IZOLACE DNA PRO STANOVENÍ GMO METODOU PCR (KIT GENELUTE)

1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání deoxyribonukleové kyseliny (DNA) ze vzorku pomocí komerčního kitu GenElute. 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.

GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit, výrobce Sigma–Aldrich, kit pro izolaci genomické DNA z čerstvého rostlinného materiálu, obsahuje

1 Lysis solution Part A.

2 Lysis solution Part B.

3 Precipitacion Solution.

4 Binding Solution.

5 Column Preparation Solution.

6 Wash Solution Concentrate.

7 Elution Solution.

8 GenElute Filtration Columns in Tubes.

9 GenElute Nucleic Acid Binding Columns in Tubes.

10 Collection Tubes, 2,0 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.

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 200ml 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, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$.

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 2ml zkumavky, rozsah teplot (65 – 70) °C.

2 Laboratorní váhy s přesností 0,001 g.

3 Centrifuga.

4 Vortex nebo Minishaker.

5 pH metr.

6 UV lampa.

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

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

9 Mrazicí box a hlubokomrazicí box.

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.

15 Optické zkumavky vhodné pro flurescenční měření koncentrace DNA, např. 0,5 ml pro Qubit™ 4, výrobce Thermo Fisher Scientific.

5 Postup

5.1 Příprava 3M octanu sodného

Naváží se 40,81 g trihydrátu octanu sodného (17) na 100 ml vody (11). Navážka se vmíchá do 80 ml vody (11). 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), 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 reagencií a faktu, že během izolace nedošlo ke kontaminaci vzorků.

5.2.2 GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit, výrobce Sigma–Aldrich

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

Ověří se, zda v chemikáliích není sraženina. Pokud se sraženina objeví u kterékoli reagencie, zahřeje se na (55 – 65) °C, dokud se nerozpustí. Před použitím se nechá zchladnout na laboratorní teplotu.

Wash Solution: Wash Solution Concentrate (6) se zředí etanolem (14) v množství uvedeném v kitu. Po zředění se vyznačí přidání etanolu.

5.2.3 Izolace DNA kitem GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep

Připraví se pracovní plocha. Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od molekul DNA otřením povrchů dekontaminačním roztokem (16), etanolem (13) a UV zářením po dobu 30 min. Vodní lázeň se předehřeje na teplotu 65 °C. Naváží se 2 × 0,06 g homogenizovaného vzorku s přesností na 0,005 g, a to každá dávka do označené 2ml zkumavky.

5.2.4 Buněčná lyze

Do zkumavky se přidá 350 µl Lysis Solution Part A (1) a 50 µl Lysis Solution Part B (2). Po přidání Part B se vytvoří bílá sraženina. Suspenze se pečlivě promíchá na vortexu asi 15 s. Štěpení RNAázou: K lyzační směsi se těsně před inkubací přidá 10 µl RNAázy (12) a vortexuje (2 – 3) s. Směs se inkubuje 10 min při 65 °C s občasným převrácením zkumavek, aby se rozpustila sraženina.

5.2.5 Vysrážení zbytků

Ke směsi se přidá 130 µl Precipitation Solution (3), směs se dobře zamíchá převracením a vloží se na 5 min na led. Potom se směs centrifuguje 5 min při (12000 – 16000) g. Buněčné zbytky, bílkoviny a polysacharidy zůstanou v peletu.

5.2.6 Filtrace zbytků

Vzniklý supernatant se pečlivě odpipetuje do filtrační kolony GenElute (modrá s 2ml sběrnou zkumavkou). Centrifuguje se 1 min při maximální rychlosti (14000 ot/min). Tím se odstraní buněčné zbytky, které zůstaly po vysrážení zbytků. Potom se odstraní filtrační kolona (modrá část) a sběrná zkumavka se uchová.

5.2.7 Příprava pro navázání

K proteklé tekutině z předchozího kroku se přidá 700 µl Binding Solution (4). Uzavře se a pečlivě promíchá převracením.

5.2.8 Příprava vázací kolony

Kolona GenElute Miniprep Binding Column (s červeným kroužkem) se vloží do připravené nové mikrocentrifugační zkumavky, pokud tam již není vložena. Do každé kolony se přidá 500 µl Column Preparation Solution (5) a centrifuguje se (30 – 60) s při 12000 g. Proteklá tekutina se vylije.

5.2.9 Přidání lyzátu

Do vázací kolony připravené v kroku 5.2.8 se opatrně pipetuje 700 µl směsi z kroku 5.2.7 a centrifuguje se 1 min při maximální rychlosti. Proteklá tekutina se vylije a zachová se sběrná zkumavka. Kolona se vrátí do sběrné zkumavky. Do kolony se pipetuje zbylý lyzát z kroku 5.2.7 a opakuje se centrifugace 1 min při maximální rychlosti. Proteklá tekutina se sběrnou zkumavkou se odstraní. Kolona se vloží do nové sběrné zkumavky.

5.2.10 Promývání

První promytí kolony: Do vázací kolony v nové 2ml zkumavce se přidá 500 µl Wash Solution (6), který se zředí podle návodu k použití kitu. Centrifuguje se 1 min při maximální rychlosti. Vylije se prošlá tekutina a uchová se sběrná zkumavka.
Druhé promytí kolony: Do kolony se napipetuje dalších 500 µl zředěného Wash Solution (6) a centrifuguje se při maximální rychlosti 3 min, aby se kolona vysušila. Prošlá tekutina se nesmí dotknout kolony.

5.2.11 Eluce DNA

Vázací kolona se přenese do nové 2ml sběrné zkumavky. Na membránu se pipetuje 100 µl na 65 °C předehřátého Elution Solution (7) a centrifuguje se 1 min při maximální rychlosti. Eluát se jímá do sběrné 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.
Do roztoku DNA se přidá 1/10 objemu octanu sodného (17). Poklepáním na zkumavku se promísí. Etanol (14) se dá vychladit do mrazicího boxu. 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 vyprchal. 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 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 reagenciemi, jako je např. fenol, nebo že vzorek obsahuje nízkou koncentraci DNA (< 10 ng/µl). 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 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 guadininu, 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 minimálně 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 (7) použitého izolačního kitu. K měření na spektrofotometru NanoDrop se použijí se 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.

5.6 Úprava koncentrace vzorku

Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje koncentrace (5 – 10) 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.

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

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

6 Literatura

1 Manuál kitu GenEluteTM Plant Genomic DNA Miniprep Kit firmy Sigma-Aldrich pro izolaci DNA z rostlinného materiálu.
2 Uživatelský manuál k přístroji NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer.
3 Uživatelský manuál k přístroji Qubit™ 4 Fluorometer