„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí “

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0032

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Odběr a uchovávání vzorků pro extrakci DNA

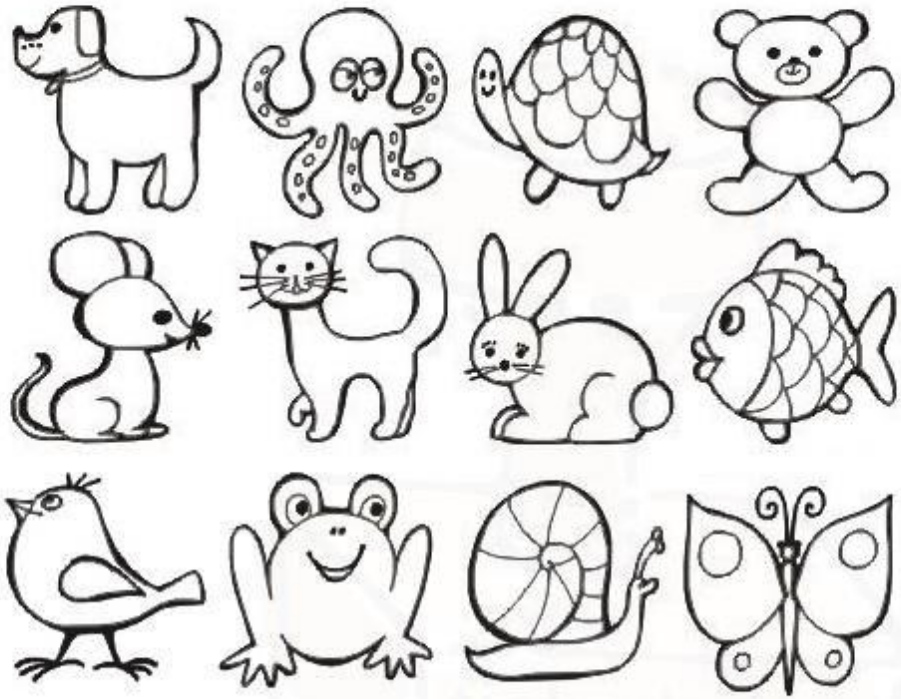
Miloslav Kitner
Katedra botaniky PřF UP

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Jaký máme vzorek/biologický objekt?

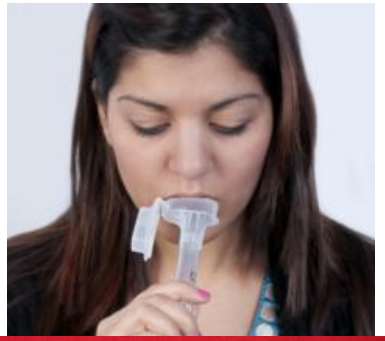
- Bakteriální kultura
- Rostlinný materiál
- Krev
- Živočišná tkáň
- Fosilní materiál
- Forenzní materiál

- Volba vhodné odběrové a extrakční metody…



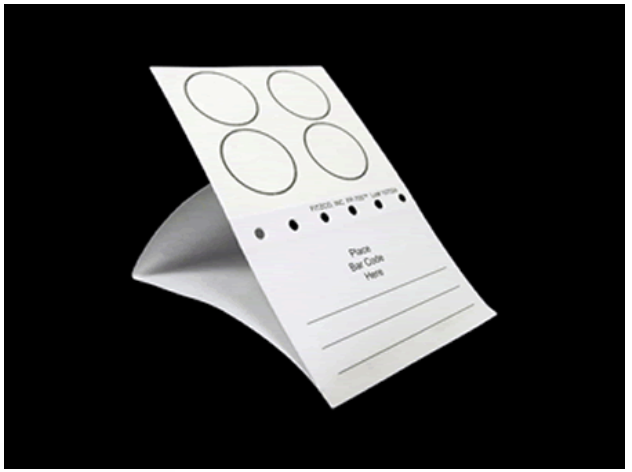
Bukální stěry

© rudi.segers



Sady pro odběry vzorků

00001
BioMatrix, LLC Lot # 6136303



DNA Collection Cards: The Fitzco Card

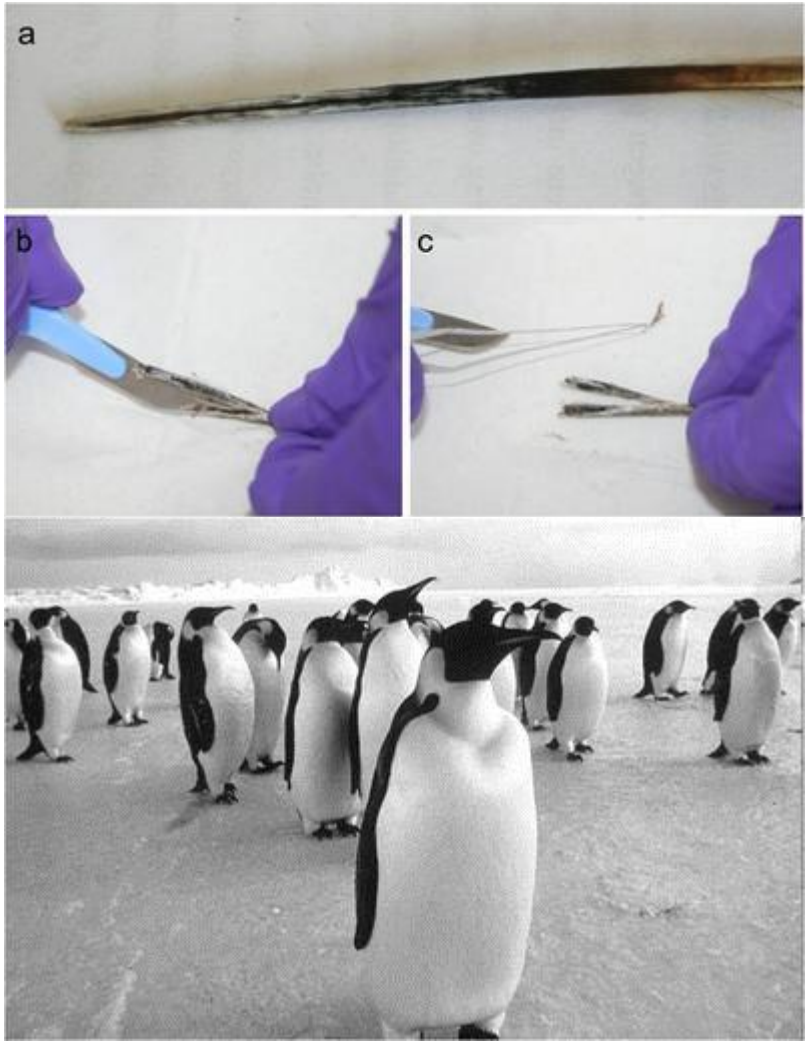
www.sciencedirect.com

Krev

- Uchování ve speciální roztoku
- Queen´s buffer (4°C)
  - 10 ml 1M TRIS (pH 8,8)
  - 2 ml 5M NaCl
  - 2,92 g EDTA
  - 10 g N-lauroylsarkosin
  - 900 ml vody → pH 7,5 → 1l

- EDTA – antikoagulant, blokuje DNázy

Kožní deriváty



Odběr u mořských živočichů

Odběry vzorků ze živočišných tkání

http://www.flmnh.ufl.edu/grr/tour_birds.htm

Uchovávání: malé kousky tkání

- -80°C
- Ethanol (100%, 70%)
- Nasycený roztok soli s DMSO
  - -20% dimethyl sulfoxyde,
  - - 0.25M EDTA,
  - - saturated with NaCl,
  - -pH 8.0.

Canadian Journal of Zoology, 1991, Vol. 69: 82-90

Fosilní materiál

- speciální metodiky extrakce DNA
- úspěšnost závisí na stupni degradace DNA
- DNA pro určité typy markerů (sekvenace, SSR)

Forenzní materiál

Ukázkový postup odběru a uchování vzorku pro extrakci DNA

Instructions for Sampling Salmon Tissues for DNA Stock Identification

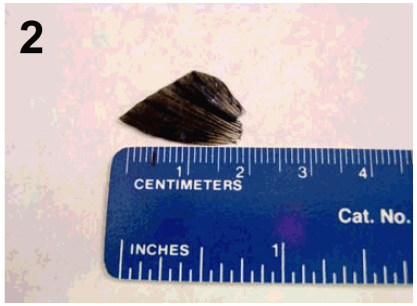
NPAFC Working Group on Stock Identification

1. General Information

Genetic stock identification is one of most reliable methods to estimate the population origins of salmon caught in the ocean. The current genetic markers include microsatellite DNA, mitochondrial DNA, and SNPs. As of June 2008 these are applicable mainly to chum, sockeye and Chinook salmon, but genetic baselines for pink, and coho salmon, and steelhead will be available in the near future. All processes begin with tissue sample collection, DNA purification, and PCR amplification of the genetic markers. This guide describes how to collect genetic samples from fresh or frozen salmon.

2. How to Collect Tissue Samples

1. Identify species of salmon or steelhead.
2. Measure body length (tip of snout to fork of tail) and weight for individual salmon (if necessary).
3. Collect scale samples from the preferred area of salmon for age determination (if necessary).
4. Cut a piece of the fin (approximately 2 cm x 2 cm) from each salmon (Figs. 1 & 2). To insure preservation, fin tissue should not exceed 1/4 of the volume of the test tube.
5. Put individual fin tissue into a plastic test tube labeled with a sample number (Fig. 3). Most pen inks dissolve in ethanol, so use a pencil or a laser printer with toner to make the test tube labels.
6. Fill the test tube with 95-100% ethyl alcohol (Fig. 4).
7. Seal the test tube with a screw cap (Fig. 5).
8. Store whole group of samples in a plastic bag labeled with sample information such as species name, date, and place of collection (Fig. 6).
9. Store the samples at room temperature out of the direct exposure to the sun.



Uchování vzorků z živočišných tkání

<u>Popsané</u> nádobky, Eppendorfky, sáčky

<u>Sáčky</u>: Vzorky bez nutnosti konzervace

- chlupy, šupiny, kosti apod.

<u>Nádobky</u>: - Tělní tekutiny, kusy tkání, celé organismy

- Ethanol
- Queen´s pufr
- DMSO-NaCl

DNA of beetles stored in ethanol will be degraded in six weeks (Reiss et al., 1995), hymenopterans kept in ethanol for twenty four months still provides DNA in good condition (Dillon et al., 1996).

RNA*later* RNA Stabilization Reagent

Print Share **Add to wishlist**

For immediate stabilization of RNA in tissues

- Immediate RNA stabilization and protection
- Reliable gene expression and gene-profiling data
- Convenient and safe handling at room temperature
- No need for liquid nitrogen or dry ice
- Tissue archiving without risk of RNA degradation

RNA*later* RNA Stabilization Reagent immediately stabilizes RNA in tissue samples to preserve the gene expression profile, and is supplied in 50 ml or 250 ml bottles. For stabilization of DNA, RNA, and protein in tissue samples, Allprotect Tissue Reagent can be used.

▾ Ordering Information ▸ Product Details ▸ Resources

Quantity	Product	Cat. no.	Price	Sum
1	RNA*later* RNA Stabilization Reagent (50 ml) 50 ml RNA*later* RNA Stabilization Reagent for stabilization of RNA in 25 x 200 mg tissue samples	76104	$73.10	$0.00 **Add to cart**

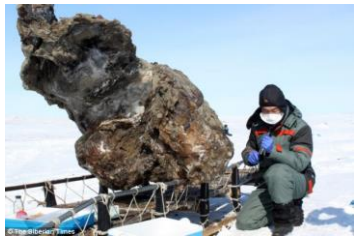
aDNA – ancient DNA

rt.com

- Po smrti – autodegradace DNA - štěpení DNA autokatalytickými enzymy – pokud je ve tkáni nedostatek vody – aktivita je snížena

- Obecně platí, že aDNA je značně fragmentovaná (několik stovek bp)

- Záleží na prostředí, ve kterém se ostatky nacházejí


www.livescience.com

- Zmrazení – permafrost, ledovce (mamut, Ötzi – desetitisíce let)
- Vysušení – mumifikace (stáří tisíce let – egyptské mumie)
- Zalití do media – hmyz v jantaru (miliony let)

www.businessinsider.com

- **sedaDNA – „sedimentary“ ancient DNA**
- aDNA vyextrahovaná z permanentně zmrzlých sedimentů, které jsou přesně odatovány (podle zastoupení izotopů uhlíku v sedimentu)
- Pokud je daná studie podložena správně datovaným paleolimnologickým záznamem, pak může zpřesnit stávající informace o výskytu dnes vymřelých organismů

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Dendrogramma, New Genus, with Two New Non-Bilaterian Species from the Marine Bathyal of Southeastern Australia (Animalia, Metazoa *incertae sedis*) – with Similarities to Some Medusoids from the Precambrian Ediacara

Jean Just*, Reinhardt Møbjerg Kristensen, Jørgen Olesen

Section of Biosystematics, Natural History Museum of Denmark (Zoological Museum), University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

Abstract

A new genus, *Dendrogramma,* with two new species of multicellular, non-bilaterian, mesogleal animals with some bilateral aspects, *D. enigmatica* and *D. discoides*, are described from the south-east Australian bathyal (400 and 1000 metres depth). A new family, Dendrogrammatidae, is established for *Dendrogramma*. These mushroom-shaped organisms cannot be referred to either of the two phyla Ctenophora or Cnidaria at present, because they lack any specialised characters of these taxa. Resolving the phylogenetic position of *Dendrogramma* depends much on how the basal metazoan lineages (Ctenophora, Porifera, Placozoa, Cnidaria, and Bilateria) are related to each other, a question still under debate. At least *Dendrogramma* must have branched off before Bilateria and is possibly related to Ctenophora and/or Cnidaria. *Dendrogramma*, therefore, is referred to Metazoa *incertae sedis*. The specimens were fixed in neutral formaldehyde and stored in 80% ethanol and are not suitable for molecular analysis. We recommend, therefore, that attempts be made to secure new material for further study. Finally similarities between *Dendrogramma* and a group of Ediacaran (Vendian) medusoids are discussed.

Citation: Just J, Kristensen RM, Olesen J (2014) *Dendrogramma*, New Genus, with Two New Non-Bilaterian Species from the Marine Bathyal of Southeastern Australia (Animalia, Metazoa *incertae sedis*) – with Similarities to Some Medusoids from the Precambrian Ediacara. PLoS ONE 9(9): e102976. doi:10.1371/journal.pone.0102976

Editor: Andreas Hejnol, Sars International Centre for Marine Molecular Biology, Norway

Received April 3, 2014; **Accepted** June 22, 2014; **Published** September 3, 2014

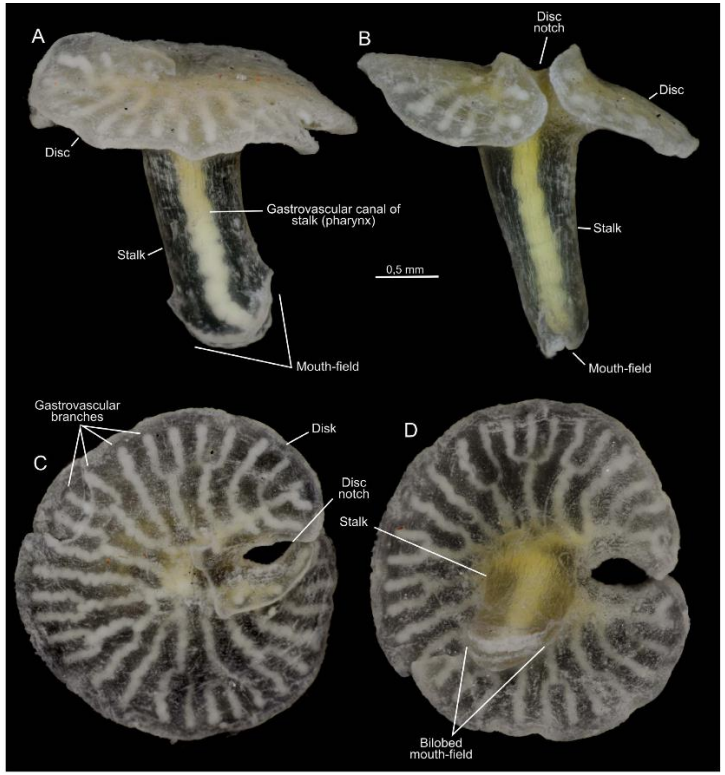
Copyright: © 2014 Just et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. Most relevant data are within the paper and its Supporting Information files. The studied specimens are stored at Museum Victoria (NMV numbers), Melbourne, Australia and Natural History Museum (ZMUC numbers) of Denmark, Copenhagen, Denmark.

Funding: This work was supported by an Australian Marine Science and Technology/Australian Research Council grant. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: jean-just@mail.dk



Novinky.cz

Hledej

Hlavní stránka » Věda a školy Podrubriky: Vzdělávání

Neznámý tvor zamotal vědcům hlavy

Vypadá jako lesní houba, ale žije několik set metrů pod hladinou oceánu a měří jen pár milimetrů. A je to živé. To je asi tak všechno, co vědci vědí o tvorech teprve nedávno identifikovaných ve třicet let starých vzorcích oceánského planktonu z výzkumu u australských břehů.

Taxonomicky však nezapadají do žádné z tzv. říší, jako jsou bakterie, houby, rostliny, živočichové a další. To se od počátku minulého století vědě stalo sotva čtyřikrát. Miniaturní „houbičky“ připomínají první mnohobuněčné organismy z éry ediakara před 540 až 630 milióny let. Ty však byly evoluční „slepou uličkou“, protože nejsou známy žádné další živé formy, které by jim byly příbuzné.

Scholars Research Library

Annals of Biological Research, 2012, 3 (7):3174-3177
(http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html)

Annals of Biological Research
Scholars Research Library
ISSN 0976-1233
CODEN (USA): ABRNBW

Extraction of genomic DNA from formalin fixed tissues of different wild avian species

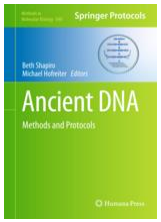
Kush Shrivastava[#1], M.S. Thakur[1], M.P.S. Tomar[2], A.B. Shrivastav[3], S.N.S. Parmar[1]

Org. Divers. Evol. 3, 195–205 (2003)
© Urban & Fischer Verlag
http://www.urbanfischer.de/journals/ode

ORGANISMS DIVERSITY & EVOLUTION

DNA, PCR and formalinized animal tissue – a short review and protocols

Christoffer Schander[1,*], Kenneth M. Halanych[2]



DNA Extraction from Formalin-Fixed Material

Paula F. Campos and Thomas M.P. Gilbert

Abstract

The principal challenges facing PCR-based analyses of DNA extracted from formalin-fixed materials are fragmentation of the DNA and cross-linked protein–DNA complexes. Here, we present an efficient protocol to extract DNA from formalin-fixed or paraffin-embedded tissues (FFPE). In this protocol, protein–DNA cross-links are reversed using heat and alkali treatment, yielding significantly longer fragments and larger amounts of PCR-amplifiable DNA than standard DNA extraction protocols.

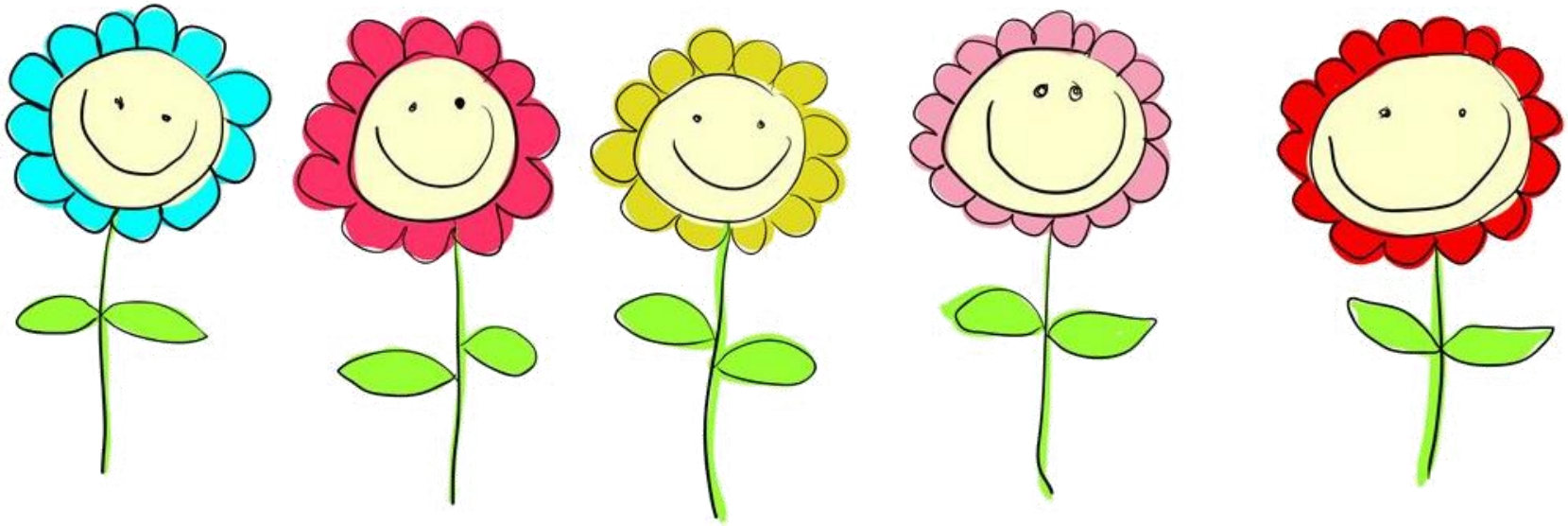
Key words: Formalin, Formalin-fixed, Paraffin-embedded, DNA extraction, Ancient DNA

1. Introduction

The quality of DNA present in formalin-fixed material is generally poor, due both to fragmentation undergone by the DNA molecule itself, in particular when unbuffered formalin is used as a fixative, and to the formaldehyde-driven cross-linking of DNA with proteins (1–7). As a result, genetic analyses of such material must restrict themselves to targeting relatively short fragments of potentially amplifiable DNA. Ultimately, the quality of the DNA in a formalin-fixed sample is difficult to predict, as the degree of degradation and cross-linking results from a complex interplay of factors including the duration, pH, strength, and temperature of the fixative, plus the amount of time that has passed and the conditions of storage since fixation. As a general rule, long fixation times, in particular if longer than 12–24 h, highly acidic fixatives, longer periods of time in storage, and storage in warm environments all contribute to DNA decay. Over time, these factors will lead to the destruction of any remaining DNA in the sample.

A large number of methods have been proposed to recover DNA from formalin-fixed material (for a review see ref. (8)). Given that it is currently difficult, if not impossible, to reverse the

Beth Shapiro and Michael Hofreiter (eds.), *Ancient DNA: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 840,



Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

Ideální případ:

- <u>použít čerstvý materiál a hned zpracovat</u>
  - odebrat apikální části mladých listů a ihned provést izolaci
  - napěstováním z osiva na jaře
  - odběrem přímo z experimentální plochy, skleníku, lokality...

Odběr:

- vzorky odstřihnout (očištěné nůžky ethanolem)
- přenést do PE sáčku, alobalu, papírového sáčku – záleží na odebíraném druhu
- popsat
- do chladícído boxu
- doprava do laboratoře
- vyextrahovat DNA
- popř. ošetřit tekutým dusíkem a přenést do -80°C pro dlouhodobé uchovávání

Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

Když nejsou listy…..specifické metodiky

- pylová zrna, somatická embrya, dormantní pupeny
- kořeny, kořenové vlášení
- kukuřičné klasy
- suché dřevo (extrém)
- **sukulenty** - problematické, velké množství polysacharidů
  - odstranění polysacharidů v sorbitolovém pufru (váže a vysráží polysacharidy)
  - homogenizace v tekutém dusíku, pak přídavek sorbitolového pufru
  - centrifugace – znovu přídavek sorbitolu – centrifugace….
  - opakovat tak dlouho, doku je roztok po centrifugaci viskózní
  - převést na explantátovou kulturu,
  - použít korunní plátky květů
  - zamrazit než sušit
- **semena** - výhody: **„může mi to vyrůst čerstvé“**
  - *méně inhibitorů PCR* (např. polyfenolů)
  - část endospermu většinou poskytne *dostatek DNA*
  - výhoda oproti listům – *skladovatelnost a doprava*
  - *nedestruktivní metoda*
  - *nevýhoda u některých metod (AFLP) změny výsledných profilů při srovnání výsledků semena-listy*
    - *methylace restrikčních míst*

Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

Problém nastává pokud víme, že vzorek nebude zpracován okamžitě
- vzdálená lokalita
- sběr materiálu v průběhu několika veget. sezón

Nutnost úpravy vzorku pro dlouhodobého uchovávání (dny – měsíce – roky)

a) chlazení, mražení, lyofilizace

b) chemická konzervace
- v roztoku **CTAB+NaCl**
- v **ethanolu**

d) Rychlé vysušení v **silikagelu** nebo jiném desikantu

e) Herbarizace

Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

Ad a) chlazení, mražení, lyofilizace
- Nejčastěji – odebrat vzorek a přenést do chladícího boxu s ledem nebo chladícími bloky

- **dlouhodobé uchovávání vyžaduje**
  - ošetření tekutým dusíkem a přenesení do – 80°C (hlubokomrazící box)
- takto připravené vzorky (nebo čerstvý materiál) poskytuje vyšší výtěžky a kvalitnější (intaktní) DNA

Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

- U některých druhů je z důvodu velkého obsahu sekundárních metabolitů rychlé zmražení podmínkou úspěšné extrakce DNA

Vol.3, No.3, 400-404 (2012)
doi:10.4236/as.2012.33047

Agricultural Sciences

RAPD analysis for genetic diversity of germplasm resources of *Strobilanthes**

Shuju Ning#, Yingjiao Zhang#, Renlei Zhu, Lanfang Zhu, Jianyong Lin, Daozhi Wei†

School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, China;

- **Materiál:**
- *Strobilanthes cusia*
- *čel.* Paznehtníkovité (*Acanthaceae*), řád hluchavkotvaré (*Lamiales*).
- **výroba tradičního barviva *indigová modř***

The indigo is rich in *Strobilanthes cusia* (*Nees*) *O. Ktze*'s leaves. It is vulnerable to oxidation, and can bind with DNA easily, resulting in the damage of DNA. Leaves may become black when indigo is oxidized, which would lead to DNA contraction, looking yellow or light brown. Therefore, the leaves used for DNA extraction should be fresh and saved in liquid nitrogen rapidly.

Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

Ad a) chlazení, mražení, lyofilizace

- Lyofilizace = vakuové vymrazování
  - *metoda založená na sublimaci zmrzlé vody při nízkém tlaku a teplotě*
  - 1. fáze: zmrazení vzorku – udržování při teplotě pod bodem tání (-50°C až -100°C)
  - 2. fáze: první sušení – v přístroji se sníží tlak a následně se dodá do systému teplo
    - dojde k sublimaci vody (přímo přechází z pevného do plynného skupenství)
    - až 95 % obsažené vody
    - pomalý proces – několik hodin až dnů
  - 3. fáze: druhé sušení – v případech, kdy je potřeba ještě více snížit obsah vody
    - další snížení tlaku, teplota kolem 0°C
    - odstraní se i voda adsorbovaná na povrchu částic

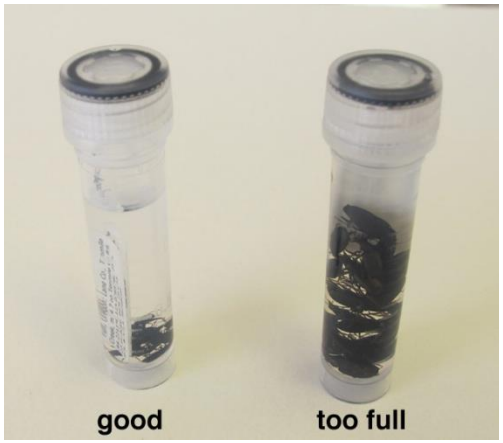
www.merci.cz

Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

Ad b) chemické ošetření

- roztok **CTAB+NaCl**
  - kousky listů v nasyceném viskózním roztoku CTAB-NaCl
    - 2,5% CTAB v nasyceném roztoku NaCl
  - homogenizace materiálu a další kroky „CTAB protokolu“
  - doporučováno pro vzorky sukulentů a další xerofytů obtížně vysušitelných v silikagelu

- v **ethanolu (95% - 100%)**
  - denaturuje proteiny (histony) a vytváří nerozpustné komplexy DNA
  - v protokolu je často použita proteináza (porušení a uvolnění DNA z komplexů DNA-protein)



https://subulatepalpomere.wordpress.com

Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

Ad d) Vysušení v **silikagelu** nebo jiném desikantu

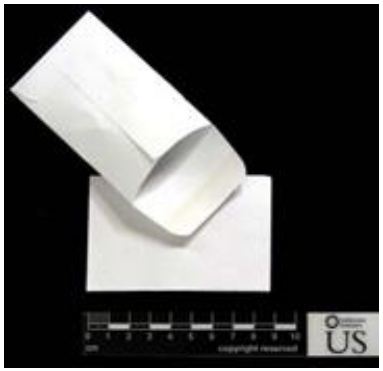
- Ideální odebrat do sáčků pro přípravu čaje a přenést do nádoby s vysušeným silikagelem, popř:
- listy v PE zipových sáčcích s nasypaným silikagelem (listy se mohou drolit)
- listy zabaleny do alobalu a uchovávány ve větším PE sáčku se silikagelem.

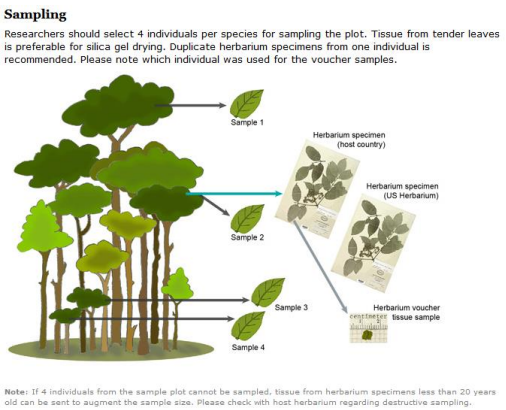
- Výhody – snadnější následná manipulace
  - vysušené vzorky není třeba před extrakcí ošetřit tekutým dusíkem
  - V přítomnosti desikantu lze skladovat roky při pokojové teplotě

Ukázkový příklad odběru a uchovávání rostlinných vzorků

- 1-2 listy do papírové obálky (např. sáček na přípravu čaje) s popisem:
  - Taxon
  - Označení/Číslo vzorku
  - Popis lokality (GPS, lokalita, typ společenstva)
  - Kdo vzorek odebral

- Obálku se vzorkem do plast. sáčku nebo nádoby se silikagelem
- Chránit před přímým slunečním světlem
- Ideálně – odebrat a uchovat (archivovat) i herbářovou položku





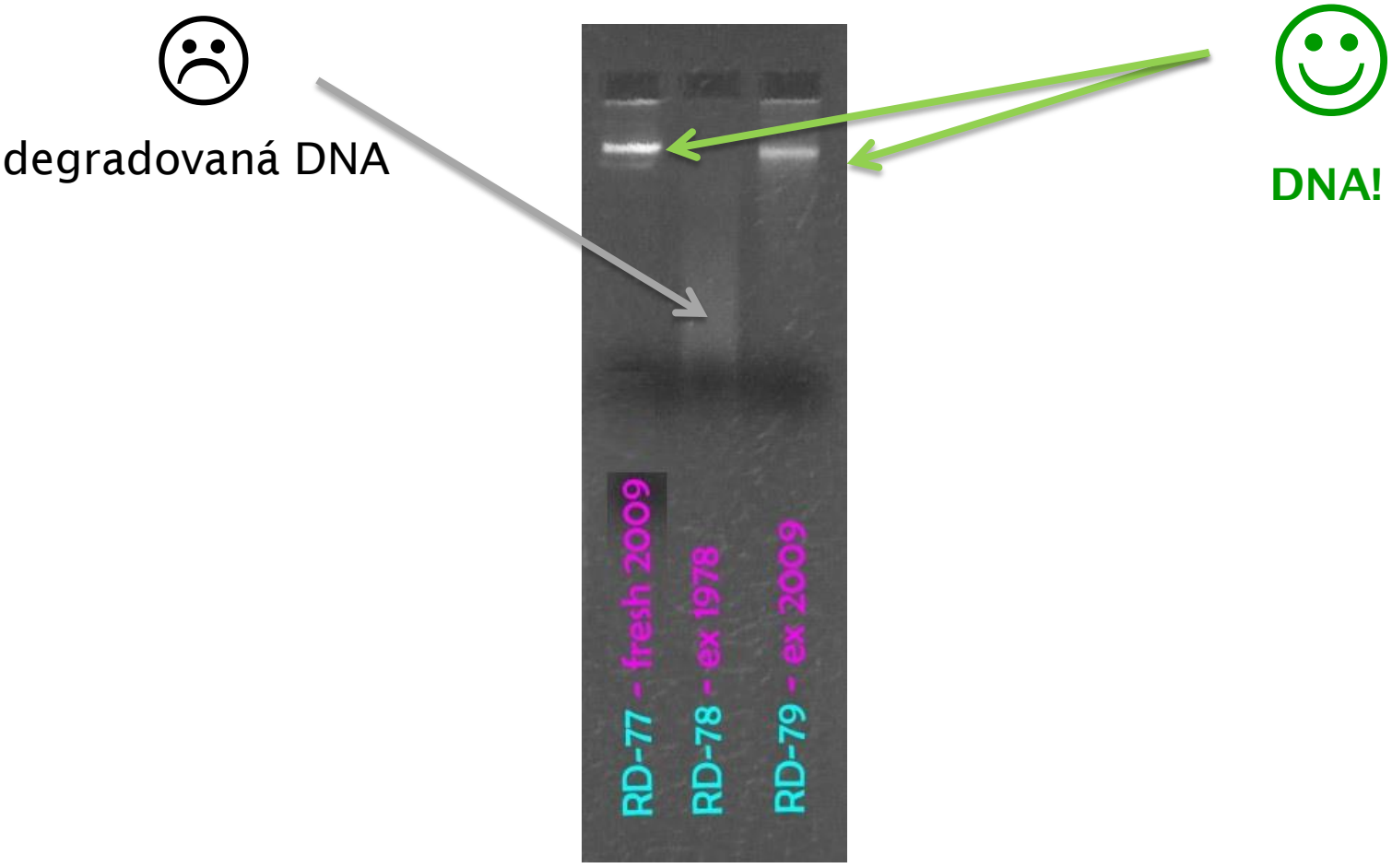
http://botany.si.edu/projects/dnabarcode/sample.htm

Odběr a uchovávání rostlinných pletiv pro izolaci DNA

Ad e) Herbarizace

- taxonomicky založené studie
- správné značení položky – název, odběrové místo, …..
- správně vysušit (pozvolna)
- duplikát – většina zemí preferuje uchování jedné z položek v národním nebo specializovaném herbariu

Někdy to ale nefunguje



Příklad zpracování vzorků po doručení do laboratoře

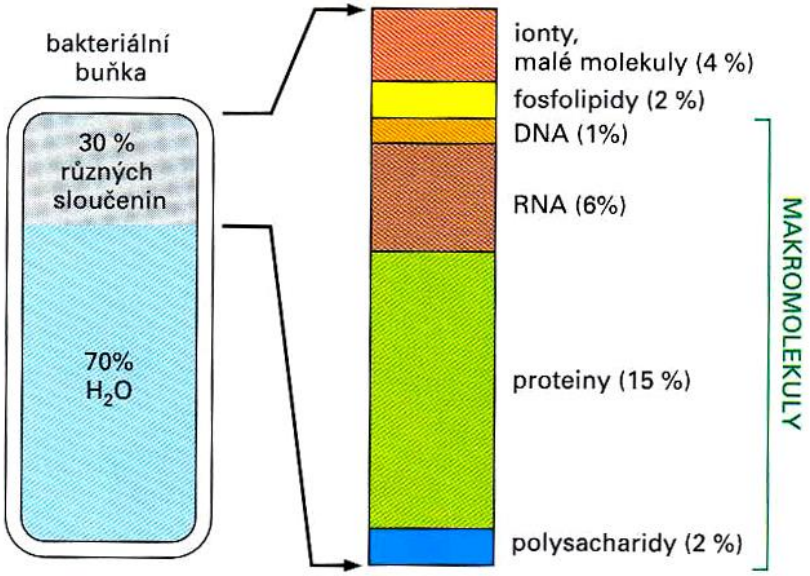
PCHP Rameno u Stříbrného rybníka

Autor: L. Adamec

Příklad zpracování vzorků po doručení do laboratoře

DNA - extrakce a kvantifikace
– princip, kroky, protokoly

Složení buňky



Složení eukaryotní i prokaryotní buňky je velice obdobné

Molekulární biologie využívá řady postupů umožňujících získání nepoškozených makromolekul nebo membránových buněčných struktur – například organel.

Izolace DNA

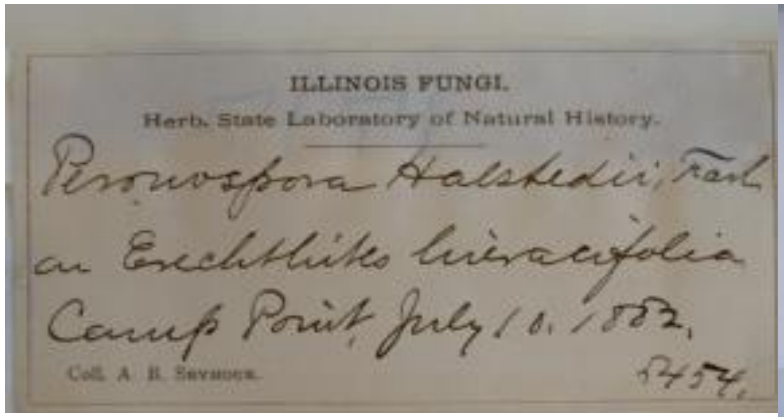
- První krok většiny analýz NK
- Odstranění inhibitorů, které blokují činnost enzymů v následných analýzách
- Volba metody extrakce NK závisí na:
  - Typu molekuly, kterou chceme extrahovat (genomová=genomická DNA, plazmidová DNA, fragment DNA z agarózového gelu, RNA)
  - Typu buněk z nichž má být NK izolována
  - Požadované čistotě NK
  - Požadovaném množství NK
  - Často je výhodnější zisk DNA ve vyšší kvalitě na úkor výtěžku izolace

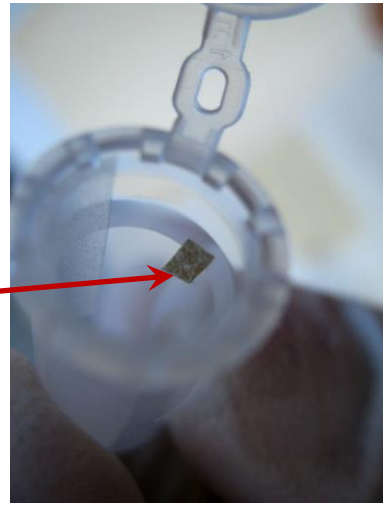
Izolace DNA

Kdy se DNA <u>neizoluje</u>:

1. **Zničený nebo kontaminovaný vzorek**
   – nevím co analyzuji – zapomenout na extrakci DNA

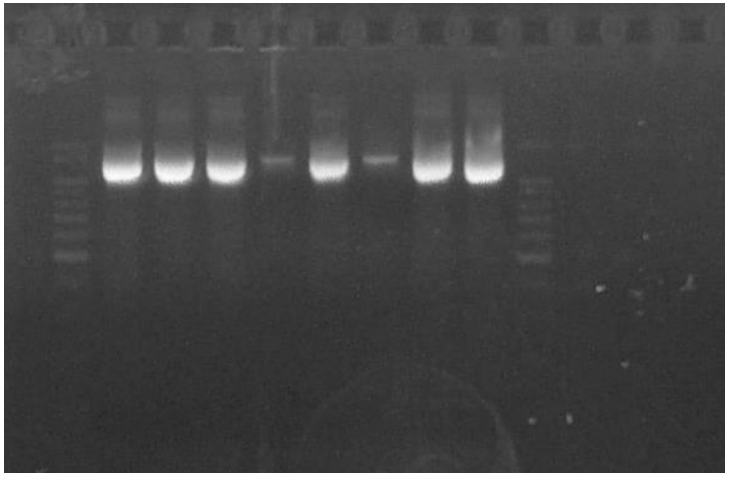
2. **Máme málo vstupního materiálu pro extrakci**
   Pro PCR použít přímo zkoumaný objekt (specifické primery)
   - Př. Studovaný organismus se nedá kultivovat
     - např. sinice *Konvophoron* – single cell PCR
   - Př. herbarizované položky rostlinných patogenů
     - *Pseudoperonospora* – spory do Epp a přidat PCRmix



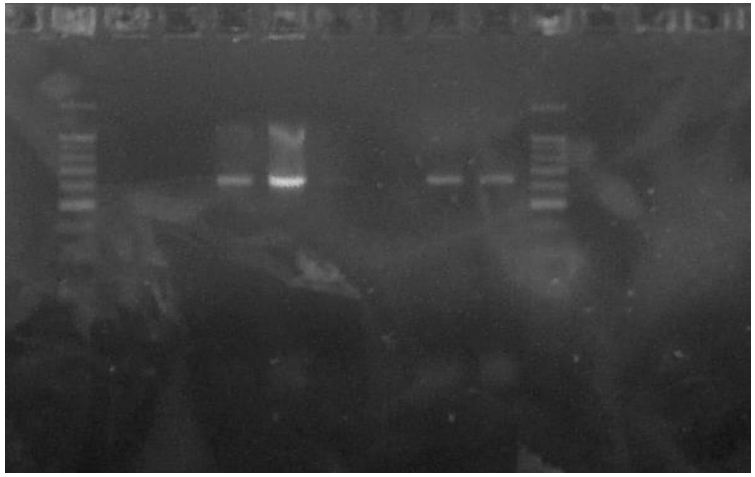


Výsledek PCR amplifikace bez extrakce DNA – spory *P. cubensis* odebrané z povrchu z infikovaných listů

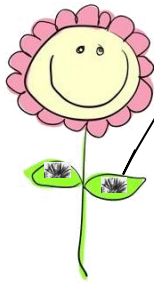
- ITS



- COX



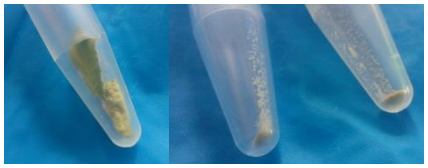
Problémy s extrakcí DNA



DNA patogena

Získat nekontaminovanou DNA patogena je u obligátních biotrofů problém

- Nemožnost kultivace patogena na médiu
- Seškrabávání mycelia
- Odběr spor
  - oplach spor pipetováním vodou, podtlakové systémy odsávající spory…
- Izolovaná DNA obsahuje i DNA hostitelské rostliny
  - Některé metody jsou obtížně použitelné – zejména pokud používají nespecifické primery (AFLP, RAPD….)
    - Jak odstranit:
      - kultivace na stejném genotypu hostitelské rostliny
      - zařadit kontrolní vzorky s DNA hostitele
        - nehodnotit PCR produkty odpovídající hostitelské DNA



Metody izolace DNA

Metody využívající rozdíly v rozpustnosti DNA v různých roztocích

- Obecně rozšířené, široce aplikované postupy
- Metody vhodné pro vysokomolekulární genomické NK
- extrakce fenolem, CTAB metoda – viz dál

Metody adsorpční

- DNA se váže na křemičité částice v přítomnosti chaotropní látky
- Rychlá purifikace plazmidů
- Zisk malých fragmentů DNA s vysoký výtěžkem
- Zisk vysokomolekulární DNA s nižším výtěžkem
- Podstata komerčních kitů $ $ $ **€ € €**
-

  Metody založené na magnetických částicích

  - Modifikovaný povrch částic s vysokou afinitou pro NK
  - Imobilizace částic pomocí magnetu, centrifugace, eluce vhodným roztokem
  - $ $ $ **€ € €** $

Další metody:

- Centrifugace v hustotním gradientu

Izolace DNA – obecný postup

1. Homogenizace materiálu
2. Inkubace s lyzačním roztokem
3. Odstranění polysacharidů, proteinů, fosfolipidů
4. Zisk přečištěné DNA

Izolace DNA – homogenizace materiálu

1) **Porcelánová miska, tlouček,**
   - **přídavek mořského písku, tekutý dusík**

Izolace DNA – homogenizace materiálu

2) Homogenizace v Eppendorfkách.

Izolace DNA – homogenizace materiálu

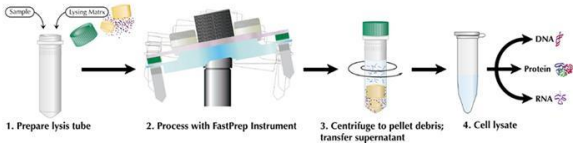
3) Homogenizační mlýny

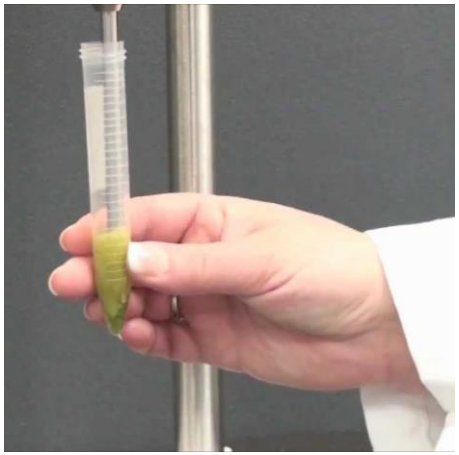
Mixer Mill

www.retsch.com

FastPrep

www.mpbio.com



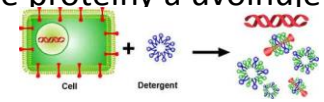


Izolace DNA – metoda CTAB - postup

1) homogenizace materiálu

2) Inkubace s extrakčním roztokem CTAB při teplotě 65°-68°C

- detergent: poruší membrány, denaturuje proteiny a uvolňuje proteiny z DNA, odstraňuje fosfolipidy



- pufr: udržuje optimální pH (8-9)
- soli: uvolňují proteiny (histony) z DNA, udržují polysacharidy v rozpustné formě, vysolují PCR inhibitory
- redukční činidla (**merkaptoethanol**) - blokují oxidační procesy vedoucí k destrukci DNA
- Chelatační činidla (EDTA) - blokují dvojmocné ionty kovů = blokace Dnáz
- - další složky (PVP – odstraňuje polyfenoly)

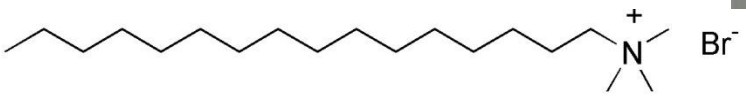
Po centrifugaci:

3) Přídavek roztoku chloroform-isoamylalkohol

- Vysrážení proteinů a polysacharidů proteiny, rozpouští tuky, odděluje fáze

4) Inkubace 5minut, centrifugace

CTAB - **C**etyl**T**rimetyl**A**monium**B**romid)

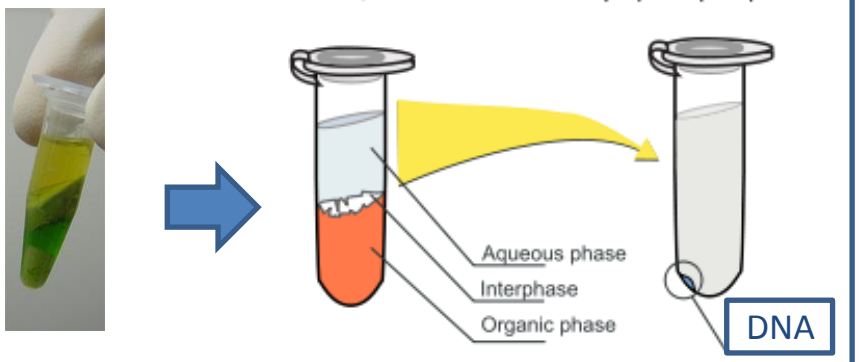


Izolace DNA – metoda CTAB - postup

1) homogenizace ;mate
2) Inkubace s extrakčn
rozrušení buně
3) Přídavek roztoku chl
- Vysrážení proteinů a p

4) Inkubace 5minut, ce

Po centrifugaci:



5) Přenesení vodné fáze do nové Eppendorfky

6) vysrážení nukleových kyselin (NK) etanolem nebo izopropanolem
- Min. 30 minut -20°C, nejlépe přes noc

7) izolace precipitátu NK centrifugací, vysušení NK

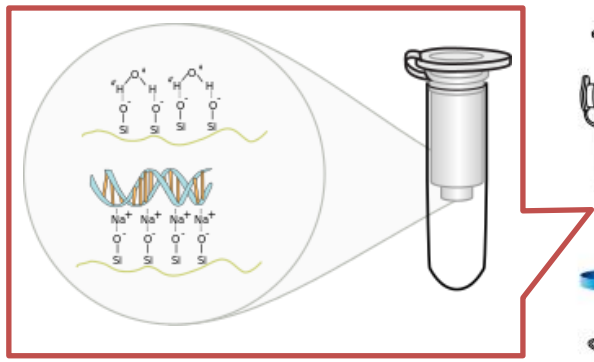
8) rozpustění získaného odparku ve vhodném roztoku

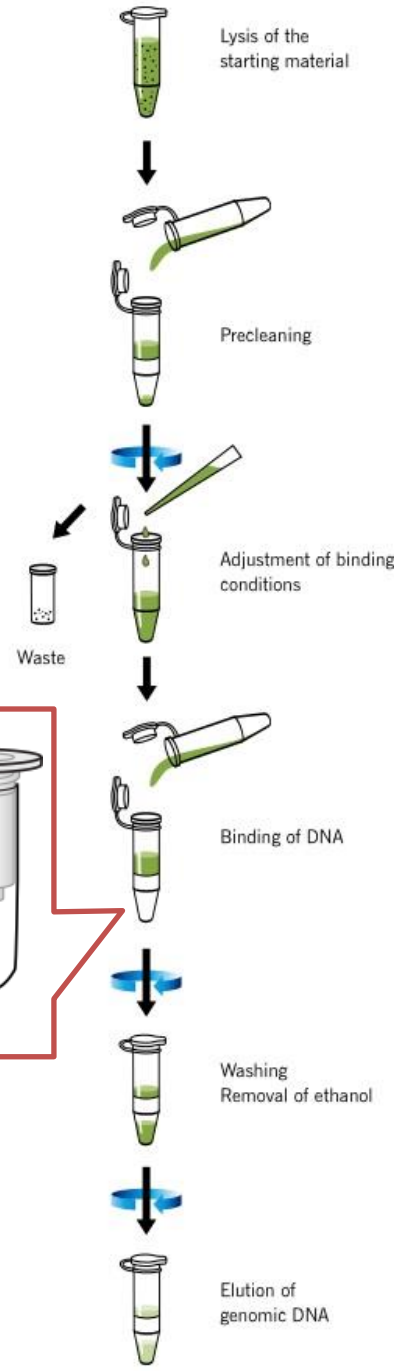
9) Uchování DNA
- chladnička 4°C – pro okamžité použití
- hlubokomrazící box -80°C pro dlouhodobé uchovávání

Izolace DNA – (silikát) komerční kity

DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí (jodid sodný nebo ionty guanidinu) **adheruje na silikátový povrch.**

1. Homogenizace
2. Inkubace s lyzačním roztokem
3. Vazba DNA na kolonku potaženou DNA-vazebným povrchem (silikátová membrána)
4. následným promýváním DNA uchycené na kolonce
5. vymytí DNA z kolonky vhodným rozpouštědlem (voda)





Izolace DNA – adsorpce na silikát

• **DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí** (jodid sodný nebo ionty guanidinu) **adheruje na silikátový povrch (sklo).**

• **K roztoku,** obsahujícímu zlyzovaný buněčný obsah, **se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic**

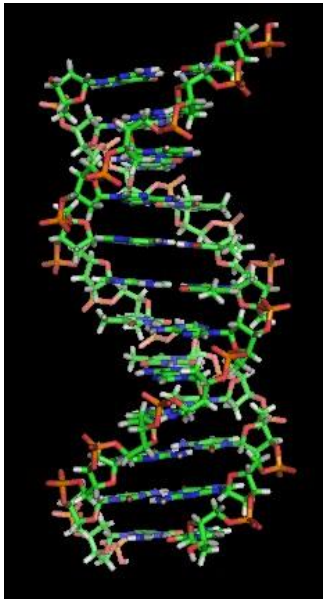
• **Protřepáváním směsi** se usnadňuje **vazba DNA na částice.**

• **Ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku a lze je pak elegantně odstranit –** částice necháme usadit nebo centrifugujeme

• **Odsajeme roztok nad částicemi a propláchneme** novou dávkou pufru s chaotropními solemi.

• **Přečištěnou DNA** na povrchu částic **lze snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru,** který neobsahuje chaotropní soli**.**

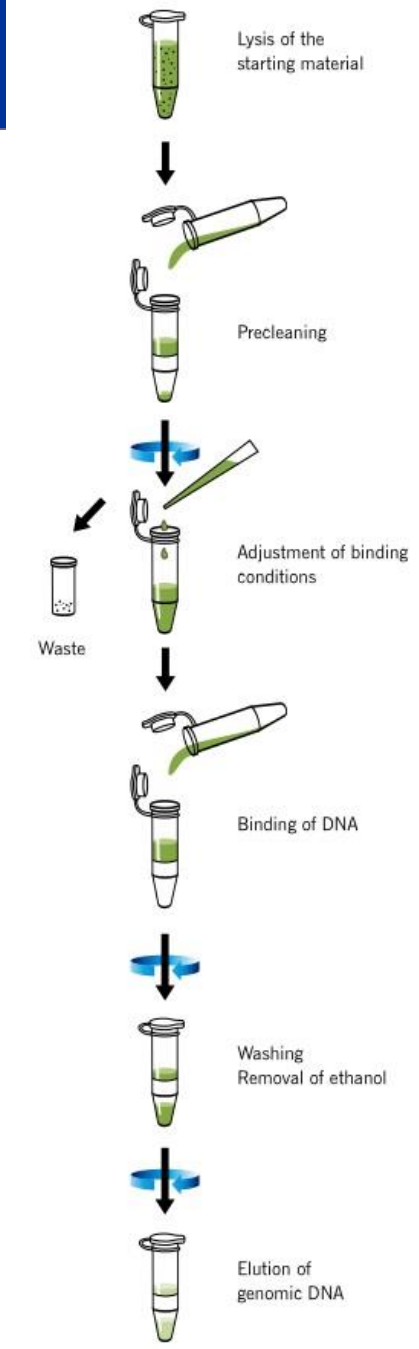
• Po odstředění zůstanou **na dně jen samotné částice, nad nimi je čistý roztok DNA.**



Výhodou metody založené na adsorpci na silikát je rychlost a pohodlnost, proto jsou na ní založeny komerční soupravy (kity) pro rutinní extrakce DNA.

Izolace DNA – př. izolační kity Invitek

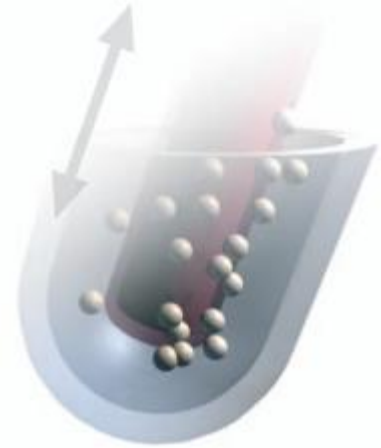
Typ vzorku	Doporučený Kit	Objem vzorku	Výtěžek
Krev, „buffy coat" – frakce leukocytů a trombocytů po ultracentrifugaci	Invisorb Spin Micro DNA Kit Invisorb Spin Blood Mini Kit Invisorb Spin Blood Midi Kit Invisorb Spin Blood Maxi Kit Invisorb Blood Giga Kit Invisorb Blood Universal Kit	1 - 50 µl 1 - 200 µl 200 µl - 2 ml 1 - 10 ml 0.2 - 20 ml 1 ml - 10 ml	1 - 2 µg up to 10 µg up to 60 µg up to 300 µg up to 600 µg up to 400 µg
Tělní tekutiny, kostní dřeň	Invisorb Spin Micro DNA Kit Invisorb Spin Blood Mini Kit Invisorb Genomic Kit III	1 - 50 µl 1 - 200 µl 1 - 200 µl	depending on type and amount of starting material
Lidské a zvířecí tkáně , tkáně zalité v parafinu	Invisorb Spin Micro DNA Kit Invisorb Spin Tissue Mini Kit Invisorb Spin Tissue Midi Kit Invisorb Spin FFPE Tissue Kit Invisorb Genomic Kit II	0.5 - 5 mg 0.5 - 40 mg 30 - 100 mg 2 - 3 paraffin sections 0.5 - 40 mg	1 - 2 µg up to 50 µg up to 80 µg up to 50 µg up to 50 µg
Lidské a zvířecí buňky	Invisorb Spin Micro DNA Kit Invisorb Spin Tissue Mini Kit Invisorb Spin Tissue Midi Kit Invisorb Genomic Kit III Invisorb Spin Cell Mini Kit	100 -10^5cells 10 –10^7cells 10^6 -10^8cells 1 x 10^5 cells 2 x 10^6 cells	depending on type and amount of starting material
Suspenze kvasinkových buněk	Invisorb Spin Yeast DNA Mini Kit Invisorb Genomic Kit III	10^7 cells, swab 3 - 10 ml bacterial or yeast suspension	depending on type of starting material
Swab material = výtěry	Invisorb Spin Swab Kit Invisorb Genomic Kit III Invisorb Spin Cell Mini Kit	depending on starting material	depending on starting material
Forensic material	Invisorb Spin Forensic Kit Invisorb Forensic Kit I	depending on type and amount of starting material	depending on type and amount of starting material
Plant material	Invisorb Spin Plant Mini Kit Invisorb Spin Plant Midi Kit	up to 100 mg up to 500 mg	5 - 35 µg up to 140 µg
Potraviny rostlinného/živočišného původu	Invisorb Spin Food Kit I (animal) Invisorb Spin Food Kit II (plant)	0.5 – 40 mg up to 100 mg	up to 50 µg up to 50 µg



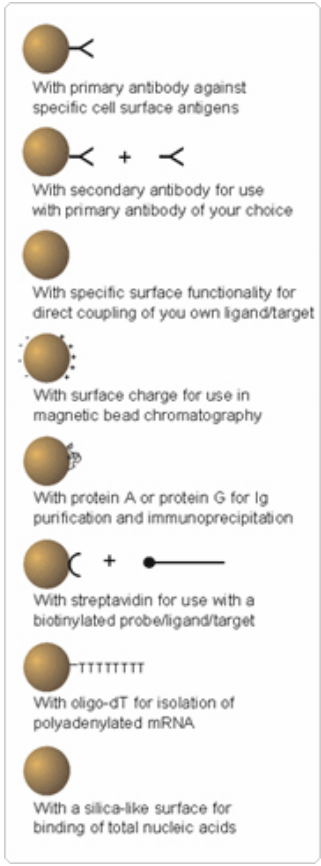
Izolace DNA – magnetické částice

Izolační kity pro izolaci genomické DNA, total RNA nebo DNA a/nebo RNA z patogenů
- magnetické částice (InviMag beads, Dynabeads) pro purifikaci NK 15, 24 nebo 96 vzorků naráz v jednom běhu (podle typu přístroje)

- DNA se váže na magnetické částice, které jsou přístrojem v konečném kroku izolovány ze vzorku



KingFisher Systems



Izolace DNA – automatizované metody

http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Dynal/Dynabeads-Types-and-Uses.html

Scheme of the InviMag® Plant DNA Mini Kit

Please read protocols prior the start of the preparation carefully

Transfer homogenized starting material into a **1.5 ml reaction tube** (not provided).
Add 400 µl of **Lysis Buffer P** and 20 µl of **Proteinase K** to the 1.5 ml reaction Tube

Vortex the tube for 5 sec and incubate the sample at 65℃ for app. 30 min under continuously shaking (e.g. by using a thermomixer).

After lysis time centrifuge the 1.5 ml reaction tube at max. speed for 1 minute to pellet down the unlysed material. Transfer the supernatant from the lysed sample carefully into a 1.5 ml reaction tube.

Add 200 µl **Binding Buffer P**, add 20 µl of **SNAP Solution** to the lysate, Mix by pipetting 5 times
Incubate for 5 min at RT

Insert the Magnetic Stripe
Incubate again for 5 min at RT
Removal of supernatant by aspiration or pipetting

Remove Magnetic Stripe
Add 500µl **Wash Buffer I**
Close the vial and mix by vortexing

Insert the Magnetic Stripe
Incubate for 5min at RT
Removal of the **Wash Buffer I** eluate by aspiration or pipetting

Remove Magnetic Stripe
Add 800 µl **Wash Buffer II**
Close the vial and mix by vortexing

Insert the Magnetic Stripe
Incubate for 3 min at RT
Removal of the **Wash Buffer II** eluate by aspiration or pipetting

Remove Magnetic Stripe
Repeat this step from point (A)

Insert the Magnetic Stripe, open the lid
Incubate for 5 min at RT to evaporate ethanol
Remove Magnetic Stripe

Add 100 µl preheated **Elution Buffer D**
Mix by vortexing
Incubate for 5 min at RT

Insert the Magnetic Stripe
Incubate for 3 min at RT

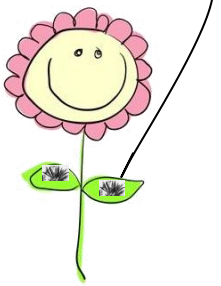
Postup izolace DNA pomocí izolačního kitu – manuálně bez přístroje

Příklad dostupných kitů – firma Invitek

Sample Source	Recommended Kit	Sample Volume	Yield
Genomic DNA Purification			
Whole human or animal blood, buffy coat, bone marrow, rinse liquid from swabs	InviMag Blood DNA Mini Kit/ KFmL	up to 200 µl	6 -10 µg
Fresh or frozen tissue, rodent tail, paraffin embedded tissue, mammalian cells	InviMag Tissue DNA Mini Kit/ KFmL	5 - 20 mg tissue sample, 0.5 cm rodent tail, 10 –10^6mammalian cells	10 – 25 µg
Saliva, swabs	InviMag SalivaGene DNA Kit/ KFmL	500 µl	up to 10 µg
Human and animal stool sample	InviMag Stool DNA Mini Kit/ KFmL	100 – 300 mg	up to 50 µg
Forensic material	InviMag Forensic Kit/ KFmL	depending on type and amount of starting material	depending on type and amount of starting material
Plant material	InviMag Plant DNA Mini Kit/ KFmL	up to 100 mg	5 – 25 µg
Nucleic Acid Purification from Pathogens			
Bacterial DNA			
Bacteria pellets, tissue samples, paraffin embedded tissue, blood, cell-free body fluids, urine, paper points, water	InviMag Bacteria DNA Mini Kit/ KFmL	depending on type and amount of starting material	depending on starting material
Human and animal stool sample	InviMag Stool DNA Mini Kit/ KFmL	100 – 300 mg	up to 50 µg
Saliva, swabs	InviMag SalivaGene DNA Kit/ KFmL	500 µl	up to 10 µg
Viral DNA and/or RNA			
Serum, plasma, cell-free body fluids, rinse liquid from swabs, cell culture supernatants, tissue biopsies	InviMag Virus DNA/RNA Mini Kit/ KFmL	up to 200 µl up to 10 mg	depending on starting material
Viral RNA			
Plasma, serum, cell-free body fluids, rinse liquid from swabs, stool samples, small tissue samples, cell culture supernatants	InviMag Virus RNA Mini Kit/ KFmL	up to 200 µl up to 50 mg	depending on viral load
Viral DNA			
Plasma, serum, whole blood, cell-free body fluids, rinse liquid from swabs, cell culture supernatants	InviMag Virus DNA Mini Kit/ KFmL	up to 200 µl	depending on viral load
Total RNA isolation			
Human or animal cells, lymphocytes pellet, tissue samples	InviMag Universal RNA Mini Kit/ KFmL	5 x 10^6 cells up to 1.0 ml blood up to 20 mg	up to 20 µg

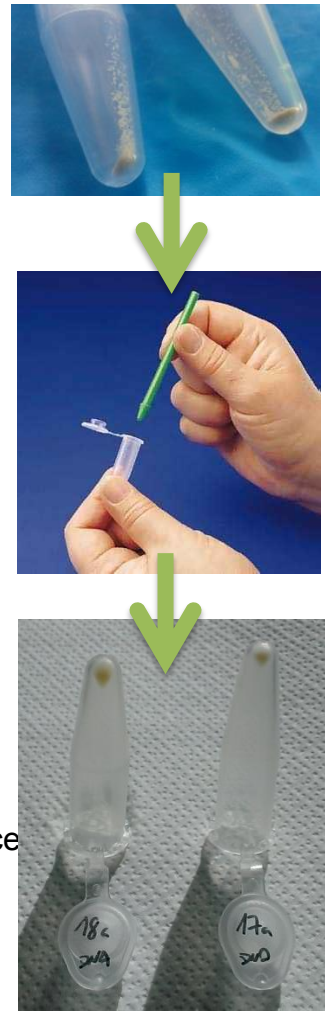
Další metody extrakce DNA – malé množství vstupního materiálu

DNA patogena



Často máme malé množství vstupního materiálu

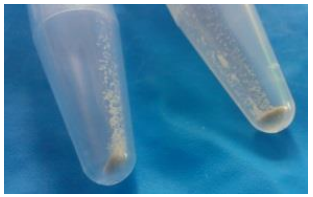
- **Extrakce DNA pomocí SDS metody**
  - Pod stereomikroskopem seškrábnout mycelium do Eppendorfky
  - Homogenizace tloučkem
  - Přídavek 350 ul SDS pufru – dodatečná homogenizace
  - 5 min centrifugace při max. otáčkách
  - Supernatant přenést do nové Epp.
  - Přidat 350 ul isopropanolu – 30x převrátit
  - 10 min centrifugace při max. otáčkách
  - Supernatant slít a zbytky isopropanolu osušit otřením Epp o filtrační papír
  - 500 ul 75% EtOH
  - 5 min centrifugace při max. otáčkách
  - Supernatant slít – osušit – nechat vyschnout ve flow boxu/vakuové odparce
  - Odparek DNA rozpustit v 50 ul sterilní vody (PCR grade)
- **Rychlá metoda (~1hod, podle počtu vzorků)**.
- „**Dirty** extraction protocol“ – vhodné pro markery založené na PCR.
- DNA je stabilní po jeden rok od data extrakce.



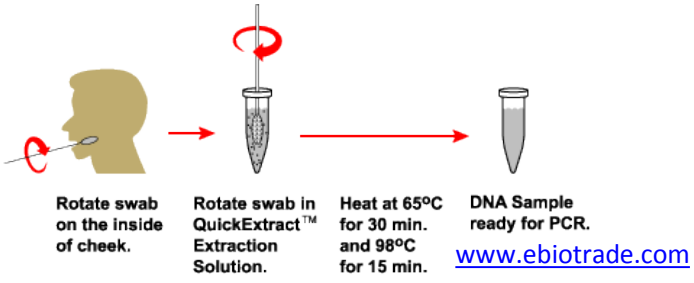
Další metody extrakce DNA – malé množství vstupního materiálu

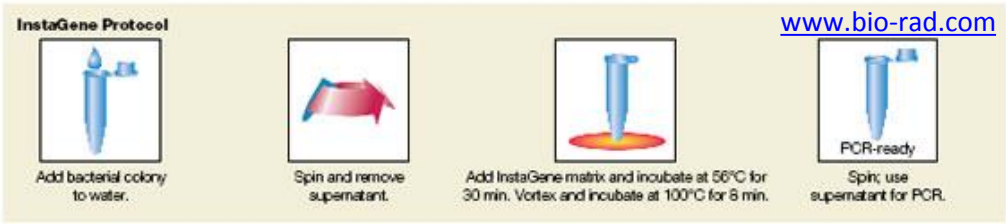
Často máme malé množství vstupního materiálu

- **Extrakce DNA pomocí Chelex/InstaGene Matrix**
  - Rozpipetovat 300ul 10% Chelexu do 1,5 ml Eppendorfek (Chelex má kašovitou konzistenci)
  - Vysterilizovat pinzetu (opakovaně ožehnout nad lihovým kahanem)
  - Sterilní pinzetou odebrat kousek pletiva)bakteriální suspenze vložit do Chelexu
    - (velmi malá množství pletiva!!! Velké množství vstupního materiálu by mohlo inhibovat PCR)
  - Negativní kontrola (vysterilizovat pinzetu a vymáchat ji v samostatné tubě s Chelexem)
  - Krátce vortexovat (10-15 sec) a centrifugovat (10-15 sec)
  - Eppendorfky vložit na 20 min do termobloku předehřátého na 95°C
  - centrifugovat (10-15 sec)
  - **Supernatant** použít do PCR (Chelex inhibuje Taq)
  - Někdy je potřeba odladit navazující kroky:
    - Počkat s PCR do druhého dne
    - Naředit supernatant 1:1 až 1:10.000
    - Pokud PCR nevyjde – opakovat centrifugaci, nechat stát přes noc a vyzkoušet PCR znova….. Ale i to někdy nemusí vést k pozitivní PCR



Rychlá metoda (~30 min podle počtu vzorků).
https://www.eeb.ucla.edu/Faculty/Barber/Protocols.htm





Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA v UV spektru

Princip:

- **MĚŘENÉ VLNOVÉ DÉLKY V UV SPEKTRU**

- A_{230} **- 230 nm -** absorbční maximum **guanidiových solí, fenolu, sacharidy**

- A_{260} **- 260 nm –** absorbční maximum **nukleových kyselin**

- A_{280} - **280 nm -** absorbční maximum **proteinů** (zbytky tyrosinu a tryptofanu)

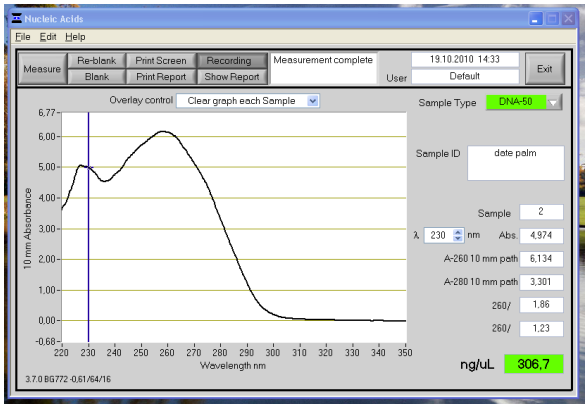
- A_{320} **(**A_{340} **)** – 320 **(340) nm – turbidita (zakalení) vzorku** – odečet pozadí, nespecifické kontaminace

Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

Spektrofotometricky

Po proměření vzorku DNA v UV spektru přístroj poskytne následující údaje:

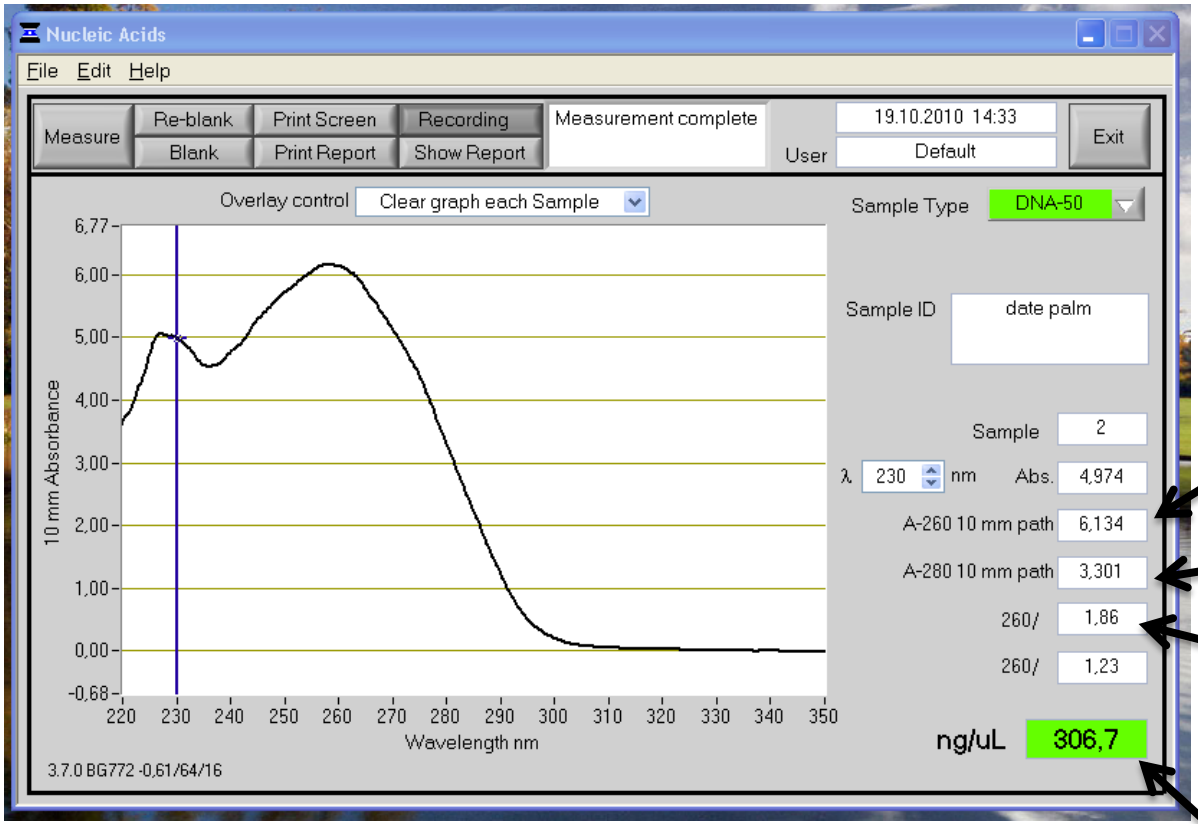
a) **koncentrace studované DNA:**
b) Poměr $R_{260/280}$
   a) $R_{260/280}$ = od 1,8 do 2,0 (blíž 1,8) = OK!
   b) $R_{260/280} < 1.8$ = kontaminace proteiny
   c) $R_{260/280} > 2.0$ = kontaminace organickými sloučeninami (chloroformem, fenolem)
c) Poměr $R_{260/230}$
   a) hodnota by měla být > 2.0
   b) hodnota pod 2.0 – kontaminace sacharidy



Izolace DNA – stanovení koncentrace a čistoty

spektrofotometrické stanovení

- příklad – výstup měření na přístroji **Nanodrop**



A_{260} : absorbance NK

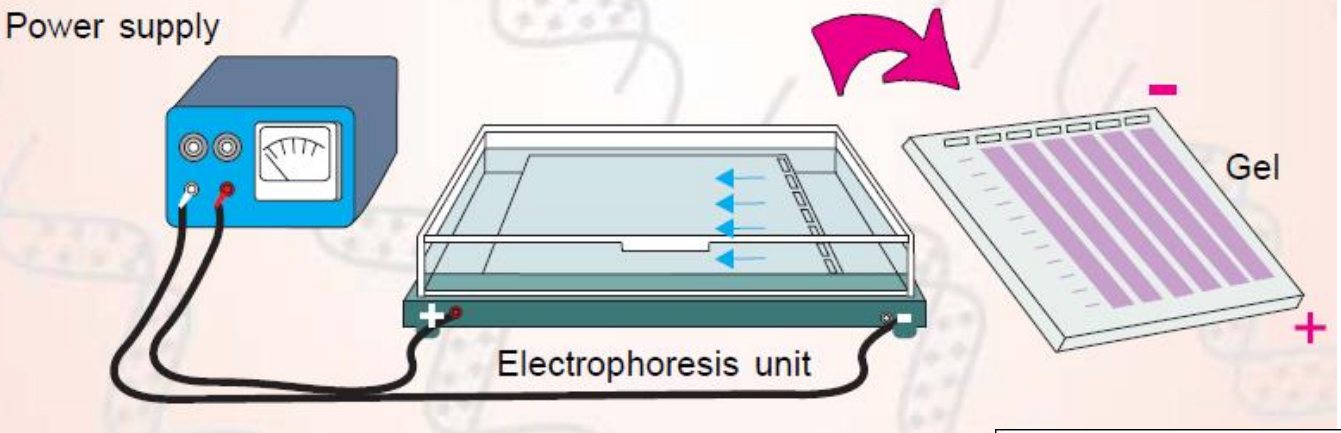
A_{280} : absorbance proteinů

$R_{260/280}$: kvalita NK

Výsledná koncentrace DNA

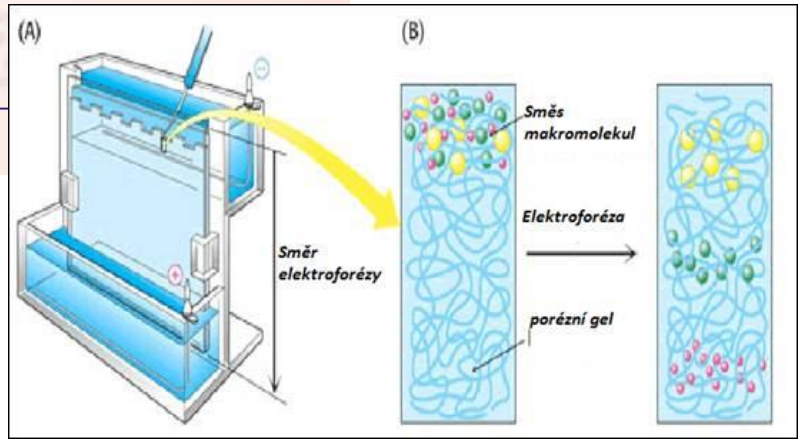
Izolace DNA - Ověření kvality a integrity agarózovou elektroforézou

A method to separate DNA fragments to allow their visualization and/or identification



Adapted from Griffiths *et al.* 1996

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003



Elektroforéza nukleových kyselin

Agarosový gel ……. AGAR vs AGAROSA

- **Agar -** směs agarosy a agaropektinu
  - zisk z polysacharidové buněčné stěny ruduch extrakcí horkou vodou
  - druhy: *Gracilaria lichenoides, Gelidium sp., Euchema sp.*

- **Agarosa** - lineární polymer
  - základ agarobiosa = disacharid (D-galaktosa + 3,6-anhydro-L-galaktopyranosa)
  - molekula nemá prakticky žádný náboj – vhodná ELFO matrice

Obsah agarosy v gelu	Délka DNA
0,5 %	1–30 kbp
0,7 %	0,8–12 kbp
1,0 %	0,5–10 kbp
1,2 %	0,4–7 kbp
1,5 %	0,2–3 kbp
2,0 %	50 bp–2 kbp
3–4 %	10 bp–1 kbp

Čím je koncentrace AGRS vyšší:
- lepší rozlišovací schopnost, ale
- pomalejší průběh elfo

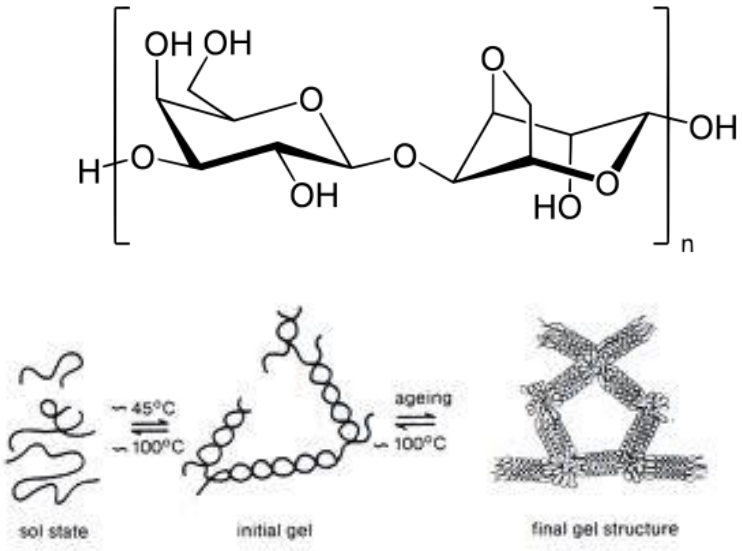
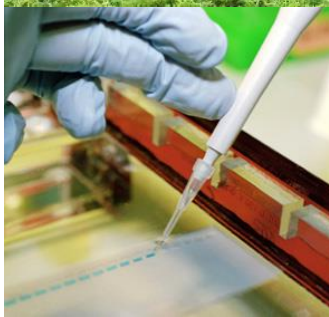


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)



Elektroforéza nukleových kyselin

Agarosový gel ……. barvení

Ethidium bromid

se vmezeřuje mezi sousední páry bazí a vytváří s NK komplex, který v UV světle červeně fluoreskuje (DNA i RNA).

Vmezeřením se do DNA dochází k **inhibici replikace** DNA (separaci dvoušroubovice) a navazujících reakcí – **transkripce a translace**
= buňka umírá, protože

1. nemůže se replikovat a
2. netvoří se proteiny potřebné pro její život

toxický a mutagenní účinek EtBr!!!

je třeba pracovat s respektem a rozvahou,
používat ochranné pomůcky (nitrilové rukavice), separovat kontaminované předměty

Elektroforéza nukleových kyselin

Polyakrylamidový gel

- gel je tvořen lineárními molekulami **polyakrylamidu**, které jsou zesíťované **N,N‘-methylenbisakrylamidem**

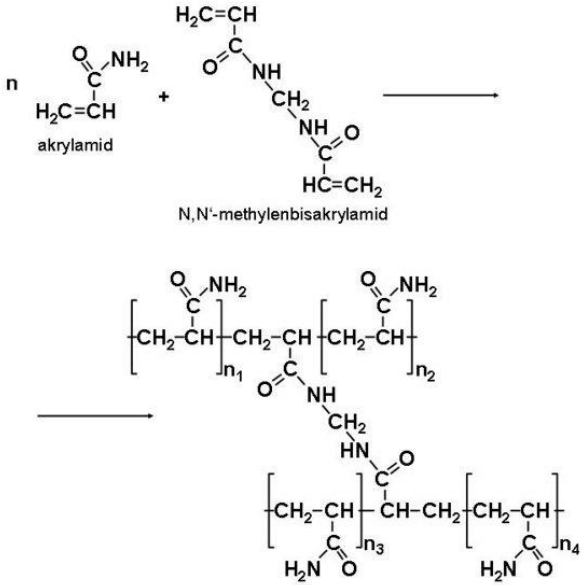
- pro dělení kratších molekul

polymerace: **akrylamid N,N‘-methylenbisakrylamid +**

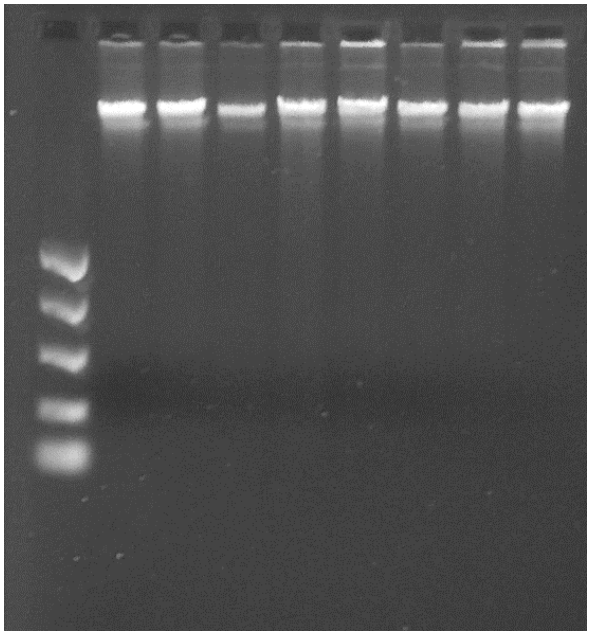
peroxydisíran amonný (APS) – zdroj kyslíkových radikálů, kt. spouští polymeraci

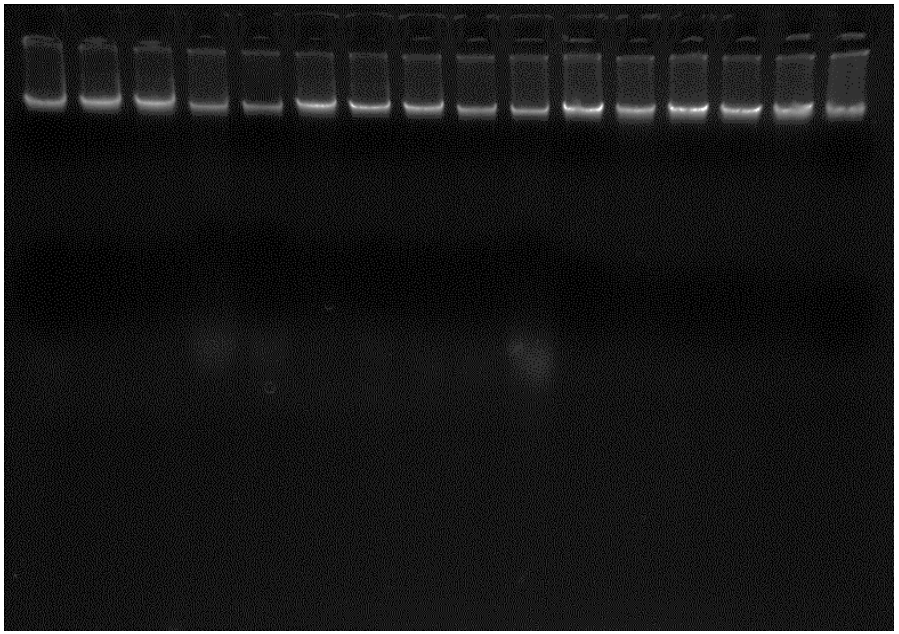
N,N,N‘,N‘-tetramethylendiamin (TEMED) – stabilizuje radikály

Polyakrylamid	Délka DNA
3,5 %	1–2 kbp
5 %	75–500 bp
8 %	50–400 bp
12 %	35–250 bp
15 %	20–150 bp
20 %	5–100 bp



!





O kvalitě a koncentraci vyextrahované DNA rozhoduje mj.

- typ použité metody extrakce (kolonková, CTAB, magnetické kuličky…)
- kvalita vstupního materiálu
  - špatně uchované vzorky = fragmentovaná DNA, omezené množství použitelných PCR aplikací
  - kontaminované, špatně určené vzorky, neznámý původ
- množství vstupního materiálu (dodržovat navážky, objemy…..)

Před realizací studie na novém organismu/druhu je potřeba si vše vyzkoušet a odladit!!!!!

That´s all folks!