

# Izolacja DNA do reakcji PCR

Dr Anna Linkiewicz  
Laboratorium Kontroli GMO, IHAR-PIB, Radzików  
21.10.2022



## Czy laboratoria ENGL postępują podobnie przy izolacji DNA?



## Izolacja DNA w analizach GMO

- Norma ISO 21571:2005(en) Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction
- ENGL Working group „DNA extraction” – nieukończone prace.
- Publikacje

J. Verbr. Lebensm.  
DOI 10.1007/s00003-014-0862-3

Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit  
Journal of Consumer Protection and Food Safety

### ANNOUNCEMENTS AND REPORTS

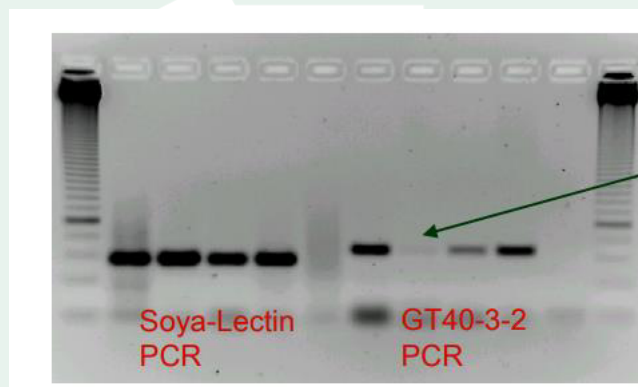
#### **Guidelines for validation of DNA extraction methods applied in subsequent PCR analysis of food and feed products for the presence of genetically modified material**

Hans-Ulrich Waiblinger · Lutz Grohmann

Received: 6 December 2013  
© Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2014

## Jak czuła jest nasza metoda?

- Czy wynik „Nie wykryto soi RR GT40-3-2” jest wiarygodny?
  - Słaba efektywność izolacji DNA?
  - Niska zawartość DNA?
- Przykład: izolacja DNA z lecytyny sojowej (za Grohman i in, 2017)



PCR negatywny.  
Czy poniżej 0,9% w odniesieniu do całej soi w próbce?



## Etapy izolacji DNA



- Uwolnienie DNA z analizowanej matrycy do roztworu
- Oczyszczenie DNA z inhibitorów PCR

1. Mechaniczna homogenizacja (ucieranie w ciekłym azocie, mielenie)
2. Zniszczenie błon komórkowych, **liza** (detergenty np. SDS, CTAB, 65oC)
3. Usunięcie białek i zbędnych składników jak polisacharydy (trawienie proteinazą K, ekstrakcja fenolem/chloroformem)
4. Usunięcie RNA (RNaza)
5. Oczyszczenie DNA (wytrącanie w etanolu, izopropanolu, dodatkowe zestawy do oczyszczania DNA)
6. Przygotowanie do przechowywania (TE, woda)

Alternatywnie: etapy 5,6 wiązanie DNA na kolumnach ze złożem silikonowym, oczyszczenie związanego DNA i elucja

# Liza komórek

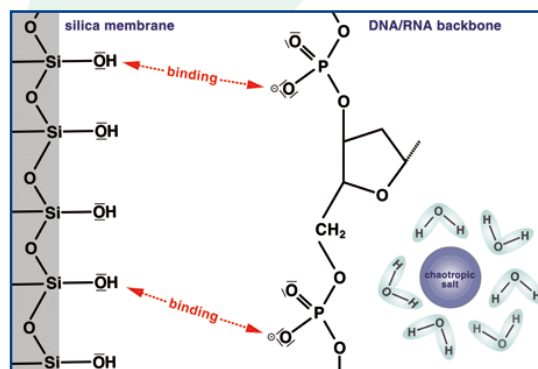
## 1. Liza fizyczna

- Rozcieranie mechaniczne  
np. w moździerzu
- zamrażanie, rozmrażanie



## 2. Liza chemiczna

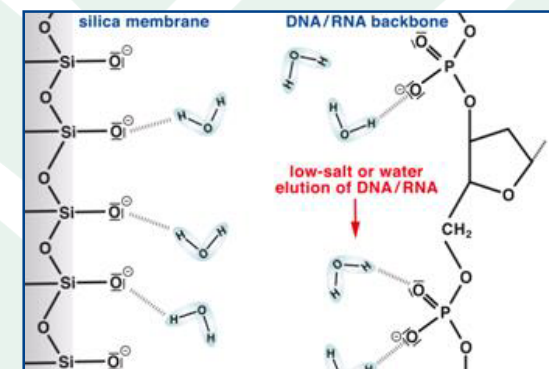
- Detergenty, surfaktanty –SDS, CTAB
- Sole chaotropowe (denaturacja białek błony)
- Proteinaza dla polepszenia rozpuszczenia ściany komórkowej



Roztwór wodny

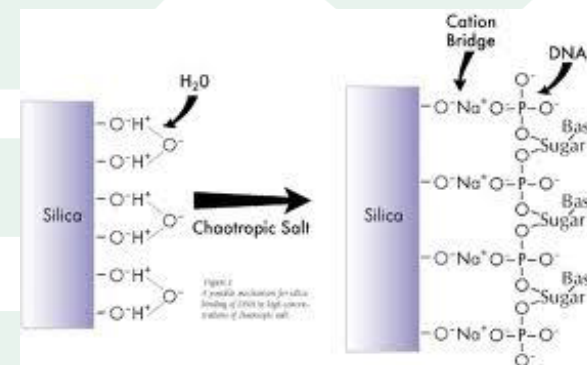
⇌

Sól chaotropowa



# Oczyszczanie DNA

- Rozpuszczalniki organiczne
  - Chloroform
- Wysalanie: białka są mniej rozpuszczalne w wyższych stężeniach soli (np. NaCl)
- złoża: DNA wiąże się do złóż krzemionkowych w obecności soli chaotropowych i przy odpowiednim pH



# Odzyskanie DNA z roztworu

- Wytrącanie alkoholem (etanol, izopropanol)
- Jeśli doda się wystarczającą ilość alkoholu, przyciąganie elektryczne między grupami fosforanowymi i dowolnymi jonami dodatnimi ( $\text{Na}^+$  lub  $\text{NH}_4^+$ ) w roztworze staje się wystarczająco silne, aby utworzyć stabilne wiązania jonowe.





# Na co zwrócić uwagę przy izolacji DNA?

## 1. Próbka

- Rodzaj czy typ próbki
- Obecność składników mogących wpływać na efektywność izolacji
- Stopień przetworzenia
- Sposób próbobrania i jednorodność próby

## 2. Metoda izolacji DNA

- Wydajność
- Czystość wyizolowanego DNA
- Wielkość wyizolowanych cząstek DNA

## 3. Sposób oceny wyizolowanego DNA

## 4. Stabilność próbki w czasie

# Próbka



## Masa próbki laboratoryjnej

<b>ZIARNO</b>	<b>Masa ziarna [g]</b>	<b>Masa próbki [g]</b>
Kukurydza	285	1000
Rzepak	4	14
Ryż	27	95
Soja	200	700
Pszenica	37	140

JRC Technical Report 2014 Recommended laboratory sample size”

Nasiona: Masa odpowiadająca 3 000 ziarniaków

Pasza – masa odpowiadająca 10000 nasion

Produkty jak mąka, semolina, otręby od 100 do 1 kg

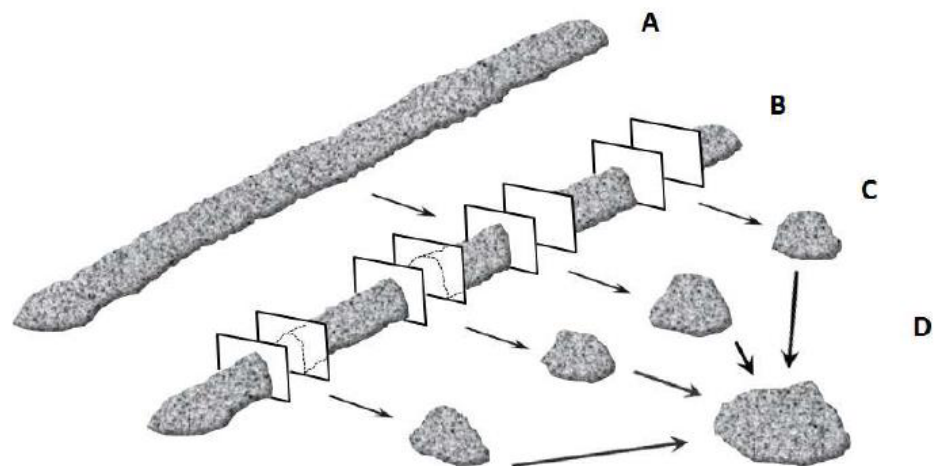
Płyny – 500 ml

Produkty lepkie, ciasta – 500g

Produkty finalne np. opakowane – od 100 g do 1 kg

Norma ISO 21571:2005

## Redukcja wielkości cząsteczek próbki



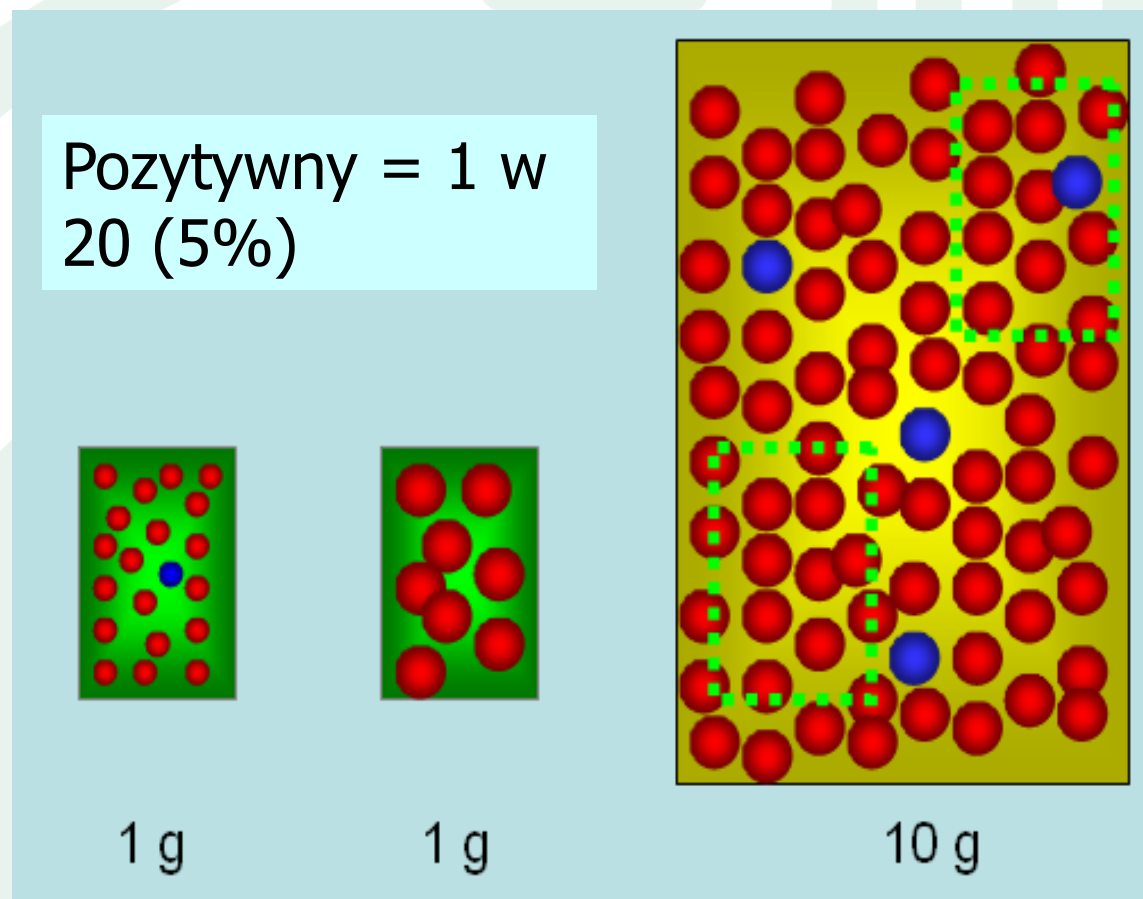
ISO 6498:2012



ISO 6498:2011

# Wpływ wielkości cząstek na dokładność oznaczenia

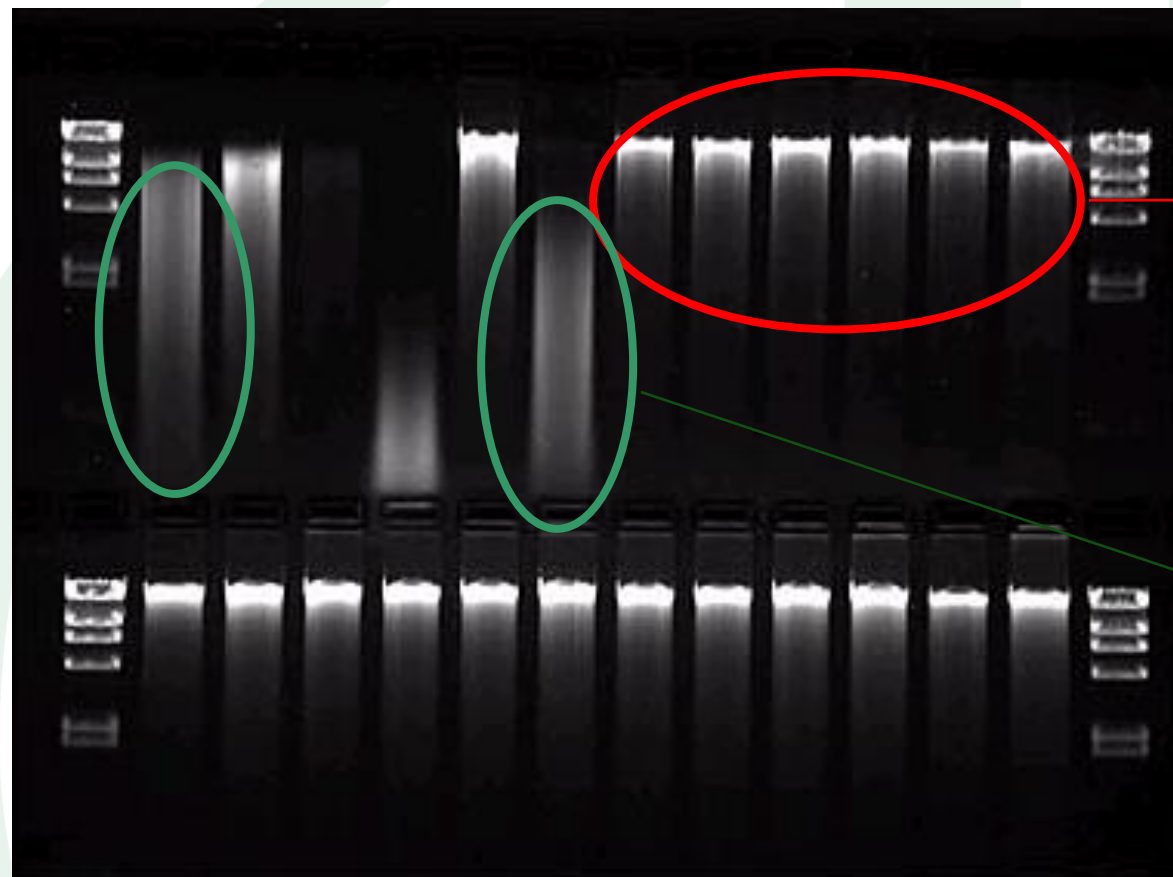
Rozmiar cząstek określa ich ilość w próbce analitycznej o określonej masie



1 nasiono w 1000 = 0,1 %



## Ocena DNA na żelu agarozowym



Genomowe,  
wysokocząsteczkowe,  
niezdegradowane DNA

Genomowe DNA  
niskocząsteczkowe,  
częściowo  
zdegradowane

## Izolacja DNA



## Etapy izolacji DNA

### • 1. LIZA i oczyszczanie

#### ❑ Solvents-based methods :

- **CTAB** (main method used in routine under ISO 21571:2005)
- phenol-chloroform

#### ❑ Silica-based methods with columns :

- DNeasy for plant, Food Kit, CTAB/Genomic-tip 20/G (Qiagen)
- Qiagen DNeasy Plant Mini Kit, Purification of Total DNA from Plant Tissue, (Mini Protocol) for soy
- Qiagen DNeasy Plant Mini Kit, Purification of Total DNA from Plant Tissue, (Mini Protocol) with CTAB lysis step for maize and mixed feed samples
  - High pure DNA extraction (Roche)
  - NucleoSpin® Food Macherey Nagel

#### ❑ Magnetic beads-based method :

- Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (with KingFisher™ device)
- PureFood GMO and Authentication Kit (with Maxwell® RSC device)
- Maxwell® Food, Feed, Seed DNA extraction kit



## Przykłady metod izolacji DNA dla różnych matryc NRL/882 Niemcy

- Fast ID Genomic DNA extraction Kit (Genetic ID)
  - soybean powder, cotton powder, soya milk, linseed
- NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel)
  - canola seed, instant soup, (soya milk), rapeseed cake
- „CTAB/Microspin“ method (CRLVL09/05XP corrected version 1)
  - potato
- CTAB method (CRLVL01/04VP 16/02/2005)
  - maize powder, "mexican tortillas" (pancake type), biscuit, complete feedingstuffs for piglets, supplemental feeds for dairy cattle, chicken feed
- CTAB method (Reiting et al., Eur food Res Technol (2013) 236: 715-723)
  - rice noodles
- Pollen enrichment and CTAB method (§64 LFGB L40.00-14)
  - honey

## Rozwiązania MN dla „trudnych” próbek (slajd Macherey Nagel)

### Plant samples

- Lysis Buffer PL1 – based on CTAB method
- Lysis Buffer PL2 – based on SDS method



**Two lysis buffer options for optimal lysis of different materials**





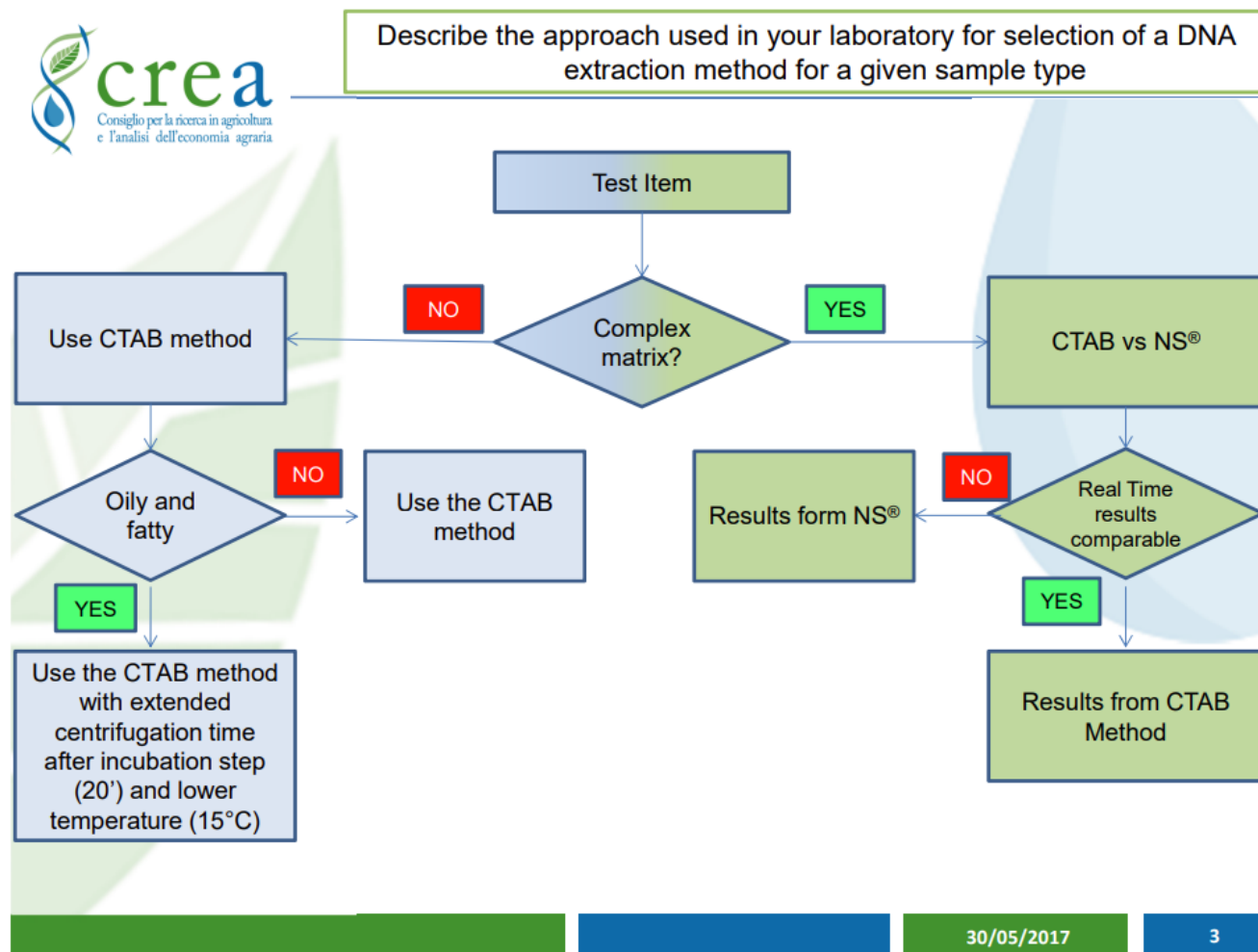
## Jakość DNA po izolacji

- DNA złej jakości – możliwość fałszywie negatywnych wyników
- Wysoko przetworzone próbki: żywność, pasze np. olej

### Oznaczanie jakości i stężenia DNA

1. Sprawdzenie DNA na żelu agarozowym (fragmentacja DNA, RNA – konieczność stosowania starterów dających krótkie produkty)
2. Spektrofotometr (oznaczenie [A260/280](#) i [A260/230](#),)
  - proste, najczęściej stosowane
  - Mała czułość
  - RNA, nukleotydy, białka, inne zanieczyszczenia- mogą zawyżać wynik
3. Oznaczenie z barwnikiem fluorescencyjnym np. PicoGreen
  - czułość 100x większa niż spektrofotometr
  - mniej czuła na zanieczyszczenie białkowe i nukleotydowe
  - zanieczyszczenie RNA- fałszywy wynik
  - oznaczenie fuorymetryczne
  - "The PicoGreen fluorescent signal was dependent on DNA fragment size but only if the DNA was in pure water, while DNA in buffer was much less sensitive. Finally, we document the high sensitivity of the PicoGreen assays to the detergent known as CTAB (Holden i in., 2009).."
4. Sprawdzenie amplifikacji: PCR dla endogennego genu roślinnego ([RbCL](#), [HMG](#), [Lectin](#)), występującego w dużej liczbie kopii w genomie  $\Delta$  [Cq](#)

# NRL/882 Włochy- doświadczenia



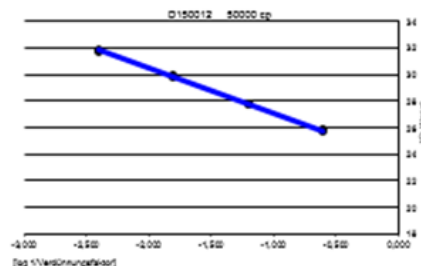
- **NRL/882 Włochy**  
**doświadczenia**

DNA extraction method	Matrix	Sample input	Modification	Grinding 0.5mm 0.75mm 1mm	DNA (ng/μL)	Elution volume (μL)	A260/280 ratio	A260/230 ratio	PCR inhib. run (ΔCq<0.5)?
CTAB ISO 21571:2005	flour, grain, baked products, feed	0.2-1 g		If need	100-1000 and more	100	>1,9	>2	YES
CTAB ISO 21571:2005	High fat content food, gluten free food	1-10 ml 1-2 g	1CTAB/ 4 ESANE 5min 10.000 g; incubate for 2 h at 65°C with PK and 5 min at 65°C with RNAsi	If need	6-50	50/100	1,29	0,79	----- -
CTAB ISO 21571:2005	Rice, precooked dried rice	1g	Amilase	yes	20-70	100	≥1.9	1-2	yes
CTAB ISO 21571:2005	Soy milk	3g; 5ml	1CTAB/ 4 ESANE	----- -	10-50	100	>1.8	0.6-2	yes
CTAB ISO 21571:2005	cow milk	10 ml raw milk for 10 min at 10 000 rpm to separate cream, skim and pellet.	For cream fraction 1 V of n- hexane at 60 °C for 10 min, followed by centrifugation, CTAB at 56 °C overnight (for all fractions).	----- -	50-150	100	>1.7	>1.3	----- -

# Sprawdzenie amplifikacji PCR dla endogennego genu roślinnego

- NRL/882 Niemcy – doświadczenia

DAS-40278 #257/4 0,5%		Proben-Nr.: D150012	50000 cp	Analyt: HMG_001-03			B
		Gemess. Ct	Mittelw. Ct	Δ Ct	Soll Δ Ct	Log	
Konzentration		23,79					
Arbeitslösung	26ng/μl	23,77	<b>23,78</b>				
		25,77				-0,6021	
Verdünnungsfaktor	1:4	25,8	25,79	2,01	2	-0,6021	
		27,76				-1,2041	
Verdünnungsfaktor	1:16	27,78	27,77	1,99	2	-1,2041	
		29,75				-1,8062	
Verdünnungsfaktor	1:64	29,98	29,87	2,10	2	-1,8062	
		31,82				-2,4082	
Verdünnungsfaktor	1:256	31,68	31,75	1,89	2	-2,4082	
		NTC	Extrapol. Ct	Extrapol.-	Steigung	R <sup>2</sup>	
		#NV	arbeitslösung	Mittelw. Ct			
		0					
		#NV	23,80	0,02	-3,32	0,999	



## NRL/882 Niemcy – doświadczenia

Fast ID Genomic DNA Kit (sample input 0.2 g; Elution volume 100 µl)			NucleoSpin Food Kit (sample input 0.2 g, Elution volume 100 µl)		
Picogreen [ng/µl]	OD [ng/µl]	ddPCR [ng/µl]*	Picogreen [ng/µl]	OD [ng/µl]	ddPCR [ng/µl]*
17.6	154.4	148.8	32.8	215.3	207.5

Na ocenę ilościową DNA z mleka sojowego wpłynęła zastosowana metoda ekstrakcji DNA.



## Pomiar wyizolowanego DNA

- Oznaczenie spektrofotometryczne DNA przy długości fali 260 nm – A 260 absorbance measurement
- 260/280 stosunek (R) określający czystość DNA po izolacji
- R=1.8 dobrej jakości DNA
- 260/230 stosunek - EDTA, węglowodory i fenol ma absorbancję blisko 230 nm
- R=2.0 dobrej jakości RNA

## Jakość DNA

- Obecność białek, lipidów, polisacharydów i niektórych innych związków organicznych lub nieorganicznych w preparacie DNA może zakłócać metody analizy DNA, zwłaszcza reakcję łańcuchową polimerazy (PCR).
- Związki te mogą zmniejszać stabilność DNA.

## Przechowywanie DNA

- W  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , w buforze TE, lub krótko w  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Nerozcieńczone

### Startery i sondy

- Przechowywać w  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania
- Rozcieńczone, rozpipetować na mniejsze porcje

### Inhibitory PCR

- Z próbki

Chlorofil, polisacharydy

- Z ekstrakcji DNA

SDS  $> 0,01\%$  (w/v)

Fenol  $> 0,2\%$  (v/v)

Etanol  $> 1\%$

Octan sodu  $> 5\text{mM}$

## Wnioski ze szkolenia ENGL 2017

- Istnieje więcej niż jeden sposób na skuteczną ekstrakcję DNA (podejście modułowe)
- Różna wydajność/jakość DNA z CRM i nieznanymi próbek przy użyciu różnych metod ekstrakcji może generować błąd oznaczenia GMO
- Odporność metod PCR jest różna i może maskować problemy z jakością DNA
- Amplifikacja ekstraktów DNA zależna od matrycy
- Wpływ na wyniki jakościowe znikomy
- Wpływ na wyniki ilościowe potencjalnie poważny

Dziękuję za uwagę i życzę:

1. Wydajnych izolacji
2. Czystych ekstraktów
3. Braku degradacji DNA

Kontakt: [a.linkiewicz@ihar.edu.pl](mailto:a.linkiewicz@ihar.edu.pl)