



Zakład Biologii Molekularnej Roślin
Uniwersytet Warszawski
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

BIOLOGIA MOLEKULARNA ROŚLIN

Skrypt do ćwiczeń



Warszawa, 2010

Spis Treści

1. Analiza modyfikacji chromatyny w cyklu komórkowym.....	5
Wstęp	5
Chromatyna	5
Potranslacyjne modyfikacje histonów	5
Fosforylacja histonu H3	6
Hodowle komórek roślinnych <i>in-vitro</i>	6
Elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych	7
Elektroforeza w warunkach natywnych.	8
SDS-PAGE	8
NuPAGE	9
Żele mocznikowe	10
Ogniskowanie izoelektryczne (IEF)	10
Elektroforeza dwukierunkowa 2DE	11
Barwienie białek po elektroforezie	11
Coomassie Brilliant Blue	11
Barwienie srebrem.....	11
Znaczniki fluorescencyjne	11
Imunodetekcja białek - Western Blot	12
Transfer mokry	12
Transfer pół-suchy	12
Blokowanie membran.....	13
Wiązanie przeciwciał.....	13
Detekcja	13
ECL.....	13
Cel doświadczenia	13
Schemat doświadczenia:	13
Dzień 1. Izolacja białek z materiału roślinnego (ok. 3 h)	14
Dzień 2, 3. Elektroforeza SDS-PAGE (ok. 3 h), barwienie (przez noc)	15
Przygotowanie żelu do SDS PAGE.....	15
Przygotowanie próbek do naniesienia na żel	16
Elektroforeza	16
Barwienie białek w żelu	16
Dzień 4. Western blot	17
Dzień 5. Detekcja metodą ECL.....	18

2. Porównanie wyciszenia ekspresji genu H1.3 w mutancie insercyjnym i mutancie amiRNA.....	20
Wstęp	20
Izolacja DNA	20
Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR.....	20
Genotypowanie roślin	21
Sztuczne mikroRNA.....	22
Izolacja RNA.....	23
RT-PCR	23
Matrycowy RNA	23
Odwrotna transkrypcja	24
Półilościowy RT-PCR	24
Opis doświadczenia	24
Cel doświadczenia:	24
Schemat doświadczenia	24
Dzień 1. Izolacja DNA genomowego na małą skalę, genotypowanie roślin	25
Dzień 2 i 3. Izolacja całkowitego RNA	25
Dzień 4. Synteza jednoniciowego cDNA.....	27
Dzień 5. Półilościowy multiplex PCR	27
Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	28
3. Badanie oddziaływań białek - drożdżowy system dwuhybrydowy	29
Zastawianie systemu dwuhybrydowego	29
Ograniczenia metody	30
Charakterystyka analizowanych białek	31
AtSWI3B.....	31
FCA	31
Test dwuhybrydowy	31
Schemat doświadczenia	31
Dzień 1. Izolacja DNA plazmidowego z bakterii.	32
Dzień 1. Izolacja DNA plazmidowego na małą skalę (minilizaty).....	32
Dzień 2. Transformacja drożdży	33
Przygotowanie do wykonania testu dwuhybrydowego.....	34
Dzień 1. Test dwuhybrydowy	34
4. Wybrane Substancje chemiczne stosowane podczas ćwiczeń	36
Zasady prowadzenia zeszytu laboratoryjnego	43
Literatura.....	43

UWAGI:

Zeszyt laboratoryjny jest podstawą do zaliczenia ćwiczeń. Wskazówki dotyczące prowadzenia zeszytu laboratoryjnego znajdują się na stronie 21 skryptu.



Akrylamid i bisakrylamid są silnymi neurotoksynami wchłanianymi przez skórę. W trakcie ważenia należy wkładać fartuchy, rękawiczki, maski i okulary. Pomimo że poliakrylamid jest uważany za nietoksyczny zawsze należy zakładać rękawiczki - może bowiem zawierać resztki niespolimeryzowanego akrylamidu.



2-merkaptoetanol i DTT – są szkodliwe dla błon śluzowych, górnych dróg oddechowych, skóry i oczu. Powinny być używane tylko pod wyciągiem, w rękawiczkach.



APS i TEMED są szkodliwe dla błon śluzowych, górnych dróg oddechowych, skóry i oczu. Wdychanie oparów, jak i kontakt ze skórą może prowadzić do poważnych schorzeń.



SDS – odważanie sypkiego odczynnika tylko w maseczce.



TCA – silny kwas, pracować w rękawiczkach i fartuchu. Rękawice lateksowe nie chronią całkowicie przed TCA. W razie zanieczyszczenia rękawic TCA, należy natychmiast je zmienić.



PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) – jest substancją toksyczną (inhibitor esterazy acetylocholinowej).



Fenol - substancja bardzo toksyczna, powoduje trudno gojące się oparzenia skóry, jest rakotwórczy.



Bromek etydyny jest substancją mutagenną, pracować w rękawiczkach.



X-gal jest substancją silnie trującą.



Azydek sodu jest substancją silnie toksyczną i mutagenną. Łatwo wchłania się przez skórę. Należy pracować w rękawiczkach i fartuchu.

W trakcie pracy z ciekłym azotem należy uważać aby nie ulec poparzeniu. Pracować w fartuchu i suchych rękawiczkach. Podczas ucierania należy trzymać moździerz przez bibułę lub rękawice kuchenną. Nie wdychać intensywnie.



Substancja niebezpieczna.



Roztwory tak oznaczone należy przygotować samemu.

1. Analiza modyfikacji chromatyny w cyklu komórkowym

Wstęp

Długość DNA w jądrze komórkowym jest daleko większa niż rozmiar kompartmentu, w którym się znajduje. Stąd też materiał genetyczny musi występować w zorganizowanej i upakowanej postaci, przy jednoczesnym zachowaniu możliwości zachodzenia wielu ważnych procesów.

Chromatyna

DNA, nośnik informacji genetycznej organizmów eukariotycznych, nie występuje w komórkach w postaci nagiej cząsteczki, lecz jest zasocjowany z białkami, tworząc nukleoproteinowy kompleks zwany chromatyną. Chromatyna posiada hierarchiczną, uporządkowaną strukturę, której podstawową jednostką organizacyjną jest nukleosom, zbudowany z oktameru histonowego, wokół którego nawinięty jest odcinek DNA o długości ok. 147 par zasad (rys. 1). Oktamer histonowy tworzy osiem cząsteczek białek histonów rdzeniowych, po dwie cząsteczki histonów H2A, H2B, H3 i H4. Histony rdzeniowe zbudowane są z domeny globularnej, tworzącej rdzeń nukleosomu, oraz

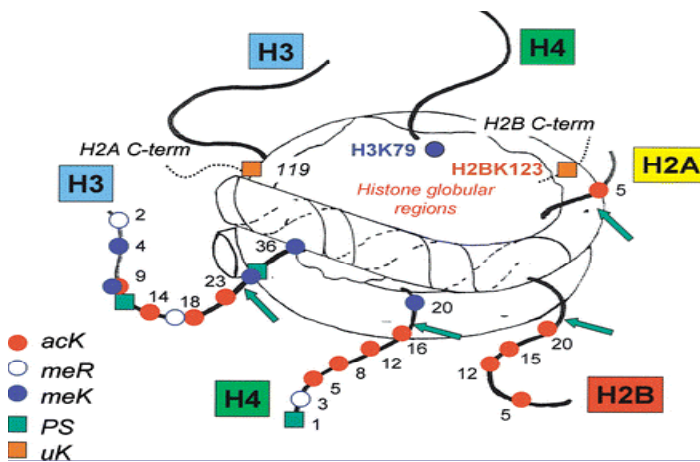
histonu H1, zwanego histonem łącznikowym. Histon H1 pozwala chromatynie na przyjmowanie wyższej formy organizacji, którą jest solenoidalna struktura o średnicy 30 nm. Przyłączanie kolejnych białek strukturalnych pozwala na utworzenie wyższych struktur organizacyjnych, z których najwyższą jest chromosom metafazowy, występujący podczas podziałów komórkowych.

Związanie DNA w rybonukleoproteinowym kompleksie nadaje materiałowi genetycznemu organizmów eukariotycznych zwartą i uporządkowaną strukturę. Z drugiej strony, obecność białek strukturalnych sprawia, że DNA jest niedostępne dla licznych czynników białkowych zaangażowanych w procesy metaboliczne zachodzące na poziomie DNA. Z tego powodu organizmy eukariotyczne wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających precyzyjną regulację struktury chromatyny, takich jak ATP-zależny remodeling chromatyny lub potranslacyjne modyfikacje histonów.

Potranslacyjne modyfikacje histonów

Ogony histonów rdzeniowych podlegają różnorodnym, zazwyczaj odwracalnym modyfikacjom potranslacyjnym. Modyfikacje te mogą polegać na przyłączeniu niewielkich grup takich jak reszta metylowa, acetylowa czy fosforanowa, jak również dużych cząsteczek, jak w przypadku ubikwitynylacji i sumoilacji. Modyfikacjom potranslacyjnym podlegają liczne reszty aminokwasowe znajdujące się we wszystkich histonach rdzeniowych (rys. 1). Istnieje więc bardzo duży zbiór potencjalnych wzorów modyfikacji pojedynczego nukleosomu. Wraz z nowymi odkryciami obraz ten dodatkowo się komplikuje. Okazało się m.in., że także liczba przyłączonych grup funkcyjnych może być różna, np. metylacja lizyny 9 histonu H3 - H3K9 może być pojedyncza (H3K9me), podwójna lub potrójna (H3K9me2 i H3K9me3). Ponadto, modyfikacjom mogą ulegać nie tylko ogony, ale również domena globularna histonów rdzeniowych, a także histon łącznikowy H1. Odkrywane są również nowe rodzaje modyfikacji, takie jak izomeryzacja proliny lub zamiana argininy na cytrulinę (deiminacja) (Kouzarides 2007).

Uważa się, że modyfikacje ogonów histonów rdzeniowych wpływają na strukturę chromatyny poprzez dwa odrębne mechanizmy. Pierwszy z nich polega na modulacji oddziaływań histon-histon oraz histon-DNA, wynikającej ze zmiany



Rys.1. Schemat budowy nukleosomu z widocznymi „ogonami histonowymi” na zewnątrz rdzenia.

nieustrukturyzowanych odcinków N-końcowych, które wystają poza strukturę nukleosomu jako tzw. „ogony histonowe”. Zasadowy charakter białek histonowych umożliwia im silne wiązanie kwasu deoksyrybonukleinowego sprawiając, że nukleosom posiada zwartą i trwałą strukturę. Pomiędzy nukleosomami występują odcinki DNA łącznikowego, z którymi wiąże się cząsteczki

ładunku histonów i osłabienia ich wiązania do DNA (acetylacja, fosforylacja) lub zaburzeniu struktury nukleosomu (modyfikacje w obrębie domeny globularnej). Drugim mechanizmem działania modyfikacji jest ich wpływ (promujący lub hamujący) na wiązanie białek regulujących strukturę chromatyny. Białka te odczytują znaczenie danego wzoru modyfikacji i powodują dalsze modyfikacje chromatyny - samodzielnie lub poprzez rekrutację innych czynników (np. ATP-zależnych kompleksów remodelujących chromatynę). Z mechanizmem tym związana jest hipoteza kodu histonowego, mówiąca o tym, że określone wzory modyfikacji histonów decydują o stanie chromatyny i aktywności genów w jej obszarze, a w konsekwencji na określony efekt biologiczny. Potwierdzeniem hipotezy kodu histonowego była m.in. identyfikacja domen białkowych wiążących określone modyfikacje histonów rdzeniowych, takich jak bromodomena wiążąca acetylowane histony czy chromodomena wiążąca niektóre typy metyloowanych histonów.

Fosforylacja histonu H3

Zależna od cyklu komórkowego fosforylacja histonu H3 w serynie 10 (H3S10ph) jest konserwowana wśród organizmów eukariotycznych. Ta dynamiczna potranslacyjna modyfikacja jest zaangażowana zarówno w aktywację transkrypcji jak i w kondensację oraz segregację chromosomów.

Wiele procesów zachodzących w trakcie mitozy jest uzależnionych od upakowania chromatyny do jej mitotycznej formy. Pojawia się coraz więcej dowodów na to, że upakowanie chromosomów jest regulowane między innymi poprzez potranslacyjną modyfikację histonów – fosforylację. Obecnie fosforylacja histonu H3 jest uznawana za jeden z mitotycznych biomarkerów.

Z obserwacji wielu organizmów wynika, że poziom fosforylacji histonu H3 jest niski w czasie interfazy, wzrasta na początku podziałów komórkowych i opada podczas telofazy. W przypadku komórek zwierzęcych mitotycznie specyficzna fosforylacja H3S10 rozpoczyna się w późnej fazie G2 w obszarach perycentromerycznych heterochromatyny i rozprzestrzenia się w sposób uporządkowany i zbieżny z kondensacją chromosomów. Modyfikacja ta jest jednolicie dystrybuowana na chromosomy zarówno w mitozie jak mejozie.

U roślin, w trakcie podziałów mitotycznych poziom fosforylacji jest wysoki w częściach perycentromerycznych i niski w obszarach ramion

chromosomów. Ta specyficzna dla perycentromerów fosforylacja może być zaburzona przez działanie stresu chłodu lub działanie inhibitorów fosfataz. Wyjątkiem są rośliny o chromosomach policentromerycznych, u których fosforylowane są histony H3 na całej długości chromosomów. W przypadku podziałów mejotycznych istnieją różnice pomiędzy pierwszym a drugim podziałem. Podczas pierwszego podziału mejotycznego fosforylowane są histony H3 na całym chromosomie, podczas gdy w trakcie drugiego podziału fosforylacja ograniczona jest, podobnie jak w mitozie, do obszarów perycentromerów. Podobny profil wykazuje również fosforylacja histonu H3 w serynie 28.

Tak szczegółowy obraz zmian modyfikacyjnych poznano przy użyciu przeciwciał specyficznych dla ufosforylowanych epitopów histonu H3.

Ćwiczenie polega na obserwacji zmian w fosforylacji Histonu H3 w komórkach roślinnych dzielących się i w fazie G₀. W tym celu należy wyizolować białka histonowe, przeprowadzić elektroforezę SDS-PAGE, a następnie detekcję białek typu Western.

Hodowle komórek roślinnych *in-vitro*

Kultury zawiesinowe komórek roślinnych stanowią homogeną populację komórek, łatwo dostępnych dla podawanych z zewnątrz substancji i rosnących w określonych, sterylnych warunkach. Są zatem dobrym materiałem do badań ścieżek metabolitów wtórnych, indukcji enzymów, czy ekspresji genów. Stosunkowo łatwa jest także izolacja enzymów i innych białek z komórek hodowanych w zawieszynie. Brak lub niewielka zawartość chlorofilu i innych barwników ułatwia doświadczenia. Stosując różnego rodzaju inhibitory można synchronizować zawiesziny komórkowe, czyli doprowadzić do stanu, w którym wszystkie komórki w zawieszynie znajdują się na tym samym etapie cyklu komórkowego. Poprzez „głodzenie” komórek można zahamować podziały komórkowe i wprowadzić je w fazę G₀.

W trakcie ćwiczeń jako materiał badawczy posłuży linia komórkowa tytoniu TBY-2.

Linia komórkowa TBY-2 (Tobacco Bright-Yellow) została wyprowadzona z komórek mezofilu liści przez Nagatę i współpracowników na początku lat 90-tych. Komórki hodowane są w płynnej pożywce MS (Murashige i Skoog) wzbogaconej o 2,4-D i witaminę B5, w ciemności, w temperaturze ok. 25°C przy stałym wytrząsaniu (125 obrotów na minutę).

Elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych

Jedną z najpowszechniej stosowanych technik jakościowej i ilościowej analizy białek jest elektroforeza w żelach poliakrylamidowych (PAGE – ang. polyacrylamide gel electrophoresis). Żele poliakrylamidowe uzyskuje się w wyniku polimeryzacji akrylamidu i bisakrylamidu. Produktem polimeryzacji akrylamidu jest liniowy polimer, zaś czynnikiem odpowiedzialnym za usieciowanie powstałego żelu jest bisakrylamid. Żel poliakrylamidowy jest więc heteropolimerem, którego stopień usieciowania można regulować poprzez zwiększanie lub zmniejszanie ilości dodanego bisakrylamidu. Standardowo stosuje się proporcję akrylamid:bisakrylamid 29:1, która pozwala na uzyskanie żelu o odpowiednich właściwościach (twardość, kruchość). Gęstość żelu można regulować poprzez manipulowanie ilością dodanych do reakcji monomerów oraz stosunkiem akrylamid:bisakrylamid. Żel poliakrylamidowy, zarówno podczas polimeryzacji jak i elektroforezy jest zwykle ustawiony pionowo (tzw. vertical slab system).

Polimeryzacja akrylamidu i bisakrylamidu ma mechanizm wolnorodnikowy. Do zainicjowania reakcji polimeryzacji konieczne jest więc źródło wolnych rodników. Powszechnie wykorzystuje się mieszaninę APS i TEMED. Aniony nadtlenosiarczanowe są nietrwałe i ulegają spontanicznej homolizie, czyli rozpadowi z wytworzeniem wolnych rodników. Tempo rozpadu ulega znacznemu przyspieszeniu w obecności TEMED. Powstałe w ten sposób wolne rodniki inicjują reakcję polimeryzacji akrylamidu i bisakrylamidu. Istotne jest staranne dobranie ilości dodanego APS i TEMED. Wraz ze wzrostem ich stężenia spada bowiem przeciętna długość łańcucha polimeru, co objawia się zmętnieniem i obniżoną elastycznością żelu. Ponadto dodatek TEMED powyżej 0,2% (v:v) może powodować zaburzenia w rozdziale elektroforetycznym białek. Istotne jest również pH polimeryzującej mieszaniny. Ponieważ TEMED, aby przyspieszać tempo rozpadu APS, musi występować w formie deprotonowanej, pH mieszaniny powinno być powyżej 6. Należy także zauważyć, że w celu osiągnięcia całkowitej polimeryzacji akrylamidu, żel powinien być pozostawiony w temperaturze 4° na okres 2–3 h. Tak przygotowany żel uzyskuje maksymalną zdolność rozdzielczą. Nawet „wizualnie” spolimeryzowany żel po upływie jednej godziny od wylania nadal

zawiera znaczne ilości niespolimeryzowanego akrylamidu.

Żele poliakrylamidowe można przygotowywać w dwóch postaciach: jako żele o stałym stężeniu poliakrylamidu w całej objętości oraz jako żele o rosnącym liniowo stężeniu poliakrylamidu (tzw. żele gradientowe). Żele o stałym stężeniu powinny być używane tylko do rozdziału białek o masie zawierającej się w określonym przedziale. Dla przykładu, w technice SDS-PAGE (patrz poniżej) 15% żele mają maksymalną zdolność rozdzielczą dla białek o masie mniejszej niż 20 kDa, 12% dla 20–30 kDa, 10% dla 30–40 kDa i 8% dla białek o masie powyżej 50 kDa. Białka o masie poniżej tych przedziałów mogą migrować jako jeden, gruby prążek wraz z czołem elektroforezy, zaś białka o wyższej masie jako słabo rozdzielone prążki lub w ogóle nie wnikną do żelu. Żele gradientowe wykonane są z poliakrylamidu o stężeniu rosnącym liniowo wraz z kierunkiem migracji białek. Użycie żeli gradientowych pozwala na rozdział białek o bardzo zróżnicowanych masach, jednakże rozdzielczość żeli gradientowych jest zawsze niższa niż rozdzielczość żelu o odpowiednio dobranym, określonym stałym stężeniu.

Elektroforezę w żelach poliakrylamidowych można prowadzić w dwóch systemach: ciągłym i nieciągłym. Systemy elektroforezy ciągłej używają buforów o identycznym pH do sporządzania żelu, przygotowywania próbki i przeprowadzania elektroforezy. Ponieważ białka z próbki nie ulegają zateżeniu, konieczne jest nanoszenie na żel próbek o niewielkiej objętości. Jakość rozdziału bardzo zależy od „wysokości” naniesionej próbki. W systemie nieciągłym stosuje się dwa rodzaje żelu: zateżający i rozdzielający. Podczas elektroforezy próbka najpierw przechodzi przez żel zateżający a następnie przez żel rozdzielający. Przejście przez żel zateżający sprawia, że białka ulegają ściśnięciu do bardzo wąskiego paska (~0,1 mm), dzięki czemu wnikają one w żel rozdzielający praktycznie w tym samym czasie, co pozwala na uzyskanie ostrych i wyraźnych prążków (patrz też: SDS-PAGE)

Niezwykle istotnym zjawiskiem podczas przebiegu elektroforezy jest wzrost oporu elektrycznego żelu, czego konsekwencją może być przegrzewanie się żelu prowadzące do zaburzeń w rozdziale białek (tzw. „uśmiechanie się” żelu). Można temu zapobiec poprzez zastosowanie zewnętrznego chłodzenia żelu lub odpowiednie dobranie parametrów przy których prowadzona jest elektroforeza. Elektroforezę można prowadzić

przy stałej wartości jednego z trzech parametrów: natężenia, napięcia lub mocy. Przy stałym natężeniu tempo migracji białek pozostaje stałe, zwiększa się jednak wraz z czasem ilość wydzielanego ciepła, co prowadzi do ogrzewania się żelu. Podczas elektroforezy przy stałym napięciu tempo migracji spada wraz z czasem prowadzenia rozdzielania, aczkolwiek stałemu zmniejszaniu ulega również ilość wydzielanego ciepła, dzięki czemu ogrzewanie się żelu jest minimalne. Przy stałej mocy tempo migracji spada wraz z czasem prowadzenia rozdzielania, zaś ilość wydzielanego ciepła pozostaje stała w czasie, co prowadzi do grzania się żelu, ale w mniejszym stopniu niż podczas elektroforezy przy stałym natężeniu. Spośród wymienionych powyżej trzech wariantów najpowszechniej stosuje się elektroforezę przy stałym natężeniu prądu z uwagi na krótszy czas trwania rozdzielania. Wartość przyłożonego natężenia powinna być dostosowywana do grubości żelu. Standardowo zaleca się prowadzenie elektroforezy przy natężeniu 12–30 mA na każdy żel o grubości 1 mm i szerokości 10 cm (żele takie stosowane są na ćwiczeniach). Wartość przyłożonego natężenia zależy także od naszych oczekiwań względem jakości i czasu rozdzielania białek.

Elektroforeza w warunkach natywnych.

Natywna elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych (Native PAGE) odbywa się w warunkach niedenaturujących. Zarówno bufor do elektroforezy jak i bufor w którym jest rozpuszczone białko nie zawierają substancji denaturujących (np. SDS, mocznik, chlorowodorek guanidyny), za wyjątkiem śladowych ilości detergentów niejonowych, które mogą być niezbędne do lizy błon biologicznych w analizowanych materiale biologicznym (jadra komórkowe, mitochondria, plastydy). Elektroforeza w warunkach natywnych pozwala na analizę kompleksów białkowych, które w warunkach denaturujących uległyby rozpadowi. Tempo migracji białek zależy od licznych czynników, takich jak wielkość białka, jego struktura przestrzenna, sumaryczny ładunek elektryczny, obecność związanych kofaktorów czy obecność modyfikacji potranslacyjnych. Sprawia to, że przewidywanie tempa migracji oraz analiza obrazu po elektroforezie mogą być problematyczne. Elektroforezę natywną można przeprowadzać zarówno w układzie ciągłego jak i nieciągłego żelu. Obecnie stosowane są liczne techniki natywnej elektroforezy, z których dwie są najpowszechniej używane: Blue Native PAGE (BN-PAGE) i Clear Native PAGE (CN-PAGE).

BN-PAGE jest najstarszą techniką natywnej elektroforezy białek. Wykorzystuje ona barwnik Coomassie Blue jako substancję nadająca białkom wypadkowy ładunek ujemny oraz uwidaczniająca ich migrację w żelu. BN-PAGE jest powszechnie stosowany do analizy kompleksów białkowych o zachowanej aktywności enzymatycznej. Tempo migracji białek zależy głównie od ich masy i konformacji. Po rozdziale elektroforetycznym prążek zawierający badany kompleks może zostać wycięty i rozpuszczony w buforze zawierającym SDS, zaś białka uwolnione z kompleksu rozdzielone techniką SDS-PAGE. Procedura ta jest czasem nazywana Two Dimensional Blue Native SDS-PAGE. Wadą techniki BN-PAGE jest to, że Coomassie Blue może w niektórych przypadkach działać jako detergent i powodować dysocjację kompleksów białkowych oraz hamować aktywność enzymatyczną. Ponadto, Coomassie interferuje z niektórymi technikami detekcji białek bazującymi na chemiluminescencji i fluorescencji (np. podczas analizy Western-blot).

CN-PAGE nie wykorzystuje barwników do nadawania białkom ładunku elektrycznego. Efektem tego jest ograniczenie tej metody do rozdzielania białek o pI poniżej pH buforu (na ogół będą to białka o $pI < 7$). Tempo migracji białek silnie zależy od ich natywnego ładunku elektrycznego. Brak detergentów sprawia, że białka mają tendencję do tworzenia agregatów, co objawia się mniejszą zdolnością rozdzielczą tej metody. CN-PAGE, w odróżnieniu od BN-PAGE, w mniejszym stopniu powoduje zaburzenia w aktywności enzymatycznej analizowanych białek oraz nie interferuje z dalszymi procedurami bazującymi na chemiluminescencji i fluorescencji. Istnieją modyfikacje tej metody, w której do stosowanych buforów dodaje się niewielkie ilości łagodnych detergentów niejonowych, które zapobiegają agregacji białek. W innym wariantcie do buforów dodaje się niewielkie ilości detergentów anionowych, takich jak deoksyholan sodu, co również zapobiega agregacji, a także nadaje białkom ładunek ujemny i pozwala na analizę białek o $pI > 7$.

SDS-PAGE

Najpowszechniej stosowaną techniką elektroforetycznego rozdzielania białek w żelach poliakrylamidowych jest elektroforeza w obecności SDS (tzw. SDS-PAGE). SDS jest silnym detergentem anionowym, który niszczy struktury białkowe wyższego rzędu, denaturując białka do postaci

liniowej (struktura pierwszorzędowa) oraz nadaje im wypadkowy ładunek ujemny. Przyjmuje się, że statystycznie jeden anion dodecylosiarczanowy przypada na dwie reszty aminokwasowe. Ponadto do rozdzielanych próbek dodaje się silne środki redukujące, takie jak 2-merkaptotanol lub DTT, które redukują mostki disiarczkowe obecne w białkach. Można więc przyjąć, że tempo migracji białek podczas SDS-PAGE jest zależne tylko od ich masy i jest wprost proporcjonalne do jej logarytmu. Oczywiście są białka dla których występują odstępstwa od tej reguły i ich migracja ulega zaburzeniu. Zaliczają się do nich białka obdarzone wysokim ładunkiem natywnym (np. białka histonowe, migrujące wolniej niż wskazywałaby na to ich masa) oraz białka błonowe. Jednakże dla większości białek tempo migracji jest zależne tylko od masy. Dlatego też możliwe jest stosowanie tzw. standardów wielkości białek. Standardy wielkości są mieszaniną kilku lub kilkunastu białek o znanej masie. Po ich równoległym rozdziale razem z analizowaną próbką możliwe jest oszacowanie masy badanych białek. Dla większości białek błąd w szacowaniu wielkości mieści się w granicach 5 do 10%.

Rozdział SDS-PAGE prowadzony jest na ogół techniką nieciągłego żelu. Jako buforu elektroforetycznego standardowo używa się układu tris-glicyna (tzw. układ Laemmli'ego), w którym pH żelu zatażającego wynosi 6,6, zaś żelu rozdzielającego 8,8. Jonami zaangażowanymi w zagęszczanie analizowanych białek w żelu zatażającym są aniony chlorkowe i glicynianowe. pH żelu zatażającego jest nieznacznie wyższe niż pI glicyny. W tych warunkach większość glicyny występuje w postaci jonów obojnych, posiadających zerowy wypadkowy ładunek elektryczny i nie migrujących w polu elektrycznym. Tylko niewielka ich część posiada w danym momencie sumaryczny ładunek ujemny i migruje w kierunku anody (elektroda „+”). Anion glicynianowy migruje więc powoli jako tzw. „jon opóźniony” (ang. trailing ion). Natomiast aniony chlorkowe, posiadające wysoką ruchliwość elektroforetyczną, przemieszczają się szybko w kierunku anody wraz z czołem próbki jako tzw. „jon wiodący” (ang. leading ion). Rozdzielenie się dwóch „chmur” jonów powoduje spadek napięcia pomiędzy nimi, w wyniku czego zawarte między nimi białka ulegają silnej kondensacji w bardzo wąskim paśmie. Dzięki temu wszystkie białka wchodzą w żel rozdzielający praktycznie w tym samym czasie. W żelu zatażającym stosuje się

na tyle niskie stężenie poliakrylamidu, aby nie zaburzał on migracji białek. Jego funkcja sprowadza się do ograniczania dyfuzji molekuł i hamowania ruchów konwekcyjnych. Po dotarciu próbki do żelu rozdzielającego dochodzi do gwałtownej zmiany w otoczeniu migrujących białek. Ponieważ pH żelu rozdzielającego jest znacznie powyżej pI glicyny (pH=8,8), praktycznie całość glicyny ulega deprotonacji i jako aniony wyprzedza białka. Powoduje to zanik miejscowego spadku napięcia. Od tej pory białka migrują w tempie zależnym od ich masy.

Technika elektroforetyczna SDS-PAGE prowadzona w układzie Laemmli'ego, mimo iż jest bardzo powszechnie stosowana, nie jest wolna od wad. Pierwsza z nich wynika z faktu, iż pH żelu rozdzielającego jest zasadowe (pH=8,8). Zasadowy odczyn promuje powolną hydrolizę żelu, prowadzącą do słabszego usieciowania żelu i w konsekwencji spadku zdolności rozdzielczej, co sprawia, że żele SDS-PAGE nie mogą być przechowane dłużej niż 1-2 miesiące. Zasadowe środowisko elektroforezy promuje również tworzenie się mostków disiarczkowych, zaś odczynniki redukujące, takie jak 2-merkaptotanol lub DTT, nie migrują wraz z białkami, co również może mieć negatywny wpływ na rozdział białek. Ponadto, wraz z przebiegiem elektroforezy, pH żelu rozdzielającego rośnie do wartości powyżej 9,5, co sprzyja zachodzeniu reakcji ubocznych, takich jak deaminacja białek oraz addycja niespolimeryzowanego akrylamidu do grup aminowych i tiolowych w łańcuchach bocznych aminokwasów. Zachodzące modyfikacje białek mogą utrudniać dalszą ich analizę technikami spektrometrii mas. Kolejną wadą układu Laemmli'ego jest wysoka temperatura podczas denaturacji próbek białek, mogąca prowadzić do hydrolizy wiązania peptydowego pomiędzy kwasem asparaginowym a proliną. Zaletą tradycyjnej techniki SDS-PAGE jest natomiast niska cena stosowanych odczynników.

NuPAGE

Opisane w powyższym rozdziale wady tradycyjnej techniki SDS-PAGE doprowadziły do opracowania udoskonalonej metody zwanej NuPAGE. Zasadniczą cechą, odróżniającą ją od systemu Laemmli'ego, jest rozdział białek w warunkach pH zbliżonych do obojętnego. Zostało to osiągnięte poprzez zastąpienie w żelu układu buforującego Tris-HCl układem Bis-Tris-HCl lub Tris-octan oraz stosowanie buforów

elektroforetycznych bazujących na układach MES-Tris, MOPS-Tris lub, dla żeli wykonanych na Tris-octan, Tris-tricyna. Obniżenie warunków pH znacząco zwiększyło stabilność poliakrylamidu, tym samym wydłużając żywotność żeli, a także zmniejszyło częstość zachodzenia reakcji ubocznych rozdzielanych białek. Dodatkowo, zastosowanie odczynników redukujących, migrujących wraz z białkami, zapobiega odtwarzaniu się mostków disiarczkowych. Również denaturacja białek, prowadzona w łagodniejszych warunkach (70°C), nie sprzyja hydrolizie wiązań peptydowych. Wadą techniki NuPAGE jest jednak wysoka cena stosowanych odczynników.

Żele mocznikowe

Podobnie jak SDS-PAGE, elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych w obecności mocznika (Urea-PAGE) jest techniką denaturującą białka. Podobnie jak SDS, mocznik niszczy struktury białkowe wyższego rzędu, jednakże nie wpływa on na sumaryczny ładunek elektryczny białka. Tempo migracji białek zależy więc zarówno od ich masy jak i ładunku. Technika ta bywa stosowana jako alternatywa dla SDS-PAGE podczas rozdziału białek błonowych, które mimo obecności SDS pozostają w formie nierozpuszczonej.

Modyfikacją tej metody jest AU-PAGE (ang. Acidic Urea PAGE), czyli elektroforeza białek w obecności mocznika i kwasu octowego. Technika ta pozwala na rozdzielanie elektroforetyczny białek o właściwościach zasadowych, głównie histonów. Niskie pH buforów używanych podczas elektroforezy (pH=3) sprawia, że analizowane białka występują w formie protonowanej, zaś wielkość wypadkowego dodatniego ładunku elektrycznego zależy od liczby reszt aminokwasów zasadowych (głównie arginin i lizyn). Ponieważ białka występują w postaci kationów, rozdzielanie elektroforetyczne prowadzi się w kierunku katody (elektroda „-”). W technice AU-PAGE tempo migracji zależy zarówno od ładunku jak i masy danego białka. Wrażliwość na sumaryczny ładunek białka jest tak wysoka, że nawet utrata jednej grupy funkcyjnej o charakterze zasadowym (np. w wyniku modyfikacji potranslacyjnych, takich jak acetylowanie lizyny) lub uzyskanie grupy funkcyjnej o wyraźnych właściwościach kwasowych (np. w wyniku fosforylacji seryny) może, w przypadku niektórych małych białek (np. histonu H4), być widoczna w postaci wyraźnego przesunięcia prążka na żelu. Technikę AU-PAGE można stosować

w formie układu nieciągłego (analogami anionów chlorkowego i glicynianowego są odpowiednio kation amonowy i kation glicyniowy) lub ciągłego (stosowane dla bardzo małych białek i peptydów lub białek które nie ulegają rozdzielaniu po załadowaniu). Podczas rozdzielania w układzie ciągłym, przed właściwą elektroforezą przeprowadza się tzw. pre-elektroforezę, czyli przykładania się napięcia do „pustego” żelu w celu usunięcia z niego kationów amonowych, które powodowałyby załadowanie próbki. Czynnikiem inicjującym polimeryzację żeli do AU-PAGE mogą być układy APS/TEMED lub ryboflawina/TEMED. Stosowanie APS jest jednak kłopotliwe, ponieważ w warunkach niskiego pH kataliza rozkładu APS przez TEMED jest mało wydajna, co prowadzi do długotrwałej polimeryzacji żelu. Ponadto, obecność jonów powstałych w wyniku rozkładu APS zaburza załadowanie białek w układach nieciągłych. W układzie ryboflawina/TEMED polimeryzacja jest indukowana przez promienie UV lub silne źródło światła.

Ogniskowanie izoelektryczne (IEF)

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym stwarza możliwość frakcjonowania białek zależnie od ich punktów izoelektrycznych (pI) - metoda ta to ogniskowanie izoelektryczne (IEF). Wykorzystuje ona rozdzielanie w żelu poliakrylamidowym, w którym utworzono gradient pH między katodą a anodą, wywołany elektrolizą amfoterycznych, syntetycznych związków buforowych - amfolitów. Jeśli wprowadzi się do żelu poliakrylamidowego z amfolitami substancje o charakterze amfoterycznym, np. polipeptydy, to podczas elektroforezy wędrują one do miejsc w żelu o wartości pH odpowiadającej pI, czyli stref, w których ładunek sumaryczny cząsteczek wynosi zero. Dobrą jakością amfolitów warunkuje niewielka masa cząsteczkowa (300-500), znaczna pojemność buforowa, dobra rozpuszczalność w wodzie oraz mała absorpcja w pasmie UV, zwłaszcza w zakresie 260-280 nm. Takie własności mają syntetyczne izomery i homologi kwasów poliaminopolikarboksylowych. Elektroforeza białek za pomocą ogniskowania izoelektrycznego przebiega zwykle w obecności dużych stężeń mocznika i detergentów niejonowych, które umożliwiają analizę białek trudnorozpuszczalnych (elektroforeza w warunkach denaturujących). Obecnie ogniskowanie izoelektryczne przeprowadza się w komercyjnie dostępnych immobilizowanych gradientach pH. Paski żelu z gradientem pH są

dostarczane w formie zliofilizowanej (suche). Najczęściej paski te rehydratuje się buforem zawierającym rozdzielane białka, amfolyty, mocznik i detergenty. Przy elektroforezie w immobilizowanych gradientach pH stosuje się bufor o jak najmniejszym stężeniu soli, co pozwala na zastosowanie wysokiego napięcia przy rozdiale białek. Ogniskowanie izoelektryczne z zastosowaniem gotowych gradientów pH prowadzi się zwykle przez 10 – 36 godzin przy stałym napięciu 3000 – 8000 V. Natężenie prądu przy takiej elektroforezie jest bardzo niskie - zwykle nie przekracza 100 μ A na jeden pasek z gradientem.

Elektroforeza dwukierunkowa 2DE

Przy analizie skomplikowanych mieszanin białek rozdzielczość jednokierunkowego rozdziału elektroforetycznego jest często niewystarczająca. Jedną z metod pozwalającą na zwiększenie liczby białek skutecznie rozdzielanych i uwidacznianych na żelu jest elektroforeza dwukierunkowa. W metodzie tej łączy się dwie różne, elektroforetyczne techniki rozdziału białek. Białka są rozdzielane najpierw przy pomocy jednej metody (pierwszy kierunek) po czym paski żelu z rozdzielonymi białkami są łączone z drugim, innym żelem i na nim rozdzielane (drugi kierunek). W ten sposób można rozdzielić i uwidocznić znacznie więcej białek. Najczęściej stosowanym wariantem elektroforezy dwukierunkowej jest rozdział białek pod względem ich punktu izoelektrycznego (ogniskowanie izoelektryczne, IEF) i późniejszy rozdział w systemie SDS-PAGE. Jest metoda powszechnie stosowana w doświadczeniach proteomicznych.

Metody elektroforezy dwukierunkowej są także wykorzystywane do badania kompleksów białkowych. Często metoda rozdziału Bue Native oraz Clear Native PAGE jest łączona z rozdziałem SDS-PAGE. W układzie takim w pierwszym kierunku białka są rozdzielane w postaci nie zdenaturowanej z zachowaniem całych kompleksów. W drugim kierunku białka są rozdzielane w warunkach denaturujących (kompleksy rozpadają się). W ten sposób można uwidocznić kompleksy białkowe jako serie plamek. Białka nie występujące w kompleksach są widoczne jako pojedyncze plamki.

Barwienie białek po elektroforezie

Białka w żelach poliakrylamidowych można wykrywać przy pomocy barwników lub fluorochromów łączących się specyficznie z białkami (Commasie, SyproRuby) lub przy

pomocy reakcji chemicznych prowadzących do powstania barwnych produktów. Reakcje takie mogą niespecyficznie wykrywać białka (np. barwienie żeli srebrem) lub opierać się na specyficznej reakcji katalizowanej przez określone białko enzymatyczne (wykrywanie enzymów w żelach po elektroforezie natywnej).

Coomassie Brilliant Blue

W barwieniu wykorzystuje się zdolność barwników z rodziny Coomassie Brilliant Blue do niespecyficznego wiązania do białek. Po inkubacji z barwnikiem żel przybiera niebieskawą barwę a prążki wskazują lokalizację białek. Barwnik nie wiąże się z żelem poliakrylamidowym i łatwo go odpłukać, dzięki czemu uzyskuje się wyraźny obraz prążków.

Barwienie tą metodą pozwala na densytometryczną analizę ilościową białek, w stosunkowo dużym zakresie dynamicznym.

Metoda ta jest mniej czuła niż barwienie srebrem cz SyproRuby, pozwala zwykle na wykrycie > 50 ng białka w prążku. Czułość metody zależy także od stosowanego protokołu barwienia.

Barwienie srebrem

Istnieje wiele protokołów wyznakowywania białek srebrem (AgNO_3). Metody te można podzielić na działające w środowisku kwaśnym i zasadowym. W środowisku kwaśnym jony srebra reagują z grupami karboksylowymi aminokwasów. W środowisku zasadowym jony srebra reagują z grupami aminowymi. W obu przypadkach jony srebra zostają zredukowane i pozostają w żelu jako koloidalne srebro. Metoda ta jest znacznie czulsza niż barwienie Coomassie – pozwala na wykrycie kilku ng białka w prążku. Barwienie srebrem pozwala na ilościową analizę densytometryczną żeli, jednak zakres dynamiczny tej metody jest mniejszy niż w przypadku barwienia Coomassie czy SyproRuby.

Znaczniki fluorescencyjne

Istnieje wiele substancji wykazujących fluorescencję, a jednocześnie łączących się z białkami. Niektóre z nich można wykorzystać do wykrywania białek w żelach. Jednym z najpopularniejszych barwników tego typu jest SyproRuby.

Barwienie SyproRuby jest mniej czułe niż barwienie srebrem, ale bardziej czułe niż barwienie Coomasie. Barwniki fluorescencyjne charakteryzują

się największym zakresem dynamicznym, więc doskonale nadają się do analiz ilościowych. Do dokumentacji (skanowania) żeli wybarwionych znacznikami fluorescencyjnymi stosuje się skanery fluorescencji.

Istnieją barwniki fluorescencyjne czulsze od barwienia srebrem. Przykładem jest barwnik Lightning Fast zawierający fluorochrom pochodzący od grzyba *Epicoccum nigrum*, który łączy się niekowalencyjnie z białkami i cząsteczkami SDS. Znakowanie tą metodą pozwala wykryć 100 pg białka w prążku, a więc jest ponad 10 razy czulsze niż barwienie srebrem.

W proteomice stosuje się także znaczniki fluorescencyjne, które przyłącza się do białek przed elektroforezą. Metody takie pozwalają na wyznaczenie różnych próbek białkowych fluorochromami o różnej barwie emitowanego światła. Próbkę są później łączone i rozdzielane na jednym żelu. Żele są skanowane przy dwóch różnych długościach fali (dla obu fluoroforów). Porównanie intensywności fluorescencji w próbkach pozwala na określenie różnic w ilości poszczególnych białek. Zaletą takiej metody jest rozdział dwóch porównywanych prób w identycznych warunkach (ten sam żel).

Imunodetekcja białek - Western Blot

Technika western blot wykorzystywana jest do detekcji i identyfikacji białek. Procedura składa się z kilku części. Pierwszym etapem jest rozdzielanie mieszaniny białek w żelu poliakrylamidowym. Następnie białka przenoszone są na membranę (w naszym przypadku jest to transfer pół-suchy), która niespecyficznie wiąże wszystkie białka.

Transfer odbywa się w kierunku elektrody dodatniej. Po rozdziale elektroforetycznym w obecności SDS-u (jonowego, naładowanego ujemnie, detergentu) białka są zdenaturowane i wszystkie posiadają ładunek ujemny proporcjonalny do ich masy. Wszystkie zatem będą wędrować w kierunku elektrody dodatniej. Należy zatem tak ułożyć membranę względem żelu, by znalazła się ona na drodze migracji białek z żelu.

Wyróżniamy dwa typy transferu: transfer mokry i półsuchy.

Transfer mokry

W metodzie tej „kanapka” złożona z żelu, membrany i bibuły Whatmana ułożona jest pionowo pomiędzy dwiema elektrodami. Całość umocowana jest w aparacie wypełnionym buforem. W niektórych typach aparatów można umieścić

i prowadzić transfer dla czterech takich „kanapek” jednocześnie.

Transfer mokry zalecany jest w przypadku białek dużych (>100 kDa), hydrofobowych lub trudno rozpuszczalnych ze względu na możliwość prowadzenia go nawet przez 24 godziny, bez ryzyka wyparowania buforu. Należy jednak pamiętać, że przy transferach trwających dłużej niż godzinę, trzeba zapewnić chłodzenie, aby utrzymać temperaturę w granicach 10 – 30°C. Transfer mokry przeprowadza się przy stałym napięciu prądu, zwykle 20 – 30 V.

Konieczność chłodzenia, jak również duża ilość buforu niezbędna do przeprowadzenia transferu są niewątpliwie wadami tej metody.

Transfer pół-suchy

Drugi rodzaj transferu to transfer półsuchy. W tym przypadku „kanapka” ułożona jest poziomo i znajduje się między płaskimi elektrodami. Żel i membrana umieszczone są pomiędzy bibułami nasączonymi buforem. Ze względu na to, że cały dostarczany prąd przechodzi przez membranę, transfer ten jest szybszy niż transfer mokry. Prowadzi się go przy stałym natężeniu prądu, wynoszącym zwykle 1 – 1,5 mA/cm² membrany. Kolejną zaletą jest niewielka ilość buforu potrzebna do przeprowadzenia transferu, nie jest też konieczne chłodzenie. Ze względu na możliwość wyparowania buforu, nie należy prowadzić transferu dłużej niż trzy godziny. W przypadku białek dużych lub trudno rozpuszczalnych, wymagających długiego transferu, zaleca się transfer mokry.

Transfer białek z żelu można przeprowadzić na różnego typu membrany. Najpopularniejsze z nich to membrany nitrocelulozowe lub membrany z polifluorku winylidenu (PVDF).

Membrany nitrocelulozowe są niezbyt drogie, a ich zdolność do wiązania białek jest wysoka (249 µg/cm²). Wielkość porów w membranach nitrocelulozowych waha się od 0,45 µm do 0,1 µm, dzięki czemu można transferować małe białka, tj. poniżej 1500 Da. Membrany te od razu nasączają się buforem do transferu, bez uprzedniego zanurzania ich w metanolu.

Membrany PVDF charakteryzują się nieco mniejszą zdolnością do wiązania białek w porównaniu do membran nitrocelulozowych (172 µg/cm²), mają one za to dużo większą wytrzymałość mechaniczną. Należy pamiętać o wcześniejszym zanurzeniu ich w metanolu i dopiero później w buforze do transferu (aktywacja membrany).

Membran PVDF można używać kilkakrotnie – po ich wywołaniu, można odplukać przeciwciała I i II-rzędowe, a następnie powtórnie zablokować w mleku i powtórzyć inkubację z innymi przeciwciałami I-, a następnie II-rzędowymi.

Blokowanie membran

Po transferze wolne miejsca wiązania białek na membranie są blokowane, aby zapobiec niespecyficjnej adsorpcji przeciwciał. Do blokowania membran najczęściej używa się odłuszczonego mleka lub albuminy z surowicy cielęcej.

Wiązanie przeciwciał

Antygeny będące przedmiotem badań identyfikuje się przy użyciu wyznakowanych przeciwciał, bądź przeciwciał niewyznakowanych a identyfikowanych poprzez wyznakowane przeciwciała drugorzędowe specyficzne dla pierwszorzędowych. W końcu następuje detekcja, której sposób zależy od rodzaju użytych przeciwciał.

Detekcja

Metoda detekcji białek w technice western blot zależy od rodzaju znacznika, jaki dołączony jest do przeciwciał. Najczęściej stosowane są alkaliczna fosfataza lub peroksydaza chrzanowa. Wizualizacja tych enzymatycznych znaczników może być przeprowadzona kolorymetrycznie (alkaliczna fosfataza, w miejscu związania przeciwciał do białka na membranie powstaje barwny produkt) lub chemiluminescencyjnie (peroksydaza, enzym przeprowadza reakcję z wytworzeniem światła, które naświetla kliszę fotograficzną).

ECL

W trakcie ćwiczeń wykorzystujemy metodę chemiluminescencyjną (ECL – enhanced chemiluminescence). Chemiluminescencja polega na wydzieleniu energii powstałej w wyniku reakcji chemicznej w postaci światła. Peroksydaza (sprzężona z przeciwciałami II-rzędowymi) w obecności nadtlenu wodoru utlenia luminol, a produktem tej reakcji jest związek o niższym stanie energetycznym. Nadmiar energii uwalniany jest w postaci fotonów światła.

Cel doświadczenia

Celem ćwiczenia jest porównanie poziomu fosforylacji histonu H3 w komórkach tytoniu (TBY-2) dzielących się i komórkach zatrzymanych w fazie G₀ cyklu komórkowego.

Przejdźcie zawiesiny do G₀ uzyskuje się w przypadku komórek TBY-2 poprzez 30-krotne obniżenie zawartości sacharozy w pożywce.

Schemat doświadczenia:

- Izolacja białek histonowych z komórek tytoniu (BY-2).
- Ocena ilości wyizolowanych białek za pomocą SDS-PAGE.
- Rozdział elektroforetyczny wyizolowanych białek i transfer na membranę PVDF metodą pół-suchą.
- Detekcja fosforylowanego histonu H3 za pomocą specyficznych przeciwciał.
- Uwidocznienie związanych przeciwciał metodą ECL
- Analiza densytometryczna ilości wykrytego białka

Wykonanie

Dzień 1. Izolacja białek z materiału roślinnego (ok. 3 h)

Metody stosowane przy izolacji i oczyszczeniu białek zależą od właściwości danego białka. Poniżej, podano procedurę izolacji histonów rdzeniowych. Należy jednak pamiętać, że obok histonów metodą tą ekstrahuje się również wiele innych białek.

Materiały:

- zamrożony materiał biologiczny (komórki hodowane w pożywce MS z 0,1% i 3% sacharozy)
- ciekły azot
- lód
- probówki wirówkowe na 30 ml lub falkony 50 ml
- duża wirówka z chłodzeniem
- kołyska laboratoryjna
- moździerz i tłuczek
- homogenizator IKA
- włóknina „Miracloth” lub gaza
- suszarka (zimny strumień powietrza)
- waga laboratoryjna

Odczynniki:

- 2M Tris-HCl pH 7,8
- 0,5M EDTA pH 8.0
- 36-38% HCl (11,46M)
- 2-merkaptioetanol (14,2 M)
- 100 mM PMSF
- bufor HI (Histone Isolation):



- 10 mM Tris-HCl pH 7.5
- 2 mM EDTA
- 0,25 M HCl
- 5 mM 2-merkaptioetanol*
- 0,2 mM PMSF *

* dodać **nie** wcześniej niż 30 min. przed izolacją



- 100% TCA
- 5x SDS loading buffer (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.025% Bromophenol Blue)



- 1 M DTT
- zimny aceton (-20°C)

W trakcie izolacji nie należy ogrzewać materiału, trzeba dbać o utrzymanie niskiej temperatury poprzez trzymanie próbek w lodzie lub pracę w chłodni. Wszelkie wirowania należy przeprowadzać w schłodzonej do 4°C wirówce.

Pierwszym etapem homogenizacja komórek w celu uwolnienia białek. Następnie białka wytrącane są kwasem trójchlorooctowym (TCA). TCA usuwany jest z osadu białek poprzez płukanie zmrożonym acetonem.

1. 0,1 – 1g materiału roślinnego zamrozić w ciekłym azocie i utrzeć w moździerzu porcelanowym na proszek (zarówno moździerz jak i tłuczek należy wcześniej schłodzić poprzez zalanie ciekłym azotem; ucieranie komórek z zawiesiny będzie łatwiejsze, jeżeli przed odwinięciem folii „obstukamy” ją zimnym tłuczkiem). Nie dopuścić do rozmrożenia.
2. Proszek przenieść schłodzoną szpatułką do falkonu na 50 ml zawierającego 10 ml buforu HI (tuż przed izolacją dodać do buforu HI 2-merkaptioetanol i PMSF).
3. Zawiesinę dodatkowo homogenizować ok. 20 s homogenizatorem IKA przy najwyższych obrotach (należy pamiętać, że nóż homogenizatora trzeba dobrze opłukać przed i po homogenizacji (najlepiej trzymając pracujący nóż w plastikowej butelce z wodą destylowaną) i wytrzeć do sucha papierowym ręcznikiem; pracujące noże należy trzymać w roztworze).
4. Próbkę zrównoważyć i wirować przez 15 minut przy 12000 g w plastikowych probówkach 30 ml.
5. Supernatant przelać do falkonu na 50 ml przez warstwę Miracloth lub wielokrotnie złożoną gazę.
6. Dodać 100% TCA do końcowego stężenia 20 do 25%.

UWAGA: TCA jest substancją silnie żrącą, dodawać w rękawiczkach pod włączonym wyciągiem. Po pracy z TCA rękawice wyrzucić i założyć nowe.

7. Pozostawić w lodzie na co najmniej 30 minut na kołysce laboratoryjnej.
8. Po zrównoważeniu próbek zwirować przez 30 - 40 minut przy 16 000 g w szklanych 30ml probówkach Corex (**należy pamiętać o założeniu gumowych adaptorów na próbówki**).
9. Wylać supernatant, zaznaczyć położenie osadu w probówce pisakiem wodoodpornym.
10. Przepłukać osad dwukrotnie porcjami po 10 ml zimnego (-20°C) acetonu, po obu płukaniach zwirować w warunkach podanych wyżej przez 5 min. – pamiętać o zrównoważeniu próbek i umieszczeniu probówek tak, aby osad znajdował się na „na zewnątrz” od osi rotora.
11. Osad wysuszyć strumieniem zimnego powietrza trzymając probówkę w lodzie

UWAGA: Na tym etapie można przerwać doświadczenie, próbki z wysuszonym osadem można przechowywać w -20°C .

12. Zawiesić w 300 μl 1x SDS loading buffer (uwaga: przygotowany bufor jest 5x stężony), przenieść do 1,5 ml probówek typu eppendorf i dodać po 15 μl 1M DTT.

13. W celu usunięcia nierozpuszczalnego osadu zwirować w mikrowirówce w 4°C przez 15 minut i przenieść do świeżych probówek. Tak uzyskane preparaty białkowe przechowywać w -20°C .

Dzień 2, 3. Elektroforeza SDS-PAGE (ok. 3 h), barwienie (przez noc)

Dla sprawdzenia wydajności i oszacowania ilości białek wyizolowanych podczas ćwiczeń wystarczy żel 12%. Rozdział białek w takim żelu zachodzi szybciej. Do analizy Western Blot lepszy będzie żel 15% (lepsza rozdzielczość dla białek histonowych).

Przygotowanie żelu do SDS PAGE

Materiały:

- 2 przekładki (*spacers*) grubości 1 mm
- szklana płytka
- porcelanowa płytka
- *caster clamp*
- *caster*
- 2 czarne śruby
- 2 czerwone klipsy
- grzebień o grubości 1 mm
- kalka ze wzorem studzienek
- bibuła filtracyjna
- aparat do elektroforezy
- zasilacz

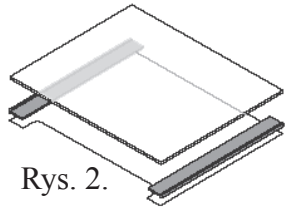
Odczynniki:

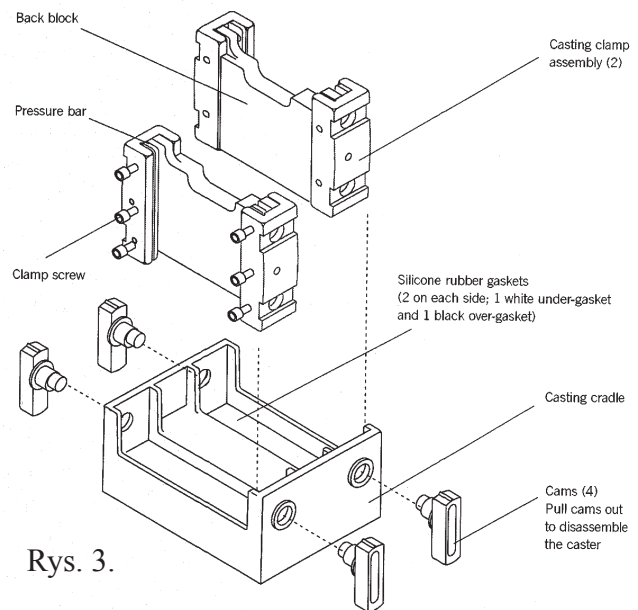
- mieszanina monomerów (30% akrylamid, 0.8% bisakrylamid)
- 1.5 M Tris-Cl pH 8.8
- 0.5 M Tris-Cl pH 6.8
- 10% SDS
- woda destylowana
- 10% APS
- TEMED
- butanol nasycony wodą
- bufor SDS-PAGE (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0.1% SDS pH 8.3)
- roztwór utrwalający (7% kwas octowy, 40% metanol)
- roztwór barwiący: (0,025% Coomassie Brilliant

Blue G-250 w 10% kwasie octowym)

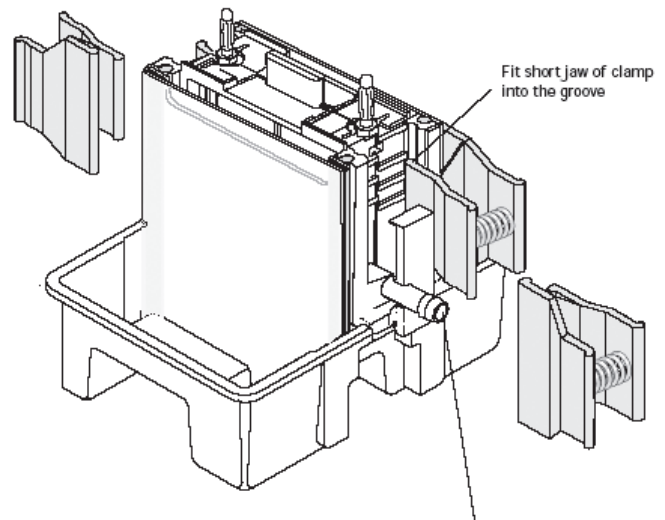
- roztwór odbarwiający (10% kwas octowy, 25% metanol)
- komercyjny ekstrakt histonów rdzeniowych
- Standard (marker) wielkości białek

Wykonanie

1. Przetrzyj szklane szybki i ceramiczne płytki metanolem lub acetonem.
2. Włóż po bokach - pomiędzy szybkę a płytkę przekładki (rys.2) i umieść w statywie (*casting clamp* - rys.3).  Rys. 2. Weź wcześniej upewnij się, że na statywie nie zostały resztki zaschniętego akrylamidu.
3. Dokręć śruby aż poczujesz lekki opór (zbyt mocne dociśnięcie może spowodować pęknięcie



Rys. 3.



Rys. 4.

Cooling is optional: Attach tubing to ports on both sides of the core before attaching gel sandwiches. Circulate coolant.

szybki).

4. Wstaw do podstawki (*casting cradle*) i dociśnij do silikonowej gumy w podstawie poprzez przekręcenie do góry czarnych śrub.

W celu sprawdzenia szczelności układu można między szybki wlać wodę destylowaną. Po takim teście szyby należy dokładnie osuszyć bibułą.



5. Przygotuj mieszaninę dla żelu rozdzielającego:

12% żel rozdzielający:

- 3 ml mieszaniny monomerów (30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid); (3,75 ml dla 15%)
- 1,8 ml 1.5M Tris-Cl pH 8.8
- 75 µl 10% SDS
- 2,625 ml wody; (1,88ml dla 15%)
- 75 µl 10% APS
- 7,5 µl TEMED



- APS i TEMED dodaje się tuż przed wylaniem mieszaniny pomiędzy szybki

6. Od razu po dodaniu katalizatorów polimeryzacji roztwór dokładnie, ale delikatnie wymieszaj (unikaj tworzenia pęcherzyków powietrza) i wlej pomiędzy przygotowane szybki pozostawiając 3-4 cm na żel rozdzielający.
7. Nałóż warstwę (2-3 mm) nasyconego wodą butanolu i pozostaw do polimeryzacji na co najmniej 30 min.
8. Delikatnie usuń butanol i osusz bibułą szybki.
9. Wlej żel zateżający i włóż grzebień pomiędzy szybki. Grzebień trzeba umieścić tak, by w studzienkach nie było pęcherzyków powietrza. Żel jest gotowy do użycia po 20 - 30 minutach.

Żel zateżający:

- 0,65 ml mieszaniny monomerów
- 1.2 ml 0.5M Tris-Cl pH 6.8
- 120 µl 10% SDS
- 3 ml wody
- 150 µl 10% APS
- 15 µl TEMED

Tak przygotowany żel można zapakować szczelnie w folię z kawałkiem mokrego ręcznika papierowego i przechowywać kilka dni w lodówce.

10. Przed elektroforezą żel (wraz z szybami) umieszcza się w aparacie, przymocowując czerwonymi klipsami (rys. 4) i zalewa buforem elektrodowym (bufor SDS PAGE) - uwaga: przygotowany bufor jest 5 razy stężony.
11. Po ostrożnym wyjęciu grzebienia z żelu nie można zapomnieć o przepłukaniu studzienek

i usunięciu ewentualnych pęcherzy powietrza pomiędzy szyb w dolnej części żelu.

Przygotowanie próbek do naniesienia na żel

UWAGA: *nie dotyczy standardu wielkości*

12. Do podpisanych probówek odpipetować po 10 i 20 µl każdej próbki. Dodatkowo marker wielkości białek (Rys. 5) – 3 µl oraz komercyjną mieszaninę histonów rdzeniowych 5 µl.
13. Inkubować preparaty przez 8-10 minut w 95°C - denaturacja białek (za wyjątkiem standardu wielkości).
14. Krótко zwirować w mikrowirówce.
15. Nanieść próbki na żel za pomocą wydłużonych tipsów i rozpocząć elektroforezę

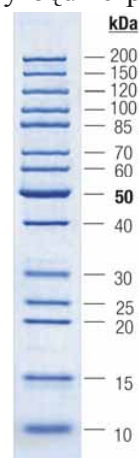
Elektroforeza

Natężenie i napięcie, przy których prowadzona jest elektroforeza, są zależne od grubości, szerokości i długości żelu oraz naszych oczekiwań co do jakości i czasu rozdziału białek.

Zwykle zalecane jest stałe natężenie prądu w granicach 12–30 mA / żel grubości 1 mm i szerokości 10 cm. W przypadku używanych na ćwiczeniach zestawów Hoefffer należy ustawić natężenie prądu 25 mA na 1 żel. 12% żel rozwijać do czasu aż czoło barwnika będzie wychodzić z żelu. W przypadku żelu 15% dobrze jest wydłużyć elektroforezę o ok. 10 minut. Przy doborze parametrów elektroforezy dla innej wielkości żeli należy pamiętać, że wraz ze wzrostem szerokości i grubości żelu można zwiększyć natężenie prądu. Jeśli żel jest dłuższy należy zwiększyć napięcie. Przy doborze napięcia i natężenia prądu należy zwrócić uwagę na moc prądu, który będzie płynął przez żel (natężenie * napięcie). Parametr ten mówi ile ciepła będzie wydzielano się podczas elektroforezy.

Barwienie białek w żelu

Spośród wielu metod barwienia białek po SDS-PAGE wybrano najpowszechniej stosowaną metodę barwienia Coomassie Brilliant Blue. Histony są białkami wysoce zasadowymi. W związku z tym ich migracja w żelu SDS jest zaburzona - tzn. położenie prążków nie odzwierciedla prawdziwej wielkości białek.



Rys. 5. Standard wielkości-PageRuler Protein Molecular Weight Marker

Masy cząsteczkowe histonów

Histon	Masa [kDa]
H1	19-29
H2a	14,0
H2b	13,8
H3	15,3
H4	11,3

Wykonanie

- Po zakończeniu elektroforezy należy rozmontować aparat i delikatnie rozdzielić szyby.
- Żel umieścić w roztworze utrwalającym i zostawić na kołysce laboratoryjnej na 15 - 30 minut.
- Następnie usunąć utrwalacz i zalać roztworem barwiącym. Barwić do uzyskania wyraźnych prążków - pozostawienie żelu na dłużej w roztworze utrwalającym (np. na noc) przyspiesza barwienie białek.
- Po zabarwieniu żel inkubować w roztworze odbarwiającym do uzyskania prawie przezroczystego tła i wyraźnych prążków białek- od kilku do kilkudziesięciu minut. Żel po odbarwieniu może być długo przechowywany w roztworze 7% kwasu octowego.
- Oszacować ilości białka w żelu tak, aby w badanych próbach mieć zbliżone ilości histonów rdzeniowych. Ilości można oszacować „na oko”, co bywa zawodne lub zeskanować wybarwiony żel białkowy i oszacować ilości za pomocą programu komputerowego np. ImageJ.

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

Ew. dodatkowa elektroforeza (lub kilka), może okazać się niezbędna, do ustawienia równych ilości białka.

Przed przejściem do kolejnych etapów doświadczenia, ilość białek we wszystkich analizowanych próbach powinna być taka sama - wystandaryzowana.

Dzień 4. Western blot

W trakcie ćwiczeń wykorzystamy niewyznakowane przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznające histon H3 z ufosforylowaną seryną 10 i drugorzędowe sprzężone z peroksydazą z chrzanu.

Materiały:

- nie barwiony żel poliakrylamidowy z rozdzielonymi białkami (może być przechowywany przez noc w 4°C, zabezpieczony wilgotną bibułą i folią).
- membrana Westran
- bibuła Whatman
- transblotter
- zasilacz
- kołyska laboratoryjna
- mysie przeciwciała pierwszorzędowe anty-fosfo(ser10)-histon H3 rozcieńczone w buforze TBST 1:5 000 z w 5% mleku w azydku sodu ☠

Odczynniki:

- bufor TGM:
 - 25 mM Tris
 - 192 mM glicyna
 - 20% metanol
- TBST:
 - 20 mM TrisHCl pH 8.0
 - 165 mM NaCl
 - 0.2 % Tween
- odtłuszczone mleko w proszku
- mysie przeciwciała pierwszorzędowe (anty-fosfo (ser10)- histon H3)
- przeciwciała drugorzędowe (anty-mysie sprzężone z peroksydazą z chrzanu)
- 1M Tris-HCl pH 8
- 250 mM luminol rozpuszczony w DMSO (Dimetylosulfotlenek)
- 90 mM kwas p-kumarynowy rozpuszczony w DMSO
- 30% nadtlenek wodoru (perhydrol)
- 100% tlenek diwodoru

Przygotowanie membran do transferu.

W technice western-blot wykorzystuje się różne membrany. W trakcie ćwiczeń wykorzystujemy membranę Westran, która jest membraną hydrofobową PVDF.

Wykonanie:

- Wyciąć membrany nieco większe (ok. 2 – 5 mm) od wielkości żelu (uwaga: nie dotykać membrany palcami, używać rękawiczek i pęset).

- Umieścić na 15 sekund w metanolu, przepłukać dobrze wodą destylowaną i umieścić w buforze do transferu TGM na kołysce na ok. 10 – 15 minut. Przygotować 8 kawałków (wielkości membrany) bibuły Whatman.

Układanie transferu

- Ułożyć na blacie aparatu do transferu: 4 kawałki bibuły Whatman nasączonej buforem TGM, następnie membranę, żel i kolejne 4 bibuły przygotowane jak powyżej. Przy układaniu transferu należy uważać, aby nie tworzyły się pęcherze powietrza pomiędzy kolejnymi warstwami. Na koniec całość można „przerolować” (np. falkonem) i delikatnie wycisnąć spomiędzy warstw ewentualne pęcherze.
- Nałożyć pokrywę i przeprowadzić transfer przez ok. 2 godziny przy stałym napięciu 25V i natężeniu 1,5 – 2 mA na cm² żelu – im krótszy transfer tym wyższe natężenie. **UWAGA:** w stosowanym na ćwiczeniach transbloterze nie wolno przekraczać napięcia 25 V!
- Po zakończeniu transferu żel wybarwić a membranę przenieść do roztworu blokującego (TBST + 5% mleko odtłuszczone) i zostawić na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej na co najmniej 30 min. Na tym etapie, membranę można przechowywać w 4°C przez kilka dni.
- Dodać przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczone 1:2500 w 10ml TBST z 5% mlekiem i pozostawić przez noc na kołysce w 4°C.
- Odpłukać przeciwciała roztworem TBST: 2 razy 5 min., 2 razy 15 min.
- Dodać przeciwciała drugorzędowe (rozcieńczyć 1:5000 w TBST z mlekiem) i pozostawić na kołysce w temperaturze pokojowej na 1 godzinę.
- Odpłukać jak wyżej.

UWAGA:

Nie pozwolić membranie wyschnąć. Obchodzić się z nią delikatnie. Używać pęsety. W celu zmniejszenia zużycia przeciwciał należy używać jak najmniejszej objętości buforów, pamiętając jednak, że konieczne jest całkowite zanurzenie membrany.

Dzień 5. Detekcja metodą ECL

Wykonanie:

UWAGA: W czasie wykonywania eksperymentu, nie należy dotykać powierzchni membrany – pozwoli to uniknąć tła

UWAGA: Nie należy dopuścić do wyschnięcia membrany

- Rozmrozić luminol i kwas kumarynowy, zostawić oba odczynniki przez ok. 5 – 10 minut w temperaturze pokojowej.
- Przygotować 10 ml roztworu (10 ml roztworu to ilość potrzebna do wywołania jednej membrany): dodać 50 µl luminolu, 22 µl kwasu kumarynowego, 3 µl nadtlenuku wodoru, 1 ml Tris, pH 8,0; dopełnić wodą do 10 ml.



UWAGA: Nadtlenek wodoru należy dodać tuż przed użyciem.

- Przelać przygotowany odczynnik do czystej szalki i zanurzyć w nim membranę na 5 minut; w tym czasie wyciąć z przezroczystej folii (najlepiej „koszulki” na dokumenty, niektóre rodzaje folii, np. saran, mogą powodować powstawanie tła) dwa kawałki o powierzchni nieco większej niż powierzchnia membrany (należy zwrócić uwagę na to, by fragmenty te nie były zabrudzone, matowe bądź ze śladami zagniecień – pozwoli to uniknąć nadmiernego tła).
- Membranę delikatnie osuszyć, najlepiej przytrzymując ją przez chwilę pęsetą i delikatnie strzepując nadmiar odczynnika (należy trzymać za róg membrany; ślad po pęsecie może być widoczny na membranie i dawać niespecyficzny sygnał).
- Membranę delikatnie położyć na wyciętym fragmencie folii i przykryć od góry drugim kawałkiem folii, w razie potrzeby należy pozbyć się pęcherzyków powietrza, w miarę możliwości nie dotykając przy tym membrany.

Kolejne etapy będą się odbywały w ciemni fotograficznej przy czerwonej lampie ciemniowej

- Na membranę położyć kliszę fotograficzną i zostawić na 2 minuty.
- Zdjąć kliszę i zanurzyć ją w roztworze wywoływacza aż do pojawienia się prążków (w tym celu należy co jakiś czas wyjmować kliszę z roztworu i sprawdzać, czy pojawił się sygnał)

UWAGA: Gdyby po upływie kilku minut sygnał nadal się nie pojawiał, należy powtórzyć punkt 6, ale wydłużyć czas ekspozycji do 5-15 minut

UWAGA: Jeśli mimo wydłużonego czasu ekspozycji nie pojawi się sygnał, należy przyjrzeć się kliszy i sprawdzić, czy widoczny jest zarys membrany. Jeśli tak, znaczy to, że sama detekcja została przeprowadzona prawidłowo, a problem wystąpił we wcześniejszych etapach eksperymentu (transfer, przeciwciała). W przypadku, gdy nie widać zarysu membrany na kliszy, należy przypuszczać, że nie powiódł się etap detekcji.

8. Przepłukać kliszę w wodzie i następnie zanurzyć ją na co najmniej 2 minuty w roztworze utrwalacza
9. Przepłukać kliszę w wodzie i zostawić do wyschnięcia

UWAGA: Po wywołaniu, membranę ze związanymi białkami można użyć ponownie (tzn. odpłukać przeciwciała I- i II-rzędowe i powtórzyć inkubację z innymi przeciwciałami). Należy wówczas przechowywać membranę w buforze TBS w chłodni do rozpoczęcia kolejnego eksperymentu.

2. Porównanie wyciszenia ekspresji genu *H1.3* w mutancie insercyjnym i mutancie amiRNA

Wstęp

Struktura chromatyny ma duże znaczenie w regulacji procesów związanych z DNA, takich jak replikacja, rekombinacja, naprawa oraz transkrypcja (patrz rozdział 1). Podstawową jednostką chromatyny jest nukleosom, zbudowany z oktameru histonów rdzeniowych H2A, H2B, H3 i H4. Funkcja histonów rdzeniowych jest obecnie dobrze poznana, natomiast niewiele wiadomo o roli histonu łącznikowego H1. Białko to przyłączone jest do nukleosomu od zewnątrz. Mimo, że histon H1 występuje w jądrach komórkowych w dużej ilości i jest silnie konserwowany ewolucyjnie, wiele prostych organizmów jest w stanie prawidłowo funkcjonować pomimo uszkodzenia genów kodujących H1. U organizmów wyższych H1 występuje w wielu wariantach i jest niezbędny do ich prawidłowego funkcjonowania. *Arabidopsis thaliana* posiada trzy izoformy histonu H1 (H1.1, H1.2 i H1.3).

W dostępnych kolekcjach mutantów insercyjnych możemy znaleźć linię *h1.3_1* pozbawioną funkcjonalnego genu *H1.3*. W celu uzyskania roślin z wyłączoną ekspresją genów kodujących histony możemy również zastosować technikę RNAi.

Celem doświadczenia jest porównanie stopnia obniżenia ekspresji genu *H1.3* w mutancie insercyjnym i mutancie uzyskanym przy użyciu metody sztucznych mikroRNA (amiRNA).

Izolacja DNA

Pierwszym etapem izolacji genomowego DNA z komórki roślinnej jest pozbycie się ściany komórkowej. Utrucie w mrożeniu zamrożonego w ciekłym azocie materiału roślinnego pozwala na mechaniczne uszkodzenie ścian komórkowych. Następnym etapem jest rozpuszczenie błon komórkowych. Detergenty takie jak SDS (dodecylsulfonian sodu) lub CTAB (bromek heksadecylotrimetyloamoniowy) zawarte w buforach do ekstrakcji DNA umożliwiają rozpuszczenie błon. EDTA chelatujący jony magnezu, naturalne kofaktory większości nukleaz, chroni uwolniony DNA przed działaniem endogennych enzymów o aktywności nukleolitycznej. Zwykle otrzymany preparat DNA zawiera duże ilości RNA. Aby pozbyć się zanieczyszczającego RNA, preparat poddajemy

trawieniu RNazą A wolną od DNaz. Jeśli uzyskany preparat zanieczyszczony jest białkami, można potraktować go proteinazą K i przeprowadzić oczyszczanie DNA za pomocą fenolu.

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

W naszym laboratorium stosuje się obecnie metodę izolacji DNA z wykorzystaniem złoża Chelex 100. Mechanizm działania Chelex-u nie jest dokładnie poznany, wiadomo jednak, że jest on silnym chelatorem jonów metali, przez co zabezpiecza DNA przed rozpadem w wysokiej temperaturze (100°C) i degradacją przez nukleazy. Izolacja DNA z wykorzystaniem chelexu jest powszechnie stosowana w badaniach kryminalistycznych śladów DNA.

Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR

Technika PCR (ang. Polymerase Chain Reaction), opracowana w latach 80-tych, zrewolucjonizowała genetykę molekularną, umożliwiając otrzymywanie dużej liczby kopii unikalnych fragmentów DNA bez konieczności stosowania żmudnych i długotrwałych procedur klonowania.

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

Replikacja rozpoczyna się od primerów na każdej nici i zachodzi na obu niciach w przeciwstawnych kierunkach. Na nowo syntetyzowanych niciach powstają zatem nowe

miejsca wiązania primerów. Po zakończeniu replikacji nici są rozdzielane (denaturacja), aby ponownie umożliwić wiązanie znajdujących się w nadmiarze primerów (tzw. annealing), syntezę DNA i kolejne rozdzielanie nici. Cykl taki powtarza się wielokrotnie, a po n cyklach otrzymuje się teoretycznie 2^n dwuniciowych cząsteczek DNA będących kopiami sekwencji zawartej pomiędzy primerami.

Typowy schemat reakcji PCR jest więc szeregiem cykli złożonych z następujących etapów:

1. denaturacja DNA (30 s – 1 min. 90 – 95°C),
2. hybrydyzacja primerów (annealing) (20 s – 2 min. 40 – 60°C),
3. wydłużanie (synteza DNA) (1 – 3 min. 68 – 75°C).

W każdym cyklu liczba cząsteczek syntetyzowanego DNA jest podwajana. Efektem replikacji DNA techniką PCR jest więc amplifikacja specyficznego obszaru DNA.

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

PCR daje się stosunkowo łatwo zastosować jako technika laboratoryjna. Materiałem wyjściowym do amplifikacji jest DNA zawierający interesującą nas sekwencję. Ilość DNA stosowanego do PCR jest bardzo mała (teoretycznie wystarczy jedna cząsteczka DNA). Do mieszaniny reakcyjnej, oprócz DNA, dodaje się nadmiar primerów (dwa rodzaje primerów określających miejsce startu replikacji na każdej nici), polimerazę DNA, odpowiedni bufor zawierający jony magnezu oraz mieszaninę 4 prekursorów DNA, tj. trifosforanów 2-deoksyrybonukleotydów (dNTP). Powodzenie reakcji PCR wymaga właściwego doboru następujących parametrów:

1. starterów reakcji amplifikacji (program Primer3 ze strony frodo.wi.mit.edu). Projektując startery reakcji PCR, należy je dobrać tak, aby:
 - starter zawierał od 40 do 60% par GC,
 - starter był wysoko specyficzny dla danej sekwencji,
 - startery nie tworzyły struktur typu szpilka do włosów lub konkatamerów,
 - długość primerów wynosiła około 20 – 30 par zasad, a temperatura ich topnienia 50 – 60°C,
 - startery nie powinny zawierać w 3' końcowej części fragmentów komplementarnych do siebie samych oraz do drugiego startera,

2. parametrów reakcji amplifikacji (stężenia dNTP, polimerazy, starterów, jonów magnezu). Do reakcji PCR używa się polimerazy z bakterii *Thermus aquaticus* (Taq polimeraza) lub innych termostabilnych polimeraz DNA (np. Pfu, Pwo, Vent). Mają one tę przewagę nad innymi polimerazami DNA, że są stabilne nawet w 94°C (optimum temperaturowe wynosi 72°C), a więc mogą być dodane jednorazowo na samym początku reakcji PCR, nie ulegając dezaktywacji w trakcie kolejnych cykli podgrzewania,
3. warunków samej reakcji PCR (temperatury, czasów trwania, ilości cykli itp.). Czasy i temperatury dobiera się według zaleceń producenta polimerazy. Temperatura przyłączania starterów zależy od ich długości i temperatury topnienia.

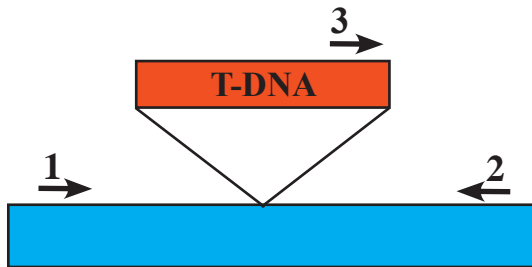
Reakcję prowadzi się w objętości 10 – 50 μ l. Probówki z mieszaniną reakcyjną umieszcza się w termocyklerze (ang. thermal cycler), w którym programuje się czas trwania i liczbę cykli oraz temperaturę poszczególnych etapów reakcji. Zwykle stosuje się 25 do 35 cykli.

Genotypowanie roślin

Arabidopsis thaliana jest organizmem diploidalnym – w jednej roślinie każdy gen występuje w postaci dwóch alleli, które mogą być identyczne (roślina jest homozygotą) lub różne (heterozygotą). Jeśli analizowana jest mutacja recesywna, to w celu odróżnienia roślin typu dzikiego od heterozygot zawierających zmutowany allel konieczne jest genotypowanie. Genotypowanie jest również niezbędne, gdy mutanty homozygotyczne nie posiadają wyraźnych cech fenotypowych, a także w analizie potomstwa pochodzącego z krzyżówki dwóch różnych mutantów, w której poszukiwane są podwójne heterozygoty.

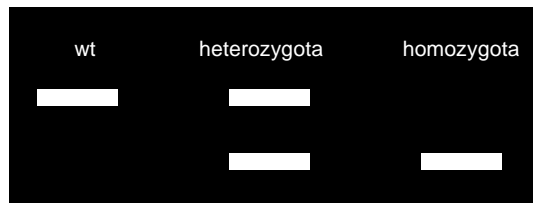
Metodą pewną i względnie prostą, która pozwala na zgenotypowanie roślin jest PCR. Genotypowanie linii zawierających mutację w postaci delecji lub insercji najczęściej polega na bezpośredniej analizie wielkości zamplifikowanych fragmentów DNA. W tej metodzie kluczowy jest dobór odpowiednich primerów, tak aby możliwe było odróżnienie produktów odpowiadających dzikiemu i zmutowanemu allelowi. W przypadku analizy mutantów insercyjnych pochodzących z kolekcji mutantów, takich jak analizowany na ćwiczeniach mutant *h1.3* z kolekcji GeneTrap, primery dobiera się wg schematu zamieszczonego na Rys. 1a. Wykorzystuje się tu fakt, że sekwencja oraz pozycja (przynajmniej przybliżona) insercji

T-DNA jest znana. Primery 1 i 2 są komplementarne do sekwencji genu flankujących insercję od strony 5' i 3' i służą do amplifikacji fragmentu DNA odpowiadającego dzikiemu allelowi genu. Primer 3 jest komplementarny do sekwencji insercji T-DNA sąsiadującej z DNA genomowym i wraz z primerem 1 lub 2 (w zależności od orientacji T-DNA, na Rys. 6 jest to primer 2) daje produkt PCR odpowiadający allelowi zmutowanemu.



Rys. 6. Schemat położenia primerów do genotypowania roślin z insercją T-DNA

Amplifikacja odpowiednich fragmentów DNA może być przeprowadzona w dwóch oddzielnych reakcjach PCR, bądź też w jednej reakcji z użyciem trzech primerów jednocześnie (Rys. 7). Primery do genotypowania można zaprojektować samodzielnie lub korzystając z programów dostępnych na stronach internetowych poświęconych kolekcjom mutantów insercyjnych.

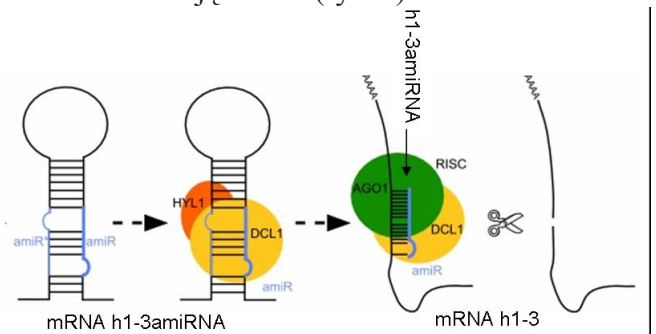


Rys. 7 Spodziewane wyniki genotypowania z użyciem trzech primerów przedstawionych na Rys. 1a, w jednej reakcji PCR.

Sztuczne mikroRNA

MikroRNA to 21-24 nukleotydowe cząsteczki jednoniciowego RNA. Sekwencja miRNA jest kodowana w genomie i transkrybowana przez polimerazę RNA II (PolII). MikroRNA powstaje z transkryptów RNA tworzących specyficzne struktury drugorzędowe, w których występują rejony do siebie komplementarne (pre-miRNA). Transkrypt pre-miRNA w jądrze komórkowym jest przetwarzany przy udziale białka DCL1 (ang. Dicer-Like 1) oraz białka HYL1, które wiąże dwuniciowe RNA. W rezultacie powstają dupлексы

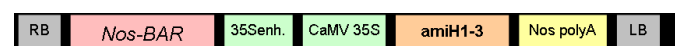
miRNA, których końce 3' są metylowane przez białko HEN1. Produkty są transportowane do cytoplazmy i tam jedna nić dupлексу włączana jest do kompleksu RISC (ang. RNA Induced Silencing Complex), wiążąc się do białka z rodziny Argonaute (AGO1). Po przyłączeniu się do docelowego mRNA wg zasady komplementarności, transkrypt jest degradowany, więc nie może zostać wykorzystany w tworzeniu białka. Niektóre mikroRNA hamują również translację białka (rys. 8).



Rys. 8 Schemat powstawania i działania miRNA w *A.thaliana*

Sztuczne mikroRNA (ang. artificial micro RNA – amiRNA) to jednoniciowe 21-nukleotydowe RNA powstające z prekursora wprowadzonego do rośliny poprzez transformację. Mechanizm jego działania jest analogiczny do funkcjonowania miRNA. Jednak amiRNA normalnie nie występuje w roślinach, tylko jest projektowany tak, aby przypominał naturalne miRNA i specyficznie wyciszał ekspresję interesującego nas genu. Do zaprojektowania odpowiedniej sekwencji amiRNA przydatnym narzędziem jest program WMD 2 (ang. Web MicroRNA Designer) dostępny w Internecie. Program ten na podstawie wprowadzonej sekwencji genu wybiera najbardziej odpowiednie 21-nukleotydowe sekwencje sztucznego miRNA.

Obecność transgenu kodującego sztuczne miRNA do sekwencji genu *H1.3* można potwierdzić stosując startery do genu oporności na herbicyd Basta (*Nos-BAR*), użytego do selekcji transformantów. Gen ten jest wprowadzany na tym samym T-DNA (Rys. 9).



Rys. 9 Schemat T-DNA (w plazmidzie binarnym pCambia0390) użytego do utworzenia sztucznego mikroRNA wyciszającego ekspresję genu *H1.3*. RB/LB- lewa i prawa granica insertu, 35Senh/CaMV35S- silny promotor z wirusa mozaiki kalafiora, amiRNA wyciszający ekspresję *H1.3*. Nos polyA - terminator transkrypcji

Izolacja RNA

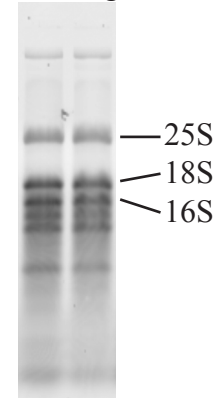
RNA jest znacznie bardziej narażony na degradację niż DNA. W materiale biologicznym oraz w środowisku zewnętrznym obecna jest duża ilość bardzo aktywnych i stabilnych rybonukleaz. Nawet po zastosowaniu wysokiej temperatury, np. 100°C, a także w obecności detergentów, np. SDS, enzymy te zachowują aktywność. Ponadto, wiele rybonukleaz nie wymaga dla swej aktywności kofaktorów, np. jonów dwuwartościowych, w związku z czym enzymu nie możemy zablokować stosując EDTA. Dlatego podczas izolacji RNA do inaktywacji RNaz należy stosować bardzo silne związki denaturujące białka, takie jak chlorowodorek guanidyny lub izotiocyanian guanidyny. Związki te, oprócz denaturacji rybonukleaz, umożliwiają również zniszczenie struktur komórkowych. RNazy powinny zostać również usunięte ze sprzętu używanego do izolacji. Do tego celu stosuje się inhibitory RNaz, tj. DEPC (dietylopirowęglan). W postaci 0,1% roztworu wykorzystujemy go do płukania sprzętu mającego kontakt z RNA oraz do przygotowywania niektórych buforów. Należy pamiętać aby roztwór ten poddać autoklawowaniu inaktywującemu DEPC, który jest silnie toksyczny. DEPC nie poddany inaktywacji blokuje aktywność enzymów wykorzystywanych na kolejnych etapach prac z RNA, np. odwrotnej transkryptazy. Kolejnym, często stosowanym inhibitorem RNaz, jest tzw. RNazin – białko które inaktywuje RNazy wiążąc się z nimi. Inhibitor ten może towarzyszyć RNA podczas przechowywania oraz podczas reakcji enzymatycznych, gdyż nie powoduje inhibicji innych enzymów.

Podczas izolacji RNA należy usunąć towarzyszący mu DNA. W tym celu stosuje się ekstrakcję fenolem o niskim pH. Kwaśny fenol powoduje usunięcie nadmiaru DNA z roztworu. DNA pozbywamy się również wytrącając RNA chlorkiem litu (LiCl). Dokładne usunięcie resztek DNA z preparatu można uzyskać wykonując trawienie DNazą wolną od RNaz.

W komórkach eukariotycznych cząsteczki rRNA, tRNA oraz RNA niskocząsteczkowy stanowią łącznie ok. 80-98% RNA komórkowego. Dlatego, jeżeli interesuje nas tylko pula mRNA, należy zastosować dodatkowy etap izolacji, podczas którego usuwamy z preparatu pozostałe kwasy rybonukleinowe. Stosowane w tym celu techniki wykorzystują fakt, że cząsteczki mRNA na 3' końcach zawierają sekwencje poli(A). Sekwencje te mogą zostać związane z cząsteczkami poli(T) przyłączonymi do stałego podłoża np. w kolumnach

chromatograficznych lub na kuleczkach magnetycznych. Cząsteczki RNA nie związane z podłożem są następnie odmywane a oczyszczone cząsteczki mRNA poddawane są elucji.

Po rozdziale elektroforetycznym całkowitego RNA w żelu agarozowym najlepiej widoczne są frakcje rRNA (rys. 10). Ich obraz może być wykorzystany jako orientacyjny marker mas cząsteczkowych, gdyż znane są wielkości podstawowych frakcji rRNA występujących u poszczególnych organizmów. Intensywność prążków rRNA (rys. 10) informuje nas o jakości preparatu, ich zanikanie świadczy o postępującej degradacji RNA. Frakcje mRNA, ze względu na ich niewielką ilość w preparacie oraz zróżnicowaną wielkość, charakterystyczną dla poszczególnych genów, nie są widoczne na żelach po rozdziale RNA całkowitego.



Rys. 10. Żel agarozowy całkowitego RNA z *A. thaliana*.

RT-PCR

RT-PCR jest techniką łączącą reakcję odwrotnej transkrypcji oraz reakcję PCR. Sprowadza się ona do amplifikacji specyficznego fragmentu RNA, dzięki czemu możliwa jest detekcja oraz oszacowanie poziomu ekspresji genów. Pod tym względem RT-PCR uzupełnia się, lub stosuje się zamiennie z takimi technikami biologii molekularnej jak Northern blot, hybrydyzacja *in situ* oraz mikromacierze DNA. Wśród zastosowań metody RT-PCR można wymienić m.in. badanie alternatywnych form splicingowych, wykrywanie markerów nowotworowych, detekcję transkrypcji genów wprowadzanych do organizmów transgenicznych oraz określanie wpływu mutacji na poziom ekspresji genów.

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

Matrycowy RNA

Jako matrycowy RNA może służyć zarówno mRNA, jak i całkowity RNA komórkowy (ten wariant zostanie użyty podczas ćwiczeń). Aby osiągnąć dobrą wydajność odwrotnej transkrypcji,

wyzolowany RNA musi być czysty – przede wszystkim nie powinien być zanieczyszczony DNA. Ewentualną obecność DNA w izolacji można sprawdzić w różny sposób, m.in. ustawiając reakcję kontrolną bez odwrotnej transkryptazy (w ćwiczeniu oznaczona „-RT”) lub amplifikując sekwencję zawierającą intron, który podczas dojrzewania mRNA jest wycinany. O czystości próbki wyizolowanego RNA świadczy także stosunek absorbancji przy długościach fali 230, 260 oraz 280 nm. Dla czystego RNA stosunki absorbancji A_{260}/A_{280} , oraz A_{230}/A_{260} wynoszą około 2 i ulegają zmniejszeniu lub podwyższeniu w obecności zanieczyszczeń (fenol, białka).

Jakość (np. czy wystąpiła degradacja) oraz ilość RNA można ocenić na podstawie elektroforezy w żelu agarozowym (Rys. 10).

Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzi się najczęściej przy użyciu primera oligo(dT) (Rys. 11a), który jest komplementarny do fragmentu poliA na 3'-końcu cząsteczek mRNA. Zastosowanie primera oligo(dT) pozwala na uzyskanie puli cDNA odpowiadającej całemu mRNA znajdującemu się w komórce (poza nielicznymi wyjątkami – m.in. mRNA wariantów histonów, których transkrypcja zależna jest od syntezy DNA). W szczególnych przypadkach (np. brak poliA w analizowanym mRNA, analiza innych klas RNA) stosuje się przypadkowe primery heksamerowe (Rys. 11b), które dają jednakową reprezentację całego RNA komórkowego, lub też primer specyficzny do określonej sekwencji (Rys. 11c).

Do oceny jakości uzyskanego cDNA służy reakcja kontrolna PCR z użyciem primerów specyficznych do genu ekspymowanego konstytutywnie, np. aktyny.

Półilościowy RT-PCR

Terminem tym określa się metodę, w której porównuje się ilość dwóch lub więcej cząsteczek RNA z jednej lub większej ilości izolacji, przy czym 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, co można stwierdzić dzięki wewnętrznej kontroli (PCR z primerami specyficznymi do genu ekspymowanego konstytutywnie, np. aktyny). Liczba cykli w półilościowym PCR musi być ustawiona tak, aby zachować liniowość przyrostu ilości produktów w kolejnych cyklach.

Opis doświadczenia

W poniższym doświadczeniu wykorzystana będzie linia homozygotyczna - mutant insercyjny T-DNA *h1.3_1* otrzymany z bazy mutantów GenTrap. Natomiast mutant *h1.3miR* został uzyskany poprzez wprowadzenie do roślin o genotypie typu dzikiego (*Col-0*) transgenu kodującego sztuczne microRNA do sekwencji genu *H1.3*. Uzyskano linie heterozygotyczne *h1.3miR*.

Cel doświadczenia:

Sprawdzenie na jakim poziomie wyrażany jest gen *H1.3* w mutantach *Arabidopsis thaliana h1.3_1* i *h1.3miR*.

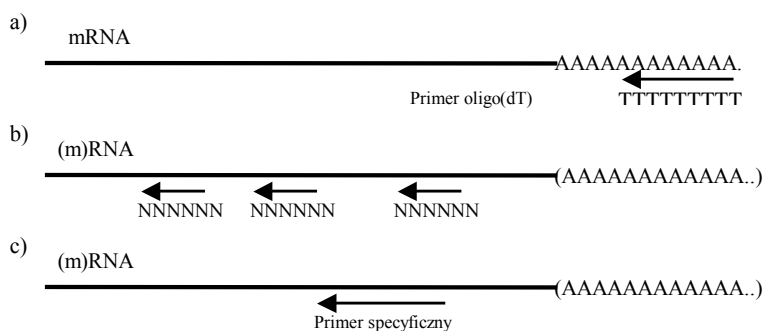
Schemat doświadczenia

Etap 1. Genotypowanie metodą PCR roślin *h1.3miR* oraz *Col-0* (jako kontrola) pod względem obecności transgenu kodującego oporność na herbicyd Basta.

- izolacja DNA genomowego
- amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR

Etap 2. Analiza poziomu ekspresji genu *H1.3* za pomocą metody RT-PCR.

- izolacja RNA
- odwrotna transkrypcja (RT)
- półilościowy RT-PCR



Rys. 11 Schemat reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem różnych typów primerów

Dzień 1. Izolacja DNA genomowego na małą skalę, genotypowanie roślin

Materiały:

- liście roślin
- probówki 200 µl do PCR,
- końcówki do pipet (tipsy),
- termocykler

Odczynniki:

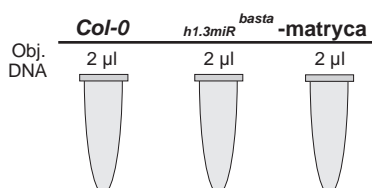
- chelex 10%
- odczynniki do PCR (bufor i polimeraza Pfu, startery, MgCl₂, dNTP)

Wykonanie:

1. Fragment liścia o wielkości wieczka od eppendorfa wrzucić do probówki PCR o pojemności 200 µl.
2. Dodać 50 µl 10% Chelex-u uprzednio silnie wymieszanego (vorteks przez 30 sekund).
3. Ucierać liść tipsem (o pojemności 200 µl) przez około 15 sekund, do pojawienia się zielonego zabarwienia roztworu chelexu.
4. Dodać kolejne 50 µl 10% Chelex-u uprzednio silnie wymieszanego (vorteks przez 30 sekund).
5. Inkubować w termocyklerze w 98°C przez 20 min. i 2 min w 22°C (program „CHELEX”).
6. Próbkę wirować przy maksymalnych obrotach przez 5 min. (w adapterach wykonanych z probówek eppendorfa 1,5 ml i 0,5 ml) w mikrowirówce.
7. Pobrać 20 µl supernatantu zawierającego DNA. Nie pobierać złoża ani fragmentów liści!

Tak otrzymane DNA można przechowywać w 4°C.

8. Przygotować 1% żel agarozowy (patrz pkt. „elektroforeza DNA w żelu agarozowym”)
9. Nanieść na 1% żel agarozowy 5 µl DNA + 0,5 µl obciążnika do DNA.
10. Przygotować mieszaninę na 3 reakcje PCR do określenia obecności genu BAR wg schematu: (próbki przygotowywać w lodzie)



Mieszanina na 1 reakcję PCR:

Matryca DNA	2 µl
Mix primerów BAR	5 µl
Bufor Pfu (10x)	5 µl
dNTP (10mM)	8 µl
MgCl ₂ (25mM)	6 µl
Polimeraza Pfu	1 µl
H ₂ O milliQ	do 50 µl

Warunki reakcji PCR (Program „BAR”):

- hold 94°C
 - 94°C 2 min.
 - 94°C 30 s
 - 60°C 30 s
 - 72°C 45 s
- } 35 cykli
- 72°C 3 min.
 - hold 4°C

11. Po zakończeniu programu dodać 5 µl obciążnika.
12. Nanieść na 1% żel agarozowy 20 µl reakcji.

Dzień 2 i 3. Izolacja całkowitego RNA

Należy pamiętać o tym, że niepowodzenie izolacji RNA zwykle wynika z zanieczyszczenia próbki RNazami (głównie z naskórka rąk), powodującymi degradację RNA.

Materiały:

- liście roślin
- moździerz
- tipsy (wolne od RNaz)
- rękawiczki (wolne od RNaz)
- vorteks pod wyciągiem
- wirówka pod wyciągiem

Odczynniki:

- bufor do homogenizacji
- 100 mM Tris-HCl pH 8
- 5 mM EDTA
- 100 mM NaCl
- 0,5% SDS
- 2-merkaptoetanol
- kwaśny fenol pH 4.0
- mieszanina fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (24:24:1) pH 4.0
- chloroform
- H₂O milliQ (wolna od RNaz)
- 3M octan sodu pH 5.2 (4°C)
- izopropanol (-20°C)
- etanol 70% (-20°C)

Wykonanie:**Pracować w rękawiczkach!!!**

1. Przygotować bufor do ekstrakcji.
Pod wyciągiem na każde 500 µl buforu homogenizacyjnego dodać 5 µl 2-merkaptoetanolu.
2. Zebrać równe ilości materiału roślinnego (roślina kontrolna Col-0 oraz mutanty *hl.3_1* i *hl.3miR*).
3. Utrzeć tkankę w ciekłym azocie w moździerzu.
4. Utartą tkankę przenieść do probówki eppendorfa 1,5 ml schłodzoną szpatułką i zalać 500 µl buforu ekstrakcyjnego.
5. Wytrząsać (vorteks) przez 30 sekund.

Pod wyciągiem (w fartuchu, okularach i rękawiczkach)

6. Dodać 250 µl kwaśnego fenolu (**uwaga substancja szkodliwa!**).
7. Wytrząsać 30-60 sekund.
8. Dodać 250 µl chloroformu (**uwaga substancja szkodliwa!**).
9. Wytrząsać 30-60 sekund.
10. Zwirować (w mikrowirówce pod wyciągiem) 10 min. przy maksymalnej prędkości.
11. Przenieść fazę wodną (górną warstwę ok. 500 – 600 µl) do nowej probówki eppendorfa.
12. Dodać 600 µl mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamyłowy – warstwa dolna (**uwaga substancja szkodliwa !**).
13. Wytrząsać 30 sekund
14. Zwirować (pod wyciągiem) 10 min. przy maksymalnej prędkości.
15. Przenieść warstwę wodną (górną warstwę 400 – 500 µl) do nowej probówki.

Od tego etapu pracować szczególnie ostrożnie, aby zapobiec zanieczyszczeniu próbek

RNazami (rękawiczki).

Próbki trzymać na lodzie

16. Dodać 50 µl 3M octanu sodu pH5,2 (0.1 v/v).
17. Dodać 450 µl (1:1 v/v) zimnego (-20°C) izopropanolu, zamieszać.
18. Inkubować 20 minut w -20°C.
19. Zwirować 30 min. przy maksymalnych obrotach.

20. Delikatnie usunąć supernatant.
21. Suszyć osad przez 10 min. w temp. pokojowej.
22. Zawiesić w 500 µl wody wolnej od RNaz.
23. Dodać 500 µl 4M LiCl (końcowe stężenie 2M).
24. Inkubować w 4°C przez noc.
25. Zwirować 30 min. przy maksymalnych obrotach, bardzo delikatnie usunąć supernatant (słabo widoczny osad RNA może się odkleić).
26. Przemyć osad 1 ml zimnego (-20°C) 70% etanolu.
27. Zwirować 5 min. przy maksymalnych obrotach, bardzo delikatnie usunąć supernatant (słabo widoczny osad RNA może się odkleić).
28. Osad zwirować powtórnie 10 sekund i bardzo delikatnie odciągnąć resztkę etanolu.
29. Powtórzyć czynność z poprzedniego punktu.
30. Suszyć osad przez 10 min. w temp. pokojowej.
31. Zawiesić osad w 30 µl wody milliQ
32. Inkubować RNA 2 min. w 65°C, worteksować 30 sekund, schłodzić w lodzie
Oddać prowadzącym ćwiczenia 3 µl RNA w nowym podpisanym eppendorfie w celu określenia ilości i czystości wyizolowanego RNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop.
33. Przygotować 1,2% żel agarozowy (patrz pkt. „przygotowanie żelu agarozowego”)
34. Zmieszać 5 µl RNA z 5 µl obciążnika do RNA, denaturować 10 min. w 70°C
35. Nanieść preparat na żel agarozowy i przeprowadzić elektroforezę przy napięciu 90 V, obejrzyć żel i zrobić zdjęcie (Rys. 2)

Dzień 4. Synteza jednoniciowego cDNA

za pomocą *RevertAid First Strand Synthesis Kit (Fermentas)*

1. Przygotować mieszaninę reakcyjną (na lodzie, w probówkach do PCR o pojemności 500 μ l)

Objętość użytego do reakcji preparatu RNA uzależniona jest od stężenia i jakości wyizolowanego RNA oraz poziomu ekspresji danego genu.

- 1 μ g RNA z rośliny kontrolnej *Col-0* (probówka 1)
- 1 μ g RNA z rośliny kontrolnej *Col-0* do reakcji -RT (probówka 2, -RT)
- 1 μ g RNA z rośliny *h1.3miR* (probówka 3)
- 1 μ g RNA z rośliny *h1.3miR* do reakcji -RT (probówka 4, -RT)
- 1 μ g RNA z rośliny *h1.3_1* (probówka 5)
- 1 μ g RNA z rośliny *h1.3_1* do reakcji -RT (probówka 6, -RT)

Do probówek 1 - 6 dodać:

- primer oligo(dT) (0,5 μ g/ μ l) 1 μ l
 - woda sterylna (Milli-Q) dopełnić do 13 μ l
2. Mieszaninę inkubować w termocyklerze w 70°C przez 5 min., a następnie probówkę umieścić w lodzie. Inkubacja w 70°C pozwala na denaturację drugorzędowych struktur mRNA.
 3. Do zdenaturowanego RNA dodać 7 μ l mieszaniny RT+ lub RT-zwierającej:
 - 5x stężony bufor reakcyjny
 - 10mM mix dNTP
 - odwrotną transkryptazę (+RT) lub wodę (- RT)
 4. Inkubować w 42°C przez 1 h. W tym etapie zachodzi reakcja odwrotnej transkrypcji. Reakcja jest zatrzymywana przez ogrzanie mieszaniny do 70°C przez 10 min. (termocykler program „CDNA”).

cDNA należy przechowywać w -20°C.

Zsyntetyzowane cDNA posłuży jako matryca do amplifikacji analizowanych sekwencji metodą PCR.

Dzień 5. Półilościowy multiplex PCR

Multiplex PCR polega na amplifikacji jednocześnie kilku sekwencji w jednej reakcji PCR. Warunkiem powodzenia takiego typu reakcji jest optymalizacja jej warunków – odpowiedni dobór buforu oraz primerów, liczby cykli, jednakowej temperatury przyłączenia starterów, itd.

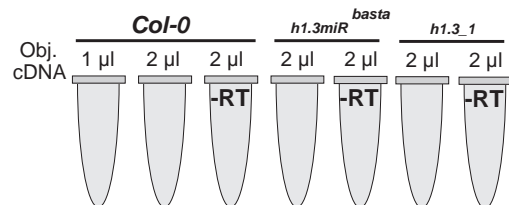
Multiplex PCR ma istotną przewagę nad zwykłym PCR. W półilościowym multiplex RT-PCR produkty amplifikacji określonych transkryptów oraz kontroli uzyskane są w jednej reakcji i w jednakowych warunkach, co pozwala na lepsze porównanie ich ilości.

Dla trzech wariantów eksperymentalnych (*Col-0*, *h1.3_1* i *h1-3miR*):

1. Przygotować mieszaninę do PCR według schematu (próbki przygotowywać w lodzie).

Mieszanina na 1 reakcję:

Matryca cDNA	1-2 μl
Mix primerów (M)	4 μ l
Bufor Pfu (10x)	5 μ l
dNTP (2,5mM każdy)	8 μ l
MgCl ₂ (25mM)	6 μ l
Polimeraza Pfu	1 μ l
H ₂ O milliQ	do 50 μ l



Warunki reakcji PCR:

- hold 94°C
- 94°C 2 min.
- 94°C 30 s
- 68°C 6 min. } 27 cykli
- hold 4°C

Startery (primery)		
	H1-3	Aktyna
lewy	h1-3F	aktynaF
prawy	h1-3R	aktynaR
wielkość produktu na cDNA		
	380	196

2. Po zakończeniu reakcji PCR do probówek należy dodać 1/10 objętości barwnika do elektroforezy.
3. 20 μ l próbki nanieść na 1,2 % żel agarozowy

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

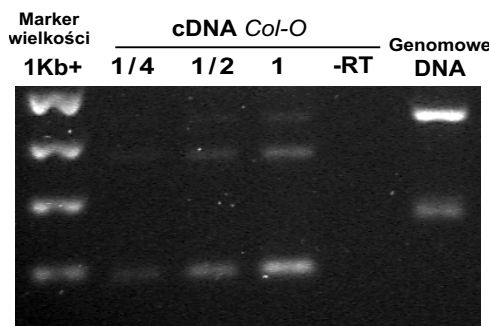
Materiały

- agarozą
- bufor TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA)
- ☠ - bromek etydyny
- obciążnik DNA (DNA loader)
- standard wielkości (marker)

Wykonanie

1. Odważyć 0,5 g / 0,6 g agarozy (1% / 1,2%)
2. Agarozę przesypać do kolby, dodać 50 ml buforu TBE
3. Rozpuścić agarozę przez podgrzanie w kuchenke mikrofalowej
- ☠ 4. Schłodzić kolbę pod bieżącą wodą, dodać bromku etydyny do stężenia 0,5 µg/ml.
5. Wlać żel do wanienki, włożyć grzebień, pozostawić do zastygnięcia
6. Prowadzić elektroforezę w buforze TBE przy napięciu ok. 100 V w obecności markera wielkości.
7. Żel obejrzyć i sfotografować na transiluminatorze UV z kamerą.

Oczekiwany wynik dla roślin dzikich z uwzględnieniem kontroli wewnętrznej (aktyna) przedstawia Rys. 4.



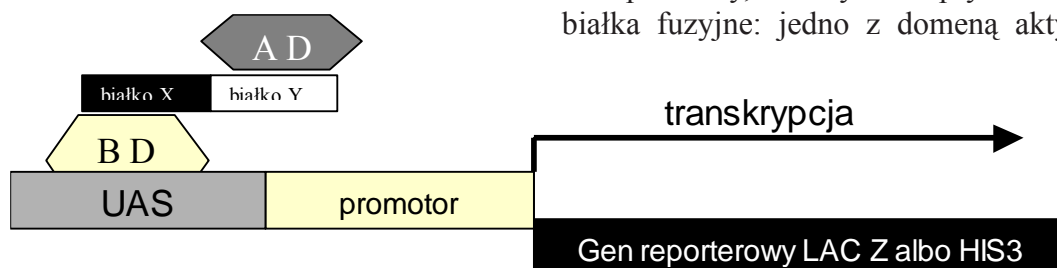
Rys. 12. Rodział elektroforetyczny produktów amplifikacji histonu H1.3 i aktyny.

3. Badanie oddziaływań białek - drożdżowy system dwuhybrydowy

Drożdżowy system dwuhybrydowy (ang. Yeast Two Hybrid) służy do badania oddziaływań między dwoma potencjalnymi partnerami białkowymi. W technice tej wykorzystuje się fakt, że wiele eukariotycznych czynników transkrypcyjnych zawiera dwie funkcjonalnie niezależne domeny. Jedna z nich wiąże się z DNA (BD, ang. Binding Domain), druga natomiast aktywuje transkrypcję danego genu (AD, ang. Activation Domain). Obie te domeny są zatem niezbędne aby nastąpiła transkrypcja określonego genu.

W drożdżowym systemie dwuhybrydowym każda z tych domen zostaje połączona z jednym z potencjalnych i będących przedmiotem badań, partnerów białkowych. W efekcie powstają dwa tzw. białka fuzyjne: jedno z nich związane z domeną wiążącą się z DNA (BD), drugie zaś z domeną aktywującą transkrypcję (AD). Geny kodujące oba fuzyjne białka znajdują się na dwóch różnych plazmidach. Plazmidy te wprowadza się do komórek drożdży, zatem oba białka podlegają ekspresji w tej samej komórce. Jeżeli badane białka oddziałują ze sobą, obie domeny: aktywująca transkrypcję (AD) i wiążąca się z DNA (BD), zbliżają się do siebie na tyle blisko, by móc aktywować transkrypcję konkretnego genu. W opisywanym układzie genem, który ulega transkrypcji jest jeden z genów reporterowych, np. gen kodujący β -galaktozydazę (*lac-Z*) lub *HIS3*.

Na zajęciach będziemy sprawdzać oddziaływanie w systemie dwuhybrydowym pomiędzy dwoma jądrowymi białkami roślinnymi: *AtSWI3B* i *FCA*. Metoda dwuhybrydowa, która zostanie zastosowana na ćwiczeniach polega na wykorzystaniu dwudomenowej struktury białka, aktywatora *GAL-4*. Aktywator ten składa się z domeny aktywującej transkrypcję genu i z domeny wiążącej się do rejonu promotorowego – *UAS* genu *GAL1*. Genem reporterowym jest *lacZ*. Używane są dwa wektory, które po wprowadzeniu do komórek drożdży dają dwa białka fuzyjne w dwóch niezależnych układach:



Rys. 13. Schemat działania drożdżowego systemu dwuhybrydowego.

- pGAD424 zawierający domenę aktywującą (AD) i sekwencję kodującą białko *FCA* oraz pGBT9 zawierający domenę wiążącą się z DNA (BD) i sekwencję kodującą drugie białko *AtSWI3B*.
- pGAD424 zawierający domenę aktywującą (AD) i sekwencję kodującą białko *AtSWI3B* oraz pGBT9 zawierający domenę wiążącą się z DNA (BD) i sekwencję kodującą białko *FCA*.

Jeśli białko X oddziałuje z białkiem Y, gen reporterowy kodujący β -galaktozydazę ulegnie transkrypcji (rys. 13). Wówczas aktywne białko β -galaktozydazy w obecności podanego z zewnątrz substratu, którym jest X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd) przeprowadzi reakcję, w wyniku której powstanie niebieski produkt.

System dwuhybrydowy może być wykorzystywany jako metoda ilościowa. To znaczy można oceniać siłę oddziaływań, a nie tylko stwierdzać ich obecność lub brak. Metoda ilościowa jest wykorzystywana bardzo rzadko, z uwagi na liczne ograniczenia wynikające m. in. z różnic w produkcji białka między poszczególnymi koloniami drożdżowymi, a także różnic w tolerowaniu danego białka przez komórkę drożdżową np. toksyczność białek. Ograniczenia te mogą powodować niedokładności w wynikach.

Schemat metody ilościowej:

- Pomiar gęstości komórek drożdżowych (spektrofotometr)
- Pomiar ilości białka (metoda Bradford)
- Badanie aktywności β -galaktozydazy poprzez pomiar ilości barwnego produktu na płytkach wielodołkowych (czytnik spektrofotometryczny)

ustalenie takich samych ilości białka we wszystkich próbkach
--

Zastawowanie systemu dwuhybrydowego

Drożdżowy system dwuhybrydowy można używać zarówno do badania kierunkowych oddziaływań między dwoma białkami, jak również do poszukiwania nowych, nieznanymi partnerów danego białka.

W pierwszym przypadku należy skonstruować dwa plazmidy, z których eksprymowane będą dwa białka fuzyjne: jedno z domeną aktywującą, zaś

drugie z domeną wiążącą. Używając odpowiednich starterów z zaprojektowanymi miejscami cięcia przez enzymy restrykcyjne należy wykonać reakcję PCR na matrycy cDNA. Otrzymane fragmenty DNA trzeba następnie zligować z odpowiednio przygotowanymi plazmidami, jednym kodującym domenę wiążącą, a drugim - domenę aktywującą, pamiętając o zachowaniu właściwej ramki odczytu. Po uzyskaniu właściwych plazmidów należy stransformować nimi odpowiedni szczep drożdży, np. Y190, HF7c czy CG-1945, które mają uszkodzony szlak syntezy leucyny i tryptofanu i potrzebują tych aminokwasów do wzrostu. Po transformacji dwoma plazmidami drożdże wysiewa się na odpowiednią pożywkę selekcyjną. Uzyskane kolonie przeszczepia się na nową szalkę i następnie przeprowadza się test dwuhybrydowy.

Drugim zastosowaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego jest poszukiwanie nieznanego partnerów konkretnego białka. W tym celu można przeszukiwać całą bibliotekę cDNA w określonym wektorze z domeną aktywującą za pomocą interesującego nas białka, wyrażanego z plazmidu z domeną wiążącą. Zarówno plazmid kodujący białko będące „przynętą” (ang. bait plasmid) którego partnerów chcemy poznać, jak i całą bibliotekę cDNA tworzy się w analogiczny sposób jak w przypadku kierunkowego systemu dwuhybrydowego. Przy przeszukiwaniu biblioteki łatwiej jest przeprowadzić wstępną selekcję ewentualnych partnerów badanego białka przed właściwym testem na obecność β -galaktozydazy. W wielu systemach wykorzystuje się zatem obecność drugiego genu reporterowego, tym razem pokarmowego, np. genu HIS3, kodującego enzym niezbędny w szlaku biosyntezy histydyny. Ponieważ transformacje pojedynczymi plazmidami są wydajniejsze od transformacji podwójnych, można też najpierw stransformować drożdże plazmidem kodującym „przynętę”, wysiewając je na odpowiednie podłoże selekcyjne i po uzyskaniu komórek zawierających jeden plazmid wprowadzić do nich plazmidy biblioteki. Po wstępnej selekcji na podłożu bez histydyny wyrosną kolonie, w których nastąpiła aktywacja transkrypcji genu HIS3. Dopiero na tych koloniach należy przeprowadzić test na obecność β -galaktozydazy w komórkach drożdży. Dzięki tej metodzie można stosunkowo szybko wykryć nowych partnerów białkowych dla interesującego nas białka. Ponadto, należy podkreślić, iż w systemie dwuhybrydowym możliwe jest badanie oddziaływań między białkami, które normalnie występują w komórce w małych ilościach,

zatem trudno je sprawdzić innymi metodami, zaś w drożdżach białka fuzyjne eksprymowane z plazmidów wystąpią w ilości wystarczającej do wykonania testu.

Ograniczenia metody

Główną wadą systemu dwuhybrydowego jest fakt, iż z różnych przyczyn oddziaływań niektórych klas białek nie można zbadać za jego pomocą. Z pewną częstotliwością pojawiają się wyniki fałszywie pozytywne i fałszywie negatywne. Te pierwsze są najczęściej powodowane przez białka, które, kodowane przez plazmid z domeną wiążącą, są aktywatorami transkrypcji i do aktywacji genu reporterowego nie potrzebują oddziaływania z drugim białkiem fuzyjnym zawierającym domenę aktywującą. Z tego powodu biblioteki cDNA tworzone do przeprowadzania wysokowydajnych analiz dwuhybrydowych są prawie zawsze tworzone w plazmidach kodujących domenę aktywującą, aby białka będące aktywatorami transkrypcji nie powodowały fałszywych wyników pozytywnych. Poza tym zdarzają się też oddziaływania niespecyficzne których wynikiem jest aktywacja genu reporterowego. Ich przyczyny mogą być różne. Niektóre białka fuzyjne z domeną aktywującą mogą oddziaływać z białkiem drożdżowym zawierającym domenę wiążącą i w ten sposób aktywować transkrypcję u drożdży. Analogicznie, białko fuzyjne z domeną wiążącą może, poprzez oddziaływanie z drożdżowym białkiem z domeną aktywującą, aktywować transkrypcję u drożdży. Te dwa przypadki fałszywie pozytywnych wyników systemu dwuhybrydowego można wyeliminować, stosując odpowiednie kontrole negatywne. W tym celu równolegle do transformacji drożdży plazmidami kodującymi białka fuzyjne należy przeprowadzić transformację plazmidem kodującym białko fuzyjne z domeną-AD z pustym plazmidem kodującym domenę-BD lub kodującym inne białko fuzyjne o którym wiadomo że nie oddziałuje z badanym białkiem fuzyjnym. Analogicznie należy przeprowadzić kontrolę dla białka fuzyjnego z domeną-BD, kotransformując drożdże plazmidem je kodującym wraz z plazmidem-AD pustym bądź kodującym białko które nie oddziałuje z białkiem z domeną-BD. Jeżeli kontrola negatywna zabarwi się na niebiesko, wiadomo, że mamy do czynienia z wynikiem fałszywie pozytywnym.

Istnieje również przypadek artefaktu systemu dwuhybrydowego, którego nie da się wyeliminować stosowaniem kontroli negatywnych. Zdarza się on wtedy, gdy oba białka fuzyjne eksprymowane w drożdżach wprawdzie nie oddziałują ze sobą,

ale oddziałują z tym samym białkiem drożdżowym i stąd ich domeny aktywująca i wiążąca mogą się znaleźć na tyle blisko siebie, aby aktywować transkrypcję w drożdżach. Z powodu tej możliwości oddziaływania między dwoma białkami stwierdzone w systemie dwuhybrydowym należy jeszcze potwierdzić drugą, niezależną metodą

Oprócz wyników fałszywie pozytywnych, w systemie dwuhybrydowym zdarzają się również wyniki fałszywie negatywne, tzn. pomimo istnienia oddziaływań nie zostają one wykryte. Tego rodzaju przypadków nie da się wyeliminować stosowaniem kontroli, a spowodowane są one najczęściej niestabilnością danego białka w drożdżach. Poza tym, niektóre białka mogą przybierać w drożdżach niewłaściwą konformację, przez co ich domena wiążąca będzie ukryta i do oddziaływań nie dojdzie. Również niektóre klasy białek, a w szczególności białka błonowe zawierające hydrofobową domenę transbłonową, mogą nie trafić do jądra i wówczas nie dojdzie do aktywacji transkrypcji.

Czasami przyczyną otrzymania wyników fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych może być też nieprawidłowa hodowla drożdży: zbyt stare drożdże wykazują tendencję do powodowania wyników pozytywnych w teście na obecność β -galaktozydazy. Szczególnie ważne jest również utrzymywanie stabilnej temperatury hodowli drożdży.

Z tego powodu wyniki otrzymane w systemie dwuhybrydowym należy potwierdzić za pomocą innych metod, jak np. koimmunoprecypitacja (Co-IP). Technika ta polega na dodaniu do mieszaniny obu analizowanych białek, przeciwciała skierowanego przeciwko jednemu z nich. Jeżeli białka te oddziałują ze sobą można „wyciągnąć” (za pomocą jednego przeciwciała) jednocześnie oba białka (białko wiążące się z przeciwciałem oraz białka, które oddziałują z pierwszym białkiem). Jeśli badane białka nie oddziałują ze sobą, można „wyciągnąć” tylko jedno białko.

Charakterystyka analizowanych białek

AtSWI3B

U *Arabidopsis thaliana* istnieje mała rodzina genów posiadająca sekwencje homologiczne do drożdżowego genu SWI3, kodującego ważną podjednostkę dużego kompleksu przebudowującego (remodelującego) chromatynę ySWI/SNF. W roślinach występują cztery białka typu ySWI3: AtSWI3A, AtSWI3B, AtSWI3C oraz AtSWI3D. Białka te zawierają charakterystyczne motywy wysoko konserwowane we wszystkich czterech

białkach, a także w drożdżowym SWI3. Białko AtSWI3B jest ekspresowane we wszystkich organach *Arabidopsis thaliana*, jest białkiem jądrowym oraz komplementuje mutację swego homologa w drożdżach.

FCA

FCA (Flowering Time Control Protein from *A. thaliana*) jest silnym aktywatorem wejścia rośliny w fazę kwitnienia. Zawiera dwie domeny wiążące RNA i domenę WW odpowiedzialną za wiązanie białko-białko. Transkrypt FCA podlega alternatywnemu składaniu (ang. splicing), w związku z czym w komórce mogą występować cztery warianty transkrypcyjne tego genu.

Test dwuhybrydowy

Jeśli badane białka, czyli AtSWI3B oraz FCA, oddziałują ze sobą, kolonie drożdży staną się niebieskie. Brak niebieskiego zabarwienia będzie świadczył o braku oddziaływań pomiędzy tymi białkami w zastosowanym układzie. Przy przeprowadzaniu testu istotne jest wykonanie szeregu kontroli. Należy wykonać analogiczny test dla drożdży transformowanych pojedynczymi plazmidami (**kontrola negatywna**), po to, żeby sprawdzić, czy pojedyncze białka nie są zdolne do aktywacji transkrypcji.

Dodatkową, wspólną kontrolą dla wszystkich analizowanych układów są drożdże transformowane plazmidem pLC1 (**kontrola pozytywna**), dla których również wykonuje się podobny test. Na plazmidzie tym kodowane są obie domeny niezbędne do aktywacji transkrypcji, a zatem domena wiążącą się z DNA (BD) oraz domena aktywująca transkrypcję (AD). Zabarwienie się kolonii kontroli pozytywnych na kolor niebieski będzie świadczyć o poprawnym wykonaniu testu. Kolonie kontroli negatywnych powinny pozostać białe.

Schemat doświadczenia

1. Izolacja DNA plazmidowego z komórek *E. coli*
2. Transformacja drożdży konstrukcjami:
 - FCA/pGAD424
 - FCA/pGBT9
 - AtSWI3B/pGAD424
 - AtSWI3B/pGBT9
 - FCA/pGAD424 i AtSWI3B/pGBT9
 - FCA/pGBT9 i AtSWI3B/pGAD424
 - pLC1 (**kontrola pozytywna**)
2. Hodowla drożdży
3. Test dwuhybrydowy

Tydzień 1

Dzień 1. Izolacja DNA plazmidowego z bakterii.

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

- hodowlę bakterii
- lizę bakterii,
- oczyszczanie plazmidowego DNA.

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

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

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

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


Następny etap oczyszczania DNA polega na oddzieleniu DNA od związanych z nim białek.

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

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

Dzień 1. Izolacja DNA plazmidowego na małą skalę (minilizaty)

Odczynniki i aparatura:

- hodowle płynne bakterii
- RNaza (10 mg/ml)
- roztwór I: 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM glukoza, 10 mM EDTA
- roztwór II: 0.2 M NaOH, 1 % SDS (przygotować tuż przed użyciem)
- roztwór III: 7.5 M octan amonu
- etanol 96 %
- etanol 70 %
- woda miliQ
- agarozą,
- bromek etydyny (10 mg/ml), 
- bufor TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA),
- barwnik do elektroforezy,
- probówki Eppendorfa,
- mikrowirówka,
- SpeedVac,
- aparat do elektroforezy.

Wykonanie (około 2 godz.)

Uczestnicy zajęć otrzymają od prowadzących 5 hodowli bakteryjnych, z których będą izolować plazmidy: AtSWI3B/pGBT9, AtSWI3B/pGAD424, FCA/pGBT9, FCA/pGAD424, pLC1.

- rozlać hodowle bakteryjne do odpowiednio podpisanych probówek Eppendorfa (po 1,5 ml) i zwirować bakterie w mikrowirówce przez 1 minutę (2 x 1.5 ml)

- odsączyć pipetą pożywkę do sucha,
- zawiesić osad końcówką do pipety w 100 µl roztworu I, dodać 5 µl RNazy
- inkubować przez 5 minut w temperaturze pokojowej
- do próbki Eppendorfa dodać 200 µl świeżo przygotowanego roztworu II
- zamieszać BARDZO delikatnie i wstawić do lodu na 5 minut
- dodać 150 µl zimnego (z lodówki) roztworu III, dwukrotnie BARDZO SILNIE wstrząsnąć i wstawić do lodu na 10 minut
- zwirować 15 minut
- zebrać klarowny supernatant (jeśli supernatant nie jest klarowny, można zwirować go powtórnie)
- dodać 450 µl izopropanolu i inkubować na lodzie 2 min
- zwirować 20 minut w mikrowirówce
- zlać izopropanol, osad przemyć (nie zawieszać) 1 ml etanolu 70%, zwirować
- wysuszyć w SpeedVacu (do 5 minut)
- osad zawiesić w 20 µl wody MiliQ
- przygotować 0,8% żel agarozowy w buforze TBE (dodać bromku etydyny do stężenia 0,5 µg/ml)
- nanieść na żel 5 µl preparatu z 1 µl barwnika do elektroforezy
- prowadzić elektroforezę w buforze TBE przy napięciu nie przekraczającym 100V
- sfotografować żel na transiluminatorze w świetle UV (ocenić jakość i ilość DNA w preparacie)

Dzień 2. Transformacja drożdży


Jest to szybka, jednoetapowa metoda uzyskania kompetentnych komórek drożdży i ich transformacji.

Uważa się, że obecność ditiotretolu (DTT) w roztworze A używanym do transformacji drożdży zmienia strukturę kompleksów mannoproteidowych w ich ścianie komórkowej. W efekcie zwiększa się liczba porów lub/ oraz plastyczność ścian komórkowych, co sprzyja przedostawaniu się wysokocząsteczkowych kwasów nukleinowych do wnętrza komórek. Jednoniciowy nośnikowy DNA dodatkowo ułatwia wprowadzanie cząsteczek plazmidu do komórek drożdży. Drożdże po

transformacji wysiewa się na pożywkę minimalną (WO) z dodatkiem jedynie tych aminokwasów, których dane transformanty nie są w stanie same syntetyzować. Na plazmidzie pGBT9 znajduje się jeden z genów szlaku biosyntezy tryptofanu, natomiast na plazmidzie pGAD424 oraz pLC1 – leucyny. Dlatego też drożdże po transformacji plazmidem pGBT9 wysiewa się na pożywkę minimalną WO bez tryptofanu, drożdże po transformacji plazmidem pGAD424 lub pLC1 na pożywkę WO bez leucyny, a drożdże po transformacji oboma plazmidami (podwójne transformanty) pGAD424 oraz pGBT9 na WO bez leucyny i tryptofanu. Postępowanie takie umożliwia wyselekcjonowanie transformantów (użyty szczep drożdży nie jest w stanie syntetyzować tryptofanu ani leucyny).


Wydajność tej metody wynosi około 10^4 transformantów/µg plazmidowego DNA.

Materiały:

- Roztwór A: 60% glikol polietylenowy 3350 (PEG 3350), 0,2 M octan litu, 100 mM ditiotretol (DTT) 
- Jednoniciowy DNA nośnikowy (10 mg/ml)
- YPD – pożywka pełna do hodowli drożdży (bacto-pepton 1%, ekstrakt drożdżowy 1%, agar 2%)
- WO – pożywka używana do selekcji transformantów (yeast nitrogen base) 0,67%, glukoza 2%, agar 2%, mieszanina aminokwasów i nukleotydów z wyjątkiem wymagania pokarmowego używanego do selekcji, np. tryptofanu: WO–trp, leucyny: WO-leu)
- Szczep drożdży Y190
- Preparaty plazmidowego DNA: AtSWI3B/pGBT9, AtSWI3B/pGAD424, FCA/pGBT9, FCA/pGAD424, pLC1
- Probówki typu Eppendorf
- Głaszczka
- sterylne wykałaczki
- Palnik, zapalarka
- lód

Hodowle stałe (na szalkach) drożdży, preparaty DNA oraz szalki z pożywką uczestnicy zajęć otrzymują od prowadzących.

Wykonanie (około 45 minut)

1. Przygotować bufor A, składający się z 600 µl PEG, 200 µl octan litu, 100 µl 1M DTT oraz 40 µl H₂O (bufor A należy przygotować tuż przed transformacją).  **DTT jest substancją szkodliwą, należy pracować w rękawiczkach!**

2. Do 7 probówek Eppendorfa (1,5 ml) dodać po 100 μ l buforu A.
3. Do każdej probówki dodać po 5 μ l nośnikowego DNA (ang. carrier DNA). Nośnikowy DNA należy trzymać w lodzie.
4. Do probówki:
 - nr 1 dodać 5 μ l (ok. 300 ng) plazmidowego DNA AtSWI3B/pGBT9 (**kontrola negatywna testu dwuhybrydowego**)
 - nr 2 dodać 5 μ l plazmidowego DNA FCA/pGBT9 (**kontrola negatywna testu dwuhybrydowego**)
 - nr 3 dodać 5 μ l plazmidowego DNA (AtSWI3B/pGAD424) (**kontrola negatywna testu dwuhybrydowego**)
 - nr 4 dodać 5 μ l plazmidu FCA/pGAD424 (**kontrola negatywna testu dwuhybrydowego**)
 - nr 5 dodać po 5 μ l dwóch preparatów plazmidowego DNA (AtSWI3B/pGBT9 oraz FCA/pGAD424)
 - nr 6 dodać po 5 μ l dwóch preparatów plazmidowego DNA (AtSWI3B/pGAD424 oraz FCA/pGBT9)
 - nr 7 dodać 5 μ l plazmidu pLC1 (**kontrola pozytywna testu dwuhybrydowego**).
5. Zebrać sterylną wykałaczką po około 1 mm³ drożdży (szcep Y190) z powierzchni pożywki stałej (drożdże hodowane w temperaturze 30°C przez 2-3 dni na pożywce YPD) i dodać do probówek, zworteksować.
6. Wszystkie otrzymane mieszaniny inkubować w bloku grzejnym lub łaźni wodnej w temperaturze 45°C przez 30 min
7. Całość przenieść na szalki:
 - mieszaninę zawierającą plazmid AtSWI3B/pGBT9 na szalkę WO-trp
 - mieszaninę zawierającą plazmid FCA/pGAD424 na szalkę WO-leu
 - mieszaninę zawierającą plazmid AtSWI3B/pGAD424 na szalkę WO-leu
 - mieszaninę zawierającą plazmid FCA/pGBT9 na szalkę WO-trp
 - mieszaninę zawierającą oba plazmidy na szalkę WO-trp-leu
 - mieszaninę zawierającą plazmid pLC1 na szalkę WO-leu
8. Mieszaniny transformacyjne **delikatnie** rozprowadzić głaszczką po całej powierzchni szalek. Szalki zaparafilmować.

9. Drożdże na szalkach hodować przez 2-3 dni w cieplarni w temperaturze 30°C (do momentu pojawienia się białych kolonii).

UWAGA!

Proszę ustalić z prowadzącym zajęcia termin przeszczepienia drożdży na nowe szalki w celu odnowienia kolonii. Do testu dwuhybrydowego używa się 2-3 dniowych kolonii, w innym wypadku sygnał jest bardzo słaby, lub w ogóle niewidoczny.

Tydzień 1/2

Przygotowanie do wykonania testu dwuhybrydowego

Materiały:

- Szalki WO-trp-leu, WO-trp, WO-leu
- Sterylne wykałaczki
- Palnik
- Zapalarka lub zapałki

Wykonanie: (około 15 minut)

1. Pobrać sterylną wykałaczką po kolei pojedyncze **białe** kolonie z szalek (po kilka kolonii z każdej szalki)
 - WO-trp-leu (podwójne transformanty),
 - WO-leu (drożdże transformowane plazmidem pLC1 lub plazmidem pGAD424),
 - WO-trp (drożdże transformowane plazmidem pGBT9)

i przenieść je na 3 nowe szalki WO-trp-leu, WO-leu, WO-trp, rozprowadzić je po niewielkiej powierzchni szalki (ok. cm² na jedną kolonię).

2. Szalki inkubować przez 2-3 dni w 30°C.

Tydzień 2

Dzień 1. Test dwuhybrydowy

Zamrożenie komórek drożdży w ciekłym azocie, a następnie ich rozmrożenie powoduje uszkodzenie i uwolnienie białek na zewnątrz komórek. Jeśli dwaj potencjalni partnerzy białkowi oddziałują ze sobą, to przyłączone do nich domeny, tj. domena wiążąca się z DNA (BD) oraz domena aktywująca transkrypcję (AD), zbliżają się do siebie i wówczas następuje ekspresja genu β -galaktozydazy. Po dodaniu do roztworu substratu dla β -galaktozydazy, którym jest X-gal, dochodzi do hydrolizy wiązania β -D-galaktozydowego. Jednym z produktów tej reakcji jest niebieski 5-bromo-4-chloro-3-indol. Produkt taki, a zatem także i niebieskie zabarwienie, świadczy o tym, że oba badane białka oddziałują ze

sobą. Brak zabarwienia będzie dowodem tego, że oddziaływania takie nie zachodzą.

Jak zostało to już wcześniej wspomniane, należy wykonać kontrole zarówno pozytywne, jak i negatywne. Kontrolą negatywną są drożdże transformowane pojedynczymi plazmidami, zaś pozytywną drożdże transformowane plazmidem pLC1.

Materiały:

- Bufor Z: 60 mM Na₂PO₄;
10 mM KCl; 1 mM MgSO₄, pH 7,0
- Bufor Z/X-gal: do 10 ml buforu Z dodać 27 µl β-merkaptioetanolu i 167 µl X-gal z roztworu wyjściowego o stężeniu 20 mg/ml
(2-merkaptioetanol i X-gal dodać tuż przed użyciem!)



UWAGA: 2-merkaptioetanol i X-gal są substancjami szkodliwymi, należy pracować w rękawiczkach! 2-merkaptioetanol należy dodawać pod wyciągiem!

- Krążki bibuły Whatmann dopasowane wielkością do średnicy szalki
- Puste szalki
- 20 mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo-β-D-galaktopiranozyd) rozpuszczony w dimetyloformamidzie
- Ciekły azot

Wykonanie: (ok. 30 minut)

1. Przygotować roztwór 10 ml Z/X-Gal
2. Przygotować 3 puste szalki (na kolonie z szalek WO-trp, WO-trp-leu, WO-leu)
3. Wyciąć 6 krążków bibuły (dopasowane do średnicy szalek) i wyłożyć po jednym krążku na każdą szalkę
4. Krążki na szalkach nasączyć buforem Z/X-gal rozprowadzając po 2 ml na krążek uważając żeby nie powstały bąble powietrza między szalką a bibułą i zlać nadmiar buforu z szalki
5. Na każdą szalkę z drożdżami
 - WO-trp-leu,
 - WO-trp (kontrola negatywna)
 - WO-leu (kontrola negatywna i pozytywna)
 przyłożyć po krążku bibuły Whatman i odcisnąć na nim kolonie.
6. Zdjąć po kolei pensetą krążki z szalek i zamrozić w ciekłym azocie przez 5 sekund, po czym przełożyć je koloniami do góry na przygotowane

wcześniej szalki, uważając by nie powstały bąble powietrza między dwoma krążkami.

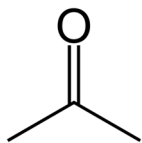
9. Szalki inkubować w 37°C przez 12 – 24 godziny.

Dzień 2.

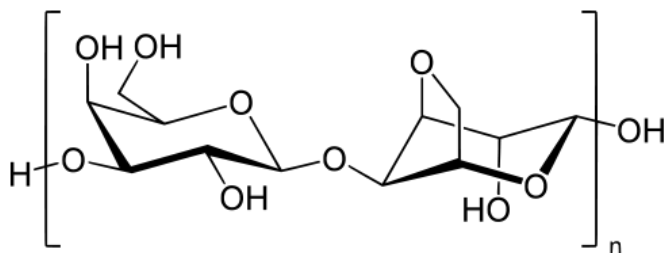
1. Wyjąć szalki z ciepłarki
2. Zanalizować zabarwienie/brak zabarwienia na szalkach
3. Zinterpretować otrzymane wyniki

4. Wybrane Substancje chemiczne stosowane podczas ćwiczeń

Aceton – propanon; bezbarwna, żywa ciecz o charakterystycznym zapachu, mieszająca się z wodą bez ograniczeń. Aceton jest powszechnie wykorzystywany w przemyśle jako rozpuszczalnik i środek do czyszczenia powierzchni metali i szkła. W chemii jest często używany jako polarny aprotyczny rozpuszczalnik do przeprowadzania reakcji chemicznych. W biologii aceton jest używany do wytrącania makromolekuł oraz przepłukiwania ich osadów. Aceton jest substancją wysoce łatwopalną i działającą drażniąco na oczy. Dłuższy kontakt ze skórą może powodować jej wysychanie i pękanie.

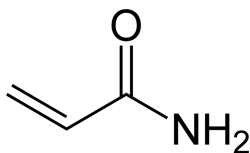


Agaroz – polisacharyd, liniowy heteropolimer galaktozy i jej pochodnych; białe, bezpostaciowe

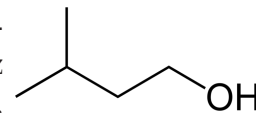


ciało stałe, higroskopijne. Agaroz jest dość dobrze rozpuszczalna w wodzie, w temperaturze pokojowej wodny roztwór agarowy tworzy żel. Przejścia żel-zol wykazują zjawisko histerezy (koagulacja zolu następuje w niższej temperaturze niż peptyzacja żelu). Żel agarozowy jest powszechnie stosowany do elektroforetycznego rozdzielania kwasów nukleinowych w procesie elektroforezy.

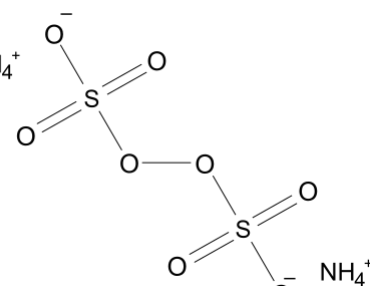
Akrylamid – 2-propenamid; biała, krystaliczna substancja, bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie (200 g/100 ml). W obecności wolnych rodników ulega reakcji polimeryzacji do poliakrylamidu. W laboratorium jest stosowany głównie do otrzymywania żeli poliakrylamidowych oraz liniowego poliakrylamidu (LPA), używanego do precypitacji DNA. Akrylamid jest substancją silnie toksyczną i kancerogenną, działającą drażniąco na skórę i błony śluzowe, łatwo wchłaniająca się przez skórę. Zatrucie akrylamidem powoduje uszkodzenia układu nerwowego.



Alkohol izoamyłowy – 3-metylo-1-butanol; bezbarwna ciecz o nieprzyjemnym zapachu, bardzo słabo rozpuszczalna w wodzie. Alkohol izoamyłowy jest składnikiem niedogonu. W biologii molekularnej alkohol izoamyłowy jest używany jako składnik mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy (25:24:1 v:v:v), w której odgrywa rolę stabilizatora i antyemulgatora. Alkohol izoamyłowy działa drażniąco na skórę i układ oddechowy. Jest również łatwopalny.

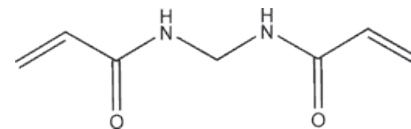


APS – nadtlenosiarczan NH_4^+ (VI) amonu; biała, krystaliczna substancja, bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie (62 g/100 ml w 20°C).



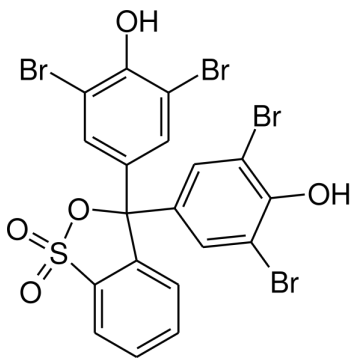
Bardzo silny utleniacz, ulega rozkładowi z wytworzeniem wolnych rodników. W przemyśle jest używany do produkcji obwodów drukowanych. W laboratoriach jest stosowany jako inicjator reakcji o mechanizmie wolnorodnikowym, np. podczas polimeryzacji akrylamidu do żelu poliakrylamidowego. APS działa drażniąco na skórę, oczy i błony śluzowe, może też wywoływać reakcje alergiczne.

Bisakrylamid – N,N'-metylenobisakrylamid; biała, krystaliczna substancja, bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie. W obecności wolnych rodników ulega polimeryzacji. Bisakrylamid, wraz z akrylamidem, jest używany do produkcji żeli poliakrylamidowych. Dodatek akrylamidu powoduje usieciowanie powstałego polimeru; im jest wyższe stężenie bisakrylamidu, tym żel jest silniej usieciowany, a zarazem twardszy i kruchszy. Bisakrylamid jest substancją szkodliwą.

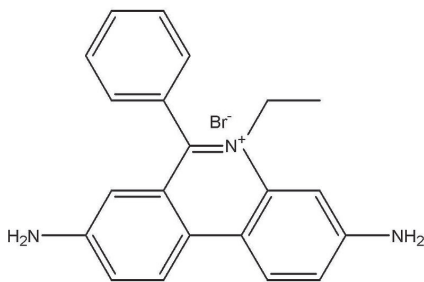


Błękit bromofenolowy – 3',3'',5',5''-tetrabromofenolosulfonoftaleina; ciemnoniebieskie ciało stałe. Wodne roztwory są wykorzystywane jako barwny marker do uwidaczniania postępów migracji związków podczas elektroforezy w żelach agarozowych i poliakrylamidowych. W warunkach typowych dla elektroforezy błękit bromofenolowy występuje w postaci anionu i jako taki migruje w kierunku anody (elektroda „+”); tempo migracji zależy od pH i gęstości stosowanego żelu. Błękit bromofenolowy jest także stosowany jako

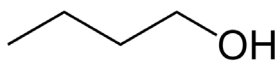
wskaźnik kwasowo-zasadowy; przy pH powyżej 4,6 posiada ciemnoniebieską barwę, przy pH poniżej 3,0 barwę żółtą, zaś w przedziale 3,0-4,6 wykazuje barwę pośrednią. Błękit bromofenolowy może działać drażniaco na oczy i skórę.



Bromek etydyny – IUPAC: bromek 3,8-diamino-N-etylo-6-fenylfenantrydynyowy; fioletowo-czerwone ciało stałe, słabo rozpuszczalne w wodzie (4 g/100 ml). Aromatyczny związek, silnie interkalujący w strukturę dwuniciowego DNA oraz, znacznie słabiej, w struktury jednoniciowego DNA i RNA. W świetle UV bromek etydyny fluoryzuje na fioletowo. Związanie z dwuniciowym DNA powoduje znaczny wzrost intensywności fluorescencji. W laboratoriach bromku etydyny używa się do uwidaczniania migracji DNA i RNA podczas elektroforezy w żelu, a także podczas ultrawirrowania w gradiencie chlorku cezu. Bromek etydyny jest związkiem silnie trującym. Wykazuje działanie rakotwórcze oraz teratogenne.



n-butanol – 1-butanol; bezbarwna ciecz o charakterystycznym, słodkawym zapachu, średnio rozpuszczalna w wodzie (7,7 g/100 ml w 20°C). Butanol jest używany w przemyśle jako rozpuszczalnik, jest składnikiem płynów hydraulicznych oraz niektórych perfum; jest także stosowany jako biopaliwo. W biologii molekularnej bywa wykorzystywany do precypitacji makromolekuł. Nasycony wodą roztwór n-butanolu może być użyty do nawarstwienia na polimeryzujący żel poliakrylamidowy w celu odcięcia dostępu tlenu i wygładzenia powierzchni żelu. Butanol może działać drażniaco na



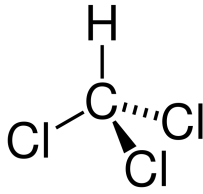
Chlorek magnezu – $MgCl_2$; białe, krystaliczne ciało stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie (54,3 g/100 ml w 20°C). Chlorek magnezu

jest podstawowym przemysłowym źródłem metalicznego magnezu. Jest wykorzystywany w przemyśle tekstylnym, papierniczym i w produkcji cementu. Wchodzi także w skład soli zapobiegających obładaniu się dróg. Bezwodny chlorek magnezu jest substancją silnie higroskopijną i jest używany jako pochłaniacz wilgoci. W biologii molekularnej siarczan magnezu jest używany jako źródło kationów magnezu, będących kofaktorami dla wielu powszechnie stosowanych enzymów, takich jak polimeraza DNA czy enzymy restrykcyjne. Bezwodny chlorek magnezu działa drażniaco na skórę i oczy.

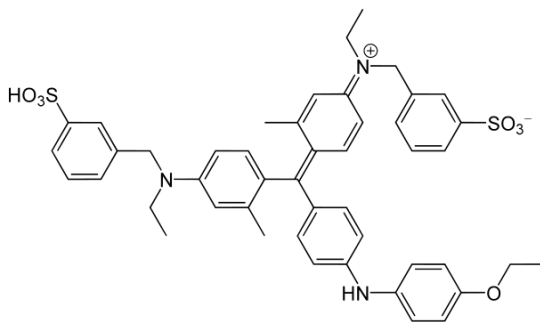
Chlorek sodu – NaCl; bezbarwne, krystaliczne ciało stałe, higroskopijne, dobrze rozpuszczalne w wodzie (35,9 g/100 ml w 25°C). Chlorek sodu jest powszechnie stosowany w przemyśle spożywczym. Jest także wykorzystywany w wielu gałęziach przemysłu (produkcja mydeł, detergentów, papieru, tekstyliów) oraz jako substrat do otrzymywania chloru i wodorotlenku sodu na skalę przemysłową. W biologii molekularnej chlorek sodu jest powszechnym składnikiem buforów do przeprowadzania reakcji enzymatycznych, zapewniającym pożądaną siłę jonową. Stosuje się go także jako składnik buforów do ekstrakcji DNA, RNA i białek. Jest również składnikiem roztworów uspecyfikujących oddziaływanie molekuł (np. buforów do płukania membran w technice Western-blot, buforów do przepłukiwania złożeń w technikach chromatograficznych itp). W technikach chromatografii jonowymiennej oraz chromatografii powinowactwa (np. technikach pull-down) może być stosowany do elucji molekuł związanych ze złożem.

Chloroform – trichlorometan; bezbarwna ciecz o charakterystycznym zapachu, bardzo słabo rozpuszczalna w wodzie (0,8 g/100 ml w 20°C), gęstszy od wody (1,48 g/ml). Chloroform jest powszechnie stosowany jako substancja chłodząca w klimatyzatorach biurowych. Używa się go także jako środka usypiającego. Z uwagi na względną bierność chemiczną chloroform jest często używany jako rozpuszczalnik w przemyśle farmaceutycznym oraz podczas produkcji barwników i pestycydów. W biologii molekularnej chloroform jest używany do ekstrakcji hydrofobowych związków. Jest również rozpuszczalnikiem w mieszaninie fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy (25:24:1

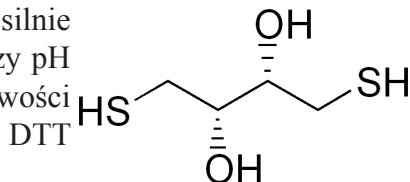
v:v:v) używanej do ekstrakcji zanieczyszczeń białkowych z wodnych roztworów DNA i RNA. Chloroform jest substancją szkodliwą. Kontakt ze skórą i oczami może prowadzić do podrażnień. Wdychanie oparów chloroformu może prowadzić do zaburzeń układów oddechowego i pokarmowego. Chloroform jest także środkiem rakotwórczym.



Coomassie Brilliant Blue G-250 – ciemnoniebieskie, drobnokrystaliczne ciało stałe, bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie (0,1g/100ml). Coomassie posiada zdolność do silnego wiązania się z cząsteczkami białka w kwaśnym środowisku. Powstałe addukty mają charakter soli i są tworzone pomiędzy anionem Coomassie a protonowanymi resztami aminokwasów zasadowych. Coomassie Brilliant Blue G-250 został opracowany i nadal jest stosowany jako substancja do barwienia wełny. W laboratoriach Coomassie jest powszechnie używany do uwidaczniania białek rozdzielonych w żelu techniką SDS-PAGE. Jest także stosowany w natywnej elektroforezie białek BN-PAGE, w której pełni rolę czynnika nadającego rozdzielanym białkom ładunek ujemny. Coomassie jest również wykorzystywany do spektrofotometrycznego oznaczania stężenia białek techniką Bradford. Wiązanie z cząsteczką białka powoduje bowiem pojawienie się silnego piku absorpcji przy fali o długości 595 nm oraz osłabienie absorpcji przy 470 nm. Należy unikać kontaktu Coomassie z oczami i skórą.

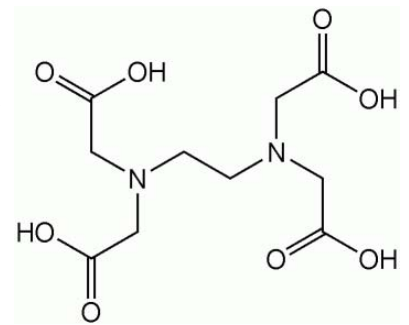


DTT – ditiotreitol, (2*S*,3*S*)-1,4-disulfanylobutan-2,3-diol; białe ciało stałe, higroskopijne, dobrze rozpuszczalne w wodzie (50 g/100 ml). DTT wykazuje silne właściwości redukujące; jest powszechnie wykorzystywany do redukcji wiązań disiarczkowych w białkach. Właściwości redukujące DTT silnie zależą od pH; przy pH poniżej 7 właściwości redukujące

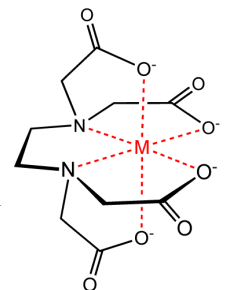


ulegają silnemu osłabieniu z uwagi na protonację grup tiolowych. DTT ulega bardzo łatwo utlenieniu tlenem atmosferycznym, w związku z czym konieczne jest przechowywanie go w niskich temperaturach, zaś na okres dłuższego przechowywania zalecane jest przetrzymywanie go pod inertną atmosferą. DTT jest substancją szkodliwą, działa drażniąco na oczy, skórę i drogi oddechowe.

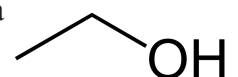
EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy, H₄EDTA; białe, pyłące się ciało stałe. EDTA jest popularnie sprzedawany jako sól dwusodowa Na₂H₂EDTA. Aniony EDTA (EDTA⁴⁻, HEDTA³⁻) tworzą silne kompleksy kleszczowe z dwu- i trójwartymi kationami metali. EDTA jest wykorzystywany w przemyśle jako konserwant żywności, stabilizator kosmetyków, środek zmiękczający wodę oraz zapobiegający precypitacji soli. W laboratoriach EDTA jest



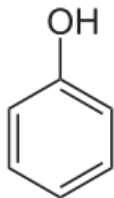
stosowany jako titrant w miareczkowaniu kompleksometrycznym (w postaci soli dwusodowej). Jest także używany do maskowania obecności kationów metali, hamowania aktywności nukleaz i proteaz oraz sporządzania roztworów buforujących. EDTA działa drażniąco na oczy, jest też szkodliwy dla organizmów wodnych.



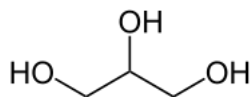
Etanol – bezbarwny alkohol pierwszorzędowy o charakterystycznym, ostrym zapachu i słodkawym, palącym smaku, mieszający się z wodą w każdym stosunku. Etanol znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, jest także składnikiem licznych perfum i kosmetyków oraz środków do dezynfekcji. W przemyśle jest stosowany jako rozpuszczalnik i substrat do syntezy innych związków o znaczeniu przemysłowym (kwas octowy, estry etylu). Jest także stosowany jako paliwo. W biologii molekularnej etanolu używa się do wytrącania makromolekuł oraz płukania ich osadów. Etanol jest substancją wysoce łatwopalną, dłuższa ekspozycja działa drażniąco na skórę.



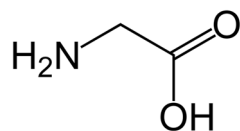
Fenol – najprostszy z fenoli; bezbarwne, krystaliczne ciało stałe, umiarkowanie rozpuszczalne w wodzie (8,3 g/100 ml w 20°C); słaby kwas ($pK_a=10,0$). Fenol stosowany jest jako substrat w syntezie leków, kosmetyków, herbicydów i tworzyw sztucznych. Jest także wykorzystywany w chirurgii kosmetycznej oraz jako środek antyseptyczny. W biologii molekularnej jest używany jako silny denaturant wytrącający białka oraz (po zakwaszeniu) DNA. Fenol jest substancją silnie żrącą i toksyczną, a także mutagenem.



Glicerol – propano-1,2,3-triol, zwany też gliceryną; lepka, gęsta, bezbarwna ciecz, bez zapachu, o bardzo słodkim smaku, higroskopijna, mieszająca się z wodą w każdym stosunku. Glicerol jest stosowany w przemyśle spożywczym jako zagęszczacz, nawilżacz lub substytut cukru oraz w przemyśle kosmetycznym jako lubrykant i nawilżacz. W biologii wodny roztwór glicerolu jest wykorzystywany do przechowywania enzymów w temperaturach poniżej 0°C. Glicerol jest także dodawany do roztworów służących do zamrażania żywych organizmów z uwagi na znaczną redukcję obrażeń powodowanych przez kryształ lodu. Jest również składnikiem buforów do nanoszenia próbek na żel podczas elektroforezy, w których działa jako obciążnik.

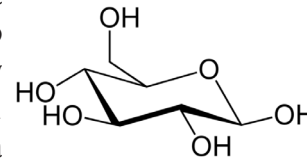


Glicyna – kwas 2-aminooctowy; białe ciało stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie (25 g/100 ml w 25°C); aminokwas, $pI = 6,06$, jeden z dwudziestu kodowanych aminokwasów białkowych. W przemyśle stosowana jako substancja wzmacniająca smak oraz czynnik buforujący w niektórych antyperspirantach. W biologii molekularnej jest stosowana jako składnik buforów (np. bufor TGM, bufor do SDS-PAGE). Przy niskim pH (~2,8) glicyna (jako kation) jest często stosowana do elucji białek ze złożeń w technikach chromatografii powinowactwa.

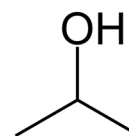


Glukoza – (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-pentahydroksoheksanal; monosacharyd, bezbarwne, krystaliczne ciało stałe, o słodkim smaku, bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie. Glukoza jest powszechnie wykorzystywana w przemyśle spożywczym, tekstylnym i medycynie.

W biologii glukoza jest wykorzystywana do sporządzania podłoży mikrobiologicznych. Jest także dodawana do roztworów wodnych w celu nadania im pożądanego ciśnienia osmotycznego.

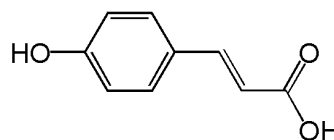


Izopropanol - 2-propanol; bezbarwny alkohol drugorzędowy o charakterystycznym zapachu, mieszający się z wodą w każdym stosunku. Powszechnie stosowany jako rozpuszczalnik i środek odtłuszczający. Może być używany jako środek konserwujący (zamiast formaldehydu), jako składnik płynów do dezynfekcji oraz dodatek do paliw. W biologii molekularnej izopropanolu używa się do wytrącania makromolekuł oraz płukania ich osadów. Izopropanol jest substancją wysoce łatwopalną, dłuższa ekspozycja działa drażniąco na skórę.

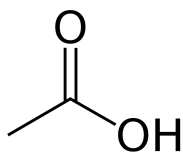


Kwas borowy – H_3BO_3 , kwas ortoborowy; białe, krystaliczne (lub sproszkowane) ciało stałe, dość słabo rozpuszczalne w wodzie (5,7 g/100 ml w 25°C); bardzo słaby kwas nieorganiczny ($pK_a=9,24$). Kwas borowy jest stosowany jako środek antyseptyczny i owadobójczy oraz środek do konserwacji drewna. Kwas borowy jest stosowany także w reaktorach jądrowych do spowalniania tempa reakcji jądrowych. W laboratoriach kwas borowy jest używany do sporządzania roztworów buforujących (np. bufor TBE). Kwas borowy działa drażniąco na drogi oddechowe i oczy.

Kwas p-kumarynowy – kwas 3-(4-hydroksyfenylo)-prop-2E-enowy; białe, krystaliczne ciało stałe, słabo rozpuszczalne w wodzie (1,8 g/100 ml w 25°C), bardzo słaby kwas organiczny. Kwas p-kumarynowy występuje powszechnie w licznych produktach pochodzenia roślinnego (pomidory, marchew, czosnek). Uważa się, że ma działanie przeciwnowotworowe. W laboratoriach jest często używany jako wzmacniacz chemiluminescencji w mieszaninie ECL. Efekt wzmocnienia polega na zwiększeniu liczby obrotów enzymu peroksydazy chrzanowej (patrz: luminol). Kwas p-kumarynowy jest substancją działającą drażniąco na oczy, skórę i drogi oddechowe.

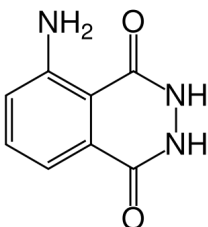


Kwas octowy – słaby ($pK_a = 4,75$) kwas karboksylowy, bezbarwna ciecz o ostrym, kwaśnym zapachu, silnie higroskopijna, mieszająca się z wodą w każdym stosunku; zamarza poniżej 16°C tworząc bezbarwne kryształy (lodowaty kwas octowy). Stosowany w przemyśle jako rozpuszczalnik, do produkcji polimerów (octan poliwinylu) i rozpuszczalników (estry kwasu octowego); jest także wykorzystywany w przemyśle spożywczym jako ocet. W biologii molekularnej kwas octowy jest często składnikiem roztworów do utrwalania i suszenia żeli poliakrylamidowych. Przy stężeniach powyżej 25% (w/w) kwas octowy jest żrący, podobnie jak jego opary.



Kwas solny - HCl_{aq} , wodny roztwór chlorowodoru; bardzo mocny kwas nieorganiczny ($pK_a = -7$), dostępny handlowo w postaci stężonej (36% w/w; $d = 1,18 \text{ g/ml}$). W przemyśle kwas solny jest używany do czyszczenia powierzchni metali oraz jako substrat do syntezy licznych związków organicznych i nieorganicznych. W laboratoriach kwas solny jest stosowany do sporządzania roztworów buforujących (np. bufor Tris-HCl), regeneracji kationitów oraz do ekstrakcji związków o charakterze zasadowym (np. białek histonowych). Kwas solny jest substancją drażniącą (przy stężeniu $< 25\%$) lub żrącą (przy stężeniu $> 25\%$). Opary stężonego kwasu solnego (gazowy chlorowódor) są żrące i toksyczne.

Luminol – 3-aminoftalhydrazid, żółte, krystaliczne ciało stałe, nierozpuszczalne w wodzie, rozpuszczalne w wodnym roztworze NaOH (20g/100ml) i DMSO, wrażliwe na działanie powietrza. W środowisku zasadowym, w obecności silnych utleniaczy (np. H_2O_2 lub tlenu atmosferycznego) luminol ulega utlenieniu do 3-aminoftalanu. Reakcji tej towarzyszy silne zjawisko chemiluminescencji. Reakcja utleniania luminolu przez nadtlenek wodoru jest katalizowana przez kationy żelaza lub enzym peroksydazę. Luminol jest powszechnie wykorzystywany do odnajdywania śladowych ilości krwi na miejscach zbrodni. W biologii molekularnej luminol stanowi składnik mieszaniny ECL (enhanced chemiluminescence) używanej do uwidaczniania aktywności peroksydazy chruzanowej (HRP), powszechnie sprzężanej z przeciwciałami drugorzędowymi stosowanymi



w analizie Western-blot. Enzymatyczna reakcja utleniania luminolu przez peroksydazę jest trój etapowa:

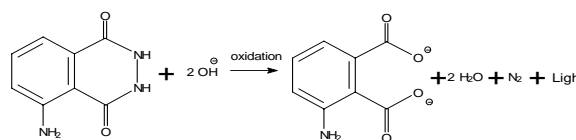


HRP0 – zredukowana, „wolna” forma HRP;

HRP1 i HRP2 – utlenione formy HRP;

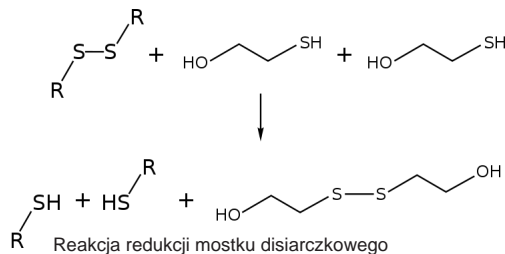
LH- – deprotonowany luminol;

L $^{\bullet-}$ – produkt jednoelektronowego utleniania luminolu



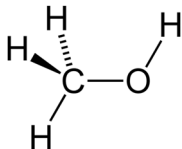
Ostatni etap (regeneracja wolnego enzymu) jest etapem limitującym szybkość reakcji. Dlatego powszechnym stało się dodawanie do reakcji tzw. wzmacniaczy (np. kwas p-kumarynowy), czyli substancji reagujących z HRP2 szybciej niż LH-. Pozwala to na szybką regenerację wolnego HRP i w praktyce zwiększenie liczby obrotów enzymu. Luminol jest także używany do ilościowego oznaczenia stężenia DNA oraz jako inhibitor syntazy poliADP-rybozy. Luminol jest substancją działającą drażniąco na skórę, oczy i drogi oddechowe, a także potencjalnym karcynogenem.

2-merkaptoetanol – 2-hydroksy-1-etanol; znany potocznie jako β -merkaptoetanol; bezbarwna ciecz o gęstości $d = 1,11 \text{ g/ml}$, lotna, o odrażającym zapachu. 2-merkaptoetanol jest wykorzystywany w biologii jako przeciwutleniacz, a także do redukcji wiązań disiarczkowych w białkach. 2-merkaptoetanol jest substancją toksyczną, działa drażniąco na układ oddechowy, skórę i oczy.

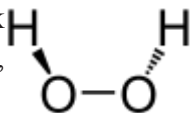


Metanol – alkohol, bezbarwna ciecz o słodkawym zapachu, mieszająca się z wodą w każdym stosunku. Metanol jest powszechnie wykorzystywany w przemyśle chemicznym jako prekursor formaldehydu, a także do produkcji tworzyw sztucznych, farb, tekstyliów itp. Może

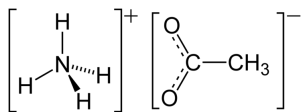
być także stosowany jako paliwo. W laboratoriach jest używany jako rozpuszczalnik. W biologii molekularnej metanol jest składnikiem roztworów do utrwalania, barwienia, odbarwiania i suszenia żeli poliakrylamidowych. Metanol jest wysoce łatwopalny oraz toksyczny, dawka śmiertelna dla człowieka wynosi 100 – 125 ml.



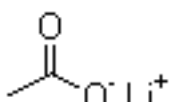
Nadtlenek wodoru – delikatnie jasnoniebieska ciecz, mieszająca się z wodą bez ograniczeń. Nadtlenek wodoru jest powszechnie wykorzystywany jako wybielacz. Jest także używany w przemyśle chemicznym jako substrat do syntezy nadtlenków organicznych i epoksydów. Nadtlenek wodoru wchodzi w skład niektórych paliw raketowych. Silne właściwości bakteriobójcze nadtlenku wodoru sprawiają, że jest używany jako środek antyseptyczny. W biologii molekularnej nadtlenek wodoru, wraz z luminolem i kwasem p-kumarynowym, jest składnikiem mieszaniny ECL używanej do detekcji aktywności peroksydazy chrzanowej (HRP). Nadtlenek wodoru jest silnym utleniaczem, substancją żrącą oraz szkodliwą.



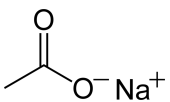
Octan amonu – $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; białe lub bezbarwne krystaliczne ciało stałe, bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie (148 g/100 ml w 4°C), higroskopijne. Octan sodu bywa wykorzystywany jako dodatek do soli zapobiegających zamarzaniu dróg. Jest także używany jako konserwant żywności (E264). W biologii molekularnej octan amonu jest wykorzystywany do precipitacji białek. Octan amonu działa drażniąco na skórę, oczy i drogi oddechowe.



Octan litu – CH_3COOLi ; białe, krystaliczne (lub sproszkowane) ciało stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie (40,8 g/100 ml w 20°C). W laboratoriach może być stosowany do sporządzania buforów do elektroforezy w żelu agarozowym. Jest również używany jako źródło kationów litu podczas transformacji drożdży. Działa drażniąco na oczy i skórę.

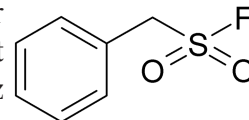


Octan sodu – białe, pyłące się ciało stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie (76 g/100 ml). Octan sodu jest używany w przemyśle tekstylnym i wulkanizacyjnym. Jest także dodawany do produktów spożywczych jako konserwant (E262). W laboratorium jest używany jako

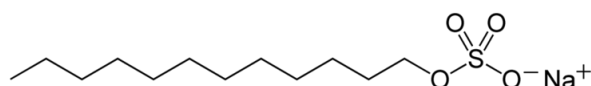


składnik roztworów buforujących (np. bufor octanowy $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$). W biologii molekularnej jest używany do wytrącania DNA i RNA z roztworów wodnych. Octan sodu może wywoływać podrażnienia skóry i oczu.

PMSF – fluorek fenylometano-sulfonylu; zwany potocznie fluorkiem fenylometylo-sulfonylu; bezbarwne, krystaliczne ciało stałe, roboczo stosowane jako roztwór etanolowy. PMSF jest inhibitorem większości proteaz serynowych. Inhibicja polega na trwałej sulfonylacji grupy hydroksylowej seryny w miejscu aktywnym enzymu. Z uwagi na specyficzne otoczenie chemiczne tej grupy funkcyjnej tylko ta seryna ulega modyfikacji. Łańcuchy boczne pozostałych seryn pozostają nie zmienione. PMSF ulega bardzo łatwo hydrolizie, w związku z czym musi być dodawany do roztworów wodnych bezpośrednio przed ich użyciem. PMSF jest związkiem silnie cytotoksycznym i wywołującym poparzenia.



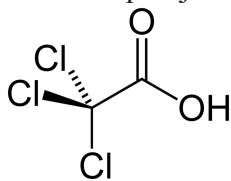
SDS – dodecylosiarczan (VI) sodu, znany również jako laurylosiarczan sodu (SLS); białe, łatwo pyłące się ciało stałe, higroskopijne, względnie łatwo rozpuszczalne w wodzie (15 g/100 ml). SDS jest anionowym surfaktantem o amfifilowych właściwościach (reszta dodecylova posiada charakter hydrofobowy, reszta siarczanowa – hydrofilowy). SDS jest powszechnie wykorzystywany jako składnik substancji odtłuszczających i detergentów. Jest



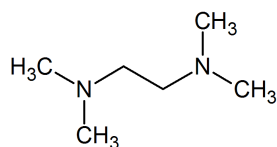
także stosowany w przemyśle kosmetycznym jako komponent szamponów, pianek do golenia i past do zębów (może wywoływać afty!). W biologii molekularnej stosowany jest do solubilizacji białek oraz jest podstawą techniki elektroforetycznego rozdzielania białek zwanej SDS-PAGE. SDS posiada zdolność łączenia się z cząsteczkami białek (~1 cząsteczka SDS na dwie reszty aminokwasowe), denaturując je do struktury I-rzędowej oraz nadając im sumaryczny ładunek ujemny. SDS jest substancją szkodliwą i łatwopalną, działa drażniąco na skórę, oczy i drogi oddechowe. Podczas pracy ze stałym SDS należy zachować szczególną ostrożność z uwagi na łatwe rozpylanie się w powietrzu (należy używać masek ochronnych).

Siarczan (VI) magnezu – $MgSO_4$; białe, krystaliczne ciało stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie (25,5 g/100 ml w 20°C); bezwodny siarczan magnezu jest silnie higroskopijny. Siarczan magnezu jest stosowany jako składnik nawozów sztucznych oraz jako substancja zmiękczająca skórę w solach do kąpieli. Bezwodny siarczan magnezu jest używany jako środek suszący. W biologii molekularnej siarczan magnezu jest używany jako źródło kationów magnezu, będących kofaktorami dla wielu powszechnie stosowanych enzymów, takich jak polimeraza DNA czy enzymy restrykcyjne. Siarczan magnezu może działać drażniaco na drogi oddechowe i oczy; należy unikać kontaktu stałego siarczanu magnezu ze skórą.

TCA – kwas trichlorooctowy; białe, grubokrystaliczne ciało stałe, doskonale rozpuszczalne w wodzie (1 kg/100 ml w 25°C), mocny kwas organiczny ($pK_a = 0,77$). TCA jest wykorzystywany w biologii molekularnej do wytrącania makromolekuł (białka, DNA, RNA). Zdolność TCA do wtrącania białek silnie zależy od jego stężenia. Przy niskich stężeniach (<5% w/v) większość białka pozostaje w supernatancie, dopiero użycie TCA w stężeniu 5-40% (zależnie od wytrącanego białka) powoduje przejście większości białka do osadu. Zastosowanie jeszcze wyższych stężeń powoduje ponowne przejście białek do roztworu. TCA jest substancją żrącą i szkodliwą dla środowiska. Stężony TCA szybko przenika przez rękawiczki lateksowe.

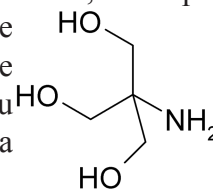


TEMED – N,N,N',N' -tetrametyloetano-1,2-diamina; bezbarwna ciecz, o odrażającym „rybnym” zapachu, mieszająca się bez ograniczeń z wodą; trzeciorzędowa amina, słaba zasada; posiada zdolność kompleksowania kationów metali jako ligand dwukleszczowy. TEMED jest używany jako katalizator polimeryzacji żeli poliakrylamidowych. Obecność TEMED w żelu wpływa na tempo migracji białek podczas elektroforezy; wzrost stężenia TEMED (> 0,2% v/v) powoduje spowolnienie tempa migracji. TEMED jest substancją łatwopalną i żrącą. Działa drażniaco na skórę i oczy.

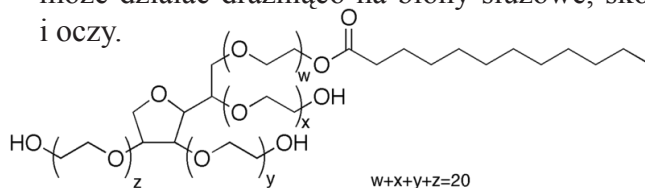


Tris – tris(hydroksymetylo)aminometan, 2-amino-2-hydroksymetylopropano-1,3-diol; amina pierwszorzędowa; białe, drobnokrystaliczne ciało stałe, dobrze

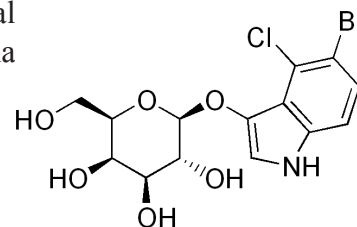
rozpuszczalne w wodzie (50 g/100 ml w 25°C), słaba zasada (pK_a sprzężonego kwasu wynosi 8,06). Tris jest używany w medycynie do leczenia kwasicy metabolicznej. W laboratoriach tris jest powszechnie stosowany do sporządzania roztworów buforujących, np. Tris-HCl, TBE. pH buforów bazujących na Tris silnie zależy od temperatury, wraz ze wzrostem temperatury pH buforu maleje. Tris działa drażniaco na oczy, skórę i układ oddechowy.



Tween-20 – laurynian polioxyetyleno(20)sorbitanu; przezroczysta, żółtawozielona, lepka ciecz, rozpuszczalna w wodzie (10 mg/100 ml); niejonowy surfaktant polisorbitanowy. Komercyjnie dostępny Tween-20 jest w rzeczywistości mieszaniną licznych laurynianów polioxyetylenosorbitanu, różniących się liczbą reszt oksyetylenowych. Używany jako detergent i emulgator. W biologii molekularnej Tween-20 jest stosowany do solubilizacji białek, lizy komórek ssaczy, a także jako składnik roztworów uspecyfikujących oddziaływania cząsteczek (np. buforu do płukania membran w technice Western-blot). Tween-20 może działać drażniaco na błony śluzowe, skórę i oczy.



X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd; bezbarwne ciało stałe, słabo rozpuszczalne w DMSO (2 g/100 ml), w wodzie ulegające powolnej hydrolizie. X-gal jest analogiem laktozy i substratem w reakcji enzymatycznej hydrolizy, katalizowanej przez β -galaktozydazę. Produkt hydrolizy X-gal (**1**) (5-bromo-4-chloro-3-hydroksyindol) ulega pod wpływem tlenu utlenieniu do niebieskiego, nierozpuszczalnego w wodzie związku (**2**) (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-1H,1H'-(2,2')biindolilideno-3,3'-dion). X-gal jest powszechnie wykorzystywany w reakcjach na oznaczanie aktywności β -galaktozydazy, np. podczas przeszukiwania kolonii bakteryjnych niosących rekombinowany plazmid czy analizy aktywności β -galaktozydazy użytej jako gen reporterowy. X-gal jest wrażliwy na światło i wilgoć.



Zasady prowadzenia zeszytu laboratoryjnego

- Prawidłowo prowadzony zeszyt pozwala na odtworzenie wykonanych doświadczeń innej osobie.
- Każdy wpis do zeszytu opatrzony jest datą.
- Wpisywać do zeszytu wszystkie przeprowadzone czynności. Jeżeli procedura jest opisana można podać gdzie (np. izolację przeprowadzono wg. przepisu ze skryptu do BMR 2006, str. 5). W takim wypadku nie trzeba przepisywać procedury.
- Zapisywać wszystkie zmiany wprowadzone do procedur.
- W zeszycie zamieszczamy wnioski z uzyskanych wyników i ich interpretację.
- Jeśli pomyliliśmy się w trakcie wykonywania doświadczenia, należy zapisać to w zeszycie.
- Zeszyt laboratoryjny jest dokumentem. Dobrze prowadzony zeszyt stanowi dowód wykonania doświadczeń i potwierdza prawidłowość uzyskanych wyników.
- Wysyłając pracę do publikacji w czasopiśmie naukowym, akceptujemy prawo redakcji do wglądu do naszych zeszytów laboratoryjnych w celu potwierdzenia poprawności uzyskanych przez nas wyników.

Literatura

1. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705
2. Li B., Carey M., Workman J.L. The Role of Chromatin during Transcription, *Cell* 2007, 128, 707–719
3. Ausio J. “Are linker histones (histone H1) dispensable for survival?” *Bioessays*. 2000 Oct; 22(10):873-7.
4. Khorasanizadeh S. “The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation” *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):259-72.
5. Wierzbicki A.T. Jerzmanowski A. “Suppression of histone H1 genes in *Arabidopsis* results in heritable developmental defects and stochastic changes in DNA methylation” *Genetics*. 2005 Feb;169(2):997-1008. Epub 2004 Oct 16.
6. Synteza jednoniciowego cDNA <http://www.fermentas.com/profiles/kits/pdf/firststrand1611.pdf>
7. Miller J.H. “Experiments in Molecular Genetics” CSH-Laboratory, 1972.
8. “Inżynieria Genetyczna i Biologia Molekularna. Metody” Podręcznik laboratoryjny Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa 1995.
9. Dz-Chi Chen, Bei-Chang Yang, Tsong-Teh Kuto “One-step transformation of yeast in stationary phase” *Curr. Genet.* **21** 83-84,1992.
10. Sarnowski T.J., Rios G., Jasik J., Swiezewski S., Kaczanowski S, Li Y., Kwiatkowska A., Pawlikowska K., Kozbial M., Kozbial P., Koncz C., Jerzmanowski A. “SWI3 subunits of putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes play distinct roles during *Arabidopsis* development.” *Plant Cell*. 2005 Sep;17(9):2454-72. Epub 2005 Jul 29.
11. Sarnowski T.J., Swiezewski S., Pawlikowska K., Kaczanowski S., Jerzmanowski A. “AtSWI3B, an *Arabidopsis* homolog of SWI3, a core subunit of yeast Swi/Snf chromatin remodeling complex, interacts with FCA, a regulator of flowering time.” *Nucleic Acids Res.* 2002 Aug 1;30(15):3412-21.

