

## 2. Srovnání postupů izolace DNA – kolonky vs. paramagnetické částice

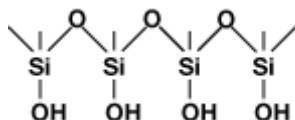
### A) Izolace DNA na kolonkách

Izolace DNA z jakéhokoliv materiálu je dnes základním postupem v laboratořích zabývajících se molekulárně-biologickými metodami. Izolace DNA je prováděna nejen v klinických laboratořích, ale například také v laboratořích veterinárních, potravinářských (např. testování GMO) a zemědělských. Nejvíce DNA analýz je v současné době prováděno v rámci lékařského výzkumu a v rámci klinické DNA diagnostiky. Proto se budeme ve většině dalších metodik v rámci Cvičení z DNA diagnostiky držet postupů používaných v klinických laboratořích.

Při DNA diagnostice je dnes využíváno především metody řetězové polymerázové reakce v podobě běžné PCR, nested PCR nebo RealTime PCR. Pro metodu PCR je třeba čisté a nefragmentované DNA o určené koncentraci. Při izolaci DNA je třeba z klinického materiálu odstranit veškeré inhibitory PCR reakce, kterými jsou například hemoglobin a další proteiny, antibiotika, polysacharidy atd.

Za účelem izolace DNA bylo vypracováno nespočet metod, nicméně v klinických provozech je z důvodu urychlení práce, standardizace práce, standardizace čistoty a výtěžků používáno komerčně dostupných izolačních metod. Mezi nejčastěji používané izolační principy patří izolace na kolonkách a pomocí paramagnetických částic.

Izolace na kolonkách je založena na principu selektivní vazby DNA a/nebo RNA o určité délce na vrstvu drceného borosilikátového skla, která se nachází mezi dvěma fritami na kolonce. K vazbě dochází v přítomnosti tzv. chaotropní soli, která vytěsňuje z molekul DNA/RNA molekuly vody čímž potlačuje jiné než iontové interakce a v přítomnosti asi 10% isopropanolu nebo etanolu, který DNA/RNA částečně vysráží. Mezi tzv. chaotropní soli patří například guanidin hydrochlorid, který potlačuje vodíkové vazby a hydrofobní interakce uvnitř molekul DNA/RNA a nebo proteinů.



V rámci cvičení z DNA diagnostiky bude použit kit určený především k izolaci genomové DNA z 200 µl plné krve. Ve cvičení se nebude pracovat s lidskou krví. Krev bude nahrazena stěrem z ústní sliznice. Ústní sliznice obsahuje velké množství živých buněk, které lze snadno a bezbolestně setřít sterilním tampónem. Stěr z ústní sliznice si provede každý student sám. Ke stěru bude použit sterilní odběrový tampón. Izolovaná DNA poslouží dále jednak ke srovnání výtěžku a čistoty s DNA izolovanou dalšími metodami, jednak poslouží k PCR analýze.

### Obsah kitu

NucleoSpin Blood QuickPure (firma MACHEREY – NAGEL)

- Proteináza K
- Roztok BQ1 – lyzační roztok
- Roztok BQ2 – promývací roztok
- Roztok BE – eluční roztok
- Kolonky ve 2 ml mikrokumavkách
- Mikrokumavky o objemu 2 ml

## Upozornění

Při práci vždy používejte rukavice. Veškerý materiál v laboratoři nutno považovat jako potenciálně infekční. Vyhněte se kontaktu reagensů s kůží. V případě kontaktu potřísněné místo omyjte důkladně vodou. Vyvarujte se požití součástí kitu. Reagencie označené jako hořlavé musejí být drženy v dostatečné vzdálenosti od otevřeného plamene nebo ohně.

## Odběr vzorku

1. Nejméně 60 minut před odběrem nejezte a nepijte, výjimkou je pouze **neslazená nesyčená** voda.
2. Před odebráním vzorku si umyjte ruce, vypláchněte si ústa čistou neperlivou vodou a polkněte případný zbytek slin nebo vody v ústech.
3. Vyjměte odběrový tampón ze zkumavky.
4. Štětíčkou otírejte sliznice obou tváří včetně záhybů mezi dásněmi a vnitřní stranou tváří, a to pohybem dopředu a dozadu (jako při čištění zubů) a zároveň štětíčkou otáčejte, aby byla využita její celá plocha. Ideální tlak je dosažen v okamžiku, kdy na vnější tváří ucítíte tlak zevnitř. Jednou štětíčkou otírejte sliznice tváří přibližně po dobu 1 minuty. Pokud se vám v průběhu stěru tvoří sliny, polkněte je (setřít sliny je nežádoucí!).
5. Po odběru umístěte odběrový tampón do kelímku štětíčkou nahoru a přistoupíte k izolaci DNA. **Štětíčka odběrového tampónu nesmí za žádných okolností přijít do styku s ničím jiným než se sliznicí, z níž se vzorek odebírá!!!**

## Postup izolace DNA:

### Po celou dobu používejte ochranné rukavice!

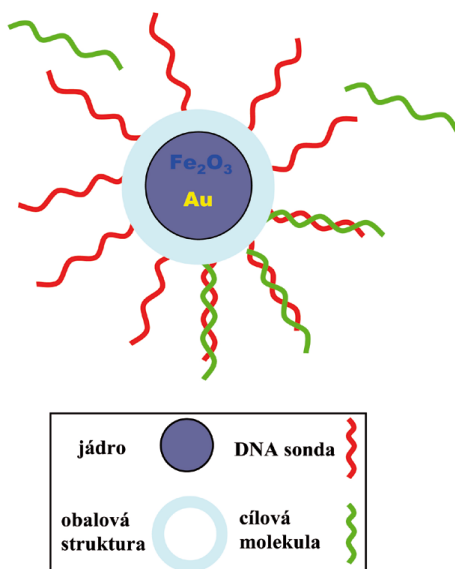
1. Do mikrozukavky nepipetujte 25  $\mu$ l proteinázy K a 400  $\mu$ l roztoku BQ1.
2. Stěrovku vložte do připravené mikrozukavky a sterilními nůžkami odstříhněte štěteček – stříhejte zhruba 0,5 cm nad štětečkem, zvortexujte.
3. Nastavte třepání na 700 rpm a inkubujte 10 minut při 70°C.
4. Sterilní pinzetou vyjměte štěteček a vyhod'te.
5. Přidejte 400  $\mu$ l etanolu a zvortexujte.
6. Krátce centrifugujte, abyste odstranili kapky z víčka mikrozukavky.
7. Přeneste veškerý obsah mikrozukavky do kolonky.
8. Centrifugujte 1 minutu při 14 000 x g.
9. Přeneste kolonku do nové mikrozukavky, přidejte 200  $\mu$ l roztoku BQ2.
10. Centrifugujte 1 minutu při 14 000 x g .
11. Vylijte supernatant do odpadu a vra'te kolonku do mikrozukavky, přidejte 350  $\mu$ l BQ2.
12. Centrifugujte 3 minuty při 14 000 x g.
13. Přeneste kolonku do nové mikrozukavky a přidejte 50  $\mu$ l elučního roztoku BE.  
Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě.
14. Centrifugujte 1 minutu při 14 000 x g.

15. Odstraňte kolonku a zavřete víčko mikrozkušavky. Genomová DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

16. Změřte koncentraci vyizolované DNA na Spektrofotometru.

## B) Izolace DNA pomocí paramagnetických částic

Jedna z metod izolace nukleových kyselin, která se více rozšířila, využívá tzv. (para)magnetické částice (MPs). MPs jsou částice o velikosti 5 nm–100 μm tvořené z kovového jádra, tím bývá nejčastěji  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemit) nebo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetit), ale i například Au. Jádro obaluje vrstva, která má připravený specifický povrch. Ten lze upravit podle toho, jaké molekuly chceme z daného materiálu izolovat. Samotná velikost MPs se dá přizpůsobit podle toho, co izolujeme: 5–50 nm proteiny; 20–450 nm nukleové kyseliny, viry; 10–100 μm buňky. Princip izolace je založen na fyzikálně-chemických vlastnostech MPs. Ty reagují na vnější magnetické pole a jsou schopny navázat různé bioreaktivní molekuly, díky jejich afinitě k modifikovanému povrchu přímo z biologického materiálu.



Při samotné izolaci se pak MPs se přidají ke vzorku, kde na sebe naváží cílené molekuly. Modifikované MPs se následně přitáhnou magnetem ke stěně zkumavky a zbylý roztok s nenavázanými, jinak běžně interferujícími látkami, se odstraní. Následuje promývání a konečné uvolnění MPs i s navázanými molekulami do námi přidaného roztoku. Různým fyzikálně-chemickým krokem (denaturace) se oddělí navázané molekuly od MPs. Tím získáme cílené molekuly a můžeme s nimi dále pracovat.

### Obsah kitu

Chemagic DNA Tissue 40 Kit (firma CHEMAGEN)

- Magnetické kuličky (Magnetic Beads)
- Lyzační pufr (Lysis Buffer 1)
- DNA-vazebný pufr (DNA Binding Buffer 2)
- Promývací pufr (Wash Buffer 3)

- Promývací pufr (Wash Buffer 4)
- Promývací pufr (Wash Buffer 5)
- Eluční pufr (Elution Buffer 6), tj. 10 mM Tris-HCl pH 8.0 nebo lze použít TE pufr pH 8.0

Proteináza K (koncentrace 10 mg/ml)

**Mikrozkumavky** 150 kusů Microcentrifuge tubes, Mikrozkumavky o objemu 2 ml

### Upozornění

Při práci vždy používejte rukavice. Veškerý materiál v laboratoři nutno považovat jako potenciálně infekční. Vyhněte se kontaktu reagensů s kůží. V případě kontaktu potřísněné místo omyjte důkladně vodou. Vyvarujte se požití součástí kitu. Reagencie označené jako hořlavé musejí být drženy v dostatečné vzdálenosti od otevřeného plamene nebo ohně.

### Odběr vzorku – viz. výše

### Postup izolace DNA:

#### Po celou dobu používejte ochranné rukavice!

1. Do 2 ml zkumavky napipetujte 400 ul Lysis **Buffer 1** a přidejte 10 ul **proteinázy K**. Jemně zvortexujte a stočte.
2. Štěrovku vložte do připravené a označené 2 ml zkumavky a sterilními nůžkami odstříhnete štěteček – stříhejte zhruba 0,5 cm nad štětečkem.
3. Zkumavku vložte do termo třepačky vytemperované na 56°C. Nastavte třepání na 600 rpm. Inkubujte 20 minut. Poté zkumavku krátce stočte na centrifuze.
4. Sterilní pinzetou vyjměte štěteček a vyhod'te. K lyzátu přidejte 600 ul **Binding Bufferu**. Jemně zvortexujte a stočte.
5. Ke vzorku přidejte 25 ul magnetických kuliček řádně promíchaných! Několikrát propipetujte a nechte inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.
6. Zkumavky umístěte do magnetického stojánku a nechte bez hýbání stát 2 minuty.
7. Aniž byste se zkumavkou pohnuly je otevřete a opatrně pipetou odsajte supernatant.
8. Ke kuličkám přidejte 600 ul **Wash Bufferu 3**, několikrát propipetujte a umístěte do magnetického stojánku na 1 minutu.
9. Odsajte supernatant a přidejte 600 ul **Wash Bufferu 4**, několikrát propipetujte a umístěte do magnetického stojánku na 1 minutu.
10. Nechte zkumavky stát v magnetickém stojánku a odpipetujte supernatant. Opatrně po stěně zkumavky připipetujte 1000 ul **Wash Bufferu 5**. Nepromíchávejte!!! Nechte stát v magnetickém stojánku přesně 60 sekund a důkladně odsajte supernatant.

11. K promytým magnetickým kuličkám přidejte 50 ul **Ellution Bufferu 6**. Několikrát promíchejte pipetou.
12. Zkumavky nechte inkubovat 10 minut v termotřepačce při teplotě 55°C a otáčkách 600 rpm.
13. Zkumavky krátce stočte a vložte do magnetického stojánku na 2 minuty. Supernatant obsahující DNA odpipetujte do čistých zkumavek (1,5 ml) a stočte na centrifuze při maximálních otáčkách 6 minut. Supernatant odpipetujte do čistých šroubovacích zkumavek.
14. Změřte koncentraci vyizolované DNA na Spektrofotometru.

