

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	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. Součástí metodiky je i měření koncentrace a stanovení čistoty DNA.

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.

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

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) dle návodu výrobce kitu.
- 7 Buffer AW2 (koncentrát), před prvním použitím se ředí (95 – 100)% etanolem (13) dle návodu výrobce kitu.
- 8 Buffer AE.
- 9 RNase A (100 mg/ml).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	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.

Další chemikálie potřebné pro fluorescenční měření koncentrace DNA

- 16 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, 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), např. NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer, výrobce Thermo Fisher Scientific.
- 13 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

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

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

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.).

5 Postup

5.1 Izolace DNA

5.1.1 Obecné zásady pro izolaci DNA

Během celého postupu je naprosto nezbytné pečlivé zacházení se vzorky, aby se zamezilo kontaminaci jednoho vzorku stopami druhého, např. mikropipetkami 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 (15) nebo etanolu (12) nebo chlornanu sodném (14) podle typu povrchu a vodou (10).
- 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 (14). 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.

5.1.2 Postup izolace DNA

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

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

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 minut.

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. Vodní lázeň nebo termoblok se vytemperuje na teplotu 65 °C.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

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.

5.1.2.1 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.

5.1.2.2 Vysrážení zbytků

K buněčnému lyzátu se přidá 130 µl 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.

5.1.2.3 Vázání DNA

Proteklá tekutina se přenese do nové 2ml zkumavky a přidá se 750 µl pufru AW1 (6). Promíchá se opakovaným pipetováním. Napipetuje se 650 µl 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.

5.1.2.4 Promývání DNA

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

5.1.2.5 Eluce DNA

Kolonky DNeasy Mini spin se přemístí do nových zkumavek a přesně na membránu se napipetuje 100 µl 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 nebo fluorescenční stanovení její koncentrace (případně výskytu dalších příměsí).

5.2.1 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

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

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 $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$ 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 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.

5.2.2 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 zkuševkách.

5.3 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 (8) 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	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10700.1 – Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini)	Revize	0

5.4 Úprava koncentrace vzorku

Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje koncentrace 10 ng/μl 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 (μl),
- y požadovaná koncentrace DNA (ng/μl),
- z změřená koncentrace DNA (ng/μl),
- d množství námi 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 DNeasy® Plant Handbook, Qiagen.
- 2 Uživatelský manuál k přístroji NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer.
- 3 Uživatelský manuál k přístroji Qubit™ 4 Fluorometer.