

IZOLACIJA DNA

Princip:

DNA lahko izoliramo iz krvi na več načinov, npr. z obarjanjem v etanolu ali izopropanolu, z ionsko-izmenjevalno kromatografijo, z ekstrakcijo v sistemu fenol-kloroform itd. Zaradi enostavnosti se DNA vse bolj izolira z uporabo kolon z membrano iz silikagela.

Z ustreznim pufrom najprej pripravimo lizat krvi. Izolacija DNA na kolonah z membrano iz silikagela poteka v treh stopnjah: vezava (adsorpcija), spiranje kontaminantov in elucija (desorpcija) DNA. V prvi stopnji se DNA adsorbira na silikagel v prisotnosti kaotropnih soli (npr. gvanidinijev klorid, natrijev tiocianat, sečnina). Ionska moč in pH lizata krvi sta uravnana tako, da omogočita optimalno vezavo DNA na silikagel, hkrati pa onemogočata vezavo proteinov, polisaharidov in drugih kontaminantov, ki jih v drugi stopnji s spiranjem odstranimo. V tretji stopnji z dodatkom prečiščene vode ali pufru z nizko ionsko močjo dosežemo desorpcijo DNA.

Natančen mehanizem vezave DNA na silikagel ni razkrit oz. še ni znan. Gotovo ima glavno vlogo pri vezavi kaotropna snov, ki odstrani vodo iz hidratiranih molekul. Ponekod je omenjen tudi kationski most med negativno nabito DNA in negativno nabitim silikagelom.

Postopek:

1) Priprava vzorcev in reagentov

- ◆ pripravimo vodno kopel (56° C)
- ◆ pufroma za spiranje AW1 in AW2 dodamo navedeno količino absolutnega etanola, liofilizirani poroteazi dodamo priloženo topilo
- ◆ vzorcu polne krvi in vsem reagentom omogočimo, da se segrejejo na sobno temperaturo

2) Priprava 2 % agaroznega gela z vgrajenim etidijevim bromidom

V erlenmajerico natehtamo 1,5 g agaroze. Dodamo 75 mL pufru TAE, postavimo na tehtnico in stariramo. Pokrijemo z urnim steklom in v mikrovalovni pečici segrevamo toliko časa, da dobimo prozorno raztopino. Pustimo 5 minut, da se raztopina nekoliko ohladi; med tem pripravimo model za gel. Raztopini dodamo 4 µL etidijevega bromida, dobro premešamo in prelijemo v model. Po 30 minutah vzamemo gel iz modela.

POZOR! Etidijev bromid je toksičen in mutagen, zato je potrebno previdno delo in je obvezna uporaba rokavic.

3) Izolacija DNA iz polne krvi

1. v epruveto, ki vsebuje 200 μ L polne krvi, dodamo 20 μ L proteaze
2. v isto epruveto dodamo 200 μ L pufra AL in premešamo na vibracijskem mešalniku (15 s)
POZOR! Zaporedje dodajanja reagentov in vzorca lahko tudi spremenimo, vendar v nobenem primeru ne smemo dodati pufra AL direktno k proteazi ali obratno.
3. inkubiramo v vodni kopeli 10 minut pri 56° C
4. dodamo 200 μ L absolutnega etanola. Premešamo na vibracijskem mešalniku (15 s)
5. vsebino previdno prenesemo v kolono, ki smo jo vstavili v zbirno epruveto. Centrifugiramo 1 minuto pri 6000 g. Kolono nato prenesemo v novo zbirno epruveto, filtrat zavržemo.
6. v kolono odmerimo 500 μ L pufra za spiranje AW1 in centrifugiramo 1 minuto pri 6000 g. Kolono nato prenesemo v novo zbirno epruveto, filtrat zavržemo.
7. v kolono odmerimo 500 μ L pufra za spiranje AW2 in centrifugiramo 3 minute pri 15000 g. Kolono nato prenesemo v 1,5 mL epruveto, filtrat zavržemo.
8. v kolono odmerimo 200 μ L pufra AE ali prečiščene vode. Inkubiramo pri sobni temperaturi 1 do 5 minut, nato centrifugiramo 1 minuto pri 6000 g. Kolono zavržemo, izolat DNA je v filtratu.

4) Ocena količine in kvalitete DNA

- ◆ količino DNA ocenimo z meritvijo absorbance pri 260 nm. Raztopina DNA s koncentracijo 50 μ g/mL ima absorbanco pribl. 1.
- ◆ čistoto izolata ocenimo z meritvijo razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm
- ◆ kvaliteto (integriteto) DNA ocenimo z elektroforezo na 2 % (m/V) agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. Uporabimo 2 μ L izolata DNA in 2 μ L nanašalnega pufra z bromfenol modrim. Elektroforeza poteka v 1x TAE pufri 30 minut pri stalni napetosti 100 V. Po končani elektroforezi gele presvetlimo z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in gel fotografiramo.

Rezultati praktičnega dela

Številka vzorca:

1. Opis vzorcev, materiala in opreme

2. Rezultati

Komentar rezultatov

Pregledal-a:

Datum:

Pripombe: