

# **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

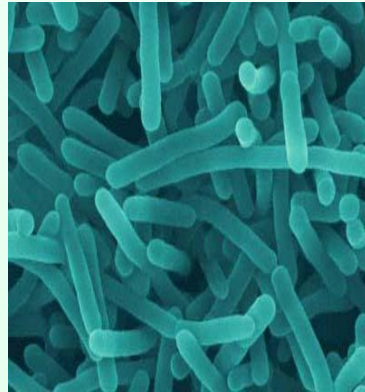
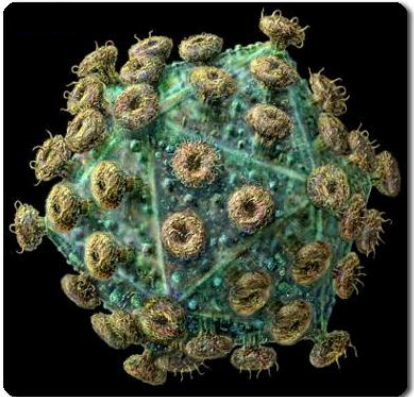
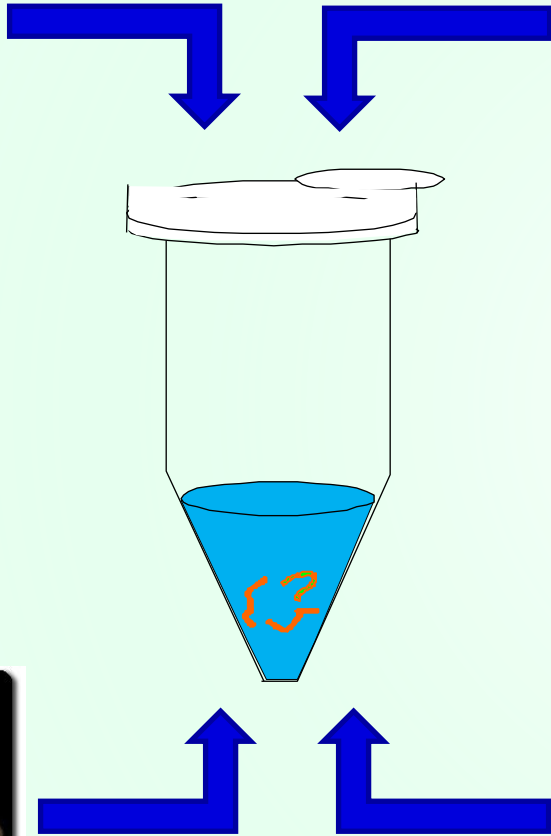
# Užitečné odkazy

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

# Cíl izolace a purifikace NA

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





A collection of scientific and medical icons including a microscope, a DNA helix, a liver, red blood cells, a bacterium, a cell, a mouse, and a pill. The logo 'FEAL' is at the top.

MUNI  
PHARM

# Obecný postup izolace NA



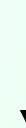
?



**Lyze buněk  
a tkání**



**Extrakce NA**



**Purifikace NA**



**Charaktrizace  
získané NA**

# Lyze buněk a tkání - uvolnění vnitřního obsahu buněk

**Lyze buněk  
a tkání**



**Extrakce NA**



**Purifikace NA**



**Charakterizace  
získané NA**

## ➤ Biologická lyze

především využití degradačních enzymů (lysozym, proteináza K, celulóza...)

## ➤ Chemická lyze

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

## ➤ Fyzikální lyze

použití varu, mražení, sonikace, drcení

**Většinou kombinace více přístupů**

# Lyze buněk a tkání - uvolnění vnitřního obsahu buněk

**Lyze buněk  
a tkání**

**Extrakce NA**

**Purifikace NA**

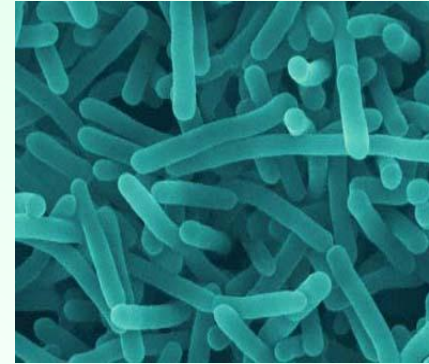
**Charaktrizace  
získané NA**



Homogenizace  
mletím

Proteináza K  
Lysozym

Detergenty



Lyze varem

Sonikace



Mražení  
tekutým  
dusíkem

Homogenizace  
drcením

Celuláza

Detergenty

# Stav materiálu po lyzi buněk

**Lyze buněk  
a tkání**

**Extrakce NA**

**Purifikace NA**

**Charaktrizace  
získané NA**

**Komplexní směs**

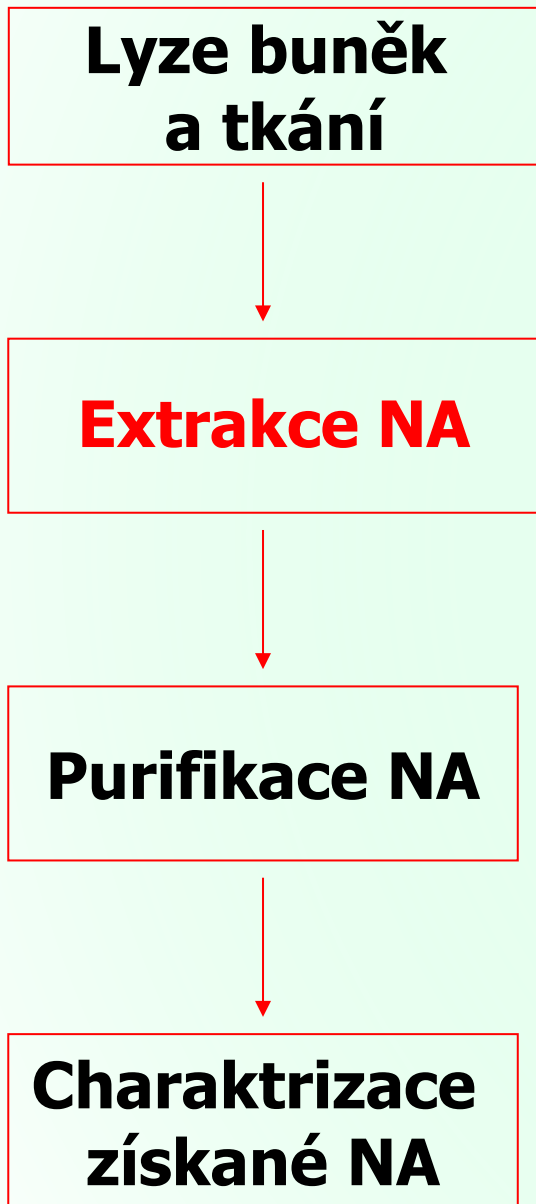
**DNA, RNA, lipidů, proteinů,  
sacharidů, uhlovodíků  
a dalších nízkomolekulárních látek**

**Další postup:**

oddělit DNA, případně RNA  
od ostatních složek směsi



# Extrakce



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

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

# Extrakce směsí fenol - chloroform

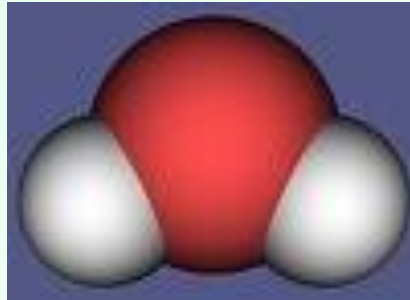
Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

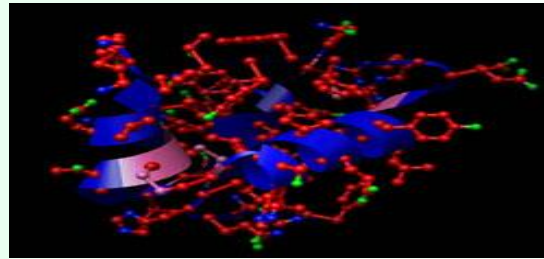
Purifikace NA

Charaktrizace  
získané NA

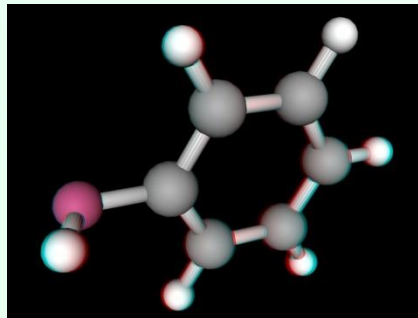
Separace proteinů a NA založená na



lehké vodné



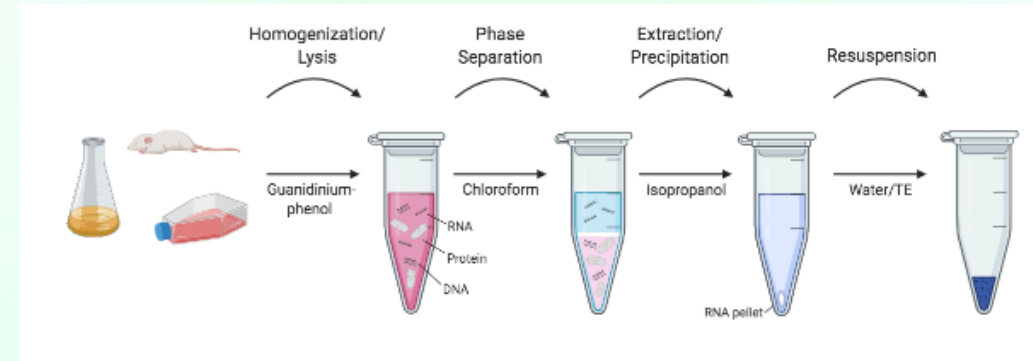
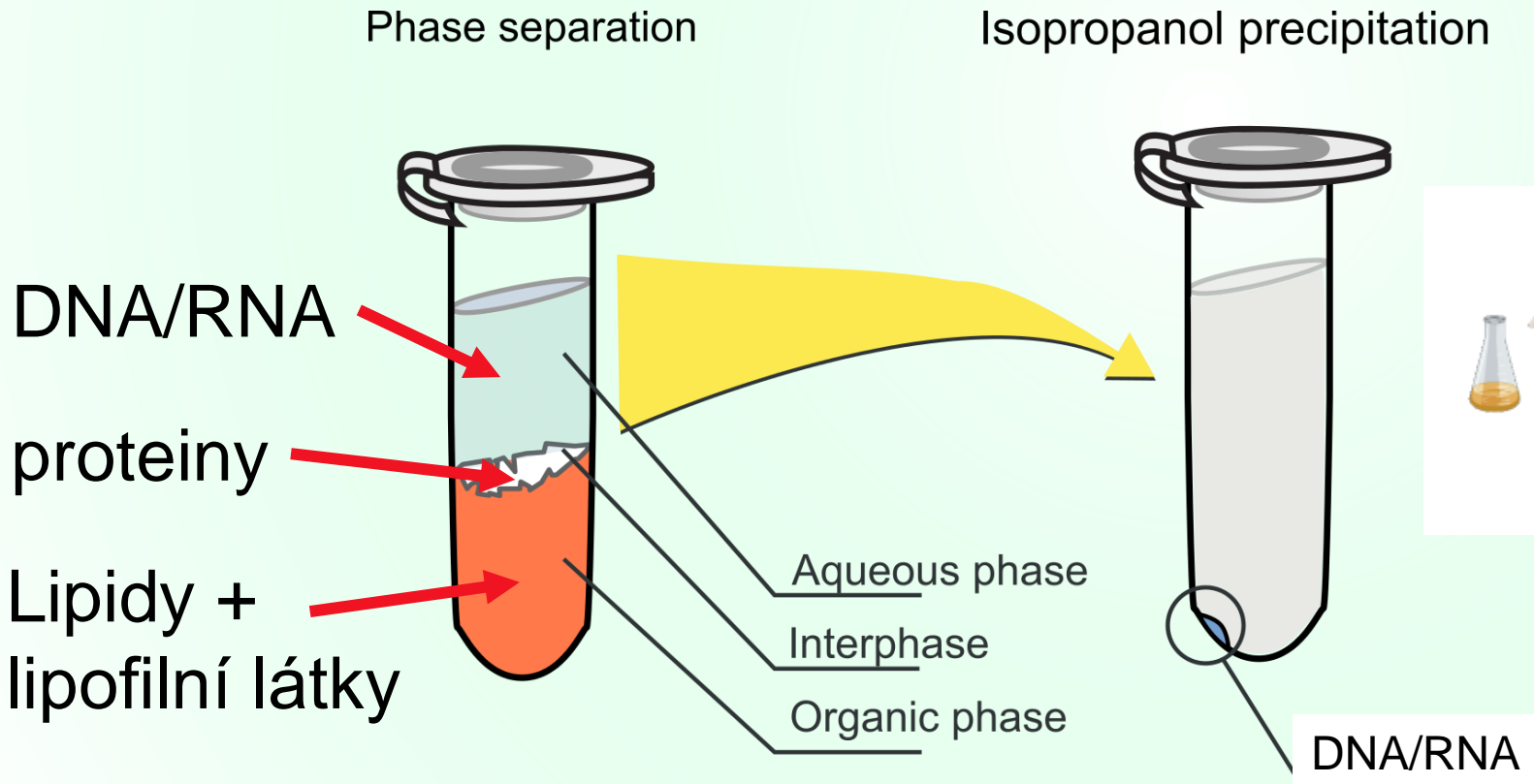
denaturaci proteinů  
na rozhraní



těžší organické fáze

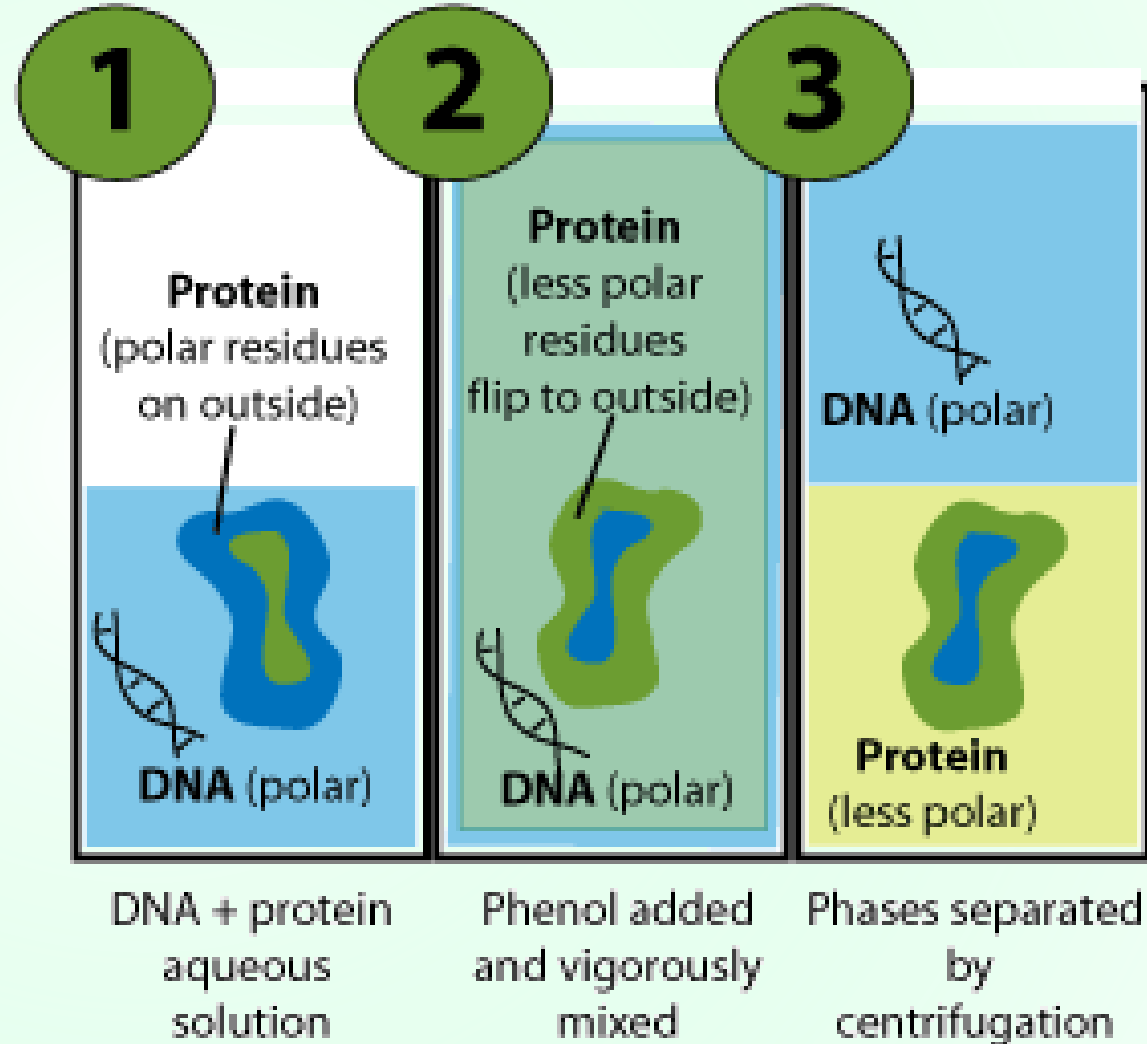
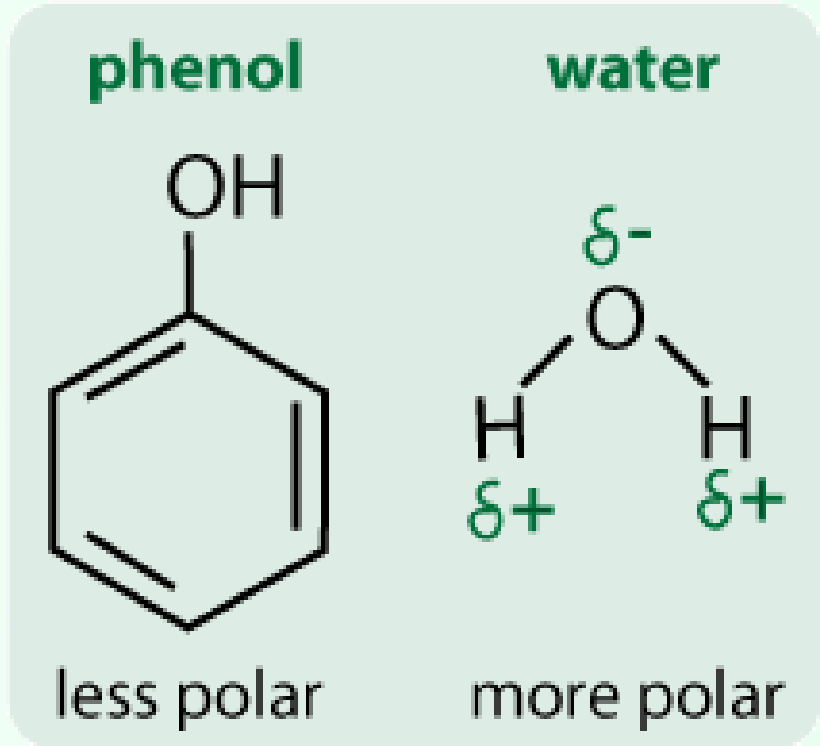
# Obecný postup extrakce fenolem

- 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>

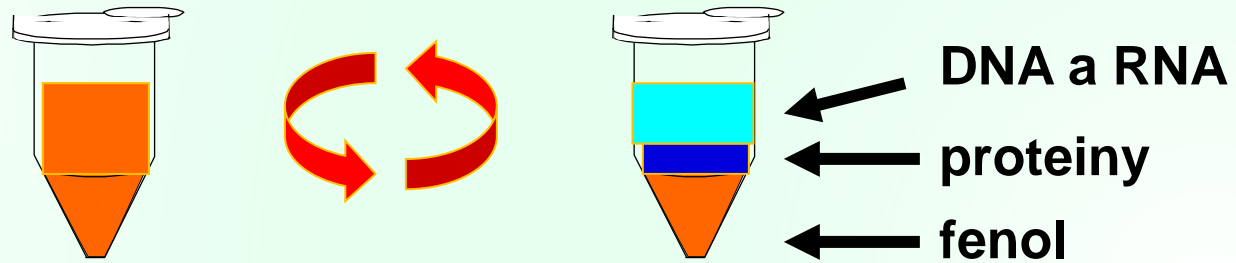
# Princip fenolové extrakce



<http://bitesizebio.com/>

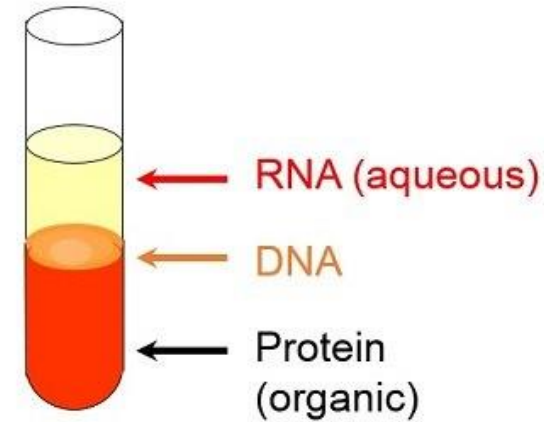
# Modifikace fenolové extrakce

Fenol ekvilibrovaný neutrálním, nebo alkalickým pufrům



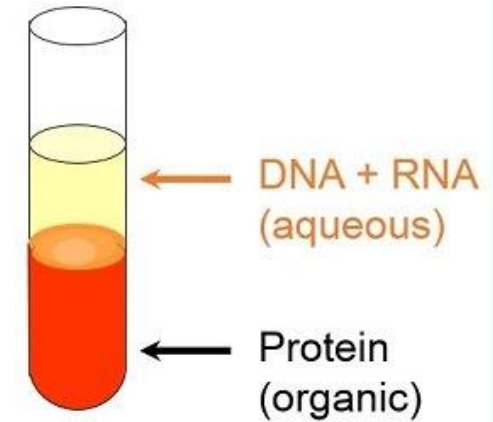
## Traditional Phenol Extraction

Phenol, pH 4



RNA

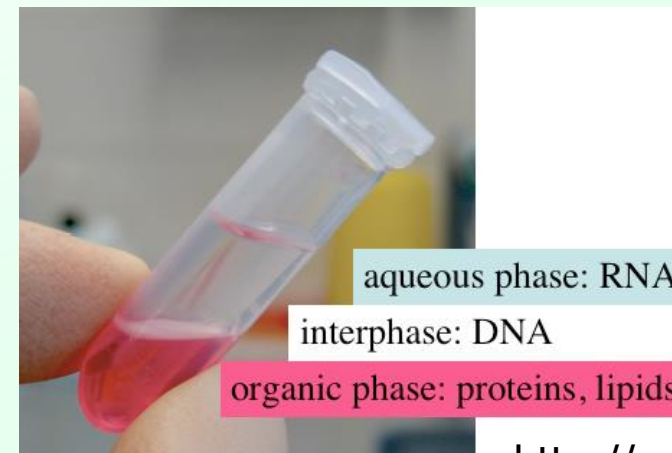
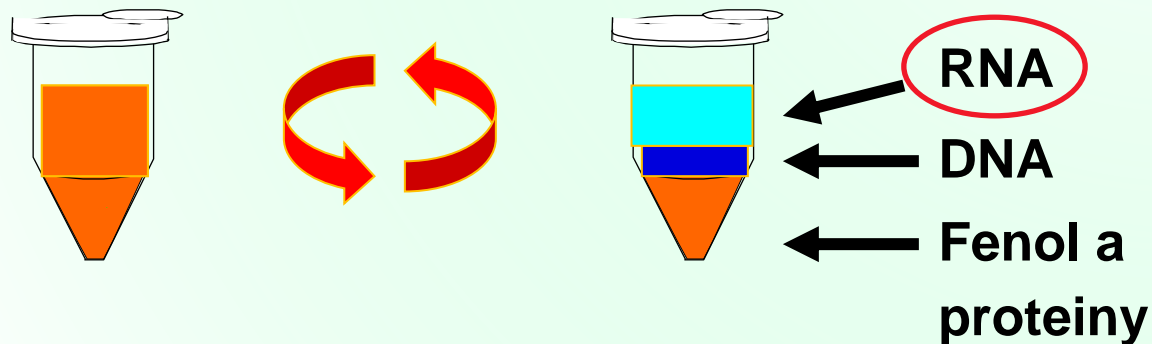
Phenol, pH 8



DNA

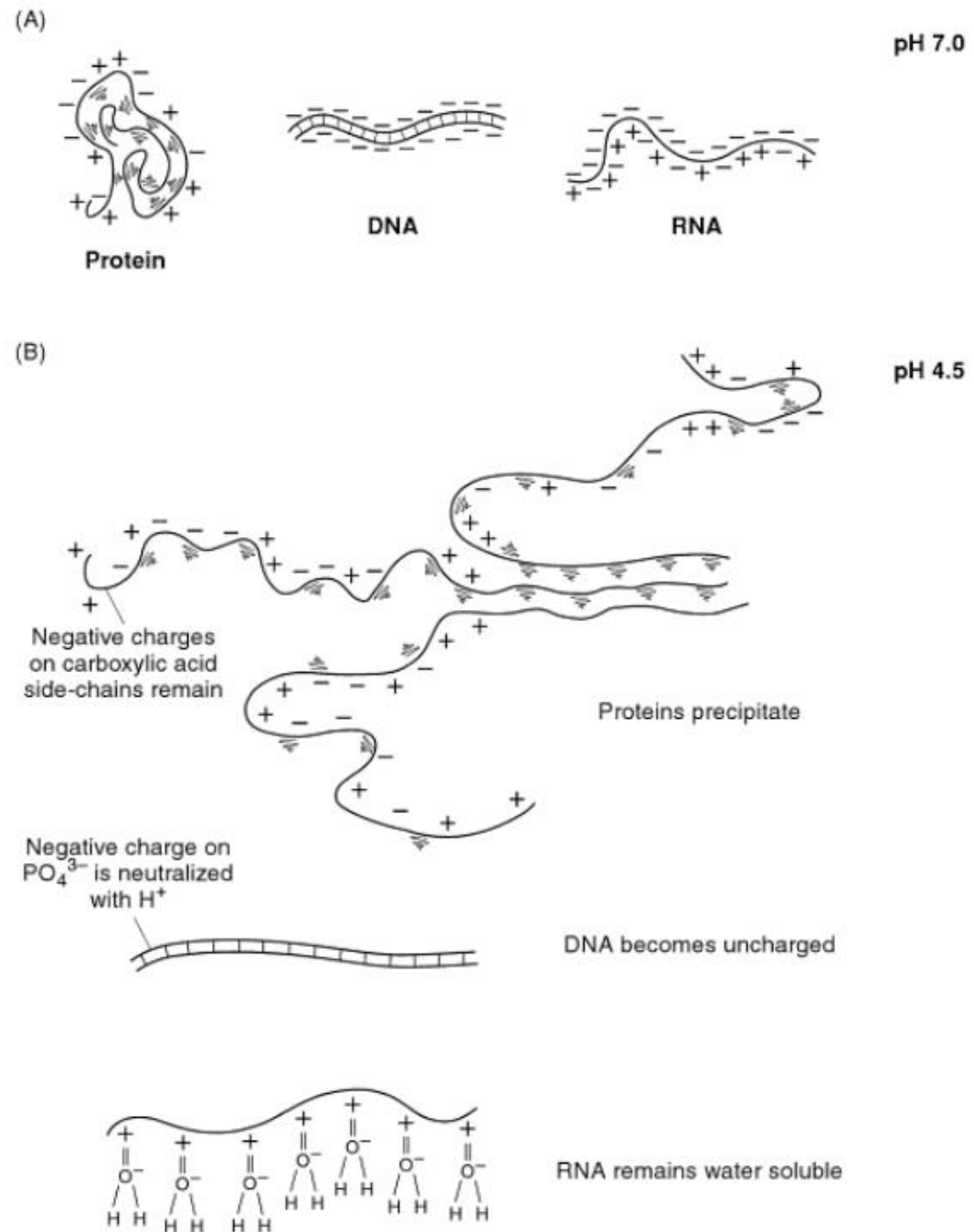
<https://www.genetargetsolutions.com.au/product/5prime-phase-lock-gel/>

Použití kyselého fenolu



<http://openwetware.org/>

# Účinek kyselého fenolu



# Stav materiálu po extrakci

Lyze buněk  
a tkání



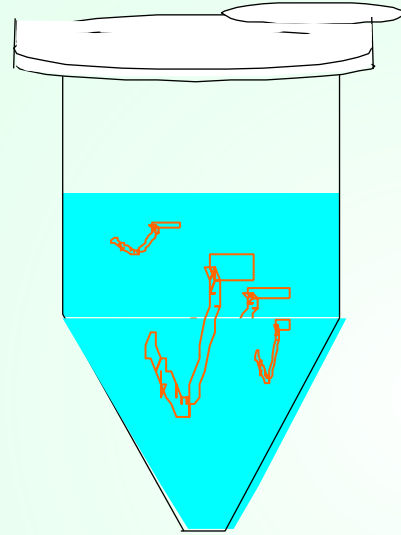
**Extrakce NA**



**Purifikace NA**



**Charaktrizace  
získané NA**



Silně zředěná DNA, RNA

Stopy chloroformu

Stopy **fenolu**

**Další postup:**

Zakoncentrování a purifikace NA

# Purifikace NA precipitací

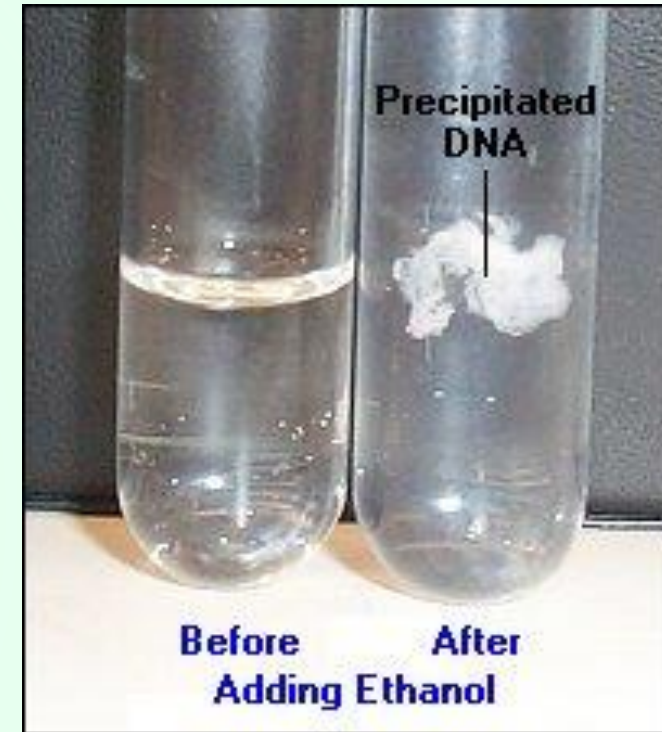
Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

**Purifikace NA**

Charaktrizace  
získané NA

Srážení, 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>



# Obecný postup precipitace ethanolem

Lyze buněk  
a tkání



**Extrakce NA**



**Purifikace NA**



**Charakterizace  
získané NA**

- 1) Přidání ethanolu, případně izopropanolu
- 2) Přidání jednomocných kationtů ( $K^+$ ,  $Na^+$ ...)
- 3) Koncentrování vzorku centrifugací (roztok zchlazený na  $-70^{\circ}C$ )
- 4) Promytí sedimentu NA **70% ethanolem**
- 5) Rozpuštění NA ve vodě

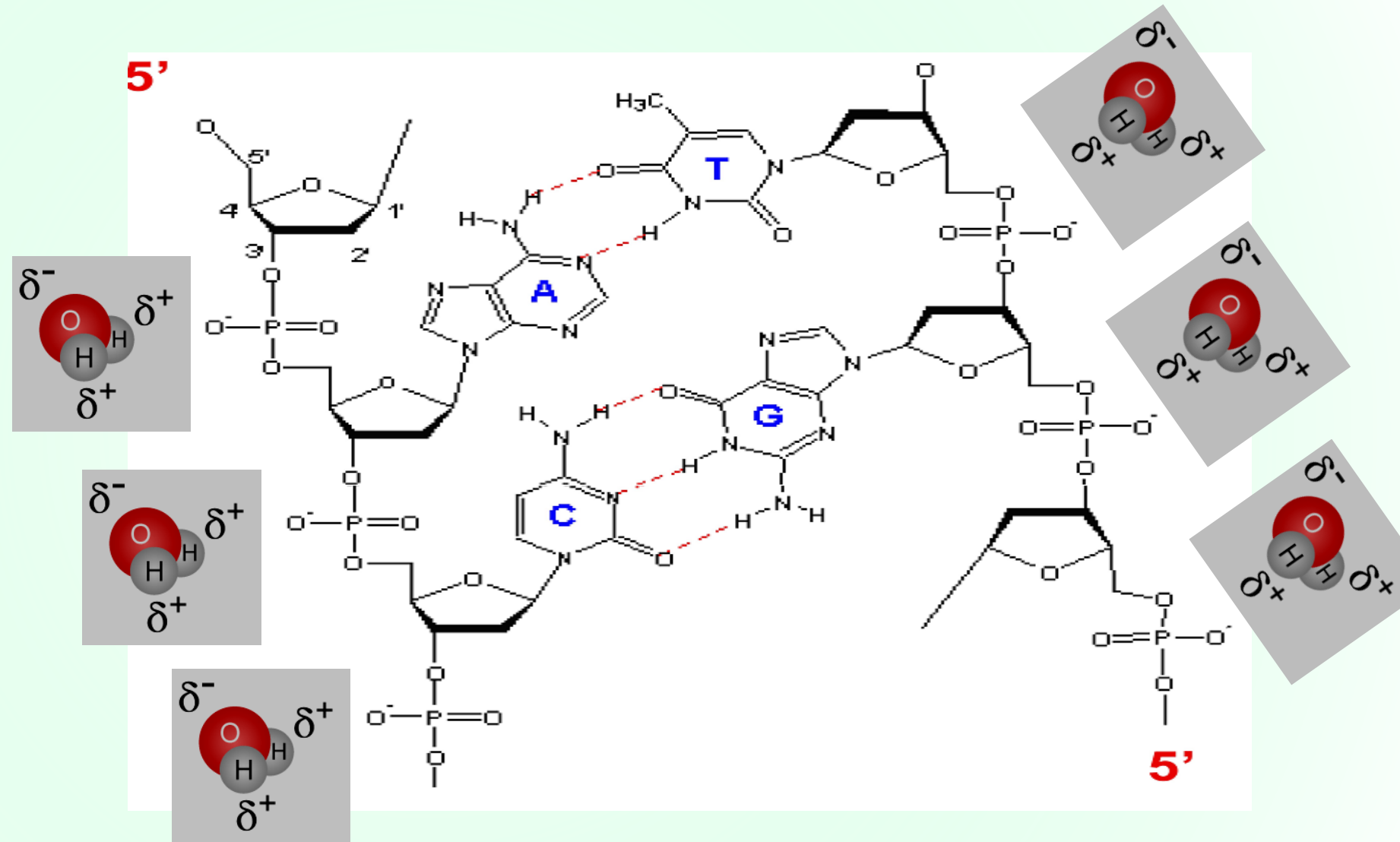
# Rozpustnost DNA ve vodě

Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

Purifikace NA

Charaktrizace  
získané NA



**DNA JE HYDROFILNÍ**

# Obecný postup precipitace ethanolem –

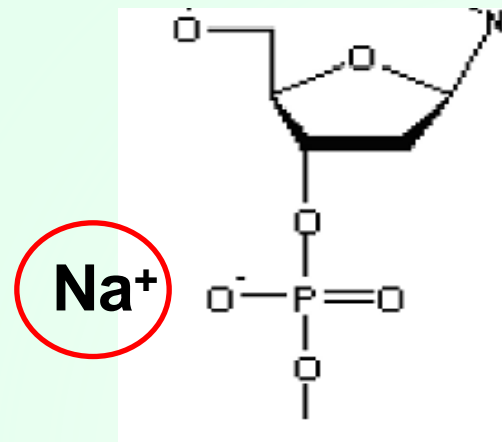
## Přidání NaCl + C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

Purifikace NA

Charaktrizace  
získané NA



Neutralizace PO<sup>3-</sup>

Snížení hydrofility DNA

VYSRÁŽENÍ DNA  
ve vodném prostředí

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

Nízká dielektrická  
konstanta

Na<sup>+</sup>

Cl<sup>-</sup>

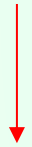
NaCl

# Obecný postup precipitace - DOKONČENÍ

**Lyze buněk  
a tkání**



**Extrakce NA**



**Purifikace NA**



**Charakterizace  
získané NA**

- 3) Koncentrování vzorku centrifugací (roztok zchlazený na  $-70^{\circ}\text{C}$ )
- 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**

# Purifikace NA chromatografií

**Lyze buněk  
a tkání**



**Extrakce NA**



**Purifikace NA**



**Charakterizace  
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

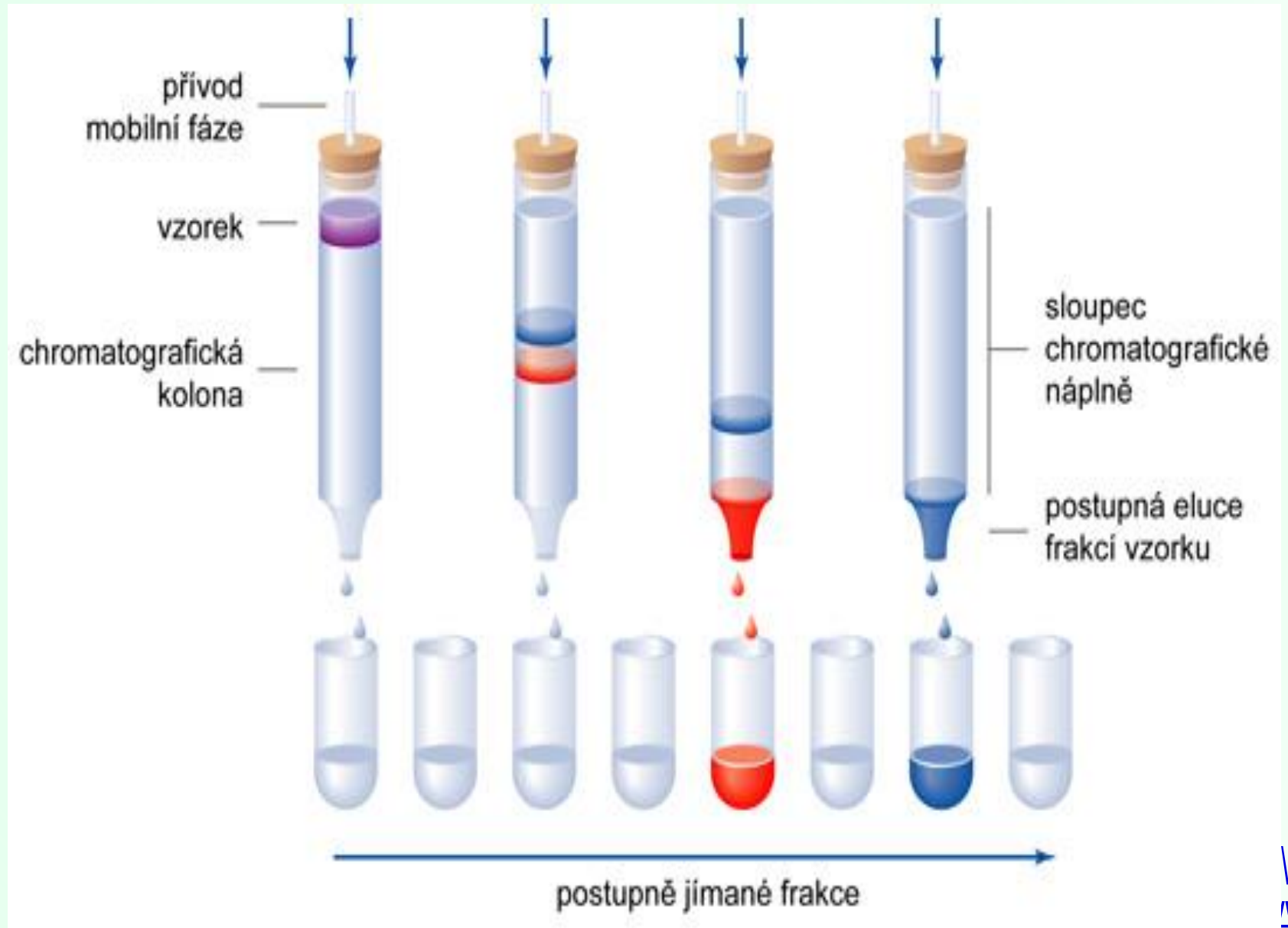
# Purifikace NA chromatografií

Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

Purifikace NA

Charaktrizace  
získané NA



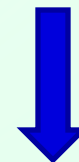
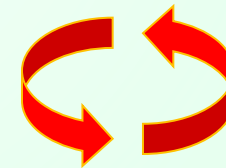
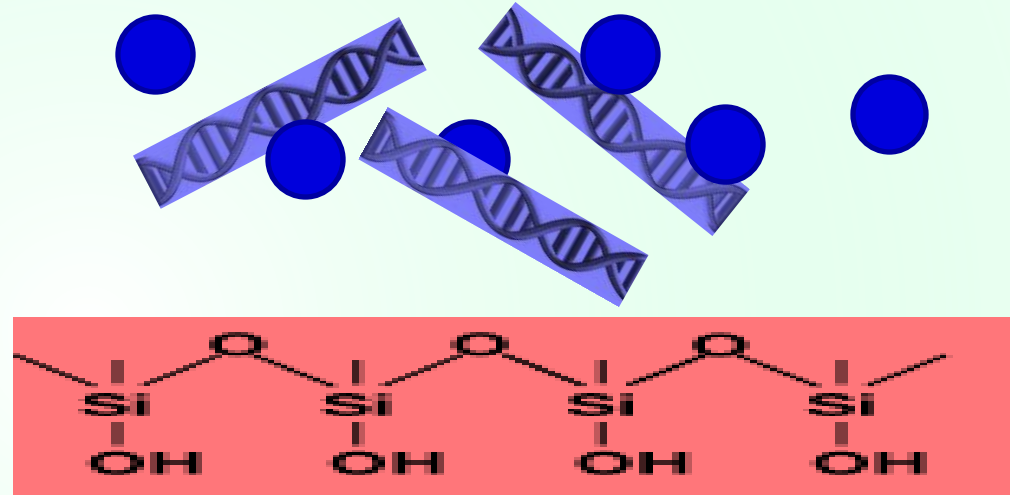
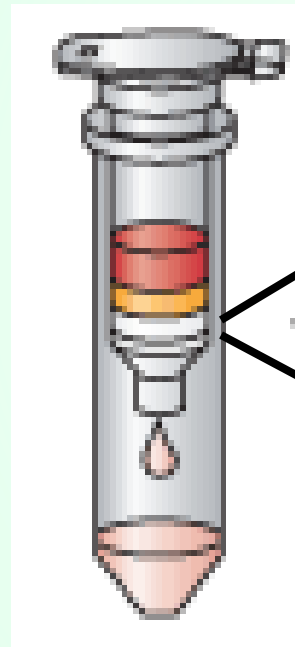
# Komerční chromatografie pro izolaci NA - spin columns -

Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

Purifikace NA

Charaktrizace  
<sup>23</sup>získané NA



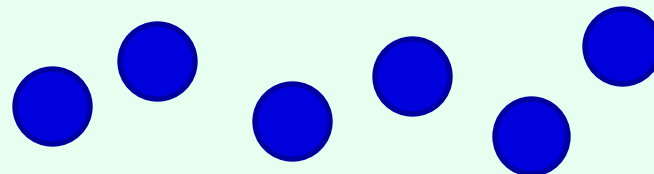
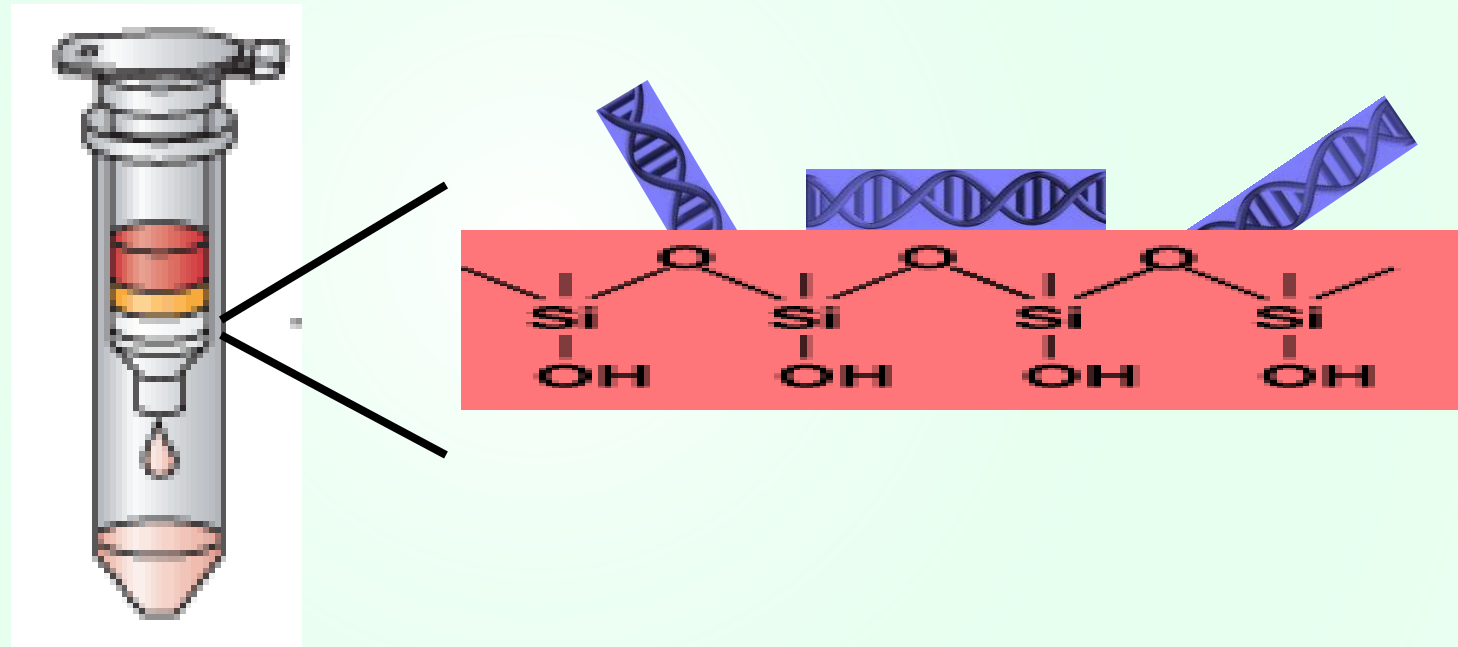
# Komerční chromatografie pro izolaci NA - spin columns -

Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

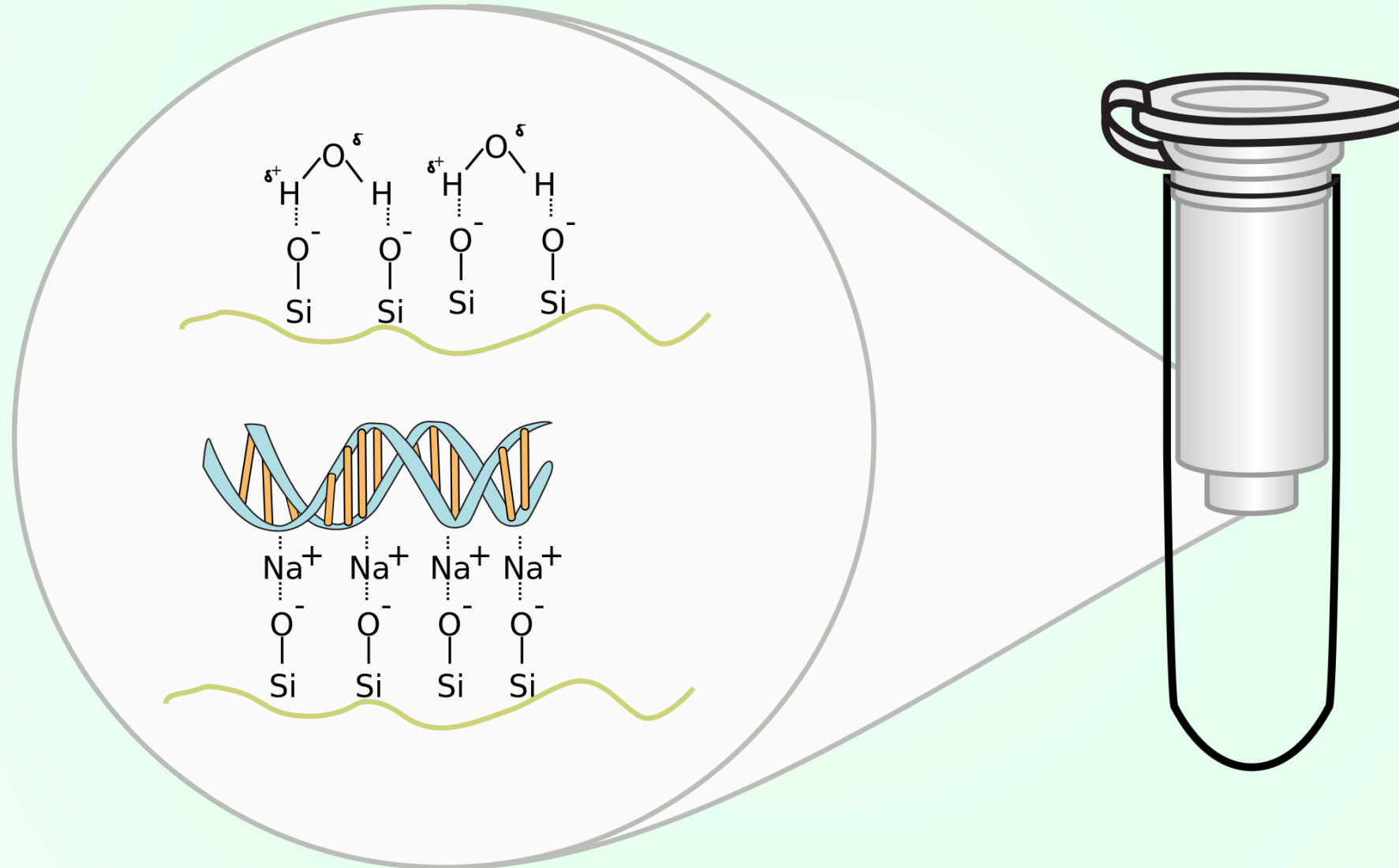
Purifikace NA

Charaktrizace  
získané NA





# Jak se DNA váže na membránu



# Komerční chromatografie pro izolaci NA

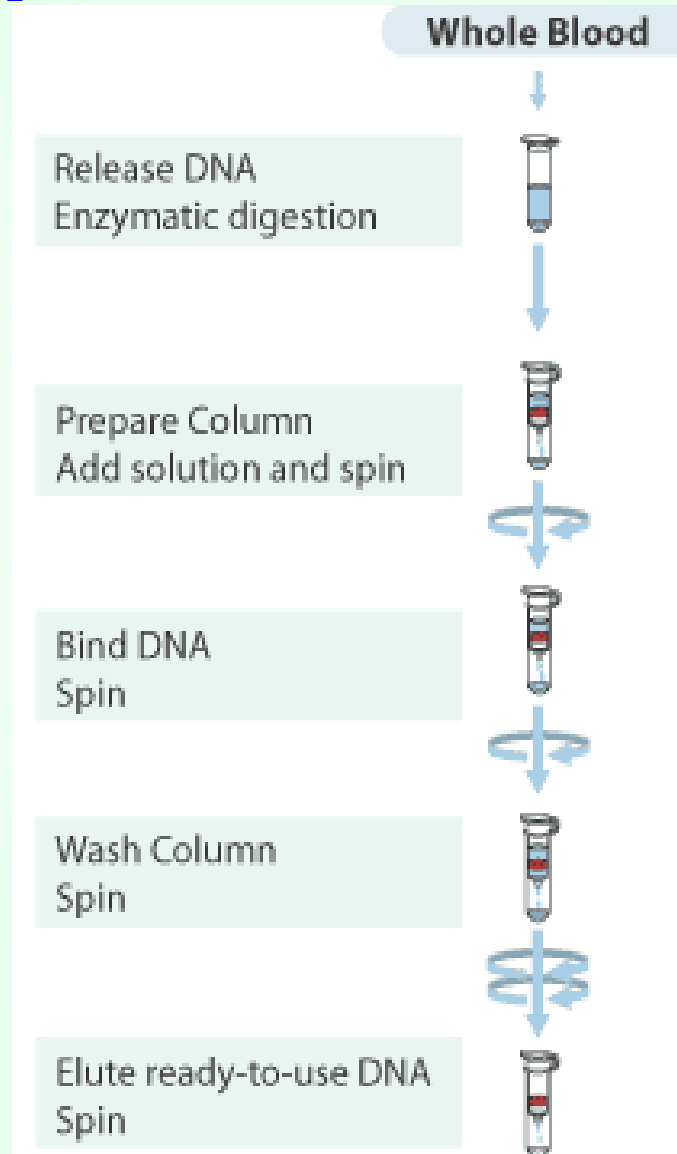
## - spin columns -

Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

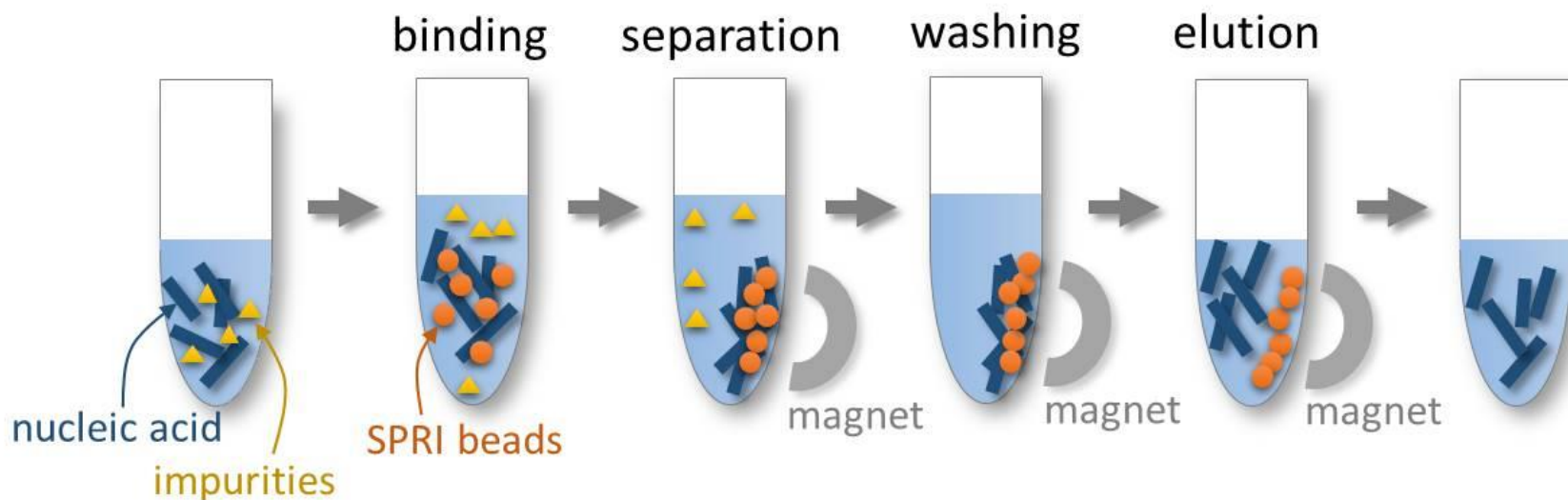
Purifikace NA

Charaktrizace  
získané NA



# Izolace DNA magnetickými kuličkami

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

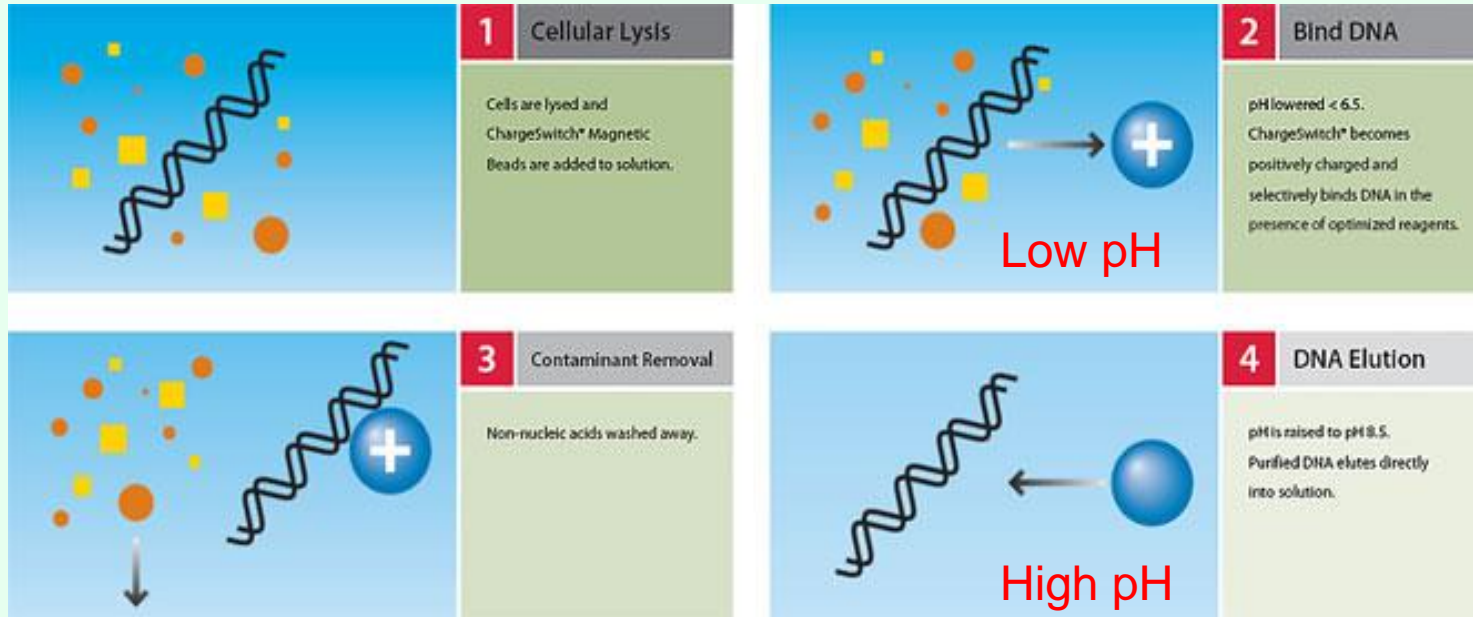


<http://www.diagenode.com/>

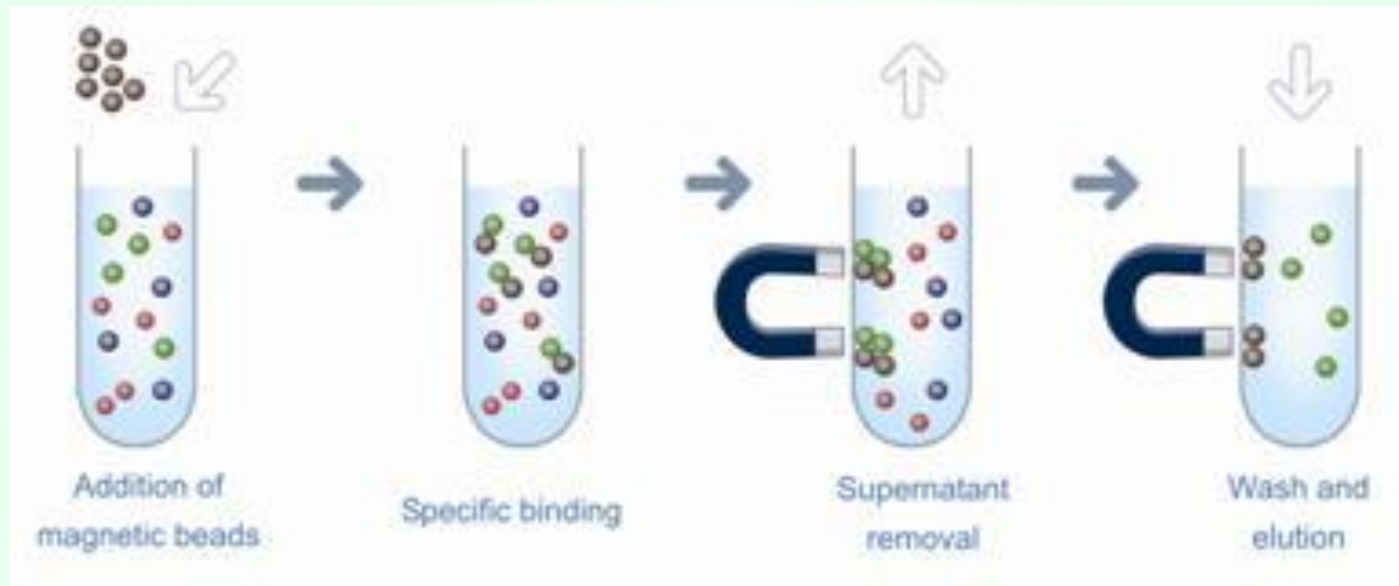
<https://nucleusbiotech.com/produkt-kategorie/ngs/magnetic-beads-for-dna-and-rna-purification/>

**MUNI**  
**PHARM**

# Magnetické kuličky - protokol



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



<http://blog.labplanet.com/>

# Izolace plasmidů alkalickou denaturací

**Lyze buněk  
a tkání**



**Extrakce NA**



**Purifikace NA**



**Charakterizace  
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

# Izolace plasmidů alkalickou denaturací

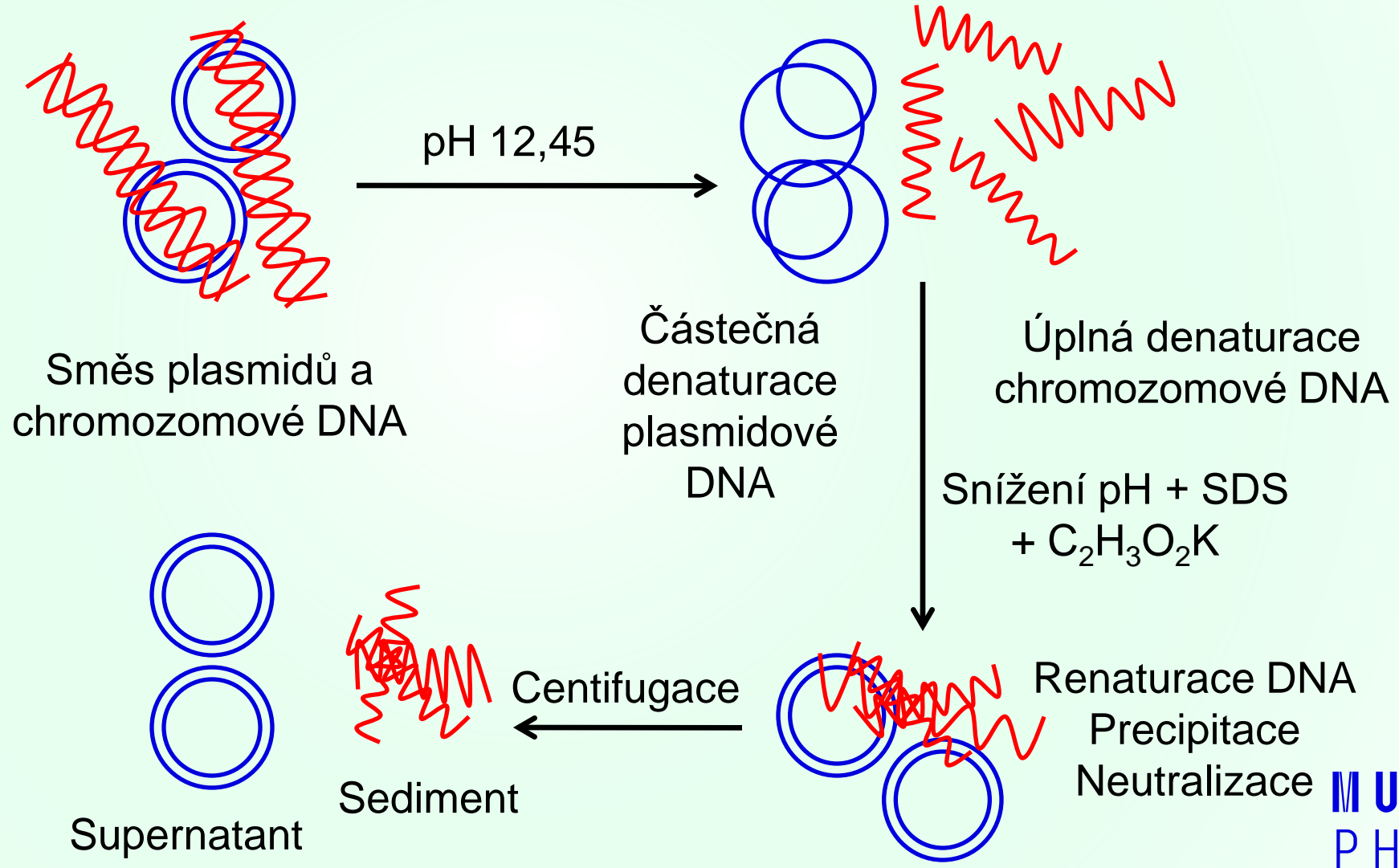
## - princip metody -

Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

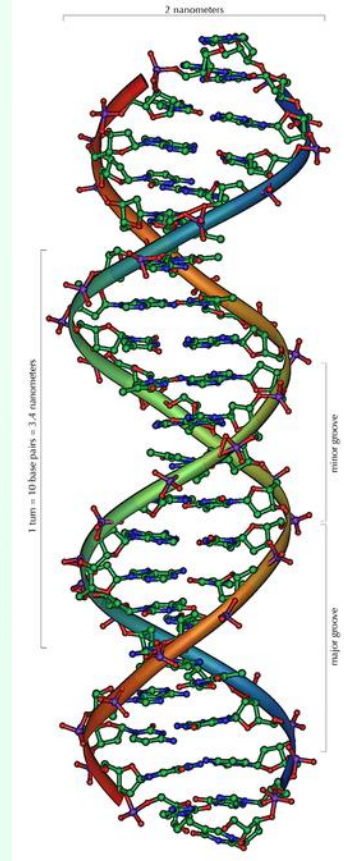
**Purifikace NA**

Charaktrizace  
získané NA



# Charakterizace izolátu NA

Důležitou charakteristikou izolované NA je:



Koncentrace

Čistota

Lyze buněk  
a tkání

Extrakce NA

Purifikace NA

Charaktrizace  
získané NA

# Charakterizace NA spektrofotometrií

**Lyze buněk  
a tkání**



**Extrakce NA**



**Purifikace NA**



**Charakterizace  
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**



# Spektrum absorpance NA

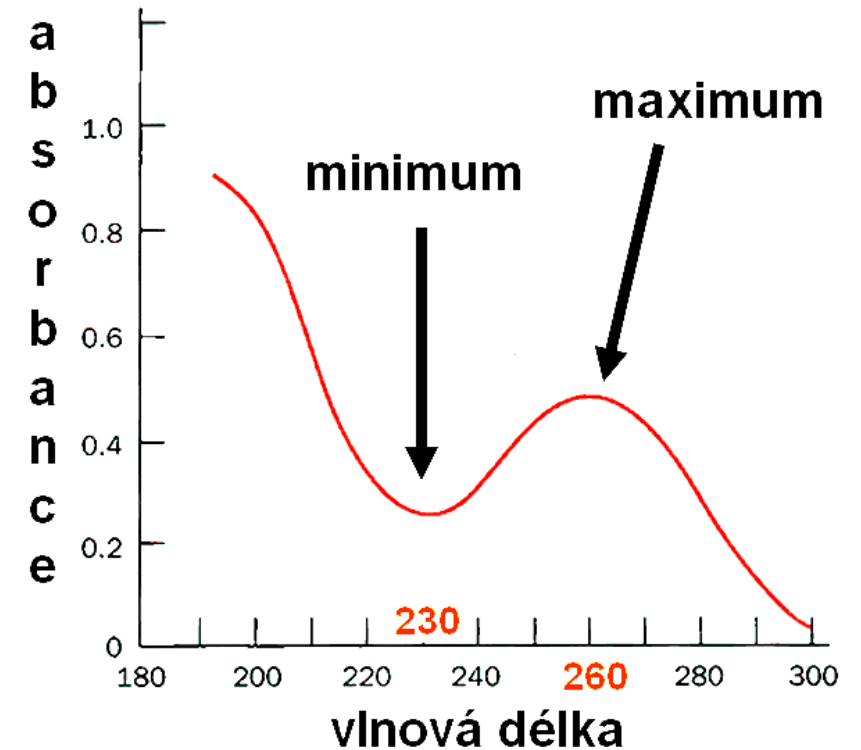
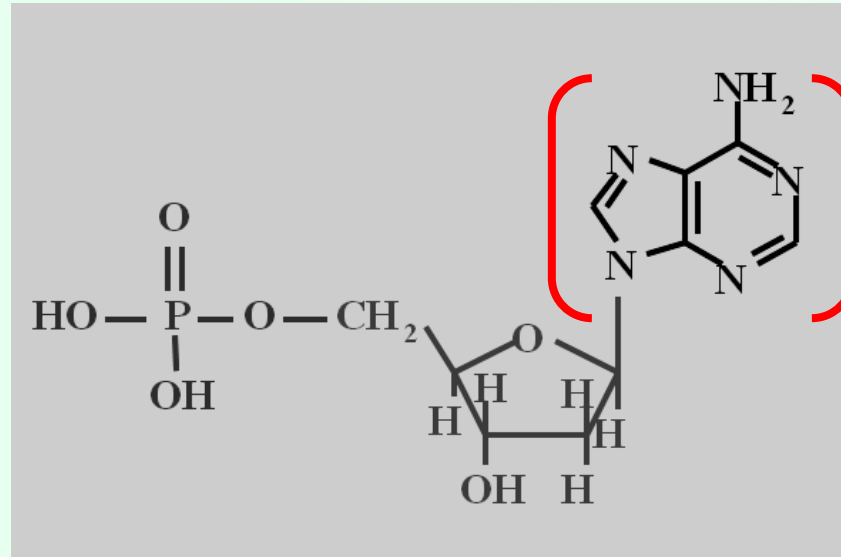
Lyze buněk  
a tkání

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

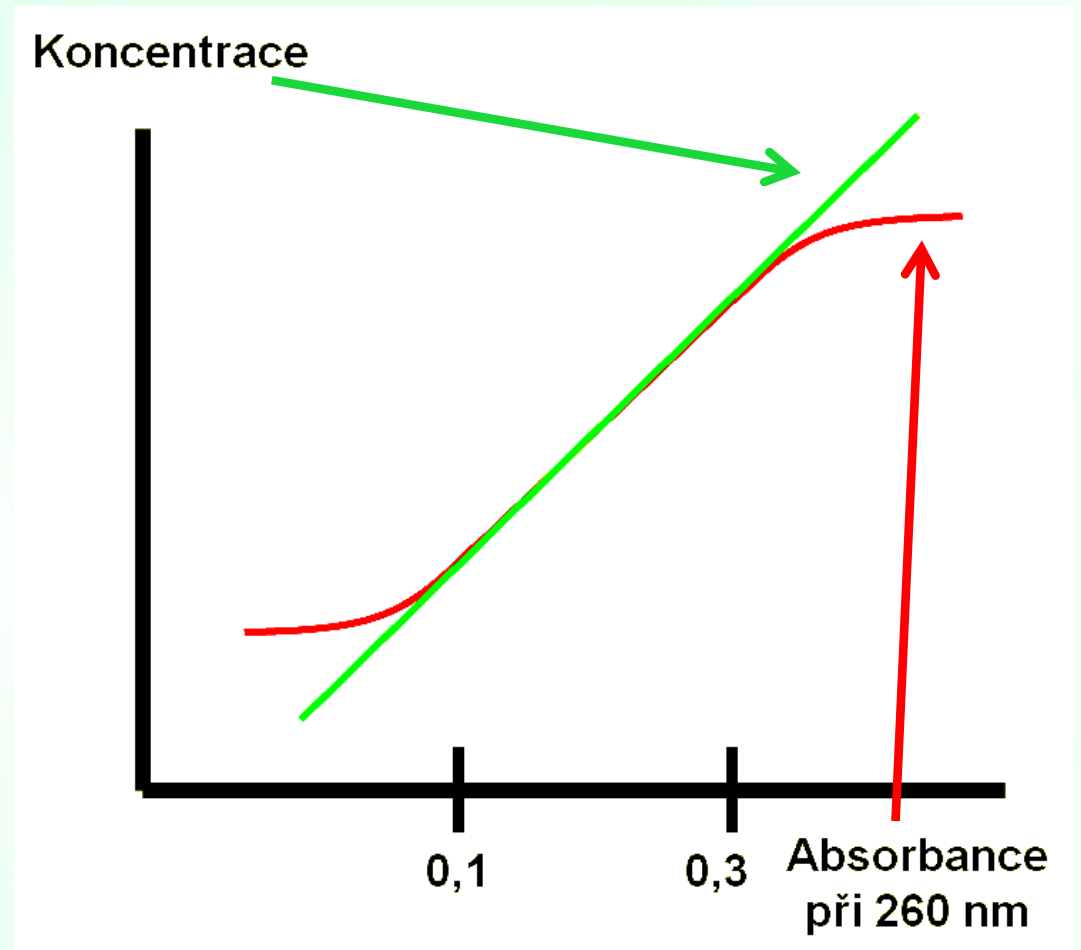
Charaktrizace  
získané NA

$A_{260} = 1,0$  (v 1 cm  
kyvetě)

dsDNA ~ 50  $\mu\text{g/ml}$

ssDNA ~ 33  $\mu\text{g/ml}$

ssRNA ~ 40  $\mu\text{g/ml}$



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

(novější přístroje mají vyšší rozsah !!)

# Optická hustota odpovídá koncentraci - praktický význam -

Lyze buněk  
a tkání

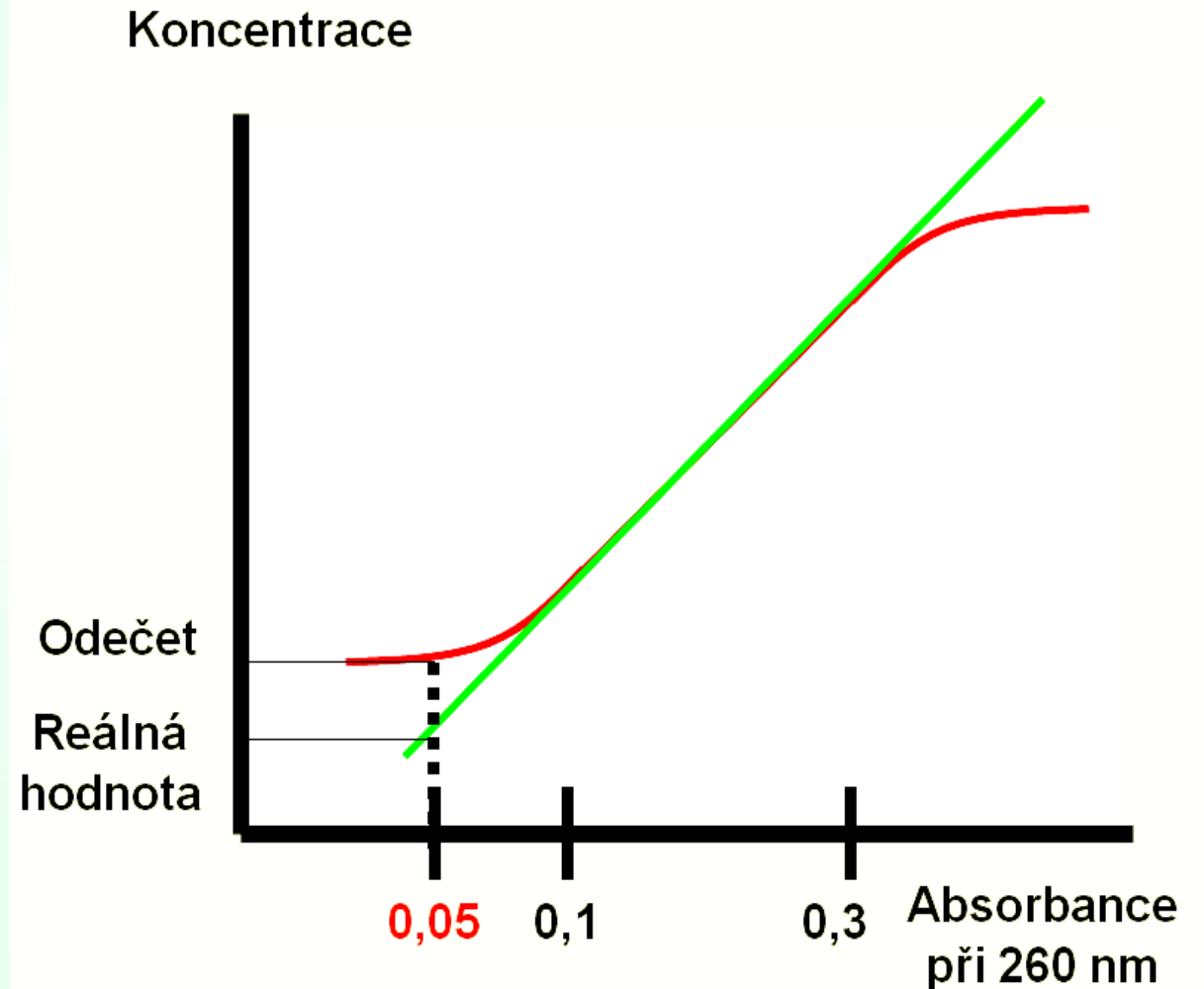
Extrakce NA

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

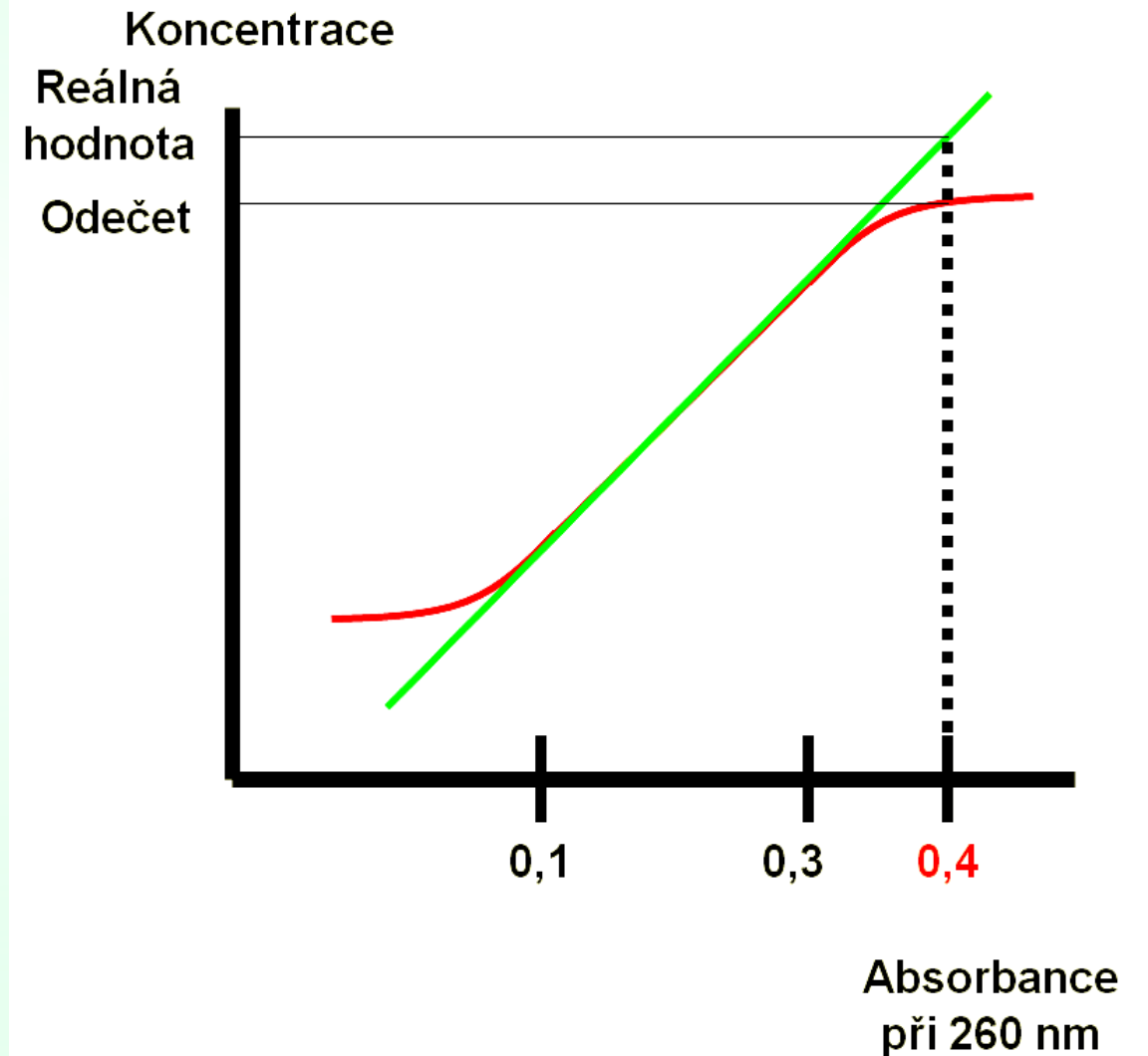
Extrakce NA

Purifikace NA

Charaktrizace  
získané NA

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

Koncentraci DNA  
**Podhodnocujete**





# 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**

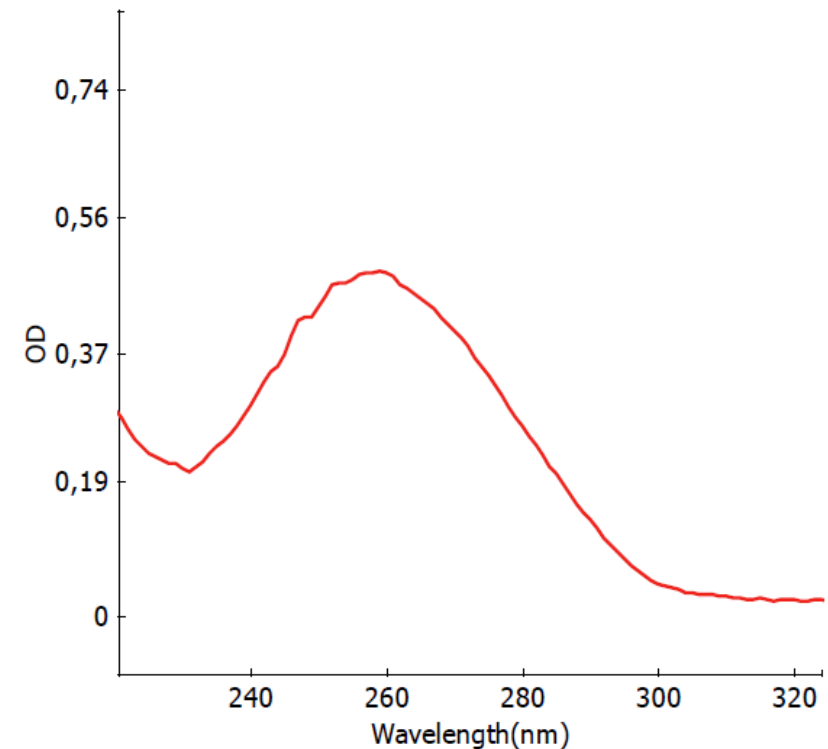
# Izolace DNA – studentská realita

Nucleic Acid Conc : 22,99 ng/ $\mu$ L

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**

