



Wybrane metody izolacji DNA

Dr Paweł Domagała, Dr Wojciech Szczepański

Organizator



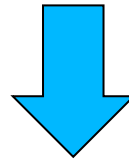
Województwo
Śląskie



Muzeum
Górnośląskie
w Bytomiu

Muzeum Górnośląskie w Bytomiu jest instytucją kultury
Samorządu Województwa Śląskiego.

23.11.2024



ACCGTGATTCGACCTGATCATCCGCAGACTGAGACGCTGCACGGTCCGAGA
CTGCACGGCGGCGACAACAGACGCGCCGCACCGATGTCCGCACAACGGCA
GGACCTCGATAATACGACGTTATCTTGCGTCGGGCCGGACGCGCTTTTGT
AAAATGCGCGTGCGCGATTTCGTGTCTTCTACCGTCCGACGGCCGGTCCGGCA
AAACCGTCACGGTCCAAACGCCTTACCCTTTGACAGGTAAAGACGATTGGGC
TCCCGAACGGCGCTTAGACCGACATCGAACGGGTTCGCGATGCATTACTAAGA
GAGAAGTGCACGCCGTCCGCGAACGTTCGACGCTGCCGGCCCCG

Metody badań genetycznych

Ogólny przebieg analiz DNA:

Metoda „klasyczna”:

- pobranie materiału,
- **izolacja DNA,**
- PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy),
- sekwencjonowanie,
- analiza sekwencji.

Izolacja DNA

Główne metody izolacji DNA:

- I. Metoda z użyciem mieszaniny fenol – chloroform
- II. Metoda solna (wysolenie białek)
- III. Metoda kolumnowa**

Izolacja DNA z wykorzystaniem odpowiedniego nośnika, do którego DNA będzie się wiązać, następnie odmycie zanieczyszczeń i uwolnienie związanego DNA.

Izolacja DNA

Jak zabezpieczyć próbkę do analiz:

- Umieścić w 96% alkoholu etylowym (najlepiej CZDA)
- Przechowywać w temperaturze - 20° C.





Izolacja DNA

Ogólny przebieg procesu:

- przygotowanie materiału biologicznego do izolacji,
- zniszczenie komórek poprzez homogenizację lub lizę,
- usunięcie błon lipidowych,
- usunięcie białek,
- usunięcie RNA,
- oczyszczenie DNA.

Izolacja DNA

Wymagany sprzęt:

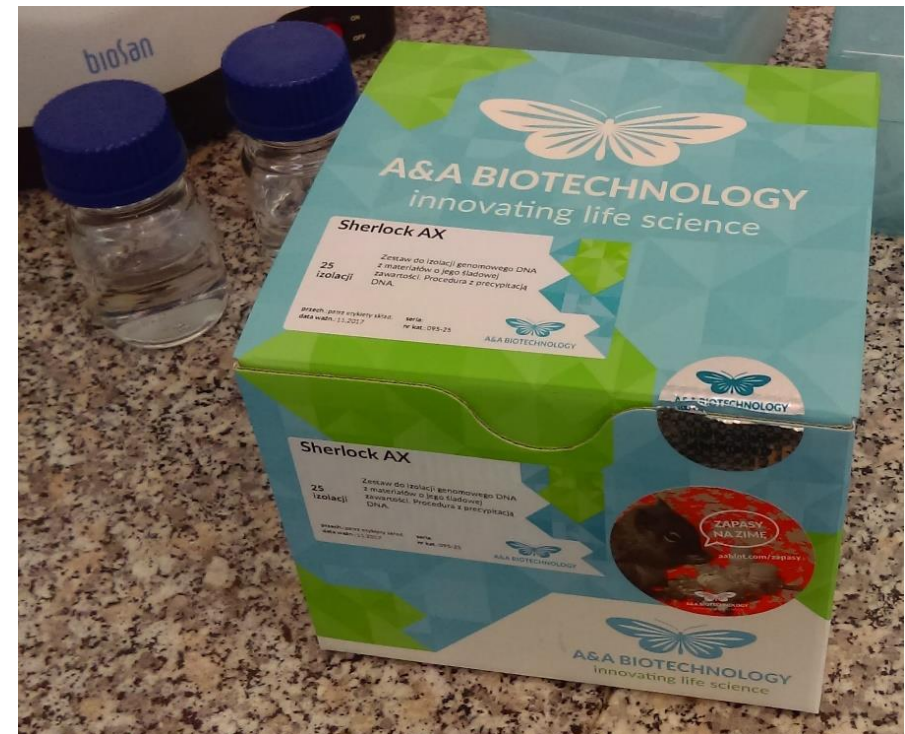
1. Zestaw pipet automatycznych
2. Wstrząsarka (vortex)
3. Blok grzewczy
4. Wirówka laboratoryjna
5. Probówki typu Eppendorf (1,5 ml)

Wymagane odczynniki:

1. Zestaw do izolacji DNA genomowego
2. Alkohol etylowy (70%)
3. Woda jałowa wolna od nukleaz

Z czego można pobrać materiał do analiz ?

Praktycznie z wszystkich tkanek organizmu.



Izolacja DNA

Wymagany sprzęt:

1. **Zestaw pipet automatycznych**
2. Wstrząsarka (vortex)
3. Blok grzewczy
4. Wirówka laboratoryjna
5. Probówki typu Eppendorf (1,5 ml)

Pipeta automatyczna

+ końcówki do pipet – służy do precyzyjnego odmierzania objętości pobieranej cieczy.



Izolacja DNA

Wymagany sprzęt:

1. Zestaw pipet automatycznych
2. **Wstrząsarka (vortex)**
3. Blok grzewczy
4. Wirówka laboratoryjna
5. Probówki typu Eppendorf (1,5 ml)

Wstrząsarka – urządzenie laboratoryjne służące do szybkiego i efektywnego mieszania małych objętości cieczy lub tworzenia zawiesin.



Izolacja DNA

Wymagany sprzęt:

1. Zestaw pipet automatycznych
2. Wstrząsarka (vortex)
3. **Blok grzewczy**
4. Wirówka laboratoryjna
5. Probówki typu Eppendorf (1,5 ml)

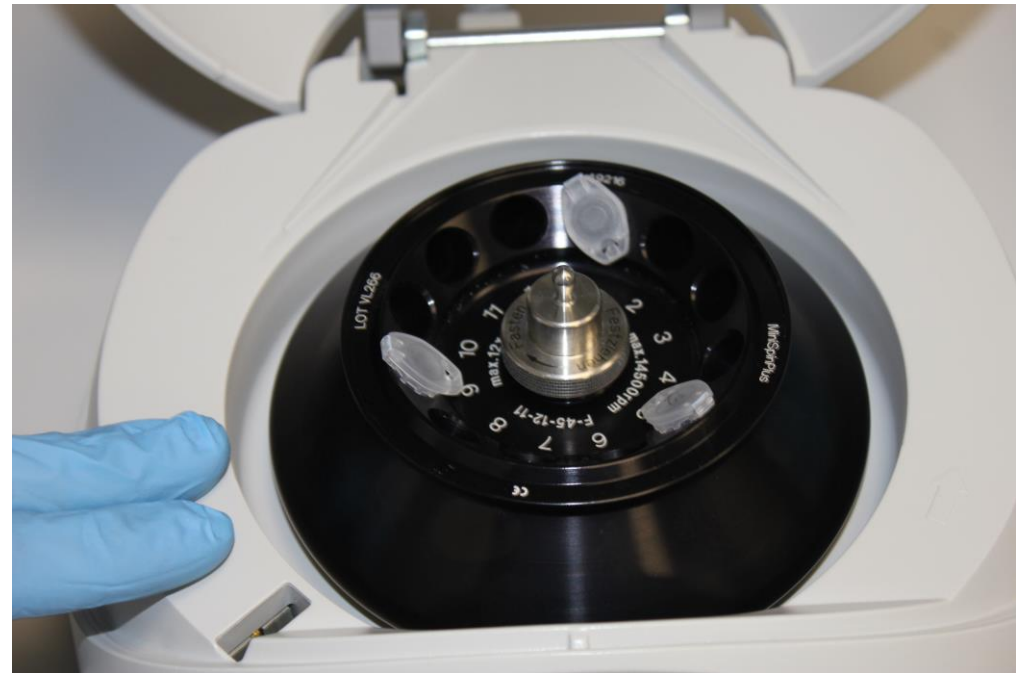


Termomikser + blok grzewczy – urządzenie laboratoryjne służące do podgrzewania bądź ochładzania próbek.

Izolacja DNA

Wymagany sprzęt:

1. Zestaw pipet automatycznych
2. Wstrząsarka (vortex)
3. Blok grzewczy
4. **Wirówka laboratoryjna**
5. Probówki typu Eppendorf (1,5 ml)



Wirówka laboratoryjna – to urządzenie, które wykorzystuje siłę odśrodkową, aby oddzielić różne składniki płynu. Osiąga się to poprzez wirowanie płynu z dużą prędkością, oddzielając w ten sposób płyny o różnej gęstości lub ciecze od ciał stałych.

Izolacja DNA

Wymagany sprzęt:

1. Zestaw pipet automatycznych
2. Wstrząsarka (vortex)
3. Blok grzewczy
4. Wirówka laboratoryjna
5. **Probówki typu Eppendorf (1,5 ml)**

Probówki typu Eppendorf (1,5 ml) – powszechna nazwa jednorazowych probówek plastikowych o małej pojemności (do 2 ml), wykonywanych zwykle z czystego, półprzezroczystego polipropylenu.

Protokół izolacji

1. Próbkę nanieść na kolumny filtracyjne Filtr 1.

Kolumna z żółtym kółkiem służy do usuwania większych zanieczyszczeń pochodzących z podłoża lub niezliwowanych fragmentów tkanek.



2. Całość wirować 1 min przy 10 000 RPM (9000 x g).



3. Usunąć kolumny filtracyjne Filtr 1. Przesącz, w którym znajduje się DNA, nanieść na kolumny oczyszczające Spin 10 AX.

Kolumna z niebieskim kółkiem jest właściwą kolumną oczyszczającą.



4. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



5. Wylać przesącz i ponownie umieścić kolumny Spin 10 AX w tych samych probówkach.



6. Nanieść na kolumny Spin 10 AX po 600 µl roztworu płuczącego K2.

Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



7. Wylać przesącz i ponownie umieścić kolumny Spin 10 AX w tych samych probówkach.



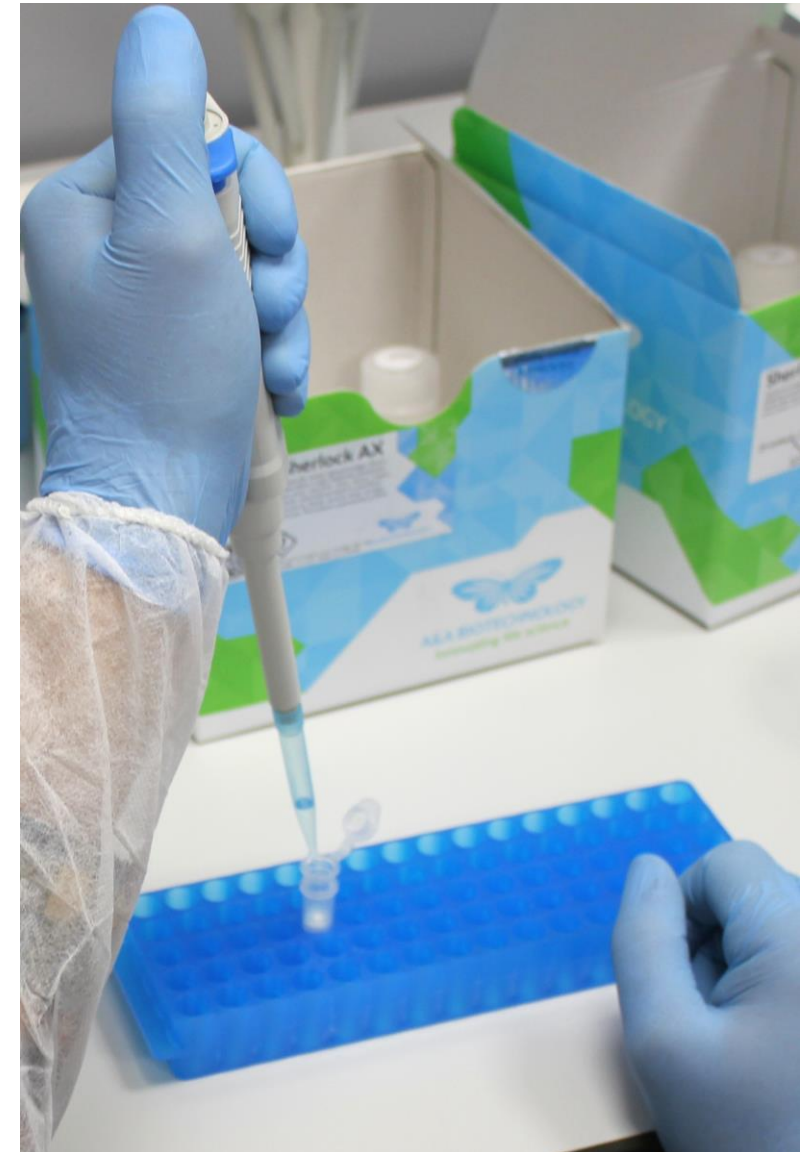
8. Nanieść na kolumny Spin 10 AX po 600 µl roztworu płuczącego K2.



9. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



10. Wylać przesącz i umieścić kolumny Spin 10 AX w nowych 2 ml probówkach typu Eppendorf (w zestawie).



11. Nanieść na kolumny Spin 10 AX po 350 μ l roztworu elucyjnego K3. Inkubować przez 2 min w temp. pokojowej.



12. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



13. Ponownie nanieść na kolumny Spin 10 AX po 350 μ l roztworu elucyjnego K3. Inkubować przez 1 min w temp. pokojowej. Wirować 1 min przy 8000 RPM (6000 x g).



14. Usunąć kolumny Spin 10 AX, a przesącz, w którym znajduje się DNA, przenieść pipetą (~ 700 μ l) do nowych 1,5 ml próbek typu Eppendorf (nie ma w zestawie).



15. Dodać po 5 μ l wzmacniacza precypitacji oraz 600 μ l izopropanolu. Całość wymieszać i wirować 10 min przy 10 000 RPM (9000 x g).



16. Usunąć supernatanty, uważając aby nie usunąć niebieskich osadów DNA.

17. Dodać po 500 μ l 70% etanolu. Całość wymieszać i wirować 5 min przy 10 000 RPM (9000 x g).



18. Usunąć supernatanty, a osady DNA suszyć przez odwrócenie próbek przez 10 min w temp. pokojowej.

Jeżeli na ściankach próbki znajdują się resztki alkoholu to należy je osuszyć kawałkiem jałowej waty (doskonale nadają się do tego patyczki higieniczne oraz pączki do pobierania wymazów). Niebieska barwa osadu umożliwia śledzenie procesu rozpuszczania DNA.

19. Osady zawiesić w buforze TE (w zestawie), wodzie jałowej, wolnej od nukleaz (nie ma w zestawie, nr kat. 003-075, 003-25) lub buforze Tris 10 mM, pH 8,0 (nie ma zestawie).



20. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. 4 °C do czasu dalszych analiz.



Osady DNA w próbkach.

Dziękujemy za uwagę !

Organizator



Województwo
Śląskie



Muzeum
Górnośląskie
w Bytomiu

Muzeum Górnośląskie w Bytomiu jest instytucją kultury
Samorządu Województwa Śląskiego.