



Izolace nukleových kyselin

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

Bartos.Milan@atlas.cz

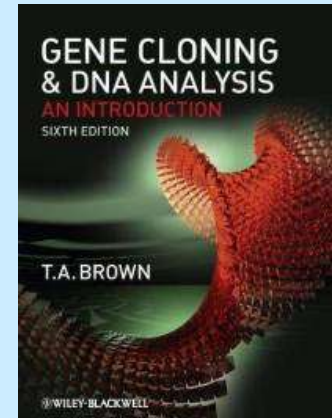
Přírodovědecká fakulta MU, 2015

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 znamená ...

- izolovat 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 rodu, druhu, kmene, ...**

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

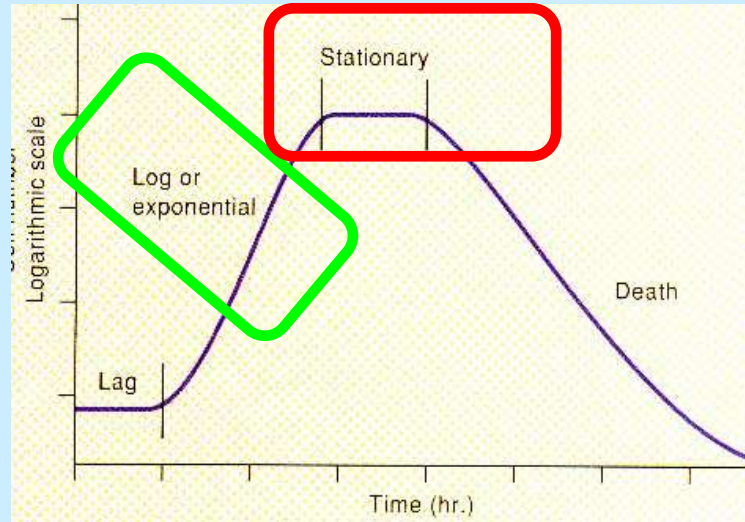
- 1) Růst kultury a sklizení buněk**
- 2) Rozbití buněk a jejich obsahu**
- 3) Zpracování buněčného extraktu – odstranění všeho kromě NA**
- 4) Zahuštění výsledného roztoku**



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 10⁹ buněk/ml**

Jak to měřit?

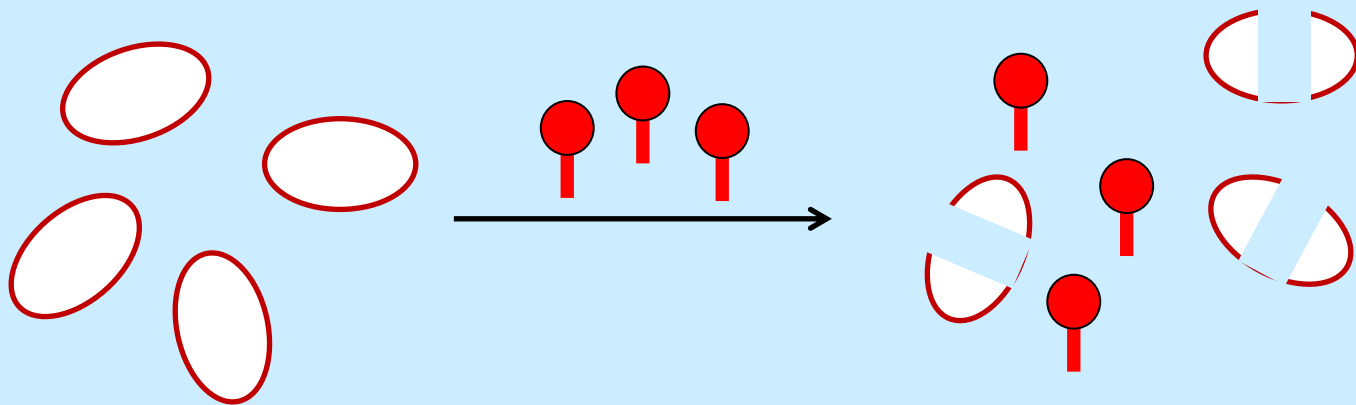
- **Optická hustota při 600 nm**
- **OD600 = 1 → 8 x 10⁸ buněk/ml**

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

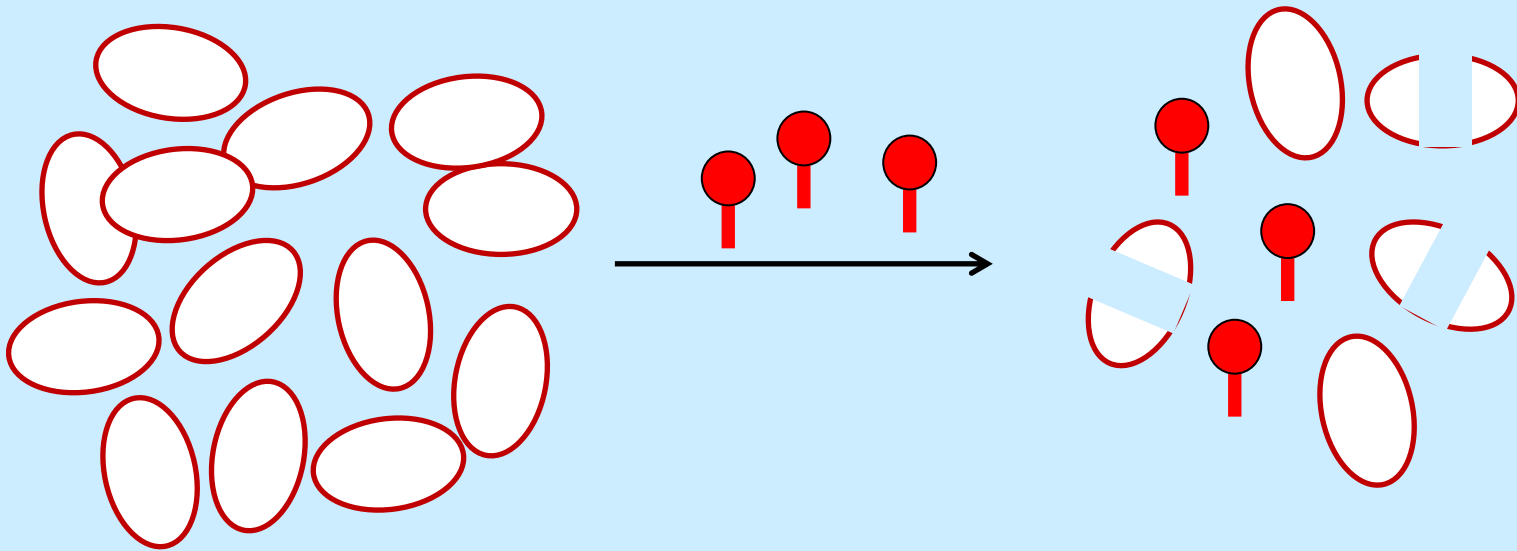
Hustota kultury nízká



Rychlá lyze buněk = nízká koncentrace fága

Rovnováha mezi stářím kultury a velikostí inokula u lyzogenního fága

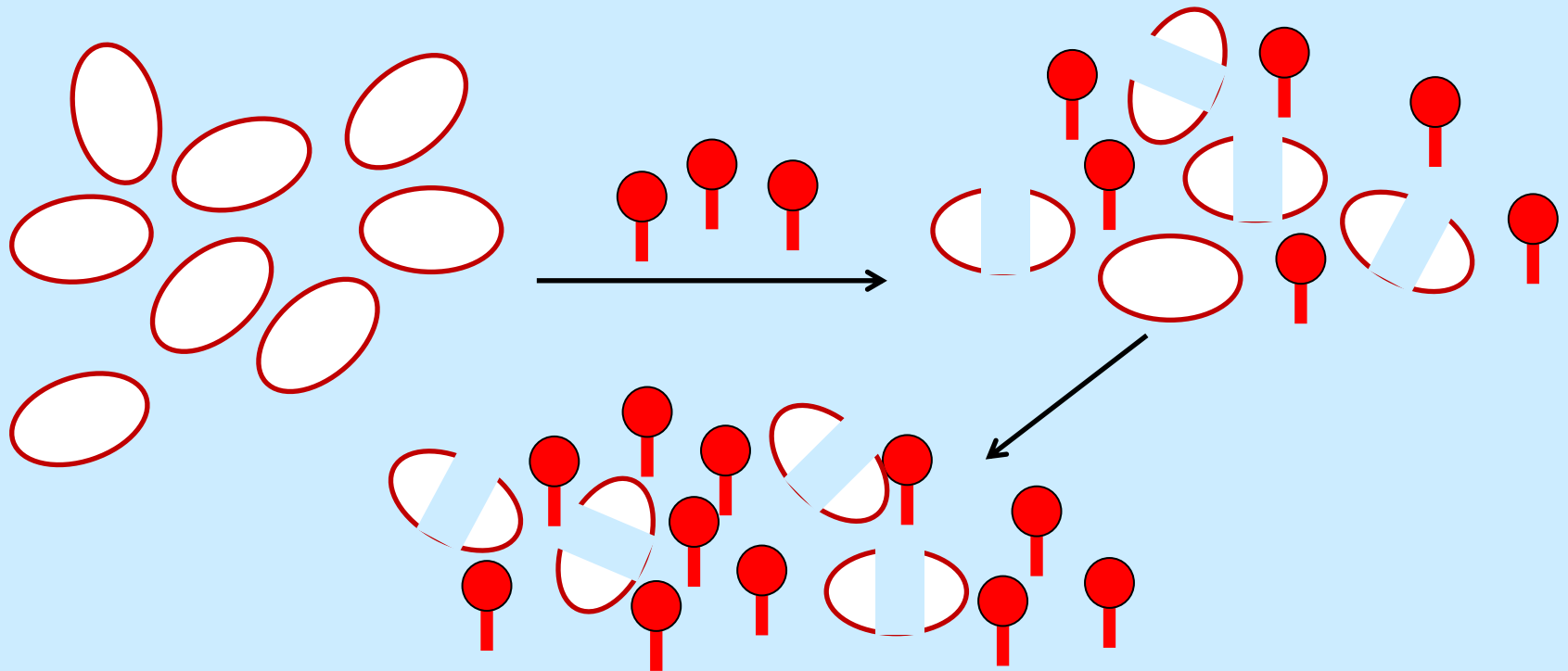
Hustota kultury vysoká



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**

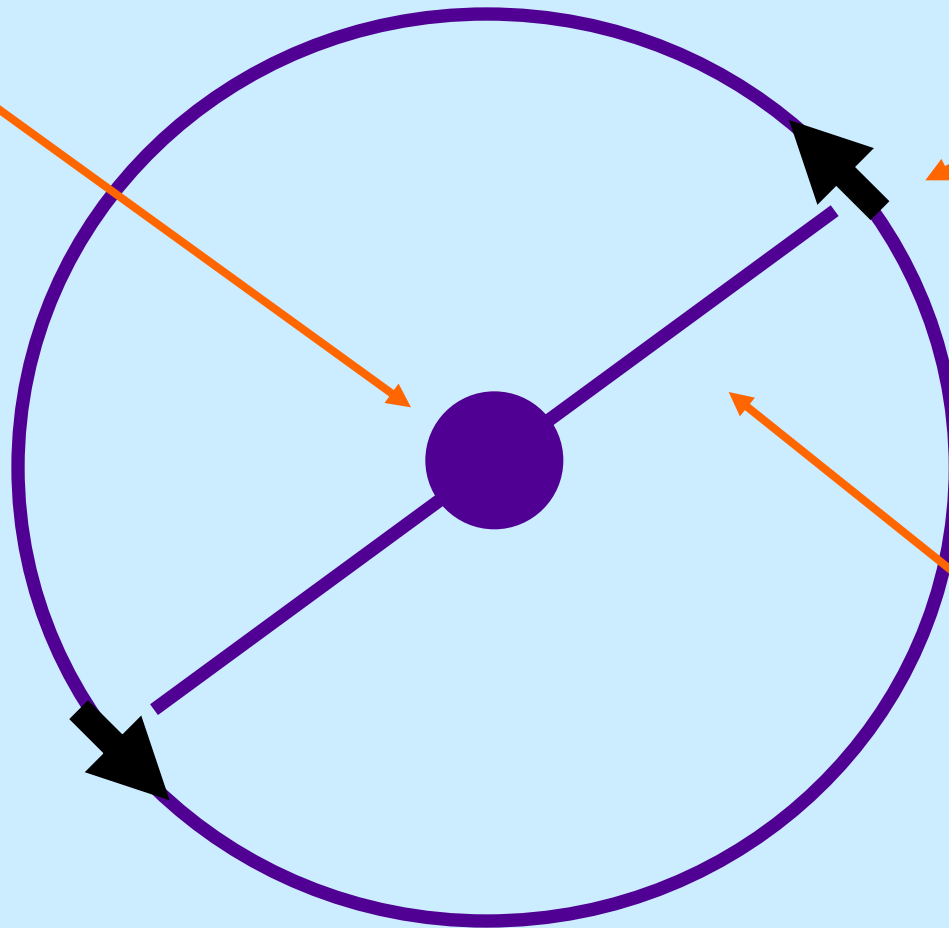
PRINCIP

- **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



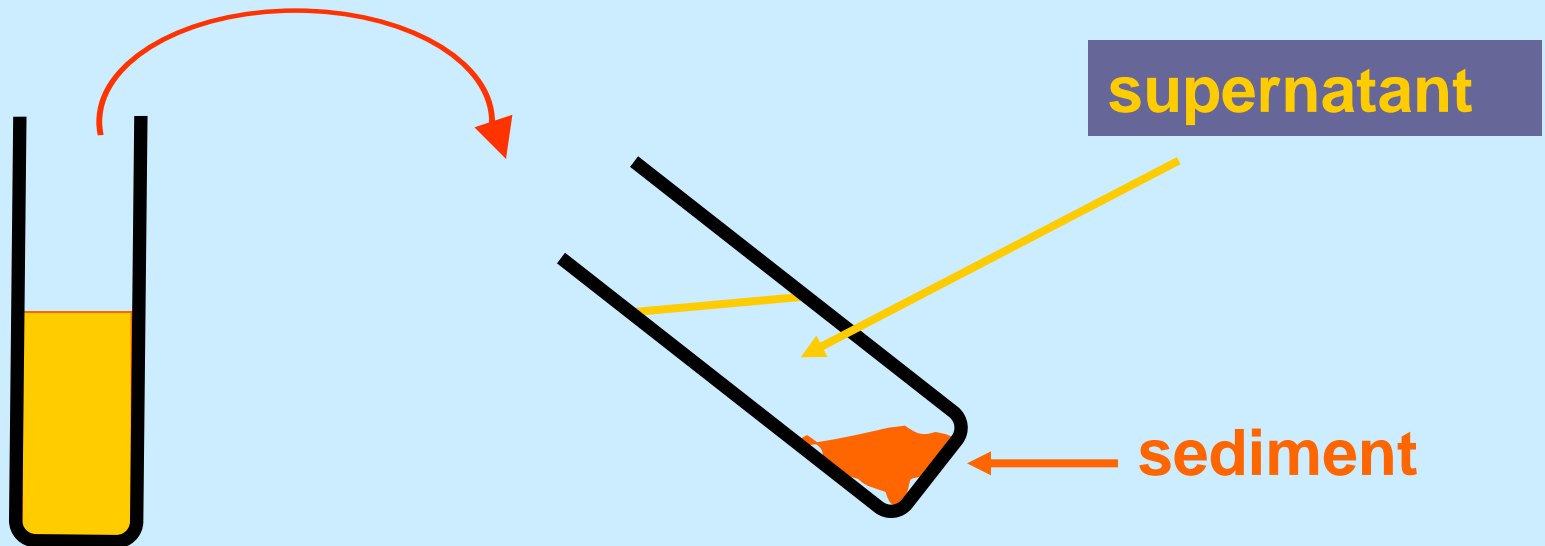
Poloměr
otáčení

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

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

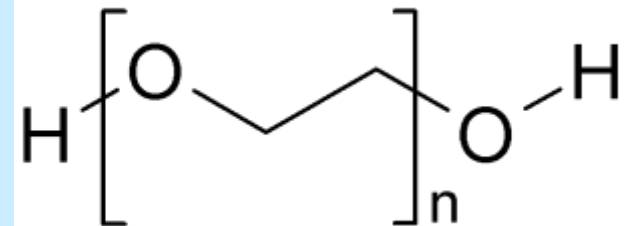
Sedimentace virionů

- 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

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

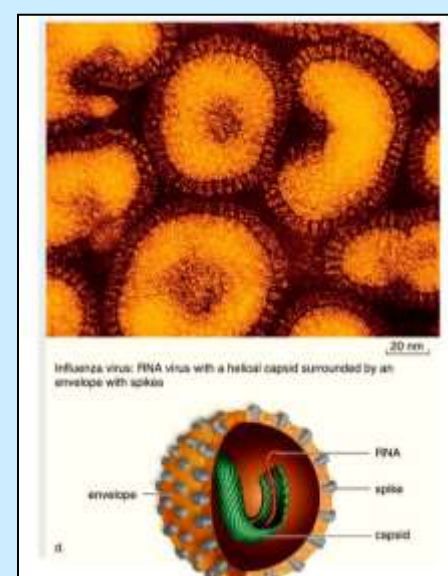
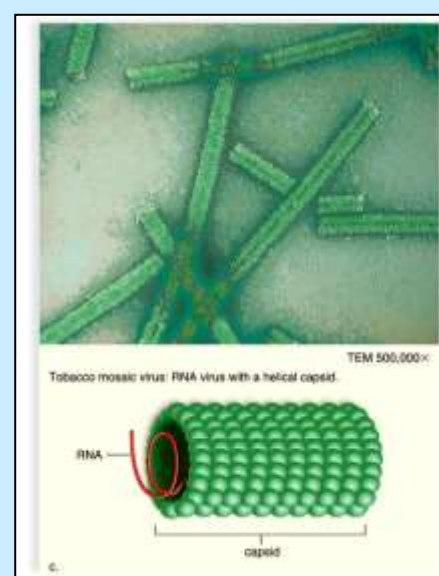
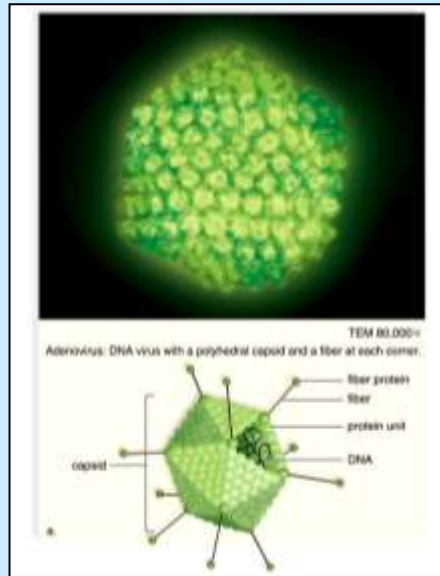
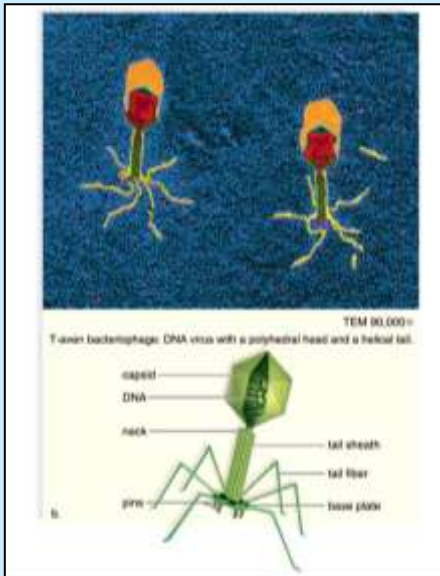
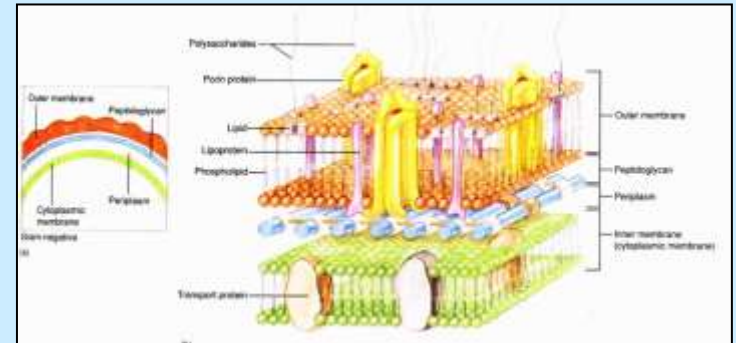
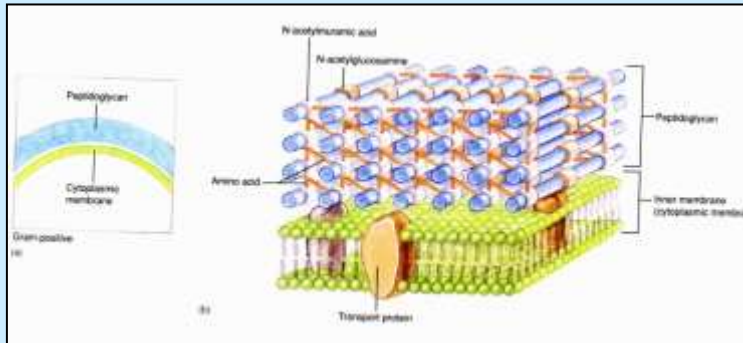
RCF = relative centrifugal force (hodnota g)

rpm = repeats per minute

r = poloměr otáčení

Příprava extraktu z buněk

Podstatou je odstranění buněčných obalů



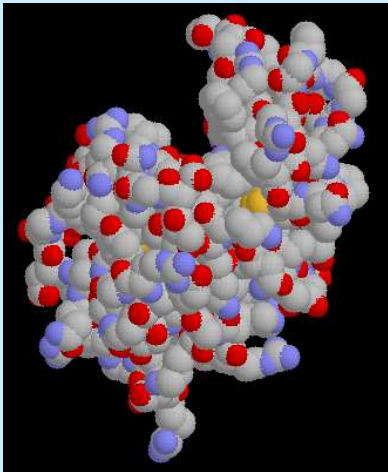
Odstranění obalů chemicky

- **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

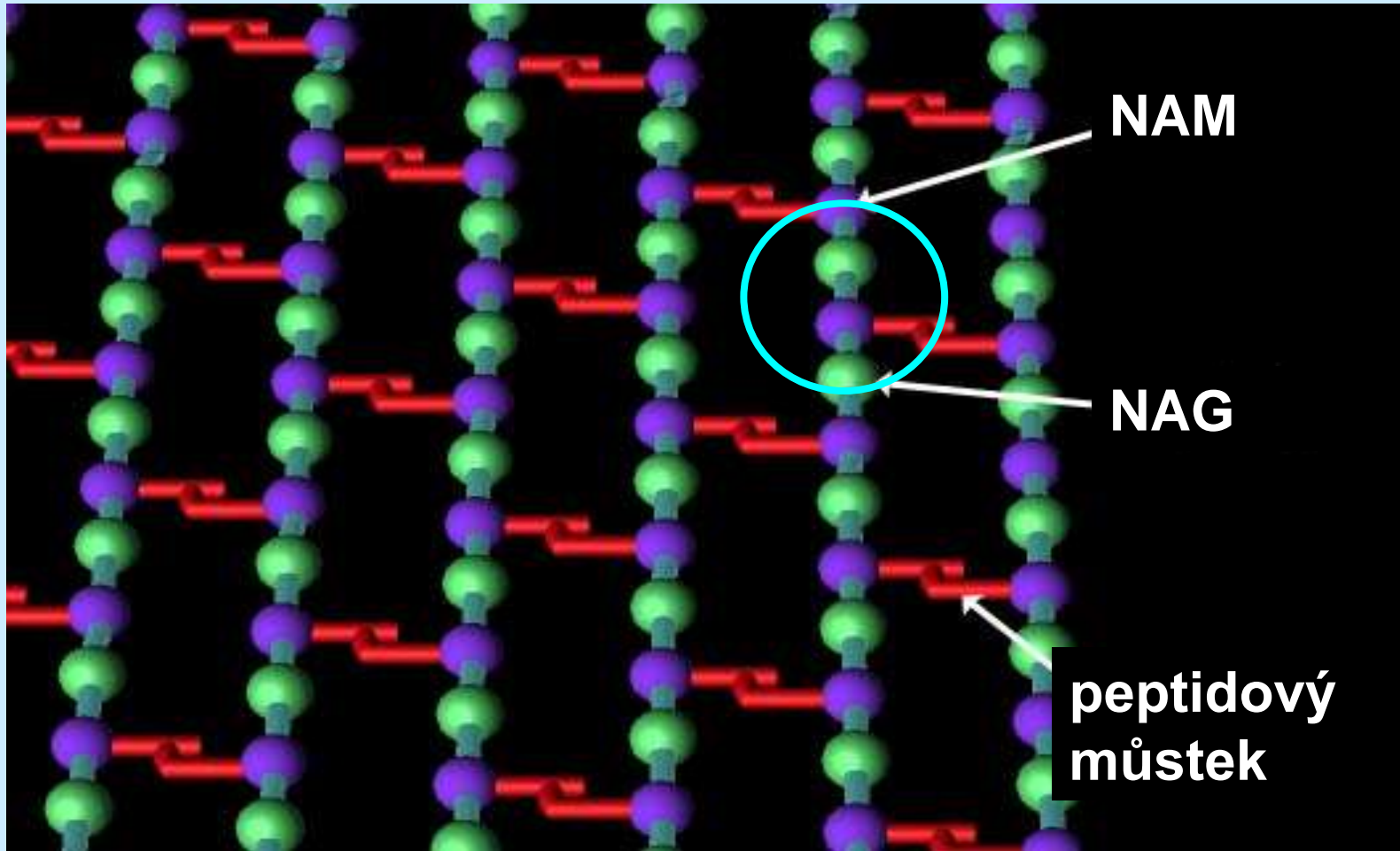


Muramidáza,
N-acetylmuramid
glykanhydroláza

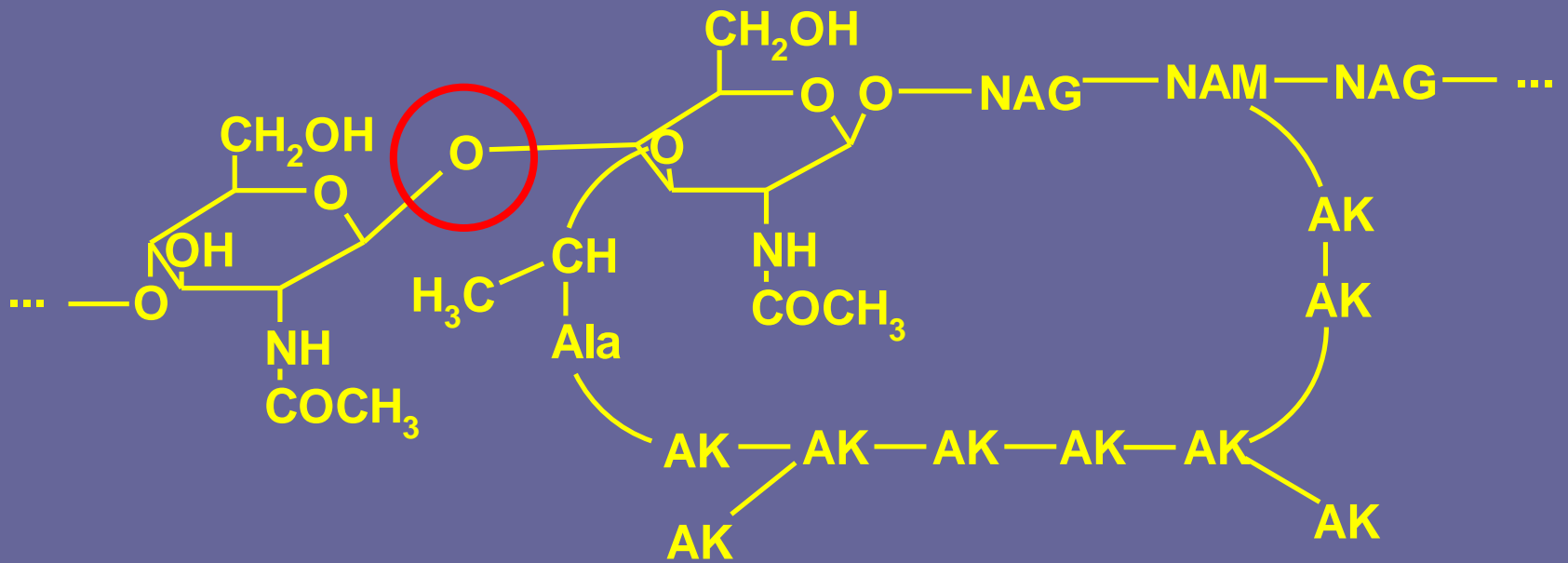


- **EC 3.2.1.17**
- **patří mezi glykanhydrolázy**
- **katalyzuje hydrolýzu vazeb 1,4-beta mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukózaminem v peptidoglykanu**

Peptidoglykan a lysozym



Peptidoglykan a lysozym



Je možné lysozymem
odbourat buněčnou
stěnu *Archae*?

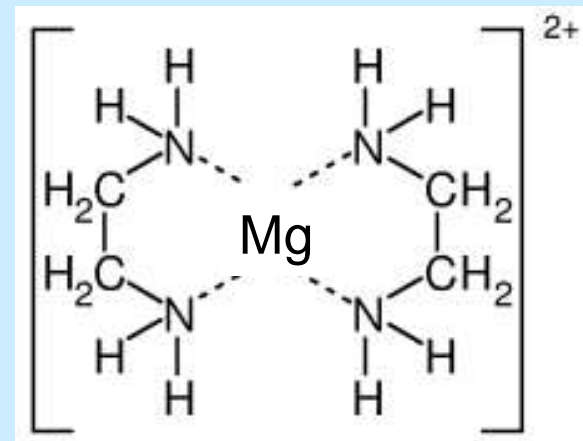
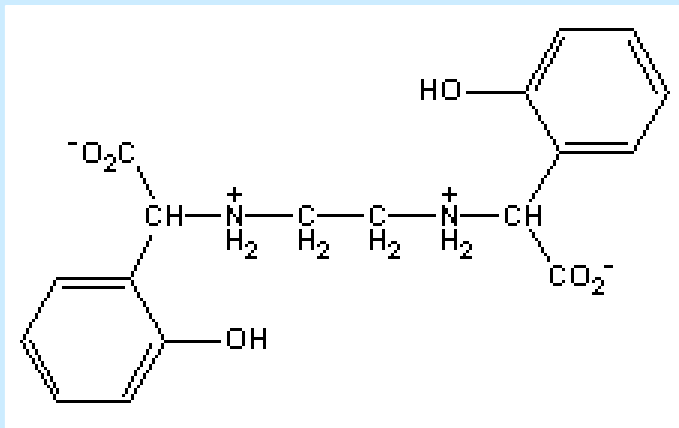


Mechanismus účinku EDTA

etylendiamin tetraacetát (EDTA)

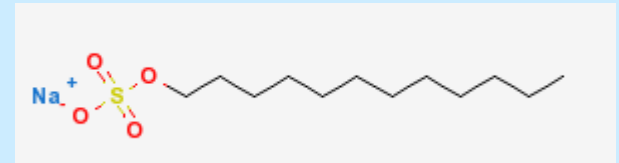
- Odstraňuje ionty hořčíku, které ochraňují strukturu buněčných obalů
- Inhibuje buněčné enzymy (s kofaktorem Mg^{2+}), které by mohly degradovat DNA

chelát

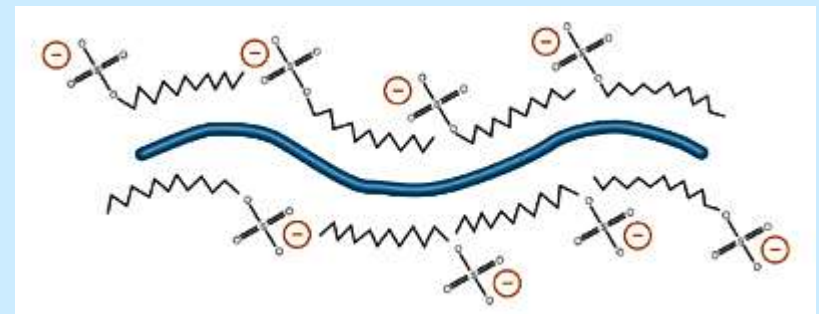
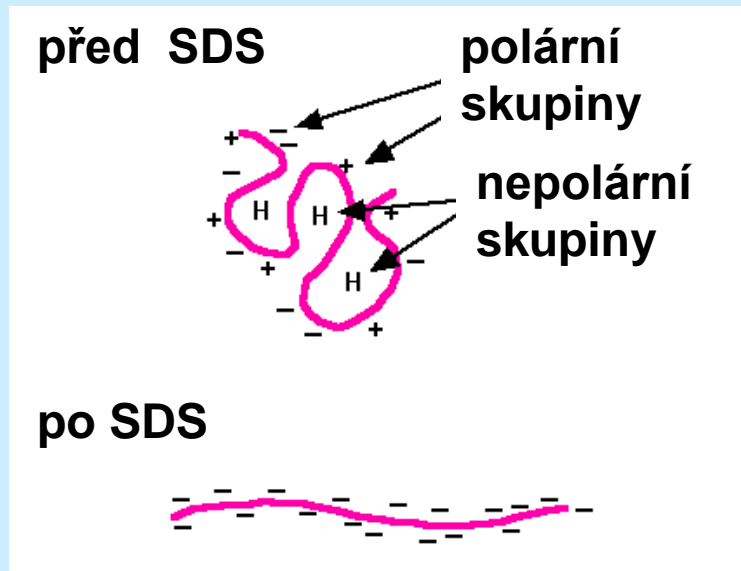
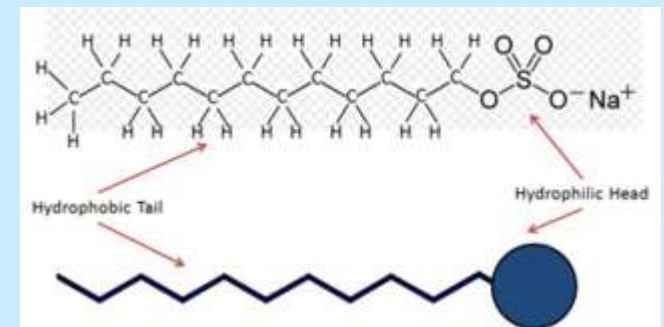


Mechanismus účinku SDS

dodecylsulfát sodný



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

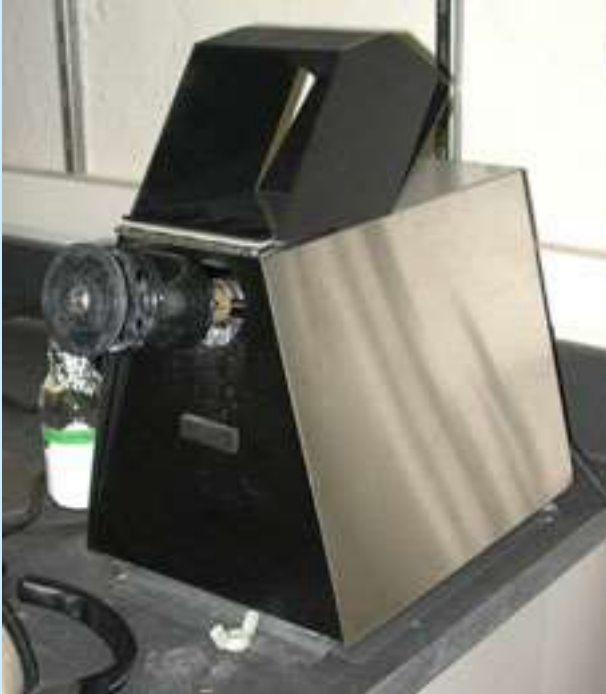


Odstranění obalů fyzikálně I

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

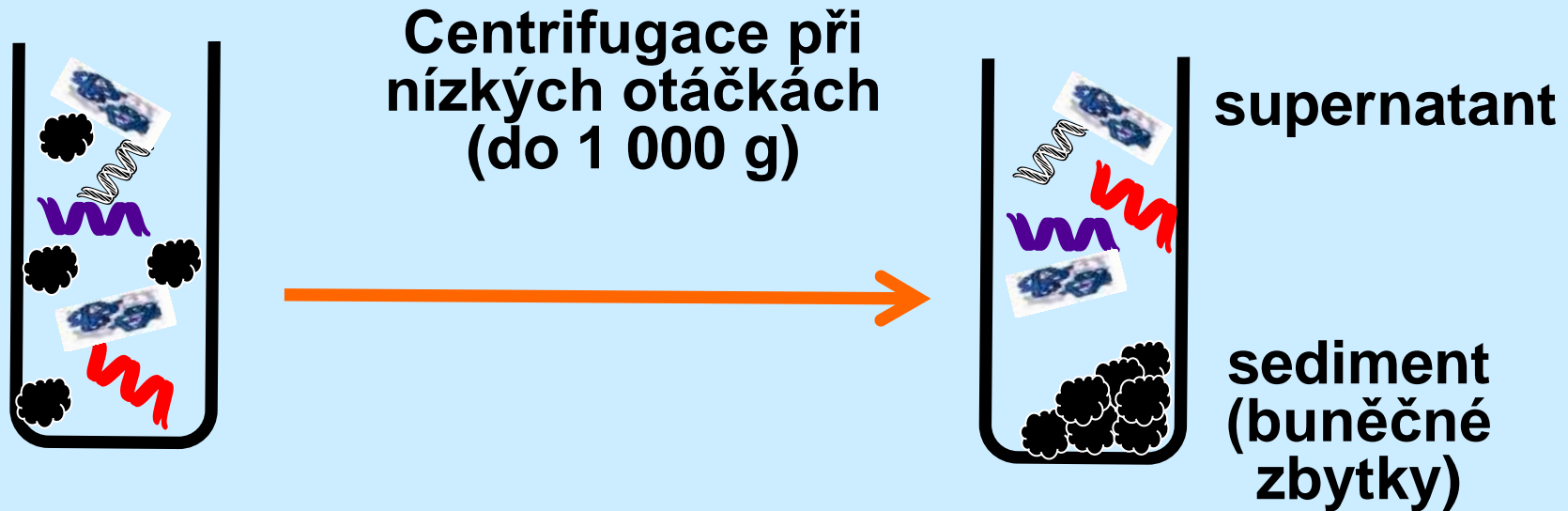
Celuláza, směsi enzymů

Vnitrobuněční parazité

???

Co se děje po odstranění obalů?

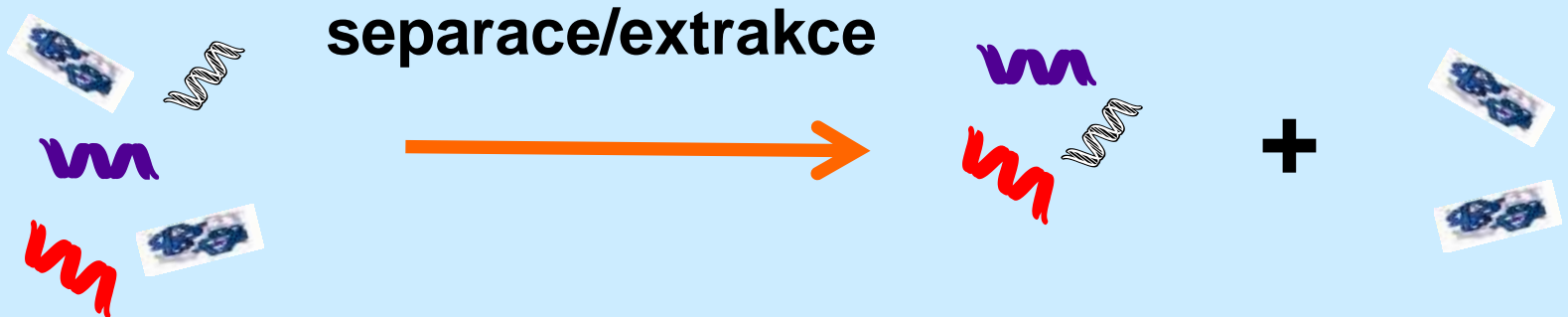
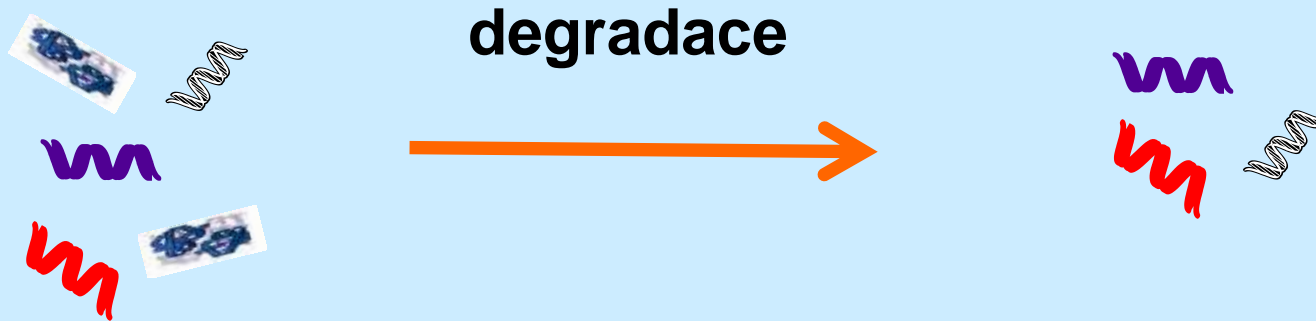
Nerozpustné buněčné zbytky jsou odstraněny centrifugací



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



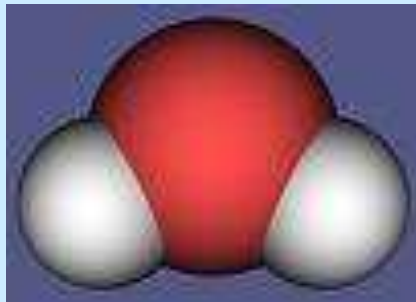
Extrakce

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.

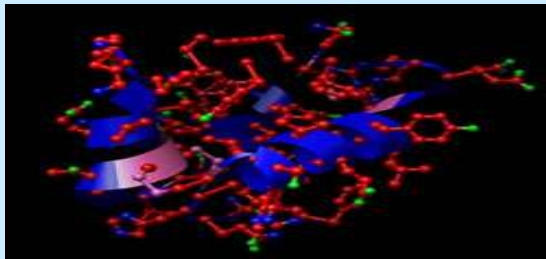
Extrakce proteinů směsí fenol-chlorofom

Fenolová extrakce podle Marmur 1961

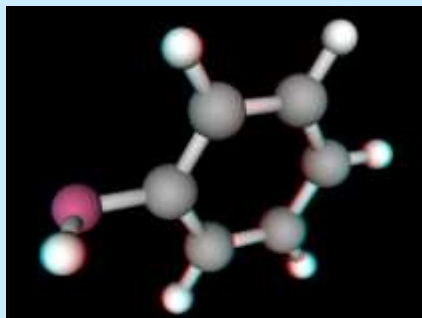


K separaci proteinů dojde po centrifugaci a vytvoření

lehké vodné fáze



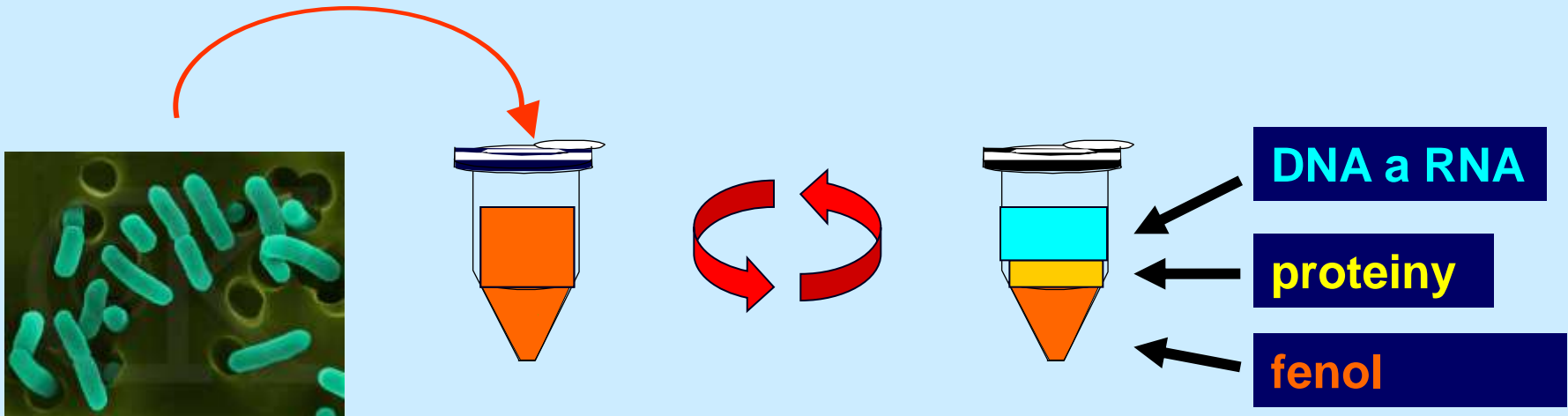
mezifáze s denaturovanými proteiny na rozhraní



těžší organické fáze

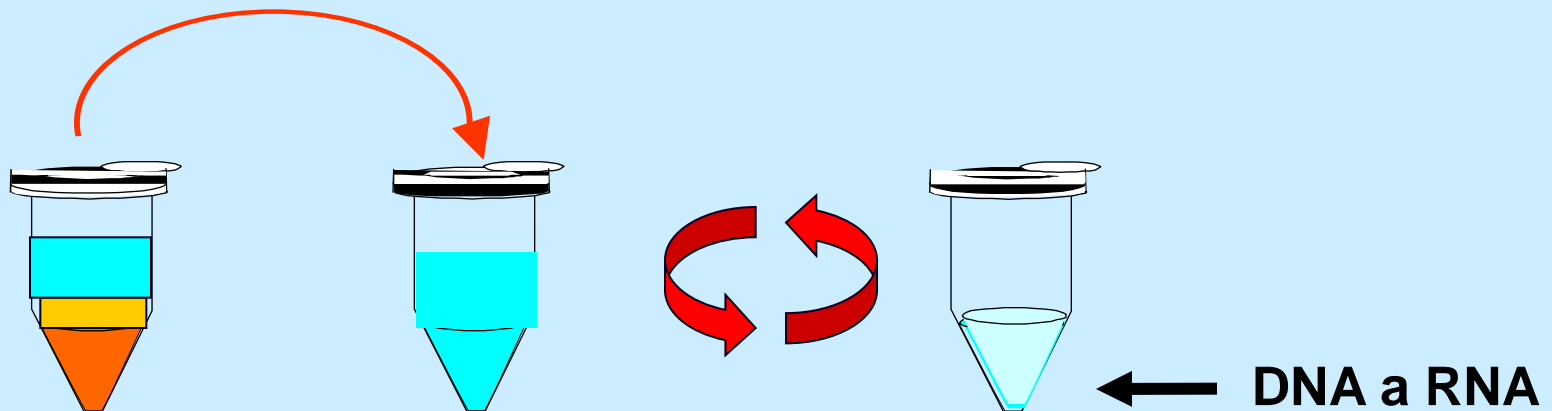
Postup při fenolové extrakci - I

- 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)



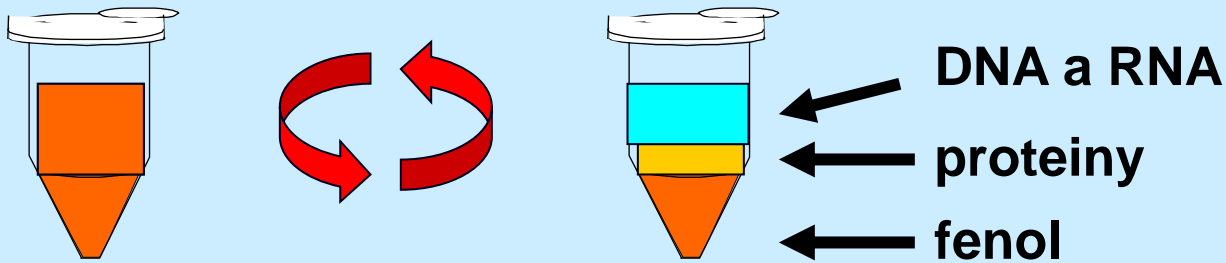
Postup při fenolové extrakci - II

- 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

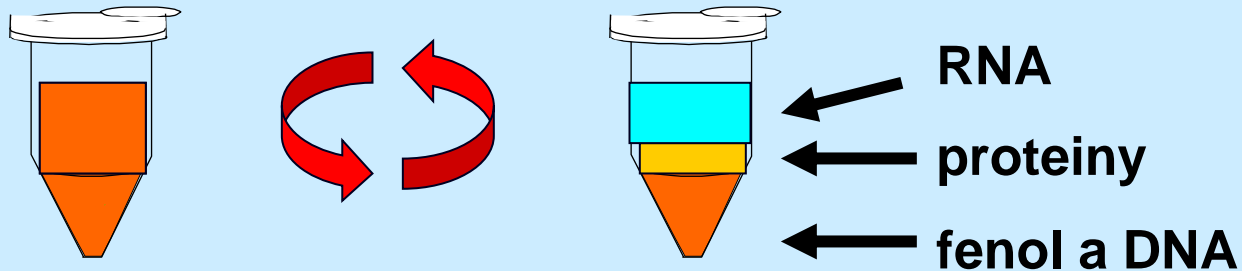


Modifikace fenolové extrakce

Fenol ekvilibrovaný neutrálním nebo alkalickým pufrům



Fenol kyselý



**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

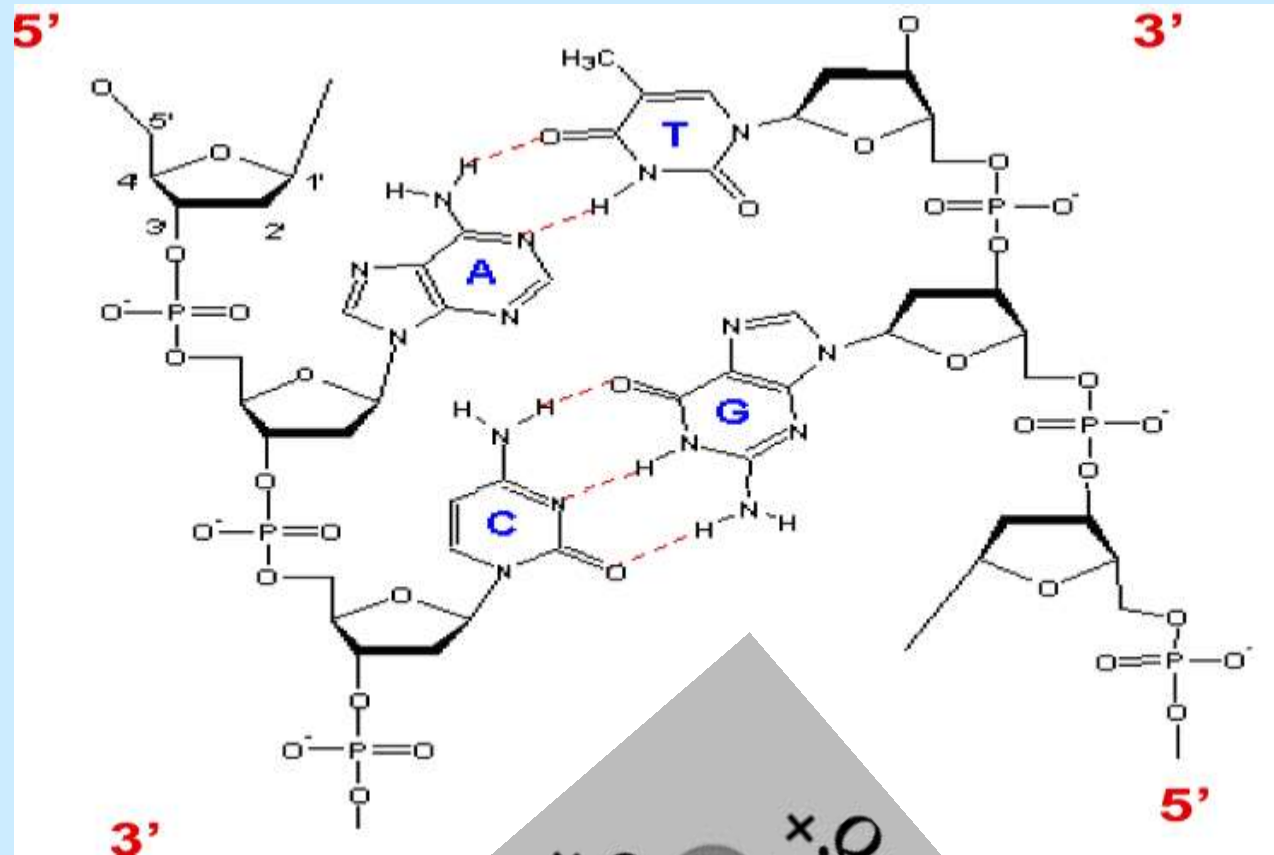
Zahuštění DNA a RNA precipitací

- **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**

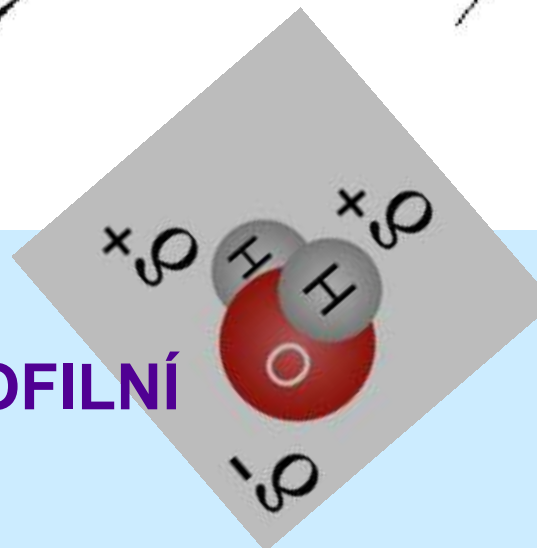
Postup při precipitaci

- 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?

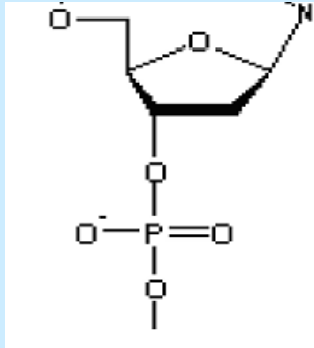


DNA JE HYDROFILNÍ

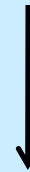


Obecný postup precipitace etanolem

Přidání NaCl + C₂H₅OH



Snížení hydrofility DNA



VYSRÁŽENÍ DNA
ve vodném prostředí

Neutralizace PO³⁻

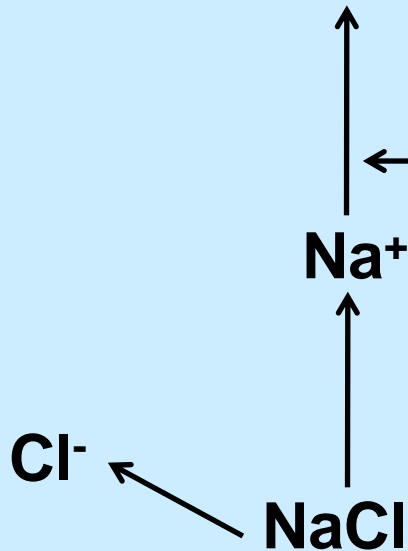
C₂H₅OH

Nízká dielektrická
konstanta (méně polární než voda)

Na⁺

Cl⁻

NaCl



Postup při precipitaci - dokončení

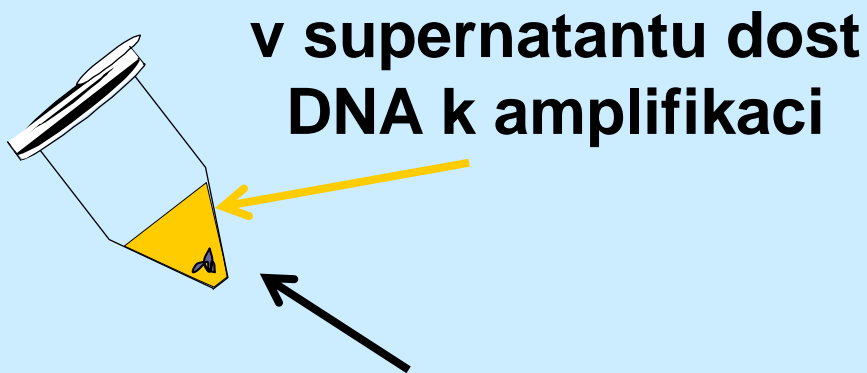
- 6) Koncentrování vzorku centrifugací (roztok zchlazený na -70°C)**
- 7) Promytí sedimentu NA od zbytků solí 70% ethanolem a odpaření ethanolu teplem**
- 8) Rozpuštění NA ve vodě (přídavek EDTA, případně Tris-HCl)**

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

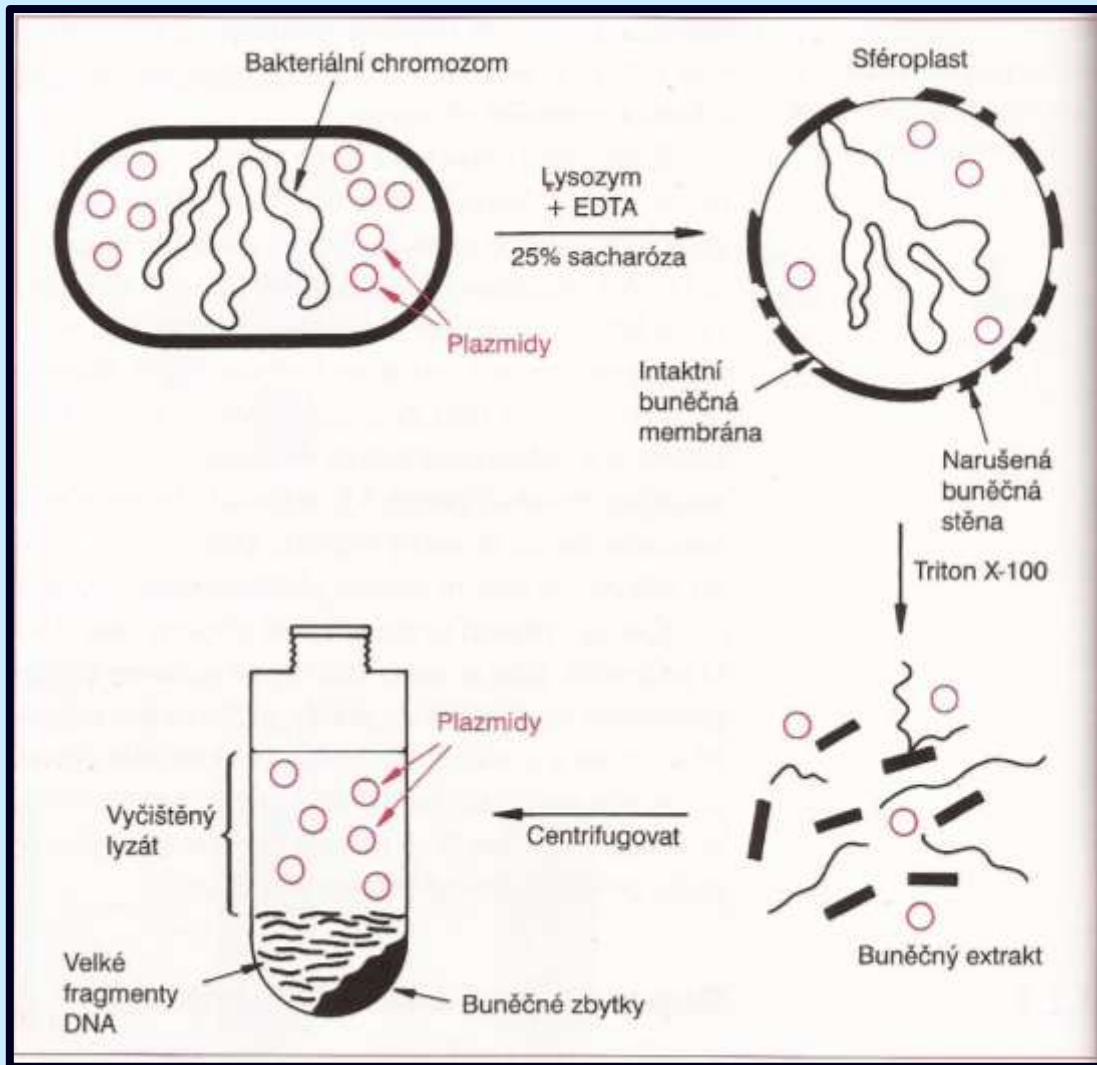
Separace na základě velikosti

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

I přečištěný lyzát ale obsahuje zbytky chromozómové DNA

Podívejme se na obrázek

Příprava vyčištěného lyzátu



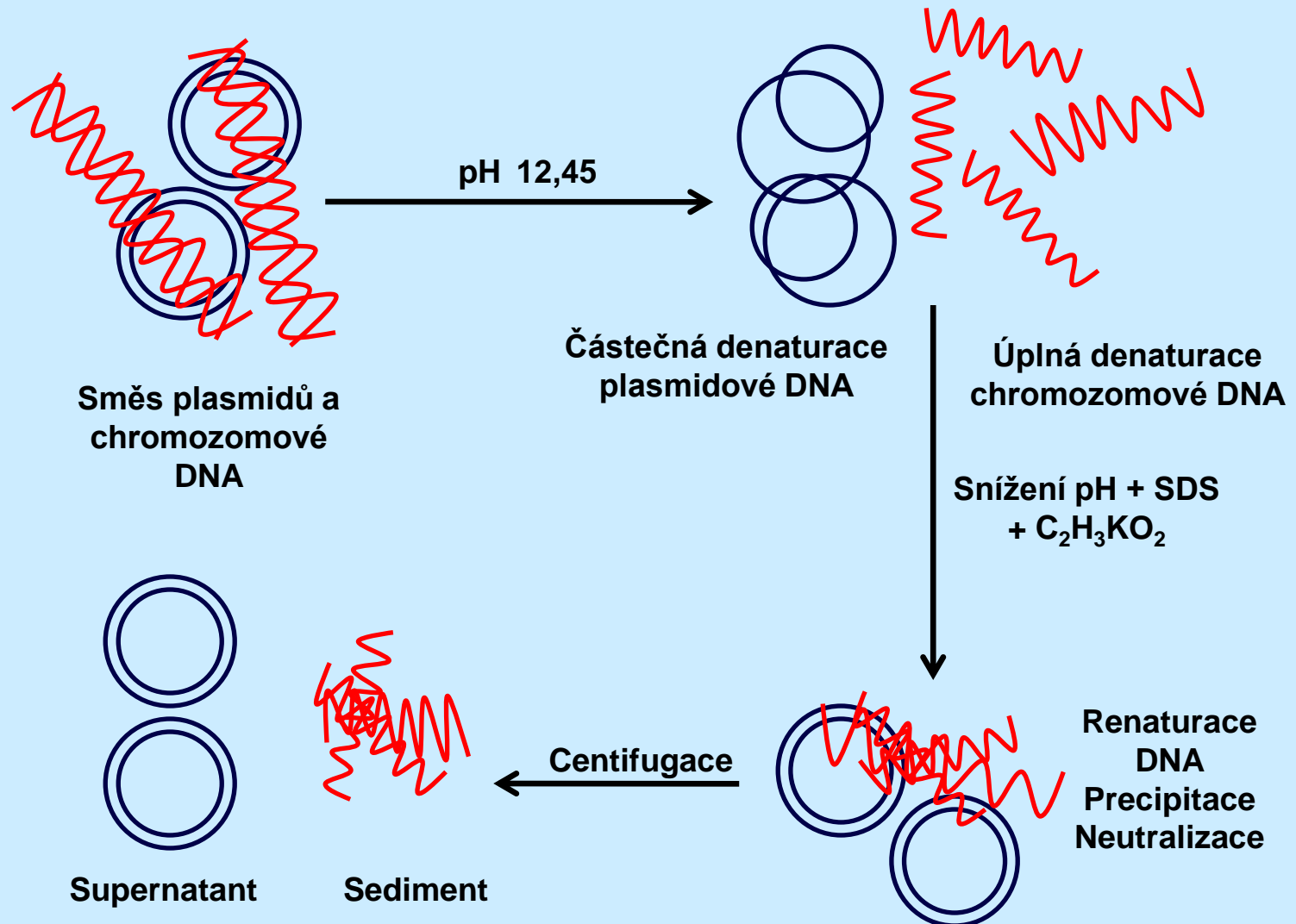
- Šetrné porušení buněk – vytvoření sféroplastů
- Lyze buněk neiontovým detergentem (Triton X-100) – SDS by chromozómovou DNA rozbil
- Centrifugací vzniká přečištěný lyzáat

Izolace plasmidů alkalickou denaturací

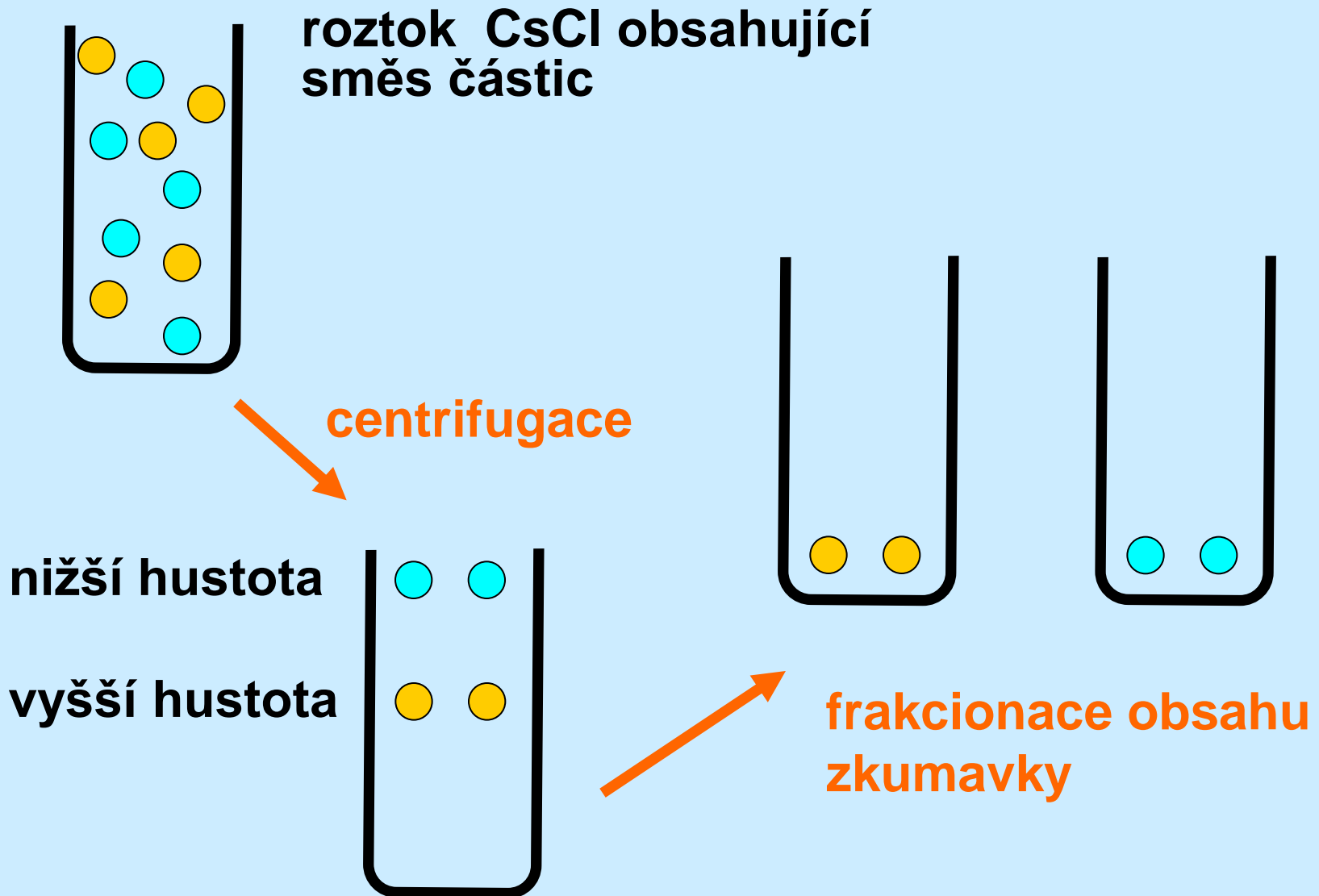
- Je založena na skutečnosti, že linearizovaná DNA po denaturaci a následné renaturaci nedokáže reasociovat, na rozdíl od kružnicové DNA
- Denaturace se provádí při pH = 12,0 až 12,5 (ideální je 12,45)
- Následuje rychlá renaturace při které lineární molekuly vytvoří agregáty, kdežto plasmidové molekuly 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



Izopyknická centrifugace



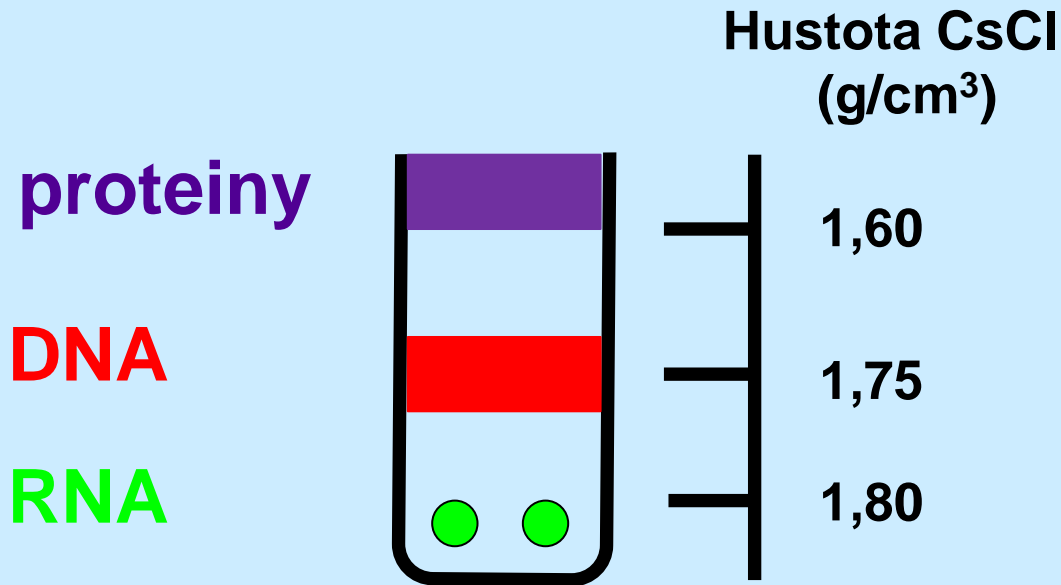
Parametry izopyknické centrifugace

- **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

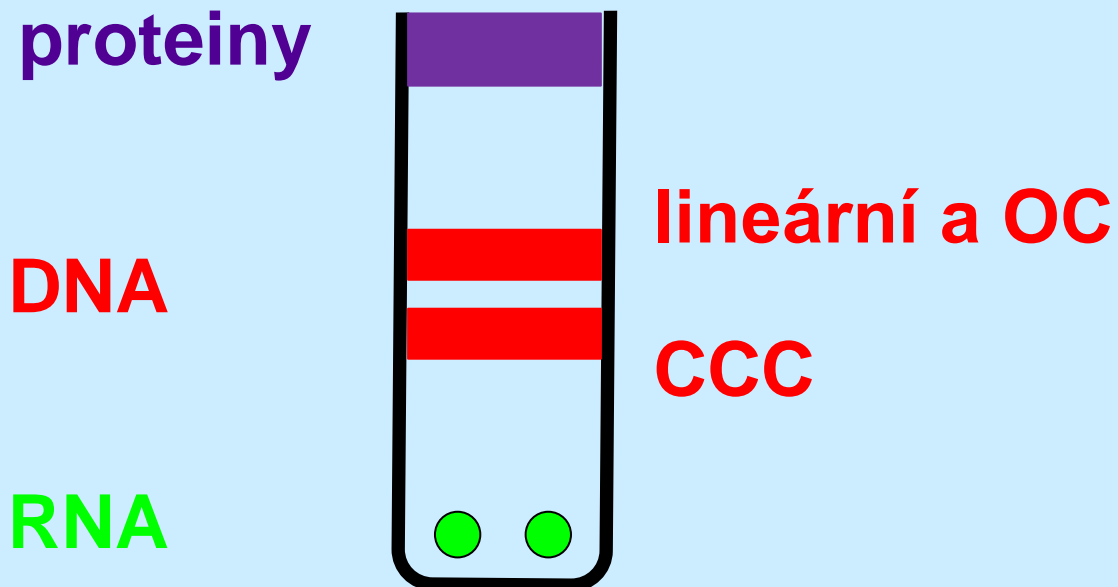
- **Lyzát je „obarven“ ethidium bromidem**
- **Vmezeřením EtBr se sníží vznášivá hustota linerární DNA až o $0,125 \text{ g/cm}^3$**
- **U kružnicové plasmidové DNA jen o $0,085 \text{ g/cm}^3$**



Vytvoří se dvě zóny s DNA

Výsledek po CsCl-EtBr

- Lyzát je „obarven“ ethidium bromidem



Purifikace po CsCl-EtBr

**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**



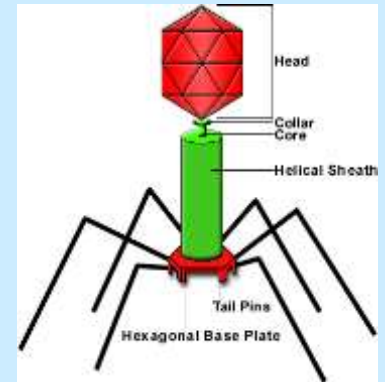
Protokoly pro bakteriální společenstva

- **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 λ - zóna při hustotě $1,45-1,50 \text{ g/cm}^3$)
- 4) Dialýza
- 5) Izolace DNA/RNA fenolem nebo proteinázami

Stanovení koncentrace a čistoty

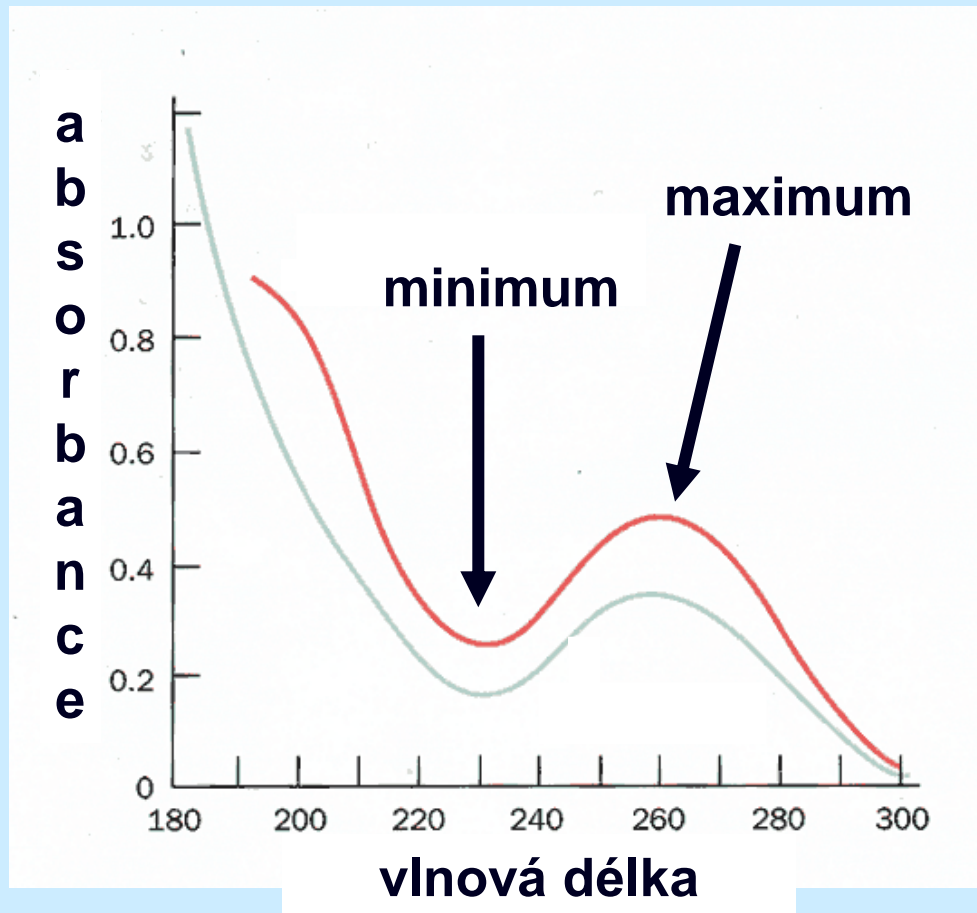
- 1) Spektrofotometricky**
- 2) Fluorescenčně**

Spektrofotometrická metoda

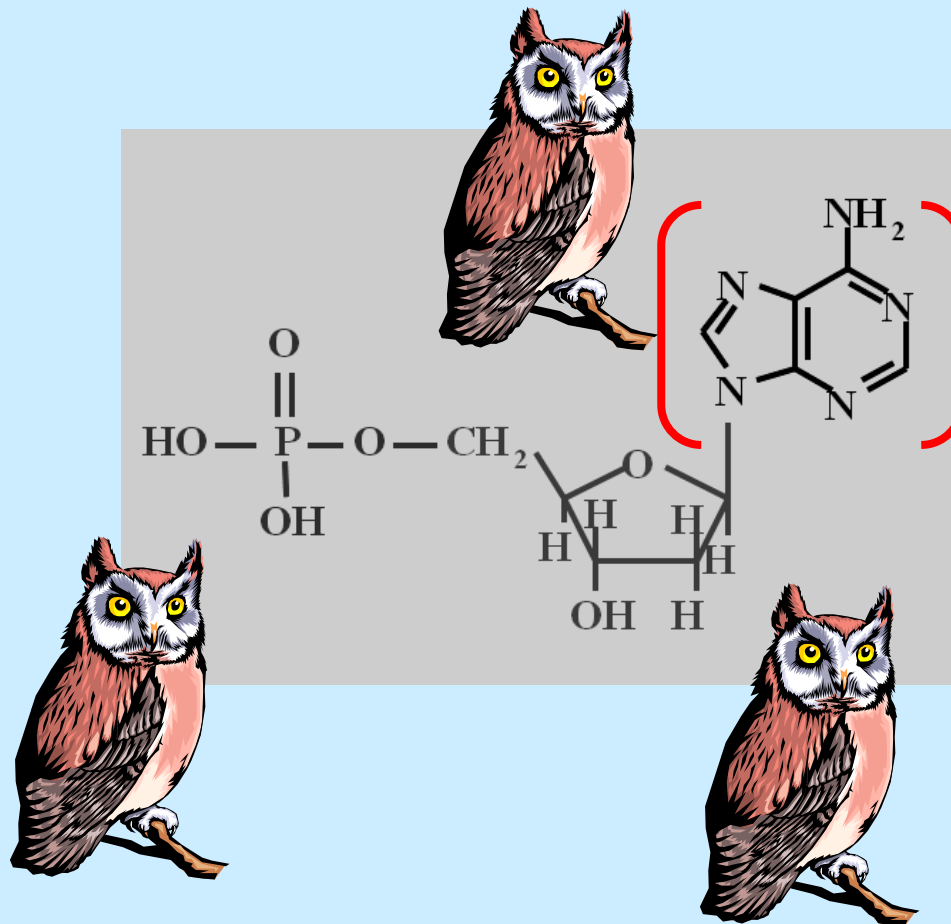
- **čisté vzorky bez většího množství kontaminant**
- **NA absorbují UV záření**
- **maximum absorbance bazí v oblasti 260 nm**
- **optická hustota odpovídá koncentraci**
- **podíl absorbancí = čistota vzorku**

Spektrum DNA

230 až 320 nm



Kterou částí nukleové kyseliny absorbují UV záření?



Koncentrace nukleových kyselin

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

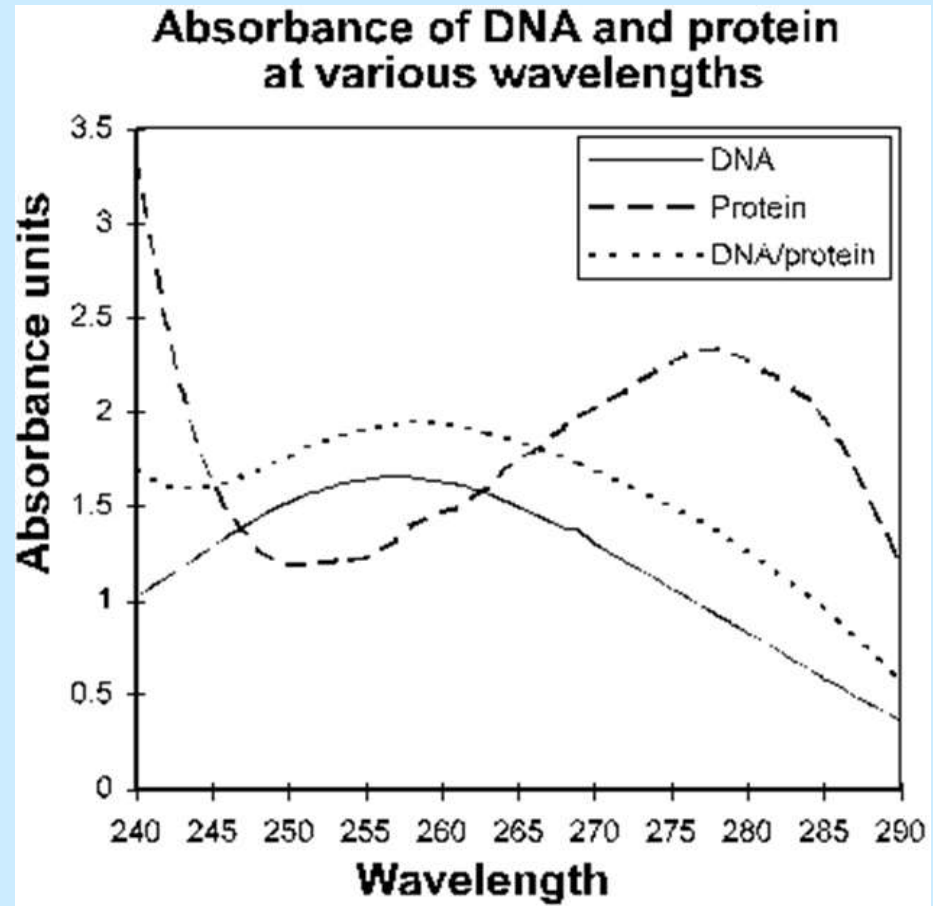
dsDNA ~ 50 $\mu\text{g/ml}$

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

$$OD_{260}/A_{280} = 1,8$$

< 1,8 = kontaminace proteiny

> 1,8 = kontaminace RNA

$$OD_{260}/A_{230} > 2,0 \text{ (ale menší než 3,0)}$$

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

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

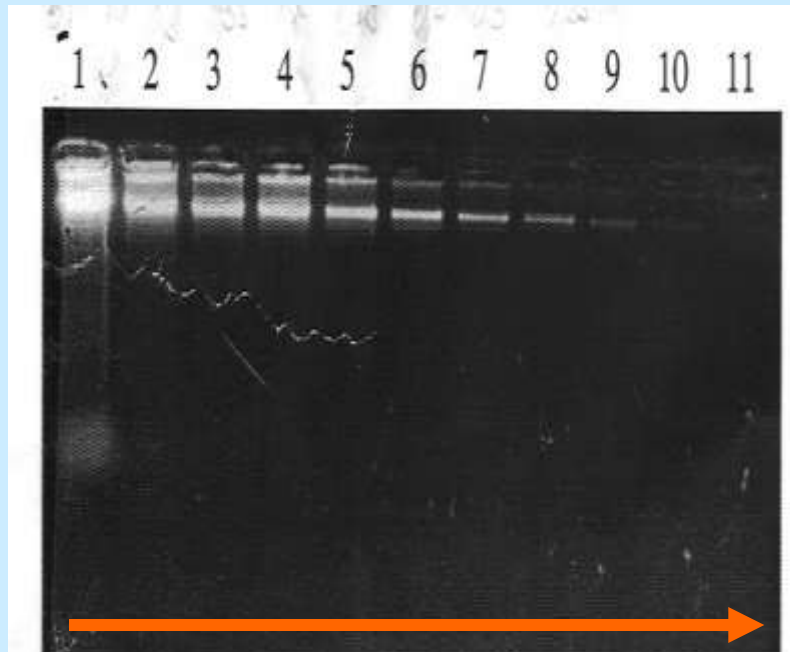


Fluorescenční metoda

- 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 luminiscenčních 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**