	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10252.1 – Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food)	Vydání	2
		Revize	0

IZOLACE DNA PRO STANOVENÍ GMO METODOU PCR (KIT NUCLEOSPIN FOOD)

1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání deoxyribonukleové kyseliny (DNA) ze vzorku pomocí komerčního kitu Nucleospin Food. Součástí metodiky je i měření koncentrace a stanovení čistoty DNA.

2 Princip

Proces izolace (extrakce) nukleových kyselin je získávání DNA či RNA z daného vzorku za použití kombinace chemického a fyzikálního přístupu.

Stanovení koncentrace, případně čistoty izolátu DNA, se provádí pomocí spektrofotometrického nebo fluorescenčního měření.

3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

NucleoSpin® Food, výrobce Macherey–Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv obsahuje

- 1 Lysis Buffer CF.
- 2 Buffer C2.
- 3 Buffer C3.
- 4 Wash buffer CQW.
- 5 Wash buffer C5 (koncentrát).
- 6 Elution buffer CE.
- 7 NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).
- 8 Proteinase K (lyofilizát).
- 9 Proteinase buffer PB.
- 10 Collection Tubes (2 ml).

Další chemikálie potřebné pro izolaci DNA

- 11 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 12 Ribonuklease A 10 mg/ml (DNase and protease free) – RNáza A.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10252.1 – Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food)	Vydání	2
		Revize	0

13 Etanol denaturovaný 70%, pro čištění povrchů.

14 Etanol (95 – 100)% pro UV spektroskopii.

15 Chlornan sodný, (0,5 – 1)% roztok.

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

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

17 Trihydrát octanu sodného, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

18 Ledová kyselina octová, CH_3COOH .

19 Voda vhodná pro PCR.

Další chemikálie potřebné pro fluorescenční měření koncentrace DNA

20 Kit vhodný pro fluorescenční měření koncentrace DNA, např. Qubit 1X dsDNA BR Assay Kit, Thermo Fisher Scientific.

4 Přístroje a pomůcky

1 Vodní lázeň nebo Termoblok s třepacím nástavcem pro 2 ml zkumavky, rozsah teplot (65– 70) °C.

2 Laboratorní váhy s přesností 0,01 g.

3 Centrifuga.

4 Vortex nebo Minishaker.

5 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μl a sterilní špičky s filtrem.

6 Plastové sterilní zkumavky, 0,5 ml, 2 ml.

7 Mrazicí a hlubokomrazicí box.

8 UV lampa.

9 pH metr.


10 Horkovzdušná sušárna.

11 Nízkoobjemový spektrofotometr (vlnové délky 230 nm, 260 nm, 280 nm), např. NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer, výrobce Thermo Fisher Scientific.

12 Latexové rukavice bezpudrové, alobal, buničitá vata, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, sterilní zkumavky (přibližně 2ml).

13 Tlakový hrnec.

14 Fluorometr, např. Fluorometer Qubit™ 4, výrobce Thermo Fisher Scientific.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10252.1 – Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food)	Vydání	2
		Revize	0

15 Optické zkumavky vhodné pro fluorescenční měření koncentrace DNA, např. 0,5 ml pro QubitTM 4, výrobce Thermo Fisher Scientific.

5 Postup

5.1 Příprava 3M octanu sodného

Naváží se 40,81 g trihydrátu octanu sodného (17). Navážka se se rozpustí ve vodě (11) v celkovém objemu přibližně 80 ml. Ledovou kyselinou octovou (18) se upraví pH na 5,2. Potom se doplní vodou (11) do 100 ml. Sterilizuje se 30 min v tlakovém hrnci.

5.2 Izolace DNA

5.2.1 Obecné zásady pro izolaci DNA

Během celého postupu je naprosto nezbytné pečlivé zacházení se vzorky, aby se zamezilo kontaminaci jednoho vzorku stopami druhého, např. mikrokapénkami DNA, které se mohou uvolnit při pipetování a otvírání zkumavek, dotekem víček 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 uvnitř kroků vyměnit, nebo alespoň dekontaminovat opláchnutím v dekontaminačním roztoku (16) nebo etanolu (13) nebo chlornanu sodném (15) podle typu povrchu a vodou (11).
- Dojde-li k ukápnutí tekutiny, která obsahuje nebo by mohla obsahovat DNA, je nutno ji okamžitě vysát vatou a potřísněný povrch otřít vatou s dekontaminačním roztokem (16), 70% etanolem (13) nebo roztokem chlornanu sodného (15). Vata se vhodí do sáčku s DNA odpadem.
- Izolace DNA se provádí ve dvou paralelních stanoveních jednoho vzorku.
- Do každého běhu izolace DNA, a to vzorků i standardů, je nutno zařadit tzv. „blank“, kontrolu izolace, tj. slepý vzorek bez rostlinného materiálu, který dále postoupí PCR-detekci příslušného vnitřního genu – pro ověření čistoty reagensů a faktu, že během izolace nedošlo ke kontaminaci vzorků.

5.2.2 Příprava roztoků pro izolaci DNA kitem NucleoSpin[®] Food, výrobce Macherey–Nagel

Před zahájením izolace se ověří, že nedošlo ke změně v návodu pro použití kitu poskytnutého výrobcem (1).

Pufir C4

Pokud je pufir C4 již součástí kitu, tento krok se vynechá.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10252.1 – Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food)	Vydání	2
		Revize	0

Do tuby s obsahem pufru C3 (3) se kvantitativně převede celý obsah tuby obsahující pufr C2 (2) a dobře se promíchá. Výsledný pufr C4 je stabilní 1 rok při uchování při laboratorní teplotě. Pro dokonalejší rozpuštění obou komponent se doporučuje inkubace při 45 °C po dobu 5 min. Pokud se kit používá pouze příležitostně, je možné smíchat malé množství pufru C3 a C2 v poměru (1 : 4).

Pufr C5

Ke koncentráту pufru C5 (5) se přidá etanol (14) v množství, které je uvedeno na lahvičce pufru. Po zředění se označí přidání etanolu. Takto upravený pufr lze uchovávat při laboratorní teplotě 1 rok.

Proteináza K

K lyofilizované proteináze K (8) se přidá množství proteinázového pufru (9), které je uvedeno na ampuli s proteinázou K. Roztok proteinázy K je stabilní 6 měsíců při uchování v mrazicím boxu.

5.2.3 Izolace DNA kitem NucleoSpin® Food

Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů dekontaminačním roztokem (16), etanolem (13) a UV zářením po dobu 30 min. Vodní lázeň nebo termoblok se přehřeje na teplotu 65 °C. Lyzační pufr CF (1) se přehřeje na 65 °C a do dvou 2ml zkumavek se naváží 0,2 g zhomogenizovaného vzorku s přesností na 0,01 g.

5.2.4 Buněčná lyze


Ke vzorku se přidá 550 µl lyzačního pufru CF (1), 15 s se dobře promíchá na vortexu, přidá 10 µl proteinázy K a 10 µl RNázy A (12) a opět se promíchá na vortexu (2 – 3) s. Inkubuje se 30 min při 65 °C. Poté se směs centrifuguje po dobu 10 min (> 10000 g), až se buněčné zbytky usadí.

5.2.5 Příprava podmínek vázání DNA

Z kroku 5.2.4 se do nové 2ml zkumavky převede 1 díl (300 µl) čistého supernatantu. Přidá se 1 díl (300 µl) pufru C4 a 1 díl (300 µl) etanolu (14) a vortexuje se 30 s.

5.2.6 Vázání DNA na silikagel

Tuba NucleoSpin se umístí do nové 2ml centrifugační zkumavky a přidá se 400 µl směsi z kroku 5.2.5. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylíje. Pipetuje se dalších 400 µl směsi z kroku 5.2.5. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylíje.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10252.1 – Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food)	Vydání	2
		Revize	0

5.2.7 Promývání a sušení

První promytí: Pipetuje se 400 µl pufru CQW (4) do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije.

Druhé promytí: Pipetuje se 650 µl pufru C5 (5) do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije.

Třetí promytí: Pipetuje se dalších 250 µl pufru C5 (5) do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 2 min při 11000 g, aby se úplně odstranil pufr C5.

5.2.8 Vymytí DNA – eluce

Předeře se eluční pufr CE (6) na 70 °C. Tuba NucleoSpin se umístí do nové centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml. Na membránu v NucleoSpin tubě se pipetuje 100 µl předeřátého elučního pufru CE (6). Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě a poté se centrifuguje 1 min při 11000 g, aby se uvolnila DNA. Eluát se přepipetuje do nové centrifugační zkumavky.

Eluát obsahuje čistou genomovou DNA. Pro krátkodobé skladování se uchovává v chladničce, pro dlouhodobé v mrazicím boxu.

5.3 Precipitace DNA

Pokud je vyizolovaná DNA znečištěna, provádí se ze získaného eluátu etanolová precipitace DNA.

Etanol (14) se nechá vychladit v mrazicím boxu. Do roztoku DNA se přidá 1/10 objemu octanu sodného (17). Poklepáním na zkumavku se promísí. Do DNA s octanem sodným se přidá trojnásobné množství vychlazeného etanolu (14). Zkumavka se nechá v mrazicím boxu přes noc, nebo 30 min v hlubokomrazicím boxu. Centrifuguje se 20 min při 12000 ot/min. Obsah zkumavky se vylije. K peletu se přidá 500 µl etanolu (14) na promytí, kývavým pohybem se pelet odlepí a rozpustí. Poté se centrifuguje 10 min při 12000 ot/min.

Obsah zkumavky se opatrně vylije a zkumavka se nechá otevřená při laboratorní teplotě, aby etanol vypřchal. Nesmí se přesušit.


Pelet DNA, který zůstane na dně zkumavky, se rozpustí (vortexuje se při nízkých otáčkách nebo se ručně poklepe) v 50 µl vody (11).

5.4 Měření koncentrace vyizolované DNA

Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické nebo fluorescenční stanovení její koncentrace (případně výskytu dalších příměsí).

5.4.1 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

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10252.1 – Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food)	Vydání	2
		Revize	0

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 absorpance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm.

Poměr absorbancí A260/A280

Při poměru hodnot $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$ se považuje vzorek vyizolované DNA za čistý. Hodnoty poměru absorbancí A_{260}/A_{280} se nejčastěji pohybují v rozmezí (1,7 – 2,0). Nízké hodnoty tohoto poměru většinou indikují, že je vzorek kontaminovaný proteiny nebo reagensy, jako je např. fenol, nebo že vzorek obsahuje nízkou koncentraci DNA ($< 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$). 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.

Poměr absorbancí A260/A230

Hodnoty A_{260}/A_{230} pro čisté nukleové kyseliny bývají většinou vyšší než hodnoty A_{280}/A_{260} , a to v rozmezí (2,0 – 2,2). Hodnoty odlišující se od tohoto rozmezí indikují buď problematický vzorek nebo použití nevhodného izolačního postupu. 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.


5.4.2 Fluorometrické měření koncentrace vyizolovaného vzorku

Ke stanovení koncentrace DNA v izolátu se využije měření fluorescence. Podle obvyklých očekávaných hodnot koncentrace ve vybere vhodný kit obsahující 2 standardy pro kalibrační křivku a pracovní roztok obsahující selektivní barvivo pro dsDNA. Vzorky i standardy se měří ve vhodných optických zkumavkách.

5.5 Vlastní měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA pomocí Nanodropu se měří proti slepému vzorku, kterým je roztok, v němž je DNA rozpuštěná. Ve většině případů se tedy jedná o eluční pufr (6) použitého izolačního kitu. K měření na spektrofotometru NanoDrop se použijí 2 μl vzorku. Každý vzorek se měří dvakrát. Z naměřených hodnot se vypočítá průměr.

Koncentrace DNA pomocí přístroje Qubit 4 se měří za použití optických zkumavek Qubit a vhodného Qubit kitu. K měření se použijí 2 μl vzorku.

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10252.1 – Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food)	Vydání	2
		Revize	0

5.6 Úprava koncentrace vzorku

Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje koncentrace (10 – 20) ng/μl templátové DNA. Pokud je její koncentrace vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR (19) 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 (μl),
- y požadovaná koncentrace DNA (ng/μl),
- z změřená koncentrace DNA (ng/μl),
- d objem vyizolovaného vzorku potřebného pro přípravu x μl roztoku o koncentraci DNA z (μl),
- v objem PCR vody potřebné pro ředění vyizolované DNA na požadovanou koncentraci (μl).

6 Literatura

- 1 Manuál kitu Genomic DNA from Food, firmy Machery – Nagel.
- 2 Uživatelský manuál k přístroji NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer.
- 3 Uživatelský manuál k přístroji Qubit™ 4 Fluorometer.