

	výhody	nevýhody
TLC	možnost současné analýzy více vzorků nízká spotřeba rozpouštědel nízké náklady jednoduché provedení	nižší rozlišení pracnost manipulace s nebezpečnými chemikáliemi vyšší odchylka měřených hodnot
HPLC	vysoké rozlišení nízká odchylka měřených hodnot automatizace 2 - 3 krát rychlejší než TLC	drahé přístrojové vybavení potřeba kvalifikovaných pracovníků

Závěr

Vzhledem k tomu, že za rozhodující faktor pokládáme schopnost rychlého a rutinního měření velkého počtu vzorků s vysokou přesností a spolehlivostí, upřednostňujeme pro stanovení aktivity CKX metodu HPLC.

Literatura

- Frébort, I., Šebela, M., Galuszka, P., Werner, T., Schmülling, T., Peč, P. 2002. - Anal. Biochem. **306**: 1.
- Kulkarni, M.J., Theerthaprasad, D., Sudharshana, L., Prasad, T.G., Sashidhar, V.R. 2001. - Phytochem. Anal. **12**: 180.
- Libreros-Minotta, C.A., Tipton, P.A. 1995. - Anal. Biochem. **231**: 339.
- Motyka, V., Faiss, M., Strnad, M., Kamínek, M., Schmülling, T. 1996. - Plant Physiol. **112**: 1035.
- Motyka, V., Kamínek, M. 1994. - J. Plant Growth Regul. **13**: 1.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována granty udělenými GAČR (206/03/0313) a MŠMT ČR (LN 00A081).

Studium transgenní RNA

MILOSLAVA FOJTOVÁ

Laboratoř molekulární epigenetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65, Brno (tel.: 541 517 230, fax: 541 211 293, e-mail: fojtova@ibp.cz)

Stabilní exprese rostlinného transgenu je kritickým parametrem pro praktické využití geneticky modifikovaných rostlin. Je známo, že rozdíly v expresi transgenu u jednotlivých

vých transformantů jsou až řádové a často pozorovaným jevem je úplné umlčení vnese-
ného genu.

Expres transgenu se měří na úrovni RNA i proteinu a právě metody analýzy RNA jsou velice výmluvné z hlediska poskytnutí informace o způsobu, jakým byl transgen umlčen. V zásadě lze rozlišit umlčení exprese genu na transkripční úrovni, na posttranskripční úrovni, na translační a posttranslační úrovni.

V případě transkripčního umlčení je promotor daného genu neaktivní, nevzniká tedy žádný transkript. Posttranskripčně umlčené geny jsou exprimovány normálně, vzniklý transkript je ale nestabilní, je degradován a nedochází k jeho translaci. V případě posttranslační regulace je RNA správně transkribována, je stabilní, ale proteinový produkt je rychle degradován.

Tento článek je zaměřen především na popis metod umožňujících odlišit regulaci na úrovni transkripční a posttranskripční. Rovnovážnou hladinu mRNA je možno studovat několika metodami, z nichž nejrozšířenější je zřejmě metoda „*northern*“ hybridizace, dále „*primer extension*“, „*RNase protection*“ a kvantitativní RT-PCR. Tyto metody poskytují informaci o množství stabilního transkriptu v buňce, nejsou však schopny odlišit situaci, kdy je nedostatek (případně absence) transkriptu způsoben inaktivitou promotoru (regulace na transkripční úrovni) nebo nízkou stabilitou transkriptu (regulace na posttranskripční úrovni). Metodou, která umožňuje stanovení iniciace transkripce a jejíž výsledek není ovlivněn stabilitou transkriptu, je metoda „*nuclear run-on*“ (viz dále). Pokud transkribovaná část transgenu obsahuje intron, lze tuto sekvenci využít pro analýzu primárního transkriptu pomocí RT-PCR. Významnou metodou studia regulace exprese genů na obou úrovních je analýza siRNA (malé interferující RNA).

Nuclear run-on

Teoretický úvod

Metoda *nuclear run-on* umožňuje stanovení frekvence iniciace transkripce a její výsledek není závislý na stabilitě transkriptu.

Objektem analýzy jsou obvykle buňky vykazující rozdílnou rovnovážnou hladinu mRNA nebo studovaného proteinového produktu. Jádra buněk jsou inkubována s radioaktivně značeným prekursorem RNA (obvykle ^{32}P -UTP - nukleotid obsahuje atom fosforu ^{32}P , který emituje záření beta). Předpokládá se, že během inkubace nedochází k iniciaci nových transkriptů, radioaktivně značený nukleotid je inkorporován do transkriptů, jejichž syntéza byla započata před zmrazením buněk. Počet vznikajících transkriptů existujících v okamžiku zamrazení buněk je úměrný frekvenci iniciace transkripce na studovaném genu. Značená RNA je izolována a použita jako hybridizační sonda, při čemž na membráně jsou imobilizovány konstrukty DNA obsahující studované geny. Intenzita signálu po hybridizaci je pak přibližně úměrná množství vznikajícího transkriptu.

Provedení

Vlastní metoda se skládá ze tří fází: izolace jader, značení vznikajících molekul RNA pomocí radioaktivního prekursoru a hybridizace radioaktivní sondy RNA s cílovou sekvencí DNA imobilizovanou na membráně.

Příprava jader

Metodou *run-on* byla studována jádra izolovaná z transgenní rostliny HeLo2, která vykazuje vysokou hladinu reporterového enzymu neomycinfosfotransferasy (NPTII) a z rostlin HeLo1 a HeLo1E, u nichž je množství proteinového produktu na hranici detekčních možností (viz dále). Jádra byla izolována metodou popsanou v práci van Bland *et al.* (1994). Mladé tabákové listy byly homogenizovány v tekutém dusíku a re-suspendovány v extrakčním pufru (10 mM NaCl, 10 mM 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina, pH 6,0, 5 mM EDTA, 0,15 M spermidin, 20 mM β -merkaptoethanol, 0,6 % Triton X-100, 0,25 M sacharosa). Jádra byla purifikována v hustotním gradientu Percollu® (Sigma, USA), rozsuspendována v 1,2 ml skladovacího pufru (12 mM Tris-HCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM MgCl_2 , 5 mM β -merkaptoethanol) a skladována v 50 % glycerolu při -70°C .

Run-on

Pro vlastní *run-on* bylo použito 800 μl suspenze jader ve skladovacím pufru důkladně promytých, aby byl z preparátu odstraněn glycerol. Reakce byla startována přidávkou směsi nukleosidtrifosfátů (výsledná koncentrace 0,5 mM pro CTP, GTP a ATP) a 100 μCi [α - ^{32}P] UTP (6000 Ci mmol^{-1} , ICN Biomedicals, Irvine, CA) a po 30 minutách inkubace při 27°C zastavena roztokem sodiumdodecylsulfátu - SDS (výsledná koncentrace v reakční směsi 3 %). Ze vzorku byla odstraněna DNA štěpením deoxyribonukleasou I a po extrakci fenolem byla RNA precipitována ethanolem. Sediment byl rozpuštěn ve 100 μl sterilní vody a použit jako sonda pro hybridizaci. Pro kontrolu kvality sondy je vhodné pro každou reakci stanovit množství inkorporovaného radioaktivního prekursoru, které má odpovídat 100 000 - 1 000 000 cpm.

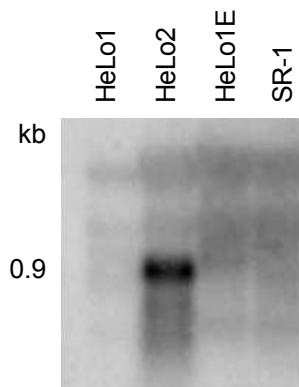
Příprava membrány a hybridizace

Plasmidy nesoucí příslušné inzerty (gen *nptII*, (neomycinfosfotransferasa II) geny *rbcS* (malá podjednotka ribulosobisfosfátcarboxylasy/oxygenasy) a 5SrDNA (gen pro ribosomální 5S rRNA jako pozitivní kontroly) a plasmid pBluescript jako negativní kontrola byly linearizovány, denaturovány a přeneseny na nylonovou membránu (Hybond XL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Vlastní hybridizace probíhala v ULTRAhyb pufru (Ambion, Austin, TX) při 42°C , 48 hodin. Membrány byly odmývány v 1xSSPE (standard saline phosphate/EDTA, 0,18 M NaCl, 10 mM NaPi, pH 7,7, 0,1 mM EDTA) + 0,1 % SDS, 15 minut při pokojové teplotě a 30 minut při 60°C . Membrány byly přes noc exponovány a hybridizační signál vizualizován na *PhosphoFluorImager*, STORM (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Použití metody *run-on* při studiu exprese transgenu

Transgenní rostliny *Nicotiana tabacum* HeLo1 a HeLo2 nesoucí gen pro neomycinfosfotransferasu II (*nptII*) se výrazně liší v expresi transgenní DNA. HeLo2 nese jednu kopii transgenu (lokus 2) a obsah proteinu NPTII v extraktu z listů je u ní až tisícinásobně vyšší ve srovnání s rostlinou HeLo1, která obsahuje dvě kopie transgenu vzájemně orientované jako obrácená repetice (lokus 1) (Van Houdt *et al.* 2000, Kovařík *et al.* 2000).

Cílem studie bylo zjistit stabilitu umlčení lokusu 1 ve tkáňové kultuře. Sledovali jsme obsah proteinu, hladinu rovnovážné (*steady-state*) RNA a množství primárního transkriptu. Zjistili jsme, že během dlouhodobé kultivace (24 měsíců) transgenního tabáku HeLo1 v kalusové kultuře a v rostlinách z kalusu regenerovaných (označených HeLo1E) nedochází ke zvýšení exprese transgenu na úrovni proteinu. Metodou „*northern blot*“ byl po hybridizaci s DNA genu *nptII* detegován signál pouze v případě transgenní rostliny HeLo2, což svědčí o nízké hladině stabilního transkriptu v obou liniích HeLo1 i HeLo1E (obr. 1). Avšak rostliny HeLo1E vykazovaly oproti původní rostlině HeLo1 nulovou hladinu primárního transkriptu *nptII* (obr. 2) (Fojtová *et al.* 2003).



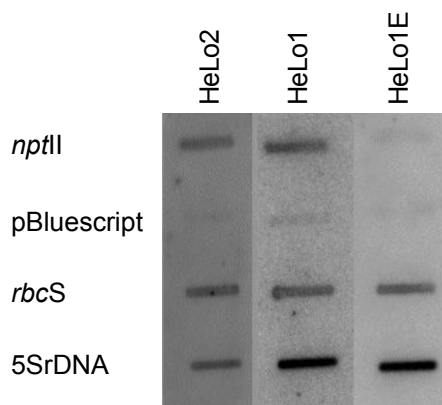
Obr. 1. „*Northern*“ hybridizace. Vzorky RNA byly izolovány pomocí *RNase Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Německo). Denaturační elektroforéza na 1,2 % agarosovém gelu v přítomnosti formaldehydu byla provedena podle Qiagen protokolu. Po elektroforéze byl gel 10 minut promýván ve vodě, aby se odstranil formaldehyd, 15 minut v 0,05 M NaOH a RNA byla přes noc blotována ve 20xSSC (*standard saline citrate*, 150 mM NaCl, 15 mM Na₃-citrát, pH 7,0) na nylonovou membránu (Amersham, Biosciences, Little Chalfont, UK). Hybridizace s radioaktivně značenou sondou (DNA genu *nptII*) probíhala v ULTRAhyb pufru (Ambion, Austin, TX) při 42°C, 24 hodin. Membrána byla odmyta (2 × 15 minut ve 2xSSC + 0,1 % SDS, 50 °C), hybridizační signály byly vizualizovány pomocí *PhosphoFluorImageru* STORM. Jako negativní kontrola byla použita RNA izolovaná z netransgenního tabáku linie SR1.

Praktické poznámky

Pro *run-on* stanovení lze imobilizovat na membránu jedno- nebo dvouvláknovou DNA obsahující sekvenci studovaného genu. Delší fragmenty DNA poskytují po hybridizaci silnější signál než fragmenty kratší, použití krátkých fragmentů zase umožňuje detailnější studium vznikajících transkriptů asociovaných s různými částmi studované genové oblasti.

Nezbytné je použití pozitivní a negativní kontroly; jako negativní kontrola se obvykle používá plasmidový vektor, pozitivní kontrolou bývá konstitutivně exprimovaný gen, v případě zelených rostlinných buněk gen *rbcS*, u ostatních typů buněk se pracuje nejčastěji s β-aktinem.

Běžně se metoda *run-on* používá ke stanovení transkripční aktivity vysoce exprimujících genů a genových rodin a i v těchto případech je nutno pracovat s vysokými dávkami radioaktivity. Pro méně aktivní genové rodiny a jednokopiové geny je obtížné získat reprodukovatelný signál i při použití velmi vysoké dávky radioaktivně značeného prekursoru.



Obr. 2. Analýza metodou „run on“. Jako sondy byly použity radioaktivně značené *in vitro* transkripty připravené z jader transgenní tabákové rostliny HeLo2 (neumlčená linie s vysokou expresí reportérového genu *nptII*) a rostlin HeLo1 a HeLo1E (linie s umlčeným transgenem). Na nylonovou membránu byl imobilizován plasmidový konstrukt obsahující gen *nptII*, dále konstrukty nesoucí geny *rbcS* a 5SrDNA jako pozitivní kontroly a linearizovaný plasmid pBluescript jako negativní kontrola. Podmínky hybridizace byly obdobné jako v případě experimentu na obr. 1. Doba hybridizace byla prodloužena na 48 - 72 hodin.

Tímto způsobem jsme prokázali epigenetické přepnutí postranskripčního umlčení na transkripční během kultivace transgenní rostliny v tkáňové kultuře.

Časté problémy

1. Nízká inkorporace radioaktivně značeného nukleotidu do vznikajícího transkriptu.

Obvyklou příčinou je nekvalitní jaderný preparát. Je dobré zkontrolovat jádra pod mikroskopem, případně použít jinou metodu izolace jader. Dalším problémem může být degradace RNA během purifikačních kroků. V tomto případě je nutné celou proceduru zopakovat, pracovat maximálně čistě a pečlivě a před vlastní hybridizací provést odhad inkorporace ^{32}P -UTP do RNA pomocí precipitace kyselinou trichloroctovou.

2. Vysoké pozadí na odmytých membránách

Signál pozadí lze eliminovat odmyváním za přísnějších podmínek. Existují speciální protokoly pro odmyvání *run-on* membrán, obecně lze ale odmyvat podle zásad uplatňovaných pro „*northern*“ hybridizace.

Další příčinou vysokého pozadí může být nedostatečná purifikace RNA; zbytky DNA a proteinů v sondě mohou ovlivňovat vazbu RNA na membránu. V tomto případě je možno prodloužit doby štěpení deoxyribonasou I a proteinasou K a samozřejmě používat čerstvé a zaručeně funkční enzymy.

3. Slabý nebo nedetegovatelný signál po hybridizaci

Slabý signál často souvisí s neefektivní hybridizací, v horším případě je odrazem nízkého počtu transkriptů. Je možno testovat různé hybridizační a odmyvací podmínky, zvýšit množství konstruktů DNA imobilizovaného na membránu, použít vyšší množství radioaktivně značeného UTP, snížit objem hybridizačního roztoku atd.

Literatura

- Fojtová, M., Van Houdt, H., Depicker, A., Kovařík, A. 2003. - Plant Physiol. In press.
 Kovařík, A., Van Houdt, H., Holý, A., Depicker, A. 2000. - FEBS Lett. **467**: 47.
 van Blokland, R., van der Geest, N., Mol, J.N., Kooter, J.M. 1994. - Plant J. **6**: 861.
 Van Houdt, H., Kovařík, A., Van Montagu, M., Depicker, A. 2000. - FEBS Lett. **467**: 41.

Poděkování. Práce byla financována granty GAČR 521/01/P042, GAČR 521/01/0037 a Z5004920.

Identifikace a izolace cDNA funkčně homologních genů

JAROSLAV FULNEČEK

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 230, e-mail: fulnecek@ibp.cz)

Úvod

V molekulární biologii může nastat situace, že potřebujeme izolovat gen, jehož funkční homolog (ortholog) byl již dříve popsán u jiného organismu. Často k této situaci dochází u projektů zaměřených na rostliny, kdy nejjednodušším způsobem řešení je využití poznatků z živočišné říše, jejíž výzkum bývá zpravidla o krok dále. Nejsnazší situace je u *Arabidopsis thaliana* díky známé sekvenci jejího genomu. Zde lze poměrně jednoduše vyhledat orthologní geny a výzkum proteomu je u této rostliny nejdále. *A. thaliana* však není reprezentativní pro celou rostlinnou říši. Existuje řada procesů, které je vhodné studovat u jiných rostlinných druhů, například ty, jež souvisejí s produkcí zemědělských plodin. Studium biologických procesů u více rostlinných modelových systémů nám pomůže odhalit složitost dějů a upozorní na rozdíly, které doplní všeobecný model založený na výsledcích studia *A. thaliana*.

Je vhodné zvolit rostlinný druh, jehož genom je ve fázi sekvenování (<http://www.info-biogen.fr/services/deambulum/english/genomes1.html>). V budoucnu nám pak kompletní sekvenční data mohou ušetřit spoustu práce. Můžeme hledat příslušné orthology, identifikovat všechny členy genové rodiny a pseudogeny, studovat regulační oblasti atd. Rostlinný genom se však čte velmi dlouho, a proto zmíněné výhody mohou vyvážit dlouhodobé zkušenosti s jinou modelovou rostlinou. Navíc, jedná-li se o zemědělsky významnou plodinu, můžeme doufat ve snazší získání finančních prostředků.

Ve funkční genomice rostlin se již uplatňují přístupy reversní genetiky. Nejprve je popsán gen a poté se ověřuje jeho funkce. Lze použít několik přístupů k izolaci genu. O konkrétním postupu se zpravidla rozhoduje na základě dostupných informací a materiálu. Pokud chceme studovat jen několik genů, které jsou známy u jiných organismů, lze využít informací z biologických databází pro identifikaci a izolaci příslušných cDNA.