

Cvičení č. 4

# Izolace a charakterizace genomové DNA

Přírodovědecká fakulta MUNI



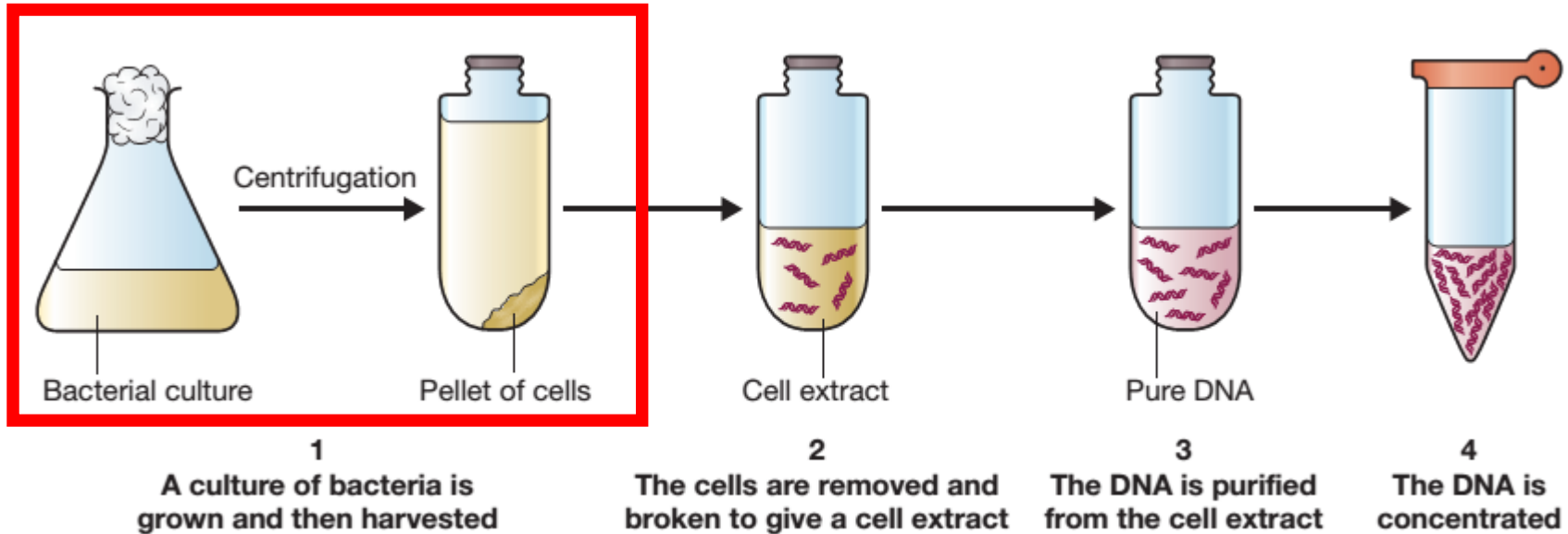
# CO NÁS DNES ČEKÁ...

- 1) Teoretický úvod k tématu
- 2) Seznámení se s protokolem
- 3) Nastudování protokolu k izolačnímu kitu
- 4) Izolace genomové DNA z tekuté bakteriální kultury
- 5) Ověření koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky
- 6) Příklady

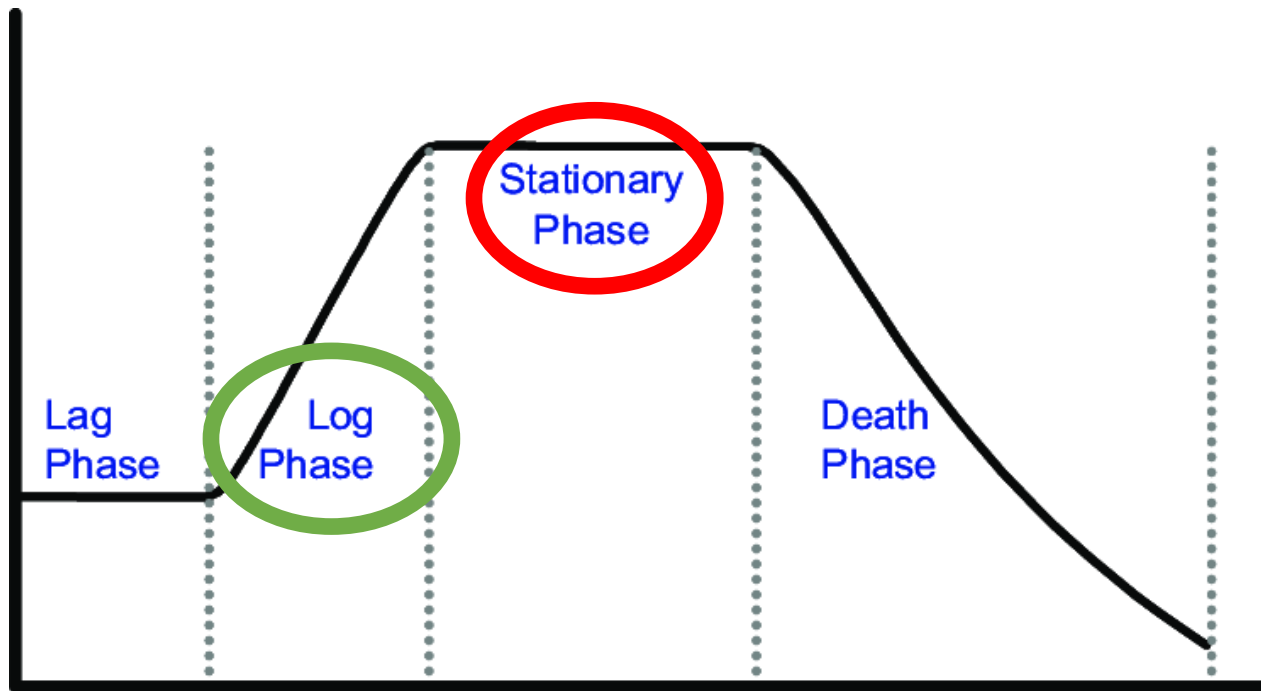
**Nezbytná podmínka další práce/charakterizace...**



# PRO IZOLACI NK POTŘEBUJEME ČTYŘI JEDNODUCHÉ KROKY



# RŮST BAKTERIÁLNÍ KULTURY



Jak izolujeme DNA z 99 % mikroorganismů,  
které nejsou v laboratoři kultivovatelné?

# MÉDIA PRO KULTIVACI

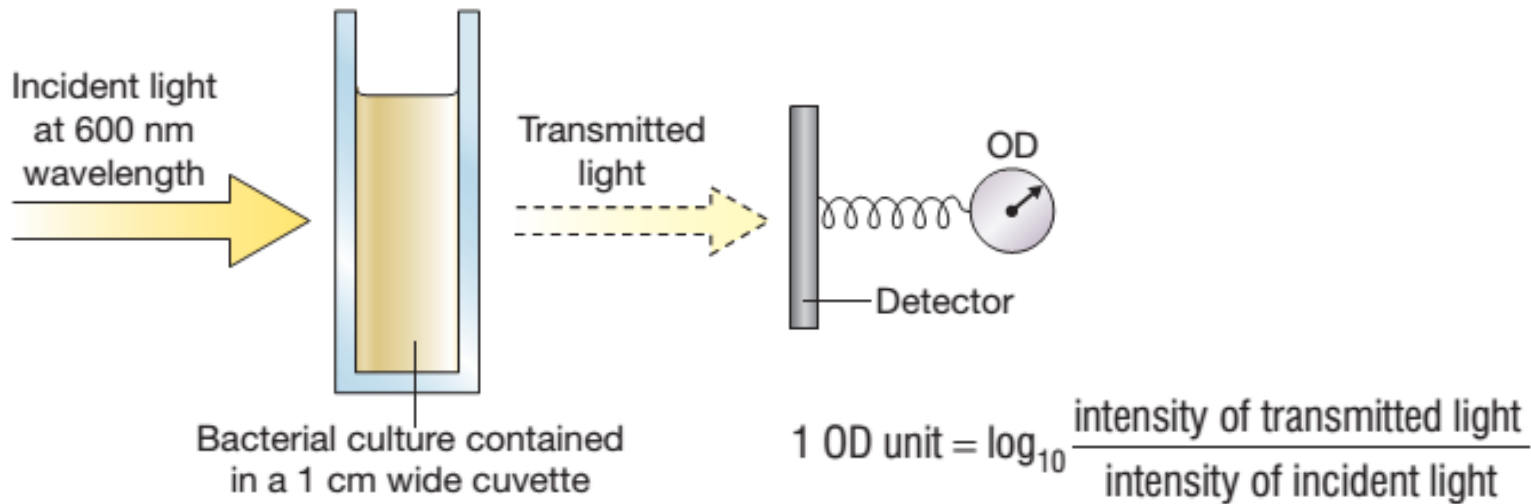
# MÉDIA PRO KULTIVACI

## Nedefinovaná (komplexní) média

- LB medium (lysogeny broth, Luria-Bertani médium)
- Složení není přesně známo! Dostačující pro izolaci NK.

MEDIUM	COMPONENT	g/l OF MEDIUM
M9 medium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0
	NaCl	0.5
	NH <sub>4</sub> Cl	1.0
	MgSO <sub>4</sub>	0.5
	Glucose	2.0
	CaCl <sub>2</sub>	0.015
LB (Luria-Bertani medium)	Tryptone	10.0
	Yeast extract	5.0
	NaCl	10.0

# NAMNOŽENÍ *ESCHERICHIA COLI*



## Jak měřit hustotu?

- Optická hustota při 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ )
- $\text{OD}_{600} = 1 \sim$



# CENTRIFUGACE

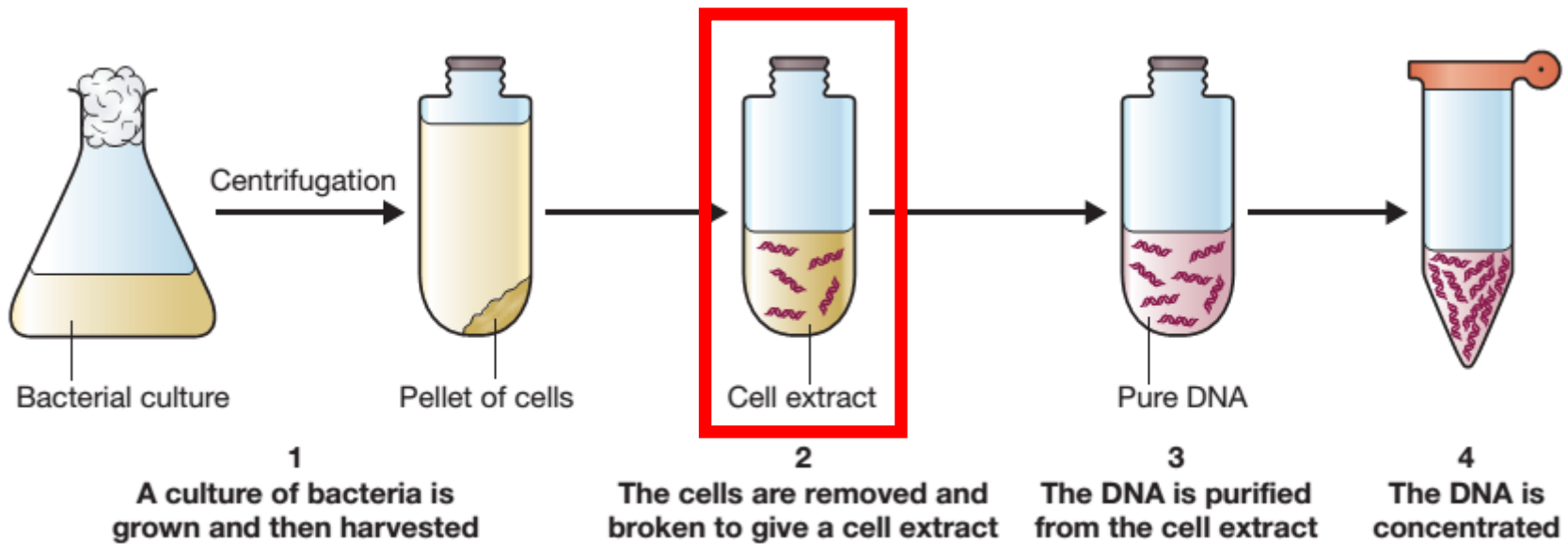
- Separační metoda – i pro makromolekuly
- Chování částic v odstředivém poli dáno jejich vlastnostmi a povahou prostředí
- **RCF** (  $\text{RCF} = g \cdot \left( \frac{r}{1000} \right) \cdot \left( \frac{\text{RPM}}{1000} \right)^2$  ) = **g** (  $\text{RCF} = g$  )  
 $\neq$  **rpm** (  $\text{rpm} = \frac{2\pi \cdot r}{60} \cdot \text{RPM}$  )
- Správné je uvádět g nebo RCF, případně rpm a typ rotoru

$$\text{RCF nebo } g = 1.12 \times r \text{ (mm)} \times (\text{RPM}/1000)^2$$

# CENTRIFUGACE - OTÁZKY

- **Jaké typy centrifugace znáte?**
- **Jaké jsou mezi nimi rozdíly?**
- **Co charakterizuje rychlost pohybu částice při centrifugaci?**

# PRO IZOLACI NK POTŘEBUJEME ČTYŘI JEDNODUCHÉ KROKY



# ODSTRANĚNÍ OBALŮ CHEMICKY

- Chemická činidla narušují integritu buněčných stěn
- Důležité je chemické složení buněčné stěny
- Klasický postup u *E. coli* a příbuzných bakterií:

**lyzozym + EDTA + SDS**

**...a jak to funguje?**



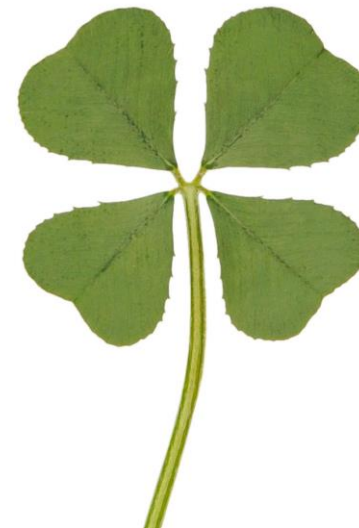
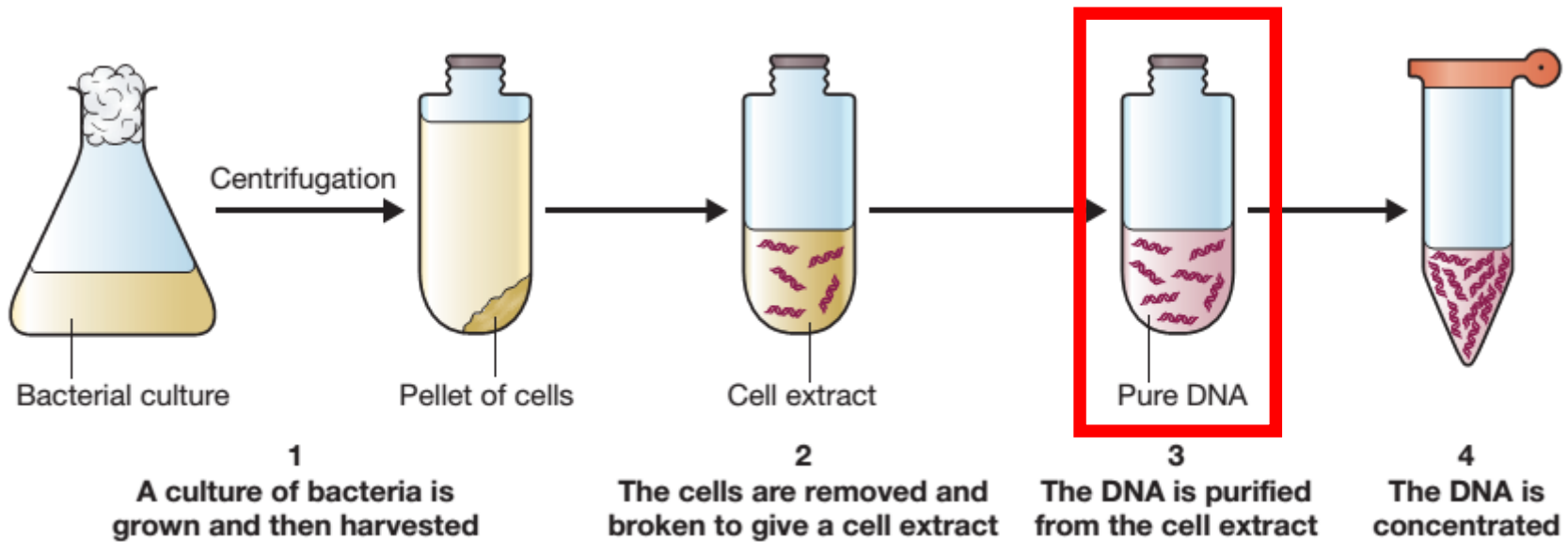
# ODSTRANĚNÍ OBALŮ FYZIKÁLNĚ

**Skleněnými kuličkami (Bead beating)**

**Sonikace**

**Osmotický šok**

# PRO IZOLACI NK POTŘEBUJEME ČTYŘI JEDNODUCHÉ KROKY



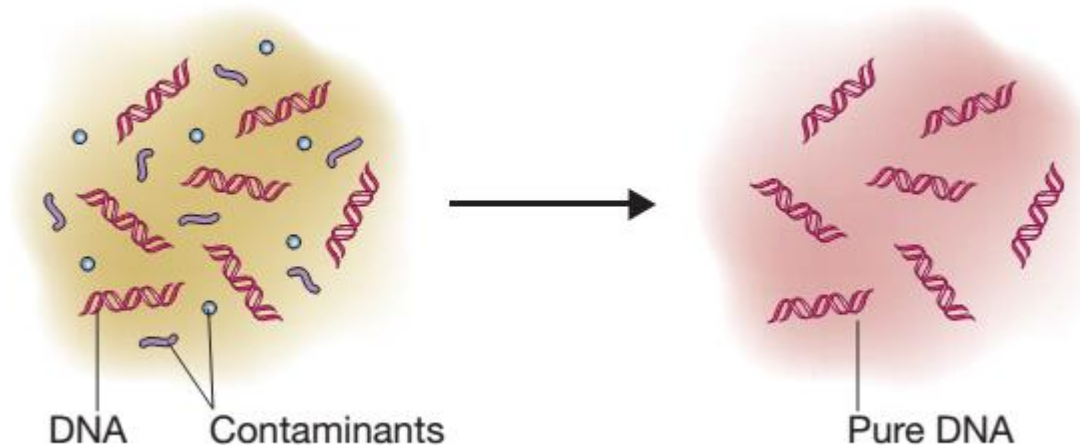
## Centrifugace lyzovaných buněk

- Nerozpustné buněčné zbytky sedimentují, zatímco rozpustné složky vč. NK, lipidů proteinů, polysacharidů a nízkomolekulárních látek zůstávají v supernatantu a tvoří tzv. **bezbuněčný extrakt** (cell-free extract)

# PURIFIKACE NK Z EXTRAKTU

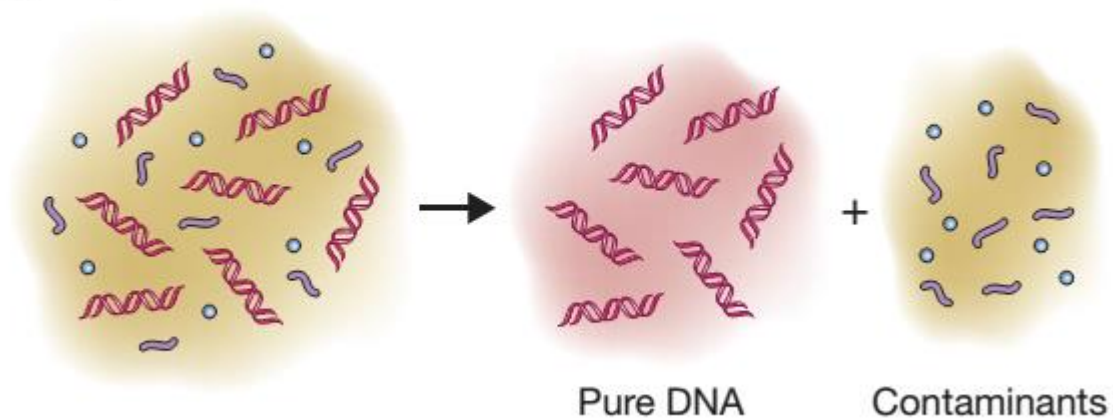
Degradace

(a) Degradation of contaminants



Separace/extrakce

(b) Separation of DNA from contaminants

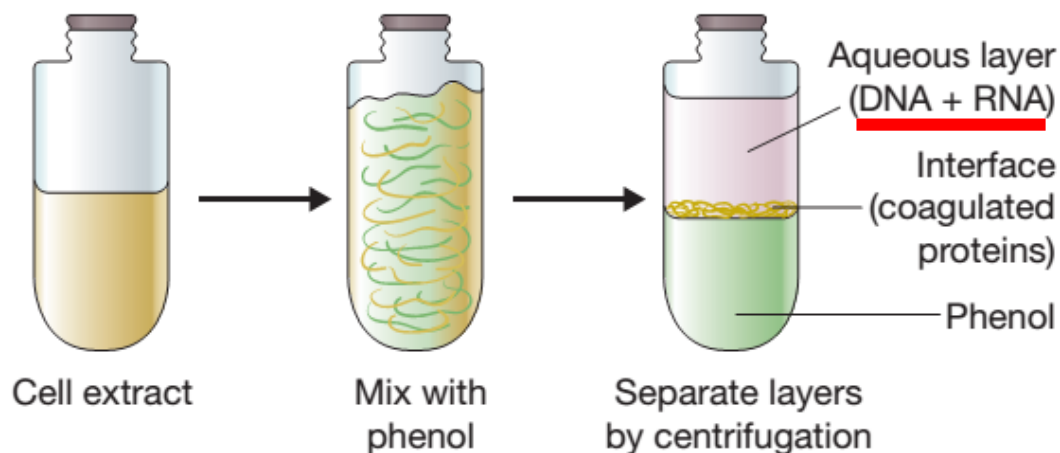




# EXTRAKCE ~~PROTEINŮ~~ NK SMĚSÍ FENOL-CHLOROFORM

## Fenolová extrakce podle Marmur 1961

- Denaturace a vysrážení proteinů mezi dvěma fázemi
- Po centrifugaci oddělení těžší organické fáze od lehčí vodné fáze obsahující NK (pokud fenol ekvilibrován neutrálním či zásaditým puforem)



**Kyselý fenol**

→ RNA

→ DNA

# JINÉ ZPŮSOBY ODSTRANĚNÍ KONTAMINANT

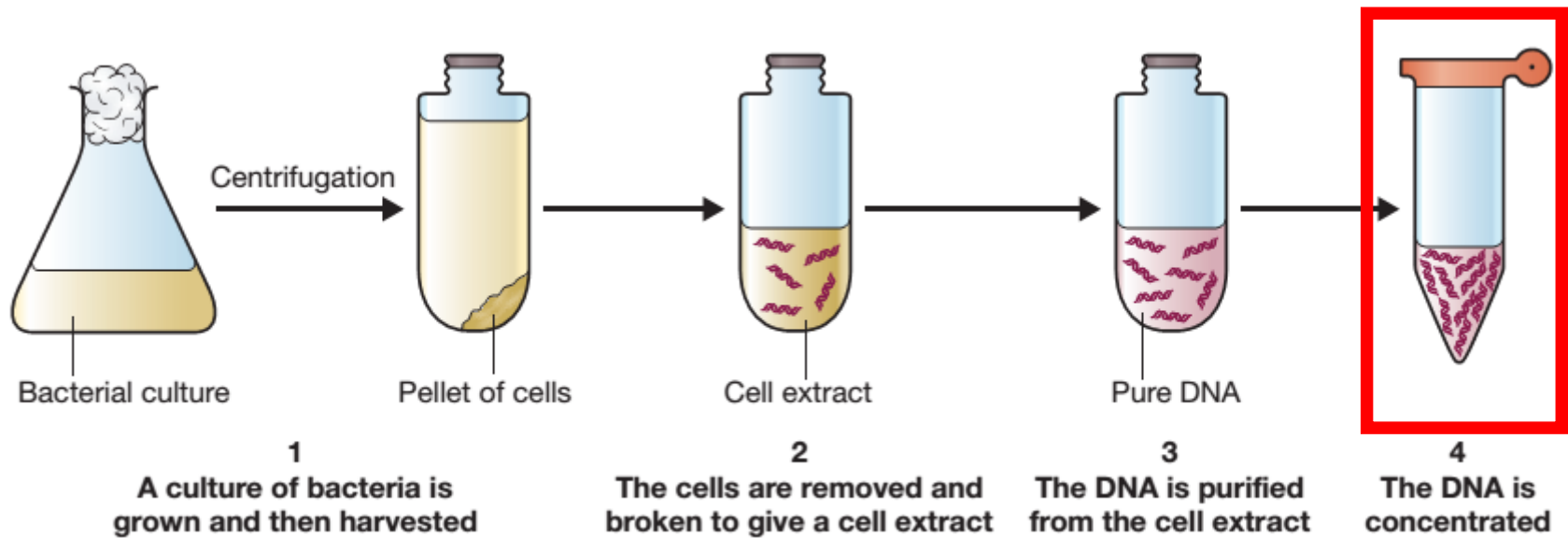
## **Detergent cetyltrimetylamonium bromid (CTAB)**

- S nukleovými kyselinami tvoří nerozpustný komplex
- V supernatantu po centrifugaci proteiny atd.
- DNA v peletu, rozpustíme ji v 1 M NaCl a dočistíme

## **Guanidium thiokyanát**

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

# PRO IZOLACI NK POTŘEBUJEME ČTYŘI JEDNODUCHÉ KROKY



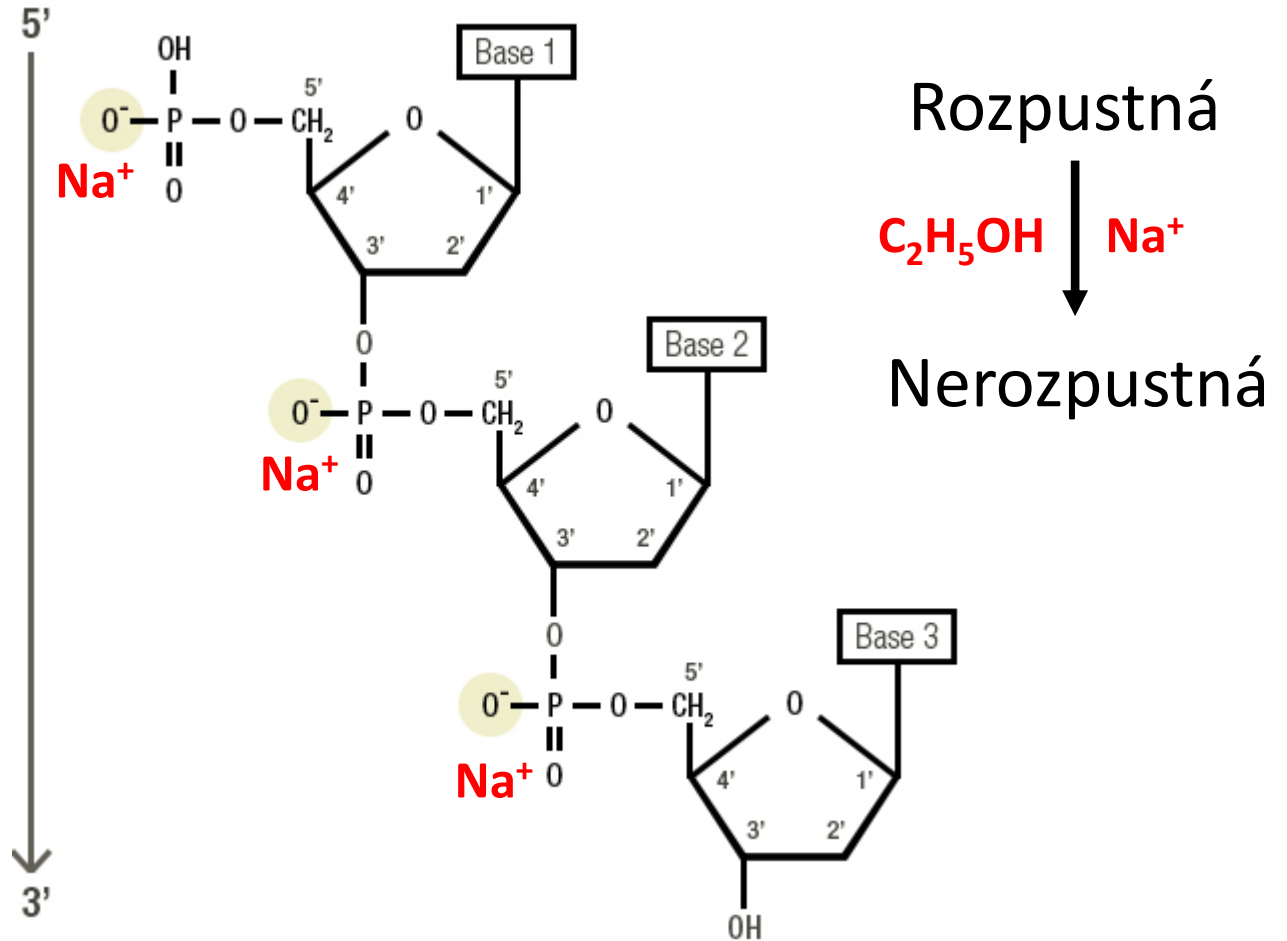
# Zakoncentrování NK precipitací

- Jedna ze základních metod izolace a koncentrace biologických makromolekul
- Do roztoku, obsahujícího danou makromolekulu, se přidá **precipitační činidlo** (síran amonný, ethanol se solí, aceton se solí apod.)
- Makromolekuly se vysráží, aniž dojde k nevratné denaturaci. Mohou se proto znovu rozpustit a použít ve své nativní, biologicky aktivní podobě

# POSTUP PRECIPITACE

- Přidání ethanolu (absolutního) či izopropanolu
- Přidání jednomocných kationtů ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) v podobě soli (2 M NaCl, 3 M octan sodný...)
- Koncentrování vychlazeného (až  $-70^{\circ}C$ ) vzorku centrifugací
- Promytí sedimentu s NK 70 % ethanolem
- Odpaření zbytkového ethanolu a rozpuštění NK ve vodě či nízkomolárním TE pufu (Tris-HCl, EDTA)

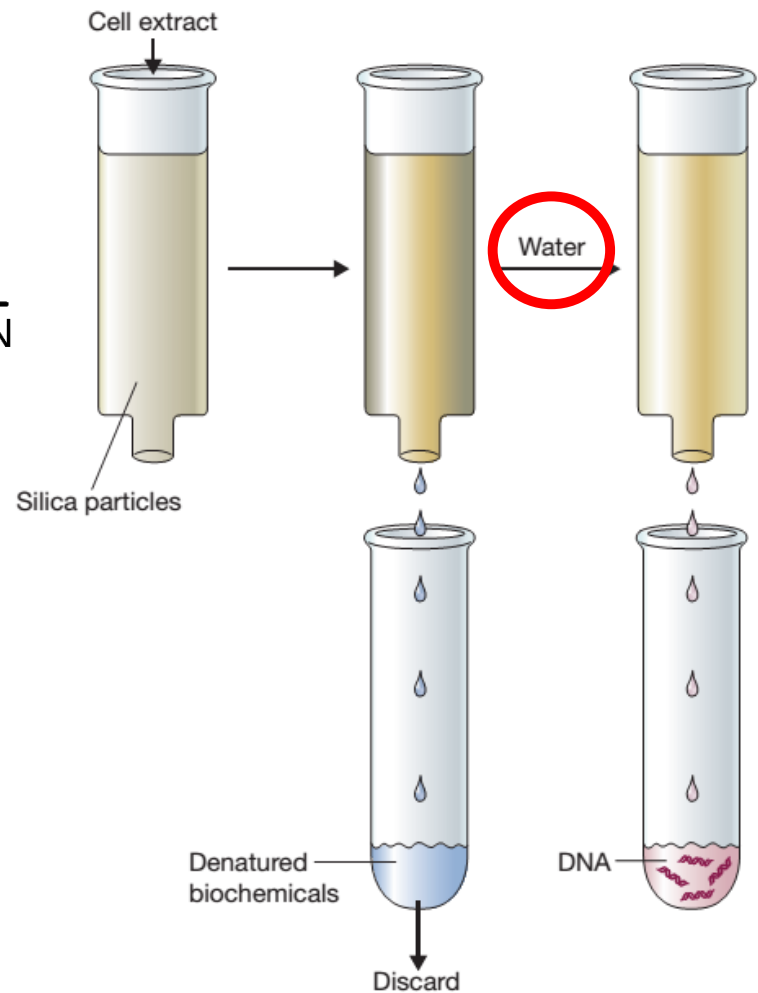
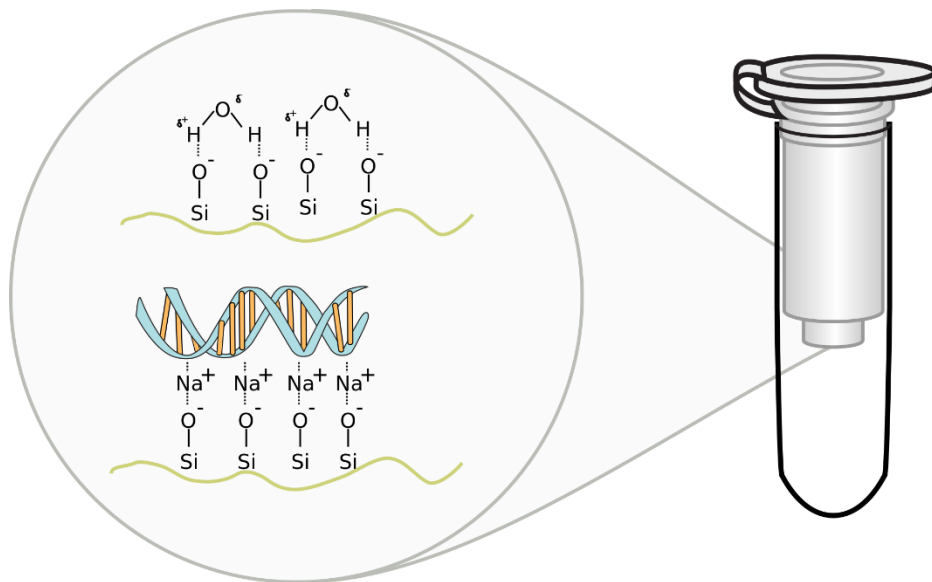
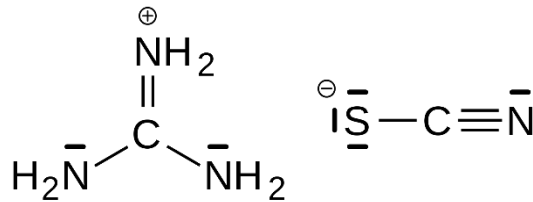
# ...a jaký je vlastně princip???



# KOMERČNÍ KITY PRO IZOLACI NK (SPIN COLUMNS)

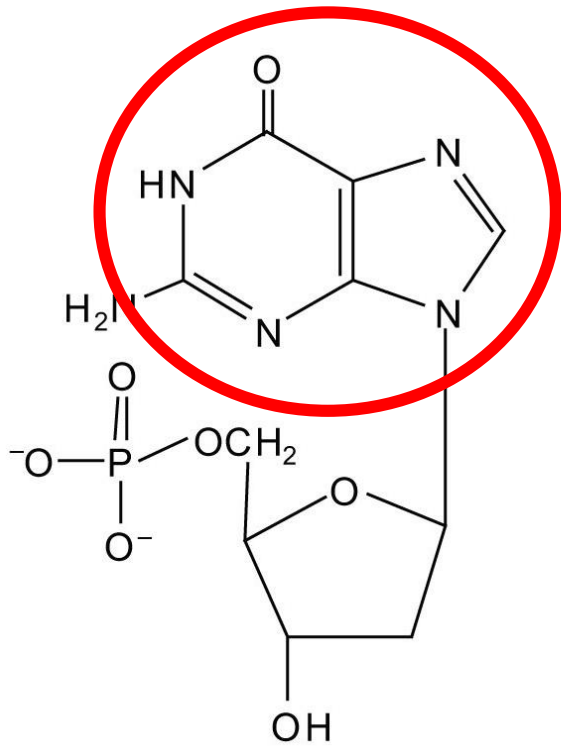
- Kolonky s křemičitou maticí
- Vazba usnadněna **guanidinium thiokyanátem**

**thiokyanátem**

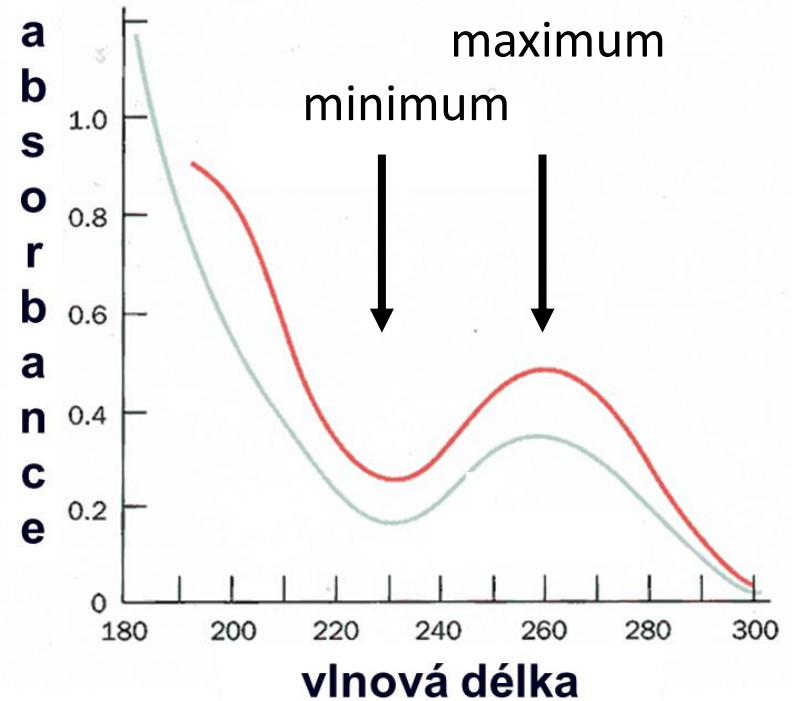


<https://en.wikipedia.org>

# SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA



Spektrum DNA (230-320 nm)



Která část NK absorbuje UV?





# KONCENTRACE NK

$$OD_{260} = 1.0$$

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

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

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



# ČISTOTA DNA

Stanovuje se na základě poměrů absorbancí při různých vlnových délkách

$$A_{260/280} = 1.8$$

< 1.8 = kontaminace proteiny

> 1.8 = kontaminace RNA

$$A_{260/230} > 2.0 \text{ (ale } < 3.0)$$

< 2.0 = kontaminace látkami z izolačních souprav

