

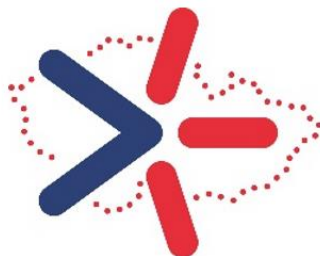
Pokročilé metody v současné genomice a proteomice

Metody extrakce, purifikace a kvantifikace nukleových kyselin

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

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

Klasika je stále moderní ... 

Rozvaha – účel izolace



**Na začátku každého experimentu je třeba si položit otázku:
K čemu chci 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)



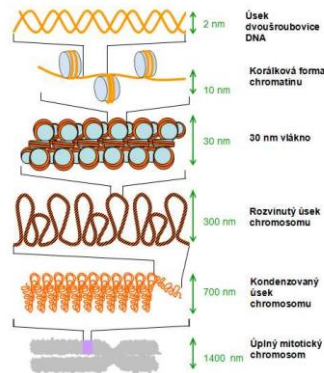
Rozvaha – účel izolace



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

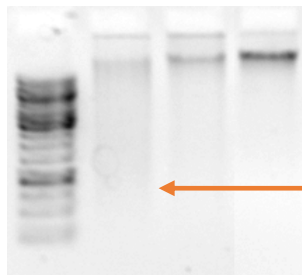
- **Výchozí material pro izolaci NK
(množství, kvalita, typ buněk...).**
- **Jaký použiji postup (vhodný pufr, detergenty...)?**

Rozvaha – účel izolace



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

**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.

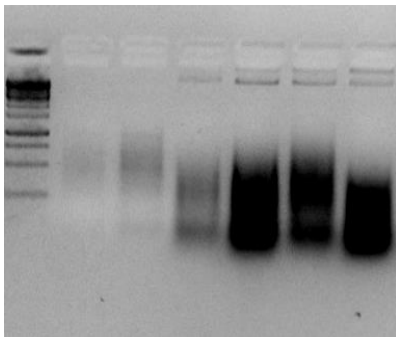


Rozvaha – účel izolace



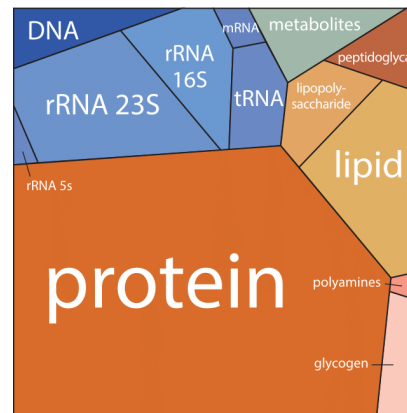
➤ Kontaminace RNA:

Vadí následné analýze přítomnost RNA?



← Genomová DNA

← RNA

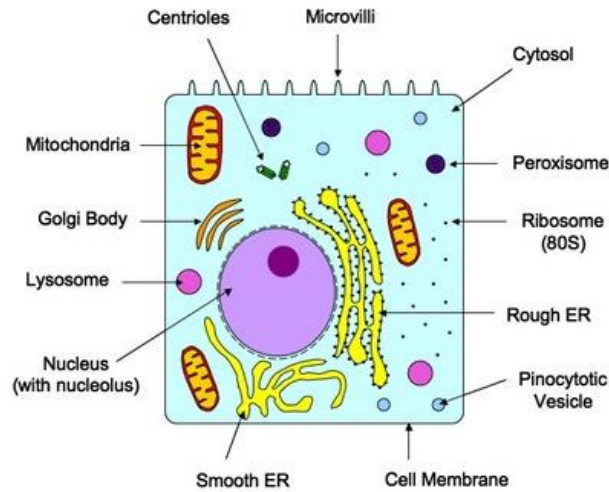


Voronoi diagram: složení buňky *E. coli* (po 40 min od dělení). Každá oblast mnohoúhelníku představuje relativní podíl odpovídající složky v suché hmotě buňky.

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

Výchozí materiál

Živočišná buňka

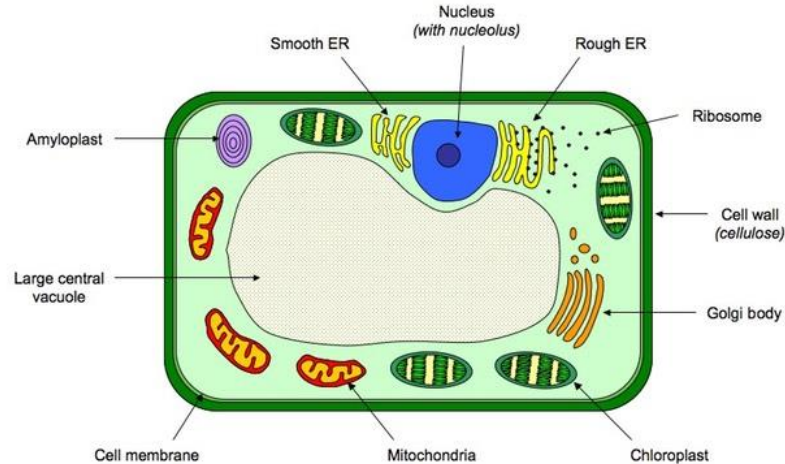


Živočišná buňka:

- 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



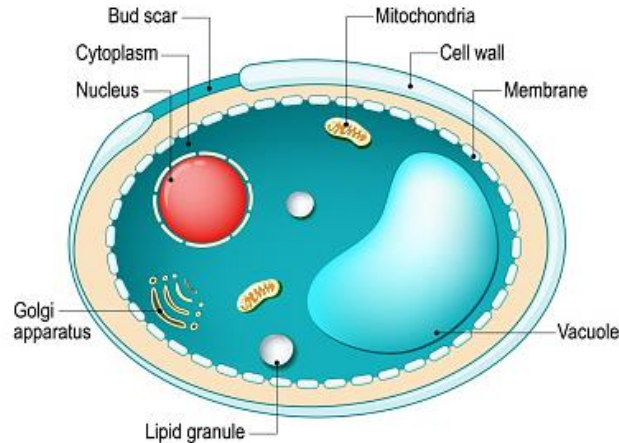
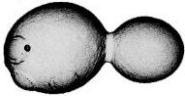
Rostlinná buňka:

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

<http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html>

Výchozí materiál

Buňka kvasinek



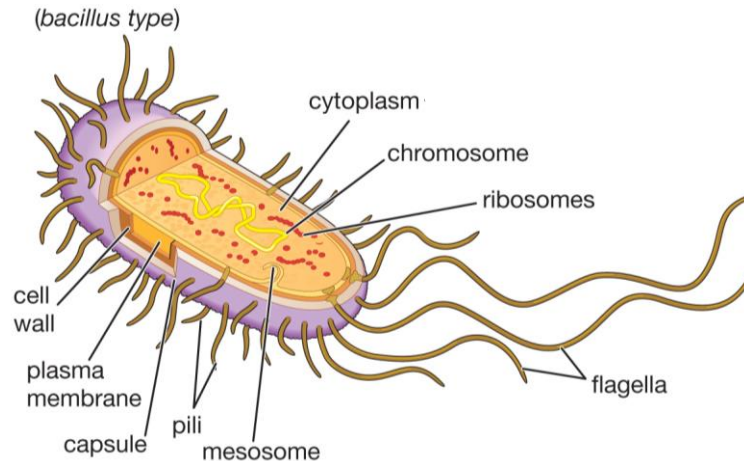
Buňka kvasinek:

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

<https://www.britannica.com/science/bacteria>
<http://www.ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-cells/23-eukaryotic-cells.html>

Výchozí materiál

Buňka bakterií



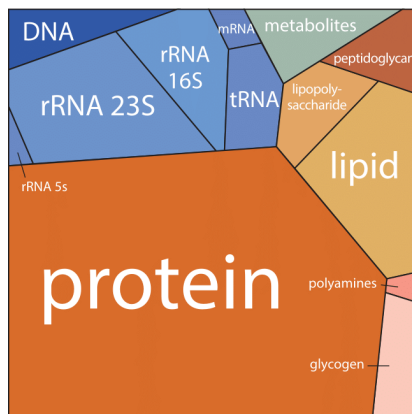
Buňka bakterií:

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

➤ 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



❖ 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

❖ Kvantifikace NK

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

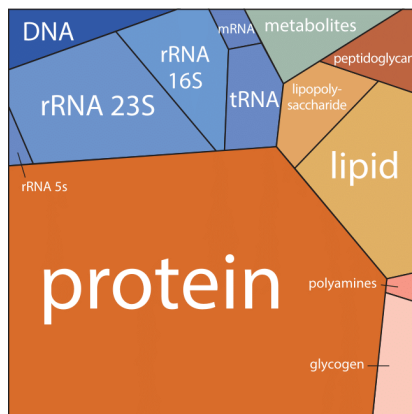
❖ Detekce NK:

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

➤ 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



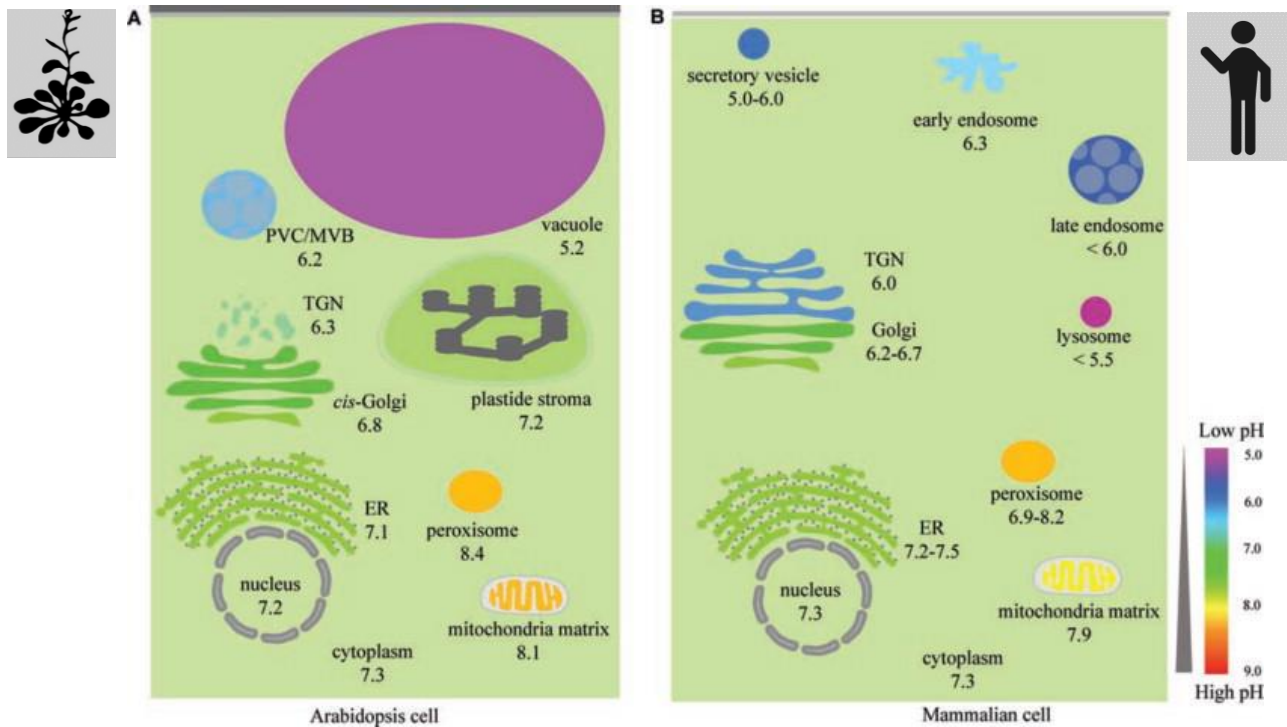
❖ Vlastní izolace NK

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

Izolační pufr

udržuje stabilní pH v roztoku

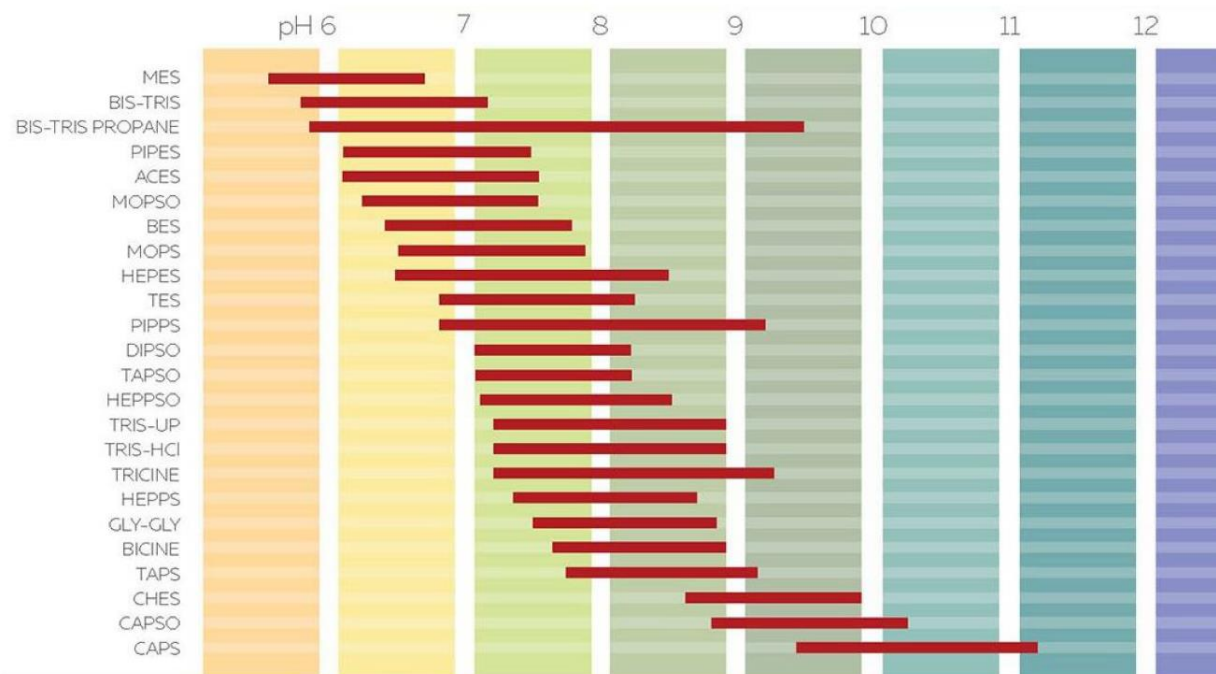
Buňky suspenduji v roztoku o vhodném pH, které by mělo být stejné jako pH cytosolu či dané organely.



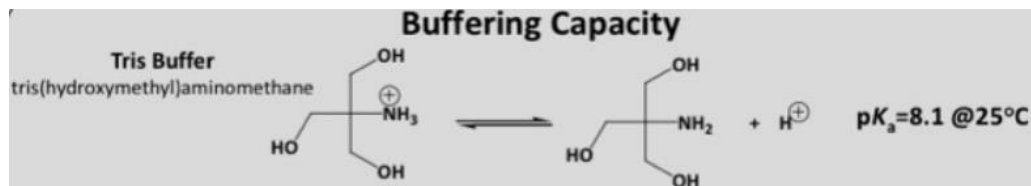
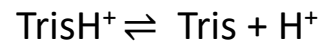
Srovnání pH v intracelulárních organelách rostlin a savců.

Izolační pufr

udržuje stabilní pH v roztoku



Tris pufr



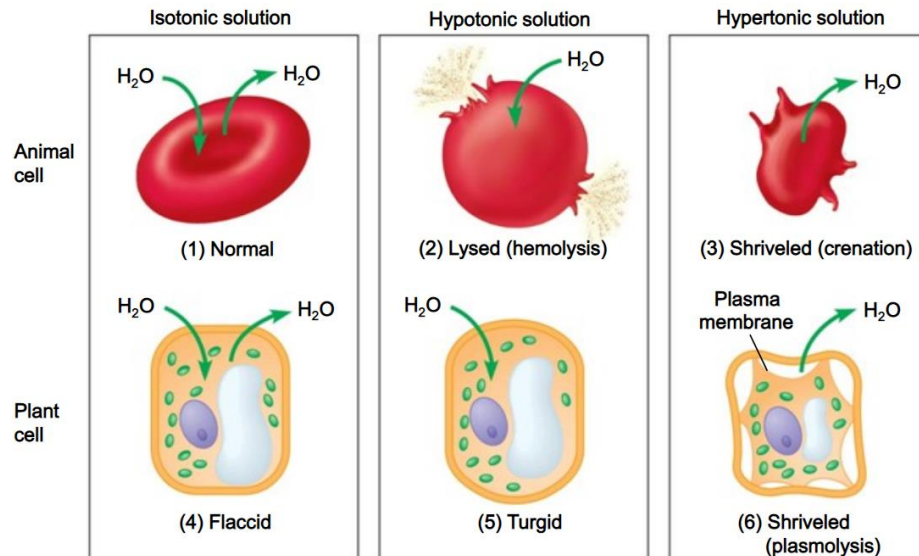
Chegg study

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.



Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

1. Rozrušení buněčných membrán / stěn

Fyzikální nebo fyzikálně-chemické postupy:

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

Mechanická lyze:



- v třecí misce v tekutém dusíku

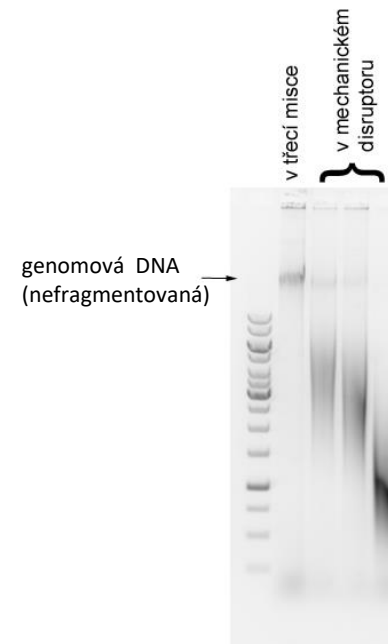


- mechanická homogenizace (pomocí skleněných kuliček)



- tyčové homogenizátory (rotor–stator)

Příklad rozpadu DNA při mechanické lyzi



1. Rozrušení buněčných membrán / stěn

Fyzikální nebo fyzikálně-chemické postupy:

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

Ultrazvuk:



© www.hielscher.com

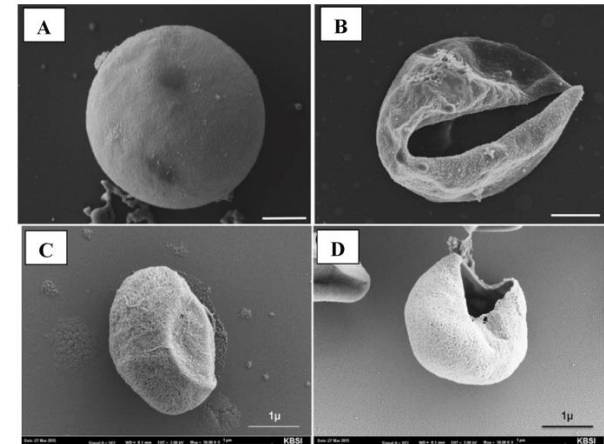


- ve zkumavce
- tyčové

Vliv ultrazvuku na morfologii řas

(Liu et al., Ultrasonics Sonochemistry, 2022)

Chlorella



*Chlamydomonas
mexicana*

1. Rozrušení buněčných membrán / stěn

Enzymatická lyze:

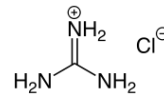
(spóry, kvasinky, rostliny ...)

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

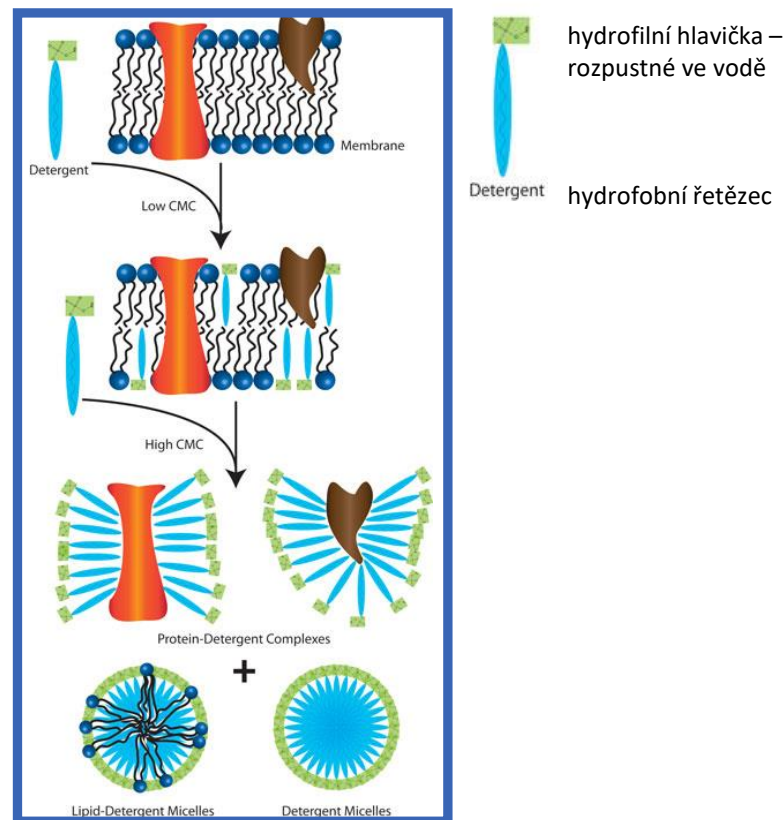
1. Rozrušení buněčných membrán / buněčných stěn

Detergenty: slouží k rozrušení a solubilizaci proteinů z lipidových membrán

Biologické membrány jsou tvořeny fosfolipidy - mají nabitou polární hlavičku.

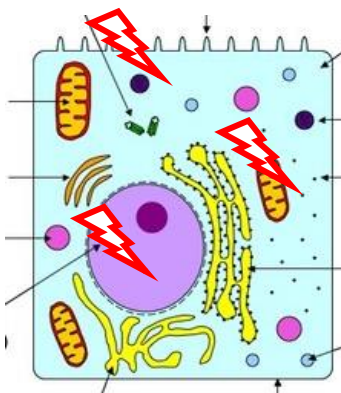
Pokud do roztoku s lipidickou membránou přidáme **detergent**, dochází k **integraci molekul detergentu dovnitř membrány** a molekuly detergentu se stávají součástí membrány.

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**.



CMC: Critical micelle concentration

Typy detergentů



MW: molecular weight

CMC: Critical micelle concentration.

Agregační číslo: počet molekul detergentu, které formují micelu.

Bod zákalu: maximální teplota, při které neiontové detergenty formují micely a nad kterou dojde k vytvoření dvou fází v roztoku (tedy detergent "vypadne" z roztoku).

NEIONTOVÉ DETERGENTY				
Název detergentu	MW	CMC	Agregační číslo	Bod zákalu
Triton X-100	647	$0.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ (25°C)	100-155	65°C
Triton X-114	537	$0.35 \times 10^{-3} \text{ M}$ (25°C)	*	23°C
Brij 35	627	90µM	24-40	>100°C
Brij 58	1122	7-77µM	70	>100°C
Tween 20	1227	$0.06 \times 10^{-3} \text{ M}$	76°C	*
Tween 80	1325	$0.012 \times 10^{-3} \text{ M}$ (25°C)	60	65°C
Nonidet P-40	573	0.05-0.3 mM (25°C)	*	*
ANIONTOVÉ DETERGENTY				
Sodium dodecyl sulfát (SDS)	288.38	7-10mM (25°C)	62	>100°C
Deoxycholát sodný	414.6	4-8mM (25°C)	3-12	*
N-laurosylsarkosin	293	14,6 mM	2	*
KATIONTOVÉ DETERGENTY				
CTAB	364.5	1mM (25°C)	61	*
OBOJETNÉ DETERGENTY				
CHAPS	614.9	6-10mM (25°C)	10	>100°C
CHAPSO	630.9	8mM (25°C)	11	90°C

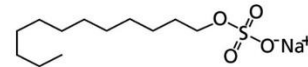
Nejčastěji používané detergenty

Ionogenní detergenty: hydrofilní skupina je ionogenní.

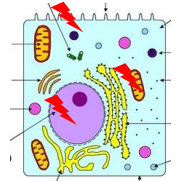
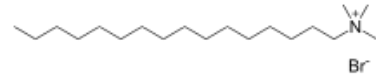
(obsahují náboj)

Buněčné membrány jsou rozrušeny a přítomné proteiny denaturují .

- **Aniontové:** Sodium dodecyl sulfate (SDS)



- **Kationtové:** Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)

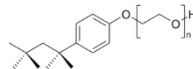


Neionogenní detergenty: hydrofilní skupina není ionogenní.

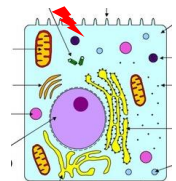
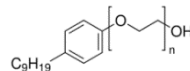
(neobsahují náboj)

Neionogenní detergenty umožní rozpustit buněčnou membránu při zachování jaderné membrány.

- Triton X100



- Nonidet (NP-40)

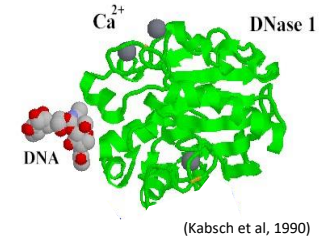


2. Inhibice nukleáz (inhibice DNáz a RNáz)

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)

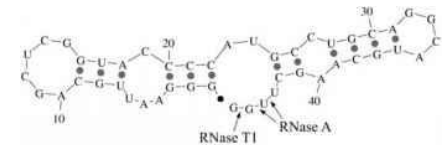
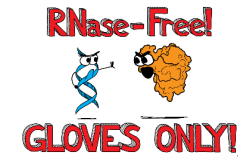
RNázy: RNase A: ssRNA, 3' konce nespárovaných C/U reziduí...

RNase I: ssRNA

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

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

....



2. Inhibice nukleáz (inhibice DNáz)

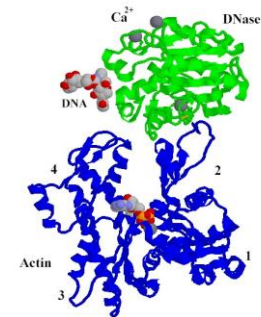
DNázy - hydrolýza DNA:

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

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

Inaktivace DNáz :

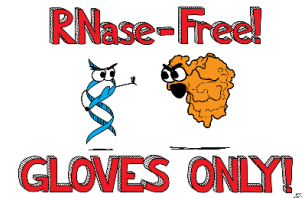
- **Nízká teplota** zastavuje enzymatickou aktivitu většiny enzymů - tj. izolace DNA na ledu redukuje enzymatickou aktivitu většiny nukleáz.
- **EGTA** (Moore 1981) **and EDTA** (Junowicz and Spencer 1973) (chelatační činidla)
- **Actin** (Mannherz et al. 2008, and Lazarides and Lindberg 1974)
- **Sodium dodecyl sulfate (SDS)** (Liao 1975)
- **2-mercaptoethanol** (Laskowski 1971)
- **2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid** (Moore 1981)
- **Alfatoxin B2a, G2, G2a, and M1** (Schabert 1970)
- **Calf spleen inhibitor protein** (Laskowski 1971)
- **Carbodiimide and cholesterol sulfate** (Iwamori 2000)
- **Iodoacetate** (Moore 1981)



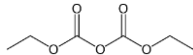
2. Inhibice nukleáz (inhibice RNáz)

RNázy - hydrolýza RNA:

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



Inaktivace RNáz:

- **Nízká teplota** zastavuje enzymatickou aktivitu většiny enzymů
- materiál (např. pipety): **oplach EtOH**
- buněčná lyze často provedena pomocí **Guanidium thiocyanatu / hydrochloride** (viz chaotropní činidla):
 - rozruší buňky
 - rozruší proteiny - včetně RNáz!!!!
- roztoky: **DEPC (Diethylpyrocarbonate)** 
 - Diethylpyrocarbonát (DEPC) - kovalentně modifikuje His, Cys a Tyr
 - 0.1% DEPC 2h/37°C → autoklávat a tak inaktivovat DEPC
 - DEPC se v H₂O rozkládá se na oxid uhličitý, H₂O a EtOH
 - Jeho zbytky nebo vedlejší produkty mohou inhibovat další biochemické reakce (in vitro translace)
 - DEPC nelze použít u chemikálií, které mají aktivní -O:, -N: nebo -S (Tris, HEPES)
- **Skladování RNA:** vždy při **-70 °C** (ochrana proti působení RNáz)

Odstranění RNA (při izolaci DNA)

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

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

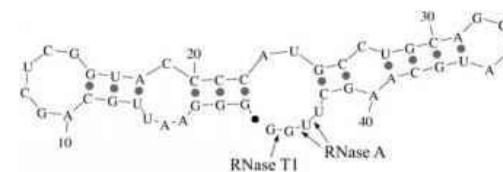
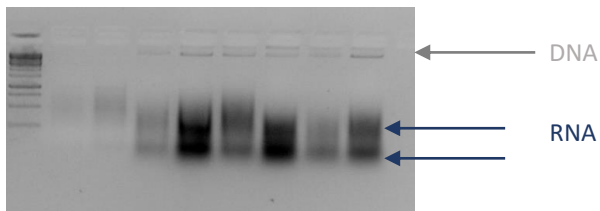
RNase I: ssRNA

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

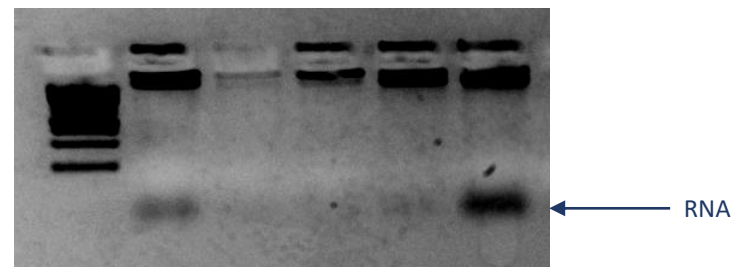
RNase T1: ssRNA, z 3' konce nespárovaných G reziduí...

....

RNA je v nadbytku nad DNA.



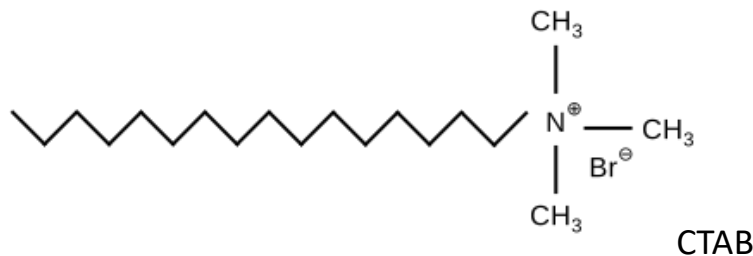
Příklad nedostatečného odstranění RNA
RNasou při izolaci genomové DNA.



3. Odstranění polysacharidů

Rostliny, houby a některé bakterie obsahují:

- Neutrální polysacharidy (mannan, inulin...): neinhibují restrikční enzymy
- Negativně nabité (pectin, xylan..): mohou inhibovat restrikční enzymy či polymerázy
Negativně nabité polysacharidy mohou být odstraněny za použití **cetyltrimethylamonium bromide (CTAB)** – kationtový detergent.
 - Kladně nabitý CTAB interaguje s negativně nabitými polysacharidy.
 - Záleží na koncentraci NaCl a kontaminantech - při koncentraci NaCl 0.7-0.8 M jsou polysacharidy precipitovány a DNA zůstává v roztoku.



4. Odstranění polyfenolů

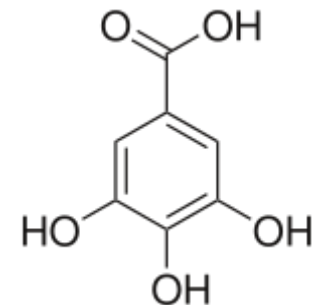
- Fce. polyfenolů: ochrana před oxidačním stresem (antioxidanty) a rostlinné obranné látky (proti průniku patogenu) atd.
- Např. taniny - zajišťují rostlině ochranu před býložravci svou svíravou, hořkou chutí.
- **Polyfenoly jsou vysoce reaktivní - tvorba chemických vazeb mezi proteiny a DNA během homogenizace.**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

Odstranění polyfenolů:

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

β-mercaptoethanol – silné redukční činidlo

BSA: (Bovine serum albumin)



Příklad polyfenolu:
např. 3,4,5-trihydroxybenzoic acid

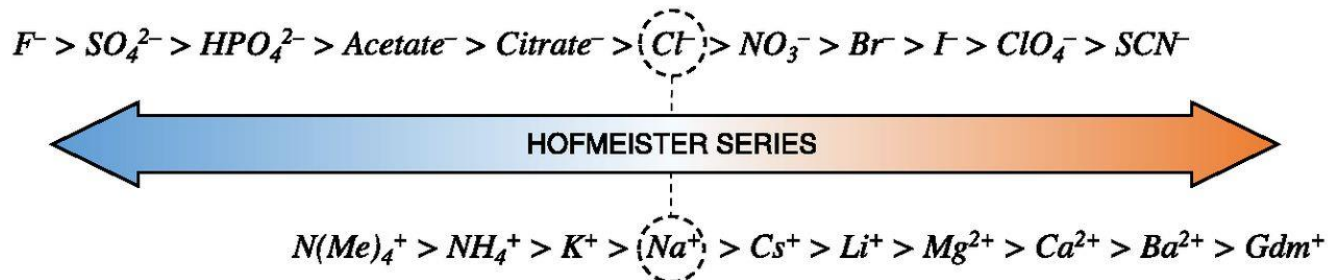
5a. Odstranění proteinů

Vysolení proteinů

Rozpusťnost 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



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

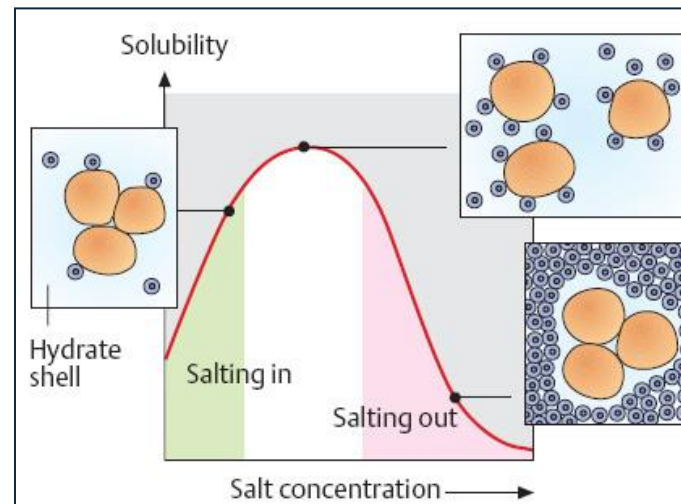
5a. Odstranění proteinů

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



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 Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty (jako např. na aktivitu nukleázy). Při odstranění vápenatých iontů (EDTA): stabilita enzymu je snížena, ale proteolytická aktivita zůstává.



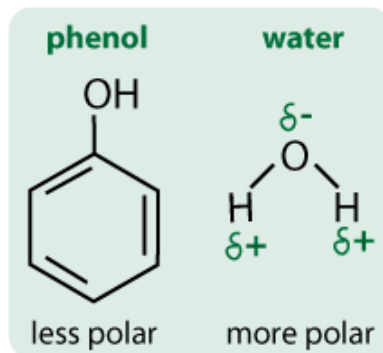
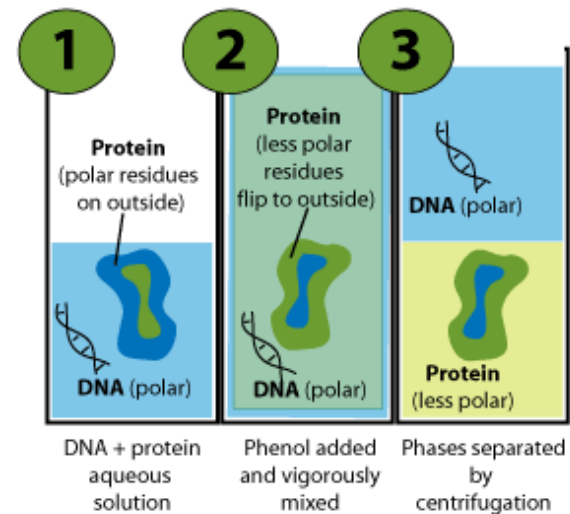
- Proteináza K zůstává ve vzorku.
- Ve vzorku zůstávají rozštěpené peptidy.

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 rozpouštěny ve fenolické fázi.

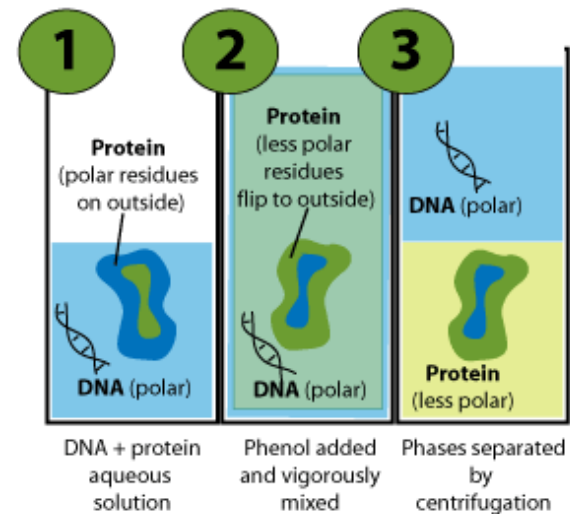
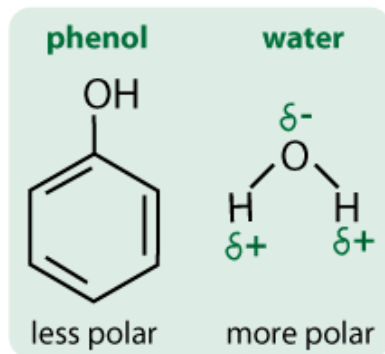


5c. Odstranění proteinů

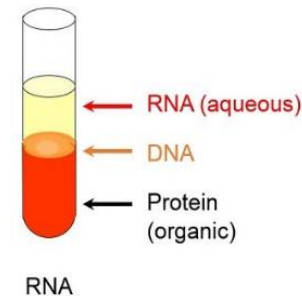
Fenol-chloroformová extrace

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

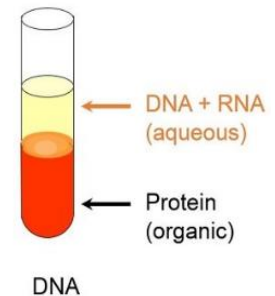
- **Fenol** v porovnání s vodou mnohem méně polární.
- **DNA:** se díky své polaritě rozpouští snadněji v polárním vodném roztoku.
- **Proteiny:** část řetězce je více polární a část méně polární (dle AMK sekvence) jsou – tj. proteiny hromadí na rozhraní mezi vodným roztokem a organickou fází nebo jsou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



Phenol, pH 4



Phenol, pH 8



Inverze fází

- Pokud vodná fáze obsahuje vysokou koncentraci soli nebo jiných látek, které by mohly zvýšit její hustotu, může dojít k inverzi fází (vodní fáze je po centrifugaci dole).



Phase Lock Gel

Gel, který vytváří pevnou bariéru mezi vodnou a organickou fází během centrifugace.



➤ Extrakce nukleových kyselin (NK)

❖ Extrakce a purifikace NK:

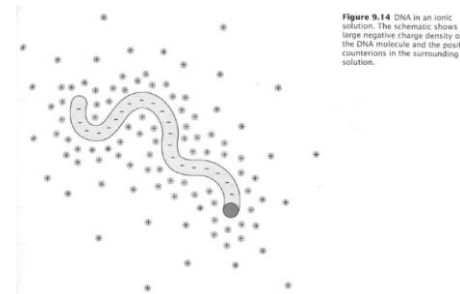
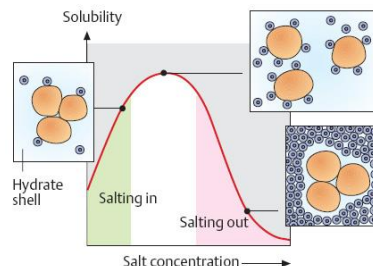
1. Rozrušení buněčných membrán / stěn
2. Inhibice nukleáz (DNáz/RNáz)
3. Odstranění polysacharidů
4. Odstranění polyfenolů
5. Odstranění proteinů
 - a. Vysolení proteinů
 - b. Proteináza K
 - c. Fenol-chloroformová extrace

❖ 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 součinu 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** (Nasiri et al., J Clin Lab Anal 19:229–232 (2005))



2. Srážení

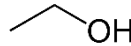
a. EtOH/Isopropanol

Ethanol (EtOH)

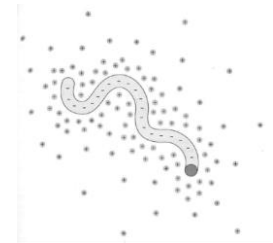
nebo

Isopropylalkohol

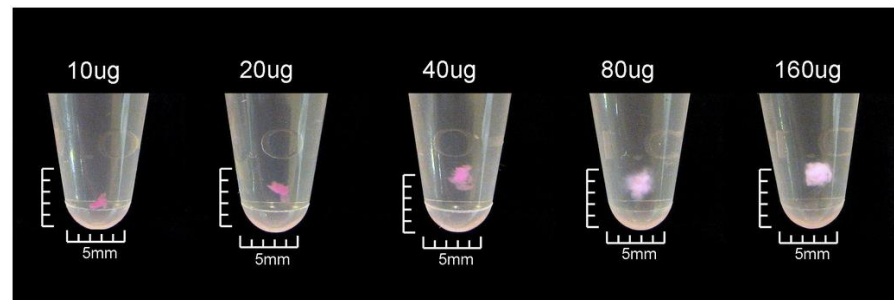
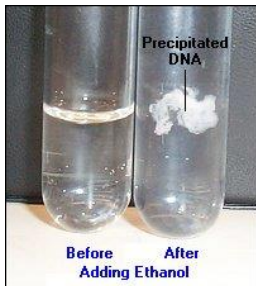
(= Izopropanol)



+ **sůl** (např. NaAc)



- Díky elektrostatickým interakcím je polární molekula **DNA snadno rozpustná v** polární **H₂O**
- **Kationty solí** (např. Na⁺, Mg²⁺, Li⁺...) **neutralizují náboj** cukr-fosfátového řetězce DNA (PO³⁻), ale v H₂O jsou ionty solí jsou víceméně volné (obklopené molekulami H₂O), netvoří iontové páry s DNA
- **Ethanol / Isopropanol umožní zformování iontových párů DNA-kationt**



2. Srážení

b. Multivalentní kationty

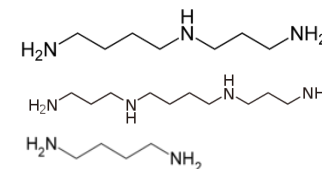
(např. polyaminy)

spermidine (3^+)

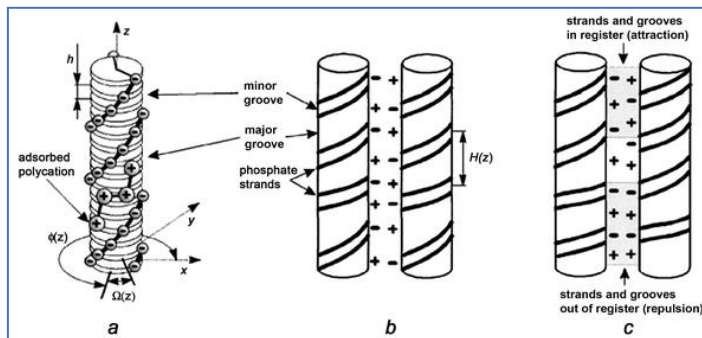
spermine (4^+)

putrescine (2^+)

...



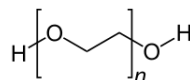
- **Polyvalentní kationty stabilizují dvoušroubovici DNA (obvykle v B-formě) což vede k precipitaci DNA.**
- **Vysoce selektivní precipitace DNA (nevhodné pro genomovou DNA a fragmenty <50bp).**
- Pokud se chcete vyhnout F:CH:IAA extraci.
- **Vhodné pro izolaci DNA-vazebných proteinů.**
- Odmytí polyaminu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



2. Srážení

c. Polyethylene glycol (PEG)

polyethylene oxide



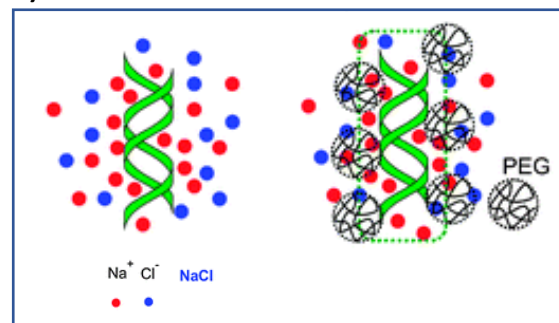
rozsah Mr:

300 g/mol - 10,000,000 g/mol

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

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



Khimji et al., Chem. Commun., 2013, 49, 1306-1308

Lis JT, Schleif R., Nucleic Acids Res. 1975 Mar;2(3):383-9.

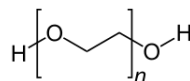
K.R.Paithankar and K.S.N.Prasad, Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 6, 1991

<http://blog.genohub.com/peg-size-selection-and-precipitation-of-dna-libraries-how-ampure-or-spriselect-works/>

2. Srážení

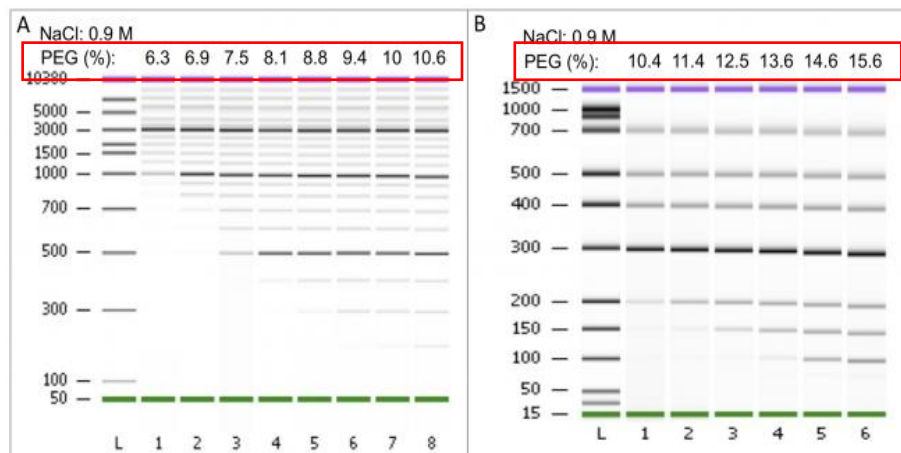
c. Polyethylene glycol (PEG)

polyethylene oxide



rozsah Mr:

300 g/mol - 10,000,000 g/mol

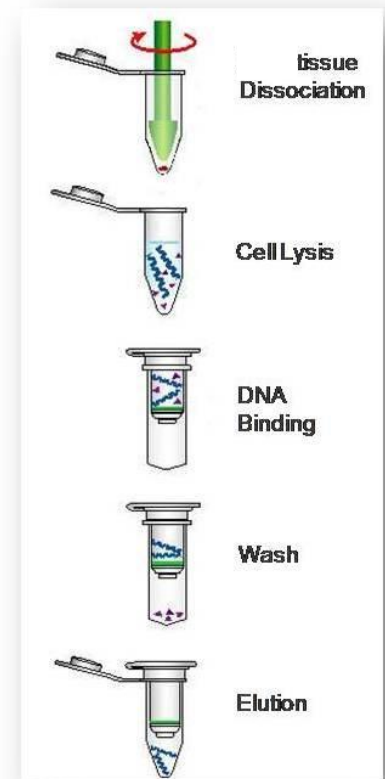
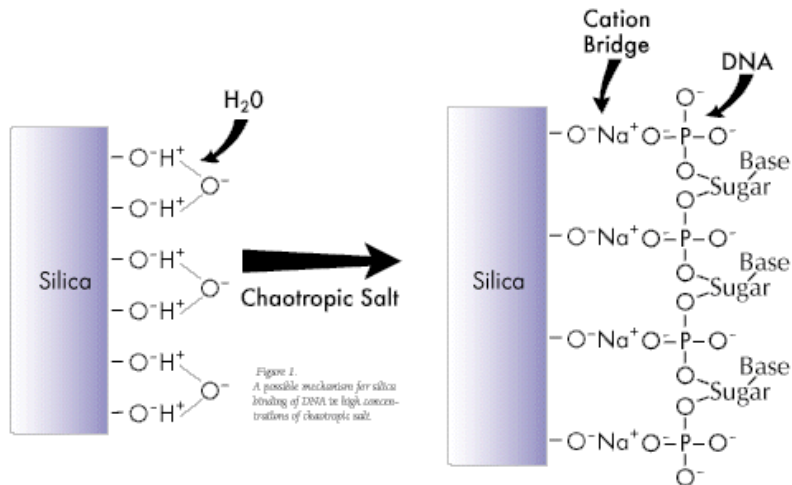
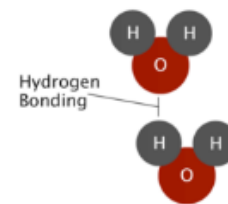


3. Adsorpce na silikát

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. Guanidinium hydrochloride





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



DNeasy Blood & Tissue Kits

For spin-column or 96-well extraction of total DNA from animal blood and tissues and from cells, yeast, bacteria, or viruses



QIAwave DNA Blood & Tissue Kit

For a more eco-friendly alternative to our standard kit for extracting total DNA from animal blood and tissues, cells, yeast, or bacteria.



QIAamp DNA Kits

For isolation of genomic, mitochondrial, bacterial, parasite or viral DNA



EZ1 & 2 DNA Investigator Kit

For automated purification of DNA from forensic and HID samples on the EZ1 XL or EZ2 Connect Fx Instruments



DNeasy Plant Pro and Plant Kits

For extraction of total cellular DNA from plant cells and tissues or fungi, or genomic DNA from plant cells, tissues and seeds



QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

For purification of genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues



QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit

For automated high-throughput isolation of total DNA from blood, cells, and tissues



QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit

For isolation of gDNA from stool samples



FlexiGene DNA Kit

For scalable isolation of genomic DNA from whole blood, buffy coat, and cultured cells in a single tube



QIAasympyony Certal Kits

For purification of residual host cell DNA and viral nucleic acids from bioprocess samples



QIAamp DNA Blood Kits

For purification of genomic, mitochondrial or viral DNA from blood and other body fluids



EZ1 & 2 DNA Blood Kits

For automated purification of high-quality DNA from 1 - 24 samples per run



EZ1 & 2 DNA Tissue Kit

For automated purification of high-quality DNA from 1 - 24 samples per run



QIAasympyony DNA Investigator Kit

For automated purification of DNA from 1 - 96 samples on the QIAasympyony SP Instrument



QIAxcel DNA Kits

For automated analysis of DNA fragments using QIAxcel instruments



Puregene Kits

For purification of archive-quality DNA from a wide variety of sample types



GeneRead DNA FFPE Kit

For efficient recovery of high-quality genomic DNA (gDNA) from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue



Blood & Cell Culture DNA Kits

For isolation of up to 20 µg, 100 µg or 500 µg high-molecular-weight DNA from blood and cultured cells



QIAGEN Genomic-tips

For isolation of up to 20 µg, 100 µg or 500 µg high-molecular-weight DNA from a wide range of samples

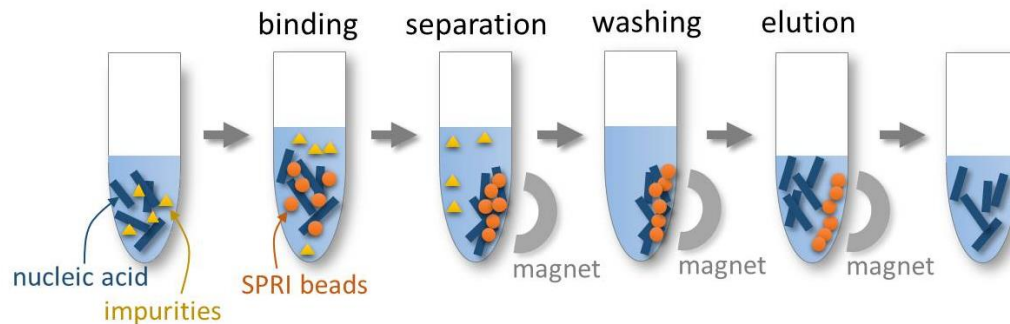
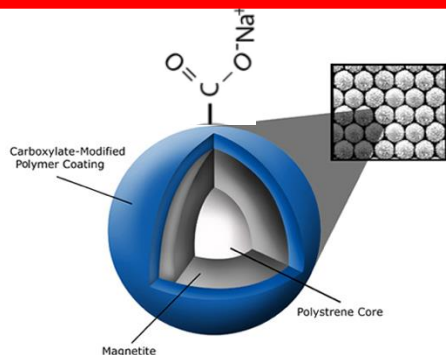


QIAamp 96 DNA Swab BioRobot Kit

For automated high-throughput DNA purification from swabs

1. + 2. + 3.

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



- 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 nukleové kyseliny **v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG) a soli**.
- Selektivně váží nukleové kyseliny dle typu a velikosti

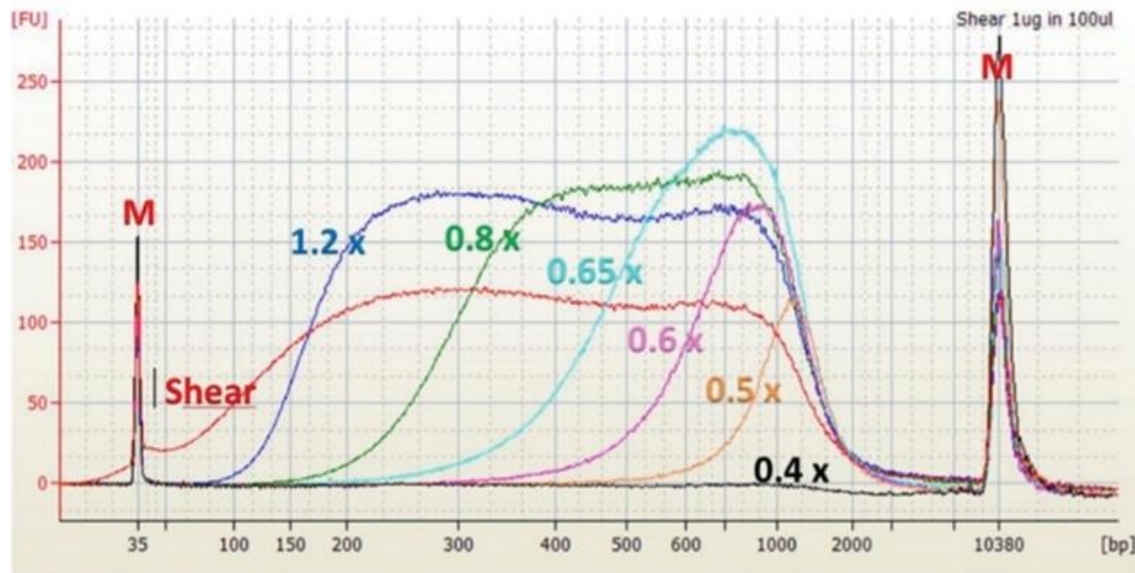
PRODUCT NAME	COMPANY
AMPure XP	Beckman Coulter Life Sciences
Mag-Bind TotalPure NGS	Omega Bio-tek
HigherPurity DNA Purification Beads	AG Scientific
ProNex	Promega
NucleoMag	Macherey-Nagel
PCRClean DX	Aline Biosciences

- 1 ul AmpureXP naváže více než 3 ug DNA.
- Poměrně cenově náročné (cca. 5ml ~ 10 tis. Kč)

Table 1: Different commercial versions of SPRI beads on the market.

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

- DNA či RNA se nespecificky a reverzibilně váže na oxid křemičitý nebo karboxylové skupiny v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG) a soli
- Kuličky většinou dodávány v 20% PEG, 2.5M NaCl
- Jelikož je imobilizace závislá na koncentraci PEG a soli v reakci, je důležitý **objemový poměr kuliček k DNA**:



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

4. Izolace vysokomolekulární DNA

Pro specifické analýzy (počáteční stádia apoptózy, délka telomer)

❖ **Standardní izolace DNA: 30 – 50 kb**

❖ **Vysokomolekulární DNA: > 1 Mb**

❖ Agaróza působí jako pevná, ale porézní matrice, která umožňuje difúzi různých reagensů pro purifikaci DNA a následné manipulace, přičemž zabraňuje fragmentaci DNA

Extrakce DNA v pufru s EDTA a mannitem:

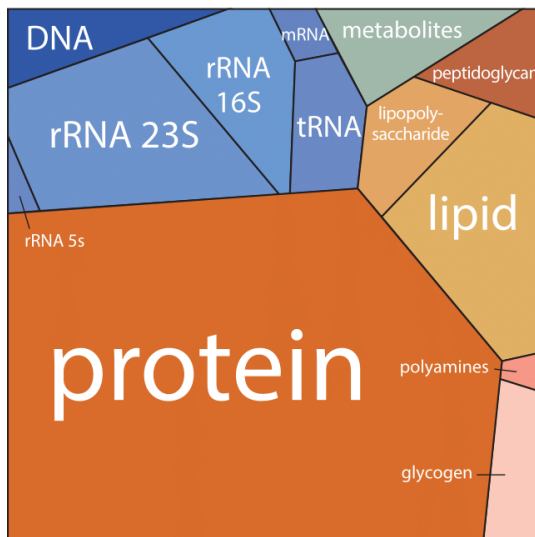
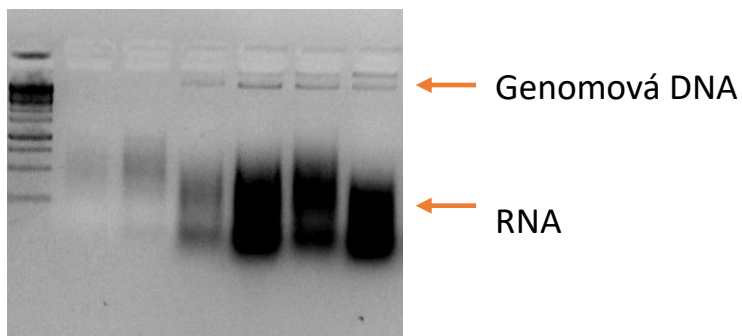
- + 2% „low melting point“ agaróza
- ...
- Odstranění proteinů – **Proteináza K**
- Inaktivace Proteinázy K pomocí PMSF (pokud je nutné vysokomolekulární DNA dále štěpit restrikcčními enzymy)
- Promytí
- ...

tzv. agarózové bločky



5. Izolace RNA

RNA je v buňkách v nadbytku oproti DNA:



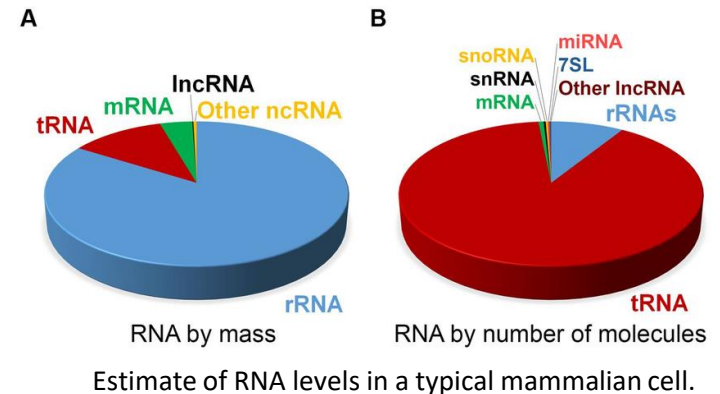
Voronoi diagram: složení buňky *E. coli* (po 40 min od dělení). Každá oblast mnohoúhelníku představuje relativní podíl odpovídající složky v suché hmotě buňky.

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

5. Izolace RNA

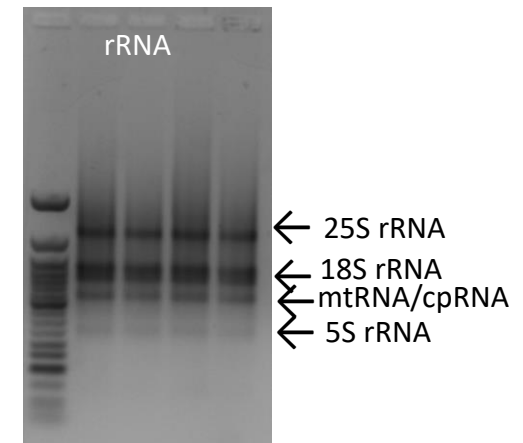
RNA je v buňkách v nadbytku oproti DNA:

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



Izolace RNA: podobný postup jako u izolace DNA

- ❖ buněčná lyze často provedena pomocí Guanidium thiocyanátu nebo Guanidium hydrochloride (viz chaotropní činidla):
 - 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





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



QIAwave RNA Mini Kit

For a more eco-friendly alternative to our standard kit for extracting total RNA from cells, tissues, and yeast.



RNeasy Kits

For purification of total RNA from cells, tissues, and yeast



RNeasy Plus Kits

For fast purification total RNA from cells and tissues using gDNA Eliminator columns or plates



RNeasy Plant Mini Kit

For purification of total RNA from plants and fungi



QIAzol Lysis Reagent

For efficient lysis of fatty and standard tissues before RNA isolation



QIAasympphony RNA Kit

For automated purification of total RNA, or total RNA with miRNA, from tissues or cells



RNeasy Lipid Tissue Mini Kit

For purification of up to 100 µg total RNA from fatty tissues and other types of tissue



PAXgene Blood miRNA Kit

For purification of miRNA and total RNA from whole blood



RNeasy FFPE Kit

For purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections



RNeasy DSP FFPE Kit

For purification of total RNA from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue sections for in vitro diagnostic use



QIAamp RNA Blood Mini Kit

For purification of cellular RNA from fresh whole blood



RNeasy 96 QIAcube HT Kit

For automated high-throughput isolation of RNA from animal and human cells and tissue



PAXgene Blood RNA Kit IVD

For isolation and purification of intracellular RNA from blood stabilized in PAXgene Blood RNA Tubes



RNeasy Universal Kits

For purification of total RNA from all types of tissue



RNAprotect Reagents and Tubes

For immediate stabilization of RNA in tissues, cultured cells and bacterial cultures



RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

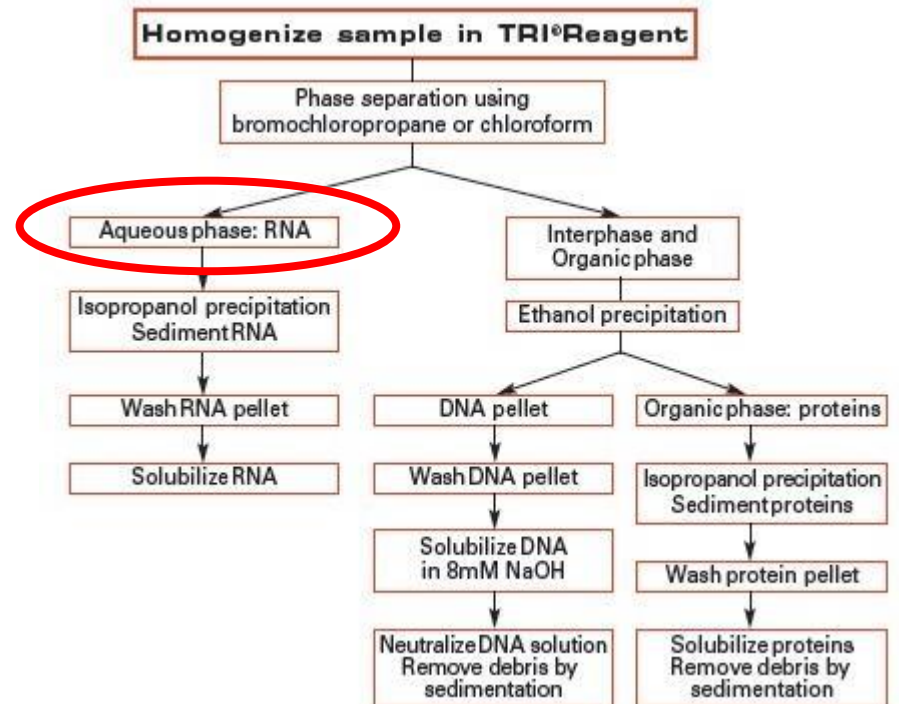
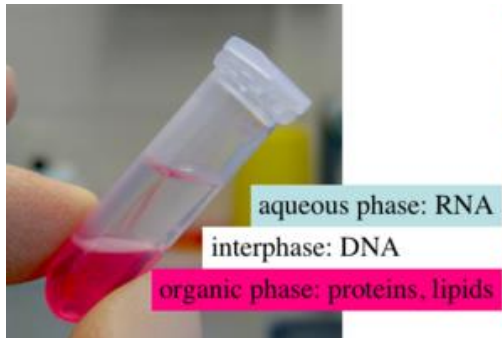
For purification of up to 100 µg total RNA from fiber-rich tissues

„Guanidinium – phenol – chloroform extraction“

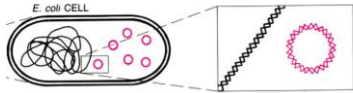
TRI Reagent (Sigma)

TRIzol (Invitrogen)

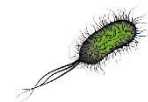
Trisure (Bioline) ...



6. Izolace plazmidové DNA „Birnboimova metoda“



plazmidová DNA x bakteriální genomová DNA



E.coli

Overnight Culture

Pellet and resuspend cells
Alkaline lyse and neutralize

Add Column Preparation
Solution and spin

Bind DNA
Spin

Wash
Spin

Elute ready-to-use
plasmid DNA

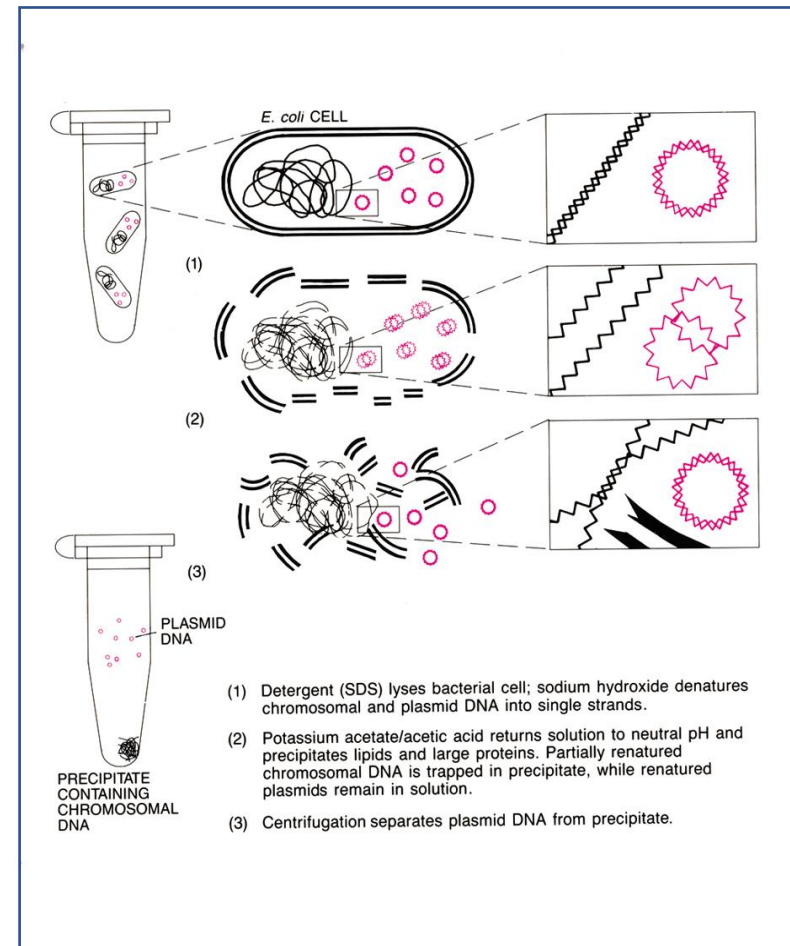


6. Izolace plazmidové DNA „Birnboimova metoda“

plazmidová DNA x bakteriální genomová DNA
→ separace dle velikosti

Postup:

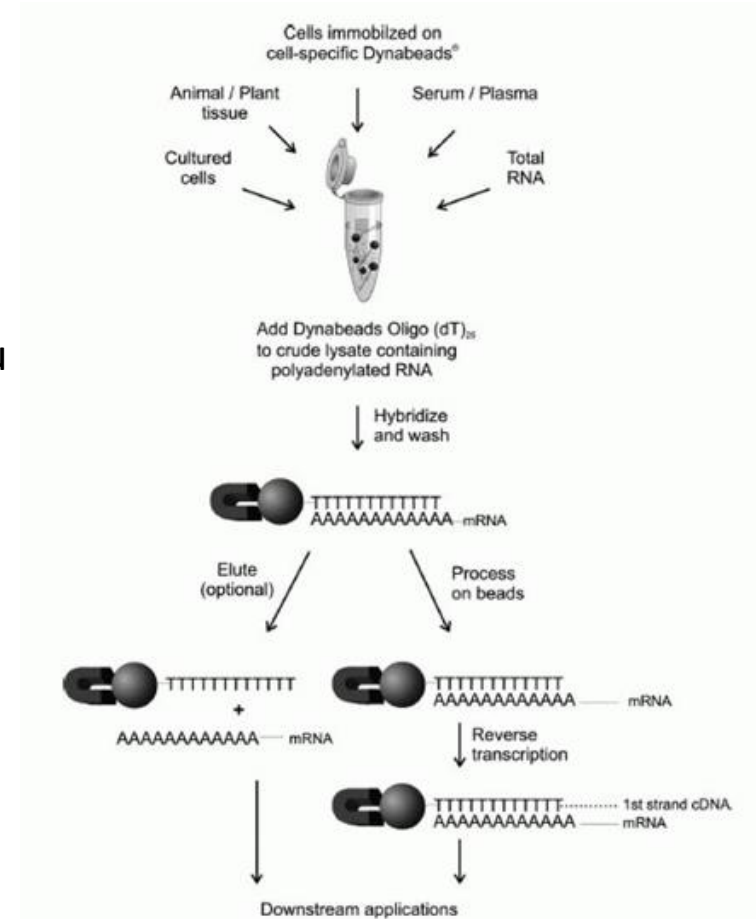
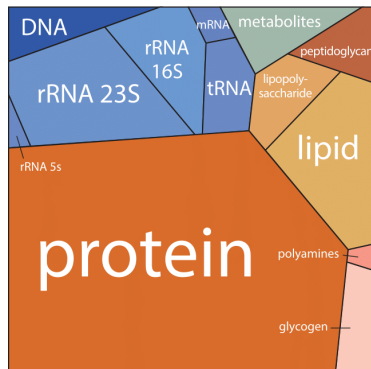
- **alkalická denaturace** (NaOH, pH=12.0 + SDS)
 - SDS rozbíjí buněčnou membránu
 - chromosomální DNA a proteiny jsou denaturovány
 - denaturuje i plazmidová DNA
- **neutralizace** (KAc, pH 5.5)
 - **plazmid renaturuje, dlouhá bakteriální DNA ne** a je vyprecipitována z roztoku (navíc je genomová DNA 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.

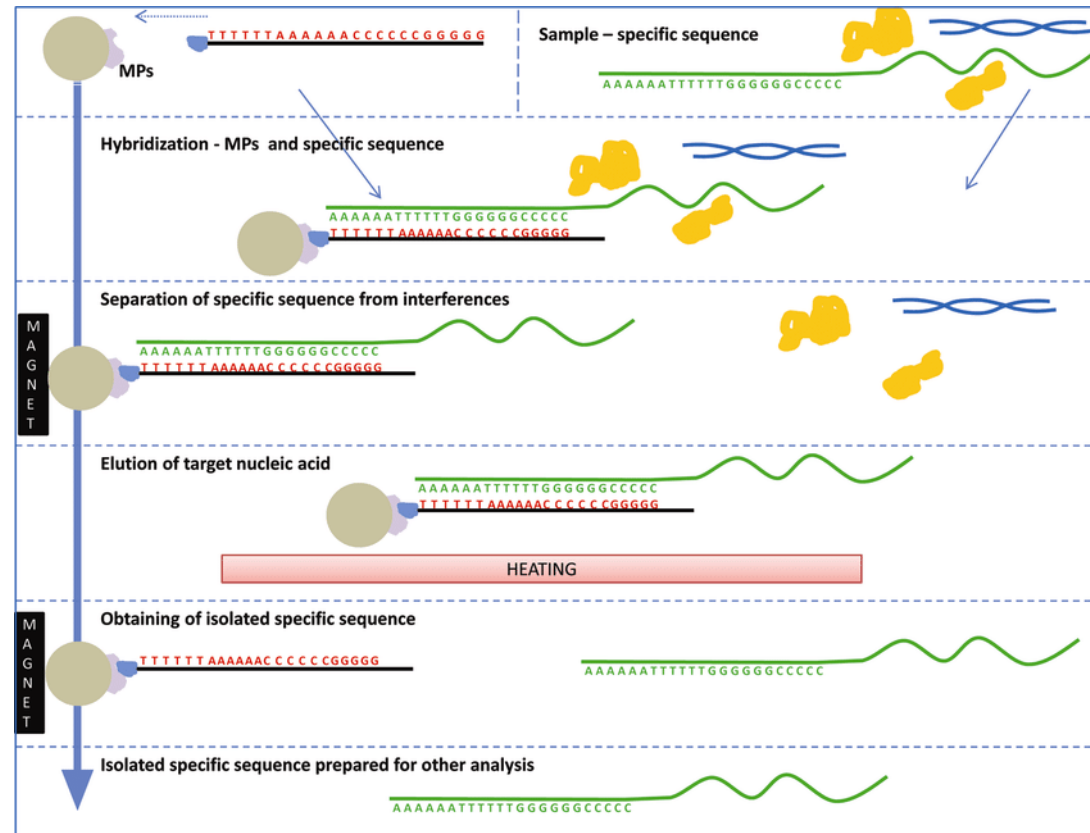


https://www.cd-bioparticles.com/t/Nucleic-Acid-Separation_49.html

7b. Selektivní izolace RNA/DNA dle specifické sekvence

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

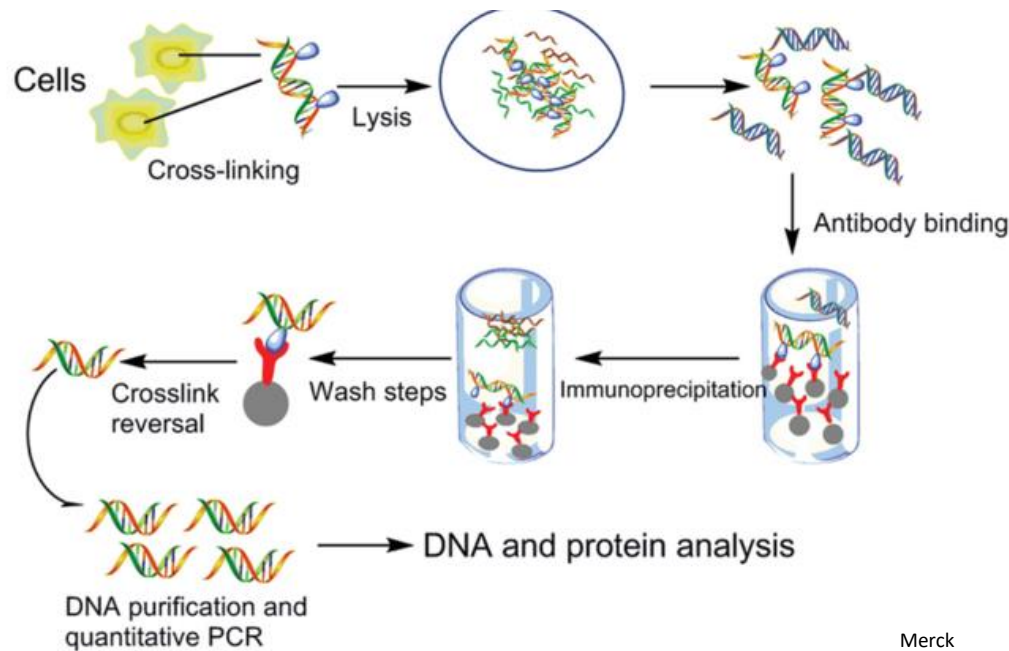
- na specifickou sekvenci DNA/RNA



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

7c. Selektivní izolace RNA/DNA pomocí asociovaných proteinů

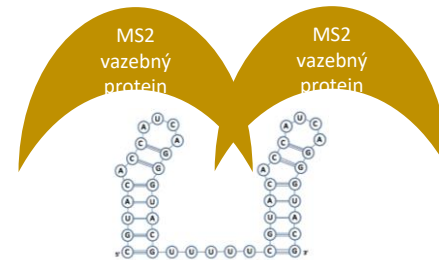
Selektivní vychytání RNA či DNA díky protilátkám, které se váží **na protein**, který se specificky váže na danou oblast (ChIP – Chromatin Immunoprecipitace)



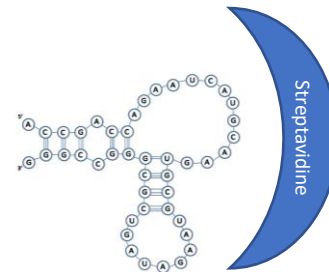
7d. Selektivní izolace RNA pomocí aptamerů

RNA aptamery:

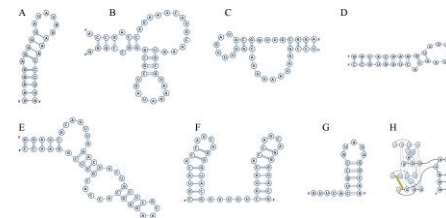
MS2: je rozpoznán MS2 vazebným proteinem



S1: je rozpoznán Streptavidinem



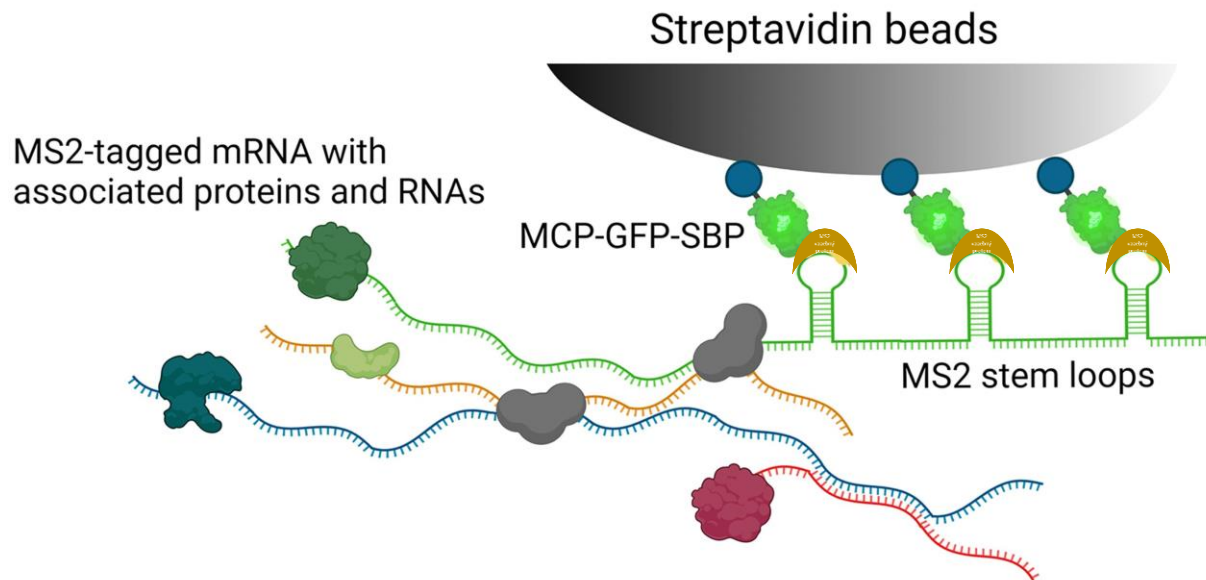
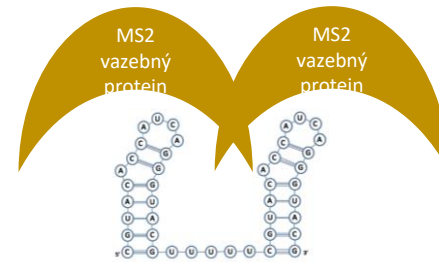
review Gemmill et al., 2019
doi.org/10.1139/bcb-2019-0041



7d. Selektivní izolace RNA pomocí aptamerů

RNA aptamery:

MS2: je rozpoznán MS2 vazebným proteinem



➤ Kvantifikace a detekce izolované NK

❖ Kvantifikace NK

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

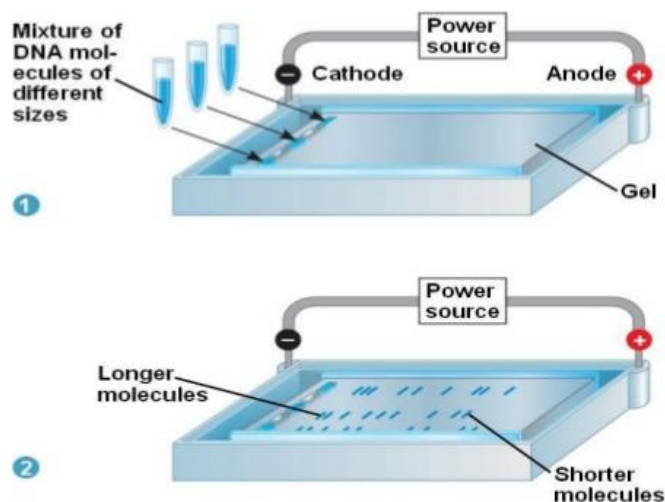
❖ Detekce NK:

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

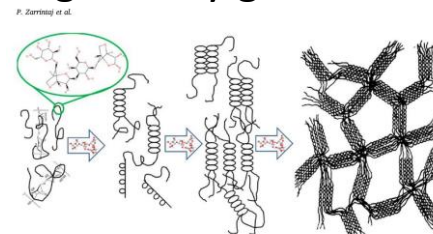
❖ Kvantifikace NK

1. Odhad z gelové elektroforézy

Elektroforéza využívá této schopnosti k separaci makromolekul na základě **náboje, konformace nebo velikosti**



Agarózový gel



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



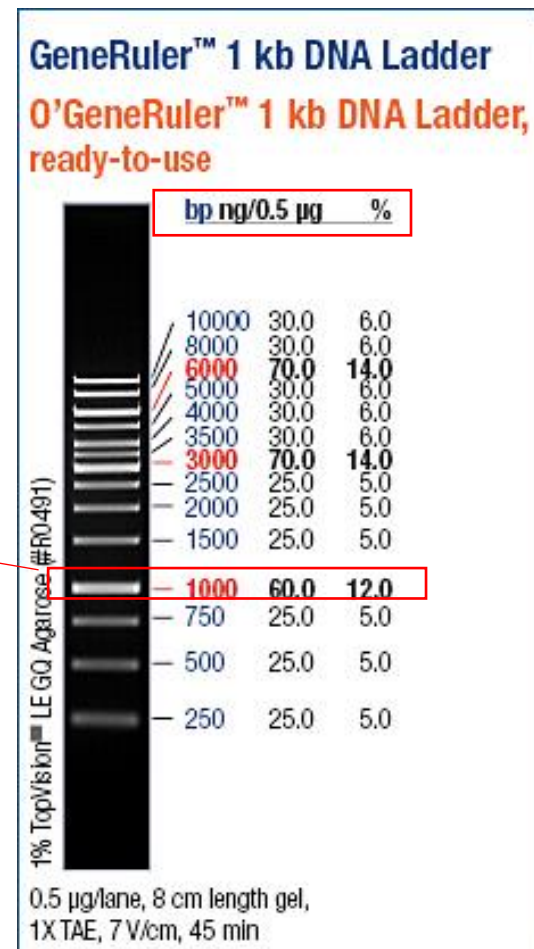
(3% agarózový gel, EtBr)

Nesvadbova et al., ACTA VET. BRNO 2019

❖ Kvantifikace NK

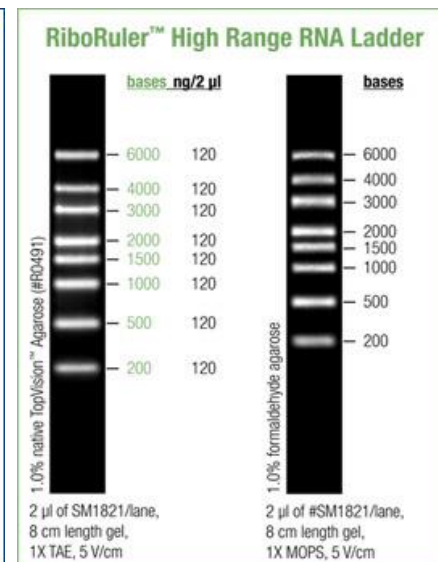
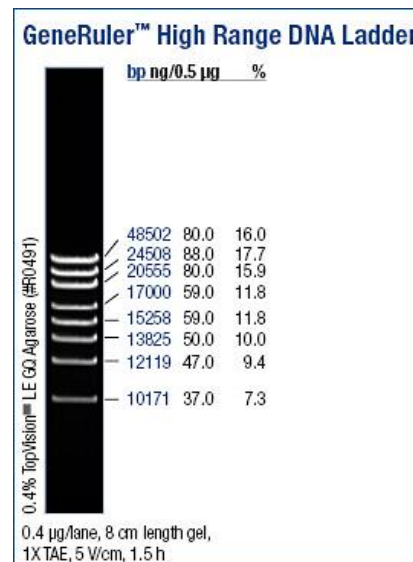
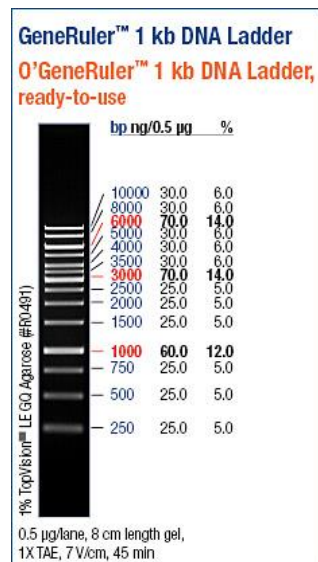
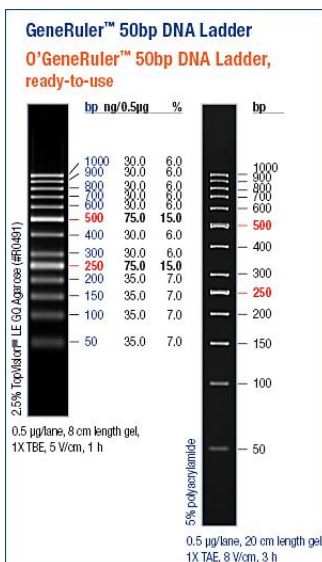
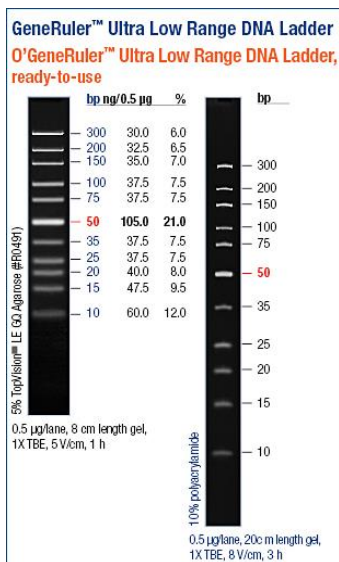
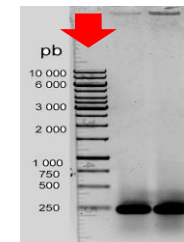
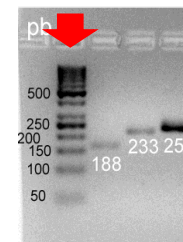
1. Odhad z gelové elektroforézy

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



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**.

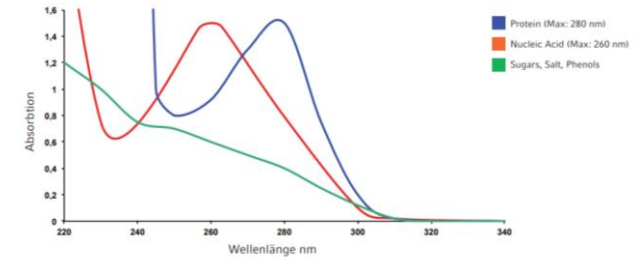
Žebříček **RNA transkriptů:** vhodné pro gely s RNA.

❖ Kvantifikace NK

2. Pomocí absorbance

Absorpce světla vlnové délky:

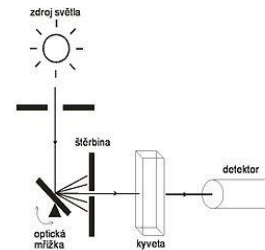
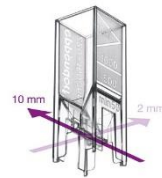
- **260 nm** - nukleové kyseliny
- **280 nm** - proteiny
- **230 (320) nm** – kontaminace (fenolické látky, EDTA, močovina...)



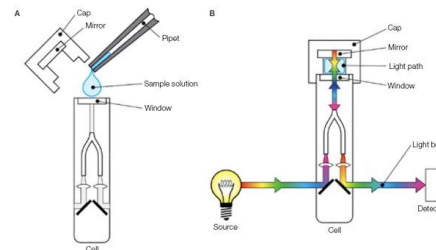
Purity Ratios:
a) $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$
b) $A_{260}/A_{230} > 2.0$

➔ low a) Contamination by proteins
low b) Contamination by organic compounds including proteins

UV-transparentní kyvety:



pro vzorky s malým objemem (~1 µl):



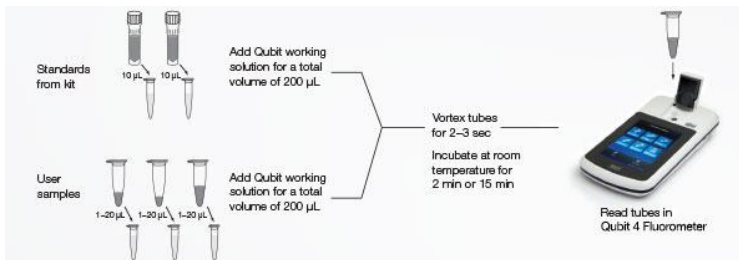
❖ Kvantifikace NK

3. Fluorimetrická kvantifikace

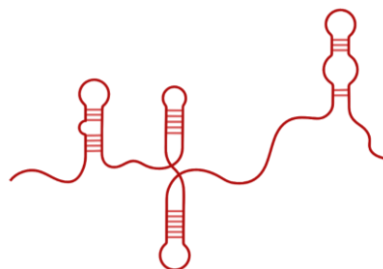
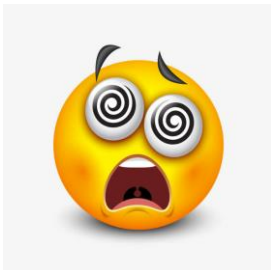
Vhodné zvláště pro málo koncentrované vzorky DNA / RNA

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:

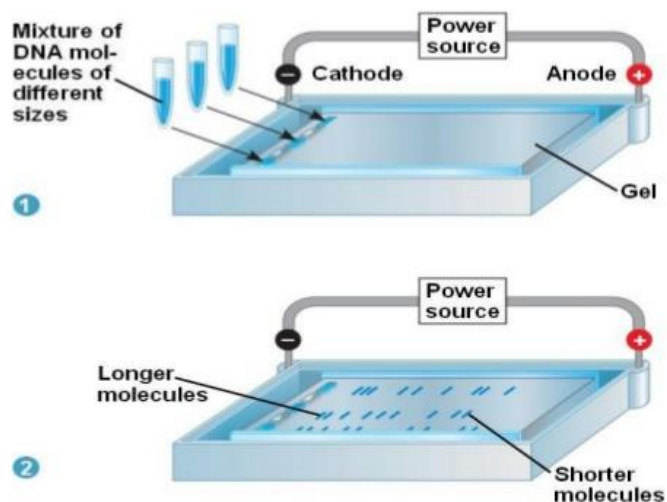


ng/ul :
298
278
388
322

výsledná
koncentrace
není ovlivněná
kontaminacemi

❖ Detekce NK

Elektroforéza využívá této schopnosti k separaci makromolekul na základě **náboje, konformace nebo velikosti**

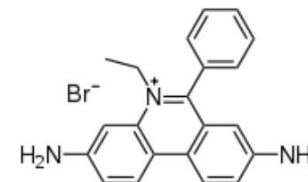


❖ Detekce NK

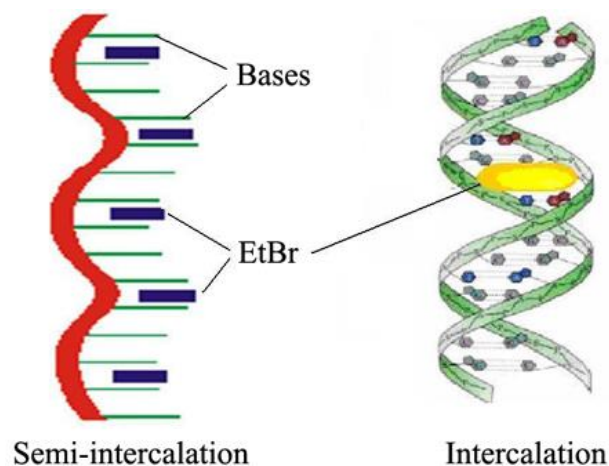
1) Fluorescenční detekce

Ethidium bromide

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



- **Interkalací EtBr** do hydrofóbního prostředí DNA se díky zbavení se molekul H_2O **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



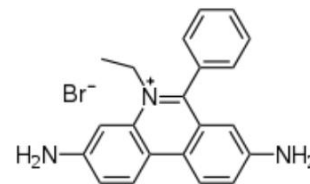
- Interkalace je závislá i na sekvenci (GC/AT).
- Vedle standardní interkalace se může EtBr semi-interkalovat.

❖ Detekce NK

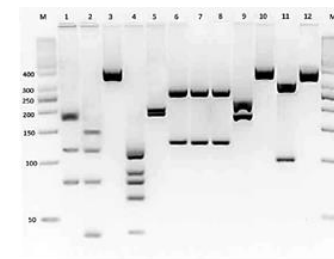
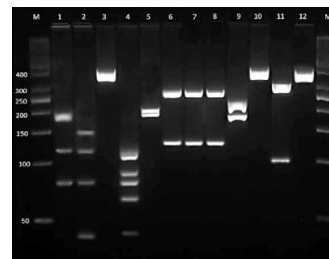
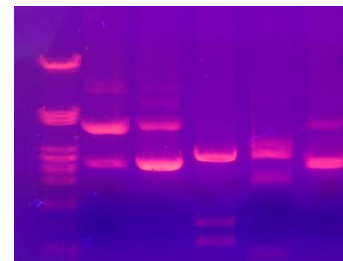
1) Fluorescenční detekce

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

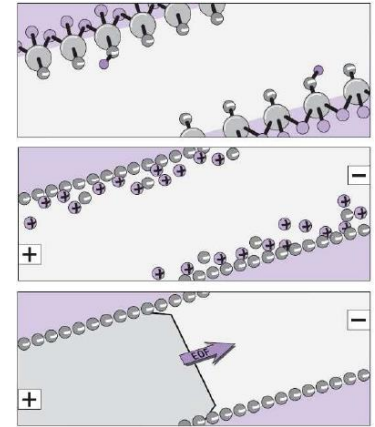
1 – 5 ng (limit detekce DNA)

5 ng (limit detekce RNA)

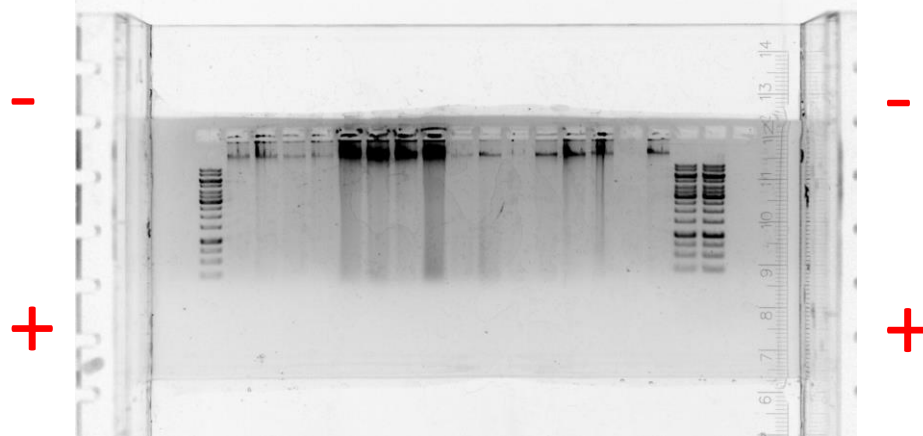
Elektroendoosmóza

= neselektivní pohyb částic

- V přítomnosti nabitých sulfátových a karboxylových skupin vzniká elektrická dvojvrstva.
- Mobilní část **iontů se pohybují směrem k elektrodě**, dochází ke vzniku proudění.
- EEO je způsobena **tokem vody**, která je pod vlivem těchto volných iontů unášena směrem ke katodě.
- Dochází k **neselektivnímu a tedy nežádoucímu pohybu částic**.



Pozn.: díky náboji, ale hlavně díky EEO putuje EtBr ke katodě.

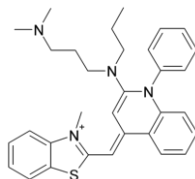


Agaróza je prodávána v několika úrovních čistoty podle množství zbytkových nabitých sulfátových a karboxylových skupin.

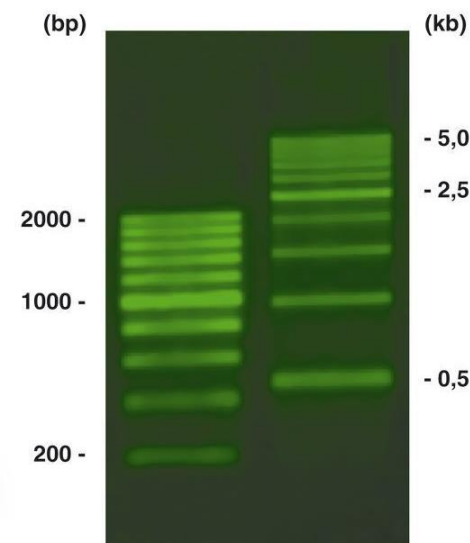
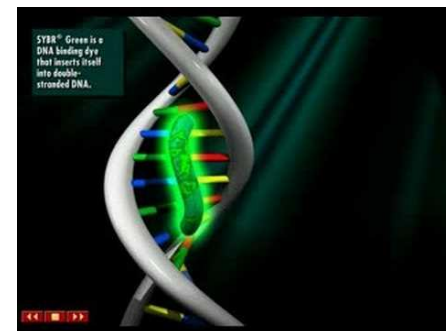
❖ Detekce NK

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 epilluminátorem).
 - Detekce ssDNA and RNA: 100–300 pg/band (s použitím 254 nm epi-illuminační).
- trans-iluminátor**-světlo prochází skrz, detektor na druhé straně vzorku
epi-iluminátor-osvětlení a detekce z jedné strany vzorku
- Využití při real-time PCR.



SYBR Green I

60 pg (limit detekce DNA)

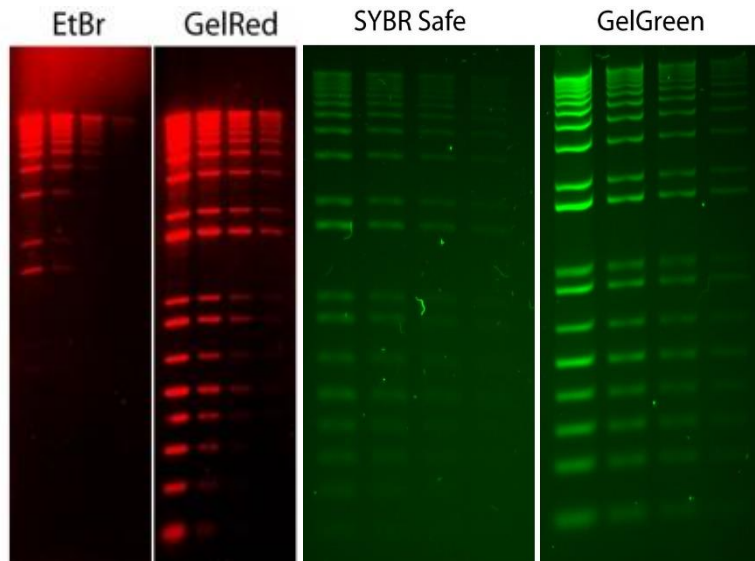
1 ng (limit detekce RNA)

❖ Detekce NK

1) Fluorescenční detekce

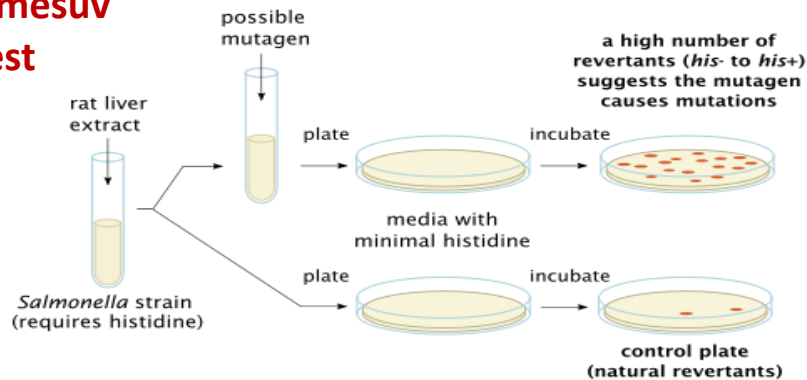
Syber Green I a mnoho dalších:

- ***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
- ...



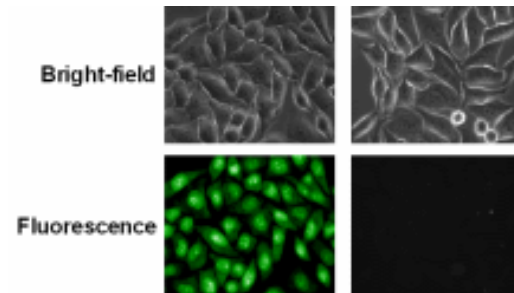
Toxicita fluorescenčních barev

Amesův test



Porovnání mutagenicity: frakce S9 z krysích jater mimikuje metabolické pochody v savčích buňkách – lze detekovat DNA mutace.

(+1 frameshift v Salmonella TA98 v přítomnosti S9 frakce)

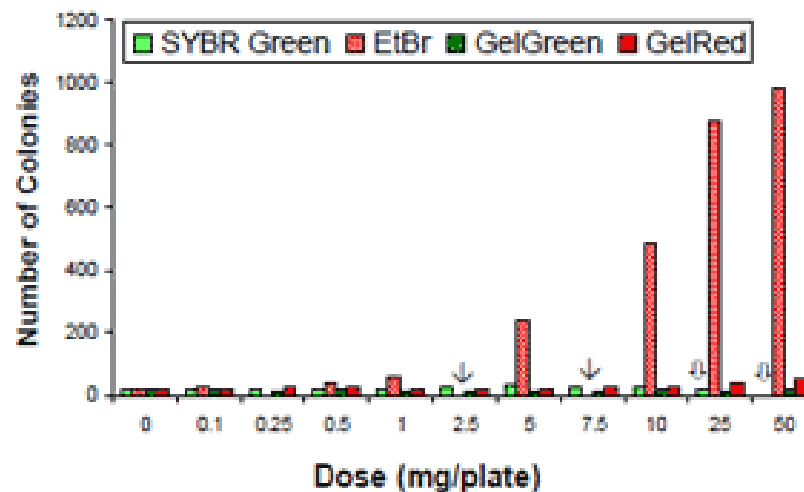


Penetrace skrze buněčnou membránu

Toxicita fluorescenčních barev

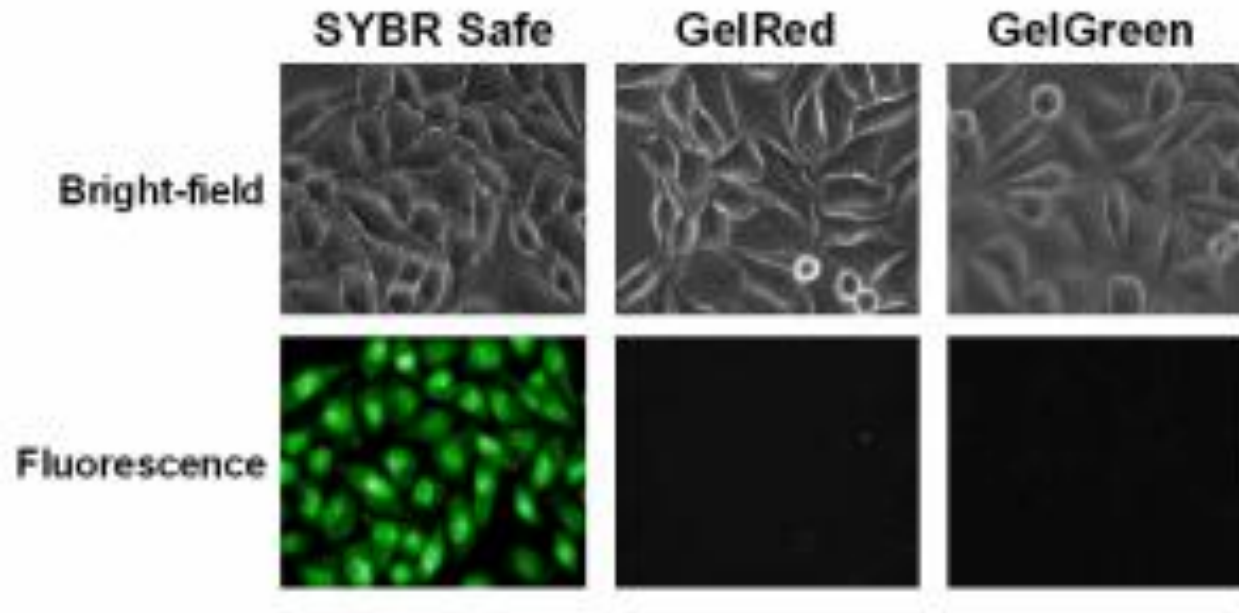
Porovnání mutagenicity mezi:

- SYBR Green I
- EtBr
- GelGreen
- GelRed



- **EtBr je mutagenní v přítomnosti S9** (musí být metabolizován)
- Otevřená šipka ukazuje, že **SybrGreen I je při této koncentraci cytotoxický**.
- Plná šipka značí, že EtBr nebyl v této koncentraci testován.

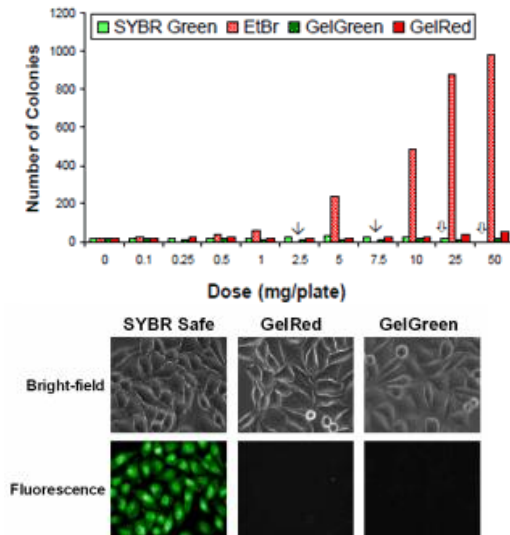
Toxicita fluorescenčních barev



GelRed and GelGreen DNA barvy jsou bezpečnější, protože nemohou **penetrovat přes buněčnou membránu a vázat buněčnou DNA**.

HeLa buňky – inkubovány 30min/37°C s 1X SYBR Safe, GelGreen nebo GelRed.

Toxicita fluorescenčních barev



...tyto barvy by měly být
bezpečnější alternativou EtBr ... ?

Ohta et al., 2001

- SYBR Green I je slabým mutagenem v Amesově testu (2.2 x než kontrolní *S.typhimurium* TA98).
- SYBR Green I zvyšuje mutagenitu Mutagenu X (3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone), který je může být součástí chlorované vody; stejně tak zvyšuje účinek UV-záření.

Kirsanov et al., Mutat Res. 2010

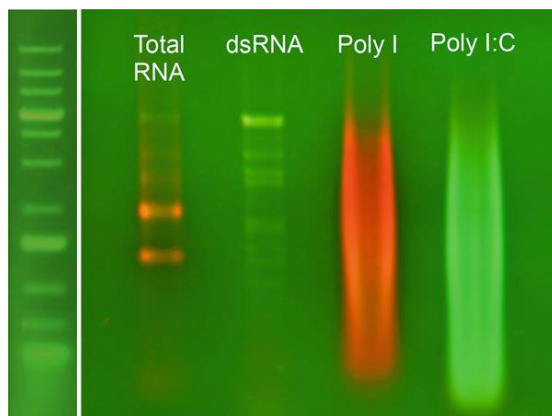
- SYBR Green II a SYBR Gold nevykazují mutagenicitu v Amesově testu (u *S.typhimurium* TA98 nebo TA100).

❖ Detekce NK

1) Fluorescenční detekce

Akridinová oranž:

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



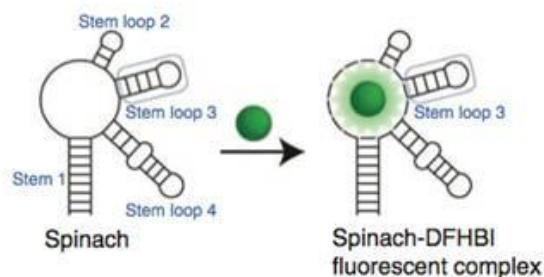
Jorg Hermann Fritz, Visualizing Virus-Derived dsRNA

❖ Detekce RNA 1) Fluorescenční detekce

RNA aptamer vážící zelený fluorofor

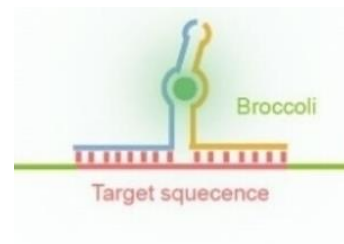
Spinach (špenát)

Paige et al., 2011



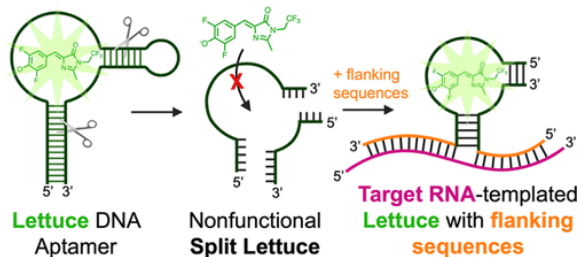
Broccoli (brokolice)

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

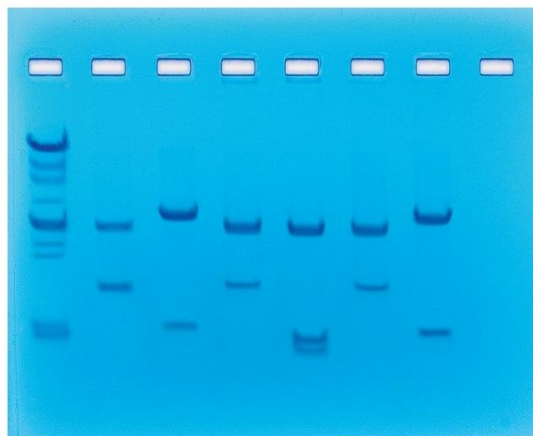


Bassam and Gresshoff
Nature Protocols (2007)

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

Metylénová 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)



Limity detekce	DNA	RNA	poznámka
SYBR Green I	60 pg	1 ng	vysoká citlivost pro DNA; jeho vazba na DNA neinhibuje aktivitu restrikčních enzymů; snížená citlivost při detekci NK v denaturujících gelech.
SYBR Green II	5 ng	500 pg	vysoká citlivost pro RNA a ssDNA; neinterferuje s přenosem na membrány (Northern blot); snížená citlivost při detekci NK v denaturujících gelech.
EtBr	1 – 5 ng	5 ng	mutagen
stříbro	1 ng	5 ng	vyšší citlivost pro polyakrylamidové gely
methylenová modř	40 – 200 ng	-	netoxický
acridinová oranž	50 ng	100 ng	rozlišuje mezi dsDNA a ssDNA

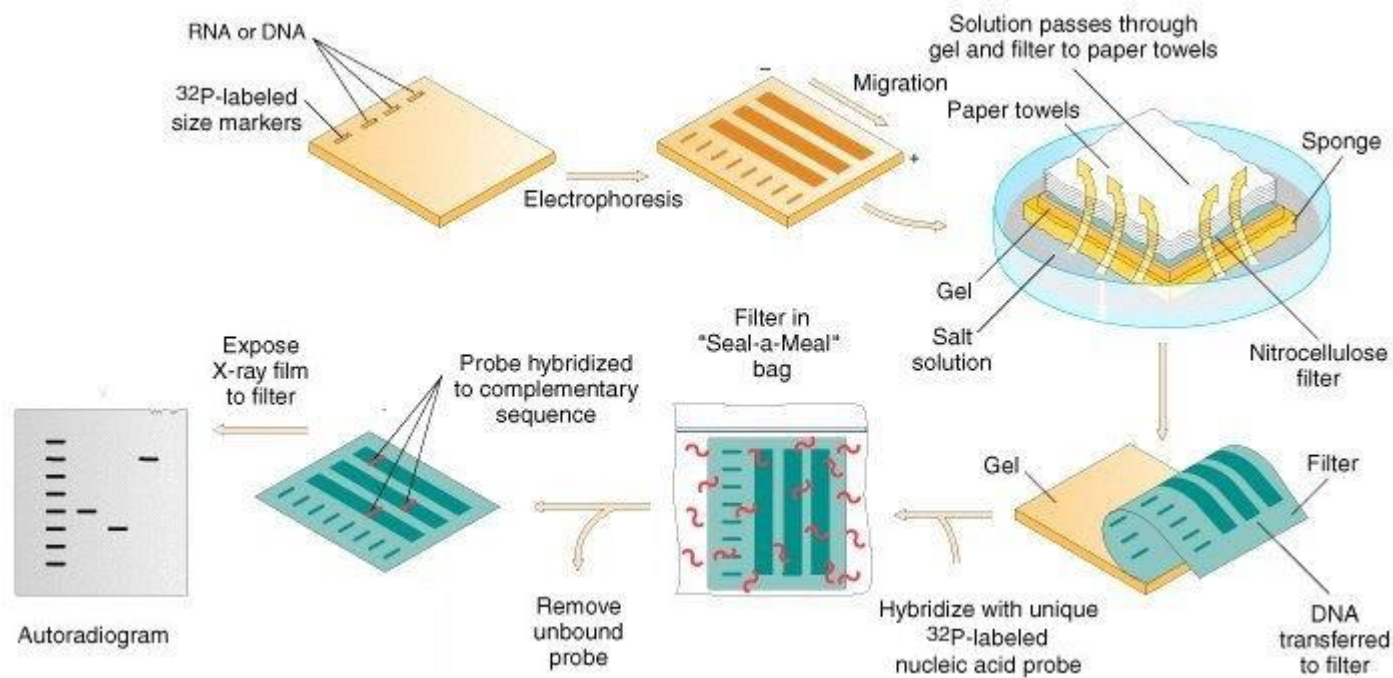
300 nm transilluminátor

❖ Detekce NK

4) Radioaktivní vizualizace

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

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



❖ Detekce NK

4) Radioaktivní vizualizace

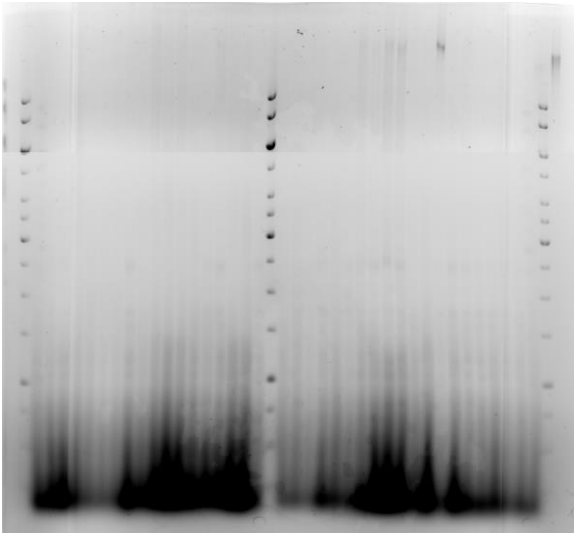
vhodné pro vizualizaci malého množství DNA:

Identický gel / membrána:

Gel:

EtBr vizualizace

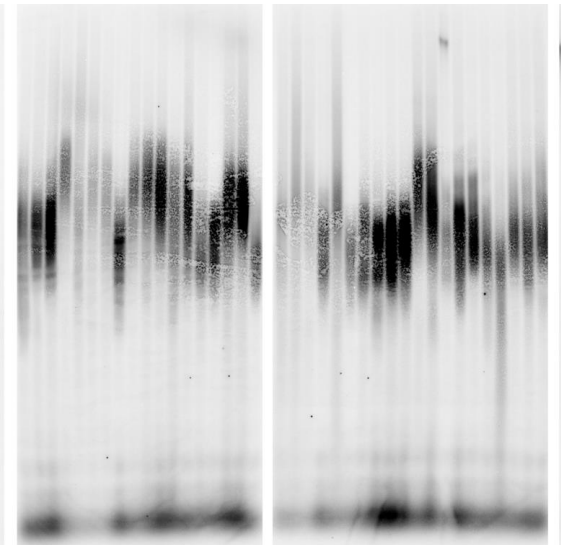
- celková genomová DNA je viditelná



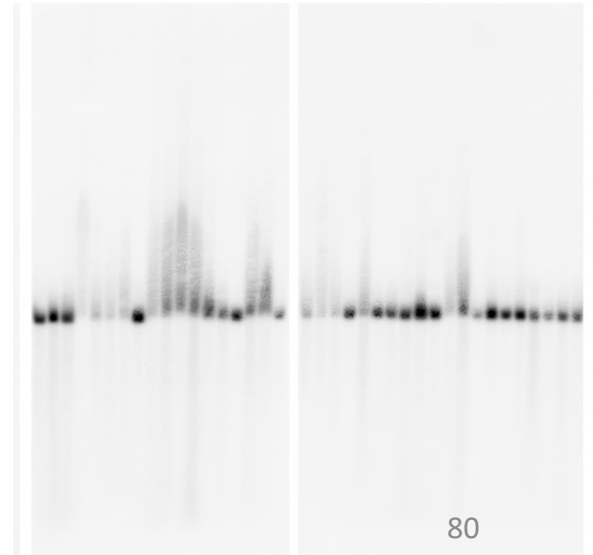
Membrána:

³²P koncové značení

- pouze telomerická DNA je vizualizovaná



- pouze chloroplastová DNA je vizualizovaná





Děkuji za pozornost

Pokročilé metody v současné genomice a proteomice

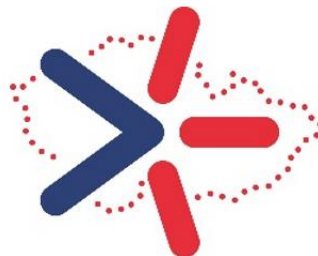
Metody extrakce, purifikace a kvantifikace nukleových kyselin (NK)



qPCR – princip, moderní přístupy, aplikace, především v klinice



**Financováno
Evropskou unií**
NextGenerationEU



**Národní
plán
obnovy**

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY