**Izolacja DNA z materiału biologicznego i z owoców**

**Wstęp**

Proces izolowania DNA z komórki jest pierwszym krokiem w wielu procedurach stosowanych w biologii molekularnej. Polega on na oddzieleniu DNA od innych komponentów wewnątrzkomórkowych. niechcianych substancji z komórki na tyle delikatnie, aby DNA nie zostało uszkodzone lub rozdrobnione. Kwas deoksyrybonukleinowy jest naturalnym elementem naszej codziennej diety. Dziennie spożycie ocenia się na około 2 g materiału genetycznego, w skład którego wchodzą pełne genomy warzyw, owoców, zbóż i różnych gatunków zwierząt [2]. DNA jest wielkocząsteczkowym organicznym związkiem chemicznym należącym do grupy **kwasów nukleinowych**. Występuje w chromosomach i pełni rolę nośnika informacji genetycznej organizmów żywych. DNA jest liniową, nierozgałęzioną cząsteczką polimerową, dla której monomerami są deoksyrybonukleotydy monofosforanowe. **Nukleotydy** w DNA zbudowane są z: pięciowęglowego cukru deoksyrybozy, jednej z czterech zasad azotowych: adeniny (A), guaniny (G), cytozyny (C) lub tyminy (T) oraz reszty kwasu ortofosforowego. W DNA można wyróżnić trzy typy wiązań: **fosfodiestrowe** pomiędzy ostatnim atomem węgla deoksyrybozy a resztą fosforanową, wiązanie **N-glikozydowe** pomiędzy pierwszym atomem węgla deoksyrybozy a jedną z czterech zasad azotowych azotowych, oraz stabilizujące II rzędową strukturę DNA wiązanie **wodorowe** tworzące się pomiędzy komplementarnymi zasadami wg schematu: A ꞊ T, C ≡ G. Zasady są cyklicznymi związkami aromatycznymi zbudowanymi z atomów węgla i azotu. Adenina i guanina są związkami dwupierścieniowymi i są określane jako puryny. Cytozyna i tymina są jednopierścieniowymi pirymidynami. Związek cukru z zasadą nazywa się **nukleozydem**. Cząsteczka DNA tworzy strukturę **α-helikalną** zbudowaną z dwóch antyrównolegle ułożonych łańcuchów polinukleotydowych zwiniętych wokół własnej osi. Cząsteczki DNA mogą być bardzo długie. U ludzi ich długość (po "rozkręceniu chromosomów") może dochodzić nawet do 2 m. W ścisłym upakowaniu DNA do postaci chromosomu biorą udział białka histonowe lub niehistonowe [2].

**Zagadnienia do przygotowania**

1. Budowa nukleotydów

2. Struktura I i II rzędowa DNA

3. Kod genetyczny

**Etapy izolacji DNA**

Niezależnie od zastosowanej procedury większość metod opiera się na kilku podstawowych etapach izolacji

**Etap 1. Wstępne przygotowanie materiału biologicznego do izolacji DNA**

* *oczyszczenie*

Materiałem wyjściowym do izolacji DNA może być niemal każdy materiał biologiczny

(tkanka, organ czy zawiesina komórkowa). W zależności od rodzaju, jak i pochodzenia

materiału, wstępne przygotowanie może obejmować oczyszczenie z różnego rodzaju

zanieczyszczeń zewnętrznych, pożywki i pozostałości innych komórek (przemywanie

buforami stabilizującymi)

* *rozdrobnienie i homogenizacja*
* *zawieszenie w buforze*

**Etap 2. Dezintegracja i liza komórek oraz uwolnienie DNA do roztworu, w którym jest on rozpuszczalny i zabezpieczony przed degradacją**

* *rozbicie ściany i błony komórkowej*

Dezintegrację komórek prowadzi się w zależności od rodzaju komórek i tkanek, np. poprzez homogenizację (miękkie tkanki zwierzęce), sonifikację (zawiesiny komórek), rozcieranie (komórki roślinne, bakteryjne), lizę detergentami (komórki z hodowli komórkowej), lizę enzymatyczną (komórki bakteryjne, drożdżowe).

* *uwolnienie DNA i innych komponentów wewnątrzkomórkowych do roztworu*

Destrukcji błon zewnętrznych towarzyszy uwolnienie DNA oraz innych komponentów

wewnątrzkomórkowych. Stąd bardzo istotne jest zachowanie odpowiednich warunków, aby kwas nukleinowy nie uległ uszkodzeniom. Do rozpuszczenia DNA i lizy komórek służy roztwór soli, najczęściej NaCl. DNA, będąc związkiem jonowym jest bardziej stabilny i rozpuszczalny w roztworze NaCl niż w wodzie.

* *inaktywacja enzymów nukleolitycznych*

Uwalniający się z komórki kwas nukleinowy jest narażony na działanie degradujące nukleaz – enzymów katalizujących hydrolizę 1- i 2-niciowych kwasów nukleinowych przecinających wiązania fosfodiestrowe. Unieczynnienie ich prowadzi się silnymi enzymami proteolitycznymi (np. proteinazą K).

**Etap 3. Oddzielenie kwasu nukleinowego od pozostałych komponentów komórkowych**

* *dysocjacja kompleksów DNA – białko*

Celem zniesienia oddziaływań jonowych pomiędzy naładowanymi dodatnio histonami

i innymi białkami a ujemnie naładowanym szkieletem DNA stosuje się różnego rodzaju

detergenty oraz sole.

**Etap 4. Zagęszczenie preparatu DNA i usunięcie zanieczyszczeń małocząsteczkowych**

* *uzyskanie roztworu DNA o pożądanej czystości i gęstości*

Po ekstrakcji kwasy nukleinowe znajdują się, przeważnie w dużym rozcieńczeniu, w fazie wodnej, zanieczyszczonej małocząsteczkowymi związkami. Dodając rozpuszczalnik organiczny (np. etanol lub izopropanol) zmniejsza się polarność środowiska, co powoduje zmniejszenie rozpuszczalności DNA, posiadającego strukturę jonową i DNA tworzy nitkowate osady.

***Cel ćwiczenia:*** Izolacja DNA z materiału biologicznego i z tkanki roślinnej

**Materiały i odczynniki:**

50 ml wody, 1 łyżeczka NaCl (soli kuchennej), 1 łyżeczka detergentu (np. płynu do mycia naczyń), etanol (schłodzony), proteinaza K, 5% roztwór bromku etydyny, moździerz, lejek, bibuła filtracyjna, lód, krew ludzka, owoce do izolacji DNA

**Wykonanie doświadczenia:**

1. Owoc rozdrabniamy w moździerzu
2. Przygotowujemy roztwór lizujący – mieszamy: 50 ml wody, 1 płaską łyżeczkę NaCl oraz 1 łyżeczkę płynu do mycia naczyń (ma za zadanie spowodowanie rozpadu błon komórkowych, otoczki jądrowej, błon organelli oraz innych błon wewnątrz komórkowych)
3. Łączymy 50 ml roztworu lizującego z 5 ml krwi lub 3 łyżeczkami uzyskanej papki owocowej i dokładnie mieszamy
4. Uzyskany roztwór ogrzewamy przez 10-15 min. w łaźni wodnej (60-650 C); ma to celu przyspieszenie procesu rozpadu błon, oraz denaturację DNAaz, które mogłyby szybko strawić DNA
5. Roztwór chłodzimy przez 5-10 min. w lodzie
6. Schłodzony roztwór przesączamy przez bibułę filtracyjną do szklanych probówek
7. Do przesączu dodajemy 2-3 krople proteinazy K; inkubujemy 5 min. (ma to celu strawienie białek znajdujących się w przefiltrowanej mieszaninie)
8. Do przefiltrowanego roztworu dodajemy ostrożnie 1 objętość zimnego etanolu i wstawiamy do pojemnika z lodem na 10 minut. W efekcie końcowym uzyskujemy DNA w postaci cienkich, długich, galaretowatych nitek z przyczepionymi bąbelkami powietrza. DNA jest kwasem, którego reszty naładowane są ujemnie, dzięki temu jony Na+ z soli kuchennej otaczają cząsteczki DNA. Przy wysokim stężeniu soli i w obecności etanolu, DNA zmienia swoją przestrzenną strukturę i tworzy agregaty – wytrąca się.
9. Do probówki Eppendorfa pobieramy około 500 μl wyizolowanego DNA i dodajemy 20 µl roztworu bromku etydyny
10. Probówkę a wyizolowanym DNA poddajemy intensywnemu wytrząsaniu na Vortexie
11. Obserwujemy fluorescencję DNA w świetle UV
12. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu

**Opracowanie wyników:**

1. Opisać procedurę izolacji DNA z krwi i z materiału roślinnego i wyjaśnić cel każdego etapu i rolę każdego odczynnika użytego w doświadczeniu
2. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu

**Piśmiennictwo:**

1. Winter P.C., Hickey G.I., Fletcher H.L.. 2008. Krótkie wykłady. Genetyka. Wyd.PWN Warszawa.

2. Brown T. A. 2001. Genomy. Wyd. PWN, Warszawa.