# 5. DNS-, RNS-, fehérjeizolálási technikák

A makromolekulák közül molekuláris biológiában leggyakrabban a nukleinsavak és a fehérjék vizsgálatával foglalkoznak, ezért mi is az ezek izolálásához szükséges lépéseket ismertetjük. Hasonlítsuk össze stabilitási szempontból a DNS-, az RNS- és a fehérjemolekulákat.

 Ha a fizikai behatásokra, pl. a **nyíróerővel** szembeni stabilitásuk alapján nézzük, akkor a DNS (elsősorban a **genomi DNS**) óriási hossza miatt igen **sérülékeny**, könnyen elszakad, míg az RNS- és a fehérjemolekulákra ez egyáltalán nem jellemző. Ha azt vizsgáljuk, hogy ugyanezek az anyagok mennyire érzékenyek különböző, az izolálási technikák során használt **vegyszerek** (erős sók, szerves oldószerek, detergensek stb.) hatására, akkor egészen más képet kapunk: A DNS szerkezete túléli a vegyszerek károsító hatását, az RNS szerkezete már kicsit érzékenyebb, de a **fehérjék** kimondottan **érzékenyek** az említett vegyszerekre, melyek gyakran **irreverzibilis károsodást** okozhatnak szerkezetükben. Elsődleges szerkezetük ugyan megmarad, de másodlagos, harmadlagos szerkezetük károsodása funkcióvesztéshez vezethet. (Nukleinsavak esetén a másodlagos és harmadlagos szerkezet károsodása többnyire reverzibilis, nem vezet funkcióvesztéshez; az elsődleges szerkezet tárolja az információt.)

 Még egy tulajdonságot kell összehasonlítanunk, az ún. **biológiai érzékenységet** (vagy stabilitást). A sejtek lízise során felszabadulnak olyan enzimek, amelyek az említett makromolekulákat bontják (dezoxiribonukleázok, ribonukleázok, proteázok). Mennyiségük, stabilitásuk, reaktivitásuk és az izolálás során használt vegyszerekkel szembeni ellenálló-képességük szabja meg azt, hogy az adott makromolekula mennyire tűnik érzékenynek az izolálás során. Mind a háromféle makromolekulánk érzékeny biológiai szempontból, de különböző mértékben. A dezoxiribonukleázok (**DN-ázok**) mennyisége viszonylag csekély, többnyire **kétértékű kationokat** igényelnek működésükhöz. Ha ezeket a kationokat valamilyen kelátorral (pl. **EDTA**-val) kivonjuk a rendszerből, gátoljuk a DN-ázok működését. A **proteázok** esetében ez keményebb dió: többféle speciális **proteáz-inhibitort** kell adnunk a rendszerhez és alacsony hőmérsékleten (4 °C) dolgoznunk, hogy a fehérjedegradációt elkerüljük. A ribonukleázok (**RN-ázok**) igen stabil enzimek, ionokat nem igényelnek működésükhöz, vegyszerekkel és még a magas hőmérséklettel szemben is igen ellenállóak. Csak speciális, ún. **kaotróp ionokat** (5-1. ábra) tartalmazó vegyszerekkel semlegesíthetőek. (A kaotróp anyagok – szemben az ún. kozmotrópokkal – megbontják a makromolekulákon belüli másodlagos kötőerőket, ezáltal tönkreteszik azok natív térbeli szerkezetét). A fentiekből következik, hogy biológiailag a DNS a legkevésbé, az RNS a leginkább érzékeny makromolekula.

5-1. ábra

## 5.1. Nukleinsavak izolálása

Nukleinsavak izolálására többféle technika létezik, mindegyikben közös, hogy el kell távolítani a más jellegű makromolekulákat (szénhidrátokat, lipideket, és legfőképp a fehérjéket). A sejtlízis során **gátolni kell** a nukleinsavakat bontó enzimek (**nukleázok**) működését, majd a nukleinsavakat ki kell nyerni a törmelékből.

 A hagyományos módszerek számos, az emberi egészségre is káros vegyszer (pl. **fenol**, **kloroform** stb.) használatát igénylik. E módszerek szerint a sejtlízist követően **extrakcióval** távolítják el a szükségtelen makromolekulákat, majd a nukleisavakat kicsapják, centrifugálják, mossák, és szárítás után vizes oldatban oldják. A folyamat meglehetősen időigényes, de megfelelő precizitással tiszta nukleinsavakat kaphatunk.

 Az újabb módszerek a nukleinsavaknak azt a tulajdonságát használják ki, hogy kaotróp ionokat tartalmazó sók jelenlétében a nukleinsavak igen erősen kötődnek az **üveg felületére**. Ha ilyen sókat használnak sejtlíziskor, a nukleinsavakat **szilikagyöngyökön** vagy **szilikamembránon** specifikusan ki lehet kötni (5-2. ábra). (A pontos mechanizmus még nem teljesen ismert, a feltételezett modell szerint a kaotróp sók megbontják a vízmolekulák közti H-híd kötést, a hidrátburkát vesztett nukleinsav vagy hidrogén-híd kötéssel, vagy a deprotonálódott szilikáthoz kötődő kationokon keresztül tud kötni a Si-OH-hoz.) A szilikamembránról mosás után igen tiszta nukleinsav eluálható le vízzel, vagy vizes pufferrel. Az ionerősség és a kémhatás változtatásával specifikálni lehet, hogy a szilikamembránhoz inkább DNS, vagy inkább RNS kötődjön, ezért ezek külön is izolálhatóak, ha más-más körülményeket teremtünk. A szilikamembránnal történő nukleinsav-izolálás gyors és egyszerű. Ha ezt a technikát választjuk, akkor érdemes valamely biotechnológiai cég által elkészített, az izoláláshoz szükséges felszerelés- és vegyszercsomagot („**kitet**”) megvásárolnunk. A szilikagyöngy vagy szilikamembrán többnyire egy lyukacsos aljú, műanyag hengerbe kerül (5-3. ábra), amelyen centrifugálással, vagy vákuummal tudjuk átpréselni a folyadékot. Itt történik a nukleinsavak megkötése és mosása, és innen történik meg az elúció is.

5-2. ábra

http://www.cultek.com/inf/otros/perfil-proveedores/Perfil%20Macherey%20Nagel/Official\_Note\_-\_Silica\_membrane\_vs\_Anion\_Exchange\_20090715.pdf

2013.09.02.

5-3. ábra

www.promega.com

2013.09.02.

 Szilikamembrán vagy szilikagyöngy alternatívájaként árulnak anioncserélő (pozitívan töltött) oszlopokkal működő nukleinsav-tisztító kiteket is. Elsősorban nagyobb mennyiségű, nagy tisztaságú nukleinsavak kinyerésére használják őket.

 Különböző (elsősorban anyagi) szempontok miatt előfordulhat, hogy inkább a hagyományos módszerekkel történő nukleinsav-izolálási technikákat használjuk. A következőkben ezeket a módszereket ismertetjük.

### 5.1.1. Genomi DNS-izolálás

Genomi DNS izolálásánál több dologra kell ügyelnünk. Első, hogy a DNS minél kevésbé törjön össze. Érdemes a minta mérése során **széles szájú pipettahegyeket** használni, és a mintát minél kevesebb rázatásnak kitenni. Nagyon fontos követelmény a DN-áz-mentesség biztosítása. Ezt megfelelő összetételű pufferrel biztosítjuk. Az izolálás végén megfelelően tiszta DNS-t kell kapjunk (a tisztaság befolyásolhatja a DNS későbbi felhasználhatóságát).

 A DNS-t izolálhatjuk szövetből, sejtkultúrából, vérből. Az első esetben a szövetet valamilyen módon össze kell törnünk, homogenizálnunk kell. Ez történhet szoros dugattyút tartalmazó ún. **potter**, elektromos, apró késeket tartalmazó **homogenizátor**, vagy **dörzsmozsár** segítségével. A sejtek lízise „lízis puffer” hozzáadásával történik, mely általában tartalmaz Tris-t, kelátort (EDTA), detergenst (SDS) valamint RN-ázt. A DNS a sejtmagban fehérjékhez kötődik, ezeket el kell távolítanunk róla, ezért a homogenizált mintát 100μg/ml **proteináz K** kezelésnek vetjük alá (50 °C, 3 óra). A további tisztítást alapvetően két módon valósíthatjuk meg:

1. **Fenolos extrakcióval**: A mintát azonos térfogatú fenollal óvatosan összerázzuk, majd az ülepítés után a felső, a DNS-t tartalmazó víztiszta fázist új centrifugacsőbe mérjük át. A procedúrát többször ismételhetjük mindaddig, amíg centrifugálás után a fenolos fázis tetején már nem látunk fehér csapadékot. Ezután vizes fázisban maradó kevés fenolt kloroformos extrakcióval távolítjuk el.

2. **Gradiens centrifugálással**: Ultracentrifugában, CsCl gradiens segítségével a lehető legkíméletesebben tudjuk elválasztani egymástól a genomi DNS-t és a szennyeződéseket. A módszer azonban igen időigényes, és igen drága műszerezettséget (ultracentrifuga) igényel.

A tiszta DNS-t vagy **dialízissel**, vagy **alkoholos kicsapással** kaphatjuk meg. A 70% etanolt, vagy 50% izopropanolt és megfelelően magas ionkoncentrációt tartalmazó oldatban a DNS kicsapódik, amit vagy egy pálcikára tekerve, vagy centrifugálás során tudunk elválasztani az oldattól (5-4. ábra).

5-4. ábra

### 5.1.2. Plazmid izolálás

Gyakran van szükség arra, hogy baktériumokból genomi DNS-től mentes extrakromoszomális DNS-t (plazmidot) izoláljunk. A médiumától megszabadított, felszuszpendált sejteket legtöbbször **lúgos sejtlízissel** tárjuk fel. A feltáró oldatban NaOH-on kívül SDS is található, mely a fehérjék hidrofób részeihez köt. A lúg hatására a DNS kettős szála is felnyílik. A feltárás után egy **semlegesítési reakció** következik: tömény kálium-acetátot mérünk a lizátumhoz. A gyors semlegesítődés hatására a plazmid DNS újra párosodik, megtalálja a komplementer szálat, a genomi DNS viszont csak részben. Ennek eredményeképp a genomi DNS-molekulák egymással és a hozzájuk kapcsolódó fehérjékkel óriási komplexeket alkotnak. **Káliumionok** precipitálják az SDS-t, ami **csapadékba** viszi a megkötött fehérjéket és a hozzájuk kötött genomi DNS-t. A csapadékot centrifugálással el tudjuk távolítani, a víztiszta felülúszóból (esetleges fenolos/kloroformos extrakciók után) pedig alkohollal kicsapható a plazmid DNS.

 Ha sok különböző mintából származó plazmidot izolálunk egyszerre, érdemes az itt leírt módszer helyett szilikamembrán vagy szilikagyöngy segítségével működő plazmid-izoláló kitet használni, mert jelentős idő és munka takarítható meg vele (5-5. ábra).

5-5. ábra

http://www.taq-dna.com/rich\_files/bilder/DNA\_RNA\_purification/Plasmid\_DNA\_Purification\_isolation\_extraction\_Miniprep\_Kit.JPG

2013.09.02.

### 5.1.3. DNS-fragment izolálása

Ha egy gélen elválasztott DNS-szakaszra van szükségünk a további kísérletekhez, akkor ezt a fragmentet izolálni kell a gélből. Az izolálásra több módszer is lehetséges, itt ezeket fogjuk ismertetni. Nem csak DNS, hanem RNS gélből való izolálására is alkalmasak ezek a módszerek, de erre sokkal ritkábban kerül sor.

5.1.3.1. Elektroelúció

Az **agarózgélben megfuttatott** fragment alá szikével egy bevágást ejtünk, a bevágásba **DEAE**-(dietil-aminoetil)-**cellulóz** papírt helyezünk. Ezután az elektroforézist folytatjuk addig, amíg a DNS-fragment ráfut a papírra. A papírt kivesszük a zsebből és mikrocentrifuga-csőbe helyezzük. Először **magas sókoncentrációjú** pufferrel mossuk, majd **alacsony sókoncentrációjú** pufferrel eluáljuk a DNS-t a papírról. További lépések (fenolos extrakció, alkoholos kicsapás) szükségesek a DNS-fragment tisztításához és koncentrálásához.

 DEAE cellulóz helyett használhatunk **dialízismembránt** is. Ilyenkor az egész fragmentet ki kell vágni a gélből, amit azután elektforézis-puffert tartalmazó dialíziszsákba zárunk. Az elektroforézis során a DNS kivándorol a gélből, de a dialízismembrán pórusain nagy mérete miatt nem tud áthatolni. Az elektroforézis végeztével a membránban lévő folyadékot egyszerűen ki kell pipettázni a dialíziszsákból, a DNS a már ismert módokon tisztítható, szükség esetén kicsapható.

 Ma már kaphatóak direkt az elektroelúció elősegítésére tervezett **speciális készülékek** is. Ezek segítségével a megfuttatott gélből egyszerre az összes DNS-t (vagy RNS-t) frakciónként eluálni lehet, utólag kiválasztva a számunkra fontosakat. A készülékek részletes működési elvét itt most nem ismertetnénk.

5.1.3.2. Alacsony olvadáspontú (low melting point) agaróz alkalmazása

Fragmentizolálás céljára lehet vásárolni olyan **speciális agarózt**, mely már alacsonyabb hőmérsékleten (~65 °C) megolvad. A futtatás után az agarózból kivágjuk azt a részt, ahol az izolálni kívánt fragment található, TE (20 mMTris, 1 mM EDTA, pH:8) puffert mérünk rá, majd mikrocentrifuga csőben felolvasztjuk (65 °C-on). A nukleinsavat fenolos/kloroformos extrakcióval tudjuk tisztítani.

Ha a gélben lévő poliszacharidoktól szeretnénk könnyen megszabadulni, érdemes **agaráz** enzimmel azokat feldarabolni. Ilyenkor a kivágott géldarabot az agaráz enzim pufferével több lépésben ekvilibráljuk, majd a géldarab megolvasztása után azt 42 °C-ra lehűtjük (itt még nem fog megszilárdulni az agaróz), majd agaráz enzimmel órákon át emésztjük. Az emésztés után jöhet a szokásos extrakciós tisztítás. A módszer hátránya, hogy nagyon időigényes, és a speciális, alacsony olvadáspontú agaróz is igen drága.

5.1.3.3. Olvasztás kaotróp sókkal

Ismert jelenség, hogy kaotróp tulajdonságú sók ionjai tönkreteszik a polimerek másodlagos szerkezetét. Ezt teszik a poliszacharidokkal is. Ennek következtében az agaróz gél már 55 °C-on megolvad. A kiszabaduló nukleinsavak kaotróp ionok oldatában kötnek az olvasztás után hozzáadott üveggyöngyökhöz. A gyöngyök centrifugával gyorsan ülepíthetőek. Alkoholos pufferekkel a megkötődött nukleinsavak moshatóak, alacsony sókoncentrációjú, alkoholmentes pufferekkel pedig eluálhatóak a gyöngyökről.

5.1.3.4. Préselés a gélből

Ez egy igen egyszerű elven működő technika. Lényege, hogy valamilyen piciny lyukon keresztül a gélből a folyadékot a benne lévő nukleinsavakkal együtt kipréseljük. Alkalmas erre egy injekciós fecskendő igen pici lyukú tűvel, vagy porózus műanyag lapon keresztül történő centrifugálás. Az oldatból a nukleinsavat a már ismert technikák egyikével (extrahálás-kicsapás, vagy kaotróp ionokkal szilikagélhez kötés) tisztíthatjuk.

### 5.1.4. RNS-izolálás

Már említettük, hogy igen sokféle RN-áz létezik a sejtekben, vannak közöttük nagyon stabil enzimek. A bőrünkről, hajunkból folyamatosan kerülnek elhalt sejtek a környezetünkbe, nem túlzás azt állítani, hogy a belőlük kiszabaduló RN-ázok mindenütt ott vannak. RNS-izolálásnál tehát elsődleges szempont, hogy megakadályozzuk az RN-ázok hozzáférését a mintánkhoz.

Az izolálást **nagyon tiszta körülmények között**, gyorsan, és lehetőleg minél alacsonyabb hőfokon (jégben hűtve) végezzük. Előre letisztított laborasztal és pipetták, tiszta kesztyű, RN-áz-mentes oldatok és műanyag áru elengedhetetlen előfeltételek. Az RNS-munkához használt oldatainkat elkészítés után 1/1000-ed térfogat dietil-pirokarbonáttal (**DEPC**) rázzuk össze, mert az tönkreteszi az RN-ázt. A DEPC-et 15 perces autoklávozással tudjuk elbontani. A manapság kapható, laboratóriumban használt víztisztító készülékek többnyire olyan tisztaságú vizet szolgáltatnak, amelyet szükségtelen további kezelésnek (pl. DEPC) alávetni.

Hagyományosan a sejteket kaotróp sókat (**guanidin-izotiocianát**, guanidin-hidroklorid) tartalmazó lizáló pufferrel tárjuk fel, mely tartalmaz **detergenst** (nátrium-szarkozilát) és diszulfid-hidakat bontó **redukálószert** (β-merkaptoetanol) is. A homogenizálás után centrifugálással eltávolítjuk az esetleges sejttörmeléket, majd magas sókoncentrációjú (2M nátrium-acetát, pH:4) pufferrel **savanyítjuk** az oldatot. A szokásos extraháláshoz savas kémhatású (pH:~4,5) fenolt használunk, az extrahálást többször ismételhetjük. A kicsapást +1 térfogat izopropanollal (alacsony pH-n a DNS nem csapódik ki), a mosást 70%-os etanollal végezzük. Száradást követően az RNS-t DEPC-cel kezelt vízbe vesszük fel. Ha csak **mRNS-ekre** van szükségünk, az izolálást követően **oligo-dT oszlopkromatográfiával** tudjuk azokat kinyerni. Ha totális RNS-t izolálunk, annak épségét gélelektroforézissel tudjuk ellenőrizni (elsősorban a riboszomális RNS-eket jelentő, jól elkülönült, két vastagabb csík alapján, 5-6. ábra).

5-6. ábra

http://www.geochemicaltransactions.com/content/7/1/3/figure/F3?highres=y

2013.09.02.

Manapság már kapni olyan vegyszerkeverékeket (*Trizol*, *Tri* stb.), amelyben a kaotróp ionoktól kezdve a fenolon át a pufferekig minden megtalálható. Ha ezekben homogenizáljuk a mintánkat, utána egy egyszerű kloroformos extrakcióval külön tudjuk választani az RNS-t tartalmazó vizes fázist, amiből a szokásos módon (izopropanollal, etanollal) csaphatjuk ki az RNS-t.

 Egyre elterjedtebbek az RNS-izoláló kitek is. Ezek az RNS szilikagél, illetve anioncserélő-oszlop iránti affinitását használják ki.

## 5.2. Fehérjék izolálása

Fehérjéket a **fiziológiás** körülményekhez jobban ragaszkodó technikákkal szoktak izolálni, mert érzékenyek a nagyobb sókoncentráció- és pH-változásokra, vagy az oldhatósági körülmények megváltozására. Egy tipikus izoláló pufferben valamilyen pufferhatású anyag (foszfát, Tris), kelátor (EDTA, EGTA), megfelelő sókoncentráció, detergensek (SDS, Tween-20) és proteáz-inhibitorok (fenilmetil-szulfonil-fluorid, benzamidin, pepsztatin) találhatóak. A sejtek lízise hidegen zajlik, hogy a fehérjék degradációját minimalizáljuk. A homogenizátumból azután igen változatos módszerekkel választhatjuk el vagy tisztíthatjuk a szükséges fehérjéket (3. fejezet).