

THE CHOICE OF THE MOST SUITABLE TECHNIQUE FOR ISOLATION OF NUCLEIC ACIDS AT DEPARTMENT OF ANIMAL MORPHOLOGY, PHYSIOLOGY AND GENETICS

VÝBĚR NEJVHODNĚJŠÍHO ZPŮSOBU IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN NA ÚSTAVU MORFOLOGIE, FYZIOLOGIE A GENETIKY ZVÍŘAT

Svobodová K., Bílek K., Knoll A.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xsvobo21@node.mendelu.cz, knoll@mendelu.cz

ABSTRACT

In 2007 we acquired a project „Education expansion by a course of molecular isolation techniques for students of Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno“ from grant agency of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. The aim of this project is to familiarize the students of bachelor, master and Ph.D. degree at Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno (MUAFA) with the recent knowledge from the field of molecular isolation techniques. This report summarizes workflow of arrangement of our project. We chose the representative samples of the kits that were currently on the market. We compared different techniques of isolation RNA, DNA from different samples. Our results suggest that testing of kits before work with samples is important. The results vary in dependence on using of kits and systems. There were not found any differences between kits for nucleic acid which were used for isolation from blood and milk. DNA from muscles and fat tissue was isolated more efficiently by kits determined only for DNA isolation, than kits for isolation DNA and RNA at the same time. For RNA isolation the kits based on phenol-chloroform methods were the best. The results of this project will be exploited for choice of suitable isolating kits used for education and also research.

Key words: DNA, RNA, isolation

This work is supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic FRVŠ no. 2385/2007 and by the Czech Science Foundation no. 523/03/H076

ÚVOD

Výsledky příspěvku jsou součástí příprav vzdělávacího semináře, který bude uspořádán pro studenty programů Zootechnika a Všeobecné zemědělství v bakalářském, magisterském i doktorském typu studia. V první fázi projektu byl vytipován reprezentativní vzorek kitů vyskytujících se momentálně na trhu. Při výběru byl kladen důraz na různorodost, časovou náročnost a v neposlední řadě na cenu kitu. Zvoleny byly jak kity využívající rozdílné rozpustnosti (Chomeczynski, 1993), tak kity využívající absorpční schopnosti deoxyribonukleové (DNA) a ribonukleové (RNA) kyseliny (Vogelstein a Gillespie, 1979). Jedním z důležitých faktorů při laboratorní práci je čas, proto byly do testu zahrnuty i kity s ozn. „fast“ nebo „quick.“ Podobné testování vhodnosti používaných reagensů a metodik by mělo patřit k běžné praxi laboratoře.

MATERIÁL A METODIKA

Jako experimentální materiál pro izolaci DNA a RNA byly použity krev a mléko a dále svalová a tuková tkáň, a to z důvodu jejich velké rozdílnosti. Vzorky krve a mléka byly uchovány v nativním stavu při -20 °C, vzorky tkání pak v RNAlater (QIAGEN, Hilden, Germany) taktéž při -20 °C. Z důvodu potřeby většího množství referenčních vzorků byl proveden tzv. pooling vzorků. To znamená, že z více vzorků jedné tkáně byl vždy vytvořen směsný vzorek, který byl použit pro veškeré analýzy. Homogenizace svalové a tukové tkáně probíhala v homogenizátoru FastPrep FP 120 (ThermoSavant).

Pro testaci byly zvoleny kity různých firem určené jak pro samostatnou izolaci DNA nebo RNA, tak pro získání obou nukleových kyselin současně. Použity byly systémy kolonkové i bezkolonkové (fenol-chloroformová izolace). Práce byla vždy prováděna podle standardního protokolu bez uváděných optimalizací.

Koncentrace a čistota získaných izolátů byly detekovány spektrofotometricky na přístroji GeneQuant (Pharmacia Biotech). Kvalita nukleových kyselin byla ověřena na 1% agarozovém (DNA) respektive denaturačním polyakrylamidovém (RNA) gelu (viz Obr. 1 a 3). DNA byla dále testována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím primerů pro gen *EEF1A2* (F: 5' – GCAGATCAGCGCCGGCTACT – 3', R: 3' – GCCGCTCTTCTTCTCCACGTTC – 5' ze sekvence TC281230). Teplotní profil PCR reakce: 95 °C/2 min, 30 x (95 °C/20 s, 60 °C/30 s, 68 °C/1 min) 68 °C /7 min (viz Obr. 2).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V tomto projektu je řešena problematika izolačních postupů využívaných v molekulární biologii. Bylo testováno deset kitů sedmi různých společností. Jednalo se o systémy kolonkové i bezkolonkové určené jak k izolaci samostatných nukleových kyselin, tak k izolaci obou kyselin v jednom postupu. Některé kity nabízely možnost izolovat pouze z tělních tekutin, některé pouze z tkáně a u některých bylo možno použít pro izolaci obojího.

Jako hodnocené aspekty byly vybrány: metoda, cena, doba potřebná pro izolaci a především získaná koncentrace a čistota izolátu (viz Tab. 1).

Pro izolaci DNA z krve a mléka byly použity shodné kity. Izolace DNA z krve byla nejjednodušší a u všech kitů určených pro tuto izolaci bylo dosaženo dobrých výsledků jak v získání DNA, tak i při jejím použití pro PCR reakci. Doba potřebná k provedení izolace se také významně nelišila, rozhodujícím kritériem tedy byla výsledná koncentrace a čistota a především cena kitu. Při izolaci DNA kitem určeným k izolaci obou nukleových kyselin současně byly výsledky spíše neuspokojivé. DNA není na gelu patrná vůbec, PCR produkt pouze velmi slabě.

Získání DNA z mléka je poněkud obtížnější než z krve. Důležitým faktorem je zde správný a shodný odběr somatických buněk. Výsledky jsou proto více variabilní. Přesto ani zde nebyly při vizualizaci DNA a PCR produktu mezi kity zjištěny významnější rozdíly.

Co se týče izolace DNA z tkání, ukázaly se jako spolehlivější také kity určené pro samostatnou izolaci DNA (viz Obr. 1 a 2 – vz. 17, 18 a 25, 26). U kitů pro izolaci obou nukleových kyselin bylo sice v některých případech dosaženo vyšší koncentrace, ale za cenu nižší čistoty.

Pro získání RNA se osvědčily kity založené na metodě fenol-chloroformové izolace. Velmi kladně bylo hodnoceno výrazné usnadnění práce, jenž umožňují některé společnosti prostřednictvím dobré vizualizace vrstev, které je při tomto postupu nutno separovat. Nevýhodou této metodiky, v porovnání s metodou kolonkovou, byla její větší časová náročnost. Kvalita výsledné RNA a také poměrně nižší cena kitů využívajících metodu fenol-chloroformové izolace jsou však faktory důležitějšími. I v případě ribonukleové kyseliny byl často výtěžek získaného izolátu nepřímě úměrný jeho čistotě (viz Tab. 1).

ZÁVĚR

V našem projektu se prokázalo, že existují významné rozdíly nejen mezi odlišnými metodikami izolace nukleových kyselin, ale i mezi produkty různých společností. Dalším zjištěním bylo, že ne vždy odpovídá vyšší cena vyšší kvalitě. Tyto výsledky potvrdily důležitost občasného testování reagensů a metodik používaných v laboratořích. Získané výstupy našeho projektu budou použity jako vodítko při výběru vhodných izolačních kitů nejenom pro výuku, ale i pro vědecko-výzkumnou činnost.

LITERATURA

- Chomczynski P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15: 532-7.
- Vogelstein B., and D. Gillespie. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 615-619.

DNA																
vzorek	krev								mléko							
	kit 1		kit 2		kit 3		kit 4		kit 1		kit 2		kit 3		kit 4 **	
označení	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
koncentrace (µg/ml)	31.9	44.8	53	48.5	21	13.5	0	1.35	11.5	13	12.5	27	15	56.5		
čistota	86	82	77	74.5	93.5	105.5	*	*	60.5	80	51.5	62.5	66	86.5		

DNA																
vzorek	svalovina								tuk							
	kit 4		kit 5		kit 6		kit 7		kit 4		kit 5		kit 6		kit 7	
označení	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
koncentrace (µg/ml)	1.65	2.1	57	38.5	78.8	116.5	135	92.8	2.25	2.1	35.5	32	31.5	3	39.3	42.5
čistota	*	*	84.5	83	63	65	55.5	53.5	*	*	82.5	82.5	52	64.5	60.5	59.5

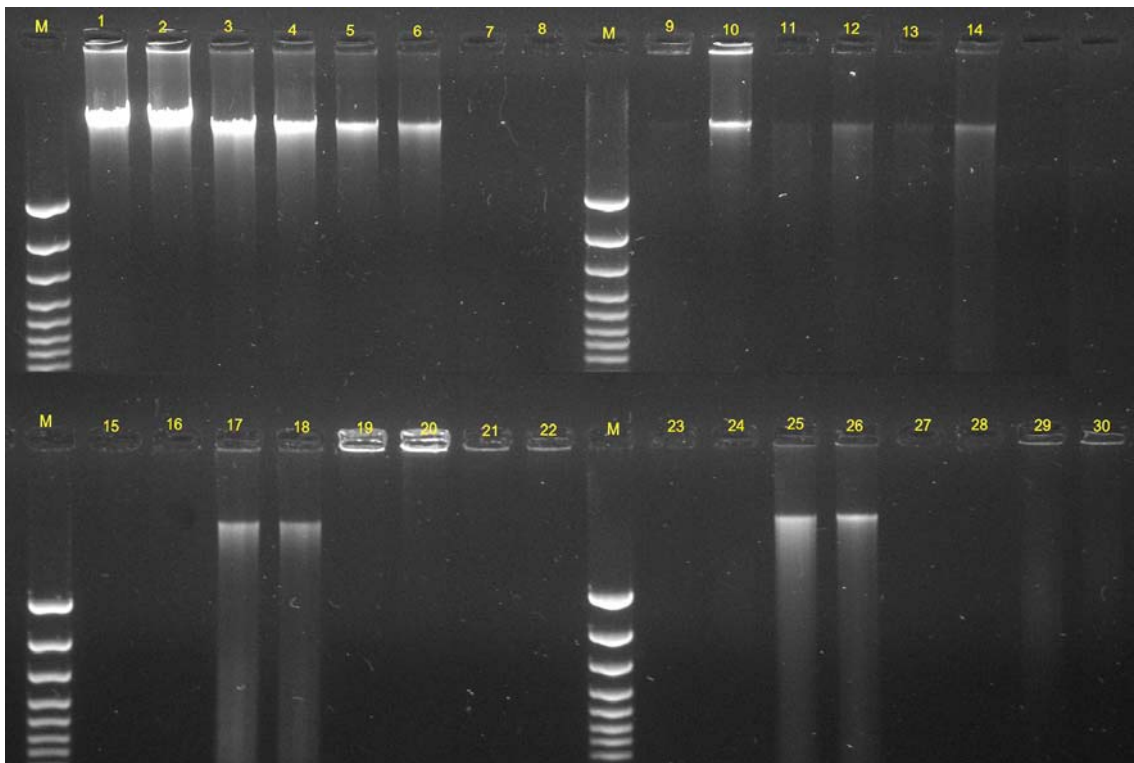
RNA														
vzorek	svalovina						tuk						krev	
	kit 8		kit 9		kit 10		kit 8		kit 9		kit 10		kit 8	
označení	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
koncentrace (µg/ml)	21.3	19.5	317	681	31.5	15	3.3	4.8	795.5	356	3.5	2.5	0.3	0.3
čistota	93.5	103	71	76	100	102	112.5	105	77.5	64	99.5	*	*	*

RNA														
vzorek	svalovina						tuk						krev	
	kit 4		kit 6		kit 7		kit 4		kit 6		kit 7		kit 4	
označení	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
koncentrace (µg/ml)	0	8.4	553	657.5	287	219.5	0	3	6.5	35	55	61.5	3.3	0.6
čistota	*	89.5	91.5	92	97	96.5	*	*	69.5	88.5	82.5	82.5	73	*

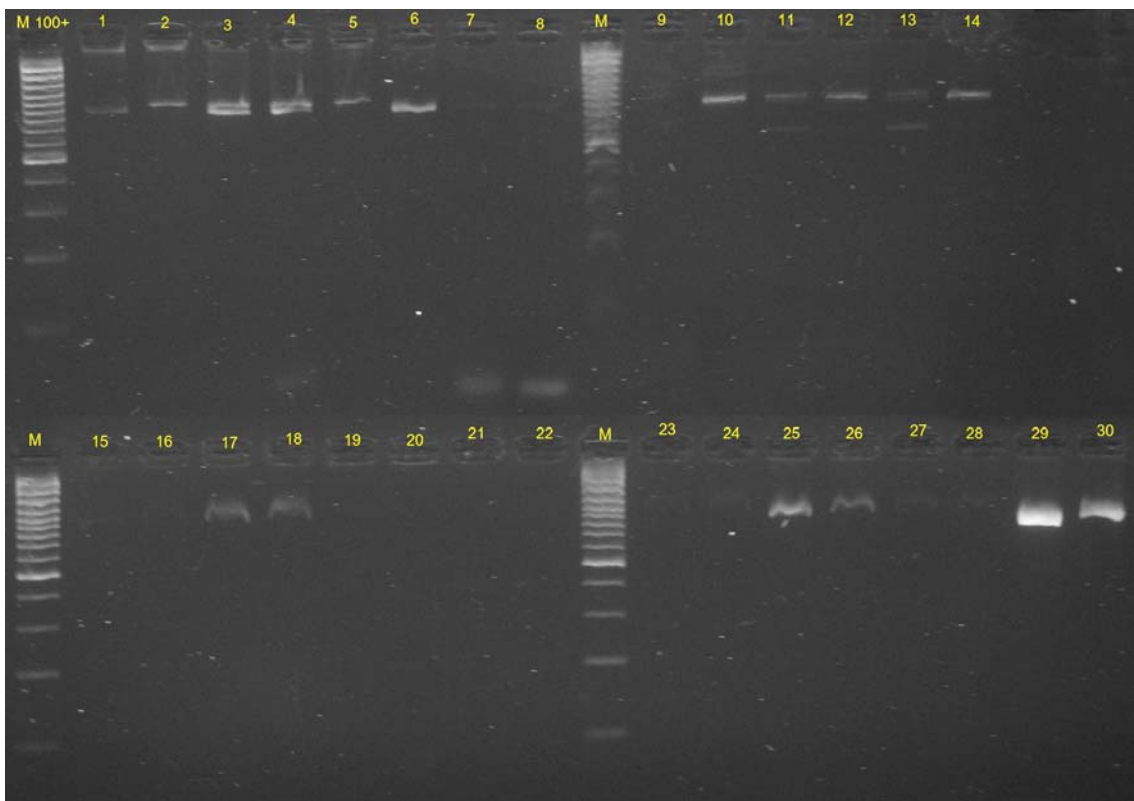
Tab. 1: Souhrnná tabulka získaných výsledků;

* hodnoty nebyly měřitelné

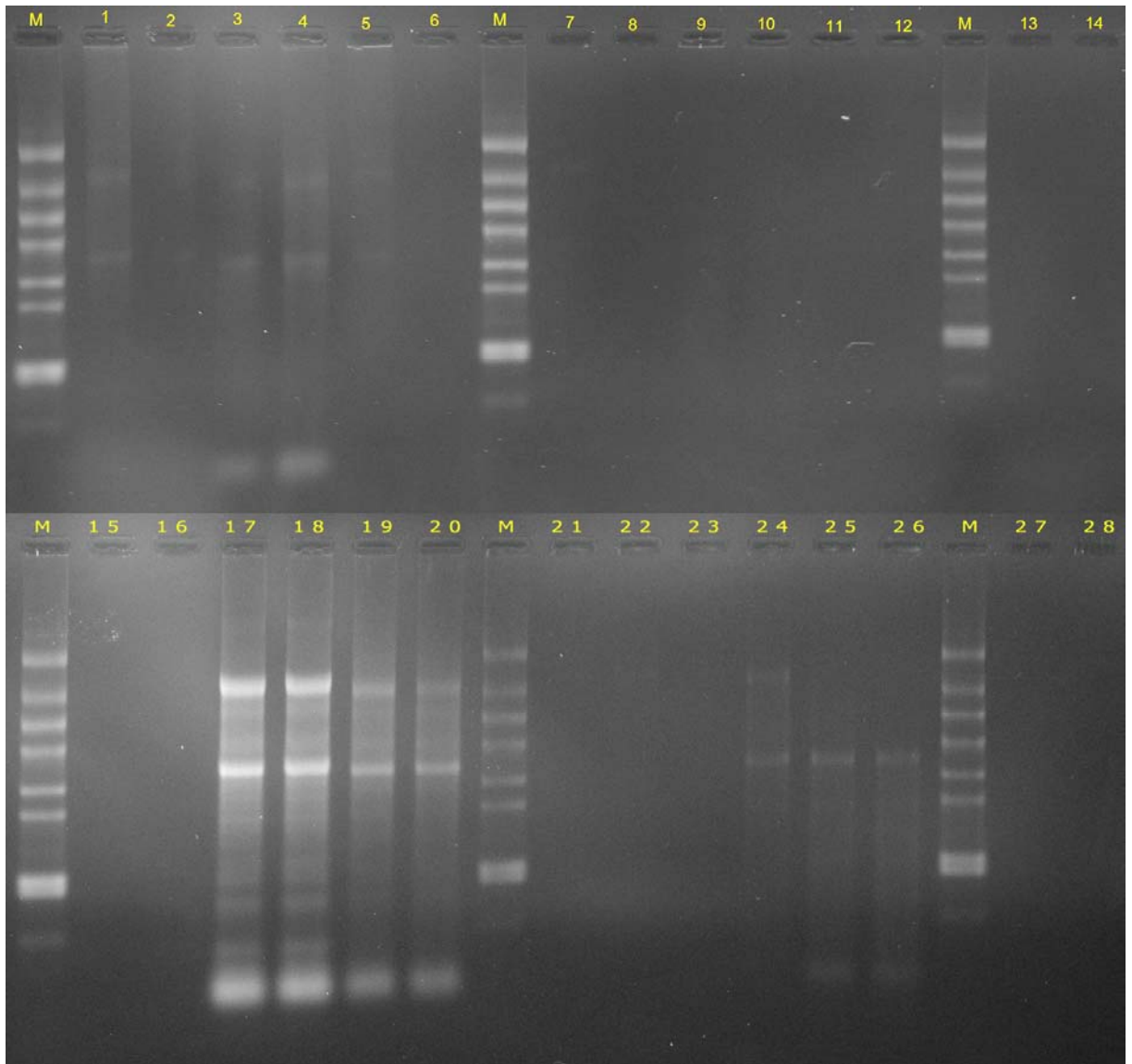
** hodnoty nebyly měřeny



Obr. 1: Izoláty DNA



Obr. 2: PCR produkty



Obr. 3: Izoláty RNA