

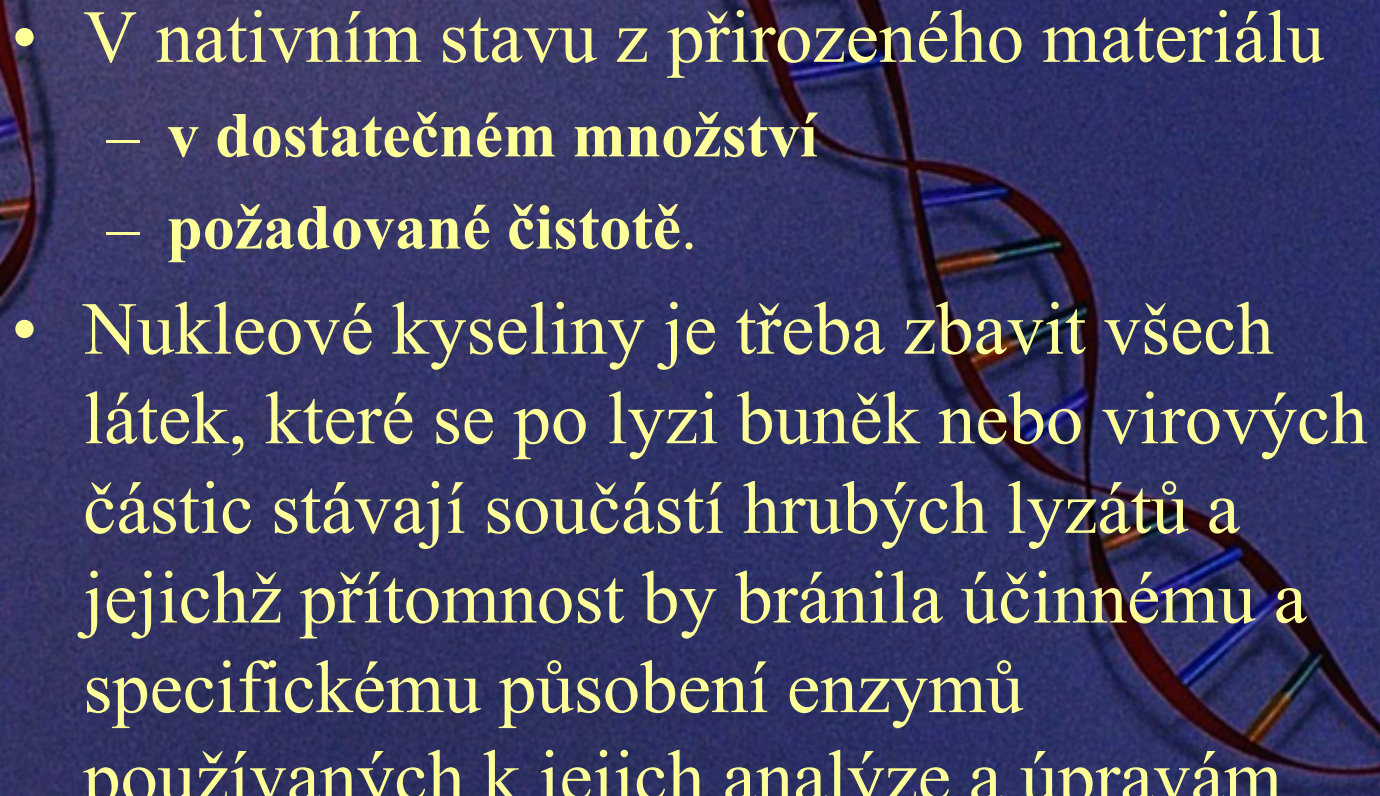
Izolace nukleových kyselin

Materiál pro izolaci nukleových kyselin



- Výchozím materiálem mohou být:
 - Jednotlivé buňky (např. prokaryotických organismů, kvasinek, leukocyty)
 - Celková genomová DNA
 - Plazmidová DNA bakterií
 - DNA z organel (mitochondrií, chloroplastů)
 - Tkáně a orgány eukaryot, které jsou nejdříve homogenizovány
 - Virové částice purifikované centrifugačními technikami
 - Postupy pro přečištění nukleových kyseliny v elektroforetických gelech nebo po enzymatických reakcích

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

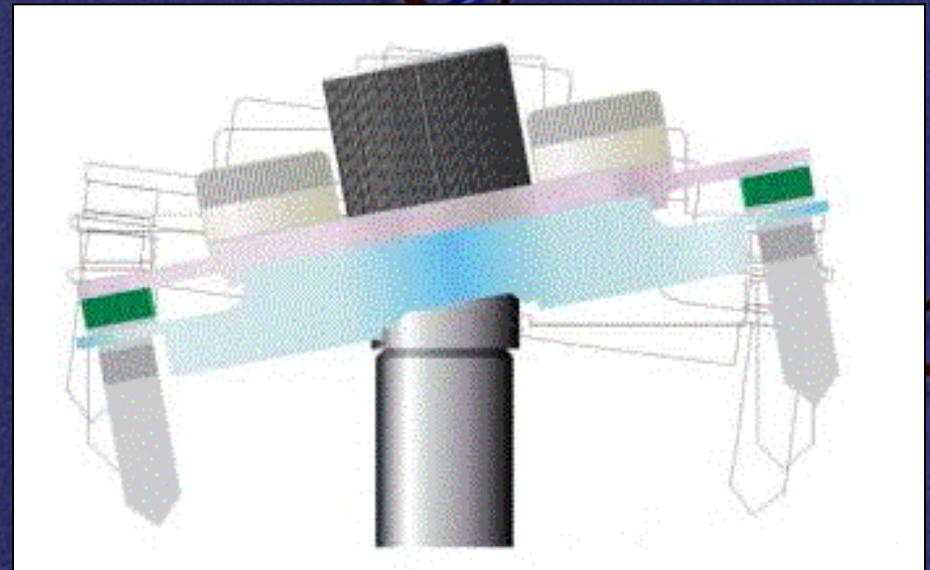
Metodické principy využívané při izolaci nukleových kyselin



- 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

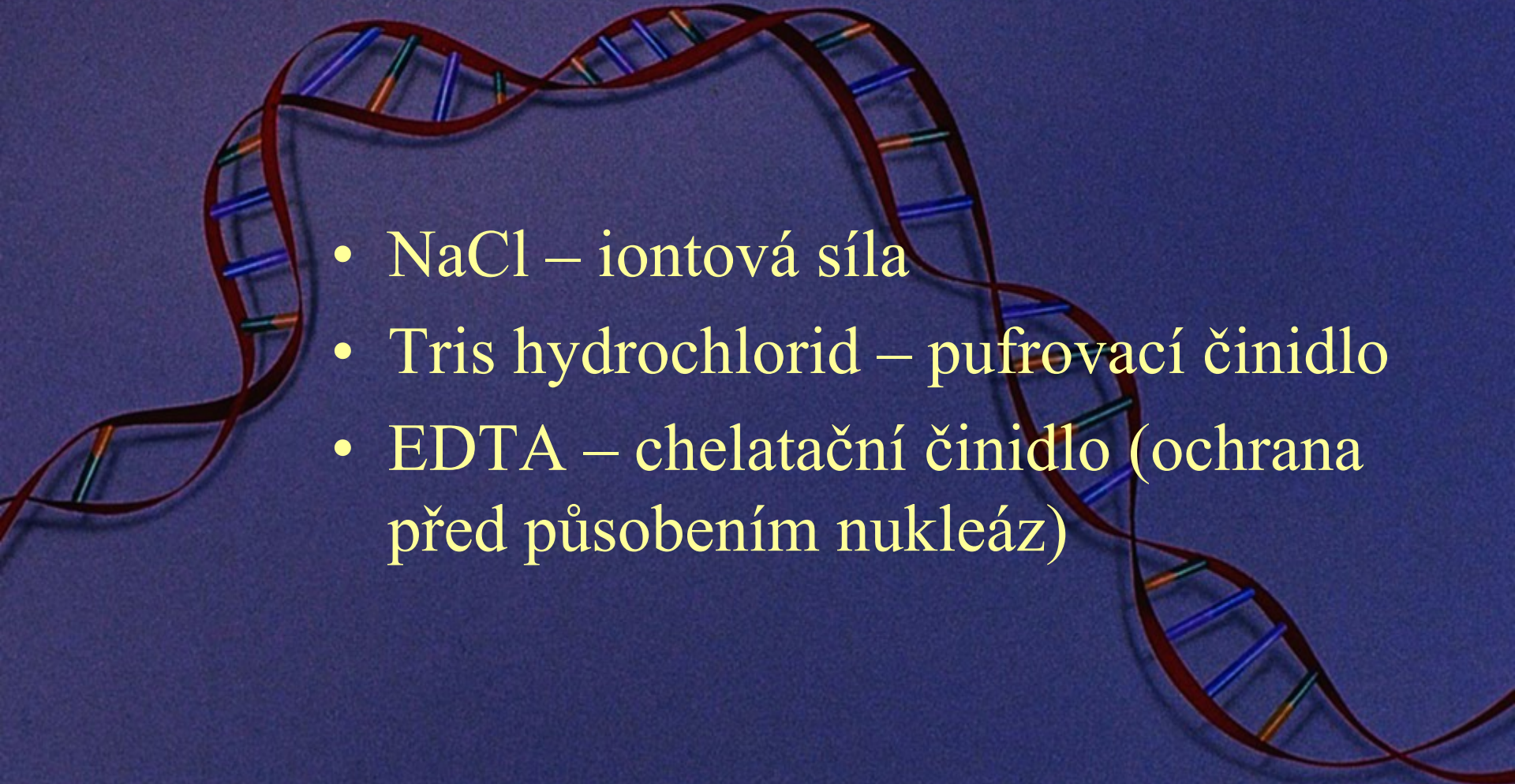
2. Metody adsorpční

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

3. Centrifugace v hustotním gradientu

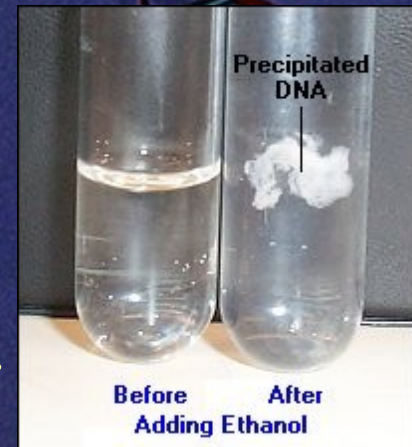
- Izopyknické centrifugace v gradientu CsCl
- Vhodné při velkém množství a pro vysokou čistotu
- Možnost frakcionace podle velikosti v sacharózových gradientech

Základní složky roztoků

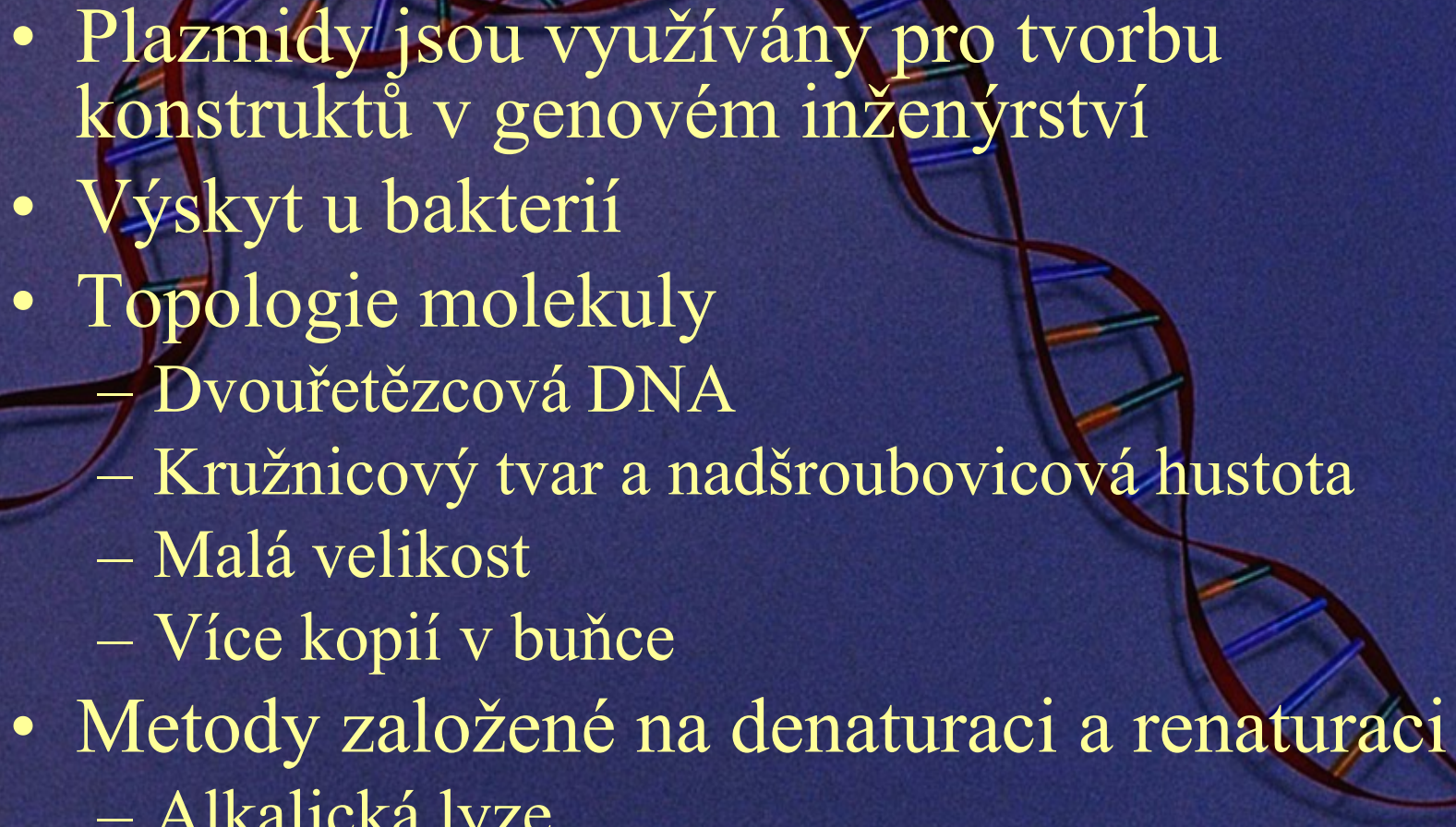
- 
- NaCl – iontová síla
 - Tris hydrochlorid – pufovací činidlo
 - EDTA – chelatační činidlo (ochrana před působením nukleáz)

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.



Izolace plazmidové DNA

- Plazmidy jsou využívány pro tvorbu konstruktů v genovém inženýrství
 - Výskyt u bakterií
 - Topologie molekuly
 - Dvouřetězcová DNA
 - Kružnicový tvar a nadšroubovicová hustota
 - Malá velikost
 - Více kopií v buňce
 - Metody založené na denaturaci a renaturaci
 - Alkalická lyze
 - Lyze varem
- 

Alkalická lyze pro izolaci plazmidové DNA

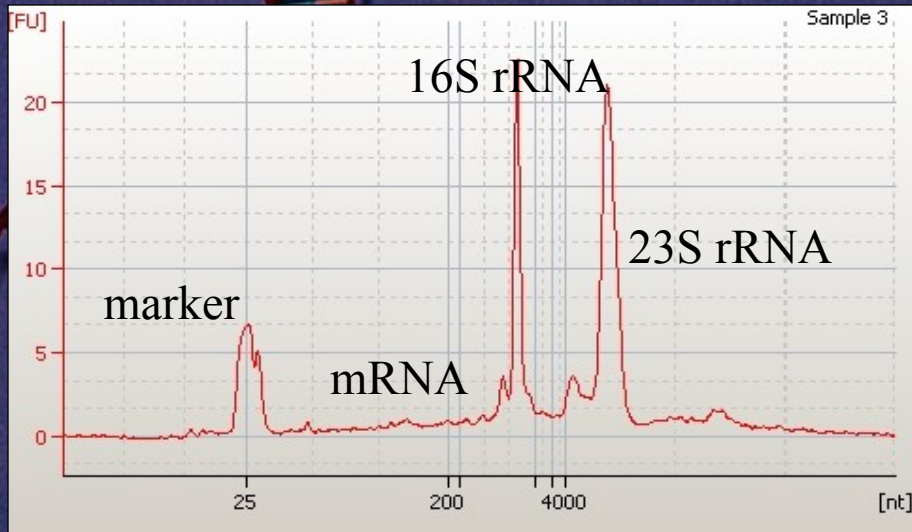


1. Kultivace buněk v přítomnosti antibiotika
2. Šetrné odstranění buněčné stěny (lysozym)
3. Přídavek roztoku s NaOH
 - Denaturace bakteriálního chromozomu
 - ČÁSTEČNÁ DENATURACE PLAZMIDU
4. Přídavek neutralizačního roztoku
 - Vysrážení chromozomální DNA s proteiny
 - RENATURACE PLAZMIDOVÉ DNA
5. Odstranění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

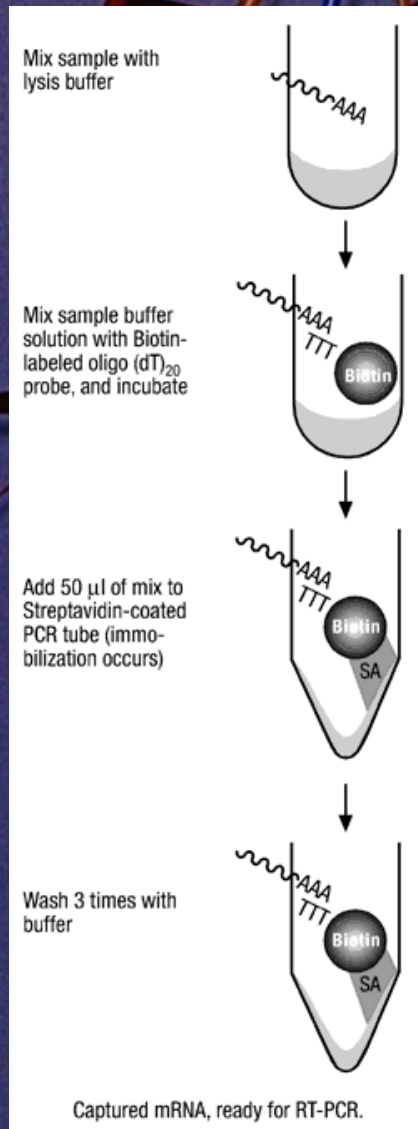


Vzorek RNA izolovaný TRIzolom po ošetření DNázou, **RIN = 8,8**

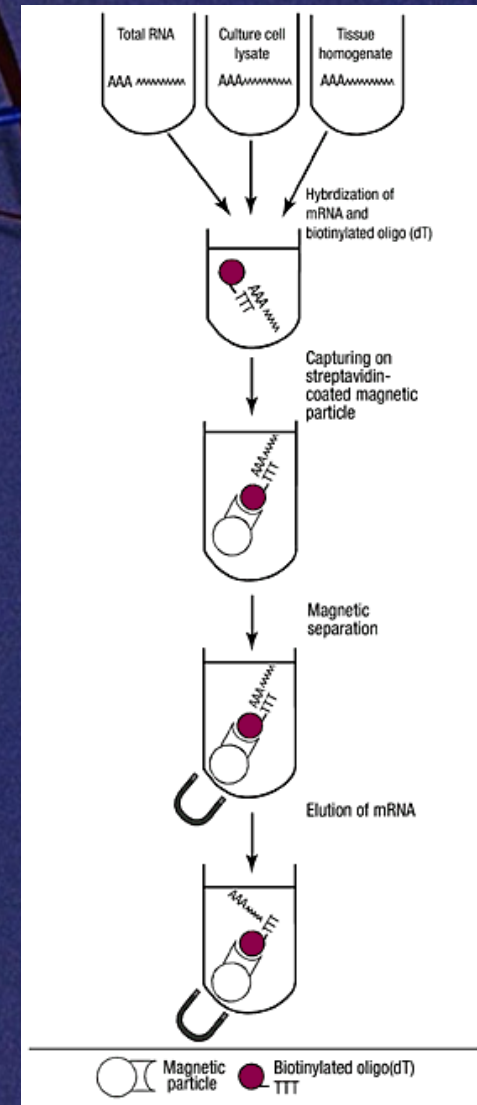
Izolace mRNA

- 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



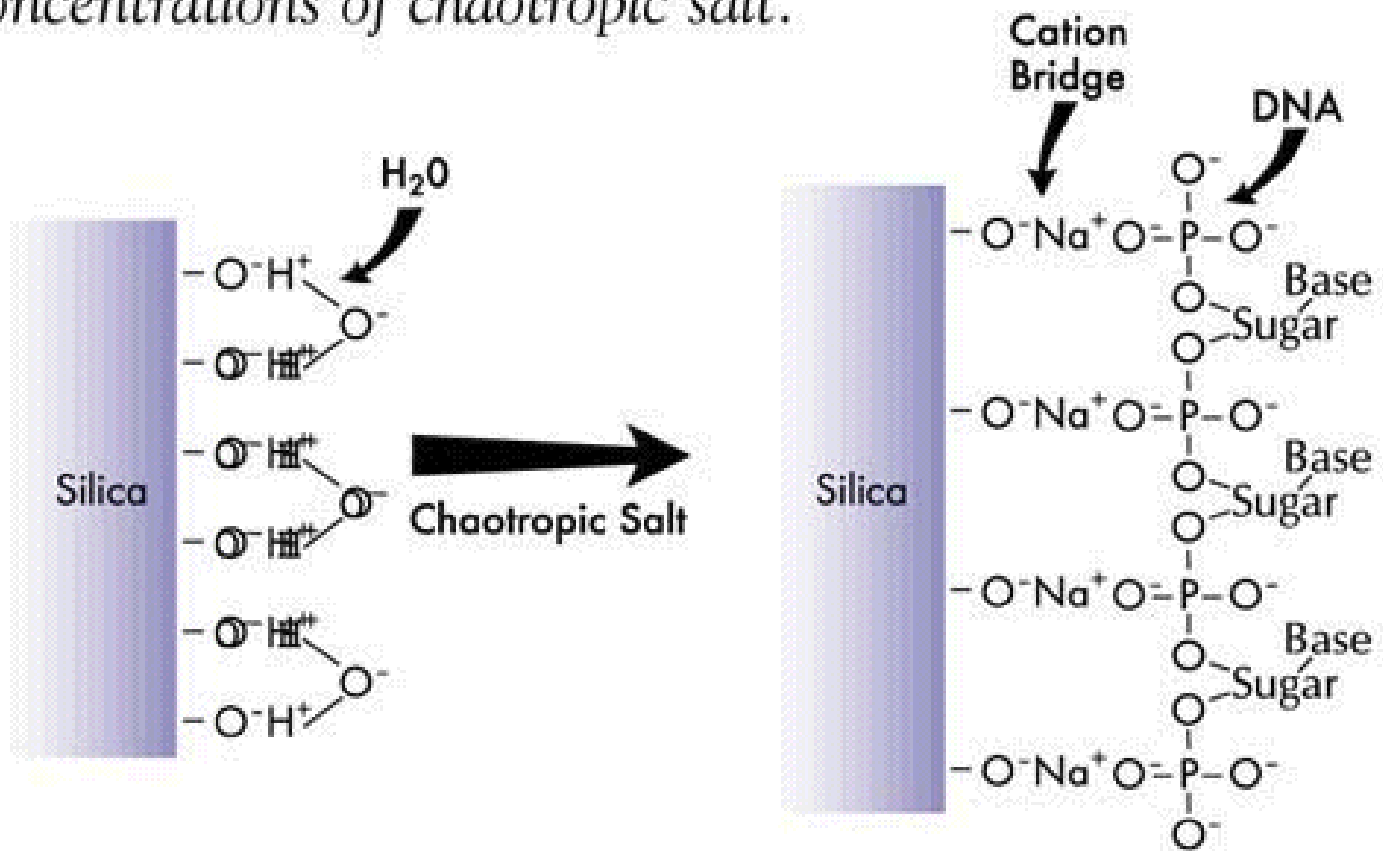
Adsorpční metody

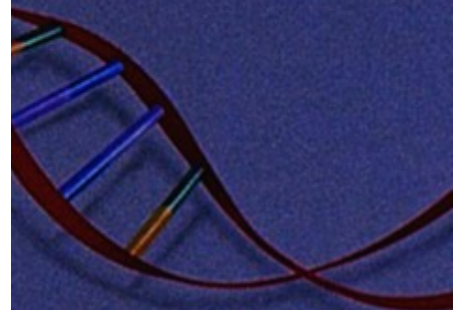
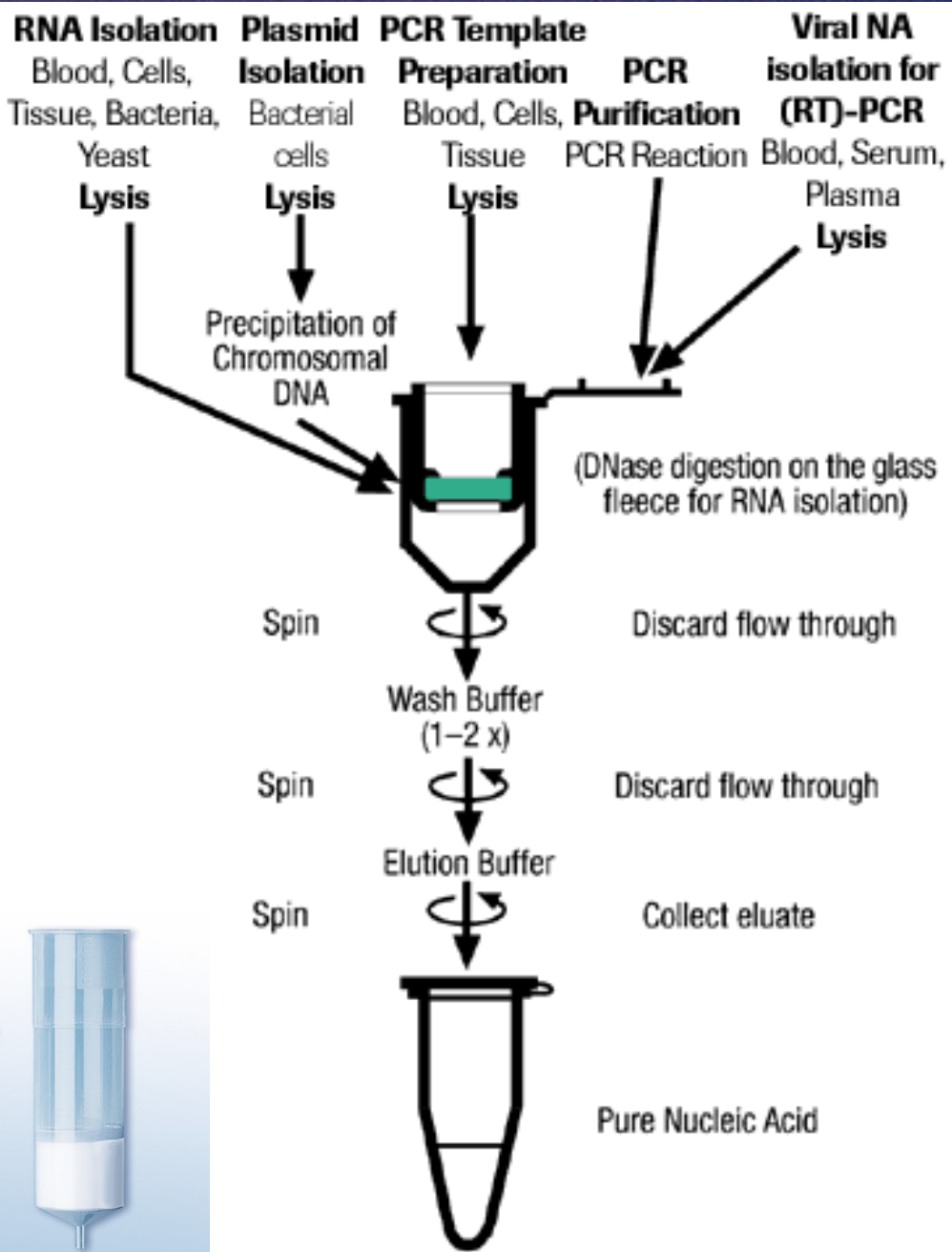
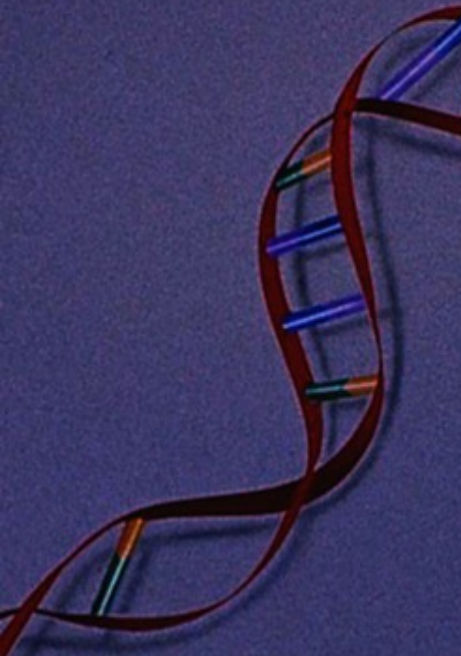
- Využívají schopnost nukleových kyselin adsorbovat se na povrchy z **oxidu křemičitého** (kolonky do centrifugačních mikrozskumavek) v přítomnosti chaotropní soli (Vogelstein and Gillespie, 1979)
 - guanidin thiokyanát
 - guanidin hydrochlorid
 - jodid sodný (NaI)
- Síla vazby závisí na
 - Typu nukleové kyseliny (DNA nebo RNA)
 - Iontové síle
 - pH roztoku
- Promývání pro odstranění proteinů a dalších kontaminant
- Eluce DNA pufrém 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.





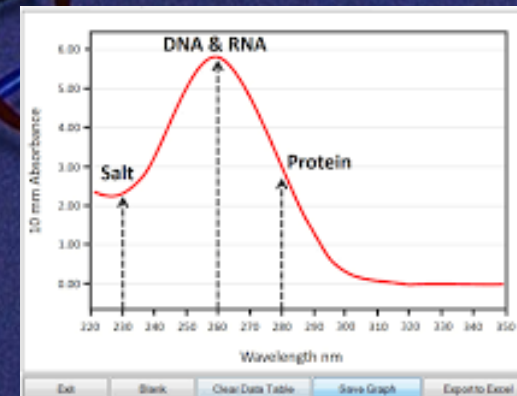
Analýza a kvantifikace

SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA

- Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm
- Koncentraci stanovujeme na základě empirie:



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



- Vhodná metoda pro měření vzorků, které jsou
 - V dostatečné koncentraci
 - Dostatečně čisté bez významného množství kontaminant