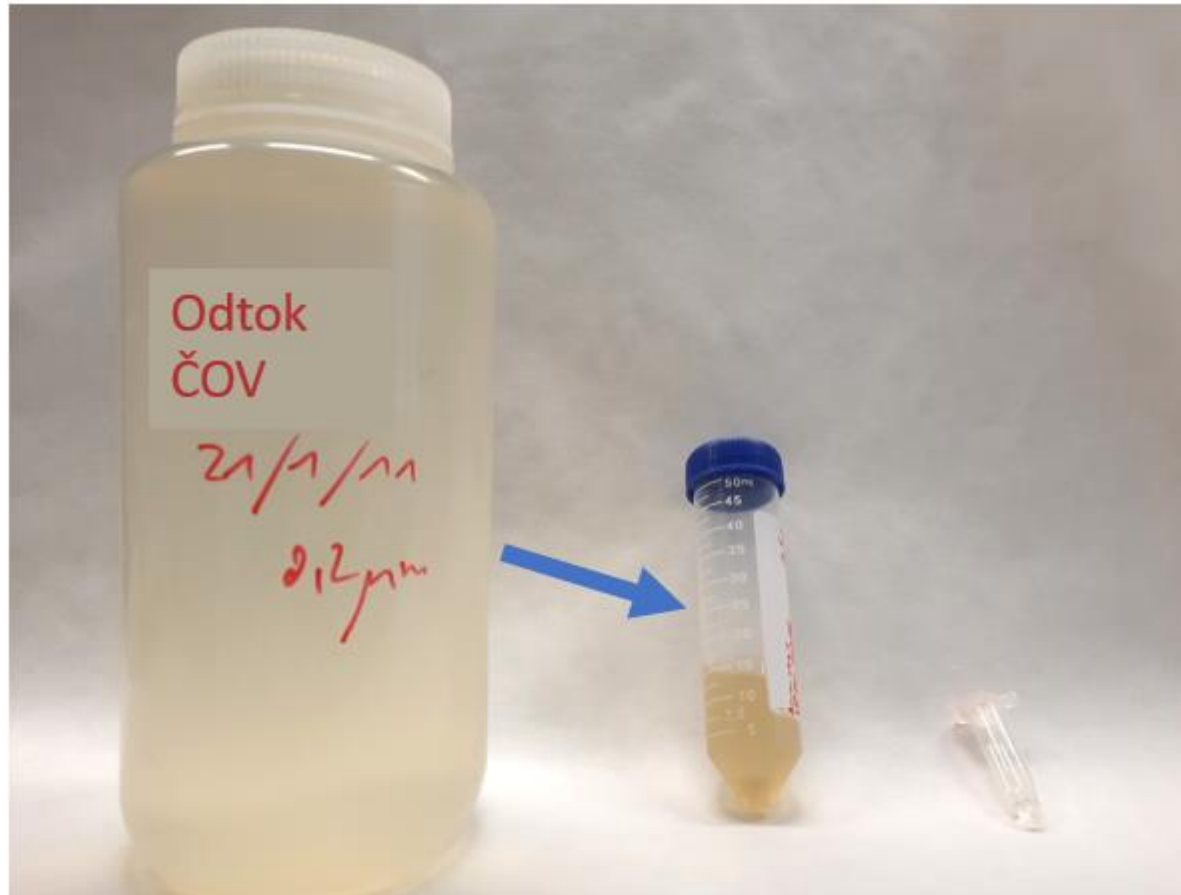


Optimalizace metod stanovení exDNA ve vodě



Stanislav Gajdoš
2021/02/10

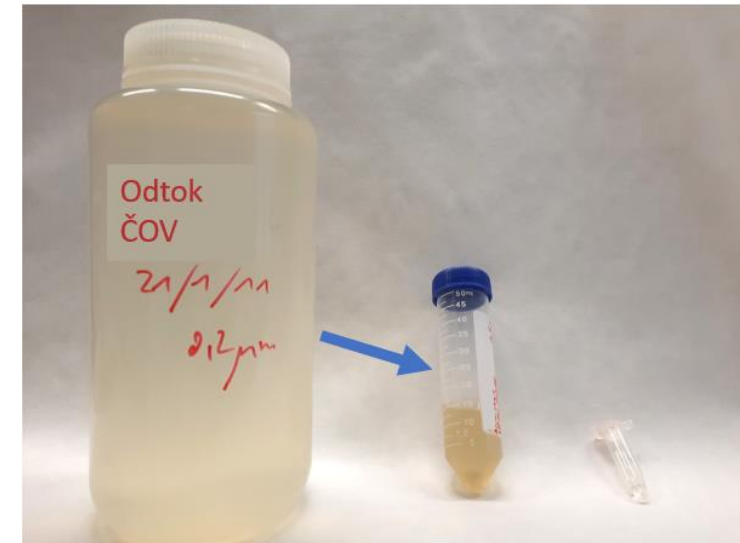
(extracelulární) DNA – zdroj informací o biosystémech

- PCR, qPCR
- Elektroforéza
- Sekvenování



Motivace

- Příspěvek exDNA k šíření antibiotické rezistence
 - Horizontální přenos genů
 - Čistírny odpadních vod nejsou navrhovány k odstraňování exDNA
 - Potřeba stanovení exDNA
- Dosažení požadovaných koncentrací DNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
 - **Stanovení zředěných vzorků vody ($\mu\text{g}/\text{L}$)**



Metody zakoncentrování exDNA

- Srážení
- Adsorpce-eluce
- Odpařování
- (Extrakce rozpouštědla)



Srážení

- Isopropanol, -20 °C, přes noc
10 000×g, 4 °C, 45 min
- Ethanol 70%
10 000×g, 4 °C, 10 min

= konečný krok všech ostatních metod

Cell-free DNA: A Neglected Source for Antibiotic Resistance Genes Spreading from WWTPs

Yan Zhang,[†] Aolin Li,[‡] Tianjiao Dai,[§] Feifei Li,^{||} Hui Xie,[‡] Lujun Chen,^{*,‡,⊥} and Donghui Wen^{*,§}

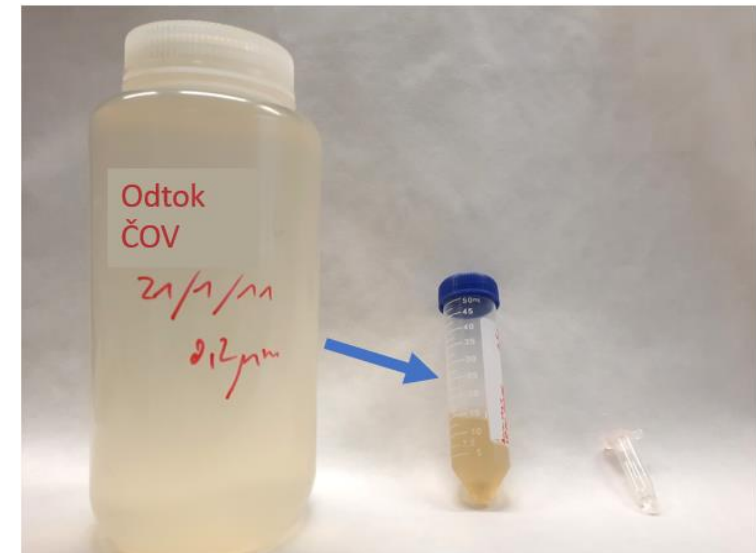
[†]Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

[‡]School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

[§]College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

^{||}School of Water Resource and Environment, China University of Geosciences, Beijing, 100083, China

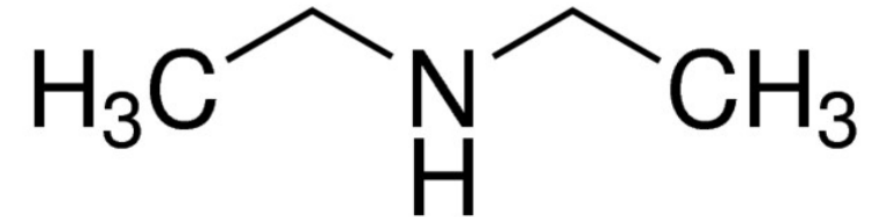
[⊥]Zhejiang Provincial Key Laboratory of Water Science and Technology, Department of Environmental Technology and Ecology, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Zhejiang Jiaxing 314050, China



Adsorpce-eluce





- Zeolity, popílek, upravený silikagel

→ DEAE kolona – nynější referenční metoda



New Results

A novel method to isolate free-floating extracellular DNA from wastewater for quantitation and metagenomic profiling of mobile genetic elements and antibiotic resistance genes

 David Calderón-Franco,  Mark C. M. van Loosdrecht,  Thomas Abeel,  David G. Weissbrodt

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.072397>



A new adsorption-elution technique for the concentration of aquatic extracellular antibiotic resistance genes from large volumes of water



Da-Ning Wang, Lu Liu, Zhi-Gang Qiu, Zhi-Qiang Shen, Xuan Guo, Dong Yang, Jing Li, Wei-li Liu, Min Jin*, Jun-Wen Li**

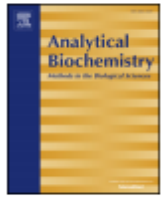
Department of Environment and Health, Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine, Key Laboratory of Risk Assessment and Control for Environment & Food Safety, Tianjin 300050, China



Odpařování

- V malých objemech
- V environmentálním kontextu zdánlivě přehlíženo

→ hlavním předmětem zájmu



Does vacuum centrifugal concentration reduce yield or quality of nucleic acids extracted from FFPE biospecimens?

Ignacio Sánchez, Fay Betsou, William Mathieson*



Extrakce rozpouštědla

- 2-butanol
- Náhrada odpařování v roce 1974

Biochimica et Biophysica Acta, 378 (1975) 18–21
© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

BBA 98179

CONCENTRATION OF DNA SOLUTIONS BY EXTRACTION WITH 2-BUTANOL

DARREL W. STAFFORD and DAVID BIEBER

Department of Zoology, University of North Carolina, Chapel Hill, N.C. 27514 (U.S.A.)

(Received August 28th, 1974)

→ odložena pro vysoké objemy butanolu



Srovnání metod

Překážky

- Časová omezení
- Okamžitá pozornost
- Chyby operátorů

Prostředky

→ pozitivní/negativní kontroly → **skutečné vzorky**

Srovnání 1

Kontaminace:

(porovnání s negativní kontrolou - dH₂O)

| | | % c _{vzorku} |
|----------------------------------|------------------|-----------------------|
| Adsorpce-eluce (Wang) | Popílkový zeolit | < 25 |
| | Silikagel | 25-125 |
| Srážení (Zhang) | | < 5 |
| Odpařování | | < 5 |
| Adsorpce-eluce (Calderón-Franco) | | < 5 |



Srovnání 2

Výtěžky DNA:

(znovuzískání z pozitivních kontrol)

Rozbité buňky

%

| | DNA koncentrát | Kultivované kolonie | Akt. kal |
|----------------------------------|----------------|---------------------|----------|
| Adsorpce-eluce (Wang) | 22 | 55 | 68 |
| Srážení (Zhang) | 16 | 41 | 53 |
| Odpařování | 6 | 60 | 93 |
| Adsorpce-eluce (Calderón-Franco) | 7 | - | - |



Srovnání 2

Výtěžky DNA:

(skutečné vzorky – odtok ČOV)

| Odtok ČOV (0,5 L) | C_{exDNA} ($\mu\text{g/L}$) Vzorek 1 |
|---|--|
| Adsorpce-eluce (Wang) | 3,3 |
| Srážení (Zhang) | 0,3 |
| Odpařování | 0,2 |
| Adsorpce-eluce (Calderón-Franco, DEAE) | 4,2 |

Nedosažitelná „prázdná“
negativní kontrola



Srovnání 2

Výtěžky DNA:

(skutečné vzorky – odtok ČOV)

| Odtok ČOV (0,5 L) | c_{exDNA} ($\mu\text{g/L}$) | |
|---|--|----------|
| | Vzorek 1 | Vzorek 2 |
| Adsorpce-eluce (Wang) | 3,3 | - |
| Srážení (Zhang) | 0,3 | 0,02 |
| Odpařování | 0,2 | 0,48 |
| Adsorpce-eluce (Calderón-Franco, DEAE) | 4,2 | 0,33 |

Vysoké objemy při centrifugaci, obtížná práce s peletou

Průběžné výsledky a úvahy

× adsorpce-eluce (Wang) → kontaminace

× srážení (Zhang) → nadměrné objemy

× extrakce rozpouštědla (Stafford) → materiálové náklady

Pouze metoda odpařování nyní dosahuje účinnosti
DEAE sorpce ve skutečných vzorcích



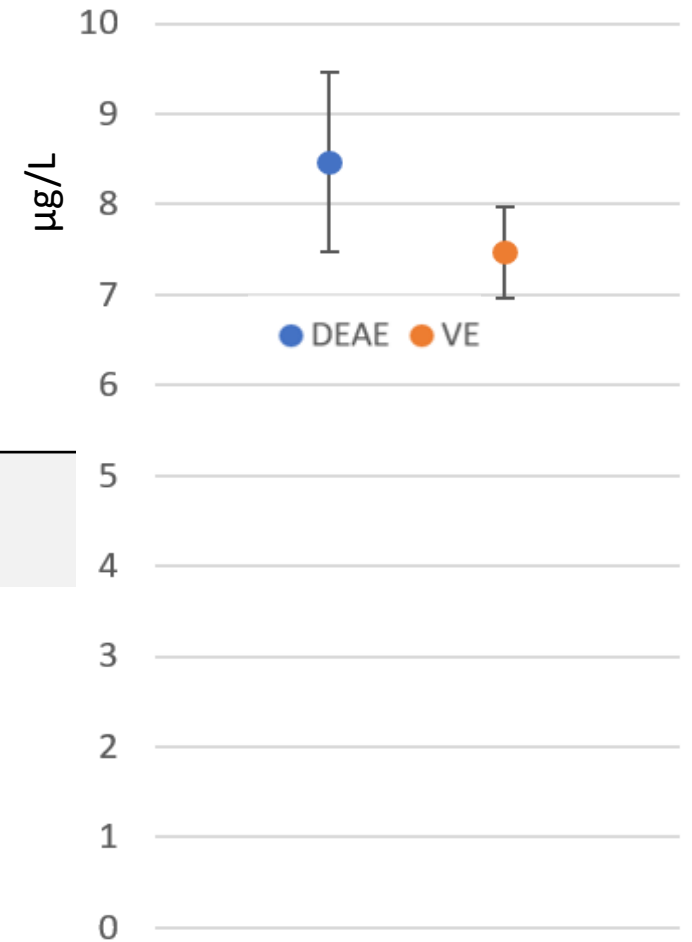
Srovnání 3

Odpařování × DEAE sorpce



výtěžky exDNA

| Odtok ČOV (0,5 L) 2021/01/11 | C_{exDNA} ($\mu\text{g/L}$) | RSD (%) |
|-------------------------------------|--|---------|
| Odpařování | 7,47 | 6,74 |
| Adsorpce-eluce (Calderón-Franco) | 8,47 | 11,65 |



Srovnání 3

Odpařování × DEAE sorpce

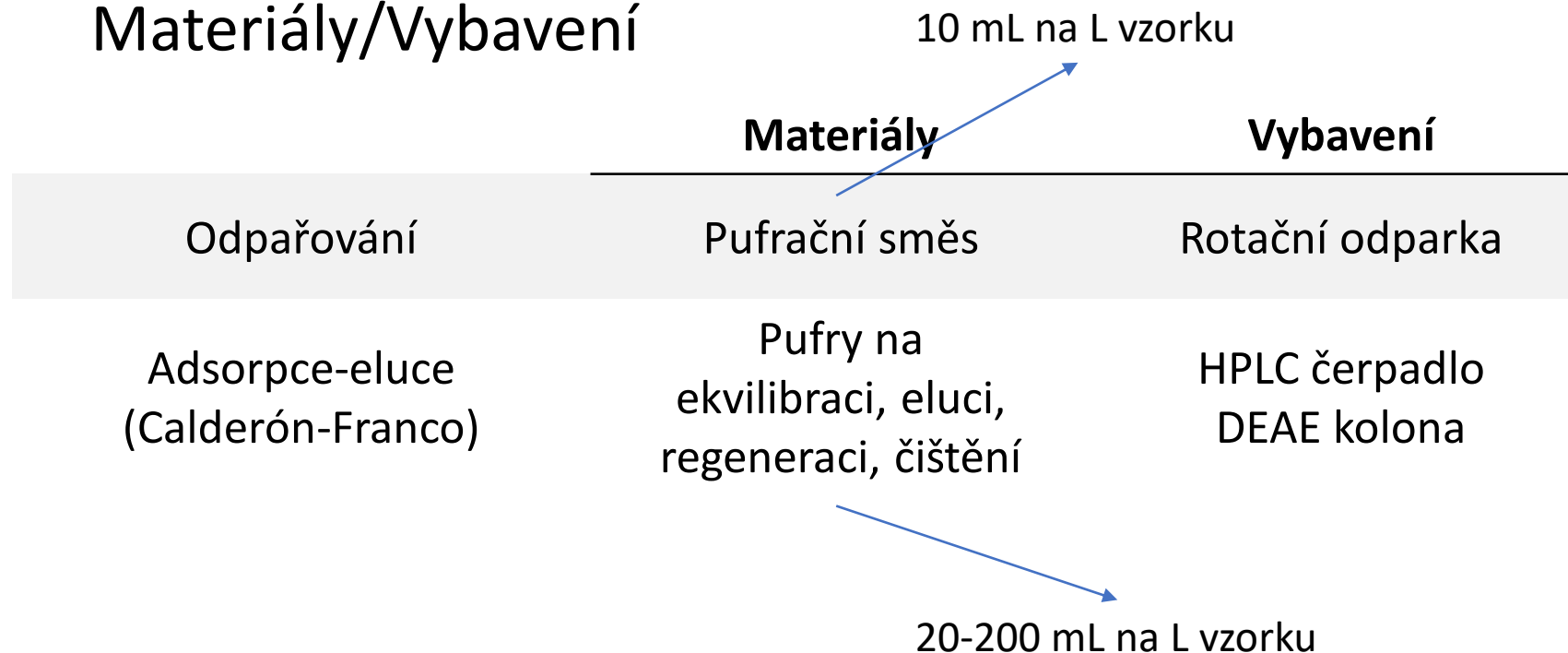
Časová náročnost

| 0,5L vzorek | Analýza (min) | Údržba (min) |
|-------------------------------------|---------------|--------------|
| Odpařování | 45-50 | < 5 |
| Adsorpce-eluce (Calderón-Franco) | > 60 | > 30 |

Srovnání 3

Odpařování × DEAE sorpce

Materiály/Vybavení



Nynější výsledky

Odpařování × DEAE sorpce

Odpařování je přibližně o 50 % rychlejší a vyžaduje jen zlomek materiálů potřebných pro DEAE sorpci

Obě metody dosahují porovnatelných výtěžků exDNA ze vzorků odtoků ČOV



Obzory

Stupně volnosti při zpracování (ex)DNA

- Vzorkování (místo, čas, frekvence)
- Předúprava vzorku (podmínky, čas skladování)
- Separace inDNA/exDNA (centrifugace, materiál membrán)
- DNA purifikace (srovnání kitů, enzymy)
- Kvalita získané DNA (délka segmentů, biodegradabilita)



Poděkování

Příspěvky

D. Vejmelková, L. Kejla, V. Kouba, K. Časarová, C. Bachmannová
a další

Příležitosti

REPARES, MICROGENEL

Grafika

Všechny uvedené obrázky byly vytvořeny prostřednictvím *BioRender*



Pokračování srovnání 3 Odpařování × DEAE sorpce

- **fragmentace DNA**
- **PCR inhibice**
- **sledování specifických ARG**



Cost analysis

Adsorption-elution

sorbent

silica gel

€5

fly ash

waste

DEAE

buffers

< €1

< €1

antisolvent (25mL IPA/EtOH)

< €1

< €1

< €1

vacuum pump

20min

20min

centrifugation

60min

60min

Precipitation

antisolvent (> 500mL IPA/EtOH)

> €2

centrifugation

60min

Solvent extraction

2-butanol (> 2L)

> €20

Vacuum evaporation

vacuum pump

€1,000

antisolvent (25mL IPA/EtOH)

< €1

Purification (PowerSoil)

sample

€7

