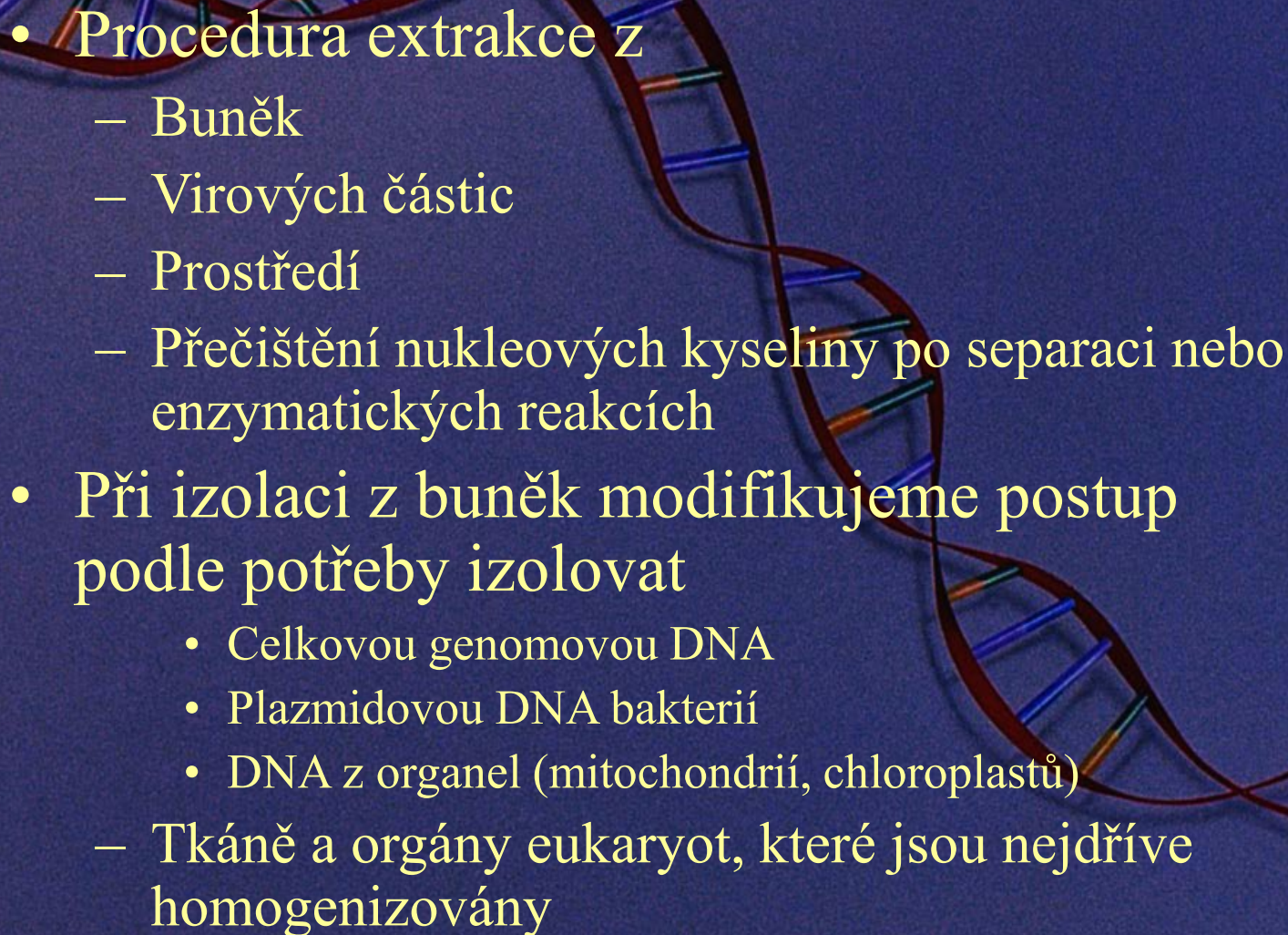
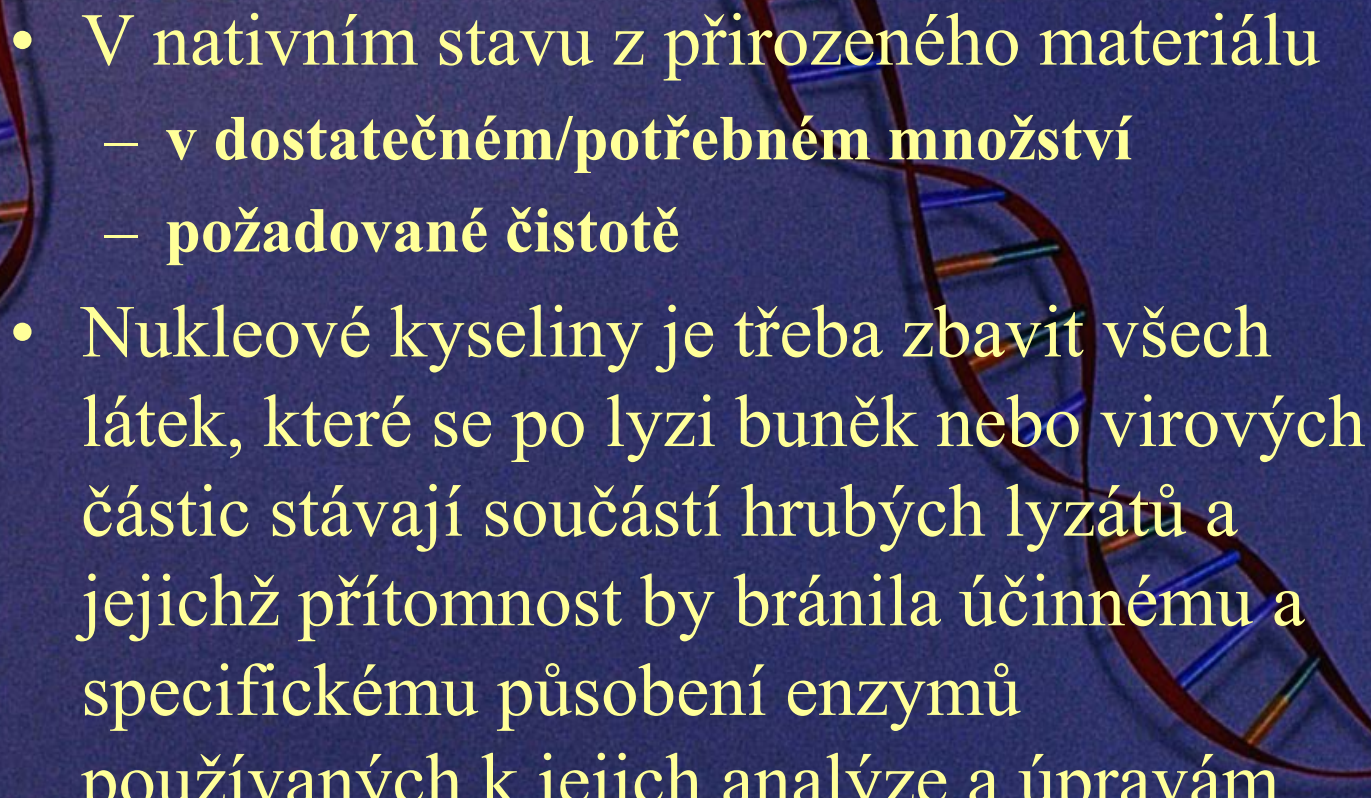


Izolace nukleových kyselin

Materiál pro izolaci nukleových kyselin

- 
- Procedura extrakce z
 - Buněk
 - Virových částic
 - Prostředí
 - Přečištění nukleových kyseliny po separaci nebo enzymatických reakcích
 - Při izolaci z buněk modifikujeme postup podle potřeby izolovat
 - Celkovou genomovou DNA
 - Plazmidovou DNA bakterií
 - DNA z organel (mitochondrií, chloroplastů)
 - Tkáně a orgány eukaryot, které jsou nejdříve homogenizovány

Požadavky na izolaci nukleových kyselin

- 
- V nativním stavu z přirozeného materiálu
 - v dostatečném/potřebném 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

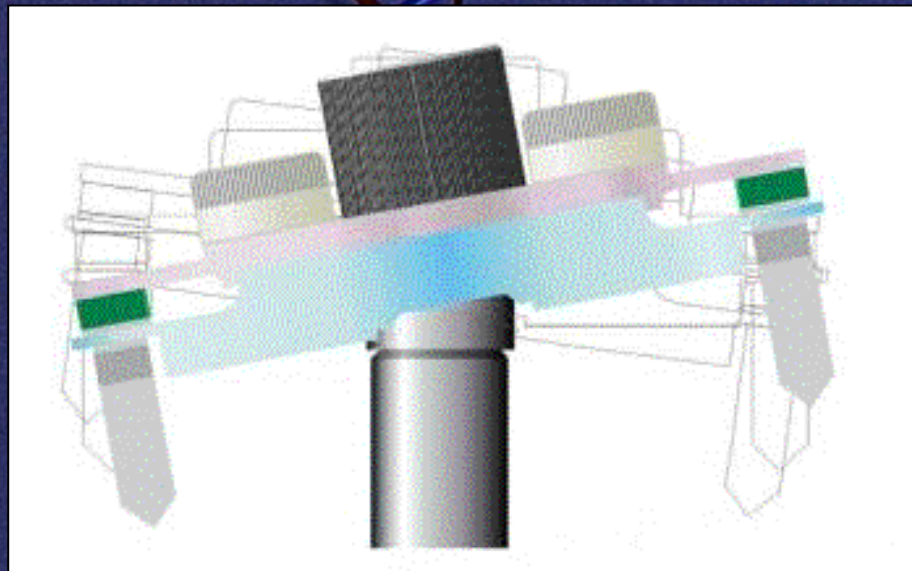
Metodické principy využívané při izolaci nukleových kyselin



- 1. Rozrušení buněčných stěn – obecně označovaný proces „lyze buněk“ pomocí
 - Enzymů (lysozym a celulázy)
 - Detergentů (dodecylsulfát sodný)
 - Mechanicky (lyzační matrice, FastPrep)
 - Ultrazvukem
- 2. Enzymatické kroky pro odstranění kontaminant (předčišťovací enzymy)
 - Proteináza K nebo pronáza E
 - RNáza nebo DNáza
- 3. Purifikace NA

FastPrep Kity

- **Homogenizátory - izolace z těžce zpracovatelných vzorků**
 - tkáně
 - rostlinný materiál
 - Gram-pozitivní bakterie
 - kosti
 - půda/prostředí
- **Balotina vhodné velikosti**



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

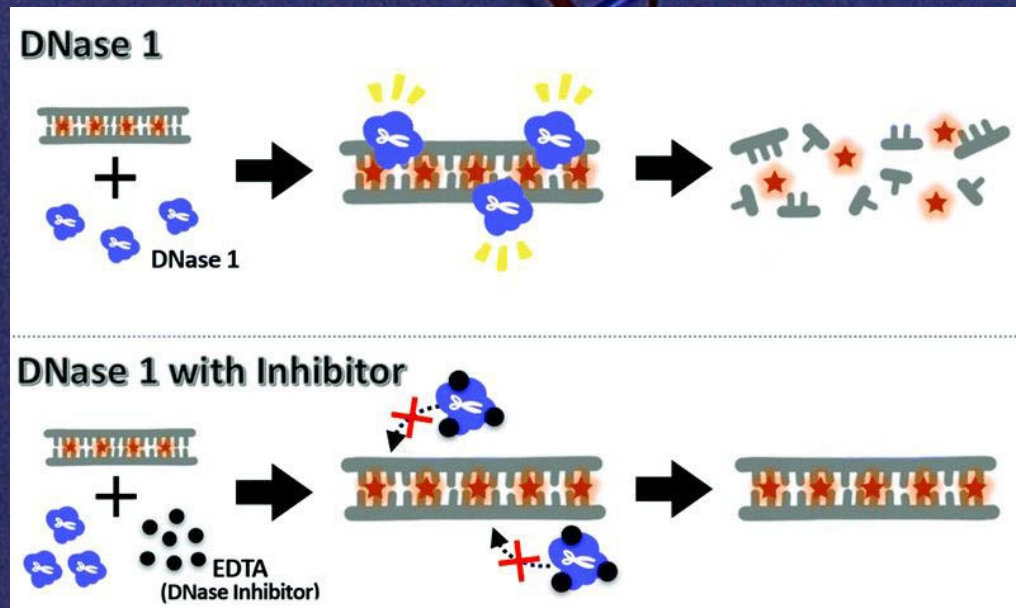
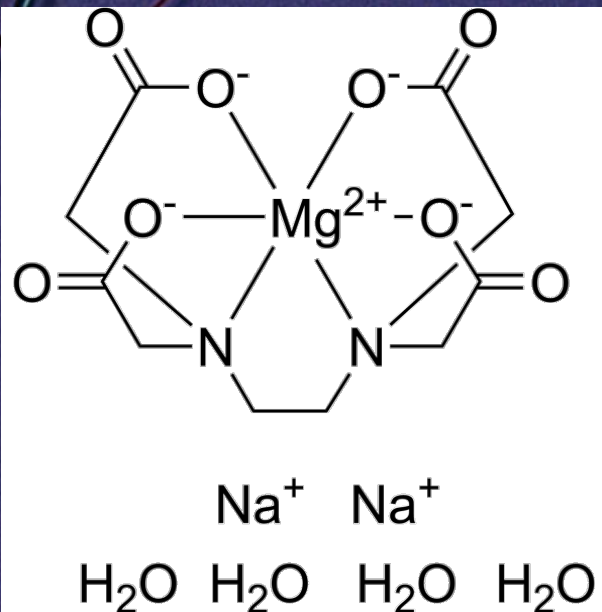
- DNA se váže na křemičité povrchy v přítomnosti chaotropní látky
- Vhodné zejména pro rychlou purifikaci malých množství

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

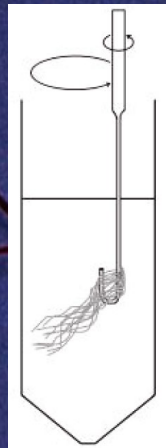
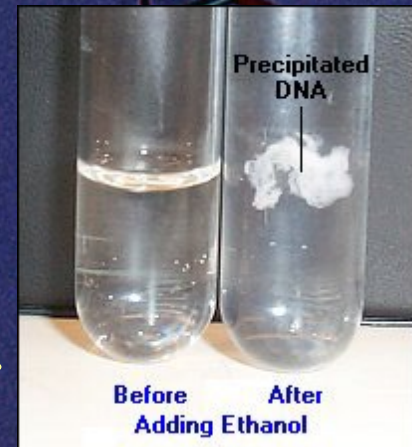
Základní složky roztoků

- NaCl – iontová síla
- Tris hydrochlorid – pufrovací 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

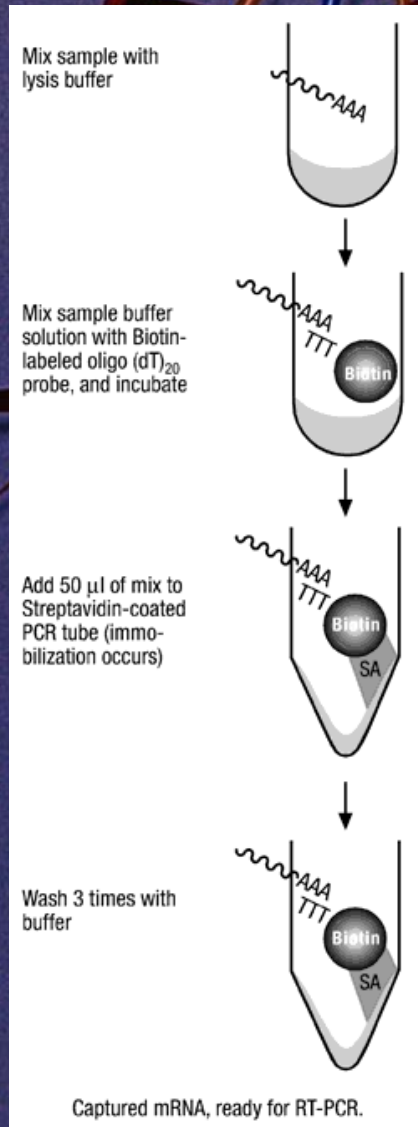
Izolace RNA

- 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

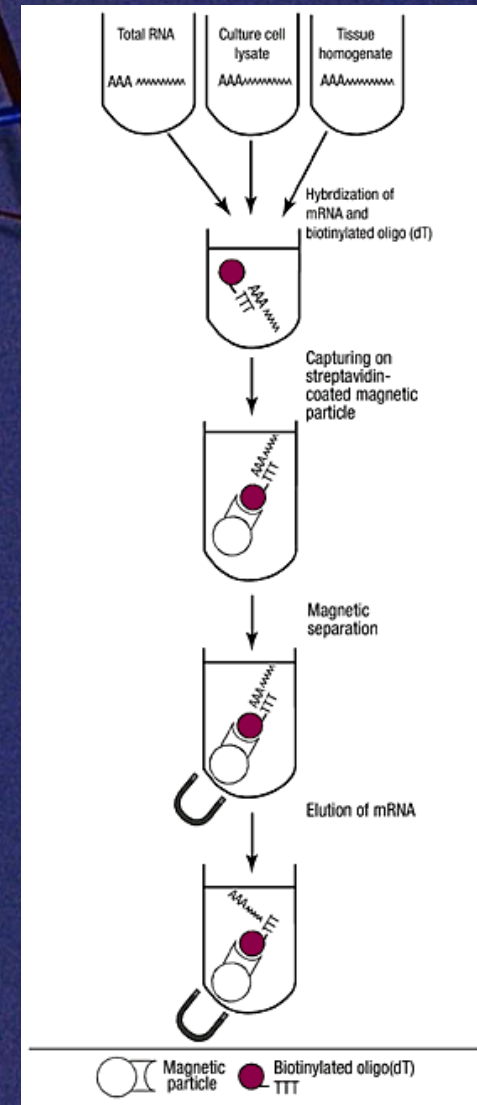
Izolace mRNA

- 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 immobilizovány na pevném podkladu pokrytém streptavidinem

- Streptavidinem pokryté mikrozkumavky

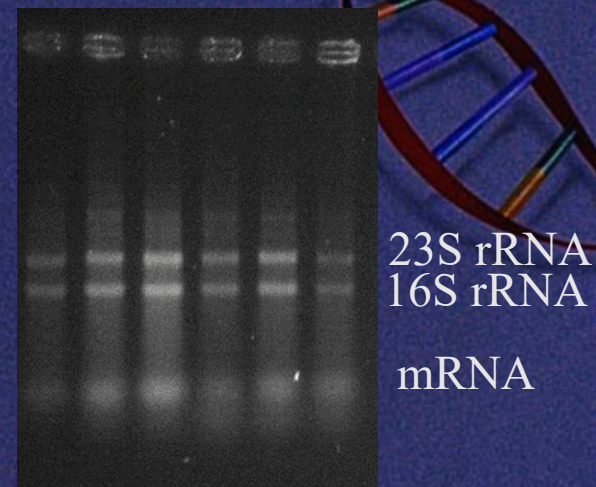
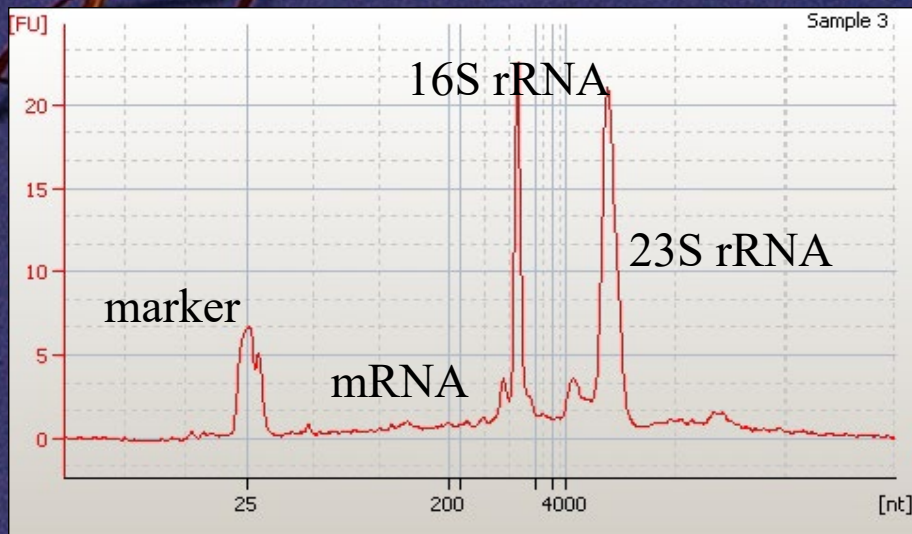


- Streptavidinem pokryté magnetické částice



RNA separovaná na bioanalyzátoru

- RNA integrity number (RIN)
 - Většinu materiálu představuje ribozomální RNA
 - 16S (18S) rRNA
 - 23S (28S) rRNA



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

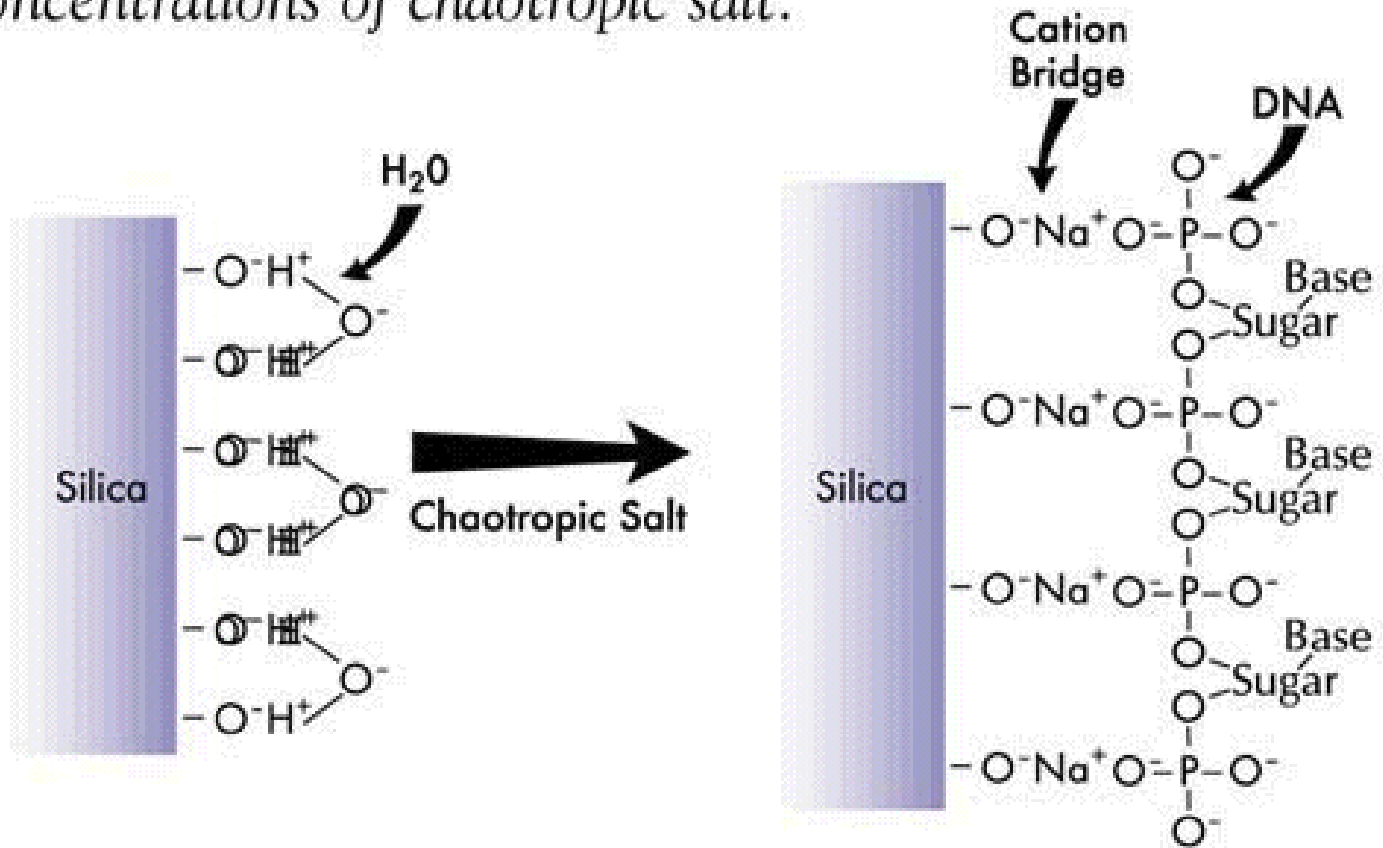
Adsorpční metody

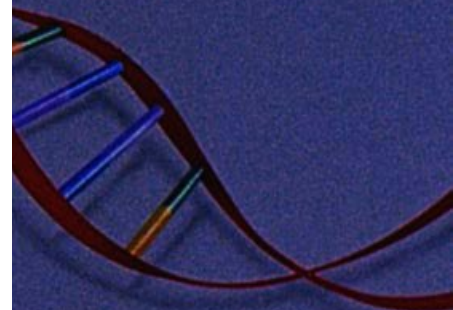
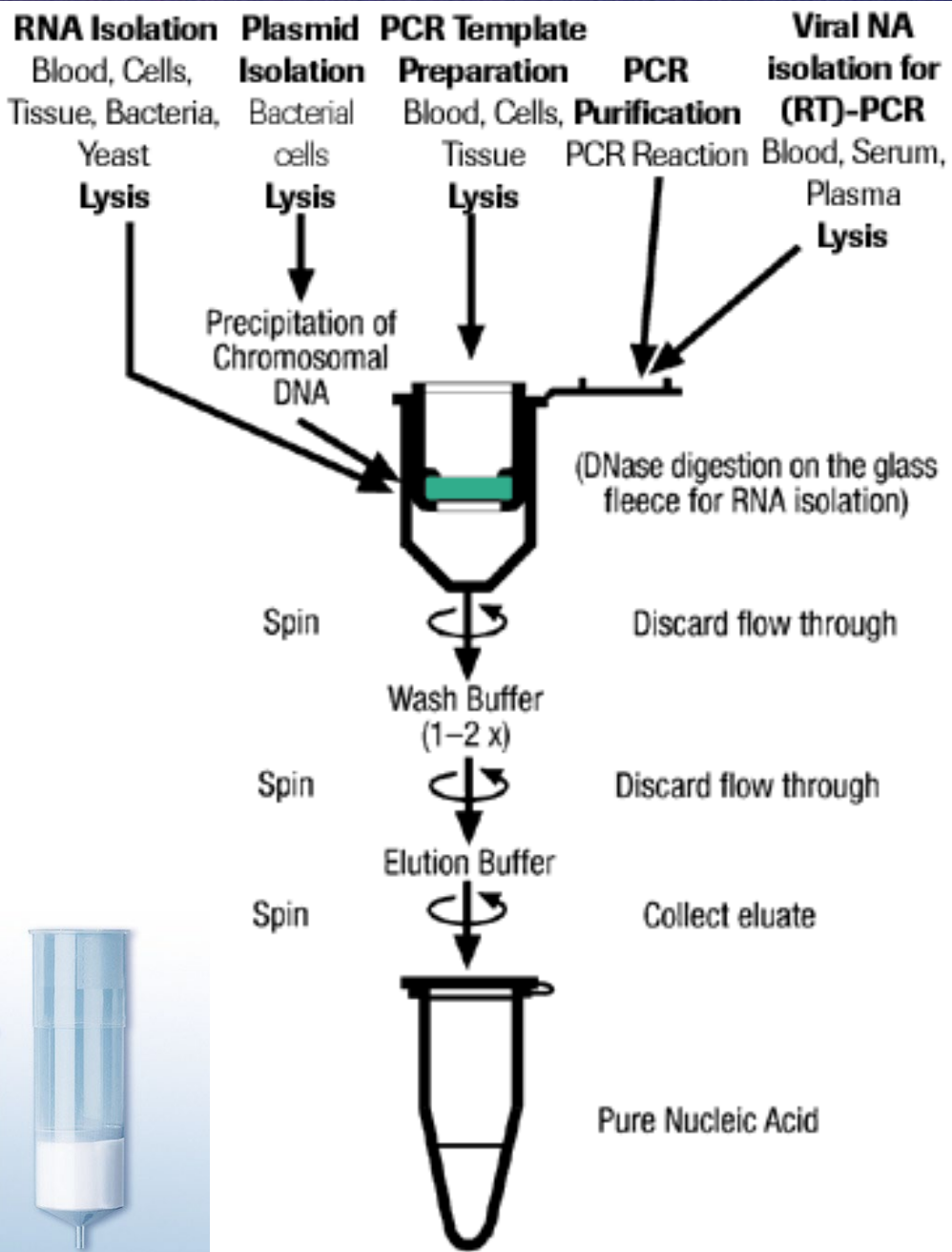
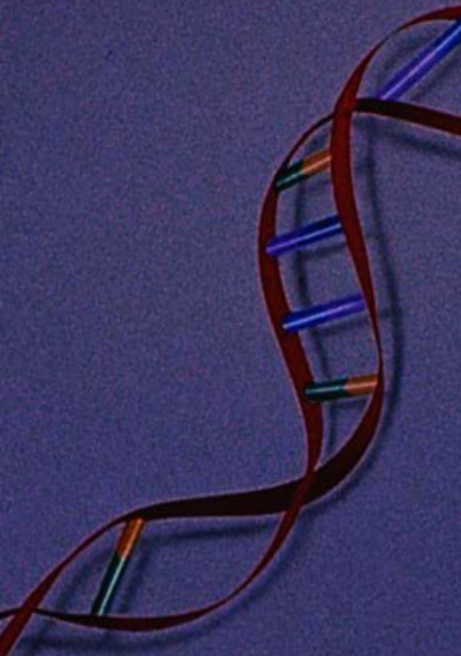
- Využívají schopnost nukleových kyselin adsorbovat se na povrchy z **oxidu křemičitého** (kolonky do centrifugačních mikrozskumavek) v přítomnosti chaotropní soli (Vogelstein and Gillespie, 1979)
 - guanidin thiokyanát
 - guanidin hydrochlorid
 - jodid sodný (NaI)
- Síla vazby závisí na
 - Typu nukleové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

Mechanismus interakce DNA s oxidem křemičitým

Fig. 1

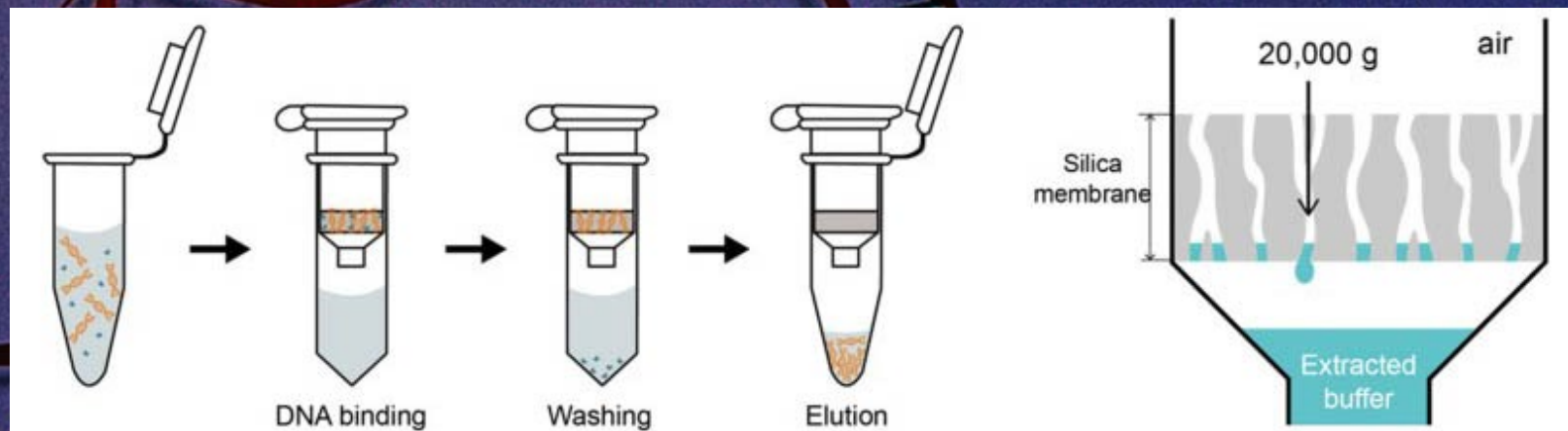
A possible mechanism for silica binding of DNA in high concentrations of chaotropic salt.



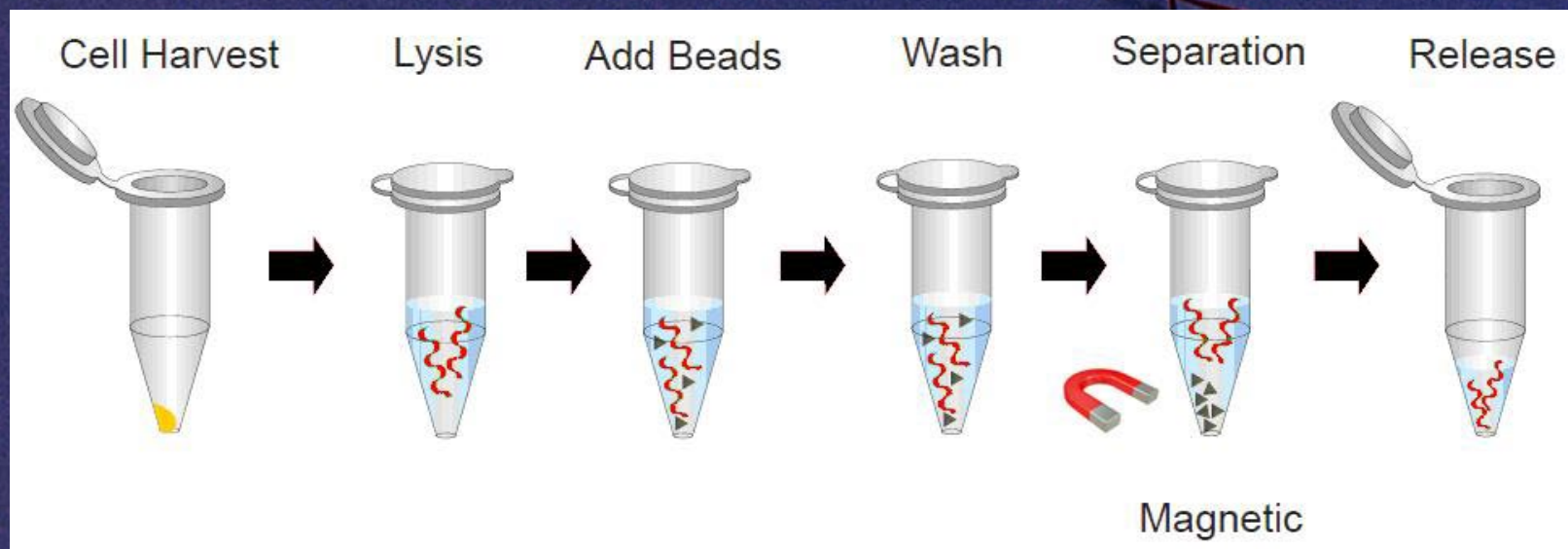


Formy silika-matric

- Kolony



- Kuličky



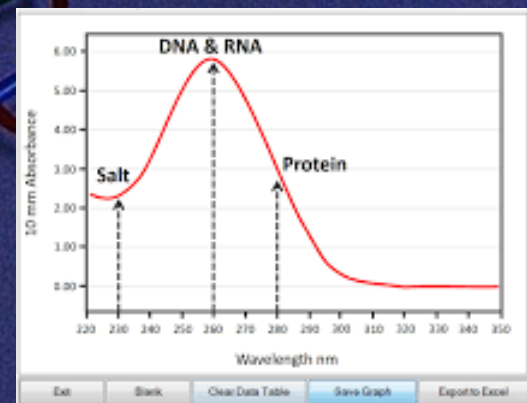
Analýza a kvantifikace

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