



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE



Chromatografické metody pro identifikaci a izolaci DNA

Bakalářská práce

Marta Šiborová

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.

BRNO 2012

Bibliografický záznam

Autor:	Marta Šiborová Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Ústav biochemie
Název práce:	Chromatografické metody pro identifikaci a izolaci DNA
Studijní program:	Aplikovaná biochemie
Studijní obor:	Aplikovaná biochemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.
Akademický rok:	2011/2012
Počet stran:	38
Klíčová slova:	<i>A. ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> , separace DNA, HILIC, IEC, kapalinová chromatografie

Bibliographic Entry

Author: Marta Šiborová
Faculty of Science
Masaryk university
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Chromatographic method for the identification
and isolation of DNA

Degree Programme: Applied biochemistry

Field of Study: Applied biochemistry

Supervisor: doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.

Academic Year: 2011/2012

Number of Pages: 38

Keywords: *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*,
separation of DNA, HILIC, IEC,
liquid chromatography

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřená na možnosti použití kapalinové chromatografie pro separaci nukleových kyselin jako alternativu ke gelové elektroforéze. Byla vypracována rešerše týkající se možností elektroforetické a především chromatografické separace nukleových kyselin. V praktické části byla vyizolována DNA bakterií *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*, se kterou byla provedena RAPD PCR a gelová elektroforéza pro kontrolu reakce. Naamplifikované fragmenty byly následně rozseparovány pomocí kapalinové chromatografie.

Abstract

The thesis is focused on the possibility of using liquid chromatography for separation of nucleic acids as an alternative to gel electrophoresis. Research has been prepared for the possibility of electrophoretic and especially chromatographic separation of nucleic acids. There was purified DNA of bacteria *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*, in the practical part. DNA was used for RAPD PCR and gel electrophoresis to check response. Amplified fragments were subsequently separated using liquid chromatography.

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala doc. RNDr. Oldřichu Janiczkovi, Csc. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost, Mgr. Jiřímu Kučerovi a Bc. Marcele Bařinové za pomoc v laboratoři.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně, s využitím uvedené literatury.

V Brně dne 11.5. 2012

.....
Marta Šiborová



Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta
Ústav biochemie
Kotlářská 2, 611 37 Brno, CZ



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bakalářský studijní program: Aplikovaná biochemie

Studijní obor: Aplikovaná biochemie

Studentka: Marta ŠIBOROVÁ

Název tématu: Chromatografické metody pro identifikaci a izolaci DNA

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.

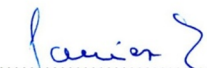
Odborný konzultant:

Datum zadání bakalářské práce: září 2011

Datum odevzdání bakalářské práce: 11.5.2012

Zpracovatel i vedoucí bakalářské práce berou na vědomí, že práce musí obsahovat i experimentální část.


.....
zpracovatel bakalářské práce


.....
vedoucí bakalářské práce


.....
ředitel Ústavu biochemie

V Brně, dne 11.1.2012

OBSAH

I.	UVOD.....	8
II.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	9
III.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.	Použité mikroorganismy.....	10
2.	RAPD PCR.....	11
3.	Elektroforéza.....	12
3.1.	Příklady použití elektroforetické separace nukleových kyselin.....	13
4.	Chromatografické metody.....	14
4.1.	Teorie.....	14
4.2.	IEC.....	17
4.3.	HILIC.....	18
4.4.	Příklady separace nukleových kyselin pomocí chromatografie.....	20
IV.	CÍL PRÁCE.....	21
V.	PRAKTICKÁ ČÁST.....	22
1.	Materiál.....	22
1.1.	Přístrojové vybavení.....	22
1.2.	Použité chemikálie.....	22
1.3.	Mikroorganismy.....	23
2.	Metody.....	23
2.1.	Izolace a purifikace DNA.....	23
2.2.	RAPD PCR.....	24
2.3.	Gelová elektroforéza.....	24
2.4.	Kapalinová chromatografie.....	25
3.	Výsledky a diskuze.....	26
3.1.	Izolace a purifikace DNA.....	26
3.2.	RAPD PCR.....	26
3.3.	Gelová elektroforéza.....	27
3.4.	Ionexová chromatografie v systému HPLC.....	29
3.5.	HILIC v systému HPLC.....	31
VI.	ZÁVĚR.....	34
VII.	POUŽITÁ LITERATURA.....	35

I. ÚVOD

Zavedenou metodou pro separaci nukleových kyselin je gelová elektroforéza. Ta ale využívá pro vizualizaci ethyidium bromid, který interkaluje mezi páry bazí ve struktuře DNA. Ethyidium bromid je dobře rozpustný ve vodě i v tucích. Díky tomu snadno proniká do organismů, kde působí jako silný mutagen.

Alternativou k této metodě je kapalinová chromatografie, kde se pro detekci používá převážně UV detektor, bez nutnosti použití činidel interagujících s DNA. Pro separaci nukleových kyselin se hojně využívá iontově výměnná chromatografie. Poměrně novou metodou je použití hydrofilní interakční chromatografie. Ta umožňuje vysoce citlivou separaci bez nutnosti použít mobilní fáze s vysokou iontovou silou. Díky tomu může být pak pro tuto metodu použita hmotnostní detekce (MS).

II. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MS – hmotnostní spektrometrie (*mass spectrometry*)

RAPD PCR – PCR náhodně amplifikované polymorfni DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA PCR*)

GPC – gelová permeační chromatografie

HILIC - Hydrofilní interakční chromatografie (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

LB – nanášecí pufr (*loading buffer*)

TAE – tris/acetátový pufr

TBE – tris/fosfátový pufr

HPLC – vysoce účinná kapalinová chromatografie (*High-Performance Liquid Chromatography*)

IEC – iontově výměnná chromatografie (*Ion Exchange Chromatography*)

PFGE – pulzní elektroforéza (*Puls Field Gradient Electrophoresis*)

NP – normální fáze

RP – reverzní fáze

IP-RP-HPLC – iontově párová chromatografie v reverzní fázi

HSCCC – vysokorychlostní chromatografie za použití střídavého proudu (*High Speed counter-current chromatography*)

DEAE - 2-(diethylamino)ethyl ether

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. Použité mikroorganismy

Acidithiobacillus ferrooxidans

Bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* je acidofilní, aerobní, gramnegativní, tyčinkovitá bakterie o průměru 0,3 – 0,5 μm a délce 1,0 -1,7 μm. Její teplotní optimum je mezi 28 – 35 °C. Žije v prostředí o pH 1,8 – 2,5. energii získává oxidací dvojmocného železa a oxidací anorganických sirných sloučenin. *A.ferrooxidans* je využívána v hydrometalurgii při těžbě kovů z rud (pyrit, chalkopyrit...). [1, 2]

Acidithiobacillus thiooxidans

Bakterie *Acidithiobacillus thiooxidans* je velmi podobná *A.ferrooxidans* a to jak tvarem, tak prostředím ve kterém žije. Stejně jako *A. ferrooxidans* má jeden polárně umístěný bičík, umožňující pohyb. Zdrojem energie je jí oxidace elementární síry a sirných sloučenin. Využívá se k bioloužení a detoxikaci průmyslových odpadů.

Paracoccus denitrificans

Paracoccus denitrificans je fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinkovitá bakterie s flexibilním respiračním řetězcem. V anaerobním prostředí je denitrifikační. Zdrojem elektronů jí může být velké množství různých organických sloučenin.

2. RAPD PCR

Polymerázová řetězcová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) umožňuje *in vitro* namnožení požadovaných fragmentů DNA pomocí cyklicky se opakující enzymové syntézy nových řetězců. Syntéza probíhá ve směru 5'→ 3' pomocí termostabilní DNA polymerázy.

Reakce probíhá na principu replikace ve čtyřech fázích:

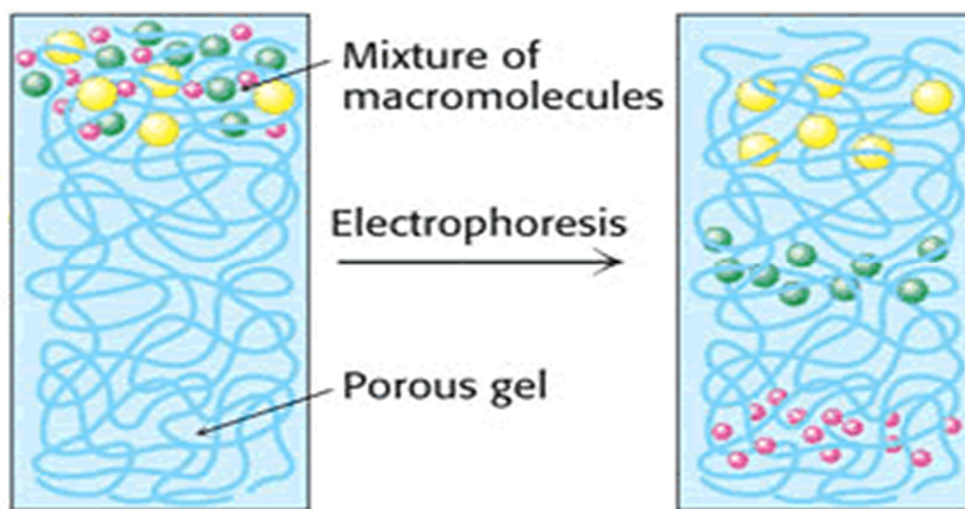
	teplota /°C/	
denaturace	94-98	rozpad vodíkových můstků, rozvolnění dsDNA, vzniká ssDNA
annealing	50-65	nasedání primerů na komplementární úsek ssDNA
elongace	75-80	DNA polymeráza tvoří komplex s primery a templářovou DNA, dosyntetizovává komplementární vlákno z volných nukleotidů
extenze		Tyto kroky se opakují v 25-30 cyklech a množství DNA v každém cyklu exponenciálně roste.

Tabulka I. : Průběh PCR

Při **RAPD PCR** (Random Amplified Polymorphic DNA PCR) se využívají primery dlouhé 8 až 12 nukleotidů bez nutnosti znát sekvenci templátové DNA. Pokud existují dvě identická nebo podobná místa v antiparalelních úsecích, vzniká PCR produkt, kterým je směs specifických fragmentů. Jejich délku lze určit například pomocí elektroforézy na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. [2]

3. Elektroforéza

Elektorforéza je separační metoda, při které se nabité molekuly biopolymerů rozdělují v elektrickém poli. Nukleové kyseliny je možné separovat díky tomu, že obsahují fosfátové zbytky, které jsou jak ve slabě kyselém, tak i v neutrální a zásaditém prostředí disociovány a tudíž mají záporný náboj. S počtem nukleotidů roste i počet fosfátových zbytků a hustota náboje je konstantní. Ve stejnosměrném poli tak dochází k rozdělení nukleových kyselin podle jejich velikosti (popřípadě tvaru).

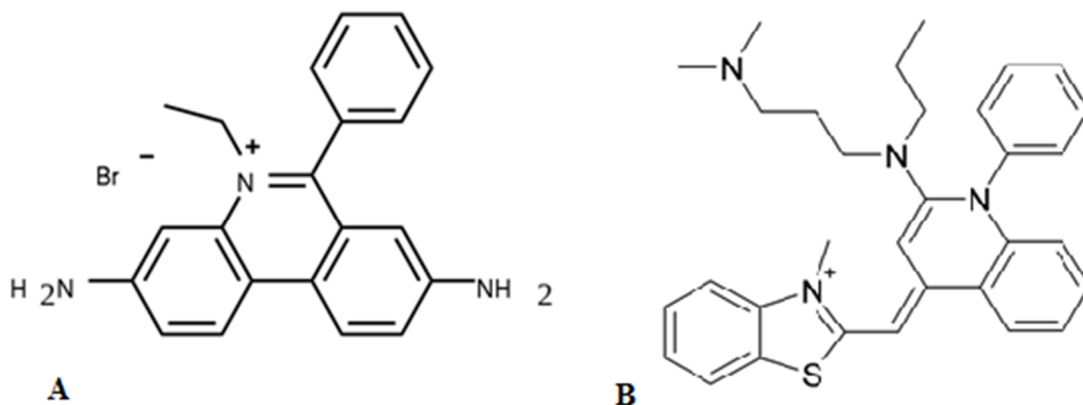


Obrázek č.1: Separace makromolekul na základě molekulové hmotnosti [3]

Jako nosiče se používají agarosové nebo polyakrylamidové gely. Polyakrylamidové gely mají větší separační schopnost, lze na nich rozdělit fragmenty, které se liší o 0,2 % hmotnosti. Používají se proto pro separaci kratších fragmentů (5 - 500 bp) a bílkovin. Agarosové gely mají větší póry, proto nemají takovou rozlišovací schopnost, mají ale větší rozmezí separace, které umožňuje dělit delší fragmenty (50 bp – 50 000 bp).

Kvalitu separace ovlivňuje homogenita a velikost elektrického pole, homogenita nosiče, velikost jeho pórů, iontová síla pufru a pH pufru. Pro elektroforézu nukleových kyselin se používá nejčastěji TAE (tris/acetátový) a TBE (tris/borátový) pufr.

K vizualizaci výsledků separace se používá nejčastěji etidium bromid. Ten tvoří s nukleovou kyselinou komplex, který pod UV zářením svítí oranžově. Pro svou toxicitu je postupně nahrazován jinými barvivy (např. SYBR Green).



Obrázek č. 2:

A - 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide (ethidium bromid)

B - N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine (SYBR Green)

3.1. Příklady použití elektroforetické separace nukleových kyselin

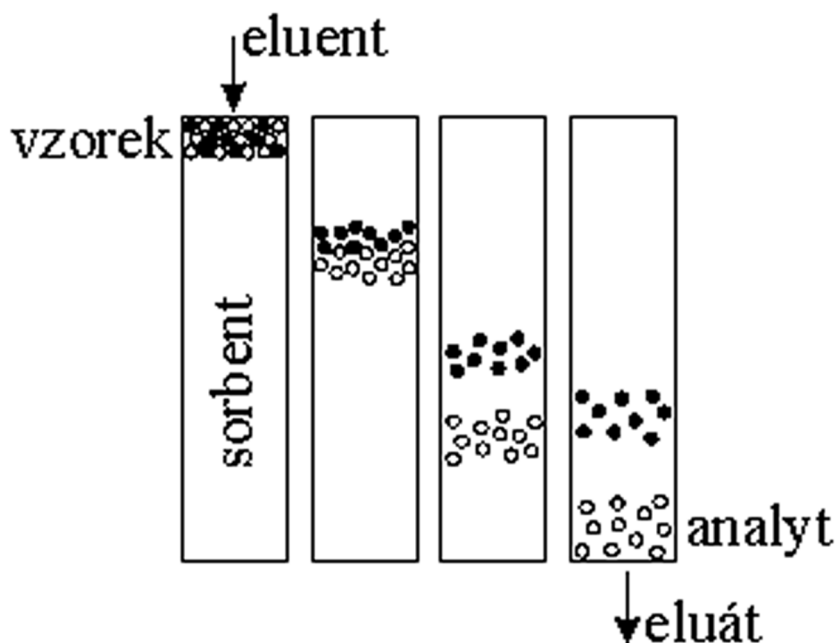
Už na konci 19. století bylo pozorováno nenáhodné putování anorganických částic koloidního roztoku v elektrickém poli. V roce 1937 separoval švédský elektrochemik Arne Thielius proteiny krevního séra podle náboje v U trubici (v roce 1948 za to získal Nobelovu cenu).[4] V roce 1955 publikoval Oliver Smithies práci o použití škrobového nosiče při separaci lidských sérových proteinů. [5] Od té doby se gelová elektroforéza stala velmi hojně využívanou metodou a to zejména v biochemii a molekulární biologii.

Nukleové kyseliny lze separovat klasicky na gelu, pro separaci delší fragmentů je vhodné použít pulzní elektroforézu (PFGE). Ta využívá střídavé napětí a umožňuje až o 2 řády vyšší rozlišení. [6] Kapilární elektroforézu (CE) lze použít například pro sledování změn konformace nukleových kyselin. [7]

4. Chromatografické metody

4.1. Teorie

Chromatografie patří mezi instrumentální separační metody. Separované látky se díky rozdílné afinitě ke stacionární fázi rozdílně distribuují a dělí mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární. Analyt se opakovaně extrahuje na rozhraní obou fází.



Obrázek č. 3: Průběh chromatografické separace [18]

Distribuci složky A ve dvou fázích popisuje distribuční konstanta:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s V_m}{(n_A)_m V_s}$$

$[A]_s$...koncentrace složky A ve stacionární fázi

$[A]_m$... koncentrace složky A v mobilní fázi

V_m ...objem mobilní fáze

V_s ...objem stacionární fáze

$(n_A)_s$...látkové množství složky A ve stacionární fázi

$(n_A)_m$...látkové množství složky A v mobilní fázi

Analyt je unášen mobilní fází na detektor. Výsledkem je chromatogram (závislost signálu na čase). Ideální je, pokud mají píky eluční křivky tvar Gaussovy křivky.

Dobu od nástřiku po maximum eluční křivky nazýváme **retenční čas t_r** , ten je charakteristický pro každou separovanou látku.

$$t_R = t_M + t'_R$$

t_m ... mrtvý čas je čas průchodu inertu kolonou bez jakékoliv interakce

t'_R ... redukovaný retenční čas. Čas, který stráví analyt ve stacionární fázi

Retenční objem V_r , je objem mobilní fáze proteklý kolonou za retenční čas

$$V_r = t_r F_m$$

F_m ... objemová rychlost mobilní fáze

$$V_r = V_m + V_{r'}$$

$V_{r'}$... redukovaný retenční čas

V_m ... mrtvý objem (způsoben mimokolonovými příspěvky a momičásticovým objemem kolony)

Kapacitní faktor k' udává, jak moc je analyt zpoždován stacionární fází :

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V_{r'}}{V_m} = K_D \frac{V_s}{V_m}$$

V_s ... objem stacionární fáze

V_m ... objem mobilní fáze

Selektivitním parametrem je **retenční faktor α** :

$$\alpha = \frac{V_{r'2}}{V_{r'1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

$V_{r'2}$; $V_{r'1}$... redukovaný retenční objem látky 2; 1

k'_2 ; k'_1 ... kapacitní faktor látky 2; 1

Pro posouzení účinnosti kolony je důležitým faktorem **počet teoretických pater** chromatografické kolony **N** :

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{Y_r} \right)^2$$

V případě, že baseline není konstantní:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_r}{1/2 Y_r} \right)^2$$

Y_r ... šířka píku

$1/2 Y_r$... šířka píku v polovině jeho výšky

Pro porovnání různě dlouhých kolon se používá **výška teoretického patra H** :

$$H = \frac{l}{N}$$

l ... délka kolony

Cílem separace je provést analýzu v co nejkratším čase při co nejvyšším rozlišení. Parametry separace se musí zvolit tak, aby jejich **rozlišovací faktor $R \geq 1,5$** , který udává míru překrytí dvou píků.

$$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{Y_{r1} - Y_{r2}}$$

Kvalitativním údajem je retenční čas, kvantitativním údajem je plocha nebo výška píku.

4.2. IEC (*Ion Exchange Chromatography*)

Iontově výměnná chromatografie se používá pro separaci iontů a polárních molekul na základě jejich náboje (proteiny, aminokyseliny, nukleové kyseliny) .

Analyt je v koloně vázán pomocí iontových interakcí. Síla iontové, polární interakce s ionexem stoupá s nábojem, polaritou a klesá s velikostí zadržované částice.

Stacionární fáze má na svém povrchu funkční skupiny nesoucí náboj opačný k analytu. Mohou to být katexy, které jsou záporně nabitě a vážou kationty. Na povrchu mají nejčastěji fenolické, karboxy, fosfátové nebo sulfátové skupiny. Anexy jsou naopak kladně nabitě a vážou anionty. Nejčastější funkční skupiny jsou aminy.

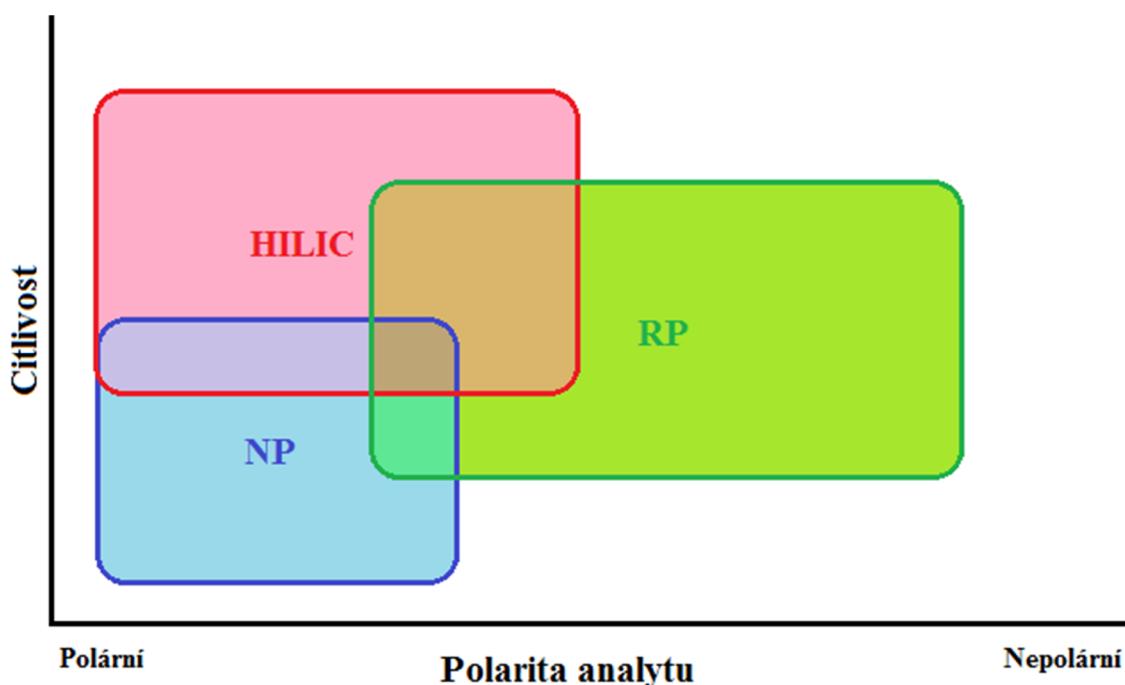
Vlastní tělo ionexu bývá tvořeno organickými (dextrany, celulóza, polymery styrenu, divinylbenzenu) nebo anorganickými (zeolity, fosforečnany, molybdenany, fosfomolibdenany...) nosiči. **Mobilní fáze** bývají vodné roztoky. Alkalické pufrý pro anexy, kyselé pufrý pro katexy. V průběhu separace roste iontová síla elektrolytu (gradientová eluce). Malé ionty (Na^+ , Cl^-) z mobilní fáze vytěsňují větší ionty vázaného analytu. U IEC využíváme vodivostní a UV/Vis detektory.

4.3. HILIC [9, 10, 11, 12, 13]

(*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

Slabě nebo středně polární analyty lze separovat v obrácených fázích (RP). Silně polární látky nelze takto dobře odseparovat, protože vykazují nízkou retenci a eluují se v mrtvém čase. Naopak v systému s normálními fázemi (NP) mohou být polární látky zadržovány příliš. Tento problém řeší HILIC chromatografie, která umožňuje s vysoce citlivou a selektivní separací polárních látek. (obr. č.4)

HILIC je variantou NPLC s použitím polární mobilní fáze s vysokým podílem organického rozpouštědla a méně polární stacionární fáze.



Obrázek č. 4: Použití HILIC

Jako **stacionární fáze** se používají částicové nebo monolitické nosiče, nejčastěji silikagelová stacionární fáze, která je modifikována funkčními skupinami. (Obr.č. 5a) Použit lze také modifikované hydrofilní polymery (polysulfoethyl, polyhydroxyethyl) (Obr. č.5b) nebo zwitterionové stacionární fáze (Obr. č.5c), které umožňují chemicky vázat jak kladně, tak záporně nabitě polární látky.

Stacionární fáze musí být vždy více polární než fáze mobilní. Jedině to umožní účinnou separaci a zamezí zadržování nepolárních látek kolonou. [11]

stacionární fáze	chemická struktura
a.	
silikagel	-OH
kyanopropyl	-(CH ₂) ₃ -CN
aminopropyl	-(CH ₂) ₃ -NH ₂
diol	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---CH}_2\text{---OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
b.	
PAC	$\begin{array}{c} \text{---(CH}_2\text{---CH---)}_n \\ \\ \text{C=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
c.	
ZIC	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---CH}_2\text{---N}^{\oplus}\text{---(CH}_2\text{)}_3\text{---SO}_3^{\ominus} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Obrázek č. 5: Používané stacionární fáze [11]

Mobilní fázi je vodná s vysokým obsahem organického rozpouštědla, nejčastěji acetonitrylu (ACN) (v 83% případech) nebo methanolu (v 15% případech).

Vysoký obsah organického rozpouštědla je nutné dodržet, aby docházelo výhradně k hydrofilním interakcím.

Do mobilní fáze se pro kontrolu pH a iontové síly přidávají **aditiva**. Nejčastěji se používají kyselina mravenčí, octan amonný, mravenčan amonný, kyselina octová, Tris. [12]

Ideálně při separaci dochází k retenci způsobené hydrofilními interakcemi, je ale možné že dochází i k druhotným interakcím a analyt tak může být zadržován elektrostatickými interakcemi. Ty je možné omezit přidáním amonných solí organických kyselin. [11]

4.4. Příklady separace nukleových kyselin pomocí chromatografie

Iontově výměnná chromatografie s DEAE (2-(diethylamino)ethyl ether) kolonou s UV detekcí byla použita pro separaci, purifikaci a kvantifikaci PCR produktů. [14, 15] Pomocí iontově párové chromatografie v reverzní fázi (IP-RP-HPLC) lze separovat nukleové kyseliny podle velikosti s rozlišením 1-5 % při délce polynukleotidového řetězce nad 500 pb a koncentraci **nejméně 300 ng / ml.** [16] dsDNA byla rychle a efektivně separována například iontově výměnnou chromatografií s neporézní pryskyřicovou kolonou [17] nebo pomocí automatického systému WAVE[®]DNA Fragment Analysis s DNA Sep[®]Cartridge. Takto lze separovat fragmenty o délce 50 – 2000 pb, což může nahradit gelovou elektroforézou.[18] Kolona s mikropelikulární stacionární fází byla použita k separaci iontově výměnnou chromatografií v reverzní fázi i iontově párovou chromatografií. [19]

Nukleové kyseliny lze separovat na polárních stacionárních fázích, je však nutné rozlišit, zda separujeme nukleosidy, nukleotidy nebo oligo – či polynukleotidové řetězce. Pro separaci uridinu, guanosinu a adenosinu byla použita monolitická kapilární kolona modifikovaná polárním polymerem kyseliny akrylové s mobilní fází acetonitril a 0,2% vodný roztok kyseliny mravenčí v poměru 90/10. [20] Monolitické kolony byly použity při gradientové separaci homooligomer a heteropolymerní sekvence 19ti a 20ti merů za použití mobilní fáze acetonitrilu, vody a octanu triethylaminu. [21] K separaci v extrémně hydrofilním rozpouštědle 1-propanolu/800 mM fosforečnanu draselného (1:1) byla použita HSCCC (High Speed counter-current chromatography). [22]

V kapiláře se speciální polymerní stacionární fází bylo dosaženo vysoké separační účinnosti při separaci thymynu, uracilu, uridinu, adenosinu, adeninu a dalších.[23] Mix-mode chromatografie umožňuje podle konkrétní stacionární fáze separaci jak iontově výměnnou v reverzní fázi, tak i hydrofilní interakční. [24] Hydroxyapatitová chromatografie byla použita pro izolaci a purifikaci plazmidové DNA. [25]

IV. CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámit se s RAPD PCR a metodami pro separaci DNA s důrazem na metody chromatografické, především hydrofilní interakční chromatografii a iontově výměnnou chromatografií. Zjistit, zda je HILIC chromatografie vhodná pro separaci nukleových kyselin a experimentálně stanovit nejvhodnější podmínky pro separaci.

V. PRAKTICKÁ ČÁST

1. Materiál

1.1. Přístrojové vybavení

Flow box: NuAir, NU-480-400E

pH metr: PHM 93 Reference Radiometer Copenhagen

Centrifuga: MPW – 6K15 Med. Instruments

Centrifuga: Minispin – Eppendorf

Vyhřívaný blok: Thermomixer comfort – Eppendorf

Exikátor Speed Vac

Oscilační mlýnky: MM301 – Retsch

Termocykler: T3 Thermocycler – Biometra

Agarosová elektroforéza: MSMINI - Cleaver SCIENTIFIC

Zdroj napětí: MP - 3AP - Cleaver SCIENTIFIC

Transiluminátor: Vilber Lourmat

Fotoaparát agarosových gelů: Bio – Imaging Systems - MiniBis Pro

mikrovlnná trouba, mrazicí box

chromatografie: Agilent 1260 infinity

kolona PrimosepSB od firmy SIELC

kolona DEAE-NPR od firmy TSK

1.2. Použité chemikálie

Primer RAPD–1 (GTGAGGCGTC) – Invitrogen

Taq DNA polymerasa – Top – Bio s.r.o.

10x Thermopol Buffer – Top – Bio s.r.o

dNTP mix - Top – Bio s.r.o

Ultračistá voda deionizovaná - Milli-Q Academic – Millipore

Ethidium bromid - Sigma-Aldrich

GeneRuler DNA Ladder Mix – Fermentas

Ostatní používané chemikálie byly v čistotě p.a.

Mikroorganismy

Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270

Acidithiobacillus thiooxidans DSM 14887

Paracoccus denitrificans CCM982

2. Metody

2.1. Izolace a purifikace DNA

Poté, co byly buňky sklizeny centrifugací při 15 000 x g/10 minut, byl vzniklý pelet následně resuspendován v 1,5 ml 1mM EDTA (pH 1,5 s H₂SO₄) a opět zcentrifugován 10 minut při 13 000 x g. Opět vzniklý pelet byl rozsuspendován v 0,5 ml 0,01M Tris/HCl (pH 7,0) a bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru (1% SDS, 0,2 M NaOH), 50 µl 5M NaClO₄ a 0,1 g balotinových kuliček. Následovalo zahřívání směsi 15 min na 95°C a poté 15 min mražení při – 70°C. Vzniklá směs byla třepána na oscilačním mlýnku 20 minut při frekvenci 30/s a centrifugována při 13 000 x g 10 minut.

Supernatant byl odebrán do nové zkumavky se stejným množstvím směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1). Směs se nechala inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě za mírného míchání, poté byla zcentrifugována 10 minut při 13 000 x g.

Horní vrstva byla převedena do nové zkumavky, do které bylo přidáno 1/10 objemu 3M octanu sodného a dvojnásobný objem vychlazeného etanolu. Srážení probíhalo 30 minut při laboratorní teplotě. Vysrážená DNA byla centrifugována 15 minut při 13 000 x g a sušena 5 minut ve vakuové odparce. Vysušený pelet vyizolované DNA byl rozpuštěn v požadovaném množství TE pufru.

2.2. RAPD PCR

PCR směs (do 25 μ l)

19 μ l dH₂O
2,5 μ l reakční pufr (10x)
0,5 μ l DTP (10 mM)
1 μ l RAPD 1 primer (100 pmol/ μ l)
1 μ l Taq DNA polymeráza
1 μ l DNA templát

Program termocykléru (Program 31)

Iniciace	94°C	3 min
Denaturace	94 °C	1 min
Anneling	35°C	1 min
Elongace	72°C	2 min
Od denaturačního kroku opakování 44x		
Finální elongace	72°C	7 min
Hold	4 °C	

2.3. Gelová elektroforéza

Směs 0,5 g agarosy a 50 ml 1x koncentrovaný TBE pufru byla v mikrovlnné troubě přivedena k varu. Po přidání 1 μ l ethidium bromidu (10 mg/ml) byl roztok promíchán krouživými pohyby. Takto připravený gel byl nalit do připravené vaničky s hřebínkem a nechán ztuhnout.

Vanička se ztuhlým gelem byla vložena do elektroforetické vany s takové množství 1x koncentrovaného TBE pufru, aby byl gel pod hladinou. Po odstranění hřebínku byla do první jamky nanášena směs 3 μ l DNA markeru a 3 μ l PCR loadovacího pufru, do dalších jamek byla nanášena směs 3 μ l PCR produktu a 3 μ l PCR loadovacího pufru.

Elektroforetická probíhala 90 minut při konstantním napětí 100 V. Výsledek elektroforézy byl zaznamenán pomocí MiniBis Pro pod UV světlem (312 nm).

10x koncentrovaný TBE pufr (do 1 litru):

108 g Tris

55 g kyselina boritá

40 ml 0,5 M Na₂EDTA

2.4. Kapalinová chromatografie

Všechny chromatografické postupy byly prováděny za laboratorní teploty v systému HPLC. Pro IEC byla použita kolona DEAD-NPR, pro HILIC kolona PrimosepBS. Kolona byla ekvilibrována mobilní fází a poté bylo nanášeno 5 µl vzorku při průtoku mobilní fáze 0,5 ml.min⁻¹. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 254 nm.

Mobilní fáze pro IEC:

A: 25 mM TRIS/HCl, pH = 9

B: 25 mM TRIS/HCl, pH = 9 + 1M NaCl

Mobilní fáze pro HILIC:

50% ACN

0,1% kyselina octová

3. Výsledky a diskuze

3.1. Izolace a purifikace DNA

Dle postupu v kapitole 2.1. byla vyizolována DNA bakterií *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*. DNA bakterie *P. denitrificans* byla poskytnuta z laboratoře prof. Kučery.

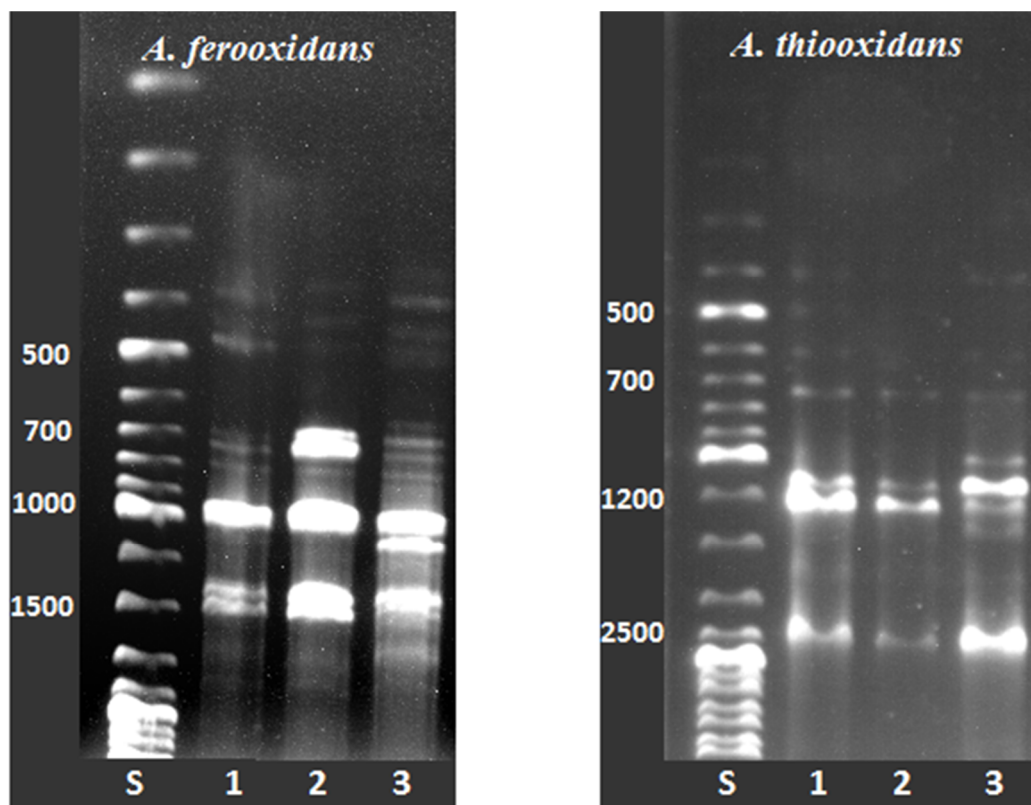
3.2. RAPD PCR

RAPD PCR byla provedena se vzorky DNA všech výše zmíněných bakterií podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.

Byl použit primer RAPD-1, sekvence: GTGAGGCGTC

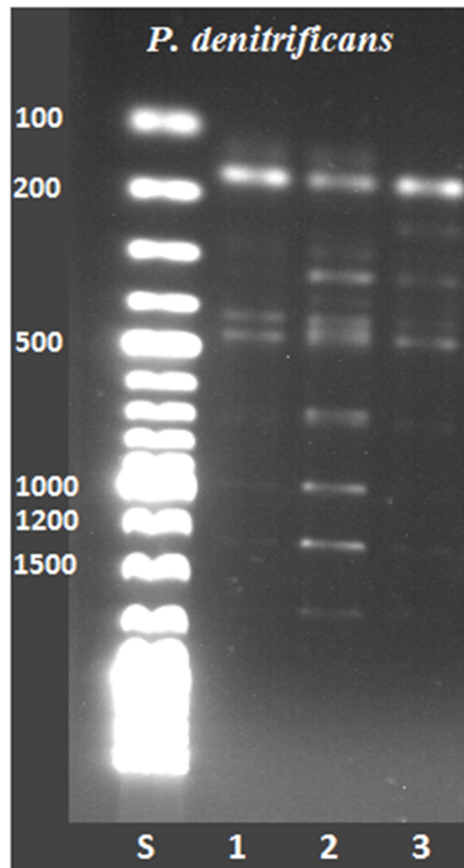
3.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza byla připravena podle návodu uvedeného výše v kapitole 2.3.



Obrázek č. 6: Elektroforézy RAPD PCR produktů *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans* na 1% agarózovém gelu. Byl nanesen vždy standard GeneRuler DNA Ladder Mix 100 – 10 000 bp a tři PCR produkty dané bakterie.

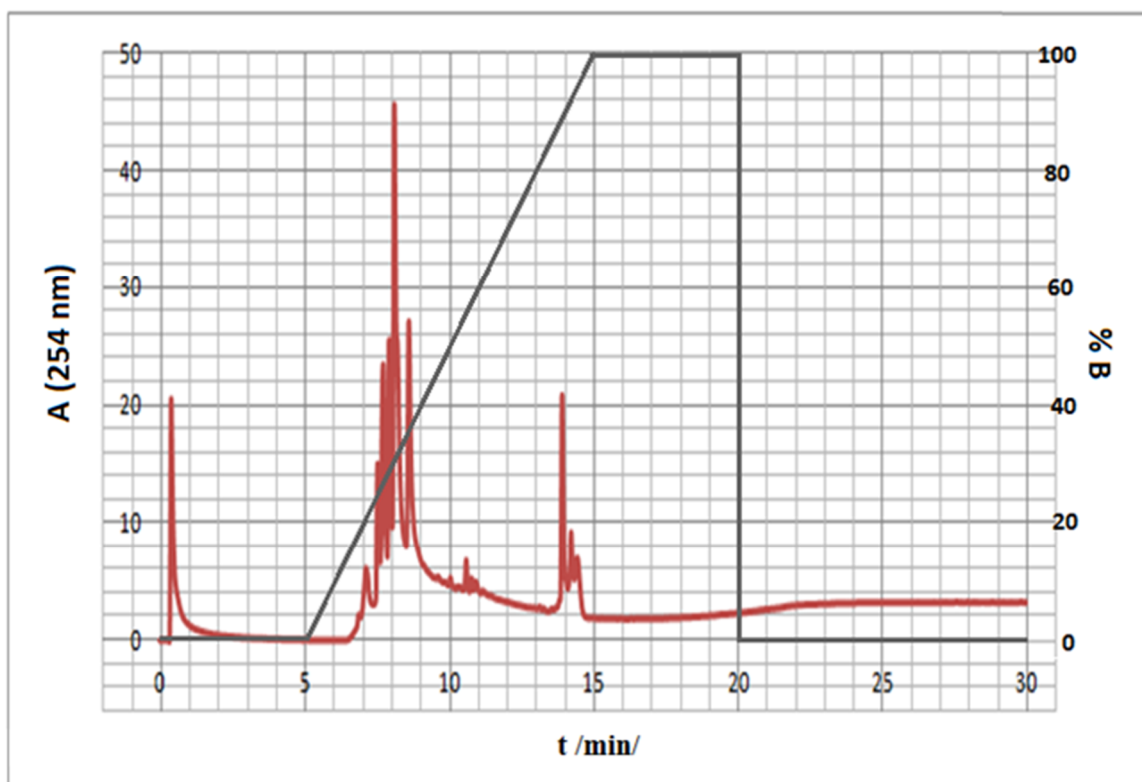
Na gelech můžeme vidět, že při RAPD PCR vznikají pro konkrétní bakterii vždy stejně dlouhé specifické fragmenty. Ty se však mohou kvantitativně lišit. To je vidět například na gelu *A. ferrooxidans*, kde je ve vzorku č.2 podstatně více fragmentů o délce okolo 700 bp, než ve vzorku č.1 a č.3.



Obrázek č. 7: Elektroforéza RAPD PCR produktu *P. denitrificans* na 1% agarózovém gelu. Standard GeneRuler DNA Ladder Mix 100 – 10 000 bp a tři PCR produkty.

K fyziologicky podobným bakteriím *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans* byla zvolena pro porovnání odlišná bakterie *P. denitrificans*.

3.4. Ionexová chromatografie v systému HPLC



Obrázek č. 8: IEC chromatografie PCR produktu *A. thiooxidans*.

Kolona: DEAE-NPR

Délka kolon: 4,6 x 250 mm

Velikost částic: 5 μm

Vzorek: 5 μl naamplifikované DNA *A. thiooxidans*

Podmínky: mobilní fáze: A: 25 mM TRIS/HCl, pH = 9

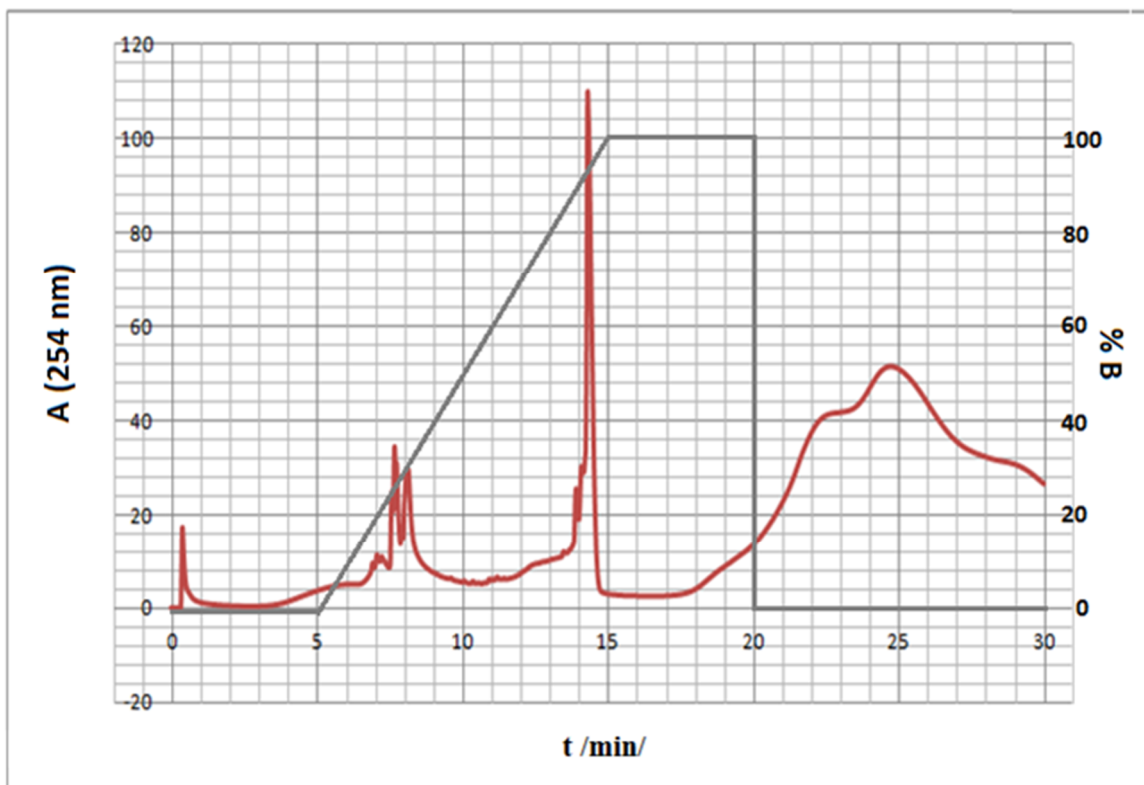
B: 25 mM TRIS/HCl, pH = 9 + 1M NaCl

rychlost průtoku: 0,5 ml.min⁻¹

asorbance: 254 nm

gradient: do 5. minuty roztok A → v 15. minutě roztok B





Obrázek č. 9: IEC chromatografie PCR produktu *P. denitrificans*.

Kolona: DEAE-NPR

Délka kolon: 4,6 x 250 mm

Velikost částic: 5 μm

Vzorek: 5 μl naamplifikované DNA *P. Denitrificans*.

Podmínky: mobilní fáze: A: 25 mM TRIS/HCl, pH = 9

B: 25 mM TRIS/HCl, pH = 9 + 1M NaCl

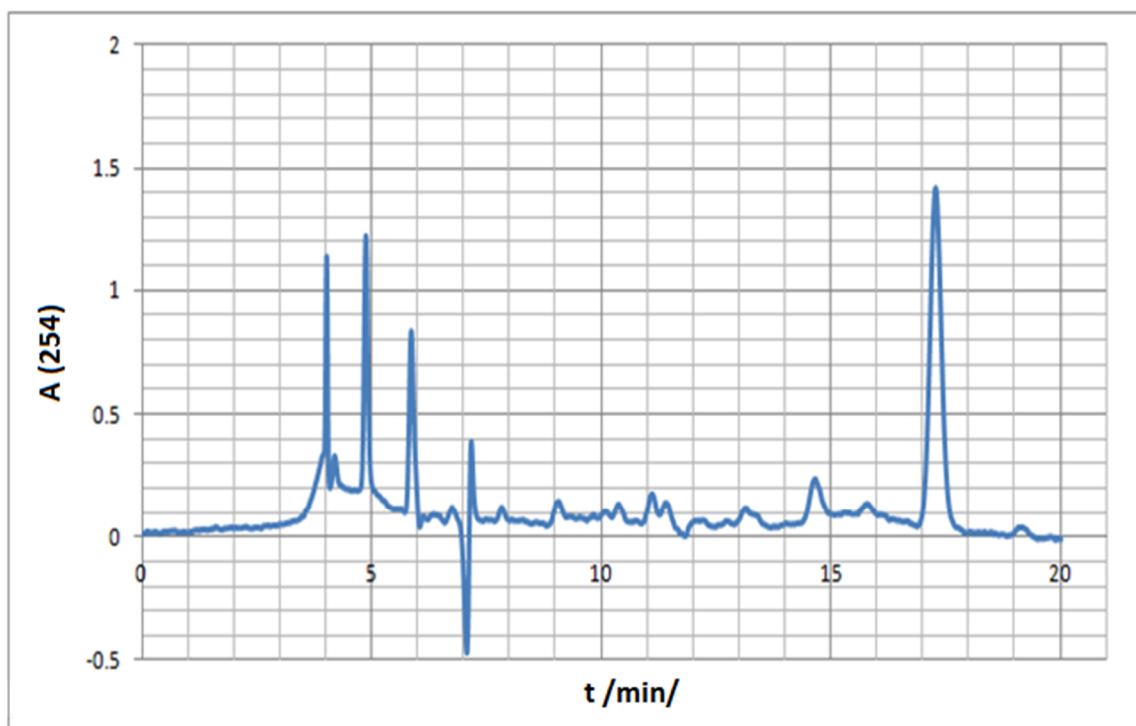
rychlost průtoku: 0,5 ml.min⁻¹

asorbance: 254 nm

gradient: do 5. minuty roztok A → v 15. minutě roztok B



3.5. HILIC v systému HPLC



Obrázek č. 10: HILIC chromatografie PCR produktu *A. ferrooxidans*.

Kolona: PrimosepSB

Délka kolony: 4,6 x 5mm

Velikost částic: 5 μm

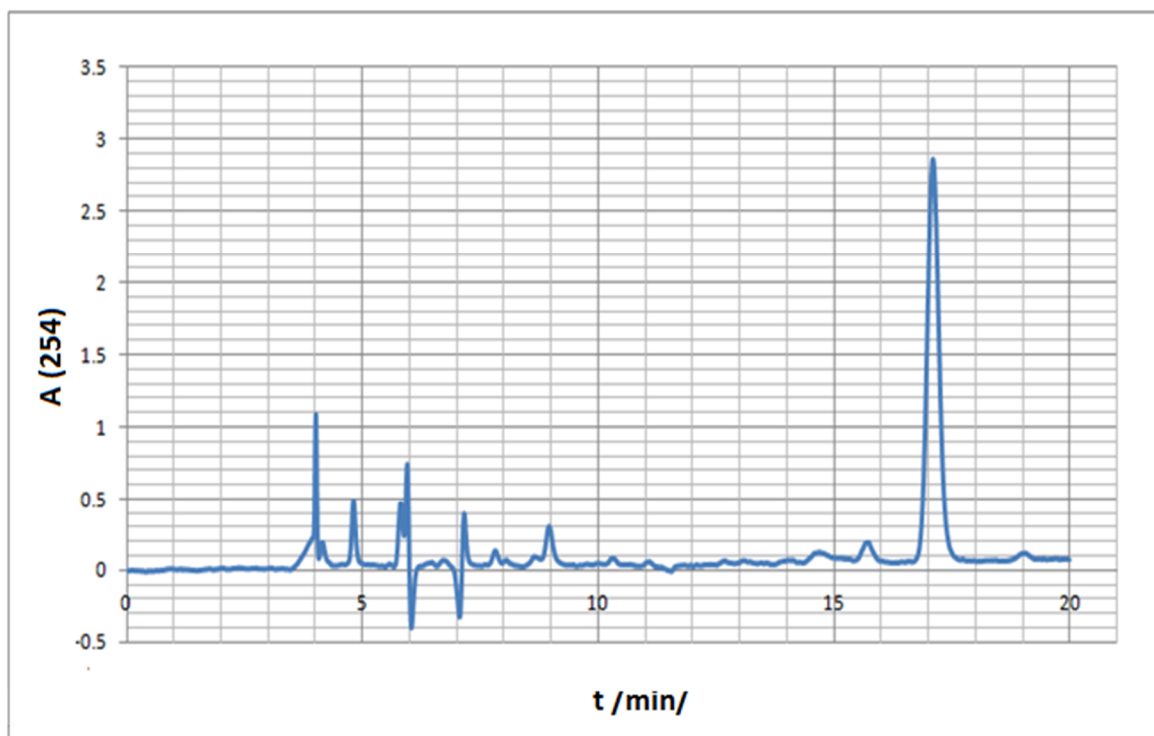
Vzorek: 5 μl naamplifikované DNA *A. ferrooxidans*

Podmínky: mobilní fáze: 25% ANC a 0,05 % kyselina octová

rychlost průtoku: 0,5 ml.min⁻¹

asorbance: 254 nm

izokratická eluce



Obrázek č. 11: HILIC chromatografie PCR produktu *A. thiooxidans*.

Kolona: PrimosepSB

Délka kolony: 4,6 x 5mm

Velikost částic: 5 μm

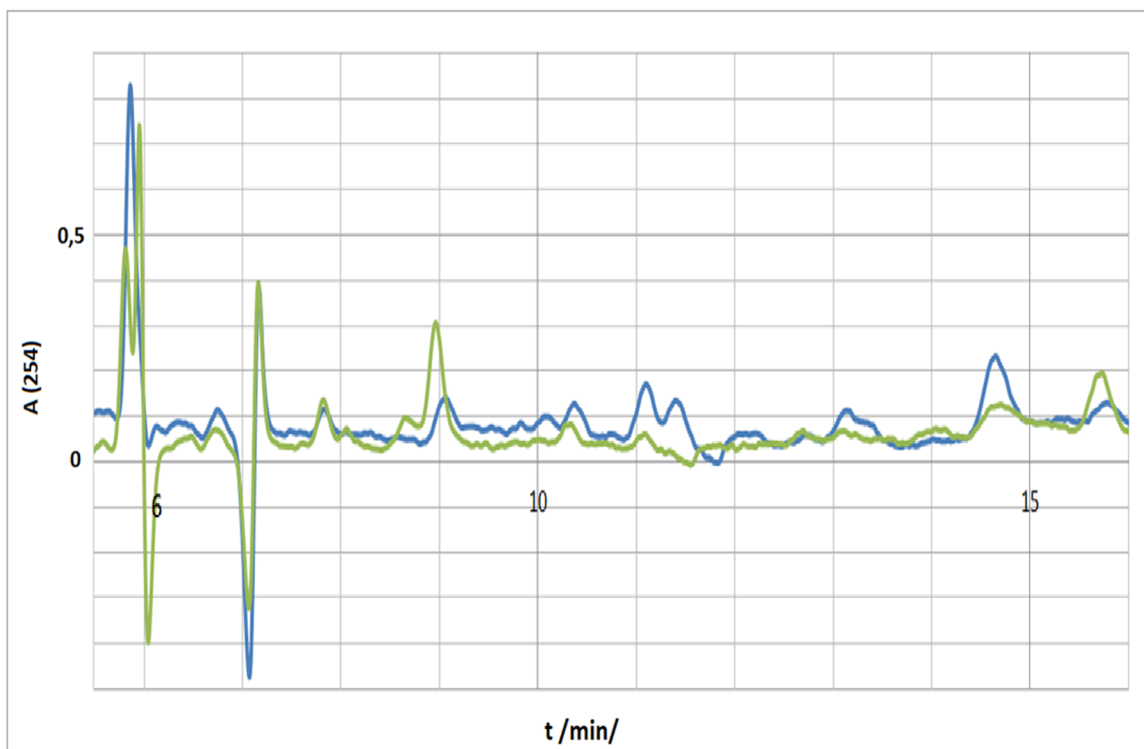
Vzorek: 5 μl naamplifikované DNA *A. thiooxidans*.

Podmínky: mobilní fáze: 25% ANC a 0,05 % kyselina octová

rychlost průtoku: 0,5 ml.min⁻¹

asorbance: 254 nm

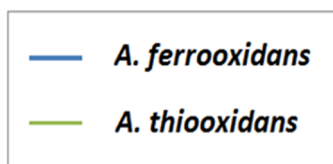
izokratická eluce



Obrázek č. 12: Porovnání chromatografických profilů (6-16 minut) bakterií

A. ferrooxidans a *A. thiooxidans*.

Podmínky viz obrázek č. 10 a č.11.



V oblasti separace mezi šestou a šestnáctou minutou je očekávána separace naapmlifikovaných fragmentů DNA. Při porovnání v tohoto úseku můžeme vidět velkou podobnost chromatografických profilů, což odpovídá fyziologické podobnosti obou bakterií.

4. ZÁVĚR

V bakalářské práci byla vypracována rešerše o elektroforetických a především chromatografických metodách separace nukleových kyselin.

V praktické části byla vyizolována DNA vybraných bakterií, se kterou byla provedena RAPD PCR a gelová elektroforéza pro kontrolu reakce. Naamplifikované fragmenty byly zároveň separovány kapalinovou chromatografií. Byla použita hydrofilní interakční chromatografie, která je poměrně novou metodou. Pro porovnání byla provedena separace i na iontově výměnné chromatografii, která je metodou již částečně zavedenou.

Velkou výhodou hydrofilní interakční chromatografie oproti iontově výměnné chromatografii je možnost použití hmotnostní detekce. Tato metoda by mohla být po optimalizaci používána pro kvantifikaci fragmentů bakteriální DNA a identifikaci bakteriálních kmenů z environmentálních vzorků z oblastí po těžbě těžkých kovů pomocí srovnávání chromatografických profilů.

5. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Doškář, J., Pantůček, R., Šmarda, J., Růžičková, V., Kostíková, J. (2005) Metody molekulární biologie. Vydavatelství MU, Brno
- [2] Linhartová, P. (2009) Využití RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) při studiu příbuznosti kmenů rodu *Acidithiobacillus*. Diplomová práce, MU, Brno
- [3] <http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html> (2.3.2012)
- [4] Tiselius, A. (1937) A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, Transaction of the Faraday Society **33**: 524-531
- [5] Smithies, O. (1955) Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group Variations in the Serum Protein of Normal Human Adults. *The Biochemical Journal* 61 (4)
- [6] Harvey, D. (2000) Modern Analytical Chemistry
- [7] Košťál, V., Katzenmeyer, J., Arriaga, E.A. (2008) Capillary Electrophoresis in Bioanalysis. *Anal. Chem.* 80 (4533-4550)
- [8] <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>> (3.3.2012)
- [9] Jandera, P. (2008) Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of Systems and Software*
- [10] Gong, L., James, S.O., McCullagh, J.S. (2011) Analysis of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to negative ion electrospray ionization mass spectrometry
- [11] Vacek, J., Onorfejevová, L., Klejdus, B., Kubáň, V. (2009) Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separaci polárních látek. *Chemické listy*

[12] Pontén, E., Appelbald, P., Jonsson, T. (2010) Is HILIC Chromatography Changing the Scene for HPLC separation?, *The Column*

[13] Woodruff, M. (2011) The Ins and Otts of HILIC chromatography, *The Column*

[14] Katz, E.D. (1996) Quantitation and purification of polymerase chain reaction products by high-performance liquid chromatography. *Molecular Biotechnology* **6** (79-86)

[15] Katz, E.D. (2000) HPLC of DNA and PCR Products

The Nucleic Acid Protocols Handbook. Rapley R (ed) Humana Press, pp. (105-113)

[16] Huber, C.G., Oefner, P.J., Preuss, E., Bonn, G.K. (1993) High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Res.* **21** (1061-1066)

[17] Kato, Y., Yamasaki, Y., Onaka, A., Katamura, T., Hoshimoto, T., Murotsu, T., Fukschige, S., Matsubara, K. (1989) Separation of DNA restriction fragments by high-performance ion-exchange chromatography on a nonporous ion exchanger. *J Chromatogr.* **478**, (264-268)

[18] Hecker, K.H., Green, S.M., Kabayashi, K. (2000) Analysis and purification of nucleic acids by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* **46** (83-93)

[19] Huber, Ch. G. (1998) Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. *J Chromatogr. A.* **806** (3-30)

[20] Horie, K., Ikegami, T., Hosoya, K., Saad, N., Fiehn, O., Tanaka, N., (2007) Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography., *J Chromatogr. A.* **1164**, 198

- [21] Holdšvendová, P., Suchánková, J., Bunček, M., Bačkovská, V., Coufal, P. (2007) Hydroxymethyl methacrylate-based monolithic columns designed for separation of oligonucleotides in hydrophilic-interaction capillary liquid chromatography, *J Biochem.Biophys. Methods* **70**, 23
- [22] Shibusawa, Y., Atsushi, S., Suzaka, Ch., Yanagida, A., Ito Y. (2010) Counter-current chromatographic separation of nucleic acids constituents with an extremely hydrophilic solvent system. *J Chromatogr.A.* (3457-3460)
- [23] Hosoya, K., Hira, N., Yamamoto, K., Nishimura, M., Tanaka, N., (2006) High-performance polymer-based monolithic capillary column., *Anal.Chem.* **78**, 5729
- [24] McLaughlin, L.W. (1989) Mixed-Mode Chromatography of Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **89** (309-316)
- [25] Hilbriq, F., Freitag, R. (2012) Isolation and purification of recombinant proteins, antibodies and plasmid DNA with hydroxyapatite chromatography. *Biotechnol. J.* (90-102)
- [26] Andrew, J. A. (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* **499** (177-196)
- [27] Fojta, M., Kejnovská, I., Havran, L., Horáková, P., Brázda, V., Brázdová, M., Orság, P., Pivoňková, H., Tichý, V., Navrátilová, L. (2011) Pokročilý kurz, Moderní biofyzikální metody - návody k cvičením. Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno
- [28] Fojta, M., Šponer, J., Špačková, N., Vorlíčková, M., Hofr, C., Pečinka, P., Réblová, K., Kejnovská, I., Havran, L., Horáková, P. (2011) Letní škola metod experimentální biologie - sborník. Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno
- [29] Klouda, P. (2003) Moderní analytické metody.

[30] Pěňčíková, H. (2003) Analytická chemie a chemická laboratorní cvičení. SPŠCh, Brno

[31] Schwartz, D.C., Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37 (1) :67-75.

[32] Zeillinger, R., Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F. (1993)
Rapid quantitative analysis of differential PCR products by high-performance liquid chromatography