

Doba laboratórna

Vývoj laboratórných techník na extrakciu nukleových kyselín

Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.¹, RNDr. Radka Tomášová¹, RNDr. Miroslav Tomka, PhD.¹, RNDr. Ivana Hojsíková²

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP

²Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP

Úspešná izolácia nukleových kyselín a proteínov je základ mnohých laboratórných genetických, biochemických, imunologických alebo mikrobiologických vyšetrení. V súčasnosti je k dispozícii široká škála extrakčných metód a výber tej správnej závisí od druhu a následného použitia cieľovej molekuly. V článku ponúkame historický prehľad vývoja jednotlivých metód a ich využitie v súčasnosti.

Kľúčové slová: nukleové kyseliny, izolácia DNA, história DNA.

Laboratory age

Basic assumption of many genetic, biochemical, immunological and microscopis methods is succesfull nucleic acid or protein purification. Wide range of different extraction methods is currently available and selection of the right one depends on the type and subsequent use of the target molecule. Here, we describe a historical overview of the development of various methods and their usage in present days.

Key words: nucleic acids, DNA isolation, DNA history.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 5–6

Úvod

Žijeme v modernej dobe laboratórnej, v dobe, ktorá nám otvára možnosti vstupovať čoraz hlbšie do sveta molekúl, produkovať v krátkom čase a na malom priestore obrovské množstvo údajov. V laboratórnej diagnostike v posledných desaťročiach zaznamenávame výrazný posun k automatizácii vyšetrovacích procesov, minimalizácii zariadení a počítačom asistovanej analýze. Tento stav je výsledkom snaženia mnohých známych výskumníkov aj bezmenných členov vývojových tímov.

Švajčiarsky lekár Friedrich Miescher (obrázok 1) v roku 1869 prvýkrát izoloval DNA. Nádej sa, že objaví fundamentálne princípy života a chemickú podstatu buniek. Spočiatku experimentoval s analýzou chemických látok (prevažne proteínov ako hlavnej zložky cytoplazmy) z leukocytov získaných z hnisavých obväzov. Zdokonaľovaním pokusov sa mu podarilo zistiť, že dokáže z roztoku pridaním kyseliny precipitovať dovtedy nepoznanú substanciu, opäť rozpustnú po pridaní alkalického látky. Zaznamenal, že táto substancija je bohatá na fosfor a vzhľadom na jej lokalizáciu v bunke ju nazval nukleín. V roku 1889 ju jeho žiak Richard Altman na podklade jej chemických vlastností premenoval na nukleovú kyselinu (NK) (1, 2).

Napriek nerozpoznanému významu nukleových kyselín sa v nasledujúcich rokoch o ne zvýšil záujem, zdokonaľovali sa izolačné a purifikačné techniky, ale až v roku 1935 sa ruskému vedcovi Andrejovi Nikolajevičovi Belozerskému podarilo izolovať čistú DNA, čím sa definitívne otvorila brána k poznaniu jej štruktúry a funkcie v organizme. Poznanie chemickej a fyzikálnej povahy nukleových kyselín znamenalo ďalší rozvoj izolačných techník (3).

Obrázok 1. Laboratórium Friedricha Mieschera na zámku Tübingen



Prebraté z http://www.tuepedia.de/index.php/Friedrich_Miescher

Môžeme konštatovať, že všetky historické metódy pretrvávajú, aj keď v upravenej podobe do súčasnosti. V roku 1958, v čase experimentov Meselsona a Stahla (dokázali semikonzervatívnu DNA) sa na extrahovanie DNA využívala hustotná gradientová centrifugácia, ktorá je v špeciálnych prípadoch a rôznych úpravách využívaná dodnes. Na izoláciu nukleových kyselín sa najčastejšie zaužívali dva prístupy – prvý (aj historicky), založený na roztokoch a druhý, založený na kolónkach (nosičoch). Výber vhodného protokolu podlieha predovšetkým potrebe množstva, kvality a druhu finálnej nukleovej kyseliny, ale aj kvantitatívnym, priestorovým, časovým a finančným pomerom (4).

Prvým krokom úspešnej izolácie NK je lýza buniek. Jej cieľom je uvoľniť obsah bunky (respektíve organel) pomocou jemných detergentov, prípadne ultrazvukom. Aby sa zabránilo degradácii cieľových molekúl, rozpad bunky prebieha v tlmivom roztoku a vhodných teplotných podmienkach. Na oddelenie cieľovej NK z roztoku bunkového obsahu sa využíva dočasná denaturácia – teplotná, vysolovacia metóda alebo zrážanie organickými rozpúšťadlami.

Kontamináciu DNA zvyškami RNA je možné jednoducho odstrániť pridaním enzýmu ribonukleázy.

Medzi jednoduchšie a historicky pôvodnejšie extrakčné prístupy patrí vysolovacia metóda založená na princípe zmeny rozpustnosti molekúl DNA v závislosti od zmeny koncentrácie iónov v roztoku (najčastejšie síranu amónneho). Ďalšou jednoduchou možnosťou je zrážanie organickými rozpúšťadlami (etanol, polyetylen glykol), ktoré sa uskutočňuje na základe ich schopnosti znížiť rozpustnosť NK (zvýšením intramolekulovej elektrostatickej interakcie). Rôzna rozpustnosť DNA sa využíva aj pri fenol-chloroformovej extrakcii. Jej podstatou je oddelenie vodnej fázy (s DNA) od roztoku

Obrázok 2. Moderné laboratórium v priestoroch MGA

obsahujúceho fenol a chloroform pomocou vysokootáčkovej centrifugácie, s následnou etanolovou precipitáciou DNA. Aj keď je táto metóda časovo náročná a závislá od kvality realizácie, je stále pomerne často využívaná pre jej finančnú nenáročnosť a vyššie výťažky DNA (4).

Metóda chromatografie na živicových kolónkach (RESIN, z angl. živica) využíva viazanie a následné uvoľnenie požadovanej substancie pomocou výmeny iónov medzi pevnou fázou a kvapalinou obklopujúcou pevnú fázou. Je to pomerne stará metóda (Thomas a Way, 1906), spočiatku využívaná v anorganickej chémii. Pôvodné prírodné materiály – sulfónované uhlie a zeolit, boli v polovici minulého storočia nahradené organickými iónomeničmi, ktoré sa používajú až do súčasnosti (aj v podobe komerčne dostupných kítov). Je to pomerne rýchla metóda s vysokým výťažkom a čistotou DNA (4, 5).

Metóda chromatografie na kremičitanových kolónkach (SILIKA matrice) je takisto pomerne stará, aj pri nej nahradil prírodný materiál – diatomit (rozsievková zemina), synteticky pripravený silikagél. Silika materiál (SiO_2) v prítomnosti chaotropných solí (jodid sodný, guanidín thiokyanát) adsorbuje DNA na svoj povrch, z ktorého je po opakovanom prečistení uvoľnená pomocou elučného činidla. Je to časovo nenáročná metóda s vysokou čistotou DNA a je takisto dostupná vo forme kítov (4).

Najmladšie metódy izolácie využívajú magnetické mikročastice alebo nanočastice. Majú jadro, tvorené magnetickými oxidmi železa, obalené látkou (organické polyméry, živice) umožňujúcou naviazanie cieľových objektov, napríklad NK. Princípom je separácia takýchto magnetických partikul pôsobením silného magnetu, ich následné premývanie a uvoľnenie NK z komplexu (obrázok 3). Aj v tomto prípade je dostupných niekoľko kítov, ktoré umožňujú pomerne v krátkom čase získať DNA nekontaminovanú proteínmi alebo RNA. Keďže táto metóda nevyžaduje manipuláciu so škodlivými organickými rozpúšťadlami, opakovanú centrifugáciu, filtráciu vo vákuu alebo kolónkovú separáciu, je ideálna na automatizovanú separáciu. Izolačné automaty zabezpečia v krátkom čase a štandardných podmienkach spravidla väčšie množstvo vzoriek, preto sú ideálne v rutinných aj výskumných laboratóriách. Ich nevýhodou je finančná náročnosť (inštrument, špeciálne plasty, kity) (4, 6).

Medzi moderné prístupy patrí aj rýchla extrakcia DNA prostredníctvom FINA diskov. Pre jej jednoduchosť a vysoký stupeň analytickej senzibility je ľahko uskutočniteľná i v odľahlejších lokálnych zdravotných centrách

Obrázok 3. Princíp separácie pomocou magnetických partikul. Bunky zo vzorky v reakčnej nádobe sú rozrušené pomocou lyzačného pufru. Účinkom proteinázy K dochádza k degradácii proteínov. Po pridaní sklenených magnetických častíc dôjde na ich povrchu k naviazaniu NK. Nasleduje premývanie sekvencia a záverečné oddelenie magnetických guľôčok. Izolovaná NK je v elučnom roztoku premiestnená do jednorazovej platničky.



(napríklad v Afrike). Princípom je zvislá filtrácia a spočívajú v oddelení buniek s obsahom DNA separačnou membránou, ktorá je v priamom kontakte s absorpčnou vložkou. Vzniknutý kapilárny tlak tak riadi prietok tekutiny. Následnou lýzou buniek (pomocou NaOH) sa s nadbytkom lyzačného pufru oddelí bunková debris a DNA ostane zachytená na separačnom disku. Ten je možné pridať priamo do PCR reakčnej zmesi (7).

Automatizácia laboratórií je nepochybne prínos; redukuje pracovný čas i personálne zdroje, zvyšuje kvalitu a reproducibilitu výsledkov. V súčasnosti je nevyhnutné pokračovať v tomto trende. Nesmieme však podľahnúť pohodlnému tlaku automatov. Naďalej je dôležité zvoliť si pre daný cieľ najvhodnejší spôsob izolácie. Principiálne poznanie metód preto ostáva rozhodujúce pre pochopenie zákonitostí a obmedzení jednotlivých prístupov. V tomto duchu nech naše mysle zostanú rovnako otvorené ako mysle bádateľov, ktorí pre nás dobu laboratórnu otvorili.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií. ITMS 26240120038, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Maderspacher F. Rags before the riches: Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Cur. Biol.* 2004;14(15):R608.
2. Wolf G. Friedrich Miescher, the man who discovered DNA. *Chemical Heritage.* 2003;21(10-11):37-41.
3. Converging on DNA. 1900 – 1953. [online]. <http://www.accessexcellence.org/RC/AB/BC/1900-1953.php>.
4. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009;1-10.
5. McGarvey FX. *Introduction to industrial ion Exchange.* Sybron Chemicals Inc. Birmingham: New Jersey, 1983.
6. Húska D, Baloun J, Trnková L, et al. Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHE-Magazin.* 2008;18(3):14-15.
7. Jangam SR, Yamada DH, McFall SM, et al. Rapid, Point-of-Care Extraction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral DNA from Whole Blood for Detection by Real-Time PCR. *J Clin Mikrobiol.* 2009;47(8):2363-2368.



Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP
 Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
 gabriela.pavlikova@medirex.sk