

AN ANALYSIS OF TOTAL CONTENT mRNA AS A NEW MARKER OF ENVIRONMENTAL STRESS AT PLANTS

DETEKCE CELKOVÉHO OBSAHU mRNA JAKO NOVÉHO MARKERU ENVIROMENTÁLNÍHO STRESU U ROSTLIN

Húska D.¹⁾, Křížková S.¹⁾, Diopan V.^{1,2)}, Šupálková V.^{1,2)}, Mikelová R.³⁾, Stejskal K.⁴⁾, Adam V.¹⁾, Havel L.²⁾, Trnková L.³⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾Ústav chemie a biochemie, a ²⁾Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ³⁾Katedra teoretické a fyzikální chemie, a ⁴⁾Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

E-mail: dalih@centrum.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Recently, approaches utilizing paramagnetic beads have been suggested for detection of nucleic acids. Paramagnetic beads are mono-dispersive, polymeric particles which have stable and defined surface enabling adsorption and/or linking of different bio-reactive molecules. The aim of this work was to suggest electrochemical sensor to analysis of total content of mRNA. The suggested sensor utilized paramagnetic micro-beads coupled with electrochemical detection of adenine to study of transcriptome (total mRNA). The optimal time of hybridization of nucleic acid on the surface of beads has been investigated. Effectiveness of the analysis was sufficient, whereas acetate buffer was the optimal supporting electrolyte. The detection limit was about 1 ng per ml. The method has been finally used for analysis of samples of plants treated by heavy metals.

Keywords: mRNA, hybridization, electrochemical detection, micro-beads.

ABSTRAKT

Nedávno byly využity paramagnetické kuličky pro detekci nukleových kyselin. Tyto kuličky jsou monodisperzní, polymerní částice, které mají stabilní a definovaný povrch, který umožňuje adsorpci nebo vazby různých bioreaktivních molekul. Cílem této práce bylo navrhnout elektrochemický senzor pro analýzu celkového obsahu mRNA. Navržený senzor využíval paramagnetické mikročástice ve spojení s elektrochemickou detekcí adeninu pro studium transkriptomu (celkový obsah mRNA). Nejvhodnější čas hybridizace nukleových kyselin na povrch kuliček byl studován. Efektivita analýzy prováděné v acetátovém pufru byla dostatečná. Detekční limit námi navrženého senzoru se pohyboval okolo 1 ng na ml. Navržený senzor byl na závěr využit pro analýzu reálných vzorků rostlin, které byly vystaveny působení stresu způsobeného těžkými kovy.

Klíčová slova: mRNA, hybridizace, elektrochemická detekce, mikro-kuličky.

ÚVOD

V roce 1869 byla izolována molekula deoxyribonukleové kyseliny. Výzkum v této oblasti rychle pokračoval a v roce 1953 byla popsána struktura molekuly DNA. Současné technologie umožňují velmi rychlé rozpoznání sekvence bazí v řetězci DNA. V současné době je známa úplná struktura téměř stovky genomů včetně člověka. Kromě tradičních molekulárně-biologických přístupů se uplatňuje celá řada metod a postupů, mezi něž patří i elektrochemická analýza. Jako první publikoval elektrochemické chování nukleových kyselin na rtuťové pracovní elektrodě v roce 1960 Paleček [1,2]. Od té doby je této problematice věnována značná pozornost [3-5]. Nejvýznamnější aplikací je především konstrukce levných a rychlých biosenzorů pro analýzu specifické sekvence DNA. Pro tento účel byly zcela nedávno vyvinuty postupy, využívající povrchu paramagnetických kuliček [6-8]. Paramagnetické kuličky jsou monodisperzní polymerní částice, zajišťující stálý a definovatelný povrch pro adsorpci nebo spojování různých bioreaktivních molekul. Tím zajišťují maximální stupeň účinnosti a reprodukovatelnosti v kvantitativním rozboru. Správná selekce NK je důležitá pro další studium NK jako je detekce, exprese genů, hledání určité sekvence. Pro výrazné zvýšení senzitivity pozorovaných signálů je využíváno rozdílných způsobů modifikace DNA redoxními značkami, jako jsou komplexy osmia, ruthenia [9-11]. Komplexy většinou vyvolávají katalytické reakce, které mnohonásobně zvyšují senzitivitu stanovení modifikované nukleové kyseliny. Navíc byla v několika minulých letech aplikována eliminační voltametrie pro analýzu nukleových kyselin, především pro pochopení základních procesů, které probíhají na povrchu pracovní elektrody.

Cílem naší práce bylo a) navržení postupu pro izolaci mRNA z biologického materiálu, b) stanovení celkového množství mRNA ve vzorku smrkových embryí.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Všechny chemikálie použité v experimentu byly od firmy Sigma Aldrich Chemical Corp. USA (čistota ACS). Pufry: a) fosfátový na úpravu paramagnetických – kuliček: 0,1 M NaCl + 50 mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄ a 0,2 M NaCl + 100 mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄; b) acetátový na měření vzorků: 0,2 M CH₃COOH + 0,2 M CH₃COONa. Roztoky pro měření byly připraveny rozpuštěním chemikálií v ACS vodě. Dále byly použity paramagnetické mikročástice Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (DBT) a magnetický stojan Dynal MPC-S (Magnetic Particle Concentrator) od firmy Dynal, Oslo, Norsko.

Elektrochemická analýza

Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA Stantand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita visící rtuťová kapková elektroda – HMDE (plocha Hg kapky = 0,4

mm²), referentní elektroda (Ag/AgCl, 3M KCl) a uhlíková tyčinka jako pomocná elektroda. Všechna elektrochemická měření byla provedena v acetátovém pufru pH = 4 za využití techniky adsorptivního přenosu. Analyzované vzorky byly deoxygenovány pro měření pomocí probublávání argonem (99.999%) nasyceného vodou po dobu 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při pokojové teplotě.

Rostlinný materiál

Byly využity kultury raných somatických embryí smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.), klony 2/32 a 3/5 H, a smrku pichlavého (*Picea pungens* Engelm.), klon PE 14. Klony 2/32 a 3/5 H pochází ze smrku ztepilého horského klimaxového typu z pokusné plochy v Beskydách. Klon PE 14 byl odvozen ze smrku pichlavého, byla použita zralá semena ze vzrostlého stromu *Picea pungens* Engelm. 'Argentea' v areálu Mendlovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Kultury jsou udržovány za striktně sterilních podmínek (flow box Galaire HF 36) tím způsobem, že se vždy po 14 dnech kultivace pasážují. Při pasáži jsou z horních partií shluků raných somatických embryí (SRSE) odebírány části s vyvinutými skupinami embryonálních buněk o hmotnosti přibližně 2,5 – 5,0 mg a přenášeny na novou Petriho misku s LP/2 médiem. SRSE jsou kultivovány ve tmě při teplotě 23±2 °C. Při experimentech byly SRSE kultivovány ve sterilních plastových Petriho miskách (průměr 90 mm, 30 ml LP/2 média).

Kultivační médium

Všechny výše uvedené kultury jsou dlouhodobě kultivovány na kultivačním médiu LP/2, které je modifikováno 9 µM 2,4-dichlorfenoxycetovou kyselinou a 4,4 µM benzylaminopurinem. Při přípravě kultivačního média byly anorganické i organické složky rozpuštěny v deionizované destilované vodě, pH bylo upraveno na hodnotu 5,7 – 5,8 pomocí KOH/HCl (pH metr Schott CG 842). Následně byla anorganická část média sterilizována při teplotě 121°C a tlaku 100 kPa po dobu 30 minut (Tuttnauer 3870 EA); organická část byla sterilizována membránovou filtrací (Whatman Puradisc 25 AS 0,2 µm).

Analýza obrazu SRSE

Pro zjištění plochy jednotlivých SRSE byla nutná digitalizace obrazu každé Petriho misky. Digitalizace byla prováděna pomocí kamery CCD Sony (UPV-GDS 8 000) a programu GRAB-IT. Pro vyhodnocení jednotlivých ploch byl využit program IMAGE – PRO. Plochy byly zjišťovány na začátku a poté v průběhu experimentu. Údaje byly dále zpracovány v programu Microsoft Excel; výsledkem byl průměrný přírůstek SRSE.

Příprava vzorků

Pro izolaci mRNA byla smrková embrya (200 mg) byla přenesena do sterilních mikrozkušavek a následně homogenizována v 0,5 ml 50 mM fosfátovém pufru po dobu 2 minut pomocí přístroje Ultra turax T8 IKA WERKE (maximální otáčky) za stálého chlazení

na ledu. Vzniklý homogenát byl ředěn 100krát vychlazeným sterilním fosfátovým pufrům. Takto připravený vzorek byl využit pro analýzu obsahu mRNA.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Elektrochemická detekce studované DNA

Je známo, že DNA poskytuje na rtuťové elektrodě redukční signál adeninu a cytosinu kolem potenciálu -1,4 V a oxidační signál redukčního produktu guaninu se signálem kolem potenciálu -0,2 V. Elektrochemická detekce představuje nástroj pro senzitivní analýzu DNA a je vhodná pro studium reálných vzorků. Pro naše účely jsme se nejdříve zaměřili na hledání co nejvhodnějších podmínek vazby nukleové kyseliny (mRNA) na povrch paramagnetických částic. Pro tento účel jsme si zvolili poly(A) jako velmi vhodnou molekulu simulující reálnou mRNA. Nukleová kyselina (poly(A)) byla měřena pomocí cyklické voltametrie na rtuťové kapkové visící elektrodě ve spojení s přenosovou technikou. Byly sledovány závislosti rychlosti polarizace elektrody (od 20 do 320 mV/s) v acetátovém pufru (pH 4,0). Na voltamogramech jsme získali charakteristický velmi dobře vyvinutý redukční signál adeninu při potenciálu -1,33 V. Na získaná experimentální data byla využita eliminační voltametrie. Eliminační voltametrie potvrdila, že poly(A) je na povrch pracovní elektrody adsorbována. V dalších experimentech jsme sledovali změny výšky signálu na různých koncentracích poly(A) (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/ml). Z těchto dat jsme získali lineární závislost $y = 5.2x + 362.6$. Proto, aby bylo možné analyzovat mRNA v reálném vzorku, je potřebné zajistit její rychlé a velmi selektivní zachycení. Velmi vhodné jsou paramagnetické částice (DBT), které mají na svém povrchu ukotvený řetězec $T_{(25)}$. Molekuly mRNA (obsahují vždy sekvenci A_{25}) interagují s řetězcem $T_{(25)}$ navázaným na DBT.

Příprava DBT pro analýzu mRNA

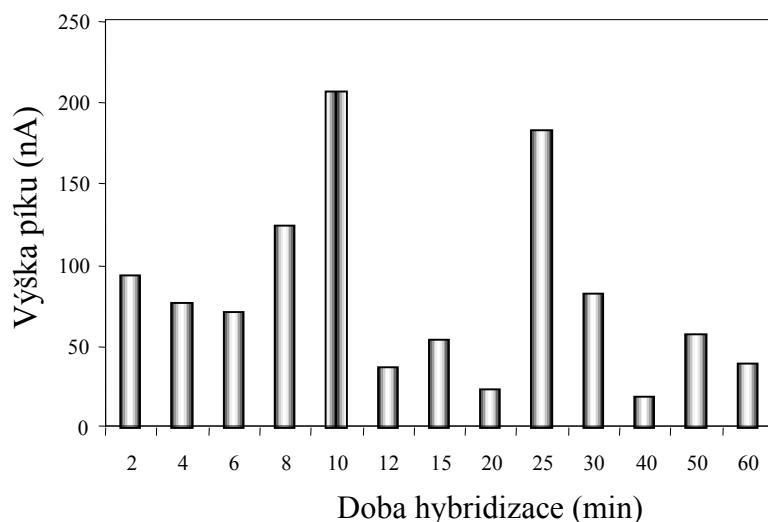
V práci jsme se zaměřili na nalezení co nejvhodnějších podmínek přípravy povrchu DBT. Zvolili jsme velmi malý objem DBT (10 µl). DBT byly promyty 20 µl 0,1 M NaCl + 50 mM $Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4$ (pH = 7), poté se DBT separovaly v magnetickém stojanu (DynaL MPC – S) a čirý roztok se odsál. Přidalo se opět 20 µl stejného promývacího roztoku a vzorek se třepal na (Vortexu – Genie 2) stupeň 6 po dobu 2 minut, pak se krátce centrifugoval a čirý roztok se opět odsál. Celý postup se 3krát opakoval. Po třetím opakování se k takto připraveným DBT přidal vzorek testované poly(A).

Proces hybridizace mRNA na DBT

Hybridizace mRNA spočívá ve vazbě poly(A) konce na poly(T) sekvenci, kterou nesou DBT. V našem experimentu jsme zvolili počáteční dobu hybridizace 30 min (podle našich dřívějších prací) [12,13]. Pro naše modelové účely byla zvolena koncentrace poly(A) o koncentraci 100 µg/ml, jelikož poskytovala dobře definované signály v acetátovém pufru. Abychom mohli změřit množství navázané poly(A) na DBT, museli jsme ji eluovat z DBT do roztoku. Jako eluční roztok jsme zvolili 20 µl eluční roztok jsme zvolili 20 µl 0,1 M NaCl +

50 mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄ (pH = 7). Denaturace probíhala při 85°C po dobu 5 min. Po ukončení denaturace se vzorek krátce centrifugoval a vzniklý supernatant se přenesl do nové mikrozkušavky. Odebralo se 5 µl a následovala elektrochemická detekce.

Obr. 1 Závislost množství poly(A) ve vzorku na době hybridizace.

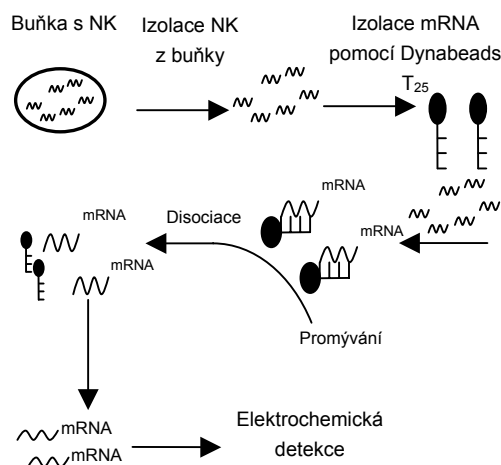


Závislost množství poly(A) ve vzorku na době hybridizace

Zajímalo nás, jaké množství poly(A) získáme při známé vstupní koncentraci 50 µg(Poly A)/ml jestliže změním dobu hybridizace na 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 min. Zjistili jsme, že po deseti minutové hybridizaci získáme maximální výtěžek poly(A) na DBT.

Opakovatelnost pokusu má u těchto technologických postupů velký význam. Zvolili jsme dva časy hybridizace (6 a 10 min). Z výsledků vyplývá, že reprodukovatelnost výsledků kolísá. To je spojeno s celou řadou experimentálních chyb, od povrchu DBT, procesu hybridizace a elektroanalytické detekce (Obr. 1). Dále byly studovány rozdílné koncentrace poly(A) (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 µg(Poly A)/ml). Z těchto dat jsme získali lineární závislost s rovnicí regrese $y = 0.6768x + 19.059$.

Obr. 2 Schéma postupu izolace mRNA pomocí DBT.



Analýza obsahu mRNA v somatických embryích smrku

Námi připravené homogenáty buněk různých klonů smrku byly přidány k připraveným DBT. Hybridizace mRNA k povrchu DBT probíhala po dobu 30 min. Poté byly DBT třikrát promyty 20 μ l 0,1 M NaCl + 50 mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄ (pH = 7). K takto připraveným DBT bylo přidáno 20 μ l 50 mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄ (pH = 7). Denaturace probíhala při 85°C po dobu 5 min. Po ukončení denaturace se vzorek krátce centrifugoval a vzniklý supernatant se přenesl do nové mikrozkušavky. Odebralo se 5 μ l a následovala elektrochemická detekce (Obr.2). Experimentálně se nám podařilo pomocí DBT zachytit a elektrochemicky analyzovat hladiny mRNA. U jednotlivých smrkových klonů byly transkriptomové hladiny různé.

ZÁVĚR

Předpokládáme, že izolace celkové mRNA (transkriptomu) z daného vzorku tkáně (pletiva) a její následná detekce nám umožní rozpoznat vliv různých vnějších faktorů na organismus. Lze předpokládat, že právě paramagnetické kuličky (DBT) jsou pro tuto izolaci jednoduchým, vysoce selektivním a rychlým nástrojem. Navíc bude možné zvýšit selektivitu a senzitivitu stanovení využitím eliminační voltametrie [14-18].

LITERATURA

- [1] E. Palecek Oszillographische Polarographie der Nucleinsäuren und ihrer Bestandteile, Naturwiss 45 (1958) 186-187.
- [2] E. Palecek Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid, Nature 188 (1960) 656-657.
- [3] T.G. Drummond, M.G. Hill and J.K. Barton Electrochemical DNA sensors, Nature Biotech. 21 (2003) 1192-1199.
- [4] E. Palecek New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, Bioelectrochem. Bioenerg. 20 (1988) 179-194.
- [5] E. Palecek Past, present and future of nucleic acids electrochemistry, Talanta 56 (2002) 809-819.
- [6] E. Palecek, M. Fojta and F. Jelen New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces, Bioelectrochemistry 56 (2002) 85-90.
- [7] J. Wang, R. Polsky, A. Merkoci and K.L. Turner "Electroactive beads" for ultrasensitive DNA detection, Langmuir 19 (2003) 989-991.
- [8] J. Wang Nanoparticle-based electrochemical DNA detection, Anal. Chim. Acta 500 (2003) 247-257.
- [9] E. Palecek and M. Fojta Detecting DNA hybridization and damage, Anal.Chem. 73 (2001) 74A-83A.

- [10] M. Fojta, L. Havran, R. Kizek, S. Billova and E. Palecek Multiply osmium-labeled reporter probes for electrochemical DNA hybridization assays: detection of trinucleotide repeats, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 985-994.
- [11] R. Kizek, L. Havran, M. Fojta and E. Palecek Determination of nanogram quantities of osmium-labeled single stranded DNA by differential pulse stripping voltammetry, *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 119-121.
- [12] E. Palecek, R. Kizek, L. Havran, S. Billova and M. Fojta Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor, *Analytica Chimica Acta* 469 (2002) 73-83.
- [13] E. Palecek, S. Billova, L. Havran, R. Kizek, A. Miculkova and F. Jelen DNA hybridization at microbeads with cathodic stripping voltammetric detection, *Talanta* 56 (2002) 919-930.
- [14] L. Trnkova, J. Friml and O. Dracka Elimination voltammetry of adenine and cytosine mixtures, *Bioelectrochemistry* 54 (2001) 131-136.
- [15] L. Trnkova, F. Jelen, J. Petrlova, V. Adam, D. Potesil and R. Kizek Elimination voltammetry with linear scan as a new detection method for DNA sensors, *Sensors* 5 (2005).
- [16] L. Trnkova, F. Jelen and I. Postbieglova Application of elimination voltammetry to the resolution of adenine and cytosine signals in oligonucleotides. I. Homooligodeoxynucleotides dA(9) and dC(9), *Electroanalysis* 15 (2003) 1529-1535.
- [17] L. Trnkova, R. Kizek and J. Vacek Square wave and elimination voltammetric analysis of azidothymidine in the presence of oligonucleotides and chromosomal DNA, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 31-36.
- [18] L. Trnkova, I. Postbieglova and M. Holik Electroanalytical determination of d(GCGAAGC) hairpin, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 25-30.

Poděkování: Práce na tomto projektu byla podporována granty Výzkumné Centrum 1M06030, INCHEMBIOL MSMT 0021622412.