

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Automatyzacja izolacji DNA z materiałów biologicznych

JUSTYNA STANINSKA¹, ZUZANNA SZCZEPANIAK², AGNIESZKA PIOTROWSKA-CYPLIK²,
PAWEŁ CYPLIK¹, JAKUB CZARNY³

¹KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOSCI, UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
W POZNANIU

²INSTYTUT TECHNOLOGII ŻYWNOSCI POCHODZENIA ROŚLINNEGO, UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY W POZNANIU

³INSTYTUT GENETYKI SĄDOWEJ, BYDGOSZCZ

Słowa kluczowe: izolacja DNA, automatyzacja

STRESZCZENIE

Intensywny rozwój nauk biologicznych, zarówno w dziedzinie medycyny, kryminalistyki, jak i szeroko rozumianych badań związanych z biotechnologią, stworzył potrzebę doskonalenia technik analitycznych. Na szczególną uwagę zasługują metody biologii molekularnej bazujące na analizie kwasów nukleinowych, charakteryzujące się wysoką czułością i powtarzalnością. Pozwalają one na precyzyjną identyfikację śladów biologicznych, ocenę zmian w profilach ekspresji genów, a także pełną ewaluację bioróżnorodności nisz środowiskowych. Kluczowym elementem determinującym efektywność przeprowadzanych analiz jest etap pozyskiwania (izolacji) materiału genetycznego. Wyraźnie dostrzega się tendencje rozwoju technologii w kierunku zwiększenia przepustowości oraz dokładności izolacji DNA. Aktualnie możliwe jest pokonanie ograniczeń związanych z metodą manualnej izolacji poprzez zastosowanie gotowych zestawów oraz robotów automatycznych umożliwiających pracę z wieloma setkami prób jednocześnie. Celem badań było przeprowadzenie walidacji wybranych metod izolacji genomowego DNA. Wykorzystano trzy komercyjne zestawy. Dwa z nich, dedykowane platformie automatycznej BioRobot M48 Robotic Workstation (Qiagen), bazowały na zjawisku immobilizacji DNA na złożach z cząstkami paramagnetycznymi: QIASymphony DNA Investigator Kit (Qiagen) oraz MagAttract® DNA Mini M48 (Qiagen). Trzeci zestaw, Sherlock AX (A&A Biotechnology), przeznaczony był do manualnej izolacji genomowego DNA i wykorzystywał mechanizm adsorpcji kwasów nukleinowych na membranach jonowymienionych połączonej ze strącaniem DNA izopropanolem. Ocenie poddano wykrywalność, powtarzalność, i odtwarzalność. Wyniki wskazują, że wszystkie analizowane metody pozwalają na izolację materiału genetycznego o wysokich standardach, który może być wykorzystany w dalszych procedurach badań molekularnych.

Automation of DNA isolation from biological materials

Keywords: DNA isolation, automation

ABSTRACT

The intensive development of biological sciences, both in the field of medicine and broadly defined biotechnology, created the need to improve the analytical techniques. Molecular biology methods based on the analysis of nucleic acids with high sensitivity and reproducibility deserve special attention. They facilitate precise identification of biological traces, assessing changes in gene expression profiles and complete evaluation of environmental niches biodiversity. The main factor determining effectiveness of analysis is a stage of genetic material isolation. There is a clear trend to increase the capacity and accuracy of DNA isolation. Currently it is possible to overcome the limitations associated with manual isolation techniques. Using of kits and automated robots facilitates working with hundreds of samples simultaneously. The aim of the study was to validate the selected genomic DNA isolation methods. Three commercial kits were used. Two of them, which are dedicated to the automatic platform BioRobot M48 Robotic Workstation (Qiagen), are based on the DNA adsorption on silica beads convenient handling of magnetic particles: QIASymphony Investigator DNA Kit (Qiagen) and MagAttract® DNA Mini M48 (Qiagen). A third kit Sherlock AX (A&A Biotechnology) for manual isolation of genomic DNA are based on the mechanism of nucleic acid adsorption on ion exchange beads combined with the isopropanol precipitation of DNA. The determination limit, reproducibility and repeatability were evaluated. The results indicate that all of the analysed methods allow the isolation of high-quality genetic material, which can be used in subsequent molecular testing procedures.

1. WSTĘP

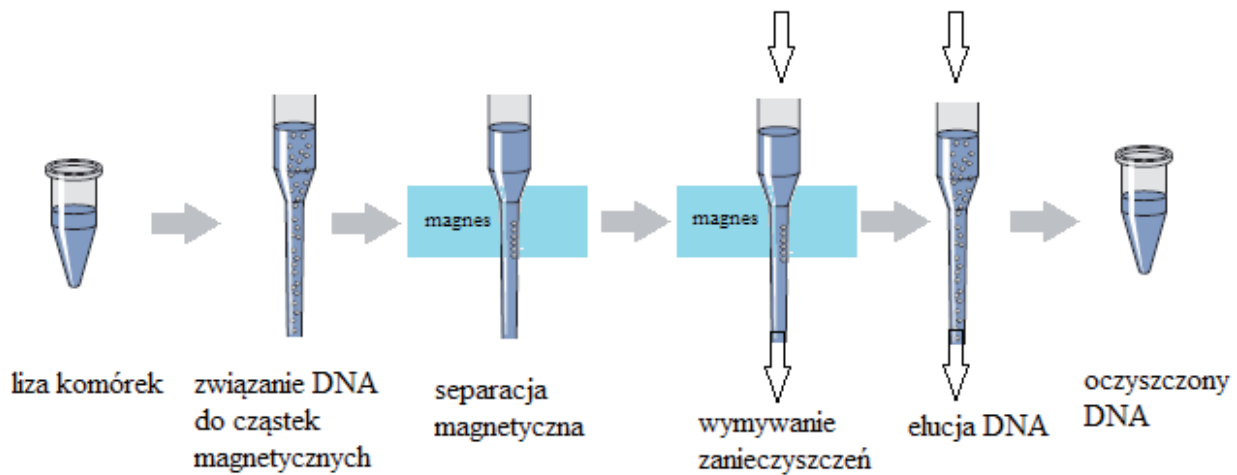
Odkrycie w XIX wieku kwasów nukleinowych zapoczątkowało intensywny rozwój badań z dziedziny biologii molekularnej, mających dziś szerokie zastosowanie w medycynie diagnostycznej i sądowej oraz w wielu gałęziach biotechnologii. W ciągu ostatnich 100 lat przeprowadzono wiele przełomowych badań, które zaowocowały poznaniem pełnej struktury chemicznej i molekularnej nierozgałęzionego biopolimeru jakim jest DNA. Współczesna inżynieria genetyczna, cechująca się wysoką czułością i powtarzalnością, pozwala na efektywne klonowanie, modyfikowanie oraz sekwencjonowanie DNA, co stwarza dla nauki coraz większe możliwości [1]. Kluczowym czynnikiem determinującym jakość analiz molekularnych jest etap izolacji kwasów nukleinowych. Niezwykle istotnym jest, by niezależnie od matrycy źródłowej uzyskany materiał charakteryzował się wysoką jakością i czystością oraz był wolny od inhibitorów reakcji PCR. Nie mniej istotną kwestią jest dobór odczynników o stosunkowo niskiej toksyczności w celu zapewnienia bezpieczeństwa osób prowadzących analizy oraz zminimalizowania oddziaływania na środowisko [2]. Każda procedura izolacji wymaga lizy komórek (mechaniczna, che-

miczna lub enzymatyczna), inaktywacji egzonukleaz oraz oczyszczania końcowego DNA. Obecnie na rynku dostępnych jest wiele komercyjnych zestawów do izolacji genomowego DNA znacznie zwiększających efektywność procesu, redukujących ilość transferów, a tym samym ryzyko zanieczyszczenia. Jednym z popularnych rozwiązań jest zastosowanie technologii opierającej się na powinowactwie cząsteczek kwasów nukleinowych do specyficznego ligandu związanego z kulkami paramagnetycznymi [3]. Schemat metody przedstawiono na Rysunku 1.

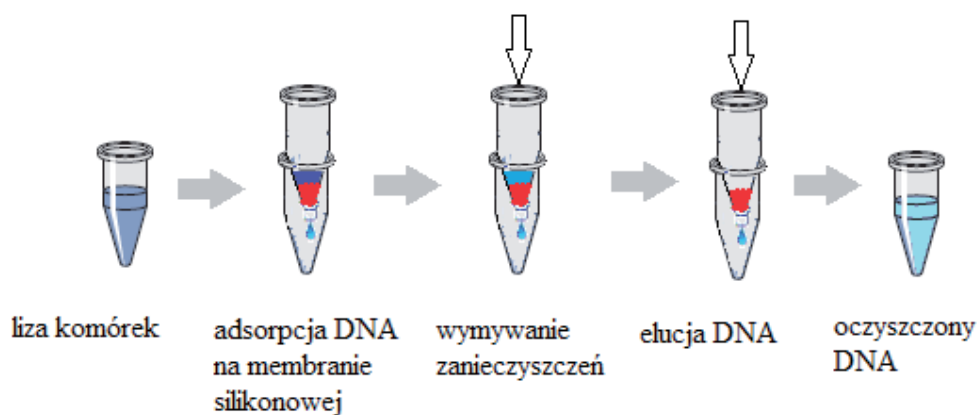
Proces izolacji rozpoczyna się od enzymatycznej lizy komórek z wykorzystaniem proteiny k. Następnie do roztworu dodaje się kulki paramagnetyczne związane z ligandem, które wiążą DNA. Podczas magnetycznej immobilizacji układ przemywa się w celu usunięcia kontaminantów. Ostatnim etapem jest elucja czystego materiału genetycznego.

Innym popularnym rozwiązaniem jest wykorzystanie membran jonowymiennych zdolnych do związania kwasów nukleinowych (Rys. 2).

Pierwszy etap stanowi enzymatyczna liza komórek. Następnie zachodzi adsorpcja DNA na membranach silikonowych oraz pierwsza filtracja w celu usunięcia kontaminantów. Roztwory poddawane



Rysunek 1 Schemat metody separacji wykorzystującej powinowactwo DNA do ligandów związanych z kulkami paramagnetycznymi



Rysunek 2 Schemat metody separacji DNA wykorzystującej membrany jonowymienne

są kolejnej filtracji w obecności soli chaotropowych o wysokim stężeniu. Następnie układy są kilkakrotnie przepłukiwane w celu usunięcia białek, inhibitorów reakcji PCR i innych zanieczyszczeń. Ostatecznie DNA jest wymywane roztworem o wysokiej sile jonowej. Uzyskany eluat kwasów nukleinowych jest wysalany oraz zagęszczany poprzez precypitację alkoholową [3]. Obecnie na rynku coraz większą popularnością cieszą się automatyczne aparaty do izolacji kwasów nukleinowych. Nowoczesne stacje robocze pozwalają na jednoczesną pracę z wieloma dziesiątkami prób jednocześnie i minimalizują zaangażowanie w bezpośrednią obsługę procesu. Pełna automatyzacja niweluje ryzyko błędów ludzkiego i zewnętrznego zanieczyszczenia oraz gwarantuje wysoką przepustowość izolacji. Możliwość dodawania standardów wewnętrznych umożliwia pełną kontrolę jakości oraz ilości uzyskiwanego materiału genetycznego. Dostępne na rynku bioroboty posiadają gotowe, zoptymalizowane procedury izolacji materiału genetycznego z różnych matryc oraz opcję ich modyfikacji w celu

zwiększenia efektywności w problematycznych układach doświadczalnych. Nie mniej istotną kwestią jest fakt, że podczas jednego cyklu pracy bioroboty w sposób automatyczny dozują objętości odczynników w przeliczeniu na ilość analizowanych prób, co znacznie zmniejsza obciążenie środowiska naturalnego w stosunku do metod konwencjonalnych oraz pozwala na pełną kontrolę kosztów [2, 4]. Warto zwrócić uwagę, że część platform może być obciążona dużą zmiennością jakości izolacji DNA, z uwagi na fakt, iż nie wymaga stosowania dedykowanych materiałów zużywalnych których klasa może mieć znaczący wpływ na przebieg procesu.

Celem niniejszych badań było przeprowadzenie walidacji wybranych metod izolacji genomowego DNA: immobilizacji materiału genetycznego na złożach z cząstkami paramagnetycznymi z wykorzystaniem platformy automatycznej i dedykowanych jej kitów oraz adsorpcji DNA na membranach jonowymiennych z zastosowaniem zestawu do izolacji manualnej.

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 Materiały i metody

2.1.1 Izolacja materiału genetycznego

Materiałem do badań były próbki krwi oraz śliny człowieka. Zastosowano gotowe zestawy do izolacji: pracujące na stacji roboczej BioRobot M48 Robotic Workstation (Qiagen): QIASymphony DNA Investigator Kit (Qiagen) i MagAttract® DNA Mini M48 (Qiagen) oraz dedykowane standardowej, manualnej izolacji: Sherlock AX (A&A Biotechnology). Oceny stężenia preparatów genomowego DNA dokonano przy pomocy zestawu Quantifiler Human DNA Quantitation Kit. Do rozcieńczeń zastosowano wodę o najwyższym stopniu czystości (Sigma).

2.1.2 Wykrywalność metody

Przygotowano trzy serie próbek krwi oraz śliny w rozcieńczeniach 1:2, 1:10, 1:20 i 1:100 oraz kontrolę negatywną zawierającą wodę. Próby przygotowano w objętości 10 µl używając do rozcieńczeń wodę i naniesiono na czystą tkaninę bawełnianą. Następnie dokonano izolacji genomowego materiału genetycznego w trzech powtórzeniach. Próbkę tkaniny z naniesioną krwią wycięto sterylnym ostrzem skalpela i umieszczono w koszyczku do ekstrakcji DNA (NAO Baskets, Copan). Technologia ta umożliwiła pełny odzysk materiału genetycznego z podłoża nasiąkliwego, w związku z czym na ocenę stężenia DNA nie miała wpływu chłonność stosowanego nośnika. Ocenę stężenia genomowego DNA przeprowadzono w trzech powtórzeniach za pomocą wymienionych zestawów, zgodnie z procedurami rekomendowanymi przez producenta. Za granicę wykrywalności DNA przyjęto najmniejszą ilość materiału biologicznego, dla którego przynajmniej w jednej próbce uzyskano stężenie 0,007 ng/µl. Jest to eksperymentalnie wyznaczona granica oznaczalności stosowanej analizy loci mikrosatelitarnych STR metodą multipleksowej reakcji PCR, która jest aktualnie najskuteczniejszym sposobem identyfikacji próbek ludzkiego materiału biologicznego [5].

2.1.3 Powtarzalność i odtwarzalność

Przygotowano pięć krążków bibuły FTA z naniesioną śliną o średnicy 3 mm i 1,2 mm. Izolacji genomowego materiału genetycznego oraz oceny stężenia dokonano w pięciu powtórzeniach, analogicznie jak w przypadku oznaczenia wykrywal-

ności metody. Oznaczenie odtwarzalności zrealizowano w różnych seriach eksperymentów, przeprowadzanych w różnym czasie, jako kontrole pozytywne rutynowych badań. Precyzję (powtarzalność i oznaczalność) metod, będącą miarą zgodności pomiędzy pojedynczymi wynikami analizy, oceniono na podstawie obliczonego współczynnika zmienności (CV) [6] zdefiniowanego jako:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (1)$$

gdzie SD – odchylenie standardowe, \bar{x} – średnia ilość DNA ($\bar{x} \neq 0$)

3. WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Wyniki wykrywalności poszczególnych metod izolacji genomowego DNA z krwi i śliny przedstawiono w Tabeli 1.

Wyniki badań wskazują, że metoda izolacji genomowego DNA wykorzystująca mechanizm adsorpcji kwasów nukleinowych na złożach jonowymienionych (Sherlock AX) gwarantuje największą efektywność w obu wariantach materiału wyjściowego (krew i ślina). W przypadku izolacji z wykorzystaniem zestawu MagAttract® DNA Mini M48 poziom wykrywalności ustalono na 1 µl (krew) i 0,5 µl (ślina). Kity do izolacji QIASymphony DNA Investigator Kit oraz Sherlock AX zapewniają poziom wykrywalności 0,1 µl dla obu matryc. Doniesienia literaturowe potwierdzają, że ekstrakcja DNA oparta na powinowactwie do kulek magnetycznych wykazuje nieco niższą wydajność w stosunku do ekstrakcji na drodze adsorpcji do fazy stałej. Wynikać to może z faktu, że intensywne płukanie układu skutkuje wymywaniem słabo zaadsorbowanych kwasów nukleinowych [7]. Berensmeier (2006) podkreśla także znaczenie faktu siły jonowej roztworu wymywającego, zmian pH i temperatury [8]. Można również stwierdzić, że wykorzystanie stacji roboczej BioRobot M48 Robotic Workstation (Qiagen) w metodach izolacji opartej na powinowactwie do kulek paramagnetycznych zwiększa ilość uzyskiwanego materiału genetycznego. Wysoka przepustowość pracy urządzenia wraz z efektywnością izolacji świadczy o przydatności w badaniach wymagających szybkiej analizy dużej ilości prób w krótkim czasie.

Wyniki analizy precyzji izolacji genomowego DNA z matryc biologicznych przedstawiono w Tabeli 2 (powtarzalność) i Tabeli 3 (oznaczalność).

Dostrzec można tendencję, że metoda wykorzy-

Tabela 1 Wykrywalność DNA wraz z odchyleniami standardowymi (SD) w serii rozcieńczeń krwi i śliny człowieka za pomocą wybranych zestawów do izolacji. Kolorem szarym oznaczono wyniki poniżej ustalonego poziomu wykrywalności

	MagAttract® DNA Mini M48		QIASymphony DNA Investigator Kit		Sherlock AX	
	średnia ilość DNA	SD	średnia ilość DNA	SD	średnia ilość DNA	SD
	[ng]					
Krew						
5 µl	0,1231	0,0827	1,9000	0,7118	2,9233	0,6984
1 µl	0,0090	0,0036	0,1400	0,0432	0,5247	0,1774
0,5 µl	0,0038	0,0033	0,0867	0,0262	0,2460	0,0193
0,1 µl	0,0008	0,0012	0,0153	0,0105	0,0413	0,0077
Ślina						
5 µl	1,0295	0,1014	0,7000	0,0000	4,3573	0,2318
1 µl	0,0525	0,0189	0,3333	0,1247	0,8457	0,1245
0,5 µl	0,0163	0,0057	0,1267	0,0249	0,4047	0,0859
0,1 µl	0,0000	0,0000	0,0087	0,0049	0,0713	0,0048

Tabela 2 Powtarzalność izolacji DNA ze śliny człowieka przy pomocy wybranych zestawów do izolacji DNA wraz z odchyleniami standardowymi (SD) i współczynnikami zmienności (CV)

średnica sączka [mm]	MagAttract® DNA Mini M48			QIASymphony DNA Investigator Kit			Sherlock AX		
	średnia ilość DNA	SD	CV	średnia ilość DNA	SD	CV	średnia ilość DNA	SD	CV
	[ng/µl]		[%]	[ng/µl]		[%]	[ng/µl]		[%]
3	3,600	0,157	4,347	0,640	0,102	15,938	8,7858	1,3289	15,126
1	0,516	0,034	6,552	0,268	0,0264	9,851	2,077	0,314	15,115

Tabela 3 Oznaczalność izolacji DNA ze śliny człowieka przy pomocy wybranych zestawów do izolacji DNA wraz z odchyleniami standardowymi (SD) i współczynnikami zmienności (CV)

średnica sączka [mm]	MagAttract® DNA Mini M48			QIASymphony DNA Investigator Kit			Sherlock AX		
	średnia ilość DNA	SD	CV	średnia ilość DNA	SD	CV	średnia ilość DNA	SD	CV
	[ng/µl]		[%]	[ng/µl]		[%]	[ng/µl]		[%]
3	1,7266	0,0948	5,491	1,0234	0,1579	15,429	8,241	1,0759	13,055
1	1,208	0,1195	9,892	2,8392	0,2001	7,048	1,8972	0,2429	12,803

stująca kulki paramagnetyczne cechuje się wyższą precyzją niż metoda bazująca na membranach jonowymiennych. Badania Shiyang i in. (2013) dotyczące porównania metod izolacji bakteryjnego DNA z próbek ludzkiego osocza wskazują także na najwyższą powtarzalność metody magne-

tycznej [9]. Berensmeier (2006) podkreśla, że eliminacja etapów wirowania próby w metodzie separacji magnetycznej redukuje zjawisko degradacji kwasów nukleinowych na skutek działania sił ścinających, co warunkuje wysoką powtarzalność metody [8]. Doniesienia literaturowe wskazują

także, iż w przypadku analizy precyzji (powtarzalności i odtwarzalności) współczynniki zmienności powinny osiągać jak najmniejsze wartości. Za wynik precyzyjny uznać można taki, wobec którego współczynnik CV nie przekracza 15%. Dopuszcza się również zakres tolerancji do 20% w przypadku próbek o niskich stężeniach, z którymi mamy do czynienia w niniejszym doświadczeniu [6]. Ponieważ uzyskane analizy charakteryzują się współczynnikiem CV nieprzekraczającym 20%, można jednoznacznie stwierdzić, że wszystkie zestawy do izolacji spełniają kryteria odtwarzalności i powtarzalności.

4. WNIOSKI

Przeprowadzona walidacja potwierdziła, że wszystkie analizowane zestawy do izolacji genomowego DNA posiadają potencjał aplikacyjny w dziedzinach nauk molekularnych. Największą efektywność ekstrakcji wykazała metoda membran jonowymiennych reprezentowana przez kit Sherlock

AX. Zestawy automatyczne wykorzystujące kulki paramagnetyczne MagAttract® DNA Mini M48 oraz QIASymphony DNA Investigator Kit charakteryzowały się natomiast największą precyzją oznaczeń. Izolacja DNA z wykorzystaniem platform automatycznych, mimo mniejszej efektywności ekstrakcji, umożliwia wyeliminowanie błędów ludzkich podczas pracy manualnej. Warto podkreślić, że praca na stacji roboczej BioRobot M48 Robotic Workstation (Qiagen) zapewniła wysoką przepustowość, wydajność izolacji i powtarzalność. Można sądzić, że bogaty asortyment dostępnych na rynku zestawów do izolacji DNA przyczyni się do intensywnego postępu badań wykorzystujących narzędzia molekularne.

5. FINANSOWANIE

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego Opus o nr. 2013/11/B/NZ9/01908 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

LITERATURA

- [1] Gabryelska M., Szymański M., Barciszewski J., DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć, *Nauka*, 2(2009), 111-134.
- [2] Gabryelczyk P., Zastosowanie aparatu NucliSens easyMag do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych w diagnostyce medycznej, *J Trasz Med*, 3(2010), 1-8.
- [3] Dębska M., Drabik J., Porównanie efektywności różnych metod izolacji genomowego DNA ze śladów biologicznych, *Probl Krym*, 264(2009), 11-25.
- [4] Małodobra M., Jonkisz A., Kowalczyk E., Lebioda A., Bartnik B., Świątek B., Wydajność trzech komercyjnych zestawów do izolacji DNA i RNA ze zróżnicowanego materiału klinicznego i dowodowego przy użyciu automatycznej stacji Janus, *Arch Med Sąd Kryminol*, 61(2011), 51-57.
- [5] Pepiński W., Niemcunowicz-Janica A., Skawrońska M., Koc-Żórawska E., Janica J., Sołtyszewski I., Berent J., Polimorfizm wybranych loci mikrosatelitarnych wśród ludności Polski północno-wschodniej w aspektach zróżnicowania etnicznego i przydatności w badaniach medyczno-sądowych, *Rocz PAM*, 53(2007), 71-75.
- [6] Spas A., Zbieć-Piekarska R., Wewnętrzna walidacja metody kwantyfikacji DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit i aparatu 7500 Real-Time PCR System wraz z oprogramowaniem Hid Real-Time PCR Analysis Software V. 1.1 w Zakładzie Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji, *Probl Krym*, 284(2014), 1-11.
- [7] Grody W., Nakamura R., Kiechle F., Strom Ch., *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*, Boston, Academic Press, 2010, 38-40.
- [8] Berensmeier S., Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids, *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(2006), 495-504.
- [9] Shiyang P., Bing G., Hong W., Zihong W., Peng W., Hao P., Weiping X., Dan Ch., Genyan L., Comparison of four DNA extraction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* by real time PCR and its clinical application in pulmonary tuberculosis, *J Thorac Dis*, 5(2013), 251-257.