



Research centre
for toxic compounds
in the environment

Bi5596

Moderní metody v ekotoxikologii

STUDIUM RNA & DNA I.

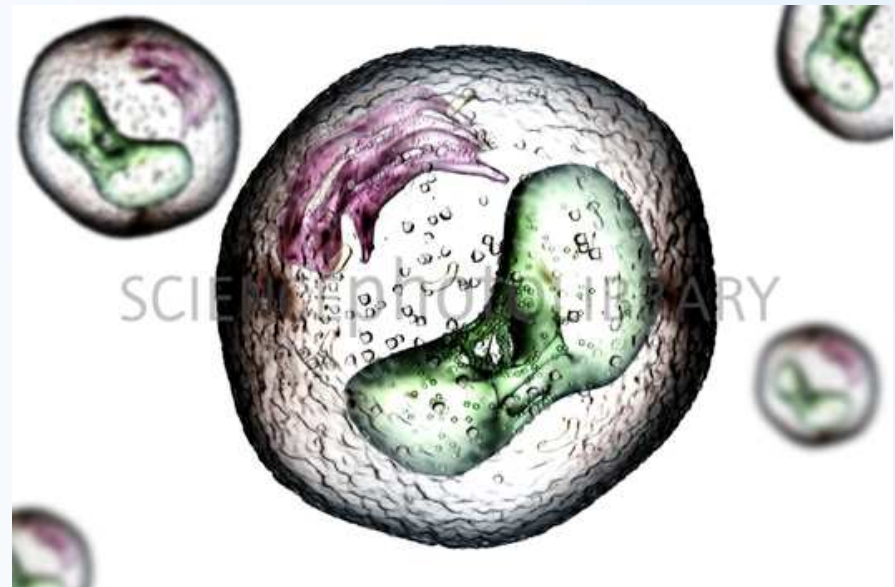
Jak je izolovat a jak s nimi nakládat

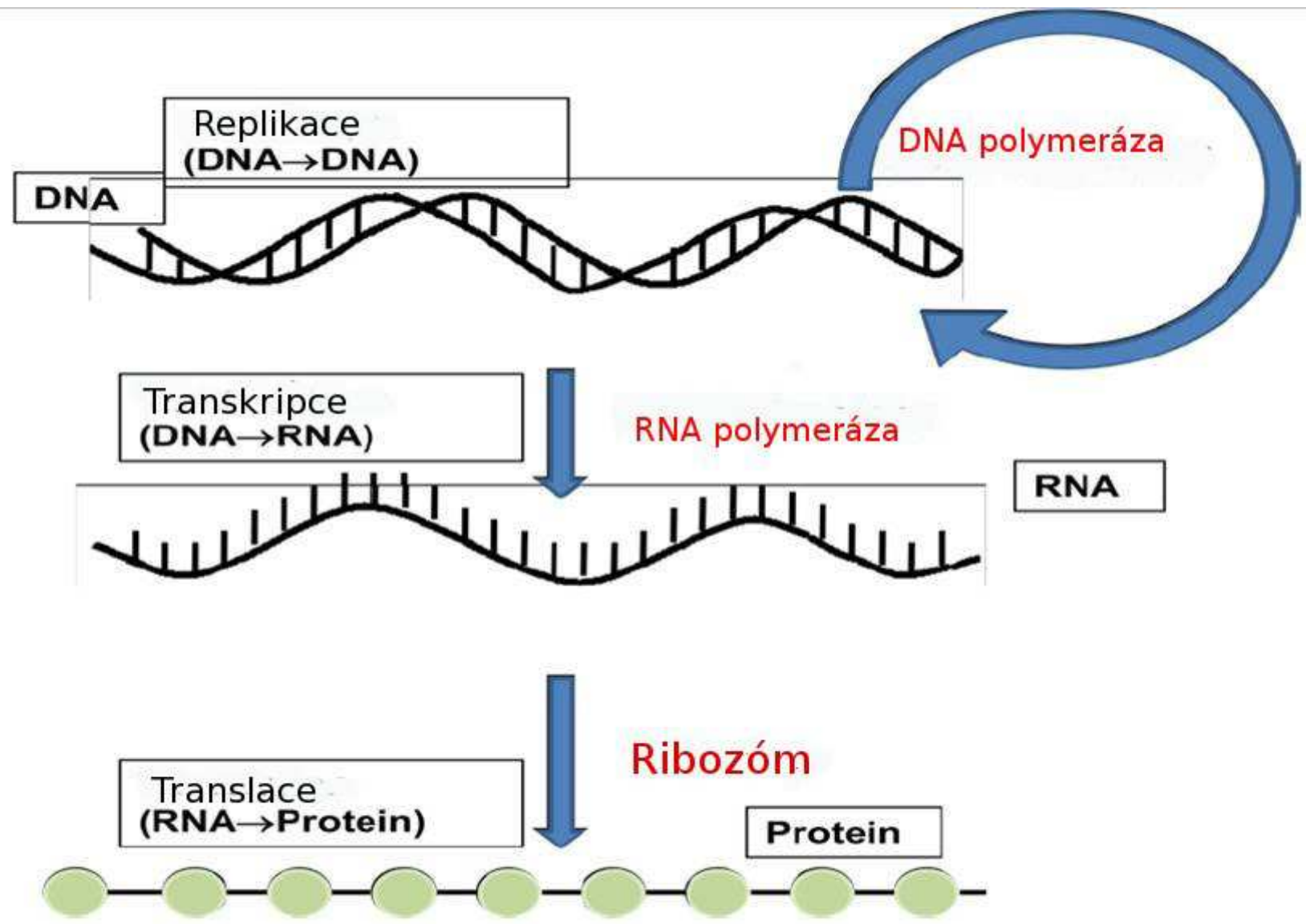
RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.
sovadinova@recetox.muni.cz

podzim 2014

CÍLE PŘEDNÁŠKY

- ✓ Co to je DNA a RNA
- ✓ Jak je získáme
- ✓ Jak je poznáme
- ✓ Jak je rozeznáme
- ✓ Jak modifikujeme
- ✓ Jak je zkoumáme

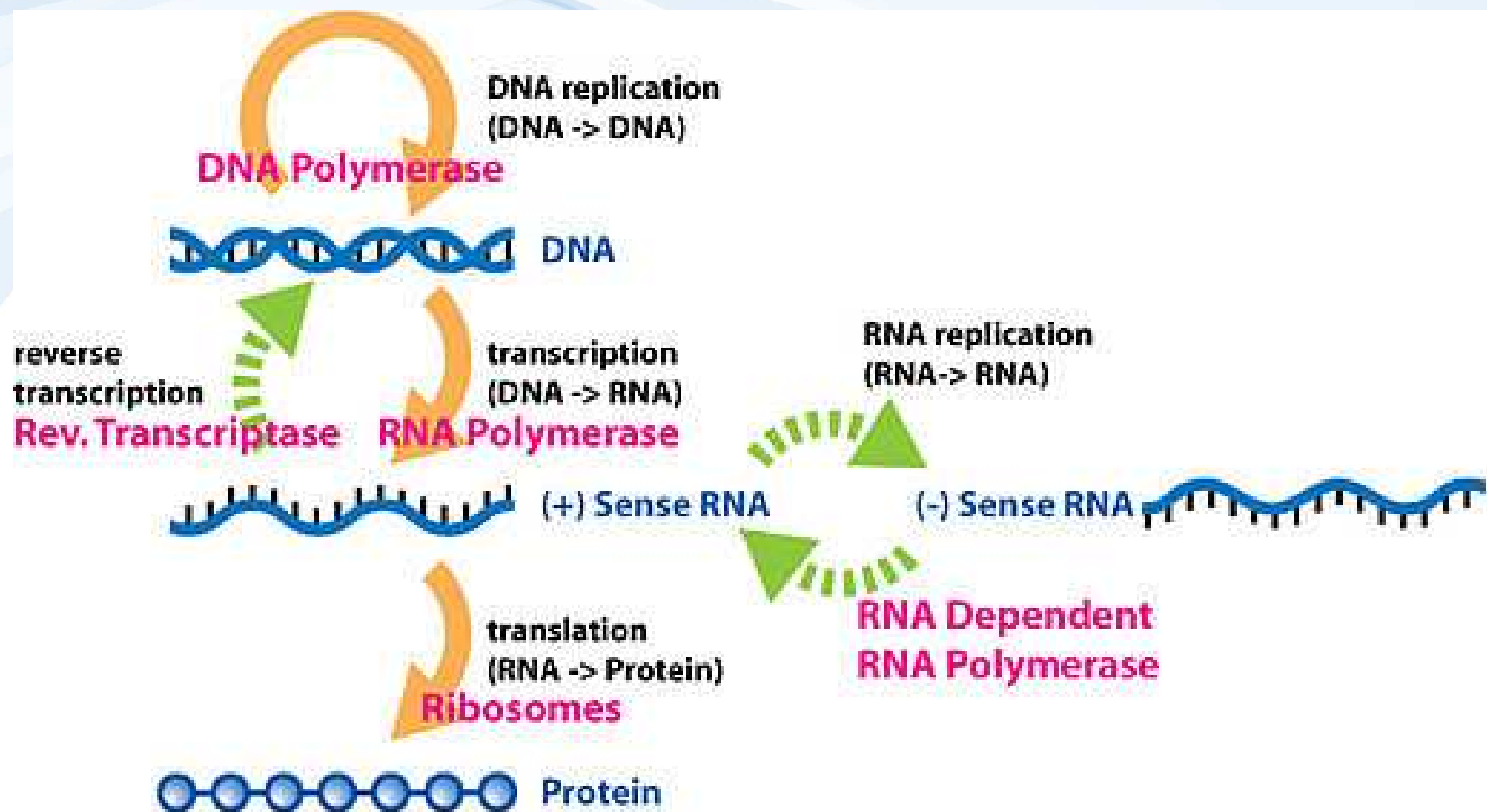




Proces přenosu genetické informace

(www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)





Centrální dogma molekulární biologie

http://en.wikipedia.org/wiki/Central_dogma_of_molecular_biology#cite_note-crick1970-2



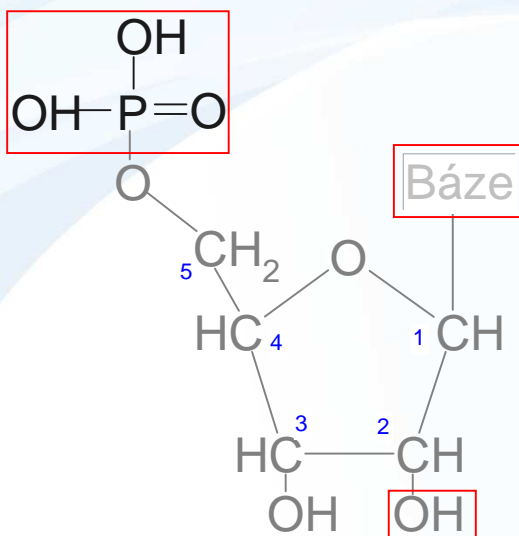
Research centre
for toxic compounds
in the environment

NUKLEOVÉ KYSELINY A JEJICH STRUKTURA A FUNKCE



Research centre
for toxic compounds
in the environment

NK: STRUKTURA

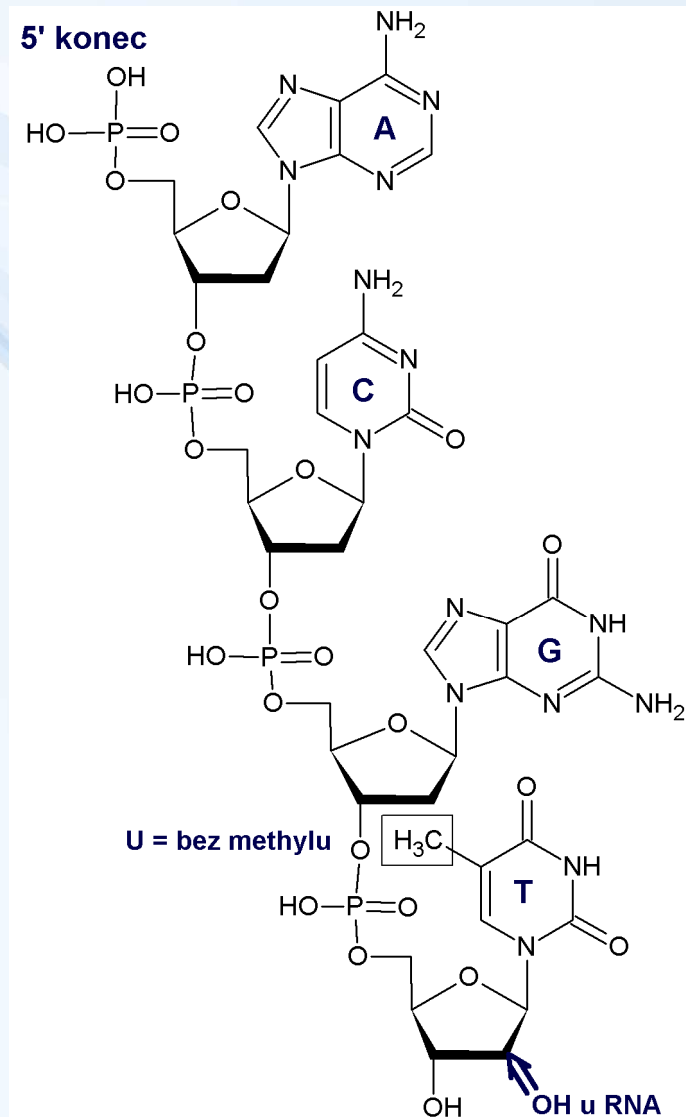


☐ nukleotidové polymery

⇒ 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

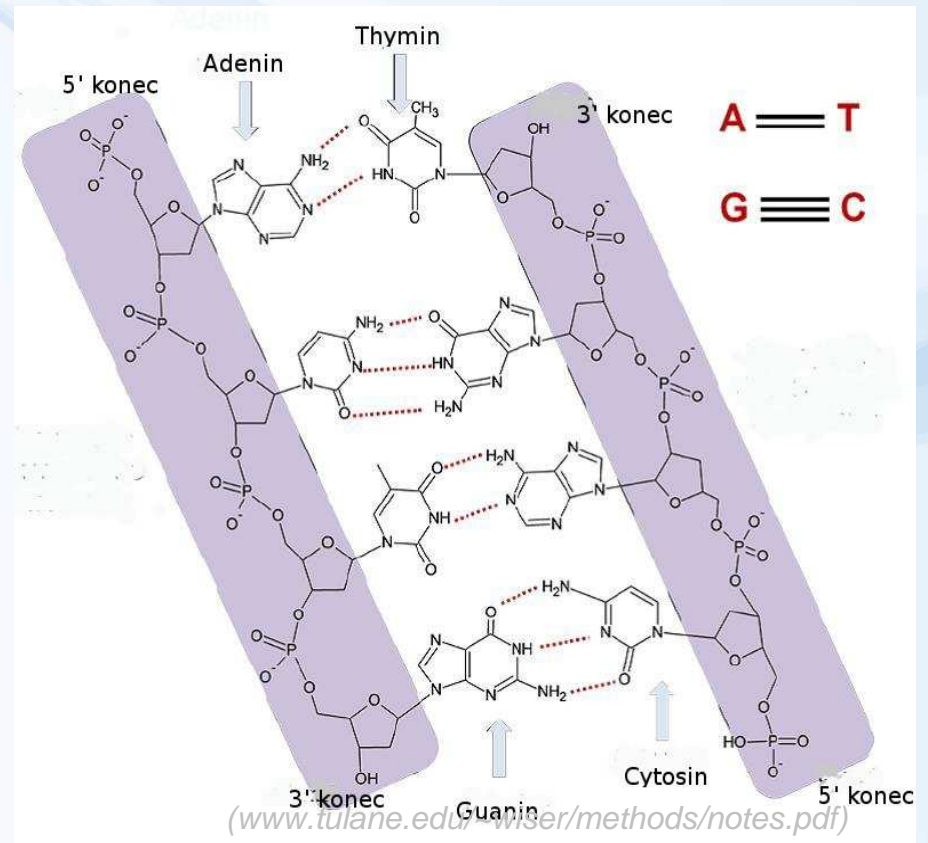
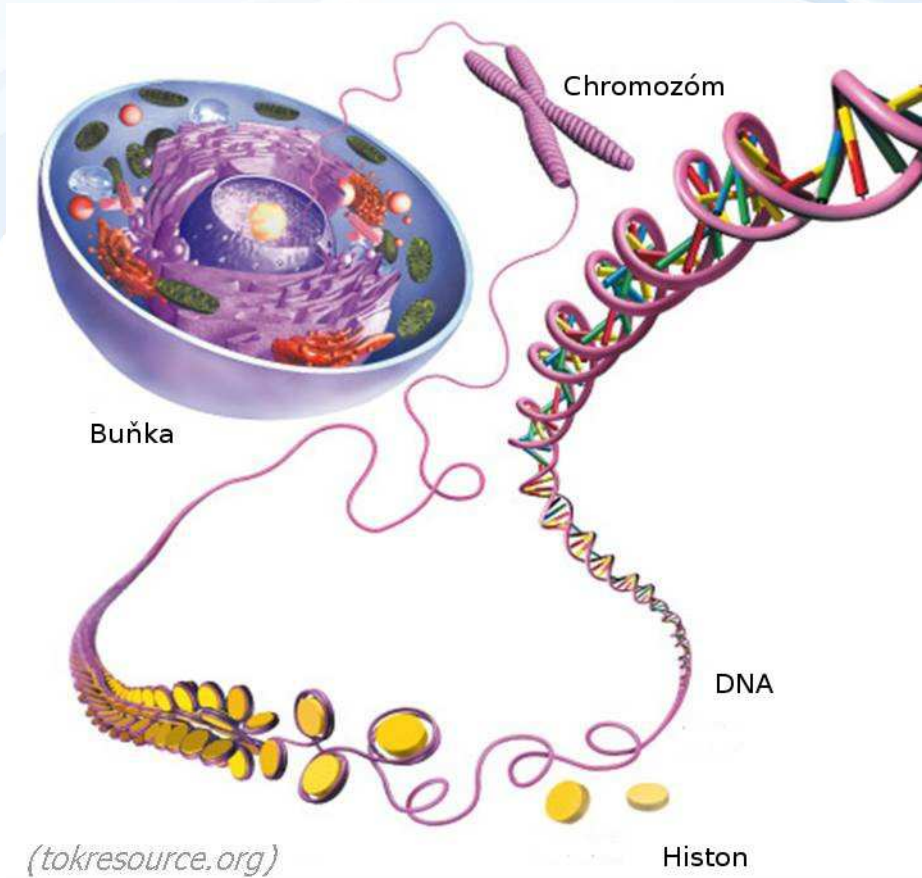


(www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)

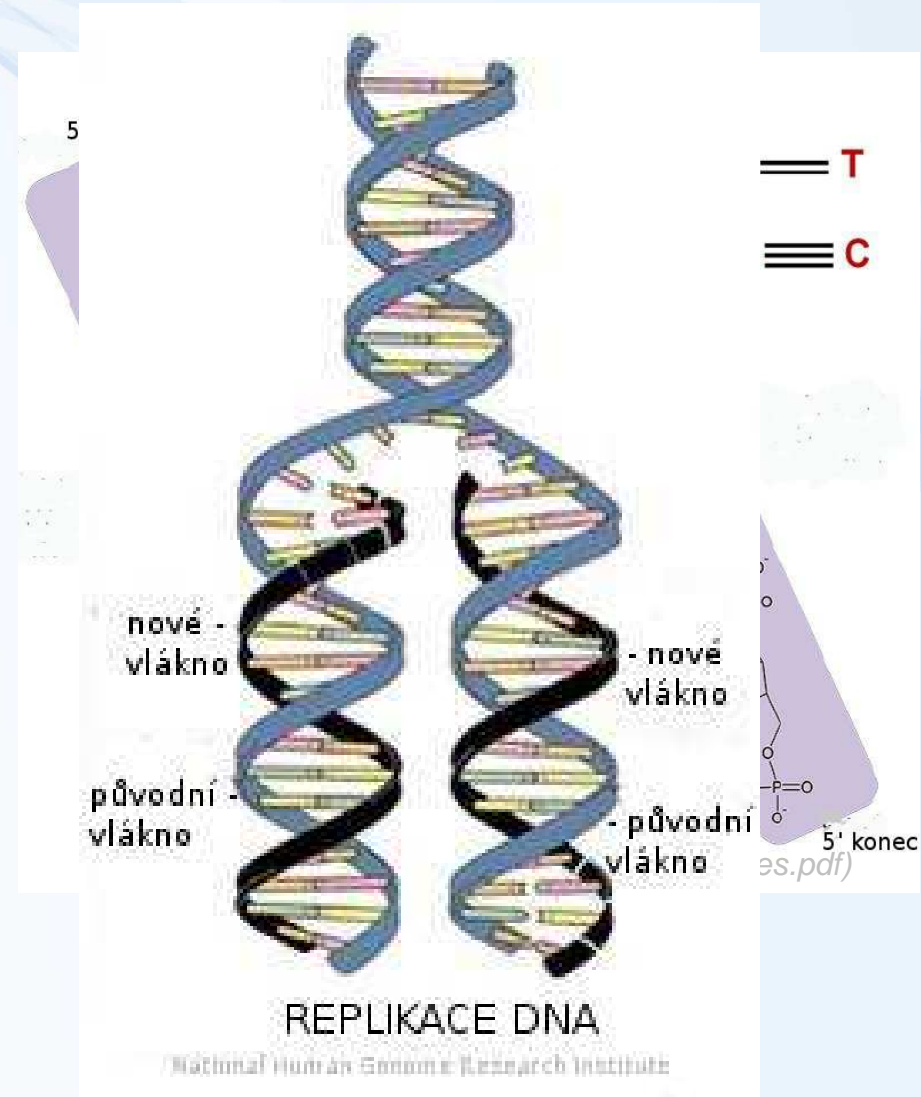
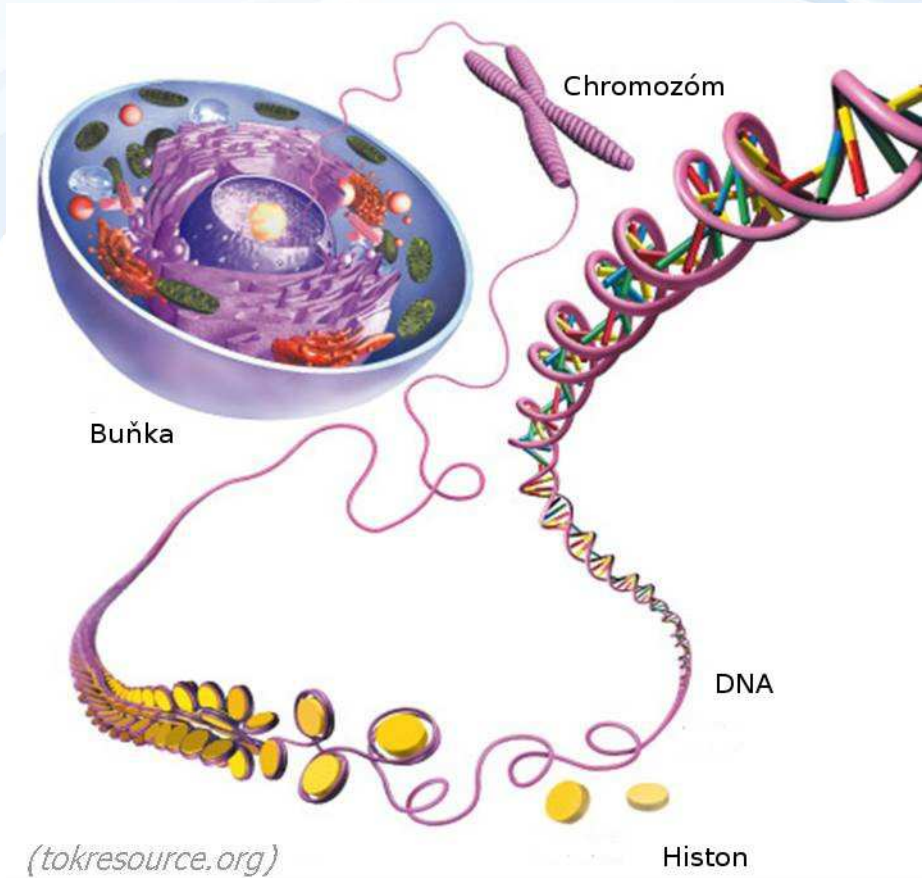


Research centre
for toxic compounds
in the environment

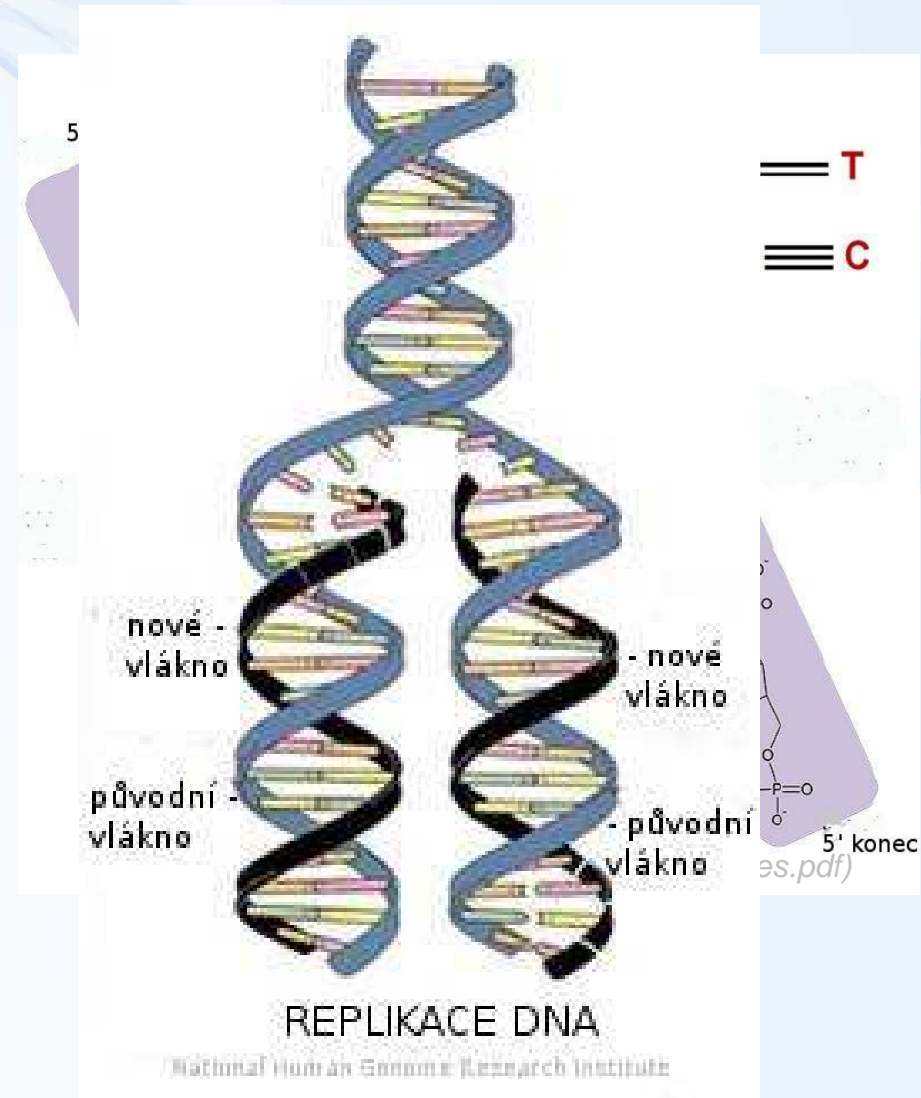
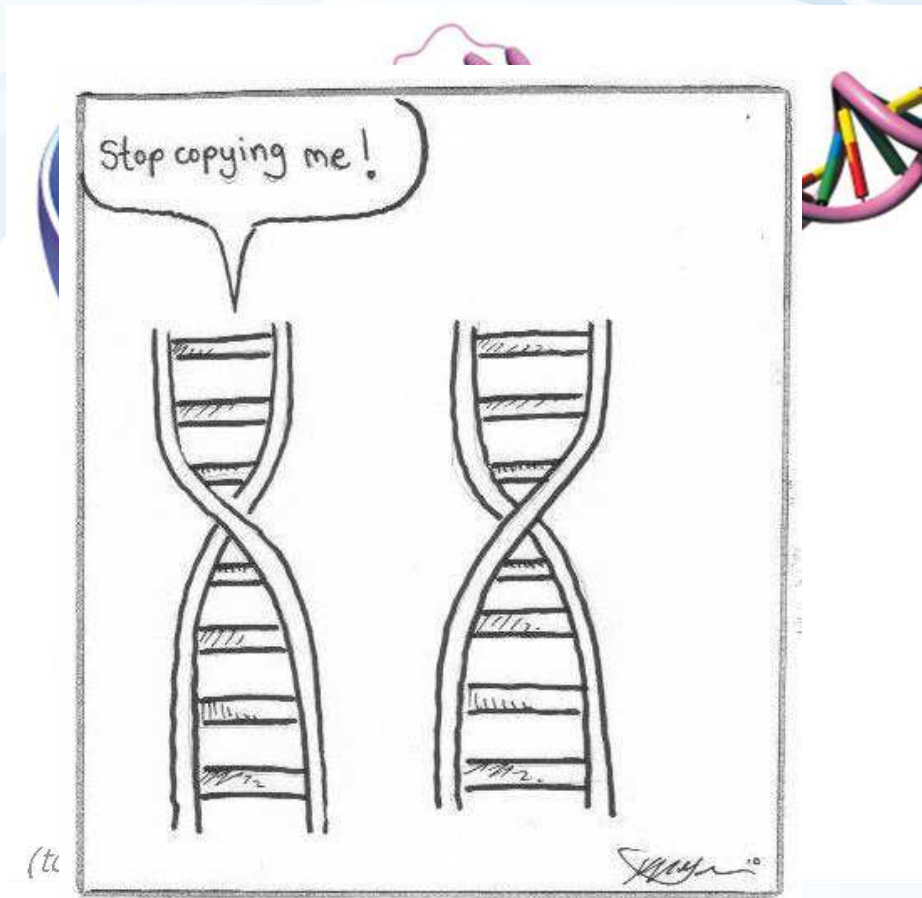
DNA: Struktura & funkce



DNA: Struktura & funkce



DNA: Struktura & funkce



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 asi 521 let (kosterní nález)

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

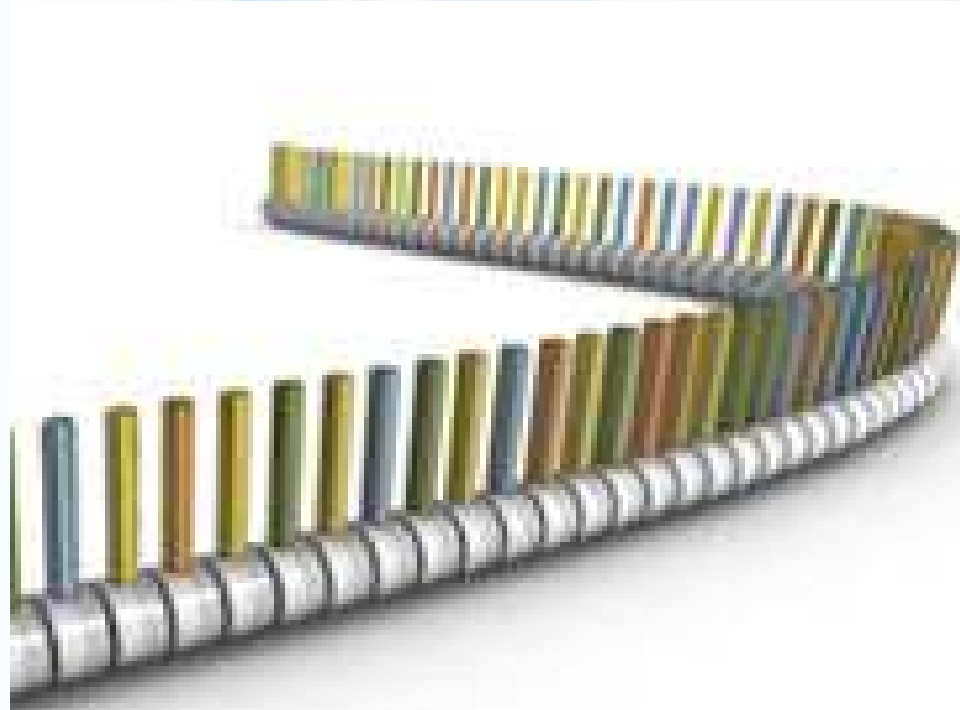
<http://www.astronauti.cz/news/novy-objev-dna-prepisuje-historii-evoluce/>

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

- ❑ roztok v pufru při -20° nebo -70°C \Rightarrow několik let, při 4°C \Rightarrow několik týdnů



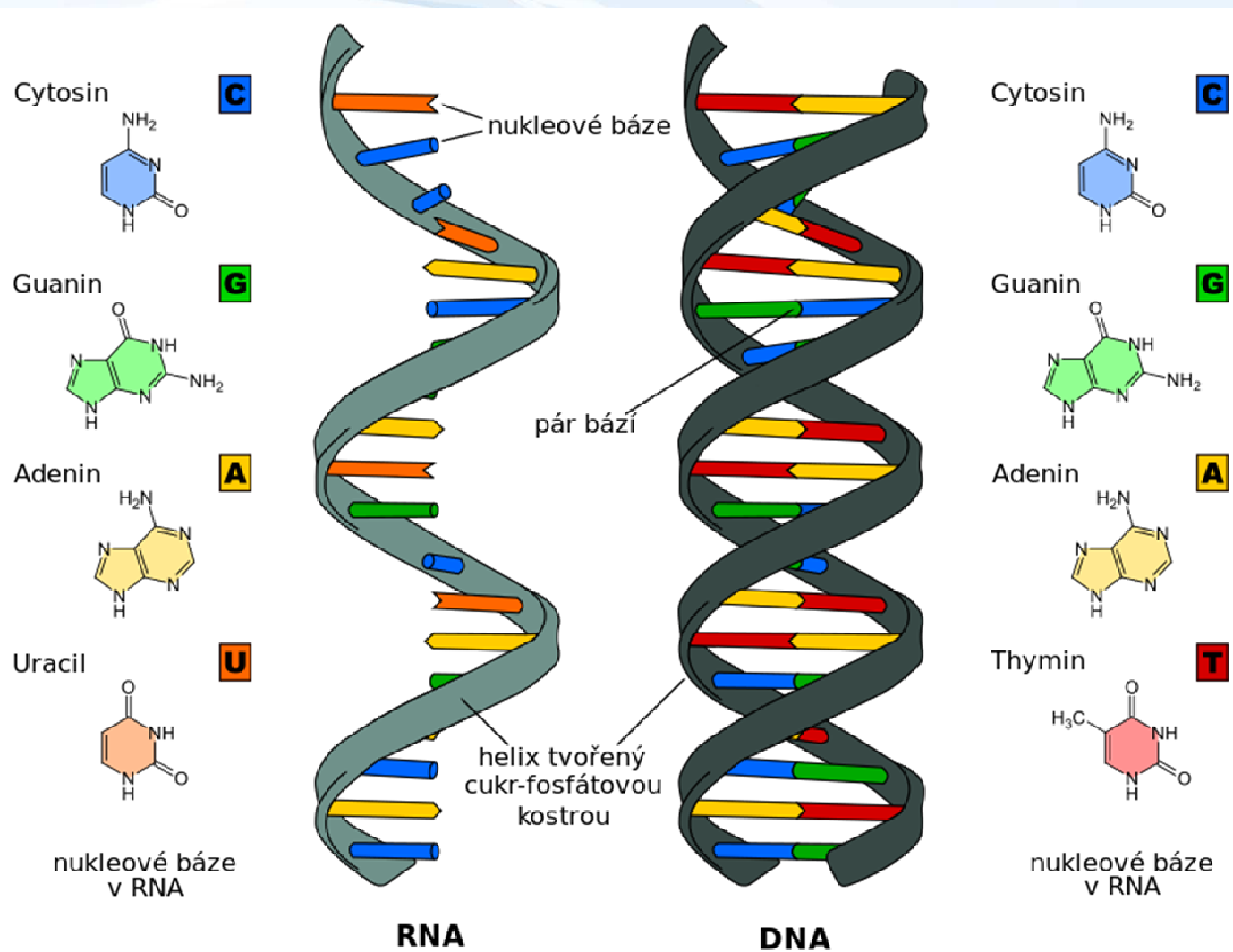
RNA: Struktura & funkce



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



RNA: Struktura & funkce



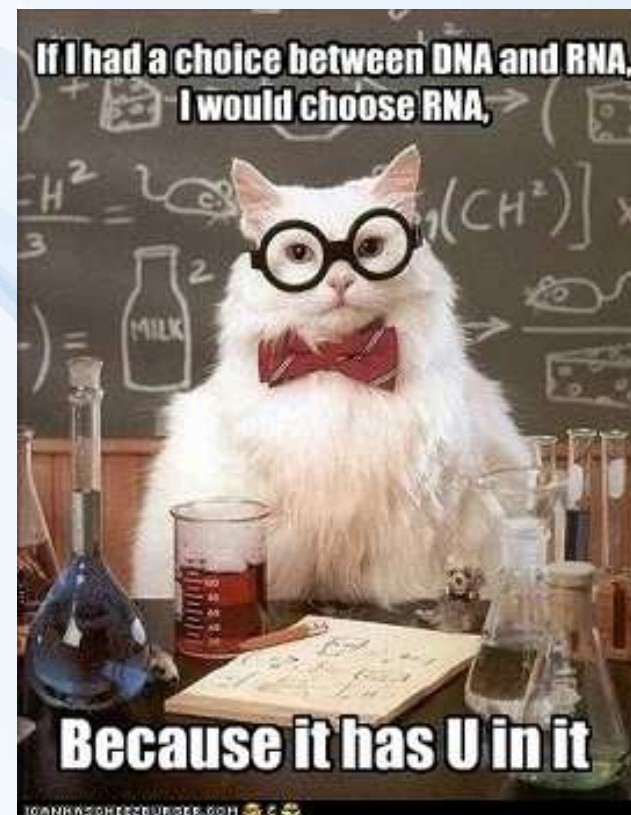
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Difference_DNA_RNA-EN.svg



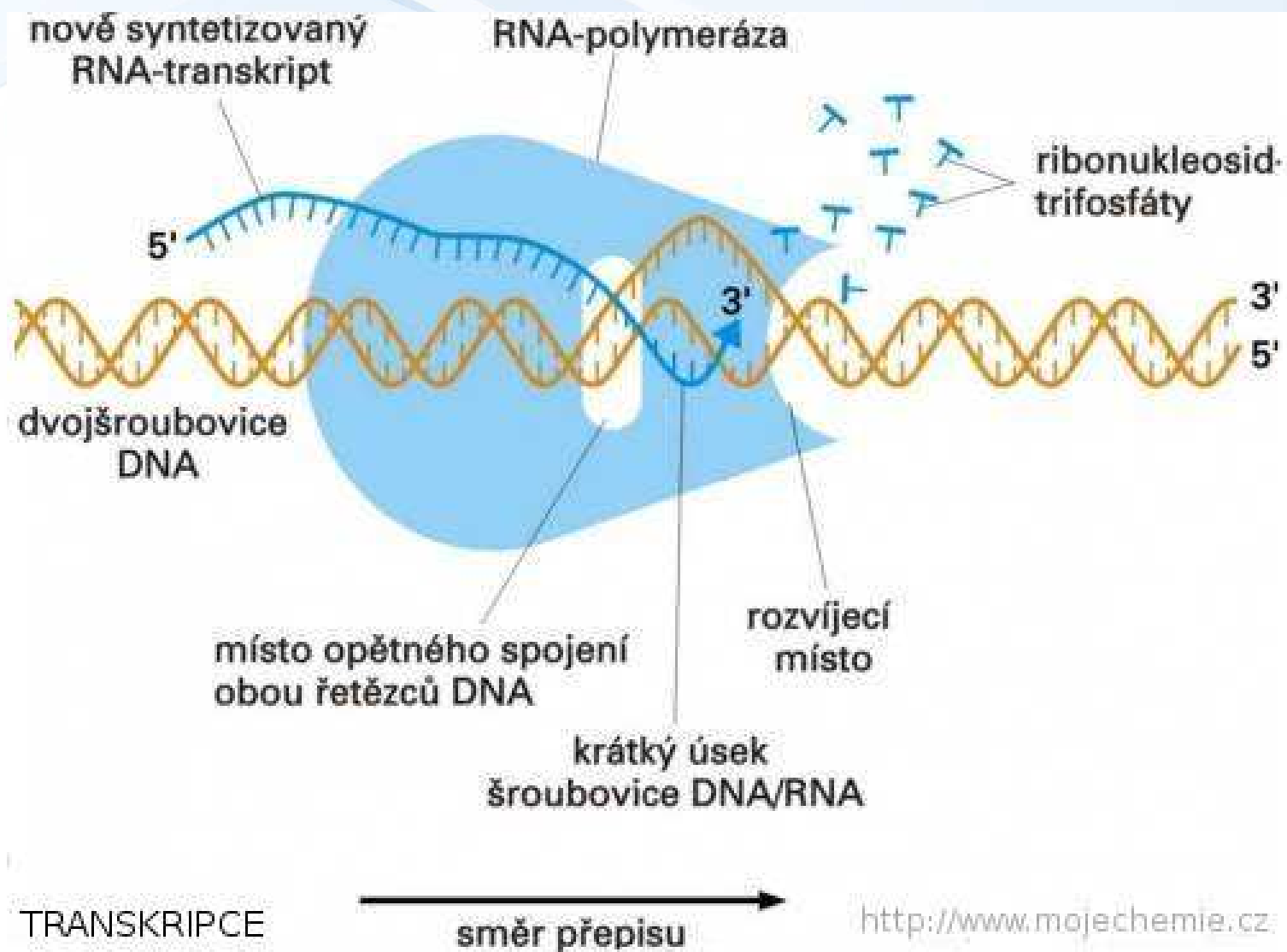
for toxic compounds
in the environment

RNA: Struktura & funkce

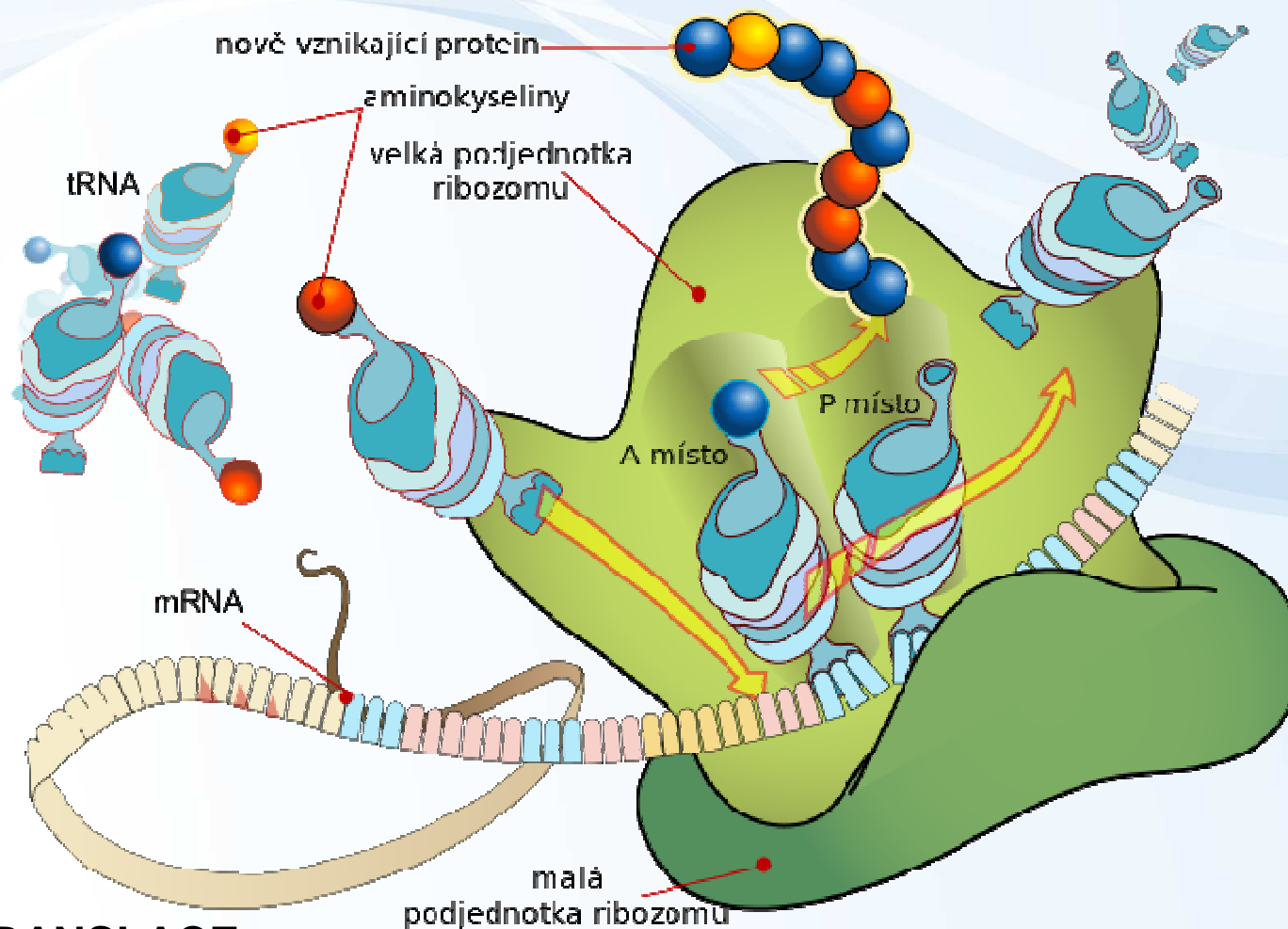
- ❑ cukr: **ribóza**, báze: **A, U, C, G**
- ❑ záporně nabitá \Rightarrow rozpustná ve vodě, naopak v ethanolu se sráží (bílá barva)
- ❑ sekundární a terciární struktury
- ❑ reaktivnější a flexibilnější, ale také nestabilnější než DNA \Rightarrow roztok v pufru při -20° stabilní pouze několik týdnů
-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



RNA: Struktura & funkce



RNA: Struktura & funkce



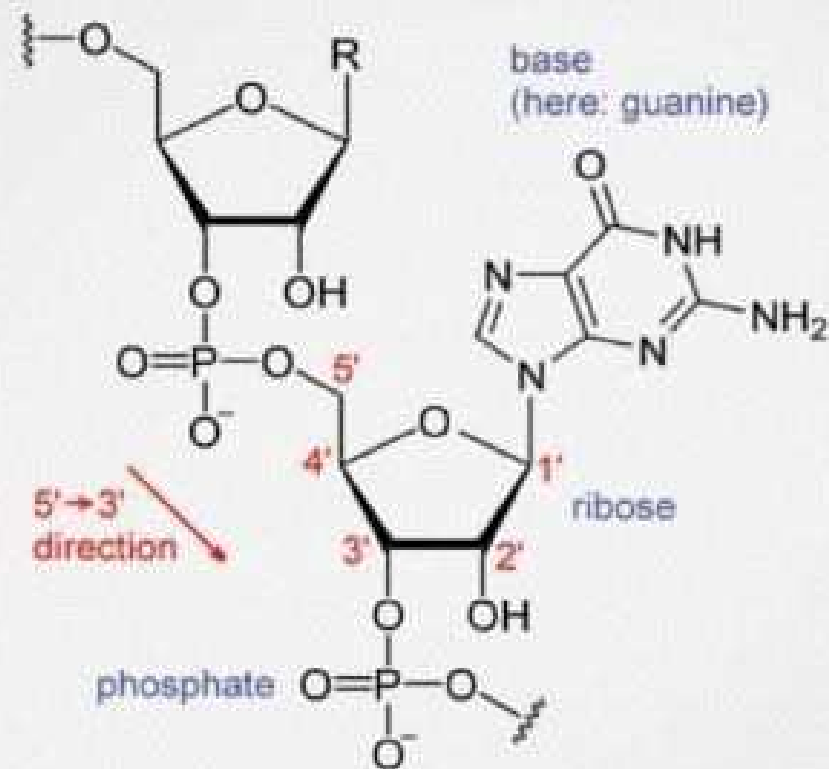
TRANSLACE

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ribosome_mRNA_translation_en.svg)



RNA: Struktura & funkce

IF I AM LOST IN TRANSLATION



JUST BLAME MY RNA

© WORDS & UNWORDS

TRANS

(<https://c>

SCHOOLFAILBLOG.ORG

n_en.svg)



Research centre
for toxic compounds
in the environment



K0026724-Translation.mp4

16

NK: Kde najít sekvence?

- ❑ **GenBank:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
 - název místa, délka sekvence, typ molekuly (DNA/RNA), nukleotidová sekvence

- ❑ **Entrez:**
 - prohledává všechny databáze asociované s NCBI

- ❑ **EMBL:** <http://www.embl.de/>
 - databáze Evropského bioinformačního institutu

- ❑ <http://molbiol-tools.ca/>
 - sekvence a jejich analýza

NUKLEOVÉ KYSELINY A JEJICH IZOLACE



Research centre
for toxic compounds
in the environment

NK: IZOLACE

□ volba techniky záleží na:

1. typu izolované NK

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

2. typu a množství materiálu

3. požadované čistotě

4. požadovaném množství

5. následné aplikaci



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 σ^{70} factor of the RNA polymerase complex, thereby regulating transcription of σ^{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.

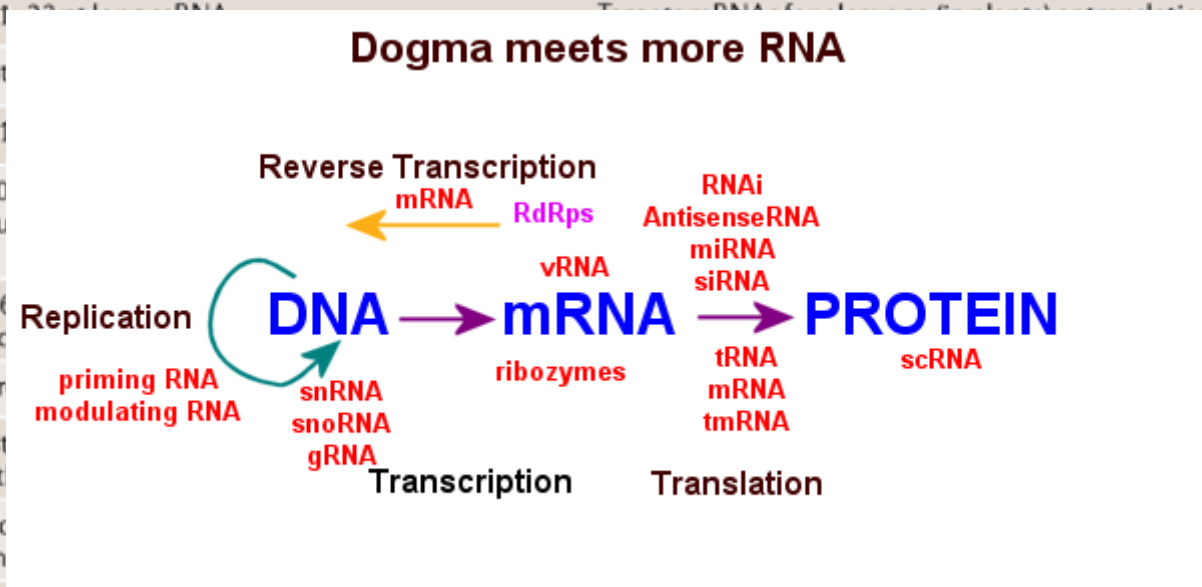
Hüttenhofer *et al.* *Nature Reviews Genetics* advance online publication;
published online 18 April 2006 | doi:10.1038/nri1855



Research centre
for toxic compounds
in the environment

nature
REVIEWS GENETICS

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	Transcription factor-mediated gene expression inhibition (in mammals)
siRNA	21–23 nt	Transcription factor-mediated gene expression inhibition (in mammals)
raRNA	Small, 21–23 nt	Transcription factor-mediated gene expression inhibition (in mammals)
snoRNA	~50–200 nucleotides	Modification of rRNA and snRNA (in Archaea only); C/D box snoRNAs: modification of a target RNA, H/ACA box snoRNAs: modification of rRNA
gRNA	Small, ~60–70 nt	Classical guide RNA for the formation of small ribosomes
snRNA	Structural	Small nuclear RNA; U4, U5 and U6 snRNAs
rRNA	Highly structured, several thousand nucleotides	Structural and catalytic components of the ribosome; formation (for large rRNA)
Xist RNA	~17 kb long, X chromosome-specific	X-chromosome inactivation
tRNA	Highly structured, sized between 70 and 90 nt	Transfer receptor molecules for amino acids, carries 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 σ^{70} factor of the RNA polymerase complex, thereby regulating transcription of σ^{70} promoters



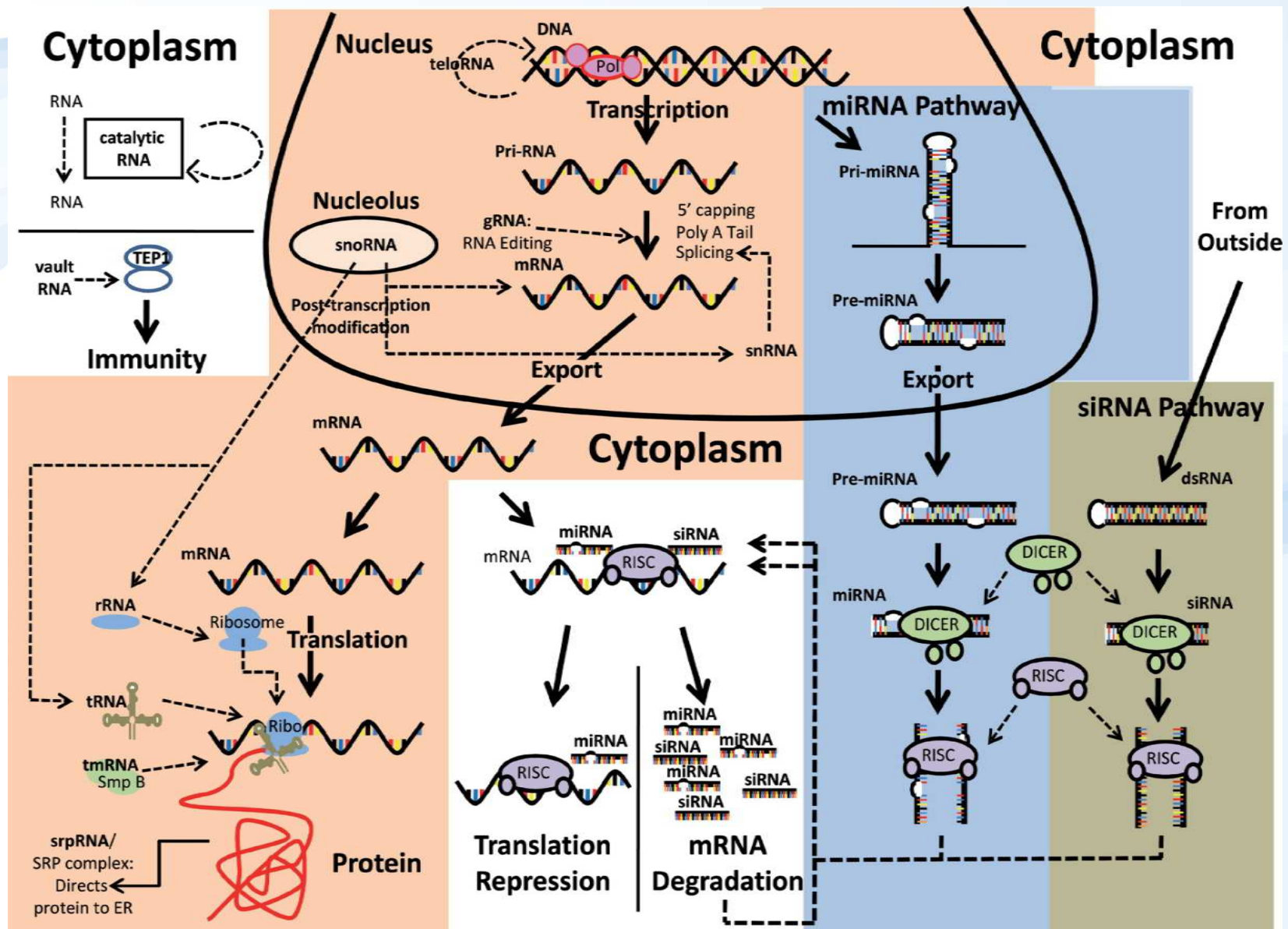
gRNA, classical guide RNA; miRNA, microRNA; ncRNA, non-protein-coding RNA; rasiRNA, repeat-associated siRNA; rRNA, ribosomal RNA; siRNA, small interfering RNA; snRNA, small nuclear RNA; snoRNA, small nucleolar RNA; SRP, signal recognition particle; Xist, X-(inactive)-specific transcript.

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





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

□ 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

Klasické v roztoku „organické“

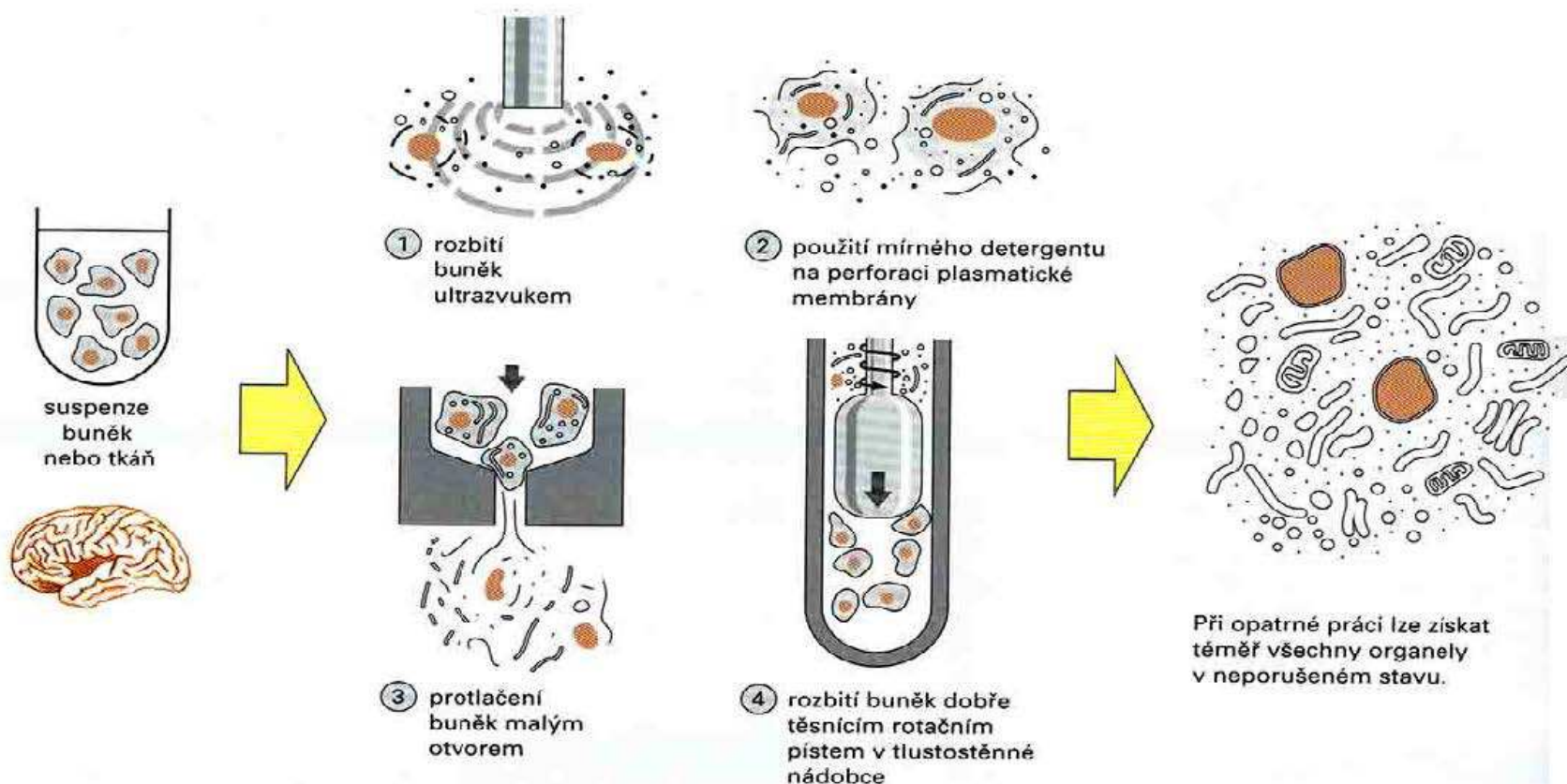
- ❑ Organické látky

- ❑ **Základní kroky:**

1. lýze buněk
2. přidavek enzymů
3. extrakce NK
4. precipitace
5. přidavek enzymů



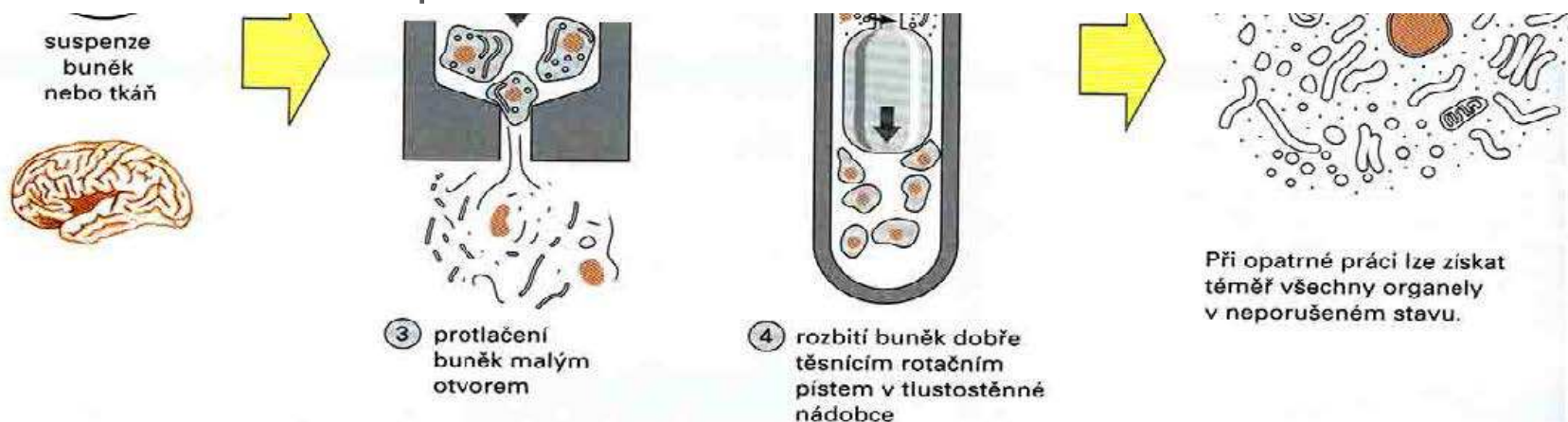
1. Lýze buněk



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

1. Lýze buněk

- detergenty (SDS, Triton X-100)
- organická rozpouštědla
- zásadité látky (NaOH)
- osmotický šok
- povaření
- chaotropní činidla



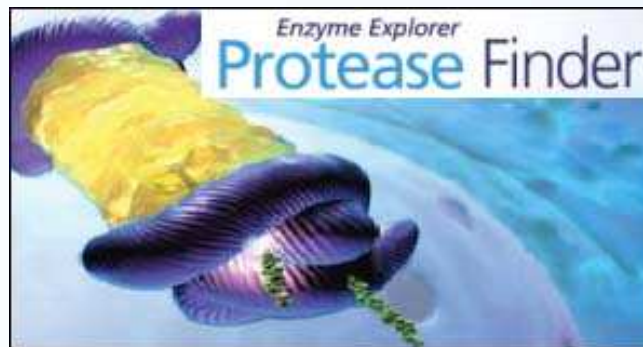
ALBERTS, B, D BRAY a A JOHNSON. *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. Espero Publishing, 2005. 740 s. [ISBN 80-902906-2-0](#).

2. Přídavek enzymů

- štěpení nechtěných složek v lyzátu:
 - proteázy (např. proteináza K) ✂ proteiny
 - nukleázy ✂ nechtěné NK



<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/nucleases.html>



<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/protease-finder.html>



2. Extrakce NK

Fenol-chloroformová extrakce

- fenol ⇒ organické rozpouštědlo
 - vysoce čistý pro molekulární techniky, skladuje se při -20°C
 - sytí se Tris pufrem (pH 4: separuje se RNA; pH 7-8: separuje se DNA) s EDTA a NaCl, skladuje se při 4°C
 - oxidace 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:

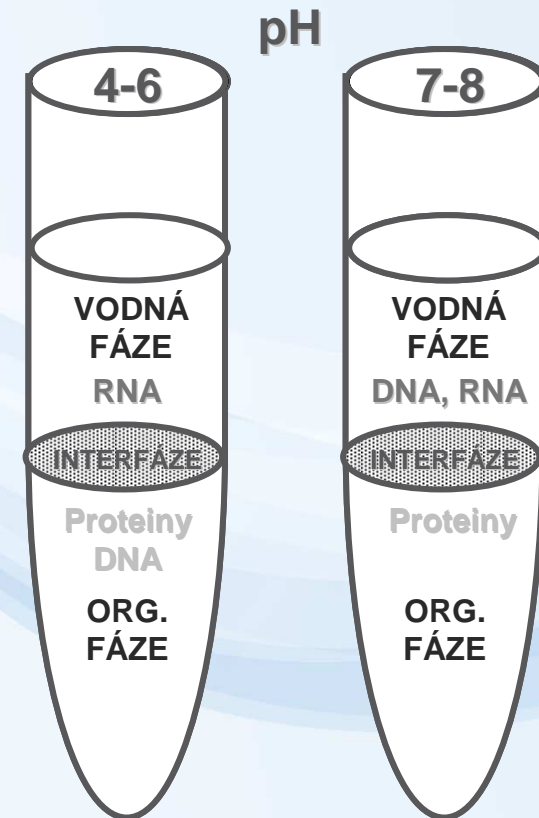
- 1 objem vzorku : 1 objem fenolu
- důkladně obě fáze smíchat
- centrifugace ⇒ NK v ve vodné fázi a proteiny v organické („fenolové“)

☐ modifikace:

- směs fenol:chloroform:isoamyl alkohol (25:24:1)
- Trizol® ⇒ monofázický roztok fenolu a guanidin thiokyanátu izoluje NK v přítomnosti chloroformu

☐ nevýhody:

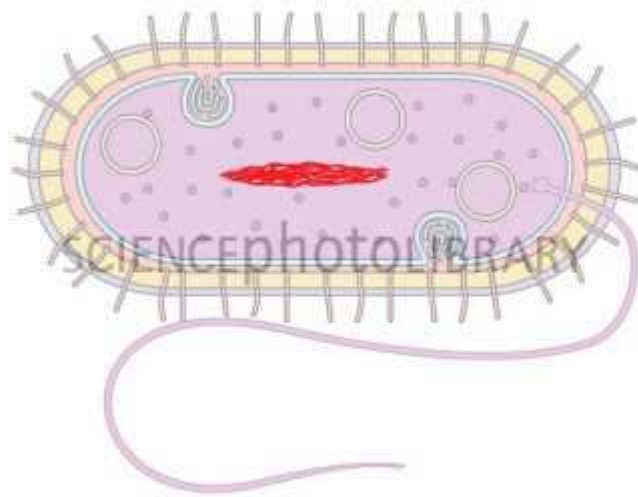
- časově náročné
- nebezpečí kontaminace
- nebezpečné chemikálie ⇒ digestoř



2. Extrakce NK

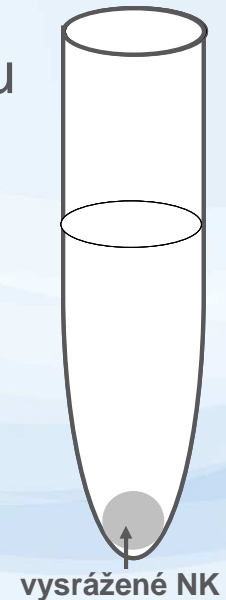
Alkalická extrakce

- ❑ selektivní alkalická denaturace (NaOH) vysokomolekulové chromozomální DNA oproti plazmidové DNA v přítomnosti SDS
- ❑ aplikace: plazmidová DNA



4. Precipitace NK

- ❑ ethanol, isopropanol, PEG, soli \Rightarrow vysráží NK z roztoku
- ❑ postup:
 - 2 objemy vzorku : 2-2,5 objemu ethanolu
nebo
 - 1 objem vzorku : 1 objem isopropanolu
 - inkubace při -20°C (min. 2 h)
 - centrifugace
 - oplach 70% etanolem (odstranění solí)
 - rozpuštění ve vodě nebo pufru (TE pufr o pH 7,5)



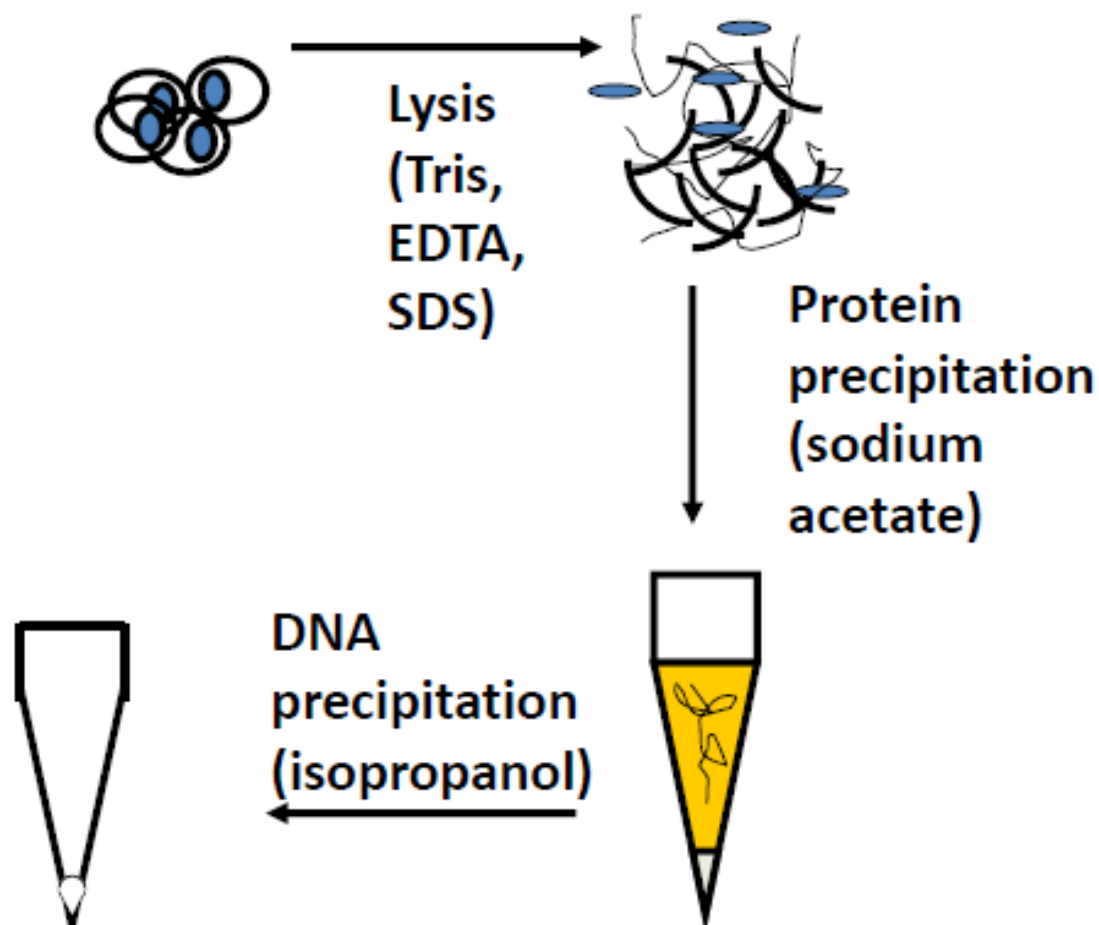
5. Přídavek enzymů

- ❑ štěpení nechtěných složek v lyzátu:
 - nukleázy ✂ nechtěné NK

NK: IZOLACE

Klasické v roztoku „anorganické“

1. Lýze buněk ⇒ SDS
2. RNA odstraněna RNázami
3. Proteiny precipitovány v koncentrovaném roztoku solí
4. DNA precipitována ethanolem a rehydratována



Copyright 2010 American Society of Cytopathology



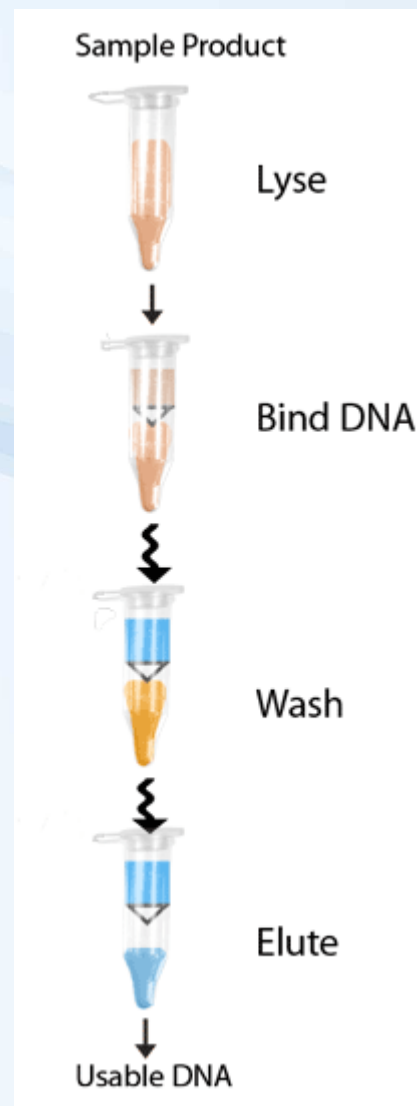
NK: IZOLACE

Adsorpční na pevnou matici

- adsorpce NK na pevnou fázi závisí na pH a obsahu soli 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

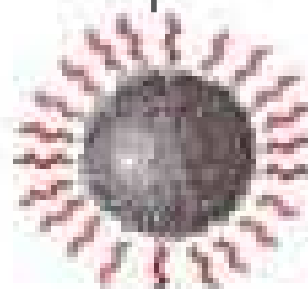
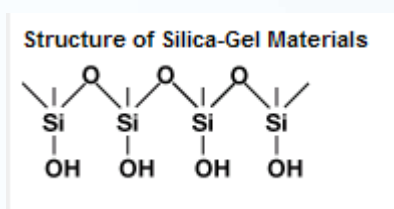


1. Adsorpce na silikát

- NK v přítomnosti chaotropních solí (jodid sodný, guanidinové soli) adherují na silikátový povrch (na sklo)

1. Lýze

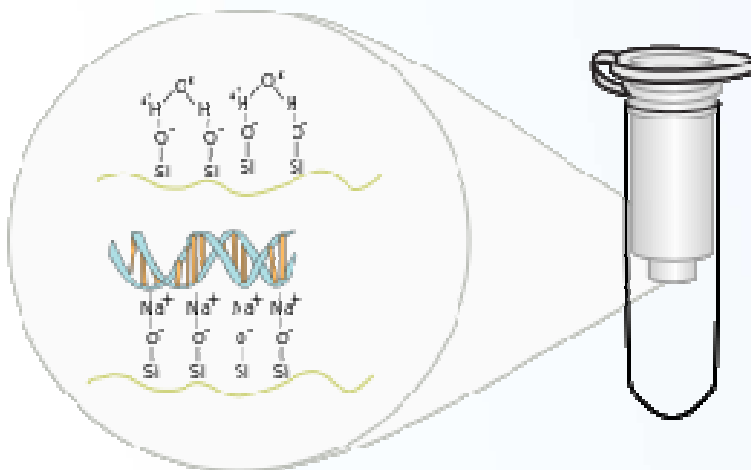
2. Přidání chaotropních solí a protřepání se silikátovými částicemi



- ## 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

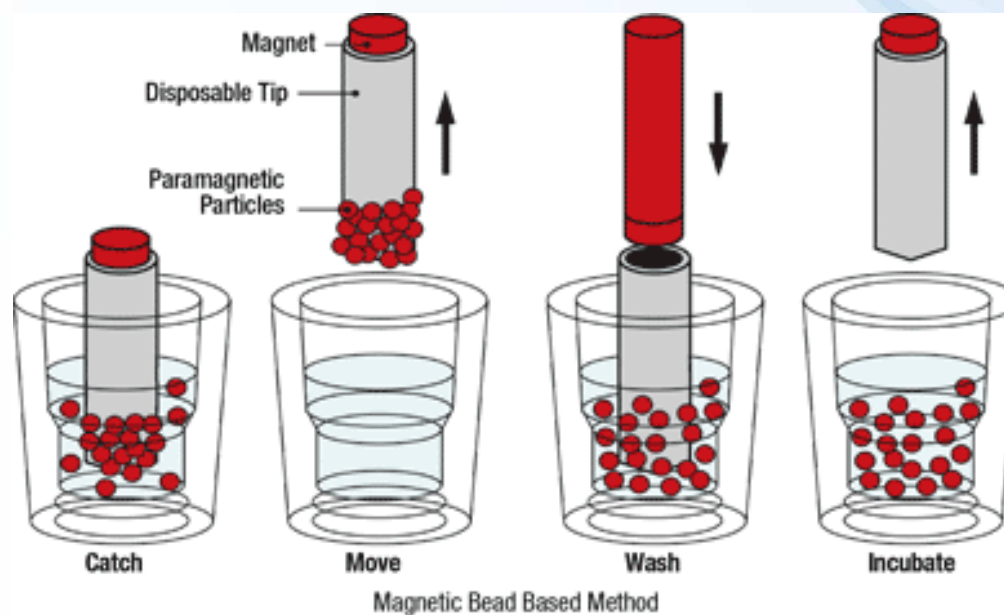
- lyzát buněk se přidá na kolonky se speciálními membránami (silikát) vázajícími NK v přítomnosti chaotropních solí, následuje vymytí NK puforem s nízkým obsahem soli
- rozpuštěná NK se vysráží ethanolom a naváže se v pufru s vysokým obsahem soli ($\text{pH} < 7$) a eluuje v pufru s nízkým obsahem soli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



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

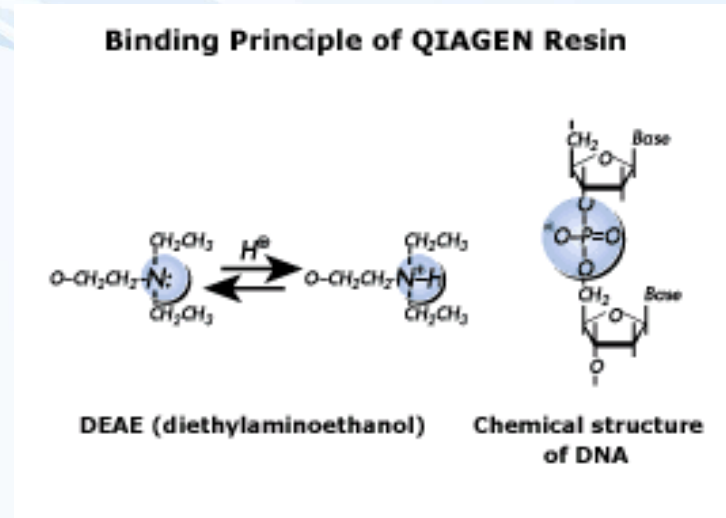
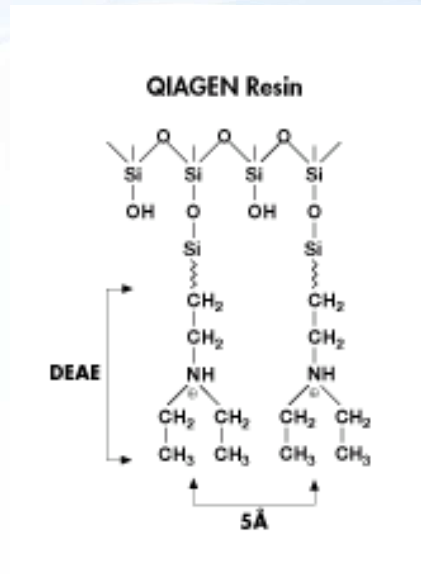
3. Magnetické částice

- 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



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

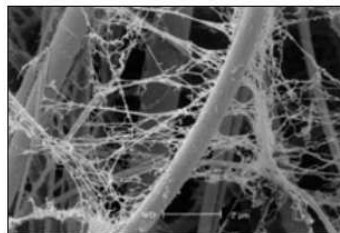
FTA Cards contain chemicals that lyse cells, denature proteins and protect nucleic acids from nucleases, oxidative, and UV damage. US Patent Nos. 5496562, 5756126, 5807527, 5972386, 5985327 and other patents pending.

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



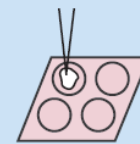
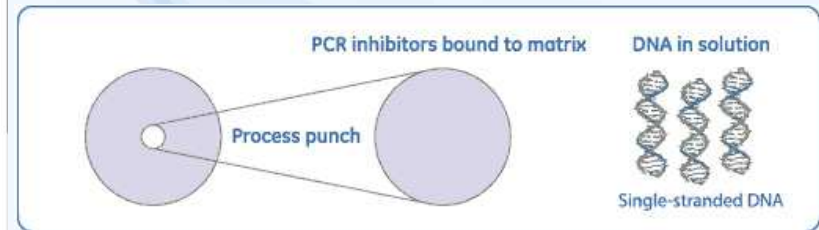
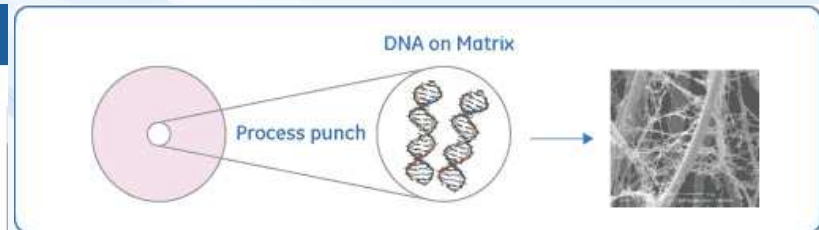
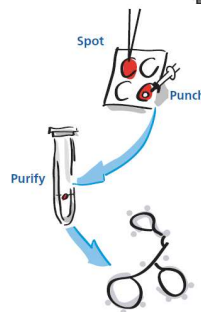
Whatman FTA devices format



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

Use FTA for a wide range of applications:

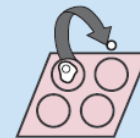
- Forensics
- Transgenic identification
- Transfusion medicine
- Plasmid screening
- Food and agriculture testing
- Drug discovery
- Genomics
- STR analysis
- Animal identification



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

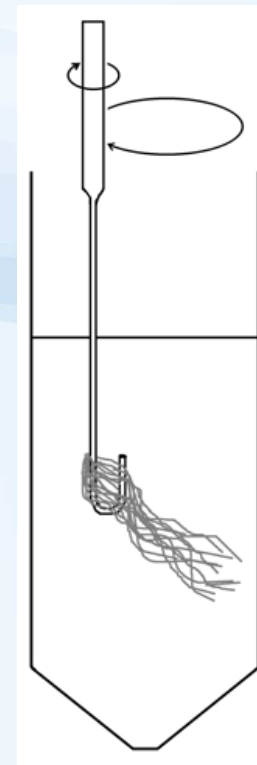
Whatman®

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)

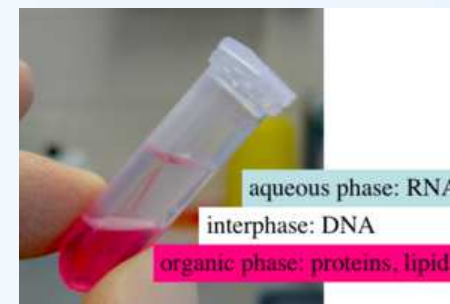


2. Izolace RNA

- inaktivace stabilních RNáz \Rightarrow inhibitory (RNasin, RNaseOUT), detergenty, DTT, merkaptoethanol
- DNáza bez přítomnosti RNáz
- selektivní precipitace: LiCl, acetát amonný
- nestabilní \Rightarrow dlouhodobě uchovávat vysráženou v 70% etanolu při -20°C nebo při -80°C
- selektivní precipitace: LiCl, acetát amonný

Organická extrakce v roztoku:

- lýze buněk a solubilizace RNA v guanidinových solích (guanidin thiokyanát-fenol-chloroform)
- fenol saturovaný pufrem o pH 4
- *Trizol*[®], *Tri reagent* \Rightarrow monofázický roztok fenolu a guanidin thiokyanátu izoluje RNA v přítomnosti chloroformu

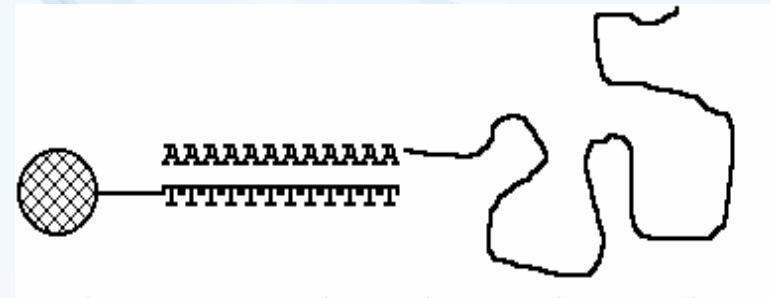


❑ Selektivní precipitace LiCl:

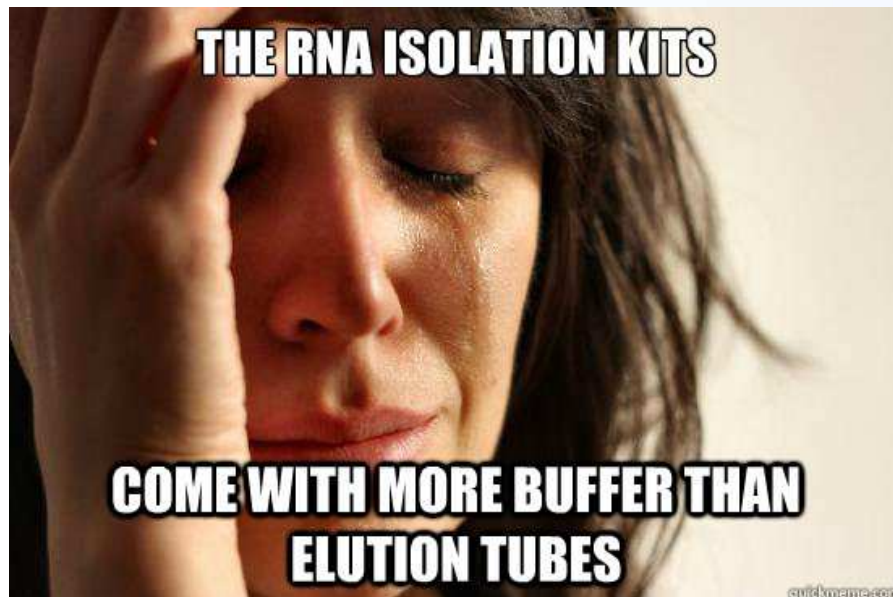
- vysráží selektivně delší RNA (rRNA, mRNA)
- postup: 8M LiCl (1:1), promíchání, inkubace při 20°C a centrifugace

❑ Afinitní chromatografie:

- kolonky s oligodT pro mRNA

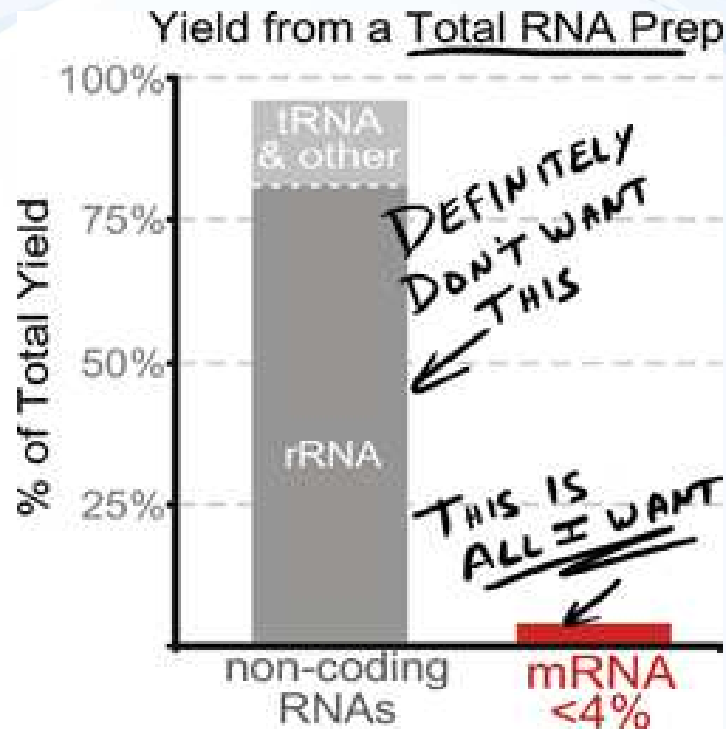


(www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)

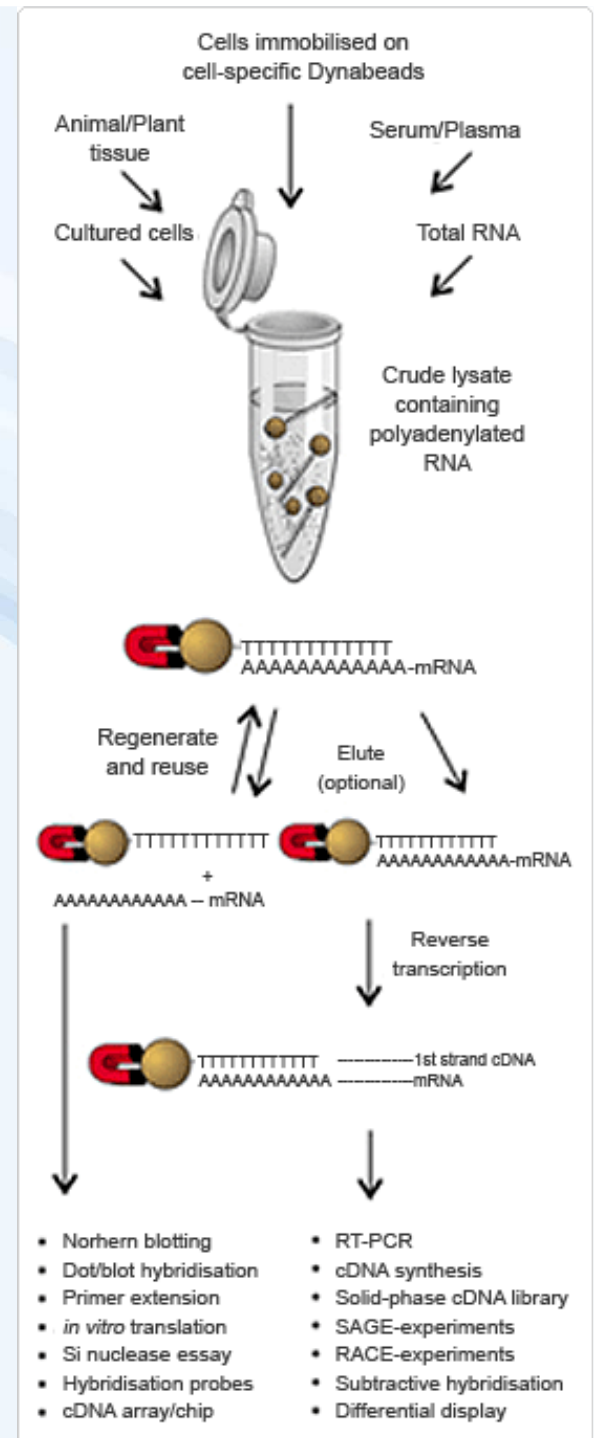


Research centre
for toxic compounds
in the environment

☐ Magnetické částice nesoucí oligodT:

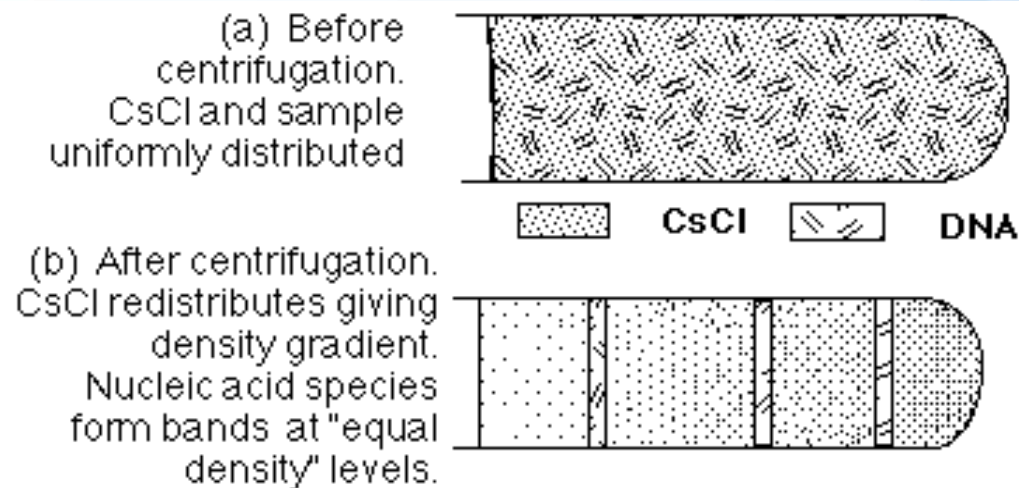


<http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/napamisc/mrna-isolation-dynabeads.html>



3. Gradientová centrifugace (hustota)

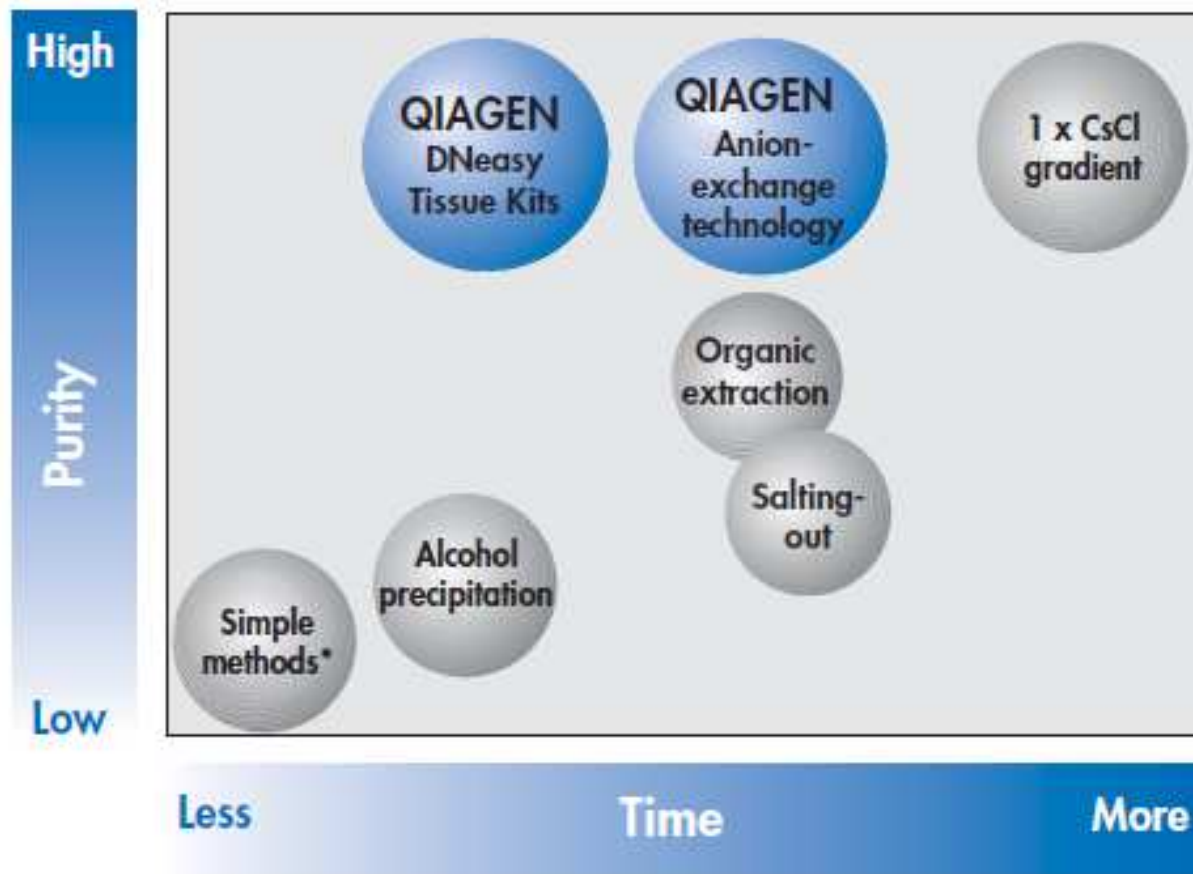
□ hustota v CsCl:	DNA	~ 1,7 g/cm ³
	proteiny	~ 1,3 g/cm ³
	RNA	> DNA
	ssDNA	> dsDNA



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



DNA Purity and Time Required for Different Isolation Methods



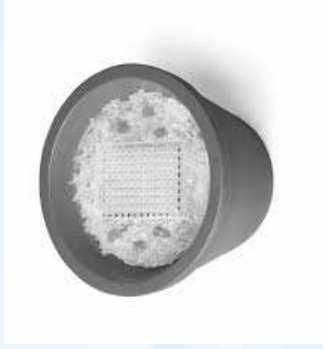
NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK S NIMI PRACOVAT



Research centre
for toxic compounds
in the environment

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

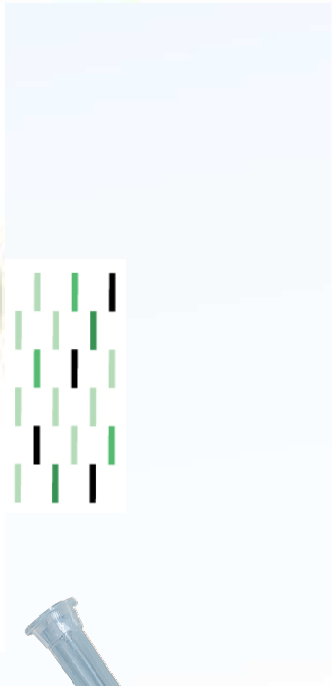
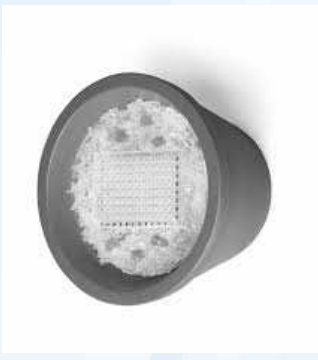


Research centre
for toxic compounds
in the environment





FREE OF



Research centre
for toxic compounds
in the environment

NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK JE STANOVIT



Research centre
for toxic compounds
in the environment

NK: KVANTITA & KVALITA

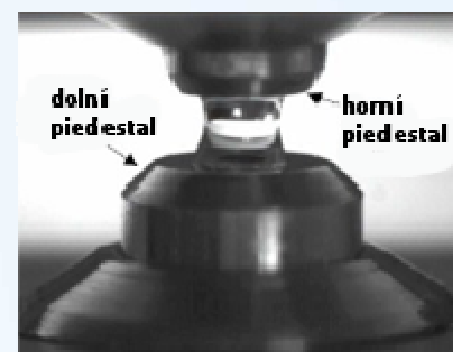
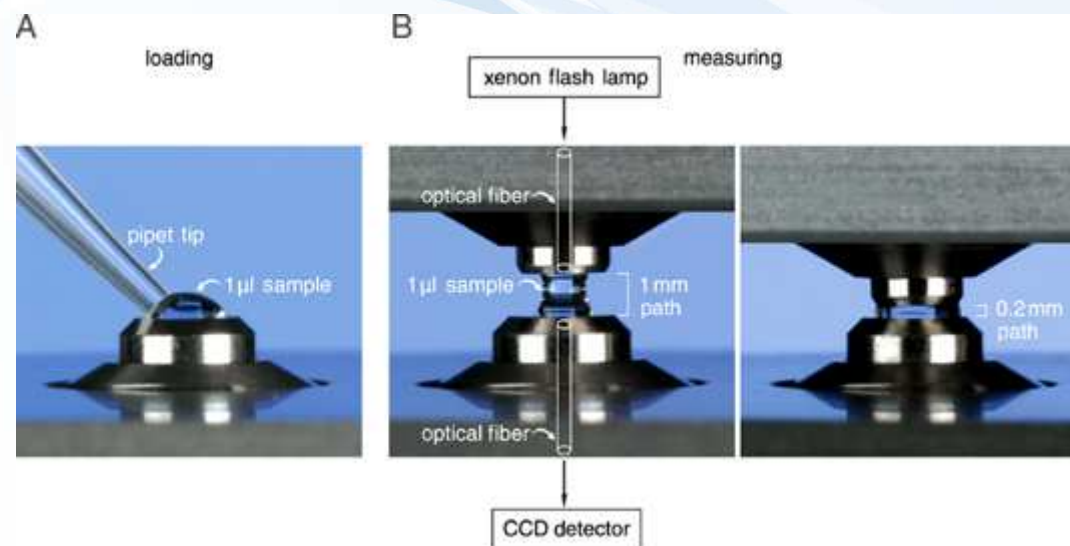
□ SPEKTROFOTOMETRICKY

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
	A_{260}/A_{230}	2,0 – 2,2
RNA	A_{260}	1,0 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$
	A_{260}/A_{280}	~2,0
	A_{260}/A_{230}	2,0 – 2,2

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.



-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



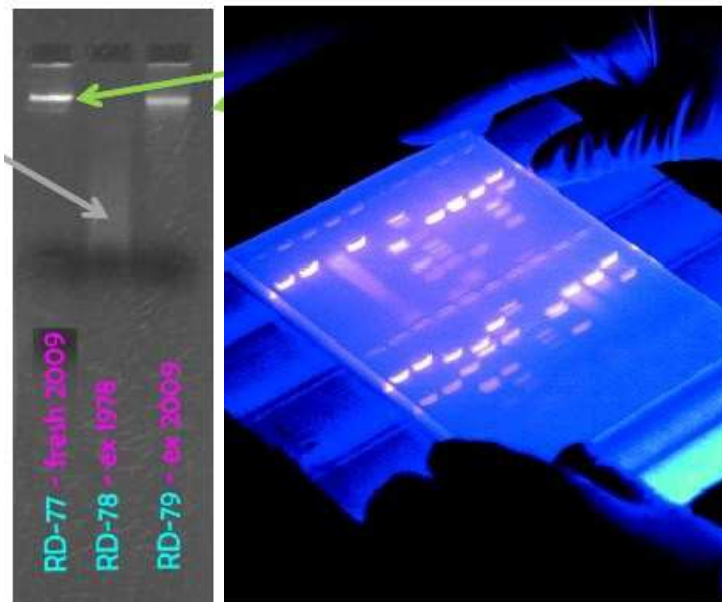
	Absorption	Fluorecence		
Method of detection	A260	Hoechst H33258	Ethidium-bromide	PicoGreen
DNA Measurement range	1–50 $\mu\text{g/mL}$	0,01–15 $\mu\text{g/mL}$	0,1–10 $\mu\text{g/mL}$	0,025–1000 ng/mL
RNA Measurement range	1–40 $\mu\text{g/mL}$	NA	1–40 $\mu\text{g/mL}$	Minimal sensitivity
Ratio DNA/RNA	0.8	400	2.2	>100

Eppendorf, Application Note 271, Březen 2013

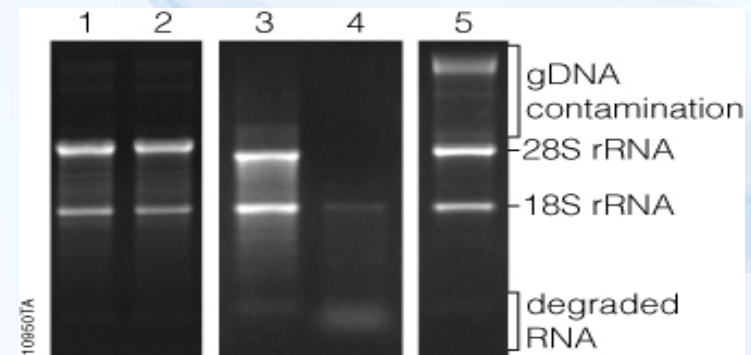


□ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZOU V AGARÓZOVÉM GELU

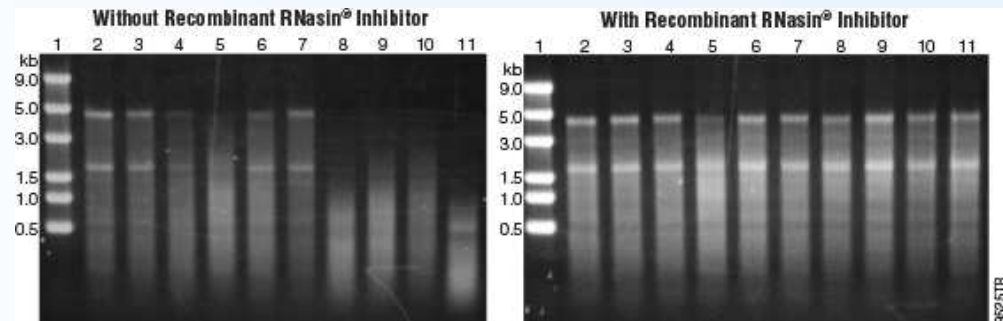
- kvalita a integrita
- barvení ethidium bromidem nebo dalšími fluorescenčními barvami pro NK ⇒ vizualizace UV světlem



http://www.priroda21.upol.cz/docs/2012-01-30_-_Kitner_-_Zakladni_metody_molekularni_biologie_v_botanice.pdf



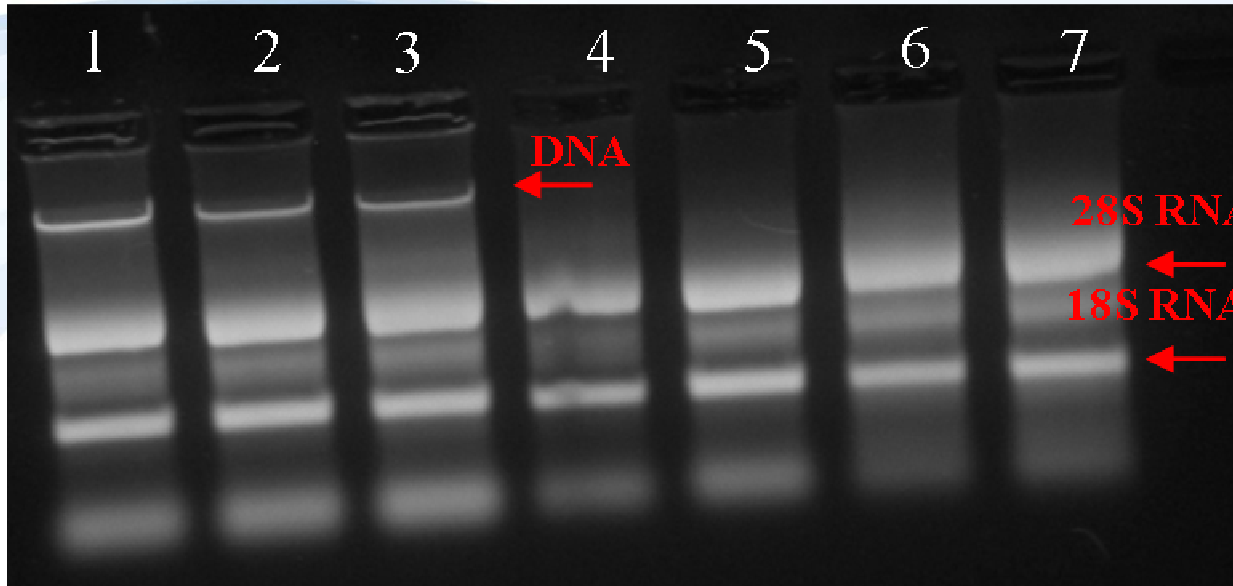
<http://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment>



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



Research centre
for toxic compounds
in the environment



1. Trizol (12 μg)
2. Trizol (24 μg)
3. RNeasy (12 μg)
4. Invisorb II (12 μg)
5. Invisorb II (24 μg)
6. Invisorb Spin (12 μg)
7. Invisorb Spin (24 μg)



NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK JE ZÍSKAT DOMA



Research centre
for toxic compounds
in the environment

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.youtube.com/watch?v=DBb1utQBIY4>

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



NKE 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.youtube.com/watch?v=UDKm9rZbhyl>



NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK JE SEPAROVAT



Research centre
for toxic compounds
in the environment

NK: ELEKTROFORÉZA

□ **HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÁ** (polymer z agarosa = agarobiosa)

□ **VERTIKÁLNÍ POLYAKRYLAMIDOVÁ** (PAGE, polymer z akrylaminu zesíťovaný N,N'-methylenbisakrylamidem)

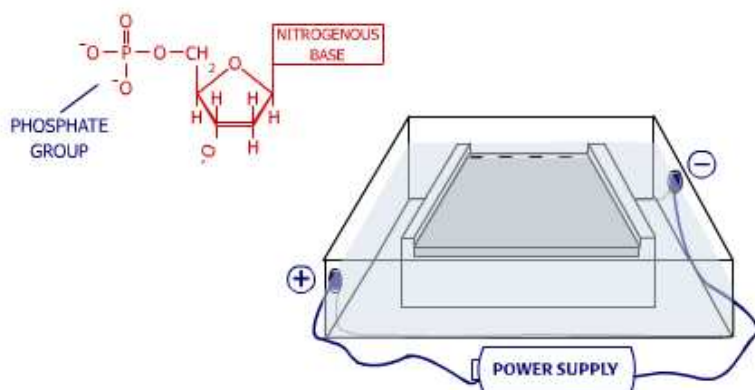
⇒ hustá síť, kterou rychleji prostupují kratší fragmenty (molekuly) než delší fragmenty – „molekulové síto“



NK: ELEKTROFORÉZA

- **HORIZONTALNÍ AGARÓZOVÁ** (polymer z agarosa = agarobiosa)
 - **VERTIKÁLNÍ POLYAKRYLAMIDOVÁ** (PAGE, polymer z akrylaminu zesíťovaný N,N'-methylenbisakrylamidem)
- ⇒ hustá síť, kterou rychleji prostupují kratší fragmenty (molekuly) než delší fragmenty – „molekulové síto“

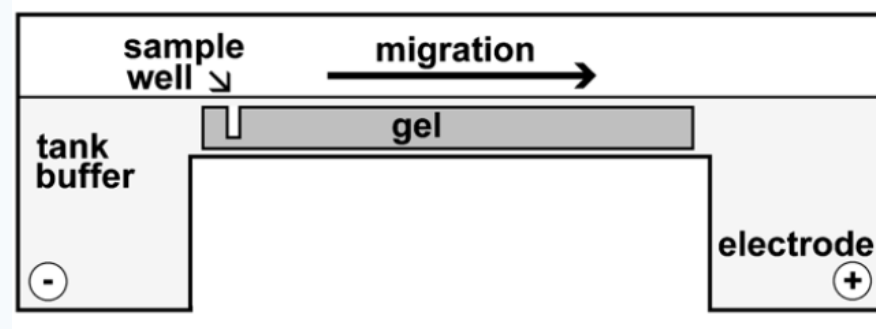
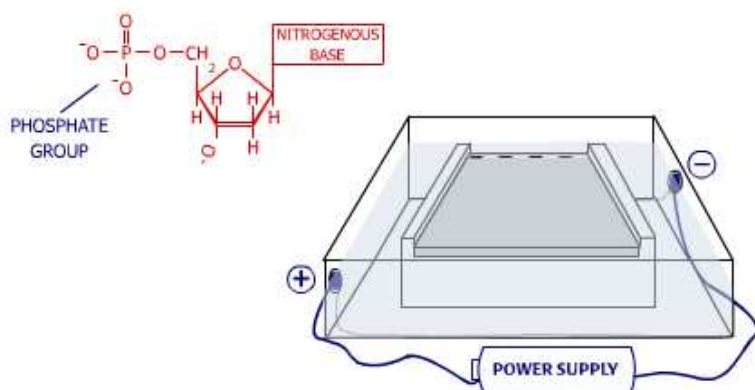
The phosphate groups in the DNA backbone carry negatively-charged oxygens – giving a DNA molecule an overall negative charge. In an electric current, the negatively-charged DNA moves toward the positive pole of the electrophoresis chamber.



NK: ELEKTROFORÉZA

- **HORIZONTALNÍ AGARÓZOVÁ** (polymer z agarosa = agarobiosa)
 - **VERTIKÁLNÍ POLYAKRYLAMIDOVÁ** (PAGE, polymer z akrylaminu zesíťovaný N,N'-methylenbisakrylamidem)
- ⇒ 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)



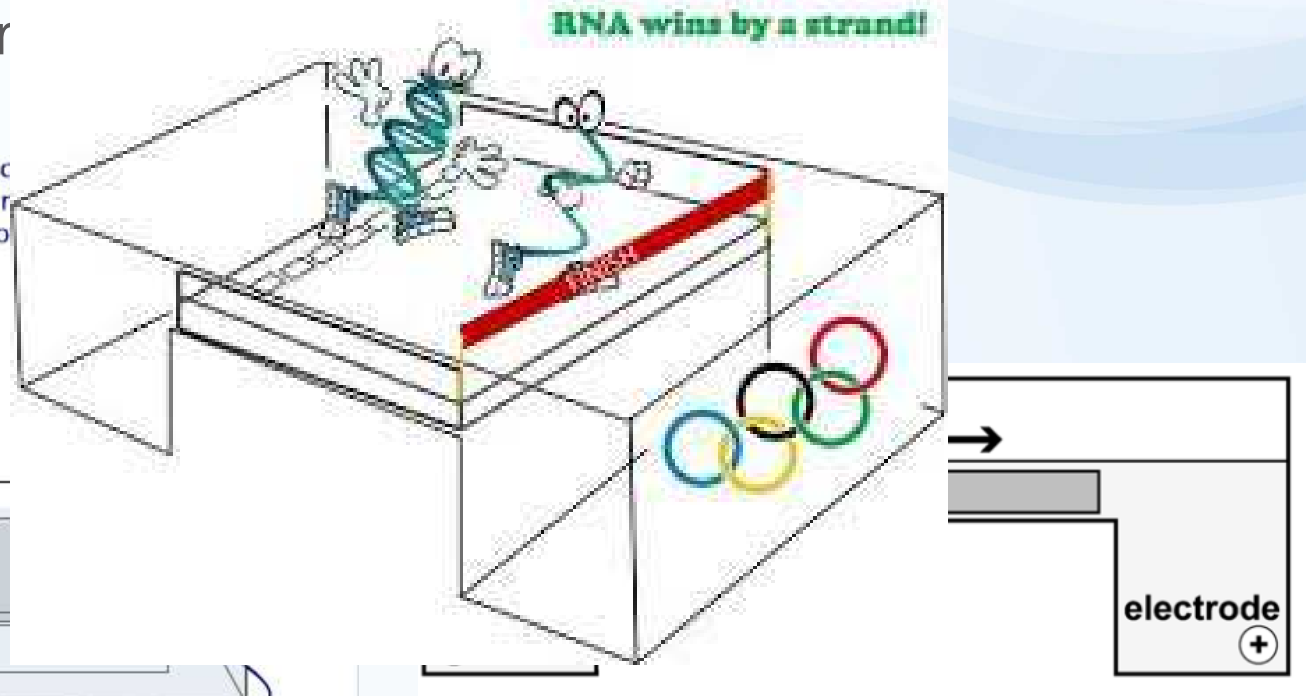
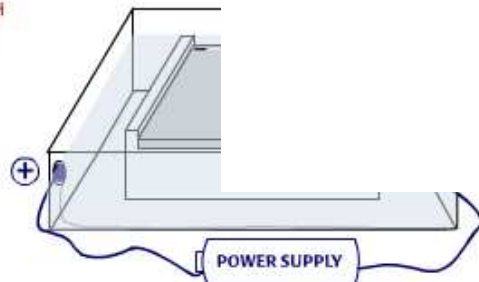
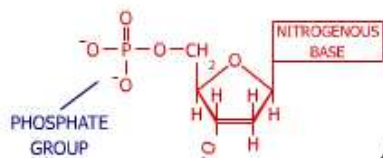
NK: ELEKTROFORÉZA

□ **HORIZONTALNÍ AGARÓZOVÁ** (polymer z agarosa = agarobiosa)

□ **VERTIKÁLNÍ POLYAKRYLAMIDOVÁ** (PAGE, polymer z akrylaminu zesíťovaný N,N'-methylenbisakrylamidem)

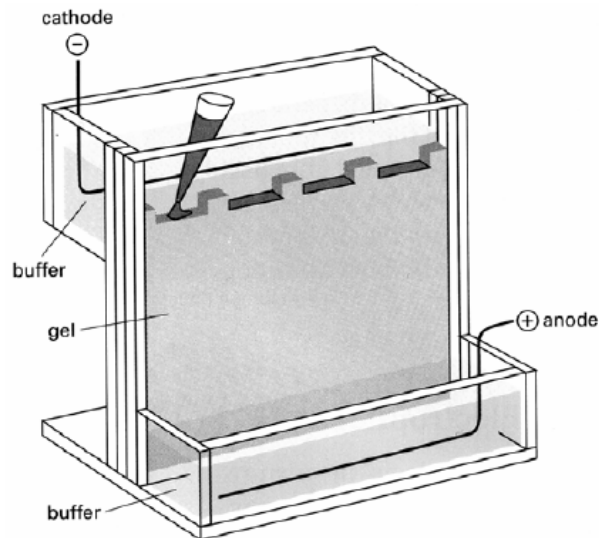
⇒ hustá síť, kterou rychleji prostupují kratší fragmenty (molekuly) než delší fragmenty – „r

The phosphate groups in the DNA backbone c
oxygens – giving a DNA molecule an overall r
current, the negatively-charged DNA moves to
electrophoresis chamber.

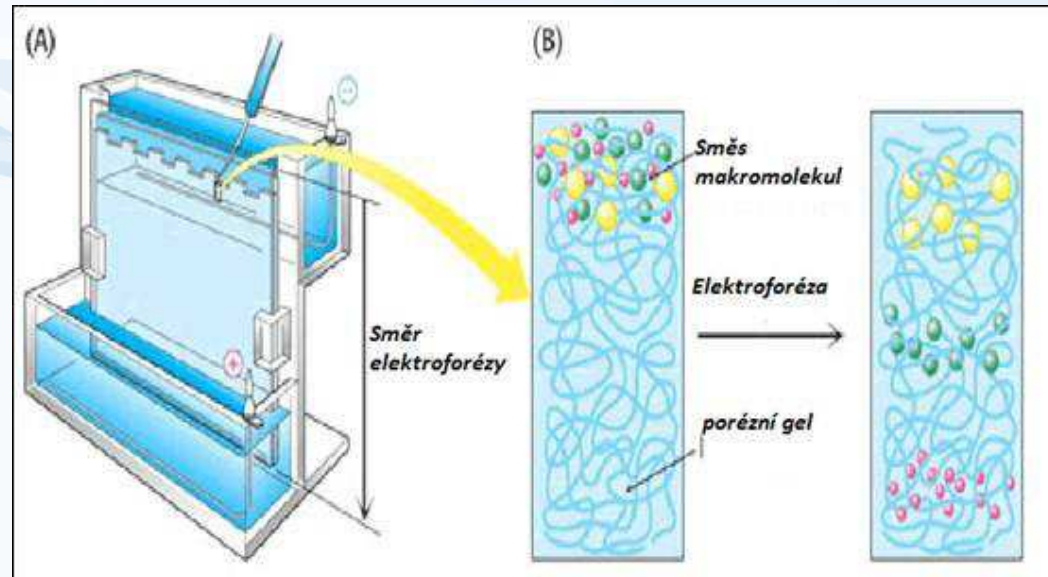


(www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)





(www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)



ALBERTS, B, D BRAY a A JOHNSON. *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. Espero Publishing, 2005. 740 s. [ISBN 80-902906-2-0](https://doi.org/10.1007/978-80-902906-2-0).

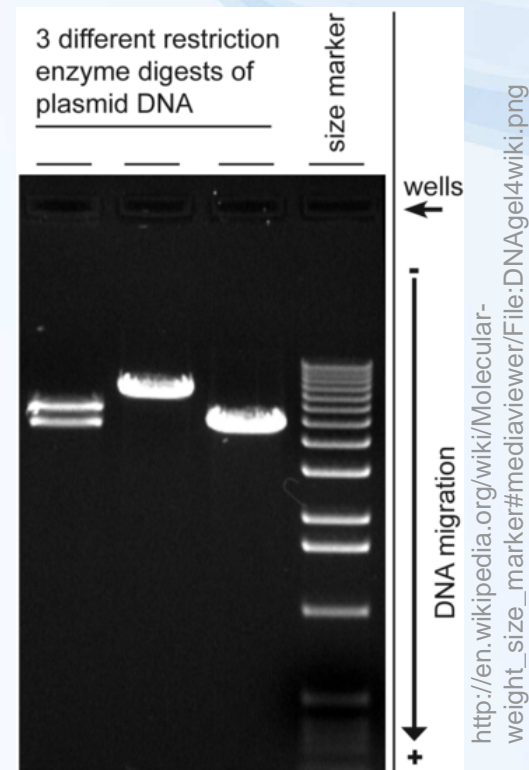
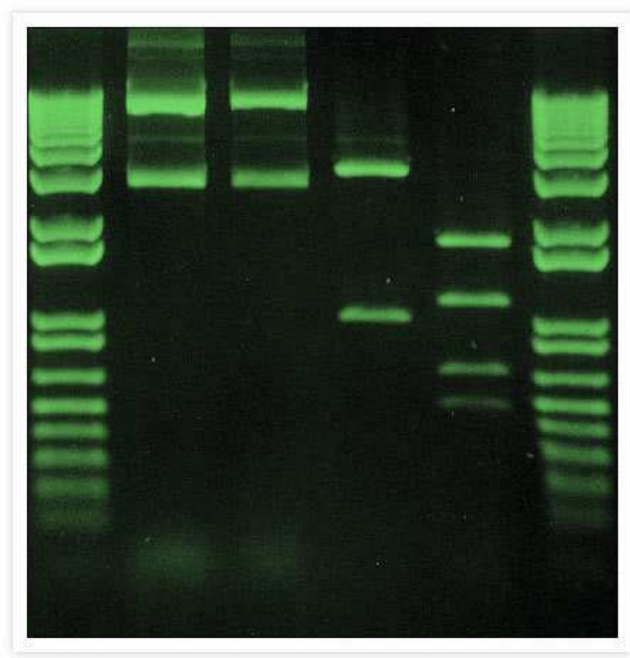
% agarose	range (kb)	% acrylamide	range (bp)
0.7	0.8-20	3.5	100-1000
0.9	0.5-7	5.0	80-500
1.2	0.4-6	8.0	60-400
1.5	0.2-4	12.0	40-200
2.0	0.1-3	20.0	10-100

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



□ VIZUALIZACE SEPAROVANÝCH NK V GELU

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

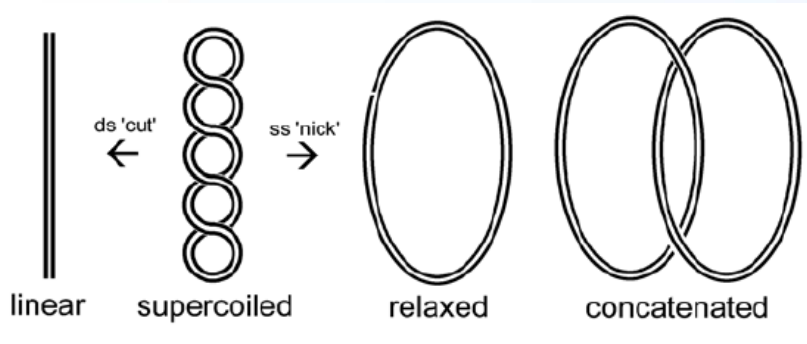


http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_weight_size_marker#mediaviewer/File:DNAgel4wiki.png

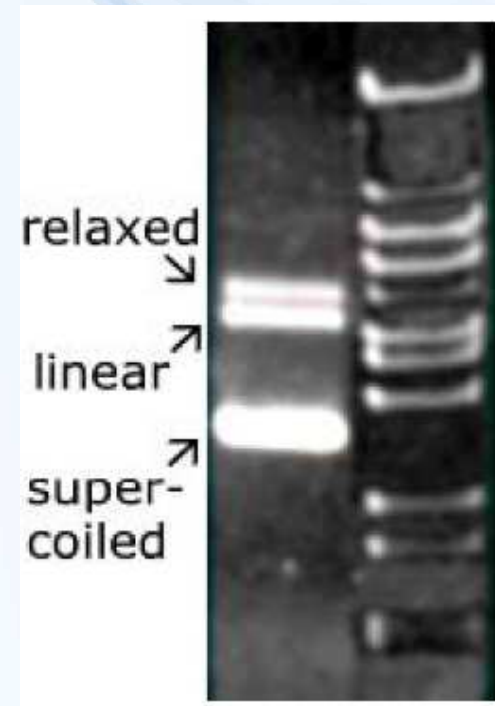


❑ co ovlivňuje migraci NK:

- velikost pór, napětí, iontová síla roztoku a koncentrace fluorescenční barvy, pokud použita v gelu
- velikost NK \Rightarrow menší rychleji
- konformace DNA



(www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)



□ KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (CGE)

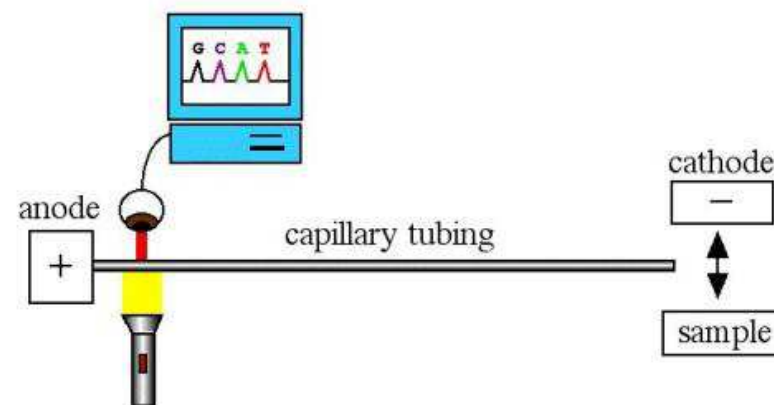
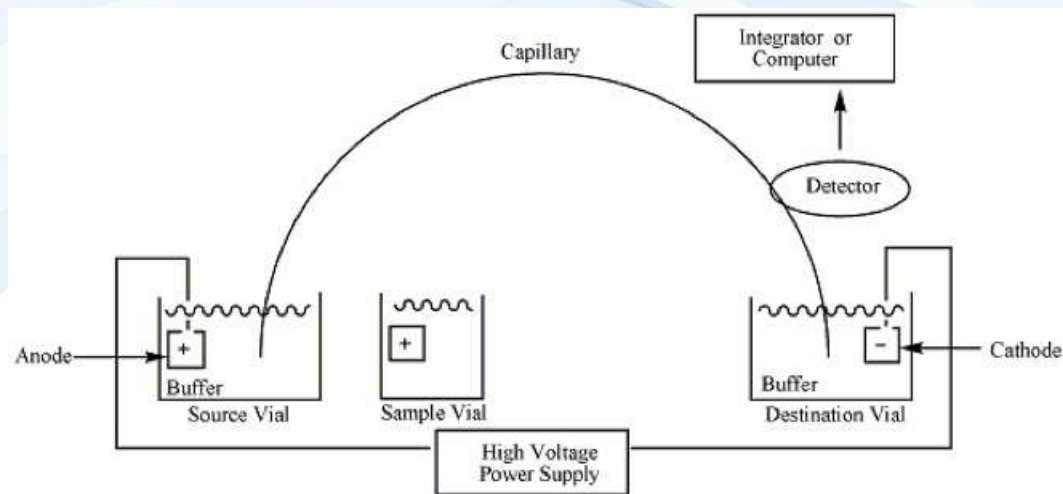
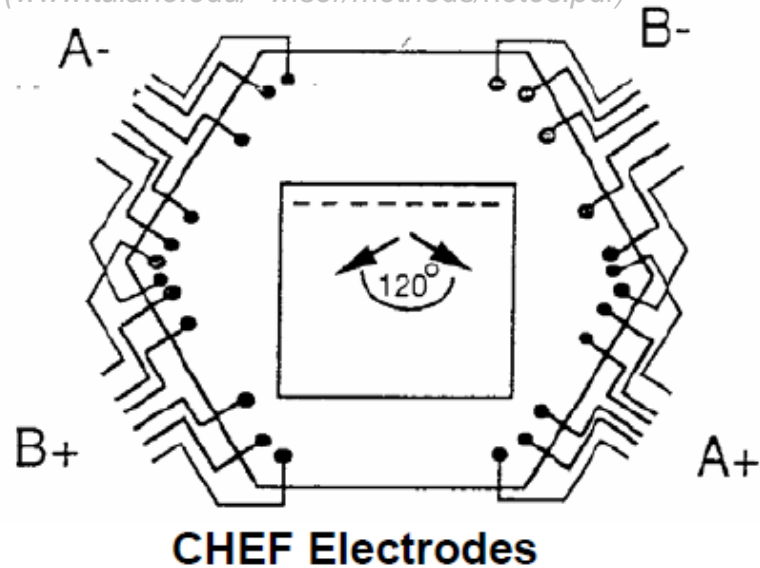


Figure 1. A schematic drawing of a capillary electrophoresis instrument. The sample is introduced on the right side and the chromatograph is detected on the left side. (Photo © Copyright 2002 Department of Biology, Davidson College).



□ PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (PFGE)

(www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)



„Contoured-Clamped
Homogeneous Electric Field“

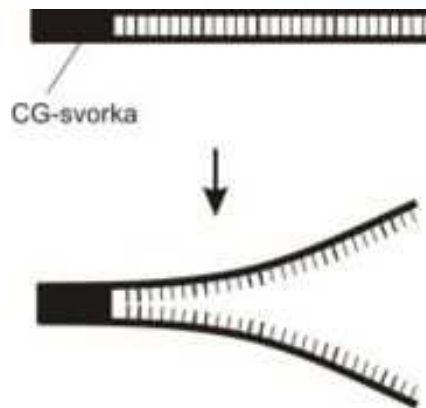
- separace velkých molekul DNA (až 10 Mb)
- i celé buňky
- genotypování, genetický otisk („fingerprint“), epidemiologie patogenních organismů



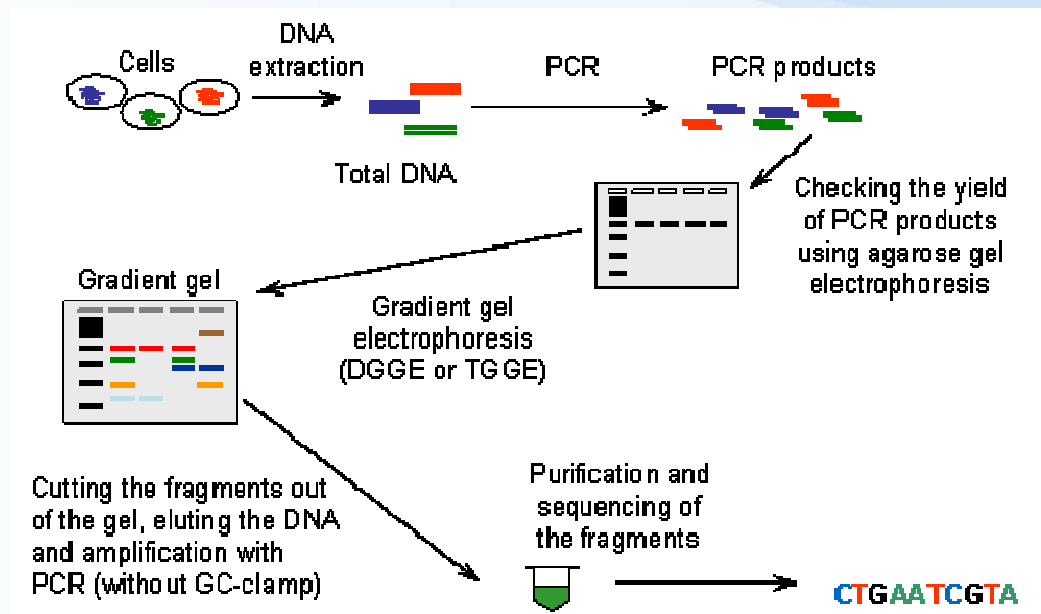
□ DGGE & TGGE (“Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis”)

⇒ Separace na základě odlišnosti tání DNA fragmentů

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



www.wikiskripta.eu/index.php/DGGE



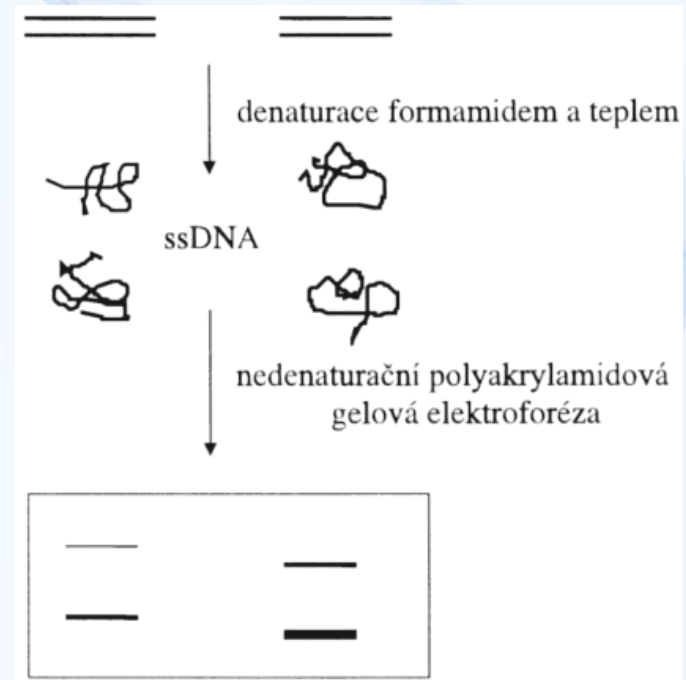
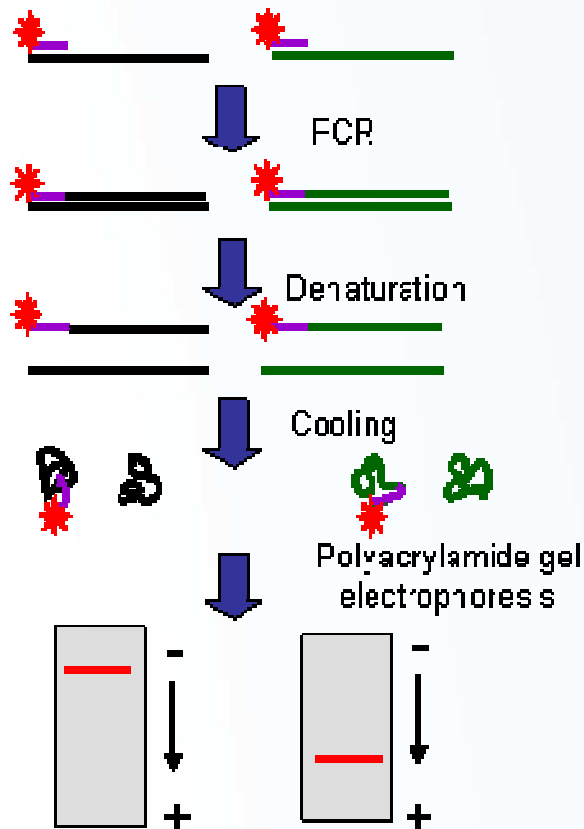
Research centre
for toxic compounds
in the environment

http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index_11.htm

□ SSCP (“Single-strand conformation polymorphism”)

⇒ Separace na základě odlišnosti tání DNA fragmentů

- bodová mutace



<http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-DNA/newlook/defa7.htm>

NK: IZOLACE Z GELU

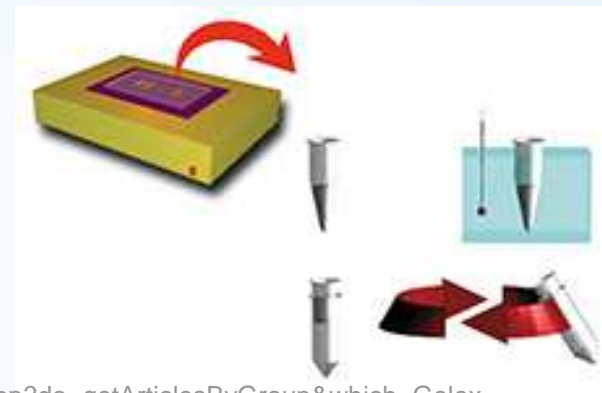
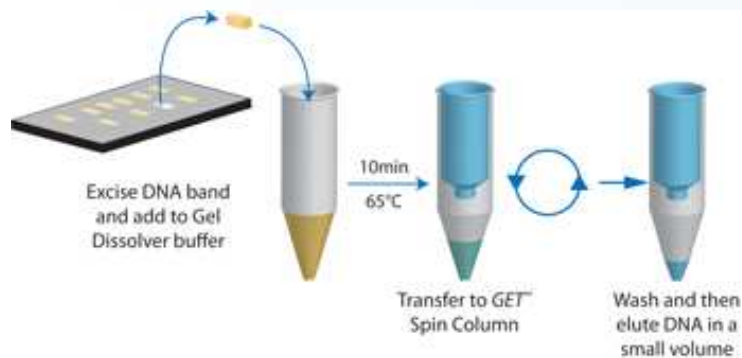
<http://webcast.skola-profession.cz/Pages/Player.aspx?id=41>

☐ 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>



Research centre
for toxic compounds
in the environment

NUKLEOVÉ KYSELINY A JAK JE MODIFIKUJEME

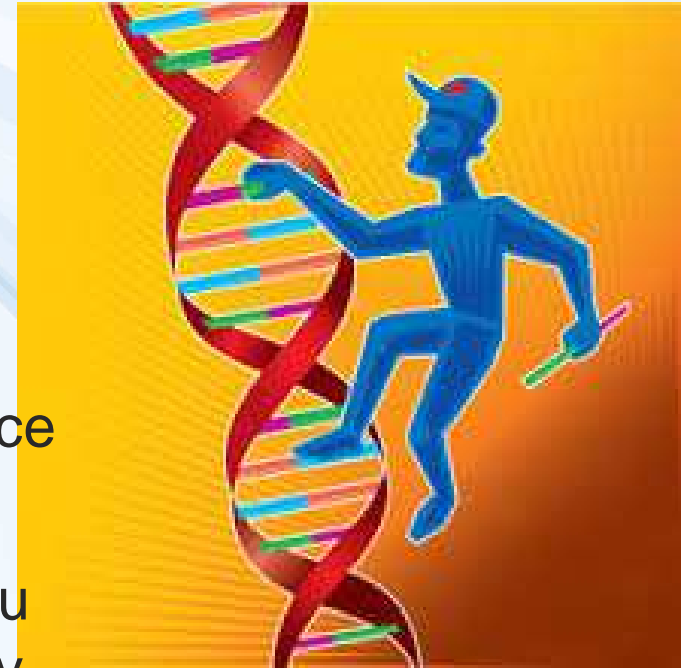


Research centre
for toxic compounds
in the environment

NK: MODIFIKACE

□ Enzymy modifikující NK

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

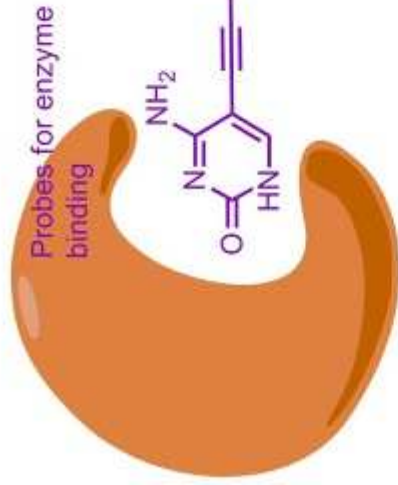


Příklady nukleáz:

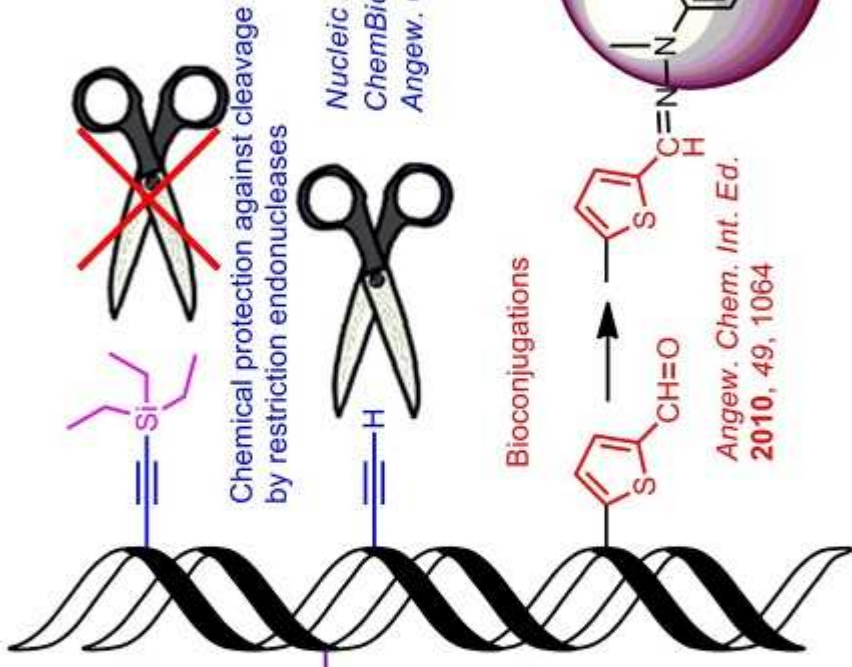
Bal31	3'-exonukleáza pro ds nebo ss DNA
S1	5'-exonukleáza pro ssDNA nebo ssRNA
DNáza I	ss nebo dsDNA (5', pyr)
ExoIII	3'-exonukleáza pro dsDNA
RNáza A	endonukleáza pro ssRNA (3', pyr)
RNáza T1	Endonukleáza pro ssRNA (3', G)



Probes for enzyme binding



J. Org. Chem. 2011, 76, 3457



Chemical protection against cleavage by restriction endonucleases

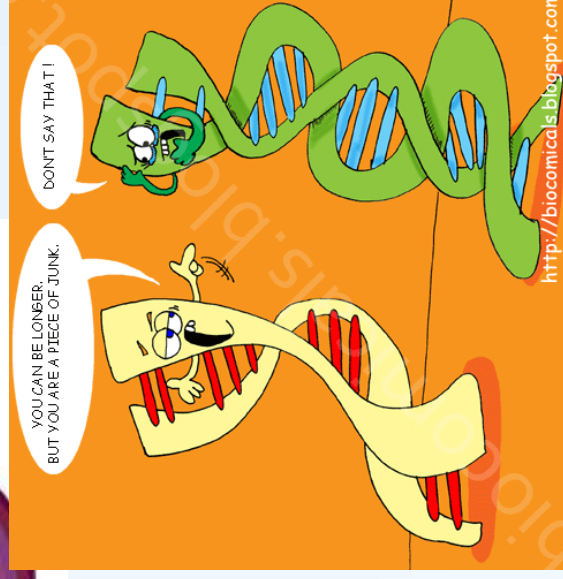
Nucleic Acids Res. 2009, 37, 7612
ChemBioChem 2011, 12, 431
Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 8727

Bioconjugations

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



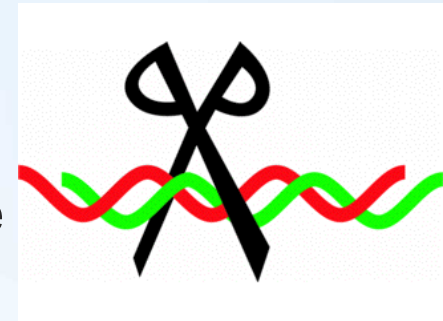
in the environment



<http://biocomicals.blogspot.com>

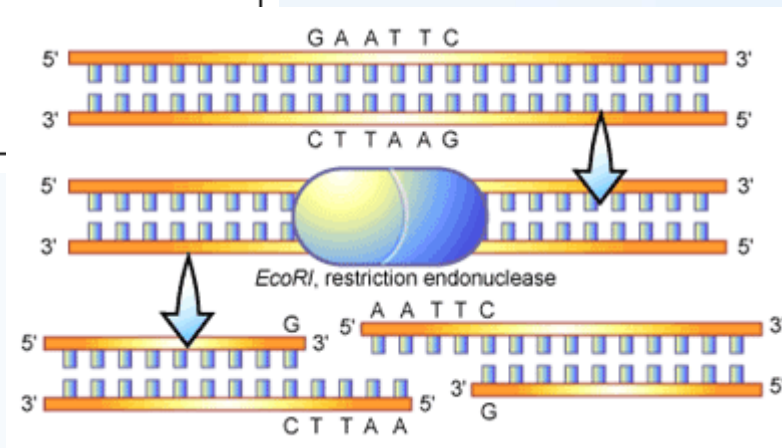
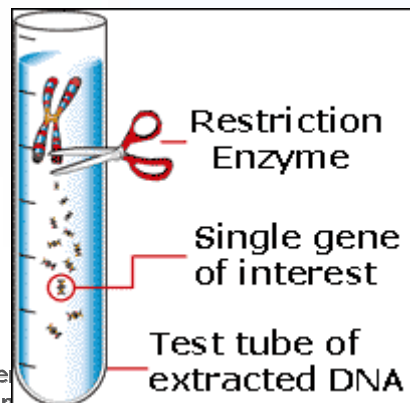
□ Restrikční endonukleázy:

- ⇒ 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/ μg)
- low ionic strength (<25 mM)
- high pH (>8)
- organic solvents
- substitution of Mg^{2+}



GENETICKÝ OTISK

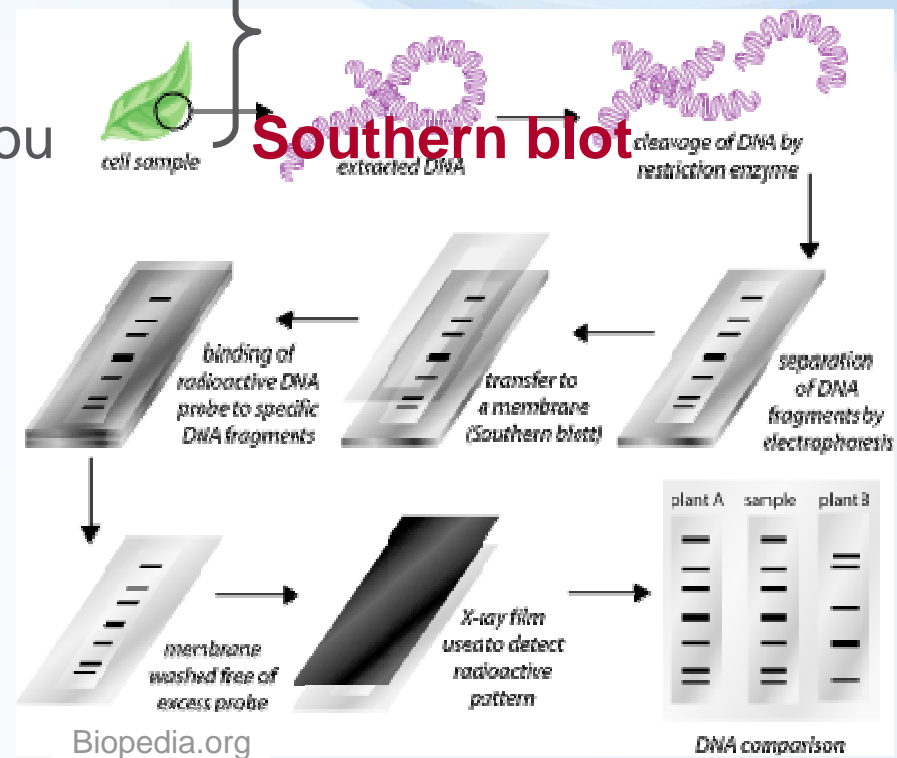


Research centre
for toxic compounds
in the environment

NGS MAPOVÁNÍ

□ (PCR/RFLP (Polymorfismus v délce restrikčních fragmentů) ⇒ restrikční analýza DNA

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



NG: MAPOVÁNÍ

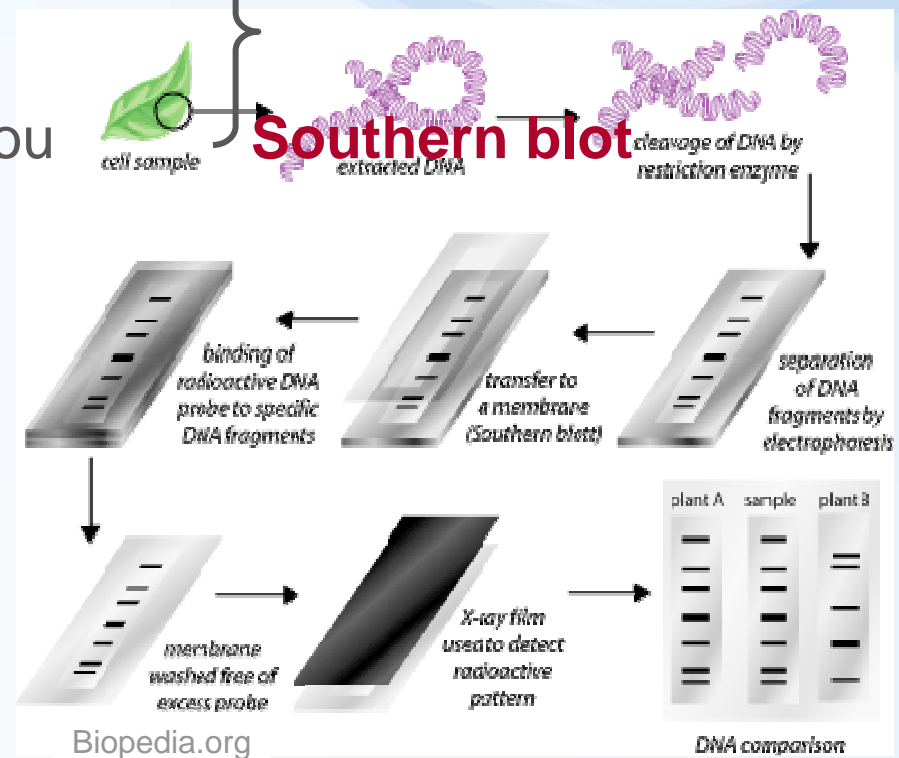
□ (PCR/RFLP (Polymorfismus v délce restrikčních fragmentů) ⇒
restrikční analýza DNA

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

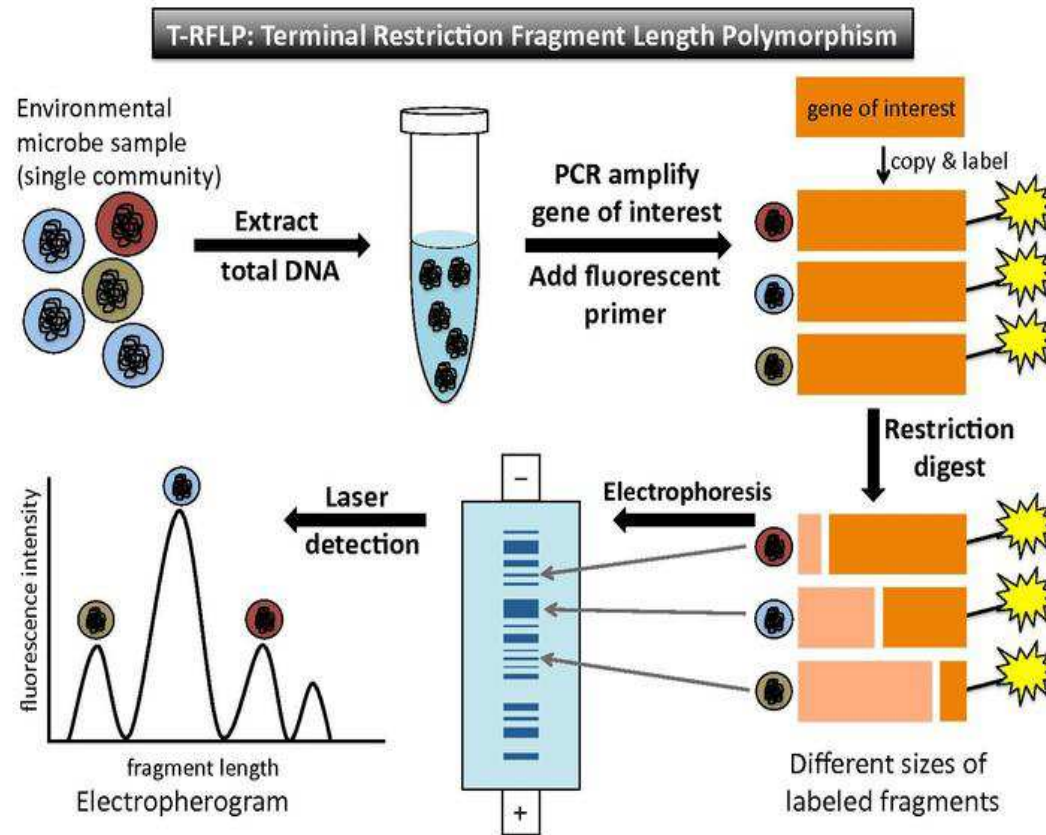
o genetické mapování
o dědičné onemocnění
o kriminalistika
o určení otcovství



Research centre
for toxic compounds
in the environment



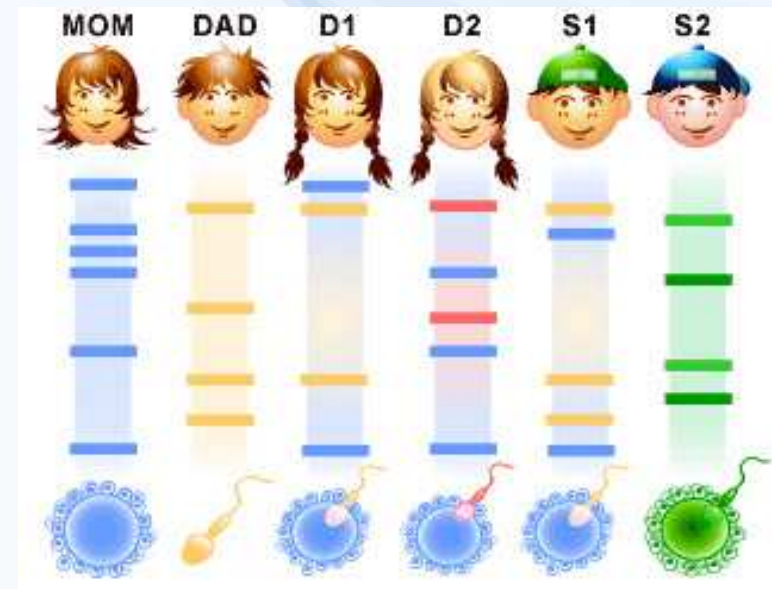
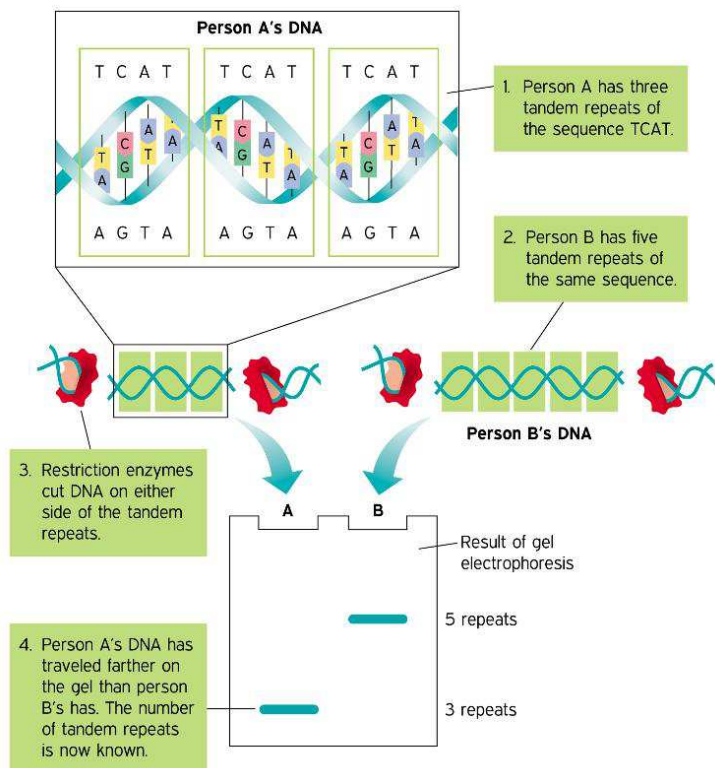
□ (PCR)/T-RFLP (Terminální polymorfismus v délce restrikčních fragmentů) ⇒ restrikční analýza DNA



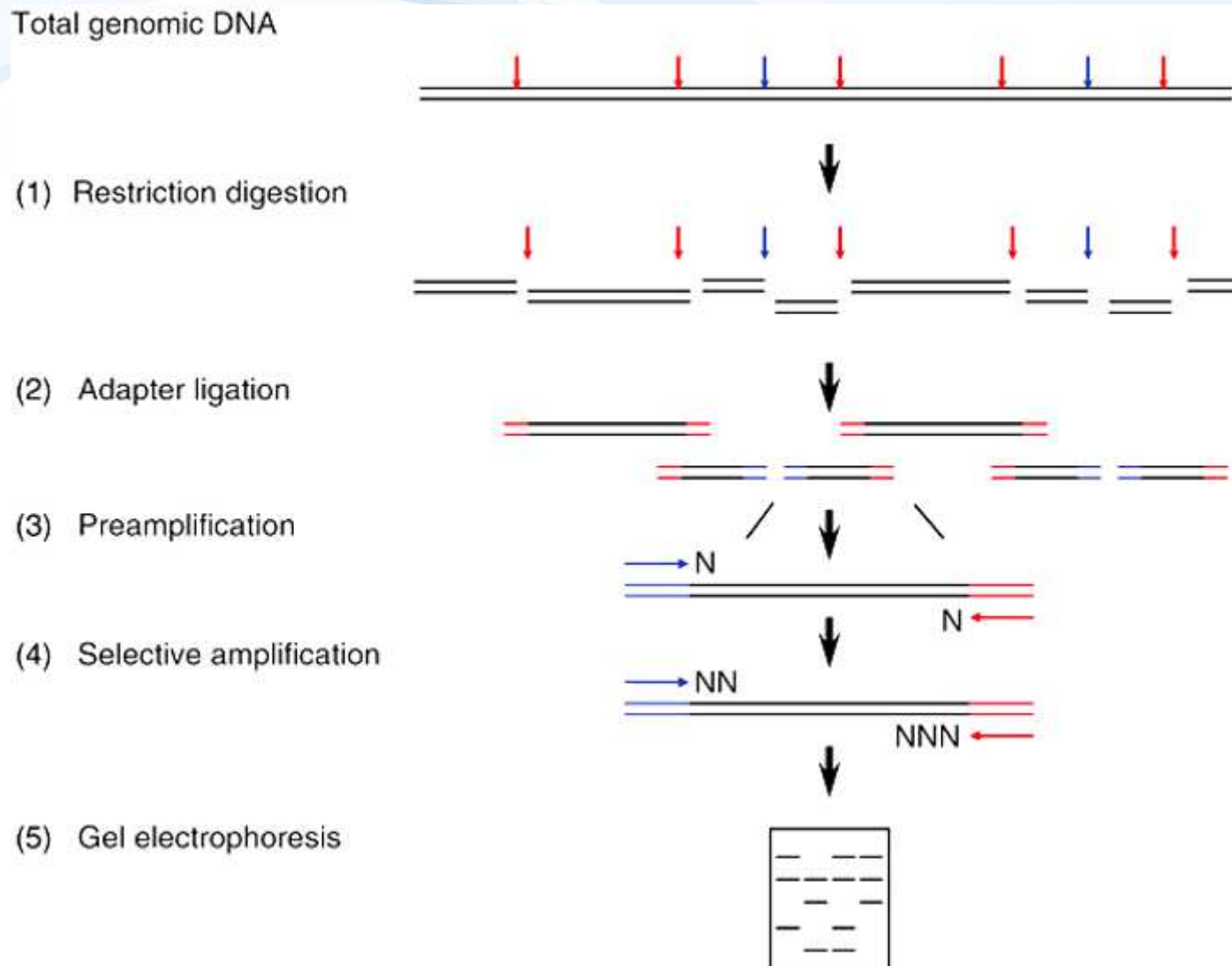
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Step-by-step_procedure_of_using_T-RFLP_analysis_in_microbiology.pdf



- **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



□ AFLP („Amplified fragment length polymorphism“)



Research centre
for toxic compounds
in the environment

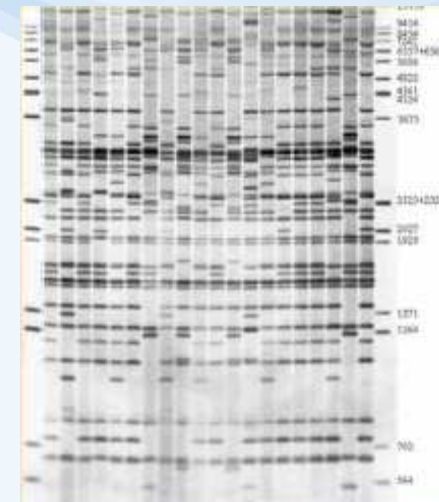
<http://www.nature.com/scitable/content/outline-of-the-aflp-procedure-41047>
https://botany.natur.cuni.cz/dna/index.php?option=com_content&view=article&id=47:aflp-princip&catid=35:aflp&Itemid=55

OTISK MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA



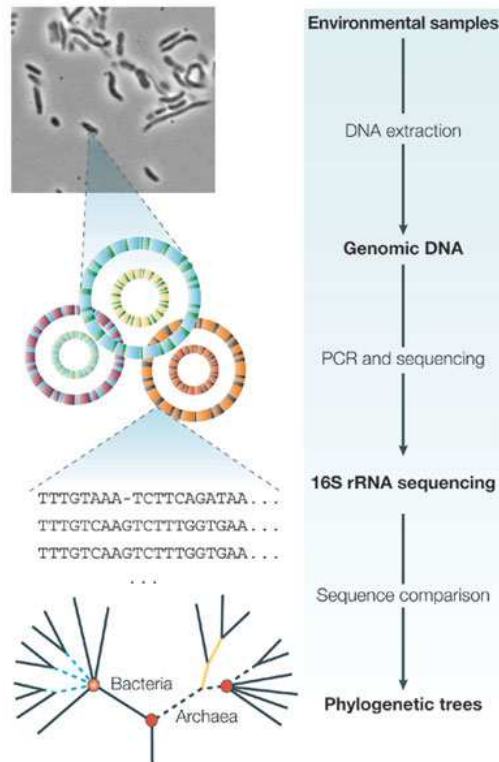
Research centre
for toxic compounds
in the environment

- 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

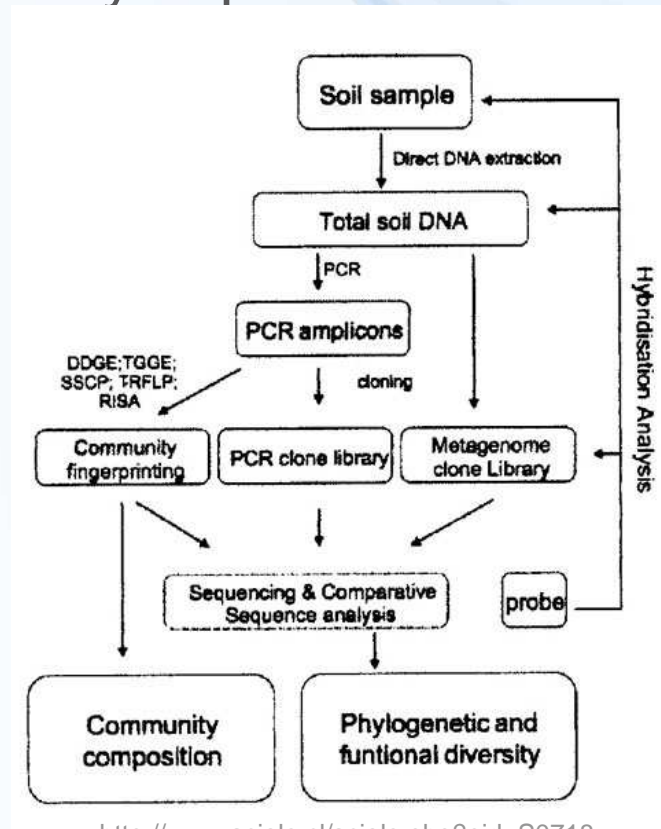


www.moloch.upol.cz/uploads/vyukovy-portal/eko-mem-rulik.pdf

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



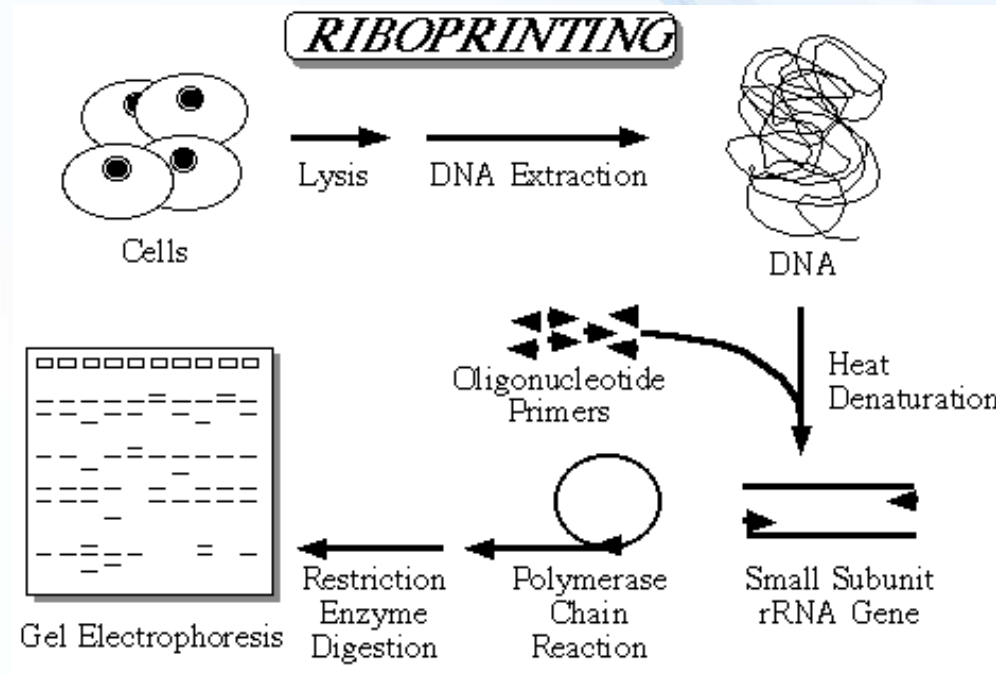
Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Genetics



http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-27912008000200004&script=sci_arttext

□ ARDRA („Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“)

- restriční 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

