bazami danych jest trudność w łączeniu informacji z kilku źródeł. Opracowano szereg mechanizmów ułatwiających to zadanie, od prostych odnośników hipertekstowych, przez identyfikatory stosowane w różnych bazach, specyficzne narzędzia, aż po całe serwisy internetowe. Jednym z takich serwisów jest system SRS (Sequence Retrieval Service). Integruje on wiele źródeł informacji ułatwiając jednocześnie zapytania do wielu baz. Dysponuje też szeregiem narzędzi bioinformatycznych umożliwiające podstawową analizę sekwencji.

Jednymi z najczęściej używanych narzędzi bioinformatycznych są programy do porównywania ze sobą sekwencji. Istnieje wiele algorytmów umożliwiających taką analizę, najbardziej rozpowszechnionym obecnie są różne odmiany algorytmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et. al, 1997). Ten heurystyczny algorytm pozwala w szybki i w miarę dokładny sposób przeszukiwać bazy sekwencji w celu znalezienia zdeponowanych tam genów/białek podobnych do szukanego. Dzięki temu pracując z nieznanym fragmentem genomu, możemy ustalić do jakich znanych sekwencji jest podobny i co o nich wiadomo.

Innym problemem z którym często styka się biolog jest porównanie cech zestawu białek; znalezienie w sekwencjach wspólnych motywów, części konserwowanych ewolucyjnie. Fragmenty takie często są konserwowane ze względu na istotną funkcję jaką pełnią – mogą to być aminokwasy odpowiedzialne za budowę centrum katalitycznego enzymu, wykorzystywane do wiązania substratu bądź oddziaływań z białkami i/lub kwasami nukleinowymi. Znalezienie takich miejsc może pomóc w zrozumieniu funkcji danego białka lub w projektowaniu dalszych doświadczeń. Aby zdefiniować takie miejsca wykorzystuje się techniki wielokrotnego alignmentu sekwencji (MSA, ang. *multiple sequence alignment*). W uproszczeniu algorytmy MSA szukają najpierw dwóch najbardziej podobnych do siebie sekwencji, dopasowując je do siebie, a następnie sukcesywnie dokładają kolejne sekwencje do alignmentu.

Wielokrotny alignment sekwencji jest wykorzystywane również do prześledzenia odległości ewolucyjnych pomiędzy genami czy białkami. Na podstawie różnic w sekwencjach możemy prześledzić ewolucję molekularną danej grupy i określić sekwencję hipotetycznego przodka, z którego się wywodzą. Odległości ewolucyjne pomiędzy białkami pozwalają nam np. określić jak różnorodną populację badamy.

Literatura

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.
(1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 25: 3389 - 3402.

V.2. Pracownia komputerowa

Ćwiczenia na stronie <http://valis.ibb.waw.pl/EFMR2009>

Ćwiczenie VI. Analiza zmian transkryptomu u roślin z użyciem techniki mikromacierzy

Paweł Sowiński, Maciej Jończyk,

Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin, UW

Alicja Sobkowiak,

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR, Radzików

V.1. Część teoretyczna

Jednym z głównych zagadnień ekofizjologii molekularnej roślin jest poznanie, jakie geny są odpowiedzialne za reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska. W szczególności dotyczy to czynników transkrypcyjnych i innych elementów regulacyjnych biorących udział w szlaku transdukcji sygnału o stresie, a także genów kodujących enzymy i inne białka odpowiedzialne z aklimatyzację roślin do stresu.

Tradycyjne metody biologii molekularnej pozwalają badać zmiany ekspresji kilku – kilkunastu genów. Ostatnie lata przyniosły rewolucyjne rozwiązania metodyczne, dzięki którym możliwa jest porównawcza ocena ekspresji bardzo wielu genów na poziomie transkryptu. Taką metodą, coraz powszechniej stosowaną do jednoczesnego monitorowania dużej liczby genów lub nawet całego genomu, są mikromacierze. Metoda ta jest wykorzystywana m.in. do badania ekspresji genów w reakcji na różne stresy. Jest szczególnie przydatna i uzasadniona ekonomicznie, jeśli celem jest zbadanie zmian wzoru ekspresji wielu genów (transcriptome profiling). Aktualnie technika mikromacierzy jest stosowana nie tylko do celów badawczych, np. w ekofizjologii molekularnej roślin (Wullschleger i Difazio, 2003), ale także do celów diagnostycznych, np. w medycynie do wykrywania takich chorób jak choroby nowotworowe, wirusowe lub genetyczne, na przykład raka piersi, jajnika, talasemii, retinopatii czy infekcji wirusem HIV. Dokładna analiza pomaga wykryć różnice w przebiegu chorób i zdefiniować ich podtypy, stanowiąc krok naprzód w kierunku zindywidualizowanej medycyny. Ponadto wykrycie zmian w ekspresji poszczególnych genów pomaga wytypować potencjalne cele dla chemio- lub immunoterapii (Schulze i Downward, 2001).

Mikromacierze są zestawami sond molekularnych naniesionych w uporządkowany sposób na podłoże w postaci szklanych lub plastikowych płytek. Sondami molekularnymi mogą być cDNA (długość łańcucha powyżej 150 nukleotydów) lub oligonukleotydy (długość do 80 nukleotydów). Sondy cDNA są zwykle produktem reakcji PCR przeprowadzonej na bazie bibliotek cDNA lub genomowego DNA. Sondy typu oligo są syntetyzowane sztucznie. Sondy są nanoszone na podłoże różnymi technikami: m.in. z użyciem precyzyjnych robotów

(głowica dotykając specjalnie przygotowanej płytki zostawia na nim kroplę sondy), napyłania (technologia typu ink-jet, podobna do stosowanej w drukarkach atramentowych) lub syntezy *in situ* na płytce. Obecna technologia pozwala na umieszczenie na płytce od kilkudziesięciu do kilkuset tysięcy sond.

W technice mikromacierzy dokonuje się porównania ekspresji genów w dwóch obiektach biologicznych. Po przeprowadzeniu odpowiedniej procedury laboratoryjnej (por. podrozdział VI.2), dla obu obiektów uzyskuje się odpowiednie pule aRNA (*amplified RNA*) wyznakowane dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Pule te, po połączeniu, hybrydują się do mikromacierzy, gdzie fragmenty aRNA uzyskane po namnożeniu mRNA z prób biologicznych wiążą się do odpowiednich sond na mikromacierzach. Obrazy mikromacierzy uzyskuje się po skanowaniu odpowiednimi urządzeniami (skanerami). O poziomach ekspresji danego genu w dwóch porównywanych obiektach biologicznych będzie świadczył stosunek fluorescencji barwników fluorescencyjnych użytych do znakowania aRNA.

Eksperyment mikromacierzowy składa się z następujących etapów:

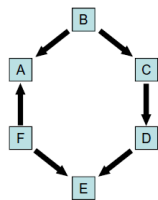
1. Planowanie eksperymentu
2. Uzyskanie wyznakowanego aRNA i hybrydyzacja do mikromacierzy
3. Wstępne opracowanie danych ze skanera
4. Analiza statystyczna i bioinformatyczna wyników.

1. Planowanie eksperymentu

W przypadku mikromacierzy dwukolorowych, uzyskiwane wyniki ekspresji genów mają charakter względny, bowiem wynik ekspresji genu w jednym obiekcie (np. w roślinach poddanych działaniu czynnika stresowego) jest odnoszony do wyniku ekspresji genu w drugim obiekcie (np. w roślinach kontrolnych). Pociąga to za sobą konieczność wykonywania wielu hybrydyzacji, jeśli eksperyment jest bardziej skomplikowany niż proste porównanie dwóch wariantów eksperymentalnych. Dla skomplikowanych eksperymentów zostały wypracowane standardowe schematy (modele) eksperymentów, których założeniem było uzyskanie jak największej wiarygodności statystycznej przy jak najmniejszej liczbie hybrydyzacji. Wśród najbardziej popularnych można wymienić (a) układ pętli oraz (b) układ referencyjny z próbą odniesienia (Ryc. VI.1.1).

a)

b)



Ryc. VI.1.1. Podstawowe schematy eksperymentów mikromacierzowych; (a) układ pętli, (b) układ referencyjny. Strzałki wskazują porównania między poszczególnymi obiektami biologicznymi.

Pierwszy układ eksperymentalny jest szczególnie efektywny przy porównywaniu małej liczby wariantów eksperymentalnych, jest to jednak układ zamknięty, tzn. dodanie nowego wariantu eksperymentalnego do pętli wymaga wielu dodatkowych hybrydyzacji. Drugi układ eksperymentalny zakłada porównanie wszystkich wariantów eksperymentalnych do próby odniesienia (np. RNA z kilku tkanek nowotworowych porównuje się do tkanki "zdrowej"). Jest to układ mało efektywny statystycznie, gdyż porównania pomiędzy wariantami eksperymentalnymi są dokonywane pośrednio, przez próbę odniesienia. Natomiast jest to układ otwarty, tzn. dodanie nowego wariantu eksperymentalnego wymaga przeprowadzenia tylko jednej dodatkowej hybrydyzacji z próbą odniesienia.

Istnieje wiele odmian powyższych dwóch układów eksperymentalnych, zadaniem badacza jest, przed przystąpieniem do eksperymentów, wybrać schemat doświadczalny odpowiedni do problemu badawczego.

Etap 2 (Uzyskanie wyznakowanego aRNA i hybrydyzacja do mikromacierzy) będzie omówiony w podrozdziale **VI.2 Część laboratoryjna**, natomiast etapy 3 (Opracowanie danych ze skanera) i 4 (Analiza statystyczna i bioinformatyczna wyników) będą omówione w podrozdziale **Część VI.3. Analiza wyników – pracownia komputerowa**.

Literatura

- Schulze A., Downward J. (2001). Navigating gene expression using microarrays – a technology review. *Nature Cell Biology* 3: E190 – E195
- Wullschleger S.D., Difazio S. (2003) Emerging use of gene expression microarrays in plant physiology. *Comparative and Functional Genomics*. 4: 216 – 224.

VI.2. Część laboratoryjna

Celem ćwiczenia jest zaprezentowanie studentom procedury laboratoryjnej, której końcowym efektem jest hybrydyzacja wyznakowanego aRNA do mikromacierzy. Istnieje kilka typów (platform) mikromacierzy. Dla każdej z nich producenci proponują własne procedury laboratoryjne. Choć różnią się w szczegółach, jednak ich ogólny schemat jest podobny. W naszym laboratorium stosujemy mikromacierze opracowane dla kukurydzy na Uniwersytecie w Arizonie, Tucson (Maize Oligonucleotide Array Project, USA, <http://www.maizearray.org>). Zawierają one sondy molekularne - oligonukleotydy o długości 70 nukleotydów - dla ok. 43 tys. genów, cDNA i EST oraz zestaw sond kontrolnych (kontrola druku, kontrola pozytywna i negatywna).

Technika mikromacierzy jest skomplikowana i długotrwała, wymaga dużego doświadczenia oraz jest bardzo kosztowna. Z tego względu jej prezentacja będzie miała formę pokazu głównych etapów. Dlatego poniższy opis techniki jest znacznie uproszczony. Dokładny opis procedury jest zamieszczony w Dodatku C.

1. Izolacja całkowitego RNA.
2. Ocena ilościowa i jakościowa RNA.
3. Namnożenie mRNA.
4. Znakowanie aRNA.
5. Hybrydyzacja do mikromacierzy.
6. Skanowanie mikromacierzy.

1. Izolacja RNA całkowitego

Istnieje kilka metod izolacji RNA z materiału biologicznego. Jedną z tych metod została zaprezentowana w opisie Ćwiczeniu I. 2.2.1.

2. Ocena ilościowa i jakościowa wyizolowanego RNA

Jakość wyizolowanego RNA jest jednym z krytycznych czynników warunkujących powodzenie dalszych etapów procedury i wysoką jakość hybrydyzacji do mikromacierzy. Ocena ilościowa i jakościowa RNA może być prowadzona wg procedury przedstawionej w opisie ćwiczenia I.2.2.2.

3. Namnożenie mRNA

W typowym eksperymencie mikromacierzowym uzyskuje się początkowo od 30 do 50 μg RNA całkowitego, co odpowiada tylko ok. 1 μg poliA-RNA. W związku z tym konieczne jest namnożenie uzyskanego mRNA. Większość metod amplifikacji mRNA polega na syntezie dwuniciowego cDNA z użyciem starterów oligo(dT) wbudowujących wirusowe promotory T3 lub T7 i następującej po tym transkrypcji *in vitro*. Efektem jest liniowy wzrost liczby cząstek mRNA. W pierwszym cyklu współczynnik amplifikacji wynosi ok. 10^3 , a w dwóch ok. 10^5 . Dzięki temu możliwe jest wykonanie eksperymentu mikromacierzowego z użyciem tylko 10 ng RNA, co odpowiada kilku komórkom.

4. Znakowanie aRNA barwnikami fluorescencyjnymi

W tym etapie, aRNA pochodzące z dwóch prób, które będą porównywane na mikromacierzy (np. z materiału z roślin kontrolnych i roślin poddanych działaniu jakiegoś czynnika stresowego) są znakowane dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Do tego celu najczęściej stosuje się barwniki Cyanine3 (Cy3) i Cyanine5 (Cy5). Barwniki są przyłączane do fragmentu aaUTP wbudowanego do aRNA podczas amplifikacji.

5. Hybrydyzacja do mikromacierzy

Celem tego etapu jest przyłączenie wyznakowanego aRNA do sond zawartych na mikromacierzach. Dwie próby wyznakowanego aRNA są mieszane z buforem hybrydyzacyjnym i nanoszone na podłoże mikromacierzy, a następnie przeprowadzana jest reakcja hybrydyzacji. Przyłączenie wyznakowanego aRNA z dwóch prób ma charakter konkurencyjny, tzn. jeśli w jednej próbie aRNA jest więcej niż w drugiej (co jest związane z różnym poziomem ekspresji danego genu w materiale biologicznym dwóch różnych typów), do sondy będzie przyłączane więcej aRNA z pierwszej próby, proporcjonalnie do stężenia w mieszaninie hybrydyzacyjnej.

W niektórych typach mikromacierzy, w celu unieruchomienia sond na powierzchni mikromacierzy, mikromacierze poddaje się działaniu pary wodnej, a następnie naświetla promieniowaniem UV. Ten etap procedury można wykonać na długo przed właściwym eksperymentem. Kondycjonowane szkiełka można przechowywać przez kilka miesięcy w

ciemności, w środowisku o obniżonej wilgotności, w temperaturze pokojowej.

W niektórych procedurach, w celu przygotowania podłoża, przed właściwą hybrydyzacją przeprowadza się prehybrydyzację.- obróbkę cieplną w obecności odpowiedniego buforu.

6. Skanowanie mikromacierzy

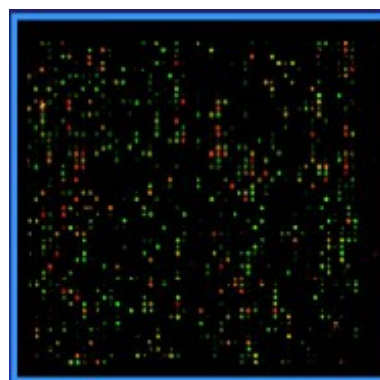
Po hybrydyzacji, wypłukaniu i osuszeniu szkiełek, wykonywane jest ich skanowanie. Odbywa się to w odpowiednich urządzeniach wyposażonych w lasery (2-4), jako źródła światła i układy zbierania obrazu (fotopowielacze, głowice detekcyjne). Niektóre ze skanerów mają wbudowane zmieniacze szkiełek (czipów). Dla barwników cy3 i cy5 skanowanie wykonuje się przy długościach fali emisji, odpowiednio 532 i 635 nm. Zeskanowany obraz szkiełka jest zapisywany w jednym graficznych formatów (*.tiff lub *.jpg). Taki obraz jest później poddawany obróbce komputerowej przy użyciu odpowiednich programów.

Ryc. obraz fluorescencji barwnika Cy3



obraz fluorescencji barwnika Cy5

nałożenie obrazów barwników
Cy3 i Cy5



VI.2.1. Powiększone fragmenty obrazu mikromacierzy skanowanego w kanale

„zielonym” (532 nm, Cy3) i „czerwonym” (635 nm, Cy5) oraz ich superpozycja.

VI.3. Pracownia komputerowa

VI.3.1. Opracowanie danych ze skanera

Zanim dane z mikromacierzy będą poddane analizom statystycznym i matematycznym, obraz graficzny mikromacierzy musi być przetworzony na wartości liczbowe. Polega to na sczytaniu wartości liczbowych (w jednostkach umownych) fluorescencji z obszarów (spotów) zajmowanego przez każdą z sond. Jest to wykonywane przy wykorzystaniu programu komputerowego dedykowanego dla konkretnego skanera. W ćwiczeniu zostanie użyty program GenePix Pro współpracujący ze skanerem GenePix firmy Axon. Program wylicza m.in. fluorescencję dla obu kanałów (532 nm i 635 nm), stosunek fluorescencji obu barwników i szereg zmiennych użytecznych dla analizy jakościowej.

Material badawczy

obraz graficzny mikromacierzy: zea_chlod.tif

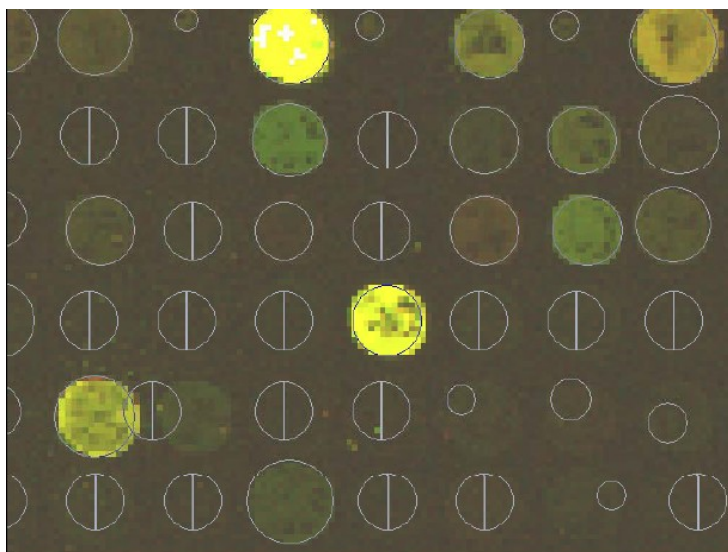
Sprzęt i aparatura

- komputer
- program GenePix Pro 6 (wersja demo)

Wykonanie ćwiczenia:

1. Otworzyć program GenePix Pro w trybie „analysis only”.
2. W polu „File” menu głównego wybrać „open images”.
3. Otworzyć plik (np. zea_chlod.tif).
Plik zawiera obraz w postaci dwóch warstw (dla obu kanałów barwnych). Program automatycznie nadaje obu warstwom fałszywe kolory: zielony i czerwony.
4. W polu „image” wybrać:
 - „wavelength 635”, aby zobaczyć obraz w kanale czerwonym,
z użyciem funkcji „zoom” można powiększyć wybrany fragment obrazu, poprawić jasność i kontrast obrazu pól zajmowanych przez sondy (spoty) ,
z użyciem funkcji zawartych w polu „tools”,
 - „wavelength 532”, aby zobaczyć obraz w kanale zielonym.
5. Kliknąć w pole „ratio 635/532”, aby sprawdzić położenie obu obrazów, korekty niezgodności można dokonać używając funkcji z pola „image tools”.

6. Powiększyć obraz tak, aby spoty były widoczne. Do obróbki obrazu wykorzystuje się plik GAL („Genepix Array List”) udostępniony przez producenta mikromacierzy, który po otwarciu nakłada na obraz siatkę z okręgów wskazujących położenie i identyfikujące sondy.
7. Kliknąć w pole „file”, a następnie „load array list” i wybrać odpowiedni plik typu GAL.
8. Aby nałożyć siatkę na obraz szkiełka:
 - wybrać funkcję „find array” (w polu „tools”),
 - wybrać funkcję „find all blocks”,
 - wybrać funkcję „align features in all blocks”



Rys. VI.3.1. Powiększony fragment mikromacierzy z naniesioną siatką przez program GenePix Pro. Spoty zidentyfikowane przez program są oznaczone okręgami. Okręgi z pionową linią oznaczają nieodnalezienie spotu.

9. Wynik automatycznego nanoszenia siatki na obraz mikromacierzy może być skorygowany po wejściu w pole „feature”, a następnie „select all features”. Aby usunąć oznaczenia spotów należy wybrać funkcję „clear all flags”. Podobnie można zmieniać inne ustawienia.
10. Po zmianie ustawień, należy ponownie użyć funkcji „align features in all bloks”. Jeśli nowe nałożenie siatki jest poprawne należy wybrać funkcję „lock settings”. Ustawienia mogą być zapisane po wejściu w pole „file”.
11. Aby uzyskać dane liczbowe odnoszące się do poszczególnych spotów, należy kliknąć w pole „analyze”. Wyniki pojawią się w tabeli „results”. Oznaczenia: „F” – „feature” (cecha), „B” – background (tło).

12. Wartości liczbowe mogą zapisane w postaci pliku o rozszerzeniu *.gpr. Plik może być odczytany zarówno przez program Microsoft Excel oraz przez różne programy statystyczne. Wartości liczbowe mogą być też wyeksportowane w postaci pliku tekstowego.

VI.3.2. Analiza statystyczna wyników z mikromacierzy.

Surowe wyniki fluorescencji, przed dalszymi analizami startystycznymi i matematycznymi , muszą zostać poddane procedurze normalizacji. Ma ona na celu usunięcie różnic między eksperymentami niezwiązanych z różnicami biologicznymi między badanymi obiektami (np. przebiegiem reakcji hybrydyzacji). Właściwa analiza statystyczna ma celu określenie poziomu istotności (p-wartości), przy którym różnice w ekspresji danego genu mogą być uznane za istotne statystycznie. Zarówno normalizacja, jak i analizy statystyczne są wykonywane przy użyciu specjalistycznych programów komputerowych, m.in. komercyjnych, Acuity, GeneSpring, JMP Genomix oraz ogólnie dostępnych, np. Bioconductor. W ćwiczeniu, analizy statystyczne zostaną wykonane w programie R przy użyciu darmowego pakietu limma (część projektu Bioconductor).

Material badawczy:

pliki w formacie *.gpr

Sprzęt i aparatura

- komputer
- pakiet limma (część projektu BioConductor, www.bioconductor.org) działający w programie R (www.r-project.org).

Geny o ekspresji istotnie zmieniającej się w chłodzie znajdziemy wykorzystując zasoby typu open-source. Będzie to pakiet limma (część projektu BioConductor, www.bioconductor.org) działający w programie R (www.r-project.org).

R działa w oparciu o komendy wpisywane z klawiatury. Każda użyta w tym tekście komenda opatrzona jest komentarzem pozwalającym zrozumieć „co się dzieje”. Proponujemy jedną z możliwych ścieżek analizy, odsyłając zainteresowanych tematem do cytowanych wyżej stron. Część komend nie zmieściła się w jednej linii i przechodzi do następnej. Aby

zaznaczyć, gdzie zaczyna się nowa komenda na początku każdej umieszczono symbol „>”. Symbol ten nie jest częścią komendy i nie należy go przepisywać.

1. Przygotowanie pliku z informacją o eksperymencie (notatnik). Plik opisujący nasze doświadczenie to „information.txt”. Zawiera on kolumny: slidenumber (numer mikromacierzy), FileName (nazwę pliku *.gpr), Cy3 i Cy5 (identyfikujące jak próbki były barwione). Każdy wiersz zawiera informacje dla jednej mikromacierzy.

2. Załadowanie pakietu limma i wczytanie pliku z opisem eksperymentu.

```
> library(limma)
> eks<-readTargets("sciezka/information.txt")
```

3. Wczytanie plików *.gpr

```
> mm<read.maimages(eks,source="genepix.median",path="sciezka/
", annotation="ID")
```

eks – plik z kroku nr 2.

source – wskazanie typu mikromacierzy i pobranie danych median fluorescencji.

annotation – wskazanie zmiennej identyfikującej sondy.

4. Wczytanie informacji o sondach (nazwa, położenie na mikromacierzy) z pliku *.gal.

```
> mm$genes<-readGAL("sciezka/maize-45k1.anno.gal.xls")
```

5. Sformatowanie danych (mm\$genes) do użycia w wykresach.

```
> mm$printer<-getLayout(mm$genes)
```

6. Rysowanie wykresów pokazujących rozkład fluorescencji (osobno dla cy5 i cy3) na mikromacierzach (analiza jakościowa eksperymentu). Po wykonaniu instrukcji „Par” nie należy zamykać pustego okna, które się pojawi. Powstałe okno z wykresami można rozciągać, zwiększając jednocześnie wykresy.

```
> par(mfrow=c(2,3))
```

```
> for (i in 1:6){imageplot(log2(mm$R[,i]),mm$printer,low="white",high="red")}
```

par – ustawia parametry bloku wykresów, tu 2 rzędy i 3 kolumny.

for i instrukcje po nim – rysują wykresy rozkładu zlogarytmowanej fluorescencji cy5.

Niskiej fluorescencji ma odpowiadać kolor biały, coraz wyższej coraz intensywniejszy czerwony.

```
> par(mfrow=c(2,3))
```

```
> for (i in 1:6){imageplot(log2(mm$G[,i]),mm$printer,low="white",high="green")}
```

Popatrz na wykresy. Czy fluorescencja z obu barwników rozkłada się równomiernie na mikromacierzy?

7. Przygotowanie wykresu MA (MA-plot). Na osi „x” odłożona będzie średnia fluorescencja $A = ((\log_2(\text{cy5}) + \log_2(\text{cy3}))/2)$ a na osi „y” różnica fluorescencji $M = (\log_2(\text{cy5}) - \log_2(\text{cy3}))$. Taki wykres pokazuje czy różnica w fluorescencji nie zmienia się wraz ze wzrostem średniej fluorescencji.

```
> logma<-normalizeWithinArrays(mm,method="none")
```

```
> par(mfrow=c(2,3))
```

```
> for (i in 1:6){plotMA(logma[,i])}
```

Aby narysować wykres MA trzeba użyć komendy „normalizeWithinArrays”. Tu nie robimy normalizacji, więc „method=„none””.

8. Normalizacja w obrębie szkiełka mikromacierzowego. Polega ona na wyrównaniu rozkładów fluorescencji z obu barwników, tak aby były porównywalne.

```
> mm_nw<-normalizeWithinArrays(mm,method="printtiploess",iterations=60,bc.method="subtract")
```

```
> par(mfrow=c(2:3))
```

```
> for (i in 1:6){plotMA(mm_nw[,i])}
```

Pierwsza komenda normalizuje dane w obrębie każdej z mikromacierzy. Robi to

osobno dla każdego bloku sond „method=’printtiploess’” i od fluorescencji sondy odejmuje fluorescencję przyległego tła „bc.method=’subtract’”.

Następne, to komendy rysujące wykresy MA dla znormalizowanych danych. Należy je porównać z wcześniejszymi.

9. Porównanie rozkładu fluorescencji między mikromacierzami – wykres.

```
> plotDensities(mm_nw)
```

Sprawdź, czy rozkłady fluorescencji się nakładają, jeśli nie – konieczna jest normalizacja między mikromacierzami.

10. Normalizacja między mikromacierzami. Wyrównuje rozkłady fluorescencji dla zbioru mikromacierzy.

```
> mm_nm<-normalizeBetweenArrays(mm_nw,method=’Aquantile’)  
> plotDensities(mm_nm)
```

Pierwsza komenda normalizuje dane metodą „aquantile”, wykorzystującą wartość A. Druga komenda rysuje rozkład fluorescencji dla wszystkich mikromacierzy, porównaj go z wcześniejszym.

11. Test istotności. Pokazuje które sondy zmieniają ekspresję w chłodzie.

```
> poj.kropki<-subset(names(table(mm$genes$ID)),(table(mm$genes  
$ID)>1)==FALSE)
```

Komenda wybiera ze zbioru po jednej sondy z każdego rodzaju (dana sonda może być nadrukowana wiele razy – powtórzenie wewnątrz mikromacierzy). Jest to wymóg następnych komend.

```
> ukl.eksp<-modelMatrix(eks,ref=’control’)
```

Wskazanie, który wariant eksperymentalny ma być użyty jako kontrola, czyli do którego ma być porównana fluorescencja pozostałych wariantów (tu chłodu – „cold”).

```
> model<-lmFit(mm_nm[mm_nm$genes$ID %in% poj.kropki,],ukl.eksp )
> ist<-decideTests(model,adjust.method="fdr",method="global")
```

Test istotności. Stosujemy poprawkę na porównania wielokrotne (fdr – false discovery rate), zmniejszającą liczbę fałszywie pozytywnych wyników.

```
> summary(ist)
```

Liczba genów reprimowanych, bez zmian i nadeksprimowanych.

12. Zapisanie genów do pliku tekstowego. Dane w R istnieją jako tzw. „obiekty”, aby móc je oglądać w innych programach trzeba utworzyć tabelę z potrzebnymi kolumnami.

```
> w.gore<-model[ist>0,]
```

Wybranie genów nadeksprimowanych. Dla genów reprimowanych będzie $ist < 0$, dla tych bez zmian $ist = 0$.

```
> cbind(w.gore$genes$ID[1:10],w.gore$coefficients[1:10])
> raus<-cbind(ID=model$genes$ID,name=model$genes$Name,log2_fold_change=model$coefficients,fdr_based_decision=ist)
```

Wybranie kolumn z nazwami sond i zmianą ekspresji w chłodzie, tu dla sond nadeksprimowanych.

```
> write.table(raus,"sciezka/plik.txt")
```

Tak wyeksportowany zbiór służy do dalszych analiz (klastrowania, analizy GeneOntology,...), które będą przedstawione w formie pokazu.

Ćwiczenie VII. Analiza poziomu wybranych transkryptów za pomocą metody real-time RT-qPCR

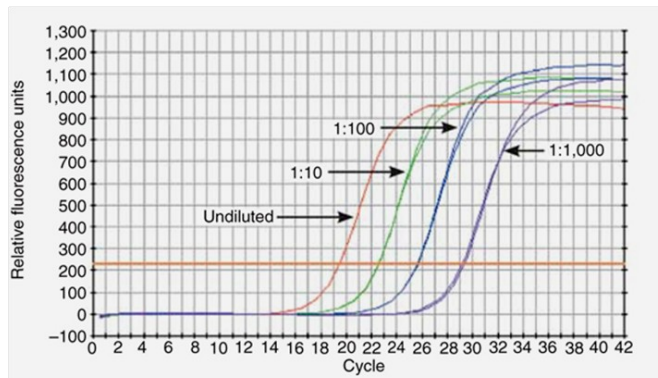
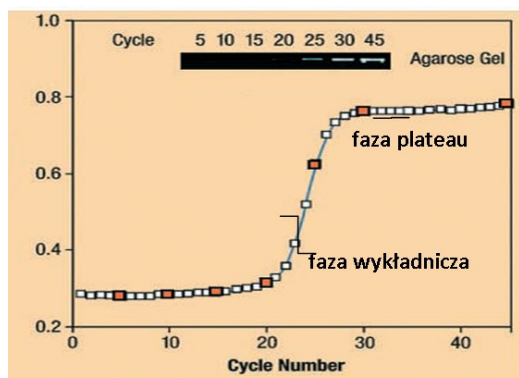
Rafał Archacki

Zakład Biologii Molekularnej Roślin

VII.1. Część teoretyczna

Istnieje kilka metod pozwalających na detekcję oraz oszacowanie poziomu ekspresji genów. Są to przede wszystkim RT-PCR, Northern blot, hybrydyzacja *in situ*, mikromacierze DNA, a także metody sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq). Metody te są stosowane zamiennie lub uzupełniają się. Na przykład metody wielkoskalowe, takie jak mikromacierze, wymagają potwierdzenia uzyskanych wyników. Jest to związane ze znaczną ilością wyników fałszywie pozytywnych oraz negatywnych w tego typu analizach, a także z tym, że poziomy ekspresji uzyskane w analizie mikromacierzy mają charakter przybliżony. Typową metodą pozwalającą na walidację wyników mikromacierzowych jest RT-PCR. W metodzie tej porównuje się ilość dwóch lub więcej cząsteczek RNA, przy czym ilość transkryptu szacuje się na podstawie ilości produktu PCR powstałego na matrycy cDNA (zob. opis Ćw. I). W ostatnich latach coraz częściej łączy się reakcję odwrotnej transkrypcji z metodą real-time PCR (PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym, inaczej qPCR - quantitative PCR).

Technika qPCR została przedstawiona w Ćw. IV. Należy podkreślić, że metoda qPCR (oraz RT-qPCR) ma zasadniczą przewagę nad klasycznym PCR (RT-PCR) – umożliwia ona uzyskiwanie bardziej wiarygodnych i powtarzalnych danych. Wynika to ze znacznie lepszego sposobu pomiaru ilości produktu PCR. W klasycznej metodzie PCR można pośrednio zmierzyć ilość powstałego produktu poprzez pomiar intensywności prążków w żelu agarozowym. Istotnym ograniczeniem tej metody jest jednak fakt, że odpowiednią ilość produktu PCR, którą można zaobserwować w żelu, otrzymuje się dopiero pod koniec fazy wykładniczej lub w fazie plateau amplifikacji (Rys. VII.1a), kiedy różnice pomiędzy badanymi próbkami są już małe (Rys. VII.1b). Natomiast qPCR, dzięki zastosowaniu znaczników fluorescencyjnych pozwala śledzić w czasie rzeczywistym przyrastanie produktu PCR. Umożliwia to pomiar ilości produktu PCR we wczesnej fazie wykładniczej (Rys. VII.1b), która bardziej odpowiada wyjściowej ilości matrycy. Różnice ilości produktu pomiędzy badanymi próbkami uzyskane tą metodą są zatem proporcjonalne do różnic w ilości transkryptów.



Rys. VII.1. a) Wykres przedstawiający przyrost produktu PCR w trakcie amplifikacji oraz obraz żelu agarozowego z uwidocznionym produktem PCR powstałym po określonej liczbie cykli reakcji. b) Przyrost ilości produktów reakcji PCR prowadzonych przy użyciu tej samej matrycy w różnych rozcieńczeniach. Po 30 cyklach reakcji, ilości produktu PCR w próbkach oznaczonych kolorem czerwonym (próbka nierozcieńczona), zielonym (rozcieńczenie 1:10) oraz niebieskim (1:100) są zbliżone. W 35 cyklu ilości produktu PCR są podobne we wszystkich próbkach. Za: Meis & Khanna, Nature Methods 6, (2009).

Metoda Real-time PCR znalazła bardzo wiele zastosowań w biologii, medycynie i rolnictwie, są to m.in.:

- analiza poziomu ekspresji genów (np. badania wpływu mutacji, czynników zewnętrznych, substancji chemicznych na ekspresję wybranych genów)
- walidacja danych mikromacierzowych
- oznaczanie zawartości GMO (zob. ćw. IV)
- badanie alternatywnych form splicingowych
- diagnostyka onkologiczna (np. wykrywanie markerów nowotworowych, translokacji chromosomowych) i mikrobiologiczna (wczesne wykrywanie patogenów)
- wykrywanie mutacji oraz polimorfizmów – w tym wypadku nie mierzy się ilości transkryptu, ale stosuje się metodę HRM (ang. *High Resolution Melting*), w której analizowana jest krzywa topnienia uzyskanego produktu PCR (zob. rozdz. VII.2.3). W analizie HRM wykorzystuje się fakt, że w przypadku obecności mutacji w amplifikowanej sekwencji, krzywa topnienia ma inny kształt.

Literatura

1. Meis & Khanna, Nature Methods 6, (2009).
2. Mark A, Repa V (2005), The Power of Real-time PCR ; Adv Physiol Educ , 29:151-159
3. Rasmussen RP, Morrison TB, Herrmann MG, Wittwer CT (1998). Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. Biochemica 02/1998, 8-11

VII.2. Część laboratoryjna

Celem ćwiczenia jest weryfikacja danych pochodzących z analizy mikromacierzowej transkryptomu rośliny dzikiej oraz mutantu SALK_030046 *Arabidopsis thaliana*. W pierwszej kolejności zostanie wytypowanych kilka genów, które – na podstawie analizy mikromacierzowej - mają obniżony lub podwyższony poziom ekspresji w mutancie. Następnie poziomy ekspresji tych genów zostaną oznaczone za pomocą metody RT-qPCR na matrycy cDNA uzyskanego z rośliny dzikiej oraz mutantu.

VII.2.1 Materiał badawczy:

Jako materiał badawczy posłużą rośliny typu dzikiego *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Col-0) oraz mutanty SALK_030046, zawierające w genie *BRM* insercję T-DNA, powodującą całkowite wyłączenie tego genu. Gen *BRM* koduje podjednostkę katalityczną kompleksu przebudowującego chromatynę SWI/SNF, który jest zaangażowany w kontrolę ekspresji przynajmniej kilkuset genów.

VII.2.3 Wybór genów do analizy

W typowych eksperymentach z użyciem mikromacierzy, poprawność uzyskanych danych ekspresyjnych weryfikuje się za pomocą RT-qPCR, oznaczając kilkanaście – kilkadziesiąt tran skryptów w próbie badanej względem próby kontrolnej. Wybór genów może być losowy, częściej jest on jednak subiektywny – zwykle wybiera się do analizy geny, które wg badacza mogą mieć istotne znaczenie w badanym procesie. W trakcie ćwiczeń studenci wybiorą 4-5 genów z listy kilkunastu genów o zmienionej ekspresji w mutancie, uzyskanej na podstawie analizy mikromacierzowej. Geny te kodują elementy ścieżki sygnalizacji giberelinowej, w której uczestniczy kompleks SWI/SNF. Analizowany również będzie gen referencyjny, którego ekspresja jest stabilna w różnych warunkach eksperymentalnych.

VII.2.3 Doświadczenie RT-qPCR

Podobnie do klasycznej metody RT-PCR, metoda z użyciem qPCR składa się z kilku etapów:

1. Izolacja RNA całkowitego oraz ocena ilościowa i jakościowa wyizolowanego RNA

Jedną z metod izolacji RNA z materiału biologicznego została zaprezentowana w opisie Ćw. I. Jakość wyizolowanego RNA jest kluczowym czynnikiem decydującym o powodzeniu dalszych etapów analizy. Ocena ilościowa i jakościowa RNA może być prowadzona wg procedury przedstawionej w opisie Ćw. I

2. Synteza cDNA

Kolejnym etapem RT-PCR z użyciem Real-time PCR jest reakcja odwrotnej transkrypcji, tj. synteza nici komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy RNA, prowadzona przez enzym odwrotną transkryptazę (zob. Ćw.I). RT-PCR z użyciem Real-time PCR może być przeprowadzony wg różnych strategii:

- jedna reakcja – jeden enzym (ang. one-step) – synteza cDNA oraz reakcja qPCR odbywają się w jednym buforze z użyciem primerów specyficznych do określonej sekwencji oraz odwrotnej transkryptazy posiadającej dodatkową aktywność polimerazy DNA. W systemie tym reakcja odwrotnej transkrypcji może się odbywać w wysokiej temperaturze, co zapewnia wysoką specyficzność reakcji (eliminacja drugorzędowych struktur RNA oraz ograniczenie nieprawidłowego parowania primerów). Ograniczone jest również ryzyko zanieczyszczenia próbki. Ten typ reakcji określa się często skrótem qRT-PCR.
- dwie reakcje (two-step) - syntezę cDNA przeprowadza się w optymalnych warunkach przy użyciu odpowiedniego startera, zazwyczaj oligodT (zob. Ćw.I). Uzyskany cDNA służy następnie jako matryca w reakcjach qPCR. Metoda ta umożliwia analizę wielu transkryptów w tej samej próbce biologicznej. **Ten typ reakcji, określany skrótem RT-qPCR zostanie zastosowany na ćwiczeniach.**

Na ćwiczeniach studenci otrzymają gotowe cDNA zsyntetyzowane przy użyciu startera oligo dT i totalnego RNA wyizolowanego z roślin Arabidopsis typu dzikiego oraz mutantu SALK_030046.

3. qPCR

Reakcje qPCR przebiegają w termocyklerach sprzężonych ze spektrofluorymetrem, dzięki czemu możliwy jest pomiar fluorescencji emitowanej przez odpowiednie sondy lub powielane fragmenty DNA. Na ćwiczeniach w reakcjach qPCR zostanie zastosowany popularny fluorofor, SYBR Green I. Związek ten emituje słabą fluorescencję w roztworze, podczas gdy jego emisja wzrasta po związaniu z dwuniciowym DNA, w tym wypadku z produktem PCR. Stąd też im więcej powstaje produktu PCR, tym wyższa rejestrowana fluorescencja. Do nastawienia reakcji PCR służą komercyjne zestawy zawierające w swoim składzie dNTPy, polimerazę, chlorek magnezu oraz barwnik SYBR Green I. Reakcje qPCR prowadzi się w specjalnie przystosowanych probówkach lub płytkach wielodołkowych, produkowanych z odpowiedniego polimeru, który umożliwia prawidłowy odczyt fluorescencji.

Sprzęt i aparatura:

- wirówka;
- worteks;

- statywy na próbki;
- pipety automatyczne o pojemności 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l;
- wyrząsarka oraz wirówka do płytek wielodołkowych
- termocykler do real –time PCR

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- Zestaw Sybr Green Master Mix (Roche)
- Startery specyficzne do badanych genów
- rękawiczki
- próbki 1,5 ml, sterylne;
- tipsy sterylne
- płytko do qPCR (na 96 próbek)

Wykonanie ćwiczenia

Przygotowanie mieszanin do reakcji qPCR (praca w parach)

Dla danego wariantu eksperymentalnego (badany gen) należy obliczyć niezbędną ilość odczynnika Sybr Green Master Mix, specyficznych starterów, cDNA oraz wody dla serii 15 próbek: 4 próbek badanych (2 próbki wt i 2 próbki brm) w 2 powtórzeniach technicznych, 3 próbek do krzywej wzorcowej w 2 powtórzeniach technicznych oraz kontroli negatywnej (K-). Objętość końcowa reakcji wynosi 20 μ l.

UWAGA: metoda qPCR jest bardzo czuła i wrażliwa na błędy pipetowania!

Tabela VII.1 Przygotowanie mieszaniny

	Końcowa koncentracja	mieszanina dla 1 próbki	mieszanina dla 15 próbek
Sybr Green Master Mix 2x	1x	 μ l
50 μ M starter 1	0,5 μ M	 μ l
50 μ M starter 2	0,5 μ M	 μ l
woda	Do 18 μ l	 μ l
RAZEM		18 μl + 2 μl cDNA μ l

Procedura:

- przygotować 1,5 ml próbkę,



- dodać odczynniki zgodnie z Tabelą VII.1
- wymieszać delikatnie mieszaninę przez pipetowanie „górze – dół” i krótko zwirować,
- odpipetować po 18 μ l mieszaniny do dziewięciu dołków na płytce (rys. I.2)
- dodać po 2 μ l roztworu cDNA do przygotowanych probówek z mieszaniną,
- zakleić płytkę folią wymieszać delikatnie na wytrząsarce i krótko zwirować,
- rozpocząć odpowiedni program w termocyklerze (w obecności prowadzącego)
- umieścić w termocyklerze i uruchomić program (Tabela VII.2)

•rys. VII.2 Nastawianie reakcji qPCR

Tabela VII.2. Program qPCR

	Temperatura	Czas
Początkowa denaturacja	95°C	10 min
Denaturacja	95°C	10 sec
Przyłączanie	58°C	8 sec
Wydłużanie	70°C	15 sec
Liczba cykli	45	
Pomiar fluorescencji w każdym cyklu w trakcie wydłużania		
Końcowe wydłużanie	70°C	7 min
Krzywa topnienia	1 cykl 40°C	15 min ∞

- po zakończeniu programu obserwować wykresy fluorescencji

4. Analiza wyników qPCR – pracownia komputerowa

Sprzęt i aparatura

- komputer
- pakiet LightCycler 480 Software (Roche)
- arkusz kalkulacyjny

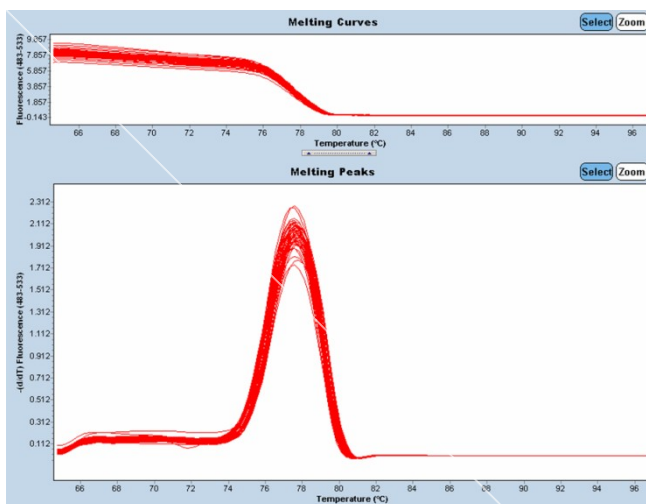
Wykonanie ćwiczenia:

Ćwiczenia będą polegały na pokazie, z elementami samodzielnej pracy studentów wg wskazówek prowadzącego

Ocena jakościowa reakcji qPCR

W pierwszej kolejności, korzystając z oprogramowania LightCycler 480 Software należy sprawdzić przebieg krzywych fluorescencji w powtórzeniach technicznych reakcji PCR. Jeśli różnice pomiędzy powtórzeniami są znaczne (co zazwyczaj świadczy o dużych błędach pipetowania), uniemożliwiają one prawidłową analizę ilościową.

Zastosowanie w reakcjach qPCR barwnika SYBR Green niesie ryzyko znacznych błędów pomiarowych, w przypadku gdy reakcja PCR nie przebiegła specyficjnie, lub powstały znaczne ilości dimerów starterów. W celu sprawdzenia specyficjności reakcji, wykonuje się analizę krzywych topnienia (Rys. VII. 3). Krzywe topnienia obrazują temperaturę, przy której następuje denaturacja produktu PCR (odczytywana jako spadek fluorescencji). Krzywa topnienia ma nieco inny przebieg w zależności od sekwencji nukleotydowej produktu PCR, dlatego też można za pomocą tej analizy określić specyficjność reakcji.

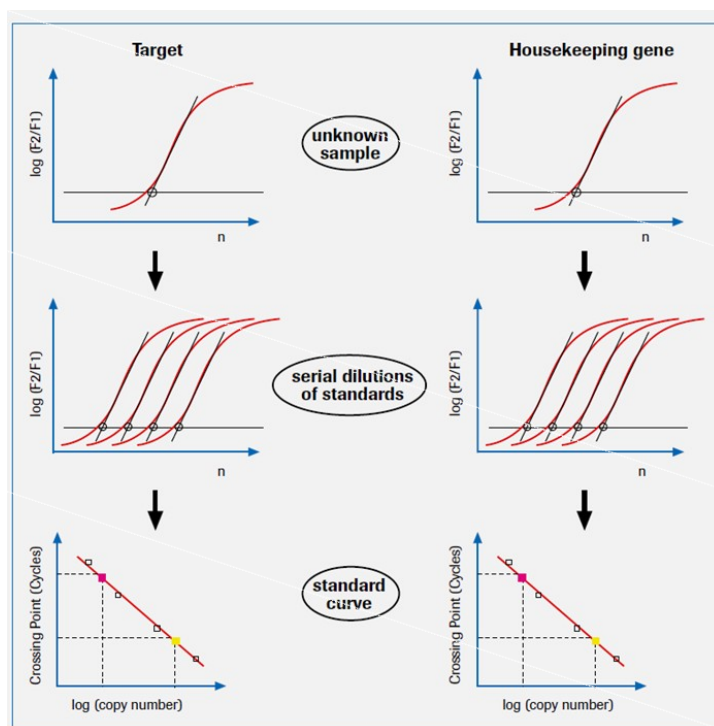


Rys. VII.3. Przykładowe krzywe topnienia dla specyficjnej reakcji qPCR

Obliczenia

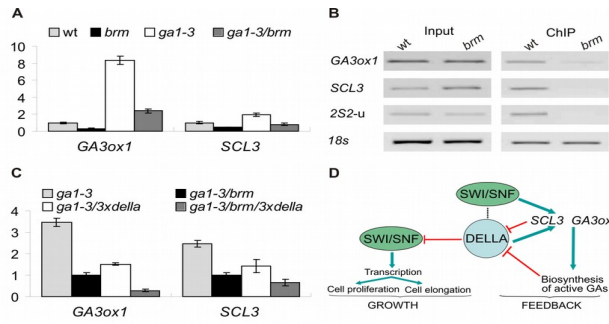
Odczyty fluorescencji w instrumencie do Real-time PCR muszą być przekształcone w informację o ilości analizowanych produktów PCR. W tym celu wyznacza się tzw. cykle progowe reakcji. Cykl progowy (Ct, ang. treshold cycle) jest to liczba cykli konieczna do przekroczenia wartości progowej fluorescencji (od tego momentu rozpoczyna się faza

wykładnicza PCR). Liczba cykli jest odwrotnie proporcjonalna do początkowej ilości badanej cząsteczki cDNA, a więc pośrednio badanego transkryptu. W celu wyznaczenia początkowych ilości matrycy należy także uwzględnić w obliczeniach wydajności reakcji PCR. Wydajność PCR wynosi w optymalnych warunkach 2 (w każdym cyklu PCR liczba cząsteczek powielanego DNA podwaja się), jednak w praktyce jest ona niemal zawsze niższa i zależy od wielu czynników, m.in. od sekwencji starterów, rodzaju i jakości matrycy, a także stężenia starterów i innych składników reakcji. Obliczanie wydajności reakcji PCR opiera się na wygenerowaniu krzywej wzorcowej z serii rozcieńczeń matrycy (Rys. VII.4). Do wykonania obliczeń wydajności reakcji, wyznaczenia cykli progowych oraz ilości produktów PCR w trakcie ćwiczeń zostanie użyte oprogramowanie LightCycler 480 Software.



Rys. VII.4 Wyznaczanie krzywych wzorcowych dla genu badanego oraz referencyjnego. Za: www.roche-applied-science.com

W końcowym etapie analizy należy porównać poziomy badanych transkryptów i transkryptu genu wyrażanego konstytutywnie oraz obliczyć średnie z powtórzeń eksperymentu. Dla łatwiejszej interpretacji danych, poziom ekspresji badanego genu (znormalizowany do poziomu ekspresji genu konstytutywnego) ustala się często dla próby kontrolnej jako równy 1 (w eksperymencie prowadzonym na ćwiczeniach są to próby pochodzące z roślin wt) i normalizuje względem niego poziomy ustalone dla prób badanych (Rys. VII.5).



Rys. VII.5 Przykład przedstawienia wyników analizy RT-qPCR dwóch genów w roślinie typu dzikiego oraz trzech różnych mutantach

Dodatek A. Elektroforeza kwasów nukleinowych

Standardową metodą do rozdzielania, identyfikacji i oczyszczania fragmentów DNA jest elektroforeza w żelu agarozowym (dla dużych cząsteczek DNA) lub poliakrylamidowym (dla małych cząsteczek DNA). Techniki te są stosunkowo proste, szybkie i umożliwiają rozdzielanie mieszaniny fragmentów DNA, których nie można rozdzielić innymi metodami, jak np. wirowaniem w gradiencie gęstości. Ponadto lokalizacja DNA w żelu jest wykonywana bezpośrednio. Prążki DNA w żelu barwi się przy użyciu bardzo małych stężeń barwnika fluoryzującego – bromku etydyny, wbudowującego się (interkalującego) między zasady.

Szybkość elektroforetycznej migracji DNA w żelu jest zależna od 5 głównych parametrów.

1. Masa cząsteczkowa DNA: większe cząsteczki DNA migrują wolniej niż cząsteczki małe ze względu na większe opory ruchu oraz większe trudności w penetrowaniu porów żelu będącego rodzajem sita molekularnego. Tempo migracji jest odwrotnie proporcjonalne do logarytmu dziesiętnego liczby par zasad.

2. Stężenie agarozy: dany fragment DNA o określonej wielkości migruje z różną szybkością w żelu zawierającym różne stężenia agarozy. Istnieje tu liniowa zależność pomiędzy logarytmem elektroforetycznej ruchliwości DNA w żelu i stężeniem agarozy. Zakres rozdziału linearnego DNA w zależności od stężenia agarozy w żelu.

Stężenie agarozy w żelu (%)	Wielkość cząsteczki DNA (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	1,2-3
2,0	0,1-2

3.

Konformacja DNA: forma I – superzwinięte (CCC), forma II – nacięte koliste (OC), forma III – liniowe (L). Cząsteczki DNA o tej samej masie migrują w żelu z różną szybkością. Względna ruchliwość tych trzech form DNA zależy głównie od stężenia agarozy w żelu oraz od wielkości przyłożonego natężenia prądu, siły jonowej buforu i od gęstości superhelikalnych skrętów w cząsteczce DNA formy I. Dobrą metodą dla identyfikacji różnych konformacyjnych form DNA jest rozdział elektroforetyczny w obecności wzrastającej ilości bromku etydyny. Przy wzroście stężenia bromku etydyny

więcej barwnika wiąże się z DNA. Skręty cząsteczki DNA formy I są sukcesywnie likwidowane, a szybkość migracji cząsteczek ulega zwolnieniu. Przy krytycznym stężeniu barwnika szybkość migracji cząsteczki DNA w formie I osiąga swoją minimalną wielkość. Ruchliwość formy II i III zmniejsza się w różny sposób w wyniku neutralizacji ładunków i dużej sztywności nadawanej cząsteczce DNA przez bromek etydyny.

4. Natężenie pola elektrycznego: przy niskim natężeniu pola, migracja fragmentów liniowych DNA jest proporcjonalna do przyłożonego napięcia. Jednak, przy wzroście natężenia pola elektrycznego, ruchliwość fragmentów DNA o dużej masie cząsteczkowej nie wzrasta w sposób proporcjonalny. Dlatego efektywny zakres rozdziału w żelu agarozowym zmniejsza się wraz ze wzrostem napięcia. Aby uzyskać maksymalny rozdział fragmentów DNA, spadek napięcia nie powinien przekraczać 5V/cm.

5. Temperatura rozdziału: temperatura w jakiej dokonuje się rozdziału nie wpływa w istotnym stopniu na elektroforetyczne właściwości DNA.

6. Skład buforu do elektroforezy: ruchliwość elektroforetyczna DNA jest zależna od składu i siły jonowej buforu, w którym przeprowadzamy elektroforezę. W roztworach o niskiej sile jonowej, DNA migruje bardzo wolno, natomiast w buforach o zbyt wysokiej sile jonowej przepływ ładunku powoduje wydzielanie się znacznej ilości ciepła, co może doprowadzić do upłynięcia żelu i denaturacji DNA. Poniżej podano skład buforów stosowanych do elektroforezy DNA.

bufor	Skład buforu (na litr)
Tris-octanowy (TAE)	4,84 g Tris 1,142 ml 99% kwasu octowego 2 ml 0,5 M EDTA
Tris-boranowy (TBE)	10,8 g Tris 5,5 g kwasu borowego 4 ml 0,5 M EDTA
Sodowo-boranowy (SB)	5mM Na ₂ B ₄ O ₇ /Borax lub 10mM NaOH doprowadzone do pH 8.0 kwasem borowym
Tris-fosforanowy (TPE)	10,8 g Tris 1,55 ml 85% kwasu fosforowego 4 ml 0,5 M EDTA
Alkaliczny	5 ml 10N NaOH 2 ml 0,5 M EDTA

Bufor alkaliczny używany jest podczas elektroforezy zdenaturowanych, jednoniciowych cząsteczek DNA. Najczęściej stosowany bufor TAE ma niską pojemność buforową i

tendencję do rozkładu podczas przedłużającej się elektroforezy. W takim przypadku roztwór w pobliżu anody zakwasza się i jeśli proces postępuje dalej obejmując żel, może dojść do degradacji rozdzielanego DNA. Prążki DNA ulegają wówczas rozmyciu i przestają być widoczne. Dlatego podczas dłuższej elektroforezy, przy wysokim napięciu, niezbędna jest wymiana buforów przyelektrodowych. Do nanoszenia próbek DNA do studzienek żelu służą bufony obciążające. Bufory te zwiększają gęstość próbek, zapewniając dobre umiejscowienie DNA w studziencie bez dyfuzji, a także zabarwiają próbkę powodując migrację barwnika w żelu w czasie elektroforezy, ułatwiając w ten sposób łatwe śledzenie przebiegu rozdziału.

Cząsteczki RNA mają ładunek ujemny i zgodnie z tym ładunkiem, nadawanym przez grupy fosforanowe, migrują w polu elektrycznym w kierunku anody. Szybkość migracji zależy od wielkości i kształtu cząsteczki. Dodanie formaldehydu do żelu agarozowego utrzymuje RNA w formie liniowej. Większe cząsteczki migrują wolniej przez macierz żelu. Przy niskich napięciach, wskaźnik migracji RNA jest proporcjonalny do stosowanego napięcia. Aby uzyskać maksymalny rozdział fragmentów RNA, spadek napięcia nie powinien przekraczać 5V/cm.

Bromek etydyny zmniejsza ruchliwość elektroforetyczną liniowego RNA o około 15%, ponieważ EtBr ma większe powinowactwo do podwójnej niż pojedynczych nici kwasów nukleinowych.

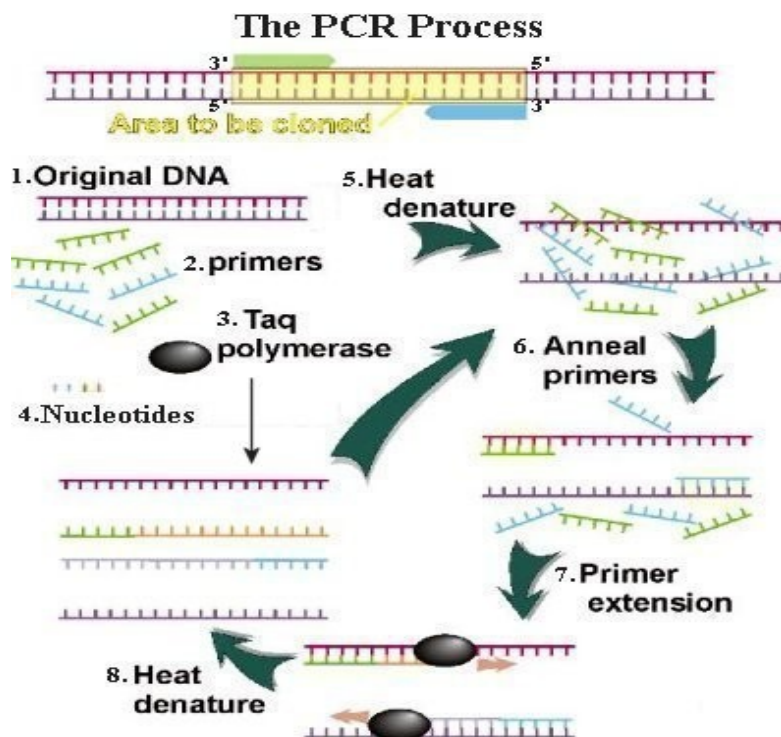
Skład buforu do elektroforezy RNA:

Bufor 10X MOPS:

- 0.4 M MOPS;
- 0,1 M octanu sodu;
- 10 mM EDTA (dwusodowy);
- doprowadzić pH do 7,0.

Dodatek B. PCR

PCR (*polimerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy) umożliwia uzyskanie milionów kopii danego odcinka DNA na matrycy tylko kilku cząsteczek, ponieważ produkt jednego cyklu PCR staje się matrycą w kolejnym cyklu.



Ryc. B.1. Schemat przebiegu reakcji PCR, zmod.

Aby doszło do namnożenia fragmentu DNA, w mieszaninie reakcyjnej muszą znajdować się:

- cząsteczki DNA stanowiące matrycę do syntezy kolejnych kopii;
- startery;
- wolne nukleotydy służące do syntezy nowych nici DNA;
- jony Mg^{2+} , które są kofaktorem polimerazy;
- polimeraza, enzym katalizujący reakcję;
- woda.

Matrycowe DNA: zazwyczaj ilość matrycowego DNA wynosi 10pg – 1ng dla plazmidowego lub fagowego DNA oraz 100ng - 1μg dla genomowego DNA na 100 μl mieszaniny reakcyjnej. Większa ilość DNA powoduje amplifikację niespecyficzných produktów PCR.

Starter:

- startery do klasycznego PCR mają długość 15-30 nukleotydów;

- zawartość GC powinna wynosić 40-60%. GC powinny być równomiernie rozłożone na całej długości primera;
- primer nie może być komplementarny do samego siebie, ani innych primerów w mieszaninie reakcyjnej, pozwala to uniknąć tworzenia struktury spinki do włosów w obrębie primera lub tworzenia się dimerów;
- temperatura topnienia primerów nie powinna różnić się o więcej niż 3-5°C.

Jony Mg^{2+} : są istotnym kofaktorem polimerazy DNA. Tworzą one także kompleksy z dNTP, primerami i matrycowym DNA. Stąd optymalne stężenie $MgCl_2$ musi być dobrane eksperymentalnie dla każdej reakcji. Zbyt mała ilość jonów Mg^{2+} obniży ilość produktów PCR, zbyt duża spowoduje wzrost produktów niespecyficznych. Dla standardowych warunków reakcji zakres stężeń dla $MgCl_2$ wynosi 1-4 mM. Jeśli matrycowe DNA jest zanieczyszczone EDTA lub innymi związkami chelatującymi należy podwyższyć stężenie $MgCl_2$.

dNTP: stężenie każdego dNTP w mieszaninie reakcyjnej wynosi 20-200 μM . Jest bardzo istotne, aby w mieszaninie reakcyjnej stężenie każdego dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) były jednakowe, ponieważ nadmiar lub niedobór chociaż jednego z nukleotydów powoduje mylne przyłączenie niewłaściwych nukleotydów w trakcie amplifikacji.

Polimeraza: zazwyczaj używa się termostabilnej 2-3 U polimerazy *Taq* na 100 μl mieszaniny reakcyjnej. Większe stężenie polimerazy może powodować amplifikację produktów niespecyficznych, mniejsze stężenie – malejącą wydajność. Natomiast jeśli w mieszaninie reakcyjnej znajdują się inhibitory polimerazy np. matrycowe DNA jest zanieczyszczone, wówczas wyższe ilości polimerazy mogą zwiększyć amplifikację.

Etapy cyklu:

1. Wstępna denaturacja: całkowita denaturacja DNA na początku reakcji PCR jest bardzo istotna. Niepełna denaturacja sprawia, że nie całe DNA może być wykorzystane jako matryca w pierwszym cyklu, a to z kolei powoduje zmniejszenie ilości amplifikowanych produktów. Etap ten powinien trwać 1-3 min. w temperaturze 94-95°C.

2. Denaturacja: zazwyczaj wystarcza 1-2 min. denaturacji w temperaturze 94 °C, z uwagi na to, że produkty reakcji PCR są krótsze od matrycowego DNA i w krótszym czasie ulegają kompletnej denaturacji.

3. Przyłączanie startera (annealing): optymalna temperatura annealingu jest o 5°C niższa od temperatury topnienia dupleksu starter-matryca DNA, a czas trwania tego etapu to 1-2 minut. Jeśli uzyskiwane są produkty niespecyficzne należy o 1-2 °C podnieść temperaturę przyłączania.

4. Wydłużanie (elongacja): przebiega w temperaturze 70-75 °C, ponieważ tempo syntezy przez polimerazę Taq jest największe i wynosi 2-4kb/min. Wydłużanie trwające 1 min. wystarcza do uzyskania produktów o wielkości do 2kb. Jeśli amplifikowane są większe fragmenty, czas wydłużania należy zwiększyć o 1 min. na każde 1000pz.

-Liczba cykli: zależy ona od ilości DNA matrycowego w mieszaninie reakcyjnej oraz od pożądanej ilości produktu. Dla niskich ilości DNA zaleca się ok. 40 cykli, dla wyższych ilości 25-35 cykli;

-po ostatnim cyklu następuje **etap końcowego wydłużania**, trwający 5-15 min. w temperaturze 72°C . Ma on na celu uzupełnienie niedokończonych w trakcie poprzednich cykli fragmentów DNA.

Rozwiązywanie problemów związanych z PCR:

symptom	przyczyna
Brak lub słaba amplifikacja	Niekompletna denaturacja matrycy Brak docelowej sekwencji na matrycy Nieodpowiedni profil termiczny reakcji Nieodpowiednia sekwencja starterów Degradacja starterów przez polimerazę Niedostateczne stężenie jonów Mg ²⁺ Zanieczyszczenie odczynników nukleazami Obecność inhibitorów
Brak amplifikacji niektórych próbek	Niedokładnie wymieszana mieszanina reakcyjna Zanieczyszczenie próbek Wada termocyklera
Smear widoczny po elektroforezie	Zbyt długi czas wydłużania Nadmiar matrycy

	Nadmiar starterów
Niespecyficzne produkty reakcji	Niespecyficzne przyłączanie startera do matrycy Nadmiar polimerazy Nadmiar Mg ²⁺
Produkty PCR w kontroli negatywnej	Zanieczyszczenie odczynników

Dodatek C. Procedura hybrydyzacji do mikromacierzy

1. Izolacja RNA całkowitego, ocena ilościowa i jakościowa

Wg procedur z ćwiczeń I.2.2.1 i I.2.2.2.

2. Namnożenie mRNA

Materiał badawczy:

RNA wyizolowane w etapie 1

Sprzęt i aparatura:

- wirówka;
- wortex;
- pH-metr;
- termocykler lub bloki grzewcze o temperaturze 16, 37, 42 i 70°C;
- pipety automatyczne o pojemności: 10 µl, 100 µl, 1000 µl i 5ml;
- waga laboratoryjna;
- szpatułka;
- pojemnik na lód;
- cienki pisak permanentny.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- etanol 99,8% CzDA;
- woda (sterylna, wolna od RNA-az);
- 12 N HCl;
- Aminoallyl Message Amp II kit (Ambion);
- DNA Clear Kit (Ambion), opcjonalnie;
- 50 mM 5-(3-aminoallyl)-UTP (Ambion);
- MEGA Clear Kit for extra aaRNA purifications (Ambion);
- rękawiczki bez pudru;
- tipsy sterylne z filtrem;
- probówki 1,5 ml, sterylne;
- probówki 0,2 ml do PCR z płaskim wieczkiem.

Wykonanie ćwiczenia

Przylączenie startera oligo(dT) i synteza pierwszej nici cDNA:

1. odpipetować 5 µg całkowitego RNA do probówki 0,2 ml;
2. dodać 1 µl startera oligo(dT);
3. następnie do objętości 6 µl dodać sterylnej wody;
4. inkubować mieszaninę 10 min w 70°C;
5. mieszaninę w probówce zwirować przez 10 s i natychmiast przenieść na lód;
6. przygotować master-mix reakcyjny wg tabeli:

Master-mix na jedną reakcję:	Objętość µl
10x First strand buffer	1 µl
Inhibitor RNA-z	0,5 µl
Mix dNTP	2 µl
Polimeraza Array script	0,5 µl
Całkowita objętość	4µl

7. do mieszaniny reakcyjnej dodać 4 µl mix-u, zmieszać poprzez ostrożne pipetowanie mieszaniny w probówce lub stukając w ściankę probówki. W razie potrzeby – krople na ściankach probówki – krótko zwirować;
8. inkubować mieszaninę w 42°C przez 2 h;
9. wyjąć, krótko zwirować, umieścić probówki z mieszaniną na lodzie.

Synteza drugiej nici DNA

1. Przygotować master-mix reakcyjny na lodzie wg tabeli:

Master-mix na jedną reakcję:	Objętość µl
Woda	31,5 µl
10x bufor do drugiej nici	5 µl
Mix dNTP	2 µl
Polimeraza DNA	1 µl
RNA-za H	0,5 µl
Całkowita objętość	40 µl

2. do probówek z poprzedniego etapu dodać po 40 µl master-mix-u;
3. inkubować próbki z mieszaniną reakcyjną w 16°C przez 2 h.

Oczyszczanie DNA

Do oczyszczania otrzymanego cDNA stosuje się kit z zestawem odczynników (kit DNA clear lub MEGA Clear Kit for extra aaRNA purifications firmy Ambion).

1. Przed przystąpieniem do pracy ogrzać butelkę ze sterylną wodą w 50°C.
2. Umieścić filtr w probówce 2,0 ml i nanieść 50 µl cDNA binding buffer. Inkubować 5 min w temperaturze pokojowej.
3. Do każdej z probówek z mieszaniną dodać po 250 µl cDNA binding buffer i dokładnie zmieszać.
4. Nanieść otrzymaną mieszaninę na wcześniej przygotowany filtr.
5. Wirować przez 1 min przy 10000 g.
6. Wylać przesącz.
7. Na filtr nanieść 500 µl cDNA wash buffer. Wirować przez 1 min przy 10000 g.
8. Wylać przesącz.
9. Zwirować probówkę z filtrem na sucho przez 1 min w celu usunięcia resztek etanolu.
10. Przenieść filtr do nowej probówki. Na środek filtra nanieść 6 µl sterylnej wody podgrzanej do 50°C. Pozostawić na 2 min w temperaturze pokojowej i zwirować przez 1,5 min. przy 10000 g.
11. Powtórzyć krok 10.
12. Oczyszczone cDNA znajduje się w przesączu (ok 11 µl).
13. Zmierzyć stężenie cDNA przy użyciu spektrofotometru Nanodrop.

Transkrypcja *in-vitro*

1. Przygotować master-mix reakcyjny na lodzie wg tabeli:

Master-mix na jedną reakcję:	Objętość µl
aaUTP (50 mM)	1,5 µl
Mix ATP + CTP + GTP	6 µl
UTP (75 mM)	0,5 µl
T7 10x reaction buffer	2 µl
Enzym T7	2 µl
Całkowita objętość	12 µl

2. Dodać 12 µl master-mix do 8 µl cDNA. Zwirować przy 3000 g przez 30 s;
3 Inkubować w 37°C przez 4 do 14 h (najwygodniej wstawić na noc).
4. Zatrzymać reakcję poprzez dodanie 80 µl wody (do 100 µl). Zworteksować;

Oczyszczanie aRNA

1. Przed przystąpieniem do pracy ogrzać butelkę ze sterylną wodą w 50°C.
2. Do próbki dodać po 350 µl aRNA binding buffer i natychmiast przejść do następnego kroku.
3. Dodać do próbki po 250 µl etanolu 99,8%, zmieszać poprzez pipetowanie. **Nie worteksować i nie wirować!**
4. Otrzymany roztwór nanieść centralnie na filtr (aRNA filter), zwirować przez 1 min przy 10000 g.
5. Wylać przesącz.
6. Na filtr nanieść po 650 µl wash buffer, wirować przez 1 min przy 10000 g.
7. Wylać przesącz.
8. Wirować „na sucho” przez 3 min, aby usunąć resztki wash buffer. **Ostrożnie! Resztki buforu zanieczyszczą próbkę!**
9. Przenieść filtr do nowej probówki (aRNA collection tube). Na środek filtra nanieść po 30 µl ogrzanej wody. Pozostawić przez 2 min i zwirować przez 1,5 min przy 10000 g. **(Nie wyrzucać przesączu!!)**
10. Powtórzyć krok 9.
11. Oczyszczone aRNA będzie się znajdowało w otrzymanym przesączu (ok. 60 µl).
12. Zmierzyć stężenie aRNA na Nanodropie.
13. Podzielić uzyskane aRNA na porcje o stężeniu 6 µg aRNA. Tak przygotowany materiał użyć do znakowania lub zamrozić w -80°C.

Znakowanie aRNA

W procedurze do aaUTP wbudowanego w amplifikacji do RNA przyłączane są barwniki fluorescencyjne (Cy3, Cy5).

Material badawczy:

Oczyszczone aRNA

Sprzęt i aparatura:

- pipety automatyczne o pojemności: 10 µl, 100 µl i 1000 µl;
- wirówka;

- wirówka próżniowa;
- wortex;
- statywy na probówki.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- rękawiczki bez pudru;
- tipsy sterylne z filtrem;
- probówki 1,5 ml, sterylne;
- folia aluminiowa;
- Na₂CO₃;
- NaHCO₃;
- Cy3 Monoreactive dye (Amersham Pharmacia);
- Cy5 Monoreactive dye (Amersham Pharmacia);
- DMSO (*DiMetylo Sulfo Oxide*);
- 4M hydroksylamina;
- Nucleo-spin Plant (Macherey-Nagel);
- etanol 99,8%;
- etanol 96%;
- woda (sterylna, wolna od RNA-z).

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotować bufor sodowo-węglanowy (200 mM Na₂CO₃, 200 mM NaHCO₃, pH 9,0).
2. Rozpuścić barwniki Cy3/Cy5 w 22 µl DMSO, dokładnie wymieszać.
3. Pozostawić barwniki w ciemności w temperaturze pokojowej przez 30 min, następnie zwirować przez 30 s w 1000 g.
4. Wsuszyć próbkę aRNA w wirówce próżniowej, (probówki z otwartymi wieczkami).
5. Wsuszoną próbkę rozpuścić w 5 µl buforu węglanowego - kilkakrotnie opłukując ścianki probówki buforem. Pozostawić w temperaturze pokojowej przez 20 min.
6. Dodać 5 µl Cy3 lub Cy5 – w zależności od układu eksperymentalnego – do próbki i

wymieszać poprzez pipetowanie. **Barwniki dodawać powoli**, inaczej duża jego ilość zostanie na ściankach końcówki pipety, zmniejszając wiarygodność całego eksperymentu.

7. Zwirować próbki w 1000 g przez 30 s.

8. Inkubować próbki z barwnikiem przez 2 h w ciemności.

9. Reakcję zatrzymać poprzez dodanie 4,5 μ l 4 M hydroksylaminy i inkubując 15 min w temperaturze pokojowej.

Usunięcie niezwiązanego barwnika

1. Do buforu RA3 dodać podaną na butelce ilość etanolu 99,8%.
2. Próbkę dopełnić sterylną wodą do objętości 100 μ l.
3. Przygotować mix buforu RA1 i etanolu w proporcji 1:1. Na każdą próbkę po 300 μ l RA1 i 300 μ l etanolu.
4. Do próbki dodać po 600 μ l mixu RA1-etanol, zworteksować.
5. Mieszaninę nanieść na filtr kolumny w probówce 2,0 ml.
6. Zwirować przez 30 s w 12000 rpm.
7. Umieścić filtr w nowej probówce 2,0 ml.
8. Dodać po 700 μ l buforu RA3 i zwirować 30 s w 12000 rpm.
9. Wylać przesącz.
10. Dodać po 350 μ l RA3 i zwirować 2 min w 12000 rpm.
11. Kolumienkę przenieść do nowej próbki 1,5 ml, otworzyć wieczko kolumienki i pozostawić w temperaturze pokojowej przez 3 min. **Zwrócić uwagę na membranę, brak zabarwienia świadczy o nieudanym znakowaniu.**
12. Dodać po 60 μ l wody i zwirować 1 min w 12000 rpm.
13. W otrzymanym roztworze znajduje się wyznakowane i oczyszczone RNA.
14. Zmierzyć stężenie RNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (opcja „microarray”), zwracając uwagę na odczyt dla barwników.

Hybrydyzacja do mikromacierzy:

W tej części procedury wyznakowane i zmieszane parami (wg wybranego układu eksperymentalnego) próbki hybrydują do sond na mikromacierzy.

Materiał badawczy:

Wyznakowane RNA

Sprzęt i aparatura:

- mikromacierze oligo;
- komory do hybrydyzacji (Telechem International);
- szkiełka nakrywkowe (Erie Scientific);
- szkiełka mikroskopowe (podstawowe, bez szlif);
- pęseta;
- spinacz typu „żabka”;
- filtr 0,22 μm CA (Corning);
- pipety automatyczne o pojemności: 10 μl , 100 μl , 1000 μl i 5ml;
- łaźnia wodna ustawiona na 55°C;
- blok grzejny (45, 95°C);
- cross-linker UV;
- szklany kominiek do płukania szkiełek mikroskopowych;
- piec hybrydyzacyjny nastawiony na 42°C;
- mieszadło magnetyczne;
- mieszadło magnetyczne;
- wirówka z rotorem z adapterami na szkiełka mikroskopowe;
- zamykany, wodoszczelny pojemnik na szkiełka mikroskopowe;
- wirówka próżniowa;
- pojemnik na lód;
- stoper.

Odczynniki i materiały jednorazowego użytku:

- rękawiczki bez pudru;
- probówki 1,5 ml, sterylne;
- probówki typu falcon;
- tipsy sterylne z filtrem;
- 20x SSC (Saline-Sodium Citrate, cytrynian sodu);
- 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, siarczan dodecyłu sodu);
- BSA (Bovine Serum Albumin, albumina bydlęca);
- formamid;
- woda destylowana;

- woda (sterylna, wolna od RNA-z);
- etanol 99,8%;
- etanol 96%;
- DNA ze spermy łososia (10 mg/ml);
- tRNA z drożdży (10 mg/ml).

Kondycjonowanie mikromacierzy

W celu unieruchomienia sond na powierzchni mikromacierzy, mikromacierze poddaje się działaniu pary wodnej i promieni UV (kondycjonuje). Ten etap procedury można wykonać na długo przed właściwym eksperymentem. Kondycjonowane szkiełka można przechowywać przez kilka miesięcy w ciemności w temperaturze pokojowej.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Od dołu do szkiełka mikromacierzowego przyłożyć mikroskopowe szkiełko przykrywkowe (czyste, można myć 96% etanolem skażonym acetonem i wykorzystywać wielokrotnie) i oznaczyć pisakiem granice pola z sondami (po skondycjonowaniu nie będzie ono widoczne). Zwrócić należy uwagę na położenie nacięcia na rogu mikromacierzy – po nim poznaje się, która strona zawiera sondy. Pozwoli to na właściwe umieszczenie szkiełka nakrywkowego przy nakładaniu mieszaniny hybrydyzacyjnej.
2. Mikromacierz spiętą spinaczem (za stronę z etykietą) trzymać należy stroną z sondami w dół nad łaźnią wodną nastawioną na 55°C przez ok. 5 s (około 10 cm nad powierzchnią wody).
3. Stroną nie zawierającą sond położyć mikromacierz na termobloku (45°C) na 5 s.
4. Powtórzyć kroki 2-3 jeszcze cztery razy.
5. Włożyć mikromacierze do cross-linkera UV (stroną z sondami w górę) i naświetlać promieniami UV 180 mJ.
6. Wstawić mikromacierze do kominka z 1% roztworem SDS na 5 min.
7. Następnie należy wypłukać mikromacierze w kominku z wodą destylowaną, ostrożnie lecz zdecydowanie, zanurzając i wynurzając statyw kominka z mikromacierzami.
8. Powtórzyć powyższy punkt jeszcze 9 razy.
9. Przenieść mikromacierze do falkonów z 99,8% etanolem na 3 min, mieszać;
10. Wsuszyć mikromacierze, wirując je 2-4 min w 1000 rpm w adaptorach lub falkonach **(etykietką w dół)**.

Prehybrydyzacja

Przygotowanie buforów

Bufor do prehybrydyzacji – 5X SSC, 0,1% SDS, 1% BSA, wysterylizować z użyciem filtra CA.

Wykonanie ćwiczenia

1. Podgrzać bufor do prehybrydyzacji i inkubować w 42^o C przez 30 min.
2. Mikromacierze umieścić w pojemniku z podgrzanym do 42°C buforem do prehybrydyzacji.
3. Inkubować 45 min w piecu hybrydyzacyjnym (42°C).
4. Płukać mikromacierze w falkonach z wodą destylowaną przez 5 min dwa razy.
5. Wypłukać mikromacierze w etanolu 96% przez 2 min (w falkonach, stawiać tylko tak, aby naklejka była na dole).
6. Wysuszyć, wirując w adaptorach lub w falkonach (1000 rpm przez 10 min).
7. Jeśli na suchych mikromacierzach widać zacieki, powtórzyć płukanie woda/woda/etanol.

Hybrydyzacja

Przygotowanie buforów

Bufor do hybrydyzacji – 50% formamid, 5X SSC, 0,1% SDS, tRNA oraz DNA ze spermy lososia.

Bufor do 1. płukania – 2x SSC, 0,1% SDS (Przed użyciem podgrzać do 42°C).

Wykonanie ćwiczenia

1. W wirówce próżniowej wysuszyć (wymieszane parami wg założonego układu eksperymentu) wyznakowane próbki RNA (próbówki wirować z otwartymi wieczkami). Suszenie trwa ok. 2 h.

2. Dokładnie umyć potrzebną ilość szkiełek nakrywkowych z silikonem (ludwik > woda > woda destylowana > etanol skażony acetonem). Zrobić to bardzo dokładnie, zabrudzenia prawie na pewno spowodują powstanie bąbli powietrza przy nakładaniu buforu na mikromacierz, a ta będzie do wyrzucenia.
3. Rozpuścić wyznakowane próbki w 60 μ l buforu do hybrydyzacji. Próbki trudno się rozpuszczają, ale ich podgrzanie w następnym kroku to ułatwi.
4. Zdenaturować próbki w 95°C, przez 3 min, a następnie wstawić do lodu na 30 s.
5. Zwirować próbki przy 12000 rpm przez 2 min.
6. Na mikromacierzy umieścić szkiełko nakrywkowe, silikonowe (paskami w dół). Aby właściwie to zrobić należy wykorzystać przygotowane przy kondycjonowaniu szkiełko z zaznaczonym polem z sondami.
7. W szczelinę między mikromacierzą a szkiełkiem nakrywkowym wprowadzić próbkę. Należy robić to ostrożnie.
8. Włożyć mikromacierz do komory hybrydyzacyjnej, w rowki komory wpuścić po 10 μ l wody wolnej od RNA-az.
9. W ostatnim etapie hybrydyzacji należy zakryć komorę wieczkiem. **Nie obracać komory** (pionowo/spodem do góry), może to spowodować zsuniecie się szkiełka nakrywkowego, wyciek buforu i/lub powstanie zacieków. Komory umieścić w piecu hybrydyzacyjnym (42°C) na 12-14 h (najwygodniej na noc).

Płukanie po hybrydyzacji:

Wykonanie ćwiczenia

1. Mikromacierze należy wypłukać w podgrzonym do 42°C buforze 1. (2x SSC, 0,1% SDS). Pojedynczo przenosić pęsetą mikromacierze do falkonów z buforem, mieszać 30 s i ponownie wstawić do pieca (całkowity czas płukania – 5 min).
2. Przenieść mikromacierze do falkonów z 0,1x SSC i płukać, obracając co jakiś czas, przez 5 min w temperaturze pokojowej.
3. Powtórzyć powyższy krok, używając buforu 0,05 SSC i płuczac 10 min, dwa razy;
4. Wysuszyć mikromacierze poprzez wirowanie w adaptorach do szkiełek mikroskopowych lub w falkonach (1000 rpm, 10 min).
5. Mikromacierze przechowywać w ciemnych falkonach owiniętych folią aluminiową i zeskanować.

niezależnie od
czasu następnego
linii, na
granicy
liścienia i