

Izolace genomové DNA z rostlinných tkání použitím fenol-chloroformu

I. Homogenizace tkáně

1. Tekutým dusíkem misky i tloučky nejprve vychladíme tak, že dusík nalijeme do misky a postupně ho přiléváme až do řádného zchlazení misky, při kterém již nebude docházet k výraznému odpařování dusíku.

2. K dusíku v misce přidáme tkáň a pomocí tloučku ji rozmělníme na jemný prášek. Získaný prášek kopistkou přeneseme do zkumavky s 2X CTAB extrakčním pufrem. Pufr je předeřhátý na 65°C. Na 50 mg tkáně dáváme 0,5 ml 2X CTAB extrakčního pufru.

3. Roztok inkubujeme ve zkumavce v horizontální poloze při 65°C, nejméně 1 hodinu, přičemž zvolna promícháváme.

! Abychom zamezili nukleolytickému štěpení DNA, s rozmělněným materiálem pracujeme rychle, nenecháme jej roztát, a co nejdříve jej přeneseme do extrakčního pufru. Rovněž při práci s tekutým dusíkem používáme ochranné pomůcky, a to zejména rukavice, ochranné brýle a laboratorní plášť. Je třeba brát zřetel na to, že se třecí misky a tlouček působením tekutého dusíku stanou velmi podchlazenými, a proto je třeba při manipulaci s nimi využít ochranných pomůcek (např. látkové chňapky, utěrky).

! Po započetí lýze vzorku v lyzačním roztoku manipulujeme s roztokem velmi jemně a opatrně, protože vlákna DNA, která se do roztoku uvolňují, jsou velmi náchylná na mechanické poškození. Opatrným zacházením zajistíme co nejlepší celistvost izolované DNA.

Složení CTAB extrakčního pufru (10 ml):

Finální koncentrace	Zásobní roztok	Množství
2% CTAB (w/v)	-	0,2g
100 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M Tris-HCl, pH 8,0	1 ml
20 mM EDTA (pH 8.0)	0,5 M EDTA	0,4 ml
1.4 M NaCl	5 M NaCl	2,8 ml
1% PVP (polyvinylpyrrolidon; MW 40,000) (w/v)*	-	0,1 g
2% β-merkaptoetanol (v/v)*		200 μl
10 μg/ml RNáza A ** (nepovinné)	10 mg/ml	10 μl
miliQ H ₂ O	-	doplň do 10 ml

* do roztoku přidejte až těsně před použitím, doba skladovatelnosti roztoku s PVP a β-merkaptoetanolem je cca týden

** přidává se až v průběhu experimentu

PROTOKOL

Volitelné

Pokud chcete z roztoku DNA odstranit také RNA, proveďte působení s RNázou A, tj. na závěr inkubace v lyzačním roztoku, přidejte do roztoku RNázu A, tak aby její finální koncentrace byla 10 mg/ml. Roztok inkubujte alespoň 15 min při 37 °C.

II. Separace DNA od proteinů

1. Přidejte stejný objem fenol/chloroformu/isoamylalkoholu (25:24:1) a jemně promíchejte 5 min při pokojové teplotě v horizontální poloze. Centrifugujte při 6000 g, 10 min. při pokojové teplotě.

2. Přeneste supernatant do čisté zkumavky a přidejte stejný objem chloroform/isoamylalkoholu (24:1) a jemně promíchejte 5 min při pokojové teplotě.

3. Předcházející krok opakujte s přidavkem stejného objemu chloroform/isoamylalkoholu (24:1).

III. Precipitace DNA

Výsledkem fenol-chloroformové extrakce je roztok DNA přečištěný od proteinů. V následném kroku je třeba DNA separovat od dalších zbylých příměsí, a to pomocí její precipitace.

I

V roztoku, z něhož je DNA precipitována nesmí být zbytky fenolu, které by mohly jednak narušit účinnost precipitace a jednak by kontaminovaly výsledný roztok DNA. Aby bylo zajištěno, že v roztoku nezbude žádný fenol či chloroform, je doporučováno roztok ještě jednou centrifugovat, do čisté zkumavky odebrat většinu roztoku opatrným pipetováním, a to s tím, že na dně zkumavky je ponechán malý zbytek roztoku.

- Pro precipitaci přidáme 1/10 objemu 3M Na-acetátu (pH 5,2) a 2,5x objem 100% etanolu a promícháme jemným pohybováním a přetáčením zkumavky.
- V případě, že koncentrace DNA je dostatečná, v roztoku se zformuje klubíčko vláken DNA. Klubíčko vytáhneme háčkem vyrobeným ohnutím špičky sterilní pasterky či špičkou, přeneseme je do zkumavky se 70% etanolem. Roztok centrifugujeme 10 min, 13 000rpm. Pokud koncentrace DNA v roztoku je nízká, a přítomnost DNA tím není okem patrná, je třeba roztok DNA centrifugovat (13 000rpm, 20 min, 4C). Centrifugací se vytvoří pelet DNA na dně zkumavky.
- Odstraníme horní vrstvu etanolu a přidáme stejný objem 75% etanolu, centrifugujeme (13 000rpm, 10 min, 4C).
- Důkladně odstraníme etanol, krátce (5 min.) necháme vyschnout (kapky etanolu usazené po stěnách můžeme případně krátce centrifugovat a odsát pipetou).

! DNA nesmí úplně vyschnout, jinak se špatně rozpustí! Naopak nesmí zůstat zbytky etanolu, které by mohly bránit následným enzymatickým reakcím.

PROTOKOL

- Přidáme takové množství TE pufru (pH 8,0) nebo autoklávované miliQ H₂O, aby přibližná koncentrace DNA byla 500 ng - 1 µg DNA/µl (nutno odhadnout empiricky). DNA resuspendujeme jemným pohybováním zkumavky v horizontálním směru a umístíme na noc do 4°C.

TIP

Intenzitu precipitace můžeme zvýšit jednak prvotním přidáním 100% etanolu, který je předem předchlazen na -20C nebo také uložením vzorku do -20C na > 1 hodinu.

IV. Kontrola celistvosti a koncentrace DNA

Celistvost DNA zkontrolujeme elektroforetickou separací na agarosovém gelu. DNA by měla být patrná jako celistvý, vysokomolekulární proužek. Pokud je místo jedolitého proužku patrná “šmouha”, značí to, že DNA byla degradovaná. Rovněž, pokud nebylo prováděno působení s RNázou, bude patrná nízkomolekulární “šmouha” ukazující přítomnost degradované RNA.

Koncentrace DNA se stanoví pomocí spektrofotometru či pomocí nanodropu.