

ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK

Izolace DNA

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka

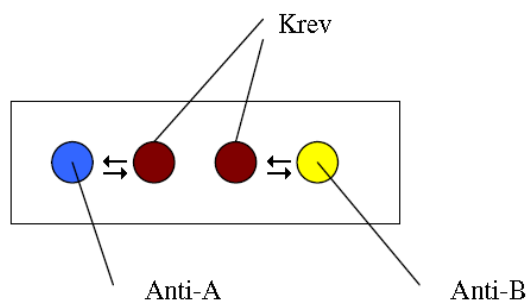


2018/19

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 provedte 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 bukalního 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)



Dodecylsírán 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 bukalní sliznice. Štětíčka se propere v 1 ml fyziologického roztoku a suspenze se zcentrifuguje (1 min) na mikrocentrifuze.
2. Supernatant se slijí

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

Extrakce DNA fenol-chloroformem

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 μ l směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1), směs se 1 minutu vortexuje (během míchání musí vzniknout bílá emulze) a centrifuguje 3 min na mikrocentrifuze.
3. Horní vodná fáze se přenese do čisté mikrozukavky (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 μ l 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 mikrozukavky.
6. K vodné fázi se přidá 600 μ l směsi chloroform-izoamylalkohol (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 mikrozukavky, přidá se 70 μ l roztoku octanu sodného s glykogenem a zkumavka se naklápěním promíchá.
8. Přidá se 600 μ l 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 \times g.
10. Slije se tekutina (peleta s izolovanou DNA po centrifugaci lpí na stěně na dně mikrozukavky), 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 μ l pufru TE, několikrát se promíchá pipetou a zkumavka se krátce zcentrifuguje.

Pracuj v digestrořil
Použij rukavice!

Úloha 3: Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Postup:

1. Vyjměte ze zásobníku spektrofotometrickou kapiláru. Dotýkejte se jen konce, ve kterém nebude probíhat měření.
2. Vsuňte kapiláru do zkumavky se vzorkem a nechte roztok vyvzlínat do výšky asi 1 cm.
3. Kapiláru uzavřete zatlačením do plastické hmoty; vytvořená zátka by měla být vysoká asi 2 mm
4. Kapiláru vložte do fotometru do speciálního držáku.
5. Změřte absorpční spektrum mezi 240 a 330 nm proti čistému TE pufru a zaznamenejte absorbance při 260, 280 a 320 nm.