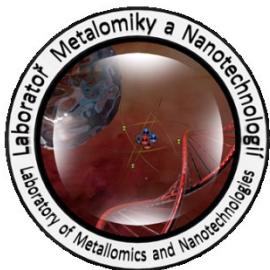


## Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



### Izolace nukleových kyselin pomocí různých magnetických částic

#### Anotace

Magnetické částice jsou částice s velikostí od nm do mm, reagující na vnější magnetické pole. Nejčastěji jsou tvořeny z oxidu železnatého či železitého, podle toho jsou buď paramagnetické, nebo ferromagnetické. Povrch takovýchto častic lez modifikovat biologickými látkami a tím usnadnit vazbu bioaktivních molekul. Modifikace povrchu částice může být dvojího charakteru, modifikace vznikem elektrické obalové vrstvy nebo modifikace biomolekulou (specifická vazba k cílové molekule).



**Obr. 1: Možnosti modifikace povrchu magnetické částice**

Jednou z největších výhod je široké spektrum využití modifikovaných magnetických částic pro separaci nejrůznějších látek anorganické (ionty těžkých kovů) až po organickou povahu (biomolekuly, proteiny). V tomto experimentu budou využity magnetické částice DynaBeads oligo (dT)25 od firmy Invitrogen. Tyto částice mají na svém povrchu imobilizovaný oligonukleotidový řetězec obsahující zbytky thyminových bazí. Z toho důvodu se hodí pro izolaci nukleových kyselin či oligonukleotidů, které obsahují ve své struktuře zbytky adeninových bazí (snazší hybridizace).



### Použité chemikálie

- voda, ACS
- promývací roztok (0.2 M NaCl + 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- hybridizační roztok (imobilizační, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl,
- 0.6 M guanidinium thiocyanate, 0.15 M Trizma base adjusted by HCl
- on pH of 7.5.)
- vzorek (nukleová kyselina, případně oligonukleotid)
- eluční roztok ( voda ACS čistoty)
- magnetické částice DynaBeads Oligo (dT)25, Invitrogen, USA

### Pracovní postup

#### Izolace nukleových kyselin pomocí modifikovaných magnetických částic

##### Promývací krok 1

- 1) do jamky mikrotitrační destičky napipetujeme 10 µl rozsuspenzovaných magnetických částic
- 2) destičku přiložíme na magnet a počkáme, až se všechny částice z roztoku přitáhnou ke stěně destičky (roztok v jamce bude čirý, nezabarvený)
- 3) pipetou opatrně odstraníme uchovávací roztok tak, aby v jamce nebyla žádná přebytečná tekutina
- 4) do téže jamky napipetujeme 10 µl promývacího roztoku, destičku sejmeme z magnetu a pipetou rozsuspenzujeme usazené částice v promývacím roztoku
- 5) po řádném promíchání položíme mikrotitrační destičku zpět na magnet
- 6) po přitáhnutí častic na stěnu jamky odsajeme přebytečnou tekutinu z jamky
- 7) promývání provedeme celkem 3x

##### Hybridizační krok

- 1) Po odpipetování promývacího roztoku přidáme k magnetickým částicím vzorek a hybridizační (imobilizační) roztok v celkovém objemu 30 µl a částice opatrně rozsuspenzujeme
- 2) Mikrotitrační destičku umístíme na třepačku, aby vzorky byly promíchávány po celou dobu inkubace
- 3) Vzorek necháme hybridizovat po dobu 40 minut při laboratorní teplotě

##### Promývací krok 2

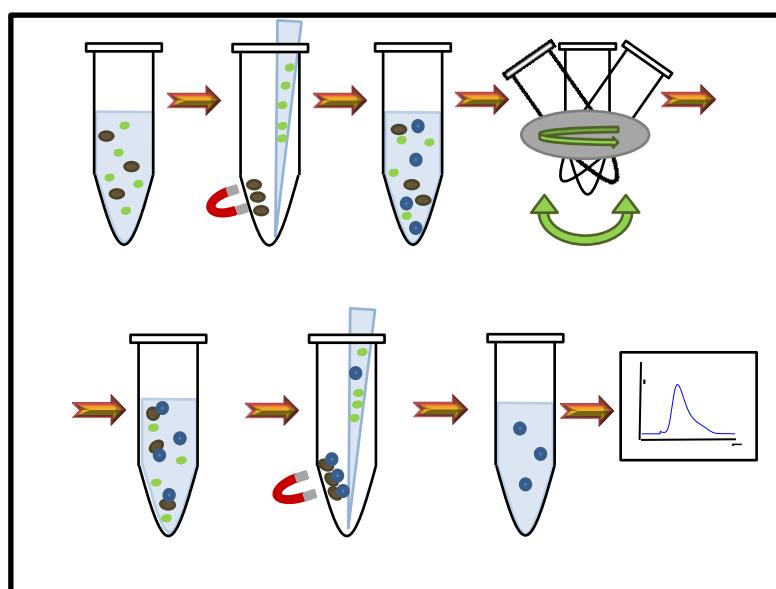
- 1) Po ukončení hybridizace přemístíme mikrotitrační destičku z třepačky na magnet, po přitáhnutí častic ke stěně jamky odsajeme nenavázanou část vzorku (retentát)



- 2) Po odsátí retentátu přidáme k částicím promývací roztok a částice opatrně rozsuspenzujeme.
- 3) Destičku opět přiložíme na magnet a odpipetujeme promývací roztok pryč.
- 4) Postup promytí provedeme 3x.

### Eluční krok

- 1) Po odstranění zbytku promývacího roztoku přidáme k částicím 10 µl elučního roztoku (voda ACS čistoty, fosfátový pufr).
- 2) Částice rozsuspenzujeme a vzorek zahříváme na 85 °C po dobu 5 minut za stálého třepání
- 3) Po uplynutí eluční doby položíme mikrotitrační destičku na magnet a počkáme, až se částice zbavené navázaného vzorku přitáhnou ke stěně jamky
- 4) Opatrně odpipetujeme vzniklý eluat s obsahem vyizolované nukleové kyseliny či oligonukleotidu
- 5) Vyizolovaná nukleová kyselina je tímto připravena k dalšímu použití



Obr. 2: Schéma izolace NK pomocí magnetických kuliček

### Doporučená literatura

1. Huska, D., et al., *Automated nucleic acids isolation using paramagnetic microparticles coupled with electrochemical detection*. *Talanta*, 2009. 79(2): p. 402-411.