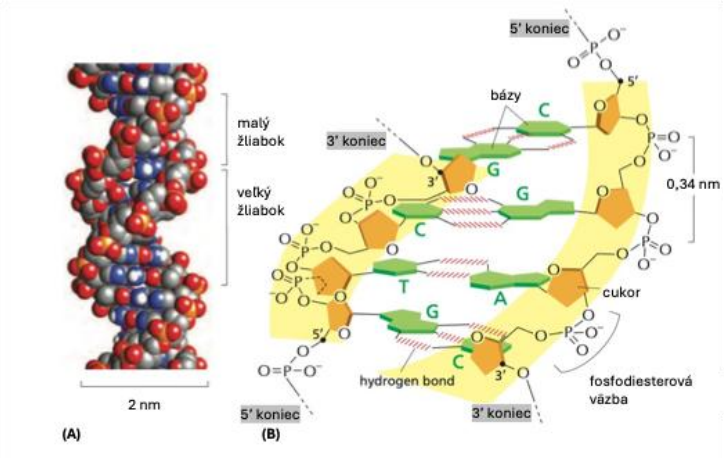
Izolácia DNA z rastlinného materiálu

1 Teoretický prehľad

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je nositeľom genetickej informácie vo všetkých živých organizmoch. Molekula DNA pozostáva z dvoch antiparalelných polynukleotidových reťazcov, ktoré sú navzájom spojené vodíkovými väzbami medzi komplementárnymi dusíkatými bázami – adenínom a tymínom, resp. guanínom a cytozínom. Nukleotidy sú v jednotlivých reťazcoch spojené 3′→5′ fosfodiesterovými väzbami, pričom cukrovo-fosfátová kostra nesie pri fyziologickom pH záporný náboj v dôsledku disociácie protónov z fosfátových zvyškov (obr. 1). Táto vlastnosť podmieňuje vysokú rozpustnosť DNA vo vodnom prostredí a jej interakcie s katiónmi a proteínmi.

V eukaryotických bunkách sa väčšina DNA nachádza v jadre vo forme chromatínu, ktorý tvorí komplex DNA a histónových proteínov. DNA je navinutá okolo histónových oktamérov za vzniku nukleozómov, základných stavebných jednotiek chromatínu. Takéto usporiadanie umožňuje kompaktné uloženie genetického materiálu v jadre bunky a zároveň ovplyvňuje dostupnosť DNA pre bunkové procesy, ako sú replikácia, transkripcia a oprava DNA.

Na získanie DNA pre molekulárno-biologické analýzy je potrebné narušiť bunkové a jadrové membrány, uvoľniť DNA z chromatínu a odstrániť ostatné bunkové zložky, predovšetkým proteíny, lipidy a polysacharidy.



Obr. 1. Dvojzávitnicová štruktúra DNA. (A) Priestorový model dvojzávitnice DNA s vyznačeným hlavným (major) a vedľajším (minor) žliabkom. (B) Bočný pohľad na úsek dvojzávitnice znázorňujúci komplementárne páry báz, anti-paralelné usporiadanie reťazcov a ich spojenie 3′–5′ fosfodi-esterovými väzbami. Prevzaté a upravené z Alberts et al. (2015), Fig. 4–5.

Referencie:
NELSON, D. L. a COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2013. ISBN 978-1-4292-3414-6
ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., MORGAN, D., RAFF, M., ROBERTS, K. a WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. 6th ed. New York: Garland Science, 2015. ISBN 978-0-8153-4432-2.

2 Princíp cvičenia

Cieľom cvičenia je izolovať genómovú DNA z rastlinného materiálu pomocou chemickej metódy založenej na lýze buniek, odstránení bunkových kontaminantov a precipitácii DNA alkoholom. Ako modelový biologický materiál sú použité čerstvé jahody, ktoré sú vhodné na izoláciu DNA vzhľadom na svoju vysokú ploidiu (2n = 8x = 56), umožňujúcu získať dostatočné množstvo DNA na jej vizualizáciu voľným okom.

Základnou podmienkou izolácie DNA je narušenie bunkových a jadrových membrán. Na tento účel sa používa aniónový detergent dodecylsulfát sodný (SDS), ktorý narúša fosfolipidovú dvojvrstvu biologických membrán a zároveň denaturuje proteíny vrátane histónov a nukleáz. Tým sa DNA uvoľní z chromatínu do roztoku a zároveň je chránená pred degradáciou nukleázami.

Ochranu DNA pred degradáciou počas izolácie zabezpečuje aj prítomnosť kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA) v homogenizačnom roztoku, ktorá chelatuje dvojmocné katióny, predovšetkým Mg^{2+}, nevyhnutné pre aktivitu väčšiny nukleáz. Okrem EDTA obsahuje pufor aj Tris-HCl, ktorý zabezpečuje stabilné pH počas izolácie, a NaCl, ktorý vytvára vhodné iónové prostredie na zachovanie rozpustnosti DNA.

V tomto cvičení sa jahody najprv mechanicky mechanicky homogenizujú (rozdrvia) v homogenizačnom roztoku. Vzniknutá suspenzia sa následne filtruje, aby sa odstránili hrubé zvyšky rastlinného materiálu. Po lýze buniek pomocou SDS sa k filtrátu pridáva octan draselný, ktorý spôsobuje precipitáciu detergentu spolu s denaturovanými proteínmi, membránovými lipidmi a ďalšími bunkovými zložkami. Po centrifugácii zostáva DNA rozpustená v supernatante. DNA sa následne precipituje pridaním ľadového izopropanolu. V prítomnosti solí dochádza k zníženiu rozpustnosti DNA, ktorá vytvára charakteristické biele vláknité agregáty viditeľné voľným okom. Precipitovaná DNA sa premyje 70 % etanolom na odstránenie zvyškov solí a ďalších nízkomolekulových kontaminantov a následne sa rozpustí v roztoku TE.

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA sa stanovujú pomocou UV spektrofotometrie na spektrofotometri NanoDrop. Tento prístroj umožňuje merať absorbanciu vzorky v objeme približne 1–2 µl bez použitia kyvety. Kvapka vzorky sa nanesie na merací povrch a po sklopení ramena sa medzi dvoma optickými povrchmi vytvorí stĺpec kvapaliny, cez ktorý prechádza svetlo.

Nukleové kyseliny vykazujú absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 260 nm v dôsledku prítomnosti aromatických dusíkatých báz, preto sa koncentrácia DNA určuje z absorbancie pri tejto vlnovej dĺžke. Čistota izolátu sa hodnotí na základe pomerov absorbancií A260/A280 a A260/A230. Pomer A260/A280 poskytuje informáciu o kontaminácii vzorky proteínmi, zatiaľ čo pomer A260/A230 poukazuje na prítomnosť ďalších kontaminantov, napríklad niektorých solí, polysacharidov alebo zvyškov organických zlúčenín. Pre čistú DNA je hodnota A260/A280 približne 1,8 a A260/A230 približne 2,0–2,2.

3 Materiál a postup

3.1 Materiál

1. Biologický materiál
- čerstvé jahody

2. Roztoky a chemikálie
- homogenizačný pufor (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA)
- 10 % SDS
- 3 M octan draselný, pH 5,2
- ľadový izopropanol
- 70 % etanol
- TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)

3. Spotrebný materiál
- gáza (2 vrstvy)
- 15 ml Falcon skúmavky
- 2 ml Eppendorf skúmavky
- Pasteurove pipety (plastové alebo sklenené)
- pipetovacie špičky (10 µl, 200 µl a 1000 µl)

4. Prístroje a vybavenie
- kuchynský alebo laboratórny mixér
- automatické mikropipety (P20, P200 a P1000)
- mikrocentrifúga (min. 12 000 × g)
- stojany na Eppendorf skúmavky
- stojany na Falcon skúmavky
- nádoba s ľadom (ľadový kúpeľ)
- NanoDrop spektrofotometer

3.2 Postup

1. Príprava homogenátu (vyučujúci/technik)
Do mixéra pridajte:
- 100 g jahôd
- 200 ml homogenizačného pufra (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA)

Homogenizujte 10–20 sekúnd.
Do 15 ml Falcon skúmavky pripravte pre každého študenta 3 ml homogenátu.

---

2. Filtrácia (ďalej už študenti)
Homogenát prefiltrujte cez dve vrstvy gázy do čistej Falcon skúmavky.
Do 2 ml Eppendorfky preneste 500 µl filtrátu.

---

3. Lýza buniek
Pridajte 55 µl 10 % SDS (konečná koncentrácia SDS = 1 %).
Skúmavku premiešajte jemným prevrátením. Nevortexujte.
Inkubujte 5 minút pri laboratórnej teplote.

---

4. Odstránenie proteínov a detergentu
Pridajte 165 µl 3 M octanu draselného (pH 5,2).
Skúmavku jemne premiešajte prevrátením.
Inkubujte 5 minút na ľade.

---

5. Centrifugácia
Centrifugujte 5 minút pri 12 000 x g.
Na dne skúmavky vznikne biely precipitát obsahujúci SDS, proteíny a membránové lipidy.

---

6. Prenesenie supernatantu
Opatrne preneste približne 600 µl číreho supernatantu do novej 2 ml Eppendorfky.
Dbajte na to, aby ste nenarušili vzniknutý precipitát.

---

7. Precipitácia DNA
Pridajte 600 µl ľadového izopropanolu. Izopropanol pridávajte pomaly po stene skúmavky.
Skúmavku 5–10x jemne prevráťte. Po 1–3 minútach sa objavia biele vláknité zhluky DNA.

---

8. Premytie DNA
Pomocou Pasteurovej pipety zachyťte vlákna DNA.
Preneste ich do novej 2 ml Eppendorfky obsahujúcej 200 µl 70 % etanolu.
Skúmavku 2–3x jemne prevráťte.
Centrifugujte 1 minútu pri 10 000 x g. Etanol opatrne odstráňte pipetou.
Nechajte DNA sušiť 3–5 minút pri laboratórnej teplote, kým sa neodparia zvyšky etanolu.

---

9. Resuspendovanie DNA
Pridajte 50 µl TE. DNA nechajte rozpúšťať 10 minút pri laboratórnej teplote.
Podľa potreby obsah skúmavky premiešajte jemným poklepaním skúmavky prstom.
Nevortexujte.

---

10. Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA
Pomocou NanoDrop spektrofotometra stanovte:

- koncentráciu DNA (ng/µl),
- pomer A260/A280,
- pomer A260/A230.

Na základe nameraných pomerov A260/A280 a A260/A230 zhodnoťte čistotu získanej DNA. Pred meraním vzorky vykonajte meranie slepej vzorky (*blank*) bez DNA, ktorá musí obsahovať rovnaký roztok, v akom je rozpustená DNA. Meracie plochy medzi jednotlivými meraniami očistite, aby nedošlo ku kontaminácii nasledujúcej vzorky.