



---

# Analiza próbek spożywczych na zawartość Genetycznie Modyfikowanych Organizmów

## Rozdział 4

### Izolacja i oczyszczanie DNA

M. Somma



## Rozdział 4

### Izolacja i oczyszczanie DNA

<i>Wstęp</i>	3
Metody izolacji kwasów nukleinowych	4
Metody oczyszczania kwasów nukleinowych	5
Metoda CTAB	7
Oznaczanie ilości DNA metodą spektrofotometryczną	10
Zasady spektrofotometrycznego pomiaru stężeń DNA	11
Oznaczanie stężenia kwasów nukleinowych	12
Część eksperymentalna	15
<i>Literatura</i>	19

## Wstęp

Izolacja i oczyszczanie kwasów nukleinowych jest pierwszym etapem większości procedur stosowanych w biologii molekularnej, jak też we wszystkich technikach inżynierii genetycznej. Podstawowym celem tego etapu prac jest uzyskanie czystego materiału, bez względu na źródło jego pochodzenia, z przeznaczeniem na przeprowadzenie specyficznych analiz metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), w celu wykrycia genetycznych modyfikacji (GM). Jakość i czystość kwasów nukleinowych jest czynnikiem silnie wpływającym na wynik reakcji PCR. Aby ograniczyć obecność inhibitorów reakcji PCR, należy użyć właściwą metodę izolacji kwasów nukleinowych. Lista możliwych inhibitorów reakcji PCR jest przedstawiona w Tabeli 1. W celu zapobieżenia fałszywie-negatywnym wynikom należy sprawdzić matrycę. W tym celu trzeba użyć specyficznych próbek dających pozytywny wynik PCR, w przypadku gdy inhibicja nie ma miejsca. Do tego celu wykorzystuje się roślinno-specyficzne (eukariotyczne lub chloroplastowe) lub gatunkowo-specyficzne analizy PCR.

**Tabela 1.** Niektóre inhibitory reakcji PCR

Inhibitor	Inhibujące stężenie
SDS	>0,005%
Fenol	>0,2%
Etanol	>1%
Izopropanol	>1%
Octan sodu	>5 mM
Chlorek sodu	>25 mM
EDTA	>0,5 mM
Hemoglobina	>1 mg/ml
Heparyna	>0,15 i. m/ml
Mocznik	>20 mM
Mieszanina reakcyjna	>15%

Istnieje wiele metod izolacji i oczyszczania kwasów nukleinowych. Wybór najwłaściwszej i najbardziej odpowiedniej metody dla konkretnych wymagań zależy od:

- Analizowanego kwasu nukleinowego

- Organizmu z jakiego przeprowadzamy izolację kwasu nukleinowego
- Rodzaju materiału z jakiego przeprowadzamy izolację (rodzaj tkanki, organ, stopień przetworzenia, itd.)
- Oczekiwanych rezultatów (plon, czystość, czas przeznaczony na oczyszczanie)
- Docelowego przeznaczenia materiału (PCR, klonowanie, znakowanie, blotowanie, Real Time-PCR, synteza cDNA)

Zasady niektórych metod stosowanych obecnie do izolacji i oczyszczania kwasów nukleinowych przedstawione są w następujących podrozdziałach.

## Metody izolacji kwasów nukleinowych

Izolacja kwasów nukleinowych z materiału biologicznego wymaga przeprowadzenia lizy komórek, inaktywacji komórkowych nukleaz oraz oddzielenia izolowanego kwasu nukleinowego od pozostałości komórkowych. Często idealna procedura lizy komórek jest kompromisem pomiędzy metodą na tyle inwazyjną, by uszkodzić materiał z którego izolujemy kwas nukleinowy i jednocześnie na tyle delikatną, by nie zniszczyć materiału genetycznego komórki. Typowe procedury lizy komórkowej składają się z etapów zawierających:

- Mechaniczne uszkodzenia (np. ucieranie, liza hipotoniczna)
- Traktowanie chemiczne (np. liza detergentem, sole chaotropowe, redukcja tiolowa)
- Trawienie enzymatyczne (np. proteinaza K)

Często w jednym etapie procedury rozrywa się błony komórkowe i inaktywuje wewnątrzkomórkowe nukleazy. Przykładowo jeden roztwór może zawierać detergenty rozpuszczające błony komórkowe i silnie chaotropowe sole inaktywujące wewnątrzkomórkowe enzymy. Po lizie komórek i inaktywacji nukleaz, pozostałości struktur komórkowych mogą być łatwo usunięte poprzez filtrację czy wytrącanie.

## Metody oczyszczania kwasów nukleinowych

Metody oczyszczania kwasów nukleinowych zazwyczaj zawierają kombinację dwu lub więcej z poniższych technik:

- Izolacja/wytrącanie
- Chromatografia
- Wirowanie
- Rozdział oparty na powinowactwie (affinity separation)

Skrótowy opis tych technik będzie przedstawiony w następujących podrozdziałach (Zimmerman i in., 1998).

### Izolacja/wytrącanie

Ekstrakcja rozpuszczalnikowa jest często wykorzystywana do eliminacji zanieczyszczeń kwasów nukleinowych. Przykładowo metoda oparta na ekstrakcji mieszaniną fenolu i chloroformu jest wykorzystywana do usuwania zanieczyszczeń białkowych. Wytrącanie przy użyciu izopropanolu czy etanolu jest stosowane w celu koncentracji kwasów nukleinowych. Jeśli ilość kwasów nukleinowych jest niewielka, można do mieszaniny dodać obojętny nośnik (inert carier) np. glikogen w celu zwiększenia efektywności wytrącania. Inne metody wytrącania kwasów nukleinowych zakładają selektywne wytrącanie w wysokich stężeniach soli (wysalanie = salting out),<sub>2</sub> czy wytrącanie białek poprzez zmiany pH roztworu.

### Chromatografia

Metody oparte na chromatografii mogą wykorzystywać różne techniki rozdzielania jak filtracja w żelu, wymiana jonowa, selektywna adsorpcja, rozdział oparty na powinowactwie (affinity binding).

Podczas filtracji w żelu wykorzystywana jest porowata struktura cząsteczek żelu i jej właściwości rozdzielania cząsteczek o różnej wielkości. Matriks żelu o zdefiniowanej wielkości porów umożliwia mniejszym cząsteczkom wniknięcie do porów na zasadzie dyfuzji, a większe cząsteczki nie wnikają do żelu i są wymywane w martwej objętości.

W ten sposób cząsteczki są wymywane w kolejności zmniejszającej się masy molekularnej. Jonowymienna chromatografia jest inną techniką, która wykorzystuje elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy docelową cząsteczką a grupą funkcyjną wypełnienia kolumny. Kwasy nukleinowe (o silnie negatywnym ładunku, liniowe polianiony) mogą być wymywane z kolumny jonowymiennnej przy użyciu prostych buforów solnych. W chromatografii adsorpcyjnej kwasy wiążą się selektywnie z krzemionką lub szkłem w obecności odpowiednich soli (np. soli chaotropowych), podczas gdy inne cząsteczki nie wiążą się do tych substancji. Do elucji kwasów nukleinowych może być użyty bufor o niskim stężeniu soli lub woda i w ten sposób otrzymuje się próbkę, która może być wykorzystana w dalszych aplikacjach.

## Wirowanie

Selektywne wirowanie może być bardzo efektywną metodą oczyszczania kwasów nukleinowych. Przykładem jest ultrawirowanie w gradiencie chlorku cezu, które już od wielu lat jest stosowane do oczyszczania DNA plazmidowego. Wirowanie często łączone jest z inną metodą. Przykładem może być wirowanie kolumn chromatograficznych, które łączy filtrację w żelu i wirowanie w celu oczyszczenia DNA i RNA z mniejszych zanieczyszczeń (soli, nukleotydów, itp.) z wymianą jonową i selekcją pod względem wielkości cząsteczki, gdzie filtracja w żelu łączona jest z wirowaniem w celu oczyszczenia DNA i RNA z mniejszych zanieczyszczeń (soli, nukleotydów, itp.). Niektóre procedury łączą selektywną adsorpcję na matriks chromatograficznej z wymywaniem jednego typu kwasu nukleinowego o określonej czystości podczas wirowania.

## Rozdział oparty na powinowactwie

W ostatnich latach, coraz więcej metod oczyszczania kwasów nukleinowych łączy immobilizację opartą na powinowactwie (affinity immobilization) z rozdziałem magnetycznym. Na przykład, poli(A) + mRNA może być wiązane z pokrytymi streptawidyną namagnesowanymi cząstkami dzięki połączeniu ze znakowanym biotyną oligo(dT). Kompleks ten może być łatwo usuwany z roztworu (lub niewiążących się zanieczyszczeń) przy użyciu magnezu. Tego rodzaju technika ułatwia oczyszczanie kwasów nukleinowych, ponieważ zastępuje kilka etapów wirowania, ekstrakcji i separacji faz, jednoetapowym i szybkim rozdziałem magnetycznym.

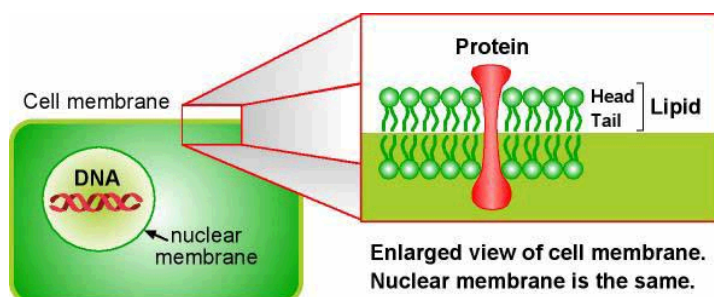
## Metoda CTAB

Protokół oparty na wykorzystaniu bromku heksadecylotrimetyloamoniowego (CTAB) został opracowany przez Murray'a i Thompsona w 1980 roku (Murray i Thompson, 1980) i opisany przez Wagnera i współpracowników w 1987 roku (Wagner i in., 1987). Metoda ta jest wykorzystywana do izolacji i oczyszczania DNA z materiału roślinnego i produktów pochodzenia roślinnego. Szczególnie przydatna jest do usuwania polisacharydów czy polifenolowych zanieczyszczeń, które mogłyby wpływać na czystość i jakość DNA. Procedura CTAB jest szeroko wykorzystywana w technikach biologii molekularnej roślin i była sprawdzana w testach walidacyjnych dotyczących detekcji GMO (Lipp i in., 1999; 2001). Istnieje kilka wariantów tej metody opracowanych dla szerokiego zakresu materiałów spożywczych nisko i wysoko przetworzonych (Hupfer i in., 1998; Hotzel i in., 1999; Mayer i in., 1997; Poms i in., 2001).

### Zasady metody CTAB: liza, izolacja i wytrącanie

Komórki roślinne mogą być poddane lizie przy użyciu detergentu jonowego bromku heksadecylotrimetyloamoniowego (CTAB), który tworzy nierozpuszczalny kompleks z kwasami nukleinowymi w środowisku o niskim zasoleniu. W tych warunkach polisacharydy, fenole i inne zanieczyszczenia pozostają w supernatancie i mogą być usunięte. Kompleks DNA jest rozpuszczany w roztworze o zwiększonym stężeniu soli i wytrącany etanolem lub izopropanolem. W tej sekcji przedstawione zostaną zasady 3 etapów izolacji metodą CTAB – liza błon komórkowych, izolacji genomowego DNA i wytrącania DNA.

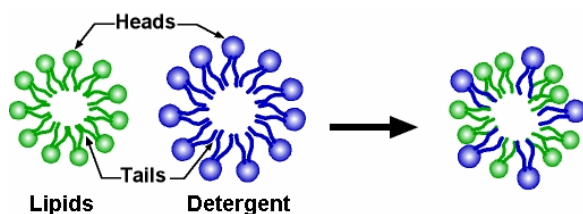
**Liza błon komórkowych.** Jak wcześniej zaznaczono, pierwszy etap izolacji DNA obejmuje rozerwanie struktur komórkowych – ściany komórkowej i błony jądrowej. W tym celu próbka jest homogenizowana i w pierwszej kolejności traktowana buforem ekstrakcyjnym zawierającym EDTA, Tris/HCl i CTAB. Wszystkie błony biologiczne mają podobną ogólną budowę, i zawierają cząsteczki tłuszczów i białek utrzymujących się razem przez oddziaływania niekowalencyjne.



**Rysunek 1.** Uproszczony schemat budowy błon komórkowych<sup>1</sup>

Jak wykazano na Rys.1, cząsteczki tłuszczów są zorganizowane w ciągłą podwójną warstwę w której „rozpuszczone” są cząsteczki białek. Cząsteczki tłuszczów składają się z hydrofilowych fragmentów nazywanych główkami (heads) i hydrofobowych końcówek zwanych ogonkami (tails). W metodzie CTAB, lizę błon komórkowych przeprowadza się poprzez użycie detergentu (CTAB) zawartego w buforze ekstrakcyjnym.

Ze względu na podobną budowę warstwy lipidowej i detergentu, CTAB jako składnik buforu ekstrakcyjnego pełni funkcję wychwytywania tłuszczów wchodzących w skład błon komórkowych i błony jądrowej. Mechanizm wiązania tłuszczów za pomocą detergentu jest przedstawiony na Rys. 2.

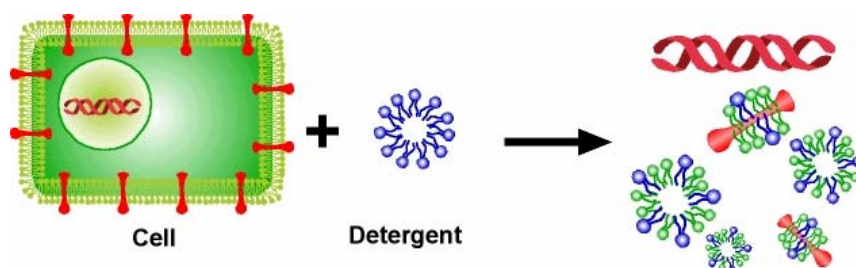


**Rysunek 2.** Wiązanie lipidów

<sup>1</sup> Rysunki umieszczone na tej i następnych stronach pochodzą z: "Genetic Science Learning Center, University of Utah, <http://gslc.genetics.utah.edu>."



Gdy membrany błony komórkowe wystawione są na działanie buforu ekstrakcyjnego CTAB detergent zawarty w buforze wiąże tłuszcze i białka, umożliwiając uwolnienie genomowego DNA, co przedstawiono na Rys. 3. W określonym stężeniu soli (NaCl), detergent tworzy z kwasami nukleinowymi nierozpuszczalny kompleks. EDTA jest związkami chelatującym i między innymi wiąże magnez. Magnez jest kofaktorem dla DNazy. Poprzez wiązanie jonów Mg przez EDTA, aktywność DNazy jest znacznie ograniczana. Tris/HCl zapewnia roztworowi odpowiednią pojemność buforową (niskie lub wysokie pH uszkadza DNA). Istotne jest, by czas pomiędzy homogenizacją próbki a dodaniem buforu zawierającego CTAB był jak najkrótszy, ze względu na szybką degradację kwasów nukleinowych na tym etapie izolacji. Od momentu kiedy błony komórkowe i błony otaczające organelle (mitochondria, chloroplasty) zostały rozerwane, rozpoczyna się etap oczyszczania DNA.



**Rysunek 3.** Rozerwanie błon komórkowych i izolacja DNA genomowego

**Izolacja.** Na tym etapie polisacharydy, składniki fenolowe, białka i inne elementy pozostałe po lizie komórki rozpuszczone w fazie wodnej są rozdzielane od kompleksu CTAB - DNA. Usunięcie polisacharydów jak i składników fenolowych jest szczególnie ważne ze względu na ich zdolność do inhibowania wielu reakcji enzymatycznych. Przy niskim stężeniu soli (< 0.5M NaCl) związki zanieczyszczające DNA nie wytrącają się i mogą być usunięte poprzez ekstrakcję fazy wodnej chloroformem. Chloroform powoduje denaturację białek i pozwala na separację fazy wodnej i fazy organicznej. Zazwyczaj faza wodna jest fazą górną. Zdarza się jednak, że gdy faza wodna jest gęsta z powodu dużego stężenia soli (> 0.5 M NaCl), formuje się jako faza dolna. Dodatkowo kwasy nukleinowe będą przechodziły do fazy organicznej, jeśli pH fazy wodnej będzie inne niż pH 7.8-8.0. Jeśli jest to potrzebne, ekstrakcja chloroformem przeprowadzana jest dwu lub

trzykrotnie w celu całkowitego usunięcia zanieczyszczeń z fazy wodnej próbki. Aby uzyskać jak najbardziej wydajną izolację DNA można przeprowadzić re-ekstrakcję z fazy organicznej za pomocą roztworu wodnego, który jest dodawany do poprzedniego ekstraktu.

Od chwili, gdy kompleks nukleinowy zostanie oczyszczony, możliwe jest przejście do ostatniego etapu – wytrącania DNA.

**Wytrącanie.** Na tym etapie, kwasy nukleinowe uwalniane są od detergentu. W tym celu, faza wodna jest traktowana w pierwszej kolejności roztworem do wytrącania będącym mieszaniną CTAB i NaCl o podwyższonym stężeniu (> 0.8M NaCl). Sól jest potrzebna do wytrącania kwasu nukleinowego. Zamiast NaCl może być stosowany octan sodu, ze względu na jego właściwości buforujące. W tych warunkach detergent, który lepiej rozpuszcza się w alkoholu niż w wodzie, może zostać wymyty ze środowiska reakcji, podczas gdy kwas nukleinowy ulega wytrąceniu. Następujące po tym traktowanie 70% etanolem prowadzi do dalszego oczyszczenia i odmycia próbki z pozostałości soli.

## Oznaczanie ilości DNA metodą spektrofotometryczną

Ilość DNA, RNA, oligonukleotydów, a nawet mononukleotydów może być mierzona bezpośrednio w roztworze wodnym w formie rozcieńczonej lub nierozcieńczonej. Wykonuje się to poprzez pomiar absorpcji A, określanej też jako gęstość optyczna OD, w świetle ultrafioletowym (czasem też w zakresie światła widzialnego). Jeśli próbka jest czysta (bez znacznych ilości zanieczyszczeń białkowych, fenolowych czy agarozy) spektrofotometryczny pomiar ilości UV zaabsorbowanego przez zasady w DNA jest prosty i dokładny. Idealne bufony do tego typu pomiarów mają niskie stężenie jonów (np. bufor TE). Stężenie kwasów nukleinowych mierzone jest poprzez porównanie pomiaru dla próby ślepej i adsorpcji przy długości fali 260 nm. Interferencja wynikająca z zanieczyszczeń próbki może być określana poprzez wyznaczenie współczynnika  $A_{260}/A_{280}$ . Adsorpcja przy długości fali 280 nm jest typowa dla białek, tak więc stosunek  $A_{260}/A_{280}$  mówi o czystości analizowanej próbki. W przypadku czystego DNA stosunek ten powinien wynosić około 1.8, podczas gdy dla czystego RNA wahać się powinien w okolicach 2.0. Absorpcja przy długości fali 230 nm odzwierciedla zanieczyszczenia pochodzące od węglowodorów, białek, fenoli,

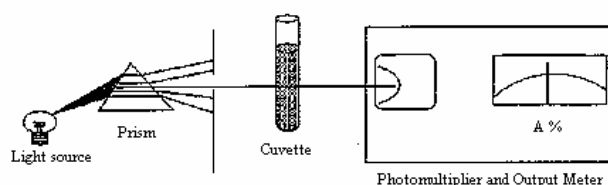
czy komponentów aromatycznych. W wypadku czystych próbek stosunek  $A_{260}/A_{230}$  powinien wynosić około 2.2.

Alternatywna metoda – płytki agarozowe z bromkiem etydyny, jest przydatna jeśli dysponujemy niewielkimi ilościami DNA. Ilość kwasu nukleinowego w analizowanych próbkach jest porównywana do szeregu standardów stężeń DNA, gdzie wyznacznikiem jest fluorescencja w świetle UV emitowana przez bromek etydyny.

## Zasady spektrofotometrycznego pomiaru stężeń DNA

Oznaczenie zawartości substancji rozpuszczonej w roztworze przy użyciu spektrofotometru polega na przepuszczeniu światła przez roztwór. Aparat pracuje na prostej zasadzie polegającej na tym, że światło o znanej długości fali przechodzi przez próbkę, a ilość energii transmitowanej przez próbkę jest mierzona przez fotokomórkę umieszczoną z drugiej strony.

Jak przedstawia Rys. 4, pojedynczy układ spektrofotometryczny zawiera źródło światła, pryzmat, statyw dla próbki i fotokomórkę. Połączone z nimi systemy elektryczny i mechaniczny pozwalają na kontrolę intensywności iluminacji, długości światła, oraz na konwersję energii otrzymanej przez fotokomórkę na zmiany napięcia. Następnie zmiany napięcia przedstawiane są na skali metrycznej, lub zapisywane przez komputer.



**Rysunek 4.** Schemat transmisji światła w spektrofotometrze.

Wszystkie cząsteczki absorbują kwanty energii przy specyficznej długości fali, dzięki czemu możliwa jest ekstrapolacja stężenia związku w roztworze. Według prawa Lamberta-Beera istnieje liniowa zależność pomiędzy absorbancją  $A$  (także

określaną jako gęstość optyczna OD) a stężeniem makrocząsteczek, która określana jest następującym wzorem:

$$A=OD=\epsilon lc$$

Gdzie  $\epsilon$  jest molowym współczynnikiem absorpcji,  $c$  to stężenie, a  $l$  to grubość warstwy absorbującej (szerokość kuwety). Białka i kwasy nukleinowe pochłaniają światło w ultrafiolecie, w zakresie fal między 210 i 300 nm. Jak już wyjaśniono, maksimum absorpcji roztworów DNA i RNA znajduje się przy 260 nm, podczas gdy maksimum dla roztworów białek znajduje się przy 280 nm. Ponieważ tak roztwory DNA, jak i RNA częściowo absorbują światło przy długości fali 280 nm, a roztwory białek częściowo pochłaniają światło również przy długości fali 260 nm, stosunek odczytu przy długości fali 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) daje informacje na temat czystości kwasów nukleinowych. W przypadku dobrej izolacji wartość  $A_{260}/A_{280}$  dla DNA wynosi 1.8, a dla RNA zbliżona jest do 2.0. Dla warstwy absorbującej 10mm, przy długości fali 260 nm, absorpcja o wielkości  $A = 1$  odpowiada około 50  $\mu\text{g/ml}$  dwuniciowego dsDNA, około 37  $\mu\text{g/ml}$  jednoniciowego ssDNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA i około 30  $\mu\text{g/ml}$  oligonukleotydów. W próbce mamy do czynienia z zanieczyszczeniem białkami, jeśli stosunek wartości  $A_{260}/A_{280}$  będzie niższy niż wartości podane powyżej. Dodatkowo niemożliwe będzie w tym wypadku dokładne ustalenie ilości DNA w próbce. Należy zaznaczyć, że zanieczyszczenia próbki DNA przez RNA nie mogą być w sposób jednoznaczny zidentyfikowane spektrofotometrycznie. Absorbancja przy długości fali 325 nm może być wyznacznikiem wytrąceń w roztworze oraz zanieczyszczeń samej kuwety.

## Oznaczanie stężenia kwasów nukleinowych

**Wybór kuwety.** Ilość roztworu kwasu nukleinowego, który możemy użyć do oznaczeń absorbancji  $A$ , zależy od pojemności stosowanej kuwety. Wybór kuwety powinien zależeć od przewidywanej ilości DNA, współczynnika rozcieńczenia próbki i objętości próbki jaką dysponujemy. W większości procedur stosowanych do analiz GMO, objętość próbki uzyskanej na koniec izolacji waha się od 50 do 100  $\mu\text{l}$ . Do pomiarów spektroskopowych niewielkich objętości

kwasów nukleinowych polecanych jest kilka typów kuwetek o niewielkiej pojemności – od 5 do 70  $\mu\text{l}$ .

**Nastawienie pomiarów.** W celu kalibracji spektrofotometru, ważne jest by:

- Ustalić właściwą wielkość kuwety (grubość warstwy absorbującej)
- Ustalić właściwy współczynnik (zależy czy matrycą jest dsDNA, ssDNA, czy RNA)
- Wykonać pomiar dla próby ślepej, zawierającej wodę lub bufor w którym rozpuszczono próbkę ( $A_{260} = 0$ )
- Upewnić się czy ślepa próbka mierzona jest periodycznie
- Wykonać pomiary dla próbek referencyjnych o znanym stężeniu, dla upewnienia się o dokładności wyników

**Pomiary próbek o nieznanym stężeniu.** W zależności od pojemności kuwетки, różne ilości próbki pobierane są do pomiaru DNA (np. dla kuwетки o pojemności mniejszej niż 0.2 ml, 5  $\mu\text{l}$  roztworu DNA rozcieńcza się w 195  $\mu\text{l}$  wody). Po wykonaniu kalibracji spektrofotometru, do kuwетки dodajemy rozcieńczony roztwór DNA, zatykamy kuwetakę i energicznie mieszamy, a następnie mierzymy absorbancję próbki. W celu zmniejszenia błędu pomiaru wynikającego z pipetowania, pomiar powinien być powtórzony przynajmniej raz, a do pipetowania powinno być pobrane przynajmniej 5  $\mu\text{l}$  próbki DNA. Wynik dla  $A_{260}$  mniejszy od 0.02 lub pomiędzy 1 i 1.5 (zależnie od użytego spektrofotometru) nie powinny być brane pod uwagę ze względu na duży margines błędu.

Stężenie  $c$  kwasu nukleinowego w próbce jest mierzone zgodnie z poniższymi wzorami:

- *Jednociowe DNA*  $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.027$
- *Dwunociowe DNA*  $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.020$
- *Jednociowe RNA*  $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.025$
- *Oligonukleotydy*  $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}100/1.5N_A+0.71N_C+1.20N_G+0.84N_T$

Gdzie  $A_{260}$  jest absorbancją mierzoną przy długości fali 260 nm

W Tabeli 2 przedstawione są pomiary absorbancji dla superoczyszczanego DNA z trzustki cielęcej rozpuszczonej w buforze 1x TNE, przy założeniu, że DNA referencyjne jest dwunociowe i jego absorbancja wynosi  $A_{260} = 1$  dla 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  w

kuwetce o grubości warstwy absorpcyjnej 10mm. Stężenie DNA nominalnie wynosiło 25 µg/ml.

Długość fali	Absorbancja	$A_{260}/A_{280}$	Stężenie (µg/ml)
325	0.01	-	-
280	0.28	-	-
260	0.56	2.0	28
230	0.30	-	-

**Tabela 2.** Wartości absorbancji dla superczystego DNA z trzustki cielęcej w buforze 1x TNE.

## Część eksperymentalna

### Wyposażenie

#### **UWAGA**

Całe wyposażenie użyte do analiz powinno być wysterylizowane przed użyciem, a wszystkie pozostałości DNA muszą być usunięte. W celu uniknięcia kontaminacji należy używać końcówek do pipet z barierą przeciw aerozolom, najlepiej z filtrem.

- Instrumenty do pobierania próbek jak skalpel, ostrza do skalpela, moździerz
- Łaźnia wodna lub blok grzejny
- Mikrowirówka
- Pipety
- Worteks
- Probówki 1,5 ml
- Naczynka wagowe
- Szpatułki
- Waga z możliwością pomiaru 0,01g
- Pałeczki do mieszania
- Statywy na probówki
- Opcjonalnie – pompa i ekcykator do suszenia osadu

### Odczynniki

#### **UWAGA**

Wszystkie odczynniki chemiczne muszą być przeznaczone do biologii molekularnej (molecular biology grade). Woda dejonizowana i bufony muszą być przez użyciem autoklawowane. Wszystkie odczynniki powinny być wolne od DNA i DNaz.

- Bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB)      CAS 124-03-8
- Chloroform

- Izopropanol
- Na<sub>2</sub>EDTA CAS 6381-92-6
- Etanol
- NaCl
- Proteinaza K
- RNaza A
- (Tris-HCl) chlorowodorek hydroksymetyloaminometanu
- Sterylna dejonizowana woda

#### *Bufor CTAB*

20g/l CTAB	4g
1,4 M NaCl	16.4g
0,1 M Tris-HCl	3.15g
20 mM Na <sub>2</sub> EDTA	1.5g

- dodaj 100 ml dejonizowanej wody
- doprowadź pH do wartości 8.0 z przy użyciu 1M NaOH
- dopełnij do 200 ml i autoklawuj
- bufor przetrzymuj w 4°C najdłużej przez 6 miesięcy

#### *Roztwór do wytrącania CTAB*

5g/l CTAB	1g
0,04 M NaCl	0.5g

- dodaj 100 ml dejonizowanej wody
- ustal doprowadź pH do wartości 8.0 przy użyciu 1M NaOH
- dopełnij do 200 ml i autoklawuj
- bufor przetrzymuj w 4 °C najdłużej przez 6 miesięcy

#### *NaCl 1,2 M*

- Rozpuść 7.0 g NaCl w 100 ml dejonizowanej wody
- Autoklawuj i przetrzymuj w temperaturze pokojowej

#### *Roztwór etanolu 70%*

Wymieszaj 70 ml czystego etanolu z 30 ml sterylnej dejonizowanej wody



*RNaza A* 10 mg/ml, przechowuj w -20°C

*Proteinaza K* 20 mg/ml, przechowuj w -20°C

### Procedura

Procedura wymaga sterylnych warunków pracy. Zanieczyszczenia próbek mogą być eliminowane dzięki użyciu jednorazowego sprzętu i związków dekontaminujących oraz przez unikanie tworzenia pyłów.

- Przenieś 100 mg homogenizowanej próbki do sterylnej probówki wirówkowej 1.5 ml
- Dodaj 300 µl sterylnej dejonizowanej wody i wymieszaj szpatułką
- Dodaj 500 µl buforu CTAB, wymieszaj
- Dodaj 20 µl proteiny K (20 mg/ml), zworteksuj i inkubuj w 65°C przez 30-90 min\*.
- Dodaj 20 µl RNazy A (10 mg/ml), zworteksuj i inkubuj w 65°C przez 5-10 min.\*
- Wiruj próbki przez 10 min przy 16 000 x g
- Przenieś supernatant do nowej probówki zawierającej 500 µl chloroformu, wytrząsaj przez 30 s
- Wiruj przez 10 min przy 16 000 x g, do momentu rozdzielenia faz
- Przenieś 500 µl górnej fazy wodnej do nowej probówki zawierającej 500 µl chloroformu, wymieszaj
- Wiruj przez 5 min, 16 000 x g
- Przenieś górną fazę wodną do nowej probówki 1.5 ml
- Dodaj 2 objętości roztworu wytrącającego CTAB, zmieszaj przez pipetowanie góra-dół
- Inkubuj przez 60 min. w temperaturze pokojowej
- Wiruj przez 5 min, 16 000 x g
- Usuń supernatant
- Rozpuść osad w 350 µl NaCl (1,2 M)

---

\* *te dodatkowe, wcześniej tylko opcjonalne etapy, są obecnie wykorzystywane w metodzie izolacji DNA opartej na CTAB w celu zwiększenia ilości DNA izolowanego z ze złożonych matryc (jak żywność, zanieczyszczone próbki itp.).*

- Dodaj 350  $\mu$ l chloroformu i wytrząsaj przez 30 sek
- Wiruj przez 10 min przy 16 000 x g, do momentu rozdzielenia faz
- Przenieś górną fazę do nowej probówki wirówkowej
- Dodaj 0.6 objętości izopropanolu, wymieszaj
- Wiruj przez 10 min przy 16,000 x g
- Usuń supernatant
- Dodaj 500  $\mu$ l 70% etanolu i wymieszaj delikatnie
- Wiruj przez 10 min, 16,000 x g
- Usuń supernatant
- Wyszus osad i rozpuść DNA w 100  $\mu$ l sterylnej dejonizowanej wody

Rozpuszczone DNA może być przetrzymywane w lodówce do maksimum 2 tygodni lub w zamrażarce (-20°C) przez dłuższy czas.

## Literatura

- Hotzel, H., Müller, W. and Sachse, K. (1999). Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *European Food Research Technology* **209**, 192-196.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. and Engel, K.H. (1998). Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* **206**, 203-207.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. and Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology* **212**, 497-504.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. and Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International* **82**, 923–928.
- Meyer, R. and Jaccaud, E. (1997). Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. In Amadò, R. Battaglia (Eds.). *Proceedings of the ninth European conference on food chemistry (Vol. 1). Authenticity and adulteration of food-the analytical approach*. 24-26 September 1997. Interlaken **1**, 23-28. ISBN : 3-9521414-0-2.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321–4325.
- Poms, R.E., Glössl, J. and Foissy, H. (2001). Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research Technology* **213**, 361-365.
- Wagner, D.B., Furnier, G.R., Saghay-Marroof, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P. and Allard, R.W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines

and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **84**, 2097–2100.

Zimmermann, A., Lüthy, J. and Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* **207**, 81–90.