MUNI
PHARM

# 1. Izolace a purifikace nukleových kyselin

## Klíčový krok pro další práci s DNA a RNA

Metody molekulární biologie pro farmaceuty

Doc. RNDr. Jan Hošek, Ph.D.
hosek@mail.muni.cz

Ústav molekulární farmacie
FaF MU

# Užitečné odkazy

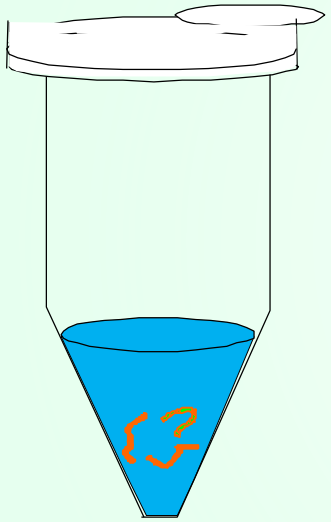
- BioTechniques
  - The International journal of Life Science Methods
  - http://www.biotechniques.com/
- Reseach Gate
  - http://www.researchgate.net/
- BitesizeBio
  - Brainfood for biolologists
  - http://bitesizebio.com/
- Journal of Visualized Experiments (JoVE)
  - http://www.jove.com/

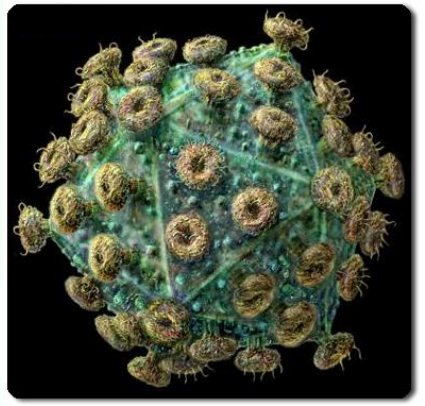
MUNI PHARM

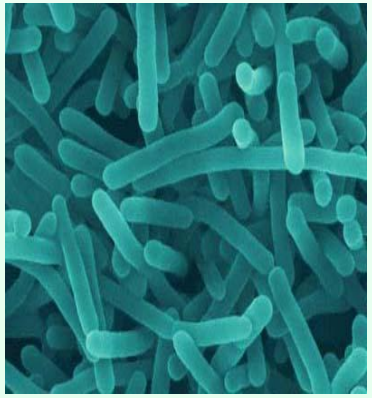
# Cíl izolace a purifikace NA

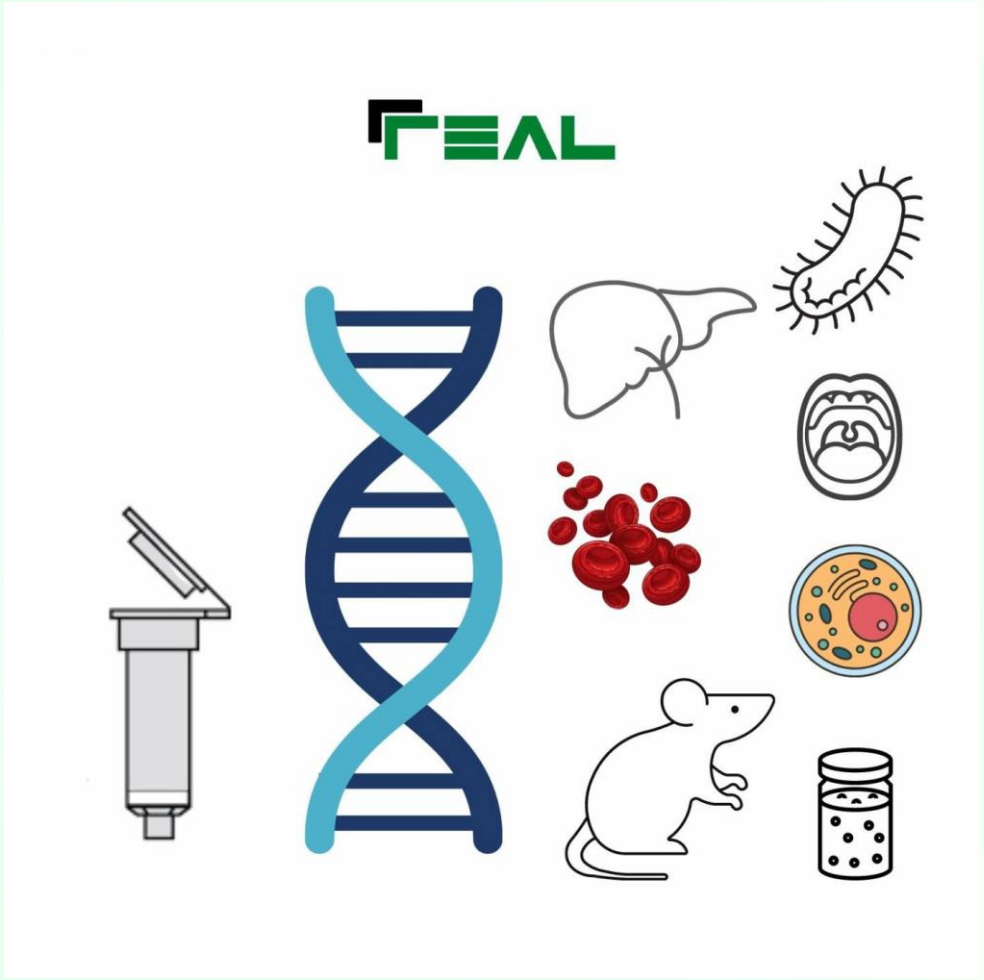
**Získat NA v nativním stavu z přirozeného materiálu v dostatečném množství a čistotě pro další analýzy**

MUNI PHARM










MUNI
PHARM

# Obecný postup izolace NA

?

Lyze buněk a tkání

Extrakce NA

Purifikace NA

Charaktrizace získané NA

MUNI PHARM

# Lyze buněk a tkání - uvolnění vnitřního obsahu buněk

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

- **<u>Biologická lyze</u>**

  především využití degradačních enzymů (lysozym, proteináza K, celuláza…)

- **<u>Chemická lyze</u>**

  využití detergentů (např. laurylsíran sodný), chelatačních činidel (např. EDTA), guanidiových solí

- **<u>Fyzikální lyze</u>**

  použití varu, mražení, sonikace, drcení

**Většinou kombinace více přístupů**

MUNI PHARM

# Lyze buněk a tkání - uvolnění vnitřního obsahu buněk

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

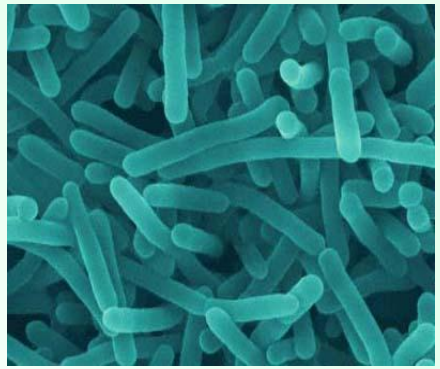
↓

**Charaktrizace získané NA**

Homogenizace mletím

Proteináza K
Lysozym

Detergenty



Lyze varem

Sonikace

Mražení tekutým dusíkem

Homogenizace drcením

Celuláza

Detergenty

MUNI PHARM

# Stav materiálu po lyzi buněk

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

**Komplexní směs**

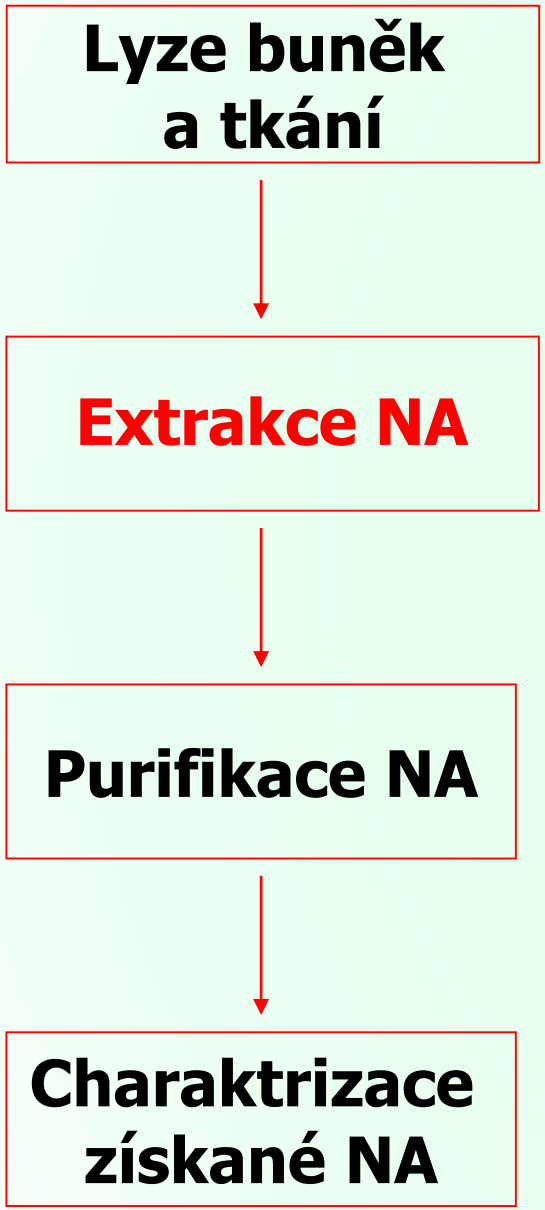
**DNA**, **RNA**, **lipidů**, **proteinů**,
sacharidů, uhlovodíků
a dalších nízkomolekulárních látek

**Další postup:**

oddělit DNA, případně RNA
od ostatních složek směsi

MUNI PHARM

# Extrakce




Extrakce je čistící a dělící operace, při které přechází složka ze směsi látek v kapalné či tuhé fázi do jiné kapalné fáze - rozpouštědla.

Extrakce je velmi výhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět i za laboratorní teploty nebo za chladu.



MUNI PHARM

# Extrakce směsí fenol - chloroform

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

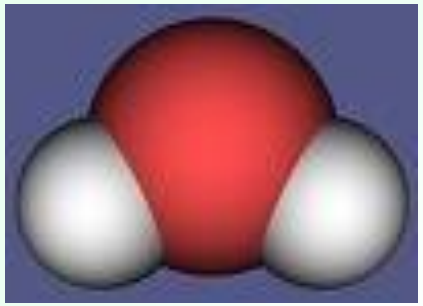
↓

**Purifikace NA**

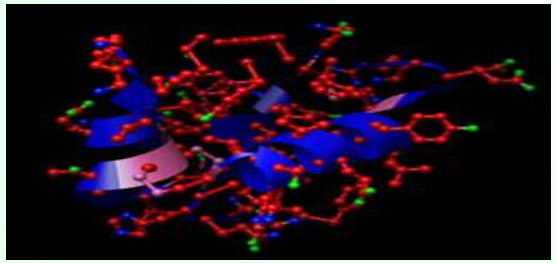
↓

**Charaktrizace získané NA**

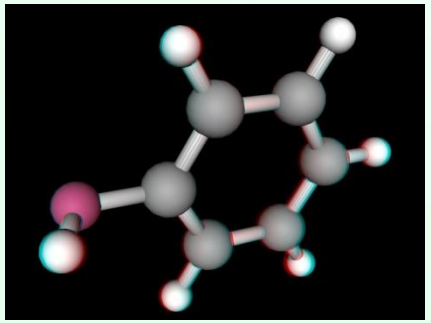
## Separace proteinů a NA založená na



lehké vodné



denaturaci proteinů na rozhraní

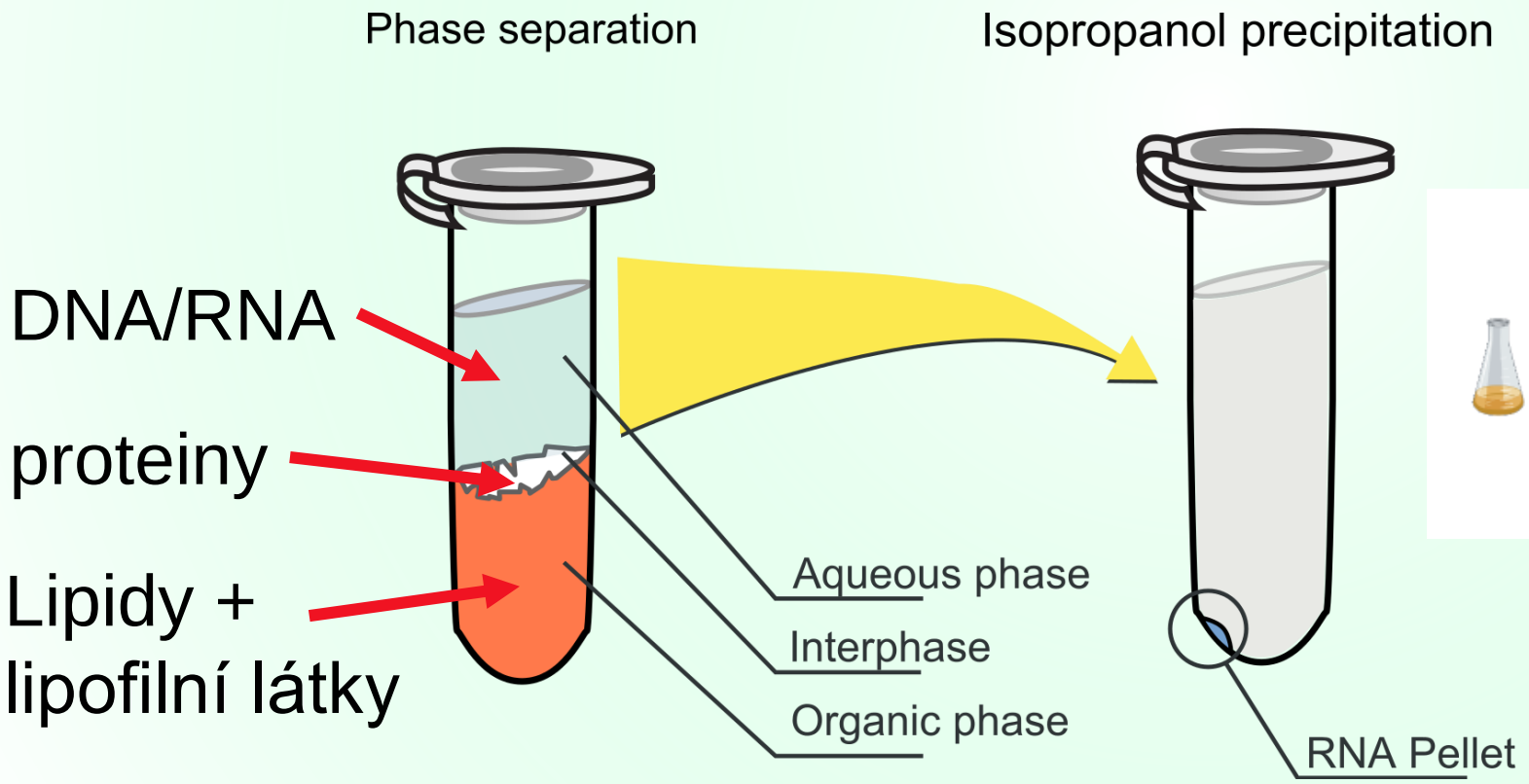


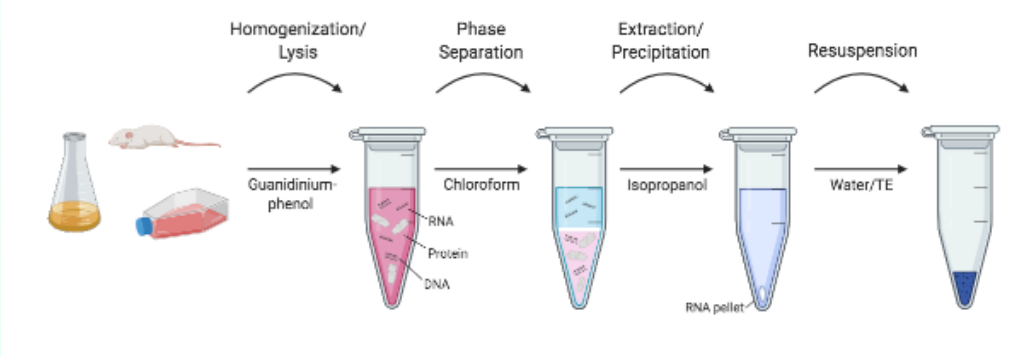
těžší organické fáze

MUNI PHARM

# Obecný postup extrakce fenolem

1) Rozrušení buněčných stěn
2) Denaturace proteinů a tuků – fenol, chloroform
3) Oddělení fází centrifugací – vrstva organická (fenol), mezifáze (proteiny a zbytky buněk), vodná (NA)

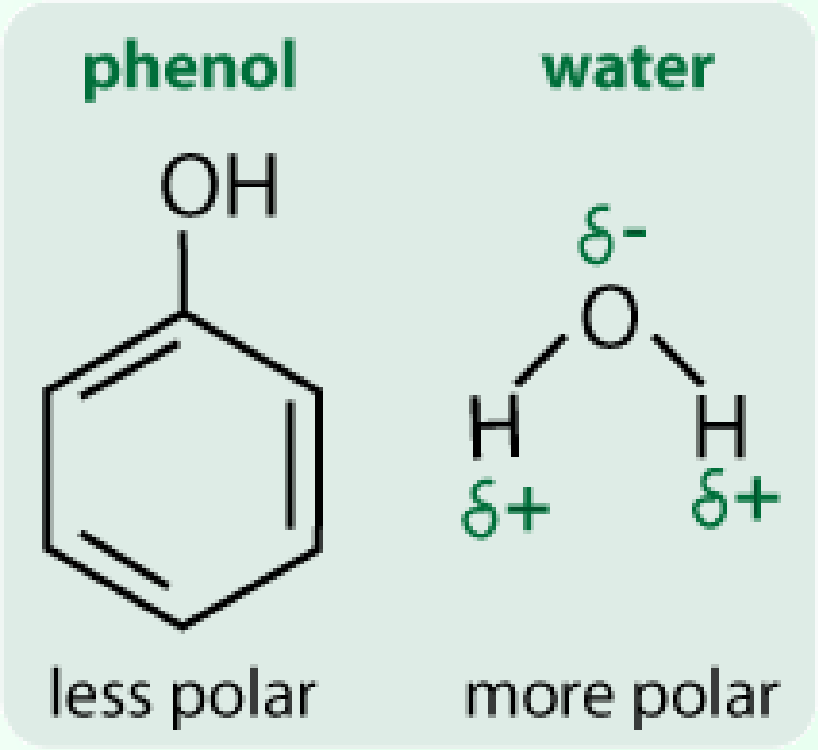


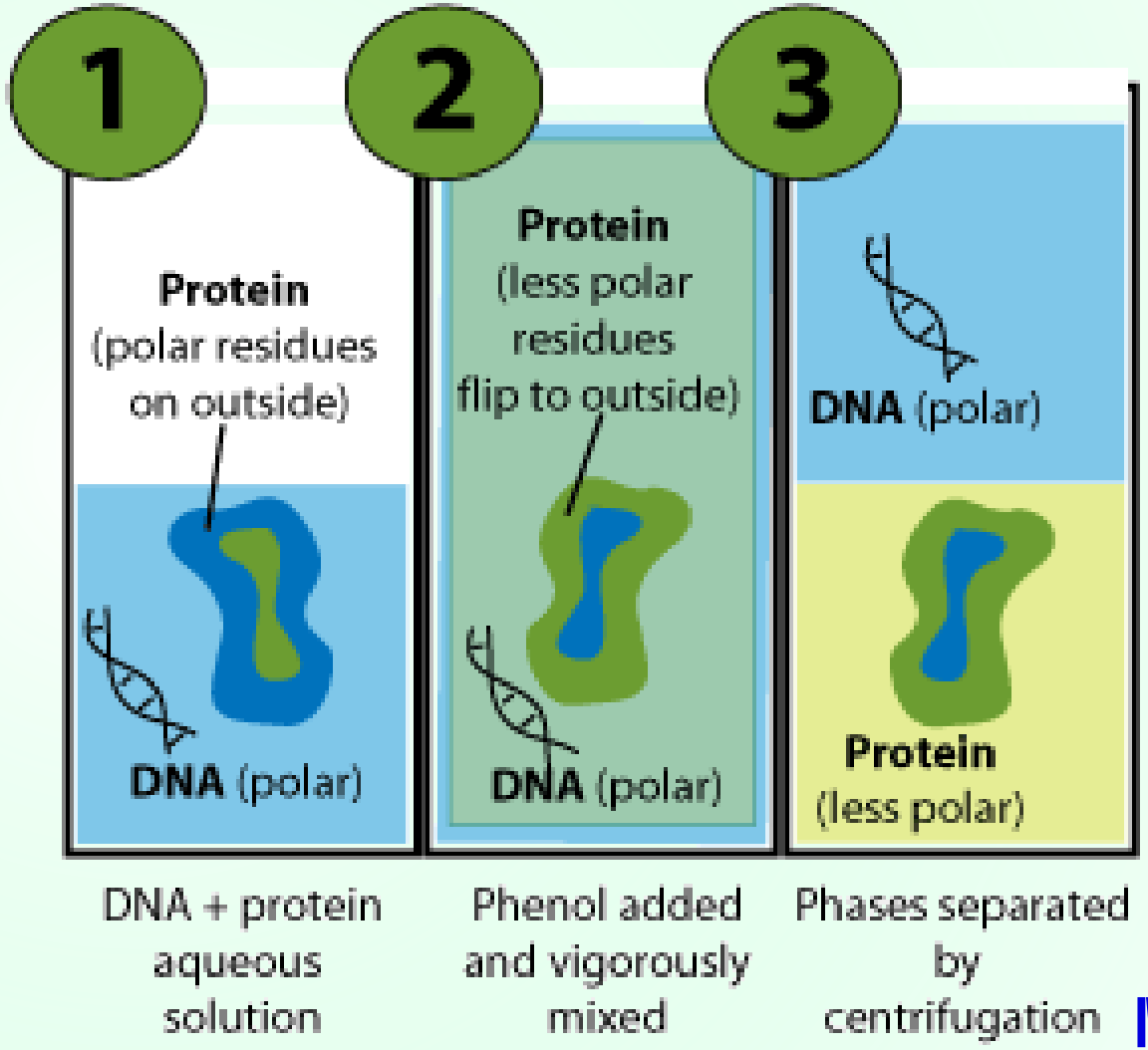




https://blog.addgene.org/rna-extraction-without-a-kit

MUNI PHARM

# Princip fenolové extrakce



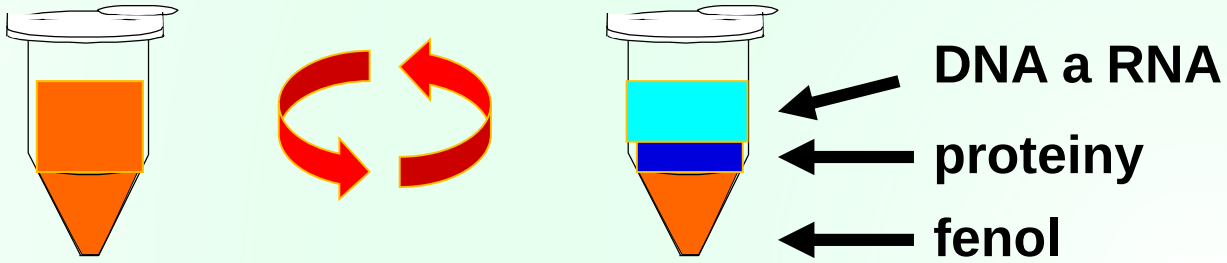




http://bitesizebio.com/

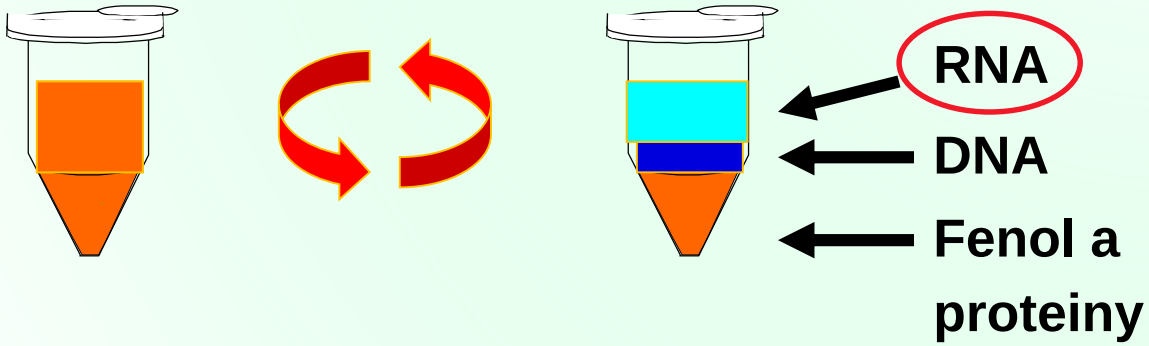
MUNI PHARM

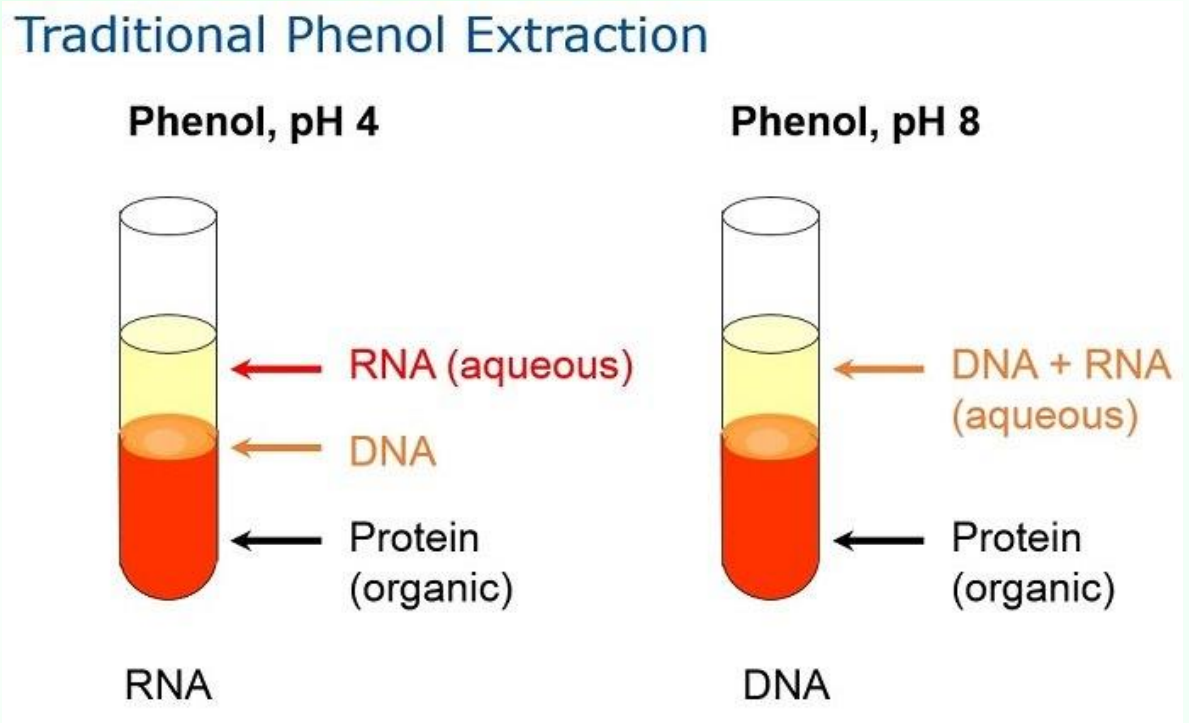
# Modifikace fenolové extrakce

## Fenol ekvilibrovaný neutrálním, nebo alkalickým pufrem

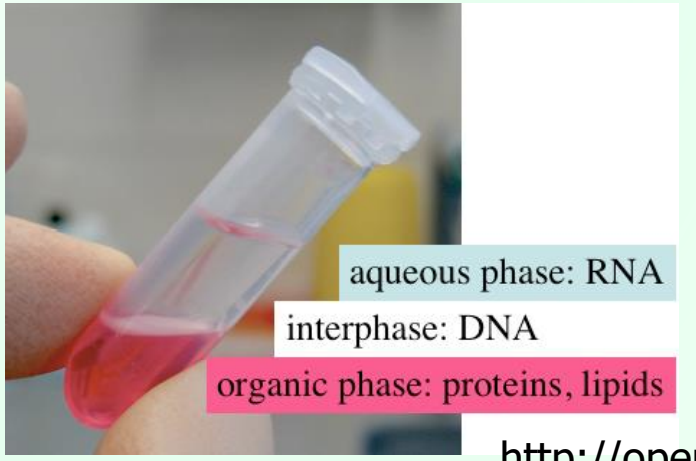



## Použití kyselého fenolu



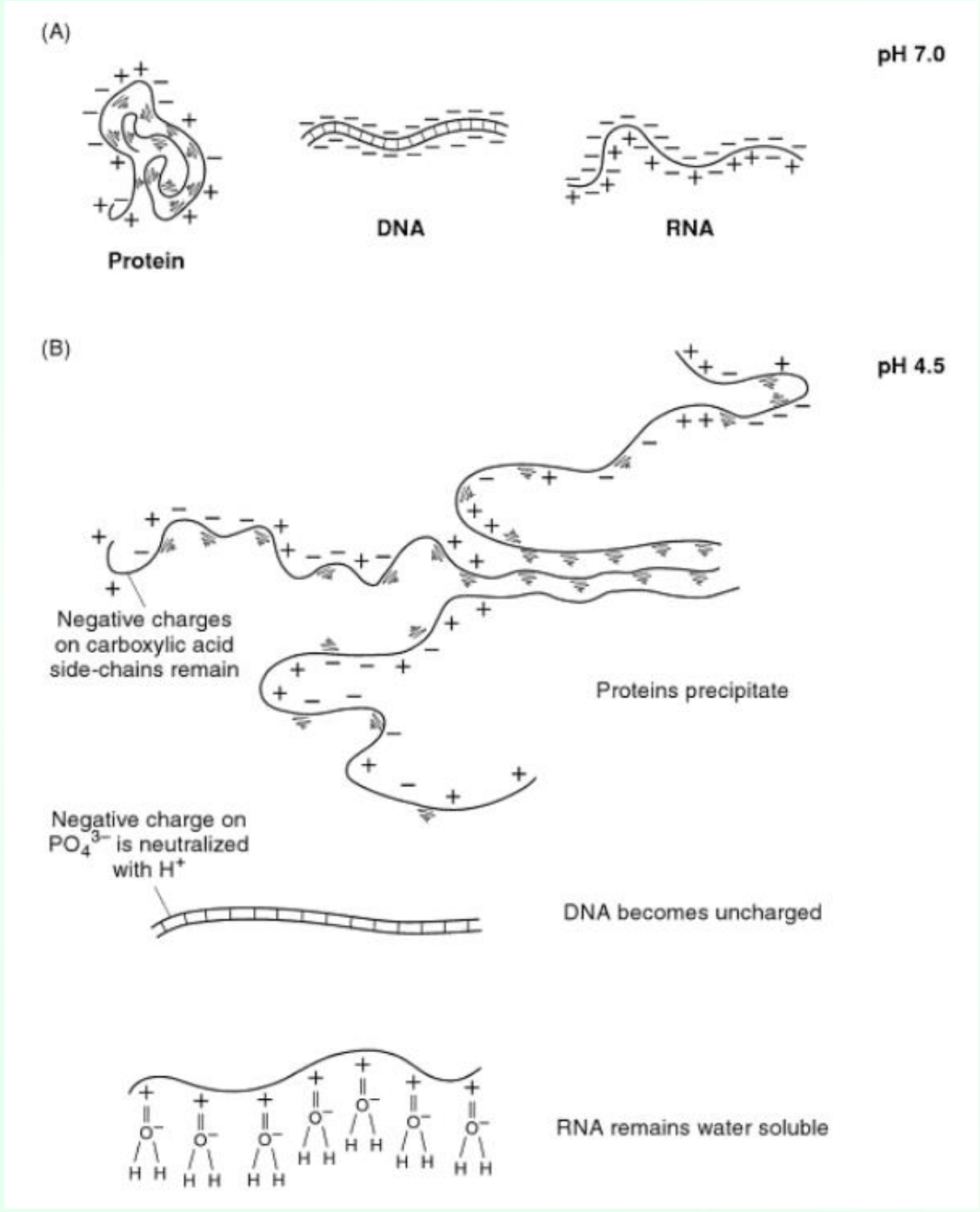

https://www.genetargetsolutions.com.au/product/5prime-phase-lock-gel/




http://openwetware.org/

MUNI PHARM

# Účinek kyselého fenolu




P. Zumbo, WEILL CORNELL MEDICAL COLLEGE

MUNI PHARM

# Stav materiálu po extrakci

**Lyze buněk a tkání**

↓

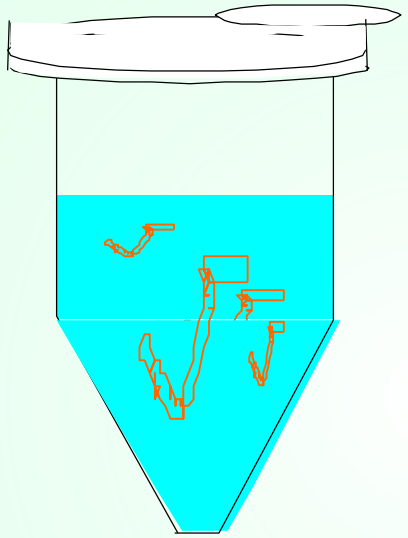
**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**



Silně zředěná DNA, RNA

Stopy chloroformu

Stopy fenolu

**<u>Další postup:</u>**

Zakoncentrování a purifikace NA

MUNI PHARM

# Purifikace NA precipitací

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

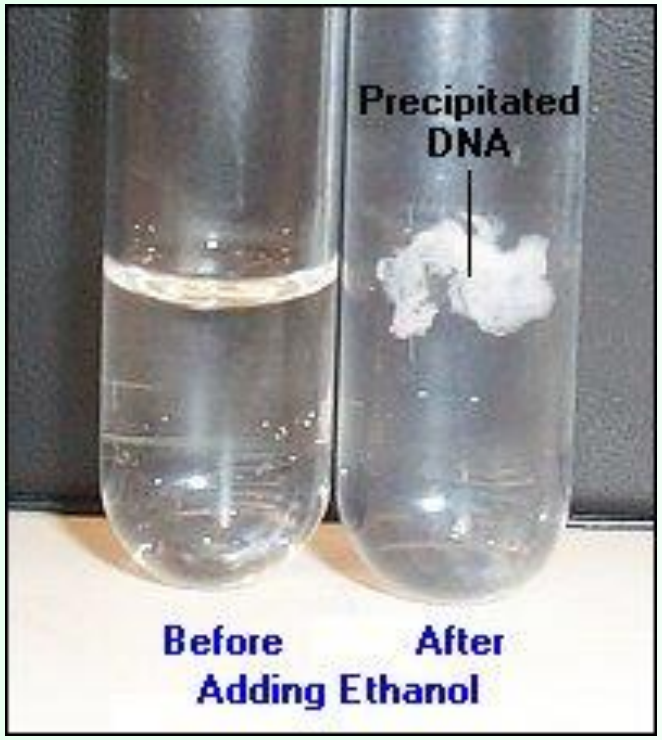
↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

Sráţení, jedna ze základních metod izolace a koncentrace biologických makromolekul. Do roztoku, obsahujícího požadovanou makromolekulu, se přidá určité množství precipitačního činidla (síran amonný, ethanol, aceton apod.); makromolekulární sloučenina se vysráží, aniž obvykle dojde k denaturaci. Může se proto následně znovu rozpustit a použít ve své nativní, biologicky aktivní podobě.




http://www.vivo.colostate.edu

MUNI PHARM

# Obecný postup precipitace ethanolem

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

1) Přidání ethanolu, případně izopropanolu

2) Přidání jednomocných kationtů ($K^+$, $Na^+$...)

3) Koncentrování vzorku centrifugací (roztok zchlazený na -70ºC)

4) Promytí sedimentu NA **70% ethanolem**

5) Rozpuštění NA ve vodě

MUNI PHARM

# Rozpustnost DNA ve vodě

Lyze buněk a tkání

↓

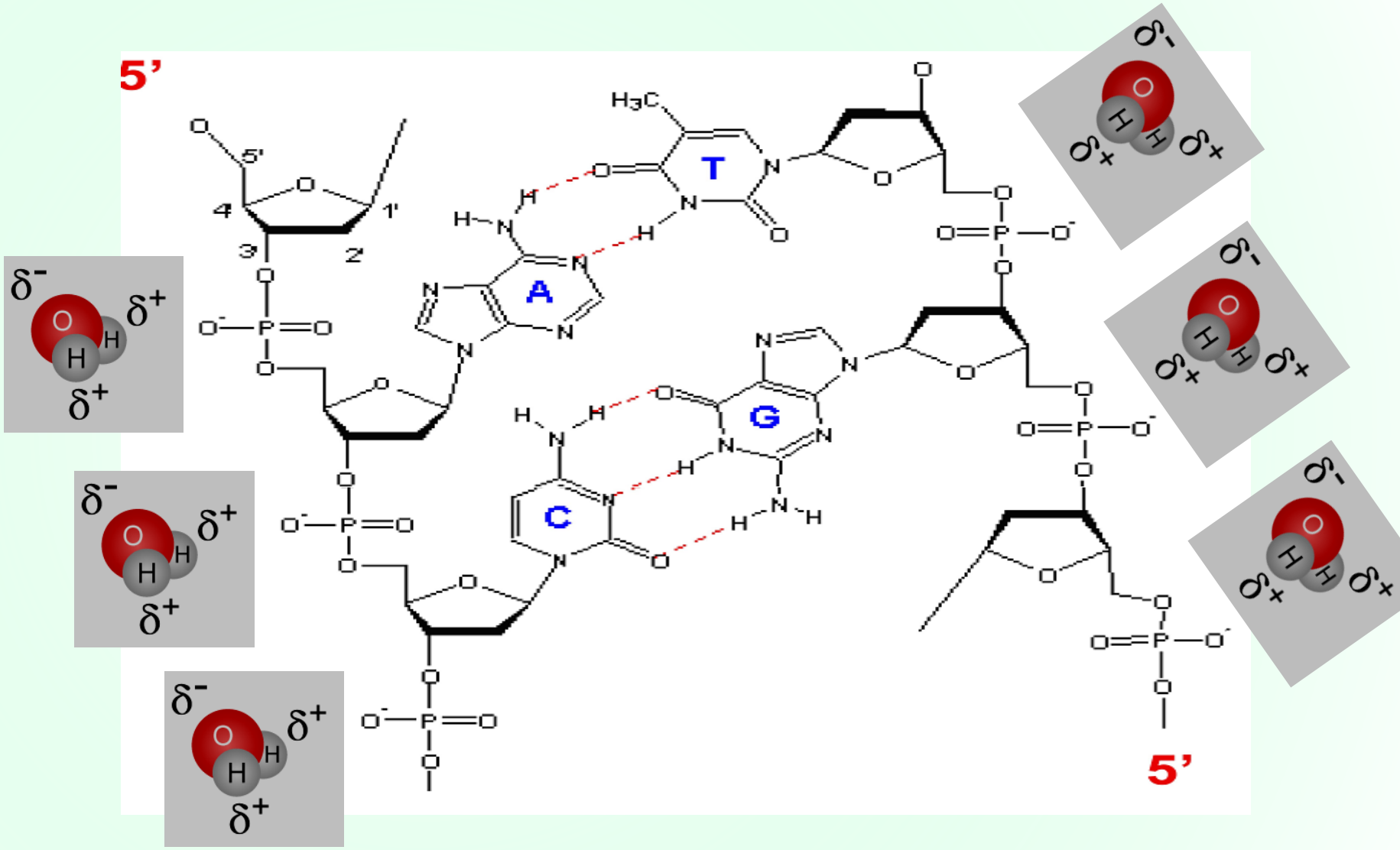
**Extrakce NA**

↓

Purifikace NA

↓

Charaktrizace získané NA




**DNA JE HYDROFILNÍ**

MUNI PHARM

# Obecný postup precipitace ethanolem – Přidání NaCl + $C_2H_5OH$

**Lyze buněk a tkání**

↓

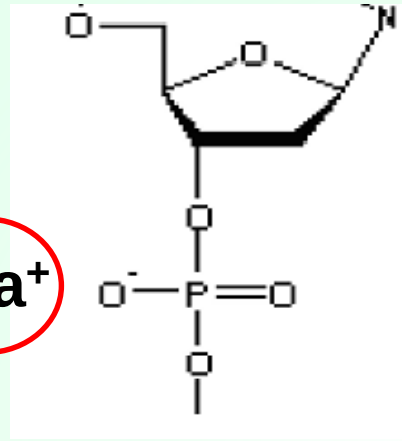
**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**




→ Snížení hydrofility DNA

↓

**VYSRÁŽENÍ DNA ve vodném prostředí**

Neutralizace $PO^{3-}$

↑ **$Na^+$**

← **$C_2H_5OH$**

Nízká dielektrická konstanta

**$Cl^-$** ← **NaCl**

MUNI PHARM

# Obecný postup precipitace - DOKONČENÍ

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

3) Koncentrování vzorku centrifugací (roztok zchlazený na -70ºC)

4) Promytí sedimentu NA od zbytků solí 70% ethanolem a odpaření ethanolu teplem

5) Rozpuštění NA ve vodě (přídavek EDTA, případně Tris-HCl)

**Nativní NA koncentrovaná v malém objemu vodného roztoku**

MUNI PHARM

# Purifikace NA chromatografií

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

- Konkrétně se jedná o preparativní, afinitní sloupcovou chromatografii
- Kolona obsahuje sorbent (matrici) schopnou specificky vázat zvolenou látku (NA)
- Je používána pro přípravu většího množství čistých molekul

MUNI PHARM

# Purifikace NA chromatografií

**Lyze buněk a tkání**

↓

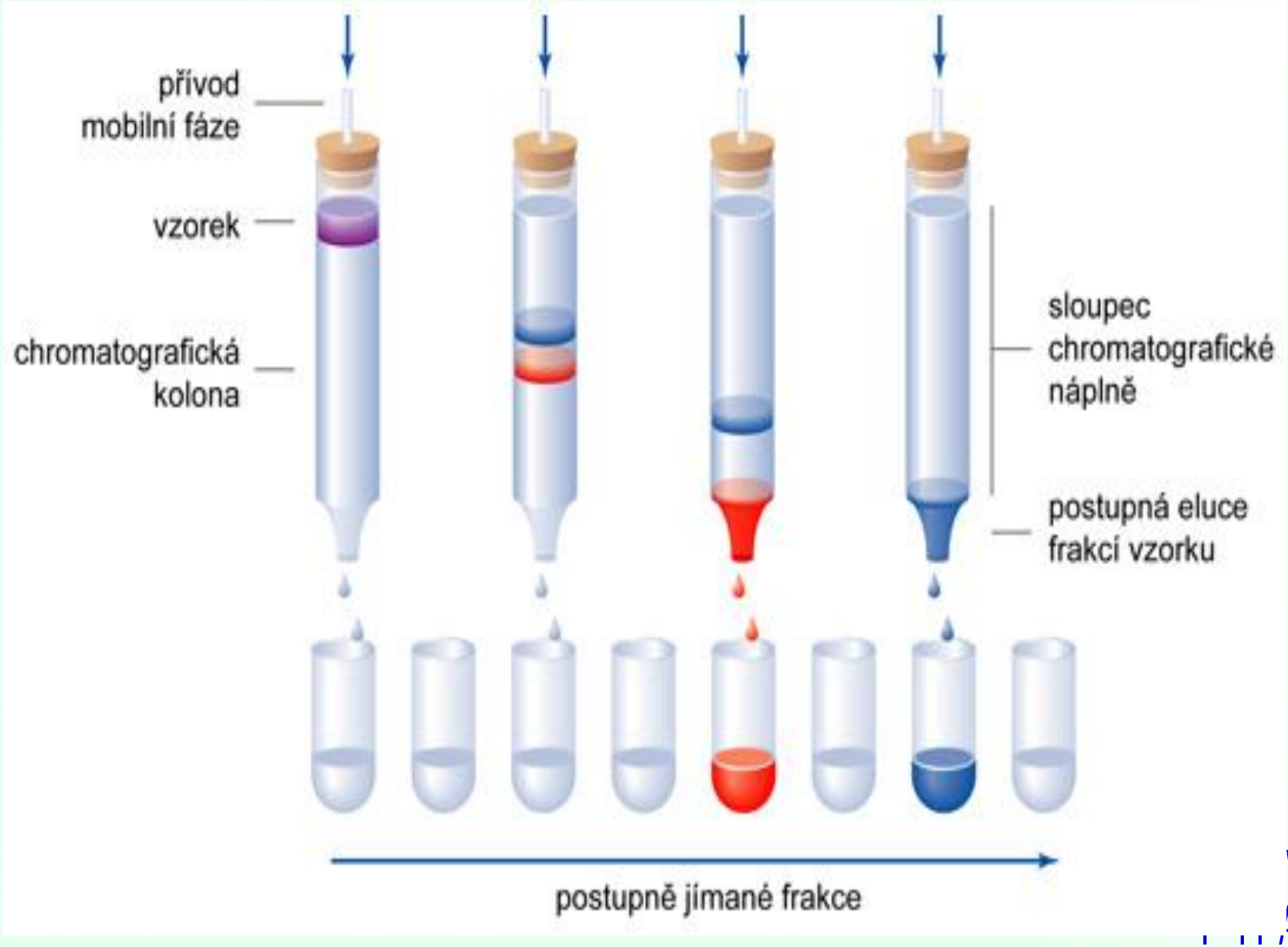
**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**



# Komerční chromatografie pro izolaci NA
# - spin columns -

**Lyze buněk a tkání**

↓

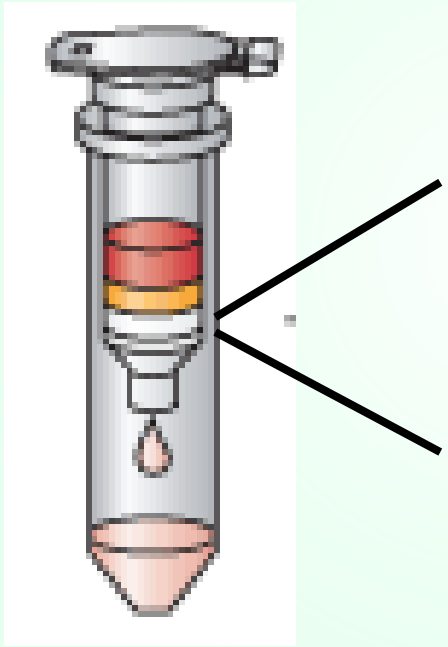
**Extrakce NA**

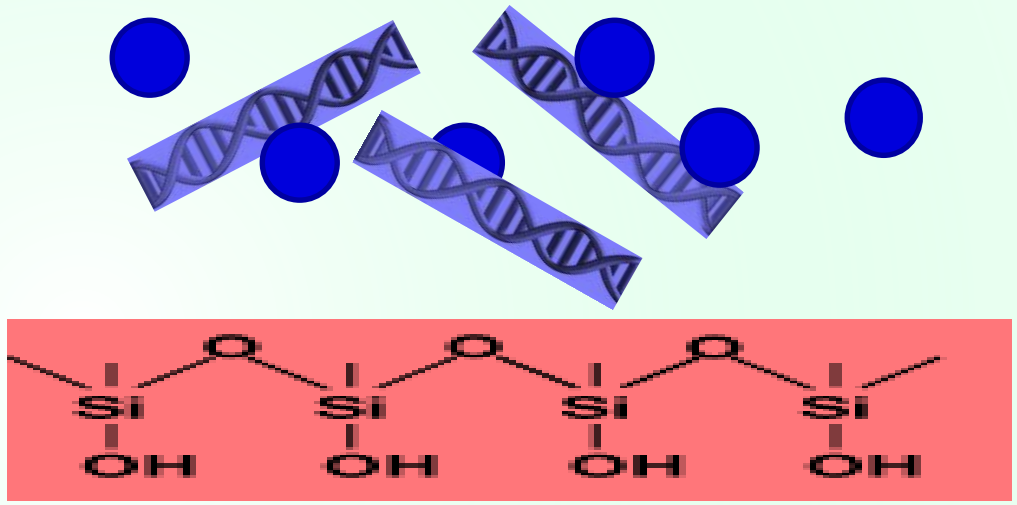
↓

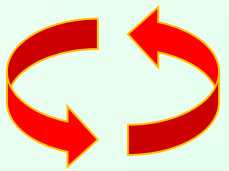
**Purifikace NA**

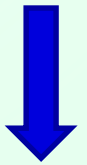
↓

**Charaktrizace získané NA**









MUNI PHARM

# Komerční chromatografie pro izolaci NA
# - spin columns -

**Lyze buněk a tkání**

↓

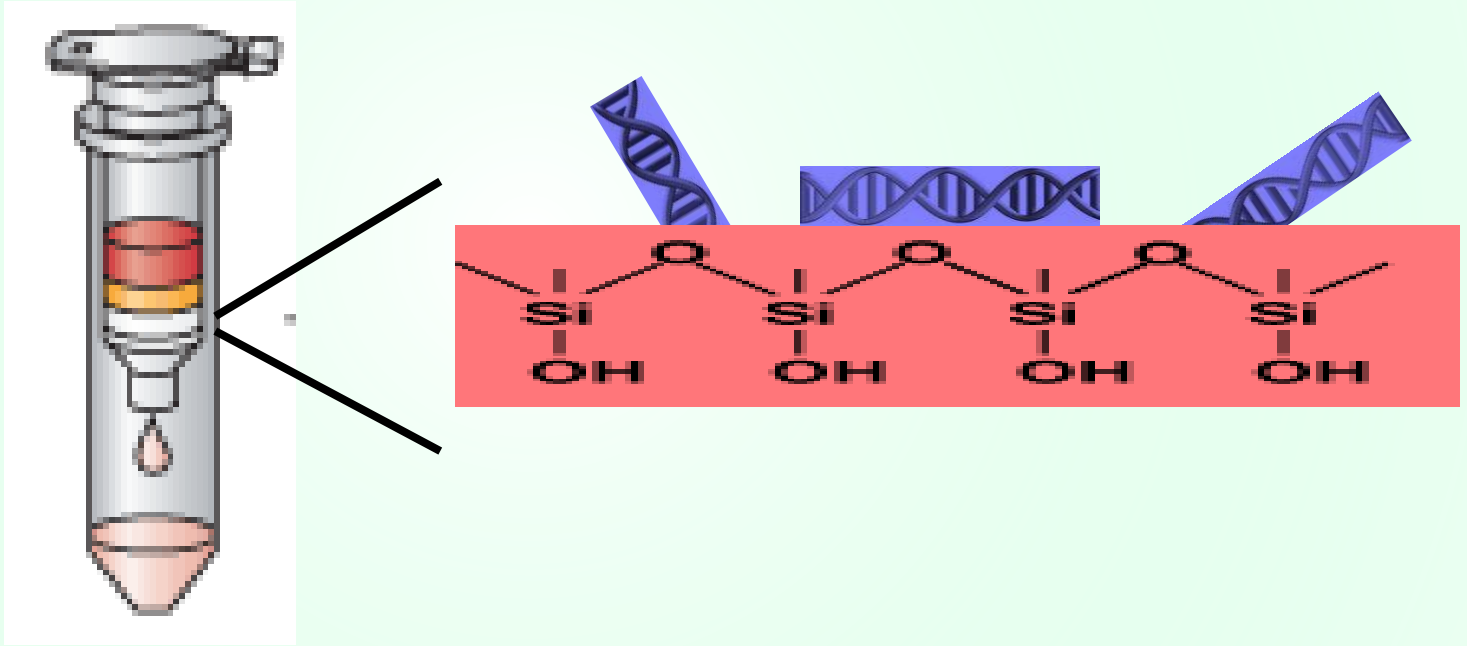
**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

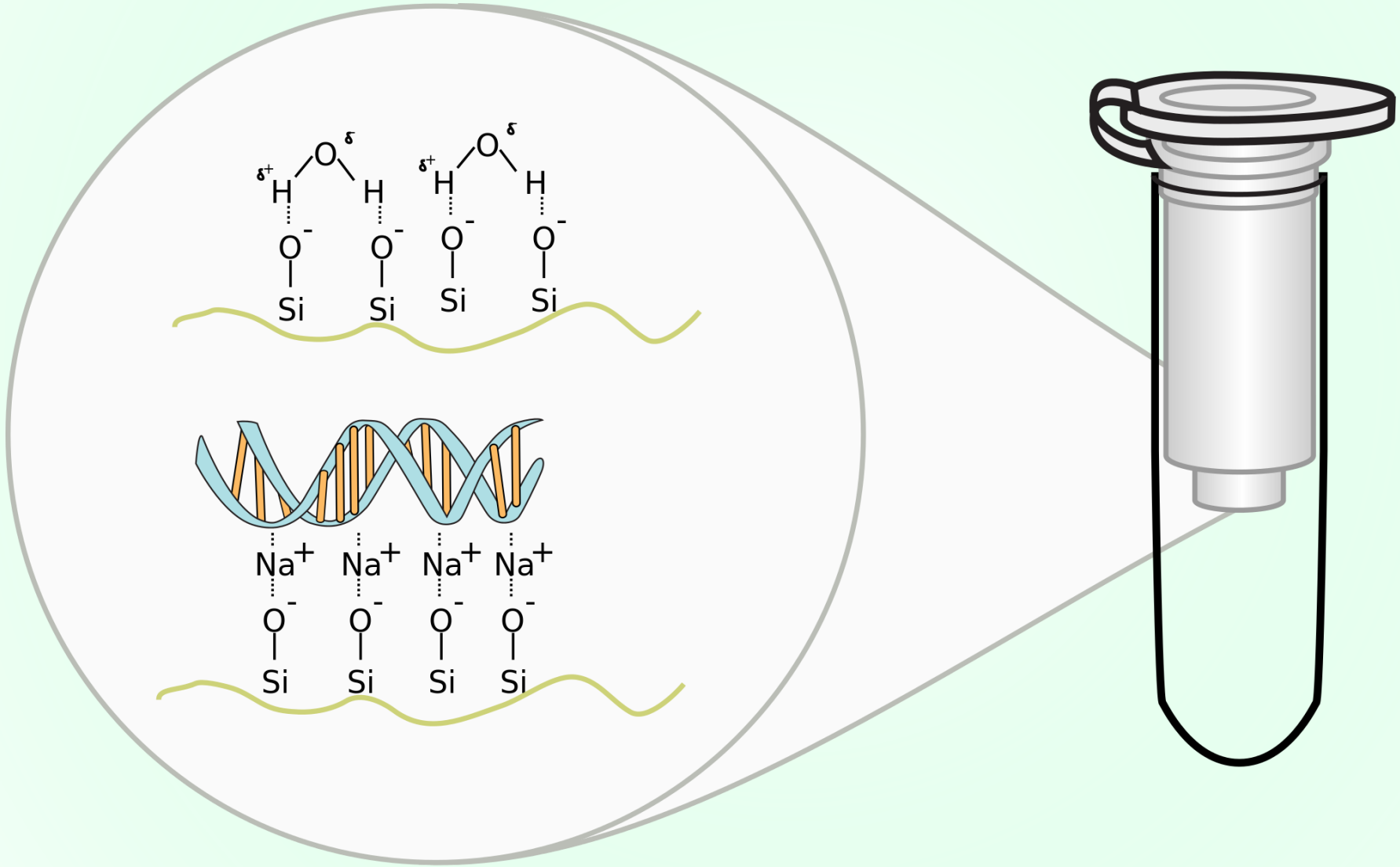
↓

**Charaktrizace získané NA**




MUNI PHARM

# Jak se DNA váže na membránu




en.wikipedia.org

MUNI PHARM

# Komerční chromatografie pro izolaci NA
# - spin columns -

**Lyze buněk a tkání**

↓

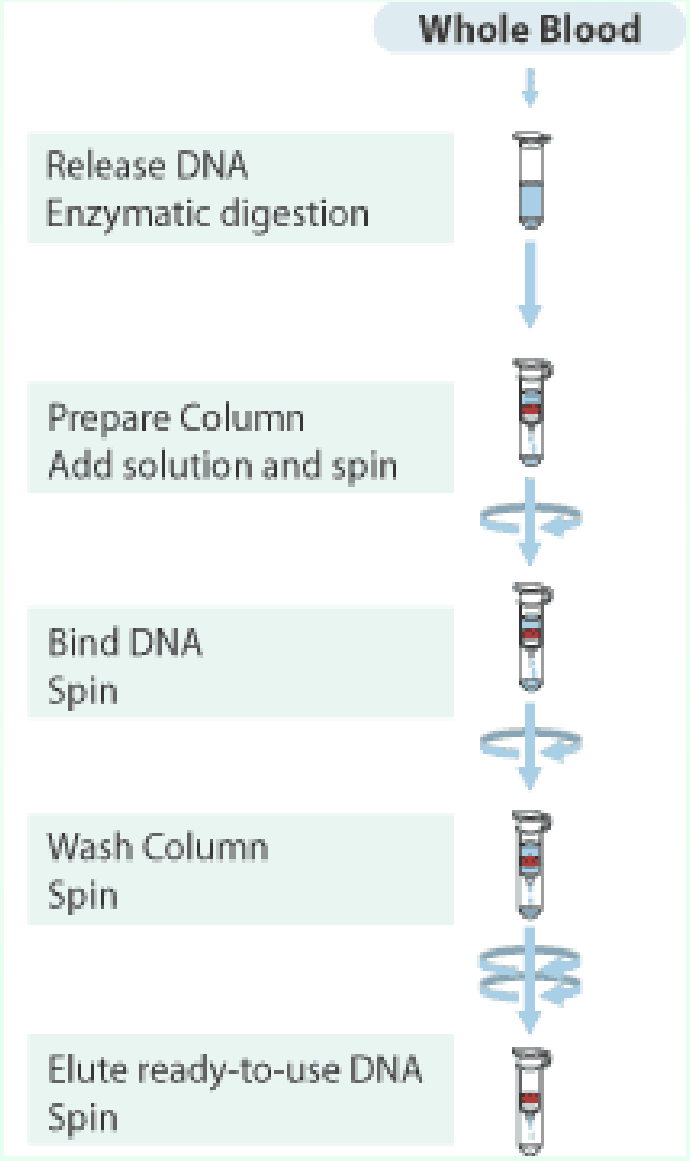
**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

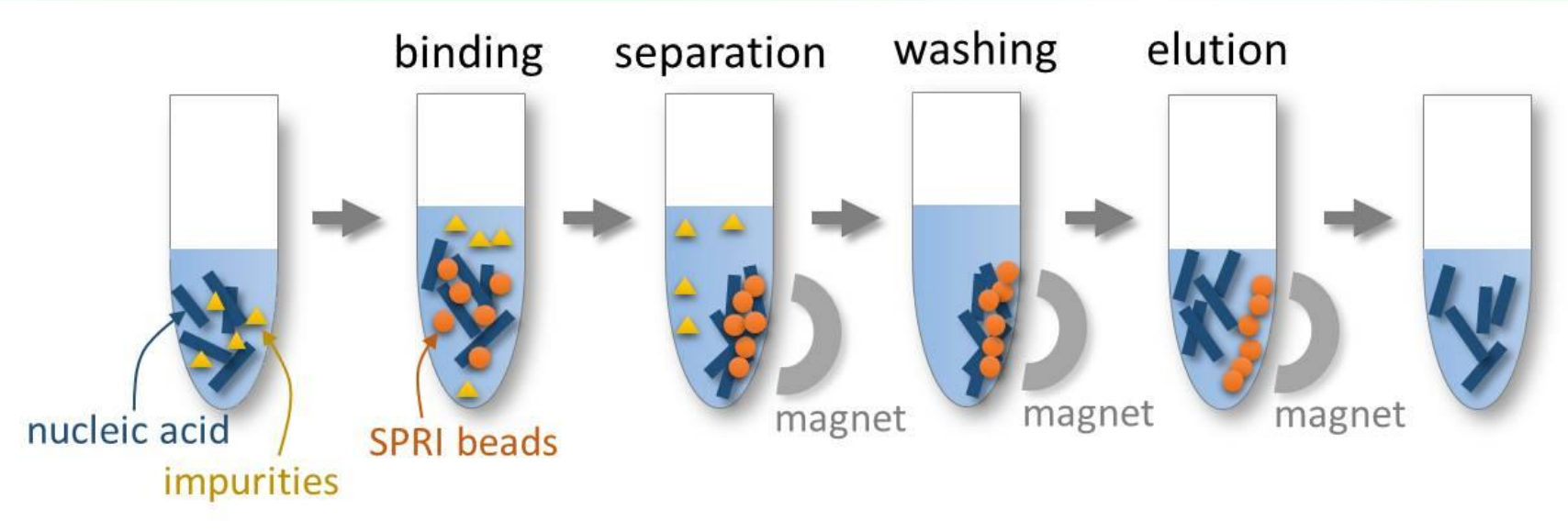
**Charaktrizace získané NA**




MUNI PHARM

# Izolace DNA magnetickými kuličkami

- DNA se váže na povrch magnetických kuliček
- Povrch kuliček může být potažen:
  - Iontoměničovým polymerem polymerem, např. diethylaminoethyl (DEAE)
  - Silica

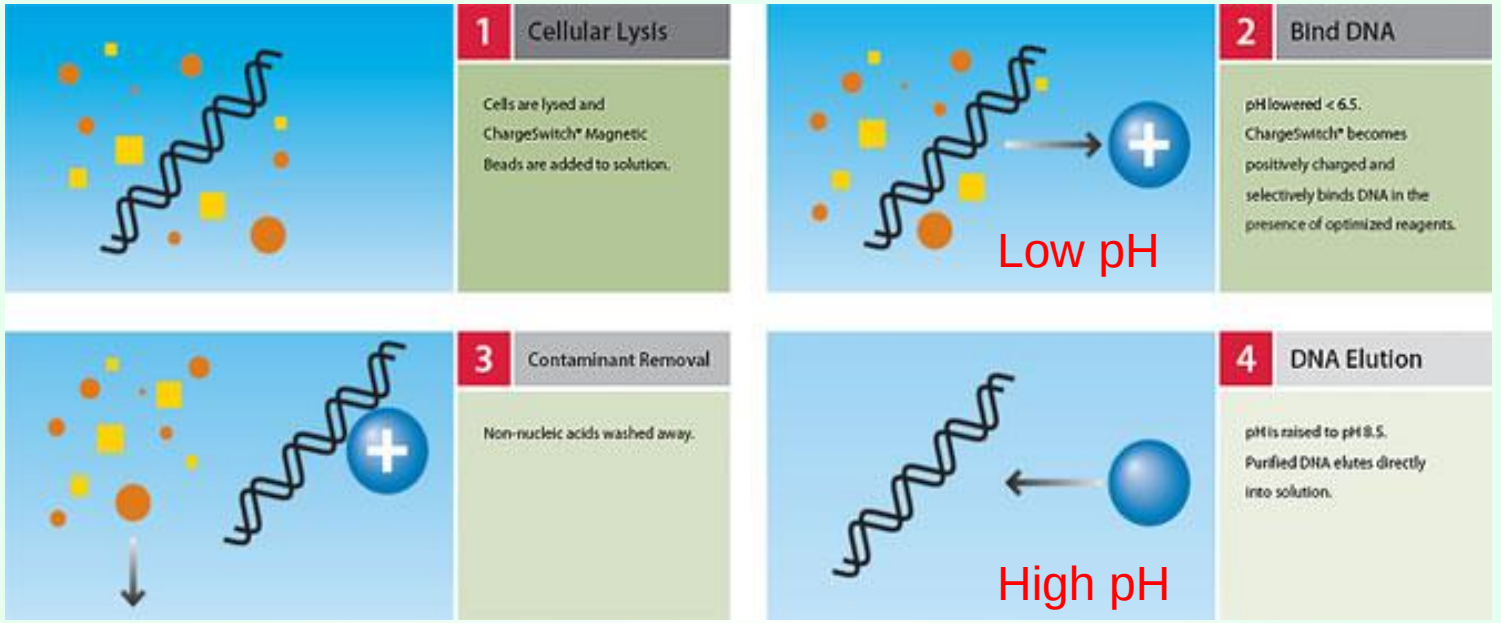



https://nucleusbiotech.com/produkt-kategorie/ngs/magnetic-beads-for-dna-and-rna-purification/

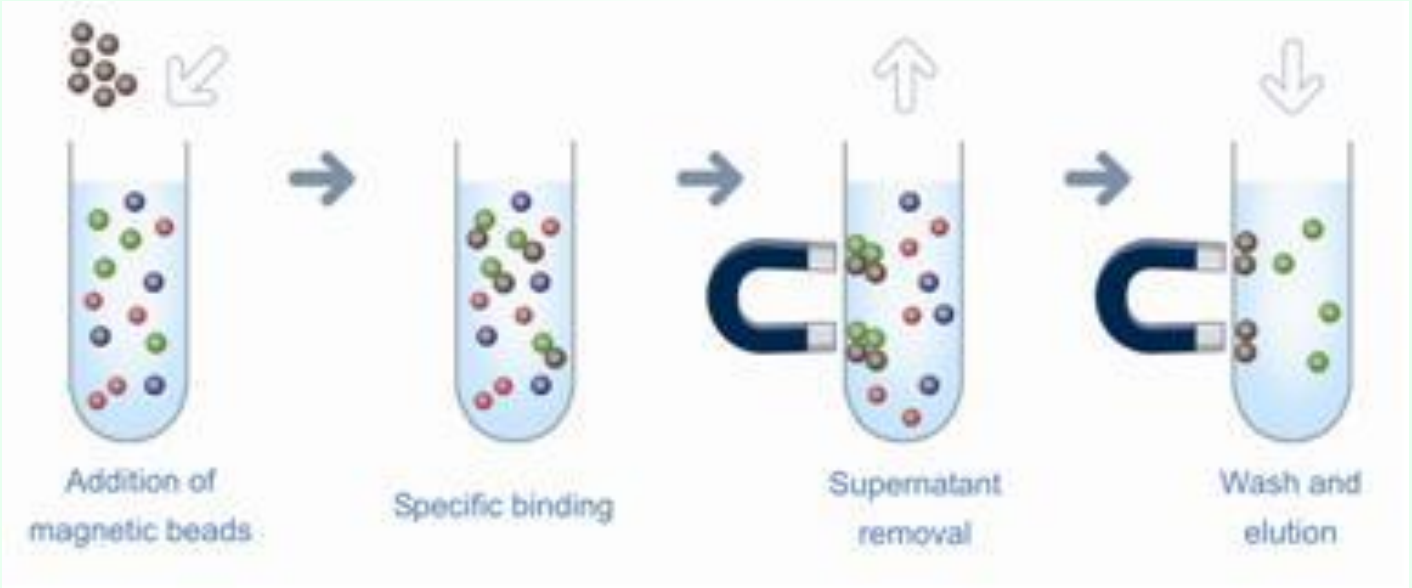
http://www.diagenode.com/

MUNI PHARM

# Magnetické kuličky - protokol




http://bitesizebio.s3.amazonaws.com/




http://blog.labplanet.com/

MUNI PHARM

# Izolace plasmidů alkalickou denaturací

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

- Jedna z metod pro oddělení plasmidů od chromozomové DNA v extraktech bakteriálních buněk
- Využívá rozdílné afinity DNA řetězců k denaturaci za vysokého pH v závislosti na jejich konformaci a stavu
- Pro izolaci plasmidů je možno použít komerční „spin column“ izolační postupy

MUNI PHARM

# Izolace plasmidů alkalickou denaturací
# - princip metody -

**Lyze buněk a tkání**

↓

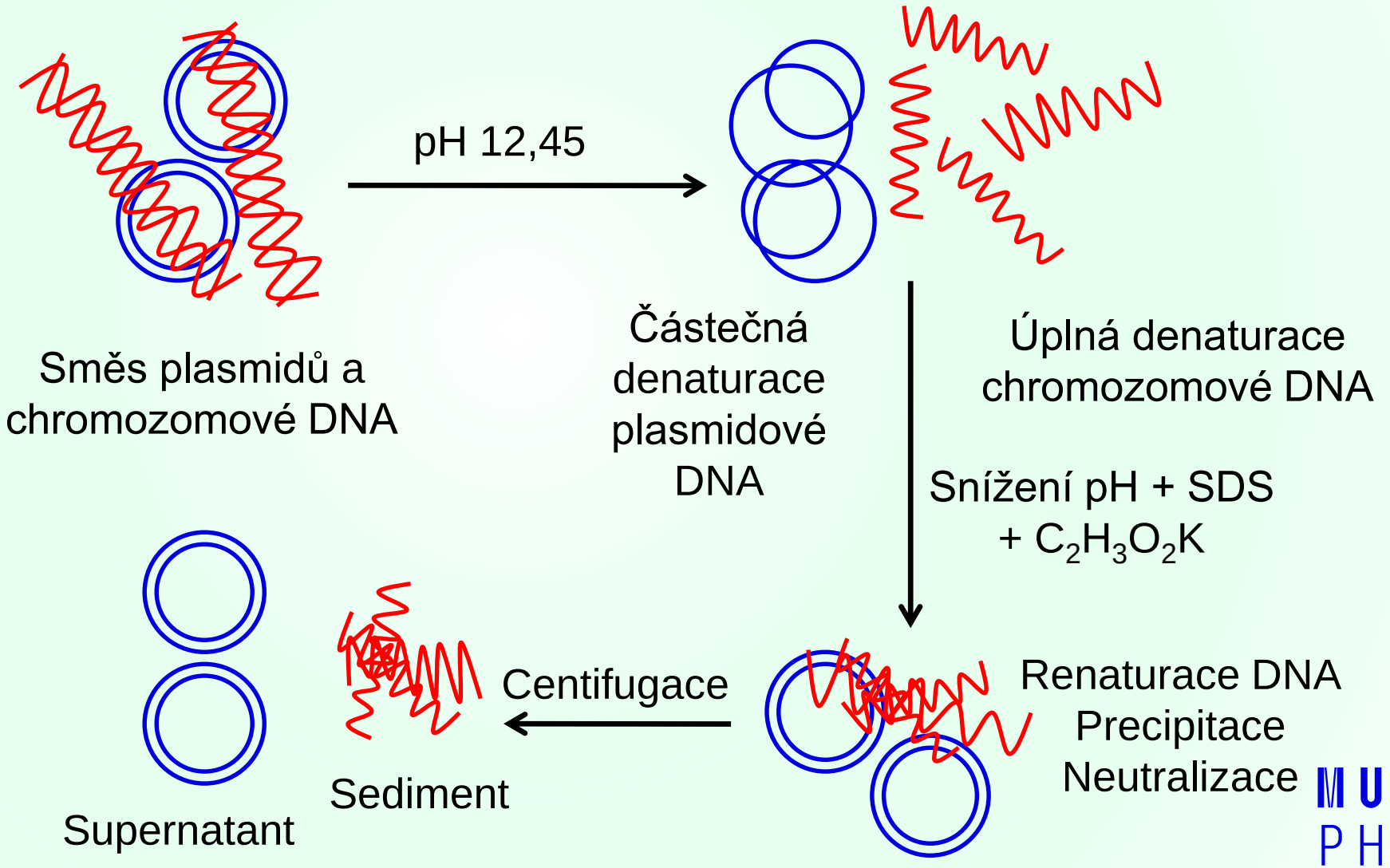
**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**




MUNI PHARM

# Charakterizace izolátu NA

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

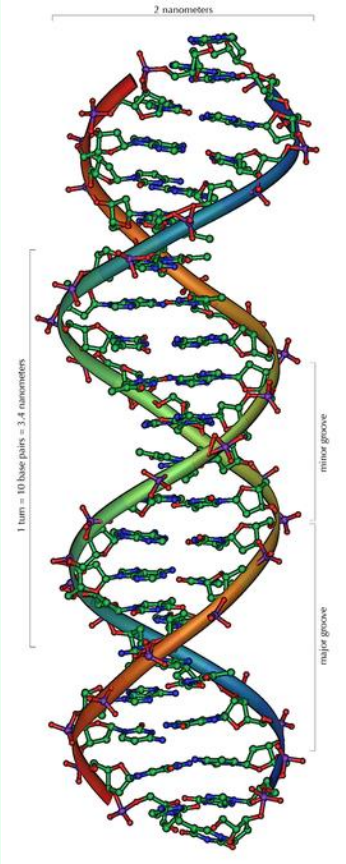
↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

## Důležitou charakteristikou izolované NA je:




Koncentrace

Čistota

MUNI PHARM

# Charakterizace NA spektrofotometrií

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

- **NA absorbují UV záření s maximem v oblasti 260 nm**
- **optická hustota odpovídá koncentraci**
- **absorbance je možno měřit při různých vlnových délkách (230 nm – 320 nm)**
- **podíl absorbancí = čistota vzorku**



MUNI PHARM

# Spektrum absorbance NA

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

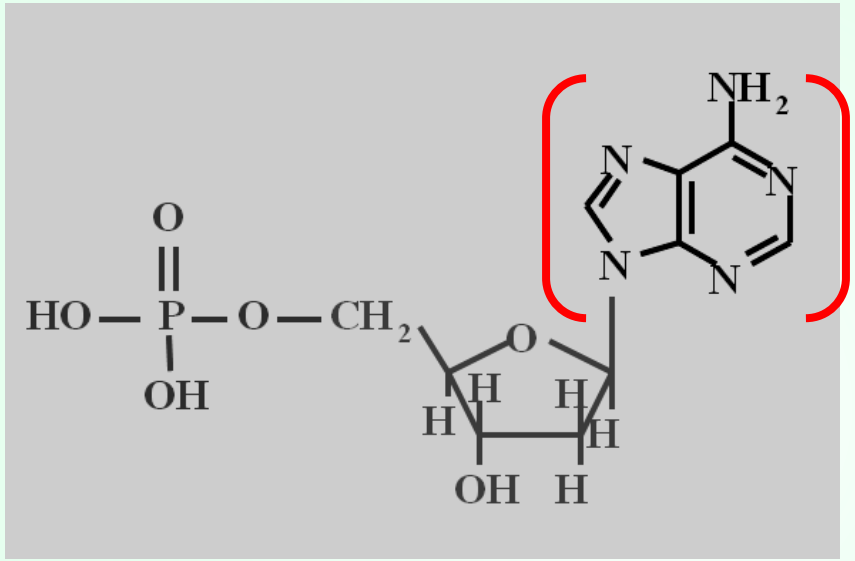
↓

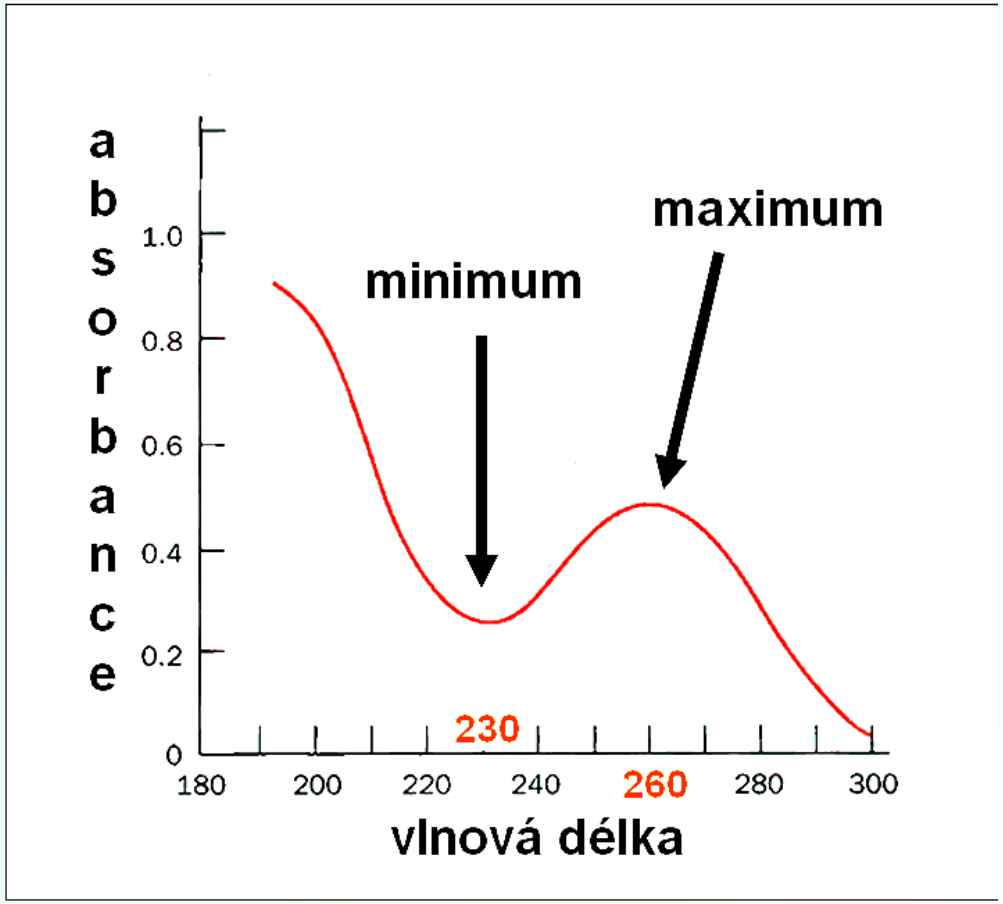
**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

## Kterou částí NA absorbuje UV záření?



# Optická hustota odpovídá koncentraci

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

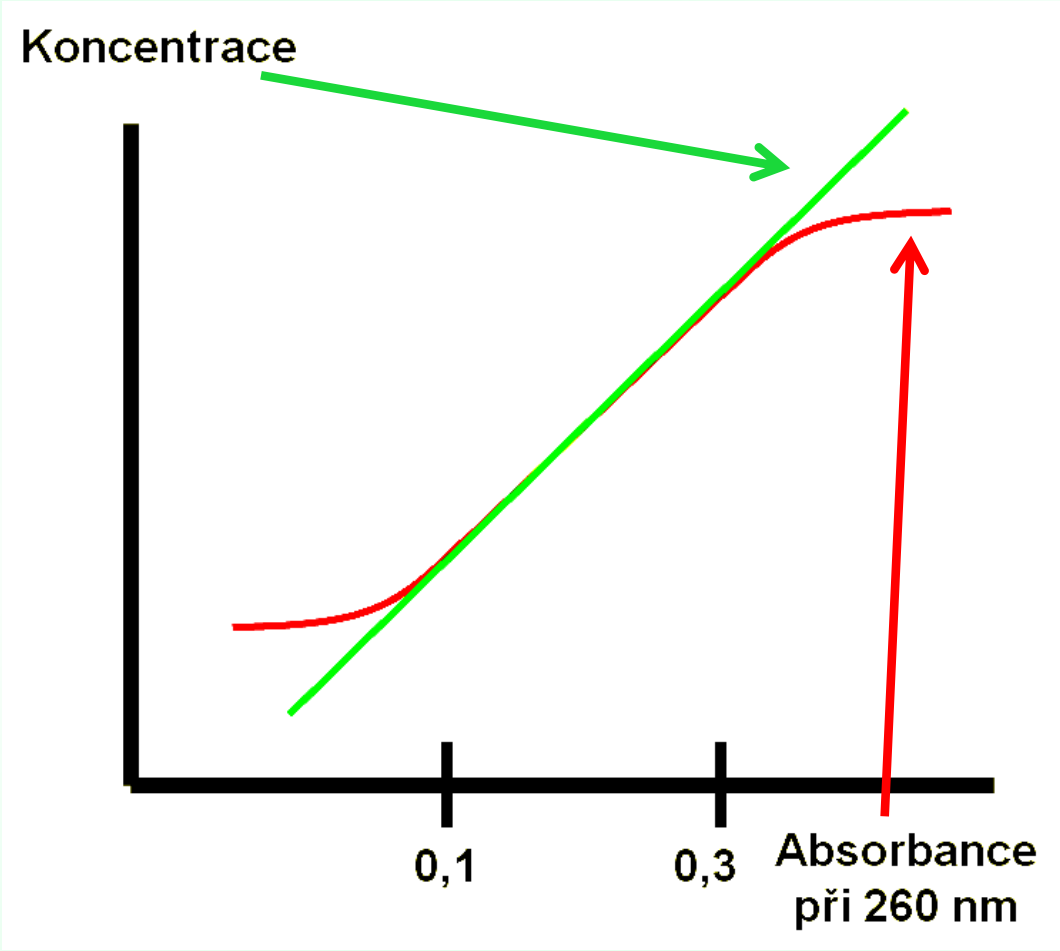
**Charaktrizace získané NA**

$A_{260}$ = 1,0 (v 1 cm kyvetě)

dsDNA ~ 50 µg/ml

ssDNA ~ 33 µg/ml

ssRNA ~ 40 µg/ml




**Závislost absorbance na koncentraci je lineární při $A_{260}$ = 0,1 až 0,3**

**(novější přístroje mají vyšší rozsah !!)**



MUNI PHARM

# Optická hustota odpovídá koncentraci - praktický význam -

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

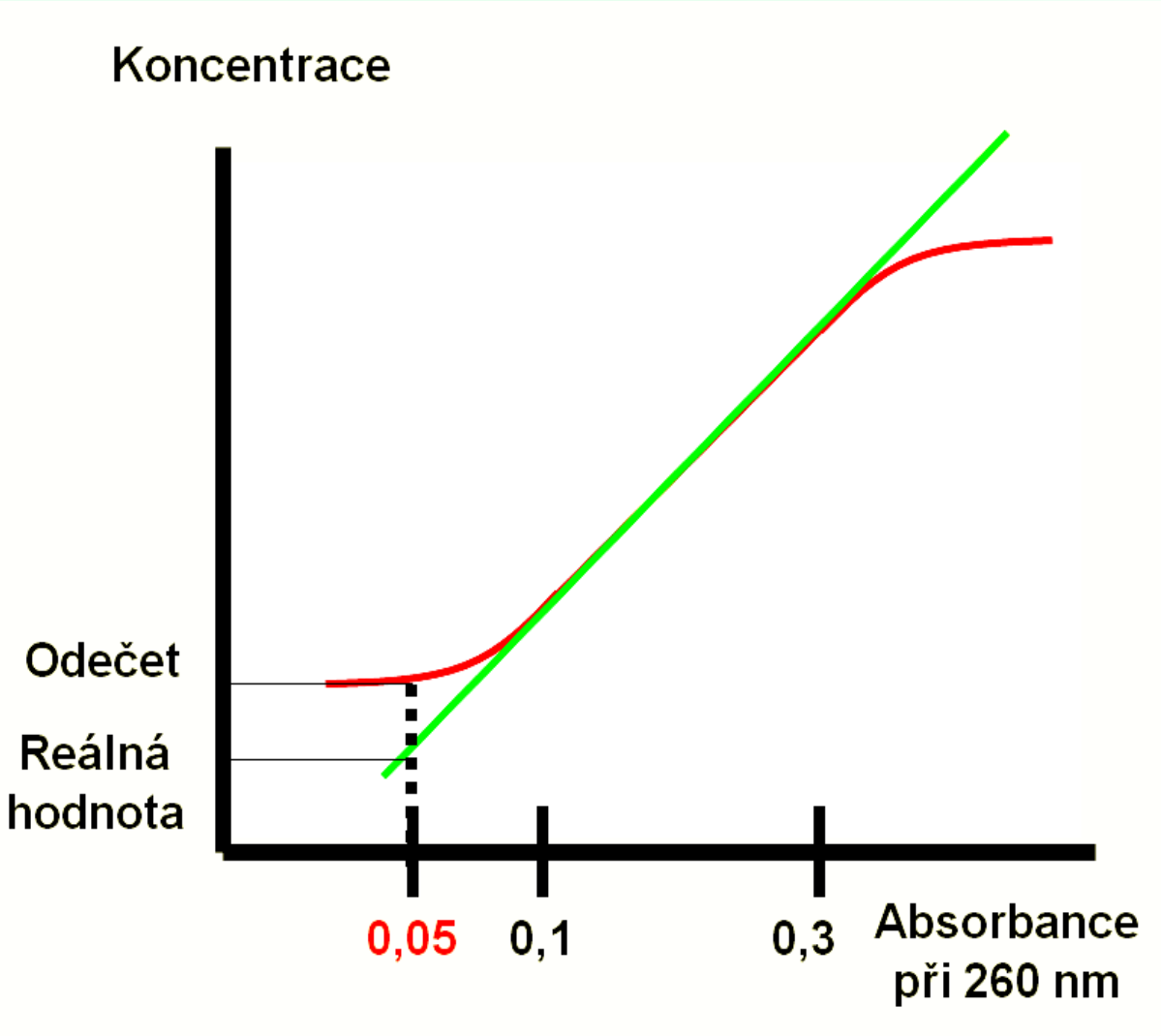
**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

Je-li absorbance příliš NÍZKÁ (pod 0,1), odečtete na křivce koncentraci VYŠŠÍ, než ve skutečnosti je.

Koncentraci DNA Nadhodnocujete



# Optická hustota odpovídá koncentraci - praktický význam -

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

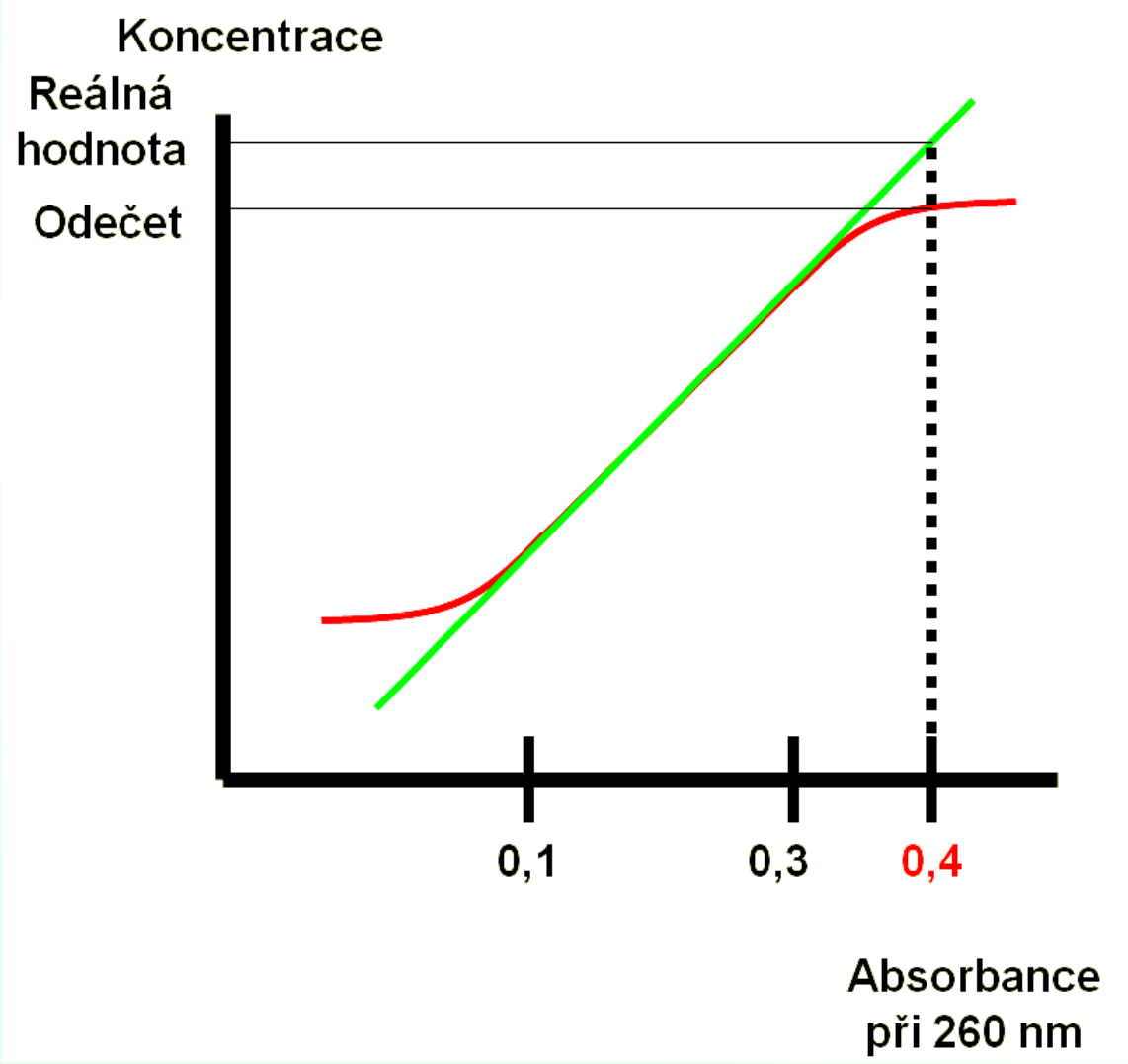
**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

Je-li absorbance příliš VYSOKÁ (nad 0,3), odečtete na křivce koncentraci NIŽŠÍ, než ve skutečnosti je.

Koncentraci DNA Podhodnocujete



# Čistota DNA

**Lyze buněk a tkání**

↓

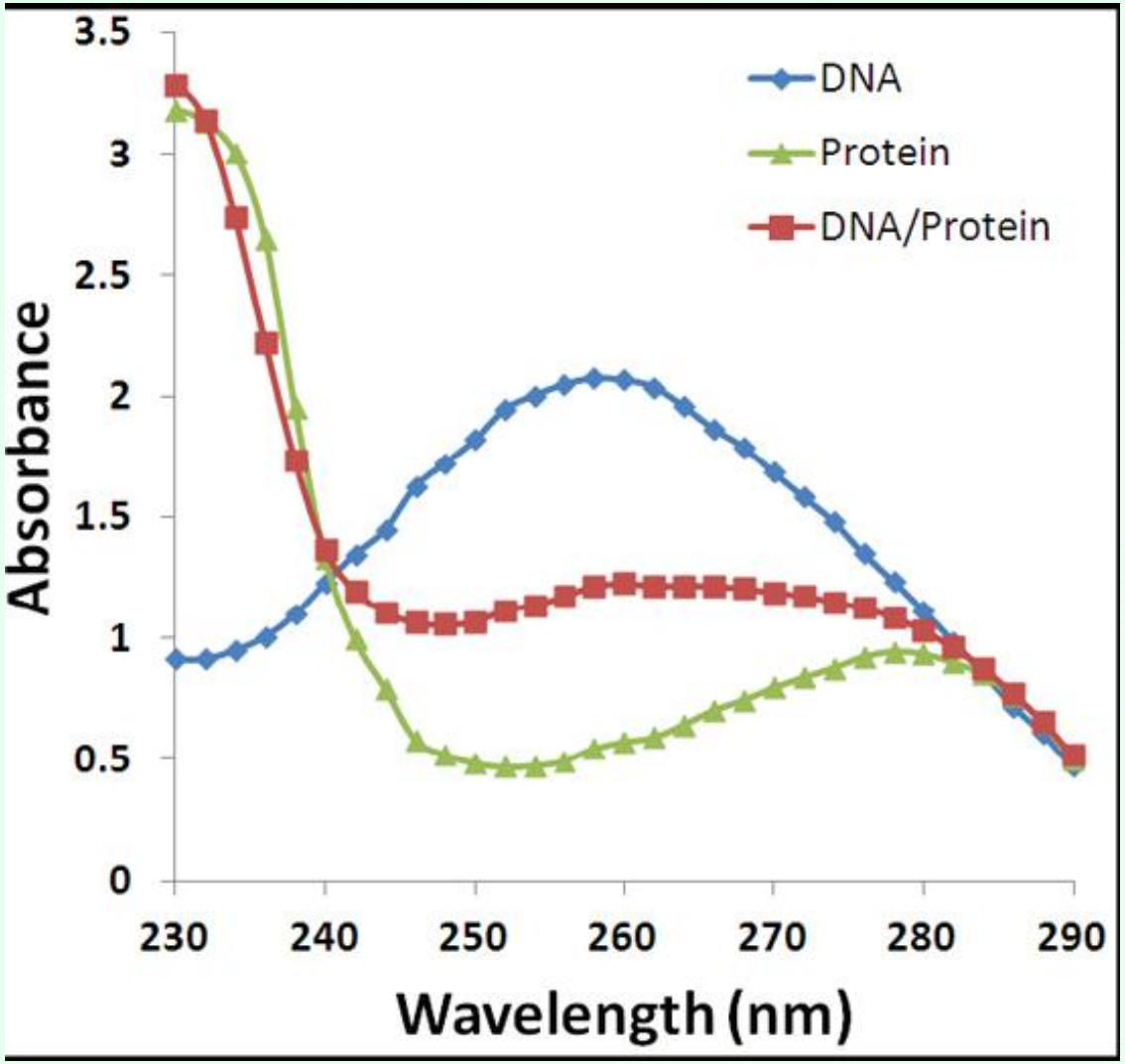
**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**




Stanovuje se na základě poměrů absorbancí při různých vlnových délkách.

http://www.biotek.com

# Čistota DNA

**Lyze buněk a tkání**

↓

**Extrakce NA**

↓

**Purifikace NA**

↓

**Charaktrizace získané NA**

$A_{260}/A_{280} = 1,8$

**< 1,8 = kontaminace proteiny**

**> 1,8 = kontaminace RNA**

$A_{260}/A_{230} > 2,0$

**< 2,0 = kontaminace látkami, které jsou součástí izolačních souprav**

MUNI PHARM

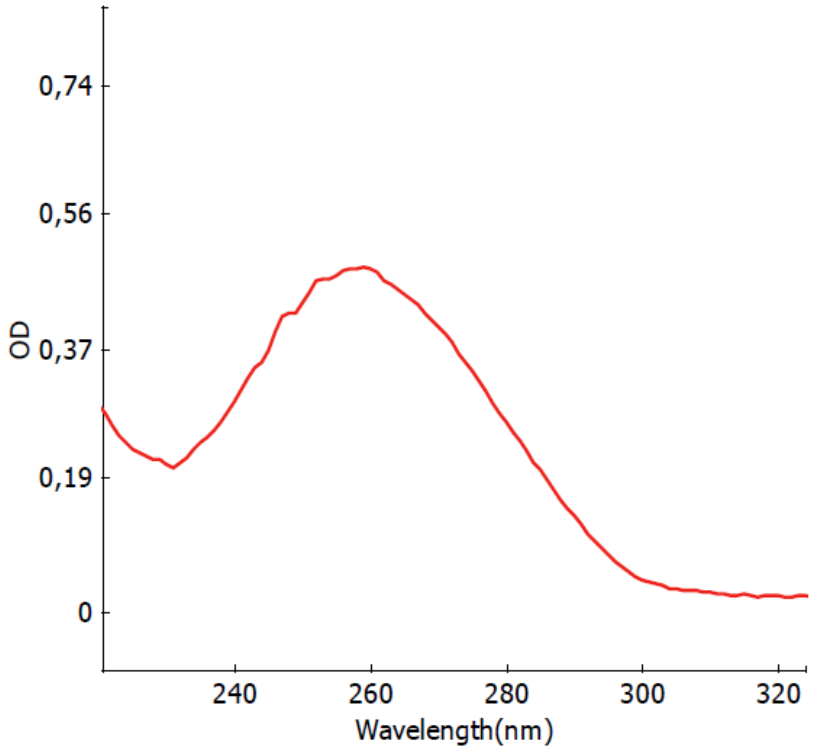
# Izolace DNA – studentská realita

Nucleic Acid Conc : 22,99 ng/µL

OD260/280 : 1,88

OD260/230 : 2,49

| Item | Result |
|---|---|
| OD260 | 0,483 |
| OD280 | 0,267 |
| OD230 | 0,208 |
| OD320 | 0,023 |
| Pathlength (mm) | 0,700 |
| Dilution | 1,000 |



# Gratuluji, právě jste zvládli jeden z nejdůležitějších kroků v molekulární biologii

# Izolaci nukleových kyselin

MUNI
PHARM