



# Využití chromatografických metod při analýze nukleových kyselin

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2012**

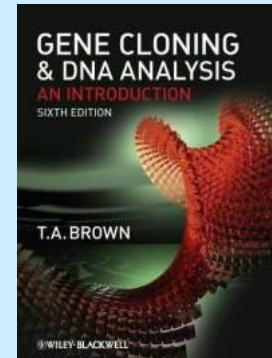
# ***Obsah přednášky***

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



## *Doporučená literatura*

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



# *Chromatografie*



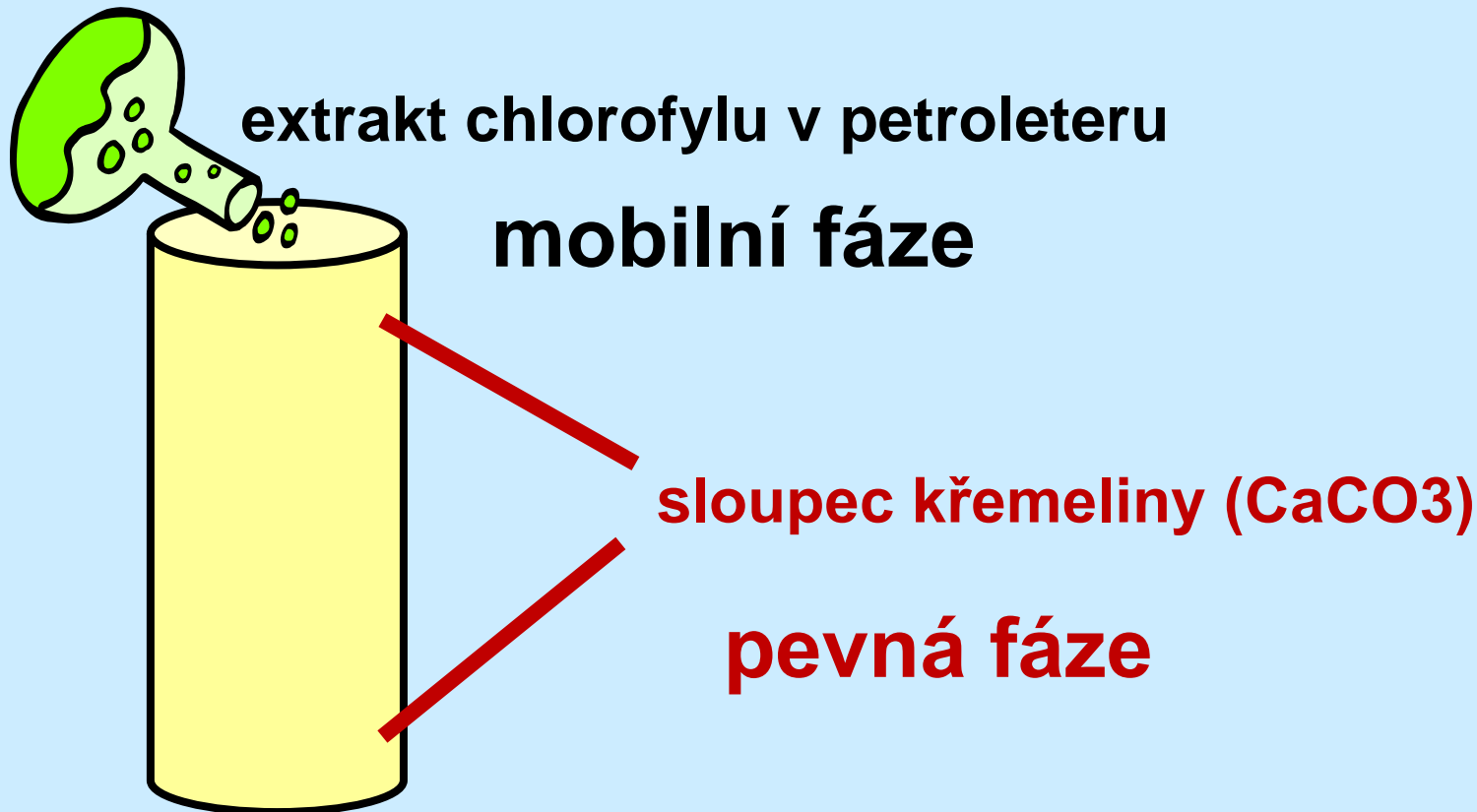
**Základní nástroj při purifikaci nukleových kyselin**

# *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 ( $\text{SiO}_2$ ), 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  $\alpha$  = 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 –  $\text{SiO}_2$ , sklo, polymery, škrob, celulóza, aj.

# ***Ionexová chromatografie***

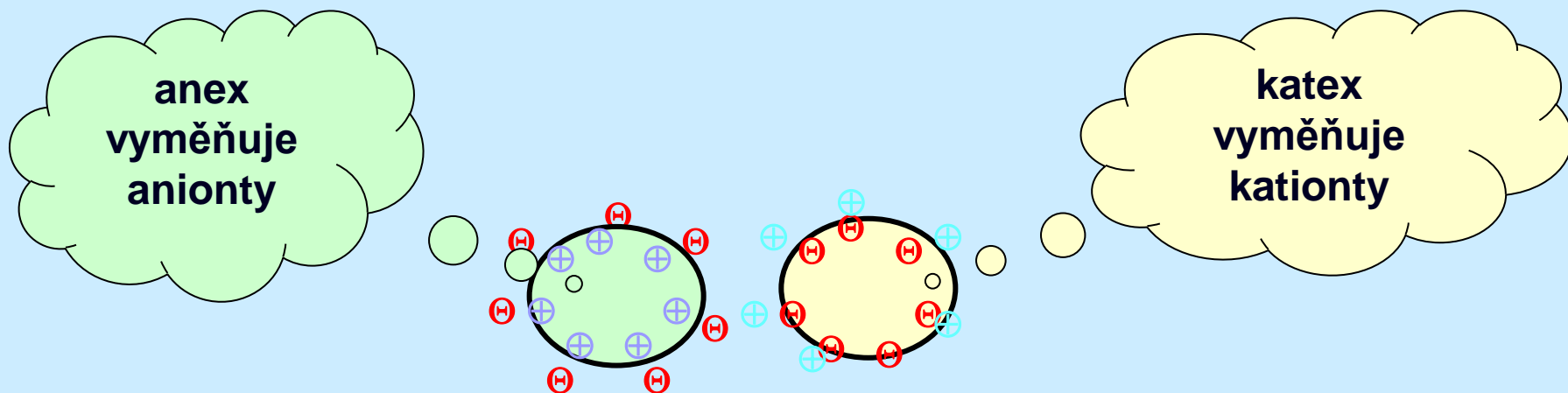
**Je založena na coulombickém přitahování opačných nábojů**

- **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 celuloza**
- **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

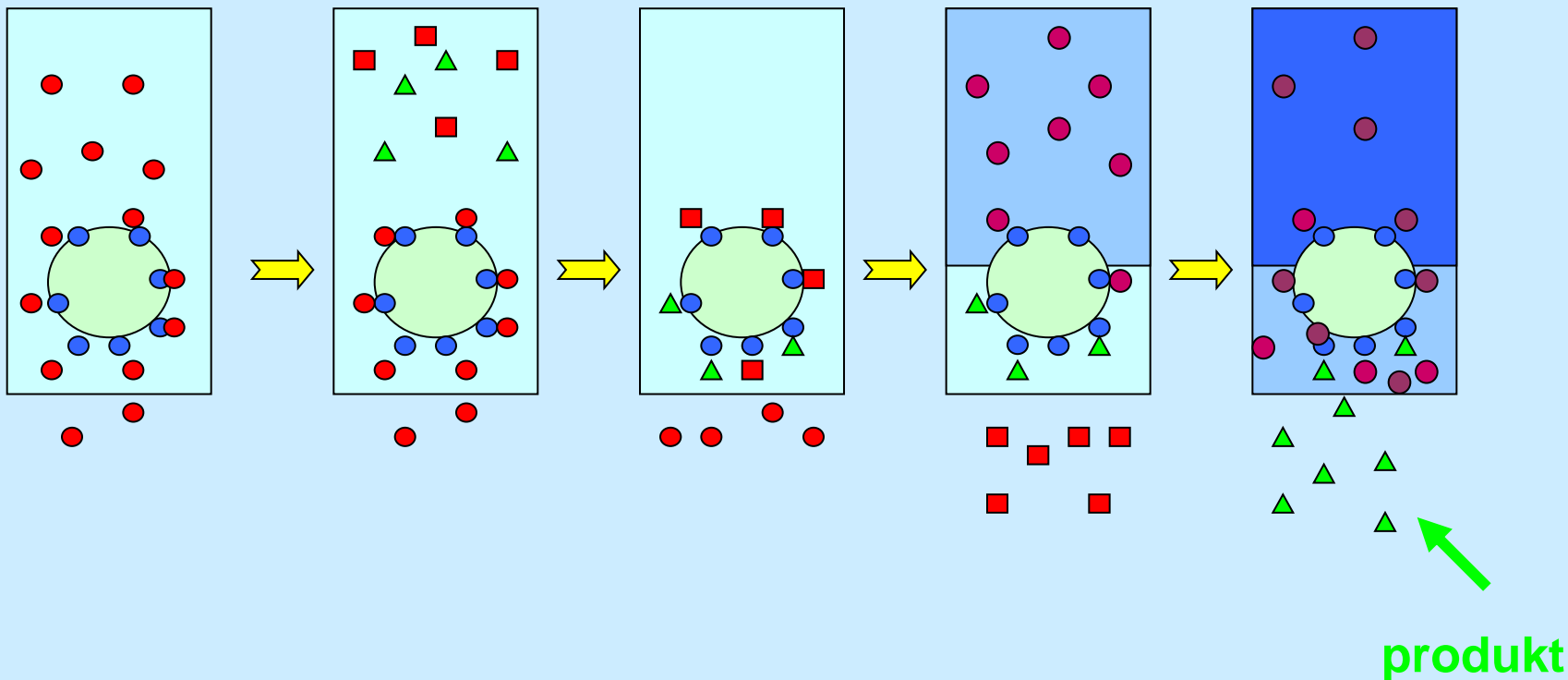
Aktivace kolony

Nanesení vzorku

Adsorbce částic

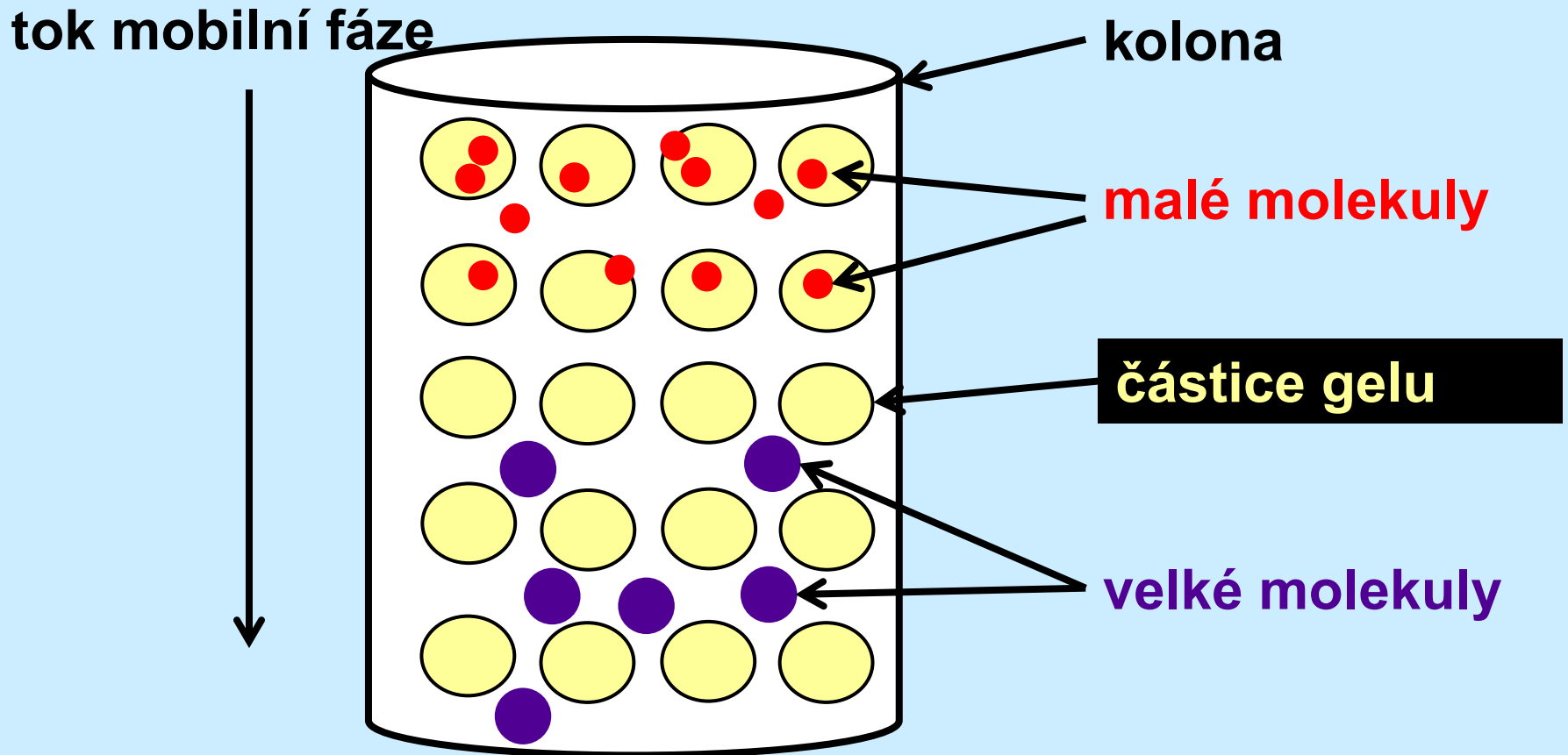
Promytí kolony

Eluce



# *Gelová permeační chromatografie*

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



# ***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***

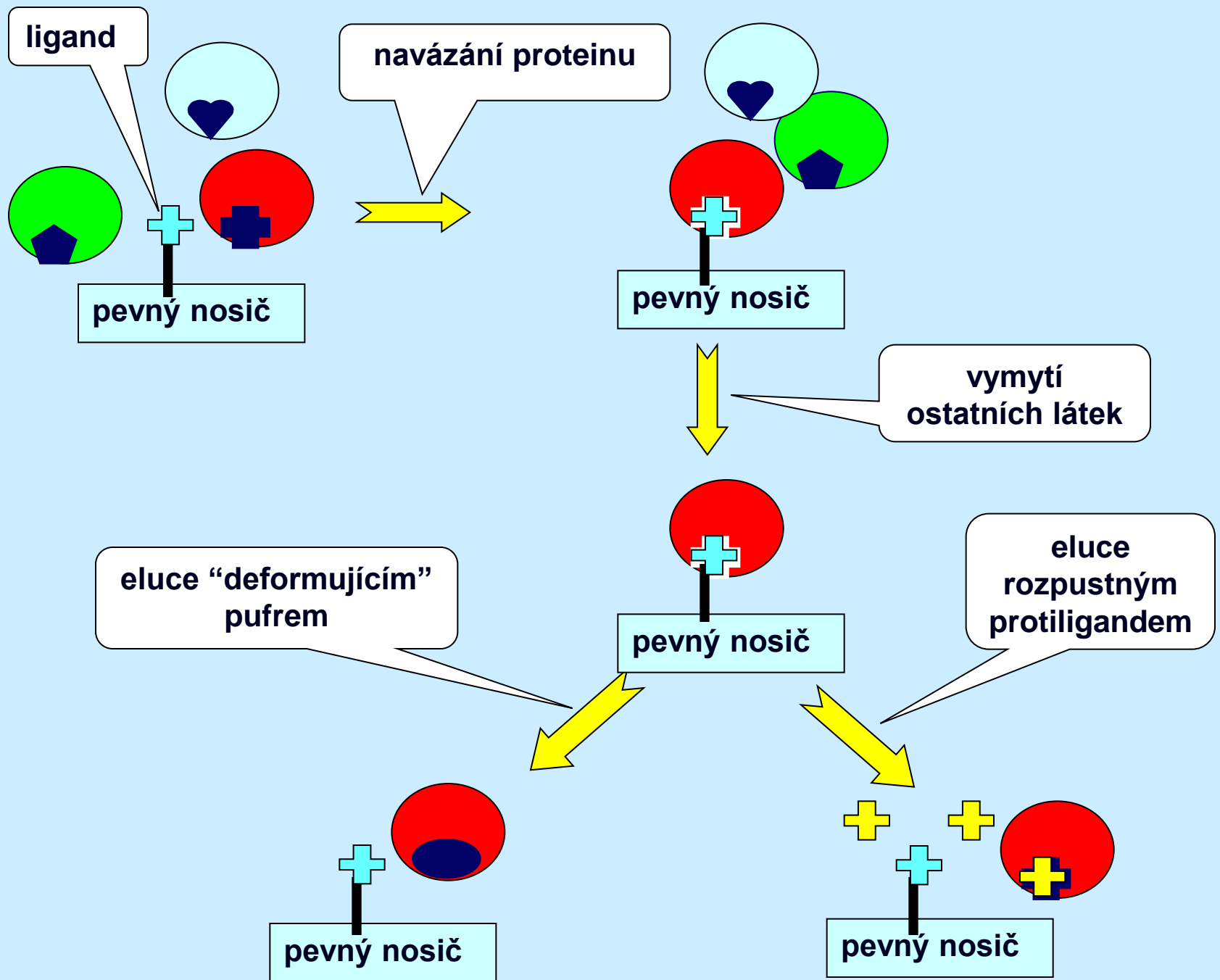
**Je založena na specifických interakcích obvykle nevazebné povahy**

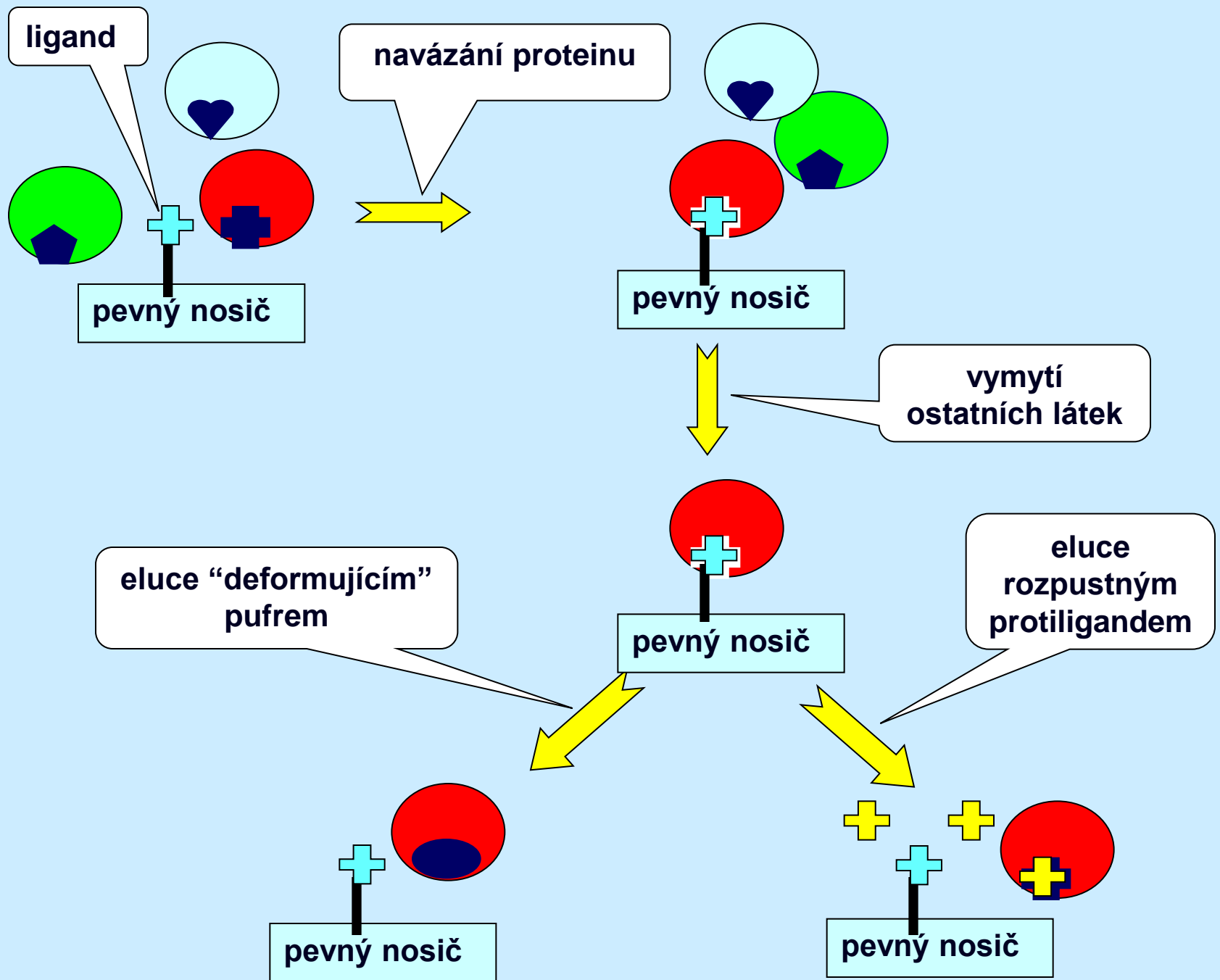
- **Stacionární fázi tvoří jedna z interagujících molekul vázaná jako ligand na pevný nosič**
- **Druhý partner v mobilní fázi se při průchodu stacionární fází váže na tento ligand**
- **Po promytí kontaminant se nespecificky (a tedy slabě) vázaná látka uvolní elučním činidlem**
  
- **Kolony komerčně dostupné**
- **Nejčastějším typem nosičů jsou polysacharidové gely, aktivují se např. bromkyanem CNBr**
- **Na nosiči aktivací vzniklé nitrilové skupiny reagují snadno se skupinami –OH nebo –NH<sub>2</sub> 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.**







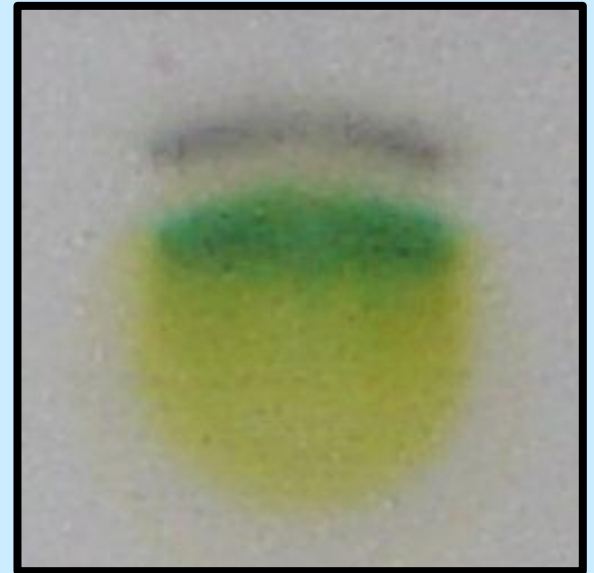
# ***Vysokoúčinná (bio)afinitní chromatografie (HPLC)***

- **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.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**



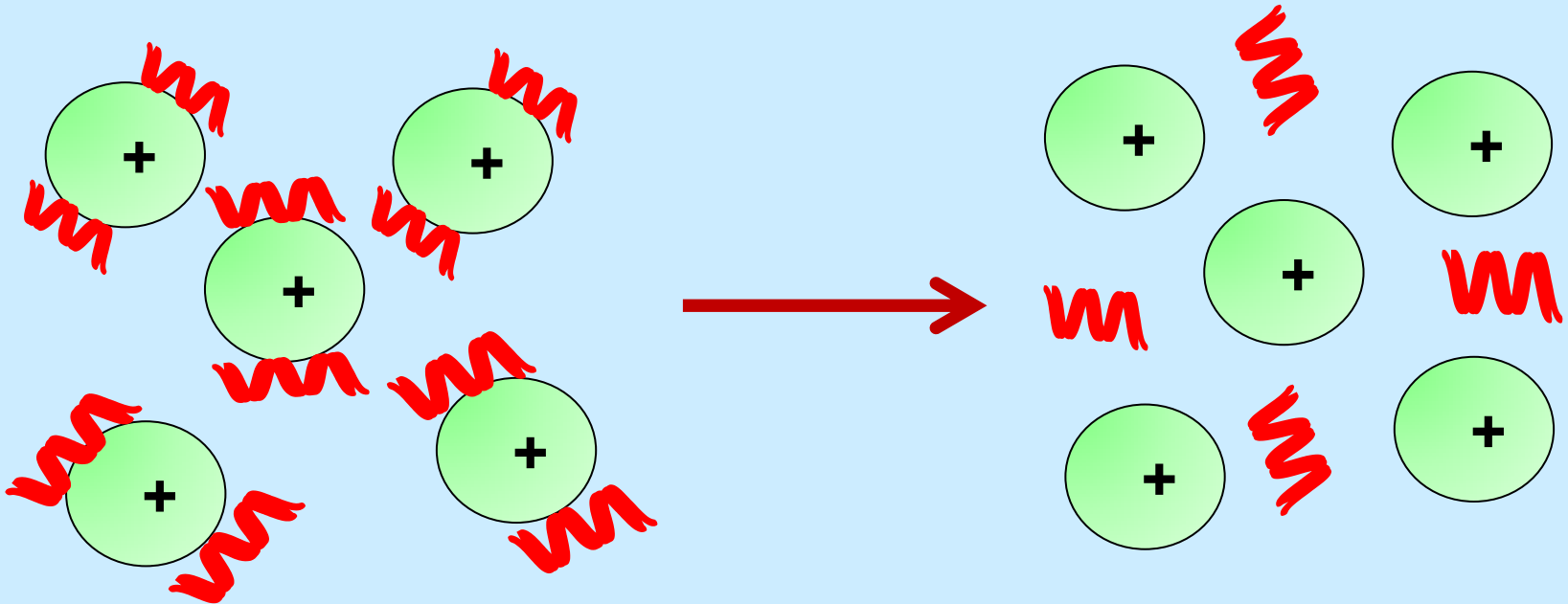
**Jaký náboj musí nést částice vázající  
DNA nebo RNA?**

**Pochopitelně pozitivní**



# Co se děje s DNA na iontoměniči

Připojení DNA k pozitivně nabitým částicím

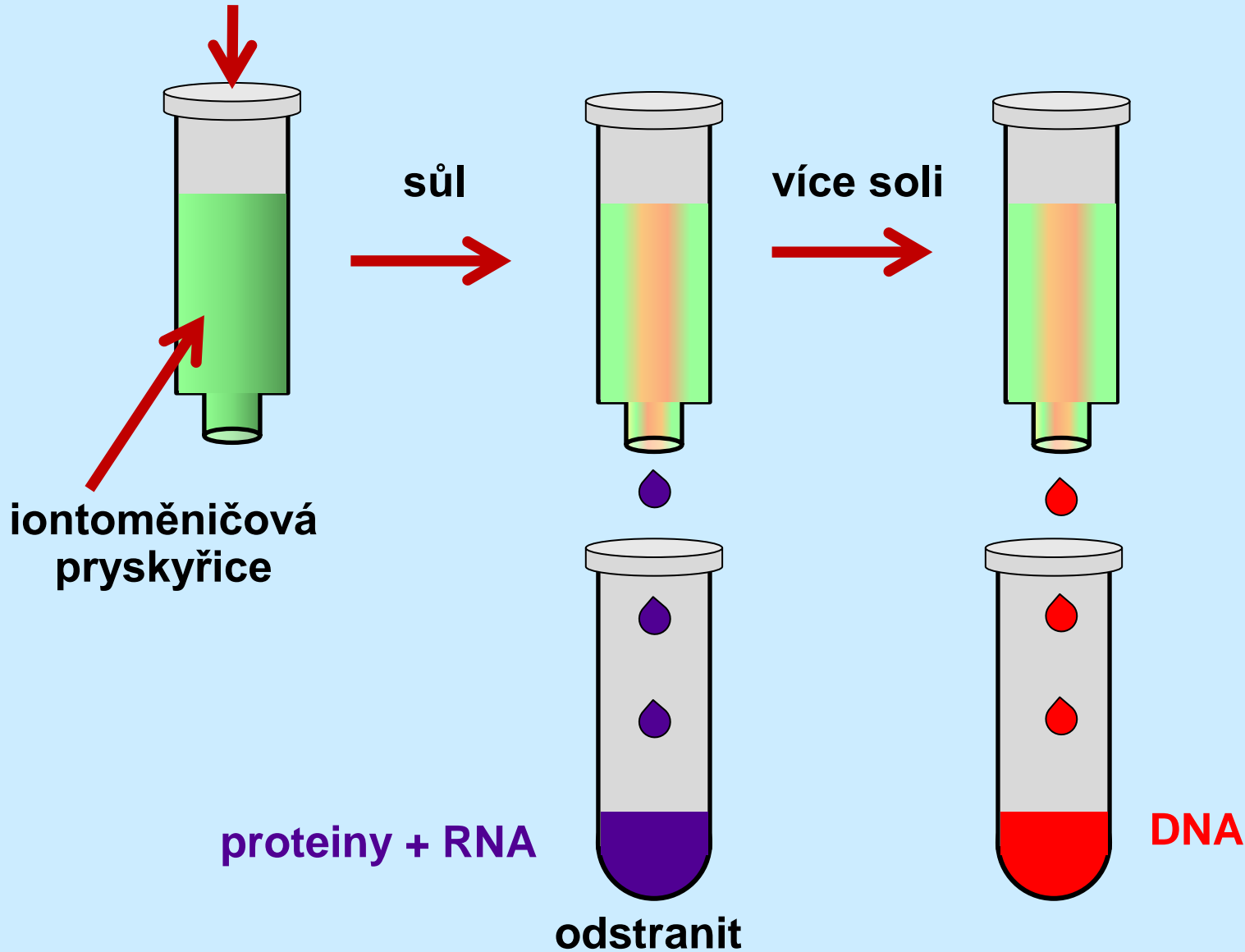


Uvolnění DNA vysokými koncentracemi solí



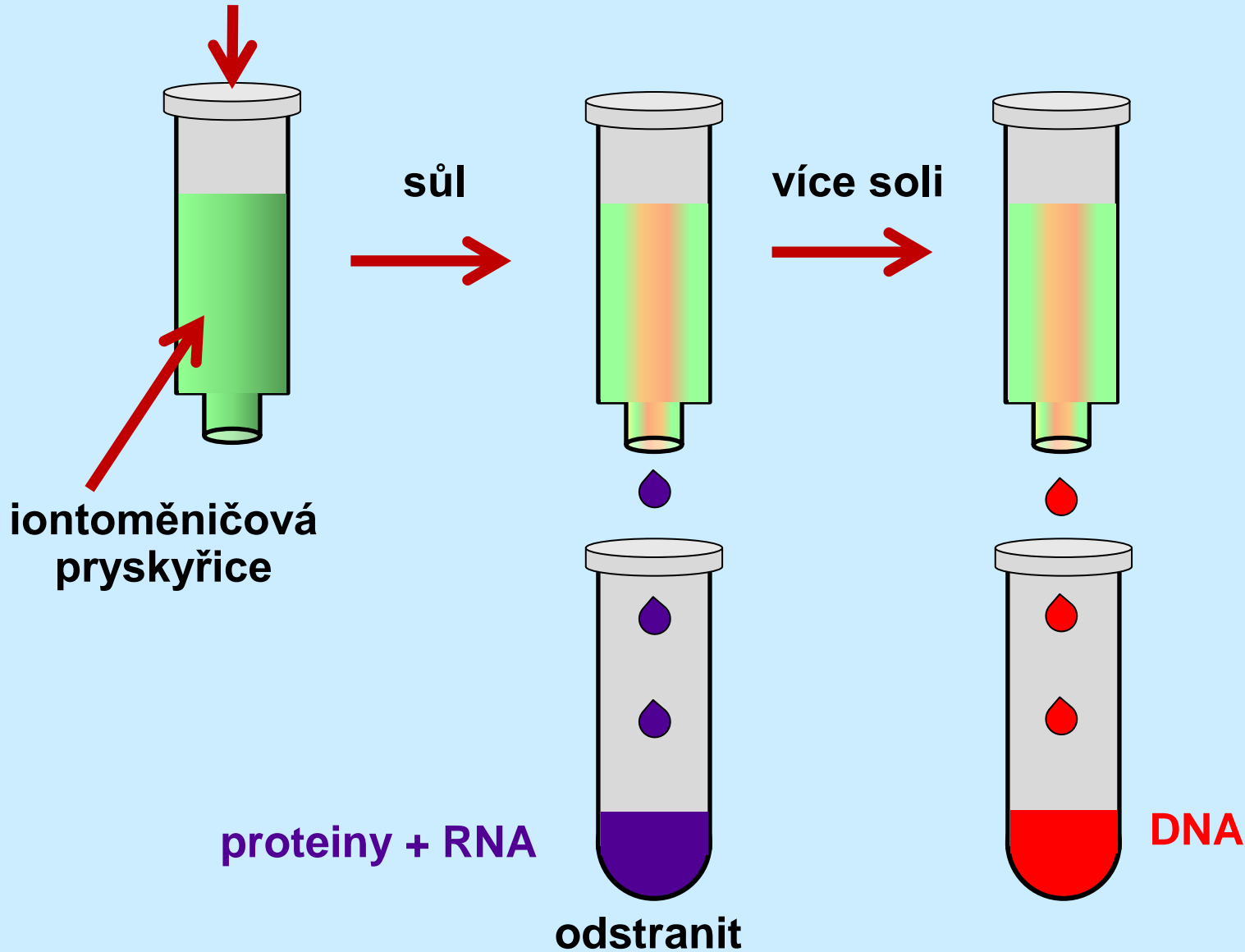
# *Jak probíhá chromatografie na koloně*

buněčný extrakt

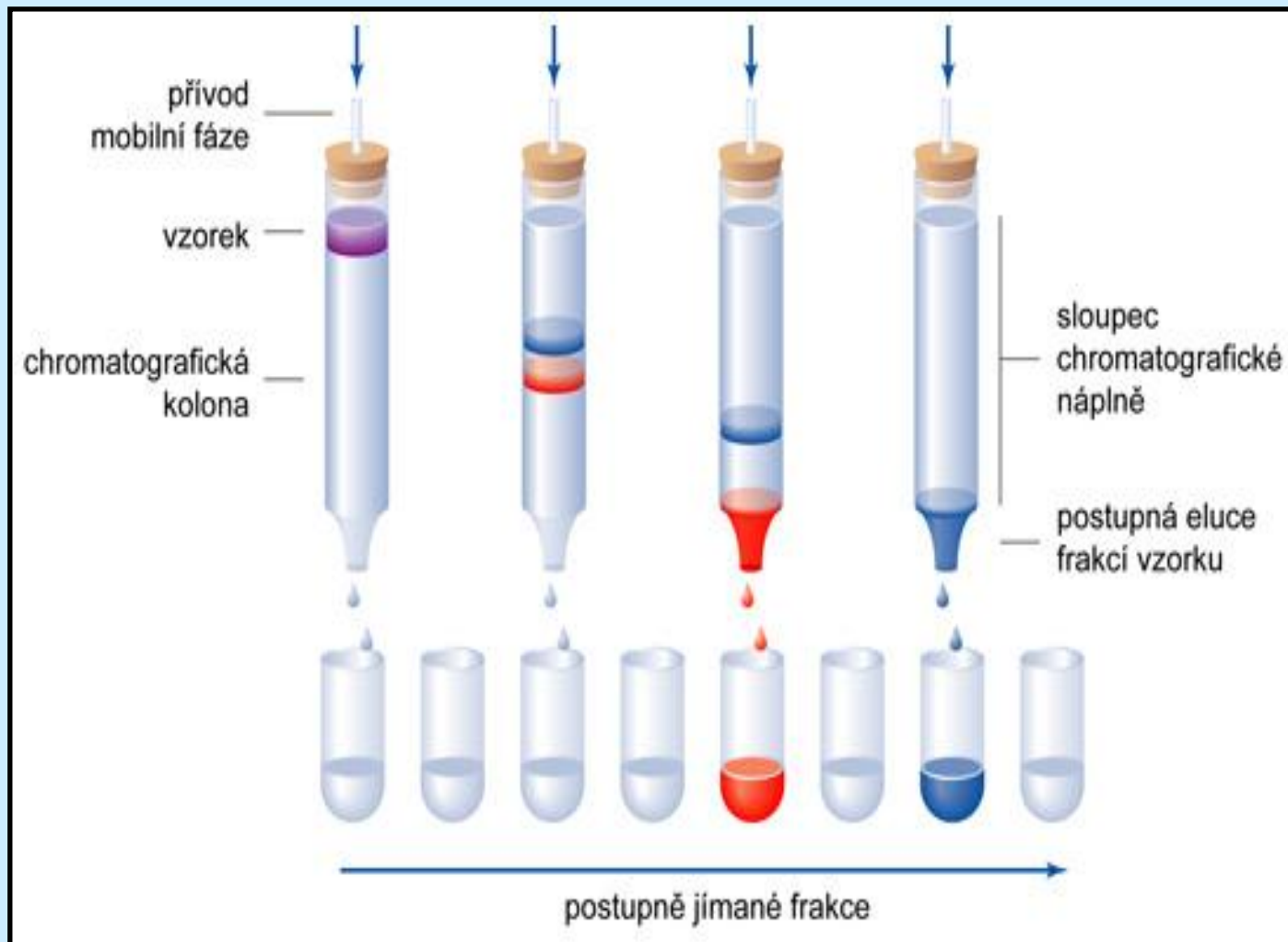


# *Jak probíhá chromatografie na koloně*

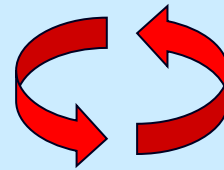
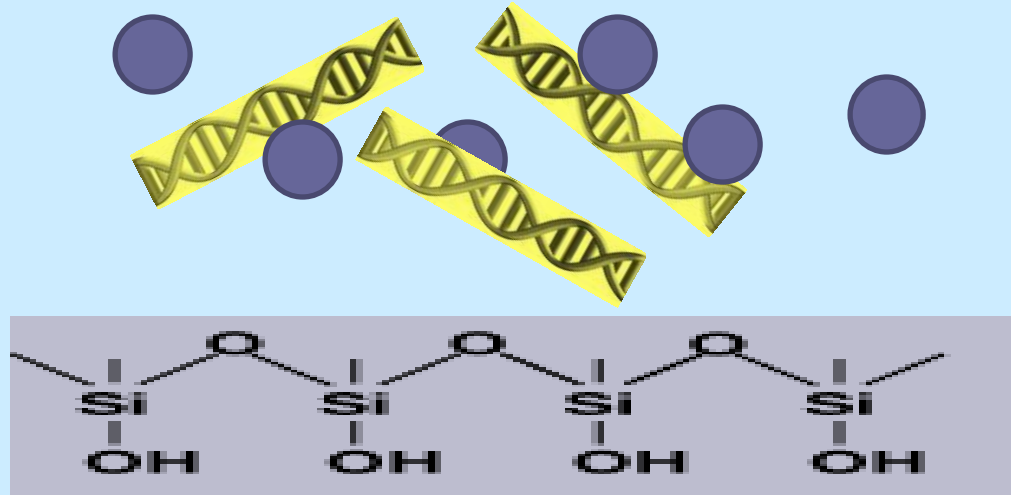
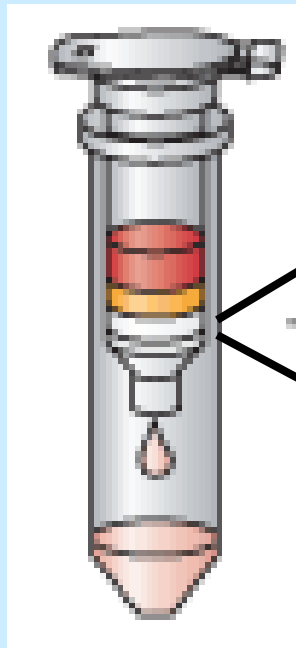
buněčný extrakt



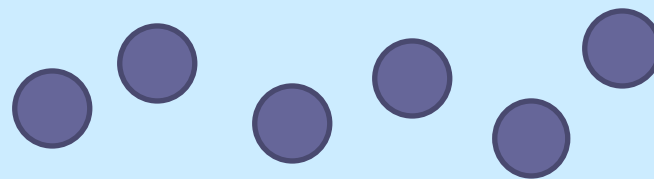
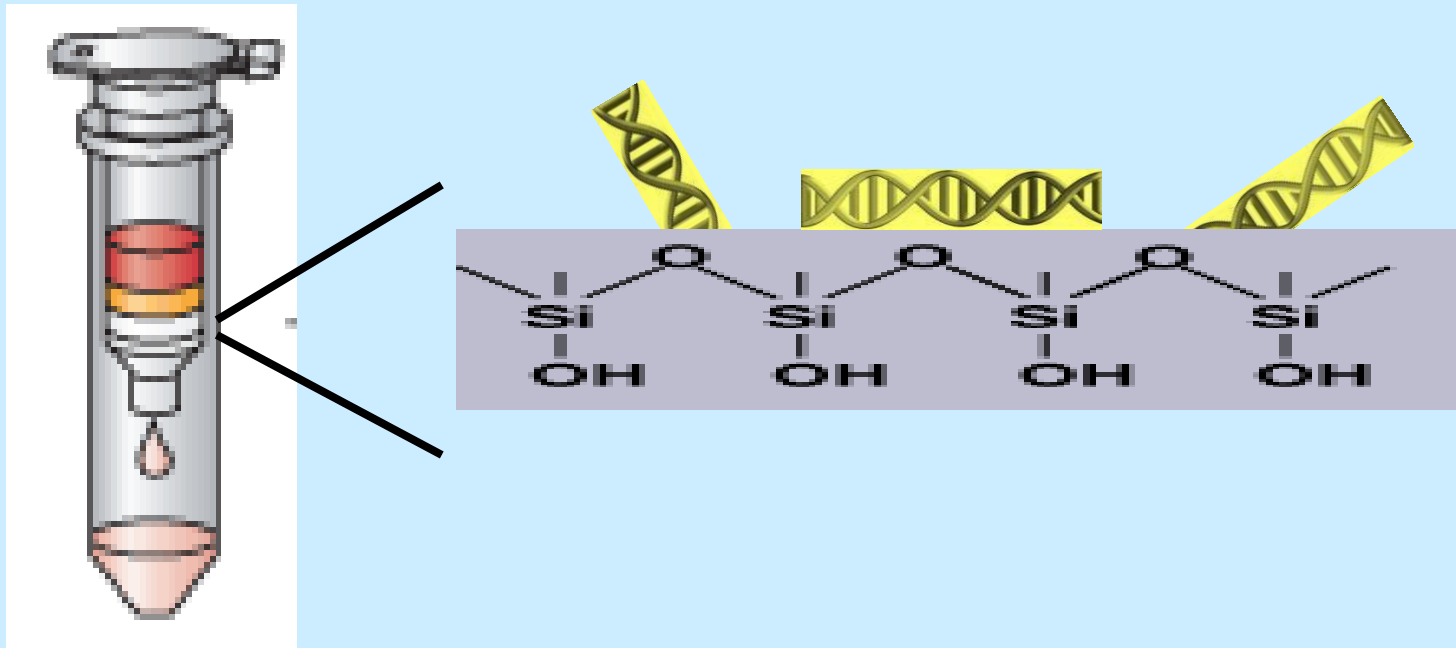
# Purifikace NA chromatografií



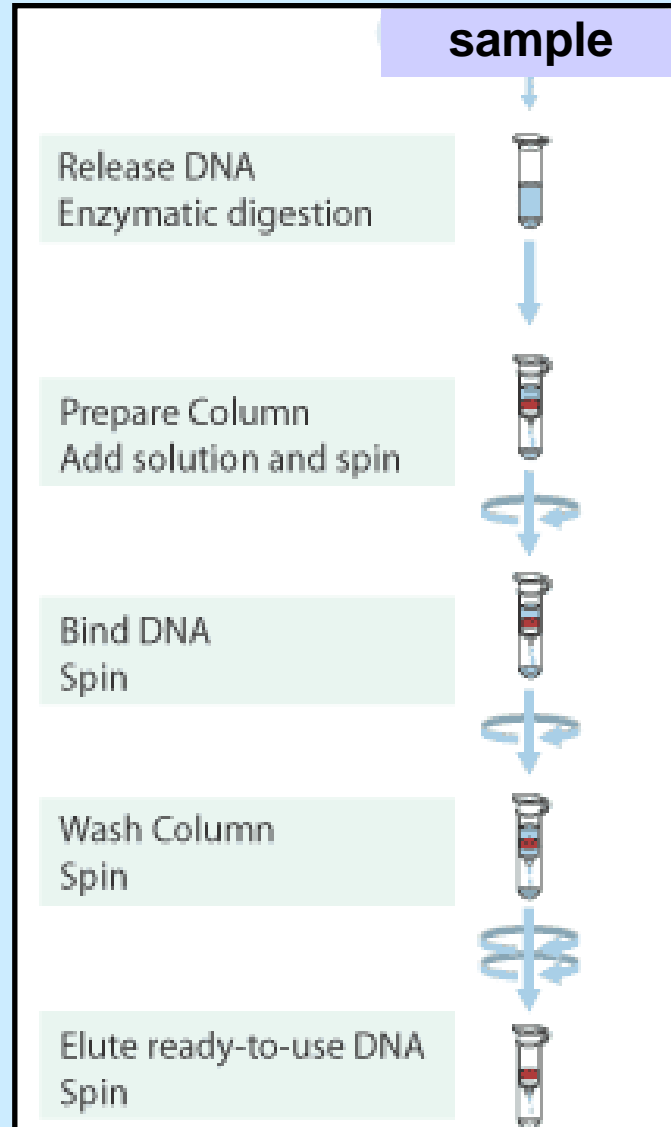
# ***Komerční chromatografie pro izolaci NA*** ***- spin columns -***



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



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



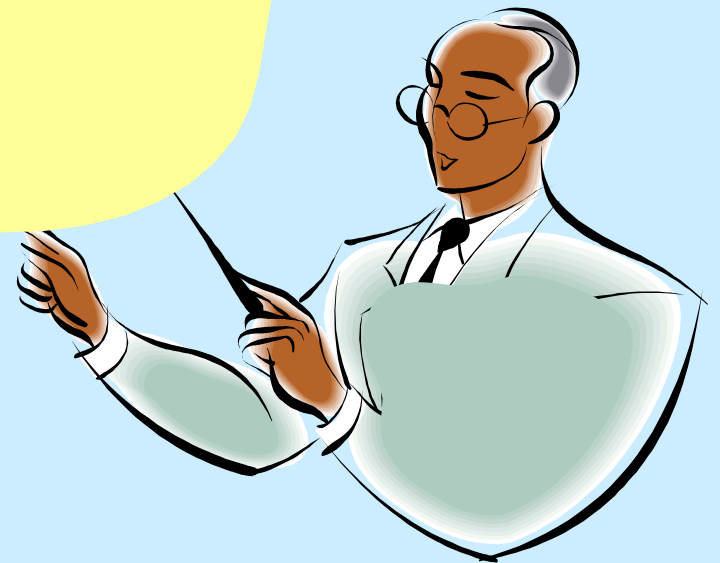
# ***Další aplikace pro izolace NA***

- 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  $5 \times 10^{-4}$  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<sup>-4</sup> 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***

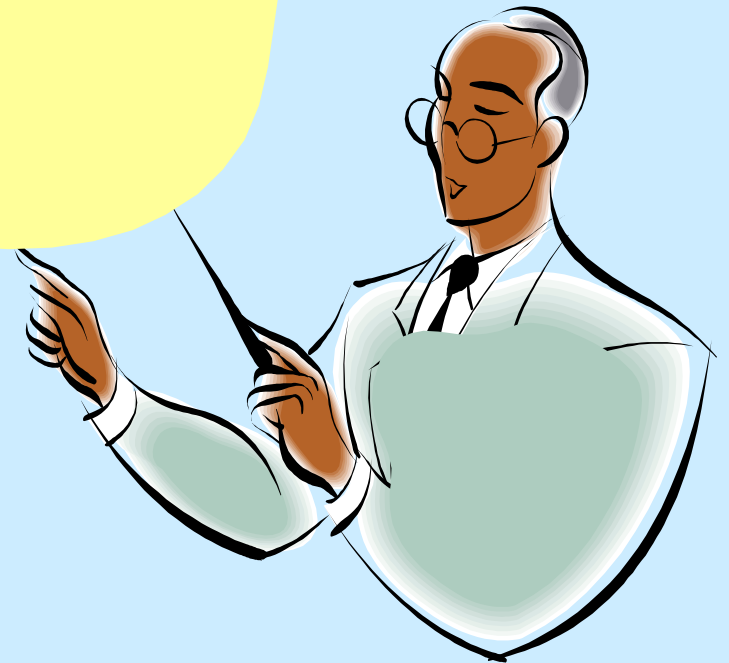
- **Používanými mobilními fázemi jsou například: cyklohexan, isopropanol, aceton, voda, toluen a pod.**
- **Stacionárními fázemi mohou být: silikagel, oxid hlinitý, iontoměniče a pod.**
- **Jako podložní materiál se pro stacionární fáze používají skleněné desky nebo hliníkové fólie.**

# ***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***

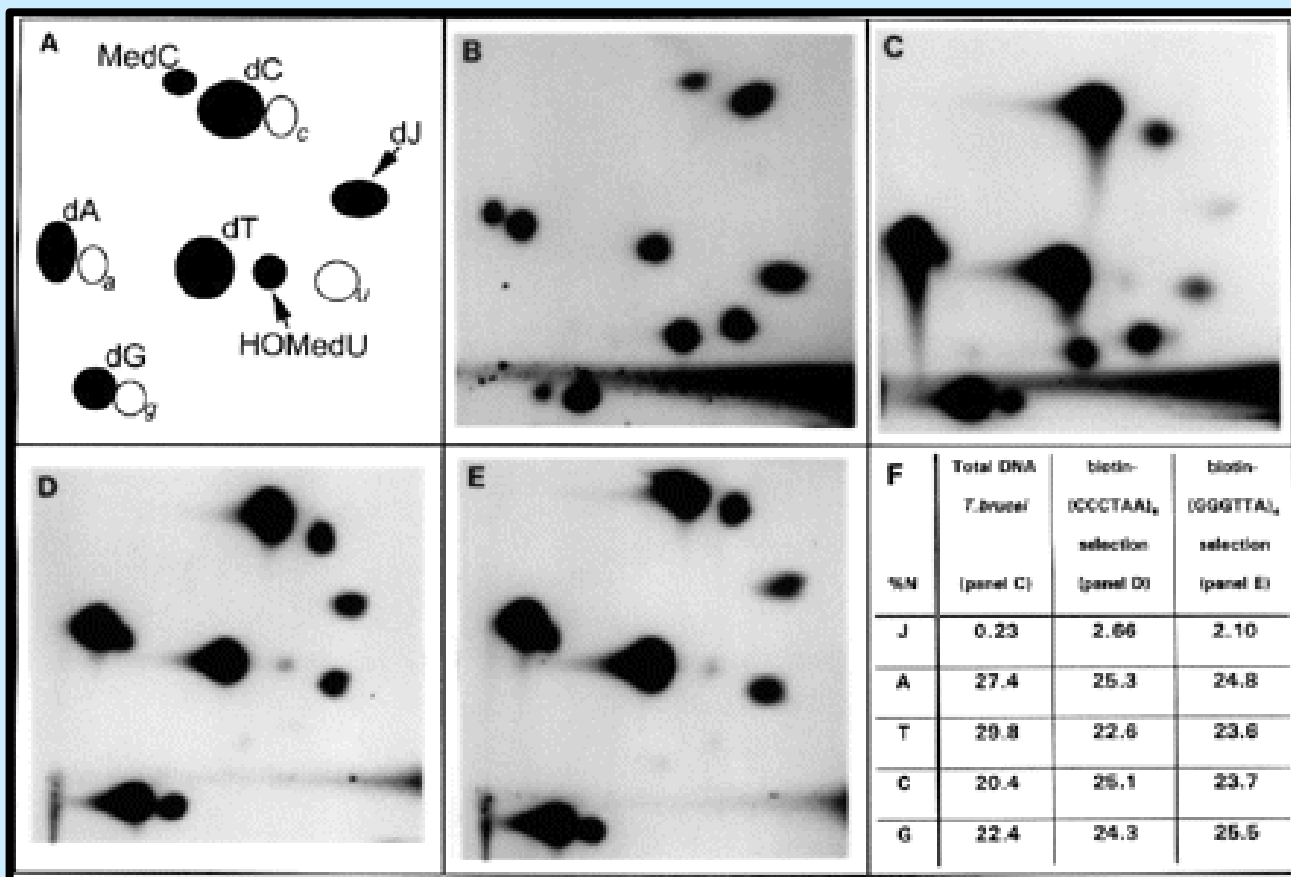
**Bochner a Ames (1982): Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. The Journal of Biological Chemistry 257, 9759-9769.**

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



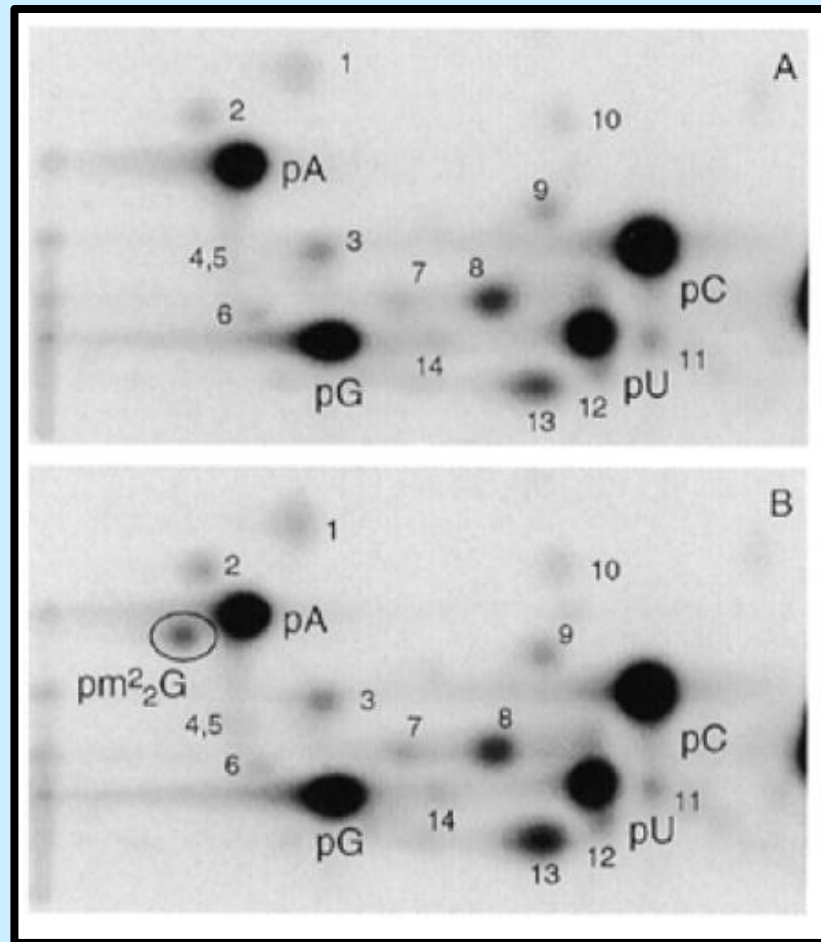


# Příklad I



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

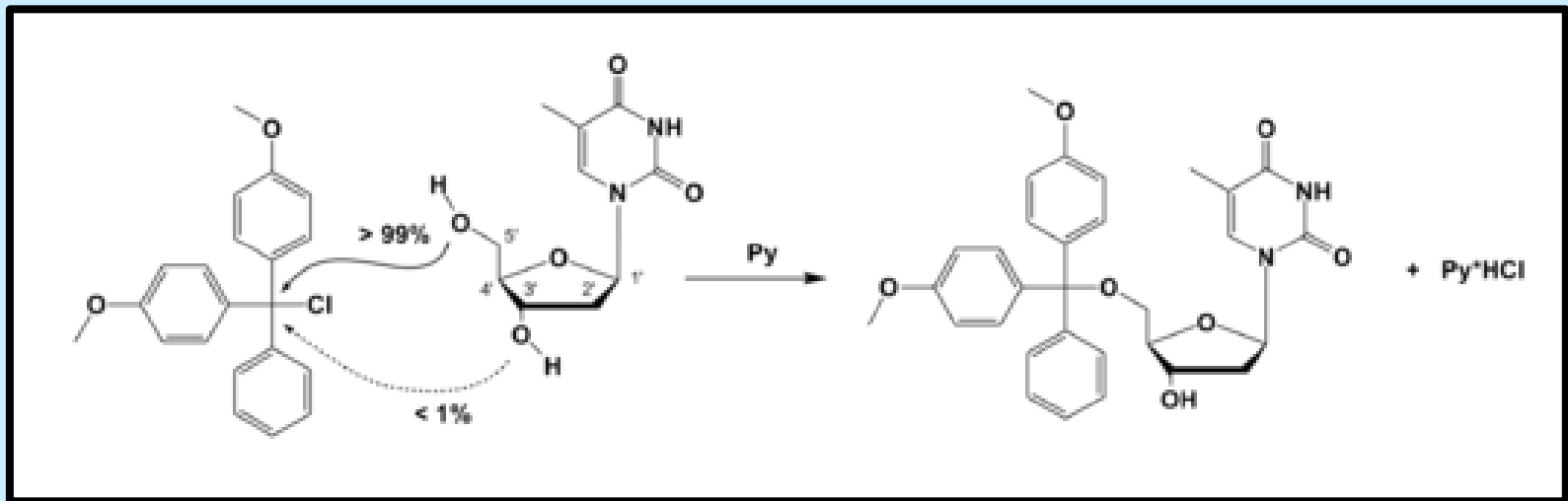
## *Příklad II*



**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.

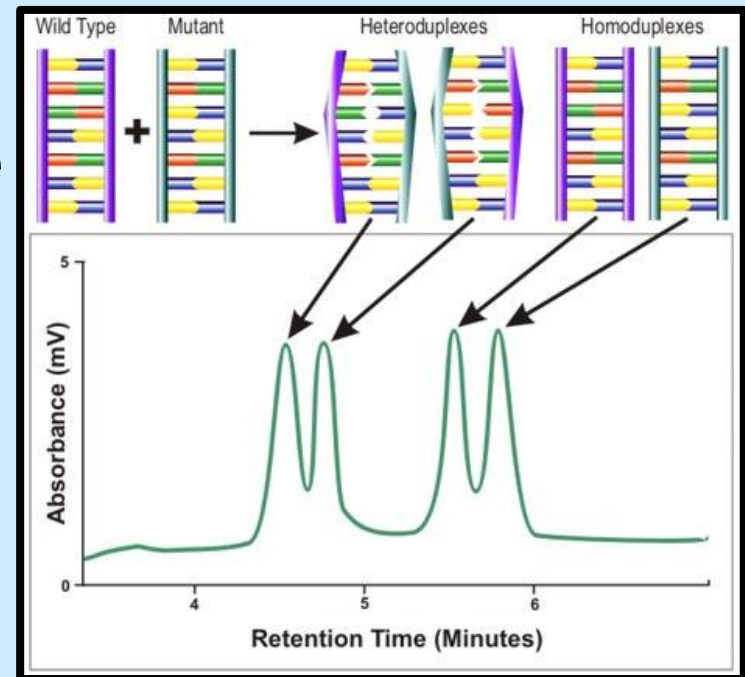
# ***HPLC chromatografie DNA***

- **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**