

ANALIZA I IZOLACIJA SINTETSKIH OLIGONUKLEOTIDA

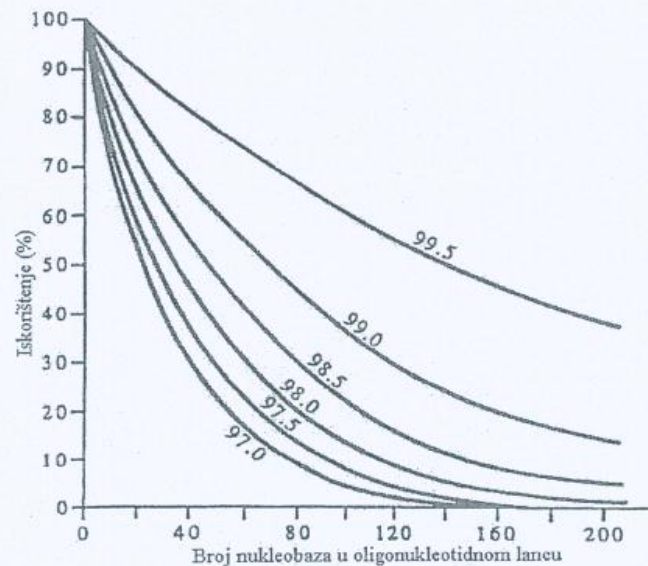
Prof. dr. sc. Ivan Habuš

5.8. Analiza i izolacija sintetskih oligonukleotida (DNA) visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom (HPLC)

Uvod

Sintetski oligonukleotidi (DNA) sastavni su dio genetičkog materijala svake stanice, te se kao takvi intenzivno rabe u laboratorijskim manipulacijama nukleinskim kiselinama u kemijskim, biokemijskim, molekularno-biološkim, molekularno-medicinskim, forenzičnim i DNA-dijagnostičkim laboratorijima. Njihova primjena seže od hibridizacijskih proba, početnica za DNA sekvenciranje i PCR (*polymerase chain reaction*), mutacijskim studijama, RFLP-analizama bioloških populacija, DNA-dijagnostici do *antisens*-terapeutika. Njihova sinteza na čvrstom nosaču (npr. *controlled pore glass beads*) na kojem se gradi rastući lanac željene sekvence oligonukleotida provodi se kao niz reakcija u kojima se na kolonu postepeno dodaju nukleotidi zaštićeni dimetoksitritilnom skupinom – DMT na 5'-hidroksi (5'-OH) skupini u deoksiribozi.

Da bi se zadovoljile sve brže rastuće potrebe za sintetskim oligonukleotidima, dizajnirani su *state-of the-art* automatizirani sintetizeri za sintezu DNA na čvrstom nosaču na kojima je moguće sintetizirati DNA u količinama od 0.05 do nekoliko stotina μ molova DNA. Takvi instrumenti operiraju visokoučinkovitim kemijskim postupcima ($\geq 99\%$ -tnim kemijskim iskorištenjima svakog pojedinog stupnja u sintezi DNA) uz mogućnost istovremene sinteze više raznovrsnih sekvenci DNA. Tako visoka učinkovitost u kemijskoj sintezi bila je ostvariva uz prateći tehnološki razvoj koji je omogućio proizvodnju kvalitetnijih automatiziranih DNA sintetizera. Nažalost, u sniženju iskorištenja u sintezi oligonukleotida također doprinosi i reakcija depurinacije u kiselom mediju, što omogućuje naknadnu hidrolizu oligonukleotidnog lanca u bazičnom mediju, a rezultat je nastajanje oligonukleotida kraćih lanaca. Količina takvih kraćih oligonukleotida prisutna u smjesi s oligonukleotidom duljine lanca i sekvence koji smo željeli sintetizirati proporcionalno raste s duljinom oligonukleotidnog lanca i negativno utječe na iskorištenje produkta kako je prikazano na slici 1.

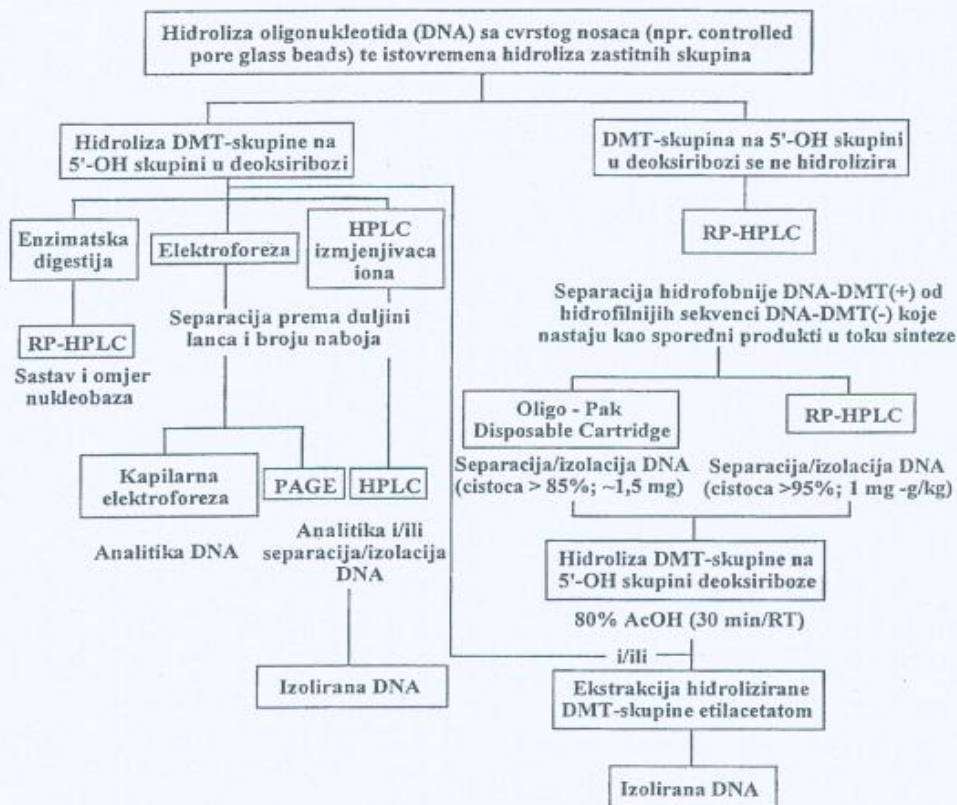


Slika 1. Ovisnost iskorištenja (%) u sintezi oligonukleotida o broju nukleobaza u oligonukleotidnom lancu i efikasnosti (%) kemijske sinteze u produljenju oligonukleotidnog lanca.

U nekim aplikacijama DNA, kao npr. mutacijskim studijama, rendgenskoj kristalografskoj analizi, postupci analize i separacije/izolacije produkta su neophodno potrebni. Tradicionalno, za takve svrhe korištena je poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE). Unatoč visokoj rezoluciji u separaciji koja se postiže primjenom elektroforeze, metoda ima i svojih nedostataka. Post-elektroforezna vizualizacija DNA često zahtijeva korištenje tehnike radioaktivnog obilježavanja ili bojenja da bi se povećala osjetljivost detekcije naročito kod niskih koncentracija DNA, a kvantifikaciju je moguće provesti tek uz uporabu uređaja za skeniranje. Nadalje, izolacija produkta podrazumijeva post-elektroforeznu ekstrakciju iz gela što često smanjuje iskorištenje na produktu, a ekstrahirani produkt često sadrži i sastojke gel-matriksa koji mogu imati inhibirajuće efekte u *in vitro* eksperimentima. Također, gel-elektroforezom nemoguće je separirati/izolirati multimiligramske do gramske količine DNA, koje je često potrebno izolirati za biološka testiranja.

Visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) opće je prihvaćena tehnika u separaciji, kvantifikaciji i izolaciji sintetske DNA, također i kao metoda koja je uspjela riješiti probleme asocirane s gel-elektroforezom, a posebno kada se radi s većim – multigramskim i kilogramskim količinama DNA. Kapilarna elektroforeza, također, se sve više rabi u separaciji i kvantifikaciji DNA. Kombinacija HPLC, CE i PAGE omogućuje nam respektabilnu lepezu analitičkih i preparativnih tehnika u analizi i separaciji/izolaciji sintetske DNA. Kao što je prikazano na slici 2,

neke ili sve od navedenih tehnika mogu se koristiti u različitim stupnjevima post-sintetske obrade DNA.



Slika 2. Shema postupaka u analizi i separaciji/izolaciji sintetskih oligonukleotida (DNA).

5.8.1. Post-sintetska obrada oligonukleotida u svrhu separacije/izolacije visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom (HPLC)

5.8.1.1. Hidroliza oligonukleotida sa čvrstog nosača i zaštitnih skupina

Po završetku sinteze oligonukleotida, DNA je potrebno hidrolizirati sa čvrstog nosača (npr. *controlled pore glass beads*). Zaštitne skupine na nukleobazama i fosfatnim podjedinicama se istovremeno kompletno hidroliziraju.

Materijali i metode

1. Prenijeti čvrsti nosač na kojem je vezan sintetizirani oligonukleotid u plastičnu epruvetu s čepom volumena 2,5 mL.
2. Dodati 1-2,0 mL svježe koncentrirane otopine amonijaka (koja se čuva u frižideru na +4°C) za sintezu u području $\leq 1,0 \mu\text{mola}$. Provjeriti da je epruveta dobro zčepljena. Korištenje koncentrirane otopine amonijaka neophodno je potrebno da bi se osigurala kompletna hidroliza oligonukleotida sa nosača i zaštitnih skupina.
3. Deprotekcija oligonukleotida sintetiziranog standardnim fosfodiesterskim postupkom postiže se grijanjem otopine pri 55°C/5 sati ili pri sobnoj temperaturi 24 sata.
4. Prenijeti supernatant u kojem se nalazi DNA u novu epruvetu (2,5 mL) i upariti do suha pri sobnoj temperaturi u aparatu za vakuum uparavanje. Suhi ostatak sadrži DNA spremnu za analizu i separaciju/izolaciju.

5.8.1.2. Procjena iskorištenja u sintezi oligonukleotida (DNA)

Procjena iskorištenja u sintezi DNA (produkt sadrži DNA željene sekvence kontaminiranu svim nečistoćama akumuliranih tokom sinteze DNA) može se odrediti spektrofotometrijski slijedećim postupkom.

Materijali i metode

1. Otopiti suhi ostatak nakon uparavanja u 1,0 mL destilirane vode.
2. Alikvotni dio otopine pod 1. razrijediti destiliranom vodom na slijedeći način da bi se dobila koncentracija DNA potrebna za apsorpcijsko očitavanje unutar linearnog područja spektrofotometra:
0,2 μmolna sinteza: 10,0 μL otopine DNA + 990,0 μL destilirane vode;
1,0 μmolna sinteza: 5,0 μL otopine DNA + 995,0 μL destilirane vode.
3. Očitati apsorpciju kod A_{260} , čistu destiliranu vodu koristiti kao standard.
4. Izračunati totalni broj A_{260} apsorpcijskih jedinica na slijedeći način:
 $A_{260}U$ za 0,2 μmolnu sintezu: Apsorpcija X 100;
 $A_{260}U$ za 1,0 μmolnu sintezu: Apsorpcija X 200;
1 $A_{260}U = \sim 33 \mu\text{g}$ oligonukleotida (DNA).

5.8.1.3. Hidroliza dimetoksitritilne skupine (DMT) i njezina ekstrakcija nakon hidrolize oligonukleotida sa čvrstog nosača

Hidroliza DMT skupine sa 5'-OH skupine deoksiriboze može se učiniti automatski na DNA sintetizeru neposredno nakon što je sinteza DNA završena i dok je oligonukleotid na čvrstom nosaču. Taj postupak rabi se samo u slučaju ako se separacija/izolacija DNA provodi putem PAGE i/ili ionske-HPLC metode. Međutim, ako se izolacija/čišćenje DNA planira RP-HPLC metodom, DMT-skupina se neće uklanjati prije postupka izolacije već nakon što je taj postupak završen.

Materijali i metode

1. Osušeni uzorak DNA otopiti u 1,0 mL 80 % octene kiseline. Nakon 30 minutne inkubacije pri sobnoj temperaturi, uzorak DNA osušiti u aparatu za vakuum uparavanje pri sobnoj temperaturi.
2. Suhi ostatak otopiti u 300 μ L destilirane vode i na otopinu dodati 300 μ L etilacetata. Smjesu dobro promućkati i ostaviti da se slojevi odijele te etilacetatni sloj (površinski sloj) odstraniti. Ekstrakciju etilacetatom ponoviti još 2 x 300 μ L.
3. Vodeni sloj upariti do suha u aparatu za vakuum uparavanje pri sobnoj temperaturi i pristupiti separaciji/izolaciji DNA tehnikama PAGE i/ili HPLC na koloni sa ionskim izmjenjivačima.

5.8.2. Analitička – visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC)

5.8.2.1. Ionska-HPLC kromatografija

Uvod

Ionska-HPLC metoda pokazala se kao efikasna tehnika u analizi sintetskih oligonukleotida. Odjeljivanje oligonukleotida s hidroliziranom DMT-skupinom bazira se na interakciji negativno nabijenih fosfatnih podjedinica oligonukleotida s pozitivno nabijenim kationskim skupinama na ionskom izmjenjivaču. Ispiranje oligonukleotida sa kolone odvija se u skladu s veličinom oligonukleotidnog lanca a postiže se gradijentom pufera u kojem se povećava koncentracija iona. Razdvajanje komponenti smjese koja se analizira ovisi o izboru kolone, profilu gradijenta i dužini oligonukleotidnog lanca tj. broju fosfatnih podjedinica. Korištenjem visokoučinkovitih kolona sa ionskim izmjenjivačima moguće je postići odjeljivanje N od $N-1$ sekvence oligonukleotida. Usporedbom PAGE i HPLC metoda, HPLC je pokazao veću efikasnost jer omogućuje trenutno praćenje odjeljivanja oligonukleotida na koloni UV detektorom. Bojenje ili drugi oblici vizualizacije oligonukleotida nakon odjeljivanja što je kod PAGE neophodno potrebno da bi se vidjela efikasnost odjeljivanja u HPLC metodi nije potrebno. Visoka osjetljivost HPLC metode također je dovodi u prednost u odnosu na PAGE (minimalno 300 ng DNA moguće je analizirati, odnosno za kvalitetnu analizu dovoljno je injektirati 50 μ L uzorka koji sadrži minimalno 0,0002 A_{260} / μ L).

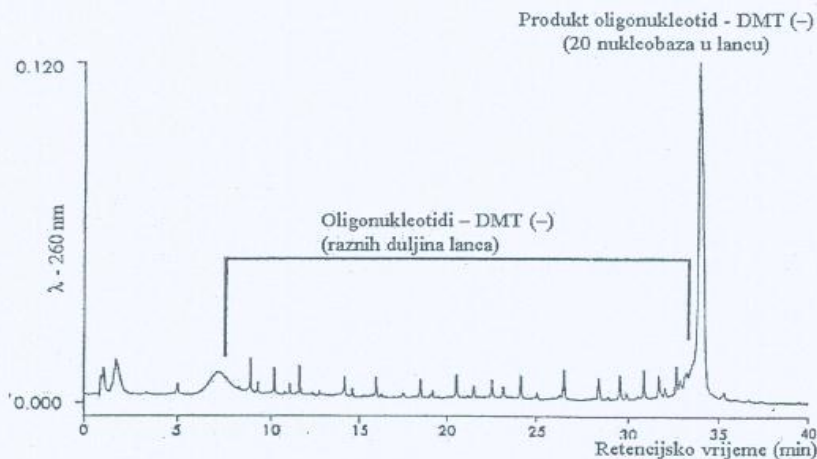
Puferi za kromatografiju

1. Destilirana voda.
2. Pufer A: 25 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0/acetonitril (90/10), (v/v).
3. Pufer B: 25 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1,0 M NaCl (ili 2,0 M NaCl), pH 8,0/acetonitril (90/10), (v/v).
4. 0.1 N fosfatna kiselina.

Priprava uzorka i kromatografija

Za brzu i efikasnu analizu smjese sintetskih oligonukleotida često se koriste visokoučinkovite kolone sa ionskim izmjenjivačima, kao npr. Waters Gen-Pak™ FAX (4,6 x 100 mm). Takva kolona je punjena neporoznim polimernim nosačem veličine čestica od 2,5 μm na kojima su vezane diaminoetilne (DEAE) skupine. Uzorci DNA koji se analiziraju ionskom kromatografijom moraju se prethodno detritilirati, tj. mora se provesti hidroliza DMT skupine. Uzorak DNA neposredno prije analize HPLC metodom potrebno je profiltrirati kroz filter veličine pora 0,22 μm . Kao i sa svakom HPLC kolonom bitno je održavanje kolone jer joj pravilna briga produžuje vijek trajanja, a naročito je to važno kod kolona sa ionskim izmjenjivačima. Dodatno pranje kolone sa 0,1 N fosfatnom kiselinom smanjuje mogućnost kontaminacije uzorka koji se analizira s prethodnim uzorkom, a fosfatna kiselina pri tome ne oštećuje polimerni nosač.

Analiza smjese detritiliranog sintetskog oligonukleotida (20 nukleobaza u oligonukleotidnom lancu) prikazana je na slici 3. Vjeruje se da takva smjesa oligonukleotida dobivena sintezom na automatiziranom DNA sintetizeru sadrži oligonukleotide gotovo identičnog omjera naboja i mase što može otežati analizu. Pretpostavlja se da će smjesa takvih oligonukleotida stvarati slične sekundarne konformacijske strukture koje će također i slično reagirati sa ionskim izmjenjivačem što bi moglo negativno utjecati na separaciju. Dodatkom 10% acetonitrila u sistem otapala za eluciju te zagrijavanjem kolone npr. na 80°C smanjuje se mogućnost takvih sekundarnih interakcija. Separacija na koloni sa ionskim izmjenjivačem omogućuje kvalitetno odjeljivanje oligonukleotida željene sekvence i duljine lanca (N) od oligonukleotida s kraćom duljinom lanca ($N-1$).



Slika 3. Ionski-HPLC kromatogram sintetskog oligonukleotida (DNA).

Uzorak: oligonukleotid-DMT(-) (20 nukleobaza u oligonukleotidnom lancu; fosfodiester; 45 µg);
Kolona: Waters Gen-Pak FAX (4,6 x 100 mm);
Pufer A: 25 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0; acetonitril (90/10);
Pufer B: Pufer A + 1,0 M NaCl;
Gradijent: 15 % B do 35 % B, 2 minute; 35 % B do 55 % B, 30 minuta; 55 % B, 10 minuta;
Protok: 0,75 mL/min;
Temperatura: 80°C.

5.8.2.2. HPLC kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC)

Uvod

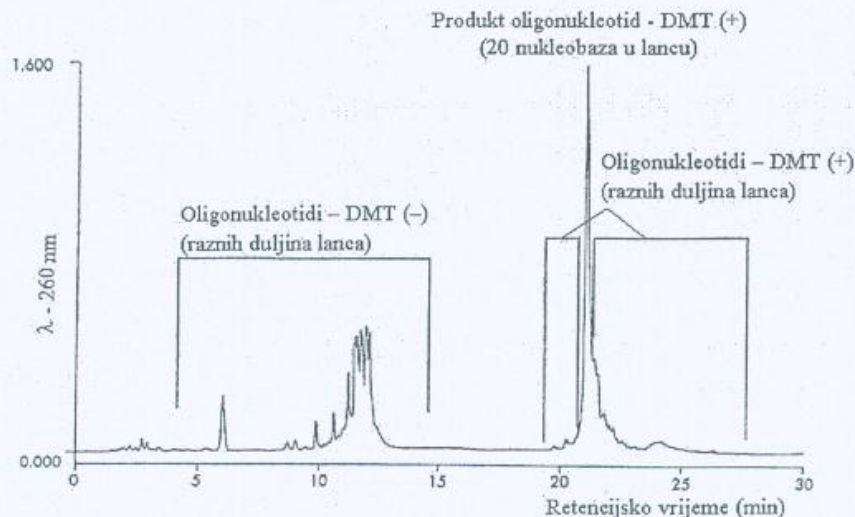
HPLC kromatografija obrnutih faza može se koristiti u analitičke svrhe za analizu reakcijske smjese sintetskih oligonukleotida i u analizi sastava nukleobaza dobivenih enzimatskom hidrolizom oligonukleotida, te za preparativne svrhe u smislu separacije/izolacije oligonukleotida. U analizi sirovih reakcijskih smjesa oligonukleotida ovom metodom nesmiye se neposredno nakon sinteze hidrolizirati DMT-skupina na oligonukleotidu. Analiza enzimatske hidrolize oligonukleotida potvrđuje prisutnost nukleobaza i njihov omjer u poznatoj sekvenci prema kojoj je oligonukleotid sintetiziran, dok analiza reakcijske smjese istog oligonukleotida nakon sinteze potvrđuje kvalitetu sinteze i iskorištenje na oligonukleotidu.

Puferi za kromatografiju

1. Destilirana voda
2. Pufer A: 100 mM Trietilamonijev acetat, pH 6,5/acetonitril (95/5), (v/v).
3. Pufer B: Acetonitril/destilirana voda (95/5), (v/v).

Priprava uzorka i kromatografija

Za brzu i efikasnu analizu visoke rezolucije smjese sintetskih oligonukleotida koristi se kolona ispunjena silikagelom obrnutih faza hidrofobnih karakteristika koje se dobivaju vezivanjem C₄, C₈, ili C₁₈ ugljikovodikovih lanaca na sferična zrnca silikagela promjera 5 µm (npr. Waters Delta-Pak™, C₁₈, 300 Å, 5 µm). Uzorci za analizu moraju biti profiltrirani kroz filter veličine pora 0,22 µm neposredno prije kromatografske analize. Na slici 4 prikazan je RP-HPLC kromatogram reakcijske smjese sinteze oligonukleotida (20 nukleotidnih baza u oligonukleotidnom lancu, fosfodiester).



Slika 4. RP-HPLC kromatogram sintetskog oligonukleotida (DNA).

Uzorak: Oligonukleotid-DMT(+) (20 nukleobaza u oligonukleotidnom lancu; fosfodiester);

Otapalo A: 0,1 M Trietilamonijev acetat, pH 6,5/acetonitril (95/5);

Otapalo B: Acetonitril/destilirana voda (95/5);

Gradijent: 0 % B do 40 % B, 25 minuta; 40 % B, 5 minuta;

Protok: 1,0 mL/min;

Temperatura: 30°C.

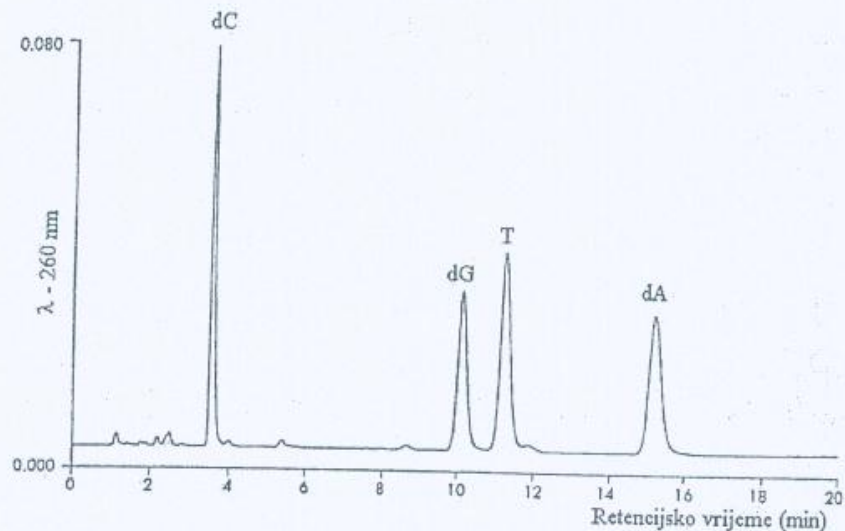
5.8.3. Priprava uzorka za analizu sastava nukleobaza dobivenih enzimatskom hidrolizom oligonukleotida (DNA) i kromatografija

Uvod

Određivanje sastava nukleobaza u izoliranom oligonukleotidu RP-HPLC kromatografijom koristi se da bi se dokazao sastav i omjer nukleobaza u sintetiziranom oligonukleotidu prema određenoj sekvenci. Tom metodom provjerava se kvaliteta sinteze, hidrolize oligonukleotida sa čvrstog nosača i zaštitnih skupina, separacije/izolacije oligonukleotida, te post-izolacijske obrade oligonukleotida (npr. hidroliza DMT-skupine). Na slici 5 prikazan je RP-HPLC kromatogram nukleobaza dobivenih enzimatskom hidrolizom oligonukleotida (16 nukleobaza u lancu oligonukleotida, fosfodiester).

Materijali i metode

1. Upariti do suha $\sim 0,5 A_{260}U$, RP-HPLC metodom očišćenog oligonukleotida kojem je hidrolizirana DMT-skupina, u aparatu za vakuum uparavanje.
2. Otopiti osušeni oligonukleotid u 50 mM Tris HCl, pH 8,0/10 mM $MgCl_2$ (50 μL).
3. Otopini oligonukleotida pod 2. dodati 3 U fosfodiesteraze iz zmijskog otrova i 3 U bakterijske alkalne fosfataze.
4. Inkubirati smjesu 6 sati pri 37°C.
5. Nakon inkubacije ultrafiltrirati smjesu kroz membranu (5000 dalton cutoff) te analizirati na RP-HPLC (5 μL).



Slika 5. RP-HPLC kromatogram enzimske hidrolize sintetskog oligonukleotida (DNA).

Uzorak: Oligonukleotid-DMT(-) (16 nukleobaza u oligonukleotidnom lancu; fosfodiester) hidroliziran fosfodiesterazom iz zmijskog otrova i bakterijskom alkalnom fosfatazom;

Kolona: Waters Nova-Pak, C18, 60 A, 4 μm (3,9 x 150 mm);

Otapalo A: 50 mM Natrijev fosfat, pH 5,7;

Otapalo B: Metanol/destilirana voda (95/5);

Gradient: 0 % B, 10 minuta; 0 % B do 30 % B, 20 minuta;

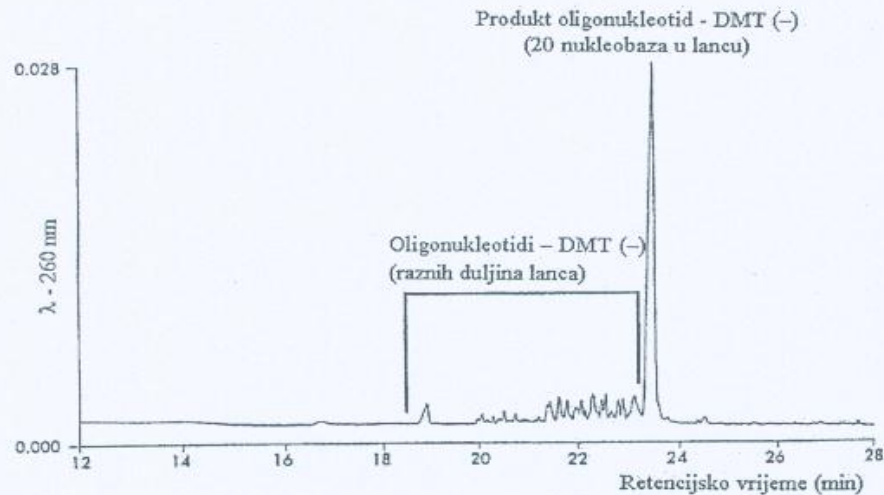
Protok: 1,0 mL/min;

Temperatura: 30°C.

5.8.4. Kapilarna elektroforeza (CE)

Uvod

Kapilarna elektroforeza je metoda koja se koristi kapilarom punjenom gelom u svrhu analize smjese sintetskih oligonukleotida (DNA). Osnova za njihovu separaciju zasniva se na principu da će u procesu elektroforeze oligonukleotidi različite veličine različito migrirati na gelu koji ispunjava kapilaru, tj. slično procesu koji se događa PAGE tehnikom. Dakle za vrijeme separacije, manje sekvence prisutne u smjesi putovati će brzo kroz kapilaru zbog njihovog malog Stokes-ovog radijusa, dok će veći oligonukleotid putovati sporije. Zbog malog internog radijusa kapilare (npr. $0,75 \mu\text{m}$) postiže se izvrsna temperaturna raspoređenost kroz matriks gela. Zbog toga CE separacije moguće je ostvariti kod viših napona (250V/cm) nego je to moguće kod uobičajene PAGE tehnike, što omogućuje vrlo efikasnu separaciju u kraćem vremenskom periodu. Kapilare su ispunjene sa premoštenim poliakrilamidnim gelom i elektrolitom (npr. Tris/Boratni/Urea puferom) i koriste se kao takve. U svrhu analize preporuča se prethodno hidrolizirati DMT-skupinu sa oligonukleotida sintetiziranog na DNA sintetizeru. Na slici 6 prikazan je kromatogram sintetskog oligonukleotida (20 nukleobaza u oligonukleotidnom lancu, fosfodiester). Separirane frakcije detektiraju se UV detektorom neposredno nakon eluacije sa kapilare što omogućuje njihovu direktnu kvantifikaciju. Ovu tehniku moguće je koristiti samo u analitičke svrhe, a kapilara ispunjena premoštenim poliakrilamidnim gelom ima puno kraći vijek trajanja nego je to kod HPLC kolone ispunjene ionskim izmjenjivačem, a također je vrlo važno kako se kapilara čuva i održava.



Slika 6. *Analiza sintetskog oligonukleotida (DNA) kapilarnom elektroforezom na Waters Quanta™ 4000 Capillary Electrophoresis sistemu.*

Uzorak: Oligonukleotid-DMT (-) (20 nukleobaza u oligonukleotidnom lancu; fosfodiester);

Kapilara: Waters μ PAGE-5 gel (5 % T i 5 % C) 75 μ m i.d.; 60 cm (total) 51 cm (efektivno);

Elektrolit: 100 mM Tris borat, pH 8,3/7 M urea;

Injection: -5 kV/5 s;

Run: -13 kV;

Detekcija: 254 nm;

Temperatura: sobna temperatura.

LITERATURA:

Warren, W.J. and Vella, G. (1994). Analysis and Purification of Synthetic Oligonucleotides by High-Performance Liquid Chromatography. U: Methods in Molecular Biology. Protocols for Oligonucleotide Conjugates Synthesis and Analytical Techniques. ur. S. Agrawal, Totowa, New Jersey: Humana Press, Vol. 26, 233-264.

PRIPREMIO: Dr. sc. Ivan Habuš, nasl. izv. prof.

VISOKOUČINKOVITI TEKUĆINSKI KROMATOGRAFSKI SUSTAV („HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY SYSTEM“ – HPLC)





ANALIZA I IZOLACIJA OLIGONUKLEOTIDA POLIAKRILAMIDNOM GEL ELEKTROFOREZOM („POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS“ – PAGE)

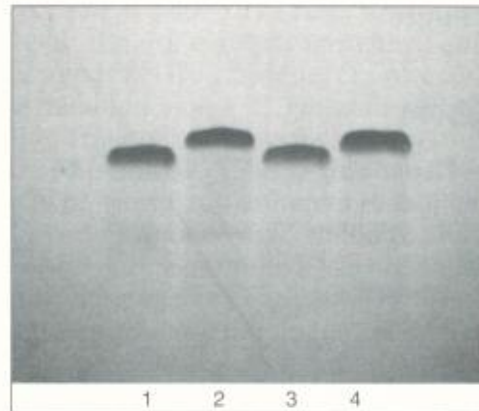


Figure 1. UV shadow gels showing the migration of 18-mers of different sequence. Lane 1: $(AT)_{18}$, Lane 2: $(GT)_{18}$, Lane 3: $(CT)_{18}$, Lane 4: $(T)_{18}$.

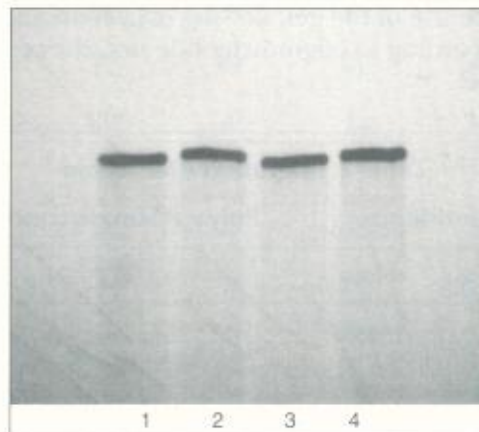


Figure 2. 32-mers that differ only in their 3' ends. The 3' ends are: Lane 1: AAAA, Lane 2: GGGG, Lane 3: CCCC, Lane 4: TTTT.

The most common method of radiolabeling is 5' end labeling. T4 polynucleotide kinase is used to catalyze the phosphorylation of the 5' hydroxyl. As shown in Figure 3, [γ ^{32}P] ATP serves as the phosphate donor. This method can be used at different scales, depending on the quantity and length of the oligonucleotide to be labeled. Variations are also used when phosphorylating oligonucleotides for ligations as well as for radiolabeled probes.

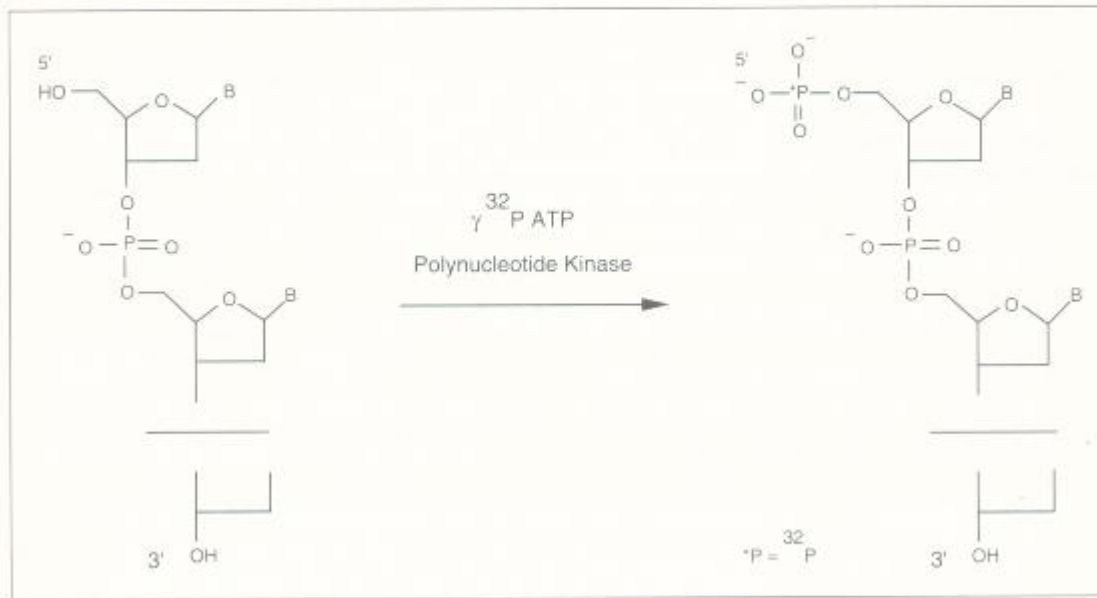


Figure 3. 5' ^{32}P labeling reaction

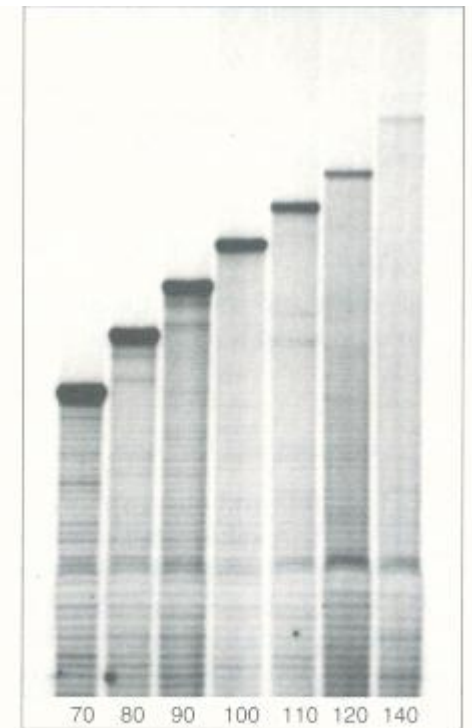


Figure 4. Autoradiograph of crude oligonucleotides

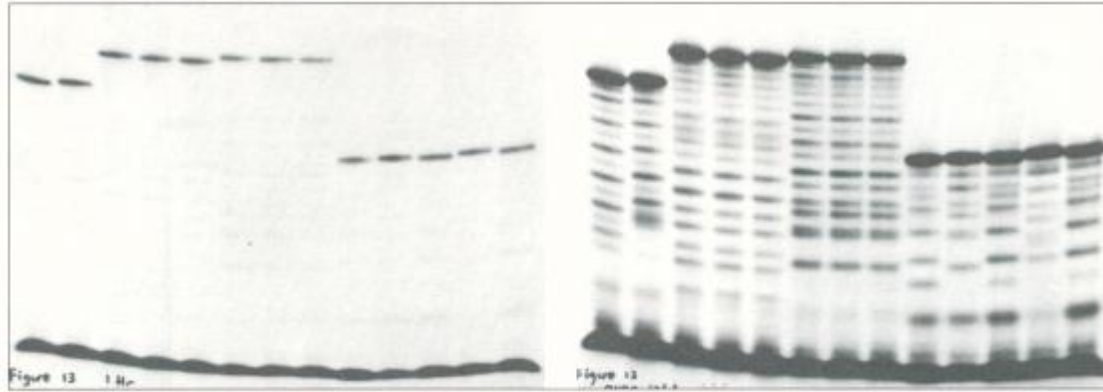


Figure 5. Light (1 h) and dark (12 h) exposure of oligonucleotides of varying length and sequence.

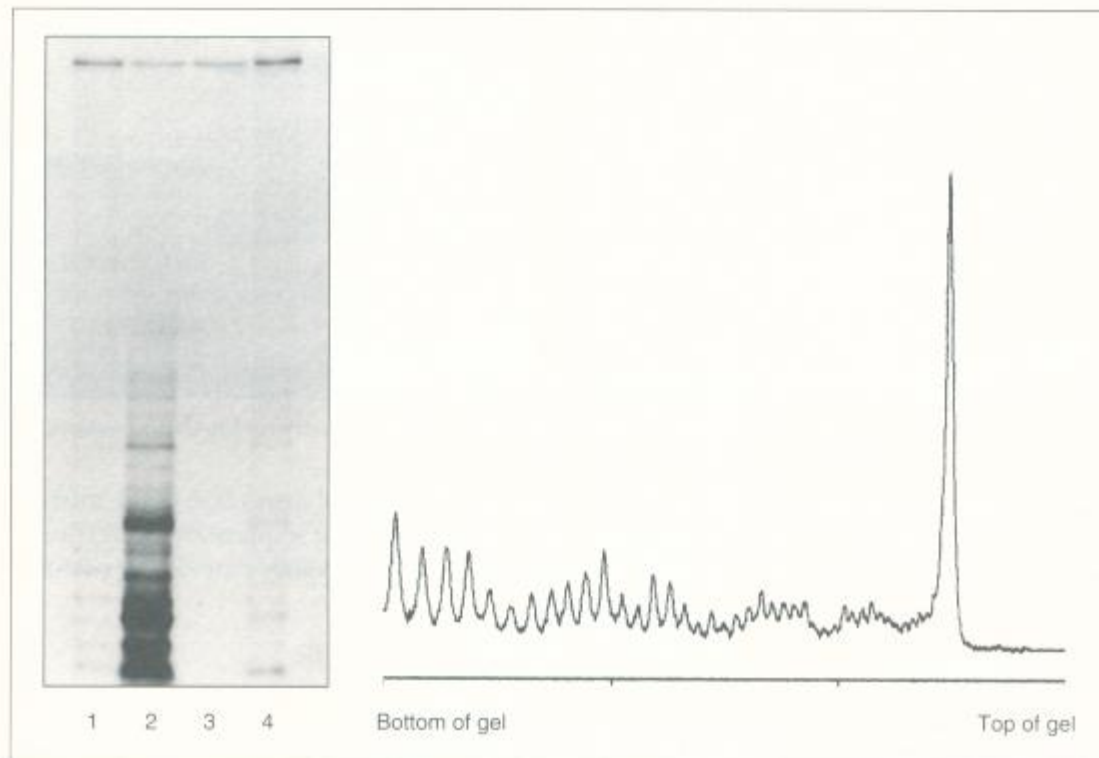


Figure 6. Densitometry trace showing the quantitation of the main product and failure sequences of the 60-mer in Lane 1 of the autoradiograph.

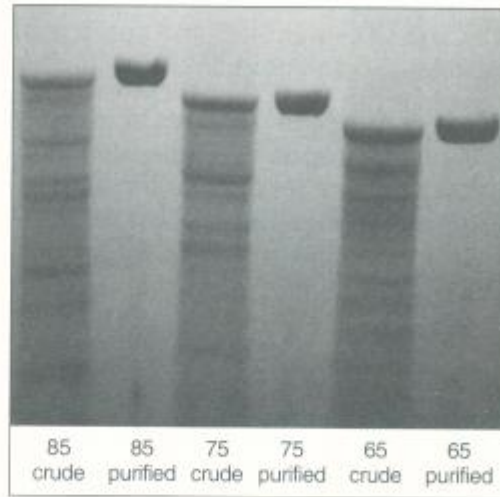


Figure 7. Comparison of crude and gel-purified 85-, 75- and 65-mers. 15% polyacrylamide. Loading: 1.5 ODU of crude or 0.45 ODU of gel-purified oligonucleotide.

Visualization and Product Excision

Gently pry apart the glass plates with a nonmetallic wedge and place the gel on a fluorescent TLC plate covered with plastic wrap. The oligonucleotides are visualized using a short-wavelength UV lamp (approximately 240 nm). It is important that a short-wave UV lamp be used. DNA does not absorb much above 280–290 nm. Take care to minimize the exposure of the oligonucleotide to UV light, which can cause thymidine dimerization.

Figures 8 and 9 are photographs of a preparative gel (before and after product band excision) illuminated by a hand-held UV light source. When excising the oligonucleotide, remember that the UV lamp must be held **directly** overhead to avoid errors. This prevents movement of the shadow from its correct position on the product band to another position that could include contaminants.

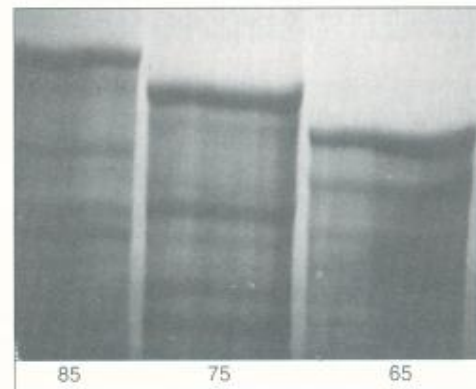


Figure 8. Preparative gel. 15% polyacrylamide, 1.5-mm thick, loading 10 ODU of each crude oligonucleotide mixture.

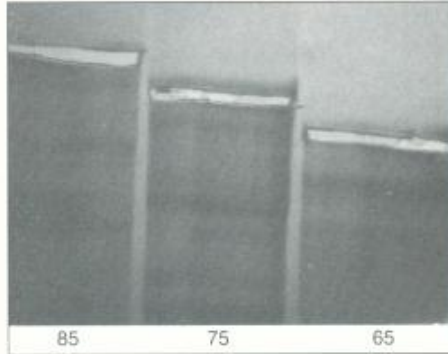


Figure 9. Excision of 85-, 75- and 65-mer product bands from a preparative gel.

The product is excised with a clean razor blade. If the oligonucleotide is not degenerate, the cuts should be slightly to the interior of the product band to eliminate contamination from failure sequences lacking only a single nucleotide. Conversely, to avoid missing some of the possible sequences in a degenerate product mixture, the cuts should be at or slightly outside the diffuse product band. The excised band is then placed in a tube or a fritted column. If more than one sequence is run on the same gel, care should be taken in handling to prevent cross-contamination.

Once the product band has been excised from the gel, it is necessary to recover the oligonucleotide from the acrylamide gel material. The two most common ways are either **soaking** or **electroelution**. Both methods are effective, but soaking is often the method of choice because it is inexpensive, easy and can be accomplished without monitoring. Product recovery yields are 10–80% of the initial oligonucleotide loading. The quantity of product recovered depends on the concentration of failure sequences in the sample. The gel slice should be soaked in at least 1 mL of any of the following extraction solutions:

- 0.5 M NaCl, 2 M triethylammonium acetate
- 50 mM triethylammonium acetate
- 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) containing 1 mM EDTA
- Deionized water

1. Incubate the gel slice at room temperature for at least 12 h.
2. Decant and save the solution.
3. Remove dissolved urea, salts and gel debris with the Oligonucleotide Purification Cartridge (OPC) desalting protocol (see Chapter 5).

Note that the OPC desalting procedure, unlike the purification procedure, is for trityl-off oligonucleotides. As with any purification method, oligonucleotide recovery should be verified by UV absorbance.

LITERATURA:

Applied Biosystems: *Evaluating and Isolating Synthetic Oligonucleotides*. The Complete Guide (Formerly: User Bulletin 13, 1987).

PRIPREMIO: Dr. sc. Ivan Habuš, nasl. izv. prof.