



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**MODERNÍ BIOFYZIKÁLNÍ METODY:  
POKROČILÉ PRAKTICKÉ VZDĚLÁVÁNÍ V EXPERIMENTÁLNÍ  
BIOLOGII**

**Operační program Vzdělávání pro konkurenceschopnost  
Číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/09.0046**

**Praktický kurz pokročilých metod experimentální biologie**

konaný

na Katedře biologie a ekologie Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity v  
Ostravě

v termínu 28. 11. – 2. 12. 2011

## Program praktického kurzu

	<b>Pondělí</b>	<b>Úterý</b>	<b>Středa</b>	<b>Čtvrtek</b>	<b>Pátek</b>
<b>9 - 10</b>	Přednáška	Přednáška	Přednáška	Přednáška	Přednáška
<b>dopoledne</b>	PCR kolonií. Elektrochemie nukleových kyselin.	Řízená mutageneze – PCR, štěpení enzymy	Kultivace transformovaných bakterií nesoucích mutaci.	Detekce poškození DNA.	Práce s bakteriofágy.
<b>odpoledne</b>	PCR kolonií. Elektrochemie nukleových kyselin.	Řízená mutageneze – pokračování Transformace buněk plasmidovou DNA . Selekce buněk s rekombinantním plasmidem.	Izolace plasmidové DNA na centrifugačních kolonkách.	Štěpení plasmidů s mutací restrikční endonukleázou, gelová elektroforéza.	Vyhodnocení výsledků, hodnocení kurzu účastníky.

# Elektrochemická analýza nukleových kyselin

## Značení DNA komplexy oxidu osmičelého

### Princip:

Komplexy oxidu osmičelého s bidentátními dusíkatými ligandy poskytují s pyrimidinovými zbytky bází v DNA kovalentní adukty. Thymin je asi 10x reaktivnější než cytosin. Pokud je jako ligand použit 2,2'-bipyridin (Os,bipy) je tato reakce specifická pouze pro jednořetězcovou DNA. Tato vlastnost byla použita pro detekci některých sekundárních struktur DNA. Tyto adukty jsou elektroaktivní a na rtuťových a uhlíkových elektrodách poskytují celou řadu elektrochemických signálů. Na rtuťových a uhlíkových elektrodách jsou to faradaické signály způsobené postupnou redukcí nebo oxidací atomu osmia v molekule aduktu. Pouze na rtuťových elektrodách pak lze získat signál katalytického vylučování vodíku v důsledku přítomnosti aduktu na povrchu pracovní elektrody. Tento katalytický signál může sloužit pro velmi citlivé stanovení modifikované DNA. Naproti tomu elektrodu z pyrolytického grafitu lze použít pro přímou analýzu reakční směsi, kdy je nezreagovaný komplex separován z povrchu pracovní elektrody extrakcí organickým rozpouštědlem (chloroform, isopropylalkohol).

### Materiál:

- CT-DNA (120 µg/ml)
- 20mM 2,2'- bipyridin (Sigma)
- 60mM OsO<sub>4</sub> (Sigma)
- Acetátový pufr pH 5
- Termostat (TermomixerPlus, Eppendorf, Německo)
- Autolab analyzátor (EcoChemie) s VA663 stojanem (MetrOhm)

### Pracovní postup:

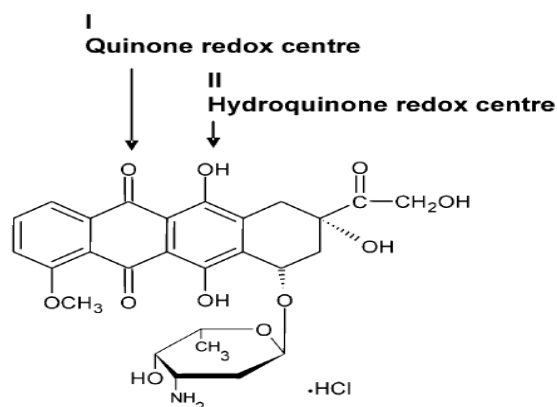
- 1) Odpipetujte 20 µl CT-DNA (120 µg/ml) a nechte 10 min inkubovat při 95 stupních, prudce zchladte v ledové lázni
- 2) Připravte si 10 µl komplexu OsO<sub>4</sub> s bipyridinem (20 mM ekvimolární)
- 3) Napipetujte: a) 2 µl komplexu, 5 µl ssDNA, 2 µl Tris-Cl pH 8, 11 µl H<sub>2</sub>O  
b) 2 µl komplexu, 5 µl dsDNA, 2 µl Tris-Cl pH 8, 11 µl H<sub>2</sub>O
- 4) Obě zkumavky nechte inkubovat 30 min při 37 °C, sledujte čas
- 5) Připravte si analogickým způsobem dvě zkumavky s nemodifikovanou DNA (ss a ds) o koncentraci 30 µg/ml
- 6) Připravte si základní elektrolyt – 200 mM acetát sodný pH 5
- 7) Na uhlíkové elektrodě změřte signál ssDNA a dsDNA
- 8) Na uhlíkové elektrodě změřte signál DNA modifikované osmiem

Elektrochemické měření: Do měřicí nádoby napipetujeme 2 ml základního elektrolytu (0,2 M acetátový pufr, pH 5) provedeme záznam SWV s počátečním potenciálem -1, konečným potenciálem +1,5 V, frekvence 200 Hz amplituda 50 mV. Poté obnovíme povrch pracovní elektrody lepící páskou, nanese vzorek (7 µl) a 60 s akumulujeme. Pak elektrodu opláchneme v destilované vodě, ethanolu a isopropylalkoholu (60 s). Po omytí provedeme měření. Po naměření provedeme elektrochemickou úpravu povrchu elektrody (30 s 1,8 V) a opět obnovíme povrch lepící páskou.

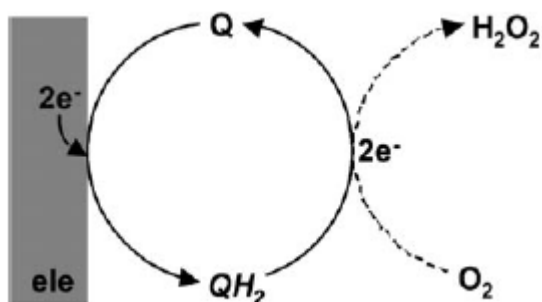
## Sledování interakce doxorubicinu s DNA

### Princip:

Interkalace bývá nazývána nekovalentním poškozením struktury DNA. Molekuly vmezeřující se mezi páry bází odvíjejí pravotočivou dvoušroubovicí a prodlužují obrysovou délku DNA. Takto změněný tvar často nemůže být rozpoznán proteiny, které mají s DNA reagovat, např. transkripčními faktory. Interkalátory navíc mohou způsobovat mutace posouvající čtecí rámec genetického kódu. Na tomto faktu je postaveno působení některých cytostatik, např. doxorubicinu, stejně tak působení některých karcinogenů, např. ethidium bromidu. Interakci elektroaktivní látky s DNA můžeme sledovat jako úbytek jejího signálu v přítomnosti DNA. Při interkalaci budou elektroaktivní centra látky vmezeřena v dvoušroubovicí a bude tak zamezeno jejich kontaktu s elektrodou. Doxorubicin je interkalující cytostatikum, které poskytuje dobře rozlišený elektrochemický signál. Signál je získán z chinon/hydrochinon redoxního páru (viz obr.).



Tento signál může být ještě lépe sledován pomocí tzv. katalytického píku kyslíku ( $O_{cat}$ ). Tento signál vzniká při měření za přítomnosti vzdušného kyslíku, který je redukován na peroxid vodíku (viz obr.).



### Materiál:

- CT-DNA (120  $\mu\text{g/ml}$ )
- Doxorubicin monohydrát, roztok (1mM)
- Acetátový pufr pH 5
- Termostat (TermomixerPlus, Eppendorf, Německo)
- Autolab analyzátor (EcoChemie) s VA663 stojanem (MetrOhm)

## Pracovní postup

- 1) Připravíme si 3ml základního elektrolytu (0.2M acetát pH5)
- 2) Změříme signál základního elektrolytu (SWV, frequency 20Hz, step potential 5mV, amplitude 20mV, initial potential 0.9V, end potential -0.6V)
- 3) Obnovíme povrch elektrody (30s potenciál 1.8V a stržení povrchu pomocí lepící pásky)
- 4) Do elektrolytu přidáme roztok Doxorubicinu tak, aby výsledná koncentrace byla 3 $\mu$ M.
- 5) Změříme signál
- 6) Obnovíme povrch elektrody
- 7) Připravíme si čistý základní elektrolyt, do kterého přidáme CT-DNA tak, aby výsledná koncentrace byla 30 $\mu$ g/ml
- 8) Postupně přidáváme doxorubicin tak, aby výsledná koncentrace byla 0.5; 1; 2; 3; 5; 10  $\mu$ M. S každou koncentrací provedeme měření signálu, mezi každým měřením provede obnovu povrchu elektrody.
- 9) Sestrojíme křivku závislosti výšky píku doxorubicinu na jeho koncentraci. Porovnáme výšku píku při koncentraci 3 $\mu$ M v přítomnosti a v nepřítomnosti CT-DNA.

## Detekce poškození DNA - detekce jednořetězcových zlomů v plasmidové DNA, detekce modifikace bází

DNA, jako nositelka genetické informace, je v buňce vystavena častým interakcím s látkami, které ji mohou negativně ovlivnit. Tyto látky, které mohou pocházet z buněčného metabolismu nebo z vnějšího prostředí, můžeme zjednodušeně rozdělit do dvou základních skupin:

- 1) Látky štěpící cukr-fosfátovou kostru
- 2) Látky modifikující báze

Do první skupiny látek, řadíme především radikály a také oxidační činidla. Reakce těchto látek s DNA vede většinou k jedno nebo dvou-řetězcovým zlomům.

Radikály jsou „vedlejším produktem“ metabolismu a jsou v buňce velmi časté. Jsou to velmi reaktivní sloučeniny a s DNA v buňce reagují poměrně často. Proto je v poslední době často zmiňována důležitost antioxidantů, které s radikály a jim podobnými látkami v buňce reagují a chrání tak nejen DNA před často ireverzibilním poškozením.

Zlomy v DNA jsou snadno detekovatelné pomocí gelové elektroforézy. Přerušení řetězce DNA vede ke změně její elektroforetické mobility. Plasmidová DNA je totiž ve své nativní formě v tzv. superhelikální – nadšroubovicové konformaci (scDNA). Tato forma se vyznačuje velkou kompaktností (molekula DNA zaujímá při stejné hmotnosti menší objem oproti tzv. otevřené kružnicové ocDNA), proto migruje agarozovým gelem rychleji. Při přerušení jednoho z řetězců dvoušroubovice dojde k přechodu z kompaktní scDNA do rozměrnější ocDNA.

Změnu si můžeme představit jako rozmotání klubka s bavlnkou a snahu protáhnout kompaktní klubko, nebo nekompaktní shluk stejně velkým otvorem malých rozměrů.

Do látek poškozujících (modifikujících) báze spadá poměrně velká a různorodá skupina chemikálií. Nejčastější modifikace vyvolávají látky s oxidačním, případně alkylačním mechanismem působení. Zvláště v případě methylování mohou být fyziologické důsledky velmi vážné, protože nativní methylace DNA hraje významnou úlohu v epigenetických regulačních procesech.

Buňky mají pro opravu poškozené DNA vyvinut poměrně rozsáhlý aparát enzymů. Proces opravy probíhá zpravidla podle schématu rozpoznání modifikace → vystřížení modifikované báze (nukleotidu) → doplnění chybějící báze (nukleotidu) podle komplementárního řetězce → ligace přerušeno řetězce (pokud k přerušení došlo).

Chceme-li využít reparačních enzymů pro detekci poškození DNA, vynecháváme poslední dva kroky. Vystřížení modifikované nukleotidu vede zpravidla k přerušení cukrfosfátové páteře DNA a tedy k přechodu do ocDNA.

Pro vytvoření volných radikálů v laboratorních podmínkách nejčastěji využíváme tzv. Fentonovy reakce:



Ve cvičení bude ke štěpení DNA použit roztok manganistanu draselného, jako druhé štěpící agens použijeme hydroxylové radikály, generované měďnatými ionty (analogie klasické Fentonovy reakce).

Pro detekci modifikace bází DNA využijeme dimethylsulfát (methylace guaninu) a reparační enzym Endonukleáza III.

## Materiál:

- Roztok měďnatých iontů (50mM)
- Zásobní roztok  $\text{KMnO}_4$  (0,1M)
- Fosfátový pufr pH 7,4 (0,2M)
- Plasmidová DNA (pBlueskript (SK<sup>-</sup>))
- TAE (50x)
- Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- Dimethyl sulfát 1% (DMS)
- Endonukleáza III + pufr
- 3M octan sodný
- 96%, 70% ethanol
- Agaróza
- Nanášecí pufr
- Minicentrifuga
- Termostat
- Aparatura pro gelovou elektroforézu
- Chemické sklo
- Mikrozkušavky
- Automatické pipety, špičky
- Destilovaná voda

## Pracovní postup:

### A) Vliv oxidačních činidel

- 1) Připravíme si koncentrační řadu roztoku manganistanu draselného v koncentracích: 100mM, 50mM a 10mM.
- 2) Do mikrozkušavek 1-4 napipetujeme dle tabulky
- 3) Krátce zcentrifugujeme (5 s, pomocí tlačítka „shortspin“)
- 4) Vše necháme inkubovat na 37°C po dobu 30 min.
- 5) Do všech mikrozkušavek napipetujeme 5  $\mu\text{l}$  nanášecího pufru.
- 6) Celý objem reakční směsi naneseme na připravený agarozový gel.

Tab. 1 – Rozpis pipetování pro  $\text{KMnO}_4$

	Zkušavka 1	Zkušavka 2	Zkušavka 3	Zkušavka 4 (kontrola)
DNA (200ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
Fosfátový pufr (200 mM)	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
$\text{KMnO}_4$	2 $\mu\text{l}$ (100 mM)	2 $\mu\text{l}$ (50 mM)	2 $\mu\text{l}$ (10 mM)	-
$\text{H}_2\text{O}$	12 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	14 $\mu\text{l}$

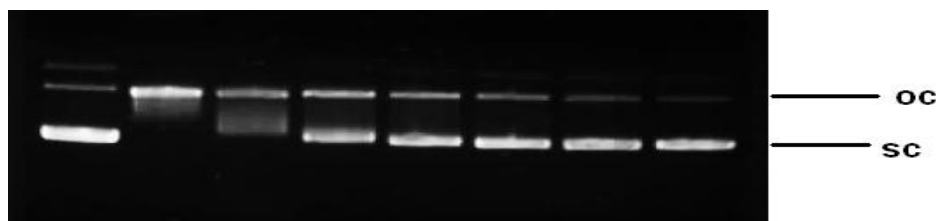
## B) Vliv volných radikálů

- 1) Připravený roztok měďnatých iontů zředíme na 10 mM.
- 2) Roztok peroxidu zředíme na 0.3%
- 3) V mikrozkušavce smícháme:

	Zkušavka 5	Zkušavka 6	Zkušavka 7
DNA (200ng/μl)	1 μl	1 μl	1 μl
Cu <sup>2+</sup>	2 μl	2 μl	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 μl	-	2 μl
H <sub>2</sub> O	15 μl	17μl	17μl

- 4) Krátce zcentrifugujeme (5 s, pomocí tlačítka „shortspin“)
- 5) Inkubujeme po dobu 30 minut při 37°C.
- 6) Do všech mikrozkušavek napipetujeme 5μl nanášecího pufru
- 7) Naneseme na připravený agarozový gel.
- 8) Do osmého startu naneseme 3 μl standardu (generuler)

1 2 3 4 5 6 7 8



**Obr.1:** Poškození plasmidové DNA působením manganistanu draselného. (1) Kontrola DNA, (2) DNA + 12 mM KMnO<sub>4</sub>, (3) DNA + 6 mM KMnO<sub>4</sub>, (4) DNA + 3 mM KMnO<sub>4</sub>, (5) DNA + 2 mM KMnO<sub>4</sub>, (6) DNA + 1 mM KMnO<sub>4</sub>, (7) DNA + 0,1 mM KMnO<sub>4</sub>, (8) DNA + 0,01 mM KMnO<sub>4</sub>.

## C) Detekce modifikace bází

- 1) V mikrozkušavce smícháme
  - 5μl DNA
  - 2μl fosfátového pufru
  - 2μl 1% DMS
  - 11μl H<sub>2</sub>O
- 2) Pro negativní kontrolu připravíme stejnou směs, roztok DMS nahradíme dest. vodou
- 3) Směs necháme inkubovat 30min při 37°C
- 4) Do obou zkumavek přidáme 5μl 3M octanu sodného a 80 μl 96% ethanolu
- 5) Zkušavky necháme inkubovat 20min na -80°C
- 6) Centrifugujeme 30min při 14500 x g
- 7) Odpipetujeme obsah zkumavky a necháme minutu schnout dnem vzhůru na filtračním papíru (ubrousku)
- 8) Přidáme 80 μl 70% ethanolu a centrifugujeme 15min při 14500 x g
- 9) Odpipetujeme obsah zkumavky, necháme minutu schnout dnem vzhůru a vložíme na 5min do exikátoru

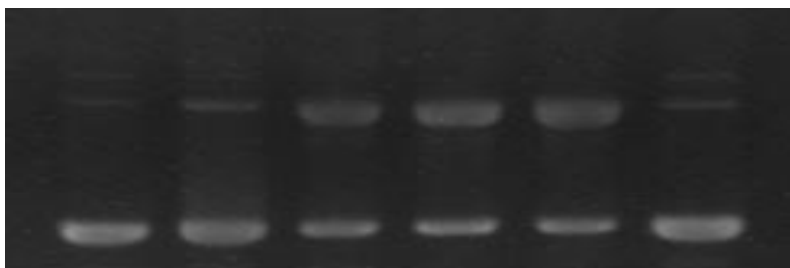


10) Do obou zkumavek přidáme 30  $\mu$ l dest. vody, chvíli protřepeme na vortexu

Body 4-10 slouží k tzv. srážení DNA, pomocí tohoto postupu se DNA v organickém prostředí usadí jako sraženina na dně zkumavky a zbytek reakční směsi je odstraněn. V tomto případě provádíme srážení, abychom si byli jisti, že z reakční směsi odstraníme nezreagovaný DMS, který by mohl inhibovat činnost reparačních enzymů, které použijeme v dalším kroku.

- 11) Z obou zkumavek odebereme 15  $\mu$ l směsi a přeneseme do dvou čistých eppendorfek
- 12) K oběma novým zkumavkám přidáme 2  $\mu$ l pufru pro Endo III a 3  $\mu$ l roztoku enzymu (naředěného na koncentraci 1u/ $\mu$ l)
- 13) Směs necháme inkubovat 30min při 37°C
- 14) Připravíme si 1% agarozový gel
- 15) Ke směsím přidáme vždy 1/6 objemu nanášecího pufru
- 16) Nanese tak, aby dvojice vzorků (s enzymem a bez enzymu) byly na gelu vedle sebe.

1            2            3            4            5            6



**Obr.2:** Detekce modifikace bazí za využití Endo III – dráhy 1) Kontrolní DNA 2) DNA + 0.1%DMS 3) DNA + 0.1%DMS + 1u EndoIII 4) DNA + 0.1%DMS+3u EndoIII 5) DNA + 0.1%DMS + 5u Endo III 6) DNA + 5u Endo III

## ***Mutagenese řízená oligonukleotidem***

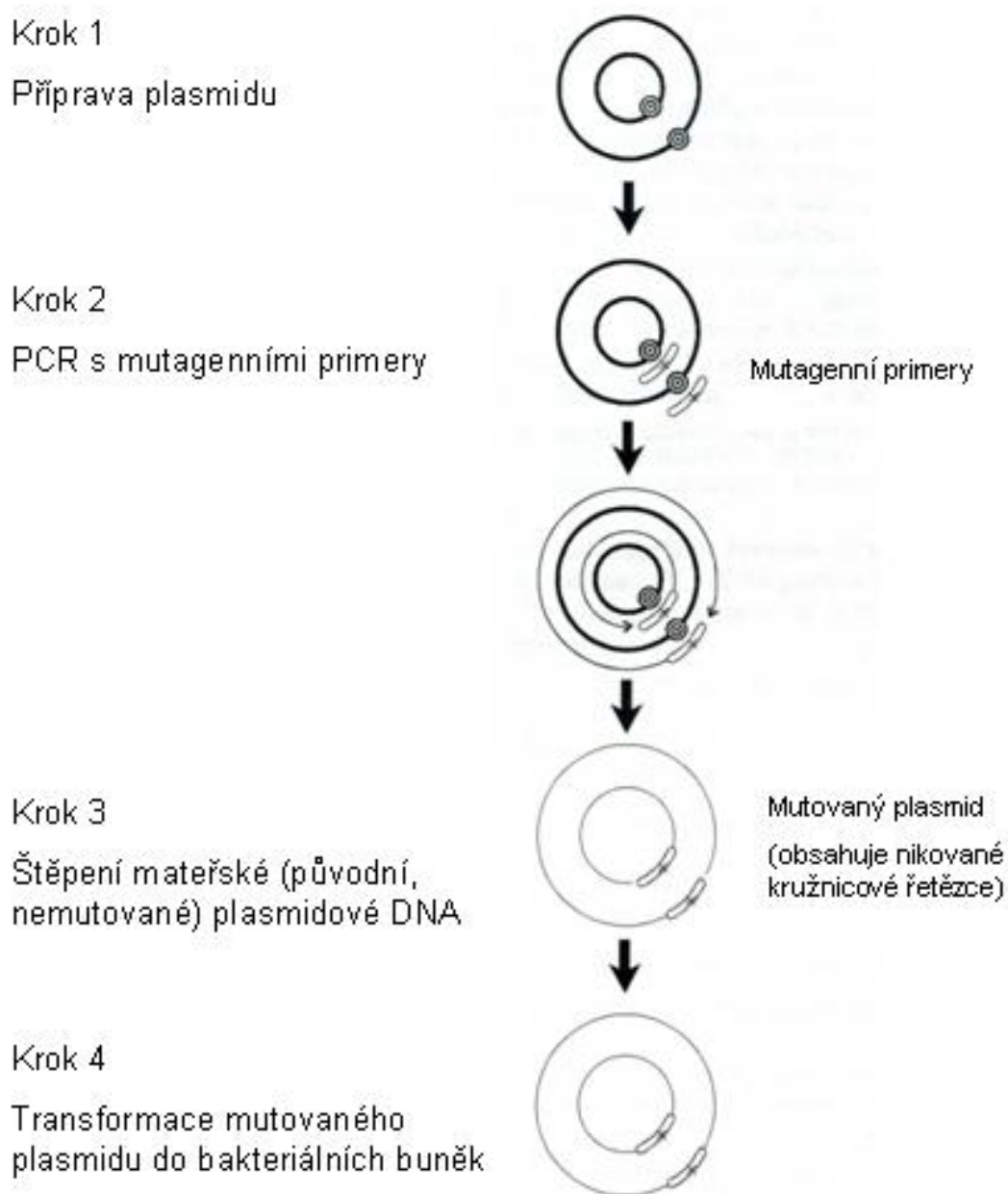
### **Princip:**

Metody místně řízené mutagenese nám dovolují zavést *in vitro* mutaci přímo do zvoleného místa. S rozvinutím těchto metod již nejsme odkázáni na náhodnou tvorbu mutantů a jejich zdoluhavé testování, zda se mutace nachází ve zvoleném místě.

Místně řízenou mutagenesi lze provádět několika způsoby. Můžeme např. z DNA restrikčních endonukleáz vyštěpit určitý úsek a ten nahradit uměle připraveným úsekem s mutací v požadovaném místě. Další možností je využít skutečnosti, že při nižší teplotě spolu hybridizují i nukleové kyseliny, které v malém procentu nukleotidů nejsou spolu komplementární. Při tomto způsobu použijeme dostatečně dlouhý oligonukleotid, který obsahuje požadovanou mutaci a ten necháme hybridizovat s jednořetězcovou DNA obsahující cílové místo pro oligonukleotid. Oligonukleotid slouží jako promer pro dosyntetizování druhého řetězce vektoru. Tím máme mutaci zavedenou do jednoho vlákna, které je třeba izolovat a použít pro syntézu vlákna komplementárního. Tento způsob se často používá v případě, že vektorová DNA je odvozena od fága M13, jehož DNA se v závislosti na životním cyklu fága nachází v jednořetězcové nebo dvouřetězcové formě.

Druhý způsob mutagenese lze v některých případech značně zjednodušit a zavést mutaci do obou vláken současně. Postup je následující: K plasmidové DNA přidáme dvojici komplementárních oligonukleotidů, které obsahují mutaci v požadovaném místě a s těmito oligonukleotidy, které slouží jako primery, provedeme PCR, při které je hybridizační teplota snížena tak, aby se oligonukleotidy vázaly na patřičná místa plasmidu. K syntéze dostatečného množství DNA s mutací zcela postačuje 12-15 cyklů. Po skončení PCR máme ve směsi (1) DNA obsahující oba původní řetězce, (2) hybridní DNA s jedním řetězcem původním a druhým řetězcem syntetizovaným ve zkumavce a obsahujícím mutaci a konečně (3) molekuly DNA, jejichž oba řetězce obsahují požadovanou mutaci. Nyní potřebujeme rozlišit a oddělit molekuly (1) a (2) od molekul (3). To provedeme zcela jednoduše přidáním restrikční endonukleázy *DpnI*. Restrikční endonukleáza *DpnI* štěpí uvnitř čtyřnukleotidové sekvence 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'. Je specifická pro metylovanou a hemimetylovanou DNA. Protože DNA syntetizovaná pomocí PCR neobsahuje žádné metylované adeniny, degraduje *DpnI* specificky pouze ty molekuly, které obsahují aspoň jedno vlákno původní, tj. bez mutace. Molekuly DNA s oběma mutovanými řetězci štěpeny nebudou. Tím je zajištěno, že pro transformaci buněk budou použity a v buňkách se budou ampolifikovat pouze plasmidové molekuly obsahující mutaci.

Princip metody je znázorněn na obr. 1.



**Obr. 1:** Postup při mutagenězi řízené oligonukleotidem

### Pracovní postup:

Místně řízenou mutagenezi provedeme v restričním místě pro *EcoRI*.

PŮVODNÍ SEKVENCE:

5'-GCT TGA TAT CGA **ATT** CCT GCA GCC CGG GGG-3'

3'-CGA ACT ATA GCT **TAA** GGA CGT CGG GCC CCC-5'

MUTOVANÁ SEKVENCE:

5'-GCT TGA TAT CGA **AGT** CCT GCA GCC CGG GGG-3'

3'-CGA ACT ATA GCT **TCA** GGA CGT CGG GCC CCC-5'

1. Pro PCR připravíme podle tabulky sadu zkumavek, které se budou lišit množstvím templátové DNA:

Vzorek č.: Pozn.	1	2	3	4
Plasmid (10 µg/ml)	0,5	1	2	5
Mutagenní primer SDM (10 µM)	1,5	1,5	1,5	1,5
Mutagenní primer SDM-com (10 µM)	1,5	1,5	1,5	1,5
Směs dNTP (10 mM)	3	3	3	3
10 x reakční pufr	5	5	5	5
dest. voda	38,5	38	37	34

2. Do všech zkumavek přidáme 1 µl Pfu DNA polymerázy (2-3 U/ µl).
3. Na PCR termocyklu nastavíme následující parametry pro amplifikaci:  
Krok 1 – denaturace: 95°C 30 sec 1 cyklus  
Krok 2 – amplifikace: 95°C 30 sec  
55°C 1 minuta  
68°C 3 minuty (1 minuta/kb délky plasmidu)  
12 cyklů
4. Po skončení amplifikace umístíme zkumavky na dvě minuty do ledové lázně, abychom reakční směs ochladili na ≤37°C.
5. Přidáme 1 µl restriční endonukleázy *DpnI* (10 U/µl) přímo do každé zkumavky s amplifikovaným plasmidem. Jemně, ale pečlivě promícháme špičkou reakční směs (nevortexujeme).
6. Stočíme reakční směs v mikrocentrifuze 1 minutu a vložíme zkumavky do termostatu na 37°C na 1 hodinu. *DpnI* rozštěpí původní (nemutovanou) DNA, ale ne amplifikovanou DNA. Důvodem je, že původní DNA, izolovaná z bakterií, je v cílových místech pro *DpnI* (Gm<sup>6</sup>ATC) metylována (postreplikační modifikace), což je nezbytné pro rozpoznání a štěpení dané sekvence. DNA syntetizovaná polymerázovou řetězovou reakcí metylace postrádá.
7. Opatrně rozmrazíme kompetentní buňky v ledu. Pro každou kontrolu nebo vzorek pro transformaci použijeme alikvot 40 µl ve vychlazené 1,5 ml zkumavce.

8. Přeneseme 1  $\mu$ l DNA z každého vzorku do oddělených alikvotů kompetentních buněk. Jemně transformační reakce promícháme a inkubujeme v ledu 30 minut.
9. Zkumavky vložíme na 45-60 sekund do lázně vyhřáté na 42°C a potom je umístíme na 2 minuty do ledu.
10. Přidáme 250  $\mu$ l LB (SOC) média vytemperovaného na 42°C a za mírného třepání (225-250 rpm) inkubujeme při 37°C po dobu 1 hodiny.
11. Na agarovou plotnu s ampicilinem nanese 250  $\mu$ l transformovaných buněk a inkubujeme při 37°C po dobu  $\geq$  16 hodin.

### **Izolace a ověření účinnosti mutagenese:**

Ověřit účinnost mutagenese můžeme několika způsoby. Nejpřesnější způsob je sekvenace DNA v místě předpokládané mutace. To je však náročné buď na vybavení nebo čas, případně obojí. Abychom šetřili materiál a finance, nejdříve provedeme selekci vzorků a z nich osekvenujeme (příp. necháme sekvenovat) pouze ty, u nichž předběžné testy poskytly pozitivní výsledek.

Pokud mutagenese proběhla v místě rozpoznávaném a štěpeném restriční endonukleázou, lze mutaci detekovat štěpením izolované DNA příslušnou restriktázou. Změna v cílovém místě se projeví změnou štěpení danou restriktázou. Obdobně můžeme restriktázu použít i v případě, že mutací vzniklo nové restriční místo.

Další možností je provést PCR kolonií se specifickými primery.

## *Izolace plasmidové DNA pomocí centrifugačních kolonek*

### **Princip:**

Pro izolaci plasmidové DNA je možné použít nejen kolonky, u kterých je k přečištění a uvolnění zachycené plasmidové DNA využíváno přirozené gravitační pole. Na trhu jsou k dispozici izolační kity, které využívají odstředivou sílu vznikající při centrifugaci. Princip izolace je obdobný jako v případě gravitačních kolonek. Použití vyššího přetížení nám však umožňuje zkrátit čas potřebný pro izolaci na 20-30min. Na druhé straně centrifugační kolonky mají nižší kapacitu, izolací proto získáme menší množství DNA.








### **Pracovní postup:**

1. Z agarové plotny přeneseme pomocí sterilní špičky (mikrobiologické kličky, párátko) dobře narostlou kolonii do 3 ml LB média s ampicilinem. Inkubujeme ~ 3 hodiny při 37°C za mírného třepání.
2. V centrifuze stočíme 1-5 ml bakteriální kultury kultivované v LB médiu. Centrifugami provádíme 30 sekund při 11 000 x g. Odstraníme supernatant, pokud možno kompletně.
3. Přidáme 250 µl pufru A1. Resuspendujeme buněčný pelet na vortexu. Pro účinnou izolaci je nutné, aby v suspenzi nezůstaly viditelné shluky buněk.  
Přidáme 250 µl pufru A2. Promícháme převrácením zkumavky dnem vzhůru a zpět 6-8x. Nevortexujeme! Inkubujeme při pokojové teplotě 5 min.  
Přidáme 300 µl pufru A3. Opět jemně zamícháme převrácením zkumavky (6-8x). Nevortexujeme!
4. Centrifugujeme 5 – 10 min při 11 000 x g při pokojové teplotě.
5. Vložíme NucleoSpin®Plasmid kolonu do 2 ml sběrné zkumavky a nanese supernatant z bodu 3 na kolonu. Centrifugujeme 1 min při 11 000 x g. Odstraníme proteklý roztok.
6. Vložíme NucleoSpin®Plasmid kolonu zpět do sběrné zkumavky a přidáme 600 µl pufru A4. Centrifugujeme 1 min při 11 000 x g. Rostok prošlý kolonou odstraníme.
7. Abychom dostatečně vysušili membránu, na které je plasmidová DNA navázána, vložíme NucleoSpin®Plasmid kolonu zpět do prázdné sběrné zkumavky a centrifugujeme další 2 min při 11 000 x g. Tento krok zabezpečí odstranění zbytků etanolu, který je součástí promývacího pufru A4. Etanol může inhibovat enzymatické reakce, ke kterým může být izolovaná DNA použita.
8. Vložíme NucleoSpin®Plasmid kolonu do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a přidáme 50 µl pufru AE. Inkubujeme 1 min při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min při 11 000 x g.  
Opakováním tohoto kroku můžeme dosáhnout zvýšení výtěžku o 15-20%. Eluce může být prováděna destilovanou vodou nebo TE pufrem.

# Plasmid DNA Purification

Mini

NucleoSpin®  
Plasmid

<p>1 Cultivate and harvest bacterial cells</p>		<p>30 s 11,000 x g</p>
<p>2 Cell lysis</p>		<p>Buffer A1 250 µl Buffer A2 250 µl Buffer A3 300 µl</p>
<p>3 Clarification of lysate</p>		<p>5 - 10 min 11,000 x g</p>
<p>4 Bind DNA</p>		<p>load supernatant  1 min 11,000 x g</p>
<p>5 Wash silica membrane</p>		<p>(optional: Buffer AW 500 µl) Buffer A4 600 µl  1 min 11,000 x g</p>
<p>6 Dry silica membrane</p>		<p>2 min 11,000 x g</p>
<p>7 Elute highly pure DNA</p>		<p>50 µl buffer AE  RT 1 min  1 min 11,000 x g</p>

## Ověření mutageneze:

Plasmid budeme štěpit restriční endonukleázou EcoRI. Jako kontrolu vezmeme původní plasmid, který jsme použili pro mutagenezi. Výsledky restričního štěpení nanese na 1% agarosový gel. Původní DNA by měla být převedena z sc formy na lineární formu, mutovaný plasmid by restriční endonukleázou neměl být štěpen (mutace proběhla v cílovém místě pro EcoRI).

- 1) Do mikroskopavky napipetujeme 3  $\mu$ l naizolovaného plasmidu (cca 0,5  $\mu$ g), přidáme 2  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru pro EcoRI, destilovanou vodu a EcoRI (cca 1-2 U). Výsledný objem činí 20  $\mu$ l. Jako kontrolní vzorek použijeme plasmidovou DNA s původní nemutovanou sekvencí.
- 2) Vzorky vložíme do termostatu na 37°C a necháme 60 minut inkubovat.
- 3) Mezitím si připravíme 1% agarosový gel v 1x TAE. Po vychladnutí gel zalijeme elektroforetickým pufrem (1x TAE).
- 4) Vzorky vyjmeme z termostatu, přidáme k nim 4  $\mu$ l 6x koncentrovaného nanášecího pufru. Na gel nanese po 10  $\mu$ l.
- 5) Elektroforézu provádíme 60 minut při 120 V.
- 6) Po skončení elektroforézy gel obarvíme v roztoku ethidiumbromidu (rukavice!), promyjeme v destilované vodě a zdokumentujeme na dokumentačním systému.
- 7) Porovnáme výsledky štěpení mutovaných vzorků se vzorkem kontrolním.



## **Téma: Práce s bakteriofágy**

### **Úkol: Stanovení titru fága (PFU/ml) a ověření titru bakteriální kultury (CFU/ml)**

Bakteriofágy jsou viry infikující bakteriální buňky. Každý bakteriofág má širší nebo užší rozmezí hostitele. Infekce bakteriální buňky fágovým virionem sestává ze dvou dějů: z adsorpce virionu na povrch buňky a ze vstupu (penetrace) jeho genomu do cytoplazmy. Jestliže po infekci následuje replikace fágového genomu, syntéza bílkovin fágového kapsidu a sestavování nových virionů s následnou lýzí buňky, hovoříme o lytické infekci. Během lytické infekce dochází k uvolňování fágového potomstva v procesu lyze buňky a získáváme tzv. fágový lyzát. Počet nově vytvořených virionů či počet virionů ve fágovém lyzátu lze stanovit odvozením od počtu vytvořených plak na indikátorovém kmeni (PFU/ml). Proces uvolňování fágového potomstva z infikovaných hostitelských buněk můžeme sledovat v závislosti na době inkubace adsorpční směsi fág-hostitelská buňka metodou dvouvrstevného agaru nebo sledování procesu lyze hostitelských buněk a vzniku fágového lyzátu.

#### **Materiál a pomůcky:**

A. Bakteriální kultura PS53, lyzát fága  $\phi$ 53

B. Média a chemikálie:

- tryptonový bujón (TB)
- 2% tryptonový agar (2% TA)
- 0,7% tryptonový agar (0,7% TA)
- fyziologický roztok
- 0,22%  $\text{CaCl}_2$

C. Laboratorní vybavení:

Petriho misky, zkumavky, vršky na zkumavky, erlenmeyerovy baňky, odměrný válec (25 ml), pipety, mikropipety, špičky, očkovací klička, termostat, vodní lázeň, spektrofotometr, třepačka, vortex, kahan

#### **Postup:**

1. 1 očkovací kličku bakteriální kultury na šikmém agaru (2% TA) zaočkujte do 10 ml TB.
2. Inokulum kultivujte staticky 24 hod. při 37 °C.
3. Po 24 hod. kultivaci naočkujte 0,5 ml bakteriální kultury do 25 ml TB (v erlenmeyerově baňce) a kultivujte 4 hodiny při 37 °C za intenzivního provzdušňování.
4. Bakteriální kulturu nařed'te TB spektrofotometricky tak, aby hustota bakteriální suspenze odpovídala  $A_{620} = 78\%$ . Dále pokračujte úkolem A nebo B.

#### **Úkol A: Stanovení titru bakteriální kultury (CFU/ml)**

1. Připravenou bakteriální suspenzi ( $A_{620} = 78\%$ ) řed'te, vždy 100x, fyziologickým roztokem - až na ředění  $10^{-6}$  (20  $\mu\text{l}$  kultury a 1,98 ml fyziologického roztoku).
2. Do dvou zkumavek, umístěných ve vodní lázni (43 °C), napipetujte 1,8 ml 0,7% TA.
3. Do každé připravené zkumavky s 0,7% TA napipetujte z posledního ředění bakteriální kultury (tj.  $10^{-6}$ ) 200  $\mu\text{l}$ .
4. Obsah zkumavek promíchejte na vortexu a vylíj'te na Petriho misky s 2% TA.
5. Misky inkubujte v termostatu při 37 °C 24 hod. a následně stanovte počet bakteriálních buněk (CFU/ml).

#### **Úkol B: Stanovení titru fága (PFU/ml)**

1. Ředění fága – připravte ředění až  $10^{-10}$  (zkumavky  $10^{-1} - 10^{-7}$ : 10  $\mu\text{l}$  fága + 90  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku, **zkumavky  $10^{-8} - 10^{-10}$ : 30  $\mu\text{l}$  fága + 270  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku**).

2. Z připravené bakteriální suspenze ( $A_{620} = 78\%$ ) odpipetujte 9 ml do sterilní erlenmeyerovy baňky a přidejte 1 ml 0,22%  $\text{CaCl}_2$ .
3. Do 6 zkumavek, umístěných ve vodní lázni (43 °C), napipetujte 2 ml 0,7% TA.
4. Z erlenmeyerovy baňky (**bod 2**) napipetujte 200  $\mu\text{l}$  kmene do každé zkumavky s 0,7% TA.
5. Ze zkumavek s ředěním fága  $10^{-8}$  -  $10^{-10}$  (**bod 1**) aplikujte na misky s 2% TA 100  $\mu\text{l}$  suspenze (z každého ředění na dvě misky).
6. Vzorek na miskách převrstvěte 0,7% TA, zaočkovaným bakteriální kulturou s adsorpčním kofaktorem  $\text{Ca}^{2+}$  (připravené zkumavky ve vodní lázni). Kývavým pohybem vytvořte tenkou vrstvu 0,7% agaru a nechte utuhnout.
7. Po utužení 0,7% TA inkubujte misky dnem vzhůru v termostatu při 30 °C 24 hod. Po 24 hod. kultivaci odečtěte vytvořené plaky a vypočtěte titr fágových částic (PFU/ml).

**Použitá literatura:**

- Horáková, D., Němec, M. (2003): Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií. Katedra mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně.

## *PCR kolonií*

### **Princip:**

Polymerázová řetězová reakce je metoda, která umožňuje namnožit požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech.

Princip metody je založen na replikaci nukleových kyselin.

Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA prostřednictvím **termostabilní** DNA-polymerázy.

Požadovaný úsek DNA je vymezen dvěma oligodeoxyribonukleotidy (primery) o délce cca 18-25 nt. Tyto primery jsou navrženy tak, aby se po denuraci dsDNA vázaly na protilehlé řetězce a vytvořily startovací místa pro syntézu DNA.

Po přidání DNA-polymerázy a dNTP probíhá syntéza nových vláken na obou templátových řetězcích protisměrně.

K syntéze DNA se používají termostabilní DNA-polymerázy izolované z termostabilních mikroorganismů. Tyto enzymy zůstávají v nativním stavu i za teplot, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby se syntéza DNA cyklicky opakovala.

Průběh PCR lze rozdělit na tři cyklicky se opakující děje s odlišnými nároky na teplotu:

- a) Denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94°C)
- b) Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65°C)
- c) Syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65-75°C)

Polymerázová řetězová reakce probíhá v zařízení nazývaném termocykler. V něm se automaticky podle předem zvoleného programu mění teplota v daných časových intervalech.

Postupným opakováním jednotlivých cyklů dochází k amplifikaci zvoleného úseku DNA.

Počet molekul roste vzhledem k počtu cyklů exponenciálně ( $2^n$ ; n = počet cyklů), výsledkem může být až miliarda kopií vybraného úseku DNA.

Použití polymerázové řetězové reakce není omezeno na izolovanou DNA, byly vyvinuty techniky, které umožňují amplifikovat zvolený úsek bez předchozí separace nukleových kyselin. Toho se využívá například při tvorbě rekombinantních plasmidů při detekci jednotlivých klonů. Další využití této techniky spočívá v přímé identifikaci bakteriálních kmenů pomocí specifických primerů.

Při PCR kolonií z agarové plotny sterilní špičkou odebereme dobře narostlou a oddělenou kolonie, rozsuspendujeme ji v destilované vodě a přeneseme do sterilní PCR zkumavky do směsi pro PCR včetně termostabilní DNA-polymerázy. První denaturační krok při PCR vyvolá lýzi bakterií a uvolněná DNA může být amplifikována. Výtěžek je nižší než při použití izolované DNA, ale dostatečný pro detekci jednotlivých klonů.

### **Materiál a chemikálie:**

- Plasmidová DNA (pBS, pPGM1)
- 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Taq DNA polymeráza + pufr
- Primery
- Termocykler
- Pipety, špičky
- Ledová lázeň
- Termostat
- Rukavice
- Agarosový gel, pufr
- Elektroforetická aparatura
- Zdroj napětí

- Dokumentační systém

### Pracovní postup:

- 1 Z agarové plotny setřeme sterilní špičkou dobře narostlou kolonii a suspendujeme v 10  $\mu$ l destilované vody. Ze suspenze odebereme 1  $\mu$ l, který přidáme ke směsi PCR. Složení směsi a množství jednotlivých komponent uvádí tabulka.
  - 2 Zkumavky vložíme do termocyklu.
  - 3 Termocykler naprogramujeme na následující hodnoty:
    - a. Krok 1:

i. denaturace	94°C	120 sec
ii. počet cyklů		1
    - b. Krok 2:

i. Denaturace DNA	94°C	30 sec
ii. Hybridizační primerů s templářovou DNA	65°C	30 sec
iii. Syntéza nových řetězců	72°C	60 sec
iv. Počet cyklů		30
- Spustíme start.
- 4 Po skončení amplifikace zkontrolujeme výtěžek namnoženého úseku pomocí gelové elektroforézy. Na agarosový gel nanese po 5  $\mu$ l reakční směsi vzorků. Délku získaných fragmentů určíme porovnáním polohy signálů s polohou fragmentů markerové DNA o známé velikosti. Výtěžek odhadneme z intenzity fluorescence srovnáním s fluorescencí známého množství DNA.
  - 5 Z délky získaných fragmentů

### Pozn.:

1) V případě odlišných koncentrací výchozích komponent je třeba příslušné objemy přepočítat. Pokud produkty PCR použijeme pouze jako kontrolní vzorky pro gelovou elektroforézu a naším cílem není dosáhnout vysokého výtěžku, můžeme snížit objemy všech látek 5-10 x, tj. PCR provádíme v 10-20  $\mu$ l. Snížení spotřeby primerů, templátové DNA i enzymu vede k finančním úsporám. Abychom mohli pracovat v tak malých objemech, je nezbytné mít modernější přístroj s vyhříváním víkem. U cyklu první generace, u kterých vyhřívání víka není běžnou součástí, hrozí při příliš malých objemech vypaření vzorků a jejich kondenzace na víčku mikrozkušavky.

Nedoporučuje se provádět PCR v objemech větších než 100  $\mu$ l, protože u velkých objemů je potřeba delších inkubačních časů, aby bylo dosaženo stejné teploty ve všech částech vzorku. Protože i termostabilní DNA-polymeráza v průběhu opakovaných cyklů PCR postupně ztrácí svou aktivitu, při prodloužení inkubačních časů bychom museli do reakční směsi přidat více enzymu.

2) PCR je velmi citlivá metoda, pomocí které dokážeme mnohonásobně zmnožit vybraný úsek DNA, nacházející se ve vzorku ve velmi malém množství. Odvrácenou tváří obrovské citlivosti této metody je možnost vzniku falešně-positivních výsledků nebo nespecifických produktů v případě sebemenší kontaminace ať už přímo vzorku nebo prostřednictvím pipet, špiček, přidávaných roztoků apod. Z tohoto důvodu musíme při PCR dbát zvýšené opatrnosti, veškeré roztoky pipetujeme sterilními špičkami, pracovní plochu předem důkladně vyčistíme a při manipulaci se vzorky nikdy nepracujeme bez rukavic.

