



Agronomická  
fakulta

Mendelova  
univerzita  
v Brně



**Možnosti izolace nukleových kyselin  
v rostlinných a živočišných matricích**

Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*  
MVDr. Ing. Václav Trojan, Ph.D.

*Vypracovala:*  
Truong Thanh Huong



# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Thanh Huong Truong**  
Studijní program: **Agrobiologie**  
Obor: **Biotechnologie rostlin**  
Konzultant: **Mgr. Helena Steigerová**  
Název tématu: **Možnosti izolace nukleových kyselin v rostlinných a živočišných matricích**  
Rozsah práce: **30 stran + grafické přílohy podle potřeby**

## Zásady pro vypracování:

1. Studium literárních pramenů věnovaných metodám izolace nukleových kyselin u rostlinných a živočišných materiálů.
2. Vypracování rešerše věnované problematice izolace nukleových kyselin u rostlinných a živočišných materiálů.
3. Vlastní izolace nukleových kyselin u rostlinných a živočišných vzorků.
4. Vyhodnocení výsledků a jejich interpretace ve vztahu k literárním pramenům.



Seznam odborné literatury:

1. SVOBODOVÁ, K. – BÍLEK, K. – KNOLL, A. Výběr nejvhodnějšího způsobu izolace nukleových kyselin na Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat. In ŠKARPA, P. – RYANT, P. – CERKAL, R. *MendelNet'07 Agro*. 1. vyd. Brno: MZLU Brno, 2007, s. 1–6. ISBN 978-80-7375-119-7.
2. TROJAN, V. – MUSILOVÁ, M. – VYHNÁNEK, T. – HAVEL, L. Detekce genů pro chalkon syntázu u pšenice (*Triticum aestivum* L.). In ŠUDYOVÁ, V. *Nové poznatky z genetiky a šlechtění poľnohospodárskych rastlín*. 1. vyd. Piešťany, Slovensko: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, 2011, s. 186–187. ISBN 978-80-89417-29-2.
3. MUSILOVÁ, M. – TROJAN, V. – VYHNÁNEK, T. – HAVEL, L. Izolace RNA z genetických zdrojů pšenice s nestandardním zabarvením obilok. In *MendelNet 2010 Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010, s. 826–830. ISBN 978-80-7375-453-2.
4. VYHNÁNEK, T. – BAČOVSKÝ, V. – VLAŠINOVÁ, H. – HAVEL, L. – ŠEDIVÁ, J. – MERTELÍK, J. Studium genetické variability u zástupců rodu *Aesculus* L. pomocí SSR markerů. *Zprávy lesnického výzkumu*. 2013. ISSN 0322-9688.
5. TROJAN, V. – HANÁČEK, P. – KIZEK, R. – HAVEL, L. PCR při detekci kontaminantů v kořeninové paprice. In GOLIAN, J. – BELEJ, L. – ČAPLA, J. *Bezpečnost a kontrola potravin*. 1. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2009, s. 219–222. ISBN 978-80-552-0193-1.

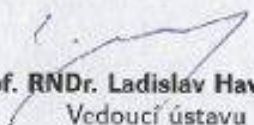
Datum zadání bakalářské práce: říjen 2013

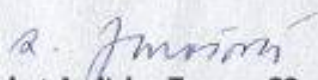
Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2015

  
Thanh Huong Truong  
Autorka práce



  
MVDr. Ing. Václav Trojan  
Vedoucí práce

  
prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.  
Vedoucí ústavu

  
prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc.  
Děkan AF MENDELU

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Možnosti izolace nukleových kyselin v rostlinných a živočišných matricích vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne: 27. 4. 15

.....  
podpis

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala MVDr. Ing. Václavu Trojanovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, dále Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za pomoc během experimentální části práce. V poslední řadě bych ráda poděkovala své rodině, příteli a mým nejlepším kamarádkám za energii a podporu, kterou mi dávali během studia.

## **Abstrakt**

Izolace nukleových kyselin je prvním krokem ve většině molekulárních diagnostik. Hlavní část bakalářská práce je věnována vypracování literární rešerše zabývající se různými možnostmi izolace nukleových kyselin. Vypracovaná práce je průřezem nejpoužívanějších metod od nejstarších až po ty nejnovější, což se týká metod srážení pomocí solí a organickými činidly, chromatografie, fenol – chloroformové extrakce a pomocí magnetických částic. V jedné ze tří kapitol literárního přehledu je popsána podstata nukleových kyselin. V malé kapitole literární části jsou uvedeny možné inhibitory separace nukleových kyselin. Minoritní část bakalářské práce je věnována experimentální části, v níž je porovnávána kvalita získané DNA z různých matic konopí setého u navážek 20 mg a 100 mg. Po vyhodnocení výsledků bylo zjištěno, že pro vyšší kvalitu izolátu je vhodné použití navážky 20 mg.

Klíčová slova: DNA, RNA, izolace nukleových kyselin, konopí seté

## **Abstract**

Isolation of nucleic acids is first step in most of molecule diagnosis. Literal abstract deals with various opportunities of nucleic acid isolation is the main part of this bachelor thesis. This work is about the most used methods from the oldest ones to the ones that are used nowadays. It covers methods such as salting in and salting out, chromatography, phenol – chloroform extraction and isolation with magnetic particles. In the one of three chapters of literal abstract the basis of nucleic acids is described. Inhibitors for separation of nucleic acids are presented in another chapter of literal abstract. Minor part of the bachelor thesis deals with experimental process. The quality of the DNA acquired from various *Cannabis sativa* matrices are compared at two different weights of 20 mg and 100 mg. Evaluation of the results shows that use of 20mg gives us better quality.

Key words: DNA, RNA, nucleic acid isolation, *Cannabis sativa*

## **1 CÍL PRÁCE**

Bakalářská práce byla zaměřena především na studium literárních pramenů týkající se izolace z rostlinných a živočišných matric, konkrétně zaměřené na metody izolace nukleových kyselin. Dále bylo mým cílem studium problematiky izolace rostlinných a živočišných materiálů, její výhody či nevýhody a v poslední řadě provést vlastní izolaci DNA.

## OBSAH

<b>1 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>7</b>
<b>2 ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
3.1 NUKLEOVÉ KYSELINY .....	11
3.1.1 <i>Struktura nukleových kyselin</i> .....	11
3.1.1.1 Primární struktura.....	11
3.1.1.2 Sekundární struktura .....	12
3.1.1.3 Terciární struktura.....	13
3.1.2 <i>Typy nukleových kyselin</i> .....	13
3.1.2.1 DNA .....	13
3.1.2.2 RNA .....	15
3.2 PŘEKÁŽKY BĚHEM IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN.....	17
3.2.1 <i>U rostlinných pletiv</i> .....	17
3.2.2 <i>U živočišných materiálů</i> .....	17
3.3 METODY IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN .....	18
3.3.1 <i>Srážení</i> .....	18
3.3.1.1 Srážení pomocí roztoků solí .....	18
3.3.1.2 Srážení organickými činidly .....	20
3.3.2 <i>Chromatografie</i> .....	21
3.3.2.1 Iontově výměnná chromatografie (IEC).....	21
3.3.2.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC).....	25
3.3.3 <i>Silika kolonky</i> .....	25
3.3.3.1 Silikagel.....	26
3.3.3.2 Princip.....	27
3.3.4 <i>Fenol – chloroformová extrakce</i> .....	28
3.3.4.1 Složky extrakce .....	29
3.3.4.2 Princip.....	29
3.3.5 <i>Izolace pomocí magnetických částic</i> .....	31
3.3.5.1 Magnetické částice .....	31
3.3.5.2 Funkční skupiny .....	32
3.3.5.3 Princip.....	33



<b>4 MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>35</b>
4.1 MATERIÁL .....	35
4.2 METODIKA .....	35
4.2.1 <i>Izolace DNA</i> .....	35
4.2.2 <i>Kontrola čistoty DNA</i> .....	35
4.2.3 <i>Kontrola celistvosti a kvality DNA – elektroforéza</i> .....	36
4.2.3.1 Příprava agarózového gelu .....	36
4.2.3.2 Elektroforéza.....	37
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>41</b>
<b>7 SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>42</b>
<b>8 SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>43</b>
<b>9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>44</b>

## 2 ÚVOD

Nukleové kyseliny jsou součástí většiny živých organismů na této planetě, můžeme je najít jak u složitějších, tak u jednodušších organismů. Jejím hlavním cílem je předání souboru vlastností a znaků z mateřské buňky do dceřiné buňky, kde následně dochází k jejím determinacím. Typické vlastnosti a znaky získány z mateřské buňky vymezují fenotyp a genotyp daného organismu.

K základním molekulárně – biologickým metodám bezpochyby patří izolace nukleových kyselin z nejrozmanitějších materiálů od jednobuněčných organismů, rostlinných pletiv, fosilních kostí či chlupů a mnoho dalších. V souvislosti s izolací různých materiálů nastávají problémy závisující na její struktuře, stáří, fyziologickém stavu a v neposlední řadě na jejích možných kontaminacích. V laboratořích se používá velké množství různých protokolů lišící se rychlostí, výtěžností či čistotou izolovaného materiálu. Důležitých faktorem je samozřejmě i cena, do níž zahrnujeme nejen chemické látky potřebné k celkovému procesu, ale i časovou náročnost vynaloženou k separaci nukleových kyselin.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

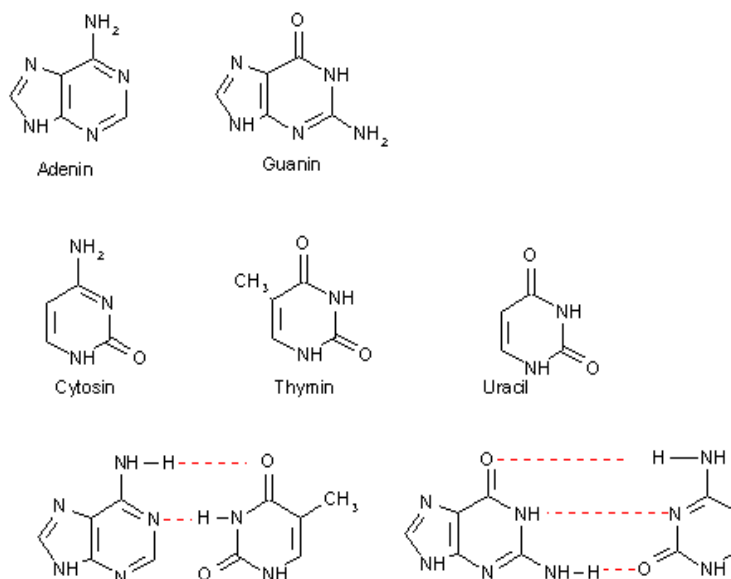
### 3.1 Nukleové kyseliny

#### 3.1.1 Struktura nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou polynukleotidy, tj. polymery mononukleotidů spojených navzájem fosfodiesterovými vazbami a zároveň jsou základními stavebními kameny v kódování genetické informace a její exprese genů (Rozsypal, 2006). Za objevitele nukleových kyselin je považován Johannes Friedrich Miescher, který v roce 1869 provedl izolaci z jader bílých krvinek a získal směs látek obsahující velké procento fosfátu, kterou následně pojmenoval *nuklein*, dnes známá jako deoxyribonukleová kyselina. (Dahm 2005)

##### 3.1.1.1 Primární struktura

Primární strukturou nukleových kyselin je lineární polymerní řetězec tvořený monomery, zvané nukleotidy. Veškeré nukleotidy jsou složeny ze tří částí: z pětiuhlíkatého monosacharidu (pentózy), z kyseliny trihydrogenfosforečné  $H_3PO_4$ , z bicyklické purinové nebo monocyklické pyrimidinové báze, které patří mezi dusíkaté heterocyklické sloučeniny. Mezi purinové báze řadíme adenin (A), guanin (G) a mezi pyrimidinové báze řadíme cytosin (C), thymin (T), uracil (U). (Lodish, 2004)



**Obř. 1:** Purinové a pyrimidinové báze nukleových kyselin, párování mezi jednotlivými bázemi (Mikeř, 1997)

### 3.1.1.2 Sekundární struktura

Sekundární strukturou nukleových kyselin je dvoušroubovice, která je tvořena z dvou polynukleotidových řetězců spojených vodíkovými vazbami mezi jednotlivými bázemi. Počet vodíkových vazeb je závislý na typu bází mezi kterými jsou tvořeny. Báze nacházející se nad a pod sebou spolu interagují tzv. stohování báze. Díky vnější fosfátové kostře a vnitřnímu párování bází tzv. komplementaritě je celek jako takový velmi stabilní. Obecně platí, že oba komplementární řetězce jsou antiparalelní, tj. liší se směrem fosfodiesterové vazby. Právě pro deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) je typické pravotočivé dvoušroubovicové prostorové uspořádání, což roku 1953 objasnili Watson a Crick a za tento významný objev získali Nobelovu cenu. (Watson & Crick, 1953)

I přesto, že ribonukleová kyselina (RNA) se obvykle vyskytuje v podobě jednořetězcové molekuly, existuje i výjimka kdy ji najdeme v dvoušroubovicovém vinutí v procesu utlumování genové exprese zvaném RNA interference (RNAi). Při RNAi dochází k degradaci cytoplazmatické mediátorové RNA (mRNA) konkrétního genu a to vnesením dvouvláknové RNA (dsRNA) se stejnou sekvencí jako má cílová mRNA a tím dojde k „vypnutí“ dráhy u odpovídajícího genu. (Fire *et al.*, 1998) Na základě objasnění jevu vědci 20. století vytvořili nové paradigma molekulární biologie pro genové regulace eukaryotických organismů, což můžeme považovat za důkaz jeho přínosu vědě. (Matzke & Matzke, 2004)



**Obr. 2:** Pravotočivá dvoušroubovice DNA dle modelu Watsona a Cricka (Dostupné na: <http://bastiaandegoede.deviantart.com/art/Commision-for-DNA-Projecten-BV-Version-2-1-LOGO-371937101>)

### 3.1.1.3 Terciární struktura

Terciární strukturou rozumíme prostorové uspořádání dvoušroubovice, které se vyskytuje pouze u molekul DNA. Terciální struktura se rozvíjí zapojením dalšího vinutí do dvouvláknové DNA a tím se vytvoří nadšroubovicové vinutí známé také jako superhelix DNA. Vznik a zánik vinutí zajišťují enzymy topoisomerasy. (Rozsypal, 2006)

## 3.1.2 Typy nukleových kyselin

### 3.1.2.1 DNA

Struktura DNA se skládá z pentózy zvané deoxyribóza, kyseliny trihydrogenfosforečné a z dusíkatých bází A, G, C, T. Molekula DNA má kyselý charakter díky zbytku kyseliny fosforečné. V buňce se nachází odlišné typy DNA, těmi jsou chloroplastová, genomová a mitochondriální. Chloroplastová a mitochondriální DNA je využívána pro evoluční a fylogenetické studia, díky matroklinní dědičnosti při níž nedochází k rekombinacím. Zkoumání podléhají změny tzv. nekódujících sekvencí, které jsou selekčně neutrální. (Wolfe *et al.*, 1987)

Genetická informace je uložena v chromozomech v jádře buňky v molekule DNA jako lineární sekvence kódů, jejíž hlavní funkcí je uchování a přenos dědičného materiálu do dalších generací tzv. *genomová DNA*. Počet a délka lineárního řetězce DNA se liší na základě jednotlivých druhů. Obecně vzato můžeme říct, že rostlinný genom větší než genom živočišný.

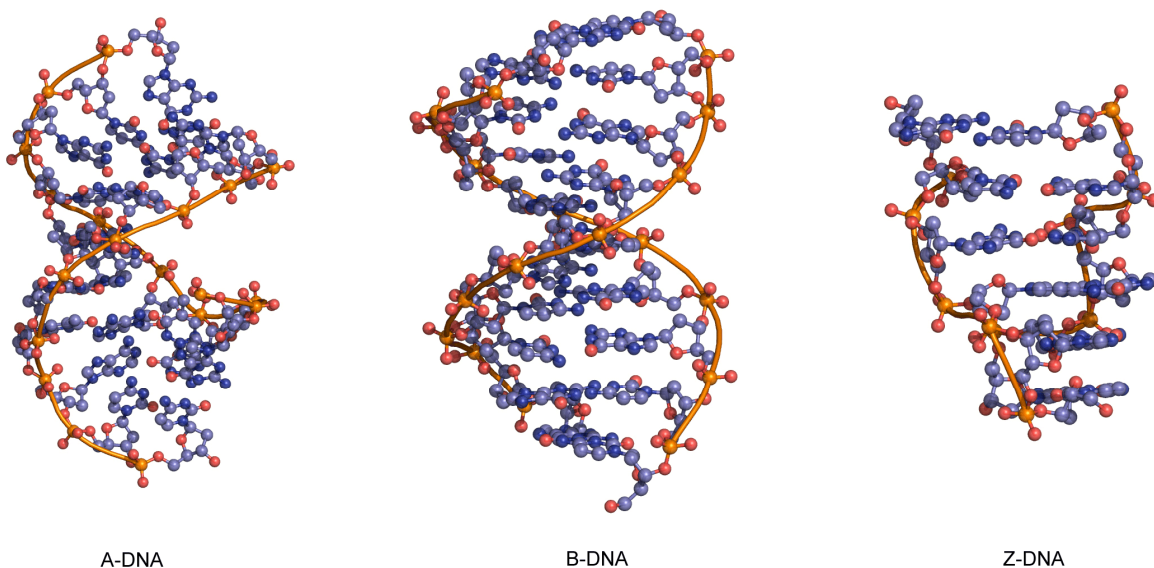
Pouze u rostlin se DNA mimo jaderný aparát nachází i u semiautonomních organel jako jsou chloroplasty (plastidy) tzv. *chloroplastová DNA*, což bylo objeveno v 60. letech v zelených řasách rodu *Chlamydomonas*. (Ris *et al.*, 1962) Chloroplastová DNA (cpDNA) je kružnicová molekula nacházející se v mnoha kopiích, kde počet kopií závisí na druhu a typu buňky. Ačkoli replikace cpDNA probíhá samostatně v chloroplastech, je stále pod vlivem jádra. (Hudák, 2010)

Po objevu cpDNA byla po roce objevena přítomnost DNA v mitochondriích pomocí elektronového mikroskopu tzv. *mitochondriální DNA (mtDNA)* (Nass, 1963) Struktury mtDNA lze u živočišných buněk sledovat pomocí elektronové mikroskopie, kdežto v rostlinných buňkách je obtížné její přítomnost identifikovat vzhledem k malým

velikostem, předpokládá se, že mtDNA existuje ve formě subgenomových kružnicových struktur.

### Konformace DNA

V živočišných, rostlinných nebo bakteriálních buňkách ji můžeme najít ve třech různých konformacích: B – DNA, A – DNA, Z – DNA. Nejčastější konformací v živých buňkách obsahující nižší koncentraci solí a vyšší obsah vody v prostředí je konformace B – DNA. B – DNA obsahuje 10 bp na otáčku a průměr dvoušroubovice činí 2nm. V případě nižšího obsahu vody v prostředí dochází ke změně a vzniku konformace A – DNA s 11 bp na otáčku. Poslední ze zmiňovaných konformací je Z – DNA, která se oproti předešlým konformacím stáčí vlevo a obsahuje 12 bp na otáčku. Dosud není známá přesná funkce této struktury, ale na základě studií se předpokládá souvislost proteinů vázajících se na Z – DNA. Nalezený komplex proteinu a Z - DNA v rodech *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila*, ve virech kravských neštovic a dále v jádrech lidských buněk. (Kwon *et al.* 2005, Krishna *et al.* 1990) Přítomnost komplexu naznačuje vzájemný vztah mezi genovou expresí, DNA rekombinací, virovou patogenitou či rozvojem nádoru. (Rich *et al.* 2003)



**Obr. 3:** Prostorové uspořádání DNA konformací (Dostupné na: <http://www.atdbio.com/content/5/Nucleic-acid-structure>)

### 3.1.2.2 RNA

Struktura RNA je v mnoha směrech podobná struktuře DNA, ale liší se obsahem pentózy zvané ribóza a obsahem dusíkatých bází A, G, C, U. Molekula RNA a DNA mají tři stejné báze a liší se pouze jednou bází. Všechny typy RNA jsou syntetizovány na jaderné matrici DNA.

Hlavní úlohou molekuly RNA je nejen přenos genetické informace z DNA do proteinů na základě centrálního dogmatu molekulární biologie dle Cricka, ale bylo dokázáno, že molekula RNA slouží u některých organismů jako nositelka genetické informace. V roce 1970 H. Temin a D. Baltimore nezávisle na sobě objevili aktivitu reverzní transkriptázy retrovirů, u nichž je genetická informace uložena v RNA a díky enzymu reverzní transkriptázy jsou schopné svou genetickou informaci přepsat do DNA, kde dále dochází k její syntéze. Typickým příkladem retroviru je vir HIV. (Baltimore, 1970; Temin *et al.*, 1970)

#### Typy RNA

##### *Transferová RNA (tRNA)*

Malá jednořetězcová molekula, která představuje hranici mezi genetickým kódem a proteinem. Hlavní funkcí je zajištění přenosu a připojení aktivovaných aminokyselin do polypeptidového řetězce, což je ovládáno pomocí malé ribozomální podjednotky (30S). Struktura tRNA má podobu tří konstantních smyček a jedné malé variabilní smyčky ve tvaru tzv. jetelového listu. Všechny tRNA molekuly obsahují tzv. antikodon, který je komplementární s kodonem na mRNA a přenáší pouze jednu aminokyselinu. Antikodon i kodon jsou složeny ze tří bází tj. triplet, které jsou vzájemně komplementární. (Craig, 2014) Molekula tRNA má zásadní roli v životě eukaryontní buňky živočichů a rostlin, víme, že ve všech genomech je různý počet tRNA kódujících 64 kodonů, z nichž 3 kodony jsou kodony terminační, tedy ukončující kódování aminokyselin tzv. stop kodony. V nedávné studii bylo zjištěno, že množství distribuovaných tRNA genů je ve většině rostlin přímo úměrný velikosti genomu. (Michaud *et al.*, 2011)

### ***Mediátorová RNA (mRNA)***

Jednovláknová molekula vznikající procesem transkripce tj. přepis genetické informace DNA do RNA. Molekula mRNA slouží jako prostředník při přenosu již transkribovaného řetězce DNA. Nově vytvořený řetězec mRNA vzniklý podle řetězce DNA slouží v tRNA jako templát pro tvorbu aminokyselin, do níž je z jádra přenášena. (Snustad *et al.*, 2009)

### ***Ribozomální RNA (rRNA)***

Je strukturní jednotka ribozomálních podjednotek, jejíž podstatnou úlohou je navázat na své receptory následující molekuly: mRNA, tRNA nesoucí aminokyselinu a tRNA zachycující peptidyl – tRNA. (Nečas, 2000) Na stavbě a funkci ribozomů se podílejí velikostně odlišné typy rRNA, které dělíme na velkou a malou podjednotku ribozomu. Geny pro 18S rRNA, 5.8S rRNA a 28S rRNA náležící do skupiny velké podjednotky ribozomu produkují tandemové repetice na chromozomech. (Otová, 2012) Díky znalosti sekvencí genů jsme schopni zjistit jak funkci, tak i příbuznost prokaryotních či eukaryotních organismů. Příkladem je např. gen pro 16S rRNA, který slouží k druhové klasifikaci bakterií, protože je přítomný u většiny prokaryotních organismů. Gen pro 16S rRNA se odlišuje v rámci druhů obsahem specifické variabilní oblasti, která určuje příslušnost ke konkrétnímu druhu. (Pereira *et al.*, 2010)

### ***Ostatní typy RNA***

Small interfering RNA (siRNA) se podílí na procesu RNA interference (RNAi), což bylo poprvé pozorováno u transgenních rostlin. (Hamilton, 1999)

Mikro RNA (miRNA) vzniká jako produkt transkripce a zabraňuje expresi komplementárních a částečně komplementárních mRNA. (Snustad *et al.*, 2009)

Malá jaderná RNA (snRNA) je nekódující RNA podílející se na vystřihování intronů z pre – mRNA v spliceozomu.



## 3.2 Překážky během izolace nukleových kyselin

### 3.2.1 U rostlinných pletiv

U rostlinných pletiv je důležitým kritériem extrakce přítomnost chemických sloučenin ve formě polysacharidů a polyfenolů, které jsou obsaženy ve všech rostlinách. Polyfenoly jsou v rostlině všudypřítomné a dávají rostlině typické zbarvení nebo chuť. Do skupiny polyfenolů řadíme fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany. Polysacharidy stejně jako polyfenoly najdeme ve všech částech rostlin od buněčné stěny po apikální vrchol a řadíme zde škrob, celulózu a chitin. Vysoký obsah daných látek působí jako inhibitor reakce a to vazbou na nukleové kyseliny, čímž klesá čistota izolátu. Tuto překážku lze odstranit aplikací isopropanolu před precipitací nukleových kyselin, což je účinné u konkrétního druhu *Terminalia arjuna*. (Deshmukh *et al.*, 2007) Čímž se dostáváme k dalšímu problému a tím je četnost rostlinných druhů, které mají jedinečné vlastnosti a proto neexistuje univerzální návod jak efektivně extrahovat námi požadované látky. (Loomis, 1974) Poslední překážkou ovlivňující separaci je přítomnost buněčné stěny, kterou je nutno rozdrtit pomocí např. tekutého dusíku v třecí misce, což nám pomůže lépe uvolnit nukleové kyseliny pro separaci. V buněčné stěně je v rostlinných pletivech obsažena celulóza, která nám může značně ovlivňovat celkovou reakci.

Dalším faktorem ovlivňující reakci je obrovské množství různých rostlinných druhů, které se nepochybně liší i svým chemickým složením a vlastnostmi.

### 3.2.2 U živočišných materiálů

U živočišných tkání je separace látek podstatně jednodušší, především díky absenci polyfenolů a buněčné stěny obsahující celulózu. U živočichů je nejdůležitějším polysacharidem zásobní látka glykogen, který zároveň negativně působí na izolaci nukleových kyselin. Problematickým materiálem pro izolaci RNA je kosterní svalstvo díky vysoké hladině glykogenu a komplikované homogenizaci. Naopak krev je nejlepší živočišnou maticí pro získávání DNA ve vysoké výtěžnosti.

Pro správný průběh izolace je nezbytná lýza pevných látek a rozklad biomembrán většinou pomocí detergentů v podobě laurylsíranu sodného. (Razin *et al.*, 1965)

## 3.3 Metody izolace nukleových kyselin

### 3.3.1 Srážení

#### 3.3.1.1 Srážení pomocí roztoků solí

Metoda tzv. vsolování a vysolování patří k tradičním separačním metodám. Aplikace není jen jednostranně využitelná u nukleových kyselin, ale účinně slouží i u bílkovin, tedy obecně lze říci u biomakromolekul. Během celého procesu separace je v ideálním případě našim cílem odstranit veškeré kontaminanty narušující čistotu látky.

Hlavní faktory ovlivňující samotný průběh reakce. (Edsall, 1982):

- obsah solí
- obsah organických rozpouštědel
- pH
- teplota

#### Princip

Princip techniky vsolování a vysolování je podmíněn změnou rozpustnosti nukleových kyselin v různě koncentrovaném roztoku iontů. Nukleové kyseliny obsahují různé sekvence a složení aminokyselin, které mají odlišnou míru přilnavosti k molekulám vody, jinými slovy jsou hydrofobní nebo hydrofilní. Pro účinnější srážecí efekt jsou vítanější molekuly s hydrofobními povrchy. V reakci dochází k zvyšování a snižování obsahu solí, což v závěru vede k vysrážení požadované nukleové kyseliny. V obou krocích je nutné dodržet součin rozpustnosti. Součin rozpustnosti je konstanta charakteristická pro každou látku, která stanovuje optimální množství látky rozpustné v roztoku za standardních podmínek.

Prvním krokem metody je zvyšování koncentrace solí v nízkých koncentracích elektrolytu, při níž je zároveň zvyšována rozpustnost nukleových kyselin do jistého maxima. Dochází k vzájemnému působení ionizovaných molekul nukleových kyselin s ionty v roztoku. Po překročení horní hranice dochází ke snižování rozpustnosti nukleových kyselin z důvodu převládajícího počtu iontů nad molekulami vody, které vyvolávají samotnou rozpustnost molekul RNA a DNA. Tuto konkrétní reakci, při níž zvyšujeme rozpustnost za pomoci solí, nazýváme tzv. vsolováním.

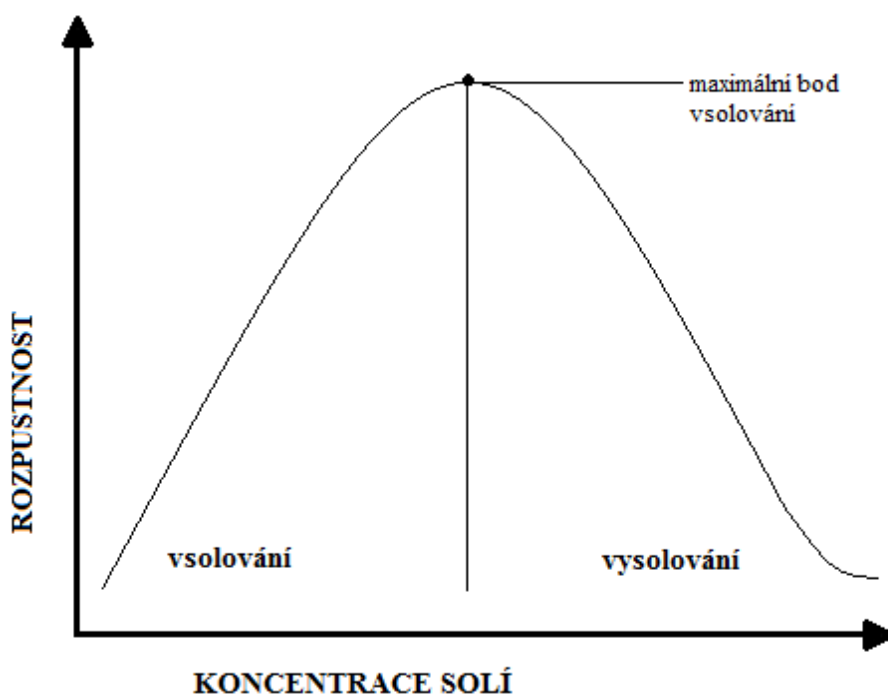
Druhým krokem reakce je snížení rozpustnosti nukleových kyselin se stále stoupající koncentrací solí. Molekuly vody mají nedostatečnou interakci s ionty nukleových kyselin, což v důsledku vede k oslabení vazeb voda-nukleové kyseliny a následné dominanci vazeb nukleové kyseliny-nukleové kyseliny. V závěru dochází k vysrážení nukleových kyselin tzv. vysolování.

Bylo dokázáno, že množství vysoleného produktu závisí na aniontu přidávané soli. Na základě efektivnosti vysolování vybíráme mezi solí monovalentních a polyvalentních aniontů. Pro vyšší vysolovací efekt jsou používány polyvalentní anionty jako fosforečnany a sírany. (Dixon *et al.*, 1961) Běžně používanou solí pro frakcionaci je síran amonný  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , především díky svému nízkému denaturačnímu účinku a vysoké rozpustnosti ve vodě. Sůl se do roztoku přidává ve formě nasyceného roztoku nebo pevné látky, přičemž přírůstek v pevném skupenství je pro reakci výhodnější kvůli nižším objemovým změnám. Při přidávání soli bychom měli dbát na to, aby byla přidávána zvolna, neboť lokální zvýšení koncentrace by mohlo vést k nevratné precipitaci. Během izolace nukleových kyselin je důležité zajistit koncentraci asi 30% množství k vytvoření nasyceného roztoku, při znatelném přesahu může dojít k nežádoucímu jevu srážení proteinů, což může nastat i při nedodržení stabilní teploty kolem 4 °C. (dostupné na <http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/skripta.pdf>)

### **Výhody a nevýhody**

Výhoda aplikace dané metody spočívá v použití u velkých objemů roztoků, dále ve většině případů nepůsobí na biologickou aktivitu izolovaných biomolekul.

Hlavní nedostatky metody se projevují u menších objemů nedostatečným rozdělením izolátu, přítomnost některých iontů naopak zvyšuje rozpustnost nukleových kyselin a v některých z mála případů ionty způsobují denaturaci a poškození nukleových kyselin. V takovýchto situacích je nutno zvolit jinou sůl nebo jinou separační metodu. (Cídlková, 2006)



**Obr. 4:** Vsolování a vysolování

### 3.3.1.2 Srážení organickými činidly

Princip metody je obdobný jako u metody vsolování a vysolování. Nukleové kyseliny mohou být oddělovány pomocí nepolárních rozpouštědel, příkladem jsou například metanol, propanol nebo etanol, které jsou mísitelné s vodou, nejčastěji se však používají aceton a diethylether. V průběhu reakce bychom měli dbát na to, aby se teplota srážení udržela pod hranicí 0°C. Podstatou odloučení je změna dielektrické konstanty prostředí, způsobené organickým rozpouštědlem, při čemž dochází k zvyšování intramolekulární elektrostatické interakce nabitých skupin. Rozpouštědlo zde slouží jako činidlo rozpustnosti různých biomakromolekul, potažmo nukleových kyselin. U polynukleotidových řetězců obsahujících více než 20 nukleotidů je hojně využívána kyselina trichloroctová.

Frakcionace organickými rozpouštědly může být kombinována se změnou teploty, pH nebo koncentrace solí. U nukleových kyselin je riziko denaturace organickými rozpouštědly zanedbatelné v porovnání s proteiny. Po dokončení precipitace je třeba odstranit zbytky rozpouštědla dialýzou nebo vakuovým sušením. (dostupné na: <http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/skripta.pdf>)

Dialýzou je považována separace pomocí semipermeabilní membrány s přesně definovanou velikostí pórů, která je schopna propouštět molekuly o menší velikosti, ostatní molekuly o větší velikosti jsou zachyceny v membráně.

### 3.3.2 Chromatografie

První chromatografické rozdělení se připisuje ruskému botanikovi M. S. Cvětovi, který separoval rostlinné barviva tzv. chlorofyly v kolonách na tuhém absorbentu, z níž následně vyřezal rozdílné barevné spektrum a vyextrahoval do roztoku. (Švec, 2009)

Chromatografie je vysoce účinná analytická separační metoda. Tato fyzikálně chemická metoda slouží k rozdělení analyzované látky pomocí dvou vzájemně nemísitelných fází, tj. fáze mobilní (pohyblivá) a stacionární (nepohyblivá), při níž dochází k analýze kvalitativní i kvantitativní. Dělení látek v analytu probíhá na základě rozdílné afinitě k stacionární fázi. V průběhu reakce dochází k eluci stacionární fáze pomocí mobilní fáze, při níž dochází k selekci příslušných látek mezi obě fáze na základě brzdící síly (retenci).

#### 3.3.2.1 Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Iontově výměnná chromatografie (IEC) je hojně využívanou technikou k purifikaci proteinů, peptidů nebo nukleových kyselin, především jako první krok purifikace a příprava k dalším krokům selektivní frakcionace. Poprvé byla analýza použita u anorganických aniontů a kationtů v roce 1975. (Small *et al.*, 1975) Metoda je založena na vzájemném působení analytu a mobilní fáze s opačně nabitými skupinami ve stacionární fázi.

#### Mobilní a stacionární fáze

*Stacionární fáze* je naplněna tzv. ionexem (iontoměničem), který zadržuje jednotlivé ionty analytu pomocí opačně nabitých funkčních skupin ionexu nacházejících se na povrchu stacionární fáze. Pro zakotvení stacionární fáze se uplatňují tzv. nosiče. Nosiče jsou složeny z různých polymerních látek, které dělíme podle původu na: přírodní (agarosa, dextran, celuloza) a syntetické (polystyren, polyakrylamid). Pro chromatografii nukleových kyselin se používá ECTEOLA – celulóza. (Harber *et al.*, 1974) Dle náboje zachycených iontů rozdělujeme ionexy na katexy zachycující kationty

a anexy zachycující anionty, což v praxi znamená, že stacionární fáze anexů obsahuje kladně nabitě skupiny, kdežto stacionární fáze katexů obsahuje záporně nabitě skupiny.

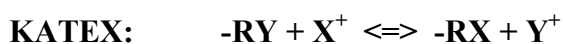
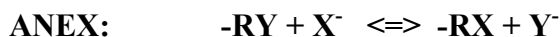
*Mobilní fáze* bývají v naprosté většině až na některé výjimky tvořeny vodnými roztoky (roztok vzorku nebo eluční činidlo). Eluční činidlo je v iontové výměnné chromatografii použito ve dvou fázích: ve vzorku k navázání na nabitě skupiny nosiče a poté k uvolnění jednotlivých iontů s nejmenším nábojem. Jako eluční činidlo využíváme triethylamin acetát (TEAA) a acetát amonný, pro nukleové kyseliny využíváme dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

### **Ionexy (iontoměniče)**

*Anexy* jsou nerozpustné polymerní polyvalentní částice nesoucí kladný náboj. Funkční skupina v disociovaném vodném prostředí odštěpuje záporně nabitě ionty a nahrazuje je anionty analytu. Anexy obsahují bazickou funkční skupinu seřazenou vzestupně dle zadržující síly složek analytu: primární aminy  $-\text{NH}_2$ , sekundární aminy  $-\text{NHR}$ , terciární aminy  $-\text{NR}_2$ , kvartérní amoniová báze  $-\text{N}^+\text{R}_3$ .

*Katexy* jsou stejně jako anexy nerozpustné polymerní polyvalentní částice obsahující funkční skupinu se záporným nábojem, která je schopná v disociovaném vodném prostředí odštěpit kladně nabitě ionty a nahradit je kationty analytu. Katexy obsahují kyselou funkční skupinu seřazenou vzestupně dle zadržující síly složek analytu: fenolická skupina  $-\text{OH}$ , karboxylová skupina  $-\text{COOH}$ , fosfátová skupina  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ , sulfátová skupina  $-\text{SO}_3\text{H}$ .

Chemická reakce IEC mezi analytem a ionexem (vytěsnění a výměna iontů):



$\text{Y}^+$  a  $\text{Y}^-$  jsou vyměnitelné ionty vázající se na funkční skupiny ionexu. Během iontové výměny prostupují ionty z okolního roztoku do ionexu a dochází k obousměrné reakci, při níž se vytěsňuje a vyměňuje příslušné množství jiných iontů vázaných na jiných výměnných skupinách.

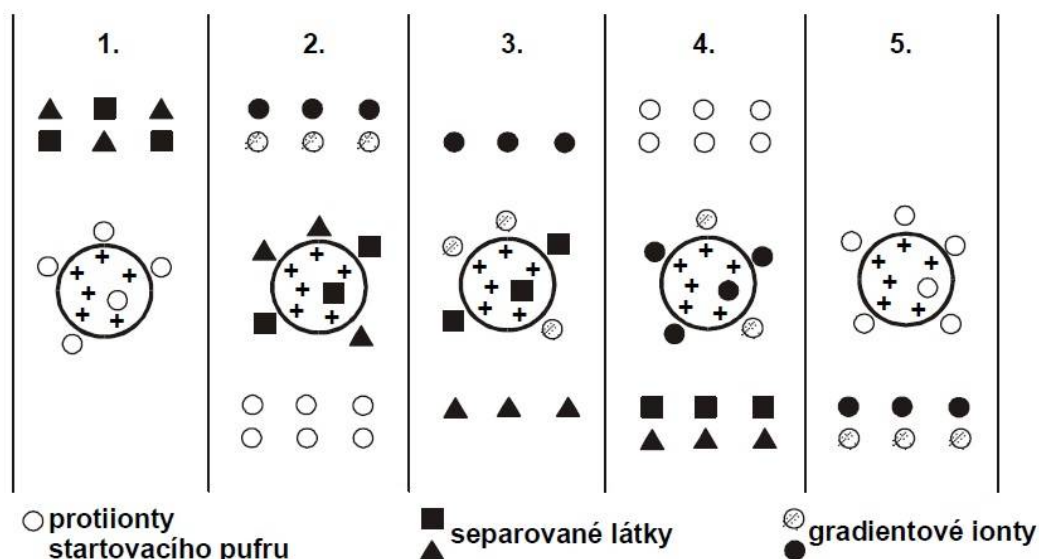
*Amfolytické ionexy* jsou schopné vyměňovat kationty i anionty, což je závislé na pH prostředí, čímž se mění náboj iontu. Eluce probíhá změnou náboje u směsí, kde požadujeme separaci aminokyselin.

Platí, že ionty s větší afinitou k funkční skupině nosiče jsou eluovány později než ionty s nižší afinitou, což znamená, že kyselina obsahující aminoskupinu přes níž je vázána je eluována později než kyselina s chybějící aminoskupinou. Afinitu analytu k ionexu lze ovlivnit iontovou silou nebo pH. Vyšší iontová síla je přítomna u iontů s vyšším mocenstvím (např.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), naopak u iontů s mocenstvím 1 je nižší (např.  $\text{Na}^+$ ).

## Princip

Reakce probíhá ve čtyřech základních krocích:

1. ekvilibrace
2. aplikace analytu
3. eluce
4. regenerace ionexu



**Obr.5:** Princip iontově výměnné chromatografie, 1 – ekvilibrace ionexu, 2 – náhrada protiiontů skupinami z analytu, 3 – ionty s malou afinitou vyměněny protiionty z pufru, 4 – náhrada gradientovými ionty, 5 – regenerace ionexu. Převzato z (Káš *et al.*, 2005)

Před započítím reakce je nutné dbát na vyrovnání ionexu a protiiontů v koloně, což je zajištěno pomocí startovního pufru tzv. **ekvilibrace vzorku**. Vhodný výběr pufru je nezanedbatelným krokem před aplikací vzorku. Iontová síla startovního pufru by neměla mít příliš nízké hodnoty, nýbrž nám může zpomalit výměnnou kinetiku či smršťování ionexu, a tím zhoršení průtoku analytu. Iontová síla pufru se volí v rozmezí 0,05 – 0,1 mol/l. (Káš *et al.*, 2005)

Po ekvilibraci vzorku přicházíme k druhému kroku, tedy **aplikaci analytu**. Před aplikací se kolona plní elučním činidlem až do fáze rovnoměrného rozložení činidla a ionexu bez vzduchových bublin, poté lze aplikovat opačně nabitý vzorek. Vzorek by měl v ideálním případě obsahovat 80 – 90% separovaných látek zachytitelných na ionexu, v případě vyšších objemových koncentrací ionex není schopen zachytit veškeré dělené látky a dochází k vymytí z kolony. Částice protékající kolonou jsou neutrální nebo mají stejný náboj jako ionexový měnič. Nukleové kyseliny nesou záporný náboj, což znamená, že musí probíhat aniontová výměnná separace na anexu. Síla adsorpce nabitých částic na ionexu roste se zvyšujícím se povrchovým nábojem. Povrchový náboj je současně závislý na změně pH prostředí.

Existují dva způsoby **eluce**: gradientová nebo isokratická. Isokratickou elucí je kolona vymývána konstantní koncentrovanou mobilní fází. Migrace složek se dělí na začátku kolony odlišnou rychlostí. Obecně je princip techniky jednoduchý, ale ve výsledku je diference složek nedostatečná a zdoluhavá, proto je používanější metodou eluce gradientová. V průběhu gradientové eluce jsou složky z kolony vymývány postupným zvyšováním solí. Na začátku kolony jsou eluovány složky s nejslabší interakční silou k stacionární fázi (nejsilnější jsou zadržovány). Zvyšováním koncentrace solí se postupně uvolňují jednotlivé složky na základě vazebných sil. (Neue, 2005) Využíváme faktu, že čím větší iont (např. ion peptidu nebo nukleových kyselin) je zachycen na ionexu, tím je elektrostatická síla nižší a menší ionty (např. Na<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup>) vytěsňují a vyměňují ionty o větší velikosti. (Matoušek *et al.*, 2010)

Po dokončení eluce všech látek je provedena tzv. **regenerace ionexu** startovním pufrům. Látky pevně vázané na ionex je nutné vymýt, to zajistíme hydroxidem sodným (NaOH) o koncentraci 0,1 M nebo ethanolem, který se na ionex neváže. Správně



provedenou ekvilibraci vytékající kapaliny zkontrolujeme změřením pH a vodivosti. (Kujawski *et al.*, 2004)

### 3.3.2.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Hydrofilní interakční chromatografie je vhodná především pro polární látky či hydrofilní látky, dále je vhodná pro problematicky rozpustné sloučeniny jako histony, membránové proteiny a peptidy. (Alpert, 1990) V posledních letech popularita HILIC roste díky vývoji nových stacionárních fází, což bylo logicky doprovázeno účinnou selekcí požadovaných látek analytu obsahující různorodé příměsi.

#### Stacionární a mobilní fáze

V posledních letech jsou jako *stacionární fáze* stále více používány zwitteriontové (ZIC) umožňující vázat kladně i záporně nabitě polární látky. Mezi klasické nosiče řadíme silikagelové stacionární fáze s hydrofilními polymerními funkčními skupinami, mezi něž patří např. polysulfoethyl či polyhydroethyl, samozřejmě s odlišnými selekčními vlastnostmi. (Boersema *et al.*, 2008)

Pro *mobilní fáze* jsou používány vodné fáze s vysokým obsahem organického rozpouštědla, nejčastěji acetonitril (ACN) a v menší míře metanol. (Hao *et al.*, 2008)

#### Princip

Během HILIC separace dochází k zachycení hydrofilních látek solutu na stacionární fázi, obecně lze říci, že čím jsou látky v analytu hydrofilnější, tím se vytváří silnější hydrofilní interakce tzv. primární interakce. V průběhu separace se mohou uplatňovat i druhotné interakce (např. elektrostatické interakce), což je podmíněno hydrofilními interakcemi, které vzniknou za podmínek vzniku hydratované vrstvy (z angl. water-rich layer) na sorbentu. Analyt je na stacionární fázi zadržován pomocí vodíkových můstků. (Boersema *et al.*, 2008) Vlivem druhotných interakcí dochází k odpuzování separovaných složek, nežádoucí účinek lze omezit přidáním amonných solí organických sloučenin (např. mravenčan nebo octan amonný). (Guo *et al.*, 2005)

### 3.3.3 Silika kolonky

Technika izolace DNA silika kolonkami patří mezi nejpoužívanější běžné metody, v praxi jsou nejčastěji využívány u komerčně dostupných kolonkových kitů, jejichž

obrovskou výhodou je její rychlost a vysoká výtěžnost. (Cady *et al.*, 2003) U rostlinných pletiv firma Qiagen uvádí při optimálních podmínkách na navážku 50 mg nevysušeného vzorku výtěžnost 1 - 15  $\mu$ l. U živočišných materiálů jako krev firma Generi Biotech uvádí až na 200  $\mu$ l vstupního objemu vzorku výtěžnost v rozmezí 40 – 60 ng/ $\mu$ l.

Adsorpce na silikát je poměrně stará metoda, dříve se k adsorpci na povrch používaly přírodní materiály jako křemelina, která je v současnosti nahrazena uměle vyrobeným silikagelem. (Janochová, 2009) Metoda izolace DNA pomocí silika kolon je založena na několika **základních vlastnostech DNA**:

- Schopnost adsorpce DNA na silikát
- DNA se snadno precipituje pomocí alkoholu
- Vodíkové vazby jsou štěpeny extrémním pH, teplotou nebo močovinou (stabilní pH je od 4 do 8)

Vazba DNA na silikátový povrch ( $\text{SiO}_2$  - sklo) probíhá v přítomnosti chaotropních solí jako jsou jodid sodný (NaI), chloristan sodný ( $\text{NaClO}_4$ ), guanidin hydrochlorid (GuHCl) a guanidin isothiokyanát (GuSCN). (Melzak *et al.*, 1996) Síla vzniklé vazby je závislá na typu nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), iontové síle a pH roztoku.

### **3.3.3.1 Silikagel**

Pod pojmem silikagel se mnohým z nás vybaví malé balení kuliček, které je součástí různých balení počínaje krabicí od bot konče balením čínských nudlí, což je využíváno pro jeho vysokou poréznost (800  $\text{m}^2/\text{g}$ ). Na svůj vysoce porézní povrch zachycuje vodu, tedy slouží jako pohlcovač vlhkosti tzv. desikant.

Silikagel je synteticky vyráběný z křemičitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) od roku 1938, je to granulovitá pórovitá forma oxidu křemičitého ( $\text{SiO}_2$ ). Základní vlastností silikagelu je schopnost v uzavřených prostorech pojmout až 40% vodných nebo olejových roztoků jeho celkové hmotnosti. (Heuser, 1938) Běžné silikagely v normálních podmínkách adsorbují 20% své hmotnosti. V porovnání s přírodními křemičitany jsou synteticky vyráběné silikagely chemicky stabilnější a nevyvolávají silikózu. (Ehrlich *et al.*, 2010)

Jeho nespornou výhodou je nehořlavost a nejedovatost, a proto je využívána i v potravinářství.

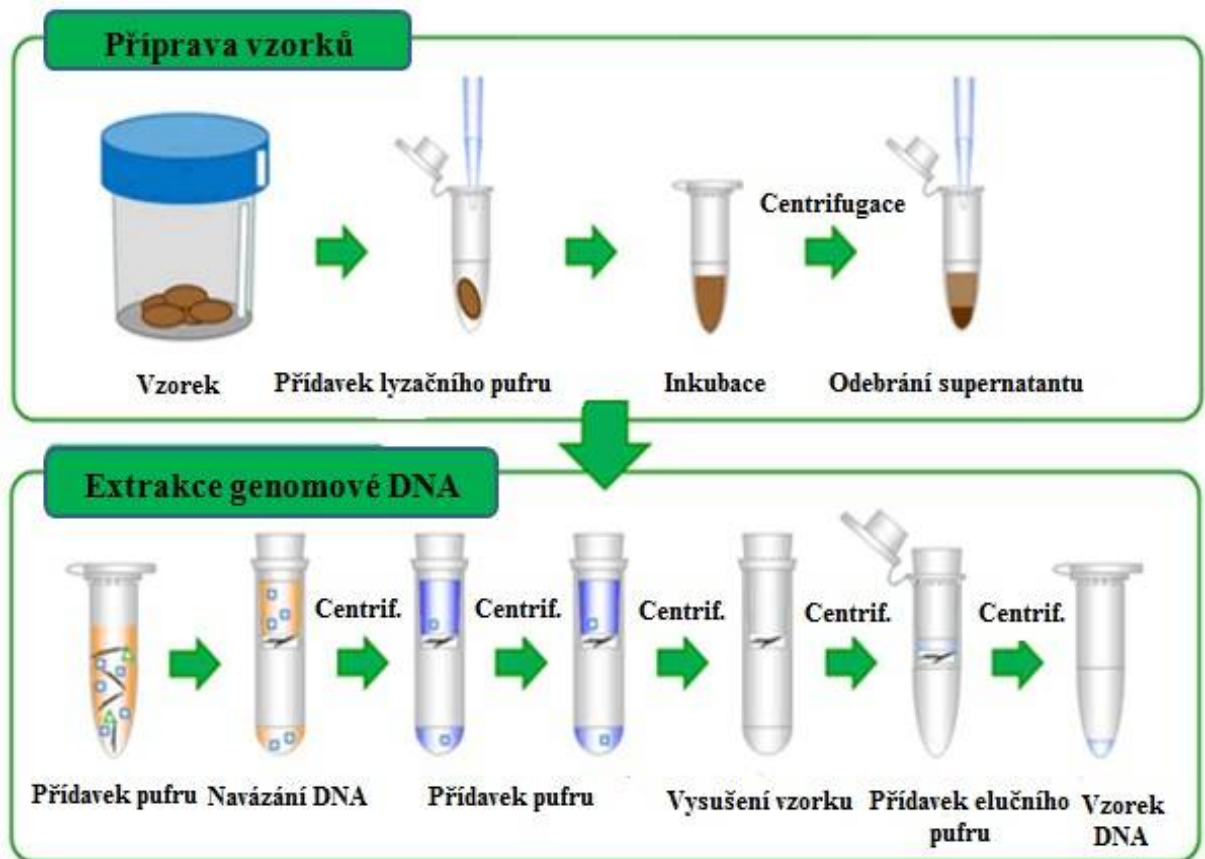
Silikagely s přesně definovanou velikostí částic se používají při chromatografii do stacionárních kolon. Povrch silikagelu je tvořen silanovými skupinami, čímž má povrch vysoce polární charakter a je schopen vázat polární skupiny. (Jandera, 2011) Nyní se v chromatografii používají porézní silikagely o velikosti částic 3 – 5  $\mu\text{m}$  a velikost pórů se pohybuje kolem 10 nm. Charakteristické velikosti pórů a částic jsou podstatné pro separaci konkrétních molekul, které se na povrchu zachytí. V posledních letech je silikagel modifikován do různých forem odtržením vodíku a nahrazením funkční skupiny, příkladem takové modifikace je připojení skupiny C18 se zabudovanou polární skupinou (karbamát). Modifikace silikagelu slouží k odlišným separacím látek. Silikagely na svůj povrch adherují fragmenty DNA, peptidy, bílkoviny, oligonukleotidy a další organické látky.

#### 3.3.3.2. *Princip*

Princip metody spočívá ve třech základních krocích a těmi jsou vazba DNA, promytí vzorku od nečistot a na závěr uvolnění DNA z vazby. V prvním kroku dochází k **vazbě DNA** na polární silikátový povrch obsahující silanové skupiny, DNA je schopna se v prostředí chaotropních solí navázat a vytvořit tak interakční vazbu mezi povrchem. Je důležité udržovat stabilní pH v rozhraní 4 – 8, pokud by došlo k extrémním změnám pH dochází k nežádoucím účinkům silikagelu, při extrémním snížení pH pod 2 se stává siloxanová vazba nestabilní a dochází ke ztrátě navázané fáze, naopak při zvýšení pH nad 8 se silikagel rozpouští. (Janečková *et al.*, 2010)

V druhém kroku dochází k **promývání vzorku** v několika opakování pomocí chaotropních solí a pufru, při čemž vzorek protřepáváme, což zajišťuje vyšší množství navázané DNA a zároveň se vymývají kontaminující látky.

V závěru extrakce provedeme odstředění vzorku, čímž na silikátové kolonce zůstávají zachycené částice DNA a ostatní nezachycené částice zůstávají v roztoku pod kolonkou. **Uvolnění DNA** ze silikátového povrchu snadno provedeme pomocí vody nebo pufru s malou iontovou silou.



**Obr. 6:** Princip izolace DNA pomocí silika kolon. Upraveno dle manuálu AccuPrep® Stool DNA Extraction Kit.

### 3.3.4 Fenol – chloroformová extrakce

Fenol - chloroformové extrakce jsou široce aplikovatelné v rámci izolace DNA, RNA, proteinů a dalších biomolekul. Technika separace probíhá ve dvou kapalných nemísitelných fázích na základě různé rozpustnosti molekul, při čemž dochází k separaci molekul.

Využití fenol – chloroformové extrakce patří k nejstarším metodám izolace nukleových kyselin. První aplikace guanidinu chloridu (předchůdce fenol – chloroformové extrakce) při izolaci savčí RNA proběhla v roce 1951. (Volkin *et al.*, 1951) Během let došlo k mnoha modifikacím a nahrazením různých složek pro její zdokonalení. Počátek skutečné fenol – chloroformové extrakce je datován do roku 1987, kdy Chromczynski a Sacchi použili pro izolaci RNA kombinaci tří složek a těmi byly

fenol, chloroform a guanidin thiokyanát, ve většině případů byli použity živočišné matrice. (Chromczynski & Sacchi, 1987)

#### **3.3.4.1 Složky extrakce**

**Fenol** je organická sloučenina obsahující hydroxylovou skupinu –OH, vyskytuje se v dehtech a mimo to je součástí živočišných těl a rostlinných pletiv. V fenol – chloroformové extrakci slouží ke srážení bílkovin a následně k oddělení nukleových kyselin od proteinů, vzhledem k tomu, že proteiny jsou hydrofobní povahy, zůstávají v organické fázi, kdežto nukleové kyseliny jsou vysoce nabitě a následně přechází do vodné fáze.

**Chloroform** je organické rozpouštědlo, je tedy nemísitelné s vodným roztokem obsahující analyzovaný vzorek a je zodpovědný za fázové rozdělení kapalin na dvě části.

Fenol je s klesající rozpustností ve vodě rozpustnější v nepolárních rozpouštědlech jako je například cyklohexan nebo chloroform. **Izoamylalkohol** je do směsi přidáván spolu s fenolem a chloroformem pro zlepšení kvality rozpustitelnosti fenolu v chloroformu.

Dále do reakce, v případě izolace RNA, vstupuje také **guanidin thiokyanát**, který inhibuje činnost ribonukleáz na membránách organel a navíc rozděluje komplexy proteinů a DNA (přechází do fenol – chloroformové fáze) od RNA. (Ding *et al.*, 2008)

#### **3.3.4.2 Princip**

Princip extrakce tkví v oddělení odlišných komponentů ve zkoumaném vzorku dle rozpustnosti ve vzájemně nemísitelných fázích organických rozpouštědel a vody. Do reakce vstupuje fenol, chloroform a izoamylalkohol (při izolaci RNA guanidin thiokyanát) v objemovém poměru 25 : 24 : 1. (Chirgwin *et al.*, 1979) K lyzátu buněk nebo k homogenizované tkáni jsou přidány fenol a chloroform, při níž dochází k rozdělení do dvou fází do horní fáze obsahující vodný roztok s nukleovými kyselinami a spodní fáze obsahující organické složky fenolu a chloroformu. Díky rozpustnosti fenolu v chloroformu je hustota směsi vyšší (1,47 g / cm<sup>3</sup>) než hustota samotné vody (1,00 g / cm<sup>3</sup>), což vede k ostřejšímu rozdělení obou fází, a tím jednoduššímu odejmutí vodné fáze s nukleovými kyselinami s minimální kontaminací

z organické fáze. Nukleové kyseliny se díky své polaritě rozpouští ve vodném roztoku, kdežto fenol má oproti vodě podstatně nižší polaritu a nukleové kyseliny se v něm hůře rozpouští.

Protřepáváním dochází k smíchání obou fází a za přítomnosti fenolu dochází k vysrážení prstence proteinů mezi nemísitelnými fázemi, proces třepání opakujeme do bodu maximálního vysrážení proteinů. Struktura proteinů je určena jednotlivými aminokyselinami o různé polaritě, což dává řetězci nespecifickou polaritu. Část řetězce by se ráda rozpustila ve vodném prostředí a část by se ráda rozpustila v prostředí organického rozpouštědla, což je důvod hromadění proteinů na rozhraní fází. Po ukončení protřepávání do reakce vstupuje izoamylalkohol, který způsobuje lepší rozpustnost fenolu v chloroformu. Pro dokonalé rozdělení rozhraní je nutné vzorek centrifugovat.

Následně opatrně odstraníme horní část oddělené směsi (obsahuje nukleové kyseliny). Extrakci opakujeme dle potřeby 1 - 2x podle množství vysrážené vrstvy proteinů do doby, kdy se již v roztoku nevyskytuje bílá sraženina proteinů. Pokud izolujeme z rostlinných pletiv, je nutné dbát na to, aby byly odstraněny nežádoucí polysacharidy pomocí cetyltrimetylamonium bromidu (CTAB). V poslední řadě extrahujeme směs jen směsí chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 24 : 1, přičemž odstraňujeme fenolické zbytky, které by mohly celkově ovlivňovat vyizolované nukleové kyseliny.

V posledním kroku bychom měli zbavit přečištěné nukleové kyseliny přebytečných nečistot a to docílíme procesem zvaným precipitace. Precipitaci provádíme koncentrovaným etanolem, případně isopropanolem. U vzorků s nižší koncentrací nukleových kyselin se vyšší a účinnější výtěžnosti napomáhá snížením teploty a přidávkem solí. Po odstředění vznikne na dně zkumavky bílá sraženina (pelet) obsahující nukleové kyseliny, bílé zbarvení způsobují soli přidané do reakce (soli vymýváme 70% etanolem). Po odsátí supernatantu na dně ulpívá pelet s nukleovými kyselinami, který rozpouštíme ve vodném roztoku nebo ve vhodném pufru. Pokud jako konečný produkt požadujeme DNA je potřebné použití RNáz, které nám odstraní molekuly RNA.

Je nezbytné během reakce dodržovat nízké teploty – 20 °C, aby případně nedocházelo k zbytečné degradaci nukleových kyselin.

## **Izolace RNA**

Během izolace RNA je nutné upravit jisté podmínky extrakce. Během homogenizace vzorku je do ní přidáván guanidin thiokyanát, který plní funkci inhibitoru ribonukleáz a zároveň s N – lauryl sarkosínátem způsobuje oddělení komplexu proteinů a nukleových kyselin. Odstranění DNA ze vzorku probíhá pomocí DNáz.

V průběhu přednostní izolace DNA nebo RNA je třeba upravit pro jednotlivý typ nukleových kyselin hodnotu pH fenolu, přičemž pH během izolace DNA je třeba upravit neutrálním pufrům a stanovit tak hodnotu pH neutrální až slabě alkalickou kolem 7- 8, oproti izolaci DNA je nutné u izolace RNA snížit hodnotu pH až do kyselých hodnot kolem 5 - 6, což zapříčiníme kyselým pufrům. Kyselou extrakcí dosáhneme mobilizace DNA a proteinů do organické fáze, protože fosfátové skupiny molekuly DNA jsou snadněji neutralizovány (je méně kyselá) než molekuly RNA, výsledkem je RNA ve vodné fázi. Obecně platí, že látka je nejlépe rozpustná v složením nejpodobnějších rozpouštědlech. Celková RNA zůstává ve vodné fázi a je precipitována isopropanolem, nakonec promývána etanolem. Poté je vymývána vodou. Ze separovaného vzorku RNA lze dále provést selektivní izolaci tRNA, rRNA nebo mRNA, což se v posledních letech hojně využívá pro další výzkum RNA. Například pro izolaci mRNA se používá afinitní chromatografie s oligo kolonami. (Tan & Yiap, 2009)

### **3.3.5 Izolace pomocí magnetických částic**

Separční technika využívající magnetizovatelné mikro - a nanočástice (MPs) nachází uplatnění na poli biomedicínských a biotechnologických oborů, jejich vlastnosti jsou využívány pro cílený transport látek včetně léčiv, kontrastní látka pro zobrazování pomocí magnetické rezonance, izolaci biomolekul nebo značení buněk. (Gupta & Gupta, 2005) Ačkoli je oblast magnetických nanočástic v posledním desetiletí středem zájmu, jeho unikátní superparamagnetické vlastnosti byly objeveny již v roce 1949 L. Neelem, bohužel tento jev zůstal poměrně bez povšimnutí širší komunity fyziků až do poloviny devadesátých let. (Widwald & Ziemann, 2010)

#### **3.3.5.1 Magnetické částice**

Magnetické částice jsou kulovité partikule o malých rozměrech v řádu nm a  $\mu\text{m}$ . Magnetické částice dělíme na nanočástice o velikosti v rozmezí 5 – 100 nm a

mikročástice s rozměrem nad 100 nm, rozdílných velikostí částic využíváme pro izolaci odlišných typů biomolekul, např. pro izolaci nukleových kyselin jsou používány částice o velikosti 20 – 450 nm. (Húska et al., 2008) Oba typy částic jsou převážně kompozitního charakteru tzn. jsou složeny z vlastního **magnetického jádra** zodpovědného za interakci s vnějším magnetickým polem a **nemagnetického obalu** zajišťující interakci se systémem biomolekul. (Šafařík et al., 2012)

Nemagnetický obal je složen z polymerní vrstvy chránící magnetické jádro před nežádoucí nespecifickou reakcí s analytem a zvětšují adsorpční plochu nosiče. (Saiyed et al., 2008) Polymerní vrstva může být přírodní nebo syntetická. Přírodní polymery mohou být různé polysacharidy např. dextran nebo celulóza, dále proteiny či lipidy, jejich velkou nevýhodou je nízká mechanická pevnost. Mezi syntetický polymer řadíme polystyren (PS) nebo polyethylenglykol (PEG), který má oproti přírodním polymerům větší mechanickou pevnou. Dále se využívá oxid křemičitý (SiO<sub>2</sub>) nebo zlato pro svou vysokou stabilitu. Polymerní vrstva podléhá velkému množství modifikací funkčními molekulami, které jsou biokompatibilní s požadovanými biologickými systémy, které chceme z materiálu izolovat.

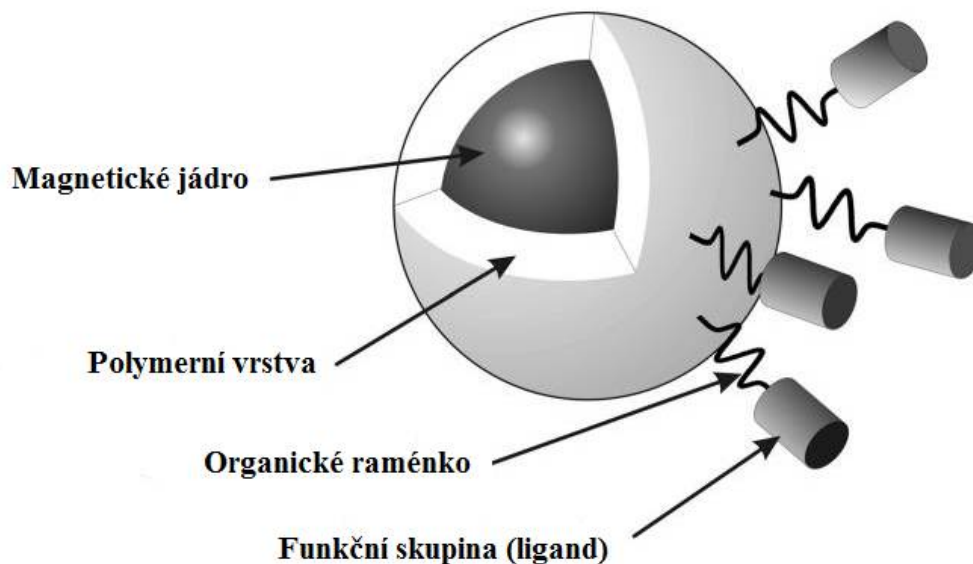
Základní částí magnetické částice je její jádro, které je tvořeno magnetizujícími materiály o průměru menšími než 30 nm. (Dopson et al., 2008) Magnetické částice musí vykazovat supermagnetické vlastnosti, což v praxi znamená, že má magnetické vlastnosti za působení vnějšího magnetického pole. (Plank et al., 2003) Nejpoužívanějším materiálem magnetického jádra jsou magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) a maghemit (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), dále se používají sloučeniny kobaltu, chromu nebo niklu, u nichž je nevýhodou použití pro biomedicínské použití pro jejich toxicitu. Magnetit je černý krychlový nerost složený z oxidu železnatého (FeO) a oxidu železitého (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), má silné magnetické vlastnosti. Maghemit vzniká oxidací magnetitu a je oblíbeným materiálem pro medicínské použití vzhledem ke své zdravotní nezávadnosti, je složen z Fe<sup>3+</sup> iontů, které se přirozeně nachází i v lidském těle.

### 3.3.5.2 Funkční skupiny

Obecně lze říct, že pokud povrch magnetické částice není modifikován vhodnými funkčními skupinami je interakce mezi biomolekulou a povrchem velmi slabá, proto je nezbytné pro specifickou separaci látek navázání funkčních skupin (ligandu) na povrch magnetických částic tzv. funkcionalizaci povrchu. Pro specifickou separaci nukleových



kyselin se využívá zavedení amino ( $-\text{NH}_2$ ) a karboxylových skupin ( $-\text{COOH}$ ). V přítomnosti různých činidel se funkční skupiny aktivují a jsou připraveny na sebe navázat požadované biomolekuly.



**Obr. 7:** Stavba magnetického nosiče. Upraveno dle (Dopson *et al.*, 2008)

### 3.3.5.3 Princip

Pro vazbu nukleových kyselin na povrch magnetických částic je potřebné splnit následující podmínky: přítomnost funkčních amino nebo karboxylových skupin, prostředí vazebného pufru tvořené chloridem sodným ( $\text{NaCl}$ ) a polyethylenglykolem (PEG). Pro konkrétní navázání DNA je důležitá přítomnost karboxylové skupiny  $-\text{COOH}$ , která je vodíkovými vazbami navázána na povrch částice. V přítomnosti chloridu sodného dochází ke kondenzaci DNA, což je jev, při němž se hydratovaná forma B - DNA „sbalí“ do konformace A - DNA, což je důvod navázání DNA na povrch částice. (Kleideter *et al.*, 1999) Mechanismus vazby kondenzované DNA není zcela objasněn. (Ma *et al.*, 2007) Polyethylenglykol je látka, která v reakci zajišťuje specifickou vazbu DNA na povrch a zároveň zeslabuje vazbu proteinů.

V prvním kroku reakce se přidává lyzační pufr, následně magnetické částice a vazebný pufr složený z  $\text{NaCl}$  a PEG, který nám umožňuje vazbu molekuly DNA s funkční karboxylovou skupinou na magnetických nosičích. V této fázi navázané DNA je na magnetické částice působeno magnetickým polem, při němž dochází k imobilizaci

částic a odstranění tzv. supernanantu. Poté jsou magnetické částice promývány pufrem bez přítomnosti NaCl například isopropanolem, který nám z magnetizovatelné částice uvolní požadovanou DNA.

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Materiál

Pro experimentální část izolaci DNA byly použity 3 odlišné vzorky z konopí setého (*Cannabis sativa*) z odrůdy Carmagnola:

- výlisky
- semena
- květy



**Obr. 8:** Vzorky *Cannabis sativa* pro izolaci DNA

### 4.2 Metodika

#### 4.2.1 Izolace DNA

Pro izolaci DNA z konopných matric byl použit komerční kit DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen. Celý postup izolace genomové DNA je uveden v příručce DNeasy® Plant Handbook.

#### 4.2.2 Kontrola čistoty DNA

Kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA byla změřena spektrofotometricky pomocí přístroje Picodrop spectometr. Byla zvolena optimální vlnová délka pro dvouvláknovou DNA při 260nm, což je nejvyšší absorpční maximum UV záření pro nukleové kyseliny. Čistota vzorku se často klasifikuje podle poměru naměřených

hodnot při absorpčních 260 nm a 280 nm. Za dostatečně čistý vzorek se považuje takový vzorek, který splňuje podmínku u DNA  $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1,8$ , u RNA  $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 2$ .

#### **4.2.3 Kontrola celistvosti a kvality DNA – elektroforéza**

Ke kvantifikaci DNA byla použita horizontální agarózová elektroforéza za použití 1,5 % agarózového gelu. Při elektroforetické kvantifikaci vyizolované DNA se porovnává intenzita fluorescence emitujícího vzorku pod UV zářením, sledovatelnost pod UV zářením umožňuje obarvení agarózového gelu ethidium bromidem. Tato látka patří do skupiny interkalačních barviv a váže se mezi báze nukleových kyselin. Metoda je velmi citlivá a je schopná poskytnout informaci i z velmi malých množství (1 – 5 ng DNA). Veškeré vzorky byly smíchány s nanášecím pufrem, který v průběhu elektroforézy slouží jako sledovatelná stopa „putujícího“ naneseného vzorku. Po ukončení elektroforézy následovalo nasnímání gelu pomocí dokumentačního systému pod UV lampou transluminátoru Ultraviolet (UltraLum Inc a následně nasnímána LCD kamerou.

##### **4.2.3.1 Příprava agarózového gelu**

Pro přípravu agarózového gelu byly použity následující komponenty: agaróza, TAE pufr, destilovaná voda a ethidium bromid. V prvním kroku bylo smícháno 1891 ml destilované vody s 38,6 ml pufru TAE (trisacetátový pufr) o zásobní koncentraci 50x. Vzniklý roztok byl promíchán skleněnou tyčinkou. Z takto připraveného roztoku bylo odlito 135 ml do připravené nádoby. Na analytických vahách bylo odváženo 2,1 g agarózy a přidáno do roztoku. Obsah nádoby byl promíchán a směs byla povařena v mikrovlnné troubě asi 3 minuty. Rozehřátá nádoba byla zchlazena pod proudem tekoucí studené vody, po zchlazení byl do nádoby přidán ethidium bromid o objemu 1,5 µl. Do již nachystané vaničky byla nalita připravená směs a případně odstraněny vzduchové bubliny. Do drážek byly opatrně nasunuty hřebínky pro vytvoření jamek. Gel byl ponechán ke ztuhnutí v digestoři po dobu asi 20-30 minut. Následně po ztuhnutí byly hřebínky odstraněny a gel byl zalit zbytkem směsi destilované vody a 50x TAE pufru.

#### ***4.2.3.2 Elektroforéza***

Vzniklé fragmenty DNA jsou běžně analyzovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Do již připraveného gelu zalitého pufrům jsem do jamek nanasla izolované vzorky DNA. Po nanesení vzorků do jamek v gelu byla elektroforetická vana zakryta bezpečnostním krytem a aparatura byla napojena na zdroj stejnosměrného napětí. Je nutné dbát na to, aby se dodržovala správná orientace vzorku v elektroforéze, což znamená, že negativně nabitě molekuly DNA putují od katody (-) k anodě (+). Délka trvání elektroforézy se obvykle stanovuje dle velikosti fragmentů DNA, v mém případě probíhala 1 hodinu.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro experimentální část byly provedeny dvě varianty izolace DNA s rozdílnými navážkami. Obě varianty tří vzorků byly provedeny ve třech opakováních, tedy 9 vzorků v každé variantě. V první variantě činila navážka 20 mg a v druhé variantě činila navážka 100 mg. Výsledky koncentrace vyizolované DNA z jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce 1 a výsledky čistoty vzorků jsou uvedeny v tabulce 2.

Konopí seté	Koncetrace DNA (ng/μl)			ø koncentrace DNA
	1	2	3	
V (20 mg)	11,1	14,7	23,1	16,30
S (20 mg)	19,5	14	23,6	19,03
K (20 mg)	37,8	55,9	23	38,90
V (100 mg)	76,6	63,3	66,5	68,80
S (100 mg)	49,8	83,5	56,1	63,13
K (100 mg)	56,6	61,2	52,6	56,80

**Tabulka 1:** Koncentrace vyizolovaných vzorků DNA z výlisku, semene a květu s navážkou 20 mg a 100 mg (V – výlisek, S – semeno, K – květ)

Konopí seté	A280 / A260			ø A 280 / A 260
	1	2	3	
V (20 mg)	2,15	1,63	1,7	1,83
S (20 mg)	1,98	1,7	1,64	1,77
K (20 mg)	1,65	1,61	1,53	1,60
V (100 mg)	1,44	1,38	1,45	1,42
S (100 mg)	1,6	1,66	1,67	1,64
K (100 mg)	1,74	1,65	1,63	1,67

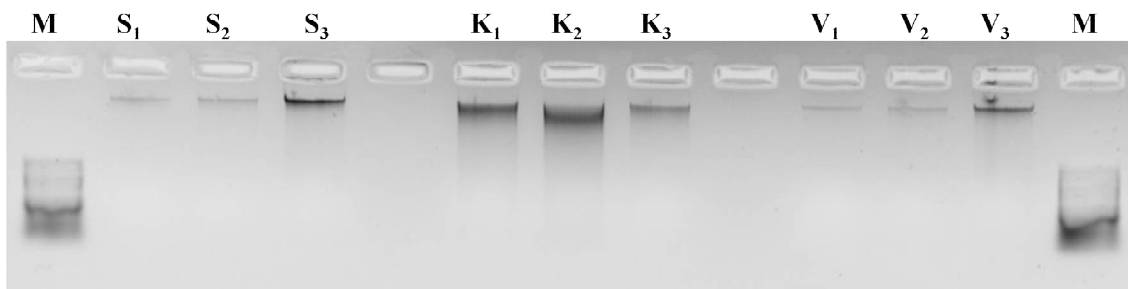
**Tabulka 2:** Čistota vyizolovaných vzorků DNA z výlisku, semene a květu s navážkou 20 mg a 100 mg (V – výlisek, S – semeno, K – květ)

Jak je možno vidět v tabulce 1, je znatelný rozdíl mezi koncentracemi DNA různých navážek, rozdíl výtěžnosti vzorků s navážkou 100 mg je několikanásobně vyšší než u 20mg navážky. Jednotlivé vzorky výlisku, semene a květu jsou odlišné mírou výtěžnosti v porovnání s různými navážkami, 100mg navážky jsou v rozmezí 1,5 – 4x

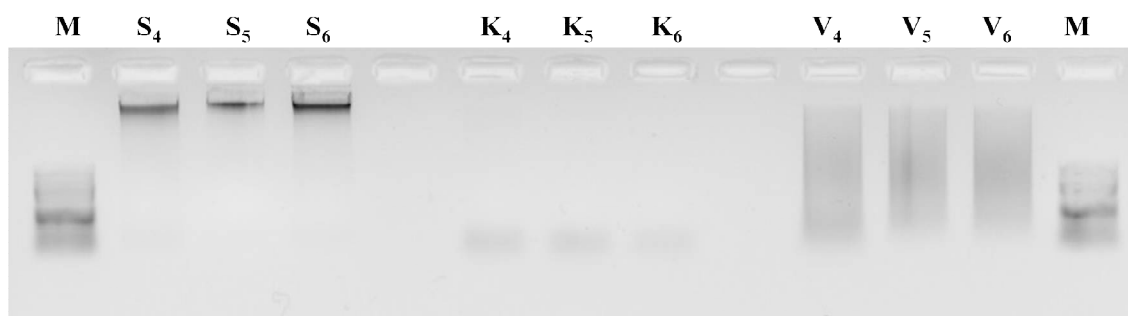
vyšší než 20mg výtěžky. I přes vysokou výtěžnost vzorku DNA je stále nutné dbát na to, aby vyizolovaná DNA byla v co nejvyšší kvalitě a v nejlepším případě celistvá. Pro izolaci byly použity konopné matrice výlisku, semena a květu o vlhkosti kolem 8 – 10%, které lze považovat za velmi suché vzorky. Firma Qiagen uvádí výtěžnost suchých vzorků s navázkou 20mg v intervalu 3 - 30 ng/μl, což bylo v případě květů převyšeno o 8 ng/μl. Co se týká čistoty vyizolované DNA u obou navážek, platí zde, že čím vyšší koncentraci DNA získáme, tím nám čistota vzorku klesá na úkor větší výtěžnosti.

Získané vzorky DNA byly rozděleny po hodinové elektroforéze dle velikostí fragmentů. Z gelů lze vyčíst, že kvalita vzorků s navázkou 100 mg je podstatně nižší než u vzorků s navázkou 20 mg, což určujeme dle výraznosti a celistvosti proužků. I přes vyšší výtěžnost vzorků 100mg navážky nebyla u vzorku květu a výlisku získána požadovaná kvalita vzorku pro další použití v následujících pokusech jako je běžně používaná PCR analýza. U vzorků květů (K<sub>4</sub>–K<sub>6</sub>) a výlisků (V<sub>4</sub>–V<sub>6</sub>) u 100 mg navážky jsou na gelu viditelné šmouhy, což značí degradaci či vysokou fragmentaci molekuly DNA. Vzorky výlisku byly lisovány za studena pod obrovským tlakem, což mohl být důvod degradace DNA a projevení se na gelu až při vyšších koncentracích DNA. Dalším možným vysvětlením šmouhy v gelu u vzorků výlisků (V<sub>4</sub>–V<sub>6</sub>) je snížená čistota vzorku. U vzorků květů (K<sub>4</sub>–K<sub>6</sub>) by důvodem šmouhy mohl být i nízký obsah látek THC (tetrahydrocannabinol) do 0, 3%, který by při vstupu většího množství izolátu inhiboval reakci. Jedinými dále použitelnými vzorky ze 100mg navážky jsou semena (S<sub>4</sub> – S<sub>6</sub>), které na gelu tvoří zřetelný proužek, jsou tedy celistvé a nefragmentované, díky absenci technologického zpracování a ponechání semen v přirozeném stavu. Proužky na gelu u vzorků semen (S<sub>1</sub>–S<sub>3</sub>), květů (K<sub>1</sub>–K<sub>3</sub>) a výlisků (V<sub>1</sub>–V<sub>3</sub>) jsou zřetelnější a vypovídají o kompaktnosti vyizolované DNA a jsou vhodné pro další aplikace do různých pokusů.

Bylo prokázáno, že izolací ze sušených materiálů s nižší navázkou 20 mg dosáhneme vyšší kvality izolované DNA, ačkoli s nižší koncentrací. Z toho důvodu doporučuji pro optimální separaci DNA u *Cannabis sativa* použití nižší navážky o hmotnosti 20mg.



**Obr. 8:** Vizualizace vyizolovaných fragmentů DNA u navážky 20 mg



**Obr. 9:** Vizualizace vyizolovaných fragmentů DNA u navážky 100 mg

**Legenda:**

M – velikostní marker 100 bp Ladder, S<sub>1</sub> – semeno (20 mg), S<sub>2</sub> – semeno (20 mg), S<sub>3</sub> – semeno (20 mg), S<sub>4</sub> – semeno (100 mg), S<sub>5</sub> – semeno (100 mg), S<sub>6</sub> – semeno (100 mg), V<sub>1</sub> – výlisek (20 mg), V<sub>2</sub> – výlisek (20 mg), V<sub>3</sub> – výlisek (20 mg), V<sub>4</sub> – výlisek (100 mg), V<sub>5</sub> – výlisek (100 mg), V<sub>6</sub> – výlisek (100 mg), K<sub>1</sub> – květ (20 mg), K<sub>2</sub> – květ (20 mg), K<sub>3</sub> – květ (20 mg), K<sub>4</sub> – květ (100 mg), K<sub>5</sub> – květ (100 mg), K<sub>6</sub> – květ (100 mg)



## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla věnována především literární rešerši, v níž jsou popsány současné vhodné metody izolace nukleových kyselin používané pro rostlinné i živočišné matrice. Po prostudování literárních zdrojů bych pro nejúčinnější separaci nukleových kyselin doporučila kombinaci dvou metod, těmi jsou iontově výměnná chromatografie s metodou izolace pomocí magnetických částic, která je současně velmi oblíbená. V prvním kroku izolace bych aplikovala iontově výměnnou chromatografii používanou jako první krok purifikace nukleových kyselin od nežádoucích látek (proteiny atd.) vyskytujících se v analytu na začátku separace. Získanou purifikovanou DNA aplikujeme do roztoku s magnetickými částicemi, jejíž výtěžnost je z důvodu přečištěného roztoku DNA zvýšena. Metoda magnetických částic je rychlá a sofistikovaná metoda, při níž není třeba pracovat se škodlivými látkami jako je například u fenol - chloroformové reakce.

Druhá část práce je v menší míře věnována vlastní izolaci DNA u druhu *Cannabis sativa* z různých matric květu, semena a výlisku u dvou odlišných navážek 20 mg a 100 mg. Pro zjištění koncentrace izolované DNA byla použita spektrometrické měření pomocí přístroje PicoDrop. Celistvost a kvalita izolátu byla porovnávána na jednotlivých agarózových gelech s odlišnou navázkou vzorků. Porovnávání bylo provedeno na základě kompaktnosti proužku, přičemž byla určena prokazatelně vyšší kvalita vzorků s navázkou 20 mg pro následující molekulární diagnostiky.

## 7 SEZNAM ZKRATEK

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

RNAi – interferující RNA

siRNA – malá interferující RNA

A – adenin

T – thymin

C – cytosin

G – guanin

U – uracil

rRNA – ribozomální RNA

mRNA – mediátorová RNA

tRNA – transferová RNA

cpDNA – chloroplastová DNA

mtDNA – mitochondriální DNA

bp – páru bází

IEC – iontově výměnná chromatografie

HILIC – hydrofilní interakční chromatografie

HIC – hydrofobní interakční chromatografie

PCR – polymerázová řetězová reakce

THC - tetrahydrocannabinol

MPs – magnetizovatelné nanočástice

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obr. 1:** Purinové a pyrimidinové báze nukleových kyselin, párování mezi jednotlivými bázemi

**Obr. 2:** Pravotočivá dvoušroubice DNA dle modelu Watsona a Cricka

**Obr. 3:** Prostorové uspořádání DNA konformací

**Obr. 4:** Vsolování a vysolování

**Obr. 5:** Princip iontové výměnné chromatografie

**Obr. 6:** Princip izolace DNA pomocí silika kolon

**Obr. 7:** Stavba magnetické částice

**Obr. 8:** Vzorčky *Cannabis sativa* pro izolaci DNA

**Obr. 9:** Vizualizace vyizolovaných fragmentů DNA u navážky 20 mg

**Obr. 10:** Vizualizace vyizolovaných fragmentů DNA u navážky 100 mg

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALPERT, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*. 1990, 499: 177-196. ISSN: 1873-3778

BALTIMORE, D. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature*. 1970-6-27, 226 (5252). ISSN:1476-4687

BOERSEMA, P. J., MOHAMMED S. a HECK A. J. R.. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, 391(1): 151-159. ISSN: 1618-2650

CADY, N. C., STELICK S. a BATT C. A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003, 19(1): 59-66. ISSN: 0956-5663

CRAIG, N. L. *Molecular biology: principles of genome function*. Second edition. Great Britain: Oxford University Press, 2014, xxxi, 912 pages. ISBN 01-996-5857-9.

DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*. 2005, 278(2): 274-288.

DESHMUKH, V. P., THAKARE P. V., CHAUDHARI U. S. a GAWANDE P. A., A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Arnot. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2007, 10(3). ISSN: 0717-3458

DING, L.-W., SUN Q.-Y., WANG Z.-Y., SUN Y.-B. a XU Z.-F.. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 2008, 374(2): 426-428. ISSN: 1096-0309

DIXON, M.; WEBB, E. C., Enzyme fractionation by salting-out: a theoretical note. *Adv. Protein Chem*, 1961, 16: 197-219. ISSN: 0065-3233

DOPSON, J., YIU a S. C. MCBAIN. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2008, 3. ISSN: 1178-2013

EDSALL, J. T. George Scatchard, John G. Kirkwood, and the electrical interactions of amino acids and proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1982, 7(11): 414-416. ISSN: 0968-0004

EHRlich, H., DEMADIS K. D., POKROVSKY O. S. a KOUTSOUKOS P. G.. Modern Views on Desilicification: Biosilica and Abiotic Silica Dissolution in Natural and Artificial Environments. *Chemical Reviews*. 2010-08-11, 110(8): 4656-4689. ISSN :1520-6890

FIRE, A., XU S., MONTGOMERY M. K., KOSTAS S. A., DRIVER S. E. a MELLO C. C.. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998, 39(6669): 806-811. ISSN: 1476-4687

GUO, Y. a GAIKI S.. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005,1074(1-2): 71-80.

GUPTA, A. K. a GUPTA M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005, 26(18): 3995-4021. ISSN: 0142-9612

HAMILTON, A. J. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science*. 1999, 286(5441): 950-952.

HAO, Zhigang, Baiming XIAO a Naidong WENG. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science*. 2008, 31(9): 1449-1464.

HARBER, M.J. a MADDOCKS J.L.. Separation of purine analogues from nucleic acid derivatives on a thin layer of ECTEOLA-cellulose. *Journal of Chromatography A*. 1974, 101(1): 231-234. ISSN: 1615-9314

HEUSER, R. *Amorphous precipitated silica and method of preparation thereof*. U.S. Patent No 2,114,123, 1938.

HUDÁK, J. Chloroplasty - zelené organely. *Chloroplasty - zelené organely*. 2010, 3/2010. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/chloroplasty-zelene-organely.pdf>

HÚSKA, D., BALOUN, J., TRNKOVÁ, L., ADAM, V., KIZEK, R. – Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA (CHEMagazín, č.3, ročník XVIII, 2008, 14-15)

CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA A. E., MACDONALD R. J. a RUTTER W. J.. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979, 18(24): 5294-5299. ISSN: 1520-4995

CHOMCZYNSKI, SACCHI P. a N.. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987, 162(1):156-159. ISSN: 1096-0309

JANDERA, P.. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*. 2011, 692 (1-2): 1-25. ISSN: 0003-2670

JANEČKOVÁ, L., SOBOTNÍKOVÁ J., TESAŘOVÁ E. a BOSÁKOVÁ Z.. Využití moderních reverzních stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého pro analýzu bioaktivních peptidů. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, č. 104.

JANOCHOVÁ, J. *Izolace DNA: Výtěžnost a kvalita* [online]. Brno : Masarykova univerzita, 2009. 48 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.

KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 8070805862.

KLEIDEITER, G. a NORDMEIER E.. Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions. *Polymer*. 1999, 40(14): 4025-4033. ISSN: 0032-3861

KRISHNA, P., B. P. KENNEDY, D. M. WAISMAN, J. H. van de SANDE, J. D. MCGHEE, A. TRAVERS, R. D. FIRN, A. H. MARCEAU, Natalie NAUE a Ute CURTH. Are many Z-DNA binding proteins actually phospholipid-binding proteins?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990, 87(4): 133-149. ISSN :1091-6490

KUJAWSKI, W., WARSZAWSKI A., RATAJCZAK W., PORBSKI T., CAPAŁA W. a OSTROWSKA I.. Application of pervaporation and adsorption to the phenol removal from wastewater. *Separation and Purification Technology*. 2004, 4(2): 123-132.

KWON, J.-A. a A. RICH. Biological function of the vaccinia virus Z-DNA-binding protein E3L: Gene transactivation and antiapoptotic activity in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005,102(36): 12759-12764. ISSN: 1091-6490

LODISH, H.. *Molecular cell biology*. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2004, xxxiii, 973 s., 79 s. příl. ISBN 0-7167-4366-3.

LOOMIS, W.D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. s. 528.

MA, Z. a H. LIU. Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology*. 2007, 5(1-2): 1-10. ISSN: 1672-2515

MATOUSEK, J., T. PODZIMEK, P. POUCKOVA, J. STEHLIK, J. ŠKVOR, P. LIPOVOVA a J. MATOUSEK. Antitumor activity of apoptotic nuclease TBN1 from *L. esculentum*. *Neoplasma*. 2010, 4: 339-348.

MATZKE, M. A. a A. J. M. MATZKE. Planting the Seeds of a New Paradigm. *PLoS Biology*. 2004, 2(5). ISSN: 2079-7737

MELZAK, K. A., SHERWOOD C. S., TURNER R. F. B. a HAYNES C. A.. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996, 181(2): 635-644. ISSN: 1095-7103

MICHAUD, M., COGNAT V., DUCHÊNE A.-M., MARÉCHAL-DROUARD L., GRIENENBERGER J., WINTZ H., RUNEBERG-ROOS P., MARECHAL L., JEANNIN G., J. H. WEIL, GROTEWOLD E., CHAPPELL J. a A. KELLOGG E.. A global picture of tRNA genes in plant genomes. *The Plant Journal*. 2011, 66(1): 199-205. ISSN: 1365-313X

MIKEŠ, V. Základní pojmy z biochemie. MIKEŠ, V. *Základní pojmy z biochemie* [online]. 1997 [cit. 2015-03-16]. Dostupné z: [http://orion.chemi.muni.cz/zakladni\\_pojmy\\_z\\_biochemie/page0191.htm](http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0191.htm)

NASS, M. M. K. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS: I. Fixation and Electron Staining Reactions. *The Journal of Cell Biology*. 1963-12-01, 19(3): 593-611. ISSN: 1540-8140

NEČAS, Oldřich. *Obecná biologie: pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd. Praha: H, 2000, 554 s. ISBN 80-860-2246-3.

NEUE, U. D. Theory of peak capacity in gradient elution. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1079 (1-2): 153-161. ISSN: 1873-3778

OTOVÁ, B. a MIHALOVÁ R.. *Základy biologie a genetiky člověka*. 1. vyd. V Praze: Karolinum, 2012, 227 s. ISBN 978-802-4621-098.



PEREIRA, F., J. CARNEIRO, R. MATTHIESEN, B. VAN ASCH, N. PINTO, L. GUSMAO a A. AMORIM. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Research*. 2010-12-11, 38(22): 203-203. ISSN: 1362-4962

PLANK, C., U. SCHILLINGER, F. SCHERER, C. BERGEMANN, J.-S. RÉMY, F. KRÖTZ, M. ANTON, J. LAUSIER a J. ROSENECKER. The Magnetofection Method: Using Magnetic Force to Enhance Gene Delivery. *Biological Chemistry*. 2003-01-15

RAZIN, S., H. J. MOROWITZ a T. M. TERRY. Membrane subunits of *Mycoplasma laidlawii* and their assembly to membranelike structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1965, 54(1): 219-225. ISSN : 1091-6490

RICH, A. a ZHANG S. Timeline: Z-DNA. *Nature Reviews Genetics*. 2003, 4(7): 566-572. ISSN: 1471-0064

RIS, H. a W. PLAUT. ULTRASTRUCTURE OF DNA-CONTAINING AREAS IN THE CHLOROPLAST OF CHLAMYDOMONAS. *The Journal of Cell Biology*. 1962-06-01, 13(3): 383-391. ISSN: 1540-8140

SAFARIK, I., POSPISKOVA K., HORSKA K. a SAFARIKOVA M.. Potential of magnetically responsive (nano)biocomposites. *Soft Matter*. 2012, 8(20): 5407-. ISSN: 1744-684

SAIYED, Z. M., RAMCHAND C. N. a TELANG S. D. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2008-05-21, 20(20): 204153-. ISSN:1361-648X

SMALL, Hamish., Timothy S. STEVENS, William C. BAUMAN, AACC TECHNICAL a AACC TECHNICAL. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Analytical Chemistry*. 1975,47(11): 1801-1809. ISSN: 1520-6882

SNUSTAD, D a M. J. SIMMONS. *Genetika*. Vyd. 1. Editor Jiřina Relichov. Překlad Anna Matalov. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

TAN, S. CHEE a B. C. YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, 1-10 s. ISSN: 1110-7251

ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulrn biologie: Dl prv. 4. inovovan vyd. Brno :, 2006, 289 s. ISBN 80-902-5625-2.*

TEMIN, HOWARD M. a SATOSHI MIZUTANI. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature*. 1970-6-27, 226(5252):1211-1213. ISSN: 1476-4687

ŠVEC, F. Co dnes hbe kapalinovou chromatografi?. *Chemick listy*. Praha: Česk společnost chemick, 2009, . 103.

VOLKIN, E. a CARTER C. E.. The Preparation and Properties of Mammalian Ribonucleic Acids 1. *Journal of the American Chemical Society*. 1951, 73(4): 1516-1519. ISSN: 1520-5126

WATSON, J. CRICK et al. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 1953, 171.4356: 737-738. ISSN: 1476-4687

WIEDWALD, U. a ZIEMANN P.. Preparation, properties and applications of magnetic nanoparticles. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2010, 1: 21-23. ISSN: 2190-4286

WOLFE, K. H., W. H. LI a P. M. SHARP. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987, 84(24): 9054-9058. ISSN: 1091-6490

**Internetové zdroje:**

Izolace biomakromolekul. *Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT* [online]. [cit. 2015-03-16]. Dostupné z:<http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/skripta.pdf>

CÍDLOVÁ, Hana. Laboratorní technika. *Vysolování* [online]. 2006 [cit. 2015-03-1]. Dostupné z:[http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni\\_metody/vysolovani.pdf](http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni_metody/vysolovani.pdf)