

Grupa.....

Wrocław,

.....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 3.

Izolacja DNA metodą chelex. Wyznaczanie stężenia i czystości DNA. Izolacja genomowego DNA metodą kolumnkową.

1. Izolacja DNA metodą chelex. Wyznaczanie stężenia i czystości DNA.

Na zajęcia proszę przynieść kalkulatory.

UWAGA! Praca z materiałem biologicznym proszę przynieść na zajęcia własne rękawice

Wszystkie próbówki i kolumny podpisywać w celu uniknięcia pomyłkowych wymian próbek z innymi grupami.

Unikaj dotykania bibuły rękoma, nożyczki po każdorazowym użyciu oczyścić za pomocą 70% etanolu (ochrona przed kontaminacjami obcym DNA).

Odczynniki:

1. Sterylna igła
2. Probówki typu Eppendorf 1,5 ml
3. PBS
4. Bibuła filtracyjna
5. 20% chelex w wodzie destylowanej
6. Woda wolna od nukleaz
7. 70% etanol (do przemywania powierzchni narzędzi)

Sprzęt:

1. Nożyczki (przed użyciem pamiętać o przemyciu 70% etanolem)
2. Termoblok (99° C)
3. Miniwirówka
4. Pipety automatyczne
5. Pensety

Zadanie 1. Przygotowanie plam z zawiesiny komórek:

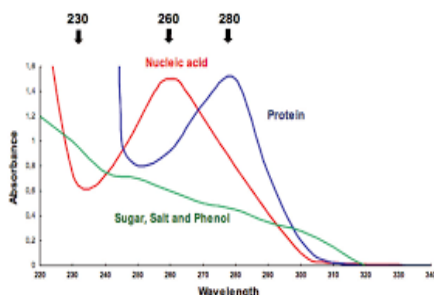
1. Nanieść 3 krople (każda po 3,5 µl) zawiesiny komórek na bibułę filtracyjną. Koniecznie zaznaczyć środek plamy przez delikatne nakłucie bibuły końcówką lub igłą (po wyschnięciu plama nie będzie widoczna).
2. Począkać do wyschnięcia, ok. 5 min.
3. Kontrolnie jedna grupa przygotowuje plamy wody (3 krople po 3,5 µl).

Zadanie 2. Izolacja DNA przy użyciu żywicy Chelex 100 (Sigma)

1. Nastawić termo blok na 99° C.
2. Przygotować, podpisaną sterylną probówkę o obj. 1,5 ml. Czystymi nożyczkami wyciąć plamy zawiesiny komórek/wody i umieścić w probówce.
3. Dodać 1 ml PBS (bibułki muszą być zanurzone w roztworze!)
4. Inkubować w temperaturze pokojowej 10 min.
5. Wirować przez 2 min., przy 14 000 xg. Usunąć supernatant za pomocą pipety.
6. Ponownie dodać 1 ml PBS i wirować przez 2 min. przy 14 000 xg.
7. Supernatant usunąć za pomocą pipety (pamiętać o zmianie końcówki)
8. Dodać 150 µl wody wolnej od nukleaz.
9. Dodać 50 µl 20% roztworu Chelex (w destylowanej wodzie)
10. Inkubować w 99° C przez 10 min.
11. Wirować przez 1 min., przy 14 000 xg. Supernatant przenieść do czystej podpisanej probówki.
12. Materiał przechowywać w -20° C.

Pytania sprawdzające:

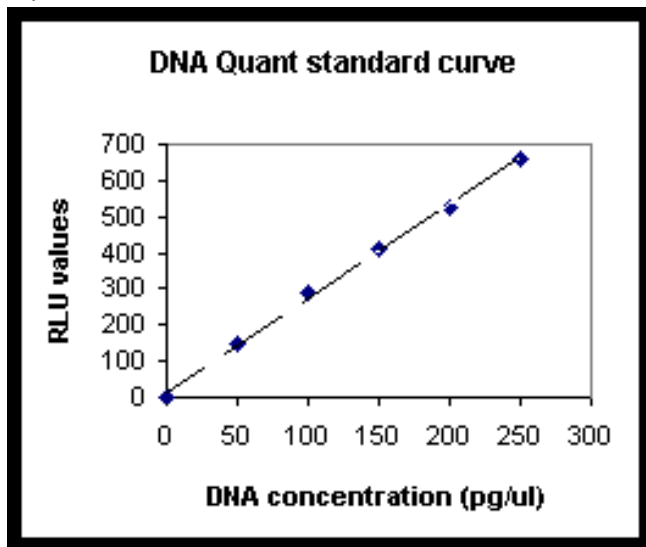
1. Chelex 100 to nazwa handlowa kopolimeru....., zawierającego jony, które działają jako grupy.....wielowartościowe jony metali.
2. Omów metodę szybkiej analizy czystości preparatów DNA:



Długość fali (nm)	Substancje absorbujące
230	EDTA, polisacharydy, etanol
260	DNA, RNA
270	Fenol
280	Białka
320	Drobiny komórkowe

3. Do pomiaru stężenia DNA przygotowano roztwór 50 razy rozcieńczony. Oblicz stężenie wyjściowego roztworu DNA plazmidowego, jeżeli absorbancja przy 260 nm roztworu rozcieńczonego wynosiła 0,250.

4. Na podstawie krzywej standardowej, oblicz stężenie DNA w próbce, której luminescencja wynosiła 300 RLU.



.....

.....

.....

5. Korzystając z dokładnego wzoru na masę molową: ssDNA M.W. = (An x 313.2) + (Tn x 304.2) + (Cn x 289.2) + (Gn x 329.2) + 79.0 lub wzoru uproszczonego: **M.W. of ssDNA = (ilość nucleotydów x 303.7) + 79.0**, oblicz ile cząsteczek DNA znajduje się w próbce zawierającej 1µg oligonukleotydu o sekwencji: 5'ATTAGCCCTTAAGGGCAGCTTAGC3'

.....

.....

.....

.....

6. Absorbancja przy 260 nm roztworu startera do reakcji PCR o sekwencji jak w zadaniu 5 wynosi 1. Ile razy należy rozcieńczyć ten roztwór aby uzyskać stężenie 1 µM?

.....

.....

.....

.....

.....

7. Jak należy przygotować 100 µl roztworu zawierającego startery F i R o stężeniu 10 µM każdy, jeżeli stek roztworu F wynosi 1mM a stek roztworu R 2,5 mM?

.....

.....

Izolacja genomowego DNA metodą kolumnienkową.

Wszystkie próbówki i kolumny podpisywać w celu uniknięcia pomyłkowych wymian probówek z innymi grupami.

Odczynniki:

1. Kolumna(mini) z probówką odbierającą
2. Probówki typu Eppendorf 1,5 ml
3. PBS
4. Roztwór QB (Sol QB)-bufor aktywacyjny
5. Bufor QB (Buffer QB)- do równoważenia kolumny
6. Roztwór Proteinazy K
7. RNAza A
8. 96% lub 99,8% etanol
9. Wash QBX 1- bufor płuczący
10. Wash QBX 2- bufor płuczący
11. Bufor do elucji -10 mM Tris –HCl, pH 8,5 (pamiętać o podgrzaniu do 80°C)

Sprzęt:

1. Termoblok (70° C, potem 80° C)
2. Vortex
3. Miniwirówka
4. Pipety automatyczne

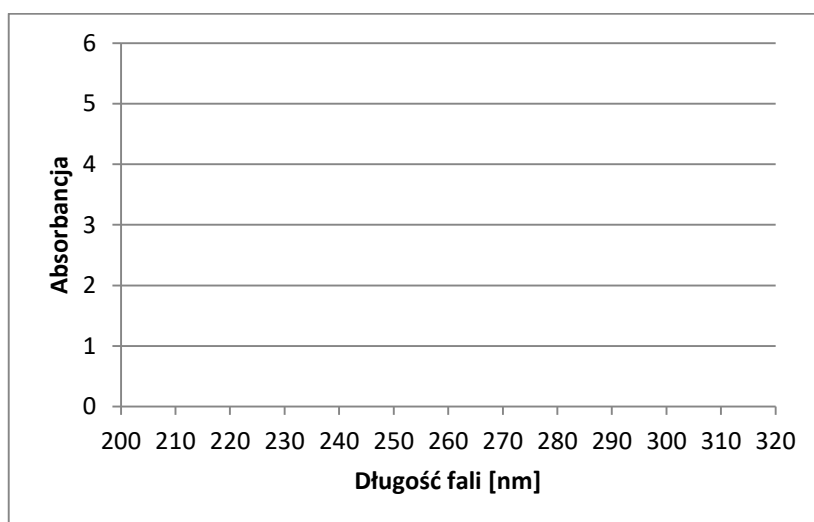
Zadanie 1. Izolacja gDNA przy użyciu zestawu GeneMATRIX Quick Blood DNA Purification Kit (EURx)

4. Materiał do izolacji: osad limfocytów pochodzących z hodowli (białaczka) zawiesić dokładnie w 200 µl sterylnego buforu PBS.
5. Do materiału biologicznego (200 µl) dodać 2µl RNAzy A, po czym 10 µl Proteinazy K, a następnie 200 µl roztworu QB (Sol QB). Wymieszać dokładnie wortexując i inkubować w termobloku przez 10 min w 70° C. W tym czasie przygotować kolumnienki – punkt 3.
6. Na kolumnę nanieść za pomocą pipety 30 µl buforu QB (Buffer QB) i inkubować 10 min, w temperaturze pokojowej w celu zrównoważenia kolumny przed nałożeniem materiału po lizie.
7. Do mieszaniny komórek z proteinazą K (punkt 2) dodać 200 µl etanolu (96-100%). Wymieszać dokładnie przy użyciu wortexu. Wirować przez 1 min., przy 11 000 xg (PAMIĘTAĆ o zrównoważeniu probówek w wirówce!).
UWAGA: Po zakończeniu lizy materiału biologicznego, przestawić temperaturę termobloku na 80°C i umieścić w nim probówkę z buforem do Elucji (bufor podgrzewać aż do momentu kiedy będzie potrzebne w punkcie 11).
8. Lizat po odwirowaniu przenieść na przygotowaną kolumnę. Wirować 1 min, przy 11 000 xg. PAMIĘTAĆ o umieszczeniu kolumny przed wirowaniem w probówce odbierającej!
9. Supernatant z probówki odbierającej usunąć i ponownie umieścić w niej kolumnę.
10. Do kolumny dodać za pomocą pipety 500 µl buforu Wash QBX 1 i wirować 1 min., przy 11000 xg
11. Usunąć ciecz z probówki odbierającej i ponownie umieścić w niej kolumnę.

12. Na kolumnę, za pomocą pipety przenieść 500 μ l buforu Wash QBX2
13. Usunąć ciecz z probówki odbierającej, umieścić ponownie w niej kolumnę i wirować 1 min., przy 11 000 xg.
14. Kolumnę umieścić w czystej probówce (koniecznie podpisanej w rozpoznawalny sposób na kolejnych zajęciach) i dodać 50 μ l GORĄCEGO buforu do Elucji dokładnie na środek membrany, unikając jej dotknięcia przez końcówkę pipety.
15. Inkubować przez 2 min. w temperaturze pokojowej, po czym wirować przez 1 min. przy 11 000 xg.
16. Usunąć kolumnę. Zamknąć probówkę z wyizolowanym gDNA i oddać do pokoju przygotowawczego w celu przechowywania materiału w -20°C .

Zadanie 2. Pomiar stężenia i czystości wyizolowanego DNA.

Narysuj schemat widma preparatu gDNA w zakresie światła UV:



Podaj wartości:

Stężenia DNA.....

A260/A280.....

A260/A280.....

Pytania sprawdzające:

8. Omów podział frakcji DNA w komórkach eukariotycznych i prokariotycznych.....
.....
.....

.....
.....
9. Wymień rodzaje materiału genetycznego spotykanego u wirusów:.....
.....
.....
.....

10. Omów strukturę DNA, wymień rodzaje wiązań stabilizujących te cząsteczki.....
.....
.....
.....
.....
.....

11. Jaka temperatura jest rekomendowana do przechowywania DNA ?
.....

12. Opisz warunki przechowywania materiału biologicznego przeznaczonego do izolacji DNA (tkanka, izolowane komórki, płyny ustrojowe).
.....
.....