

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ
/специальный практикум/

- выделение ДНК
- выделение РНК
- измерение концентрации ДНК/РНК
- оценка чистоты и пригодности ДНК или РНК для исследования
- получение кДНК на матрице РНК (ОТ-ПЦР)
- детекция и оценка концентрации кДНК с геноспецифическими праймерами (РТ-ПЦР)
- выделение продуктов экспрессии генов (белков) и методы их электрофоретического анализа

Лабораторная работа №1

Выделение ДНК из растительного материала /по Ивановой Н. с модиф./

(не содержащего большого количества фенолов, углеводов, жиров и вторичных соединений)

1. Растереть 1-2 проростка в холодной ступке с 0,5-1 мл холодного 2хЦТАБ-буфера.
2хЦТАБ-буфер:
2% ЦТАБ
1,4 М NaCl
100 мМ Трис-HCl, pH 8.0
20 мМ ЭДТА
0,1% β-меркаптоэтанол (добавить непосредственно перед использованием)
2. Поместить массу в пластиковую завинчивающуюся пробирку (или эппендорф) и погрузить в водяную баню при температуре 60-65⁰С.
3. Инкубировать 45 мин – 1 час.
4. Охладить до комнатной температуры и добавить равный объем (0,5-1мл) смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) или хлороформ:изопропанол (24:1), тщательно перемешать, инкубировать 20 мин при комнатной температуре.
5. Центрифугировать 15000 об/мин в течение 10 мин.
6. Отобрать пипетированием верхний водный слой буфера, содержащий ДНК в чистую пробирку.
7. Добавить 1/5 от объема 5х ЦТАБ, перемешать, инкубировать при 60-65⁰С 15-20 мин.
5х ЦТАБ:
5% ЦТАБ
350 мМ ЭДТА
8. Охладить. Прибавить равный объем хлороформ:изопропанол (24:1), перемешать, инкубировать 5 мин при комнатной температуре.
9. Центрифугировать 15000 об/мин 10 мин.
10. Отобрать водную фазу в чистый эппендрф, поместить в ледяную баню и прибавить два объема холодного чистого изопропанола.
11. Инкубировать при -20⁰С 30 мин – 1 час до выпадения осадка ДНК.
12. Центрифугировать 15000 об/мин 10 мин.
13. Супернатант отбросить, а осадок ДНК промыть промывочным раствором около 20 мин при перемешивании.
Промывочный раствор:
3:7 ТЕ-этанол
ТЕ-буфер:
10 мМ Трис-аминометан, pH 8,0
1 мМ ЭДТА
14. Центрифугировать 15000 об/мин 15 мин для отделения осадка.
15. Растворить осадок в 0,5 мл высоко солевого ТЕ при нагревании до 65⁰С.
Высоко солевой ТЕ:
1 М NaCl
10 мМ Трис, pH 8,0
2 мМ ЭДТА
16. Добавить двукратный объем абсолютного изопропанола.
17. Инкубировать 2 часа при -20⁰С для преципитации ДНК.
18. Центрифугировать 15000 об/мин 15 мин. /**Стадии 13-18 можно опускать**/
19. Осадок промыть двукратно 70⁰С этанолом центрифугированием 15000 об/мин 10 мин.
20. Высушить ДНК от этанола на воздухе.
21. Растворить в чистой воде при 37⁰С или ТЕ (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0).
22. Хранить раствор ДНК при -20⁰С.

Демонстрационное видео:

<https://www.youtube.com/watch?v=nWUJInri9D4> выделение ДНК

<https://www.youtube.com/watch?v=oLnY4X8Ztv0> выделение ДНК

Лабораторная работа №2

Выделение РНК из растительного материала /по Гау и Лиу в модиф./

(не содержащего большого количества фенолов, углеводов, жиров и вторичных соединений)

Все реагенты готовятся из чистых новых реактивов в перчатках. Все манипуляции с выделением РНК проводят в перчатках, масках, шапочках, халатах и бахилах в чистой лаборатории (лаборатория вымыта с использованием пирокарбонатных растворов и обработана УФ). Вся посуда для выделения РНК должна быть новой или начисто вымытой с пирокарбонатами и выполоскана десятикратно бидистиллированной водой. Вода для работы должна быть бидистиллированной и очищенной путем обратного осмоса.

1. 1 г свежзамороженных проростков пшеницы растереть в охлажденной до 0°C ступке, добавить к гомогенной массе порциями 5 объемов буфера и перенести всю массу в пробирки с крышками.
Буфер:
3% ЦТАБ
1,5 М NaCl
200 мМ ЭДТА
100 мМ Трис pH 8,0
Добавить перед использованием к 9,15 мл буфера:
0,2 мл β-меркаптоэтанола
0,65 мл гепарина 5000 ЕД
2. Инкубировать 30 мин при 65°C.
3. Добавить равный объем смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1), тщательно перемешать.
4. Центрифугировать 10 мин при 18000 об/мин (15°C).
5. Собрать пипетированием супернатант, перенести в чистую пробирку и прибавить 1 мл 3М КАС.
6. Выдержать в ледяной бане 20 мин.
7. Центрифугировать 10 мин при 15000 об/мин (4°C).
8. Собрать верхнюю водную фазу в чистые пробирки.
9. Прибавить 1/4 объема 10 М раствора LiCl и поместить пробы на -20°C на ночь.
10. Центрифугировать 20 мин при 18000 об/мин (4°C).
11. Отделить осадок, промыть осадок дважды 1 мл 2 М LiCl, повторив процедуру 10.
12. Отмытый осадок растворить в 1 мл 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5).
13. Прибавить к раствору 1/10 объема 3М КАС (pH 5,2) и выдержать на ледяной бане 30 мин.
14. Отцентрифугировать 15 мин при 18000 об/мин (4°C).
15. Отобрать супернатант и прибавить к нему 2,5 объема абсолютного этанола.
16. Поместить на 3 часа при -20°C.
17. Центрифугировать 30 мин при 18000 об/мин (4°C).
18. Осадок промыть 80% этанолом, вакуумно высушить, растворить в 150 мкл свободной от РНК бидистиллированной воды или TE (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0). Хранить РНК при -70°C.

Демонстрационные видео:

Выделение РНК с помощью TRIzol-реагента

<https://www.youtube.com/watch?v=MgNicWbANkA>

Выделение РНК с помощью силикагелевых фильтров

<https://www.youtube.com/watch?v=9WSkt9JEok8>

Лабораторная работа №3

Измерение концентрации ДНК/РНК спектрофотометрически при А260/280

1. Для измерения берут несколько аликвот 100, 200 и 300 мкл нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), растворенной в ТЕ-буфере.
2. Вносят в лунки планшета или кюветы для спектрофотометра.
3. Контролем служит ТЕ.
4. Измеряют поглощение при А260 для нуклеиновых кислот и затем А280 для белков.
5. Раствор с концентрацией двуцепочечной ДНК 1 мг/мл при 260 нм в среднем дает 20-50 единиц А, а одноцепочечной РНК – 10-40 единиц А.
6. При А280 проверяют чистоту препаратов НК от белковых веществ.

Демонстрационное видео:

Использование микроспектрофотометра NanoDrop приведено по ссылке

<https://www.youtube.com/watch?v=FiGZnNs2xXY>

Очистка, амплификация ДНК и измерение ее концентрации при подготовке библиотек ДНК

<https://www.youtube.com/watch?v=xxzlmjtRM4c>

Исследование препаратов ДНК/РНК методом горизонтального электрофореза в агарозе.

Визуализация результатов электрофореза

1. Приготовление 0,8% агарозного геля (*процент геля подбирается под задачу*):
 - 0,8 г агарозы + 95 мл дистиллированной воды, затем кипятить до растворения;
 - добавить к горячему раствору 5 мл ТРЕх20 буфера или ТВЕх20 буфера, еще немного прокипятить;
 - охладить (периодически перемешивая) до 60⁰С.
 - добавить 20 мкл раствора бромистого этидия до конечной концентрации 0,2 мкг/мл (20 мкг/100 мл) из стокового раствора бромистого этидия 1 мг/мл, перемешать;
 - в кювету, зафиксированную в устройстве для заливки гелей, залить горячую агарозу, вставить гребенки для формирования лунок.
- | | |
|---------------------------------------|--|
| <i>Буфер ТРЕх20 (на 1 л):</i> | <i>Буфер ТВЕх20 (на 1 л):</i> |
| 87 г Трис-аминометан | 108 г Трис-аминометан |
| 94 г NaH ₂ PO ₄ | 55 г H ₃ BO ₃ |
| 7,44 Na ₂ ЭДТА | 7,44 г Na ₂ ЭДТА |
| Довести HCl pH до 8,3 | Довести H ₃ BO ₃ pH до 8,3 |
2. Приготовить буфер для внесения проб ДНК или РНК (на 20 мл):
 - 5 мг бромфенолового синего (или крезоловый красный, или метиленовый синий, или другой)
 - 8 г сахарозы или 8 мл глицерина
 3. Смешать 20 мкл образца и 4 мкл буфера для внесения (1:5).
 4. Поставить кювету с гелем в камеру и заполнить ее электродным буфером 1х ТРЕ или ТВЕ (предварительно разбавив 20х буфер в 20 раз).
 5. Аккуратно внести образцы, предварительно смешанные с буфером для внесения.
 6. Разгонять ДНК от – к +, при 60-80 В и 100 мА. Длительность электрофореза 2-4 часа.
 7. Гель с подложкой поместить в трансиллюминатор, сфотографировать гель (задокументировать) в ультрафиолете.

Демонстрационное видео:

<https://www.youtube.com/watch?v=nWUJlnri9D4> выделение ДНК и горизонтальный электрофорез

Лабораторная работа №4

Проведение обратной транскрипции для получения кДНК

Для получения кДНК используют следующие праймеры:

- олиго-дТ для обратной транскрипции всех мРНК, содержащих поли-А-хвост (матричные РНК эукариот)
- рандомные олиго-праймеры (чаще гексамеры) для случайной обратной транскрипции всех РНК
- специфические праймеры для обратной транскрипции только необходимых мРНК (определенного гена и белка), которые подбирают по последовательности нуклеотидов искомой РНК согласно базам данных.

Проведение обратной транскрипции

1. Установить в ледяную баню две серии эппендорфов (+контроль и -контроль).
2. Установить полистероловую пробирку большого объема в ледяную баню, в которой приготовить следующую смесь:
 - 1 мл 10 мМ дНТФ (конечная концентрация 500 мкМ каждого);
 - 4 мл 5х буфера для проведения ОТ (1х конечная концентрация) следующего состава 250 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 375 мМ КCl, 15 мМ MgCl₂;
 - 2 мл 0,1 М ДТТ (10 мМ конечная концентрация);
 - 0,5 мл 3 мг/мл одного из необходимых праймеров (конечная концентрация 1-10 мкМ);
 - 0,5 мл (40 ЕД) ингибитора РНКаз (идет в наборе, например, диэтилпирикарбонат).Тщательно перемешать. На каждую пробу идет по 8 мкл.
3. В эппендорф добавить:
 - 8 мкл приготовленной смеси;
 - 12 мкл выделенной РНК (общая добавляемая концентрация до 2 мкг);
 - 2 мкл раствора Superscript II обратной транскриптазы.
4. В контрольные пробирки добавить 2 мкл бидистиллированной воды вместо транскриптазы.
5. Инкубировать эппендорфы в амплификаторе или ультратермостате при 42⁰С 50 мин для протекания обратной транскрипции.
6. Затем 5 мин при 85-92⁰С для денатурации обратной транскриптазы.
7. Остановить реакцию перенесением пробирок в ледяную баню.

Демонстрационное видео:

Проведение ОТ-ПЦР

<https://www.youtube.com/watch?v=qmACKSvFZpM>

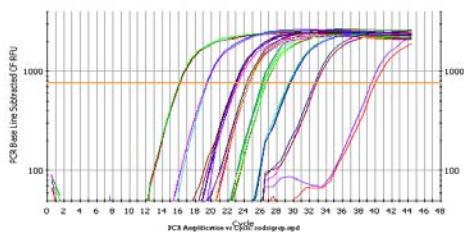
Лабораторная работа №5

Проведение Real-Time PCR для тестируемого гена /пример с геном GliA-1/

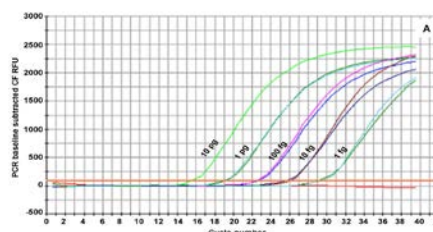
- В пробирка на 1,5 мл приготовить смесь в необходимом объеме. Ниже указаны объемы реагентов на 1 пробу из расчета 25 мкл общей смеси:
 - 12,5 мкл 2x GoTaq Green Master Mix (смесь буфера, нуклеотидов, флуорисцентных меток и полимеразы для РТ-ПЦР) (конечная концентрация 1x);
 - 0,5 мкл 25 пмоль/мкл прямого (+) праймера GliA-1 (конечная концентрация 0,5 пмоль/мкл);
 - 0,5 мкл 25 пмоль/мкл обратного (-) праймера GliA-1 (конечная концентрация 0,5 пмоль/мкл);
 - 10,5 мкл H₂O до конечного объема 24 мкл.
- Перенести по 24 мкл МастерМикс (из приготовленной смеси) в необходимое число лунок планшета или 0,2мл-пробирок для РТ-ПЦР.
- Необходимо минимум 5 повторов опытного образца, 5 отрицательных контролей без образцов, 5 контролей без МастерМикса, вместо которого вода с образцами.
- Прибавить по 1 мкл кДНК, полученной методом ОТ (матрица) в опытные лунки и контроль образцов.
- Запустить термоциклер.
- Прописать пометки для каждой лунки, которую заполняли.
- Прописать программу (*температуры отжига праймеров подбирают экспериментально или исходя из данных литературы, а также с помощью программ, например, PerlPrimer*):

Step1: 95°C 2 мин /общая денатурация всех НК в образцах, шаг более не повторяется/	}	шаги повторяются, см. Step5
Step2: 95°C 30 сек /денатурация/		
Step3: 52°C 30 сек /отжиг (аннелинг) праймеров/		
Step4: 72°C 1 мин /полимеризация/		
Step5: Go to step 2, повтор 30 раз (многократная репликация)		
Step6: 72°C 5 мин /дорепликация/		
Step7: 4°C forever		

/Температуры и длительность шагов могут меняться в зависимости от методики!/
- Оценить количество мРНК данного исследуемого гена, к которому применяли праймеры, можно по сравнению со стандартными пробами, содержащими известное количество кДНК либо этого гена, либо другого в качестве свидетеля.
- Прибор выдает графики показывающие количество ампликонов (*в нашем случае ампликоны исследуемого гена будут зелеными*) в течение заданных циклов. График имеет лаг-фазу, когда концентрация ампликонов слишком мала для детекции, затем идет логарифмическая фаза быстрого увеличения количества ампликонов, и далее – граф выходит на плато. Чем раньше начинается лог-фаза графика (меньшее число циклов), тем выше концентрация исследуемой кДНК, и, соответственно, комплементарной ей исследуемой мРНК.



Анализ опытных образцов



Калибровка по стандартным образцам

- Пробы после РТ-ПЦР также можно разделить методом горизонтального электрофореза (см. работу №3).

Демонстрационные видео:

<https://www.youtube.com/watch?v=QQwL13Ng6Ks> проведение ПЦР в реальном времени

<https://www.youtube.com/watch?v=BiWkioda7mo> общие принципы технологии ПЦР

<https://www.youtube.com/watch?v=kvQWKcMdyS4> общий принцип ПЦР в реальном времени

<https://www.youtube.com/watch?v=1vRByU2VMUE> работа с термоциклером ABI

Лабораторная работа №6

Препаративное выделение и фракционирование белков по Осборну в модификации Жилича с соавт. / на примере глеадинов /

I. Подготовка растительного материала

1. Отобрать по 5-10 хороших зерновок каждого сорта/линии пшеницы.
2. Растереть зерновки пшеницы в ступке до мелкодисперсной муки.
3. В пластиковые завинчивающиеся пробирки внести по 500 мг муки.

II. Экстракция масел /обезжиривание/

4. В пробирки добавить 3 мл бутанола, перемешивать на вортексе 15 мин.
5. Центрифугировать при 15000 об/мин 10 мин.
6. Слить супернатант и добавить к осадку 2 мл петролейного эфира. Тщательно перемешать.
7. Центрифугировать при 15000 об/мин 10 мин.
8. Вакуумно высушить осадок. /Процедуры 3-7 можно опустить, если в зерне содержится мало масел или предварительно удалить зародыши/.

III. Экстракция водо- и солерастворимых белков /глобулины и альбумины/

9. К муке или осадку после обезжиривания прибавить 3 мл 0,5 М NaCl и перемешивать на вортексе 30 мин при 4⁰С.
10. Центрифугировать 15000 об/мин при 4⁰С 15 мин. Супернатант слить или отобрать в отдельную пробирку.
11. Процедуры 9-10 повторить дважды.
12. К осадку прибавить 3 мл дистиллированной воды для отмывки солей, перемешивать на вортексе 20 мин при 4⁰С.
13. Центрифугировать 15000 об/мин при 4⁰С 15 мин. Супернатант слить или перенести в пробирку с предыдущими фракциями.

IV. Экстракция спирторастворимой фракции белков (глеадины)

14. К осадку прибавить 3 мл 70⁰ этанола и перемешивать на вортексе 1-1,5 часа при комнатной температуре.
15. Центрифугировать при 15000 об/мин 15 мин.
16. Супернатант перенести в отдельную пробирку.
17. Для доэкстракции прибавить к осадку 2 мл 70⁰ этанола и перемешивать на вортексе 30 мин при комнатной температуре.
18. Центрифугировать при 15000 об/мин 15 мин.
19. Объединить экстракт с предыдущим. Затем 5 мл экстракта вакуумно сконцентрировать до 2,5 мл и хранить в закупоренных пробирках при 4⁰С не более недели.

/далее по необходимости/

V. Экстракция глютелинов

20. К осадку прибавить 7 мл 50% н-пропанола и 1% ДТЭ. Экстрагировать трижды. Супернатанты объединить.

VI. Экстракция щелочерастворимых белков

21. К осадку прибавить 1н или 2н NaOH. Экстрагировать трижды. Супернатанты объединить.

VII. Нерастворимые глютелины (глютелины)

22. В осадке определить содержание общего азота микрометодом по Кьельдалю. И пересчитать на белок с коэффициентом 5,7.

Лабораторная работа №7

Разделение белков с помощью нативного кислого электрофореза по Новосельской в модификации Дукича с соавт.

1. Приготовить 5 мМ Al-лактатный буфер объемом 2 л.
5 мМ Al-лактатный буфер:
3 г $AlCl_3$
6,5 мл 80% молочной кислоты
Довести дистиллированной водой до 800 мл
Выставить pH 3,1 с помощью 20% раствора $AlCl_3$ или 1 М NaOH
Довести объем дистиллированной водой до 2 л.
2. Приготовить основу для 7,5-8,33% геля:
12,5 г (12 г) акриламида
0,62 г (0,6 г) бис-акриламида
0,15 г (0,2 г) аскорбиновой кислоты
200 мкл 10% $Fe_2(SO_4)_3$ или 80 мкл $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
Растворить все компоненты в 150 мл Al-лактатного буфера (pH 3,1)
После приготовления и растворения всех компонентов гель профильтровать. Хранить в плотно закупоренных сосудах из темного стекла. Перед использованием охладить до 0°C.
3. Приготовить раствор 1% перекиси водорода из 3% перекиси водорода (аптечная) и охладить до 0°C.
4. Стекла вымыть с детергентом и высушить.
5. Собрать камеру и установить в устройство для заливки геля.
6. Приготовить 50 мл 1% агара на Al-лактатном буфере.
7. Залить в подложку остуженный до 60°C агар и дать застыть /герметизация щелей между стеклами/.
8. 40 мл основы геля пропустить через фильтр Шота №3 путем вакуумной фильтрации для дегазации и охладить до 0°C.
9. В 40 мл охлажденного геля внести 60-80 мкл холодной 1% перекиси водорода, один раз перемешать и немедленно быстро заполнить пространства между стеклами, сразу же вставив гребенку. /Гель полимеризуется в течении 30-45 сек!!!/.
10. Приготовить буфер для внесения образцов:
4 мл глицерина
6 мл Al-лактатного буфера
5 мг метилового зеленого
11. Приготовить образцы для внесения. Для этого в эппендорф добавить 100 мкл спиртового раствора экстракта глеадинов и 50 мкл буфера для внесения. Тщательно перемешать до полного смешения жидкостей с разными плотностями.
12. Аккуратно вынуть гребенку из геля, лунки промыть буфером и почистить.
13. Удалить буфер из лунок и снова заполнить их буфером наполовину.
14. Внести в лунки по 20-25 мкл образцов, предварительно смешанных с буфером для внесения.
15. Аккуратно наслоить буфер до краев лунок.
16. Одеть крышку на прибор и подключить электроды к источнику тока. Разгонку вести от + к – при 70 мА и 360 В. Длительность электрофореза 4-5 часов.
17. По окончании отключить прибор, кассету из стекол поместить в воду и снять одно из стекол, оставив гель на втором в качестве подложки. /Перекисные гели хрупкие в сравнении с персульфатными!/.
18. Приготовить окрашивающий раствор объемом 250 мл:
0,5 г амидочерный Б
6 г ТХУ
14 мл уксусная кислота
80 мл метанол
150 мл вода

19. Залить гель на стекле окрашивающим раствором. Окраску проводить 2 часа при периодическом помешивании для лучшей диффузии красителя.
20. Слить краситель, промыть небольшим количеством воды.
21. Залить гель раствором для обесцвечивания №1 объемом 250 мл:
 - 18 мл уксусная кислота
 - 80 мл метанол или этанол
 - 152 мл вода
22. Отмывать 45 мин – 1 час при постоянном помешивании. Затем слить отмывочный раствор и ополоснуть гель небольшим количеством воды.
23. Залить гель раствором для обесцвечивания №2:
 - 50 мл метанола или этанола
 - 70 мл уксусной кислоты
 - 880 мл воды
24. Обесцвечивать меняя раствор №2 четыре раза до полного обесцвечивания.
25. Промыть гель водой.
26. Сфотографировать или отсканировать гель, задокументировав результаты.

Демонстрационное видео:

<https://www.youtube.com/watch?v=YoKUiTWjy18> обзор применение методов электрофореза

<https://www.youtube.com/watch?v=jt1a8AUeJcg> электрофорез по Лэмли

Использованные источники литературы:

1. [Cota-Sanchez J.H. et al. Ready-to-use DNA-extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissues // Plant Mol Biol Reporter, 2006. – Vol. 24. – P.161–167](#)
2. [Ivanova N.V. et al. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Molecular Ecology Notes, 2006. – Vol. 6. – P.998–1002.](#)
3. [Song H., Liu Y. et al. An improved method for total RNA isolation from recalcitrant loquat \(*Eriobotrya japonica* Lindl.\) buds // Pak. J. Bot., 2011. – Vol. 43, N 2. – P.1163–1171](#)
4. [Сомма М., Кверчи М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов: Сессия 5. Электрофорез в агарозном геле / Всемирная организация здравоохранения. Европейское бюро.](#)
5. [Testing gene expression by reverse transcriptase PCR \(rt-PCR\). Overview](#)
6. [Žilić S., Barać M. et al. Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes // Int. J. Mol. Sci., 2011. – Vol. 12. – P.5878–5894: doi:10.3390/ijms12095878](#)
7. [Đukić N., Matić G. et al. Biochemical analysis of gliadins of wheat *Triticum durum* // Kragujevac J. Sci., 2005. – Vol. 27. – P.131–138](#)
8. Новосельская А.Ю, Метакровский Е.В., Созинов А.А. Изучение полиморфизма глиадинов некоторых пшениц методами одномерного и двухмерного электрофореза // Цитология и генетика, 1983. – Т.17, № 5. – С.49–45
9. [Tenea G.N. et al. Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions // BMC Research Notes, 2011. – Vol. 4. – P.373: doi:10.1186/1756-0500-4-373](#)
10. [Schmittgen T.D. et al. Quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods // Analytical Biochemistry, 2000. – Vol. 285. – P.194–204](#)