

Izolace genomové DNA ze savčích buněk, stanovení koncentrace DNA pomocí absorpční spektrofotometrie

IZOLACE GENOMOVÉ DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) představuje základní genetický materiál většiny živých organismů. Její nejběžnější struktura je pravotočivá dvoušroubovice tvořená dvěma antiparalelními polynukleotidovými řetězci. Oba řetězce jsou vzájemně vázány dvěma vodíkovými vazbami mezi bázemi adeninem (A) a thyminem (T) a třemi mezi cytosinem (C) a guaninem (G). Kostru každého řetězce tvoří zbytky deoxyribosy a kyseliny fosforečné, dovnitř šroubovice směřují jednotlivé báze. DNA u prokaryot se nachází v bakteriálním chromozomu a v plazmidech, u rostlin v buněčném jádře, chloroplastech a mitochondriích, u živočichů a člověka v buněčném jádře a v mitochondriích. DNA lze izolovat buď jako celkovou genomickou DNA, nebo si dle potřeby vybrat konkrétní typ DNA k izolaci.

Pro izolaci DNA z živých organismů byla vyvinuta řada metod, které se od sebe mohou značně odlišovat. Volba konkrétní izolační techniky pak závisí na typu použitého biologického materiálu, dále na požadované rychlosti a účinnosti metody, na dalším využití získané DNA a v neposlední řadě také na vlastní finanční náročnosti celého procesu.

Izolace DNA obvykle probíhá v několika základních krocích. Prvním krokem u všech metod je vždy mechanické narušení tkání či rostlinných pletiv např. mrazem nebo homogenizací. Následuje lýze buněk, cytoplazmatických a jaderných membrán a denaturace proteinů. Nejčastěji se pro tento účel používají detergenty jako je dodecylsulfát sodný (SDS) nebo Triton X-100. Buněčný obsah včetně DNA se uvolní do extrakčního pufru, který vždy musí obsahovat chelatační činidlo etylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA), která vychtá vápenaté ionty z extraktu. Tyto ionty fungují jako kofaktory nukleáz (enzymy štěpící nukleové kyseliny), které by izolovanou DNA rozštěpily a znehodnotily. Do extrakčního pufru se dále přidávají proteinázy. Jsou důležité pro odstranění histonů (proteinů interagujících s DNA), které ovlivňují čistotu izolované nukleové kyseliny. Ze vzorků se odstraní proteiny a polysacharidy např. pomocí octanu draselného nebo fenol-chloroformovou extrakcí DNA, kdy se k lyzátu přidává směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Fenol je organická látka rozpouštějící se jak ve vodě, tak v chloroformu, ochotněji se však rozpouští v chloroformu. Chloroform se ve vodě nerozpouští. Po přidání směsi fenolu a chloroformu k extraktu tkáňové veškeré tuky přecházejí do chloroformu, proteiny a část polysacharidů se působením rozpouštědel vysráží a DNA zůstane ve vodné fázi. Pro dokonalé odstranění polysacharidů se někdy používá CTAB (cetyltrimethylamonium bromid). DNA se z vodné fáze vysráží přidáním absolutního

ethanolu. Lze ji dále promýt 80% ethanolem a rozpustit ve vodě nebo TE pufru. Pro dlouhodobější skladování se DNA uchovává zamražená v TE pufru.

Novější metody využívají adsorpce DNA na kuličky skla v přítomnosti chaotropních solí. Takto imobilizovaná nukleová kyselina se promývá a tím zbavuje nečistot. Nakonec se DNA z kuliček uvolní snížením iontové síly roztoku. Jde o velmi rychlou a efektivní metodu.

Další z metod izolace deoxyribonukleoproteinu (DNP) z buněk je tzv. vysolovací metoda. DNA je v buňce vázána s bílkovinami ve formě DNP, který je možné separovat od ostatních částí zhomogenizovaného biologického materiálu pomocí 1M roztoku NaCl. Po zředění vzorku se DNP vysráží jako vláknitý produkt. Získaný DNP je výchozím materiálem pro izolaci DNA. Po odstranění proteinů a polysacharidů se DNA ze vzorku vysráží ethanolem. Tato metoda je velmi jednoduchá a levná při zachování velkého výtěžku izolované DNA.

SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA

Viditelné záření tvoří jen malý úsek z oblasti elektromagnetického vlnění v rozmezí délek 400-700 nm. Přilehlá oblast se nazývá blízká ultrafialová (200-400 nm) a blízká infračervená (700-2000 nm) oblast. V každé biologické laboratoři je nezbytným vybavením přístroj na měření spektrálních veličin ve viditelné a UV oblasti, tzv. spektrofotometr, který pracuje v rozsahu 200-1000 nm, kde absorbují téměř všechny biologicky zajímavé látky (kromě sacharidů). Lze tedy využít jejich charakteristických absorpčních pásů a jejich koncentraci jednoduše stanovit na základě spektrálních vlastností těchto látek.

Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů, proto molekulová absorpční spektra v UV-VIS oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra. Molekulové orbitály vznikají při tvorbě vazby z atomových orbitalů. Předpokládejme, že na spektrofotometrickou kyvetu s optickou drahou l , obsahující absorbující dráhu, dopadá světlo o intenzitě I_0 . Pokles intenzity světla v důsledku jeho absorpce vrstvou roztoku (dl): $-dI = k \times I \times dl$, kde k je konstanta úměrnosti. Po separaci proměnných a integraci získáme vztah $\log \frac{I_0}{I} = jc$ (Lambertův zákon), kde I je intenzita světla vystupujícího z kyvety.

Při studiu závislosti poklesu intenzity světla na koncentraci při konstantní délce kyvety vycházíme z předpokladu, že dl bude, přes jinou konstantu j úměrné vzrůstu koncentrace: $-dI = jI dc$, který opět integrujeme v intervalu 0 až c , a získáme Beerův zákon: $\log \frac{I_0}{I} = jc$. Veličina I_0 je intenzita světla do kyvety vstupující a I je intenzita světla vystupujícího. Poměrem těchto dvou hodnot se dostaneme k vyjádření transmitance

$T = \frac{I}{I_0}$, která je často vyjádřena v procentech. Transmittance je ovšem pro laboratorní použití nevhodná, neboť není přímo úměrná koncentraci absorbující látky. Veličinou, která tímto nedostatkem netrpí je absorbance A : $A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T}$. Intenzita paprsku nemusí být vždy snižována jen absorpcí, může jít i o rozptyl záření na velkých částicích nebo o pohlcení fotonu s excitací molekuly do vyššího energetického stavu. Tato zeslabení intenzity je vhodné kvantifikovat jako optickou hustotu: $OD = \log \frac{I_0}{I}$.

Spojíme-li oba zákony dohromady, získáme jeden z nejznámějších zákonů fyzikálně-chemických, **Lambert-Beerův zákon**:

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

kde ε je konstanta úměrnosti, odvoditelná z výše definovaných konstant k a j . Absorbance je bezrozměrná veličina musí mít ε rozměr (délka⁻¹×koncentrace⁻¹). Pokud je koncentrace vyjádřena v mol×l⁻¹ má ε rozměr cm⁻¹×l×mol⁻¹ a jde o molární absorpční (extinkční) koeficient. Pokud je analyzovaným vzorkem směs látek, které absorbují při dané vlnové délce je měřená absorbance součtem všech dílčích absorbancí.

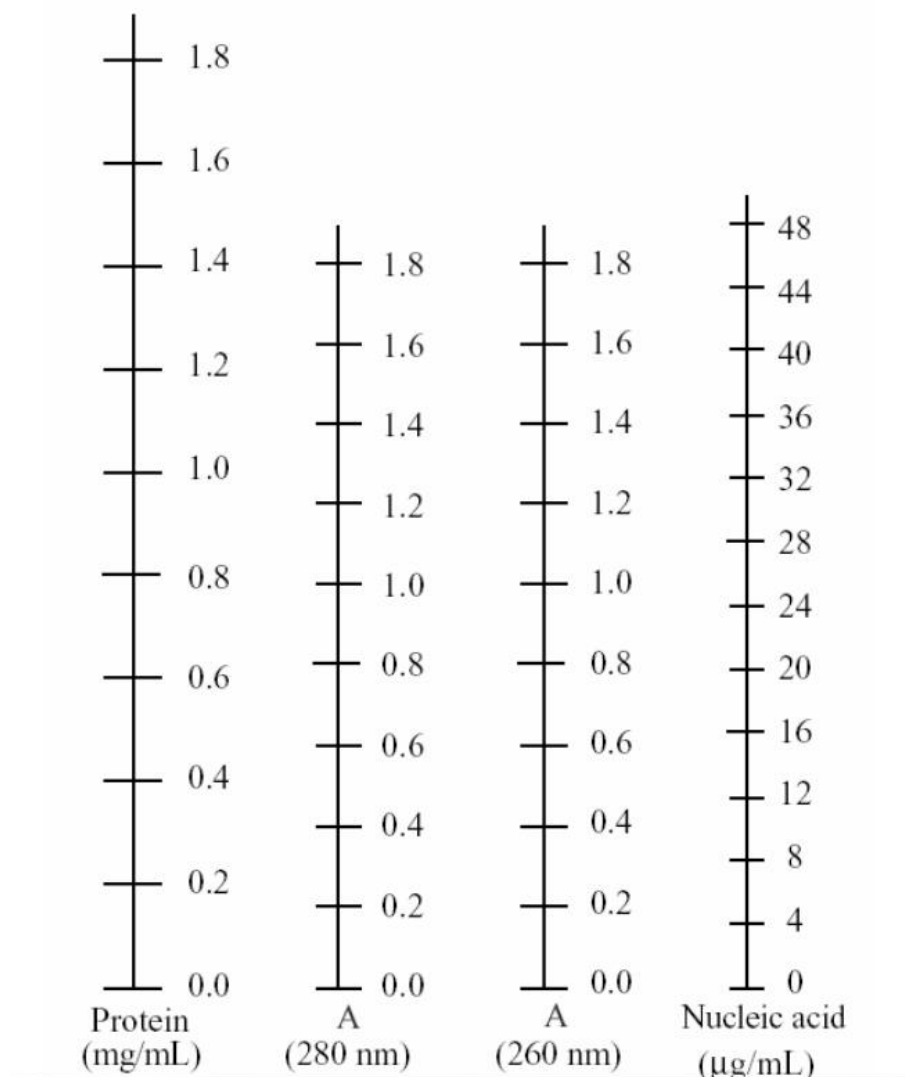
Koncentraci izolované DNA nejčastěji měříme pomocí spektrofotometru. Nukleové kyseliny absorbují nejintenzivněji světlo o $\lambda = 260$ nm, kdy hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci DNA. Při měření koncentrace DNA platí:

$$A(260 \text{ nm}) = 1 \text{ při } c(\text{dsDNA}) = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$A(260 \text{ nm}) = 1 \text{ při } c(\text{ssDNA}) = 33 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pro maximální přesnost měření by měla být koncentrace vzorku v kyvetě taková, aby hodnoty absorbancí vycházely mezi 0,1 a 1,0. V tomto rozmezí vykazuje kalibrační křivka vysokou linearitu. Koncentraci DNA v daném vzorku lze stanovit několika způsoby:

- 1) zjištění koncentrace DNA změřením $A(260 \text{ nm})$ a $A(280 \text{ nm})$:
 $c \text{ DNA} = 62,9 \times A(260 \text{ nm}) - 36,0 \times A(280 \text{ nm}) \text{ } [\mu\text{g/ml}]$
- 2) zjištění koncentrace DNA změřením $A(230 \text{ nm})$ a $A(260 \text{ nm})$:
 $c \text{ DNA} = 49,1 \times A(260 \text{ nm}) - 3,48 \times A(230 \text{ nm}) \text{ } [\mu\text{g/ml}]$
- 3) pomocí nomogramu (obr. 1)



Obr. 1: Nomogram pro učení koncentrace DNA a proteinů ve vzorku pomocí absorpance při 260 a 280 nm.

Obvykle je izolovaná DNA znečištěná zejména proteiny a polysacharidy. Dalším nutným krokem v laboratorní praxi je tedy určit čistotu získané DNA, abychom následně mohli stanovit vhodnou metodu přečištění této nukleové kyseliny. Většina technik molekulární biologie a biofyziky vyžaduje použití čisté DNA, proto je nezbytné po izolaci zařadit purifikační krok. Míru kontaminace DNA určujeme z poměru absorpance při 260 nm a 280 nm. Při měření čistoty DNA platí:

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) \in 1,7; 1,8$ čistá DNA

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) < 1,7$ znečištěná DNA (proteiny nebo organické látky)

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) > 1,9$ DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami

Úloha 1: Spočítejte navážku nebo objem potřebných komponent pro přípravu zadaných roztoků a tyto roztoky namíchejte:

Roztok LB (25 ml): 0,3M sacharóza
10 mM TRIS pH 7,5
5 mM MgCl₂ × 6H₂O
1% Triton X-100

Roztok R (25 ml): 10 mM TRIS pH 7,5

Roztok P (25 ml): 10 mM TRIS pH 7,5
40 mM EDTA pH 8,0
4 mM CaCl₂ × 2H₂O
300 mM NaCl
4% SDS

Pufr TE (25 ml): 10 mM TRIS pH 8
1 mM EDTA pH 8

5 M NaCl (10 ml)

96% Ethanol (10 ml)

70% Ethanol (10 ml)

Úloha 2: Izolujte lidskou genomovou DNA vysolovací metodou

Pomůcky: centrifuga, vortex, automatické pipety, špičky, mikrozkuhavky

Chemikálie: Roztok LB, roztok R, roztok P, proteinasa K, NaCl, ethanol, TE pufr

Postup:

Připraví vedoucí cvičení:

1. Do kultivační lahve T25 nasadte 10⁶ savčích buněk (CHO-K, V-79, A2780, apod.).
2. Inkubujte 48 hod při 37 °C v 5% atmosféře CO₂.
3. Odsajte médium a vrstvu buněk promyjte 2 × 5 ml předehřátého PBS 1×.
4. Přidejte 500 μl roztoku trypsinu 1×.
5. Inkubujte 5 min nebo do doby, než se buňky pustí podkladu.
6. Trypsinizaci zastavte přidáním 500 μl FBS (fetální bovinní sérum) nebo plnohodnotného média.
7. Spočítejte buňky a nařeďte suspenzi tak, abyste měli 10⁶ buněk v 500 μl vzorku.

Pracujte ve dvojicích/jednotlivě:

8. Ze suspenze buněk odeberte 500 μl vzorku (obsahující 10^6 buněk) a přeneste jej do čisté a označené mikrozkušavky.
9. K vzorku přidejte 1000 μl roztoku LB a protřepejte.
10. Centrifugujte 5 min při 4 000 rpm.
11. Odstraňte supernatant.
12. K peletě přidejte 175 μl roztoku R.
13. Třepáním důkladně rozbijte peletu.
14. Centrifugujte při 4000 rpm 5 min.
15. Odstraňte supernatant a k sedimentu přidejte 95 μl roztoku R.
16. Třepáním rozbijte sediment a postupně přidejte 35 μl roztoku P a 4 μl proteinasy K.
17. Důkladně promíchejte překlopením. Nesmí se napěnit!
18. Inkubujte při 37 °C přes noc (možno prodloužit na 3 dny nebo zamrazit).
19. Ke schladlým vzorkům přidejte 400 μl 5 M NaCl a důkladně protřepejte.
20. Centrifugujte 15 min při 4000 rpm.
21. Supernatant opatrně přepipetujte do čisté a označené 1,5 ml mikrozkušavky.
22. Centrifugujte 10 min při 14 000 rpm.
23. Supernatant přepipetujte do nové 1,5 ml mikrozkušavky.
24. Přidejte 350 μl vychlazeného 100% ethanolu.
25. Vysrážejte DNA překlápěním.
26. Centrifugujte 15 min při 14 000 rpm.
27. Odstraňte supernatant.
28. K peletě přidejte 200 μl vychlazeného 80% ethanolu.
29. Centrifugujte 15 min při 14 000 rpm.
30. Odstraňte supernatant.
31. Nechte odpařit zbytek ethanolu.
32. DNA rozpouštějte v TE pufru při 70 °C 5 min nebo při RT přes noc.
33. Spočítejte teoretickou koncentraci DNA v roztoku, pokud víte, že jedna buňka obsahuje cca 6,6 pg genomické DNA.
34. Vzorek pro měření pomocí UV spektrometrie nařeďte tak, aby měl absorpční 0,5 OD.
35. Změřte absorpční vzorku DNA pomocí absorpčního spektrofotometru – zaznamenejte hodnoty absorpce vzorku nutné k výpočtu skutečné koncentrace DNA v roztoku.
36. Spočítejte koncentraci DNA dle rovnice: $c = (A_{260} - A_{350}) * 50 * \text{ředění}$.
37. Spočítejte čistotu izolované DNA.
38. DNA uchovávejte při teplotě 2–8 °C při krátkodobém použití, při teplotách -20 °C nebo -80 °C pro dlouhodobé skladování.