ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK

Izolace DNA

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství

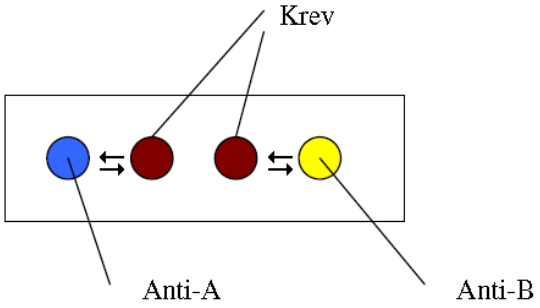
Martin Vejražka

2022/23

Úloha 1: Stanovení krevní skupiny hemaglutinační zkouškou

Postup:

1. Dezinfikujte bříško prstu, ze kterého se bude provádět odběr. Zpravidla se odebírá kapilární krev z bříška 3. nebo 4. prstu, u praváků z levé ruky.
2. Sterilní jehlou proveďte vpich do bříška prstu a naneste 2 kapky krve poblíž středu podložního skla.
3. Ke stranám podložního skla kápněte vlevo kapku protilátky anti-A, vpravo anti-B.



4. Špičkou promíchejte krev s každou z protilátek, asi po 1 minutě odečtěte výsledek.

Hodnocení:

Pokud krvinky nesou antigen A nebo B, začnou se v přítomnosti odpovídající protilátky shlukovat.

Úloha 2: Izolace DNA z bukálního stěru fenol-chloroformovou metodou

Chemikálie:

Homogenizační pufr 2× konc. (EDTA 80 mmol·l^{-1}, Tris-HCl 80 mmol·l^{-1} pH 7,65, NaCl 400 mmol·l^{-1}, sterilizovaný autoklávováním)
Dodecylsíran sodný 10 g·l^{-1} sterilizovaný filtrací
Fyziologický roztok (NaCl 150 mmol·l^{-1}) sterilizovaný autoklávováním
Proteináza K 20 mg.ml^{-1}
Fenol ekvilibrovaný s Tris, pH 8, stabilizovaný 0,1 % 8-hydroxychinolinu
Chloroform-isoamylalkohol 24:1
2-propanol
Etanol (čistý) 70 %
TE pufr (Tris-HCl 10 mmol·l^{-1}, EDTA 1 mmol·l^{-1}, pH 7,6, sterilizovaný autoklávováním)
Octan sodný 3 mol·l^{-1} s glykogenem 4 g·l^{-1} sterilizovaný autoklávováním

Postup:

1. Sterilní štětičkou se setřou epitelové buňky bukální sliznice. Štětička se propere v 1 ml fyziologického roztoku a suspenze se zcentrifuguje (asi 1 min) na mikrocentrifuze.

2. Supernatant se odstraní (slije).
3. Peleta se resuspenduje v 300 µl homogenizačního pufru a důkladně promíchá na vortexu.
4. Přidá se 300 µl SDS a směs se promíchá opakovaným protažením špičkou pipety
5. Dále se přidá 1 µl proteinázy K a suspenze promíchá opakovaným otočením zkumavky dnem vzhůru a zpět.
6. Inkubace 45 minut při 50 °C v bloku, míchání 300 otáček za minutu.

Extrakce DNA fenol-chloroformem

Pracuj v digestoři!
Použij rukavice!

1. Ve skleněné zkumavce připravte směs fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1): smíchejte 1,2 ml fenolu a 1,2 ml chloroform-izoamylalkoholu.
2. K buněčnému lyzátu z bodu 6 předchozí části se přidá 600 µl směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1), směs se 1 minutu vortexuje (během míchání musí vzniknout bílá emulze) a centrifuguje 3 minuty na mikrocentrifuze.
3. Horní vodná fáze se přenese do čisté mikrozkumavky (při odsávání je nutné dát pozor na to, aby nedošlo ke kontaminaci bílkovinami vysráženými na rozhraní vodné a fenolové fáze).
4. K vodné fázi z bodu 3 se přidá 600 µl směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1), směs se 2 minuty intenzivně míchá naklápěním zkumavky (během míchání musí vzniknout bílá emulze) a centrifuguje 3 min na mikrocentrifuze
5. Horní vodná fáze se přenese do čisté mikrozkumavky.
6. K vodné fázi se přidá 600 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1), směs se krátce promíchá rychlým otáčením zkumavky dnem vzhůru a zpět a centrifuguje se asi 10 s.
7. Vodná fáze se přenese do čisté mikrozkumavky, přidá se 70 µl roztoku octanu sodného s glykogenem a zkumavka se nakláněním promíchá.
8. Přidá se 600 µl 2-propanolu a zkumavka se kýváním promíchá. Pak se nechá 15 minut stát při pokojové teplotě.
9. Zkumavky se centrifugují ve vysokootáčkové centrifuze 10 minut při 10 000× g.
10. Slije se tekutina (peleta s izolovanou DNA po centifugaci lpí na stěně u dna mikrozkumavky), zkumavka se osuší přitisknutím na sterilní buničinu.
11. Přidá se 1 ml 70% etanolu, centrifuguje se 10 minut.
12. Slije se supernatant a zkumavka se opět osuší na sterilní buničině. Pak se nechá odpařit zbylý etanol – otevřená zkumavka se několik minut zahřívá na 80 °C.
13. Přidá se 20 µl pufru TE, několikrát se promíchá pipetou a zkumavka se krátce zcentrifuguje.

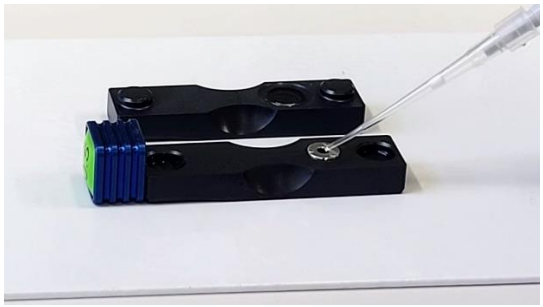
Úloha 3: Stanovení koncentrace a čistoty DNA

K měření použijte magnetickou ultramikrokyvetu.

Postup:

1. Magnetickou ultramikrokyvetu položte na kovovou podložku a otevřete ji.

2. Do komůrky vymezené kovovým kroužkem napipetujte 3 µl pufru TE (blank) nebo vzorku. Pracujte tak, aby nevznikly bubliny. Kyvetu uzavřete. Chcete-li zkontrolovat, zda v kyvetě nejsou bublinky nebo mechanické nečistoty, použijte pomůcku s lupou.



3. Změřte absorbance při 260, 280 a 320 nm. Optická délka uzltramikrokyvety je 0,5 mm.
4. Kyvetu opět otevřete a obsah vypláchněte proudem čištěné vody. Pak kyvetu vysušte buničinou.