

Návod a protokol k praktickému cvičení z lékařské chemie a biochemie

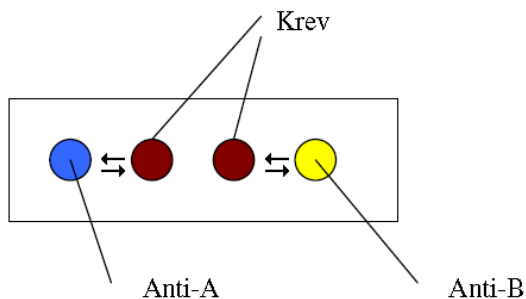
Téma: Izolace DNA

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 provedte 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 

Isopropanol 

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 štětičkou se setřou epitelové buňky bukální sliznice. Štětička 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
4. Přidá se 300 µl SDS a směs se promíchá opakovaným protažením špičkou pipety
5. Dále se přidá 1 µl proteinázy K a suspenze se vortexuje
6. Inkubace 45 minut při 50 °C v bloku, míchání 300 rpm

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 krátce vortexuje, 3 minuty promíchává nakláněním zkumavky 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 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 izopropanolu a zkumavka se kýváním promíchá. Pak se nechá 15 minut stát při pokojové teplotě.
8. Zkumavky se centrifugují 10 minut na mikrocentrifuze.
9. Slije se izopropanol, 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. 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.

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

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

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

Závěr: