

IZOLACE A PURIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Proces izolace (extrakce) nukleových kyselin je získávání DNA či RNA z daného vzorku za použití kombinace chemického a fyzikálního přístupu.

Izolací nukleových kyselin se rozumí především:

- izolace genomové DNA,
- izolace totální (celkové) RNA či mRNA,
- izolace plasmidové DNA z bakterií.

Purifikace (přečištění) nukleových kyselin je odstranění veškerých nežádoucích kontaminant z daného vzorku nukleové kyseliny. Jedná se o:

- součást procesu izolace nukleové kyseliny z testovaného organismu
- přečištění stávajícího vzorku nukleové kyseliny (vzorek DNA není dostatečně čistý a je třeba jej přečistit od daných příměsí)
- přečišťování reakčních produktů (např. produktu PCR reakce)
- přečišťování DNA po separaci v elektroforetickém gelu.

Postupy při izolaci a přečišťování nukleových kyselin jsou ve výše uvedených případech v mnoha bodech identické či se značně překrývají.

IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Při izolaci nukleových kyselin obvykle postupujeme v tomto sledu:

- Rozrušení tkáně/buněk daného vzorku pomocí lyzačních roztoků
 - Separace nukleových kyselin od proteinů a dalších příměsí
 - Kontrola celistvosti a velikosti získané nukleové kyseliny elektroforetickou separací
 - Zjištění koncentrace nukleové kyseliny v získaném roztoku a čistota roztoku
-

IZOLACE GENOMOVÉ DNA

Proces izolace či extrakce DNA je získávání DNA z daného vzorku za použití kombinace chemického a fyzikálního přístupu.

Při izolaci genomové DNA postupujeme v těchto krocích:

1. Rozrušení tkáně za použití tloučků, homogenizátorů či sonikátoru

2. Rozrušení celistvosti buněk buněčnou lyzí pomocí tzv. lyzačních roztoků a natrávení proteinů pomocí přidané proteázy.

- U bakterií a rostlinných buněk je důležité nejprve rozrušit buněčnou stěnu. Toho můžeme docílit pomocí lysozymu, CTABu nebo celulázy. U živočišných buněk stačí destabilizovat buněčnou membránu slabými neiontovými detergenty (např. 0,5% SDS), které způsobí snížení osmolarity a popraskání buněk.
- V lyzačním roztoku je rovněž přítomná proteáza (nejčastěji Proteináza K), která natráví přítomné proteiny, a RNáza pro odstranění RNA.
- Přítomná je EDTA, tzv. chelatační činidlo, která vyvazuje dvojmocné kationty, které jsou jinak důležité pro aktivitu enzymů deoxyribonukleáz (DNáz). Pokud by nedošlo v roztoku k vyvážení dvojmocných iontů, došlo by vlivem působení DNáz k degradaci DNA.

3. Separace DNA od proteinů a dalších příměsí

4. Získání roztoku DNA

ZPŮSOBY JAK IZOLOVAT GENOMOVOU DNA

IZOLACE POMOCÍ FENOL-CHLOROFORMU

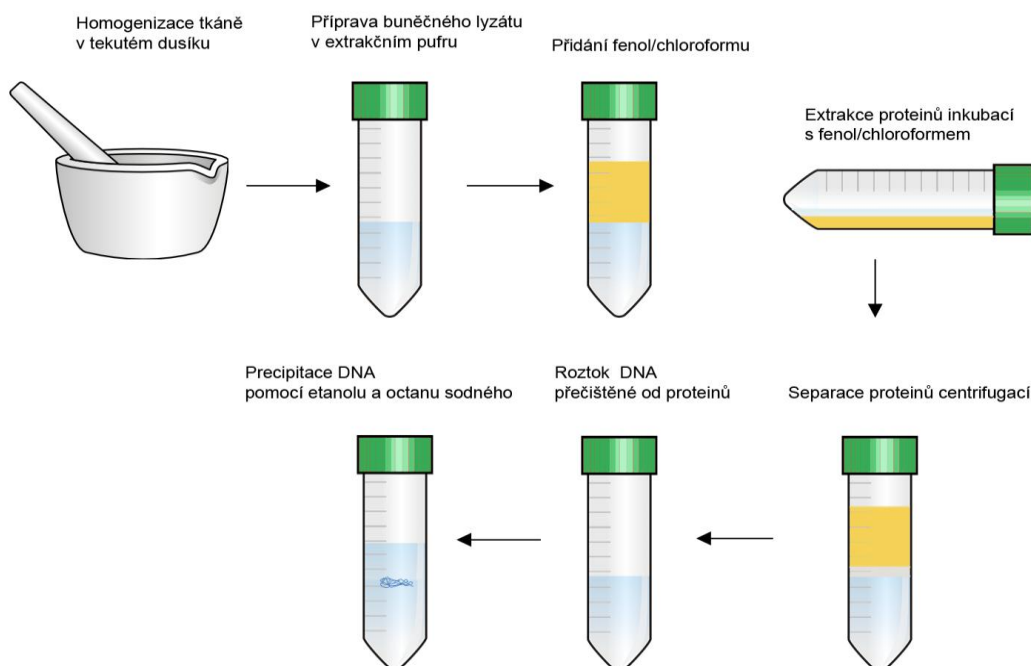
Izolace pomocí fenol-chloroformu je klasickým způsobem izolace DNA. Tato izolace je poměrně pracná a zdlouhavá, ale poskytuje velké množství velmi čisté DNA.

K lyzátu, který se nejprve získá rozrušením tkáně a buněk, a také působením proteázy, se postupně přidává fenol či směs fenolu a chloroformu, které z lyzátu vyváží proteiny. Přidáním těchto látek k vodnému roztoku dojde k separaci roztoku do dvou fází. **Horní fáze je vodný roztok obsahující DNA, spodní je pak organická fáze fenolu či chloroformu. Mezi vodnou a organickou fází se hromadí proteiny.**

Princip této metody tkví v tom, že DNA se díky své polaritě ochotně rozpouští v polárním vodném roztoku. Naproti tomu je fenol v porovnání s vodou mnohem méně polární, a proto se v něm DNA

rozpuští mnohem hůře. Co se týče ale proteinů, jejich polarita je dána jednotlivými aminokyselinami, a tudíž část řetězce je více polární a část méně polární. Část řetězce daného proteinu by se ráda rozpustila ve vodě a část ve fenolu. Z toho důvodu se proteiny hromadí na rozhraní mezi vodným roztokem a organickou fází. Opakovaným přidáváním fenol/chloroformu k roztoku DNA a odebíráním vrchní fáze, dochází k postupnému pročišťování roztoku od proteinů.

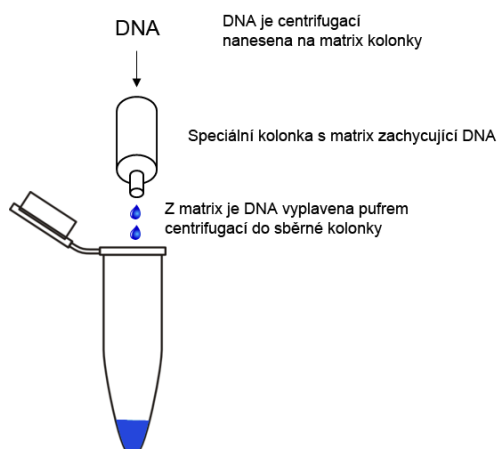
EXTRAKCE PROTEINŮ Z ROZTOKU DNA



IZOLACE DNA POMOCÍ GRAVITAČNÍCH KOLONEK

Izolace pomocí komerčně dostupných gravitačních kolonek je v současné době nejčastějším způsobem izolace genomové DNA. Jedná se o rychlou a účinnou metodu poskytující DNA o dostatečné čistotě pro většinu aplikací.

- Lyzát, který se ponejprv získá rozrušením tkání a buněk, a také působením proteázy, se nanese do speciální kolonky.
- V kolonce je přítomna matrix, na kterou se dodaná DNA naváže.
- Centrifugací kolonky se roztok (bez DNA) odplaví pryč do sběrné zkumavky.
- Matrix s navázanou DNA se promyje promývacím roztokem. Promývací roztok je odplaven z kolonky následnou centrifugací.



- Po promytí se DNA z matrix vyváže centrifugací s vodou či elučním puřrem. DNA je takto odplavena z matrix do řipravené zkumavky.

Vyuřivaná je technologie vazby na silika membránu.

U kolonkovřch kitř je řležité brát v řvahu tyto parametry:

- pro jakř druh vstupního materiálu jsou řřeny (krev, tkáň, rostliny)
- vstupní množství materiálu - na trhu jsou také kity optimalizované pro maximalizaci vřtřřků, tj. např. kity pro použití při malřch vstupních množstvřch materiálu (tzv. kity XS)
- vřtřřek se pohybuje řádovř větřinou desřtky μg DNA
- řelka protokolu (větřinou cca 30 min – 1 hodina)
- vazebná kapacita kolonky – větřinou cca 50 μg
- řistota vřtřřku (A260/A280) – udává kontaminaci proteiny (vřrobci kitř udávají větřinou 1,6 – 1,9)

IZOLACE DNA POMOCŘ CHELEXU

Speciální izolaci DNA je izolace pomocí Chelexu. Chelex poskytuje extrakci DNA z velmi malřho množství materiálu, jakřm je např. lidský vlas. řistota DNA je velmi nřzká, ale je dostatečná pro PCR. Tato metoda se vyuřívá ve foreznř genetice.

KOMERČNŘ PRODUKTY ZALOŘENŘ NA BEZKOLONKOVŘM PŘŘSTUPU

Větřinou se jedná o kompromisní řeřenř mezi fenolovou extrakci a kolonkami. Jsou to nejrřznřjší produkty dostupné od řady firem (např. DNazol od firmy MRC), které pracujř na podobné bazi jako je izolace fenolem, ale poskytujř daleko větřř jednoduchost a rychlost.