



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

**Bi5596**

**Moderní metody v ekotoxikologii**

**STUDIUM RNA & DNA I.**

**Jak je izolovat a jak s nimi nakládat**

**RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.**  
**[sovadinova@recetox.muni.cz](mailto:sovadinova@recetox.muni.cz)**

**podzim 2015**

# CÍLE PŘEDNÁŠKY

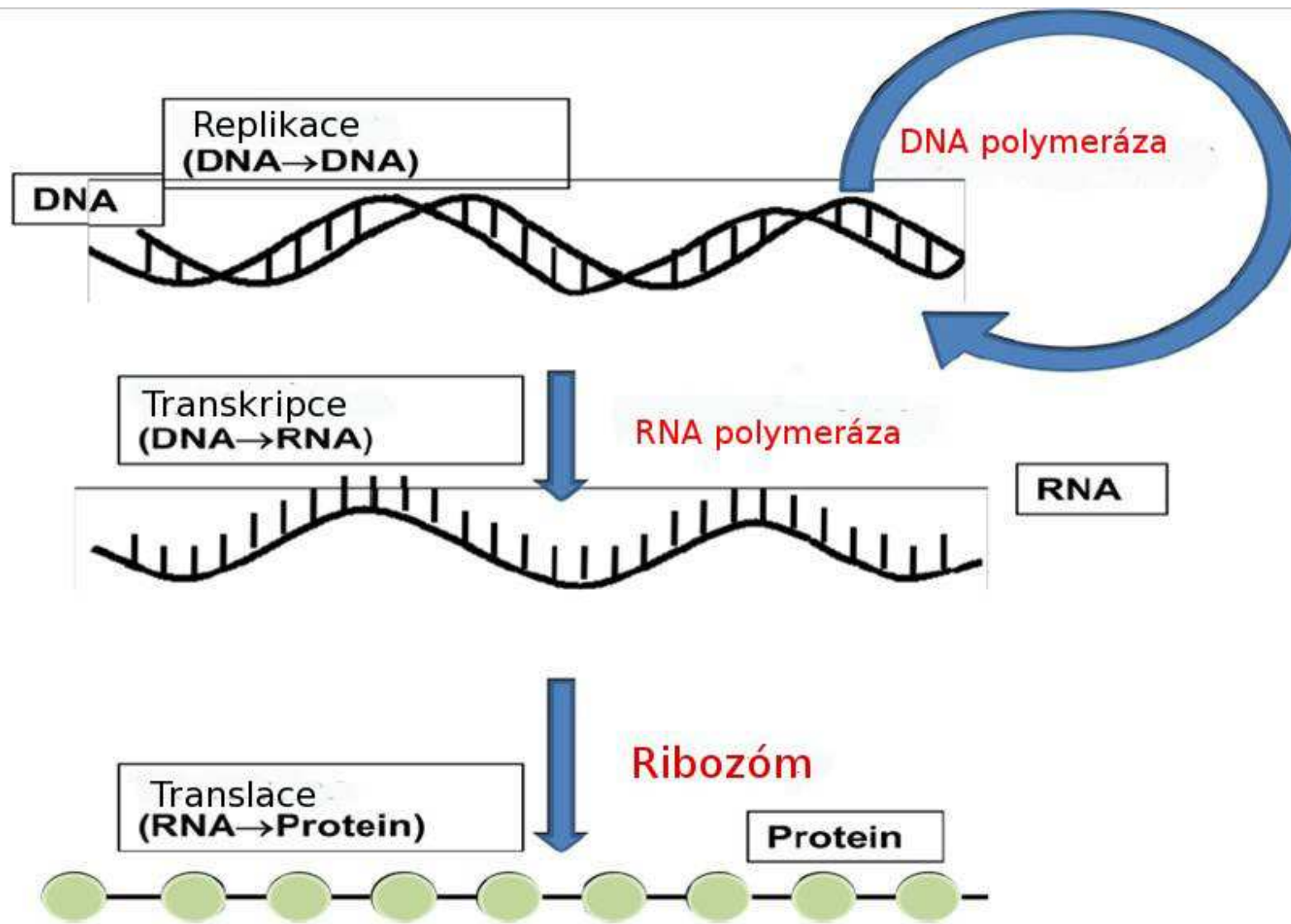
- ✓ Co to jsou NK
- ✓ Jak je získáme
- ✓ Jak je poznáme
- ✓ Jak je rozeznáme – DNA vs. RNA
- ✓ Jak s nimi manipulujeme
- ✓ Jak je zkoumáme



# CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ Co to jsou NK
- ✓ Jak je získáme
- ✓ Jak je poznáme
- ✓ Jak je rozeznáme – DNA vs. RNA
- ✓ Jak s nimi manipulujeme
- ✓ Jak je zkoumáme





## Proces přenosu genetické informace ⇒ Centrální dogma molekulární biologie

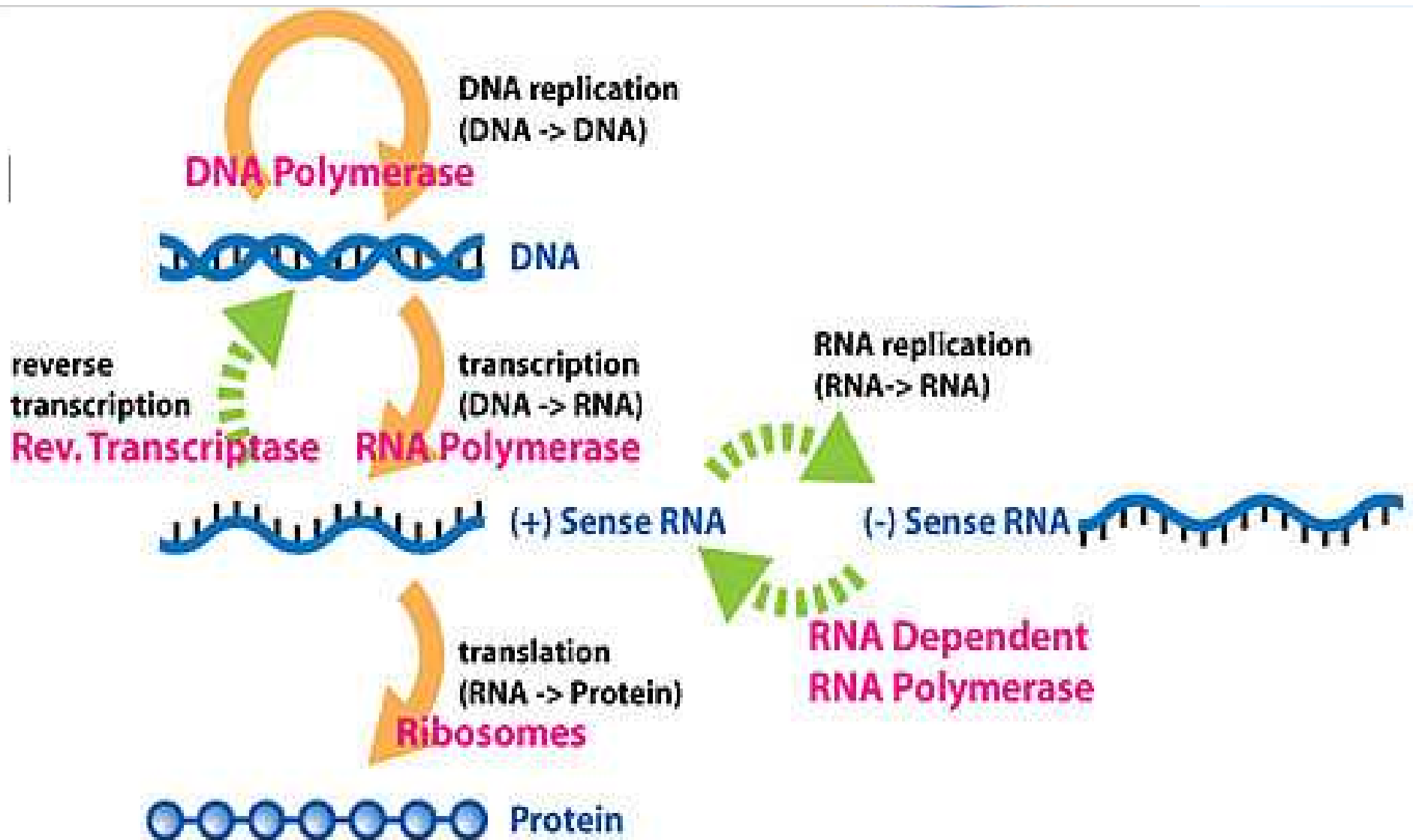
[www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf](http://www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf),

[http://en.wikipedia.org/wiki/Central\\_dogma\\_of\\_molecular\\_biology#cite\\_note-crick1970-2](http://en.wikipedia.org/wiki/Central_dogma_of_molecular_biology#cite_note-crick1970-2)



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

<https://www.youtube.com/watch?v=yVQ1or5FYx8><sup>3</sup>



## Proces přenosu genetické informace ⇒ Centrální dogma molekulární biologie

[www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf](http://www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf),

[http://en.wikipedia.org/wiki/Central\\_dogma\\_of\\_molecular\\_biology#cite\\_note-crick1970-2](http://en.wikipedia.org/wiki/Central_dogma_of_molecular_biology#cite_note-crick1970-2)



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

<https://www.youtube.com/watch?v=yVQ1or5FYx8><sup>3</sup>

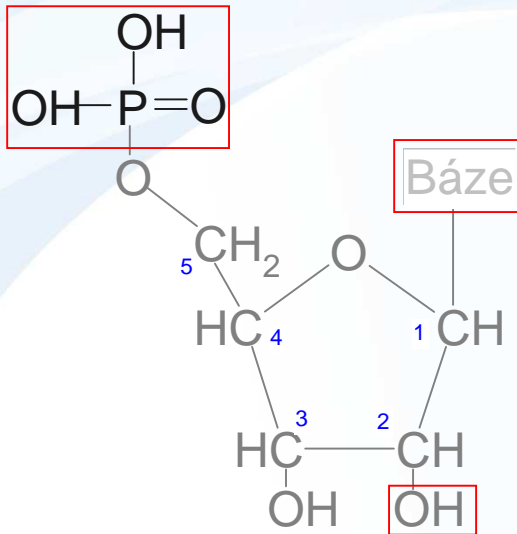
<https://www.youtube.com/watch?v=yVQ1or5FYx8>



# NUKLEOVÉ KYSELINY A JEJICH STRUKTURA A FUNKCE



# NK: STRUKTURA

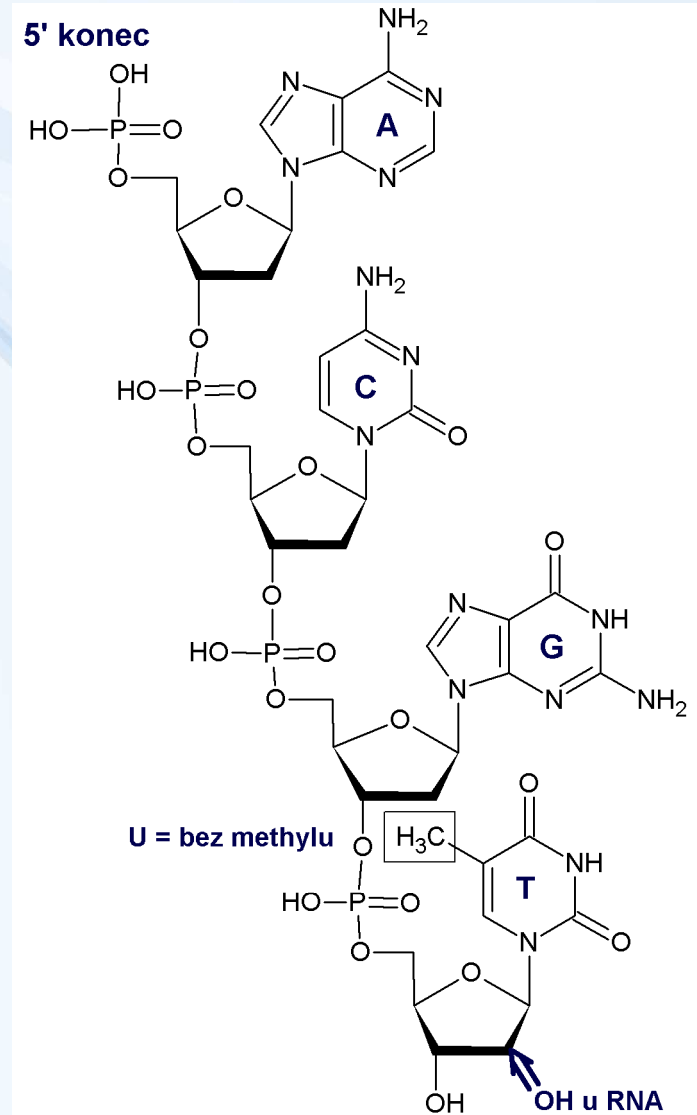


☐ nukleotidové polymery

⇒ nukleotid:

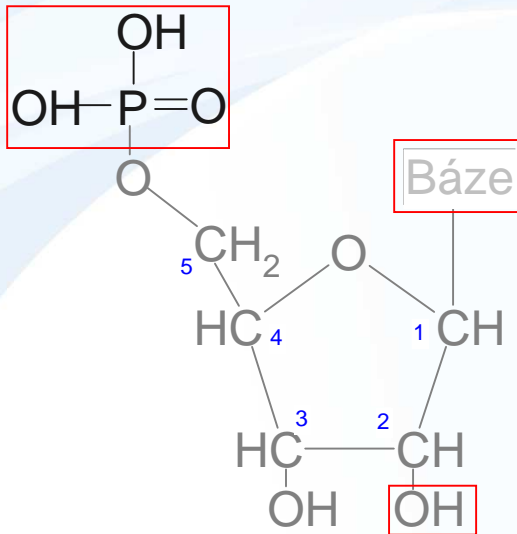
1. dusíkatá báze
2. pentózový cukr
3. fosfátová skupina

Báze (1.)	Nukleosid (2.)	Nukleotid (3.)
Adenin	Adenosin	AMP
Guanin	Guanosin	GMP
Cytosin	Cytidin	CMP
Thymin	Thymidin	dTMP
Uracil	Uridin	UMP





# NK: STRUKTURA

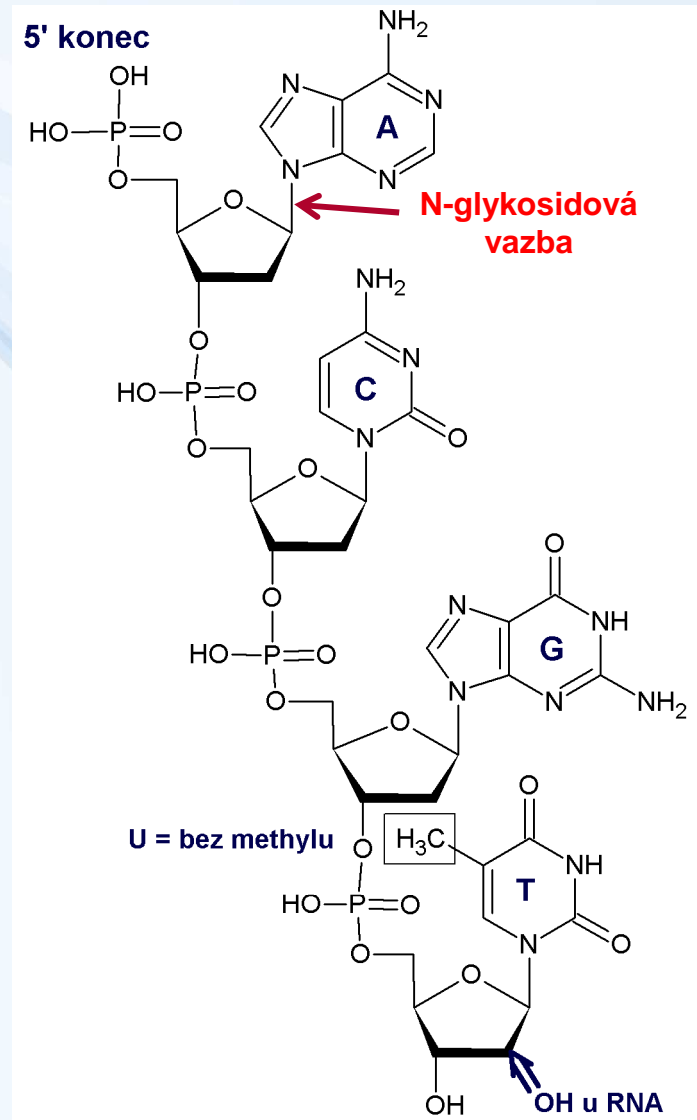


☐ nukleotidové polymery

⇒ nukleotid:

1. dusíkatá báze
2. pentózový cukr
3. fosfátová skupina

Báze (1.)	Nukleosid (2.)	Nukleotid (3.)
Adenin	Adenosin	AMP
Guanin	Guanosin	GMP
Cytosin	Cytidin	CMP
Thymin	Thymidin	dTMP
Uracil	Uridin	UMP

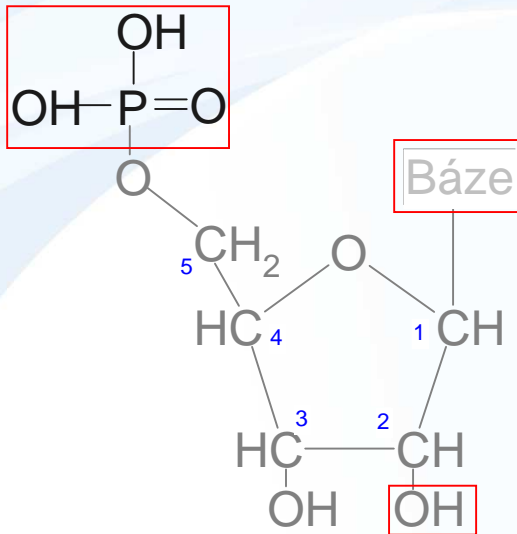


3' konec



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

# NK: STRUKTURA

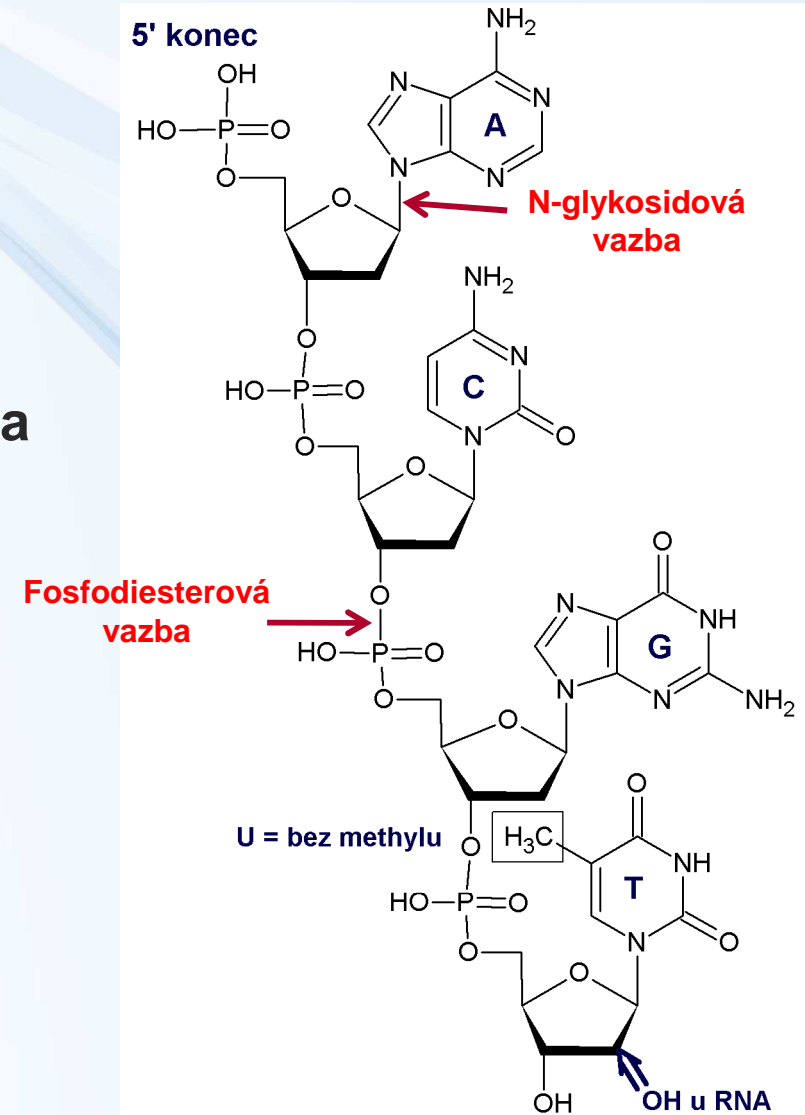


☐ nukleotidové polymery

⇒ nukleotid:

1. dusíkatá báze
2. pentózový cukr
3. fosfátová skupina

Báze (1.)	Nukleosid (2.)	Nukleotid (3.)
Adenin	Adenosin	AMP
Guanin	Guanosin	GMP
Cytosin	Cytidin	CMP
Thymin	Thymidin	dTMP
Uracil	Uridin	UMP

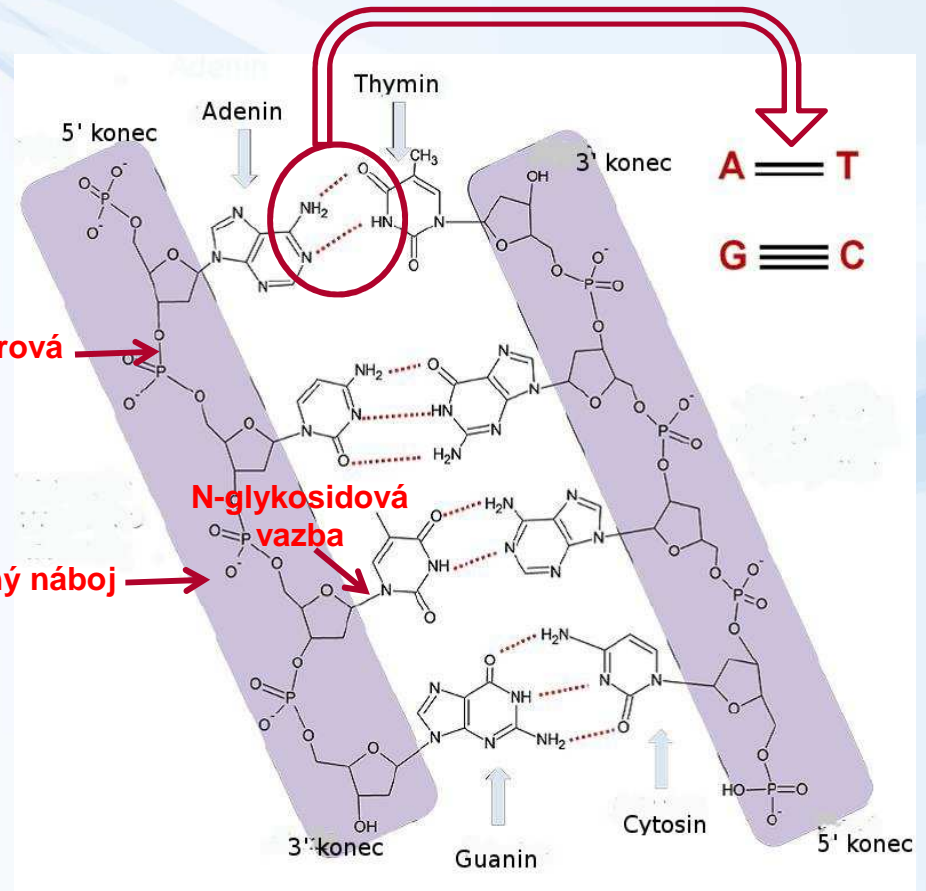
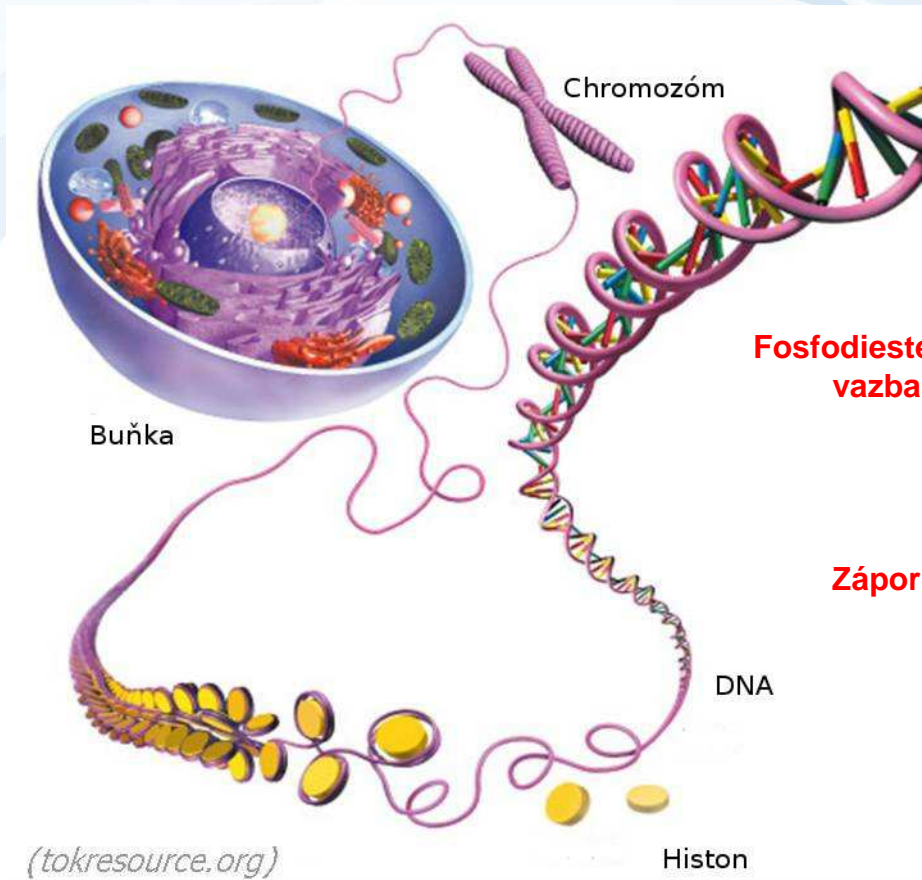


3' konec



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

# DNA: Struktura & funkce



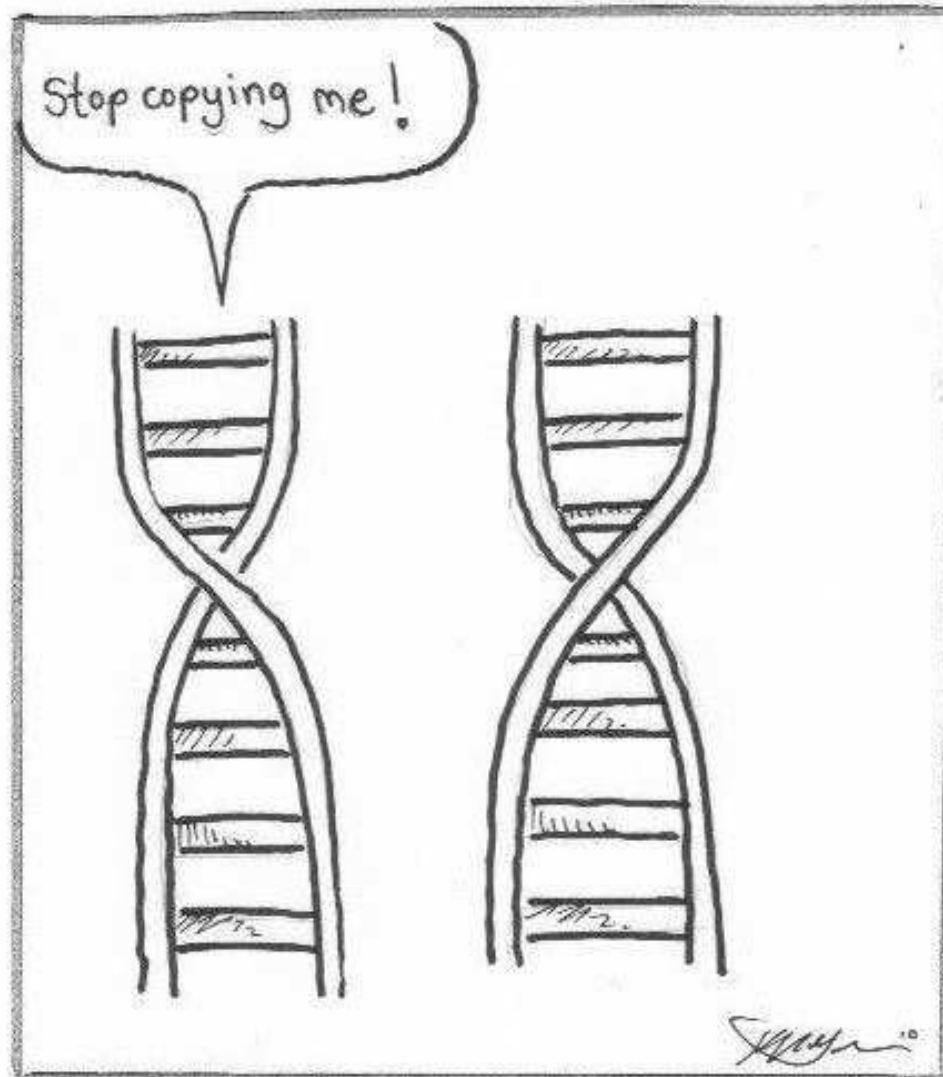
[www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf](http://www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)



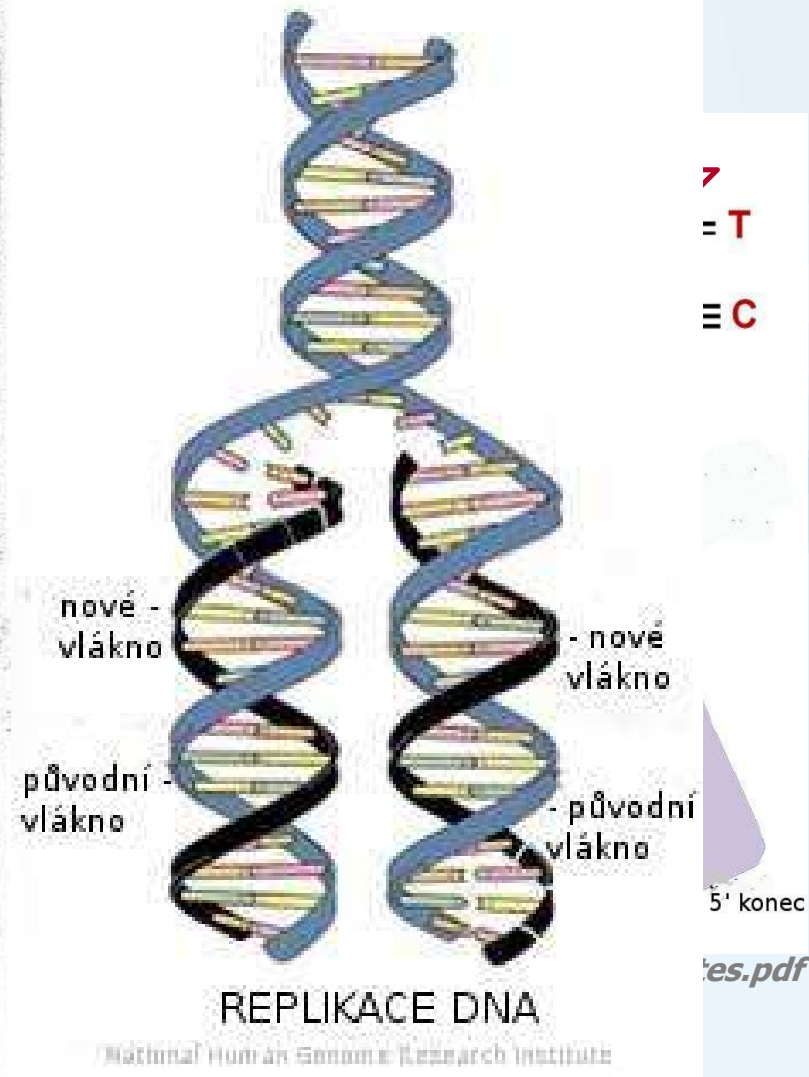
Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

<https://is.muni.cz/do/sci/UEBBiol/DNA-FTBcz/pages/2-19-zkrouceny-zebrik.html>

# DNA: Struktura & funkce



(to)



7  
= T  
≡ C

5' konec

es.pdf



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

<https://is.muni.cz/do/sci/UEBBioI/DNA-FTBcz/pages/2-19-zkrouceny-zebrik.html>

# DNA: Struktura & funkce

- ❑ záporně nabitá  $\Rightarrow$  rozpustná ve vodě, naopak v ethanolu se sráží (bílá barva)
- ❑ denaturace  $\Rightarrow$  vysoká teplota, nízká iontová síla, silně zásadité prostředí (obsah CG)
- ❑ kyselé prostředí  $\Rightarrow$  hydrolýza glykosidových vazeb
- ❑ stabilní  $\Rightarrow$  poločas rozpadu DNA v kosti - asi 521 let (kosterní nález)

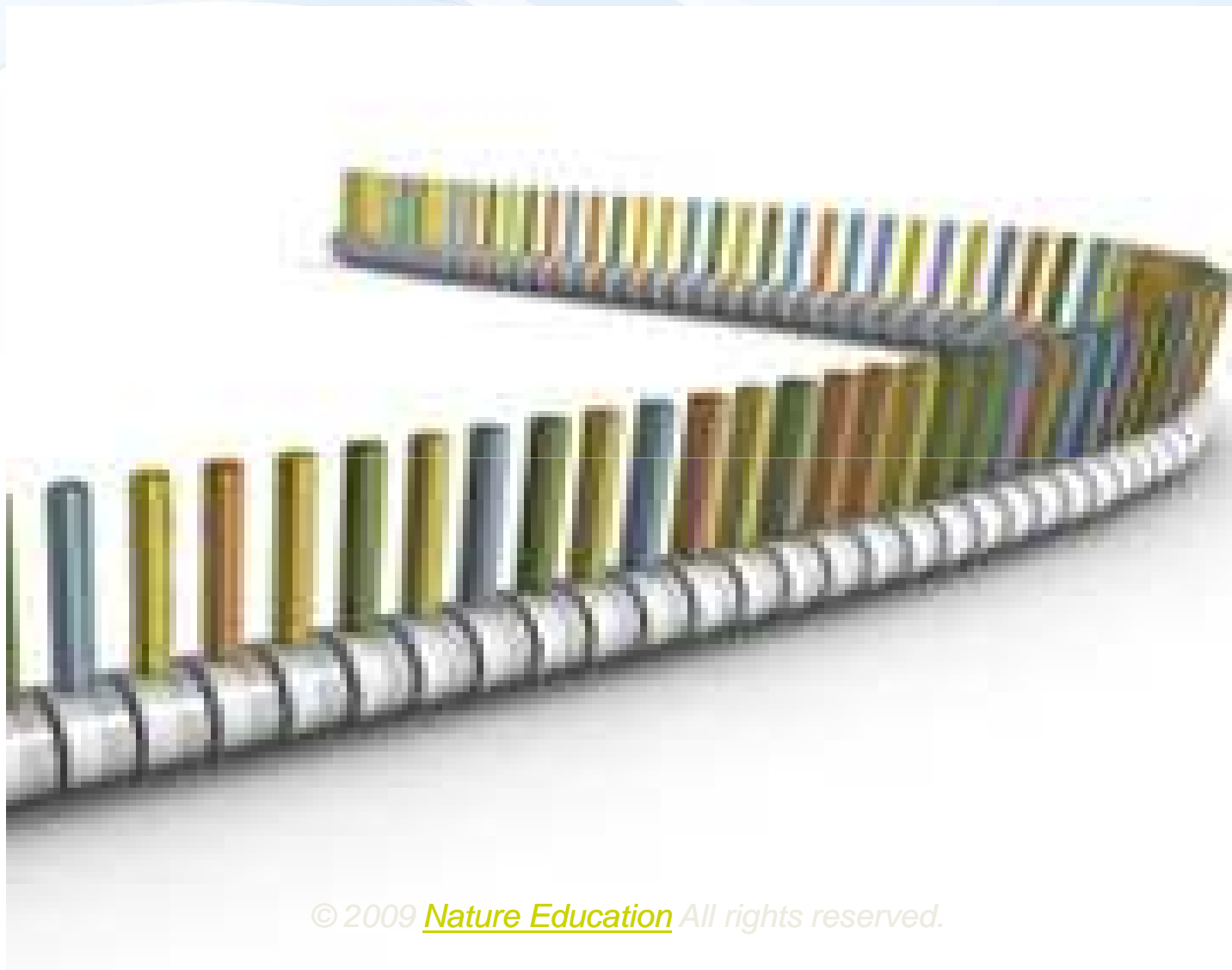
<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/32799/title/Half-Life-of-DNA-Revealed/>

<http://www.astronauti.cz/news/novy-objev-dna-prepisuje-historii-evoluce/>

<http://news.discovery.com/earth/weather-extreme-events/oldest-dna-bacteria-discovered.htm>

- ❑ DNA v roztoku při  $-20^{\circ}$  nebo  $70-80^{\circ}\text{C}$   $\Rightarrow$  několik měsíc až let, při  $4^{\circ}\text{C}$   $\Rightarrow$  několik týdnů

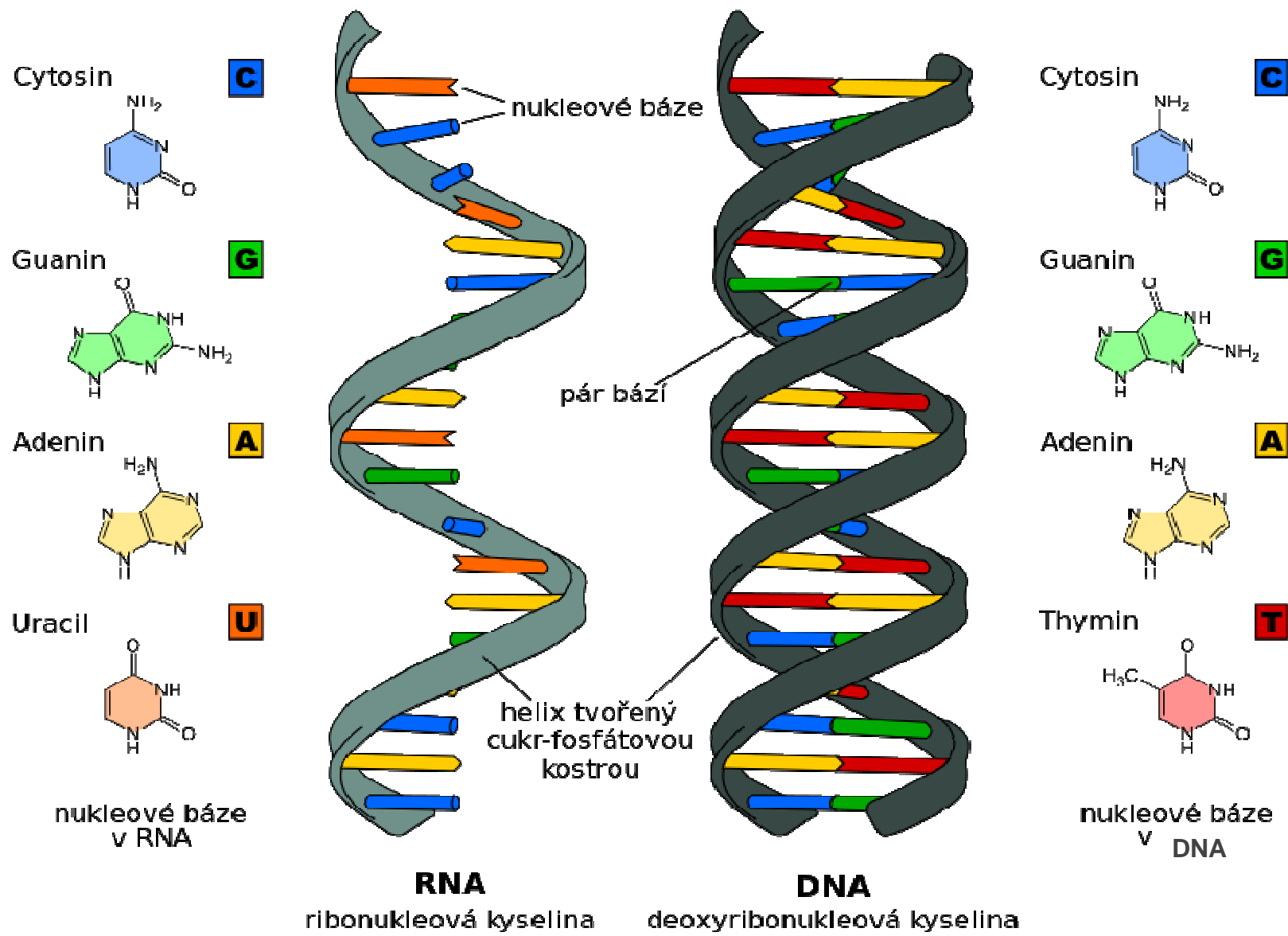
# RNA: Struktura & funkce



© 2009 [Nature Education](#) All rights reserved.



# RNA: Struktura & funkce

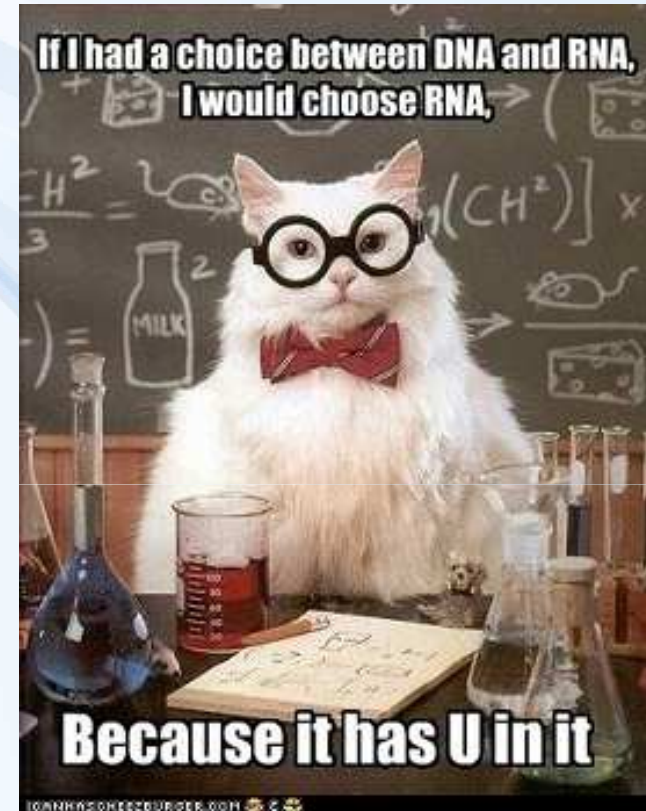


for toxic compounds  
in the environment

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Difference\\_DNA\\_RNA-EN.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Difference_DNA_RNA-EN.svg)

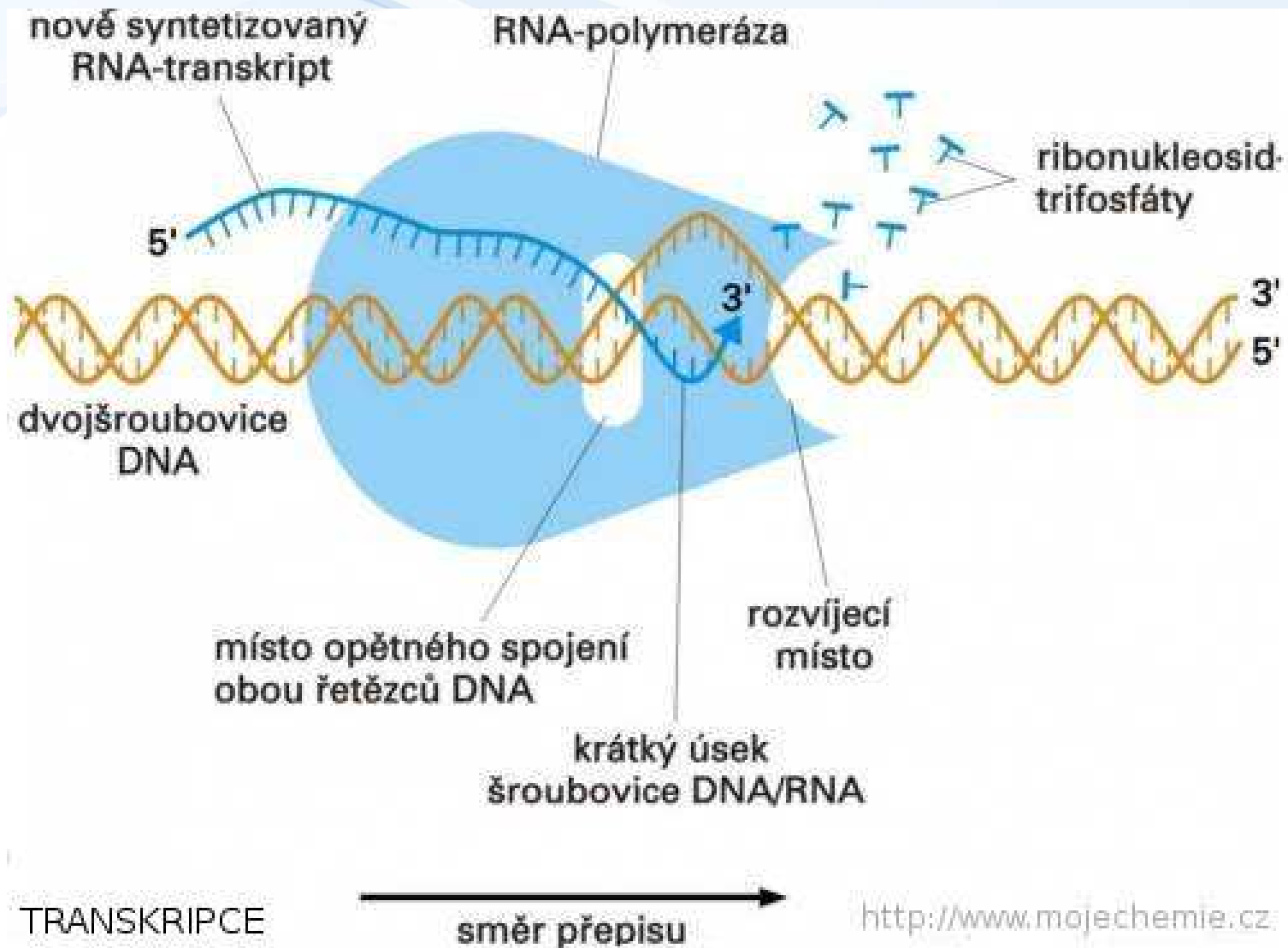
# RNA: Struktura & funkce

- ❑ cukr: **ribóza**, báze: **A, U, C, G**
- ❑ záporně nabitá  $\Rightarrow$  rozpustná ve vodě, naopak v ethanolu se sráží (bílá barva)
- ❑ sekundární a terciární struktury
- ❑ reaktivnější a flexibilnější, ale také nestabilnější než DNA  $\Rightarrow$  roztok v pufru při  $-20^\circ$  stabilní pouze několik týdnů
- ❑ náchylnější k degradaci enzymů  $\Leftrightarrow$  RNázy těžko degradovatelné

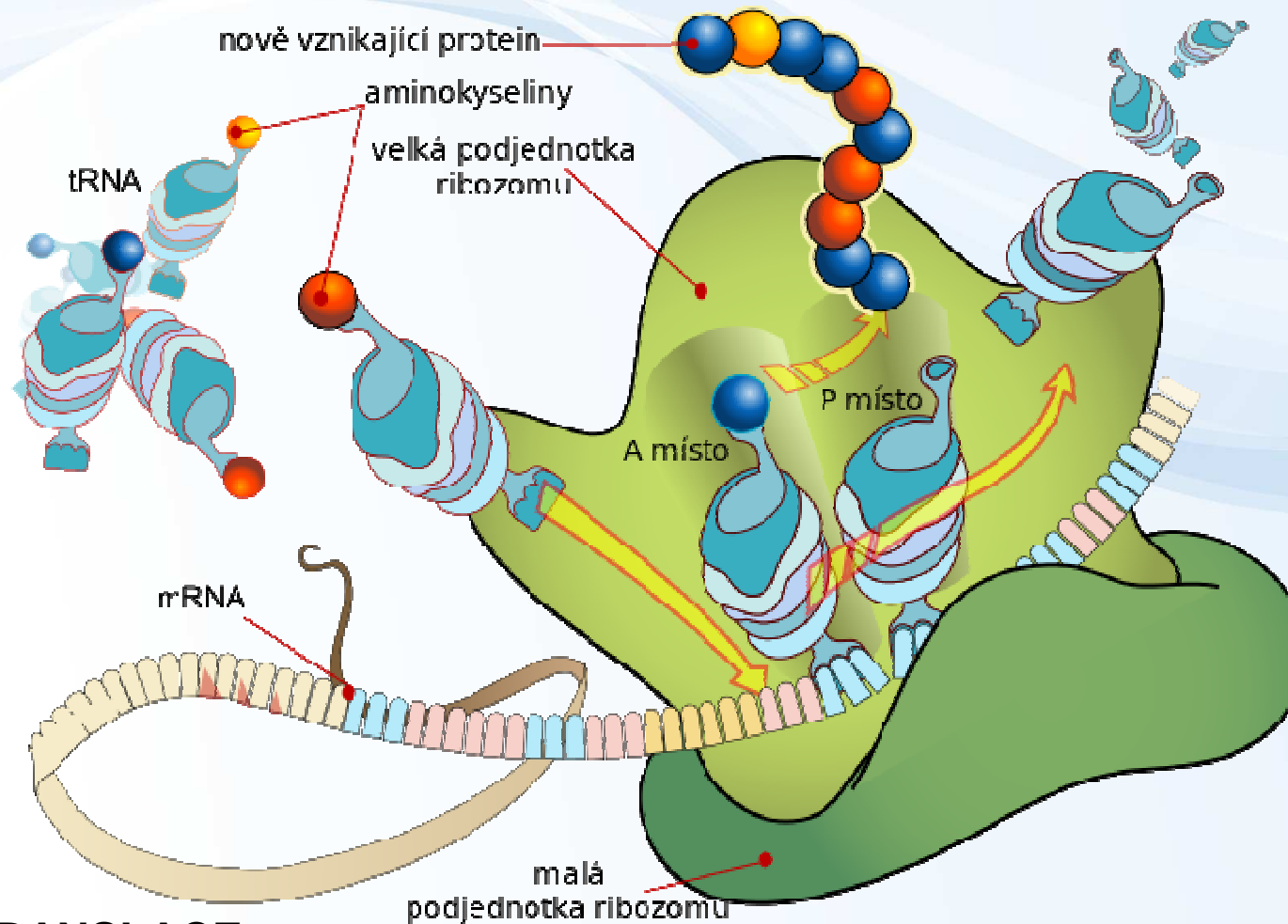




# RNA: Struktura & funkce



# RNA: Struktura & funkce



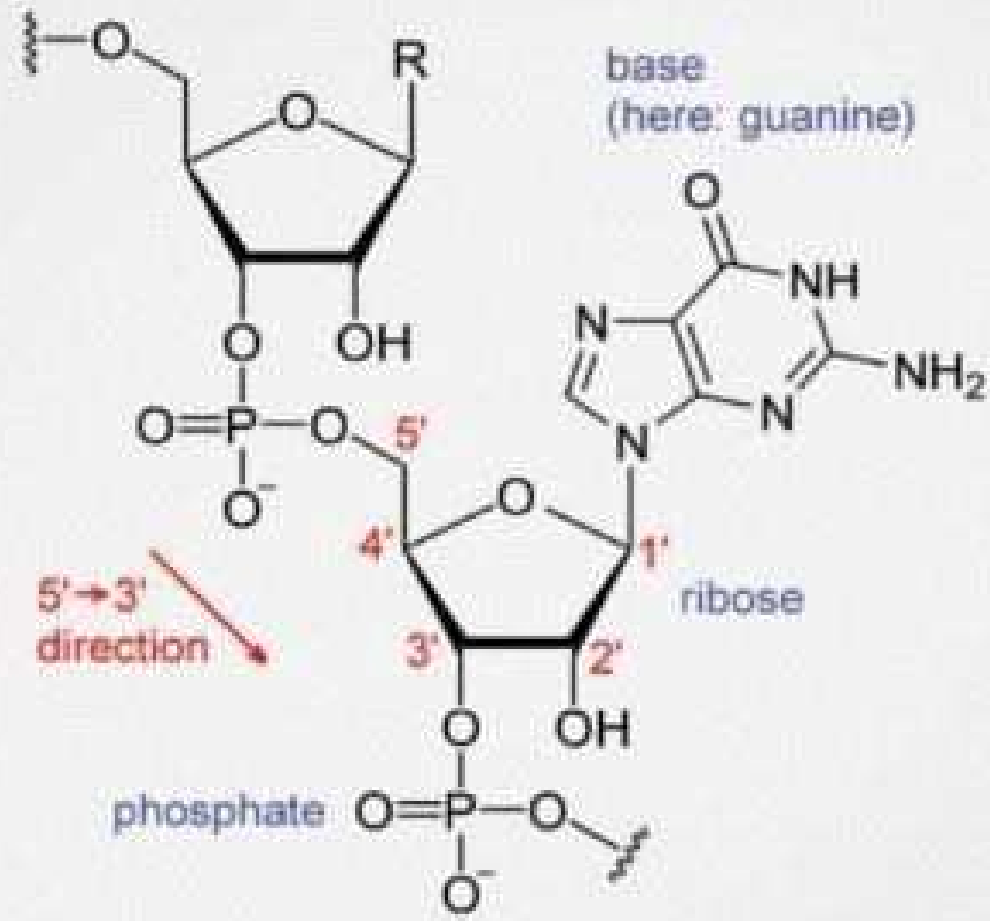
## TRANSLACE

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ribosome\\_mRNA\\_translation\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ribosome_mRNA_translation_en.svg)

[http://highered.mheducation.com/sites/0072507470/student\\_view0/cha-pter3/animation\\_how\\_translation\\_works.html](http://highered.mheducation.com/sites/0072507470/student_view0/cha-pter3/animation_how_translation_works.html)



# IF I AM LOST IN TRANSLATION



# JUST BLAME MY RNA

© WORDS & UNWORDS

TRA



Resea  
for to:  
in the

# NUKLEOVÉ KYSELINY A JEJICH IZOLACE



# NK: IZOLACE

## □ volba techniky záleží na:

1. výchozím materiálu (typ, množství, kvalita atd.)

2. typu izolované NK

- genomová DNA (chromozomální)
- satelitní DNA
- plasmidová DNA (extrachromozomální)
- fragment DNA v agarózovém gelu
- fagová (virová) NK
- RNA

3. požadované čistotě

4. požadovaném množství

5. následné aplikaci

6. časové náročnosti

- **Izolace ve zkumavce**
- **Kity**
- **Automatické roboty**



ncRNA type	Description	Function
RNase P	~400 nt long	Cleaves tRNA precursors to result in mature 5' ends; as a catalytic RNA (ribozyme) in bacteria, for example, cleaves tRNA precursors under high monovalent salt conditions in the absence of a protein
miRNA	Small, 21–23 nt long ssRNA	Targets mRNAs for cleavage (in plants) or translation inhibition (in mammals)
siRNA	21–23 nt long ssRNA	Targets mRNAs for cleavage
rasRNA	Small, 21–23 nt long ssRNA	Involved in repeat silencing
snoRNA	~50–200 nt long, structured RNA that is localized to the nucleolus	Specifies modification of rRNAs, snRNAs or tRNAs (in Archaea only); C/D box snoRNAs specify 2'-O-methylation of the ribose of a target RNA, H/ACA box snoRNAs specify pseudouridylation
gRNA	Small, ~60 nt long ssRNA, containing a poly U tract at its 3' end (from 5–20 U residues)	Guides U insertions or deletions within mitochondrial pre-mRNAs of certain protozoan organisms, for example, trypanosomes
snRNA	Structured; ~100–300 nt long (in humans)	Guides splicing of pre-mRNAs (for example, U1, U2, U4, U5 and U6 snRNAs)
rRNA	Highly structured; sized between ~120 (5S rRNA) and several thousand nucleotides (18S, 28S rRNAs)	As part of the ribosome it catalyses peptide bond formation (for large rRNA only)
Xist RNA	~17 kb long RNA, which is transcribed from the X chromosome	Involved in X-chromosome inactivation and dosage compensation
tRNA	Highly structured, sized between ~70 and 95 nt	RNA adapter molecules for amino acids; guides amino acids to the ribosome in an mRNA-dependent mode
SRP RNA	Has a rod-like structure, sized ~300 nt (in humans)	Part of the SRP, a ribonucleo-protein complex that is involved in targeting specific proteins to the endoplasmic reticulum for subsequent secretion
6S RNA	Highly structured RNA (~180 nt long in <i>Escherichia coli</i> ), which forms a single hairpin that is found in bacteria	Binds to the $\sigma^{70}$ factor of the RNA polymerase complex, thereby regulating transcription of $\sigma^{70}$ promoters

gRNA, classical guide RNA; miRNA, microRNA; ncRNA, non-protein-coding RNA; rasiRNA, repeat-associated siRNA; rRNA, ribosomal RNA; siRNA, small interfering RNA; snRNA, small nuclear RNA; snoRNA, small nucleolar RNA; SRP, signal recognition particle; Xist, X-(inactive)-specific transcript.

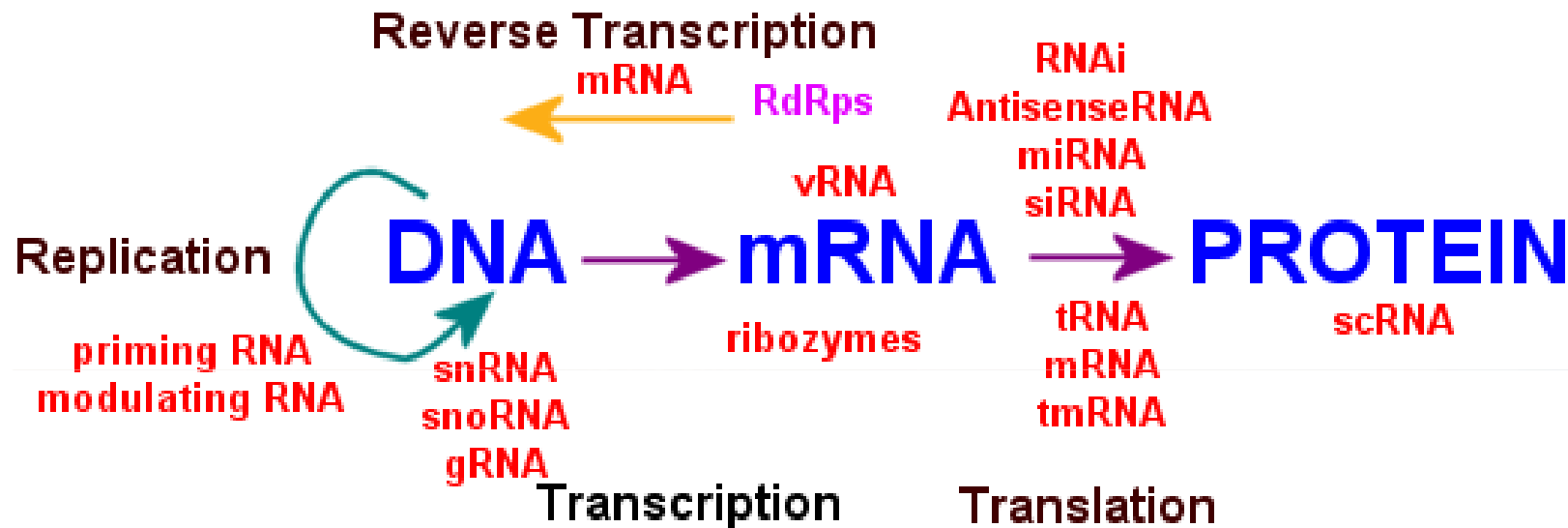
Hüttenhofer *et al.* *Nature Reviews Genetics* advance online publication;  
published online 18 April 2006 | doi:10.1038/nri1855



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

nature  
REVIEWS GENETICS

# Dogma meets more RNA



which forms a single hairpin that is found in bacteria

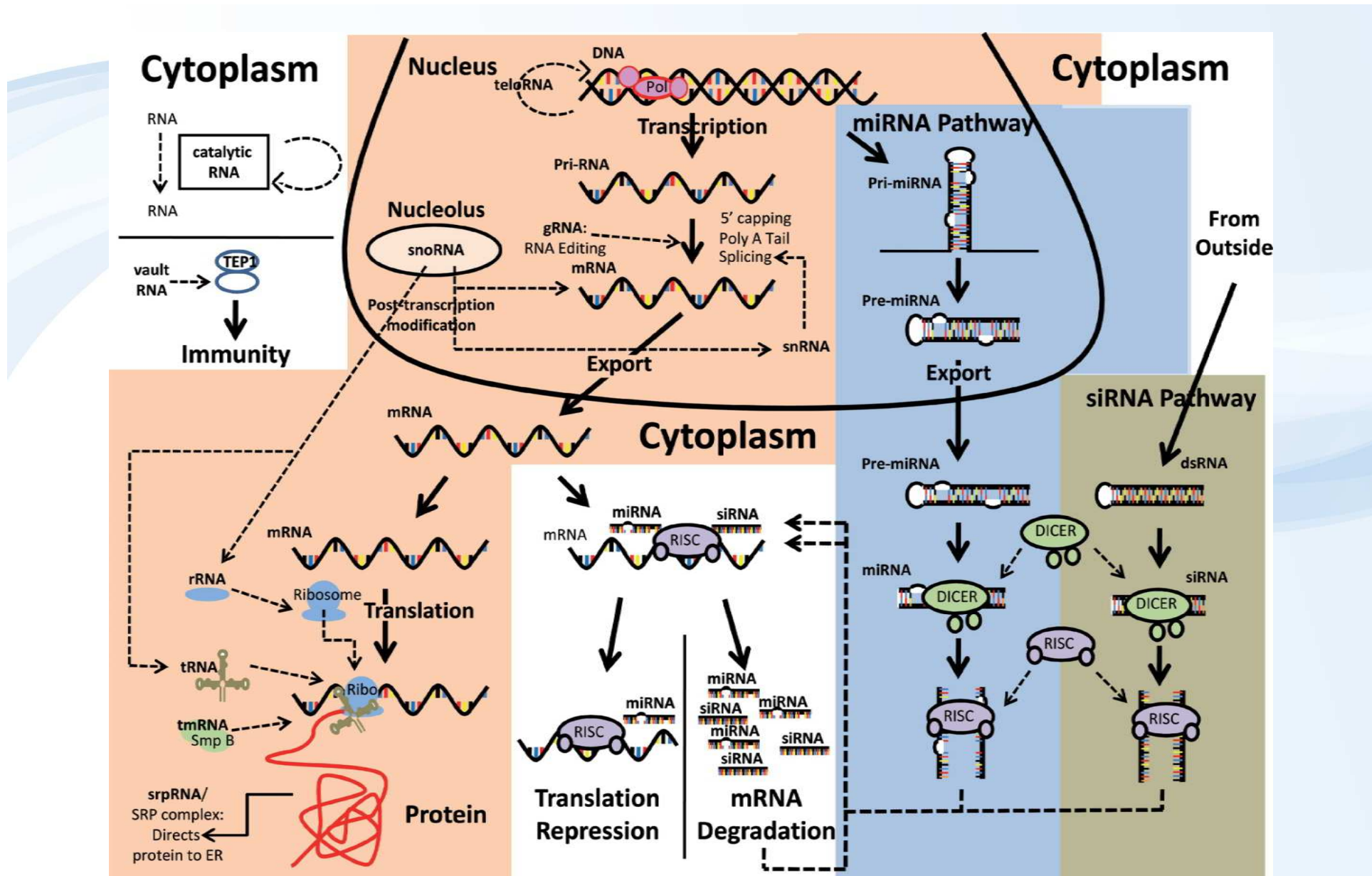
transcription of  $\sigma^{70}$  promoters

*gRNA*, classical guide RNA; *miRNA*, microRNA; *ncRNA*, non-protein-coding RNA; *ra-siRNA*, repeat-associated siRNA; *rRNA*, ribosomal RNA; *siRNA*, small interfering RNA; *snRNA*, small nuclear RNA; *snoRNA*, small nucleolar RNA; *SRP*, signal recognition particle; *Xist*, X-(inactive)-specific transcript.

Hüttenhofer *et al.* *Nature Reviews Genetics* advance online publication;  
published online 18 April 2006 | doi:10.1038/nri1855



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment



RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography  
 Douglas T. Gjerde, Lee Hoang, and David Hornby  
 Copyright © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim  
 ISBN: 978-3-527-32116-2



# NK: IZOLACE

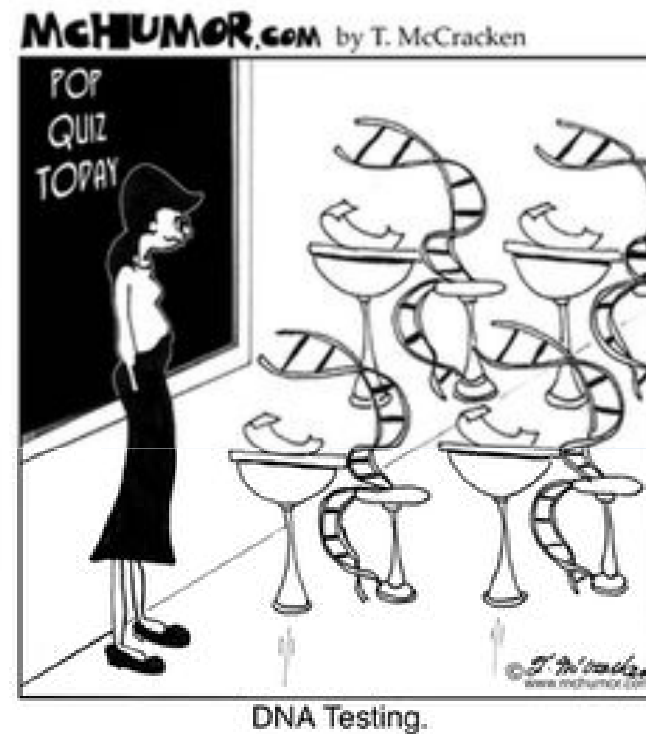
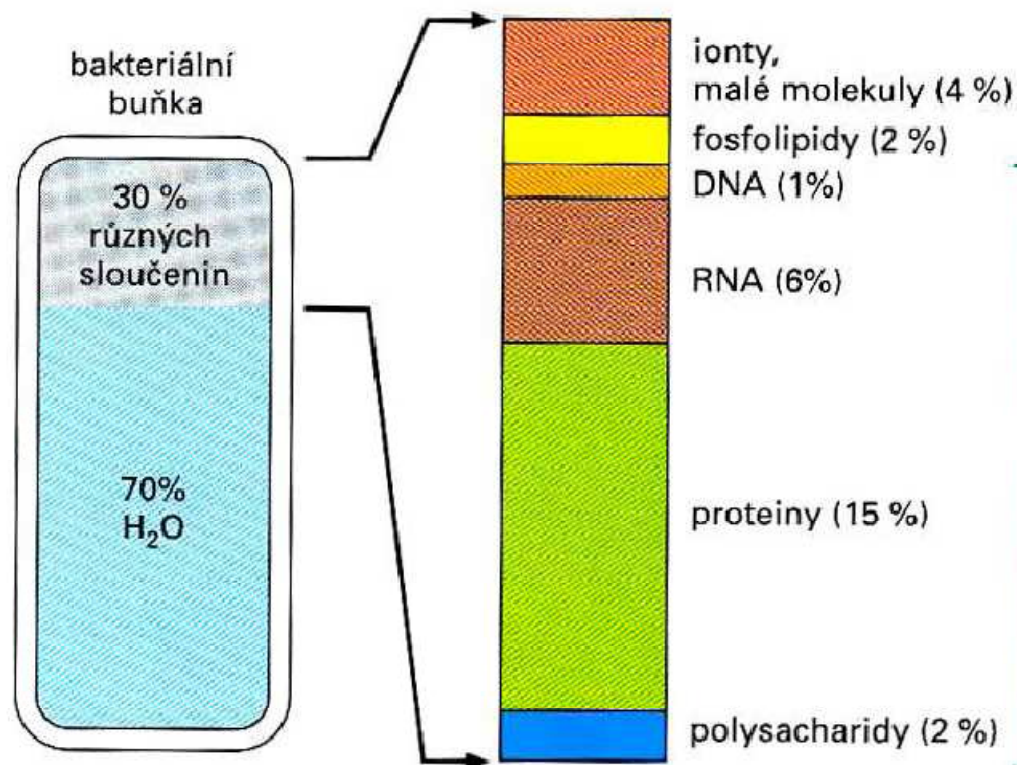


[http://isb-up.cz/data/PDF/MMSR/MMSR\\_LS\\_2012\\_01\\_DNA-extrakce.pdf](http://isb-up.cz/data/PDF/MMSR/MMSR_LS_2012_01_DNA-extrakce.pdf)



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

# NK: IZOLACE



[http://isb-up.cz/data/PDF/MMSR/MMSR\\_LS\\_2012\\_01\\_DNA-extrakce.pdf](http://isb-up.cz/data/PDF/MMSR/MMSR_LS_2012_01_DNA-extrakce.pdf)



# NK IZOLACE

## Principy I.

### □ Vychází z fyzikálně-chemických vlastností NK:

- fosfátové estery jsou silné kyseliny a chovají se jako anionty při neutrálním pH
- báze jsou jen slabě bazické a bez náboje
- nabitá fosfátová páteř dělá NK spíše hydrofilní vs. proteiny jsou spíše hydrofóbní
- NK se snadno precipitují alkoholem
- vodíkové vazby mezi skupinami  $-NH_2$  a  $-OH$  jsou stabilní od pH 4 do pH 9
- NK mají max. absorbance UV světla při 260 nm

# NK IZOLACE

## Principy II.

### □ Využívá se:

- odlišná rozpustnost
- adsorpční metody
- gradientová centrifugace (hustota)



### □ Metody lze rozdělit na:

- Klasické v roztoku „organické“
- Klasické v roztoku „anorganické“
- Adsorpční na pevnou matici



# NK: IZOLACE

## Důležité kroky

- A.** úspěšné rozbití vzorku a narušení buněčných membrán
- B.** denaturace nukleoproteinového komplexu
- C.** inaktivace nukleáz
- D.** odstranění všech nežádoucích složek – proteinů, solí, sacharidů, lipidů, DNA/RNA
- E.** vyhnutí se kontaminování vyizolované NK jinou NK během izolace

# Rozrušení vzorku a buněčných membrán

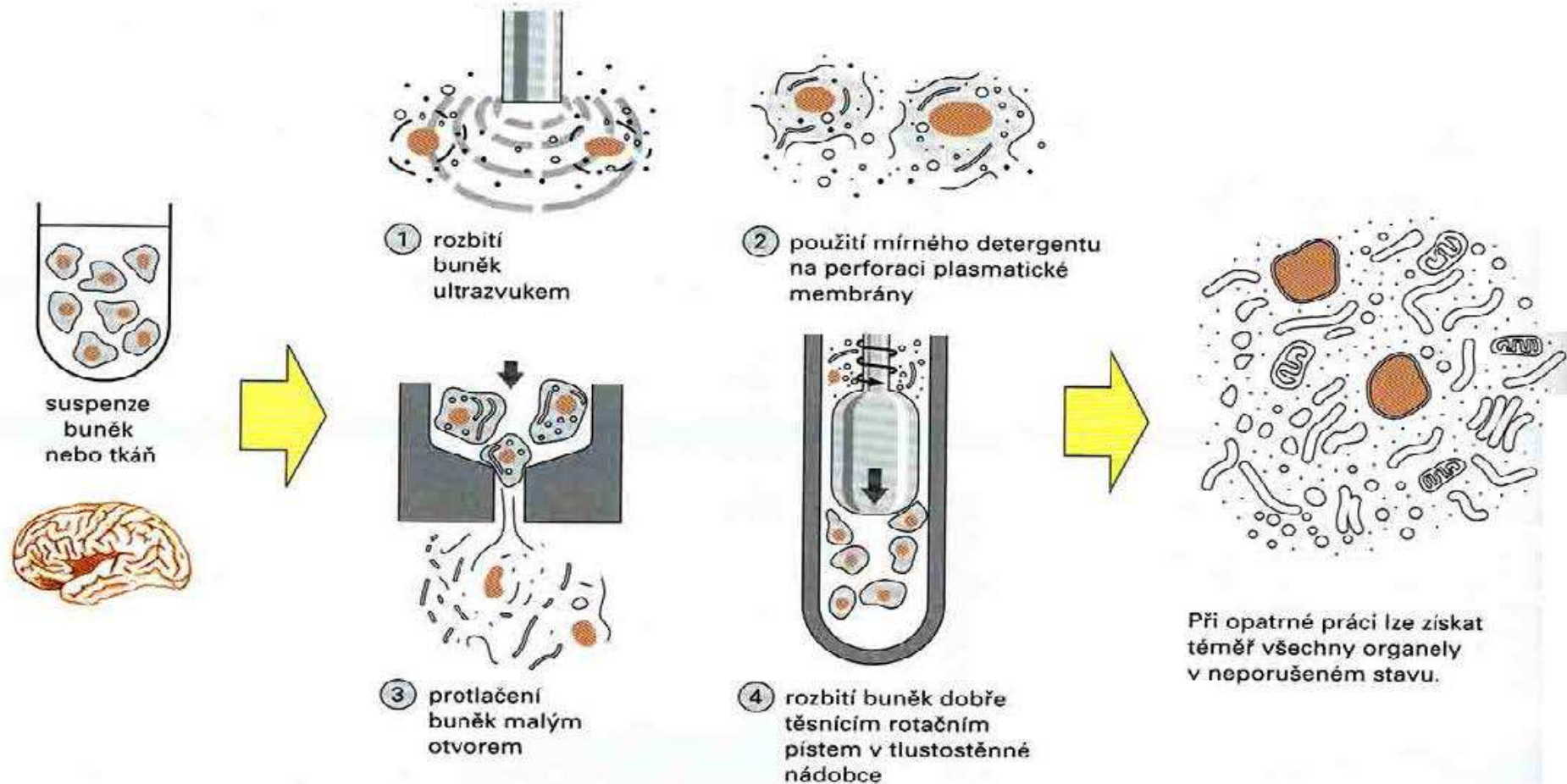


# Rozrušení vzorku a buněčných membrán

- **mechanická lyze** – kvasinky, houby, rostliny, živočišné pojivové tkáně  
⇒ v třecí misce v tekutém dusíku, skleněné kuličky, tyčové homogenizátory atd.
- **enzymatická lyze** – spóry, kvasinky  
⇒ lysozym, celuláza atd.
- **osmotická lyze** – např. *E. coli*, živočišné tkáně: krev, mozek
- **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
- **organická rozpouštědla**
- **zásadité látky** (NaOH)
- **povaření**
- **chaotropní činidla**



# Rozrušení vzorku a buněčných membrán



ALBERTS, B, D BRAY a A JOHNSON. *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. Espero Publishing, 2005. 740 s. [ISBN 80-902906-2-0](#).

## • chaotropní činidla



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment



# Denaturace NK

# Inkubace s enzymy



## Denaturace NK

- používá se: SDS, zásady, zahřátí na vysokou teplotu, chotropní činidla
- rozpustí a oddělí NK od ostatního materiálu (např. proteinů)
- inhibuje nukleázy

## Inkubace s enzymy

## Denaturace NK

- používá se: SDS, zásady, zahřátí na vysokou teplotu, chotropní činidla
- rozpustí a oddělí NK od ostatního materiálu (např. proteinů)
- inhibuje nukleázy

## Inkubace s enzymy

- degradace nechtěných komponent:
  - proteázy (např. proteináza K) ✂ proteiny
  - nukleázy ✂ nechtěné NK
  - RNáza štěpí RNA, pak nutné přečistit fenol:chloroform extrakcí a DNA vyzrážet EtOH



# NK: IZOLACE

## Metody „quick-and-dirty“ pro genomovou DNA

- ❑ inkubace zahřátí lyzovaných buněk na vysokou teplotu (např. 90°C/ 20 min, v přítomnosti SDS na 65-70°C)
- ❑ „natrávení“ lyzovaných buněk proteinázou K



- ↓ limitované použití nepřečištěného lyzátu v dalších aplikacích
- ↓ obsahuje složky inhibující enzymy (např. soli)
- ↓ DNA není v optimálním pH
- ↓ nutná úplná inaktivace proteinázy K
- ↓ omezené skladování – rychlá degradace DNA

# NK: IZOLACE

Klasická metoda v roztoku - „organická extrakce“

- ❑ **Organické látky sráží proteiny – fenol**
- ❑ **Princip:** proteiny jsou hydrofóbní a přecházejí do organické fáze, kdežto NK jsou vysoce nabitě a přecházejí do vodné fáze



# Extrakce NK – převedení NK do vodné fáze

## Fenol-chloroformová extrakce

- ❑ **fenol** ⇒ organické rozpouštědlo
  - vysoce čistý pro molekulární techniky, skladuje se při  $-20^{\circ}\text{C}$
  - sytí se **Tris pufrem** (**pH 4**: separuje se RNA; **pH 7-8**: separuje se DNA) s **EDTA** (vychytává ionty nutné pro aktivitu nukleáz – např.  $\text{Ca}^{2+}$ ) a **NaCl** - skladuje se při  $4^{\circ}\text{C}$
  - oxidace (zežloutnutí) snižuje účinnost izolace
  - vysoce nebezpečná látka (hořlavá, korozivní a toxická)
  
- ❑ **výhody:**
  - jednoduché provedení
  - lehce modifikovatelné
  - rozmezí objemů:  $40\ \mu\text{l}$  až několik ml
  
- ❑ **aplikace:** genomová DNA s vysokou molekulovou hmotností

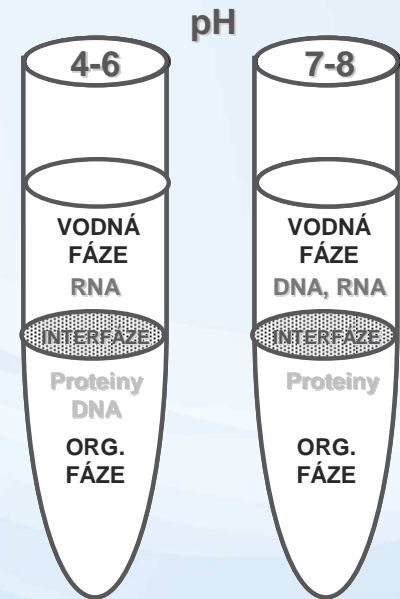


## □ postup:

- důkladně smíchat vzorek s fenolem
- centrifugace  $\Rightarrow$  NK ve vodné fázi a proteiny v organické („fenolové“)

## □ modifikace:

- přidavek **chloroformu**  $\Rightarrow$  lepší separace fází
- přidavek **guanidin thiokyanátu** nebo **guanidin hydrochloridu**  $\Rightarrow$  denaturace proteinů
- směs **fenol:chloroform:isoamyl alkohol**
  - isoamylalkohol: zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu
- **TRizol®**  $\Rightarrow$  monofázický roztok fenolu a guanidin thiokyanátu izoluje NK v přítomnosti chloroform nebo bromochloropropanu (**TRI reagent®**) – izolace DNA, RNA a proteinů z 1 vzorku



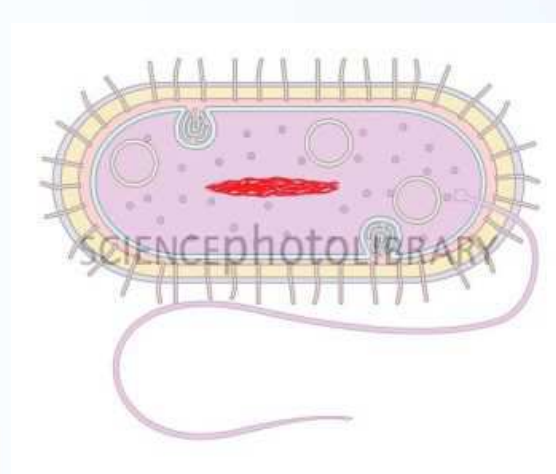
## □ nevýhody:

- časově náročné
- nebezpečí kontaminace, zejména fenolem (odstranění fenolu pomocí extrakce směsí chloroform-isoamylalkohol  $\Rightarrow$  fenol do chloroformové/organické fáze)

# Extrakce NK – převedení NK do vodné fáze

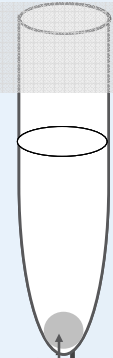
## II. Alkalická extrakce

- ❑ alkalická denaturace (NaOH, pH = 12)  $\Rightarrow$  vysokomolekulové chromozomální DNA i plazmidové DNA v přítomnosti SDS
- ❑ neutralizace (KAc, pH = 5.5)  $\Rightarrow$  selektivní renaturace plazmidové DNA, dlouhá bakteriální genomová DNA NErenaturuje
- ❑ centrifugace  $\Rightarrow$  plazmidová DNA v roztoku, genomová DNA vázána na proteiny, které v tomto prostředí precipitují
- ❑ (RNáza A), precipitace ethanolem
- ❑ aplikace: plazmidová DNA (i kolonková verze)





# Precipitace NK – srážení NK z vodné fáze



## □ srážení v nevodném prostředí

\*ethanol, isopropylalkohol

- alkohol má nižší dielektrickou konstantu než voda  $\Rightarrow$  neutralizace negativního náboje NK, která se stává méně hydrofilní, tedy rozpustnou ve vodě
- odmytí solí oplachem 70% ethanolem a rozpuštění NK ve vodě nebo pufru (TE pufr o pH 7,5)

## □ srážení ve vodném prostředí

\*polyaminy (spermidin, spermin)

- vysoce selektivní precipitace (nevhodné pro genomovou DNA, ne < 50 bp)
- vhodné pro izolaci NK-vazebných proteinů
- odmytí polyaminu oplachem peletu koncentrovanou solí

\*PEG (různá MW i koncentrace)

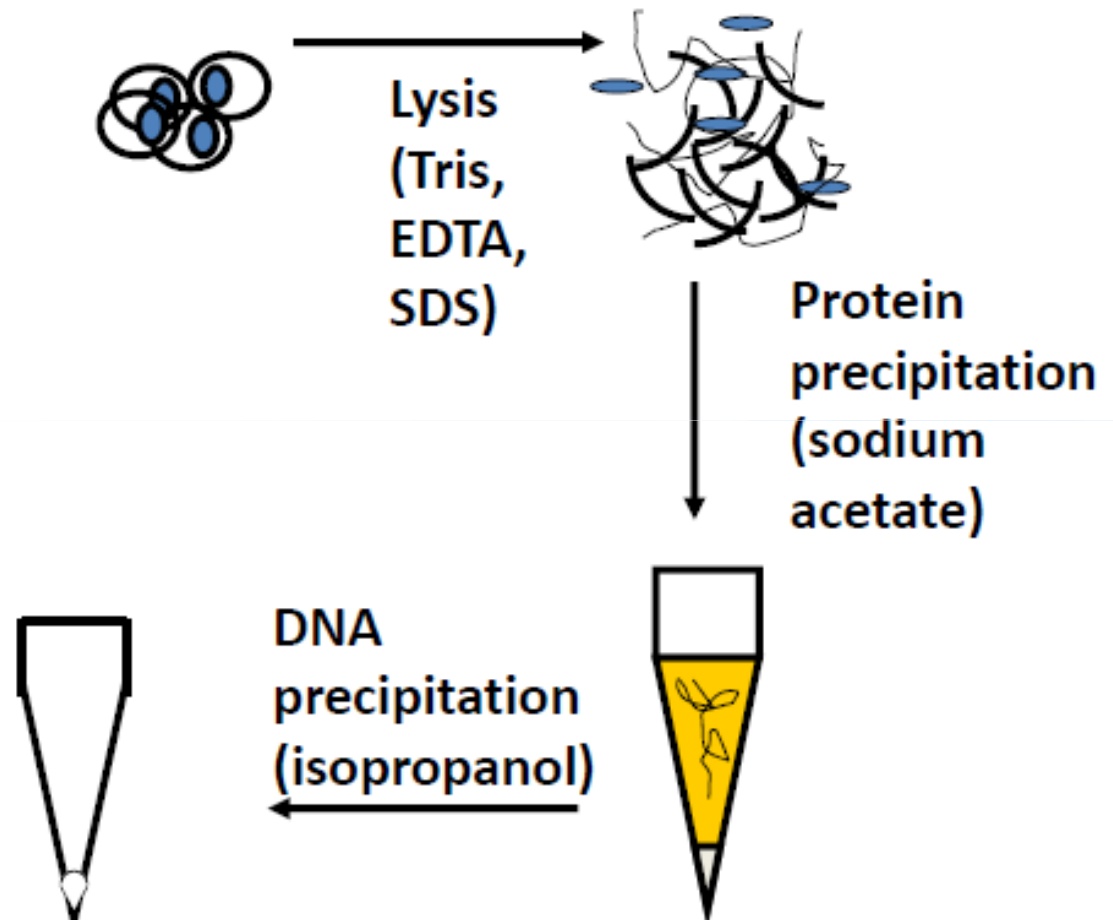
- vysoce selektivní precipitace (nevhodné pro nízkomolekulární NK <150 bp)
- vhodné pro selektivní precipitaci v závislosti na délce NK
- odmytí PEG oplachem peletu ethanolem

# NK: IZOLACE

## Klasické metody v roztoku - „anorganická extrakce“

### Vysolování:

1. Lýze buněk  $\Rightarrow$  SDS
2. RNA odstraněna RNázami
3. Proteiny precipitovány v koncentrovaném roztoku solí (octan sodný či amonný)
4. DNA precipitována ethanolem a rehydratována



Copyright 2010 American Society of Cytopathology



### Odstranění polysacharidů:

- rostliny, houby a některé bakterie
- extrakce s cetyltrimetylamonium bromidem (CTAB)
- kladně nabitý CTAB se váže s negativně nabitými polysacharidy (pectin, xylan)
- při 0.7-0.8 M NaCl jsou polysacharidy vyprecipitovány a DNA/RNA zůstává v roztoku ⇒ precipitace alkoholem

# NK: IZOLACE

## Adsorpční na pevnou matrici

- NK se v přítomnosti chaotropních solí adhezuje na pevný povrch/nosič
- adsorpce NK na pevnou fázi závisí na pH a obsahu solí v roztoku
- pevná fáze: silikát, silikagel, skleněné kuličky, křemelina a nosiče aniontů

### □ Kroky:

1. Lýze buněk
2. Adsorpce NK na pevnou fázi
3. Oplach
4. Vymytí

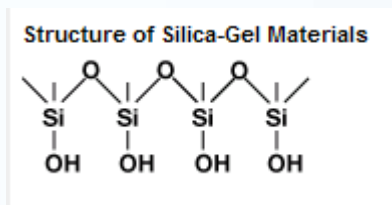


# 1. Adsorpce na silikát

- NK v přítomnosti chaotropních solí (jodid sodný, guanidinové soli) adherují na silikátový povrch (na sklo)
- vazba: vysoký obsah soli a  $\text{pH} \leq 7$ , vymytí: nízký obsah soli a  $\text{pH} \geq$

## 1. Lýze

## 2. Přidání chaotropních solí a protřepání se silikátovými částicemi



## 3. Centrifugace a oplach navázané NK roztokem chaotropních solí

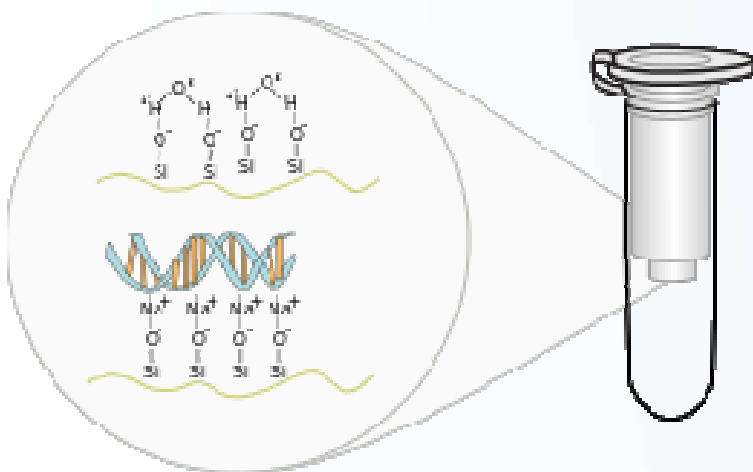
## 4. Přidání vody či pufru $\Rightarrow$ eluce

## 5. Centrifugace $\Rightarrow$ NK v roztoku



## 2. Kolonky založené na adsorpční chromatografii

- lyzát buněk se přidá na kolonky se speciálními membránami (silikát) vázajícími NK v přítomnosti chaotropních solí, následuje vymytí NK puforem s nízkým obsahem soli
- rozpuštěná NK se vysráží ethanolem a naváže se v pufru s vysokým obsahem soli ( $\text{pH} < 7$ ) a eluuje v pufru s nízkým obsahem soli ( $\text{pH} > 7$ )

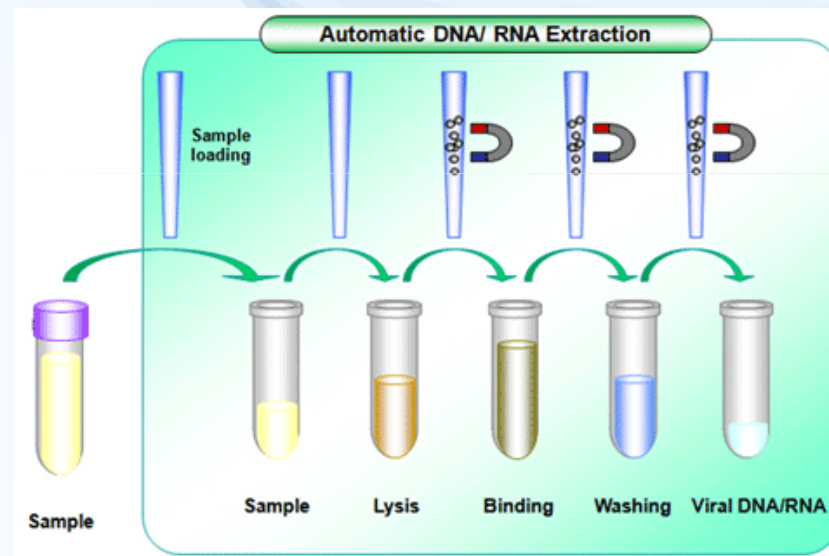
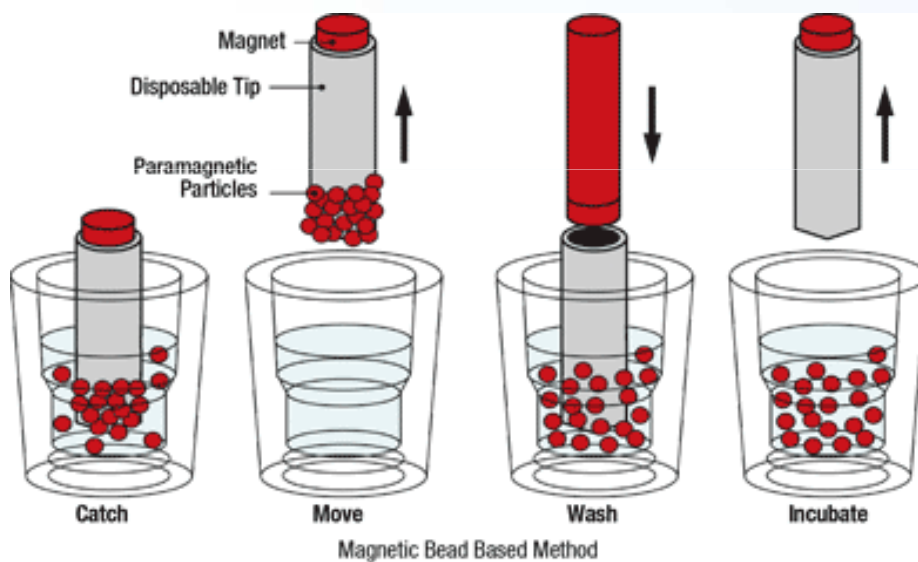


1. Lýze
2. Navázání
3. Oplach
4. Vymytí



### 3. Magnetické částice

- magnetické silikátové částice  $\Rightarrow$  NK se váží při vysoké koncentraci chaotropních solí
- magnetické silikátové částice váží při vysoké koncentraci solí i kratší NK a eluují při nízké



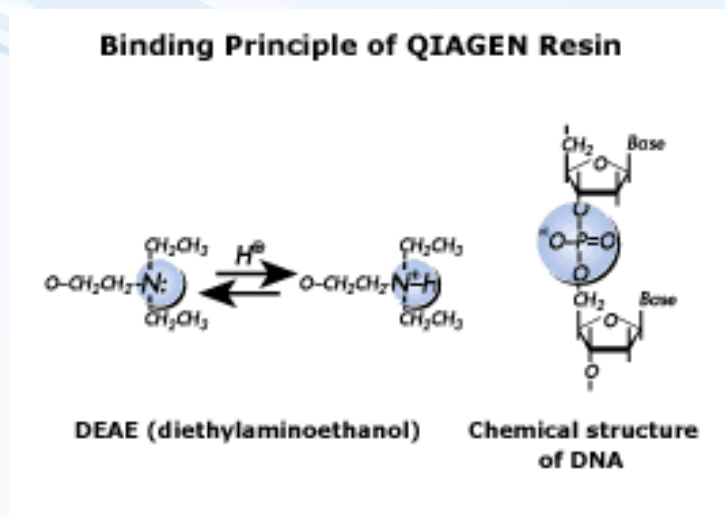
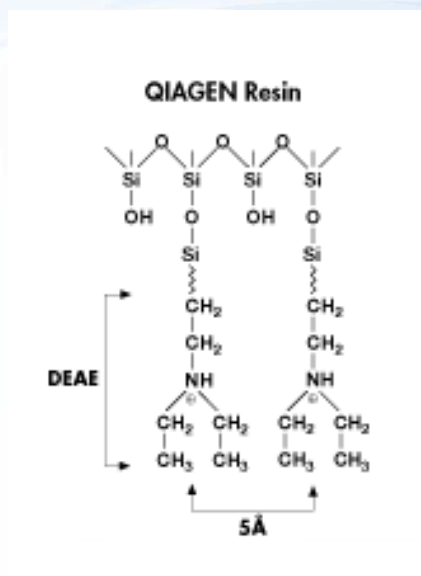
<http://www.bio-protocol.org/e1238>

<http://eng.bioneer.com/products/Protein/MagneticBeads-technical.aspx>



## 4. Iontoměniče

▪ resin ⇒



- interakce mezi negativně nabitými fosfátovými skupinami NK a pozitivně nabitými molekulami zvoleného povrchu (např. DEAE, diethylaminoethyl)
- vazba i eluce při různých koncentracích solí a pH dle izolované NK



# 5. FTA® Technology

- „fast technology for analysis of nucleic acids“

## FTA™ Nucleic Acid Collection, Storage and Purification

Home | Nucleic Acid and Protein Sample Preparation | FTA™ and FTA™ Elute | FTA™ Nucleic Acid Collection, Storage and Purification

FTA Cards contain chemicals that lyse cells, denature proteins and protect nucleic acids from nucleases, oxidative, and UV damage. US Patent Nos. 5496562, 5756126, 5807527, 5972386, 5985327 and other patents pending.

### Advantages and benefits

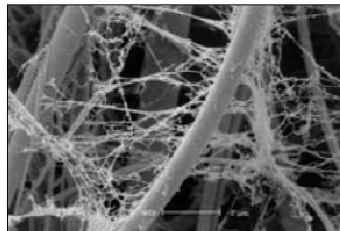
- Capture nucleic acid in one easy step
- Captured nucleic acid is ready for downstream applications in less than 30 minutes
- DNA collected on FTA Cards is preserved for years at room temperature
- FTA Cards are stored at room temperature before and after sample application, reducing the need for laboratory freezers
- Suitable for virtually any cell type
- Indicating FTA Cards change color upon sample application to facilitate handling of colorless samples
- FTA Cards are available in a variety of configurations to meet application requirements
- Custom configurations are available on request

### Use FTA for a wide range of applications:

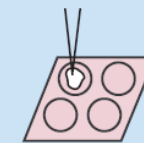
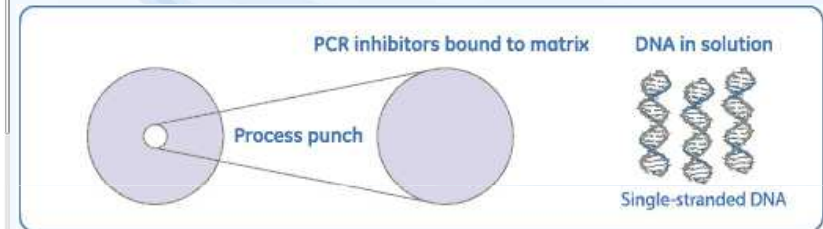
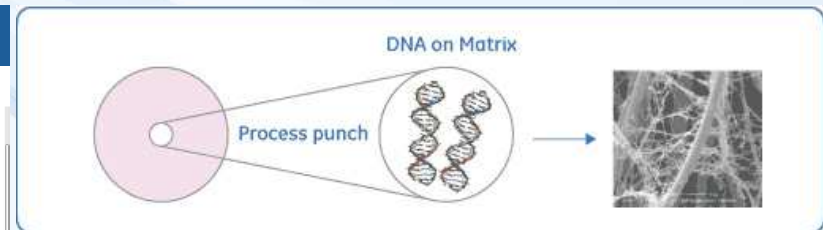
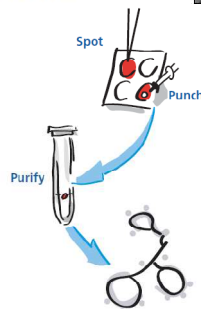
- Forensics
- Transgenic identification
- Transfusion medicine
- Plasmid screening
- Food and agriculture testing
- Drug discovery
- Genomics
- STR analysis
- Animal identification



Whatman FTA devices format



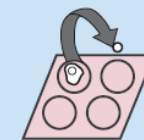
Electron micrograph showing DNA entrapped within the FTA matrix (Magnification x 10,000)



**Sample Application**  
Apply sample to the FTA Card. Allow to dry completely.



**RNA Processing Buffer Elution**  
Add RNA Processing buffer, incubate on ice.



**Disk Removal**  
Punch a disk out of the sample on the FTA Card and place in 1.5 mL tube.



**RT-PCR or Northern Blot**  
Use RNA directly for RT-PCR or precipitate for Northern Blot analysis.



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

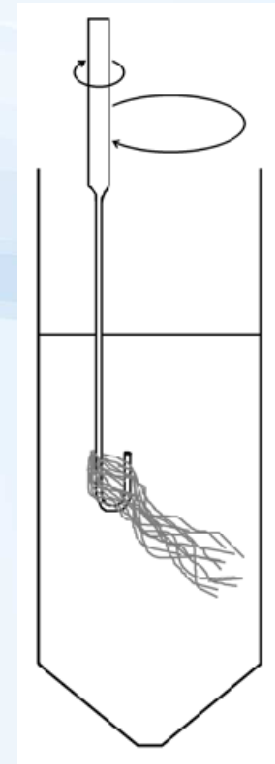
Whatman®

# NK: IZOLACE

## Specifické aplikace & modifikace

### 1. Izolace vysokomolekulární chromozomální DNA

- opakované použití enzymů a opakovaná extrakce fenolem
- zákaz natahování a napínání v opačném směru a vortexování
- několika hodinová fenolová extrakce za pomalého míchání
- po vysrážení DNA ethanolem dojde k namotání DNA

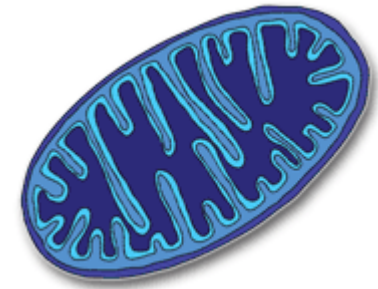


[www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf](http://www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)

df  
38

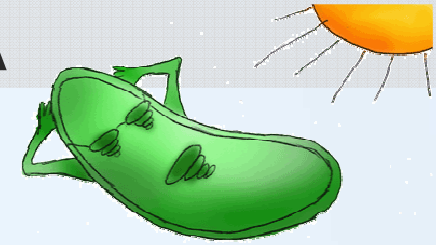


## 2. Izolace mitochondriální DNA

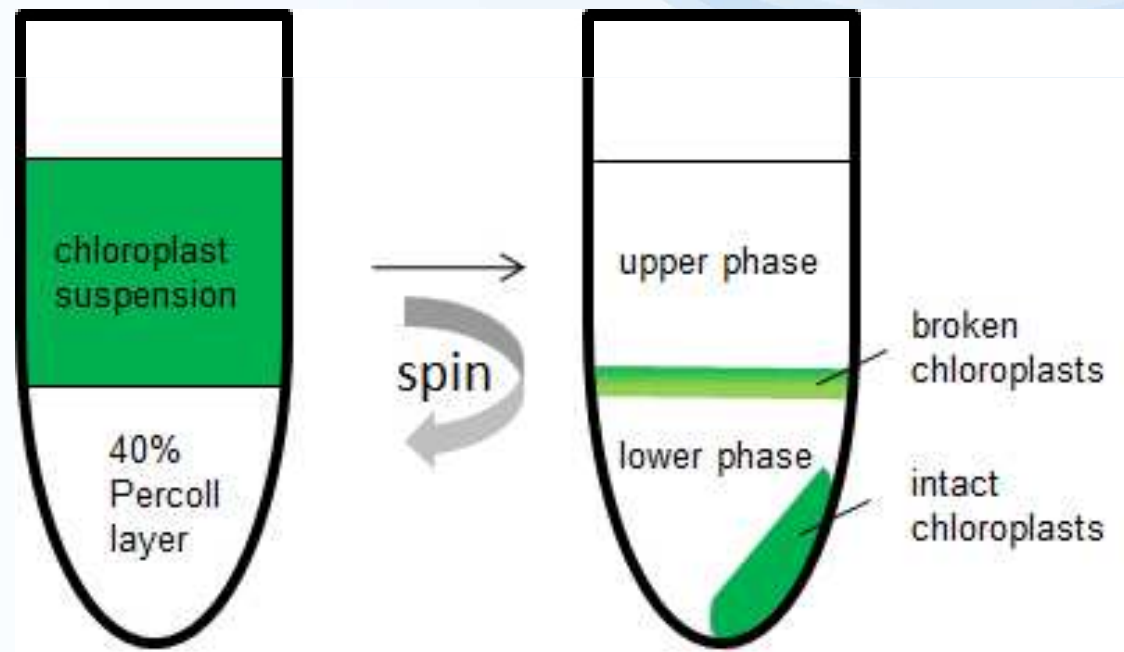
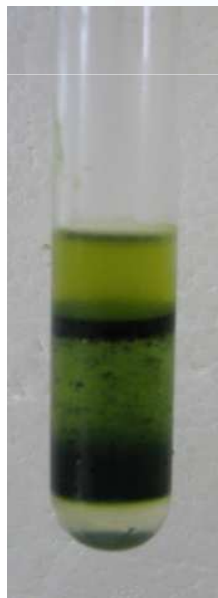


- **osmotická lýze** buněk v pufru pH=7 – rostlinná tkáň: sacharóza nebo mannitol 0,2-0,5 M, živočišná tkáň: 0,15 M KCl
- **EDTA** – inhibuje proteolytické enzymy
- **BSA** – bovinní sérový albumin – vychytává fenolické látky uvolněné např. z vakuol, váže mastné kys., inhibice proteáz
- **PVP** – polyvinylpyrrolidone – absorbuje fenolické látky
- Diferenciační centrifugace
  - krátce nízké otáčky např. 3000 g/5-10 min ⇒ *pelet*: zbytky buněčných stěn, jádra, intaktní plastidy, škrobová zrna; *supernatant*: mitochondrie
  - dlouze vysoké otáčky např. 10,000 g/10-20 min ⇒ *pelet*: mitochondrie, peroxizómy, zbytky membrán plastidů
- Gradientová ultracentrifugace
  - v roztoku Percollu – separovaný prstenec oddělený od ostatních

### 3. Izolace chloroplastové DNA



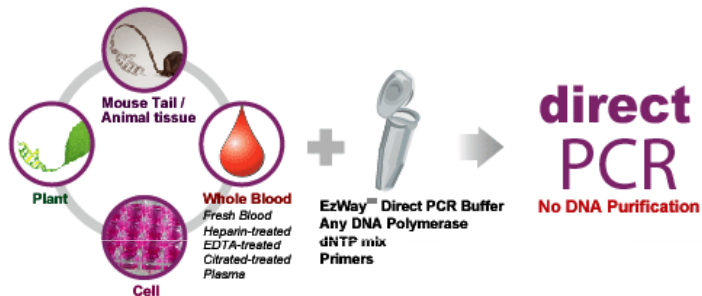
- Diferenciační centrifugace
  - krátce nízké otáčky např. 1500 g/15 min  $\Rightarrow$  *pelet*: plastidy, zbytky buněčných stěn, jádra, škrobová zrna
- Gradientová ultracentrifugace
  - v roztoku Percollu nebo CsCl – separovaný prstenec oddělený od ostatních kontaminant



# 4. „Rychlé izolace“ DNA nebo RNA

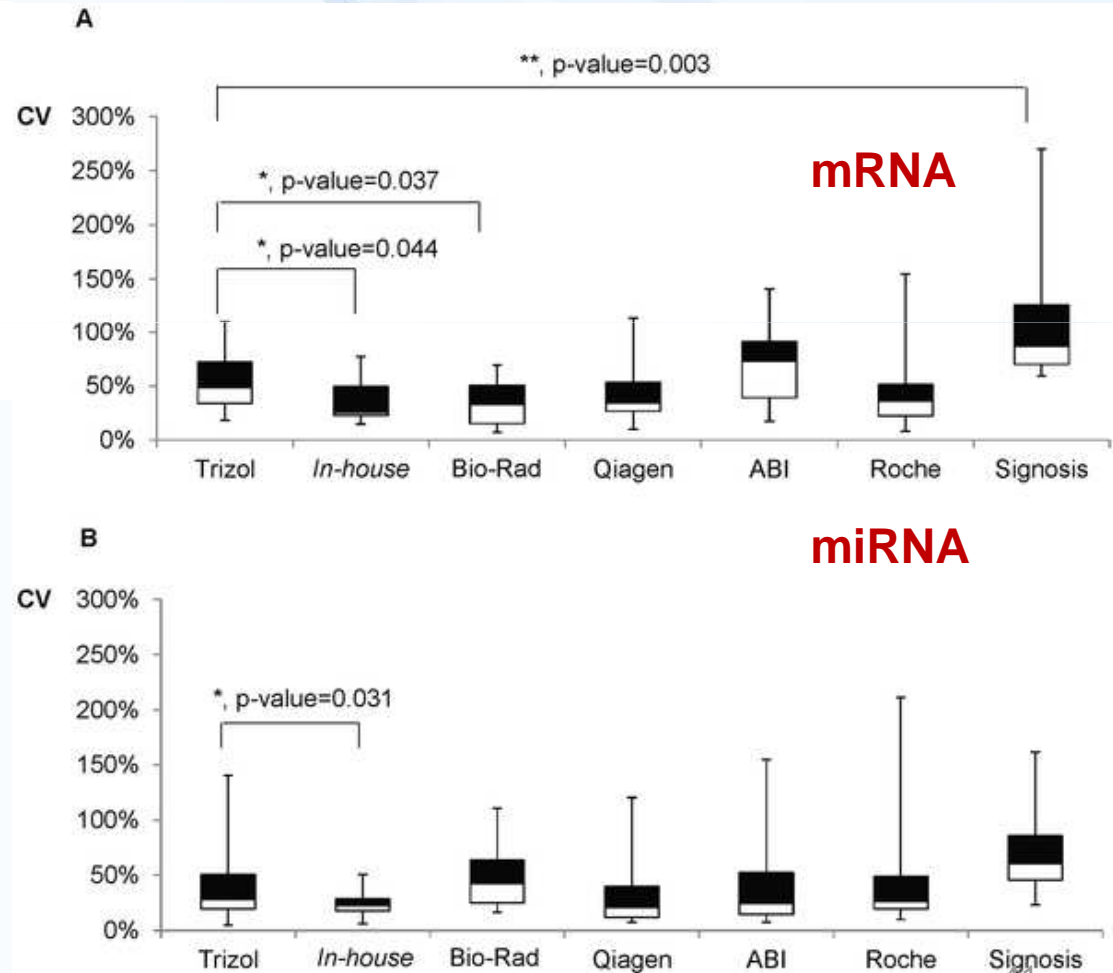
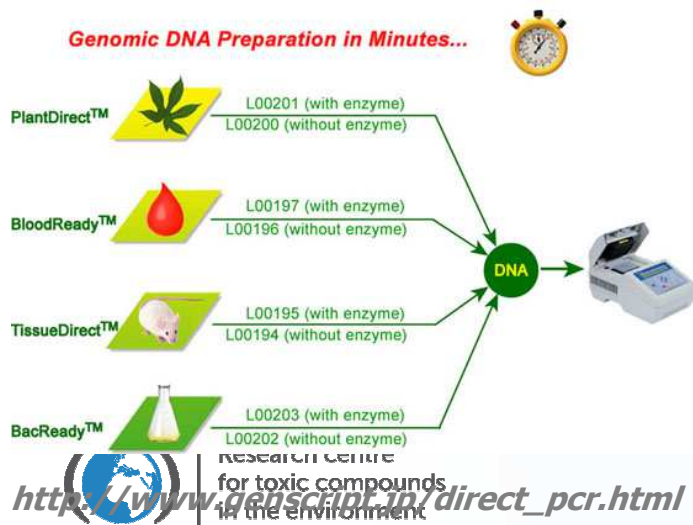
- DNA vhodná pro přímou PCR bez nutnosti zdlouhavé izolace a přečištění – klíčový je návrh primerů
- extrakt buněk vhodný přímo pro RT-PCR

## PCR w/o DNA Purification?



([http://www.komabiotech.com/product/sub/directPCR\\_selectionGuide.php](http://www.komabiotech.com/product/sub/directPCR_selectionGuide.php))

## Genomic DNA Preparation in Minutes...



## 5. Izolace RNA

- 95% objemu NK v buňce (rRNA - 80-85 %, tRNA a snRNA – 15-12 %, mRNA – 1-5 %)
- inaktivace stabilních Rnáz  $\Rightarrow$  inhibitory (RNasin, RNaseOUT), detergenty, DTT, merkaptoethanol
- DNáza bez přítomnosti Rnáz, selektivní polymer/nosič (Adsorbin)
- nestabilní  $\Rightarrow$  dlouhodobě uchovávat vysráženou v 70% etanolu při  $-80^{\circ}\text{C}$
- selektivní precipitace: LiCl, acetát amonný

### Organická extrakce v roztoku:

- lýze buněk a solubilizace RNA v guanidinových solích (guanidin thiokyanát-fenol-chloroform)
- fenol saturovaný pufrém o pH 4
- *Trizol*<sup>®</sup>, *Tri reagent*  $\Rightarrow$  monofázický roztok fenolu a guanidin thiokyanátu izoluje RNA v přítomnosti chloroformu

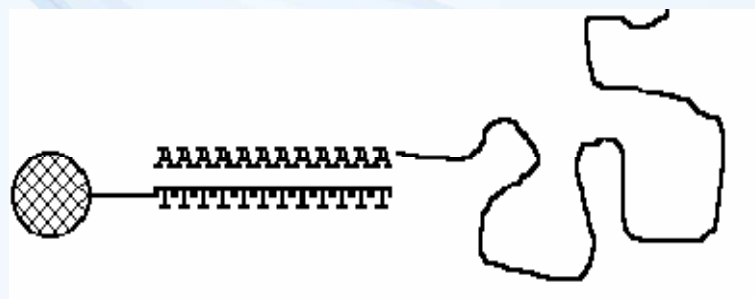


❑ Selektivní precipitace LiCl:

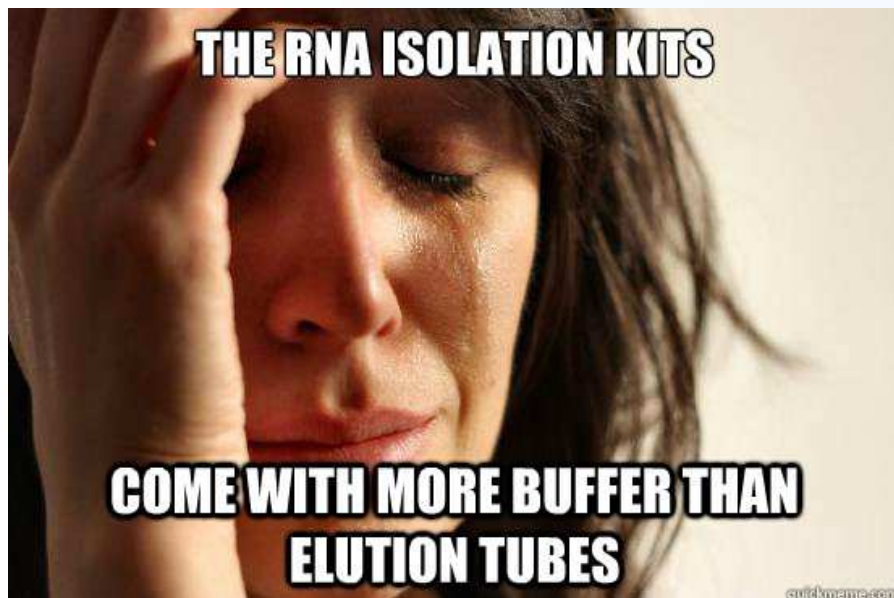
- vysráží selektivně delší RNA (rRNA, mRNA)
- postup: 8M LiCl (1:1), promíchání, inkubace při 20°C a centrifugace

❑ Afinitní chromatografie:

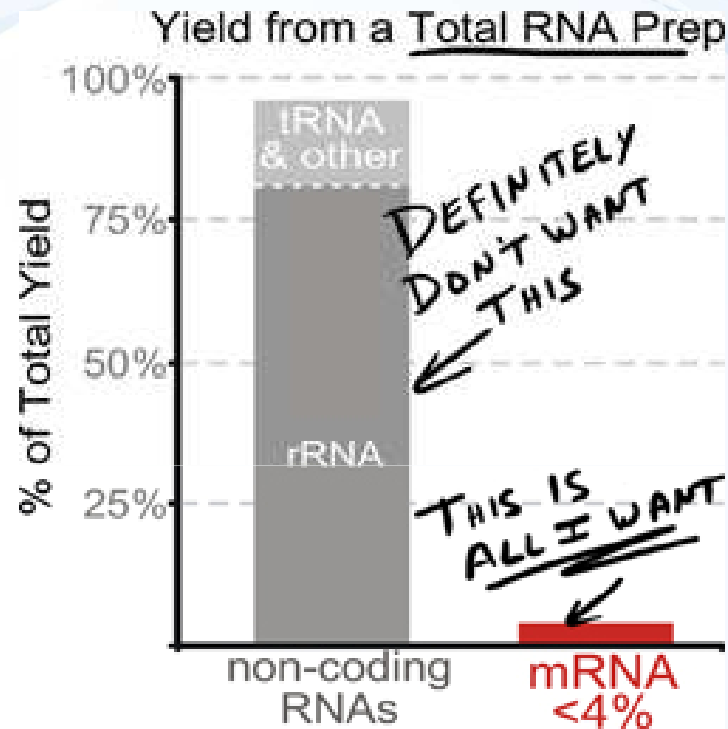
- kolonky s oligodT pro mRNA



[www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf](http://www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)



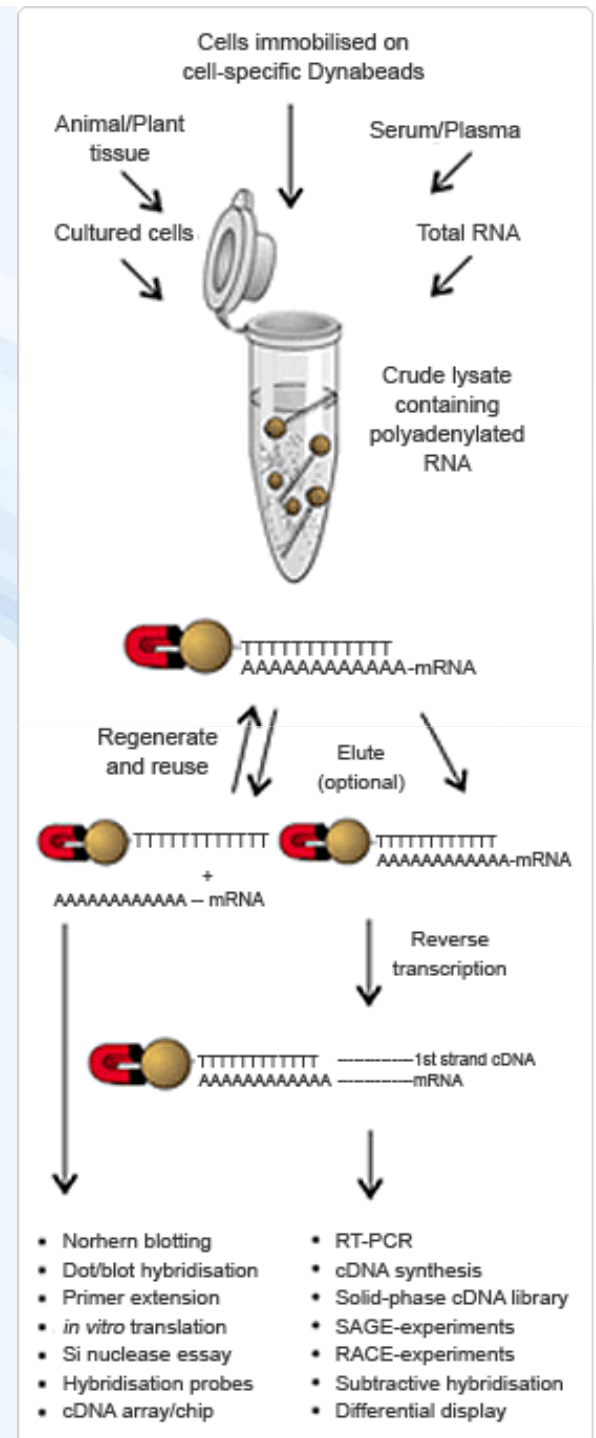
☐ Magnetické částice nesoucí oligodT:



<http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/napamisc/mrna-isolation-dynabeads.html>



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment





## 6. Gradientová centrifugace (hustota)

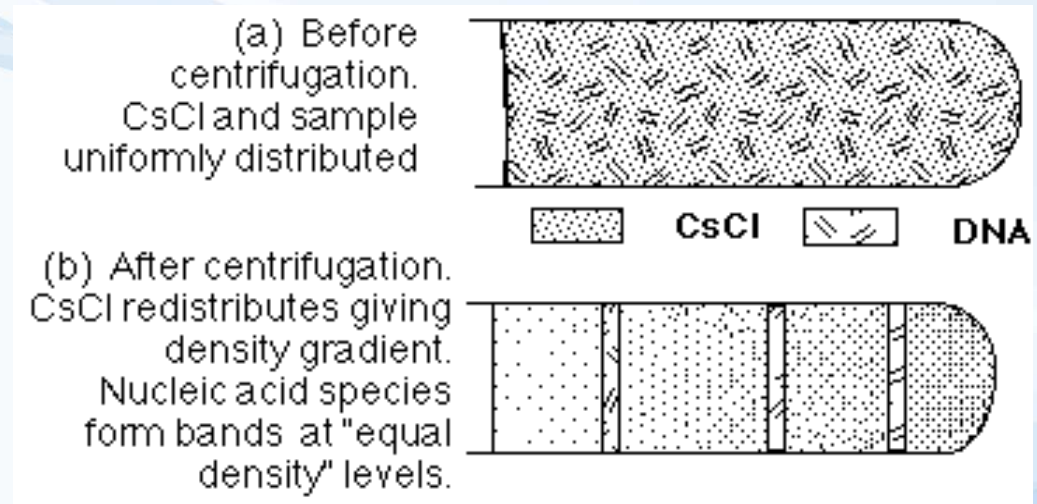
### □ hustota v CsCl:

DNA ~ 1,7 g/cm<sup>3</sup>

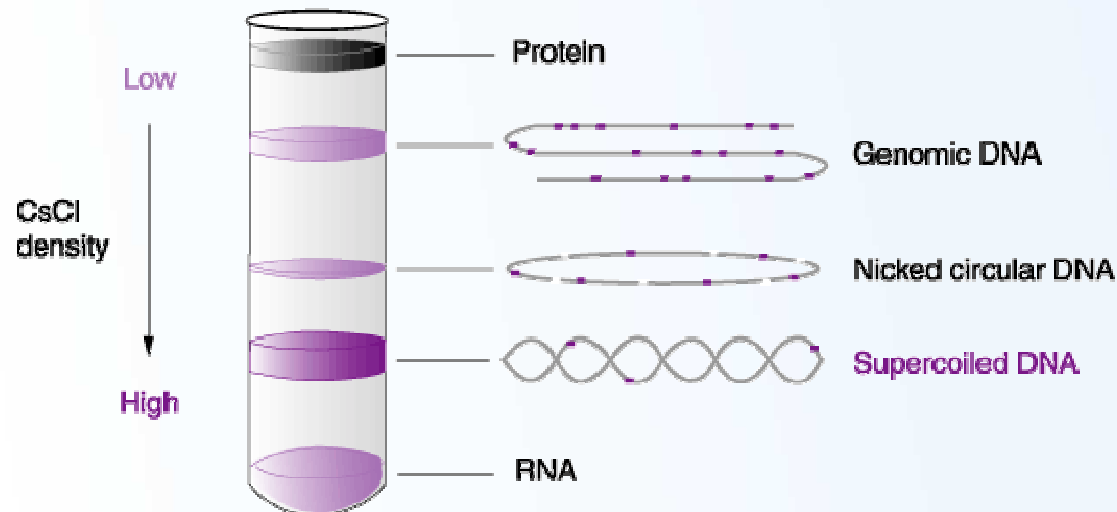
proteiny ~ 1,3 g/cm<sup>3</sup>

RNA > DNA

ssDNA > dsDNA



<http://biochem1362blog.wordpress.com/>

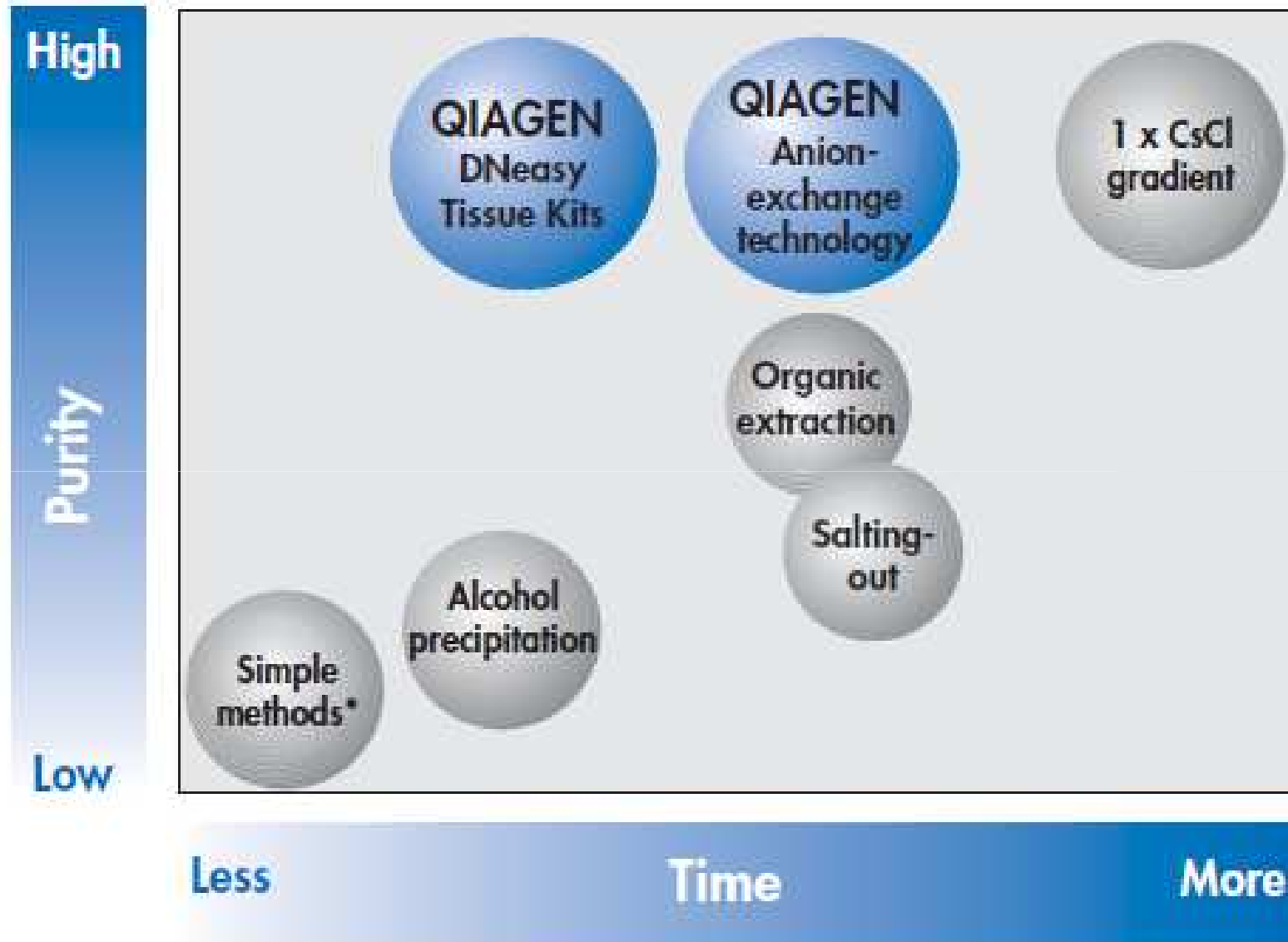


<http://cbc.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture2/Lecture2.html>



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

## DNA Purity and Time Required for Different Isolation Methods



# NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK JE ZÍSKAT DOMA



# NK: Recept do domácí kuchařky



- Homogenizace jahod v roztoku detergentu a NaCl
- Pomůcky: igelitový sáček, vidlička, JAR, solnička, slivovice (55-65%), hrubé plátno nebo kuchyňské cedítko
- Postup:
  - jahody zhomogenizovat pomocí vidličky s přidavkem pár kapek soli a detergentu (JAR, PUR... = popraskání stěn buněk, uvolnění DNA do roztoku)
  - Filtrace přes plátno
  - Přídavek etanolu = vysrážení DNA v podobě bílé hmoty

[http://www.priroda21.upol.cz/docs/2012-01-30\\_-\\_Kitner\\_-\\_Zakladni\\_metody\\_molekularni\\_biologie\\_v\\_botanice.pdf](http://www.priroda21.upol.cz/docs/2012-01-30_-_Kitner_-_Zakladni_metody_molekularni_biologie_v_botanice.pdf)

<http://www.youtube.com/watch?v=UDKm9rZbhyl>



# NK: Recept do domácí kuchařky

- Homogenizace kousku jater (5-10g) v 10% roztoku kuchyňské soli a vysrážení DNA alkoholem
- Pomůcky: talířek, vidlička, nůž, solnička, slivovice (55-65%), kuchyňské cedítko (hrubé plátno)
- Postup:
  - kousek jater zhomogenizovat pomocí vidličky
  - zalít přiměřeným objemem 10% NaCl – popraskání stěn buněk, uvolnění DNA do roztoku
  - filtrace přes plátno
  - přidavek etanolu = vysrážení DNA v podobě bílé hmoty

*[http://www.priroda21.upol.cz/docs/2012-01-30\\_-\\_Kitner\\_-\\_Zakladni\\_metody\\_molekularni\\_biologie\\_v\\_botanice.pdf](http://www.priroda21.upol.cz/docs/2012-01-30_-_Kitner_-_Zakladni_metody_molekularni_biologie_v_botanice.pdf)*

<http://www.youtube.com/watch?v=DBb1utQBiy4>

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/howto/>

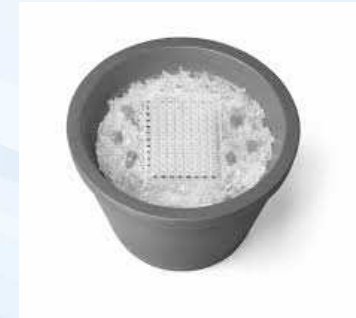
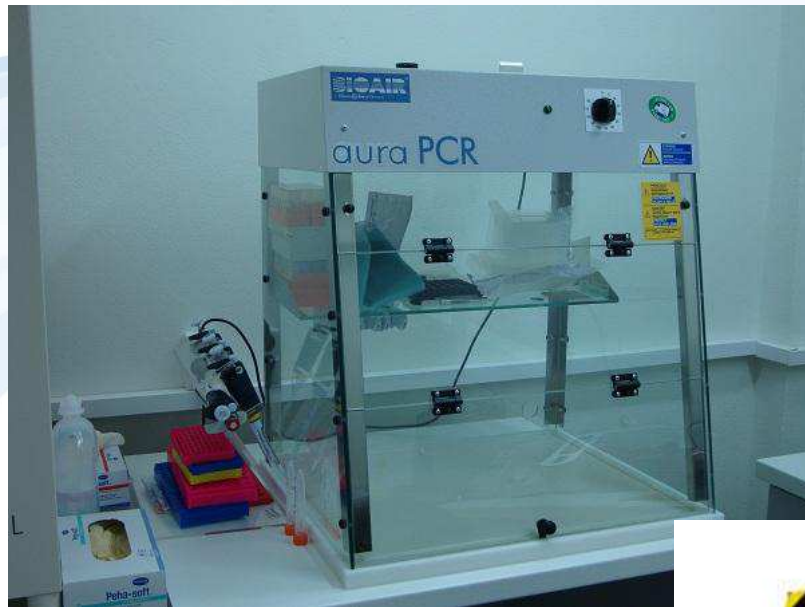


# NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK S NIMI PRACOVAT



# NK. PRACOVNÍ PODMÍNKY

- ✓ dekontaminace a sterilizace pracovních ploch UV zářením, čerstvým 10% roztokem bělidla (SAVO) a komerčním roztokem pro inkativaci RNáz (např. RNaseZap™), DNáz a NK (např. DNAZap™)
- ✓ používat pouze vodu pro molekulární biologii („molecular grade water“)
- ✓ sklo – omýt detergentem a vodou a sušit při vysoké teplotě (350°C/2 h)
- ✓ plast – garantované bez RNáz/DNáz a DNA/RNA nebo autoklátovat
- ✓ nosit rukavice a často je měnit
- ✓ používat špičky s filtry

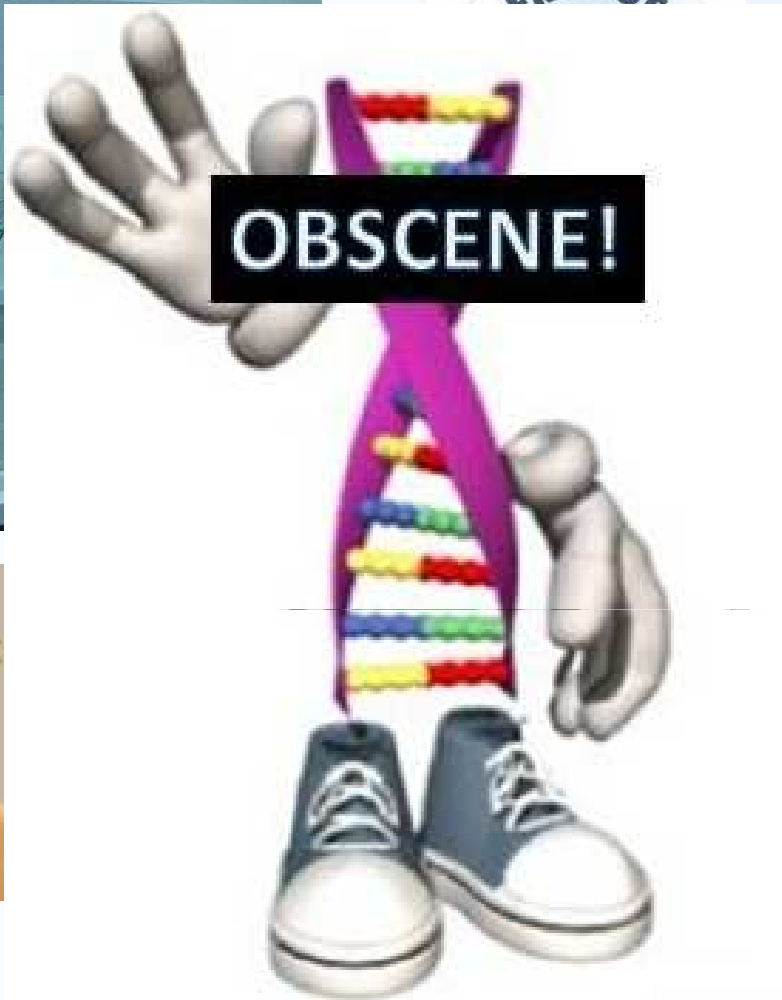


DNA  
RNase/DNase  
**FREE**



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment





Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

# NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK JE STANOVIT

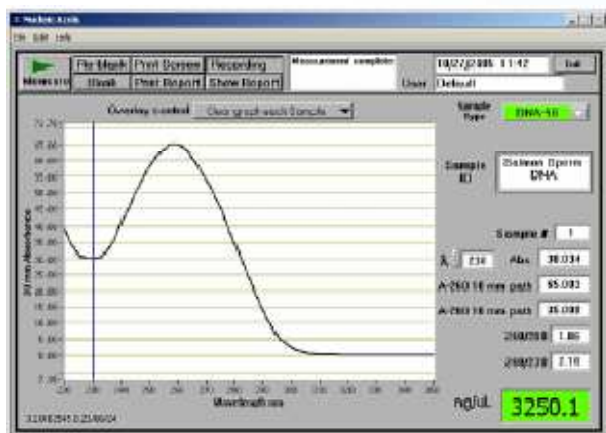


# NK: KVANTITA & KVALITA

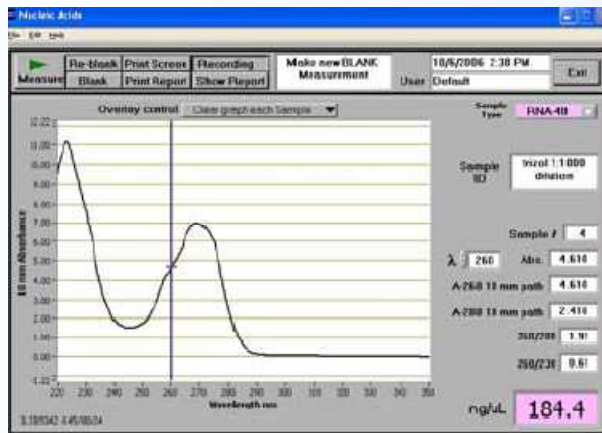
## □ SPEKTROFOTOMETRICKY

VLNOVÁ DÉLKA	ODEZVA	KOMENTÁŘ
215-230 nm	*NK absorbují minimálně *Peptidová vazba v proteinech absorbuje	Měření nejsou při této délce prováděny, protože obecně používané pufrы a solventy (např. Tris) také absorbují při těchto vlnových délkách.
260 nm	*NK absorbují maximálně	Puriny absorbují maximálně při vlnové délce mírně pod 260 nm; pyrimidiny kolem 260 (mírně nad). Puriny mají vyšší molární absorptivitu než pyrimidiny. Maximum absorbance a absorptivity záření úseku RNA/DNA proto závisí na přítomných bázích. Proteiny absorbují pouze slabě při této vlnové délce.
270 nm	* Fenol absorbuje silně	Fenol může být kontaminant ve vzorku izolovaných NK.
280 nm	*Aromatické aminokyseliny absorbují	NK také absorbují při této vlnové délce.
320 nm	*Ani proteiny ani NK neabsorbují	Používá se jako pozadí, když ani NK, ani proteiny neabsorbují.

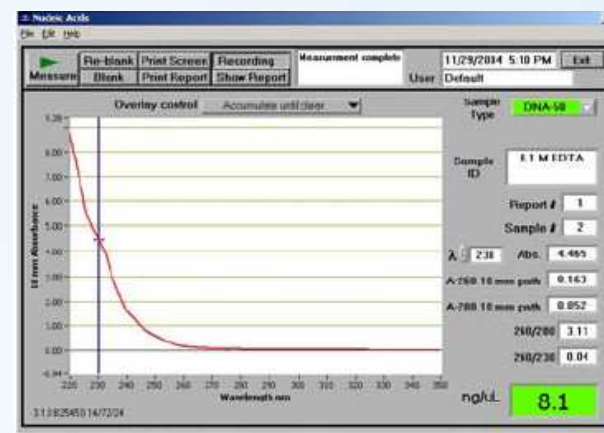
### DNA



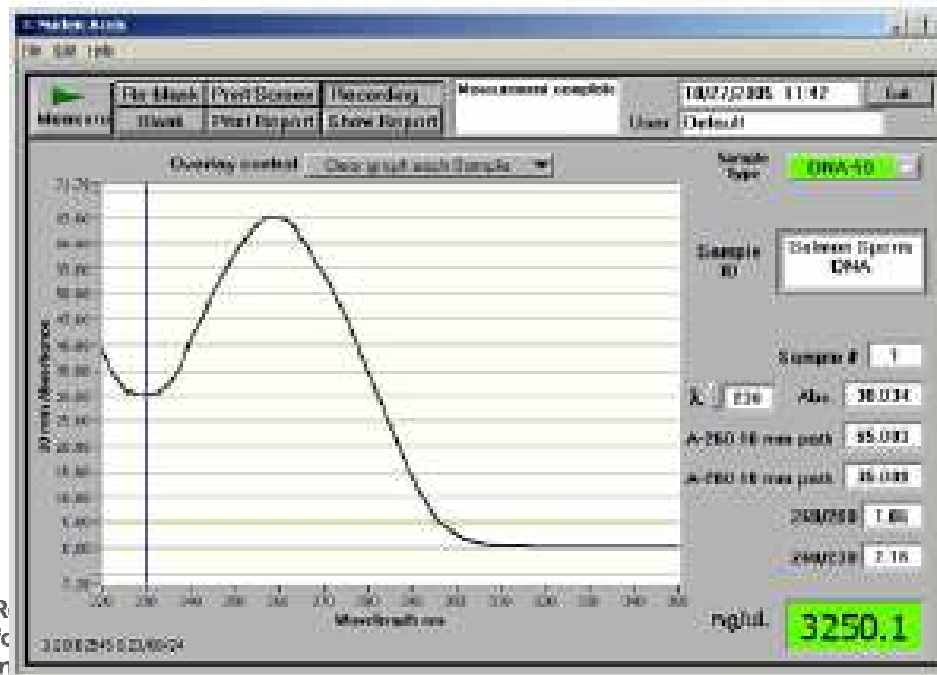
### TRIZOL



### EDTA



DNA	$A_{260}$	1,0 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA 1,0 ~ 33 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA
	$A_{260}/A_{280}$	1,6-1,8 (>1,8 $\Rightarrow$ RNA; <1,6 $\Rightarrow$ protein, fenol atd.)
	$A_{260}/A_{230}$	1,8-2,2 (< 1,8 naznačuje přítomnost např. fenolu, solí, EDTA, TRIZOLu, guanidine HCl)
RNA	$A_{260}$	1,0 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA
	$A_{260}/A_{280}$	~2,0 (>2 $\Rightarrow$ guanidin isothiokyanát; <1,6 $\Rightarrow$ proteiny, fenol atd.)
	$A_{260}/A_{230}$	1,8-2,2 (< 1,8 naznačuje přítomnost např. fenolu, solí, EDTA, TRIZOLu)



← Typ vzorku

← 260/280

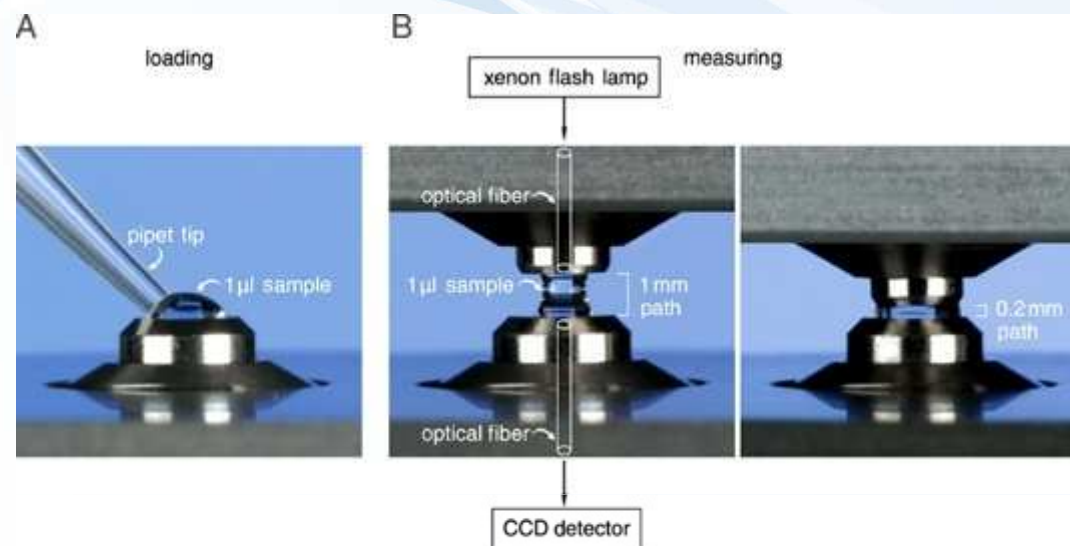
← 260/230

← Koncentrace



R  
f  
in

-NanoDrop® ⇒ UV/Vis spektrum vlnových délek (220-750 nm), 1 µl vzorku bez ředění (3700 ng/µl dsDNA)



## □ FLUORESCENČNĚ

- vzorky s nízkou koncentrací nebo kontaminované
- fluorescenční barvy: ethidium bromid, Ribogreen, QuantiFluor® RNA Systém, PicoGreen



Dye	Target molecule	Measurement range
PicoGreen	dsDNA	0,025 – 1000 ng/mL
Hoechst H33258	dsDNA	0,1 – 10 µg/mL (dsDNA)
Ethidiumbromide	dsDNA, RNA	0,1 – 10 µg/mL (dsDNA)
RiboGreen®	RNA	1 – 1000 ng/mL
Oligreen®	ssDNA, Oligo-DNA	0,1 -1000 ng/mL
NanoOrange®	Protein	10 ng/mL-10 µg/mL

*Eppendorf, Application Note 271, Březen 2013*



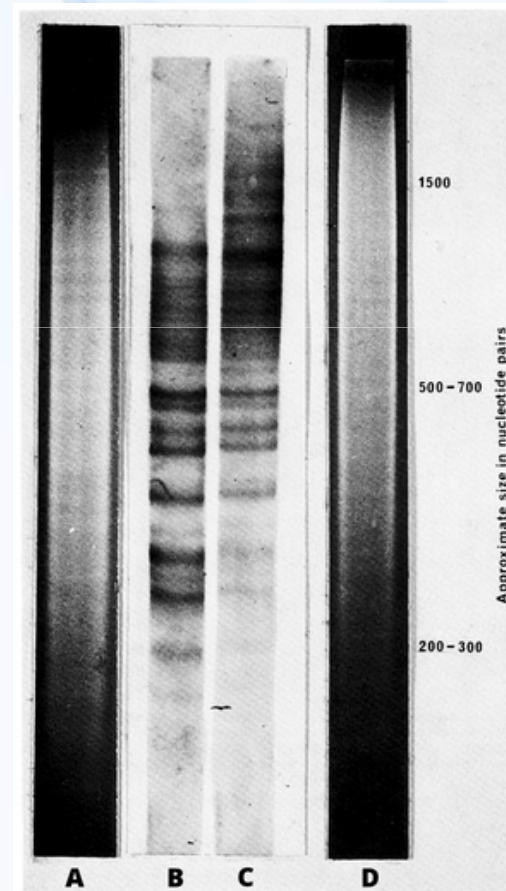
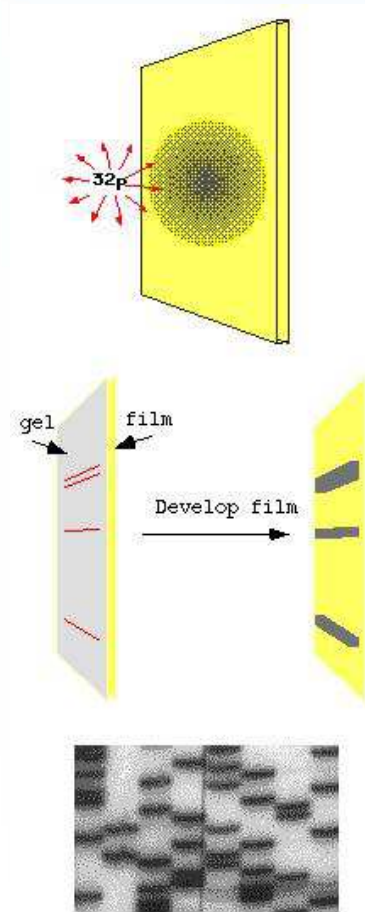
	Absorption	Fluorecence		
<b>Method of detection</b>	A260	Hoechst H33258	Ethidium-bromide	PicoGreen
<b>DNA Measurement range</b>	1–50 µg/mL	0,01–15 µg/mL	0,1–10 µg/mL	0,025– 1000 ng/mL
<b>RNA Measurement range</b>	1–40 µg/mL	NA	1–40 µg/mL	Minimal sensitivity
<b>Ratio DNA/ RNA</b>	0.8	400	2.2	>100

*Eppendorf, Application Note 271, Březen 2013*



## □ RADIOAKTIVNĚ

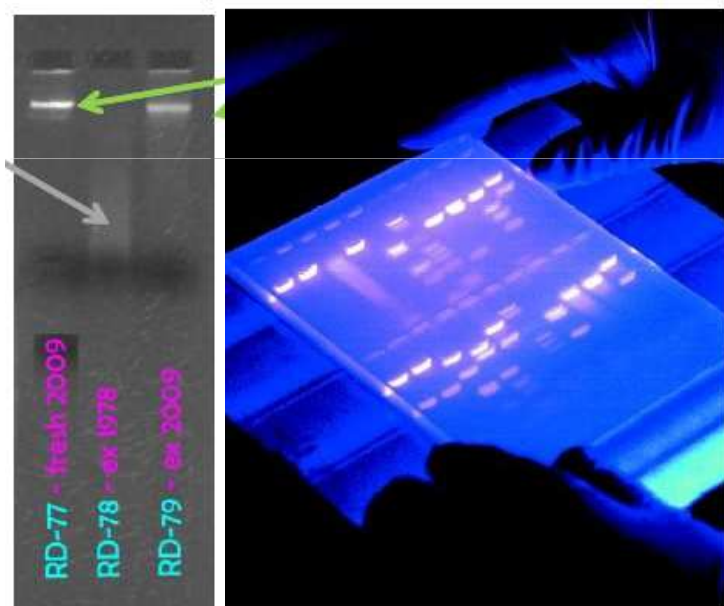
- vizualizace malého množství DNA
- Southernův či Northernův přenos na nylonovou membránu, hybridizace s radioaktivně značnou sondou
- $^{32}\text{P}$



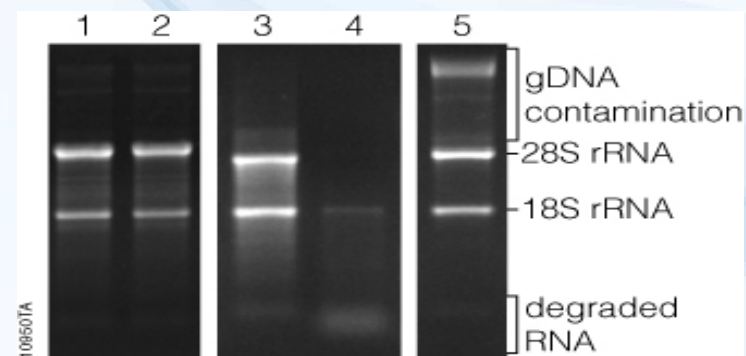


# □ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZOU V AGARÓZOVÉM GELU

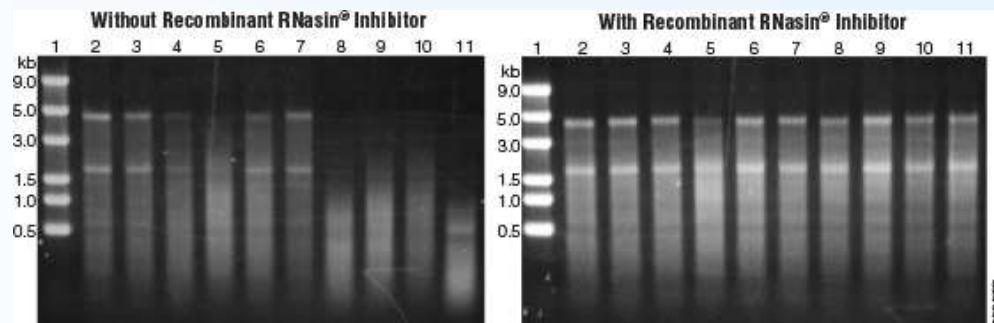
- odečet množství NK z gelu - marker
- kvalita a integrita
- barvení ethidium bromidem nebo dalšími fluorescenčními barvami pro NK ⇒ vizualizace UV světlem



[http://www.priroda21.upol.cz/docs/2012-01-30\\_-\\_Kitner\\_-\\_Zakladni\\_metody\\_molekularni\\_biologie\\_v\\_botanice.pdf](http://www.priroda21.upol.cz/docs/2012-01-30_-_Kitner_-_Zakladni_metody_molekularni_biologie_v_botanice.pdf)



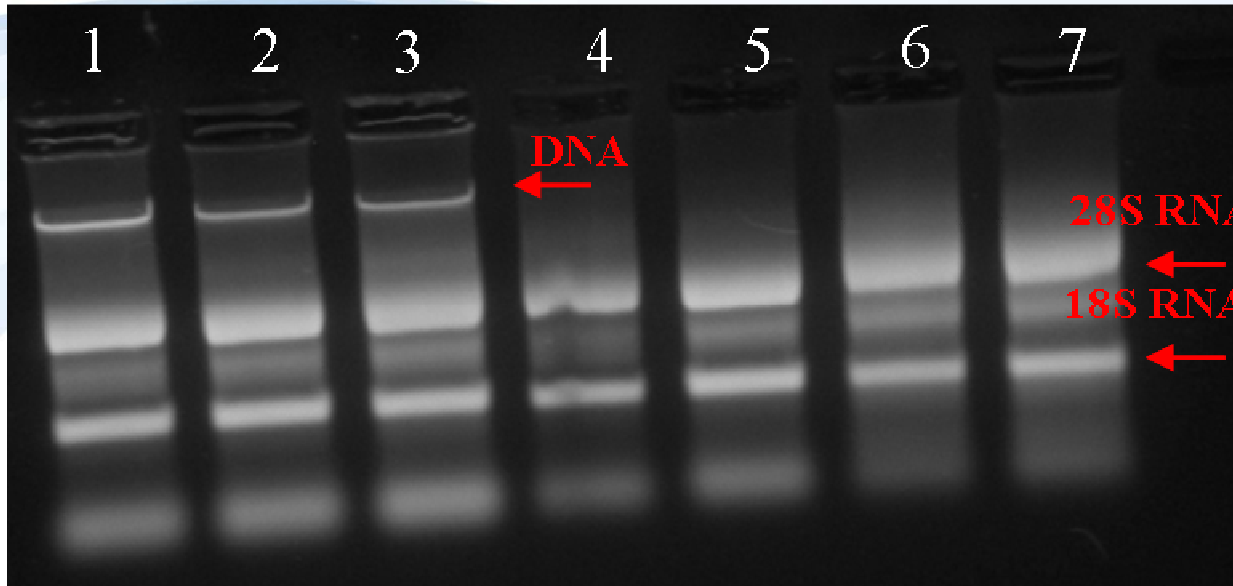
<http://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment>



<http://worldwide.promega.com/products/pm/genomics/rnasin>



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment



1. Trizol (12  $\mu$ g)
2. Trizol (24  $\mu$ g)
3. RNeasy (12  $\mu$ g)
4. Invisorb II (12  $\mu$ g)
5. Invisorb II (24  $\mu$ g)
6. Invisorb Spin (12  $\mu$ g)
7. Invisorb Spin (24  $\mu$ g)



# JAK SEPAROVAT NK



# NK: ELEKTROMIGRACE

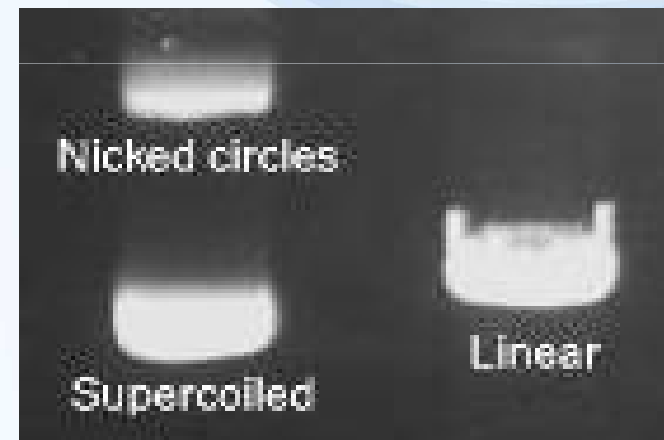
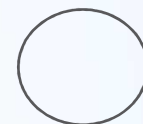
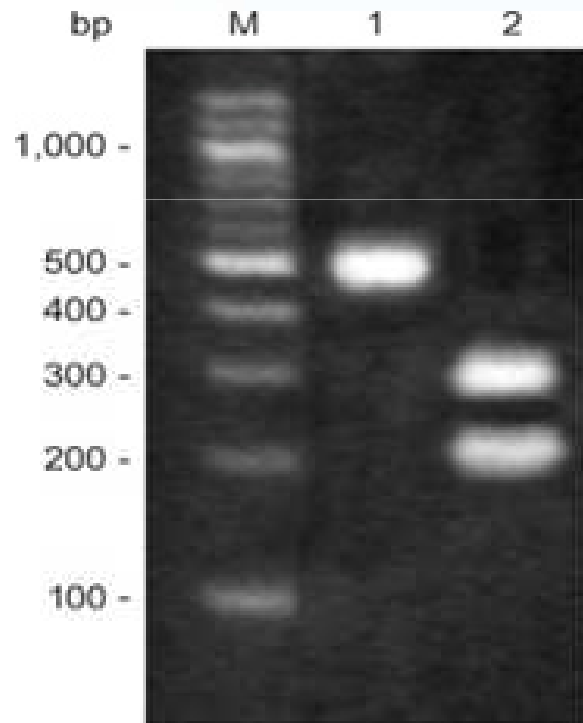
- ❑ využívá separace makromolekul na základě náboje, konformace nebo velikosti v elektrickém poli
- ❑ migrace nabité částice v elektrickém poli je úměrná jejímu celkovému náboji, velikosti a tvaru
- ❑ malé částice s velkým nábojem vs. velké částice s velkým nábojem

## ELEKTROFORÉZA V GELU

- Agarózová – vhodné pro rozlišení dlouhých fragmentů DNA a RNA (>400 bp), 1 kbp ssDNA ~ 330 kDa
- Polyakrylamidová – vodné pro rozlišení krátkých fragmentů DNA nebo sekvenci lišícího se záměnou jednoho nukleotidu (<400 bp)

## ❑ CO OVLIVŇUJE MIGRACI NK V GELU:

- velikost pór, napětí, iontová síla roztoku, koncentrace fluorescenční barvy
- velikost NK  $\Rightarrow$  menší rychleji
- konformace DNA či RNA



## □ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA

– agarózová (neutrální lineární polymer agarobiózy)

⇒ hustá síť, kterou rychleji prostupují kratší fragmenty (molekuly) než delší fragmenty – „molekulové síto“



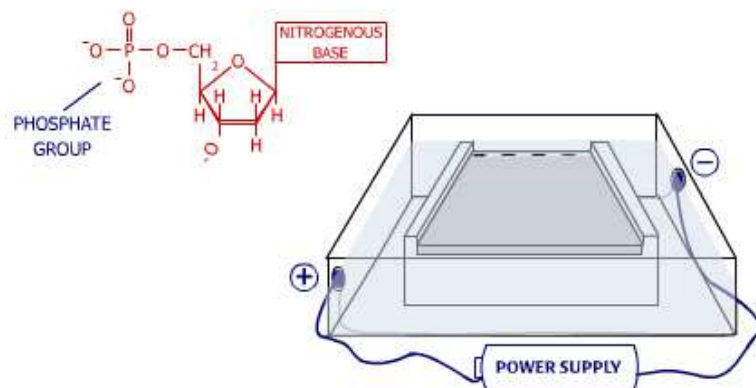
# NK: ELEKTROMIGRACE

## □ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA

– agarózová (neutrální lineární polymer agarobiózy)

⇒ hustá síť, kterou rychleji prostupují kratší fragmenty (molekuly) než delší fragmenty – „molekulové síto“

The phosphate groups in the DNA backbone carry negatively-charged oxygens – giving a DNA molecule an overall negative charge. In an electric current, the negatively-charged DNA moves toward the positive pole of the electrophoresis chamber.



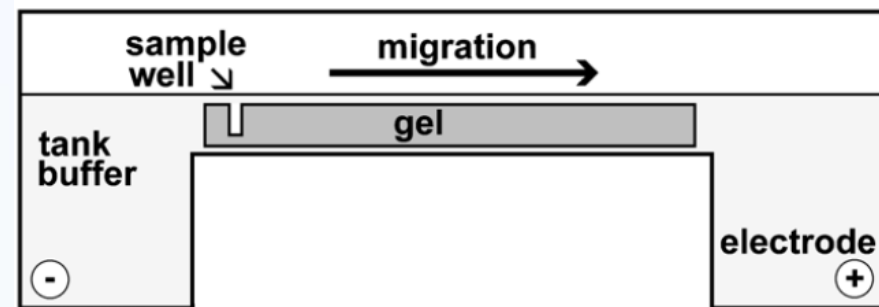
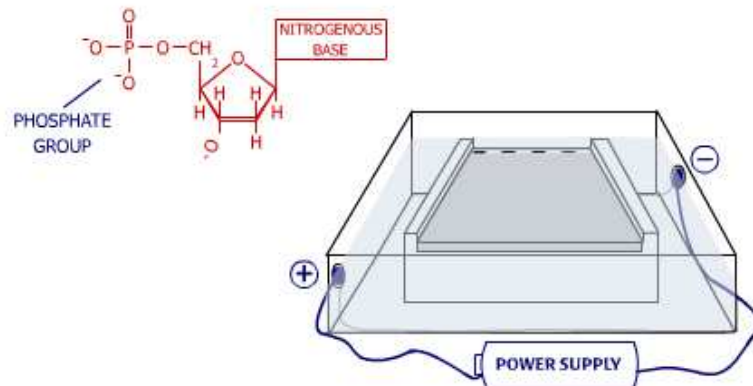
# NK: ELEKTROMIGRACE

## □ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA

– agarózová (neutrální lineární polymer agarobiózy)

⇒ hustá síť, kterou rychleji prostupují kratší fragmenty (molekuly) než delší fragmenty – „molekulové síto“

The phosphate groups in the DNA backbone carry negatively-charged oxygens – giving a DNA molecule an overall negative charge. In an electric current, the negatively-charged DNA moves toward the positive pole of the electrophoresis chamber.



[www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf](http://www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)





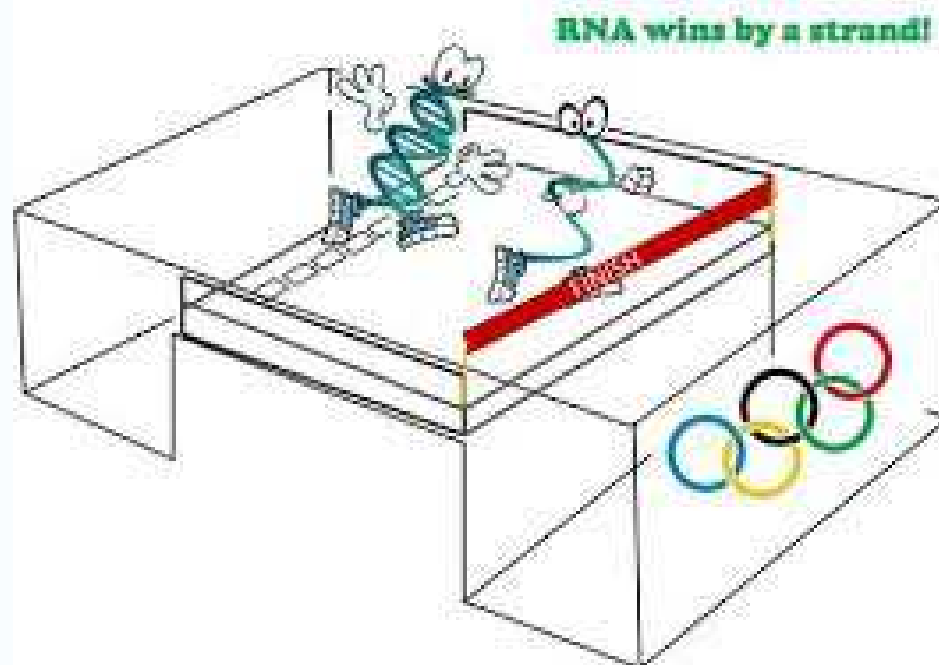
**Agaróza** – odlišná úroveň čistoty podle množství zbytkových nabitých sulfátových a karboxylových skupin, jejichž ionty mohou migrovat ke katodě a způsobovat jev zvaný **elektroendoosmóza** (EEO) ⇒ neselektivní, nežádoucí tok částic

- **agaróza s nízkým bodem tání** (<90°C) – až 4% „méně pevné“ gely, vhodné pro separaci menších molekul DNA
  - izolace DNA z gelu bez denaturace
  - „in-gel“ PCR nebo „in-gel“ ligace
- **agaróza pro „pevné“ gely** – pulse field gel elfo (PFGE)



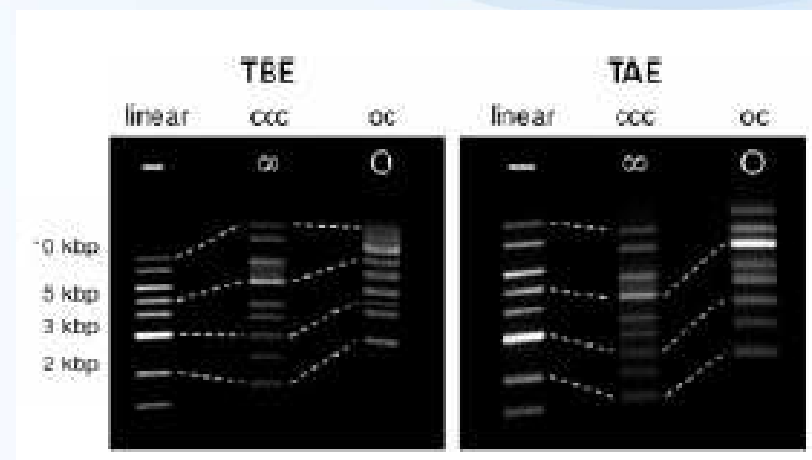
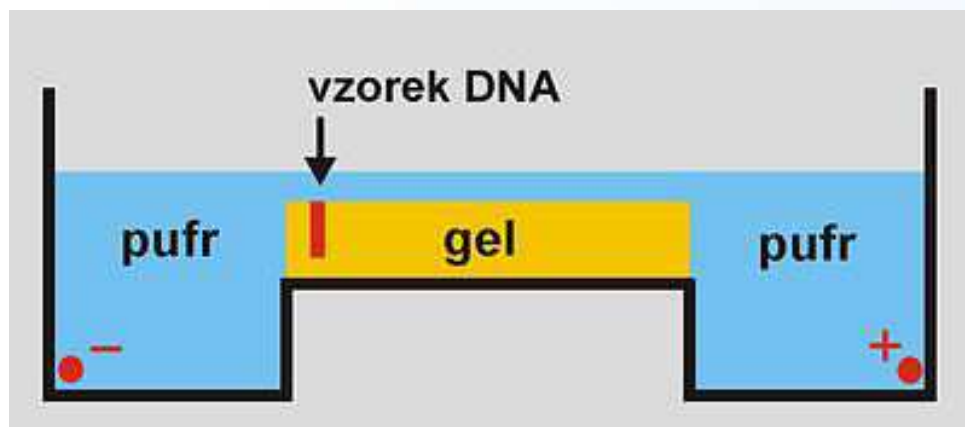
**Agaróza** – odlišná úroveň čistoty podle množství zbytkových nabitých sulfátových a karboxylových skupin, jejichž ionty mohou migrovat ke katodě a způsobovat jev zvaný **elektroendoosmóza** (EEO) ⇒ neselektivní, nežádoucí tok částic

- **agaróza s nízkým bodem tání** (<90°C) – až 4% „méně pevné“ gely, vhodné pro separaci menších molekul DNA
  - izolace DNA z gelu bez denaturace
  - „in-gel“ PCR nebo „in-gel“ ligace
- **agaróza pro „pevné“ gely** – pulse field gel elfo (PFGE)



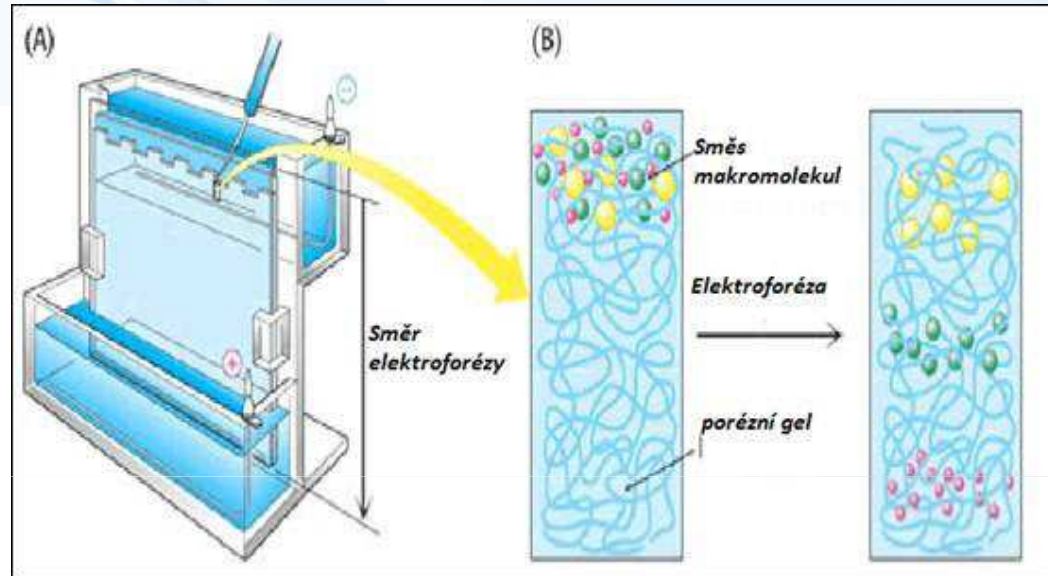
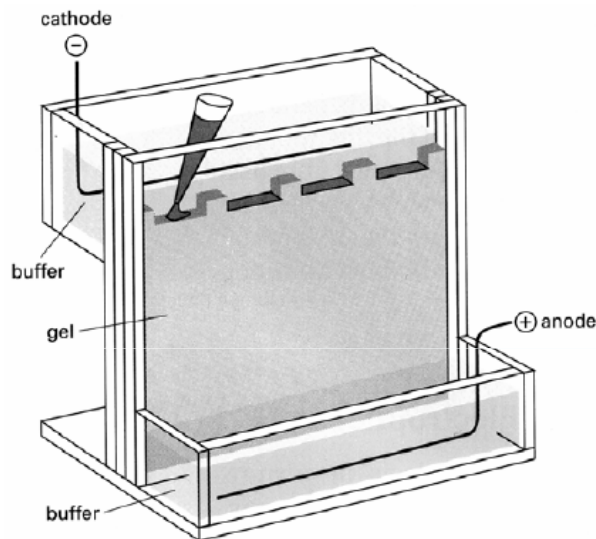
## Elektroforetické pufry:

- **TBE (Tris/kyselina boritá/EDTA)**
  - 0.1-3 kb DNA
  - i vysoké napětí (>150 V)
- **TAE (Tris/kyselina octová/EDTA)**
  - 12-50 kb DNA
  - nižší pufrovací schopnost než TBE
  - nižší napětí (90-120 V)



# □ VERTIKÁLNÍ ELEKTROFORÉZA

- polyakrylamidová (PAGE, polymer z akrylamidu zesíťovaný N,N'-metylenbisakrylamidem)



Alberts (2015), *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. Espero Publishing, 2005. 740 s. [ISBN 80-902906-2-0](https://www.esperopublishing.com/ISBN/80-902906-2-0).

[www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf](http://www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)

% agarose	range (kb)	% acrylamide	range (bp)
0.7	0.8-20	3.5	100-1000
0.9	0.5-7	5.0	80-500
1.2	0.4-6	8.0	60-400
1.5	0.2-4	12.0	40-200
2.0	0.1-3	20.0	10-100

- 5-10 ng DNA
- agarózová elektroforéza ⇒ 100 bp až 20 kb
- polyakrylamidová elektroforéza ⇒ malé NK a oligonukleotidy

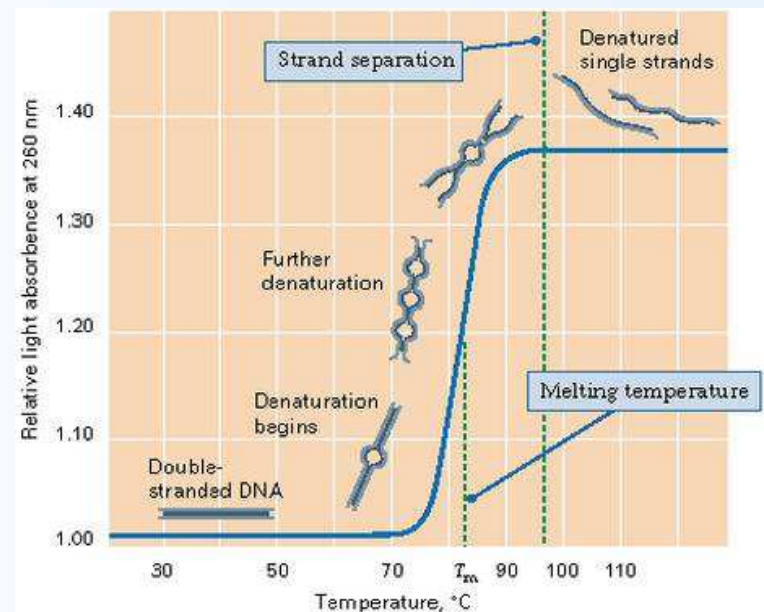
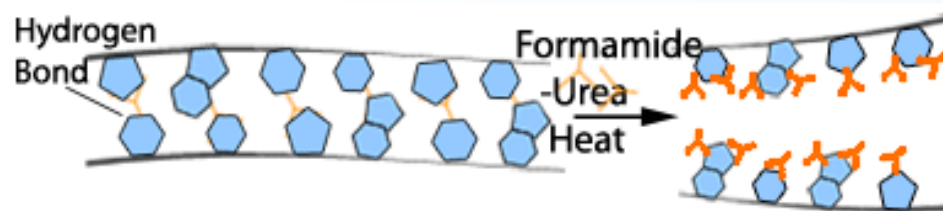
## □ Separace NK:

- bez denaturujících činidel si DNA i RNA zachovává sekundární struktury, které znemožňují separaci dle velikosti

**RNA: Formaldehydový denaturační gel** – agarózový gel v elektroforetickém pufru MOPS (3-(N-morfolino)propan sulfonová kyselina) s přidavkem formaldehydu

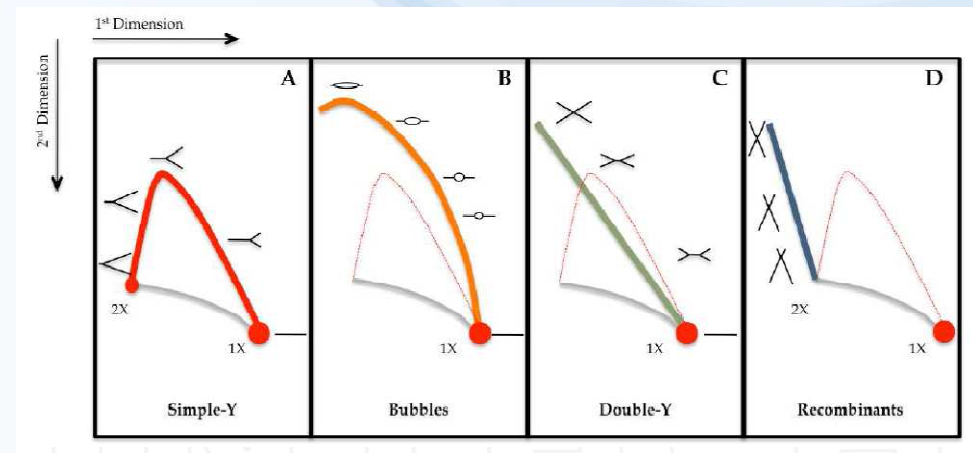
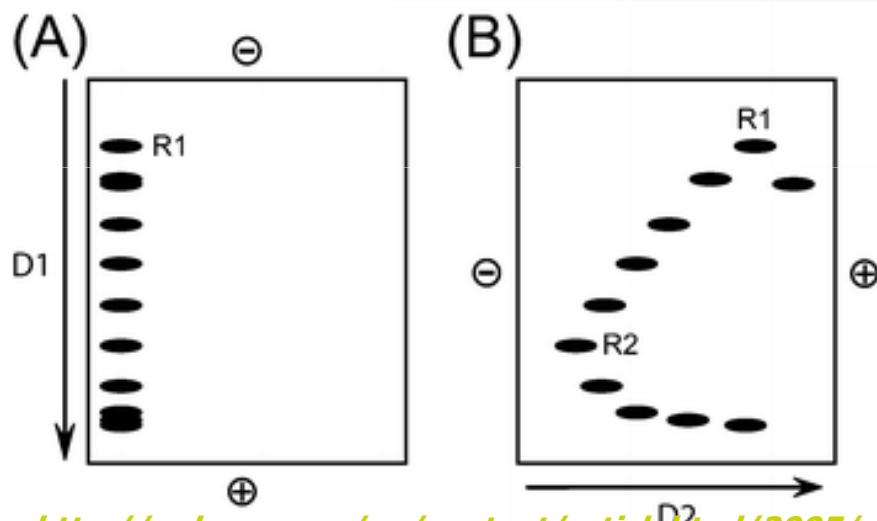
**DNA: Denaturující alkalické gely pro DNA** – agarózový gel s přidavkem NaOH a EDTA v elektroforetickém pufru (75mM NaOH)

**DNA&RNA: denaturující PAGE s močovinou nebo formaldehydem či formamidem**



## □ 2D AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA:

- **1. rozměr** – separace molekul dle velikosti: např. při nízkém napětí v nízkoprocentní agaróze
- **2. rozměr** – při vysokém napětí ve vysokoprocentní agaróze v přítomnosti interkalační látky (EtBr)  $\Rightarrow$  separace molekul dle tvaru a složitosti struktur



<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2005/mb/b509471m>  
<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/34921.pdf>

## □ 2D PAGE ELEKTROFORÉZA

- „Two-dimensional strandness-dependent electrophoresis“ (2D-SDE):

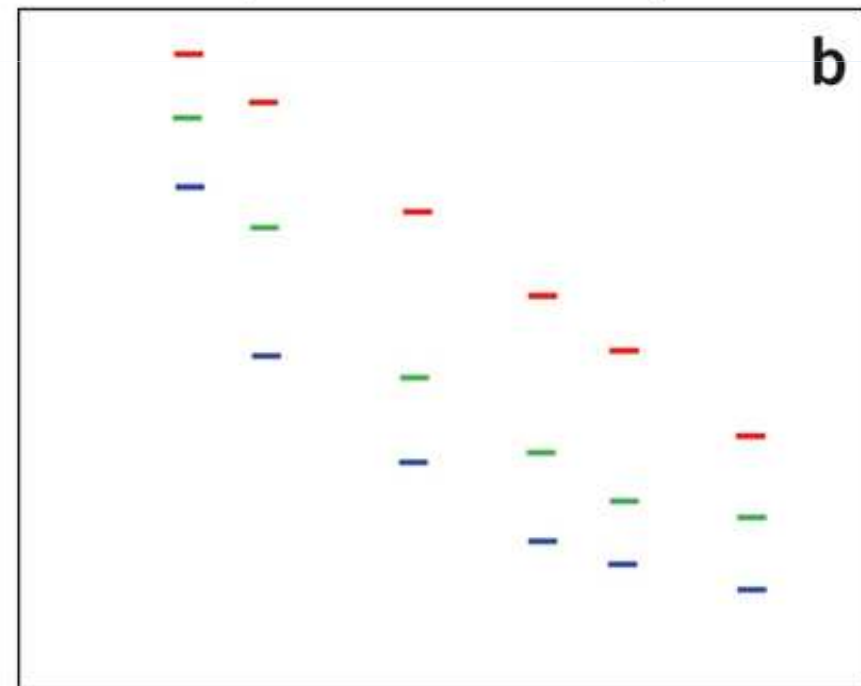
- **1. rozměr** ⇒ separace dle počtu řetězců, jejich délky i konformace
- **2. rozměr** - denaturace všech fragmentů na jednořetězcové ⇒ separace dle délky

2D-SDE to separate ssDNA, dsDNA and RNA•DNA hybrids

1D, different migration velocities of equally long  
ssDNA, and dsDNA and RNA•DNA hybrids

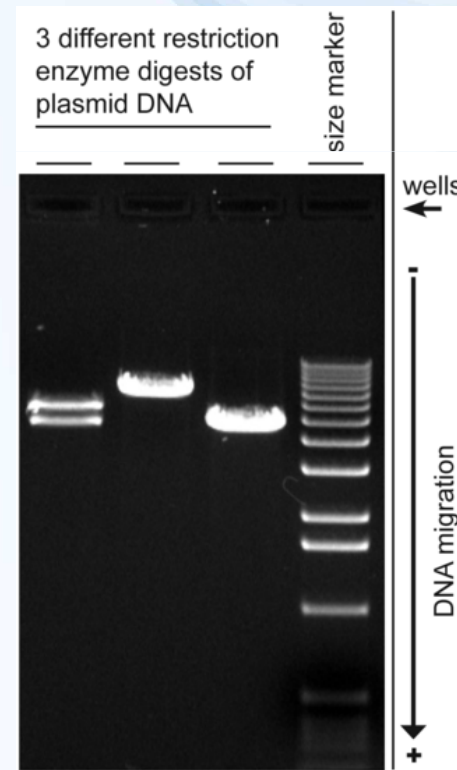
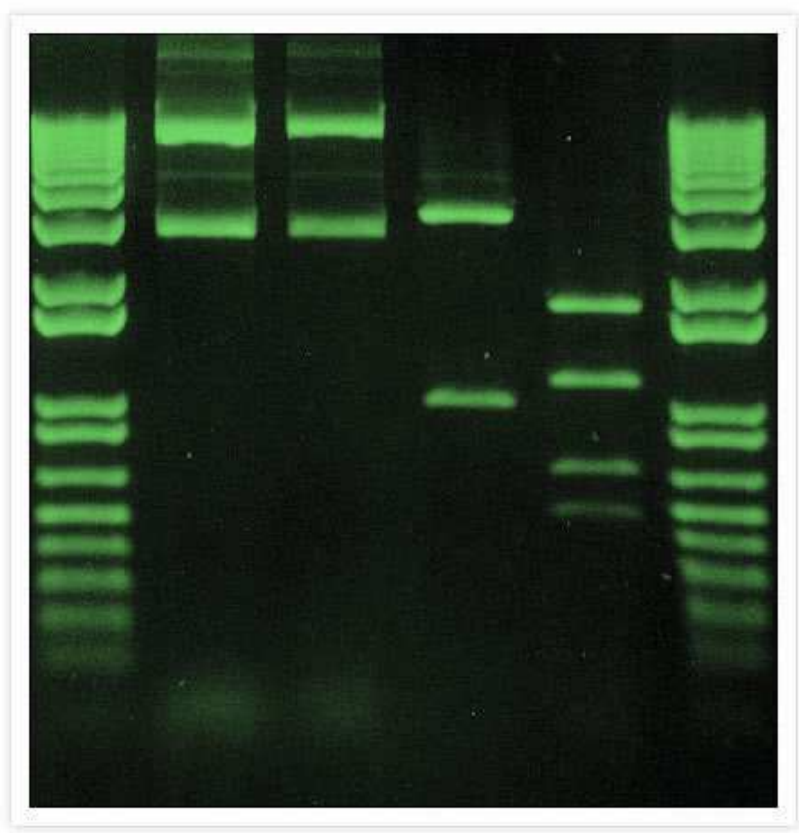


2D, same migration velocities of equally long  
ssDNA, and dsDNA and RNA•DNA hybrids



## □ VIZUALIZACE SEPAROVANÝCH NK V GELU

- agarózový gel  $\Rightarrow$  ethidium bromid, SYBR Green I
- polyakrylamidový gel  $\Rightarrow$  ethidium bromid, stříbro, radioaktivita, kovalentně navázané fluorescenční sloučeniny



[http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular\\_weight\\_size\\_marker#mediaviewer/File:DNAge4wiki.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_weight_size_marker#mediaviewer/File:DNAge4wiki.png)





## □ KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (CGE)

- využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry ⇒ vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE)
  - volná kapilární elektroforéza
  - gelová elektroforéza



<https://publi.cz/books/140/02.html>

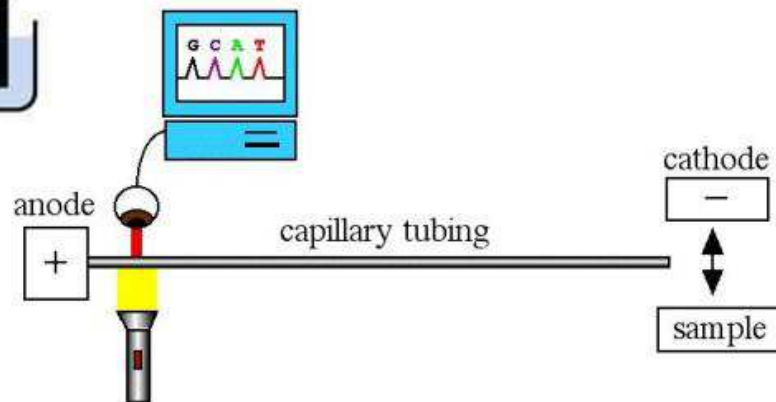


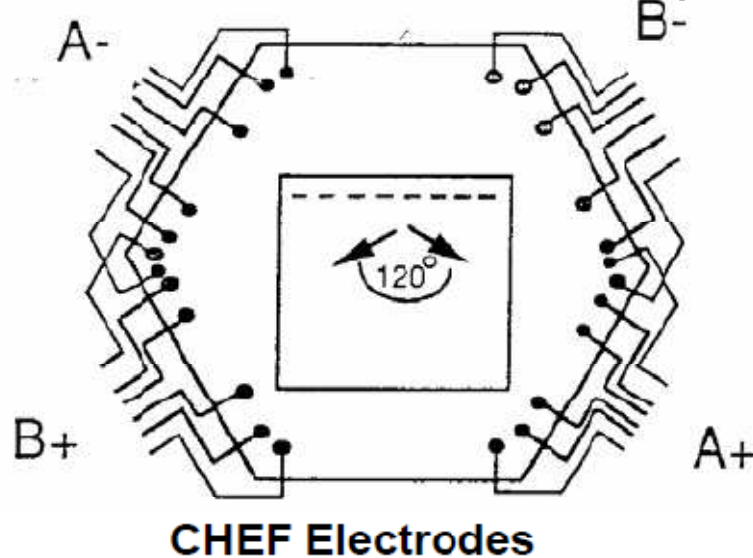
Figure 1 A schematic drawing of a capillary electrophoresis instrument. The sample is introduced on the right side and the chromatograph is detected on the left side. (Photo © Copyright 2002 Department of Biology, Davidson College).

[delliss.people.cofc.edu](http://delliss.people.cofc.edu)



## □ PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (PFGE)

[www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf](http://www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)



„Contoured-Clamped  
Homogeneous Electric Field“

- standardní gelová ELFO rozliší DNA fragmenty do 75 kb
- separace velkých molekul DNA (až 10 Mb) v měnícím se elektrickém poli (orientace pólů o 90°, 120°, 180° atd.)
- délka pulzu, orientace, chlazení, pufr agaróza s nízkým EEO
- i celé buňky
- genotypování, genetický otisk („fingerprint“), epidemiologie patogenních organismů



## □ SEPARACE DNA LIŠÍCÍ SE V JEDNÉ BÁZI

- bodová mutace

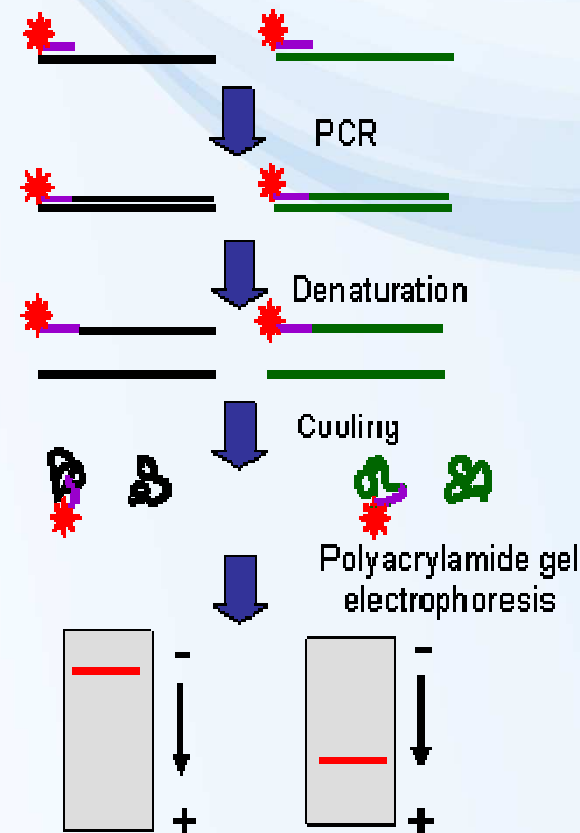
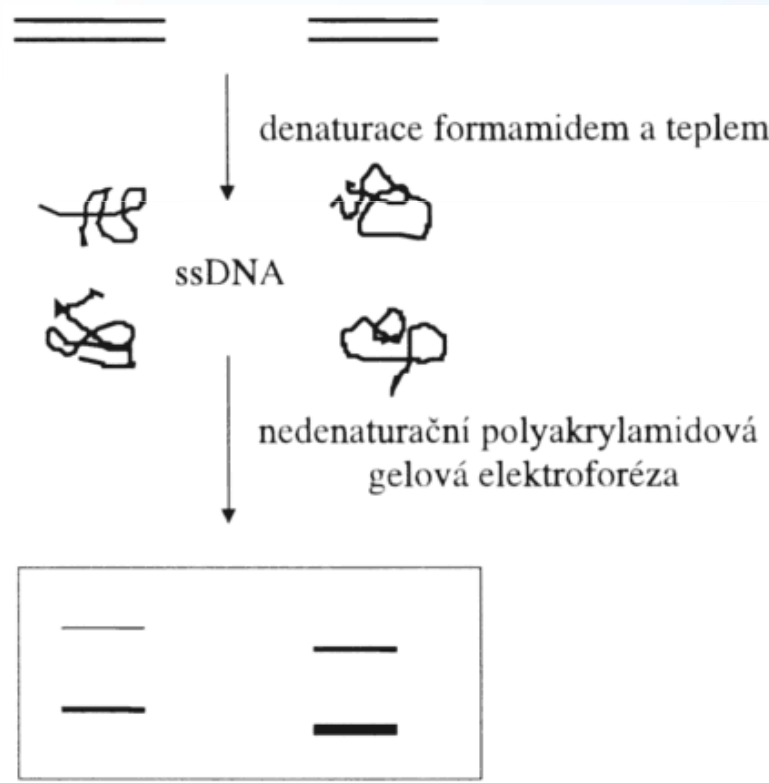
**SSCP** = jednovláknový konformační polymorfismus

**DGGE** = denaturační gradientová gelová elektroforéza chemickým činidlem

**TGGE** = denaturační gradientová gelová elektroforéza teplotním gradientem

## □ SSCP (“Single-strand conformation polymorphism”)

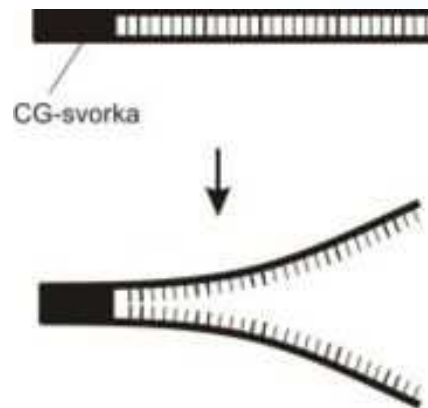
- Separace jednořetězcové DNA (denaturovaná) na nendenaturujícím polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě ⇒ DNA řetězec se sbalí na základě vnitřních komplementarit a separuje se na základě odlišnosti tání DNA fragmentů



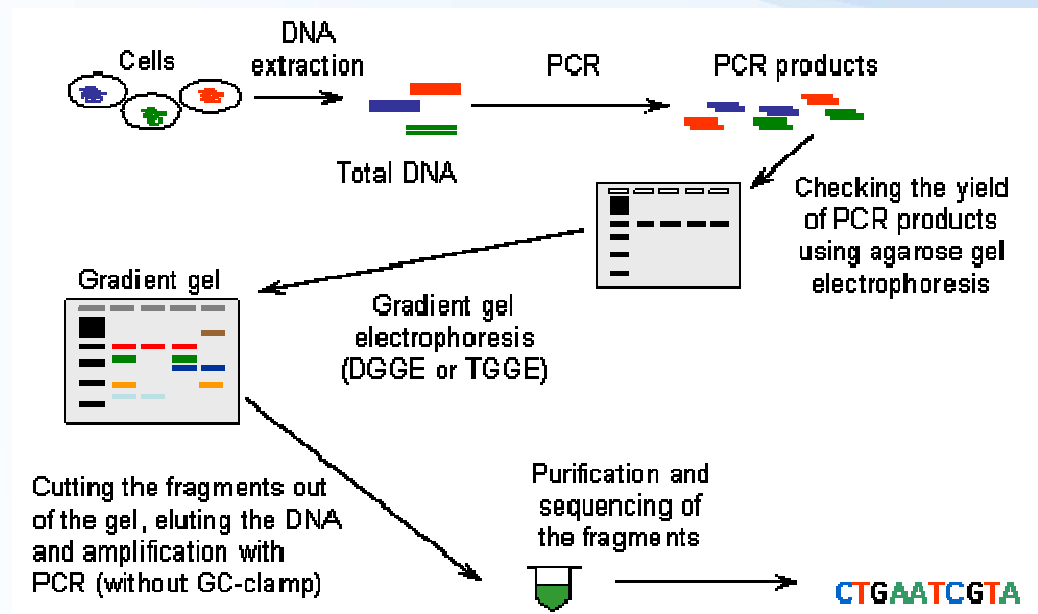
# DGGE & TGGE (“Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis”)

⇒ Separace na základě odlišnosti tání DNA fragmentů

- posloupnost nukleotidů
- obsah GC párů
- ovlivňují průběh tání fragmentu DNA a následně rychlost migrace v denaturačním gradientu v polyakryamidovém gelu - zvyšující se teplota, nebo koncentrace denaturantů



[www.wikiskripta.eu/index.php/DGGE](http://www.wikiskripta.eu/index.php/DGGE)



Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

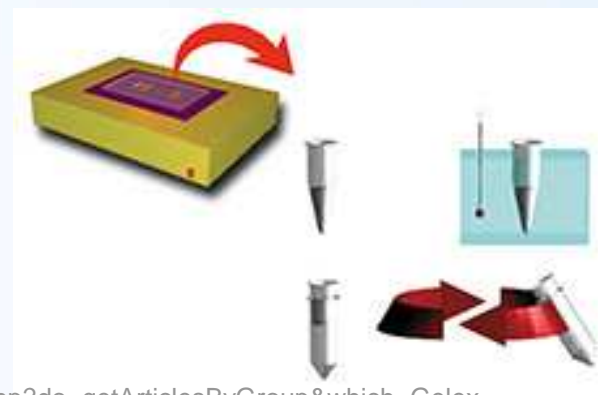
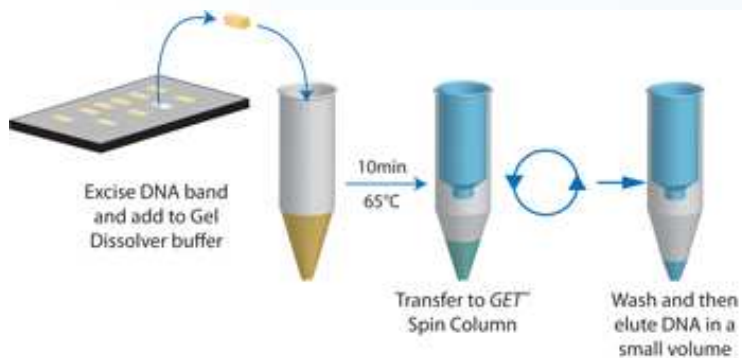
<http://webcast.skola-profession.cz/Pages/Player.aspx?id=41>

## ☐ AGARÓZOVÝ GEL

- elektroeluce
- vazba a eluze ze skleněných nebo silikátových kuliček
- elektroforéza na DEAE-celulóзовou membránu
- agaróza s nízkou teplotou tání

## ☐ POLYAKRYLAMIDOVÝ GEL

- metoda “crush and soak”



<http://www.peqlab.co.uk/wcms/uk/products/index.php?do=getArticlesByGroup&which=Gelex>



# NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK S NIMI MANIPULUJEME



# NK: MANIPULACE & MODIFIKACE

## □ Enzymy pro manipulace s NK (štěpení, klonování, značení atd.)

- **polymerázy** ⇒ syntetizují NK dle templátu
- **ligázy** ⇒ spojují fragmenty DNA
- **fosfatázy a kinázy** ⇒ defosforylace a fosforylace
- **nukleázy** ⇒ štěpí fosfodiesterovou vazbu; exonukleázy a endonukleázy

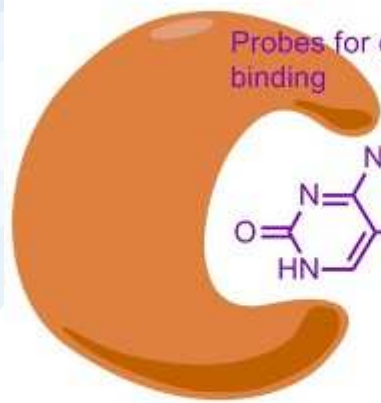


### Příklady nukleáz:

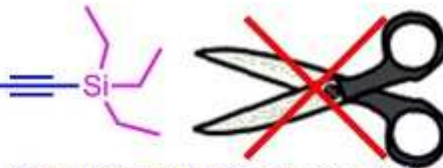
Bal31	3'-exonukleáza pro ds nebo ss DNA
S1	5'-exonukleáza pro ssDNA nebo ssRNA
DNáza I	ss nebo dsDNA (5', pyr)
ExoIII	3'-exonukleáza pro dsDNA
RNáza A	endonukleáza pro ssRNA (3', pyr)
RNáza T1	Endonukleáza pro ssRNA (3', G)



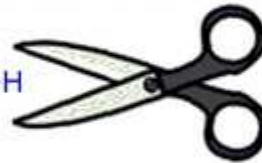




*J. Org. Chem.* **2011**, 76, 3457

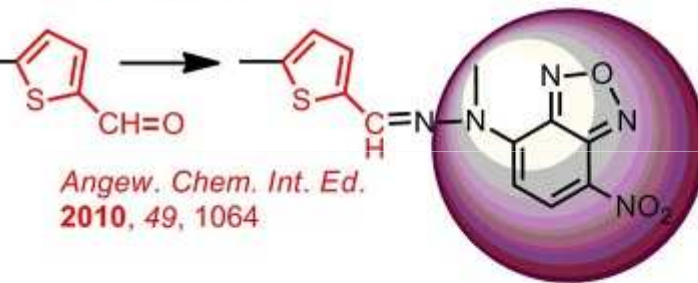


Chemical protection against cleavage by restriction endonucleases



*Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 7612  
*ChemBioChem* **2011**, 12, 431  
*Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8727

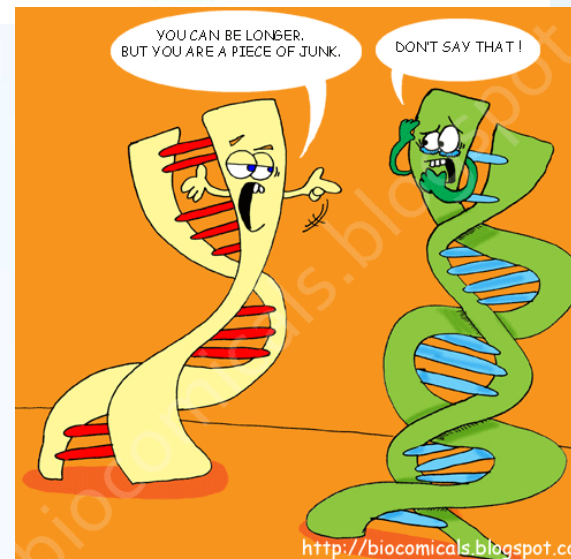
Bioconjugations



*Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1064

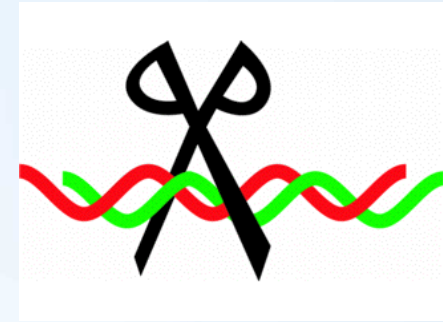


 in the environment



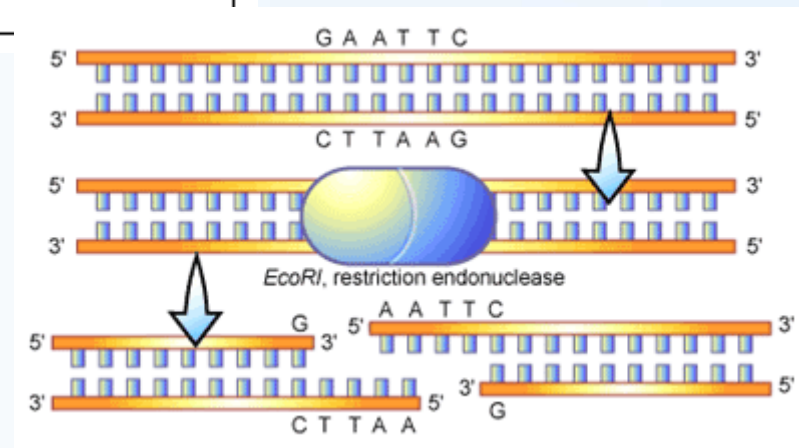
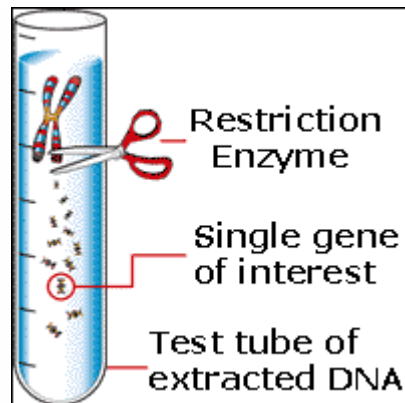
## □ Restrikční endonukleázy:

- ⇒ štěpí DNA na specifických místech
- ⇒ Třída II: štěpí DNA v rozpoznávacím místě (4-8 nukleotidů), palindrom



### Conditions Promoting Star Activity

- high glycerol (>5%) concentration
- high enzyme/DNA ratio (100 units/ $\mu\text{g}$ )
- low ionic strength (<25 mM)
- high pH (>8)
- organic solvents
- substitution of  $\text{Mg}^{2+}$



# GENETICKÝ OTISK

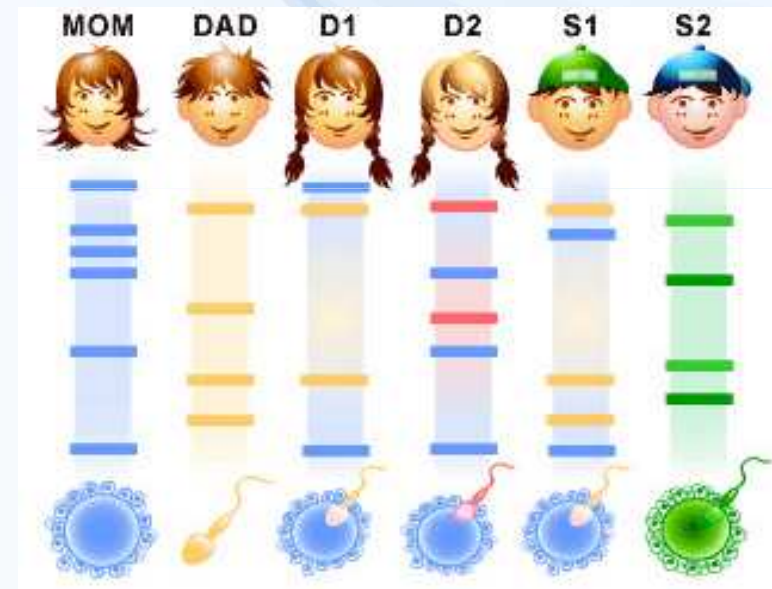
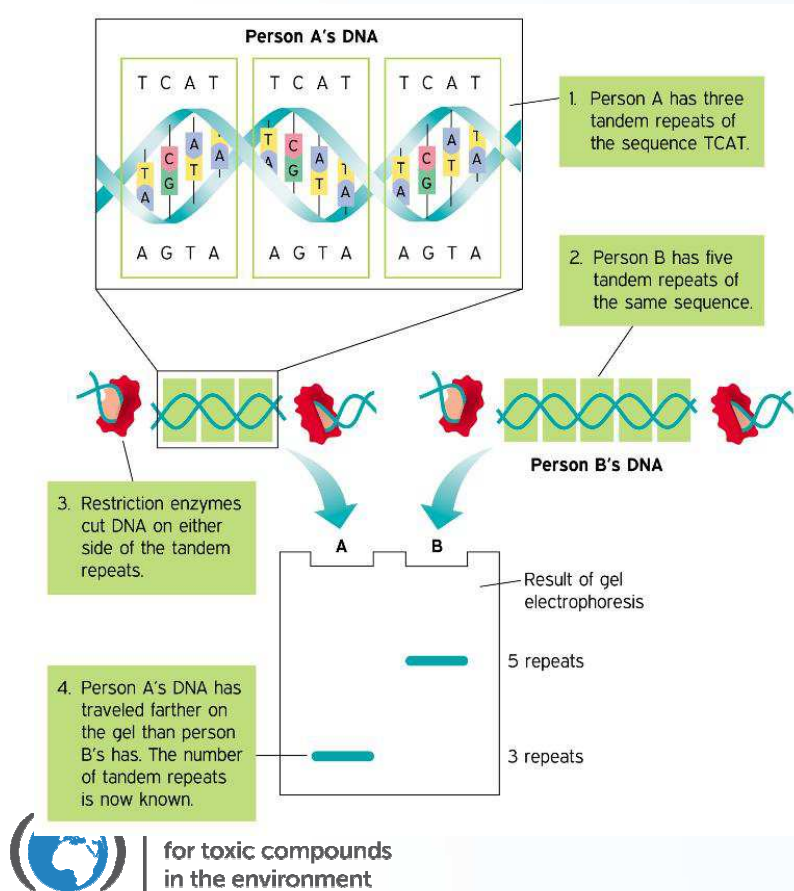


# NK: MAPOVÁNÍ SNP

- ❑ **Metody detekce bodových polymorfismů (SNP)**
  - **SSCP, DGGE, TGGE**
  - **RFLP (restriction fragments length polymorfismus)**



- **Autozomální mikrosatelity** („Short Tandem Repeats“, STRs) ⇒ nekódující čtyřnukleotidové tandemově se opakující repetice
- **VNTR** (variabilní počet tandemových opakování) ⇒ polymorfismu repetitivních úseků DNA
- Variabilita v populaci je délková, daná počtem repetice



# NGS MAPOVÁNÍ

□ **(PCR/RFLP** (Polymorfismus v délce restričních fragmentů) ⇒  
restriční analýza DNA

- gDNA nebo namnožený specifický úsek naštěpíme restriktázou
- Fragmenty rozdělíme elektroforeticky
- Z gelu je přesajeme na membránu
- Membránu hybridizujeme se sondou
- Navázanou sondu detekujeme

} **Southern blot**

# NG: MAPOVÁNÍ

□ **(PCR)/RFLP** (Polymorfismus v délce restričních fragmentů) ⇒  
restriční analýza DNA

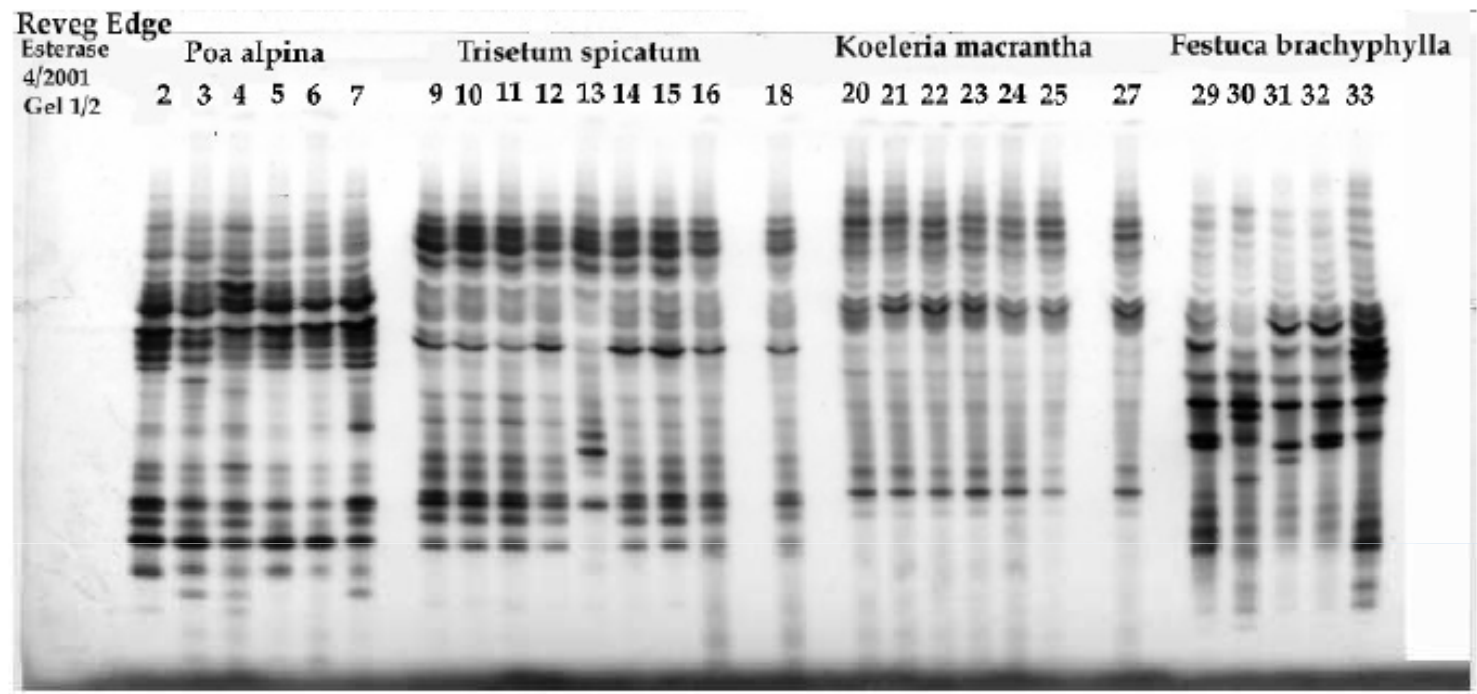
- gDNA nebo namnožený specifický úsek naštěpíme restriktázou
- Fragmenty rozdělíme elektroforeticky
- Z gelu je přesajeme na membránu
- Membránu hybridizujeme se sondou
- Navázanou sondu detekujeme

} **Southern blot**

- o **genetické mapování**
- o **dědičné onemocnění**
- o **kriminalistika**
- o **určení otcovství**

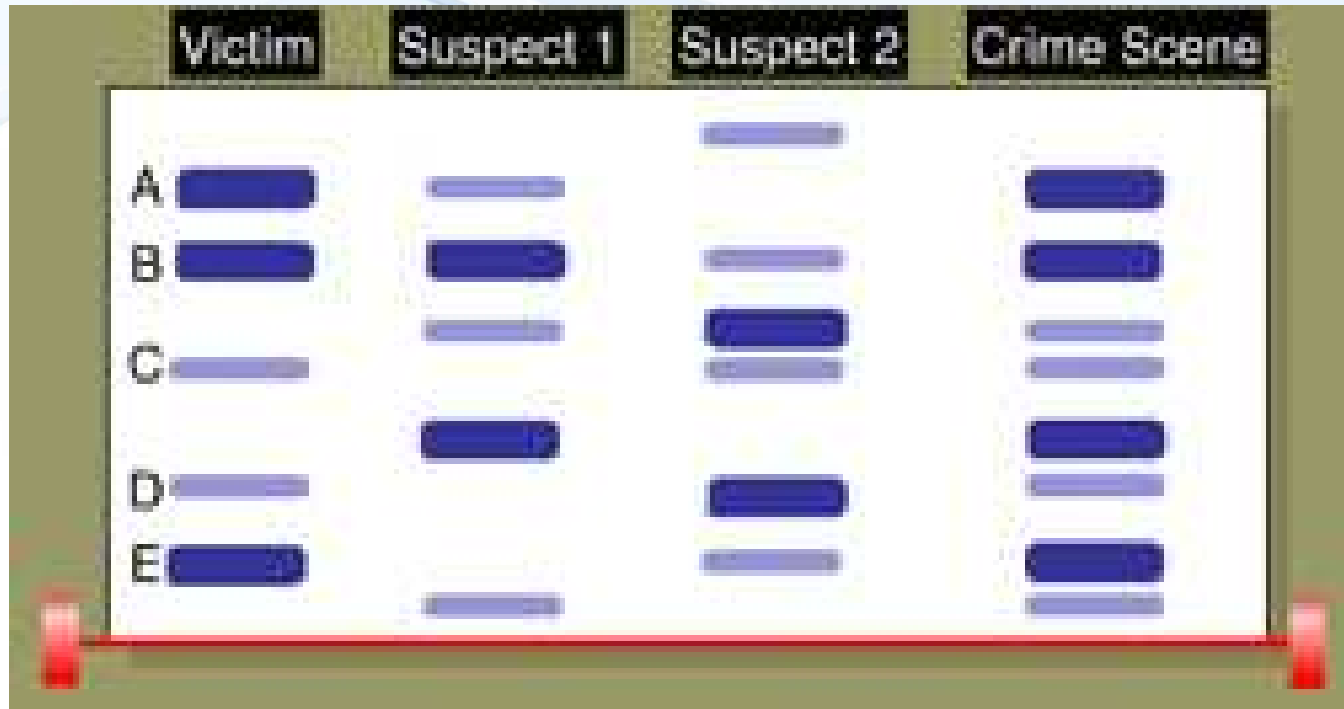






<http://www.ecoseeds.com>

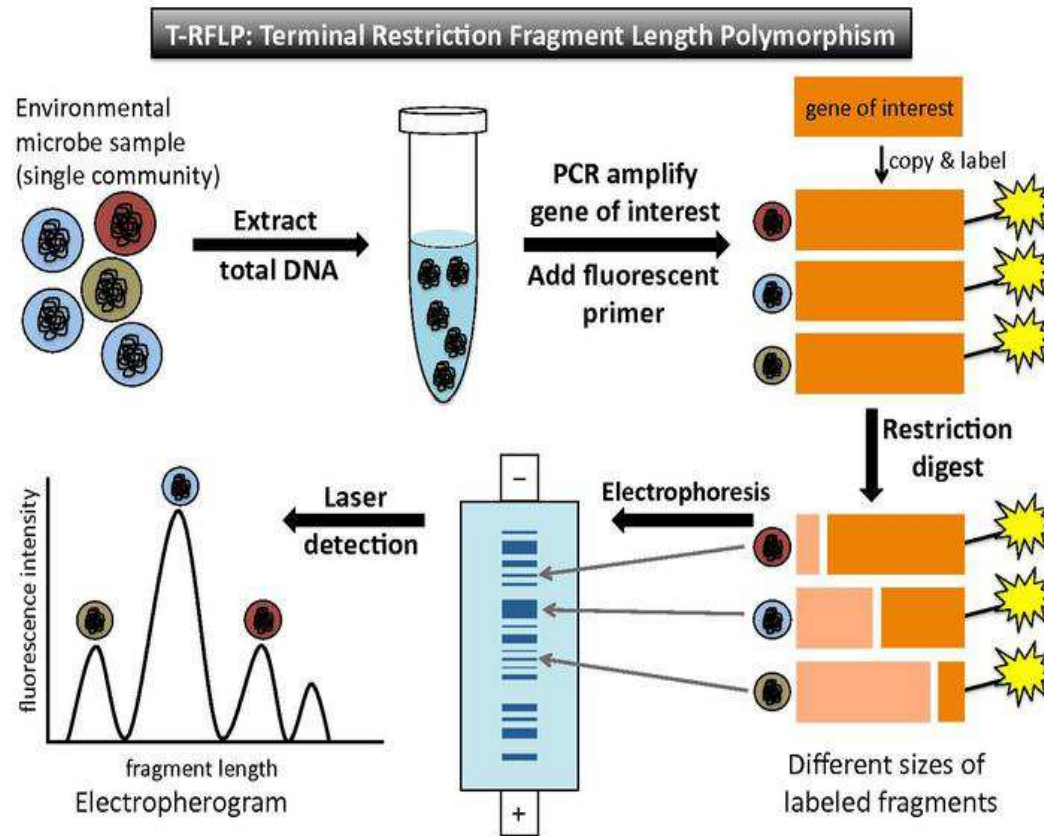
10



<http://www.hbwbiology.net/quizzes/ch20-DNA-technology.htm>



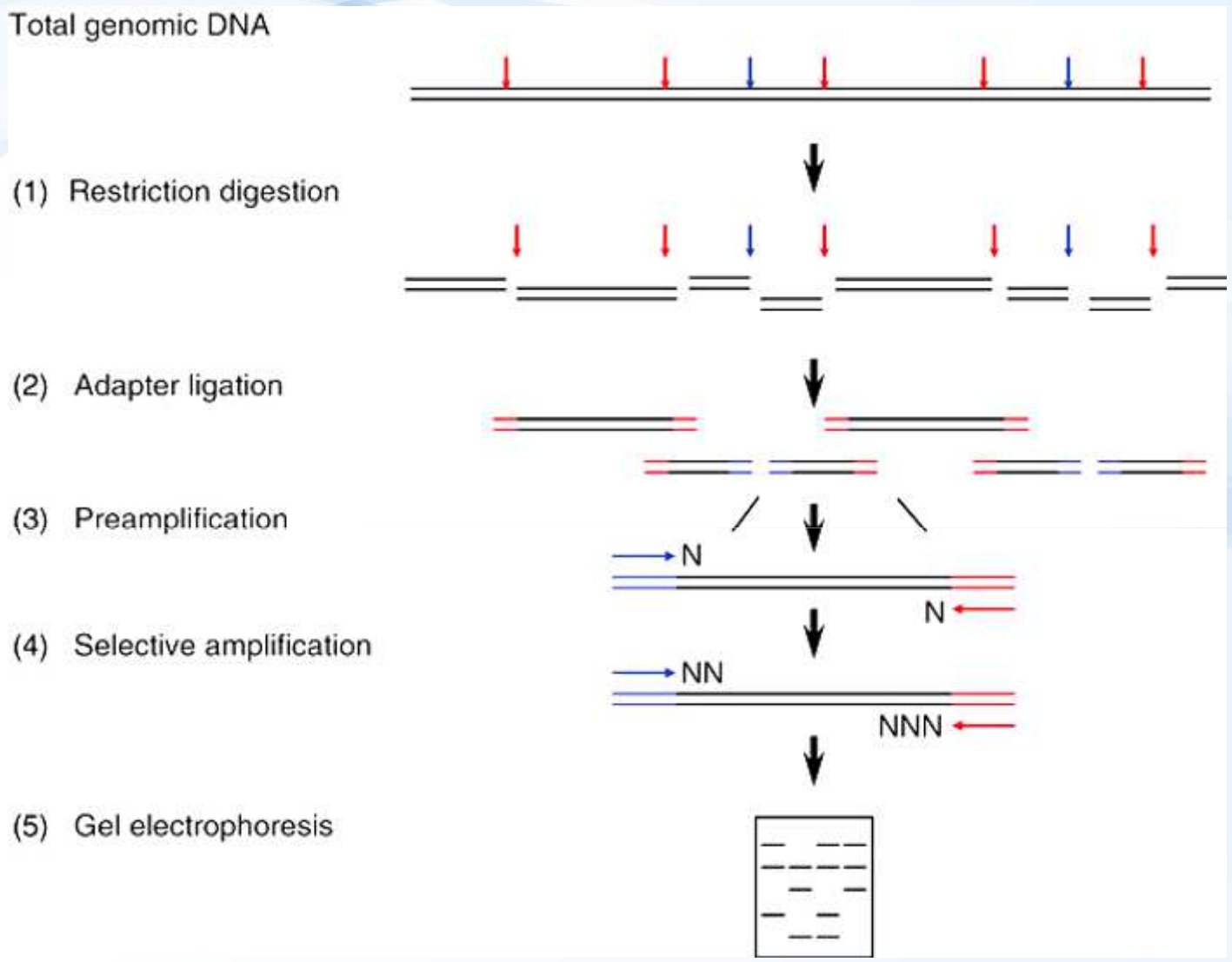
# □ (PCR)/T-RFLP (Terminální polymorfismus v délce restrikčních fragmentů) ⇒ restrikční analýza DNA



[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Step-by-step\\_procedure\\_of\\_using\\_T-RFLP\\_analysis\\_in\\_microbiology.pdf](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Step-by-step_procedure_of_using_T-RFLP_analysis_in_microbiology.pdf)



# □ AFLP („Amplified fragment length polymorphism“)



<http://www.nature.com/scitable/content/outline-of-the-aflp-procedure-41047>



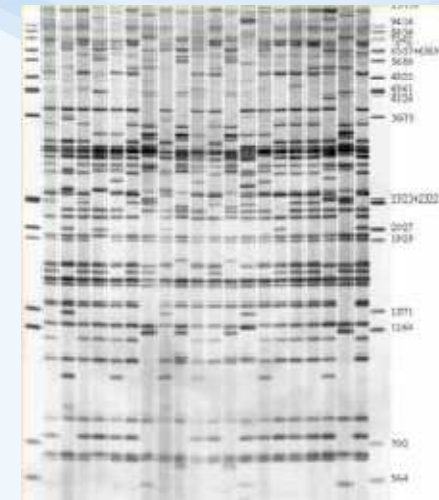
Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

[https://botany.natur.cuni.cz/dna/index.php?option=com\\_content&view=article&id=47:aflp-princip&catid=35:aflp&Itemid=55](https://botany.natur.cuni.cz/dna/index.php?option=com_content&view=article&id=47:aflp-princip&catid=35:aflp&Itemid=55)

# OTISK MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA

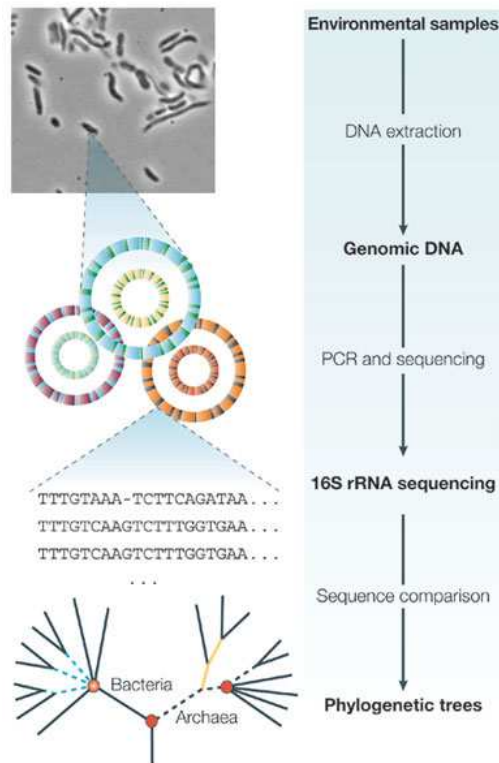


- Stanovení profilu diverzity mikrobiálního společenstva pomocí technik mol. biologie
- Odhad množství variant genu ve společenstvu
- Celkový pohled na společenstvo, neřekne nic o přímé identifikaci nebo počtech individuálních buněk
- Studium mikrobiálních systémů (vodní ekosystémy, půdy, lidská mikroflóra) - měření biodiverzity, změny ve společenstvu v čase, vliv faktorů..... sukcese společenstva, environmentální narušení habitatu, odpověď na znečištění polutanty

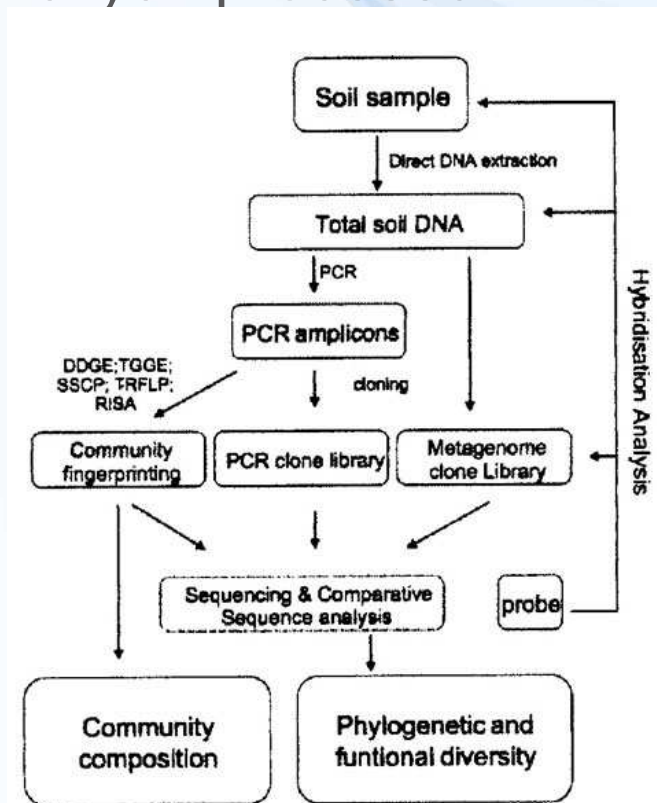


[www.moloch.upol.cz/uploads/vyukovy-portal/eko-mem-rulik.pdf](http://www.moloch.upol.cz/uploads/vyukovy-portal/eko-mem-rulik.pdf)

- **DGGE, TGGE, SSCP, RFLP, T-RFLP, ARDRA, ARISA**
- Izolace DNA ze vzorku s mikrobiálním společenstvem
- Cílem analýzy je gen nebo specifický úsek DNA
- Častým cílem geny kódující 16S rRNA nebo geny, které mají klíčovou roli v metabolických procesech



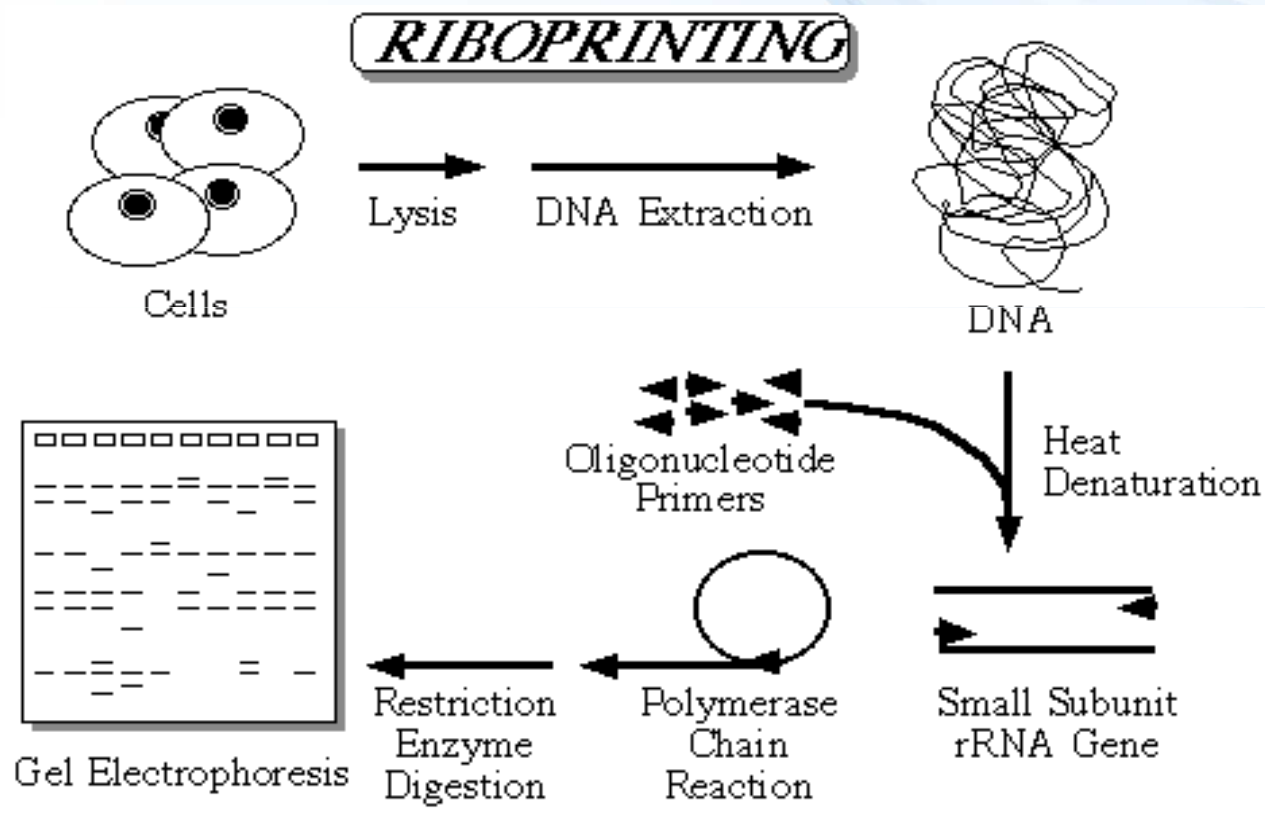
Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Genetics



[http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-27912008000200004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-27912008000200004&script=sci_arttext)

## □ ARDRA („Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“)

- restrikční štěpení amplifikovaného fragmentu DNA pro konzervativní úseky rRNA bakterií



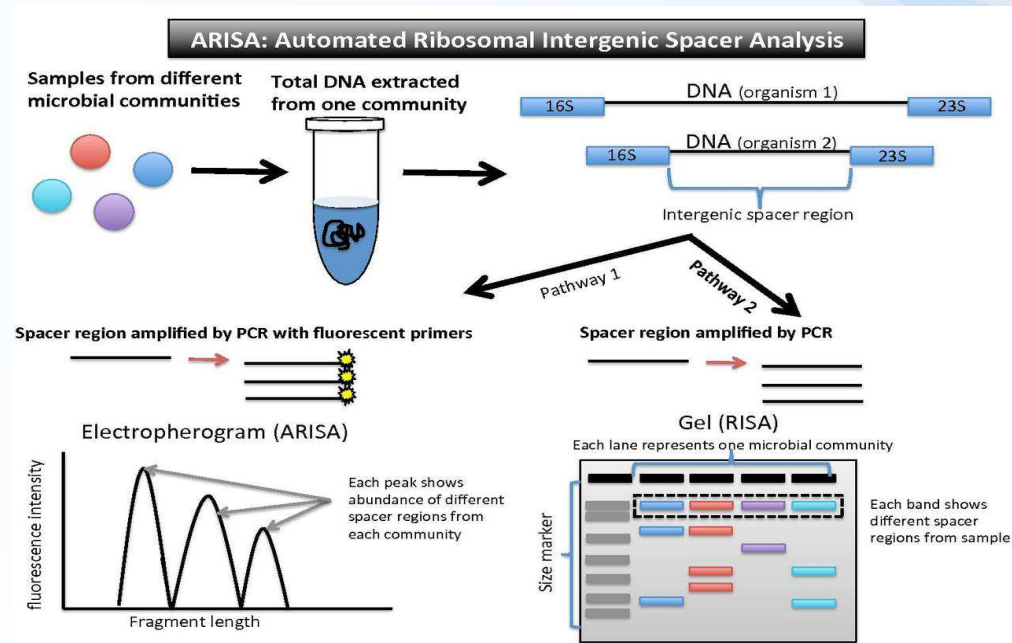
<http://entamoeba.lshtm.ac.uk/riboprnt.htm>





## □ RISA/ARISA („(Automated) Ribosomal Intergenic Spacer Analysis“)

- prokaryocká DNA kodující vysoce konzervativní 16SrRNA a 23SrRNA geny
- mezi těmito dvěma geny se nachází tzv. „internal transcribed spacer (ITS)“ region
- ITS - nekoduje proteiny, vysoce variabilní v sekvenci a délce nukleotidů



[http://en.wikipedia.org/wiki/Community\\_Fingerprinting](http://en.wikipedia.org/wiki/Community_Fingerprinting)



Hi kids! I'm DNA!



You probably hate me,  
but don't understand why.



It's because I control  
your life and when you die.



CHRISHOLDEN.NET

