

## LP6. Tehnici de izolare și purificare ADN și ARN. Metode de evaluare a concentrației, purității și gradului de fragmentare a acizilor nucleici anterior PCR

Multe dintre tehnicile de analiză a modalităților de stocare, transmitere și exprimare a informației genetice se bazează pe posibilitatea obținerii unor cantități relativ mari de ADN purificat. Izolarea materialului nuclear din celule este un proces relativ simplu ce implică lizarea membranelor celulare, însă în primă fază ADN-ul va fi contaminat atât cu ARN cât și cu proteine. De aceea metodele folosite trebuie să aibă în vedere eliminarea acestor molecule și implicit creșterea fracției de ADN purificat.

Izolarea ADN-ului genomic se desfășoară, în general, urmând etapele:

- ✓ **Lizarea membranei celulare.** În alegerea metodei folosite pentru lizare se ține cont de natura celulei. Spre exemplu, celulele bacteriene înainte de a fi lizate cu ajutorul unor detergenți sunt frecvent tratate cu lizozim ce destabilizează structura membranaară prin hidrolizarea componentei polizaharidice a acesteia.
- ✓ **Înlăturarea fragmentelor celulare** prin centrifugare.
- ✓ **Precipitarea proteinelor**, vizând înlăturarea lor, prin vortexarea materialului solubil restant în faza apoasă în prezența fenolului. Cloroformul este adesea folosit împreună cu fenolul (ca soluție fenol/cloroform) având pe lângă proprietatea de denaturant proteic și capacitatea de a stabiliza limita dintre faza apoasă și stratul de fenol.
- ✓ **Precipitarea acizilor nucleici în etanol.** După adăugarea etanolului ADN-ul va forma un precipitat alb ce poate fi colectat prin centrifugare.
- ✓ **Înlăturarea ARN-ului** din amestec - prin tratarea cu RN-aze.

Pentru multe aplicații ADN-ul trebuie supus ulterior unor procese suplimentare de purificare. Centrifugarea izopicnică<sup>1</sup> poate fi folosită pentru separarea ADN-ului de agenți contaminanți și de asemenea pentru separarea unor tipuri individuale de molecule ADN. Proba ADN este amestecată cu o substanță (clorură de cesiu, CsCl) capabilă să formeze în timpul procesului de centrifugare un gradient de densitate uniform. Moleculele de ADN vor sedimenta numai în zona din tubul de centrifugă cu a cărei densitate intră în echilibru, formând o bandă. Această bandă este apoi transferată într-un alt tub, CsCl fiind înlăturat prin precipitarea ADN-ului în etanol. **Avantajul tehnicii:** abilitatea de a separa diferite tipuri de molecule ce pot fi analizate separat prin diferite tehnici (fig.1). **Dezavantaj:** centrifugarea izopicnică necesită 36-48 ore pentru formarea gradientului de CsCl. Tehnica a pierdut teren în fața kit-urilor<sup>3</sup> oferite de diferite companii ce permit izolarea rapidă, cu costuri reduse și expunere minimă a investigatorului la acțiunea unor agenți cu potențial nociv asupra sănătății.

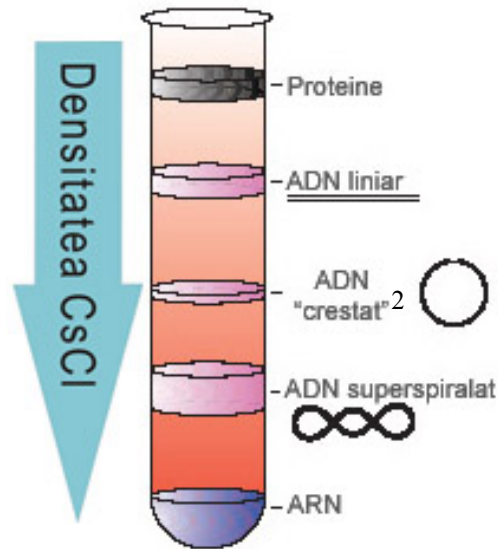


Fig. 1 Centrifugarea izopinică a moleculelor ADN în gradient de clorură de cesiu.

## Izolarea ADN-ului genomic din sânge

### Principiul metodei

Acest protocol este destinat izolării ADN din leucocite, cantitatea obținută fiind de aproximativ 5-15 $\mu$ g. Purificarea ADN are loc în patru etape: (1) liză celulară și nucleară - această etapă implică inițial liza eritrocitelor în *soluția de liză celulară* urmată de liza leucocitelor și a nucleilor acestora în *soluția de liză nucleară*; (1\*) digestia opțională a ARN-ului total cu ajutorul RN-azelor; (2) înlăturarea proteinelor după o prealabilă precipitare a acestora în soluție salină ce lasă în soluție ADN-ul cu masă moleculară mare (*soluție de precipitare a proteinelor*); (3) concentrarea ADN-ului și eliminarea sărurilor din soluție prin precipitare în *izopropanol*; (4) spălarea cu etanol, deshidratarea și rehidratarea ADN-ului (fig.2);

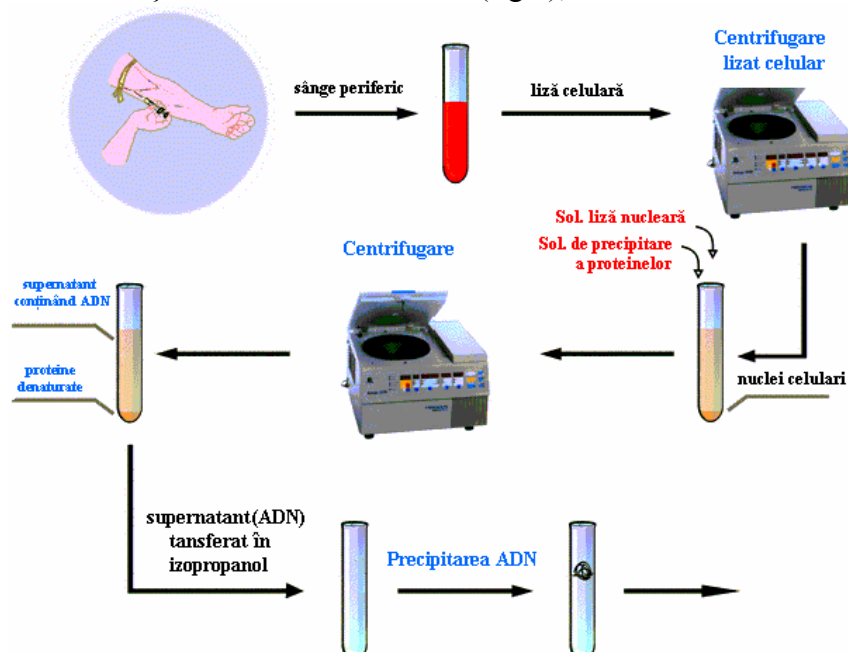


Fig. 2 Schema generală a izolării ADN din sânge

## **Materiale necesare**

- ✓ Microcentrifugă capabilă să dezvolte o forță centrifugală relativă (RCF) de 13.000 - 16.000g;
- ✓ Tuburi de 1.5ml pentru microcentrifugă;
- ✓ Vortex (agitator turbionar);
- ✓ Bloc de incubare uscată a tuburilor de 1.5ml;
- ✓ Micropipete;
- ✓ Baie de apă termostată - \*opțional;
- ✓ Sânge recoltat pe anticoagulant (EDTA);
- ✓ Kit de extracție ADN:
  - soluție de liză celulară;
  - soluție de liză nucleară;
  - soluție de precipitare a proteinelor;
  - soluție de rehidratare a ADN-ului;
- ✓ Izopropanol 100%;
- ✓ Etanol 70%;

## **Etapele izolării ADN din 300μl sânge**

1. Într-un tub steril de microcentrifugă (1,5ml) se transferă 900 μl *soluție de liză celulară*.
2. Se răstoarnă ușor recipientul în care s-a recoltat sângele (omogenizare) și apoi se transferă un volum de 300 μl în tubul conținând 900 μl *soluție de liză celulară*. Se inversează de 5-6 ori.
3. Incubare 10 minute la temperatura camerei. **Rezultat - liza hematiilor.**
4. Se centrifughează proba la 13.000 - 16.000g timp de 1 minut. **Rezultat - sediment leucocitar.**
5. Se îndepărtează supernatantul fără a afecta sedimentul leucocitar. Cantitatea admisă de lichid rezidual deasupra sedimentului - 10-20 μl.
6. Se vortexează intens tubul, până ce leucocitele sunt resuspendate (10-15 secunde).
7. Peste celulele resuspendate se adaugă 300 μl *soluție de liză nucleară*. Amestecul se pipetează de 5-6 ori pentru a produce atât liza leucocitelor cât și a nucleilor leucocitari. În timpul acestei etape soluția devine foarte vâscoasă. **Rezultat - eliberarea acizilor nucleici din compartimentul nuclear.**
8. **Opțional:** Se adaugă 1,5 μl soluție conținând *RN-aze* peste lizatul nuclear și se amestecă proba prin inversare de 2-5 de ori. Se incubează 15 minute la 37°C și apoi se răcește la temperatura camerei.
9. Se adaugă 100 μl de *soluție de precipitare a proteinelor* peste cei 300 μl de lizat nuclear și se vortexează timp de 10-20 secunde. La final pot fi vizibile mici precipitate proteice.
10. Se centrifughează proba la 13.000 - 16.000g timp de 3 minute. Se obține un sediment proteic brun-negricios.
11. Se transferă supernatantul conținând ADN-ul aflat în stare solubilă într-un nou tub de 1,5 ml ce conține 300 μl izopropanol.
12. Se amestecă ușor soluția prin inversie până ce devin vizibile filamente albe de ADN și până ce acestea formează o masă compactă. **Rezultat - precipitarea ADN.**
13. Se centrifughează proba la 13.000 - 16.000g timp de 3 minute. La sfârșitul acestei etape ADN-ul trebuie să fie vizibil ca un mic sediment alb.
14. Se îndepărtează supernatantul și se adaugă un volum de 300 μl de etanol 70% la temperatura camerei. Se inversează ușor tubul de câteva ori pentru a spăla sedimentul

de ADN și pereții tubului. Se centrifughează din nou în aceleași condiții ca la punctul 13.

15. Se înlătură etanolul evitându-se aspirarea sedimentului. Se răstoarnă tubul pe o hârtie de filtru absorbantă și se permite evaporarea etanolului restant timp de 10-15 minute la temperatura camerei.

16. Se adaugă 100  $\mu$ l *soluție de rehidratare a ADN-ului* peste sediment și se incubează proba peste noapte la temperatura camerei sau la 4°C. Alternativ, pentru rehidratare se poate incuba tubul la 65°C timp de 1 oră.

17. ADN-ul în stare rehidratată se păstrează la 2-8°C.

## Notă

*Probele de sânge recoltate pe anticoagulant pot fi stocate la 2-8°C un interval de maxim două luni însă cantitatea de ADN obținută se va diminua pe măsură ce crește timpul de stocare.*

**Concentrația, puritatea ADN.** Evaluarea va fi efectuată folosind spectrofotometrul **Eppendorf Biophotometer** fiind posibilă măsurarea în volume de peste 50  $\mu$ l.

## Cuantificare ADN:

a. Măsurătorile se vor efectua în 50  $\mu$ l probă ADN;

b. Înregistrarea absorbanțelor: 230, 260 & 280 nm;

c. Calculul concentrației:

$A_{260} \times 40 \times \text{Factorul de diluție} = \text{Concentrația } \mu\text{g/ml};$

d. Determinarea purității prin calcularea fracțiilor 260/280 și 260/230.

Probele de o puritate acceptată vor avea valori mai mari sau egale cu:

i. 260/280: **1.8**;

(o valoare mai mică a raportului 260/280 indică o posibilă contaminare cu proteine);

ii. 260/230 = 1.7

(o valoare mai mică a raportului 260/230 indică o posibilă contaminare cu săruri, guanidină, carbohidrați, peptide, fenoli sau alți compusi aromatici).

## Glosar

1. *Izopicnic*: având aceeași densitate.

2. *ADN "crestat"*: ADN dublu-catenar cu secvențe în care se remarcă absența legăturilor fosfo-diesterice între două nucleotide adiacente de pe aceeași catenă ca urmare a distrugerii sau acțiunii unei enzime.

3. *Kit*: set de substanțe destinat unui anumit protocol de lucru.