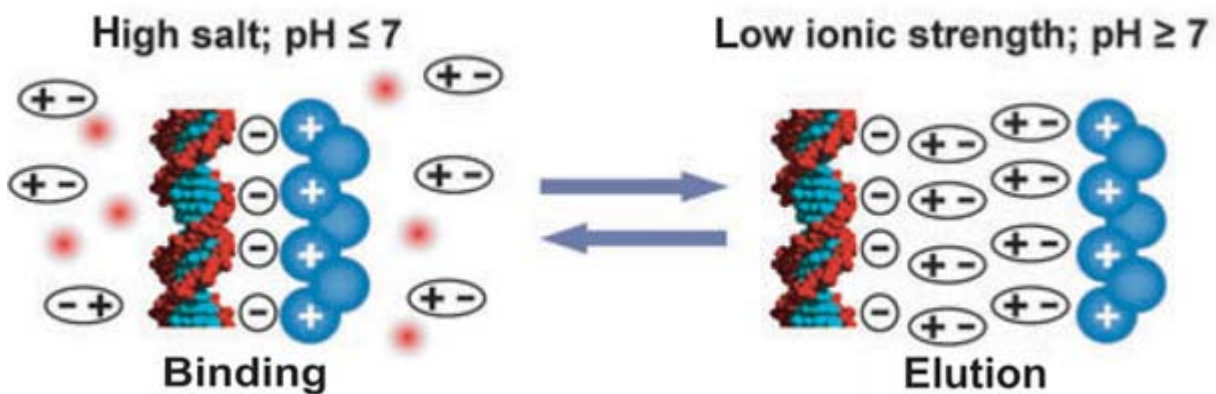


Instrukcja do ćwiczeń Nr 1.

Temat: *Izolacja całkowitego DNA z tkanki ssaczej metodą wiązania DNA do kolumny krzemionkowej oraz spektrofotometryczna ocena jego czystości i stężenia*

W tej metodzie izolacji wykorzystuje się wiązanie DNA do złoża krzemionkowego w wysokim stężeniu soli chaotropowych. Ujemnie naładowane cząsteczki DNA łączą się w dużym stężeniu soli do dodatni naładowanej krzemionki. Zanieczyszczenia są odpłukiwane a następnie DNA wymywany jest roztworem o niskim stężeniu soli (woda lub bufor o niskim stężeniu).



1. Przygotowanie tkanki i trawienie Proteinazą K w buforze lizującym.

Każdy zespół otrzyma próbkę 1.5 ml zawierającą fragment tkanki (wątroba nornicy rudej) umieszczony w 180 ul buforu T1. W drugiej próbówce będziemy przeprowadzać kontrolę negatywną ekstrakcji, to znaczy przeprowadzimy wszystkie kroki rozpoczynając od próbki wypełnionej buforem, bez tkanki.

- włącz termoblok i ustaw go na 55°C
- opisz próbkę zawierającą tkankę w buforze numerem grupy, numerem zespołu i kolejnym numerem (np. „DNA 1.1.1”)
- opisz pustą próbkę symbolem „KN” (Kontrola Negatywna), numerem grupy, numerem zespołu i kolejnym numerem (np. „KN 1.1.1”)
- do próbki KN dodaj pipetą automatyczną (żółte końcówki) 180 ul **buforu T1**
- do obu próbek** dodaj pipetą automatyczną (białe końcówki) 10 ul roztworu Proteinazy **K**

- f) zamknij probówki i silnie wytrząsaj przez kilkanaście sekund
- g) umieść probówki w termobloku nastawionym na 55°C
- h) po 15 minutach wyjmij probówki i energicznie wytrząsaj przez kilkanaście sekund, umieść probówki ponownie w termobloku
- i) powtarzaj p. h) aż do momentu gdy tkanka zostanie całkowicie strawiona, powinno wystarczyć ok. 30-45 min
- j) nastaw termoblok na 70°C
- k) dodaj (niebieskie końcówki) 200 µl **buforu B3**
- l) intensywnie wytrząsaj przez chwilę
- m) umieść probówki w termobloku na 10 min
- n) umieść w termobloku probówki z **buforem BE** (ogrzany bufor BE będzie nam potrzebny później)

2. Izolacja DNA poprzez wiązanie do złoża krzemionkowego w obecności soli chaotropowych.

- a) wiruj próbki przez 2 minuty przy 11 000 x g; **Pamiętaj o symetrycznym ułożeniu próbek w wirówce**
- b) przenieś supernatant do opisanej probówki zawierającej 200 µl 96% etanolu, wymieszaj
- c) przygotuj kolumny (każda kolumna ma się znajdować w probówce bez wieczka) i podpisz je tak samo jak probówki zawierające lizat
- d) przenieś zawartość probówek na kolumny
- e) umieść kolumny w wirówce i wiruj przez 1 min przy 11 000 x g
- f) wyjmij kolumny z wirówki i wylej zawartość probówki, samą kolumnę umieść ponownie w probówce
- g) dodaj na kolumny po 500 µl **buforu BW**
- h) umieść kolumny w wirówce i wiruj przez 1 min przy 11 000 x g
- i) wyjmij kolumny z wirówki i wylej zawartość probówki, samą kolumnę umieść ponownie w probówce
- j) dodaj na kolumny po 600 µl **buforu B5**
- k) umieść kolumny w wirówce i wiruj przez 1 min przy 11 000 x g
- l) wyjmij kolumny z wirówki i wylej zawartość probówki, samą kolumnę umieść ponownie w probówce
- m) umieść kolumny w wirówce i wiruj przez 1 min przy 11 000 x g (w tym kroku suszymy kolumnę)
- n) w czasie gdy próbki się wirują przygotuj i opisz nowe probówki z wieczkiem tak samo jak w p. 1b i c.

- o) wyjmij kolumny z wirówki, przenieś **same kolumny** na podpisane probówki z wieczkiem
- p) do każdej kolumny dodaj 100 μl **buforu BE** ogrzanego do 75C
- q) odczekaj 3 min
- r) umieść kolumny w wirówce, nie zamykając wieczek probówek Eppendorfa i wiruj przez 1 min przy 11 000 x g
- s) wyjmij kolumny z wirówki, zdejmij kolumny z probówek i wyrzuć. Probówki szczelnie zamknij. Roztwór w probówkach zawiera wyizolowane DNA.

3. Pomiar stężenia i czystości uzyskanego DNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop-1000.

- a) uruchom program ND-1000;
- b) wybierz „*Nucleic Acid*”
- c) podnieś ramię NanoDropa (Rys. 1)
- d) pipetą automatyczną (białe końcówki) nanieś 1.5 μl **wody** destylowanej na podstawę urządzenia, woda powinna tworzyć wyraźną kroplę, nie rozlewać się na podstawie (Rys. 2);
- e) opuść ramię NanoDropa (Rys. 3)
- f) naciśnij <Enter>
- g) po krótkiej chwili instrument jest gotowy do kalibracji
- h) podnieś ramię i zetrzyj bibułą pozostałości wody z podstawy i ramienia (Rys. 4)
- i) nanieś 2 μl **buforu BE** i opuść ramię NanoDropa
- j) w programie naciśnij przycisk „*Blank*”
- k) po krótkiej chwili pomiar ślepej próby będzie zakończony
- l) wprowadź w programie nazwę próbki
- m) podnieś ramię i zetrzyj bibułą pozostałości wody z podstawy i ramienia
- n) nanieś 2 μl **roztworu DNA**
- o) w programie naciśnij przycisk „*Measure*”
- p) zanotuj wyniki: stężenie DNA (ng/ μl), A260/280, A230/260. (Rys. 5)

Po ćwiczeniach powinieneś(aś) potrafić wyjaśnić:

1. Jakie zjawisko wykorzystujemy przy ekstrakcji DNA metodą poznaną na ćwiczeniach?
2. Znaczenie poszczególnych etapów procedury.
3. Co to jest kontrola negatywna izolacji i dlaczego się ją stosuje?
4. Zasadę spektrofotometrycznego pomiaru stężenia DNA.
5. Znaczenie wartości A260/280 i A260/230.

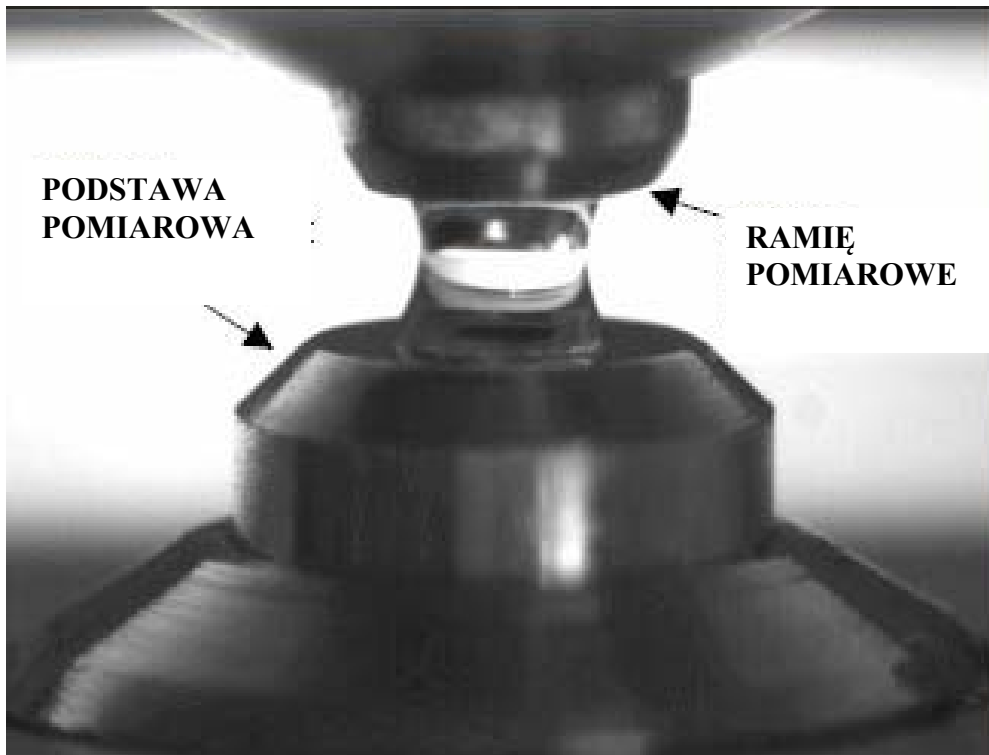
Rys. 1. Nakładanie próbki na podstawę pomiarową NanoDropa



Rys. 2. Nakładanie próbki na podstawę pomiarową NanoDropa (zbliżenie)



Rys. 3. Między górnym i dolnym ramieniem pomiarowym powstaje kolumna cieczy, która pozwala na mierzenie absorbancji.



Ryc. 4. Czyszczenie podstawy NanoDropa.



Ryc. 5. Typowy wygląd krzywej pomiaru.

