

Certifikovaná metodika QJ1210300 CM2

Metodika izolace DNA v kvalitě pro PCR z komplexních vzorků pomocí magnetických mikročástic

Autoři:

Doc. RNDr. Alena Španová, CSc., Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. (40 %)

Doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc., Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. (40 %)

Ing. Irena Němečková, Ph.D, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. (20 %)

Certifikovaná metodika je výstupem z řešení projektu QJ1210300

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z komplexních vzorků, zejména mléčných výrobků a dalších potravin, potravinových doplňků, trusu, výkalů aj. vzorků potenciálně obsahujících směsnou mikroflóru a/nebo inhibitory PCR, pomocí magnetických mikročástic.

II. Vlastní popis metodiky

Metodika je založena na izolaci DNA z tekutých i tuhých potravin, potravinových doplňků a z trusu/feces pomocí magnetických nosičů funkcionalizovaných karboxylovými skupinami. Skládá se z následujících částí:

1. příprava vzorků pro analýzu,
2. lyze buněk,
3. příprava směsí s magnetickými mikročásticemi, separace DNA reversibilně navázané na magnetických mikročásticích a eluce DNA z mikročástic,
4. ověření amplifikace DNA pomocí PCR.

Potřebné přístroje:

Centrifuga na Eppendorfovy zkumavky, automatické pipety o objemu 1000, 20-200, 2-20 a 0.5-10 μl , termostat na 55 °C, magnetický separátor, zařízení pro konvenční PCR s gelovou elektroforézou pro detekci produktů PCR příp. zařízení pro PCR v reálném čase

Materiál: Eppendorfovy zkumavky 1,5 ml, špičky modré, žluté, bílé, 0,2 ml zkumavky (pro konvenční PCR), třecí miska, běžné laboratorní sklo na přípravu roztoků.

Chemikálie: PBS pufr (137 mM NaCl, 137 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0) 20 % SDS, lysozym, proteinasa K, mutanolysin, 5M NaCl, 40% polyethylenglykol 6000, komponenty pro PCR, agarosa, TBE pufr (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8,0) pro gelovou elektroforézu na agarose, velikostní DNA standard, magnetické mikročástice na bázi silikagelu (magnetického skla) nebo organické polymery pokryté karboxylovými skupinami s magnetickým jádrem.

1. Příprava vzorků pro analýzu

a) tekuté potraviny a potravinové doplňky

- z homogenizovaného tekutého výrobku odebrat 1 ml vzorku do sterilní Eppendorfovy zkumavky (1,5 ml),
- po centrifugaci (12 000g) po dobu 3 minut odstranit supernatant a získaný sediment promýt v 1 ml sterilní vody,
- po centrifugaci (12 000g) po dobu 5 minut odstranit supernatant a získaný sediment použít pro lyzi buněk.

b) tuhé potraviny a potravinové doplňky

- 5 g vzorku rozetřít ve sterilní třecí misce s 12,5 ml sterilní vody,
- vzniklou suspenzi přefiltrovat přes sterilní gázu,
- odpipetovat 3 ml suspenze,
- suspenzi stočit při 12 000g/3 min, supernatant slít
- získaný sediment použít pro lyzi buněk.

c) tuhé potravinové doplňky

- obsah 1 tablety/1 tobolky přemístit do Eppendorfovy zkumavky a
- použít pro lyzi buněk

d) trus (výkaly, feces)

- trus (50 mg) 2x promýt v 1 ml PBS pufru (137 mM NaCl, 137 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4),

- buňky sedimentovat centrifugací (12 000 g/3 min),
- sediment promýt TE pufrem (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0),
- suspenzi centrifugovat (12000g/3min),
- získaný sediment použít pro lyzi buněk.

2. Lyze buněk

a) sedimenty buněk z potravin a potravinových doplňků, obsah tablety/tobolky

- resuspendovat v 1 ml lyzačního roztoku s lysozymem (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; lysozym 10 mg/ml), roztok připravovat vždy čerstvý,
- suspenzi inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě,
- k suspenzi přidat 50 μ l 20 % SDS a 10 μ l proteinasy K (100 μ g/ml),
- vzorky inkubovat při 55 °C do druhého dne (18 hod),
- takto připravené lyzáty buněk použít pro izolaci DNA magnetickými mikročásticemi.

b) sedimenty buněk trusu

- sediment buněk resuspendovat v 1ml lyzačního pufru s mutanolysinem (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; lysozym 10 mg/ml), přidat 2 μ l mutanolysinu (5 U/ μ l),
- směs inkubovat 1 hod při 37 °C,
- přidat 10 μ l proteinasy K (1mg/ml) a 50 μ l 20 % SDS,
- směs inkubovat při 55 °C po dobu 24 hod,
- takto připravené lyzáty buněk použít pro izolaci DNA magnetickými mikročásticemi.

3. Příprava separačních směsí s magnetickými mikročásticemi, separace reversibilně vázané DNA a eluce DNA.

DNA se izoluje z lyzátů buněk adsorpcí na vhodné magnetické mikročástice pokryté karboxylovými skupinami nebo magnetické sklo (magnetický silikagel) v prostředí vysoké koncentrace NaCl a PEG 6000 (konečná koncentrace 16 % PEG 6000; 2,0 M NaCl).

Do čisté Eppendorfovy zkumavky napipetovat komponenty separační směsi v pořadí dle následující Tabulky

Pořadí	Komponenta	V [μl]
1.	NaCl (5 M)	400
2.	Lyzát buněk	350
3.	PEG 6000 (40 %)	200
4.	Magnetické mikro částice (2 mg/ml)	50

- DNA nechat 15 minut vázat na magnetické částice,
- na 5 minut vložit Eppendorfovu zkumavku do magnetického separátoru a supernatant odpipetovat a odstranit,
- částice s navázanou DNA 2x promýt 70 % ethanolem (1x 1 ml a 1x 0,5 ml), separace částic 1 min., supernatant odpipetovat a odstranit
- Eppendorfovu zkumavku s DNA navázanou na nosiči vyjmout z magnetického separátoru a napipetovat do ní 100 μl TE pufru (10mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0),
- eluci DNA z mikročástic nechat probíhat 15 min,

- Eppendorfovou zkumavku vrátit do magnetického separátoru a odseparovat magnetické částice. DNA zůstává v supernatantu.
- supernatant s eluovanou DNA přepipetovat do čisté Eppendorfovy zkumavky,
- izolovanou DNA lze skladovat rozpuštěnou v TE pufru při 4 °C po dobu asi 3 měsíců,
- ověřit kvalitu izolované DNA v PCR.

4. Ověření kvality izolované DNA pomocí PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Množství izolované DNA záleží na výrobku, na množství buněk, ze kterých byly připraveny lyzáty. Za podmínek použitých při izolaci DNA se z magnetických částic přednostně eluuje DNA na rozdíl od RNA. Množství a kvalitu DNA lze ověřit spektrofotometricky (z hodnoty $A_{260\text{nm}}$ se stanoví koncentrace DNA, z poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ lze usuzovat na kontaminaci proteiny). Intaktnost izolované DNA lze ověřit pomocí gelové elektroforézy na agarose (0,8%).

DNA je izolovaná v kvalitě vhodné pro PCR. Amplifikovatelnost lze ověřit pomocí konvenční PCR s primery Feub a Reub specifickými pro doménu *Bacteria* (1). Tato PCR byla optimalizována tak, aby byla citlivá, specifická, rychlá a úsporná. Použitá teplota hybridizace (55 °C) a počet cyklů (30) nevede k amplifikaci nespecifických produktů PCR na cykleru MJ Research 200. Specifické produkty PCR (466 bp) dostatečné intenzity jsou detekovány pomocí gelové elektroforézy na agarose (1,5%, 0,5xTBE pufr) po amplifikaci 10ng až 100fg DNA/PCR směs.

a) Reakční směs pro konvenční PCR obsahuje komponenty uvedené v následující tabulce:

Komponenta	Objem (μl)
Voda pro PCR	19,0
Reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný)	2,5
Směs dNTP (10 mmol/l)	0,5
Primer 1 (10 μmol/l)	0,5
Primer 2 (10 μmol/l)	0,5
Taq DNA polymerasa (1 U/μl)	1,0
DNA matrice	1,0

Sekvence primerů Feub a Reub specifických pro doménu *Bacteria* (1) je následující :

Primer F eub: 5' - TCC TAC GGG AGG CAG CAG T -3'

Primer R eub: 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'

Při provádění PCR se vždy provádí negativní kontrola (místo DNA se do směsi pro PCR přidává voda). Vhodné je provádět i pozitivní kontrolu s DNA, jejíž amplifikovatelnost byla nezávisle ověřena.

b) Podmínky amplifikace

- amplifikace sestává z následujících kroků: 5 min denaturace při 95 °C (hot start), 30 s denaturace při 95 °C, 30 s připojení primerů při 55 °C, 30 s syntéza při 72 °C. Poslední krok při 72 °C prodloužit na 7 min, celkový počet cyklů 30,
- přítomnost produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp) lze ověřit gelovou elektroforézou na agarose (1,8 % agarosa) v 0.5 × TBE pufru. Jako DNA standard použít 100 bp žebříček.

III Srovnání novosti postupů a jejich zdůvodnění

Identifikace bakterií v komplexních vzorcích potravin či v jiných komplexních matricích může být provedena s využitím klasických kultivačních postupů či s využitím postupů založených na amplifikaci DNA. K amplifikaci DNA se využívá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR je zvláště vhodná pro identifikaci jednotlivých druhů bakterií mléčného kvašení, u nichž nejsou k dispozici selektivní media umožňujících jejich druhovou identifikaci.

DNA používaná k amplifikaci musí být v kvalitě vhodné pro PCR, aby nedocházelo k inhibici amplifikace a tím ke snížení citlivosti reakce nebo k falešně negativním výsledkům. Inhibice amplifikace může být zapříčiněna přítomností inhibitorů PCR. Tyto inhibitory mohou být buď vnitrobuněčného původu, nebo mohou pocházet z exogenních zdrojů, jsou-li analyzovány komplexní biologické vzorky (např. mléčné výrobky, masné výrobky, doplňky stravy, klinický materiál (2-6)). Komplexní vzorky obsahují často látky, které interferují s PCR. Vzhledem k tomu, že tyto látky bývají koextrahovány spolu s DNA, je základním předpokladem identifikace mikroorganismů s využitím PCR izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

Jedním ze způsobů, jak izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z komplexních vzorků obsahujících inhibitory PCR je metoda využívající reversibilní adsorpce DNA na pevnou fázi. Jako pevná fáze mohou být využity nejrůznější materiály. S výhodou se používají magnetické mikročástice (nosiče).

Magnetické mikročástice mají jedinečné vlastnosti a schopnost interagovat s různými molekulami a proto v současné době nacházejí uplatnění v celé řadě oblastí jako je analytická chemie (7), magnetická extrakce na pevné fázi (8,9), nosiče enzymů pro katalýzu (10,11), biosenzory (12,13), cílený transport léčiv (14), magnetem indukovaná hypertermie a zobrazování magnetické rezonance (15,16).

Bylo ukázáno (17), že DNA v kvalitě vhodné pro PCR lze izolovat z hrubých lyzátů buněk s použitím magnetických polymethakrylátových nosičů funkcionalizovaných karboxylovými (-COOH) skupinami. Využít lze i jiné magnetické nosiče funkcionalizované karboxylovými skupinami nebo silikagel. DNA v požadované čistotě lze izolovat z komplexních reálných vzorků obsahujících inhibitory PCR. DNA se na nosiče váže v prostředí vysokých koncentrací NaCl a PEG 6000. Po promytí je DNA eluována do pufru o nízké iontové síle (17).

Výhoda použití magnetických nosičů spočívá v tom, že při separaci mikročástic s navázaným analytem není potřeba vzorky centrifugovat a proces lze automatizovat. Novostí metodiky QJ1210300 CM2 je relativně rychlý postup izolace DNA z komplexních matric. Metodika je obzvláště dobře aplikovatelná na obtížně zpracovatelné vzorky jako jsou sedimenty, mléčné výrobky nebo trus/feces obsahujících inhibitory PCR. Lze ji použít i k izolaci DNA z matric, pro které nejsou k dispozici komerční kity nebo kde použití kitu nedává uspokojivý výsledek, případně pro přečištění DNA.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika QJ1210300 CM2 pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR je univerzální. Tato metodika byla uplatněna u uživatele Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. Jedná se o pracoviště, které metodiku využije při identifikaci probiotických aj. bakterií pomocí metody PCR ve vzorcích stolic a trávenin různých organismů. Dále lze metodiku QJ1210300 CM2 použít k průkazu žádoucích i nežádoucích bakterií v potravinách a potravinových doplncích. Pro tyto účely je metodika QJ1210300 CM2 využitelná ve všech mikrobiologických laboratořích zabývajících se kontrolou potravin a potravinových doplňků

pomocí PCR z hlediska mikrobiologické bezpečnosti, plnění legislativních parametrů, odhalování příčin kažení a dalších aplikací.

V. Ekonomické aspekty

Výhodou metodiky QJ1210300 CM2 je z ekonomického hlediska skutečnost, že metodika nevyžaduje použití kitů, které jsou ekonomicky nákladné (případně nejsou dosud k dispozici). Pro laboratoře, které jsou vybaveny zařízením pro provádění PCR je navrhovaný postup izolace DNA relativně levný. Vyžaduje běžné chemikálie používané pro práci s DNA (Tris, EDTA, NaCl, lysozym, proteinasa K, polyethylenglykol 6000) a běžný umělohmotný materiál. Oproti běžně používaným postupům je finančně náročnější pouze vybavení laboratoře magnetickým separátorem (asi 15 000,- Kč) a zakoupení magnetických nosičů (asi 10 000,- Kč /300 mg). Vzhledem k tomu, že se jedná o mikrometodu, pracuje se v malých objemech a uvedené množství nosiče postačuje na cca 3000 analýz.

Vyčíslení ekonomického přínosu pro uživatele

Celkové náklady na materiál potřebný ke zpracování 1 vzorku (1 izolace DNA) lze odhadnout na řádově jednotky Kč. Při započítání nákladů na přístroje, osobní a režijní náklady se náklady na zpracování vzorku včetně ověření kvality DNA v PCR pohybují kolem jednoho sta Kč. Čas potřebný k provedení analýzy se zkrátí, neboť při vlastní izolaci DNA se neprovádí centrifugace vzorku, separace mikročástic magnetem je velmi rychlá a lze paralelně zpracovávat více vzorků. Úspora pro uživatele, který provádí rutinně PCR, bude spočívat v úspoře času při izolaci DNA (větší průchodnost) a v úspoře nákladů na pořízení kitů používaných pro izolaci DNA. Ve srovnání s konvenčním postupem např. izolace DNA komerčním kitem Qiagen, který využívá reversibilní adsorpci DNA na kolonku (vzorek asi

300 Kč) bude úspora pro uživatele dvoutřetinová (200 Kč/ vzorek). Při analýze např. 200 vzorků ročně bude proto úspora odhadem 40 tisíc Kč, což za 5 let činí 200 000 Kč.

Kromě toho zavedení metodiky umožní laboratoři provádět PCR analýzu i u vzorků, u kterých by to dříve nebylo možné kvůli vysokému obsahu inhibitorů PCR ve vzorku. Tím se rozšíří spektrum prováděných analýz a poskytovaných služeb.

VI: Seznam použité literatury

1. Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 2359–2365.
2. Kitpipit T, Chotigeat W, Linacre A, Thanakiatkrai P. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. *Forensic Sci Med Pathol* 2014; 10: 29–38.
3. King CE, Debruyne R, Kuch M, Schwarz C, Poinar HN. A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *BioTechniques* 2009; 47: 941-949.
4. Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Sci Inter Gen* 2012; 6: 297–305.
5. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012; 113: 1014—1026.
6. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci* 2010; 55: 25–33.
7. Aguilar-Arteaga, K.; Rodriguez, J. A.; Barrado, E Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Anal Chim Acta* 2010; 674: 157-165.

8. Chen J, Wang Y, Ding X, Huang Y, Xu K. Magnetic solid-phase extraction of proteins based on hydroxy functional ionic liquid-modified magnetic nanoparticles. *Anal Methods* 2014; 6: 8358-8367.
9. Wan Ibrahim WA, Nodeh HR, Aboul-Enein HY, Sanagi MM. Magnetic solid-phase extraction based on modified ferrum oxides for enrichment, preconcentration, and isolation of pesticides and selected pollutants. *Crit Rev Anal Chem* 2015; 45: 270-287.
10. Horák D, Babič M, Macková H, Beneš MJ. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *J Sep Sci* 2007; 30: 1751—1772.
11. Guzik U, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases. *Molecules* 2014; 19: 8995–9018.
12. de la Escosura-Muñiz A, Plichta Z, Horák D, Merkoçi A. Alzheimer's disease biomarkers detection in human samples by efficient capturing through porous magnetic microspheres and labelling with electrocatalytic gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron* 2015; 67: 162-169.
13. Ravalli A, Marrazza G. Gold and magnetic nanoparticles-based electrochemical biosensors for cancer biomarker determination. *J Nanosci Nanotechnol* 2015; 15: 3307-3319.
14. Mody VV, Cox A, Shah S, Singh A, Bevins W, Parihar H. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Appl Nanosci* 2014; 4: 385–392.
15. Kaman O, Veverka P, Jiráček Z, Maryško M, Knížek K, Veverka M, Kašpar P, Burian M, Šepelák V, Pollert E. The magnetic and hyperthermia studies of bare and silica-coated La_{0.75}Sr_{0.25}MnO₃ nanoparticles. *J Nanopart Res* 2011; 13: 1237–1252.
16. Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res* 2010; 62: 90-99.

17. Horák D, Rittich B, Španová A. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *J Magn Magn Mater* 2007; 311: 249–254.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Křížová J, Španová A, Rittich B, Horák D: Magnetic hydrophilic methacrylate-based microspheres for genomic DNA isolation. *J. Chromatogr A* 2005; 1064: 247-253.

-Rittich B, Španová A, Horák D, Beneš MJ, Klesnilová L, Petrová K, Rybníkář A. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloid Surf B- Interfaces* 2006; 52: 143-148.

- Rittich B, Španová A, Šálek P, Němcová P, Trachtová Š, Horák D. Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethylene glykol)-NaCl water solutions. *J Magn Magn Mater* 2009; 321: 1667-1670.

-Trachtová Š, Obermajer T, Španová A, Matijašić BB, Rogelj I, Horák D, Rittich B. Magnetic hydrophilic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-*co*-glycidyl methacrylate) microspheres for DNA isolation from faeces. *Mol Cryst Liq Cyst* 2012; 555: 263-270.

- Čakajdová M, Trachtová Š, Mohelský T, Němečková I, Španová A, Rittich, B. Identifikácia baktérií v solných nálevoch nezrejúcich syrov pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy. *Mlékařské listy - Zpravodaj* 2014; 147: XLIX - L.

- Pazlarová J, Demnerová K, Růžičková H, Roubal P, Němečková I, Karpíšková R. Mikrobiologická rizika v mlékárenských výrobcích - detekce patogenních bakterií. *Mlékařské listy – Zpravodaj* 2011; 128: VII - X.

- Jebavá I, Purkrťová S, Hanušová J, Savická D, Šviráková E, Němečková I, Demnerová K. Identifikace mikrobiálních původců vad mlékařenských výrobků moderními molekulárně-biologickými metodami. Mlékařské listy - Zpravodaj 2013; 138: X - XIV.

- Němečková I, Solichová K, Roubal, P, Uhrová B, Šviráková E. Methods for detection of *Bacillus* sp, *B. cereus* and *B. licheniformis* in raw milk. Czech J Food Sci 2011; 29: S55 - S60.

VIII Přílohy, dokumenty a doklady

- Smlouva s uživatelem - Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.
- Posudek odborníka v daném oboru - Ing. Lukáš Valíhrach, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.
- Posudek ze státní správy - MVDr. Jiří Hlaváček, Státní veterinární správa ČR
- Osvědčení odborného orgánu státní správy - Státní veterinární správa ČR

V Praze dne

Za zhotovitele: Ing. Irena Němečková, Ph.D.

.....

Certifikovaná metodika QJ1210300 CM 2 vznikla s finanční podporou NAZV, č. projektu QJ1210300 v programu KUS.