

Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego



GENETYKA MOLEKULARNA

Materiały do zajęć laboratoryjnych

Skrypt przygotowany przez pracowników
Zakładu Genetyki UW

Warszawa 2003

Spis treści

<i>Wstęp</i>	3
<i>Enzymy restrykcyjne</i>	4
<i>Podstawowe enzymy modyfikujące DNA przydatne do klonowania</i>	6
<i>Elektroforeza DNA w żelach</i>	8
<i>Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego</i>	11
<i>Ligacja DNA</i>	12
<i>Transformacja E. coli</i>	13
<i>Izolacja DNA plazmidowego</i>	16
<i>Wytrącanie kwasów nukleinowych</i>	18
<i>Znakowanie kwasów nukleinowych</i>	19
<i>Hybrydyzacja kwasów nukleinowych na filtrach</i>	23
<i>Izolacja RNA</i>	30
<i>Elektroforeza RNA w żelach</i>	32
<i>PCR</i>	36
<i>Elektroforeza białek w żelach poliakryloamidowych</i>	41
<i>Technika Western</i>	46
<i>Dodatek</i>	49

Wstęp

Celem ćwiczeń prowadzonych w ramach fakultetu *Genetyka molekularna* jest przedstawienie wybranych metod biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej. Każdy student powinien opanować praktycznie prezentowane techniki, do których należą:

- komputerowa analiza sekwencji kwasów nukleinowych i białek
- izolacja plazmidowego DNA
- analiza restrykcyjna DNA (mapy restrykcyjne)
- klonowanie genów (ligacja DNA z wektorem, transformacja *E. coli*, analiza klonów)
- metoda PCR
- heterologiczna ekspresja białek w *E. coli*
- analiza białek metodą Western
- znakowanie DNA izotopami radioaktywnymi
- hybrydyzacja kwasów nukleinowych
- izolacja i analiza RNA

Fakultet składa się z dwóch bloków ćwiczeń.

Pierwszy blok to kilka podstawowych technik współczesnej biologii molekularnej, takich jak izolowanie DNA, trawienie enzymami restrykcyjnymi, klonowanie, techniki PCR i Western.

Manipulacje te będą wykonywane w ramach doświadczenia, którego ostatecznym celem jest wyrażenie fragmentu cDNA kodującego ludzkie białko Xip w *E. coli*. Fragment cDNA kodujący Xip został wyizolowany przy zastosowaniu drożdżowego systemu dwóch hybryd, w którym jako *przynętę* wykorzystano C-końcowy fragment ludzkiej mitochondrialnej helikazy hSuv3p. Interakcję obu białek potwierdzono stosując dodatkowe badania *in vitro*.

Zadaniem studentów będzie namnożenie fragmentu cDNA Xip w reakcji PCR, wklonowanie go do wektora ekspresyjnego oraz wyrażenie w *E. coli*. W pierwszym etapie doświadczenia dokonana zostanie analiza komputerowa sekwencji DNA i białkowej Xip oraz wyszukanie danych literaturowych dotyczących tego białka. Następnie zaprojektowane zostaną startery pozwalające na namnożenie pełnej długości cDNA Xip, wbudowujące do produktu PCR sekwencję rozpoznawaną przez enzym *NcoI*. Następnie uzyskany produkt PCR będzie klonowany do wektora ekspresyjnego pET15TAP, pozwalającego na heterologiczną ekspresję Xip w fuzji ze znacznikiem TAP (ang. *Tandem Affinity Purification*), ułatwiającym późniejsze oczyszczanie produktu białkowego. W tym celu, wektor i produkt PCR zostaną pocięte enzymem *NcoI*, a następnie mieszanina fragmentów DNA będzie poddana ligacji. Po transformacji komórek *E. coli* izolowane będą klony zawierające wstawkę w odpowiedniej orientacji. Z klonów tych otrzymywany będzie plazmidowy DNA i transformowany do komórek *E. coli* BL21. Otrzymane szczepy zostaną poddane indukcji, a następnie obecność fuzji białkowej Xip-TAP w komórkach *E. coli* zostanie zweryfikowana przy pomocy metody Western.

W drugim bloku ćwiczeń przedstawione zostaną metody izolacji i analizy RNA oraz DNA pochodzących z różnych organizmów. Zaprezentowane będą również techniki hybrydyzacji typu Northern i Southern.

Fakultet kończy się kolokwium na prawach egzaminu.

Polecana literatura uzupełniająca.

- Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. Recombinant DNA. Scientific American Books, 2nd ed., 1992.

- Primrose S.B. Principles of Gene Manipulation. Blackwell Scientific Publications, 4th ed., 1989
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. CSHL Press, 2nd ed., 1989.
- Turner P. C. McLennan A. G., Bates A. D., White M. R. H. Biologia molekularna, PWN, 1999.
- Primrose S.B. Zasady analizy genomu PWN, 1999.
- Brown T. A., Genomy, PWN, 2001.
- Słomski R. Przykłady analiz DNA. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu, 2001.

Enzymy restrykcyjne

Enzymy restrykcyjne (zwane także restryktazami, endonukleazami restrykcyjnymi) są enzymami izolowanymi z bakterii, zdolnymi do rozpoznawania specyficznych sekwencji w DNA i do przecinania dwuniciowej cząsteczki DNA.

System restrykcji i modyfikacji *Escherichia coli*

Systemy restrykcji i modyfikacji Typu I obejmują trzy geny: *hsdR*, *hsdM* i *hsdS*. Produkty tych genów tworzą wielojednostkowy enzym posiadający zarówno aktywności endonukleolityczne jak i metylacyjne. Enzym działa jako metylaza, kiedy jedna z nici rozpoznawanego miejsca jest metylowana, przeprowadzając modyfikację nici niemetylowanej. Kiedy rozpoznawane miejsce jest całkowicie niezmodyfikowane, enzym działa jako endonukleaza i hydroлізуje DNA.

Enzymy restrykcyjne typu II. Ich substratem jest dwuniciowa cząsteczka DNA, zawierająca przynajmniej jedną sekwencję rozpoznawaną przez dany enzym (od 4 do kilkunastu nukleotydów). W wyniku reakcji, w obecności jonów Mg^{2+} , obydwie nici DNA zostają przecięte w obrębie lub w określonej odległości w pobliżu rozpoznawanej sekwencji. Obecnie znanych jest kilkaset różnych enzymów restrykcyjnych, z czego większość jest dostępna handlowo. Enzymy restrykcyjne stanowią podstawowe narzędzie w inżynierii genetycznej.

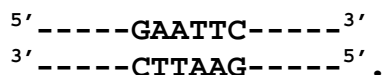
Innym systemem restrykcyjnym *E. coli* jest system zwany McrA skierowany wobec DNA zmetylowanego w sekwencji Cm^5CGG

Dobrze poznane systemy metylacji *E. coli* to system Dam i Dcm. Metylaza adeninowa kodowana przez gen *dam* modyfikuje resztę adeniny w obydwu niciach w obrębie sekwencji GATC. Metylaza cytozynowa kodowana przez gen *dcm* modyfikuje wewnętrzną resztę cytozyny w obydwu niciach w obrębie sekwencji CC(A/T)GG.

Najczęściej używane szczepy laboratoryjne *E. coli* to pochodne typów dzikich K-12 i B, mające system restrykcji i modyfikacji, odpowiednio, *EcoKI* (rozpoznawana sekwencja: 5' AAC(N)₆GTGC) i *EcoBI* (rozpoznawana sekwencja 5' TGA(N)₈TGCT). Mutacje *hsdS* zaburzają zarówno modyfikację, jak i restrykcję DNA, mutanty *hsdR* nie mają aktywności restrykcyjnej, ale zachowują aktywność metylacyjną (są $r_K^- m_K^+$ lub $r_B^- m_B^+$).

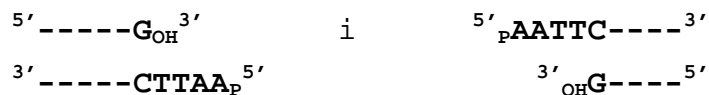
W dalszej części skryptu termin enzymy restrykcyjne będzie określał stosowane powszechnie w metodach inżynierii genetycznej enzymy restrykcyjne typu II

Większość enzymów restrykcyjnych rozpoznaje sekwencję czterech lub sześciu nukleotydów. Są to zazwyczaj sekwencje palindromiczne, to znaczy posiadające oś symetrii. Na przykład enzym *EcoRI* rozpoznaje sześcionukleotydową sekwencję:



W obrębie tej sekwencji następuje cięcie nukleolityczne obydwu nici, pozostawiające grupę -OH na końcach 3', a grupę -P na końcach 5'. Ponieważ miejsce przecięcia jednej

nici (G/AATTC) nie znajduje się naprzeciwko miejsca nacięcia drugiej (CTTAA/G), powstają tzw. lepkie końce:



W tym przypadku, w wyniku działania enzymu powstają cząsteczki DNA z jednoniciowymi końcami 5'. W wyniku trawienia przez niektóre enzymy restrykcyjne otrzymujemy cząsteczki z jednoniciowymi końcami 3' (n.p. *PstI* – 5'CTGCA/G3') lub też tzw. tępe końce, które powstają w wyniku przecięcia obydwu nici DNA pośrodku rozpoznawanej sekwencji (w obu niciach naprzeciwko siebie).

Lepkie końce mają duże znaczenie przy rekombinowaniu DNA. Ponieważ sekwencje lepkich końców powstałych w wyniku działania tego samego enzymu są komplementarne, mogą one łatwo parować ze sobą. W obecności enzymu - ligazy DNA - można takie cząsteczki połączyć kowalencyjnie.

Zdarza się, że dwa enzymy wytwarzają takie same lepkie końce, mimo iż rozpoznają różne sekwencje DNA. Przykładowo, enzym *Sau3AI* rozpoznaje sekwencję 5'/GATC 3' i pozostawia jednoniciowe końce 5'GATC. Takie same końce pozostawia *BamHI*, który rozpoznaje sekwencję 5'G/GATCC3'. Umożliwia to klonowanie DNA strawionego *Sau3AI* w wektorze strawionym *BamHI*. Taką parę enzymów stosuje się często przy konstrukcji banków genów (DNA donorowy trawi się enzymem *Sau3AI* niecałkowicie). [Należy pamiętać, że nie każdy sklonowany odcinek DNA będzie wycinany ze zrekombinowanego wektora enzymem *BamHI*.]

Na ogół różne enzymy rozpoznają różne sekwencje DNA. Istnieje jednak wiele przykładów enzymów restrykcyjnych, izolowanych z odrębnych organizmów, lecz rozpoznających takie same sekwencje DNA. Na przykład enzymy *Sau3AI* oraz *MboI* rozpoznają sekwencję 5'GATC3'. Takie enzymy nazywamy izoschizomerami. Izoschizomery mogą ciąć rozpoznawaną sekwencję w różny sposób [np. *MboI* (G/TAC) i *DpnI* (GA/TC)].

Niektóre izoschizomery różnią się wrażliwością na metylację DNA. Przykładowo, enzym *Sau3AI* jest niewrażliwy na metylację DNA, zaś jego izoschizomer *MboI* nie tnie DNA, kiedy reszta cytozynowa w sekwencji rozpoznawanej (GATC) jest zmetylowana. Fakt ten pozwala badać metylację DNA pochodzącego z różnych źródeł (cząsteczki zmetylowane będą trawione przez *Sau3AI*, a nie będą trawione przez *MboI*).

W wyniku trawienia danej cząsteczki DNA przez określony enzym restrykcyjny powstaje zawsze taka sama liczba fragmentów określonej wielkości. Liczbę i wielkość uzyskiwanych fragmentów DNA ustala się poddając strawiony DNA elektroforezie w żelach agarozowych lub akryloamidowych. Analizując produkty trawienia różnymi enzymami restrykcyjnymi, stosowanymi pojedynczo, w kombinacjach, oraz w ilościach wystarczających lub niewystarczających do pełnego strawienia preparatu - można ustalić wzajemne położenie i odległości pomiędzy sekwencjami rozpoznawanymi przez te enzymy w obrębie badanej cząsteczki DNA, czyli sporządzić jej **mapę restrykcyjną**. Stosując techniki hybrydyzacyjne można ustalić mapę restrykcyjną danego fragmentu i jego otoczenia w genomie (**mapa genomowa**).

Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

- Trawienie enzymami restrykcyjnymi przeprowadza się zwykle przy stężeniu 0.05-0.5µg DNA /µl.

- Większość stosowanych w laboratorium enzymów restrykcyjnych działa w jednym z trzech podanych poniżej buforów, różniących się stężeniem soli.

Najczęściej używane bufor do enzymów restrykcyjnych

bufor	NaCl	TrisHCl	MgCl ₂	DTT
pH 7.5				
LSB*	0 mM	10 mM	10 mM	1 mM
MSB**	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
HSB***	100mM	50 mM	10 mM	1 mM

*niskie stężenie soli (ang. low, L); **średnie stężenie soli (ang. medium, M);

***wysokie stężenie soli (ang. high, H)

- Dane dotyczące wymaganego stężenia soli zamieszczają katalogi firm produkujących enzymy np. New England Biolabs, Fermentas. Wskazane jest stosowanie buforów zalecanych przez producenta danego enzymu.
- Jeśli DNA ma być strawiony dwoma enzymami wymagającymi różnych buforów, należy najpierw przeprowadzić trawienie w buforze o niższym stężeniu soli, a następnie podwyższyć stężenie soli w mieszaninie reakcyjnej poprzez dodanie odpowiedniej objętości stężonego roztworu NaCl.
- Bufory do trawień przygotowane są w postaci 10-krotnie stężonych roztworów.
- **Ilość enzymu, jaką należy wziąć do reakcji, oblicza się korzystając z następującej definicji: 1 jednostka enzymu trawi kompletnie 1 µg DNA faga λ (ok. 50 kb) w czasie 1 godz.**
- Nie należy dodawać więcej enzymu niż 1/10 objętości mieszaniny reakcyjnej. Glicerol obecny w preparatach enzymów może bowiem hamować aktywność enzymu lub zmieniać jego specyficzność.
- Niektóre enzymy mają dodatkowe aktywności, pojawiające się w pewnych warunkach trawienia, określane jako aktywność „star”. Informacje o takiej aktywności podawane są przez producentów enzymów restrykcyjnych.
- Przy sporządzaniu mieszaniny reakcyjnej enzym dodaje się na końcu. Należy bezwzględnie pamiętać, że enzymy muszą być trzymane w temperaturze -20°C, a więc pobyt enzymu poza zamrażarką powinien trwać krótko. Po użyciu enzymy należy natychmiast odstawić na miejsce.
- Trawienie należy prowadzić w temperaturze zalecanej przez producenta enzymu (dane w katalogach).
- Trawienie można zatrzymać przez dodanie EDTA, grzanie przez 10-15 min. w temp. 65-70°C lub ekstrakcją fenolem. Należy pamiętać, że niektóre enzymy są termostabilne i nie ulegają termicznej inaktywacji (patrz katalogi).

Podstawowe enzymy modyfikujące DNA przydatne do klonowania

Alkaliczna fosfataza

- z jelita cielęcego (CIP lub CIAP)
- bakteryjna (z *E. coli*)
- Shrimp (z krewetki)

Katalizuje usuwanie grup 5'fosforanowych z DNA, RNA oraz trifosforanów. Enzymy różnią się odpornością na inaktywację termiczną, najbardziej odporna jest

fosfataza bakteryjna, najmniej fosfataza z krewetek (można ją inaktywować w 65° C).

Zastosowanie:

- defosforylacja końców DNA przy przygotowywaniu wektorów do klonowania (fragmenty pozbawione grup fosforanowych na końcach nie mogą zamykać się w kółko w reakcji ligacji)
- defosforylacja DNA lub RNA przed znakowaniem końców przy użyciu kinazy polinukleotydowej T4
- defosforylacja białek

Fragment Klenowa polimerazy DNA I

Fragment Klenowa jest produktem proteolizy polimerazy DNA I z *E. coli*, który ma aktywność polimeryzacji (3'→5') i aktywność egzonukleolityczną 3'→5', ale stracił aktywność egzonukleolityczną 5'→3'. Dzięki temu zachował wierność polimeryzacji holoenzymu nie degradując końców 5'.

Zastosowanie:

- wypełnianie lepkich końców (jednoniciowe odcinki wysunięte w kierunku 5', nie 3' cofnięta)
- sekwencjonowanie metodą Sangera
- synteza drugiej nici cDNA
- znakowanie metodą losowych oligonukleotydów (tu można zastosować fragment Klenowa exo^- , bez obydwu aktywności egzonukleolitycznych)

Nukleaza Mung Bean

Egzonukleaza specyficzna wobec jednoniciowych odcinków DNA i RNA, która degraduje wysunięte jednoniciowe końce (zarówno 3' jak i 5') z cząsteczek RNA i DNA pozostawiając tępe końce.

Zastosowanie:

- usuwanie jednoniciowych odcinków (3' i 5') na końcach DNA i RNA.
- przecinanie struktur szpilki do włosów
- mapowanie transkryptów

Nukleaza S1

Degraduje jednoniciowe odcinki kwasów nukleinowych

Zastosowania

- usuwanie jednoniciowych odcinków (3' i 5') na końcach DNA.
- przecinanie struktur szpilki do włosów
- mapowanie transkryptów

Egzonukleaza III

Egzonukleaza 3'→5' uwalniająca 5' mononukleotydy z dwuniciowych odcinków DNA. Działa na DNA z jednoniciowymi nacięciami, degradując przeciętą nić. Nie działa na wystające końce 3' o długości przynajmniej 4 nukleotydów i na DNA jednoniciowy.

Zastosowanie:

- konstrukcja jednokierunkowych delecji we fragmentach DNA
- wytwarzanie jednoniciowych fragmentów DNA (np. jako matryc do sekwencjonowania metodą Sangera).

Kinaza polinukleotydowa T4

Enzym, który katalizuje przeniesienie grupy γ -fosforanowej z ATP na koniec 5'-OH DNA, RNA, oligonukleotydów lub nukleozydo 3'-monofosforanów i katalizuje wymianę 5'-końcowej grupy fosforanowej. Ma również aktywność 3' fosfatazy.

Zastosowanie:

- dołączanie grup fosforanowych do syntetycznych oligonukleotydów
- znakowanie końców 5' kwasów nukleinowych

Odwrotna transkryptaza

Polimeraza DNA zależna od RNA, kodowana przez gen pol z retrowirusów, np. (M-MuLV, AMV czy M-MLV).

Zastosowanie:

- synteza pierwszej nici cDNA
- analiza RNA poprzez wydłużanie startera

Elektroforeza DNA w żelach

Elektroforeza w żelach jest techniką stosowaną standardowo przy rozdziale, analizie i oczyszczaniu kwasów nukleinowych. Po umieszczeniu w polu elektrycznym cząsteczki te migrują w żelu zgodnie ze swym ładunkiem, przy czym szybkość migracji zależy od wielkości i kształtu cząsteczki. Elektroforeza w żelach jest połączeniem techniki rozdziału w polu elektrycznym z metodą sączenia molekularnego. Powszechnie stosuje się dwa rodzaje żeli: agarozowe i akryloamidowe. Elektroforezę możemy prowadzić w warunkach natywnych bądź denaturujących.

Elektroforeza w żelach agarozowych.

Elektroforeza w żelach agarozowych, jako metoda szybka i prosta, znalazła powszechne zastosowanie. Zdolność rozdzielcza żelu zależy od stężenia agarozy, determinującego wielkość porów w żelu. Standardowo stosuje się żele 1%. Do rozdziału cząsteczek mniejszych (0.5-2.0 kb) używa się żeli bardziej stężonych 1,4-2%, a do rozdziału cząsteczek większych (10-20 kb i większych) żeli o stężeniu mniejszym, 0,5-0,7%. Podczas elektroforezy w żelach agarozowych następuje również rozdział cząsteczek o tej samej wielkości, lecz różniących się kształtem np. rozdział trzech różnych form plazmidu: CCC (ang. covalently closed circle), liniowej i OC (ang. open circle).

Elektroforeza musi być przeprowadzana w odpowiednim buforze. Najczęściej stosowanym buforem jest TAE (Tris-octan, EDTA) lub TBE (Tris-boran, EDTA). Przed naniesieniem na żel próbki zawieszają się w buforze zawierającym „obciążacz” (glicerol, Ficoll lub sacharoza) oraz barwnik umożliwiający śledzenie przebiegu elektroforezy (*Xylene cyanol* niebieski, fioletowy *Bromophenol blue* lub pomarańczowy *Orange G*). DNA w żelu można uwidocznic dzięki barwieniu związkiem interkalującym - bromkiem etydyny, który fluoryzuje w świetle UV.

Elektroforeza w żelach poliakryloamidowych

Żel poliakryloamidowy powstaje przez polimeryzację monomerów akryloamidu w długie łańcuchy z wytworzeniem wiązań poprzecznych przez bisakryloamid. W reakcji tej konieczna jest obecność odpowiedniego katalizatora (PERS) i związku inicjującego reakcję (TEMED). Wielkość porów w żelu zależy od stosunku stężenia akryloamidu do bisakryloamidu. Żele poliakryloamidowe stosuje się przy rozdziale fragmentów o wielkości od 6 bp (20% poliakryloamid) do 1000 bp (3% poliakryloamid) oraz przy rozdziale jednoniciowych cząsteczek DNA (np. sekwencjonowanie).

Do elektroforezy stosuje się bufor TEB (Tris, EDTA, boran). DNA w żelu uwidacznia się poprzez barwienie bromkiem etydyny.

Elektroforeza w żelach denaturujących

Szybkość migracji w żelu jednoniciowych cząsteczek DNA zależy nie tylko od ich wielkości i ładunku, ale również w dużym stopniu od ich struktury drugorzędowej. Aby dokładnie określić wielkość takich cząsteczek, należy wyeliminować różnice w szybkości migracji wywołane różną konformacją cząsteczki. Można to osiągnąć stosując elektroforezę w żelach denaturujących. Są to najczęściej żele akryloamidowe, w których czynnikiem denaturującym jest mocznik. Takie żele stosuje się między innymi przy analizie jednoniciowych fragmentów DNA podczas sekwencjonowania.

Przed naniesieniem próbki na żel denaturujący konieczne jest odpowiednie jej zdenaturowanie. Najczęściej osiąga się to przez dodanie formamidu i odpowiednie podgrzanie.

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Odczynniki

- Bufor do elektroforezy TAE (10×): 400 mM Tris-octan, pH 8.2, 10 mM EDTA
- agaroz
- Bufor do nanoszenia próbek 6x: 15 % Ficoll 400 lub 30% glicerol, 0, 25% barwnika (*Xylene cyanol*, *Bromophenol blue* lub *Orange G*)
- Bromek etydyny: 10mg/ml wodny roztwór

Przygotowanie żelu

1. Dodać odważoną agarozę do odpowiedniej objętości rozcieńczonego buforu do elektroforezy.
2. Gotować w kuchenke mikrofalowej aż do rozpuszczenia się agarozy.
3. Schłodzić agarozę do temp. ok. 50°C i dodać bromek etydyny do stężenia 0.5 µg/ml. **UWAGA!:** bromek etydyny to **silny mutagen**; należy używać **rękawiczek**.
4. Okleić taśmą saneczki, umieścić w nich grzebyk.
5. Wlać agarozę do saneczek (żel nie powinien być zbyt gruby).
6. Kiedy żel całkowicie zastygnie (15-30 min.), przenieść saneczki do aparatu i zalać taką objętością rozcieńczonego buforu do elektroforezy, aby warstwa buforu nad żelem nie przekraczała 2-3 mm grubości.
7. Ostrożnie wyjąć grzebyk.

Przygotowanie próbki

1. Do próbki dodać 1/6 objętości barwnika, wymieszać i krótko zwirować.
2. Próbkę nanosi się do kieszonki żelu (nie obok!) za pomocą pipety automatycznej; należy uważać aby do końcówki pipety nie pobrać razem z próbką pęcherzyków powietrza.
3. Ilość DNA w próbce, którą należy nanieść do jednej kieszonki, zależy od ilości fragmentów i ich wielkości. Minimalna ilość DNA, którą widać na żelu w postaci prążka, wynosi 20 ng. Ilość DNA w prążku nie powinna przekraczać 200 ng, w przeciwnym wypadku obserwuje się przeładowanie kieszonki.

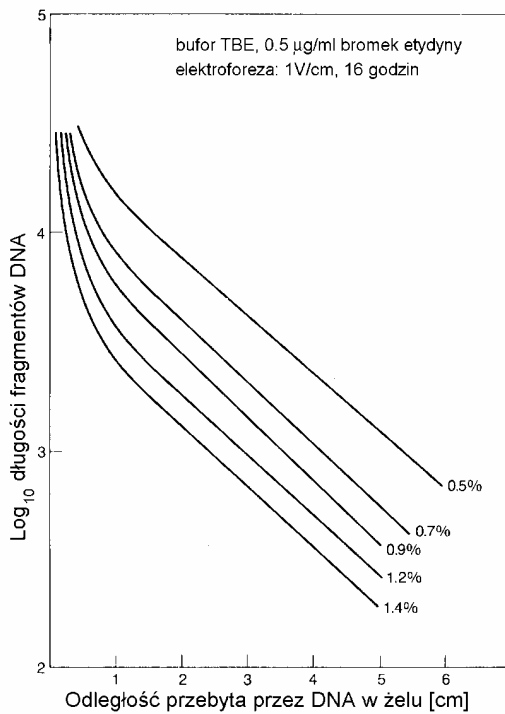
Elektroforeza

1. Aparat należy podłączyć do zasilacza pamiętając, że DNA migruje w kierunku elektrody dodatniej (dobrze jest zrobić to przed naniesieniem próbek, aby sprawdzić czy płynie prąd; próbki nanosimy oczywiście przy wyłączonym napięciu!).
2. Wielkość napięcia zależy od oczekiwanego czasu elektroforezy i wielkości żelu. Najczęściej stosuje się napięcie 5-7 V/cm długości żelu. Na ogół lepszy rozdział

uzyskuje się przy niższym napięciu. Zbyt duże napięcie może spowodować przegrzanie żelu.

- Po skończonej elektroforezie żel wyjmuje się z aparatu (**rękawiczki !**), a następnie ogląda i fotografuje w świetle UV na transiluminatorze. Bezwzględnie należy także **przestrzegać** zasad pracy z transiluminatorem (**okulary** na nosie i **szyba** na transiluminatorze). **Pamiętaj!** światło UV jest szkodliwe dla oczu i skóry.

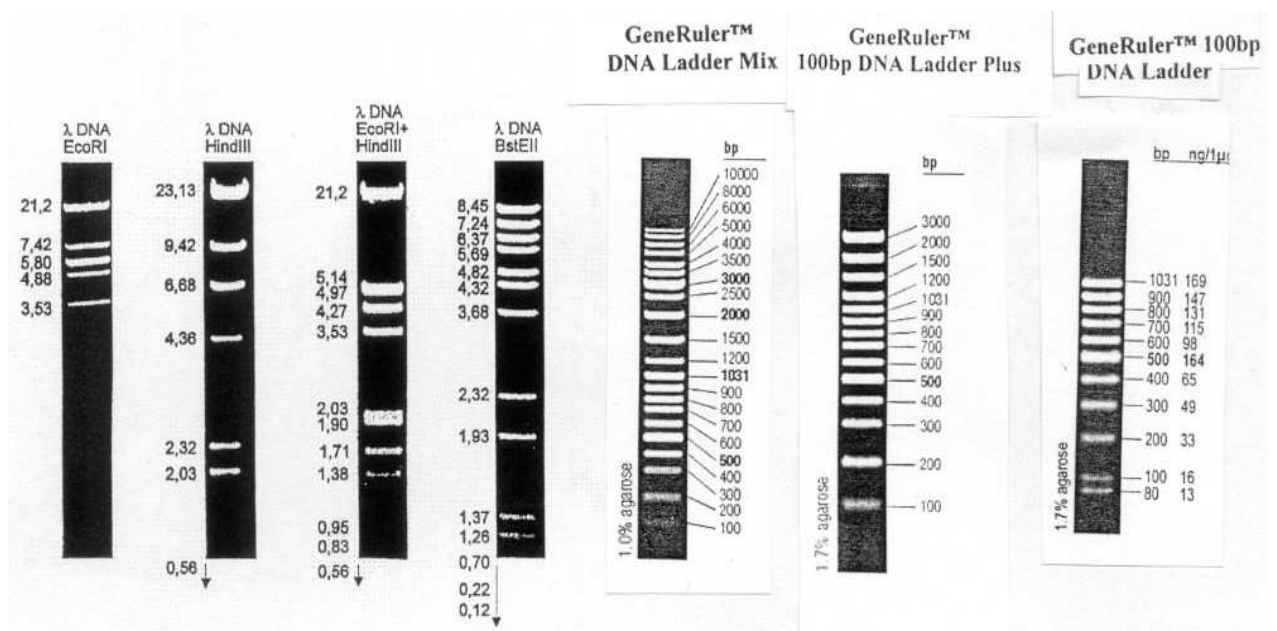
Kalibracja żelu



Kalibrację wielkości fragmentów DNA przeprowadza się w oparciu o zasadę, że liniowe cząsteczki DNA migrują w żelu agarozowym z prędkością odwrotnie proporcjonalną do logarytmu dziesiętnego ich masy cząsteczkowej, wyrażonej w Daltonach lub w tysiącach par zasad (kb). W celu wyznaczenia wielkości nieznanymi fragmentów DNA stosuje się tzw. standardy wielkości, czyli cząsteczki DNA o znanej wielkości, poddawane elektroforezie w tym samym żelu, co cząsteczki badane. Kalibracja żelu polega więc na wykreśleniu krzywej zależności odległości przebytej w czasie elektroforezy przez poszczególne fragmenty, od logarytmu masy cząsteczkowej (tzw. krzywej kalibracyjnej).

Zależność migracji fragmentów DNA od wielkości

Powszechnie używanymi standardami są preparaty DNA bakteriofaga λ strawione odpowiednimi kombinacjami endonukleaz restrykcyjnych lub mieszanina fragmentów o znanej długości (np. DNA Ladder Mix i 100bp DNA Ladder Plus z firmy Fermentas).



Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego

Istnieje szereg sposobów izolowania fragmentów DNA z żeli agarozowych. Cztery najczęściej stosowane metody to:

- odwirowanie agarozy w odpowiednich warunkach, zebranie wydzielonego płynu i wytrącenie DNA etanolem (odmianą tej metody jest tzw. „freeze squeeze”, czyli zamrożenie i rozmrożenie kawałka agarozy z fragmentem DNA przed wirowaniem)
- elektroelucja DNA poprzez poddawanie elektroforezie kawałka agarozy umieszczonego w woreczku dializacyjnym lub zastosowanie odpowiedniego urządzenia np. firmy Biorad.
- zastosowanie agarazy, czyli enzymu rozkładającego agarozę (np. z firmy NewEngland Biolabs)
- zastosowanie jednego z wielu dostępnych handlowo źródeł wiążących DNA np. filtry NA 45 (Schleicher & Schuell), złoża: QIAEX (QIAGEN), GENECLEAN (BIO101) i Wizard (Promega).

Zanieczyszczenia agarozy są silnym inhibitorem wielu enzymów, dlatego często pojawiają się problemy np. przy ligacji, znakowaniu lub innych reakcjach enzymatycznych. Istotne znaczenie ma zatem jakość stosowanej agarozy. Wysokiej jakości agarozą jest sprzedawana np. przez firmę FMC. W przypadku bardzo czystej agarozy o niskiej temperaturze topnienia (low melting point) można, po upłynnieniu, przeprowadzać reakcje enzymatyczne w jej obecności.

Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego metodą "freeze-squeeze"

1. Fragmenty DNA rozdzielić w żelu agarozowym.
2. Umieścić żel na transiluminatorze i wyciąć skalpelem kawałek agarozy z fragmentem DNA (rękawiczki, okulary ochronne).
3. Na dnie Eppendorfówki 0,5 ml umieścić pensetą odrobinę waty szklanej
4. Wycięty kawałek agarozy włożyć do probówki i zamrozić w -20°C lub w ciekłym azocie.
5. Agarozę rozmrozić, zrobić cienką igłą mały otworek w dnie probówki, wstawić do eppendorfówki 1,5 ml i wirować przez 15 min.
6. Do zwirowanego płynu dodać 1/10 objętości 3M octanu sodu pH 5,2 i ekstrahować równą objętością mieszaniny fenol:chloroform:oktanol (25:24:1).
7. Odwirować przez 5 min. w mikrowirówce i zebrać górną warstwę do świeżej Eppendorfówki
8. Dodać 1 μl tRNA (10mg/ml) i 2,5 objętości zimnego etanolu.
9. Inkubować 30 min. w temp. -20°C .
10. Zwirować przez 15 min. w mikrowirówce.
11. Osad przepłukać 70% etanolem i ponownie zwirować.
12. Osad wysuszyć w wirówce pod próżnią (SpeedVac) przez 5 min.
13. Zawiesić w 10 μl TE.

Ligacja DNA

Ligacja polega na tworzeniu kowalencyjnych wiązań fosfodwuestrowych pomiędzy grupami 3'OH i 5'P dwóch sąsiadujących nukleotydów w łańcuchu DNA. Najczęściej stosowanym enzymem do przeprowadzenia tej reakcji jest ligaza faga T4.

Istotnym parametrem reakcji ligacji jest stosunek molowy DNA donorowego do wektorowego. Najczęściej stosuje się proporcję molową 2:1. Często w konkretnym doświadczeniu istnieje konieczność optymalizacji tej proporcji eksperymentalnie. W przypadku małej ilości DNA donorowego można użyć nadmiar wektora.

Stężenie wektora w próbce powinno wynosić 0,02-0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Przy stężeniu 0,01-0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ plazmid zamyka się w kółka, stężenie 0,3-0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sprzyja zaś tworzeniu konkatamerów.

Reakcję ligacji prowadzimy na ogół w niskiej temperaturze, 14-16°C. Taka temperatura sprzyja powstawaniu wiązań wodorowych pomiędzy lepkiymi końcami fragmentów DNA, co zwiększa wydajność reakcji. W przypadku łączenia fragmentów DNA z tępyimi końcami konieczne jest stworzenie takich warunków, aby zwiększyć prawdopodobieństwo ich zetknięcia się. Można to osiągnąć przez dodanie glikolu polietylenowego (PEG) do buforu ligacyjnego. Ponieważ reakcja ligacji tępych końców przebiega wolniej, można wydłużyć czas ligacji lub dodać więcej jednostek enzymu w celu uzyskania większej ilości produktów.

Aktywność enzymu określa się stosując różne jednostki aktywności. Jednostka Weissa jest zdefiniowana jako ilość enzymu wymagana do katalizowania wymiany 1 nmola ^{32}P z pirofosforanu do ATP. Jednostka aktywności ligacji lepkich końców jest zdefiniowana jako ilość enzymu wymagana do uzyskania 95% ligacji 1 μg fragmentów HindIII faga λ w czasie 20 min. w 16 °C. Taka jednostka odpowiada 0,01 jednostek Weissa, a 1 jednostka Weissa odpowiada 67 jednostkom ligacji lepkich końców.

W próbce należy mieszać odpowiednią ilość (patrz wyżej) donorowego i wektorowego DNA, 1/10 objętości mieszaniny reakcyjnej buforu do ligacji oraz wody do końcowej objętości 10-20 μl . Następnie należy dodać odpowiednią ilość ligazy (na ogół stosuje się ok. 1 jednostki ligacji Weissa, co stanowi ogromny nadmiar w stosunku do końców DNA).

Skład buforu do ligacji (10 \times) zależy od rodzaju końców łączonych fragmentów DNA.

lepkie końce	tępe końce
200 mM Tris-HCl, pH 7.5	250 mM Tris-HCl pH 7.5
100 mM MgCl ₂	50 mM MgCl ₂
50 mM ATP	2.5 mM ATP
100 mM DTT	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA
	2.5 mM spermidyna
	7.0 mM β -merkaptoetanol
	10% PEG

Reakcje ligacji przeprowadza się:

- dla lepkich końców 1-24 godz. temp. 14°C
- dla tępych końców 12-24 godz. temp. 14°C

Transformacja *E. coli*

Transformacją nazywamy proces pobierania przez komórki DNA z podłoża. U niektórych bakterii proces ten zachodzi w sposób naturalny. Komórki takich bakterii w pewnych warunkach fizjologicznych osiągają tzw. stan kompetencji i są zdolne do pobierania DNA. U innych bakterii stan kompetencji zostaje wymuszony, np. u *E. coli* poprzez traktowanie komórek jonami Ca^{2+} lub Rb^+ w niskiej temperaturze. Transformacja *E. coli* zachodzi z niską częstością i zależy od rodzaju DNA: najwyższą wydajność uzyskuje się dla DNA plazmidowego w formie CCC, niższą dla formy OC, a najniższą dla formy liniowej. Najczęściej do jednej komórki bakteryjnej wnika tylko jedna cząsteczka DNA. Ma to istotne znaczenie w przypadku, kiedy bakterie transformowane są mieszaniną różnych cząsteczek zrekombinowanego DNA.

Wydajność transformacji *E. coli* plazmidami w formie CCC wynosi 10^5 - 10^9 transformantów na 1 μg DNA i zależy od wielu czynników :

- użytego szczepu bakterii,
- związków chemicznych używanych do wymuszania kompetencji (metoda z zastosowaniem RbCl jest bardziej wydajna),
- fazy wzrostu komórek,
- ilości i wielkości DNA użytego do transformacji,
- czasu inkubacji DNA z komórkami kompetentnymi,
- czasu trwania szoku termicznego,
- **czystości odczynników i szkła,**
- jakości pożywki, na którą wysiewane są transformanty.

Kompetencja komórek gwałtownie spada po 24 godzinach, o ile nie są one przechowywane w odpowiednich warunkach. Komórki zawieszone w 15% roztworze glicerolu i przechowywane w -70°C zachowują swoje właściwości przez szereg tygodni.

Istnieje bardzo wiele różnych metod transformacji *E. coli*. Przedstawiona tu metoda jest jednym z licznych wariantów metody z zastosowaniem CaCl_2

Odczynniki

- 0.1M CaCl_2
- 0.9% NaCl
- glicerol

Przygotowanie bakterii kompetentnych

1. Wyszczepić szczep *E. coli* na pojedyncze kolonie (posiew redukcyjny) na stałe podłoże LB, inkubować 12-24 godz. w temp. 37°C .
2. Zaszczepić 10 ml podłoża LB pojedynczą kolonią i hodować 12-20 godz. z wytrząsaniem, w temp. 37°C .
3. Zaszczepić 50 ml podłoża SOB 0.5 ml nocnej hodowli i inkubować z wytrząsaniem w temp. 37°C do $\text{OD}_{650} = 0,2$ - $0,3$.
4. Hodowlę schłodzić przez 10 min. w lodzie.
5. Bakterie przenieść do sterylnych próbek JA20 i wirować przy 4 krpm. w temp. 0°C przez 5 min.
6. Osad delikatnie zawiesić w 2 ml zimnego roztworu 0.1M CaCl_2 , następnie dodać 0.1M CaCl_2 do objętości 25 ml i inkubować 10 min. w lodzie.
7. Bakterie zwirować jak wyżej.
8. Osad zawiesić w 1 ml zimnego roztworu 0.1 M CaCl_2 i inkubować 30 min. w lodzie LUB w 1 ml zimnego roztworu: 85% (v/v) 0,1 M CaCl_2 , 15% glicerol, rozporcjować po 200 μl do schłodzonych eppendorfówek i zamrozić w temp -70°C .

Transformacja *E. coli*

1. Do schłodzonej w lodzie eppendorfówki przenieść 200 μ l kompetentnych bakterii i dodać 50-100 ng DNA **LUB** eppendorfówkę z zamrożonymi bakteriami kompetentnymi wstawić do lodu i po rozmrożeniu dodać DNA (j.w.).
2. Inkubować 30 min. w lodzie.
3. Przenieść do łaźni wodnej o temp. 42 °C i inkubować przez 90 sek.
4. Schłodzić w lodzie (1 min.)
5. Dodać 1 ml pożywki SOB i inkubować 1 godz. z wytrząsaniem.
6. Wysiewać na podłoże selekcyjne:
 - a. w przypadku selekcji na antybiotyki wysiewać bezpośrednio na podłoże kompletne LB z antybiotykiem i inkubować przez noc w temp. 37 °C.
 - b. w przypadku selekcji na wymaganie pokarmowe:
 - bakterie zwirować w mikrowirówce przez 1 min.
 - zawiesić w 1 ml soli fizjologicznej (0,9% NaCl)
 - bakterie ponownie zwirować
 - zawiesić w 200 μ l soli fizjologicznej.
 - wysiewać na podłoże minimalne M9
 - inkubować 2 dni w temp. 37°C.

Podłoża (skład patrz Dodatek):

- podłoże kompletne LB płynne
- podłoże kompletne LB stałe
- podłoże płynne SOB
- podłoże minimalne M9 stałe (200 ml podłoża przygotowuje się poprzez zmieszanie 100 ml soli M9 2x stężonych ze 100 ml 3% agaru i dodanie po 2 ml 20% glukozy, 0,1 M MgSO₄ i 0,01 M CaCl₂ oraz odpowiednich składników pokarmowych [20 μ g/ml L-aminokwasów; 1 μ g/ml witamin])
- Ampicylina (Polfa) 500 x stężona: 100 mg/ml w 75% etanolu, przechowywana w -20°C.
- X-gal (500 x stężony): 2% roztwór w dimetyloformamidzie, przechowywany w -20°C.
- IPTG (500 x stężony): 100 mM, przechowywany w -20°C.

Transformacja *E. coli* przy zastosowaniu elektroporacji

Elektroporacja, czyli pobieranie DNA po zadziałaniu na komórki krótkim impulsem elektrycznym, jest szybką i wydajną metodą transformacji. Przygotowanie bakterii elektrokompetentnych jest prostsze niż w przypadku transformacji chemicznej. Po wyhodowaniu bakterii do fazy logarytmicznej, schładza się je, przemywa intensywnie wodą w celu zmniejszenia siły jonowej zawiesiny, a następnie zawiesza w zimnym buforze zawierającym 10% glicerol. Elektroporację można przeprowadzać od razu albo przechowywać bakterie w -70°C do 6 miesięcy przez elektroporacją.

Elektroporacja następuje pod wpływem krótkiego wysokonapięciowego wyładowania elektrycznego (12,5-15 kV cm⁻¹). Optymalne wydajności uzyskuje się dla małej objętości gęstej zawiesiny bakteryjnej (ok. 2x 10¹⁰/ml) w specjalnych kuwetach z odpowiednio oddalonymi od siebie elektrodami. Proces jest zależny od temperatury i najlepiej przeprowadzać go w temp. 0-4°C. Wydajność spada 100-krotnie w temperaturze pokojowej.

Elektroporację przeprowadza się przy małym stężeniu DNA (ok. 10 pg/ml), aby zminimalizować pobieranie przez komórkę więcej niż jednej cząsteczki DNA.

Materiały

10% glicerol

Pożywka LB płynna

Pożywka SOB płynna

Kuwety do elektroporacji: odległość elektrod 0,2 cm. **Uwaga!** Kuwety są w zasadzie jednorazowe, ale można ich używać wielokrotnie po dokładnym umyciu wodą destylowaną, a następnie przepłukaniu etanolem i starannym wysuszeniu (można je przechowywać po etanolem do czasu ponownego użycia).

Przygotowanie bakterii elektrokompetentnych

1. Wyszczepić szczep *E. coli* na pojedyncze kolonie na stałe podłoże LB, inkubować 12-24 godz. w temp. 37°C.
2. Zaszczepić 50 ml podłoża LB pojedynczą kolonią i hodować 12-20 godz. z wytrząsaniem w temp. 37°C.
3. Zaszczepić 2 x 500 ml podłoża LB 25 ml/kolbę nocnej hodowli i inkubować z wytrząsaniem w temp. 37°C do $OD_{600} = 0,4$.
4. Hodowlę schłodzić przez 15 min. w lodzie.
5. Bakterie przenieść do sterylnych probówek wirówkowych i wirować przy 3000 rpm. w temp. 4°C przez 15 min.
6. Zlać supernatant i osad delikatnie zawiesić w 500 ml schłodzonej w lodzie czystej (mili Q) wodzie.
7. Bakterie zwirować przy 3000 rpm przez 20 min. w temp. 4°C. Zlać supernatant i osad zawiesić w 1 ml schłodzonego w lodzie glicerolu
8. Pobrać 10 μ l, zawiesić w 1 ml i zmierzyć OD_{600} . Doprowadzić wyjściową zawiesinę bakterii kompetentnych do gęstości 2×10^{10} - 3×10^{10} komórek/ml ($1,0 OD_{600} = 2,5 \times 10^8$ komórek/ml).
9. Rozporcjować zawiesinę po 40 μ l do schłodzonych eppendorfówek, zamrozić w ciekłym azocie i przenieść do -70°C.

Elektroporacja

1. Eppendorfówkę z zamrożonymi bakteriami wstawić do lodu razem z kuwetami do elektroporacji
2. Po rozmrożeniu do bakterii dodać DNA (nie więcej niż 5 ng czystego plazmidu). **UWAGA!** Roztwór DNA powinien być odsolony. Soli można pozbyć się przez mikrodializę (patrz rozdział: Wytrącanie kwasów nukleinowych, str. 22).
3. Inkubować w lodzie przez 30-60 sek.
4. Nastawić aparat do elektroporacji na pojemność 25 μ F, napięcie 2,5V i opór 200 ohm.
5. Przenieść mieszaninę DNA/komórki do schłodzonej kuwety. Upewnić się, że zawiesina znajduje się na dnie kuwety. Osuszyć kuwetę z zewnątrz i umieścić w elektroporatorze.
6. Włączyć puls elektryczny: 4-5 milisekund, siła pola 12,5 kV/cm.
7. Tak szybko, jak to możliwe wyjąć kuwetę z elektroporatora i dodać 1 ml pożywki płynnej SOB o temp. pokojowej.
8. Dodać 1 ml pożywki SOB i inkubować 1 godz. z wytrząsaniem w temp. 37°C.
9. Wysiewać na podłoże selekcyjne (100 μ l zawiesiny nierozcieńczonej plus rozcieńczenia 10^{-1} , 10^{-2}).

Izolacja DNA plazmidowego

Istnieje szereg metod otrzymywania plazmidowego DNA, z których każda obejmuje trzy etapy:

- hodowla bakterii niosących plazmid
- zebranie bakterii i ich liza
- oddzielenie plazmidowego DNA od genomowego DNA

Mimo, że w poszczególnych metodach etapy te przebiegają w odmienny sposób, wykorzystuje się w nich dwie istotne różnice pomiędzy DNA genomowym *E.coli* a DNA plazmidowym:

1. DNA genomowy jest wielokrotnie większy od DNA plazmidowego.
2. W czasie procesu otrzymywania DNA plazmidowego, DNA genomowy zostaje trwale zniszczony, podczas gdy DNA plazmidowy pozostaje na ogół w postaci kowalennie zamkniętych cząsteczek (tzw. forma CCC).

Bakterie zawierające plazmidy hoduje się w warunkach presji selekcyjnej. W celu zwiększenia wydajności preparatyki plazmidów zawierających ori replikacji Col E1 (np. plazmid pBR322 i jego pochodne) można przeprowadzić amplifikację plazmidowego DNA w czasie hodowli bakterii. Zwiększenie liczby kopii plazmidu uzyskuje się poprzez dodanie do hodowli antybiotyku (chloramfenikolu lub spektynomycyny) hamującego syntezę białek, koniecznych do replikacji DNA genomowego. Obecność antybiotyku zatrzymuje syntezę genomowego DNA, nie wpływa natomiast na tempo syntezy plazmidowego DNA. Otrzymuje się w ten sposób do kilkuset razy więcej kopii plazmidu na komórkę.

Kolejne etapy otrzymywania DNA plazmidowego obejmują lizę zebranych bakterii i nieodwracalną denaturację genomowego DNA. W zależności od metody proces ten przeprowadza się w różnych buforach zawierających m.in. lizozym - enzym niszczący ściany komórkowe (Uwaga! lizozym nie działa w $\text{pH} < 8,0$) oraz detergenty (SDS, Triton-X100) destabilizujące błony komórkowe.

W metodzie lizy alkalicznej, która jest najczęściej stosowaną metodą izolacji plazmidowego DNA, bufor o $\text{pH} 12,5$ zawierający NaOH i SDS powoduje całkowitą lizę komórki. W tak wysokim pH zachodzi również denaturacja genomowego DNA, podczas gdy DNA plazmidowy w formie CCC zostaje zdenaturowany na jedynie niewielkich odcinkach. Po dodaniu buforu octanowego, przywracającego mieszaninie neutralne pH , jedynie DNA plazmidowy ulega renaturacji i zostaje w roztworze. Genomowy DNA wraz z białkami i nierozpuszczalną solą potasową siarczanu dodecyłu wytrąca się w postaci serowatego osadu.

W przypadku otrzymywania plazmidowego DNA metodą termiczną czynnikiem denaturującym/renaturującym DNA jest temperatura. W wysokiej temperaturze DNA genomowy i plazmidowy zachowują się podobnie jak w wysokim pH . Oziębienie powoduje renaturację jedynie plazmidowego DNA. DNA genomowy zostaje w postaci zdenaturowanej.

W dalszych etapach oczyszczania plazmidów usuwa się białka, najczęściej stosując ekstrakcję fenolową lub wysalanie octanem amonu i DNA wytrąca się etanolem lub izopropanolem. RNA, który izoluje się razem z plazmidowym DNA można usunąć poprzez trawienie RNazą. Otrzymany w ten sposób plazmidowy DNA może być użyty do większości eksperymentów (trawienie enzymami restrykcyjnymi, ligowanie, transformacja itd.).

Jeżeli chcemy uzyskać bardzo czysty preparat, nie zanieczyszczony genomowym DNA i białkami, możemy zastosować proces ultrawierowania w gradiencie chlorku cezu w

obecności bromku etydydy. W metodzie tej wykorzystuje się fakt, że bromek etydydy interkaluje w większym stopniu do liniowego DNA genomowego, niż do DNA plazmidowego w formie CCC. Tym samym zmniejsza się gęstość pławna DNA genomowego i w gradiencie chlorku cezu DNA plazmidowy ustawia się poniżej DNA genomowego.

Po otrzymaniu plazmidowego DNA należy:

- Oznaczyć jego stężenie. Stężenie DNA można oszacować w żelu agarozowym stosując jako kontrolę DNA o znanym stężeniu (najlepiej użyć kilka rozcieńczeń badanego preparatu). Dokładne stężenie DNA (dla czystych preparatów) oznacza się przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 260 nm stosując zależność, że $E_{260} = 1,0$ odpowiada stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$.
- Ocenić czystość i jakość DNA.
 - Stosunek E_{260}/E_{280} powinien zawierać się w przedziale 1.8-2.0.
 - Aby sprawdzić, czy otrzymany DNA nie ulega degradacji, przeprowadza się tzw. „samotrawienie”, polegające na tym, że próbkę DNA w buforze do trawień pozostawia się na noc w 37°C. Następnie próbkę sprawdza się w żelu agarozowym, jako kontroli używając tego samego DNA nie testowanego w powyższych warunkach.

Izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej

Odczynniki:

- Roztwór I: 50 mM glukoza, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0
- Roztwór II: 0.2 M NaOH, 1% SDS
- Roztwór III: na 100 ml: 60 ml 5M octanu potasu, 11.5 ml lodowatego kwasu octowego, 28.5 ml H₂O
- mieszanina fenol:chloroform:oktanol (25:24:1 v/v), wysycona TE
- izopropanol
- etanol 96%
- etanol 70%
- Bufor TE: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
- RNaza A : roztwór wyjściowy 10 mg/ml. Przed użyciem rozcieńczyć 10x

Izolacja plazmidu na małą skalę - mikrolizaty

1. 1,5 ml pożywki LB uzupełnionej odpowiednim antybiotykiem zaszczerpić eżą bakterii i inkubować przez noc w temp. 37°C, z wytrząsaniem.
2. Hodowle przenieść do eppendorfówki i odwirować w mikrowirówce w ciągu 2 min., dokładnie usunąć pożywkę
3. Bakterie zawiesić w 100 μl roztworu I.
4. Dodać 200 μl roztworu II, łagodnie wymieszać przez kilkukrotne obrócenie próbówki. Pozostawić w lodzie na 5 min.
5. Dodać 150 μl zimnego roztworu III, wytrząsać przez kilkanaście sekund i pozostawić w lodzie przez 10 min.
6. Zwirować 5 min.
7. Supernatant przenieść ostrożnie do nowej eppendorfówki, dodać równą objętość mieszaniny fenol:chloroform:oktanol, wytrząsać przez kilkanaście sekund i zwirować 2 min. Zebrać warstwę wodną do nowej eppendorfówki. W przypadku silnego zabiałczenia preparatu powtórzyć fenolowanie.
8. Dodać 2 objętości 96% etanolu i pozostawić w lodzie 10-15 min.
9. Zwirować 5-10 min., osad przepłukać 70% etanolem, wysuszyć i zawiesić w 20-50 μl TE lub TE z RNazą (10 $\mu\text{g/ml}$).

Izolacja plazmidu na średnią skalę ze 100 ml hodowli

1. Pojedynczą kolonią bakterii zaszczyć 100 ml pożywki LB, uzupełnionej antybiotykiem. Wyrząsać przez noc w temp. 37°C.
2. Hodowlę przenieść do probówek JA14; zwirować 6 krpm, 5 min, 4°C.
3. Zlać pożywkę, jej resztki usunąć pipetą pasteurowską; osad zawiesić w 3 ml roztworu I i przenieść do probówki JA20.
4. Dodać 5 ml roztworu II, delikatnie wymieszać; inkubować 10 min w lodzie.
5. Dodać 4 ml zimnego roztworu III, delikatnie wymieszać; inkubować 15 min. w lodzie.
6. Zwirować 11 krpm, 15 min, 4°C.
7. Supernatant przesączyć przez pojedynczą chusteczkę higieniczną do nowej probówki JA20.
8. Dodać 0,6 objętości izopropanolu; dokładnie wymieszać; inkubować 10 min w temperaturze pokojowej.
9. Zwirować 10 krpm, 15 min., 4°C, usunąć supernatant, dokładnie osączyć osad.
10. Zawiesić w 2 ml buforu TE; przenieść do probówki Corex 15 ml.
11. Dodać 1 ml 7,5M octanu amonu; wymieszać; inkubować 10 min w lodzie.
12. Zwirować 10 krpm, 10 min, 4°C.
13. Supernatant przenieść do nowej probówki Corex; dodać 2,5 objętości etanolu; inkubować w lodzie 10 min.
14. Zwirować 10 krpm, 15 min, 4°C.
15. Osad wysuszyć; zawiesić w 300 µl TE o pH 8.0; przenieść do eppendorfówki
16. Dodać 300 µl mieszaniny fenol:chloroform:oktanol (25:24:1); intensywnie wstrząsnąć; odwirować w mikrowirówce 5 min.
17. Powtórzyć punkt 16.
18. Górną fazę delikatnie zebrać; przenieść do nowej eppendorfówki; dodać 750µl 96% etanolu; inkubować 5 min; zwirować 15 krpm, 15 min, 4°C.
19. Osad przepłukać 70% etanolem; zwirować 15 krpm, 5 min, 4°C; wysuszyć.
20. Zawiesić w 100µl TE 8.0.

Wytrącanie kwasów nukleinowych.

Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworów wodnych przeprowadza się na ogół w celu ich zateżenia i/lub pozbycia się zanieczyszczeń. Do wytrącania najczęściej stosuje się alkohol: etanol lub izopropanol. Istotne parametry przy wytrącaniu DNA to:

- Wielkość cząsteczki (im mniejsza tym większe straty). Standardowe warunki stosuje się przy wytrącaniu cząsteczek większych niż 100 bp
- Stężenie kwasów nukleinowych. Przy niskim stężeniu DNA >20ng/ml do roztworu można dodać jako nośnik tRNA (zwykle 5-10 µg/ml etanolu).
- Rodzaj zastosowanego alkoholu: etanol dodaje się w ilości 2-3 objętości roztworu kwasu nukleinowego, izopropanol 0,6 obj. Etanolu po wytrąceniu łatwiej się pozbyć, ale osad może zawierać sole dodawane do wytrącania. Izopropanol jest mniej lotny i trudniej go usunąć.
- Obecność soli: wytrącanie jest wydajne przy odpowiedniej sile jonowej. Zwykle stosuje się:
 - octan sodu 0,3 M (roztwór podstawowy NaAc: 3 mM, pH 5,2)
 - octan amonu 2-2,5 M (roztwór podstawowy NH₄Ac: 7,5 M lub 10 M). Nie wytrąca dNTP, ale hamuje kinazę polinukleotydową T4.
 - chlorek sodu 0,2 M (roztwór podstawowy NaCl 4M). Nie wytrąca SDS.
 - chlorek magnezu 0,01 M (roztwór podstawowy MgCl₂ 1 M). Strąca efektywnie małe cząsteczki DNA <100 bp.

- chlorek litu 0,8 M (roztwór podstawowy LiCl 8 M). Stosowany głównie do wytrącania RNA. Zaleta: nie wytrąca się etanolem.
- Warunki wytrącania
 - Generalnie im niższa temperatura i dłuższy czas wytrącania, tym wyższa wydajność (ale również możliwość współstrącania zanieczyszczeń). Przy wytrącaniu etanolem zwykle stosuje się temp. 0°C lub -20°C przez 30-60 min., przy wytrącaniu izopropanolem temperaturę pokojową przez 10-30 min.
- Nie należy wytrącać DNA bezpośrednio z roztworów zawierających > 1 mM fosforan i/lub >10 mM EDTA z powodu współstrącania się z kwasami nukleinowymi. W tym przypadku przed strąceniem należy przeprowadzić dializę. **Mikrodializę** można przeprowadzić nakraplając roztwór na membranę Millipore VS 0,025 μm umieszczoną na powierzchni dejonizowanej wody (50-100 ml) i zbierając po 10-30 min. inkubacji w temp. pokojowej
- Wirowanie osadu: im mniejsze stężenie i wielkość cząsteczek, tym wyższe obroty i niższa temperatura. Zwykle wystarcza wirowanie w mikrowirówce w temp. pokojowej (ok. 8-12 tys./obr./min.) przez 15 min. Supernatant po wirowaniu zlewa się (dobrze jest zachować supernatant - możliwość odzyskania DNA w przypadku złego dobrania parametrów strącania) lub odsysa końcówką do pipety automatycznej połączonej z pompką wodną, uważając żeby pozostawić osad (czasem bardzo słabo widoczny).
- Płukanie osadu: zwykle poprzez dodanie 70% etanolu i ponowne wirowanie. **Uwaga na osad!**, często w czasie płukania odkleja się od ścianek probówki (warto zlewać supernatant do czystej probówki).
- Suszenie osadu:
 - na powietrzu trwa dłużej, ale osad łatwiej się rozpuszcza.
 - w wirówce pod próżnią (SpeedVac) ok. 5 minut: szybciej, wydajniejsze pozbywanie się alkoholu, ale mogą być kłopoty z rozpuszczeniem osadu, szczególnie w przypadku wysokocząsteczkowego DNA i dłuższego czasu suszenia. **Uwaga!** Najpierw zapowietrzyć wirówkę, a potem zatrzymać rotor (przy odwrotnej kolejności osad zostanie wyspany).

Znakowanie kwasów nukleinowych

Wiele metod biologii molekularnej opiera się na wykorzystaniu wyznakowanych cząsteczek kwasów nukleinowych. Włączanie znakowanych nukleotydów w procesach enzymatycznych umożliwia badanie transkrypcji, obróbki RNA itp., jest też podstawą takich metod jak sekwencjonowanie DNA. Wyznakowane cząsteczki kwasów nukleinowych wykorzystywane są jako sondy wiążące się z określonymi cząsteczkami DNA (Southern), RNA (Northern) czy białek (South-western). Dla wszystkich tych metod istotna jest możliwość uzyskiwania sondy o wysokiej aktywności, odpowiedniej czystości i specyficzności.

Mimo dużego postępu technik znakowania nieradioaktywnego, w dalszym ciągu najpowszechniej wykorzystywane do znakowania kwasów nukleinowych są cząsteczki nukleotydów, w których jeden z atomów zastąpiony został izotopem radioaktywnym. Zasadniczo stosuje się dwa izotopy — fosfor ^{32}P , włączany w pozycji α lub γ cząsteczki trifosforanu nukleotydu oraz siarkę ^{35}S , włączaną w miejsce atomu tlenu odpowiedniej reszty fosforanowej (α lub γ).

Fosfor ^{32}P emituje promieniowanie β o energii 1,709 MeV — jest to najwyższa energia promieniowania wśród wykorzystywanych w praktyce biologicznej izotopów. Praca z nim wymaga zatem zachowania szczególnej ostrożności. **Próbki zawierające ^{32}P**

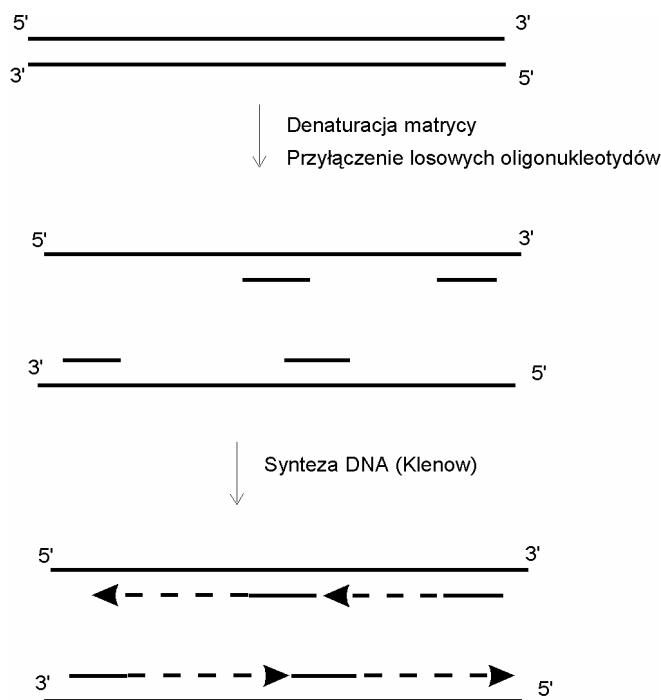
należy przechowywać w specjalnych pojemnikach wyposażonych w warstwę ochronną z ołowiu. Podczas pracy z fosforem należy bezwzględnie używać ekranów ochronnych (1 cm warstwa pleksiglasu hamuje prawie całkowicie promieniowanie ^{32}P), pracować w rękawiczkach i fartuchach (dotyczy to wszystkich izotopów, nie tylko fosforu), zalecane jest noszenie dozymetrów osobistych. Okres półtrwania ^{32}P wynosi 14,3 dni, jest to zatem izotop stosunkowo nietrwały. Wykorzystuje się go wtedy, gdy wymagane jest uzyskanie sondy o wysokiej aktywności - zapewnia wysoką czułość i krótki czas detekcji. Jest standardowo wykorzystywany we wszystkich hybrydyzacjach, doświadczeniach typu *primer extension*, oznaczeniach aktywności transkrypcji itp.

Siarka ^{35}S emituje promieniowanie β o energii 0,167 MeV. Energia ta jest na tyle niska, że nie są wymagane żadne specjalne ekrany ochronne, nie stosuje się też osłon z ołowiu. **Konieczne jest jednak zachowanie ostrożności — w zawierających siarkę preparatach powstają pewne produkty organiczne o dosyć wysokiej lotności. Mogą one być łatwo wchłonięte do organizmu, gdzie ulegną akumulacji. Z preparatami zawierającymi ^{35}S należy zatem pracować pod sprawnym wyciągiem.** Okres półtrwania ^{35}S wynosi 87,4 dni. Podstawowym zastosowaniem ^{35}S jest sekwencjonowanie DNA. W postaci siarczanu stosuje się ją też do badania metabolizmu białek, zaś w postaci metioniny do badań nad translacją.

Od niedawna stosuje się też fosfor ^{33}P , o właściwościach pośrednich pomiędzy omówionymi powyżej izotopami. Główną jego wadą jest wysoka cena.

W zależności od konkretnego zastosowania, wykorzystywane są różne metody znakowania DNA. Niektóre z nich (*nick translation* oraz *random priming*) prowadzą do otrzymania sondy wyznakowanej losowo na całej długości, inne zaś znakują specyficznie końce nici DNA. Stosuje się też sondy RNA generowane w procesie transkrypcji *in vitro* przy użyciu radioaktywnych substratów. Poniżej omówiono w skrócie podstawowe metody znakowania DNA.

- *Nick translation* jest metodą stosowaną obecnie coraz rzadziej. Opiera się na wykorzystaniu aktywności dwóch enzymów: DNazy I i DNA polimerazy I. DNaza I wprowadza do cząsteczki jednoniciowe pęknięcia (*nick*), które są następnie miejscem działania polimerazy I. Enzym ten, dzięki swej aktywności 5'-3' egzonukleazy, usuwa "przed sobą" nukleotydy, a "za sobą" dobudowuje nowe "przesuwając", niejako miejsce pęknięcia. W trakcie syntezy wbudowywane są radioaktywne nukleotydy. Otrzymywany jest w ten sposób preparat DNA o aktywności specyficznej do 10^8 dpm/ μg DNA, a wydajność inkorporacji wynosi ok. 50%. Metoda ta lepiej nadaje się do znakowania całych plazmidów, nie jest zalecana do fragmentów liniowych.
- *Random priming* jest obecnie podstawową metodą znakowania DNA. Wykorzystuje się tutaj krótkie oligonukleotydy (6-9 nt) o losowej sekwencji. Do zdenaturowanej matrycy DNA dodaje się mieszaninę oligonukleotydów, które łączą się ze znakowanym DNA. Następnie dodawany jest enzym, który syntetyzuje DNA z wykorzystaniem tych fragmentów jako starterów. Enzymem tym jest fragment Klenowa - fragment polimerazy I, nie posiadający aktywności 5'-3' egzonukleolitycznej. Syntetyzując komplementarną nić DNA, enzym włącza radioaktywny nukleotyd. Można w ten sposób otrzymać sondy o aktywności dochodzącej do 10^9 dpm/ μg DNA. Metoda ta pozwala na wydajne znakowanie zarówno całych plazmidów, jak i liniowych fragmentów, np. izolowanych z żelu.



Schemat znakowania DNA metodą *random priming*

- Znakowanie DNA na końcach.

- ◆ Znakowanie 5' końca fragmentu DNA przy użyciu kinazy polinukleotydowej faga T4. Kinaza polinukleotydowa przenosi grupę fosforanową z pozycji γ ATP na DNA lub RNA zawierające grupę -OH na 5' końcu. Normalnie cząsteczki DNA zawierają na 5' końcu grupę fosforanową, przed znakowaniem należy zatem poddać je działaniu alkalicznej fosfatazy w celu jej usunięcia. Jest to podstawowa metoda znakowania syntetycznych oligonukleotydów (nie jest wówczas oczywiście konieczne stosowanie fosfatazy).
- ◆ Znakowanie 3' końca fragmentu DNA przy użyciu terminalnej transferazy. Substratem dla terminalnej transferazy są zarówno jednoniciowe, jak i dwuniciowe cząsteczki DNA. Enzym dołącza deoksyrybonukleotydy na 3' końcu, nie wymagając matrycy.
- ◆ Wypełnianie lepkich końców przy użyciu fragmentu Klenowa. Enzym ten wypełnia brakujące na 3' końcu nukleotydy w cząsteczkach strawionych enzymami restrykcyjnymi pozostawiającymi 5' lepkie końce. Dobierając odpowiedni enzym i radioaktywny trifosforan nukleotydu, można uzyskać specyficzne znakowanie 3' końca określonych cząsteczek.

Zależnie od użytej metody osiąga się wydajność inkorporacji od 50% do nawet 90%. Pozostające nie włączone radioaktywne trifosforany nukleotydów mogą ujemnie wpływać na jakość hybrydyzacji, powodując nadmiernie wysokie tło. Po znakowaniu warto zatem oddzielić nie włączone nukleotydy poprzez sączenie na kolumnkach z Sephadex'em G-50, który zatrzymuje związki drobnocząsteczkowe, przepuszczając makrocząsteczki.

Poniżej podano przepis znakowania metodą *random priming* wg instrukcji do zestawu do znakowania DecaLabel firmy Fermentas.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

- Bufor do znakowania 5x stężony (Tris-HCl pH 8,0; 25 mM MgCl₂; 5 mM-DTT; losowe oligonukleotydy-dekamery 12,5 u/ml)
- Mieszanina nukleotydów minus dATP (Mix A): dTTP, dGTP, dCTP, 0,33 mM każdy
- DNA do wyznakowania (30-100 ng)
- Nukleotyd radioaktywny α - ³²P dATP, 3000 Ci/mmol
- Mieszanina nukleotydów (dNTP Mix): dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 0,25 mM każdy
- Fragment Klenowa exo⁻ (5 jednostek/ μ l)
- Woda bidestylowana.

Wykonanie

1. Do eppendorfówki odpipetować DNA, 5 μ l buforu do znakowania i dopełnić wodą do 22 μ l.
2. Zdenaturować przez ogrzanie we wrzącej łaźni wodnej przez 5 min., a następnie szybko schłodzić w lodzie.
3. Do próbki dodać 1,5 μ l MixA, 1 μ l (10 μ Ci) izotopu (**UWAŻNIE!**) i 0,5 μ l enzymu (2,5 jednostki).
4. Reakcję prowadzić w 37°C przez 5 min.
5. Dodać 2 μ l dNTP i inkubować przez 5 min. w 37°C.
6. Po wyznakowaniu dodać Blue-Dextran, nałożyć na kolumnkę z Sephadex'em G-50 zebrać frakcję zabarwioną na niebiesko. **UWAGA:** kolumnka po użyciu jest odpadem radioaktywnym!
7. Odpipetować 1 μ l sondy do eppendorfówki i zmierzyć aktywność. Obliczyć aktywność właściwą oraz wydajność znakowania.
8. Przed hybrydyzacją ZDENATUROWAĆ sondę!

Pomiar aktywności sondy.

Jednostki aktywności preparatów izotopowych.

Podstawowym parametrem fizycznym preparatu izotopowego jest jego **aktywność**. Aktywność promieniotwórcza definiowana jest jako liczba aktów emisji cząstek α , cząstek β lub kwantów γ zachodzących w próbce substancji promieniotwórczej w jednostce czasu. Jednostką aktywności w układzie SI jest s⁻¹. Jednostka ta nosi miano **bekerela (Bq)**. Często stosowaną jednostką spoza układu SI jest **kiur (Ci)**. 1 Ci odpowiada 3,7 x 10¹⁰ Bq. Aktywność preparatów promieniotwórczych stosowanych w biologii wyraża się zazwyczaj w μ Ci (10⁻⁶ Ci).

Oprócz całkowitej aktywności próbki istotnym jej parametrem jest jej **aktywność właściwa**, wyrażana w jednostkach aktywności na jednostkę objętości, masy lub liczbę moli preparatu. Aktywność właściwa preparatów izotopowych stosowanych jako substrat do znakowania i sekwencjonowania DNA wynosi standardowo 10 μ Ci/ μ l.

Urządzenia przeznaczone do pomiaru aktywności promieniotwórczej zliczają zarejestrowane rozpady promieniotwórcze w jednostce czasu. Podstawową jednostką skali tych urządzeń będzie więc **zliczenie na minutę (sekundę)**, oznaczane odpowiednio jako **cpm** (ang. *counts per minute*) lub **cps** (*counts per second*). Dla celów biologii molekularnej można przyjąć, że w przypadku pomiaru w liczniku scyntylicyjnym, liczba zliczeń w jednostce czasu odpowiadać będzie liczbie rozpadów promieniotwórczych w jednostce czasu, wyrażanych w **dpm** (*disintegrations per minute*). Te zaś można, już po

dokonaniu stosownych przeliczeń, bezpośrednio czasu na aktywność preparatów izotopowych

Aktywność preparatu izotopowego maleje z upływem czasu. Dla wygody trwałość izotopu określa się poprzez wartość okresu półtrwania $T_{1/2}$. Wartość ta określa średni czas, po którym aktywność próbki wynosi połowę aktywności początkowej. Do obliczania aktywności preparatu stosuje się odpowiednie tabele rozpadu, które znaleźć można w katalogach firm sprzedających związki radioaktywne.

Warto w tym miejscu nadmienić, że błędem jest kompensowanie spadku aktywności preparatu znakowanego nukleotydu zwiększaniem jego ilości w reakcji. Zwiększa się w ten sposób całkowite stężenie dodawanego nukleotydu, co może niekorzystnie zmienić warunki reakcji enzymatycznej.

Preparatów DNA wyznakowanego fosforem ^{32}P nie należy zbyt długo przechowywać, może bowiem dojść do radiolizy cząsteczek DNA. Preparaty znakowane siarką ^{35}S są trwalsze.

Pomiar aktywności otrzymanej sondy

1. Odpipetować do eppendorfówki 1 μl sondy, otrzymanej w p. 4 powyżej. Eppendorfówkę umieścić w naczynku scyntylicyjnym.
2. Zmierzyć aktywność w liczniku scyntylicyjnym. Oszacować całkowitą objętość preparatu sondy i obliczyć całkowitą aktywność uzyskanego preparatu.
3. Uwzględniając ilość użytego do znakowania DNA, obliczyć aktywność właściwą sondy w przeliczeniu na μg DNA.
4. Obliczyć całkowitą aktywność sondy w μCi . Obliczyć wydajność reakcji znakowania (w %), uwzględniając aktywność użytego izotopu (zwykle 10 μCi).
5. Powtórzyć obliczenie z p. 4 uwzględniając wiek użytego preparatu izotopu.

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych na filtrach

Hybrydyzacja jest to reasocjacja komplementarnych nici kwasów nukleinowych. Najczęściej stosowanymi technikami hybrydyzacji, umożliwiającymi identyfikację specyficznych sekwencji DNA i RNA są odpowiednio Southern i Northern. Metody te polegają na przeniesieniu na filtr rozdzielonych uprzednio w żelach kwasów nukleinowych i hybrydyzacji filtru z wyznakowaną sondą.

Filtry wykorzystywane w procedurach hybrydyzacji

Podstawowym elementem technik Southern i Northern jest przeniesienie materiału z żelu na odpowiedni filtr a następnie utrwalenie go.

Wybór różnych filtrów produkowanych przez czołowe firmy, takie jak Amersham, BioRad czy Promega, jest bardzo szeroki. Każdy producent przedstawia tabelę ułatwiającą dobór filtru do konkretnego zastosowania. Poniżej przedstawiono jedynie zarys podstawowych typów filtrów i ich zastosowań.

Niezależnie od rodzaju używanego filtru i prowadzonego eksperymentu należy przestrzegać kilku podstawowych zasad:

- Nigdy nie wolno dotykać powierzchni filtru palcami. Wszelkie manipulacje z filtrem należy prowadzić w rękawiczkach, na czystym i suchym stole. Należy unikać wyciągania filtru pomiędzy ochronnych przekładek, gdy nie jest to konieczne.
- Z filtrów dostarczanych w rolkach lub arkuszach należy samemu wyciąć odpowiedni kawałek. Ciąć trzeba ostrym skalpelem lub nożyczkami, posługując się narysowanymi

wcześniej na przekładce ochronnej liniami. Należy starannie planować cięcie tak, aby zminimalizować straty na ścinkach.

- Należy przestrzegać wskazówek producenta dotyczących sposobu przechowywania filtru. W każdym przypadku trzeba unikać wilgoci, wysokich temperatur i światła.
- Przed ułożeniem transferu należy filtr delikatnie zwilżyć, kładąc go na powierzchnię tacki z roztworem 5 x SSC (nie wpychać pod powierzchnię na siłę). Warto to zrobić nawet wtedy, gdy nie jest to absolutnie niezbędne (w przypadku filtrów nylonowych).
- Przed użyciem należy sprawdzić datę ważności filtru. Filtry przeterminowane tracą często swoje właściwości, co może przyczynić się do niepowodzenia eksperymentu.
- Pisać i rysować na filtrze można jedynie miękkim ołówkiem lub długopisem typu BIC. Flamastry są wykluczone.

Filtry nitrocelulozowe

Nitroceluloza była jednym z najwcześniej opracowanych i najpowszechniej wykorzystywanych materiałów do transferu kwasów nukleinowych oraz białek. Do dzisiaj jest rutynowo wykorzystywana jako niezawodny filtr w wielu zastosowaniach.

Filtry wykonane z czystej nitrocelulozy są bardzo kruche, zwłaszcza po wysuszeniu. Należy traktować je bardzo delikatnie. Z tego też względu niezbyt nadają się do wielokrotnej dehybrydyzacji i rehybrydyzacji oraz do hybrydyzacji kolonijnej. Filtry z czystej nitrocelulozy mają zwykle w nazwie literę C (np. Hybond-C firmy Amersham).

Powyższej wady pozbawione są filtry z nitrocelulozy wzmacnianej, które otrzymywane są przez umieszczenie warstwy nitrocelulozy na cienkiej siateczce z tworzywa sztucznego. Mają one dostateczną wytrzymałość mechaniczną przy zachowaniu praktycznie wszystkich właściwości klasycznych filtrów nitrocelulozowych. W nazwie takich filtrów pojawia się zwykle określenie supported i oznaczenie C+ lub C extra.

Utrwalania materiału przeniesionego na filtr nitrocelulozowy dokonuje się poprzez zapiekanie w temperaturze 80°C w próżni (lub w atmosferze azotu). **Nie wolno zapiekać nitrocelulozy w podwyższonej temperaturze w atmosferze zawierającej tlen — nitroceluloza jest materiałem łatwopalnym i może nawet dojść do eksplozji.** Utrwalanie przy pomocy promieni UV daje w przypadku nitrocelulozy gorsze wyniki.

Głównym obszarem zastosowań nitrocelulozy jest obecnie transfer białek (metoda Western). Nitroceluloza jest tu podstawowym materiałem, gdyż nylon do tych celów się nie nadaje. Filtry nitrocelulozowe działają też dobrze w transferach RNA (Northern) oraz DNA (Southern), aczkolwiek są wypierane z tych zastosowań przez filtry nylonowe.

Filtry nylonowe

Opracowanie filtrów nylonowych przyczyniło się do wyparcia nitrocelulozy z wielu zastosowań w hybrydyzacji kwasów nukleinowych. **Filtry nylonowe nie nadają się do transferu białek**, przy transferze kwasów nukleinowych górują jednak nad nitrocelulozą.

Podstawowe zalety filtrów nylonowych to: wysoka czułość (do sześciu razy wyższa niż dla nitrocelulozy), znaczna wytrzymałość mechaniczna i większa odporność na niekorzystne warunki przechowywania oraz możliwość zastosowania szybkich metod utrwalenia przez naświetlanie UV.

Istnieją dwie główne odmiany filtrów nylonowych: zwykłe i naładowane dodatnio. Zwykły nylon jest obecnie podstawowym filtrem wykorzystywanym w hybrydyzacji DNA i RNA. Może być wielokrotnie dehybrydyzowany i rehybrydyzowany. Kwasy nukleinowe można utrwalić na filtrze nylonowym przy pomocy naświetlania UV (na transiluminatorze

lub w specjalnym urządzeniu — *cross-linker*) lub przez zapiekanie w temp. 80°C. Zapiekać można w powietrzu, gdyż nylon nie jest łatwopalny. Filtry nylonowe mają zwykle w nazwie literę N (np. Hybond N firmy Amersham).

Filtry nylonowe naładowane dodatkowo różnią się zasadniczo tolerancją na pH zasadowe. Przy pracy ze zwykłym nylonem należy unikać zbyt zasadowego pH (żel po denaturacji należy zneutralizować). Filtry z nylonu naładowanego dodatkowo są odporne na działanie wysokiego pH i dzięki temu możliwy jest transfer alkaliczny. Traktowanie roztworem zasady jest też sposobem na trwałe związanie DNA z filtrem, metoda ta jest jednak mniej niezawodna niż naświetlanie UV. Filtry z nylonu naładowanego dodatkowo mogą gorzej spisywać się przy transferze RNA (Northern), ich odporność na zasady jest tu zresztą i tak bezużyteczna. Z tego powodu filtry te zaleca się głównie do pewnych typów transferów DNA (Southern). Dane niektórych producentów sugerują, że filtry z nylonu naładowanego dodatkowo mają przewagę nad zwykłym nylonem przy stosowaniu nie radioaktywnych metod znakowania i detekcji kwasów nukleinowych. W nazwie filtry te zawierają zwykle oznaczenie N+.

Poza wymienionymi powyżej głównymi typami filtrów, produkowanych jest też szereg wariantów przeznaczonych do specjalnych zastosowań (np. specjalne filtry nitrocelulozowe do określonych metod detekcji białek, czy do badania glikoprotein albo filtry nylonowe przeznaczone do diagnostyki medycznej metodą RFLP — tu liczy się głównie bardziej rygorystyczna kontrola jakości).

Filtry dostarczane są w postaci rolek, arkuszy lub przyciętych kótek o wielkości odpowiadającej rozmiarom szalki Petriego — do hybrydyzacji kolonijnej lub łysinkowej. Praktycznie wszystkie produkowane obecnie filtry są dwustronne i mogą być używane w dowolnej orientacji. Filtry stosowane dawniej były jednostronne, stąd w literaturze znaleźć można jeszcze opisy odróżniania właściwej strony filtru.

Przy projektowaniu eksperymentu należy zawsze kierować się wskazówkami producenta zawartymi w dołączonej do filtru broszurze. Większość standardowych protokołów daje się jednak zastosować do typowych filtrów bez większych modyfikacji.

Hybrydyzacja

Filtr, na którym unieruchomione zostały rozdzielone odpowiednio cząsteczki kwasów nukleinowych, czy to jako obraz żelu po elektroforezie, czy też rozmieszczenia kolonii lub łysinek na szalce, poddaje się hybrydyzacji, wykorzystując wyznakowane radioaktywnym izotopem sondy. Dzięki temu można zidentyfikować obszar filtru, do którego związały się cząsteczki o określonej sekwencji.

Każda hybrydyzacja składa się zasadniczo z trzech etapów: prehybrydyzacji, właściwej hybrydyzacji i płukania filtru.

Prehybrydyzacja polega na moczeniu filtru w odpowiednim roztworze, którego składniki blokują miejsca mogące związać kwasy nukleinowe na filtrze. Materiały, z których robi się filtry (nitroceluloza, nylon) mają oczywiście wysokie powinowactwo do DNA i RNA - jest to podstawą ich funkcjonowania. Po przeniesieniu badanego materiału na filtr należy jednak możliwość tę zablokować, aby uniknąć dalszego, niespecyficznego wiązania się sondy (jest nią przecież DNA lub ew. RNA!) z całą powierzchnią filtru. Dlatego po utrwaleniu filtru, przed dodaniem sondy, traktuje się go odpowiednim roztworem zawierającym wysokocząsteczkowe substancje blokujące miejsca wiążące kwasy nukleinowe na filtrze. Od efektywności prehybrydyzacji zależy uzyskanie w eksperymencie niespecyficznego tła, dobra prehybrydyzacja zapewnia więc wysoką czułość i specyficzność.

Istnieje wiele różnych metod prehybrydyzacji, wybór jednej z nich zależy od warunków, typu eksperymentu (Southern, Northern), rodzaju filtru a także preferencji eksperymentatora. Stosuje się kilka podstawowych rodzajów roztworów prehybrydyzacyjnych:

- Supermix (Church buffer) zawiera 1% BSA, 1mM EDTA, 0.5M bufor fosforanowy, 7% SDS. Przed użyciem należy rozpuścić wytrącony w buforze SDS. Siła buforująca roztworu jest bardzo duża, co pozwala na denaturację sondy w 100mM NaOH. Najlepszy ze znanych buforów prehybrydyzacyjnych, stosowany w analizach typu Southern i Northern.
- odczynnik Denhardta, zawiera BSA (*Bovine Serum Albumine*), PVP (*polivinylopyridone*) oraz Ficoll-400. Przygotowuje się go w stężeniu 50x (po 2% każdej z w/w. substancji), stężenie robocze to 1x lub 2x. 50x stężony odczynnik Denhardta jest trwały, jeżeli przechowuje się go w temp. -20°C, najlepiej rozpipetowany na małe porcje, aby uniknąć wielokrotnego rozmrażania i zamrażania. Daje dobre wyniki w szeregu zastosowań (Southern, Northern), wadą jest wysoki koszt składników. Niekiedy dodaje się również siarczanu dekstranu.
- BLOTTO - czyli po prostu odtłuszczone mleko w proszku, stężenie końcowe 0,25%. Skuteczny i tani sposób prehybrydyzacji, pozwalający na uproszczenie metody i zmniejszenie kosztów. Nie zalecany do metody Northern (może zawierać RNazy)! Roztwory z mlekiem należy przygotowywać na świeżo, nie nadają się one bowiem do dłuższego przechowywania.

Do roztworu prehybrydyzacyjnego dodaje się oczywiście również soli w odpowiednim stężeniu. Zależnie od warunków hybrydyzacji (patrz uwagi poniżej) stosuje się najczęściej SSC w stężeniu od 3x do 6x. Niekiedy stosuje się SSPE (buforowany buforem fosforanowym), głównie przy Northern'ach. Roztwór ten zawiera również SDS w stężeniu 0.1%.

Stosuje się także gotowe roztwory dostępne komercyjnie, np. PERFECTHYBTMPLUS firmy Sigma. Roztwory takie często pozwalają na skrócenie czasu hybrydyzacji, zmniejszają niespecyficzny sygnał i mogą być dłużej przechowywane. PERFECTHYBTMPLUS został opracowany zarówno dla hybrydyzacji Northern jak i Southern, pozwala na kilkuminutową prehybrydyzację i 3 godzinną hybrydyzację (przy prostych hybrydyzacjach jak np. do produktów PCR lub plazmidów czas może być skrócony do 30 minut). Do płukania filtrów (patrz niżej) po hybrydyzacji w tym buforze wykorzystuje się standardowe bufony na bazie SDS i SSC.

Jeżeli zależy nam na zminimalizowaniu tła wynikającego z hybrydyzacji sondy do losowych cząsteczek DNA lub RNA (np. przy hybrydyzacji z totalnym DNA), do roztworu prehybrydyzacyjnego dodaje się również nie homologicznego DNA nośnikowego (*carrier*), którym najczęściej jest DNA spermy łososa. *Carrier* należy zawsze zdenaturować przed dodaniem. DNA nośnika dodaje się do stężenia 100 µg/ml. Kosztowną alternatywą, stosowaną głównie przy niektórych hybrydyzacjach RNA-DNA, jest użycie tRNA jako nośnika.

Warunki (stężenie soli, temperatura, ew. użycie nośnika, substancja blokująca) prehybrydyzacji są takie same jak właściwej hybrydyzacji (patrz uwagi poniżej). Czas od 1h (proste hybrydyzacje) do kilku godzin.

Hybrydyzacja właściwa to ten etap procedury, w którym wyznakowana sonda wiąże się z unieruchomionymi na filtrze kwasami nukleinowymi. Dobranie odpowiednich warunków hybrydyzacji zapewnia specyficzność - wiązanie sondy tylko z określonymi fragmentami - oraz czułość. Jeżeli wykrywamy sekwencję identyczną lub o wysokiej homologii zastosujemy ostrzejsze (*stringent*) warunki, niż dla wykrycia sekwencji o

słabszym stopniu homologii. Ustalenie odpowiednich dla danego eksperymentu warunków wymagać może wielu prób, poniżej podano jedynie podstawowe wskazówki. Należy pamiętać o umieszczeniu w eksperymencie odpowiednich kontroli - pozytywnej i negatywnej. Bez nich ustalenie odpowiednich warunków będzie niemożliwe.

Hybrydyzację prowadzi się w takim samym roztworze, jak użyty do prehybrydyzacji. Czynniki wpływającymi na "ostrość" (*stringency*) warunków są: temperatura, stężenie soli i ew. dodatek formamidu. Wzrost temperatury powoduje oczywiście zwiększenie wymagań co do homologii sekwencji. Typowa temperatura dla hybrydyzacji o pełnej (lub bardzo wysokiej) homologii to 65°C, sekwencje o częściowej homologii hybrydują się w temp. ok 55°C. Możliwe jest teoretyczne przewidzenie temperatury hybrydyzacji dla znanej sekwencji i stopnia homologii (trzeba uwzględnić zawartość par GC), w praktyce metody obliczeniowe nie zastąpią doświadczenia. Bardzo istotnym czynnikiem jest stężenie soli w roztworze hybrydyzacyjnym. Im mniejsze stężenie soli, tym "ostrzejsza" hybrydyzacja. Częściej jednak manipuluje się temperaturą, niż składem mieszaniny. Dodatek formamidu pozwala na znaczne obniżenie temperatury hybrydyzacji. Hybrydyzację, która normalnie wymaga temperatury 65°C, można prowadzić w temperaturze 42°C, w roztworze zawierającym 50% formamid. Formamid stosuje się głównie w hybrydyzacji RNA-DNA, stanowi on dodatkowe zabezpieczenie przed aktywnością RNaz. Podobnie, jak dla prehybrydyzacji, do hybrydyzacji dodać można *carrier* DNA. Niekiedy, dla oszczędności, dodaje się go jedynie do hybrydyzacji, pomijając go w składzie roztworu prehybrydyzacyjnego.

Sondę przed dodaniem do hybrydyzacji należy oczywiście zdenaturować! Bezpieczna i wygodna metoda denaturacji radioaktywnej sondy polega na dodaniu roztworu NaOH do stężenia 100mM (dodajemy 1/10 objętości 1M NaOH). Można też stosować termiczną denaturację jak przed znakowaniem sondy ale trwa to dłużej i może spowodować „wystrzelenie” pod ciśnieniem pary radioaktywnej zawartości próbówki. **Sondy do znakowania nie denaturujemy chemicznie!** Hybrydyzację prowadzi się zasadniczo przez noc, w najprostszych przypadkach może jednak wystarczyć nawet 1 godzina.

Płukanie pozwala na usunięcie nie zhybrydyzowanej sondy, a zatem na uzyskanie obrazu specyficznej hybrydyzacji. Zasadniczo filtr płucze się roztworami zawierającymi sól (SSC) w stężeniach mniejszych niż w pre- i hybrydyzacji z dodatkiem 0.1% SDS. Czas, temperatura i skład płukania zależą od konkretnej metody. Najczęściej wystarczy kilka płukań roztworem 2xSSC, 0.1%SDS w temp. pokojowej, niekiedy wymagany jest dodatkowy etap płukania 0.1xSSC, 0.1%SDS w podwyższonej temperaturze. Postęp płukania można weryfikować licznikiem Geigera. **UWAGA** - roztwór sondy i roztwory po pierwszych płukaniach są radioaktywne, należy pamiętać o odpowiednich środkach ostrożności.

Technika Southern

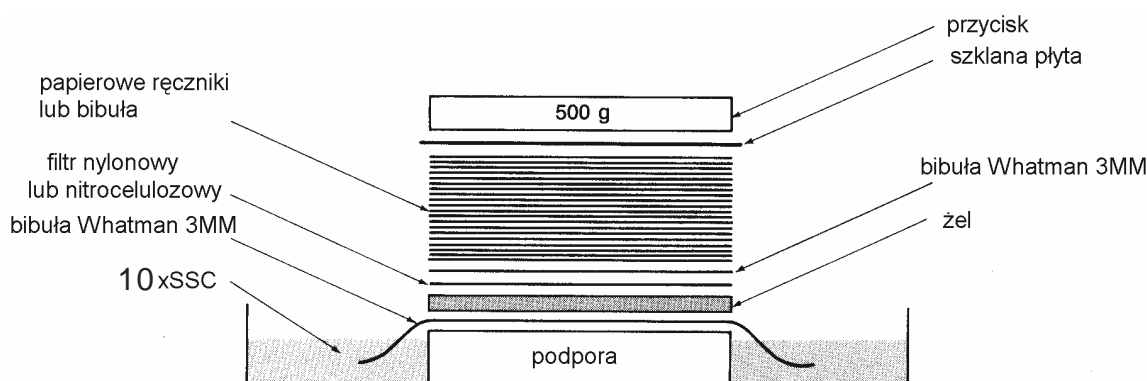
Przeniesienie DNA na filtr

Odczynniki

- Roztwór do denaturacji: 0.5M NaOH, 1.5M NaCl
- Roztwór do neutralizacji: 0.5M Tris-HCl pH 7.0, 3M NaCl
- 20x SSC: 3M NaCl, 0.3M cytrynian sodu, pH 8.2 (odpowiednio rozcieńczony aby otrzymać 10X i 2X SSC)

Wykonanie

1. Żel agarozowy z rozdzielonymi fragmentami DNA zabarwić bromkiem etydy, zorientować przez odcięcie jednego z rogów, wzdłuż ścieżek umieścić linijkę z dobrze widoczną podziałką lub pasek papieru milimetrowego i sfotografować.
2. Ustalić wymiary żelu.
3. Żel umieścić w kuwecie z roztworem denaturującym o temp. 42°C i inkubować w tej temperaturze przez 20 min.
4. Przełożyć żel do roztworu neutralizującego i inkubować 10 min. w temp. 42°C.
5. Roztwór zlać, żel traktować ponownie jak w pkt.4.
6. W czasie neutralizacji żelu wyciąć filtr nitrocelulozowy o wymiarach żelu (może być o kilka milimetrów większy), umieścić go w roztworze 2xSSC. Filtr powinien nasiąkać



Schemat transferu DNA na filtr

równomiernie. **UWAGA!** Starać się maksymalnie ograniczać dotykanie filtru palcami.

1. Ułożyć transfer:
 - na kuwecie umieścić szklaną płytkę
 - na płytce ułożyć warstwę bibuły Whatman 3MM o rozmiarach płytki
 - do kuwecy nalać roztwór 10 x SSC; tym samym roztworem zwilżyć bibułę
 - na bibule położyć żel, tak aby nie pozostawić pod nim pęcherzy powietrza
 - na żelu umieścić filtr, a następnie bibułę Whatman 3MM o wymiarach żelu, namoczoną uprzednio w roztworze 2xSSC (nie pozostawiać pęcherzy powietrza)
 - na wierzchu ułożyć ok. 5cm grubości warstwę bibuły filtracyjnej lub ligniny, tak aby nie dotykać bibuły, na której leży żel i kompres przycisnąć jakimś ciężarkiem.
2. Transfer prowadzić przez 10-20 godzin.
3. Zdjąć wierzchnie warstwy bibuły, zaznaczyć na filtrze długopisem typu BIC lub ołówkiem pozycje kieszonek i odciętego rogu żelu.
4. Filtr przepłukać roztworem 2xSSC i odsączyć na bibule.
5. Filtr umieścić w cross-linkerze (na czystej bibule) i naświetlać UV o energii $6 \times 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ (wartość 600 na wyświetlaczu urządzenia).
6. Filtr jest gotowy do użycia, przy czym można też dodatkowo zapiec w piecu próżniowym w 80 °C - co jest istotne gdy chcemy filtr wykorzystać do kilku różnych hybrydyzacji.

Hybrydyzacja Southern — wykonanie

W wykonywanym na ćwiczeniach doświadczeniu hybrydujemy sondę o pełnej homologii z fragmentem z preparatu trawionego plazmidu oraz z trawionym DNA genomowym. Przygotowane wcześniej próbki DNA rozdzielamy w 0,8% żelu agarozowym i przenosimy na filtr.

Prehybrydyzacja

Prehybrydyzację prowadzimy w temperaturze 65°C w roztworze PERFECTHYB™PLUS przez przynajmniej 5 minut.

Hybrydyzacja

Hybrydyzacja będzie prowadzona w roztworze jak wyżej + zdenaturowana (!) sonda. Czas - 3 godziny.

Płukanie

Sondę po hybrydyzacji zebrać pipetą pasteurowską do naczynka scyntylacyjnego i przechowywać we wskazanym miejscu.

Płukanie roztworem 2xSSC, 0.1%SDS w temp. pokojowej, 3,4 razy po 1 min., kontrola licznikiem Geigera. Przy wyjątkowo mocnym sygnale można filtr poddać ostremu płukaniu roztworem 0.1SSC, 0.1%SDS, prowadzonemu w temperaturze hybrydyzacji. Roztwory po pierwszych dwóch płukaniach zbierać do pojemników przeznaczonych na płynne odpady radioaktywne.

Technika Northern

Technika Northern nie różni się w istotny sposób od techniki Southern. Przy przenoszeniu RNA najczęściej posługujemy się techniką kapilarną z użyciem roztworów 20(lub 10)×SSC lub 20×SSPE jako fazy ruchomej. Czynniki denaturujący usuwa się przez odplukanie wodą dejonizowaną (formaldehyd), poddanie żelu działaniu pH>8 lub ogrzanie filtru z przeniesionym RNA w 80°C przez 2 godziny (glioksal). RNA przeniesione na filtr można uwidocznić poprzez barwienie błękitem metylenowym.

Hybrydyzacja, płukanie, autoradiografia.

Szczególne labilność RNA wymusza stosowanie metod ostrożności takich, jak przy izolacji RNA oraz pewne modyfikacje w samej hybrydyzacji:

- roztwór prehybrydyzacyjny i hybrydyzacyjny oparty jest na odczynniku Denhardta - stosowanie BLOTTO jest wykluczone, gdyż odczynnik ten zawierać może RNAzy. Stosuje się także gotowe bufory do hybrydyzacji (patrz wyżej).
- Aby uniknąć narażenia RNA na wysokie temperatury, stosuje się w roztworze pre- i hybrydyzacyjnym formamid, najczęściej w stężeniu 50%. Hybrydyzacja w 50% formamidzie i w temperaturze 42°C odpowiada hybrydyzacji w temp. 65°C w roztworze wodnym (typowe warunki hybrydyzacji przy pełnej homologii).

Ponieważ formamid zmniejsza szybkość reakcji tworzenia dupleksów, czas hybrydyzacji zwykle przedłuża się do 36-48 godzin, szczególnie wtedy, gdy staramy się wykryć mało liczną klasę RNA. Filtry odplukuje się w temperaturze pokojowej, stosując wodne roztwory SSC z SDS. W przypadku obecności sygnału niespecyficznego można ewentualnie dodatkowo wyplukać filtr w wyższej temperaturze.

Materiały, odczynniki, roztwory

- bibuła: Whatman 3MM oraz zwykła lub ręczniki papierowe
- filtr nylonowy Hybond-N (Amersham)

- formamid dejonizowany, formaldehyd
- 20×SSC (3M NaCl, 0.3M cytrynian sodu, pH 7.0)
- bufor do hybrydyzacji PERFECTHYB™PLUS
- 10% SDS
- Bufor 10×NBC (0.5 M kwas borny, 10 mM Cytrynian sodu, 50mM NaOH)

Wykonanie

1. Elektroforezę prowadzimy w buforze 1×NBC w 1% żelu agarozowym z dodatkiem formaldehydu.
2. Po elektroforezie odpłukać formaldehyd inkubując żel przez 15 minut w 3 zmianach wody dejonizowanej (tylko w przypadku żelu formaldehydowego).
3. Ułożyć transfer kapilarny stosując roztwór 10×SSC jako fazę ruchomą (patrz. Southern).
4. Następnego dnia rozebrać transfer, pamiętając o zaznaczenie na filtrze położenia kieszonek żelu.
5. Filtr umieścić w cross-linkerze (na czystej bibule) i naświetlać UV o energii $6 \times 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ (wartość 600 na wyświetlaczu urządzenia) filtr dodatkowo zapiec w piecu próżniowym w 80°C.
6. Prehybrydyzację prowadzimy w roztworze PERFECTHYB™PLUS przez przynajmniej 5 minut w temp. 65°C.
7. Dodać zdenaturowanej sondy i prowadzić hybrydyzację w temp. 65°C, przez 3 godziny.
8. Odpłukać sondę inkubując filtr:
 - w roztworze 2×SSC, 0.1% SDS, dwukrotnie przez 10 minut w temperaturze pokojowej
 - w roztworze 1×SSC, 0.1% SDS, dwukrotnie przez 10 minut w temperaturze pokojowej
 - W uzasadnionych wypadkach można przepłukać filtr w roztworze 0.1×SSC, 0.1% SDS, w temp. 65°C, kontrolując licznikiem Geigera stopień odpłukania sondy w odstępach 1-minutowych.
9. Filtr odsączyć na bibule, zawinąć w folię polietylenową i poddać autoradiografii.

Izolacja RNA

Właściwości RNA

Właściwości chemiczne RNA powodują, że jego preparatyka wymaga dużej staranności i uwagi. Komórki wszystkich organizmów zawierają zestaw rybonukleaz, które biorą udział w różnych procesach związanych z metabolizmem RNA. Preparatyka nie zdegradowanego RNA wymaga więc czynnika będącego inhibitorem RNaz oraz powodującego selektywne frakcjonowanie RNA. Wszędobylskie RNazy są odporne na denaturację wieloma czynnikami, co wymaga specjalnego przygotowania materiałów i odczynników.

Przygotowania

Roztworem najczęściej używanym do inaktywacji RNaz jest 0.01%-0.1% DEPC (dietylopirokarbonian). Szkło laboratoryjne, narzędzia metalowe itp. należy inkubować przez noc z roztworem DEPC (lub przynajmniej przepłukać), a następnie wyprażyć w 180-220°C przez 3 godziny. Roztwory zawierające substancje reagujące chemicznie z DEPC (np. Tris) powinny być przygotowane na wodzie traktowanej DEPC, dwukrotnie autoklawowanej. Do pozostałych roztworów można dodać DEPC przed autoklawowaniem. Wskazane jest stosowanie odczynników o najwyższej czystości z certyfikatem „RNase free”.

UWAGA! DEPC jest silną trucizną metaboliczną, jest silnie rakotwórczy i teratogeny. Praca wyłącznie w rękawiczkach i odzieży ochronnej.

Metody oczyszczania.

- Ekstrakcja fenolem na gorąco w niskim pH. W metodzie tej wykorzystuje się:
 - denaturujące właściwości fenolu,
 - niewrażliwość RNA na mechaniczną fragmentację,
 - tendencję poszczególnych kwasów nukleinowych do lokalizacji w różnych fazach, uzyskiwanych w czasie ekstrakcji i wirowania materiału

Materiał homogenizuje się krótko w buforze o pH 5.0, a następnie poddaje się kilkukrotnej ekstrakcji gorącym fenolem o tym samym pH. Po wirowaniu faza wodna (górną) zawiera wyłącznie RNA, a interfaza - DNA, polisacharydy oraz zdenaturowane białka. Po ekstrakcji RNA wytrąca się etanolem. Uzyskany preparat może zawierać śladowe ilości RNaz i dlatego zwykle nie nadaje się do długiego przechowywania. Trwałość próbki można zwiększyć przechowując preparat RNA pod etanolem w -70°C .

- Ekstrakcja z użyciem soli chaotropowych. Roztwory związków chaotropowych, chlorowodoru guanidyny lub rodanku guanidyny, powodują całkowite upłynnienie zawartości komórki i inaktywację enzymów. Fakt ten wykorzystuje się przy otrzymywaniu RNA. Materiał homogenizuje się w buforze o pH 4.0, zawierającym 4M rodanek guanidyny, a następnie przeprowadza się ekstrakcję fenolem nasyconym wodą. Po odwirowaniu faza wodna zawiera RNA, który wytrąca się izopropanolem. Preparat poddaje się jeszcze zwykle jednej do dwóch ekstrakcji fenolem pH ~ 7.0 w celu odbiałczenia.
- Ekstrakcja TRIzol'em. Opisana powyżej metoda posłużyła przy opracowaniu uniwersalnego odczynnika do preparatyki RNA (również DNA i białek). TRIzol (TRI reagent) umożliwia otrzymanie czystego preparatu RNA z bardzo małej ilości materiału, w bardzo krótkim czasie.

Izolacja RNA z różnych organizmów

Materiały :

- Komórki *E. coli* OTC, drożdży *S. cerevisiae* i *P. tannophilus*, oraz ewentualnie innych organizmów.
- Fenol nasycony wodą
- Bufor ekstrakcyjny: 0.1M octan sodu pH 5.2, 50mM NaCl, 0.2% SDS, 20mM EDTA

Wykonanie:

1. Komórki odwirować i przenieść do moździerza
2. Zamrozić przez dolanie ciekłego azotu
3. Dodać piasek szklany i ucierać na zimno
4. Dodać buforu ekstrakcyjnego i fenolu w proporcji ok. 1 : 1 : 1
5. Utrzeć pastę o konsystencji śmietany. Uwaga: komórek *E.coli* można nie ucierać w moździerzu
6. Przenieść do eppendorfówek i wirować 5 minut
7. Zebrać fazę wodną (górną)
8. Dodać równą objętość fenolu, wirować 5 minut
9. Powtarzać ekstrakcję i wirowanie aż do zaniku interfazy (2 - 5 razy)
10. Do fazy wodnej dodać octanu sodu do stężenia 0.3M
11. Dodać 2 objętości etanolu i wymieszać
12. Osad odwirować i osuszyć w kilku eppendorfówkach

Sprawdzenie jakości RNA w żelu:

1. Osad z jednej eppendorfówki zawiesić w TE
2. Dodać roztworu barwnika

3. Prowadzić standardową elektroforezę w żelu agarozowym

Elektroforeza RNA w żelach

RNA posiada silną tendencję do tworzenia skomplikowanych struktur drugo- i trzeciorzędowych, które mają wpływ na migrację cząsteczek w sitach molekularnych. Stąd też, aby uzyskać rozdział cząsteczek zależny wyłącznie od ich wielkości, należy prowadzić go w warunkach denaturujących. Najczęściej jako czynniki denaturujące stosuje się mocznik, formaldehyd i formamid. Cząsteczki RNA można również poddawać odwracalnej chemicznie modyfikacji powodującej zniesienie oddziaływań prowadzących do wytwarzania struktur przestrzennych, np. działając roztworem glioksalu.

Do elektroforezy RNA stosuje się następujące rodzaje żeli:

- agarozowy (częściowa denaturacja)
- agarozowy z formaldehydem
- agarozowy z glioksałem
- akryloamidowy z mocznikiem

Żele RNA standaryzuje się na podstawie położenia klas rRNA lub stosując handlowo dostępne markery RNA np. z firmy USB.

Elektroforeza zdenaturowanego RNA w żelu agarozowym

Ten typ rozdziału pozwala na szybką ocenę jakości preparatu RNA. Ze względu na to, że część cząsteczek RNA może ulegać renaturacji w czasie elektroforezy, metoda ta nie może być stosowana w przypadku, gdy rozdzielony w żelu RNA ma być przenoszony na filtr.

Materiały, odczynniki, roztwory

- 10×bufor TBE: 1M Tris, 1M kwas borowy, 10mM EDTA, pH 8.3
- barwnik formamidowy: 0.1% błękit bromofenolowy w 90% formamidzie
- barwnik do RNA: 1µg/ml wodny roztwór bromku etydyny

Przygotowanie żelu (50 ml)

1. Odważyć 0.75g agarozy i rozpuścić w 50 ml 1×buforu TBE.
2. Schłodzić żel do ok. 50°C.
3. Wylać żel w aparacie horyzontalnym.

Przygotowanie próbki RNA

1. Zawiesić próbkę suchego RNA (20µg) w 20 µl barwnika formamidowego.
2. Ogrzać próbkę przez 5 minut w temperaturze 95°C.
3. Schłodzić próbkę w lodzie i dodać 1 µl roztworu bromku etydyny (1µg/ml).
4. Nanieść próbkę na żel.

Elektroforeza

Elektroforezę prowadzić przy napięciu 8 V/cm stosując jako bufor elektrodowy 1×bufor TBE.

Dokumentacja żelu

Po zakończonej elektroforezie żel obejrzyć w świetle UV (300 nm) i sfotografować.

Elektroforeza RNA w żelu agarozowym z formaldehydem

Jest to, obok elektroforezy gliksylowanego RNA, najczęściej stosowana technika rozdzielania cząsteczek RNA. Jej zaletą jest niezawodność, natomiast poważną wadą konieczność stosowania toksycznego odczynnika (formaldehyd) i związanych z tym odpowiednich zabezpieczeń.

Materiały, odczynniki, roztwory

- formaldehyd dejonizowany (37% roztwór wodny)
- 10×bufor MOPS: 200mM MOPS, 50mM octan sodu, 10mM EDTA, pH 7.0
- barwnik formamidowy: 0.1% błękit bromofenolowy w 90% formamidzie
- barwnik do RNA: 1µg/ml wodny roztwór bromku etydyny

Przygotowanie żelu

1. Odważyć 0.75 g agarozy i rozpuścić w 37 ml wody w kolbce stożkowej na 100 ml.
2. Umieścić kolbkę w łaźni wodnej o temperaturze ok. 60°C.
3. Dodać kolejno 5 ml 10×buforu MOPS i 8.25 ml formaldehydu, starannie wymieszać.
4. Wylać żel w aparacie horyzontalnym.

Przygotowanie próbki RNA

1. Zawiesić próbkę suchego RNA (20µg) w 20 µl barwnika formamidowego.
2. Ogrzać próbkę przez 5 minut w temperaturze 95°C.
3. Schłodzić próbkę w lodzie i dodać 1 µl roztworu bromku etydyny (1µg/ml).
4. Nanieść próbkę na żel.

Elektroforeza

Elektroforezę prowadzić przy napięciu 8V/cm długości żelu stosując jako bufor elektrodowy 1×bufor MOPS.

Dokumentacja żelu

Po zakończonej elektroforezie żel obejrzyć w świetle UV (300 nm) i sfotografować.

Uwaga:

Próbki można przygotowywać bez bromku etydyny, a RNA można uwidocznić umieszczając żel na fluoryzującej płytce celulozowej F₂₅₄ (Merck) i stosując UV o długości fali 254 nM (RNA pochłania UV).

Gliksylacja RNA i elektroforeza w żelu agarozowym

Technika ta jest pracochłonna i wymaga stosowania odczynników najwyższej czystości oraz specjalnie przystosowanego sprzętu do elektroforezy (aparat z pompą do recyrkulacji buforu), jednak jakość uzyskiwanego rozdzielania często przewyższa jakość uzyskiwaną przy zastosowaniu żeli formaldehydowych.

Materiały, odczynniki, roztwory

- 7M wodny roztwór gliksalu (dejonizowany i przefiltrowany)
- 10×bufor fosforanowy: 100mM NaP_i, pH 7.0
- bufor do próbek: 20% glicerol, 20mM EDTA, 0.05% błękit bromofenolowy

- barwnik do żelu: 1µg/ml wodny roztwór bromku etydyny

Przygotowanie żelu

1. Rozpuścić 0.75g agarozy w 50 ml 1×buforu fosforanowego.
2. Wylać żel w aparacie horyzontalnym.

Przygotowanie próbki RNA

1. Zawiesić próbkę suchego RNA (20µg) w 10 µl 1×buforu fosforanowego.
2. Dodać 8 µl wody i 3 µl 7M glioksalu.
3. Nawarstwić olej mineralny i ogrzewać próbkę w 50°C przez 1 godzinę.
4. Pobrać roztwór spod oleju, przenieść do nowej probówki umieszczonej w lodzie.
5. Dodać 10 µl buforu do próbek.
6. Nanieść próbkę na żel.

Elektroforeza

Elektroforezę prowadzić przy napięciu 6V/cm długości żelu, stosując jako bufor elektrodowy 1×bufor fosforanowy. Do ciągłej wymiany buforu między naczyniami użyć pompy perystaltycznej.

Barwienie żelu

Po zakończonej elektroforezie żel wybarwić w wodnym roztworze bromku etydyny o stężeniu 1µg/ml.

Elektroforeza RNA w żelu poliakryloamidowym z 8M mocznikiem

Technika ta jest stosowana do rozdzielania małych cząsteczek RNA (<500 zasad).

Materiały, odczynniki, roztwory i odczynniki

- 40% akryloamid (akryloamid/bisakryloamid 30:1)
- mocznik
- PERS (nadsiarazan amonu)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametylenodiamina)
- 10×bufor TBE: 1M Tris, 1M kwas borowy, 10mM EDTA, pH 8.3
- bufor do próbek: 0.1% błękit bromofenolowy w 90% formamidzie
- barwnik do żelu: 1µg/ml wodny roztwór bromku etydyny

Przygotowanie żelu

1. Płyty szklane dokładnie umyć, odtłuścić acetonem, wysuszyć i złożyć stosując przekładki o grubości 1mm.
2. W cylindrze na 50 ml odważyć 24g mocznika, dodać 7.5 ml roztworu akryloamidu i bisakryloamidu, 5 ml buforu TEB 10× i dopełnić wodą do 50 ml.
3. Ogrzewać i mieszać do całkowitego rozpuszczenia mocznika.
4. Dodać ok. 100mg PERS, wymieszać do rozpuszczenia.
5. Przefiltrować roztwór przez filtr nylonowy 0.45µm.
6. Do małej zlewki pobrać 5 ml mieszaniny, dodać 10 µl TEMED i wylać zatyczkę.
7. Po zakrzepnięciu zatyczki do pozostałej mieszaniny dodać 30 µl TEMED i wylać żel. Od momentu zakrzepnięcia żelu odczekać jeszcze co najmniej 30 minut.

Przygotowanie próbki RNA

1. Zawiesić próbkę suchego RNA (20µg) w 20 µl buforu do próbek.
2. Ogrzać próbkę przez 5 minut w temperaturze 95°C.
3. Nanieść próbkę na żel.

Elektroforeza i barwienie żelu

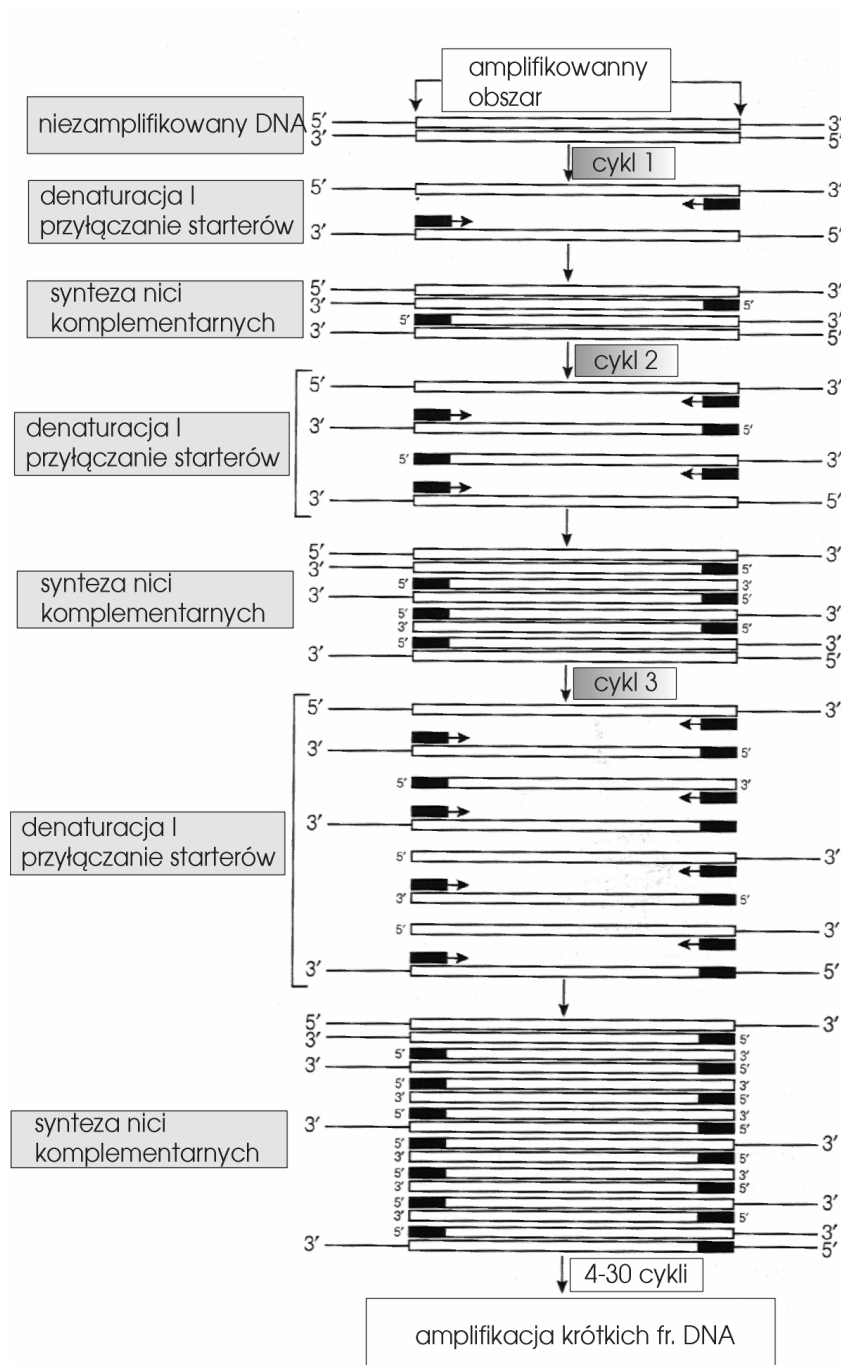
Elektroforezę prowadzić przy napięciu 12V/cm długości żelu, stosując jako bufor elektrodowy 1×bufor TBE. Barwienie żelu jak w poprzedniej procedurze

PCR.

Reakcja łańcuchowa polimerazy lub polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR)

- technika amplifikacji (powielania) *in vitro* określonych, bądź przypadkowych, fragmentów DNA. Kluczowym momentem w rozwoju tej techniki było wprowadzenie przez Kary'ego Mullisa (K.B. Mullis) (Saiki i wsp. 1985, Mullis i wsp. 1986, Mullis i Faloona 1987) termostabilnej polimerazy umożliwiającej przeprowadzenie wielu cykli reakcji (obejmujących denaturację DNA w 94-95°C). Reakcja polega na powielaniu fragmentu DNA na matrycy kwasu nukleinowego z użyciem starterów i termostabilnej polimerazy. Starterami są hybrydujące ze specyficznymi sekwencjami w DNA (*annealing*) oligonukleotydy wyznaczające miejsca rozpoczęcia syntezy komplementarnych nici DNA. W zależności od amplifikowanego materiału (DNA lub RNA), oraz celu prowadzonej reakcji, istnieje szereg odmian polimerazowej reakcji łańcuchowej takich jak:

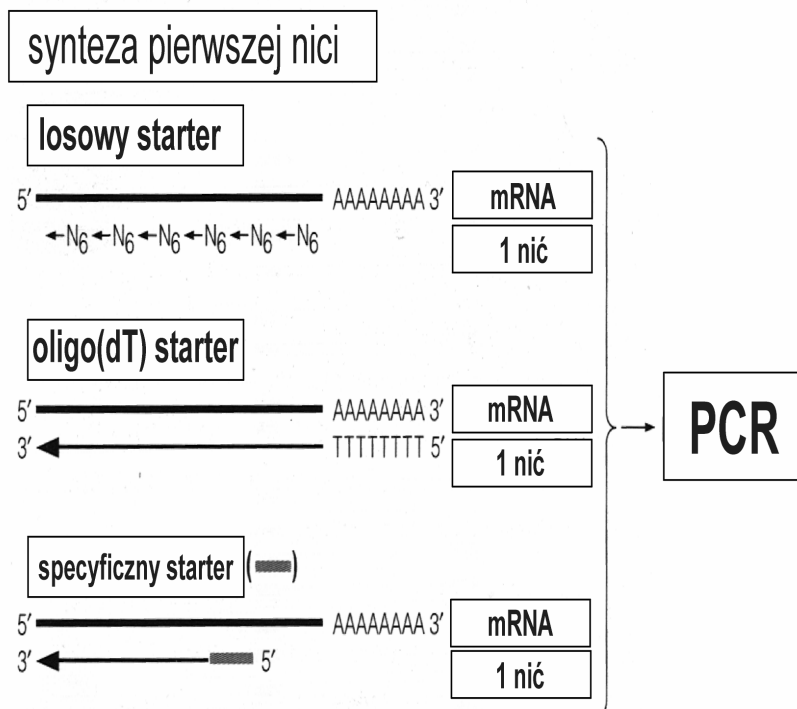
1. **Klasyczny PCR** - technika umożliwiająca amplifikację specyficznych fragmentów DNA. W metodzie tej używa się jako starterów syntetycznych jednoniciowych fragmentów DNA (o długości od 10 do ok. 30 par zasad - zależnie od prowadzonej reakcji). Miejsce przyłączenia starterów wyznacza amplifikowany obszar; konieczne jest aby hybrydowały one z komplementarnymi niemi, umożliwiając syntezę komplementarnych do siebie fragmentów DNA. Reakcja PCR składa się zazwyczaj z 25 do 40 cykli. Jeden cykl stanowią następujące po sobie reakcje: a) denaturacji DNA (zazwyczaj 20-30 sek. w temp. 94-95°C), b) hybrydacji starterów (*annealing* - w zależności od stosowanych starterów 20-90 sek. w temp. 40-65°C) oraz c) syntezy komplementarnych nici (zazwyczaj 20-90 sek. w temp. 72°C) (Rys.1). Warunki prowadzonej reakcji PCR muszą być optymalizowane (temperatura i długość cykli, ilość cykli, stosowana termostabilna polimeraza - np. Taq, Pvu, Tth, Tfl, stężenie MgCl₂, ilość matrycy i stężenie starterów oraz szereg innych specyficznych parametrów) dla każdego doświadczenia.
- 1.1. **Amplifikacja długich fragmentów DNA (Long PCR)** - zazwyczaj, w standardowych warunkach, klasyczną metodą PCR (patrz wyżej) można amplifikować, z zadawalającą wydajnością, fragmenty DNA o długości do ok. 2 tys. par zasad. Celem amplifikacji fragmentów o większej długości (Barnes, 1994, Cheng i wsp. (1994) przetestowano szereg parametrów reakcji wpływających na wydajność syntezy fragmentów DNA o długości ponad 5 tys. par zasad. Najlepsze wyniki osiąga się stosując równocześnie dwie termostabilne DNA zależne polimerazy DNA, z których jedna jest pozbawiona aktywności korekcyjnej (3'→5' aktywność egzonukleolityczna), a druga, obecna w bardzo ograniczonej ilości charakteryzuje się bardzo wysoką aktywnością korekcyjną. Gdy pierwszy z enzymów (np. Taq polimeraza) błędnie wbuduje nukleotyd, w konsekwencji czego następuje zahamowanie lub nawet zatrzymanie syntezy komplementarnej nici, drugi z enzymów (np. Pfu lub Tli polimeraza) może wydajnie usunąć tę pomyłkę, pozwalając Taq polimerazie na kontynuowanie syntezy. Na wydajność syntezy długich cząsteczek DNA w reakcji PCR ma również wpływ szereg innych czynników, takich jak stosowanie w reakcji glicerolu lub/i DMSO oraz obniżenie stężenia jonów magnezu.



Rys. 1 Schemat amplifikacji przez PCR fragmentów DNA

- 1.2. **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA Analysis) - metoda pozwalająca na szybkie wyznaczenie różnic między badanymi genomami. Miarą różnic jest podobieństwo w ilości oraz wielkości otrzymywanych w wyniku reakcji PCR fragmentów DNA. Odmiennie od klasycznego PCR w RAPD stosowane są jako startery oligonukleotydy o długości 10 par zasad (w klasycznej PCR 17 - 23 par zasad). Zazwyczaj w reakcji stosuje się jeden starter, a nie parę. Podobnie jak w przypadku innych reakcji PCR, RAPD wymaga śladowych ilości matrycy (w tym przypadku DNA).

- 1.3. **Sekwencjonowanie cykliczne** - reakcję PCR można również wykorzystywać do oznaczania sekwencji nukleotydowych fragmentów DNA, bądź to dla otrzymania wystarczającej ilości specyficznego fragmentu, którego sekwencję chcemy ustalić, bądź dla analizy sekwencji nukleotydowej fragmentu, który posiadamy w śladowych ilościach (sekwencjonowanie cykliczne). Pierwotnie stosowano zmodyfikowaną metodę Sangera, wykorzystując do syntezy komplementarnych nici termostabilne polimerazy (zazwyczaj Taq polimerazę). Dużym postępowaniem było wprowadzenie udoskonalonej biotechnologicznie, termostabilnej, polimerazy T7 (TermoSequenase™, Amersham, USB). Enzym ten nie tylko popełnia znacznie mniej błędów, lecz również pozwala prowadzić reakcję sekwencjonowania w sposób cykliczny. Kolejnym istotnym krokiem jest wprowadzenie czterech, radioaktywnych (³³P) nukleotydów terminacyjnych (dideoksynukleotydów) (ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP). Reakcja sekwencjonowania cyklicznego różni się od klasycznej reakcji PCR tym, że wykorzystuje się w niej jeden (zazwyczaj długi - 17-30 bp) oligonukleotyd jako starter.
2. **RT-PCR** - jest odmianą PCR pozwalającą na amplifikację cząsteczek (określonych lub przypadkowych) RNA (Rys. 2). RT-PCR jako pierwszy opisał P. Seeburg. Reakcja może przebiegać w dwóch etapach: 1) synteza jednoniciowego DNA komplementarnego do RNA (prowadzona przez AMV, M-MLV lub MuLV odwrotną transkryptazę) oraz 2) PCR - amplifikacja cDNA.

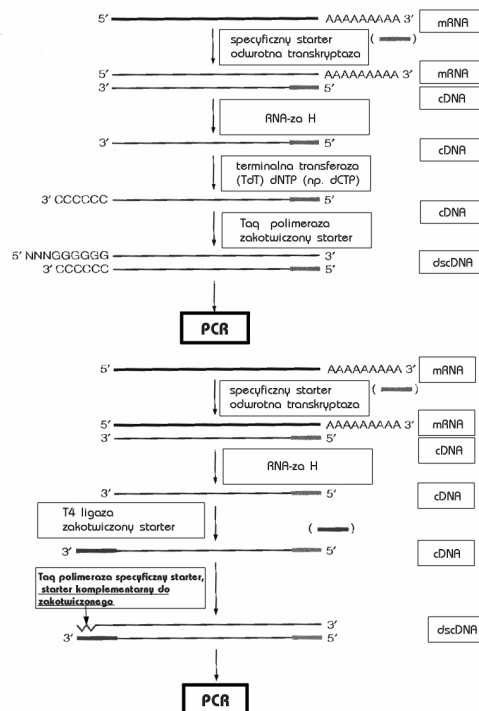
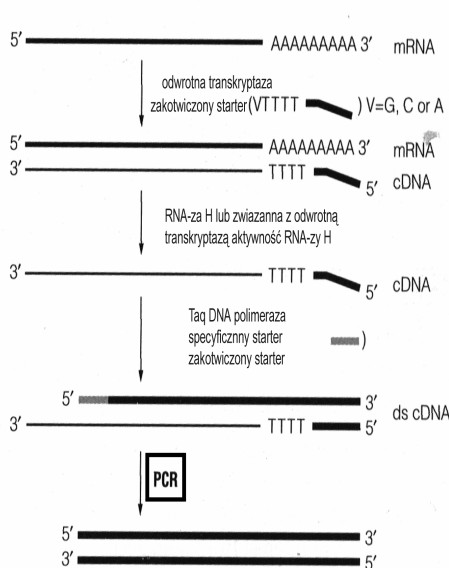


Fig

Rys. 2 Schemat RT-PCR

- 2.1. **3' lub 5'RACE** - (Rapid Amplification of cDNA Ends), jest specyficzną odmianą RT-PCR umożliwiającą szybkie namnażanie i analizę rejonów odpowiadających, w zależności od prowadzonej reakcji, sekwencjom 3' i 5' końców specyficznych RNA (zazwyczaj mRNA). Z uwagi na

charakterystykę enzymu prowadzącego reakcję (polimerazy mogą katalizować syntezę nowych nici DNA jedynie w kierunku 5'→3') to o ile stosunkowo prostą jest technika 3'RACE (Rys. 3) o tyle 5'RACE (Rys. 4) jest metodą znacznie bardziej skomplikowaną.



Rys. 3 Schemat typowego doświadczenia 3' RACE

Rys. 4 Schemat dwóch typów metody 5' RACE

- 1.1. **DDPCR (Differential Display PCR)** - różnicowy PCR - jest odmianą RT-PCR pozwalającą na porównanie różnic w ekspresji informacji genetycznej w komórkach różnych tkanek, lub tych samych komórkach w zależności od działających na nie bodźców lub/i ich odmiennego stanu fizjologiczno-biochemicznego (np. warunki hodowli, wiek komórek, itp.) W reakcji DDPCR jako pierwszy starter (do reakcji RT) stosowane są zazwyczaj zakotwiczone oligo(dT) nukleotydy (podobnie jak w reakcji 3' RACE - Rys. 3). W reakcji PCR jako wewnętrzny starter (wiążący się z pierwszą nicią cDNA) stosowane są zazwyczaj startery losowe. Reakcje DDPCR podobnie jak, RT-PCR, mogą być katalizowane przez dwa enzymy (reakcja RT - odwrotna transkryptaza i PCR - termostabilna DNA zależna polimeraza DNA) lub przez jeden enzym (np. Tth polimeraza).

Alternatywą dla DDPCR jest technika RDA (Representational Difference Analysis). Wymaga ona posiadania cDNA (cDNA RDA) lub bibliotek cDNA otrzymanych z komórek, dla których chcemy dokonać porównania ekspresji informacji genetycznej.

- 1.2. **Ilościowy PCR** - zazwyczaj jest to odmiana RT-PCR (czasem PCR), pozwalająca na oszacowanie ilości specyficznego RNA lub DNA w badanej próbce. Teoretycznie powinna łatwo szybko i w powtarzalny sposób określać ilość badanego materiału (np. poziom infekcji wirusem lub ekspresji określonego genu), jednak z uwagi na niską zazwyczaj czystość analizowanych prób (np. obecność inhibitorów) reakcje RT-PCR i PCR przeważnie nie wykazują liniowego przyrostu ilości amplifikowanego materiału. Ilościowy PCR bezwzględnie wymaga wewnętrznej standaryzacji, co oznacza równoczesne amplifikowanie badanego materiału

(np. mRNA genu, którego ekspresję chcemy zbadać) oraz próbki referencyjnej (np. mRNA genu ulegającego konstytutywnej ekspresji lub DNA dodanego w ściśle określonej ilości).

Reakcja PCR.

Materiały

- sterylna woda bidestylowana
- startery (~ 2pM/ul)
- Taq polimeraza ok. 10U
- bufor do Taq polimerazy
- 25 mM chlorek magnezu
- 2 mM roztwór dNTP
- olej mineralny
- 2% żel agarozowy

Wykonanie

1. Do 0,5 ml. próbki typu Ependorff odpipetować:
 - 1 µl DNA (50 x rozcieńczony roztwór podstawowy).
 - 5 µl 10x stęż. buforu do Taq polimerazy (w zależności od stosowanego enzymu).
 - x µl roztworu MgCl₂ (do końcowego stężenia 3 mM).
 - x µl 2pM starter(ów)a
 - 2 µl dNTP
 - x µl (ok. 1,0 - 1,5 U) Taq polimerazy **Uwaga!** enzym pipetować na samym końcu wodę do objętości 50 µl.
 2. Nanieść na powierzchnię próbki małą kroplę oleju mineralnego.*
 3. Wstawić próbki do PCR maszyny i wystartować program.
Standardowo program złożony jest z 20-40 cykli, poprzedzonych wstępną denaturacją DNA (5 min 94-95°C) o następującej charakterystyce:
 1. Cykle amplifikacji:
 - a) denaturacja DNA - 94°C, 20 sek. -1 min. (zależnie od zawartości par GC)
 - b) przyłączenie startera - XX°C, 20 sek. 3 min. (zależnie od właściwości starter(ów)a)
 - c) synteza - 72°C, 20 sek. – 2 min. (zależnie od długości amplifikowanego fragmentu DNA – średnio 1000 par zasad/min.)
 2. Zakończenie reakcji - 72°C, 7 min.
 3. przechowywanie - 4°C, bez ograniczeń
- * stosuje się jedynie, gdy maszyna do PCR nie posiada płyty ogrzewającej górną powierzchnię próbki (płyta zapobiega skraplaniu się pary na wieczku próbki).

Elektroforeza produktów reakcji

1. Pobrać pipetą automatyczną całość produktów reakcji spod oleju mineralnego i przenieść do nowej probówki typu Eppendorf.
2. Dodać 7 μ l barwnika do elektroforezy.
3. 25 μ l próbki nanieść na 1,8 - 2,0 % żel agarozowy. Pamiętać o naniesieniu standardu wielkości.

Elektroforezę prowadzić aż do momentu, kiedy barwnik osiągnie koniec żelu.

Dokumentacja żelu

Po zakończeniu elektroforezy żel obejrzyć w świetle UV i sfotografować.

Elektroforeza białek w żelach poliakryloamidowych

Podstawową i najszerszej stosowaną metodą rozdziału białek jest elektroforeza w żelach poliakryloamidowych zawierających SDS (SDS-PAGE, ang *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS jest silnym jonowym detergencem, który denaturuje białka i wiąże się z nimi. SDS nadaje polipeptydom ujemny ładunek, pozwalający na migrację w polu elektrycznym. Ilość związanego detergentu jest prawie zawsze liniowo zależna od masy polipeptydu. Umożliwia to, używając markerów o znanej wielkości wyznaczanie masy rozdzielanych białek.

Najczęściej stosuje się elektroforezę z nieciągłym systemem buforowym, która pozwala na uzyskanie wysokiej rozdzielczości. Bufor w zbiornikach ma inne pH i siłę jonową niż żel. Żel podzielony jest na dwie części tak zwany żel zateżający i żel rozdzielający. Żel zateżający ma niższe pH i większą porowatość od żelu rozdzielającego. Kompleks SDS z polipeptydami pod wpływem napięcia migruje najpierw przez krótki odcinek żelu zateżającego i jest osadzany na wąskiej powierzchni żelu rozdzielającego. Zwiększa to rozdzielczość elektroforezy.

Bufor do elektroforezy zawiera Tris-glicyna (pH 8.3), żel zateżający Tris-HCl (pH 6.8), a żel rozdzielający Tris-HCl (pH 8.8). Wszystkie roztwory zawierają 0.1% SDS. Podczas elektroforezy jony chlorkowe z próbek i żelu zateżającego tworzą przedni koniec poruszającego się czoła. Wleczony koniec składa się z nie zjonizowanych cząsteczek glicyny. Pomiedzy dwoma granicami zmniejsza się przewodnictwo elektryczne i tworzy się ostrzejszy gradient napięcia, który przesuwa polipeptydy osadzając je na powierzchni żelu rozdzielającego. Żel rozdzielający ma wyższe pH, co powoduje jonizację glicyny, która migruje tuż za jonami chlorkowymi. Polipeptydy zostają uwolnione z przesuwanego się czoła i migrują zależnie od swojej wielkości.

Zazwyczaj stosuje się żele o grubości 0.5 - 2 mm i stężeniu poliakrylamidu od 5 do 15%. Stosunek akrylamidu do bisakrylamidu wynosi 29/1

Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym zawierającym SDS

Odczynniki

- Bufor do elektroforezy (5X): 125mM Tris, 1.25M glicyna (pH 8.3), 0.5% SDS
- Mieszanina monomerów akryloamid, bisakryloamid (37.5/1) 30% (**Uwaga! Akryloamid jest silną neurotoksyną**)
- 10% SDS
- 10% nadsiarczan amonu (**Przygotować bezpośrednio przed użyciem!**)
- TEMED (tetrametyloetylenodiamina)
- 1.5M Tris (pH 8,0)
- 1M Tris (pH 6,8)
- Bufor Laemmli'ego 0.065M Tris-HCl, 2% SDS, 5% β -merkaptotanol (pH 6.8), 0.01 % błękit bromofenolowy, 5% glicerol

Przygotowanie żelu

1. Przygotować odpowiednią ilość roztworu żelu rozdzielającego (Tabela 18.3 załączona w dodatku)
2. Roztwór wlać pomiędzy dwie szklane płytki przedzielone przekładkami i połączone klamkami, pozostawiając odpowiednią ilość miejsca dla żelu zatężającego i grzebień. Roztwór żelu ostrożnie zalać wodą lub alkoholem izoamylowym.
3. Żel pozostawić do polimeryzacji (około 30 minut). Następnie zlać roztwór z nadżelu i żel przepłukać wodą w celu usunięcia resztek nie spolimeryzowanego akryloamidu
4. Przygotować roztwór żelu zatężającego. (Tabela 18.4 zamieszczona w dodatku)
5. Roztwór wlać bezpośrednio na żel rozdzielający a następnie delikatnie wsunąć grzebień uważając by nie powstały pęcherzyki powietrza. Żel pozostawić do polimeryzacji (około 30 minut)
6. Gdy żel spolimeryzuje delikatnie usunąć grzebień i przepłukać kieszonki wodą dejonizowaną, żeby usunąć resztki niespolimeryzowanego akryloamidu
7. Umieścić żel w aparacie i zalać buforem

Przygotowanie próbek.

- Próbki zawiesić w roztworze Laemmli'ego, a następnie inkubować przez 3 minuty w 100°C w celu denaturacji białek. Próbki nałożyć na żel

Elektroforeza

- Elektroforezę należy prowadzić pod napięciem około 15 V na centymetr długości żelu do momentu, kiedy barwnik dojdzie do dolnej krawędzi żelu.

Barwienie żeli poliakryloamidowych zawierających SDS.

Istnieją dwie podstawowe metody barwienia żeli poliakryloamidowych: Błękitem Coomassie'go oraz jonami srebra. Barwienie błękitem jest prostsze i tańsze, ale od 100 do 1000 razy mniej czułe od barwienia jonami srebra. W metodzie tej białka są jednocześnie unieruchamiane i barwione roztworem metanolu i kwasu octowego z dodatkiem błękitu Coomassie'go.

Barwienie żelu błękitem Coomassie'go

Odczynniki

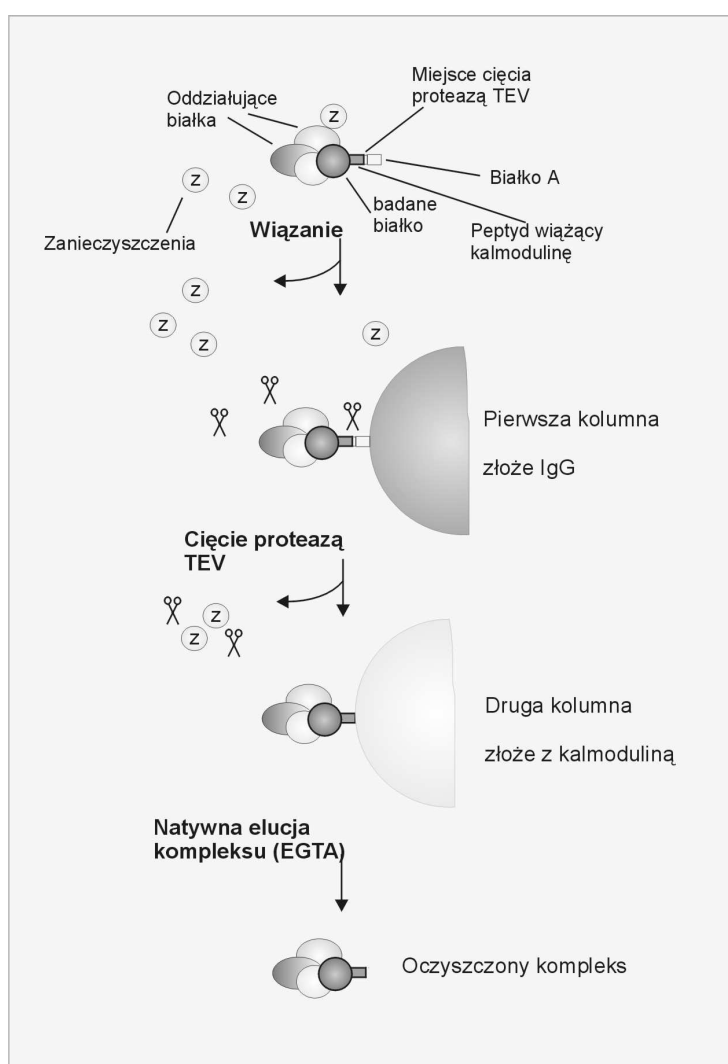
- Bufor do barwienia żelu: 40% metanol, 10% lodowaty kwas octowy 0,025% Błękit Coomassie'go R250
- Bufor do odbarwiania: 30% metanol, 10% lodowaty kwas octowy

Procedura

1. wyjąć żel z aparatu i umieścić go w roztworze do barwienia, inkubować 30 minut.
2. roztwór zlać z powrotem do butelki a żel umieścić w aparacie do odbarwiania.

d Tandemowa chromatografia powinowactwa (TAP-tag - tandem affinity purification).

Metoda tandemowej chromatografii została opracowana do oczyszczania kompleksów białkowych. Pozwala ona na oczyszczanie białka za pomocą dwóch następujących po sobie chromatografiach powinowactwa. Znacznik TAP składa się z białka A oraz peptydu wiążącego kalmodulinę (CBP). Między nimi jest miejsce cięcia rozpoznawane przez proteazę TEV. Białko z znacznikiem TAP jest wiązane do złoża zawierającego IgG, uwalniane przez odcięcie proteazą TEV, a następnie oczyszczane na złożu kalmodulinowym (Rigaut i wsp.,1999). Fragment białka A znajdujący się w znaczniku pozwala również na bardzo łatwą detekcję białka fuzyjnego za pomocą analizy typu Western blot, przy użyciu jako przeciwciała peroksydazy chrzanowej opłaszczonej przeciwciałami IgG królika (PAP).



Rys. Schemat oczyszczania białek przy użyciu tandemowej chromatografii powinowactwa.

Elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych

Podstawową i najszerszej stosowaną metodą rozdzielania białek jest elektroforeza w żelach poliakrylamidowych zawierających SDS (SDS-PAGE, ang. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS jest silnym jonowym detergencem, który nadaje polipeptydom

ujemny ładunek, pozwalający na migrację w polu elektrycznym. Ilość związanego detergentu jest prawie zawsze liniowo zależna od masy polipeptydu. Umożliwia to, używając markerów o znanej wielkości wyznaczanie masy rozdzielanych białek.

Najczęściej stosuje się elektroforezę z nieciągłym systemem buforowym, która pozwala na uzyskanie wysokiej rozdzielczości. Bufor w zbiornikach ma inne pH i siłę jonową niż żel. Żel podzielony jest na dwie części - żel zateżający i żel rozdzielający. Żel zateżający ma niższe pH i mniejsze stężenie poliakryloamidu od żelu rozdzielającego. Kompleks SDS z polipeptydami pod wpływem napięcia migruje najpierw przez krótki odcinek żelu zateżającego i jest osadzany na wąskiej powierzchni żelu rozdzielającego. Zwiększa to rozdzielczość elektroforezy.

Bufor do elektroforezy zawiera Tris i glicynę (pH 8.3), żel zateżający Tris-HCl (pH 6.8), a żel rozdzielający Tris-HCl (pH 8.8). Wszystkie roztwory zawierają 0.1% SDS. Podczas elektroforezy jony chlorkowe z próbek i żelu zateżającego tworzą przedni koniec poruszającego się czoła. Wleczony koniec składa się z nie zjonizowanych cząsteczek glicyny. Pomiedzy dwoma granicami zmniejsza się przewodnictwo elektryczne i tworzy się ostrzejszy gradient napięcia, który przesuwa polipeptydy osadzając je na powierzchni żelu rozdzielającego. Żel rozdzielający ma wyższe pH, co powoduje jonizację glicyny, która migruje tuż za jonami chlorkowymi. Polipeptydy zostają uwolnione z przesuwanego się czoła i migrują zależnie od swojej wielkości.

Zazwyczaj stosuje się żełe o grubości 0.5 - 2 mm i stężeniu poliakryloamidu od 5 do 15%. Stosunek akryloamidu do bisakryloamidu wynosi około 29/1

Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym zawierającym SDS

Odczynniki

- Bufor do elektroforezy (5X): 125mM Tris, 1.25M glicyna (pH 8.3), 0.5% SDS
- Mieszanina monomerów akryloamid, bisakryloamid (37.5/1) 30% (**Uwaga! Akryloamid jest silną neurotoksyną**)
- 10% SDS
- 10% nadsiarczan amonu (APS)
- TEMED (tetrametylenodiamina)
- 1.5M Tris (pH 8.8)
- 1M Tris (pH 6.8)
- Bufor Laemmliego 0.065M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% β -merkaptoetanol, 0.01 % błękit bromofenolowy, 5% glicerol

Przygotowanie żelu

8. Przygotować odpowiednią ilość roztworu żelu rozdzielającego (Tabela 18.3 załączona w dodatku)
9. Roztwór wlać pomiędzy dwie szklane płytki przedzielone przekładkami i połączone klamkami, pozostawiając odpowiednią ilość miejsca dla żelu zatężającego i grzebienia. Roztwór żelu ostrożnie zalać alkoholem izopropanolowym
10. Żel pozostawić do polimeryzacji (około 30 minut). Następnie zlać roztwór nad żelu i żel przepłukać wodą w celu usunięcia resztek niespolimeryzowanego akryloamidu
11. Przygotować roztwór żelu zatężającego. (Tabela 18.4 zamieszczona w dodatku)
12. Roztwór wlać bezpośrednio na żel rozdzielający a następnie delikatnie wsunąć grzebień uważając by nie powstały pęcherzyki powietrza. Żel pozostawić do polimeryzacji (około 30 minut)
13. Gdy żel spolimeryzuje delikatnie usunąć grzebień i przepłukać kieszonki wodą dejonizowaną żeby usunąć resztki niespolimeryzowanego akryloamidu
14. Umieścić żel w aparacie i zalać buforem

Przygotowanie próbek.

- Próbki zawiesić w roztworze Laemmliego, a następnie inkubować przez 3 minuty w 100°C w celu denaturacji białek. Próbki nałożyć na żel.

Elektroforeza

- Elektroforezę należy prowadzić pod napięciem około 15 V na centymetr długości żelu do momentu kiedy barwnik dojdzie do dolnej krawędzi żelu.

Barwienie żeli poliakryloamidowych zawierających SDS.

Istnieją dwie podstawowe metody barwienia żeli poliakryloamidowych: Błękitem Coomassie'go oraz jonami srebra. Barwienie błękitem jest prostsze i tańsze ale od 10 do 100 razy mniej czułe od barwienia jonami srebra. W metodzie tej białka są jednocześnie unieruchamiane i barwione roztworem metanolu i kwasu octowego z dodatkiem błękitu Coomassie'go.

Barwienie żelu błękitem Coomassie'go

Odczynniki

- Bufor do barwienia żelu: 40% metanol, 10% lodowaty kwas octowy 0,025% Błękit Coomassie'go R250
- Bufor do odbarwiania: 30% metanol, 10% lodowaty kwas octowy

Procedura

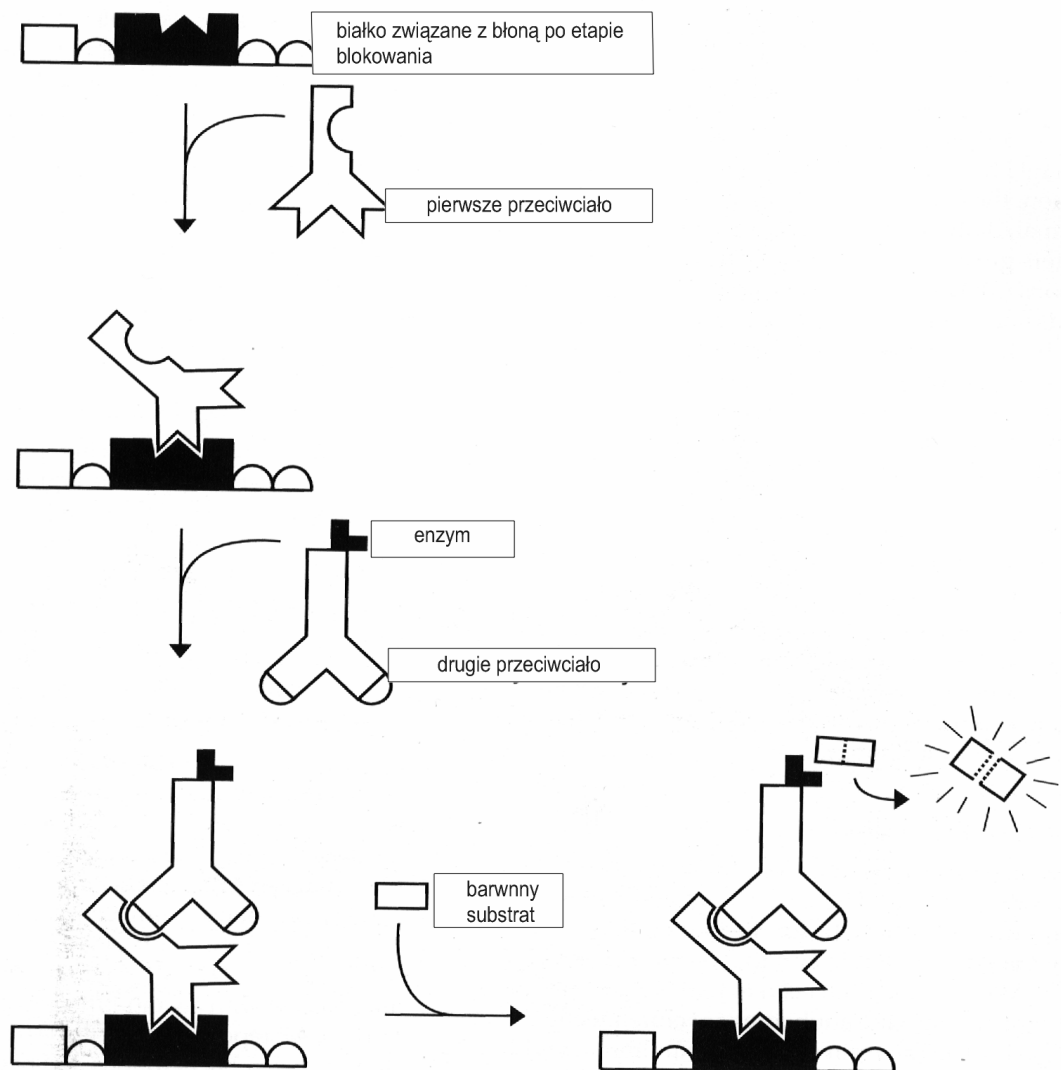
3. wyjąć żel z aparatu i umieścić go w roztworze do barwienia, inkubować 30 minut.

4. roztwór zlać z powrotem do butelki a żel umieścić w roztworze do odbarwiania.

Technika Western.

Technika Western jest najszerszej stosowaną metodą służącą do wykrywania określonych białek (epitopów) w badanych próbkach. Technika ta składa się z szeregu etapów (Rys. 1):

1. Przeniesienie (kapilarne lub elektroforetyczne) rozdzielonych przez SDS-PAGE antygenów na filtr (zazwyczaj nitrocelulozowy lub PVDF).
2. Blokowanie filtra celem uniemożliwienia niespecyficznego wiązania się z nim przeciwciał (białka).
3. Reakcja z pierwszym przeciwciałem - przeciwciało specyficznym rozpoznające wykrywany epitop.
4. Reakcja z drugim, zazwyczaj wyznakowanym przeciwciałem. Drugie przeciwciało specyficznym rozpoznaje pierwsze przeciwciało. Przykładowo, jeśli pierwszym przeciwciałem jest otrzymane przez immunizację świnki morskiej IgG skierowane przeciw epitopowi A, to drugim przeciwciałem jest wyznakowane przeciwciało skierowane przeciw specyficznemu epitopowi IgG świnki morskiej. Drugie przeciwciało jest zazwyczaj wyznakowane przez skoniugowanie go z np. fosfatazą alkaliczną, peroksydazą lub biotyną.
5. Wykrywanie przyłączonego do pierwszego, drugiego przeciwciała dzięki specyficznym reakcji barwnej, katalizowanej przez koniugat (fosfataza alkaliczna lub peroksydaza).



Rys 1. Immunologiczne wykrywanie specyficznych epitopów przeniesionych z żelu na filtr (nitrocelulozowy lub PVDF) - metoda Western.

Odczynniki

Do przeprowadzenia doświadczenia wymagane są następujące odczynniki:

- Roztwór do transferu białek z żelu na filtr 1x bufor do elektroforezy (Tris-glicyna), 20% metanol
- Roztwór do barwienia białek na filtrze PonceauS – 0,2% PonceauS, 3% kwas octowy
- PBST – 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄; 0,1 % Tween20
- Mleko w proszku (koniecznie odtuszczone).
- Pierwsze przeciwciało: specyficzne do badanych epitopów.
- Drugie przeciwciało: znakowane peroksydazą chrzanową przeciwciało wykrywające specyficzne przeciwciało.
- Zestaw do wykrywania aktywności peroksydazy.

Sposób postępowania.

Pamiętaj, to, co będzie na żelu, to wykryją Twoje przeciwciała. Pracuj w rękawiczkach.

1. **Przenoszenie antygenów (białek) z żelu na filtr nitrocelulozowy.**

Filtr nitrocelulozowy umieszcza się na zwilżonych buforem do transferu 3 kawałkach bibuły Whatman 3MM (uwaga - wysoki koszt filtra).

Filtr przykrywamy namoczoną w buforze do elektrotransferu żelą poliakryloamidowym. Następnie żel przykrywamy 3 kawałkami zwilżonymi buforem do elektrotransferu bibuły Whatman 3MM. UWAGA!!!! Nie powinno być powietrza pomiędzy kolejnymi warstwami „kanapki”. Tak wykonaną kanapkę umieszczamy w aparacie do elektrotransferu pól suchego, firmy Bio-Rad. UWAGA!!! Filtr nitrocelulozowy powinien znaleźć się pod żelą.

Transfer prowadzi się przez 70 minut przy stałym napięciu prądu 15V. Po zakończeniu doświadczenia wyjmujemy filtr. Jeśli natychmiast nie przystępujemy do dalszej analizy, to filtr należy dokładnie zapakować w folię polietylenową i przechowywać (do 1 miesiąca) w lodówce.

2. **Barwienie białek na filtrze.** Bezpośrednio po transferze filtr płuczemy wodą dejonizowaną, a następnie zalewamy roztworem PonceauS. Po kilku minutach inkubacji w temperaturze pokojowej roztwór wylewamy, a filtr płuczemy dużymi ilościami wody dejonizowanej. Następnie filtr należy zawinąć w folię polietylenową i zeskanować. W celu usunięcia odczynnika PonceauS filtr umieszcza się w buforze PBST i inkubuje aż do odbarwienia białek.

3. **Blokowanie.** Dla zablokowania nie związanej z białkami powierzchni filtra, a co za tym idzie uniemożliwienia późniejszego niespecyficznego wiązania się z nim przeciwciał, filtr umieszcza się w płaskodennym naczyniu z 5% roztworem mleka w proszku w PBST i delikatnie wytrząsa przez 30 min. w temp. pokojowej.

4. **Inkubacja z pierwszorzędowym przeciwciałem.** Po blokowaniu należy zmienić roztwór mleka (dodajemy na ogół 10ml), a następnie dodać przeciwciało. Stężenie przeciwciała oraz długość inkubacji musi zależeć od jakości przeciwciał.

5. **Płukanie.** Celem usunięcia niezwiązanego lub związanego niespecyficznego pierwszego przeciwciała, płuczemy filtr 3 - 4 razy buforem PBST. Każde płukanie dokonywane jest przez delikatne wytrząsanie filtra w PBST w temp. pokojowej przez minimum 5 min.

6. **Inkubacja z drugorzędowym przeciwciałem.** Po usunięciu ostatniego roztworu do płukania zalewamy filtr roztworem PBST (jak najmniejszą objętością) zawierającym drugie przeciwciało (w stężeniu zalecanym przez producenta) skoniugowane z peroksydazą.

7. **Płukanie.** Nadmiar niezwiązanego specyficznego drugiego przeciwciała usuwamy w sposób opisany w pkt. 4.

8. **Wykrywanie drugorzędowego przeciwciała.** Reakcję barwną pozwalającą na wykrycie przeciwciał prowadzimy w sposób zgodny z zaleceniami producenta zestawu do wykrywania aktywności peroksydazy chrzanowej.

Fakultet odbywa się w pon. 10 -16, wt. 10 – 16, śr. 9 – 15 i 8 – 14

Tydzień I. 4, 5, 6 i 8. X

1. Sprawy organizacyjne i zapoznanie ze zwyczajami w ZG. UW.
6 godz. – **P. Borsuk**

Tydzień IV 11, 12, 13 i 15. X

PCR, przygotowanie wektora (defosforylacja) 6 godz. **P, Borsuk**

Tydzień II i III. 18, 19 i 21 X oraz 25, 26, 27 i 29. X

Analiza komputerowa – metody. Projektowanie doświadczenia *in silico*. – 2 x 6 godz. **P. Golik**

Tydzień V. 2, 3, 5 i 8. XI

Elektroforeza produktu PCR, i strawionego, defosforylowanego wektora. Izolacja wstawki. Ligacja. 6 godz. **P.Borsuk**

Tydzień VI. 15, 16, 17 i 19. XI.

Analiza ligacji i transformacja – elektroporacja + przygotowanie bakterii chemokompetentnych (BL21!) – 6 godz. **A. Dmochowska**

Tydzień VII. 22, 23, 24 i 26. XI.

Analiza transformantów. Mikrolizaty + elektroforeza **Seweryn Mroczek, Michał Małecki**

Tydzień VIII. 29, 30. XI, 1 i 3. XII

Analiza restrykcyjna mikrolizatów. Mapy restrykcyjne. Transformacja *E. coli* BL21.
6 godz. **A. Dmochowska**

Tydzień IX. 6, 7, 8 i 10 .XII.

SDS-PAGE, blot. Ew. barwienie. 6. godz. **P. Grzechnik.**

Tydzień X 20, 21, 22. XII i 7. I.

Western. Omówienie blotów. 5 godz. **P. Grzechnik** + 1 godz. omówienie formy sprawozdania **P. Borsuk**

Tydzień XI i XII 10, 11, 12 i 14. I oraz 17, 18, 19 i 21. I.

Northern + podsumowanie Western 8 godz. **E. Sergiejuk** + 4 godz. seminaria **P. Borsuk**

Genotypy szczepów bakteryjnych

Systemy restrykcji i modyfikacji Typu I obejmują trzy geny: *hsdR*, *hsdM* i *hsdS*. Produkty tych genów tworzą wielojednostkowy enzym posiadający zarówno aktywności endonukleolityczne jak i metylacyjne. Enzym działa jako metylaza kiedy jedna z nici rozpoznawanego miejsca jest metylowana, przeprowadzając modyfikację nici niemetylowanej. Kiedy rozpoznawane miejsce jest całkowicie niezmodyfikowane, enzym działa jako endonukleaza i hydroлізуje DNA. Najczęściej używane szczepy laboratoryjne

E. coli to pochodne typów dzikich K-12 i B, mające system restrykcji i modyfikacji, odpowiednio, *EcoKI* (rozpoznawana sekwencja: 5' AAC(N)₆GTGC) i *EcoBI* (rozpoznawana sekwencja 5'TGA(N)₈TGCT). Mutacje *hsdS* zaburzają zarówno modyfikację, jak i restrykcję DNA, mutanty *hdsR* nie mają aktywności restrykcyjnej, ale zachowują aktywność metylacyjną (są $r_K^- m_K^+$ lub $r_B^- m_B^+$).

Innym systemem restrykcyjnym *E. coli* jest system zwany McrA skierowany wobec DNA zmetylowanego w sekwencji Cm⁵CGG.

Inne dobrze poznane systemy metylacji *E. coli* to system Dam i Dcm. Metylaza adeninowa kodowana przez gen *dam* modyfikuje resztę adeniny w obydwu niciach w obrębie sekwencji GATC. Metylaza cytozynowa kodowana przez gen *dcm* modyfikuje wewnętrzną resztę cytozyny w obydwu niciach w obrębie sekwencji CC(A/T)GG.

XL2-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (r_K^-, m_K^+) *supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q* *ZΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]

DH5: F' *deoR recA1 endA1 hsdR17* (r_K^-, m_K^+) *glnV44 thi-1 gyrA96* (Nal^r) *relA1 Δ* (*lacZYA-argF*) U169 [φ80Δ*lacZ*]

BL21 CodonPlus(DE3)-RIL: F' *ompT hsdS* (r_B^-, m_B^-) *dcm⁺ Tet^r gal λ* (DE3) *endA Hte* [*argU ile Y leuW* Cam^r]

F'	typ płciowy
[F']	gospodarz zawiera episom F
<i>recA</i>	gen związany z ogólną rekombinacją DNA
<i>endA</i>	gen dla DNA-specyficznej endonukleazy. Mutacja poprawia jakość wyizolowanego plazmidu
<i>gyrA</i>	gen dla gyrazy DNA. Mutacja wprowadza oporność na kwas nalidiksowy
<i>thi</i>	gen związany z metabolizmem tiaminy. Mutant wymaga do wzrostu tiaminy
	<i>supE</i> supresor mutacji amber (UAG), tRNA supresorowy przenosi glutaminę. Obecnie zwany <i>glnV</i>
<i>relA</i>	zrelaksowany fenotyp. U mutanta istnieje możliwość syntezy RNA przy braku syntezy białka
<i>lacI^q ZΔM15</i>	fragment operonu laktozowego zawierający superrepresor <i>lacI^q</i> i gen β-galaktozydazy z N-kończącą delecją M15
<i>proAB</i>	geny związane z syntezą proliny. Mutant wymaga do wzrostu proliny
<i>Tn10</i>	transpozon przenoszący oporność na tetracyklinę (Tet ^r)
Tet ^r	gen oporności na tetracyklinę
Cam ^r	gen oporności na chloramfenikol
Amy	gen kodujący amylazę
<i>deoR</i>	gen regulacyjny dla operonu <i>deo</i> . Umożliwia pobieranie dużych plazmidów
<i>glnV</i>	patrz <i>supE</i>
[φ80]	komórka zawiera profaga φ80
<i>ompT</i>	gen kodujący proteazę OmpT
<i>lon</i>	gen kodujący proteazę Lon. Szczep dziki <i>E. coli</i> B nie posiada proteazy Lon
<i>gal</i>	geny związane z katabolizmem galaktozy
λ (DE3)	pochodna faga lambda zawierająca gen kodujący polimerazę faga T7 pod kontrolą elementów operonu laktozowego

Hte [*argU ile Y leuW*] dodatkowe geny kodujące tRNA rozpoznające heterologiczne kodony dla arg ile leu

Enzym	Sekwencja	Adeno-2		pBR322	pUC19	
		Lambda			T7	
Aat II	GACGTC	3	10	1	1	1
Acc65 I	GGTACC	8	2	0	1	5
Acc I	GTMKAC	17	9	2	1	33
Acl I	CCGC	582	516	67	34	199
Acl I	AACGTT	3	7	4	2	19
Afe I	AGCGCT	13	2	4	0	0
Afl II	CTTAAG	4	3	0	0	19
Afl III	ACRYGT	25	20	1	1	23
Age I	ACCGGT	5	13	0	0	2
Ahd I	GACNNNNNGTC	9	9	1	1	14
Ale I	CACNNNNGTG	10	20	0	0	8
Alu I	AGCT	158	143	17	15	140
Alw I	GGATC	35	58	12	10	1
AlwN I	CAGNNNCTG	25	41	1	1	15
Apa I	GGGCC	12	1	0	0	0
ApaL I	GTGCAC	7	4	3	3	1
Apo I	RAATY	29	58	1	1	13
Asc I	GGCGCGCC	2	2	0	0	0
Ase I	ATTAAT	3	17	1	3	12
AsiS I	GCGATCGC	1	0	0	0	0
Ava I	CYCGRG	40	8	1	1	4
Ava II	GGWCC	73	35	8	2	54
Avr II	CCTAGG	2	2	0	0	3
Bae I	ACNNNNGTAYC	5	10	0	0	3
BamH I	GGATCC	3	5	1	1	0
Ban I	GGYRCC	57	25	9	4	33
Ban II	GRGCYC	57	7	2	1	1
Bbs I	GAAGAC	27	24	3	0	38
BbvC I	CCTCAGC	9	7	0	0	10
Bbv I	GCAGC	179	199	21	12	116
BceA I	ACGGC	80	115	3	2	47
Bcg I	CGANNNNNNTGC	10	28	3	1	19
BciV I	GTATCC	9	26	2	2	23
Bcl I	TGATCA	5	8	0	0	1
Bfa I	CTAG	54	13	5	4	60
BfrB I	ATGCAT	10	14	0	0	8
BfuA I	ACCTGC	39	41	1	1	18
Bgl I	GCCNNNNNGGC	20	29	3	2	2
Bgl II	AGATCT	11	6	0	0	1
Blp I	GCTNAGC	8	6	0	0	20
Bme1580 I	GKGC MC	45	10	3	3	16
BmgB I	CACGTC	15	17	0	0	8
Bmr I	ACTGGG	22	4	5	2	6
Bpm I	CTGGAG	32	25	4	1	23
Bpu10 I	CCTNAGC	23	19	1	0	39
BpuE I	CTTGAG	19	13	6	4	56
BsaA I	YACGTR	22	14	1	0	35
BsaB I	GATNNNNATC	2	21	1	0	7
BsaH I	GRCGYC	44	40	6	3	8

Bsa I	GGTCTC	18	2	1	1	29
BsaJ I	CCNNGG	234	105	8	5	85
BsaW I	WCCGGW	28	81	5	3	32
BsaX I	ACNNNNNCTCC	29	19	0	1	12
BseR I	GAGGAG	63	19	0	0	13
BseY I	GCTGGG	31	32	2	1	29
Bsg I	GTGCAG	34	41	1	0	21
BsiE I	CGRYCG	50	22	7	5	17
BsiHKA I	GWGCWC	38	28	8	5	24
BsiW I	CGTACG	4	1	0	0	0
Bsl I	CCNNNNNNNGG	216	176	20	6	90
BsmA I	GTCTC	60	37	3	4	95
BsmB I	CGTCTC	21	14	1	2	16
BsmF I	GGGAC	59	38	4	0	46
Bsm I	GAATGC	10	46	1	0	15
BsoB I	CYCGRG	40	8	1	1	4
Bsp1286 I	GDGCHC	105	38	10	5	40
BspCN I	CTCAG	75	80	7	5	142
BspD I	ATCGAT	2	15	1	0	3
BspE I	TCCGGA	8	24	1	0	0
BspH I	TCATGA	3	8	4	3	13
BspM I	ACCTGC	39	41	1	1	18
BsrB I	CCGCTC	28	17	2	3	17
BsrD I	GCAATG	14	44	2	2	18
BsrF I	RCCGGY	40	61	7	1	3
BsrG I	TGTACA	5	5	0	0	13
Bsr I	ACTGG	86	110	19	11	118
BssH II	GCGCGC	52	6	0	0	1
BssK I	CCNNGG	233	185	16	12	11
BssS I	CACGAG	11	8	3	3	31
BstAP I	GCANNNNTGC	20	34	2	1	12
BstB I	TTCGAA	1	7	0	0	7
BstE II	GGTNACC	10	13	0	0	1
BstF5 I	GGATG	78	150	12	5	97
BstN I	CCWGG	136	71	6	5	2
BstU I	CGCG	303	157	23	10	65
BstX I	CCANNNNNNTGG	10	13	0	0	11
BstY I	RGATCY	22	21	8	7	2
BstZ17 I	GTATAC	3	3	1	0	8
Bsu36 I	CCTNAGG	7	2	0	0	30
Btg I	CCRYGG	82	46	2	0	26
Bts I	GCAGTG	22	34	2	3	20
Cac8 I	GCNNGC	285	238	31	14	104
Cla I	ATCGAT	2	15	1	0	3
CviJ I(x)	RGCY	680	692	73	44	562
Dde I	CTNAG	97	104	8	6	282
Dpn I	GATC	87	116	22	15	6
Dpn II	GATC	87	116	22	15	6
Dra I	TTTAAA	12	13	3	3	9
Dra III	CACNNNGTG	10	10	0	0	16
Drd I	GACNNNNNGTC	6	3	2	2	11
Eae I	YGGCCR	70	39	6	3	2
Eag I	CGGCCG	19	2	1	0	0
Ear I	CTCTTC	29	34	2	3	46
Ecl I	GGCGGA	29	32	4	3	2

Eco57 I(x)	CTGAAG	23	40	2	2	1
EcoN I	CCTNNNNNAGG	10	9	1	0	1
EcoO109 I	RGGNCCY	44	3	4	1	22
EcoR I	GAATTC	5	5	1	1	0
EcoR V	GATATC	9	21	1	0	0
Fau I	CCCGC	147	90	10	5	24
Fnu4H I	GCNGC	411	380	42	19	156
Fok I	GGATG	78	150	12	5	97
Fse I	GGCCGGCC	3	0	0	0	0
FspA I(x)	RTGCGCAY	5	2	2	0	2
Fsp I	TGCGCA	17	15	4	2	7
Hae II	RGCGCY	76	48	11	3	26
Hae III	GGCC	216	149	22	11	68
Hga I	GACGC	87	102	11	4	70
Hha I	GCGC	375	215	31	17	103
HinP1 I	GCGC	375	215	31	17	103
Hinc II	GTYRAC	25	35	2	1	61
Hind III	AAGCTT	12	6	1	1	0
Hinf I	GANTC	72	148	10	6	218
Hpa I	GTTAAC	6	14	0	0	18
Hpa II	CCGG	171	328	26	13	58
Hph I	GGTGA	99	168	12	7	102
Hpy188 I	TCNGA	80	170	15	10	153
Hpy188 III	TCNNGA	103	185	19	13	173
Hpy8 I(x)	GTNNAC	116	125	8	5	199
Hpy99 I	CGWCG	61	102	9	5	29
HpyCH4 III	ACNGT	122	187	14	8	174
HpyCH4 IV	ACGT	83	143	10	5	170
HpyCH4 V	TGCA	207	273	21	13	116
I-Ceu I	TAACTATAACGGT CCTAAGGTAGCGA	0	0	0	0	0
I-Sce I	TAGGGATAACA GGGTAAT	0	0	0	0	0
Kas I	GGCGCC	20	1	4	1	2
Kpn I	GGTACC	8	2	0	1	5
Mae III(x)	GTNAC	118	156	17	11	212
Mbo I	GATC	87	116	22	15	6
Mbo II	GAAGA	113	130	11	7	140
Mfe I	CAATTG	4	8	0	0	8
Mlu I	ACGCGT	5	7	0	0	1
Mly I	GAGTC	40	61	4	4	115
Mnl I	CCTC	397	262	26	13	342
Msc I	TGGCCA	17	18	1	0	2
Mse I	TTAA	115	195	15	13	207
Msl I	CAYNNNNRTG	35	62	7	3	38
MspA1 I	CMGCKG	95	75	6	6	35
Msp I	CCGG	171	328	26	13	58
Mwo I	GCNNNNNNNGC	391	347	34	13	170
N.BstNB I	GAGTC	40	61	4	4	115
Nae I	GCCGGC	13	1	4	0	0
Nar I	GGCGCC	20	1	4	1	2
Ncl I	CCSGG	97	114	10	7	9
Nco I	CCATGG	20	4	0	0	1
Nde I	CATATG	2	7	1	1	7
NgoM IV	GCCGGC	13	1	4	0	0
Nhe I	GCTAGC	4	1	1	0	1

Nla III	CATG	183	181	26	11	148
NlaIV	GGNNCC	178	82	24	11	99
Not I	GCGGCCGC	7	0	0	0	0
Nru I	TCGCGA	5	5	1	0	3
Nsl I	ATGCAT	10	14	0	0	8
Nsp I	RCATGY	41	32	4	3	24
Oli I(x)	CACNNNGTG	10	20	0	0	8
PI-Psp I	TGGCAAACAGCTATT ATGGGTATTATGGGT	0	0	0	0	0
PI-Sce I	ATCTATGTCGGGTGCG GAGAAAGAGGTAAT	0	0	0	0	0
Pac I	TTAATTAA	1	0	0	0	1
PaeR7 I	CTCGAG	6	1	0	0	0
Pcl I	ACATGT	9	2	1	1	6
PfiF I	GACNNNGTC	12	2	1	0	1
PfiM I	CCANNNNNTGG	18	14	2	0	8
Ple I	GAGTC	40	61	4	4	115
Pme I	GTTTAAAC	1	2	0	0	2
Pml I	CACGTG	10	3	0	0	1
PpuM I	RGGWCCY	23	3	2	0	12
PshA I	GACNNNGTC	2	7	1	0	6
Psl I	TTATAA	4	12	0	0	5
PspG I	CCWGG	136	71	6	5	2
PspOM I	GGGCCC	12	1	0	0	0
Pst I	CTGCAG	30	28	1	1	0
Pvu I	CGATCG	7	3	1	2	0
Pvu II	CAGCTG	24	15	1	2	3
Rsa I	GTAC	83	113	3	3	168
Rsr II	CGGWCCG	2	5	0	0	1
Sac I	GAGCTC	16	2	0	1	0
Sac II	CCGCGG	33	4	0	0	0
Sal I	GTCGAC	3	2	1	1	0
SanD I(x)	GGGWCCC	8	1	0	0	3
Sap I	GCTCTTC	7	10	1	1	4
Sau3A I	GATC	87	116	22	15	6
Sau96 I	GGNCC	164	74	15	6	79
Sbf I	CCTGCAGG	3	5	0	1	0
Sca I	AGTACT	5	5	1	1	4
ScrF I	CCNGG	233	185	16	12	11
SexA I	ACCWGGT	9	5	0	0	0
SfaNI	GCATC	86	169	22	8	96
Sfc I	CTRYAG	47	38	4	4	48
Sfi I	GGCCNNNNNGGCC	3	0	0	0	1
Sfo I	GGCGCC	20	1	4	1	2
SgrA I	CRCCGGYG	6	6	1	0	0
Sma I	CCCGGG	12	3	0	1	0
Sml I	CTYRAG	29	17	6	4	75
SnaB I	TACGTA	0	1	0	0	13
Spe I	ACTAGT	3	0	0	0	2
Sph I	GCATGC	8	6	1	1	0
Srf I(x)	GCCCCGGC	1	0	0	0	0
Ssp I	AATATT	5	20	1	1	6
Stu I	AGGCCT	11	6	0	0	1
Sty I	CCWWGG	44	10	1	0	36
Swa I	ATTTAAAT	1	0	0	0	1
Taq I	TCGA	50	121	7	4	111

Tat I(x)	WGTACW	19	24	2	2	37
Tau I(x)	GCSGC	232	181	21	7	40
Tfl I	GAWTC	32	87	6	2	103
TII I	CTCGAG	6	1	0	0	0
Tse I	GCWGC	179	199	21	12	116
Tsp45 I	GTSAC	73	81	9	4	108
Tsp509 I	AATT	87	189	8	7	79
TspGWI(x)	ACGGA	39	107	5	2	90
TspR I	CASTG	83	119	12	10	94
Tth111 I	GACNNGTC	12	2	1	0	1
Xba I	TCTAGA	5	1	0	1	3
Xcm I	CCANNNNNNNNTGG	14	12	0	0	8
Xho I	CTCGAG	6	1	0	0	0
Xma I	CCCGGG	12	3	0	1	0
Xmn I	GAANNNTTC	5	24	2	1	12

