

Návod a protokol k praktickému cvičení z lékařské chemie a biochemie

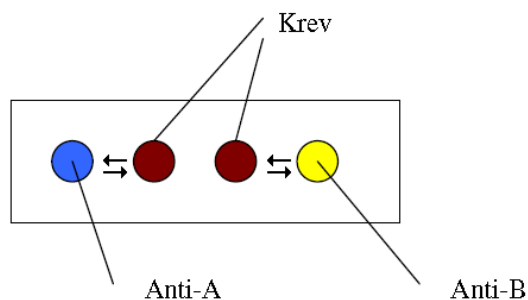
Téma: Izolace DNA

Úloha 1: Stanovení krevní skupiny hemaglutinační zkouškou

Princip:

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.

Výsledky a závěr:

Anti-A	Anti-B	Krevní skupina

Úloha 2: Izolace DNA z bukálního stěru fenol-chloroformovou metodou

Princip:


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 štětíčkou se setřou epitelové buňky bukální sliznice. Štětíčka se propere v 1 ml fyziologického roztoku a suspenze se zcentrifuguje (1 min) na mikrocentrifuze.
2. Supernatant se slije
3. Peleta se resuspenduje v 300 µl homogenizačního pufru a důkladně promíchá na vortexu
4. Přidá se 300 µl SDS a směs se promíchá opakovaným protažením špičkou pipety
5. Dále se přidá 1 µl 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 stejný 600 µl 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. Kroky 2 a 3 se ještě jednou opakují.
5. K vodné fázi se přidá 600 µl směsi chloroform-izoamylalkohol (24:1), směs se krátce promíchá rychlým otáčením zkumavky dnem vzhůra a zpět a centrifuguje se asi 10 s.
6. Vodná fáze se přenese do čisté mikrozukavky, přidá se 70 µl roztoku octanu sodného s glykogenem a zkumavka se nakláněním promíchá.
7. Přidá se 600 µl 2-propanolu a zkumavka se kýváním promíchá. Pak se nechá 15 minut stát při pokojové teplotě.
8. Zkumavky se centrifugují ve vysokootáčkové centrifuze 10 minut při 10 000× g.
9. Slije se 2-propanol, zkumavka se osuší přitisknutím na sterilní buničinu.
10. Přidá se 1 ml 70 % etanolu, centrifuguje se 10 minut.
11. 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.

12. Přidá se 20 µl pufru TE, několikrát se promíchá pipetou a zkumavka se krátce zcentrifuguje.

Úloha 3: Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Princip:

Postup:

1. Vyměňte 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.

Výsledky:

A_{260} :

A_{280} :

A_{320} :

Čistota DNA:

Vypočtete poměr $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$.

$$(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320}) =$$

Pro čistou DNA je tento poměr 1,8.

Koncentrace DNA:

Při optické délce kapiláry 0,5 mm odhadneme koncentraci DNA podle vztahu

$$w (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = 20 \cdot 62,9 \cdot (A_{260} - A_{320}) - 20 \cdot 26 \cdot (A_{280} - A_{320})$$

$$20 \cdot 62,9 \cdot (A_{260} - A_{320}) - 20 \cdot 26 \cdot (A_{280} - A_{320}) = \dots\dots\dots \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Závěr: