

Izolace genomové DNA z rostlinných buněk (cvičení č. 2)

Úvodní slovo

V případě práce s rostlinným materiálem, je nutno, aby byl dostatečně a co nejrychleji rozmělněn. Zaprvé se takto zajistí větší množství izolované DNA a za druhé je ochráněna před nežádoucím působením intracelulárních enzymů, zejména nukleáz. Kromě způsobu jak se pletivo zpracovává, je ještě potřeba myslet na použití vhodného typu pletiv. Nejlépe se k tomuto účelu hodí měkká pletiva, jsou totiž bohatá na tenkostěnné buňky a nukleové kyseliny. V lýzi buněk se mohou uplatnit mnoho postupů (viz krok 1 až 5), které rozdělujeme do tří základních skupin dle způsobu lyze, a s to

- a) Biologická lyze zprostředkovaná degradačními enzymy jako např. proteináza K, nebo lysozym.
- b) Fyzikální lyze jako je var, zmrazení, či drcení (v našem případě jsme materiál rozdrtili po zmrazení tekutým dusíkem, viz krok 1)
- c) Chemická lyze, kdy využíváme např. chelatační činidla (EDTA), detergenty (laurysíran sodný), anebo guanidinové soli

Po tomto zpracování biologického materiálu, máme k dispozici směs nejen nukleových kyselin, ale i dalších biomolekul proteinů, lipidů, či sacharidů. Tyto nežádoucí složky se odstraňují zejména prostřednictvím extrakce, může se také vytvářet jejich sraženina (viz krok 7), která se od roztoku oddělí pomocí centrifugace a kolony (viz krok 8 až 10). Následně musíme oddělit izolovanou nukleovou kyselinu od extrakčních činidel, tedy provést purifikaci. Extrakční postup využívá vznik sraženiny DNA po kontaktu s etanolem (viz krok 11). Abychom potlačili hydrofilní vlastnosti nukleových kyselin, musíme nejprve na jejich molekuly (konkrétně cukernatou složku) navázat jednomocné kationty (Na^+ , K^+), tak lze vytvořit precipitát ve vodném prostředí. Nyní precipitát zkoncentrujeme centrifugací, zbytek solí odstraníme 70% ethanolem a samotný ethanol se odpaří. Precipitát jsme tak schopni rozpustit ve vodním prostředí a získat tak roztok nukleové kyseliny. V precipitaci se však uplatňují i preparativní, afinitní sloupcová chromatografie, oddělení na kolonce u komerčních spin columns, popřípadě ještě magnetické kuličky.

Komerční souprava společnosti NUCLEOSPIN (Plant II Maxi Kit), která bude použita v tomto cvičení, je určena pro izolaci rostlinné DNA ze 100 mg pletiva. Izolovanou DNA je možné použít pro všechny následné metody genomového inženýrství.

Cíl cvičení

Izolovat rostlinnou DNA z klíčků bramboru obecného *Solanum tuberosum* anebo z listů rostliny Laskavce ocasatého *Amaranthus caudatus*.

Použité rostliny

brambor obecný *Solanum tuberosum*

Laskavec ocasatý *Amaranthus caudatus*

Seznam přístrojů a pomůcek

- nádoba s tekutým dusíkem
- tekutý dusík
- termomixer
- třepačka Vortex
- centrifuga na 1,5 ml mikrozkušavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)
- sada pipet o objemech 20, 200 a 1000 µl

Vlastní pracovní postup

Než začnete izolaci

- Před prvním použitím nové soupravy připravte promývací roztok přidáním ethanolu 96-100% do lahvičky s roztokem PW2, množství ethanolu přidejte podle pokynů výrobce. Řádně protřepejte a označte, že v nádobě už je ethanol.
- Před prvním použitím nové soupravy připravte také roztok RNázy A. Napipetujte 1 500 µl sterilní destilované vody do skleněné lahvičky s 15 mg RNázy A a vortexujte. Poté roztok už uchovávejte v lednici při 4 °C.
- Všechny centrifugace se provádějí při 11 000 g

Bezpečnostní opatření!

- po celou dobu izolace mějte nasazené jednorázové plastové rukavice, nukleázy z vašich rukou by mohly zničit izolovanou DNA,
- dodržujte pravidla bezpečnosti práce předepsaná pro laboratoř,
- jakékoli zranění hlase vedoucímu cvičení.

Vlastní izolace

- 1) Navažte 100 mg naklíčených brambor anebo listů amarantů a přeneste do třecí misky, nalijte na to tekutý dusík. Homogenizujte vzorek 100 mg v tekutém dusíku. Po rozdrčení se rostliny špičkou 1000 µl pipety seškrábnou do 1,5 ml eppendorfků.
- 2) Přidejte 400 µl pufru PL1
- 3) Řádně promíchejte vortexováním po dobu nejméně 30 s. (když se vzorek nedá rozsuspendovat přidejte ještě dalších 400 µl pufru PL1 a opět vortexujte)
- 4) Přidejte 10 µl RNázy A (z lednice 4 °C).
- 5) Inkubujte vzorek při 65 °C 20 minut
- 6) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 5 min.
- 7) Vložte kolonku Nucleospin Filter (s fialovým proužkem) do 2,0 ml mikrozkušavky.
- 8) Přepipetujte supernatant (max. 750 µl) do kolonky.
- 9) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 2 min. a vyhod'te kolonku do koše
- 10) K filtrátu přidejte 450 µl pufru PC a pořádně promíchejte vortexováním
- 11) Vložte kolonku Nucleospin Plant II (se zeleným proužkem) do 2,0 ml mikrozkušavky
- 12) Filtrát s PC pufrům přepipetujte (max. 700 µl) do kolonky.
- 13) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 1 min.
- 14) Vylijte obsah zkumavky, který protekl kolonkou a kolonku vraťte zpět do zkumavky
- 15) Do kolonky napipetujte 450 µl promývacího pufru PW1
- 16) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 1 min.
- 17) Vylijte obsah zkumavky, který protekl kolonkou a kolonku vraťte zpět do zkumavky
- 18) Do kolonky napipetujte 700 µl promývacího pufru PW2
- 19) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 1 min.

- 20) Do kolonky napipetujte ještě 200 μ l promývacího pufru PW2
- 21) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 2 min.
- 22) Odstraňte zkumavku. Kolonku přeneste do čisté 1,5 ml mikrozukavky.
- 23) Do kolonky napipetujte 50 μ l elučního PE pufru zahřátého na 65 °C na kolonku a inkubujte po dobu 5 min při 65 °C
- 24) Centrifugujte při laboratorní teplotě po dobu 1 min.
- 25) Opakujte kroky 23 a 24. (Výslední objem eluátu bude 100 μ l)
- 26) Odstraňte kolonku, eluovaná DNA je v roztoku.
- 27) Stanovte koncentraci DNA podle cvičení č. 4 nebo 5, proveďte elektroforézu podle cvičení č. 13 a posuďte kvalitu izolované DNA. Uskladněte DNA při -20 °C.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

MACHEREY-NAGEL, červenec 2017, Genomic DNA from plant, User manual