Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií

Izolace nukleových kyselin pomocí automatické pipetovací stanice EP motion

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 částic 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).
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). Magnetické částice mohou hrát klíčovou roli i v průběhu jiných procesů, např. při hledání vhodného aptameru pro cílovou molekulu. V tomto případě je možné částice využít na separaci analytu ve vzorku a usnadnění procesu SELEX, při kterém se vyhledává vysoce selektivní a specifická oligonukleotidová sekvence pro určitou cílovou molekulu.

Použité chemikálie

- voda, ACS
- promývací roztok
- hybridizační roztok (imobilizační)
- vzorek (nukleová kyselina, případně oligonukleotid)
- eluční roztok (většinou voda ACS čistoty nebo fosfátový pufr)
- magnetické částice se specifickou modifikací povrchu vhodnou pro izolaci vybrané DNA nebo RNA molekuly

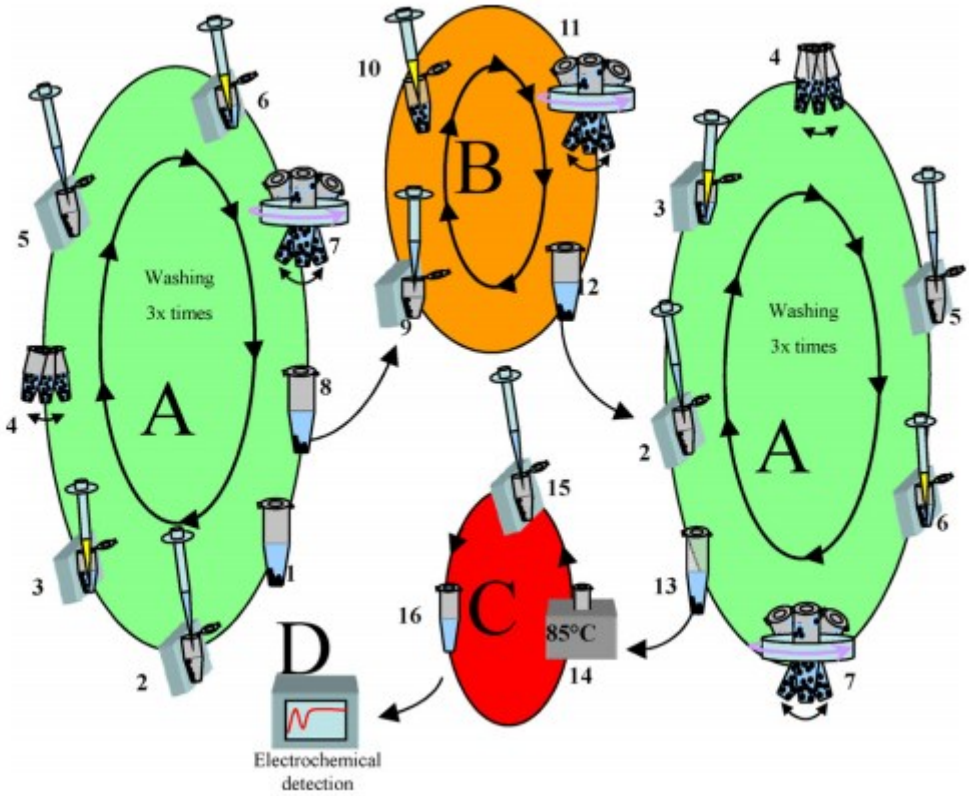
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pracovní postup

Izolace nukleových kyselin magnetickými částicemi pomocí automatické pipetovací stanice EP-motion:

Paramagnetické částice s udržovacím roztokem (10 µl) jsou pipetovány do jamky mikrotitrační destičky (A1). Mikrotitrační destička je pomocí pohyblivého ramena přemístěna na magnetický držák, který zajišťuje separace paramagnetických částic od udržovacího roztoku (A2). Tento roztok je odpipetován pryč a k částicím je přidáno 20 µl promývacího roztoku (A3). Mikrotitrační destička je odebrána z magnetické podložky a vzorky jsou krátce protřepány pro ideální disperzi magnetických částic v promývacím roztoku (A4). Promývací krok je několikrát opakován (A5-A7). Po promytí jsou paramagnetické částice připraveny k samotné izolaci nukleových kyselin (proces hybridizace). Po odstranění promývacího roztoku (A8-B9) je k paramagnetickým částicím přidán hybridizační roztok. Celkový objem hybridizační směsi se vzorkem je 30 µl (B10). Hybridizace probíhá 40 minut, do procesu je zařazeno i promýchávání a centrifugace (B11). Po hybridizace jsou třikrát zopakovány promývací kroky (A2-A7). K promytým paramagnetickým částicím s navázanými nukleovými kyselinami ze vzorku je přidán eluční roztok (30 µl), (A13). Potom je mikrotitrační destička přemístěna na Thermomixer 5355. Denaturace probíhá po dobu 5 minut a vzorky jsou zahřáty na 85 °C (C14). Po tepelném působení jsou nukleové kyseliny uvolněny z paramagnetických částic do elučního roztoku. Paramagnetické částice jsou pomocí magnetické destičky přitaženy ke stěnám jamek mikrotitrační destičky a eluční roztok obsahující nukleovou kyselinu je odpipetován do vedlejších jamek (C15-C16). Koncentrace nukleové kyseliny obsažené v tomto roztoku je stanovena elektrochemicky metodou square wave voltametrie.

Obr. 1.: Automatická pipetovací stanice EP-motion (Eppendorf, Německo)



Obr. 2: Schéma izolace nukleových kyselin paramagnetickými částicemi pomocí automatické pipetovací stanice EP motion.

Doporučená literatura

1. Huska, D., et al., *Microfluidic robotic device coupled with electrochemical sensor field for handling of paramagnetic micro-particles as a tool for determination of plant mRNA*. Microchim. Acta, 2011. **173**(1-2): p. 189-197.