

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΡΙΣΤΕΙΑ II – NodHypSNF: Μελέτη της σχετιζόμενης με την υποξία έκφρασης και του Βιοχημικού ρόλου γονιδίων που εμπλέκονται στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση στα φυμάτια των ψυχανθών



ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ

ΑΘΗΝΑ, 2015

Περιεχόμενα

1. Ανάπτυξη φυτών <i>Medicago truncatula</i>	4
1.1. Αποθήκευση σπόρων και εξαγωγή από τους χέδρωπες	4
Αποθήκευση	4
Εξαγωγή σπόρων	4
Υλικά	4
1.2. Προβλάστηση σπόρων	5
Υλικά	5
Σημειώσεις.....	6
1.3. Συνθήκες ανάπτυξης φυτών	6
Μεταφορά σπόρων και ανάπτυξη φυτών	6
Εμβολιασμός με ριζόβια.....	7
Υλικά	7
Σημειώσεις.....	8
2. Συλλογή ιστού και απομόνωση RNA.....	10
2.1. Συλλογή ιστού <i>M. truncatula</i>	10
2.2. Απομόνωση RNA	10
2.3. Καθαρισμός ολικού RNA	11
2.4. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων.....	12
Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων	12
Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αгарόζης.....	12
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	13
3. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	14
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)	14
Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)	15
Υλικά	17
Σημειώσεις.....	18
4. In situ RNA-RNA υβριδισμός.....	18
4.1. Προετοιμασία σημασμένου RNA probe	18
In vitro μεταγραφή (DIG RNA Labeling Kit).....	18
Καθαρισμός DIG-σημασμένου RNA.....	19
Υδρόλυση RNA.....	19
Υλικά	20
4.2. Μονιμοποίηση ιστού	20
Μονιμοποίηση φυματίων <i>M. truncatula</i>	20
Αφυδάτωση ιστού	20
Διαφανοποίηση ιστών	21
Διήθηση ιστού	21
Υλικά	22

Σημειώσεις.....	22
4.3. Πραγματοποίηση τομών	22
Υλικά	23
4.4. Αποπαραφίνωση	23
Υλικά	24
4.5. Ενυδάτωση	24
Υλικά	24
4.6. Προ-υβριδισμός.....	25
Υλικά	25
4.7. Υβριδισμός	26
Υλικά	26
4.8. Χειρισμός μετα-υβριδισμού	27
Υλικά	28
4.9. Εντοπισμός	28
Προετοιμασία 10% πολυβινυλ-αλκοόλης 89-98 kD (ενίσχυση σήματος) σε buffer εντοπισμού 1x.	
Ανά 100 ml:	28
Ανασύσταση των buffers DIG Wash και Block buffer set	28
Διαδικασία εντοπισμού	29
Προετοιμασία μέσου έγκλισης Mowiol 4-88.....	29
Έγκλιση αντικειμενοφόρων πλακών.....	30
Υλικά	30
Σημειώσεις.....	30
5. Μετασχηματισμός σε ζύμες	31
Υλικά	32
Σημειώσεις.....	33
6. Μετασχηματισμός και μόλυνση με <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	33
6.1. Μετασχηματισμός <i>A. rhizogenes</i>	34
6.2. Μόλυνση με <i>A. rhizogenes</i>	34
Υλικά	35
Παρατηρήσεις.....	35
7. Ταυτοποίηση <i>Tnt1</i>-μεταλλαγμένων σειρών <i>M. truncatula</i>	36
Υλικά	38
Σημειώσεις.....	39

1. Ανάπτυξη φυτών *Medicago truncatula*

Οι σπόροι του ψυχανθούς φυτού της μηδικής εμπεριέχονται σε χέδρωπες, συμπαγείς ακανθωτές αδιάρρηκτες σπείρες. Σε κανονικές συνθήκες, ο χέδρωψ προστατεύει το σπόρο μέχρι να επέλθουν ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας και να μαλακώσει το περίβλημα του χέδρωπα. Σε εργαστηριακές συνθήκες, οι χέδρωπες αποθηκεύονται ξηραμένα και διαρρηγνύονται ώστε να απελευθερωθεί ο σπόρος.

Κάθε χέδρωψ περιέχει συνήθως 5-8 σπόρους (ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης του μητρικού φυτού), οι οποίοι περιβάλλονται από ένα υδρόφοβο επίστρωμα, το οποίο πρέπει να διαρρηχτεί έστω μερικώς ώστε να βλαστήσει ο σπόρος. Επιπροσθέτως αυτού του φυσικού «λήθαργου», οι σπόροι του *M. truncatula* μπορούν να επιδείξουν και διαφόρους βαθμούς εμβρυϊκού λήθαργου 3-4 μήνες μετά την απόπτωση του χέδρωπα.

1.1. Αποθήκευση σπόρων και εξαγωγή από τους χέδρωπες

Αποθήκευση

Αν το περίβλημα δεν έχει υποστεί μηχανικό σκαριφισμό οι σπόροι του *M. truncatula* παραμένουν αδιαπέραστοι και ζωτικοί για αρκετά χρόνια. Αντίθετα, αν έχουν υποστεί σκαριφισμό η διάρκεια ζωτικότητας μειώνεται δραστικά στους 6-12 μήνες, πιθανά λόγω οξείδωσης ουσιών του σπόρου. Έτσι συνιστάται οι χέδρωπες να διατηρούνται ακέραια για μακροπρόθεσμη αποθήκευση.

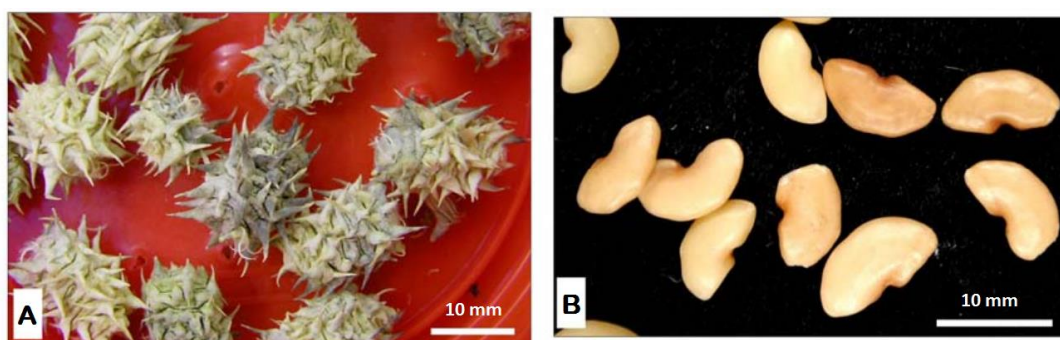
Μετά τη συγκομιδή των χεδρώπων, αυτά πρέπει να ξηρανθούν (περίπου 1 εβδομάδα) και να αποθηκευθούν σε θερμοκρασία δωματίου με χαμηλή υγρασία, σε χάρτινους φακέλους ή δοχεία τύπου falcon με μικρές τρύπες για να επιτρέπεται η κυκλοφορία αέρα.

Εξαγωγή σπόρων

Οι χέδρωπες είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί και πρέπει πρώτα να συνθλιβούν ελαφρώς με χρήση εργαστηριακής λαβίδας και έπειτα να ελγχθούν κατά μήκος. Έτσι οι περισσότεροι σπόροι απλά απελευθερώνονται με ελάχιστο βαθμό σκαριφισμού. Τέλος, οι σπόροι διαχωρίζονται από τα θραύσματα του χέδρωπα.

Υλικά

- Εργαστηριακές λαβίδες
- Δοχείο αποθήκευσης



Εικόνα 1: (Α) Ωριμοί χέδρωπες *M. truncatula*, (Β) Σπόροι *M. truncatula* μετά τη διάρρηξη του χέδρωπα.

1.2. Προβλάστηση σπόρων

Το υδρόφοβο κηρώδες επίστρωμα του σπόρου του *M. truncatula* **πρέπει** να υποστεί σκαριφισμό, ώστε να επιτραπεί η εισροή νερού και οξυγόνου που ενεργοποιεί τη βλάστηση, καθώς ακέραιοι σπόροι δε θα βλαστήσουν ακόμα και αν παραμείνουν μία βδομάδα σε κανονικές συνθήκες προβλάστησης. Στο εργαστήριό μας πραγματοποιείται χημικός σκαριφισμός των σπόρων. Τέλος, η εξωτερική επιφάνεια των σπόρων πρέπει να απολυμανθεί πριν τη χρήση σε πείραμα που απαιτεί αξενικές συνθήκες:

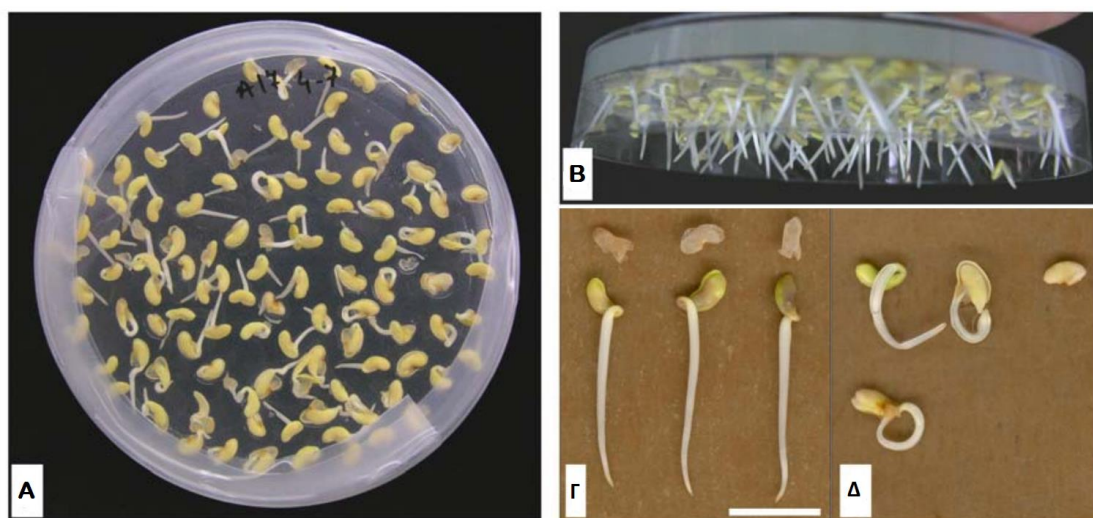
- **Χημικός σκαριφισμός (ΠΡΟΣΟΧΗ:** ο παρακάτω χειρισμός θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε εργαστηριακό απαγωγό με τον απαραίτητο προστατευτικό εξοπλισμό): Οι σπόροι μεταφέρονται σε γυάλινο δοχείο τύπου beaker με προσθήκη **μητρικού άνυδρου** θειικού οξέος (H_2SO_4) (έως την κάλυψη των σπόρων) και ανακινούνται περιοδικά. Παρακολουθούμε την πορεία του σκαριφισμού έως ότου να εμφανιστούν 3-5 μαύρα στίγματα στην επιφάνεια κάθε σπόρου (συνήθως μέσα σε 10-15 λεπτά).
- Έπειτα αφαιρούμε **όλο** το H_2SO_4 με γυάλινη πιπέτα Pasteur και κάνουμε 5 πλύσεις με απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό. Είναι **πολύ σημαντικό** να αφαιρεθεί όλο το H_2SO_4 ώστε να αποφευχθεί τοπική θέρμανση κατά την προσθήκη του νερού και να μην τραυματιστούν οι σπόροι· πλύσεις με κρύο νερό βοηθούν.
- **Απολύμανση σπόρων:** προτείνεται να γίνει χρήση αποστειρωμένων εργαλείων και αναλώσιμων σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Οι σπόροι στο γυάλινο δοχείο τύπου beaker καλύπτονται με 3% διάλυμα χλωρίου για 1.5-2 λεπτά. Μετά αφαιρούμε γρήγορα τη χλωρίνη και ξεπλένουμε καλά τους σπόρους 8 φορές με απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό.
- **Βλάστηση σπόρων:** οι σπόροι μεταφέρονται σε τρυβλία τύπου Petri με αποστειρωμένο 0.8% άγαρ (20-30 σπόροι/τρυβλίο) με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας. Τα τρυβλία σφραγίζονται με parafilm και ανοίγουμε 2-3 τρύπες με μία βελόνα ώστε να γίνεται ανταλλαγή αερίων. Τα τρυβλία τυλίγονται με αλουμινόχαρτο (σκοτάδι) και τοποθετούνται ανάποδα στους 4°C για 1-3 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρονται στους 20°C. Σε σπόρους καλής ποιότητας θα πρέπει να έχουμε ποσοστό βλαστικότητας 80-90% και μήκος ριζιδίου 0.5-1 cm 24-36 ώρες μετά τη μεταφορά των σπόρων στους 20°C.

Υλικά

- Τρυβλία Petri
- 0.8% w/v άγαρ αποστειρωμένο
- Λαβίδες
- Πιπέτες Pasteur
- Βελόνα
- Γυάλινα δοχεία τύπου beaker
- Πυκνό άνυδρο H_2SO_4
- Αποστειρωμένο απιονισμένο νερό

Σημειώσεις

- Όλες οι εργασίες γίνονται υπό ασηπτικές συνθήκες και με αποστειρωμένα εργαλεία και διαλύματα.
- Ο χρόνος δράσης του θειικού οξέος δεν είναι προκαθορισμένος και πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα με την εμφάνιση των μαύρων στιγμάτων. Μπορεί να διαρκέσει από λίγα έως 30 λεπτά.
- Για την απολύμανση των σπόρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί οικιακή χλωρίνη και είναι πολύ σημαντικό να μην ξεπεραστεί ο χρόνος των 1.5-2 λεπτών, καθώς μετά μπορεί να υπάρχουν αρνητικές επιδράσεις στη βλάστηση και την ανάπτυξη των φυτών.
- Οι μύκητες (πιθανά λόγω της παρουσίας σποριδίων) μπορούν να επιβιώσουν την απολύμανση και καλό είναι μετά τη βλάστηση να αφαιρείται ο φλοιός του σπόρου.
- Οι ιδανικές συνθήκες για βλάστηση των σπόρων μηδικής είναι οι 20°C. Οι σπόροι τοποθετούνται στους 4°C για 1-3 μέρες για συγχρονισμό βλάστησης και διακοπή πιθανού ληθάργου. Μεγαλύτερη διάρκεια παραμονής στους 4°C (15-20 ημέρες) προάγει εαρινοποίηση.



Εικόνα 2: (Α) Πάνω όψη ανεστραμμένου και σφραγισμένου τρυβλίου άγαρ μετά από επώαση 24 h στους 20°C. Οι περισσότεροι σπόροι έχουν βλαστήσει. (Β) Πλαϊνή όψη του τρυβλίου με τα κάθετα ριζίδια των καλώς ανεπτυγμένων σπόρων ορατά. (Γ) Εμφάνιση καλώς βλαστημένων σπόρων; Το περισπέρμιο (πάνω) έχει αφαιρεθεί χειροκίνητα από τα φυτάρια; Μπάρα= 10 mm. (Δ) Σπόροι με ακανόνιστη βλάστηση που συνήθως καταλήγουν σε παύση της ανάπτυξης του φυταρίου.

1.3. Συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Τα φυτά *M. truncatula* μπορούν να αναπτυχθούν επιτυχώς σε διάφορα υποστρώματα (υγρό χαρτί, άγαρ, υγρό μέσο, έδαφος, κλπ.) και συστήματα ανάπτυξης (χάρτινη σακούλα, τρυβλία, θάλαμο ανάπτυξης, υδροπονικό/αεροπονικό σύστημα, θερμοκήπιο, κλπ.). Η επιλογή του συστήματος εξαρτάται από το είδος του πειράματος για το οποίο θα χρησιμοποιηθούν τα φυτά (αν απαιτούνται φυτάρια, μεγάλα φυτά με ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, κλπ.)

Μεταφορά σπόρων και ανάπτυξη φυτών

- Προετοιμασία πλαστικών παλετών φυτωρίου με αποστειρωμένο και νοτερό μίγμα περλίτη και άμμου (1:1).

- Μεταφορά των σπόρων που έχουν βλαστήσει από τα τρυβλία στα γλαστράκια και ελαφριά κάλυψη των σπόρων με το μίγμα άμμου/περλίτη.
- Μεταφορά σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι και θερμοκρασία 22°C.
- Πότισμα φυτών ανά 2-3 μέρες με διάλυμα B & D (με χαμηλό άζωτο για φυτά με φυμάτια) και dH₂O εναλλάξ.



Εικόνα 3: Θάλαμος ανάπτυξης φυτών *M. truncatula* σε στερεό θρεπτικό υλικό (περλίτης/άμμος) με θερμοκρασία 20-25°C και φωτοπερίοδο 16 h φως/8 h σκοτάδι.

Εμβολιασμός με ριζόβια

Σε πειράματα που χρειάζεται η παρουσία φυματίων, τα φυτά πρέπει να εμβολιαστούν με υγρή καλλιέργεια ριζοβίων *Sinorhizobium meliloti*. Προετοιμάζεται σε κωνική φιάλη θρεπτικό διάλυμα YMB και μετά την αποστείρωση προστίθενται 5μg/ml τετρακυκλίνης. Υπό ασηπτικές συνθήκες εμβολιάζεται η καλλιέργεια με *S. meliloti* 1021 και αναπτύσσεται στους 30°C για 2 μέρες. Τα φυτάρια εμβολιάζονται την ημέρα της φύτευσης με 1ml καλλιέργειας *S. meliloti* (οπτικής πυκνότητας 0.6). Ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται μετά από επτά ημέρες.

Υλικά

- Γλαστράκια φυτωρίου
- Περλίτης
- Άμμος
- Γυάλινη κωνική φιάλη
- Κρίκος μικροβιολογίας
- Λαβίδες
- Πιπέτα 1 ml
- Tips 1 ml
- Θρεπτικό YMB
- Τετρακυκλίνη
- Θρεπτικό διάλυμα B & D

Σημειώσεις

- Τα ριζίδια των φυτών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα και υπάρχει κίνδυνος αποξήρανσης σε παρατεταμένη επαφή με τον αέρα και πρέπει να παραμένουν στο τρυβλίο μέχρι τη φύτευση.
- Κατά τη φύτευση ανοίγουμε μια τρύπα στο υπόστρωμα με μια λαβίδα και το φυτό τοποθετείται ώστε μόνο οι κοτυληδόνες να βρίσκονται πάνω από την επιφάνεια. Η τρύπα κλείνεται «σπρώχνοντας» το υπόστρωμα και βρέχεται ώστε να «προσδεθεί» ισχυρά.
- Ο περλίτης πρέπει να ξεπλένεται πριν τη χρήση (με απιονισμένο νερό), καθώς το pH του μπορεί να είναι >8 κάτι που θα επιδράσει αρνητικά στην ανάπτυξη των φυτών.
- Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μην υπερ-ποτίζονται τα φυτά, καθώς θα προξενηθεί μη-αναστρέψιμη ζημιά λόγω έλλειψης οξυγόνου στη ρίζα.
- Στα διαλύματα ποτίσματος είναι απαραίτητη η χρήση απιονισμένου νερού για να αποφευχθεί η συγκέντρωση αλάτων και το στρες αλατότητας που θα προκαλέσει.
- Τα φυτά πρέπει να παρακολουθούνται για παρουσία εντόμων και ασθενειών που πιθανά να προκαλέσουν ζημιές στα φυτά και να αντιμετωπίζονται.



Εικόνα 4: Φυμάτιο *M. truncatula* R108 εμβολιασμένου με ριζόβιο *S. meliloti*.

A. Σύσταση διαλύματος B & D (Broughton & Dilworth) low nitrogen:

Μητρικά Διαλύματα	Συγκεντρώσεις Μητρικών		C _{τελ}	V για 1 lt
CaCl ₂ 2H ₂ O (147.014)	0.1 M	2.94 gr at 200ml	1 mM	10 ml
KH ₂ PO ₄ (136.086)	1 M	6.8 gr at 50ml	0.5 mM	500 µl
MgSO ₄ 7H ₂ O (246.469)	1 M	24.65 gr at 100ml	0.25 mM	250 µl
K ₂ SO ₄ (174.177)	0.1 M	1.74 gr at 100ml	0.25 mM	2.5 ml
Ferric citrate (244.94)	10 mM	0.123 gr at 50 ml	10 µM	1 ml
Μικροστοιχεία				
H ₃ BO ₃ (61.83)	2 mM	61.83 mgr at 500ml	2 µM	1 ml
MnSO ₄ H ₂ O (169.02)	1mM	84.51 mgr at 500ml	1 µM	
ZnSO ₄ 7H ₂ O (287.54)	0.5 mM	71.89 mgr at 500ml	0.5 µM	
CuSO ₄ 5H ₂ O (249.70)	0.2 mM	24.97 mgr at 500ml	0.2 µM	
CoSO ₄ 7H ₂ O (281.103)	0.1 mM	14.06 mgr at 500ml	0.1 µM	
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O (241.95)	0.1 mM	12.1 mgr at 500ml	0.1 µM	
Χαμηλό Άζωτο				
KNO ₃ (101.103)	1 M	10.11 gr at 100 ml	0.5 mM	500 µl

B. Σύσταση θρεπτικών διαλυμάτων

YMB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *S. meliloti*: Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος YMB:

- Σε 1 lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10gr μαννιτόλη, 0.5gr K₂HPO₄, 0.2gr MgSO₄•7H₂O, 0.1gr NaCl και 0.5gr Yeast extract.
- Ακολουθεί αποστείρωση.



Εικόνα 5: Βλαστός και φύλλα ώριμου *M. truncatula* R108. Τα κίτρινα άνθη είναι ορατά.

2. Συλλογή ιστού και απομόνωση RNA

Από φυτά *M. truncatula* απομονώνεται ολικό RNA και παράγεται cDNA για να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου και κλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς ώστε να επιτραπεί η *in vitro* μεταγραφή των κλωνοποιημένων τμημάτων. Το RNA είναι ασταθές μόριο, ενώ οι RNases που έχουν την ικανότητα να το αποδιατάσουν είναι ιδιαιτέρως σταθερά μόρια και ενέχει ο κίνδυνος ύπαρξής τους στο δείγμα. Όλοι οι χειρισμοί με RNA πρέπει να γίνονται αυστηρά υπό ασηπτικές συνθήκες, με εργαλεία και διαλύματα που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά με RNA, να γίνεται συχνή αλλαγή των εργαστηριακών γαντιών και το RNA να παραμένει στον πάγο.

2.1. Συλλογή ιστού *M. truncatula*

Πρώτα θα πρέπει να συλλεχθεί ο ιστός από τον οποίο θα γίνει η απομόνωση του RNA. Παρουσία υγρού αζώτου, υπό ασηπτικές συνθήκες και σε μικρό χρονικό διάστημα, γίνεται συλλογή φυματίων, ρίζας, βλαστού, και φύλλων από φυτά *M. truncatula*. Οι ιστοί αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2. Απομόνωση RNA

- Τα φύλλα, ο βλαστός, και η ρίζα ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτρίβησης παρουσία υγρού αζώτου. Τα φυμάτια ξεκινάνε από το επόμενο βήμα.
- Το δείγμα μεταφέρεται με αποστειρωμένη σπάτουλα σε σωλήνα eppendorf και προστίθενται 250 μl αντιδραστηρίου TRIzol και γίνεται ομογενοποίηση με έμβολο.
- Προστίθενται άλλα 250 μl TRIzol και πραγματοποιείται καλό vortex (περίπου 2 min).
- Φυγοκέντρωση στις 12,000 rpm, για 12 min, στους 4°C .
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf (προσοχή στα κυτταρικά θραύσματα).
- 5 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 100 μl χλωροφορμίου και ισχυρή ανακίνηση (15 sec).
- 2-3 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις 12,000 rpm, για 15 λεπτά, στους 4°C .
- Προσεκτική μεταφορά της πάνω φάσης σε νέο eppendorf, προσθήκη 250 μl ισοπροπανόλης και ανακίνηση.
- 10 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις 12,000 rpm, για 12 min, στους 4°C .
- Απόρριψη υπερκειμένου και ξέπλυμα ιζήματος με 75% αιθανόλη (100-150 μl).
- Φυγοκέντρωση στις 12,000 rpm, για 10 min, στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου.
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε απαγωγό για περίπου 10 min και έπειτα επαναδιαλύεται σε 50 μl ddH₂O.
- Με μέτρηση NanoDrop εκτιμάται η ποσότητα του RNA και με gel αгарόζης η ποιότητά του.
- Το RNA αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι την επόμενη χρήση.

2.3. Καθαρισμός ολικού RNA

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA από τους φυτικούς ιστούς και τα βακτηριακά κύτταρα απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA αυτών. Για την αποφυγή λήψης λανθασμένων αποτελεσμάτων κατά την μελέτη της μεταγραφής και έκφρασης γονιδίων απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυμα που κόβουν/καταστρέφουν το DNA και αφήνουν ανέπαφο το RNA και είναι η ακόλουθη:

- Σε σωλήνα eppendorf τοποθετούμε:
 - 10 µg ολικό RNA,
 - 5 µl TURBO DNase buffer,
 - 0.5 µl TURBO DNase,
 - 1 µl RNase inhibitor, και
 - Συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι τα 50 µl.
- Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 30 min.
- Προσθήκη επιπλέον 0.5 µl TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ανάμιξη με πιπετάρισμα και επώαση για 30 min στους 37°C.
- Μετά τον καθαρισμό του RNA θα πρέπει με αντίδραση PCR (με primers που ενισχύουν DNA) να ελεγχθεί η καθαρότητα του δείγματος.

Το επόμενο βήμα είναι η απενεργοποίηση των DNases στο δείγμα μας. Το 95% περίπου μπορεί να απενεργοποιηθεί με θέρμανση (5-10 min) στους 75°C, αλλά για ολική απενεργοποίηση (και απενεργοποίηση πιθανών RNases) προτείνεται ένα πρωτόκολλο απενεργοποίησης με χρήση φαινόλης/χλωροφορμίου.

- Στο δείγμα RNA προστίθεται ddH₂O έως τα 200 µl.
- Προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης 25:24:1 (PIC).
- Το μίγμα αναδεύεται καλά (vortex) και φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά (vortex) και φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και προστίθεται 1/2 του όγκου διάλυμα 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2x του όγκου αιθανόλη 100% (κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων).
- Το βακτηριακό δείγμα επωάζεται στους -80°C overnight (O/N).
- Μετά το πέρας της επώασης το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 100-150 µl αιθανόλης 75%.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα στεγνώνει σε συνθήκες κενού.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20-25 µl ddH₂O.
- Γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop και το δείγμα αναλύεται σε 2% πηκτή αгарόζης.

2.4. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα γίνεται με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop. Αναλύοντας 1 μ l δείγματος, το φασματόμετρο NanoDrop μπορεί να μας δώσει τα εξής δεδομένα:

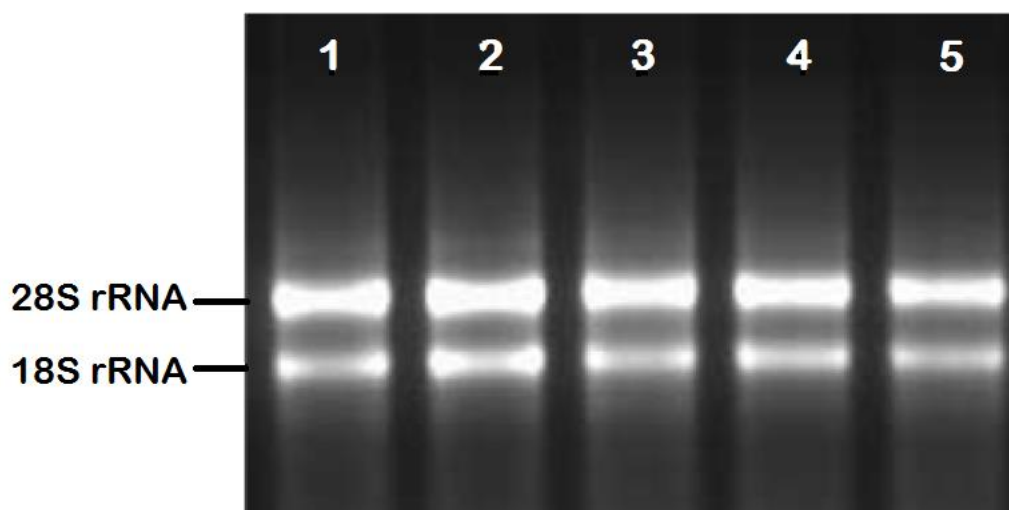
- τη συγκέντρωση των επιθυμητών νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA),
- την καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες (δείκτης OD_{260/280}), και
- την καθαρότητα του δείγματος ως προς άλλες ουσίες όπως EDTA, υδρογονάνθρακες, φαινόλες κ.ά. (δείκτης OD_{260/230}).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα αρχικά μεταφέρεται 1 μ l ddH₂O στην υποδοχή της συσκευής για τον μηδενισμό (blank measurement). Στη συνέχεια 1 μ l από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής, η οποία μετρά την οπτική πυκνότητα του δείγματος στα μήκη κύματος 230, 260 και 280 nm. Τέλος, η συσκευή εμφανίζει τη συγκέντρωση του DNA ή RNA και τους λόγους OD₂₆₀/OD₂₈₀ OD₂₆₀/OD₂₃₀. Για να θεωρείται ένα δείγμα νουκλεϊκών οξέων καθαρό, ο δείκτης OD_{260/280} πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0, ενώ ο δείκτης OD_{260/230} πρέπει να κυμαίνεται σε μεγαλύτερα επίπεδα, μεταξύ 2.0-2.2.

Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αгарόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA/RNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους του. Το εύρος των μεγεθών που μπορεί να διαχωριστούν στην πηκτή αгарόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της αгарόζης (πίνακας 1).

- Η πηκτή παρασκευάζεται με προσθήκη αгарόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE, με αναλογίες που εξαρτώνται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηκτής.
- Η αгарόζη διαλύεται με θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων και αφού κρυώσει ελαφρά προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μ g/ml και αναμιγνύεται καλά.
- Το διάλυμα τοποθετείται στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και στη συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα προς ανάλυση (αναμεμιγμένα με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης) στα "πηγαδάκια" που σχηματίστηκαν.
- Το κύκλωμα κλείνει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE και τόσο η τάση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και ο χρόνος εφαρμογής του εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.



Εικόνα 6: Ευκαρυωτικό RNA με την ανάλυση σε πηκτή αгарόζης. Η πάνω ζώνη αντιπροσωπεύει το 28S και η κάτω το 18S ριβοσωμικό RNA.

Πίνακας 1: Συγκέντρωση αгарόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων νουκλεϊκών οξέων (kb)
0.3	1.7-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1	0.3-10
1.2	0.2-8
1.5	0.2-6
2	0.1-5

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική αυτή αποτελεί μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η βασική αρχή της PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: Το εκμαγείο του DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94-98°C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Δύο μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα.

Ακολούθως, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων, ιόντων Mg^{+2} και μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης.

Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες, καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση, μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδίσουν οι εκκινητές. Η εκθετική συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφ' όσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στη μήτρα του DNA.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από το είδος του. Έτσι, στην περίπτωση γενωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα ίση με 1μg, ενώ για πλασμιδιακό DNA αρκούν 10-100 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (T_m).

Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιείται PCR για να επαληθευθεί η δράση των DNases. Έτσι επειδή το δείγμα είναι θεωρητικά καθαρό από DNA, δεν θα πρέπει να υπάρχουν προϊόντα μετά την ολοκλήρωση της PCR.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

1. Σε ειδικό σωλήνα eppendorf προστίθενται:

- Μήτρα DNA/RNA 0.5 μl
- Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης Forward (10 μM) 0,5 μl
- Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM) 0,5 μl
- Μίγμα dNTPs (10 mM) 0.5 μl
- 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα 2.5 μl
- Taq DNA πολυμεράση (2 units/μl) 0,5 μl
- ddH₂O 20 μl για $V_{\text{τελ}}=25\mu\text{l}$

2. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

- Βήμα 1: Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 4 λεπτά
- Βήμα 2: Αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό
- Βήμα 3: Υβριδισμός εκκινητών στους 58°C για 1 λεπτό
- Βήμα 4: Επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό/1.3-15kb
- Επανάληψη βημάτων 2-4 για 30 κύκλους
- Βήμα 5: Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

3. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)

Για να χρησιμοποιηθεί το RNA σε ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου πρέπει πρώτα θα μετατραπεί σε cDNA το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα στην qPCR. Η αντίδραση ενίσχυσης τμημάτων RNA με την μέθοδο RT-PCR περιλαμβάνει δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο το RNA μεταγράφεται σε cDNA με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η μεταγραφή ξεκινά από τον κατάλληλο εκκινητή, που μπορεί να είναι dT-ολιγονουκλεοτίδιο όταν μεταγράφεται το σύνολο των mRNA ή εξειδικευμένο νουκλεοτίδιο για το συγκεκριμένο τμήμα RNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Κατά το δεύτερο στάδιο, τα μόρια του cDNA, που δημιουργήθηκαν με

τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ενισχύονται σε μια τυπική αντίδραση PCR, με την παρουσία μη-εξειδικευμένων εκκινητών.

Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται τα εξής:

- RNA 1.5 μ g
- Random primers 1 μ l
- Μίγμα dNTPs (10mM) 1 μ l
- ddH₂O έως τελικό όγκο 10 μ l

Στη συνέχεια το RNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, οπότε και πραγματοποιείται ο υβριδισμός εκκινητή-RNA. Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.

Ακολουθεί η προσθήκη στο eppendorf:

- 5X First-Strand Buffer 4 μ l
- DTT (0,1M) 2 μ l
- RNase out (40 units/ μ l) 1 μ l

Το μίγμα αναμιγνύεται ελαφρώς (με χρήση πιπέτας) και επωάζεται στους 25°C για 2 λεπτά.

Στη συνέχεια προστίθεται 1 μ l ενζύμου SuperScript™ II RT (200units/ μ l) και ακολουθεί επώαση στους 25°C για 10 λεπτά.

Έπειτα το μίγμα επωάζεται στους 42°C για 50 λεπτά και η αντίδραση απενεργοποιείται με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά.

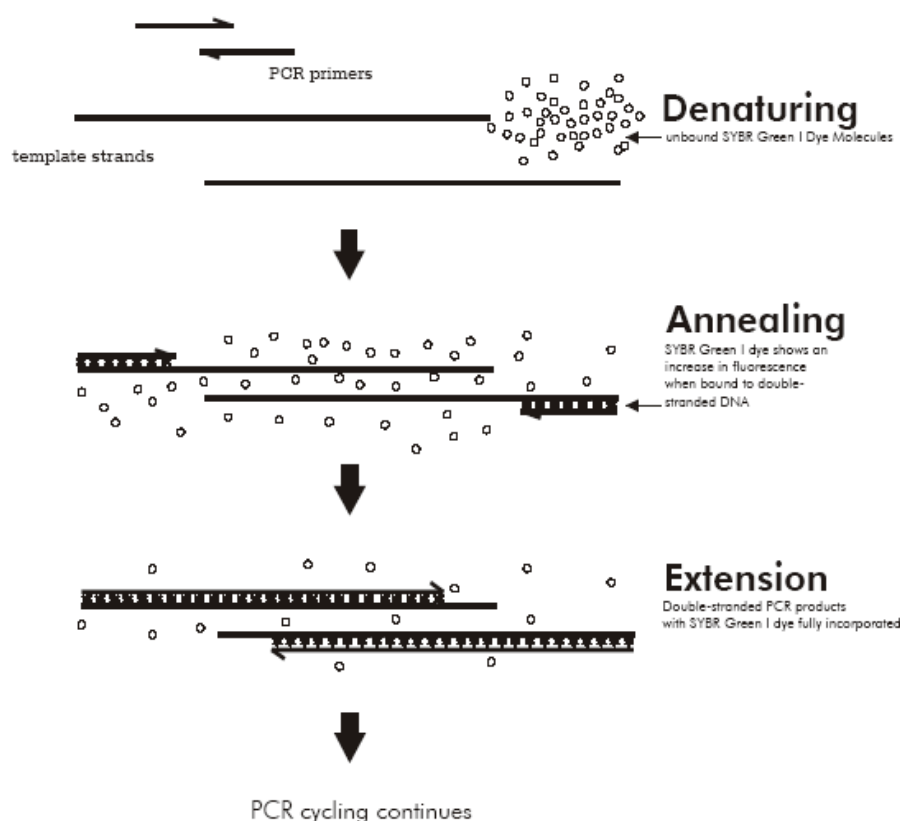
Το cDNA που προέκυψε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιείται με μια αντίδραση qPCR και χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA που δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης δίνεται από τη μέτρηση των επιπέδων φθορισμού της χρωστικής SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεση της στα δίκλιωνα μόρια του DNA (dsDNA). Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση σαρωτή. Συχνά η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη μέθοδο της RT-PCR, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών αλληλουχιών mRNA που έχουν μετατραπεί σε cDNA, δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς, κύτταρα ή αναπτυξιακά στάδια.

Κατά την διάρκεια της φάσης της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA, η SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και ο φθορισμός που παράγει είναι μικρός. Κατά

τις φάσεις της πρόσδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης, όπου έχουμε διπλή έλικα DNA, η SYBR Green προσδένεται στη διπλή έλικα και ο φθορισμός που παράγει αυξάνεται σημαντικά (έως και 1000 φορές). Η αύξηση του σήματος του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του DNA που υπάρχει στην έναρξη της αντίδρασης του PCR. Η ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται πραγματοποιείται από ένα ειδικό φωτόμετρο που ανιχνεύει το φθορισμό που παράγεται στα 520 nm. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Λόγω αυτού του φαινομένου ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων είναι αναγκαίοι για την αποφυγή μολύνσεων και παραλαβή εσφαλμένων μετρήσεων φθορισμού.



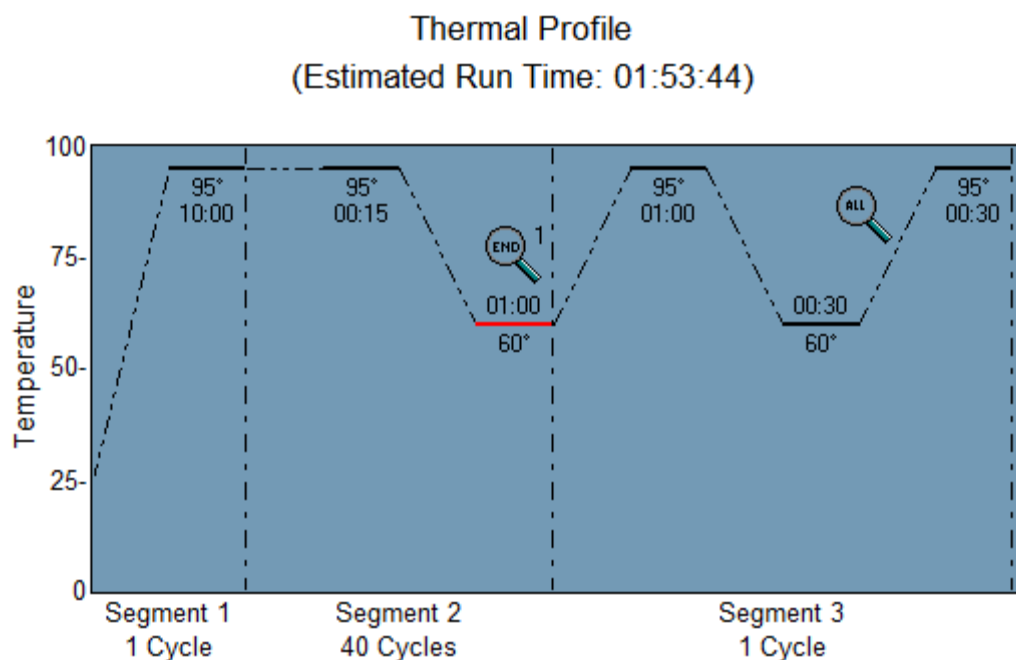
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας πρόσδεσης της χρωστικής SYBR Green στη δίκλωνη έλικα του DNA κατά την διάρκεια των βημάτων του PCR.

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mx3005P (Stratagene), καθώς και το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα MxPro-3005P. Τα δείγματα τοποθετούνται σε πλακέτα ειδική για αυτή τη χρήση.

Για μία τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

- 2X Fast Start SYBR-GREEN Master ROX (Roche): 5 μl,
- cDNA (χρησιμοποιείται ως εκμαγείο): 1 μl, και
- Μίγμα (Forward+Reverse) εξειδικευμένων εκκινητών (0.5 μM): 4 μl.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και τα στάδια της αντίδρασης είναι:



Εικόνα 8: Στάδια και θερμοκρασιακό πρόγραμμα Real Time PCR.

Υλικά

- Γουδί λειοτρίβησης
- Υγρό άζωτο
- Λαβίδες
- Νυστέρι
- Σωλήνες eppendorf
- Πιπέτες
- Tips
- Αντιδραστήριο TRIzol
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη
- ddH₂O
- Συσκευή NanoDrop
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Αγαρόζη
- Διάλυμα TAE
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- DNase/DNase buffer
- RNase inhibitor
- Διάλυμα PIC
- 3M οξικό νάτριο
- Συσκευή qPCR
- Πλακέτες qPCR
- Αντιδραστήρια PCR (DNA polymerase, DNA polymerase buffer, SYBR Green, dNTPs, specific primers)

Σημειώσεις

- Κατά τη συλλογή οι ιστοί πρέπει να μένουν συνεχώς παγωμένοι για να μην αλλοιωθεί το RNA ή αλλάξει το μεταγραφικό προφίλ.
- Κατά τους χειρισμούς με χλωροφόρμιο και PIC σχηματίζονται φάσεις. Κρατάμε την πάνω υδατική φάση που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα και προσέχουμε να μην πάρουμε τη μεσόφαση που περιέχει κυτταρικά θραύσματα, μεμβράνες, και DNA.
- Στα διφασικά/τριφασικά συστήματα όταν αφαιρέσουμε την πάνω φάση, μπορούμε να αφαιρέσουμε αντίστοιχη ποσότητα από την κάτω φάση και να επαναφυγοκεντρήσουμε ώστε να συλλέξουμε τυχόν υπολειπόμενο δείγμα RNA.
- Όταν αφήνουμε το pellet του RNA να στεγνώσει, προσοχή να μην «ξεραθεί» καθώς δυσκολεύει την επαναδιάλυση.
- Όταν «τρέχει» RNA στο gel αгарόζης, το gel και το ρυθμιστικό διάλυμα TAE πρέπει να είναι αποστειρωμένα, και το gel να μην «τρέξει» παραπάνω από 10-15 λεπτά, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος αποδιάταξής του.
- Αν με το πρώτο DNase treatment δεν έχει αποδομηθεί όλο το DNA, μπορεί να επαναληφθεί το treatment. Χρειάζεται προσοχή όμως καθώς μειώνεται και η ποσότητα του RNA σε κάθε treatment.

4. *In situ* RNA-RNA υβριδισμός

Καθορίζεται η τοπολογία των mRNAs των γονιδίων-στόχων. Για το σκοπό αυτό, το ολικό RNA φυματίων του *M. truncatula* χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής (παραγωγή cDNA) και συγκεκριμένες περιοχές (π.χ. 3' UTRs) των υπό εξέταση γονιδίων ενισχύονται (PCR) από το cDNA και κλωνοποιούνται σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς που επιτρέπουν την *in vitro* μεταγραφή των κλωνοποιημένων τμημάτων. Με τη βοήθεια της *in vitro* μεταγραφής των κλωνοποιημένων τμημάτων παράγονται σημασμένοι με διγοξιγενίνη RNA ανιχνευτές (αλληλουχίες), που αντιστοιχούν είτε στην *in vivo* παραγόμενη αλληλουχία (μάρτυρας) είτε στην αντίστροφα συμπληρωματική της. Οι ανιχνευτές αυτοί χρησιμοποιούνται σε πειράματα *in situ* RNA-RNA υβριδισμού, με χρήση ιστού από λεπτές τομές διαφόρων φυτικών οργάνων.

4.1. Προετοιμασία σημασμένου RNA probe

In vitro μεταγραφή (DIG RNA Labeling Kit)

- Σε σωλήνα eppendorf αναμινγούνται:
 - 1 µg καθαρού DNA,
 - 2 µl 10x NTP μίγμα σήμανσης,
 - 2 µl 10x buffer μεταγραφής,
 - 1 µl Παρεμποδιστή RNases,
 - 2 µl RNA πολυμεράσης T7 ή SP6, και
 - RNase-free H₂O έως τα 20 µl.
- Ανάμιξη και spin-down.
- Επώαση για 2 h στους 37°C.
- Προσθήκη 2 µl DNase (RNase-free), ανάμιξη, και spin-down.
- Επώαση για 15 min στους 37°C.

Καθαρισμός DIG-σημασμένου RNA

- Προσθήκη RNase-free H₂O μέχρι τα 100 µl στο RNA δείγμα.
- Προσθήκη 250 µl Binding Solution και ανάμιξη με vortex.
- Προσθήκη 200 µl 95-100% αιθανόλης και ανάμιξη με vortex για 10 sec.
- Τοποθέτηση στήλης καθαρισμού στον παρεχόμενο σωλήνα συλλογής.
- Μεταφορά (έως 600 µl) δείγματος στη στήλη και φυγοκέντρωση για 1 min στις 13,000 rpm.
- Απόρριψη εκλούσματος. Αν το δείγμα είναι περισσότερο των 600 µl επαναλαμβάνεται το πέρασμα από τη στήλη.
- Τοποθέτηση 400 µl Wash Solution στη στήλη και φυγοκέντρωση για 1 min στις 13,000 rpm. Οπτικός έλεγχος της στήλης για επιβεβαίωση διέλευσης όλης της ποσότητας του Wash Solution από τη στήλη.
- Απόρριψη εκλούσματος, ανασυγκρότηση της στήλης με το σωλήνα συλλογής και επανάληψη του προηγούμενου βήματος 2 φορές.
- Φυγοκέντρωση της στήλης για 2 min στις 13,000 rpm για να «στεγνώσει» η στήλη. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής.
- Τοποθέτηση στήλης σε νέο σωλήνα έκλουσης 1.7 ml που παρέχεται με το kit.
- Προσθήκη 50 µl RNA Elution Buffer στη στήλη. Για υψηλές συγκεντρώσεις RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μικρότερη ποσότητα (ελάχιστη ποσότητα είναι τα 20 µl).
- Φυγοκέντρωση για 2 min στα 200 g και μετά για 1 min στα 14,000 g. Αν δεν έχει γίνει έκλυση όλης της ποσότητας πραγματοποιείται περαιτέρω φυγοκέντρωση για 1 min στα 14,000 g.

Υδρόλυση RNA

- Για probes μεγαλύτερες των 500 νουκλεοτιδίων, υδρολύεται 1 µg RNA με προσθήκη ίσου όγκου RNase-free H₂O και 2x όγκους carbonate buffer (60 mM Na₂CO₃, 40 mM NaHCO₃, pH 10.2). Επώαση στους +60°C. Ο χρόνος επώασης υπολογίζεται ως εξής:
 - $t = (L_o - L_f) / (k \times L_o \times L_f)$,
 - L_o = αρχικό μέγεθος μεταγραφήματος (σε kb),
 - L_f = επιθυμητό μέγεθος probe (σε kb), και
 - k = σταθερά = 0.11 kb/min.
- Τερματισμός αντίδρασης με προσθήκη ίσου όγκου buffer αδρανοποίησης υδρόλυσης (3 M sodium acetate, 1% (v/v) acetic acid, pH 6).
- Ακολουθεί ο καθαρισμός του RNA.

Υλικά

- Eppendorfs – tips – πιπέτες
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος
- Καταψύκτης
- Πλασμίδιο με T7/SP6 υποκινητές ευθυγραμμισμένο με περιοριστικό ένζυμο που δεν δημιουργεί 3' εξοχή, ή προϊόν PCR που έχει τουλάχιστον 5 βάσεις ανωφερώς/κατωφερώς των T7/SP6 υποκινητών
- Kit καθαρισμού gel και προϊόντων PCR (Nucleospin)
- DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche)
- RNase-free νερό
- RNA Clean-Up and Concentration kit (Norgen)
- b-μερκαπτοαιθανόλη
- Carbonate Buffer: 60 mM Na₂CO₃, 40 mM NaHCO₃ pH 10.2
- Hydrolysis neutralization buffer: 3 M CH₃COONa, 1% (v/v) CH₃COOH pH 6.0
- Αιθανόλη
- 70% αιθανόλη, 0.15 M NaCl

4.2. Μονιμοποίηση ιστού

Μονιμοποίηση φυματίων M. truncatula

- Συλλογή φυματίων (με νυστέρι) σε τρυβλίο με RNase-free ddH₂O και άμεση μεταφορά τους σε buffer μονιμοποίησης.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 50 λεπτά και εφαρμογή κενού για 10 min για βελτίωση περατότητας και απαέρωσης των ιστών.
- Επανάληψη βήματος άλλες 3 φορές.
- Αλλαγή buffer μονιμοποίησης και επώαση στους 4°C O/N.

Αφυδάτωση ιστού

- Προσθήκη 1x fixation buffer (pH 7) και επώαση στους 4°C για 30 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση buffer, προσθήκη 10% αιθανόλης (σε RNase-free ddH₂O) και επώαση στους 4°C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 10% αιθανόλης, προσθήκη 20% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 20% αιθανόλης, προσθήκη 30% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 30% αιθανόλης, προσθήκη 40% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 40% αιθανόλης, προσθήκη 50% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 50% αιθανόλης, προσθήκη 60% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 60% αιθανόλης, προσθήκη 70% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 20 min έως O/N υπό ελαφριά ανάδευση.

- Αφαίρεση 70% αιθανόλης, προσθήκη 80% αιθανόλης + 0.5% σαφρανίνης και επώαση στους 4°C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 80% αιθανόλης, προσθήκη 90% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 90% αιθανόλης, προσθήκη 100% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 100% αιθανόλης, προσθήκη 100% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 100% αιθανόλης, προσθήκη 100% αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.

Διαφανοποίηση ιστών

- Αφαίρεση 100% αιθανόλης, προσθήκη 25% ξυλενίου (σε αιθανόλη) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h ή O/N στους 4°C.
- Αφαίρεση 25% ξυλενίου, προσθήκη 50% ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.
- Αφαίρεση 50% ξυλενίου, προσθήκη 75% ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.
- Αφαίρεση 75% ξυλενίου, προσθήκη 100% ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.
- Αφαίρεση 100% ξυλενίου, προσθήκη 100% ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.
- Αφαίρεση 100% ξυλενίου, προσθήκη 100% ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.

Διήθηση ιστού

- Προετοιμασία λιωμένης παραφίνης: Θέρμανση κομματιών παραφίνης στους 65°C έως ότου λιώσουν, φιλτράρισμα σε χαρτί Whatman (για αφαίρεση σκόνης) και διατήρηση στους 65°C σε κλειστό δοχείο.
- Προσθήκη 2-3 σταγόνων παραφίνης στους ιστούς που βρίσκονται στο ξυλένιο και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60 min.
- Προσθήκη σταγόνων έως ότου η παραφίνη να φτάσει περίπου τον μισό όγκο του ξυλενίου (4-16 h).
- Μεταφορά στους 42°C και προσθήκη σταγόνων παραφίνης ανά 30-60 min έως ότου ο όγκος της παραφίνης να είναι διπλάσιος από αυτόν του ξυλενίου.
- Μεταφορά δοχείων στους 60°C, προσθήκη αρκετών σταγόνων παραφίνης, γρήγορη αφαίρεση διαλύματος παραφίνης/ξυλενίου, αντικατάστασή του με παραφίνη και επώαση για 48 h στους 60°C. Σε αυτό το διάστημα η παραφίνη θα πρέπει να αλλάχθει τουλάχιστον 4 φορές.
- Προθέρμανση τρυβλίου στους 60°C και προσθήκη λίγης παραφίνης. Τα φυμάτια από τα δοχεία μεταφέρονται στο τρυβλίο. Οι θέσεις προσαρμόζονται με μια προθερμασμένη βελόνα και το τρυβλίο μεταφέρεται γρήγορα σε παγωμένη επιφάνεια. Οι ιστοί στην παραφίνη μπορούν να διατηρούνται για αρκετά χρόνια στους 4°C.

Υλικά

- Eppendorfs – tips – πιπέτες
- Δοχείο κενού
- Καταψύκτης
- Επωαστήρας
- Θάλαμος 60°C
- Αναδευτήρας
- pH-μετρικό χαρτί
- Σκοτεινό δοχείο
- Παραφορμαλδεΰδη (τοξική, προσοχή στο χειρισμό)
- 25% διάλυμα γλουταραλδεΰδης
- NaOH
- Na₂HPO₄
- NaH₂PO₄
- Fixation buffer 10x (pH 7): Ανά 100 ml: 30.5 ml Na₂HPO₄ 0.2M, 19.5 ml NaH₂PO₄ 0.2M, 5.844 gr NaCl, ddH₂O (RNase-free)
- Διάλυμα μονιμοποίησης: 4% παραφορμαλδεΰδη, 0.25% γλουταραλδεΰδη σε 1x Fixation buffer
- RNase-free ddH₂O
- Αιθανόλη
- Σαφρανίνη
- Ξυλένιο
- Χαρτί Whatman
- Παραφίνη

Σημειώσεις

- Όλα τα διαλύματα να είναι RNase-free και αποστειρωμένα.
- Μετά την τοποθέτηση των φυματίων με παραφίνη στο τρυβλίο, αυτό θα πρέπει να μεταφερθεί γρήγορα σε παγωμένη επιφάνεια, ώστε να μην κατακαθίσουν τα φυμάτια στο τρυβλίο και υπάρχουν προβλήματα κατά τη διαδικασία των τομών.
- Ο θάλαμος που διατηρείται η παραφίνη θα πρέπει να έχει σταθερή θερμοκρασία 60°C ώστε να μην πήξει η παραφίνη.

4.3. Πραγματοποίηση τομών

- Το κομμάτι της παραφίνης που περιέχει το δείγμα στο οποίο θέλουμε να κάνουμε τομές, κόβεται έτσι ώστε η επιφάνεια τομής να έχει τραπεζοειδές σχήμα.
- Το κομμάτι τοποθετείται στο μικροτόμο με τέτοιο τρόπο, ώστε η τομή να πραγματοποιείται από τη «μεγάλη» προς τη «μικρή» πλευρά του τραπεζοειδούς.
- Οι τομές πραγματοποιούνται με την ειδική λεπίδα μικροτόμου και είναι 7-10 μm σε πάχος. Η «λωρίδα παραφίνης» που κόβεται, μπορεί να αποθηκευτεί σε χαρτί χωρίς σκόνη μέσα σε σφραγισμένο αποστειρωμένο πλαστικό κουτί έως μία εβδομάδα στους 4°C.

- Γίνεται επιλογή των επιθυμητών τομών, τοποθετούνται στις ειδικές επικαλυπτόμενες αντικειμενοφόρες πλάκες («γυαλιστερή» πλευρά προς τα κάτω), και καλύπτονται με RNase-free ddH₂O.
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε hot-plate στους 60°C για 5-20 sec ώστε να «τεντώσουν» οι ιστοί.
- Η περίσσεια του ddH₂O αφαιρείται είτε με αποστειρωμένο χαρτί Whatman, είτε με πιπέτα.
- Οι πλάκες αφήνονται O/N σε hot-plate στους 42°C για άριστη προσκόλληση των τομών. Σε αντίθετη περίπτωση, οι τομές μπορεί να χαθούν και τη διαδικασία υβριδισμού. Έπειτα, οι πλάκες αποθηκεύονται στους 4°C ή -20°C σε σφραγισμένο πλαστικό κουτί.

Υλικά

- Μικροτόμος
- Ξυραφάκι – νυστέρι
- Φλόγα
- Επωαστήρας
- Καταψύκτης
- Heat-block
- Ειδικές επικαλυπτόμενες (με σιλάνιο) αντικειμενοφόρες πλάκες
- Χαρτί Whatman
- Σφραγιζόμενο πλαστικό κουτί

4.4. Αποπαραφίνωση

Κατά την εργασία με υλικό που περιέχει ιδιαιτέρως κενотоποιημένα κύτταρα, είναι σημαντικό να αφαιρεθεί το μέσο μονιμοποίησης ακριβώς πριν τον προ-υβριδισμό. Αντίθετα, κατά την εργασία με λιγότερα ευαίσθητο υλικό (π.χ. φυμάτια) και μετά την αφαίρεση του μέσου μονιμοποίησης, οι πλάκες μπορούν (αφού στεγνώσουν) να αποθηκευθούν στους 4°C ή -20°C σε σφραγισμένα δοχεία.

- Οι πλάκες αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αν έχουν αποθηκευθεί στους -20°C, πρέπει να παραμείνουν τουλάχιστον 1 h σε θερμοκρασία δωματίου πριν ανοιχθεί το σφραγισμένο δοχείο ώστε να μην υγρανθούν οι πλάκες.
- Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων πλακών σε δίσκο ειδικό για τη συγκράτησή τους.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει 100% ξυλένιο και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε νέο δοχείο που περιέχει 100% ξυλένιο. Επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 50% ξυλένιο (σε αιθανόλη). Επώαση για 25 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 100% αιθανόλη και επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Σε περίπτωση εργασίας με φυμάτια, οι πλάκες μπορούν να στεγνώσουν και να αποθηκευτούν στους -20°C ή 4°C.

Υλικά

- Καταψύκτης
- Λαβίδα
- Δίσκος συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών
- Δοχείο για τοποθέτηση πλακών
- Αναδευτήρας
- Σφραγισμένο πλαστικό δοχείο
- Ξυλένιο
- Αιθανόλη

4.5. Ενυδάτωση

- Σε περίπτωση που οι πλάκες αποθηκεύθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, πρέπει να μείνουν πρώτα και να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι πλάκες τοποθετούνται στο δίσκο συγκράτησης και μεταφέρονται σε δοχείο που περιέχει 100% αιθανόλη. Επώάζονται για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε νέο δοχείο που περιέχει 100% αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου με τις πλάκες σε δοχείο που περιέχει 90% αιθανόλη (σε RNase-free ddH₂O) και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 70% αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 50% αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 30% αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 10% αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει RNase-free ddH₂O και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει RNase-free ddH₂O και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει RNase-free ddH₂O και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Υλικά

- Δίσκος συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών
- Δοχείο για τοποθέτηση πλακών
- Αναδευτήρας
- Αιθανόλη
- RNase-free ddH₂O

4.6. Προ-υβριδισμός

- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει Protease K buffer και 2 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K. Επώαση για 30 min στους 37°C.
- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει 1x TBS και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει 1x TBS και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει 1x TBS και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει 0.1M τρι-αιθανολ-αμίνη, 0.25 (v/v) οξικό ανυδρίτη σε RNase-free ddH₂O, pH 8 (5.2 ml τρι-αιθανολ-αμίνη, 1.6 ml HCl, 391.2 ml H₂O, 2 ml οξικός ανυδρίτης) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση, ώστε να ακετυλιωθούν θετικά φορτία που πιθανόν να προκαλέσουν μη-ειδική πρόσδεση.
- Μεταφορά του δίσκου με τις πλάκες σε δοχείο με 0.1M τρι-αιθανολ-αμίνη, 0.25 (v/v) οξικό ανυδρίτη σε RNase-free ddH₂O, pH 8 και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο που περιέχει 2x SSC για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 10% αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 30% αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 50% αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 70% αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 90% αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 100% αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 100% αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Οι τομές αφήνονται να στεγνώσουν για τουλάχιστον 1 h και αποθηκεύονται μέχρι τον υβριδισμό.

Υλικά

- Επωαστήρας
- Δίσκος συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών
- Δοχείο για αντικειμενοφόρες πλάκες
- Αναδευτήρας
- Protease K buffer: 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7.5
- Proteinase K
- TBS 10x (pH 7.5) πυκνό: 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl, pH 7.5 (with HCl)
- Τρι-αιθανολ-αμίνη
- Οξικός ανυδρίτης

- SSC 20X (pH 7) πυκνό: 3M NaCl, 0.3 M κιτρικό νάτριο ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), pH 7.0 (ρύθμιση με HCl)
- RNase-free ddH₂O

4.7. Υβριδισμός

- Προετοιμασία 50% Dextran sulfate: διαλυτοποίηση 5 g Dextran sulfate (MW=500.000) σε 8 ml RNase-free H₂O, ανακίνηση O/N στους 4°C, και προσθήκη RNase-free H₂O έως τελικό όγκο 10 ml.
- Προετοιμασία buffer προ-υβριδισμού (ανά 50 ml): 25 ml απιονισμένο φορμαμίδιο, 3 ml NaCl 5M, 100 μl Tris-HCl 1M pH 7.5, 1 ml Denhardt's 50x, 11.25 μl tRNA (10 mg/ml), 21 ml RNase-free ddH₂O.
- **Υβριδισμός:** Τοποθέτηση χαρτιού Whatman σε πλαστικό κουτί (σφραγιζόμενο) και διάβροχη με διάλυμα SSC 2x.
- Μεταφορά δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει SSC 2x για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά πλακών και τοποθέτησή τους στο βρεγμένο χαρτί Whatman μέσα στο πλαστικό κουτί.
- Επικάλυψη κάθε πλάκας με περίπου 1 ml buffer προ-υβριδισμού και επώαση για τουλάχιστον 10 min στους 45°C.
- **Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού (100 μl ανά πλάκα):**
 - Προετοιμασία **διαλυμάτων A (90 μl ανά πλάκα) & B (5 μl ανά πλάκα)** για n+2 πλάκες:
 - Διάλυμα A: 50 μl απιονισμένο φορμαμίδιο, 6 μl NaCl 5M, 2 μl Denhardt's 50x, 20 μl 50% Dextran sulfate, 10 μl TE 10x pH 7.5, 2 μl ddH₂O.
 - Διάλυμα B: 1.5 μl tRNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1.5 μl poly(A) (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μl ddH₂O
 - Προετοιμασία probe:
 - Για κάθε πλάκα γίνεται ανάμιξη ίσης ποσότητας (20-50 ng) DIG-σημασμένου probe και υδρολυμένου DIG-σημασμένου probe.
 - Προσαρμογή όγκου probe στα 5 μl ανά πλάκα με προσθήκη RNase-free ddH₂O.
 - Ανάμιξη probe με 5 μl διαλύματος B και επώαση για 5 min στους 80°C για μετουσίωση RNA και μετά άμεση μεταφορά στον πάγο.
 - Ανάμιξη 90 μl διαλύματος A με το μίγμα probe/διάλυμα B.
- Αφαίρεση με πιπέτα του buffer προ-υβριδισμού από τις πλάκες.
- Μεταφορά (με πιπέτα) buffer υβριδισμού στις πλάκες.
- Κάλυψη πλάκας και διαλύματος με Parafilm και σφράγισμα κουτιού.
- Επώαση O/N στους 42°C σε σκοτάδι.

Υλικά

- Επωαστήρας
- Υδατόλουτρο
- Θερμαντήρας
- Δίσκος συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών
- Δοχείο για αντικειμενοφόρες πλάκες
- Λαβίδα
- Σφραγιζόμενο πλαστικό κουτί για αντικειμενοφόρες πλάκες

- Χαρτί Whatman
- Parafilm
- Απιονισμένο φορμαμίδιο
- NaCl 5M
- TE 10x: 100mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH 7.5
- 50% Dextran sulfate (MW: 500,000)
- tRNA (10 mg/ml)
- poly(A) (20 mg/ml)
- DIG-σημασμένο probe και DIG-σημασμένο υδρολυμένο probe
- Denhardt's 50x: 1% Ficoll, 1% πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP), 1% BSA RNase-free
- SSC 20x: 3M NaCl, 0.3M κιτρικό νάτριο ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), Ph 7.0 (ρύθμιση με HCl)
- Buffer προ-υβριδισμού: 50% απιονισμένο φορμαμίδιο, 300mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 7.5, 1x Denhardt's, 2.25 µg/ml tRNA

4.8. Χειρισμός μετα-υβριδισμού

Επειδή ακολουθεί πέψη με RNase, όλα τα υαλικά που θα χρησιμοποιηθούν στο χειρισμό μετα-υβριδισμού, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά σε αυτό το βήμα.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl (0-100 mM) η RNase A κόβει ssRNA, dsRNA, και RNA σε RNA-DNA υβρίδια. Σε συγκεντρώσεις NaCl άνω των 300 mM κόβει αποκλειστικά ssRNA.

- Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων πλακών στον ειδικό δίσκο συγκράτησης.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο που περιέχει SSC 4x για 5-10 min ώστε να «γλιστρήσει» το parafilm.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο που περιέχει RNase buffer για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με προθερμασμένο RNase buffer και 50 µg RNase A/ml RNase buffer ώστε να απομακρυνθεί το μη-υβριδισμένο RNA, και επώαση στους 37°C για 30 min υπό ανάδευση. Η άριστη συγκέντρωση RNase εξαρτάται από φυτικό υλικό.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με RNase buffer για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με RNase buffer για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με RNase buffer για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με SSC 2x για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με SSC 0.2x για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με SSC 0.2x για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

Υλικά

- Δίσκος συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών
- Δοχείο για αντικειμενοφόρες πλάκες
- Λαβίδα
- Επωαστήρας
- Αναδευτήρας
- Μαγνήτης
- SSC 20X: 3M NaCl, 0.3 M κιτρικό νάτριο ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), pH 7.0 (με HCl).
- RNase buffer: 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl
- RNase



Εικόνα 9: Δοχείο και σκεύος συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών που χρησιμοποιούνται στον RNA-RNA *in situ* υβριδισμό.

4.9. Εντοπισμός

Προετοιμασία 10% πολυβίνυλ-αλκοόλης 89-98 kD (ενίσχυση σήματος) σε buffer εντοπισμού 1x. Ανά 100 ml:

- Ισχυρή ανακίνηση buffer εντοπισμού 10x και αραιώση 1:10 σε ddH₂O.
- Ανάμιξη 10 gr πολυβίνυλ-αλκοόλης 89-98 kD με buffer εντοπισμού 1x σε τελικό όγκο 100 ml.
- Θέρμανση στους 90°C υπό ανάδευση για να διαλυθεί η πολυβίνυλ-αλκοόλη.
- Επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ανασύσταση των buffers DIG Wash και Block buffer set

- Προετοιμασία του Washing buffer 1x (100 mM μαλαϊκό οξύ, 150 mM NaCl, pH 7.5 with NaOH, 0.3-0.5% Tween 20): α. Ισχυρή ανακίνηση του μητρικού Washing Buffer 10x πριν τη χρήση, β. Αραιώση 1:10 με RNase-free ddH₂O.
- Προετοιμασία buffer μαλαϊκού οξέος 1x (100 mM μαλαϊκό οξύ, 150 mM NaCl, pH 7.5 με NaOH): Ανακίνηση και αραιώση 1:10 με RNase-free ddH₂O του Buffer μαλαϊκού οξέος 10x.
- Προετοιμασία Blocking Solution 1x (διάλυμα αποκλεισμού – μείωση θορύβου): α. Ισχυρή ανακίνηση μητρικού Blocking Solution 10x πριν κάθε χρήση, β. Αραιώση 1:10 με RNase-free ddH₂O.

- Προετοιμασία buffer εντοπισμού 1x (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl): α. Ισχυρή ανακίνηση μητρικού Detection Buffer 10x πριν κάθε χρήση, β. Αραίωση 1:10 με RNase-free ddH₂O.

Διαδικασία εντοπισμού

- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει Washing Buffer 1x για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου με τις πλάκες σε δοχείο με Blocking Solution 1x για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Τοποθέτηση χαρτιού Whatman νοτισμένου με Washing Buffer 1x στον πάτο πλαστικού κουτιού (το οποίο μπορεί να σφραγιστεί).
- Μεταφορά των πλακών στο κουτί και οριζόντια τοποθέτησή τους στο χαρτί Whatman.
- Μεταφορά με πιπέτα 1 ml Blocking Solution 1x που περιέχει anti-digoxigenin-AP 1:500 (150 mU/ml) και επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών στον ειδικό δίσκο, μεταφορά σε δοχείο που περιέχει Washing Buffer 1x και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου με τις πλάκες σε δοχείο με Washing Buffer 1x και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με Detection Buffer 1x για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά των αντικειμενοφόρων και οριζόντια τοποθέτησή τους σε φωτοστεγανό πλαστικό κουτί.
- Προετοιμασία διαλύματος χρώσης αμέσως πριν τη χρήση: Αραίωση μητρικού διαλύματος NBT/BCIP 1:50 (ή προετοιμασία μητρικών διαλυμάτων: NBT 75 mg/ml σε 70% διμέθυλ-φορμαμίδιο, BCIP 50 mg/ml σε H₂O και προσθήκη 45 μl μητρικού διαλύματος NBT + 35 μl μητρικού διαλύματος BCIP ανά 10 ml Detection Buffer 1x που προαιρετικά περιέχει 10% πολυβίνυλ-αλκοόλη 89-98 kD) σε Detection Buffer 1x με 10% πολυβίνυλ-αλκοόλη 89-98 kD (να μην γίνει χρήση MgCl₂ για αποφυγή στικτού φόντου).
- Προσθήκη 1 ml διαλύματος χρώσης σε κάθε πλάκα και επώαση στο σκοτάδι (χωρίς ανακίνηση) έως την εμφάνιση μπλε χρώματος στις τομές (30 min έως O/N).
- Όταν εμφανιστεί η χρώση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται στον ειδικό δίσκο συγκράτησης και μεταφέρονται σε δοχείο που περιέχει TE. Οι πλάκες μπορούν να διατηρηθούν στο διάλυμα έως την έγκλιση, αλλά όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για παν ενδεχόμενο, καλό είναι να βγάλουμε μερικές φωτογραφίες σε αυτό το στάδιο, καθώς μερικές φορές χάνεται μέρος της χρώσης κατά τη διάρκεια της έγκλισης.

Προετοιμασία μέσου έγκλισης Mowiol 4-88

- Προσθήκη 4.758 ml γλυκερόλης σε σωλήνα τύπου Falcon των 50 ml.
- Προσθήκη 2.4 g Mowiol 4-88 και ανακίνηση μέχρι ομογενοποίησης.
- Προσθήκη 6 ml ddH₂O και παραμονή για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανακίνηση.
- Προσθήκη 12 ml 0.2 M Tris (pH 8.5) και επώαση στους 50°C έως τη διάλυση του Mowiol. Σποραδική ανακίνηση.

- Διαχωρισμός με φυγοκέντρηση στις 4,000-5,000 rpm για 20 min.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε γυάλινους σωλήνες με βιδωτά καπάκια (περίπου 1 ml στον καθένα). Αποθήκευση στους -20°C.

Εγκλιση αντικειμενοφόρων πλακών

- Προθέρμανση σε θερμοκρασία δωματίου των σωλήνων που περιέχουν το μέσο εγκλισης Mowiol 4-88. Οι ανοιγμένοι σωλήνες μπορούν να αποθηκευθούν στους 4°C για περίπου ένα μήνα. Απόρριψη υλικού στο οποίο παρατηρείται κρυσταλλοποίηση.
- Τοποθέτηση 15-20 μl μέσου Mowiol 4-88 στις τομές όταν χρησιμοποιείται καλυπτρίδα 22x22 mm και 40-50 μl μέσου Mowiol 4-88 όταν χρησιμοποιείται καλυπτρίδα 22x50 mm. Προσοχή ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες (να μην αδειάσει τελείως το tip).
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις καλυπτρίδες αφήνονται στο σκοτάδι O/N για να πήξουν.

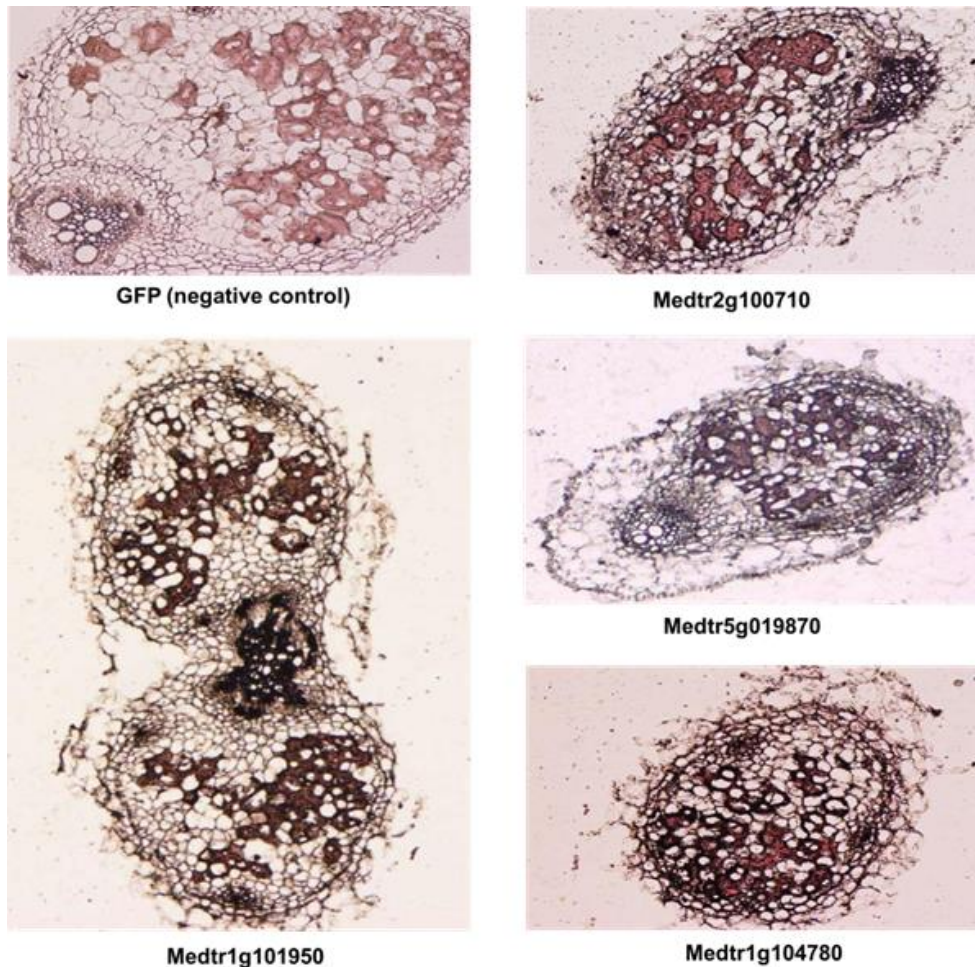
Υλικά

- Δίσκος συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών
- Δοχείο για αντικειμενοφόρες πλάκες
- Λαβίδα
- Επωαστήρας
- Αναδευτήρας
- Μαγνήτης
- Φυγόκεντρος
- Καλυπτρίδα
- Φωτοστεγανό, σφραγιζόμενο πλαστικό κουτί
- DIG Wash and Block Buffer Set (Roche)
- Anti-digoxigenin-AP conjugate, Fab fragment (Roche)
- Μητρικό διάλυμα NBT/BCIP (Roche)
- Πολυβίνυλ-αλκοόλη 89-98 kD
- Mowiol 4-88
- Γλυκερόλη

Σημειώσεις

- Όλος ο εξοπλισμός που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να είναι αποστειρωμένος και χωρίς παρουσία RNases. Στα βήματα μετά τον υβριδισμό να χρησιμοποιηθούν δίσκοι συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών και δοχεία αποκλειστικά για αυτό το βήμα.
- Κατά την πραγματοποίηση των τομών, καλό είναι να γίνει πειραματισμός με κομμάτι παραφίνης ώστε να υπάρχει εξοικείωση με τον χειρισμό του μικροτόμου και της παραφίνης.
- Κατά τη διαδικασία της αποπαραφίνωσης πρέπει να αφαιρεθεί τελείως η παραφίνη από τις τομές, καθώς σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να μην γίνει καλά η χρώση της τομής.

- Ο οξικός ανυδρίτης είναι ιδιαίτερα ασταθής και πρέπει να προστίθεται σε διάλυμα αμέσως πριν τη χρήση του. Ακετυλιώνει βασικές ομάδες, μειώνει το «θόρυβο», εμποδίζει τη μη-ειδική πρόσδεση των probes, και απενεργοποιεί τις RNases.
- Το φορμαμίδιο μειώνει τη θερμική σταθερότητα των δεσμών και έτσι ο υβριδισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.
- Τα μονοσθενή κατιόντα του SSC αντιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων μειώνοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ελίκων.
- Το Blocking Solution θα πρέπει να είναι φρέσκο σε κάθε χρήση του.



Εικόνα 10: *In situ* RNA-RNA υβριδισμός σε τομές φυματίων του *M. truncatula*. Για κάθε γονίδιο, το σημασμένο με διγοξιγενίνη antisense RNA χρησιμοποιήθηκε σαν ανιχνευτής του αντίστοιχου mRNA. Το σημασμένο με διγοξιγενίνη antisense RNA για την κωδική περιοχή του γονιδίου της GFP χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας (είναι χαρακτηριστική η έλλειψη θετικού σήματος). Με κόκκινο βέλος σημειώνονται τα κύτταρα του ιστού του φυματίου που αζωτοδεσμεύουν (ξεχωρίζουν από το εκτεταμένο κυτταρόπλασμα). Με γαλάζιο βέλος το θετικό σήμα που ανιχνεύτηκε για το mRNA κάθε γονιδίου αντίστοιχα. Το σήμα αυτό εντοπίζεται μέσα στα κύτταρα που εκτελούν αζωτοδέσμευση και στα γειτονικά τους.

5. Μετασχηματισμός σε ζύμες

Πριν το βιοχημικό χαρακτηρισμό των γονιδίων-στόχων στο σύστημα του *Saccharomyces cerevisiae*, ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός πρέπει να γίνει και στα κύτταρα της ζύμης. Για το λόγο αυτό, για το κάθε γονίδιο-στόχο, παρήχθησε αλληλουχία DNA που αντιστοιχεί στην υβριδική πρωτεΐνη-GFP με βοήθεια

πλασμιδίων. Η αλληλουχία αυτή θα ενισχυθεί με τη χρήση PCR και κατάλληλων εκκινητών και θα κλωνοποιηθεί σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ικανό να εκφράσει την υβριδική πρωτεΐνη στη ζύμη, υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισχυρού υποκινητή ζύμης PMA1. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του μεταφορέα θα αναλυθεί με τη βοήθεια συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου laser.

- Αρχικά χρειάζεται μία προκαλλιέργεια *S. cerevisiae* σε θρεπτικό υλικό YPD (0.5 g yeast extract, 1 g πεπτόνης, 1 g γλυκόζης ανά 50 ml) στους 30°C.
- Ακολουθεί εμβολιασμός 4 ml από της προκαλλιέργεια της ζύμης σε 50 ml θρεπτικού YPD και επώαση για περίπου 4 h στους 30°C.
- Φυγοκέντρηση των ζυμών στις 2500 rpm για 10 min στους 20°C.
- Επαναδιάλυση σε 40 ml TE 1x.
- Φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 min στους 20°C.
- Επαναδιάλυση σε 2 ml οξικό λίθιο (CH₃COOLi) 1x/TE 0.5x.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Για κάθε μετασχηματισμό αποδιατάσσονται με θέρμανση (5 min, 100°C) 100 μg κομμένου salmon sperm DNA και μεταφέρονται αμέσως στον πάγο.
- Μετά την επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, μεταφορά 100 μl από την καλλιέργεια της ζύμης σε σωλήνα eppendorf.
- Προσθήκη 100 μg αποδιατεταγμένου salmon sperm DNA, PEG-3350 40%/TE 1x/700 μl CH₃COOLi 1x (προστίθεται τελευταίο) και ανάδευση με πιπέτα.
- Προσθήκη 1 μg του πλασμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί.
- Επώαση για 30 min στους 30°C σε υδατόλουτρο.
- Προσθήκη 88 μl DMSO και καλή ανάδευση με πιπέτα.
- Επώαση για 7 min στους 42°C σε heat-block (heat-shock).
- Αναμονή 1-2 min ώστε να ελαττωθεί η θερμοκρασία
- Φυγοκέντρηση για 12 sec στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (spin-down).
- Αφαίρεση υπερκείμενου και αναδιάλυση ιζήματος ζυμών σε 1 ml TE 1x.
- Φυγοκέντρηση για 12 sec στις 1300 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 100 μl TE 1x.
- «Στρώσιμο» σε τρυβλία με θρεπτικό MC (0.34 g yeast nitrogen base w/o amino acids, 0.09 g yeast synthetic drop-out medium w/o uracil, 1 g γλυκόζη ανά 50 ml) 1.5% agar.

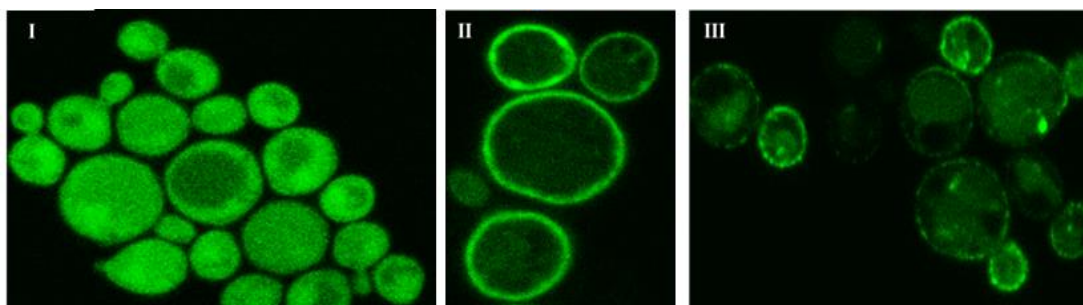
Υλικά

- Επιθυμητά πλασμίδια
- Σωλήνες τύπου eppendorf
- Φυγόκεντρος
- Φλόγα
- Heat-block
- Βραστήρας
- Υδατόλουτρο
- Ζυγαριά
- Falcons 50 ml
- Πιπέτες

- Tips
- Τρυβλία
- *S. cerevisiae*
- Άγαρ
- Γλυκόζη
- Πεπτόνη
- Yeast extract
- Οξικό λίθιο
- TE
- PEG-3350
- Salmon sperm DNA
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Yeast nitrogen base (χωρίς αμινοξέα)
- Yeast synthetic drop-out medium (χωρίς ουρακίλη)

Σημειώσεις

- Η καλλιέργεια *S. cerevisiae* δεν θα πρέπει να επωαστεί για περισσότερες από 5 ώρες.
- Προσοχή κατά τη φυγοκέντρηση των ζυμών καθώς το ίζημα ξεκολλάει εύκολα.
- Η προσθήκη του salmon sperm DNA γίνεται για να αυξηθεί η πιθανότητα να «επιβιώσει» το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιείται. Μεγαλύτερη ποσότητα DNA αυξάνει την πιθανότητα να μην υποστεί ενζυμική πέψη ή να μην προσκολληθεί σε κυτταρική μεμβράνη το πλασμιδιακό DNA.
- Το PEG και το DMSO χρησιμοποιείται για αύξηση περατότητας των μεμβρανών.
- Μετά το «στρώσιμο» των ζυμών στα τρυβλία απαιτούνται 3-4 μέρες έως την εμφάνιση μετασχηματισμένων αποικιών.



Εικόνα 11: Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια Medtr1g104780 και Medtr5g019870 στο σύστημα του *Saccharomyces cerevisiae* με χρήση συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου Lazer. Κύτταρα ζύμης μετασχηματισμένα με pDR196+YFP (I), pDR196+Medtr1g104780+YFP (II) και pDR196+Medtr5g019870+YFP (III). Η YFP εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα του μετασχηματισμένου κυττάρου ζύμης, ενώ οι υβριδικές πρωτεΐνες (μεταφορέας-YFP) εντοπίζονται στη κυτταρική μεμβράνη της ζύμης.

6. Μετασχηματισμός και μόλυνση με *Agrobacterium rhizogenes*

Ο υποκυτταρικός εντοπισμών κωδικοποιημένων πρωτεϊνών στο φυμάτιο γίνεται με τη βοήθεια του *A. rhizogenes*. Η κασέτα «υποκινητής-πρωτεΐνη στόχος-πρωτεΐνη αναφοράς» μεταφέρεται στο *A. rhizogenes*, αφού πρώτα έχει κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pCambia1302. Ο pCambia1302 φέρει αλληλουχίες που

αντιστοιχούν στο αριστερό και δεξιό όριο (LB και RB) του T-DNA βακτηρίων του γένους *Agrobacterium*, οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα μεταφοράς του τμήματος που οριοθετούν, στο γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου όταν ο φυτικός ιστός μολυνθεί με βακτήρια *Agrobacterium*. Στην περιοχή που οριοθετείται από τις LB και RB αλληλουχίες του T-DNA ο pCAMBIA1302 φέρει ήδη κλωνοποιημένη την κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης GFP υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή CaMV 35S, καθώς και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη για επιλογή των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων.

6.1. Μετασχηματισμός *A. rhizogenes*

- Η μεταφορά του πλασμιδίου έγινε με την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) (1kV, 400 Ω, 25 μF) σε ειδική κυβέτα ηλεκτροδιάτρησης με 0.2 cm απόσταση ηλεκτροδίου χρησιμοποιώντας 50 μl δεκτικά κύτταρα *A. rhizogenes* ARQUA1 (σε TE 1x/γλυκερόλη 10%) και περίπου 4 μl πλασμιδίου.
- Αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό LB (στο 1 L: 10 g πεπτόνη, 10 g NaCl, 5 g yeast extract) για 1-2 h στους 28°C.
- Μετά ακολουθεί «στρώσιμο» τρυβλίων LB 1.5% άγαρ (με προσθήκη καναμυκίνης 20 μg/ml) και επώαση στους 28°C για 48 h.
- Επιλέγονται αποικίες για επαλήθευση επιτυχημένου μετασχηματισμού με χρήση περιοριστικών ενζύμων.

6.2. Μόλυνση με *A. rhizogenes*

- Προκαλλιέργεια μετασχηματισμένων *A. rhizogenes* ArQUA1 σε υγρό θρεπτικό LB + καναμυκίνη και επώαση O/N στους 28°C.
- Απολύμανση και χημικός σκαριφισμός σπόρων *M. truncatula* R108 (όπως περιγράφηκαν στην ενότητα 1). Προβλάστηση στους 14°C για 30 h.
- Από την υγρή προκαλλιέργεια ArQUA1 400 μl «στρώνονται» σε τρυβλίο LB 1.5% άγαρ με καναμυκίνη και επωάζονται για 24 h στους 28°C.
- Μετά τις 30 h προβλάστησης οι σπόροι (θα πρέπει να έχουν ριζίδιο μήκους 1-2 cm) μεταφέρονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminar flow hood). Με μία λαβίδα συγκρατείται η άκρη του ριζιδίου και με νυστέρι κόβονται περίπου 3 mm από την άκρη.
- Το φυτάριο πιάνεται με τη λαβίδα έτσι ώστε να μπορεί να «συρθεί» η ρίζα στο τρυβλίο με το μετασχηματισμένο ArQUA1.
- Μέχρι 10 μολυσμένα φυτάρια τοποθετούνται σε τετράγωνο (120 x 120 mm) τρυβλίο (περίπου 5 cm απόσταση από τις άκρες) με θρεπτικό μέσο Fahreüs, 1.5% άγαρ, καναμυκίνη (20 μg/ml), και pH 6.5. Σύσταση θρεπτικού Fahreüs:
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mM,
 - KH_2PO_4 0.7 mM,
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8 mM,
 - Ferric-EDTA 50 μM (ξεχωριστή προετοιμασία με θέρμανση στους 50°C FeSO_4 5.6 g/L, EDTA 7.4 g/L και ανάμιξη),
 - Micronutrients (MnSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_4 , Na_2MoO_4) 0.1 μg/L το καθένα, και
 - CaCl_2 1 mM (προσθήκη μετά την αποστείρωση).

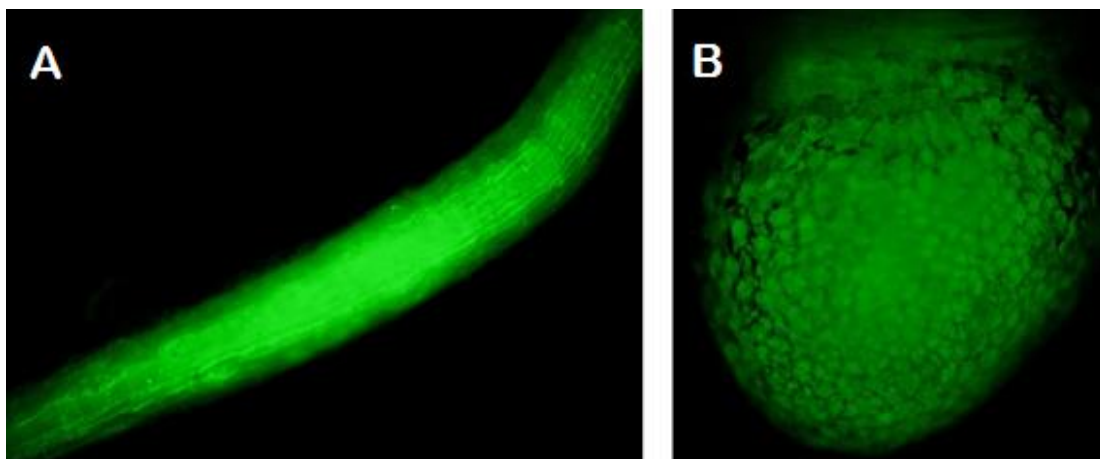
- Τα τρυβλία κλείνονται καλά με parafilm το οποίο έχει τρύπες για ανταλλαγή αερίων και τοποθετούνται στις 45° για 2-3 ημέρες και μετά κάθετα για 4-5 ημέρες στους 20°C με φωτοπερίοδο 16 h φως/8 h σκοτάδι.
- Μετά από 7 ημέρες τα τρυβλία μεταφέρονται στους 25°C (ίδια φωτοπερίοδος) και οι μετασχηματισμένες με Ri T-DNA+Vector ρίζες θα πρέπει να έχουν εμφανιστεί στο 50-75% των φυτών.
- Μετά από 3 εβδομάδες οι μετασχηματισμένες ρίζες θα πρέπει να έχουν αναπτυχθεί επαρκώς για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

Υλικά

- ArQUA1 δεκτικά κύτταρα *A. rhizogenes*
- Επιθυμητό πλασμίδιο
- Σπόροι *M. truncatula* R108
- Γυάλινες κωνικές φιάλες καλλιέργειας
- H₂SO₄
- Χλωρίνη
- Επωαστήρας
- Αναδευτήρας
- Λαβίδα
- Λεπίδα
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής
- Τρυβλία 90 mm τύπου Petri
- Τετράγωνα τρυβλία 120 x 120 mm
- Μετρητής pH
- Parafilm
- Θάλαμος ανάπτυξης με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία/φωτοπερίοδο
- Πεπτόνη
- NaCl
- Yeast extract
- Άγαρ
- Καναμυκίνη
- Χημικά για παρασκευή θρεπτικού διαλύματος Fahreüs: MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, Na₂HPO₄·2H₂O, FeSO₄, EDTA, Micronutrients (MnSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, H₃BO₄, Na₂MoO₄), CaCl₂

Παρατηρήσεις

- Ο μετασχηματισμός των ριζών είναι 2 φορές πιο αποτελεσματικός αν τα τρυβλία με τα μολυσμένα φυτάρια αναπτυχθούν στους 20°C αντί για τους 25°C.
- Σε κάθε πείραμα καλό είναι να υπάρχουν και control φυτά που δεν έχουν μολυνθεί με *Agrobacterium* (επιπλέον των φυτών που έχουν μολυνθεί με μη-μετασχηματισμένο ArQUA1).
- Άμα γίνει επιλογή με καναμυκίνη να χρησιμοποιηθεί άγαρ και όχι phytigel.
- Αν είναι επιθυμητός ο σχηματισμός φυματίων τα φυτά πρέπει να μεταφερθούν σε δοχεία-γλαστράκια πριν τη μόλυνσή τους με το ριζόβιο.



Εικόνα 12: Ρίζα (A) και φυμάτιο (B) του *M. truncatula* που εκφράζουν την GFP πρωτεΐνη, ύστερα από μόλυνση αρχέφυτρων *M. truncatula* με *A. rhizogenes*, μετασχηματισμένου με το πλασμίδιο pCambia1302, και εμβολιασμό των φυτών μετά την ανάπτυξης μετασχηματισμένων ριζών (υδρομυκίνη 20 $\mu\text{g/ml}$) με *S. meliloti* 1021. Η έκφραση της GFP πρωτεΐνης ανιχνεύτηκε με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.

7. Ταυτοποίηση *Tnt1*-μεταλλαγμένων σειρών *M. truncatula*

Για το γονίδια-στόχους εντοπίζονται μεταλλαγμένες σειρές *M. truncatula* στη βάση δεδομένων του *Tnt1*-μεταλλαγμένου πληθυσμού του Ινστιτούτου Noble (Plant Biology Division, Noble Foundation, Oklahoma, USA). Χρησιμοποιώντας το εργαλείο BLAST εντοπίζονται μεταλλαγμένες σειρές στις οποίες το *Tnt1* ρετροτρανσποζόνιο έχει εισαχθεί και διακόψει την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου. Το *Tnt1* είναι ένα αυτόνομο ρετροτρανσποζόνιο 5.3 kB το οποίο έχει απομονωθεί από το φυτό του καπνού και δημιουργεί μια επανάληψη 5 βάσεων στο σημείο εισαγωγής του. Η εισαγωγή του είναι τυχαία, αλλά διακόπτει συχνά γονίδια δείχνοντας μια «προτίμηση» σε περιοχές ευχρωματίνης και σε ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια. Στη μηδική το *Tnt1* ρετροτρανσποζόνιο προκαλεί 4 έως 40 εισαγωγές ανά μετασχηματισμένο φυτό και είναι σταθερές κατά τον κύκλο ζωής του φυτού.

Μετά την παραλαβή των μετασχηματισμένων σειρών, οι σπόροι φυτεύονται και αναπτύσσονται όπως έχει περιγράψει στην Ενότητα 1. Όταν φυτά αναπτυχθούν επαρκώς (3-4 εβδομάδες) απομονώνεται γενωματικό DNA ώστε τα φυτά να ελεγχθούν για ομοζυγωτία στη μετάλλαξη (απενεργοποίηση γονιδίου).

Η απομόνωση του γενωματικού DNA γίνεται με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Τρία φύλλα από κάθε φυτό λειοτριβούνται σε γουδί με χρήση υγρού αζώτου.
- Προσθήκη στο γουδί 200 μl CTAB extraction buffer (0.1M Tris-HCl με pH=8, 0.02M EDTA pH=8, 1.4M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% w/v PVP-40) το οποίο έχει προθερμανθεί στους 65°C.
- **Εναλλακτικά**, λόγω της μικρής ποσότητας του ιστού, αυτός μπορεί να λειοτριβηθεί με πλαστικό έμβολο μέσα σε eppendorf, παρουσία 200 μl CTAB extraction buffer.
- Ανακίνηση και επώαση στους 65°C για 10-30 min .
- Προσθήκη ίσου όγκο διαλύματος Sevag (χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη=24:1) και καλή ανάμιξη με χρήση vortex.
- Φυγοκέντρωση στις 13,000 rpm για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης σε νέο eppendorf.
- Προσθήκη 0.7 όγκου ισοπροπανόλης. Ανάμιξη με αναστροφή του eppendorf (10-15 φορές) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση υπερκλειμένου.
- Πλύσιμο ιζήματος DNA με 200-300 μ l 70% αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13,000 rpm στους 4°C.
- Αφαίρεση υπερκλειμένου με προσοχή (το ίζημα ξεκολλά εύκολα).
- Επαναφυγοκέντρηση (spin down) για να αφαιρεθεί όσο το δυνατόν περισσότερη αιθανόλη.
- Στέγνωμα ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 min.
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 40-50 μ l ddH₂O ή TE.
- Επώαση στον πάγο για 10 min, vortex, spin down, και αποθήκευση στους -20°C.

Το απομονωμένο DNA χρησιμοποιήθηκε σε τεχνική PCR με 3 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για ταυτοποίηση ομοζυγωτίας:

- Ένα ζεύγος που υβριδίζει έξω από την περιοχή εισαγωγής, ώστε να ενισχυθεί το γονίδιο αν **δεν** έχει διακοπεί από το *Tnt1* (το ένθετο στοιχείο είναι 5.3 kB, οπότε σε περίπτωση που έχει εισαχθεί στο γονίδιο δεν μπορεί να ενισχυθεί λόγω του μεγέθους του και των συνθηκών της PCR).
- Ένα ζεύγος που ο ένας εκκινητής (forward) υβριδίζει πριν τη θέση της ένθεσης και ο άλλος (reverse) εντός του μεταθετού στοιχείου (**Tnt109** – GCATTCAAACCTAGAAGACGATGCTACC).
- Ένα ζεύγος που ο ένας εκκινητής (forward) υβριδίζει εντός του μεταθετού στοιχείου (**Tnt109**) και ο άλλος (reverse) μετά τη θέση του μεταθετού στοιχείου (σε περίπτωση που η ένθεση έχει γίνει με αντίθετη κατεύθυνση).

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA σε θερμοκρασία 94°C για 3 min.
- Κύκλος που επαναλαμβάνεται 35 φορές και αποτελείται από τα βήματα:
 - Θερμική αποδιάταξη στους 94°C για 1 min,
 - Υβριδισμό του εκκινητή στους 57°C για 1 min (ανάλογα το T_m των εκκινητών),
 - Επιμήκυνση του εκκινητή για σύνθεση νέου κλώνου στους 72°C για 1 min & 50 sec (ο χρόνος αυτού του βήματος εξαρτάται από το μέγεθος του αμπλικονίου που μας ενδιαφέρει, ο ρυθμός είναι περίπου 1 kB/min), και
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min.

Κατά συνέπεια, μετά από ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης τα φυτά που εμφανίζουν ζώνη με το 2^ο ή το 3^ο ζεύγος εκκινητών αλλά όχι με το 1^ο είναι ομοζυγωτά για τη μετάλλαξη. Ένας έλεγχος τέτοιων φυτών φαίνεται στην **Εικόνα 13**, όπου το wild type (WT) φυτό εμφανίζει μία ζώνη με το ζεύγος εκκινητών που ενισχύει το γονίδιο, ενώ τα ομοζυγωτά μεταλλαγμένα φυτά εμφανίζουν ζώνη με το ζεύγος εκκινητών γονιδίου-Tnt1.



Εικόνα 13: Ανάλυση gel αγαρόζης

Τέλος, τα φυτά τα οποία βρέθηκαν να είναι ομοζυγωτά για την εκάστοτε μετάλλαξη αναπτύσσονται μέχρι τη συλλογή σπόρων.

Υλικά

- Σπόροι μεταλλαγμένων σειρών *M. truncatula*
- Υλικά ανάπτυξης φυτών (βλ. Ενότητα 1)
- Γουδί ή πλαστικό έμβολο
- Υγρό άζωτο
- Σωλήνες τύπου erpendorf
- Πιπέτες
- Tips
- CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)
- Tris-HCl
- NaCl
- PVP-40 (Polyvinylpyrrolidone με μέσο μοριακό βάρος 40.000)
- Διάλυμα Sevag (χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη, 24:1)
- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο
- Vortex
- Αιθανόλη
- ddH₂O (ή TE)
- Συσκευή PCR
- Αντιδραστήρια PCR (dNTPs, πολυμεράση, buffer πολυμεράσης)
- Ειδικοί εκκινητές (για Tnt1 & γονίδια)
- Αγαρόζη
- Συσκευή για gel αγαρόζης
- Βρωμιούχο αιθίδιο (ή άλλη φθορίζουσα ουσία που παρεμβάλλεται μεταξύ αλυσίδων DNA)

Σημειώσεις

- Είναι σημαντικό να σημειωθεί σωστά το κάθε μεταλλαγμένο φυτό, ώστε να είμαστε σίγουροι για το ποιο αποτέλεσμα αντιστοιχεί σε κάθε φυτό.
- Είναι συχνό φαινόμενο να μην επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα με τις πρώτες PCR, οπότε ίσως να χρειαστεί να δοκιμαστούν περισσότερα/διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνοι στα βήματα της PCR αντίδρασης.



Εικόνα 14: Σημειωμένες *Tnt1* μεταλλαγμένες σειρές *M. truncatula* R108 σε παλέτα με γλαστράκια στο θάλαμο ανάπτυξης.