



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.

Απομόνωση DNA

Είναι η διαδικασία εξαγωγής του DNA από διάφορα δείγματα.

Γιατί να απομονώσω DNA;

1. Άριστη πρώτη ύλη για πειράματα Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας.
2. Απομονώνεται εύκολα από πολλές πηγές.
3. Είναι εξαιρετικά σταθερό.
4. Διατηρείται για μεγάλο διάστημα σε συνθήκες απλής κατάψυξης (-30°C).

Απόμονωση DNA



- 1869 – Friedrich Miescher
- Ονόμασε την ουσία που βρήκε σε πυρήνες από λευκά αιμοσφαίρια ψαριών «Νουκλεΐνη».

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

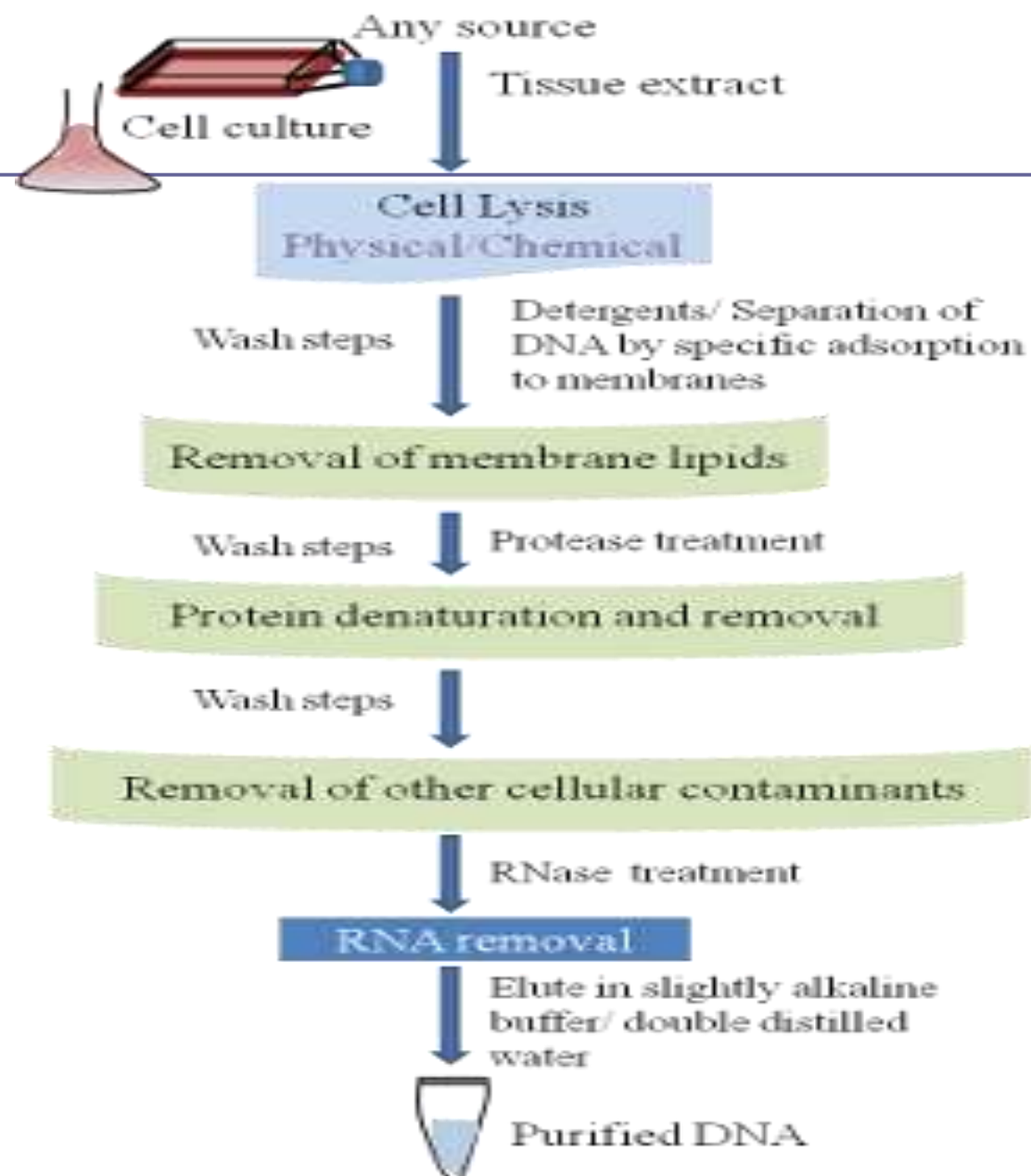
Μέθοδοι Απομόνωσης DNA

- με τη χρήση απλών χημικών αντιδραστηρίων
- με τη χρήση προκατασκευασμένων αντιδραστηρίων (kit)
- με αυτοματοποιημένα συστήματα απομόνωσης DNA (τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων)

Στάδια Απομόνωσης DNA

1. Διάσπαση συνδετικών ιστών
2. Διάρρηξη κυττάρων, κυτταροπλασματικών μεμβρανών, οργανιδίων
3. Απενεργοποίηση των νουκλεασών
4. Διαχωρισμός των νουκλεϊϊκών 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];
```

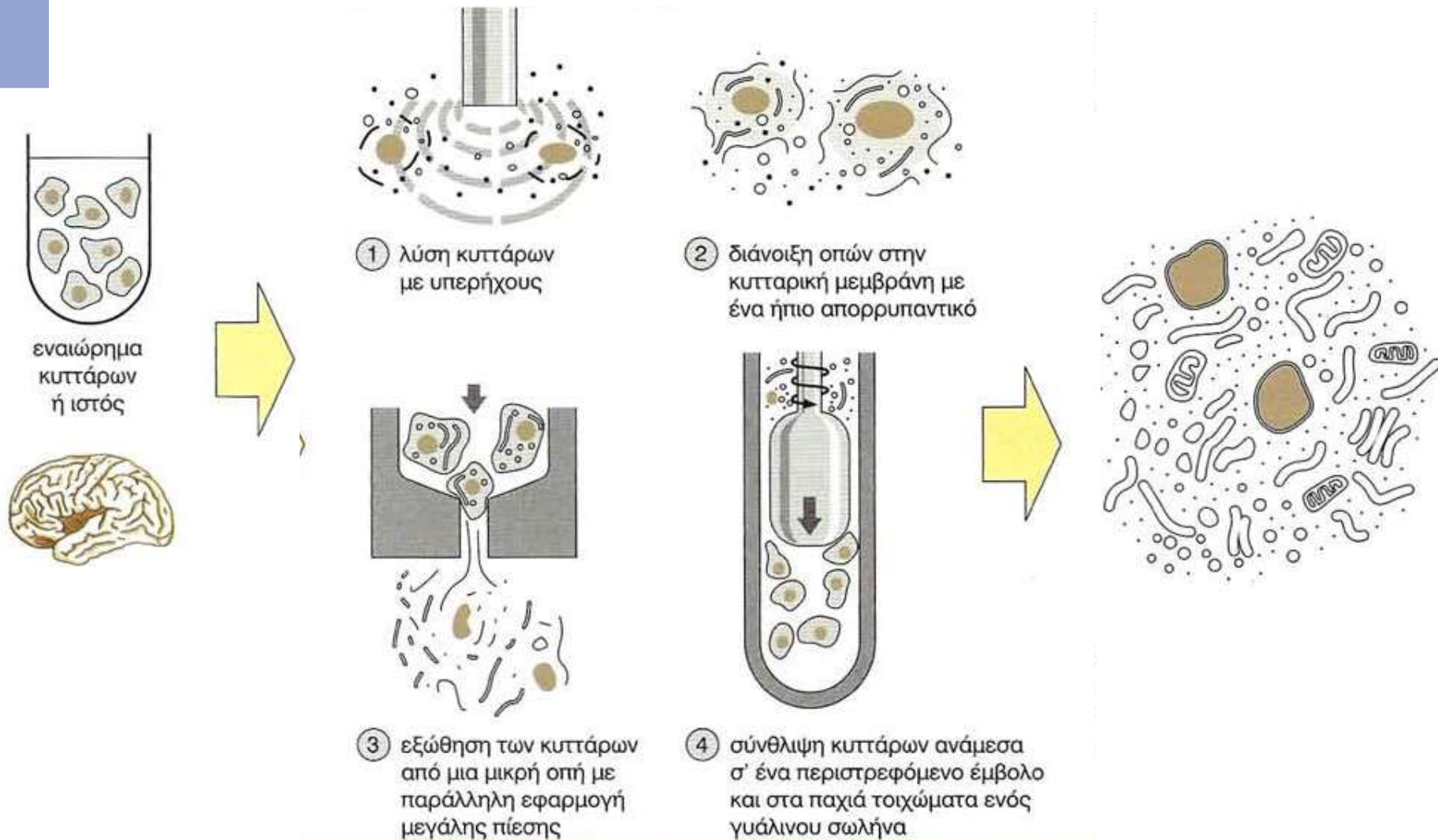
Μηχανικές Μεθόδους

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

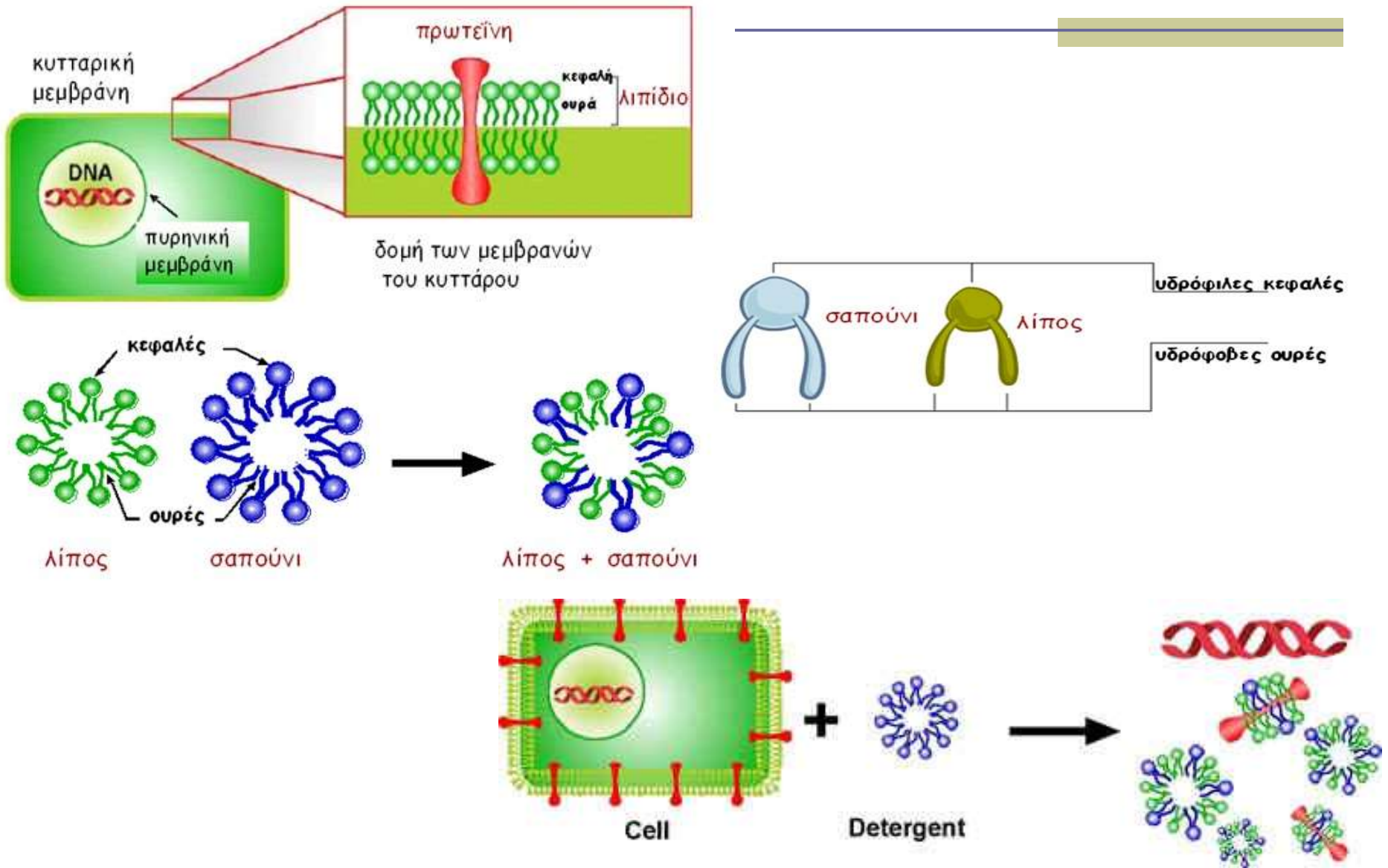
Χημικές Μεθόδους

1. Διάλυμα Λύσης
2. Απορρυπαντικά
3. Διαλύτες

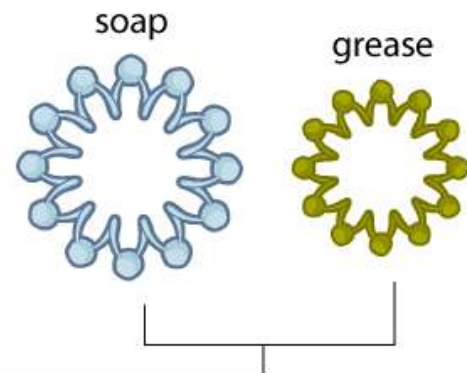
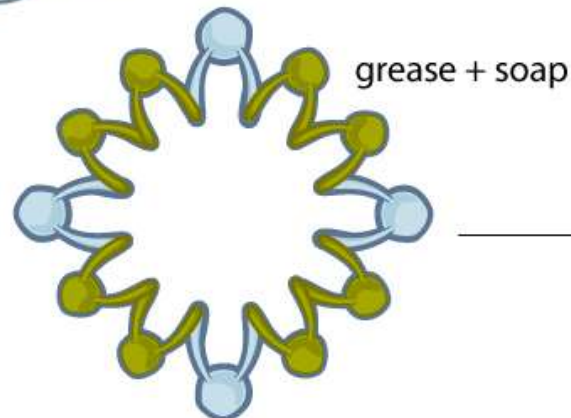
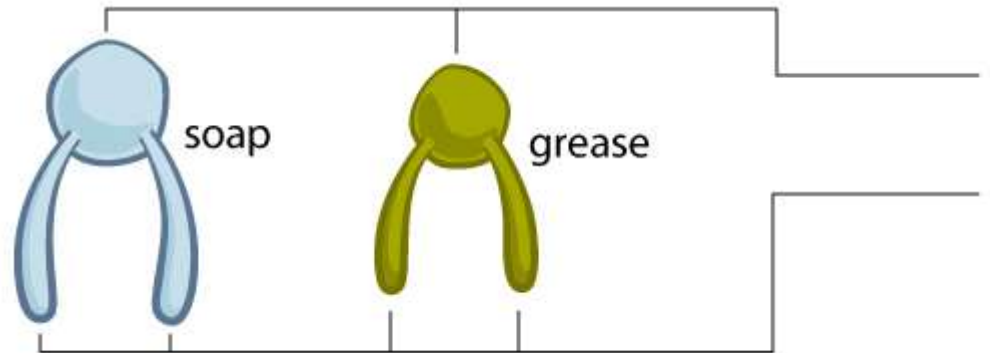
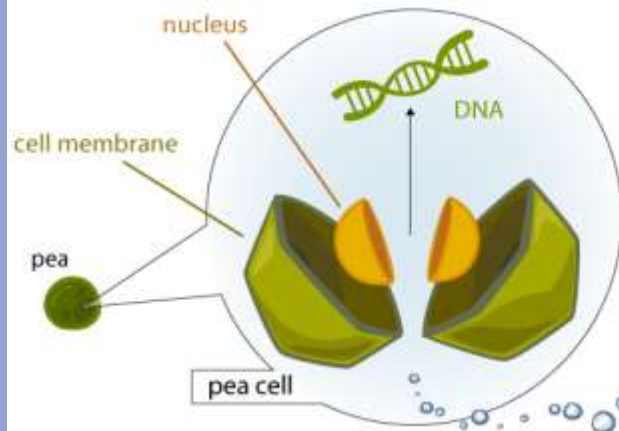
Ομογενοποίηση



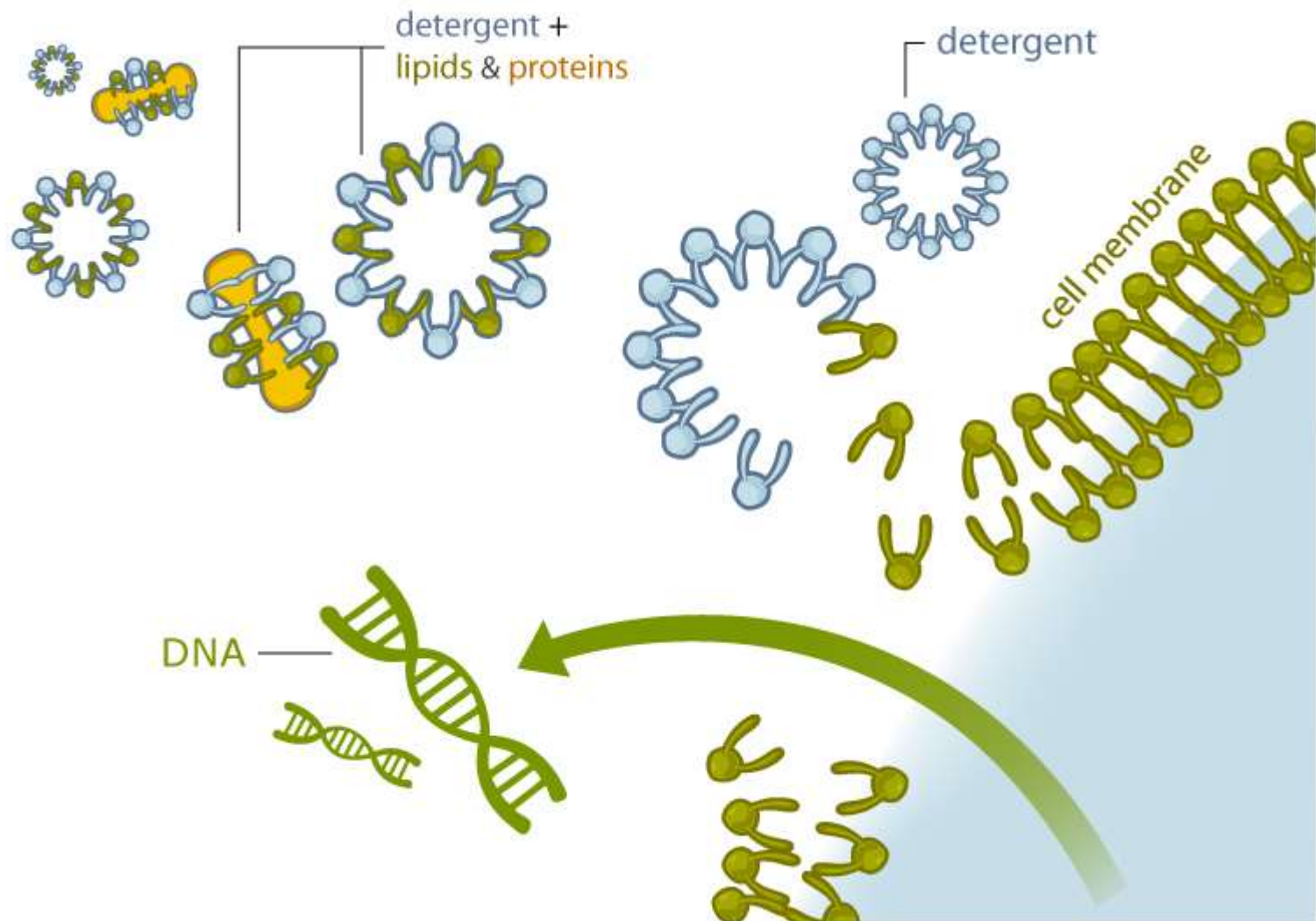
2. Χρήση απορρυπαντικών



2. Χρήση απορρυπαντικών



2. Χρήση απορρυπαντικών



3. Απενεργοποίηση των Νουκλεασών

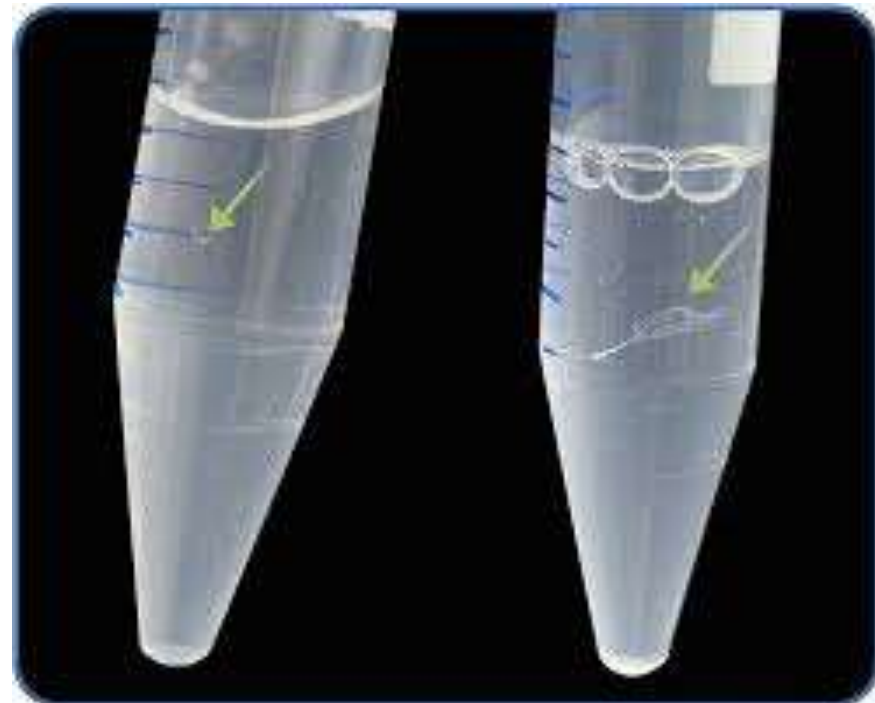
- **EDTA**: Δεσμεύει τα ιόντα Mg^{++} , απαραίτητος συμπράγοντας για τη λειτουργικότητα των νουκλεασών.
- **Απορρυπαντικό**: επιβραδύνει τη δράση τους
- **Εργασία στον πάγο**

4. Διαχωρισμός Νουκλεϊνικών οξέων από πρωτεΐνες

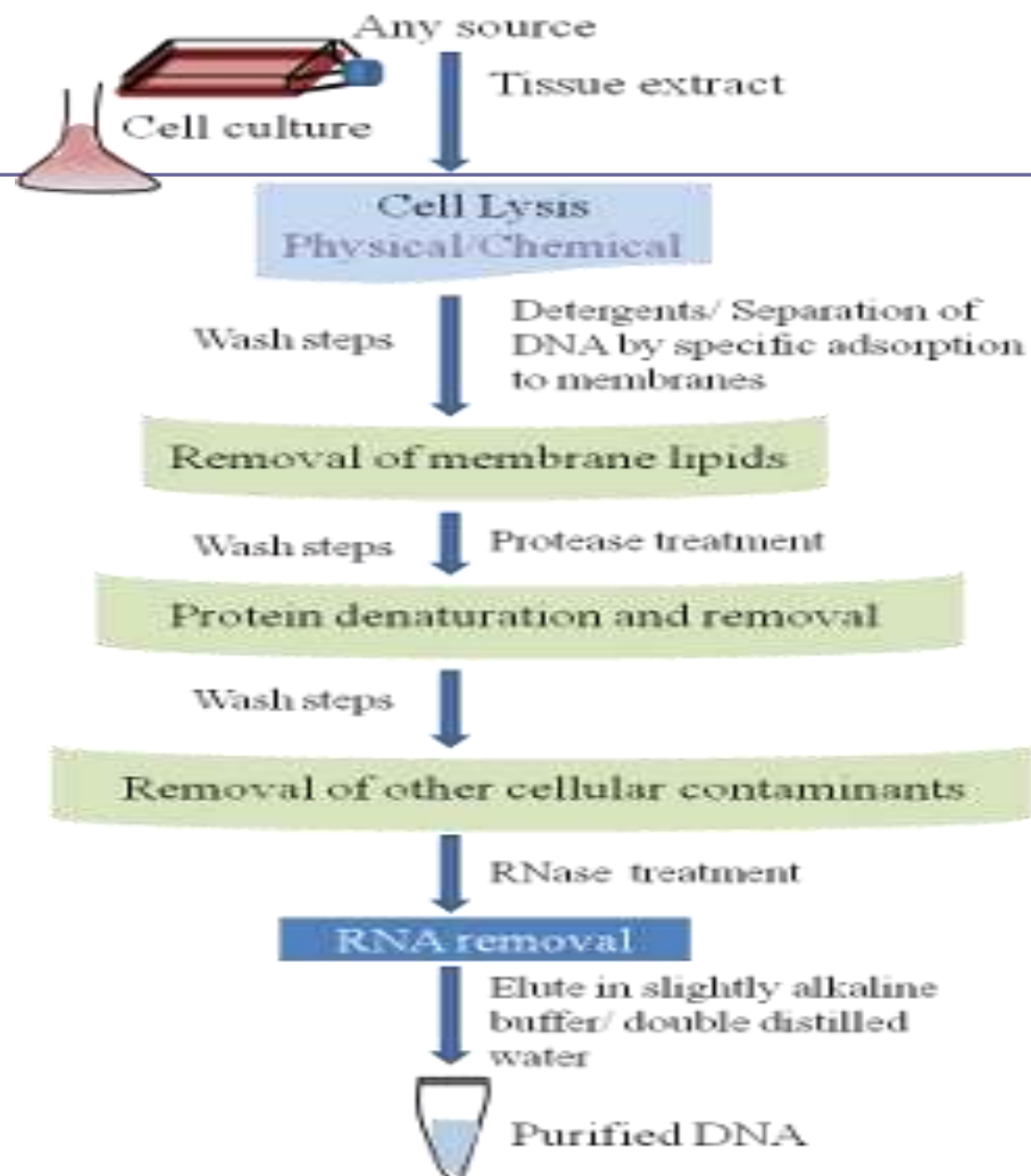
- Ενζυμική Πέψη
- Υψηλή συγκέντρωση άλατος
- Χρήση απορρυπαντικών
- Προσθήκη φαινόλης ή χλωροφόρμιο – ισοαμυλική αλκοόλη

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



Απομόνωση DNA με τη χρήση προκατασκευασμένου αντιδραστήριου

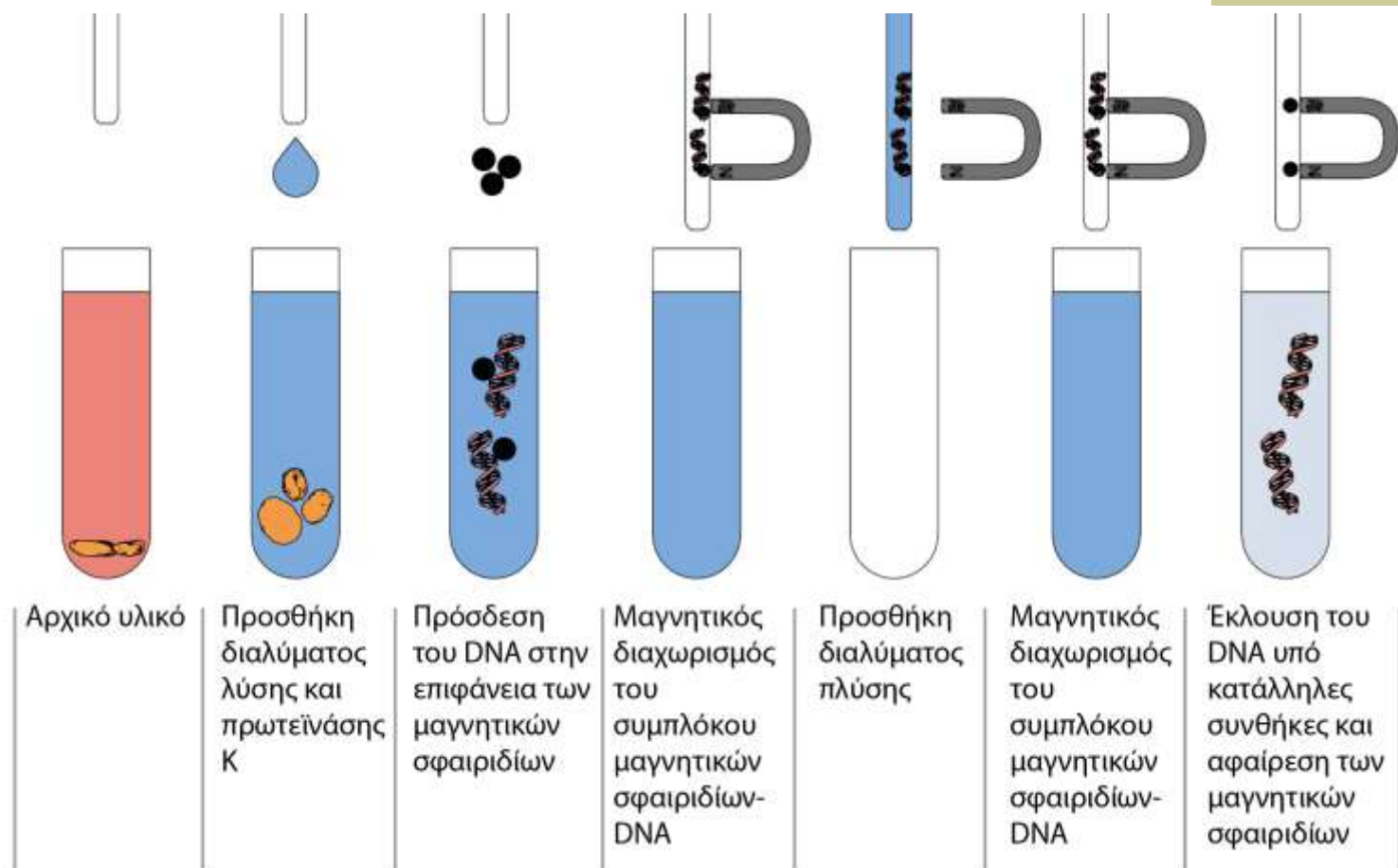


Απομόνωση DNA με τη χρήση προκατασκευασμένου αντιδραστηρίου

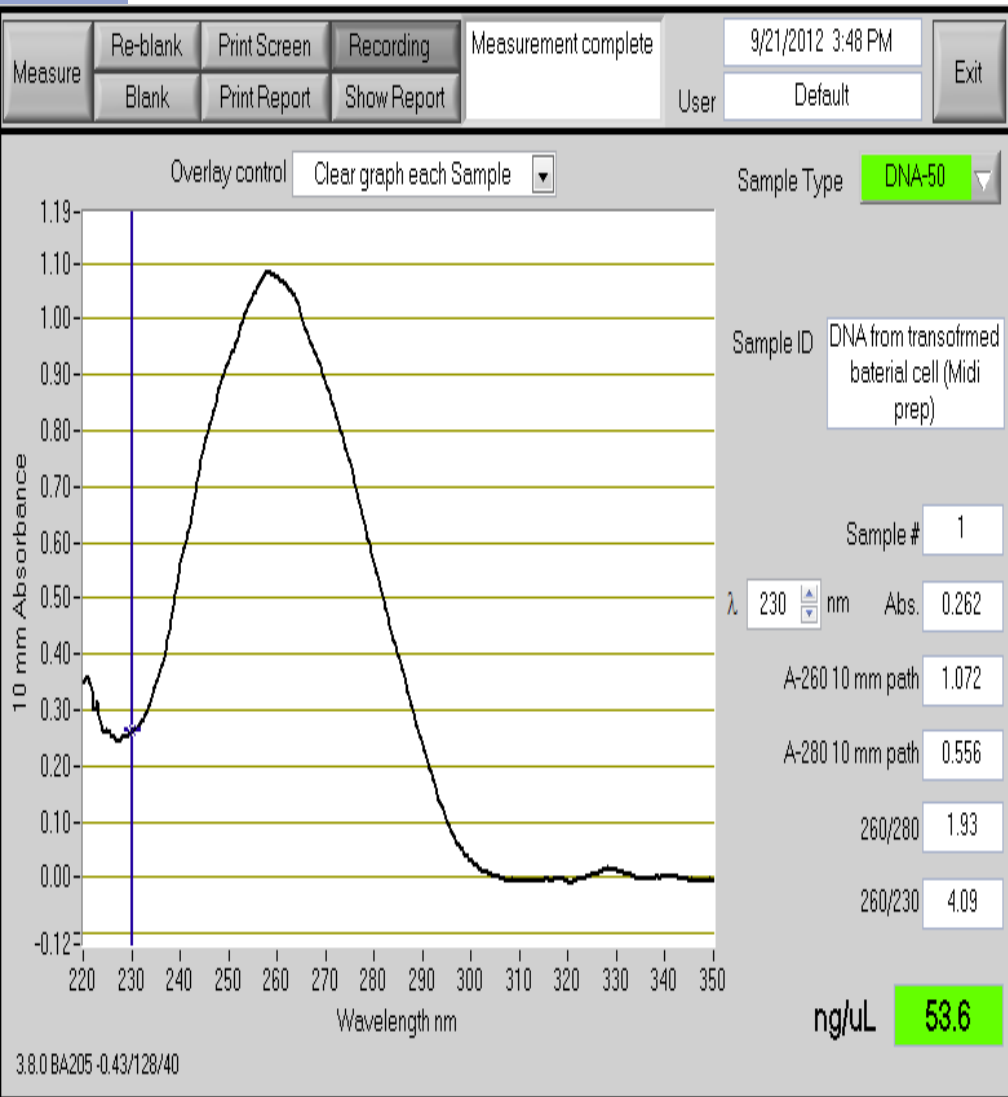
NucleoSpin® Tissue

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

Απομόνωση DNA με τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων



Φασματοφωτόμετρο



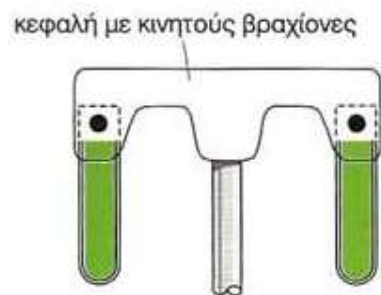
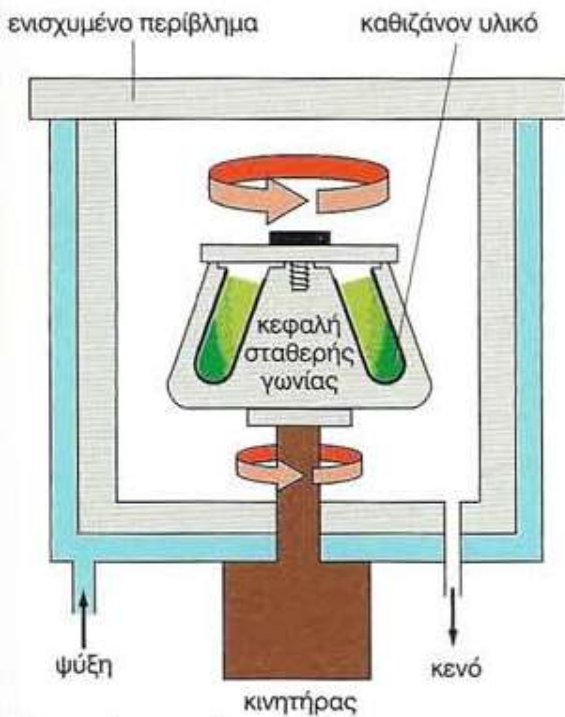
- Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA
- Έλεγχος της καθαρότητάς του



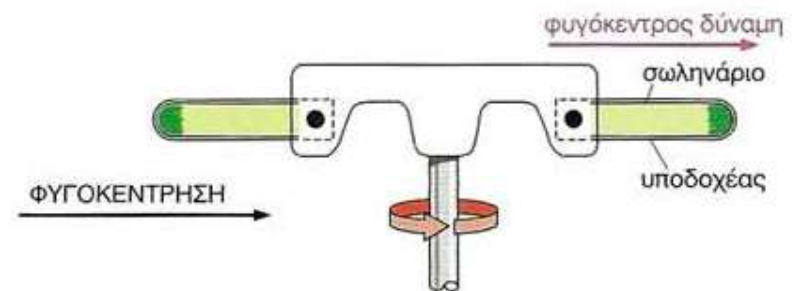
Φυγόκεντρος

- 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



πολλές κλασματοποιήσεις
διενεργούνται σε κεφαλές
με κινητούς βραχίονες



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

Φυγοκέντρωση

- 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.

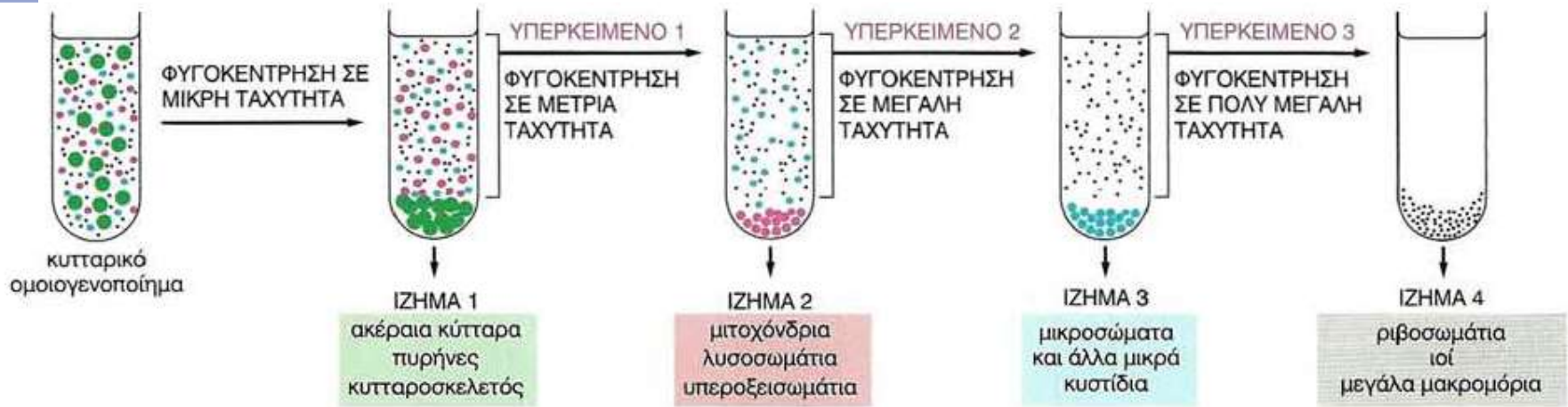


Φυγοκέντρηση

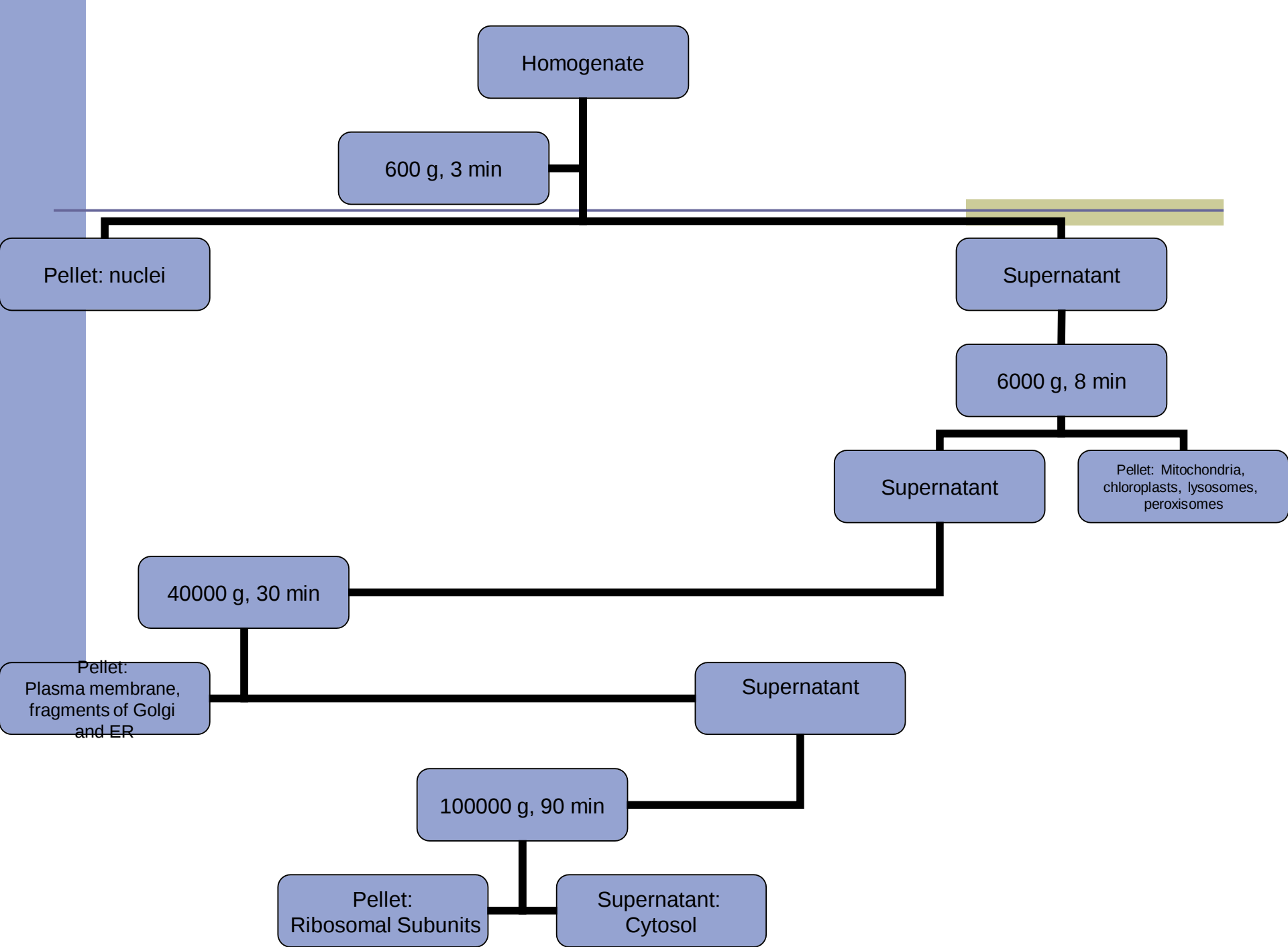
1. Διαφορική Φυγοκέντρηση (Differential centrifugation)
2. Φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας (Density gradient centrifugation)
 - Διαχωρισμός με βάση την ταχύτητα καθίζησης – Φυγοκέντρηση ταχύτητας (Velocity centrifugation)
 - Καθίζηση Ισορροπίας – Φυγοκέντρηση ισορροπίας (Equilibrium density gradient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





Επιδιώχνει κυτταρικών θραυσμάτων που περιέχει υποκυτταρικά συστατικά, όπως λισοσώματα, υπεροξειδοσώματα και θραύσματα κυτταρικών μεμβρανών



Φυγοκέντρωση
Σχετική φυγοκέντρωση δύναμη 800 x g
(10 λεπτά)



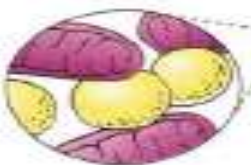
καθίζηση των πυρήνων



Φυγοκέντρωση υπερκρομένου
Σχετική φυγοκέντρωση δύναμη 15.000 x g
(10 λεπτά)



καθίζηση των μιτοχονδρίων, των λισοσωμάτων και των υπεροξειδοσωμάτων



Φυγοκέντρωση υπερκρομένου
Σχετική φυγοκέντρωση δύναμη 100.000 x g
(60 λεπτά)



καθίζηση των θραυσμάτων της κυτταροπλασματικής αμβύδασης και του ενδοπλάσματικού δικτύου



Φυγοκέντρωση υπερκρομένου
Σχετική φυγοκέντρωση δύναμη 200.000 x g
(3 ώρες)



Κυτταροδιάλυμα

καθίζηση των ριβοσωμάτων



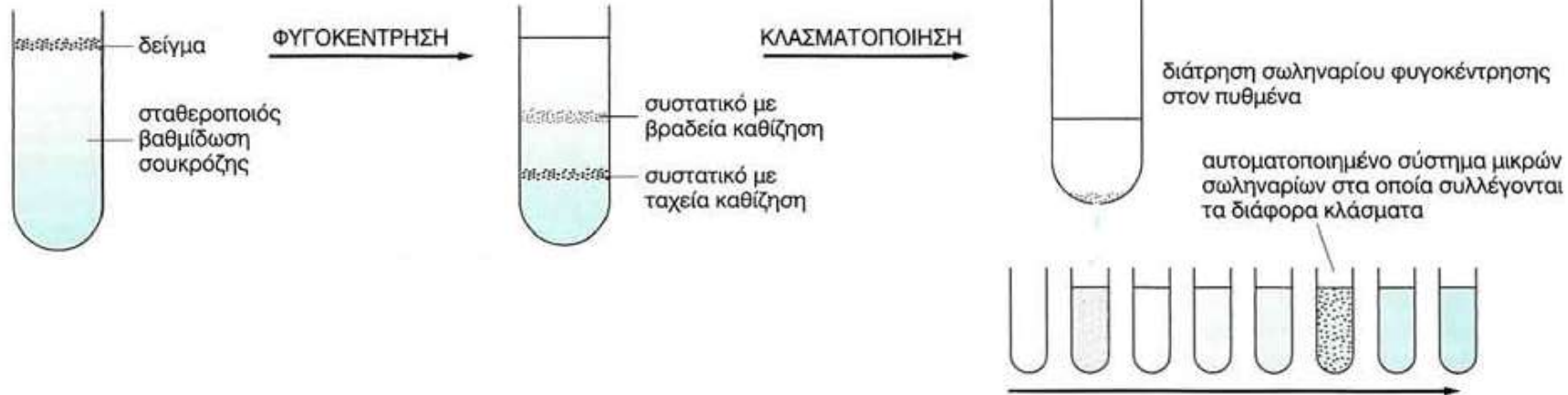
Φυγοκέντρωση σε βαθμίδωση πυκνότητας

Density gradient centrifugation

- Τα κλάσματα που προκύπτουν από τη διαφορική φυγοκέντρωση αντιστοιχούν σε εμπλουτισμένα, αλλά ακόμη όχι καθαρά, παρασκευάσματα οργανιδίων.
- Υψηλότερος βαθμός καθαρισμός είναι δυνατόν να επιτευχθεί μέσω φυγοκέντρωσης 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

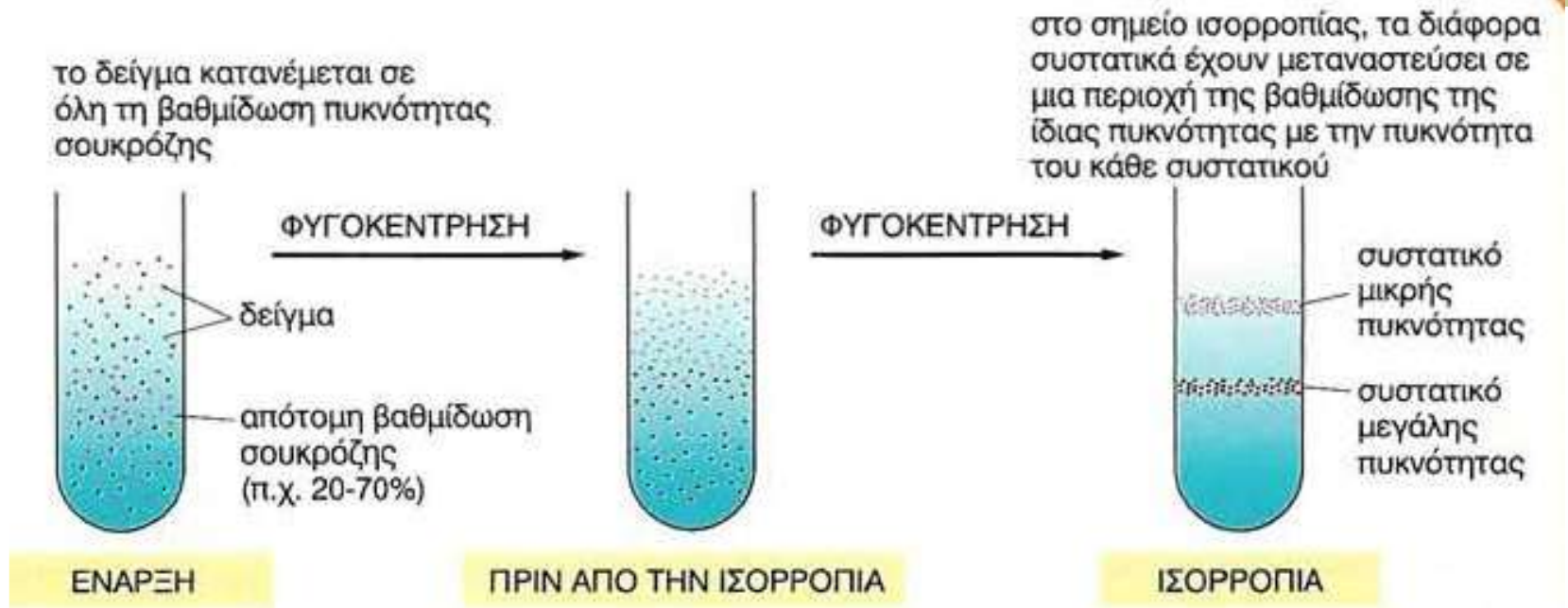
Συλλογή κλασμάτων του διαλύματος διαβαθμισμένης πυκνότητας

Σωματίδια που καθιζάνουν ταχέως

Σωματίδια που καθιζάνουν βραδέως

Καθίζηση Ισορροπίας

Equilibrium density gradient centrifugation



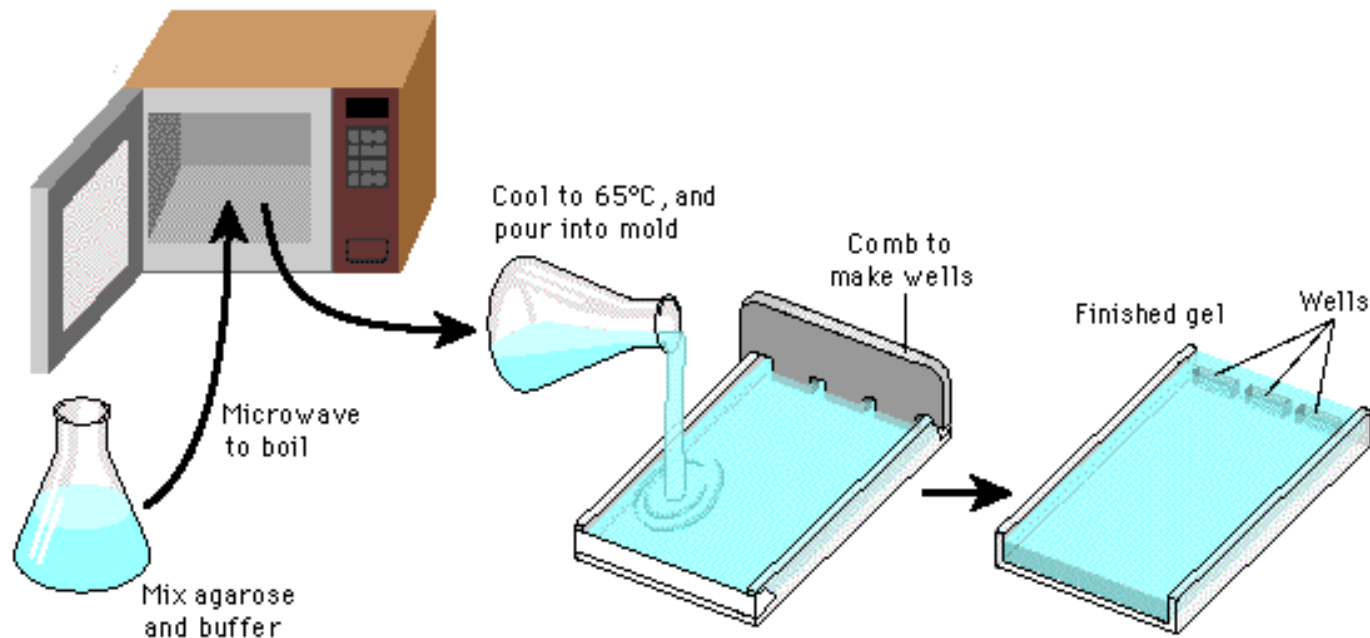
Ηλεκτροφόρηση

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

Εφαρμογές:

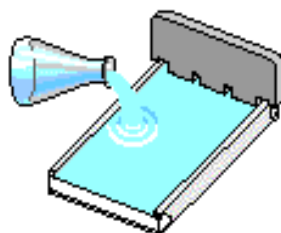
1. Διαχωρισμό μακρομορίων
2. Στον έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος
3. Στον ποσοστικό και ποιοτικό έλεγχο
4. Στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους

Πήκτωμα Αγαρόζης

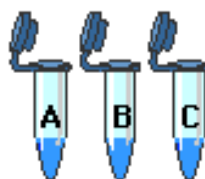


Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

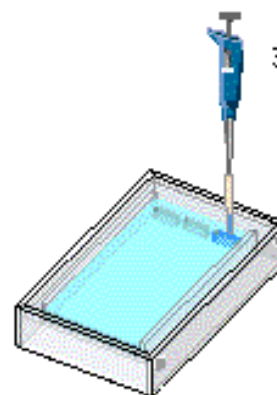
1. Make gel.



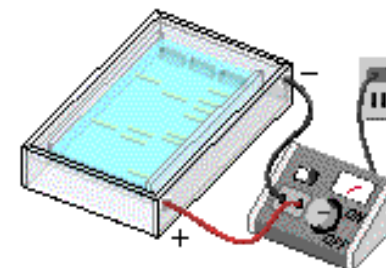
2. Obtain prepared DNA samples.



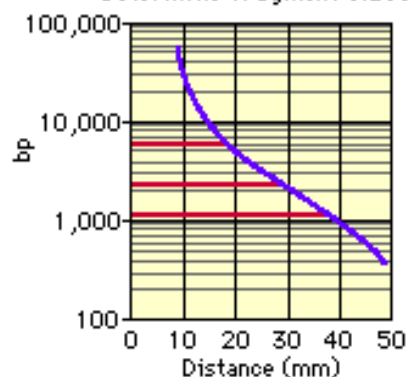
3. Load samples into gel.



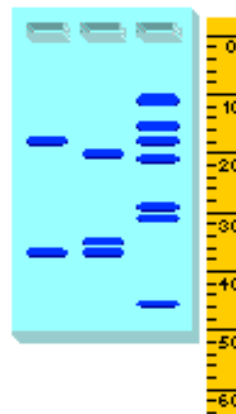
4. Separate fragments by electrophoresis.



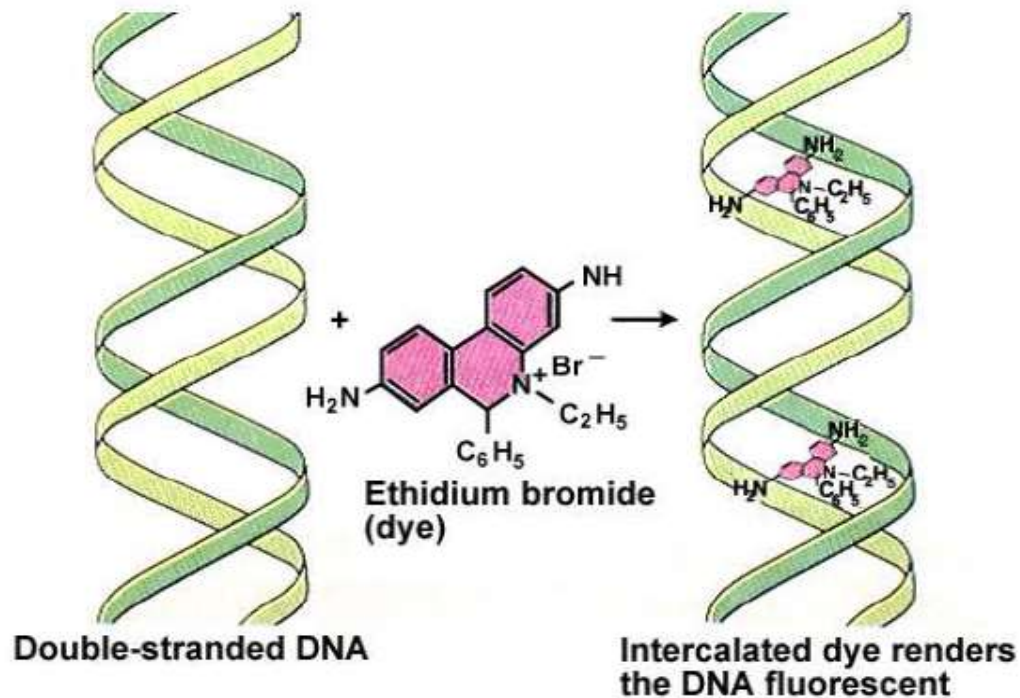
6. Prepare a standard curve.
Determine fragment sizes.



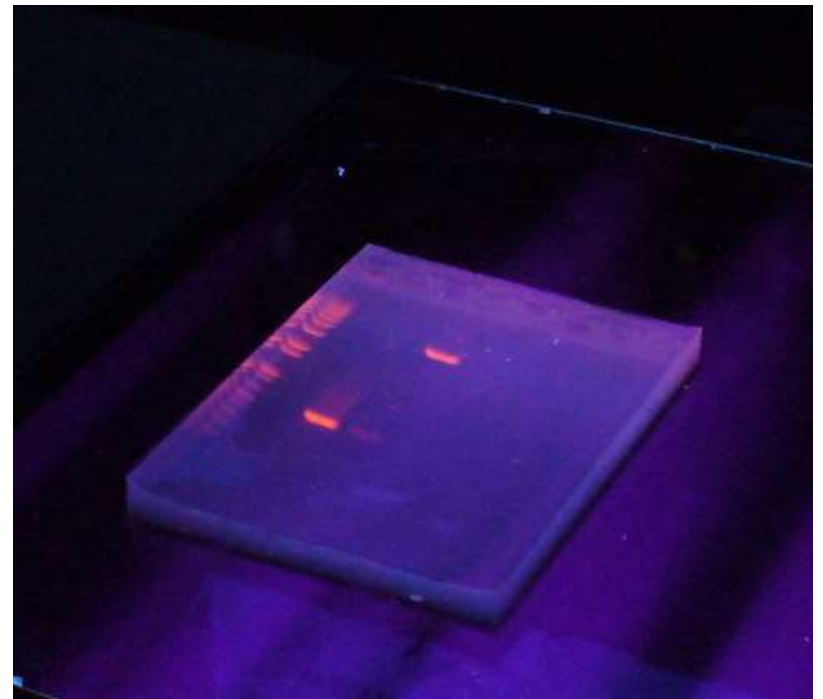
5. Stain DNA fragments and measure distances.



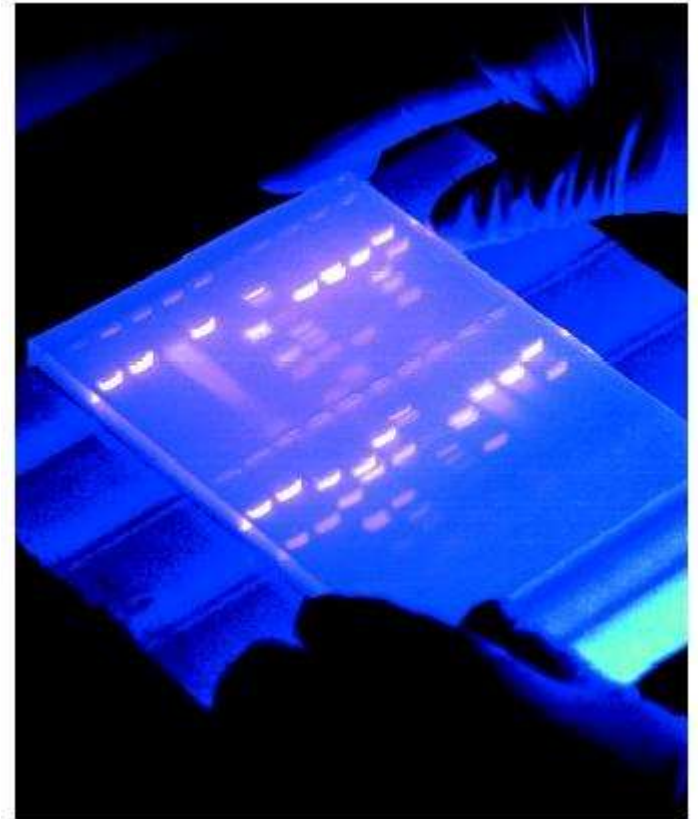
Βρωμιούχο Αιθίδιο [EtBr]



Χωρίς UV και με UV



Ηλεκτροφόρηση DNA



Ηλεκτροφόρηση μετά την Απομόνωση DNA



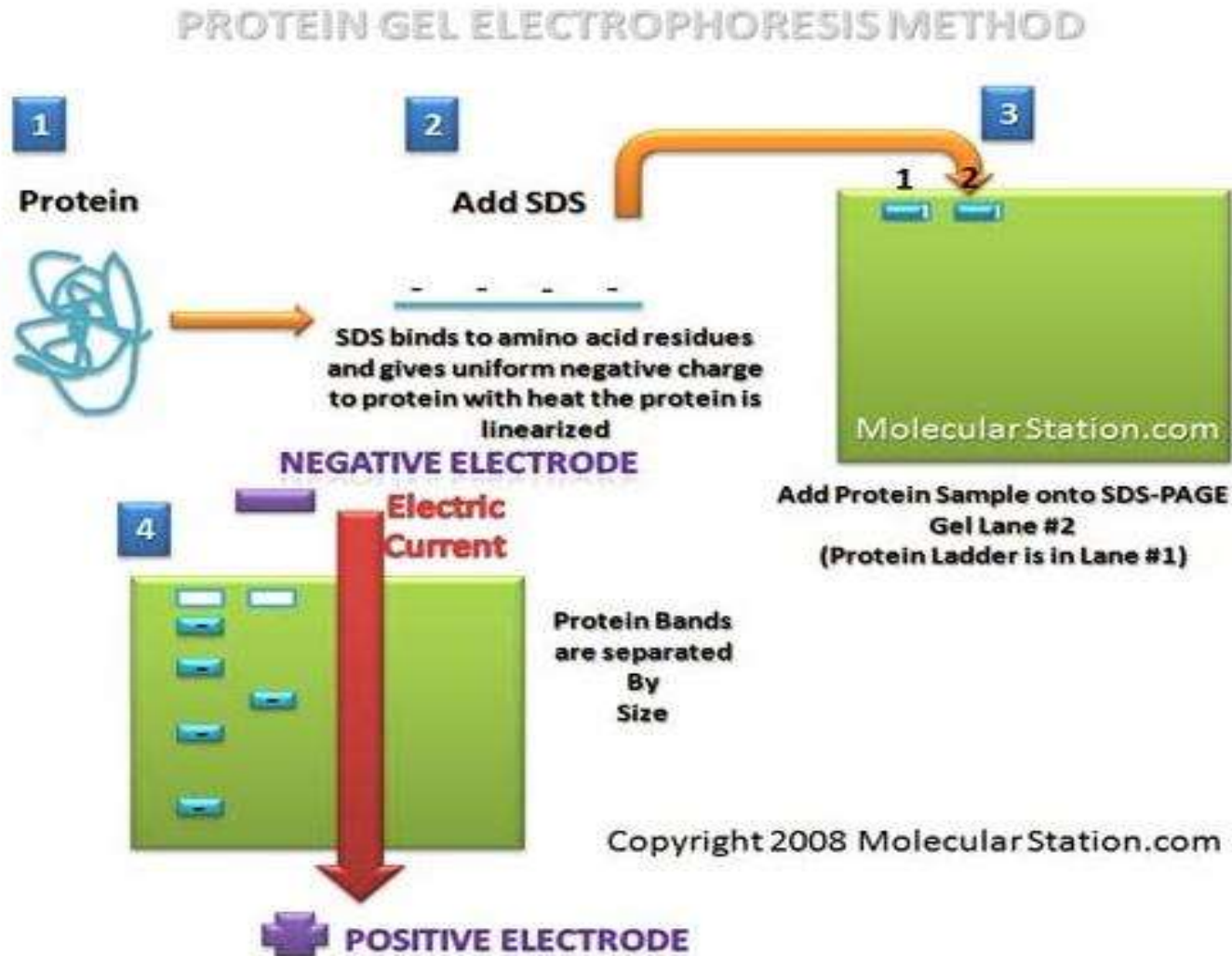
Fig 1. Genomic DNA was purified from 300 μ l of whole blood using the WizPrep™ DNA Extraction Kit (Blood). 7 μ l of the eluate (elution volume 100 μ l) were analyzed on a 1.5% agarose gel. Marker : 1kb DNA ladder.

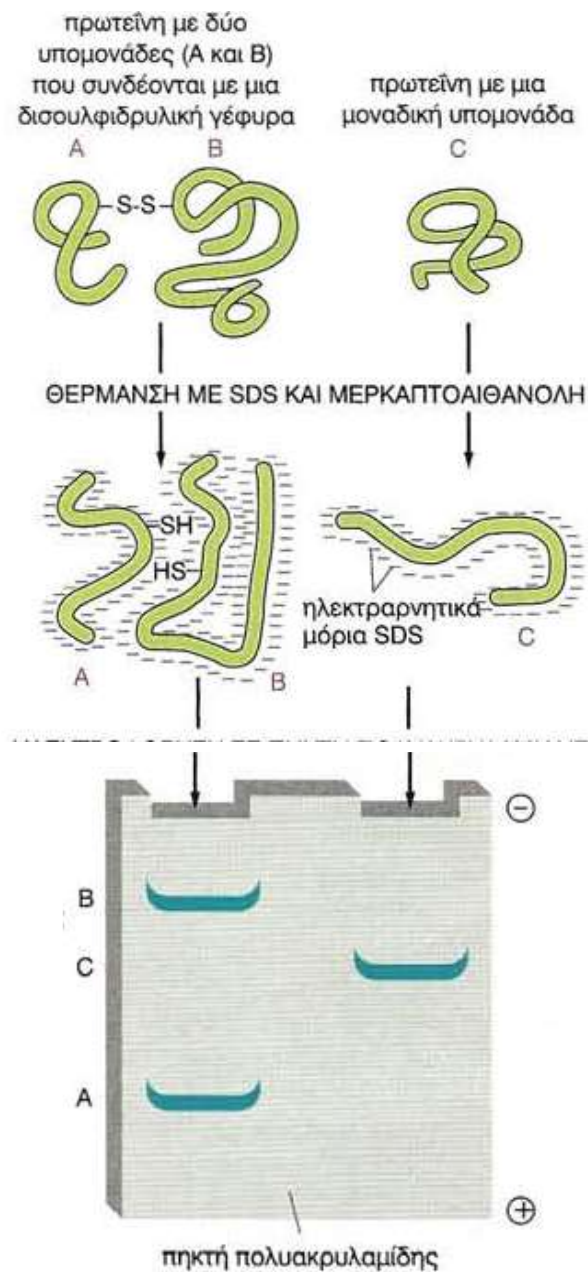
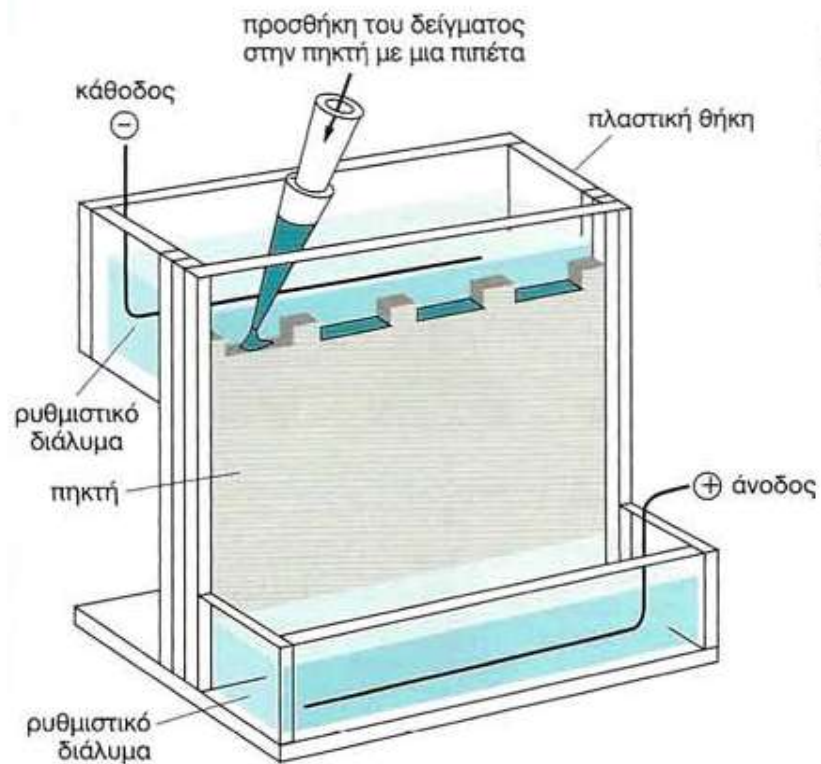
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμίδης

Εφαρμογές:

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

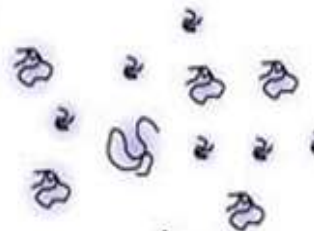
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμίδης – SDS (SDS-PAGE)





SDS-PAGE

1 Denature sample with sodium dodecylsulfate

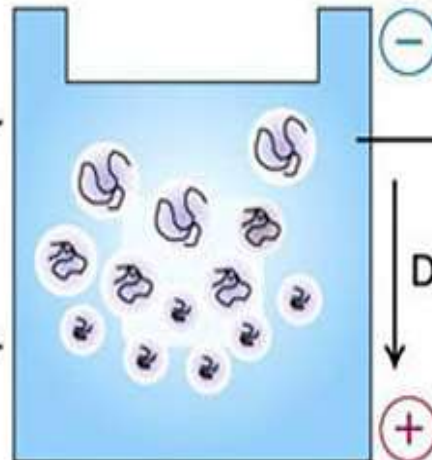


SDS-coated proteins

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

Partially separated proteins

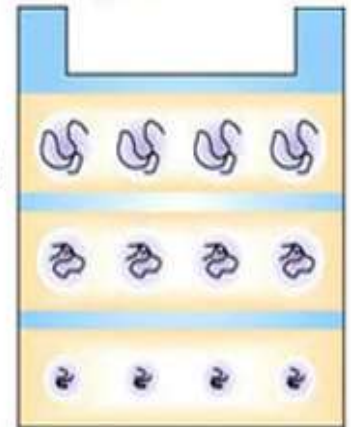


Cross-linked polyacrylamide gel

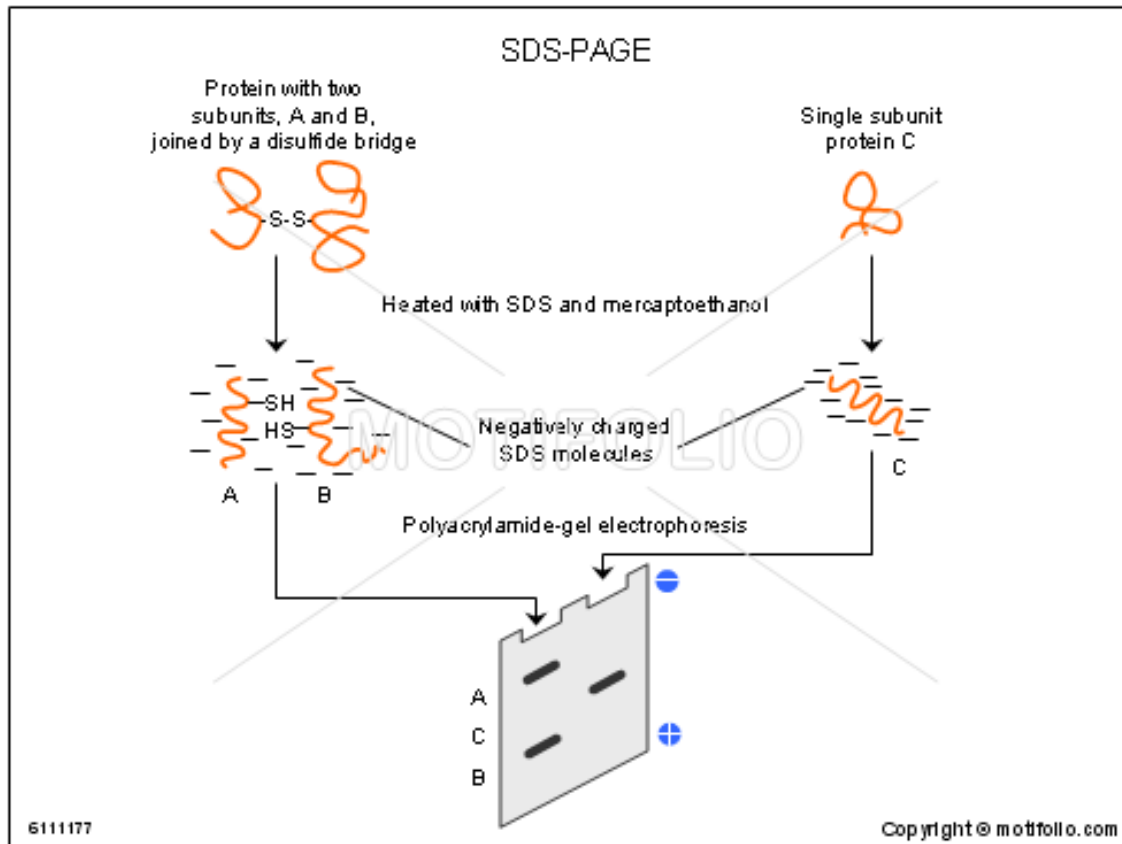
Direction of migration

Decreasing size

3 Stain to visualize separated bands



SDS-PAGE



SDS-PAGE

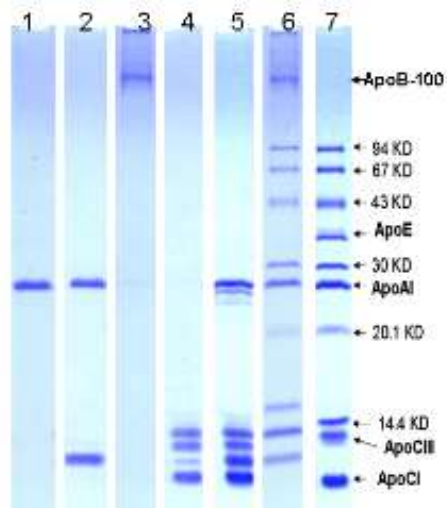


Figure 1: SDS PAGE of Apoprotein Standard on a 18% gel (12 wells, Invitrogen) with 30 mA and 65 minutes; Lane 1 to lane 7 represents Item SP1 to Sp7, respectively.

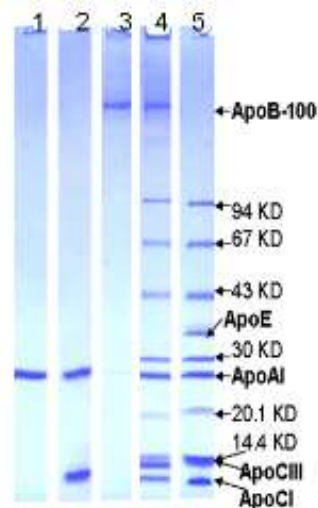
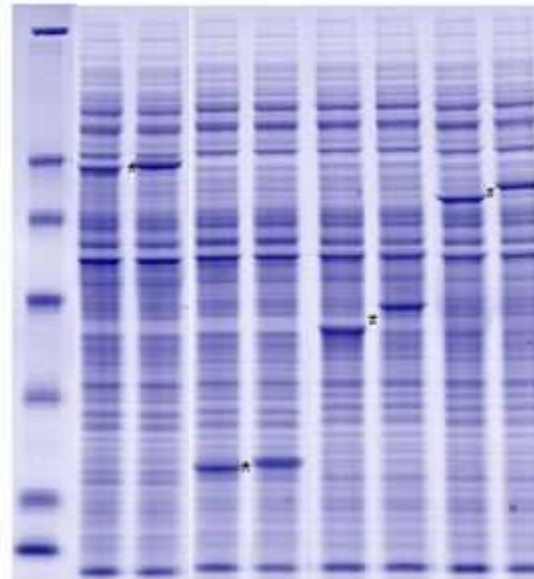


Figure 2: SDS PAGE of Apoprotein Standard on a 4-20% gel (10 wells, Invitrogen) with 30 and 60 minutes; Lane 1, 2, 3, 4, and 5 represent Item SP1, SP2, SP3, SP6, and SP7, respectively.

M 1 2 3 4 5 6 7 8



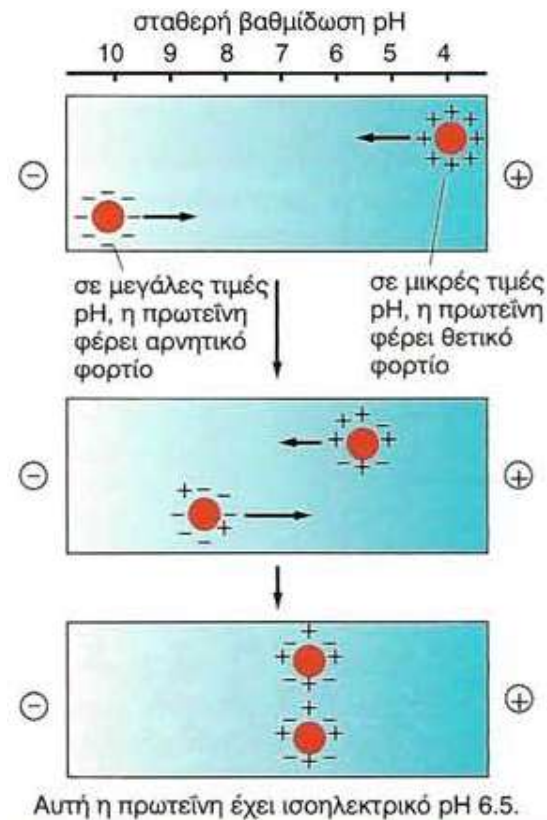
M: Marker proteins
1,2: glucuronidase
3,4: survivin,
5,6: human kinase,
7,8: receptor protein.
lanes 1,3,5,7: C-terminal His₆ tag
lanes 2,4,6,8: N-terminal His₆ tag

Total reaction aliquots

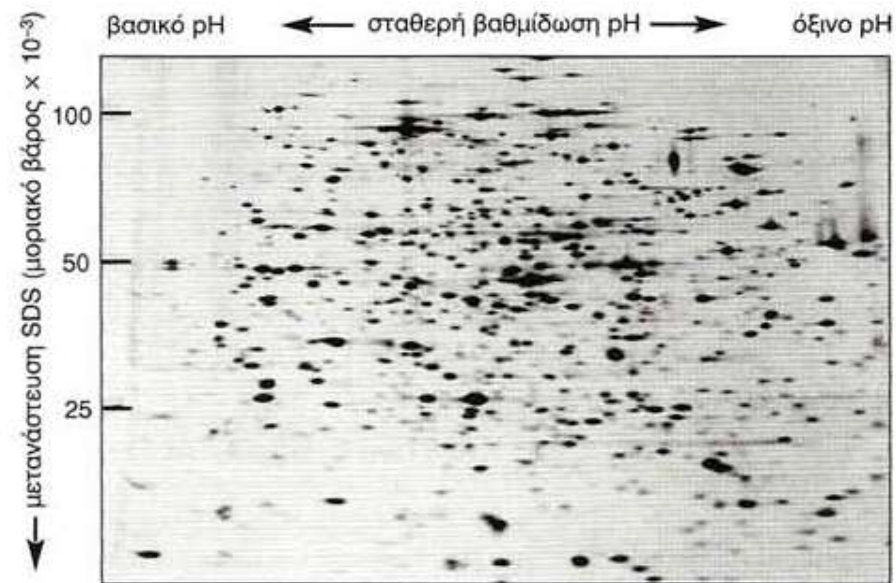
Coomassie-stained SDS-PAGE gel

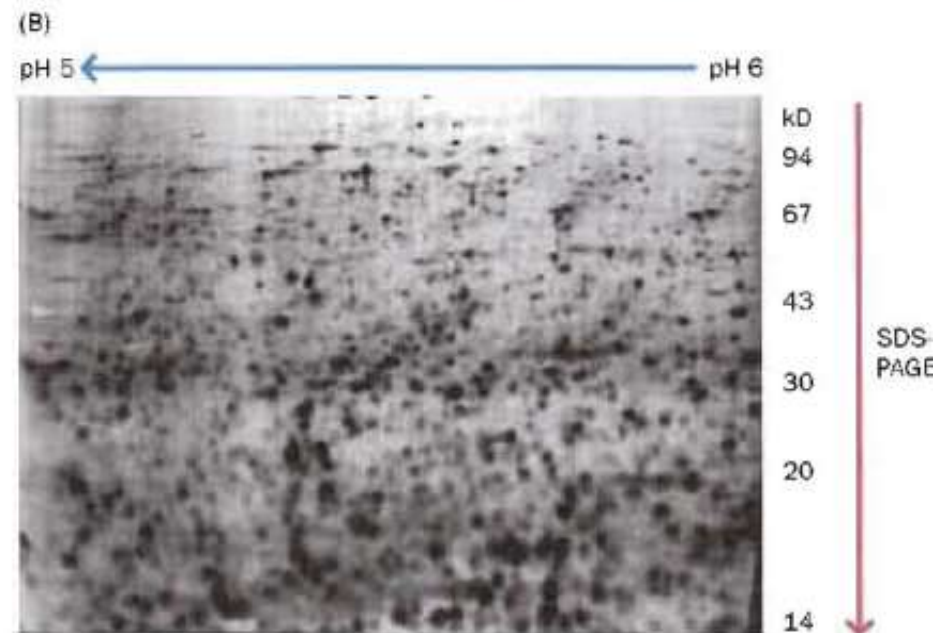
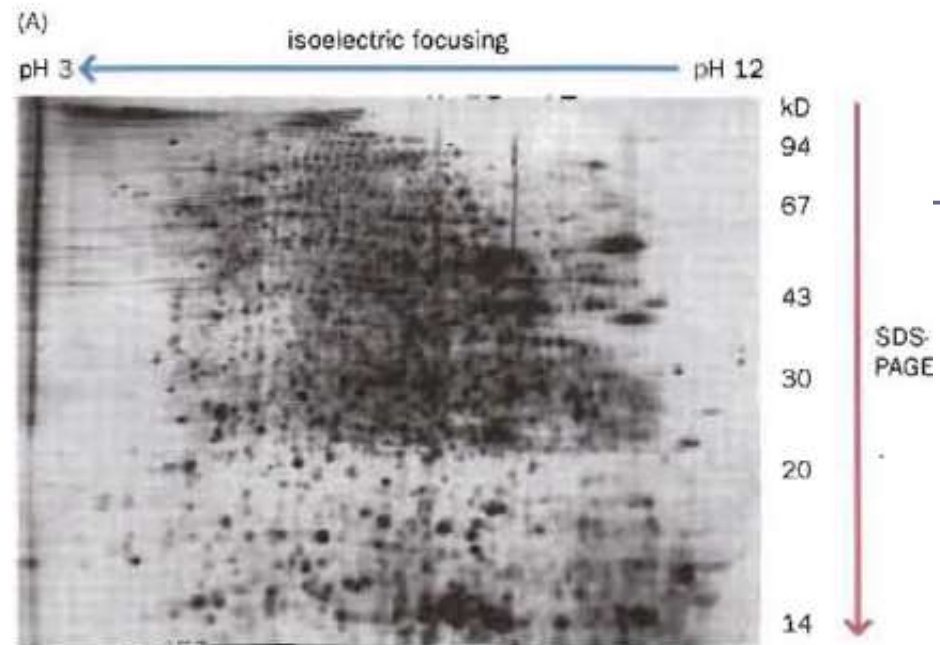
Ισοηλεκτρική Εστίαση

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



Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2D - PAGE





DNA extraction in the kitchen



Βιβλιογραφία

- Σημειώσεις 2^{ου} Εργαστηρίου (Απομόνωση DNA από ζωϊκό ιστό)
- Σημειώσεις 3^{ου} Εργαστηρίου (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης) !!!Προσοχή!!!
Μόνο ότι αφορά την Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης
- 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

Απομόνωση DNA με χρήση τεχνολογίας μαγνητικών σφαιριδίων

- Λύση Δείγματος

Λύση του δείγματος παρουσία κατάλληλου διαλύματος λύσης και πρωτεΐνάσης K

- Προσθήκη μαγνητικών σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου

- Προσκόλληση DNA και εφαρμογή μαγνητικού πεδίου

Τα μόρια προσροφώνται σε μαγνητικά σωματίδια και τα μη δεσμευμένα κυτταρικά στοιχεία απομακρύνονται.

- Απομόνωση ακαθαρσιών

Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις για την απομάκρυνση των αλάτων και άλλων αναστολέων.

- Εξαγωγή DNA

Έκλουση με ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας.

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

