

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

## IZOLACE DNA (KIT DNeasy Plant Mini)

### 1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání deoxyribonukleové kyseliny (DNA) ze vzorku pomocí komerčního kitu DNeasy Plant Mini.

### 2 Princip

Proces izolace (extrakce) DNA pomocí výše uvedeného kitu je založen na principu vázání DNA na silikagelové membrány v kolonkách. Kit využívá dva druhy kolonek – fialové kolonky umožňují mechanickou filtraci zbytků buněčných stěn, precipitovaných proteinů a polysacharidů. Bezbarvé kolonky adsorbují DNA a opakovanými promývacími kroky umožňují odstranění sacharidů, polyfenolů a ostatních rostlinných metabolitů.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

**DNeasy® Plant Mini Kit - kit pro izolaci genomické DNA z rostlinných buněk a pletiva (Qiagen), obsahuje:**

- 1 DNeasy Mini Spin Columns (bezbarvé).
- 2 QIAshredder Mini Spin Columns (fialové).
- 3 Collection Tubes (2 ml).
- 4 Buffer AP1.
- 5 Buffer P3.
- 6 Buffer AW1 (koncentrát), před prvním použitím se ředí (95 – 100)% etanolem (13) podle návodu výrobce kitu.
- 7 Buffer AW2 (koncentrát), před prvním použitím se ředí (95 – 100)% etanolem (13) podle návodu výrobce kitu.
- 8 Buffer AE.
- 9 RNase A (100 mg/ml).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

### Další chemikálie potřebné pro izolaci DNA

- 10 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 11 Voda vhodná pro PCR.
- 12 Etanol denaturovaný 70%, pro čištění povrchů.
- 13 Etanol (95 – 100)% pro UV spektroskopii.
- 14 Chlornan sodný, (0,5 – 1)% roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrného válce se nalije 200ml 5% roztoku chlornanu sodného (dodává se komerčně od ověřeného výrobce) a doplní se vodou na objem 1000 ml.

- 15 Dekontaminační roztok pro ošetření ploch, vhodný pro odstranění DNA. Dodává se komerčně od ověřeného výrobce ve formě určené přímo k použití.

### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vodní lázeň nebo termoblok s třepacím nástavcem pro 2ml zkumavky, teplota 65 °C.
- 2 Laboratorní váhy s přesností 0,01 g.
- 3 Centrifuga.
- 4 Minishaker,
- 5 Vortex.
- 6 pH metr.
- 7 UV lampa.
- 8 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem.
- 9 Plastové sterilní zkumavky 0,5ml, 2ml.
- 10 Mrazicí box a hlubokomrazicí box.
- 11 Horkovzdušná sušárna.
- 12 Nízkoobjemový spektrofotometr (vlnové délky 230 nm, 260 nm, 280 nm).
- 13 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

Sterilizace a dekontaminace se provádí podle charakteru materiálu buď tepelně v sušárně 1 h při (115 – 120) °C) nebo chemicky (např. dekontaminačním roztokem, (0,5-1)% chlornanem sodným, apod.).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy –          zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

## 5 Postup

### 5.1 Izolace DNA

#### Obecné zásady pro izolaci DNA

Během celého postupu je naprosto nezbytné pečlivé zacházení se vzorky, aby se zamezilo kontaminaci jednoho vzorku stopami druhého, např. mikrokapěnkami DNA, které se mohou uvolnit při pipetování, otevírání zkumavek, dotekem více zkumavek jedné po druhé, apod. Proto je třeba přizpůsobit veškeré operace prevenci kontaminace.

- Vyhnout se nevhodným pohybům a dotekům, všechny operace vykonávat v rukavicích a rukavice po každém kroku nebo kdykoli je třeba i v průběhu jednotlivých kroků vyměnit, nebo alespoň dekontaminovat otřením dekontaminačním roztokem (15) a vodou.
- Používat sterilní materiál.
- Dojde-li k ukápnutí tekutiny, která obsahuje nebo by mohla obsahovat DNA, je nutno ji okamžitě vysát buničitou vatou a potřísněný povrch otřít dekontaminačním roztokem (15) nebo roztokem chlornanu sodného (14). Vata se vyhodí do DNA odpadu.
- Do každého běhu izolace DNA je nutno zařadit slepý vzorek bez rostlinného materiálu, který dále postoupí PCR detekci pro ověření čistoty reagensů a případné kontaminace vzorků, tzv. kontrolu izolace (K).

#### Postup izolace DNA

K izolaci DNA se používá komerční kit DNeasy®Plant Mini Kit.

Připraví se pracovní plocha: pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od molekul DNA otřením povrchů dekontaminačním roztokem (15), 70% chlornanem sodným (14) a UV zářením po dobu 30 min.

Ke koncentrátům pufrů AW1 (6) a AW2 (7) se přidá etanol (13) v množství uvedeném na lahvičce pufru. Po zředění se na lahvičku vyznačí jeho přidání. Vytemperuje se vodní lázeň nebo termoblok na teplotu 65 °C.

Do sterilních 2ml zkumavek se naváží 0,1 g zhomogenizovaného vzorku s přesností na 0,01 g, vždy ve dvou paralelních stanoveních od každého vzorku.

#### Buněčná lyze

Do každé 2ml zkumavky se vzorkem se napipetuje 500 µl pufru AP1 (4) a 4 µl RNázy A (9). Obsah zkumavek se krátce promíchá na vortexu. Inkubuje se 10 min při 65 °C ve vodní lázni nebo termobloku. Během inkubace se vzorky 2 × až 3 × promíchají. Tímto krokem se získá buněčný lyzát.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

### Vysrážení zbytků

K buněčnému lyzátu se přidá 130  $\mu$ l pufru P3 (5), promíchá se a inkubuje se 5 min na ledu (vysrážení bílkovin a polysacharidů). Centrifuguje se 5 min při 14000 ot/min. Supernatant se pipetuje do QIAshreddes Mini spin kolonek (fialové) (2), které jsou umístěny ve sběrných 2ml zkumavkách a centrifuguje se 2 min při 14000 ot/min.

### Vázání DNA

Proteklá tekutina se přenese do nové 2ml zkumavky a přidá se 750  $\mu$ l pufru AW1 (6). Promíchá se opakovaným pipetováním. Napipetuje se 650  $\mu$ l vzniklé směsi do kolonek DNeasy Mini spin (bezbarvé) (1) umístěných ve sběrných zkumavkách. Centrifuguje se 1 min při 8000 ot/min. Proteklá tekutina se vylije. Zopakuje se předchozí krok se zbytkem směsi.

### Promývání DNA

Dneasy Mini spin kolonky se přemístí do nových sběrných zkumavek a přidá se 500  $\mu$ l pufru AW2 (7). Centrifuguje se 1 min při 8000 ot/min. Proteklá tekutina se vylije. Znovu se přidá 500  $\mu$ l pufru AW2 (7) a centrifuguje se 2 min při 14000 ot/min.

### Eluce DNA

Kolonky DNeasy Mini spin se přemístí do nových zkumavek a přesně na membránu se napipetuje 100  $\mu$ l pufru AE (8). Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě a poté se centrifuguje 1 min při 8000 ot/min. V proteklé tekutině se nachází vyizolovaná DNA, která se přepipetuje do sterilních 2ml zkumavek.

## 5.2 Měření koncentrace vyizolované DNA

Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA a čistoty DNA.

### Spektrofotometrické měření koncentrace a čistoty vyizolovaného vzorku

Koncentrace získané DNA i hodnocení čistoty vzorku se stanoví měřením při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm. Koncentrace nukleových kyselin se počítá na základě absorbance vzorku při 260 nm. Předpokladem pro správné určení koncentrace DNA je čistota vzorku. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbancí naměřených při 260 nm a 280 nm; 260 nm a 230 nm. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm.

### Poměr absorbancí A260/A280

Při poměru hodnot A260/A280 ~ 1,8 se považuje vzorek vyizolované DNA za čistý. Hodnoty poměru absorbancí A260/A280 se nejčastěji pohybují v rozmezí (1,7 – 2,0). Nízké hodnoty tohoto poměru většinou indikují, že je vzorek kontaminovaný proteiny nebo reagenциemi, jako je např. fenol, nebo že vzorek obsahuje nízkou koncentraci DNA (< 10 ng/ $\mu$ l). Vysoké hodnoty problém neindikují, protože vyizolovaná DNA může vedle dvouvláknové DNA obsahovat DNA jednovláknovou, volné nukleotidy a RNA. Jedná se o látky, které absorbují při 260 nm.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

### Poměr absorbancí A260/A230

Hodnoty A260/A230 pro čisté nukleové kyseliny bývají většinou vyšší než hodnoty A280/A260, a to v rozmezí (2,0 – 2,2). Hodnoty odlišující se od tohoto rozmezí indikují buď problém se vzorkem, nebo s izolačním postupem. Proto je důležité brát v úvahu jak hodnoty pod 2,0, tak i hodnoty nad 2,2. Nízké hodnoty uvedeného poměru mohou být způsobeny přítomností sacharidů, zbytkového fenolu z izolace DNA a zbytků guanidinu, který je součástí izolačních kolonek. Vysoké hodnoty tohoto poměru mohou být způsobeny špatným postupem měření koncentrace a kvality.

### Vlastní měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA se měří proti slepému vzorku, kterým je roztok, v němž je DNA rozpuštěná. Ve většině případů se tedy jedná o eluční pufr (8) použitého izolačního kitu. K měření na spektrofotometru NanoDrop se použijí 2  $\mu$ l vzorku. Každý vzorek se měří dvakrát. Z naměřených hodnot se vypočítá průměr.

### Úprava koncentrace vzorku

Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje koncentrace 10 ng/ $\mu$ l templátové DNA. Pokud je její koncentrace vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR (11) podle níže uvedeného vztahu. Snížením koncentrace DNA se sníží i koncentrace případných inhibitorů reakce, které mohou být ve vzorku přítomny.

$$d = (x \times y) / z \qquad v = x - d$$

- x požadované množství naředěné DNA ( $\mu$ l),
- y požadovaná koncentrace DNA (ng/ $\mu$ l),
- z změřená koncentrace DNA (ng/ $\mu$ l),
- d množství námi vyizolovaného vzorku potřebného pro přípravu x  $\mu$ l roztoku o koncentraci DNA z ( $\mu$ l),
- v množství PCR vody potřebné pro ředění vyizolované DNA na požadovanou koncentraci.

## 6 Literatura

- 1 Manuál kitu DNeasy®Plant Handbook, Qiagen, 2015
- 2 Uživatelský manuál k přístroji NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer.