

Metody badania ekspresji genów

dr Katarzyna Knapczyk-Stwora

Warunki wstępne:

Proszę zapoznać się z tematem „Metody badania ekspresji genów” zamieszczonym w skrypcie pod reakcją A. Lityńskiej i M. Lewandowskiego „Techniki badań fizjologicznych”, Wydawnictwo UJ, 1998. (skan w załączeniu)

Wstęp:

Działanie i właściwości każdej komórki zależą od sygnałów, które do niej dochodzą. Odpowiedź komórki na takie sygnały polega na zmianie ekspresji genów, a co za tym idzie na zmianie ilości produkowanego białka. Zatem analiza ekspresji genów może odbywać się na poziomie mRNA lub białka. W pierwszym przypadku po wyizolowaniu komórkowego RNA przeprowadza się reakcję odwrotnej transkrypcji w celu przepisania cząsteczek mRNA na cDNA, a następnie przy użyciu metody PCR powiela się konkretne cDNA. Po powieleniu, DNA z łatwością daje się oddzielić od reszty, która nie została powielona podczas elektroforezy w żelu agarozowym. Obecność prążka o określonej ilości par zasad, widzianego w świetle UV, świadczy o ekspresji genu na poziomie mRNA. Inną metodą służącą do analizy RNA jest metoda Northern blot, w której całkowity komórkowy RNA jest wpierw rozdzielany w żelu agarozowym. Następnie cząsteczki RNA z żelu są przenoszone na nitrocelulozowe membrany i uwiadczniane za pomocą odpowiednich sond. Obie metody analizy ekspresji genów na poziomie RNA pozwalają na wskazanie, w której tkance lub typie komórek następuje ekspresja określonego genu i jakie czynniki ją regulują.

Z kolei analiza ekspresji genów na poziomie białka jest możliwa stosując metodę Western blot. Metoda ta polega na izolacji całkowitego białka z komórek, następnie jego rozdzieleniu w żelu poliakrylamidowym i detekcji konkretnego białka przy użyciu znakowanych, specyficznych przeciwciał. W celu detekcji badanego białka, rozdzielone po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym białka przenosi się w polu elektrycznym na membranę nitrocelulozową, a obecność badanego białka jest potwierdzana za pomocą specyficznego przeciwciała pierwszorzędowego, które z kolei wykrywane jest przy użyciu drugorzędowego przeciwciała odpowiednio wyznakowanego np. enzymem. W przypadku, gdy drugorzędowe przeciwciało jest wyznakowane peroksydazą chrzanową, do identyfikacji miejsca związania tego przeciwciała można zastosować metodę chemiluminescencji, która polega na enzymatycznie katalizowanej produkcji światła i amplifikacji powstałego światła przez chemiczne wzmacniacze. Detekcję można również prowadzić z zastosowaniem

autoradiografii, alkalicznej fosfatazy, czy diaminobeznidydy. Jednak metoda chemiluminescencji jest najlepsza pod względem czułości, szybkości i bezpieczeństwa.

Opis procedury:

W trakcie ćwiczeń studenci pracują w dwóch grupach zgodnie z przygotowanym opisem procedury, z których każda przygotowuje żele agarozowe, następnie nakłada na nie próbki po reakcji PCR, a po zakończonym rozdiale elektroforetycznym ogląda rezultat w aparacie GelDoc. Ponadto studenci w każdej z grup mają za zadanie wylać 10% żel poliakrylamidowy rozdzielający oraz 5% żel zagęszczający oraz przygotować próbki (zmieszać odpowiednią objętość próbki z buforem do próbek i zagrzać w temperaturze 95°C przez 3 minuty) i nałożyć je na żel.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotować aparat do wylewania żeli agarozowych.
2. Przygotować 100ml 1% agarozy w buforze TAE i ogrzewać do całkowitego rozpuszczenia w kuchenie mikrofalowej; po lekkim przestudzeniu wylać żel do przygotowanego aparatu do wylewania żeli; nałożyć grzebień i zostawić do polimeryzacji (około 30 min). Po polimeryzacji żel włożyć do aparatu do elektroforezy, zalać buforem TAE i wyjąć grzebień.
3. Do próbek po reakcji PCR dodać bufor obciążający wraz z Midori Green (w celu uwidocznienia DNA w świetle UV) i nałożyć próbki na żel.
4. Elektroforezę prowadzić przez 45 min przy 70V. Po tym czasie oglądać żel w aparacie GelDoc.
5. Przygotować poliakrylamidowy żel 10% :

H ₂ O	2 ml
Tris-HCl (pH 8.8)	1,25 ml
Akryloamid/BisAkr	1,65 ml
SDS	50 µl
APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

TEMED DODAWAĆ POD DIGESTORIUM;

wylać żel do aparatu (pod digestorium), na wierzch nawarstwić wodę, pozostawić na 45min do polimeryzacji

6. Przygotować poliakrylamidowy żel 5% :

H ₂ O	1,52 ml
Tris-HCl (pH 6.8)	625 µl
Akryloamid/BisAkr	335 µl
SDS	25 µl
APS	12,5 µl

7. Przygotować próbki do nałożenia na żel: do objętości próbki zawierającej 20µg białka dodać bufor TRIS/EDTA do objętości 15µl i dodać 15µl buforu do próbek; gotować próbki przez 3 min w temp. 95°C i po ochłodzeniu na lodzie nałożyć próbki na żel przygotowany przez poprzednią grupę.
8. Usunąć wodę z żelu 10%, dodać TEMED (2,5 µl) do żelu 5% i nawarstwić go na żel 10%; włożyć grzebień i pozostawić do polimeryzacji.

Wymagania:

Student powinien wiedzieć na czym polegają metody badania ekspresji genów na poziomie mRNA (PCR, real-time PRC, Northern blot) oraz na poziomie białka (Western blot), jak przeprowadzić elektroforezę w żelu agarozowym i poliakrylamidowym (przygotować żele i próbki do elektroforezy).

Student powinien potrafić samodzielnie przygotować próbki do elektroforezy kwasów nukleinowych i białek oraz żele agarozowe i poliakrylamidowe w oparciu o przygotowany przez prowadzącego protokół oraz interpretować wyniki.

Student powinien rozumieć konieczność odpowiedniego zaplanowania eksperymentu, precyzyjnego odmierzenia próbek w badaniach ilościowych oraz zachowanie zasad bezpiecznego wykonywania doświadczeń.

METODY BADANIA EKSPRESJI GENÓW

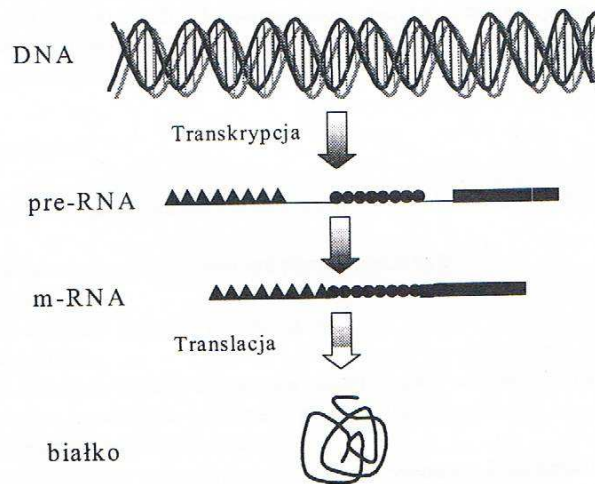
Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek

Wstęp

Poznanie struktury, funkcji i mechanizmów regulacji genów jest konieczne do zrozumienia funkcjonowania systemów biologicznych. Wiadomo, że działanie i właściwości każdej komórki są zdeterminowane przez białka w niej zawarte. Ale co decyduje o ilości białka w każdej z komórek? Tymi czynnikami są:

- ilość mRNA odpowiadająca danemu białku,
- częstotliwość z jaką mRNA ulega translacji,
- stabilność powstałego białka.

Te czynniki decydują, które geny ulegają ekspresji i w jakim stopniu w danej komórce. Poniższy schemat przedstawia drogę prowadzącą od genomowego DNA do końcowego produktu – białka.



Rys.1

Regulacja ekspresji genów może się odbywać na poziomie translacji, potranslacyjnym, transkrypcji, potranskrypcyjnym. Częsteczki RNA są produkowane w procesie transkrypcji w jądrze komórkowym. Po modyfikacji, wycięciu intronów i dobudowaniu łańcucha poli(A) są eksportowane do cytoplazmy. Stabilność cytoplazmatycznego RNA jest również elementem regulacji ekspresji genów. Należy pamiętać, że większość cząsteczek mRNA tworzy kompleksy z polisomami, lecz powstają również kompleksy mRNA: białka, które nie podlegają translacji.

Badaniu ekspresji genów na poziomie transkrypcji bądź translacji służą opisane poniżej metody (*Northern* i *Western blotting*). Opisano krótko również metodę *Southern blottingu*, która była pierwszą z zastosowanych metod blottingu.

Southern blotting, wprowadzony przez E.M. Southern, jest metodą służącą do analizy struktury genu. Genomowy DNA wyizolowany z komórki jest cięty przy użyciu enzymów restrykcyjnych i rozdzielany w żelu agarozowym. Po zakończeniu rozdzielania, na żel nakładamy filtr nitrocelulozowy lub nylonowy (o wymiarach żelu) i strumień buforu przechodzący przez żel przenosi rozdzielone fragmenty DNA na filtr, gdzie są wiązane. W taki sposób powstaje replika DNA na filtrze. Znakowana izotopem sonda, specyficzna dla genu, ulega hybrydyzacji (przyłącza się) z cząsteczkami DNA związanymi z filtrem. Sondą taką może być oczyszczony RNA, sklonowany cDNA lub krótki syntetyczny oligonukleotyd. Sonda będzie hybrydować tylko ze specyficznymi cząsteczkami zawierającymi komplementarną sekwencję. Autoradiografia nitrocelulozowego filtru umożliwi określenie ilości i wielkości fragmentów DNA komplementarnych do sondy. Metoda ta jest niezwykle użyteczna do wykrywania głównych rearanzacji i delecji w genie, które mogą być przyczyną wielu chorób.

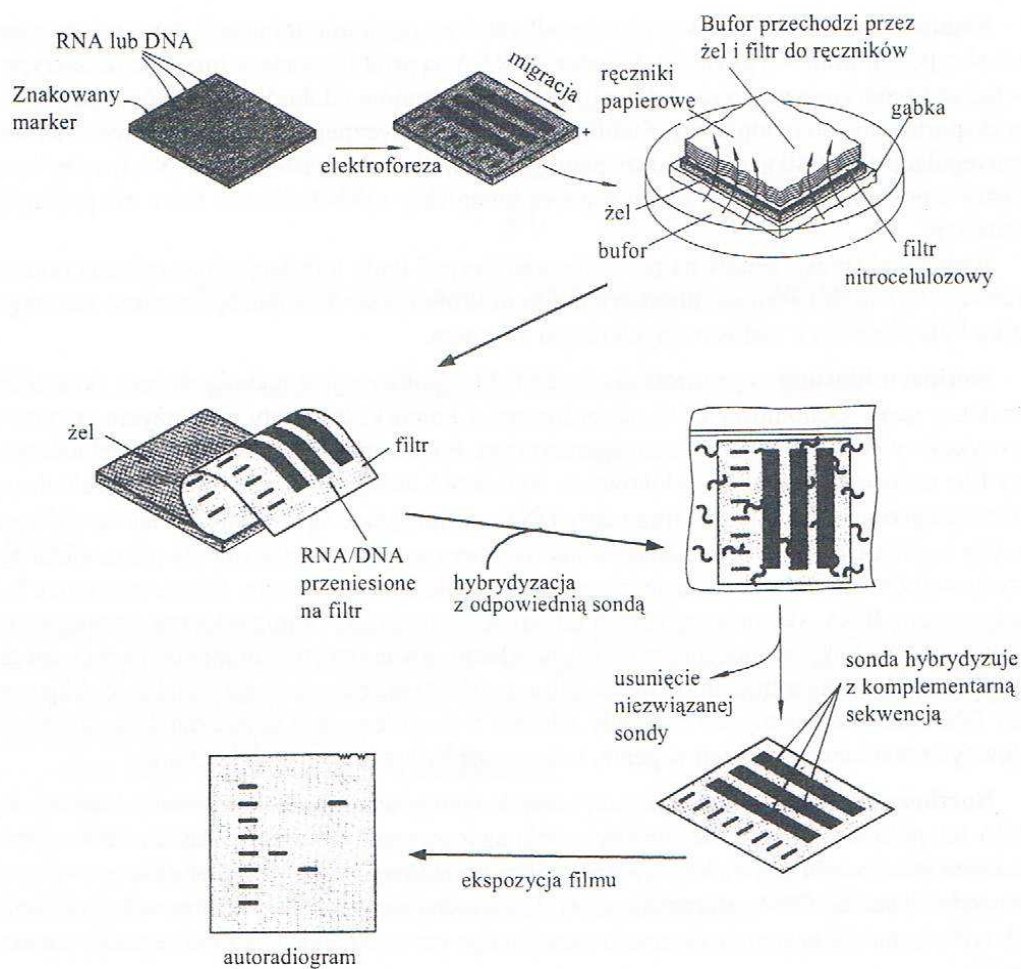
Northern blotting jest techniką używaną do analizowania RNA. Całkowity komórkowy RNA lub poli(A)RNA jest rozdzielany w żelu agarozowym. Częsteczki RNA z żelu są przenoszone na nitrocelulozowe lub nylonowe filtry i wykrywane (uwidoczniane) za pomocą odpowiednich sond (cDNA, oligonukleotyd). Ta metoda pozwala na wskazanie, w której tkance lub typie komórek następuje ekspresja określonego genu lub jakie czynniki regulują ich ekspresję.

Przykład zastosowania metody

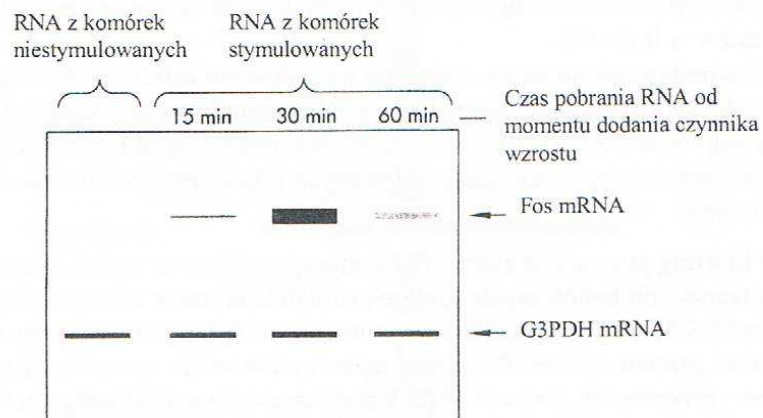
Badano wpływ czynników wzrostu zawartych w surowicy na ekspresję genu c-Fos w komórkach fibroblastów w hodowli.

Komórki stymulowano surowicą; następnie wyizolowano całkowity RNA w kilku punktach czasowych. RNA otrzymane w każdym z punktów analizowano metodą *Northern blotting*, stosując odpowiednie cDNA jako sondę. Wyniki pokazują, że Fos mRNA było obecne w małych ilościach w komórkach niestymulowanych i ilość jego gwałtownie wzrastała pod wpływem surowicy.

Western blotting pozwala na zidentyfikowanie specyficznych białek. Mieszanina białek otrzymana z tkanek lub hodowanych komórek rozdzielana jest w żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS. Rozdzielone białka są przenoszone na filtr nitrocelulozowy i inkubowane z odpowiednimi przeciwciałami. Pierwotne przeciwciało wiąże specyficzny epitop i kompleks antygen – przeciwciało jest wykrywany przy użyciu drugorzędowego przeciwciała odpowiednio wyznakowanego (patrz rozdział 23).

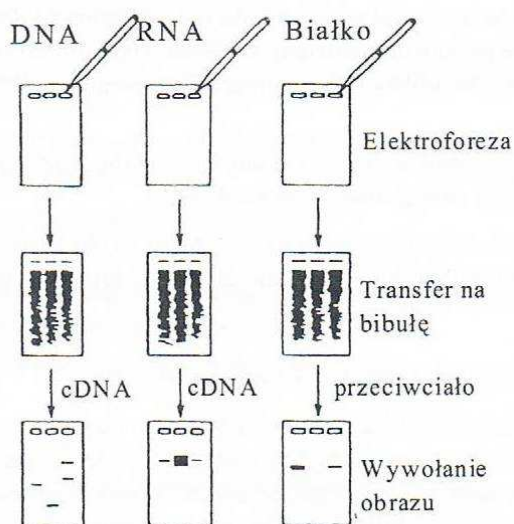


Rys. 2



Rys. 3

Southern Northern Western



Rys. 4

24.1. Wykonanie ćwiczenia

24.1.1. Aparatura

Aparat do rozdziału elektroforetycznego, aparat do elektrotransferu, wytrząsarka.

24.1.2. Odczynniki

Akrylamid: bisakrylamid (29:1), nadsiarczan amonu (100 mg/ml), TEMED, bufor Laemmli, bufor do próbek (2x), 10% SDS, bufor do transferu, TBS, Tween 20, bufor 1.5 M Tris (pH 8.8), bufor 1 M Tris (pH 6.8), przeciwciało pierwotne, odpowiednie przeciwciało drugorzędowe sprzężone z peroksydazą chrzanową, 30% H_2O_2 , DAB (dwuaminobenzzydina).

U w a g a: Podczas wykonywania doświadczenia konieczne jest używanie rękawiczek lateksowych.

24.1.3.1. Elektroforeza

a) Przygotować 10 ml 10% żelu: zmieszać w zlewce 4 ml H_2O , 3.3 ml mieszaniny 30% akrylamidu, 2.5 ml 1.5 M buforu Tris (pH 8.8), 0.1 ml 10% SDS, 0.1 ml 10% nadsiarczanu amonu i dobrze wymieszać.

b) Przygotować szklane płytki według instrukcji dołączonej do aparatu.

c) Dodanie 4 μ l TEMED rozpocznie proces polimeryzacji. Wlać przygotowany żel między płytki (do określonej wysokości) i na powierzchnię żelu nawarstwić delikatnie wodę (zapobiega to wysychaniu polimeryzującego żelu).

d) Po godzinie usunąć wodę z powierzchni i nałożyć żel zagęszczający przygotowany następująco: 2.7 ml H_2O , 0.67 ml 30% akrylamid, 0.5 ml 1.0 M buforu Tris (pH 6.8), 40 μ l

10% SDS, 40 μ l 10% nadsiarczuanu amonu, 4 μ l TEMED. Między płytki wsunąć grzebień, który pozwoli na utworzenie studzienek w polimeryzującym żelu.

e) Zmontować aparat do elektroforezy; do komory górnej i dolnej nalać bufor.

f) Przygotowanie próbek do rozdzielu: zmieszać 10 μ l próbki (zawierającej znane stężenie białka) z 10 μ l buforu do próbek (2x), zagrzzać w temperaturze 95°C przez 3 minuty i nałożyć próbki na żel.

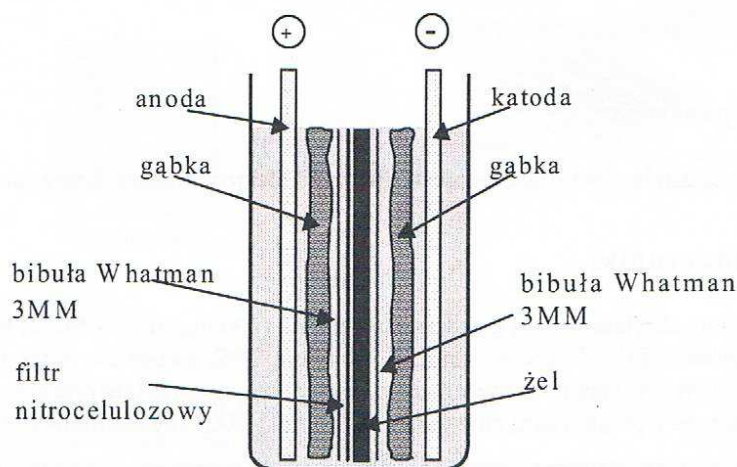
Uwaga: Do pierwszej studzienki nakładamy zawsze standard mas cząsteczkowych (mieszanina białek o znanej masie cząsteczkowej).

g) Przeprowadzać elektroforezę przy 150 V, przez około 45 minut. Kiedy barwnik zawarty w buforze (błękit bromofenolowy) dojdzie do dolnej krawędzi płytki, elektroforezę można zakończyć.

24.1.3.2. Elektrofotransfer białek na filtr nitrocelulozowy

a) Żel z rozdzielonymi białkami przemyć buforem do transferu.

b) W aparacie do transferu (leżącym płasko na stole) wypełnionym buforem umieścić elektrodę, na niej położyć specjalną gąbkę, arkusz bibuły Whatman 3 MM, żel poliakrylamidowy, filtr nitrocelulozowy, bibułę 3 MM, gąbkę i drugą elektrodę (patrz rys. 5). Między żelem a filtrem nie może być banieczek powietrza!



Rys. 5

c) Prawidłowe ułożenie wszystkich elementów sprawia, że przylegają one ściśle do siebie i są zanurzone w buforze. Umieścić je w komorze wypełnionej buforem do transferu, podłączyć elektrody.

d) Transfer przeprowadzamy przy natężeniu 480 mA przez 1.5 godziny.

24.1.3.3. Reakcje z przeciwciałami

a) Po zakończeniu transferu filtr przepłukać buforem i zostawić do blokowania w TBST przez noc w temperaturze 4°C.

b) Inkubacja z pierwszorzędowym przeciwciałem – do szalki wlać roztwór przeciwciała (zwykle rozcieńczenie 1:100 – 1:1000), przenieść filtr i pozostawić na 1–2 godziny z łagodnym wytrząsaniem w temperaturze pokojowej.

c) Przemyć filtr buforem TBST 3x10 minut.

d) Inkubować z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (rozcieńczenie 1:1000).

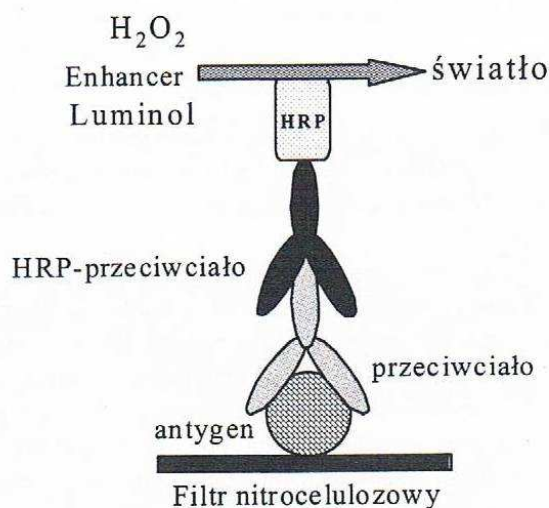
e) Przemyć buforem TBST 3x10 minut, buforem TBS 1x10 minut.

f) Przeprowadzić reakcję barwną:

100 ml buforu TBS pH 7.4 zawiera: 40 mg DAB
35 μ l 30% H_2O_2

Filtr zanurzać w buforze z substratami tak długo (1–10 min), aż pojawią się brązowe paski w miejscach, gdzie znajduje się identyfikowane białko.

g) Reakcję przerwać, przemywając filtr wodą destylowaną.



Rys. 6

Przeciwciało znakowane peroksydazą może być również uwidocznione przy użyciu techniki ECL (wzmocniona chemiluminiscencja). ECL jest nieradioaktywną metodą opartą na enzymatycznie katalizowanej produkcji światła i amplifikacji powstałego światła przez chemiczne wzmacniacze. Pod względem czułości, bezpieczeństwa, szybkości i łatwości użycia metoda ta jest najlepsza przy immunodetekcji białek. Czułość tej metody pozwala na wykrycie pikogramowych ilości białka.