



Izolace DNA

- **Izolace genetického materiálu (DNA) je prvním krokem většiny molekulárně genetických technik.**
- **Skládá se z rozbití tkáně a buněk, izolace a čištění a stanovení koncentrace a čistoty získané DNA.**
- **Izolace DNA spočívá v uvolnění DNA z vazby na jaderné proteiny a následném odstranění kontaminujících komponent.**
- **Jadernou DNA je možné izolovat z lidských buněk, tkání a orgánů , a to přímo z buněk bez v předchozí izolace jader.**
- **Podstatou metody je desintegrace komplexů DNA-protein a následná extrakce čisté nerozštěpené DNA bez RNA a proteinů.**

Typy metod

- **fenol-chloroformová deproteinace**
- **DNA Lego kit**
- **Izolace DNA z neseparované krve**
- **Modifikovaná proteinázová metoda**

Fenol-chloroformová deproteinace

- 1. homogenizace tkáně v pufru (např. dodecylsírán sodný, SDS- rozpustí buněčné membrány)**
 - rozpad buněk se usnadňuje přidavkem proteinasy K (teplotní optimum kolem 60 °C).**
- 2. denaturace bílkovin a jejich vysrážení směsí fenolu a chloroformu (DNA je disociovaná, proteiny se denaturují a vypadávají do hydrofobní fáze)**
- 3. DNA se vysráží z vodného roztoku**
- 4. vysrážená DNA se promývá v 70% ethanolu, který rozpustí zbytky solí a bílkovin, samotná DNA však zůstane nerozpuštěná**

Izolace DNA z neseparované krve

1. Odebrat krev do EDTA-etylendiamintetraoctová kyselina [například smícháním 50 μ l 50 mM (nebo 2%) EDTA s 0,5 ml krve].
2. Do 1,5 ml zkumavky vpravit 1 ml DNA vazebného pufru, 50 μ l DNA bind partikulí (po extensivním protřepání a míchání) a 50 μ l krve s EDTA. Směs inkubovat 10 min. , zkumavky stočit na mikrofuze 30 sec.
3. Peletu DNA bind a nukleových kyselin postupně opláchnout:
 - 1 x 1 ml DNA vazebný pufr
 - 2 x 1 ml promývací pufr
 - 1 x 1 ml acetonu a pak(vysušit peletu 10 min. při 56oC)

Izolace DNA z neseparované krve-pokračování

- 4. K vysušené peletě přidat 100 μ l elučního pufru, vortexovat a inkubovat 10 min při 56oC; dojde k uvolnění DNA z DNA bind.**
- 5. Vzorek centrifugovat 1 min. na mikrofuze a supernatant s DNA (přibližně 1 μ g) přenést do nové zkumavky.**

DNA Lego kit

- základ moderní soupravy pro izolaci čistých preparátů DNA
- využívá poznatku o kapacitě křemičitých mikropartikulí vázat DNA v přítomnosti chaotropních látek
- ve srovnání s klasickými metodami izolace DNA je rychlejší (nevyžaduje etanolovou precipitaci a vysoušení), bezpečnější (nevyžadují fenolovou extrakci) a izolované preparáty DNA jsou podstatně čistější
- zrychlení procedury izolace DNA a větší výtěžky izolované DNA jsou dosaženy nahrazením řady centrifugačních kroků podtlakovým promýváním

DNA Lego kit-pokračování

- **Komponenty *DNA Lego kitu*:**
- **DNA bind, 25 ml, křemičité mikropartikule**
- **DNA vazebný pufr, 150 ml**
- **Promývací pufr, 500 ml**
- **Minikolonky a nástavce, 25/250 ks**

Video



KONEC