

Izolácia a uchovávanie DNA

Úspešná izolácia nukleových kyselín a proteínov je základom mnohých laboratórnych 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.

Súčasťou genetického vyšetovania na oddelení genetiky Medirex v laboratórnej časti MEDIREX GROUP ACADEMY sú molekulovo-genetické analýzy nukleových kyselín (NK). Na úspešnú analýzu je esenciálne získať z vyšetovaného materiálu dostatočné množstvo DNA v požadovanej kvalite. V súčasnosti sa na extrakciu DNA používa viacero prístupov – počnúc historicky najpôvodnejšími, až po moderné plne automatické metódy.

Prvým krokom úspešnej izolácie DNA je lýza buniek. Jej cieľom je uvoľniť obsah bunky (resp. 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 DNA z roztoku bunkového obsahu sa využíva dočasná denaturácia. Kontamináciu DNA zvyškami RNA je možné jednoducho odstrániť pridaním enzýmu ribonukleázy. Extrahovanú DNA je možné pri vhodných podmienkach archivácie uchovávať pomerne dlhý čas. Najvhodnejším spôsobom archivácie s bezpečným zachovaním jej vlastností je zmrazenie na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V minulosti 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 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.¹

Medzi jednoduchšie extrakčné prístupy patrí vysolovacia metóda založená na princípe zmeny rozpustnosti molekúl DNA v závislosti od zmeny koncentrácie iónov v roztoku. Ďalšou možnosťou je zrážanie organickými rozpúšťadlami (etanol, polyethylenglykol), uskutočnené na základe ich schopnosti znížiť rozpustnosť NK. Rôzna rozpustnosť DNA sa využíva aj pri fenol-chloroformovej extrakcii. Jej podstatou je oddelenie vodnej fázy (s DNA) od roztoku obsahujúceho fenol a chloroform pomocou vysoko otáčkovej centrifugácie, s následnou etanolovou precipitáciou DNA. Táto metóda je časovo náročná a závislá od kvality prevedenia, no stále pomerne často využívaná pre jej finančnú nenáročnosť a vyššie výťažky DNA.¹

Metóda chromatografie na živicových kolónkach (tzv. RESIN) využíva viazanie a následné uvoľnenie NK pomocou výmeny iónov medzi pevnou fázou a kvapalinou obklopujúcou pevnú fázu. Metóda bola spočiatku využívaná v anorganickej chémii. Pôvodné prírodné materiály – sulfónované uhlie a zeolit – boli nahradené organickými iónomeničmi. Je pomerne rýchla, s vysokým výťažkom a čistotou DNA.^{1,2}

Aj pri metóde chromatografie na živicových kolónkach (tzv. SILIKA) nahradil prírodný materiál diatomit synteticky pripravený silikagél. Silika materiál (SiO_2) v prítomnosti chaotropných solí adsorbuje DNA na svoj povrch, z ktorého je po opakovanom prečistení uvoľnená pomocou elučného činidla. Metóda je časovo nenáročná, s vysokou čistotou DNA a je tiež dostupná vo forme kitov.¹

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. Aj v tomto prípade je dostupných niekoľko kitov, ktoré umožňujú v pomerne krátkom čase získať DNA nekontaminovanú proteínmi alebo RNA. Keďže si 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). Napriek tomu je automatizácia laboratórií nepochybne prínosom; redukuje pracovný čas i personálne zdroje, zvyšuje kvalitu a reproducibilitu výsledkov.^{1,3}

Vypracovali

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.: **Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.**, laboratórny diagnostik

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.: **RNDr. Radka Tomášová**, laboratórny diagnostik

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.: **RNDr. Miroslav Tomka, PhD.**, laboratórny diagnostik

Medirex, a. s.: **RNDr. Ivana Hojsíková**, manažér lekárskej genetiky

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. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009;1-10
2. McGarvey FX. *Introduction to industrial ion Exchange.* Sybron Chemicals Inc., Birmingham, New Jersey; 1983
3. Húska D, Baloun J, Trnková L, et al. Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHEMagazín.* 2008;18(3):14-15