

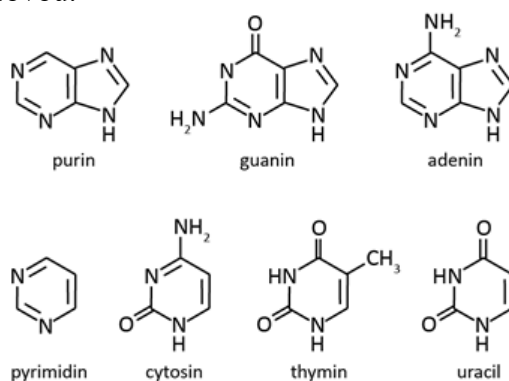
# Izolace plasmidové DNA

## 1. Teoretický úvod

### 1.1. Nukleové kyseliny

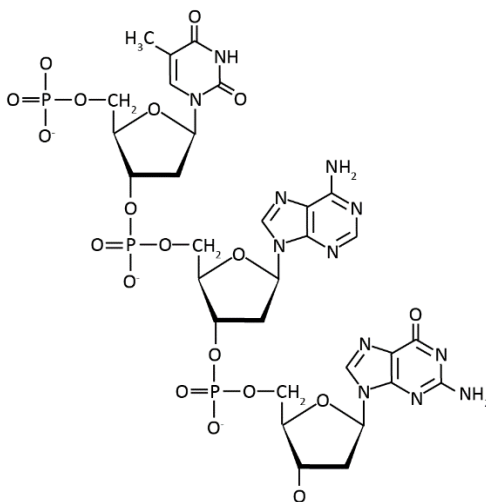
Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky, které ve své struktuře nesou genetickou informaci. Běžnými nukleovými kyselinami jsou kyselina deoxyribonukleová (DNA) a ribonukleová (RNA). Základní stavební jednotkou nukleových kyselin je tzv. nukleotid. Nukleotid je obecně heterocyklická báze, která N-glykosidickou vazbou váže sacharid (pentosu) a esterovou vazbou fosfát (odtud kyselina). Heterocyklické báze v nukleových kyselinách jsou purinové nebo pyrimidinové povahy. Nejčastěji zastoupené pyrimidinové báze jsou cytosin (C), thymin (T) a uracil (U), a purinové báze adenin (A) a guanin (G) (Obr. 1). Zatímco DNA obsahuje báze C, T, A, G, u RNA je T zaměněn za U.

Jak už z názvu vyplývá, nukleotidy RNA v sobě vážou sacharid ribosu, kdežto DNA její 2-deoxy variantu. Jednotlivé nukleotidy jsou vázány do polynukleotidového řetězce skrze fosfát (Obr. 2), jedná se tedy o vazbu diesterovou.

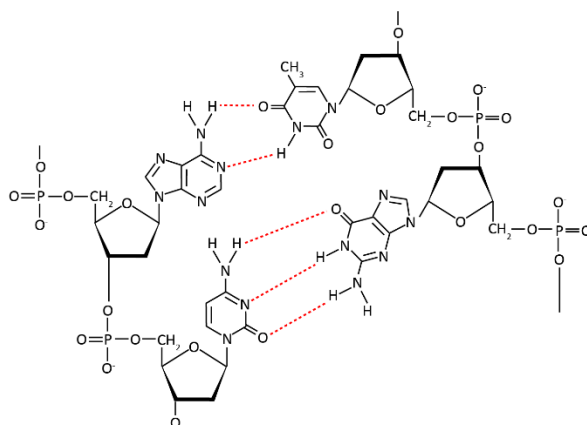


**Obr. 1** Purinové a pyrimidinové nukleotidy.

Nukleové kyseliny byly objeveny již roku 1869 v buněčných jádrech. Jejich strukturu však odhalili až v roce 1953 pánové Watson a Crick (Nobelova cena), kdy bylo rozluštěno vzájemné párování nukleotidů dvou na sebe antiparalelních řetězců dvoušroubovice DNA (Obr. 3).



**Obr. 2** Nukleotidy spojené v řetězec (UAG).



**Obr. 3** Párování bází ve dvoušroubovici DNA.

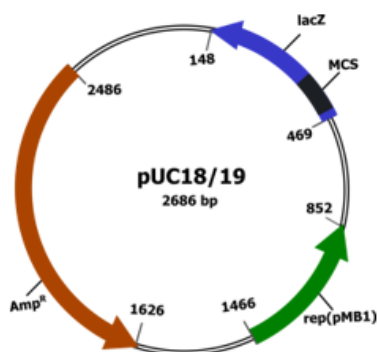
## 1.2. Typy DNA

Genom zahrnuje veškerou genetickou informaci uloženou v DNA konkrétního organismu – kódující i nekódující sekvence. Jinak řečeno, genom organismu je kompletní sekvencí DNA jedné sady chromosomů. U složitějších organismů je do genomu mimo jadernou (chromozomální) DNA zahrnuta taktéž DNA semiautonomních organel – mitochondrií (mitochondriální DNA) anebo DNA plastidů například chloroplastů (plastidová DNA – chloroplastová DNA), které se liší od jaderné DNA sekvencí nukleotidů.

U některých bakterií, archebakterií a méně často u některých eukaryot se v cytoplasmě vyskytuje ještě další typ DNA, který se replikuje nezávisle na chromozomu. Tato DNA je malá, kruhová a nazývá se plasmid (Obr. 4). Plasmidovou DNA tvoří stovky až statisíce párů bází (base pairs; bp).

Hostitelská buňka je vybavena veškerým aparátem pro replikaci DNA, ale genetická informace počátku replikace (*locus ori*) se nachází na plasmidu. Některé plasmidy se do chromozomální DNA mohou včleňovat a replikují se společně s ní, takové plasmidy se nazývají konjugativní. Přeneseny přirozeným způsobem mohou být pouze plasmidy, které mají geny pro tento přenos.

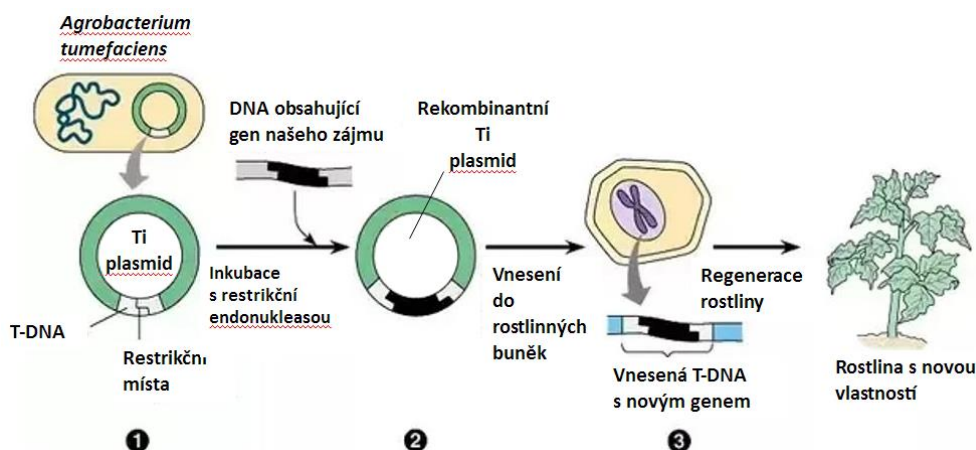
Plasmidy kódují geny, které nejsou esenciální pro přežití bakterie, ale jejich přítomnost přináší často výhody pro bakteriální buňku – například rezistence vůči antibiotikům, schopnost degradace toxických organických látek. V buňce může být větší počet různých druhů plasmidů. Uměle vytvořené plasmidy (vektory) slouží v molekulární biologii pro různé klonovací a expresní techniky.



**Obr. 4** Schéma klonovacího plasmidu pUC18/19 o velikosti 2686 bp: gen pro rezistenci k antibiotiku ampicilinu ( $Amp^R$ ), sekvence počátku replikace (rep), místo pro vklonování cizorodého genu (multiple cloning site; MCS), indikátor pro kontrolu vkládaného cizorodého genu (lacZ).

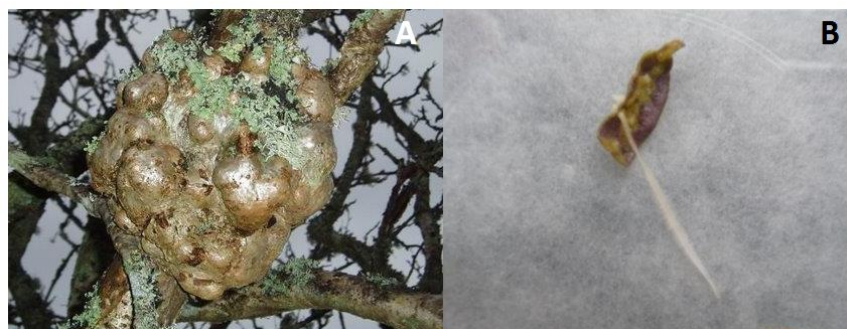
### 1.3. Bakterie rodu *Agrobacterium*

*Agrobacterium* je půdní patogen schopný napadat mechanicky poškozené rostliny, které ze svých ran produkují fenolické látky chemicky velmi podobné acetosyringonu, jež chemotakticky tyto bakterie přitahují. *Agrobacterium* je gramnegativní bakterie, která má schopnost přenosu své plasmidové DNA do buněk napadené rostliny, přičemž se část této DNA (transfer DNA, T-DNA) začleňuje do chromozomu hostitelských buněk. Hlavním zástupcem rodu Agrobakterií je *Agrobacterium tumefaciens*, který po infekci, přenosu a integraci (Obr. 5) svých genů pomocí speciálního Ti-plasmidu (tumor-inducing plasmid) u rostlin způsobuje tvorbu nádorů (Obr. 6A).



**Obr. 5** Schéma přenosu cizorodého genu do Ti-plasmidu Agrobakteria. Po infekci rostliny dochází k integraci cizorodého genu do genomové DNA hostitelské rostliny.

Druhým důležitým kmenem rodu Agrobakterií je *Agrobacterium rhizogenes*, které přenáší Ri-plasmid (root-inducing plasmid). Tento plasmid na sobě nese tzv. *root locus* (*rol*) geny, které jsou zodpovědné za tvorbu transgenních kořenů morfologicky srovnatelných s normálními kořeny (Obr. 6B). Pro experimentální účely se k transformaci rostlin využívá nízkoviruelntních kmenů jako např. kmen *Agrobacterium rhizogenes* R15834, se kterým budete pracovat v rámci této úlohy.



**Obr.6** Tumor vytvořený bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (A) a kořen rostoucí z děložního lístku rajčete po jeho transformaci bakterií *Agrobacterium rhizogenes* (B)

Pro svou schopnost přenosu genů do rostlin je *Agrobacterium* používáno v rostlinných biotechnologiích k cílenému vnášení konkrétních genů do rostlinného genomu a vytváření tzv. transgenních rostlin (geneticky modifikovaných organismů, GMO).

## 1.4. Metody izolace nukleových kyselin

Pro izolaci nukleových kyselin z živých organismů byla vyvinuta řada metod, které se od sebe mohou dosti odlišovat. Pro stručnost tohoto textu budou popsány dvě základní.

Prvním krokem u všech metod je vždy lýze buněk, nebo pevné tkáně. U buněk většinou stačí rozrušit buněčnou stěnu a membrány, nejčastěji se za tímto účelem používají detergenty jako je dodecylsulfát sodný (SDS) nebo Triton X-100. Pro izolaci DNA nebo RNA z rostlinných pletiv nebo živočišných tkání je třeba nejdříve mechanického narušení, to provádíme buď mrazem – tekutým dusíkem nebo různými typy homogenizátorů. Buněčný obsah včetně DNA se z lyzovaných buněk uvolní do extrakčního pufru, který vždy musí obsahovat chelatační činidlo etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA), která vychtá veškeré vápenaté ionty z extraktu. Vápenaté ionty fungují jako kofaktory nukleas, enzymů které štěpí nukleové kyseliny, a pokud by tyto enzymy byly během extrakce aktivní, naštěpily by veškeré izolované nukleové kyseliny. Do extrakčního pufru se někdy přidávají navíc ještě proteinasy, enzymy štěpící proteiny. Většina DNA je totiž obalená histony a jejich odstranění proteinasou zvýší čistotu izolované DNA.

Jeden typ metod je založen na extrakci směsi fenolu a chloroformu. Fenol se rozpouští ve vodě i v chloroformu, preferuje ale chloroform. Chloroform se jako organické rozpouštědlo s vodou nemísí. Přidáme-li tedy směs fenolu a chloroformu k extraktu ze živé tkáně, veškeré tuky přecházejí do chloroformu, bílkoviny a část polysacharidů se působením organických rozpouštědel vysráží a nukleové kyseliny zůstanou ve vodné fázi. Po intenzivní extrakci se směs zcentrifuguje a vzniklé fáze od sebe oddělí. Vysrážené proteiny a sacharidy vytvoří na rozhraní bílou prstencovitou sraženinu.

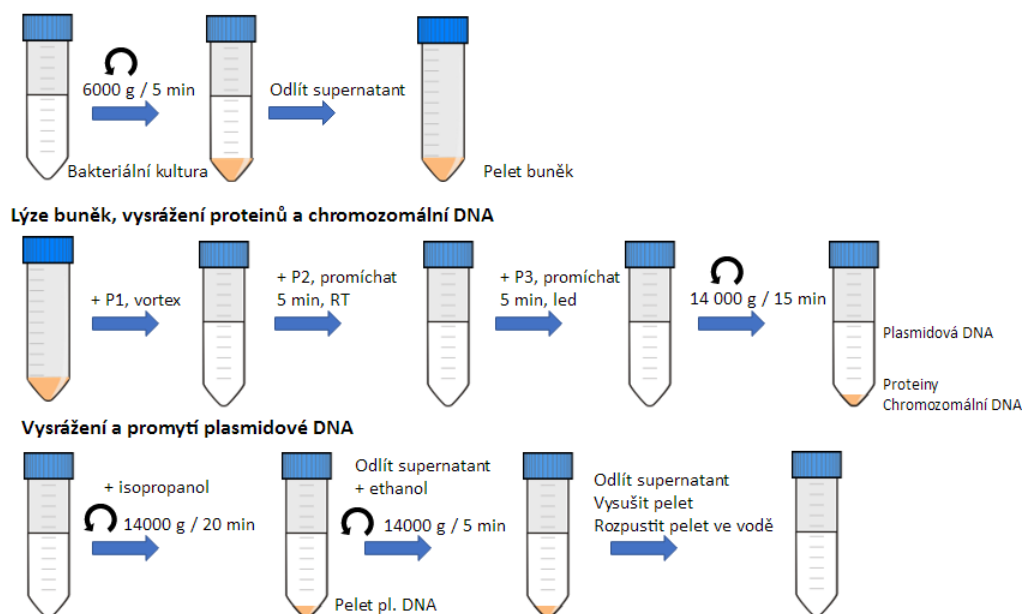
Pro vysrážení nukleových kyselin z vodné fáze se používá absolutní ethanol s přidavkem soli nebo isopropanol. Po intenzivní centrifugaci (14.000 RPM) pak nukleová kyselina vytvoří ve zkumavce opaleskující pelet, který se ještě promývá etanolem, suší a nakonec rozpouští ve vodě nebo vhodném pufru.

Novější metody využívají adsorpce nukleových kyselin na silikát v přítomnosti chaotropních solí, jako je třeba guanidin thiokyanát. Extrakt nukleových kyselin se smíchá se silikátovou maticí v podobě vrstvy silikátových kuliček v přítomnosti chaotropní soli. Nukleové kyseliny se naváží na kuličky a ty se pak promýváním zbaví kontaminujících proteinů, polysacharidů a jiných nečistot. Nakonec se nukleové kyseliny z kuliček uvolní snížením iontové síly roztoku. Tato metoda je velice rychlá a efektivní a využívá se ve většině komerčních setů pro izolaci nukleových kyselin např. v diagnostických laboratořích v nemocnicích.

## 1.5. Izolace plasmidové DNA metodou alkalické lýze

Plasmidy z bakteriální kultury nejčastěji izolujeme metodou tzv. alkalické lýze. Tato metoda je založena na faktu, že většina chromozomální DNA, bakteriálních proteinů a SDS precipituje při neutralizaci silně alkalického roztoku pomocí octanu draselného, kdežto plasmidová DNA zůstává v roztoku.

Lýze buněk se provádí zvýšením pH pomocí hydroxidu sodného v dodecylsíranu sodném. V tomto kroku se denaturuje a sráží chromozomální DNA. Většina chromozomální DNA a proteinových sraženin se nachází v komplexních sloučeninách s draslíkem a SDS, které se ze suspenze odstraní pomocí centrifugace. Molekuly plasmidové DNA, které jsou menší, zůstanou v rozvolněném stavu v roztoku. Po neutralizaci roztoku uskutečněnou octanem draselným se rozvolněná plasmidová DNA renaturuje a chromozomální DNA zůstane ve sraženině. Precipitát obsahující proteiny a chromozomální DNA se odstraní centrifugací a plasmidová DNA se ze supernatantu vysráží isopropanolem a promyje etanolem. Po vysušení lze plasmidovou DNA rozpustit ve vodě nebo v uchovávacím pufru zamraženou na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Obr.7** Schéma izolace plasmidové DNA metodou alkalické lýze

## 1.6. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin

Jako důkaz přítomnosti izolované DNA i kontrolu její čistoty používáme nejčastěji spektrofotometrii v blízké UV oblasti, jelikož nukleové kyseliny absorbují nejintenzivněji světlo o vlnové délce 260 nm. Pomocí Lambert-Beerova zákona lze dát do souvislosti množství absorbovaného světla a koncentraci absorbujících molekul (zde nukleových kyselin) dle vztahu:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l,$$

kde: A...absorbance,  
 $\varepsilon$ ...molární absorpční koeficient,  
 c...koncentrace,  
 l...délka kyvety.

Pro jednotlivé typy nukleových kyselin byly stanoveny průměrné molární absorpční koeficienty, které shrnuje tabulka 1.

**Tab. 1:** Molární absorpční koeficienty nukleových kyselin.

Typ nukleové kyseliny	Molární absorpční koeficient $\varepsilon$ [( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]
<b>dvouvláknová DNA</b>	0,020
<b>jednovláknová DNA</b>	0,027
<b>jednovláknová RNA</b>	0,025

Díky znalosti molárního absorpčního koeficientu a Lambert-Beerova zákona lze například pro dvouvláknovou DNA vyvodit, že při jednotkové délce kyvety ( $l=1$  cm), je  $A_{260}$  rovno 1, když koncentrace dvouvláknové DNA odpovídá 50  $\mu\text{g/ml}$ . Tento princip výpočtu lze použít i pro další dva typy nukleových kyselin (shrnutí poskytuje tabulka 2), přičemž lze využít pro absorbance dosahující až dvou jednotek.

**Tab. 2:** Koncentrace nukleových kyselin při jednotkové délce kyvety a  $A_{260}=1$ .

Typ nukleové kyseliny	Koncentrace při $l=1$ cm a $A_{260}=1$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<b>dvouvláknová DNA</b>	50
<b>jednovláknová DNA</b>	37
<b>jednovláknová RNA</b>	40

Při stanovení koncentrace nukleových kyselin je nutné dbát na čistotu preparátu, protože ruší přítomnost proteinů, aromatických látek a dalších. Jelikož proteiny absorbují záření o vlnové délce 280 nm, lze z poměru  $A_{260}/A_{280}$  určit čistotu preparátu. Pokud je DNA preparát čistý, poměr  $A_{260}/A_{280}$  dosahuje hodnoty 1,8, pro RNA tento poměr dosahuje hodnoty 2,1.

Koncentraci DNA lze získat také ze vztahu:

$$c_{\text{DNA}} = 62,9 \cdot A_{260} - 36,0 \cdot A_{280} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Obsah kontaminujících proteinů lze vypočítat podle následujícího vztahu:

$$c_{\text{proteiny}} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Absorbance je ve vztahu s absorbovaným světlem dle rovnice:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0},$$

kde: A...absorbance,  
T...transmitance (propustnost),  
I<sub>0</sub>...intenzita záření dopadajícího na vzorek,  
I...intenzita záření prošlého vzorkem.

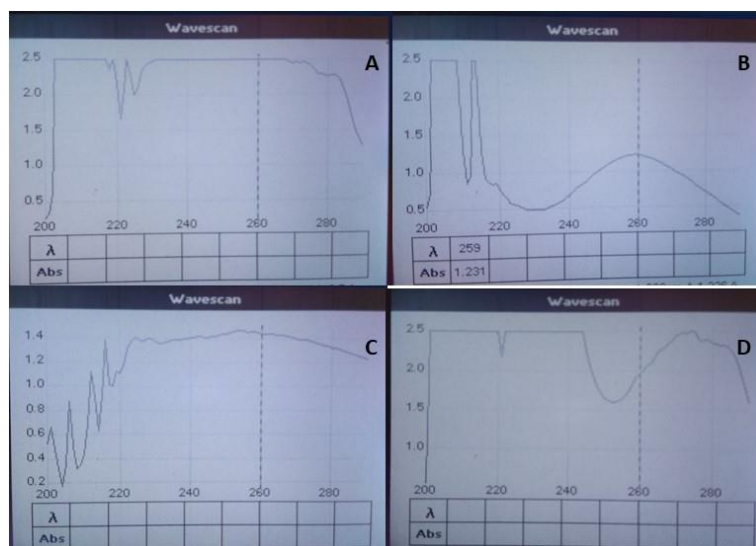
Z tohoto vztahu je patrné, že při absorpaci  $A=2$ , je hodnota transmitance  $T=0,01$ , tedy 1%, což znamená, že 99% dopadajícího záření bylo absorbováno (blokováno) vzorkem, což měření zatěžuje velkou chybou.

Měřené hodnoty absorbance by tedy měly dosahovat hodnot nejlépe v rozmezí 0,1-1,0. Při absorpaci vyšších než 1, je tedy nutné vzorek vhodně zředit. Faktor ředění, tedy kolikrát byl vzorek naředěn, je poté nutno zahrnout do výpočtu koncentrace dle vztahu:

$$c_{\text{neředěný vzorek}} = c_{\text{ředěný vzorek}} \cdot \text{faktor ředění}.$$

Daleko citlivější stanovení koncentrace DNA je pomocí fluorimetrie, kdy měříme fluorescenci DNA po smísení se specifickým interkalačním barvivem, tedy barvivem, které se vmezeřuje mezi páry bází v DNA.

Pro měření v UV oblasti je třeba používat kyvety, které jsou pro tuto oblast spektra určené – obvykle se jedná o kyvety křemenné či jinak upravené. Při použití plastové či obyčejné skleněné kyvety dochází k absorpci UV záření materiálem kyvety, tudíž jím paprsek neprojde a nelze stanovit absorpaci měřeného vzorku (Obr. 4A). Při použití UV kyvety uvidíte hladký průběh spektra (Obr. 4B). Dále je třeba dávat pozor na směr, kterým kyvetu do spektrofotometru vkládáte. Při špatném vložení kyvety opět nelze stanovit absorpaci měřeného vzorku (Obr. 4C).



**Obr. 8** UV spektra stejného vzorku plasmidové DNA při použití (A) plastové kyvety, (B) UV kyvety, (C) UV kyvety vložené špatným směrem, s vysokou koncentrací kontaminujících proteinů (D). Na obrázku B je vidět absorpční maximum DNA při 260 nm.

## 2. Praktická část: Izolace DNA Ri-plasmidu z bakteriálního kmene *Agrobacterium rhizogenes* R15834 metodou alkalické lýze

### 2.1. Cíle úlohy

- I. Zvládnutí techniky izolace plasmidové DNA.
- II. Trénink pipetování a práce s centrifugou.
- III. Práce se spektrofotometrem v UV oblasti.
- IV. Stanovení koncentrace plasmidové DNA, její čistoty a obsahu kontaminujících proteinů.

### 2.2. Materiál

Jako výchozí materiál pro izolaci plasmidové DNA bude použita přes noc pěstovaná kultura divokého kmene (wild-type) *Agrobacterium rhizogenes* R15834.

### 2.3. Přístroje

Vortex, chlazená centrifuga, spektrofotometr.

### 2.4. Chemikálie

Tris, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), hydroxid sodný, dodecylsulfát sodný (SDS), octan draselný, kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina octová, RNasa A, isopropanol, ethanol

### 2.5. Roztoky

#### Roztok P1

50 mM Tris/HCl pH=8,0, 10 mM EDTA. Autoklávováno. Po autoklávování přidáno 0,1 mg/ml Rnasy A. Uchováváno v lednici.

### **Roztok P2**

0,2 M NaOH, 1 % SDS. Autoklávováno.

### **Roztok P3**

3 M octan draselný/kyselina octová pH=5.5. Autoklávováno.

### **100% isopropanol**

### **70% ethanol**

Pro účely této úlohy uchováván v mrazáku.

## **2.6. Úkoly**

### **2.6.1. Izolace plasmidové DNA**

**Předcházejte kontaminaci roztoků a pipet bakteriálními kulturami!!!  
Vychlad'te centrifugu na 4°C. Do centrifugy vkládejte pouze očištěné a osušené  
falkony!**

- Do falkony o objemu 50 ml přeneste 20 ml kultury *Agrobacterium rhizogenes*.
- Falkony centrifugujte 5 minut při 6000 g. Médium opatrně odlijte, abyste zachovali bakteriální pelet.
- K bakteriálnímu peletu přidejte 3 ml roztoku P1 a resuspendujte pomocí vortexu až do úplného rozpuštění peletu.
- Přidejte 3 ml roztoku P2, promíchejte 5x opakovaným převrácením falkony a nechejte 5 minut stát při laboratorní teplotě.
- Přidejte 3 ml roztoku P3, promíchejte 5x opakovaným převrácením falkony a nechejte 5 minut stát na ledu.
- Falkony centrifugujte 15 minut na 12000 g při teplotě 4°C. Vzniklý čirý supernatant přepipetujte do čisté falkony o objemu 50 ml a přidejte 6 ml 100% isopropanolu. Promíchejte 5x opakovaným převrácením falkony (netřepat!) a centrifugujte 20 min při 12000 g.
- Po centrifugaci je možné vidět sraženinu plasmidové DNA jako téměř průsvitný, lehce mléčný pelet na stěně falkony. Odpipetujte supernatant do odpadu a k peletu přidejte 5 ml vychlazeného (v mrazáku) 70% ethanolu. Centrifugujte 5 min při 12000 g.
- Supernatant neodlévejte, ale odpipetujte do odpadu. Opatrně, ale důkladně odpipetujte veškeré zbytky ethanolu do odpadu. V případě přítomnosti i nepatrného množství ethanolu falkony pulsně zcentrifugujte a ethanol odpipetujte „dosucha“. Pelet nechejte zcela vysušit (pelet zprůsvitní a na stěnách zkumavky nejsou vidět žádné zbytky ethanolu, minimálně 10 min) v **zapnuté** digestoři při laboratorní teplotě.
- **Velikost peletu konzultujte s vedoucím cvičení** a rozpust'te resuspendováním za pomoci pipety se špičkou v přiměřeném množství vody (přibližně 100 µl), roztok plasmidové DNA přeneste do mikrozukavky o objemu 1,5 ml a uchovejte na ledu pro další práci. Pokud se část peletu nerozpouští, jedná se o kontaminující proteiny. Těch je možné se zbavit centrifugací a odpipetováním supernatantu plasmidové DNA.



## 2.6.2. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plasmidové DNA

**Používejte kyvetu určenou pro měření v UV oblasti!  
Do spektrofotometru vkládejte pouze očištěné a osušené kyvety!**

- Část plasmidové DNA (1-10  $\mu$ l) vhodně nařed'ete do čisté mikrozkušavky (do celkového objemu 100  $\mu$ l, 10-100x po konzultaci s vedoucím cvičení).
- Jako blank (slepý vzorek) pro měření použijte vodu, ve které jste plasmidovou DNA rozpustili.
- Zapněte spektrofotometr, zvolte Applications  $\rightarrow$  Wavescan. Nastavte parametry měření:
  - Start wavelength: 200 nm
  - End wavelength: 290 nm
  - Mode: Absorbance

Potvrďte nastavené parametry tlačítkem zeleným tlačítkem OK.

- Do kyvety napipetujte vodu tak, aby dosahovala vyznačené rysky. Vynulujte přístroj modrým tlačítkem s nápisem 0A. Po vyblankování vodu vylijte do odpadu.
- Do kyvety pomocí Pasteurovy pipety přeneste vzorek vámi izolované naředěné plasmidové DNA a proměřte jeho absorpční spektrum zmáčknutím zeleného tlačítka.
- Pomocí šipek odečtete hodnoty absorbancí  $A_{260}$  a  $A_{280}$ . Plasmidovou DNA přepipetujte zpět do mikrozkušavky. Spektrum si vyfoťte.
- Kyvetu pořádně vypláchněte destilovanou vodou a přistupte k měření dalšího vzorku.
- V případě  $A < 1$  vzorky vhodně nařed'ete a měření zopakujte. Nezapomeňte si poznamenat výsledný faktor ředění.
- Vzorky popište vašimi iniciály, uveďte datum a kód skupiny a uchovejte při  $-20^{\circ}\text{C}$  do druhé série úloh, kde budete DNA analyzovat pomocí elektromigrační metody a vizualizovat specifickým barvením.

## 2.7. Vyhodnocení

- Vypočítejte koncentraci vámi izolované plasmidové DNA, stanovte její čistotu z poměru  $A_{260}/A_{280}$  a stanovte obsah kontaminujících proteinů. Výsledky porovnejte s kolegy a v protokolu shrňte do přehledné tabulky.
- Do protokolu zahrňte naměřený graf absorpčního spektra vámi izolované plasmidové DNA.

## 2.8. Možné problémy

***Při srážení plasmidové DNA ze supernatantu isopropanolem není vidět pelet/sraženina.***

Centrifugujte dalších 20 min. Sraženina obsahující plasmidovou DNA je téměř průsvitná, ulpívá na povrchu falkonky a jeví se často jako „nerovnost“ povrchu falkony. Je viditelná po převrácení falkony dnem vzhůru proti světlu.

***Sraženina plasmidové DNA se nerozpouští.***

Příčinou může být vysoká koncentrace DNA v roztoku – zkuste sraženinu rozpustit ve větším množství vody.

Další příčinou může být nedostatečné vysušení peletu DNA, přítomný ethanol DNA sráží – vzorek znovu zcentrifugujte, supernatant odeberte a sraženinu řádně vysušte.

***Při spektrálním stanovení není detekován pík při vlnové délce 260 nm.***

Nízká koncentrace plasmidové DNA – k měření použijte méně ředěný vzorek. Pokud nepozorujete žádný pík ani při zvýšení obsahu DNA v kyvetě, změřte přímo váš vzorek. Pokud ani poté nepozorujete absorpci při 260 nm, nepodařilo se vám plasmidovou DNA izolovat.