

Využití chromatografických metod při analýze nukleových kyselin

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2013

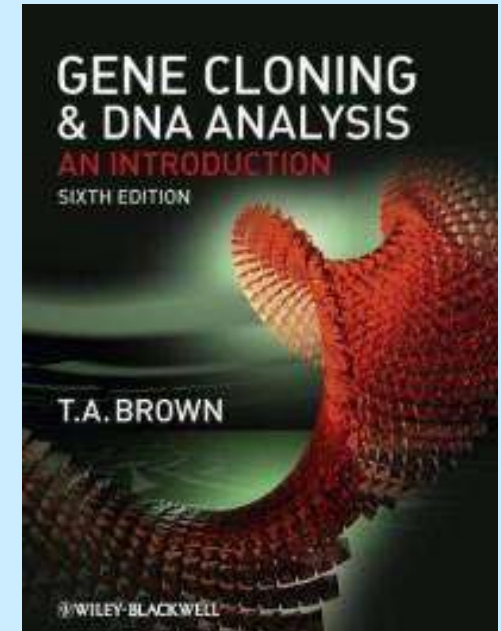
Obsah přednášky

- 1) Chromatografie – základní informace**
- 2) Druhy chromatografických metod**
- 3) Absorpční a rozdělovací chromatografie**
- 4) Ionoměničová chromatografie**
- 5) Gelová permeační chromatografie**
- 6) Afinity chromatografie**
- 7) Chromatografie a izolace NA**
- 8) Chromatografie a analýza DNA**



Doporučená literatura

Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition



Chromatografie



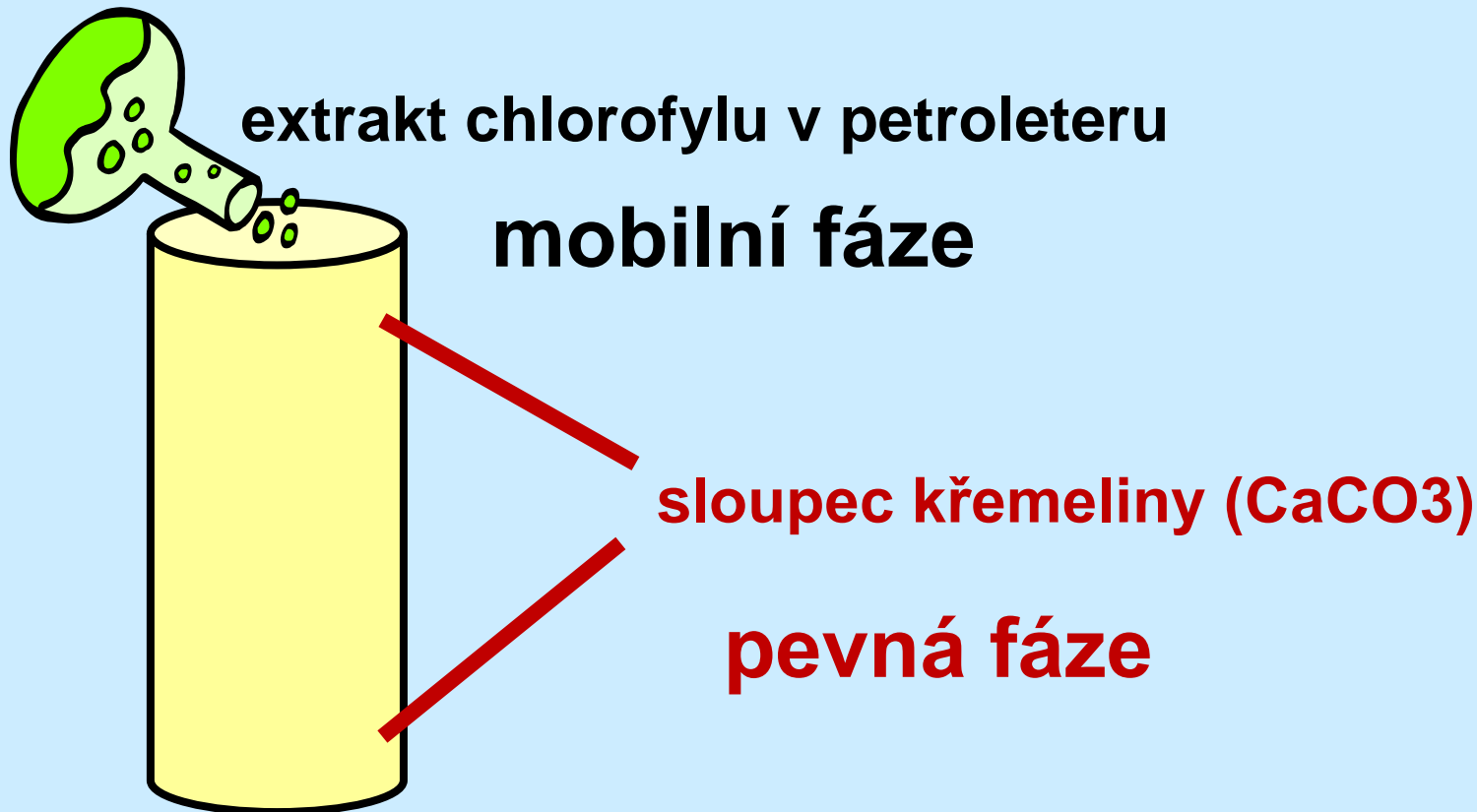
Základní nástroj při purifikaci nukleových kyselin

Chromatografie

- Je souhrnné označení pro skupinu fyzikálně-chemických separačních metod
- Slouží k **separaci** a **analýze** složitých směsí látek
- Molekuly analyzované látky se u všech typů chromatografických separací rozdělují mezi tzv. **stacionární** a **mobilní** fázi
- Dělení je založeno na rozdílné distribuci složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi

Proč chromatografie?

1906 - ruský botanik, fyziolog a biochemik M. S. Cvet provedl experiment, při kterém rozdělil chlorofyl na jeho složky - chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy – vznikly barevné zóny (chroma = barva)



Základní koncept chromatografie

- **biologicky aktivní látky tvoří rozsáhlou skupinu sloučenin se speciálními funkcemi**
- **změny pH, iontové síly, koncentrace kovových iontů, kofaktorů atp. mohu mít za následek **velké ovlivnění** izolovaných biologicky aktivních molekul**
- **aby během izolace nedocházelo ke ztrátám jejich biologické aktivity, je nutné použít pokud možno **co nejmírnější separační metody****

Druhy chromatografických metod I

Podle účelu použití

- **analytická chromatografie**
- **preparativní chromatografie**

Podle fyzikálně-chemického principu

- **adsorpční chromatografie**
- **rozdělovací chromatografie**
- **iontově výměnná chromatografie**
- **gelová chromatografie**
- **(bio)afinitní chromatografie**

Druhy chromatografických metod II

Podle skupenství mobilní fáze

- **kapalinová chromatografie**
- **plynová chromatografie**

Podle uspořádání stacionární fáze

- **kolonová (sloupcová) chromatografie**
- **kapilární chromatografie**
- **chromatografie na tenké vrstvě
(tenkovrstvá chromatografie)**
- **chromatografie na papíře**

Co chromatografie taky znamenala

- **Vývoj účinných izolačních metod, jako jsou gelová, ionexová, bioafinitní aj. chromatografie a nejrůznější typy elektroforéz, umožnil vývoj celé řady nových odvětví chemie**
- **Nebyl by možný např. současný rozvoj chemie proteinů a nukleových kyselin - molekulární biologie, genové inženýrství, imunochemii aj.**

Strategie při purifikaci - I

- **nízká koncentrace biologicky aktivních látek**
- **směs mnoha podobných látek**

První stupeň izolace = adsorpce

- **biospecifická afinitní chromatografie**
- **při fyziologických hodnotách pH je většina proteinů negativně nabitých → sorpce na anex**

Další stupeň izolace

- **gelová chromatografie**
- **elektroforetické metody**

Strategie při purifikaci - II

Izolaci čisté biologicky aktivní látky dosahujeme nejčastěji **kombinací** několika separačních metod

Při volbě purifikačního schématu bychom měli dbát na to, aby se **neopakovaly metody založené na stejném dělicím principu**

Adsorpční chromatografie

Je založena na rozdílné adsorpci látek na povrchu sorbentu, tvořícího stacionární fázi

- **Látky, které jsou za daných podmínek silněji vázány sorpčními silami, jsou v jednotlivých úsecích naadsorbovány častěji a déle než látky jiné**
- **Sorbenty stacionární fáze se liší polaritou nebo kyselostí**
 - **nepolární – aktivní uhlí, polární kyselý silikagel (SiO_2), polární bazický hydratovaný oxid hlinitý nebo hořečnatý**
- **Mobilní fáze – směsi rozpouštědel (... chloroform, etanol, ...)**
 - **U plynové adsorpční chromatografie dusík nebo hélium**

Rozdělovací chromatografie

Je založena na založena na rozdílné rozpustnosti dělených látek ve dvou různých kapalinách, tedy na rozdílných hodnotách rozdělovacího koeficientu ($\alpha = c_m/c_s$)

- Jedna z použitých kapalin je mobilní fází, druhá je potom zakotvena na nějakém nosiči a tvoří tak stacionární fázi
- Vyšší hodnota α = silnější vazba na stacionární složku = pomalejší průtok kolonou
- Normální fáze = ukotvenou stacionární fází je voda
- Obrácená fáze = ukotvenou stacionární fází tvoří nízkopolární organické kapaliny
- Nosiče – SiO_2 , sklo, polymery, škrob, celulóza, aj.

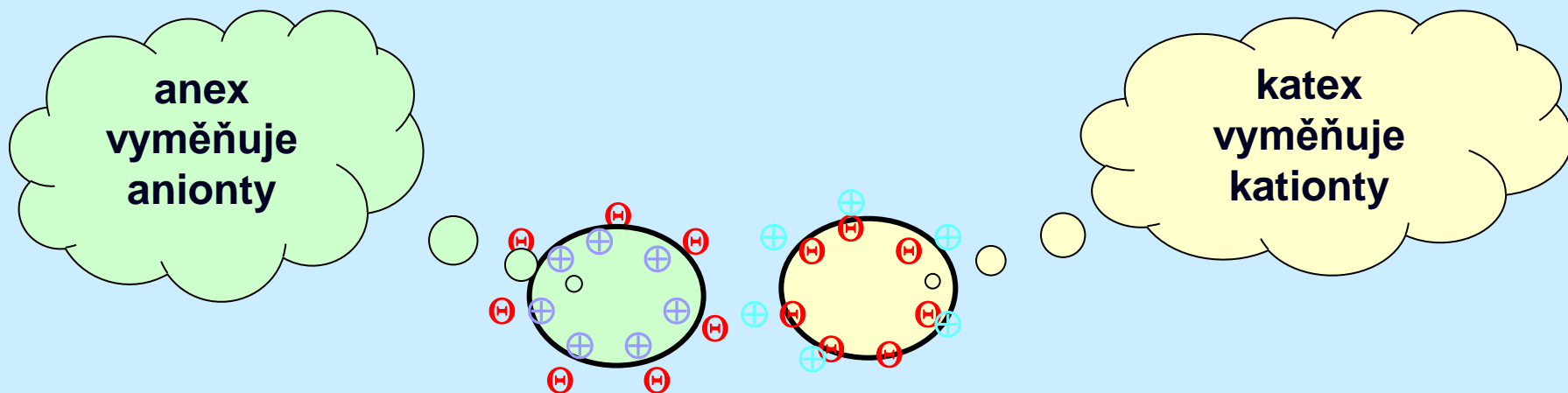
Ionexová chromatografie

Je založena na coulombickém přitahování opačných nábojů

- **Stacionární fáze má na svém povrchu chemické skupiny nesoucí náboj**
- **Pokud jsou v protékající mobilní fázi přítomné ionty opačného náboje nebo molekuly silně dipólové, jsou elektrostatickými silami přitaženy a dostatečně pevně zadrženy na povrchu stacionární fáze**
- **Zadržení je absolutní, k uvolnění nutná změna náboje**

Iontoměniče - ionexy

Ionexy (anex nebo katex) tvoří stacionární fázi



- **Anexy:** primární aminy $-\text{NH}_2$, sekundární aminy $-\text{NHR}$, terciární aminy $-\text{NR}_2$ a kvartérní amoniové báze $-\text{N}^+\text{R}_3$
- **Katexy:** fenolická skupina $-\text{OH}$, karboxylová skupina $-\text{COOH}$, fosfátová skupina $-\text{PO}(\text{OH})_2$ a sulfátová skupina $-\text{SO}_3\text{H}$

Materiál pro ionexy

- **různě modifikovaná celulosa**
- **Sephadex**
- **ionexy odvozené od agarózy (Trisacryl, Fractogel...)**
- **ionexy založené na bázi křemičitanů a syntetických polymerů**

Ionexová chromatografie patří mezi nejrozšířenější metody, které byly a jsou používány pro izolace nejrůznějších biologicky aktivních látek (enzymy, NA, AA, antibiotika, vitamíny, nukleosidy a nukleotidy, lipidy, aj.)

Průběh ionexové chromatografie

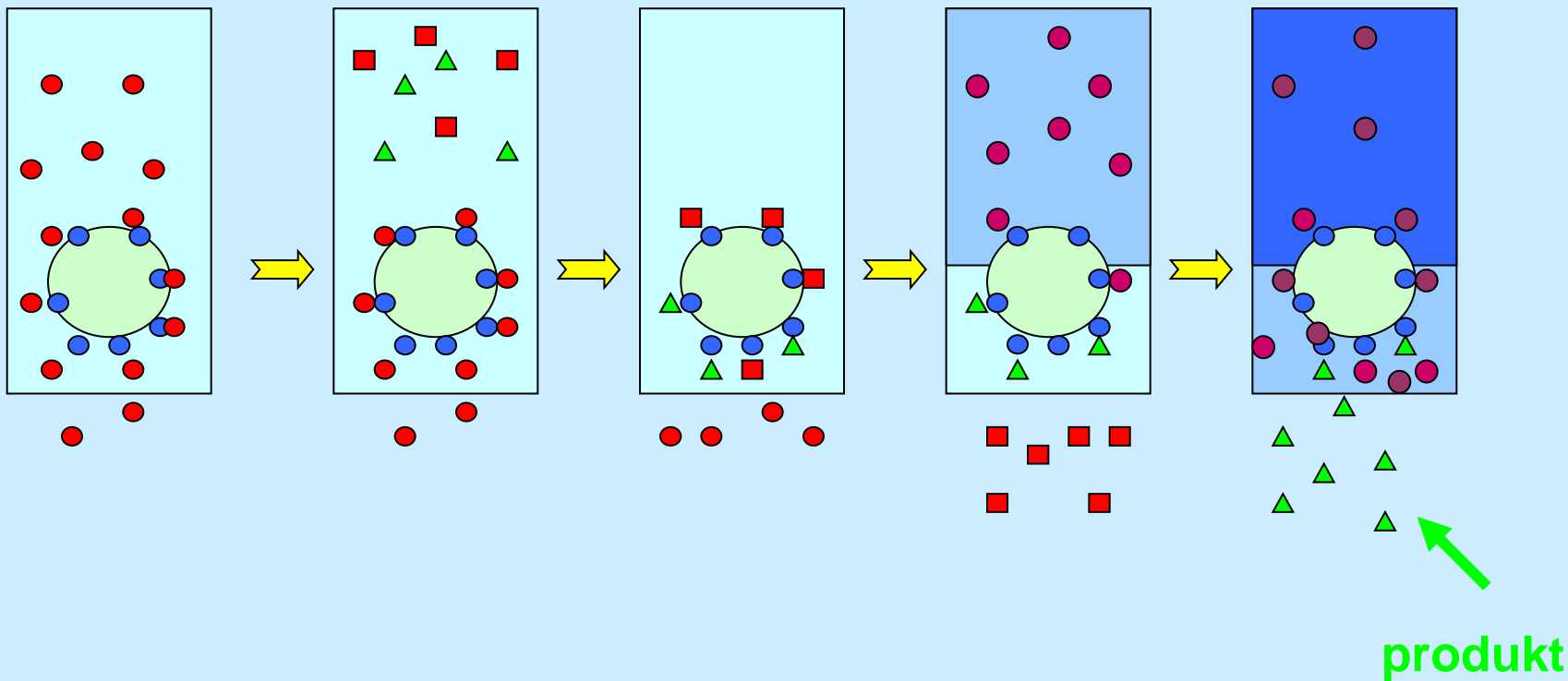
Aktivace kolony

Nanesení vzorku

Adsorbce částic

Promytí kolony

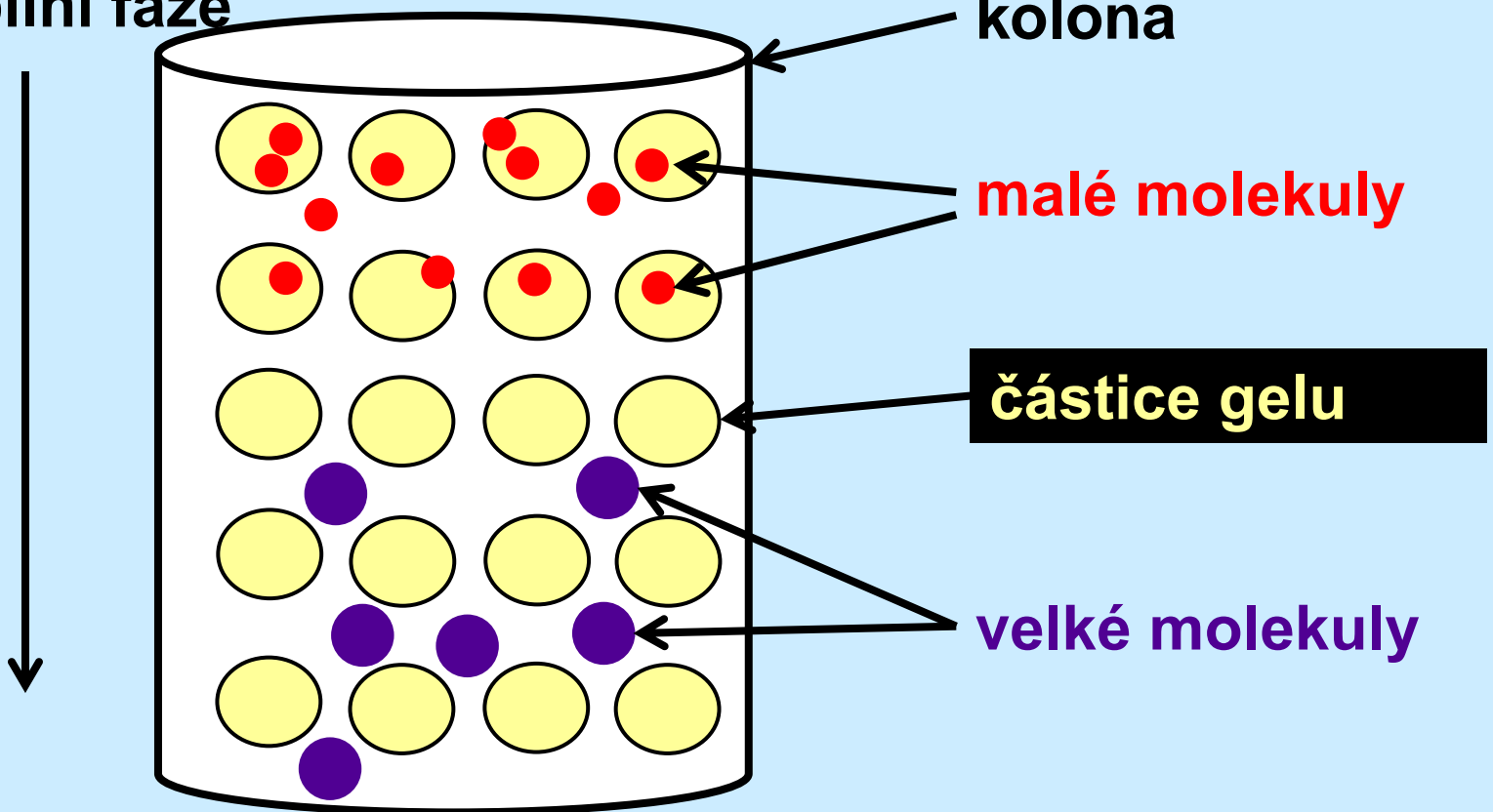
Eluce



Gelová permeační chromatografie

Je založena na rozdílné průchodnosti otvorů a dutých výklenků na částicích stacionární fáze pro různě velké částice dělené směsi

tok mobilní fáze



Gelová permeační chromatografie

- **Při průchodu směsi látek porézní stacionární fázi dochází k tomu, že malé molekuly jsou schopny difundovat dovnitř pórů matrice a jejich pohyb je tedy zpomalen, zatímco velké molekuly se nezachytí a prochází matricí rychleji – čím větší molekula, tím rychleji prochází ven z kolony**
- **Postupným promýváním mobilní fází se ven z kolony vymyjí i malé molekuly**
- **Důležité je, aby mezi děleným roztokem a matricí nedocházelo k žádným vazbám nebo k denaturaci děleného materiálu**

Materiály pro stacionární fázi

Inertní porézní materiál nasycený kapalinou

- **agaróza**
- **zesíťovaný dextran (Sephadex)**
- **polyakrylamid (BioGel P)**
- **celulosa (Cellufin)**
- **materiály založené na silikagelu nebo porézním skle**

Afinitní chromatografie I

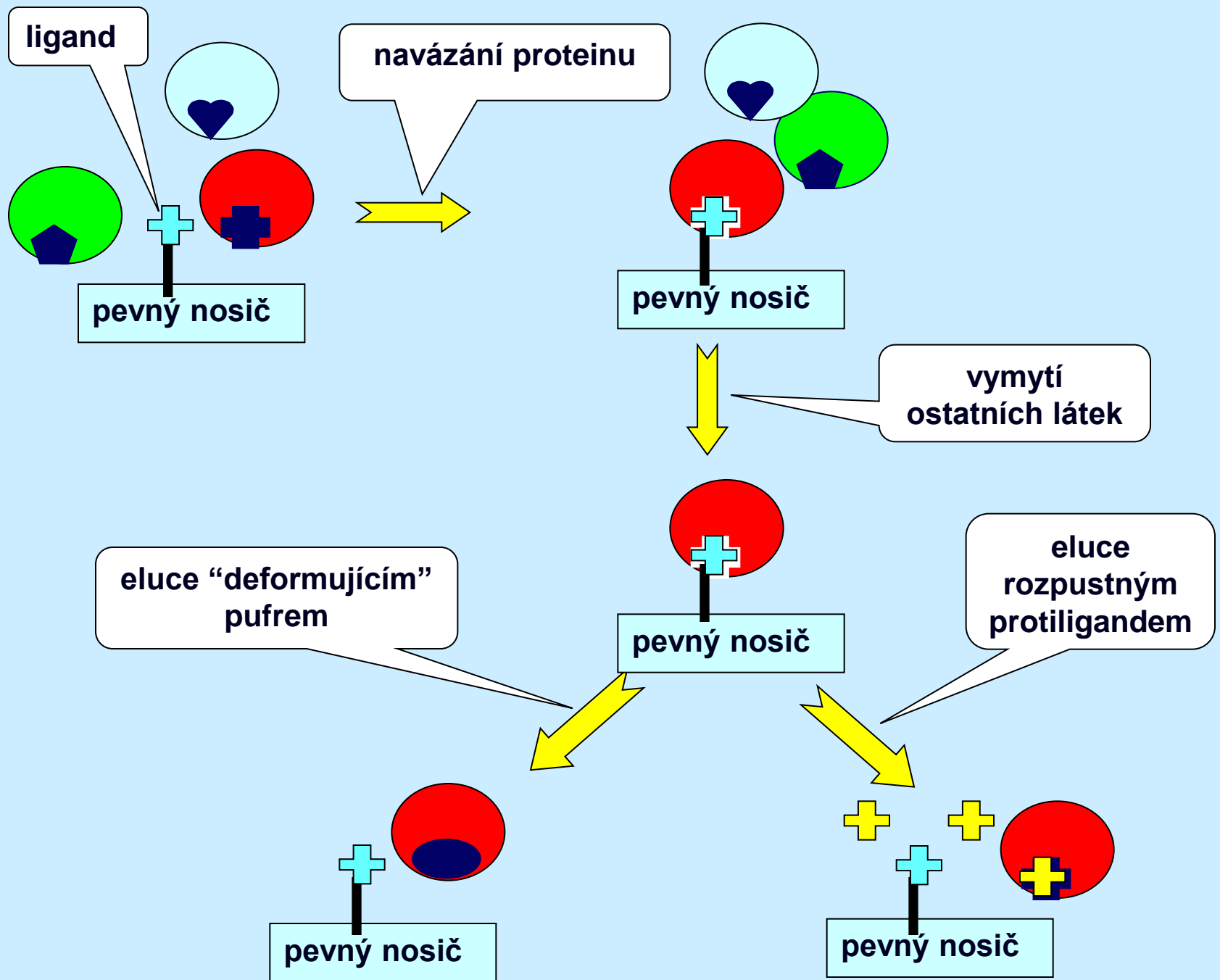
Je založena na specifických interakcích obvykle nevazebné povahy

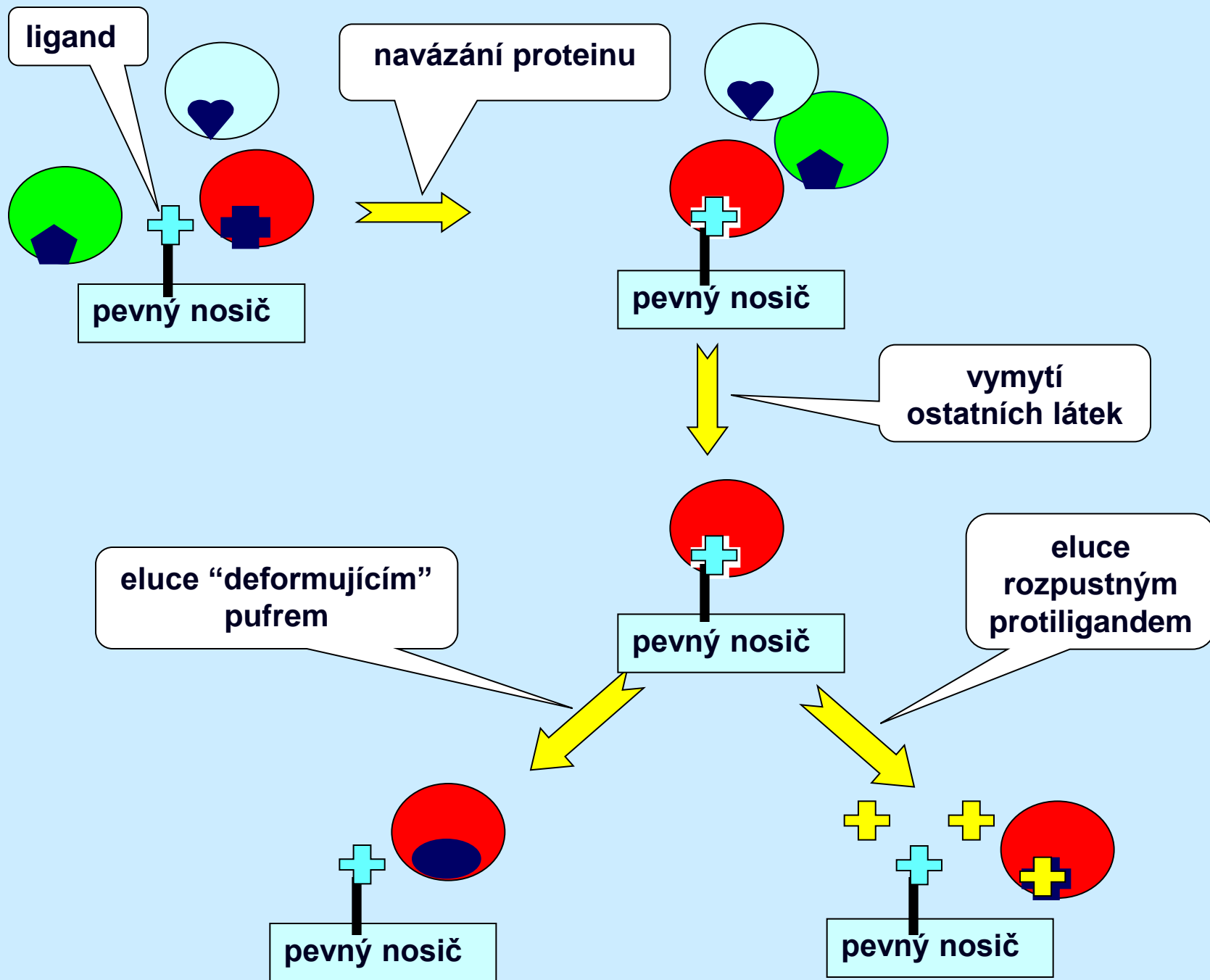
- **Stacionární fázi tvoří jedna z interagujících molekul vázaná jako ligand na pevný nosič**
- **Druhý partner v mobilní fázi se při průchodu stacionární fází váže na tento ligand**
- **Po promytí kontaminant se nespecificky (a tedy slabě) vázaná látka uvolní elučním činidlem**

- **Kolony komerčně dostupné**
- **Nejčastějším typem nosičů jsou polysacharidové gely, aktivují se např. bromkyanem CNBr**
- **Na nosiči aktivací vzniklé nitrilové skupiny reagují snadno se skupinami –OH nebo –NH₂ ligandu za vzniku klasických kovalentních vazeb**

Afinitní chromatografie II

- Elučními činidly bývají nejčastěji pufry o nízkém nebo naopak vysokém pH
- Změnou pH se mění konformace nebo náboj izolované látky nebo ligandu = uvolnění
- Eluce též vytěsněním kompetitivním ligandem nebo kompetitivní substancí
- **Používá se pro soustavy antigen-protilátka, lektin-glykoprotein, enzym-substrát, receptor-hormon, imunoglobuliny-protein A nebo G, albuminy-Blue Sepharose apod.**





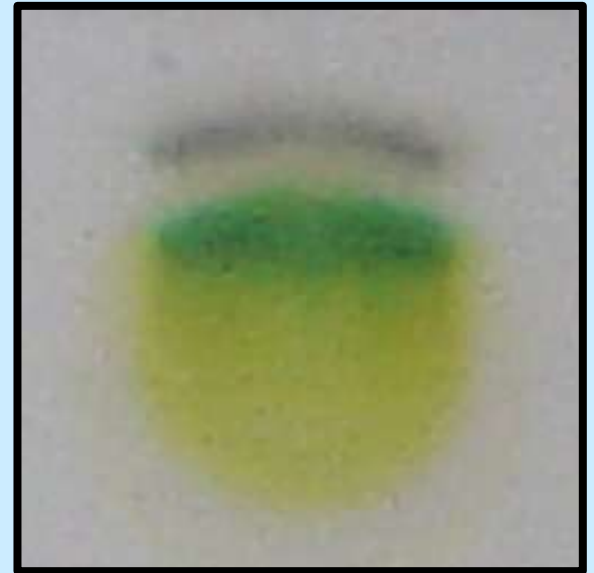
Vysokoúčinná (bio)afinitní chromatografie (HPLC)

- **nová metoda, využívaná zatím převážně v laboratorním měřítku**
- **plně automatizovaný systém pracující za zvýšeného tlaku**
- **lepší rozlišení než při klasickém způsobu**
- **mobilní fáze je kapalina – voda, metanol, acetonitril**
- **stacionární fáze zpravidla uhlovodíky vázané na silikagel**

Detekční metody v chromatografii

Sloupcové/kapilární kolony

- **absorpční spektrofotometrie**
- **fluorescenční spektrofotometrie**
- **coulometrie**
- **amperometrie**
- **konduktometrie**
- **hmotnostní spektrometrie**



Plošná chromatografie

- **Produkty jsou barevné nebo chemiluminiscenční**
- **Barevné chemické reakce**
- **Vždy jen kvalitativní !**

Některé zajímavé odkazy

http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=en_US

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

<http://chromatography.researchtoday.net/>

Izolace nukleových kyselin chromatograficky

- **Jedná se o preparativní, iontoměničovou sloupcovou chromatografii**
- **Kolona obsahuje sorbent (matrici) schopnou vázat zvolenou látku (NA) na elektricky nabitě částice v chromatografické matrix**
- **Je používána pro přípravu většího množství čistých molekul**



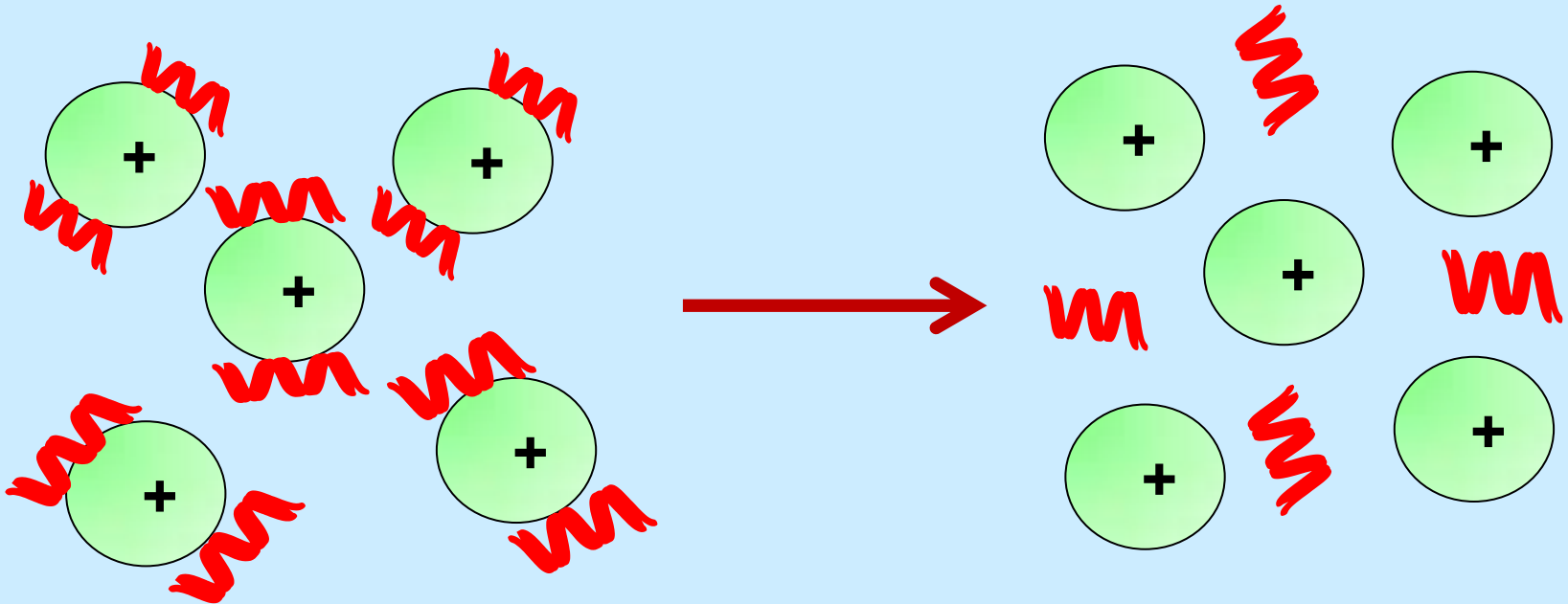
**Jaký náboj musí nést částice vázající
DNA nebo RNA?**

Pochopitelně pozitivní



Co se děje s DNA na iontoměniči

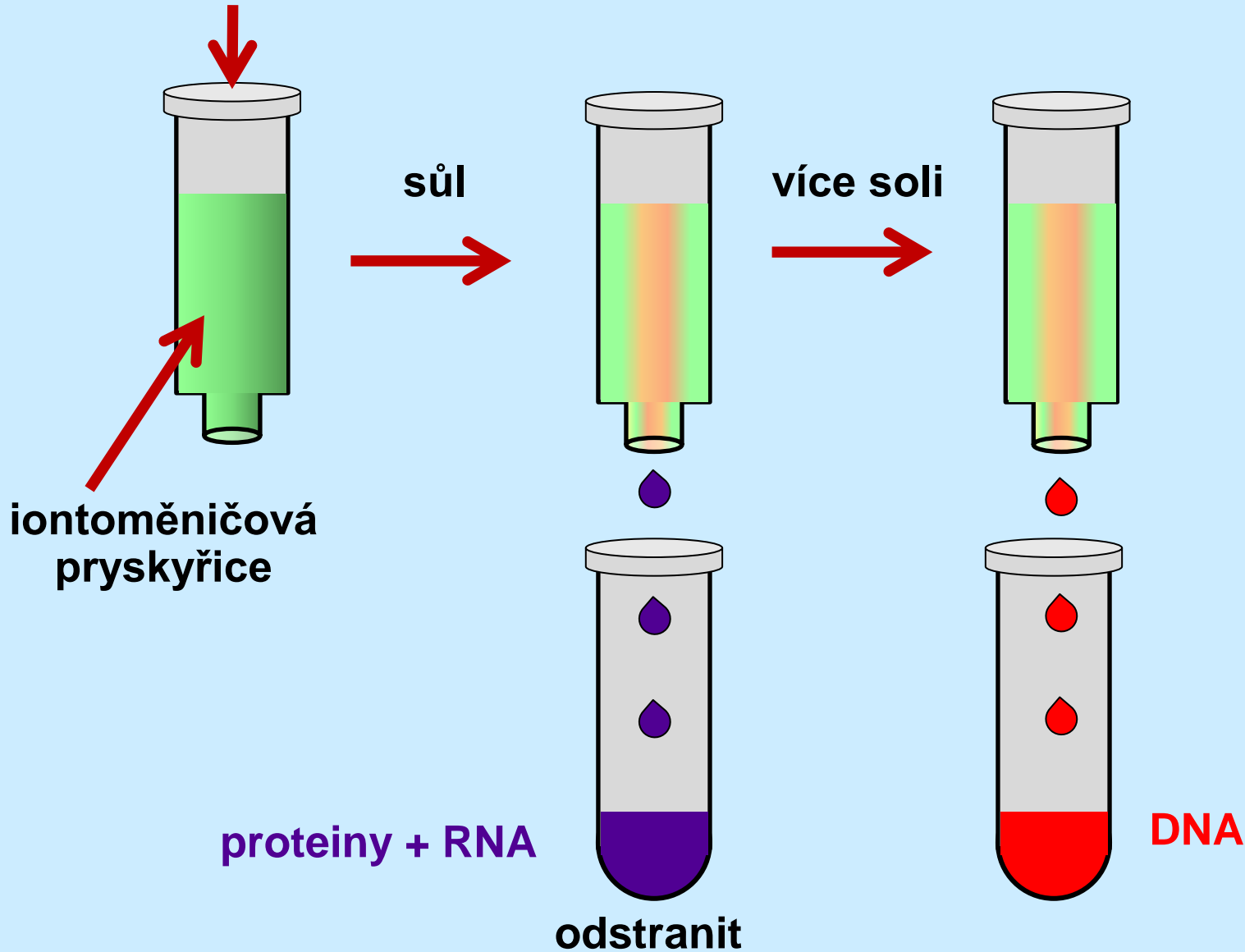
Připojení DNA k pozitivně nabitým částicím



Uvolnění DNA vysokými koncentracemi solí

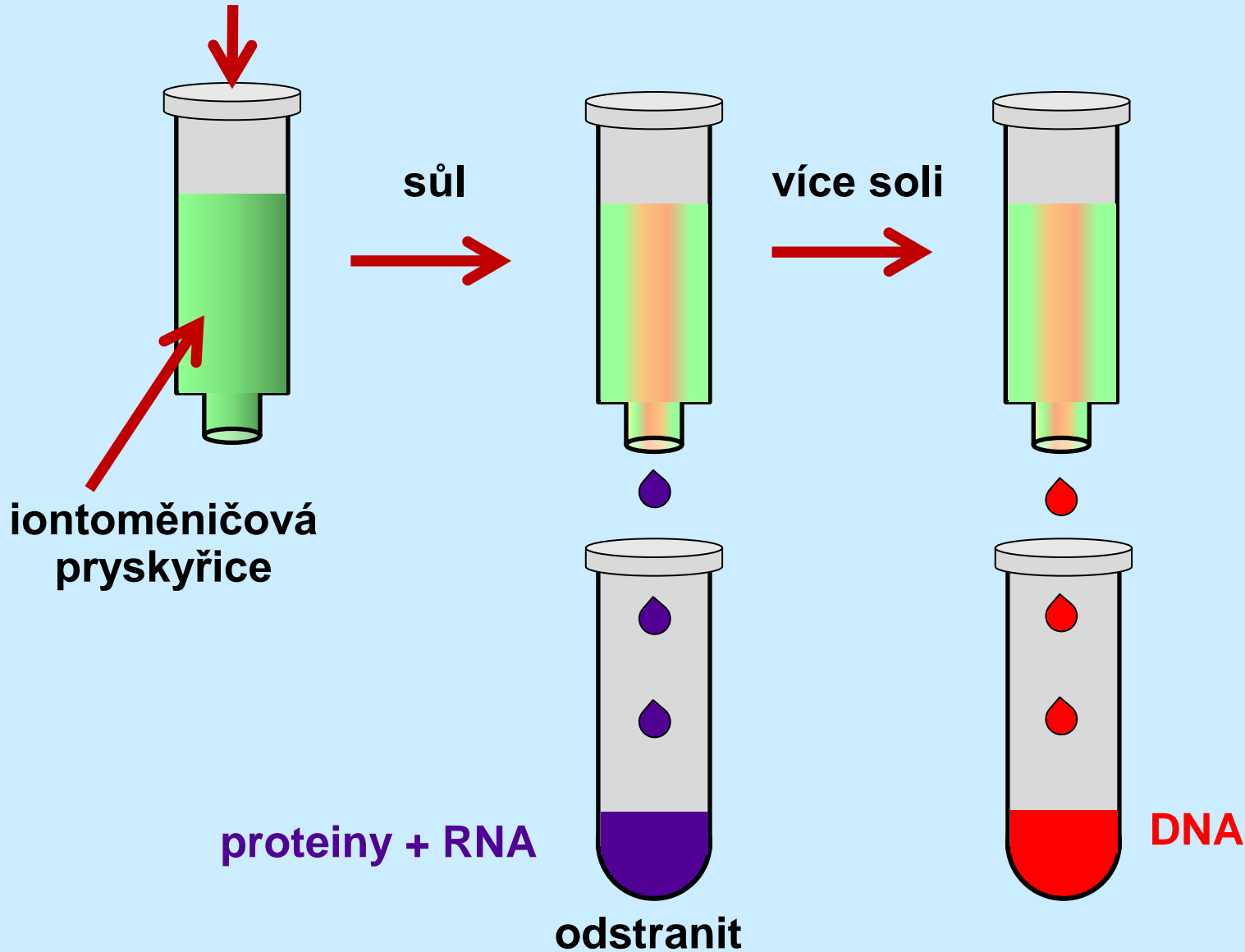
Jak probíhá chromatografie na koloně

buněčný extrakt

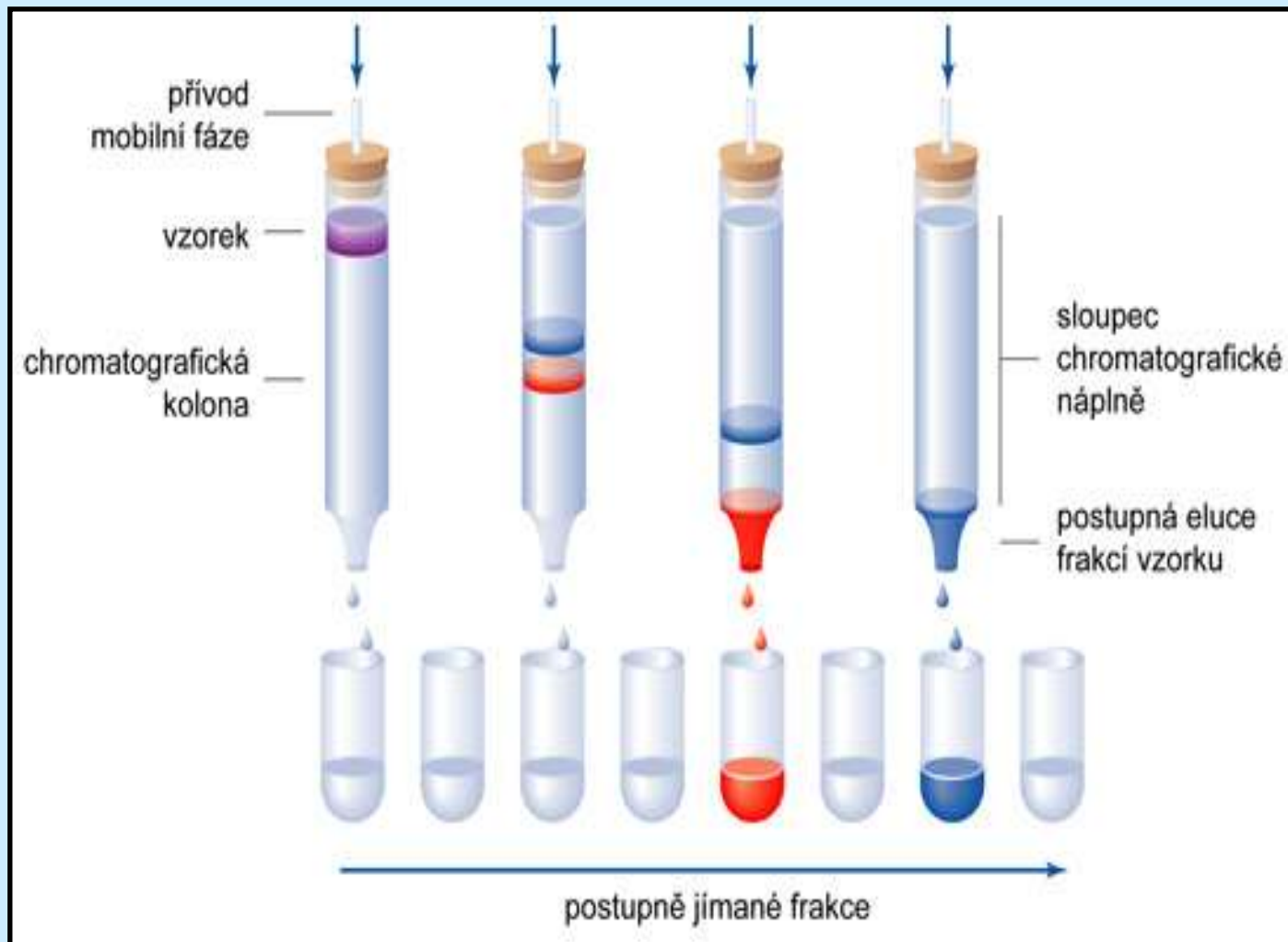


Jak probíhá chromatografie na koloně

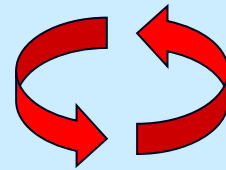
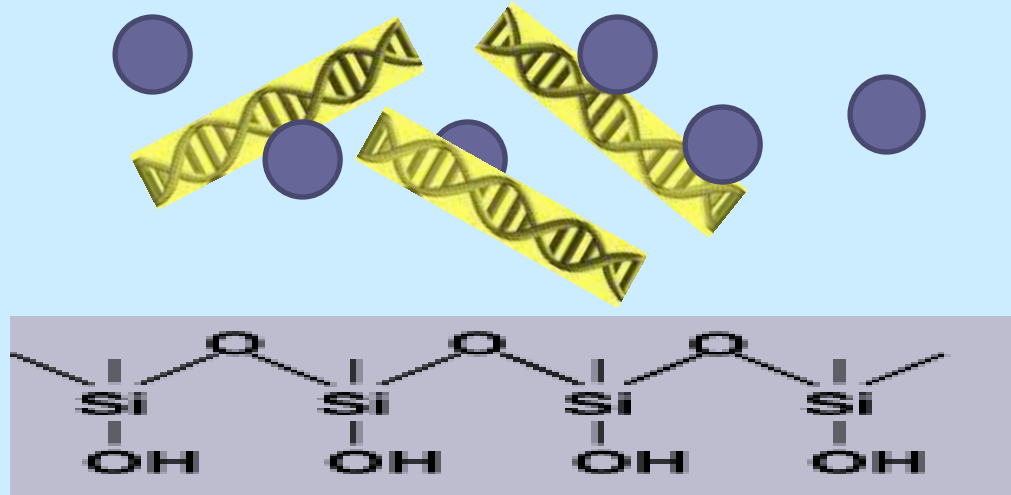
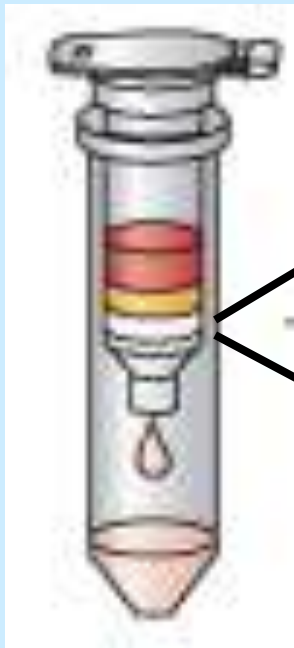
buněčný extrakt



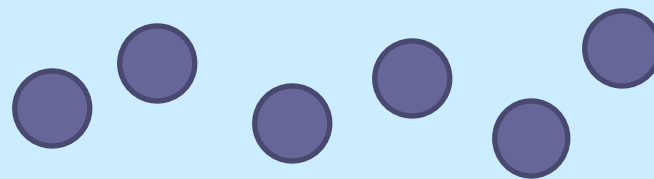
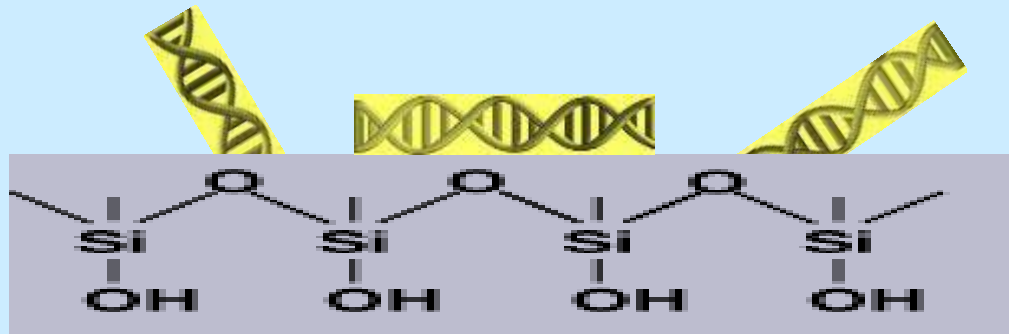
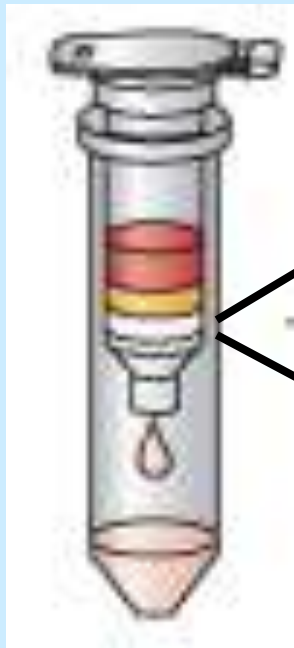
Purifikace NA chromatografií



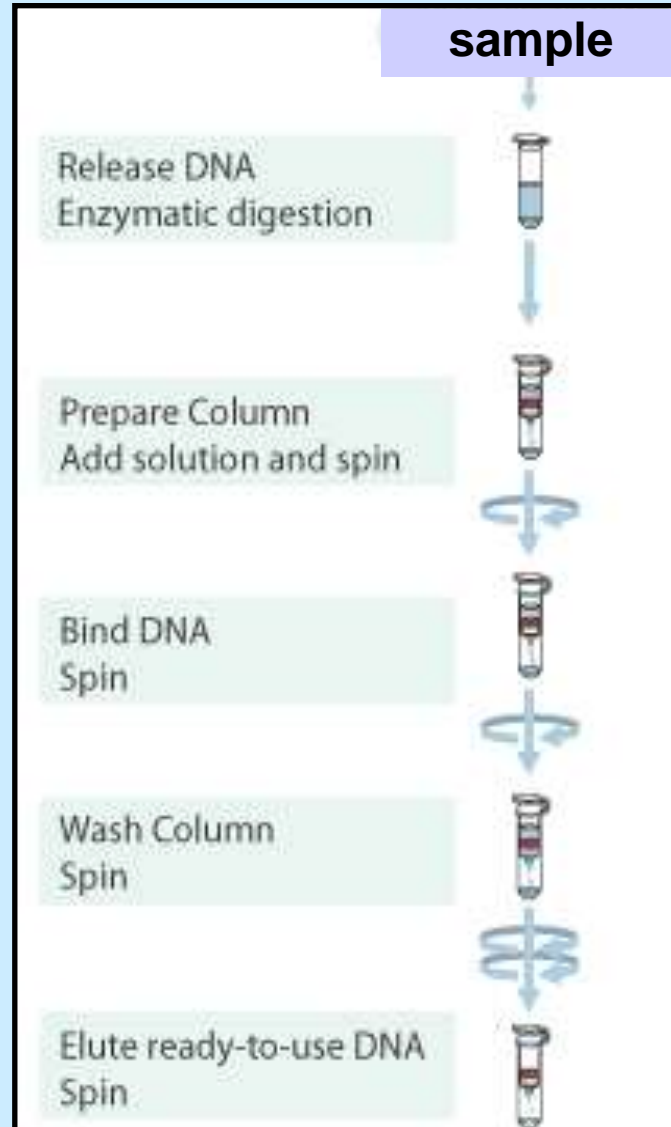
Komerční chromatografie pro izolaci NA ***- spin columns -***



Komerční chromatografie pro izolaci NA ***- spin columns -***



Komerční chromatografie pro izolaci NA ***- spin columns -***



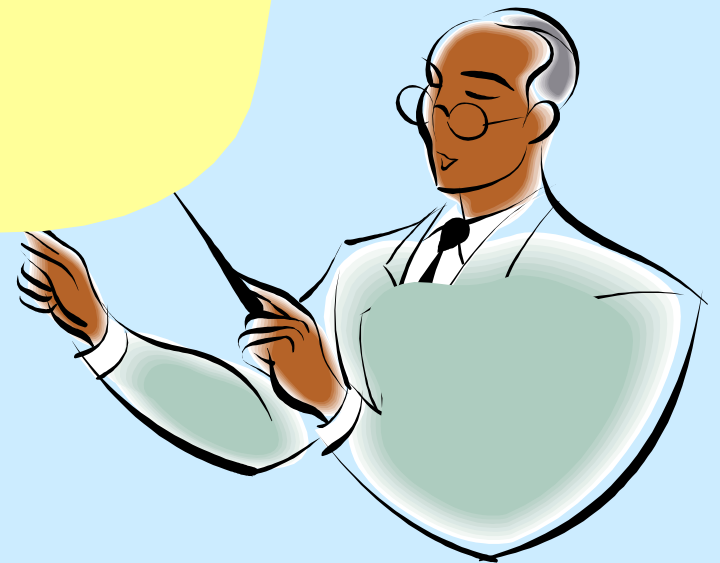
Další aplikace pro izolace NA

- 1) Macherey-Nagel (<http://www.mn-net.com/>)**
- 2) QIAGEN (<http://www.qiagen.com/default.aspx>)**
- 3) Promega (<http://www.promega.com/>)**
- 4) Fermentas (<http://www.fermentas.com/en/home>)**

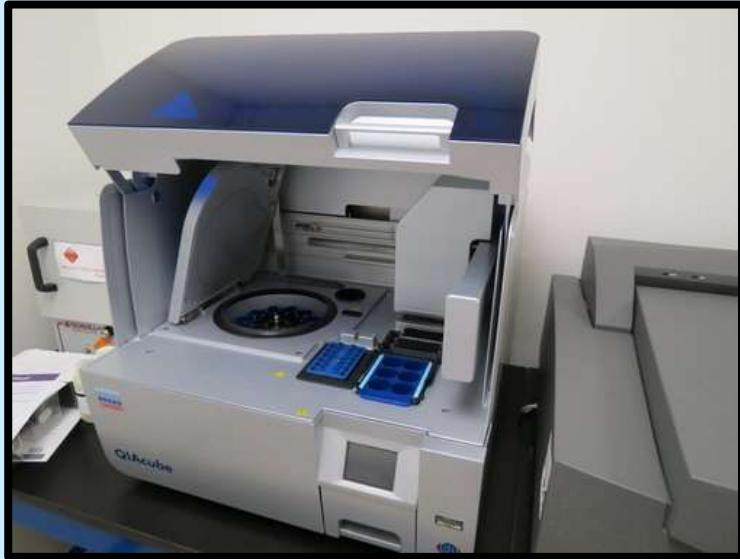
- Izolace genomové DNA (bakterie, rostliny, krev, ...)**
- Izolace virové DNA nebo RNA**
- Izolace mRNA**
- Izolace microRNA**
- Izolace plasmidové DNA**
- Speciální aplikace – purifikace PCR produktů, parafínové bločky, forenzní aplikace**

PCR purification kit

**Seznámíte se detailně v
praktických cvičeních**



Automaty na izolaci



QIAcube firmy QIAGEN



GeneXpert firmy Cepheid

Analytická chromatografie nukleových kyselin

- **na tenké vrstvě**
 - **papírová chromatografie NA**
 - **separace NA na hydroxyapatitu (od roku 1965*)**
- **HPLC**
- **řada dalších přístupů**

Bernardi (1965): Chromatography of Nucleic Acids on Hydroxyapatite. Nature 206, 779-783.

Chromatografie nukleotidů na tenké vrstvě

- počátky v 60. letech
- provádí se na tenké vrstvě DEAE-, ECTEOLA- nebo polyethylenimin-celulóze nebo na hydroxyapatitu
- Silikagelové nebo aluminiové vrstvy jsou nevhodné – absorbují při 260 nm
- např. citlivost až 5×10^{-4} molu adeninu
- lze kompletně oddělit směs 10^{-2} μmolu ADP a ATP, a to za 4-10 minut

Randerath (1962): Thin-Layer Chromatography of Nucleotides. *Angewandte Chemie International Edition in English*. Volume 1, Issue 8, pages 435–439



5 x 10⁻⁴ molu adeninu, kolik je to molekul?

Má v mikrobiologii význam odlišit ATP od ADP?

$$6,023 \times 10^{23} \times 5 \times 10^{-4} = 30,115 \times 10^{19}$$

ANO



Princip chromatografie na tenké vrstvě

- **Mobilní fáze je kapalina**
- **Stacionární fáze je buď kapalina zakotvená v tenké vrstvě na podložním materiálu nebo pevná látka (adsorbent) v podobě tenké vrstvy**
- **U papírové chromatografie je stacionární fází taky kapalina, ovšem zakotvená v chromatografickém papíru**

Princip chromatografie na tenké vrstvě - fáze

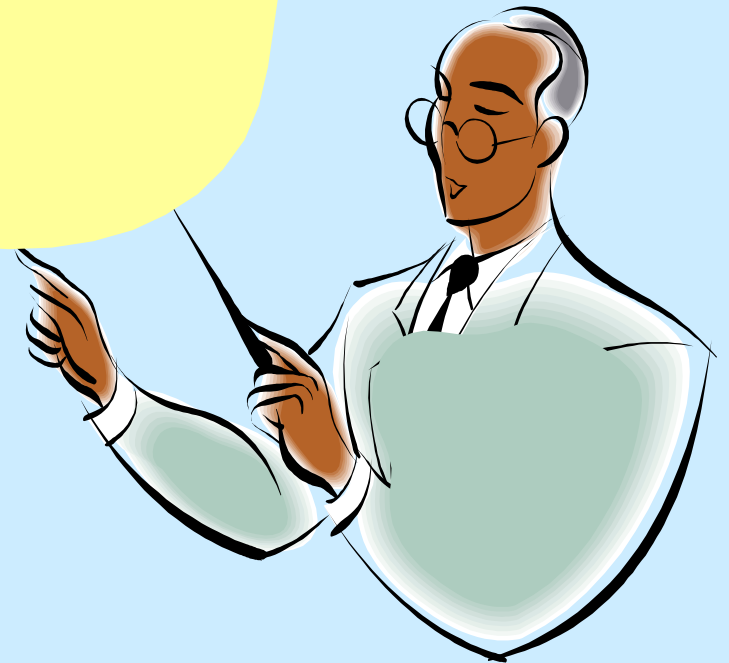
- **Používanými mobilními fázemi jsou například: cyklohexan, isopropanol, aceton, voda, toluen a pod.**
- **Stacionárními fázemi mohou být: silikagel, oxid hlinitý, iontoměniče a pod.**
- **Jako podložní materiál se pro stacionární fáze používají skleněné desky nebo hliníkové fólie.**

Dvourozměrná chromatografie na tenké vrstvě

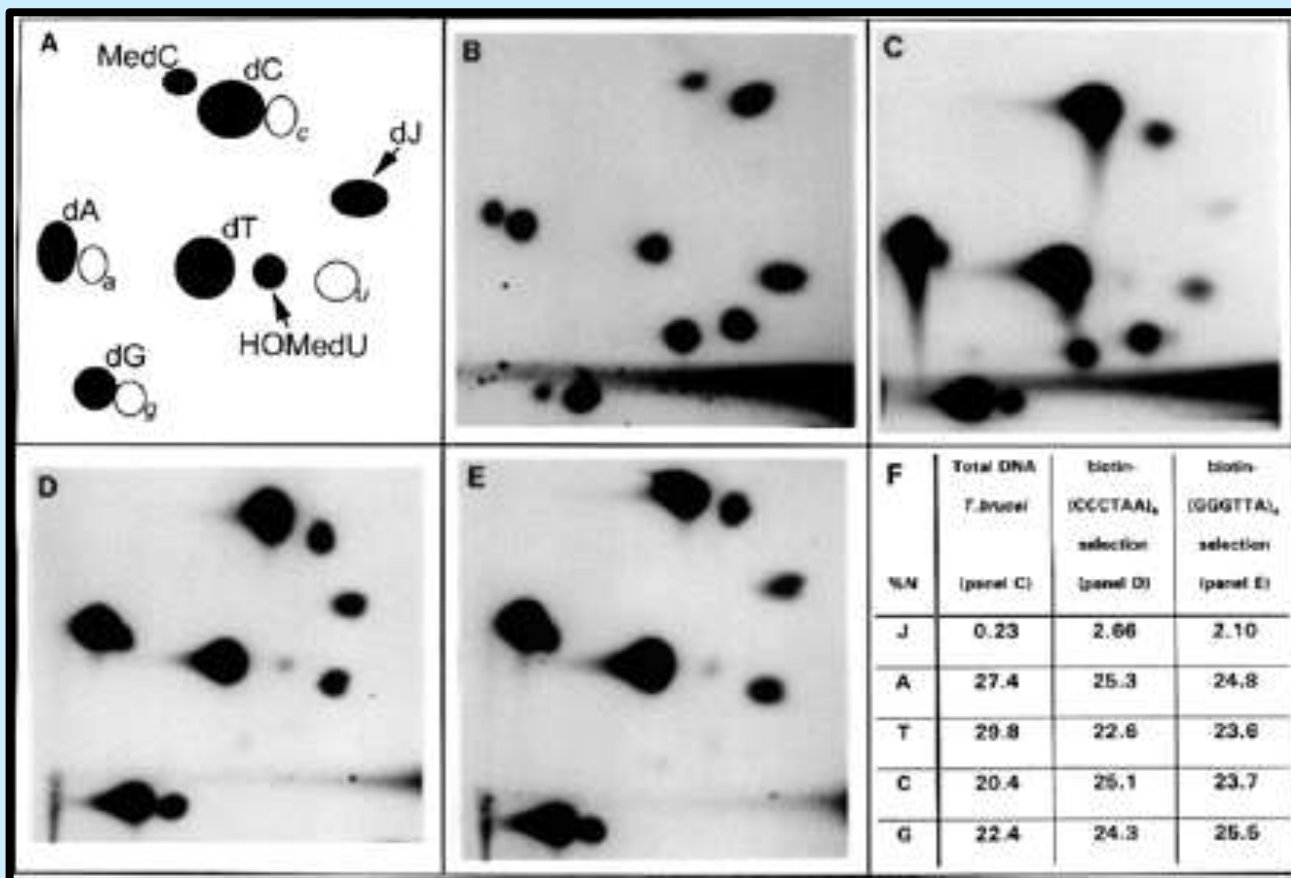
- **separace na polyethylenimin-celulóze**
- **v prvním rozměru separace na základě negativního náboje**
- **ve druhém rozměru dělení podle obsahu A, T, U, C, G**
- **detekce autoradiograficky**
- **použita ke stanovení 90 biologicky významných nukleotidů, jejich derivátů a modifikovaných nukleotidů na tRNA u *Salmonella typhimurium***

Bochner a Ames (1982): Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. The Journal of Biological Chemistry 257, 9759-9769.

Metoda se používá k separaci nejen jednotlivých nukleotidů, ale taky oligonukleotidových sekvencí

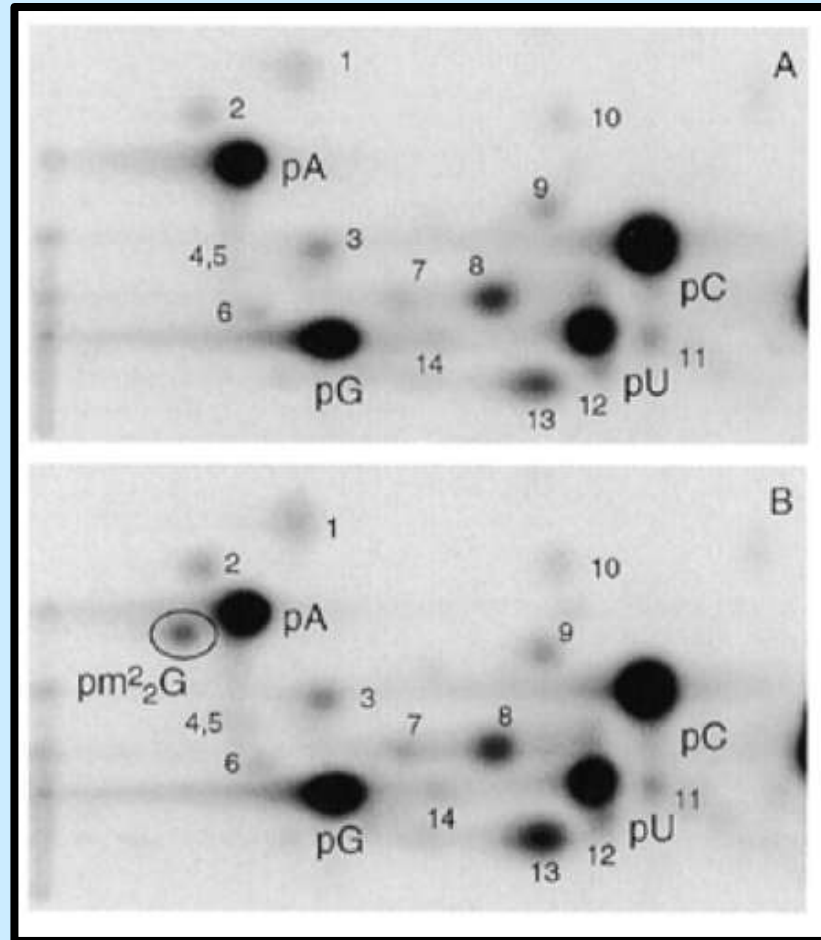


Příklad I



Telomerické repetice GGGTTA u *Trypanosoma Brucei*, které obsahují hypermodifikovanou bázi J (beta-glukosylhydroxymethyluracil), rok 1996

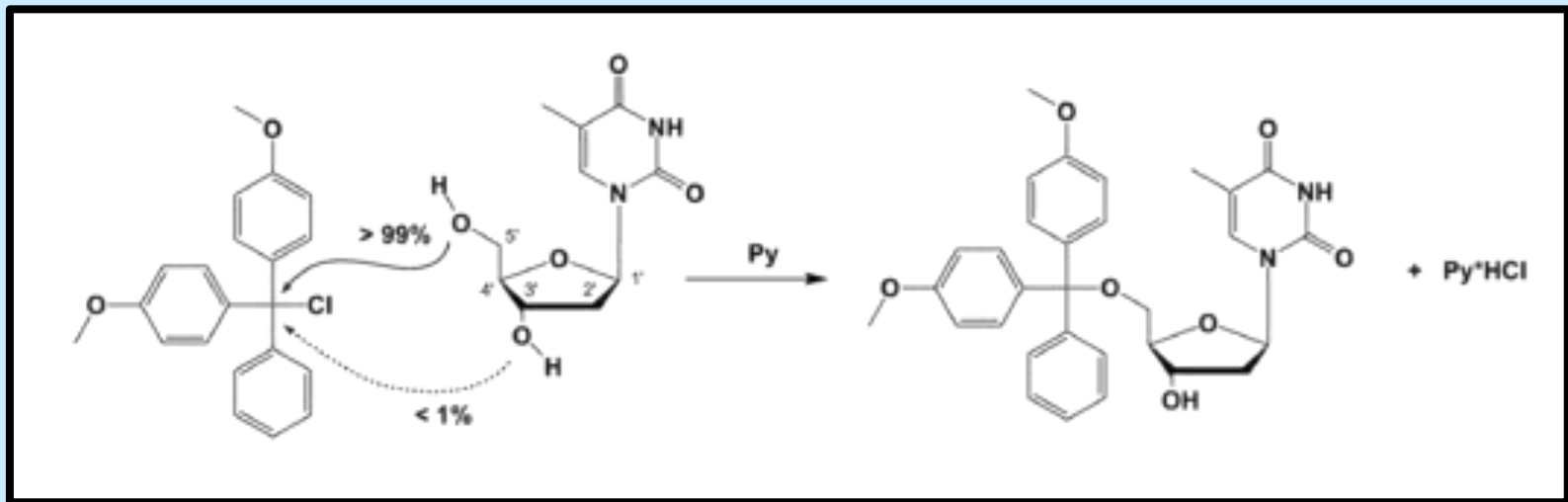
Příklad II



Objev dvou krátkých konvenčních sekvenčních modivů pro vazbu S-adenosyl-L-methioninu, rok 1998

Hydrofobní chromatografie DNA

- 5'-tritylované oligonukleotidy navázané na celulózu nebo sepharózu si zachovávají rozpoznávací schopnost vůči komplementárním sekvencím DNA a RNA



Cashion et al. (1980): Hydrophobic affinity chromatography of nucleic acids and proteins. *Nucleic Acids Research* 8(5), 1167-1185.

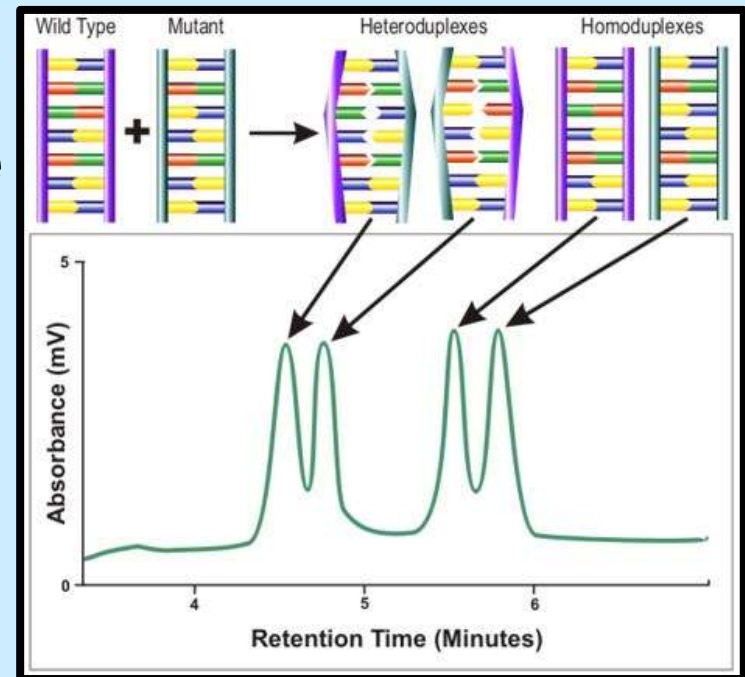
HPLC chromatografie DNA

- **separace fragmentů do 500 bp jako alternativa gelové elektroforézy**
- **jako kotvící fáze neporézní alkylované polystyren-divinylbenzenové částice**
- **separace během 2 minut, DNA nemusí být kompletně vyčištěna**
- **použitelná také k semikvantitativnímu stanovení**

Huber et al. (1993): High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Research* 21(5), 1061-1066.

Denaturační HPLC

- analýza eukaryotických genomů, **včetně mapování a klonování genů kvasinek**
- polystyren-divinylbenzenové částice
- dokáže odlišit oligonukleotidy do 100 bp, pokud se liší v jediném nukleotidu



<http://insertion.stanford.edu/pub.html>

Chromatografie v mikrobiologii

**O tom si budeme povídat v
přednášce č. 10**



Shrnutí

- 1) Chromatografie – základní informace**
- 2) Druhy chromatografických metod**
- 3) Absorpční a rozdělovací chromatografie**
- 4) Iontoměničová chromatografie**
- 5) Gelová permeační chromatografie**
- 6) Afinitní chromatografie**
- 7) Chromatografie a izolace NA**
- 8) Chromatografie a analýza DNA**