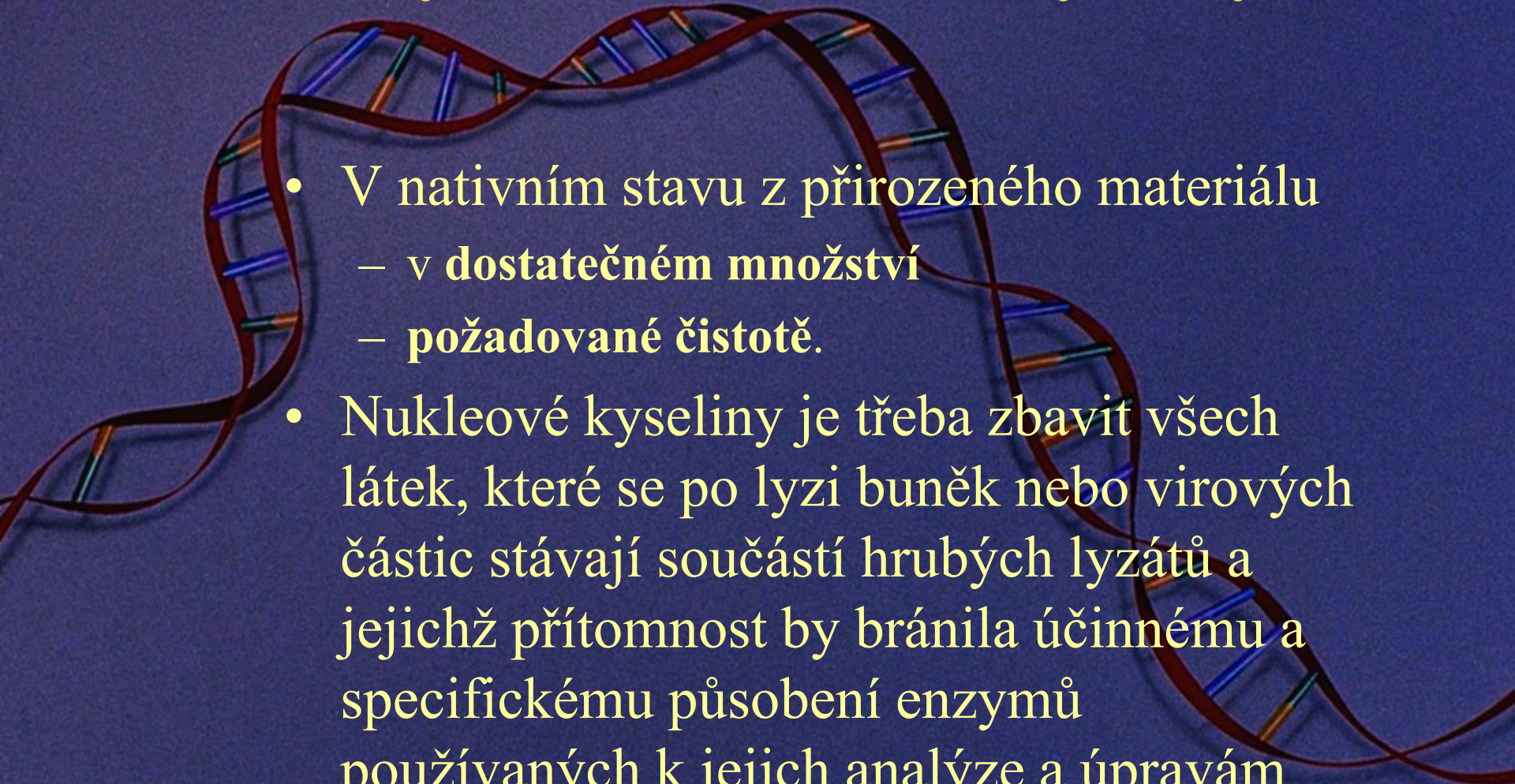
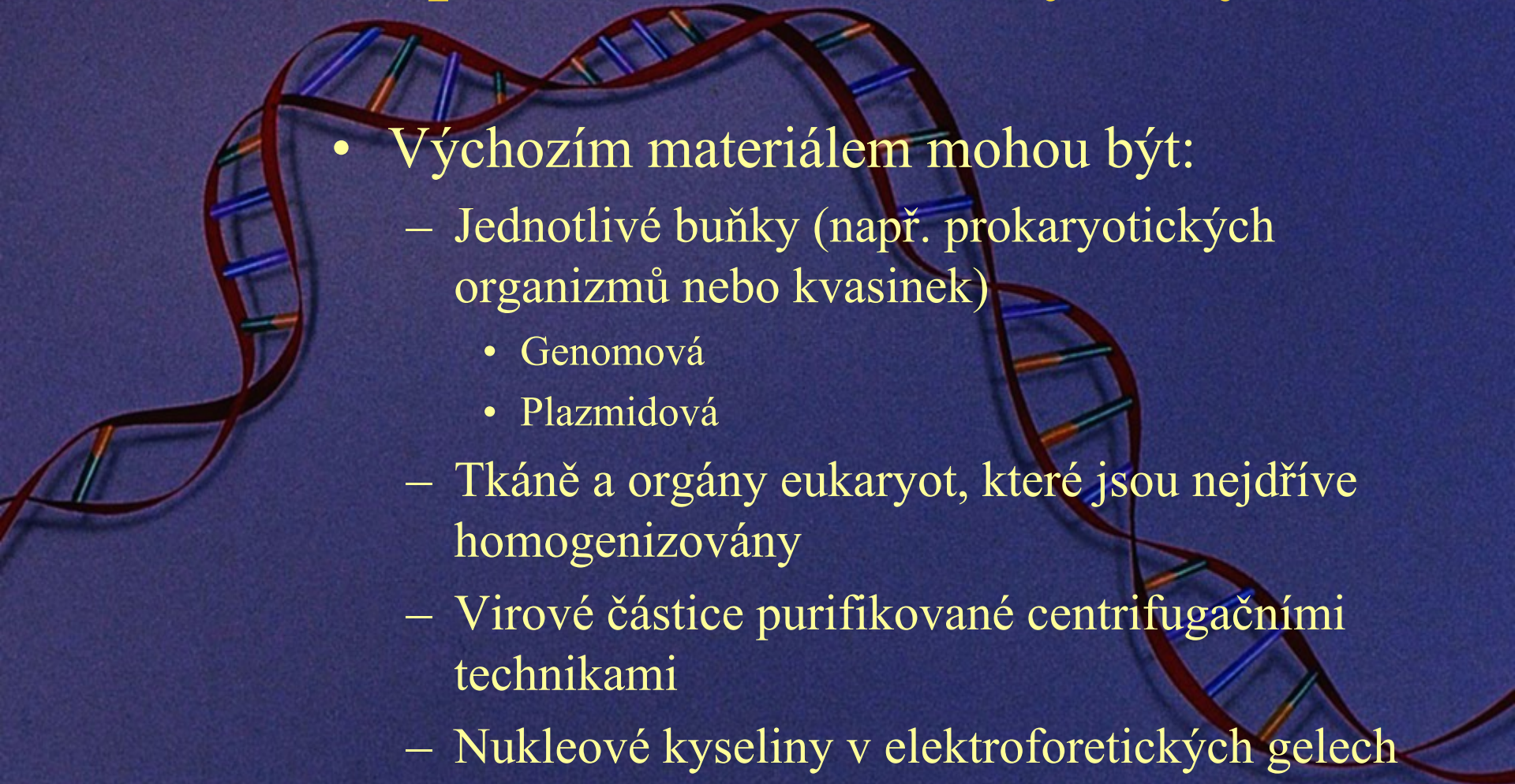


# Izolace nukleových kyselin

# 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

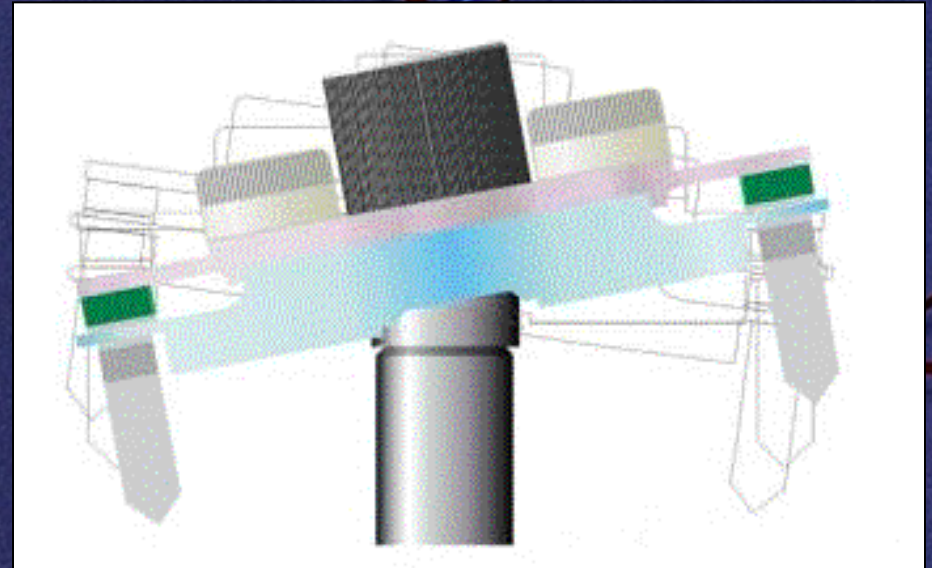
# Metodické principy využívané při izolaci nukleových kyselin



- Rozrušení buněčných stěn nebo virových nukleokapsidů působením
  - Enzymů (lysozym a celulázy)
  - Detergentů (dodecylsulfát sodný)
  - Mechanicky (lyzační matrice, FastPrep)
- Enzymatické kroky pro odstranění kontaminant
  - Proteináza K nebo pronáza E
  - RNáza nebo DNáza
- Purifikace

# FastPrep Kity

- **Izolace z neznámých a těžce zpracovatelných vzorků**
  - tkáně
  - rostlinný materiál
  - gram + bakterie
  - sediment
  - kosti



# 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

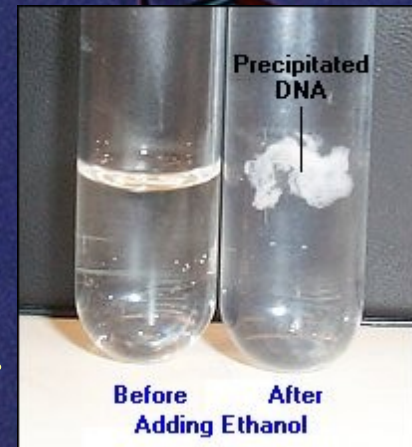
- DNA se váže na křemičité povrchy v přítomnosti chaotropní látky
- Vhodné zejména pro rychlou purifikaci malých množství

## 3. Centrifugace v hustotním gradientu

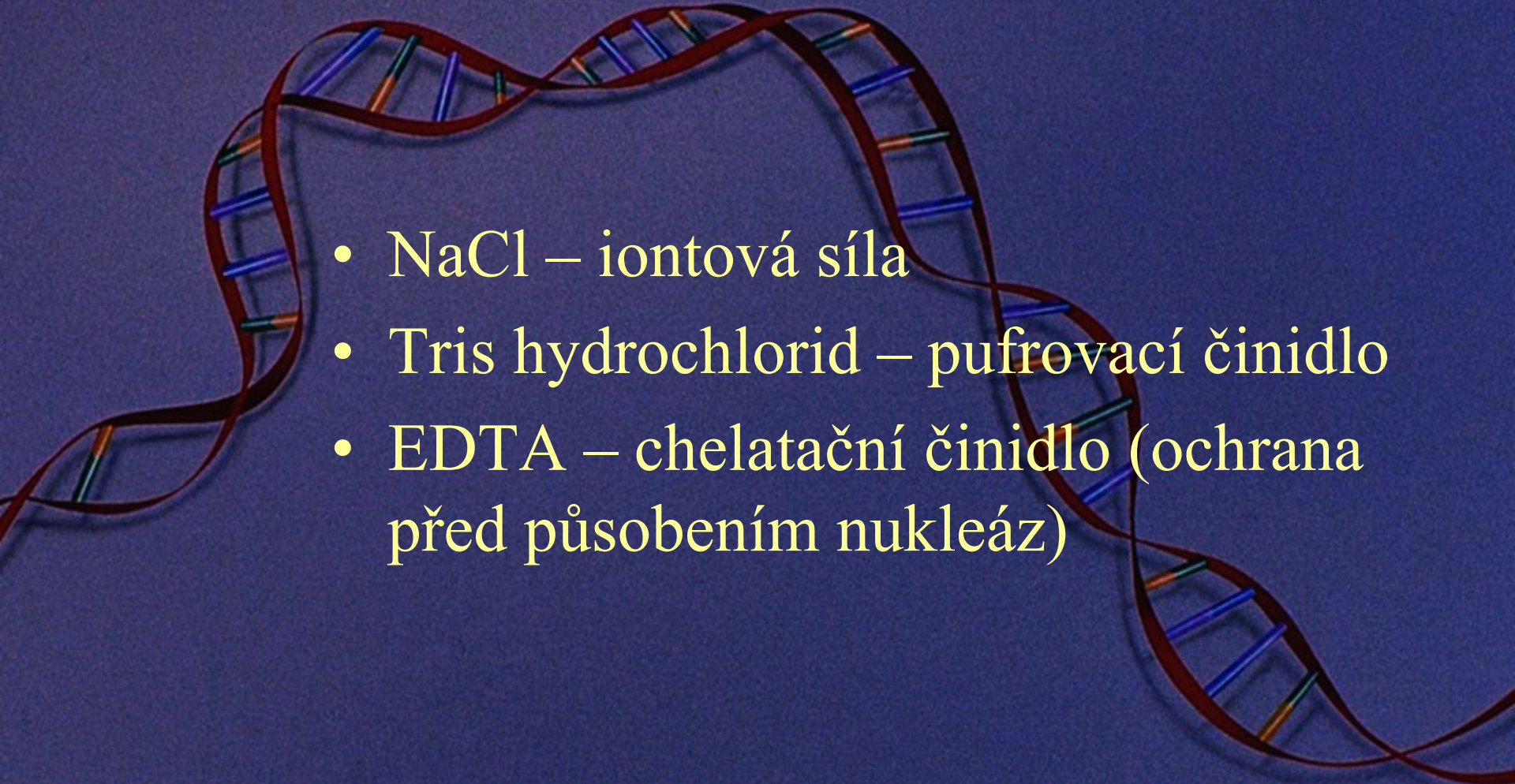
- Izopyktnické centrifugace v gradientu CsCl
- Vhodné při velkém množství a pro vysokou čistotu
- Možnost frakcionace podle velikosti v sacharózových gradientech

# 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 rozpouštění získaného sedimentu ve vhodném roztoku.

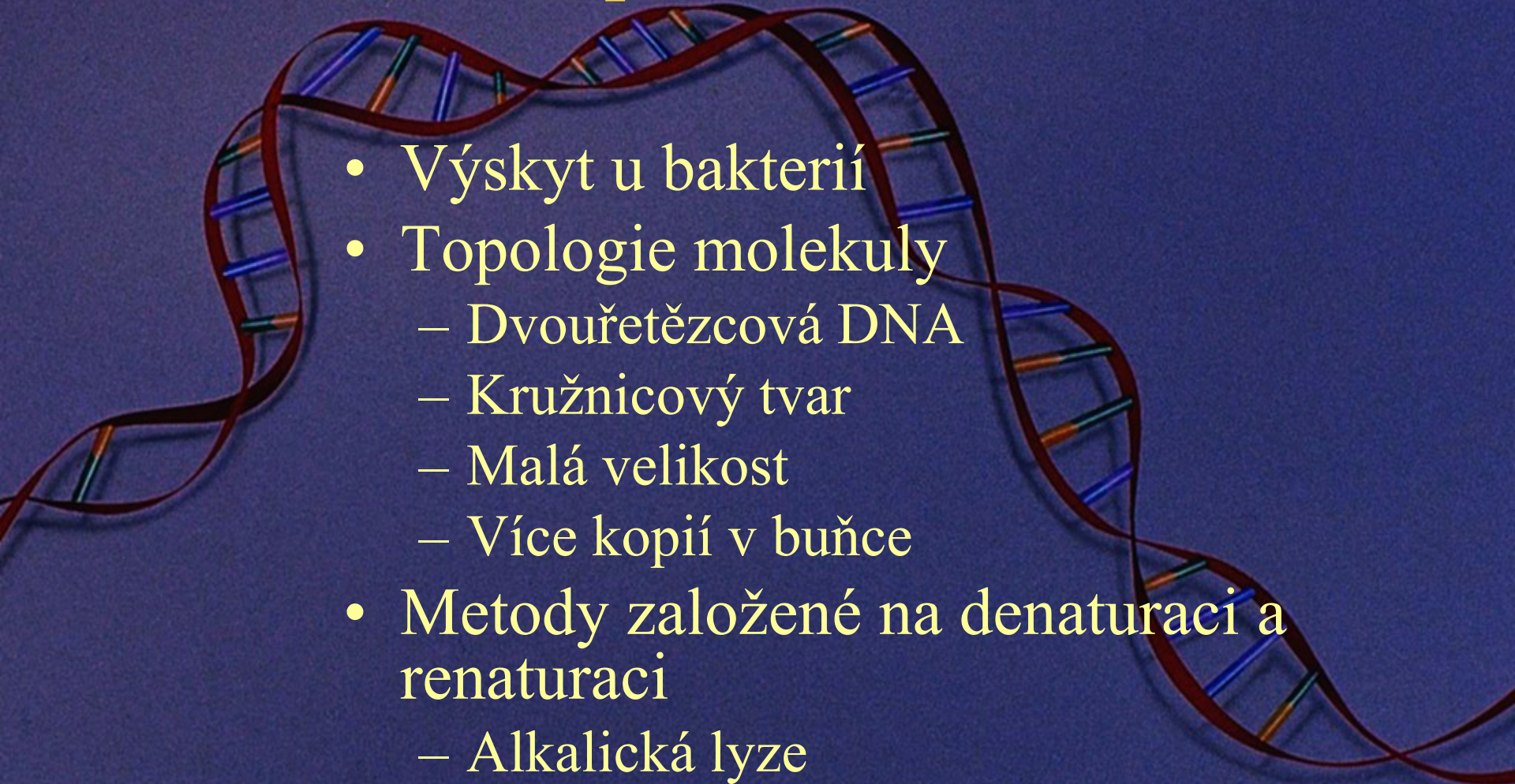


# Základní složky roztoků

- 
- 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

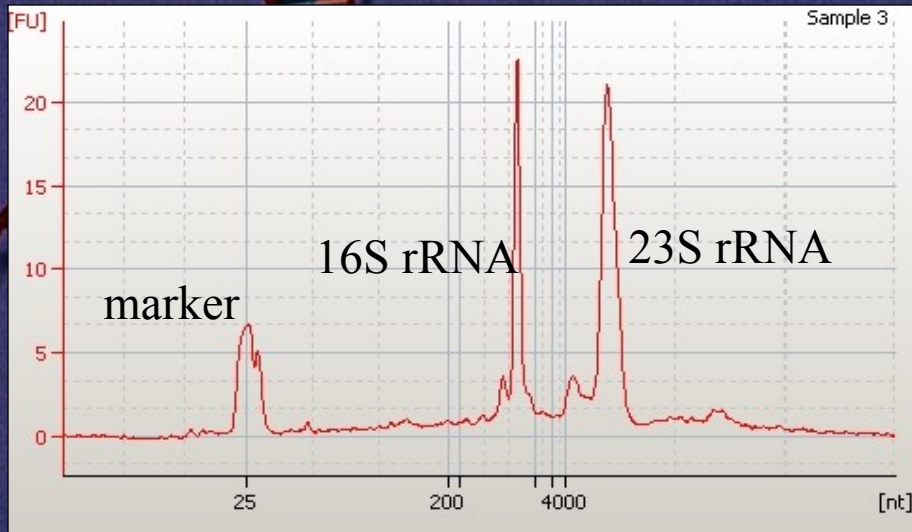
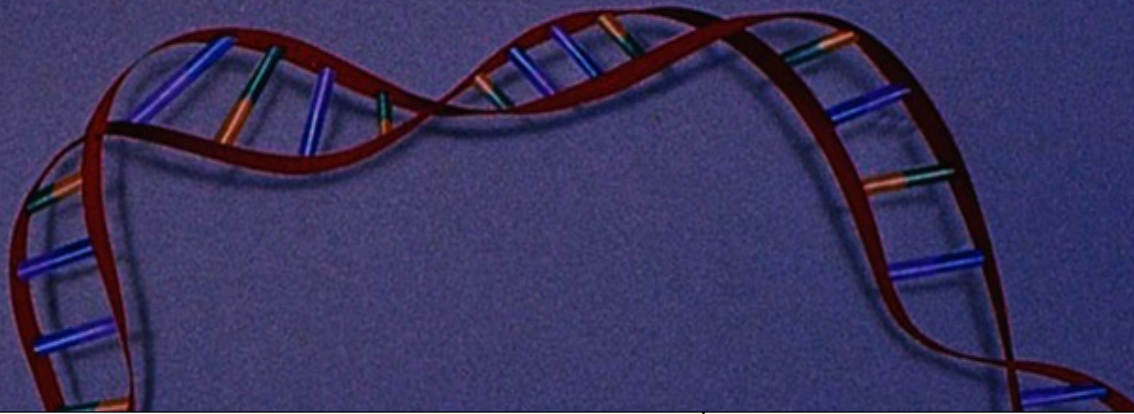


1. Kultivace buněk v přítomnosti antibiotika
2. Šetrné odstranění buněčné stěny (lysozym)
3. Přídavek roztoku s NaOH
  - Denaturace bakteriálního chromozomu
  - ČÁSTEČNÁ DENATURACE PLAZMIDU
4. Přídavek neutralizačního roztoku
  - Vysrážení chromozomální DNA s proteiny
  - RENATURACE PLAZMIDOVÉ DNA
5.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

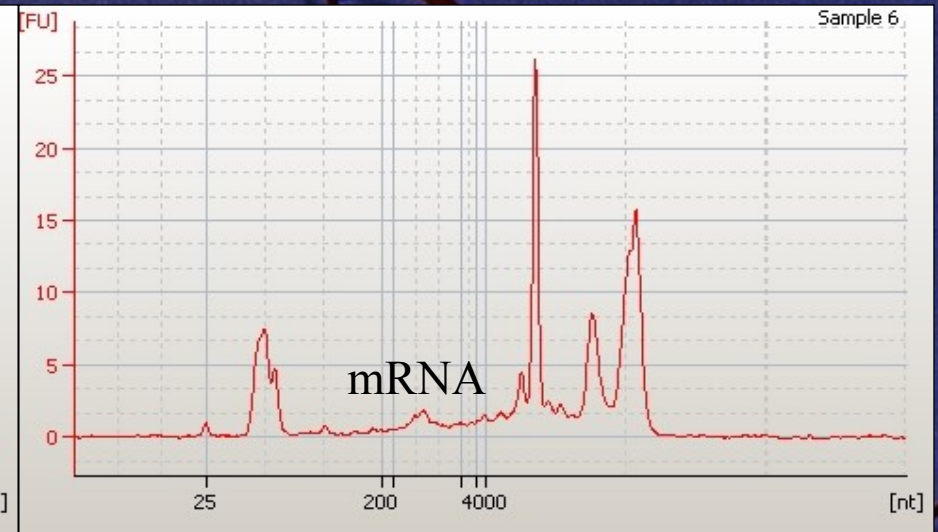
# Izolace RNA

- Izolace RNA fenolovou extrakcí je podobná izolaci DNA s následujícími rozdíly:
  - Inhibitory RNáz, sterilní boxy, DEPC-H<sub>2</sub>O, rukavice!
  - Extrakce v guanidinových solích
  - Fenolové extrakce při pH 5-6
  - Extrakce trizolem
  - Odstranění DNA DNázami bez RNáz
  - Selektivní srážení RNA pomocí LiCl
  - Afinity chromatografie na oligo-dT kolonách pro izolaci mRNA

# RNA separovaná na bioanalyzátoru Agilent



Vzorek RNA izolovaný TRIzolem po ošetření DNázou, **RIN = 8,8**

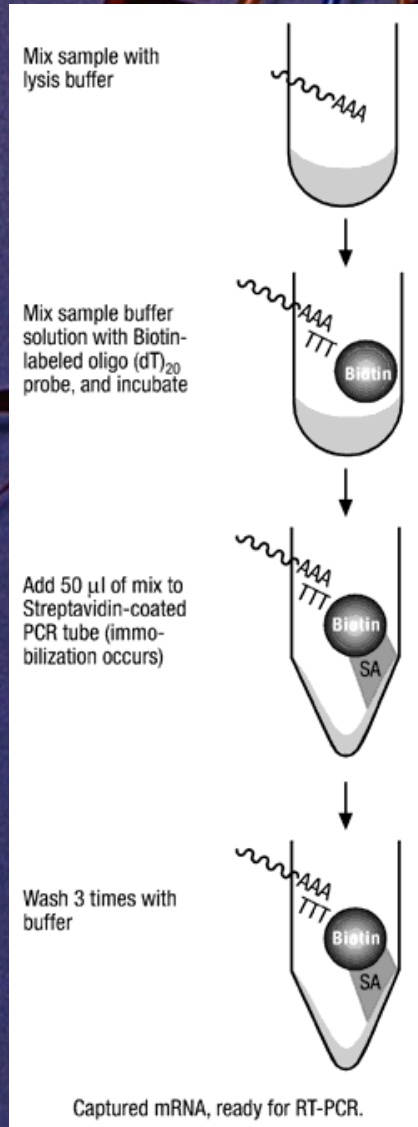


Vzorek RNA izolovaný fenol-chloroformem po ošetření DNázou, **RIN = 7,7**

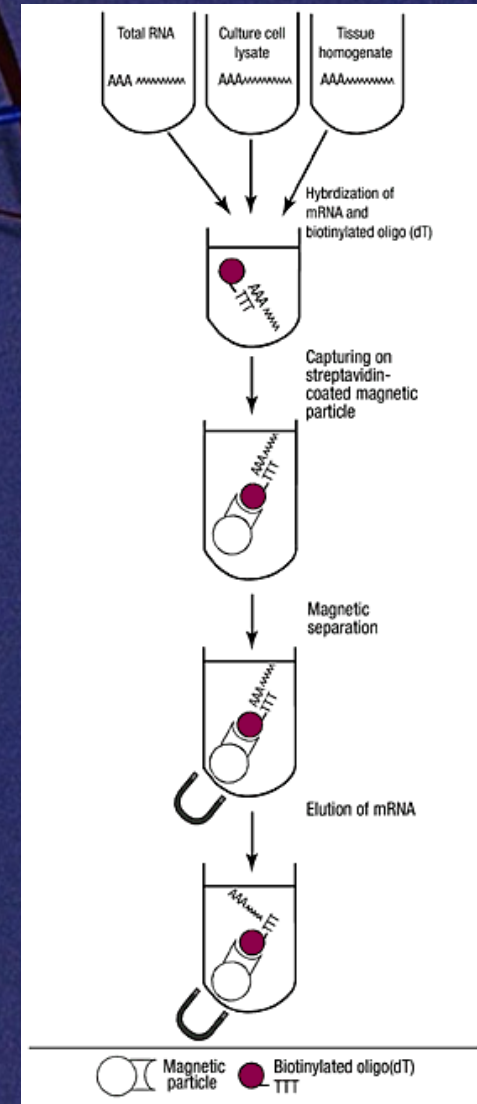
# Izolace mRNA

- 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

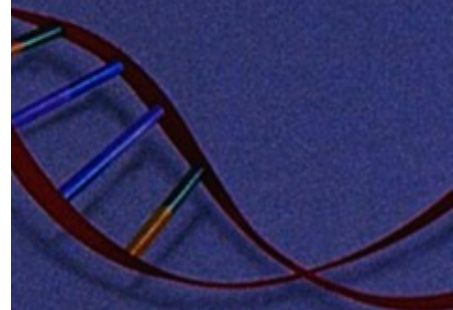
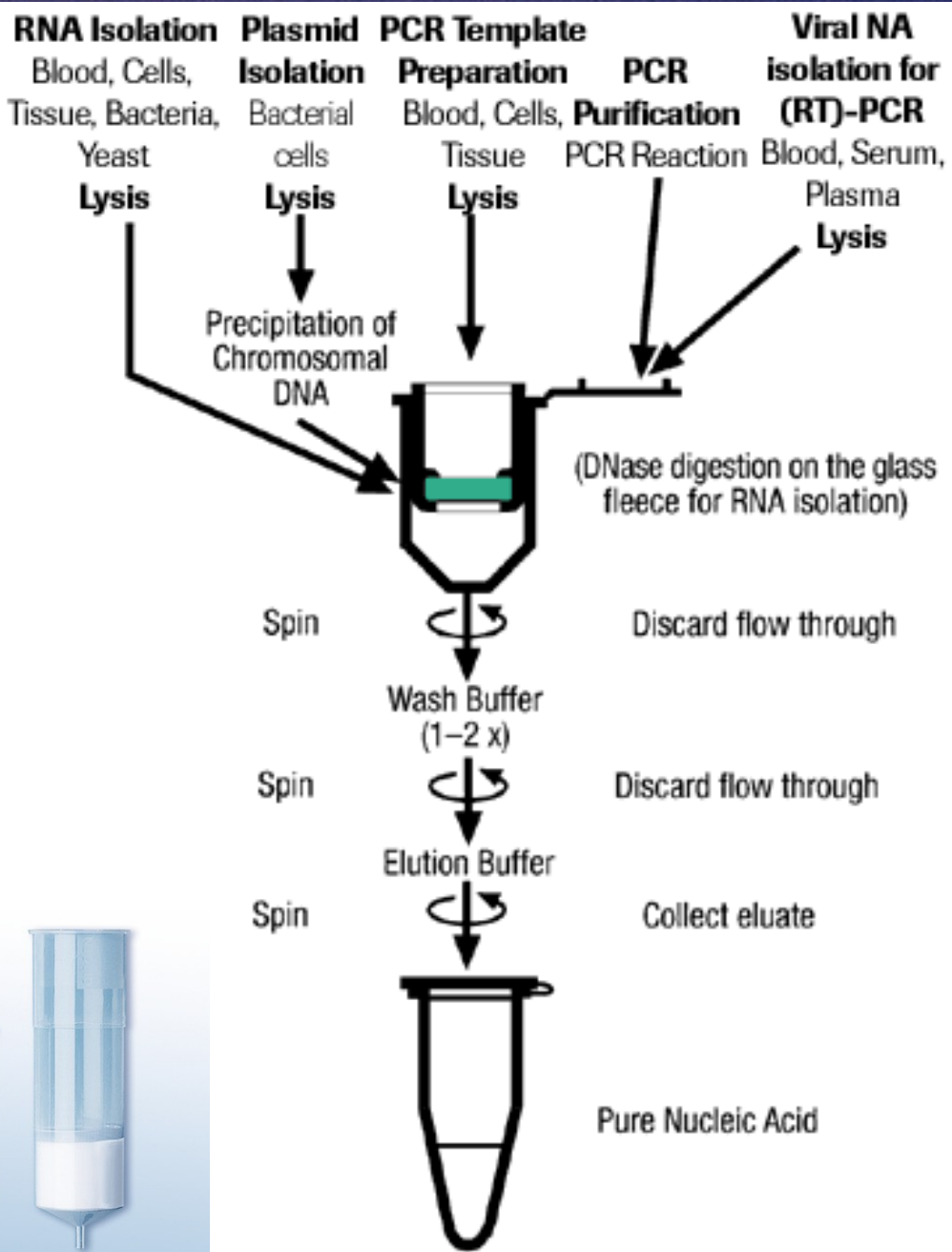
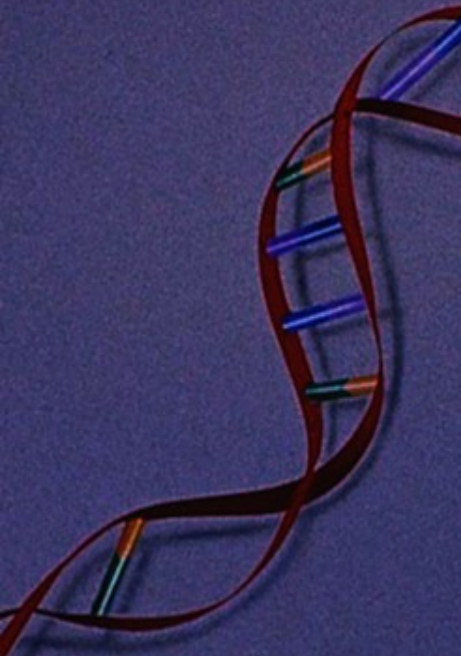


- Streptavidinem pokryté magnetické částice



# 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
  - jodid sodný (NaI)
- Síla vazby závisí na
  - Typu nukleové kyseliny (DNA nebo RNA)
  - Iontové síle
  - pH roztoku
- Promývání pro odstranění proteinů a dalších kontaminant
- Eluce DNA pufrům s nízkou koncentrací solí nebo H<sub>2</sub>O
- Rychlá metoda, vysoký výtěžek (malé fragmenty), vysoká čistota

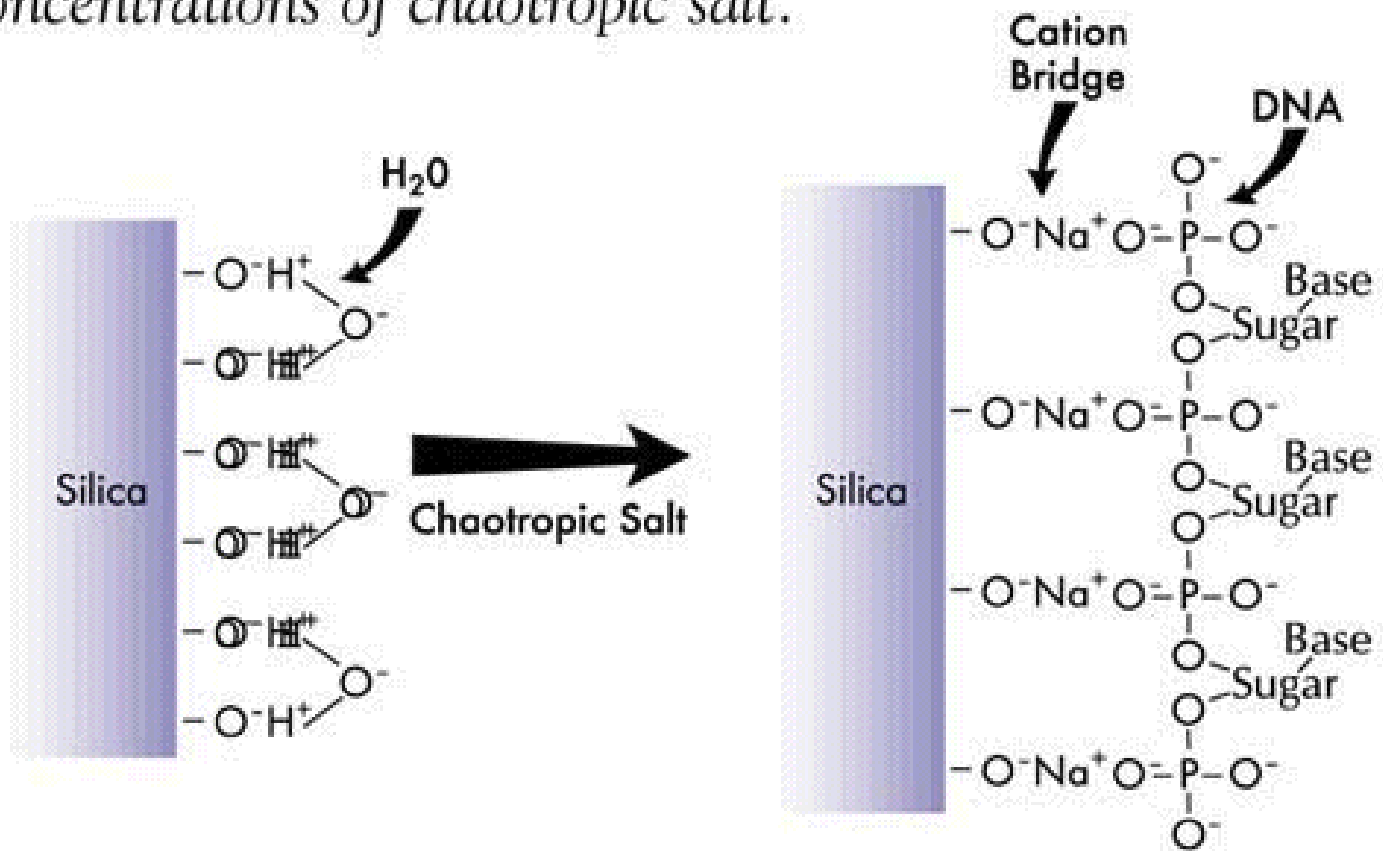




# Mechanismus interakce DNA s oxidem křemičitým

**Fig. 1**

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



# 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