

Izolace nukleových kyselin

Požadavky na izolaci nukleových kyselin

- Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami je jejich izolace v nativním stavu z přirozeného materiálu, v **dostatečném množství a čistotě.**
- Nukleové kyseliny je třeba zbavit všech látek, které se po lyzi buněk nebo virových částic stávají součástí hrubých lyzátů a jejichž přítomnost by bránila účinnému a specifickému působení enzymů používaných k jejich analýze a úpravám.

Materiál pro izolaci nukleových kyselin

- Výchozím materiálem mohou být:
 - Jednotlivé buňky (např. prokaryotických organismů nebo kvasinek)
 - Genomová
 - Plazmidová
 - Tkáně a orgány eukaryot, které jsou nejdříve homogenizovány
 - Virové částice purifikované centrifugačními technikami
 - Nukleové kyseliny v elektroforetických gelech
 - Produkty PCR reakcí

Metodické principy využívané při izolaci nukleových kyselin

- Rozrušení buněčných stěn nebo virových nukleokapsidů působením
 - Enzymů (lysozym a celulázy)
 - Detergentů (dodecylsulfát sodný)
- Enzymatické kroky pro odstranění kontaminant
 - Proteináza K nebo pronáza E
 - RNáza nebo DNáza
- Kroky využívající různou rozpustnost
 - Fenolová extrakce
 - Adsorpce na pevný podklad
- Centrifugace
- Precipitace

Typy metod pro izolaci nukleových kyselin

1. Metody využívající rozdílné rozpustnosti

- Zahrnují fenolové extrakce a etanolové nebo izopropanolové precipitace (srážení)
- Obecně rozšířené, široké aplikace
- Vhodné pro vysokomolekulární genomové NK

2. Metody adsorpční

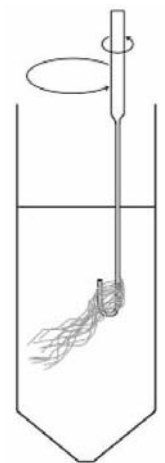
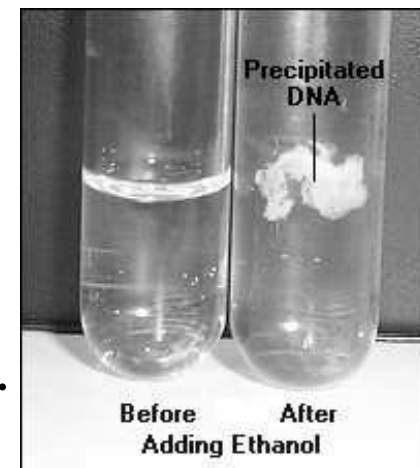
- DNA se váže na křemičité sklo v přítomnosti chaotropní látky
- Vhodné zejména pro rychlou purifikaci plazmidů a malých fragmentů

3. Centrifugace v hustotním gradientu

- Izopyknické centrifugace v gradientu CsCl
- Vhodné při velkém množství a pro vysokou čistotu
- Možnost frakcionace podle velikosti v sacharózových gradientech

Typická fenolová extrakce

- Promíchání lyzátu buněk s roztokem fenolu, případně se směsí fenolu a chloroformu. **Fenol je organické rozpouštědlo používané k oddělení proteinů od nukleových kyselin.** Proteiny jsou hydrofobní a zůstávají v organické fázi, zatímco NK jsou vysoce nabitě a přecházejí do vodné fáze. **Chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení jednotlivých fází získaných v následujícím kroku.**
- **Centrifugace**, při níž dojde k oddělení spodní organické fáze, tvořené fenolem (případně směsí fenolu a chloroformu), mezifáze, tvořené denaturovanými proteiny a zbytky buněk, a horní vodné fáze, v níž jsou rozpuštěny nukleové kyseliny.
- **Vysrážení nukleových kyselin etanolem, případně izopropanolem.** Účinnému vysrážení nukleových kyselin přítomných v nízkých koncentracích se napomáhá **snížením teploty a přidavkem solí.**
- Shromáždění precipitátu nukleových kyselin centrifugací a rozpuštění získaného sedimentu ve vhodném roztoku.

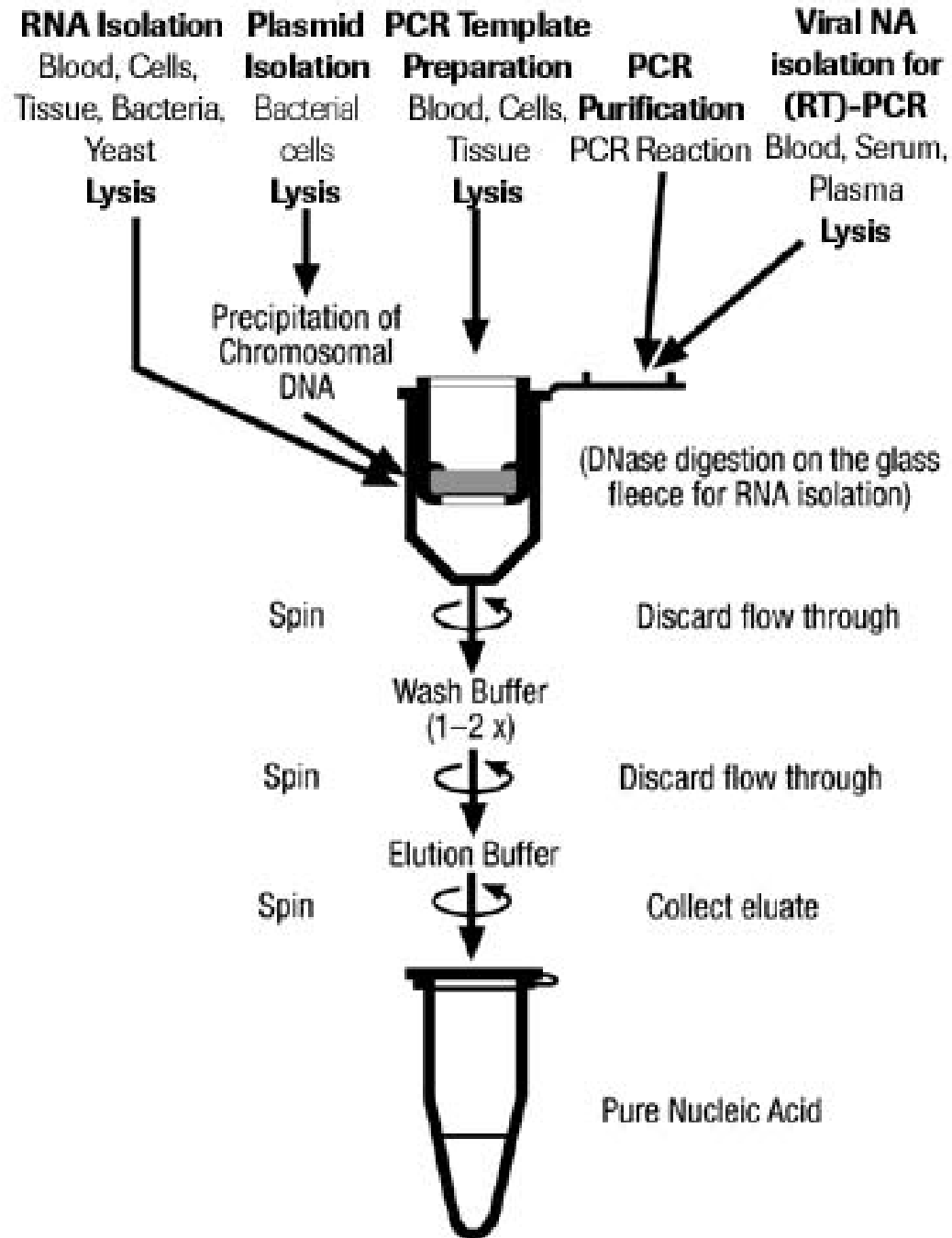


Izolace RNA

- Izolace RNA fenolovou extrakcí je podobná izolaci DNA s následujícími rozdíly:
 - Inhibitory RNáz, sterilní boxy, DEPC-H₂O, rukavice!
 - Extrakce v guanidinových solích
 - Fenolové extrakce při pH 5-6
 - Odstranění DNA DNázami bez RNáz
 - Selektivní srážení RNA pomocí LiCl
 - Afinitní chromatografie na olido-dT kolonách pro izolaci mRNA

Adsorpční metody

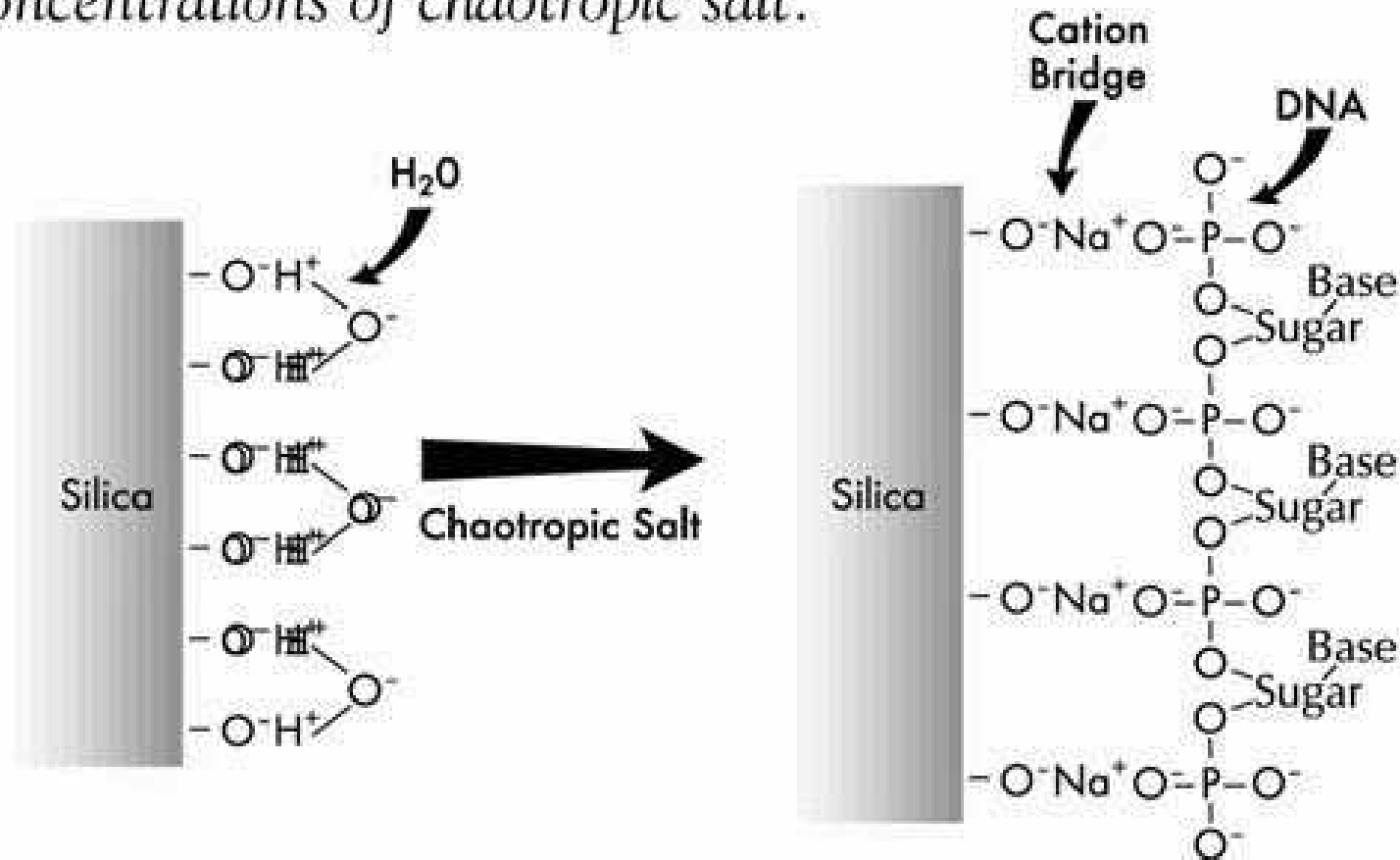
- Využívají schopnost nukleových kyselin adsorbovat se na povrchy z **oxidu křemičitého** (kolonky do centrifugačních mikrozkušavek) v přítomnosti chaotropní soli (Vogelstein and Gillespie, 1979)
 - jodid sodný (NaI)
 - guanidin thiokyanát
 - guanidin hydrochlorid
- Síla vazby závisí na
 - Typu nukleové kyseliny (DNA nebo RNA)
 - Iontové síle
 - pH roztoku
- Promývání pro odstranění proteinů a dalších kontaminant
- Eluce DNA puřem s nízkou koncentrací solí nebo H₂O
- Rychlá metoda, vysoký výtěžek (malé fragmenty), vysoká čistota



Mechanismus interakce DNA s oxidem křemičitým

Fig. 1

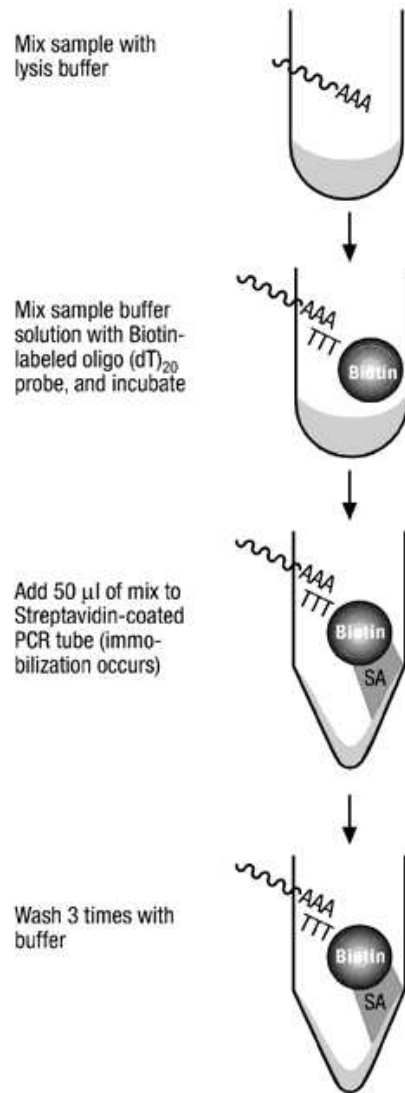
A possible mechanism for silica binding of DNA in high concentrations of chaotropic salt.



Izolace mRNA

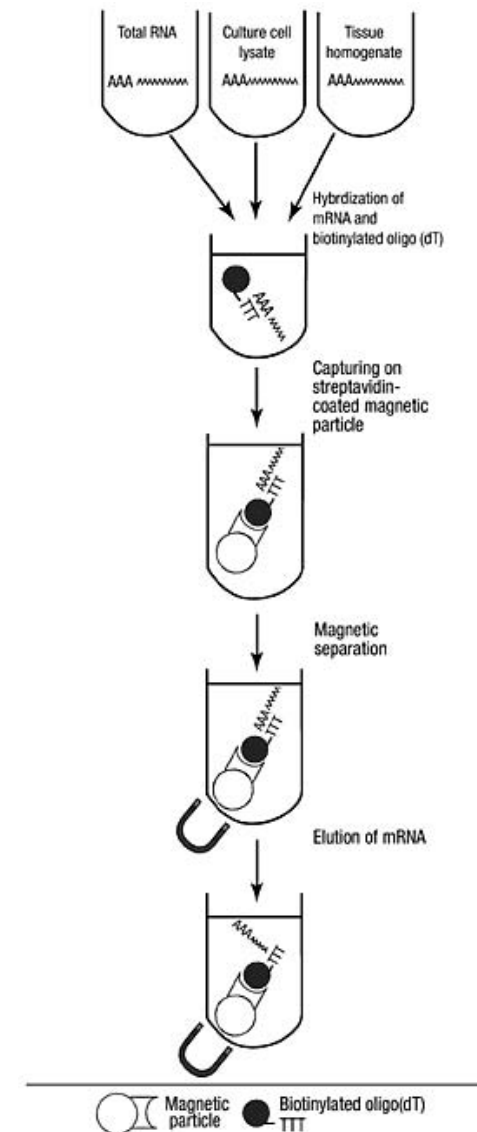
- mRNA tvoří pouze malý podíl z celkové RNA, proto je její izolace obtížná
- Pro izolaci se využívají
 - Tradiční metody, kdy se nejprve izoluje celková RNA, která je následně separovaná na mRNA, rRNA a tRNA
 - Metody využívající afinitu poly(A) konce u mRNA a biotinem značené oligo(dT) sondy
 - Sonda se v lyzátu selektivně váže na mRNA, aniž by interagovala s DNA nebo jinými RNA
 - Hybridní molekuly biotinylované dT-A mRNA jsou imobilizovány na pevném podkladu pokrytém streptavidinem

- Streptavidinem pokryté mikrozkumavky



Captured mRNA, ready for RT-PCR.

- Streptavidinem pokryté magnetické částice



Analýza a kvantifikace

- **SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA**

- Je to vhodná metoda pro měření vzorků, které jsou dostatečně čisté bez významného množství kontaminant.
- Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorpce v oblasti vlnové délky okolo 260 nm.
- Z hodnot optické hustoty lze koncentraci a čistotu vzorku stanovit podle empirických vztahů. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorpce při 260 a 280 nm. Při znečištění vzorku proteiny, jejichž absorpční maximum leží okolo 280 nm, bude vypočtený poměr výrazně nižší a stanovení koncentrace NK nebude přesné.

DNA	A_{260}	$1.0 \approx 50 \mu\text{g/ml}$
	A_{260}/A_{280}	1.6 - 1.8
RNA	A_{260}	$1.0 \approx 40 \mu\text{g/ml}$
	A_{260}/A_{280}	~ 2.0

- **FLUORESCENČNÍ METODA**

- Je vhodná u vzorků s nízkou koncentrací nukleových kyselin nebo znečištěných přítomností jiných látek.
- Využívá se fluorescence, k níž dochází po ozáření komplexu etidiumbromidu navázaného na DNA UV světlem. Vzniká viditelné červenooranžové světlo o vlnové délce 590 nm, jehož intenzitu lze srovnat s intenzitou standardu o známé koncentraci buď vizuálně, nebo po pořízení fotografického záznamu. Stanovení se provádí na agarózových gelech obsahujících nízkou koncentraci etidiumbromidu, na něž se testované vzorky buď nakapou, nebo podrobí elektroforéze, která umožní částečnou purifikaci nukleových kyselin.