

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

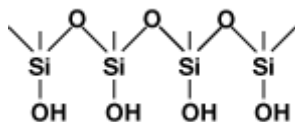
A) Izolace DNA na kolonkách

Izolace DNA z jakéhokoli 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 BQ2 – promývací
- roztok BE – eluční
- kolonky ve 2 ml mikrozkuvkách
- mikrozkuvky 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 20 μ l proteinázy K a 400 μ 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 μ 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 μ 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 μ l BQ2.
12. Centrifugujte 3 minuty při 14 000 x g.
13. Přeneste kolonku do nové mikrozukavky a přidejte 50 μ 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 mikrozkuhavky. Genomová DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

16. Změřte koncentraci vyizolované DNA na Spektrofotometru.

Izolační kit UltraClean™ Blood Spin DNA

- proteináza K
- roztok B1 – lyzační
- roztok B2 – ethanol
- roztok B3 – promývací
- roztok B4 – promývací
- roztok B5 – eluční
- kolonky ve 2 ml mikrozkuhavkách
- mikrozkuhavky o objemu 2 ml

Postup izolace DNA:

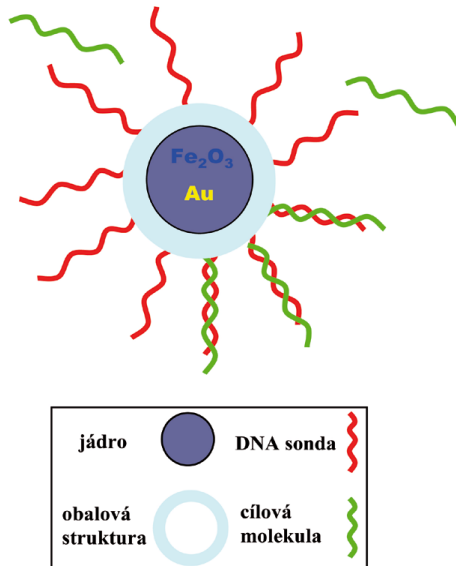
Po celou dobu používejte ochranné rukavice!

1. Do připravených mikrozkuhovek **napipetujte 400 µl roztoku TD1 (B1) a 20 µl proteinázy K.**
2. Stěrovku vložte do označené mikrozkuhavky a sterilními nůžkami odstříhnete štěteček.
3. Mikrozkuhavky vložíme do termotřepačky (Biosan) vytemperované na 56°C. Nastavte třepání na 600 rpm a inkubujte 20 min. Poté mikrozkuhavky krátce stočte na centrifuze.
4. Sterilní pinzetou vyjměte štěteček a vyhoďte. Ke každému lyzátu **přidejte 400 µl roztoku B2.** Jemně zvortexujte a zcentrifugujte.
5. Přeneste veškerý obsah mikrozkuhavky do kolonky.
6. Centrifugujte 1 min při 13 000 x g.
7. Přendejte kolonku do nové mikrozkuhavky.
8. **Do kolonky přidejte 500 µl roztoku B3.**
9. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g.
10. Vyjměte kolonku z mikrozkuhavky, obsah mikrozkuhavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
11. **Do kolonky přidejte 500 µl roztoku B4.**
12. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g .
13. Vyjměte kolonku z mikrozkuhavky, obsah mikrozkuhavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
14. Znovu centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g.

15. Opatrně vyjměte kolonku a přeneste ji do nové mikrozkušavky, aniž byste se dotkli roztoku B4 na dně původní mikrozkušavky.
16. Roztok B5 inkubujte asi 5 minut na vodní lázni (termostřepače) při 65°C. do středu kolonky nepipetujte 100 µl roztoku B5 přehřátého na 65°C.
17. Centrifugujte 1 min při 13 000 x g.
18. Odstraňte kolonku a zavřete víčko mikrozkušavky. Genomická DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

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 kového jádra, tím bývá nejčastěji $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) nebo Fe_3O_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 dál pracovat.

Obsah kitu

Chemagic DNA Blood 100 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 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 100 ul PCR H₂O 125 ul Lysis **Bufferu 1** a přidejte 20 ul **proteinázy K**.
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 vyhoďte. K lyzátu přidejte 360 ul **Binding Bufferu**. Jemně zvortexujte.
5. Ke vzorku přidejte 14 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 stojánu na 1 minutu.
10. Nechte zkumavky stát v magnetickém stojánu a odpipetujte supernatant. Opatrně po stěně zkumavky připipetujte 1000 ul **Wash Bufferu 5**. **Nepromíchejte!!!** Nechte stát v magnetickém stojánu přesně 90 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 stojánu 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.

