

## Od dat k informaci: klonování *in silico*

FATIMA CVRČKOVÁ, MAREK ELIÁŠ

Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2,  
tel.: 219 53 179, email: fatima@natur.cuni.cz

### Problém dat a informace

Dramatický nárůst množství dostupných primárních i anotovaných sekvenčních dat (tab.1) přináší kvalitativně nový problém rozlišování relevantních a zajímavých informací v přívalu experimentálních údajů. K interpretaci obsahu databází lze přistupovat mnoha způsoby, a tomuto tématu jsou věnovány rozsáhlé monografie (např. Kanehisa 2000).

Zde se pokusím nastínit některé cesty využití sekvenčních informací při **vyhledávání, předběžné charakterizaci a klonování rostlinných genů na základě znalosti analogických genů jiných organismů**. V přednášce bude tento postup dokumentován konkrétními příklady identifikace a charakterizace homologů forminů u *Arabidopsis thaliana* (Cvrčková 2000) a identifikace a analýzy rostlinných genů kódujících pravděpodobné nové formy fosfolipasy D (M. Eliáš, *nepublikované výsledky*).

Název	Adresa	Charakteristika
NCBI Entrez	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/</a>	DNA a proteinové sekvence + literatura (GenBank, EMBL, DDBJ, SwissProt, PIR, PubMed)
EBI	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Databases/">http://www.ebi.ac.uk/Databases/</a>	EMBL, GenBank, DDBJ, SwissProt - přístup přes SRS
TAIR	<a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a>	genom <i>Arabidopsis thaliana</i> , vyhledávací nástroje
Stanford Genomic Resources	<a href="http://genome-www.stanford.edu/">http://genome-www.stanford.edu/</a>	genom <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , odkazy na další zdroje
Proteome, Inc.	<a href="http://www.proteome.com/">http://www.proteome.com/</a>	porovnání genomu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a <i>Caenorhabditis elegans</i>
Stanford Human Genome Center	<a href="http://shgc.stanford.edu/">http://shgc.stanford.edu/</a>	jeden z mnoha vstupů do databáze lidského genomu
TIGR Databases	<a href="http://www.tigr.org/tdb/">http://www.tigr.org/tdb/</a>	mikrobiální genomy, část genomu <i>Arabidopsis</i> a rýže

Tab.1: Vybrané veřejně přístupné databáze sekvenčních dat na Internetu

### Hardwarové a softwarové předpoklady

Nutností je počítač připojený pevnou linkou k internetu. Zde zmiňované postupy zvládne i postarší Pentium na 166 MHz s 32 MB RAM, vybavené Windows 95, i když lepší počítač je samozřejmě výhodou.

Ceny softwarových balíčků pro analýzu sekvenčních dat zpravidla přesahují 100 000 Kč. V současnosti však lze po registraci zdarma využívat software GCG (Womble 2000) pod Unixem, instalovaný na Biofyzikálním ústavu v Brně. Začátečník vstupující do světa genomiky ale může k základní manipulaci s datovými soubory i k pokročilejším úkolům, jako je vytváření a vyhodnocování alignmentů (viz dále) využít také řady volně dostupných programů (tab.2).

Tab. 2: Volně dostupné programy pro práci se sekvenčními daty

\*operační systém: www = program pracuje na vzdáleném počítači a je dostupný prostřednictvím standardních prohlížečů pro různé operační systémy; jiné - program ke stažení a instalaci na vlastním počítači

Název	Adresa	OS*	Charakteristika
BCM Sequence Utilities	<a href="http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-util/seq-util.html">http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-util/seq-util.html</a>	www	formátování sekvencí, translace, restriční analýza
ExpASy Translate Tool	<a href="http://www.expasy.ch/tools/dna.html">http://www.expasy.ch/tools/dna.html</a>	www	translace
ClustalW	<a href="http://www.clustalw.genome.ad.jp/">http://www.clustalw.genome.ad.jp/</a>	www	porovnávání sekvencí a konstrukce alignmentu
ClustalW	<a href="http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw/clustalw.html">http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw/clustalw.html</a>	DOS, Mac	
MACAW	<a href="ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/macaw/">ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/macaw/</a>	Win95+, Win3.x, Mac	porovnávání sekvencí a konstrukce alignmentu s možností ručního editování
PHYLIP	<a href="http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html">http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html</a>	Win95+, Win3.x, DOS, Mac	komplexní analýza podobnosti a příbuznosti (nejen) sekvencí
Boxshade	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html</a>	www, Win, DOS, Linux	formální úpravy alignmentu pro publikaci
pDRAW32	<a href="http://www.crosswinds.net/~acaclone/">http://www.crosswinds.net/~acaclone/</a>	Win95+	konstrukce map plasmidů

### Strategie vyhledávání sekvencí v databázích

Sekvence známých genů lze nejspíše získat na základě publikovaného čísla záznamu v databázi (*Accession No.*) nebo vyhledáváním pomocí klíčových slov (dostupné z domovské stránky většiny databází). Příbuzné, dosud necharakterizované geny v databázích sekvencí organismu, o který se zajímáme, lze identifikovat několika způsoby:

Různé varianty programů BLAST (Gish a States 1993, Altschul *et al.* 1997) a FASTA (Pearson 2000) umožňují použít vybranou aminokyselinovou či nukleotidovou sekvenci jako sondu (*query*) k prohledávání databází; možné jsou všechny kombinace typu sondy a typu databáze (Tab.3). Součástí výstupu programu jsou statistické parametry charakterizující míru příbuznosti - pravděpodobnost náhodného výskytu stejně blízce podobné sekvence  $P(N)$  či očekávaný počet sekvencí se stejnou mírou podobnosti  $E$  ve zkoumané databázi.

Databáze NCBI Entrez nabízí automaticky generované seznamy příbuzných sekvencí (*related sequences*); statistickou významnost příbuznosti je nutno ověřit např. stanovením  $P(N)$ , s jakým BLAST s nově nalezenou sekvencí jakožto sondou identifikuje sekvenci, od níž jsme vyšli.

Známe-li krátký evolučně konzervovaný sekvenční motiv charakterizující třeba aktivní místo enzymu (*pattern*), můžeme využít programů PatternFind nebo PatMatch. Rovněž zde je třeba ověřit statistickou významnost výsledku (tab.3).

### Analýza sekvencí: identifikace kódujících oblastí a charakterizace predikovaných proteinů

Uvedenými metodami můžeme najít jak geny již známé (na kterých zpravidla někdo

intenzivně pracuje), tak i veskrze neznámé, nanejvýš anotované jako „předpokládané kódující sekvence“. Pokud nalezená sekvence nemá anotaci určující předpokládané hranice transkriptů, exonů, intronů a otevřených čtecích rámců, nebo pokud (zpravidla automaticky generovanou) anotaci chcete ověřit, lze použít některý z programů uvedených v Tab.4. Spolehlivost predikce hranic exonů a intronů a otevřených čtecích rámců je však vždy omezená, míru důvěryhodnosti výsledků lze odhadnout porovnáním alespoň 2 metod. Někdy lze předpokládanou strukturu mRNA potvrdit porovnáním se sekvencemi EST (*expressed sequence tags*), které rovněž poskytují informace o expresi studovaného genu.

V predikované aminokyselinové sekvenci se vyplatí pátrat po přítomnosti dalších evolučně konzervovaných domén či speciálních strukturních motivů (např. transmembránových úseků), které se mohou objevovat ve značně překvapivých kontextech. Lze k tomu použít např. programu SMART (Schultz *et al.*, 1998) či některého z ostatních nástrojů uvedených v tab.4.

Tab. 3: Vybrané servery pro vyhledávání příbuzných sekvencí

Program	Databáze	Adresa	Poznámky
BLAST	NCBI Entrez	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>	také specializované varianty BLASTu, možnost složitější strukturovaného zadávání
BLAST	různé	<a href="http://blast.wustl.edu/">http://blast.wustl.edu/</a>	
BLAST	TAIR	<a href="http://www.arabidopsis.org/blast/">http://www.arabidopsis.org/blast/</a>	
FASTA	EBI	<a href="http://www.ebi.ac.uk/fasta3/">http://www.ebi.ac.uk/fasta3/</a>	
FASTA	TAIR	<a href="http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/fasta/TAIRfasta.pl">http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/fasta/TAIRfasta.pl</a>	
PatternFind	SwissProt a další	<a href="http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PATFND_form.html">http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PATFND_form.html</a>	vyhledávání krátkých, uživatelsky definovaných peptidových sekvencí
PatMatch	TAIR	<a href="http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl">http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl</a>	funkce jako PatternFind, ale jiný algoritmus

Tab. 4: Vybrané servery pro analýzu nukleotidových a proteinových sekvencí

Název	Adresa	Charakteristika
CBS	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/">http://www.cbs.dtu.dk/services/</a>	predikce transkribovaných a kódujících úseků DNA, sekrečních signálů a posttranslačních modifikací proteinů
Webgene	<a href="http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/">http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/</a>	predikce struktury genu - několik různých metod
GeneFinder	<a href="http://argon.cshl.org/genefinder/">http://argon.cshl.org/genefinder/</a>	predikce interních kódujících exonů
SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>	vyhledávání známých sekvenčních motivů, sekrečních signálů, transmembránových domén
TopPred	<a href="http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/toppredServer.cgi">http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/toppredServer.cgi</a>	predikce sekrečních signálů a transmembránových sekvencí
ScanProsite	<a href="http://www.expasy.ch/tools/scnpsite.html">http://www.expasy.ch/tools/scnpsite.html</a>	vyhledávání známých sekvenčních motivů z databáze PROSITE
ProfileScan	<a href="http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html">http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html</a>	vyhledávání sekvenčních motivů z PROSITE, bere v úvahu "váhu" variabilních pozic

Součástí charakterizace nalezených genů by měla být podrobná charakterizace nalezených evolučně konzervovaných domén, pokud možno včetně vytvoření alignmentu. K tomuto účelu lze využít jak automatizované metody, jako je BLAST pro 2 sekvence či Clustal (Thompson *et al.* 1997), tak i manuální postup s asistencí programu MACAW

(Schuler *et al.* 1991). (V posledním případě je vskutku radno prostudovat on-line nápovědu, kde najdete důležitá varování týkající se situací, v nichž se nedá věřit statistickým odhadům dodávaným programem.) Odkazy na tyto nástroje jsou v tab.2 a 3.

Důkladnější fylogenetická analýza predikovaných sekvencí (vytváření dendrogramů) překračuje rámec této práce, zájemce odkazují na manuály programu PHYLIP (Felsenstein 1989; tab.2) a na jinde publikovaný podrobný návod (Cvrčková 2000).

### **Od sekvence k DNA: tipy pro klonování**

Se všeobecným zavedením metody PCR se významně usnadnila izolace úseků DNA (ať už genomové či cDNA) se známou sekvencí. Na identifikaci potenciálních genů může proto snadno navázat jejich klonování - zejména klonování cDNA. Rozbor používaných metod překračuje rámec tohoto příspěvku, dovoluji si však upozornit na tři zajímavé možnosti:

Nejjednodušší je „klonování poštou“ (*cloning by mail*). Řadu částečně sekvenovaných EST klonů *Arabidopsis* lze získat za únosný manipulační poplatek ze sbírky AIMS (Scholl a Kim 1995).

Z postupů založených na PCR stojí za to připomenout různé varianty RT-PCR (viz např. (Martin-Parras a Zerial 1995).

Za pozornost stojí i využití PCR ke screenování postupně se zmenšujících frakcí komplexních cDNA knihoven v plasmidových nebo fágových vektorech (Bockmann *et al.* 1998).

### **Poděkování**

Tento příspěvek shrnuje zkušenosti získané při práci na projektech podporovaných granty GAČR 204/98/0482, MŠMT ČR :113100003 a MŠMT ČR LN00A081.

### **Literatura**

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. - *Nucleic Acids Res.* **25** :3389
- Bockmann, J., Winter, C., Kreutz, M. R., Wittkowski, W., and Böckers, T. M. 1998. - Elsevier Trends Journals Technical Tips Online T01373.
- Cvrčková, F. 2000. - *Genome Biology.* **1**:research 001
- Felsenstein, J. 1989. - *Cladistics.* **5**:164
- Gish, W., States, D.J. 1993. - *Nature Genetics.* **3**:266
- Kanehisa, M. 2000. - *Post-genome Informatics.* Oxford University Press, Oxford.
- Martin-Parras, L., Zerial, M. 1995. - *Methods in Enzymology.* **257**:189
- Pearson, W.R. 2000. - *Methods Mol.Biol.* **132**:185
- Scholl, R., Kim, J. 1995. - *Weeds World.* **2** :27
- Schuler, G.D., Altschul, S.F., Lipman, D.J. 1991. - *Prot.Struct.Funct.Genet.* **9**:180
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C. 1998. - *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**:5857
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. - *Nucleic Acids Res.* **24**:4876
- Womble, D.D. 2000. - *Methods Mol.Biol.* **132** :3

### **Další doporučené odkazy na www**

(tyto i všechny ostatní odkazy v článku jsou aktuální na přelomu června a července 2000)

- AIMS - Arabidopsis information management system (<http://aims.cps.msu.edu/aims/>) - databáze linií *Arabidopsis* a klonů
- Celera Genomics (<http://www.celera.com/>) - soukromá firma, která sekvenovala genom člověka a octomilky...
- Český národní uzel ICBnetu (<http://ICCBnet.ibp.cz/Services.html>) - přístup k GCG softwaru
- ExPASy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) - server Švýcarského institutu pro bioinformatiku s nástroji pro analýzu sekvencí a řadou odkazů na další užitečné stránky
- Genome Biology (<http://www.genomebiology.com/>) - internetový časopis věnovaný analýzám genomů - originální práce zdarma, přehledné články placené
- TIGR - The Institute of Genome Research (<http://www.tigr.org/>) - kromě databází též řada dalších odkazů

## Využití soustavy *in vitro* transkripce, translace a ko-translace

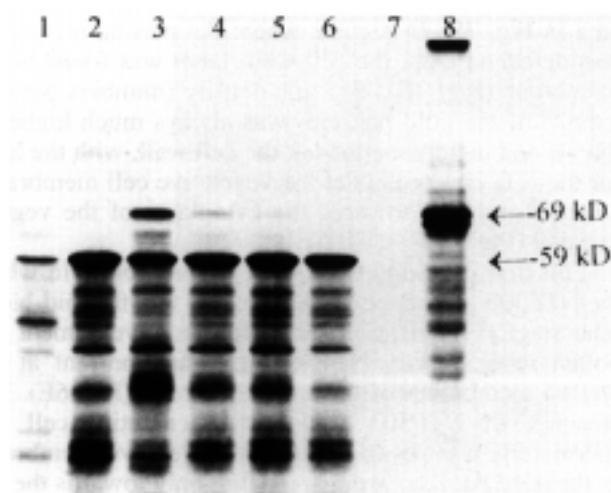
VĚRA ČAPKOVÁ

Ústav Experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, Praha 6, 165 02,  
tel.: 203 90 452, email: [capkova@ueb.cas.cz](mailto:capkova@ueb.cas.cz)

Jednotlivé fáze ontogenese bývají charakterizovány spektry specifických bílkovin či spektry specificky aktivovaných genů. Oba typy analýz jsou v současnosti metodicky snadnou záležitostí. Problémem ale zůstává přiřazení bílkoviny a odpovídajícího, kodujícího genu. Navíc je třeba počítat s možností časového posunu syntézy mRNA a syntézy bílkovin. Při nejmenším gametogenese a první fáze klíčení semen jsou procesy kde se plně uplatňuje translační regulace genové exprese, kdy výsledkem transkripce jsou skladované typy mRNA a k syntéze bílkovin dochází později, až po aktivaci těchto transkriptů. Vzhledem k tomu, že značná část bílkovin objevujících se během ontogenese je N-glykosylována, je možno k identifikaci bílkovina-gen použít kombinaci tunikamycinu, inhibitoru prvního stupně N-glykosylace a spojené transkripce/translace/glykosylace *in vitro*.

V první části pokusu je rostlinný materiál inkubován se  $^{14}\text{C}$ -směsí aminokyselin a to paralelně za přítomnosti i nepřítomnosti tunikamycinu. Inhibitor blokuje vazbu oligosacharidového řetězce na dolichol a tím zabraňuje ko-translačnímu navázání glykanu (Elbein 1987), takže bílkovina zůstává v nascentní podobě, s nižší molekulovou hmotností. Rozdělení *de novo* syntetizovaných bílkovin na SDS-PAGE (Laemmli 1970) a následná fluorografie (Bonner and Laskey 1974) dovolují identifikovat nascentní a plně posttranslačně modifikované typy bílkovin. Tím se vydělí vysoce glykosylované bílkovin (Čapková et al. 1997) a sekvenční analýza specifických transkriptů ukáže typy které mají vyšší počet potenciálních glykosylačních míst, ukáže pravděpodobné kandidáty na kodující mRNA. Vybrané typy mRNA jsou použity do druhé části pokusu, pro *in vitro* transkripce/translaci a glykosylaci (systém firmy Promega). Přesně podle protokolu je nasyntetizována mRNA a je využita pro translaci *in vitro* na králičích retikulocytech a takto vytvořená bílkovina je dále glykosylována na mikrosomálních membránách psích pankreasů. Bílkoviny rozděleny na SDS-PAGE a fluorograficky zviditelněny ukazují jak nascentní podobu, tak glykosylovanou formu a po doplnění *in vitro* systému tunikamycinem i neglykosylované formy. Porovnáním prvního a druhého kroku je možno identifikovat gen kodující bílkovinu syntetizovanou v určité fázi ontoge-

nese a navíc časově lokalizovat expresi transkriptu a příslušné bílkoviny (Štorchová et al. 1994, Wittink et al. 2000).



Obr. 1. Fluorogramy bílkovinných produktů *in vitro* transkripce/translace a glykosylace pylově specifického genu *npt303*. 1: *in vitro* translace celkové RNA izolované z pylových láček po 24 hodinách kultivace, 2: *in vitro* transkripce genu *npt303* a následná translace *in vitro*, 3: *in vitro* transkripce, translace a glykosylace, 4,5,6: totéž jako 3, ale s přidáním 0,1, 0,2 a 0,5 µg tunikamycinu, 7: kontrola bez RNA, 8:  $^{14}\text{C}$ -30' značení nekovalentně vázaných bílkovin pylových láček po 24 hodinách kultivace.

### Literatura

- Bonner and Laskey: Eur J Biochem 46, 83-88, 1974.  
 Čapková et al.: Eur J Cell Biol 72, 282-285, 1997.  
 Elbein: Annu Rev Biochem 56, 497-534, 1987.  
 Promega – Protocols and Applications, 1989/90.  
 Štorchová et al.: Planta, 192, 441-445, 1994.  
 Wittink et al.: SexPlant Reprod 12, 276-284, 2000.

## Jak se vypořádat s problémy při hydrogensířičitanovém genomovém sekvenování

JAROSLAV FULNEČEK

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno,  
 tel.: 05/415 17 178, email: fulnecek@ibp.cz

### Úvod

Až do roku 1992, kdy byl vyvinut zcela nový postup stanovení 5-methylcytosinů (5-mC) v DNA (Frommer et al. 1992; McDonald a Kay 1997), používané metody nedovolily v uspokojivé míře detailně určit pozice 5-mC v DNA vyšších organismů. Do té doby existovala řada různých metod, které však neposkytovaly dostatečně přesné a podrobné výsledky, vedoucí k zásadnímu pokroku ve studiu methylace DNA. Avšak ani genomové sekvenování s použitím hydrogensířičitanu nelze považovat za vše řešící metodu. I když je princip metody geniálně jednoduchý, postup je poměrně pracný a navíc hrozí získání falešných výsledků. Abychom obdrželi správné a přesné výsledky, je nutné provést řadu kontrolních pokusů. Tyto pokusy se provádí paralelně s vlastním

stanovením, a proto zvyšují náročnost na čas i materiál. Navíc je výsledek kontrolních pokusů znám až na samém konci celého postupu.

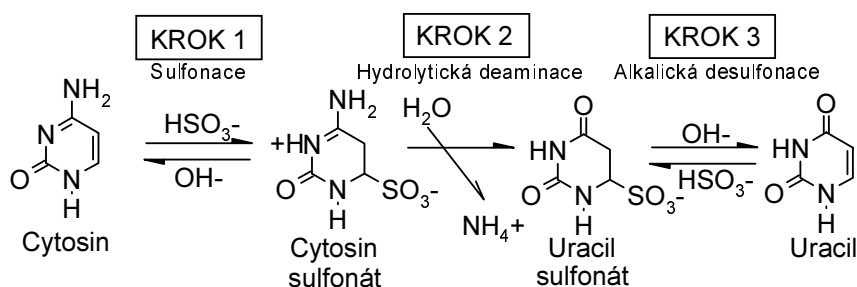
Tento článek se zabývá právě možnostmi vzniku falešných výsledků, použitím vhodných postupů, které je minimalizují a navržením kontrolních experimentů, jež slouží jako svědci pochodů, odehrávajících se během procedury. Přitom vychází z bohatých osobních zkušeností z používání této metody od jejího zavedení na našem pracovišti v roce 1996 až dodnes.

### Podstata metody

Touto metodou lze zjistit přesné pozice 5-mC v kratším úseku jednoho vlákna DNA. Je možné analyzovat třeba část unikátního genu pouze z několika desítek 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 nereagují (Wang et al. 1980; obr. 1).

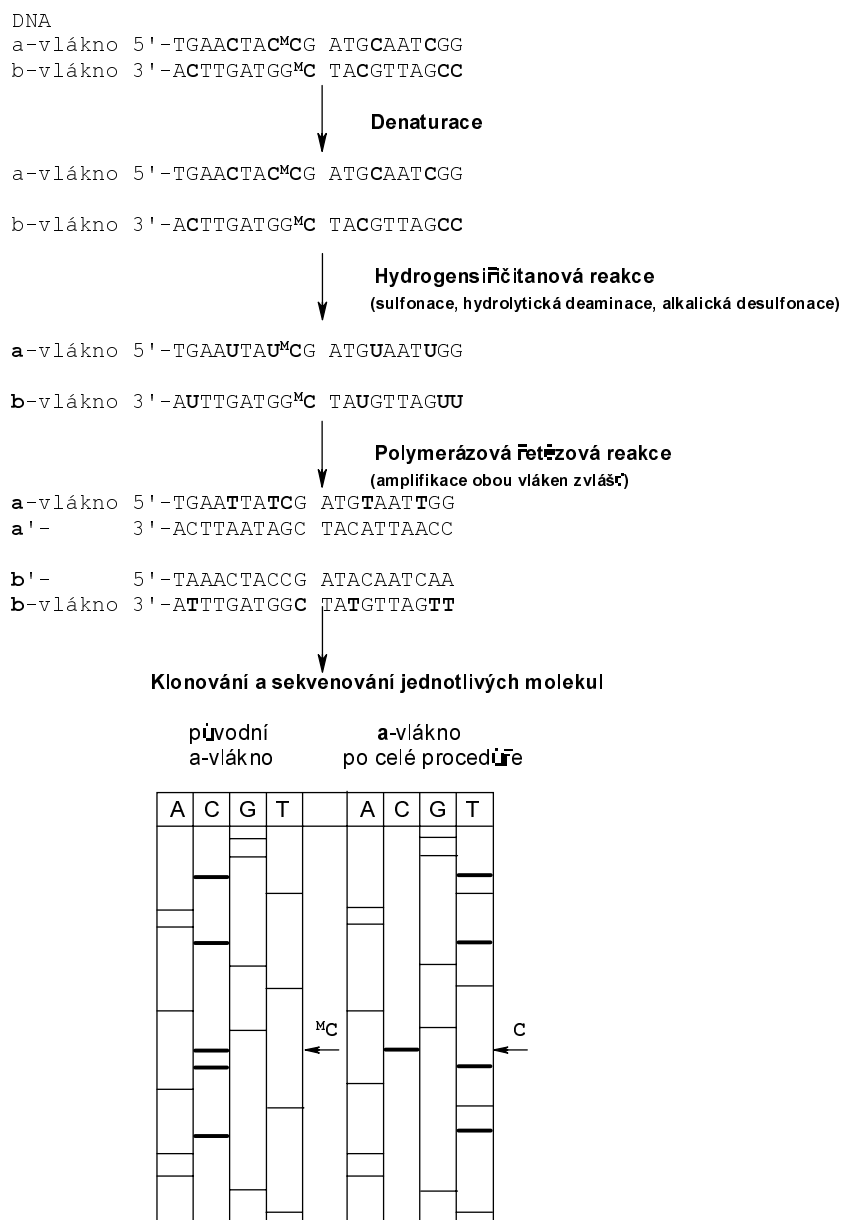
(V prvním kroku reakce, sulfonaci, interaguje hydrogensířičitanový anion s dvojnou vazbou mezi 5 a 6 uhlíkem cytosinu a tvoří se sulfonát cytosinu na 6 uhlíku. Tento krok je reversibilní a pomalejší u jednořetězcové DNA než u nukleotidů. Reakce přímá probíhá při nízkém pH. Ve druhém kroku reakce, hydrolytické deaminaci, se ve vodném prostředí deaminuje aminoskupina na 4 uhlíku a vzniká sulfonát uracilu. Tento krok je nevratný a je katalyzován bazickými látkami, sířičitanovými, hydrogensířičitanovými nebo acetátovými anionty, a probíhá při pH nižším než 7. Poslední krok reakce, alkalická desulfonace, je vlastně zpětná reakce sulfonace, probíhající v alkalickém prostředí a produktem je uracil. Ačkoli 5-mC může s hydrogensířičitanem také reagovat, reakce je velice pomalá a podmínky reakce dávají přednost vzniku 5-mC než jeho deaminačnímu produktu thyminu.)



Obr. 1. Reakční mechanismus převedení cytosinových zbytků na uracilové zbytky v DNA při proceduře hydrogensířičitanového sekvenování viz. text.

Původně komplementární vlákna se po reakci stanou nekomplementárními, a proto se dále analyzují samostatně. Podle reakcí změněné sekvence studovaného úseku DNA se ke každému vláknu navrhnou dva oligonukleotidové primery se zabudovanými cílovými místy pro restriční endonukleázy pro zjednodušení následující ligace a transformace. Po izolaci plasmidové DNA se insertovaný úsek sekvenuje. Všechny původní cytosiny, přeměněné hydrogensířičitanem na uracily, jsou v PCR amplifikovány jako

thyminy, pouze methylcytosiny, které s hydrogensířičitanem nereagují, jako cytosiny. Základní postup je schematicky znázorněn na obrázku 2.



Obr.2. Schematické vyjádření postupu při hydrogensířičitanovém genomovém sekvenování viz. text. Methylcytosin je označen jako MC.

### Pracovní postup

Isolovaná rostlinná nebo živočišná genomová DNA se fragmentuje restriční endonukleasou, která nemá cílové místo ve studovaném úseku. Fragmentovaná DNA, po inkubaci s RNasou A a poté s proteinasou K, se přečistí fenolovou a chloroformovou extrakcí.

Nejdříve se 2 mg takto připravené DNA v 90 ml destilované vody denaturují přidáním 10 ml čerstvě připraveného 3 M NaOH a inkubací 15 minut při 37°C. Těsně před použitím se připraví roztok 10 mM hydrochinonu a nasycený roztok (při 20°C) hydro-



gensířičitanu sodného (SIGMA S-8890 sodium bisulfite, což je obvykle směs asi 1:1 hydrogensířičitanu sodného  $\text{NaHSO}_3$  a disířičitanu sodného  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ( $\text{HS}_2\text{O}_5^- = \text{HSO}_3^- + \text{SO}_2$ )), 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 provzdušením 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). 1000 ml 3.6 M roztoku hydrogensířičitanu a 58 ml 10 mM hydrochinonu se přidá k denaturované DNA (konečná koncentrace 3.1 M a 0.5 mM). 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 dialyzují 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" (Qiagen), DNA se rozpustí v 3x30 ml redestilované vody. Desulfonace se provede přidáním 11 ml čerstvě 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 vrchní a spodní vlákna studovaného úseku DNA odděleně pomocí dvou navržených dvojic oligonukleotidových primerů, které obsahují cílová místa restrikčních endonukleas pro snazší ligaci. Použijí 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 polymerasy (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 pomocí restrikčních endonukleas, produkt se přečistí elektroforesou a izolací z gelu a liguje se do předem připraveného plasmidového vektoru. Poté se transformuje do kompetentních E. coli (Stratagene), plasmidová DNA se izoluje a insert se sekvenuje pomocí [32]P-dATP a "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit" (BioTech).

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 zvlášť vrchní a spodní vlákno studovaného úseku DNA.

### Úskalí metody

Metoda je založena na konversi všech cytosinů na uracily v jednořetězcové DNA hydrogensířičitanem. Existuje zde nebezpečí získání falešně pozitivních signálů (5-mC se deteguje i tam, kde není přítomen) minimálně ze dvou důvodů.

Za prvé jde o to, aby modifikovaná DNA byla během konverse stále denaturovaná a nedocházelo tedy k renaturaci. V podezření, že došlo k renaturaci nebo že vůbec nedo-

šlo k denaturaci, nese každý delší úsek DNA, kde byly detekovány pouze 5-mC bez přerušení cytosiny (Rother et al. 1995).

Za druhé je modifikace hydrogensířičitanem běžná chemická reakce, která je vždy v určité rovnováze a i když se snažíme o co největší konversi 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 (Warnecke et al. 1997).

S druhým bodem souvisí problém kvantifikace methylačního stavu jednotlivých sekvencních motivů DNA. Obdržené hodnoty nemusí odpovídat skutečnosti, protože bylo použito PCR, ve které mohlo dojít k výběru některých templátových vláken DNA (templáty se v tomto případě mohou významně lišit v CG obsahu a tím pádem i v  $T_m$ ).

Další nepříjemností je to, že DNA je poměrně dlouho vystavena pH kolem 5 a může docházet k depurinaci a tak 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.

### Řešení

Kontrola, zda nedochází k falešně pozitivním výsledkům, se provádí použitím plasmidové DNA s insertem totožné sekvence studovaného úseku DNA v paralelním experimentu. Plasmidová DNA je linearizovaná a ve směsi s nosičovou DNA v takovém množství, aby se pokud možno co nejvíce blížila vlastnostem genomové DNA. Ověření správné modifikace a také zda nedošlo k výběru při PCR docílíme použitím plasmidové DNA bez 5-mC a *in vitro* methylované pomocí Msp I, Hpa II nebo Sss I methylás (známá pozice 5-mC) v poměru 1:1.

Nevýhoda spočívá v tom, že se správnost výsledků ověří až po posledním kroku procedury - sekvenování.

Zabránit renaturaci lze během reakce s hydrogensířičitanem zvyšováním teploty každé tři hodiny v pětiminutových pulzech na 90°C nebo lze reakci provést v 50% roztoku močoviny, což nijak reakci neovlivní (Grigg 1996). 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 methylované nebo nemethylované zástupce studované sekvence DNA (Herman et al. 1996) (několik kopií genu lišících se transkripční aktivitou a tak pravděpodobně rozmístěním 5-mC, geny v různých tkáních kde se přepisují nebo nepřepisují, dvě alely imprintovaného genu v diploidním genomu). 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 (Warnecke et al. 1997). Existuje celá řada zjednodušených verzí sekvenování (použijí se primery, které nasedají jen na takovou modifikovanou DNA, kde buď původně byl a nebo nebyl 5-mC (Herman et al. 1996); modifikovaná DNA se inkubuje s restriktasou 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 restriktasy byl methylovaný), ale tyto metody mají celou řadu technických problémů a navíc se zabývají jen určitými místy. Existuje také možnost obejití klonování sekvenováním PCR produktu (Pogribny et al. 1995; Oakeley a Jost 1996), což se nedá doporučit, neboť tento způsob je založen na statistickém vyhodnocení intenzity proužků (plochy píků) v bázích C a T a je zřejmé, že polymerasa 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 hydrogensiričitanem, PCR, se dá provést s použitím LMP-agarosy a má řadu výhod. Jednak je možné analýzu provést s minimálními ztrátami DNA, zabránit renaturaci, poškození DNA a tak je možné získat PCR produkt i z delších úseků modifikované DNA (Olek et al. 1996).

### **Závěr**

I když není snadné a levné udělat správnou analýzu methylačního stavu byt' jen kratšího úseku DNA, předkládaná metoda znamenala zlom v této oblasti výzkumu a poskytla řadu zajímavých výsledků ve světě i v naší laboratoři (Fulneček et al. 1998; Fulneček 1998).

Používání metody hydrogensiričitanového genomového sekvenování pro získávání originálních experimentálních výsledků je v současné době podporováno prostředky z grantů GAČR 204/99/D001 a 204/98/0191.

### **Literatura**

- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. and Paul, C.L. 1992. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827.
- Fulneček, J. 1998. – Kandidátská disertační práce. BFÚ AV ČR Brno
- Fulneček, J., Matyášek, R., Kovařík, A., Bezděk, M. 1998. – Mol. Gen. Genet. 259: 133.
- Grigg, G.W. 1996. - DNA Sequence 6: 189.
- Herman, A.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. and Baylin, S.B. 1996. - Proc. Natl. Acad. Sci USA. 93: 9821.
- McDonald, L.E., Kay, G.F. 1997. - BioTechniques 22: 272.
- Oakeley, E.J., Jost, J.P. 1996. - Plant Molecular Biology 31: 927.
- Olek, A., Oswald, J. and Walter, J. 1996. - Nucleic Acids Res. 24: 5064.
- Pogribny, I.P., Poirier, L.A., James, S.J. 1995. - Carcinogenesis 16: 2863.
- Rother, K.I., Silke, J., Georgiev, O., Schaffner, W. and Matsuo, K. 1995. - Analytical Biochemistry 231: 263.
- Wang, R.Y.H., Gehrke, C.W. and Ehrlich, M. 1980. - Nucleic Acids Res. 8: 4777.
- Warnecke, P.M., Stirzaker, C., Melki, J.R., Millar, D.S. 1997. - Nucl. Acids Res. 25: 4422.

## Retardační analýza

JANA FULNEČKOVÁ

Laboratoř analýzy biologicky významných molekulárních komplexů, Masarykova univerzita v Brně, Královopolská 135, 612 65 Brno, tel.: 05/415 17 151, email: fulneckova@ibp.cz

### Podstata metody

Retardační analýza se používá k detekci přímých interakcí proteinů s nukleovými kyselinami. Po smíchání proteinů s DNA (RNA) jsou vzniklé komplexy odděleny od volné nukleové kyseliny gelovou elektroforesou. Vazbou proteinu na DNA vznikne nukleoproteinový komplex, který má odlišnou elektroforetickou mobilitu než volná DNA a ve většině případů je jeho pohyblivost v gelu nižší. Výjimkou jsou pouze cirkulární molekuly DNA, jejichž DNA-proteinové komplexy se mohou pohybovat rychleji.

Separace komplexů od volné DNA v gelu závisí na řadě faktorů, které musí být určeny experimentálně pro konkrétní případ. Mezi faktory, které ovlivňují elektroforetickou mobilitu nukleoproteinových komplexů, patří molekulová hmotnost proteinu a nukleové kyseliny, iontová síla a pH elektroforetického pufru, hustota gelu a teplota. Jakým způsobem modifikace těchto parametrů ovlivňuje mobilitu DNA-proteinových komplexů, bylo publikováno M. Friedem (1989). Podstatou retardační analýzy je oddělení volné DNA od nukleoproteinového komplexu při vstupu do gelové matrix. Putování volné DNA v gelu není proteiny ovlivněno na rozdíl od mobility DNA v komplexu s proteinem. Gelová matrix napomáhá stabilizaci komplexů (Fried a Crothers 1981) tím, že omezuje difuzi proteinů od DNA při reverzibilní disociaci a reasociaci komplexů v gelu (Revzin et al. 1986). Ale i v případě, že se nukleoproteinový komplex během elektroforesy rozpadne, nemůže jeho DNA složka dosáhnout DNA, která byla volná již na startu.

V okamžiku nanášení na gel dojde ke “zmrazení” rovnováhy mezi vázanou a volnou DNA. Vzhledem k této skutečnosti je možné určit množství volné a vázané DNA, což jsou údaje potřebné jak pro stanovení rovnovážné konstanty vazby proteinu na DNA, tak kinetiky interakce analýzou vzorků v různých časových intervalech po smíchání DNA s proteinem (Shanblatt a Revzin 1984, Lobell a Schleif 1990). Ačkoliv retardační analýza dává možnost kvantitativního určení síly nukleoproteinové interakce, je to pouze přibližný údaj (Carey 1991). Důležitým parametrem je doba, za kterou komplex vputuje po nanesení do gelu. Je žádoucí, aby tato doba byla minimální (Fried a Crothers 1984).

Jestliže má substrátová DNA pouze jedno specifické vazebné místo pro protein, měla by retardační analýza odhalit pouze jeden retardovaný proužek odpovídající DNAProteinovému komplexu. Kromě oddělení vázané a volné DNA mohou být na retardačním gelu rozlišeny nukleoproteinové komplexy s různou stechiometrií. Na jednu molekulu DNA se může vázat více molekul proteinu. Na gelu se v takovém případě objevuje série proužků DNA s progresivně se snižující elektroforetickou mobilitou. Stechiometrie každého komplexu může být určena, jelikož změna mobility jednoho komplexu vůči následujícímu komplexu je obvykle v poměru ke změně molekulové

hmotnosti způsobené navázáním další molekuly proteinu. Přesnější, ale technicky náročnější, je určení stechiometrie komplexů radioaktivním značením proteinu ( $^{14}\text{C}$ ) a substrátové DNA ( $^{32}\text{P}$ ). V tomto případě se dá měřit molární poměr přímo u každého proužku (Carey 1988). Jednou z hlavních výhod této metody oproti jiným metodám je schopnost retardační analýzy rozlišit komplexy s různou stechiometrií tvořené jedním proteinem od komplexů vzniklých vazbou různých proteinů na substrátovou DNA. Navíc retardační analýza umožňuje rozlišit komplexy se stejnou stechiometrií ale lišící se konformací DNA.

## **Shrnutí základních praktických postupů**

### ***Původní retardační analýza***

Retardační analýza byla zavedena před dvaceti lety a od té doby se používá ke studiu interakcí proteinů s nukleovými kyselinami jen s malými modifikacemi původní metody (Garner a Revzin 1981).

Substrátová DNA obsahující vazebné místo je koncově značena  $^{32}\text{P}$ . Vzniklé nukleo-proteinové komplexy jsou od volné DNA odděleny na polyakrylamidovém gelu a poloha DNA je určena autoradiografií.

Retardační analýza spojená s horizontální agarosovou elektroforesou

V případě vzniku velkých nukleoproteinových komplexů je vhodnější používat agarosovou elektroforesu (Berman et al. 1987). Dosáhne se tak lepšího rozlišení díky větší velikosti pórů. Horizontální uspořádání umožňuje studovat vazbu velkých proteinů i na krátké substrátové molekuly DNA. Vzorky jsou nanášeny do středu gelu a během elektroforesy se mohou pohybovat pozitivně nabitě DNA-proteinové komplexy opačným směrem než volná DNA. Můžeme studovat vazbu proteinu na přirozeně dlouhou substrátovou DNA bez potřeby kompenzace pozitivního náboje vázaného proteinu (Froelich-Ammon et al. 1998). Použití agarosového gelu je výhodné i ze zdravotního a ekonomického hlediska.

Neradioaktivní varianty retardační analýzy

Při retardační analýze se doporučuje používat nízké koncentrace substrátové DNA, nižší než může být detegováno ethidiumbromidem. Z toho pramení široké použití radioaktivně značených substrátových DNA. To ale s sebou nese zdravotní rizika a komplikace práce. Vadí hlavně krátký poločas rozpadu isotopů a fragmentace řetězců DNA u silně značených vzorků. S rozvojem neradioaktivních metod detekce se naskýtá možnost dostatečně citlivé detekce i bez použití radioaktivního značení. Dnes se používají pro detekci DNA v gelu tři základní způsoby - barvení gelu fluorescenčními barvami, značení substrátové DNA fluorescenčními značkami a použití sekundárního detekčního systému, který je fluorescenční nebo chemiluminiscenční. Nová generace fluorescenčních barev je až 20-krát citlivější než ethidiumbromid (Tuma et al. 1999). Např. při obarvení gelu barvivem SYBR Gold se detekční limit pohybuje mezi 2-10 fmol/proužek (Tuma et al. 1999), což může v některých případech stačit. Vyšší citlivosti dosáhneme použitím sekundárního detekčního protokolu, kdy je substrátová DNA značena biotinem. Po separaci volné DNA od nukleoproteinového komplexu v gelu je nutný přenos na pozitivně nabitou membránu. K detekci se využívá streptavidin-fosfatasový chemi-

niluminiscenční detekční systém. V tomto případě detekční limit je 0,001 fmol/proužek, a to díky amplifikaci signálu (Rodgers et al. 2000).

## **Pracovní postup**

### ***Příprava a výběr substrátové DNA***

Jestliže má být zkoumána vazba proteinu na potenciální vazebnou sekvenci, je nutné si nejprve připravit substrátovou DNA o vhodné délce, která obsahuje vazebné místo. Neexistuje žádná obecná minimální délka substrátové DNA. Podmínkou je, aby substrátová DNA obsahovala celé vazebné místo. Minimální délku musíme určit experimentálně pro konkrétní případ. Syntetické oligonukleotidy používané jako substrátová DNA musí být purifikované na HPLC anebo denaturační elektroforesou. Naopak obecná maximální délka substrátové DNA je asi 500 bp. Je-li délka DNA větší než 500 bp, projeví se vazba jedné molekuly proteinu pouze malým posunem. Použití delší substrátové DNA je opodstatněné při studiu DNA-proteinových interakcí, při kterých se více proteinů váže na skupinu vazebných míst. Delší DNA fragmenty (100-500 bp) jsou připravovány restrikčním štěpením nebo PCR na plasmidových vektorech. Fragmenty DNA pro retardační analýzu musí být vyčištěny elektroforesou v polyakrylamidovém gelu. Při jejich přípravě restrikčním štěpením je výhodné používat takové enzymy, které tvoří 5'-přesahy. To usnadňuje jejich radioaktivní značení, neboť tyto přesahy mohou být doplněny Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I v přítomnosti  $\alpha$ -[32P] dNTP a ostatních dNTP. Oligonukleotidy používané jako sondy při retardační analýze se značí  $\gamma$ -[32P]ATP pomocí polynukleotidkinasy. Značená DNA musí být oddělena od volných radioaktivních dNTP. Dnes se používají k tomuto účelu komerční kolonky a kity. Pro neradioaktivní detekci si necháme biotinylované oligonukleotidy syntetizovat, zatímco dlouhé DNA fragmenty si můžeme připravit sami pomocí značících kitů.

### ***Volba kompetitorové DNA***

Při každé retardační analýze se kromě substrátové DNA přidává do vzorku i nespecifická neznačená kompetitorová DNA, která by neměla obsahovat ani jedinou kopii specifického vazebného místa. Úlohu kompetitorové DNA může plnit DNA fága I a mnoho plasmidů. V poslední době se hlavně používají nepřírozené polynukleotidy poly d(I-C). Množství kompetitorové DNA, které je nutné přidat do vzorku, aby byly všechny nespecifické interakce vysyceny, závisí na specifitě studované interakce. Velký nadbytek kompetitorové DNA může způsobit disociaci specifického komplexu, protože součet afinit všech nespecifických vazebných míst je větší než afinita specifického vazebného místa (McGhee a von Hippel 1972). Jiným testem specifity vazby proteinu k určité sekvenci DNA je použití DNA fragmentů, které se liší od původního fragmentu v 1 nebo 2 bp (Carey 1988). Konkrétní experimenty vyžadují specifické úpravy DNA fragmentů. Například studium ohybu DNA při vazbě proteinu vyžaduje sérii fragmentů o stejné délce, které se navzájem liší polohou vazebného místa. Podobně při studiu vazby jediného proteinu současně do dvou vzdálených míst na DNA je třeba si připravit sérii DNA fragmentů s různě dlouhými úseky mezi vazebnými místy (Kramer et al. 1988).

***Tvorba komplexu***

Vlastní tvorbě komplexu předchází preinkubace DNA-vazebných proteinů s kompetitorovou DNA ve vazebném pufru. Jeho složení ovlivňuje tvorbu komplexu. Hlavními faktory jsou iontová síla pufru (konc. NaCl, KCl) a přítomnost divalentních kationtů jako je  $Mg^{2+}$ . Objem přidávaných proteinů by neměl překročit 10 % objemu reakční směsi. Po preinkubaci se přidá minimální množství značené substrátové DNA (0,1-5 ng) a vzorek se inkubuje 10-20 min na ledu nebo při laboratorní teplotě. Následuje okamžité nanesení vzorku na gel.

***Elektroforesa***

Nedoporučuje se míchat vzorky s nanášecím pufrům, aby se negativně neovlivnila tvorba komplexů. Glycerol přítomný ve vzorku většinou postačí k úspěšnému nanesení na gel. Bromfenolová modř se nanáší odděleně. Polyakrylamidová i agarosová elektroforesa se provádí při 40°C. Do elektroforetického pufru se přidává 2-merkptoethanol, popř.  $Mg^{2+}$ . Hořčnaté ionty mohou být přítomny také v gelu. Pro agarosovou elektroforesu se používá 1-2 % gel. Při PAGE se hustota gelu pohybuje v rozmezí 4-6 % (poměr akrylamid/ bisakrylamid 29/1 až 47/1). Důležitá je rychlá penetrace vzorku do gelu, proto se na prvních 5 minut vkládá na elektrody vyšší napětí, které se následně sníží na 10 V/cm.

***Detekce***

V případě původní retardační analýzy se gel po fixaci vysuší a poloha DNA se určí autoradiografií. Při použití agarosové elektroforesy event. neradioaktivní detekci je nutný přenos DNA na membránu. Neradioaktivní detekce DNA na membráně se provádí promytím membrány roztokem s detergentem a roztokem blokujícím nespecifickou vazbu streptavidinu. Potom se na biotinylovanou DNA naváže streptavidin s kovalentně vázanou alkalickou fosfatase. Po odstranění nenavázaného konjugátu se zahájí chemiluminiscenční reakce přidáním substrátu.

**Úskalí metody*****Nespecifita vazby***

Objevení jediného retardovaného proužku na gelu nemusí nutně znamenat tvorbu specifického komplexu. Jedním z testů specificity, který by měl vyloučit vznik nespecifických komplexů, je přidání neznačené kompetitorové DNA do reakce (Garner a Revzin 1981). Zbývající proužky by mohly představovat specifické komplexy, ale i to je potřeba ověřit přidáním neznačené substrátové DNA ke vzorku. Postupné mizení retardovaného proužku při této titraci dokazuje specifitu nukleoproteinového komplexu. Použití dostatečného množství kompetitorové DNA skýtá možnost vyhledat proteiny, které jsou schopné se specificky vázat na substrátovou DNA, přímo z hrubých jaderných extraktů (Strauss a Varshavsky 1984).

**Použití příliš krátké substrátové DNA**

Při použití příliš krátké substrátové DNA hrozí, že u vzniklého nukleoproteinového komplexu převáží kladný náboj proteinu a komplex se bude pohybovat opačným

směrem než volná DNA. Při vertikálním uspořádání PAGE je nutné substrátovou DNA prodloužit, aby kompenzovala kladný náboj proteinu, zatímco jsou-li komplexy separovány horizontální agarózovou elektroforézou s nanášením vzorků do středu gelu, žádná kompenzace není nutná.

### Citlivost detekce

Při detekci komplexů musíme mít na paměti, že nukleoproteinový komplex se nebarví v gelu tak dobře jako volná DNA. Také při sekundární detekci může protein bránit vazbě streptavidinu na biotin, zvláště je-li substrátová DNA krátká.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem MŠMT VS97032.

### Literatura

- Berman, J., Eisenberg, S., Tye, B.K. 1987. – *Methods Enzymol.* 155: 528  
Carey, J. 1988. – *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 957  
Carey, J. 1991. – *Methods Enzymol* 208: 103  
Fried, M., Crothers, D.M. 1981. – *Nucleic Acids Res.* 9: 6505  
Fried, M., Crothers, D.M. 1984. – *J. Mol. Biol.* 172: 263  
Fried, M. 1989. – *Electrophoresis* 10: 366  
Froelich-Ammon, S. J., Dickinson, B. A., Bevilacqua, J. M., Schultz, S. C., Cech, T. R. 1998. – *Genes Dev* 12: 1504  
Garner, M. M., Revzin, A. 1981. - *Nucleic Acids Res.* 9: 3047  
Kramer, H., Amouyal, M., Nordheim, A., Muller-Hill, B. 1988. – *EMBO J* 7: 547  
Lobell, R. B., Schleif, R. F. 1990. – *Science* 250: 528  
McGhee, J. D., von Hippel, P. H. 1972. – *J. Mol. Biol.* 86: 469  
Revzin, A., Ceglarek, J. A., Garner M. M. 1986. – *Anal. Biochem.* 153: 172  
Rodgers, J. T., Patel, P., Hennes, J. L., Bolognia, S. L., Mascotti D. P. 2000 – *Anal. Biochem.* 277:254  
Shanblatt, S., Revzin, A. 1984 – *Nucleic Acids Res.* 12: 5287  
Strauss, F., Varshavsky, A. 1984 – *Cell* 37: 889  
Tuma, R.S., Beaudet, M. P., Jin, X., Jones, L. J., Cheung, C. Y., Yue, S., Singer, S. 1999 – *Anal. Biochem.* 268: 278

## Konstrukce částečné chomosomově-specifické knihovny – optimalizace metody

PAVEL HANÁČEK, LADISLAV HAVEL, IVO ŮBERALL

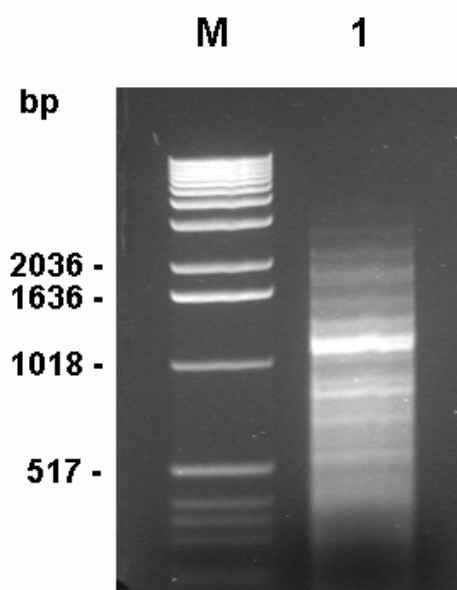
Ústav botaniky a fyziologie rostlin MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno,  
tel.: 05/451 33 343, email: hanacek@mendelu.cz

### Abstrakt

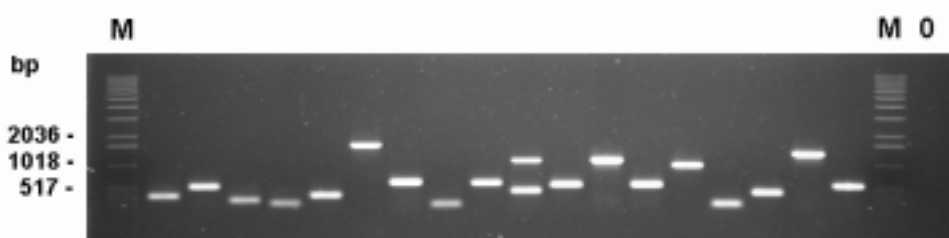
Konstrukce knihovny byla provedena podle metodiky Macas a kol. Výchozí postup byl modifikován a zjednodušen. Rekombinantní DNA-knihovna byla skonstruována z chromosomu 1 smrku ztepilého (*Picea abies* L. (Karst.)) separovaného pomocí flow sorteru v laboratoři ŮEB AV ŮR. Jako výchozí materiál pro knihovnu bylo použito 1000 chromozomů jejichž DNA byla amplifikována pomocí DOP PCR s primerem E6-MW (5'-CCG AGA ATT CNN NNN NAT GTG G-3', kde N = A, G, C nebo T;



podtržená sekvenca je restrikční místo pro EcoRI). Purifikace DOP PCR fragmentů DNA byla značně zjednodušena použitím gelové filtrace (Sephacrose CL-6B). DOP PCR fragmenty byly štěpeny příslušným restrikčním enzymem (EcoRI). Po následné purifikaci, opět s použitím gelové filtrace, byly tyto fragmenty DNA chromosomu 1 klonovány v defosforylovaném plasmidu pBluescript II SK+. Plasmidovými konstrukty byly transformovány elektroporací kompetentní buňky *Escherichia coli* (kmen Top 10). Bylo získáno  $2 \times 10^5$  transformovaných klonů *E. coli*. Náhodně bylo vybráno 192 klonů, jejichž plasmidová DNA byla použita jako templát pro PCR s primery T3 a T7. Od průměrné velikosti vzniklých produktů PCR bylo odečteno 175 bp (velikost polylinkru), tak byla určena průměrná velikost insertu - 487 bp.



Obr. 1. DOP-PCR produkty DNA chromosomu 1 smrku ztepilého. M - velikostní marker (1 Kb DNA Ladder (Life Technologies)); 1 - chromosom 1.



Obr. 2. Velikostní distribuce klonovaných fragmentů DNA – náhodný vzorek z knihovny. Inserty byly amplifikovány pomocí PCR s primery T3 a T7. M - velikostní marker (1 Kb DNA Ladder (Life Technologies)); 0 - bez DNA (negativní kontrola).

#### Literatura:

Macas, J., Gualberti, G., Nouzová, M., Samec, P., Lucretti, S., Doležel, J. 1996. – Chromosome Research 4: 531 – 539

Poděkování: Tato práce byla finančně podporována grantem GV521/96/K117.

## Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů *Arabidopsis thaliana*

JAN HEJÁTKO<sup>A,B</sup>, TÄNZLER, P.<sup>C</sup>, LEXA, M.<sup>A</sup>, PERNISOVÁ, M.<sup>A</sup>, PALME, K.<sup>C</sup> A BRZOBOHATÝ, B.<sup>A,B</sup>

<sup>A</sup> Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, PřF MU, Kotlářská 2, CZ-611 37, Brno, ČR

<sup>B</sup> Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, CZ-612 65, Brno, ČR

<sup>C</sup> Max-Delbrück-Laboratorium, Carl-von-Linne Weg 10, D-508 29, Köln, SRN

Biologie rostlin prožívá v současnosti velký rozmach téměř ve všech disciplínách od environmentální fyziologie a fyziologie stresu až po vývojovou a buněčnou biologii. Rychlý růst stupně porozumění biologickým procesům u rostlin je podmíněn ve značné míře dostupností přístupů funkční genomiky u několika modelových objektů, např. *Arabidopsis thaliana*. Aplikace funkční genomiky pak umožňuje velmi efektivní analýzu molekulárně genetické podmíněnosti řady biologických procesů. Jedním z klíčových přístupů funkční genomiky je reverzní genetika.

Podstatou reverzně genetického přístupu je identifikace sekvenčně specifických mutantů, umožňujících zpětné (reverzní) studium fenotypové manifestace absence biologické aktivity studovaných sekvencí (genů) v definovaných fyziologických podmínkách případně stádiích vývoje rostlin. Základním metodickým prvkem je skrínink knihoven inserčních mutantů metodami využívajícími polymerasové řetězové reakce (PCR). V současné době nejpoužívanějšími jsou (i) trojrozměrný skrínink, prováděný přímo metodou PCR, založený na znalosti sekvence insertu a inserčně mutované sekvence a (ii) hybridizace sekvenčně specifické sondy s filtry nesoucími imobilizované produkty sady inverzních PCR odpovídajících jednotlivým inserčním lokusům ve výše uvedených knihovnách. Oba tyto přístupy byly použity k identifikaci inzerční mutace v genu kódujícím domnělý receptor cytokininů, *CKII* (Kakimoto, 1996). Naše zkušenosti ze skríninků několika knihoven ukazují, že kritickým parametrem pro jejich úspěšnost jsou především vlastnosti oligonukleotidů použitých jako primery v PCR. Prokázalo se, že vhodnost oligonukleotidů pro PCR lze se značnou mírou spolehlivosti stanovit s využitím počítačového programu OLIGO® 4.06. První inzerční mutaci v *CKII* genu jsme identifikovali trojrozměrným skríninkem knihovny mutantů vytvořené vnesením autonomního kukuřičného transposonu En-1 do populace *Arabidopsis thaliana* (Wissman et al., 1998). Následně jsme provedli molekulární lokalizaci inserce a genetickou kosegregační analýzu. Pro potvrzení příčinné souvislosti nalezeného fenotypu s insercí En-1 v *CKII* genu jsme využili genetické nestability En-1 transposonu v inserčním lokusu. Identifikovali a charakterizovali jsme jak tichou mutaci vedoucí k reversi ke standardnímu typu, tak novou stabilní mutaci, která způsobuje ztrátu funkčnosti genu změnou čtecího rámce. V současnosti dokončujeme analýzu expresního profilu genu *CKII* a jeho funkčních projevů.

Uvedené využití funkční genomiky spolu s (i) metodami studia globálních změn exprese genomu s využitím mikročipových technologií a (ii) komplementární charakterizace změn proteomu v průběhu vývojových procesů nebo v reakci na změny vnitřních i vnějších fyziologických faktorů bude hrát zásadní roli při studiu řady význam-

ných biologických fenomenů. Úspěšnost etablování těchto přístupů v našich laboratorních bude zásadním způsobem spolupodmiňovat udržení dobrého jména české biologie rostlin.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem programu INCO-Copernicus ERB351PL966135 a granty MŠMT VS96096 a LN00A081.

#### **Literatura:**

- Ellen Wissman, Cardon G.H., Fransz, P. and Sädler H., 1998: The behaviour of the autonomous maize transposable element En/Spm in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Molecular Biology* 37, 989-999
- Tatsuo Kakimoto, 1996: CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274, 982-985

## **Studium acetylace histonů molekulárně–biologickými metodami**

JAROMÍRA HODURKOVÁ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, BFÚ AV ČR, 612 65 Brno,  
tel.:05/415 17 203, email: mira@ibp.cz

Acetylace nukleosomálních histonů je považována za jev bezprostředně související s transkripční aktivitou (Grunstein 1997). Přesný mechanismus, jakým transkripci ovlivňuje, však není dosud zcela objasněn. Nejnovější studie naznačují, že acetylace histonů se zřejmě podílí na změnách struktury chromatinu (Turner 1999). Acetylaci podléhají  $\epsilon$ -aminoskupiny lysinových zbytků na N-terminálních koncích všech typů histonů nukleosomového jádra. Počet acetylovatelných míst je u jednotlivých histonů odlišný. Acetylace snižuje pozitivní náboj histonů, proto se isoformy s různým počtem navázaných acetátů navzájem liší svým elektrickým nábojem. Této skutečnosti se využívá pro jejich separaci na gelech. Podrobnější informace o celkové úrovni acetylace studovaného biologického materiálu lze získat imunodetekcí histonových izoform po přenosu proteinů z gelu na membránu. Pro prokázání přímé souvislosti acetylace a transkripční aktivity určitého genu se jeví velmi slibnou nedávno zavedená metoda imunoprecipitace chromatinu (Crane–Robinson a Wolffe 1998).

U rostlin byla problematika acetylací histonů studována jak molekulárně–biologickými analýzami (Waterborg 1992, Georgieva et al. 1991) tak i imunocytologickými metodami (Belyaev et al. 1998, Bůžek et al. 1998). Technika imunoprecipitace chromatinu je u rostlinných studií teprve v počátcích.

### **Příprava histonů z rostlinných pletiv**

Prvním krokem při izolaci histonů je homogenizace materiálu. V naší laboratoři materiál předchlazujeme tekutým dusíkem a následně drtíme ve třecí misce. Z takto homogenizovaného materiálu izolujeme buněčná jádra (Dolferus 1991). Histony jsou pak extrahovány do 0,4N HCl. Vzhledem k tomu, že se při homogenizaci uvolňuje

z rostlinných buněk velké množství katabolických enzymů (např. proteas) a fenolic-  
kých látek, je nutno proteiny izolovat v co nejkratší době, pracovat při nízkých teplo-  
tách a do používaných pufrů zahrnout látky zabraňující degradaci proteinů jako je PMSF  
(fenylmethylsulfonylfluorid) a merkaptoethanol. Pro zachování acetylovaných isofo-  
rem je v průběhu izolace kritické použití inhibitoru histondeacetylasy (butyrátu sodné-  
ho).

### **Separace acetylovaných histonů na AUT-gelech**

Pro separaci proteinů podle jejich přirozeného elektrického náboje se používá kyse-  
lých gelů s močovinou. V případě, že gel obsahuje i triton X-100 (jde o tzv. AUT-gely,  
acid-urea-triton), podílí se na separaci proteinů i jejich schopnost vázat se na tento  
neiontový detergent. Podrobné informace o složení AUT- gelů lze získat z práce Wiley  
et al. 1999.

Potřebná délka vertikálních deskových AUT-gelů je alespoň 16 cm, pro velmi dobré  
rozlišení jednotlivých acetylovaných isoforem se používají až 30 cm gely. Vertikální  
elektroforesy s chladícím systémem nabízí firmy Hoefer nebo Bio-Rad. Proteiny lze  
na gelu zviditelnit nejjednodušeji pomocí barvení Coomassie blue-R250 nebo  
Sypro Ruby (Molecular Probes, USA). Pro detailnější studium kinetiky acetylací a pře-  
devším k lokalizaci jednotlivých acetylovaných lysinů je však nezbytné použití speci-  
fických protilátek.

### **Přenos proteinů na membránu (western blot) a imunodetekce histonů**

Proteiny se přenášejí na nitrocelulosoovou membránu (Hybond C extra, Amersham) elek-  
trickými bloty. Rychlého přenosu docílíme použitím polomokrý aparatury (BioRad). Časo-  
vě náročnější, ale kvantitativnější, je přenos na klasických mokřých blotech (BioRad, Hoefer).

Histony navázané na membráně se inkubují s primární a posléze sekundární protilát-  
kou. Na našem pracovišti provádíme imunodetekci izoform histonů H4. Primární pro-  
tilátky jsou polyklonálního původu a jsou specifické k jednotlivým acetylovaným lysi-  
nům histonu H4. Tyto protilátky jsou v současné době již komerčně dostupné, např.  
u firmy Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, USA) nebo Serotec (Birmingham,  
UK). Sekundární protilátka je obvykle značena peroxidasou, která je poté zviditelňová-  
na chemoluminiscencí (ECL substrát, Amersham) na RTG filmu.

### **Imunoprecipitace chromatinu (CHIP assay)**

Výchozím předpokladem pro použití této metody je přístup k speciálně purifikova-  
ným protilátkám. Jejich komerční dostupnost je prozatím limitována. Vazba protilátek  
specifických k jednotlivým acetylovaným isoformám rozděluje chromatin na acetylo-  
vanou a neacetylovanou frakci. Na základě výsledků imunoprecipitace pak můžeme  
rozhodnout, zda se studovaná sekvence DNA (gen) nachází v acetylované části chro-  
matinu či nikoliv. Lze tak přímo studovat souvislost mezi acetylací histonů a transkripční  
aktivitou určitého genu.

Vstupní chromatin se pro imunoprecipitaci připravuje z izolovaných buněčných ja-  
der. K jádrům se přidává mikrokokální nukleasa, jejíž množství a dobu působení je

nutné optimalizovat tak, aby byl chromatin naštěpen na mononukleosomy až oligonukleosomy. K takto připravenému chromatinu se přidávají specifické protilátky a směs se inkubuje. Vzniklé imunokonjugáty jsou imobilizovány na agarosových kuličkách a odděleny centrifugací od nevázaného chromatinu. Vázaná frakce obsahuje nukleosomy se specificky acetylovanými histony. V supernatantu zůstává po centrifugaci nevázaná neacetylovaná frakce. Z obou frakcí pak lze běžnými metodami izolovat DNA a tuto podrobit další analýze (hybridizace se specifickými DNA sondami, PCR detekce).

### Literatura

- Belyaev, N. D., Houben, A., Baranczewski, P., Schubert, I. 1998. - *Chromosome Res.* 6: 59.  
 Bůžek, J., Říha, K., Šíroky, J., Ebert, I., Greilhuber, J., Vyskot, B. 1998. - *Biol. Chem.* 379: 1235.  
 Crane-Robinson, C., Wolffe, A.P. 1998. - *Trends Genet.* 14: 477.  
 Dolferus, R. 1991. - In: Negrutiu, I., Gharti-Chhetri, G.B. (ed.): *A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Plant Biology*. Birkhauser Verlag, Basel.  
 Georgieva, E.I., López-Rodas, G., Sendra, R., Grobner, P., Loidl, P. 1991. - *J. Biol. Chem.* 266: 18751.  
 Grunstein, M. 1997. - *Nature* 389: 349.  
 Turner, B.M. 1999. - *Seminars Cell Devel. Biol.* 10: 165.  
 Waterborg, J.H. 1992. - *Biochemistry* 31: 6211.  
 Wiley, E.A., Mizzen, C.A., Allis, C.D. 1999. - *Meth. Cell. Biol.* 62: 379.

Poděkování: Tato práce byla podporována GA AV ČR (A5004901).

## Isolace nativních, genově specifických ribonukleoproteinových částic metodou magnetické separace

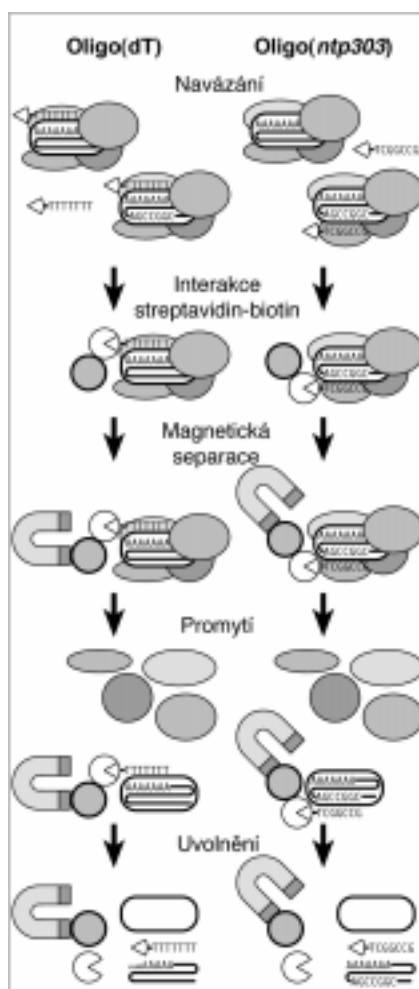
DAVID HONYS

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6,  
 tel.: 203 90 450, email: honys@ueb.cas.cz

Plakátové sdělení představuje původní metodu pro rychlou a jednoduchou izolaci nativních mediátorových ribonukleoproteinových částic (mRNP) metodou magnetické separace. K izolaci obecných i genově specifických mRNP z postmitochondriálního supernatantu je použito paramagnetických částic s asociovaným streptavidinem spolu s biotinylovanými deoxyribonukleotidovými sondami. Byla testována účinnost dvou biotinylovaných sond při izolaci mRNP z cytoplasmatických extraktů z nezralého pylu tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun); sondy oligo(dT) a ntp303. Oligo(dT) sonda představuje 25-mer deoxythymidinů a byla použita pro nespecifickou izolaci obecných mRNP přítomných v extraktu. Genově specifická sonda ntp303 je 25-mer komplementární k sekvenci uvnitř kódující oblasti mRNA pylově specifického genu ntp303 (Weterings et al., 1992, Štorchová et al., 1994). Princip metody je schematicky znázorněn na obr. 1. Po navázání sondy k cílové mRNA byly oligodeoxyribonukleotidové sondy s asociovanými ribonukleoproteinovými komplexy polapeny paramagnetickými částicemi za účasti streptavidinu a koncentrovány v magnetickém poli. Po odstranění nespecificky navázaných proteinů během několika promývacích kroků byly bílkoviny tvořící mRNP uvolněny povařením vzorků v nanášecím pufru pro SDS-PAGE a analy-

zovány pomocí elektroforezy (Laemmli, 1970) a western blot imunodetekce RNA vazebných bílkovin.

Právě popsaná metoda představuje alternativní přístup k izolaci mRNP částic, je rychlá a obzvláště vhodná při předpokládané následné práci s bílkovinnou složkou uvedených komplexů. Postup, při němž dochází v jediném kroku k výraznému nabohacení ribonukleoproteinových částic ve vzorku může být s výhodou použit k zesílení detekce málo zastoupených mRNA vazebných bílkovin pomocí UV řetězení a „northwestern“ detekce či k přímé identifikaci a biochemické charakterisaci bílkovin interagujících s RNA, a to nejen mRNA; záleží jen na vhodném výběru sondy.



Obr. 1. Schematické znázornění magnetické separace ribonukleoproteinových částic.

### Literatura

Laemmli, U.K. 1970. – Nature 227:680-685.

Štorchová, H., Čapková, V., Tupý, J. 1994. – Planta 192: 441-445.

Weterings, K.A.P., Reijnen, W., Aarssen, R.v., Kortstee, A., Spijkers, J., Herpen, M.M.A.v., Schrauwen, J.A.M., Wullems, G.J. 1992 – Plant. Mol. Biol. 18: 1101-1111.

## Metodické aspekty studia methylací DNA a acetylací histonů u pylu

BOHUSLAV JANOUŠEK

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno,  
tel.: 05/415 17 203, email: janousek@ibp.cz

### Úvod

První pylová mitosa u krytosemenných rostlin, při které dochází ke vzniku vysoce kondenzovaného jádra buňky generativní a dekondezovaného jádra buňky vegetativní, je příkladem výrazné diferenciaci struktury chromatinu. Jelikož se vegetativní a generativní jádro velmi liší i v expresi jednotlivých genů, představuje pyl vhodný modelový systém pro studium mechanismů řízení genové exprese na úrovni chromatinu. V současné době jsou z těchto mechanismů nejvíce studovány metylace DNA a acetylace N-terminálních lysinů v nukleosomálních histonech. Pro vlastní studium pylu má zásadní význam volba modelového druhu. Kriteria pro tento výběr závisejí na tom, zda se rozhodneme zkoumat změny nastávající na úrovni celých jader nebo na úrovni jednotlivých genů. Změny na úrovni jednotlivých genů je nutno analyzovat molekulárně biologickými metodami, ale pro studium celkových změn na úrovni jader je nejvýhodnější použití imunocytochemických přístupů.

### Imunocytochemické metody

U této skupiny metod je výhodné si zvolit modelový objekt, který umožňuje snadnou izolaci pylových protoplastů (viz Shivanna a Rangaswamy 1992). Tento požadavek splňují zejména druhy z čeledi Liliaceae vyznačující se unikolpátními pylovými zrny. Nejstudovanějším modelovým objektem z imunocytochemického hlediska je druh *Lilium longiflorum*, který je charakteristický také značnou velikostí pylových zrn a láček. Pro studium acetylací histonů v pylových zrnech je zřejmě nevyhnutelné použití pylových protoplastů, protože se jedná o málo odolné epitopy, které by byly použitím kyselé fixace degradovány. Preparáty jsou z pylových protoplastů připravovány pomocí cytocentrifugace za současného fixačního působení formaldehydu (Hladilová et al. 1998). Následná permeabilizace preparátů je zajištěna působením methanolu a Tritonu X-100. Detekci epitopů je nejlépe provádět pomocí nepřímé imunofluorescence (Hladilová et al. 1998). Pro studium methylací DNA v pylových zrnech není nezbytné nutné využití pylových protoplastů, ale je možno rovněž připravovat roztlakové preparáty. Roztlaky lze nejlépe provádět ve 45% kyselině octové. Přimražením vzorků na poly-L-lysinovaná skla a následným odstraněním krycích skel je možno získat vhodné preparáty. Kvalita preparátů získaných z cytocentrifugovaných protoplastů je ovšem obvykle lepší. V obou případech je nutno zpřístupnit epitopy DNA další permeabilizací za použití pepsinu, chloroformu, éteru, acetonu a kyseliny chlorovodíkové, která zároveň slouží ke kyselé denaturaci. Pro zkoumání pylových láček se nám nejvíce osvědčil postup založený na fixaci a permeabilizaci láček v suspenzi (Zhang et al. 1995), nikoli na podložním skle. Láčky jsou postupně fixovány a permeabilizovány na speciálním sítku vytvořeném z nylonové sítky s póry 50 μm umístěném do zkumavky. Permeabili-

zace pomocí celulasy se provádí až po formaldehydové fixaci. V případě studia histonů provádíme i imunodetekce v suspenzi. Pro studium methylocí je nutno chromatin jader dále opracovat a pro tento účel přemísťujeme částečně permeabilizované láčky na poly-L-lysinovaná skla. V suspenzi je rovněž možné permeabilizovat i celé mikrospory. Postup je obdobný jako u láček, ale pro manipulaci s mikrosporami používáme centrifugaci. Při studiu methylocí DNA je nutno použít další permeabilizaci na podložních sklech, ale u histonových epitopů je opět vhodné provádět i imunodetekci ve zkumavce. Pro pozorování a dokumentaci je u objektů, které jsou dostatečně ploché (např. cytospinovaná jádra) efektivnější dát přednost klasickému epifluorescenčnímu mikroskopu před konfokálním. Konfokální mikroskop je ovšem velmi užitečný v případě prostorových objektů, např. při studiu mikrospor. Vyhodnocování provádíme pomocí analýzy obrazu, jako je např. ISIS (Metasystems). Detailnější popis imunocytochemických postupů při studiu pylu lze nalézt v práci Janouška et al. (2000).

### **Molekulárně biologické metody**

Požadavky na zkoumaný modelový objekt pro studia methylačního stavu konkrétního genu jsou zcela odlišné než pro imunocytochemii. Důležitá je především možnost izolace dostatečného množství DNA s relativně malým obsahem repetitivních sekvencí. Hlavní modelový objekt rostlinné molekulární biologie *Arabidopsis thaliana* neposkytuje bohužel dostatek pylu a druhy, které jsou velmi výhodné pro imunocytochemická studia, jako je např. *L. longiflorum* tomuto požadavku také nevyhovují, jelikož obsahují rozsáhle zastoupenou frakci repetitivních sekvencí. Výhodné je volit kompromis v podobě druhů se středně velkými genomy, které jsou dobrými donory pylu, jako jsou např. *Nicotiana tabacum* či jiné druhy z čeledi Solanaceae. Vhodné je i použití dvoudomé rostliny *Silene latifolia* (Caryophyllaceae). Tento druh je rovněž uspokojivým donorem pylu se střední velikostí genomu a navíc se postupně stává zdrojem pohlavně specificky exprimovaných sekvencí DNA včetně genů exprimovaných při vývinu pylu. Jinak často používaná metoda založená na použití methylačně citlivých restričních endonukleas a Southernově přenosu má u pylu velmi omezené použití vzhledem k velké spotřebě DNA při studiu unikátních sekvencí. Studium methylocí v repetitivních sekvencích touto metodou ovšem může na rozdíl od cytochemického přístupu poskytnout informaci o místech methylocí cytosinu, jež podléhají změnám (CG, CNG či asymetrická cílová místa). Mnohem výhodnější pro studium unikátních sekvencí je metoda genomového sekvenování založená na modifikaci DNA hydrogensířičitanem sodným, která využívá skutečnosti, že nemethylované cytosiny jsou nejdříve přeměněny na uracil a následně (po PCR) na thymin. Jelikož se jedná o metodu založenou na PCR, umožňuje pracovat s mnohem menším množstvím DNA. Pro přípravu DNA se nám nejvíce osvědčilo použití DNasy Plant Mini kitu od firmy Qiagen. Pylová zrna pro izolaci vymýváme ze zralých prašníků pomocí hexanu. Po vysušení provádíme homogenizaci v tekutém dusíku, kvalitu homogenizace zkontrolujeme pod binokulární lupou. Pylové láčky nehomogenizujeme, ale využíváme jejich citlivosti k detergentům. Jelikož pylové láčky představují masu o velkém objemu s relativně malým obsahem DNA, provádíme první extrakci a přečištění podle Dellaporty et al. (1983) ve větším objemu. Přesrá-



ženou DNA dále purifikujeme pomocí DNasy Plant Mini kitu. Výtěžky DNA jsou obvykle malé, tj. několik stovek nanogramů z 300 ml pylové suspenze. Tento problém řešíme použitím metody hydrogensířičitanové modifikace DNA imobilizované v agarose (Oleg et al. 1996). Ihned po denuraci jsou ke vzorku přidány dva objemy 2% agarosy tuhnoucí při nízké teplotě a napipetováním do zkumavky s předchlazeným minerálním olejem získáme agarosové kuličky obsahující denaturovanou DNA, která je následně podrobena modifikaci. Použití agarosy nejen brání renaturaci DNA, která musí být pro modifikaci zcela denaturovaná, ale také umožňuje snadnou manipulaci se vzorkem a snížení ztrát templátu. Ze 100 ng templátové DNA je možno získat dostatek PCR produktů pro klonování a následnou analýzu pomocí sekvenování.

### Zhodnocení metod

Oba přístupy jsou velmi důležité pro studium methylací DNA a acetylací histonů u rostlin. Imunocytochemické metody jsou relativně málo finančně náročné a umožňují snadno získat informaci o celkovém methylačním stavu DNA v různých typech jader bez nutnosti jejich separace. Vyžadují ovšem zpravidla optimalizaci pro každý nový zkoumaný druh. Metoda genomového sekvenování je finančně i časově náročnější, umožňuje však získat poznatky o úloze methylací DNA v expresi jednotlivých genů. Tyto poznatky jsou pro posouzení biologické role methylací DNA nepostradatelné, neboť změny odehrávající se na úrovni jednotlivých genů nemusí nutně korelovat se změnami celkového methylačního stavu genomu.

Poděkování: Tato práce byla podporována Grantovou agenturou ČR (521/98/P061).

### Literatura

- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. 1983. - *Plant Mol. Biol. Reporter* 1: 19.  
 Hladilová, R., Široký, J., Vyskot, B. 1998. - *Biotech. Histochem.* 73: 150.  
 Janoušek, B., Žlůvová, J., Vyskot, B. 2000. - *Protoplasma* 211: 116.  
 Oleg, A., Oswald, J., Walter, J. 1996. - *Nucl. Acids Res.* 24: 5064.  
 Shivanna, K.R., Rangaswamy, N.S. 1992. - *Pollen Biology*. Springer Verlag, Berlin.  
 Zhang, H.-Q., Bohdanovicz, J., Pierson, S.-E., Li, Y.-Q., Tiezzi, A., Cresti, M. 1996. *J. Plant. Res.* 108: 269.

## Construction of plant BAC libraries

EDUARD KEJNOVSKÝ

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno,  
 tel.: 05/415 17 194, email: kejnovsk@ibp.cz

### INTRODUCTION

The first large DNA fragment cloning system was based on yeast artificial chromosome, YAC, (Burke *et al.* 1987) which allows cloning of DNA fragments up to 1Mb. However, several difficulties of YACs have limited the utility of YAC libraries, including their high level of chimerism, insert instability and difficulty of purifying cloned

insert DNA. It has led to a development of alternative systems using bacteria as the host. Bacterial artificial chromosome (BAC) system has been developed (Shizuya *et al.* 1992) based on *E. coli* fertility plasmid (F-factor). Another system using P1-derived artificial chromosome (PAC) has been constructed (Pierce *et al.* 1992) combining the features of the bacteriophage P1 and the F-factor-based systems. Both BAC and PAC are capable of cloning and stably maintaining of DNA fragments larger than 300 kb in *E. coli*. Major advantages of BACs and PACs include lower level of chimerism, high stability in the host cells and the facility and speed of insert DNA purification.

There are two widely used BAC vectors - pBeloBAC11 and pECBAC1. Both vectors carry the chloramphenicol resistance gene and the *lacZ* gene with cloning sites for colony color selection. Cloning sites are flanked by recognition sites for rare-cutting *NotI* restrictase allowing release of the insert from recombinants. In addition, binary vectors were developed for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. The most commonly used binary vector is BIBAC2. All BAC vectors have a unique copy per cell what has been widely accepted to ensure their stability.

### MAJOR STEPS IN CONSTRUCTION OF BAC LIBRARY

Successful cloning of large DNA fragments (100-300 kb) is critically dependent on the integrity of the DNA to be cloned. Two basic methods are used for isolation of very high molecular weight DNA (also called megabase-sized DNA) from plants. The protoplast method yields megabase-sized DNA of high quality with a minimal breakage, but it is more expensive and laborious than alternative nuclei method. The protoplast method must be optimized for a given plant species while the nuclei method is more universal and results in lower amounts of contaminant chloroplast DNA. Protoplasts or nuclei must first be embedded in agarose plugs or microbeads. Agarose acts as a solid porous matrix which allows diffusion of various reagents for protoplast or nuclear lysis, DNA purification and subsequent manipulation (e.g. restrictase cleavage) while preventing the isolated DNA from being sheared. To obtain DNA of desired size range, the embedded DNA is fragmented by a physical shearing or by a partial digestion with restrictases. The physical shearing yields a more random distribution of DNA fragments but needs subsequent manipulation (repairing the ends) which lowers the yields of clonable DNA. The reproducible partial digestion of high molecular weight DNA by restrictases (6-bp cutters like e.g. *HindIII*) is achieved by varying the time of digestion, concentration of the enzyme or  $Mg^{2+}$  cofactor. After partial digestion, the DNA is size-selected to obtain desired range of fragment length using pulse-field gel electrophoresis (PFGE). Two subsequent size-selections are often performed to remove the smaller DNA fragments that can compete more effectively with the larger fragments for vector ends. Fragments 100-300 kb in length are mostly used for ligation. Before ligation DNA fragments are released from agarose by gelase (or agarase) treatment or by electroelution. The enzymatic digestion of agarose is straightforward but includes the heating step (agarose melting) causing breakage of DNA. On the other hand the electroelution gives DNA of better quality resulting in a higher efficiency of BAC cloning (Strong *et al.* 1997). Genomic DNA is ligated with restrictase digested and

dephosphorylated vector and then transferred into *E. coli*. Electroporation has proved to be the most efficient transformation method thus far. After transformation, recombinant clones (white colonies) are picked manually or robotically (e.g. Q-bot, Genetix, or Biomek 2000 Robotics Workstation, Beckman) into 384-well microtiter plates containing a culture medium. The library is stored at -80°C to be ready for screening using hybridization or PCR.

### ANALYSIS OF BAC LIBRARY

The quality of BAC library is usually tested by determining: (1) average insert size, (2) average number of clones hybridizing with single-copy DNA probes and (3) content of chloroplast DNA. To determine the average insert size, BAC DNA is isolated from random recombinant clones, digested with *NotI* to free the insert and then sized by PFGE. It is recommended to determine average insert size for every ligation during the library construction. Genome coverage of the library is determined by screening with single copy markers by hybridization or PCR. For hybridization, BAC clones are spotted onto the nylon membranes using a multitasking robot. The chloroplast DNA content in the BAC library is estimated by hybridizing with labeled chloroplast DNA.

### SIZE OF BAC LIBRARY

Similarly as in any other genomic library, the number of BAC clones needed to get a target gene depends on the genome size and the length of average clone insert. The number of clones in the library is determined using the following equation:  $N = \ln(1-P) / \ln(1-L/G)$  where, N = number of clones in library, P = probability to get the target gene, L = length of average insert in bp, G = haploid genome size in bp. This equation is based on homogenous distribution assumption despite, in practice, the collection of clones is often not randomly distributed. In general, 99% coverage represents 4-5 haploid genome equivalents. BAC libraries with 4-20x genome coverage are usually used for construction of complete physical maps or whole genome sequencing.

A number of plant BAC libraries have been constructed including *Arabidopsis*, rice, barley and tomato. The growing list of available BAC libraries is on Internet (<http://hbz.tamu.edu> or <http://www.genome.clemson.edu>).

### APPLICATIONS OF BAC LIBRARIES

BAC libraries are used for all kind of modern structural, functional and evolutionary genomics research. They are important tools for physical mapping, positional cloning and genome sequencing, especially in the whole genome sequencing projects of complex eukaryotic genomes.

Recent studies show that BACs are also a promising tool for physical mapping of genomes using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). In plants, FISH is not reliable with classical vectors containing less than 10 kb of single-copy DNA. Recently, BAC clones harbouring about 100 kb inserts have been successfully used as probes in FISH (Lapitan *et al.* 1997). Repeated DNA sequences present in BAC clones can be suppressed during hybridization allowing to detect single-copy sequences. FISH with BACs

was used not only for localization of single-copy genes to chromosomes but also to compare a gene order in related species (Zwick *et al.* 1998). Because the gene order is often highly conserved along chromosomes, probes generated in one species can be used for mapping in another species. It can accelerate the genome mapping projects especially when BAC libraries of species with small genomes are used to identify syntenous chromosomal regions in related plant species with larger genomes (Keller and Feuillet 2000).

Acknowledgments: I thank Professors Sarah Grant and Boris Vyskot for suggestions on the manuscript. This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (No. 521/96/K117) and NSF-ME grant No. 380 (2000).

### References

- Burke, D.T., Carle, G.F. and Olson, M.V. 1987. - *Science* **236**: 806.  
Keller, B. and Feuillet, C. 2000. - *Trends Plant Sci.* **5**: 246.  
Lapitan, N., Brown, S.E., Kennard, W., Stephens, J.L. and Knudson, D.L. 1997. - *Plant J.* **11**: 149.  
Pierce, J.C., Sauer, B. and Sternberg, N. 1992. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2056.  
Shizuya, H., Birren, B., Kim, U-J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiri, Y. and Simon, M. 1992. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8794.  
Strong, S.J., Ohta, Y., Litman, G.W. and Amemiya, Ch.T. 1997. - *Nucl. Acids Res.* **25**: 3959.  
Zwick, M.S., Islam-Faridi, M.N., Czeschin, D.G. Jr., Wing, R.A., Hart, G.E., Stelly, D.M. and Price, H.J. 1998. - *Genetics* **148**: 1983.

## Využití rRNA genů pro detekci cizorodé DNA ve vzorku

ALEŠ KOVAŘÍK<sup>1</sup> A JIŘÍ MAYER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 621 65 Brno,  
tel.: 05/415 17 178, email: kovarik@ibp.cz;

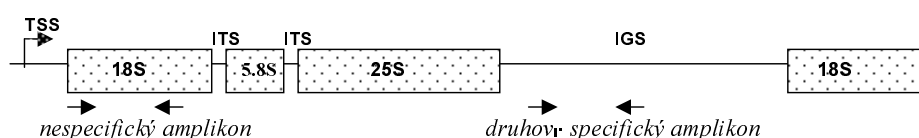
<sup>2</sup>II. Interní klinika FN MU v Brně-Bohunicích, Jihlavská 20, 639 00 Brno

Bude prezentována univerzální PCR metoda pro stanovení velmi malých množství DNA v biologickém materiálu. Strategie při výběru cílové sekvence vychází ze značného objemu známých nukleotidových sekvencí genů kodujících ribosomální RNA (18S rDNA). Bude předvedena ukázka vyhledávání sekvenčních dat, porovnání sekvenčních homologií a výběru oligonukleotidových primerů pomocí GCG package software. Na příkladu amplifikace genu pro 18S rRNA bude demonstrována detekce DNA pathogenní houby *C. albicans* odpovídající 10-100 buňkám v 200 ml krve. Využití 18S rDNA pro evoluční studia bude ukázáno na příkladu odhalení rodičovských allel rRNA genů v amfidiploidním genomu *N. tabacum*.

### Podstata metody

V praxi se často setkáváme s požadavkem odhalit přítomnost malého množství buněk cizorodého organismu (například pathogenu) v biologickém materiálu. Ideálním přístupem k řešení tohoto problému je detekce specifické DNA pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR). Kromě značné citlivosti a specifičnosti výhodou metod založe-

ných na detekci genomu je schopnost odhalení “stopy DNA“ v době, kdy ve zkoumaném vzorku již živý organismus není přítomen. Při zahájení projektu je zpravidla zapotřebí řešit otázky spojené s výběrem cílové sekvence DNA, která je dána informací o nukleotidovém složení zkoumaného genomu. Ačkoliv kompletní sekvenční údaje jsou zatím známy jen pro několik málo modelových organismů, existují skupiny genů, které již byly sekvenovány u značného počtu biologických druhů. Mezi tyto patří geny kódující ribosomální 18S-5.8S-25S rRNA, jejichž sekvence jsou známy pro více než stovku organismů. Tyto sekvence proměnlivé délky 10-20 kb obsahují na jedné straně úseky, které jsou značně evolučně konzervovány, na straně druhé se zde vyskytují druhově specifické motivy (Obr. 1). Tyto vlastnosti rRNA genů (rDNA) značně ulehčují výběr primerů pro PCR nebo pro případné klonování (Obr. 2). rRNA geny bývají navíc

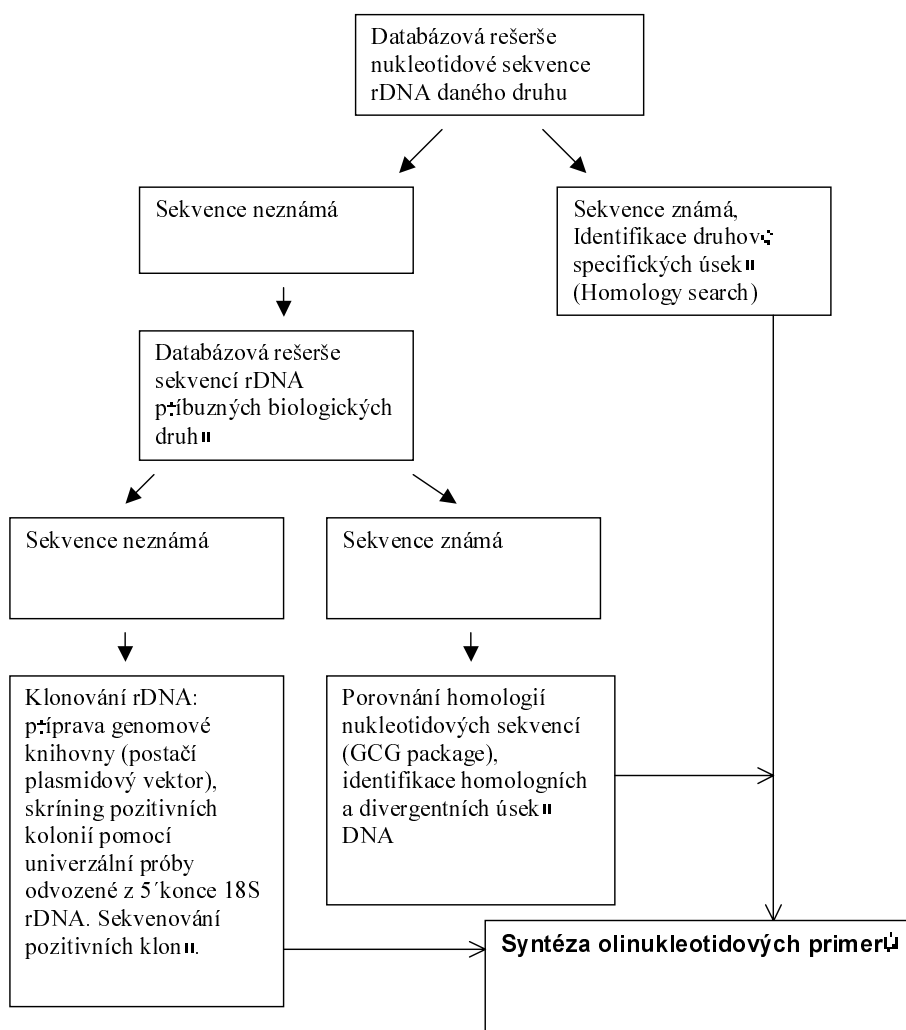


Obr. 1. Obecná struktura jednotky 18S-5.8S-25S rRNA genu. Obdélníky jsou znázorněny evolučně konzervované úseky, čarami pak evolučně divergentní úseky intergenových (IGS) a intragenových (ITS) sekvencí. TSS – počátek transkripce rRNA operónu. Šipkami jsou znázorněny páry primerů pro PCR.

v genomu přítomny v několikatisícových kopiích, což výrazně zvyšuje účinnost PCR amplifikace při malých množstvích vzorku.

### **Shrnutí základních praktických postupů :**

- Výběr vhodného amplikonu (Obr. 2). Porovnání homologie 18S rRNA genů (např. *C. albicans* v *H. sapiens*) (Podprogram Homology search/pairwise comparison/ Best fit). Selektce druhově-specifických motivů. Navržení oligonukleotidových primerů pro rDNA *C. albicans*
- Optimalizace extrakce DNA z klinického materiálu
  1. DNA byla izolovaná ze 100  $\mu$ l nesrážlivé krve.
  2. Porušení buněčné stěny: vzorek krve byl preinkubován s lytikasou (10  $\mu$ g/mL) pro lepší degradaci buněčné stěny *Candida albicans*.
  3. Deproteinaci vzorku jsem provedli přidáním 5  $\mu$ l 20% SDS a 10 ml proteasyK (20 mg/ml). Deproteinace probíhala 16 hodin při 52 °C. Poté byl vzorek naředěn na objem 400  $\mu$ l dest. vodou, ke kterému následně bylo přidáno 400  $\mu$ l směsi fenol-chloroformisoamylalkohol (25:24:1) (při vyšším obsahu proteinů byla extrakce opakována). Odebraná vodní fáze byla dále smíchána se stejným objemem směsi chlorofom-isoamylalkohol (24:1).
  4. Po poslední extrakci byla DNA precipitována z vodní fáze přidáním 3 objemů ethanolu (přes noc, -20 °C). Pro kvantitativní precipitaci jsme přidávali 5 ml 0,25% lineárního polyakrylamidu. Precipitát jsme odstředili a promyli 70% ethanolem a po vysušení rozpustili v 20  $\mu$ l destilované vody.



Obr. 2. Postup při výběru primerů pro PCR. Číslo sekvence v databázi lze nejjednodušeji vyhledat pomocí internetu například na adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Číslo sekvence pak uplatníme při stahování dat ve vhodném formátu pro GCG package Wisconsin software, který je speciálním unixovským programem pro analýzu nukleových kyselin. Podprogram SEQLAB, který je podporován X-WINDOWS, umožňuje uživatelsky příjemné prostředí. Pro stahování sekvencí jsme použili příkaz "add sequence from...", pro porovnání sekvencí homologií 18S rDNA pak příkazy "pairwise comparison" a "best fit alignment".

#### • Optimalizace amplifikační reakce

Polymerasová řetězová reakce probíhala v 50  $\mu$ l objemu na cykleru Perkin Elmer (USA). Amplifikační směs obsahovala 20ml naředěné DNA a 30  $\mu$ l amplifikačního pufru (1.5  $\mu$ l 20 mM C1F primer (5'-ACTTTCGATGGTAGGATAG-3'), 1.5  $\mu$ l 20 mM C1R primer (5'-TGATCATCTTCGATCCCCTA-3') (Makimura et al., 1994, Mayer et al., 1998), 5 ml 10 x Taq pufr (Boehringer), 2  $\mu$ l 50mM MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l 10 mM dNTP (Boehringer), 18 ml H<sub>2</sub>O). Koncentrace primerů (MWG, Německo) byla stanovena spektroskopicky při 260 nm. Zásobní 20 mM roztok byl skladován při -20 °C. Směs byla v 0.5 mL tenkostěnných mikrozkuvkách převrstvena minerálním olejem a zahřata na 94°C po dobu 10 min. Poté bylo ke směsi přidáno 1.5 jednotky enzymu Taq polymerázy (Boehringer). Amplifikace probíhala za následujících podmínek : 35 cyklů (94°C - 20 s, 55°C - 60 s, 72°C -120 s). Přibližně 20 ml PCR produktu bylo

analyzováno v gelové elektroforese. Separace fragmentů probíhala v 1% agaróze v TAE pufru (40 mM Tris-acetát, 1mM EDTA), který obsahoval ethidium bromid v koncentraci 1 mg/mL. Po 2 hodinách elektroforesy při 60V byly DNA fragmenty fluorescenčně detegovány na transiluminátoru (310 nm). Jako velikostní standarty byly použity restriční fragmenty plasmidu pUC19 (BstNI). Molekulární hybridizace byla provedena na Nylonové membráně s radioaktivně značenou sondou 18S rDNA *S. cerevisiae*.

- Stanovení citlivosti PCR metody.  
Požadavek na citlivost stanovení může odpovídat jedné cílové molekule mezi 104 -105 nehomologními DNA molekulami. V našem případě byla citlivost stanovena pomocí ředění DNA na 1-10 pg DNA odpovídající přibližně 10-100 buňkám *C. albicans* (Mayer et al., 1998)
- Vyhodnocení experimentálních dat.  
Bývá zpravidla jednoduché a funguje na principu je signál/není signál. Jako pozitivní signál se považuje detekce fragmentu odpovídající délky po gelové elektroforese. Hybridizační signály vyhodnocujeme pomocí autoradiografie, fluorografie, FosforImageru nebo vizuálně v případě použití neradioaktivních metod.

### Laboratorní vybavení:

Běžné laboratorní přístroje jako je stolní centrifuga, termostaty, vodní lázeň, PCR cyklér, gelová elektroforesa, UV transiluminátor, (hybridizační pec, laboratoř pro práci s radiaktivitou). Počítač s napojením na GenEMBL databáze. Software umožňující kvalitní porovnávání nukleotidových sekvencí a databázovou rešerši (GCG package, Dnasis)

### Zhodnocení finanční a časové náročnosti

Pro velmi citlivé stanovení cizorodé DNA je třeba počítat s cca 72 hodin. Lze však zpracovávat současně více vzorků. Odhad finančních nákladů na jeden vzorek je nízký a pohybuje se v rozmezí 20-50 Kč. S molekulární hybridizací ještě 48-72 hodin navíc a rovněž finanční náročnost může vzrůst až desetinásobně.

### Tipy a triky

Pozornost je třeba věnovat zejména vhodnému výběru primerů. Počítačové programy pro analýzu DNA již mají podprogramy umožňující optimální selekci primerů v dané sekvenci. Základní parametry primerů jako je jejich délka, obsah GC, teplota tání lze i bez programů kalkulovat pomocí jednoduchých vzorců (Sambrook et al., 1989). Vzhledem ke známé vlastnosti Taq polymerasy nestejněmálně amplifikovat DNA sekvence různého nukleotidového složení, bývá výběr amplikonu značně kritický. Na začátku experimentu je vhodné otestovat kombinaci několika oligonukleotidů a posléze vybrat ty z nich, které poskytují specifický signál při maximálním ředění templátové DNA. Při zavádění metody je vhodné určit nukleotidovou sekvenci získaného PCR produktu, nebo se alespoň přesvědčit o jeho specifitě restričním štěpením.

## Literatura

- Buchman TG, Rossier WG, Merz WG and Charache P (1990) *Surgery* 108, 338-347.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, Van Burik J-A, Engelhard D, Kanz L and Schumacher U (1997) *J Clin Microbiol* 35, 1353-1360.
- Mayer J, Kovařík A, Vorlíček J, Číhalová J and Kubálek V (1998) *Mycoses* 41, 471-475.
- Makimura K, Murayama SY and Yamaguchi H (1994) *J Med Microbiol* 40, 358-364.
- PCR and multiplex PCR: guide and troubleshooting. WWW: <http://info.med.yale.edu/genetics/wardtavi/PCR.html>
- Rau J and Hudson P (1998) In: Rau J (ed.): *SeqLab Guide for the Wisconsin Package GCG*. Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Vorlíček J, Mayer J, Kovařík A, Číhalová J, Kubálek V and Dvořáková D (1997) *Vnitřní lékařství* 1997.
- Wisconsin Package Version 10, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc. WWW: <http://www.gcg.com/>

## Fyzická lokalizace DNA sekvencí na rostlinných chromosomech metodou PRINS

MARIE KUBALÁKOVÁ, JAN VRÁNA, JARMILA ČÍHALÍKOVÁ, MARTIN LYSÁK, JAROSLAV DOLEŽEL  
Ústav experimentální botaniky, Laboratoř cytogenetiky a průtokové cytometrie, Sokolovská 6,  
77 200 Olomouc, tel.: 522 85 21, email: [mariek@aix.upol.cz](mailto:mariek@aix.upol.cz)

Pro fyzickou lokalizaci repetitivních sekvencí i jednotlivých genů na chromosomech se tradičně používá fluorescenční *in situ* hybridizace FISH (Landegent et al. 1985). V roce 1989 vyvinul Koch se spolupracovníky (Koch et al. 1989) alternativní metodu, kterou nazvali PRINS (*Primed In Situ labelling*). Princip metody spočívá v nasednutí primerů na denaturovanou chromosomovou DNA a v tvorbě nového úseku pomocí DNA polymerasy. Reakční směs musí obsahovat jeden nebo více značených nukleotidů. Značeny mohou být buď fluorescenčně, díky tomu je možné okamžitě po ukončení reakce pozorovat místo syntézy DNA pomocí fluorescenčního mikroskopu nebo je také možné používat nukleotidy značené digoxigeninem nebo avidinem. V tomto případě je reakční produkt nutné detegovat pomocí fluorescenčně značené protilátky. Na rozdíl od FISH tedy není pro PRINS nutné připravovat značené sondy. Protože jsou sondy (primery) neznačené, je možné je používat ve vyšších koncentracích než v případě FISH a tak dosáhnout vysoké citlivosti. Další zvýšení citlivost umožňuje tzv. „cycling-PRINS“. Tato metoda, kterou poprvé použili Gosden et al. (1991), spočívá v opakování reakčních cyklů (denaturace, nasednutí primeru a syntéza) stejně jako v případě PCR reakce.

Pomocí PRINS či C-PRINS lze lokalizovat sekvence DNA na roztlakových preparátech, na preparátech připravených nakápáním izolovaných protoplastů nebo je možné použít chromosomy tříděné pomocí flow cytometru. Materiál použitý pro přípravu roztlakových a protoplastových preparátů by měl obsahovat dostatečné množství buněk nacházejících se v metafázi. Pro daný úsek DNA, který chceme lokalizovat si navrhne primery. Cyklovanou C-PRINS reakci provádíme na cycleru s nástavcem



pro mikroskopická sklíčka. Výsledek reakce pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu, chromosomy si zviditelníme fluorochromem DAPI nebo PI.

### **Pracovní postup**

Není třeba žádné předběžné opracování preparátu jako je tomu v případě FISH. Na mikroskopické sklíčko nalepíme okolo chromosomů speciální samolepící rámeček (MJ Research nebo Hybaid), nakápneme reakční směs, přilepíme plastové víčko, které se dodává s rámečkem. Provedeme reakci, která se skládá u PRINS z denaturace při 91-94°C po dobu 1-5 minut, nasednutí primerů při teplotě 50-60°C po dobu 15 minut a syntézy nového značeného úseku DNA pomocí polymerasy při teplotě 72°C po dobu 30-60 minut. Při C-PRINS reakci se teploty zkracují na 1 minutu i méně a provede se 10-60 cyklů. S každým cyklem se intenzita fluorescence na lokalizovaných úsecích zvýší. Nakonec reakci zastavíme pomocí pufru s NaCl při 70°C, 3x promyjeme pufrem a podbarvíme příslušným fluorochromem. Preparát zavřeme do montovacího media Vectashield a přilepíme krycí sklíčko.

### **Vyhodnocení experimentálních dat**

Pozorování na fluorescenčním mikroskopu provádíme buď ve filtrech pro jednotlivé fluorochromy, obrázky snímáme kamerou a skládáme v počítači nebo použijeme dvojité filtry a exponujeme na citlivý Kodak Ektapress Multi film (100-1000 ASA).

### **Zhodnocení finanční a časové náročnosti**

Na 1 mikroskopické sklíčko se používá 25 nebo 50 µl reakční směsi, ve které nejdražší složka jsou značené nukleotidy a DNA polymerasa. Při cyklované reakci je možno použít koncentraci 2 µM fluorescenčně značeného nukleotidu, kdežto u necyklované se používá až 8 µM. V našich experimentech se osvědčila Finzyme polymerasa, která je velmi levná. Samolepící rámeček je druhá finančně náročná položka.

Pro lokalizace dlouhých repetitiv např. FokI u bobu stačí 1 cyklus, který spolu s promytím a navázáním fluorochromu trvá asi 30-40 minut. Cyklovaná reakce, podle počtu cyklů a délky jednotlivých teplotních kroků, trvá asi 3 hodiny. Klasická FISH reakce trvá obvykle 2 dny.

### **Úskalí metody**

Podmínkou dobrého proběhnutí reakce je příprava kvalitních preparátů, pokud možno s co nejmenším překrytím chromosomů cytoplasmou. Taky je třeba zabránit poškození chromosomů nukleasami, protože vytvořené niky jsou při reakci příčinou nespecifického značení chromosomů. Optimální podmínky reakce je zapotřebí stanovit pro každý druh zvlášť. Velmi důležité je stáří preparátů a poměr značeného a neznačeného nukleotidu.

### **Srovnání s alternativními metodami**

Pro FISH reakci potřebujeme namnožit a izolovat sondu z plasmidu a naznačit ji nebo znát primery a vyrobit značenou sondu pomocí PCR, kdežto u PRINS reakce

používáme neznačené primery a značené nukleotidy v reakční směsi. Použití neznačených primerů dovoluje zvýšit jejich koncentraci asi 10krát a tím zvýšit i citlivost reakce. Každý cyklus zvyšuje intenzitu signálu asi o 20 %, což umožňuje i detekci jednotlivých genů (Shi 1996).

#### Literatura

- Gosden J, Hanratty D, Starling J, Fantes J, Mitchell A, Porteous D 1991- Cytogenet Cell Genet **57**: 100.  
Koch JE, Křívaa S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund L 1989 – Chromosoma **98**: 259.  
Landegent JE, Jansen in de Wal N, van Ommen GJ, Baas F, de Vijlder JJ, van Duijn P, Van der Ploeg M 1985 – Nature **317**: 175.  
Shi L, Zhu T, Morgante M, Rafalski JA, Keim P 1996. - J Hered **87**: 308.

Další informace [www.ueb.cas.cz/Olomouc1](http://www.ueb.cas.cz/Olomouc1) nebo [mariek@aix.upol.cz](mailto:mariek@aix.upol.cz)

## Imunodetekce heterochromatinu v interfázních jádrech

MARTINA LENGEROVÁ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, 612 65 Brno,  
tel.: 05/415 17 203, email: [lengerova@ibp.cz](mailto:lengerova@ibp.cz)

Jedním z přístupů k lokalizaci a studiu struktury heterochromatinu je použití specifických protilátek vůči DNA nebo proteinovým epitopům. Jejich distribuce v interfázním jádře odráží strukturu a funkci chromatinu. Jedním z nejdůležitějších předpokladů pro takovéto studie je příprava cytologických preparátů, které svou kvalitou musí splňovat náročné požadavky imunocytochemických metod. Jedná se zejména o zachování původní organizace jádra, usnadnění penetrace protilátek a samozřejmě zachování sledovaných epitopů. Při studiu rostlinných jader je nutné dbát zejména na důsledné odstranění buněčné stěny, která znesnadňuje pronikání protilátek a vyznačuje se silnou autofluorescencí. Řešením tohoto problému je příprava mikrotomových řezů nebo odstranění buněčných stěn působením enzymatických roztoků obsahujících celulasu a pektinasu.

K nejzajímavějším modelům rostlinné cytogenetiky patří *Rumex acetosa* (šťovík kyselý). Samičí rostliny tohoto druhu mají 14 (karyotyp 12A+XX) a samčí 15 chromozómů (12A+XY1Y2). Pohlaví rostlin je určeno na základě poměru počtu chromosomů X a sad autosomů, podobně jako u drozofily. Chromosomy Y nejsou pro vznik samčího pohlaví nezbytné, ale jsou zodpovědné za vývoj fertilního pylu z mikrosporocytů. Velmi zajímavým poznatkem je jejich heterochromatický charakter (Váňa 1972). Recentní údaje prokázaly, že jde zřejmě o heterochromatin konstitutivní, neboť v chromosomech Y došlo evolučně k akumulaci specifických repetitivních sekvencí (Shibata et al. 1999). Tyto chromosomy perzistují v interfázních jádrech jako tzv. chromocentra. Zejména jejich výskyt nabízí tento druh k analýze struktury interfázních jader.

Protože chromocentra se vyskytují v jádrech izolovaných pouze z některých pletiv samčích rostlin, bylo pro studium struktury interfázních jader rodu *Rumex* nutné vypracovat metodiku jejich přípravy z diferencovaných pletiv. Jako vhodný zdroj jader

byly vybrány listy z rostlin se známým pohlavím. Metoda založená na přípravě protoplastů se ukázala jako nevhodná, protože docházelo k inhibici působení enzymů (pravděpodobně působením sekundárních metabolitů přítomných v listech *R. acetosa*). Bylo proto třeba vypracovat postup, který by vedl k izolaci jader jinou cestou než s použitím enzymatických směsí. Ukázalo se, že jádra lze v dostatečném počtu i kvalitě získat mechanickým rozbitím buněk. V prvním kroku jsou listy rozsekány žiletkou, přičemž dochází k uvolňování jader do izolačního pufru. Tento pufir obsahuje látky, které zajišťují ochranu jejich struktury jader (spermidin) a zároveň obsahuje Triton-X-100, který selektivně lyzuje biomembrány obklopující např. chloroplasty, takže dochází k uvolňování chlorofylu, ale nedochází k porušení integrity jaderné membrány. Všechny ostatní kroky je nutné provádět na ledové lázni. Pufir s uvolněnými jádry je odebrán pipetou a dvakrát přecezen přes mlynářské hedvábí (velikost pórů 100  $\mu\text{m}$ ). Jaderná suspenze je poté přenesena do centrifugační kyvety a sedimentována v chlazené centrifuze 10 minut při 800 g. Supernatant je opět odebrán a sediment resuspendován v izolačním pufru, poté následuje další centrifugace. Tento krok je opakován, dokud má sediment zelenou barvu. (Přítomný chlorofyl dává v mikroskopu silnou červenou autofluorescenci, což znemožňuje vyhodnocení preparátů.) V dalším postupu je nutné zvolit specifické strategie pro studium jednotlivých epitopů. Pro studium DNA epitopů (např. 5-methylcytosin) může být použita kyselá fixace, která výborně permeabilizuje buněčný materiál. Proto je po poslední centrifugaci supernatant odebrán, sediment resuspendován a fixován ve Farmerově fixáži (ethanol : kyselina octová, 3:1). Takto připravená jádra jsou kapána na očištěná podložní skla. Pro studium proteinových epitopů (např. acetylovaných histonů) je nutné použít neextrakční fixaci, která by je nepoškozovala či zcela neodstraňovala. Osvědčilo se nanášení jader na skla metodou cytocentrifugace ve formaldehydové fixáži (Hladilová et al. 1998). Sediment je resuspendován v pufru a do cytocentrifugačního komínku je napipetováno asi 100 ml jaderné suspenze a 500 ml formaldehydové fixáže. Následuje centrifugace 10 minut při 500 g. Preparáty jsou ihned ponořeny do vychlazeného methanolu ke zvýšení permeability. Takto připravené preparáty mohou být ihned použity pro protilátkové reakce nebo krátkodobě skladovány v 50% glycerolu v chladničce.

Dalším krokem je imunodetekce na preparátech připravených výše uvedeným způsobem. Empiricky je nutné stanovit zejména koncentraci a také dobu působení primární protilátky. Při vyšších koncentracích jsou celá jádra silně značená a rozdíly mezi euchromatinovými a heterochromatinovými oblastmi by nebyly patrné. Jako nejvhodnější se ukázala inkubace po dobu nejméně 24 hodin, aby protilátka měla možnost proniknout do vnitřních struktur jádra. Při takto dlouhé inkubaci je však nutné preparáty chránit před vyschnutím krycím sklem a zarámováním gumovým lepidlem.

Pro analýzu methylace DNA byla použita specifická myší monoklonální protilátka vůči 5-methylcytozinu (Podesta et al. 1993). DNA je v heterochromatických oblastech výrazně methylována (Lewis a Bird 1991). Proto lze na základě distribuce 5-methylcytozinu charakterizovat strukturu interfázních jader. Zjistili jsme, že heterochromatické bloky se u samčích i samičích jader nacházejí zejména na okrajích jádra a že mezi samčími a samičími jádry však nejsou výraznější rozdíly. Odlišné výsledky přinesly reakce s králičí polyklonální protilátkou rozpoznávající acetylovaný lysin

v N-terminální pozici 5 histonu H4 (Turner et al. 1989). Na jádrech izolovaných ze samičích rostlin protilátka reagovala zejména s euchromatinovými úseky, které jsou transkripčně aktivní, a tedy mají vyšší obsah acetylovaných histonů H4. V heterochromatických oblastech byl signál výrazně slabší. Na preparátech připravených ze samičích rostlin se asi v 15% případů vyskytovala jádra, ve kterých se nacházela dvě periferní vysoce kondenzovaná tělíska, která s protilátkou nereagovala. Je zřejmé, že by se mohlo jednat o přežívající chromozomy Y: tento závěr ještě bude ověřen pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace s Y-specifickou DNA sondou. V obou případech (detekce 5-methylcytosinu resp. acetylovaných histonů H4) byla vizualizace signálů prováděna s pomocí anti-myší resp. anti-králičí protilátky značené FITC a preparáty byly vyhodnocovány ve fluorescenčním (Olympus Provis) nebo konfokálním (Nikon) mikroskopu.

Tato metoda přípravy interfázních jader z diferencovaných rostlinných pletiv a jejich následné imunochemické analýzy se zdá být velmi vhodná pro studium jejich vnitřní struktury. Na rozdíl od metod přípravy pletivových řezů nebo izolace protoplastů je velmi nenáročná na přístrojové vybavení, a také finanční náklady nejsou (s výjimkou nákupu protilátek) nijak vysoké.

Poděkování: Tato práce byla finančně podporována Grantovou agenturou AV ČR (A5004901).

#### Literatura

- Hladilová, R., Široký, J., Vyskot, B. 1998. - Biotechnic Histochem. 73 : 150.  
Lewis, J., Bird, A. 1991. - FEBS Lett. 285 : 155.  
Podesta, A., Ruffini Castiglione, M., Avanzi, S., Montagnoli, G. 1993. - Int. J. Biochem. 25: 929.  
Shibata, F., Hizume, M., Kuroki, Y. 1999. - Chromosoma 108: 266.  
Turner, B.M., O'Neill, L.P., Allan, I.M. 1989. FEBS Lett. 253: 141.  
Váňa, V. 1972 - Preslia 44: 316.

## DNA microarrays: nový nástroj pro studium struktury a exprese genomu

JIŘÍ MACAS

Ústav molekulární biologie rostlin, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
tel.: 387 775 513, e-mail: macas@umbr.cas.cz

### Úvod

Technologie *DNA microarrays* vznikla z potřeby účinnější analýzy vysoce komplexních genomů živočichů a rostlin. Podobně jako metody Southern nebo Northern blottingu je založena na hybridizaci nukleových kyselin, avšak na rozdíl od konvenčních postupů dovoluje analyzovat řádově až desetitisíce sekvencí najednou. Toho je dosaženo imobilizací DNA sond ve vysoké hustotě na pevných (nejčastěji skleněných) nosičích. Další zvláštností je, že pro hybridizaci na *microarrays* se využívá převážně fluorescenčního značení, což umožňuje hybridizovat současně několik vzorků značených různě barevnými fluorochromy. Jednotlivé elementy *arrays* jsou tvořeny buď delšími fragmenty DNA nebo krátkými oligonukleotidy a v terminologii *microarrays* jsou označovány jako sondy (*probes*), zatímco značená DNA nebo RNA přítomná v hybridizač-

ním roztoku se nazývá *target* (v tomto pojednání bude označována jako vzorek). Tato terminologie je z hlediska klasických hybridizací (kde se sondou rozumí značená DNA/RNA) poněkud matoucí, avšak v současné době je již všeobecně zavedená a používána.

### **Metody přípravy *DNA arrays***

#### ***Imobilizace dlouhých fragmentů DNA***

Používá se pro sondy tvořené fragmenty cDNA, ESTs, příp. i většími klony (BAC, YAC). DNA je nanášena robotickými manipulátory na speciálně upravená mikroskopická sklíčka (silanizovaná nebo potažená poly-lysinem), na která je následně přichycena chemicky nebo pomocí UV záření. Proces nanášení sond většinou využívá kovových hrotů s vyříznutými drážkami, do kterých je roztok DNA nasáván kapilárními silami; po dotyku hrotu se sklíčkem se vytvářejí nanolitrové kapičky představující jednotlivé elementy *arrays*. Tyto elementy mají po zaschnutí a zafixování průměr kolem 100-150  $\mu\text{m}$ . Při 300  $\mu\text{m}$  rozestupech elementů může *microarray* velikosti mikroskopického sklíčka pojmout až 15 tisíc sond.

#### ***Fotolitografická technika***

Spočívá v syntéze oligonukleotidů přímo na sklíčku s využitím reagensů citlivých na světlo. Syntéza začíná na syntetických linkerech, přichycených na sklíčko a chráněných fotoreaktivními chemickými skupinami. Pokud jsou účinkem světla aktivovány, mohou být linkery v následujícím kroku prodlouženy o další nukleotid, který je opět blokován fotoreaktivní skupinou. Jelikož syntéza probíhá jen v ozářených částech sklíčka, lze aplikací fotolitografických masek, které stíní nebo naopak odkrývají jednotlivé elementy, dosáhnout syntézy různých sekvencí v jednotlivých elementech arraye. Takto připravené arraye jsou většinou označovány jako DNA čipy a běžně obsahují až 300 tisíc elementů na ploše několika  $\text{cm}^2$  (experimentální verze DNA čipů již obsahují i přes milion sond).

#### ***Příprava arrayů pomocí počítačových tiskáren***

Tato metoda se stejně jako předchozí používá k *de novo* syntéze oligonukleotidů, avšak reagensie jsou dopravovány na *array* pomocí upravených piezoelektrických nebo termálních inkoustových tiskáren.

#### ***Ostatní metody***

Kromě výše uvedených metod existuje řada postupů, které z nich vycházejí nebo jsou jejich kombinací (např. nanášení polyakrylamidových bločků, na něž jsou fixovány oligonukleotidy), a navíc jsou vyvíjeny i zcela originální techniky, jako je např. syntéza oligonukleotidových čipů pomocí hydrodynamické fokusace reagensů. Zvláštní kategorií jsou *arrays* připravované nanášením sond nebo kultivací bakteriálních kolonií na „klasických“ hybridizačních membránách. I když lze pomocí speciálních manipulátorů nanášet vzorky s velkou přesností i na tyto nosiče, jejich vlastnosti (rozpíje-

ní vzorků, nerovnoměrný povrch) negativně ovlivňují maximální hustotu a zpracování takto připravených *arrays*.

### **Metodika experimentů**

Pro hybridizaci na *microarrays* jsou vzorky nejčastěji značeny enzymatickou inkorporací dNTPs konjugovaných s vybranými fluorochromy (velmi často se používají Cy3-dUTP a Cy5-dUTP, které mají dobře oddělená excitační a emisní spektra, vykazují relativně vysokou účinnost inkorporace a dobrou fotostabilitu). V případě analýzy mRNA se značení provádí během reversní transkripce s využitím oligo-dT jako primeru; pro značení DNA se používají běžné postupy (*random priming*, PCR). Samotná hybridizace probíhá ve velmi malých objemech (řádově desítek mikrolitrů), takže koncentrace značené DNA je vysoká a hybridizace má rychlou reakční kinetiku. Hybridizační pufrы a podmínky vycházejí z metodik, používaných při hybridizacích na membránách. Hybridizační signály jsou detegovány pomocí speciálních skenerů, které excitují jednotlivé fluorochromy a zaznamenávají intenzitu fluorescence. Výstupem bývá 16-bitový TIFF obrázek, který je následně analyzován speciálními programy, schopnými lokalizovat jednotlivé elementy *arrays* a vypočítat celkovou intenzitu signálu po odečtení fluorescence pozadí. V současné době existuje několik integrovaných softwarových systémů, umožňujících management dat a sledování jednotlivých sond (elementů *arrays*) od okamžiku jejich přípravy a nanášení na *array* až po výsledky hybridizací. Další programy jsou vyvíjeny za účelem efektivní analýzy dat („*data mining*“).

### **Aplikace**

#### ***Monitorování genové exprese***

Možnost provádět hybridizaci se dvěma nebo více různě značenými vzorky zároveň se výrazně uplatňuje při studiu genové exprese. Populace mRNA z kontrolního a srovnávaného vzorku (jiný typ pletiva, jiné experimentální podmínky, apod.) jsou značeny vybranými fluorochromy, smíchány a hybridizovány současně na jednu *array*, čímž jsou zaručeny naprosto stejné podmínky hybridizace i vyhodnocení. Jako sondy jsou na *array* nanášeny klony cDNA nebo ESTs, v případě DNA čipů jsou syntetizovány oligonukleotidy podle sekvencí známých genů. Velkou výhodou je, že lze sledovat hladinu exprese velkého počtu genů v závislosti na použitých experimentálních podmínkách a tím kromě identifikace těch, jejichž exprese se změnila, i usuzovat na jejich možné vazby a regulační dráhy. Tak byly např. charakterizovány některé metabolické dráhy kvasinek (s využitím *arrays* obsahujících všech 6200 známých nebo předpokládaných genů *S. cerevisiae*).

#### ***Detekce mutací***

DNA čipy mohou být konstruovány tak, že obsahují řady oligonukleotidů, jejichž sekvence se částečně překrývají a odpovídají sekvenci určitého genu. Každý oligonukleotid je na čipu ve čtyřech variantách, lišících se jednou bází v centrální části oligonukleotidu. Hybridizací značeného fragmentu, získaného např. PCR amplifikací daného genu lze zjistit, zda ve své sekvenci obsahuje bodové mutace a pokud ano, tak jaké.

Tohoto postupu se využívá i ke konstrukci nové generace genetických map, založených na polymorfismu jednotlivých nukleotidů (*singlenucleotide polymorphisms* - SNPs).

### **Sekvenování**

Pro sekvenování pomocí hybridizace se používají podobné čipy jako pro detekci mutací, avšak obsahující všechny permutace bazí pro oligonukleotid dané délky nebo jeho část. Sekvence se pak rekonstruuje pomocí složitých počítačových algoritmů na základě hybridizačních signálů z oligonukleotidů se vzájemně se překrývajícími sekvencemi. Přestože jde o velmi perspektivní metodu, je pro její širší využití třeba vyřešit některé principiální problémy spojené např. se sekvenováním repetitivních sekvencí.

### **Analýza genomů**

V poslední době se začínají objevovat metody využívající *DNA arrays* i čipů pro analýzu zastoupení jednotlivých typů sekvencí v komplexních genomech eukaryot. Příkladem může být mezidruhová srovnávací analýza skupin repetitivní DNA, při které jsou klony těchto repetitivních sekvencí nanášeny na microarray a postupně hybridizovány se značenou genomickou DNA jednotlivých druhů.

### **Závěr**

Vzhledem k možnostem, které využití *DNA microarrays* nabízí pro základní i aplikovaný výzkum, a k překotnému vývoji nových technologií je nemožné postihnout všechny aspekty této metody v jediném přehledu. Případné zájemce o podrobnější informace proto odkazují na přehled literatury a odkazů na WWW stránce Laboratoře molekulární cytogenetiky UMBR ([http://www.umbr.cas.cz/806\\_www/arrays/arrays.htm](http://www.umbr.cas.cz/806_www/arrays/arrays.htm)).

## **Genomics: Strategies and Methods**

VÁCLAV PAČES

Institute of Molecular Genetics AV ČR and Center for Molecular Genetics, VŠCHT Praha,  
CZ16637 Prague, Czech Republic

Phone: (420-20) 201 83 541, email: [vpaces@img.cas.cz](mailto:vpaces@img.cas.cz)

One of the major advances of molecular genetics in recent years is the development of methods for DNA sequencing. These methods became so efficient that determination of the complete DNA sequence of even very complex organisms is now possible. This development led to the establishment of a new branch of biology – genomics.

Genomics consists of three major stages: sequencing of a genome, complex analysis of the obtained nucleotide sequence by bioinformatics tools, and experimental assignment of functions to individual genes and regulatory elements (functional genomics). The ultimate goal of genomics is to completely describe metabolism and internal networks of organisms, and their evolution.

There are two major strategies applied in genome sequencing. The more conservative one is based on careful mapping of restriction sites in DNA. DNA is then fragmen-

ted by partial digestion with selected restriction enzymes and fragments of appropriate lengths are inserted into a suitable vector. In bacterial genome projects often cosmid vectors are used. These vectors accommodate DNA fragments of 35 to 40 kb. The clones are then analyzed for presence of restriction sites and cosmid encyclopedia is created where overlaps of individual cosmids are established. In the genome projects of more complex organisms with larger genomes, e.g. divided to several chromosomes, vectors accommodating larger DNA fragments are used (often BACs or YACs).

Individual clones are then further fragmented and the resulting smaller DNA fragments are subcloned with specialized sequencing vectors such as M13-derived or pUB-derived vectors. These subclones are sequenced and the final complete nucleotide sequence is then assembled. This assembly is based on the presence of the mapped restriction sites and on overlapping sequences in the case of random fragmentation (e.g. by sonication) or by partial digestion with frequently cutting restriction enzymes.

This “ordered” strategy is rather elaborate but it has the advantage of constant control over the growing sequence information: the researchers always know which part of the genome they are working on.

The other strategy (the so called “shotgun strategy”) is based on random fragmentation of the whole genome or chromosome. The fragments are inserted directly to a sequencing vector and they are sequenced. The assembly of the final nucleotide sequence is based on the sequence overlaps. With this strategy fast accumulation of the sequence data is achieved from the very beginning of the project. At first no contigs are generated but at the later stages long contigs are assembled from the primary data. At the stage when approximately 80 to 90 % of the nucleotide sequence is determined and is present is several long contigs further sequencing of the random fragments yields redundant information. At this stage sequencing of selected restriction fragments or PCR generated DNA or the primer-walking strategy are necessary.

These two major large-scale DNA sequencing strategies have each their advantages and disadvantages. The major advantage of the “shotgun” strategy is fast data acquisition. This strategy is used by large laboratories. The “ordered” strategy has the advantage of the later functional analysis of the genome in question because individual clones containing complete genes can be deleted from the genome or subjected to further experimentation.

The methods used for DNA sequencing belong to common arsenal of any good molecular biology laboratory. The Sanger dideoxy method is generally used with fluorescent rather than radioactive labels. Often the cycling sequencing based on the polymerase chain reaction (PCR) is used.

Genome projects heavily depend on good and efficient software. This is fundamental not only for data assembly but also for analysis of the DNA sequence. This analysis starts with the search for individual genes and regulatory elements and continues with variety of predictions and comparisons with the database entries. Bioinformatics tools are the bottleneck of the present genomics with extremely high potential for improvement and exploitation.

Even in the simplest genomes (Table 1) 20 to 30% of the genes have unknown func-



tion. Deletion or inactivation of these genes is one way how to analyze these functions. However, this is a difficult task especially with genes vital for the organism.

Extremely efficient genome analysis is now being achieved by the so called serial analysis of gene expression (SAGE). This method is based on sequence analysis of cDNA ends derived from mRNA expressed in studied tissues. Thus profiles of expressed genes are obtained. Another method of genome analysis is using biochips consisting of microarrays of genes or oligonucleotides which hybridize to messenger RNAs expressed under various conditions. This leads to identification and characterization of proteins present in cells and determination of changes in the protein profiles e.g. in development and differentiation.

Genomics is a field of biology that undoubtedly will strongly influence life of men in the next Century.

This work was supported by grant VS96074 of the Ministry of Education Youth and Sports.

Tab. 1. Completed Genome Projects

Category	Species	Genome size (Mb)	Genes
Actinobacteria	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4,4	4,397
Chlamydia	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1,1	1,000
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,0	937
Cyanobacteria	<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	3,6	3,215
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	4,2	4,221
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4,4	4,000
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,5	503
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,8	707
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	0,7	640
Oxygen-reducing bacteria	<i>Aquifex aeolicus</i>	1,5	1,572
Proteobacteria	<i>Campylobacter jejuni</i>	1,6	1700
	<i>Escherichia coli</i>	4,6	4,397
	<i>Haemophilus influenzae</i>	1,8	1,791
	<i>Helicobacter pylori</i>	1,7	1,609
	<i>Neisseria meningitidis</i>	2,3	2,158
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	1,1	834
Radioresistant bacteria	<i>Deinococcus radiodurans</i>	3,2	3,000
Spirochete	<i>Borrelia burgdorferi</i>	0,9	1,279
	<i>Treponema pallidum</i>	1,1	1,082
Archaea	<i>Aeropyrum pernix</i>	1,7	2,000
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2,2	2,456
	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	1,7	1,914
	<i>Methanococcus jannaschii</i>	1,6	1,813
	<i>Pyrococcus horicoshii</i>	1,7	2,027
Fungi	<i>Thermotoga maritima</i>	1,8	1,877
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (16 chromosomes)	12	6,548

Nematode	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	97	19,000
	<i>Caenorhabditis elegans</i> (6 chromosomes)		
Insect	<i>Drosophila melanogaster</i>	137	13,500
	(6 chromosomes)		
Human	<i>Homo sapiens</i> (23 chromosomes)	3000	70,000

## Praktické využití mikrosatelitových markerů při sledování genetické variability populací

MARKÉTA POSPÍŠKOVÁ

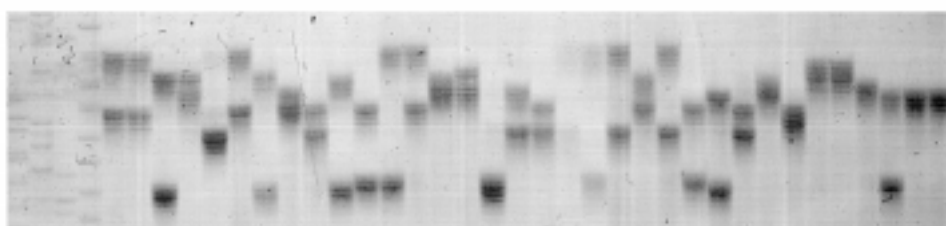
Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, Květnové náměstí,  
252 43 Průhonice, tel.: 02/677 50 038, email: [pospiskova@vuoz.cz](mailto:pospiskova@vuoz.cz)

V příspěvku je krátce shrnuta podstata metody detekce mikrosatelitů včetně základních praktických postupů při jejich analýze. Stručně je zmíněna možnost vyhodnocení získaných experimentálních dat a jejich dalšího využití při sledování populací.

Při studiu populací se stále častěji využívají metody založené na analýze DNA. Rozdíly na úrovni DNA (DNA polymorfismus) nejsou oproti morfologickým znakům ovlivněny tak významně podmínkami prostředí a jsou zdrojem velkého počtu znaků. Pro stanovení rozdílů v DNA byla vyvinuta řada metod. Mikrosatelitové markery (také SSR – *simple sequence repeats*) (Tautz 1989) patří mezi metody lokusové (sleduje se jen určité, předem definované místo v genomu) a amplifikační (fragment DNA je namnožen pomocí polymerasové řetězové reakce - PCR). Jsou náročné na přípravu a vývoj metody, protože nejprve je nutné nalézt vhodné polymorfní mikrosatelitové oblasti v DNA daného organismu a stanovit jejich sekvence, další praktické využití je pak již snadné. Výsledky jsou dobře reprodukovatelné i mezi různými laboratořemi (na rozdíl od jiných metod, např. RAPD – *random amplified polymorphic DNA*). Mikrosatelity jsou krátká tandemová opakování charakterizovaná krátkými motivy (2 – 6 bp) v počtu 5 – 40 opakujících se jednotek. Celková délka lokusu obvykle nepřesahuje 100 bp. U rostlin jsou méně časté než u živočichů (mikrosatelit delší než 20 bp se v genomu rostlin vyskytuje na každých 23,3 kb, u živočichů na každých 6 kb) (Koblížková 1998). Nacházejí se v kódujících i nekódujících oblastech genomu všech eukaryot a některých prokaryot, jejich funkce je zatím nejasná. Nejčastější jsou dinukleotidové mikrosatelity (u rostlin převažuje motiv AT, např. u člověka AC/GT) (Beckman a Weber 1992). Mikrosatelitové lokusy mají kodominantní charakter a umožňují tak snadné odlišení homo- a heterozygoty v daném lokusu. Vyznačují se vysokým stupněm polymorfismu, který je dán rozdílem v počtu opakujících se jednotek (byly nalezeny lokusy s 10 – 20 různými alelami). Počet opakování základního motivu se ve srovnání s frekvencí genových mutací relativně rychle mění, příčinou je zřejmě klouzání DNA polymerasy během replikace (Tautz a Schlötterer 1994). Některé mikrosatelitové lokusy nalezené u jednoho druhu lze s úspěchem amplifikovat i u druhu příbuzného nebo vzdálenějšího

(primery pro tyto mikrosatelity jsou tzv. heterologní). Záleží na tom, v jak konzervované oblasti genomu se daný mikrosatelitový lokus nachází (Koblížková 1998).

Detekce délkového polymorfismu v již popsaném mikrosatelitu je poměrně jednoduchá. Nejprve je třeba izolovat DNA z rostlinného materiálu, přičemž na její kvalitu a množství nejsou kladeny žádné zvláštní nároky (výhoda oproti jiným metodám, např. RFLP – *restriction fragment length polymorphism* a AFLP – *amplified fragment length polymorphism*). Pak se pomocí PCR amplifikuje úsek DNA obsahující mikrosatelitový lokus. Tento *in vitro* proces simuluje proces replikace probíhající *in vivo*. Reakční směs obsahuje genomovou DNA jedince, termostabilní DNA polymerasu (enzym pochází z některých termostabilních organismů a připojuje volné nukleotidy do prodlužujícího se nově vznikajícího řetězce podle vzoru), směs nukleotidů dATP, dCTP, dGTP a dTTP (stavební kameny pro nové vlákno DNA), 2 primery (krátké oligonukleotidy – obvykle kolem 20 bp, které jsou komplementární k sekvenci DNA obklopující daný mikrosatelit). Během PCR v průběhu každého cyklu (celkem asi 25 – 30 cyklů) dochází při změně teploty v termocykleru postupně k denaturaci DNA, nasedání primerů na komplementární úseky DNA a prodlužování řetězců DNA polymerasou. Po 30 cyklech je amplifikovaný fragment teoreticky namnožen asi 109 krát (230). V praxi je však výtěžek reakce menší. I tak lze po ukončení reakce původně vloženou templátovou DNA zanedbat a předpokládat, že reakční směs obsahuje pouze hledaný fragment DNA. Namnožené fragmenty DNA se následně porovnávají podle velikosti elektroforetickým rozdělením na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Výsledky lze fotografovat a archivovat. K analýze mikrosatelitů lze s úspěchem využít také různé typy automatických sekvenátorů, např. genetický analyzátor ABI PRISM 310 firmy Perkin-Elmer. V naší laboratoři používáme sekvenační polyakrylamidové gely barvené stříbrem (obr. 1), které dovolují rozdělit fragmenty lišící se až o 1 bázi. Protože k jednoznačné charakterizaci jedince není jeden mikrosatelitový lokus dostatečně informativní, je třeba hodnotit 5 – 10 lokusů.



Obr. 1. Analýza 34 jedinců topolu černého (*Populus nigra*) z Polabí, mikrosatelit WPMS05 s motivem (GT)<sub>n</sub>. U 90 jedinců topolu černého bylo nalezeno celkem 10 alel, velikost alel se pohybovala v rozsahu 265 – 305 bp; 4 dráhy zcela vlevo standard molekulových hmotností.

Pro zpracování experimentálních dat získaných analýzou mikrosatelitů existuje řada počítačových programů (přehled uvádějí např. Luikart a England 1999), které lze využít pro stanovení nejrůznějších parametrů populace. Je možné sledovat genetickou vzdálenost populací, genetickou diversitu uvnitř populací a mezi populacemi, heterozygositu, četnost jednotlivých alel a tok genů, stupeň inbreedingu a genetický posun během disperzivního procesu, efektivní velikost populace. Na našem pracovišti budeme vyu-

žítat program POPGENE (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh/>), určený pro hodnocení genetické variability přirozených populací.

### Literatura

- Beckmann, J.S., Weber, J.L. 1992. - *Genomics* 12:627.  
Koblížková, A. 1997. - *Biol. listy* 63: 139.  
Luikart, G., England, P.R. 1999. - *Trends Ecol. Evol.* 14: 253.  
Tautz, D. 1989. - *Nucl. Acids Res.* 17: 6463.  
Tautz, D., Schlötterer, C. 1994. - *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 832.

## Zjednodušené postupy přípravy vzorků pro PCR a RT PCR

PAVEL RYŠÁNEK, MILOSLAV ZOUHAR, JANA DOUBKOVÁ A JIBAN KUMAR KUNDU\*

Katedra ochrany rostlin, Česká zemědělská univerzita v Praze, 165 21 Praha 6,  
tel.: 02/243 82 595, e-mail: rysanek@af.czu.cz

\* Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha - Ruzyně

### Podstata metody

Metody detekce patogenů a škůdců rostlin PCR resp. RT PCR převyšují ostatní metody detekce svou citlivostí, avšak v klasickém provedení při extrakci nukleové kyseliny ze vzorku jsou také většinou časově i pracovně náročnější. Tím je motivována snaha vyhnout se vlastní extrakci nukleových kyselin a používat v dalším postupu víceméně neupravených extraktů (Wetzel *et al.*, 1991 a 1992, Mulholland *et al.*, 1996, Zouhar *et al.*, 2000), případně se může použít nejdříve vycytání viru pomocí protilátek a následně se extrahuje NA (Nolasco *et al.*, 1993, Wetzel *et al.*, 1992, James, 1999). V naší laboratoři pracujeme se třemi různými skupinami organismů. Největší skupinou jsou rostlinné RNA viry s nejrůznější stavbou částic: isometrické (virus nekrosy tabáku, TNV), tyčinkovité (virus žluté nekrotické žilkovitosti řepy - BNYVV, půdou přenosný virus řepy - BSBV a Q virus řepy - BVQ) i vláknité (virus žloutenky řepy - BYV, virus vrásčitosti kmene jabloně - ASPV). Další skupinou organismů jsou hád'átka: hád'átko bramborové *Globodera pallida* a *G. rostochiensis* a rod *Meloidogyne*. Třetí skupinou jsou půdní organizmy *Polymyxa betae* a *P. graminis* z říše Protozoa.

### Pracovní postup

#### a) viry

K extrakci jsou používány mladé i starší listy, bulvy a kořeny cukrovky, zemina a mšice jako vektorů daného viru.

a1) klasická fenol-chloroformová extrakce a následné vysrážení RNA octanem sodným a etanolem.

a2) použití extrakční soupravy na bázi afinitivní vazby RNA na kolonu dle návodu výrobce.

a3) hrubý homogenát z rostlin se použije přímo k reversní transkripci buď s předchozím zahřátím nebo bez zahřátí a buď s přídavkem Tritonu nebo bez Tritonu.

- a4) IC-RT PCR s vychytáním virových částic z hrubého homogenátu pomocí protilátek na pevné bázi a následná transkripce jako v bodě a3.
- b) háďátka
  - b1) klasická extrakce viz a1.
  - b2) použití hrubého homogenátu z cyst nebo jedinců přímo do PCR.
  - b3) extrakce DNA z půdy extrakčním pufrem a následné čištění pomocí polyethylenglykolu.
- c) *Polymyxa betae* a *P. graminis*
  - c1) klasická extrakce z homogenátu.
  - c2) uvolnění DNA z trvalých spor několika cykly mražení v tekutém dusíku a zahřívání ve vodní lázni.

### Co je třeba v laboratoři

Vzhledem k tomu, že se jedná o zjednodušené metody, je i vybavení jednodušší: alternativně centrifuga na eppendorfky (ale není nezbytně nutná), vodní nebo suchá lázeň, případně přímo thermocykler, Triton X-100, EDTA, Tris a další běžné chemikálie pro molekulární biologii, PCR a RT PCR, pro IC-RT PCR ještě mikrotitrační desky a protilátky.

### Vyhodnocení dat

Vyhodnocení úspěšnosti extrakčního postupu se provádí přímo v PCR či RT PCR na ředících řadách vzorku.

- a) klasická fenol-chloroformová extrakce obvykle funguje velmi dobře. Nevýhodou je zde časová náročnost, pracnost a práce se zdraví škodlivými chemikáliemi. Výjimkou, pokud jde o výsledky, mohou být kořeny rostlin, které mohou být v důsledku infekce silně nekrotizované a potom se z nich kopurifikují také inhibitory reverzní transkripce či PCR.
- b) Extrakce RNA pomocí soupravy Qiagen je z hlediska bezpečnosti práce určitým přínosem, je rychlejší než klasická extrakce, ale také finančně náročnější. Při přetížení kolonky je výtěžek nízký. Hodí se i na extrakci RNA z půdy (TNV).
- c) Použití hrubého extraktu k reversní transkripci nebo PCR je ve většině případů možné a výsledky jsou stejně dobré, ne-li lepší než u klasické extrakce. Výjimku mohou opět tvořit nekrotizované kořeny a dosud se tento postup nedaří ani u ASPV. Obvykle je nutné extrakt z rostlin dostatečně zředit, protože v málo naředěných extraktech jsou pravděpodobně inhibitory reverzní transkripce či PCR. Zahřátí extraktu na 60 – 70 °C před transkripcí má obvykle negativní vliv u BYV. Přidání 1 % Tritonu do extraktu se naopak projeví pozitivně. U háďátek je třeba k homogenizaci použít TE nebo TNE, nikoliv čistou vodu.
- d) IC-RT PCR se hodí především tam, kde je třeba se zbavit případných inhibitorů reverzní transkripce či PCR, tj. při extrakcích z kořenů nebo půdy. Nevýhodou je zde časová náročnost, při zkrácení doby vychytávání částic se může značně snížit i citlivost metody. Ne vždy jsou také k dispozici příslušné protilátky (ASPV).
- e) Uvolnění DNA z trvalých spor *Polymyxa betae* a *P. graminis* pomocí cyklů mra-

žení a zahřívání se ukázalo jako velmi efektivní a v současnosti je zkoušeno i na jiném pracovišti pro získání DNA z trvalých spor *Synchytrium endobioticum*.

### **Finanční a časová náročnost**

Finančně nejnáročnější je extrakce NA pomocí kitů, kde se cena 1 vzorku pohybuje okolo 200,- Kč.

Klasická fenol-chloroformová extrakce vychází v závislosti na použitých chemikáliích cca na koruny až desítky korun (české chemikálie p.a. x speciální chemikálie RNase/DNase free). IC-RT PCR vychází cenově obdobně jako klasická extrakce v závislosti na použitých protilátkách. Časově je tato metoda nejnáročnější.

Použití hrubých homogenátů je, pokud pomineme minimální cenu extrakčních puf-rů, zcela zdarma. Také časově je tato metoda nejvýhodnější.

### **Tipy**

Nelze použít jednu univerzální metodu pro všechny organizmy, ale vždy se vyplatí pokusit se alespoň o použití zjednodušených protokolů. Leckdy totiž funguje i to, co by teoreticky fungovat nemělo.

### **Literatura**

- James D. 1999: A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *J. Virol. Meth.* 83, 1-9.
- Mulholland, V., Carde, L., O' Donnall, K.J., Fleming, C.C., Powers, T.O., 1996: Use of the polymerase chain reaction to discriminate potato cyst nematode at the species level. *Proc. BCPC Symposium No 65: Diagnosis in crop production*, 247-252.
- Nolasco G., De Blas C., Torres V., Ponz F. 1993: A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Meth.* 45, 201-218
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Dunez J. 1991: A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Meth.* 33, 355-365.
- Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro M., Dunez J. 1992: A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Meth.* 39, 27-37.
- Zouhar M., Ryšánek P., Kočová M. 2000: Detection and differentiation of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. *Pl. Protect. Sci*, 36: v tisku

## **Metody studia struktury chromatinu**

EVA SÝKOROVÁ<sup>1,2</sup>, JIŘÍ FAJKUS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Analýza biologicky významných molekulárních komplexů, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, tel.: 05/415 17 199, email: evin@ibp.cz

<sup>2</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

### **Úvod**

Dnes jsou databáze plné sekvenčních dat o genomech mnoha organismů. Interpretace této primární informace se tak stává stěžejním úkolem pro další výzkum. Co všechno kóduje sled basí a jaké procesy může ovlivňovat, to jsou jen jedny z mnoha řešených otázek, na které může dát odpověď experiment.

V naprosté většině procesů metabolismu genetického materiálu vystupuje DNA ve formě komplexu s proteiny, který se nazývá chromatin. Základní jednotkou stavby chromatinu jsou nukleosomy - komplexy DNA s dřeňovými histony, které jsou spojeny kratšími úseky DNA (linkery). Poloha nukleosomů na sekvenci můžeme analyzovat ze dvou hledisek – tzv. rotační a translační usazení. Rotační usazení označuje base, které se díky periodicitě 10,5bp/otáčku DNA vždy ocitnou na přivrácené/odvrácené straně vzhledem k histonovému oktameru a jsou tak různě dostupné štěpení nebo modifikaci. Translační polohou se rozumí přesně ohraničená oblast DNA, která je navinuta na histonovou dřeň. Znamená to také, že jedné rotační poloze může příslušet několik poloh translačních.

Vhodným modelem pro studium polohy nukleosomů jsou repetitivní sekvence, vyskytující se u vyšších organismů v hojné míře, které mají často délku jednotky odpovídající délce mono- a dinukleosomů (Schmidt a Heslop-Harrison 1998), a o nichž se předpokládá, že by tak mohly představovat jakýsi sbalovací kód chromatinu (Vogt 1990). Biologicky významná funkce byla nukleosomům přiřazena v regulačních oblastech některých genů, kde jejich pevné umístění na sekvenci ovlivňuje transkripci (Davey et al. 1995; McPherson et al. 1993). V současnosti existují i programy, které na základě sekvenčních charakteristik (Mengeritsky a Trifonov 1983) předpovídají s určitou nepřesností polohu nukleosomu.

### Pracovní postupy

Translační polohu nukleosomů lze přibližně určit pomocí restričního štěpení mononukleosomové DNA získané ze štěpení chromatinu mikrokokovou nukleasou, která štěpí DNA mezi nukleosomy, současně doplněné degradací mezinukleosomové DNA pomocí Exonukleasy III. Po ukončení reakce a deproteinaci následuje extrakce DNA a štěpení zbývajících jednovláknových přesahů S1 nukleasou. Z agarosové elektroforesy pak lze stanovit periodu fázování nukleozómů na zkoumané sekvenci. Mononukleosomální DNA získaná z preparativní polyakrylamidové elektroforesy pak může být štěpena paralelně pomocí vybraných restričních enzymů (Thoma 1992) a fragmenty odděleny na 6-8% polyakrylamidovém gelu. Následuje blotting a hybridizace se značenou sondou pro zkoumanou sekvenci. Na základě znalosti cílových míst pro restriktasy lze určit hranice nukleosomové DNA.

Přesnější určení polohy nukleosomu lze provést pomocí prodloužení primeru (Thoma 1992), který má místo uvnitř nukleosomu, na mononukleosomální DNA. Pro reakci lze použít buď koncově značený primer, nebo [alfa-32P]-dNTP. Extenze probíhá až na konec templátu, vzniklé produkty lze snadno identifikovat porovnáním se sekvenčními reakcemi na známé DNA a určit tak přesnou polohu terminačního signálu. Pro určení druhého konce nukleozómu můžeme zvolit primery z obou řetězců DNA, nebo hranici dopočítat díky konzervativní délce dřeňové částice (146bp).

Další z metod, které lze použít pro určení polohy nukleosomu je klonování nukleosomální DNA. Vyžaduje opracování frakcí DNA z preparativní polyakrylamidové elektroforesy pomocí alkalické fosfatasy, zarovnání na tupé konce T4 DNA polymerasou a doplnění fosfátových zbytků polynukleotidkinasou (Widlund et al. 1997). Po ligaci do vhod-

ného vektoru a transformaci buněk je nutno identifikovat kolonie obsahující zkoumanou sekvenci. Detekci pak můžeme provést pomocí hybridizace otisku misky na membráně se značenou sondou. Následuje pak izolace DNA z pozitivních kolonií a sekvenování.

Kombinací popsaných metod lze získat velmi přesnou informaci o poloze nukleosomu odpovídající situaci v organismu, stejně tak je možno tyto metody použít pro vyhodnocení polohy nukleosomů v rekonstitučních experimentech.

Nároky na vybavení laboratoře a materiál (kromě běžných chemikálií a přístrojů) - hybridizační pec, aparatury pro elektroforesy (agarosová, polyakrylamidová, příp. sekvenční), thermocykler, kit pro sekvenování a polymerasa pro primer extenzi (je vhodné použít thermostabilní enzym a cyklickou extenzi), mikrokoková nukleasa, exonukleasa III, S1 nukleasa, restriční enzymy a enzymy pro klonování (T4 DNA ligasa, T4 DNA polymerasa, polynukleotidkinasa, alkalická fosfatasa).

Finanční náročnost – podle použitých metod 40-60 000 Kč za materiál.

Typy a úskalí - pro analýzu fragmentů restričního štěpení mononukleosomální DNA lze jako značenou sondu použít také primery, které pak hybridizují pouze s některými fragmenty restričního štěpení a umožní tak lepší orientaci. Poskytne-li restriční štěpení informaci o pevné pozici nukleosomu a máme-li k dispozici DNA z kvalitně štěpeného chromatinu lze pro primer extenzi použít vedle mononukleosomální DNA také dinukleosomální frakci nebo dokonce vzorek celého štěpení. Signály z těchto běhů by se neměly lišit, pouze by měly poskytnout další informaci o delších fragmentech, které je možno porovnat s výsledky získanými pomocí primeru z druhého řetězce. Klonování je dobrou metodou pro vysoce repetitivní sekvence, také možno provést pro mono i dinukleosomální DNA.

#### **Literatura**

- Davey, C., Pennings, S., Meersseman, G., Wess, T. J. and Allan, J. 1995.- Proc Natl Acad Sci USA 92: 11210  
McPherson, C. E., Shim, E. Y., Friedman, D. S. and Zaret, K. S. 1993.- Cell 75, 387  
Mengeritsky, G. and Trifonov, E. N. 1983.- Nucleic Acids Res 11: 3833  
Schmidt, T. and Heslop-Harrison, J. S. 1998.- Trends in Plant Science 3: 195  
Thoma, F. 1992.- Biochim Biophys Acta 1130: 1  
Vogt, P. 1990.- Hum Genet 84: 301  
Widlund, H. R., Cao, H., Simonsson, S., Magnusson, E., Simonsson, T., Nielsen, P. E., Kahn, J. D., Crothers, D. M. and Kubista, M. 1997.- J Mol Biol 267: 807

## **Konstrukce DNA knihoven dlouhých insertů klonovaných ve vektoru BAC**

JAN ŠAFÁŘ, HANA ŠIMKOVÁ, JARMILA ČÍHALÍKOVÁ A JAROSLAV DOLEŽEL

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc,  
tel.: 068/522 85 21, email: safar@ueb.cas.cz

DNA knihovny dlouhých insertů jsou nepostradatelné při analýze genomů rostlin a živočichů. Používá se jich k izolaci genů, genetických markerů a při vytváření fyzických map a jejich integraci s mapami genetickými. Celý postup je založen na přípravě



vysokomolekulární DNA ( $10^5$ - $10^6$  bp), která se po parciálním štěpení liguje do BAC vektoru (umělého bakteriálního chromosomu) a transformuje do bakterií.

Úspěšnou konstrukci knihovny lze v podstatě zvládnout s použitím běžně komerčně dostupných chemikálií a enzymů, příslušného BAC vektoru a elektrokompetentních buněk (*Escherichia coli* DH10). Laboratoř by měla být vybavena základními přístroji používanými v molekulární biologii (centrifuga, PCR cycler nebo chlazená vodní lázeň, flow box, hluboko mrazící box, vyhřívaná třepací lázeň, klasická gelová elektroforesa a dále zařízení pro pulsní gelovou elektroforesu-PFGE a elektroporátor). Jak pro konstrukci, tak následné zpracování knihovny je výhodné používat robotizované zařízení.

### Pracovní postup

1. Izolace vysokomolekulární DNA z jader
  - izolace jader a jejich purifikace na sacharosovém gradientu nebo pomocí průtokové cytometrie
  - smíchání jader s nízko tuhnoucí agarosou (LMA) a odlití bločků
  - inkubace agarových bločků v lyzačním pufru s proteinasou
  - parciální štěpení vysokomolekulární DNA restrikční endonukleasou
  - velikostní selekce fragmentů DNA (100-300 kbp) pomocí pulsní elektroforesy
  - izolace DNA z gelu
2. Příprava BAC vektoru
  - izolace BAC vektoru z bakterií
  - štěpení příslušnou restrikční endonukleasou
  - defosforylace vektoru
3. Ligace vysokomolekulární DNA do defosforylovaného BAC vektoru
4. Transformace ligačního produktu do bakterií *E. coli* DH10 elektroporací a vysetí buněk na selekční medium
5. Výběr a uskladnění rekombinantních klonů

### Hodnocení kvality knihovny

Spočítá se počet rekombinantních klonů a zjistí průměrná velikost insertů DNA. Fragmenty DNA obsažené v knihovně by měly několikanásobně pokrývat velikost genomu.

### Náročnost metody

Po optimalizaci metody, která je zpravidla dosti časově náročná, je možné úspěšně konstruovat knihovnu za dva týdny. Metoda vyžaduje poměrně nákladné přístrojové vybavení.

### Kritické body

Velice náročné je připravit kvalitní, dobře fragmentovanou vysokomolekulární DNA. Pro vysokou účinnost ligace a následné transformace je potřeba kvalitní, čistý a defosforylovaný vektor.

Kritickým krokem je účinná ligace vysokomolekulární DNA.

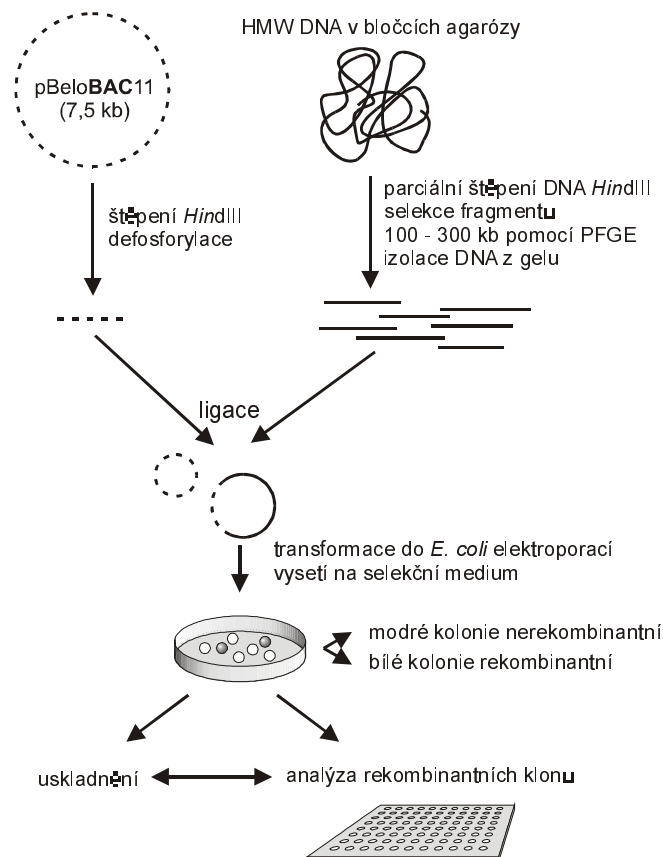
### Tipy a triky

1. Při izolaci vysokomolekulární DNA používat vysoké pH všech roztoků, aby se snížila aktivita nukleas.
2. U rostlin s vysokým obsahem polyfenolických látek v listech izolovat jádra z kořenových špiček.
3. Ligační poměr vektoru a vysokomolekulární DNA

### Srovnání metod:

Podobné spektrum využití jako DNA knihovny klonované ve vektoru BAC mají knihovny klonované vektorem YAC. Tyto vektory jsou schopné nést delší fragmenty, ale projevuje se u nich nižší účinnost transformace a významná míra chimerismu. Jednoznačně se proto dnes upřednostňuje systém s BAC vektorem. V kosmidových knihovnách nelze klonovat inzerty delší 50 kbp, proto nejsou vhodné pro fyzické mapování.

### SCHÉMA KONSTRUKCE BAC KNIHOVNY



### Odkazy na web:

- <http://www.genome.clemson.edu/protocols2new.html>  
<http://hbz.tamu.edu/cgi-bin/htmlassembly?manual-2>

## Regulovatelné systémy exprese transgenu u rostlin

MARKÉTA ŠÁMALOVÁ

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno,

tel.: 05/411 29 558, email: atekram@sci.muni.cz

Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 61137 Brno

Katedra fyziologie a anatomie rostlin, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 61137 Brno

Aplikace transgenních technologií u rostlin je v současné době zvyšována dostupností širokého spektra promotorů lišících se ve schopnostech regulovat dočasnou a trvalou expresi transgenu. K navození dočasné exprese transgenů jsou využívány jak endogenní rostlinné promotory tak několik nedávno popsanych chimerických promotorů regulovatelných specifickými chemickými induktory. Patří mezi ně například promotory indukované antibiotikem tetracyklinem, steroidem dexamethasonem, měďnatými ionty nebo ethanolem. Spojením nového transkripčního aktivčního systému umožňujícího aktivaci transkripce vneseného genu teprve po zkřížení definovaných reporterových a aktivátorových linií rostlin s chemicky indukovaným expresním systémem je možné docílit regulovatelné exprese libovolného transgenu v definovaných časoprostorových obrazcích.

Nově vyvinutý transkripční aktivční systém pOp/LhG4 pro regulovanou genovou expresi v transgenních rostlinách se skládá ze dvou složek: (1) reporteru kódujícího gen zájmu umístěného pod kontrolu chimerického *pOp* promotoru obsahujícího lac operátory klonované před TATA box a (2) aktivátoru exprimujícího pod kontrolou silného promotoru CaMV 35S z viru mozaiky kvěťáku chimerický transkripční faktor LhG4, který specificky rozpoznává pOp promotor. Tento faktor se skládá z transkripční aktivční domény Gal4 z kvasinek a vazebné domény LacI z represoru bakterií vážící se na lac operátory. K aktivaci genu zájmu dojde teprve po zkřížení reporterových a aktivátorových linií rostlin.

Výše uvedený systém byl zdokonalen přidáním třetí domény (GR) do aktivátorového konstruktů. GR doména pochází z krysího receptoru glukokortikoidů, kde je místem vazby steroidů. Pokud není příslušný steroid (např. dexamethason) přítomen, aktivátor je zachycen komplexem heat-shock proteinů HSP90 a stává se neaktivním. Vazba dexamethasonu způsobí uvolnění HSP90 komplexu a dojde k navázání aktivátoru na pOp promotor. Poté může dojít k transkripci genu zájmu z tohoto promotoru.

Stupeň exprese transgenu a exprese samotná může být regulována kombinací příslušného genu s vhodným promotorem. Chemicky indukované promotory se nejvíce uplatňují v případech, kdy produkt vneseného genu ovlivňuje růst, regeneraci a reprodukci rostlin. V těchto případech jsou rostliny regenerovány pokud je promotor neaktivní a následné analýzy jsou prováděny teprve po aktivaci exprese transgenu. Dalším příkladem využití je exprese transgenu v různých fázích vývoje rostlin, rozlišení primárních a sekundárních efektů, analýzy primárních efektů před spuštěním homeostatických mechanismů rostlin, sledování přímé korelace mezi indukcí transgenu a změ-

něným fenotypem. Chemicky indukovatelné expresní systémy jsou také často kombinovány s tkáňově specifickými promotory, exprese genu je tak omezena na dané pletivo a daný čas.

Pro chemický induktor transkripce vneseného transgenu je nezbytné, aby byl vysoce specifický pro daný promotor, neovlivňoval expresi ostatních genů ani jiné buněčné funkce a nebyl toxický pro rostlinu. Pro případné aplikace v polních pokusech a rostlinné produkci je důležité, aby nebyl toxický pro okolí. Dexamethason splňuje výše uvedené požadavky pro práci v tkáňových kulturách a při kultivacích ve skleníku. Dexamethason je možné aplikovat přidáním do agarového média tkáňových kultur, do vodních kultur nebo zaléváním rostlin v zemině, byla popsána také lokální aplikace na listy a květy vše v řádové koncentraci 1 – 10 mM. Dexamethason dodává firma Sigma, cena za 1g je 295,2 DM.

Transformací prostřednictvím *A. tumefaciens* byly získány reporterové linie rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*). Jako gen zájmu byl použit *ipt* gen kódující isopentenyl-transferasu – enzym katalyzující první krok biosyntézy cytokininů. Dalším, kontrolním genem byl *GUS* gen kódující  $\beta$ -glukuronidasu. Tyto reporterové linie byly retransformovány aktivátorovými konstrukty a byl získán dostatečný počet nezávislých transformantů nesoucích již zmíněný transkripční aktivační systém. Primární transformanti budou v nejbližší době podrobeni Northern blot analýzám. Získaná semena generace F1 budou použita pro další experimenty.

Poděkování: Tento výzkum je prováděn za finanční podpory MŠMT (VS96096) a GA AV ČR (IAA5004001).

#### Literatura

- Aoyama, T., and Chua, N.-H. (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 11: 605-612.
- Gatz, C., and Lenk, I. (1998) Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science* 3: 352-358.
- Moore, I., Galweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J., and Palme, K. (1998) A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 376-381.

## Produkce rostlinného enzymu v bakteriálních expresních systémech

JAN ZOUHAR

Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 61137 Brno  
tel.: 05/411 29 375, e-mail: zouhar@chemi.muni.cz

#### Východiska

Komplexní analýza biologicky významných bílkovin často vyžaduje taková množství homogenního preparátu, který není dostupný klasickou purifikací z biologického

materiálu. Izolace komplementární DNA (cDNA) studovaného proteinu umožňuje jeho produkci v heterologních systémech. Nejčastěji používanou a metodicky nejjednodušší je exprese v buňkách *Escherichia coli*. V současné době je dostupná řada expresních vektorů, které obsahují mnohočetná klonovací místa pro snadnou inserci cDNA. Významným obohacením expresní technologie se stala technika fúzních proteinů. Studovaný protein je možné na úrovni cDNA upravit tak, aby na některém z jeho konců byla přítomna nová funkční doména. Doménu může představovat krátký umělý peptid nebo přirozený protein. Její úlohou je nejčastěji usnadnit purifikaci rekombinantního proteinu některou z technik afinitní chromatografie.

### Příklad užití

Kukuřičná  $\beta$ -glukosidasa Zm-p60.1 hydrolyzuje cytokinin-O- a N3-glukosidy za vzniku volných basí a je tak významným prvkem regulace hladiny cytokininů v rostlině. cDNA Zm-p60.1 (1) byla klonována do plasmidu pRSET A tak, aby N-konec exprimovaného proteinu obsahoval sekvenci šesti histidinových zbytků (2). Transkripce je zde pod kontrolou T7 promotoru, který je specificky rozeznáván vysoce aktivní T7 polymerasou. Jako hostitel byl použit kmen BL21(DE3)pLysS *E. coli*. Analýza exprese prokázala nadprodukcí rekombinantního enzymu, současně však bylo přibližně 80% produkované bílkoviny nalezeno v inkluzních tělískách. Pro nativní purifikaci proteinu byla použita metallochelatační afinitní chromatografie, která využívá afinity fúsované hexahistidinové domény k imobilizovaným iontům přechodných kovů. Výsledkem byl vysoce čistý bílkovinný preparát, který vykázal stejné strukturní a katalytické vlastnosti jako přirozený enzym izolovaný z koleoptilí *Zea mays* (3).

U některých mutantních forem Zm.p60.1 dosahovalo zastoupení nerozpustné frakce rekombinantního proteinu až 100% (4) a znemožňovalo tak biochemickou analýzu mutantu. Fúzní technologie se ukázala být jedním z možných způsobů řešení. cDNA Zm-p60.1 standardního typu byla klonována do plasmidu pThioHis A za účelem translační fúze Zm-p60.1 a modifikovaného thioredoxinu z *E. coli* (5). Transkripce probíhá přirozenou bakteriální RNA polymerasou pod kontrolou hybridního tac promotoru. Jako hostitel byl použit kmen JM109 *E. coli*. Byl pozorován výrazný nárůst zastoupení rozpustné frakce enzymu, které dosahovalo 80%. Fusního partnera lze účinně odstranit řízenou proteolýzou, analýza fusního proteinu však neprokázala vliv thioredoxinové domény na strukturně-funkční charakteristiku rekombinantní  $\beta$ -glukosidasy. Efekt proteinové fuse na profil exprese dříve málo rozpustných mutantních forem je nyní studován. Modifikace přirozeného thioredoxinu místně řízenou mutagenesí umožňuje purifikaci fusního proteinu metallochelatační afinitní chromatografií a snižuje tak nároky na speciální afinitní sorbenty.

### Finanční náročnost

Molekulárně-biologické techniky jsou finančně náročné. Některé vhodné vektory jsou dostupné pouze v komplexních kitech a jejich cena dosahuje desítek tisíc Kč. Nezbytným předpokladem je rovněž standardní přístrojové vybavení pracoviště pro práci s DNA a proteiny.

### Výhody proteinových fusi

- jednoduchá detekce exprese s použitím komerčních protilátek připravených proti fúsované doméně
- unifikace purifikační strategie (různé rekombinantní proteiny a jejich mutanty se stejným fúsním partnerem lze izolovat na jednom typu matrice s malými úpravami postupu)
- pozitivní vliv charakteristik fúsovaného proteinu na vlastnosti studované bílkoviny (zvýšení rozpustnosti, vliv na korektní skládání rekombinantního proteinu apod.)

### Komplikace

- komplementární DNA je nezbytnou podmínkou
- posttranslační modifikace eukaryotních proteinů jsou v bakteriální buňce silně omezeny
- problémem může být i správné rozpoznání eukaryotního proteinu bakteriálními chaperony, které nemusí být řešitelné fúsní metodikou

Poděkování: Práce byla podpořena granty MŠMT VS96096 a LN00A081.

### Literatura

- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bakó, L., Campos, N., Schell, J., and Palme, K. (1993) *Science* 262, 1051-1054.
- Kuderová, A., Nanak, E., Truksa, M., and Brzobohatý, B. (1999) *Protein Expression Purif* 16, 405-409.
- Zouhar, J., Nanak, E., and Brzobohatý, B. (1999) *Protein Expression Purif* 17, 153-162.
- Rotrekl, V., Nejedlá, E., Kuč5. era, I., Abdallah, F., Palme, K., and Brzobohatý, B. (1999) *Eur J Biochem* 266, 1056-1065.
- Zouhar, J., and Brzobohatý, B. (2000). His-patch Thioredoxin-fusion in Expression of Recombinant Plant Enzyme. In *Biochemie a molekulární biologie na prahu nového tisíciletí*, 66. (Abstrakt plakátového sdělení ze IV. pracovního setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita Brno).

## Kvantitativní PCR (RT-PCR) pomocí přístroje LightCycler

PETR ŽÁK

B.M.-Comp s.r.o.

Polymerasová řetězová reakce (PCR) se stala zřejmě nejpoužívanější metodou současné molekulární biologie. Díky velké citlivosti umožňuje detekci pouhých několika molekul DNA. Citlivost se často dále kombinuje s dodatečnou specifitou hybridizačních technik, například blotů, nebo hybridizací oligonukleotidů.

S rozvojem polymerasové řetězové reakce se stala velmi aktuální a žádanou také možnost využít PCR nebo RT-PCR pro kvantifikaci relativně malého počtu molekul nukleových kyselin, například při analýze genové exprese z velmi malého množství RNA (dokonce na úrovni jediné buňky). Tento přístup totiž umožňuje provádět v jednom experimentu analýzu velkého počtu vzorků nebo případně velkého počtu genů a to

ve velkém rozsahu koncentrací. Takováto pružnost je nedosažitelná tradičními metodami (Northern bloty, dot bloty, hybridization protection assay atd.).

Kvůli komplexnosti faktorů ovlivňujících PCR, ale bohužel kvantitativní analýza příslušných vzorků po skončení PCR nevede ke spolehlivým výsledkům. Dochází například k tomu, že po 40 amplifikačních cyklech obsahuje vzorek s větším počtem vstupních molekul templátu méně amplifikovaných molekul, než vzorek s výrazně nižším počtem vstupních molekul templátu. Přesnější je kinetický přístup, kdy se zjišťuje kinetika nárůstu počtu amplifikovaných molekul. Po objevení se nových přístrojů, které tuto techniku výrazně zjednodušily, se kvantitativní PCR (případně RT-PCR) v reálném čase stává další metodou, která se běžně používá v molekulárně biologických laboratořích.

Přístrojem pro kvantitativní PCR je například LightCycler firmy Roche Molecular Biochemicals. Principy jeho činnosti jsou obdobné s přístroji jiných výrobců (Perkin-Elmer, BioRad, Corbett Research).

### Popis a princip činnosti LightCycleru

LightCycler je unikátní kombinací rychlého teplotního cyklátoru pro polymerasovou řetězovou reakci a mikrofluorimetru, která umožňuje flexibilní *on-line, real-time* detekci reakční kinetiky. Důležitým rysem tohoto přístroje je skutečnost, že k amplifikaci a analýze dochází ve stejném reakčním prostoru. LightCycler je možné použít pro:

- rychlou kvantitativní analýzu vstupního počtu molekul templátu pomocí PCR; pro kvantifikaci se využívá výhodnější kinetický přístup místo vyhodnocení reakce až po jejím skončení.
- tzv. analýzu hybridizačních křivek, použitelnou pro identifikace/charakterizace PCR produktů nebo pro mutační analýzu.

Pro typické ohřívání a ochlazování vzorků při PCR se používá vzduch, který má velmi malou teplotní kapacitu. Vlastní (RT) PCR reakce probíhá ve speciálních skleněných kapilárách s vysokým poměrem objem/povrch. Spojením obou faktorů je možné měnit velmi rychle teplotu reakční směsi (až 20 °C/sec). LightCycler je tak jedním z nejrychlejších teplotních cyklátorů – 30 cyklů PCR je možné provést (v závislosti na dané reakci) za méně než 20 minut. Skleněná kapilára působí jako optický prvek podobný skleněnému vláknu - záření aplikované na špičku kapiláry je rozvedeno po celém objemu kapiláry a uvnitř kapiláry excitované fluorescenční záření je možné měřit na špičce. Běžný reakční objem je 20 µl.

Kapiláry jsou umístěné v karuselu s 32 pozicemi, který může být vyjmut a naplněn vzorky mimo přístroj. To také znamená, že je možné karusel snadno čistit a desinfikovat.

Fluorimetr používá jako zdroj světla LED diodu s dlouhou životností a bez nároků na údržbu. Excitační světlo se filtruje na příslušnou vlnovou délku a zaměří soustavou čoček na špičku kapiláry. Emitované fluorescenční záření vzorku je zkoncentrované stejnou soustavou čoček a po průchodu přes systém zrcadel a filtrů změřené. Použité filtry umožňují měřit fluorescenci při třech vlnových délkách – 530, 640 a 710 nm.

Tyto vlnové délky byly navrženy tak, aby docházelo k co nejmenšímu spektrálnímu ovlivňování při použití tří fluorescenčních barev v jedné reakci (přesah je dále eliminován pomocí tzv. kompenzačních souborů). Používají se pro měření fluorescence fluoresceinu a SYBR Green I (530 nm) a fluorescenčních barev LightCycler Red 640 a 705. Protože se fluorescein standardně používá jako donorové fluorescenční barvivo (viz dále) může se provádět multiplex PCR se dvěma různými templáty nebo zjišťovat dvě různé mutace (viz dále).

Data je možné měřit:

- jedenkrát za cyklus (v závislosti na používaném způsobu detekce buď při nasedání primerů nebo na konci prodlužování řetězce)
- kontinuálně u jednoho vzorku při analýze hybridizačních křivek (viz dále)
- všechny vzorky kontinuálně (s frekvencí závislou na počtu vzorků)
- postupně v definovaných teplotních intervalech

### **Ovládání přístroje a získávání dat**

LightCycler se dodává s počítačem a příslušným ovládacím software. Během jednotlivých cyklů je PCR reakce monitorována měřením fluorescence a naměřené výsledky jsou okamžitě (po každém měření) zobrazovány na monitoru. Signál je měřen vždy po přesném nastavení vzájemné pozice dané kapiláry proti optické jednotce. Doba měření je asi 20 msec a všech 32 vzorků se proměří za asi 5 vteřin. Získaná data se použijí při následné analýze (kvantifikaci, detekci mutací). V případě potřeby se do daného PCR profilu může přidat krok, kterým se provede analýza hybridizačních křivek (viz dále).

### **Používané metody a protokoly**

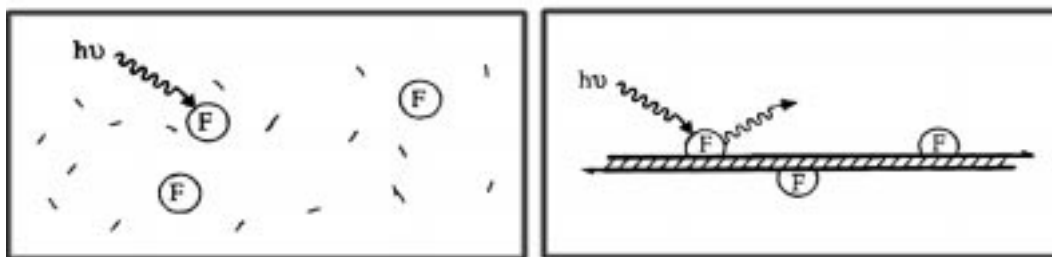
Při použití LightCycleru se sleduje zvyšování koncentrace cílové DNA měřením fluorescence. Používají se dva odlišné přístupy. Při obou se do reakční směsi před vlastní amplifikací přidají jak jednotlivé komponenty pro PCR (nukleotidy, enzym, primery, templát) tak fluorescenční barvivo (barviva).

### **Metoda využívající SYBR® Green I**

Jedná se o fluorescenční barvivo obdobné známému ethidiumbromidu, ale s vyšší citlivostí. Váže se přednostně na dvouřetězcovou DNA a při navázání na dsDNA změní své vlastnosti tak, že je schopné po excitaci emitovat fluorescenční záření. Velikost tohoto záření u daného vzorku je úměrná počtu navázaných molekul SYBR Green I a tedy i koncentraci dsDNA. Signál se může měřit buď jedenkrát za cyklus (typicky na konci elongace) nebo kontinuálně. Protože se barvivo váže na jakoukoliv dsDNA (jak na specifické produkty, tak na nespecifické úseky, například na dimery primerů), je možné ověřit analýzou hybridizačních křivek přítomnost případných nespecifit (viz. dále).

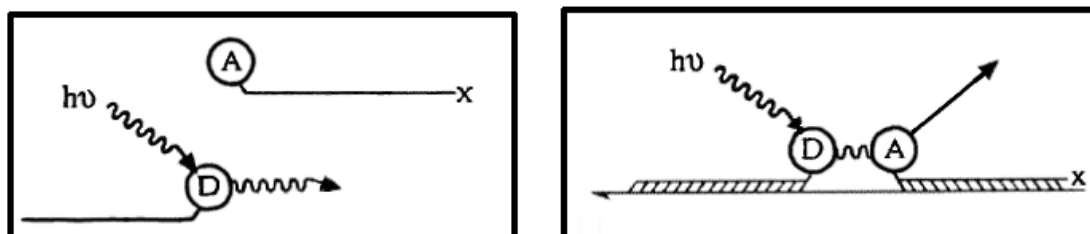
### **Metoda využívající hybridizační sondy s přenosem rezonanční fluorescenční energie (FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer)**





Obr. 1. Minimální fluorescence SYBR Green I v roztoku se zvýší po navázání na DNA

Vyžaduje-li se specifitější detekce, může se specifický produkt detegovat tzv. **hybridizačními sondami**. Sondy jsou navrženy tak, aby byly komplementární k určitému úseku mezi amplifikačními primery. Na 3' konec jedné sondy je navázána donorová fluorescenční barva (typicky fluorescein) a na 5' konec druhé sondy akceptorová fluorescenční barva (zpravidla fluorescenční barviva označené jako LightCycler Red 640 nebo LightCycler Red 705). Během FRET procesu donorové fluorescenční barvivo excitované excitačním zářením emituje světlo, které slouží jako excitační záření pro druhou (akceptorovou) fluorescenční barvu. Akceptorová fluorescenční barva emituje světlo **odlišné vlnové délky**, které se po průchodu příslušným filtrem změří. K přenosu energie dochází pouze tehdy, jsou-li obě sondy v těsné blízkosti – proto musí být navrženy tak, aby mezera mezi nimi po hybridizaci s templátem nebyla větší než 5 nukleotidů. Velikost FRET signálu (fluorescence) je úměrná množství specifického DNA produktu využitelného pro hybridizaci specifických sond. Ty se dostanou do potřebné (malé) vzdálenosti pouze po nasazení na cílovou DNA – v roztoku k FRET přenosu nedochází.



Obr. 2. K FRET procesu může dojít pouze při malé vzdálenosti obou fluorescenčních barev, tedy po navázání na amplifikovanou DNA.

FRET princip používají i tzv. **hydrolyzační sondy** (známé pod názvem TaqMan), které je možné také při práci s LightCyclerem použít.

Principiálně je možné využít LightCycler pro dva odlišné typy kvantifikací:

- absolutní kvantifikaci, kdy se stanovuje množství vstupního templátu v reakci v absolutních hodnotách porovnáním se standardy (pomocí kalibrační křivky)
- relativní kvantifikaci, kdy se koncentrace vstupního templátu vyjádří jako poměrná hodnota vztažením k obsahu vhodného *house-keeping* genu.

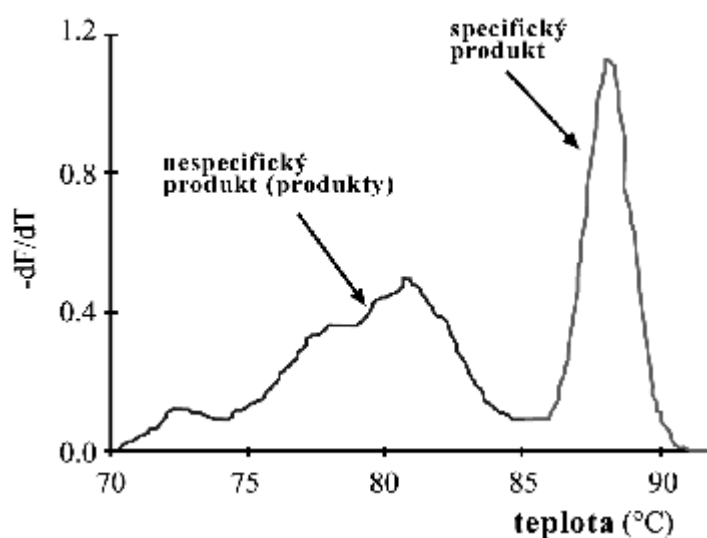
### Princip analýzy hybridizačních křivek

Analýzu hybridizačních křivek je možné použít pro kontrolu amplikonů vzniklých

při PCR nebo (při použití hybridizačních sond) také pro detekci mutací.

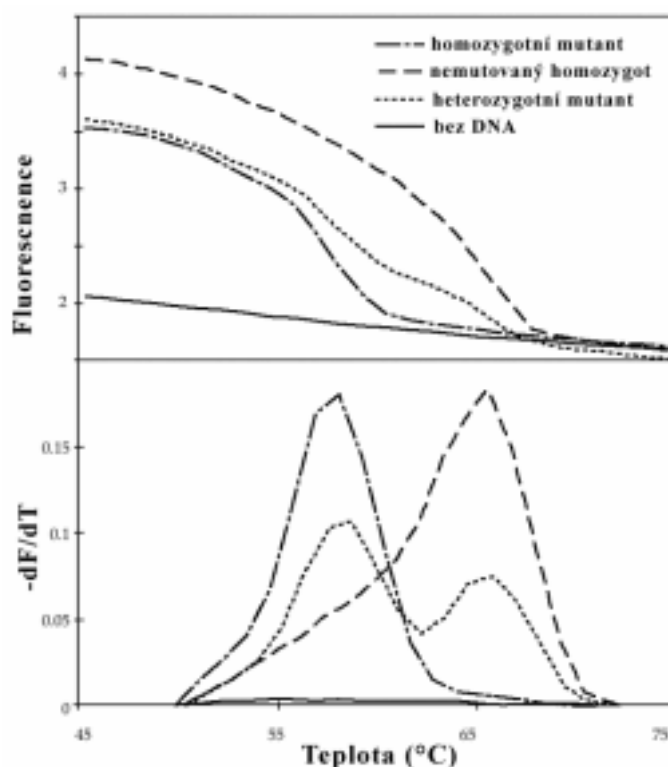
Denurací DNA se rozumí přechod dvoušroubovicové DNA na volné polynukleotidové řetězce, ke kterému dochází při uvolnění vodíkových vazeb mezi basemi. Toho je možné dosáhnout například zvýšením teploty. Při pomalém zahřívání roztoku se objevují a postupně zvětšují denaturované (tedy rozvolněné) úseky. Při určité teplotě se právě polovina DNA nachází v dvoušroubovicové konformaci. Tato teplota odpovídá inflexnímu bodu sigmoidní denaturační křivky a označuje se jako teplota tání ( $T_m$ ). Teplota tání dané molekuly závisí zejména na obsahu GC basí – se zvyšujícím se zastoupením GC stoupá teplota tání. Tohoto faktu využívá LightCycler pro identifikaci produktů.

Při použití SYBR Green I se reakční směs v kapilárách pomalu zahřívá a současně se kontinuálně měří hodnota fluorescence. S rozvolňováním dvouřetězcové DNA dochází k uvolňování SYBR Green I a k poklesu hodnot naměřené fluorescence. Pro snadnější analýzu výsledků obslužný software automaticky spočítá zápornou derivaci výsledné křivky  $-(dF/dT)$  – inflexní bod se tak stane vrcholem píku. Pak je možné snadno rozlišit fragmenty s různou  $T_m$  a zjistit, jestli dochází k tvorbě nespecifických produktů.



**Obr. č. 3.:** Analýza hybridizačních křivek odhalí případné nespecifické produkty.

Při použití stejného principu ve spojení s hybridizačními sondami je možné snadno detegovat některé mutace. Nutným předpokladem je, aby mutace byla v místě, kde nasadá jedna z hybridizačních sond. U nemutovaného templátu je shoda mezi tímto templátem a sondou 100%. Je-li přítomná v amplifikovaném templátu mutace, chybné párování se projeví snížením teploty  $T_m$  a po příslušném matematickém zpracování ( $dF/dT$ ) posunem příslušného píku do oblasti nižších teplot. Výsledky mutační analýzy je tak možné získat s LightCyclerem během 30 minut po zahájení PCR a to bez otevření kapilár.



**Obr. 4.** Pomocí analýzy hybridizačních křivek je možné detegovat mutace. Mutace se díky snížené  $T_m$  projeví posunem výsledného píku do oblasti nižších teplot.

Podrobnější informace o systému LightCycler a kvantitativní PCR můžete nalézt na Internetové adrese

<http://biochem.roche.com/lightcycler>

## Imunohistochemický přístup k řešení molekulárně-biologických problémů

JITKA ŽLŮVOVÁ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, tel.: 05/415 17 203, email: jitka@ibp.cz

### Úvod

„Klasický“ molekulárně-biologický přístup používaný při stanovování přítomnosti určité látky v organismu spočívá v homogenizaci materiálu a v separaci a vyhodnocení obsahu sledované látky. Takto lze během poměrně krátkého časového intervalu získat informace o velkém počtu vzorků, avšak získané výsledky poskytují poměrně malou informaci o tkáňově nebo buněčně specifické přítomnosti dané látky. Pro přesnou lokalizaci přítomnosti mnohých látek v organismech je z tohoto hlediska nejvhodnější použití imunohistochemie, která využívá mikrotomové řezy, na něž jsou obvykle aplikovány protilátky schopné specificky detegovat stanovovanou látku. Tato metoda je tudíž schopná poskytnout informace o lokalizaci i množství studované látky. Metodika spo-

čívá ve fixaci rostlinného materiálu, přípravě mikrotomových řezů, poté zpravidla následuje postfixační opracování preparátů, aplikace primární protilátky interagující se stanovovaným epitopem, většinou následovaná aplikací značené sekundární protilátky (Southgate a Trejdosiewicz 1997).

### **Fixace materiálu**

Prvním z klíčových bodů imunohistochemických metod je vhodná fixace materiálu. Vzorky po fixaci by měly splňovat několik základních požadavků - předně je to zachování původní histologické struktury, dále musí zůstat zachována antigenita studovaných epitopů a v neposlední řadě musí fixáž spolu s dalšími postfixačními kroky umožnit reprodukovatelnou penetraci protilátek (Jeppesen 1994). Pro studium omezené skupiny epitopů může být použita kyselá fixace (jako např. Carnoyova nebo Farmerova fixáž), která výrazně permeabilizuje rostlinný materiál, avšak není vhodná ke studiu většiny proteinových epitopů. Proto se v těchto případech většinou nahrazuje aplikací formaldehydu nebo glutaraldehydu.

### **Tloušťka řezů a postfixace**

Pronikání protilátek není limitováno pouze způsobem fixace vzorku, ale také tloušťkou mikrotomového řezu. Reprodukovatelná penetrace protilátek do celého řezu se zpravidla slučuje s tloušťkou do 10  $\mu\text{m}$ . Penetraci protilátek lze výrazně zlepšit postfixačním opracováním preparátů. Pro postfixační procedury platí stejné podmínky jako pro vlastní fixaci - tj. musí být zachovány morfologické struktury a nesmí být porušena antigenita epitopu. Vzhledem k tomu je většinou přijatelné pouze působení detergentů jako jsou např. Tween 20 nebo Triton X-100. Kromě toho lze poměrně často s úspěchem použít chloroformu, diethyléteru, acetonu a/nebo předchlazeného methanolu, které kromě permeabilizace také z preparátu odstraňují chlorofyl. Pronikání protilátek je možné zlepšit také krátkým působením celulas a pektinas. V případě detekce neproteinových epitopů je rovněž možné aplikovat proteolytické enzymy, jejichž použití se často projeví výrazným snížením nespecifického pozadí. Pro imunodetekci DNA-epitopů je nutná denaturace DNA, kterou je nejlepší provádět za použití 2N HCl (Žlůvová a Vyskot 2000).

### **Blokáda nespecifických vazeb protilátek a vazba primární protilátky**

Další redukce nespecifického pozadí je možno dosáhnout blokováním možných nespecifických vazeb protilátek, které se zpravidla provádí pomocí BSA (telecí sérum albumin) s přídatkem detergentu (např. Tween 20). Primární protilátka bývá většinou aplikována v blokovacím roztoku při laboratorní teplotě nebo při 4°C. Koncentraci i dobu aplikace protilátky je nutno empiricky stanovit.

### **Detekce vazby primární protilátky**

Detekce vazby primární protilátky se většinou provádí aplikací značené sekundární protilátky schopné rozpoznat imunoglobuliny živočišného druhu použitého pro tvorbu primární protilátky. Tato metoda má dvě výhody: jednak dochází k amplifikaci signálu,

což výrazně zvyšuje citlivost detekce, a také snižuje finanční náklady na výzkum, protože se tak obchází nutnost konjugovat všechny protilátky se značkami. Značení protilátek může být v principu trojího druhu: signální enzym, částice koloidního zlata nebo fluorescenční značka. Použití protilátek značených enzymy nebo koloidním zlatem má sice výhodu v možnosti vyhodnocení preparátů pomocí světelného mikroskopu, je však náročné na zkušenosti experimentátora. V našem experimentálním systému se nejlépe osvědčilo fluorescenční značení, protože na rozdíl od zbývajících dvou technik poskytuje možnost značení většího počtu odlišných epitopů na jednom preparátu.

### **Zhodnocení metody**

Nevýhodou imunohistochemie je nutnost provádění velkého množství kontrolních experimentů. Kromě ověření specifity primární protilátky, kterou nelze provádět histochemicky, se jedná zejména o kontrolu nespecifického pozadí (kdy nedochází k aplikaci primární protilátky), kontrolu nespecifické vazby sekundární protilátky (kdy je aplikována pouze sekundární protilátka), kontrolu penetrace primární protilátky (je aplikována protilátka proti podobnému epitopu, avšak s homogenní distribucí ve zkoumaném materiálu; detekce je prováděna sekundární protilátkou) a kontrolu možné nespecifické vazby primární protilátky (kdy je aplikováno preimunní sérum živočicha, který sloužil pro výrobu primární protilátky, a detekce je provedena sekundární protilátkou). Další nevýhodou je velká časová náročnost na zavedení metodiky, protože všechny kroky je nutno empiricky optimalizovat. S výjimkou nákupu protilátek a samozřejmě i kvalitního mikrotomu (v naší laboratoři se velmi dobře osvědčil kryomikrotom Leica 1800) se však jedná o metodu relativně levnou, která navíc poskytuje informace, jež není možno získat pomocí jiných přístupů.

Poděkování: Tato práce byla podporována grantem GA ČR (521/99/0696).

### **Literatura**

- Jeppesen, P. 1994 – In: Gosden, J.R. (ed.): *Chromosome Analysis Protocols*, S 253-285. Totowa, Humana Press.
- Southgate, J., Trejdosiewicz, L.K. 1997 - *Hum. Reprod.* 12: 65.
- Žlůvová, J., Vyskot, B. 2000 – *JBSD* in press.

