

VYUŽITÍ PARAMAGNETICKÝCH ČÁSTIC PRO IZOLACI mRNA

Dalibor HÚSKA^{1,2}, Jiří BALOUN^{1,2}, Libuše TRNKOVÁ⁴, Vojtěch ADAM^{1,3}, René KIZEK¹

¹Ústav chemie a biochemie, ²Ústav biologie rostlin a ³Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,

⁴Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Studium biomolekul, jako jsou především nukleové kyseliny a proteiny, je závislé na jejich kvantitativní a kvalitativní izolaci z nativního biologického materiálu. Věda nalézá nové materiály, technologie a postupy, jak izolaci těchto látek a sloučenin co nejvíce zefektivnit jak na úrovni rychlosti tak i kvantity a kvality izolace.

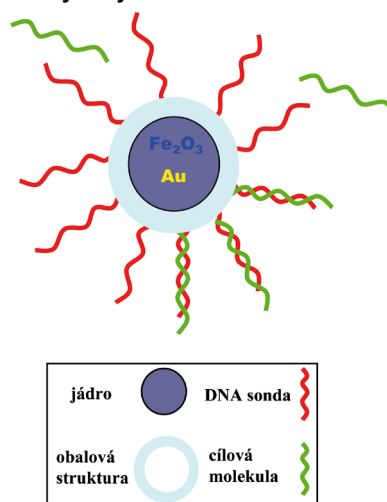
Jedny z technologií, které se více rozšířily mezi širší odbornou veřejnost, jsou metody založené na (para)magnetických částicích (MPs). MPs jsou částice o velikosti 5 nm–100 μm tvořené z kového jádra tím bývá nejčastěji gamma-Fe₂O₃ (maghemit) nebo Fe₃O₄ (magnetit), ale i například Au. Jádro obaluje vrstva, která má připravený specifický povrch. Ten lze upravit podle toho, jaké molekuly chceme z daného materiálu izolovat (Obr. 1). Samotná velikost MPs se dá přizpůsobit podle toho, co izolujeme: 5–50 nm proteiny; 20–450 nm nukleové kyseliny, viry; 10–100 μm buňky. Princip izolace je založen na fyzikálně-chemických vlastnostech MPs. Ty reagují na vnější magnetické pole a jsou schopny navázat různé bioreaktivní molekuly, díky jejich afinitě k modifikovanému povrchu přímo z biologického materiálu. Samotná izolace pak probíhá následovně. MPs se přidají ke vzorku, kde na sebe naváží cílené molekuly. Modifikované MPs se následně přitáhnou magnetem ke stěně zkumavky a zbylý roztok s nenavázanými, jinak běžně interferujícími látkami, se odstraní. Následuje promývání a konečné uvolnění MPs i s navázanými molekulami do námi přidaného roztoku. Různým fyzikálně-chemickým krokem (denaturace) se oddělí navázané molekuly od MPs. Tím získáme cílené molekuly a můžeme s nimi dál pracovat (Obr. 2).

Mezi další výhody MPs patří to, že se vzorek nemusí složitě upravovat (odstředováním, dialýzou apod.), jak je tomu u konvenčních purifikačních metod. Vynecháním těchto kroků se podstatně zkracuje čas získání cílených biomolekul a navíc se zmenší riziko jejich případného fyzikálního nebo biologického poškození.

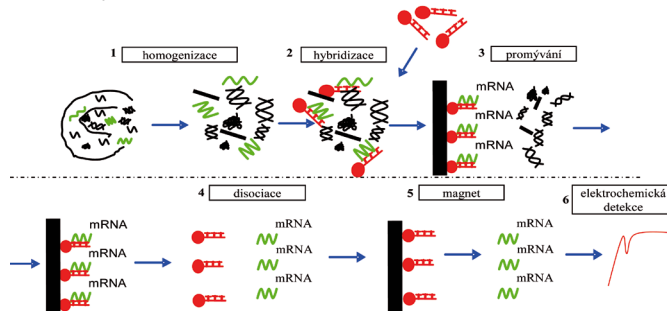
Magnetizovatelné částice v analýze nukleových kyselin

MPs jsou velmi vhodné pro rychlou a selektivní izolaci mRNA. mRNA je jednořetězcová nukleová kyselina, která vzniká přepsáním z DNA a nese informaci, na jejímž základě se produkují proteiny u všech živých organismů. Podle konkrétní mRNA, vyskytující se v daném okamžiku, lze specificky zjistit aktivitu genů (genová exprese). K izolaci mRNA používáme komerční MPs oligo(dT)₂₅, které mají na svém povrchu ukotveny nukleotidové

Obr. 1 – Schematicky znázorněné (para)magnetické částice určené pro izolaci nukleových kyselin



Obr. 2 – Postup izolace mRNA pomocí paramagnetických částic oligo dT₂₅



1) Homogenizace vzorku. 2) Přidání MPs k homogenizátu a následná hybridizace (navázání mRNA na MPs). 3) Odstranění interferujících nenavázaných látek promýváním. 4) Uvolnění navázané mRNA do sterilního pufru denaturací. 5) odebrání uvolněné mRNA. 6) Kvantifikace mRNA pomocí elektrochemie.

řetězce složené z 25 thyminů. Každá mRNA má na jednom svém konci řetězec složený z opakující se sekvence adeninů. Na základě principu komplementarity bází nukleových kyselin pak za určitých podmínek dochází k vazbě řetězce z adeninů s řetězcem složeného z thyminů (hybridizace), jenž je ukotven na MPs. Jakmile získáme cílené molekuly pomocí MPs, je dalším velmi důležitým krokem jejich kvantifikace. Pro kvantifikaci mRNA jsme zvolili elektrochemickou metodu square wave voltametrii ve spojení s adsorptivní přenosovou technikou. Zde probíhá akumulace vzorku na visící rtuťovou kapkovou elektrodu (HMDE). Pro vlastní měření se odebralo 5 μl připraveného vzorku, toto množství se dalo na parafilm, pak se vzorek adsorboval na HMDE. Následně byla HMDE omyta v acetátovém pufru a ponořena do elektrolytu, kde proběhlo měření.

Paramagnetické částice umožňují rychlou a nenáročnou izolaci biomolekul ze vzorku. To je velmi důležité pro další molekulárně-biologické studium, kam patří především sledování exprese genů a hledání určité sekvence nukleové kyseliny případně bodové mutace. MPs jsou blížkou budoucností v snadné a precizní izolaci biomolekul.

Práce je podporována projektem Nanotechnologie pro společnost GA AV KAN208130801

Literatura

- [1] Safarik I., Safarikova M.: *Mon. Chem.*, 133, 737 (2002).
- [2] Safarik I., Safarikova M.: *J. Chromatogr. B*, 722, 33 (1999).
- [3] Hsing I.-M., Xu Y., Zhaob W.: *Electroanalysis*, 19, 755 (2007).
- [4] Bangs L. B.: *Pure Appl. Chem.*, 68, 1873 (1996).
- [5] Fojta M., Havran L., Billova S., Kostecka P., Masarik M., Kizek R.: *Electroanalysis*, 15, 431 (2003).
- [6] Ngomsik A. F., Bee A., Draye M., Cote G., Cabuil V.: *C. R. Chim.*, 8, 963 (2005).
- [7] Palecek E., Billova S., Havran L., Kizek R., Miculkova A., Jelen E.: *Talanta*, 56, 919 (2002).
- [8] Wang J., Xu D. K., Kawde A. N., Polsky R.: *Anal. Chem.*, 73, 5576 (2001).
- [9] Huska D., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Prusa R., Havel L., Kizek R.: *Tumor Biol.*, 28, 124 (2007).
- [10] Adam V., Hubalek J., Kizek R.: *CHEMagazín*, 17, 25 (2007).

Abstract:

UTILIZING OF PARAMAGNETIC PARTICLES FOR ISOLATION OF mRNA

Summary: *A studying of bio-molecules such as nucleic acids or proteins depends on qualitative and quantitative isolation of target molecules from native biological material. Scientists discover new materials, technologies and approaches to make the isolation of such molecules more effective, rapid and accurate.*

Key words: mRNA, paramagnetic beads, isolation, electrochemistry