

Úloha č. 1

Izolace DNA na kolonkách

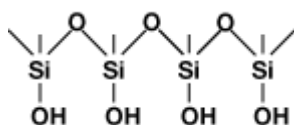
ÚVOD

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 nebo 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 vytěšňuje 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.



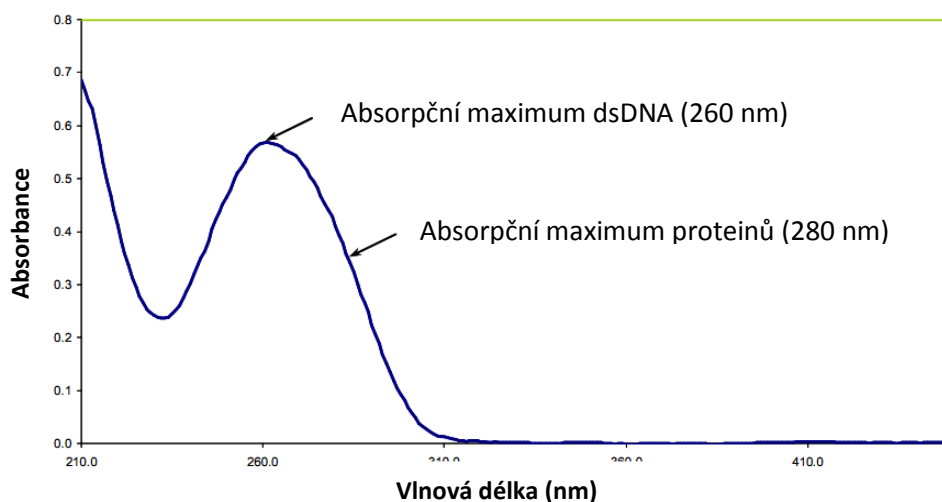
V rámci cvičení z DNA diagnostiky bude použit kit určený především k izolaci genomové DNA z plné krve. Jelikož ve cvičení nelze pracovat s lidskou krví, bude krev nahrazena stěrem z ústní sliznice. Ústní sliznice obsahuje velké množství živých buněk, které lze snadno a bezbolestně setřít sterilním tampónem. Stěr z ústní sliznice si provede každý student sám. Ke stěru bude použit sterilní odběrový tampón.

U izolované DNA bude následně stanovena její koncentrace a čistota pomocí UV spektrofotometru. Měření vychází ze známého faktu, že aromatické struktury bází nukleových kyselin specificky absorbují UV záření určitých vlnových délek s maximem při 260 nm. Zároveň

platí, že čím vyšší je absorpce záření, tím vyšší je koncentrace DNA a naopak. Tento vztah je vyjádřen v Lambert-Beerově zákoně pro absorpanci (bezrozměrná veličina):

$$A = c \cdot l \cdot \epsilon$$

A – absorpance; c – molární koncentrace; l – délka kyvety resp. tloušťka vrstvy roztoku; ϵ – molární absorpční koeficient



Při izolaci DNA se mohou do finálního roztoku rovněž dostat určitá množství dalších molekul obsažených v buňkách (proteiny, polysacharidy, polyfenoly apod.), které mohou inhibovat následné analýzy. Z těchto důvodů je vhodné vedle stanovení koncentrace DNA ve vzorku sledovat i jeho čistotu. Proteiny mají díky aromatickým aminokyselinám (fenylalanin, tyrosin) absorpční maximum při vlnové délce 280 nm. Poměr absorbancí DNA/protein (260/280) pak vyjadřuje míru znečištění proteiny. U čistého vzorku by se tento poměr měl pohybovat v rozmezí 1,8 – 2,0. Ve stejném rozmezí by se měl nacházet i druhý ukazatel znečištění vyjádřený poměrem absorbancí 260/230, který upozorňuje na možnou kontaminaci různými organickými látkami jako jsou polysacharidy, (poly)fenoly, močovina, thiokyanáty, EDTA apod.

PRACOVNÍ POSTUP

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.

I. Odběr vzorku

Materiál: sterilní odběrový tampón, kelímek s vodou

1. Nejméně 60 minut před odběrem nejzte a nepijte, výjimkou je pouze **neslazená nesycená** 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 tváři ucítíte tlak zevnitř. Jednou štětíčkou otírejte sliznice tváří přibližně po dobu 1 minuty. Pokud se vám v průběhu stěru tvoří sliny, polkněte je (**setření slin 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!!!**

II. Izolace DNA

Materiál: izolační kit, pipety, centrifuga, vodní lázeň, mikrozukavky o objemu 1,5 ml a 2 ml, popisovače.

Obsah kitu:

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 mikrozukavkách
- mikrozukavky o objemu 2 ml

Postup izolace DNA:

Po celou dobu používejte ochranné rukavice!

1. Do připravených 2 ml mikrozkušavek **napipetujte 400 µl roztoku TD1 a 10 µl proteinázy K.**
2. Štěrovku vložte do označené mikrozkušavky a sterilními nůžkami odstříhnete štěteček.
3. Mikrozkušavky vložte do vodní lázně vytemperované na 56°C a inkubujte 20 min. Poté mikrozkušavky krátce stočte na centrifuze.
4. Sterilní pinzetou vyjměte štěteček a vyhodte. Ke každému lyzátu **přidejte 200 µl roztoku B2.** Jemně zvertexujte a zcentrifugujte.
5. Přeneste veškerý obsah mikrozkušavky do kolonky.
6. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
7. Přendejte kolonku do nové mikrozkušavky.
8. **Do kolonky přidejte 500 µl roztoku B3.**
9. Centrifugujte 30 sekund při 14 000 x g.
10. Vyjměte kolonku z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
11. **Do kolonky přidejte 500 µl roztoku B4.**
12. Centrifugujte 30 sekund při 14 000 x g .
13. Vyjměte kolonku z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
14. Znovu centrifugujte 30 sekund při 14 000 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 při 65°C. Do středu kolonky napipetujte 50 µl roztoku B5 předehřátého na 65°C.**
17. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
18. Odstraňte kolonku a zavřete víčko mikrozkušavky. Genomická DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

III. Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Materiál: pipeta, izolovaná DNA, UV spektrofotometr (IMPLEN)

Postup:

- 1) Naneste 3 µl PCR vody na sklíčko měrné kyvety a přiložte krycí víčko s Lid faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko BLANK.
- 2) Sejměte víčko, otřete měrné plochy kyvety a víčka.
- 3) Naneste 3 µl vzorku na sklíčko měrné kyvety a přiložte krycí víčko s Lid faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko SAMPLE.
- 4) Na displeji odečtete a zapište si hodnotu koncentrace DNA a příslušné poměry absorbance.