

# Izolace nukleových kyselin

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

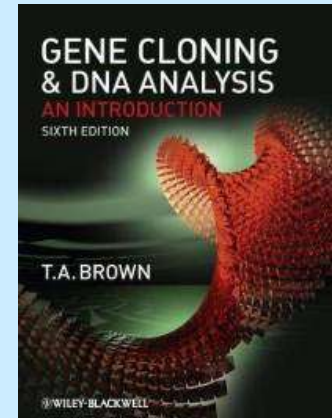
**Přírodovědecká fakulta MU, 2012**

# ***Obsah přednášky***

- 1) Základní informace o izolaci nukleových kyselin**
- 2) Sled kroků při izolaci nukleových kyselin**
- 3) Principy centrifugace**
- 4) Specifické postupy ve zvláštních případech**
- 5) Izolace nukleových kyselin z fágů**
- 6) Spektrofotometrická analýza nukleových kyselin**
- 7) Fluorometrické a kolorimetrické stanovení koncentrace DNA**



## ***Doporučená literatura***



- 1) Šmarda et al. (2005): Metody molekulární biologie, MU Brno**
- 2) Brown (2007): Klonování genů a analýza DNA. Univerzita Palackého v Olomouci (1. české vydání, překlad 5. vydání)**

**(vyšlo už 6. vydání v angličtině)**

**Brown (2010): Gene Cloning and DNA Analysis. 6th edition, Wiley-Blackwell**

# *Izolace nukleových kyselin*



**Nezbytná podmínka další práce ...**

# ***Izolace nukleových kyselin***

- **izolace NA v nativním stavu z přirozeného materiálu v dostatečném množství a čistotě**
- **zbavit NA všech látek po lyzi bakterií, virů nebo eukaryotických buněk (kvasinky, prvoci)**
- **základ tvoří fenolová extrakce**
- **výchozí materiálem jsou buňky**



## **Proč ???**

***... vůbec potřebujeme izolovat nukleové kyseliny z mikroorganismů?***

**Pro analýzu - genetické informace mikroorganismu**

- **Potvrzení přítomnosti mikroorganismu ve vzorku**
- **Klasifikaci druhu**

**Pro syntézu – klonování a expresi genů**

- **Celkovou buněčnou DNA**
- **Chromozomální nebo plasmidovou DNA**
- **Fágovou DNA**



# ***Poprvé izoloval nukleovou kyselinu ...***

**... Švýcarský vědec Friedrich Miescher v roce 1869**

- **izoloval ji z hnisu v obvazech pacientů z nemocnice v Tübingenu**
- **pojmenoval ji nuklein**
- **obsahovala velké množství fosforu**
- **později ji našel také ve spermatu lososů**



**DNA (nukleoprotein) byla tedy poprvé izolována z eukaryotických buněk**

# *Čtyři jednoduché věci potřebujeme*

- 1) Růst kultury a sedimentace buněk**
- 2) Rozbití buněk a jejich obsahu**
- 3) Zpracování buněčného extraktu – odstranění všeho kromě NA**
- 4) Zahuštění výsledného roztoku**

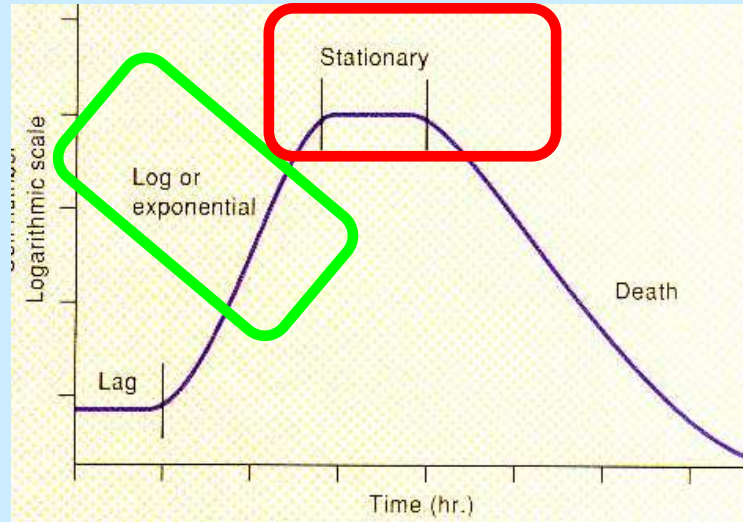




# *Růst bakteriální kultury*



**Zpravidla tekuté médium  
(suspenní kultura)**



**Pevná půda méně vhodná  
– nižší výtěžky**

**Jak izolovat DNA z přirozeně rostoucích bakterií?**

# ***Média pro kultivaci***

## **Definovaná a minimální média**

**Směs anorganických látek**

**Všechny komponenty známy**

**Zdroje uhlíku a energie**

**Stopové prvky a vitamíny**



## **Nedefinovaná (komplexní) média**

**Luria-Bertani**

**Složení není přesně známo**

**Trypton nebo pepton**

**Dostačující pro izolaci NA**



# ***Namnožení Escherichia coli***

## **Podmínky**

- **LB médium, 37°C**
- **aerobní podmínky = rotační třepačka 150-250 rpm**

## **Čeho dosáhneme?**

- **Zdvojení počtu buněk každých 20 minut**
- **Maximální hustota 2-3 x 10<sup>9</sup> buněk/ml**

## **Jak to měřit?**

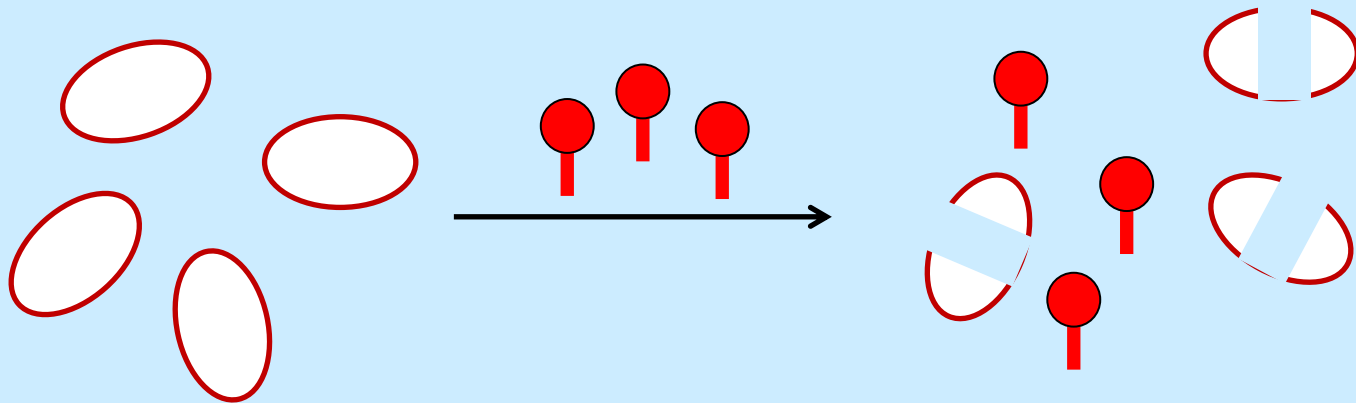
- **Optická hustota při 600 nm**
- **OD600 = 1 → 8 x 10<sup>8</sup> buněk/ml**

# ***Množení fágů***

- **Vnitrobuněční parazité**
- **Nutno nechat narůst do vysokého titru**
- **Izolovat z objemu kultury do 50 l**
- **Vždy zajistit lytický cyklus**

# *Rovnováha mezi stářím kultury a velikostí inokula u lyzogenního fága*

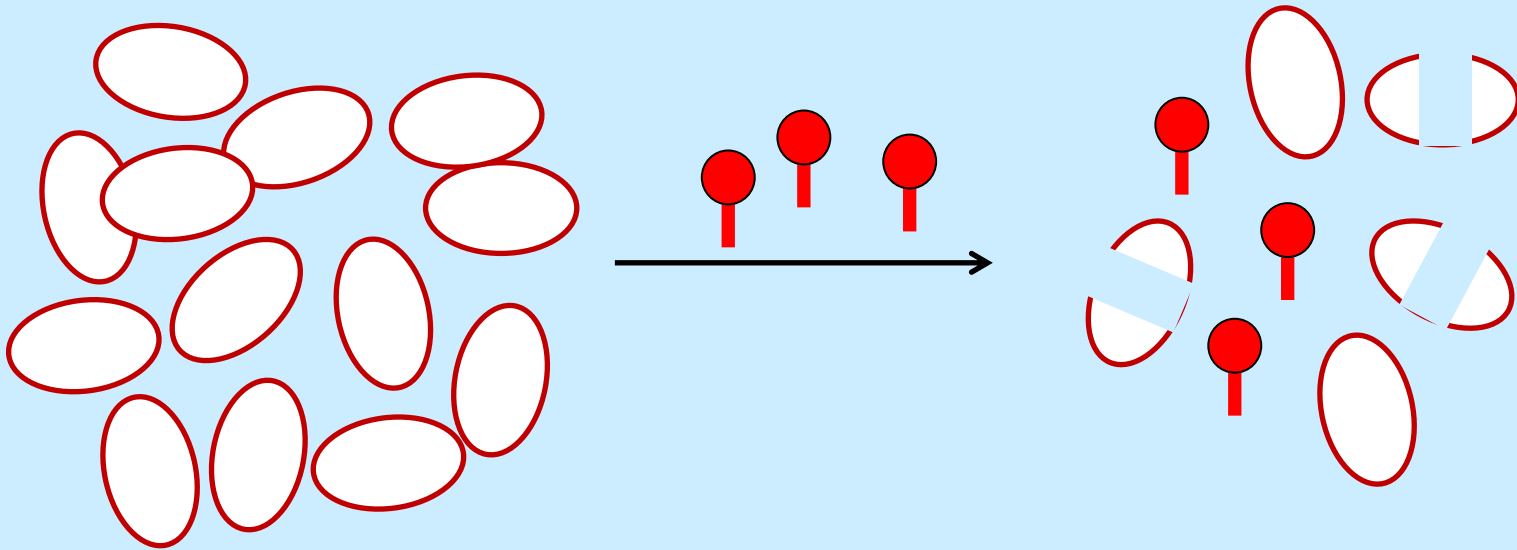
Hustota kultury nízká



**Rychlá lyze buněk = nízká koncentrace fága**

# *Rovnováha mezi stářím kultury a velikostí inokula u lyzogenního fága*

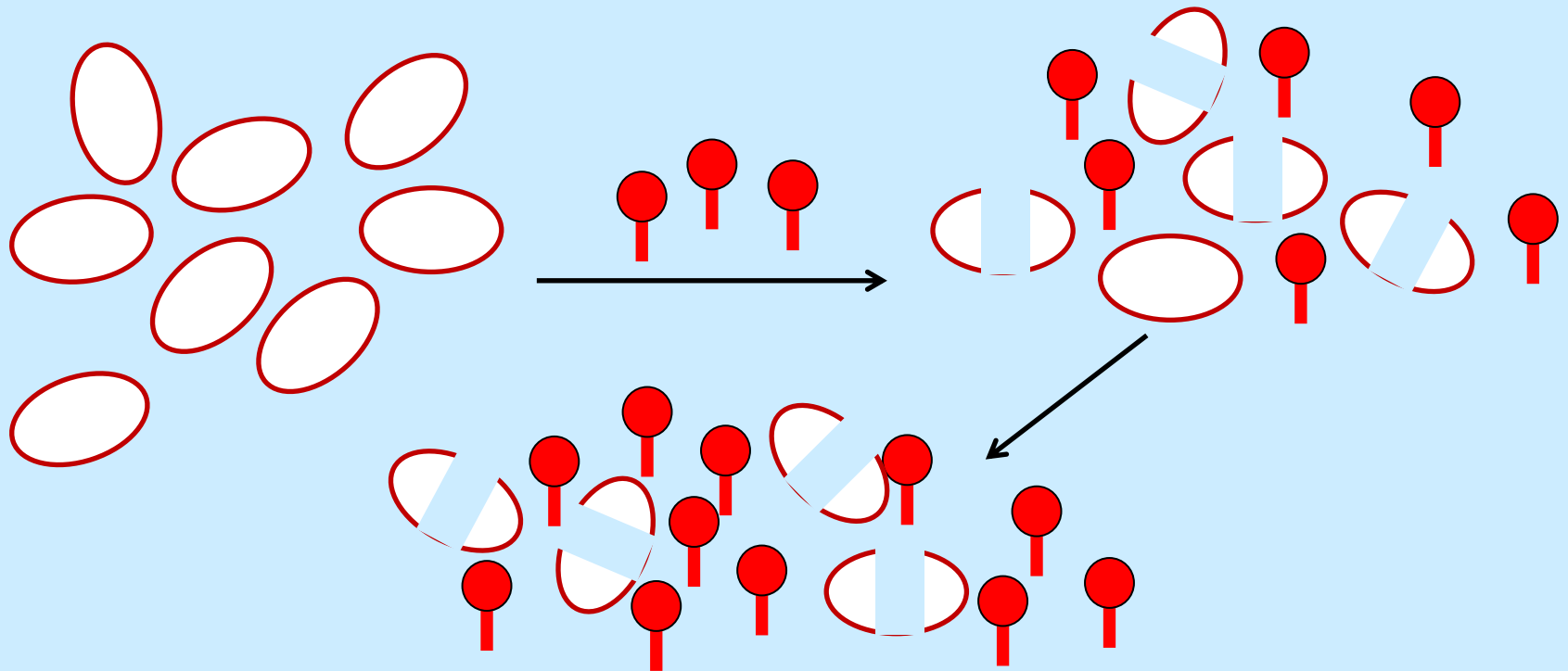
**Hustota kultury vysoká**



**Kultura není úplně zlyzována = nízká koncentrace fága**

# *Rovnováha mezi stářím kultury a velikostí inokula u lyzogenního fága*

**Hustota kultury optimální**



**Kultura stále roste a lyzuje = vysoká koncentrace fága**

# ***Sedimentace buněk***

## **Usazování buněk v gravitačním poli - centrifugace**



- **Sedimentací při nízké rychlosti oddělíme buněčnou biomasu od média**
- **Buňky se usadí na dně zkumavky**
- **Bakterie z 1 litru kultury můžeme resuspendovat v 10 ml (100 násobné zahuštění)**



# ***Metoda centrifugace***

- **separační metoda**
- **izolace, purifikace a charakterizace částic, včetně makromolekul**

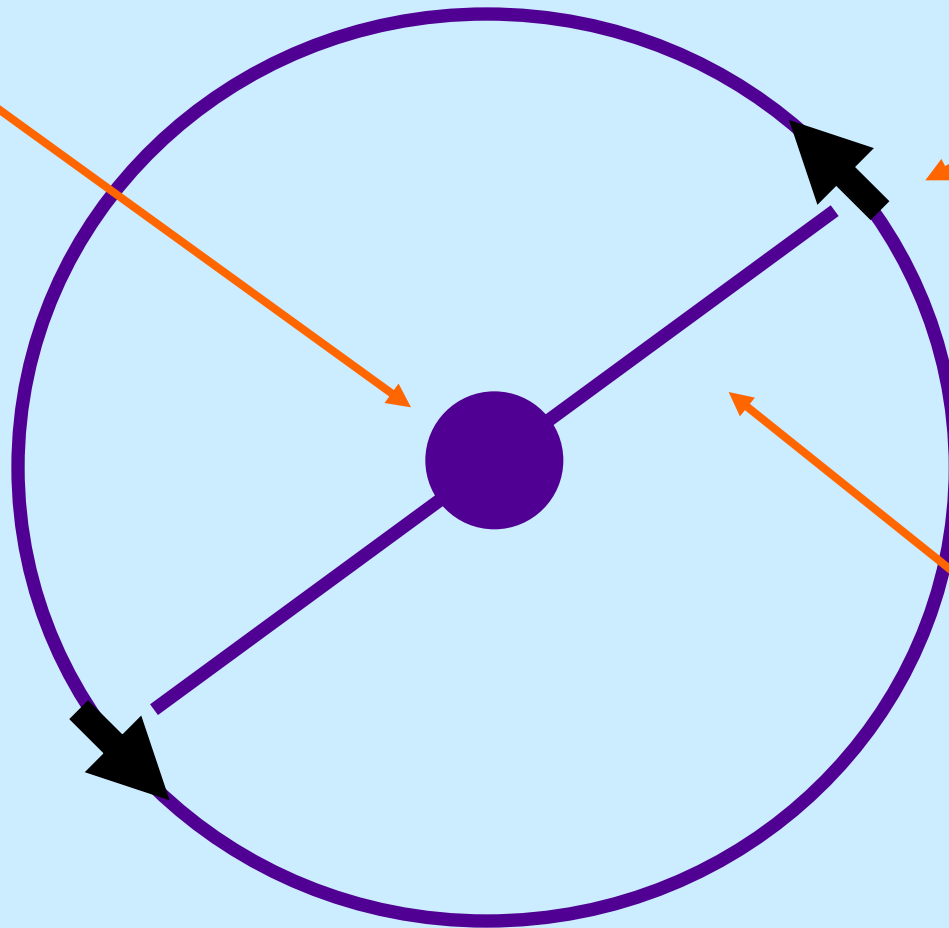
## **PRINCIP**

- **pohyb částic v tekutém prostředí pod vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy**
- **chování částic je dáno jejich vlastnostmi a povahou prostředí**

# *Princip centrifugace*

Osa rotoru

Rotace



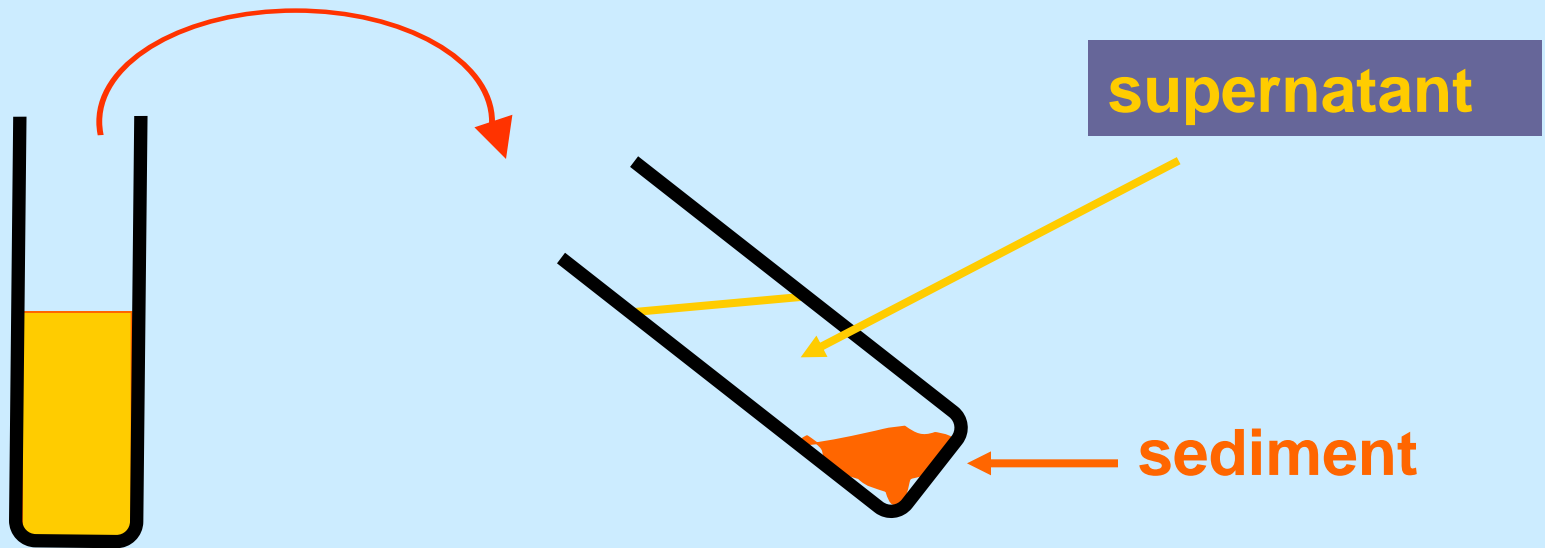
Poloměr  
otáčení

# Centrifugy



# *Diferenciální centrifugace*

- homogenní roztok
- částice lišící se podstatně velikostí, hmotností nebo hustotou
- sedimentace různou rychlostí



Rovněž separace jader, ribozómů, mitochondrií, buněčných membrán, nukleových kyselin, proteinů

# ***Sedimentace virionů***

**Viry sedimentují velmi pomalu, mají nízké hodnoty sedimentačních koeficientů**

<b>Virus/fág</b>	<b>Sedimentační koeficient</b>
<b>Virus vakcínie</b>	<b>92S</b>
<b>Influenzavirus</b>	<b>18-21S</b>
<b>Fág T2</b>	<b>60S</b>

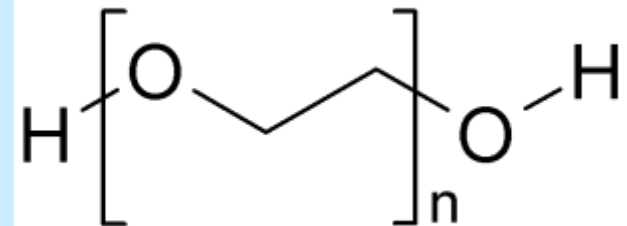
# Sedimentace virionů

- Diferenciální centrifugace při vysokých otáčkách
- Vysrážení virových částic hydrofilním polyethylenglykolem (PEG) – stačí nižší otáčky



## Jaký je princip účinku PEG?

- V přítomnosti soli pohlcuje vodu
- Tím vyloučí z vody virové částice - srážení



# *Centrifugace – praktický vzorec*

$$\text{RCF} = 1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$$

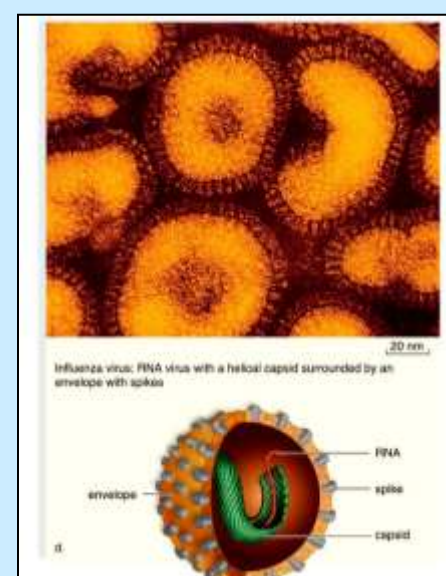
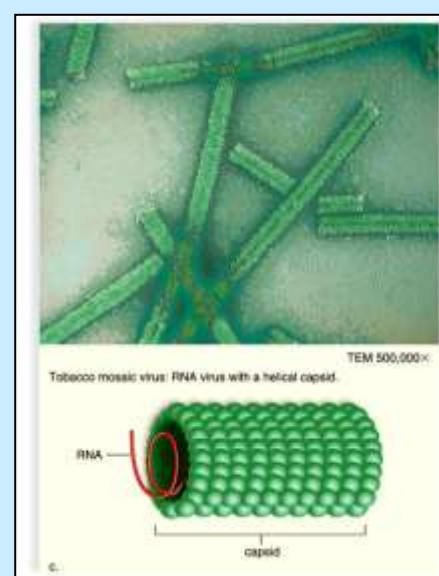
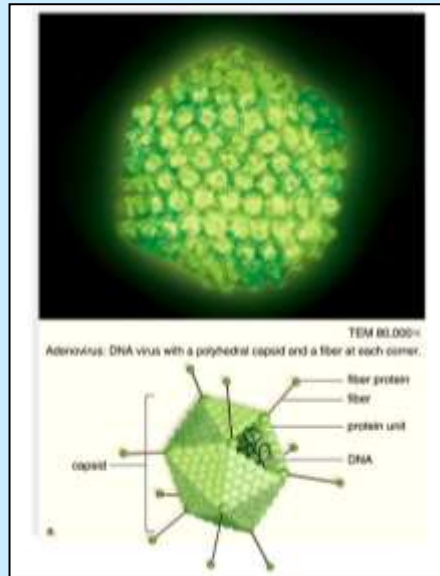
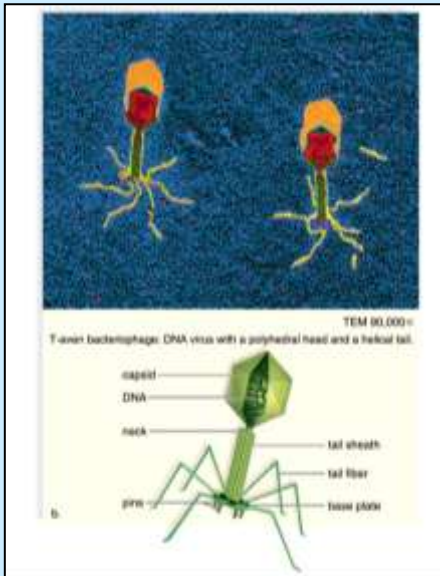
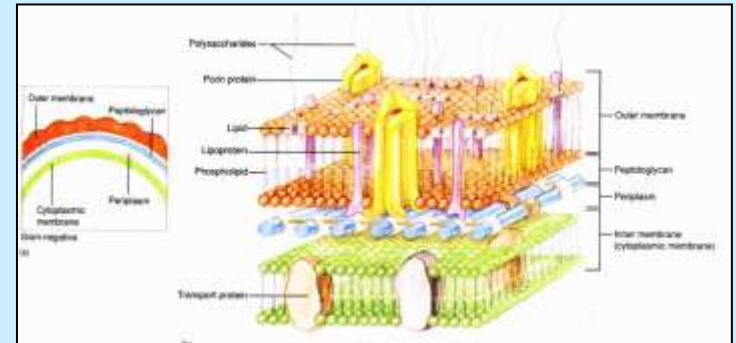
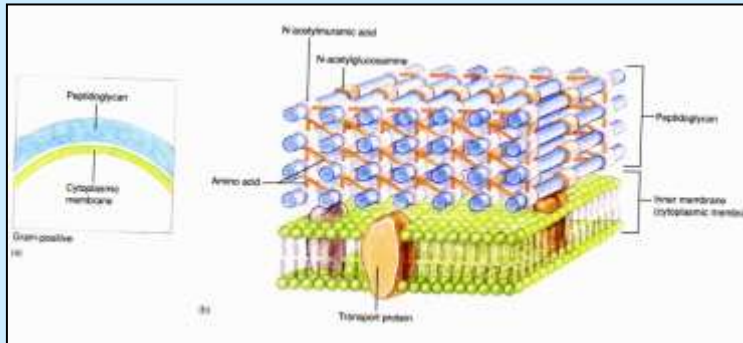
**RCF = relative centrifugal force (hodnota g)**

**rpm = repeats per minute**

**r = poloměr otáčení**

# Příprava extraktu z buněk

Podstatou je odstranění buněčných obalů





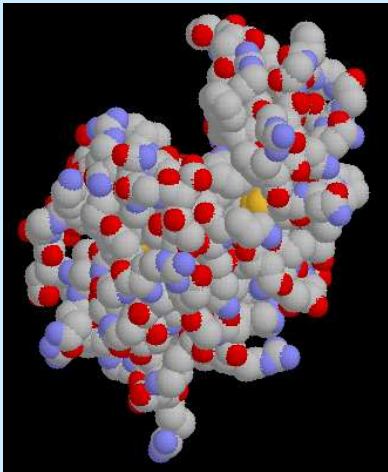
# ***Odstranění obalů chemicky***

- **Chemická činidla narušující integritu buněčných stěn**
- **Rozhoduje chemické složení buněčné stěny**
- **Druhé činidlo musí narušit buněčnou membránu**

***U *Escherichia coli* a příbuzných bakterií lysozym a etyléndiamin tetraacetát (EDTA) + dodecylsulfát sodný***

***Jaký je mechanismus účinku?***

# *Mechanismus účinku lysozymu*

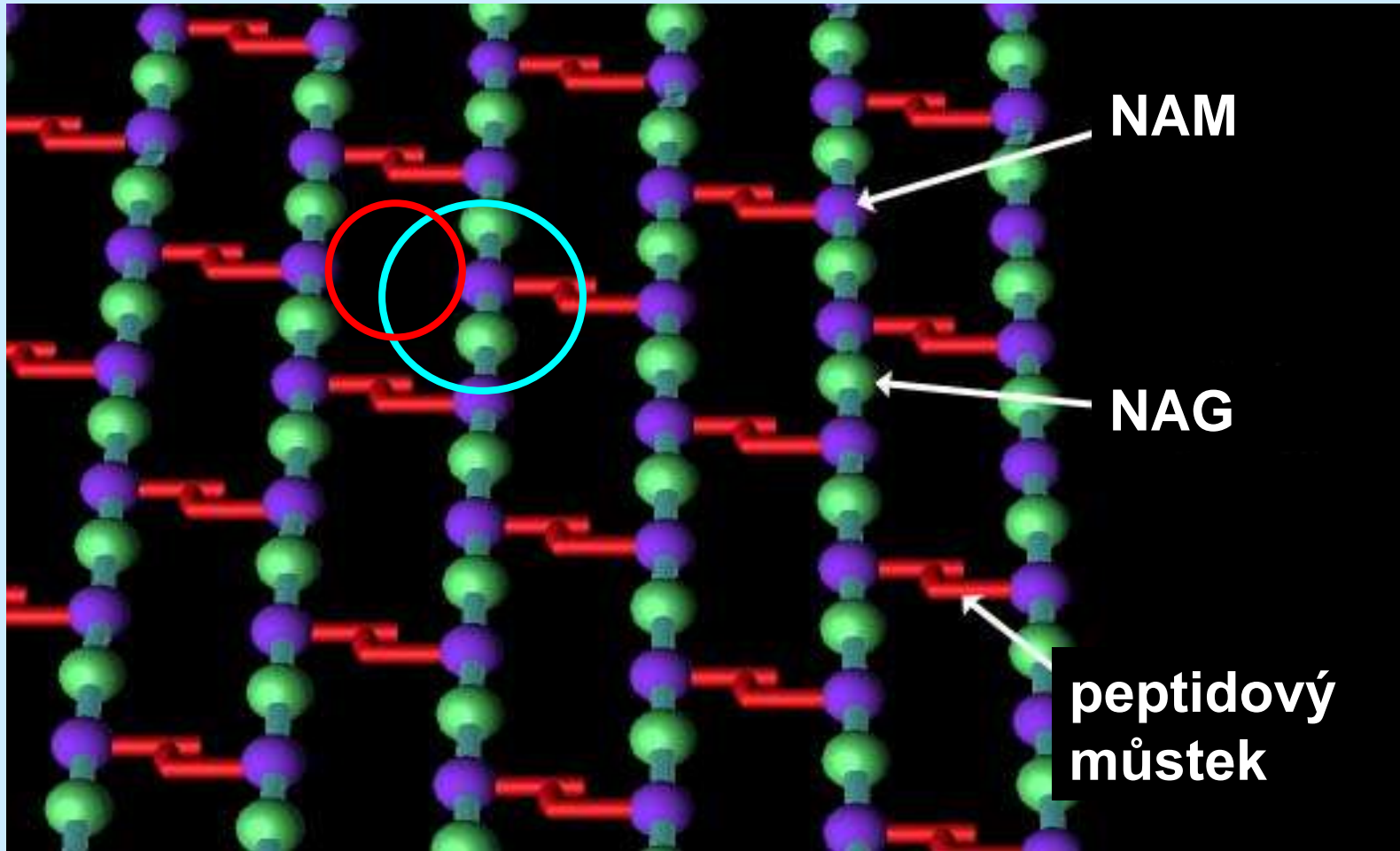


**Muramidáza,  
N-acetylmuramid  
glykanhydroláza**

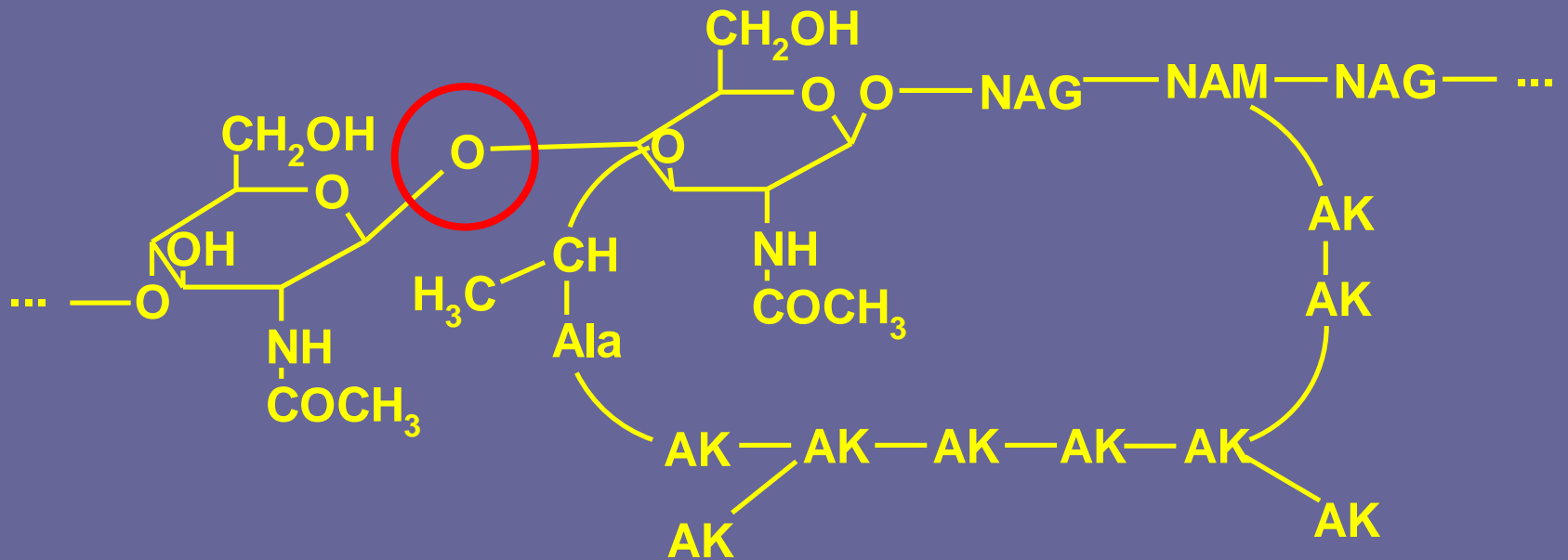


- **EC 3.2.1.17**
- **patří mezi glykanhydrolázy**
- **katalyzuje hydrolýzu vazeb 1,4-beta mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukózaminem v peptidoglykanu**

# Peptidoglykan a lysozym



# Peptidoglykan a lysozym



Je možné lysozymem  
odbourat buněčnou  
stěnu *Archae*?

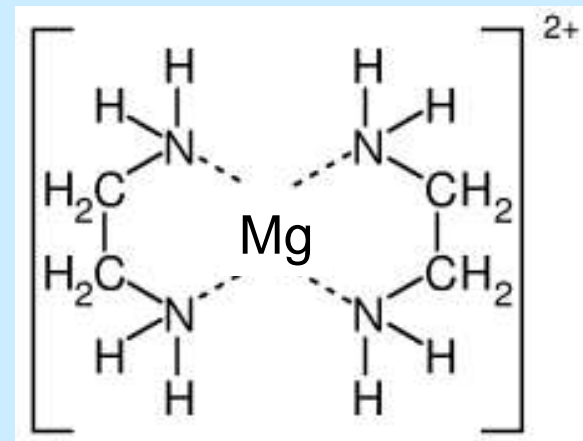
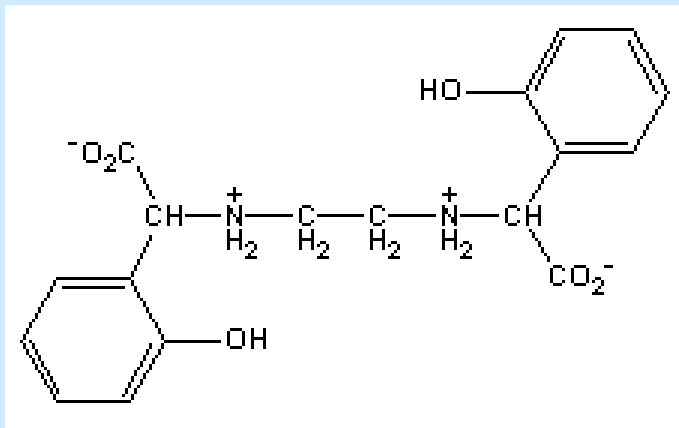


# Mechanismus účinku EDTA

## etylendiamin tetraacetát (EDTA)

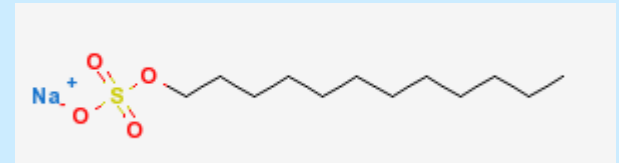
- Odstraňuje ionty hořčíku, které ochraňují strukturu buněčných obalů
- Inhibuje buněčné enzymy, které by mohly degradovat DNA

## chelát

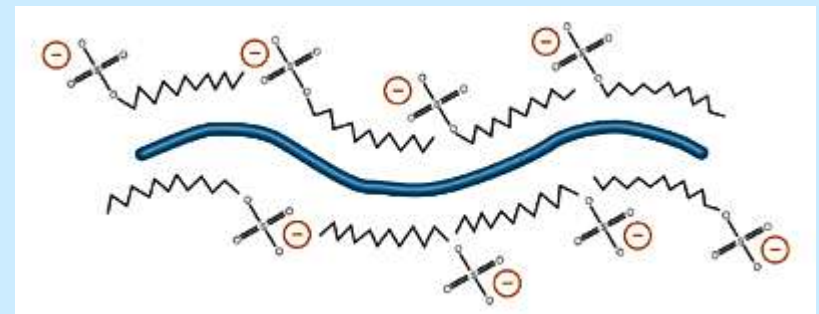
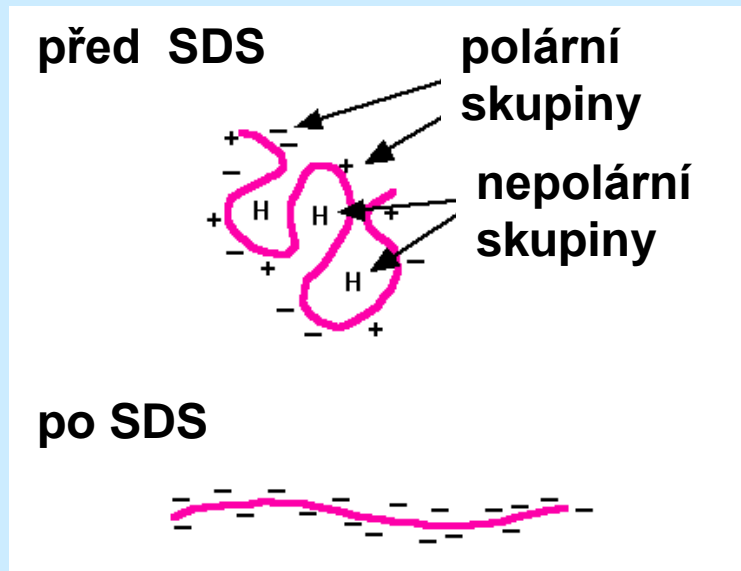
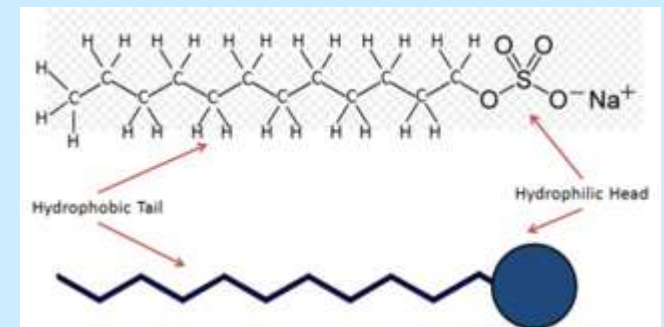


# Mechanismus účinku SDS

dodecylsulfát sodný



- aniontový detergent detergent
- narušuje nekovalentní vazby proteinů, denaturuje je a ničí jejich přirozenou strukturu (konformaci)
- odstraňuje molekuly lipidů

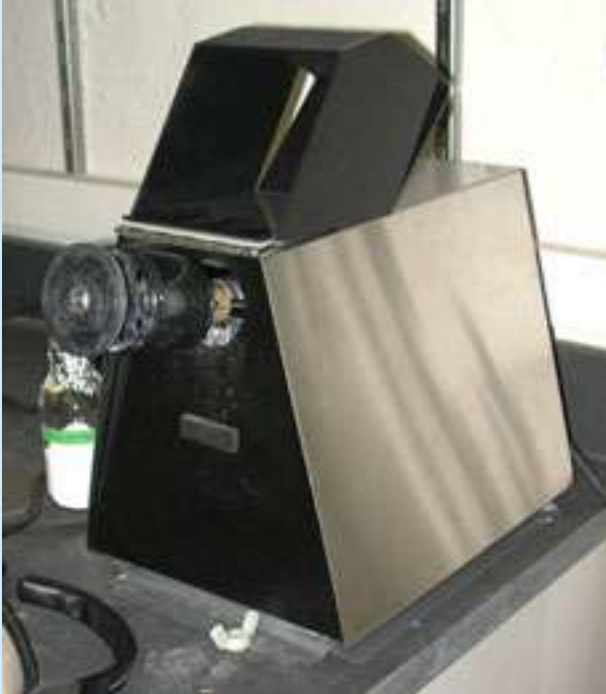


# Odstranění obalů fyzikálně I

## Kuličkami

### Bead beating

- Třepání biologického materiálu v nádobce se zirkoniovými nebo skleněnými kuličkami
- Velikost 0,5 až 1,0 mm



### Bead beater

- Metoda vhodná na vzorky půdy
- Může ale rozbít DNA na malé kousky
- Snižuje kvalitu extrakce u tkáňových vzorků



# **Odstranění obalů fyzikálně II**

## **Sonikace**

**Aplikace ultrazvukových vln za účelem rozrušení částic v roztoku**

**Používají se ultrazvukové lázně a sonda**

**Účinky fyzikální i chemické**

**Porušení mezimolekulárních interakcí**



## **Osmotický šok**

**Kombinace chemické a fyzikální metody**

# ***Jak odstranit jiné typy buněčných stěn?***

## **Vybrané bakterie**

***Staphylococcus* - lysostafin**

***Mykobakterie* – směs více enzymů**

## **Kvasinky a houby**

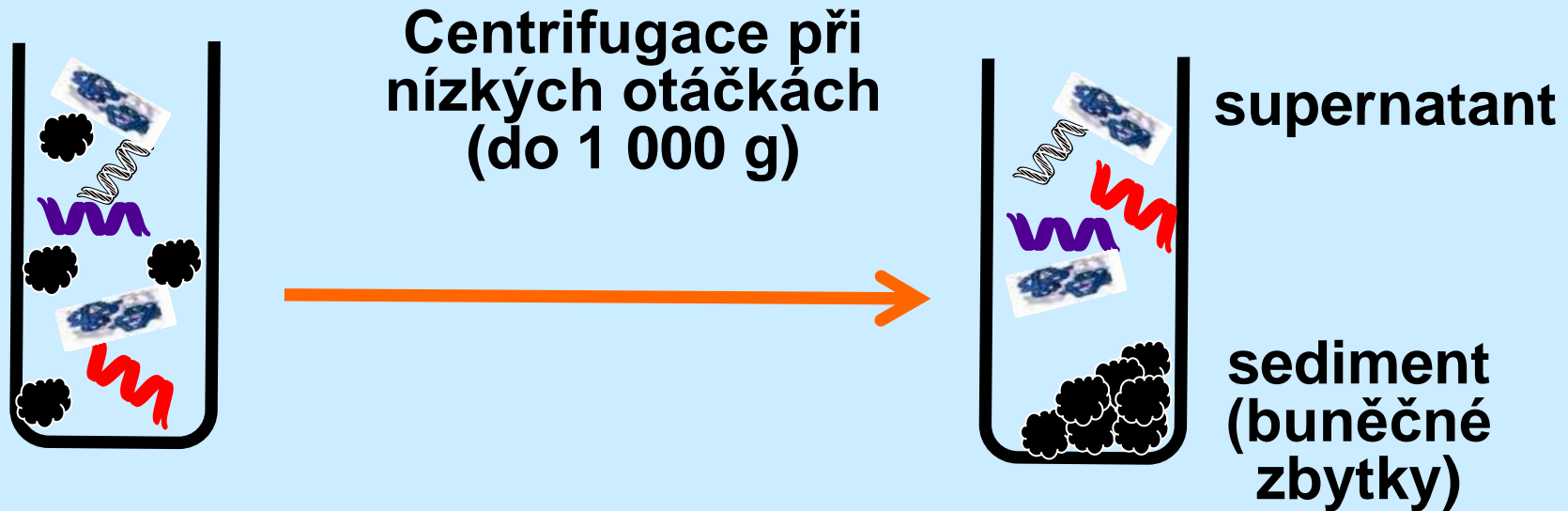
***Celuláza, směsi enzymů***

## **Vnitrobuněční parazité**

**???**

# Co se děje po odstranění obalů?

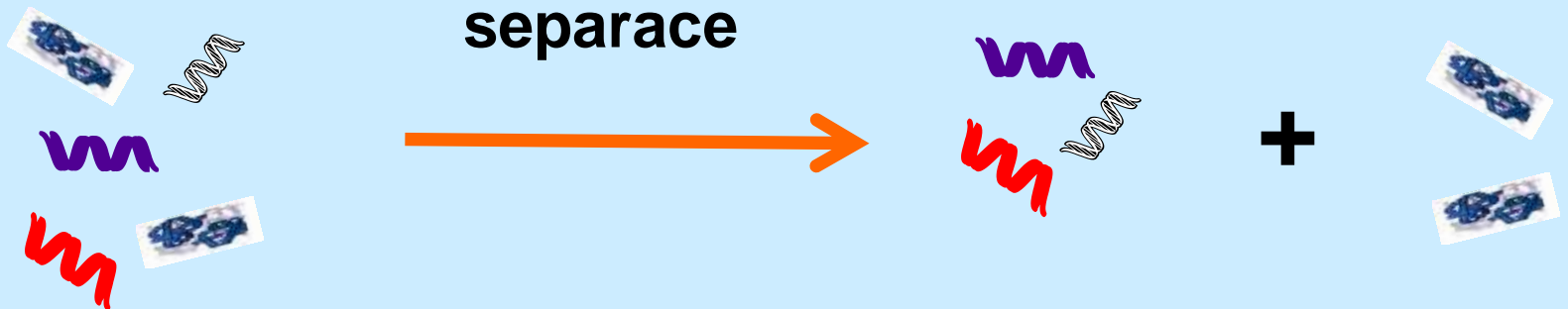
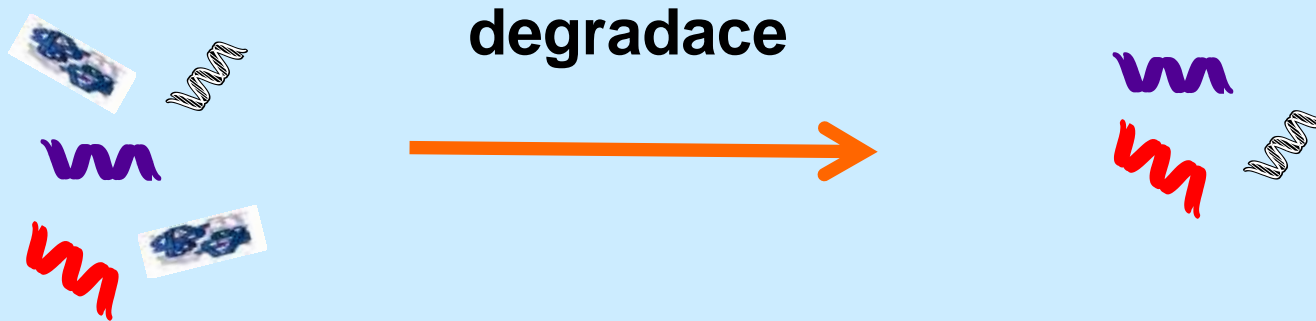
Nerozpustné buněčné zbytky jsou odstraněny centrifugací



V supernatantu se nachází buněčný extrakt obsahující nukleové kyseliny, proteiny, lipidy, polysacharidy a nízkomolekulární látky

# Izolace DNA z buněčného extraktu

- 1) Degradace kontaminujících látek
- 2) Oddělení směsi na dvě frakce, DNA zůstává v jedné z nich



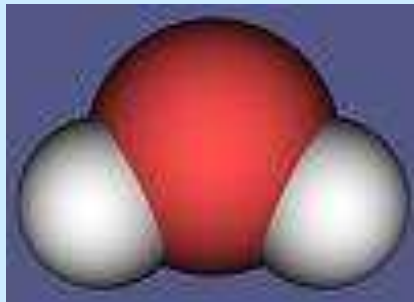
# ***Extrakce***

**Extrakce je čistící a dělicí operace, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze - rozpouštědla.**

**Extrakce je velmi výhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět i za laboratorní teploty nebo za chladu.**

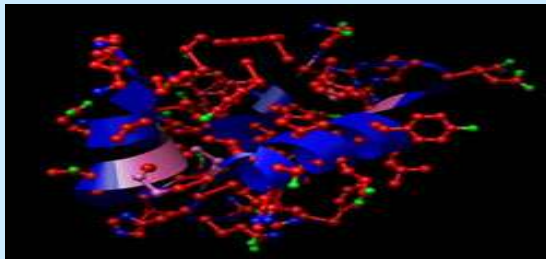
# ***Extrakce proteinů směsí fenol-chlorofom***

## **Fenolová extrakce podle Marmur 1961**

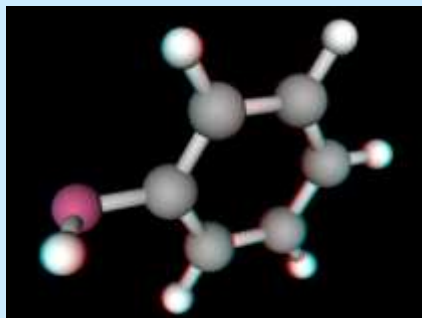


**K separaci proteinů dojde po centrifugaci a vytvoření**

**lehké vodné fáze**



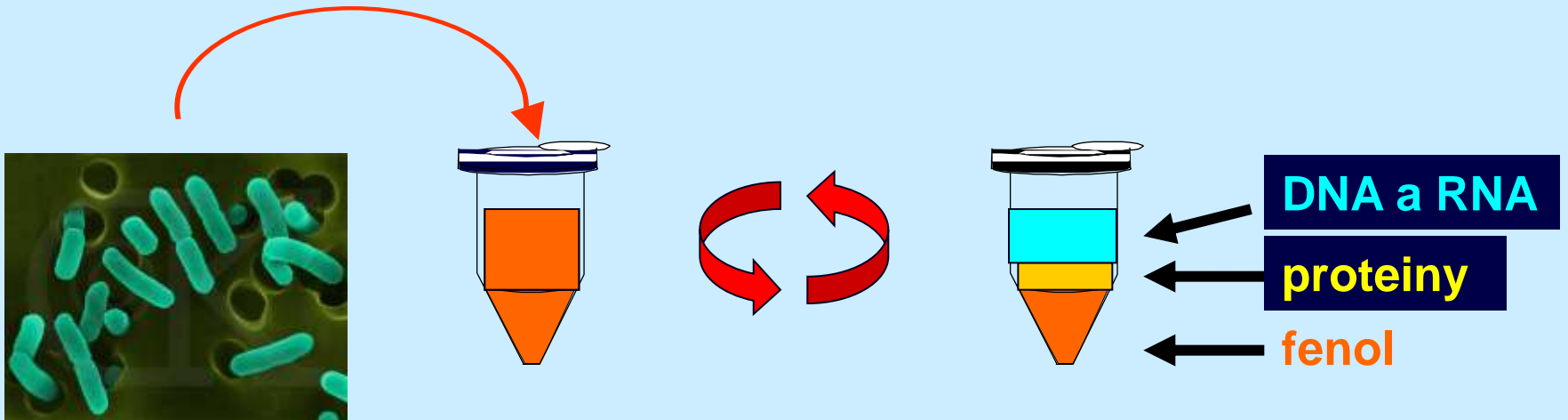
**mezifáze s denaturovanými proteiny na rozhraní**



**těžší organické fáze**

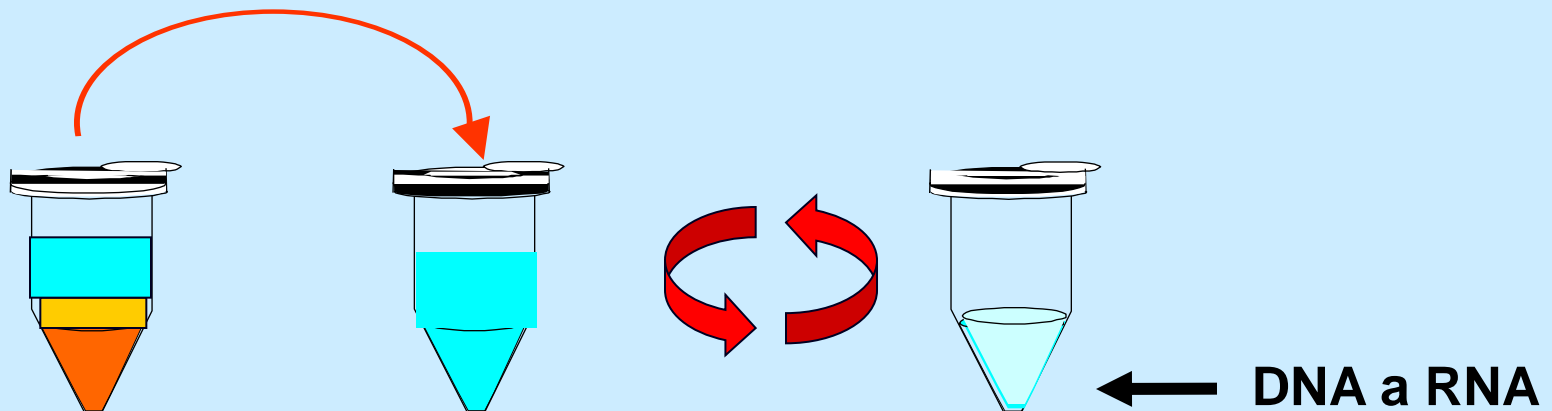
# Postup při fenolové extrakci - I

- 1) Rozrušení buněčných stěn nebo virových kapsidů – enzymy (lysozym, celulázy) a detergenty (laurylsulfát sodný)
- 2) Denaturace proteinů a tuků – fenol, chloroform
- 3) Oddělení fází centrifugací – vrstva organická (fenol), mezifáze (proteiny a zbytky buněk), vodná (NA)



# *Postup při fenolové extrakci - II*

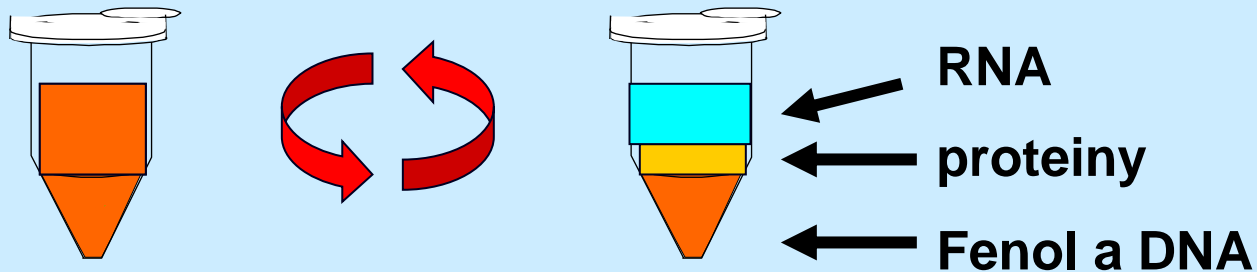
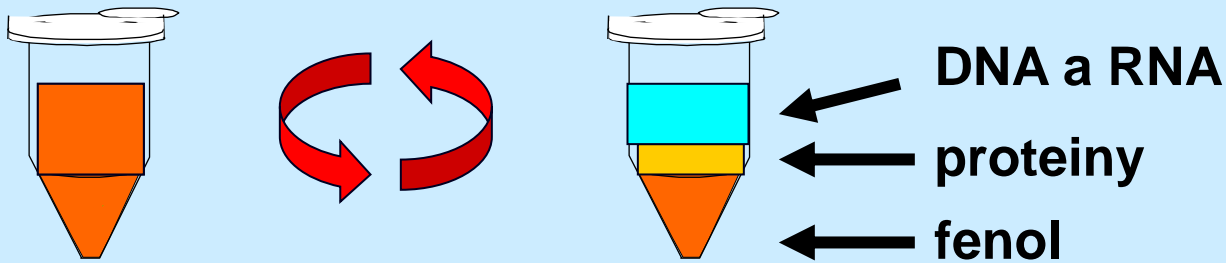
- 4) Odběr DNA a RNA frakce
- 5) Precipitace NA – soli, etanol, izopropylalkohol, nízká teplota
- 6) Shromáždění precipitátu centrifugací
- 7) Odběr etanolové frakce
- 8) Rozpuštění sedimentu ve vhodném médiu – voda, TE-puf





# *Modifikace fenolové extrakce*

Fenol ekvilibrováný neutrálním nebo alkalickým pufrům



**Pro vyšší efektivitu může  
extrakci předcházet degradace  
(např. odstranění proteinů  
proteinázou)**



# ***Jiné způsoby odstranění kontaminant***

## **Detergent cetyltrimetylamonium bromid, CTAB**

- **S nukleovými kyselinami tvoří nerozpustný komplex**
- **Po centrifugaci v supernatantu proteiny a jiné ...**
- **Sedimentovanou DNA rozpustíme v 1M NaCl a dočistíme**

## **Guanidium thiokyanát**

- **Denaturuje vše kromě nukleových kyselin**
- **V jeho přítomnosti se DNA váže na oxid křemičitý – chromatografická kolona**

# ***Separace DNA a RNA***

## **Specifické nukleázy**

**DNáza odstraní z roztoku DNA**

**RNáza odstraní z roztoku RNA**

## **Diferenciální precipitace**

**➤ chlorid lithný sráží RNA**

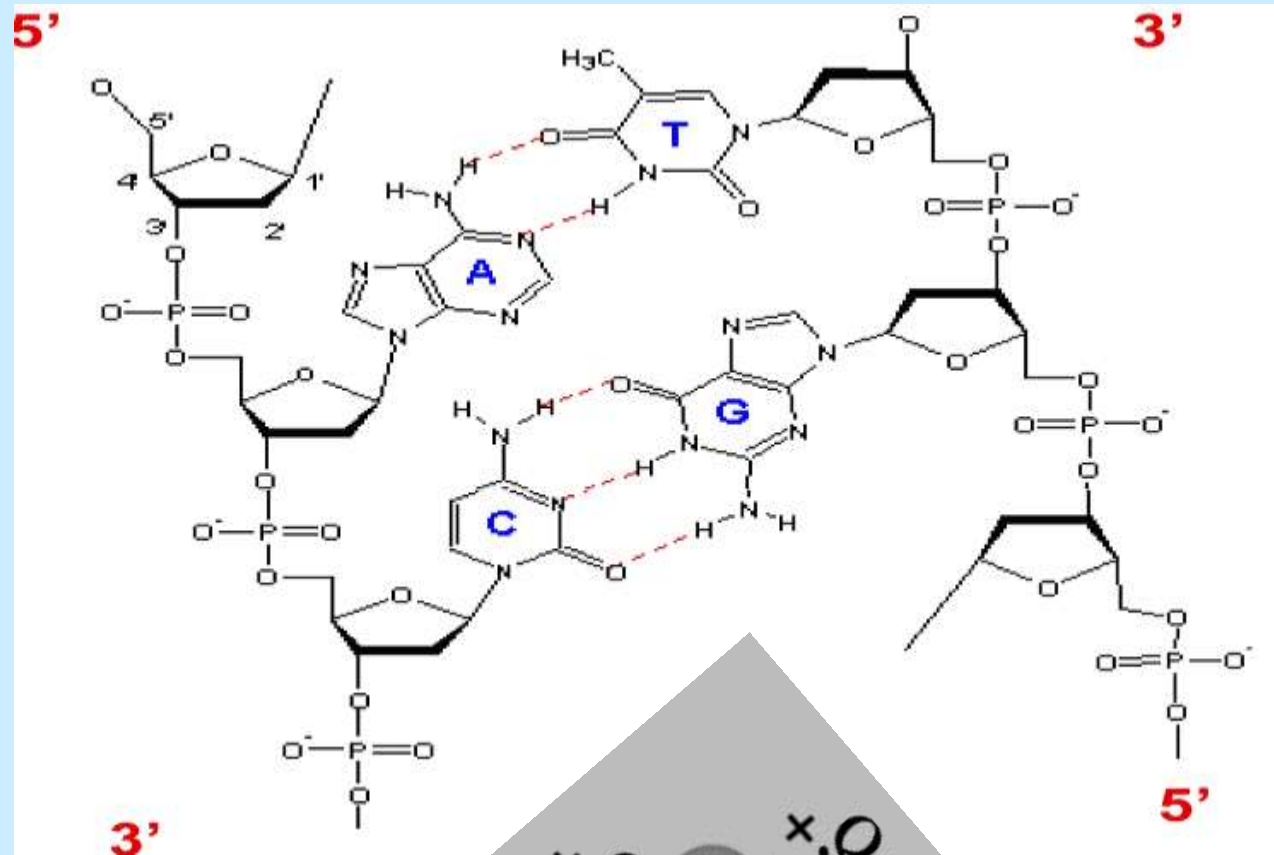
# ***Zahuštění DNA a RNA precipitací***

- **Precipitace (srážení), jedna ze základních metod izolace a koncentrace biologických makromolekul.**
- **Do roztoku, obsahujícího požadovanou makromolekulu, se přidá určité množství precipitačního činidla (síran amonný, ethanol, aceton apod.)**
- **Makromolekuly se vysráží, aniž obvykle dojde k denaturaci. Může se proto následně znovu rozpustit a použít ve své nativní, biologicky aktivní podobě.**

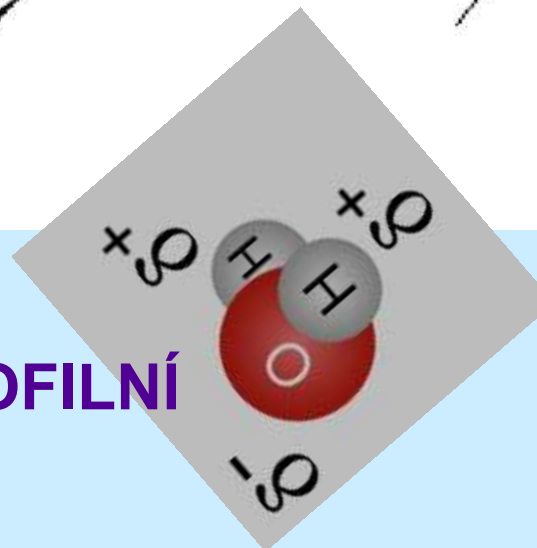
# ***Postup při precipitaci***

- 1) Přidání etanolu, případně izopropanolu**
- 2) Přidání jednomocných kationtů ( $K^+$ ,  $Na^+$ ...)**
- 3) Koncentrování vzorku centrifugací  
(roztok zchlazený na  $-70^{\circ}C$ )**
- 4) Promytí sedimentu NA 70% ethanolem**
- 5) Rozpuštění NA ve vodě**

# Jaká je rozpustnost DNA ve vodě?

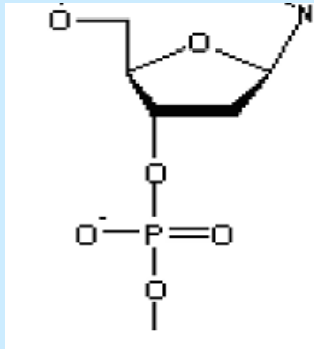


DNA JE HYDROFILNÍ

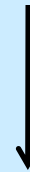


# Obecný postup precipitace etanolem

Přidání NaCl + C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH



Snížení hydrofility DNA



VYSRÁŽENÍ DNA  
ve vodném prostředí

Neutralizace PO<sub>3</sub><sup>-</sup>

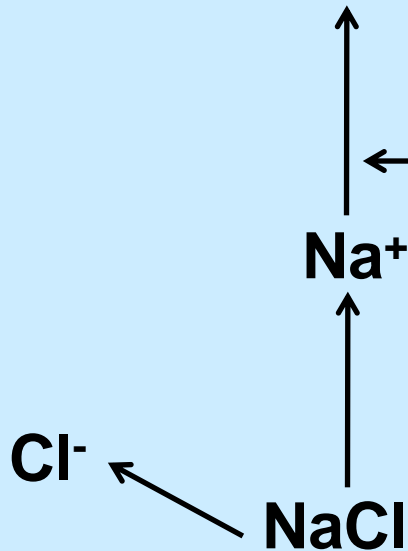
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

Nízká dielektrická  
konstanta

Na<sup>+</sup>

Cl<sup>-</sup>

NaCl





# ***Postup při precipitaci - dokončení***

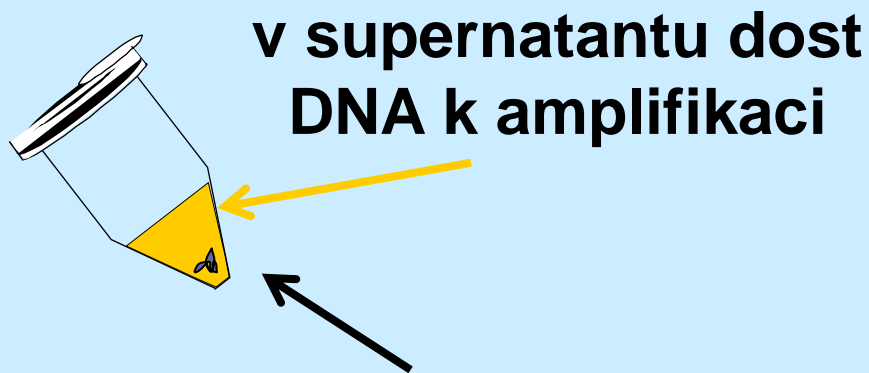
- 6) Koncentrování vzorku centrifugací (roztok zchlazený na  $-70^{\circ}\text{C}$ )**
- 7) Promytí sedimentu NA od zbytků solí 70% ethanolem a odpaření ethanolu teplem**
- 8) Rozpuštění NA ve vodě (přídavek EDTA, případně Tris-HCl)**

**Výsledek?**

**Nativní NA koncentrovaná v malém objemu vodného roztoku**

# ***Jednoduchá příprava DNA pro PCR***

**Zpravidla stačí bakterie  
povařit 5-10 min. ve vlastní  
šťávě a zcentrifugovat**



**sediment buněčných zbytků**

# ***Specifický postup u kvasinek***

**Rozbití buněk inkubací po dobu 10 minut při 80°C**

**Prodloužení nebo zkrácení času, zvýšení nebo snížení teploty mělo fatální důsledky na výsledek PCR**



**Dej pozor, abys nepřevařil  
nebo nedovařil ...!**

**BURDYCHOVA, R. - RUZICKA, V. - BARTOS, M. (2002): PCR-based method for identification of integration events in the *Pichia pastoris* genome. BioTechniques 33: 1214-1218.**

# ***Izolace plasmidové DNA***

**Zásadní problém je oddělení plasmidové a chromozómové DNA**

- Na základě velikosti (největší plasmidy dosahují jen 8% velikosti chromozómu *Escherichia coli*)
- Na základě konformace – chromozómová DNA se při purifikaci linearizuje!
  - Alkalická denaturace
  - Centrifugace v gradientu CsCl

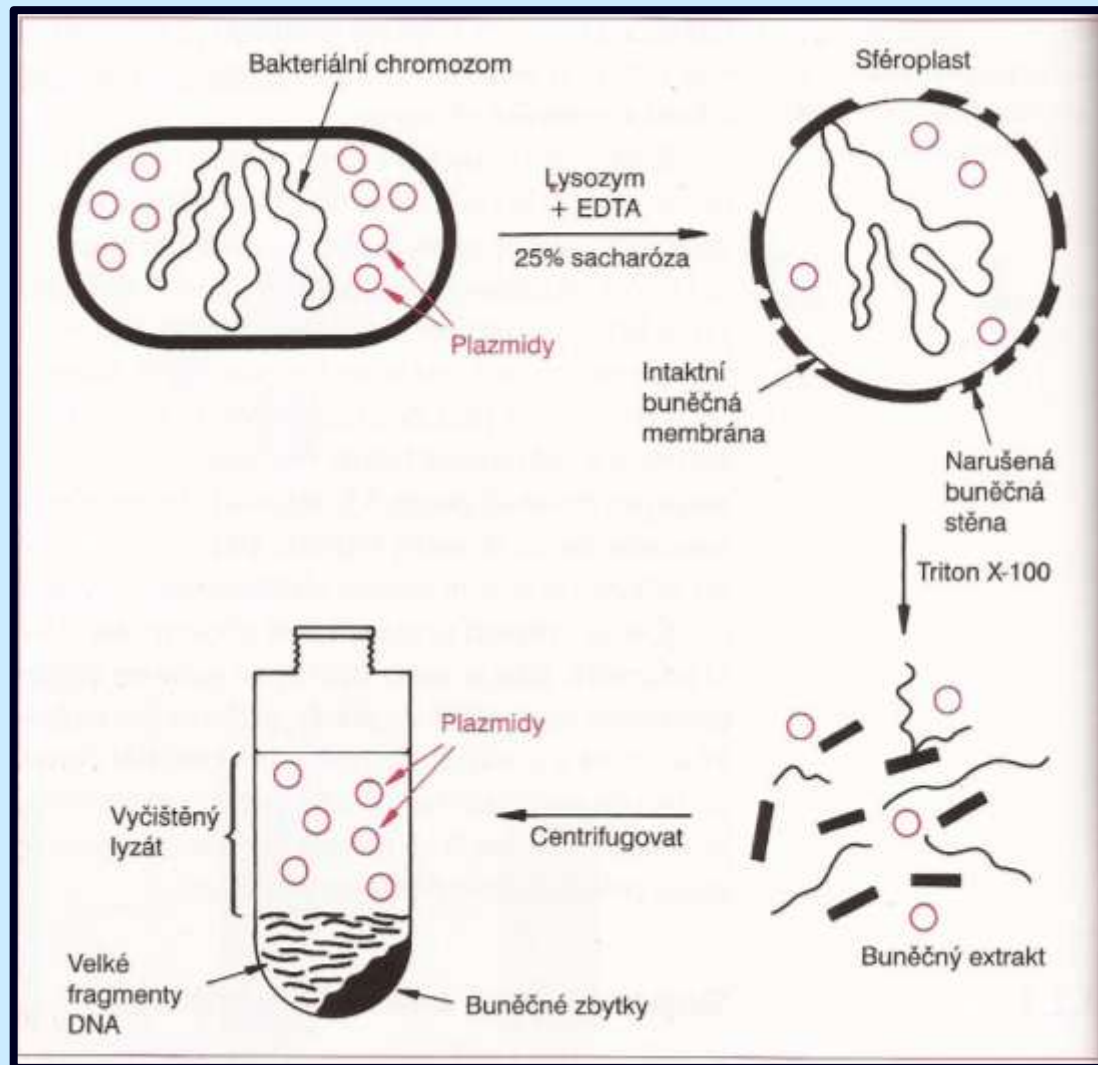
# ***Separace na základě velikosti***

**Velké kusy chromozómové DNA lze odstranit diferenciální centrifugací spolu se zbytky buněk**

- **Šetrné porušení buněk – vytvoření sféroplastů**
- **Lyze buněk neiontovým detergentem (Triton X-100) – SDS by chromozómovou DNA rozbil**
- **Centrifugací vzniká přečištěný lyzát**

**I přečištěný lyzát ale obsahuje zbytky chromozómové DNA**

# Příprava vyčištěného lyzátu

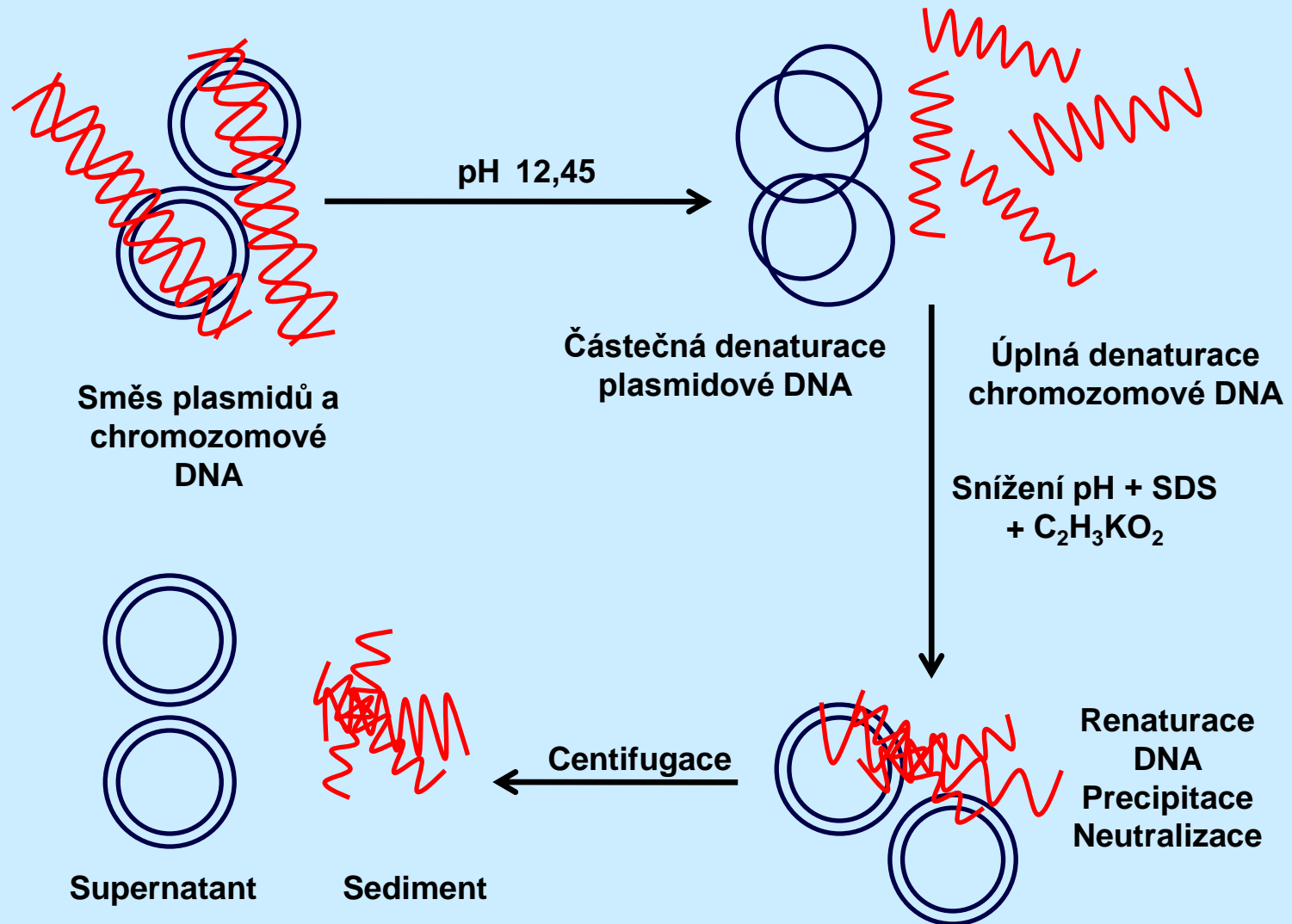


# ***Izolace plasmidů alkalickou denaturací***

- Je založena na skutečnosti, že linearizovaná DNA po denaturaci a následné renaturaci nedokáže reasociovat, na rozdíl od kružnicové DNA
- Denaturace se provádí při pH = 12,0 až 12,5 (ideální je 12,45)
- Následuje rychlá renaturace při které lineární molekuly vytvoří agregáty, kdežto plasmidové molekuly reasociují
- Kromě toho v prostředí SDS a neutralizaci acetátem sodný se nerozpustí ani proteiny a RNA (není třeba fenolové extrakce ani ribonukleáz)

**Birnboim a Doly(1979): Nucleic Acids Research 7, 1513-1523.**

# Izolace plasmidů alkalickou denaturací

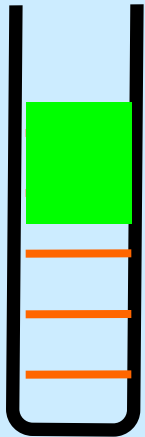




# Zonální centrifugace

- částice podobných fyzikálních vlastností
- typy nukleových kyselin, podjednotky ribozómů, apod.
- koncentrační gradient sacharózy, glycerolu

vzorek

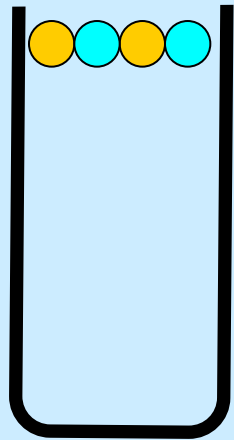


vzrůstající hustota a viskozita

gradient eliminuje vliv zvyšujícího se odstředivého zrychlení

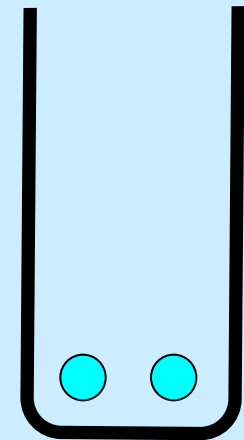
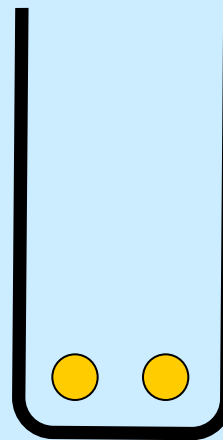
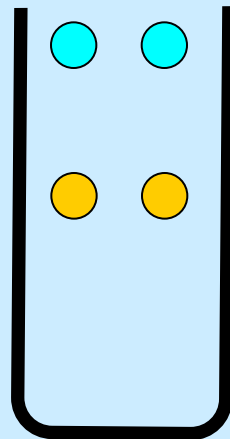
částice se rozvrství podle velikosti, tvaru a hustoty

# Zonální izokinetická centrifugace



vzorek nanesený na povrch  
gradientu (5-20% sacharóza)

centrifugace



frakcionace obsahu  
zkumavky

# ***Parametry zonální izokinetické centrifugace***

- používá se k podrobnější charakterizaci částic – přesné stanovení jejich velikosti
- monitorování lze i v průběhu centrifugace

**Rychlost sedimentace závisí na**

- velikosti
- tvaru
- hustotě

**Rychlost sedimentace je ovlivňována**

- vlastnostmi prostředí
- podmínkami centrifugace

# *Sedimentační koeficient*

**Charakterizuje rychlost pohybu částice při centrifugaci**

$$dr/dt = S \cdot a = S \cdot \omega^2 \cdot r$$

**r = vzdálenost od osy otáčení**

**t = doba centrifugace**

**S = sedimentační koeficient**

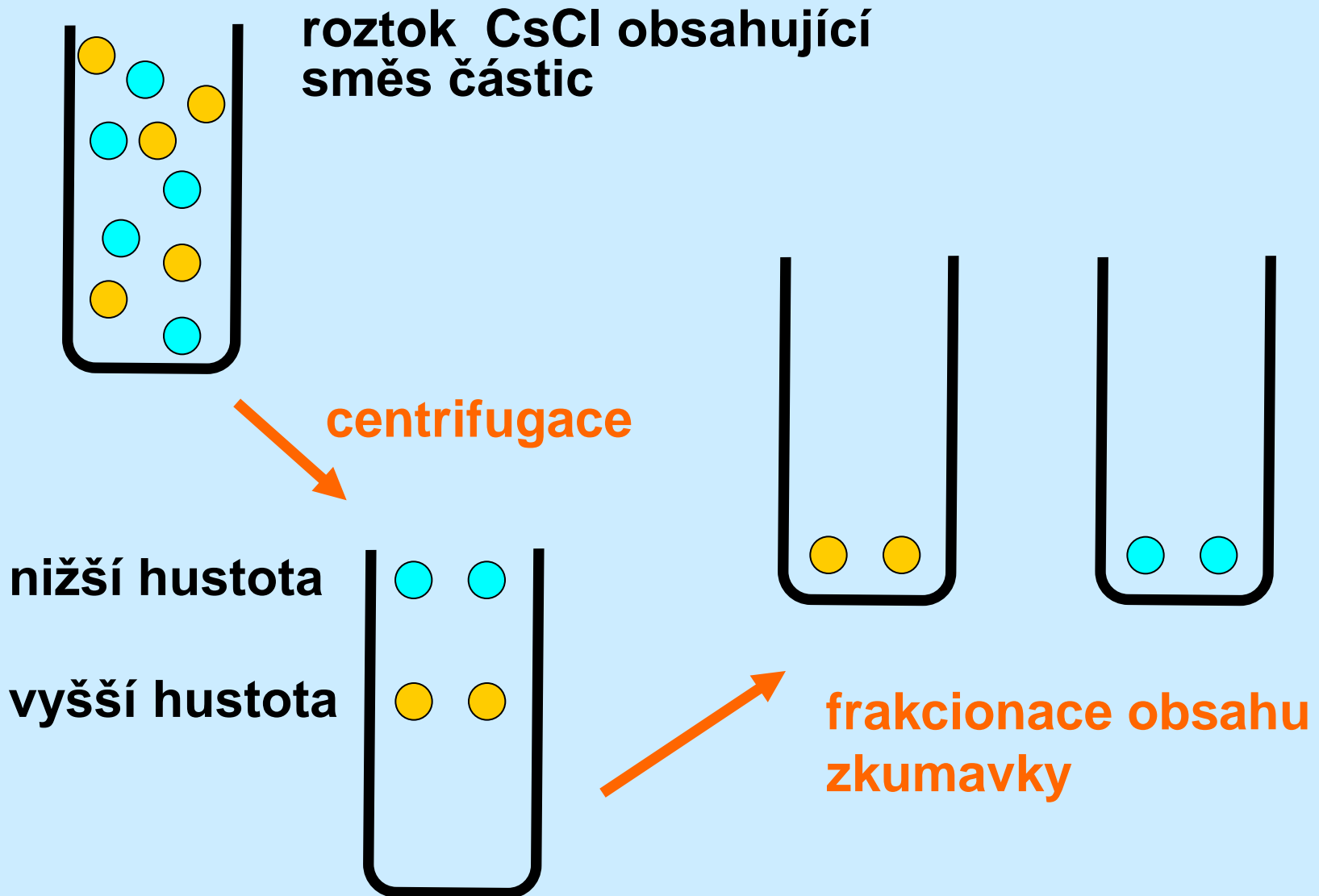
**a = ostředivé zrychlení**

**$\omega$  = úhlová rychlost**

$$1 \text{ Svedberg} = 10^{-13} \text{ sekundy}$$

**23S-rRNA, 16S-rRNA, rib. podjednotky 30S, 50S**

# Izopyktnická centrifugace



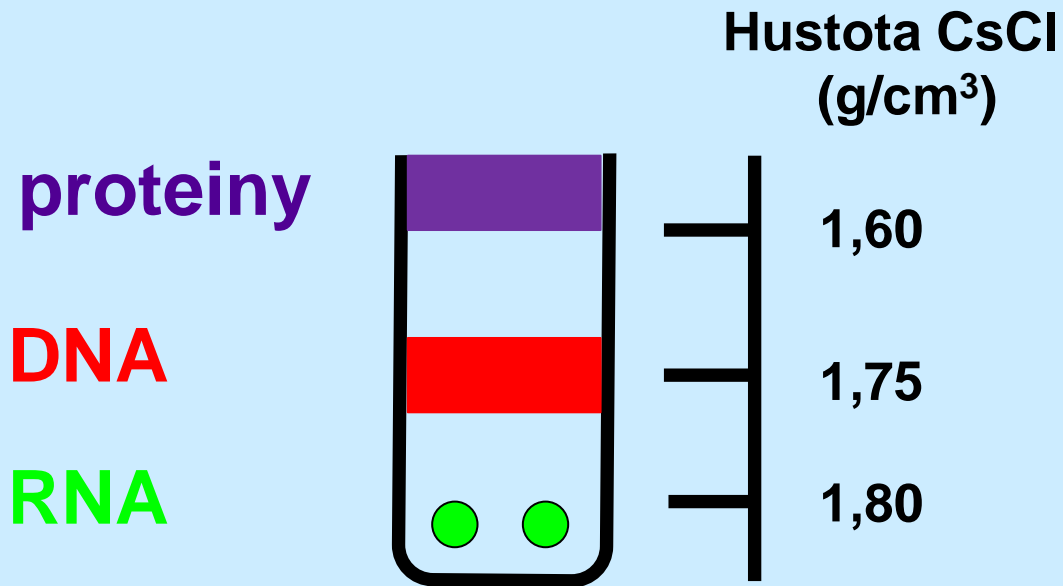
# *Parametry izopyknické centrifugace*

- **centrifugace do rovnováhy**
- **vznášivá hustota – ovlivněna interakcí s ionty roztoku**

## **Využití**

- **analytické = stanovení velikosti nebo hustoty částic**
- **preparativní = izolace dvou druhů DNA**

# *Izopyknická centrifugace a purifikace*



# ***Separace s ethidiumbromidem***

- **Lyzát je „obarven“ ethidium bromidem**
- **Vmezeřením EtBr se sníží vznášivá hustota linerární DNA až o  $0,125 \text{ g/cm}^3$**
- **U kružnicové plasmidové DNA jen o  $0,085 \text{ g/cm}^3$**

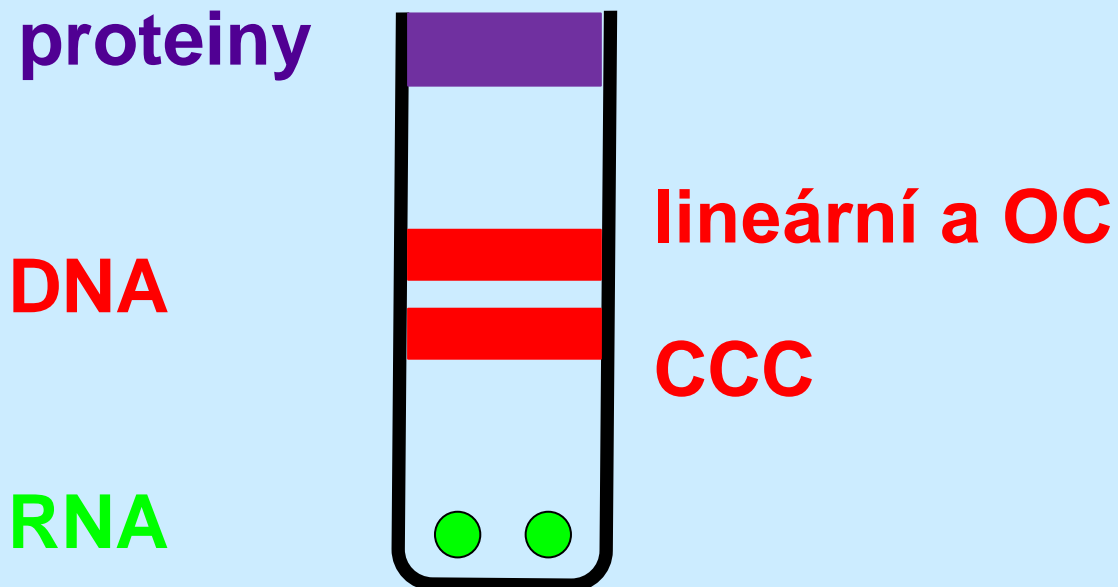


**Vytvoří se dvě zóny s DNA**



# Výsledek po CsCl-EtBr

- Lyzát je „obarven“ ethidium bromidem



# *Purifikace po CsCl-EtBr*

- Lyzát je „obarven“ ethidium bromidem

**EtBr v organické  
fázi**

**DNA ve vodné  
fázi**



**DIALÝZA**

# *Hledání univerzálního protokolu*



**Vyzkoušel jsem leccos, ale takový protokol neexistuje**

**Nespoléhejte se na komerční kity, ale**

- **zvažujte,**
- **experimentujte,**
- **opakujte a**
- **porovnávejte různé procedury**



# ***Protokoly pro bakteriální společenstva***

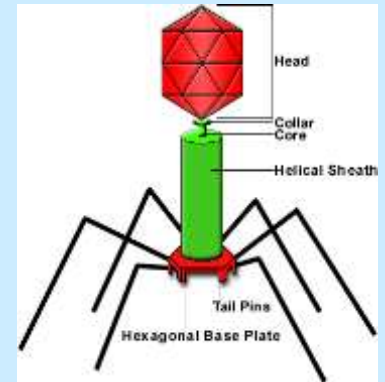
- **Je vhodné kombinovat fyzikální a chemickou cestu odstranění buněčných stěn**
- **Koktejly různých enzymů lepší než enzym jediný**
- **Neexistuje významný vztah mezi výtěžkem a reprezentativností vzorku**
  - ❖ **Můžeme mít protokol, který lyzuje ze 100% jeden druh a druhý vůbec!**
  - ❖ **Jak potom poznáme, co je ve vzorku za mikroorganismy?**
- **Přemýšlejte o použité metodě, neberte to, co je snadno dostupné nebo levné!**

**Weaver J. (2012): DNA extraction: Overcoming obstacles in microbial studies. Biotechniques 10/03/2012**



# *Izolace fágové DNA (RNA)*

- Výchozí materiál není buněčný extrakt
- Většinou stačí deproteinovat



## Základní kroky

- 1) Získání fága o vysokém titru (alespoň  $10^{10}/\text{ml}$ )
- 2) Zahuštění částic v polyethylenglykolu + NaCl
- 3) Purifikace v gradientu CsCl (fág  $\lambda$  - zóna při hustotě  $1,45-1,50 \text{ g/cm}^3$ )
- 4) Dialýza
- 5) Izolace DNA/RNA fenolem nebo proteinázami



# ***Stanovení koncentrace a čistoty***

- 1) Spektrofotometricky**
- 2) Fluorescenčně**

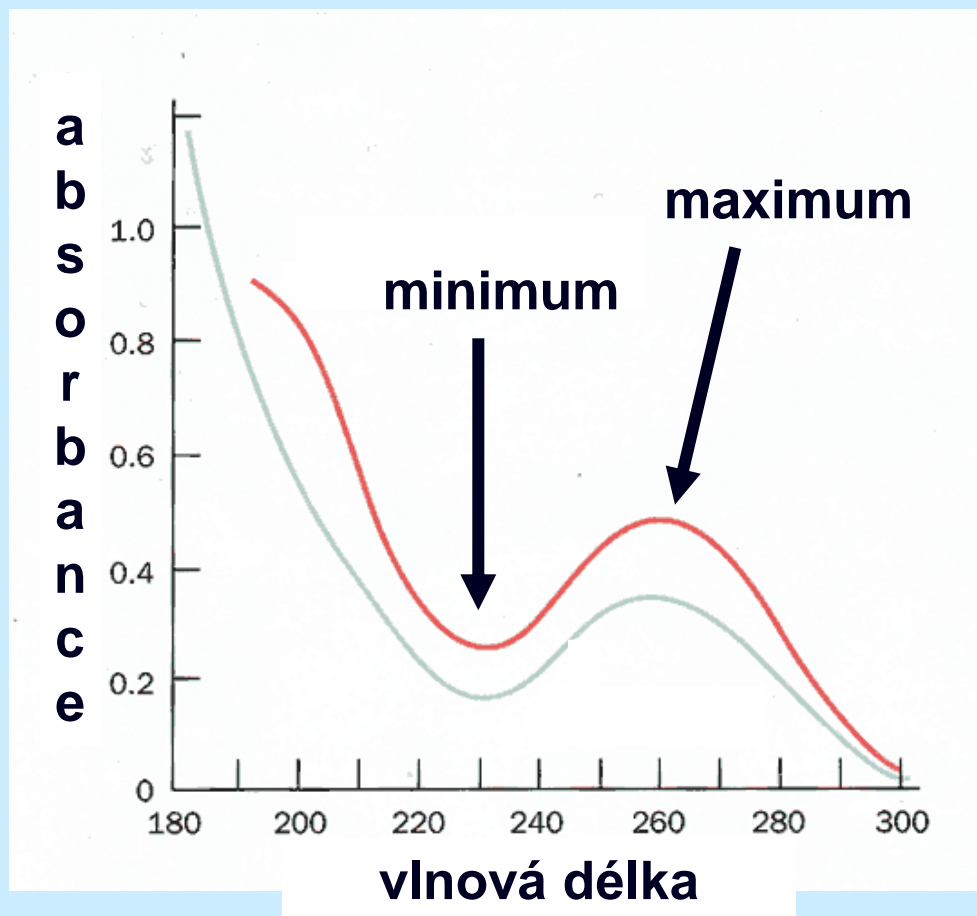


# ***Spektrofotometrická metoda***

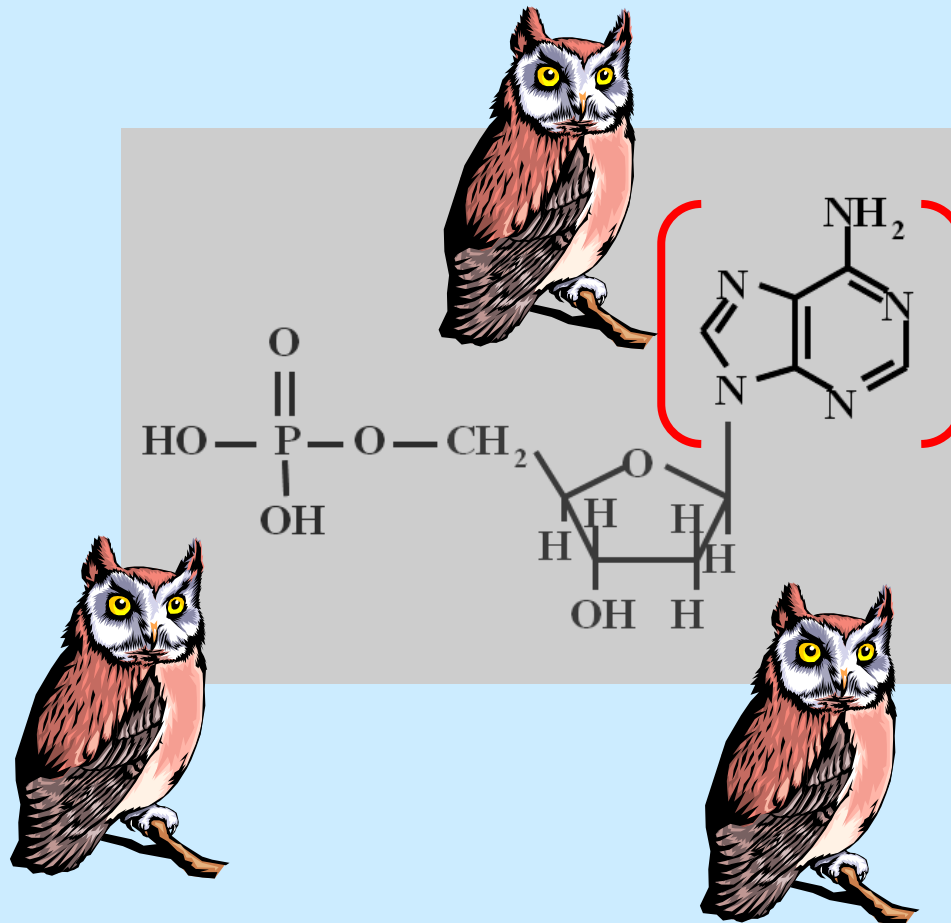
- **čisté vzorky bez většího množství kontaminant**
- **NA absorbují UV záření**
- **maximum absorbance bazí v oblasti 260 nm**
- **optická hustota odpovídá koncentraci**
- **podíl absorbancí = čistota vzorku**

# Spektrum DNA

230 až 320 nm



# *Kterou částí nukleové kyseliny absorbují UV záření?*



# *Koncentrace nukleových kyselin*

$$\text{OD}_{260} = 1,0$$

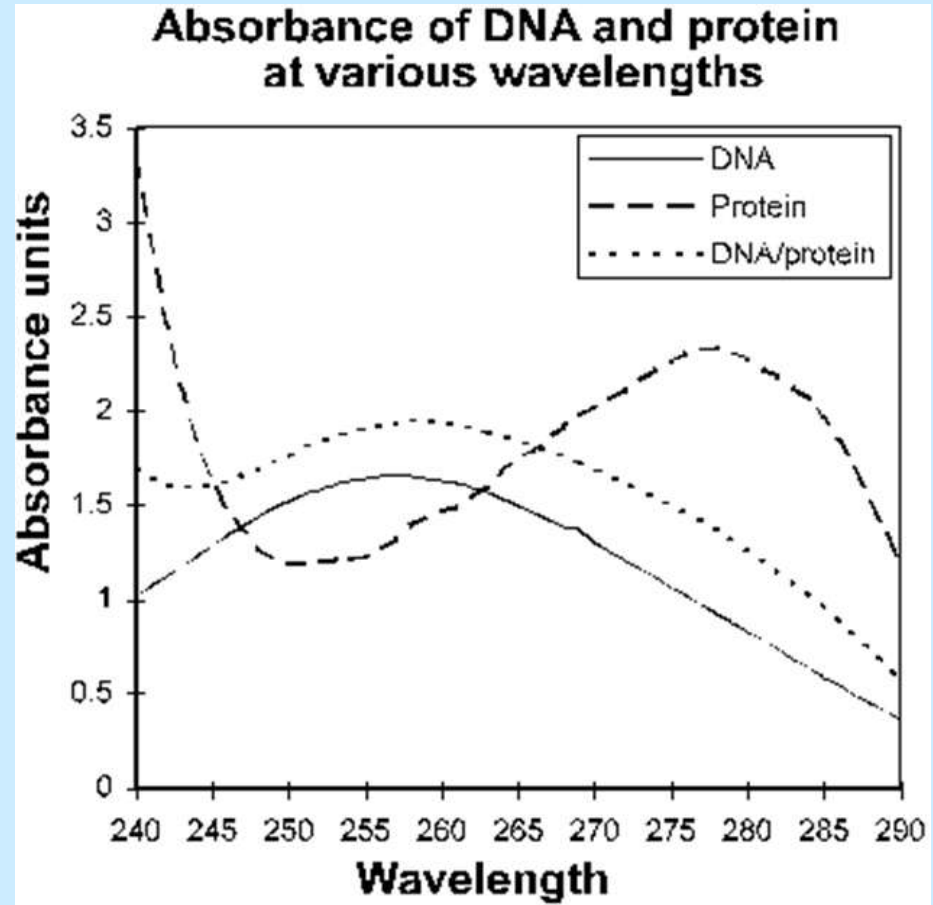
**dsDNA ~ 50  $\mu\text{g/ml}$**

**ssDNA ~ 33  $\mu\text{g/ml}$**

**ssRNA ~ 40  $\mu\text{g/ml}$**

# Čistota DNA

Stanovuje se na základě poměrů absorbancí při různých vlnových délkách



# Čistota DNA

$$OD_{260/A280} = 1,8$$

< 1,8 = kontaminace proteiny

> 1,8 = kontaminace RNA

$$OD_{260/A230} > 2,0$$

< 2,0 = kontaminace látkami, které jsou součástí izolačních souprav

**Prohlédněte si naši výukovou prezentaci, která vám pomůže pochopit problematiku hlouběji**

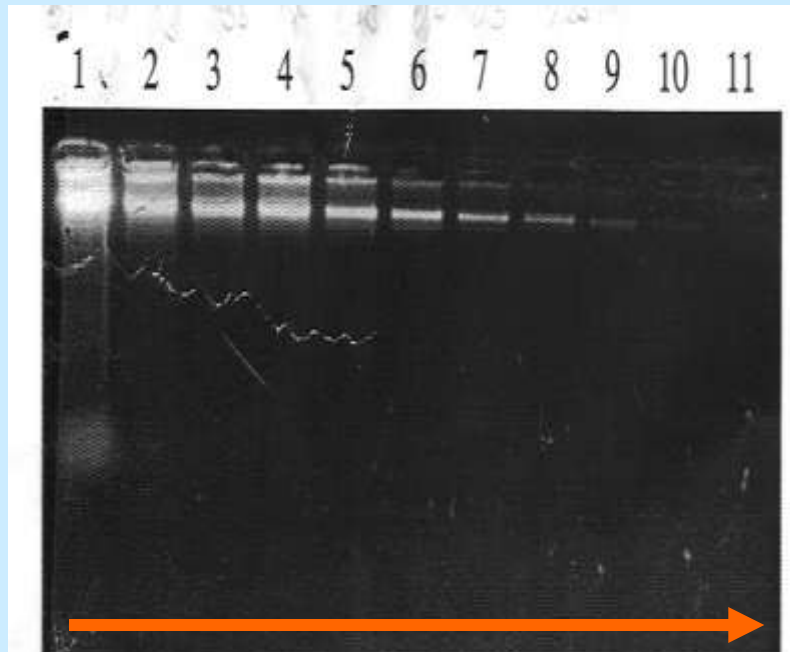


# *Fluorescenční metoda*

- vzorky s nízkou koncentrací NA nebo znečištěné jinými látkami
- porovnání se standardem

DNA

RNA



**Klesající koncentrace DNA**



# *Kolorimetrie*

- využívají specifické reakce nukleových kyselin s jinými sloučeninami
- vzorky porovnáváme se standardy o známé koncentraci
- Po reakci NA s cysteinem a 70% kyselinou sírovou vzniká růžové zbarvení (490 nm) – metoda pochází z roku 1944
- Hydrolýza DNA trichloroctovou kyselinou a reakce s nitrofenylhydrazinem za vzniku hydrazonu (560 nm)
- Nové metody využívají značení luminiscentních barviv a dosahují citlivostí až 1 pg DNA ve vzorku

# ***Shrnutí***

- 1) Základní informace o izolaci nukleových kyselin**
- 2) Sled kroků při izolaci nukleových kyselin**
- 3) Principy centrifugace**
- 4) Specifické postupy ve zvláštních případech**
- 5) Izolace nukleových kyselin z fágů**
- 6) Spektrofotometrická analýza nukleových kyselin**
- 7) Fluorometrické a kolorimetrické stanovení koncentrace DNA**