

Izolace DNA

Izolace DNA

- Cílem: získat DNA v nejvyšší kvantitě a kvalitě
- Ideální izolační postup:
 - 1) co nejvyšší separační účinnost – odstranit maximum látek vyjma NK
 - 2) co nejvyšší výtěžnost – získat veškeré přítomné DNA (! malé množství DNA)
 - 3) převedení do stabilního stavu

Obecný postup

- 1) lýze buněk – voda, pufr
- 2) denaturace bílkovin – proteináza K, DTT, teplota
- 3) přidání alkoholu – zamezení degradace DNA + PK (deaktivuje DNázy a RNázy)
- 4) „DNA je molekula s parciálním záporným nábojem“
vazba na pevnou fázi – zafixována na nosiči
- 5) odmytí buněčných debris – wash buffers
- 6) změna složení roztoku (snížení koncentrace solí, změna pH z kyselého na zásadité, teplota) - zrušení vazby DNA na nosič a její uvolnění do roztoku

Nosiče

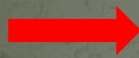
- Silikátové kolonky – DNA zachycena na kolonce během centrifugace (případně vakuovým odsátím) lyzátu, pak přečištěna a následně uvolněna do čistého elučního roztoku.
- Magnetosilikové partikule – DNA vázána na paramagnetické kuličky, které mohou být manipulovány pomocí magnetu – např. vyjmuty z roztoku, přeneseny do přečišťovacích roztoků a z nich nakonec do elučního roztoku, kde je DNA uvolněna.

Typické množství DNA, které může být z biologického materiálu extrahováno
(kvalita i kvantita získané DNA je významně ovlivněna faktory vnějšího prostředí)

Typ vzorku	Množství DNA
Tekutá krev	2000 ng/ml - 4000 ng/ml
Krevní stopa	250 ng/cm ² - 500 ng/cm ²
Tekuté sperma	150000 ng/ml - 300000 ng/ml
Post-koitální vaginální stěr	10 ng/stěr - 3000 ng/stěr
Vytržený vlas (s cibulkou)	1 ng/cibulku - 750 ng/cibulku
Vypadený vlas (s kořínkem)	1 ng/cibulku - 10 ng/cibulku
Tekuté sliny	1000 ng/ml - 10000 ng/ml
Stěr dutiny ústní	100 ng/stěr - 1500 ng/stěr
Moč	1 ng/ml - 20 ng/ml
Kost	3 ng/ml - 10 ng/ml
Tkáň	50 ng/ml - 500 ng/ml

Co čím izolovat?

- komerční kit x chemikálie z laboratoře x mix
- ? vstupní materiál (trusiči a netrusiči, degradace DNA, vlhké prostředí, expozice vnějším vlivům, ...)
- ? jeden kit / postup na vše
- ? opakovatelnost/srovnatelní množství vyizolované DNA

 Komerční kity (validace a testovací studie provede výrobce x situace u soudu, DNA free, kontaminace výrobcem ověřitelná)

Izolace dle vstupního materiálu

- vzorek s předpokládaným velkým množstvím DNA (bukální stěry) – 5% chelex, Swab solution
- vzorek – stopy (s malým množstvím DNA a degradované stopy) - - Blood Mini kit, Investigator kit (QIAGEN), IQ systém (Promega)
- stopy po daktyloskopickém zkoumání – Prepfiler (AB)
- kostní tkáň a zuby – Prepfiler, alkoholová metoda
- směsné vzorky (mravnostní TČ) – diferenciální lýza
- vzorky ošetřené formalinem

FTA karty (Whatman™)

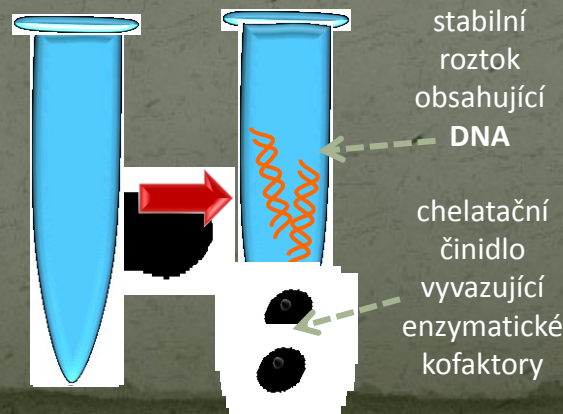
- pro sběr, transport, archivaci a izolaci nukleových kyselin při pokojové teplotě. Karty typu FTA® obsahují chemikálie, které lyzují buňky, denaturují proteiny a chrání nukleové kyseliny před nukleázami, oxidací a poškozením od UV záření - zajištění tekutého materiálu
- předpoklad: tekutá krev a bukální stěry
- realita: tekutá krev
- Mikro karta typu FTA® - jedna vzorkovací plocha pro aplikaci až 125 µl plné krve
- výhody: rychle inaktivují organismy, včetně krevních patogenů a brání růstu bakterií a dalších mikroorganismů, minimální nároky na uskladnění



Bukální stěry

- **Chelex[®] 100**

- Chelex je pryskyřice složená ze styren divinylbenzen kopolyméru obsahující párové iminodiacetátové ionty. Tyto ionty působí chelatačně a váží polyvalentní kovové ionty. Pro izolaci DNA je především důležité vyvazování Mg^{2+} iontů, které jednak jsou nezbytné pro aktivitu nukleáz (např. DNáz degradujících DNA) a je tedy nezbytné je tímto způsobem inaktivovat, a také tyto ionty při vysoké teplotě (95-100°C) mohou vést k poškození DNA. Principem izolace je homogenizace vzorku, destrukce buněčných komponent alkalickým prostředím a vysokou teplotou a separace roztoku obsahujícího DNA od zbytků buněčných komponent a pryskyřice chelexu.
- bukální stěr + 1 ml dd H₂O; centrifugace – vznik peletky; odpipetování tekutiny; přidá se 1 ml 5% roztok chelexu, 30 min. při 56 °C, 10 min. při 95 °C
- !!! Chelex je na dně, DNA ve vodné fázi v horní části zkumavky



Bukální stěry

- Swab Solution (Promega)
 - možnost izolovat z FTA karty i z BS
 - součástí balení: 100 ml SwabSolution™ Reagent a 500 µl 5X AmpSolution™ Reagent
 - postup: 1 ml SS ke vzorku, 30 min. při 70 °C – nosič zůstává v eppendorfce!!!
 - skladování při 4 °C
 - při amplifikaci ke 2 ul izolátu nutno přidat 5 ul 5x AmpSolution Reagent

Stopy

- Izolace pomocí kolonek
 - QIAamp DNA Mini Kit
 - Investigator kit
 - QIAamp Fast DNA Tissue Kit

- Izolace pomocí magnetických partikulí
 - PrepFiler[®] Forensic DNA Extraction Kits
 - EZ1 Investigator kit
 - DNA IQ Promega

QIAamp[®] DNA Mini kit



QIAamp[®] DNA Mini kit

- izolace ruční/robot (QIAcube)
- vhodný na krev a tkáně
- finální objem 50 – 150 μ l

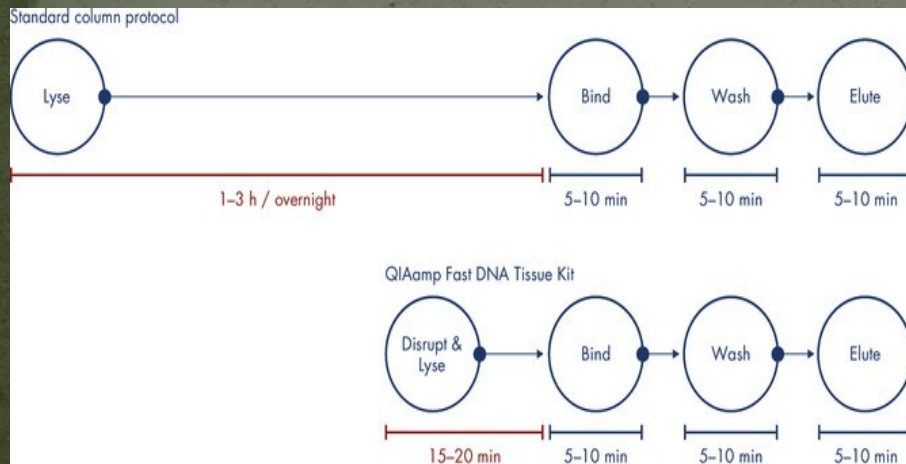


QIAamp[®] DNA Investigator

Protocol	Volume of Buffer AL added to sample (µl) RNA (µl)	Dissolved carrier
Surface and buccal swabs	600* or 400†	1
FTA and Guthrie cards	300	1
Body fluid stains	300	1
Chewing gum	300	1
Cigarette butts	300	1
Nail clippings and hair	300	1
Paper and similar materials	300	1
Small volumes of blood or saliva	100	1
Tissues	200	1
Laser-microdissected specimens	50	1
Bones and teeth	300	1
Sexual assault specimens	300	1

QIAamp Fast DNA Tissue Kit

- The QIAamp Fast DNA Tissue Kit využívá nově kombinace mechanismů chemické a enzymatické lýzy. Každý kit obsahuje ocelové kuličky a speciální tvar kolonek napomáhá procesu izolace. Nejprve se přidá vzorek a mix reagensií a pouhým vortexováním dochází k uvolnění DNA z buněk. Celý proces izolace trvá cca 30 min.



EZ1 DNA Investigator Kit

- EZ1 Advanced a BioRobot EZ1 umí automatizovanou purifikaci jaderné DNA na bázi silikomagnetických partikulí. Odpadají kroky centrifugace a najednou lze v závislosti na přístroji izolovat až 14 /resp. 6 vzorků najednou. Přístroj je během izolace zavřený/zamčený, nelze jej otevřít, čímž je eliminováno riziko kontaminace.



DNA IQ™ System

■ s využitím nově navržených paramagnetických partikulí lze s tímto kitem připravit vzorky pro STR analýzu a to velmi jednoduše a efektivně. DNA IQ™ System lze použít k extrakci DNA z různých typů vzorků, včetně bukálních stěrů, tekuté krve a FTA karet.



Robot s využitím IQ izolačního kitu

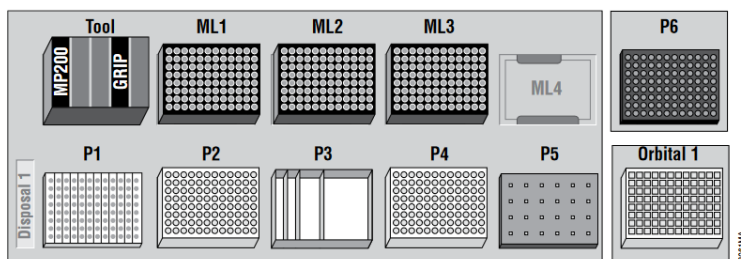


Figure 1. Biomek® 4000 initial deck configuration.

Position Tool	Tool rack containing MP200 and Gripper tools
Position ML1	Tip rack holder, Biomek® AP96 P250 Tips (required for each run)
Position ML2	Tip rack holder, Biomek® AP96 P250 Tips as needed
Position ML3	Tip rack holder, Biomek® AP96 P250 Tips as needed
Position P6	Single-Position ALP, V&P Scientific Heating Block, Deep Well Heat Transfer Block
Position P1	Gray labware holder, 96-well PCR plate or strip tubes (Elution Plate)
Position P2	Gray labware holder, empty 1.2ml, Round-Bottom Deep Well Plate (Purification Plate 2)
Position P3	Gray labware holder, frame for reservoirs, reservoirs with reagents (see Figure 2 for configuration)
Position P4	Gray labware holder, empty 1.2ml, Round-Bottom Deep Well Plate (Purification Plate)
Position P5	Gray labware holder, MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device, 1/4 inch Foam Spacer
Position	Biomek® Orbital Shaker, 2.2ml, Square-Well Deep Well Plate containing samples (Sample Plate)
Orbital1	Samples should be arranged in columns across the plate and will be processed from left to right using the 8-channel MP200 tool.



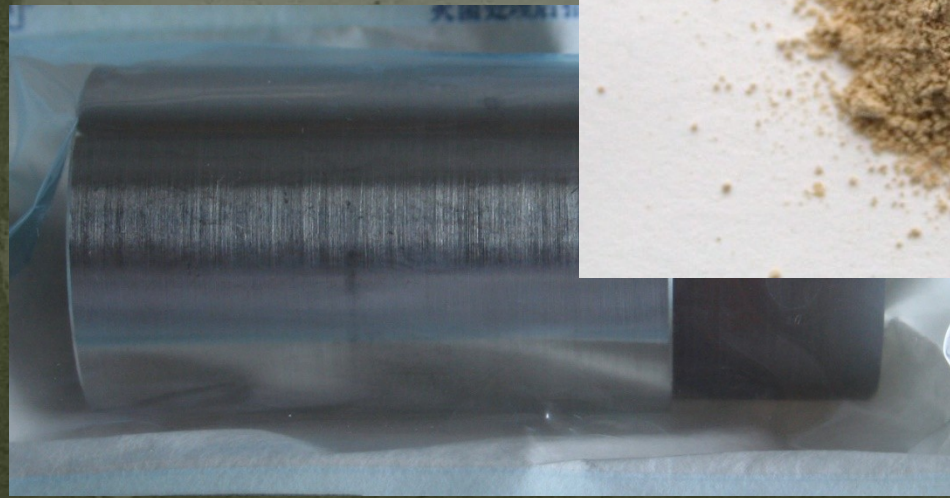
<https://www.youtube.com/watch?v=5wqs7I1Ez7M&t=84s>

Stopy po daktyloskopickém zkoumání

- PrepFiler[®] Forensic DNA Extraction Kits – obvyklé forenzní vzorky včetně „tekutých vzorků“, stěry tělních tekutin, cigaretové nedopalky, žvýkačky, dopisní známky a lepenky...
 - lyzační pufr a DDT (k rozrušení vnitromolekulových i mezimolekulových disulfidických můstků, které stabilizují terciární a kvartérní strukturu proteinů)
 - dle typu materiálu délka inkubace a teplota (tělní tekutiny- 20 min., suché vzorky a stěry (bukální i stěry na slepo)- 40 min., čisté sperma - 90 min.
 - po inkubaci přidání „kuliček“ - vazba DNA na ně
 - promytí
 - uvolnění DNA z nosiče
 - 50 ul izolátu DNA

Kostní tkáň a zuby - příprava





Kostní tkáň a zuby

- PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit

- místo lyzačního pufru se přidává BTA pufr, PK a DTT, změna teploty inkubace
- stačí pilkou nařezat plátky – použití pilin je dostačující

- Fenol chloroformová metoda

- klasickým způsobem izolace DNA, tato izolace je poměrně pracná a zdlouhavá, ale poskytuje velké množství velmi čisté DNA
- obecný postup: rozrušení působením proteinázy, se postupně přidává fenol či směs fenolu a chloroformu, které z lyzátu vyváží proteiny
- kostní moučka inkubována s 20 ml roztoku EDTA SARCO s proteinázou K při 55°C 24 hod., poté výměna roztoku a následovala další 24 hod. inkubace – dokud se moučka nerozpustila
- přidáno 20 ml fenol/chloroform/izoamylalcohol (25:24:1), 20 ml chloroform/izoamylalcohol (24:1), extrakce DNA opakována 3x,
- přidáním těchto látek k vodnému roztoku dojde k separaci roztoku do dvou fází: **horní fáze je vodný roztok obsahující DNA; spodní je pak organická fáze fenolu či chloroformu**
- **mezi vodnou a organickou fází se hromadí proteiny**
- koncentrováno pomocí Centriplus YM-100 kolonek na výsledný objem 150 ul

Kostní tkáň a zuby

Silica-based DNA extraction

- vycházelo se z Qiagen Blood Maxi kit
- kostní moučka byla inkubována s 15 ml ATL pufr, 10 mg proteinázy K a 300 ul DTT po dobu 24 hod. při 56°C ve vodní lázni
- přidáno 14 ml AL pufr a následovala inkubace při 70°C na 10 min.
- supernatant přenesen do 50 ml zkumavky, přidáno 22 ml EtOH 96% a postupně byl obsah přenesen na kolonu 50 ml zkumavky
- omytí 10 ml pufru AW 1 a 10 ml pufru AW 2
- DNA eluce pomocí AE
- koncentrace eluátu pomocí Centriplus YM-100 kolonek na výsledný objem 150 ul

Diferenciální buněčná lýza („differential cell lysis“)

- směs ženských epiteliálních buněk a spermií – typicky u vzorků poševního stěru po znásilnění
- oddělení ženské a mužské frakce vzorků (rozdělení původního smíšeného vzorku na separátní vzorky obou původců materiálu)
- užití „měkčích“ a posléze „tvrdších“ lyzačních podmínek (zatímco ženské epiteli podléhají lýze snadno, spermie jsou mnohem odolnější)
 - 1) v mírně lyzačním roztoku rozrušeny a spolu s roztokem odebrány ženské epiteli
 - 2) v silně lyzujícím roztoku rozrušeny spermie

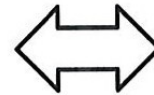
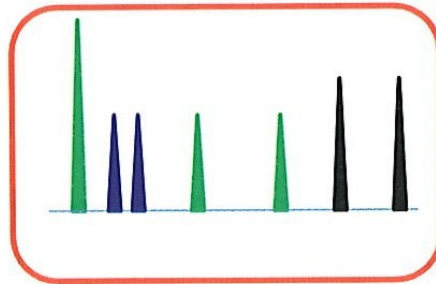
Differential extraction

Evidence (Q)

Reference Samples (K)

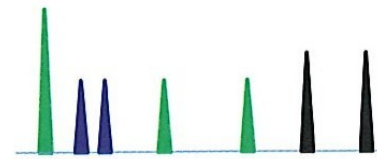
(a)

Non-sperm fraction



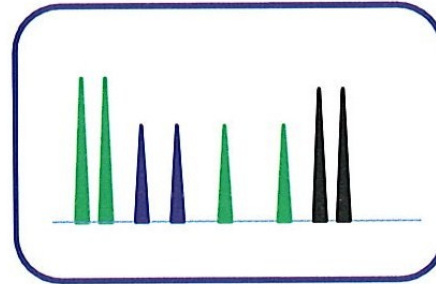
(c)

Victim



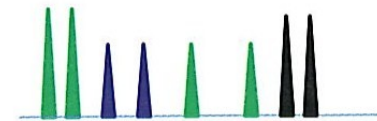
(b)

Sperm fraction



(d)

Suspect

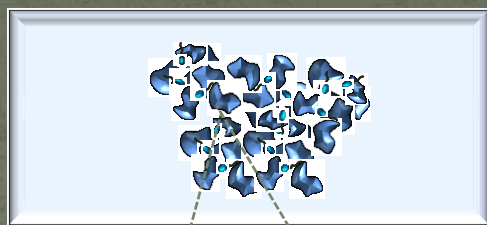


- **Differex™ Systém (Promega)**
 - pomocí automatu – výrazné zkrácení doby izolace

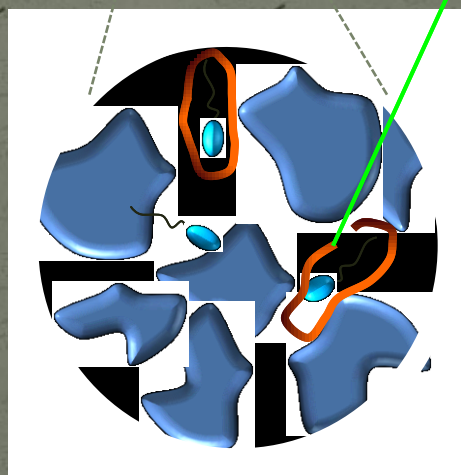


Laserová mikrodisekce (LCM - „laser capture microdissection“)

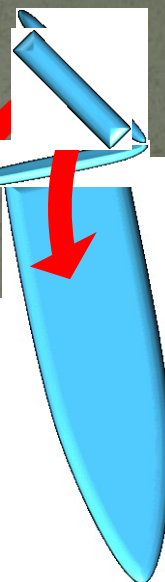
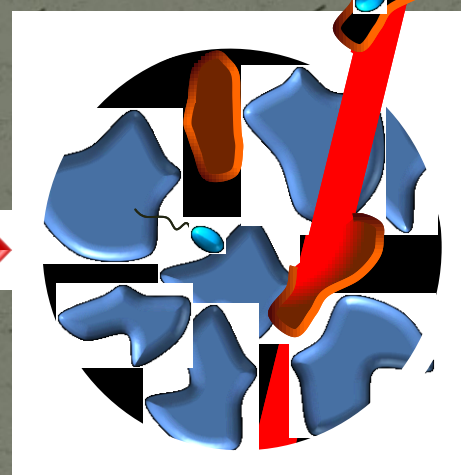
- vysoce pokročilá technologie mikromanipulace, užívaná v nejrůznějších oborech pracujících s biologickým materiálem
- vyhledávání příslušných objektů (např. buněk) v mikroskopu, jejich oddělení od ostatního materiálu pomocí laserového paprsku a přenesení světelným pulzem do čisté zkumavky
- např. jednotlivé spermie z poševního stěru, embryonální buňky z potratu apod.



pomocí světelného pulzu jsou vyříznuté buňky přeneseny do víčka zkumavky



pomocí laserového paprsku jsou vyříznuty požadované buňky (např. spermie)



Vzorky ošetřené formalinem/parafínem

- 1. Zajištění tkáně z parafínového bločku (odstranit část parafínu tak, aby se odhalila přímo zájmová oblast tkáně, část tkáně nařezeme na tenké plátky)
- 2. Odstranění parafínu (xylén)
- 3. Rehydratace tkáně (100 % , 70 % a 50 % EtOH)
- 4. Rozložení tkáně (ATL pufru)
- 5. Izolace DNA (fenol chloroformové metoda, QIAamp DNA mini)

- Izolát DNA – finální produkt izolace DNA; jedná se o vodný roztok DNA (tj. ředidlem je voda) nebo roztok pufru a DNA (v izolátu mohou být přítomny i další látky, např. soli, které DNA stabilizují)
- Inhibitory – látky nejrůznější povahy s negativním účinek na průběh jednoho ze zásadních kroků analýzy – PCR; jejich přítomnost ve vzorku může vést ke zhoršené kvalitě výsledků analýzy či k jejímu úplnému selhání
- - během průběhu izolace – alkoholy, fenol, některé typy detergentů.
- - původ přímo ve vzorku (přítomny už v původním biologickém materiálu, který je dodán do laboratoře ke zkoumání)

Inhibitory a jejich zdroj

Inhibitor PCR	Pravděpodobný zdroj
Hemoglobin (hemin)	Krev
Melanin	Tkáň, vlasy
Polysacharidy	Rostlinný materiál
Žlučové soli	Výkaly
Huminové kyseliny	půda
Močovina	Moč
Indigové barvivo	Jeansovina
Kolagen	Tkáň
Myoglobin	Svalová tkáň
Vápníkové ionty	Kosti, zuby

Odstranění inhibitoru

- přečištění izolátu DNA
- účinné odstranění inhibitorů, případně dalších nežádoucích látek, které zůstaly ve vzorku přítomny i po izolaci
- inhibitory původem z krevních vzorků – potlačení jejich negativních účinků až v průběhu PCR – přidáním BSA (bovinní sérový albumin)
- použití kitů s magnetickými partikulemi – odmytí inhibitoru v průběhu izolace (AB)
- QIAamp MinElute spin kolonek (Qiagen)
- Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega)

Zakoncentrování DNA

- snížení objemu izolátu při zachování veškeré DNA
- „zahuštění“ roztoku
- u vzorků s malým obsahem DNA
- postup:
 - 1) vyvázání DNA z roztoku na pevnou fázi (např. SiO_2) a její následné uvolnění do roztoku o menším objemu
 - 2) centrifugace pomocí tzv. mikrokoncentrátorů – velmi husté sítko, které propustí pouze rozpouštědlo a drobné molekuly, makromolekuly DNA však ne – zůstanou zachyceny a opět mohou být uvolněny do roztoku o menším objemu, než měl původní izolát
 - vakuová odparka – koncentrátor vodný, etanolový a vysoký tlak vodní páry; okolí, 30°C , 45°C , 60°C

