



Απομόνωση DNA

Δρ. Γκατζίδου Ελισάβετ
Μέλος Ε.ΔΙ.Π.

DNA



- Το DNA εντοπίζεται στον πυρήνα κάθε κυττάρου και περιέχει όλη τη γενετική πληροφορία ενός οργανισμού.
- Η μελέτη του DNA έχει ιδιαίτερη σημασία δεδομένου ότι περιέχει τα γονίδια που ελέγχουν τη δομή και τη λειτουργία του οργανισμού.

Αντιμετώπιση τριών προβλημάτων

1. Το σπάσιμο των μεμβρανών
2. Τη δράση των ενζύμων που απελευθερώνονται και είτε αναστέλλουν είτε καταστρέφουν
3. Διαδικασία της συλλογής του DNA μέσα από ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει θραύσματα μεμβρανών, πρωτεΐνες, RNA και ένζυμα

Η διαδικασία της απομόνωσης ακολουθείται ανάλογα με τον ιστό που επιλέγεται και το εργαστηριακό - τεχνικό εξοπλισμό που είναι διαθέσιμος.

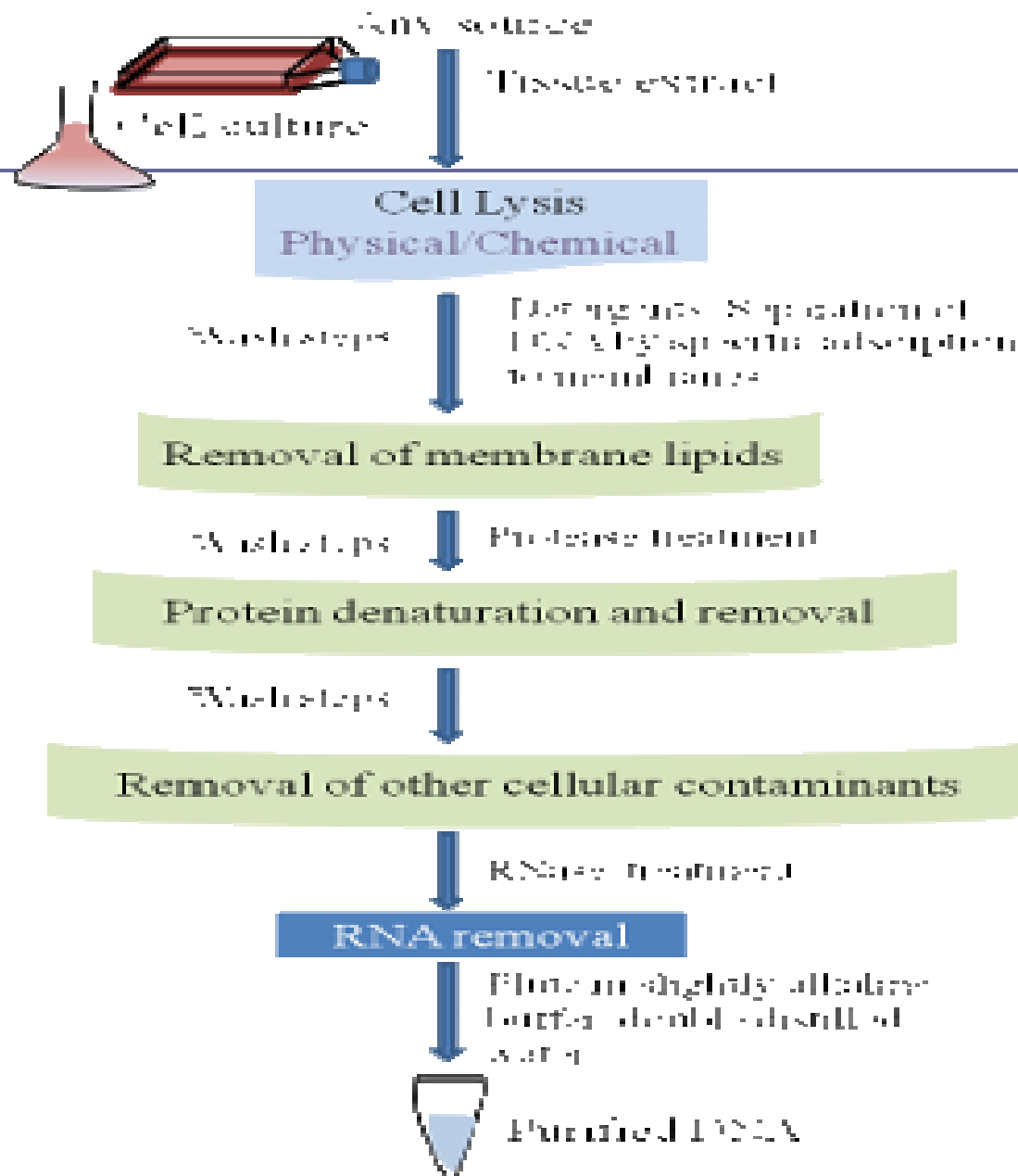
Στόχοι

- Απόδοση:
 1. Μεγάλη ποσότητα DNA
 2. Καθαρότητα
 3. Ακέραιο
- Ταχύτητα – απλή και γρήγορη διαδικασία απομόνωσης
- Αξιόπιστη και ασφαλής διαδικασία
- Οικονομική

Στάδια Απομόνωσης DNA

1. Διάσπαση συνδετικών ιστών
2. Διάρρηξη κυττάρων, κυτταροπλασματικών μεμβρανών, οργανιδίων
3. Απενεργοποίηση των νουκλεασών
4. Διαχωρισμός των νουκλεϊνικών οξέων από πρωτεΐνες
5. Απομάκρυνση RNA
6. Κατακρήμνιση DNA

DNA extraction



1. Διάσπαση Κυτταρικών Ιστών και 2. Διάρρηξη των Κυττάρων

Ομογενοποίηση

```
graph TD; A[Ομογενοποίηση] --- B[Μηχανικές Μεθόδους]; A --- C[Χημικές Μεθόδους];
```

Μηχανικές Μεθόδους

1. Μπλέντερ / Γουδί
2. Υπέρηχοι
3. Ψύξη – απόψυξη
4. Ξήρανση

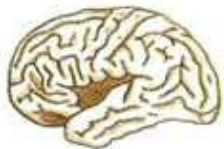
Χημικές Μεθόδους

1. Διάλυμα Λύσης
2. Απορρυπαντικά
3. Διαλύτες

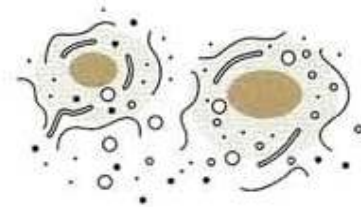
Ομογενοποίηση



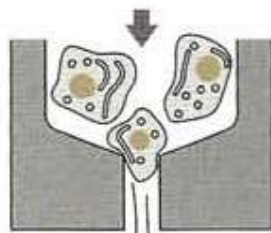
εναιώρημα
κυττάρων
ή ιστός



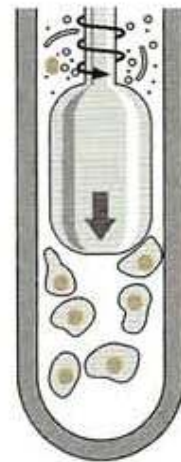
① λύση κυττάρων
με υπερήχους



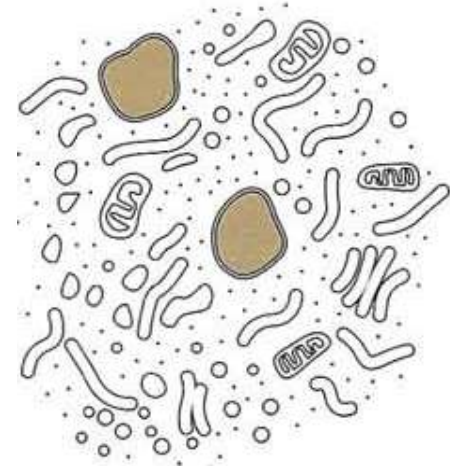
② διάνοιξη οπών στην
κυτταρική μεμβράνη με
ένα ήπιο απορρυπαντικό



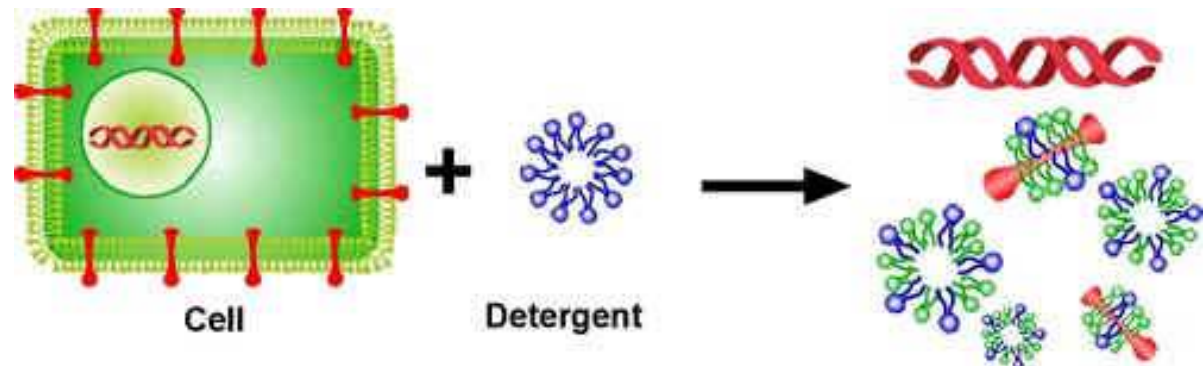
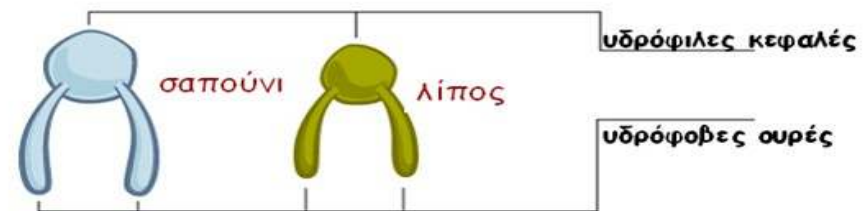
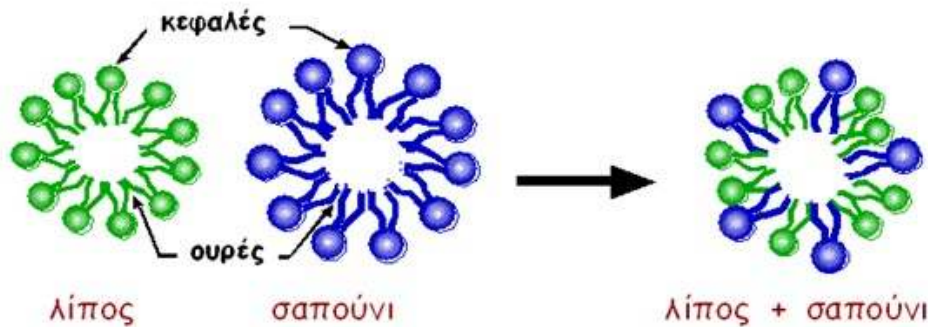
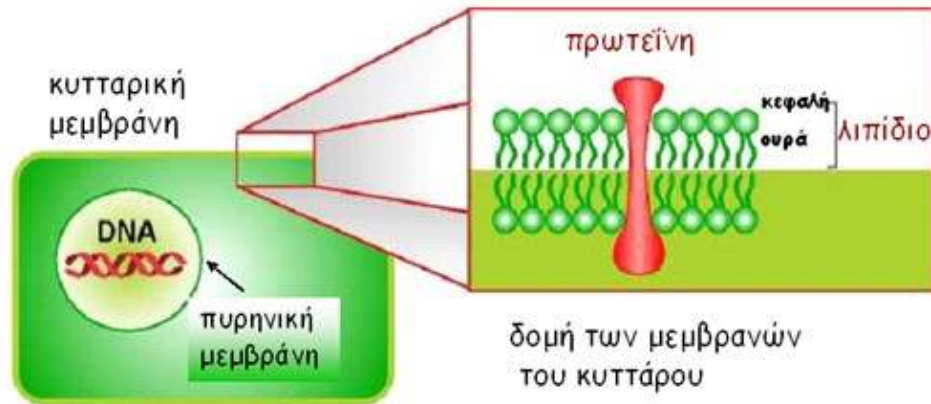
③ εξώθηση των κυττάρων
από μια μικρή οπή με
παράλληλη εφαρμογή
μεγάλης πίεσης



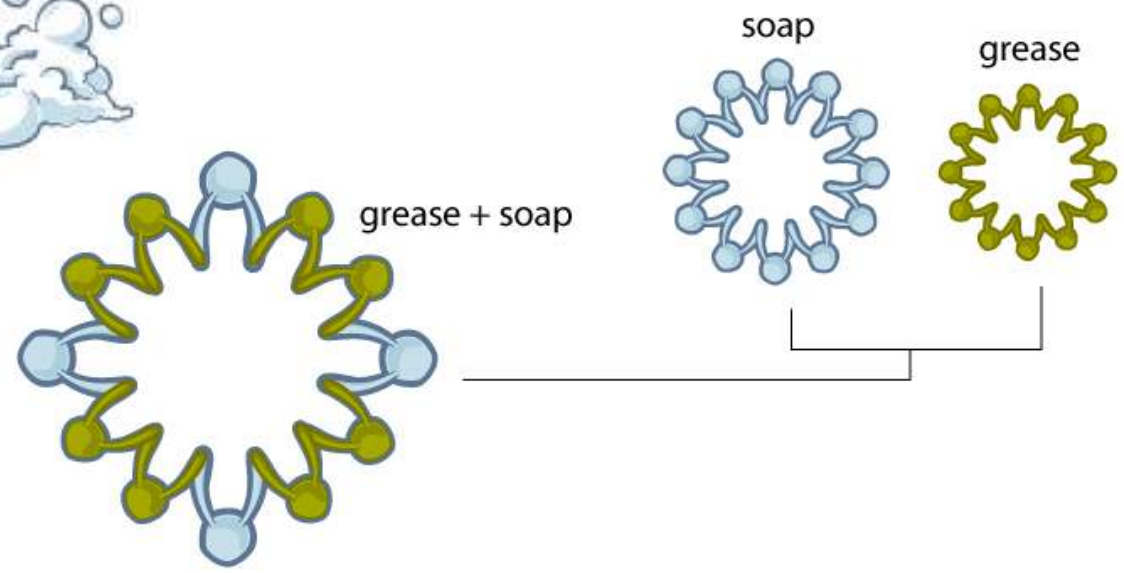
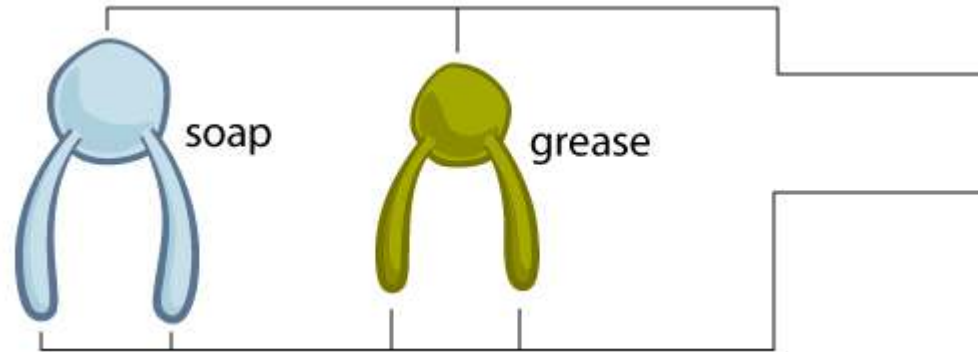
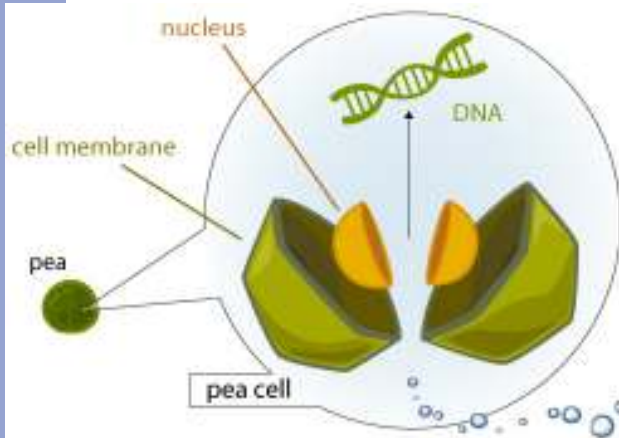
④ σύνθλιψη κυττάρων ανάμεσα
σ' ένα περιστρεφόμενο έμβολο
και στα παχιά τοιχώματα ενός
γυάλινου σωλήνα



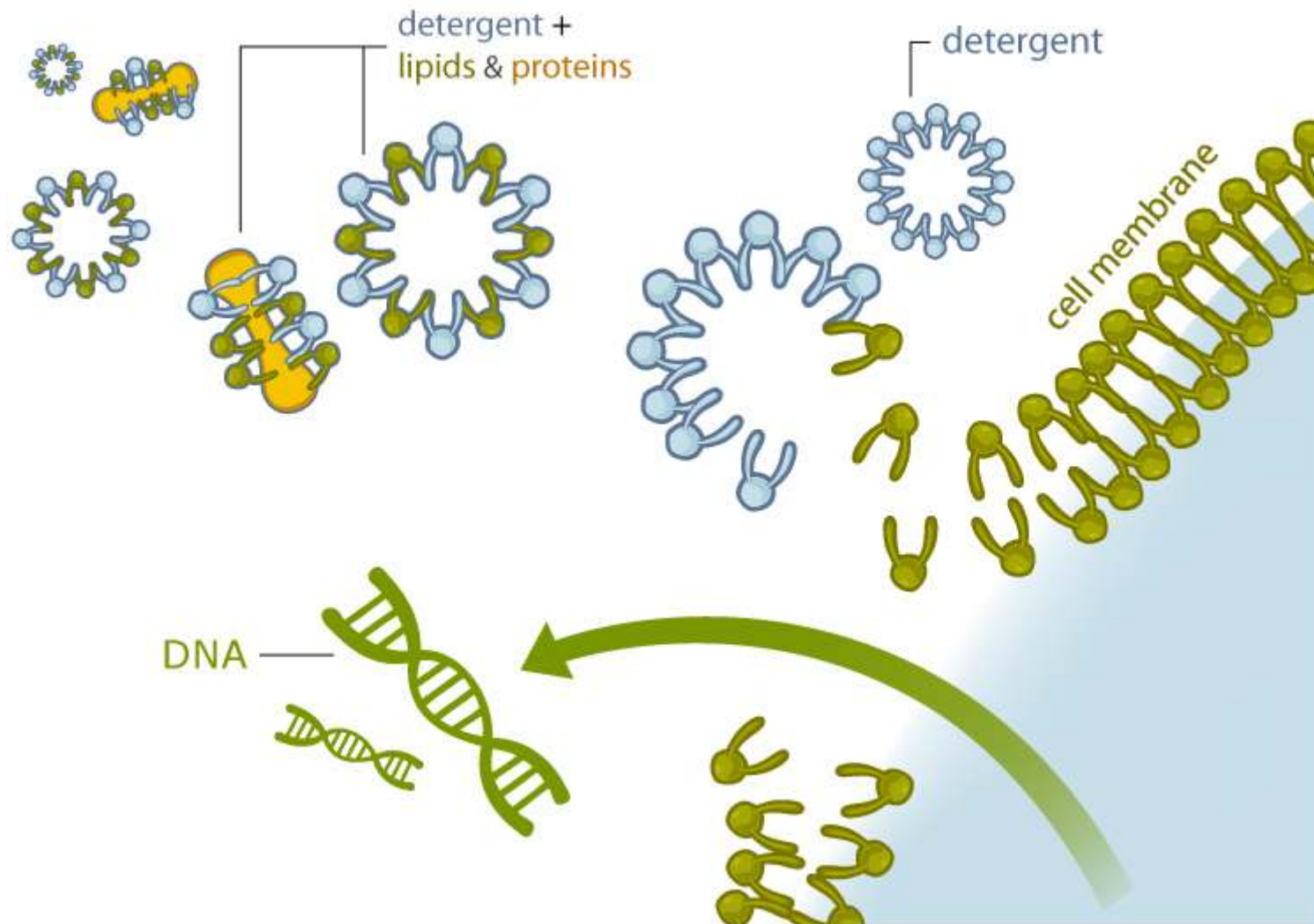
2. Χρήση απορρυπαντικών



2. Χρήση απορρυπαντικών



2. Χρήση απορρυπαντικών



3. Απενεργοποίηση των Νουκλεασών

- **EDTA**: Δεσμεύει τα ιόντα Mg^{++} , απαραίτητος συμπράγοντας για τη λειτουργικότητα των νουκλεασών.
- **Απορρυπαντικό**: επιβραδύνει τη δράση τους
- **Εργασία στον πάγο**

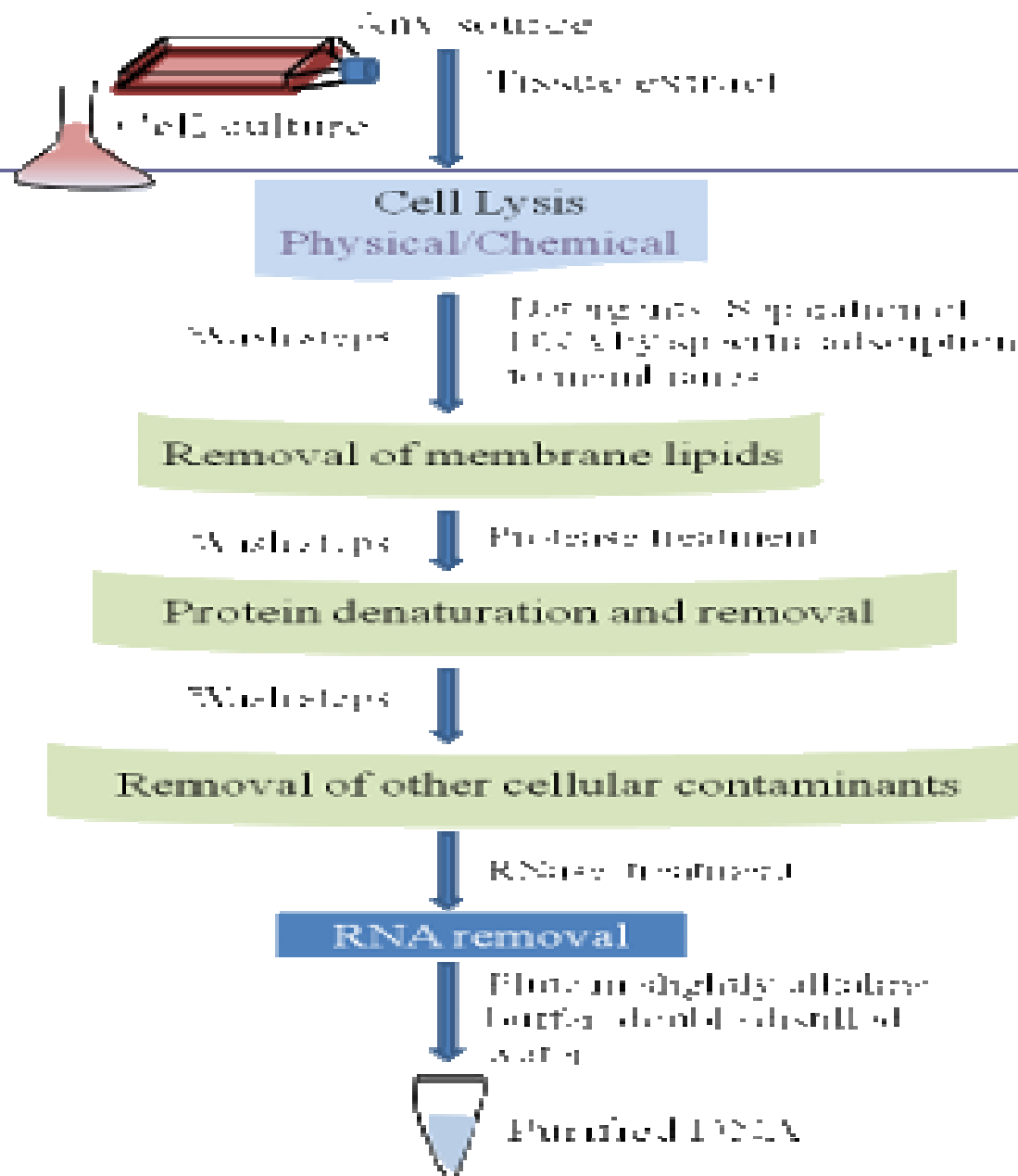
4. Διαχωρισμός Νουκλεϊνικών οξέων από πρωτεΐνες

- Ενζυμική Πέψη
- Υψηλή συγκέντρωση άλατος
- Χρήση απορρυπαντικών
- Προσθήκη φαινόλης ή χλωροφόρμιο – ισοαμυλική αλκοόλη











5.Απομάκρυνση του RNA και 6.καταβύθιση του DNA

- Η απομάκρυνση του RNA γίνεται με χρήση RNase
- Η κατακρήμνιση του DNA γίνεται με παγωμένη αλκοόλη, συνήθως ισοπροπανόλη ή αιθανόλη.

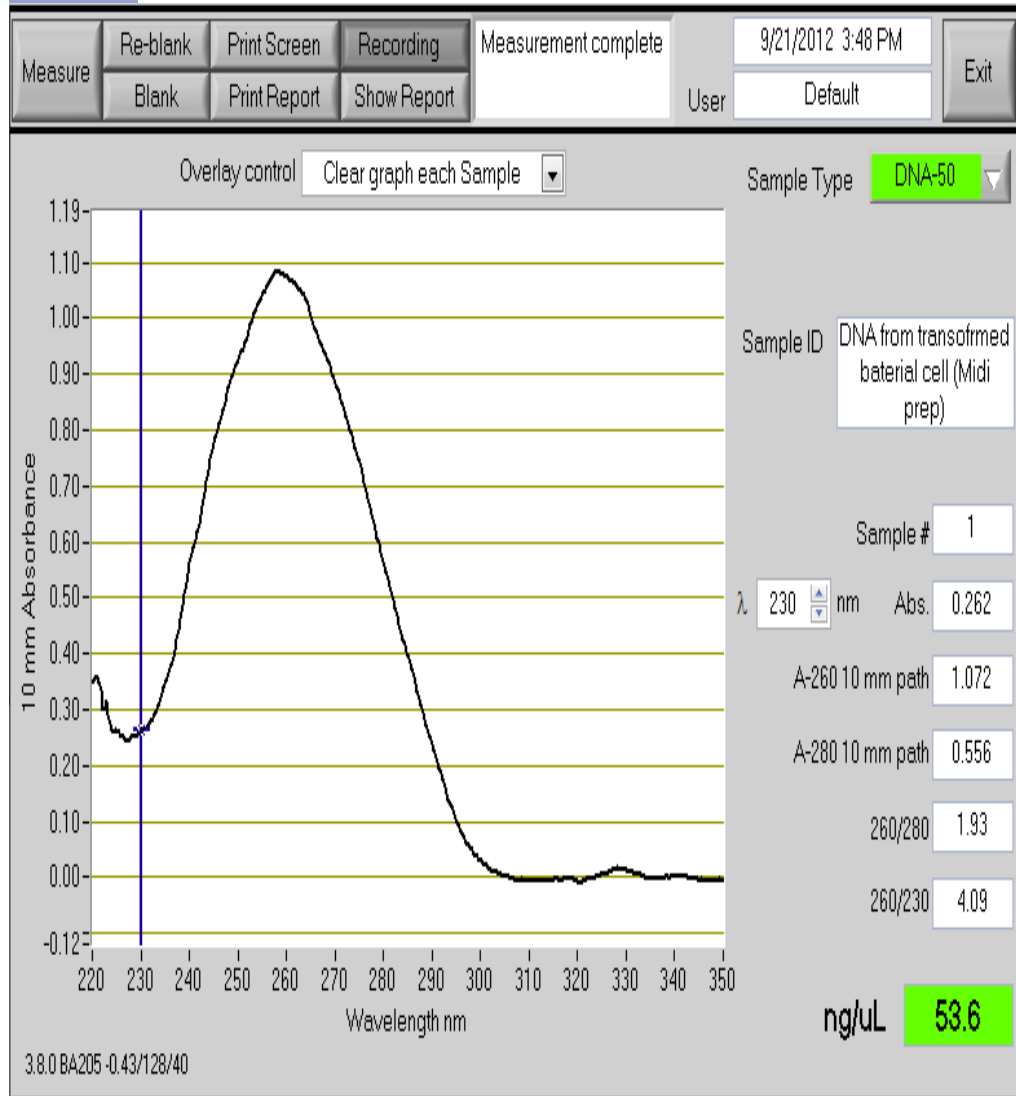
DNA extraction



NucleoSpin® Tissue

1	Prepare sample		Cut 25 mg into small pieces
2	Pre-lyse sample		180 µL T1 25 µL Proteinase K 56 °C, 1–3 h
3	Lyse sample		200 µL B3 70 °C, 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 µL 96–100% ethanol
5	Bind DNA	 	Load all 11,000 x <i>g</i> , 1 min
6	Wash silica membrane	 1 st and 2 nd 	1 st wash 500 µL BW 2 nd wash 600 µL B5 11,000 x <i>g</i> , 1 min
7	Dry silica membrane		11,000 x <i>g</i> , 1 min
8	Elute highly pure DNA	 	100 µL BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x <i>g</i> , 1 min

Φασματοφωτόμετρο



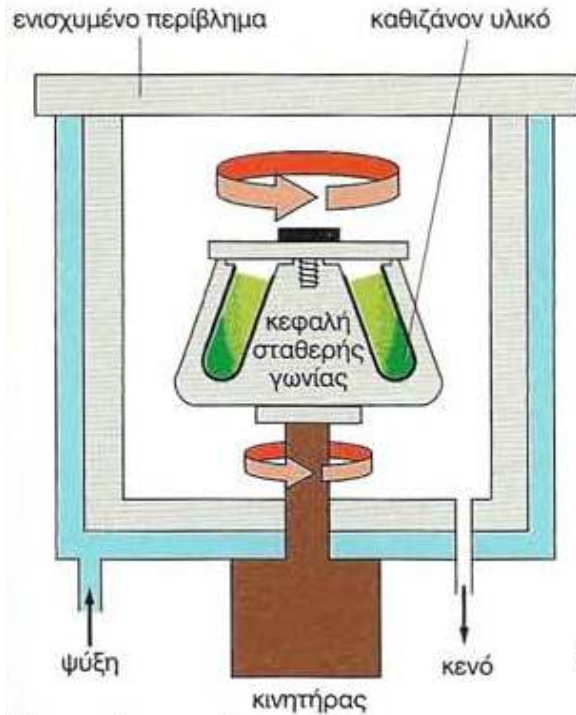
- Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA
- Έλεγχος της καθαρότητάς του



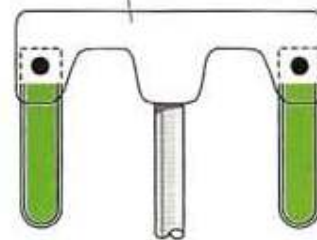
Φυγόκεντρος

- Είναι μία συσκευή, που αποτελεί εργαστηριακό εξοπλισμό και ασκεί φυγόκεντρο δύναμη σε κάθε δείγμα.
- Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ενός στερεού από ένα υγρό ή ενός υγρού από ένα άλλο υγρό διαφορετικής πυκνότητας.

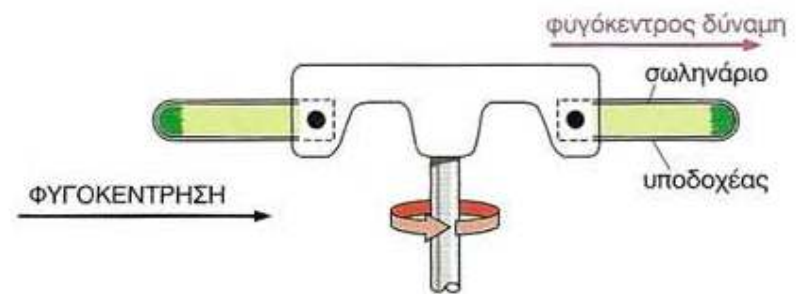
Φυγόκεντρος



κεφαλή με κινητούς βραχίονες



πολλές κλασματοποιήσεις
διενεργούνται σε κεφαλές
με κινητούς βραχίονες



οι μεταλλικοί υποδοχείς που συγκρατούν τα
σωληνάκια είναι ελεύθεροι να κινηθούν με φορά
προς τα έξω καθώς περιστρέφεται η κεφαλή

Φυγοκέντρηση

- Σε δεδομένη φυγόκεντρο δύναμη, ο διαχωρισμός συνιστάται σε καθίζηση ενός μίγματος στον πυθμένα του σωληναρίου αφήνοντας ένα υπερκείμενο εναιώρημα.
- Η καθίζηση καθορίζεται μεταξύ των άλλων, από το μέγεθος και την πυκνότητα των σωματιδίων του συστήματος.

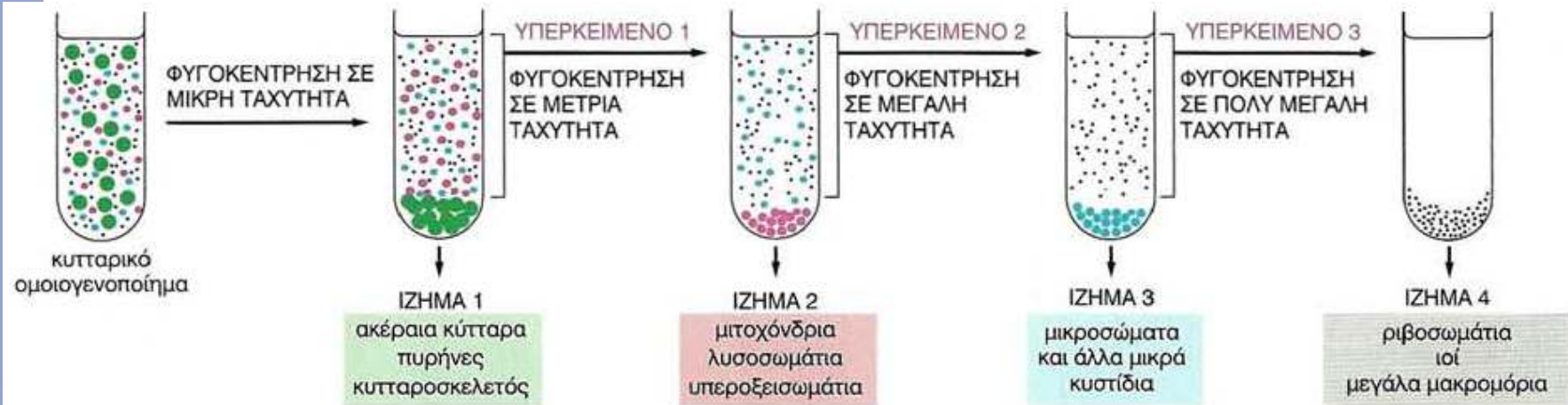


Φυγοκέντρηση

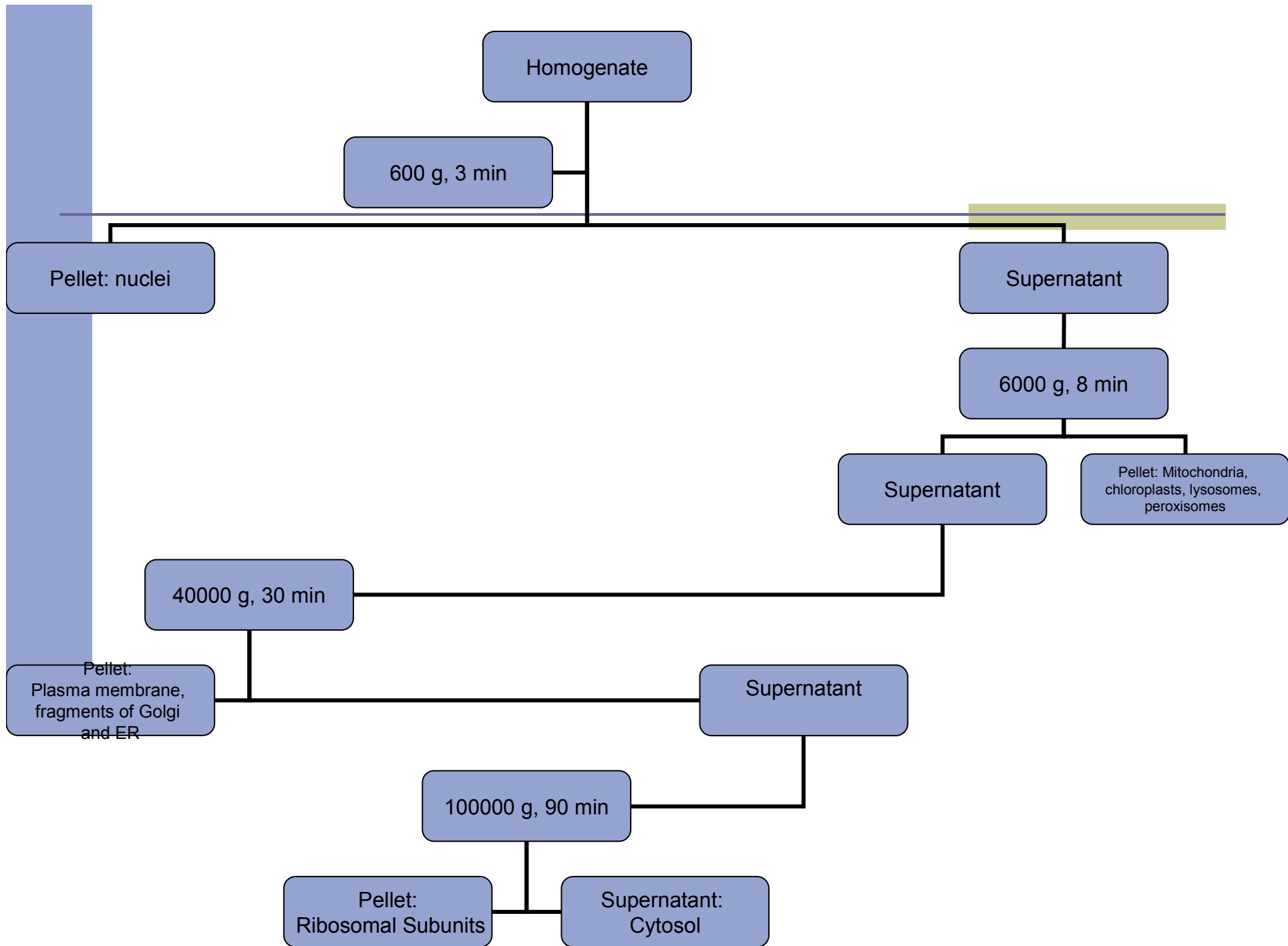
1. Διαφορική Φυγοκέντρηση (Differential centrifugation)
2. Φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας (Density gradient centrifugation)
 - Διαχωρισμός με βάση την ταχύτητα καθίζησης – Φυγοκέντρηση ταχύτητας (Velocity centrifugation)
 - Καθίζηση Ισορροπίας – Φυγοκέντρηση ισορροπίας (Equilibrium density gradient centrifugation)

Διαφορική Φυγοκέντρηση

Differential centrifugation



- Η φυγοκέντρηση διαχωρίζει τα κυτταρικά συστατικά με βάση το μέγεθος και την πυκνότητά τους.
- Τα μεγαλύτερα και πυκνότερα συστατικά δέχονται τη μεγαλύτερη φυγόκεντρο δύναμη και μετακινούνται πιο γρήγορα, καθιζάνουν στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Τα μικρότερα λιγότερο πυκνά συστατικά, παραμένουν στο εναίωμα πάνω από το ίζημα.





Επιχώρημα κυτταρικών θραυσμάτων που περιέχει υποκυτταρική σκετοσκόκη, όπως λυσοζώματα, υπεροξειδάση και θρομβίνη κυτταρικών μεμβρανών



Φυγοκέντρωση
Σχετική φυγόκεντρος δύναμη 800 x g
(10 λεπτά)



Φυγοκέντρωση υπερκερμάτων
Σχετική φυγόκεντρος δύναμη 15.000 x g
(10 λεπτά)



Φυγοκέντρωση υπερκερμάτων
Σχετική φυγόκεντρος δύναμη 100.000 x g
(60 λεπτά)



Φυγοκέντρωση υπερκερμάτων
Σχετική φυγόκεντρος δύναμη 200.000 x g
(3 ώρες)

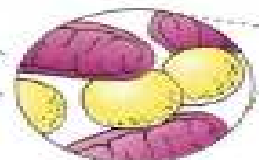


Κυτταροδιάλυμα

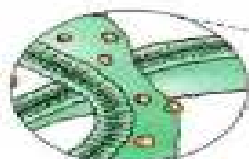
Καθίζηση των πυρήνων



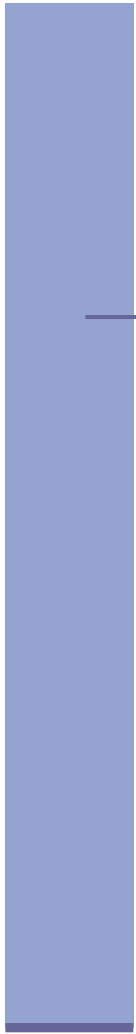
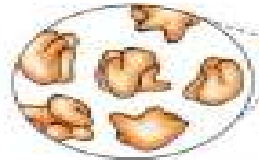
Καθίζηση των μιτοχόνδριων, των λυσοζώματων και των υπεροξειδάσεων



Καθίζηση των θραυσμάτων της κυτταροπλασματικής αβήθρας και του ενδοπλασματικού δικτύου



Καθίζηση των ριβοσωμάτων



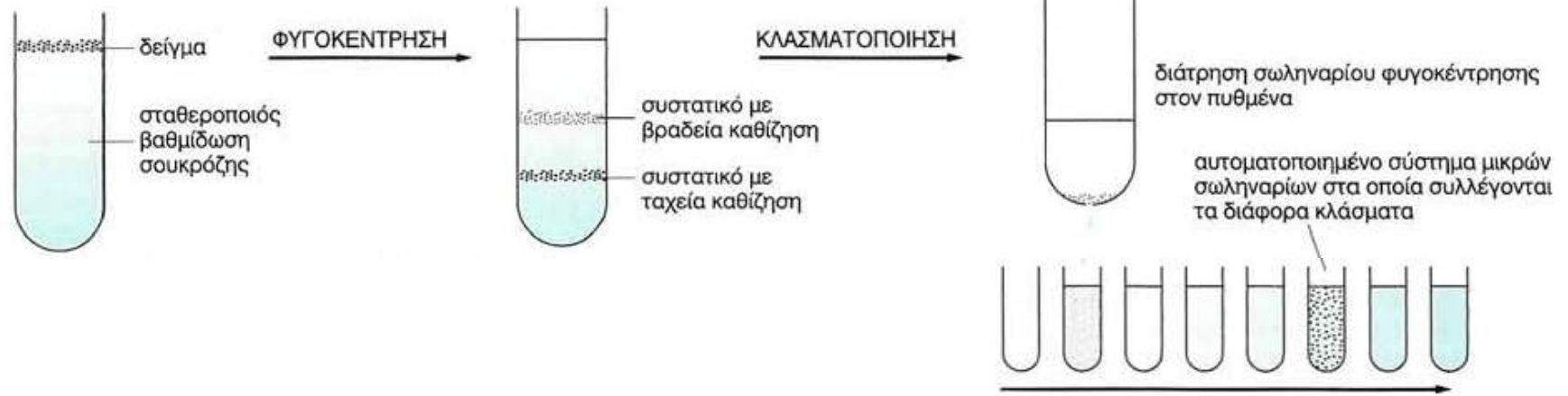
Φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας

Density gradient centrifugation

- Τα κλάσματα που προκύπτουν από τη διαφορική φυγοκέντρηση αντιστοιχούν σε εμπλουτισμένα, αλλά ακόμη όχι καθαρά, παρασκευάσματα οργανιδίων.
- Υψηλότερος βαθμός καθαρισμός είναι δυνατόν να επιτευχθεί μέσω φυγοκέντρισης σε βαθμίδωση πυκνότητας.
- Τα οργανίδια διαχωρίζονται με καταβύθιση σε ένα διάλυμα που περιέχει προοδευτικά αυξανόμενες από επάνω προς τα κάτω συγκεντρώσεις μιας ουσίας υψηλής πυκνότητας, π.χ. σουκρόζης.

Διαχωρισμός με βάση την ταχύτητα καθίζησης

Velocity centrifugation



Το δείγμα τοποθετείται στην επιφάνεια διαλύματος σακχαρόζης διαβαθμισμένης πυκνότητας.

Διάλυμα σακχαρόζης διαβαθμισμένης πυκνότητας

Φυγοκέντρωση

Σωματίδια που καθιζάνουν βραδέως

Σωματίδια διαφορετικού μεγέθους καθιζάνουν σχηματίζοντας διακριτές ζώνες.

Σωματίδια που καθιζάνουν ταχέως

Συλλογή κλασμάτων του διαλύματος διαβαθμισμένης πυκνότητας

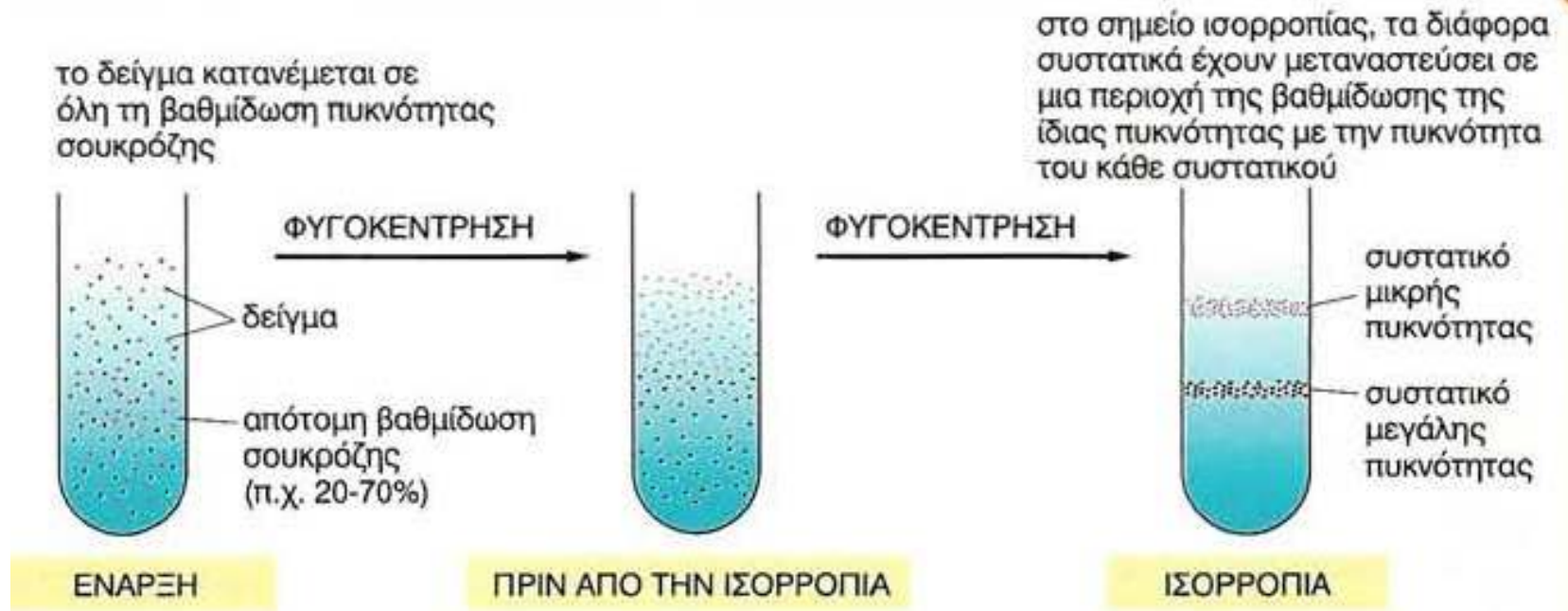
Σωματίδια που καθιζάνουν ταχέως

Σωματίδια που καθιζάνουν βραδέως



Καθίζηση Ισορροπίας

Equilibrium density gradient centrifugation



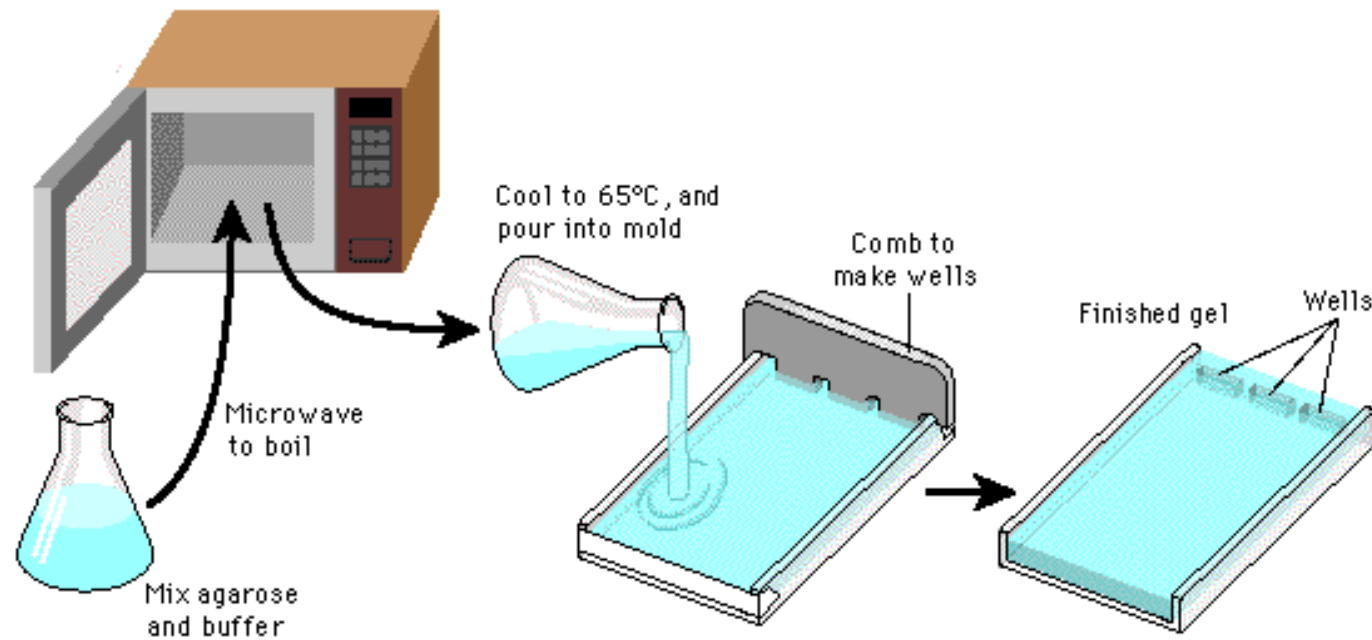
Ηλεκτροφόρηση

Βασίζεται στη μετακίνηση φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου.

Εφαρμογές:

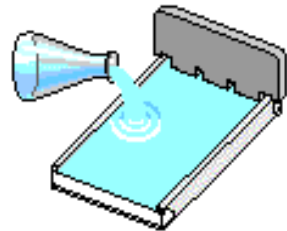
1. Διαχωρισμό μακρομορίων
2. Στον έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος
3. Στον ποσοστικό και ποιοτικό έλεγχο
4. Στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους

Πήκτωμα Αγαρόζης

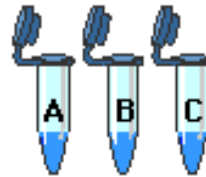


Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

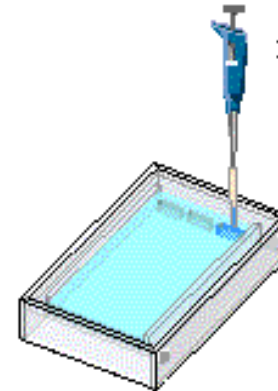
1. Make gel.



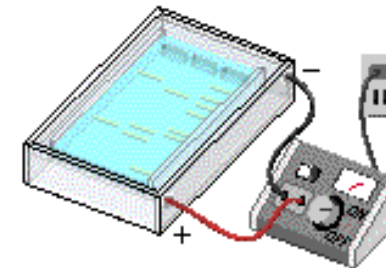
2. Obtain prepared DNA samples.



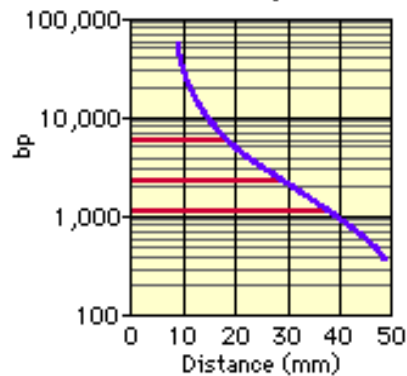
3. Load samples into gel.



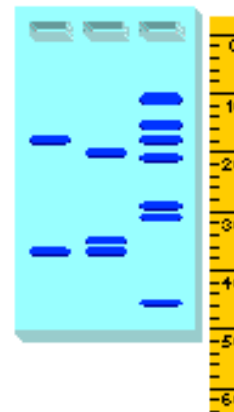
4. Separate fragments by electrophoresis.



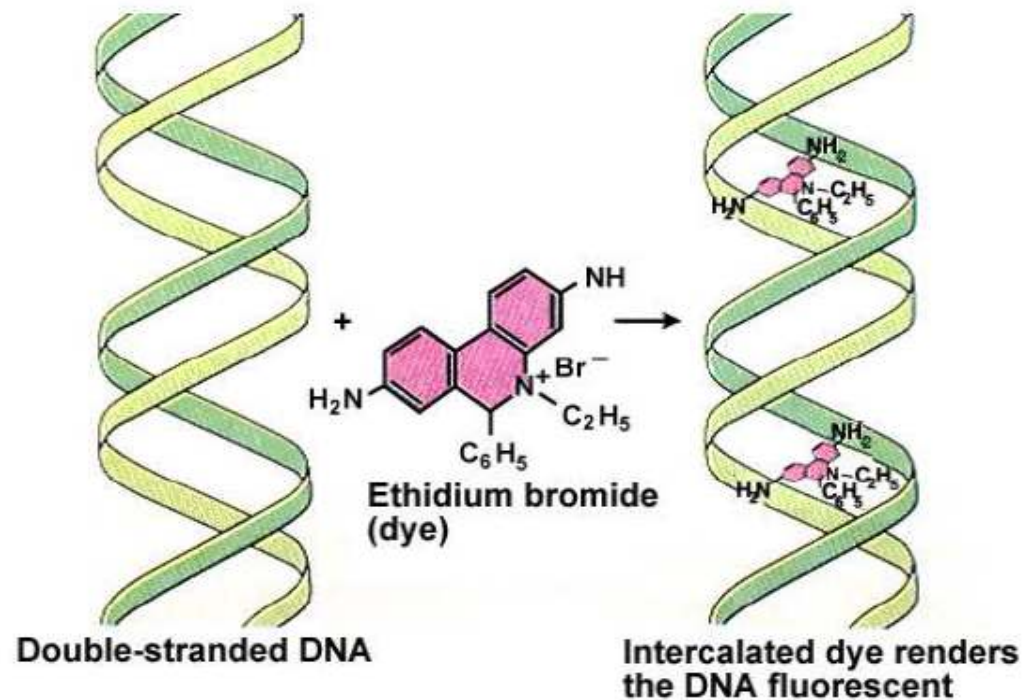
6. Prepare a standard curve.
Determine fragment sizes.



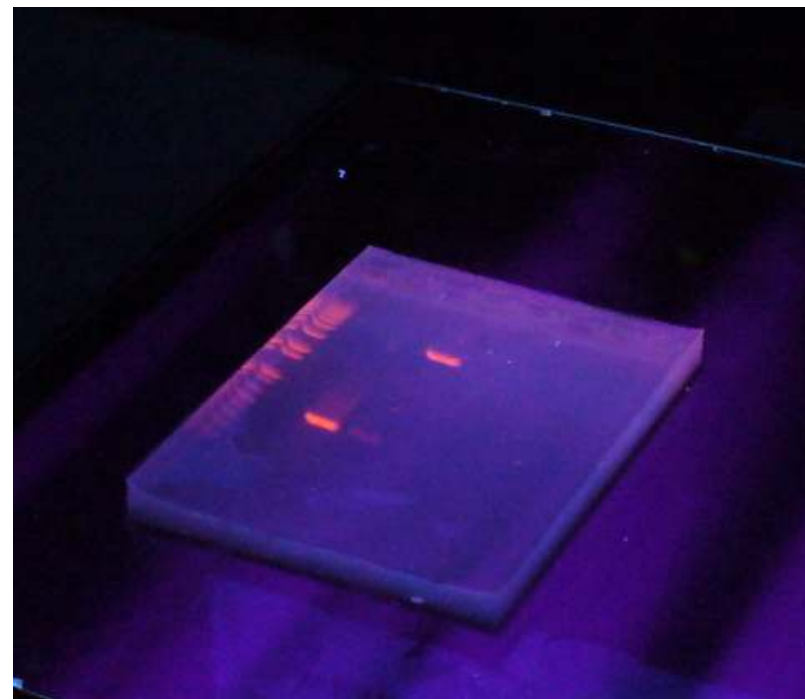
5. Stain DNA fragments and measure distances.



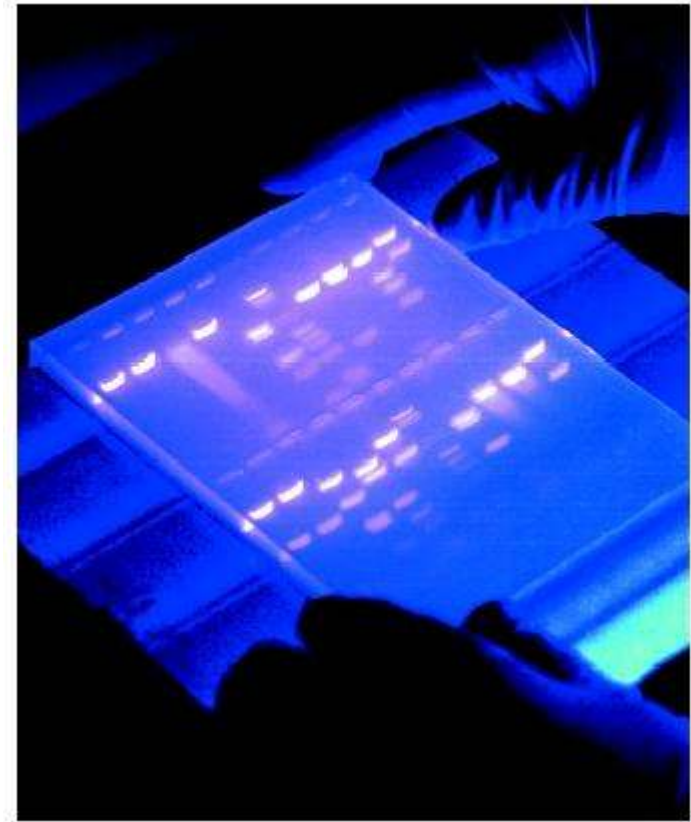
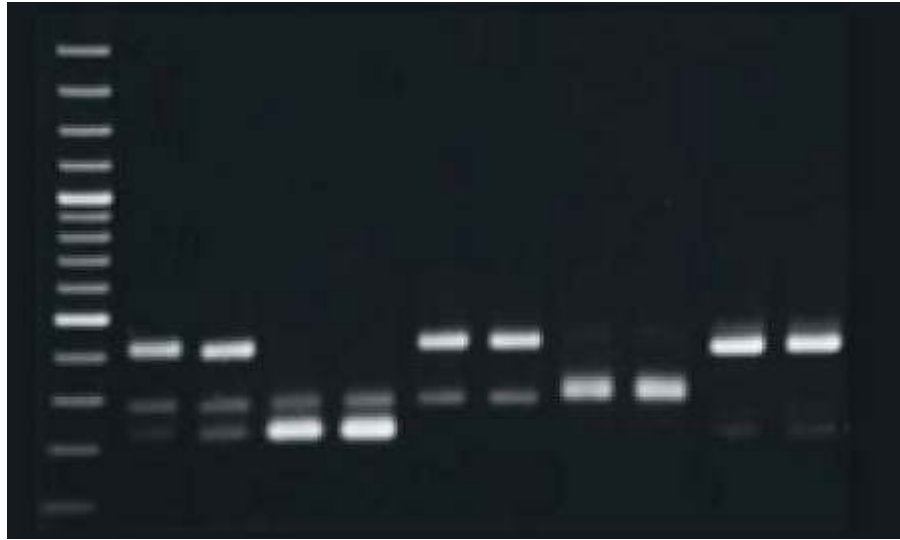
Βρωμιούχο Αιθίδιο [EtBr]



Χωρίς UV και με UV



Ηλεκτροφόρηση DNA



Ηλεκτροφόρηση μετά την Απομόνωση DNA

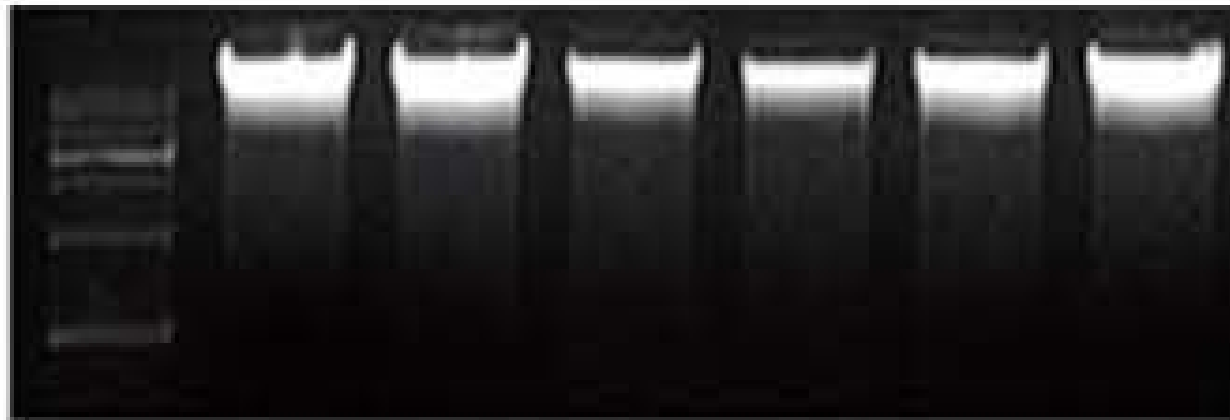


Fig 1. Genomic DNA was purified from 300 μ l of whole blood using the WizPrep™ DNA Extraction Kit (Blood). 7 μ l of the eluate (elution volume 100 μ l) were analyzed on a 1.5% agarose gel. Marker : 1kb DNA ladder.

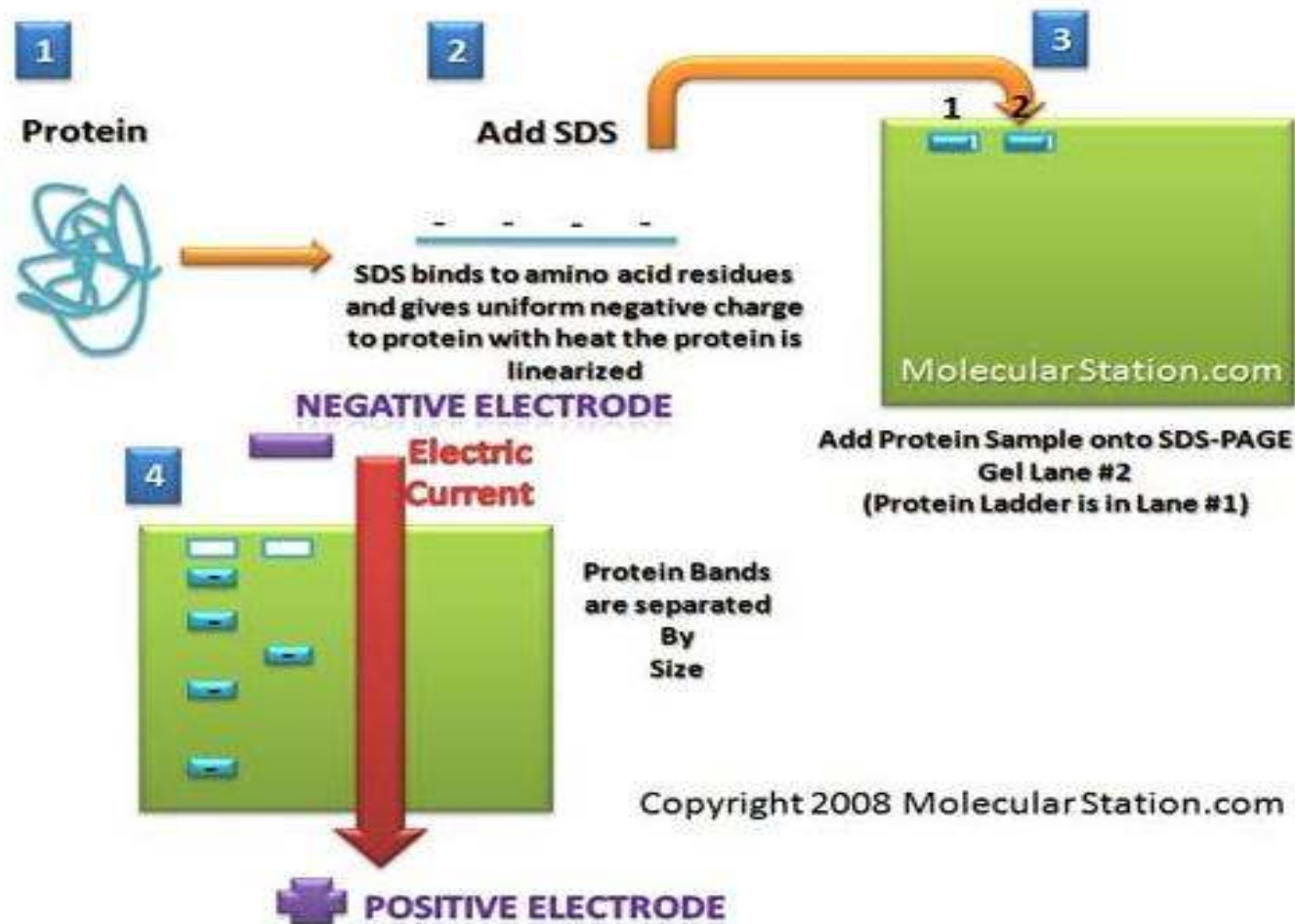
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

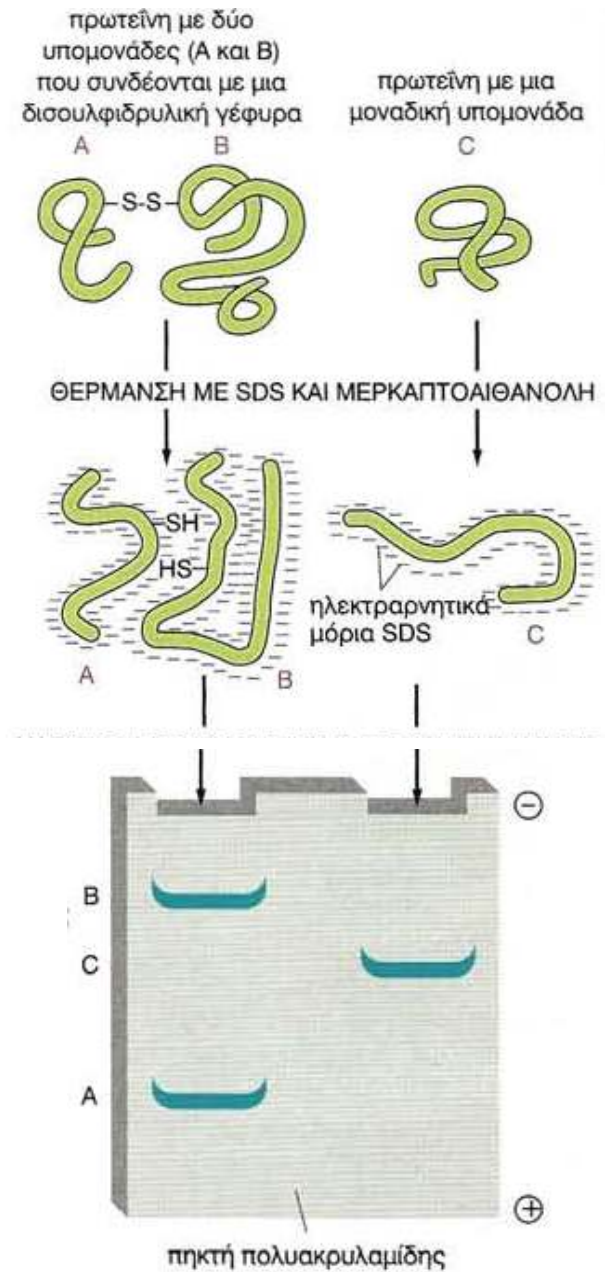
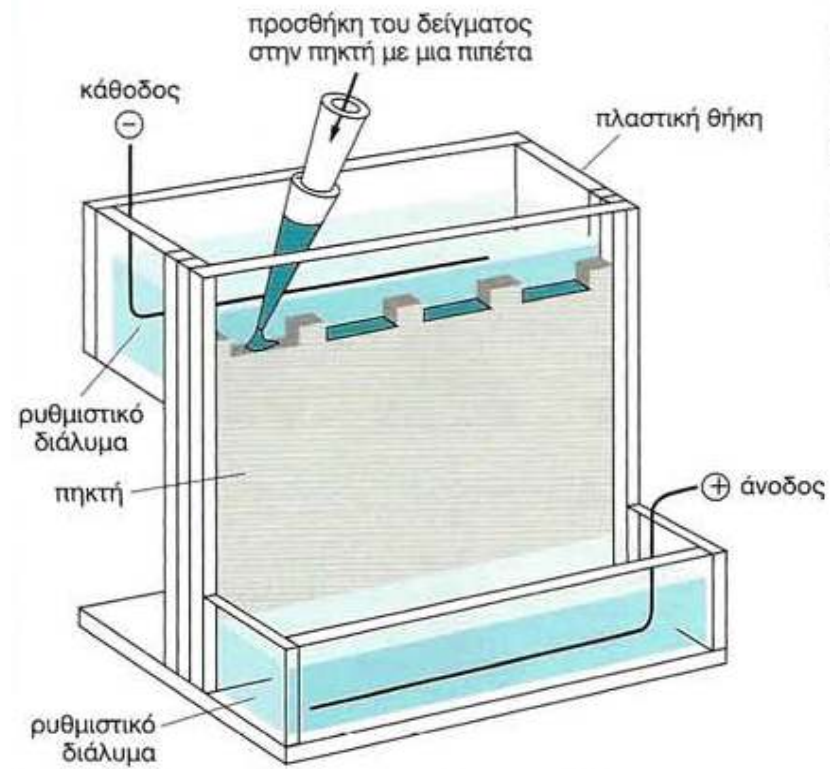
Εφαρμογές:

- Στον βαθμό καθαρότητας
- Στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους
- Στον προσδιορισμό του αριθμού των πολυπεπτιδικών αλυσίδων

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης – SDS (SDS-PAGE)

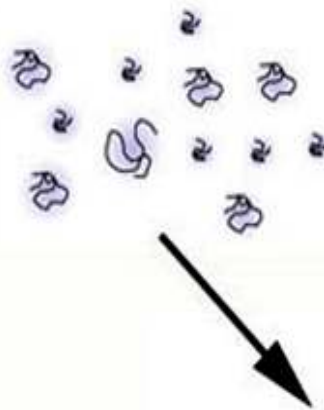
PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS METHOD





SDS-PAGE

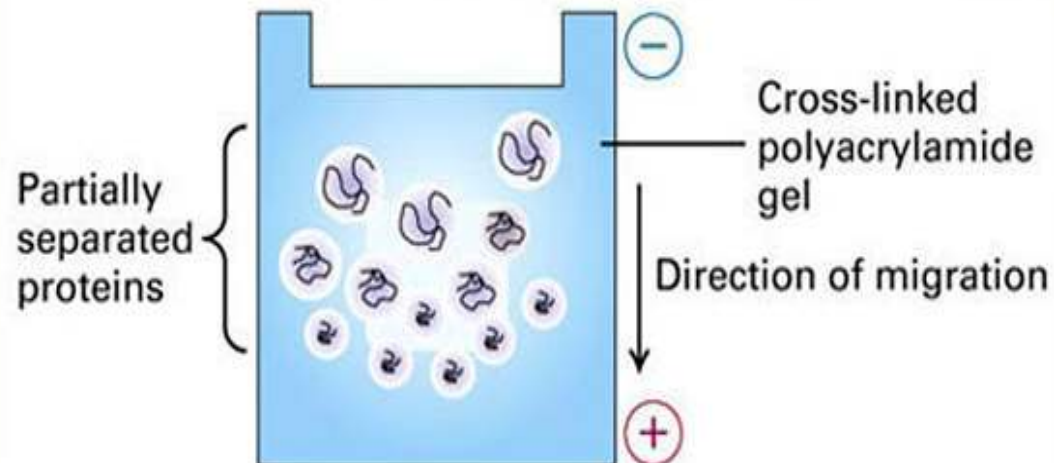
1 Denature sample with sodium dodecylsulfate



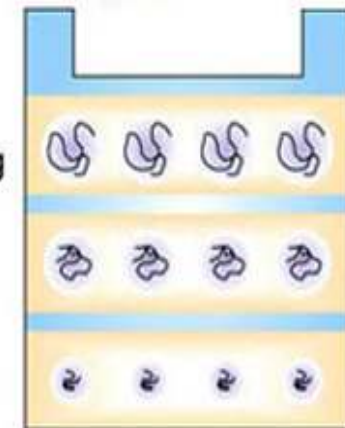
SDS-coated proteins

SDS is an ionic detergent that binds stoichiometrically to number of peptide bonds, thus separates on basis of size (MW).

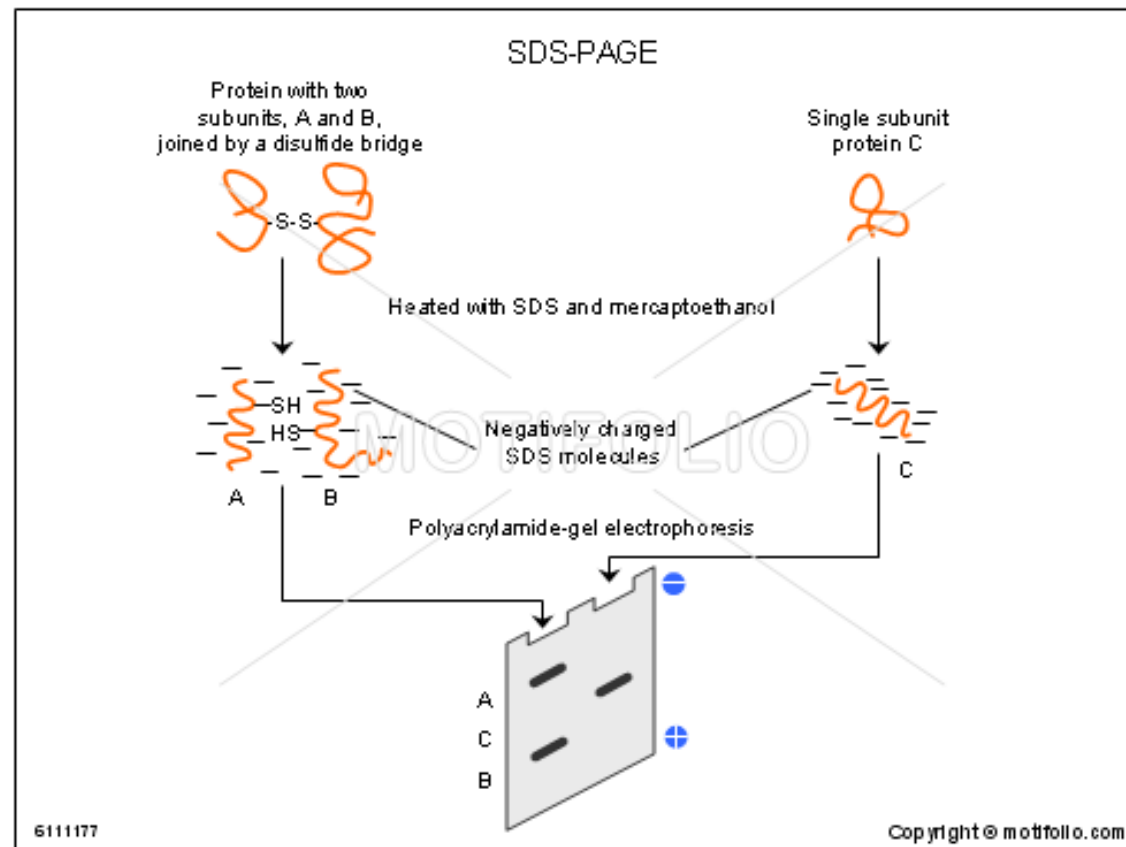
2 Place mixture of proteins on gel, apply electric field



3 Stain to visualize separated bands



SDS-PAGE



SDS-PAGE

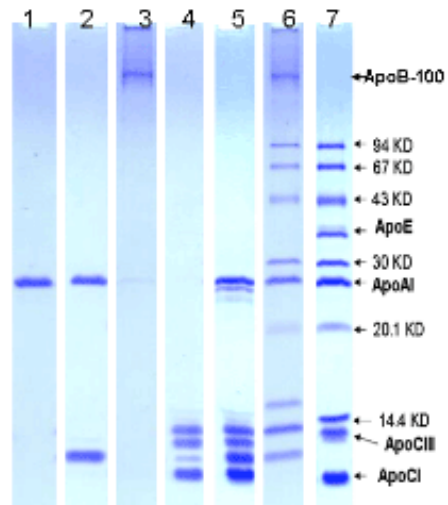


Figure 1: SDS PAGE of Apoprotein Standard on a 18% gel (12 wells, Invitrogen) with 30 mA and 65 minutes; Lane 1 to lane 7 represents Item SP1 to Sp7, respectively.

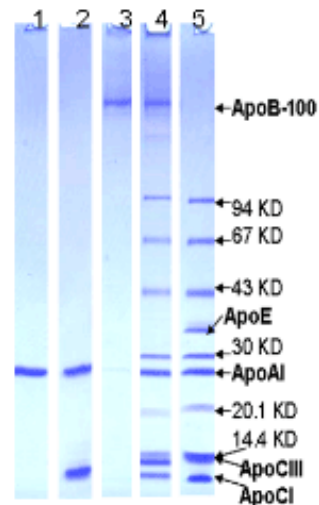
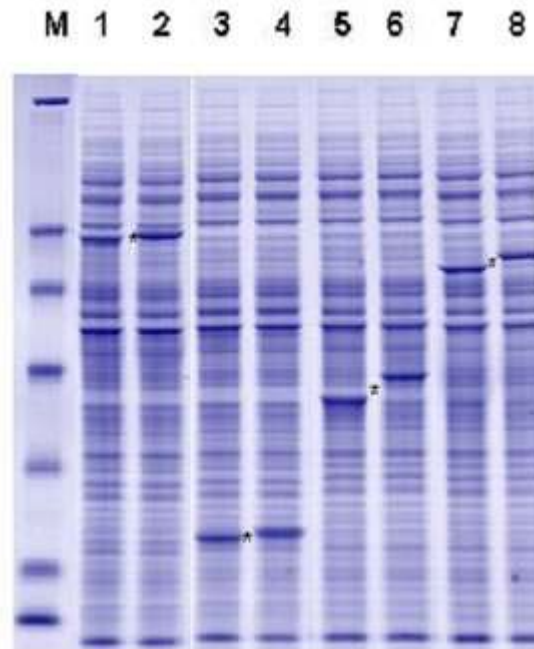


Figure 2: SDS PAGE of Apoprotein Stand on a 4-20% gel (10 wells, Invitrogen) with 30 and 60 minutes; Lane 1, 2, 3, 4, and 5 represent Item SP1, SP2, SP3, SP6, and SP7, respectively.

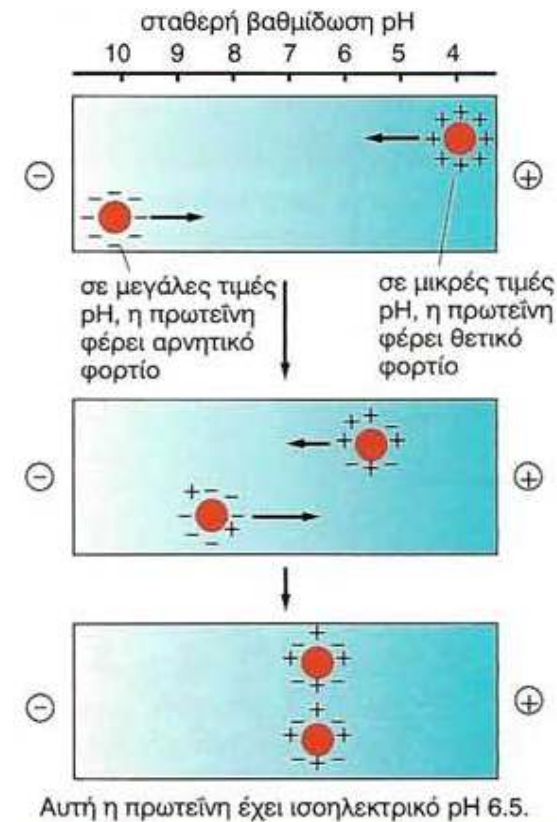


M: Marker proteins
1,2: glucuronidase
3,4: survivin,
5,6: human kinase,
7,8: receptor protein.
 lanes 1,3,5,7: C-terminal His₆ tag
 lanes 2,4,6,8: N-terminal His₆ tag

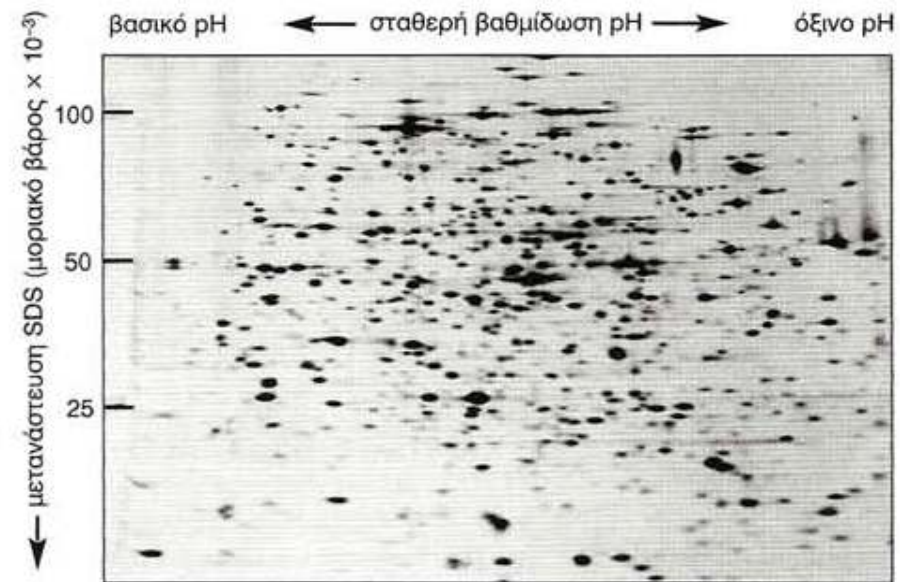
Total reaction aliquots
 Coomassie-stained SDS-PAGE gel

Ισοηλεκτρική Εστίαση

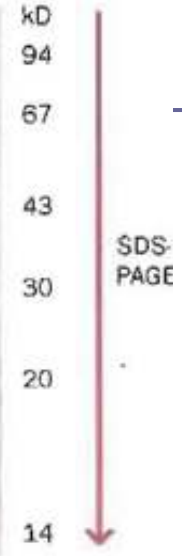
- Ισοηλεκτρικό σημείο είναι το σημείο στο οποίο το ολικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι ουδέτερο.



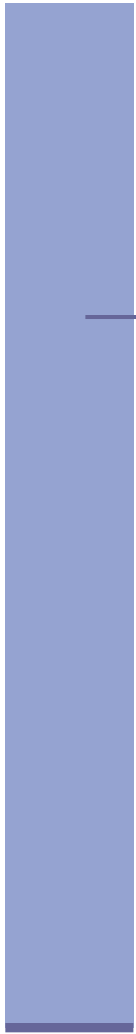
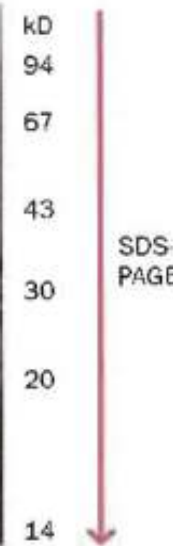
Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2D - PAGE



(A) ← isoelectric focusing → pH 12
pH 3



(B) ← isoelectric focusing → pH 6
pH 5



DNA extraction in the kitchen



Βιβλιογραφία

- Σημειώσεις 1^{ου} Εργαστηρίου (Απομόνωση DNA από ζωϊκό ιστό)
- Σημειώσεις 2^{ου} Εργαστηρίου (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης) **!!!Προσοχή!!!**
Μόνο ότι αφορά την Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- Cooper GM και Hausman RE, Το κύτταρο, Τόμος 1, Κεφάλαιο 1, Υποκυτταρική Κλασμάτωση, σελ. 46-50
- Alberts, Τόμος 1, Κεφάλαιο 4, Παράρτημα 4-3, 4-4, 4-5, σελ. 192-194.

Videos

- Using a Micropipette – University of Leceister
https://youtu.be/uEy_NGDfo_8
- Making an Agarose Gel – University of Leceister
<https://youtu.be/wXiiTW3pflM>
- Running an Agarose Gel – University of Leceister
https://youtu.be/U2-5ukpKg_Q
- Agarose Gel Electrophoresis Animation – Biology with Animations
<https://youtu.be/saJIWFUGebw>



Ευχαριστώ

Καλό Σαββατοκύριακο

Χρωματογραφία Στήλης

- Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν σύμφωνα με το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, τον υδρόφοβο χαρακτήρα και τη συγγένειά τους για άλλα μόρια.
- Τρία είδη χρωματογραφίας:
 1. Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία
 2. Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή
 3. Χρωματογραφία χημικής συγγένειας

Χρωματογραφία Στήλης

