

Izolace DNA



Začíná-li molekulárně-genetické vyšetření polymerázovou řetězovou reakcí, stačí někdy jako vzorek velmi malé množství DNA. Někdy lze dokonce použít přímo část tkáně nebo několik buněk lyzovaných např. hydroxidem, tenzidy nebo zmrazováním a rozmrazováním. Kvalita templátové DNA nicméně ovlivňuje účinnost amplifikace v průběhu PCR a nečistoty obsažené ve vzorku mohou polymerasovou reakci výrazně zpomalovat. Nečistoty reakci zpomalují tím, že působí jako inhibitory polymerázy, nebo tím, že se vážou na templátovou DNA a znepřístupňují ji tak polymerasové reakci. Bývá proto výhodné DNA ze vzorku izolovat.

Metody izolace

Pokud se DNA izoluje z buněk (např. z částech tkáně, buněk bukalní sliznice získaných stěrem, leukocytů periferní krve), je obvykle prvním krokem **homogenizace tkáně a lýza buněk**. Buněčné a jaderné membrány se obvykle rozpouštějí účinkem tenzidů. Současně se většinou částečně hydrolyzují kontaminující bílkoviny a histony, na které je jaderná DNA navázaná, pomocí proteolytických enzymů – nejčastěji proteinázy K. Vzniklý lyzát obsahuje kromě DNA řadu kontaminujících látek – všechny nízkomolekulární i vysokomolekulární součásti tkáně nebo buněk. Následuje proto extrakce a purifikace DNA z lyzátu. V praxi se používají různé metody extrakce DNA, které se liší svou pracností a náročností na chemikálie a vybavení na jedné straně a výtěžkem a čistotou izolované DNA na straně druhé.

Organická extrakce

Kontaminující bílkoviny se hydrolyzují proteázami a/nebo denaturují a vysráží. Nejčastěji používaným denaturačním a precipitačním činidlem bývá **fenol**. Vysrážené bílkoviny se poté oddělí vytřepáním do **chloroformu** a centrifugací. Přitom se současně odstraní i hydrofobní součásti směsi, např. lipidy.

Po odstranění kontaminujících bílkovin a lipidů je DNA stále znečištěná převážně nízkomolekulárními látkami. Následuje proto vysrážení DNA z roztoku např. jejím **vysolením** nebo pomocí jednoduchých **alkoholů** (etanolu nebo izopropanolu). Vysrážená DNA se poté omyje a znovu rozpustí ve vhodném pufru.

Mezi výhody organické extrakce patří vysoký výtěžek a vysoká čistota purifikované DNA. **Fenol-chloroformová** technika je proto stále „zlatým standardem“ purifikace nukleových kyselin. Metoda je ale časově náročná a pracuje se při ní s nebezpečnými chemikáliemi. Při zpracování velkého počtu vzorků se obtížně automatizuje. Je také třeba zajistit, aby v závěru extrakce byly spolehlivě odstraněny zbytky fenolu a chloroformu, které by interferovaly s navazujícími metodami (např. by denaturovaly polymerázu při PCR).

Extrakce pomocí silikátů

Využívá se křemičitých kuliček s velkým povrchem, kterými je například naplněná krátká chromatografická kolonka. Ve vodných roztocích je povrch silikátu hydratovaný. Přídavkem vysoké koncentrace tzv. **chaotropních solí** při vhodném pH dojde k rozbití vodíkových můstků mezi molekulami vody a povrchem silikátu. Na takto dehydratovaný silikát se svými fosfátovými skupinami s vysokou afinitou váže DNA. Kontaminující látky je pak možné odmyt. DNA se ze silikátových kuliček uvolní pufrům s nízkým obsahem solí nebo destilovanou vodou.

Extrakce pomocí silikátové pevné fáze je relativně jednoduchá, hodí se i pro automatizaci. Výtěžky i čistota izolované DNA jsou o něco nižší, přesto zcela postačující pro většinu aplikací.

Magnetická separace

Při magnetické separaci se DNA reverzibilně váže na magnetické kuličky potažené vhodným povrchem – protilátkami proti DNA, silikátem, iontoměničím nebo povrchem s jinými vhodnými funkčními skupinami. Po navázání DNA se kuličky pomocí magnetu oddělí od roztoku s kontaminujícími látkami a opakovaně se promyjí. Purifikovaná DNA se z nich poté uvolní nejčastěji pomocí etanolu.

Magnetická separace je vhodná k automatizaci a používá se především pro zpracování velkých počtů vzorků. Výtěžky a čistota DNA jsou srovnatelné se silikátovou extrakcí, je však možné izolovanou DNA získat v menším množství roztoku (tj. koncentrovanější). Obvykle je tato technika nákladnější.

Další techniky

Další metody extrakce DNA jsou založené např. na vysolení DNA z roztoku, dělení směsi centrifugováním na gradientu chloridu cesnatého, iontoměničové chromatografii apod.

Fenol-chloroformová metoda izolace DNA

Fenol-chloroformová metoda je nejpoužívanější technikou organické extrakce DNA. Ačkoli je náročnější na čas a pracuje se při ní s nebezpečnými chemikáliemi, umožňuje dosáhnout vysokých výtěžků a získat prakticky čistou DNA. V mírné modifikaci se používá i pro izolaci RNA.

Homogenizace tkáně

Prvním krokem je homogenizace tkáně v pufru, který obsahuje tenzid (např. dodecylsírán sodný, SDS). Tenzid rozpustí buněčné membrány. Rozpad buněk se usnadňuje přidavkem proteinázy K. Tento účinný bakteriální enzym, který má teplotní optimum kolem 60 °C, nevyžaduje vápenaté ani hořečnaté ionty a který neinhibují ani koncentrované tenzidy, částečně hydrolyzuje kontaminující bílkoviny. Navíc velmi účinně štěpí DNázy, které by izolovanou DNA mohly degradovat.

Odstranění bílkovin

Následuje denaturace bílkovin a jejich vysrážení směsí fenolu a chloroformu. Fenol-chloroformová směs se nemísí s vodou. Při pH roztoku nad 7,6 je DNA disociovaná a zůstává rozpuštěna ve vodné fázi, zatímco proteiny se denaturují a vypadávají do hydrofobní fáze. Ke směsi se přidává malé množství izoamylalkoholu, který usnadní oddělení fází a zabrání pění při zpracovávání vzorků bohatých na proteiny. Protože i stopové zbytky fenolu by mohly inhibovat polymerázovou reakci, přečistí se nakonec vzorek protřepáním se samotným chloroformem.

Odstranění nebílkovinných kontaminantů

Poté se DNA vysráží z vodného roztoku. Nejprve se přidá ve velké koncentraci vhodná sůl (chlorid sodný, octan sodný apod.). Její ionty si vytvářejí hydratační obal, čímž odejmou DNA rozpouštědlo (tzv. vysolování). Pak se ke směsi přidá málo polární látka (např. etanol nebo izopropanol); snížení polaritý rozpouštědla vede k precipitaci DNA.

Vysrážená DNA se promývá v 70% etanolu. Alkohol v této koncentraci rozpustí zbytky solí a bílkovin, samotná DNA však zůstane nerozpuštěná.

Izolovaná a přečištěná DNA se poté zpravidla rozpouští v alkalickém pufru, který obsahuje etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA). Tato komplexotvorná látka jednak usnadní rozpouštění DNA, jednak vychytáním Ca^{2+} působí jako inhibitor DNázy a vzorek tak stabilizuje.