

IZOLACE DNA Z ŽIVOČIŠNÝCH TKÁNÍ POUŽITÍM FENOL-CHLOROFORMU

Při izolaci genomové DNA pomocí fenol-chloroformu postupujeme v těchto krocích:

- Homogenizace, tj. rozrušení tkáně – nejlépe v tekutém dusíku a porcelánových miskách, případně tloučkem přímo ve zkumavce v lyzačním roztoku
- Rozrušení buněk buněčnou lýzí a natrávení proteinů
- Separace DNA od proteinů a dalších příměsí pomocí fenol-chloroformu
- Získání roztoku DNA
- Kontrola integrity izolované DNA elektroforetickou separací (měl by být patrný celistvý proužek vysokomolekulární DNA)
- Stanovení koncentrace DNA v roztoku DNA

1. HOMOGENIZACE (ROZMĚLNĚNÍ) TKÁNĚ V TEKUTÉM DUSÍKU

Tkáň nejlépe homogenizujeme pomocí tekutého dusíku v porcelánových třecích miskách. V některých případech můžeme vzorek homogenizovat i jednodušším způsobem, i když mnohem méně efektivně, tj. přímo ve zkumavce v připraveném lyzačním roztoku s použitím plastového tloučku.

Homogenizace tkáně v tekutém dusíku

- 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.
- K dusíku v misce přidáme tkáň a pomocí tloučku ji rozmělníme na jemný prášek. Získaný prášek vychlazenou kopistkou či lžičkou přeneseme do zkumavky s extrakčním pufrům. Objem extrakčního pufru se obvykle pohybuje kolem 500 μ l na 100 mg tkáně, ale samozřejmě také závisí na typu tkáně (je třeba určit empiricky). Složení extrakčního roztoku je uvedeno v tabulce.
- Roztok inkubujeme ve zkumavce v horizontální poloze při 37 °C 2 - 12 hod., 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

PROTOKOL

podchlazenými, a proto je třeba při manipulaci s nimi využít ochranných pomůcek (např. látkové chňapky, utěrky).

!

Po započítí 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 extrakčního pufu (10 ml):

Finální koncentrace	Zásobní roztok	Množství
100 mM NaCl	1 M NaCl	1 ml
10 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 M Tris-HCl, pH 8,0	100 µl
50 mM EDTA, pH 8,0**	0,5 M EDTA	1 ml
0,5% SDS nebo Sarcosylu	10%	0,5 ml
100 µg/ml Proteináza K*	20 mg/ml (-20°C)	50 µl
10 µg/ml RNáza A *** (nepovinné)	10 mg/ml	10 µl
miliQ H ₂ O	-	7,35 ml

* do extrakčního roztoku se přidává až těsně před použitím

** koncentrace závisí na množství endogenních nukleáz ve vzorku. Podle toho se finální koncentrace může pohybovat od 25 - 100 mM (je třeba určit empiricky).

*** přidává se až v průběhu experimentu

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.

2. PURIFIKACE DNA OD PROTEINŮ

Při purifikaci roztoku DNA od proteinů se k získanému lyzátu postupně přidává fenol či směs fenolu a chloroformu, které z lyzátu proteiny odseparují. Přidáním těchto látek k vodnému roztoku dojde k rozdělení roztoku do dvou fází. **Horní fáze je vodný roztok obsahující DNA, spodní je pak organická fáze fenolu či chloroformu. Mezi vodnou a organickou fází se hromadí proteiny.**

PROTOKOL

- Roztok necháme zchladnout na pokojovou teplotu, přidáme stejný objem fenolu jako je objem roztoku a zvolna promícháváme cca 15 - 30 min. Přidáním fenolu se vytvoří dvě fáze. Horní je roztok s DNA, spodní je vrstva fenolu.



pH použitého fenolu musí být 8. Fenol určený pro izolaci DNA lze již přímo koupit nebo si ho lze v laboratoři připravit.

- Centrifugací (5000 g, 15 min., při pokojové teplotě) oddělíme tři vrstvy - DNA, bílkoviny a fenol. Vrchní viskózní vodnou fázi, jež obsahuje DNA, opatrně a velmi zvolna odsajeme a přeneseme do nové zkumavky.

Fenolovou extrakci s následnou centrifugací opakujeme dle potřeby 1 - 2x, a to podle velikosti vrstvy proteinů, která se centrifugací vytvoří. Rovněž doba inkubace s fenolem může být snížena či zvýšena.

- Podobným způsobem provedeme extrakci s fenol-chloroform-izoamylalkoholem (25:24:1) a poté chloroform-izoamylalkoholem (24:1). Počet extrakčních kroků závisí na vlastním uvážení podle velikosti vrstvy proteinů, které se nám centrifugací separují.

Směs fenol-chloroform-izoamylalkoholu by měla být pokud možno průhledná. Pokud není, znamená to, že směs obsahuje vodu. Vodu lze odstranit centrifugací, kterou se voda separuje jako vrchní fáze (5000 g, 6 min., při pokojové teplotě).

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.



Pro zvýšení celistvosti izolované DNA jsou doporučovány špičky s velkým průměrem okolo 3mm (například nůžkami ustřižený konec). Rovněž při centrifugaci dbáme na nízkou akceleraci a deceleraci centrifugy! Celkově s roztokem DNA zacházíme šetrně, bez prudkých pohybů.



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 získaný roztok ještě jednou na závěr centrifugovat, do čisté zkumavky odebrat většinu roztoku opatrným pipetováním, a to s tím, že na dně zkumavky je ponechán malý zbytek roztoku (s případnou fenol-chloroformovou kontaminací).

PROTOKOL

3. PRECIPITACE DNA

Precipitací DNA se rozumí její vysrážení. Vysrážení DNA, tj. separaci DNA od vodného roztoku, je docíleno přidavkem vhodných látek.

- Pro precipitaci přidáme 1/10 objemu 3 M 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 klubičko vláken DNA. Klubičko vytáhneme háčkem vyrobeným ohnutím špičky sterilní pasterky či špičkou, přeneseme jej do zkumavky se 70% etanolem. Roztok centrifugujeme 10 min při 13 000 rpm. Pokud je koncentrace DNA v roztoku nízká a vlákna DNA tím nejsou okem patrná, je třeba roztok DNA centrifugovat (13 000 rpm, 20 min, 4 °C). Centrifugací se vytvoří pelet DNA na dně zkumavky.

- Odstraníme horní vrstvu etanolu a přidáme stejný objem 75% etanolu, centrifugujeme (13 000 rpm, 10 min, 4 °C).

- Důkladně odstraníme etanol, krátce (5 min.) necháme vyschnout (kapky etanolu usazené po stěnách můžeme případně krátce centrifugovat a odsát pipetou).

I DNA nesmí úplně vyschnout, jinak se špatně rozpustí! A naopak se do výsledného roztoku nesmí dostat zbytky etanolu, které by mohly bránit následným enzymatickým reakcím.

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

TIP Intenzitu precipitace můžeme zvýšit tím, že 100% etanol, který použijeme pro precipitaci, je předem předchlazen na -20 °C nebo také tím, že roztok DNA s přidáním etanolem a octanem sodným uložíme do -20 °C na více než 1 hodinu.

4. 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.