

TECHNIKA IZOLACJI DNA METODĄ KOLUMNOWĄ

1. Warunki wstępne

Należy powtórzyć wiadomości dotyczące budowy i właściwości kwasów nukleinowych.

2. Wstęp

Izolacja DNA jest wyjściowym etapem wielu procedur stosowanych w biologii molekularnej i diagnostyce. Celem izolacji DNA jest otrzymanie preparatu wysokocząsteczkowego, oczyszczonego DNA z maksymalną wydajnością.

Materiał przeznaczony do izolacji DNA powinien być pobierany jałowo i do czasu izolacji przechowywany w odpowiednich warunkach, tj. takich, które zabezpieczają DNA przed degradacją i kontaminacją. Sposób przechowywania zależy od rodzaju tkanki; np. miękkie tkanki zwierzęce przechowywać należy zamrożone w temp. -20°C

Wybór metody izolacji i oczyszczania zależy od rodzaju kwasu nukleinowego jaki chcemy uzyskać (DNA genomowe, mitochondrialne, plazmidowe), jego pochodzenia (roślinne, zwierzęce, bakteryjne, wirusowe), rodzaju materiału z jakiego przeprowadzamy izolację (tkanka, hodowla komórkowa), oczekiwanych rezultatów (czystość, jakość, czas izolacji) oraz przeznaczenia (PCR, klonowanie, synteza cDNA). Metoda izolacji powinna uwzględniać parametry warunkujące zachowanie natywnej struktury DNA, takie jak: pH, temperatura, siła jonowa, obecność deoksyrybonukleaz czy odporność mechaniczna DNA.

Etapy izolacji DNA:

- I. wstępne przygotowanie materiału biologicznego do izolacji DNA: oczyszczanie, rozdrobnienie, zawieszanie w buforze
- II. dezintegracja i liza komórek:
 - rozbicie ściany i błony komórkowej (homogenizacja – miękkie tkanki zwierzęce, sonifikacja – zawiesiny komórek, rozcieranie – komórki roślinne, liza detergentami – hodowle komórkowe, liza enzymatyczna – komórki bakterii, drożdży);
 - uwolnienie DNA i innych komponentów wewnątrzkomórkowych do roztworu
- III. inaktywacja komórkowych nukleaz silnymi enzymami proteolitycznymi (proteinaza K, pronaza)
- IV. oddzielenie izolowanego kwasu od pozostałych komponentów komórek (sposób zależy od stosowanej metody)
- V. oczyszczenie i zagęszczenie roztworu DNA (nie zawsze jest konieczne; stosowane w przypadku niektórych metod)
- VI. przechowywanie roztworu czystego DNA w $+4^{\circ}\text{C}$ lub zamrożony w -20°C

Izolacja DNA z tkanek metodą kolumnową (*Genomic Mini*, AA Biotechnology)

Metoda ta opiera się na zdolności wiązania się DNA do złóż krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Komórki lub tkanka są lizowane w buforze lizującym zawierającym sole chaotropowe i detergenty niejonowe (**bufor TL**). Dodatkowo w procesie lizy uczestniczy silna proteaza (**Proteinaza K**). W tych warunkach dochodzi do lizy

komórek i degradacji wszystkich białek. Następnie mieszanina nanoszona jest na **minikolumnę ze specjalnym złożem krzemionkowym**. DNA przechodząc przez złożę osiada na nim, podczas gdy zanieczyszczenia przechodzą nie wiążąc się. Po wypłukaniu z kolumny resztek zanieczyszczeń (za pomocą **roztworu A1**), oczyszczone DNA wymywane jest z niej niskojonowymi buforami (**bufor Tris - TB**) lub wodą i nadaje się do bezpośredniego wykorzystania bez konieczności precypitacji.

Oznaczanie stężenia i czystości roztworów kwasów nukleinowych

W celu pomiaru stężenia wyizolowanego DNA najczęściej stosowana jest metoda spektrofotometryczna. Oznaczanie stężenia roztworu DNA opiera się na pomiarze absorpcji światła (gęstości optycznej OD) przy długości fali najpierw 260 nm, a następnie 280 nm. OD przy 260 nm jest równa 1 dla dwuniciowego DNA o stężeniu 50 µg/ml, dla jednoniciowego DNA o stężeniu 33 µg/ml. Stosunek OD_{260}/OD_{280} opisuje czystość preparatu. Wartość tego współczynnika między 1,8 – 2,0 oznacza, że wyizolowane preparaty są wystarczająco oczyszczone, z kolei wartość równa < 1,8 świadczy o tym, że w danym preparacie DNA znajdują się białka, natomiast wartość > 2,0 wskazuje na obecność RNA, w związku z czym preparat taki wymaga dodatkowego oczyszczenia.

Wykrywanie obecności DNA

Obecność DNA można wykryć za pomocą reakcji Feulgena. Reakcja Feulgena jest szeroko stosowana w metodach histochemicznych do wybiórczego wybarwiania jąder i chromosomów. Jest to technika półilościowa; na podstawie intensywności uzyskanego zabarwienia można ocenić względne różnice w zawartości DNA między analizowanymi próbkami/preparatami.

Reakcja ta składa się z dwóch etapów:

- I. tkankę lub wyizolowany DNA poddaje się hydrolizie w kwasie solnym, co powoduje pęknięcie pierścienia pentozowego dezoksyrybozy i powstanie grupy aldehydowej
- II. wykrywanie wolnej grupy aldehydowej odczynnikiem Schiffa; DNA barwi się na kolor czerwony

Ponieważ hydroliza nie powoduje pęknięcia pierścieni rybozy, reakcja ta nie wykrywa RNA.

3. Opis procedury

Ćwiczenie 1. Izolacja DNA z komórek zwierzęcych metodą kolumnową

1. Komórki w ilości 1×10^6 należy odwirować dokładnie i zawiesić w 100 µl buforu Tris (10mM TRIS.HCl pH 8.5).
2. Dodać: 150 µl uniwersalnego roztworu lizującego LT i 20 µl roztworu Proteinazy K
3. Całość wymieszać przez worteksowanie i inkubować w temperaturze 37°C przez 20 min
4. Przenieść próbkę do 75° C i inkubować 5 min.

5. Próbkę intensywnie wortexować 20 s, następnie wirować 3 min. przy 10-15 tys. RPM.
6. Pobrać supernatant i nanieść na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA i wirować 1 min. przy 10-15 tys. RPM.
7. Dodać do kolumny 500 µl roztworu płuczającego A1 i wirować 1 min. przy 10-15 tys. RPM.
8. Przenieść minikolumnę do nowej probówki 2 ml (w zestawie) i dodać 400 µl roztworu płuczającego A1, wirować 2 min. przy 10-15 tys. RPM.
9. Osuszoną minikolumnę umieścić w nowej probówce 1,5 ml i do złoza znajdującego się na dnie kolumny dodać 100 µl buforu Tris (10mM TRIS.HCl pH 8.5)
10. Inkubować próbki przez 5 min. w temperaturze pokojowej, a następnie wirować 1 min. przy 10-15 tys. RPM.
11. Minikolumnę usunąć, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przetrzymywać w lodówce lub zamrozić do czasu dalszych analiz.

Ćwiczenie 2. Wykrywanie DNA za pomocą reakcji Feulgena

1. Odparafinowane i uwodnione preparaty przepłukać w wodzie destylowanej (2 min.)
2. Umieścić jeden preparat w 1M HCl (czas zależy od zastosowanego utrwalacza i temperatury), a drugi w wodzie destylowanej
3. Przepłukać w wodzie destylowanej (1 min.)
4. Zanurzyć w odczynniku Schiffa (30 - 60 min)
5. Przepłukać w roztworze pirosiarczynu potasu (2 x 2 min.)
6. Odwodnić (szereg alkoholi, ksylen) i zamykać szkiełkiem nakrywkowym

4. Wymagania

Student powinien potrafić przeprowadzić izolację DNA metoda kolumnowa oraz reakcję Feulgena. Student powinien znać podstawy teoretyczne izolacji DNA z zastosowaniem metody kolumnowej oraz reakcji Feulgena oraz umieć wyjaśnić znaczenie poszczególnych etapów przeprowadzanych procedur.

5. Literatura dodatkowa

Nowak Z, Gruszczyńska J. Wybrane techniki i metody analizy DNA. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2007, S.13-19

Słomski R, 2008. Analiza DNA, teoria I praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008. S.44-53