

ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK

# Izolace DNA

---

Praktické cvičení z lékařské biochemie  
*Všeobecné lékařství*

Martin Vejražka

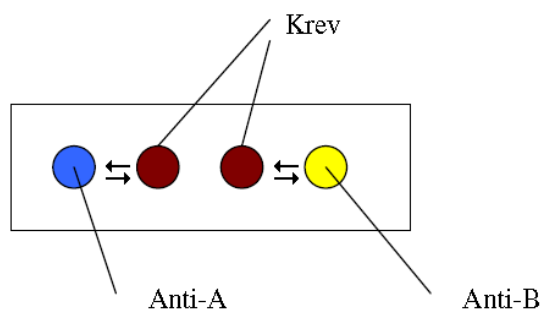


2020/21

## 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<sup>-1</sup>, Tris-HCl 80 mmol·l<sup>-1</sup> pH 7,65, NaCl 400 mmol·l<sup>-1</sup>, sterilizovaný autoklávováním)

Dodecylsírán sodný 10 g·l<sup>-1</sup> sterilizovaný filtrací

Fyziologický roztok (NaCl 150 mmol·l<sup>-1</sup>) sterilizovaný autoklávováním

Proteináza K 20 mg·ml<sup>-1</sup>

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<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol·l<sup>-1</sup>, pH 7,6, sterilizovaný autoklávováním)

Octan sodný 3 mol·l<sup>-1</sup> s glykogenem 4 g·l<sup>-1</sup> 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  $\mu$ l homogenizačního pufru a důkladně promíchá na vortexu.
4. Přidá se 300  $\mu$ l SDS a směs se promíchá opakovaným protažením špičkou pipety
5. Dále se přidá 1  $\mu$ l 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

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  $\mu$ l 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 přenesse 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  $\mu$ 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 přenesse do čisté mikrozukavky.
6. K vodné fázi se přidá 600  $\mu$ l 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 přenesse do čisté mikrozukavky, přidá se 70  $\mu$ l roztoku octanu sodného s glykogenem a zkumavka se naklápěním promíchá.
8. Přidá se 600  $\mu$ 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 u dna 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  $\mu$ l pufru TE, několikrát se promíchá pipetou a zkumavka se krátce zcentrifuguje.

Pracuj v digestoři!  
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.
6. Zhodnoťte čistotu izolované DNA a odhadněte její koncentraci (vzorec je v protokolu).