

**Středa 5.11.1997**

***Molekulárně-genetické přístupy ke studiu rostlinné buňky***

Bůžek, J. ....	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (přesunuto na čtvrtek)
Bůžek, J. <i>et al.</i> ....	Detekce repetitivních DNA sekvencí na chromozómech <i>Melandrium album</i> metodou fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
Fajkus, J. ....	Analýza struktury DNA a chromatinu
Fulneček, J. ....	Mapování 5-metylcytosinů pomocí hydrogensířičitanového genomového sekvenování
Honys, D. ....	Způsoby izolace translačně aktivní a neaktivní RNA
Konečná, H. ....	Syntéza a purifikace oligonukleotidů
Kovařík, A. ....	Analýza rostlinného genomu pomocí pulzní gelové elektroforézy
Nejedlá, E. ....	Zkušenosti s genetickým analyzátozem ABI PRISM 310
Pavingerová, D. ....	Metody transformace rostlin pomocí <i>Agrobacteria</i>
Rotrekl, V. ....	Cílená a náhodná mutageneze DNA v podmínkách <i>in vitro</i> . Příklady a použití.
Říha, K. ....	Vnášení genů do rostlin prostřednictvím agrobakteriálních vektorů
Říha, K. <i>et al.</i> ....	Izolace transgenních buněčných linií u modelové dvoudomé rostliny <i>Melandrium album</i>
Smýkal, P. ....	Klonování diferencielně exprimovaných mRNA
Štorchová, H. ....	Analýza DNA v rostlinné taxonomii a ekologii

**Přednášky jsou vyznačeny tučným písmem.**

## Fluorescenční *in situ* hybridizace

Bůžek, J.

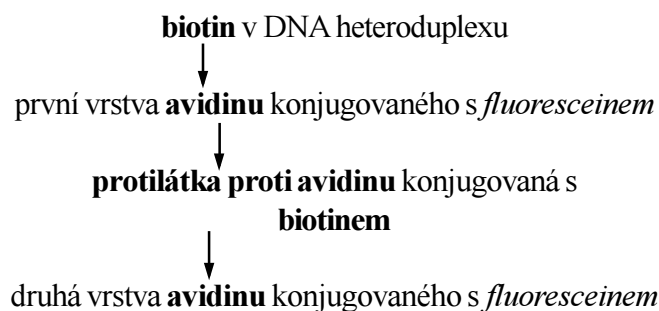
Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno  
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: buzek@ibp.cz

### Historie a princip metody

Koncem šedesátých let bylo zjištěno, že hybridizaci nukleových kyselin lze úspěšně provádět i tehdy, je-li cílová nukleová kyselina obsažena ve strukturách cytologického preparátu, například v chromozómech (Pardue a Gall 1969). Tím byl položen základ zcela novému, přímému způsobu mapování genomů. První značkou, která byla používána v sondách nukleových kyselin, byly izotopy ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ), jejichž výhodou je vysoká citlivost detekce, nevýhodou však nepřesně lokalizovaný signál na chromozómech. Po autoradiografii preparátů je někdy nutno statisticky zhodnotit distribuci stříbrných zrn podél chromozómu a teprve na základě tohoto hodnocení lze rozhodnout o umístění dané sekvence (např. Ambros *et al.* 1986).

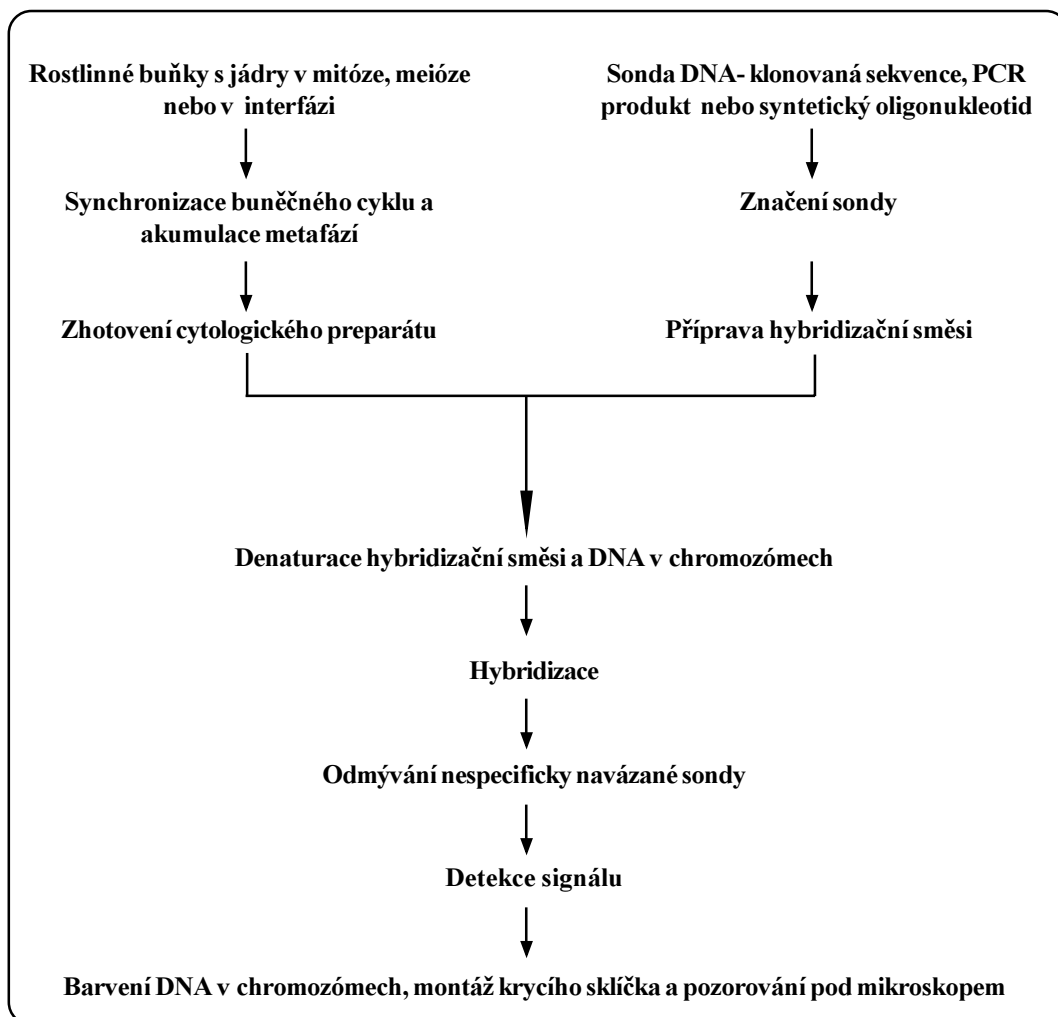
Posléze se přešlo na značení pomocí jednoduchých organických molekul (biotin, digoxigenin) a heteroduplexy DNA v chromozómech se detekovaly pomocí příslušných protilátek nebo jiných proteinových ligandů, konjugovaných s molekulami umožňujícími jejich vizualizaci v mikroskopu. Nejprve to byly enzymy (peroxidáza, alkalická fosfatáza) přeměňující určitý substrát v barevný nerozpustný produkt. Pravou revoluci způsobilo však zavedení fluorescenčního značení, které s sebou přineslo řadu výhod (Jiang a Gill 1994), například výrazné zvýšení citlivosti nebo možnost užití více sond najednou. Fluorescenční značka (nejčastěji fluorescein, rhodamin nebo nověji např. cyaninová barviva) může být buďto přímo navázána k nukleotidu, např. dUTP, a inkorporována do sondy NK (přímé značení, např. Reader *et al.* 1994) nebo může být konjugována k proteinovému ligandu proti biotinu nebo digoxigeninu. Podle toho, jaký zvolíme postup značení a detekce, bude procedura různě rychlá a citlivá. Přímé značení se používá tam, kde je žádoucí rychlost (imunodetekce se neprovádí), ale není třeba vysoké citlivosti (značení celých chromozómových sad pomocí genomové *in situ* hybridizace, Anamthawat-Jónsson a Reader 1995).

Při použití sondy značené biotinem nebo digoxigeninem a následné detekci signálu pomocí protein-fluorescenčního konjugátu lze vhodně zvolenou kaskádou reakcí dosáhnout vysoké citlivosti. V posledních asi třech letech se díky tomu již poměrně často objevují práce o detekci velmi krátkých a unikátních sekvencí na rostlinných chromozómech (např. Hoopen *et al.* 1996), ačkoli je to mnohem náročnější úkol nežli u živočichů (rostlinné chromozómy jsou velmi kontrahované a buněčná stěna často ztěžuje penetraci proby i pozorování výsledku v mikroskopu). Způsobů amplifikace signálu je celá řada. V naší laboratoři se používáme následující postup, jenž využívá afinity avidinu k biotinové značce (systém firmy Vector, viz též Bůžek *et al.* 1997).



Fluorescenční značka je excitována světlem rtuťové výbojky o takové vlnové délce, kterou propustí příslušný filtr zabudovaný v mikroskopu. Emitovanou fluorescenci daného fluorochromu pak pozorujeme jako signál (fluorescein - zelená fluorescence, rhodamin - červená fluorescence), DNA v chromozómech se barví látkou s odlišnou fluorescencí (DAPI - modrá, propidium jodid - červená).

### Obecné schéma postupu :



### Poznámky:

*Pokusný materiál a příprava preparátů:* Nejrozšířenější je fluorescenční *in situ* hybridizace na mitotických chromozómech. Klasická metoda jejich přípravy je akumulace metafázi v meristému kořenových špiček (např. ledovou vodou, kolchicinem, monobromnaftalenem atd.), fixace, macerace celulázami a pektinázami a roztlak. Tento postup se (s výjimkou synchronizace a akumulace metafázi) užívá i při přípravě preparátů meiotických chromozómů z pylových mateřských buněk. Dokonalejší odstranění buněčných stěn představuje metoda izolace mitotických protoplastů. Spočívá v působení celulytických enzymů na nefixované kořenové meristémy obsahující jádra v mitóze. Do izotonického roztoku se pak uvolní protoplasty, které se nechají mírně nabobtnat přidáním destilované vody, fixují se a kapou na preparát. Lze tak docílit velmi čistých preparátů s dobře rozprostřenými metafázními figurami, vhodných pro různé účely (*in situ* hybridizace-Bůžek *et al.* 1997, *in situ* nick translace-Vyskot *et al.* 1993). Preparáty se mohou ještě ošetřit ribonukleázou a proteolytickými enzymy pro snížení pozadí a lepší penetraci proby. V jistých specifických případech se používají pletivové řezy s jednou nebo více

vrstvami buněk s intaktními, neroztlačenými jádry. Tento materiál se uplatňuje při studiu prostorové lokalizace DNA sekvencí (repeticí, telomer) v interfázi. K vyhodnocení preparátů se obvykle užívá konfokální laserový skenovací mikroskop (CLSM, Rawlins *et al.* 1991).

**Značení sondy:** Provádí se výhradně pomocí kitů od různých firem (Amersham, Boehringer), buďto extenzi náhodných primerů připojených k denaturované DNA, nebo nick translaci (vytvoří se jednořetězcový zlom - nick - v cukrfosfátové kostře DNA a následně probíhá výměna nukleotidů v daném řetězci). Značka je většinou připojena na raménku ( $C_{11}$ ) k dUTP, kterým se nahrazuje část tymidinů v nově syntetizované DNA. Do značených oligonukleotidů se biotin-dUTP vkládá již při jejich syntéze. Po značení je vhodná kontrola inkorporace značeného dUTP, např. nanesením několika ředění sondy na membránu a detekcí konjugátem avidin-alkalická fosfatáza nebo anti-digoxigenin-alkalická fosfatáza. Stupeň inkorporace se stanoví pomocí intenzity štěpení chromogenního substrátu (NBT-BCIP).

Technika fluorescenční *in situ* hybridizace umožňuje detekovat polohu více různých DNA sond zároveň na jednom preparátu, pokud použijeme pro každou sondu jinou značku, např. fluorescein-dUTP a rhodamin-dUTP (přímé značení), nebo biotin a digoxigenin-dUTP s příslušně odlišnými detekčními systémy aplikovanými postupně (nepřímé značení). Tato metoda se nazývá multicolour FISH (viz např. Jiang a Gill 1994).

**Denaturace a hybridizace:** Někteří autoři doporučují společnou denaturaci sondy a preparátu na vyhřívané ploché destičce (např. upravený termocykler pro PCR - Heslop-Harrison *et al.* 1991). V naší laboratoři se nejlépe osvědčila denaturace oddělená. Sonda se denaturuje ve vroucí vodní lázni v mikrozkuhavce a posléze se rychle zchladí v ledové lázni. Chromozómové preparáty se denaturují krátce (cca 1-2 minuty) v 70% formamidu (snižuje  $T_m$  DNA) při cca 70°C. Poté se rychle zchladí ve vzestupné ethanolevé řadě (50, 70, 100 %) při

-20°C a vysuší se proudem vzduchu. Delší denaturace při vyšší teplotě by vedla k poškození struktury chromozómů. Hybridizační směs obsahuje mimo denaturované DNA sondy ještě nosičovou DNA (sonikovaná denaturovaná DNA připravená ze spermií lososa), formamid, roztok solí (SSC) a dextransulfát. Po aplikaci hybridizační směsi a krycího sklíčka se preparát zarámuje (používáme gumové lepidlo) a nechá inkubovat nejčastěji přes noc ve vlhké komůrce při 37°C.

**Odmývání a detekce:** Odmývání nespecificky navázané sondy ve formamidu a SSC je analogické odmývání při membránových hybridizacích. Při použití krátkého oligonukleotidu jako sondy je třeba stringenci snížit. Při hybridizaci s přímo značenou sondou následuje po tomto kroku již jen barvení DNA v chromozómech a pozorování. Je-li sonda značena biotinem nebo digoxigeninem, je nutno provést kaskádu amplifikačních a vizualizačních reakcí. Nejdříve je třeba provést vysycení povrchu preparátu (např. proteiny příslušného séra), aby nedocházelo k nespecifické vazbě daných ligandů a tím ke zvýšení pozadí. Několik desítek mikrolitrů roztoku fluorescenčně značené protilátky nebo avidinu v příslušném inkubačním pufru se nakape na preparát a inkubace probíhá ve vlhké komůrce pod kouskem plastické fólie. Mezi jednotlivými kroky musí následovat důkladné odmývání v PBS (ve skleněných kyvetách, tzv. Coplin jar).

**Barvení chromozómů, montáž a pozorování:** Pro barvení DNA v chromozómech užíváme většinou roztoku barviv DAPI (DNA specifické) nebo PI (DNA a RNA specifické) v komerčně vyráběném médiu (Vectashield, Vector, VB), které snižuje zhášení fluorescence při pozorování. Po aplikaci několika desítek mikrolitrů roztoku se přiloží krycí sklíčko, preparát se zarámuje a po cca 15 minutách je připraven k pozorování. K vyhodnocení preparátů užíváme fluorescenční mikroskop Olympus AX-70 a vybraná jádra nebo mitózy buď fotografujeme (na citlivý film o 400 ISO) nebo častěji snímáme CCD kamerou připojenou k počítači. K vytvoření obrázků pak užíváme systému analýzy obrazu ISIS (MetaSystems, SRN), vyvinutého speciálně pro cytogenetické účely. Obrázky se dají fotografovat z obrazovky nebo tisknout na speciální barevné tiskárně (např. Mitsubishi CP-D1E).

**Poděkování:** Tato práce byla finančně podporována grantem 521/96/1717 GA ČR.

## Literatura:

- Ambros PF, Matzke MA, Matzke AJM (1986) Detection of a 17-kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma* **94** : 11-18
- Anamthawat-Jónsson K, Reader SM (1995) Pre-annealing of total genomic DNA probes for simultaneous *in situ* hybridization. *Genome* **38** : 814-816
- Bůžek J, Koutníková H, Houben A, Říha K, Janoušek B, Šíroky J, Grant S, Vyskot B (1997) Isolation and characterization of X chromosome-derived DNA sequences from a dioecious plant *Melandrium album*. *Chromosome Res* **5**: 57-65
- Jiang J, Gill BS (1994) Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* **37** : 717-725
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jónsson K, Leitch AR, Shi M, Leitch IJ *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* **3** : 109-116
- Hoopen, RT, Robbins TP, Fransz PF, Montijn BM, Oud O, Gerats AGM, Nanninga N (1996) Localization of T-DNA insertions in *Petunia* by fluorescence *in situ* hybridization: Physical evidence for the suppression of recombination. *Plant Cell* **8** : 823-830
- Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA on cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **64**: 600-604
- Rawlins DJ, Highett MI, Shaw PJ (1991) Localization of telomeres in plant interphase nuclei by *in situ* hybridization and 3D confocal microscopy. *Chromosoma* **100** : 424-431
- Reader SM, Abbo S, Purdie, KA, King IP, Miller TE (1994) Direct labelling of plant chromosomes by rapid *in situ* hybridization. *Trends Genet* **10** : 265-266
- Vyskot B, Araya A, Veuskens J, Negrutiu I, Mouras A (1993) DNA methylation of sex chromosomes in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol Gen Genet* **239** : 219-224

## Další doporučená literatura:

- Gosden, JR (ed.) Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 29. Humana Press, Totowa, NJ, 1994
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ: *In Situ* Hybridization : A Practical Guide. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks, Vol. 27. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 1994
- Katalogy firem Amersham, Boehringer Mannheim, Vector, Molecular Probes atd.

## Detekce repetitivních DNA sekvencí na chromozómech *Melandrium album* metodou fluorescenční *in situ* hybridizace

Bůžek, J., Široký, J., Říha, K., Vyskot, B.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno  
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: buzek@ibp.cz

Modelový dvoudomý druh knotovka bílá (*Melandrium album*, syn. *Silene latifolia*) je charakteristický dobře rozlišitelnými pohlavními chromozómy (konstituce XY v samčích a XX v samičích buňkách). Chromozómy *M. album* byly studovány pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s různými DNA sondami: vnitřním *EcoRI* fragmentem z 25S-rDNA rajčete (2478 bp), šesti netranskribovanými repetitivními sekvencemi (získanými DOP-PCR amplifikací DNA z izolovaného X chromozómu, 208-750 bp) a se syntetickým oligonukleotidem (TTTAGGG)<sub>5</sub> homologním s telomerovou repetitivní sekvencí *Arabidopsis thaliana*. Hybridizační signály X-repetitivních sekvencí byly lokalizovány v konstitutivním heterochromatinu (pozitivních C-proužcích) v distálních, subtelomerových oblastech chromozómových ramen. 25S-rDNA byla lokalizována na autozómech 5, 7, 9 a 10 a netranskribované repetice na většině autozómů i na obou pohlavních chromozómech X a Y. Ačkoli byly netranskribované repetitivní sekvence izolovány z chromozómu X, žádná z nich nebyla pro tento chromozóm specifická. Hybridizační signál repetitivních sekvencí na chromozómu Y se vyskytoval pouze v heterochromatinovém bloku na konci jednoho ramene. Pomocí analýzy meiotických bivalentů v pylových mateřských buňkách bylo zjištěno párování této oblasti s homologním úsekem chromozómu X, což umožnilo ztotožnit ji s dříve již klasicky lokalizovanou pseudoautozomální oblastí. Signály po *in situ* hybridizaci s telomerově specifickým oligonukleotidem byly patrné jako body na koncích chromatid. Tyto body byly různě intenzivní, případně se nevyskytovaly vůbec. Variabilita síly signálu byla sledována u některých vybraných chromozómů (X, Y, autozómy 1 a 7) na více metafázích, avšak žádné pravidelně se vyskytující rozdíly v intenzitě signálů nebyly nalezeny. Zmíněná různá intenzita byla tedy zřejmě zapříčiněna relativní krátkostí cílové sekvence pro FISH. Délka telomerových repetice u *M. album* je asi 2-4 kb, což představuje téměř dolní limit detekce nejcitlivějších FISH technik u rostlinných chromozómů.

Poděkování: Uvedené výsledky byly získány při řešení grantu A5004601 GAAV ČR.

## Analýza struktury DNA a chromatinu

Fajkus, J.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno.  
tel: 05/41 51 71 99, fax: 05/41 21 12 93, e-mail: fajkus@ibp.cz

Významnou charakteristikou sekvencí DNA je jejich pravděpodobná konformace v prostoru (tvar osy dvojšroubovice DNA, *DNA curvature*) a nukleozómová struktura (určení části sekvence, která tvoří komplex s dřevnými histony, a části, která tvoří spojovník (linker) mezi nukleozómy, a je relativně přístupná (*nucleosome positioning*)).

Obě tyto charakteristiky významně závisí na primární sekvenci DNA a byly vysloveny domněnky, že právě ony představují strukturální kód skrytý v primární sekvenci DNA.

V současné době máme k dispozici počítačové programy umožňující predikci ohybů v DNA (software *Curvature*) i polohu nukleozómů (software *Nucleosome*) přímo ze zadané sekvence DNA. Oba programy nám byly laskavě poskytnuty partnerským pracovištěm (Prof. E. Trifonov, Weizmann Inst. Sci., Israel). Program *Curvature* je založen na "wedge" modelu zakřivení DNA, podle něhož výsledná deformace osy je vektorovým součtem příspěvků mezi každými dvěma sousedními páry bází. Program *Nucleosome* predikuje polohu nukleozómu z ohýbatelnosti (*bendability*) sekvence, která je dána charakteristickým rozložením dinukleotidů, především AA a TT.

Experimentálně lze ohyby v DNA lokalizovat a kvantifikovat pomocí ligačního-cyklizačního testu (u velmi krátkých sekvencí, zjišťuje se počet opakování dané sekvence, které je již schopno uzavření do kruhu) a univerzálnější permutační analýza. Při ní se připraví dimer dané sekvence, z něhož se vyštěpí restričními enzymy v různých místech stejně dlouhé, avšak vzájemně permutované, monomery. Mobilita těchto monomerů v polyakrylamidovém gelu za nízké teploty je pak maximální u monomeru, u něhož ke štěpení došlo uvnitř ohybu, a minimální u monomeru, který má ohyb lokalizován ve svém středu.

V dosavadních experimentech bylo dosaženo velmi dobré shody experimentu s predikcí.

Polohu nukleozómu můžeme analyzovat ze dvou hledisek: tzv. *rotační* usazení, které určuje, které nukleotidy dané sekvence jsou (přibližně s 10,5 bp periodicitou) obráceny směrem ke komplexu histonů, kolem nichž se DNA ovíjí, a které naopak vyčnívají směrem do okolí - ty jsou pak dostupnější štěpení nebo modifikaci (např. štěpení DNázou I). *Translační* polohou nukleozómu se rozumí přesné určení počátku a konce té části sekvence, která je navinuta na histonovou dřev. Je zřejmé, že jednomu rotačnímu usazení může vyhovovat více translačních poloh, vzájemně se lišících o jeden a více závitů dvojšroubovice DNA. Dosti často se reálně vyskytuje několik translačních poloh nukleozómu, např. na různých kopiích jednoho typu repetitivní sekvence. Translační polohu nukleozómu je možno určit přibližně ( $\pm 10$  bp) pomocí restričního štěpení mononukleozómové, resp. dřevové frakce DNA, extrahované z chromatinu štěpeného Mikrokokovou nukleázou (štěpí v úseku mezi nukleozómy) současně s Exonukleázou III (provede degradaci mezinukleozómové DNA od jejího 3' konce až k místu jejího vstupu do nukleozómu). Po ukončení reakce, odbourání proteinů a extrakci DNA následuje ještě štěpení jednovláknového převisu DNA, zbývajícího po ExoIII-štěpení pomocí Mung Bean nebo S1 nukleázy. Z kontrolní elektroforézy sady nukleázových štěpení můžeme prostřednictvím blotování a hybridizace stanovit periodu fázování nukleozómů na zkoumané sekvenci - ta závisí na délce spojovníkové DNA mezi nukleozómy. Mononukleozómová, resp. dřevová frakce (délka cca 146 bp) získaná z preparativní polyakrylamidové nebo agarózy elektroforézy vybraného nukleázového štěpení je dále štěpena paralelně alespoň dvěma restričními enzymy, následuje separace fragmentů na 6-8 % polyakrylamidovém gelu, blotting a hybridizace se značenou sondou pro zkoumanou sekvenci. Velikost hybridizujících fragmentů pak udává polohu restričního místa vzhledem k hranicím nukleozómové DNA. Přesnější určení translační polohy nukleozómu se provede pomocí extenze primeru, umístěného uvnitř nukleozómové DNA, opět na templátu dřevové frakce DNA. Přitom je použit buď koncově značený primer, nebo [ $a\text{-}^{32}\text{P}$ ]-dNTP.

K ukončení syntézy dojde zákonitě na konci templátového fragmentu. Přesnou polohu terminace určíme porovnáním se sekvenačními reakcemi ve kterých byl použit stejný primer, souběžně nanesenými na stejném sekvenačním gelu. Je vhodné ověřit na druhém vlákně v opačném směru, druhou hranici lze však i vypočítat díky konzervativní délce dřevové DNA (146 bp). I v tomto případě existuje dobrá shoda predikce a experimentu, odchylky byly zjištěny jen v posunu translační polohy o  $\pm 1$  otáčku DNA v rámci stejné rotační polohy nukleozómu.

Nároky na vybavení laboratoře: termostat, aparatury pro agarózovou, polyakrylamidovou a sekvenační elektroforézu, termocykler, UV trasiluminátor.

Chemikálie: kromě běžných jde především o výše zmíněné enzymy, primery a kit pro sekvenování a cyklickou extenzi primerů (např. Circum Vent thermal cycle sequencing kit -NEB), značené dNTP.

Finanční a časová náročnost: *analýza ohybu na cca 200 bp sekvenci:* obnáší přípravu, event. klonování dimeru v uspořádání "hlava k patě", jeho restriční štěpení na základě známé sekvence, PAGE za konstantní nízké teploty ( $\leq 20$  °C), grafické vyhodnocení retardace, kontrolní PAGE za konstantní zvýšené teploty (50 °C) při níž je vliv ohybu potlačen.

Celkem 2-4 týdny, 30.000 Kč za materiál.

*analýza chromatinové struktury včetně přesné translační polohy nukleozómů na 200 bp sekvenci:* 4 týdny, 40.000 Kč za materiál.

Úskalí a tipy: při permutační analýze je bezpodmínečně nutné dodržení konstantní teploty při PAGE. Lze analyzovat sekvence v délkovém rozmezí přibližně 60-400 bp, podmínkou je přítomnost vhodné rozmístěných restričních míst. Čím kratší je analyzovaná sekvence, tím koncentrovanější nebo hustěji zesíťovaný polyakrylamid je nutno použít. Při analýze struktury chromatinu je třeba nalézt vhodný postup přípravy buněčných jader nebo chromatinu (bez nespecifické degradace DNA), nukleázové štěpení provádět v souboru alespoň čtyř reakcí lišících se množstvím Mikrokokové nukleázy nebo dobou štěpení, každá z reakcí musí obsahovat dostatečné množství materiálu pro následné experimenty (110 mg). V průběhu přípravy jader a nukleázového štěpení je třeba zabránit degradaci proteinů prostřednictvím inhibitorů proteináz (např. PMSF). Předběžné restriční stanovení hranic nukleozómové DNA umožňuje při extenzi primerů odlišit nespecifické terminační signály od více skutečných, různě zastoupených poloh nukleozómu na dané sekvenci.

Literatura:

- Ioshikhes, I., Bolshoy, A., Trifonov, E.N., *J. Biomol. Struct. Dyn.* 9, 1111 (1992)
- Ioshikhes, I., Bolshoy, A., Derenshteyn, K., Borodovsky, M., Trifonov, E.N., *J. Mol. Biol.* 262, 129 (1996)
- Královics, R., Fajkus, J., Kovařík, A., Bezděk, M., *J. Biomol. Struct. Dyn.* 12, 1103 (1995)
- Matyášek, R., Fulneček, J., Fajkus, J., Bezděk, M., *Chromosome Res.* 4, 340 (1996)
- Shpigelman, E.S., Trifonov, E.N., Bolshoy, A., *CABIOS* 9, 435 (1993)
- Wu, H.-M., Crothers, D.M., *Nature* 308, 509 (1984)



# Mapování 5-metylcytosinů pomocí hydrogensířičitanového genomového sekvenování

Fulneček, J.

Biofyzikální ústav Akademie Věd České Republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno, Česká Republika  
tel: (0420) 05/41 51 71 75, fax: (0420) 05/41 21 12 93, e-mail fulnecek@ibp.cz

## 1. Podstata metody

Hydrogensířičitanové genomové sekvenování má ve srovnání s dříve používanými metodami dvě základní výhody:

a) Poskytuje informace o rozmístění 5-metylcytosinů (5-mC) v celé délce studovaného úseku DNA.

b) Vysoká citlivost PCR kroku umožňuje analyzovat metylaci DNA v několika desítkách buněk.

Metoda je založena na chemické reakci, při níž na jednořetězcové DNA dochází pomocí  $\text{HSO}_3^-$  k hydrolytické deaminaci cytosinů na uracily, kdežto 5-mC nereaguje.

V prvním kroku reakce, sulfonaci, interaguje hydrogensířičitanový anion s dvojnou vazbou mezi 5 a 6 uhlíkem cytosinu a tvoří se sulfonát cytosinu na 6 uhlíku. Tento krok je reversibilní a pomalejší u oligonukleotidů než u nukleotidů. Reakce přímá probíhá při nízkém pH. Ve druhém kroku reakce, hydrolytické deaminaci, se ve vodném prostředí deaminuje aminoskupina na 4 uhlíku a vzniká sulfonát uracilu. Tento krok je nevratný a je katalyzován basickými látkami, sířičitanovými, hydrogensířičitanovými nebo acetátovými anionty, a probíhá při pH nižším než 7. V posledním kroku reakce se sulfonát uracilu alkalicky desulfonuje na uracil.

Původně komplementární vlákna se po reakci stanou nekomplementárními a proto se dále analyzují samostatně pomocí PCR. K těmto vzájemně nekomplementárním vláknům se navrhnu čtyři oligonukleotidové primery umožňující amplifikovat obě vlákna studovaného úseku DNA. Na 5' konci primerů se nachází cílové sekvence pro restriční endonukleázy vhodné pro klonování do běžných plasmidových vektorů. Naklonované PCR produkty se poté sekvenují. Na sekvenačních gelech všechny proužky odpovídající cytosinu znamenají přítomnost 5-mC v původní genomové DNA.

## 2. Shrnutí základních praktických postupů

A) Co je potřeba v laboratoři (chemikálie, přístroje, atd.)

Metodu lze provést v běžné laboratoři molekulární biologie, je třeba PCR-cyklér, elektroforetická zařízení pro agarosové a akrylamidové gely, sekvenátor a syntetizér primerů (formou služby).

Jako reakční činidlo se používá hydrogensířičitan sodný (SIGMA S-8890 sodium bisulfite), což je obvykle směs asi 1 : 1 hydrogensířičitanu sodného  $\text{NaHSO}_3$  a disiřičitanu sodného  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ( $\text{HS}_2\text{O}_5^- = \text{HSO}_3^- + \text{SO}_2$ ). Použije se několik restričních endonukleáz na štěpení genomové DNA a úpravu PCR produktů před ligací. Jsou zapotřebí také kolonky "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Quiagen) nebo podobné, ligáza, kompetentní buňky (Stratagene), oligonukleotidové primery, sekvenování lze provést pomocí kitu "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB) a  $\alpha$ [ $^{32}$ P]-dATP.

B) Pracovní postup

Isolovaná rostlinná nebo živočišná genomová DNA se naštěpí restriční endonukleásou, která nemá cílové místo ve studovaném úseku. Štěpená DNA, po inkubaci s Rnásou A a poté s Proteinásou K, se přečistí fenolovou a chloroformovou extrakcí.

Nejdříve se 2 mg takto připravené DNA v 90 ml destilované vody zdenaturuje přidáním 10 ml čerstvě připraveného 3 M NaOH a inkubací 15 minut při 37°C. Těsně před použitím se připraví nasycený roztok (při 20°C) hydrogensířičitanu sodného, asi 3.6 M (5.29 g v 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). pH 4.8 - 5.0 roztoku hydrogensířičitanu se upraví pomocí 10 M NaOH. Je velice důležité hydrogensířičitan rozpouštět

a upravovat jeho pH opatrně v zazátkované zkumavce s minimálním provzdušněním tak, aby byl roztok co nejvíce nasycen  $\text{SO}_2$  ( $\text{SO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} = \text{HSO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+$ , bublinky plynu pod vrstvou oleje po inkubaci). 1 000 ml 3.6 M roztoku hydrogensířičitanu a 5.8 ml čerstvého 10 mM hydrochinonu se přidá k denaturované DNA. Roztok se opatrně promíchá a ihned převrství 150 ml minerálního oleje, po 16 ti hodinové inkubaci při 55°C ve tmě se vzorky odeberou bez oleje a dialysují ve tmě při 4°C v a) 3X2 litrech 0.5 mM hydrochinonu/5 mM octanu sodném pH 5.2 po jedné hodině, b) 3X2 litrech 0.5 mM octanu sodném pH 5.2 po jedné hodině, c) 3X2 litrech destilované vody po jedné hodině a 1X2 litrech destilované vody přes noc. Poté se objem vzorku sníží lyofilizací na 100–200 ml a DNA se izoluje z roztoku pomocí kitu “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Quiagen), kolonky se promyjí promývacím roztokem, 80% ethanolem a vysuší se na vzduchu. DNA se rozpustí v 3X30 ml redestilované vody. Desulfonace se provede přidáním 11 ml čerstvého připraveného roztoku 3 M NaOH a inkubací 15 minut při 37°C. Roztok se poté neutralizuje přidáním octanu amonného pH 7 na koncentraci 3 M, DNA se precipituje ethanolem, vysuší, rozpustí v 100 ml TE pufru a uchová při -20°C.

Následuje PCR, ve které se amplifikují transkribující se a netranskribující se vlákna studovaného úseku DNA odděleně pomocí dvou navržených dvojic oligonukleotidových primerů, které obsahují cílová místa restričních endonukleás pro snazší ligaci. Použije se asi 4 ml templátové DNA v 50 ml směsi (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH 9.0, 0.14% TRITON X-100, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM dNTP a 0.5 mM primery). Po denuraci 5 min. při 96°C se amplifikuje pomocí 1.5U *Taq* DNA polymerázy (Promega) v 35 cyklech, ve kterých je teplota denaturace 94°C 20 s, teplota nasednutí primerů závisí na jejich sekvenci a teplota polymerace 72°C 20 s.

Teplota nasedání primerů by se měla zvolit taková, aby produkt vznikal selektivně na DNA modifikované hydrogensířičitanem a nevznikal na původní genomové DNA.

Konce produktu se před ligací upraví sestřížením pomocí restričních endonukleás, produkt se přečistí elektroforézou a izolací z gelu a liguje se do předem připraveného plasmidového vektoru. Poté se transformuje do kompetentních *E. coli* buněk (Stratagene), plasmidová DNA se izoluje a insert se sekvenuje pomocí “Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit” (USB) a  $\alpha$ [32]P-dATP.

### C) Vyhodnocení experimentálních dat

Je třeba sekvenovat alespoň 5 zástupců naklonovaného PCR produktu.

Ze sekvencí přečtených z autoradiogramů sekvenačních gelů se zjistí přesné polohy 5-mC, neboť tam, kde se vyskytne cytosin byl původně 5-mC. Vyhodnocuje se zvláště netranskribující se a transkribující se vlákno studovaného úseku DNA.

### 3. Zhodnocení finanční a časové náročnosti

Provést metodu není příliš finančně náročné (hydrogensířičitan sodný 100g asi 700 Kč, oligonukleotidový primer asi 90 Kč/basi, *Taq* DNA polymeráza asi 15 Kč/U, T4 DNA ligasa asi 13 Kč/U, restriční endonukleasy asi 0.17–35 Kč/U, jedna izolace DNA na kolonce 50 Kč, sekvenační kit pro radioaktivní značení 120 Kč/reakci,  $\alpha$ [32]P-dATP asi 70 Kč/reakci, kit pro automatický sekvenátor asi 300 Kč/reakci a další laboratorní materiál).

Pokud všechno probíhá v pořádku a nestane se během postupu žádná chyba, tak je metodu možné provést během jednoho měsíce (příprava a modifikace připravené DNA hydrogensířičitanem trvá asi jeden týden, PCR, úprava produktů, jejich ligace a transformace trvá také asi jeden týden, kultivace bakterií, izolace plasmidové DNA a zjištění přítomnosti insertu trvá také asi jeden týden a sekvenace také týden).

Mohou se však vyskytnout problémy se získáním PCR produktu a poté je nutné použít jiné oligonukleotidové primery nebo zopakovat modifikaci hydrogensířičitanem, ale zkušený pracovník, který by tuto metodu chtěl použít, by ji měl zvládnout během tří měsíců, maximálně půl roku.

#### 4. Úskalí metody

Metoda je založena na konverzi všech cytosinů na uracily v jednořetězcové DNA hydrogensířičitanem. Zde tkví nebezpečí získání artefaktů v pozitivním smyslu (5-mC se vyskytne i tam, kde není přítomen). Během konverze musí být DNA stále denaturovaná, nesmí tedy docházet k renaturaci. K renaturaci došlo tehdy, pokud se nalezne delší úsek DNA obsahující 5-mC bez přerušení cytosiny.

Jedná se o běžnou chemickou reakci, která je vždy v určité rovnováze a i když se snažíme o co největší konverzi a docílíme toho, že 99.99% cytosinů se změnilo na uracily, zbylé původní molekuly se mohou selektivně amplifikovat v PCR, pokud se použijí nevhodně navržené oligonukleotidové primery.

Všechna tato úskalí se dají bez problémů ověřit použitím plasmidové DNA s insertem totožné sekvence studovaného úseku DNA a se známou pozicí 5-mC, po metylaci *in vitro* (viz. 5), nevýhoda je ale v tom, že se správnost výsledků ověří až po posledním kroku metody - sekvenování.

Další nepříjemnost je v tom, že DNA je poměrně dlouho vystavena pH kolem 5 a může docházet k depurinaci a tudíž ke znehodnocení DNA jako templátu PCR. Proto je vhodné vybírat si ke studiu úseky krátké, maximálně do 300 bp, aby nedošlo k problémům při získávání PCR produktu.

#### 5. Tipy a triky

Kontrola správnosti provedené reakce se provede tak, že se modifikace genomové DNA provede paralelně s modifikací linearisované plasmidové DNA nesoucí insert stejné sekvence jako je analyzovaný úsek. Přitom se použije takové množství plasmidu a nosičové DNA aby se zachovalo množství celkové DNA v reakci a množství plasmidového insertu odpovídalo zastoupení této sekvence v genomové DNA. Je možné plasmidovou DNA použít bez 5-mC nebo ji před modifikací *in vitro* metylovat pomocí *Msp* I, *Hpa* II nebo *Sss* I metylás. Takto simuluje použitá kontrola co do množství a délek fragmentů použitou genomovou DNA, a tak lze ověřit správnost výsledků.

K zabránění renaturace lze během reakce s hydrogensířičitanem zvyšovat teplotu v pulsech na 90°C nebo lze reakci provést v 50% roztoku močoviny.

Velice záleží na použitých oligonukleotidových primerech. Měly by se navrhnout tak, aby co nejvíce odpovídaly modifikované DNA a lišily se od původní DNA, což znamená, že by měly obsahovat co nejvíce změněných míst cytosinů. Pokud se předpokládá přítomnost 5-mC, lze zvolit takové primery, které "si vybírají" buď metylované nebo nemetylované zástupce studované sekvence DNA. Tento přístup umožňuje analyzovat jednotlivé zástupce genové rodiny s různým stupněm metylace. Další možností je použití primerů, které "si nevybírají". Získají se zkouškou a výběrem po amplifikaci směsi modifikované DNA a nemodifikované DNA v poměru 1:1, přičemž vhodné primery tyto sekvence amplifikují nezávisle a výsledný poměr molekul po amplifikaci a sekvenování je opět 1:1.

Existuje celá řada zjednodušených verzí s obejitím sekvenování (použijí se primery, které nasedají jen na takovou modifikovanou DNA, kde buď původně byl a nebo nebyl 5-mC; modifikovaná DNA se inkubuje s restriktásou s cílovým místem v oblasti mezi primery, pokud se její cílové místo nezměnilo, tak se DNA štěpí, nevznikne PCR produkt a tak cytosin v cílovém místě restriktázy byl metylovaný), ale tyto metody mají celou řadu technických problémů a navíc se zabývají jen určitými místy. Existuje také možnost obejití klonování sekvenováním PCR produktu, což se nedá doporučit, neboť tento způsob je založen na vyhodnocení intenzity proužků (plochy píků) a je zřejmé, že polymeráza použitá při sekvenování se nezastavuje na všech místech stejně často, navíc pokud je v dráze C jen několik proužků.

Celá procedura, i včetně izolace genomové DNA, denaturace, modifikace hydrogensířičitanem, PCR, se dá provést s použitím LMP-agarosy a má řadu výhod. Jednak je možné analýsu provést s minimálními ztrátami DNA, zabránit renaturaci, poškození DNA a tak je možné získat PCR produkt i z delších úseků modifikované DNA.

#### 6. Srovnání s alternativními metodami

Ke studiu 5-mC se většinou používá isoschisomerů restriktás, které jsou buď citlivé a nebo necitlivé k 5-mC v jejich cílové sekvenci. Tato metoda je nenáročná, levná a rychlá, ale dokáže analyzovat 5-

mC jen v určitých místech v určitých sekvencích. Je založena na štěpení genomové DNA těmito restriktázami, elektroforéze v agarosovém gelu, přenosem na membránu a hybridací s označeným specifickým úsekem DNA.

Ke studiu 5-mC v delších úsecích se používá klasické genomové sekvenování s použitím chemických činidel, která odlišně modifikují cytosiny a 5-mC. Zmodifikovaná DNA se poté štěpí piperidinem, rozdělí se sekvenční elektroforésou, přenese na membránu a hybriduje s označeným specifickým úsekem DNA. Tato metoda má celou řadu nevýhod, je velice náročná a pracná a nedosahuje zdaleka takové citlivosti a přesnosti.

Celkové zastoupení 5-mC v DNA lze určit pomocí HPLC, neposkytuje však žádné informace o jejich poloze.

#### Literatura:

- Wang, R.Y.H., Gehrke, C.W. and Ehrlich, M.: Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Research* 8, 20, 4777-4790 (1980).
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. and Paul, C.L.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1827-1831 (1992).
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. and Frommer M.: High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research* 22, 15, 2990-2997 (1994).
- Grigg, G. and Clark, S.: Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *BioEssays* 16, 6, 431-436 (1994).
- Rother, K.I., Silke, J., Georgiev, O., Schaffner, W. and Matsuo, K.: Influence of DNA sequence and methylation status on bisulfite conversion of cytosine residues. *Analytical Biochemistry* 231, 263-265 (1995).
- Selker, E.U., Fritz, D.Y. and Singer, M.J.: Dense nonsymmetrical DNA methylation resulting from repeat-induced point mutation in *Neurospora*. *Science* 262, 1724-1728 (1993).
- Codón, A.C., Lee, Y.S. and Russo, V.E.A.: Novel pattern of DNA methylation in *Neurospora crassa* transgenic for the foreign gene *hph*. *Nucleic Acids Research* 25, 12, 2409-2416 (1997).
- Grigg, G.W.: Sequencing 5-methylcytosine residues by the bisulphite method. *DNA Sequence* 6, 189-198 (1996).
- Olek, A., Oswald, J. and Walter, J.: A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Research* 24, 24, 5064-5066 (1996).
- Herman, A.G., Graff, J.R., My'gh, S., Nelkin, B.D. and Baylin, S.B.: Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9821-9826 (1996).

#### Další doporučená literatura:

- Saluz, H.P. and Jost, J.P.: Genomic sequencing and *in vivo* footprinting. *Analytical Biochemistry* 176, 201-208 (1989).
- Saluz, H. and Jost, J.P.: Major techniques to study DNA methylation. *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, eds. Jost and Saluz, Basel (1993).
- Church, G.M. and Gilbert, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991-1995, (1984).
- Kochanek, S., Hosokawa, K., Schiedner, G., Renz, D. and Doerfler, W.: DNA methylation in the promoter of ribosomal RNA genes in human cells as determined by genomic sequencing. *FEBS Letters* 388, 192-194 (1996).
- Hornstra, I.K. and Yang, T.P.: *In vivo* footprinting and genomic sequencing by ligation-mediated PCR. *Anal. Biochem.* 213, 179-193 (1993).
- Nelson, M. and McClelland, M.: Site-specific methylation: effect on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research* 19, 2045-2071 (1991).
- Jeddeloh, J.A. and Richards, E.J.: mCCG methylation in angiosperms. *The Plant Journal* 9, 579-586 (1996).

# Způsoby izolace translačně aktivní a neaktivní RNA

Honys, D.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 16/15, 166 30 Praha 6  
tel: 02/36 80 10, fax: 02/361 52 30, e-mail: honys@site.cas.cz

---

## 1. O co jde

Molekuly RNA neplují v cytoplasmě osamocené či lépe řečeno nahé, ale jsou po celou dobu své existence obklopeny množstvím bílkovin na ně navázaných, je chránících a výrazně ovlivňujících jejich životní dráhu. Takto vzniklé ribonukleoproteinové částice, krátce RNP, mají mimo své funkce charakteristickou molekulovou hmotnost danou druhem a množstvím bílkovin asociovaných s molekulou RNA.

Právě na rozdílné molekulové hmotnosti translačně aktivních a neaktivních RNP je založena metoda jejich separace. Translačně neaktivní mRNA se v buňkách nacházejí ve formě volných RNP, které jsou lehčí než ribonukleoproteinové komplexy, na nichž probíhá translace, známé polysomy (Spirin a Nemer 1965). Aby nebyla situace tak jednoduchá, ne na všech polysomech musí v daném okamžiku docházet k translaci, některé mohou být translačně neaktivní. Tyto struktury byly popsány zejména ve stresových podmínkách (Crosby a Vayda 1991, Davies 1993) a jedna z možností, jak je rozpoznat, bude diskutována níže.

Na počátku izolace se oba typy RNP komplexů, volné RNP i polysomy, nacházejí ve směsi a k jejich oddělení dochází během centrifugace díky jejich odlišným sedimentačním charakteristikám. Běžně se používají dva typy separací, a to centrifugace postmitochondriálního supernatantu přes sacharosový polštářek či v lineárním sacharosovém gradientu. Při centrifugaci přes sacharosový polštářek oddělíme obě populace RNA tak, že za konkrétních podmínek sedimentují pouze polysomy, zatímco volné RNP setrvávají v supernatantu. Pomocí centrifugace v sacharosovém gradientu získáme tzv. polysomální profil, t.j. distribuci ribonukleoproteinových komplexů podle hmotnosti a pro další izolaci větší množství frakcí.

## 2. Co potřebujeme

Při separaci vystačíme s běžnými chemikáliemi, laboratorním sklem a porcelánem. Jediným omezením je fakt, že veškeré použité pomůcky musí být prosty RNAs, jak nás poučí v každém molekulárně biologickém manuálu (Sambrook et al. 1989). V praxi to znamená, že laboratorní sklo a porcelán před použitím pečeme 3 hodiny ve 200°C, méně odolné pomůcky autoklávueme nebo povaříme v 70% ethanolu. Roztoky, u nichž je to možné, před autokláfováním ošetříme DMDC (Fluka). Roztoky obsahující Tris ošetřovat DMDC nemůžeme, připravíme je tedy čerstvé ve sterilní vodě i nádobí.

Jediné speciální vybavení, bez něhož se neobejdeme, jsou centrifugační zkumavky a rotory. Pro polštářkovou metodu potřebujeme rotor Beckman 75Ti a odpovídající zkumavky Beckman (#355630), při separaci v sacharosovém gradientu uijeme rotor Beckman NVT 90 a zkumavky Beckman OptiSeal (#362185).

## 3. Jak to uděláme

Prvním krokem obou popisovaných metod je příprava postmitochondriálního supernatantu. Nejprve homogenisujeme přibližně 100 mg rostlinné tkáně v homogenisačním puftru (sacharosa, Tris-Cl, KCl, MgOAc, EGTA, PTE, β-merkapt ethanol) v tekutém dusíku ve sterilní třecí misce s tloučkem a převedeme do centrifugační zkumavky. Poté je nutno nechat vzorek odpočinout 15 minut na ledu. Desetiminutovou centrifugací při 300 g odstraníme těžké buněčné součásti a po další desetiminutové centrifugací supernatantu při 20 000 g získáme kýžený postmitochondriální supernatant.

### 3.1 Separace pomocí sacharosového polštářku

Je-li naším cílem centrifugace přes sacharosový polštářek, převrstvíme postmitochondriální supernatant přes předem připravený polštářek 60% sacharosy v pufru KTM (Tris-Cl, KCl, MgOAc, EGTA, PTE,  $\beta$ -merkaptoethanol) a hodinu centrifugujeme při 320 000 g. Pellet je tvořen polysomální frakcí, zatímco supernatant musíme znovu centrifugovat přes noc za stejných podmínek, abychom sedimentovali i frakci volných RNP.

Po uvedené separaci nejčastěji následuje izolace celkové RNA z obou frakcí (Chomczynski a Sacchi 1987). Pellet rozpustíme ve vzorkovém pufru (guanidinium thiokyanát, citrát sodný,  $\beta$ -merkaptoethanol), roztok okyselíme přidáním NaOAc a extrahujeme směsí fenol/chloroform/isoamylalkohol. Celkovou RNA přítomnou ve vodné fázi precipitujeme pomocí 2-propanolu, sedimentujeme a po propláchnutí 75% ethanolem rozpustíme v destilované vodě. Z celkové RNA můžeme pomocí afinitní chromatografie přechistit mRNA (Promega 1992a). Principem metody je hybridizace poly(A) řetězců molekul mRNA k oligo(dT) řetězcům navázaným na pevný paramagnetický nosič (Whitesides et al. 1983). Magnetických vlastností nosičů se využívá při promývání a eluci mRNA.

Již mimo rámec této kapitoly patří další použití izolované RNA. Informační obsah každé frakce mRNA a rozdíly mezi nimi je lze zjistit po provedení *in vitro* translace v heterologním systému z králíčích retikulocytů (Promega 1992b). Přítomnost konkrétních transkriptů může být odhalena pomocí Northern blot hybridizace či RNase protection assay.

Učiníme jedinou výjimku a podrobněji popíšeme metodu run-off translace polysomů bez předchozí izolace RNA (Vayda 1995), neboť tento postup nám umožní rozeznat mRNA aktivně translatované *in vivo* od polysomálních messengerů t.č. translačně inaktivních (viz. výše). Obecně, při *in vitro* translaci smícháme nebuněčný translační systém, vyrobený na basi lysátu z králíčích retikulocytů (Promega, #L4960), s námi dodanou mRNA a radioaktivně značenými aminokyselinami a necháme proběhnout translační reakci. Tak získáme radioaktivně značené bílkoviny syntetizované *de novo* na základě matric naší mRNA. Zjistíme ujednak inkorporaci, tedy množství nově vytvořených polypeptidů a ujednak spektrum bílkovin na elektroforese, tedy informační obsah vnesené mRNA. V našem případě vycházíme z bodu, kdy jsme po první centrifugaci při 320 000 g sedimentovali polysomy. Tyto rozpustíme ve sterilní destilované vodě a část z nich použijeme namísto roztoku celkové RNA nebo mRNA při míchání reakční směsi. Tím vneseme do původně heterologního translačního systému mimo molekul RNA i na ně navázané bílkoviny regulující jejich translaci, čímž vytvoříme systém semihomologní, který přesněji odráží situaci v námi zkoumané tkáni.

Z obou sedimentů, polysomálního i tvořeného frakcí volných RNP, můžeme také izolovat a analyzovat bílkoviny (Madjar 1994).

### 3.2 Separace v sacharosovém gradientu

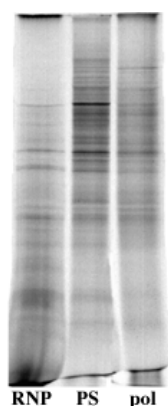
Hodláme-li rozdělit ribonukleoproteinové komplexy podle jejich hmotnosti v lineárním sacharosovém gradientu, převrstvíme postmitochondriální supernatant přes předem připravený gradient 10-60% sacharosy v centrifugačních zkumavkách. Gradient získáme naplněním jedné poloviny objemu zkumavky 60% roztokem sacharosy v gradientovém pufru (Tris-Cl, KCl, MgOAc, DTT, PTE,  $\beta$ -merkaptoethanol) a jeho převrstvením stejným objemem 10% roztoku sacharosy v gradientovém pufru. Zkumavku poté uzavřeme, velice opatrně převrátíme na bok a necháme sacharosu v lednici difundovat po dobu 3 hodin potřebnou k utvoření lineárního gradientu (Davies a Abe 1995). Vzorky poté centrifugujeme 3 hodiny při 100 000 g. Následně rozebereme gradient (BioRad, Econo System), na zapisovači získáme kvantitativní vyhodnocení distribuce ribonukleoproteinů v jednotlivých vrstvách gradientu a nasbíráme frakce. Z jednotlivých frakcí můžeme podobně jako v předešlém případě izolovat RNA (Chomczynski a Sacchi 1987, Promega 1992a), či bílkoviny (Madjar 1994).

### 4. Jak zjistíme, co jsme udělali

První podmínkou úspěchu je přesně kvantifikovat izolovanou RNA. Spektrofotometrické měření absorbance roztoku RNA při 260 nm, běžně užívané pro celkovou RNA se v případě mRNA ukazuje býti nedostatečným. Důvodem je malý výtěžek, s tím související nedostačující rozlišovací schopnost

spektrofotometru a zejména jiný poměr mezi mRNA a celkovou RNA v získaných frakcích. Mnohem přesnější je odhadnout množství mRNA dot blot hybridisací s oligo(dT) nebo oligo(rU) probou a porovnáním se standardem o známé koncentraci.

Spektra bílkovin syntetisovaných při *in vitro* translaci zviditelníme pomocí SDS-PAGE (Obr. 1). Takto máme možnost porovnat informační obsah jednotlivých populací RNA.



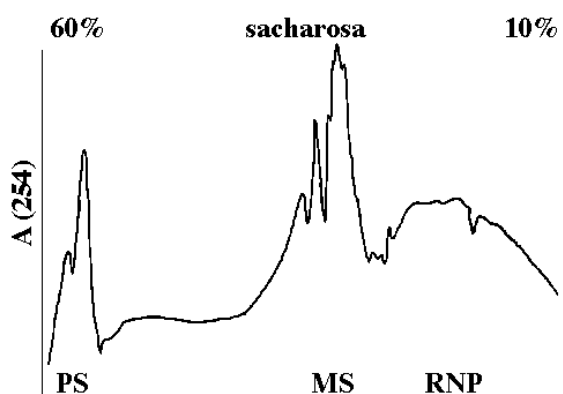
**Obr. 1**

Spektrum bílkovin syntetisovaných *in vitro* v heterologním translačním systému na základě matrice mRNA obsažené ve frakci volných RNP (RNP), v polysomální frakci (PS) a v semihomologním systému s použitím celých polysomů (pol). Jako výchozí materiál byl použit nezralý pyl tabáku (*Nicotiana tabacum*).

Druhý obrázek nám ukazuje zápis distribuce RNP částic v lineárním sacharosovém gradientu. Peaky odpovídají zvýšené koncentraci komplexů obsahujících RNA v jednotlivých vrstvách gradientu. Obvykle jsme schopni rozlišit tři skupiny peaků odpovídající volným RNP, monosomům a polysomům.

## 5. Máme na to?

Ve srovnání s jinými molekulárně biologickými postupy nepatří popisované metody k finančně nejnáročnějším. Nejnákladnější položku představují centrifugační zkumavky, firmou Beckman patřičně ohodnocené. To platí pochopitelně pouze v případě, že není nutno předem investovat do rotoru nebo nedej bože do centrifugy. Jeden člověk může bez problémů zpracovat čtyři vzorky najednou a celý



**Obr. 2**

Polysomální profil získaný ze stadia 3 nezralého pylu tabáku (*Nicotiana tabacum*). Distribuce ribonukleoproteinových částic byla zjišťována v lineárním gradientu 10-60% sacharosy. (PS-polysomy, MS-monosomy, RNP-volné RNP)

protokol je lze zvládnout za jeden den v případě sacharosových gradientů či za dva dny, používáme-li polštářkovou metodu.

## 6. Čeho bychom se měli vyvarovat

Polysomy jsou velice citlivé na přítomnost RNAs, vyšší teplotu, koncentraci solí a mají tendenci se časem rozpadat. Proto je nutné držet vzorky neustále na ledu a minimalisovat dobu mezi jednotlivými kroky. Za samozřejmost považujeme přísné dodržování prostředí prostého RNAs, bez něhož nemůžeme očekávat uspokojivé výsledky.

Jinak jsme při používání popsanych metod nenalezli vážnějších úskalí. Pouze považujeme za vhodné upozornit na nutnost důkladné homogenisace vzorku s tekutým dusíkem a následné dodržení

jeho přibližně patnáctiminutového odpočinutí na ledu, kdy dochází k uvolňování ribonukleoproteinových částic z buněčných struktur.

Literatura:

- Chomczynski P. a Sacchi N. (1987): *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.  
Crosby J.S. a Vayda M.E. (1991): *Plant Cell* **3**, 1013-1023.  
Davies E. (1993): *Seminars Cell. Biol.* **4**, 139-147.  
Davies E. a Abe S. (1995): *Methods Cell. Biol.*, **50**, 209-222.  
Madjar J.J. (1994): *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, pp 657-661.  
Promega (1992a): PolyAtract mRNA isolation systems. Technical manual, #TM021.  
Promega (1992b): Rabbit reticulocyte lysate system, Technical manual, #TM232.  
Sambrook J., Fritsch E.F. a Maniatis T. (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.  
Spirin A.S. a Nemer M. (1965): *Science* **150**, 214.  
Vayda M.E. (1995): *Methods Cell Biol.*, **50**, 349-359.  
Whitesides G.M., Kazlauskas R.J. a Josephson L. (1983): *Trends Biochem. Sci.* **1**, 144-148.



## Syntéza a purifikace oligonukleotidů

Konečná, H.

Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
tel: 05/41 12 93 71, fax: 05/41 12 93 72, e-mail: hanak@sci.muni.cz

---

Pokrok v mnoha oblastech molekulární biologie by nebyl možný bez existence automatických syntetizátorů oligonukleotidů. Jejich produkty mají nespočet aplikací, zejména v oblasti rekombinantní DNA (PCR, sekvenování, konstrukce duplexů, hybridizační próby, místně cílená mutagenéza aj.). Analoga oligonukleotidů jsou intenzivně studována jako potenciální protirakovinná a antivirová léčiva. Miligramová množství oligonukleotidů vyžadují strukturální rentgenové analýzy a NMR spektroskopická studia.

DNA je chemicky syntetizována obráceně než *in vivo*, tedy od 3' k 5' konci. Cyklickým procesem, který se odvíjí od 3' terminální báze zakotvené na kolonce nebo membráně, jsou postupně připojovány jednotlivé monomery podle zadané sekvence. Celý cyklus se skládá z připojení aktivovaného monomeru k rostoucímu řetězci, deaktivace nezreagovaných 5' konců, oxidace labilního trivalentního fosforu na pentavalentní a odblokování ochranné skupiny na 5' konci. Tím je řetězec připraven na další cyklus, který se opakuje tak dlouho, až je zadaná sekvence kompletní. Pak je produkt odštěpen z pevné fáze a podroben finální deprotekcí obvykle přes noc.

Kvalitní syntéza probíhá s účinností 98 - 99% na jeden cyklus, což pro běžný 20-mer znamená, že očekávaný oligonukleotid bude ve výsledném produktu tvořit 67 - 82 %. Během syntézy se spektrofotometricky nebo konduktometricky sledují odštěpené tritylové skupiny, které fungují jako markery účinnosti připojení následující báze. Výtěžek syntézy se stanovuje měřením absorbance při 260 nm. Kvalita oligonukleotidů se nejčastěji kontroluje elektroforeticky (PAGE nebo kapilární elektroforéza), chromatograficky, event. se využívá hmotnostní spektrometrie.

Surový produkt po syntéze obsahuje nejenom očekávaný oligonukleotid, ale také jisté procento kratších nedosyntetizovaných řetězců, minoritní frakci delších řetězců, amonné soli, benzamid, isobutyramid a stopová množství dalších organických látek. Koncentrace nežádoucích látek vždy závisí na kvalitě syntézy a délce oligonukleotidu. Kvalitní produkt běžné délky nepotřebuje pro většinu dalších aplikací žádné dodatečné čištění. Každá purifikace zvyšuje náklady a uživatel vždy musí vzít v úvahu příslušnou aplikaci. Pro sekvenování a PCR mohou být obvykle použity surové primery mající 80% čistotu, event. primery po odsolení. Odstranění nízkomolekulárních nečistot se provádí etanolovou precipitací nebo gelovou filtrací na kolonce Sephadexu G-25. Pokud je pro některé aplikace nutné odstranit kratší nedosyntetizované řetězce (např. pro antisense hybridizace), používá se purifikace na OPC (Oligonucleotide Purification Cartridge). Finančně nejnáročnějším způsobem čištění je HPLC.

Na trhu je řada vysoce efektivních syntetizátorů, které často pracují v režimu několika syntéz běžících současně. V tomto oboru se zejména angažují firmy Perkin-Elmer, PerSeptive Biosystems, Pharmacia, Beckman a Cruachem. Běžný lyofilizovaný oligonukleotid lze dokončit ve 24 hodinách. Existují i speciální (dražší) postupy, jak zkrátit postsyntetické procesy, aby mohl být oligonukleotid dokončen během několika hodin po zadání. Syntetizátory umožňují syntézu nejrůznějších modifikací oligonukleotidů - fosforothioáty, značení biotinem, fluorescenčními značkami, užití inosinu, degenerované oligonukleotidy, amino deriváty užívané pro postsyntetické derivatizace oligonukleotidu (připojení digoxigeninu aj.). Většina syntetizátorů je schopna syntetizovat kromě DNA též RNA, produkt je však několikanásobně dražší než DNA. Pouze syntetizátor Expedite 8909 firmy PerSeptive Biosystems umožňuje navíc i syntézu PNA (Peptide Nucleic Acid). To je nová skupina informačních molekul, které

obsahují neutrální, peptidu podobný řetězec s bázemi dovolujícími hybridizaci s komplementární DNA nebo RNA.

### **Praktické rady pro uživatele:**

Rozsah syntézy (scale), kterou zadáváte, není finální koncentrace budoucího oligonukleotidu. Je to koncentrace 3' báze, zakotvené na kolonce či membráně. Skutečný výtěžek závisí na kvalitě syntézy, délce oligonukleotidu, sekvenci a použité purifikační metodě. Koncentrace surového produktu stanovená měřením absorbance při 260 nm zahrnuje i přítomné nečistoty, je proto pouze přibližná. Přesnější odečet je možný po odsolení. Každý syntetizátor umožňuje výběr z několika koncentračních rozsahů, náš Expedite např. nabízí pro DNA 50 nmol, 200 nmol, 1 μmol a 15 mmol syntézu. Požadujete-li purifikaci na OPC kolonce, musí být oligonukleotid syntetizován s poslední tritylovou skupinou ponechanou na 5' konci. Na základě hydrofobicity této skupiny se pak na reverzní fázi zachytí pouze kompletní produkt, všechny ostatní nečistoty jsou odmyty. Tento typ purifikace nelze, na rozdíl od gelové filtrace a etanolového srážení, provést dodatečně. Stejně to platí pro HPLC čištění na reverzní fázi.

Degenerované pozice v oligonukleotidu je možné navrhnout jako kombinaci bází v příslušné pozici, nebo použít 2' deoxyinosinu, který má nízkou, ale nestejnou vaznost k ostatním bazím. Lze též využít univerzálního nukleosidu, který nehybridizuje se žádnou ze čtyř bází.

Počítačové programy jako **Oligo** (National Biosciences), **Primer Designer** (Scientific and Educational Software), **Primer Detective** (Clontech Laboratories) vám pomohou vybrat optimální primer pro vaši konkrétní aplikaci. Hlavní zásady pro navrhování PCR primeru: sekvence unikátní pro danou oblast, nejdůležitější je 3' konec. Na 3' konec zařaďte jeden až dva G/C nukleotidy, které zajistí kvalitní "annealing". Vyberte primer s náhodnou distribucí bází, s obsahem GC obdobným jako ve fragmentu, který má být amplifikován. Nepoužívejte řady purinů nebo pyrimidinů jdoucích za sebou. Vyhněte se primerům se stabilními sekundárními strukturami, zvláště na 3' konci. Zvláště se vyhněte primerům, které tvoří "hairpins" a jsou vzájemně komplementární. Nespolehejte slepě na počítač. Primery, které jsou programem zavrženy jako nepoužitelné, někdy fungují a tzv. dobře navržené primery občas nefungují.

Literatura:

Manuály a aplikační protokoly firem **PerSeptive Biosystems, Perkin-Elmer, Beckman, Cruachem, Pharmacia**

## **Analýza rostlinného genomu pomocí pulzní gelové elektroforézy**

Kovařík, A.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno  
tel: 05/41 51 71 78, fax: 05/42 21 12 93, e-mail: kovarik@ibp.cz

### **Teoretický princip pulzní gelové elektroforézy (PFGE)**

Pulzní elektroforéza je analytická metoda, pomocí níž lze analyzovat velké úseky DNA o délce 50-5000 kb. Nejčastěji používaná konvenční agarózová elektroforéza je v nejjednodušším uspořádání schopna separovat molekuly o velikosti 0.2 - 20 kb. Molekuly nad 20 kb při konvenční elektroforéze zaujmají přibližně stejnou konformaci (mají srovnatelný gyrační poloměr) a tudíž migrují stejnou rychlostí. Výsledkem je ztráta dělivosti gelu a rozmazaný obraz heterogenní, málo rozdělené populace molekul. V roce 1984 Cantor a Schwarz přišli s revoluční myšlenkou použít pro separaci dlouhých úseků DNA elektroforézu s dvěma elektrickými poli orientovanými kolmo na sebe. Elektrická pole se navzájem periodicky zapínají a vypínají, což indukuje reorientaci každé molekuly DNA v gelu. Rychlost reorientace ve směru nového pole je závislá na velikosti molekuly, přičemž platí, že čím je větší velikost (délka DNA v kb) tím pomalejší je její reorientace pravděpodobně vlivem sterických interakcí s agarózovou maticí. Čas ztrávený orientací molekuly ve směru nového pole je rozhodujícím parametrem pro separaci molekul DNA v PFGE. Na molekulární úrovni je pohyb DNA v gelu "plazivý" a připomíná klikatou čáru. Poněvadž však velikost a čas sepnutí obou elektrických polí jsou shodné výsledná celková dráha DNA fragmentů je přímá.

### **Kritické parametry PFGE**

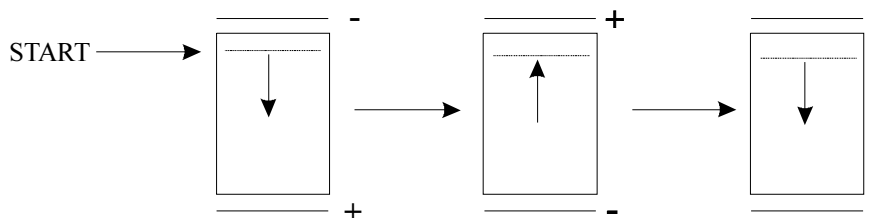
1. Uniformita elektrického pole. Vlivem nehomogenity elektrického pole dochází k nerovnoměrné migraci molekul a pokřivení dráhy.
2. Délka časových pulzů. Variací délky elektrických pulzů lze dosáhnout optimálního rozdělení molekul v požadované oblasti délek. U většiny komerčních systémů je délka pulzů programovatelná.
3. Poměr délek elektrických pulzů v obou polích.
4. Vektor elektrického pole. Uspořádání elektrod v podélném směru určuje úhel, pod kterým se molekuly DNA reorientují. Jako optimální bylo zjištěno střídání 60 a 120° v CHEF systému.
5. Relativní intenzita obou polí. Vyšším napětím lze zkrátit urychlit pohyb molekul a tím i zkrátit dobu běhu elektroforézy, avšak vzrůstají požadavky na chlazení systému.

### **Technické zabezpečení**

Elektroforetická aparatura představuje nejdůležitější část zařízení nezbytného pro uskutečnění elektroforézy.

Technické uspořádání elektrod PFGE prodělalo během uplynulých let značný vývoj a v současné době je z literatury známo až 7 různých systémů. V běžných laboratořích však převládají systémy FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) a CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis). Systém FIGE periodicky přepíná elektrické pole v jednom směru, takže se molekuly orientují o 180° při každém přepnutí:

Systém FIGE je schopen separovat fragmenty v rozmezí 20-700 kb, což postačuje pro značnou část genomových analýz. Cena zařízení je rovněž výrazně nižší (až 3 x) než u ostatních systémů a představuje investici ca. 120 000 Kč. Systém CHEF zejména ve spojení s počítačem řízenými pulzy



přestavuje nejdokonalejší uspořádání umožňující v optimálních podmínkách separaci molekul až do 5 Mb. Systém je složen z celkem 24 elektrod a jimi vytvořené vektorové elektrické pole střídavě orientuje molekuly o 60° resp. 120°. Nejběžněji používaný je systém CHEF-DRII-III firmy Biorad v ceně ca 200 000 Kč. Počítačem řízeným CHEF-MAPPER systémem je až 3x dražší.

Pulzní elektroforéza se obvykle provádí při teplotách 12-16°C, a proto je nezbytné elektroforetický pufr recirkulovat přes chladicí lázeň nebo kryostat. Pro fluorescenční detekci fragmentů DNA (pomocí ethidium bromidu) je zapotřebí transiluminátor.

### Příprava vzorků pro PFGE

Vzhledem k tomu, že velikost analyzovaných fragmentů se běžně pohybuje od 50 - 1000 kb, je třeba při přípravě DNA dbát na to aby připravená DNA byla nejméně 1000 kb dlouhá. Při klasických postupech izolace DNA zpravidla délka DNA molekul nepřesahuje 50-100 kb. Zkracování je způsobeno mechanickým poškozením vlivem střížných sil, působící v roztoku například při míchání. Proto se při izolaci vysokomolekulární DNA vyhýbáme manipulaci v roztoku a celou proceduru purifikace provádíme v agarózových bločcích, které zabraňují mechanickému poškození. Všechny kroky jsou prováděny v prostředí vysoké koncentrace EDTA, která inhibuje většinu buněčných nukleolytických enzymů. Výchozím materiálem jsou nejlépe izolované protoplasty (buňky zbavené celulozové stěny) nebo izolovaná jádra v množství ca  $2 \times 10^6$  buněk na jeden bloček. K suspensi protoplastů v koncentraci  $4 \times 10^7$  buněk/ml přidáme stejný objem 1.5% nízkotuhnoucí agarózy v 0.4M manitolu zahřáté na 50°C, opatrně rozmícháme a suspensi zalijeme od formy. Formu poté umístíme do ledničky, kde agaróza ztuhne. Po zatuhnutí agarózové bločky se vzorky opatrně vyjmeme a přeneseme do zkumavky s předem připraveným roztokem obsahujícím Proteásu-K (400 ug/ml), 1% laurylsarkosin, 0.5 M EDTA. Bločky inkubujeme při 37°C přes noc. Poté vyměníme lyzační roztok a inkubaci opakujeme. Po 48-ti hodinové deproteinaci by vzorky již neměly být zelené - což je důkaz, že došlo k lýze protoplastů a uvolnění chlorofylu. Proteasu-K poté inaktivujeme 1mM PMSF a bločky uchováváme v 0.5M EDTA při 4°C. Velmi čisté preparáty vysokomolekulární DNA jsou stabilní i několik let.

### Manipulace DNA v agarózových bločcích

Prakticky většina DNA analýz využívá restričních endonukleáz. Enzymová manipulace DNA v agarózových bločcích je zpravidla mnohem obtížnější než v roztoku a obecně vyžaduje vyšší koncentrace enzymu. Rovněž ne všechny enzymy jsou schopny pracovat v prostředí agarózy a jejich seznam je možno nalézt například v katalogu firmy NEB. Pro totální štěpení vysokomolekulární DNA restričními enzymy je zapotřebí alespoň 5 násobně vyšší aktivity enzymu než při štěpení stejného množství DNA v roztoku, což celou proceduru výrazně prodražuje. Vzhledem k labilitě některých enzymů doporučujeme opakované štěpení dvěma dávkami enzymu. Před přidáním enzymu agarózový bloček preinkubujeme opakovaně (2 x 30 min) s restričním pufrům. Na jedno štěpení použijeme zhruba 50-100 jednotek enzymu, což představuje finanční zatížení ca 100-200 Kč. Enzym se po štěpení DNA inaktivuje pomocí EDTA a bloček se umístí do komůrky gelu a eventuálně zalije nízkotuhnoucí agarózou v elektroforetickém pufru.

## Vyhodnocení průběhu elektroforézy

Vlastní elektroforetická separace probíhá nejčastěji po dobu alespoň 16 hod, jsou však popsány běhy i 48 hod. Důležitou otázkou je programování pulzního zdroje. Pulzní zdroj napětí naprogramujeme tak, aby se postupně pulzní časy prodlužovaly, přičemž platí čím delší fragmenty požadujeme separovat, tím delší pulzní čas nastavíme. Například pro separaci molekul 50-800 kb na CHEF-DRII systému volíme na počátku 10 sekundové pulzy, na konci běhu 60s. Jako elektroforetický pufr se nejčastěji používá Tris-borátový pufr, pH 8.0 (0.045 M Tris-borát, 0.001 M EDTA) a je vhodné si tento ještě před vlastním během předchladit na 12-16 °C. Napětí přiváděné na elektrody se pohybuje v rozmezí 160-200 V. Po skončení běhu gel barvíme roztokem ethidium bromidu (1 ug/ml H<sub>2</sub>O) a proužky DNA vizualizujeme pomocí UV světla. V případě, že připravená DNA je intaktní, pohybuje se jako proužek v zóně komprese t.j. v oblasti limitního dělení elektroforetického systému (obvykle >800 kb). Gel lze poté blotovat na nylonovou membránu a provést molekulární hybridizaci se specifickou sondou. Jako standarty pro porovnání délek používáme ligované konkatemery fága I (50-1000 kb), pro větší délky pak chromozomy *Sacharomyces cerevisiae* (225-2500 kb).

## Úskalí metody

Při použití komerčních elektroforetických aparatur zpravidla odpadají problémy spojené s vlastní elektroforézou. Nejčastějším úskalím bývá příprava vysokomolekulární DNA. Připravená DNA má často následující nedostatky, které znemožňují její další analýzu: 1. *DNA není intaktní, ale je již degradovaná na nízkomolekulární fragmenty*. Na gelu se takový vzorek projeví jako šmouha směrem k čelu gelu. Znamená to, že během přípravy nebo často již v samém výchozím materiálu došlo k mechanickému nebo nukleolytickému štěpení DNA. Doporučujeme proto při přípravě protoplastů vycházet z mladých listů, ze světlých částí kalusů a suspensí kultur v exponenciální fázi růstu. Ve starších nebo nekrotických tkáních bývá DNA často poškozena. Doba inkubace tkáně v protoplastovacím roztoku by měla být co nejkratší - pro deproteinaci často postačuje jen částečná degradace celulosové stěny. 2. *DNA není štěpitelná restričními enzymy*. Pro kontrolu štěpitelnosti doporučujeme zařadit štípání enzymy, které poskytují krátké restriční fragmenty (v průměru < 5 kb). Na gelu by tato dráha neměla obsahovat žádnou viditelnou stopu DNA, neboť krátké fragmenty vymigrují z gelu. Pokud DNA není dobře štěpitelná použijeme větší množství enzymů Proteasy, eventuálně Celulasy pro dokonalejší purifikaci. Rovněž je třeba dbát na důsledné odstranění EDTA ze vzorku.

## Aplikace PFGE

PFGE je unikátní, vysoce citlivá metoda určená pro separaci vysokomolekulární DNA. Poskytuje informace o vzájemné poloze genů, repetitivních sekvencí v úsecích, které jsou příliš velké pro detailní sekvenování nukleotidů nebo naopak příliš malé pro analýzu pomocí hybridizace in situ. Spojením sekvenačních technik, pulzní gelové elektroforézy a hybridizace in situ lze dosáhnout přesné charakterizace genových oblastí na chromozomu. Z tohoto důvodu se všechny tři metody uplatňují ve velkých komplexních projektech, jako je mapování genomů různých biologických druhů. Praktického využití se PFGE dočkala v rostlinné aplikované genetice, kdy pomocí restričních polymorfismů lze charakterizovat příbuzné biologické druhy nebo jednotlivé kultivary hospodářsky významných plodin.

Literatura:

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Birren, B., Lai, E. (1993) Pulsed Field Gel Electrophoresis. A practical guide. Academic Press, INC. San Diego.

## Zkušenosti s genetickým analyzátořem ABI PRISM 310

Nejedlá, E.

Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 61137 Brno  
tel: 05/41 12 93 71, fax: 05/41 12 93 72, e-mail: nejedla@sci.muni.cz

**Genetický analyzátoř ABI PRISM 310** firmy Perkin-Elmer, divize Applied Biosystems byl na trh uveden v roce 1995. V současnosti je to jediný přístroj, který umožňuje provádět i menším laboratořím plně automatizovanou sekvenační a fragmentační analýzu DNA. Analyzátoř pracuje na principu elektroforetického dělení fragmentů ve velmi tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Je vybaven automatickým dávkovačem na 48 (resp. 96) vzorků. Pro každý vzorek je kapilára naplněna čerstvým polymerem, poté je automaticky nanesen přesný objem vzorku. Tento postup zaručuje vysokou reprodukovatelnost analýz a zároveň se snižuje pracnost, protože odpadá potřeba nalévání gelů. Materiál a reagentie se využijí jen pro daný počet vzorků. Sekvenování probíhá podle Sangerovy metody. Analýza je založena na patentovaném procesu ABI PRISM - detekce vícebarevné fluorescence ze značených primerů, terminátorů (ddTNP) nebo inkorporovaných nukleotidů (dUTP, dCTP) po excitaci argonovým laserem (excitační spektrum 488 - 514 nm). Detekce emitovaného záření je prováděna pomocí citlivého CCD chipu s maximální citlivostí ve spektrálním pásmu 525 - 650 nm. Při jediném průchodu kapilárou je proto možné při sekvenování stanovit pořadí všech čtyř bází, nebo při analýze fragmentů analyzovat 3 vzorky současně (3 vzorky + délkový standard). Řízení celého procesu i zpracování dat probíhá současně za použití výkonného počítače Apple Power Macintosh a speciálního software.

**Správná příprava vzorku** je prvním předpokladem úspěšného sekvenování. Ačkoliv existují různé (levnější) postupy, jak získat čistou DNA, pro fluorescenční sekvenování je nejvhodnější izolace DNA pomocí produktů firmy Qiagen nebo alkalickou lyzou s PEG precipitací. Sekvenovat lze plazmidovou DNA a PCR produkty. U PCR produktů je nutné před sekvenováním velmi pečlivě odstranit všechny zbytky primerů a dNTP, protože by se změnilo složení reakční směsi a značení by neproběhlo!

Dalším důležitým faktorem je správné **určení koncentrace DNA** (nejlépe pomocí spektrofluorimetrické metody, protože stanovení z gelu není příliš přesné) a volba správné sekvenační strategie. Doporučené koncentrace templátů: ssDNA 50-100 ng/ul, 300-600 ng na reakci, ds DNA 100 - 200 ng/ul, 0,6 - 1,2 ug na reakci, PCR DNA 10 - 30 ng/ul, 60 - 180 ng na reakci..

Některé typy templátů (zejména GC, resp. AT - rich, templáty s dlouhou homopolymerní sekvencí, templáty s dlouhými repeaty nebo templáty, které tvoří sekundární struktury) jsou obecně hůře sekvenovatelné a je nutno upravovat sekvenační strategii.

**Příprava značených fragmentů probíhá pomocí cyklického (PCR) sekvenování a to buď za použití značených primerů nebo terminátorů.** Značení probíhá za použití ready-reaction cycle sequencing kits, které obsahují AmpliTaq DNA polymerázu FS, směs d/ddNTP a pufr ve stabilním složení, které zaručuje pohodlnou práci a reprodukovatelnost metody. Po skončení PCR sekvenování je nutné vzniklé fragmenty přesrážet a odstranit všechny nezreagované složky kitu. Tento krok je důležitý zejména při práci se značenými terminátory. DNA se pak rozpustí v TSR (Template supression reagent), provede se závěrečná denaturace a vzorek se vloží do analyzátořu.

Celý postup přípravy značených fragmentů probíhá podle protokolu optimalizovaného firmou Perkin Elmer. Trvá 3,5 - 4 hodiny, vlastní analýza vzorku (600 bází) 2,75 hod., pro kratší PCR produkty asi 90 minut (při přesnosti sekvenování 98,5 %).

Softwarové zpracování dat trvá pouze necelou minutu!

**Náklady** na 1 analýzu : přibližně 500 Kč.

**Výhody:** odpadá náročné nalévání gelů, reagentie se spotřebovávají pouze pro daný počet vzorků, automatické provádění operací zaručuje stále stejné podmínky pro všechny analýzy (čímž se

zvyšuje reprodukovatelnost stanovení), přístroj může pracovat přes noc bez dozoru, takže se efektivně využívá i nejcennější deviza - tj. čas!!!

Literatura:

The Qiagen Guide to Template Purification and DNA Sequencing - možno objednat u firmy Qiagen jako FREE Literature

ABI PRISM 310 - User's manual Perkin - Elmer

DNA Sequencing - Chemistry guide Perkin - Elmer

ABI PRISM™ Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Protocol

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Protocol

ostatní firemní literatura Perkin - Elmer

## Metody transformace rostlin pomocí agrobacteria

Pavingerová, D.

Ústav molekulární biologie rostlin AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
tel.: 038/777 55 05, fax: 038/414 75, e-mail: daniela@umbr.cas.cz

Principem všech metod transformace rostlinných pletiv pomocí agrobacteria je zabezpečit kontakt poraněných rostlinných buněk s buňkami bakterie rodu *Agrobacterium*, což odstartuje přenos T-DNA do rostlinného genomu. K tomuto účelu byla vyvinuta řada metod, z nichž se na pracovišti ÚMBR nejčastěji používají tři: disková metoda, transformace semen a infiltrace.

### Disková metoda:

Metoda transformace listových disků představuje ideální kombinaci vysoké transformační frekvence se snadnou a rychlou selekcí regenerovaných transformantů. Poprvé ji popsal Horsch et al. (1985) a postupně byla modifikována v mnoha laboratořích tak, že je použitelná na jakoukoli část rostliny (kořen, hypokotyl, internodia, stonkové segmenty atd).

Metoda je velmi jednoduchá a nevyžaduje žádné speciální vybavení. Zvolenou část *in vitro* kultivované rostliny rozstříháme na segmenty asi 1 cm dlouhé, u listů na terčíky asi 5x5 mm, a ty ponoříme do připravené bakteriální suspenze tak, aby všechny řezné plochy přišly s touto suspenzí do styku. Po určité době kokultivace částí rostliny s bakteriemi se transformované segmenty přenesou na médium, které eliminuje růst bakterií, umožňuje proliferaci jen transformovaným buňkám a navozuje kalogenezi s následnou regenerací stonků.

### Jak připravit bakteriální suspenzi?

Baktérie kultivujeme přes noc v LK médiu (Langley and Kado, 1972) na třepačce ve tmě při 28°C. Před vlastní transformací je vhodné bakterie stočit (2 minuty při 10000 rpm), supernatant odstranit a bakterie rozředit ve stejném množství 10 mM MgSO<sub>4</sub>. Je rovněž možné přímo naředit bakteriální suspenzi stejným množstvím tekutého kultivačního média (např. MS). Nedoporučuji používat bakteriální suspenzi přímo bez předchozího ředění, jelikož může v některých případech působit na rostlinná pletiva toxicky.

### Jakou část rostliny použít?

Pro transformaci používáme tu část rostliny, ze které spolehlivě umíme získat v podmínkách *in vitro* dostatečný počet regenerantů. Výhodné je zajistit jednobuněčný původ regenerované rostliny, např. využitím somatické embryogeneze a pod.

### Jak dlouhá kokultivace?

Vyzkoušená optimální doba kokultivace bakteriální suspenze s rostlinnými segmenty je 15 - 30 minut. Po této době se transformované části rostliny přenesou na některé základní agarové médium (např. MS) bez antibiotik, kde se ponechají 24 - 48 hod. Při 24 hod kultivaci není nutné osušení segmentů filtračním papírem, jak se často uvádí. U některého rostlinného materiálu je možné nahradit kultivaci na agarovém médiu kultivací v tekutém médiu (segmenty se třepou 24 hod při laboratorní teplotě). Až po této době se aplikují antibiotika pro vyhubení bakterií a selekční činidla.

### Jak eliminovat bakterie?

Baktérie eliminujeme pomocí vhodného antibiotika (podle použitého kmene agrobacteria), které přidáváme do kultivačního média. Antibiotikum neklávujeme, používáme sterilizaci filtrem nebo autosterilizaci (antibiotikum rozpustíme ve sterilní vodě ve sterilní kádince a necháme 2 - 3 hodiny stát).



Na médiu s antibiotikem kultivujeme rostliny i několik měsíců, aby eliminace bakterií byla dokonalá. Často je vhodné použít směs dvou antibiotik.

Nejběžněji používaná antibiotika	nejčastěji používaná koncentrace
Ticarcillin (Ticarpen)	500 mg/l
Carbenicillin	500 mg/l
Vancomycin	500 mg/l
Cefotaxime (Claforan)	200 mg/l
Augmentin	300 mg/l
Timentin	300 mg/l

### Jak stanovit koncentraci selekčního antibiotika?

K selekci se v současné době využívá především gen pro neomycinofosfotransferázu II (*nptII*), který vnáší do rostlin rezistenci ke kanamycinu a gen pro hygromycinofosfotransferázu (*hpt*), který navozuje rezistenci k hygromycinu. Poněvadž tato antibiotika mají zabránit růstu netransformovaných rostlin, musíme nejprve otestovat, na jakou koncentraci antibiotika dané rostliny reagují. To snadno zjistíme kultivací kontrolních rostlin na médiu s koncentrační řadou příslušného antibiotika. Významným a často rozhodujícím znakem bývá fakt, zda rostlina koření, či nikoli. Je si však třeba uvědomit, že koncentrace antibiotika použitá pro selekci regenerovaných rostlin, nemusí souhlasit s koncentrací aplikovanou těsně po transformaci rostlinných segmentů. Ta se často musí snížit, případně úplně vynechat, a antibiotikum využít až pro selekci regenerovaných rostlin. Zde neexistuje jednotný návod, koncentraci selekčního antibiotika je u každého rostlinného druhu nutné vyzkoušet. Rozdíly se mohou vyskytnout i mezi odrůdami téhož druhu.

### Transformace semen:

Tuto zajímavou metodu transformace zavedli v roce 1987 Feldmann a Marks u *Arabidopsis thaliana*. Semena *A. thaliana* se nechají v 50 ml vody předklíčit (třepat při laboratorní teplotě) po dobu 12 - 16 hod. Poté se k nim přidají 3 ml přes noc narostlé bakteriální suspence a společně se kultivují dalších 24 hod. Po této době se semena několikrát propláchnou vodou a vysejí na perlit provlhčený živným roztokem. Získané rostliny se označují jako T1 generace. U T2 generace provádíme selekci na příslušném antibiotiku.

#### Výhody:

- 1) Možnost získání velkého počtu transgenních rostlin při práci v nesterilních podmínkách.
- 2) Není nutná eliminace bakterií pomocí antibiotik (finanční přínos).
- 3) Nedochází k tvorbě kalusu, čímž je vyloučena somaklonální variabilita.

#### Nevýhody:

- 1) Velká variabilita výsledků.
- 2) Metoda zatím použitelná pouze u *Arabidopsis thaliana*.

### Infiltrace:

Jedná se o novou metodu transformace, kterou publikoval Bechtold et al. v roce 1993 a stejně jako předchozí metoda se úspěšně používá zatím jen u *Arabidopsis thaliana*. Spočívá v transportu bakteriálních buněk do rostlinných pletiv vlivem podtlaku. Rostliny ve stádiu kvetení, kdy se již začínají objevovat první plody se ponoří (otočením květináče) do infiltračního média. Infiltrace probíhá ve vakuu ( $10^4$  Pa) po dobu 15 - 20 min. Rostliny se pak opláchnou pod tekoucí vodou a nechají odkvést. T2 semena se vysévají na selekční médium.

Předpokládá se, že bakterie proniknou do vodivých pletiv rostliny, kterými se dostanou až k meristémům květních základů, kde se může T-DNA začlenit do genomu gamet. Výhodou této metody je rovněž vyloučení somaklonální variability.

Příprava infiltračního média: Bakteriální suspenzi (OD = 1,2) stočíme a ředíme do 1/3 původního objemu tekutým MS médiem s 5% sacharózou a s 10 mg/l BAP. Uvádí se, že ve dvou litrech bakteriální suspenze je možné infiltrovat 100 - 500 rostlin.

Literatura:

- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.: *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences 316:1194-1199, 1993.
- Feldmann, K.A., Marks, M.D.: *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. Mol. Gen. Genet. 208:1-9, 1987.
- Langley, R.A., Kado, I.: Studies on *Agrobacterium tumefaciens* conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine and relationships of *A. tumefaciens* mutants to crown-gall tumor induction. Mut. Res. 14:227-286, 1972.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T.: A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227:1229-1231, 1985.

## Cílená a náhodná mutagenese DNA v podmínkách *in vitro*. Příklady a použití

Rotrekl, V.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
tel: 05/41 32 13 74, e-mail: rotrekl@chemi.muni.cz

---

Laboratorní technika prošla v posledních desetiletích obdobím bouřlivé revoluce, jejímž výsledkem jsou přístroje, které nám umožňují studovat vztah struktury a funkce DNA a proteinů. Existují dva směry, kterými je možné k tomuto studiu přistupovat. Je možné indukovat *in vivo* náhodné mutace a izolovat následně jedince s určitým fenotypem a studovat na molekulární úrovni změny, které k danému fenotypu vedly. V opačném směru se pak dá vnést buď náhodná nebo řízená mutace do určitého úseku DNA *in vitro* a studovat buď změny ve struktuře proteinu kódovaného tímto úsekem DNA nebo přímo vliv této mutace na organizmus po zpětném vnesení DNA do organismu. Díky tomu, že se ve druhém uvedeném přístupu dá do jisté míry vynechat závěrečný krok studia *in vivo*, a že tento přístup umožňuje studium změn přímo na molekulární úrovni (struktura a funkce proteinů kódovaných DNA nesoucí mutaci), těší se tato technika v poslední době ve světě velké obliby.

Místně řízená mutagenese je technika, s jejíž pomocí můžeme vnášet, deletovat či zaměňovat nukleotidy v rámci nám známého segmentu DNA. Na rozdíl od jiných technik mutagenese, kde jsou výsledkem většinou velká množství nejrůznějších mutantů, respektuje místně řízená mutagenese (alespoň většinou) názor experimentátora na polohu a strukturu mutované DNA. Vzhledem k přesnosti jakou lze od této techniky očekávat, lze ji využívat ke specifické změně individuálních kodonů aminokyselin v rámci kódujících úseků DNA, nebo k vnášení definovaných mutací majících regulační funkci. Místně řízená mutagenese tak mohla vnést v mnohých případech světlo a poznání do našeho chápání vztahů struktury a funkce proteinů. V jiných případech tak mohla být využita ke konstrukci nových vektorů, či chimerních genů. Přes zdánlivou dokonalost této techniky je si však třeba uvědomit také její omezení. Proteiny jsou nesmírně komplexní struktury a mnohdy by bylo třeba příliš mnoho jednotlivých mutantů k porozumění konkrétní funkce konkrétní oblasti proteinu. Jinými slovy, ke srozumitelnému výkladu výsledku mutagenese je také třeba velké představivosti autora které, jak minulost již ukázala, není vždy dostatek.

V současné době existuje celá řada variací a technik, které je možné použít k místně řízené mutagenese. Všechny tyto techniky mají však společného jmenovatele. Je to oligonukleotid nesoucí mutaci, který nám umožňuje zavedení mutace. Tento oligonukleotid, který je až na limitovaný počet pozměněných bazí komplementární, hybridizuje k jednořetězcové templátové DNA. *In vitro* je poté dosyntetizován komplementární řetězec s použitím uvedeného oligonukleotidu jako primeru. V tuto chvíli je možné odušit existenci několika principů, kde je možná aplikace výše uvedeného principu. Mutaci nesoucí oligonukleotid (primer) je možné použít k PCR amplifikaci námi požadovaného úseku DNA. Ten pak může být například použit k tzv. kazetové mutagenese. Při této technice je využito rozpoznávacích sekvencí restričních endonukleáz na koncích mutovaného úseku DNA. Celý úsek je pak možné použít jako kazetu, která se zamění za homologní úsek DNA divokého typu. Jiným velmi užitečným příkladem techniky využívající výše zmíněného principu je použití vektoru, který je schopen existovat jak v jednořetězcové, tak ve dvojitřetězcové formě DNA. DNA, která má být pozměněna, je naklonována do tohoto vektoru. Oligonukleotid nesoucí mutaci je použit opět jako primer, tentokrát však k syntéze komplementárního řetězce. Tento řetězec je dále zacelen pomocí ligázy. Dvojitřetězcová molekula DNA je následně amplifikována *in vivo*, nejčastěji s použitím bakteriálního hostitelského kmene *E. coli*. Původně byla tato metoda popsána s použitím vektoru M13. V současné době jsou však komerčně dostupné vektory kombinující výhodné vlastnosti klasických plazmidů a fágové DNA. Tyto vektory jsou známy jako fágemidy, z nichž snad nejznámějším (avšak zdaleka ne jediným) příkladem je pBluescript.

Je jasné, že výsledkem popsaných mutagenezních postupů bude vždy směs původní nezmutované DNA s její mutovanou formou. Proto jejich výsledkem bylo možné dosáhnout v ideálním případě padesátiprocentní účinnosti metody. Vzhledem k faktu, že v reálných podmínkách je prakticky nemožné takového výsledku dosáhnout byla vynalezena celá řada modifikací uvedených postupů vedoucích ke zvýšení jejich účinnosti. Příkladem nám může být T.A. Kunkelem popsaná modifikace poskytující velmi silnou selekci proti templátovému řetězci neobsahujícímu mutaci<sup>1,2</sup>. Metoda je založena na syntéze templátové DNA v bakteriálním kmenu *E. coli* obsahujícím mutace *dut* a *umg*<sup>3</sup>. Tato bakterie je deficitní v enzymové aktivitě enzymů dUTPázy a uracil-N-glykozylázy. V důsledku těchto mutací se zvyšuje pravděpodobnost zabudování uracilu na místo thyminu do nascentního řetězce DNA. Jednořetězcový templát je z syntetizován s použitím pomocného řága, odvozeného z řága M13<sup>4</sup>. Syntéza komplementárního řetězce nesoucího mutaci následně probíhá *in vitro* za standardních podmínek tak, aby nascentní řetězec neobsahoval žádný uracil. Taková hybridní molekula je posléze amplifikována v normálním kmenu *E. coli*, což vede k degradaci řetězce obsahujícího uracil. Výsledkem celého procesu je tedy DNA nesoucí mutaci, v ideálním případě bez kontaminací DNA mutaci neobsahující. Jiným příkladem systému selekce řetězce DNA nesoucího mutaci (opět komerčně dostupným) je použití vektoru, obsahujícího bodovou mutaci v oblasti b-laktamázové rezistence proti antibiotiku. V průběhu hybridizace mutaci nesoucího oligonukleotidu je současně hybridizován i oligonukleotid komplementární s původní sekvencí divokého typu b-laktamázové rezistence. Se zavedením námi požadované mutace je tedy v tomto systému možné očekávat vzrůst rezistence vůči antibiotiku. Seleční tlak je tedy vyvíjen pomocí antibiotik při amplifikaci DNA v *E. coli*<sup>5</sup>.

Navzdory existenci modifikací původní metodiky místně řízené mutageneze je však nutné přiznat, že pouze málo případů se svojí účinností vyšplhá nad padesát procent. Velmi důležitým krokem je proto při provádění řízené mutageneze účinný skrínig. K vyhodnocení výsledku máme z praktického hlediska tři přístupy. Nejjednodušší a nejrychlejší metodou je restriktázová analýza. Při navrhování oligonukleotidu je v některých případech možné zavést či vymazat současně se zavedením mutace také rozpoznávací sekvenci restriktázní endonukleázy. Ověření zavedení mutace pak spočívá v analýze štěpů námi vytvořené DNA. Tato metoda je velmi výhodná především proto, že je možné analyzovat velkou skupinu potenciálních mutantů. Přes snadnost provedení a ekonomičnost metody ji mnohdy není možné aplikovat. V takovýchto případech máme k dispozici další velmi jednoduchou metodu. K jejímu provedení potřebujeme další oligonukleotid, který je homologní buď s původní molekulou divokého typu, nebo s mutantem. 3'-konec tohoto oligonukleotidu musí pak být v místě, které bylo podrobena mutaci. Pakliže poté použijeme tento oligonukleotid k amplifikaci úseku DNA pomocí PCR, záleží výsledek amplifikace na komplementaritě 3'-konce oligonukleotidu a templátové molekuly<sup>6</sup>. Tento postup nám opět umožňuje analyzovat velké množství mutantů a navíc mnohdy je možné použít k amplifikaci přímo bakteriální kolonii, bez nutnosti izolovat DNA. Ani tato metoda však není aplikovatelná vždy. Ne každá kombinace bazí poskytuje při aplikaci této metody spolehlivý výsledek. Proto je v mnohých případech nutné přistoupit k metodě sice trochu těžkopádné, zato však velmi přesné, jakou je sekvenace úseku DNA obsahujícího mutaci. Omezeními této metody jsou její finanční náročnost a menší kapacita týkající se množství vyhodnocených mutantů (ve srovnání se dvěma předchozími metodami).

Jelikož naše znalosti o vztazích struktury a funkce regulačních úseků DNA a proteinů nejsou zdaleka ucelené, není možné abychom vždy mohli předpovědět jaká změna struktury by mohla mít za výsledek námi požadovanou změnu funkce. Pro tento případ byly vyvinuty a zdokonaleny metodiky náhodné mutageneze. Výsledkem aplikace této techniky je knihovna mutantů, s různě (více méně náhodně) pozměněnou strukturou DNA. Existuje celá řada technik (zahrnujících především různá mutagenní chemická činidla) poskytující v různé míře (spíše ne)kompletní knihovnu mutantů. Velmi dobré výsledky byly dosaženy s pomocí enzymové metody<sup>7</sup>. Prvním krokem této metody je hybridizace DNA s oligonukleotidem pod místem určeným k mutageneze. Druhým krokem je *in vitro* syntéza komplementárního řetězce za různě limitujících podmínek jednotlivých dNTP. V průběhu této části experimentu je vyrobena sada všech možných 3'-koneců (prodlužujícího se primeru) v úseku DNA,

který chceme mutovat. V dalším kroku dochází k zavedení tří nesprávných bází na 3'-konec každé sady oligonukleotidů za podmínek ve kterých neprobíhá kontrola čtení. Posledním krokem je zkompletování řetězce do formy, která může podstoupit další selekci a amplifikaci. Selekcce proti nezmutovanému (templátovému) řetězci může probíhat Kunkelovou metodou (viz výše). Na závěr je však třeba si uvědomit, jednu z hlavních limitací této techniky. K úspěšnému použití a interpretaci této techniky v rámci experimentu je nutné mít k dispozici účinný skriningový, respektive selekční mechanismus s jehož pomocí můžeme vybrat námi požadovaného mutanta.

#### Literatura:

- <sup>1</sup> Kunkel, T.A. (1985). Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **82**, 488.
- <sup>2</sup> Kunkel, T.A.; Roberts, J.D.; Zakour, R.A. (1987). In Methods in Enzymology (ed. R. Wu), Vol. 154, p. 367.
- <sup>3</sup> Yuckenberg, P.D.; Witney, F.; Geisselsoder, J.; McClary, J. (1991). In Directed mutagenesis: A practical approach (ed. M.J. McPherson), IRL Press, Oxford.
- <sup>4</sup> Vieira, J.; Messing, J. (1987). In Methods in Enzymology (ed. R. Wu, and L. Grossmann), Vol. 153, p.3
- <sup>5</sup> Andrews, C.; Lesly, S. (1997) Promega Notes **61**, 12
- <sup>6</sup> Kwok, S.; Kellog, D.E.; McKinney, N.; Spasic, D.; Goda, L.; Levenson, C.; Sninsky, J.J. (1990) Nucleic Acids Research, Vol. 18, 4
- <sup>7</sup> Knowles, J.; Lehtovaara, P. (1991). In *Directed mutagenesis: A practical approach* (ed. M.J. McPherson), IRL Press, Oxford.

## Vnášení genů do rostlin prostřednictvím agrobakteriálních vektorů

Říha, K.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno  
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: riha@ibp.cz

Genově upravené rostliny se uplatňují nejen v základním výzkumu, ale v posledních několika letech se transgenozе rostlin stále více používá pro šlechtění nových odrůd hospodářských plodin. S prohlubujícími se znalostmi molekulárních mechanismů fyziologických a vývojových procesů rostlin se zvyšuje i počet znaků, které je možné pomocí transgenozе cíleně upravovat či měnit. Proto také vyvstává potřeba zvládnout proces transformace nejen u několika modelových rostlin, ale také u celé řady druhů a kultivarů zemědělsky významných plodin. Bylo vytvořeno mnoho postupů umožňujících začlenění cizorodé DNA do rostlinného genomu, téměř všechny však lze rozdělit do dvou základních skupin. První skupina metod využívá přímé introdukce DNA do buněk, jejichž membrány, popřípadě buněčné stěny, byly přechodně narušeny buď mechanicky (mikroinjekce, particle bombardment, silikonová vlákna), elektrickým pulsem (elektroporace), či chemickými činidly (polyetylenglykol). Druhou možností je využít bakterií rodu *Agrobacterium*, které jsou schopné konjugovat s rostlinnými buňkami a vnášet do nich část své DNA.

### Princip přenosu DNA do rostlin pomocí agrobakterií

Půdní bakterie *A. tumefaciens* způsobuje v místě napadení rostlin tvorbu kalusovitých nádorů, tzv. crown galls. Během infekce se přenáší část *Ti* plazmidu nazývaná T-DNA do rostlinného genomu. T-DNA je ohraničena krátkými repeticemi. Obsahuje geny pro syntézu metabolitů, které vyživují bakterie, a dále pak onkogeny (*onc*) kódující tvorbu auxinů a cytokininů. To způsobuje hormonální disbalanci v napadených buňkách a vede ke vzniku crown galls. Přenos T-DNA do rostlinné buňky zajišťují geny virulence (*vir*), které se také nacházejí na *Ti*-plazmidu. *Vir* operón je aktivován chemickými látkami - acetosyringony, které se uvolňují z poraněných buněčných stěn rostlin. Vazbou acetosyringonu na membránový receptor VirA dochází k aktivaci transkripčního faktoru VirG, jenž spouští přepis ostatních *vir* genů. Po aktivaci dochází k naštěpení hraničních sekvencí T-DNA a uvolnění jednořetězcového T-vlákna. Na tomto procesu se podílejí proteiny VirD2, VirD1 a VirC, přičemž VirD2 zůstává kovalentně navázaný na 5' konec T-řetězce a nese signály pro směřování do rostlinného jádra. Jednořetězcová T-DNA je stabilizována proteiny VirE2, které ji chrání před rostlinnými nukleázami. T-DNA je z bakteriální do rostlinné buňky transferována proteinovým kanálem, který je tvořen produkty genů *virB*. Zatímco přenos bakteriální DNA do rostlinné buňky je plně řízen bakteriálními geny, integrace T-DNA do rostlinného genomu je s největší pravděpodobností zprostředkovávána reparačními mechanismy hostitelské buňky. Zdá se, že T-DNA se preferenčně začleňuje do transkribujících se oblastí genomu ilegální rekombinací.

Pro přenos DNA z agrobakterií do rostlin jsou důležité dvě oblasti *Ti*-plazmidu: hraniční sekvence vymezující T-DNA a *vir* geny. Bylo zjištěno, že transformační účinnost není nijak ovlivněna, jsou-li deletovány *onc* geny a nachází-li se T-DNA na jiném plazmidu než *vir* geny. Na základě těchto poznatků byly vyvinuty dva typy vektorů: (a) kointegrativní vektory, které nesou na *Ti* plazmidu modifikovanou T-DNA bez *onc* genů a do které se transgeny začleňují homologní rekombinací. (b) binární vektory, což jsou relativně malé plazmidy nesoucí upravenou T-DNA, do které jsou transgeny klonovány v *E. coli* a poté je celý plazmid přenesen do vhodného agrobakteriálního kmene, jenž obsahuje *Ti* plazmid s upravenou nebo úplně deletovanou T-DNA. Pro snadnější manipulovatelnost a větší univerzálnost se ve většině laboratoří používají vektory binární.

## Metoda kokultivace listových disků

Nejrozšířenější metodou transformace rostlin je tzv. kokultivace listových disků. Při této metodě se rostlinné explantáty kokultivují s agrobakteriálním vektorem nesoucím v T-DNA gen selektovatelný v rostlinách, poté se explantáty přenesou na médium, které umožňuje regeneraci a obsahuje látku umožňující selekci transformantů. Agrobakterium se nakultivuje v tekutém médiu (např. YEB, LB), připravené explantáty se na několik minut ponoří do bakteriální suspenze a poté přenesou na misky s kokultivačním médiem - tím je "rostlinné" médium, většinou bez fytohormonů. Následuje několikadenní kokultivace, při níž je nutné kontrolovat, zda agrobakterium příliš nepřerůstá. Odstranění bakterií po kokultivaci je asi technicky nejobtížnější krok celé metody. Většinou nestačí pouhé přenesení explantátů na médium s antibiotiky, která eliminují růst agrobakterií (cefotaxim, vancomycin). Důležité je několikrát důkladně omýt explantáty ve vodě, osušit na filtračním papíře a potom teprve přenést na médium, jež obsahuje fytohormony pro regeneraci rostlin, antibiotikum pro selekci transformantů a antibiotikum potlačující růst agrobakterií. Tento postup je velice účinný při transformaci snadno regenerujících rostlin citlivých k agrobakteriální infekci - např. rostlin čeledi *Solanaceae*. Mnoho rostlinných druhů je však málo citlivých k agrobakteriální infekci a celý transformační protokol je třeba krok za krokem optimalizovat.

## Optimalizace metody

Stojíme-li před úkolem transformovat druh nebo kultivar, u kterého doposud nebyl vypracován transformační protokol a rozhodneme se použít metodu kokultivace listových disků, je nezbytné najít vhodné podmínky pro účinnou regeneraci celých rostlin. U většiny druhů se využívá indukce prýtlů, a to buď přímo nebo přes stádium kalusu. Velice účinným se zdá být postup, při němž se po kokultivaci nejdříve indukuje tvorba kořenů a z těchto po selekci následuje regenerace celých rostlin. Kořeny jsou více citlivé k selekčním antibiotikům, což snižuje chimérismus a množství netransformovaných regenerantů, jenž unikly selekci (Zhan et al., 1997). Jako selekční markery se nejčastěji používají neomycin fosfotransferáza (rezistence ke kanamycinu), hygromycin fosfotransferáza (rezistence vůči hygromycinu) nebo fosfinotricin acetyltransferáza (rezistence k fosfinotricinu). Jelikož různé druhy mají odlišnou rezistenci vůči výše uvedeným látkám, je nutné zjistit koncentraci selekčního činidla vhodnou pro selekci transgenních rostlin - příliš nízká koncentrace dovoluje regenerovat i netransformovaným rostlinám, zatímco příliš vysoká koncentrace brzdí i růst transformantů. Vedle selektovatelných genů je výhodné začlenit do T-DNA i geny reportérové, jejichž expresi lze snadno sledovat jak kvantitativně, tak i histochemicky. Nejrozšířenějším reportérovým genem u rostlin je *uidA* gen kódující beta-glukuronidázu. Pomocí substrátu X-Gluc je možné histochemicky detekovat expresi transgenů již několik dní po kokultivaci. Místa exprese transgenů na explantátu reprezentují jednotlivé transformační události, a tak se dá předběžně vyhodnotit účinnost transformace, aniž by bylo nutné čekat několik měsíců na tvorbu rezistentních kalusů nebo regenerujících prýtlů. Takto je možné relativně rychle testovat vliv různých faktorů na účinnost transformace a v krátké době optimalizovat celý transformační postup pro daný rostlinný druh. Tímto způsobem byly například nalezeny optimální podmínky pro transgenozu u hrachu a karafiátu (de Kathen a Jacobsen, 1995; van Altvorst et al., 1995).

Prvním krokem při optimalizaci metody by měl být výběr agrobakteriálního kmene virulentního pro transformovanou rostlinu. Rozsah virulence určitého kmene je determinován geny na *Ti*-plazmidu. Byla odvozena celá řada odzbrojených vektorů, které se liší v typu *Ti*-plazmidu (GV3101, LBA4404, EHA101, GV2206). Jsou dvě možnosti jak vybrat nejvhodnější kmen pro transformaci dané rostliny: buď se explantáty kokultivují s divoký kmenem a sleduje se tvorba crown gallů, nebo se použije odzbrojený kmen nesoucí binární vektor s *uidA* genem a detekuje se exprese transgenů. Nejenom virulence agrobakteriálního vektoru, ale i kompetence rostlinných buněk rozhoduje o úspěchu transgenoze. Typ explantátu je do značné míry předurčen jeho schopností regenerace: hypokotyly se používají u brukve (Mukhopadhyay et al., 1992), kořenové explantáty u huseníčku (Clarke et al., 1992), korunní plátky se osvědčily u karafiátu (Lu et al., 1991). Bylo zjištěno, že kompetenci buněk je možným zvýšit přidáním auxinu do kokultivačního média (de Kathe a Jacobsen, 1995). Frekvenci

transformace ovlivňuje mnoho dalších faktorů, jako je délka kokultivace, hustota bakteriální suspenze, přídavek acetosyringonu nebo stáří a fyziologický stav rostliny. U některých rostlin méně senzitivních k agrobakteriální infekci může nalezení optimálních podmínek výrazně zvýšit efektivnost transgenozy.

### Jiné metody využívající agrobakteriálního přenosu DNA

Nevýhodou metody kokultivace listových disků je nutnost regenerace transformantů v podmínkách *in vitro*. Ne všechny rostlinné druhy jsou schopny *in vitro* regenerace a často také tento krok vede k somaklonální variabilitě. Proto byla u *Arabidopsis thaliana* vypracována metoda *in planta* transformace pomocí agrobakterií. Principem je inokulace bakterií na poraněná místa nebo infiltrace bakteriální suspenze do celých rostlin. F1 generace takto transformovaných rostlin je vystavena selektivnímu antibiotiku a přežívající rostliny by měly nést integrovanou T-DNA (Bechtold et al., 1993; Katavic et al., 1994). Agrobakteriální vektory jsou velice účinné při transformaci dvouděložných rostlin, zatímco jednoděložné rostliny jsou k agrobakteriální infekci odolnější. Zde se uplatňuje tzv. biolistická metoda (particle bombardment), při níž se DNA váže na mikroskopické částičky zlata, které jsou vstřelovány do rostlinných pletiv. Dochází k integraci cizorodé DNA do rostlinného genomu a poté je možné izolovat transgenní rostliny. Nevýhodou je, že transformanty často nesou více kopií transgenů a dochází k jejich nestabilní expresi. Hansen a Chilton (1996) spojili výhody biolistické a agrobakteriální metody: do buněk tabáku vstřelili selektivní gen umístěný mezi hraniční sekvence T-DNA a současně plazmid nesoucí agrobakteriální geny *virD1* a *virD2* řízené promotorem CaMV35S. Byl zde využit biolistický transfer DNA do buněk a k začlenění cizorodé DNA došlo stejným způsobem jako po agrobakteriální infekci.

Tato práce byla vypracovaná v rámci projektů GAČR (521/96/1717) a GA AV ČR (A5004601).

#### Literatura:

- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.: *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1194-1199, 1993
- Clarke, M.C., Wei, W., Lindsey, K.: High-frequency of transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. Rep. 10: 178-189, 1992
- Hansen, G., Chilton, M.D.: "Agrolistic" transformation of plant cells: Integration of T- strands generated in planta. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 4978-14983, 1996
- de Kathe, A., Jacobsen, H.: Cell competence for *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in *Pisum sativum* L., Transgenic Res. 4: 184-191, 1995
- Katavic, V., et al.: *In planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 245: 363-370, 1994
- Lu, C., et al.: *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus*). Bio/Technology, 9: 864-868, 1991
- Mukhopadhyay, A., et al.: *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. Plant Cell Rep. 11: 506-513, 1992
- van Altvorst, A., Riksen, T., Koehorst, H., Dons, H.J.M.: Transgenic carnations obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf explants. Transgenic Res. 4: 105-113, 1995
- Zhan, X., Kawai, S., Katayama, Y., Morohoshi, N.: A new approach based on the leaf disc method for *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of aspen. Plant Sci. 123: 105-112, 1997

#### Doporučená literatura:

- Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A.: *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Mol. Biol. 19: 15-38, 1992
- Methods in Molecular Biology: *Agrobacterium* protocols. Ed. by Gartland, K.M.A., Davey, M.R., Totowa, New Jersey, 1995
- Tinland, B.: The integration of T-DNA into plant genomes. Trends Plant Sci. 1: 178-184, 1996



## Izolace transgenních buněčných linií u modelové dvoudomé rostliny *Melandrium album*

Říha, K., Hladilová, R., Vyskot, B.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno  
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: riha@ibp.cz

---

Knotovka bílá (*Melandrium album*, syn. *Silene latifolia*, čeleď *Caryophyllaceae*) je oblíbeným dvoudomým modelem ke studiu determinace pohlaví i struktury a funkce heteromorfních pohlavních chromozómů. Z hlediska schopnosti regenerace *in vitro* i transgenoze však patří mezi výrazně rekalcitrantní rostlinné druhy. Cílem této práce bylo proto: (a) vypracovat podmínky k regeneraci rostlin z různých typů explantátů samičích i samčích rostlin odlišného stupně ploidie, (b) izolovat kořenové buněčné linie typu hairy-roots k cytologickým účelům a (c) vnést do rostlin reportérové transgeny, které by sloužily ke sledování genové exprese v semenném potomstvu v závislosti na pohlaví výchozího rodiče (gametický imprinting). Z řady testovaných ekotypů našeho i zahraničního původu se úspěšná regenerace z explantátů zdařila pouze u samičích genotypů původem z Francie a Belgie (získány laskavostí prof. I. Negrutia). Fragmenty řapíků, listových čepelí a kořenů, extirpované z rejuvenilizovaných axenických kultur, vyvářely četné regeneranty na agarových médiích typu B5 s nízkými koncentracemi NAA a BAP. Tyto genotypy (diploidní, triploidní a tetraploidní) byly dále využity k transformačním studiím kokultivací s agrobaktériemi. Několik onkogenních kmenů *Agrobacterium rhizogenes* bylo použito k izolaci kultur hairy-roots, které jsou ideálním materiálem k přípravě mitotických protoplastů a analýze pohlavních chromozómů. Z řady testovaných kmenů *A. rhizogenes* se podařilo připravit stabilní kořenové kultury prostřednictvím kmenů A<sub>4</sub>R<sub>5</sub> II a AR12. Na bezhormonovém médiu B5 regenerovaly kořeny především z fragmentů listových čepelí. Frekvence tvorby hairy-root kultur však byla výrazně nižší než u kontrolních pokusů s tabákem. Karyologická analýza kořenových kultur *M. album* prokázala jejich vysokou stabilitu u všech typů ploidie (samičí linie 2*n*, 3*n* a 4*n*, samčí linie 2*n* a 3*n*). Kořenové a listové explantáty odvozené z axenických kultur vyselektované diploidní samičí rostliny byly kokultivovány s odzbrojeným kmenem *A. tumefaciens* AGLO (nesoucím reportérový gen *gus* s intronem) a selektovány na médiu s kanamycinem. Histochemické analýzy regenerujících kultur s pomocí substrátu X-gluc prokázaly expresi vneseného transgenu. V obou typech experimentů (infekce *A. rhizogenes* a *A. tumefaciens*) aplikace acetosyringonu zvyšovala frekvenci transformací.

Poděkování: Tento výzkum byl prováděn za finanční podpory GA ČR (521/96/1717).

## Klonování diferenciálně exprimovaných mRNA na modelu indukce mikrosporové embryogenese řepky (*B. napus* L.)

Smykal, P.

Katedra fyziologie rostlin, PřF UK, Viničná 5, 128 44 Praha  
tel: 02/21 95 32 87, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: smykal@prfdec.natur.cuni.cz

Identifikace diferenciálně exprimovaných mRNA je velmi často používaný postup, pro studium molekulárních mechanismů daného biologického systému. Rozdíly ve fenotypu buněk popř. pletiv, jak anatomické tak funkční jsou na molekulární úrovni určeny změnami v genové expresi.

Termín diferenciální zahrnuje jednak prostorové tak časové změny v genové expresi tj. mezi různými pletivy, různými vývojovými stádii, nebo během různých fyziologických podmínek.

Pro porozumění diferenciální genové exprese daného biologického systému, je důležité určit jaký podíl tvoří a na jaké úrovni citlivosti dané metody budou diferenciálně exprimované mRNA identifikovány. Pro vhodnost zvolené metody je proto nutné znát, zda-li a v jaké míře identifikuje celé spektrum abundantních a vzácných mRNA. Parametr abundance určuje počet klonů potřebných k vyhledávání v cDNA knihovnách a ten je dále ovlivněn zvolenou hladinou pravděpodobnosti. Pomocí saturačních a kinetických studií bylo zjištěno, že jednotlivé typy buněk exprimují 20 - 30 000 různých druhů RNA, z nichž 99% je vzácných. Těchto 99% představuje pouze 50% z celkového množství mRNA, proto zbývajících 50% představuje poměrně malý počet (cca 300) abundantních mRNA. Optimální metoda musí identifikovat diferenciálně exprimované mRNA nezávisle na jejím zastoupení. Úspěšnost metody závisí proto na zvolení vhodných dostatečně odlišných experimentálních systémů.

**Vyhledávání genů na základě homologie k již existujícím genům/proteinům** z jiných organismů. Je možné postupovat pomocí vyhledávání v cDNA knihovnách pomocí DNA hybridizačních sond popř. v expresních knihovnách pomocí existujících protilátek. V současnosti je velmi populární PCR postup pomocí vhodně zvolených primerů.

Hlavní pozornost věnují vyhledávání nových genů popř. pro komplexní charakterizaci biologických systémů. Na začátku je nutné si uvědomit, jaké množství definovaného materiálu budeme mít k dispozici, jakou hladinu citlivosti zvolené metody budeme požadovat a jak komplexně budeme daný systém chtít popsat. Nejdříve používaná, ale nejméně citlivá technika je **diferenciální screening cDNA knihoven** (Sambrook et al., 1989). cDNA knihovna zhotovená z jednoho typu pletiva nebo buněk je prohledávána pomocí značených sond z jiného typu pletiv nebo buněk. Autoradiografický signál každé kolonie pak představuje zastoupení odpovídající sekvence v dané tkáni. Pomocí označených cDNA sond celkové mRNA je možné detekovat jednotlivou mRNA představující kolem 0,1% v populaci. Citlivost této metody je možné zvýšit použitím subtrahovaných cDNA sond. Tímto způsobem je možné detekovat jednotlivou mRNA představující 0,005% z celkové populace.

**Klasická subtrakční hybridizace** (Duguid a Dinauer, 1990, Sargent a David, 1983, Sambrook et al., 1989) je založena na srovnání dvou mRNA populací, z nichž jedna představuje tester (mRNA pletiva jehož exprese nás zajímá) a druhá jenž je v přebytku představuje driver (mRNA pletiv jenž chceme eliminovat). Z izolované mRNA testeru se získá pomocí reverzní transkripce ss-cDNA a ta je v roztoku hybridizována s 10 - 30 násobným přebytkem driver mRNA. Reverzní transkripce je nutná pro získání komplementárního řetězce a přebytek driveru pro účinné vychytání společných mRNA. Nezhybridizovaná ss-cDNA je pomocí hydroxyapatitové chromatografie oddělena od DNA-RNA hybridů a použita pro syntézu ds-cDNA s následným naklonováním do vhodného vektoru. Získá se **subtrahovaná cDNA knihovna**, nebo se radioaktivně/neradioaktivně označí a použije jako **subtrahovaná cDNA sonda**. Existuje elegantnější možnost využívající afinity streptavidinu k biotinu a magnetických částic (firma Dynal).

Touto technikou je možné obohatit transkripty, jež nás zajímají, přibližně 10 krát a následně tak snížit počet prohledávaných klonů. Nevýhodou této metody je velké množství potřebného výchozího

materiálu, přibližně 5 mg polyA mRNA, vyšší pravděpodobnost vyhledání abundantnějších mRNA a její jednosměrnost tj. detekce přítomných, chybějících mRNA - typu ano, ne.

**Elektronická subtrakce** (Adams et al., 1993, Franco et al., 1995, Itoh et al., 1994, Okubo et al., 1992), zahrnující rozšířenou sériovou analýzu genové exprese (SAGE), představuje metodu jenž je využívána pouze velkými laboratořemi, vybavenými automatickými sekvenátory. Spočívá totiž v sekvenování náhodně vybraných cDNA klonů (řádově několika tisíců) a ve srovnání jejich četností s jinou cDNA knihovnou. Pomocí modifikované metodiky bylo takto identifikováno několik desítek tisíc EST - expressed sequence tags. U všech zmíněných metod následuje ověření diferenciální exprese pomocí RNA blotu, jenž obvykle představuje časově nejnáročnější část, ale nezbytnou pro vyloučení falešných pozitivů. Pro zachycení vzácných sekvencí s 95% pravděpodobností je nutné analyzovat 120 000 až 500 000 klonů v závislosti na komplexitě systému. **Technika SAGE (serial analysis of gene expression)** využívající restrikce získaných cDNA a ligace do jednoho řetězce, zredukuje tento počet, ale stále je časově a pracovně příliš náročná (Velculescu et al., 1995).

Nedávno zavedené techniky diferenciálního PCR - **differential display PCR** (Liang, Pardee, 1992) a velmi příbuzná technika náhodně primerovaného PCR - **RNA arbitrary primed PCR** (Wetsh, et al., 1992) jsou založeny na přepisu izolované celkové RNA popř. mRNA pomocí specifických primerů a následné sady PCR reakcí s náhodnými primery. Primery jsou zvoleny tak, aby byla amplifikována pouze část cDNA, která je radioaktivně označena a následně rozlišena pomocí gelové elektroforézy.

Existuje mnoho modifikací základní metodologie:

**1.** Odlišnost v délce a typu použitých PCR primerů, nejčastěji byly používány krátké decamery, které jsou nejčastějším zdrojem nespecifických PCR fragmentů, vzhledem k nízké teplotě nasednutí na templát. Proto se přešlo k užívání delších 20merů.

Celková RNA reverzně přepsaná pomocí oligo dT primeru a následně amplifikovaná poskytuje pouze 3'-UTR. Při použití mRNA přepsané pomocí směsi náhodných hexamerů je větší pravděpodobnost získání kódující sekvence.

**2.** Vzhledem k citlivosti PCR je třeba zbavit RNA přítomných zbytků genomové DNA, nejlépe pomocí DNázy I.

**3.** Stringentností PCR reakce v závislosti na délce použitých primerů. Volbou primerů je možné zacílit PCR reakci k izolaci specifických transkriptů určitých genových rodin, popř. homologů.

**4.** Velmi důležitý je typ enzymu pro PCR, nejčastěji různé druhy Taq polymeráz, nejvíce doporučovaný je Stoffel fragment (Perkin-Elmer), který je procesivnější a méně citlivý ke koncentraci  $Mg^{2+}$  a optimalizaci průběhu PCR.

**5.** Největší odlišnosti jsou pak ve způsobu separace a detekce získaných PCR fragmentů. Původní metoda využívá sekvenační gel a radioaktivní značení, nevýhodou je však příliš vysoká citlivost, projevující se velkým počtem falešných pozitivů a obtížnost vyřiznutí daného fragmentu na základě autoradiogramu. Proto v jednodušších verzích se využívá agarózové elektroforézy a fluorescenční detekce pomocí EtBr nebo citlivějších barviv, popř. přenos digoxigeninem značených fragmentů na membránu s následnou detekcí pomocí protilátek.

Vzhledem k možnosti dlouhodobého uchování a přímé vizualizace fragmentů je nejzajímavější využití citlivého barvení DNA stříbrem.

Existuje množství podobných technik, ale doporučuji postup používanou firmou Promega ve spojení s využitím speciálních fólií firmy FMC (Gel Bond PAGE + AcrylAide), umožňující polymerizaci polyakrylamidového gelu k této fólii s velmi snadnou manipulací. Osvědčilo se mi jednodušší uspořádání formátu proteinových elektroforéz.

**6.** Atraktivní je využití magnetických afinitních částic (Dynal), umožňující práci s mnohem menším množstvím materiálu a optimalizaci všech enzymatických kroků, vzhledem ke snadnějšímu přenosu.

Nejdůležitější je opět ověření exprese pomocí RNA blotu. Tato analýza je materiálově a časově nejnáročnější. V mnoha případech se ukázalo, že vyříznutý a reamplifikovaný fragment obsahoval více délkově stejných DNA fragmentů, popř. nebyla potvrzena diferenciální exprese.

#### Hlavní výhody DD-PCR:

1. Velmi malé množství potřebného výchozího materiálu, řádově několik nanogramů mRNA popř. 1 mg celkové RNA.
2. Unikátní možnost srovnání několika vzorků najednou, limitující je pouze kapacita gelu.
3. Teoretická závislost pouze na sekvenci primeru a ne na abundanci daných mRNA.
4. Možnost detekce up - down regulovaných genů.

#### Hlavní nevýhody DD-PCR:

1. Poměrně vysoký počet falešných pozitivů.
2. Deklarovaná systematičnost studia genové exprese je dosažitelná pouze za cenu vysokého počtu PCR reakcí a následných gelů.
3. Přítomnost více fragmentů v jednom PCR fragmentu detekovaném na gelu ztěžuje následné ověření exprese.
4. Diskutovatelná detekovatelnost nízké abundančních transkriptů.
5. Krátká délka naklonovaných fragmentů, v případě originální metodiky představující pouze nekódující 3' konec.
6. Diskutovatelná je rovněž snadnost a reprodukovatelnost provedení postupu. Byla demonstrována závislost na množství výchozího materiálu a tedy na abundanci RNA.

#### Doporučení :

- používat jako výchozí materiál izolovanou mRNA a přepisovat ji pomocí směsi náhodných hexamerů pomocí reverzní transkriptázy postrádající Rnázovou H aktivitu ( např. SuperScript II, BRL ), neboť takto je možné získat delší cDNA s větší pravděpodobností kódující sekvence.
- jako další krok je nutné odstranit RNA templát pomocí Rnázy H, tento krok doporučuji provést v každém případě.
- použitý typ PCR enzymu je velmidůležitý, doporučuji nešetřit a použít např. Stoffel fragment (Perkin-Elmer), Expand High Fidelity (Boehringer).
- používat nejlépe 20mery pro PCR reakci, umožňující nasednutí při teplotě 55°C.
- použít nejdříve jeden méně stringentní PCR krok, 95°C 1min, 45-50°C 5 min., 72°C 2min., a následně 30 cyklů 95°C 1min., 55°C 1 min., 72°C 1min.
- při daném uspořádání je možné amplifikovat fragmenty o délce 0,5 - 2 kbp (5-30 fragmentů v závislosti na použitém primeru) s následným rozlišením na 5% Gel Bond PAGE a detekcí pomocí stříbra.

Závěrem bych se chtěl zmínit o nové metodice subtrakční hybridizace využívající PCR technologie. Tato technologie byla vyvinuta několika autory ( Diatchenko et al., 1996, Gurskaya et al., 1996 ) a na trh uvedena v kompletní formě **PCR-Select cDNA Subtraction Kitu** firmou Clontech.

Metoda spočívá v syntéze cDNA dvou populací testeru a driveru, přičemž driver může být složen z několika různých pletiv, jejichž mRNA chceme ve vzorku testeru eliminovat. Přepsané ds - cDNA jsou enzymaticky štěpeny pomocí Rsa I, pro získání kratších lépe amplifikovatelných a klonovatelných zatupených fragmentů. Populace testerové cDNA je rozdělena do dvou frakcí, jimž jsou naligovány odlišné adaptory. Poté jsou provedeny dvě následné hybridizace za přebytku driverové cDNA. Koncentrace vysoce a nízké abundančních cDNA jsou tak normalizovány a zastoupení ss-cDNA je významně zvýšeno. Během druhé hybridizace jsou tyto hybridizační mixy spojeny bez denaturace a poté je přidána denaturovaná cDNA driveru. Během tohoto kroku tak vzniknou nové molekuly ds-cDNA testeru mající různé adaptory na koncích. Během PCR molekuly driveru nemající odpovídají

sekvence adaptorů nejsou amplifikovány vůbec, molekuly testeru mající jen jeden typ adaptoru na jednom svém konci jsou amplifikovány pouze lineárně, molekuly testeru mající stejný typ adaptoru na obou svých koncích jsou sice amplifikovány, ale následně díky efektu suprese (Siebert et al., 1995, U.S. patent # 5,565,340), kdy se vytvoří forma vlásenky vzhledem ke stejné koncové sekvenci a zamezí se tak amplifikaci, pouze molekuly testeru mající po hybridizaci dva různé adaptory na svých koncích jsou amplifikovány exponenciálně.

Během sekundárního PCR, použitím nested primerů je dále eliminováno pozadí a dále obohaceny diferenciálně exprimované cDNA. Takto získané fragmenty je možné přímo klonovat do vhodného vektoru nebo je zároveň použít jako hybridizační sondu pro vyhledávání v takto vytvořené popř. jiných DNA knihovnách.

Pro přesnost a eliminaci falešných pozitivů se doporučuje provést paralelní reverzní subtrakci, kdy jsou zaměněny úlohy testeru a driveru. Vybrané klony je vhodné uspořádat v 96 jamkovém formátu na duplikáty filtru a provést jednu hybridizaci s forward (pozitivně) a druhou s reverse (negativně) subtrahovanou sondou. Poté je již možné přistoupit k ověření exprese pomocí Northern blotu.

Metoda umožňuje :

1. použít malé množství výchozího materiálu, v optimálním případě je třeba 0,5 - 2 mg mRNA, popř. je možné při nedostatku vhodného materiálu provést PCR amplifikaci.
2. Účinně obohatit frakci nízce exprimovaných mRNA.
3. Není třeba provádět fyzickou separaci ss- a ds-cDNA molekul, jenž vede k jisté ztrátě části populace.
4. Tato metoda je velmi rychlá, v optimálním provedení je třeba jen 2-3 dnů pro naklonování a společně s hybridizací je možné během jednoho týdne znát výsledek.  
Při použití původního kitu firmy Clontech, je možná průběžná kontrola všech kroků postupu vzhledem k použití kontrolního setu.
5. Umožňuje provádět rovněž vyhledávání down-regulovaných genů, vzhledem k provedení reverzní subtrakce.

Literatura :

- Adams, M.D.**, Soares, M.B., Kerlavage, A.R., Fields, C., Venter, J.C.: Rapid cDNA sequencing (EST) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature Genetics* 4: 373-380, 1993
- Bassam, B.J.**, Caetano-Anolés, G., Gresshoff, P.M.: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83, 1991
- Bauer, D.**, et al.: Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *NAR* 18: 4272-4280, 1993
- Chen, J.J.W.**, Peck, K.: Non-radioisotopic differential display method to directly visualize and amplify differential bands on nylon membrane. *NAR*, 24: 793-794, 1996
- Diatchenko, L.**, et al.: Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030, 1996
- Duguid, J.R.**, **Dinauer, M.C.**: Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *NAR* 18: 2789-2792, 1990
- Franco, G.R.**, et al.: Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by EST strategy using a directional cDNA library. *Gene* 152: 141-147, 1995
- Gurskaya, N.G.**, et al.: Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of PCR: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* 240: 90-97, 1996
- Itoh, K.**, Matsubara, K., Okubo, K.: Identification of an active gene by using large-scale cDNA sequencing. *Gene* 140: 295-296, 1994

- Liang, P.**, et al.: Analysis of Altered Gene Expression by Differential Display. *Methods in Enzymology*, Vol. 254, 304-321, 1995 Academic Press
- Liang, P.**, Pardee, A.B.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971, 1992
- Lukyanov, K.A.**, Launer, G.A., Tarabykin, V.S., Zarskiy, A.G., Lukyanov, S.A.: Inverted terminal repeats permit the average length of amplified DNA fragments to be regulated during preparation of cDNA libraries by PCR. *Anal. Biochem.* 229: 198-202, 1995
- Perucho, M.**, Welsh, J., Peinado, A., Ionov, Y., McClelland, M.: Fingerprinting of DNA and RNA by Arbitrary Primed PCR: Application in Cancer Research. *Methods in Enzymology*, Vol. 254, 275-290, 1995
- Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 1989
- Siebert, P.D.**, Chenchik, A., Kellog, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A.: An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *NAR* 23: 1087-1088, 1995
- Sokolov, B.P.**, Prockop, D.J.: A rapid and simple PCR based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *NAR*, 19: 40009-4015, 1994
- Velculescu, V.E.**, Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.: Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487, 1995
- Wan, J.S.**, et al.: Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotechnology* 14: 1685-1691, 1996
- Welsh, J.**, et al.: Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acid Research* 20: 4965-4970, 1992
- Zhao, S.**, Loon, S., Pardee, A.B.: New primer strategy improves precision of differential display. *BioTechniques*, 18, 5: 843-850, 1995

## Analýza DNA v rostlinné taxonomii a ekologii

Štorchová, H.

Botanický ústav AVČR, 252 43 Průhonice u Prahy  
tel: 02/67 75 01 88 l. 285, e-mail: storch@ibot.cas.cz

Poměrně novou oblastí molekulární biologie je využití analýzy DNA v rostlinné taxonomii a evoluční biologii. Druhá polovina osmdesátých let přinesla pokrok v laboratorních metodikách, a tak byl splněn základní požadavek - analýza velkého množství vzorků v rozumném čase. Rozsáhlého využití se dočkal revoluční objev polymerázové řetězové reakce. Řada komerčně dostupných chemikálií, enzymů a tzv. kitů (reakčních souprav) zpřístupnila molekulárně biologické techniky i terénním přírodovědcům.

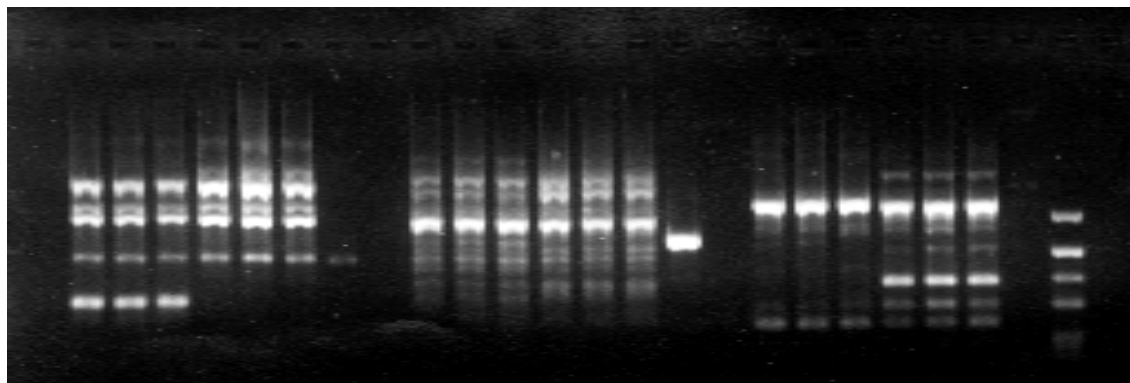
Historicky starší jsou práce využívající porovnání restričních map či prostě jen souboru restričních fragmentů daného úseku genomu u dvou různých jedinců. Tyto postupy jsou založeny na DNA:DNA hybridizaci (Southernova metoda). Potřebujeme specifické sondy - naklonované úseky sledovaného génomu. Tyto sondy musí být vybrány tak, aby cílová místa byla dostatečně polymorfni a aby hybridizace byla jednoznačná. Ke značení sond se zpravidla používá radioizotopů, a tak je nutná radioizotopová laboratoř. Proto se RFLP (restriction fragment length polymorphism) uplatnil zejména při studiu ekonomicky významných plodin - kukuřice, pšenice, rýže, tabáku, rajčat. Vítané zjednodušení přineslo využití nespecifických sond - náhodně vybraných úseků DNA, zpravidla kratších. Tyto sondy můžeme použít i u rostlin, u nichž nemáme k dispozici znalost jakékoliv sekvence. Empiricky byly nalezeny takové sondy, které dávají rozumné výsledky u většiny rostlin. Příkladem je 15 nukleotidů dlouhý úsek fága M 13. Tento bakteriofág ovšem s rostlinami nemá nic společného. Krátké nespecifické sondy jsou zpravidla protějškem středně repetitivních sekvencí - tzv. minisatelitů. Cílových míst je v genomu mnoho, a tak je výsledkem tohoto typu DNA analýzy "žebříček" podobající se čárkovému kódu na zboží v samoobsluze. Protože repetitivní sekvence jsou velmi proměnlivé, může být "žebříček" individualně specifický, může charakterizovat jedince podobně jako označuje konkrétního člověka otisk prstu. Proto hovoříme o DNA fingerprintingu.

Možnost odlišení morfologicky zcela shodných jedinců nabízí terénní biologii nepřehledné množství aplikací. Můžeme stanovit otcovství vajíček v ptačím hnízdě, rozlišit jednotlivá mycelia prorůstající trouchnivějící pařež, stopovat historii šíření rostlinných druhů. Ochrana přírody pomáhá znalost genetické variability ohroženého druhu. Jen zdánlivě futuristická, ve skutečnosti žhavě aktuální, je možnost identifikace uniklých transgenů.

Objev PCR (polymerázová řetězová reakce) na sklonku osmdesátých let vnesl do rozvoje DNA fingerprintingu neočekávanou dynamiku. Náročné techniky se velmi zjednodušily a staly se dostupné i pracovištím např. muzejního typu (v Německu). Podstata PCR spočívá v selektivním namnožení vybraného místa v genomu. Potřebujeme znát sekvenci bezprostředně sousedních míst a dle této informace si nechat nasyntetizovat homologní primery. Tyto primery poslouží jako očka termorezistentní DNA polymeráze, která žádaný úsek opakovaně replikuje. Výsledek replikace se pak stává matricí následujícího cyklu, a tak žádaný úsek DNA přibývá exponenciální rychlostí. PCR probíhá v termocyklu, který časově přesně definovanými změnami teplot reakci řídí.

Analogii klasického DNA fingerprintingu se stal PCR fingerprinting, využívající krátkých náhodných primerů. Jakákoliv znalost sekvencí studovaného organismu není rovněž nutná. Tímto krátkým primerem může být třeba výše zmíněný oligonukleotid odvozený od M 13. Zvláštním případem PCR fingerprintingu, který si od svého objevu v roce 1991 získal nesmírnou popularitu, je RAPD (random amplification of polymorphic DNA). Jak tomu bývá, zprvu vystupovaly do popředí výhody tohoto přístupu, později se počalo upozorňovat na různá úskalí. Největší výhodou je jednoduchost. K provedení RAPD analýz potřebujeme pouze termocykler, obyčejnou horizontální elektroforetickou aparaturu, agarózu, transiluminátor, a fotoaparát (osvědčil se starý vyřazený Pentacon na svitkové filmy). Z chemikálií je nejdůležitější Taq polymeráza, dostupná nyní z českých zdrojů za nižší ceny. RAPD metodika používá

jediný primer (nikoliv dva různé, jak je tomu u klasické PCR), dlouhý deset nukleotidů. Teplota přisednutí primeru je nižší, dovoluje méně specifickou hybridizaci. Počet replikačních cyklů je naopak vyšší než u klasické PCR. Výsledkem takového postupu je, že některé fragmenty DNA zreplikujeme téměř u jakéhokoliv studovaného organismu. Naopak se velkým problémem stává míra reprodukovatelnosti, a to v téže laboratoři. Mezi různými laboratořemi nejsou RAPD “žebříčky” reprodukovatelné vůbec, můžeme porovnávat jen interpretace. Na řadě obrázků z naší laboratoře je dokumentována závislost výsledků RAPD na koncentraci hořčíku, primeru a DNA, dále na čistotě vložené DNA, typu DNA polymerázy a teplotě přisednutí primerů (annealing). Významným činitelem je použitý termocykler (toto



**Obr.1.** Dva různí jedinci dubu pýřitého (*Quercus pubescens*). RAPD analýza byla provedena postupně třemi primery (OPA-02, OPA-03, OPA-04) ve třech provedeních. Zcela vpravo standard molekulových vah pBR 322/Alu.

ukázáno není, protože máme jenom jeden). Naopak obr. 1 ukazuje, že přes všechny obtíže lze dosáhnout rozumné reprodukovatelnosti výsledků a rozdíly v RAPD “žebříčkách” odrážejí různost dvou genomů.

V naší laboratoři užíváme RAPD k identifikaci klonů tří druhů trav z krkonošské louky pro potřeby ekologů, dále se RAPD osvědčily při porovnávání různých apomiktických populací jestřábníků a ke studiu vnitro- a mezipopulační variability u pomněnek. Pro posuzování fylogenetické příbuznosti či dokonce ke konstrukci vývojových diagramů se RAPD příliš nehodí. Odhalují variabilitu na příliš nízké taxonomické úrovni. Pro tyto potřeby bude nutno sáhnout k jiným variantám PCR. Rozšířen je v poslední době použití univerzálních primerů replikujících vhodné úseky DNA. Namnožené fragmenty DNA se následně štěpí vhodnými restričními enzymy.

Molekulární biologie však nemusí sloužit jen popisu evolučních událostí, může přinést nečekaná odhalení týkající se podstaty evoluce génomu. Posledních pět let přináší překvapivá zjištění o přítomnosti velkého množství neaktivních retropozomů u rostlin. Tyto deriváty retrovirů se ve větším rozsahu u rostlin nepředpokládaly. Ukazuje se však, že jsou odpovědné za velkou délku a extrémně vysokou proměnlivost rostlinné mitochondriální DNA. Naše znalosti jsou dosud omezeny na laboratorní modely. Studium vhodných rostlin nasbíraných v terénu může objasnit případnou roli retropozomů v evoluci rostlin i jako mediátorů horizontálního přenosu genetické informace.

Práce je umožněna díky podpoře grantů 202/94/0660 GAČR a A6005602/1996 GAAV ČR.

#### Literatura:

- McPherson M.J., Hames B.D., Taylor G.R., Eds (1995): PCR 2. A practical Approach. - IRL Press. Oxford, New York, Tokyo.
- Soltis P.J., Soltis D.E., Doyle J.J., Eds (1992): Molecular systematics of Plants. - Chapman and Hall. New York.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W., Eds (1995): DNA fingerprinting in plants and fungi. - CRC Press.



