

Metody v genomice a proteomice

genomika

lekce 1	Izolace DNA a RNA, Separace nukleových kyselin	(P. Procházková Schruppfová)
lekce 2, 3	Manipulace s DNA (štěpení, klonování, značení..)	(M. Fojtová)
lekce 4	Techniky založené na renaturaci DNA	(M. Fojtová)
lekce 5	Sekvenování, analýza genové exprese	(J. Fajkus)
lekce 6	Využití mutantů v genomice	(J. Hejátko)

proteomika

lekce 1	Příprava proteinových izolátů, separace/frakcionace proteinů	(J.Havliš)
lekce 2, 3	Hmotnostní spektrometrie proteinů	(Z. Zdráhal)
lekce 4	Analýza proteinových komplexů	(J. Paleček)
lekce 5	Metody makromolekulární strukturní analýzy	(J. Marek)
lekce 6	Příprava rekombinantních proteinů	(R. Dopitová)

1) Metody izolace nukleových kyselin

- čistota
- výtěžek
- výchozí materiál
(množství, kvalita, typ buněk...)

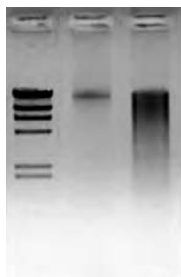
X

- časová náročnost metody
- ekonomická náročnost

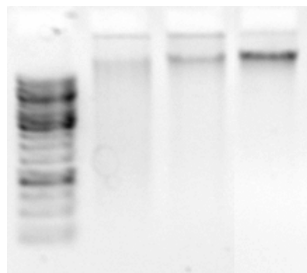
- izolace ve zkumavce
- kity
- automatické roboty



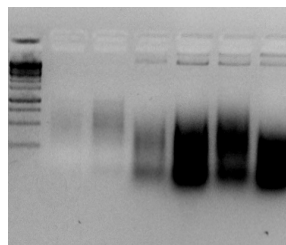
výtěžnost:



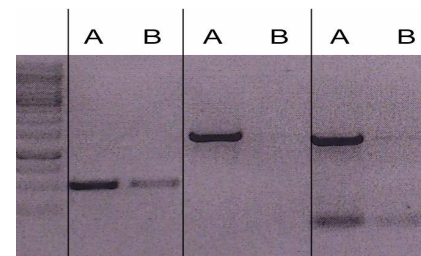
rozpad DNA při izolaci:



znečištění RNA:



čistota DNA pro další aplikace :



Rozrušení buněčných membrán a denaturace proteinů:

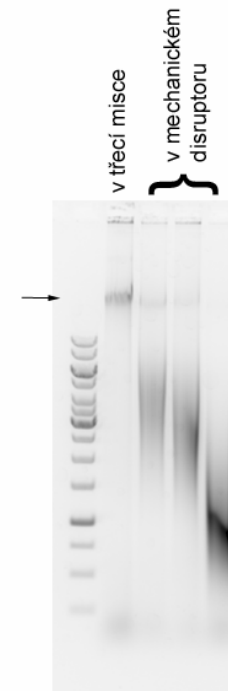
- osmotická lyze: (*E.coli*, živočišné tkáně: krev, mozek...)
- mechanická lyze: (kvasinky, houby, rostliny, živočišné pojivové tkáně..) v třecí misce v tekutém dusíku, skleněné kuličky, tyčové homogenizátory...
- enzymatická lyze: (spóry, kvasinky...) lysozyme, celuláza atd.

- ionogenní detergenty:

 - sodium dodecyl sulfát (SDS)
 - N-laurylsarkosin
 - guanidinium hydrochlorid ...

- neionogenní detergenty: (umožní rozpustit buněčnou membránu při zachování jaderné membrány; izolace plazmidové DNA)

 - Triton X100
 - NP-40...



příklad rozpadu DNA při mechanické lyzi

Inhibitory nukleáz:

EDTA ((etylendiaminotetraoctová kyselina) chelatace dvojmocných iontů (kofaktorů nukleáz))
laurylsíran sodný a N-laurylsarkosin

Odstranění RNA:

RNáza

Odstranění polysacharidů:

rostliny, houby a některé bakterie

Extrakcí s cetyltrimethylamonium bromidem (**CTAB**). Kladně nabitý CTAB se váže s negativně nabitými polysacharidy (pectin, xylan..) V závislosti na koncentraci NaCl dochází k precipitaci DNA nebo kontaminat (při 0.7-0.8 M NaCl jsou polysacharidy vyprecipitovány a DNA zůstává v roztoku).

Odstranění proteinů:

proteinase K

fenol/chloroformová extrakce

F:CH:IAA (25:24:1); protřepat; stočit; odebrat vodnou fázi

CH:IAA (24:1); protřepat; stočit; odebrat vodnou fázi

fenol/chloroformová extrakce

Fenol: sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu (pro DNA pH=7)

Chloroform: organické rozpouštědlo, nemísitelné s vodou, po jeho přidavku dochází k vytvoření dvou fází: horní vodné a dolní organické.

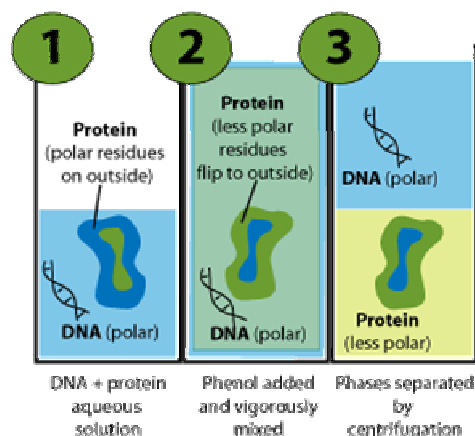
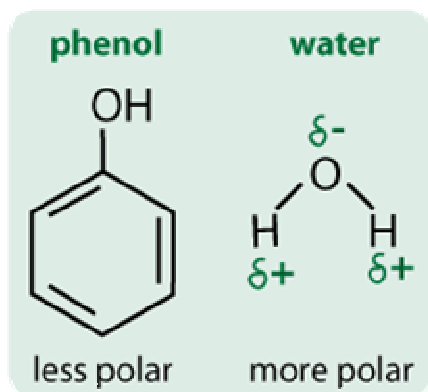
Izoamylalkohol: zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu; po skončení protřepávání přejde fenol do chloroformové fáze.

Protřepáním dojde k mísení fází, po mísení se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou.

Vysrážené **proteiny** jsou na rozhraní fází.

Nukleové kyseliny jsou obsaženy v horní vodné fázi

odstraněny i stopy fenolu v roztoku, které by mohly interferovat např. s použitím enzymů při dalším opracování izolovaných nukleových kyselin.



Izolace DNA

Srážení DNA

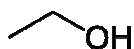
Adsorpce na silikát

Izolace DNA

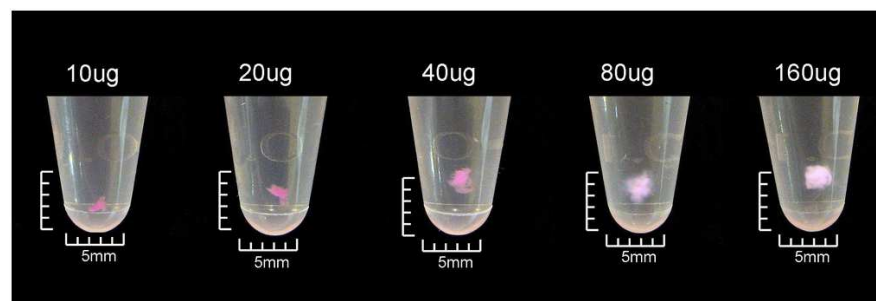
Srážení DNA v nevodném prostředí

Ethanol

Izopropylalkohol



- díky elektrostatickým interakcím je polární molekula **DNA snadno rozpustná v polární H₂O**
- kationty solí** (např. Na⁺, Mg²⁺, Li⁺...) **neutralizují náboj** cukr-fosfátového řetězce DNA (PO₃⁻); **DNA** se stává méně hydrofilní, tedy **méně rozpustnou v H₂O**
- elektrostatický náboj mezi ionty je v H₂O** díky vysoké dielektrické konstantě **nízký** (ionty solí jsou víceméně volné (obklopené molekulami H₂O), netvoří iontové páry); **ethanol** má nižší dielektrickou konstantu a **umožní** tak **zformování iontových párů DNA-kationt**



Isopropanol vs. EtOH

- **Isopropanol** má nižší dielektrickou konstantu než EtOH tzn. DNA se **sráží rychleji a při nižším množství** isopropanolu (35% isopropanol vs. 75% EtOH při 0.5M soli)
- Během srážení **isopropanolem** dochází k **precipitaci většího množství solí** než s EtOH
- Při použití EtOH je nutná vyšší koncentrace DNA, aby došlo ke srážení; avšak soli zůstávají rozpustné (i při nízkých teplotách).
- Protože DNA při koncentracích nižších než 20ng/ml precipituje až při teplotě 0-4°C, doporučuje většina protokolů mix **DNA/sůl/EtOH** ponechat srážet **-20°C O/N** nebo **-80°C / 1h**. Avšak stačí **15-30min/led**. Mix s **isopropanolem se nedoporučuje chladit**, protože dochází k precipitaci zbytečně velkého množství solí.
- **Odstranění přebytečných solí** (bílé zbarvení peletu) stačí oplach peletu 70% EtOH (DNA se začíná rozpouštět při 65%EtOH).

Výběr solí

Acetát sodný (0.3M výsl. konc., pH 5.2)

Chlorid sodný (0.2M výsl. konc.) pro vzorky s SDS, aby SDS neprecipitoval s EtOH (např. izolace plazmid DNA...); [ale Cl⁻ ionty mohou inhibovat následné proteinovou syntézu (např. polymerace, in vitro translace...)]

Chlorid lithný (0.8M výsl. konc.) vhodné pro izolaci RNA; selektivně precipituje plnodélkové RNA transkripty

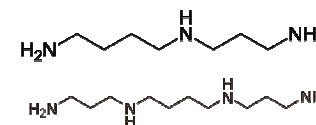
Acetát amonný (2M výsl. konc.) vhodné pro odstranění dNTP; ale amonné ionty inhibují např. T4 PNK

Izolace DNA

Srážení DNA ve vodném prostředí

polyaminy:

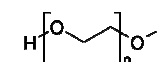
spermidine
spermine



- vysoce selektivní precipitace DNA (nevhodné pro genomovou DNA, ne <50bp)
- pokud se chcete vyhnout F:CH:IAA extraci
- vhodné pro izolaci DNA-vazebných proteinů
- odmytí polyaminu oplachem peletu koncentrované solii (např. LiCl, NaOAc...)

polyether:

PEG



- vhodné pro délkově selektivní DNA precipitaci
- hůře precipituje nízkomolekulární DNA (<150bp)
- různé molekul. hmotnosti PEG 300 g/mol až 10,000,000 g/mol
- odmytí PEG oplachem peletu EtOH

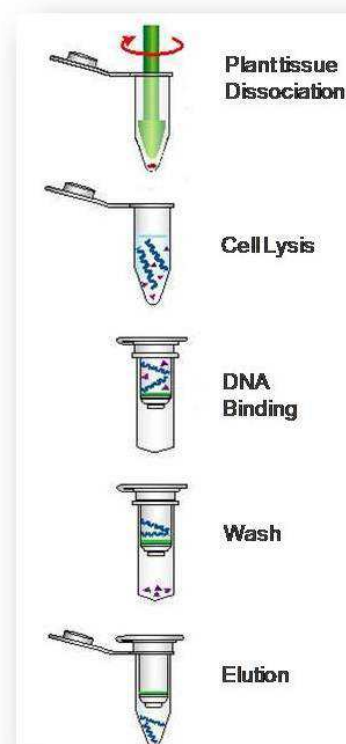
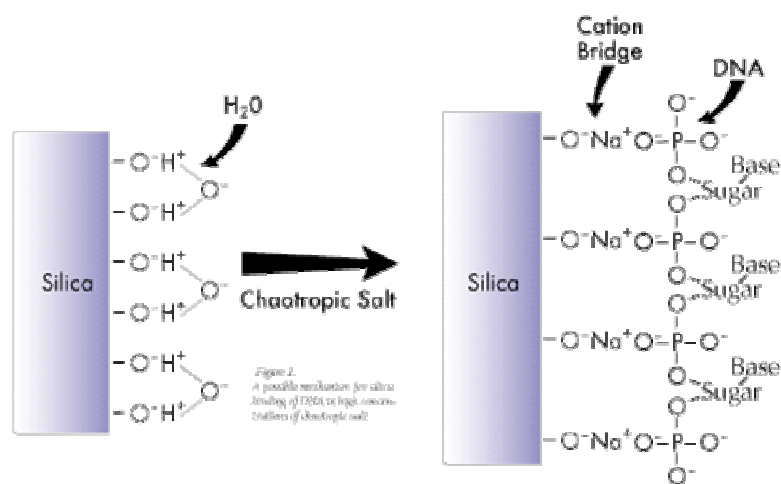
např.: % PEG 8000 -- odstranění fragmentů menších než:

- 10% -- <300bp
- 6% -- <500bp
- 5% -- <700bp
- 4% -- <1kb

Izolace DNA

Adsorpce na silikát

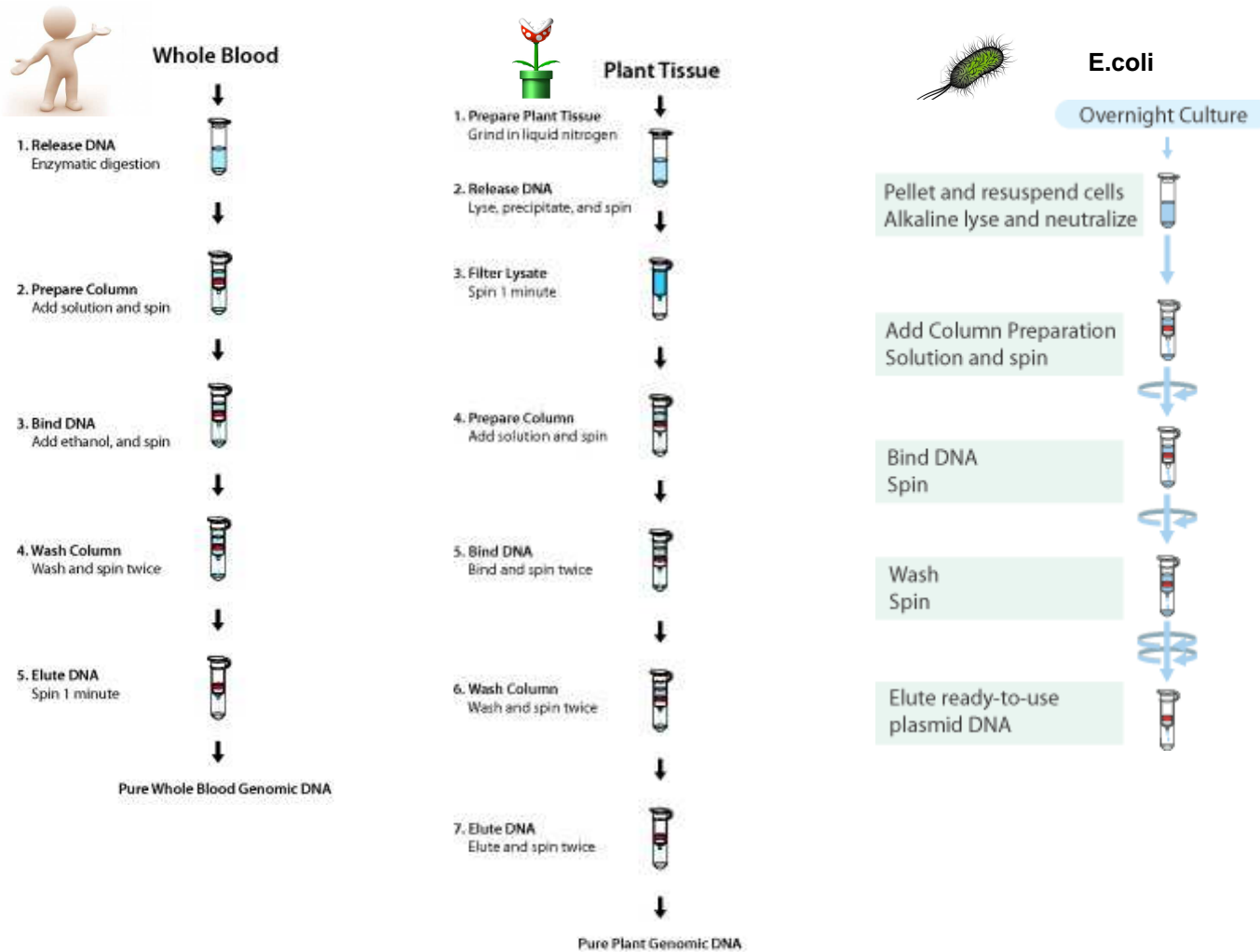
DNA se v přítomnosti chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch



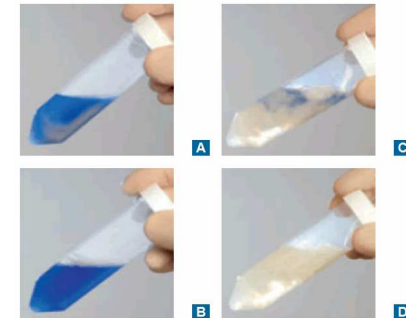
eluze H₂O (vhodné pro další použití (in vitro translace atd.))
TE pufrem (DNA je stabilnější)

kity pro izolaci DNA (rostlinné, živočišné...)
 RNA (celková, mRNA...)
 plazmidové DNA
 odstranění krátkých oligo (např. dNTP po PCR reakci)
 izolace z DNA gelu...

a jejich výhody /nevýhody



- nutná řádná lyze
- nepřekračovat kapacitu kolon



Izolace rostlinné genomové DNA

- homogenizace v třecí misce
- nutno odstranit zbytky buněčných stěn
- izolace v SDS / CTAB pufru

NucleoSpin® Plant II	Mini	Midi	Maxi
1 Homogenize samples	100 mg	400 mg	1500 mg
2 Cell lysis	400 µL PL1 10 µL RNase A 65°C, 10 min ALTERNATIVELY 300 µL PL2 10 µL RNase A 65°C, 10 min 75 µL PL3 on ice, 5 min	1.7 mL PL1 25 µL RNase A 65°C, 10 min ALTERNATIVELY 1.5 mL PL2 25 µL RNase A 65°C, 15 min 200 µL PL3 on ice, 5 min	6 mL PL1 100 µL RNase A 65°C, 10 min ALTERNATIVELY 5.3 mL PL2 100 µL RNase A 65°C, 20 min 700 µL PL3 on ice, 5 min
3 Filtration / Clarification of lysate	≥ 11,000 x g, 2 min	4,500 x g, 10 min	4,500 x g, 10 min
4 Adjust DNA binding conditions	450 µL PC	2.3 mL PC	10 mL PC
5 Bind DNA	≥ 11,000 x g, 1 min	4,500 x g, 2 min	4,500 x g, 2 min
6 Wash and dry silica membrane	1st 400 µL PW1 ≥ 11,000 x g, 1 min 2nd 700 µL PW2 ≥ 11,000 x g, 1 min 3rd 200 µL PW2 ≥ 11,000 x g, 2 min	1st 1 mL PW1 4,500 x g, 2 min 2nd 3 mL PW2 4,500 x g, 2 min 3rd 1 mL PW2 4,500 x g, 10 min	1st 4 mL PW1 4,500 x g, 2 min 2nd 10 mL PW2 4,500 x g, 2 min 3rd 2 mL PW2 4,500 x g, 10 min
7 Elute DNA	50 µL PE 65°C, 5 min ≥ 11,000 x g, 1 min Repeat elution step	200 µL PE 65°C, 5 min 4,500 x g, 2 min Repeat elution step	1000 µL PE 65°C, 5 min 4,500 x g, 2 min Repeat elution step

Table 2: Plant species tested with NucleoSpin® Plant II

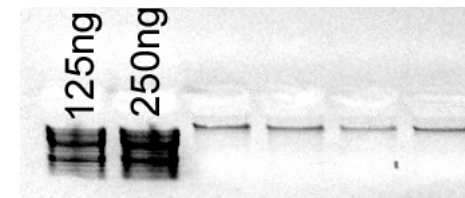
Plant species	Plant tissue / organ	Lysis Buffer successfully tested	
		CTAB	SDS
<i>Abies alba</i> (fir)	Needle	✓	✓
<i>Amorphophallus titanum</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Apium graveolens</i> (celery)	Corm	✓	✓
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Leaf	✓	✓
<i>Boreava orientalis</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Cleisostoma racemiferum</i>	Inflorescence rachis, silica-gel dried	✓	Not tested
<i>Doritis pulcherrima</i>	Leaf, silica-gel dried	✓	Not tested
<i>Eichornia azurea</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Encephalartos natalensis</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Galium aparine</i>	Leaf	✓	✓
<i>Hordeum</i> sp. (barley)	Leaf	✓	✓
<i>Isatis kotschyana</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Laurus azorica</i> (laurel)	Leaf	✓	Not tested
<i>Lupinus</i> sp. (lupin)	Leaf	✓	✓
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	Stem	✓	✓
<i>Myagrum perfoliatum</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Oryza sativa</i> (rice)	Leaf	✓	✓
<i>Persea feru./caerulea</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Pteridium</i> sp.	Leaf	✓	Not tested
<i>Pterocarya fraxinifolia</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Rosa</i> sp. (rose)	Leaf	✓	✓
<i>Rubus fruticosus</i> (blackberry)	Leaf	✓	✓
<i>Sameraria nummularia</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Secale</i> sp. (rye)	Leaf	✓	✓
<i>Stereochilus</i> sp.	Leaf, silica-gel dried	✓	Not tested
<i>Tauscheria lasiocarpum</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Trachycarpus takil</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Trichoglossis</i> sp.	Leaf, silica-gel dried	✓	Not tested
<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	Leaf	✓	✓
<i>Vigna radiata</i> (mung bean)	Root	✓	✓
<i>Zea mays</i> (malze)	Leaf	✓	✓
<i>Zea mays</i> (maize)	Grain, dried, ground	✓	✓

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6-8 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-270 · Fax: +49 24 21 969-199 · tech-bio@mn-net.com · www.mn-net.com



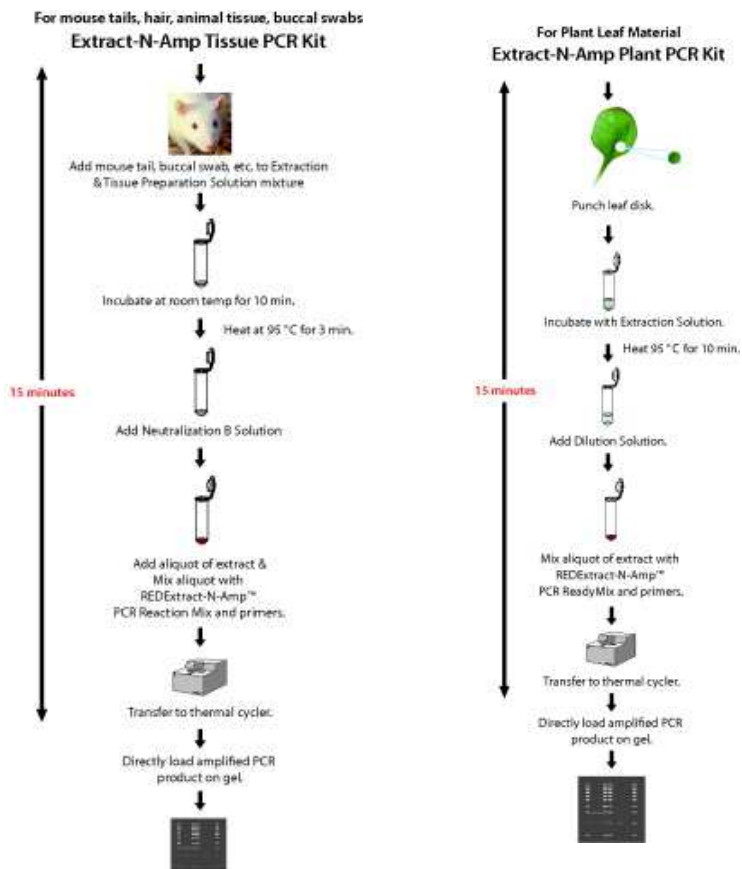
Typical yield	1–30 µg	10–100 µg	50–300 µg
---------------	---------	-----------	-----------

toto není slibovaných x ug DNA

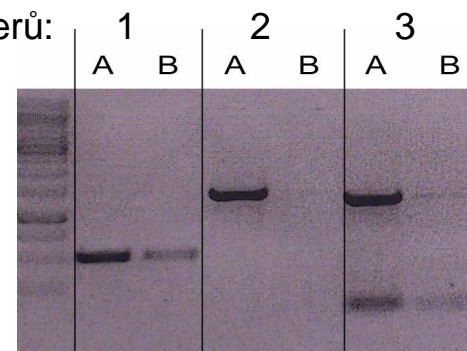


výtěžnost genomové DNA udaná výrobcí a realita se mohou lišit o řád(y)

"rychlo-izolace" DNA vhodná pro přímou PCR



dvojice primerů:



A-izolace kitem
 B-"rychlo-izolace"

- u rostlin přímá izolace genomové DNA z listového disku a následná PCR nefunguje příliš dobře -záleží spíše na konkrétní kombinaci primerů

RNA

Zhruba 95% objemu NK v buňce tvoří RNA.

odstranění RNA: po izolaci NK přidám RNázu (nutno znovu přechistit F:CH extrakcí, vysrážet DNA EtOH)

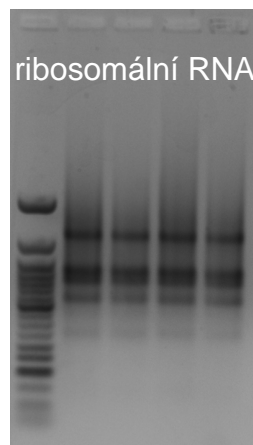
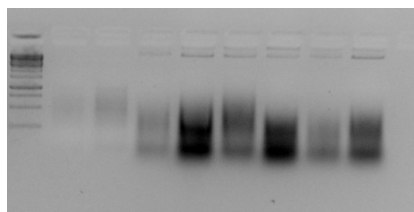
izolace RNA: stejný postup jako u DNA

Pro extrakci se používá kyselý fenol pH=4 (DNA přejde do organické fáze a ve vodné fázi zůstane spíše RNA)

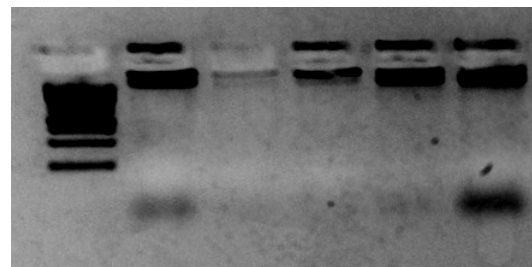
RNázy - všudypřítomné a velmi odolné enzymy, štěpící RNA. Materiál i vodné roztoky musí být zbaveny RNáz (oplach EtOH, DEPC (Diethylpyrocarbonát; kovalentně modifikuje His, Cys a Tyr))

Skladování RNA vždy při -70 °C (ochrana proti působení RNáz)

až 95% celkové NK tvoří RNA



špatně RNázovaná genomová DNA



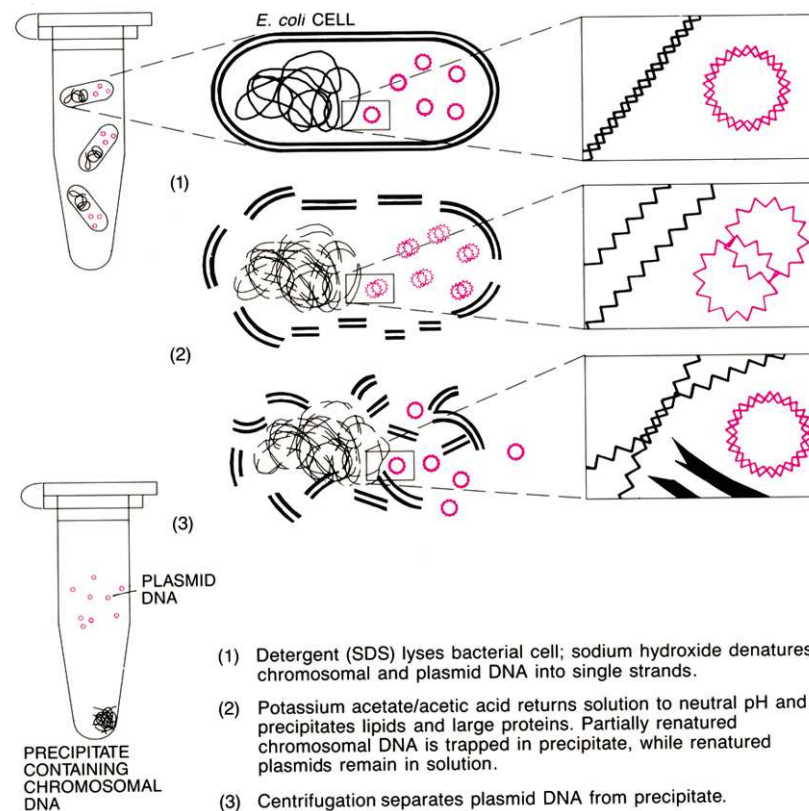
Izolace plasmidové DNA

Separace plasmidové DNA a bakteriální genomové DNA, založena na rozdílné velikosti molekul

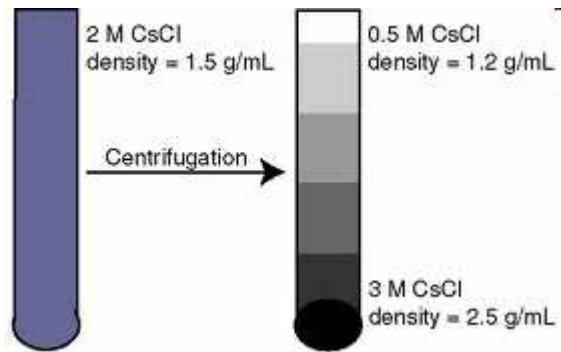
„Birnboimova metoda“

- alkalická **denaturace** (pH=12) v přítomnosti SDS – denaturuje plasmidová i bakteriální DNA
- **neutralizace** (KAc, pH 5.5) – **plasmid renaturuje, dlouhá bakteriální DNA ne**
- **centrifugace** – plasmidová DNA v roztoku, genomová DNA je vázána na proteiny, které v tomto prostředí precipitují
- (RNase A), precipitace ethanolem

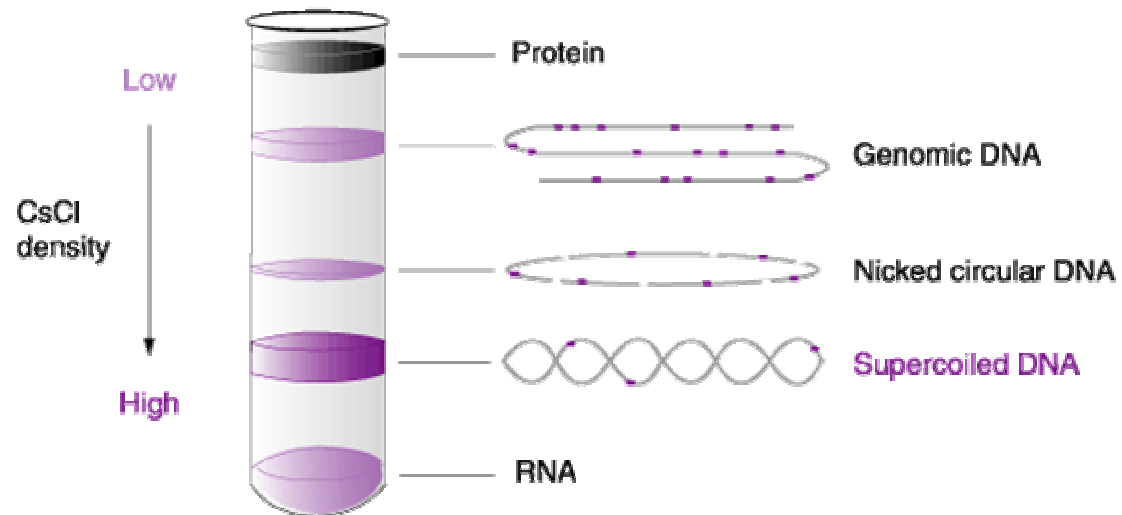
Kolonkové kity – založeny na tomto principu + kolonka



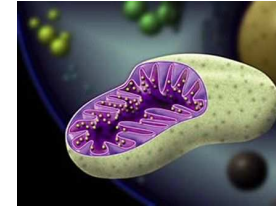
Izolace DNA pomocí CsCl gradientu



300 000 x g, 12 hodin
v zatavených polypropylenových zkumavkách
v přítomnosti EtBr



Izolace mitochondriální DNA



osmotická lyze buněk v pufru pH=7

(rostlinná tkáň: sacharóza nebo mannitol 0.2–0.5 M, živočišná tkáň: 0.15 M KCl)

EDTA- inhibuje proteolytické enzymy

BSA (Bovine serum albumin) - vychytává fenolické látky uvolněné např. z vakuol, váže mastné kys, inhibice proteáz..

PVP (Polyvinylpyrrolidone) - absorbuje fenolické látky

diferenční centrifugace

1) ctfg.krátce s nízkými otáčkami např. 3000 g / 5–10 min.;

pelet: obsahuje zbytky buněčných stěn, jádra, intaktní plastidy, škrobová zrna...

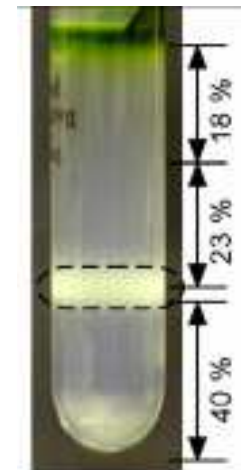
supernatant: mitochondrie...

2) ctfg. dlouze a delší čas (např. 10,000 g / 10–20 min.); hrubý mitochondriální extrakt

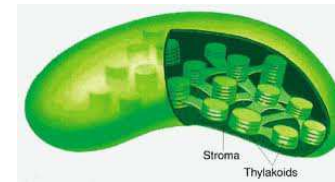
pelet: obsahuje mitochondrie, peroxizómy, zbytky membrán plastidů

gradientová centrifugace

ctfg. v gradientu roztoku Percolu. Intaktní mitochondrie vytvoří separovaný prstenec oddělený od ostatních kontaminant zhruba v 25–30%.



Izolace chloroplastové DNA

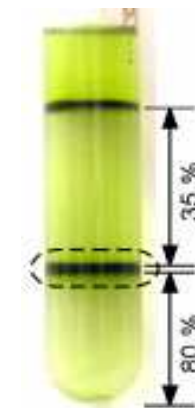


diferenční centrifugace

1) ctfg.krátce s nízkými otáčkami (např. 1500 g / 15 min.);
pelet obsahuje plastidy, zbytky buněčných stěn, jádra,
škrobová zrna

gradientová centrifugace

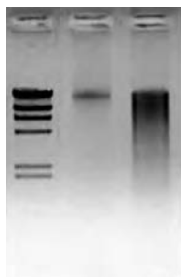
ctfg. v gradientu roztoku Percolu (např. 2600g/14h nebo 3
6500g/1h) Chloroplasty vytvoří separovaný prstenec
oddělený od ostatních kontaminant mezi 35-např.55%.



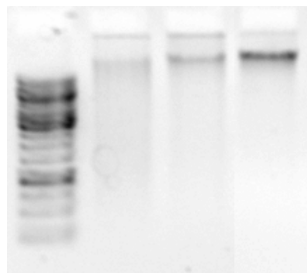
2) Elektromigrace

- metoda využívaná k **separaci makromolekul** na základě **náboje, konformace nebo velikosti**
- migrace nabité částice v elektrickém poli je **úměrná** jejímu **celkovému náboji, velikosti a tvaru**

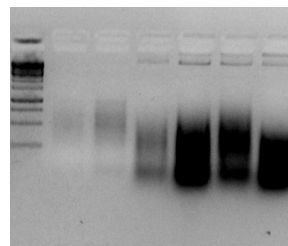
výtěžnost:



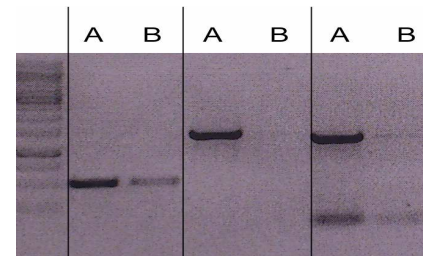
rozpad DNA při izolaci:



znečištění RNA:



čistota DNA pro další aplikace :



2) Elektromigrace

- metoda využívaná k **separaci makromolekul** na základě **náboje, konformace nebo velikosti**
- migrace nabité částice v elektrickém poli je **úměrná** jejímu **celkovému náboji, velikosti a tvaru**

$$v = q \cdot E / f$$

rychlost

celkový náboj

intenzita el. pole

frikční (třecí) koeficient
(popisuje tvar a velikost molekuly)

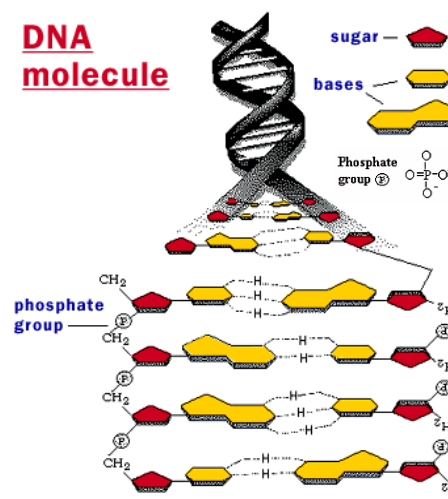
2) Elektromigrace

- metoda využívaná k **separaci makromolekul** na základě **náboje, konformace nebo velikosti**
- migrace nabité částice v elektrickém poli je **úměrná** jejímu **celkovému náboji, velikosti a tvaru**

$$v = q \cdot E / f$$

rychlost \swarrow v
 \swarrow q celkový náboj
 \swarrow E intenzita el. pole
 \swarrow f frikční koeficient
 (popisuje tvar a velikost molekuly)

Celkový náboj molekuly:



$pI > pH$ kladný náboj
 $pI < pH$ záporný náboj

- malé částice s velkým nábojem – velká pohyblivost
- velké částice s malým nábojem – malá pohyblivost

2) Elektromigrace

- metoda využívaná k **separaci makromolekul** na základě **náboje, konformace nebo velikosti**
- migrace nabité částice v elektrickém poli je **úměrná** jejímu **celkovému náboji, velikosti a tvaru**

$$v = q \cdot E / f$$

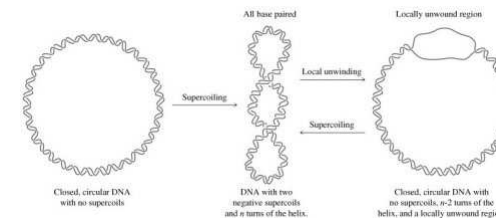
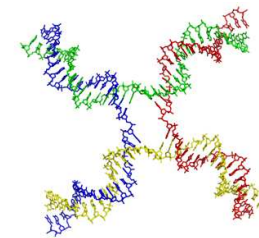
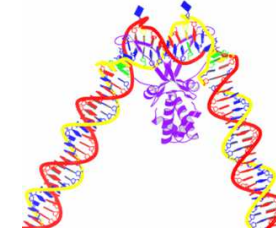
rychlost

celkový náboj

intenzita el. pole

frikční koeficient
(popisuje tvar a velikost molekuly)

Tvar: ohyby, struktury...



2) Elektromigrace

- metoda využívaná k **separaci makromolekul** na základě **náboje, konformace nebo velikosti**
- migrace nabité částice v elektrickém poli je **úměrná** jejímu **celkovému náboji, velikosti a tvaru**

$$v = q \cdot E / f$$

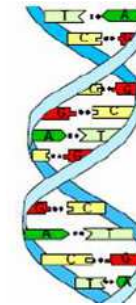
rychlost

celkový náboj

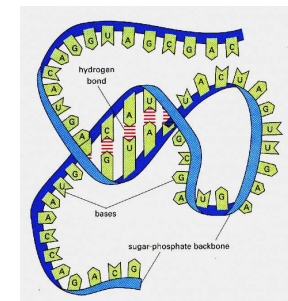
intenzita el. pole

frikční koeficient
(popisuje tvar a velikost molekuly)

DNA vs. RNA



X



Elektroforéza

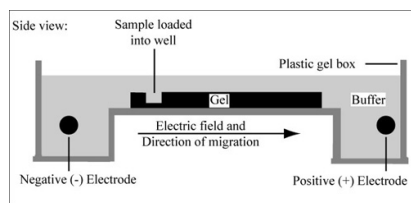
- agarózová

vhodné pro rozlišení dlouhých fragmentů DNA a RNA (1kb ssDNA ~ 330 kDa)
(>400 bp)

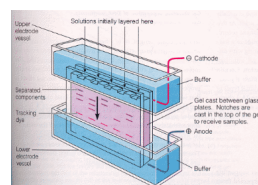
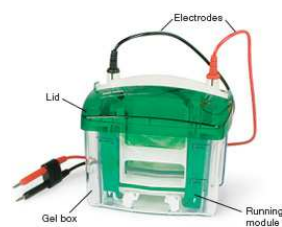
- polyakrylamidová

vhodné pro rozlišení krátkých fragmentů DNA nebo sekvencí lišících se záměnou jednoho nukleotidu (<400 bp)

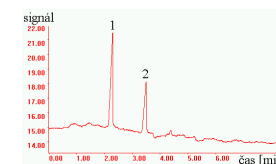
- horizontální



- vertikální



- kapilární



Agaróza:

většinou horizontální separace

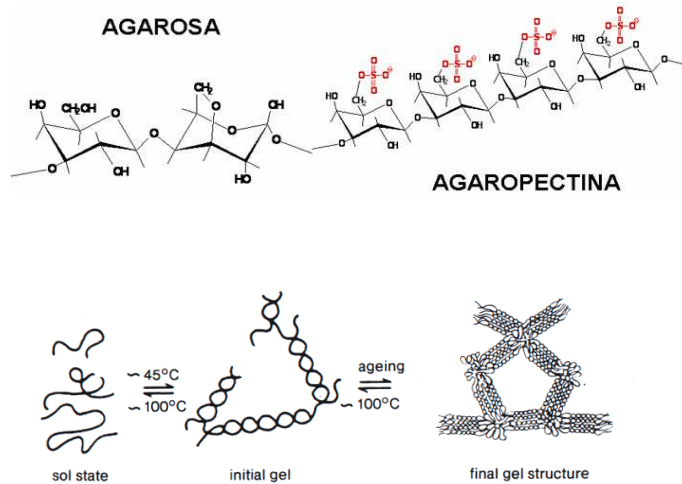
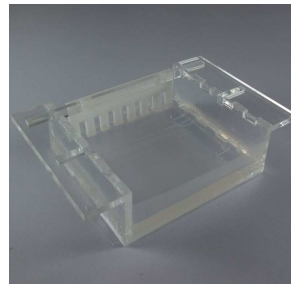
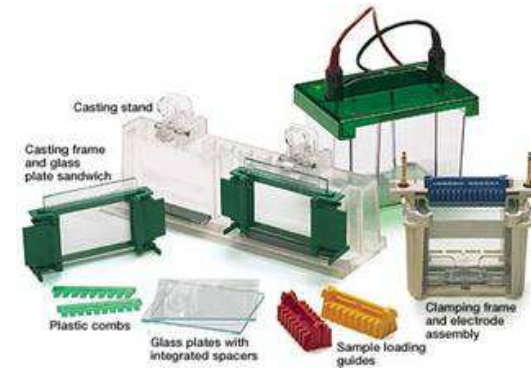
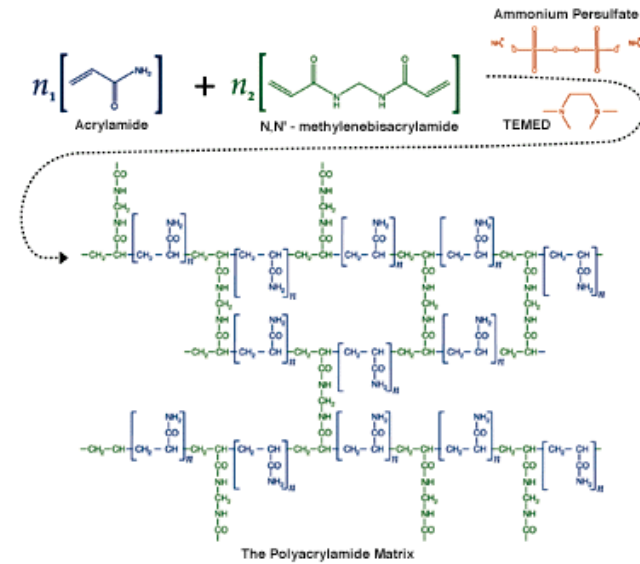


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Lääs, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)



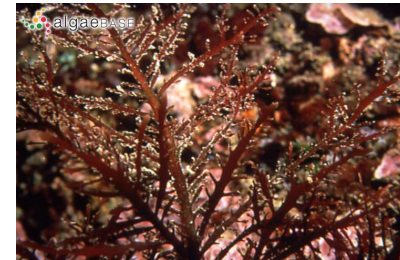
Polyakrylamid:

většinou vertikální separace



agarózová elektroforéza

- **agar** se získává z buněčných stěn červených řas
- slovo agar pochází z malajského slova agar-agar = medúza



agar je směsí agarózy a agaropektinu

- **agaróza** je neutrální lineární polymer agarobiózy (disacharid D-galaktóza and 3,6-anhydro-L-galaktopyranóza)
- **agaropektin** je heterogenní směsí malých větvených molekul s navázanými sulfáty, které se oddělují od agarózy pomocí náboje

Terciární struktura agarózy je dvojšroubovice se schopností akomodovat vysoké množství vody (až 99.5%).

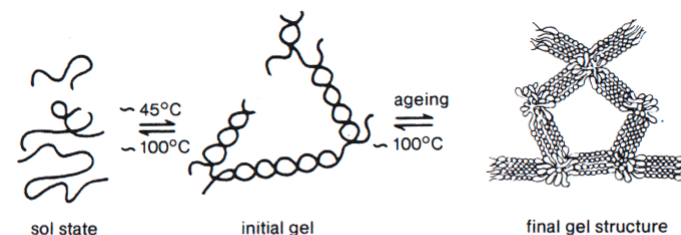
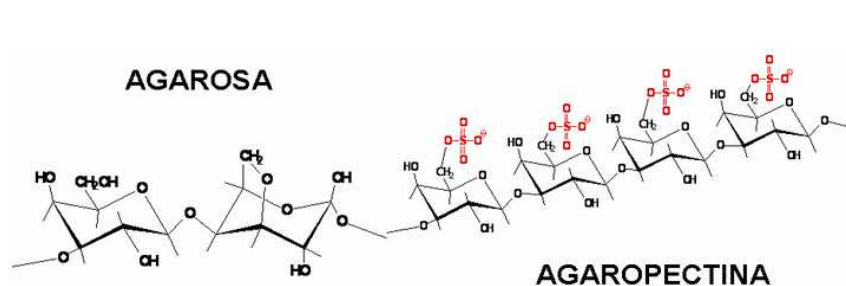


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)

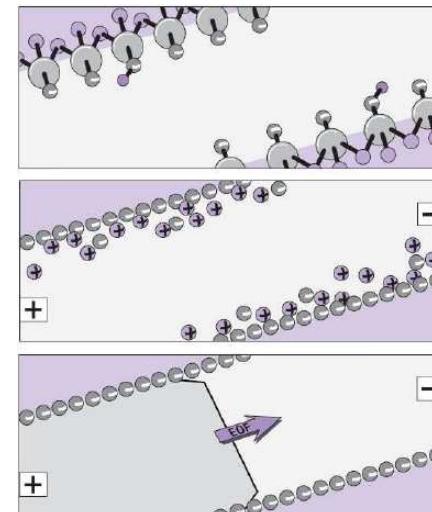
EEO - Elektroendoosmóza

Agaróza je prodávána v **několika úrovních čistoty** podle množství **zbytkových nabitých sulfátových a karboxylových skupin**, jejichž ionty mohou migrovat ke katodě a způsobovat jev zvaný elektroendoosmóza (EEO).

- V přítomnosti nabitých sulfátových a karboxylových skupin vzniká elektrická dvojrstva
- Mobilní část **iontů se pohybují směrem k elektrodě**, dochází ke vzniku proudění
- EEO je způsobena **tokem vody**, která je pod vlivem těchto volných iontů unášena směrem ke katodě.
- Dochází k **neselektivnímu a tedy nežádoucímu pohybu částic**

SIGMA-ALDRICH

Product #	Product Name	Grade	EEO	Transition Temp.	Gel Strength	Anion Traces	Add to Cart
A2576	Agarose Type IX-A, Ultra-low Gelling Temperature		≤0.12	gel point ≤20 °C	≥300 g/cm ² (1.5% gel)	sulfate (SO ₄ ²⁻): ≤0.14%	pricing
A7174	Agarose Type VI-A, High Gelling Temperature		≤0.14	gel point 41 °C ±1.5 °C	≥1200 g/cm ² (1.5% gel) ≥900 g/cm ² (1% gel)	sulfate (SO ₄ ²⁻): ≤0.20%	pricing
A7299	Agarose Type XII		≤0.14	gel point 41 °C ±1.5 °C	≥500 g/cm ² (1% gel) ≥900 g/cm ² (1.5% gel)	sulfate (SO ₄ ²⁻): ≤0.20%	pricing
A5304	Agarose for electrophoresis	Electrophoresis	≤0.40	gel point 36 °C ±1.5 °C	≥700 g/cm ² (1% gel)	sulfate (SO ₄ ²⁻): ≤0.30%	pricing



Rozlišení agaróz:

Low-melting agarózy

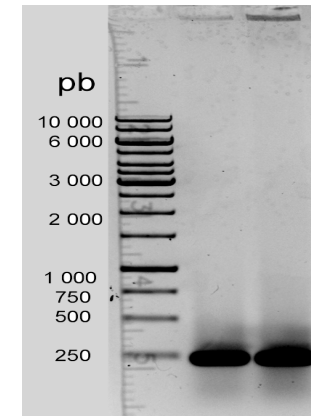
Snížený bod tání ze standardních ~90°C na nižší teploty

- zvýšení koncentrace agarósového gelu na koncentraci až ~4%, vhodné pro separaci menších molekul DNA
- méně "pevné" gely
- izolace DNA z gelu bez DNA denaturace
- in-gel PCR
- in-gel ligace

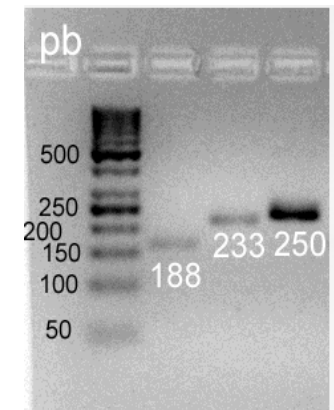
Agarósa pro "pevné" gely

- pulsed field gel elfo. (PFGE)
viz. dále

"běžná" agaróza



low-melting agaróza



	AquaPor LE	AquaPor LM	AquaPor HR	AquaPor ES
EEO (-m)	≤ 0.12	≤ 0.05	≤ 0.12	≤ 0.05
Gel Strength (g/cm ²)	≥ 1200 @ 1.0%	≥ 450 @ 1.0% ≥ 1700 @ 3.0%	≥ 400 @ 1.5% ≥ 1100 @ 3.0%	≥ 1700 @ 1.0% ≥ 3200 @ 1.5%
Gel Temp (°C)	≤ 37 @ 1.0%	≤ 27 @ 1.5%	≤ 26 @ 1.5% ≤ 35 @ 3.0%	≤ 40 @ 1.5%
Melt Temp (°C)	≤ 92 @ 1.0%	≤ 65 @ 1.5%	≤ 66 @ 1.5% ≤ 75 @ 3.0%	≤ 86 @ 1.5%
Sulfate (%)	≤ 0.20	≤ 0.20	≤ 0.20	≤ 0.20
DNase, RNase, Protease	None	None	None	None

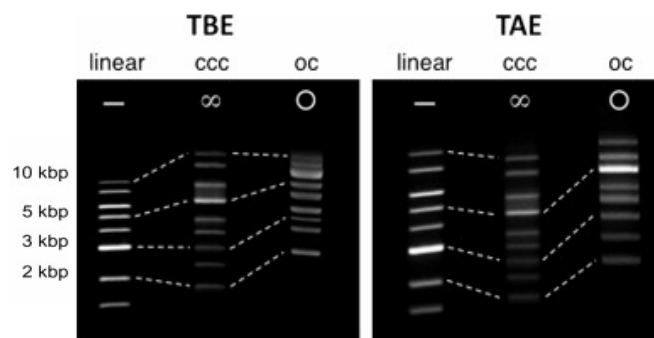
Nejčastěji používané pufry:

TBE Tris/kyselina boritá/EDTA

- optimální pro rozlišení molekul fragmentů DNA od 0.1- to 3-kb
- kys. boritá je silný inhibitor mnoha enzymů
- vhodná při vysokém napětí (>150 V)

TAE Tris/kyselina octová/EDTA

- optimální pro rozlišení DNA od 12 kb to 50 kb
- má nižší pufrovací schopnost než TBE, ale je možno použít separovanou DNA pro další enzymatické aplikace (při vyloučení EDTA)
- při nižším napětí dostaneme lepší rozlišení
- TAE pufr je vhodný pro separaci DNA s nadšroubovicovitým vinutím



pozn.: při separaci DNA s nadšroubovicovitým vinutím nutno použít vhodný marker

Nejčastěji používané pufry:

TBE Tris/kyselina boritá/EDTA

- optimální pro rozlišení molekul fragmentů DNA od 0.1- to 3-kb
- kys. boritá je silný inhibitor mnoha enzymů
- vhodná při vysokém napětí (>150 V)

TAE Tris/kyselina octová/EDTA

- optimální pro rozlišení DNA od 12 kb to 50 kb
- má nižší pufrovací schopnost než TBE, ale je možno použít separovanou DNA pro další enzymatické aplikace (při vyloučení EDTA)
- při nižším napětí dostaneme lepší rozlišení
- TAE pufr je vhodný pro separaci DNA s nadšroubovicovitým vinutím

Další méně používané pufry:

TPE Tris(base)/kyselina fosforečná/EDTA

TTE TRIS-TAPS-EDTA

TTE Tris-Taurine-EDTA ...

Nanášecí pufry:

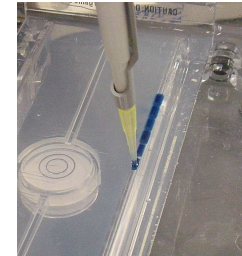
zvýšení hustoty nanášeného vzorku:

- glycerol
- Ficoll
- sacharóza

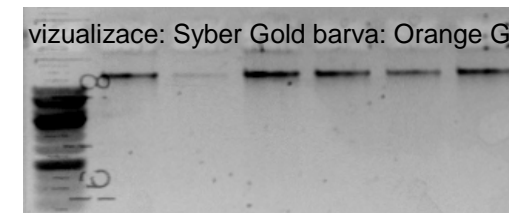
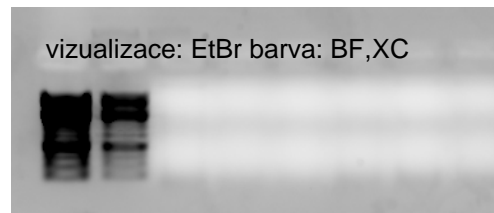
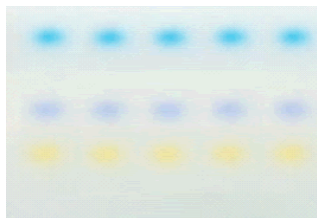
barva:

- bromfenolová modř
- xylen cyanol
- Orange G
- kresolová červeň

H₂O nebo pufr (např. TAE, TBE...)



výběr vhodné nanášecí barvy:

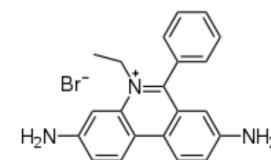


Vizualizace DNA:

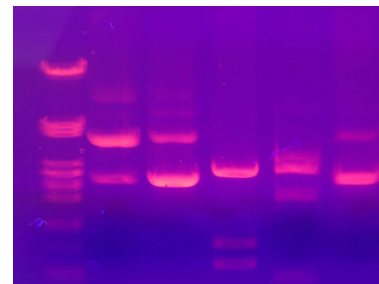
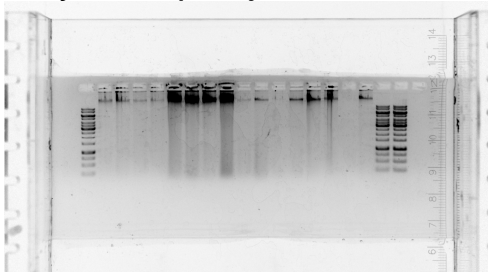
1) fluorescenční vizualizace

Ethidium bromide (2,7-diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridinium bromide)

- Excitační maximum je kolem 590nm, avšak využívá se absorpce UV záření při 254, 302 a 366 nm. Emisní max. je 605 nm.
- interkalací do hydrofóbního prostředí DNA se díky zbavení se molekul H₂O zvýší síla fluorescence zhruba 10x
- limit detekce DNA pouhým okem je zhruba 10ng/band
- ssDNA je nutno dávat na gel zhruba 5x více než dsDNA
- interkalace EtBR dsDNA každých 2.5 pb
- EtBr retarduje mobilitu DNA zhruba o 15%
- EtBr inhibuje polymerizaci PAGE gelů
- běžná koncentrace používaná při barvení agarózových gelů je 0.05 µg/ml

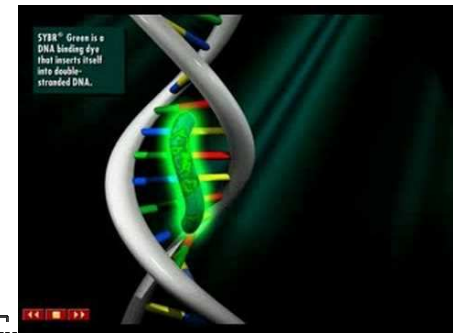
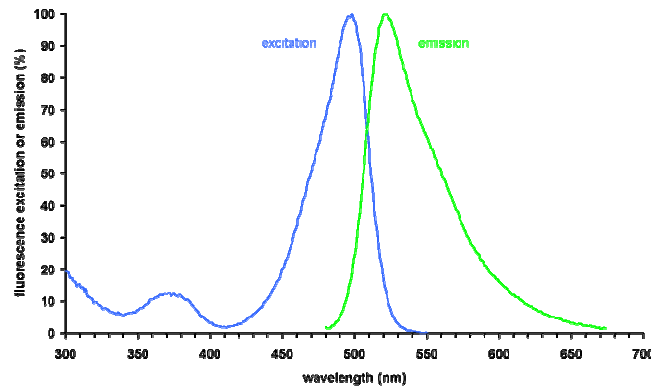
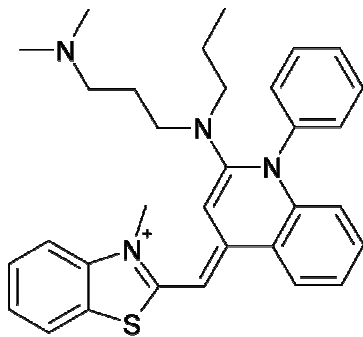


díky EEO putuje EtBr k anodě



Syber Green I

- absorbuje UV 250 nm a 300 nm avšak nejsilnější absorpční max má v rozmezí modrého světla ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$)
- emituje zelené světlo ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$)
- Při použití 300 nm transiluminátoru lze detekovat méně než 60pg dsDNA/band
- Při použití speciálního epi-iluminátoru (254nm) lze detekovat již 20pg dsDNA/band
- tzn. SYBR green I je 25x senzitivnější než EtBr
- využití při real-time PCR



Syber Green I

- absorbuje UV 250 nm a 300 nm avšak nejsilnější absorpční max má v rozmezí modrého světla ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$)
- emituje zelené světlo ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$)
- Při použití 300 nm transiluminátoru lze detekovat méně než 60pg dsDNA/band
- Při použití speciálního epi-iluminátoru (254nm) lze detekovat již 20pg dsDNA/band
- tzn. SYBR green I je 25x senzitivnější než EtBr
- využití při real-time PCR

Syber Green II na detekci ssDNA/RNA

- Při použití speciálního epi-iluminátoru (254nm) lze detekovat již 100 pg RNA nebo ssDNA.

- Při použití 300 nm transiluminátoru je možno detekovat zhruba 500 pg RNA/band.

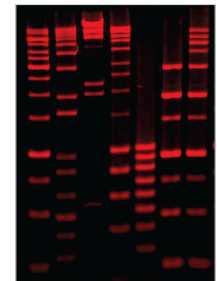
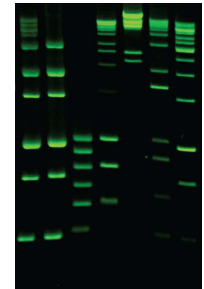
GelGreen excitace při UV(254nm), modrým světlem(470 nm) nebo laserem (488 nm); nutno přidat zelený filtr

GelRed excitace při UV(302 nm); stačí EtBr filtr

Gel Star

Sybr Safe fluorescenční λ_{\max} při 280 a 502 nm; emisní λ_{\max} 530 nm

·
·
·



Toxicita DNA vizualizačních barev

Test buněčného barvení:

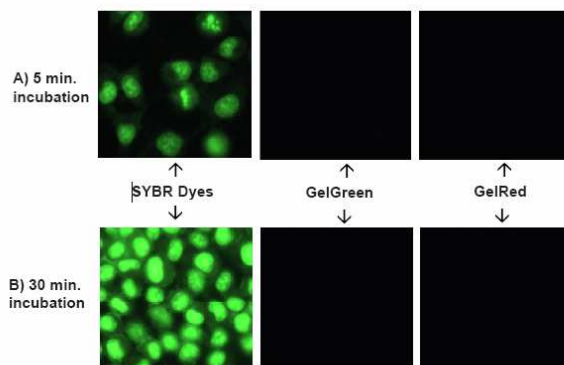


Figure 2. HeLa cells were incubated at 37 °C with 1X of SYBR Green I, SYBR Safe, GelGreen and GelRed, respectively. Images were taken following incubation for 5 min (panel A) and 30 min (panel B), respectively. SYBR Green I and SYBR Safe entered into cells rapidly as evident from the bright green nuclear staining (only images from SYBR Green are shown). However, GelRed and GelGreen were unable to cross cell membranes as shown by the lack of any fluorescence staining.

Amesův test:

Results from Ames Test Using *Salmonella* Strain TA98 with S9 Metabolic Activation
(Tests performed by Litron Laboratories Inc., Rochester, NY)

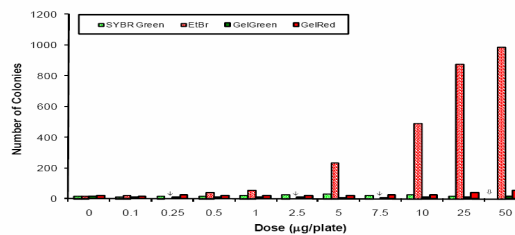


Figure 4. Comparison of mutagenicity among GelGreen™, GelRed™, SYBR® Green I and EtBr in +1 frameshift *Salmonella* indicator strain TA98 with the presence of S9 fraction. * indicates EtBr was not tested at this concentration. *# indicates SYBR® Green I became cytotoxic at this concentration.

Avšak dle Ohta et al., 2001 je SYBR green v bakteriálních buňkách ošetřených UV zářením více mutagenní než EtBr...

Vizualizace DNA:

2) radioaktivní vizualizace

vhodné pro vizualizaci malého množství DNA:

(southernův n. northernův přenos na nylonovou membránu, hybridizace s radioaktivně značenou sondou)

Nejčastěji používaná radioaktivní značka: ^{32}P

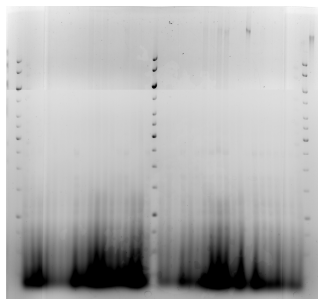
-koncové značení DNA (výměna 5' koncového fosfátu za radioaktivně značený pomocí polynukleotid kinázy)



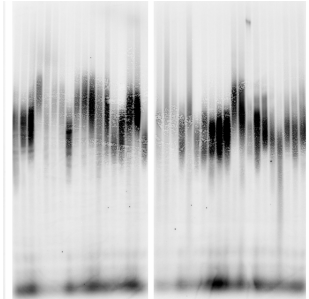
-značení celých sond („nick translace“ : značení DNA radioizotopy metodou posunu zlomu)



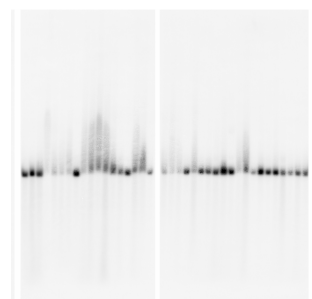
EtBr
celková DNA



koncové značení
telomerická DNA



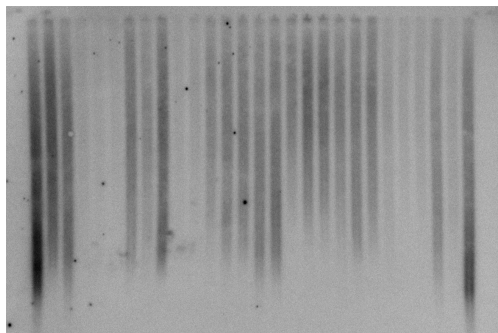
znač. *nick transl.*
chloroplast. DNA



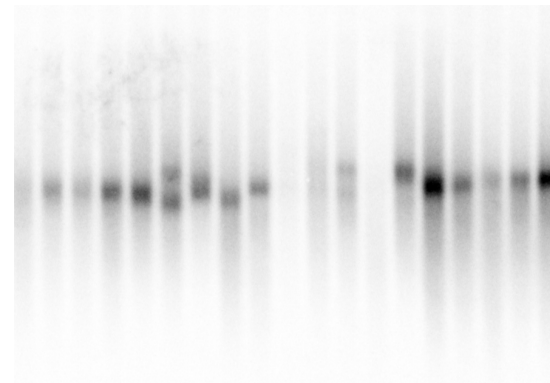
pozn. pozor na množství separované DNA:

při velmi malém množství DNA má na mobilitu DNA vliv také EEO, přítomnost interkalačních činidel a samotné malé množství DNA

elfo bez EtBr
(radioaktivní vizualizace telomerickou sondou)



elfo s EtBr
(radioaktivní vizualizace telomerickou sondou)



Separace RNA:

Při nepřítomnosti denaturujících činidel si RNA zachovává sekundární struktury, které znemožňují separaci podle velikosti.

Formaldehydový denaturační gel: (pro RNA)

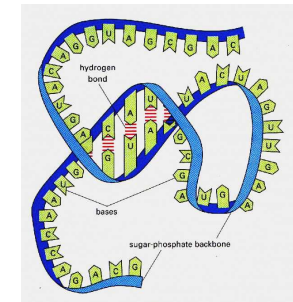
agarózu rozvařit v DEPC H₂O (zabrání se degradaci RNA);

10X MOPS pufr: 0.2M MOPS pH 7

50mM NaAc

10mM EDTA

doplnit na výsl. **1% formaldehyd**



Denaturující alkalické gely: (pro DNA)

agarózu nutno rozvařit v H₂O (v přítomnosti NaOH se agaróza nerozvaří);

po schládnutí přidat NaOH

50X Alkalický pufr: **1.5M NaOH**

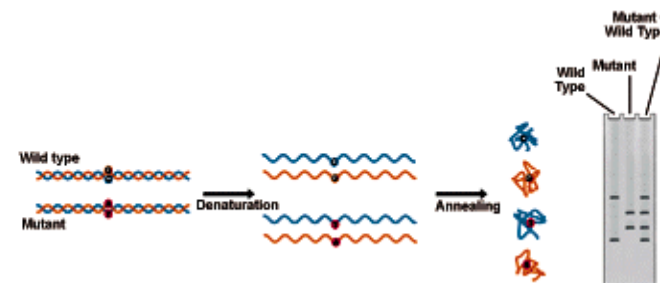
50mM EDTA

separační pufr je 75mM NaOH

Separace DNA lišících se v jedné bázi:

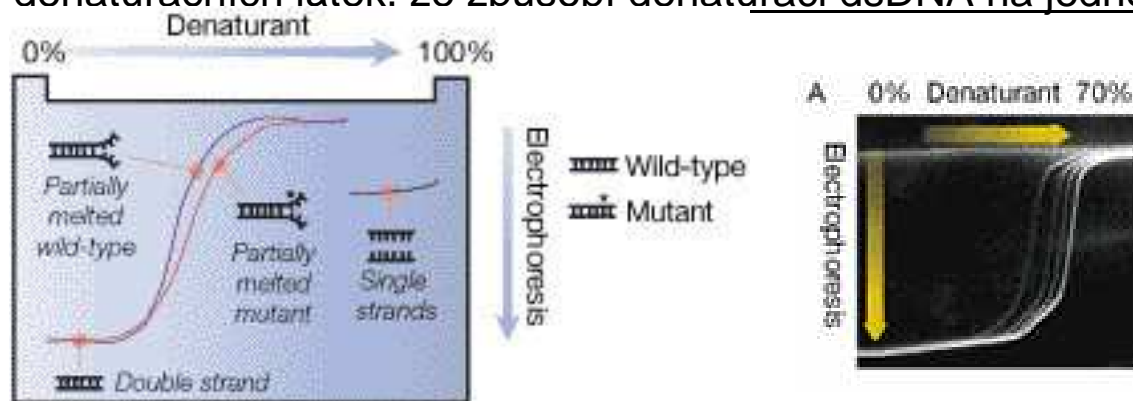
SSCP (jednovláknového konformačního polymorfismu)

Separace jednovláknové DNA na nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě. DNA řetězec se sbalí podle vnitřních komplementarit. Mobilita DNA v gelu závisí na konformaci. Malá změna může vést ke změně sbalení, které lze někdy odlišit pomocí SSCP



DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza)

Separace DNA molekul v polyakrylamidovém gelu. Gel obsahuje lineární gradient formamidu a močoviny. Dvouvláknová DNA putuje rychlostí určenou její molekulovou hmotností do doby, než vstoupí do té části gelu, kde je taková koncentrace denaturačních látek, že způsobí denaturaci dsDNA na jednovláknové molekuly.

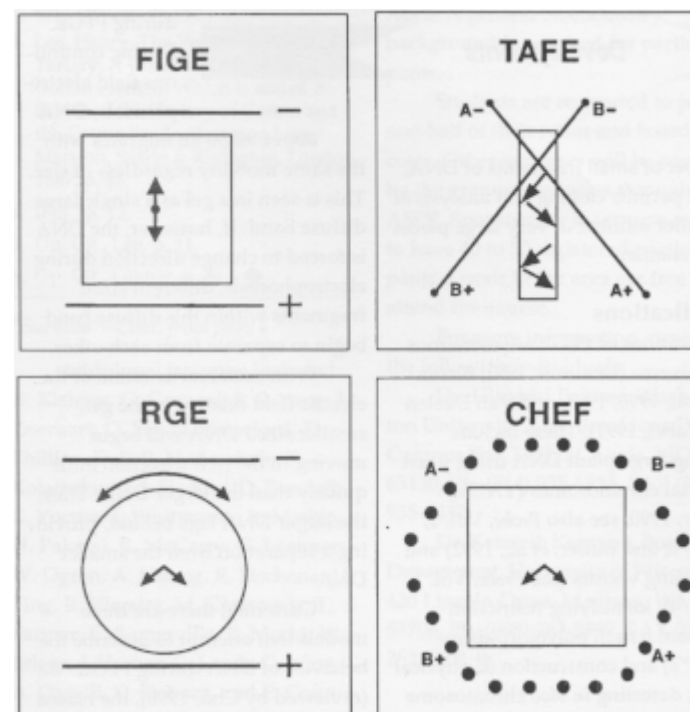


TGGE (denaturační gelová elektroforéza teplotním gradientem)

Separace velkých DNA molekul:

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

- Standardní gelová elektroforéza rozliší DNA fragmenty do 75kb; větší fragmenty putují pospolu
- separace v měnícím se elektrickém poli (orientace pólů o 90°; 120°; 180° atd.)



důležité parametry:

délka pulzu; orientace; chlazení; pufr; agaróza s nízkým EEO

Separace DNA struktur:

2D elfo

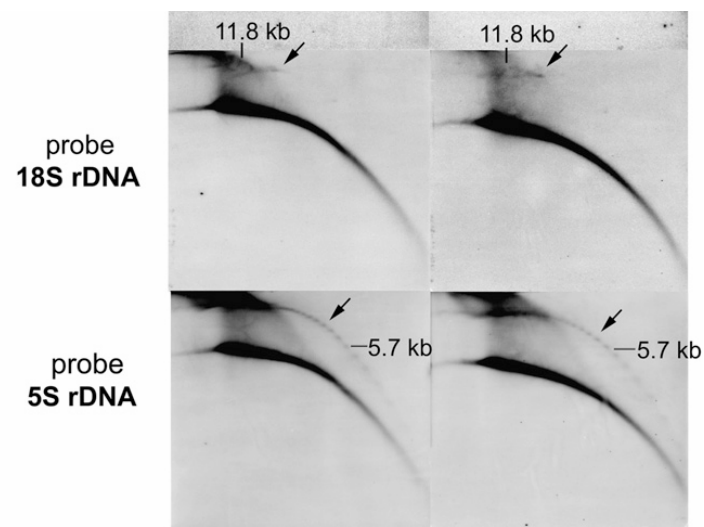
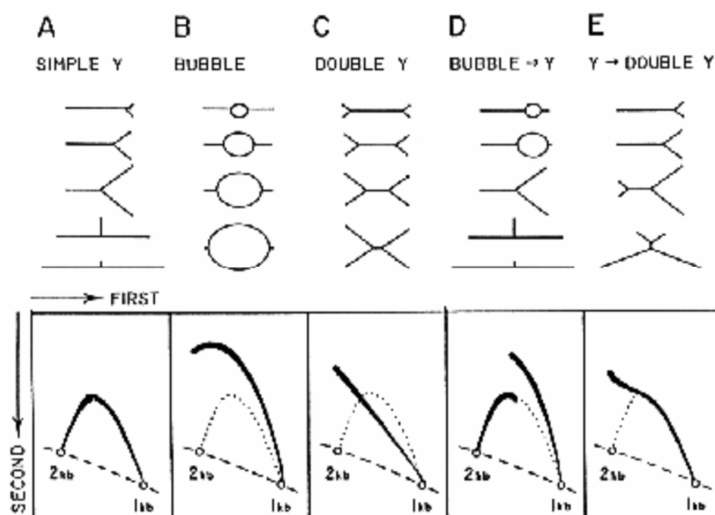
první rozměr:

při nízkém napětí v nízkoprocentní agaróze dochází k separaci DNA molekul dle velikosti, bez vlivu struktury

vyříznu pruh DNA, který chci separovat a vložím na vrchol nového gelu

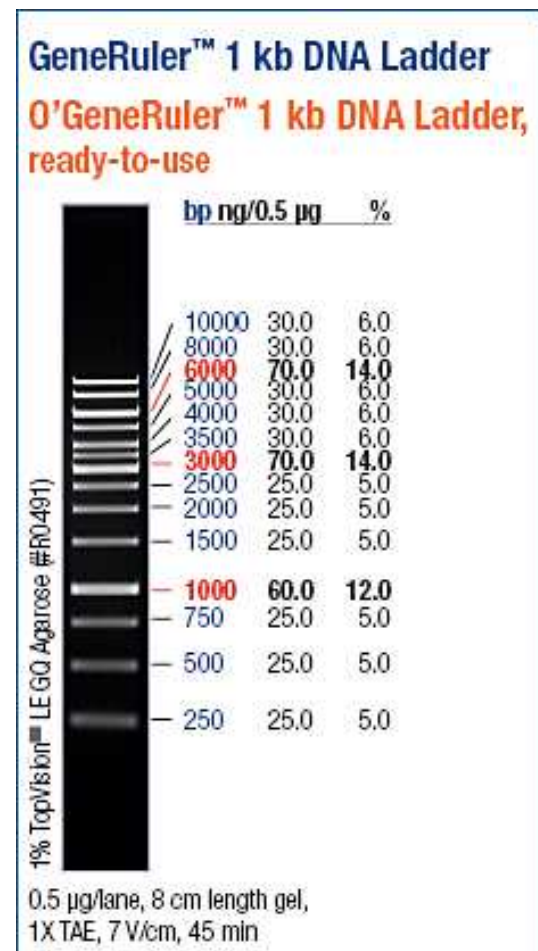
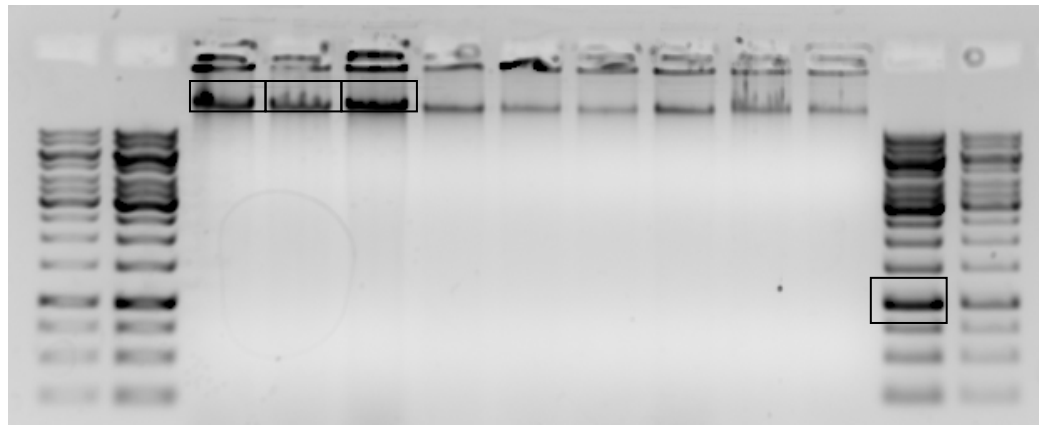
druhý rozměr:

při vysokém napětí ve vysokoprocentní agaróze v přítomnosti EtBr dochází je mobilita silně ovlivněna tvarem molekul a složitostí struktur



Měření koncentrace izolované DNA:

odečet množství DNA z gelu:



měření spektrofotometricky:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A = absorbance (bez jednotek)

ϵ = extinkční koeficient ($M^{-1}cm^{-1}$) (konstanta pro každou DNA)

c = koncentrace (M)

l = tloušťka kyvety (většinou 1cm)

Neznáme-li extinkční koeficient, můžeme pro určení koncentrace DNA o vysoké molekulární hmotnosti použít zjednodušeného předpokladu:

roztok **dsDNA** o absorbanci **1.0** při **260nm** má koncentrací **50 $\mu g/mL$**

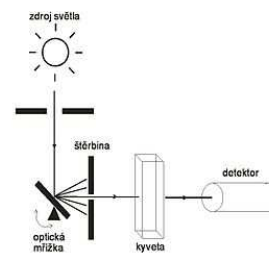
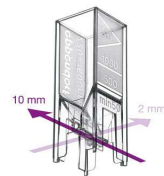
ssDNA

33 $\mu g/mL$

RNA

40 $\mu g/mL$

měření DNA v
kyvetách:



měření spektrofotometricky:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A = absorbance (bez jednotek)

ϵ = extinkční koeficient ($M^{-1}cm^{-1}$) (konstanta pro každou DNA)

c = koncentrace (M)

l = tloušťka kyvety (většinou 1cm)

Neznáme-li extinkční koeficient, můžeme pro určení koncentrace DNA o vysoké molekulární hmotnosti použít zjednodušeného předpokladu:

roztok **dsDNA** o absorbanci 1.0 při 260nm má koncentrací **50 $\mu g/mL$**

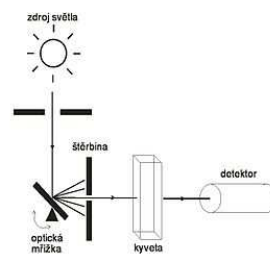
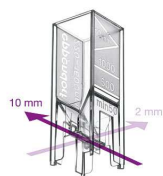
ssDNA

33 $\mu g/mL$

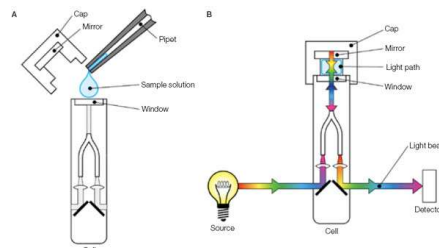
RNA

40 $\mu g/mL$

měření DNA v
kyvetách:



měření velmi malých
objemů DNA:



měření spektrofotometricky:

vysoká absorbance:

260 nm nukleové kyseliny

280 nm proteiny

nízká absorbance NK a proteinů:

230 nm

poměr A260/280

pro DNA: 1.8

pro RNA: 2.0

pokud je poměr >1.8 je vzorek kontaminován RNA

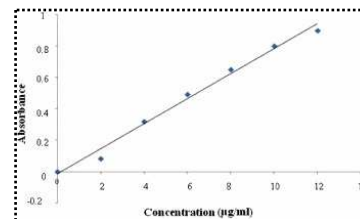
<1.75 je vzorek kontaminován proteiny

poměr A260/230

pro DNA: 1.5-1.8

jiný poměr naznačuje kontaminaci např. fenolem, solemi, EDTA, močovinou, TRIzol, guanidinium HCl...

Absorbance by měla být mezi 0.1-1.0



1. <http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=2660&ID=5139&Men>
4. <http://bitesizebio.com/articles/the-basics-how-phenol-extraction-works/>
http://openwetware.org/wiki/Image:Phenol_chloroform_gDNA_ex_tail_vs_liver.JPG
6. <http://arbl.cvms.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/manip/conc.html>
http://openwetware.org/wiki/Ethanol_precipitation_of_nucleic_acids
http://www.flickr.com/photos/damon_tighe/4799892345/
9. <http://dnature.co.nz/mini-plant-DNA/>
<http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/lauren/gene-clean.html>
10. <http://www.qiagen.com>
<http://www.sigmaaldrich.com>
http://fantendo.wikia.com/wiki/New_Super_Mario_Bros_Delta/Enemies
http://www.123rf.com/photo_11293706_e-coli-bacteria-isolated-on-white-background-vector-illustration.html
http://mi9.com/wallpaper/3d-human-figure_233/
<http://pathogensandpassageways.blogspot.cz/2011/07/extractions.html>
11. <http://www.mn-net.com/>
12. <http://www.sigmaaldrich.com>
14. <http://www.carolina.com/dna-extraction-quantification-reagents-supplies/plasmid-dna-isolation-reagent-system/211310.pr>
15. <http://course1.winona.edu/sberg/241f00/Lec-note/DNA.htm>
16. <http://drwyckoff.wordpress.com/>
Anja Rödiger et al., Journal of Plant Physiology, Vol. 167, Issue 8 , 15 May 2010, Pages 620–624_ , Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue
17. <http://pc8-27.edus.uwindsor.ca/samples/WebSite/chloro.html>
22. <http://knowledgatism.blogspot.cz/2011/01/dna-electrophoresis.html>
http://www.recman.cz/en/ionosep_2002.htm
<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>
<http://www.bio-rad.com>
<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>
23. <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/polyacrylamide-matrix>
http://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/20-109-laboratory-fundamentals-in-biological-engineering-fall-2007/labs/mod1_2/
24. <http://students.washington.edu/uwfarm/2011/02/10/food-science-2-0-fragments-of-heredity/>
25. <http://www.eurobiotechproject.net/doc/wp7/ELECTR1.pdf>
27. humgen.wustl.edu
Analysis of supercoiled DNA by agarose gel electrophoresis using low-conducting sodium threonine medium
Tomomi Ishido et. al., Analytical Biochemistry, Vol. 400, Issue 1 1 May 2010, Pages 148–150
29. <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/2x-rna-loading-dye/>
<http://delliss.people.cofc.edu/virtuallabbook/LoadingGel/LoadingGel.html>
http://www.gendepot.com/kb/subview.php?sel_a=25&sel_b=43&sel_c=&idx=325&sel_page=sub_view_new
30. <http://darwin.wcupa.edu/beneski/bio-515/f09/mohanty/Main/TPM3>
31. <http://www.innovateus.net/innopedia/what-does-sybr-green-mean>
http://en.wikipedia.org/wiki/File:SYBR_Green_I_spectra.png
32. <http://www.innovateus.net/innopedia/what-does-sybr-green-mean>
http://en.wikipedia.org/wiki/File:SYBR_Green_I_spectra.png
33. http://www.biotium.com/product/product_info/safety_report/GR%20%20GG%20safety.pdf
Ohta T, Tokishita S, Yamagata H. (2001). "Ethidium bromide and SYBR Green I enhance the genotoxicity of UV-irradiation and chemical mutagens in E. coli.". *Mutat Res.* 492 (1-2): 91–7.
34. <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/NIH/gene15.php>
<http://bioweb.wku.edu/courses/biol350/enzymetools7/review.html>
37. http://www.bio-rad.com/webroot/web/html/lsr/products/electrophoresis/product_overlay/global/electro_dgge.html
<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/sscp-analysis>
38. <http://www.nal.usda.gov/pgdic/Probe/v2n3/puls.html>
40. <http://www.hellma-analytics.com/text/130/en/micro-volume-analysis-traycell.html> <http://eshop.ependorfna.com/product/view/507/> mOzgo et al. The Plant Cell Vol. 22: 2768–2780, August 2010
41. <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/LSR/PDP/e12b12ef-e6e2-4ae3-9faa-fd4fb60ccca/SmartSpec-Plus-Spectrophotometer>
<http://www.biochrom.co.uk/product/24/biochrom-wpa-biowave-ii-uv-visible-spectrophotometer-with-life-science-methods.html>
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Spektrofotometr.jpg>
<http://www.eastport.cz/genova-plus-life-science-jenway-bibby-scientific.html>
42. <http://iopscience.iop.org/2043-6262/3/4/045012/article>

Děkuji za pozornost



...a příště

Miloslava Fojtová

Manipulace s DNA (štěpení, klonování, značení, ...)

Enzymy používané v molekulární biologii (restrikční endonukleázy typu I, II, III; metylačně citlivé enzymy, izoschizomery)

Vektory (bakteriofágy, plasmidy, cosmidy, umělé bakteriální a kvasinkové chromozómy)

Klonování do plasmidu (ligace s tupými a kohezními konci, transformace s použitím chemicky kompetentních buněk, transformace elektroporací, screening)

Radioaktivní a neradioaktivní metody značení nukleových kyselin.