



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



*„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”*

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

WYKORZYSTANIE MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ W BADANIACH GENOMÓW ROŚLIN UŻYTKOWYCH

03.– 07.10.2011

Instrukcja do ćwiczeń

Prowadzący:

Dr Dominika Idziak

Mgr Hanna Sas - Nowosielska



ZNAKOWANIE SOND DNA

Znakowanie metodą nick – translacji

Za pomocą metody nick-translacji można znakować koliste lub liniowe cząsteczki DNA o długości od 1 kpz (np. plazmidy, niektóre produkty PCR) do 20-30 kpz (przeciętna długość sekwencji pofragmentowanego jądrowego DNA), a nawet ok. 100 kpz (klony BAC). Metoda ta nie umożliwia amplifikacji DNA podczas znakowania, zatem ilość znakowanej matrycy DNA potrzebnej do przeprowadzenia jednej reakcji jest stosunkowo duża (0,5-20 µg/20 µl).

Przykładowe sondy znakowane metodą nick – translacji:

Całkowity genomowy DNA (wyizolowany za pomocą metody C-TAB lub przy użyciu komercyjnych zestawów odczynników do izolacji).

Sonda 25S rDNA. Matrycą do znakowania jest fragment DNA o długości 2,3 kpz wycięty w wyniku trawienia restryktazą *ClaI* z odcinka kodującego 25S rDNA u *A. thaliana* (Unfried, Gruendler, 1990).

Skład mieszaniny reakcyjnej do znakowania metodą nick-translacji

Składniki	Objętość [µl]
dATP (0,4 mM)	2,50
dCTP (0,4 mM)	2,50
dGTP (0,4 mM)	2,50
dTTP (0,4 mM)	1,67
10x bufor reakcyjny	2,00
DNA do znakowania (100-300 ng/µl)	6,00
Digoksygenina-11-dUTP (1 mM; Roche, nr kat. 1363905) lub Tetrametylorodamina-5-dUTP (1 mM; Roche, nr kat. 1534378)	0,83
Mieszanina enzymów DNazy I i polimerazy I (Roche, nr kat. 11745808910)	2,00
RAZEM	20,00

Warunki reakcji nick-translacji:



15°C × 95 minut + 65°C × 10 minut + 4°C × ∞

Znakowanie metodą PCR

Metoda ta jest odpowiednia do znakowania kolistych lub liniowych cząsteczek DNA o długości od 0,2 kpz do 1-2 kpz. Pozwala ona na amplifikację DNA podczas procedury znakowania, dzięki czemu ilość matrycy DNA potrzebna do przeprowadzenia reakcji jest stosunkowo niewielka (zwykle 10-50 ng/50 µl).

Przykładowe sondy znakowane metodą PCR:

Sonda 5S rDNA (pTa794). Sonda znakowana metodą PCR. Matrycę do znakowania stanowi klon wyizolowany z *Triticum aestivum* (Gerlach, Dyer, 1980). W reakcji PCR wykorzystuje się uniwersalne startery sekwencyjne typu M13 „forward”, (5'-CAG GGT TTT CCC AGT CAC GA-3') oraz „reverse” (5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3').

Skład mieszaniny reakcyjnej dla sondy 5S rDNA

Składniki	Ilość [µl]
Sterylna woda destylowana	27,50
Bufor reakcyjny 10× dla polimerazy DNA <i>Taq</i> (Promega)	5,00
dATP (2,5 mM)	2,00
dCTP (2,5 mM)	2,00
dGTP (2,5 mM)	2,00
dTTP (2,5 mM)	3,25
M13 forward (starter 5 pmol/ml)	2,00
M13 reverse (starter 5 pmol/ml)	2,00
DNA (preparat plazmidowy, 20 ng/µl)	2,00
Tetrametylorodamina-5-dUTP lub digoksygenina-11-dUTP	1,75
Enzym <i>Taq</i> -polimeraza (5U/µl, Promega)	0,50
RAZEM	50,00

Warunki reakcji PCR:

94°C/1 min + [94°C/40 sek. + 55°C/40 sek. + 72°C/60 sek.] × 35 + 72°C/5 min



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Sonda telomerowa (HT100.3). Matrycę do tworzenia sondy stanowi około 30 powtórzeń telomerowych typu *Arabidopsis* (TTTAGGG)_n znajdujących się w plazmidzie pGEM-T Easy (Promega).

Skład mieszaniny reakcyjnej dla sondy telomerowej HT100.3

Składniki	Ilość [μl]
Sterylna woda destylowana	26,50
Bufor reakcyjny 10× dla polimerazy DNA <i>Taq</i> (Promega)	5,00
dATP (2,5 mM)	2,00
dCTP (2,5 mM)	2,00
dGTP (2,5 mM)	2,00
dTTP (2,5 mM)	3,25
M13 forward (starter 5 pmol/ml)	2,00
M13 reverse (starter 5 pmol/ml)	2,00
DNA (preparat plazmidowy, 10 ng/μl)	2,00
Tetrametylorodamina-5-dUTP lub digoksygenina-11-dUTP	1,75
Enzym <i>Taq</i> -polimeraza (5U/μl, Promega)	0,50
RAZEM	50,00

Warunki reakcji PCR:

94°C/1 min + [94°C/30 sek. + 55°C/40 sek. + 72°C/60 sek.] ×35 + 72°C/5 min



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Sonda centromerowa (CCS1). Sekwencja CCS1 o długości 260 par zasad wyizolowana z *Brachypodium sylvaticum* (Aragon-Alcaide i in., 1996).

Skład mieszaniny reakcyjnej dla sondy CCS1

Składniki	Ilość [μl]
Sterylna woda destylowana	26,50
Bufor reakcyjny 10× dla polimerazy DNA <i>Taq</i> (Promega)	5,00
dATP (2,5 mM)	2,00
dCTP (2,5 mM)	2,00
dGTP (2,5 mM)	2,00
dTTP (2,5 mM)	3,25
CCS1 A (starter)	2,00
CCS1 B(starter)	2,00
DNA (sekwencja CCS1)	2,00
Digoksygenina-11-dUTP lub tetrametylorodamina-5-dUTP	1,75
Enzym <i>Taq</i> -polimeraza (5U/μl, Promega)	0,50
RAZEM	50,00

Warunki reakcji PCR:

94°C/1 min + [94°C/40 sek. + 56°C/40 sek. + 72°C/1 min 10 sek.] ×35 + 72°C/5 min

UWAGA: Sondy znakowane tetrametylorodaminą są wrażliwe na światło!



PRECYPITACJA SOND

Precypitację sond DNA etanolem przeprowadza się w celu usunięcia z próbki nukleotydów, które nie zostały inkorporowane w trakcie reakcji znakowania .

- Dodać 3 M octanu sodu w ilości 0,1 objętości próbki
- Dodać 100% etanol o temperaturze -20°C w ilości 2,5 objętości próbki
- Pozostawić w temperaturze -80°C na 1,5 – 2 godz. lub w temperaturze -20°C na noc
- Odwirować sondę: 30 min., 14000 obr./min., 4°C i przy pomocy szklanej kapilary usunąć supernatant.
- Osad DNA dwukrotnie przemyć 70% alkoholem etylowym i odwirować (5 min., 14000 obr./min., 4°C). Przy pomocy szklanej kapilary usunąć supernatant
- Po usunięciu supernatantu DNA suszyć przez 10-15 min. w temperaturze 37°C w cieplarni
- Rozpuścić wysuszone DNA w 10 μl buforu 1 \times EB (elution buffer, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5).
- Pozostawić na 10-15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie umieścić na noc w lodówce w temperaturze 4°C
- Gotowe sondy przechowywać w temperaturze -20°C .

Literatura:

Aragon-Alcaide L, Miller T, Schwarzacher T, Reader S, Moore G, 1996. A cereal centromeric sequence. *Chromosoma* **105**: 261-268

Gerlach WL, Dyer TA. 1980. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* **8**: 4851-65

Schwarzacher T, Heslop-Harrison J S, 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Limited.

Unfried I, Gruendler P. 1990. Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **18**: 4011



GENOMOWA HYBRYDYZACJA *IN SITU*

Przygotowanie preparatów (materiał: merystemy korzeniowe siewek)

- Nasiona badanych gatunków roślin kiełkować na wilgotnej bibule w szalkach Petriego w temperaturze pokojowej w ciemności (zwykle 3-5 dni).
- (opcjonalnie) Traktowanie siewek w celu nagromadzenia komórek w stadium metafazy: młode (3-5 – dniowe) siewki zanurzyć w 0,05% roztworze wodnym kolchicyny na 5 h w temperaturze pokojowej w ciemności. W zależności od gatunku zamiast kolchicyny używa się 0,002 M roztworu 8-hydroksychinoliny (2 h w temperaturze pokojowej + 2 h w 4°C w ciemności) lub zimnej wody (w naczyniach z wodą schłodzoną do temperatury ok. 4°C znajdujących się w pojemniku z lodem, przez 24 h).
- Siewki utrwalić w świeżo przygotowanym acetoalkoholu, w temperaturze pokojowej przez 4 godziny (lub w temperaturze 4°C przez noc), a następnie przechowywać w temperaturze -20°C aż do momentu wykorzystania.
- Z młodych siewek odciąć korzenie o długości 1-2 cm. Wypłukać materiał w 0,01 M buforze cytrynianowym przez ok. 15 min. (3 × 5 min.)
- Materiał strawić w mieszaninie enzymatycznej o składzie: 4% pektynaza, 1% celulaza (Calbiochem), 1% celulaza („Onozuka”, Serva) w 0,01 M buforze cytrynianowym, przez 30 min - 2 h (w zależności od gatunku) w temperaturze 37°C. Następnie przemyć 3 × 5 min. w 0,01 M buforze cytrynianowym.
- Preparaty wykonywać metodą rozgniotową w 45% kwasie octowym. Gotowe preparaty zamrażać na suchym lodzie. Po zamrożeniu zerwać żyletką szkiełko nakrywkowe.
- (opcjonalnie) W celu usunięcia cytoplazmy przepłukać przez kilka sekund preparaty acetoalkoholem (99,8% etanol : kwas octowy lodowaty w proporcji 3:1), a następnie umieścić na 10-15 min. w zimnym 99,8% etanolu, w kopolinie. Wysuszyć preparaty na powietrzu w temperaturze pokojowej. Przechowywać do momentu wykorzystania w temperaturze 4°C.



Procedura

1. Traktowanie RNaz'ą

1h – 1h30 min./37°C

15 µl stocku (100 µg/ml) rozcieńczyć 1:100 w 2×SSC, tj. do 15 µl stock'u dodać 1485 µl 2×SSC Worteksować. Nałożyć ok. 170 µl/preparat i nakryć folią. Umieścić preparaty w wilgotnej komorze.

Przygotowanie stocku

- 10 mg RNase A (Sigma-R-5503)
- 1 ml 10 mM TrisHCl + 15 mM NaCl

Gotować przez 15 min, schłodzić. Przechowywać w alikwotach po 15 µl w temperaturze -20°C.

2. Płukania w buforze solankowym

2×SSC, 3×5 min., temp. pokojowa

W tych warunkach DNA jest najbardziej stabilne; ściągnąć folie ze szkiełek

3. Utrwalanie w paraformaldehydzie w 1×PBS

Formaldehyd w 1×PBS, 10 min., temp. pokojowa

na 250 ml

- 37% paraformaldehyd 7,5 ml
- 10× PBS 25 ml
- WSD 217,5 ml

4. Płukania w buforze solankowym

2×SSC, 2-3×5 min., temp. pokojowa

5. Dehydratacja w szeregu alkoholowym 70%, 90%, 100%, 3 min. w każdym ze stężeń, temp. pokojowa

6. Wysuszyć preparaty w temperaturze pokojowej



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

7. PRZYGOTOWANIE MIX’U Z SONDĄ

Kolejność dodawania substancji:

- Formamid 100% (F) /warunkuje siłę wiązań próby z sekwencjami specyficznymi i niespecyficznymi DNA na preparacie, denaturuje DNA, stabilizuje ssDNA i obniża temperaturę topnienia DNA, silny kancerogen determinuje kinetykę hybrydyzacji/
- Siarczan dekstranu (DS 50%) /wypełniacz, zapewnia lepkość, zwiększa efektywność reakcji poprzez ułatwienie tworzenia konglomeratów sondy w miejscu hybrydyzacji, uprzednio podgrzać, 42°C kilka minut, pipetować ściętym tipsem/
- 20× SSC /ustala środowisko reakcji, determinuje kinetykę hybrydyzacji/
- **WORTEKSOWAĆ**
- SDS /detergent – ułatwia penetrację sondy/
- **ROZMROZIĆ WYZNAKOWANE PRÓBY, ODWIROWAĆ 2000rpm/15-20 sek. PRZED DODANIEM SOND DO MIX’U ZAMIESZAĆ TIPSEM W PROBÓWKACH**
- **WSD H₂O**
- **DOBRZE WYMIESZAĆ MIX PO DODANIU PRÓBY, WSTRZĄSAĆ RĘCZNIE (OBRACAĆ PROBÓWKĘ), NIE WORTEKSOWAĆ.**

MIX HYBRYDYZACYJNY

100% F	20 µl
50% DS	8 µl
20× SSC	4 µl
10% SDS	2 µl
Genomowy DNA	100-150 ng/µl
Blokujący DNA	25-100 × więcej niż sondy genomowego DNA
WSD	dopełnić do całkowitej objętości 40 µl



*„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”*

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

40 ul

8. Predenaturacja (denaturacja sondy): 10 min., temp. 75°C
Po upływie czasu natychmiast przenieść sondę na lód
9. Stabilizacja sondy: 10 min. na lodzie
10. Nałożyć mix ze zdenaturowaną sondą na preparaty (38 µl MIX'U)
Dobrze zamieszać tipssem w mixie przed jego nałożeniem na preparat; przykryć folią
11. Denaturacja preparatu (z sondą): 70°C/5 min.30 min. min. (pr. nr 10 – Hybaid PCR)
12. Przenieść preparaty do wilgotnej kamery na dobę temp.37°C

Po upływie doby:

13. PŁUKANIA PO HYBRYDYZACJI

A. sondy znakowane rodaminą:

Pamiętać o rozmrożeniu formamidu i włączeniu łaźni 42°C!

- 2×SSC, 42°C, aż spłyną folie (3-4 min.)
 - 20% formamid w 0,1×SSC; 2×5 min., temp.42°C:
 - 2×SSC, 2-3×3 min., temp.42°C
 - 2×SSC, 2-3×3 min., temp. pokojowa
14. Dehydratacja: 70%, 90% i 100% EtOH, 1 min. w każdym ze stężeń, temp. Pokojowa
 15. Zamknąć preparaty w DAPI + Vectashield (9 µl/preparat)

DAPI: stock 100 µg/ml w SDW

DAPI + Vectashield:

DAPI stock	5.0 µl
------------	--------



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Vectashield (Vector Laboratories) 245.0 µl

Przechowywać w 4°C w ciemności.

B. sondy znakowane digoksygeniną:

Pamiętać o rozmrożeniu formamidu, block-milk 5% i włączeniu łaźni 42°C!

- 2×SSC, 42°C, aż spłyną folie (3-4 min.)
- 20% formamid w 0,1×SSC; 2×5 min., temp.42°C:
- 2×SSC, 2-3×3 min., temp.42°C
- 2×SSC, 2-3×3 min., temp. pokojowa
- 4×SSC + 0,2% Tween20, 5 min., temp. pokojowa

14. Milk blok: 5% roztwór odtłuszczonego mleka w proszku w 4×SSC, 180-250 µl/preparat; 30 min., temp. pokojowa

Rozmrozić milk blok, odwirować 14000 rpm przez 5-10 sek., nie pobierać osadu. Nałożyć na preparaty, przykryć folią, inkubować w wilgotnej komorze.

Uważać, aby nie przesuszyć preparatów!

15. Immunodetekcja: przeciwciała anti-dig skoniugowane z FITC, 42 µl/preparat, przykryć folią. Inkubować przez 1h w temp. 37°C w ciemności. W tym czasie włączyć łaźnię wodną i ustawić temperaturę na 37°C.

Stock anti-dig 200 µg anti-dig-fluorescein fab fragments; Roche - 1207741). Rozpuścić liofilizat w 1 ml SDW, rozpipetować po 30/µl, przechowywać w ciemności w temperaturze -20°C. przed użyciem rozcieńczyć milk blokiem w proporcji 1:11.

16. Płukania po immunodetekcji:

4×SSC + 0,2% Tween20, 3×8 min., temp. 37°C

17. Dehydratacja: 70%, 90% i 100% EtOH, 1 min. w każdym ze stężeń, temp. pokojowa

18. Zamknąć preparaty w DAPI + Vectashield (9 µl/ preparat)

DAPI: stock 100 µg/ml w SDW

DAPI + Vectashield:

DAPI stock 5.0 µl



Vectashield (Vector Laboratories) 245.0 μ l

Przechowywać w 4°C w ciemności.

Wykrywanie metylacji białek histonowych metodą immunodetekcji fluorescencyjnej

Przygotowanie preparatów (materiał: merystemy korzeniowe siewek):

- Młode (3-5 – dniowe) siewki utrwalić w 4% formaldehydzie w świeżo przygotowanym 1×PBS przez 20-30 min na wytrząsarce. Następnie przemyć 3 × 5 min. w 1×PBS.
- Z młodych siewek odciąć korzenie o długości 1-2 cm. Materiał strawić w mieszaninie enzymatycznej o składzie: 2,5% pektynaza, 2,5% celulaza, 2,5% pektoliaza w 1×PBS, przez 15 - 35 min. (w zależności od gatunku) w temperaturze 37°C. Następnie przemyć 3 × 5 min. w 1×PBS.
- Preparaty wykonywać metodą rozgniotową w 1×PBS. Gotowe preparaty zamrażać na suchym lodzie. Po zdjęciu szkiełka nakrywkowego natychmiast należy przenieść preparaty do kopolina z 1×PBS zanurzonego w lodzie.
- Tak przygotowane preparaty muszą być wykorzystane do barwienia jeszcze tego samego dnia. Jeśli planujemy je przetrzymać dłużej (do 1 miesiąca) to należy je umieścić w 100% bezwodnej glicerynie i przechowywać w temperaturze 4°C. Przed wykorzystaniem preparatów należy je wyplukać 3 × 5 min. w 1×PBS.

Procedura:

1. Po wyjęciu preparatów z 1×PBS, na mokre nakropić 5% BSA w 1×PBS (ok. 50 μ l na preparat, nakryć folią) i inkubować przez 1h w temp. pokojowej w wilgotnej komorze.
2. Delikatnie zdjąć folie i strzepnąć nadmiar BSA, następnie nakropić I-rzędowe przeciwciało (ok. 25-50 μ l na preparat), następnie inkubować w 4°C przez noc (lub w 37°C przez 1 h). Rozcieńczenia przeciwciał wykonuje się w 1% BSA w 1×PBS, zazwyczaj 1:100).
3. Wyplukać preparaty 3×5 min. w 1×PBS w temperaturze pokojowej, w kopolinie.



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

4. Nakropić II-rzędowe przeciwciała skoniugowane z fluorochromem, (ok. 25-50 μ l na preparat, nakryć folią) i inkubować 1h w 37°C. Rozcieńczenia przeciwciał wykonuje się w 1% BSA w 1×PBS, zazwyczaj 1:100, 1:200.
5. Wypłukać preparaty 3×5 min. w 1×PBS w temperaturze pokojowej, w kopolinie.
6. Zamknąć preparaty na mokro w DAPI z Vectashieldem (ok. 10 μ l na szkiełko).

ODCZYNNIKI WYKORZYSTYWANE W PROCEDURZE

10×PBS, pH 7,3

137 mM NaCl	80 g
2,7 mM KCl	2 g
4,3 mM Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O,	9,65 g
1,4 mM KH ₂ PO ₄	2 g

Uzupełnić SDW do objętości 1 litra, sterylizować w autoklawie

4% formaldehyd

4 g paraformaldehydu rozpuścić w 100 ml 1×PBS, dodać kilka kropel NaOH i wymieszać na mieszadło magnetycznym z podgrzewaczem (62°C) Przygotowywać na świeżo, tuż przed utrwalaniem materiału, pod dygestorium.

Mieszanina enzymatyczna

2,5% pektynaza (Sigma-Aldrich, nr kat. P0690)	0,25 ml
2,5% celulaza (Calbiochem, nr kat. 21947)	0,25 g
2,5% pektoliza (Sigma, nr kat. P-3026)	0,25 g

Uzupełnić do objętości 10 ml 1×PBS. Wymieszać roztwór na mieszadło magnetycznym i rozdzielić po 1 ml do probówek typu Eppendorf. Przechowywać w temperaturze -20°C.

5% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma - Aldrich)

0,5 g BSA rozpuścić w 10 ml 1×PBS. Wymieszać roztwór na mieszadło magnetycznym i rozdzielić po 1 ml do probówek typu Eppendorf. Przechowywać w temperaturze -20°C.

1% BSA

0,1 g BSA rozpuścić w 10 ml 1×PBS. Wymieszać roztwór na mieszadło magnetycznym i rozdzielić po 1 ml do probówek typu Eppendorf. Przechowywać w temperaturze -20°C.



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

PRZECIWCIAŁA STOSOWANE DO LOKALIZACJI METYLOWANYCH HISTONÓW

Nazwa przeciwciała	Źródło
Przeciwciała pierwszorzędowe	
Anti-dimethyl-histone H3 (Lys4) [H3K4me2] Rabbit polyclonal IgG	Upstate (07-030)
Anti-dimethyl-histone H3 (Lys9) [H3K9me2] Rabbit polyclonal IgG	Upstate (05-768, 07-212)
Przeciwciała drugorzędowe	
Goat anti-rabbit Alexa ⁴⁸⁸ IgG (H+L)	Invitrogen (A-11008)



Wykrywanie zmetylowanej cytozyny metodą immunodetekcji fluorescencyjnej

Przygotowanie preparatów (materiał: merystemy korzeniowe siewek)

- Młode (3-5 – dniowe) siewki utrwalić w świeżo przygotowanym acetoalkoholu.
- Z młodych siewek odciąć korzenie o długości 1-2 cm. Wypłukać materiał w 0,01 M buforze cytrynianowym przez ok. 15 min. (3 × 5 min.)
- Materiał strawić w mieszaninie enzymatycznej o składzie: 4% pektynaza, 1% celulaza (Calbiochem), 1% celulaza ("Onozuka", Serva) w 0,01 M buforze cytrynianowym, przez 30 min - 2 h (w zależności od gatunku) w temperaturze 37°C. Następnie przemyć 3 × 5 min. w 0,01 M buforze cytrynianowym.
- Preparaty wykonywać metodą rozgniotową w 45% kwasie octowym. Gotowe preparaty zamrażać na suchym lodzie. Po zamrożeniu zerwać żyletką szkiełko nakrywkowe.
- (opcjonalnie) w celu usunięcia cytoplazmy przepłukać przez kilka sekund preparaty acetoalkoholem (99,8% etanol : kwas octowy lodowaty w proporcji 3:1), a następnie umieścić na 10-15 min. w zimnym 99,8% etanolu, w kopolinie. Wysuszyć preparaty na powietrzu w temperaturze pokojowej. Przechowywać do momentu wykorzystania w temperaturze 4 °C.

Procedura:

1. Zdenaturować preparaty w roztworze 70% formamidu w 2x SSC, przez 2 min. w temperaturze 70°C, w łaźni wodnej, w kopolinie.
2. Odwodnić preparaty w szeregu alkoholowym (zimny etanol o stężeniu 70% i 100%, po 5 min. w każdym ze stężeń).
3. Wysuszyć preparaty na powietrzu, w temperaturze pokojowej.



*„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”*

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

4. Na preparaty nałożyć 5% BSA w 1×PBS z 0,0 % Tween20 (ok. 50 µl na preparat, przykryć folią) i inkubować przez 1-2 h w temperaturze pokojowej w wilgotnej komorze.
5. Zdjąć delikatnie folię, strzepnąć nadmiar BSA, następnie nakropić po 25-50 µl I-rzędowego przeciwciała w odpowiednim rozcieńczeniu, nakryć folią. Inkubować preparaty przez 1h w temperaturze 37°C lub w temperaturze 4°C przez noc. Rozcieńczenia przeciwciał wykonuje się w 1% BSA w 1×PBS, zazwyczaj 1:100, 1:200.
6. Wypłukać preparaty 3×5 min. w 1×PBS w temperaturze pokojowej, w kopolinie.
7. Nakropić II-rzędowe przeciwciała skoniugowane z fluorochromem, w odpowiednim rozcieńczeniu (ok. 25-50 µl na preparat), inkubować przez 1 h w 37°C. Rozcieńczenia przeciwciał wykonuje się w 1% BSA w 1×PBS, zazwyczaj 1:50, 1:100.
8. Wypłukać preparaty 3×5 min. w 1×PBS w temperaturze pokojowej, w kopolinie.
9. Zamknąć preparaty na mokro w DAPI z Vectashieldem (ok. 10 µl na szkiełko).

Po rozmrożeniu nie zamrażać ponownie przeciwciał. Można je przechować w temperaturze 4°C i w ciągu 5 dni użyć ponownie.

ODCZYNNIKI WYKORZYSTYWANE W PROCEDURZE

Utrwalacz Carnoy (acetoalkohol, AA)

99,8% metanol/etanol i kwas octowy lodowaty zmieszać w proporcji 3:1

0,1 M Bufor cytrynianowy, pH 4,8

Mieszanina 40 ml roztworu **A** i 60 ml roztworu **B**

A: 0,1M roztwór kwasu cytrynowego ($C_6H_8O_7 \times H_2O$)

B: 0,1M roztwór cytrynianu sodu ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$)

Roztwór stosowany (0,01 M bufor cytrynianowy): roztwór podstawowy rozcieńczony w stosunku 1:9 wodą destylowaną

45% kwas octowy



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Mieszanka enzymatyczna

4% pektynaza (Sigma-Aldrich, nr kat. P0690)	0,4 ml
1% celuloza (Calbiochem, nr kat. 21947)	0,1 g
1% celuloza ‘Onozuka R-10’ (Serva, nr kat. 16419)	0,1 g

Uzupełnić do objętości 10 ml 0,01 M buforem cytrynianowym (pH 4,8). Wymieszać roztwór na mieszadle magnetycznym i rozdzielić po 1 ml do probówek typu Eppendorf. Przechowywać w temperaturze -20°C .

20×SSC, pH 7

3M NaCl	175,3 g
0,3M cytrynian sodu ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	88,3 g
SDW	800 ml

Ustalić wartość pH przy pomocy 1N HCl. Uzupełnić SDW do objętości 1 litra i sterylizować w autoklawie

10×PBS, pH 7,3

137 mM NaCl	80 g
2,7 mM KCl	2 g
4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$,	9,65 g
1,4 mM KH_2PO_4	2 g

Uzupełnić SDW do objętości 1 litra i sterylizować w autoklawie

5% BSA (Bovine serum albumin, Sigma - Aldrich)

0,5 g BSA rozpuścić w 10 ml 1×PBS. Wymieszać roztwór na mieszadle magnetycznym i rozdzielić po 1 ml do probówek typu Eppendorf. Przechowywać w temperaturze -20°C .

1% BSA

0,1 g BSA rozpuścić w 10 ml 1×PBS. Wymieszać roztwór na mieszadle magnetycznym i rozdzielić po 1 ml do probówek typu Eppendorf. Przechowywać w temperaturze -20°C .

PRZECIWCIAŁA STOSOWANE DO LOKALIZACJI METYLOWANEJ CYTOZYNY

Nazwa przeciwciała	Źródło
Przeciwciała pierwszorzędowe	
Anti-methyl-cytosine	Abcam



*„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”*

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Mouse monoclonal IgG	(Ab 10805-50)
Przeciwciało drugorzędowe	
Goat anti-mouse Alexa ⁴⁸⁸ IgG (H+L)	Invitrogen (A-11001)