

USAGE OF CHITOSAN FOR DNA AND BIOLOGICAL SAMPLES STORAGE

VYUŽITÍ CHITOSANU PRO UCHOVÁNÍ DNA A BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

Šrubařová P., Dvořák J.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: xsrubaro@mendelu.cz, dvorakJ@mendelu.cz

ABSTRACT

The main aim of this study was to find the appropriate way of DNA or biological samples' storage on chitosan medium (prepared by Food Research Institute in Prague). While storing these samples on chitosan, it should be possible to keep this material at the room temperature for a long time. We tried to store the isolated genomic DNA, blood, milk, meat, sperm, saliva and pieces of ears (all from livestock) on the chitosan in different thermal conditions to verify the influence of the environment on the sample quality. Isolation was done using JETQUICK Tissue DNA Spin Kit (GENOMED GmbH) and DNA was extracted using TE solution. Manipulation with the samples was very difficult. Comparing results of isolation or extraction DNA in four different intervals, we obtained DNA suitable for further analyses only from archived tissues. To disprove the presumption that the storing of biological materials (especially DNA) on chitosan is useless, we decided to continue in this experiment with another form of chitosan and direct the forthcoming studies to find the fitting way of blood and DNA storing.

Key words: Chitosan, DNA storage, DNA isolation

Acknowledgments: This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (project no. 1G58073). Author thanks the staff of the working team of Animal Genetics ÚMFGZ in Mendel University in Brno. Author acknowledges the kind contributions of the personnel of Food research Institute in Prague.

ÚVOD

V současné době výzkum směřuje k metodám uchování DNA při pokojové teplotě. Při tomto způsobu uchování je kladen důraz především na kvalitu DNA pro další genetické analýzy, což ovlivňuje zejména doba skladování. Mezi další požadavky patří ekonomické a prostorové hledisko. Na trhu se objevuje mnoho komerčních produktů jako např. FTA card nebo Whatman, které zaručují uchování plasmidové DNA při pokojové teplotě. Ale tyto metody jsou limitovány v jejich efektivnosti. I když lze DNA uloženou na těchto papírcích uchovávat při pokojové teplotě, doporučují se nižší teploty, -15°C až -20°C , což je velkou finanční nevýhodou.

Mezi základní požadavky pro ukládání a uchování DNA patří:

- Uchování při pokojové teplotě bez degradace
- Jednoduchost metody
- Finanční nenáročnost
- Uchování nejen DNA, ale i např. krve, mléka, apod.
- Prostorová nenáročnost
- Dostatečná kvalita DNA pro další genetické analýzy

Jako velmi vhodný materiál se jeví chitosan. Je to biologický polymer, jenž se dnes široce využíván v medicíně. Je vhodný hlavně kvůli své stabilitě a biodegradabilitě. Pokud se chitosan sloučí s kyselinou, tvoří ve vodě rozpustné soli, které jsou silně pozitivně nabitě a díky tomu se výborně váže s DNA, proteiny apod. S DNA vytváří chitosan silnou vazbu a tím ji chrání.

Chitosan je velmi bezpečný a nevykazuje žádné vedlejší účinky. Po absorpci chitosanu do živého těla dochází v lysozomech k jeho degradaci na N-acetylglukosamin, který je dále využíván během syntézy glykoproteinů a zbytek je uvolněný ve formě oxidu uhličitého (Woo-Chul *et al.*, 2007). Díky svému unikátnímu kationaktivnímu charakteru má chitosan velký potenciál v potravinářském průmyslu a biotechnologických aplikacích. Ukázalo se, že chitosan je efektivním koagulantem při čištění odpadních vod (Casal *et al.*, 2006). Kvůli svým vlastnostem může být chitosan bezpečně použit také při zpracování mléka.

Chitosan je účinný derivát z chitinu, který díky svému pozitivnímu náboji vykazuje silné vazebné vlastnosti. Poprvé byl připraven v roce 1859 profesorem Rougetem, první patent byl publikován v roce 1920. Čeští vědci mají také mnoho významných objevů týkajících se využití chitosanu, zejména Výzkumný ústav potravinářský v Praze (bok, 2006). Ve většině případů je chitosan extrahován z rozdrčených krunyřů krabů nebo ústřic. Čeští vědci ale dokáží získávat tento materiál z odpadu. Produkce chitosanu je díky tomuto postupu výrazně levnější a surovina je stále dostupná. Chitosan může být dále využíván také proti obezitě, na speciální barvení látek nebo jako implantát vnesený do pacientova těla k léčbě zranění (Mařík, 2006).

MATERIÁL A METODIKA

Chitosan byl připraven vědeckým týmem z Výzkumného ústavu potravinářského v Praze. Na něj poté byly uloženy biologické vzorky a DNA. 30mg masa a kousků uší; 20 μ l krve, mléka a slin; 10 μ l spermatu a 5 μ l izolované DNA bylo přeneseno na tři speciální mikrodestičky (mikrotitrační mikrodestička s připevněným chitosanem), každý do jiné jamky v paralelním uložení. Maso a kousky uší byly před uložení rozmělněny. Pro určení vlivu skladovacího prostředí byly připraveny tři mikrodestičky se stejnými vzorky a zvoleny tři rozdílné skladovací podmínky – pokojová teplota, mrazák a termostat (72°C).

Izolace DNA z biologických vzorků uložených na chitosanu byla prováděla v několika časových intervalech pomocí JETQUICK Tissue DNA Spin Kit (GENOMED GmbH) a DNA byla z chitosanu extrahována TE roztokem (10 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 mM EDTA). Izolovaná a extrahovaná DNA byla vizualizovaná na 1,5% agarózovém gelu s použitím ethidiumbromidu.

Pro ověření kvality izolované a extrahované DNA byla provedena PCR (polymerázová řetězová reakce). Byl vybrán amplikon genu MC3R (melanocortin 3 receptor) o délce 880bp. Reakční směs pro amplifikaci DNA z krve, masa a kousků uší obsahovala 8,5 μ l destilované vody, 12,5 μ l PPP Master Mix (150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerase, monoclonal anti-Taq DNA polymerase (38 nM)), 1 μ l primeru MC1A, 1 μ l primeru MC1B a 2 μ l DNA. Celkové množství reakční směsi bylo 25 μ l. Amplifikace probíhala na termocykleru PTC-100TM (MJ Research, Inc., USA) s následujícími kroky: počáteční aktivační krok při 95°C po dobu 2 min; denaturace při 95°C po dobu 20 s, annealing při 65° po dobu 20 s a elongace při 68° po dobu 7 min s opakováním 30 cyklů. PCR produkty byl vizualizovány po elektroforéze (20 min, 100V) na 1,5% agarózovém gelu s ethidiumbromidem.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Účelem této práce bylo vyvinout novou metodu pro jednoduché a levné uchování biologických vzorků a DNA bez degradace DNA. Medium pro uchování, chitosan, byl vyroben Výzkumným ústavem potravinářským v Praze. DNA byla izolována v různých časových intervalech ověřeným postupem na pracovišti genetiky ÚMFGZ MZLU v Brně.

Manipulace s biologickými vzorky a DNA uloženými na chitosanu se lišila. Velmi problematická byla se vzorky uloženými v mrazáku a termostatu, chitosan ztratil kompatibilitu a bylo velmi obtížné vyjmout celý vzorek z mikrodestičky. Nejjednodušší práce byla se vzorky uloženými při pokojové teplotě.

Izolace a extrakce DNA byla prováděna třikrát po dvou týdnech a jednou po půl ročním uložení biologických vzorků a DNA na chitosanu. Kvalita DNA byla kontrolována na 1,5% agarózovém gelu po každé izolaci, popř. extrakci. Výsledky se velmi lišily. Izolace DNA z mléka, slin a spermatu byla neúspěšná a žádná DNA nebyla z chitosanu extrahována. Po druhé izolaci (4 týdny od uložení) izolace ze vzorků krve byla také neúspěšná, s výjimkou vzorků uložených v termostatu. Množství DNA izolované z masa a kousků uší bylo značně

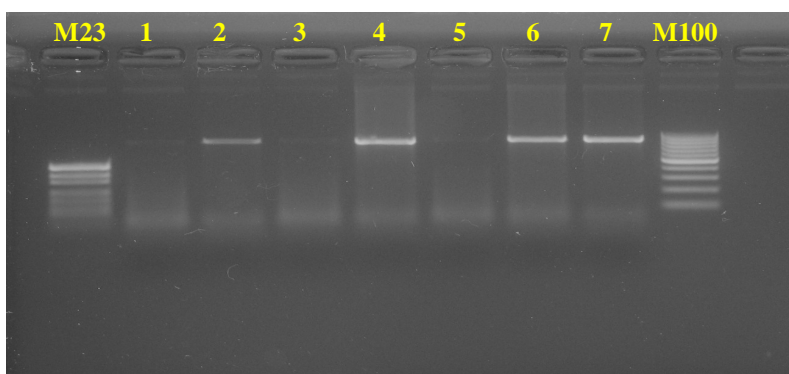
vysoké. Zajímavým zjištěním bylo, že po další půlroční izolaci a extrakci DNA z chitosanu uloženého v termostatu bylo množství DNA nižší než při izolaci a extrakci po dvoutýdenních intervalech.

Pro ověření, zda je DNA izolovaná z biologického materiálu uchovaném na chitosanu použitelná pro PCR, byl vybrán gen pro melanocortinový 3 receptor (MC3R), jehož PCR produkt je dlouhý 88bp. Amplifikace byla úspěšná jen u DNA izolované z masa a kousků uší (Obr.1). Pro validaci délky fragmentů byly použity dva velikostní markery – M23 a M100 (MBI Fermentas, Lithuania).

PCR analýza potvrzuje, že DNA nejvyšší kvality byla izolována z tkání (maso, kousky uší) a že uchování ostatních vzorků (krev, izolovaná DNA, sliny a sperma) na chitosanu a izolace DNA z těchto biologických vzorků se nezdá být příliš vhodná.

Při srovnání rozdílných podmínek uchování dobře vychází pokojová teplota. Manipulace se vzorky uloženými při pokojové teplotě byla totiž nejsnazší. Při srovnání množství DNA izolované se vzorků z různých podmínek uchování (25°C, -20°C a 72°C) nejlepších výsledků dosahují vzorky uložené v termostatu.

Obr. 1 PCR produkty



Poznámka: Vzorek 1 je PCR produkt DNA izolované z krve a uchovaný při pokojové teplotě po dobu 2 týdnů; vzorek 2 je PCR produkt DNA izolované z masa a uchovaný při pokojové teplotě po dobu 2 týdnů; vzorek 3 je PCR produkt DNA izolované z krve uchované v termostatu po 4 týdnech; vzorek 4 je PCR produkt DNA izolované v kousku ucha uchovaného po dobu 4 týdnů při pokojové teplotě; vzorek 5 je PCR produkt DNA izolované v krve uchované v termostatu po dobu 6 týdnů; vzorek 6 je PCR produkt DNA izolované z kousku ucha uchovaného v mrazáku po dobu 6 týdnů; vzorek 7 je referenční vzorek.

Hlavním problémem uchování vybraných biologických vzorků a DNA je počáteční množství. Takto připravený chitosan totiž nedokáže absorbovat dostatečné množství tekutiny, proto je množství vzorku k uchování na chitosanu omezené.

ZÁVĚR

V současné době je snahou vědců najít materiál, na kterém by mohla být uchována DNA, popř. biologický materiál, při pokojové teplotě, aniž by DNA degradovala, a tím snížit ekonomické a prostorové náklady pro archivaci. Hlavním cílem naší studie bylo najít vhodný způsob archivace DNA a biologických vzorků na chitosanu (připraven Výzkumným ústavem potravinářským, Praha). Na tomto nosiči jsme vyzkoušeli uchovat izolovanou genomovou DNA, krev, mléko, maso, sperma, sliny a kousky uší hospodářských zvířat. Pro ověření vlivu prostředí na kvalitu uchovávaných vzorků byly uchovávané vzorky vystaveny třem rozdílným teplotním podmínkám. DNA byla izolována pomocí JETQUICK Tissue DNA Spin Kit (GENOMED GmbH) a DNA extrahována TE roztokem. Manipulace s jednotlivými vzorky byla složitá. Při porovnání vzorků izolovaných (popř. extrahovaných) ve 2 týdenních intervalech byly výsledky velmi odlišné. Pro následné analýzy byla vhodná pouze DNA izolovaná z tkání uchovávaných na chitosanu. Uchovávání tkáňových biologických materiálů je ale nepotřebné. Samotná příprava vzorku na jeho uchování je pracná a tím pádem je takovýto způsob uchování nevýhodný. Abychom potvrdili nesprávnost tvrzení, že uchovávání biologických materiálů (zejména DNA) na chitosanu je zbytečné, rozhodli jsme se v experimentu pokračovat s modifikovanou formou chitosanu a zaměřit další studie k nalezení vhodného způsobu archivace krve a DNA.

LITERATURA

(BOK). Chitosan, patenty ověřený derivát. Technik : Materiály. 14.8.2006, s. 37. Dostupný z WWW: <<http://www.vupp.cz/czvupp/departments/odd330/060814technikChitosan.pdf>>.

Casal E., et al. (2006): Use of Chitosan for Selective Removal of β -Lactoglobulin from Whey. *J. Dairy Sci.*, no. 89: 1384-1389.

Mařík M. (2006): Nové lepidlo pro chirurgy. *Hospodářské noviny*. 14.6.2006. Dostupný z WWW: <http://hn.ihned.cz/2-18673240-500000_d-2b>.

Woo-Chul M., et al. (Goodgene Inc.) (2007): Method for storing DNA using chitosan, and products using the methods. US 0254294A1; <http://www.freepatentsonline.com/y2007/0254294.html> (9.4.2008).