

## CVIČENÍ Č. 3: IZOLACE A ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN

TEORETICKÁ PŘÍPRAVA: TYPY A FUNKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN.  
ELEKTROFORETICKÉ A SPEKTRÁLNÍ METODY PRO STUDIUM NUKLEOVÝCH KYSELIN.

### ÚLOHA 1A: Izolace plazmidové DNA

**ÚKOL:** Získejte plazmidovou DNA izolací z kultury *E.coli* a stanovte výtěžek izolace.

#### TEORETICKÁ PŘÍPRAVA

Bakteriální plazmidy jsou uzavřené, kružnicové molekuly dvouřetězcové DNA. Pro mnoho bakteriálních druhů představují přídatnou genetickou informaci, která je nezávislá na bakteriálním chromozomu. Často informace, která je v plazmidové DNA uložena, je pro bakterii výhodná, a proto si ji udržuje. Například může kódovat enzym, který ji propůjčuje rezistenci k antibiotikům.

Plazmidová DNA má široké využití od klonování, sekvenací, PCR (polymerázová řetězová reakce), expresi proteinů, po genové manipulace či terapie. Jejich velikost je od 1 do více než 200 kb (tisíc párů bazí).

#### PRINCIP

Mezi nejpoužívanější metody izolace plazmidové DNA z *E. coli* patří alkalická lýze v prostředí NaOH a dodecylsíranu sodného (SDS), jak je znázorněna na obr. 1.1. Chromozomální i plazmidová DNA jsou v alkalickém prostředí denaturovány. Tato denaturace může být u plazmidové DNA reverzibilní. Přidáním octanu draselného je prostředí zneutralizováno a dochází k vysrážení KDS (dodecylsíran draselný) a tím i chromozomální DNA a dalších komponent buněk, zatímco plazmidová DNA zůstane v roztoku.

K vlastní izolaci je využíváno aniontoměničových kolon, jejichž náplň je většinou křemenná pryskyřice vázající DNA. Pórovitost, modifikace např. methyl-ethylaminovou funkční skupinou umožňují optimální vazbu plazmidové DNA na křemennou matici. Promytí nežádoucích komponent a selektivní eluce DNA z kolony umožní efektivní oddělení plazmidové DNA od proteinů, sacharidů a dalších

#### 1. Resuspendace



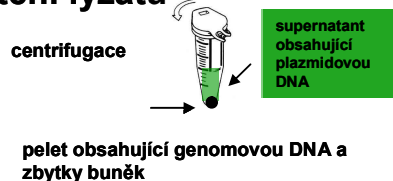
#### 2. Lýze



#### 3. Neutralizace

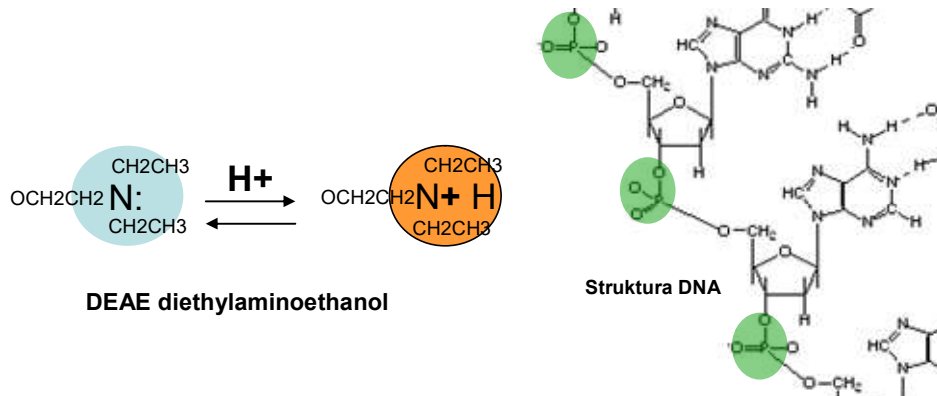


#### 4. Čistění lyzátu



Obr. 1.1 Princip alkalické lýze

nežádoucích buněčných komponent. Zvýšení rychlosti separace je umožněno kombinací chromatografické separace s centrifugací, kdy zachycení DNA, promývání na koloně i vlastní eluce je tak výrazně urychlena.



*Obr. 1.2 Princip chromatografické separace DNA na aniontoměničové matrix*

**Činidla a materiál:**

- NucleosSpinPlazmid (firma Macherey-Nagel) kolonka s 2 ml zkumavkou
- bakteriální kultura – zmražený pelet
- roztok A1 – resuspenzační (obsahuje Tris-HCl pH 8, EDTA)
- roztok A2 – lyzační (0,2 M NaOH, 1% SDS)
- roztok A3 – neutralizační (3 M KAc pH 5,5)
- roztok A4 – promývací (50 mM MOPS pH 7; 15% isopropanol; 1 M NaCl)
- roztok AE – eluční (10 mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA)

**PRACOVNÍ POSTUP**

Postupujte podle následujícího protokolu a schématu obr. 1.3 na str. 4:

**1. Kultivace a sklízení bakteriální kultury**

- použijte 2 ml napěstované kultury *E.coli* pro izolaci plazmidové DNA
- vytvořte pelet buněk centrifugací 2 ml kultury při pokojové teplotě při 11 000 g po dobu 30 s, supernatant opatrně odsajte, aby byl pelet co nejsušší
- pelet již vytvořen a zamražen na -20 °C

**2. Buněčná lyze**

- přidejte **250 µl roztoku A1** a opatrně rozsuspendujte pelet buněk opakovaným pipetováním či na vortexu
- připravte si stopky s nastaveným časem 5 min
- přidejte **250 µl lyzačního pufru A2** a jemným převrácením zkumavky 6-8krát smíchejte buňky s tímto pufrem a **inkubujte 5 minut** při pokojové teplotě
- před vypršením inkubační lhůty si nachystejte pufr A3
- přidejte **300 µl roztoku A3** a promíchejte intenzivně převrácením zkumavky 6-8krát, nepoužívejte vortex, tím by došlo k nalámání genomové DNA

**3. Pročištění lyzátu centrifugací**

- centrifugujte získaný lyzát při pokojové teplotě při **11 000 g** po dobu **5 min**
- zopakujte tento krok, pokud není supernatant čirý!!!

**4. Chromatografie - vazba DNA (-) na aniontomeničovou matrix (+)**

- kolonku umístěte do 2 ml zkumavky a naneste lyzát z kroku 3 na její membránu, centrifugujte **1 min** při **11 000 g**
- vyhod'te vše, co prošlo kolonou, opakujte tento postup, máte-li větší objem lyzátu

**5. Promývání kolony**

- přidejte **600 µl roztoku A4** na kolonku a zcentrifugujte **1 min** při **11 000 g** a vylijte vše, co prošlo kolonou, mikrozkuavka musí být prázdná před dalším krokem

**6. Sušení membrány**

- centrifugujte prázdnou kolonku po dobu **2 min** při **11 000 g**








**7. Eluce DNA**

- umístěte kolonku do **nové** centrifugační mikrozkuavky (1,5 ml) a na kolonku opatrně naneste **50 µl** roztoku **AE**
- inkubujte **1 min** při **pokojové teplotě**
- centrifugujte kolonku s mikrozkuavkou po dobu **1 min** při **11 000 g**
- vzorek popište (vaše jméno, datum, plazmid) a bude použit pro spektroskopické měření, elektroforetickou separaci a další analýzy

**VYHODNOCENÍ**

Eluát obsahuje izolovanou plazmidovou DNA, vaším úkolem bude zjistit její koncentraci spektrofotometrickým měřením, analyzovat integritu plazmidové DNA pomocí elektroforetických metod a určit výtěžek izolace.

Obr. 1.3 Schéma separace

<p>1. <b>Kultivace a sklizení bakteriální kultury s plasmidovou DNA</b></p>	 <p>pelet buněk Kultivační medium</p>	<p>Centrifugace 11 000g 30s</p>
<p>2. <b>Buněčná lýze</b></p>		<p>250 <math>\mu</math>l A1 rozsuspendovat 250 <math>\mu</math>l A2 5min RT, lýze, převracení 300 <math>\mu</math>l A3 převracení</p>
<p>3. <b>Čištění lyzátu</b></p>		<p>Centrifugace 11 000g 5-10min</p>
<p>4. <b>Vazba plasmidové DNA na matrix</b></p>		<p>Nanesení supernatantu Centrifugace 11 000g 1min</p>
<p>5. <b>Promývání membrány</b></p>		<p>600 <math>\mu</math>l A4 Centrifugace 11 000g 1min</p>
<p>6. <b>Sušení membrány</b></p>		<p>Centrifugace 11 000g 2min</p>
<p>7. <b>Eluce plasmidové DNA</b> nová 1.5ml mikrozkušavka</p>		<p>50 <math>\mu</math>l AE RT 1min Centrifugace 11 000g 1min (1.5ml zkumavka je nezavřená, pozor dát víčko u centrifugy)</p>

## ÚLOHA 1B: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

**ÚKOL:** Stanovte koncentraci získané plazmidové DNA spektrofotometrickým měřením na přístroji BioSpec-nano a určete tak výtěžek izolace z předešlé úlohy.

### TEORETICKÁ PŘÍPRAVA

Spolehlivé určení koncentrace DNA je jednou z velice důležitých aplikací biochemie a molekulární biologie. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem 260 nm ( $A_{260}$ ), zatímco bílkoviny při 280 nm ( $A_{280}$ ). Kromě absorpce, biopolymery záření také rozptylují, proto je důležité změřit také hodnotu absorbance mimo absorpční oblast tj. např. při 330 nm ( $A_{330}$ ). Proto hodnotu  $A_{260}$  často korigujeme právě odečtením hodnoty  $A_{330}$ .

K měření absorbance se používá spektrofotometrů, které měří intenzitu, jak moc světla je absorbováno. Síla absorpce je dána množstvím látky, její chemickou strukturou a byla určena empiricky pro mnoho sloučenin (absorpční či extinkční koeficient). Vztah mezi koncentrací dané látky, optickou dráhou a absorpčním koeficientem je dán:

**Lambert-Beerovým zákonem:  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$**

<b>A</b>	absorbance (bezrozměrná jednotka)
<b><math>\epsilon</math></b>	absorpční koeficient (charakteristika dané látky, $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
<b>c</b>	koncentrace dané látky (M)
<b>l</b>	optická dráha (cm)

Vzhledem k relativně homogennímu zastoupení bází se pro nukleové kyseliny nejčastěji používají koncentrace hmotnostní ( $\mu\text{g/ml}$ ) a pro určení koncentrace platí následující zjednodušení. Je nutné si ale uvědomit s jakým typem NK pracujeme. Rozeznáváme DNA a RNA, jednořetězcovou (ss) či dvouřetězcovou (ds).

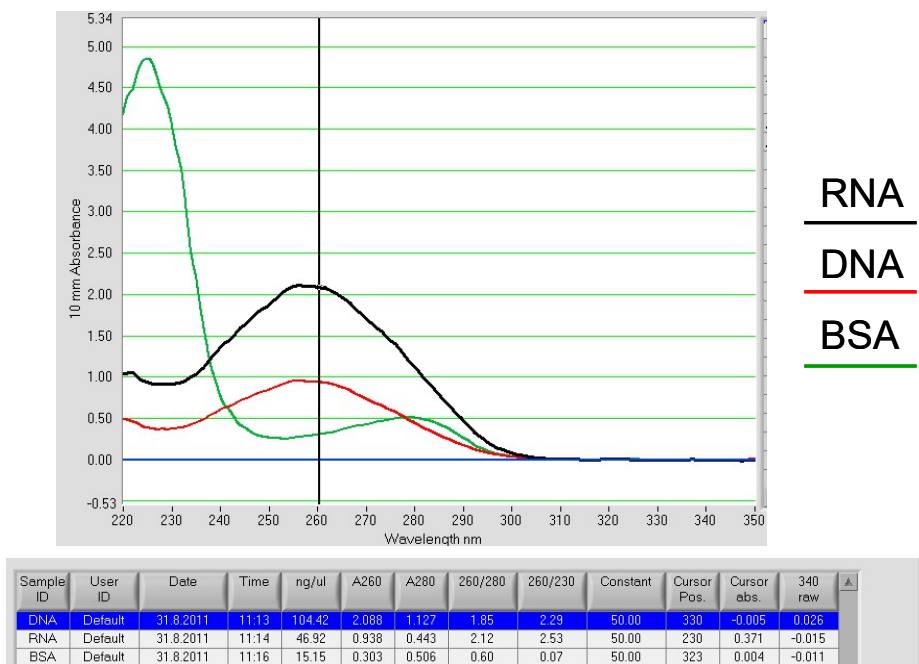
Zjednodušená pravidla pro jednotlivé typy znějí:

Je-li absorbance vzorku dvouřetězcové DNA (např. plazmidové) při 260 nm v 1 cm kyvetě rovna 1, tak koncentrace **dsDNA je rovna 50  $\mu\text{g/ml}$ .**

Je-li absorbance vzorku jednořetězcové DNA (např. oligonukleotid) při 260 nm v 1 cm kyvetě rovna 1, tak koncentrace **ssDNA je rovna 33  $\mu\text{g/ml}$**

Je-li absorbance vzorku RNA při 260 nm v 1 cm kyvetě rovna 1, tak koncentrace **RNA je rovna 40  $\mu\text{g/ml}$**

Na obr. 1.4 můžete vidět spektrum dsDNA, RNA a proteinu BSA.



Obr. 1.4 Spektrum DNA, RNA a BSA

## PRACOVNÍ POSTUP

### 1. Měření izolované plazmidové DNA

- pro měření koncentrace na přístroji BioSpec-nano použijeme 3-4  $\mu$ l plazmidové DNA získané z úlohy 1A
- jako blank použijeme 3-4  $\mu$ l vody
- naměřené hodnoty absorbance zapište do následující tabulky:

Vzorek	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
Plazmidová DNA						

### 2. Vyhodnocení měření, stanovení koncentrace

Na základě změřené absorbance vypočítejte koncentraci vaší izolované plazmidové DNA, kolik  $\mu$ g DNA jste získali a určete výtěžek izolace na 1 ml kultury *E.coli* za předpokladu, že použitý pelet vznikl centrifugací 2 ml kultury. Vazebná kapacita kolony je 60  $\mu$ g.

## VÝSLEDEK

Koncentrace plazmidové DNA	$\mu$ g/ml
Výtěžek izolace	$\mu$ g
Výtěžek izolace na 1 ml bakteriální kultury	$\mu$ g/ml

## ÚLOHA 1C: Elektroforetická analýza DNA

**ÚKOL:** Separujte na 1% agarózovém gelu molekuly plazmidové DNA a vizualizujte pomocí fluorescence.

### TEORETICKÁ PŘÍPRAVA:

Elektroforetické metody využívají pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu iontu ve stejnosměrném poli je přímo úměrná intenzitě vloženého pole, poměru náboje iontu k jeho velikosti a odporu prostředí. Zmíněné vlastnosti separované molekuly označujeme souhrnně za elektroforetickou mobilitu. Úspěšně lze tedy separovat molekuly, které se dostatečně liší svojí mobilitou. Nejčastěji se při analýze DNA či proteinů používá elektroforéza na nosiči (agarózovém či akrylamidovém gelu). V tomto případě se uplatňují vlastnosti nosiče – pórovitost gelu.

Při separaci DNA či RNA se používají gely s elektroforetickými pufrů TBE a TAE, které se liší svojí pufrovací kapacitou a stabilitou. Po skončení elektroforézy je nutné molekuly NK zviditelnit, například barvením interkalátory ethidium-bromidem nebo jeho netoxickými varianty GelRed, GelGreen či Sybr Safe za pomoci transiluminátoru. Při barvení těmito látkami využíváme toho, že fluorescence samotného barviva je výrazně nižší než interkalovaného či navázaného na molekulu NK.

---

### Činidla a materiál:

- mikrovlnná trouba, nosič gelu, hřebínky pro tvorbu jamek na nanášení
- erlenmeyerova baňka (250 ml), agaróza, voda
- 1xTAE (připravit ředěním z 50x TAE 20 ml – odměřit falkonkou do 1 l vody)
- Sybr Safe, GelRed netoxická náhražka EtBr
- 6xLB (nanášecí pufr, který je 6x koncentrovaný)
- vzorek plazmidové DNA (úloha 1A)
- DNA marker M
- mikrozkušavky (1,5 ml)
- centrifuga

---

### PRACOVNÍ POSTUP :

#### *1. Příprava agarózového gelu*

- do erlenmeyerovy baňky (250 ml) navážíme 1 g agarózy, přidáme 2 ml pufru 50x TAE a 100 ml vody. Směs rozvaříme v mikrovlnce, doplníme vodu, která se odpařila. Vaříme tak dlouho, až je tekutina čirá.
- připravíme nosič na nalití gelu, pečlivě oblepíme strany izolepou
- umístíme hřebínky pro tvorbu jamek na nanášení vzorků
- gel opatrně zchladíme pod tekoucí vodou na 50 °C a přidáme 50 µl roztoku EtBr (**přidává vedoucí cvičení**)
- opatrně naléváme do nosiče, zamezíme vzniku bublin v gelu
- gel necháme zchladnout 30 minut
- připravíme si elektroforetickou vanu s elektroforetickým pufrům (1x TAE), do které umístíme gel s nosičem tak, aby byl zcela zalit pufrům TAE, teprve poté vytáhneme opatrně hřebínek a zkontrolujeme jamky, do kterých se budou nanášet vzorky.

## 2. Příprava vzorku pro nanášení na agarózový gel

- do čisté mikrozkušavky smíchejte 10  $\mu$ l vámi naizolované plazmidové DNA a 3  $\mu$ l nanášecího pufru 6 $\times$  LB
- směs zvortexujte a krátce zcentrifugujte
- připravený vzorek naneste do jamky v agarózovém gelu

## 3. Nanášení vzorků na agarózový gel a elektroforetická separace

- umístíme vychladlý a zpolymerovaný gel do elektroforetické vany, převrstvíme pufrům 1 $\times$  TAE a opatrně vytáhneme hřebínek
- celý objem připraveného vzorku nanese na gel
- nanášení se provádí tak, že špičku mírně ponoříme do jamky, tak aby se nedotýkala stěny jamky, a pomalu vypouštíme tekutinu do jamky, která díky glycerolu klesá na dno jamky, poté zmáčkneme píst na maximum a vytáhneme pipetu z jamky, teprve potom uvolníme stlačení pístu pipety
- zapojíme kontakty na elektroforetické vaně ke zdroji elektrického napětí (**zapojuje vedoucí**) tak, aby DNA (-) putovala ke kladnému pólu (černý kontakt do černé zdičky, červený do červené), nastavíme na zdroji 120 V a po dobu 30 minut necháme probíhat separaci
- po 30 min vypneme zdroj a odpojíme kontakty z elektroforetické vany

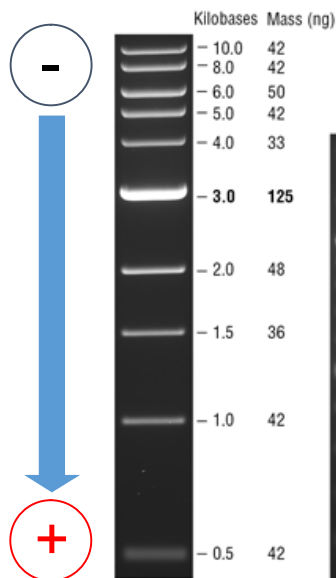
## 4. Detekce DNA

- následně vezmeme gel za nosič a položíme jej na UV-transiluminátor
- zapojíme UV-transiluminátor, pozorujeme fluorescenci komplexu interkalátor-DNA, která je asi 80 $\times$  silnější než volného interkalátoru (EtBr, Sybr Safe), gel vyfotíme či si polohu jednotlivých proužků obkreslíme do protokolu

## VYHODNOCENÍ

Plazmidová DNA putuje v gelu TAE v několika proužcích odpovídajících superhelikální DNA (scDNA), otevřené kružnicové DNA (ocDNA) a dimerní formě. Do protokolu se pokuste pomocí hmotnostního markeru určit velikost molekuly vaší plazmidové DNA. Dokumentujte fotkou či obrázkem.

### Hmotnostní marker 1 kbp



### Hmotnostní marker 100 bp

