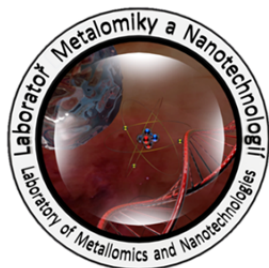


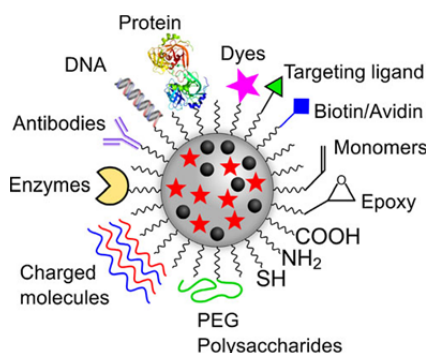
Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



## 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 částic lze 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). 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

### **Pracovní postup**

#### **Izolace nukleových kyselin pomocí modifikovaných magnetických částic**

##### Promývací krok 1

- 1) do jamky mikrotitrační destičky napipetujeme 10  $\mu$ l rozsuspendovaných 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  $\mu$ l promývacího roztoku, destičku sejmeme z magnetu a pipetou rozsuspendujeme usazené částice v promývacím roztoku
- 5) po řádném promíchání položíme mikrotitrační destičku zpět na magnet
- 6) po přitáhnutí částic 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  $\mu$ l a částice opatrně rozsuspendujeme
- 2) Mikrotitrační destičku umístíme na třepačku, aby vzorky byly promíchávány po celou dobu inkubace
- 3) Vzorek necháme hybridizovat po určenou dobu (podle typu vzorku a modifikace povrchu částice) při laboratorní teplotě

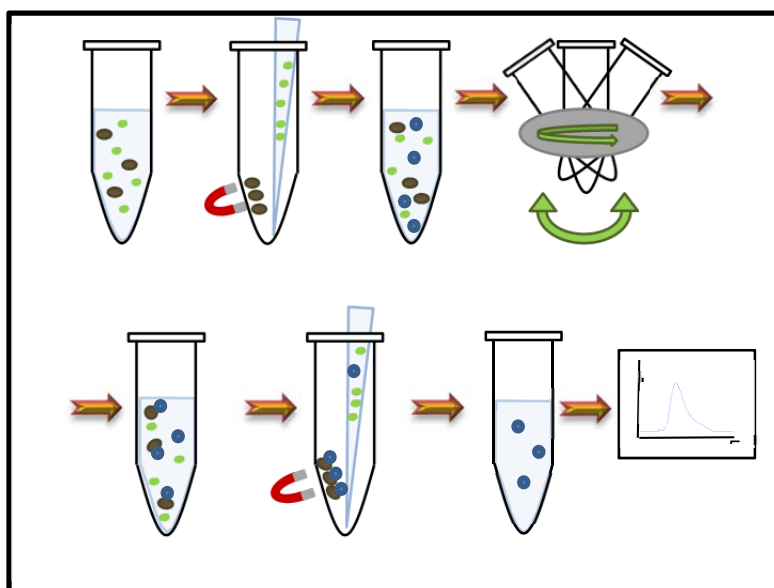
##### Promývací krok 2

- 1) Po ukončení hybridizace přemístíme mikrotitrační destičku z třepačky na magnet, po přitáhnutí částic 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  $\mu$ l elučního roztoku (voda ACS čistoty, fosfátový pufr).
- 2) Částice rozsuspenzujeme a vzorek zahříváme na 85  $^{\circ}$ 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 eluát s obsahem vyizolované nukleové kyseliny či oligonukleotidu
- 5) Vyizolovaná nukleová kyselina je tímto připravena k dalšímu použití



Obr. 2: Obecné schéma izolace NK pomocí magnetických kuliček

#### 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.