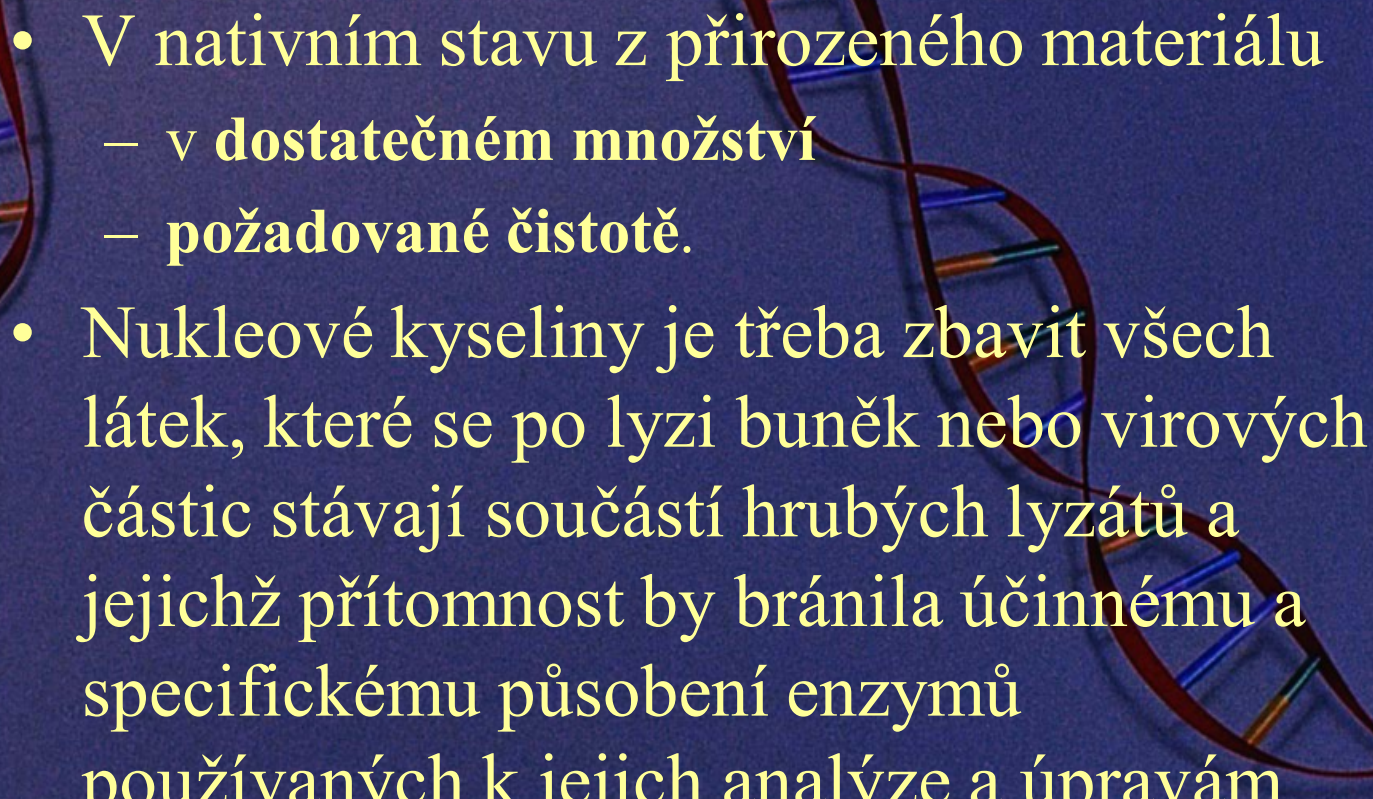


Požadavky na izolaci nukleových kyselin

- 
- V nativním stavu z přirozeného materiálu
 - v dostatečném množství
 - požadované 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
 - přečišťovací enzymy

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

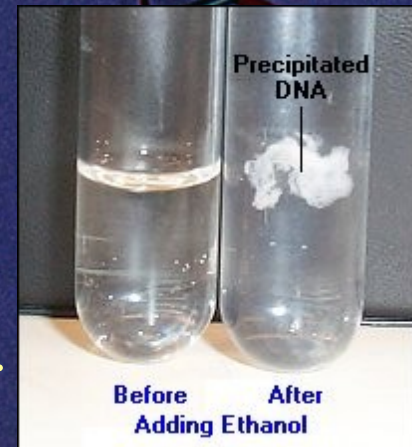
- Zahrnují fenolové extrakce a etanolové nebo izopropanolové precipitace (srážení)
- Obecně rozšířené, široké aplikace
- Vhodné pro vysokomolekulární genomové NK

2. Metody adsorpční

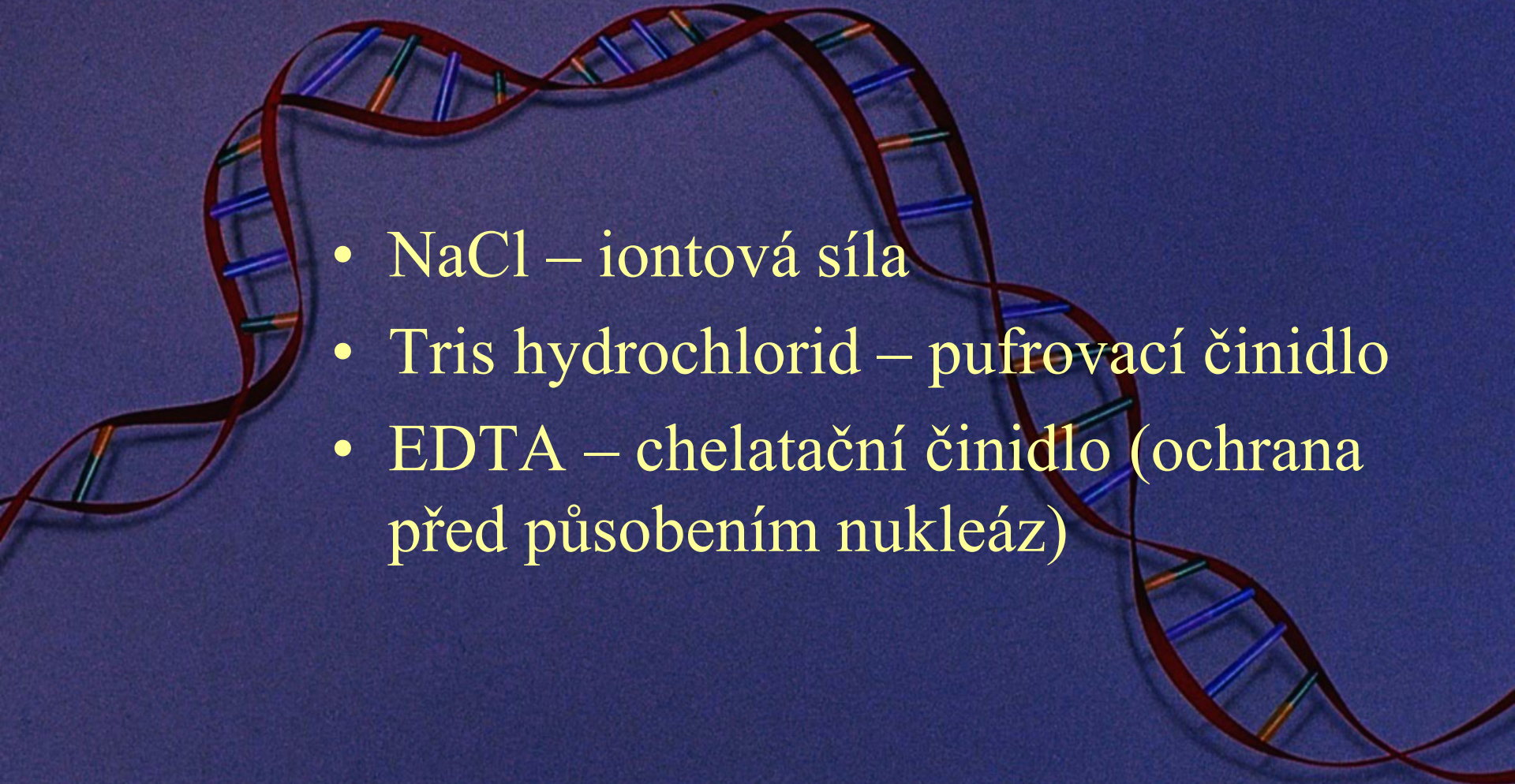
- DNA se váže na křemičité sklo v přítomnosti chaotropní látky
- Vhodné zejména pro rychlou purifikaci plazmidů a malých fragmentů

Typická fenolová extrakce

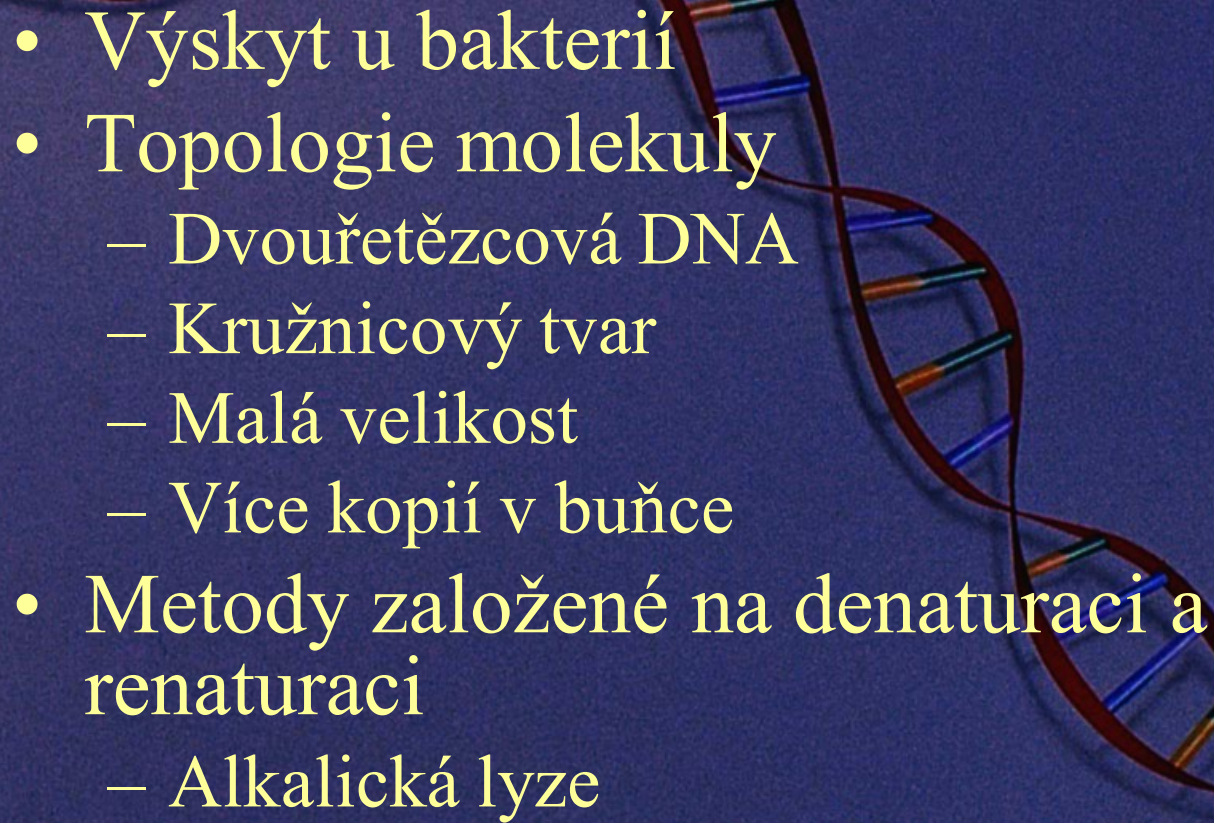
- Promíchání lyzátu buněk s roztokem fenolu, případně se směsí fenolu a chloroformu. **Fenol je organické rozpouštědlo používané k oddělení proteinů od nukleových kyselin.** Proteiny jsou hydrofobní a zůstávají v organické fázi, zatímco NK jsou vysoce nabitě a přecházejí do vodné fáze. **Chloroform denaturuje 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 rozpouštění získaného sedimentu ve vhodném roztoku.



Základní složky roztoků

- 
- NaCl – iontová síla
 - Tris hydrochlorid – pufovací činidlo
 - EDTA – chelatační činidlo (ochrana před působením nukleáz)

Izolace plazmidové DNA

- 
- Výskyt u bakterií
 - Topologie molekuly
 - Dvouřetězcová DNA
 - Kružnicový tvar
 - Malá velikost
 - Více kopií v buňce
 - Metody založené na denaturaci a renaturaci
 - Alkalická lyze
 - Lyze varem

Alkalická lyze pro izolaci plazmidové DNA



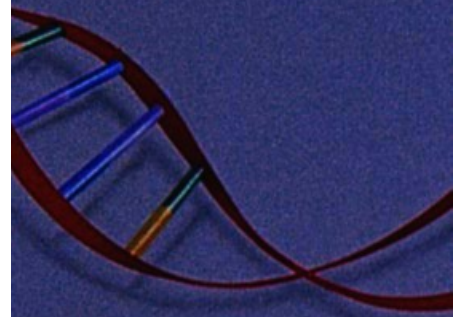
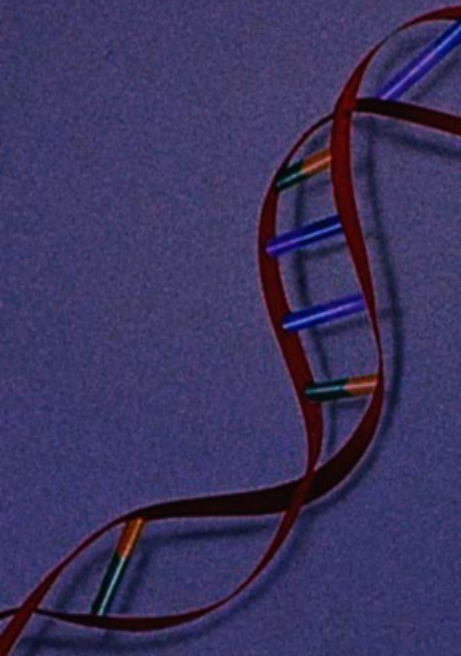
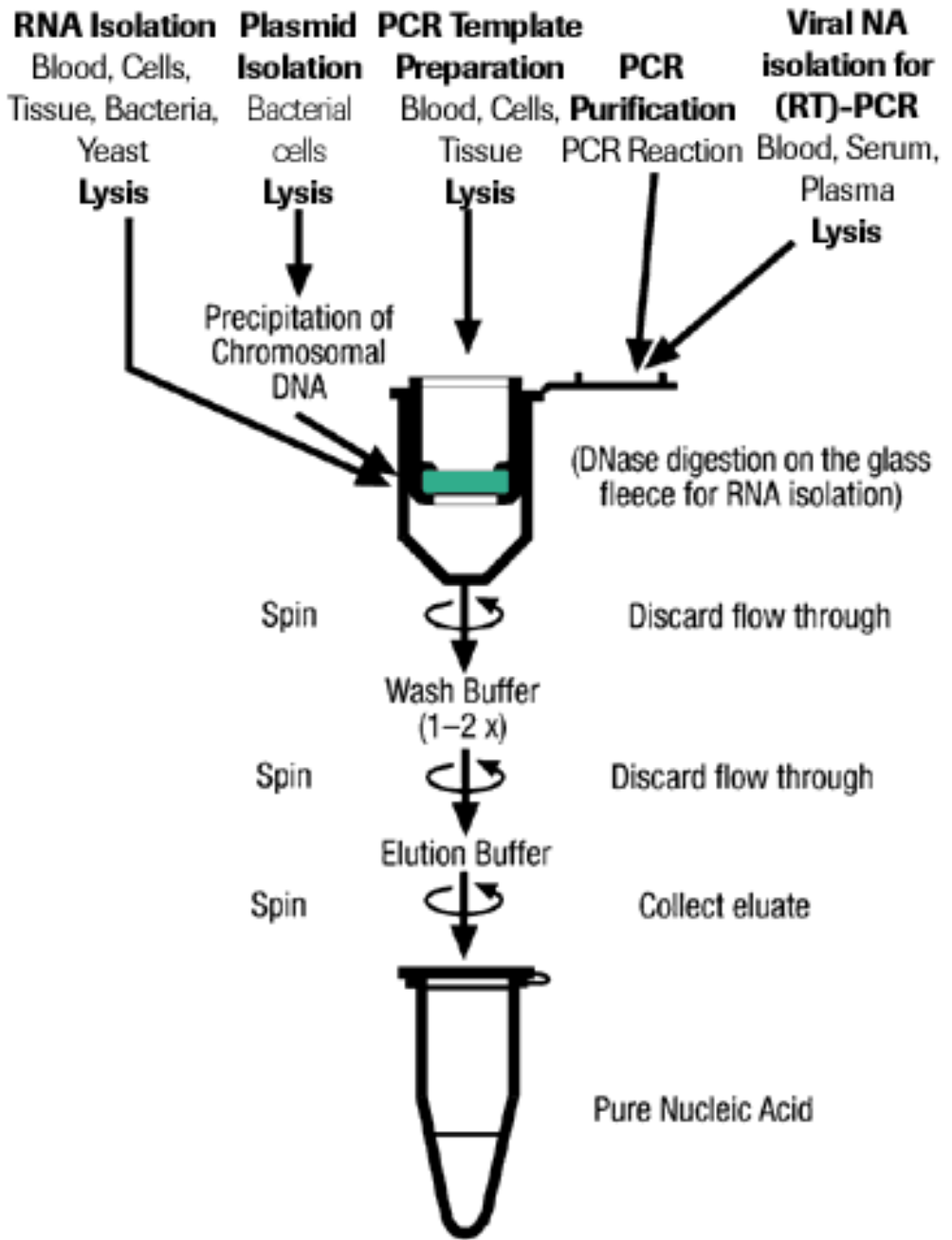
1. Kultivace buněk v přítomnosti antibiotika
2. Šetrné odstranění buněčné stěny (lysozym)
3. Přídavek roztoku s NaOH
 - Denaturace bakteriálního chromozomu
 - ČÁSTEČNÁ DENATURACE PLAZMIDU
4. Přídavek neutralizačního roztoku
 - Vysrážení chromozomální DNA s proteiny
 - RENATURACE PLAZMIDOVÉ DNA
5. Odstranění bakteriální DNA centrifugací
6. Purifikace plazmidové DNA

Izolace RNA

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

Adsorpční metody

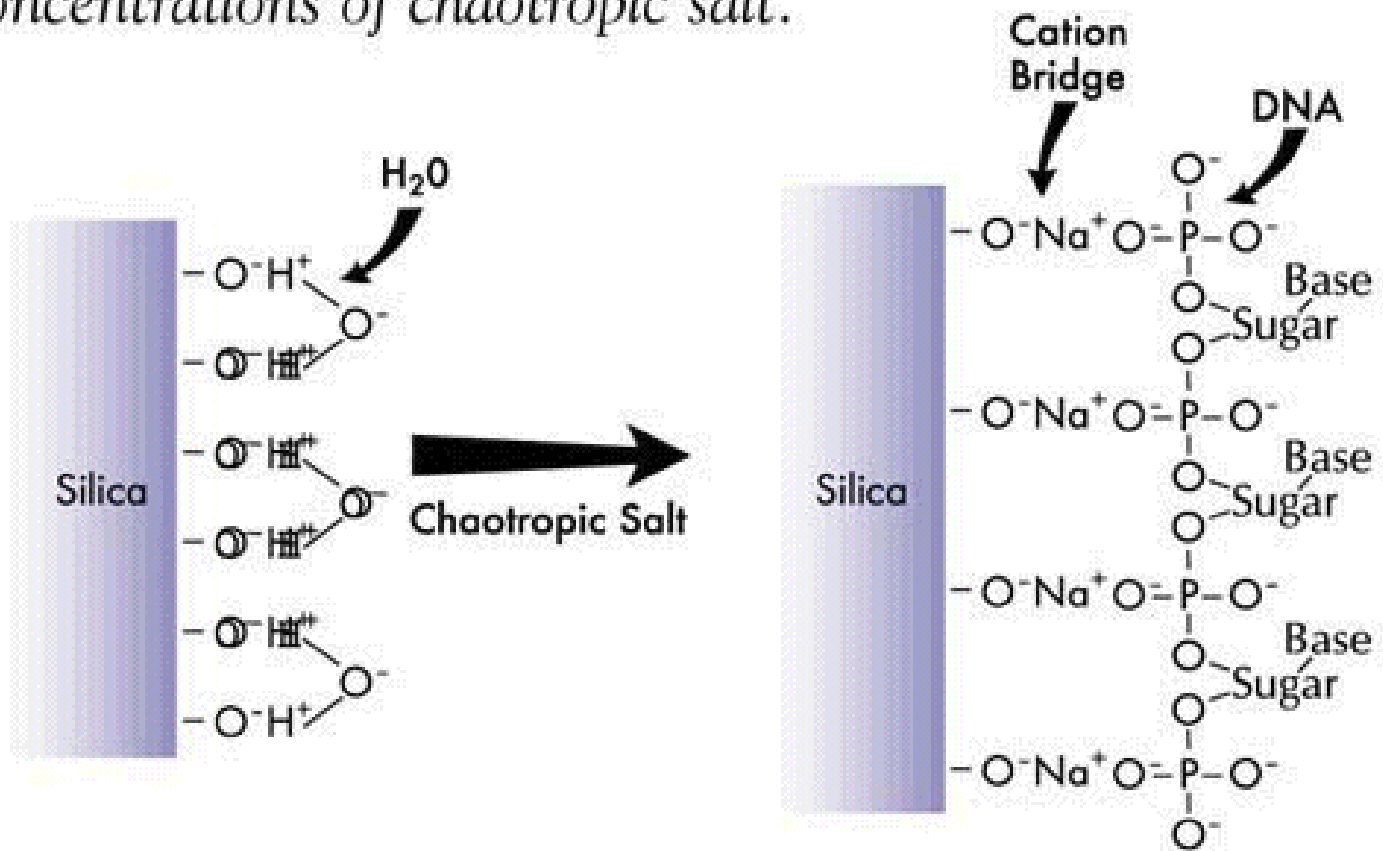
- Využívají schopnost nukleových kyselin adsorbovat se na povrchy z **oxidu křemičitého** (kolonky do centrifugačních mikrozskumavek) v přítomnosti chaotropní soli (Vogelstein and Gillespie, 1979)
 - guanidin thiokyanát
 - guanidin hydrochlorid
- Síla vazby závisí na
 - Typu nukleové kyseliny (DNA nebo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



Mechanismus interakce DNA s oxidem křemičitým

Fig. 1

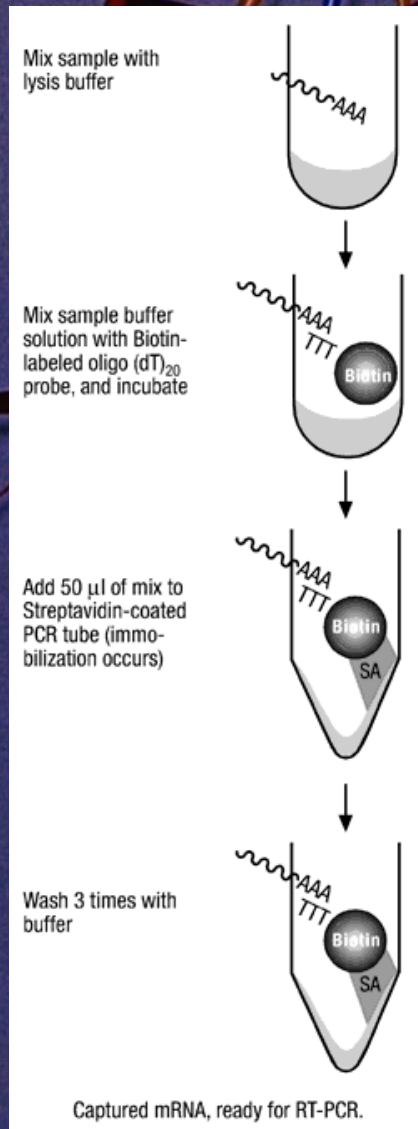
A possible mechanism for silica binding of DNA in high concentrations of chaotropic salt.



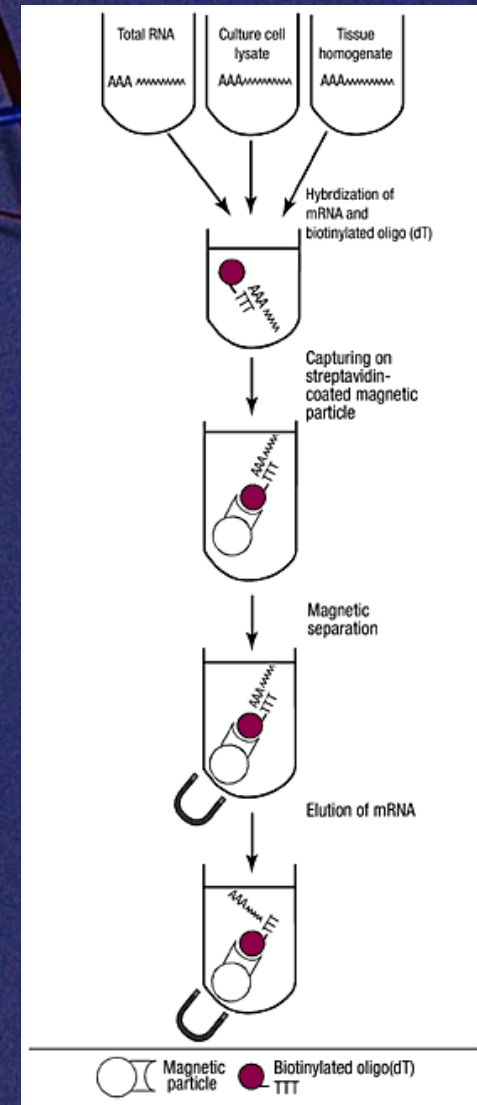
Izolace mRNA

- 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



- Streptavidinem pokryté magnetické částice



Analýza a kvantifikace

• SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA

– Vhodná metoda pro měření vzorků, které jsou

- Dostatečné koncentraci
- Dostatečně čisté bez významného množství kontaminant.

– Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm.

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}	\sim 2.0