

Laboratórne cvičenie z biochémie č. 1

Téma: Extrakcia DNA z biologického materiálu

Meno a priezvisko: Dan Gašpar Pleceník, Matúš Matisko

Dátum: 7. 9. 2010

Úloha: Izolácia DNA zo vzorky biologického materiálu (mäso, sliny, zelenina, ...)

Pomôcky: kadičky, skúmavka, trojnožka, sieťka, kahan, sklená tyčinka, teplomer, roztieračka s roztieradlom, chladiaca zmes/lad, váhy

Chemikálie: ľubovoľný biologický materiál (musí obsahovať celé bunky, lepšie živočíšne), tekutý detergent (čistiaci prostriedok na riad), kuchynská soľ, ananášový džús (bromelaín – protolytický enzým)/proteáza, denaturovaný alkohol, voda

Aparatúra:

Teória: **DNA** alebo kyselina deoxyribonukleová patrí medzi 1 zo 4 základných biomolekúl – nukleovú kyselinu. Je uložená v jadre v podobe chromozómov, kde je chránená. Má tvar dlhej dvojitej pravotočivej skrutkovnice a obtáča sa okolo histónov. Skladá sa z deoxyribózy, fosfátu a 4 typov dusíkatých báz, jej úlohou je uloženie genetickej informácie – kľúču k životu a jej následné kopírovanie. Nachádza sa v každej bunke a je nevyhnutná pre jej život a rozmnožovanie.

Princíp:

V prvom kroku získame vzorku a opatrne sa snažíme čo možno najviac oddeliť jej bunky od seba (nie poškodiť!) za účelom zväčšenia aktívneho povrchu. Keďže DNA je chránená cytoplazmatickou membránou a jadrovým obalom zloženými z fosfolipidov (nerozpustné vo vode), musíme tieto membrány rozpustiť (emulgovať ?) pomocou extrakčnej zmesi obsahujúcej detergent ako nepolárne rozpúšťadlo a soľ, ktorej úlohou je eliminovať históny (bielkoviny, okolo ktorých sa obtáča DNA). Ďalej môžeme túto zmes zahriať na 60, kvôli lepšej rozpustnosti membrán a zablokovaniu enzýmov ako DNA-za, ktoré môžu degradovať DNA. Zmes je potrebné ochladiť, aby sa DNA nepolámala. Nakoniec prilejeme alkohol (nesmieme premiešať!) a začne sa nám kondenzovať vlákno DNA (pretože DNA je rozpustná vo vode, ale nie v alkohole), ktoré opatrne povytiahneme do etanolovej vrstvy, kde ju môžeme uchovať.

Postup:

I. Úprava biologického materiálu

1. Oddelíme a rozdrvíme vzorku biologického materiálu v roztieračke (podľa druhu) Umiestnime vzorky do kadičky.

II. Príprava extrakčného roztoku

1. Do kadičky zmiešame 80 ml vody a 3g kuchynskej soli
2. Sklenou tyčinkou zamiešame
3. Do kadičky pridáme 10 ml tekutého detergentu
4. Dolejeme vodu do celkového objemu 100 ml
5. Zhomogenizujeme vzorku (Snažíme sa vyhnúť vzniku peny)

III. Extrakcia DNA z buniek

1. Do kadičky zmiešame vzorku s extrakčným roztokom
2. Zahrievame na cca 60
3. Pridáme 10 ml ananásového džúsu
4. Zmes ochladíme na 0

IV. Vizualizácia a kondenzácia DNA

1. Ochladenú zmes nalejeme do skúmavky
2. Pridáme rovnaké množstvo ochladeného denaturovaného alkoholu (nemiešať !)
3. Zmes necháme 5 min, pričom môžeme vlákna DNA jemne (pozor na polámanie) jemne povytáňovať do alkoholovej vrstvy

Výsledky: V skúmavke v etanolovej vrstve môžeme pozorovať zhuk bielych vláken (môžu sa vyskytnúť aj drobné bublinky), ktoré predstavujú molekulu DNA. Týmto pokusom sa nám podarilo izolovať DNA z bunky a následne ju v alkohole skondenzovať.

Záver: Účelom pokusu bolo priblíženie metód molekulárnej biológie a forenznnej vedy.

Poznámky: Takto získanú DNA môžeme ďalej pozorovať mikroskopom alebo ju použiť na estetické účely (náhrdelník).