



Zakład Biologii Molekularnej Roślin
Uniwersytet Warszawski
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

BIOLOGIA MOLEKULARNA ROŚLIN

Skrypt do ćwiczeń



Warszawa, 2009

Spis Treści

1. Analiza zmian na poziomie chromatyny w cyklu komórkowym	3
Chromatyna.....	3
Cykl komórkowy.....	3
Fosforylacja histonu H3.....	4
Elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych.....	4
Elektroforeza w warunkach natywnych.....	6
SDS-PAGE.....	6
Żele mocznikowe.....	7
Ogniskowanie izoelektryczne (IEF).....	8
Elektroforeza dwukierunkowa 2DE.....	8
Barwienie białek po elektroforezie.....	8
Coomassie Brilliant Blue.....	9
Barwienie srebrem.....	9
Znaczники fluorescencyjne.....	9
Imunodetekcja białek - Western Blot.....	9
Transfer mokry.....	9
Transfer pół-suchy.....	10
Blokowanie membran.....	10
Wiązanie przeciwciał.....	10
Detekcja.....	10
Dzień 1. Izolacja białek z materiału roślinnego (ok. 3 h).....	11
Dzień 2, 3. Elektroforeza SDS-PAGE (ok. 3 h), barwienie (przez noc).....	12
Przygotowanie żelu do SDS PAGE.....	12
Przygotowanie próbek do naniesienia na żel.....	14
Elektroforeza.....	14
Barwienie białek w żelu.....	14
Dzień 4. Western blot.....	15
Dzień 5. Detekcja metodą ECL.....	16
2. Analiza mutanta <i>A. thaliana</i> z insercją w genie kodującym H1-1 i transgen amiRNA	17
Izolacja DNA.....	17
Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR.....	17
Genotypowanie roślin.....	18
Sztuczne mikroRNA.....	19
Izolacja RNA.....	20
RT-PCR.....	20
Matrycowy RNA.....	21
Odwrotna transkrypcja.....	21
Półilościowy RT-PCR.....	22
Dzień 3. Synteza jednoniciowego cDNA.....	25
Dzień 4. Półilościowy multiplex PCR.....	26
Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	26
3. Badanie oddziaływań białek - drożdżowy system dwuhybrydowy	27
Zastawianie systemu dwuhybrydowego.....	27
Ograniczenia metody.....	28
AtSWI3B.....	29
FCA.....	29
Test dwuhybrydowy.....	29
Schemat doświadczenia.....	29
Dzień 1. Izolacja DNA plazmidowego z bakterii.....	30
Dzień 1. Izolacja DNA plazmidowego na małą skalę (minilizaty).....	30
Dzień 2. Transformacja drożdży.....	31
Dzień 1. Test dwuhybrydowy.....	32
4. Wybrane Substancje chemiczne stosowane podczas ćwiczeń	34
Zasady prowadzenia zeszytu laboratoryjnego	41
Literatura	41

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 zmian na poziomie chromatyny w cyklu komórkowym

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

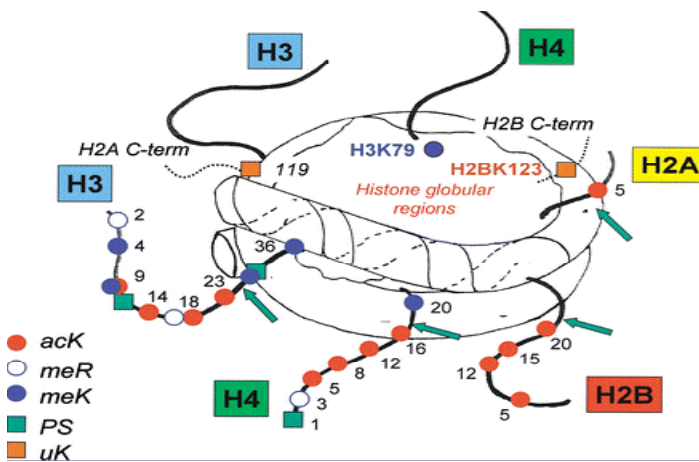
W przeciwieństwie do organizmów prokariotycznych, DNA u eukaryota nie jest „nagie”, ale występuje w postaci kompleksu z białkami chromatynowymi, warunkującego organizację strukturalną DNA w przestrzeni. Dynamika tego kompleksu warunkuje zachodzenie tak ważnych procesów, jak kondensacja chromosomów, czy regulacja transkrypcji genów. Podstawową jednostkę strukturalną chromatyny stanowi nukleosom, będący kompleksem DNA i pięciu zasadowych białek histonowych. W skład pojedynczego nukleosomu wchodzi dyskowatego kształtu oktamer histonów (tzw. rdzeń) H2A, H2B, H3, H4, fragment cząsteczki DNA nawiniętej na rdzeń nukleosomu, oraz stabilizujący oddziaływania rdzeń – DNA histon łącznikowy H1. Za wiązanie

odpowiedzialne za zachodzenie konkretnych procesów w komórce. Modyfikacje te mogą bowiem z jednej strony wpływać na oddziaływania DNA–histony, decydując o lokalnym (lub jak w przypadku mitozy – globalnym) rozluźnieniu lub kondensacji chromatyny. Stopień upakowania chromatyny wpływa np. na możliwość wiązania czynników transkrypcyjnych do znajdujących się w tych obszarach promotorów. Z drugiej strony, naznaczone modyfikacjami epitopy histonów mogą stanowić platformy rozpoznawane przez różne białka regulatorowe. Niektóre modyfikacje histonów mogą brać udział w wielu, często różnych, procesach. Np. fosforylacja seryny 10 histonu H3 bierze udział zarówno w kondensacji chromatyny w czasie podziałów komórkowych, jak i w indukcji genów wczesnej odpowiedzi pod wpływem różnych czynników zewnętrznych - z czym wiąże się lokalne rozluźnienie chromatyny.

Cykl komórkowy

Podział mitotyczny jest poprzedzony replikacją chromosomów. Podczas mitozy ma miejsce rozdzielanie się chromosomów na dwie równe grupy, po czym następuje podział komórki. Mitoza dzieli się na szereg etapów charakteryzujących lokalizację i zachowanie chromosomów. Przejście komórki do kolejnego etapu jest zwykle nieodwracalne. Chromosomy rozdzielane są przez wrzeciono mitotyczne. Jest ono symetryczną, bipolarną strukturą zbudowaną z mikrotubul rozciągających się pomiędzy dwoma biegunami, w których znajdują się centrosomy oraz białka motoryczne zależne od mikrotubul. Centrosom definiuje bieguny wrzeciona i odgrywa ważną rolę w samym jego tworzeniu.

Utworzenie nowego centrosomu wymaga duplikacji centrioli, która kontrolowana jest przez cykl komórkowy i jest skoordynowana z replikacją DNA. Oddziaływania pomiędzy centrosomami inicjują tworzenie wrzeciona mitotycznego. Chromosomy przyczepiają się do wrzeciona za pomocą oddziaływania ich kinetochorów z mikrotubulami. Oddzielenie się centrosomów zależy od białek motorycznych. Niemożliwe jest uformowanie się wrzeciona pod nieobecność chromosomów, które stabilizują geometrycznie wrzeciono i mikrotubule poprzez wiązanie astralnych mikrotubul przy ich kinetochorach. Chromosomy przylegają do wrzeciona na kinetochorach, gdzie oddziałują z mikrotubulami. Miejsce, w którym tworzą się kinetochory to centromer. Ponadto stwierdzono występowanie



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

histonów w oktamerze, jak też za tworzenie miejsc dla wiązania DNA, odpowiedzialne są domeny globularne histonów rdzeniowych o regularnie rozmieszczonych ładunkach. N i C końce (tzn. „ogony histonowe”), mogą natomiast ulegać wielu odwracalnym modyfikacjom posttranslacyjnym (Rys.1). W 2000 roku wysunięto hipotezę „kodu histonowego”, która sugeruje, że istnieją pewne określone wzory modyfikacji histonów rdzeniowych

wyselekcjonowanych wariantów histonów w rejonie centromerowym. Każdy chromosom ma pojedynczy region centromerowy, w którym nie ma genów - złożony jest on z wysoce wyspecjalizowanych, powtórzonych sekwencji DNA wiążących unikalny zestaw białek. Kinetochor zmienia strukturę na początku mitozy formując płaską blaszkę na powierzchni centromeru. Kinetochory i mikrotubule łączą się dzięki dynamicznej niestabilności samych mikrotubul. Zdolność kinetochorów do stabilizacji związanych mikrotubul ma kluczowe znaczenie dla tworzenia włókien kinetochorowych. Kinetochory kontrolują przejście metafaza/anafaza. W anafazie ma miejsce rozdzielenie chromatyd siostrzanych. Podczas telofazy następuje wyjście komórki z mitozy.

Fosforylacja histonu H3

Zależna od cyklu komórkowego fosforylacja histonu H3 w serynie 10 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 w dużej mierze 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 S10 histonu H3 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 natomiast, 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.

Kultury zawiesinowe komórek roślinnych stanowią homogenną 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 zawiesinie. Brak lub niewielka zawartość chlorofilu i innych barwników ułatwia doświadczenia. Stosując różnego rodzaju inhibitory można synchronizować zawiesiny komórkowe, czyli doprowadzić do stanu, w którym wszystkie komórki w zawiesinie 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 rozdziału, 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 rozdziału, 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 rozdzielaniu 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-merkaptoetanol 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 wskazywałyby 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 większość 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 Leammi'ego), w którym pH żelu zateżającego wynosi 6,6, zaś żelu rozdzielającego 8,8. Jonami zaangażowanymi w zagęszczanie analizowanych białek w żelu zateżającym są aniony chlorkowe i glicynianowe. pH żelu zateżającego jest nieznacznie wyższe niż pI glicyny. W tych warunkach większość glicyny występuje w postaci jonów obojnaczych, 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 zateżającym 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.

Wadą układu Leammi'ego jest to, że zasadowe pH żelu rozdzielającego promuje tworzenie się mostków disiarczkowych, zaś czynniki redukujące, takie jak 2-merkaptoetanol lub DTT nie migrują wraz z białkami. Można temu zapobiec stosując inne układy buforujące, na przykład bufory bazujące na bis-tris o pH=6,5, a także używając środków, których aniony o redukujących właściwościach migrują wraz z białkami (np. disiarczek sodu).

Żele mocznikowe

Podobnie jak SDS-PAGE, elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych w obecności mocznika (Urea-PAGE) jest techniką denaturująca białka. Podobnie jak SDS, mocznik niszczy strukturę białkową 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 rozdzielania 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 rozdział 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, rozdział elektroforetyczny 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 acetylacja 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 rozdziałowi po

zateżeniu). Podczas rozdziału w układzie ciągłym, przed właściwą elektroforezą przeprowadza się tzw. pre-elektroforezę, czyli przykładą się napięcie do „pustego” żelu w celu usunięcia z niego kationów amonowych, które powodowałyby zateżenie 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 zateżanie 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 rozdział w żelu poliakrylamidowym, w którym utworzono gradient pH między katoda a anoda, 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, amfolity, mocznik i detergenty. Przy elektroforezie w immobilizowanych gradientach pH stosuje

się bufony o jak najmniejszym stężeniu soli, co pozwala na zastosowanie wysokiego napięcia przy rozdziale 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 niespecyficjnie 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 czy 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.

Znaczники 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 Coomassie. 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 wyznakowanie różnych próbek białkowych fluorochromami o różnej barwie emitowanego światła. Próbkki 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 rozdzielenie 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

przewodzenia 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 zanurzenia 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 odpłukać 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 niespecyficznemu adsorpcji przeciwciał. Do blokowania membran najczęściej używa się odfuszczonego 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 nadtlenku 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 dzielących się i komórkach zatrzymanych w fazie G_0 cyklu komórkowego.

Przejście zawiesiny do G_0 uzyskuje się w przypadku komórek TBY-2 przez 30-krotne obniżenie zawartości sacharozy w pożywce.






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

Metody stosowane przy izolacji i oczyszczaniu 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% sacharozą)
- ciekły azot
- lód
- probówki wirówkowe na 30 ml lub falkony 50 ml
- duża wirówka z chłodzeniem
- kołyska laboratoryjna
- moździerz i tłuczki
- homogenizator IKA
- 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)
- β -mercaptoethanol (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 β -mercaptoethanol* 
 - 0,2 mM PMSF 
 -  (Phenylmethanesulfonyl fluoride)*
- * 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 jest uszkodzenie komórek w celu uwolnienia białek. Następnie białka wytrącane są kwasem trójchlorooctowym (TCA). TCA jest usuwany poprzez płukanie acetonem.

Wykonanie

1. ok. 0,1 – 1g materiału roślinnego zamrozić w ciekłym azocie i utrzeć w moździerz porcelanowym na proszek (zarówno moździerz jak i tłuczek należy wcześniej schłodzić poprzez zalanie ciekłym azotem; ucieranie komórek z zawiesiny będzie łatwiejsze, jeżeli przed odwinieciem foli „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 β -mercaptoethanol 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. próbki zrównoważyć i wirować przez 15 min. przy 12 000 g (~10 500 rpm wirówka preparatywna Eppendorf) w plastikowych probówkach 30 ml.
 5. supernatant przelać do falkonu na 50 ml przez warstwę miracloth lub wielokrotnie złożoną gazę
 6. dodać 100% TCA (kwas trójchlorooctowy) do końcowego stężenia 20 – 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 kołyszce laboratoryjnej
 8. po zrównoważeniu prób zwirować przez 30 - 40 minut przy 16 000 g (~13 000 rpm wirówka preparatywna Eppendorf) w szklanych 30ml probówkach Corex (**należy pamiętać o założeniu gumowych adaptorów na próbówki**).
 9. wylać supernatant, zaznaczyć położenie osadu, markerem, na próbówce
 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, probówki z wysuszonym osadem można przechowywać w -20°C.

12. zawiesić w 300 μ l 1x SDS loading buffer (uwaga: przygotowany bufor jest 5x stężony), przenieść do 1,5 ml probówek typu eppendorf i dodać po 15 μ l 1M DTT (dithiothreitol)
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 płytką
- porcelanowa płytką
- *caster clamp*
- *caster*
- 2 czarne śruby
- 2 czerwone klipsy
- grzebień o grubości 1 mm
- kalka ze wzorem studzienek
- bibuła filtracyjna
- aparat do elektroforezy
- zasilacz

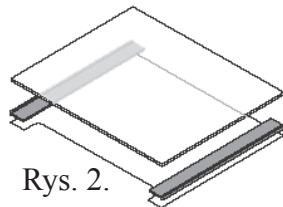
Odczynniki:

- 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 (ammonium persulfate)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) 
- butanol nasycony wodą
- bufor SDS-PAGE (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0.1% SDS pH 8.3)

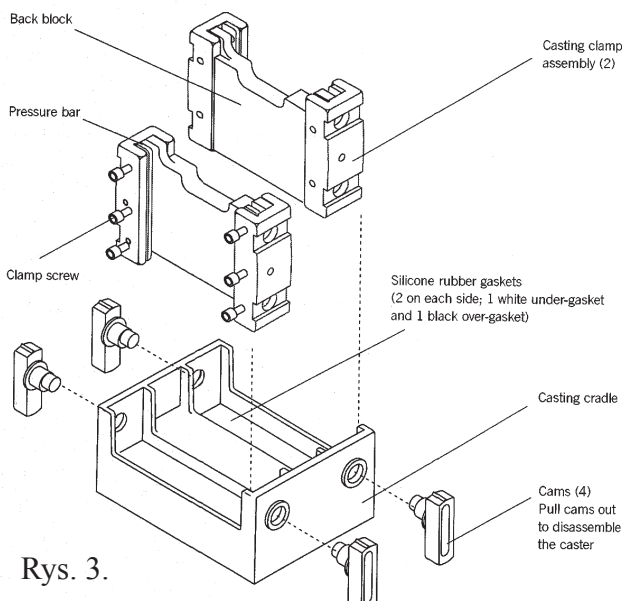
- roztwór utrwalający (7% kwas octowy, 40% metanol)
- roztwór barwiący: (0,025% Coomassie Brilliant Blue G-250 w 10% kwasie octowym)
- roztwór odbarwiający (10% kwas octowy, 25% metanol)
- komercyjny ekstrakt histonów rdzeniowych
- Standard (marker) wielkości białek

Wykonanie

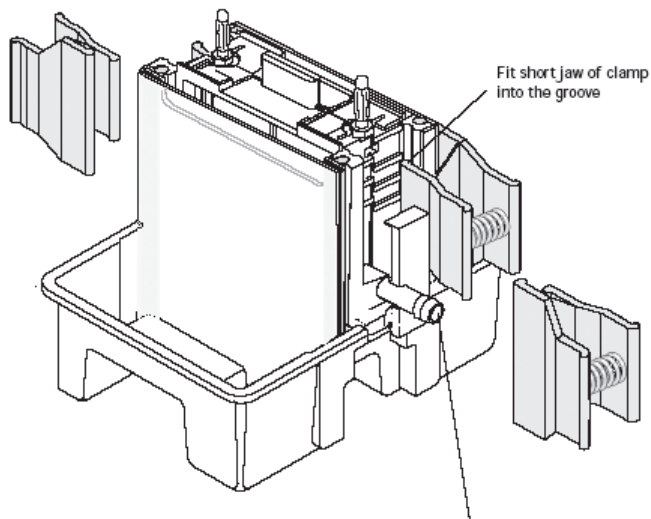
1. Przetrzyj szklane szybki i ceramiczne płytki metanolem lub acetonem.
2. Włóż po bokach - pomiędzy szybką a płytkę przekładki (rys.2) i umieść w statywie (*casting clamp* - rys.3). Wcześniej upewnij się, że na statywie nie zostały resztki zaschniętego akrylamidu.
3. Dokręć śruby aż poczujesz lekki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



Rys. 2.



Rys. 3.



Rys. 4.

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

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 (ammonium persulfate)
 - 7,5 µl TEMED (N,N,N',N'Tetramethylethylenedi amine) ☠
 - 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 (ok.2-3 mm) nasyconego wodą butanolu i pozostaw do polimeryzacji na co najmniej 30 min.
 8. Delikatnie usuń bibułą butanol i osusz 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 ok. 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 (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. Krótco zwirować w mikrowirówce

15. Nanieść próbki na żel za pomocą wydłużonych tipsów i rozpocząć elektroforezę

Elektroforeza

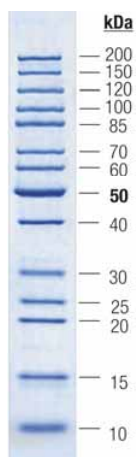
Natężenie i napięcie, przy których prowadzona jest elektroforeza, są zależne od grubości, szerokości i długości żelu oraz naszych oczekiwań co do jakości i czasu rozdziału białek.

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 Hoeffer 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

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



ich migracja w żelu SDS jest zaburzona - tzn. położenie prążków nie odzwierciedla prawdziwej wielkości białek.

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 agarozowa służąca do rozdziału preparatów DNA.

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

Przed przejściem do kolejnych etapów doświadczenia, ilość białek we wszystkich analizowanych próbach powinna być taka wystandaryzowana (wyrównana).

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 1:50 000 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) ☠
- woda destylowana

Przygotowanie membran do transferu.

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

Wykonanie:

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

2. 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

3. 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.
4. Nałożyć pokrywy 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!
5. 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.
6. Dodać przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczone 1:2500 w 10ml TBST z 5% mlekiem i pozostawić przez noc na kołysce w 4°C.
7. Odplukać przeciwciała roztworem TBST: 2 razy 5 min., 2 razy 15 min.
8. Dodać przeciwciała drugorzędowe (rozcieńczyć 1:5000 w TBST z mlekiem) i pozostawić na kołysce w temperaturze pokojowej na 1 godzinę.
9. Odplukać 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.

Dzien 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

1. Rozmrozić luminol i kwas kumarynowy, zostawić oba odczynniki przez ok. 5 – 10 minut w temperaturze pokojowej



2. Przygotować 10 ml roztworu (10 ml roztworu to ilość potrzebna do wywołania jednej membrany): dodać 50 μ l luminolu, 22 μ l kwasu kumarynowego, 3 μ l nadtlenu wodoru, 1 ml Tris, pH 8,0; dopełnić wodą do 10 ml

UWAGA: Nadtlenek wodoru należy dodać tuż przed użyciem

3. Przebrać 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 zagniecia – pozwoli to uniknąć nadmiernego tła)

4. 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)

5. Membranę delikatnie położyć na wyciętym fragmencie folii i przykryć od góry drugim kawałkiem folii, w razie potrzeby należy pozbyć się pęcherzyków powietrza (ale: w miarę możliwości nie dotykając przy tym membrany)

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

6. Na membranę położyć kliszę fotograficzną i zostawić na 2 minuty

7. 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. Analiza mutantu *Arabidopsis thaliana* posiadającego insercję T-DNA w genie kodującym H1-1 i transgen kodujący amiRNA skierowane do H1-3

U organizmów eukariotycznych DNA jądrowy nawinięty jest na białka histonowe tworząc kompleks zwany chromatyną. Struktura chromatyny ma duże znaczenie w regulacji procesów związanych z DNA, takich jak replikacja, rekombinacja, naprawa oraz transkrypcja. 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. U *Arabidopsis* wyróżniamy trzy izoformy histonu H1. Pozbawienie roślin jednego z wariantów poprzez insercję T-DNA w obszar kodujący genu, powoduje kompensację – wzrost poziomu ekspresji pozostałych wariantów. W dostępnych kolekcjach mutantów insercyjnych możemy znaleźć linię pozbawioną funkcjonalnego genu *h1-1_1*. Aby uzyskać rośliny z wyłączoną ekspresją pozostałych wariantów musimy posłużyć się techniką RNAi

Izolacja DNA

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

uzyskany preparat zanieczyszczony jest białkami, można potraktować go proteinazą K i przeprowadzić ekstrakcję fenolem.

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

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 dwóch przeciwstawnych kierunkach. Na nowosyntetyzowanych niciach powstają zatem nowe miejsca wiązania primerów. Po zakończeniu replikacji nici są rozdzielane (denaturacja), aby ponownie umożliwić wiązanie znajdujących się w nadmiarze primerów (tzw. annealing), syntezę DNA i kolejne rozdzielenie 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. elongacja (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. Ponieważ sekwencja ta określona jest przez primery użyte do reakcji, nie jest konieczne izolowanie samej sekwencji. Ilość DNA stosowanego do PCR jest bardzo mała (teoretycznie wystarczy jedna cząsteczka DNA). Do mieszaniny reakcyjnej, oprócz DNA, dodaje się nadmiar primerów (dwa rodzaje primerów określających miejsce startu replikacji na każdej nici), polimerazę DNA, odpowiedni bufor zawierający magnez oraz mieszaninę 4 prekursorów DNA, tj. dezoksyrybonukleotydów (dNTP). Powodzenie reakcji PCR wymaga właściwego doboru następujących parametrów:

1. starterów reakcji amplifikacji (primerów).
Projektując startery reakcji PCR, należy je dobrać tak, aby:
 - starter zawierał około 50% par GC,
 - starter był wysoko specyficzny dla danej sekwencji,
 - odległość między starterami w amplifikowanym DNA wynosiła 0.1 do 3 kb (o ile używana jest Taq polimeraza),
 - startery nie tworzyły struktur typu hairpin lub konkatamerów,
 - długość primerów wynosiła około 20 – 30 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, magnezu). Do reakcji PCR używa się polimerazy z *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,

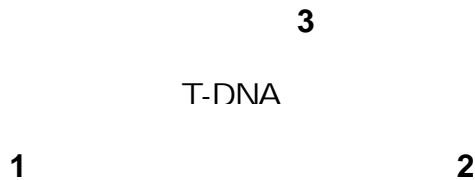
3. warunków samej reakcji PCR (temperatury, czasu trwania cykli itp). Optymalne temperatury annealingu dla starterów można dobrać wykorzystując m.in. program OLIGO. Czasy i temperatury w dużym stopniu zależą od wielkości produktów otrzymywanych w procesie amplifikacji oraz sekwencji i długości starterów.

Reakcję prowadzi się w objętości 10 – 50 µl. Probówki z PCR 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 delekcji 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 *h1-1* z kolekcji SALK, 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



Rys. 1a Schemat położenia primerów do genotypowania roślin z insercją T-DNA

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.1a jest to primer 2) daje produkt PCR odpowiadający allelowi zmutowanemu. Amplifikacja odpowiednich fragmentów DNA może być przeprowadzona w dwóch oddzielnych reakcjach PCR, bądź też w jednej reakcji z użyciem trzech primerów jednocześnie (Rys.1b). Primery do genotypowania można zaprojektować samodzielnie lub korzystając z programów dostępnych na stronach internetowych poświęconych kolekcjom mutantów insercyjnych.



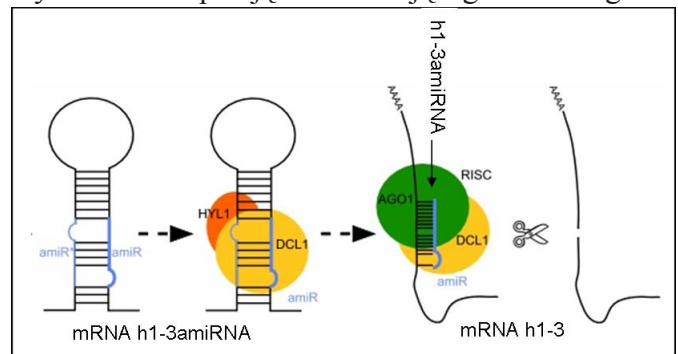
Rys. 1b Spodziewane wyniki genotypowania z użyciem trzech primerów przedstawionych na Rys.1 a, w jednej reakcji PCR.

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.

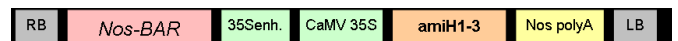
Sztuczne mikroRNA (ang. artificial micro RNA – amiRNA) to jednoniciowe 21-nukleotydowe RNA powstające z prekursora wprowadzonego do rośliny poprzez transformację. Mechanizm jego działania jest analogiczny do funkcjonowania miRNA. Jednak amiRNA normalnie nie występuje w roślinach, tylko jest projektowany tak, aby przypominał naturalne miRNA i specyficjnie wyciszał ekspresję interesującego nas genu.



Rys. 1d Schemat powstawania i działania miRNA w *A.thaliana*

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.1c).



Rys. 1c 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

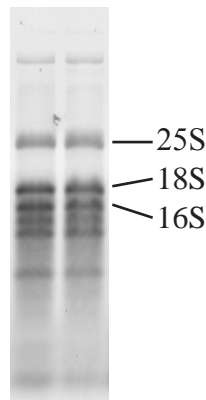
RNA jest znacznie bardziej narażony na degradację niż DNA. W materiale biologicznym oraz w środowisku zewnętrznym obecna jest duża ilość bardzo aktywnych i stabilnych rybonukleaz. Nawet po zastosowaniu wysokiej temperatury, np. 100°C, a także w obecności detergentów, np. SDS, enzymy te zachowują wysoką aktywność. Ponadto, wiele rybonukleaz nie wymaga dla swej aktywności kofaktorów, np. jonów dwuwartościowych, w związku z czym aktywności tych enzymów nie możemy zablokować stosując EDTA. Dlatego podczas izolacji RNA do inaktywacji RNaz należy stosować bardzo silne związki degradujące białka, takie jak chlorowodorek guanidyny lub izotiocjanian guanidyny. Związki te, oprócz degradacji 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 inaktywującym DEPC. Należy pamiętać, że 0,1% DEPC nie poddany inaktywacji blokuje aktywność enzymów wykorzystywanych na kolejnych etapach prac z RNA, np. odwrotnej transkryptazy. Kolejnym, często stosowanym inhibitorem RNaz, jest tzw. RNazina – 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 DNA-za wolną od RNA-az.

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 rybonukleinowych. 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. 2). 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. 2), 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. 2 Żel agarozowy całkowitego RNA z *Arabidopsis 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.

RT-PCR może być przeprowadzony wg różnych strategii:

1. jedna reakcja – jeden enzym (ang. one tube, one-step) – synteza cDNA oraz reakcja PCR odbywają się w jednym buforze z użyciem primerów specyficznych do określonej sekwencji oraz odwrotnej transkryptazy posiadającej dodatkową aktywność polimerazy DNA. W systemie tym reakcja odwrotnej transkrypcji może się odbywać w wysokiej temperaturze, co zapewnia wysoką specyficzność reakcji (eliminacja drugorzędowych struktur RNA oraz ograniczenie nieprawidłowego parowania primerów). Ograniczone jest również ryzyko zanieczyszczenia próbki. Wadą metody jest duża ilość błędów wprowadzanych przez enzym (otrzymany produkt nie nadaje się do dalszego klonowania).
2. jedna reakcja – dwa enzymy (one tube, two-step) – w pierwszym kroku przy pomocy odwrotnej transkryptazy i odpowiedniego primera (patrz pkt „odwrotna transkrypcja”) uzyskuje się cDNA. Następnie do tej samej próbki dodaje się odpowiedni bufor (pozbawiony jonów Mg_2^+), termostabilną polimerazę DNA, specyficzne primery i przeprowadza reakcję PCR. Metoda ta jest przydatna w przypadku, gdy dysponujemy małą ilością matrycy – cały uzyskany cDNA zostaje użyty w jednej reakcji PCR.
3. dwie reakcje – dwa enzymy (two tube, two-step) – syntezę cDNA przeprowadza się w optymalnych warunkach przy użyciu odpowiedniego primera (patrz pkt „odwrotna transkrypcja”). Uzyskany cDNA służy następnie jako matryca w „zwykłych” reakcjach PCR. Metoda ta umożliwi analizę wielu transkryptów

z jednego cDNA. Ponadto dzięki optymalnym warunkom odwrotnej transkrypcji i reakcji PCR, umożliwi ona amplifikację długich produktów (nawet kilkanaście tysięcy par zasad).

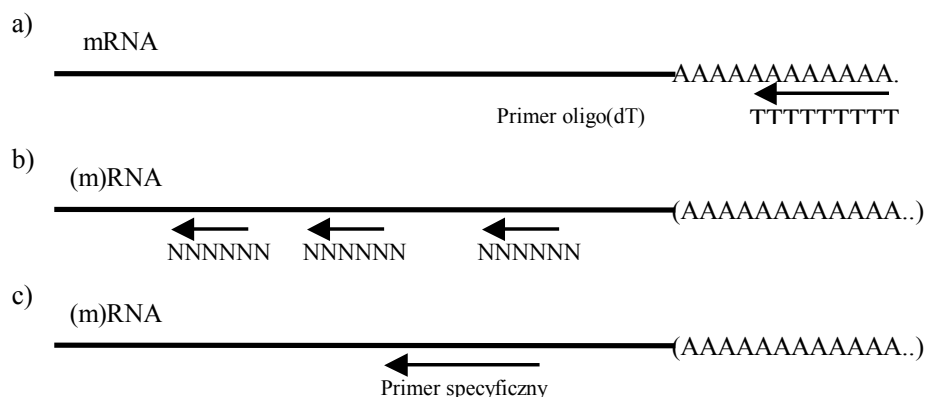
Matrycowy RNA

Jako matrycowy RNA może służyć zarówno mRNA, jak i całkowity RNA komórkowy (ten wariant zostanie użyty podczas ćwiczeń). Aby osiągnąć dobrą wydajność odwrotnej transkrypcji, wyizolowany 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. O czystości próbki wyizolowanego RNA świadczy także stosunek absorbancji przy długościach fali 260 oraz 280 nm. Dla czystego RNA A_{260}/A_{280} wynosi 2 i ulega zmniejszeniu w obecności zanieczyszczeń (fenol, białka).

Jakość (np. czy wystąpiła degradacja) oraz ilość RNA można ocenić na podstawie elektroforezy w żelu agarozowym (Rys. 2).

Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzi się najczęściej przy użyciu primera oligo(dT) (Rys. 3a), 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



Rys. 3 Schemat reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem różnych typów primerów

mRNA, analiza innych klas RNA) stosuje się przypadkowe primery heksamerowe (Rys. 3b), które dają jednakową reprezentację całego RNA komórkowego, lub też primer specyficzny do określonej sekwencji (Rys. 3c).

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 i cel doświadczenia

Do mutantów insercyjnych T-DNA *h1-1 Arabidopsis* wprowadzono transgen kodujący sztuczne microRNA do sekwencji genu H1-3 i otrzymano linie w *pierwszym pokoleniu h1-1/h1-3miR^{basta}*. oraz poziomu ekspresji poszczególnych wariantów histonu H1. Rośliny te opryskano herbicydem Basta w celu selekcji transformantów. Należy również potwierdzić ich transgeniczną genotypując rośliny pod kątem obecności genu kodującego odporność na Bastę. (NosBAR)

Celem doświadczenia jest sprawdzenie czy w mutantach *Arabidopsis thaliana h1-1/h1-3miR^{basta}* następuje wyciszenie ekspresji wariantu H1-1 i H1-3.

Etap 1. Genotypowanie metodą PCR otrzymanych roślin *h1-1/h1-3miR^{basta}* oraz *Col-0^{basta}* (jako kontrola) pod względem: a) insercji w genie H1-1 oraz b) obecności transgeny kodującego oporność na herbicyd bastę i amiRNA skierowane do H1-3.

Etap 2. Za pomocą metody RT-PCR sprawdzenie: czy mutant wyraża uszkodzony gen H1-1, czy wyciszeniu ulega ekspresja wariantu H1-3 i czy wariant H1-2 kompensuje brak pozostałych wariantów.

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

Materiały:

- liście roślin
- probówki Eppendorfa,
- końcówki do pipet (tipsy),
- tłoczki do ucierania tkanki
- ciekły azot

Odczynniki:

- bufor do ekstrakcji (200 mM Tris HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS),
- izopropanol,
- etanol 70%,
- H₂O
- odczynniki do PCR (bufor i polimeraza Pfu, startery, chlorek magnezu, dNTP)

Wykonanie:

- 100 mg tkanki utrzeć (15 – 30 sekund) w ciekłym azocie za pomocą tłoczka, na jednolitą masę
- Dodać 400 µl buforu do ekstrakcji i mieszać na vorteksie przez 5 sekund (taka mieszanina może stać 1 godzinę)
- Wirować przy 13000 obr./min. przez 5 min.
- Przenieść 300 µl supernatantu do nowej probówki. (W przypadku pobrania osadu należy ponownie zwirować próbkę i przenieść supernatant do nowej probówki)
- Zmieszać z 300 µl izopropanolu i pozostawić na 2 min. w temp. pokojowej (mieszać delikatnie)
- Wirować przy 13000 obr./min. przez 5 min.
- Supernatant wylać, osad przepłukać dodając 1 ml 70% etanolu. Następnie zwirować 1 min.
- Supernatant wylać, osad zwirować powtórnie i usunąć resztkę etanolu
- Osad wysuszyć pozostawiając otwartą probówkę na ok. 30 min. w temp. pokojowej
- Zawiesić osad w 30 µl H₂O
- Przygotować 1% żel agarozowy (patrz pkt. „elektroforeza DNA w żelu agarozowym”)
- Nanieść na 1% żel agarozowy 5 µl DNA + 0,5 µl obciążnika do DNA.

Tak otrzymane DNA można przechowywać przez rok w 4°C.

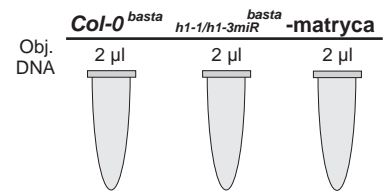
- Przygotować mix na 3 reakcje PCR w celu określenia obecności genu BAR wg schematu: (próbki przygotowywać w lodzie)

na 1 reakcję:

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

Warunki reakcji PCR:

- 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



- Po zakończeniu programu dodać 5 µl obciążnika.

- Nanieść na 1% żel agarozowy 25 µl reakcji.

- Przygotować mix na 3 reakcje PCR w celu genotypowania mutantu h1-1 według schematu pkt13: (próbki przygotowywać w lodzie)

na 1 reakcję:

Matryca DNA	2 µl
Mix primerów (G) do genotypowania LP/PR/LBb1-3	7,5 µl
Bufor Pfu (10x)	5 µl
dNTP (2,5mM)	8 µl
MgCl ₂ (25mM)	6 µl
Polimeraza Pfu	1 µl
H ₂ O milliQ	do 50 µl

Warunki reakcji PCR:

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

- Po zakończeniu programu dodać 5 µl obciążnika.

- Nanieść na 1% żel agarozowy 25 µl reakcji.





Dzień 2. Izolacja całkowitego RNA

Podczas izolacji RNA należy pamiętać o tym, że zanieczyszczenie próbki może się wiązać z wprowadzeniem RNaz (głównie z naskórka rąk), a więc z degradacją RNA i niepowodzeniem całej procedury.

Materiały:

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

Odczynniki:

- bufor do homogenizacji
 - 100 mM Tris pH 8 – 9
 - 5 mM EDTA
 - 100 mM NaCl
 - 0,5% SDS, 0,5% Sarkozyl
 - 2-mercaptoethanol 
- kwaśny fenol pH 4.0 
- mieszanina fenol/chloroform/alkohol izoamyłowy (24:24:1) pH 4.0 
- chloroform 
- H₂O milliQ (wolna od RNaz)
- 3M NaAc 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-mercaptoetanolu
2. Zebrać materiał roślinny (roślina kontrolna oraz mutant)
3. Utrzeć 150 – 200 mg tkanki w moździerzu



Pod wyciągiem (w fartuchu, okularach i rękawiczkach)



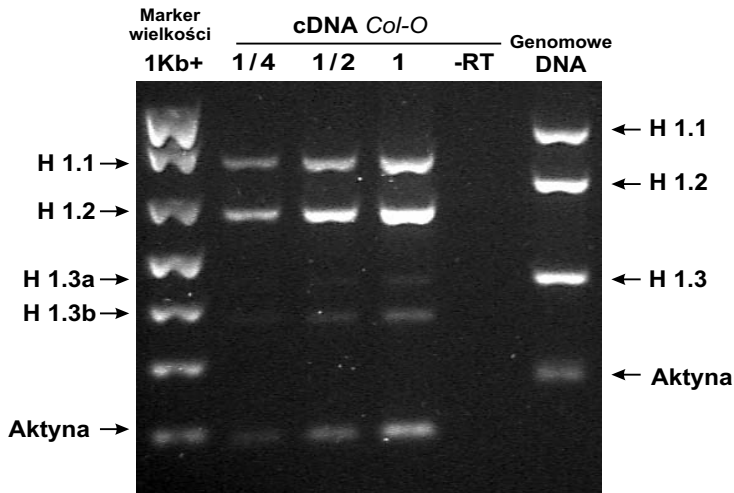
4. Utartą tkankę przenieść do eppendorfa zalać 500 µl buforu ekstrakcyjnego
5. Wyrząsać (vortex) 30 sekund
6. Dodać 250 µl kwaśnego fenolu (**uwaga substancja szkodliwa!**)
7. Wyrząsać 30-60 sekund
8. Dodać 250 µl chloroformu (**uwaga substancja szkodliwa!**)

9. Wyrząsać 30-60 sekund
10. Zwirować (w mikrowirówce pod wyciągiem) 10 min. przy 13000 rpm
11. Przenieść fazę wodną (górną warstwę ok. 500 – 600 µl) do nowego eppendorfa
12. Dodać 600 µl mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamyłowy – warstwa dolna (**uwaga substancja szkodliwa !**)
13. Wyrząsać 30 s
14. Zwirować (pod wyciągiem) 10 min. 13000 rpm
15. Przenieść warstwę wodną (górną warstwę 400 – 500 µl) do nowej próbki

Od tego etapu pracować szczególnie ostrożnie, aby zapobiec kontaminacji próbek RNazami (rękawiczki, trzymanie próbek na lodzie).

16. Dodać 50 µl 3M NaAc pH5.2 (0.1v/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.
 20. Delikatnie usunąć supernatant
 21. Wysuszyć osad 15 – 20 min. w temp. pokojowej
 22. Zawiesić w 500 µl H₂O wolnej od RNaz
 23. Dodać 500 µl 4M LiCl (końcowe stężenie 2M)
 24. Inkubować w 4°C przez noc
 25. Zwirować 30 minut, 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., bardzo delikatnie usunąć supernatant (słabo widoczny osad RNA może się odkleić).
 28. Osad zwirować powtórnie i bardzo delikatnie odciągnąć resztkę etanolu
 29. Wysuszyć osad 15 – 20 min. w temp. pokojowej
 30. Zawiesić osad w 30 µl H₂O miliQ
 31. 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.

32. Przygotować 1% żel agarozowy (patrz pkt. „przygotowanie żelu agarozowego”)
33. Zmieszać 5 μ l RNA + 5 μ l obciążnika do RNA, denaturować 10 min. w 70°C
34. Nanieść preparat na żel agarozowy i przeprowadzić elektroforezę przy napięciu 90 – 100 V, obejrzeć żel i zrobić zdjęcie (Rys. 2)



Rys. 4. Rodział elektroforetyczny produktów amplifikacji wariantów histonu H1. Histon H1.3 występuje w dwóch wariantach splicingowych (a i b).

Dzień 3. 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):
 - 1 μ g RNA z rośliny kontrolnej *Col-0^{basta}* (probówka 1)
 - 1 μ g RNA z rośliny kontrolnej *Col-0^{basta}* do reakcji -RT (probówka 2, -RT)
 - 1 μ g RNA z rośliny *h1-1/h1-3miR^{basta}* (probówka 3)
 - 1 μ g RNA z rośliny *h1-1/h1-3miR^{basta}* do reakcji -RT (probówka 4, -RT)

Ilość wymaganego do reakcji RNA uzależniona jest od ilości i jakości wyizolowanego RNA oraz poziomu ekspresji danego genu.

- 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. Dodać kolejno:
 - 5x stężony bufor reakcyjny 4 μ l
 - 10mM mix dNTP 2 μ l
 - odwrotna transkryptaza lub H₂O 1 μ l (H₂O do reakcji „- RT”)
 4. Inkubować w 42°C przez 1 h (termocykler). W tym etapie zachodzi reakcja odwrotnej transkrypcji
 5. Reakcję zatrzymać przez ogrzewanie w 70°C (termocykler) przez 10 min.

cDNA należy przechowywać w -20°C.

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

Dzień 4. Półilościowy multiplex PCR

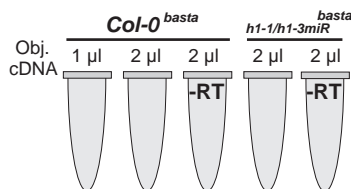
Multiplex PCR polega na amplifikacji jednocześnie kilku sekwencji w jednej reakcji PCR. Warunkiem powodzenia takiego typu reakcji jest optymalizacja jej warunków – odpowiedni dobór buforu oraz primerów, liczby cykli, jednakowej temperatury przyłączenia starterów, itd.

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 dwóch wariantów eksperymentalnych (*Col-0^{basta}* i *h1-1/h1-3miR^{basta}*):

- Przygotować mix do PCR według schematu: (próbki przygotowywać w lodzie) **na 1 reakcję:**

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



Warunki reakcji PCR:

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

Primery			
H1-1	H1-2	H1-3	Aktyna
152 h1-1F	154 h1-2F	156 h1-3F	158 aktynaF
153 h1-1R	155 h1-2R	157 h1-3R	159 aktynaR
Długość produktu (par zasad)			
783	618	380	196

- Po zakończeniu reakcji PCR do probówek należy dodać 1/10 obj. barwnika do elektroforezy.
- 20 µl próbki nałożyć na 1,2 % żel agarozowy

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Materiały

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

Wykonanie

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

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

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:

- 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. 1). 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, różnic w tolerowaniu danego białka przez komórkę drożdżową np. toksyczność białek. Ograniczenia te mogą wpływać na niedokładności w wynikach.

Schemat metody ilościowej:

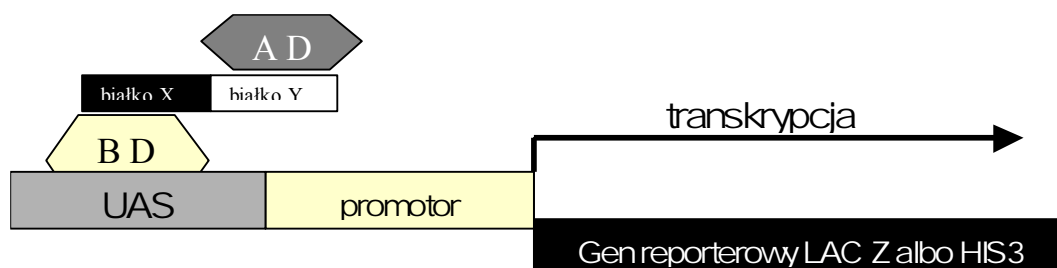
- Pomiar gęstości komórek drożdżowych (spektrofotometr)
- Pomiar ilości białka (metoda Bradford)
- Badanie aktywności β -galaktozydazy poprzez pomiar ilości barwnego produktu na płytkach wielodołkowych (czytnik spektrofotometryczny)

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, nieznanych partnerów danego białka.

W pierwszym przypadku należy skonstruować



Rys. 1 Schemat działania drożdżowego systemu dwuhybrydowego.

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 interesującym nas białkiem, eksprymowanym 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 równoległe 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 ekspresowane 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 otrzymywania 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. pull-down. 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.

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 wiążąca 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. Transformacja drożdży konstruktami:
 - 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 wyrośniętej hodowli dodaje się w tym celu chloramfenikol, który selektywnie zapobiega replikacji chromosomu bakteryjnego.

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

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

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


Następny etap oczyszczania DNA polega na oddzieleniu DNA od 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 3,5 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 probówki 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 ditiotreitolu (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 ditiotreitól (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 LiAC, 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 zaparafilować.

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-merkaptotetanolu i 167 μl X-gal z roztworu wyjściowego o stężeniu 20 mg/ml
(β-merkaptotetanol i X-gal dodać tuż przed użyciem!)



UWAGA: β-merkaptotetanol i X-gal są substancjami szkodliwymi, należy pracować w rękawiczkach! β-merkaptotetanol 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.

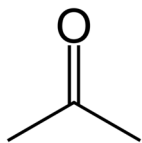
9. Szalki inkubować w 37°C przez 12 – 24 godziny.

Dzień 2.

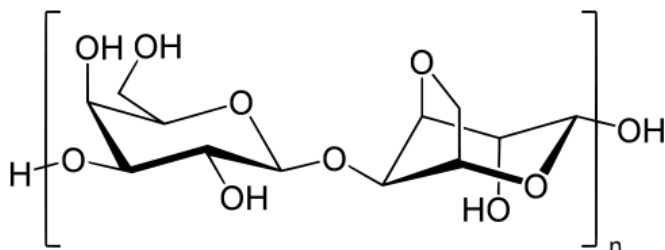
1. Wyjąć szalki z ciepłarki
2. Zanalizować zabarwienie/brak zabarwienia na szalkach
3. Zinterpretować otrzymane wyniki

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.

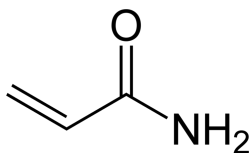


Agaroz – polisacharyd, liniowy heteropolimer galaktozy i jej pochodnych; białe, bezpostaciowe

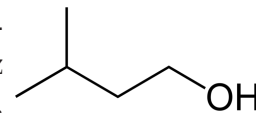


ciało stałe, higroskopijne. Agaroz jest dość dobrze rozpuszczalna w wodzie, w temperaturze pokojowej wodny roztwór agarowy tworzy żel. Przejścia żel-zol wykazują zjawisko histerezy (koagulacja zolu następuje w niższej temperaturze niż peptyzacja żelu). Żel agarozowy jest powszechnie stosowany do elektroforetycznego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

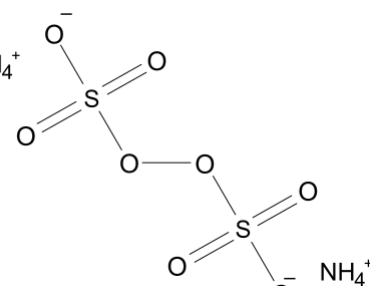
Akrylamid – 2-propenamid; biała, krystaliczna substancja, bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie (200 g/100 ml). W obecności wolnych rodników ulega reakcji polimeryzacji do poliakrylamidu. W laboratorium jest stosowany głównie do otrzymywania żeli poliakrylamidowych oraz liniowego poliakrylamidu (LPA), 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.



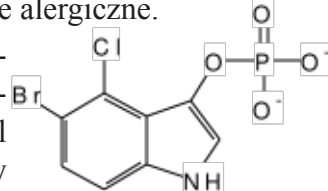
Alkohol izoamyłowy – 3-metylo-1-butanol; bezbarwna ciecz o nieprzyjemnym zapachu, bardzo słabo rozpuszczalna w wodzie. Alkohol izoamyłowy jest składnikiem niedogonu. W biologii molekularnej alkohol izoamyłowy jest używany jako składnik mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy (25:24:1 v:v:v), w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



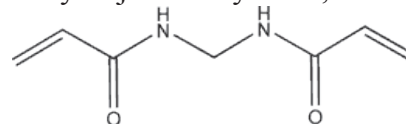
APS – nadtlenosiarczan NH_4^+ (VI) amonu; biała, krystaliczna substancja, bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie (62 g/100 ml w 20°C). Bardzo silny utleniacz, ulega rozkładowi z wytworzeniem wolnych rodników. W przemyśle jest używany do produkcji obwodów drukowanych. W laboratoriach jest stosowany jako 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.



BCIP – fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolilu, (ang. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate); sprzedawany jako sól p-toluidyny bezbarwne ciało stałe, higroskopijne, bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie, słabo rozpuszczalne w DMF (2 g/100 ml), wrażliwe na światło. Używany wraz z NBT w barwnej reakcji na wykrycie aktywności alkalicznej fosfatazy. BCIP jest substratem dla alkalicznej fosfatazy. W wyniku enzymatycznej hydrolizy BCIP powstaje bezbarwny produkt, który jest następnie utleniany przez NBT do ciemnoniebieskiego, nierozpuszczalnego w wodzie związku (równocześnie NBT jest zredukowane także do ciemnoniebieskiego, nierozpuszczalnego w wodzie związku). BCIP działa drażniąco na oczy, układ oddechowy i skórę.

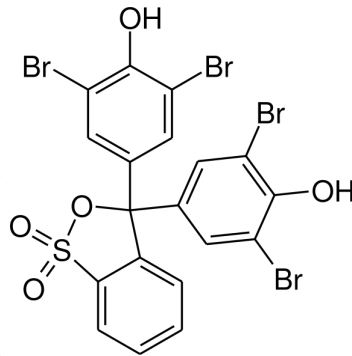


Bisakrylamid – N,N'-metylenobisakrylamid; biała, krystaliczna substancja, bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie. W obecności wolnych rodników ulega polimeryzacji. Bisakrylamid, wraz z akrylamidem, jest używany do

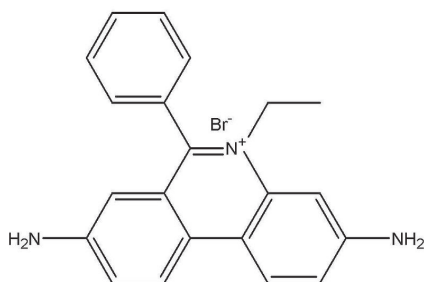


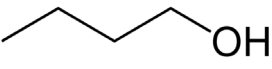
produkcji żeli poliakrylamidowych. Dodatek akrylamidu powoduje usieciowanie powstałego polimeru; im jest wyższe stężenie bisakrylamidu, tym żel jest silniej usieciowany, a zarazem twardszy i kruchszy. Bisakrylamid jest substancją szkodliwą.

Błękit bromofenolowy - 3',3'',5',5''-tetrabromofenolosulfonofaleina; 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 drażniąco na oczy i skórę.



Bromek etydyny – IUPAC: bromek 3,8-diamino-N-etylo-6-fenylfenantrydyniowy; 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 ultrawirowania w gradiencie chlorku cezu. Bromek etydyny jest związkiem silnie trującym. Wykazuje działanie karcinogenne oraz teratogenne.

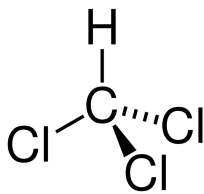


n-butanol–1-butanol; bezbarwna ciecz o charakterystycznym,  słodkawym zapachu, średnio rozpuszczalna w wodzie (7,7 g/100 ml w 20°C). Butanol jest używany w przemyśle jako rozpuszczalnik, jest składnikiem płynów hydraulicznych oraz niektórych perfum; jest także stosowany jako biopaliwo. W biologii molekularnej bywa wykorzystywany do precipitacji 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 drażniąco na skórę i oczy.

Chlorek magnezu – MgCl₂; 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 obladzaniu 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 drażniąco 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.

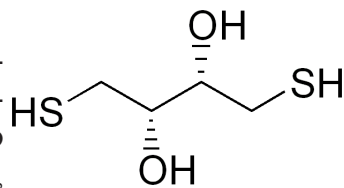
Chloroform – trichlorometan; bezbarwna ciecz o charakterystycznym zapachu, bardzo słabo rozpuszczalna w wodzie (0,8 g/100 ml w 20°C), gęstszy od wody (1,48 g/ml).



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.

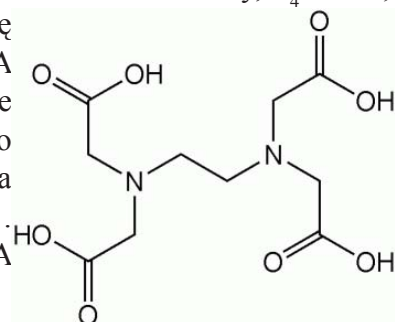
DTT – ditiotreitol, (2S,3S)-

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 DTT 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.

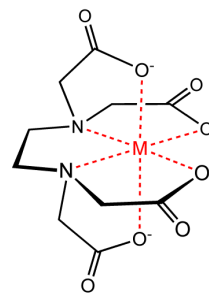


EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy, H₄EDTA;

białe, pyłące się ciało stałe. EDTA jest popularnie sprzedawany jako sól dwusodowa Na₂H₂EDTA. Aniony EDTA

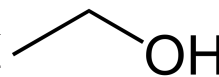


(EDTA⁴⁻, HEDTA³⁻) tworzą silne kompleksy kleszczowe z dwu- i trójdatnimi kationami metali. EDTA jest wykorzystywany w przemyśle jako konserwant żywności, stabilizator kosmetyków, środek zmiękczający wodę oraz zapobiegający precypitacji soli.

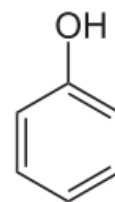


W laboratoriach EDTA jest stosowany jako titrant w miareczkowaniu kompleksometrycznym (w postaci soli dwusodowej). Jest także używany do maskowania obecności kationów metali, hamowania zależnej od obecności kationów metali aktywności nukleaz i proteaz oraz sporządzania roztworów buforujących. EDTA działa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

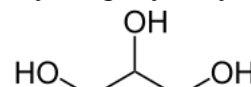
Etanol – bezbarwny alkohol pierwszorzędowy o charakterystycznym, ostrym zapachu i słodkawym, palącym smaku, mieszający się z wodą w każdym stosunku. Etanol znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, jest także składnikiem licznych perfum i kosmetyków oraz środków do dezynfekcji. W przemyśle 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.



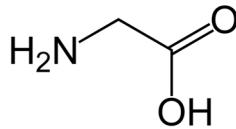
Glicerol – propano-1,2,3-triol, zwany też gliceryną; lepka, gęsta, bezbarwna ciecz, bez zapachu, o bardzo słodkim smaku, higroskopijna, mieszająca się z wodą w każdym stosunku. Glicerol jest stosowany w przemyśle spożywczym jako zagęszczacz, nawilżacz lub substytut cukru oraz



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 kryształy lodu. Jest również składnikiem buforów do nanoszenia próbek na żel podczas elektroforezy, w których działa jako obciążnik.

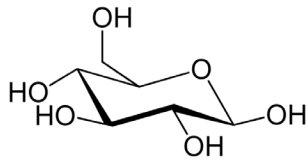
Glicyna – kwas 2-aminooctowy;

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 żłóż w technikach chromatografii powinowactwa.



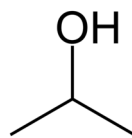
Glukoza – (2R,3S,4R,5R)-

2, 3, 4, 5, 6 - pentahydrokshexanal; 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;

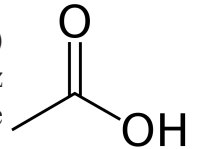
bezbarwny alkohol drugorzędowy o charakterystycznym zapachu, mieszający się z wodą w każdym stosunku. Powszechnie stosowany jako rozpuszczalnik i środek odtłuszczający. Może być używany jako środek konserwujący (zamiast formaldehydu), jako składnik płynów do dezynfekcji oraz dodatek do paliw. W biologii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



Kwas borowy – H₃BO₃, 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 (pKa=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 octowy – słaby (pKa = 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 (pKa=-7), dostępny handlowo w postaci stężonej (36% w/w; d=1,18 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.

2-merkaptioetanol – 2-hydrokshs-1-etanotiol; znany potocznie jako

β-merkaptioetanol; bezbarwna ciecz o gęstości d=1,11 g/ml, lotna, o odrażającym zapachu.

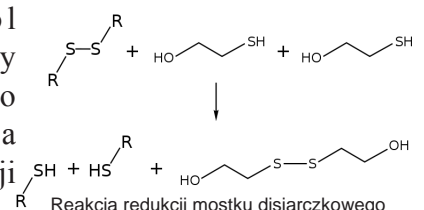
2-merkaptioetanol

jest wykorzystywany

w biologii jako

przeciwutleniacz, a

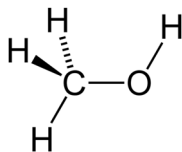
także do redukcji



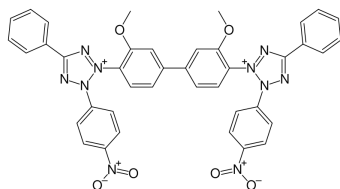
Reakcja redukcji mostku disiarczkowego

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.

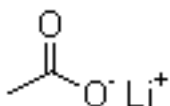


NBT – chlorek tetrazoliowy “nitro-blue” (ang. nitro-blue tetrazolium chloride); lekko żółte ciało stałe, słabo rozpuszczalne w wodzie (1 g/100 ml), wrażliwe na światło i powietrze. Używany wraz z CIP w barwnej reakcji na wykrycie aktywności alkalicznej fosfatazy. NBT działa jako utleniacz w stosunku do produktu enzymatycznej hydrolizy BCIP. W wyniku reakcji powstają dwa ciemnoniebieskie związki bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie (patrz **BCIP**). NBT jest także używany jako wskaźnik redoks w innych reakcjach enzymatycznych. NBT jest substancją szkodliwą, wdychanie pyłu, kontakt ze skórą lub połknięcie może prowadzić do nieodwracalnych zmian w organizmie.



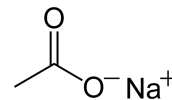
Octan amonu – $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; białe lub bezbarwne krystaliczne ciało stałe, bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie (148 g/100 ml w 4°C), higroskopijne. Octan sodu bywa wykorzystywany jako dodatek do soli zapobiegających zamarzaniu dróg. Jest także używany jako konserwant żywności (E264). W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

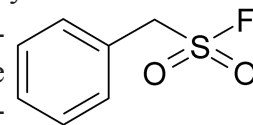


być stosowany do sporządzania buforów do elektroforezy w żelu agarozowym. Jest również używany jako źródło kationów litu podczas transformacji drożdży. Działa drażniąco na oczy i skórę.

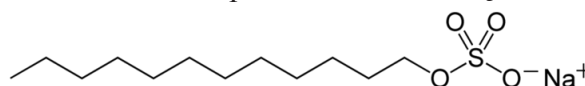
Octan sodu – białe, pyłące się ciało stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie (76 g/100 ml). Octan sodu jest używany w przemyśle tekstylnym i wulkanizacyjnym. Jest także dodawany do produktów spożywczych jako konserwant (E262). W laboratorium jest używany jako składnik roztworów buforujących (np. bufor octanowy $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$). 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 niezmienione. 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 amfilowych 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

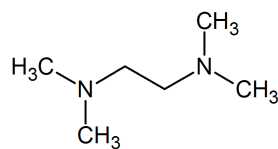
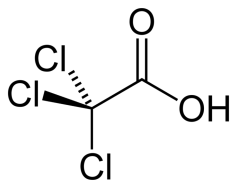


z cząsteczkami białek (~1 cząsteczka SDS na dwie reszty aminokwasowe), denaturując je do struktury I-rzędowej oraz nadając im sumaryczny ładunek ujemny. SDS jest substancją szkodliwą i łatwopalną, działa drażniąco na skórę, oczy i drogi oddechowe. Podczas pracy ze stałym SDS należy zachować szczególną ostrożność z uwagi na łatwe rozpylenie się w powietrzu (należy używać masek ochronnych).

Siarczan (VI) magnezu – $MgSO_4$; białe, krystaliczne ciało stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie (25,5g/100ml 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 drażniąco na drogi oddechowe i oczy; należy unikać kontaktu stałego siarczanu magnezu ze skórą.

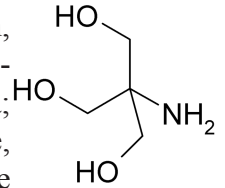
TCA – kwas trichloroocetowy; białe, grubokrystaliczne ciało stałe, doskonale rozpuszczalne w wodzie (1kg/100ml w 25°C), mocny kwas organiczny ($pK_a = 0,77$). TCA jest wykorzystywany w biologii molekularnej do wytrącania makromolekuł (białka, DNA, RNA). Zdolność TCA do wtrącania białek silnie zależy 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, miesząca się bez ograniczeń z wodą; trzeciorzędowa amina, słaba zasada; posiada zdolność kompleksowania kationów metali jako ligand dwukleszczowy. TEMED jest używany jako katalizator polimeryzacji

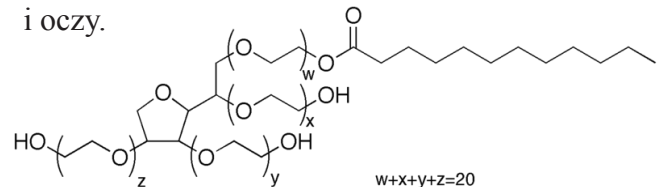


zeli poliakrylamidowych. Obecność TEMED w żelu wpływa na tempo migracji białek podczas elektroforezy; wzrost stężenia TEMED (> 0,2% v/v) powoduje spowolnienie tempa migracji. TEMED jest substancją łatwopalną i żrącą. Działa drażniąco na skórę i oczy.

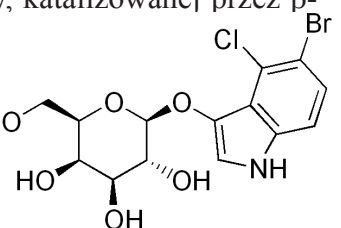
Tris–tris(hydroksymetylo)aminometan, 2-amino-2-hydroksymetylopropano-1,3-diol; amina pierwszorzędowa; białe, drobnokrystaliczne ciało stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie (50g/100ml w 25°C), słaba zasada (pK_a sprzężonego kwasu wynosi 8,06). Tris jest używany w medycynie do leczenia kwasicy metabolicznej. W laboratoriach tris jest powszechnie stosowany do sporządzania roztworów buforujących, np. Tris-HCl, TBE (patrz też: **bufor Tris-HCl**). pH buforów bazujących na Tris silnie zależy od temperatury, wraz ze wzrostem temperatury pH buforu maleje. Tris działa drażniąco na oczy, skórę i układ oddechowy.



Tween-20 – laurynian polioksyetyleno(20)sorbitanu; przezroczysta, żółtawozielona, lepka ciecz, rozpuszczalna w wodzie (10mg/100ml); niejonowy surfaktant polisorbitanowy. Komercyjnie dostępny Tween-20 jest w rzeczywistości mieszaniną licznych laurynianów polioksyetylenosorbitanu, 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. bufory do płukania membran w technice Western-blot). Tween-20 może działać drażniąco na błony śluzowe, skórę i oczy.



X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd; bezbarwne ciało stałe, słabo rozpuszczalne w DMSO (2g/100ml), 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. Ausio J. "Are linker histones (histone H1) dispensable for survival?" *Bioessays*. 2000 Oct; 22(10):873-7.
2. Khorasanizadeh S. "The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation" *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):259-72.
3. 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.
4. Synteza jednoniciowego cDNA <http://www.fermentas.com/profiles/kits/pdf/firststrand1611.pdf>
5. Miller J.H. "Experiments in Molecular Genetics" CSH-Laboratory, 1972.
6. "Inżynieria Genetyczna i Biologia Molekularna. Metody" Podręcznik laboratoryjny Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa 1995.
7. Dz-Chi Chen, Bei-Chang Yang, Tsong-Teh Kuo "One-step transformation of yeast in stationary phase" *Curr. Genet.* **21** 83-84,1992.
8. 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.
9. 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.

