



Úloha č. 1

IZOLACE DNA NA KOLONKÁCH

VYUŽITÍ

- pro DNA analýzu v lékařském výzkumu, klinické DNA diagnostice
- laboratoře s využitím molekulárně-biologických metod:
 - klinické
 - veterinární
 - potravinářské
 - zemědělské

METODY IZOLACE DNA

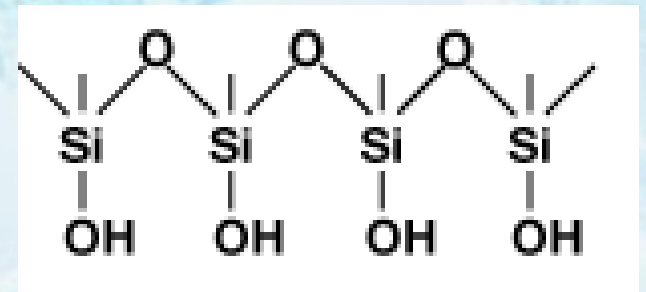
- velké množství
- komerčně dostupné izolační metody

(izolace na kolonkách nebo pomocí paramagnetických částic)

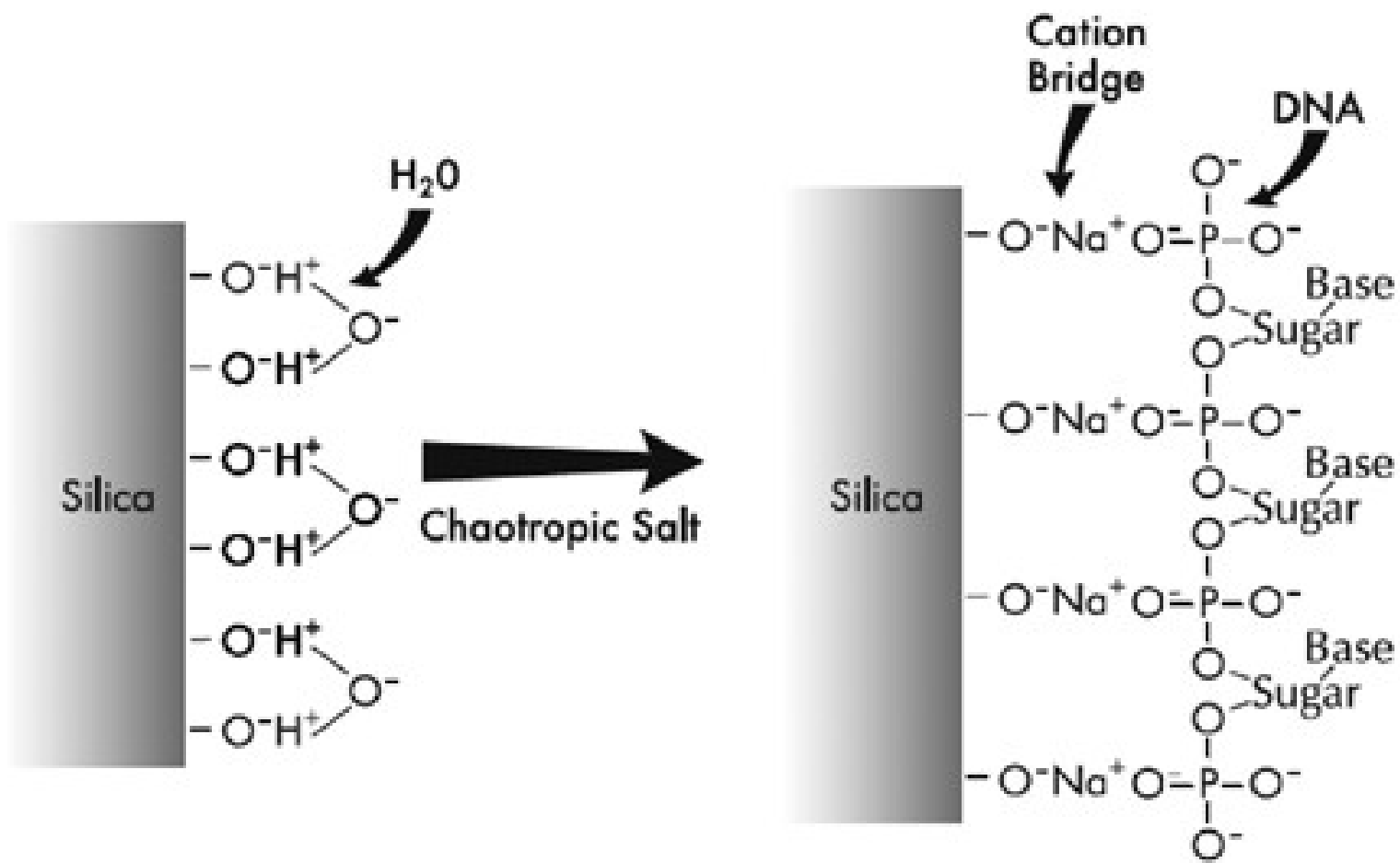
výhody: urychlení práce
 standardizace práce, čistoty a výtěžků

IZOLACE DNA NA KOLONKÁCH

- princip: selektivní vazba DNA na membránu obsahující silikátové částice (kolonka).



- k vazbě dochází v přítomnosti:
chaotropní soli (Guanidin HCl), která vytěsňuje z molekul DNA molekuly vody, čímž uvnitř DNA potlačuje jiné interakce (hydrofobní, vodíkové vazby) než iontové
a *10% isopropanolu* nebo *etanolu*, který DNA částečně vysráží



POSTUP

- stěr z bukální sliznice vatovým tamponem
- izolace DNA:
 - TD1 – lyzační roztok (Guanidine HCl/Tween) + proteináza K
 - B2 – 100% ethanol
 - B3 – promývací roztok (Ethanol/Guanidine HCl)
 - B4 – promývací roztok (Ethanol, Tris, NaCl)
 - B5 – eluční roztok (10 mM Tris-HCl)

STANOVENÍ KONCENTRACE

- **UV spektrofotometr**
- princip: DNA absorbuje UV záření při vlnové délce 260 nm díky aromatickým strukturám bazí nukleových kyselin.
- absorpce je vyjádřena pomocí **absorbance**:
podle Lambert-Beerova zákona platí, že

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

STANOVENÍ ČISTOTY

- kontaminace: organické látky
- princip: proteiny absorbují UV záření při vlnové délce 280 nm díky aromatickým AMK (tyrosin, fenylalanin)
poměr absorbancí DNA/protein (260/280) = míra znečištění proteiny
u čistého vzorku v rozmezí 1,8 – 2,0
- organické látky (polysacharidy, polyfenoly, močovina, thiokyanáty, EDTA) absorbují při 230 nm
poměr absorbancí DNA/organická látka (260/230) = míra znečištění organickými látkami
u čistého vzorku v rozmezí 1,8 – 2,0

