

Separace molekul nukleových kyselin centrifugací

Centrifugace se používá v molekulární biologii k čištění a charakterizaci biopolymerů a nadmolekulárních útvarů. Přináší též informace o vznášivé hustotě a sedimentačním koeficientu, pomocí kterého lze za určitých podmínek vypočítat molekulovou hmotnost biopolymeru.

Během centrifugace působí na částici odstředivá síla

$$F_1 = m \omega^2 r$$

ω - úhlová rychlost

$$\omega = 2\pi n \quad n = \text{rpm}$$

n - počet otáček

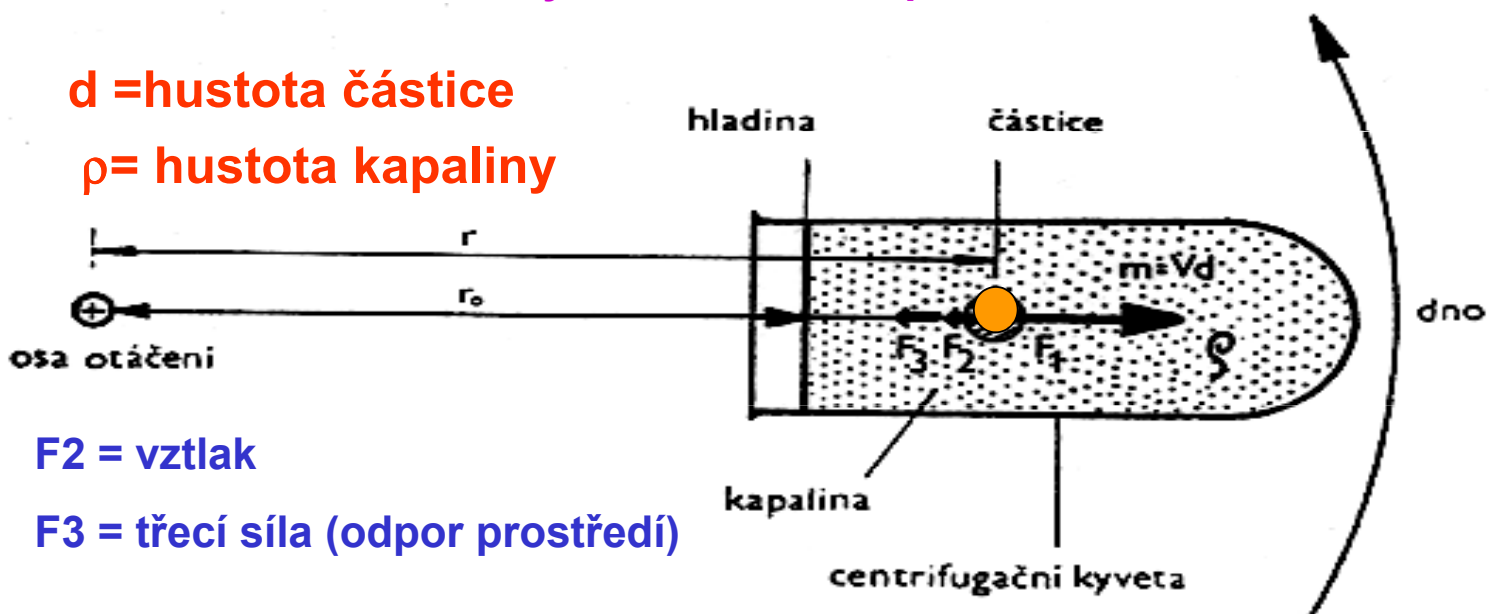
d = hustota částice

ρ = hustota kapaliny



F_2 = vztlak

F_3 = třecí síla (odpor prostředí)



Relativní odstředivá síla

Parametry centrifugace se nejčastěji vyjadřují relativní odstředivou silou **RCF**.

$$\text{RCF} = \frac{m \omega^2 r}{m \cdot g} = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (\text{jednotka} = g)$$

RCF se uvádí v násobcích gravitačního zrychlení g nebo počtem otáček za minutu.

$$g = 980 \text{ cm/s}^2$$

$$\underline{\text{RCF} = 1.119 \cdot 10^{-5} \cdot n^2 \cdot r}$$

Typy centrifugací

- **Diferenciální** – separace směsi homogenních částic v heterogením roztoku
- **Zonální** – separace směsi částic s podobnými vlastnostmi v gradientním roztoku
- **A) Izokinetická** – separace dle rychlosti sedimentace
 - stanovení sedimentačního koeficientu S
- **B) Izopyknická** – separace dle hustoty částic
 - stanovení % G+C
 - separace různých forem DNA

ZÁKLADNÍ TYPY CENTRIFUGACE

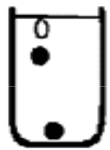
zonální centrifugace v hustotním gradientu

diferenciální centrifugace



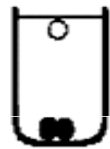
směs látek v roztoku

centrifugace při nízkých otáčkách (1 000 g)



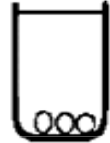
shromáždění sedimentu

centrifugace supernatantu při středních otáčkách (20 000 g)



shromáždění sedimentu

centrifugace supernatantu při vysokých otáčkách (80 000 g)

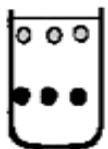


izokinetická centrifugace



vzorek nanesený na povrch 5 - 20 % sacharózového gradientu

centrifugace



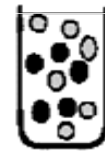
pomaleji sedimentující částice
rychleji sedimentující částice

frakcionace obsahu zkumavky



sběr frakcí

izopyknická centrifugace



roztok CsCl obsahující směs částic

centrifugace



částice s nižší hustotou
částice s vyšší hustotou

frakcionace obsahu zkumavky



sběr frakcí

Příprava lineárního sacharózového gradientu

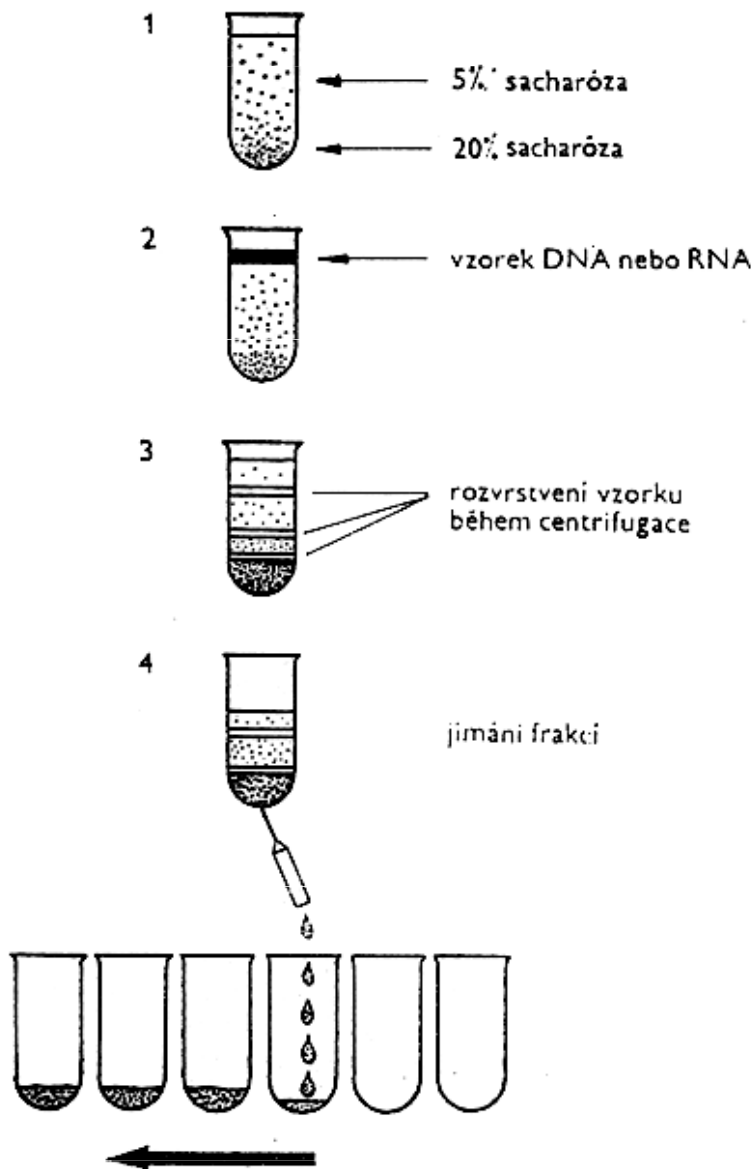
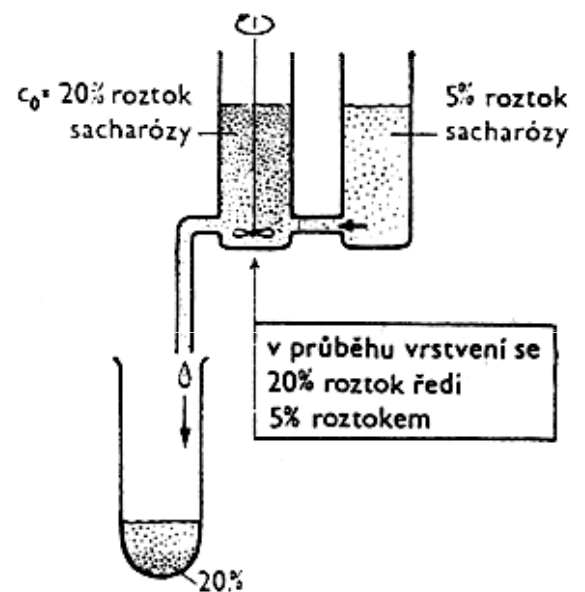


Schéma ultracentrifugace
v sacharózovém gradientu



Zařízení na vrstvení lineárního
sacharózového gradientu

Stanovení sedimentačního koeficientu

Sedimentační koeficient

$$dr/dt = S \times \omega^2 \times r$$

r - vzdálenost částice od osy otáčení

t - doba centrifugace

S - sedimentační koeficient

ω - úhlová rychlost rotoru

Hodnota sedimentačního koeficientu se udává ve Svedbergových jednotkách

$$1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s.}$$

Využití: charakterizace informačních makromolekul buněčných organel apod.

Hodnoty S (v rozpětí 10^{-13} - 200×10^{-13})

např. $30\text{S} = 30 \times 10^{-13} \text{ s}$

23S RNA, 16S RNA, nebo ribozómy 30S, 50S

Příprava sacharózového gradientu

Připravit zásobní 5, 15, 25, 35 a 45% roztoky sacharózy (w/v). Zkontrolovat koncentraci zásobních roztoků refraktometricky, změřit index lomu

Vzorek	Koncentrace % (w/v)	Koncentrace stanovená na refraktometru	Index lomu n_D^{25}	Hustota ρ_{25} (při 25 °C)
1	5			
2	15			
3	25			
4	35			
5	45			

Úkoly:

- 1) Do tabulky vyplnit hodnoty koncentrací a indexu lomu zjištěných refraktometricky
- 2) Vypočítat hustotu podle vztahu

$$\rho_{25} = 10,8601 \times n_D^{25} - 13,4974 \text{ [g/cm}^3\text{]}$$

15 a 35% roztoky obarvit **safraninem** nebo **krystalovou violetí**

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (POLYMERASE CHAIN REACTION) PCR

PCR umožňuje získat požadovanou specifickou DNA sekvenci bez klonování

Metoda pro mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA *in vitro* založená na principu (enzymatické syntézy) replikace DNA.

Replikace DNA *in vivo* vyžaduje mnoho enzymů
Replikace DNA *in vitro* vyžaduje pouze jeden enzym

Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií).

PCR – Enzymatická syntéza

1. Jako **templát** slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec (**PCR produkt - amplikon**).
2. K zahájení reakce je zapotřebí **primer**, který se **připojuje** na komplementární úseky DNA. Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován.
K enzymatické syntéze PCR produktu dochází po připojení dvou primerů vzájemných se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich **3'-OH**-konce směřují proti sobě.
3. Jako templáty pro syntézu mohou sloužit **oba řetězce dsDNA**, po předchozí **denaturaci**.

PCR – Složení reakční směsi

1. Templátová nukleová kyselina (DNA).

Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než **1 µg genomové DNA**,

Kvalita templátu ovlivňuje výsledek PCR.

- znečištěný templát může obsahovat inhibitory PCR

Zdroj: mikroorganismy, buňky z tkáňových kultur, tělní tekutiny, bioptické vzorky, stěry, vlasy, atd...

2. Primery. Syntetické oligonukleotidy o velikost 10 – 30 nt.

3. dNTP ve formě Na⁺ nebo Li⁺ solí

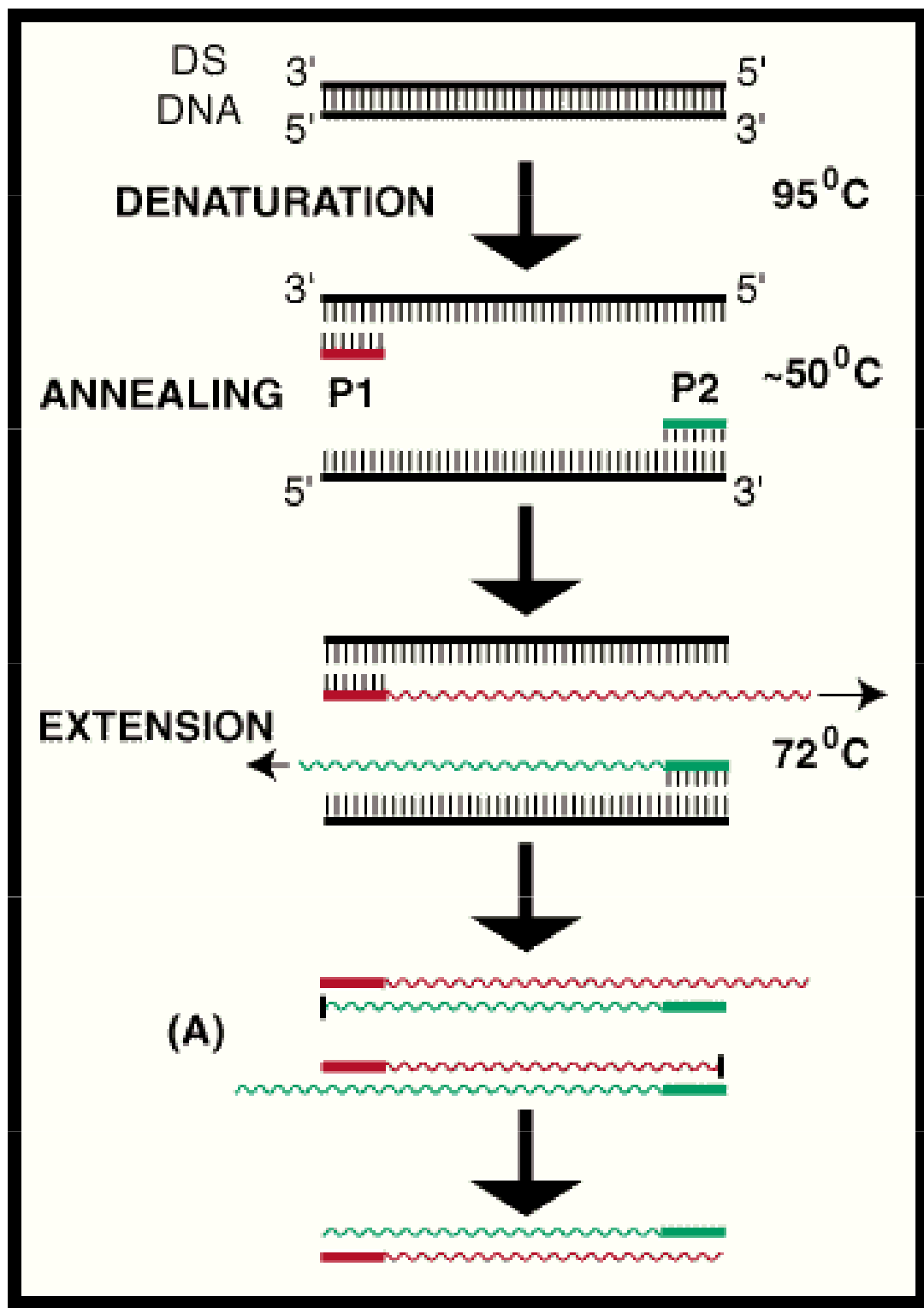
4. Mg²⁺ ionty tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytvářejí substrát, který rozpoznává DNA polymeráza.

5. Termostabilní DNA polymeráza, která odolává teplotám až 98 °C.

Taq *Thermus aquaticus* (5`-exonukleáza)

Tth *Thermus thermophilus* (5`-exonukleáza) delší úseky

Pwo *Pyrococcus woesei* (3`-exonukleáza)



PCR - Podmínky standardní PCR reakce

- 1. Počáteční denaturace DNA. Důležitá je kompletní denaturace templátu, obvykle postačuje zahřátí směsi na 2 – 5 min / 95 °C. V případě, že dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují a to vede k nespecifické vazbě primerů a možným falešným výsledkům.**
 - 2. Denaturační krok (oddělení řetězců): 94 – 95 °C / 20 – 45 s.** Nedostatečně denaturovaná DNA neumožňuje přístup primerům, naopak příliš dlouhá denaturace snižuje aktivitu DNA polymerázy (~ 2 hod / 98 °C).
 - 3. Připojení primerů (55 - 65 °C / 30 – 90 s)** teplota určuje specifčnost a závisí na T_m primeru a templátu. **Ta** se optimalizuje v teplotním gradientu.
 - 4. Prodlužování primeru (syntéza PCR produktu) probíhá při 72 °C / 45 – 90 s.** *Taq* DNA polymeráza syntetizuje DNA při této teplotě rychlostí cca 60 bází/s. Nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus.
- PCR se provádí se v termocyklerech, v 25 - 35 cyklech.**
- 5. Závěrečná extenze se provádí obvykle po posledním cyklu (72°C / 5 min) a slouží k dokončení syntézy a renaturaci jednořetězcových produktů.**

Proces amplifikace

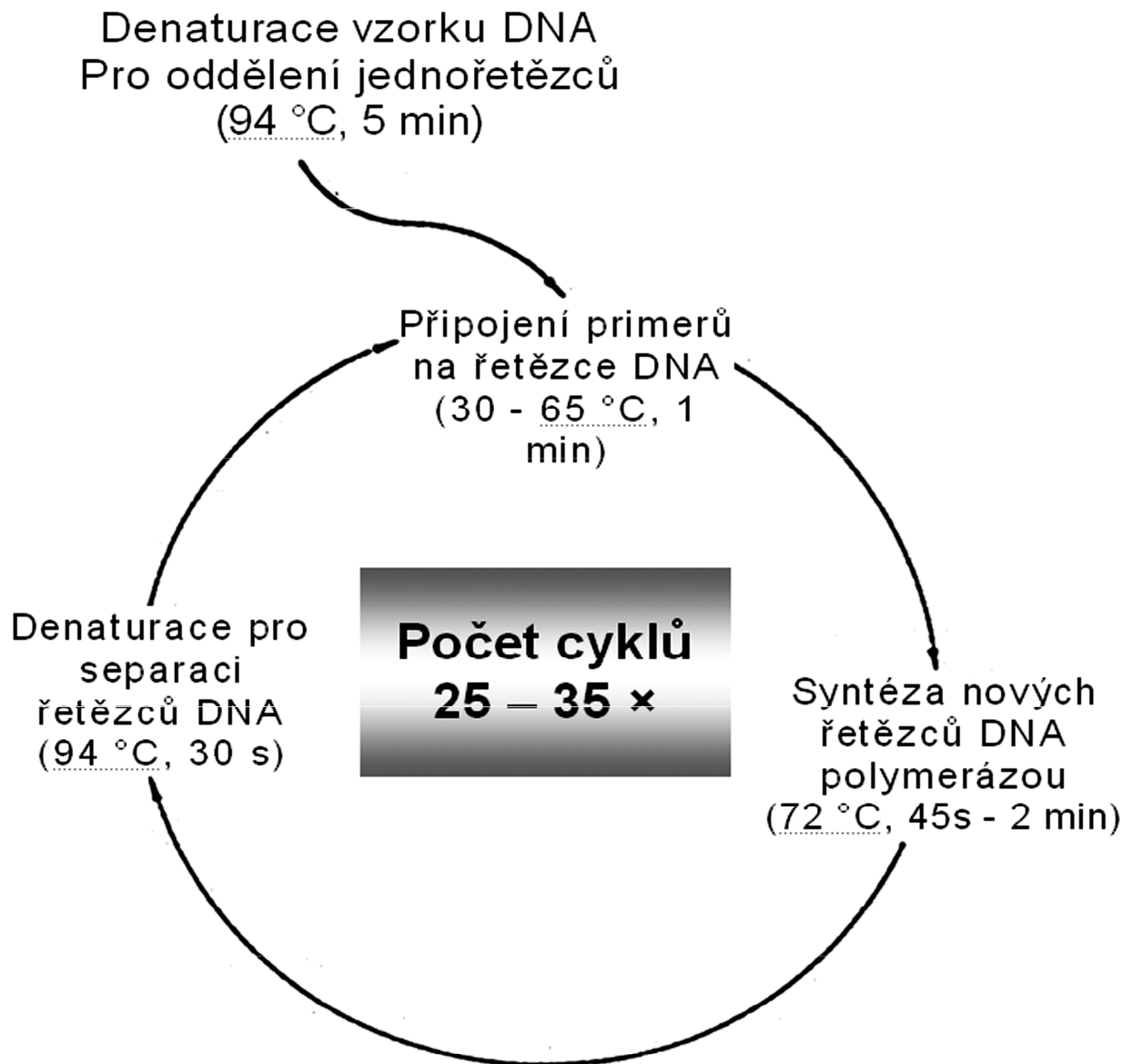
Denaturace vzorku DNA
Pro oddělení jednořetězců
(94 °C, 5 min)

Připojení primerů
na řetězce DNA
(30 - 65 °C, 1
min)

Denaturace pro
separaci
řetězců DNA
(94 °C, 30 s)

Počet cyklů
25 – 35 ×

Syntéza nových
řetězců DNA
polymerázou
(72 °C, 45s - 2 min)



PCR - Optimalizace složek PCR

DNA. Pro standardní PCR se doporučuje následující množství DNA podle velikosti templátu:

lidská genomová DNA: 100 - 500 ng

bakteriální DNA: 1 – 10 ng

plazmidová DNA: 0,1 – 1 ng

Primery. Sekvence a koncentrace primeru významně ovlivňuje výsledek PCR.

Optimální koncentrace je mezi **0,1 a 0,6 μM** .

U některých systémů může vyšší koncentrace (až 1 μM) zlepšit výsledky.

Nižší koncentrace vede k předčasnému vyčerpání primerů a snížení výtěžku.

dNTP. Výsledná koncentrace se může pohybovat v rozmezí 50 – 500 μM (pro každý nukleotid)

Nejběžnější koncentrace dNTP je 200 μM . Při zvýšení koncentrace dNTP je třeba zvýšit koncentraci Mg^{2+} iontů.

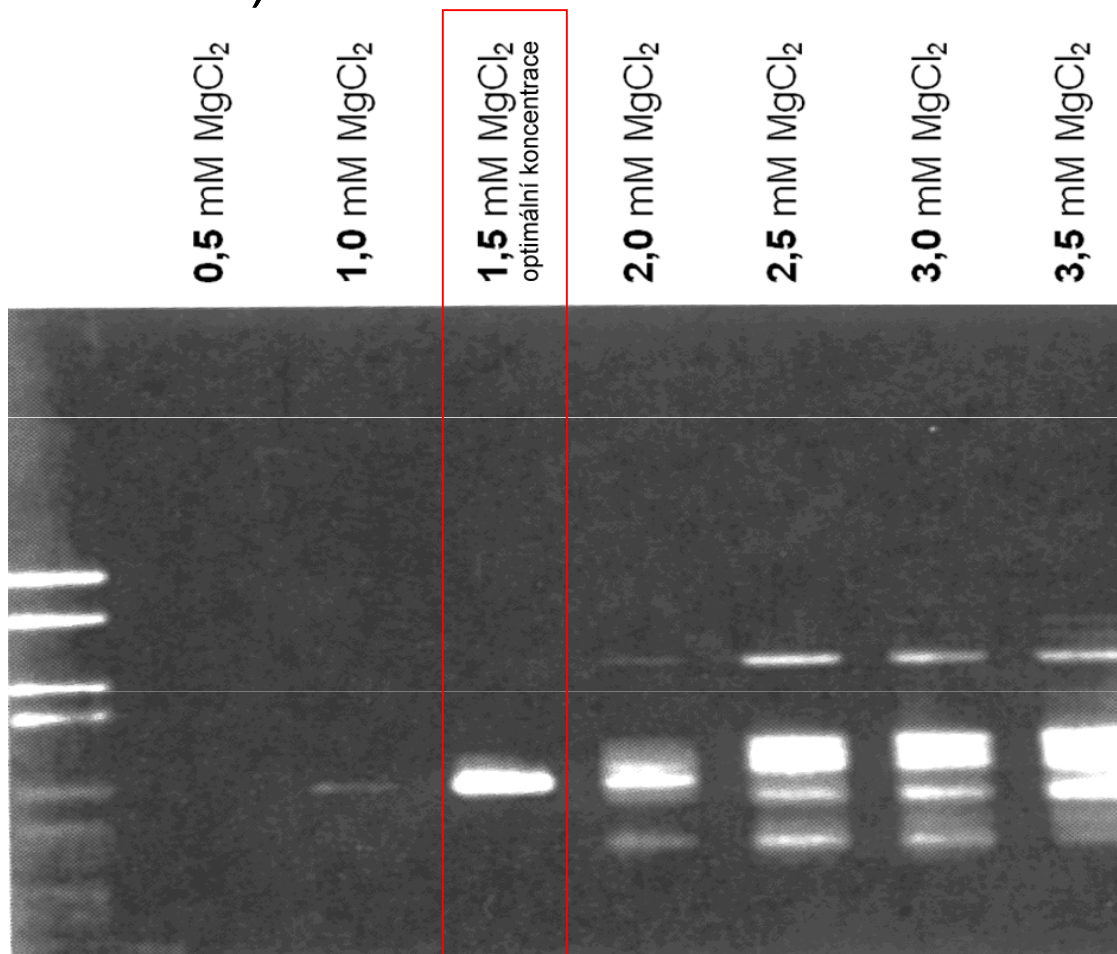
PCR – optimalizace koncentrace MgCl_2

MgCl_2

Volné Mg^{2+} ionty ovlivňují aktivitu enzymu a zvyšují hodnotu T_m u dsDNA.

Pro dosažení nejlepšího výsledku vždy stanovujeme koncentraci Mg^{2+} experimentálně.

Optimální koncentrace může kolísat od **1 mM** do **5 mM**. Nejčastěji používaná koncentrace je **1,5 mM** (pro **200 mM dNTP**).



PCR – optimalizace reakce

DNA polymeráza.

Obvyklá koncentrace je **0,5 – 2,5 jednotek / 50 μ l**.

pH je dané reakčním pufrům, obvykle odpovídá **pH 8,3 - 9,0**.

Příklad složení pufru pro PCR:

10 mM Tris; pH 8.3

50 mM KCl

1,5 mM MgCl₂

Přídavné látky mohou v některých případech ovlivnit účinnost a specifičnost PCR reakce. Jejich vliv se obvykle určuje experimentálně:

albumin z bovinního séra (BSA) (100 ng/50 μ l)

dimetylsulfoxid (DMSO) (2- 10 % v/v) – redukce nespecifické vazby primeru

detergenty (Triton X-100, Tween 20)

Minerální olej – zabraňuje vypařování během reakce

PCR – optimalizace teploty

Teplota pro připojení primeru (**annealing temperature**) zkr. T_a . Teplota používaná pro teplotní hybridizaci molekul primeru a matricové DNA in vitro.

Orientačně lze vypočítat T_a podle vztahu:

$$T_a = 2(A+T) + 4(G+C) - 5 \text{ °C} = T_m - 5 \text{ °C}$$

PCR – detekce PCR produktu

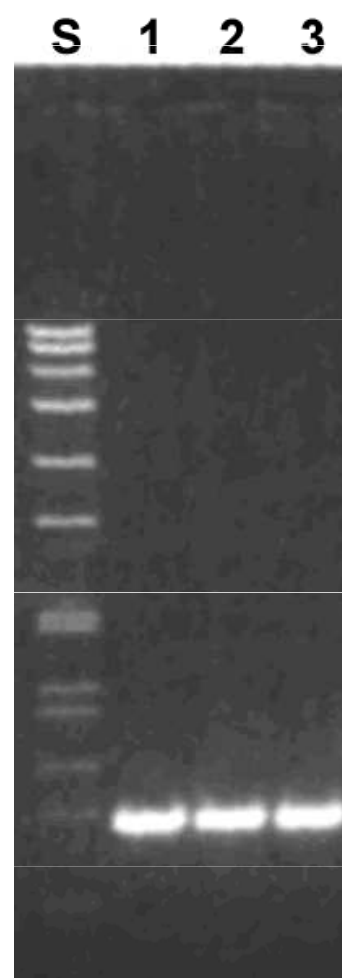
**Stanovení velikosti produktu gelovou elektroforézou (agaróza, polyakrylamid).
Pozorování pod **UV** světlem.**

Příklad standardní gelové elektroforézy v agarózovém gelu.

Legenda k obrázku

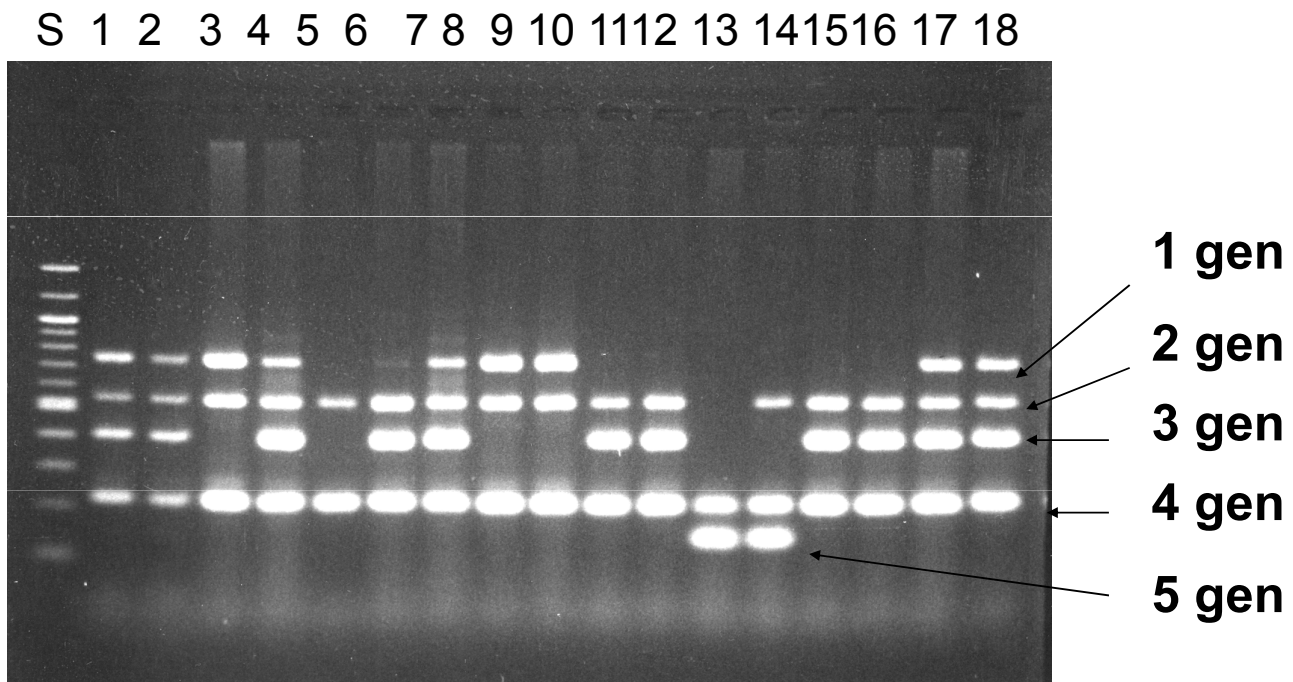
S = velikostní standard

Dráhy 1, 2 a 3 = produkty PCR



Multiplex PCR (mnohonásobná PCR)

Při použití více párů specifických primerů, dochází k amplifikaci více cílových sekvencí při jedné reakci.



PCR - využití metod PCR

1. Základní výzkum

izolace genů nebo jejich částí

sekvencování DNA

mutageneze in vitro

modifikace konců DNA

analýza (selekce) klonů z genových knihoven

příprava značených sond

2. Aplikovaný genetický výzkum

prenatální diagnostika (dědičných chorob)

detekce mutací v genech

studium polymorfizmu genů (např. RAPD)

populační genetika

3. Využití v klinických disciplínách

detekce patogenních mikroorganismů (baktérií, virů,
prvoků, hub)

identifikace onkogenů

typizace nádorů

stanovení pohlaví

5. Využití v praxi

archeologie

soudnictví

kriminalistika