

# OPTIMALIZACE IZOLACE VOLNÉ DNA Z VODNÝCH VZORKŮ

Adsorpčně-eluční metoda



ÚSTAV TECHNOLOGIE  
VODY A PROSTŘEDÍ



**VŠCHT PRAHA**

Stanislav Gajdoš, Kristýna Časarová, Ivan Karpíšek, Dana Vejmelková, VŠCHT

# Význam stanovení eDNA



- Vertikální vs. horizontální přenos genetické informace
  - Konjugace – přenos plazmidu mezi D a A buňkou
  - Transdukce – zprostředkování virem
  - Transformace – zavedení, přijetí a exprese cizí volné DNA
  - Gene transfer agents
- Nedostatečnost čistírenských procesů při jejím odstranění
  - Součástí eDNA i (e)ARG → podpora šíření ATB rezistence transformací po vypouštění OV nebo jejich opětovném využití
  - eDNA může ve vodním prostředí přetrvat s různou životností (hodiny až měsíce)

# Význam stanovení eDNA



- Nedostatečnost čistírenských procesů při jejím odstranění
  - Součástí eDNA i (e)ARG → podpora šíření ATB rezistence transformací po vypouštění OV nebo jejich opětovném využití
  - eDNA může ve vodním prostředí přetrvat s různou životností (hodiny až měsíce)
- Úprava procesů za účelem znemožnění nebo omezení šíření eDNA (a s ní i eARG) vodním cyklem
- Pro posuzování účinnosti procesů ohledně odstraňování eDNA je zásadní její **kvantitativní stanovení**

# Podstata – oddělení frakcí DNA



- Filtrace
  - Vázaná DNA na membráně, volná ve filtrátu
- Záchyt
  - Precipitace (Miłobedzka et al. 2019)
    - Na 500 ml vzorku – 50 ml octanu sodného a 1 100 ml ethanolu
    - Směs tohoto objemu se centrifuguje při 10 000×g

# Podstata – oddělení frakcí DNA



- Filtrace
  - Vázaná DNA na membráně, volná ve filtrátu
- Záchyt
  - Precipitace (Miłobedzka et al. 2019)
    - Na 500 ml vzorku – 50 ml octanu sodného a 1 100 ml ethanolu
    - Směs tohoto objemu se centrifuguje při 10 000×g
  - **Adsorpce-eluce** (Wang et al. 2016)
    - Zakoncentrování, snížení potřebného objemu reagensů a objemu k odstředování

# Princip dle Wang et al. 2016

referenční postup

- 1) Záchyt DNA na NAAP (= částice sorbující nukleové kyseliny)
  - Silikagel preparovaný  $\text{Al}(\text{OH})_3$
- 2) Promytí kolony elučním roztokem
  - NaCl (15 g/l), trypton (30 g/l), hovězí extrakt (15 g/l), glycin (3,75 g/l), NaOH (0,28 g/l)
  - pH =  $9,3 \pm 0,2$
- 3) Filtrace eluátu
  - PES filtr (0,45  $\mu\text{m}$ )
- 4) Precipitace eDNA isopropanolem, resuspendace v 1 ml Tris/EDTA

# Příprava NAAP

referenční postup

## 1) Příprava roztoku $\text{Al}(\text{OH})_3$

- $\text{AlCl}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$  ve vodném roztoku s  $\text{pH} = 7,2$
- Několikanásobná centrifugace a resuspendace v roztoku  $\text{NaCl}$  (0,14 mol/l)
- Sterilizace

## 2) Kontakt se silikagelem

- Smísení roztoku  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (47,8 obj.%) se silikagelem (5-6 %; g/ml)
- Vysušení

# Příprava NAAP

vlastní postup

## 1) Příprava roztoku $\text{Al}(\text{OH})_3$

- $\text{AlCl}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$  ve vodném roztoku s  $\text{pH} = 7,2$
- Několikanásobná centrifugace a resuspendace v roztoku  $\text{NaCl}$  (0,14 mol/l)
- Sterilizace

## 2) Kontakt se silikagelem

- Smísení roztoku  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (47,8 obj.%) se silikagelem (5-6 %; **g/ml**)
- Vysušení
- 20 ml roztoku na 1 g silikagelu





# Postup 1

odtok z nemocniční ČOV

- 1) Záchyt DNA na NAAP (1 g), 100 ml vzorku
- 2) Promytí kolony elučním roztokem (5 ml)
  - ~~NaCl (15 g/l), trypton (30 g/l), hovězí extrakt (15 g/l), glycin (3,75 g/l), NaOH (0,28 g/l)~~
  - ~~pH = 9,3 ± 0,2~~
  - Tris pufr, pH = 8,0
- 3) Filtrace eluátu
  - ~~PES filtr (0,45 μm)~~
  - Stříkačkový filtr z regenerované celulózy (0,2 μm)
- 4) Precipitace eDNA isopropanolem
  - K precipitaci nedošlo

# Postup 2

modelový vzorek

- 1) Záchyt DNA na NAAP (3 g), 100 ml vzorku
- 2) Promytí kolony elučním roztokem (5 ml)
  - NaCl (15 g/l), trypton (30 g/l), hovězí extrakt (15 g/l), glycin (3,75 g/l), NaOH (0,28 g/l)
  - pH = 9,3 ± 0,2
- 3) Filtrace eluátu
  - ~~PES filtr (0,45 µm)~~
  - Stříkačkový filtr z regenerované celulózy (0,2 µm)
- 4) Precipitace eDNA isopropanolem, resuspendace v 1 ml Tris/EDTA
- 5) Při následné izolaci **nezískána žádná DNA**
  - DNeasy PowerSoil Kit; Qiagen

# Souhrnně



## Postup 1 (odtok z nemocniční ČOV)

- Směsný eluční roztok → Tris pufr  
(pH 9,2 → 8,0)
- Filtr: PES → reg. Celulóza  
(pH 9,2 → 8,0)
- Koncentrace eDNA pod LD?
- **Nedošlo k precipitaci**

## Postup 2 (modelový vzorek)

- ✓ Směsný eluční roztok
- Filtr: PES → reg. Celulóza  
(pH 9,2 → 8,0)
- ✓ Modelový vzorek nad LD
- **Kitem nebyla získána žádná DNA**

# Souhrnně



## Potenciální překážky

- Filtry z hydrofilní regenerované celulózy
- Stejný sorbent

## Možnosti optimalizace

- ✓ Hydrofobní polyethersulfonové membránové filtry
- ✓ Mikroskopická analýza preparovaného silikagelu
- ✓ Úprava metody pro skutečné vzorky

# Závěry/plány do budoucna



- Dosavadní snahy neúspěšné
  - Neúspěch zapříčiněn pravděpodobně odlišným materiálem filtrů
  - Nejistota tkví i v preparaci silikagelu
- 
- Použití PES filtrů
  - Mikroskopická analýza preparovaného silikagelu
  - Aplikace na reálné vzorky

# Poděkování

Příspěvek vznikl za finanční podpory projektu TAČR TJ02000139 – Vývoj technologie pro eliminaci vnosu mikropolutantů a genů rezistence na antibiotika do životního prostředí a lidského organismu.

Díky náleží kolegyni Bukola Lois Ojobe za sdílení zkušeností s vybranou metodou a všem autorům podílejícím se na příspěvku za jejich přínosy v rámci této práce.



ÚSTAV TECHNOLOGIE  
VODY A PROSTŘEDÍ



VŠCHT PRAHA

**EKOMONITOR**