

Pokročilé metody v současné genomice a proteomice

Metody extrakce, purifikace a kvantifikace nukleových kyselin

doc. Mgr. Petra Procházková Schrumpfová, Ph.D.



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Pokročilé metody v současné genomice a proteomice

Genomika je obor biologie zaměřený na studium veškeré DNA organismu - tedy jeho genomu. To zahrnuje identifikaci a **charakterizaci všech genů** a **funkčních prvků v genomu** organismu a jejich vzájemné interakce.

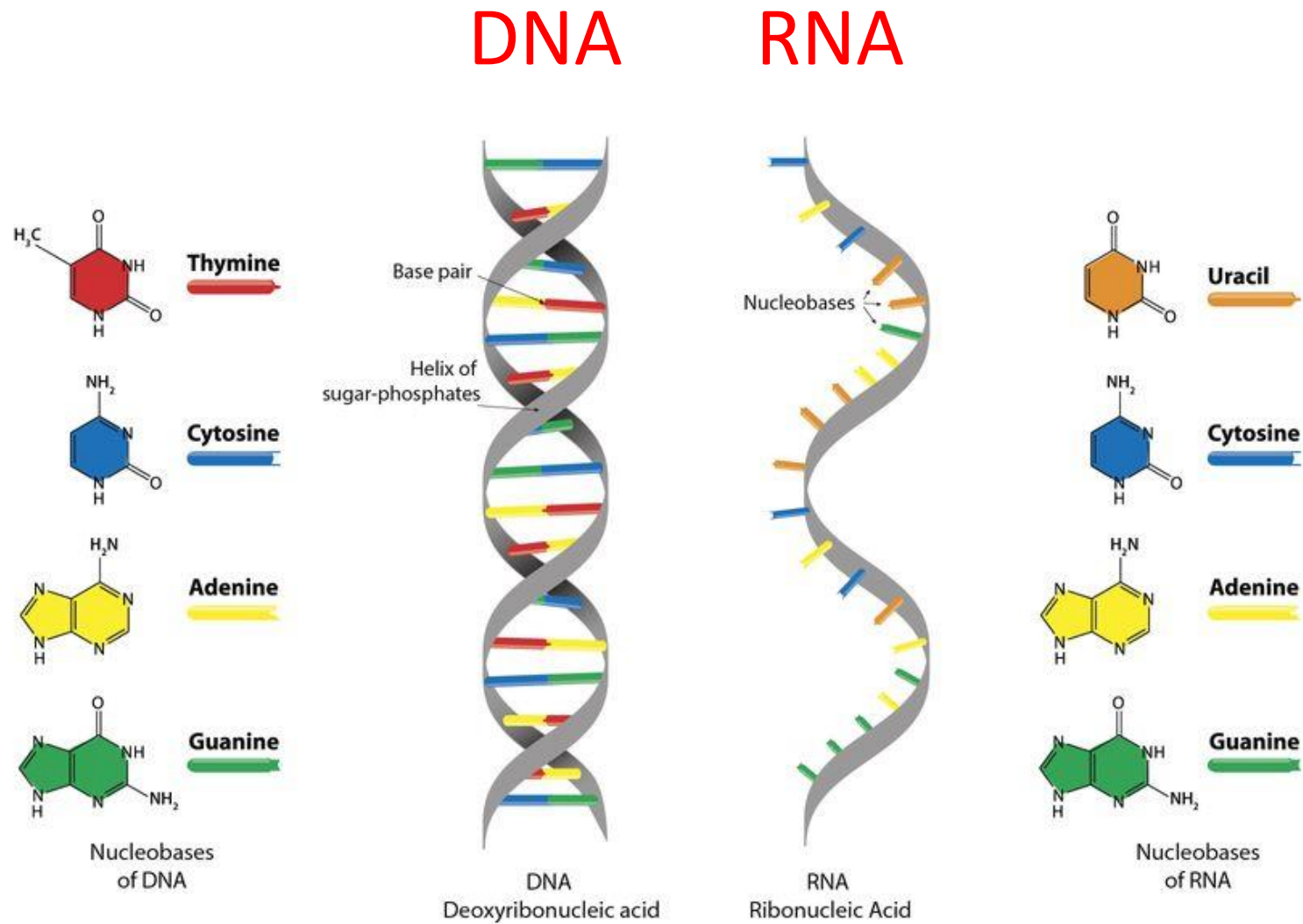
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/genomics>

Pokročilé metody v současné genomice a proteomice

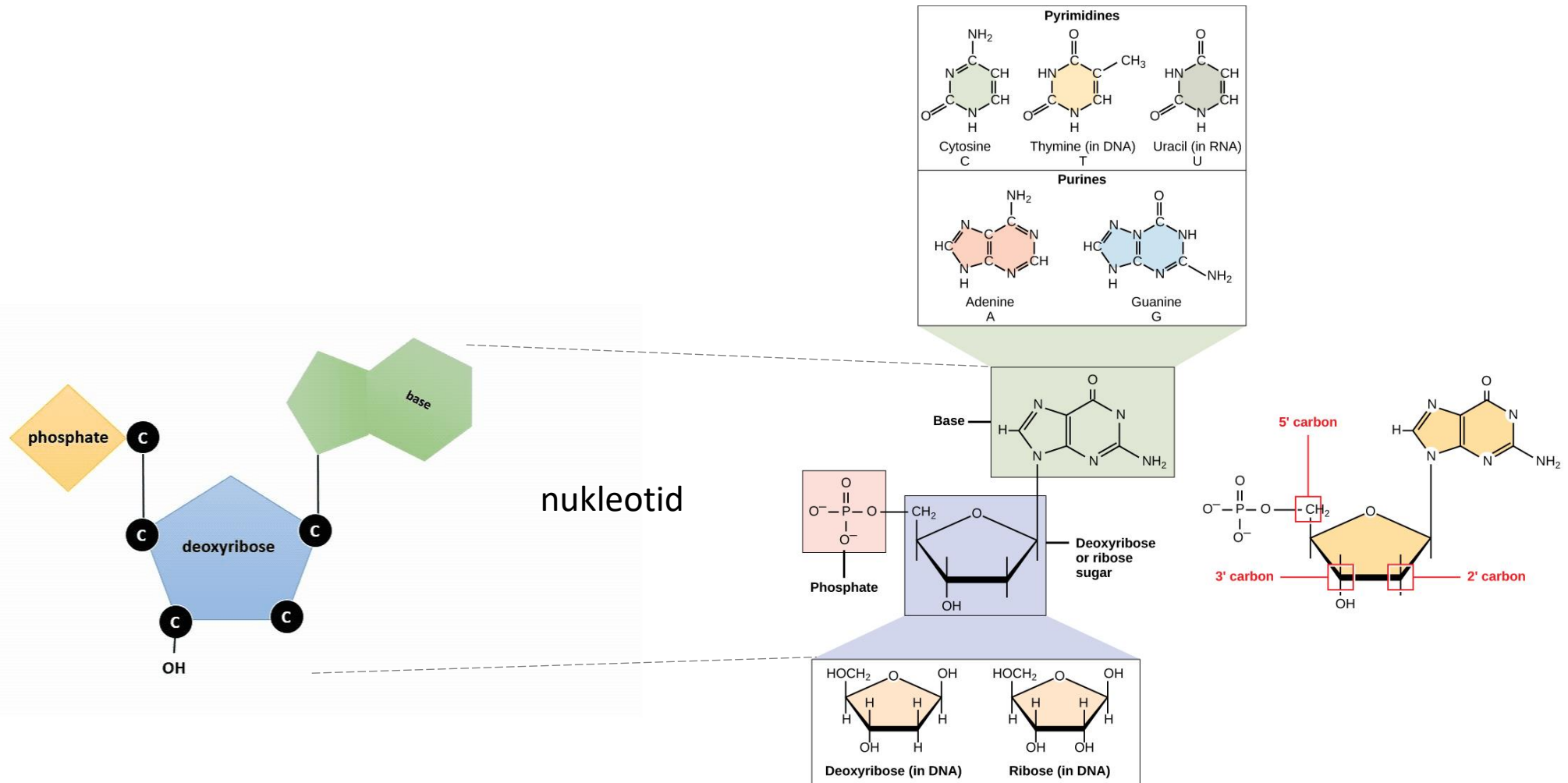
**Metody extrakce, purifikace a kvantifikace
nukleových kyselin**

Klasika je stále moderní ... 

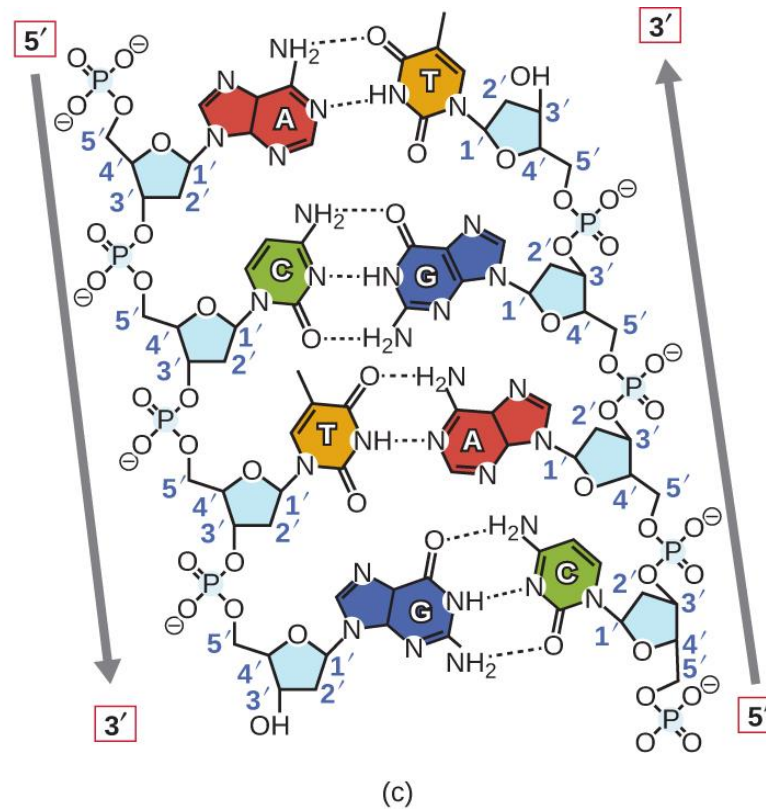
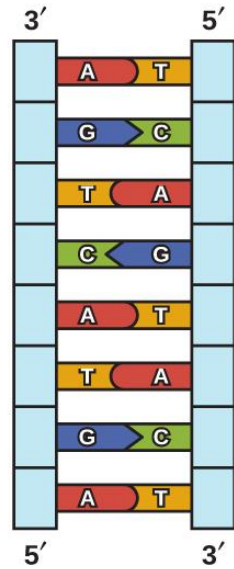
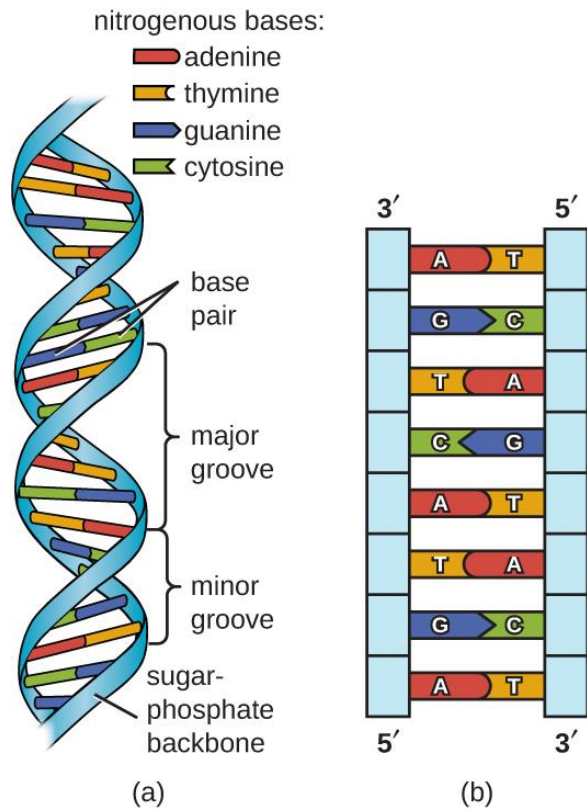
Nukleové kyseliny



Nukleové kyseliny



Nukleové kyseliny



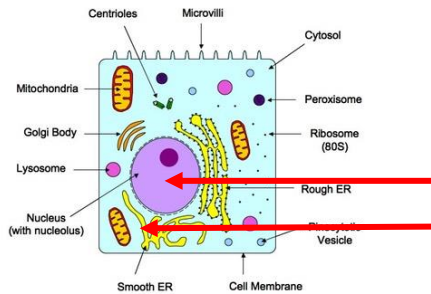
DNA je negativně nabitá

<https://www.rcsb.org/3d-view/1BNA>

Nukleové kyseliny

DNA

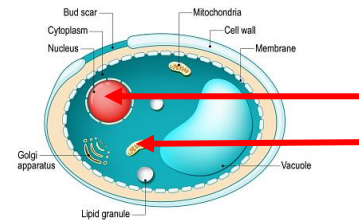
Živočišné buňky



Jádro (nucleus, ntDNA)
Mitochondrie (mtDNA)

Obr.2 dostupne z <http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html> vid. 01/09/2023

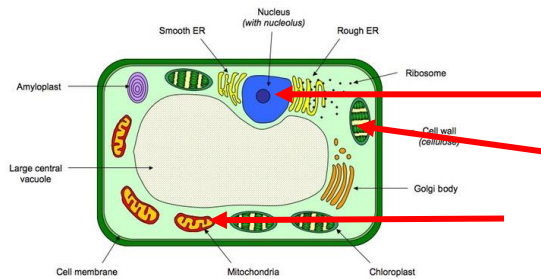
Buňky kvasinek



Jádro (nucleus, ntDNA)
Mitochondrie (mtDNA)

Obr.4 dostupne z <https://www.britannica.com/science/bacteria> vid. 01/09/2023

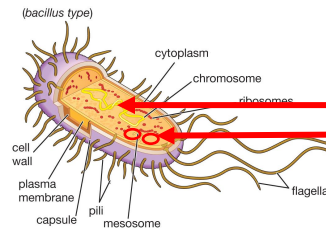
Rostlinné buňky



Jádro (nucleus, ntDNA)
Chloroplasty (cpDNA)
Mitochondrie (mtDNA)

Obr.3 dostupne z <http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html> vid. 01/09/2023

Bakteriální buňky

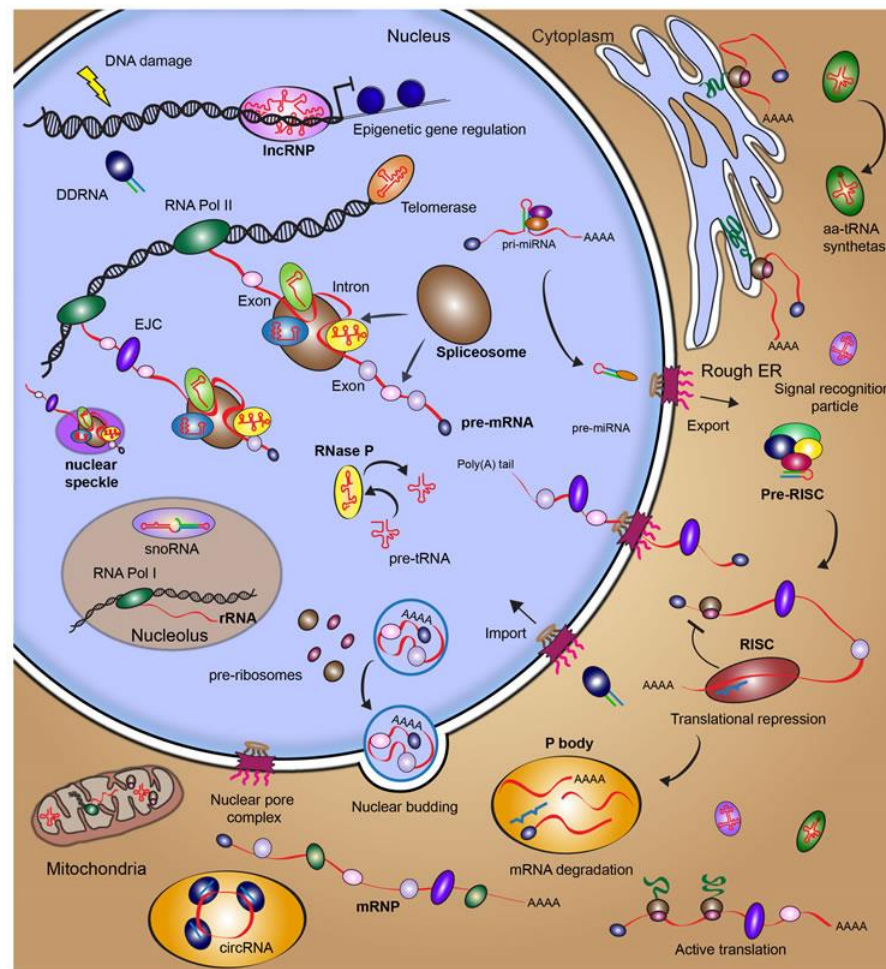


Chromosome
Plasmidy

Obr.5 dostupne z <https://www.britannica.com/science/bacteria> vid. 01/09/2023

Nukleové kyseliny

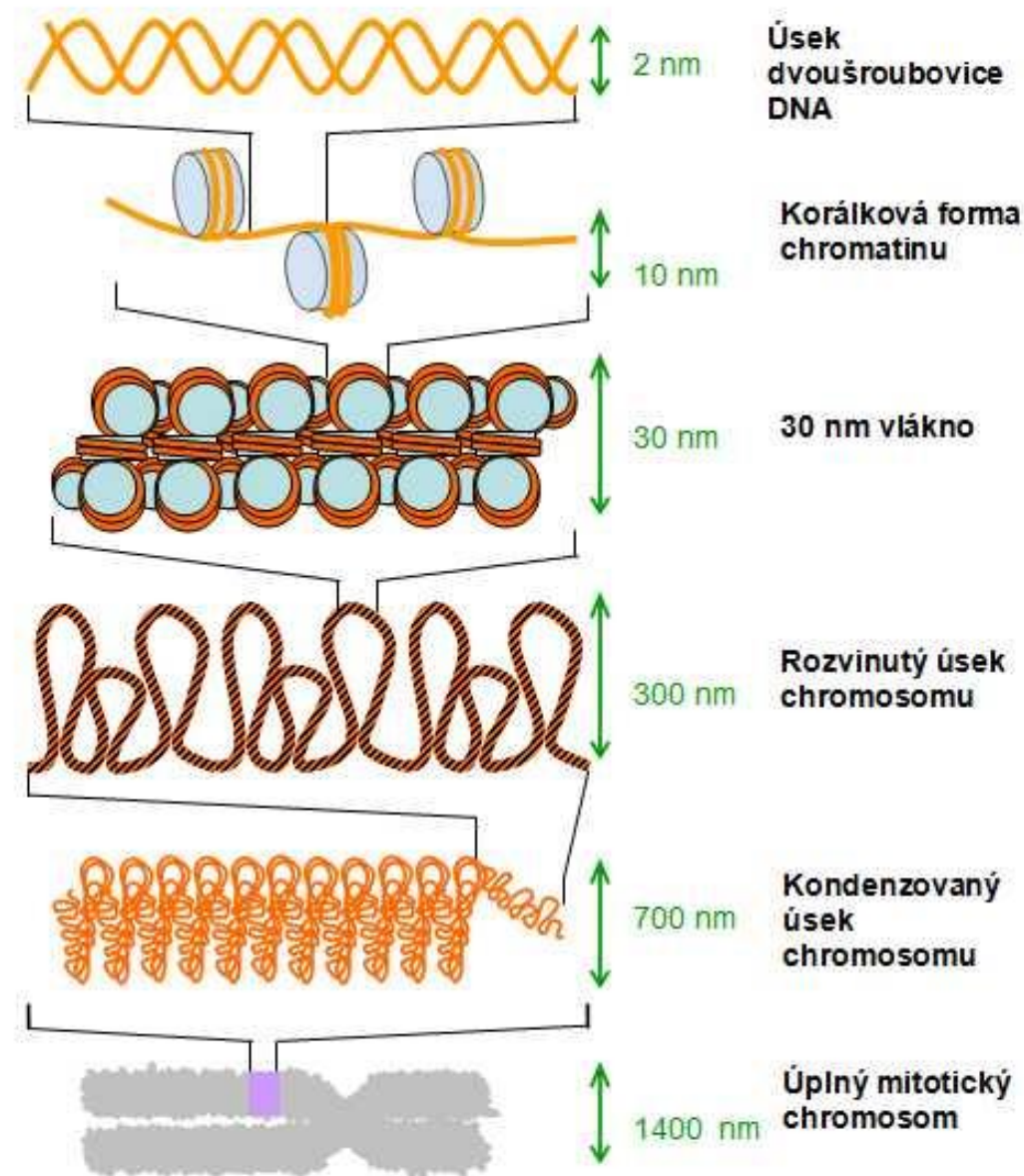
RNA



Obr. 6 dostupné z <https://rna.umich.edu/about/about/> 28/6/2024

https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_RNAs

Chromatin - komplex DNA a proteinů



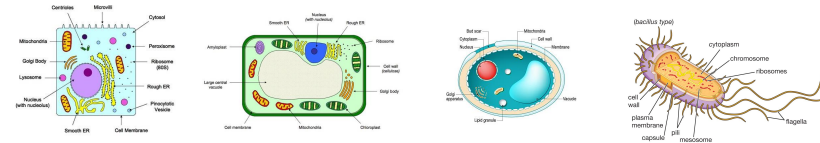
Jádro typické lidské buňky obsahuje DNA o délce asi 2 metrů (Alberts)

Rozvaha – účel izolace



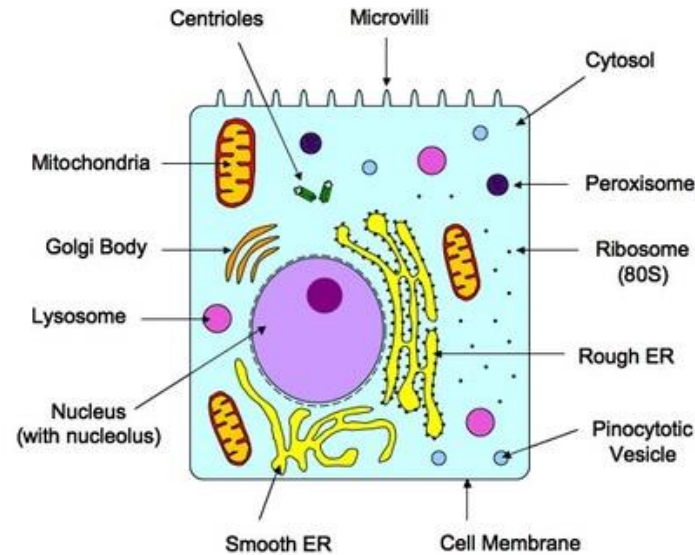
Na začátku každého experimentu je třeba si položit otázku:
K čemu bych chtěl izolovanou nukleovou kyselinu použít?

➤ **Výchozí materiál pro izolaci NK (množství, kvalita, typ buněk...).**



Výchozí materiál

Živočišná buňka



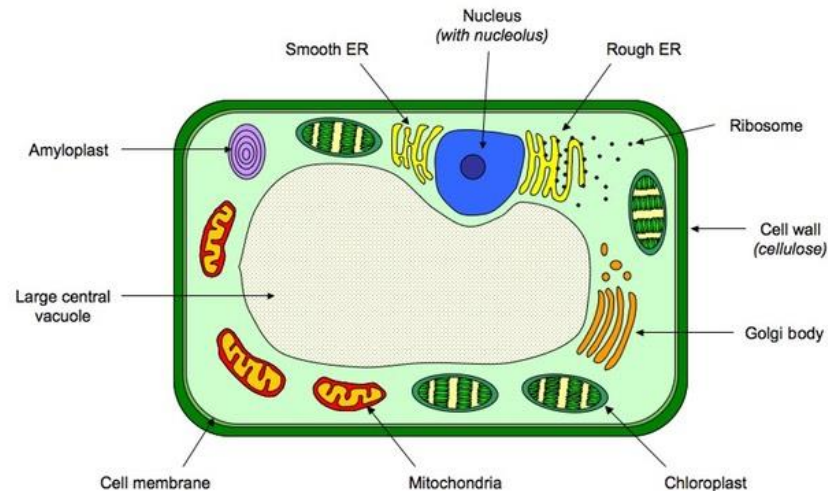
Obr.2 dostupne z <http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html> vid. 01/09/2023

Živočišná buňka:

- má pouze cytoplazmatickou membránu (lipidová membrána)
- nemají plastidy ani barviva
- místo vakuol mají lysozomy
- zásobní látky jsou tuky a glykogen
- mitochondrie (mtDNA, lipidová membrána)

Výchozí materiál

Rostlinná buňka



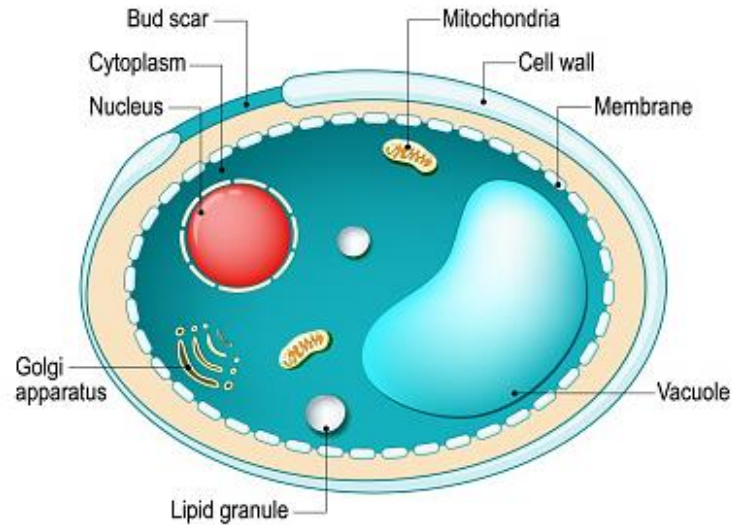
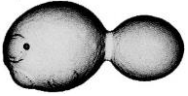
Obr.3 dostupne z <http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html> vid. 01/09/2023

Rostlinná buňka:

- má buněčnou stěnu z celulózy
- obsahují plastidy a barviva
- má vakuoly (nízké pH)
- zásobní látky: olej a škrob
- obsahuje chloroplasty (tj. i cpDNA, lipidová membrána)
- s věkem rostlin vzrůstá množství polyfenolických látek

Výchozí materiál

Buňka kvasinek



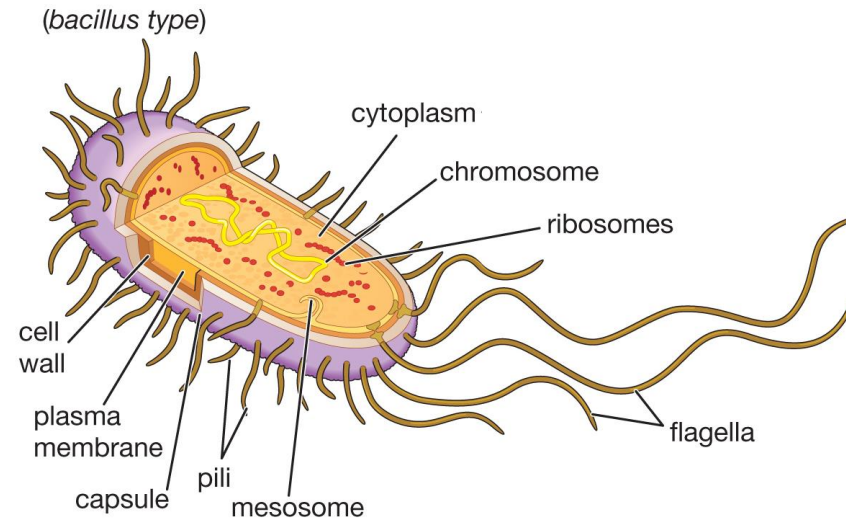
Obr.4 dostupne z <https://www.britannica.com/science/bacteria> vid. 01/09/2023

Buňka kvasinek:

- buněčná stěna je složena zvláště z polysacharidů (mannan a β -glukan)
- neobsahují chloroplasty (cpDNA)
- zásobní látky: lipidy a glykogen
- vakuola

Výchozí materiál

Buňka bakterií



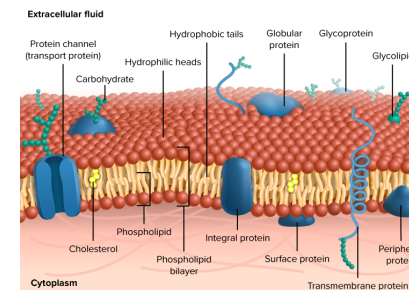
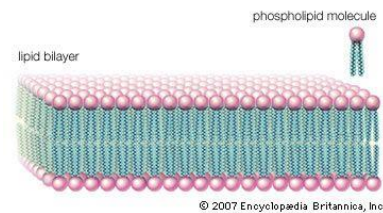
Obr.5 dostupne z <https://www.britannica.com/science/bacteria> vid. 01/09/2023

Buňka bakterií:

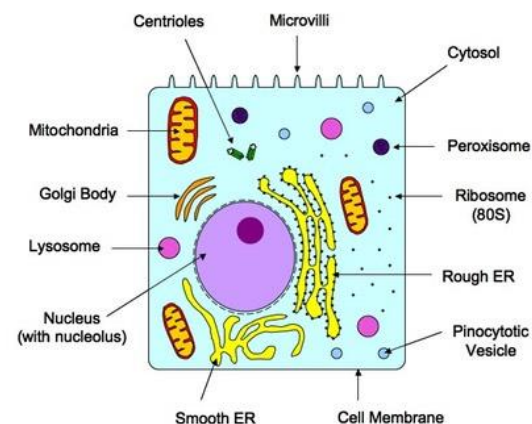
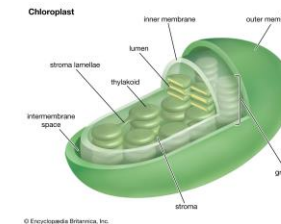
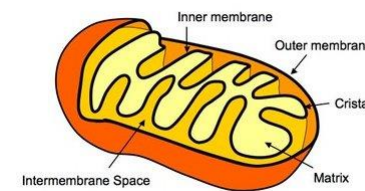
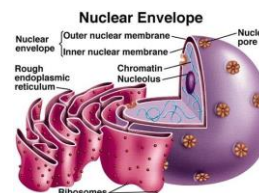
- grampozitivní bakterie - silná vrstva peptidoglykanu
- gramnegativní bakterie - vnější membrána, periplazmatický prostor s tenkou vrstvou peptidoglykanu
- nemají organely
- nemají mtDNA či chDNA

Membránové organely

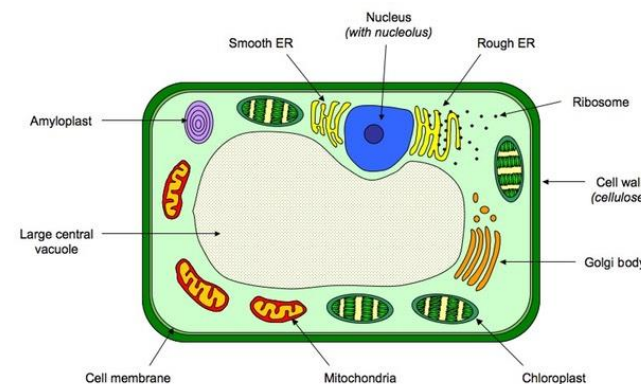
- s jednou membránou:
 - Endoplazmatické retikulum
 - Golgiho aparát
 - Lysosomy
 - Vakuola



- s dvěma membránami:
 - Jádro
 - Mitochondrie
 - Plastidy



Obr.2 dostupne z <http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html> vid. 01/09/2023



Obr.3 dostupne z <http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html> vid. 01/09/2023

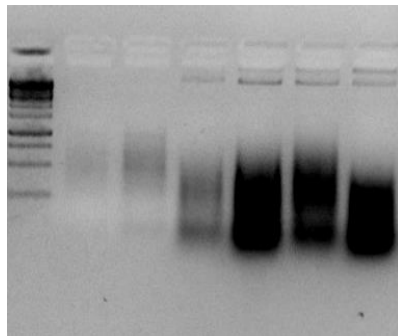
Rozvaha – účel izolace



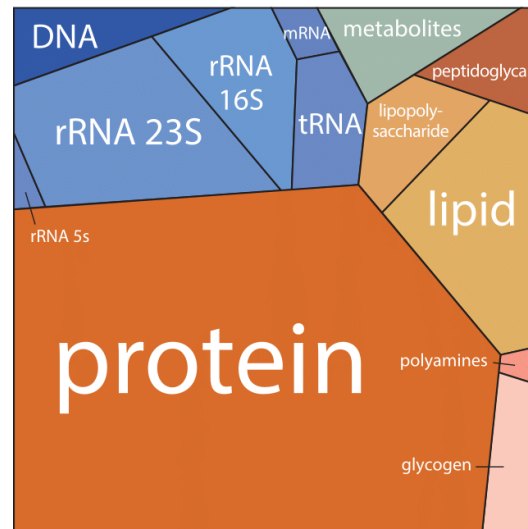
**Na začátku každého experimentu je třeba si položit otázku:
K čemu bych chtěl izolovanou nukleovou kyselinu použít?**

➤ Kontaminace RNA:

Vadí následné analýze přítomnost RNA?



Obr.8 dostupne z foto autor



Obr. 9 dostupne z <https://book.bionumbers.org/what-is-the-macromolecular-composition-of-the-cell/> vid. 01/09/2023

Voronoi diagram: složení buňky *E. coli* (po 40 min od dělení). Každá oblast mnohoúhelníku představuje relativní podíl odpovídající složky v suché hmotě buňky.

- DNA 3%
- RNA 20%
- proteiny 55%
- lipidy 10%

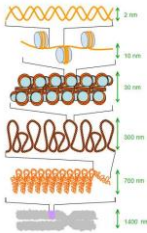
➤ **Jaký použiji postup (vhodný pufr, detergenty...)?**

Rozvaha – účel izolace



Na začátku každého experimentu je třeba si položit otázku:
K čemu bych chtěl izolovanou nukleovou kyselinu použít?

➤ Čistota izolované DNA



➤ Výtěžek



X

➤ Časová náročnost metody



➤ Ekonomická náročnost

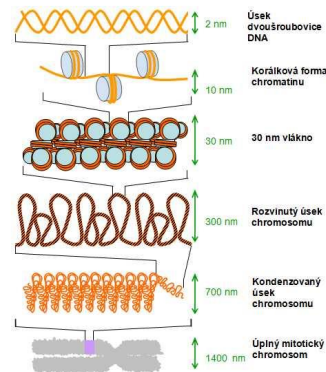


➤ Počet vzorků:

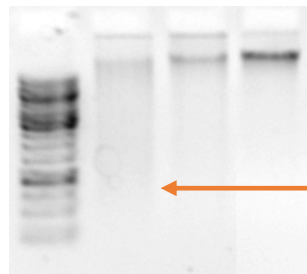
- izolace jednoho vzorku (jedna zkumavka)
- několik vzorků (kity)
- mnoho vzorků (automatický robot)



Rozvaha – účel izolace



např.: DNA je fragilní a má sklon k fragmentaci →
vadí mé následné analýze fragmentovaná DNA?



← Genomová DNA

← Fragmentovaná genomová DNA

- Fragmentace DNA pro PCR analýzu - nemusí být problém. 😄
- Fragmentace DNA pro analýzu délky telomer - zásadní nedostatek. 😞

➤ Extrakce nukleových kyselin (NK)

❖ Extrakce a purifikace NK:

1. Rozrušení buněčných membrán / stěn
2. Inhibice nukleáz (DNáz/RNáz)
3. Odstranění polysacharidů
4. Odstranění polyfenolů
5. Odstranění proteinů
 - a. Vysolení proteinů
 - b. Proteináza K
 - c. Fenol-chloroformová extrace

❖ Vlastní izolace NK

1. Vysolování
2. Srážení
 - a. EtOH / Isopropanol
 - b. Multivalentní kationty
 - c. Polyethylene glycol (PEG)
3. Adsorpce na silikát
4. Izolace vysokomolekulární DNA
5. Izolace RNA
6. Izolace plazmidové DNA
7. Selektivní izolace RNA/DNA
 - a. Izolace mRNA
 - b. Izolace RNA/DNA dle specifické sekvence
 - c. Izolace pomocí asociovaných proteinů
 - d. Selektivní izolace RNA pomocí aptamerů

➤ Kvantifikace a detekce izolované NK

❖ Detekce NK:

1. Fluorescenční detekce
2. Barvení NK stříbrem
3. Pomocí metylenové modři
4. Radioaktivní vizualizace

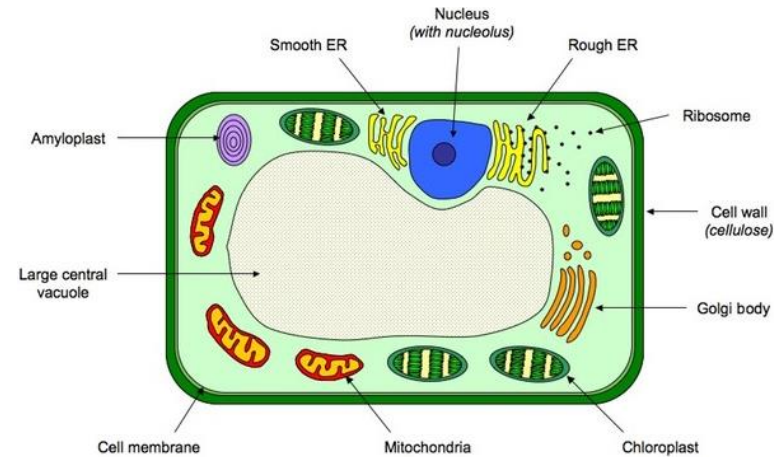
❖ Kvantifikace NK

1. Odhad z gelové elektroforézy
2. Pomocí absorbance
3. Fluorimetrická kvantifikace

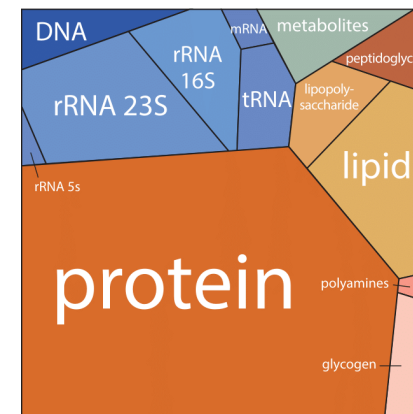
➤ Extrakce nukleových kyselin (NK)

❖ Extrakce a purifikace NK:

1. Rozrušení buněčných membrán / stěn
2. Inhibice nukleáz (DNáz/RNáz)
3. Odstranění polysacharidů
4. Odstranění polyfenolů
5. Odstranění proteinů
 - a. Vysolení proteinů
 - b. Proteináza K
 - c. Fenol-chloroformová extrakce



Obr.3 dostupne z <http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html> vid. 01/09/2023

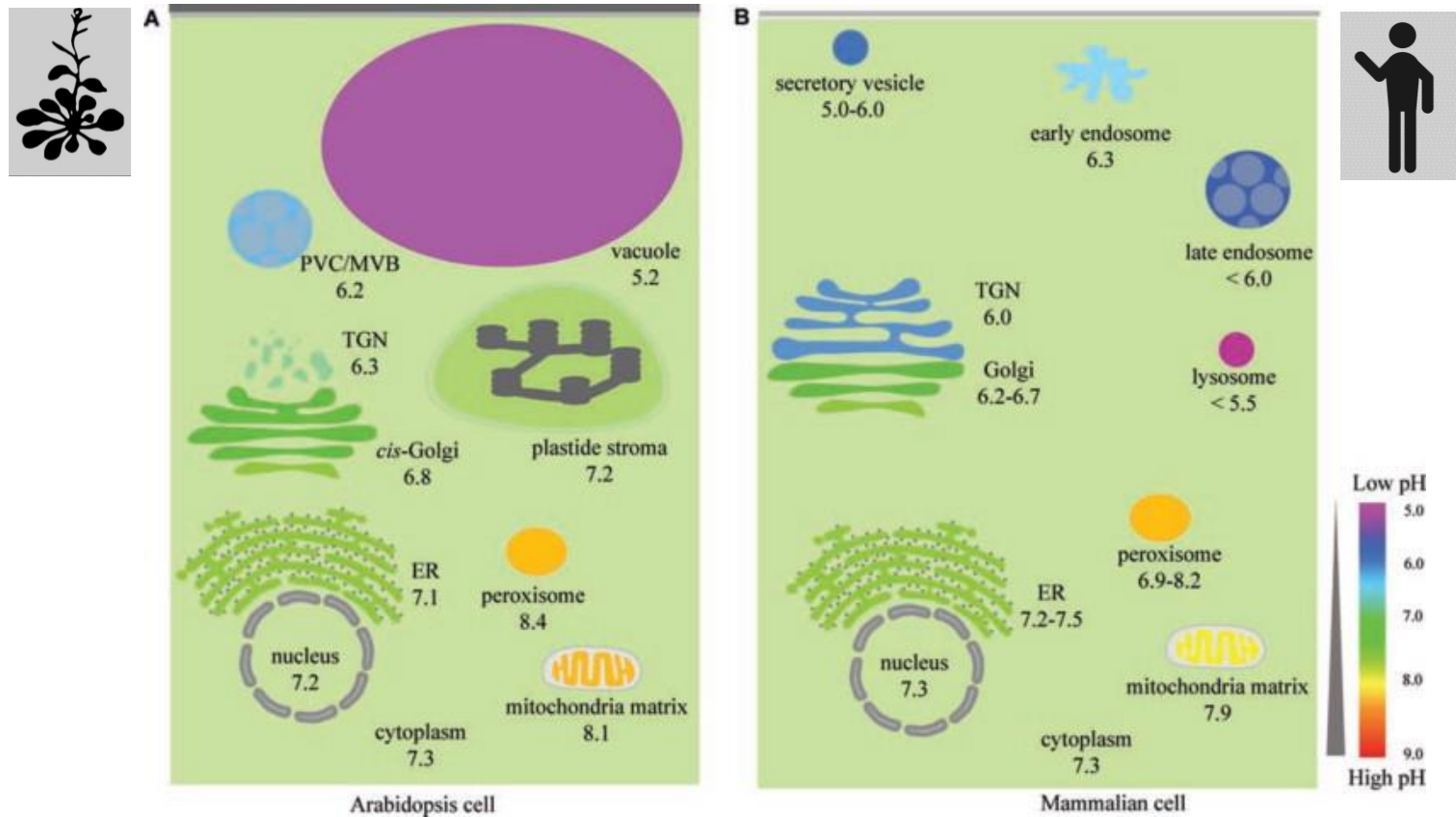


Obr. 9 dostupne z <https://book.bionumbers.org/what-is-the-macromolecular-composition-of-the-cell/> vid. 01/09/2023

Izolační pufr

udržuje stabilní pH v roztoku

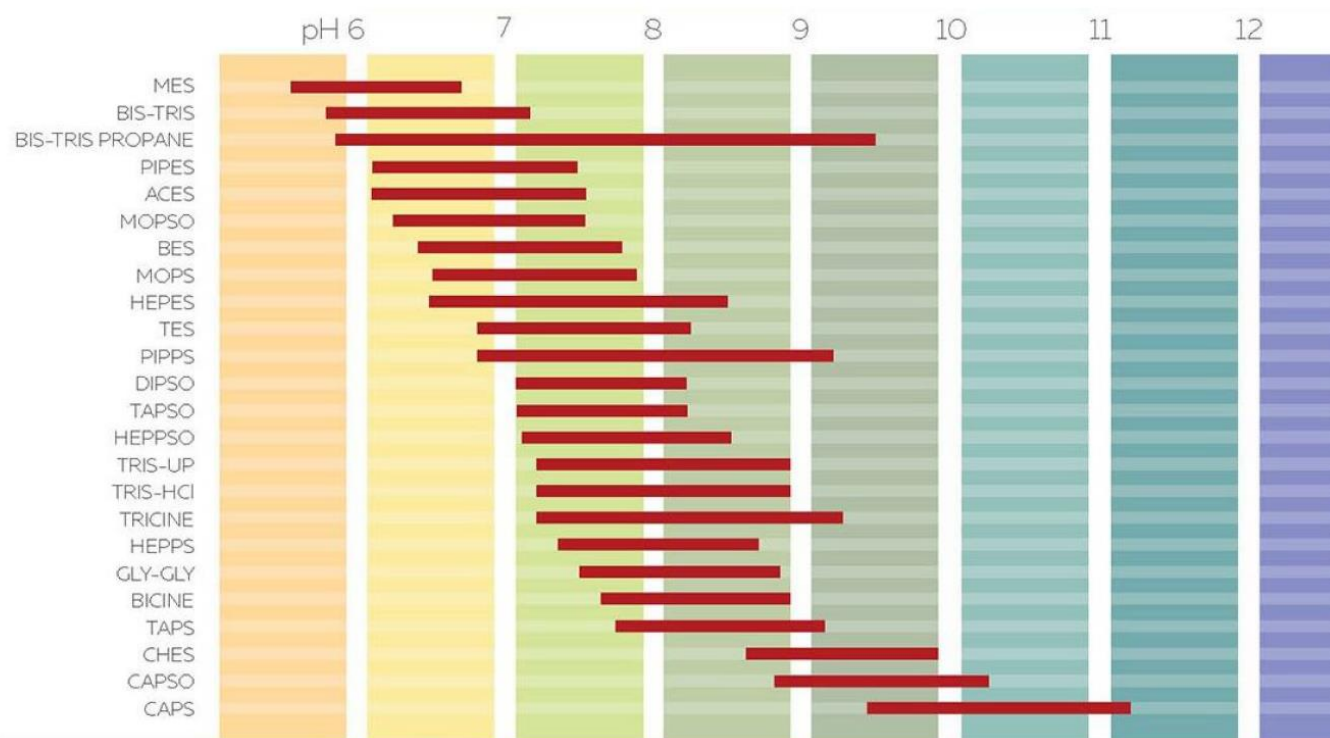
Buňky suspendují v roztoku o vhodném pH, které by mělo být stejné jako pH cytosolu či dané organely.



Srovnání pH v intracelulárních organelách rostlin a savců.

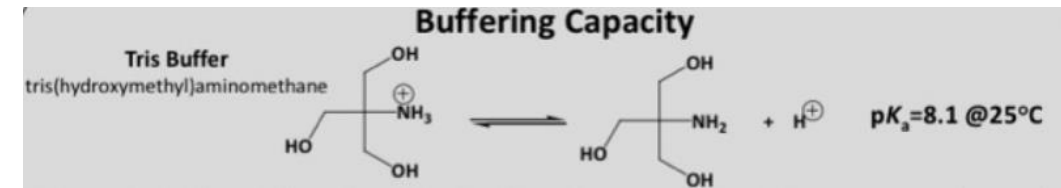
Izolační pufr

udržuje stabilní pH v roztoku



Obr.11 dostupne z <https://www.mybiosource.com/category/MG?page=122> vid. 01/09/2023

Tris pufr
 $\text{TrisH}^+ \rightleftharpoons \text{Tris} + \text{H}^+$



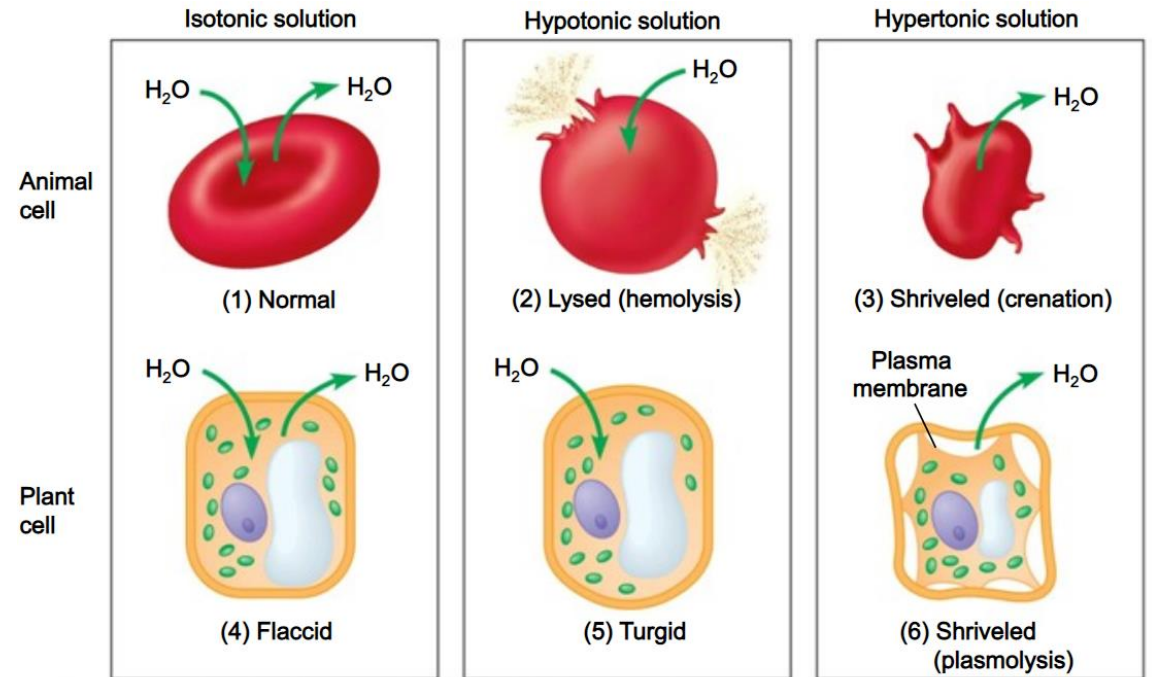
Obr.12 dostupne z <https://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/buffer-preparation-lab-oh-tris-buffer-tris-hydroxymethylaminomethane-nh2-pk-81-25-c-tris--q30749516> vid. 01/09/2023

1. Rozrušení buněčných membrán / stěn

Osmotická lyze:

(*E.coli*, živočišné tkáně...)

- Membrány jsou selektivně permeabilní.
- Buňky jsou přizpůsobeny vyššímu osmotickému tlaku.
- Osmotická lyze - vně buňky menší koncentrace než v buňce tj. **buňka přijímá vodu a zvětšuje svůj objem až praskne.**
- **Živočišná buňka praskne - avšak rostlinná buňka osmotickému tlaku odolává díky přítomnosti buněčné stěny.**



1. Rozrušení buněčných membrán / stěn

Fyzikální nebo fyzikálně-chemické postupy:

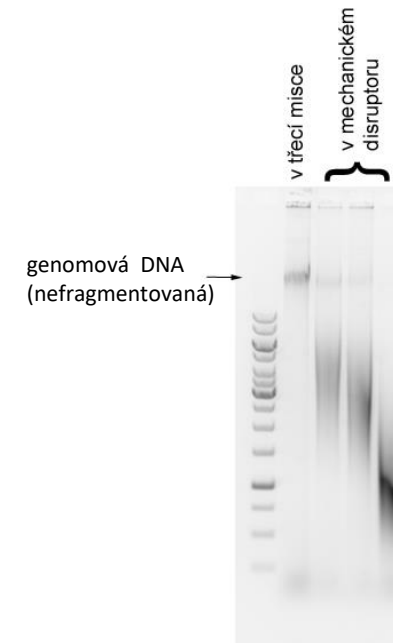
(kvasinky, houby, rostliny, živočišné pojivové tkáně...)

Mechanická lyze:



- v třecí misce v tekutém dusíku
- mechanická homogenizace (pomocí skleněných kuliček)
- tyčové homogenizátory (rotor–stator)

Příklad rozpadu DNA při
mechanické lyzi



Obr.15 dostupne z
foto autor

1. Rozrušení buněčných membrán / stěn

Fyzikální nebo fyzikálně-chemické postupy:

(kvasinky, houby, rostliny, živočišné pojivové tkáně...)

Ultrazvuk:



© www.hielscher.com



www.hielscher.com

- ve zkumavce

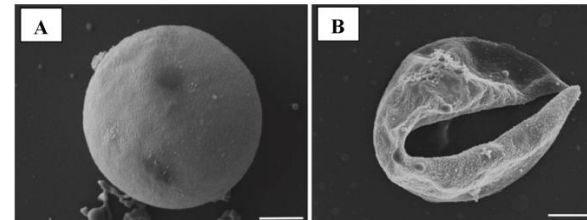
- tyčové

Obr.16 dostupné z
<https://www.scimed.co.uk/product/the-hielscher-range/> vid. 01/09/2023

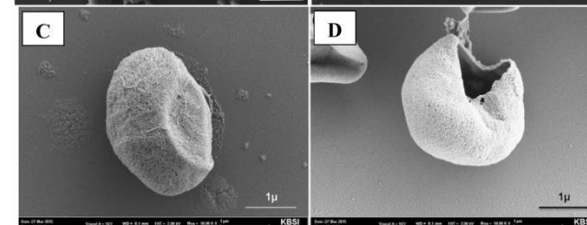
Vliv ultrazvuku na morfologii řas

(Liu et al., Ultrasonics Sonochemistry, 2022)

Chlorella



Chlamydomonas mexicana



Obr.17 dostupné z

https://www.researchgate.net/publication/361031339_Ultrasound_for_microalgal_cell_disruption_and_product_extraction_A_review/figures?lo=1 vid. 01/09/2023

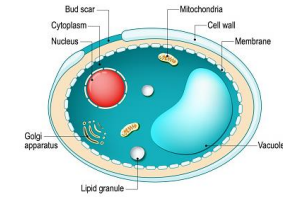
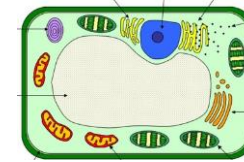
1. Rozrušení buněčných membrán / stěn

Enzymatická lyze:

(spóry, kvasinky, rostliny ...)

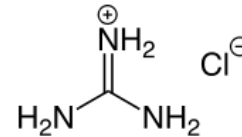
např.: lysozym

pro rostliny např.: celuláza, macerozym, pectolyáza ...



Další typy lyzí:

Chaotropní činidla: (např. guanidium hydrochloride)



Alkalická lyze: NaOH (v přítomnosti SDS) rozvolňuje buněčné stěny u *E. coli* a uvolňuje plazmidovou DNA (viz. Birnboimova metoda)

Rozmražení/zmražení

...

Lyzační protokoly jsou často kombinací několika postupů

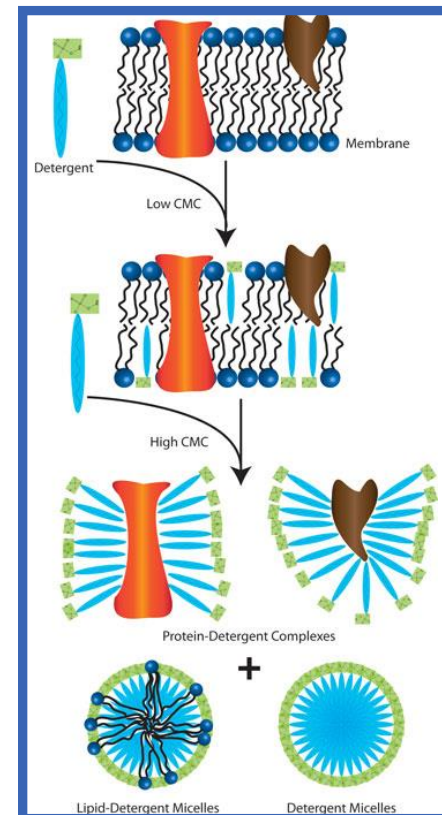
1. Rozrušení buněčných membrán / buněčných stěn

Detergenty: slouží k rozrušení a solubilizaci proteinů z lipidových membrán

Biologické membrány jsou tvořeny fosfolipidy - mají nabitou polární hlavičku.

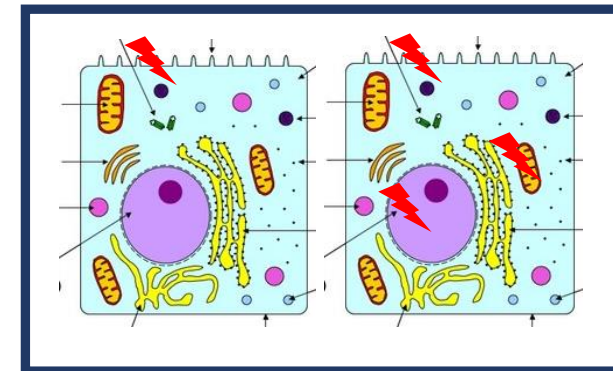
Pokud do roztoku s lipidickou membránou přidáme **detergent**, dochází k **integraci molekul detergentu dovnitř membrány** a molekuly detergentu se stávají součástí membrány.

Pokud je **koncentrace detergentu dostatečně vysoká**, to znamená, že je vyšší nebo rovna hodnotě CMC, je membrána detergenty satureovaná a **dochází k rozpadu membrány a uvolnění proteinů do roztoku**.



hydrofilní hlavička –
rozpuštěné ve vodě

Detergent hydrofobní řetězec

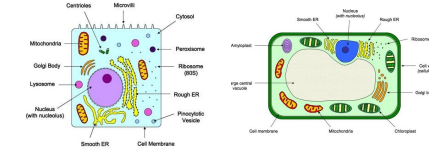


Obr.18 dostupné z
<https://info.gbiosciences.com/blog/proteomic-grade-detergents-why-you-should-use-them> vid. 01/09/2023

CMC: Critical micelle concentration

2. Inhibice nukleáz (inhibice DNáz a RNáz)

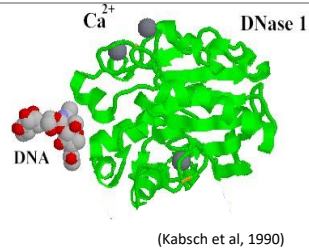
Nukleáza: hydrolytický enzym, který je schopen štěpit molekuly DNA či RNA.
V živé buňce oddělen od NK.



DNázy - hydrolýza DNA:

DNázy I: vyžadují Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty

DNázy II: fce v nízkém pH (např. lysozomy)



RNázy - hydrolýza RNA:

(RNázy jsou velmi stabilní a všudypřítomné; v běžném prostředí jsou molekuly RNA velmi rychle degradovány)

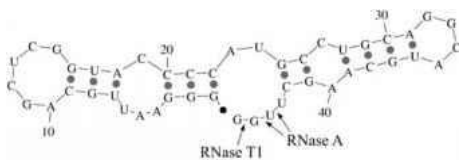
RNázy: RNase A: ssRNA, 3' konce nespárovaných C/U reziduí...

RNase I: ssRNA

RNase H: RNA, RNA/DNA duplex...

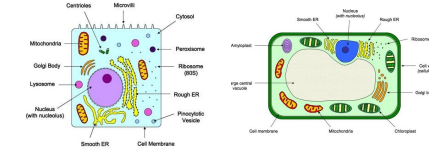
RNase T1: ssRNA, z 3' konce nespárovaných G reziduí...

....



2. Inhibice nukleáz (inhibice DNáz a RNáz)

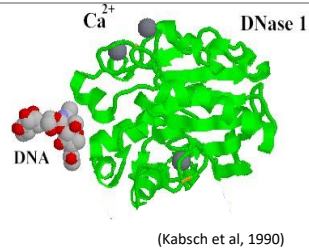
Nukleáza: hydrolytický enzym, který je schopen štěpit molekuly DNA či RNA.
V živé buňce oddělen od NK.



DNázy - hydrolýza DNA:

DNázy I: vyžadují Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty

DNázy II: fce v nízkém pH (např. lysozomy)



- **Nízká teplota** zastavuje enzymatickou aktivitu většiny enzymů - tj. izolace DNA na ledu
- **EGTA / EDTA** (chelatační činidla)

RNázy - hydrolýza RNA:

(RNázy jsou velmi stabilní a všudypřítomné; v běžném prostředí jsou molekuly RNA velmi rychle degradovány)

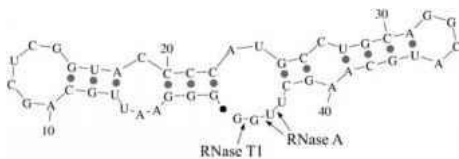
RNázy: RNase A: ssRNA, 3' konce nespárovaných C/U reziduí...

RNase I: ssRNA

RNase H: RNA, RNA/DNA duplex...

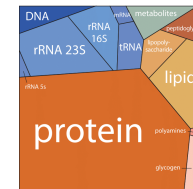
RNase T1: ssRNA, z 3' konce nespárovaných G reziduí...

....



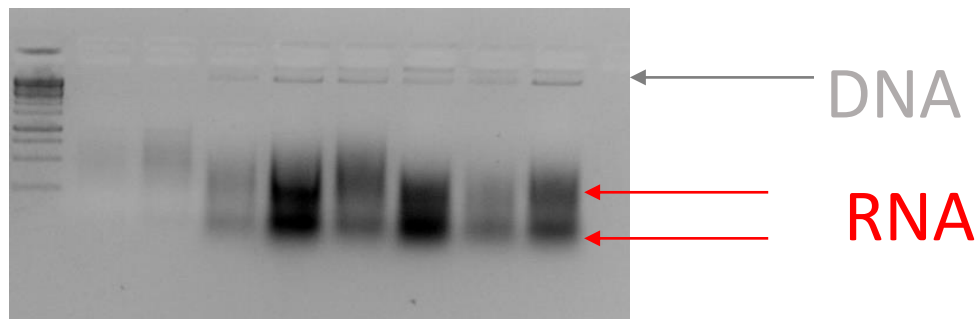
- **Nízká teplota**
- **oplach EtOH:** materiál (např. pipety):
- **DEPC (Diethylpyrocarbonate):** ošetření roztoků, kovalentně modifikuje His, Cys a Tyr NA RNázách
- **Guanidium thiocyanatu / hydrochloride:** buněčná lyze často provedena pomocí chaotropní činidla - rozruší buňky rozruší proteiny - včetně Rnáz
- **Skladování RNA:** vždy při **-70 °C** (ochrana proti působení RNáz)

Odstranění RNA (při izolaci DNA)



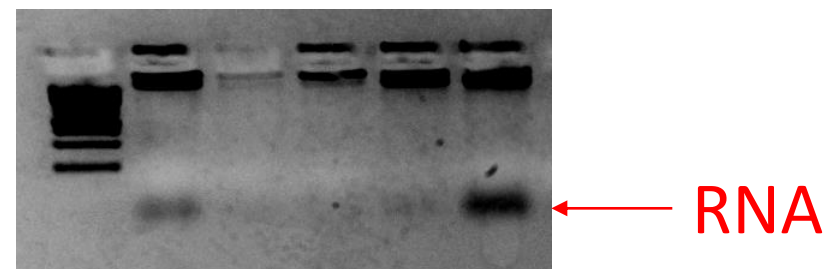
RNase (RNase A, RNase I, RNase T1, RNase H...):

RNA je v nadbytku nad DNA.



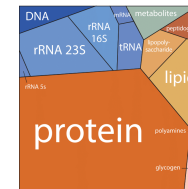
Obr.21 dostupne z foto autor

Příklad nedostatečného odstranění RNA
RNasou při izolaci genomové DNA.

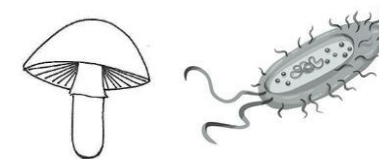


Obr.22 dostupne z foto autor

3. Odstranění polysacharidů



Rostliny, houby a některé bakterie obsahují:

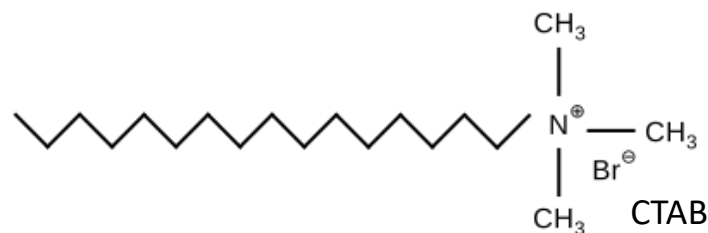


➤ Neutrální polysacharidy (mannan, inulin...): neinhibují restriční enzymy

➤ Negativně nabité (pectin, xylan..): mohou inhibovat restriční enzymy či polymerázy

Negativně nabité polysacharidy mohou být odstraněny za použití **cetyltrimethylamonium bromide (CTAB)** – kationtový detergent.

- Kladně nabitý CTAB interaguje s negativně nabitými polysacharidy.
- Polysacharidy precipitovány a DNA zůstává v roztoku.



Obr.23 dostupne z <https://cs.wikipedia.org/wiki/Cetrimoniumbromid> vid. 01/09/2023

4. Odstranění polyfenolů

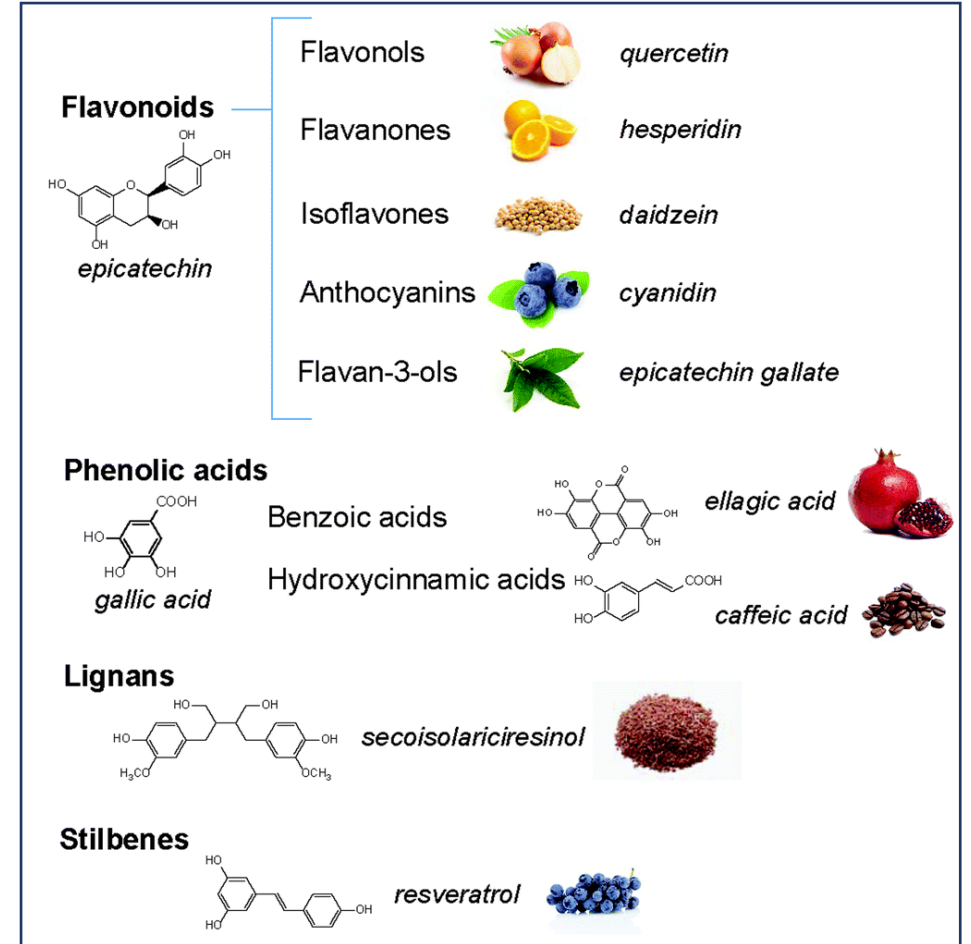
- Polyfenoly jsou vysoce reaktivní - tvorba chemických vazeb mezi proteiny a DNA během homogenizace.
- V nativní buňce odděleny od DNA kompartmentací. Množství polyfenolických látek vzrůstá s věkem rostlin.
- Fce. polyfenolů:
- ochrana před oxidačním stresem (antioxidanty)
- ochranu před býložravci svou svíravou, hořkou chutí (taniny)
- rostlinné obranné látky - proti průniku patogenu ...

Odstranění polyfenolů:

PVP: (Polyvinylpyrrolidone) – PVP vytváří vodíkové vazby s taniny

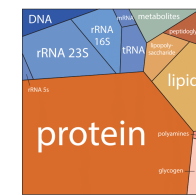
β-mercaptoethanol: silné redukční činidlo

BSA (Bovine serum albumin)



5a. Odstranění proteinů

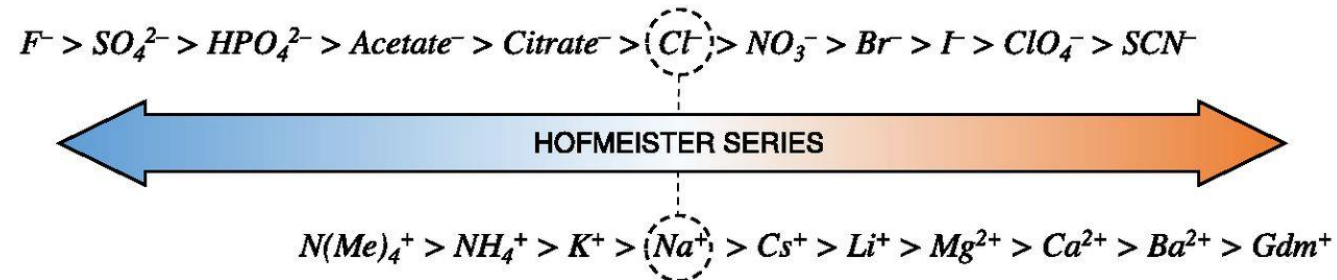
Vysolení proteinů



Rozpustnost proteinu v koncentrovaných roztocích solí je závislá na přítomných aniontech a kationtech v **Hofmeisterově sérii**:

- Increase protein stability
- Less denaturing
- Salting out (aggregates)
- Kosmotropic

- Decrease protein stability
- More denaturing
- Salting in (solubilizes)
- Chaotropic



Wicky te al., PNAS 2017 114 (37) 9882-9887

Obr.25 dostupne z <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1705105114> vid. 01/09/2023



prof. **Franz Hofmeister**
30. srpna 1850 v Praha
26. července 1922 Würzburg

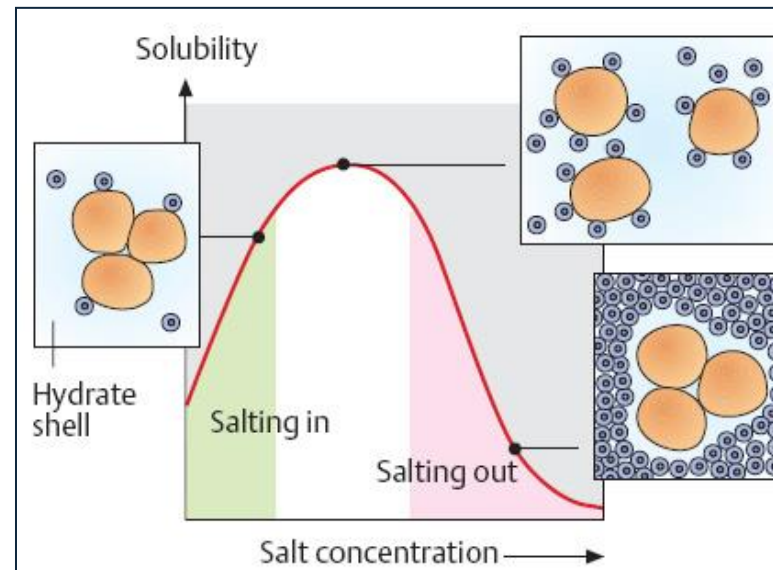
5a. Odstranění proteinů

Vysolení proteinů

- Vsolovací a vysolovací soli ovlivňují rozpustnost proteinu.
- Při zvyšující se koncentraci soli náboj na povrchu proteinu interagují se solí a ne s vodou → protein se vysolí.

Příklady solí:

Na citrate = LiSO_2 = Na_2SO_4 = K_2HPO_4 = Na_2HPO_4 > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ > MgSO_4 > KAc = NaAc > NaCl > NaNO_3



Obr.26 dostupné z <https://academic-accelerator.com/encyclopedia/salting-out> vid. 01/09/2023



Za určitých podmínek se může vysolit i chromosomální DNA.

5b. Odstranění proteinů

Proteináza K

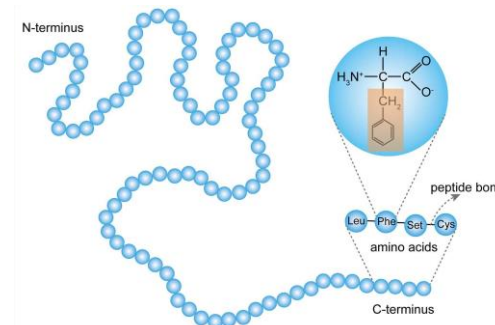
➤ **Proteináza K:** (původ jména: štěpí Keratin)



- Štěpí přednostně za hydrofobními (nepolárními) aminokyselinami (alifatické, aromatické).
- Stabilní v širokém rozmezí pH (4 až 12), s pH optimem pH 8.0.
- Při zvýšení teploty z 37°C na 50-60°C se silně zvyšuje aktivita enzymu.
- Není inhibována guanidinium hydrochloridem, močovinou, Triton X-100, Tween 20, SDS, EDTA - naopak, některé v nízkých koncentracích její aktivitu zvyšují.
- Nevyžaduje ke své aktivitě Ca²⁺ a Mg²⁺ ionty (jako např. na aktivitu nukleázy). Při odstranění vápenatých iontů (EDTA): stabilita enzymu je snížena, ale proteolytická aktivita zůstává.



- Proteináza K zůstává ve vzorku.
- Ve vzorku zůstávají rozštěpené peptidy.

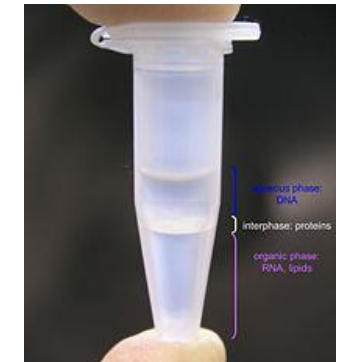
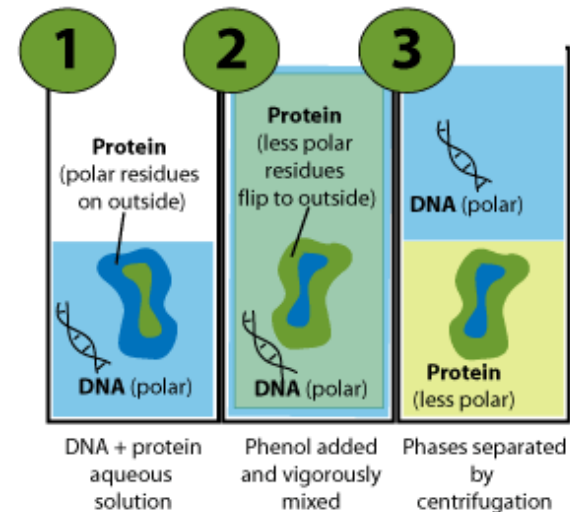
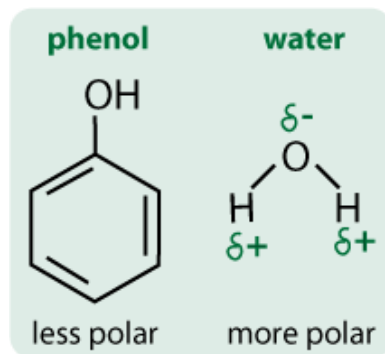


5c. Odstranění proteinů

Fenol-chloroformová extrace

Poměrně pracná a zdlouhavá metoda avšak poskytuje velké množství velmi čisté DNA.

- **Fenol** v porovnání s vodou mnohem méně polární.
- **DNA:** se díky své polaritě rozpouští snadněji v polárním vodném roztoku.
- **Proteiny:** část řetězce je více polární a část méně polární (dle AMK sekvence) jsou – tj. proteiny hromadí na rozhraní mezi vodným roztokem a organickou fází nebo jsou rozpuštěny ve fenolické fázi.



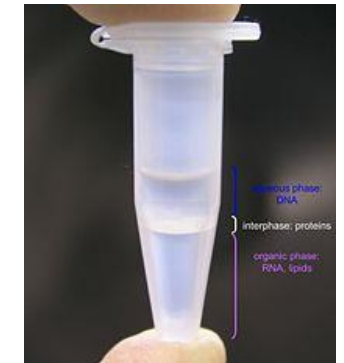
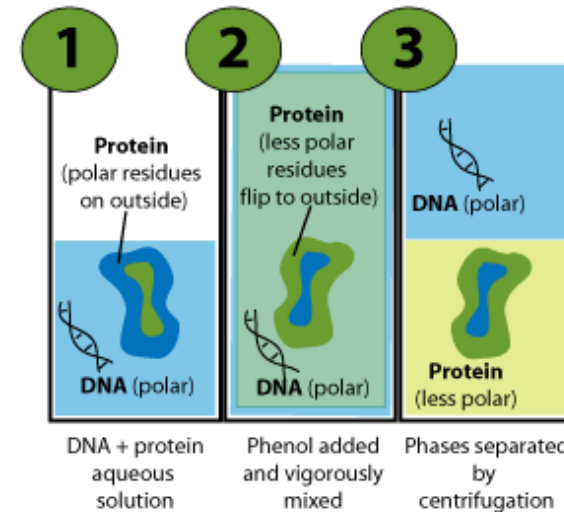
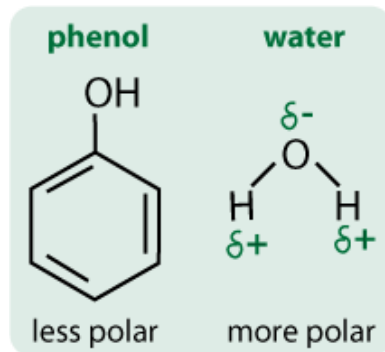
Obr.27 dostupne z <https://www.smacgigworld.com/blog/principle-dna-extraction.php> vid. 01/09/2023

5c. Odstranění proteinů

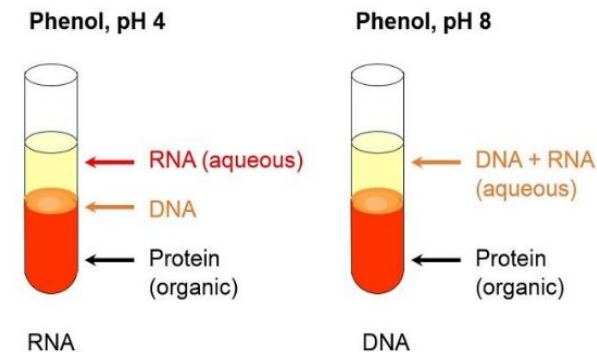
Fenol-chloroformová extrace

Poměrně pracná a zdlouhavá metoda avšak poskytuje velké množství velmi čisté DNA.

- **Fenol** v porovnání s vodou mnohem méně polární.
- **DNA:** se díky své polaritě rozpouští snadněji v polárním vodném roztoku.
- **Proteiny:** část řetězce je více polární a část méně polární (dle AMK sekvence) jsou – tj. proteiny hromadí na rozhraní mezi vodným roztokem a organickou fází nebo jsou rozpuštěny ve fenolické fázi.



Obr.27 dostupne z <https://www.smacgigworld.com/blog/principle-dna-extraction.php> vid. 01/09/2023



Obr.28 dostupne z <https://www.genetargetsolutions.com.au/wp-content/uploads/2016/05/?SD> vid. 01/09/2023

➤ Extrakce nukleových kyselin (NK)

❖ Extrakce a purifikace NK:

1. Rozrušení buněčných membrán / stěn
2. Inhibice nukleáz (Dnáz / RNáz)
3. Odstranění polysacharidů
4. Odstranění polyfenolů
5. Odstranění proteinů
 - a. Vysolení proteinů
 - b. Proteináza K
 - c. Fenol-chloroformová extrace

❖ Vlastní izolace NK

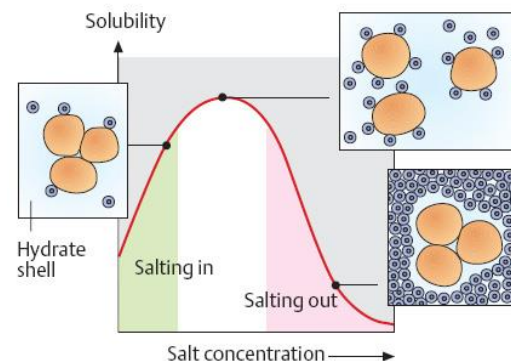
1. Vysolování
2. Srážení
 - a. EtOH / Isopropanol
 - b. Multivalentní kationty
 - c. Polyethylene glycol (PEG)
3. Adsorpce na silikát
4. Izolace vysokomolekulární DNA
5. Izolace RNA
6. Izolace plazmidové DNA
7. Selektivní izolace RNA/DNA
 - a. Izolace mRNA
 - b. Izolace RNA/DNA dle specifické sekvence
 - c. Izolace pomocí asociovaných proteinů
 - d. Selektivní izolace RNA pomocí aptamerů

1. Vysolování

- Rozpustnost DNA ve vodných roztocích závisí na koncentraci iontů v roztoku při zachování součiny rozpustnosti (konstanta daná pro každou látku za standardních podmínek, která určuje, kolik látky je možné v roztoku rozpustit).

- **Vsolování:** oslabují se intramolekulové iontové vazby DNA a molekula se vsoluje do H_2O
- **Vysolování:** při vysokých koncentracích iontů dochází k vysolování DNA v důsledku nedostatečných interakcí s molekulami rozpouštědla tj. H_2O

- Síran amonný
- NaCl



Phillips, et al., *Physical Biology of the Cell*.

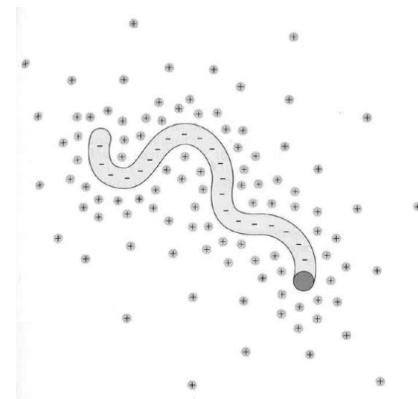
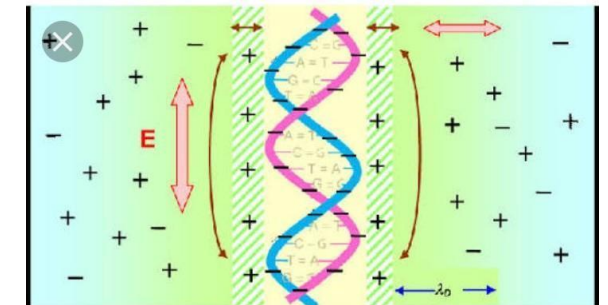


Figure 9.14 DNA in an ionic solution. The schematic shows the large negative charge density on the DNA molecule and the positive counterions in the surrounding solution.

Obr.30 dostupne z Adapted from Physical Biology of the Cell, Fig. 9.14 vid. 01/09/2023

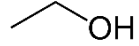


Obr. 30b <https://brainly.in/question/12666660> 18/9/2024

2. Srážení

a. EtOH/Isopropanol

Ethanol (EtOH)



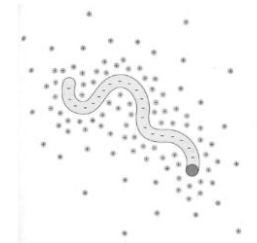
nebo

Isopropylalkohol

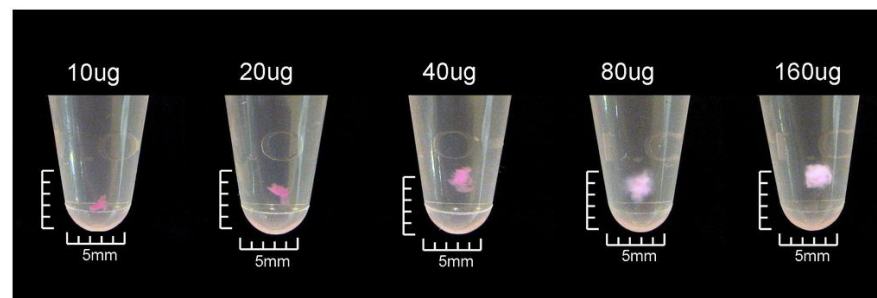
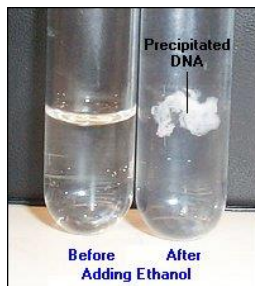
(= Izopropanol)



+ **sůl** (např. NaAc)



- Díky elektrostatickým interakcím je polární molekula **DNA snadno rozpustná v polární H_2O**
- **Kationty solí** (např. Na^+ , Mg^{2+} , Li^+ ...) **neutralizují náboj** cukr-fosfátového řetězce DNA (PO_3^-), ale v H_2O jsou ionty solí jsou víceméně volné (obklopené molekulami H_2O), netvoří iontové páry s DNA
- **Ethanol / Isopropanol umožní zformování iontových párů DNA-kationt**



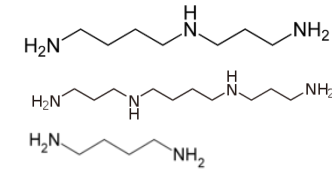
Obr.31 dostupne z https://www.flickr.com/photos/damon_tighe/4799892345 vid. 01/09/2023

2. Srážení

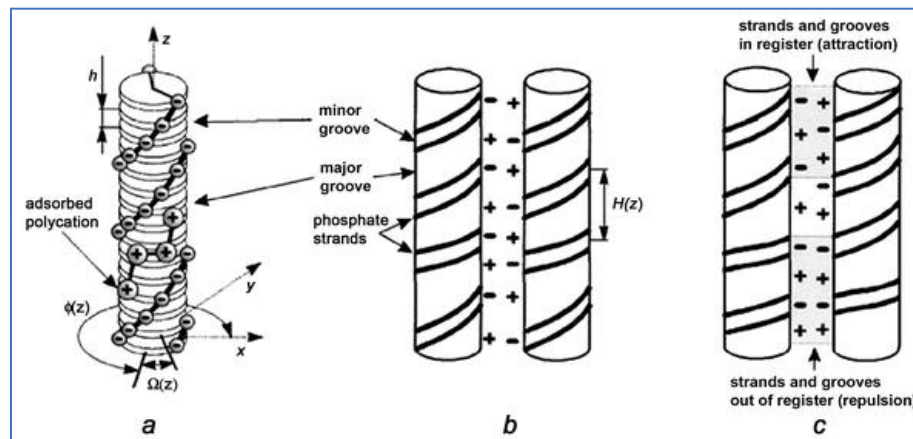
b. Multivalentní kationty

např. polyaminy

spermidine (3⁺)
spermine (4⁺)
putrescine (2⁺)
...



- **Polyvalentní kationty stabilizují dvoušroubovici DNA (obvykle v B-formě) což vede k precipitaci DNA.**
- Vysoce selektivní precipitace DNA (**nevhodné pro genomovou DNA a fragmenty <50bp**).
- Pokud se chcete vyhnout F:CH:IAA extraci.
- **Vhodné pro izolaci DNA-vazebných proteinů.**
- Odmytí polyaminu oplachem sraženiny DNA koncentrovanou solí (např. LiCl, NaOAc...).

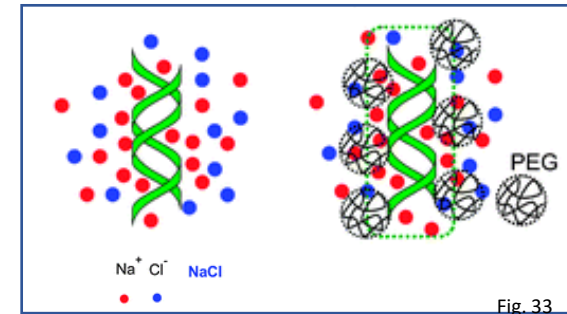
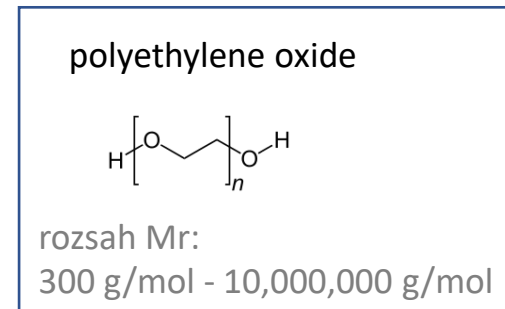


Obr.32 dostupné z
https://www.researchgate.net/publication/24189143_The_homology_recognition_well_as_an_innate_property_of_DNA_structure/figures?lo=1 vid. 01/09/2023

2. Srážení

c. Polyethylene glycol (PEG)

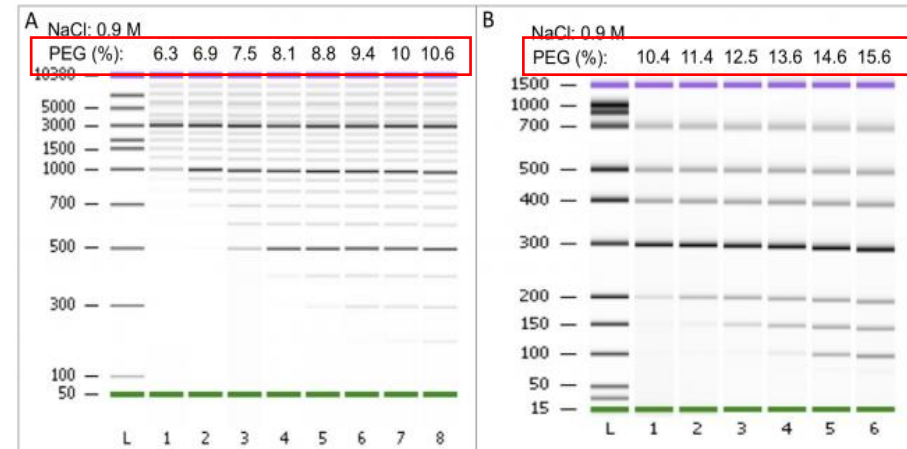
- **Délkově selektivní precipitace** →
přídavek PEG ve správné koncentraci a zároveň přídavek iontů (Na^+) → způsobuje DNA agregaci a srážení.



Obr.33 dostupne <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/cc/c2cc38627e> vid. 01/09/2023
Khimji et al., Chem. Commun., 2013, 49, 1306-1308

Precipitace závisí na :

- délce polymeru (např.: PEG 6.000, 8.000, 10.000 ...)
- koncentraci PEG
- koncentraci divalentních iontů (např. NaCl)
- koncentraci DNA
- pH
- času precipitace ...
- oplach 70% EtOH odstraňuje zbytky PEG

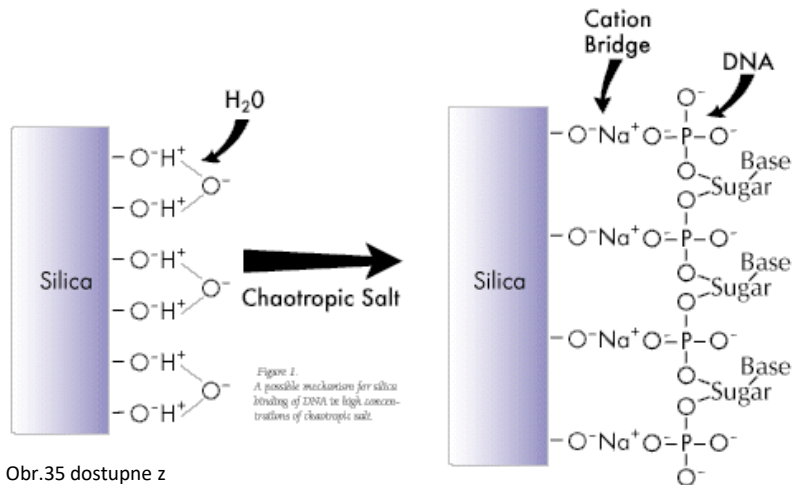
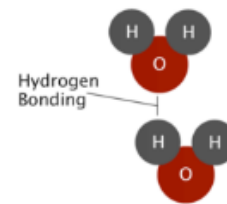


Obr.34 dostupne z https://www.researchgate.net/publication/43131703_Increased_Throughput_by_Parallelization_of_Library_Preparation_for_Massive_Sequencing/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic vid. 01/09/2023

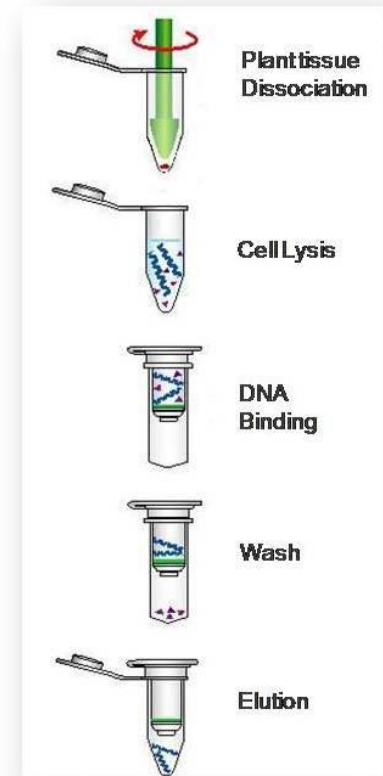
3. Adsorpce na silikát

NK se za určitých pH podmínek v přítomnosti chaotropních solí adherují na silikátový povrch.

Chaotropní soli = iontové sloučeniny snižující strukturovanost vody. Ve vodě v tekutém stavu totiž vznikají přechodně vodíkové můstky mezi kyslíkem a vodíkem sousedních molekul, tzn. je určitým způsobem "strukturovaná".
např. Guanidium hydrochloride



Obr.35 dostupne z <https://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/lauren/geneclean.html> vid. 01/09/2023



Obr.36 dostupne z <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/kit-pro-izolaci-dna-z-telnich-tekutin/> vid. 01/09/2023



DNA



Home > Products > Discovery & Translational Research > DNA & RNA Purification > DNA

DNA Purification

When purifying DNA, it is critical to use an optimized method for your sample type. Our trusted DNA purification kits ensure high yields of high-quality DNA free of contaminants and inhibitors. Streamlined DNA extraction protocols simplify handling and are optimized for your specific sample types, formats and throughputs, as well as for manual and automated processing.

Browse DNA

[DNA Clean Up](#)







[Cell-Free DNA](#)

[Genomic DNA](#)

[Microbial DNA](#)

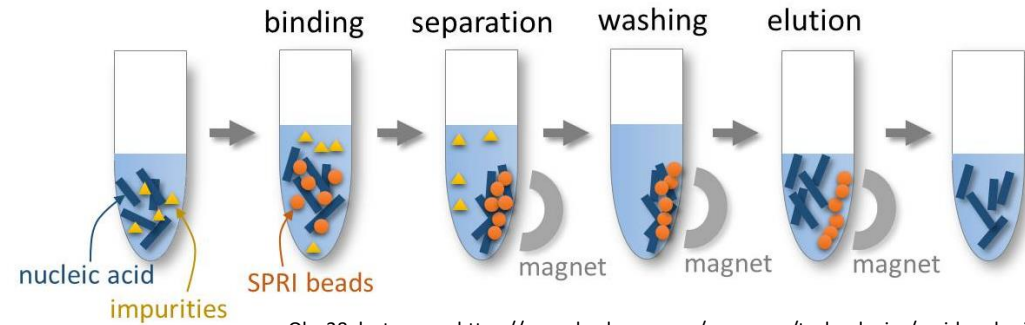
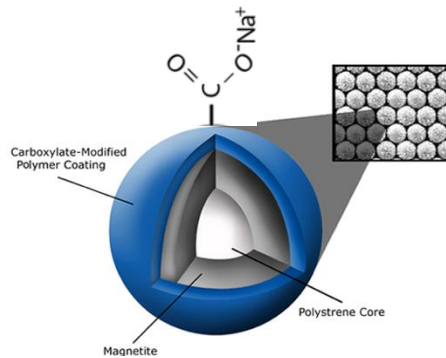
[Plasmid DNA](#)

35 Products found

| | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|---|---|--|---|--|---|
|  <p>DNeasy Blood & Tissue Kits</p> <p>For spin-column or 96-well extraction of total DNA from animal blood and tissues and from cells, yeast, bacteria, or viruses</p> |  <p>QIAwave DNA Blood & Tissue Kit</p> <p>For a more eco-friendly alternative to our standard kit for extracting total DNA from animal blood and tissues, cells, yeast, or bacteria.</p> |  <p>QIAamp DNA Kits</p> <p>For isolation of genomic, mitochondrial, bacterial, parasite or viral DNA</p> |  <p>EZ1 & 2 DNA Investigator Kit</p> <p>For automated purification of DNA from forensic and HID samples on the EZ1 XL or EZ2 Connect Fx Instruments</p> |  <p>DNeasy Plant Pro and Plant Kits</p> <p>For extraction of total cellular DNA from plant cells and tissues or fungi, or genomic DNA from plant cells, tissues and seeds</p> |  <p>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit</p> <p>For purification of genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues</p> |  <p>QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit</p> <p>For automated high-throughput isolation of total DNA from blood, cells, and tissues</p> |  <p>QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit</p> <p>For isolation of gDNA from stool samples</p> |  <p>FlexiGene DNA Kit</p> <p>For scalable isolation of genomic DNA from whole blood, buffy coat, and cultured cells in a single tube</p> |  <p>QIASymphony Cerial Kits</p> <p>For purification of residual host cell DNA and viral nucleic acids from bioprocess samples</p> |
|  <p>QIAamp DNA Blood Kits</p> <p>For purification of genomic, mitochondrial or viral DNA from blood and other body fluids</p> |  <p>EZ1 & 2 DNA Blood Kits</p> <p>For automated purification of high-quality DNA from 1 - 24 samples per run</p> |  <p>EZ1 & 2 DNA Tissue Kit</p> <p>For automated purification of high-quality DNA from 1 - 24 samples per run</p> |  <p>QIASymphony DNA Investigator Kit</p> <p>For automated purification of DNA from 1 - 96 samples on the QIASymphony SP Instrument</p> |  <p>QIAxcel DNA Kits</p> <p>For automated analysis of DNA fragments using QIAxcel instruments</p> |  <p>Puregene Kits</p> <p>For purification of archive-quality DNA from a wide variety of sample types</p> |  <p>GeneRead DNA FFPE Kit</p> <p>For efficient recovery of high-quality genomic DNA (gDNA) from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue</p> |  <p>Blood & Cell Culture DNA Kits</p> <p>For isolation of up to 20 µg, 100 µg or 500 µg high-molecular-weight DNA from blood and cultured cells</p> |  <p>QIAGEN Genomic-tips</p> <p>For isolation of up to 20 µg, 100 µg or 500 µg high-molecular-weight DNA from a wide range of samples</p> |  <p>QIAamp 96 DNA Swab BioRobot Kit</p> <p>For automated high-throughput DNA purification from swabs</p> |

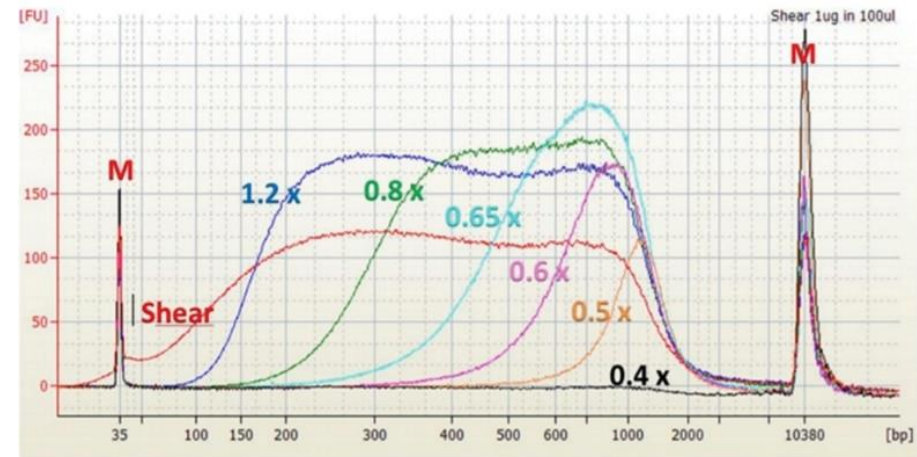
1 + 2 + 3

Vazba na magnetické kuličky v přítomnosti PEG= Solid-Phase Reversible Immobilization (SPRI) beads



Obr.38 dostupne z <https://www.beckman.com/resources/technologies/spri-beads> vid. 01/09/2023

- Každá kulička je vyrobena z polystyrenu obklopeného vrstvou magnetitu.
- Paramagnetické (magnetické pouze v magnetickém poli) - to zabraňuje jejich shlukování a vypadávání z roztoku.
- **Potažené oxidem křemičitým nebo karboxylem: reverzibilně váží NK v přítomnosti PEG a soli.**
- Selektivně váží nukleové kyseliny dle typu a velikosti
- Jelikož je imobilizace závislá na koncentraci PEG a soli v reakci, je důležitý **objemový poměr kuliček k DNA.**
- Poměrně cenově náročné (cca. 5 ml ~ 10 tis. Kč)



Obr.39 dostupne z <https://diagnostech.co.za/next-generation-sequencing-tips-n-tricks-part-2/> vid. 01/09/2023

např. **poměr 0,8x** (tj. 40 μ l kuliček na 50 μ l vzorku) naváže všechny fragmenty větší než ~200 bp

diagnostech.co.za/next-generation-sequencing-tips-n-tricks-part-2/
Stortchevoi et al., J Biomol Tech. 2020

4. Izolace vysokomolekulární DNA

Pro specifické analýzy (počáteční stádia apoptózy, délka telomer)

- ❖ Standardní izolace DNA: 30 – 50 kb
- ❖ Vysokomolekulární DNA: > 1 Mb
- ❖ Agaróza (2% „low melting point“) působí jako pevná, ale porézní matrice, která umožňuje difúzi různých reagensů pro purifikaci DNA a následné manipulace, přičemž zabraňuje fragmentaci DNA

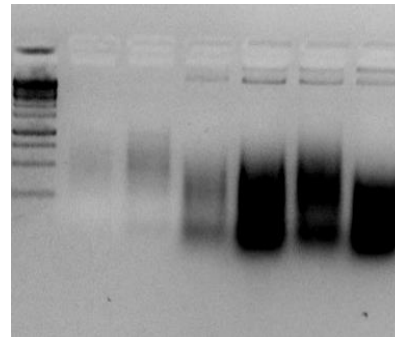
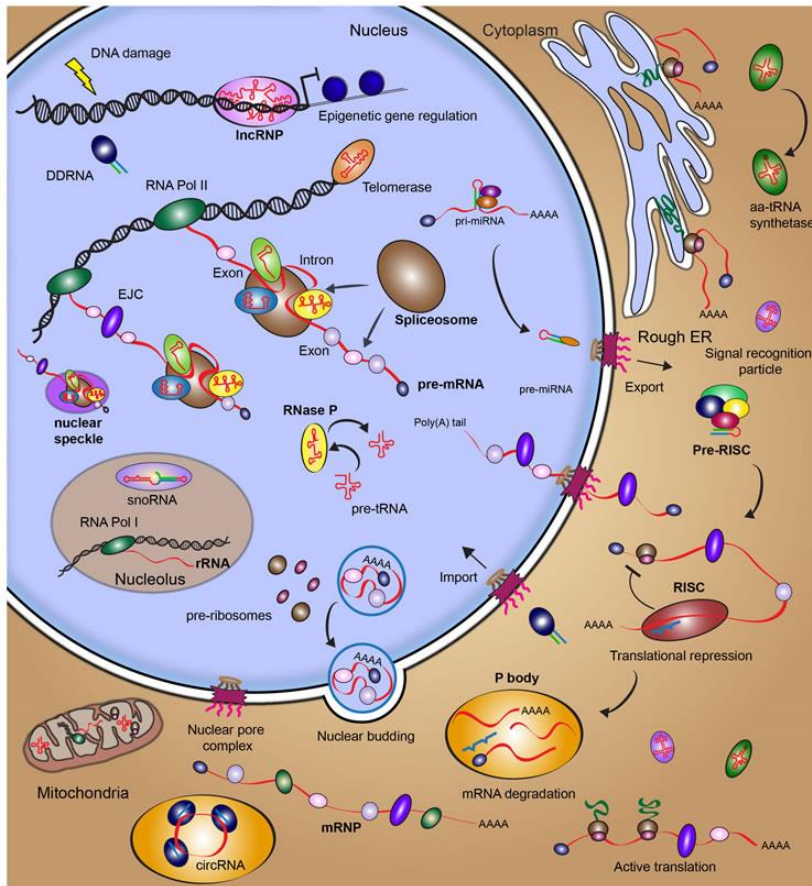
tzv. agarózové bločky



Obr.15 dostupné z foto autor

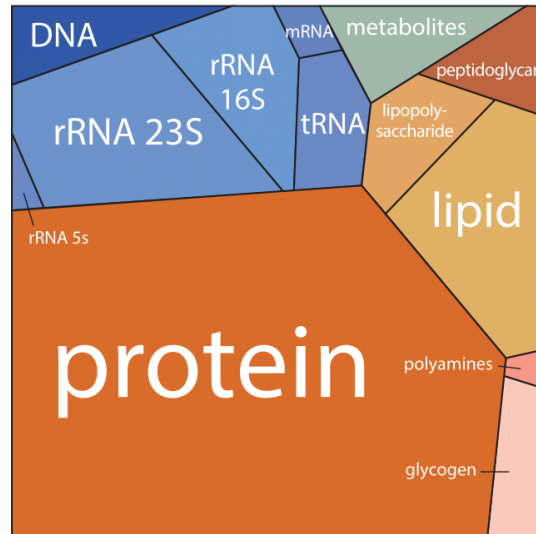
5. Izolace RNA

RNA je v buňkách v nadbytku oproti DNA:



← Genomová DNA

← RNA



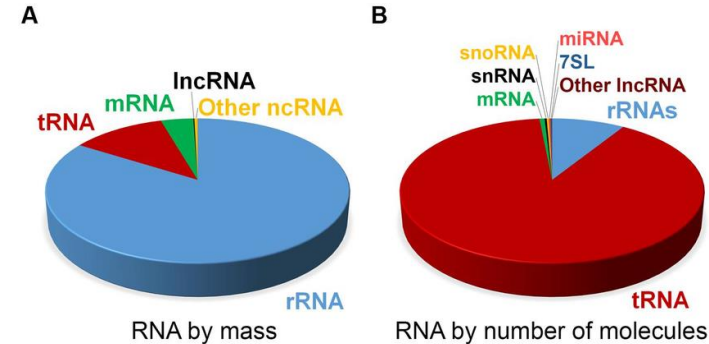
Voronoi diagram: složení buňky *E. coli* (po 40 min od dělení). Každá oblast mnohoúhelníku představuje relativní podíl odpovídající složky v suché hmotě buňky.

- DNA 3%
- RNA 20%
- proteiny 55%
- lipidy 10%

5. Izolace RNA

RNA je v buňkách v nadbytku oproti DNA:

- ❖ Pouze 3 - 5% je mRNA.
- ❖ Nekódující RNA (ncRNA) – většina celkové RNA eukaryotických buňkách.
- ❖ Ribozomální RNA (rRNA) – výrazný podíl v rychle se dělících buňkách.

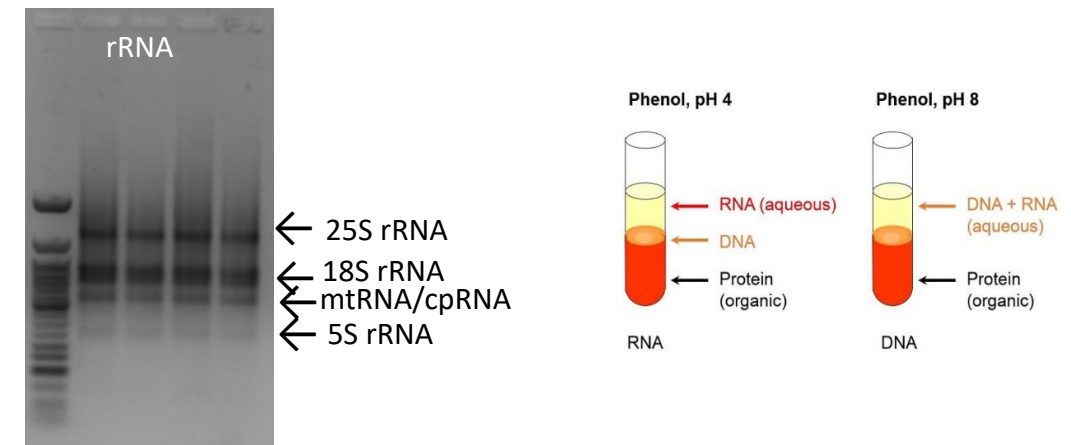


Estimate of RNA levels in a typical mammalian cell.

Obr.40 dostupne z https://www.researchgate.net/publication/272188718_Non-coding_RNA_What_is_functional_and_what_is_junk/figures?lo=1 vid. 01/09/2023

Izolace RNA: podobný postup jako u izolace DNA

- ❖ buněčná lyze často provedena pomocí Guanidium hydrochloride (chaotropní činidlo):
 - rozruší buňky
 - rozruší proteiny - včetně RNáz
 - pomůže separaci rRNA od ribozomálních proteinů
- ❖ separace RNA z roztoku s proteiny (pokud se použije F/C extrakce – fenol má pH=4)
- ❖ pozor na RNázy



Obr.41 dostupne z foto autor

RNA



Home > Products > Discovery & Translational Research > DNA & RNA Purification > RNA

Optimized RNA isolation – even from difficult samples

When purifying RNA, it is critical to use an optimized method for your sample type. Our trusted RNA extraction kits ensure high yields of high-quality RNA free of contaminants and inhibitors. Streamlined protocols with optimized RNA extraction reagents simplify handling and are optimized for your specific sample types, formats and throughputs, as well as for manual and automated processing.

Browse RNA

- RNA Clean Up
- Total RNA**
- Cell-Free RNA
- Microbial RNA
- miRNA
- mRNA

25 Products found

















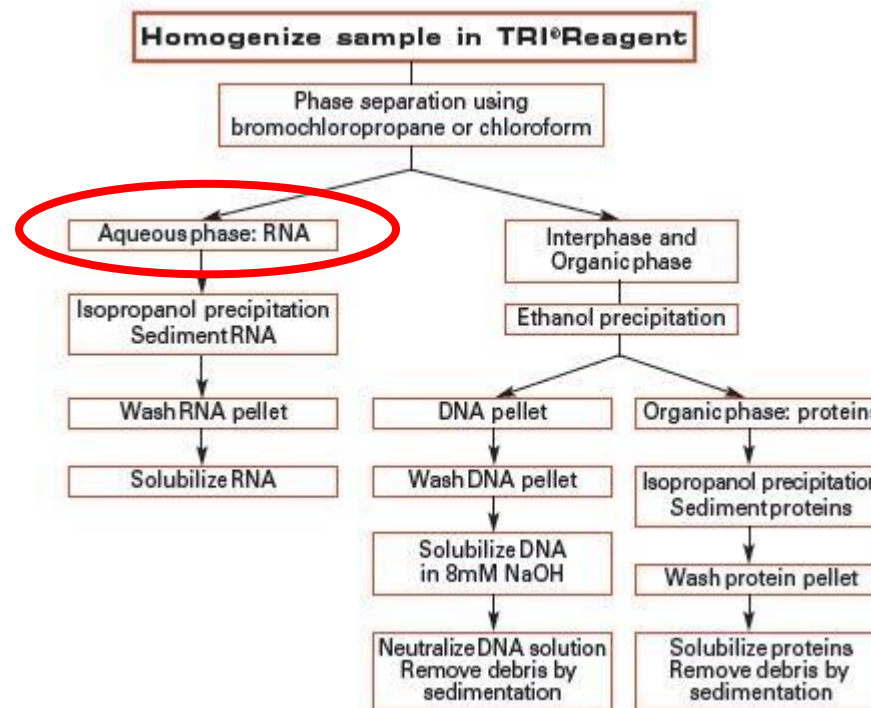
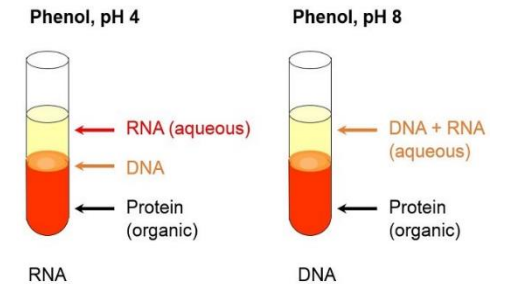
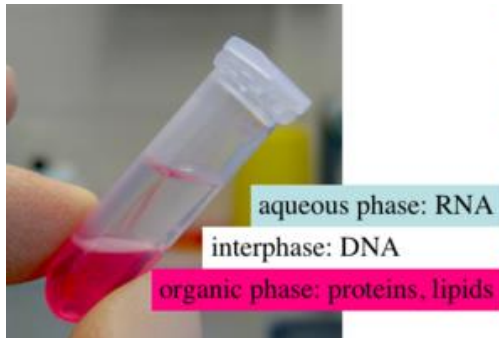
| | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|--|---|--|
|  <p>QIAwave RNA Mini Kit</p> <p>For a more eco-friendly alternative to our standard kit for extracting total RNA from cells, tissues, and yeast.</p> |  <p>RNeasy Kits</p> <p>For purification of total RNA from cells, tissues, and yeast</p> |  <p>RNeasy Plus Kits</p> <p>For fast purification total RNA from cells and tissues using gDNA Eliminator columns or plates</p> |  <p>RNeasy Plant Mini Kit</p> <p>For purification of total RNA from plants and fungi</p> |  <p>QIAzol Lysis Reagent</p> <p>For efficient lysis of fatty and standard tissues before RNA isolation</p> |  <p>QIAasyphony RNA Kit</p> <p>For automated purification of total RNA, or total RNA with miRNA, from tissues or cells</p> |  <p>RNeasy Lipid Tissue Mini Kit</p> <p>For purification of up to 100 µg total RNA from fatty tissues and other types of tissue</p> |  <p>PAXgene Blood miRNA Kit</p> <p>For purification of miRNA and total RNA from whole blood</p> |
|  <p>RNeasy FFPE Kit</p> <p>For purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections</p> |  <p>RNeasy DSP FFPE Kit</p> <p>For purification of total RNA from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue sections for in vitro diagnostic use</p> |  <p>QIAamp RNA Blood Mini Kit</p> <p>For purification of cellular RNA from fresh whole blood</p> |  <p>RNeasy 96 QIAcube HT Kit</p> <p>For automated high-throughput isolation of RNA from animal and human cells and tissue</p> |  <p>PAXgene Blood RNA Kit IVD</p> <p>For isolation and purification of intracellular RNA from blood stabilized in PAXgene Blood RNA Tubes</p> |  <p>RNeasy Universal Kits</p> <p>For purification of total RNA from all types of tissue</p> |  <p>RNAprotect Reagents and Tubes</p> <p>For immediate stabilization of RNA in tissues, cultured cells and bacterial cultures</p> |  <p>RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit</p> <p>For purification of up to 100 µg total RNA from fiber-rich tissues</p> |

Fig. 42

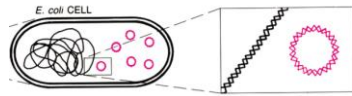
5. Izolace RNA

„Guanidinium – phenol – chloroform extraction“

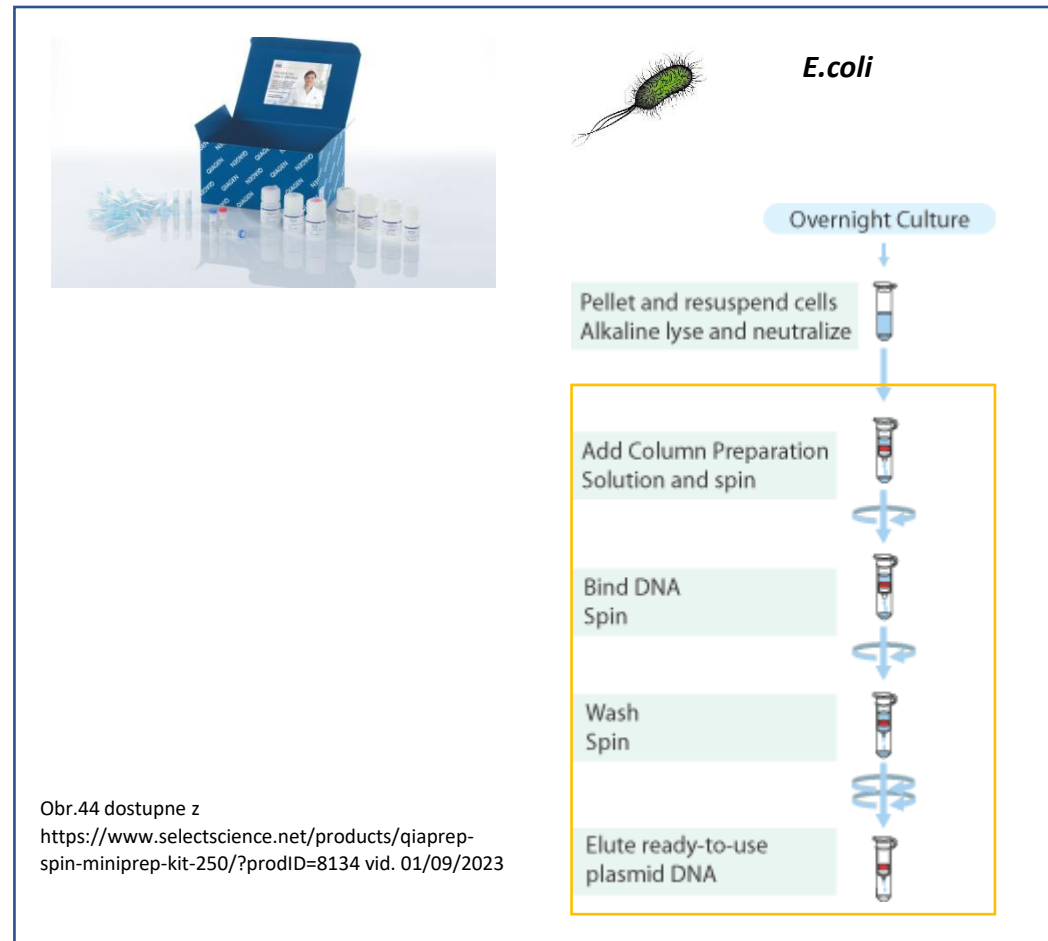
TRI Reagent (Sigma)
TRIzol (Invitrogen)
Trisure (Bioline) ...



6. Izolace plazmidové DNA „Birnboimova metoda“



plasmidová DNA x bakteriální genomová DNA

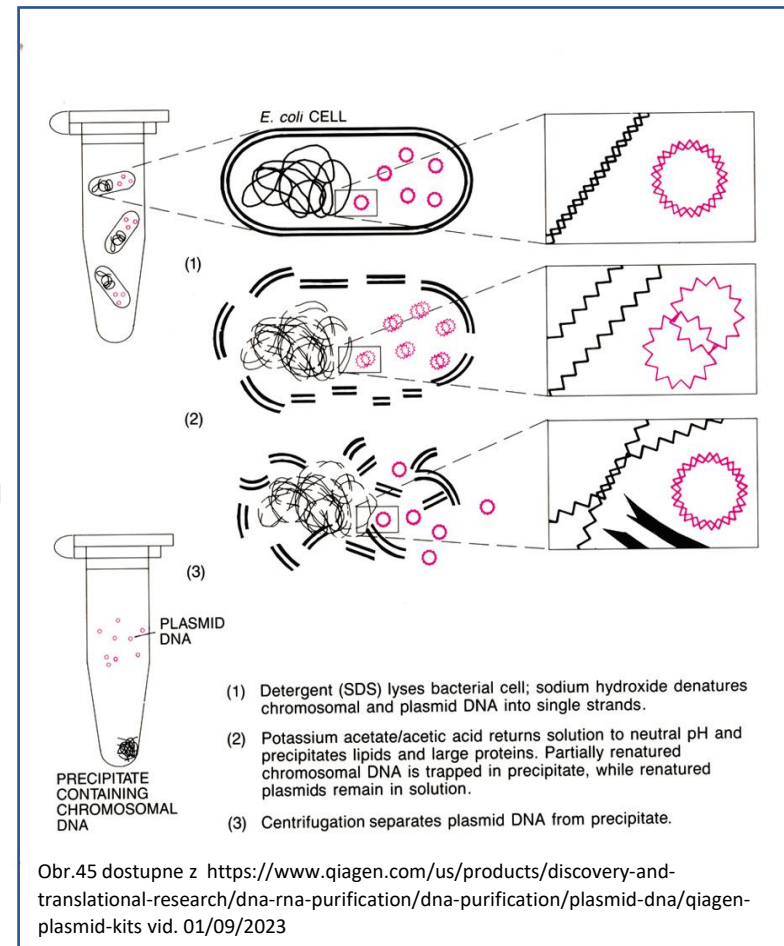


6. Izolace plazmidové DNA „Birnboimova metoda“

plazmidová DNA x bakteriální genomová DNA
→ separace dle velikosti

Postup:

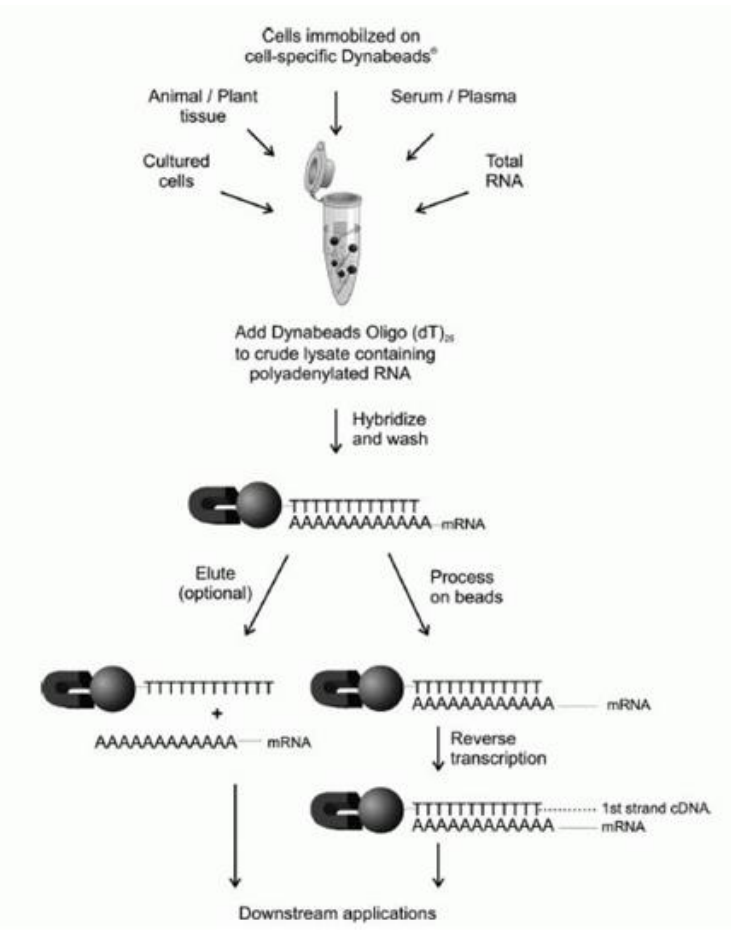
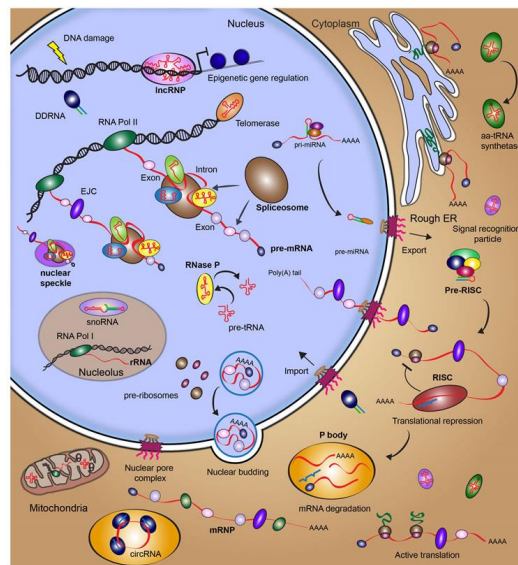
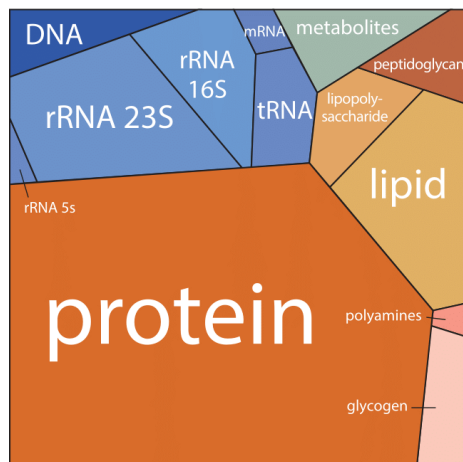
- **alkalická denaturace** (NaOH, pH=12.0 + SDS)
 - SDS rozbíjí buněčnou membránu
 - chromosomální DNA a proteiny jsou denaturovány
 - denaturuje i plazmidová DNA
- **neutralizace** (KAc, pH 5.5)
 - **plazmid renaturuje, dlouhá bakteriální DNA ne** a je vyprecipitována z roztoku (navíc je genomová DNA vázána na proteiny, které v tomto prostředí precipitují)
- **centrifugace**
 - **supernatant: plazmid**
 - **pelet: proteiny, genomová DNA ...**
- (RNase A)
- precipitace plazmidové DNA ethanolem
- centrifugace



7a. Selektivní izolace RNA/DNA mRNA

Izolace mRNA (messenger RNA)

- mRNA, která tvoří pouze 1 – 5 % totální RNA
- Typická mRNA je chráněna na 5' konci čepičkou a 3' konci poly(A).
- mRNA naváže na oligo dT matrici často umístěnou ve speciální kolonce či konjugované s kuličkami.

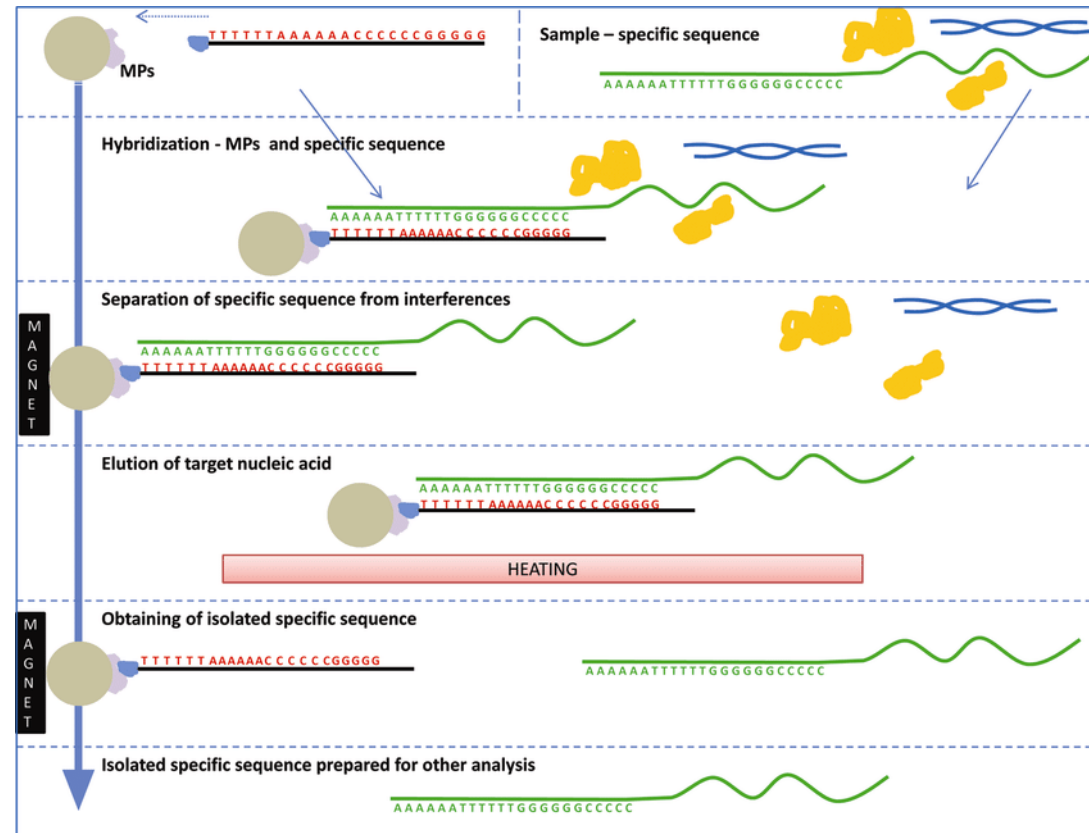


Obr.46 dostupne z https://www.cd-bioparticles.com/t/Nucleic-Acid-Separation_49.html
01/09/2023

7b. Selektivní izolace RNA/DNA dle specifické sekvence

Selektivní vychytání RNA či DNA díky částicím, které se váží:

➤ **na specifickou sekvenci DNA/RNA**

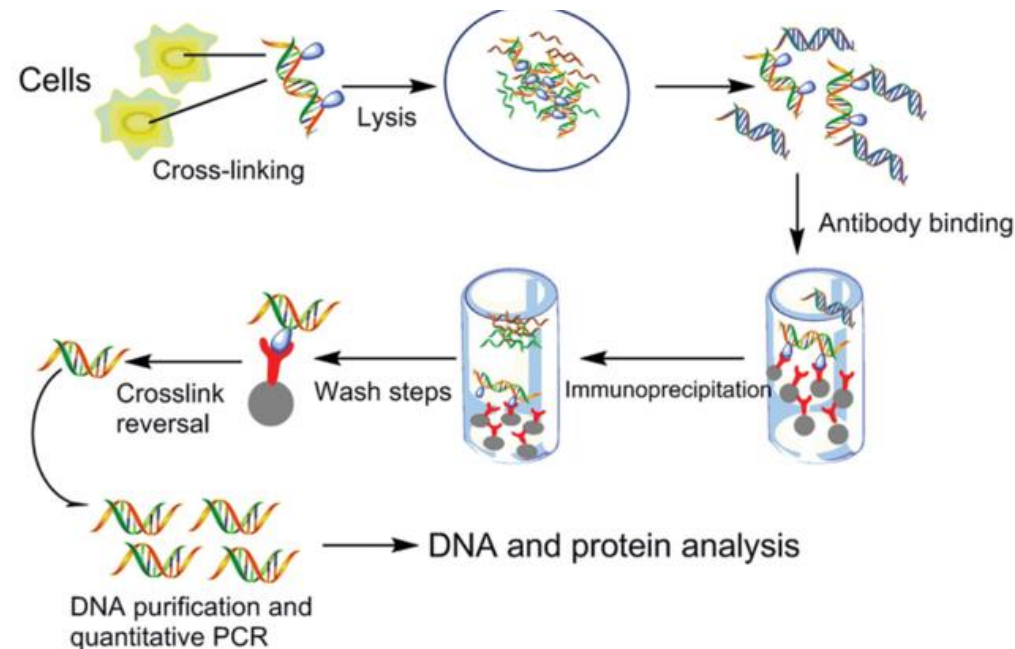


Chomoucka et al., International Journal of Nanotechnology, 2012
Nanotechnologies for society: new designs and applications of nanosensors and nanobiosensors in medicine and environmental analysis.

Obr.47 dostupne z
https://www.researchgate.net/publication/257948895_Nanotechnologies_for_society_New_designs_and_applications_of_nanosensors_and_nanobiosensors_in_medicine_and_environmental_analysis/figures?lo=1 vid. 01/09/2023

7c. Selektivní izolace RNA/DNA pomocí asociovaných proteinů

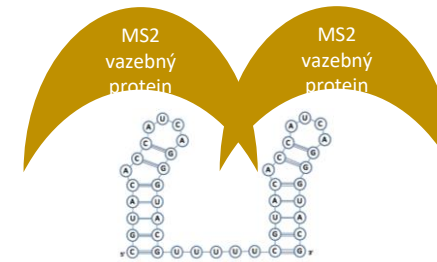
Selektivní vychytání RNA či DNA díky protilátkám, které se váží **na protein**, který se specificky váže na danou oblast (ChIP – Chromatin Immunoprecipitace)



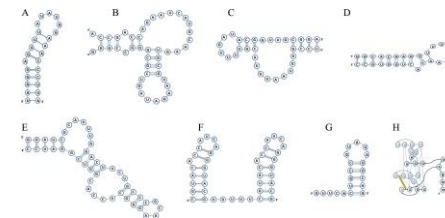
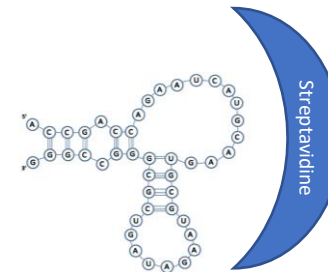
7d. Selektivní izolace RNA pomocí aptamerů

RNA aptamery:

MS2: je rozpoznán MS2 vazebným proteinem

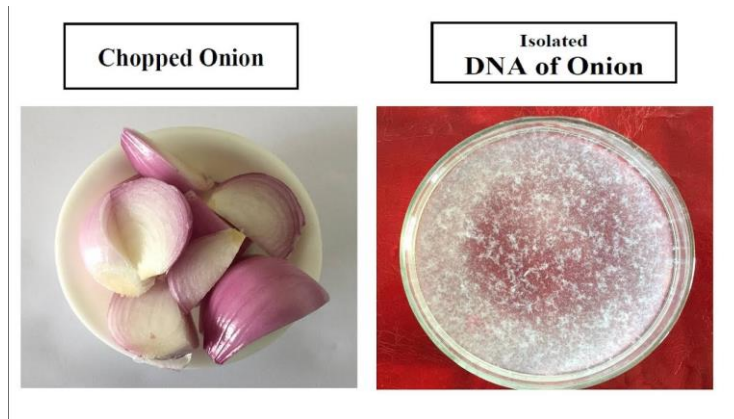


S1: je rozpoznán Streptavidinem



Izolace DNA z cibule

<https://www.youtube.com/watch?v=priDTavoEK4>



PRINCIPLE Isolation of DNA from Onion

| S.N. | PROCESS | PRINCIPLE |
|------|------------------|---|
| 01 | Blending | This degrades the cell walls and membranes further, permitting the release of DNA. Do not blend for too long as this will break up the DNA fibers. |
| 02 | Detergent & Heat | The detergent and heat treatment degrades membrane phospholipids and proteins, releasing the DNA. |
| 03 | Salt | The positively-charged sodium ions from the salt shield the negatively-charged phosphate groups of the DNA molecules, helping them to precipitate out of solution |
| 04 | Cooling | This slows the breakdown of the DNA which would occur if a high temperature was maintained. |
| 05 | Ethanol | It will precipitate into the upper (ethanol) layer. The DNA is the white material in the clear alcohol layer. |

Uploaded by- Solution-Pharma

<https://edu.ceskatelevize.cz/video/5531-pokus-izolace-dna-z-cibule-a-rajcete>



➤ Detekce a kvantifikace izolované NK

❖ Detekce NK:

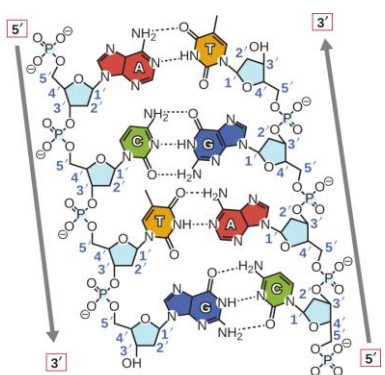
1. Fluorescenční detekce
2. Barvení NK stříbrem
3. Pomocí metylenové modři
4. Radioaktivní vizualizace

❖ Kvantifikace NK

1. Odhad z gelové elektroforézy
2. Pomocí absorbance
3. Fluorimetrická kvantifikace

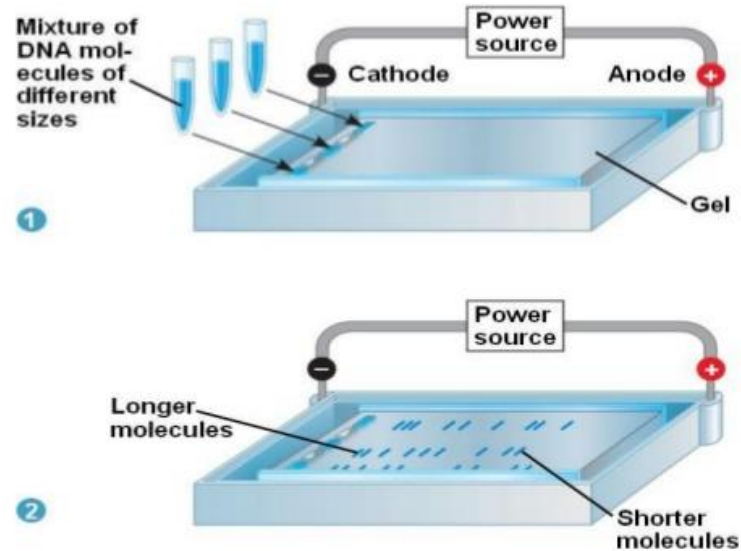
❖ Detekce NK

Elektroforéza - separace makromolekul na základě **náboje, konformace nebo velikosti**

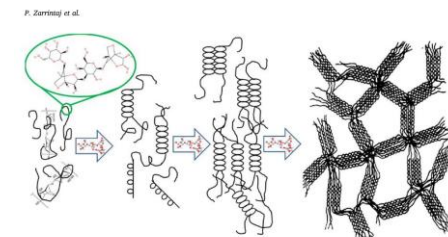


NK jsou negativně nabitě

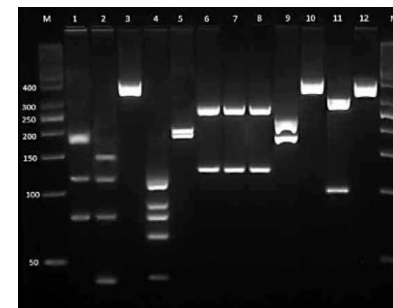
konformace



Agarózový gel



Zarrintaj et al., Carbohydrate Polymers 187 (2018) 66–84



(3% agarózový gel, EtBr)

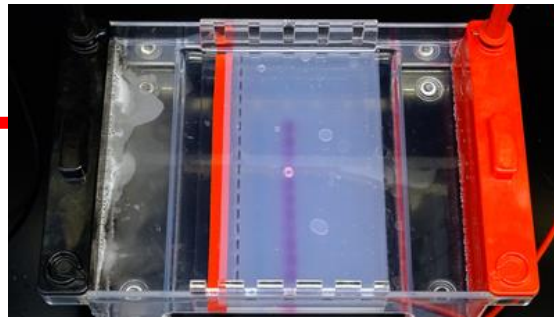
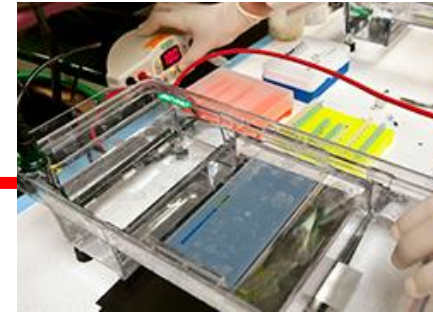
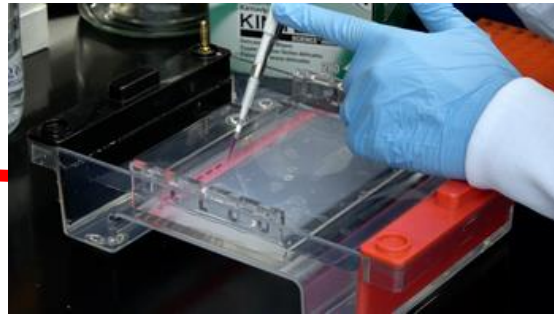
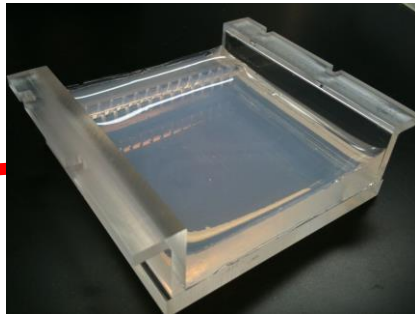
Nesvadbova et al., ACTA VET. BRNO 2019

<https://www.thermofisher.com>

[datahttps://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/](https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/) 01/09/2023

❖ Kvantifikace NK

1. Odhad z gelové elektroforézy

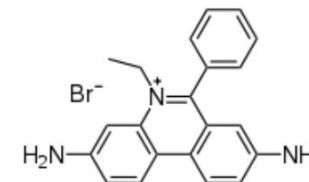


❖ Detekce NK

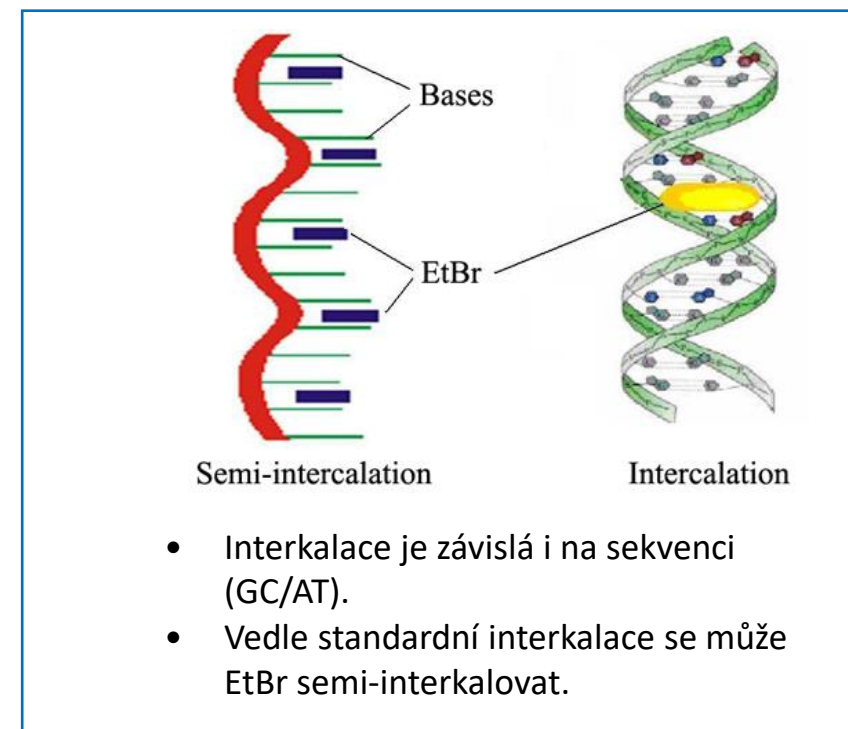
1) Fluorescenční detekce

Ethidium bromide

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



- **Interkalací EtBr** do hydrofóbního prostředí DNA se díky zbavení se molekul H₂O **zvýší síla fluorescence zhruba 10x**
- Interkalace EtBr dsDNA každých 2.5 pb
- **Limit detekce DNA pouhým okem je zhruba 10 ng/band**
- **ssRNA nebo ssDNA** také může být detekována - (vytváří často helikální struktury) **je nutno dávat na gel zhruba 5x více než dsDNA**
- EtBr retarduje mobilitu DNA zhruba o 15%
- EtBr inhibuje polymerizaci PAGE gelů



Obr.58 dostupne z

<https://www.scielo.br/j/jbchs/a/cvCGDs6rph79SxmTwJcJtNt/?lang=en> vid.

01/09/2023

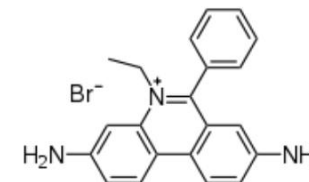
Vardevanyan et al., J. Braz. Chem. Soc. 2012

❖ Detekce NK

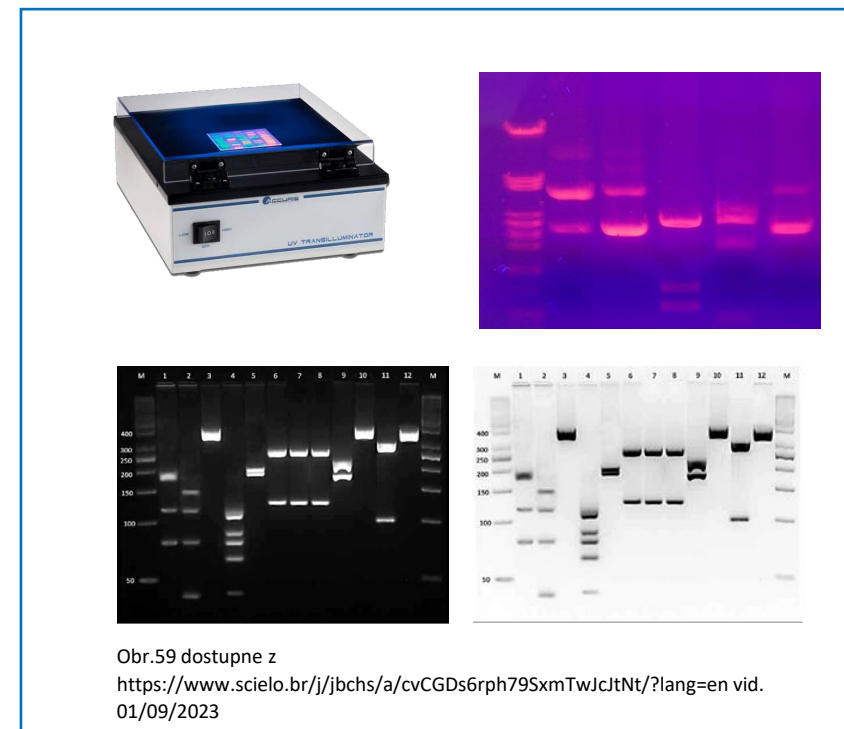
1) Fluorescenční detekce

Ethidium bromide

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



- **Interkalací EtBr** do hydrofóbního prostředí DNA se díky zbavení se molekul H₂O **zvýší síla fluorescence zhruba 10x**
- Interkalace EtBr dsDNA každých 2.5 pb
- **Limit detekce DNA pouhým okem je zhruba 10 ng/band**
- **ssRNA nebo ssDNA** také může být detekována - (vytváří často helikální struktury) **je nutno dávat na gel zhruba 5x více než dsDNA**
- EtBr retarduje mobilitu DNA zhruba o 15%
- EtBr inhibuje polymerizaci PAGE gelů

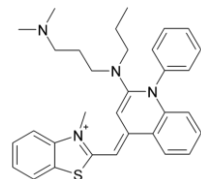


| | | |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| EtBr | 1 – 5 ng (limit detekce DNA) | 5 ng (limit detekce RNA) |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------|

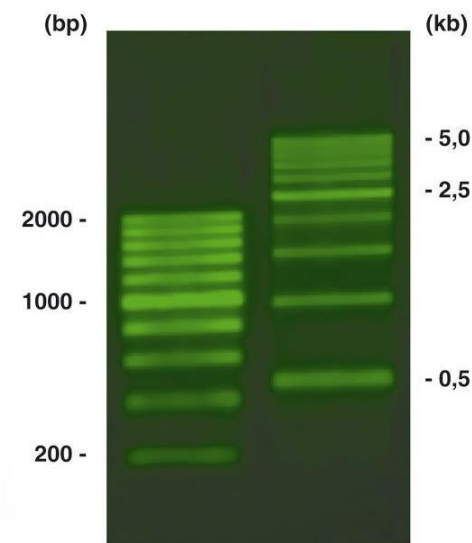
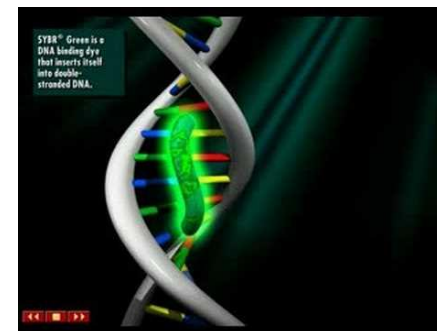
❖ Detekce NK

1) Fluorescenční detekce

Syber Green I



- Váže se na dsDNA.
- Senzitivita Syber-greenu je zhruba 25x vyšší než EtBr (pomocí 300 nm transiluminátoru).
- Detekční limit **dsDNA je ~60 pg/band** pomocí 300 nm transiluminátoru (zhruba 20 pg s 254 nm epillumínátorem).
- Detekce ssDNA and RNA: 100–300 pg/band (s použitím 254 nm epi-illumínace).
trans-iluminátory-světlo prochází skrz, detektor na druhé straně vzorku
epi-iluminátory-osvětlení a detekce z jedné strany vzorku
- Využití při fluorescenční kvantifikaci či real-time PCR.



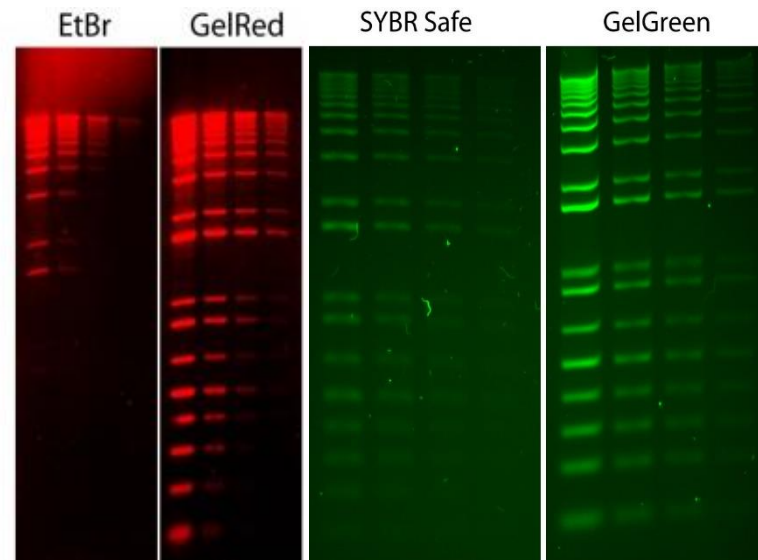
Obr.62 dostupné z https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTbIIS_Y6TJH5M4naFpDZ2tZCFnO2ACkxwHBn66_qyLT4jYps_O vid. 01/09/2023

| | | |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| SYBR Green I | 60 pg (limit detekce DNA) | 1 ng (limit detekce RNA) |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|

❖ Detekce NK 1) Fluorescenční detekce

Syber Green I a mnoho dalších:

- ***Syber Green II*** ...senzitivnější pro RNA
- ***Syber Gold*** ... 10x senzitivnější než EtBr
- ***Syber Safe*** ...podobná senzitivita jako EtBr
- ***GelGreen*** ...ekvivalent k 2 molekulám EtBr
- ***GelRed*** ... 10x senzitivnější než EtBr
- ...

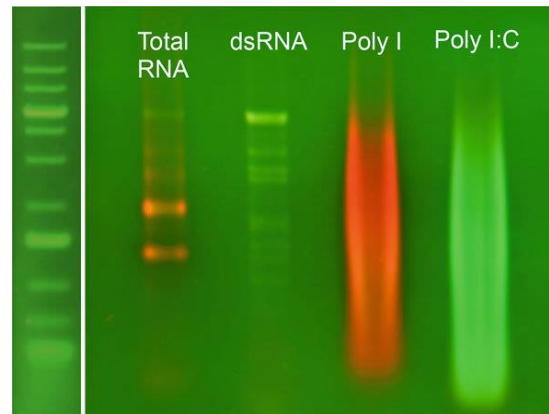


❖ Detekce NK

1) Fluorescenční detekce

Akridinová oranž:

- dsDNA, dsRNA: emise zelené fluorescence.
- ssDNA, ssRNA: emise červené fluorescence.
- Pozn.: při vyšším poměru barva/DNA - emise jen zelené fluorescence.
- Excitace / Emise (nm): 460/650 (RNA), 500/526 (DNA).



Obr.67 dostupne z
https://www.researchgate.net/publication/319107687_Isolation_of_Group_2_Innate_Lymphoid_Cells_from_Mouse_Lungs/figures?lo=1 vid. 01/09/2023

Jorg Hermann Fritz, Visualizing Virus-Derived dsRNA

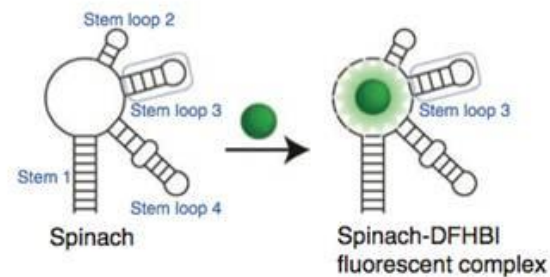
| | | |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| acridinová oranž | 50 ng (limit detekce DNA) | 100 ng (limit detekce RNA) |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|

❖ Detekce RNA 1) Fluorescenční detekce

RNA aptamer vážící zelený fluorofor

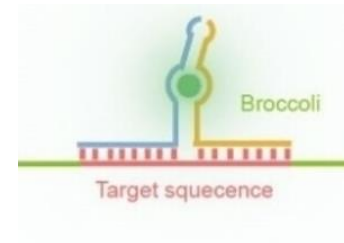
Spinach (špenát)

Paige et al., 2011



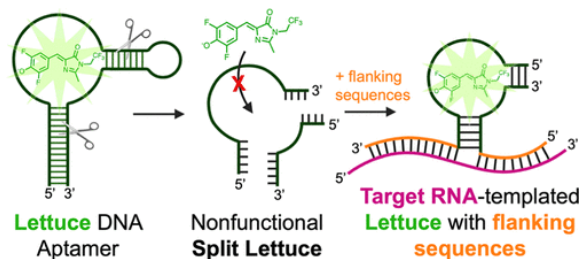
Broccoli (brokolice)

Filonov et al., 2014



Lettuce (salát)

VarnBuhler et al., 2022



shrnuto v Yin et al., 2022
doi.org/10.1002/anse.202200090

❖ Detekce NK

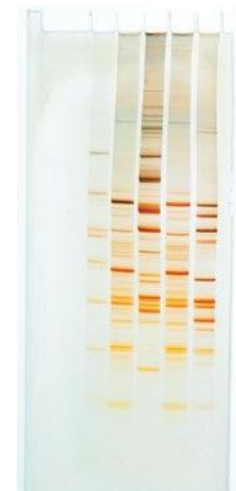
2) Barvení NK stříbrem

Barvení stříbrem:

- Dusičnan stříbrný - redukce stříbrných kationtů na nerozpustné stříbro.
- Detekuje ssDNA, dsDNA i RNA.
- Mírně vyšší citlivost než EtBr.
- Vhodnější pro polyakrylamidové gely.

Postup barvení:

- fixace (metanol, ledová kyselina octová, glycerol, formaldehyd...)
- vlastní barvení (AgNO_3)
- zastavení (ledová kyselina octová)
- promytí v destilované vodě

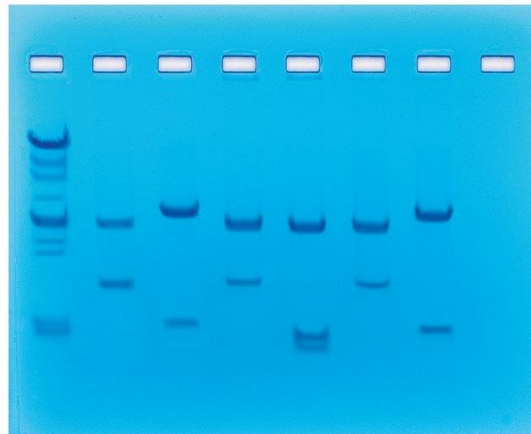


Bassam and Gresshoff
Nature Protocols (2007)
Obr.69 dostupné z
<https://www.nature.com/articles/nprot.2007.330> vid. 01/09/2023

| | | |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|
| stříbro | 1 ng (limit detekce DNA) | 5 ng (limit detekce RNA) |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|

Metylenová modř:

- nekarcinogenní
- asi 40x méně citlivá detekce ve srovnání s EtBr
- není třeba zdroj UV (více šetrná k DNA – při absenci UV záření nevznikají pyrimidinové dimery (jako např. jako u detekce EtBr))



Obr.70 dostupne z <https://www.istechhk.com/product/dna-fingerprinting-using-restriction-enzymes/> vid. 01/09/2023

| | | |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| methylenová modř | 40-200 ng (limit detekce DNA) | - (limit detekce RNA) |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------|

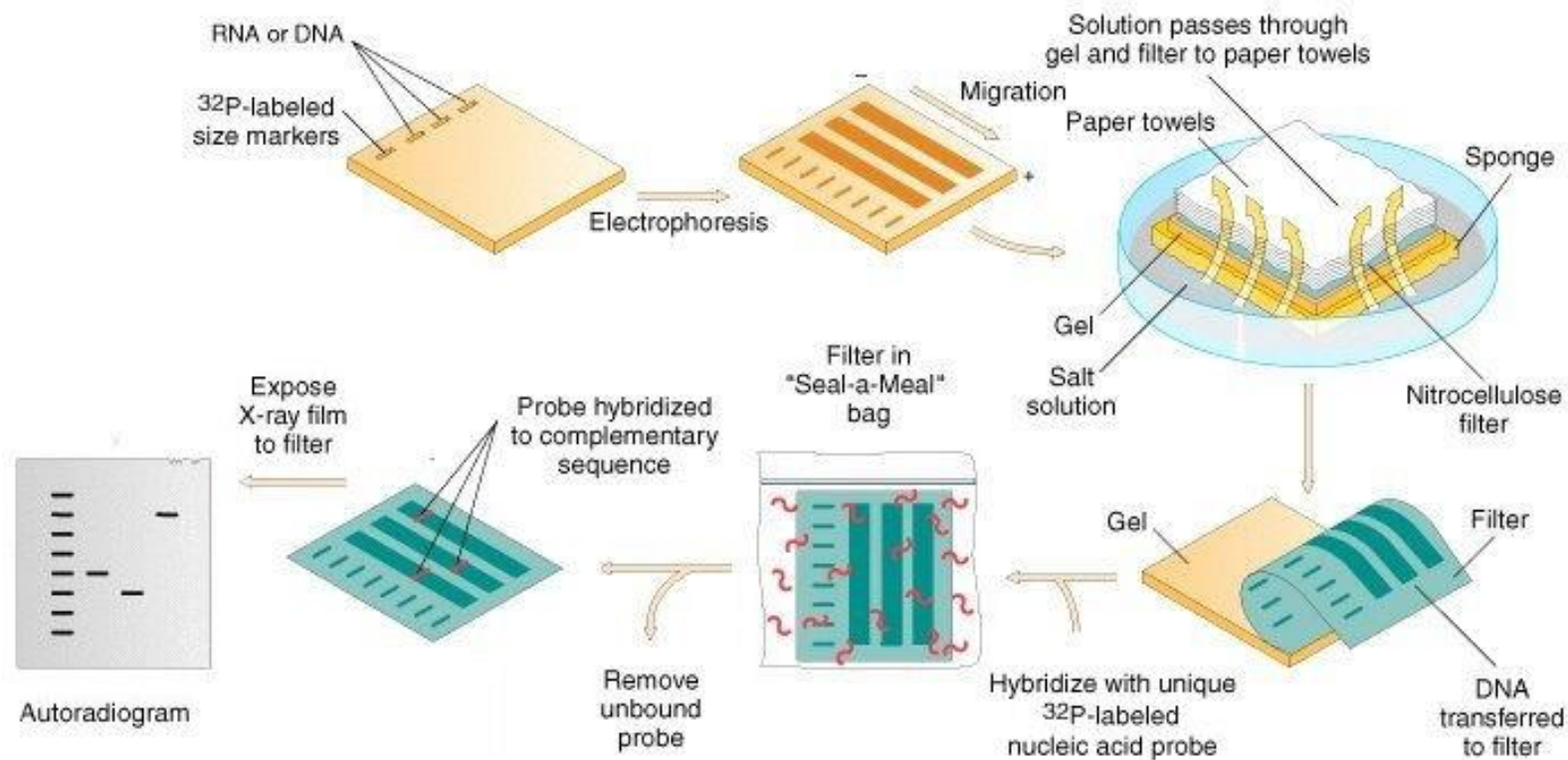
❖ Detekce NK

4) Radioaktivní vizualizace



vhodné pro vizualizaci malého množství DNA/RNA, specifické sekvence:

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





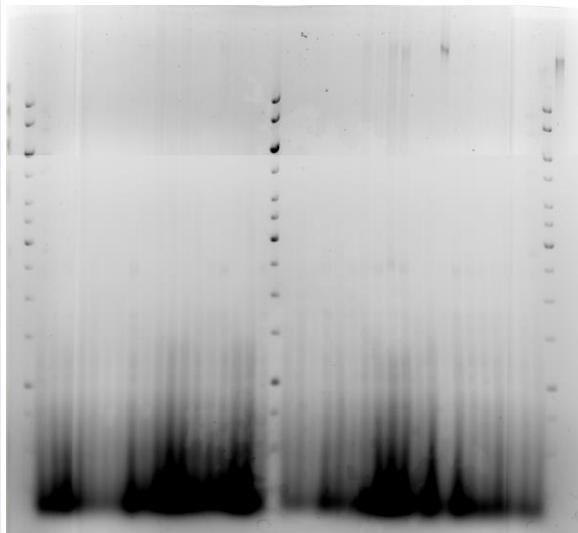
vhodné pro vizualizaci malého množství DNA/RNA, specifické sekvence:

Identický gel / membrána:

Gel:

EtBr vizualizace

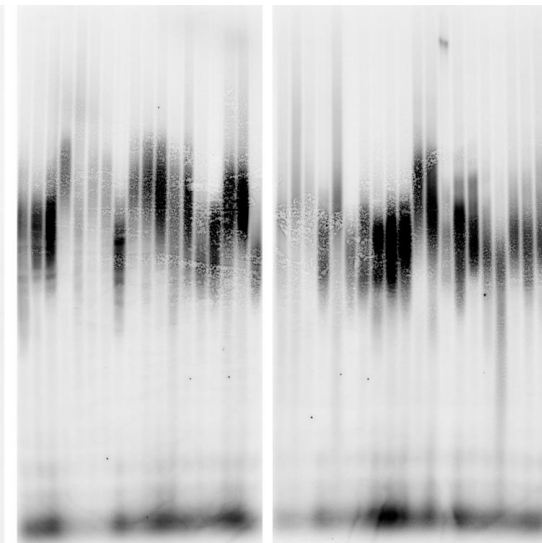
- celková genomová DNA je viditelná



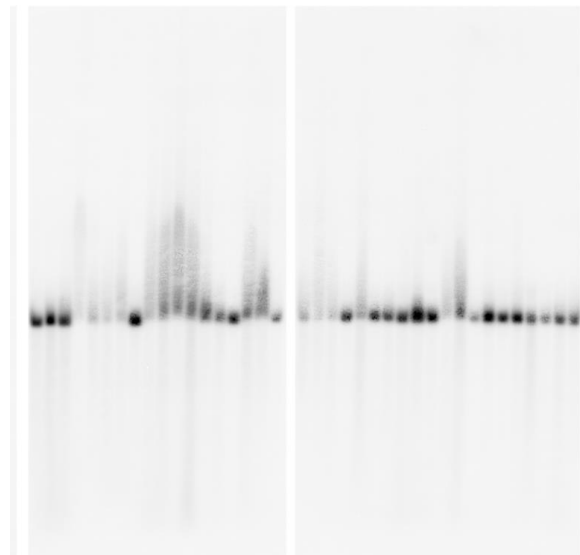
Membrána:

^{32}P koncové značení

- pouze telomerická DNA je vizualizovaná



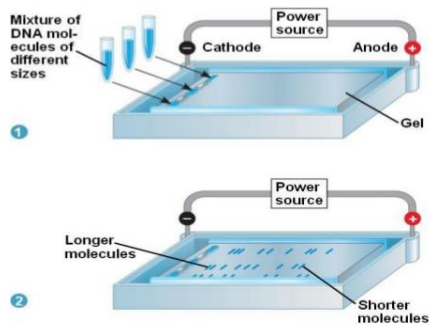
- pouze chloroplastová DNA je vizualizovaná



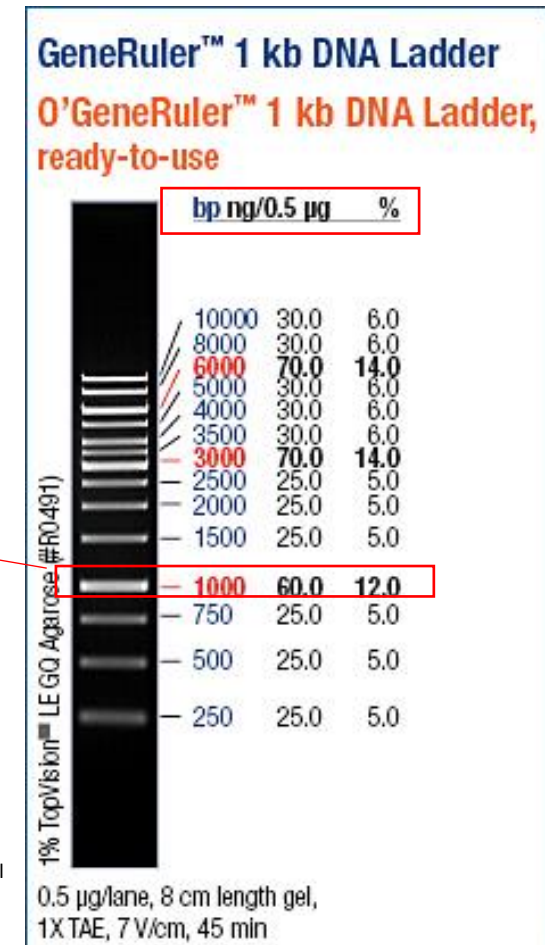
❖ Kvantifikace NK

1. Odhad z gelové elektroforézy

Koncentrace DNA a celkový výtěžek může být odečten po **gelové elektroforéze**
- porovnáme-li intenzitu bandu vzorku DNA s příslušným standardem.



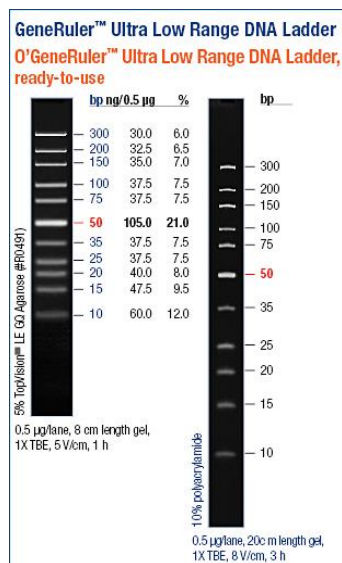
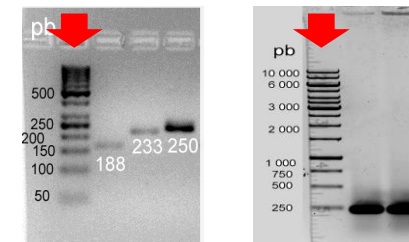
Obr.51 dostupne z foto autor



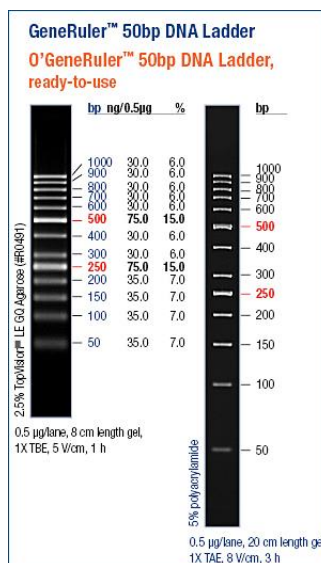
Obr.52 dostupne z
<https://eshop.biogen.cz/ogeneruler-1-kb-plus-dna-ladder-ready-to-use> vid. 01/09/2023

Výběr vhodného žebříčku (ladder)

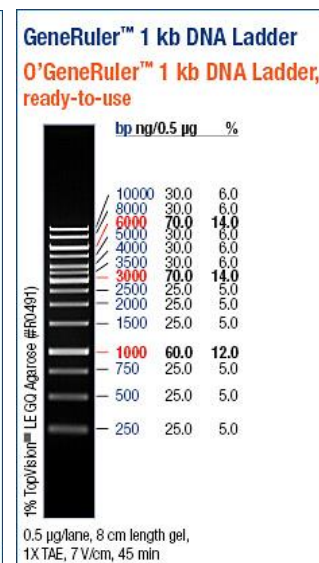
Separace stejných DNA fragmentů
„Low melting agarosa“ „Běžný“ agarózový gel



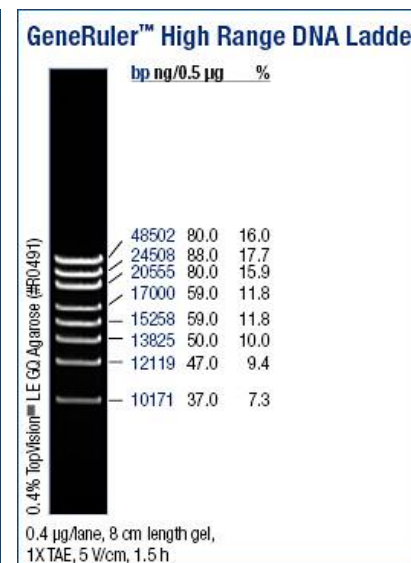
Pro rozlišení **super-krátkých fragmentů**: vhodné pro PAGE gely, např siRNA.



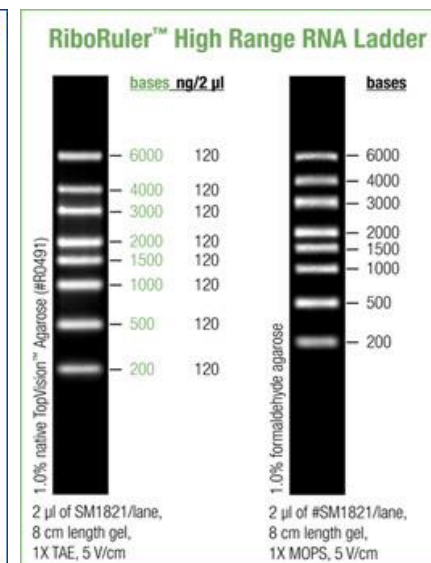
Pro rozlišení **velmi krátkých fragmentů**.



Nejčastěji používaný žebříček: vhodný pro rozlišení běžných PCR produktů.



Žebříček vhodný pro **vysokomolekulární dsDNA**.



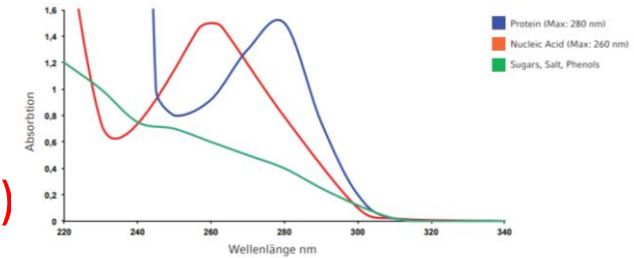
Žebříček **RNA transkriptů**: vhodné pro gely s RNA.

❖ Kvantifikace NK

2. Pomocí absorbance

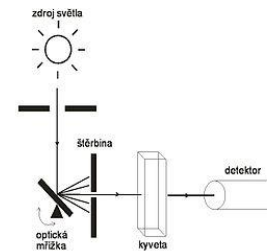
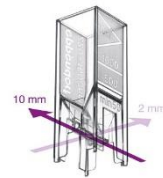
Absorpce světla vlnové délky:

- **260 nm** - nukleové kyseliny
- **280 nm** - proteiny
- **230 (320) nm** – kontaminace (fenolické látky, EDTA, močovina...)

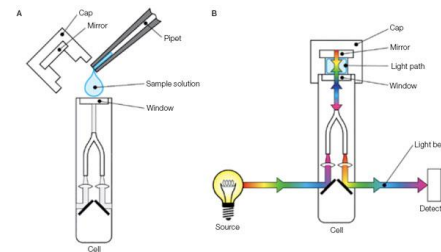


Purity Ratios:
a) $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$ → low a) Contamination by proteins
b) $A_{260}/A_{230} > 2.0$ → low b) Contamination by organic compounds including proteins

UV-transparentní kyvety:



Pro vzorky s malým objemem (~1 µl):

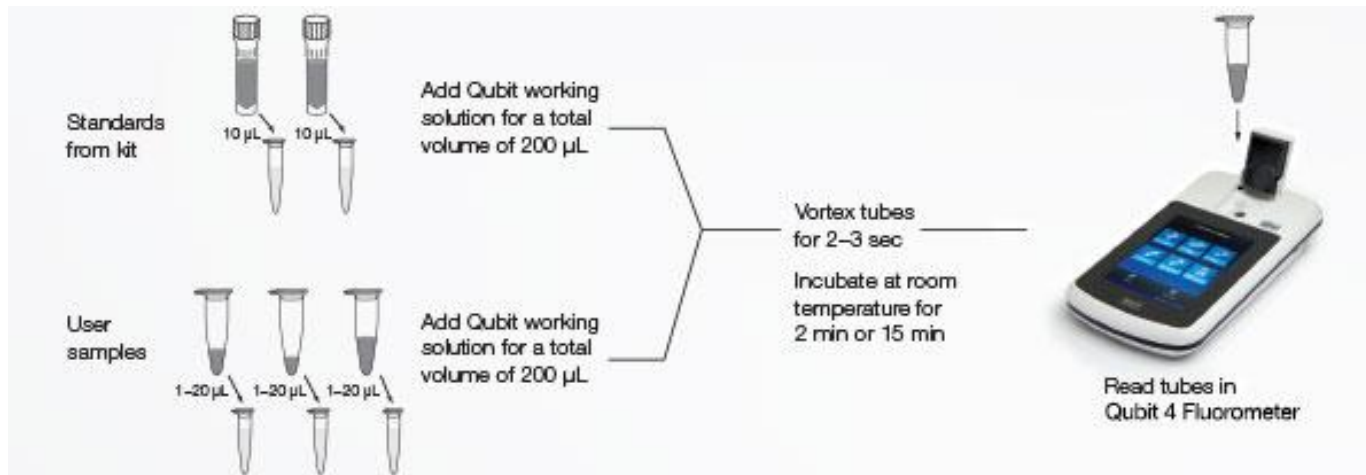


3. Fluorimetrická kvantifikace

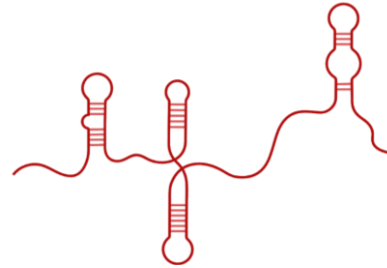
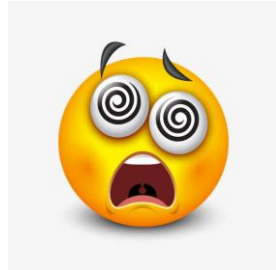
Vhodné zvláště pro málo koncentrované vzorky DNA / RNA

Invitrogen™ Qubit™ 4 Fluorometer

- KitPicoGreen **dsDNA** Assay Kit
- OliGreen **ssDNA** Assay Kit
- Qubit **RNA** HS (High Sensitivity) Assay Kit
- ...



Porovnání metod kvantifikace



RNA

Kvantifikace pomocí absorbance:



ng/ul:
4.037
4.283
4.308
2.950
2.602
3.455
700

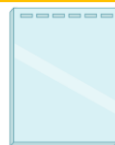
Kvantifikace pomocí absorbance:



ng/ul:
984
731
936
686



Detekce na 1% agarózovém gelu pomocí EtBr:



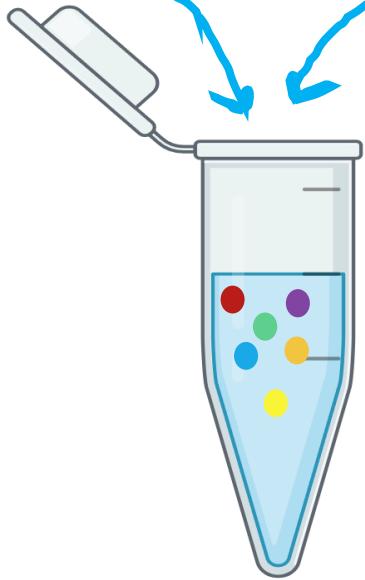
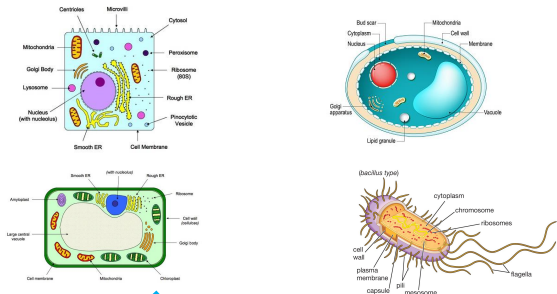
Kvantifikace pomocí fluorescence:



ng/ul:
298
278
388
322

výsledná koncentrace není ovlivněná kontaminací

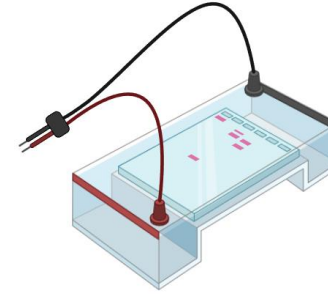
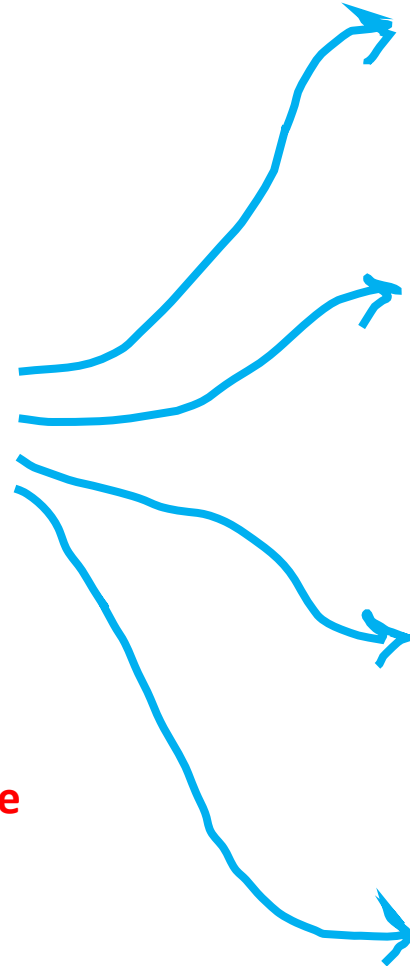
Souhrn: extrakce, purifikace a kvantifikace NK



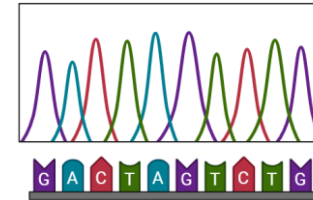
Extrakce



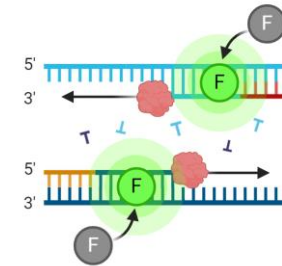
Purifikace



Detekce a kvantifikace



Sekvenace



Amplifikace pomocí PCR / real-time PCR

...



Krátká návštěva laboratoří...



Děkuji za pozornost

Pokročilé metody v současné genomice a proteomice

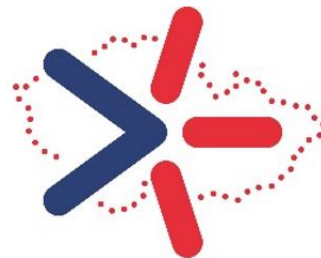
Metody extrakce, purifikace a kvantifikace nukleových kyselin (NK)



Metody sekvenování DNA a RNA



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



Národní
plán
obnovy

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY