

SYNTÉZA cDNA

cDNA (complementary cDNA) je DNA syntetizovaná podle RNA, v laboratorních postupech nejčastěji mRNA, v reakci katalyzované enzymem reverzní transkriptázou.

U eukaryotických organismů mRNA vzniká post-transkripční úpravou pre-mRNA, která je syntetizovaná při samotné transkripci genu. Při post-transkripční modifikaci jsou odstraněny introny, je dodána 5' metyl guaninová čepička a při procesu zvaném polyadenylace je také na 3' konec přidán tzv. poly-A konec. Poly-A konec je úsekem za sebou uspořádaných adenosin monofosfátů. Vzhledem k odstranění intronů při post-transkripční modifikaci, syntézou cDNA získáváme kódující sekvenci daného genu, tj. sekvenci bez intronů.

ZÁKLADNÍ POSTUP PŘI PŘÍPRAVĚ cDNA

Syntéza cDNA se odvíjí v těchto krocích:

1. krok: Příprava kvalitní RNA nebo mRNA
2. krok: Samotná syntéza cDNA
3. krok: Ověření správnosti syntézy pomocí PCR

- Pro iniciaci syntézy jsou jako primery využívány poly-dT (komplementární k poly-A na konci každého genu) nebo se využívá směs náhodných hexanukleotidů, nebo i specifické oligonukleotidy, pokud chceme cDNA jen k nějakému konkrétnímu genu a máme nějakou informaci o sekvenci.

- Činností reverzní transkriptázy se podle molekuly RNA vytváří 1. vlákno cDNA a tím vzniká hybridní dvouvláknová molekula RNA-DNA. Vlákno RNA se odstraní pomocí RNázy H.

- K 1. vláknu cDNA se syntetizuje 2. vlákno cDNA a tím vzniká dvouvláknová molekula DNA.

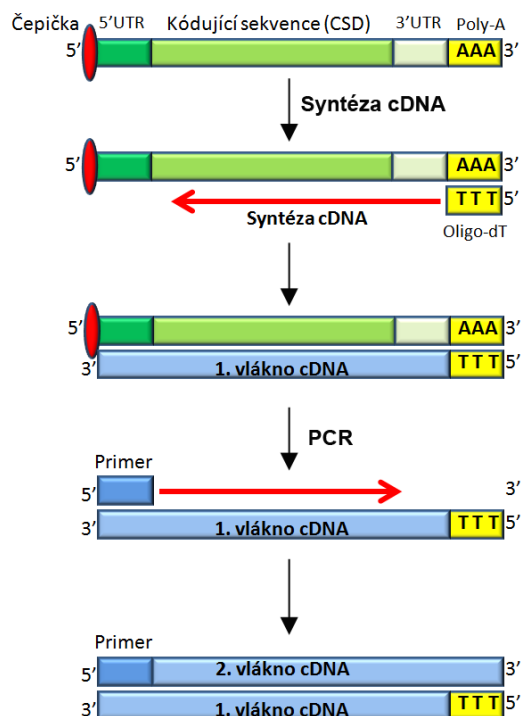
REAKČNÍ FÁZE

1. **Denaturace RNA při 65 °C.** RNA je denaturována pro odstranění sekundárních struktur na její molekule, které zde mohou být formovány vzhledem k jednořetězcové struktuře RNA.

2. **Syntéza prvního řetězce cDNA.** Syntéza probíhá podle řetězce RNA prostřednictvím RT transkriptázy, která pro iniciaci syntézy využívá poly-dT komplementárních k poly-A koncům, případně hexanukleotidy či specifické oligonukleotidy a syntézu provádí pomocí dodaných dNTP (směsi nukleotidů). Výsledkem reakce je DNA-RNA molekula.

3. **Odstranění řetězce RNA z molekuly DNA-RNA.** Pro odstranění RNA řetězce je využívána RNasa H.

4. **Syntéza druhého vlákna prostřednictvím PCR.** Pro syntézu druhého vlákna je využívána klasická PCR s primerem specifickým pro cílový úsek.



POSTUP PŘI PŘÍPRAVĚ cDNA

Uvádíme nejčastěji používaný postup. Nicméně dle doporučení výrobce zvolené reverzní transkriptázy se konkrétní postup může mírně lišit.

Reakce:

Syntéza 1. vlákna cDNA:

1. Dle uvedené tabulky připravte směs RNA, primeru, dNTP, doplňte vodou tak, aby objem celé reakce po doplnění všech dalších komponent byl 20 μ l.



Jako templát by měla být používána RNA bez jakékoliv kontaminace genomovou DNA. Při izolaci RNA se proto doporučuje zahrnout krok s působením DNázy.

Doporučeno

Paralelně s každým testovaným vzorkem připravte vzorek jeho negativní kontroly (tzv. RT(-)). Pro vzorek negativní kontroly použijete všechny komponenty jako použijete u daného vzorku až na reverzní transkriptázu. Při přípravě negativní kontroly postupujete identickým způsobem jako při přípravě samotných testovaných vzorků. Kontrola RT(-) nám ukáže, jestli ve vzorku RNA, který byl použit pro přípravu cDNA, nebyla kontaminace genomovou DNA. Příprava kontroly RT(-) je doporučována zejména, pokud jsou vzorky cDNA využívány ke kvantifikaci transkriptu.

Komponenta	Množství
poly(A)+ mRNA <i>nebo</i>	2 ng - 1 μ g
celková RNA <i>nebo</i>	10 ng - 5 μ g
specifický transkript RNA	0,5 - 1 μ g
Oligo(dT) <i>nebo</i>	0,5 μ g
Náhodný hexamer <i>nebo</i>	0,2 μ g
GSP (genově-specifický primer)	100 pmol
puf	1x
dNTP Mix, 10mM	(0,5 - 1) mM
RNase Inhibitor	1U/ μ l
DTT	5 mM
Reverzní transkriptáza	25 U/ μ l

2. RNA denaturujte inkubací připravené směsi při 65 °C 5 min., poté rychle vložte na led a nechte inkubovat alespoň 1 min.

3. Přidejte pufr, DTT, RNase inhibitor a na závěr reverzní transkriptázu. Lehce promíchejte, krátce centrifugujte.
4. Nechte inkubovat 50 min při 42 °C (teplota a délka inkubace závisí na typu reverzní transkriptázy).
5. Ukončete reakci inkubací v 70 °C 15 min. Zchladte na ledu a centrifugujte.
6. Přidejte 1 µl RNasy H a inkubujte v 37 °C po 20 min.

Syntéza 2. vlákna cDNA:

Syntéza 2. vlákna cDNA probíhá pomocí standardní PCR s primery k cílovému genu.

Doporučeno

Produkty PCR můžete ověřit elektroforetickou separací a ověříte tak i syntézu cDNA. Pokud jste připravovali také negativní kontrolu RT(-), po PCR reakci byste v této negativní kontrole neměli dostat žádný PCR produkt. A pokud vám po PCR v této kontrole produkt vznikne, je to na základě kontaminace genomovou DNA, a to pozůstatkem genomové DNA ve vzorku RNA.