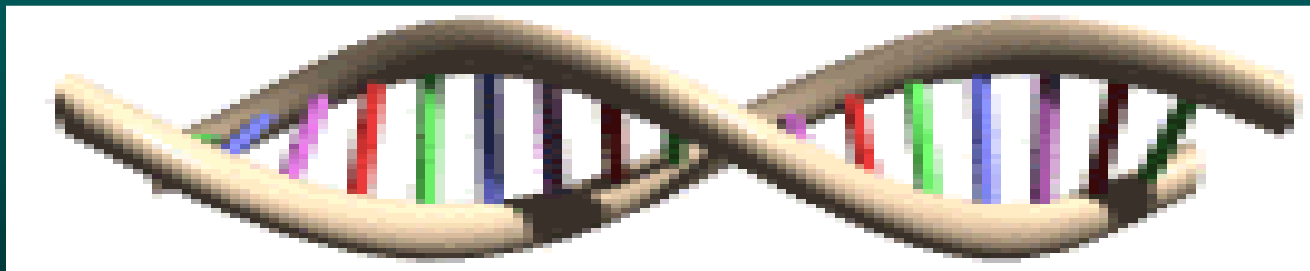


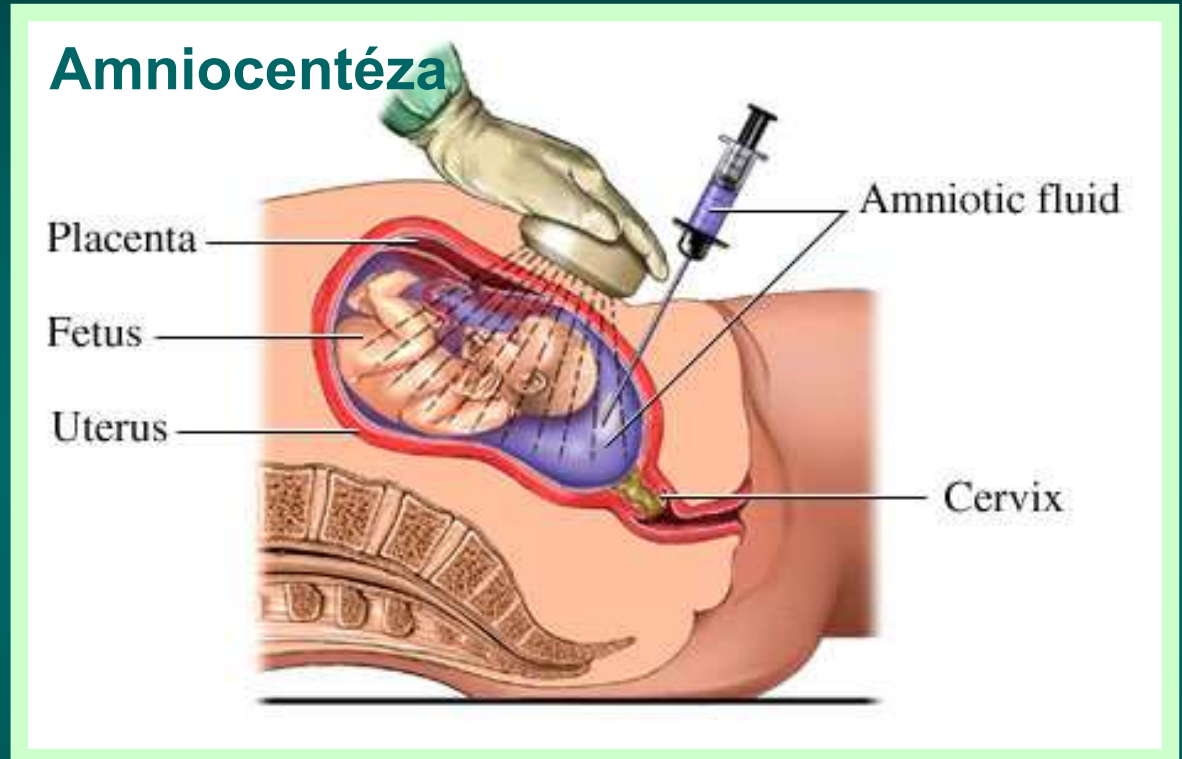
IZOLACE DNA

Mária Ol'hová, Veronika Frkalová,
Petra Feberová



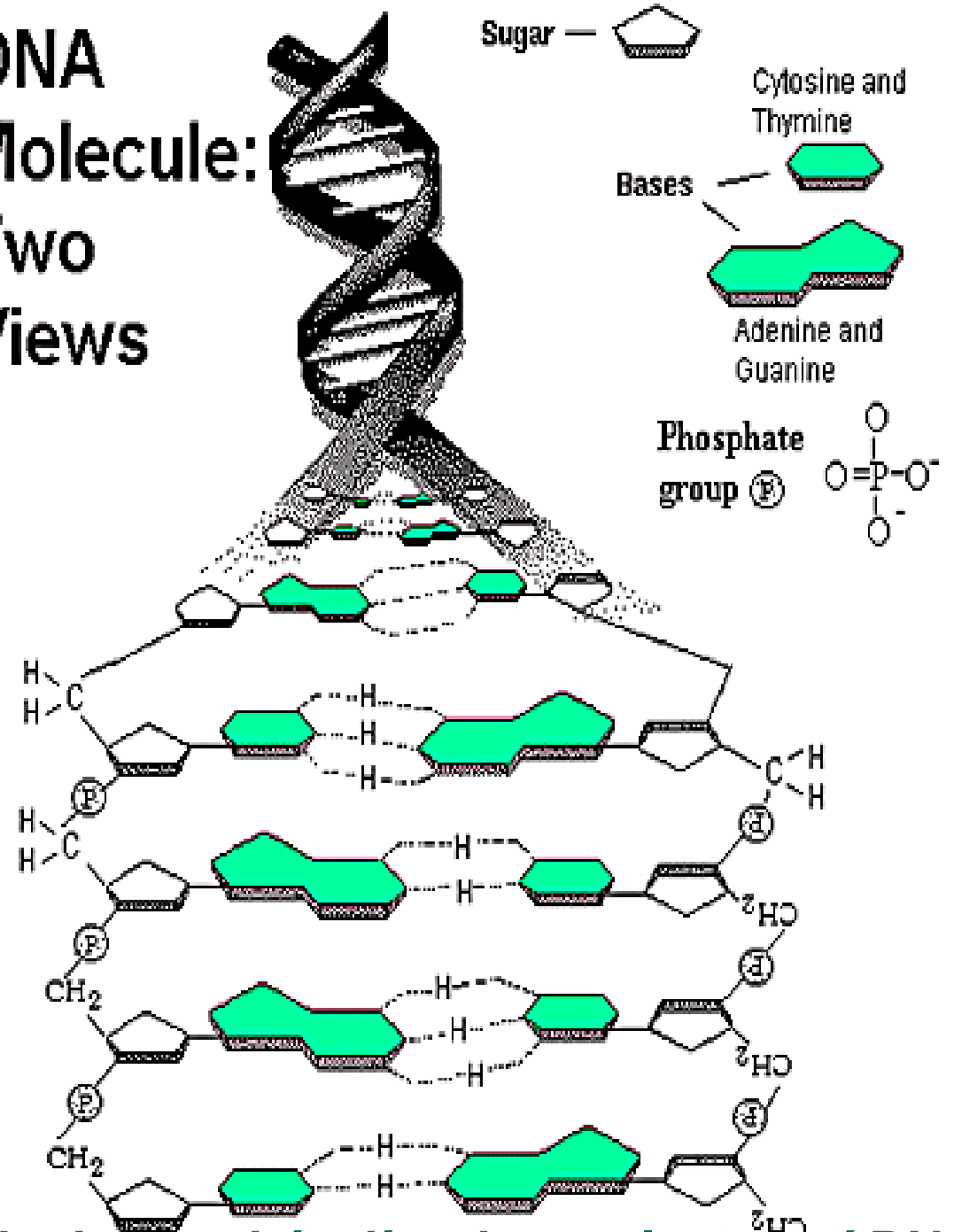
Zdroje DNA

- leukocyty
- amniocyty, choriové klky
- buňky z bukové sliznice
- vlasové kořínky
- krevní skvrny
- biotický materiál
- mikrobiologický a virologický kultivovaný a nekultivovaný materiál
- buňky z cerebrospinálního moku



- Fosfátové estery jsou silné kyseliny (při neutrálním pH anionty)
- Base jsou jen slabě bazické a bez náboje
- DNA se snadno precipituje alkoholem
- Vodíkové vazby mezi skupinami $-NH_2$ a $-OH$ jsou stabilní v rozmezí pH 4-9
- Absorpční maximum UV světla při 260 nm (jednovláknová dává o 20-30% větší absorbanci než dvouvláknová)

DNA Molecule: Two Views



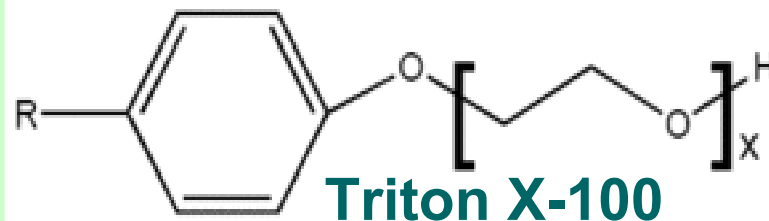
Principy vycházejí z chem. vlastností DNA

Prvním krokem je vždy uvolnění buněčného obsahu rozrušením buněčné stěny, která je složená převážně z polysacharidů a cytoplazmatické membrány složené z fosfolipidů a bílkovin.

Fyzikální metody:

mechanické tření buněk,
opakované mražení a
rozmrazování buněk, ozvučení
ultrazvukem

Chemické metody: detergenty
(SDS – dodecylsulfát sodný,
Triton X-100), organická
rozpuštědla (chloroform, fenol)



Specifické enzymy



Druhým krokem je VLASTNÍ IZOLACE

- oddělení
denaturovaných
proteinů a lipidů
(fenol-chloroformová
extrakce)

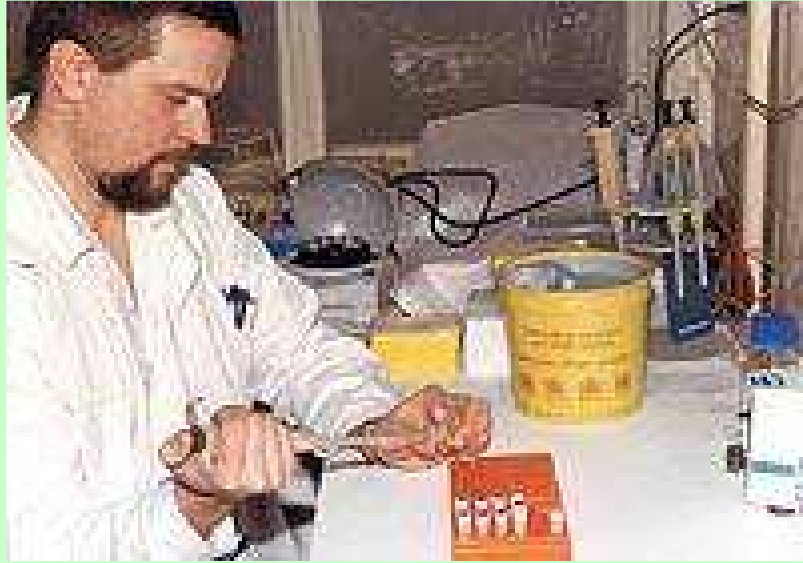
- srážení (NaCl,
ethanol)

Třetím krokem je
PURIFIKACE

- reprecipitace



Fenol-chloroformová extrakce DNA



- **Směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu**
 - chloroform dělí lyzát na 2 fáze (horní vodnou, dolní chloroformovou)
 - fenol sráží proteiny
 - izoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu, po skončení protřepávání přejde fenol do chloroformové fáze
- **Protřepání, odstředění**
- **Srážení DNA ethanolem**



Adsorpce na silikátovou kolonu

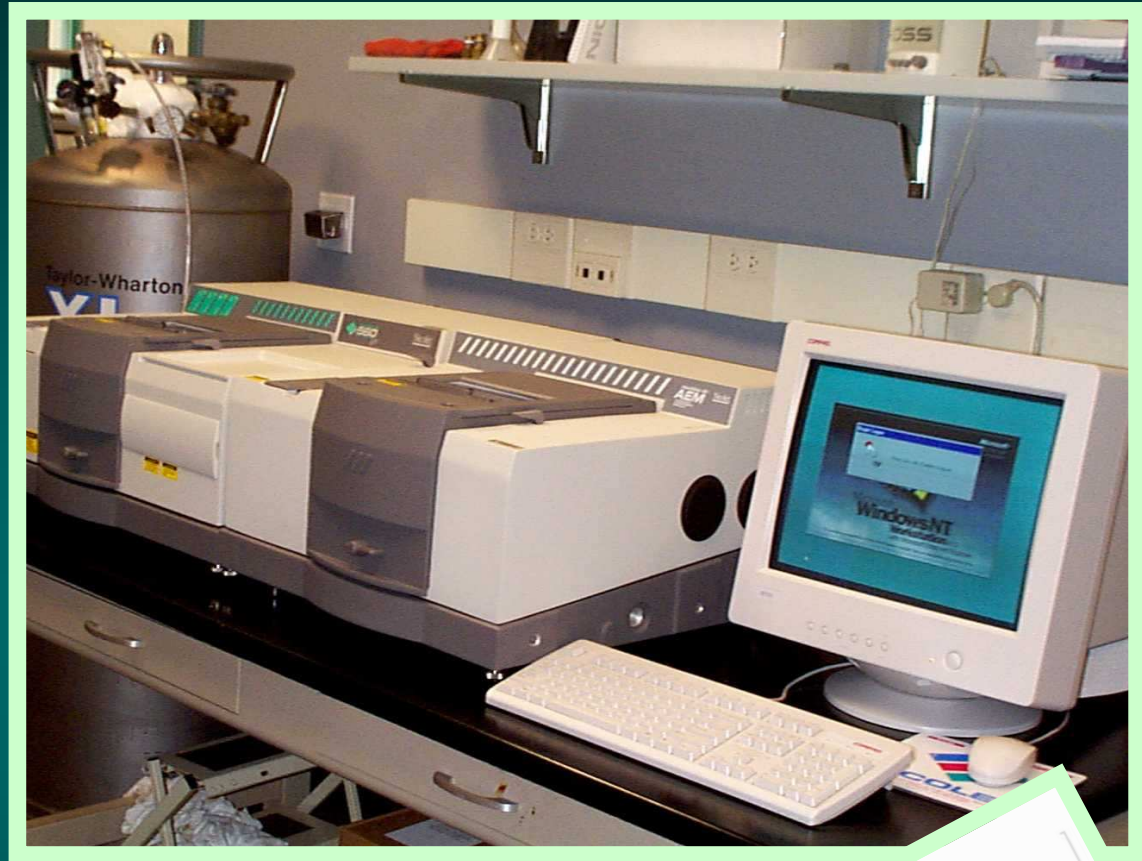
- Rychlejší, pohodlnější – **komerční soupravy (kity)**
- DNA v přítomnosti tzv. **chaotropních solí*** adheruje na silikátový povrch
- Částice se usadí (odstředěním)
- Odsátí roztoku nad částcemi



***Chaotropní soli** jsou obecně iontové sloučeniny, které snižují strukturovanost vody. Ve vodě v tekutém stavu totiž vznikají přechodně vodíkové můstky mezi kyslíkem a vodíkem sousedních molekul, takže je určitým způsobem "strukturovaná". V molekulární genetice je využíván fakt, že molekuly DNA v přítomnosti chaotropních solí adherují na SiO_2 , tedy obecně na skleněný povrch. Nejčastěji se používá jodid sodný (NaI) nebo ionty guanidinu.

Spektrofotometrická kontrola

- Vzorek NK se naředí destilovanou vodou
- Měří se při vlnových délkách 260nm (absorpční maximum DNA) a 280nm (absorpční maximum bílkovin)

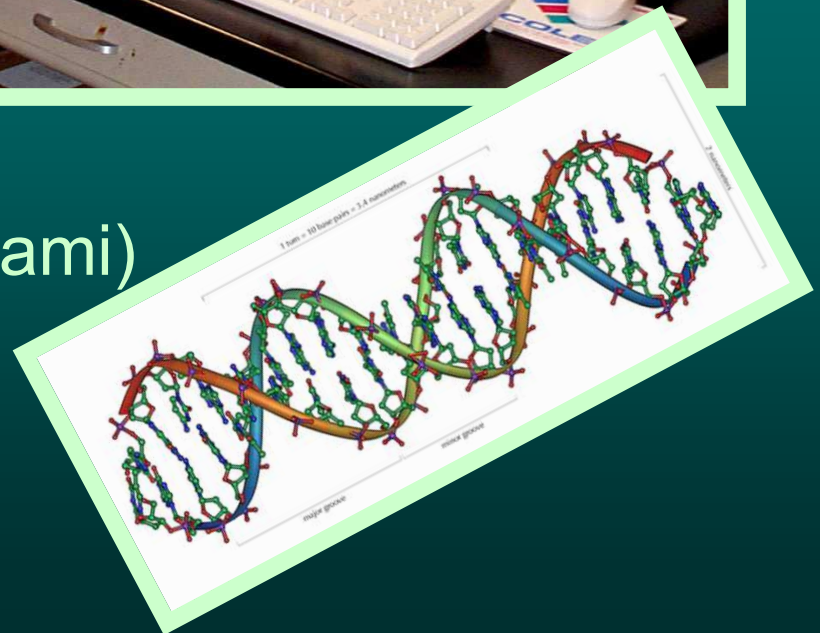


$A_{260}/A_{280} = 1,8$ pro čistou DNA
($A_{260}/A_{280} < 1,75$ = kontaminace bílkovinami)

$$A_{260} = 1$$

ds-DNA o koncentraci 50 mg.l⁻¹

ss-DNA o koncentraci 40 mg.l⁻¹



Manipulace s biologickým materiálem pro izolaci DNA

krev

+4°C/1-5 dní;
dále -20°C

biotický materiál

kultivace
kryoprezervace
izolace



mikroorganizmy

-70°C/-196°C
kultivace
izolace

amniocyty, choriové klky

kultivace
kryoprezervace
(-70/-196°C)
izolace



Děkujeme za pozornost!

<http://www.rozhlas.cz/multimedia/videoplayer/?po=311062&format=wmv&kvalita=f>