

Izolácia DNA, gélová elektroforéza a vizualizácia nukleových kyselín

DNA predstavuje menej než 1% z celkovej bunkovej hmotnosti. Až 22% pripadá na bielkoviny a 3% na lipidy. Bežné izolačné metódy sú kombináciou extrakcie a zrážania DNA alebo izolácie pomocou kolóniek.

FENOL - CHLOROFORMOVÁ IZOLÁCIA

1. Rozbitie buniek:

Lýza bunkových membrán sa dosiahne pomocou detergentov, ktoré pomáhajú rozpúšťať lipidy bunkových membrán a denaturujú bielkoviny. Najčastejšie používaným detergentom je SDS (sodium dodecyl sulfát), Triton X-100.

2. Odstránenie bielkovín:

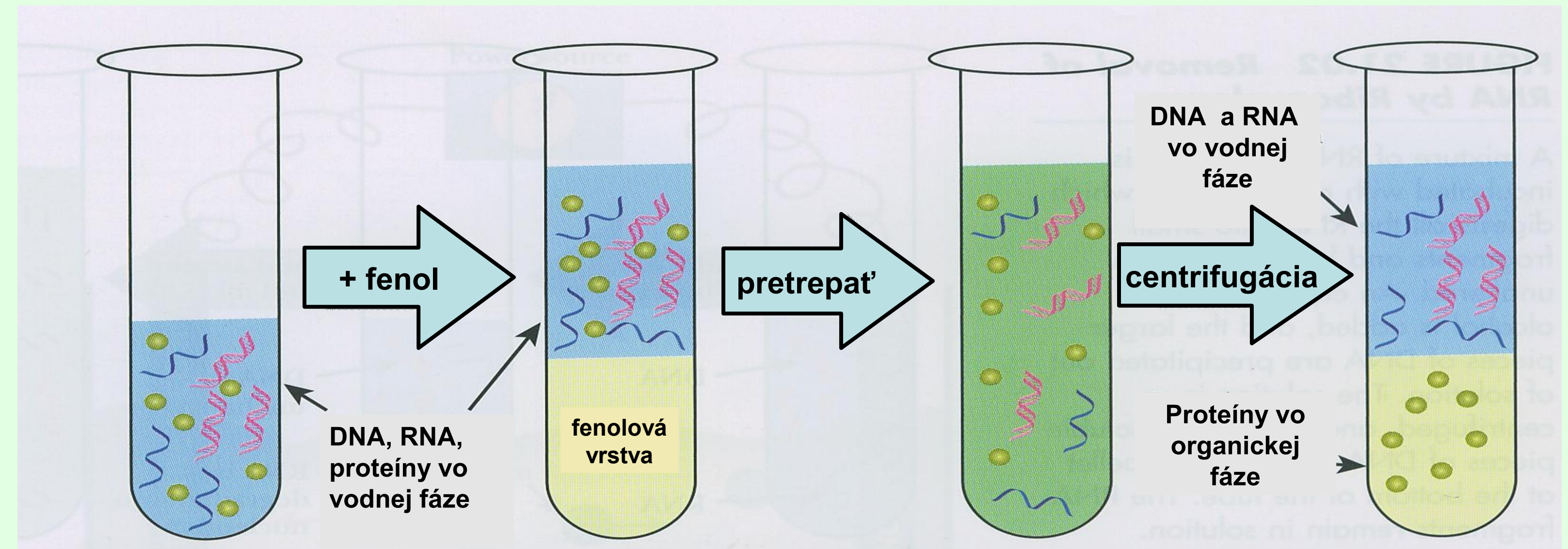
e) pomocou organických rozpúšťadiel (fenol, chloroform)
Nukleové kyseliny sú hydrofilné molekuly, ktoré sa dobre rozpúšťajú vo vodnej fáze. Bielkoviny vďaka prítomnosti hydrofóbných skupín sú lepšie rozpustné v organickej vrstve (spodná). Po intenzívnom pretrepaní sa vzorka centrifuguje a vytvorí sa dve fázy. Vrchná vodná fáza obsahuje rozpustené nukleové kyseliny. Ak sa pridá k fenolu chloroform, nukleové kyseliny sa podstatne menej dostanú do organickej vrstvy, zatiaľ čo bielkoviny sa hromadia v interfáze.

b) pomocou enzýmov

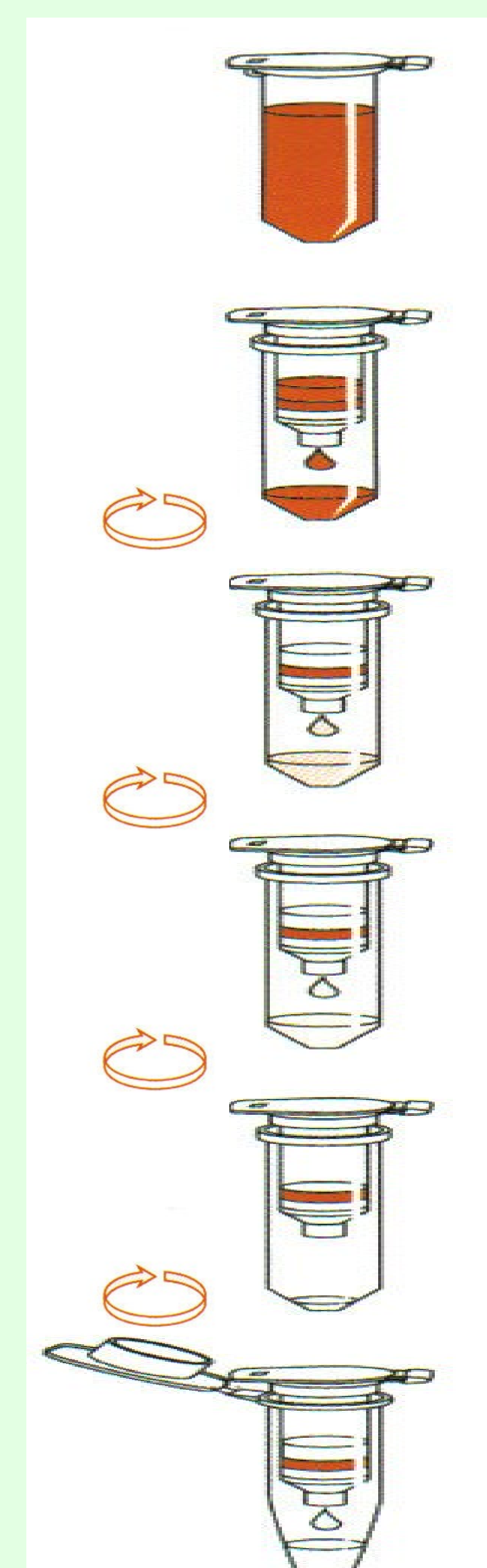
Na deproteinizáciu sa používajú proteázy – proteináza K alebo pronáza. Nevýhodou je, že sa dá odstrániť iba 80 až 90 % proteínov. Zvyšok bielkovín sa odstráni vyššie uvedenou extrakčnou procedúrou.

3. **Odstránenie RNA:** kontaminujúca RNA sa dá odstrániť pomocou enzýmu ribonukleázy, ktorá degraduje molekuly RNA na malé fragmenty.

4. **Vyzrážanie DNA:** DNA sa zráža v etanole alebo izopropanole a pridaním soli (NaCl, Na-acetát). Získaný sediment DNA sa rozpustí v sterilnej vode.



Prevzaté od: Clark (citácia č.1 z postu C1)



lýza bunkových membrán

zachytenie DNA na membránu kolónky

1. premytie DNA a odstránenie kontaminujúcich zložiek

2. premytie DNA

vysušenie kolónky s DNA

elúcia DNA do sterilnej vody

Kolónková izolácia DNA, na obrázku sú znázornené jednotlivé kroky samotnej izolácie až po uvoľnenie DNA z membrány kolónky.

IZOLÁCIA DNA POMOCOU KOLÓN

Princíp metódy je založený na zachytení DNA na kolónkach, ktoré obsahujú silikagély alebo anión iontomeničové živice. Na izoláciu stačí 0,2 ml nezrazenej krvi.

3. **Rozbitie buniek:** proteináza K narušuje bunkové steny a napomáha rozrušeniu buniek. Lyzačný roztok, obsahujúci chaotropné soli a detergent rozbiť otvorené bunky. Intenzívne premiešanie a teplota 65 °C napomáhajú lýze membrán a natráveniu bielkovín.

2. **Zachytenie DNA na membráne kolónky:** DNA sa viaže na kremičitú membránu kolónky, nežiadúci bunkový materiál, denaturované proteíny a RNA sa odstránia pretečením kolónkou.

3. **Premývanie a odstránenie kontaminujúcich zložiek:** Tlmivý roztok s etanolom odstráni nežiaduce bunkové zvyšky, soľné prímеси a zároveň vyčistí naviazanú DNA na kolónke.

4. **Elúcia DNA z kolónky:** podľa typu živice dosiahne sa alkalickým tlmivým roztokom alebo roztokom s vysokou koncentráciou soli. Výťažok býva cca 10 µg DNA/0,2 ml krvi.

ELEKTROFORETICKÉ METÓDY (ELFO)

Princíp elektroforézy: Molekuly nukleových kyselín (DNA aj RNA) sa v elektrickom poli delia na základe ich náboja. Všeobecne sa pri ELFO využíva schopnosť nabitých častíc pohybovať sa v elektrickom poli ku opačne nabitým elektródam. Katióny sa pohybujú ku záporne nabitým elektróde katóde(-) a anióny ku kladne nabitým elektróde anóde (+). Za fyziologických podmienok sú fosfátové skupiny nukleových kyselín ionizované, molekuly sa správajú ako polyanióny a v elektrickom poli sa pohybujú ku (+) anóde. Nosiče – gély ako sú agaróza a polyakrylamid výrazne zvyšujú viskozitu ELFO prostredia, úmerne ich koncentrácií a stupňu zosieťovania. Gély vytvárajú zosieťované štruktúry s malými pórami a voľnými poliami, ktoré sú vyplnené tlmivým roztokom. Agaróza je polysacharid, ktorej základná jednotka je agarobióza.

Pohyblivosť molekúl DNA v géli bude prakticky závisieť od veľkosti molekúl a ich konformácie, koncentrácií agarózy, napätia a charakteru tlmivého roztoku.

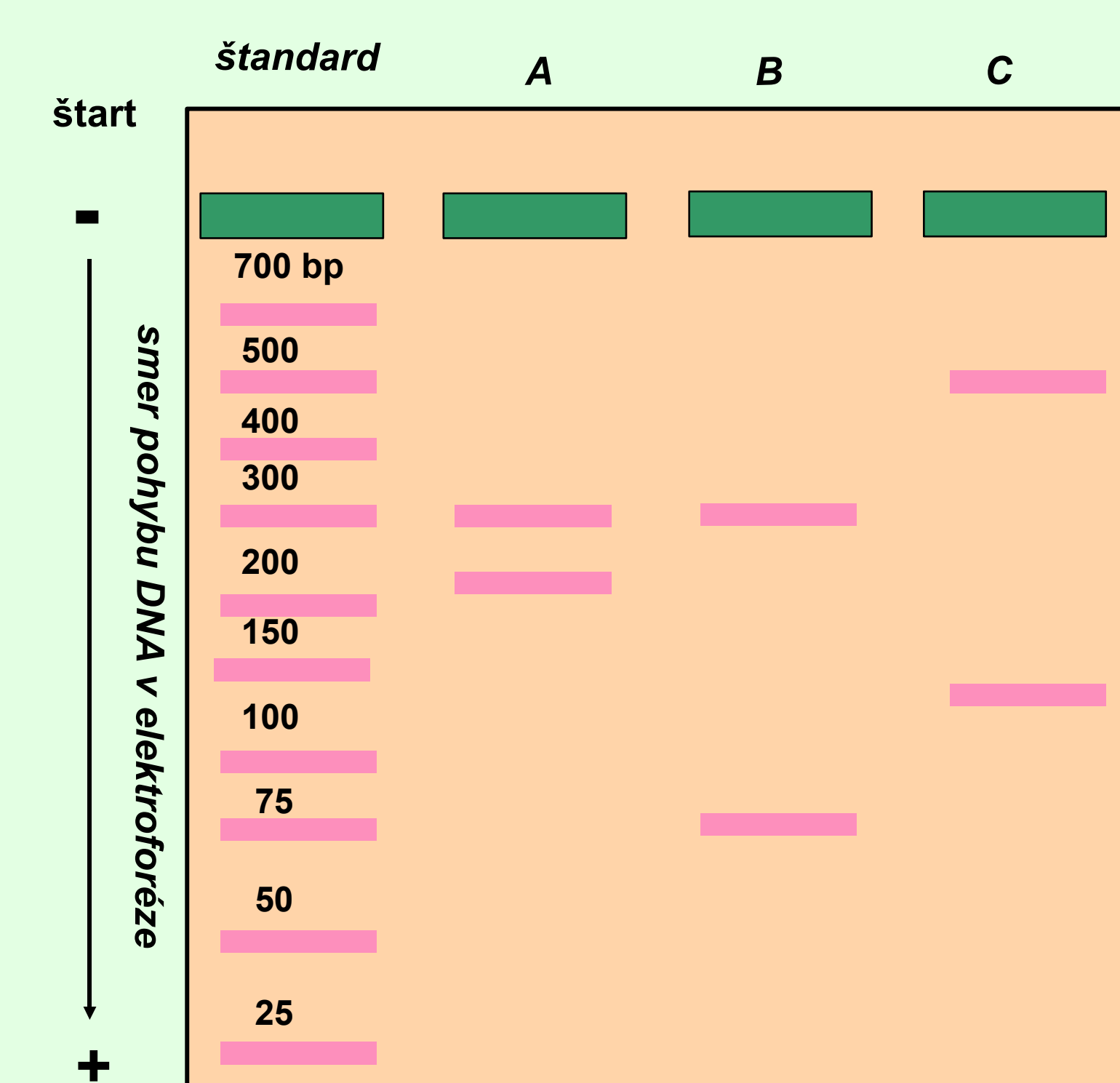
Hustota gélu: Agarózové gély sa bežne používajú vo výslednej koncentrácii agarózy 0,5 až 3,0 %. Možno na nich dosiahnuť efektívne rozdelenie fragmentov obsahujúcich desiatky až 10 000 bp. V prípade, že je potrebné dosiahnuť rozdelenie malých fragmentov DNA a odlišiť rozdiel vo veľkosti 1 bp použijú sa gély až s 20% koncentráciou polyakrylamidu.

Tlmivé roztoky: používajú sa mierne alkalické tlmivé roztoky (pH – 8,0) z dôvodu zlepšenia ionizácie fosfátových skupín. Bežne používaný je Tris-acetátový (TAE), Tris-borátový (TBE) a Tris-fosfátový (TPE) tlmivý roztok.

Vizualizácia DNA v géli: Používajú sa tzv. interkalačné farbivá, ktoré sa viažu s prítomnými bázami. Najčastejšie používané farbivá sú etídiumbromid a SYBR Green. Vizualizácia fragmentov sa dosiahne pri použití etídiumbromidu pri UV svetle 300 až 360 nm. Veľkosť fragmentov sa vyhodnocuje pomocou štandardy - zmes fragmentov DNA o známej dĺžke

DENATURAČNÁ GRADIENTOVÁ GÉLOVÁ ELEKTROFORÉZA (DGGE)

Denaturačná gradientová elektroforéza umožňuje rozlíšiť rozdiel sekvencie iba jednej bázy u kratších fragmentov DNA. Počas elektroforézy sa vzorka DNA pohybuje v géli, ktorý obsahuje vzrastajúcu koncentráciu denaturačného činidla (urea, formamid). Metóda má nenahraditeľný význam pri odhaľovaní bodových mutácií a polymorfizmov (single nukleotid substitution, polymorphism - SNS a SNP) teda tam, kde sa nemení dĺžka DNA. Uvedená metóda môže byť nahradená metódou pri ktorej sa vzorky najskôr denaturujú a potom sa delia jednovláknové úseky denaturovanej DNA. Elektroforéza prebieha v polyakrylamidovom géli. Pri zámene nukleotidu sa zmení pohyblivosť vlákna v dôsledku rozdielnych konformačných zmien, čo možno danou metódou odhaliť.



Schematické znázornenie elektroforézy v agarózovom gély. Smer pohybu DNA v elektroforéze ukazuje šípka na obrázku. V prvej dráhe je veľkostný štandard, v ďalších dráhach sú vzorky DNA s rôzne dlhými fragmentami, ktoré sú rozdelené podľa ich molekulovej hmotnosti.

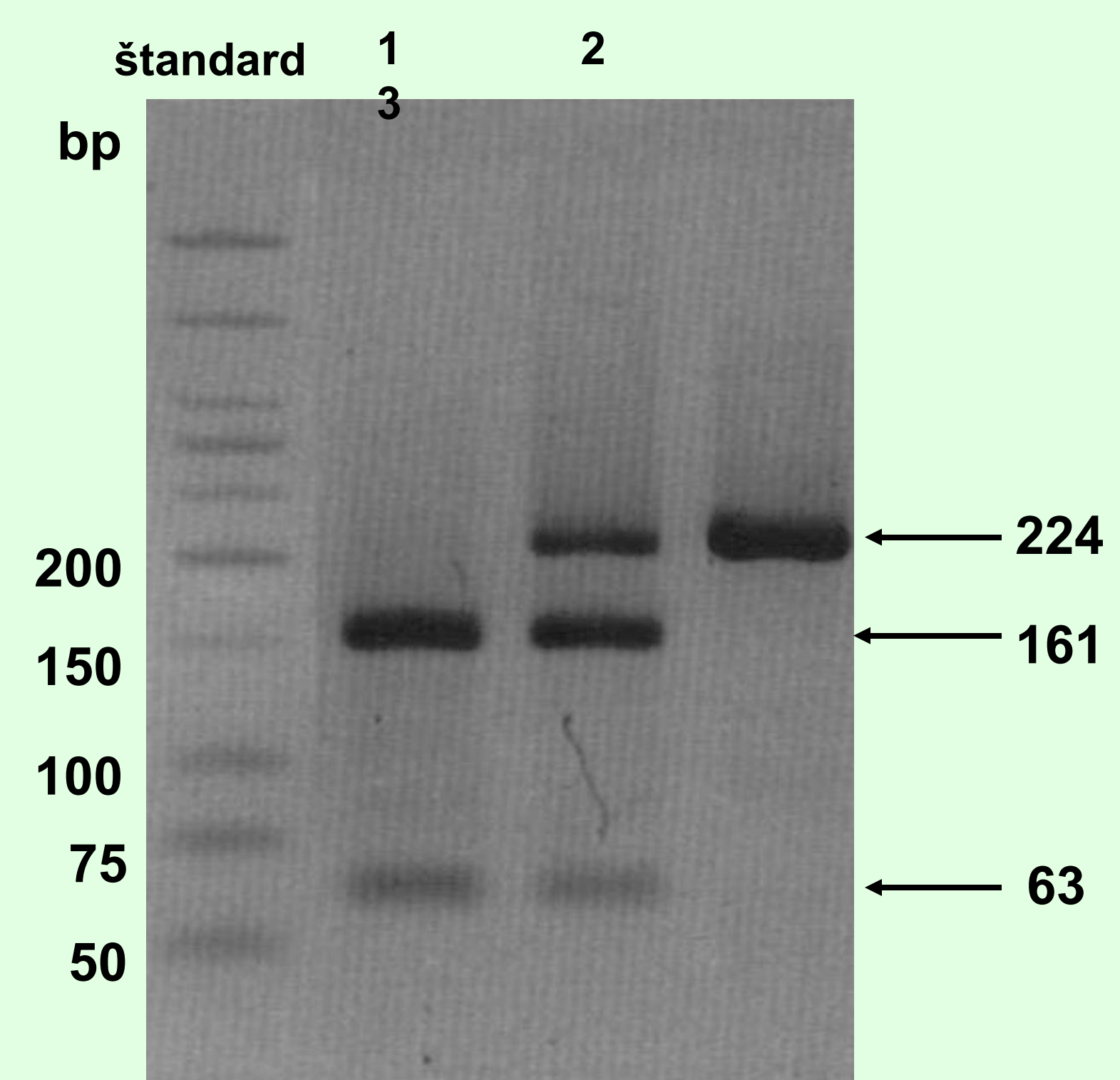


Foto agarózového gélu, DNA je vizualizovaná etídiombromidom pod UV lampou pri 360 nm. V dráhe 1. veľkostný štandard, v ďalších dráhach sú vzorky DNA (fragmenty) rozdelené podľa ich molekulovej hmotnosti.