

ДНҚ-ны бөліп алу және тазалау әдістері

CNE9131 ДНҚ технологиялары · 6B05105 Биотехнология

3-апта · Жаниязов Ж.А., аға оқытушы

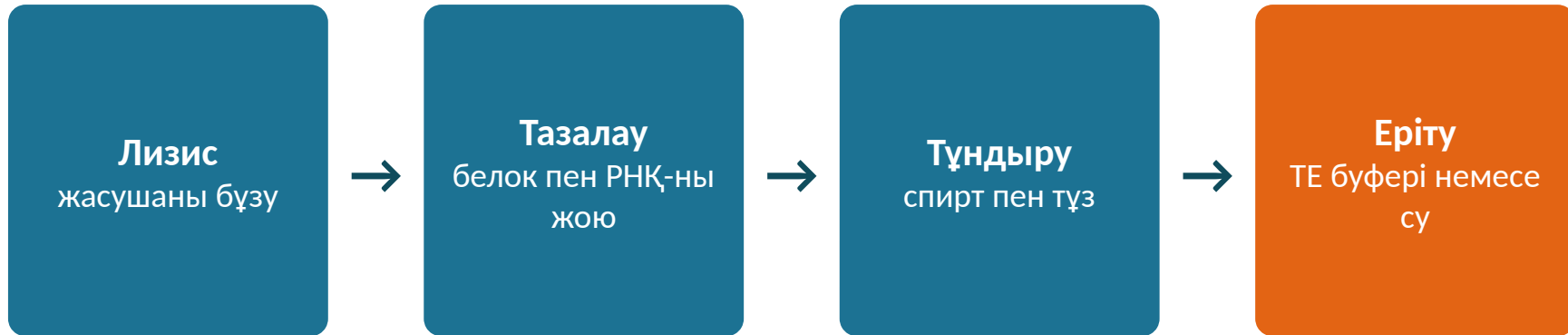
Дәріс жоспары

- ДНҚ бөліп алудың жалпы кезеңдері
- Жасушаны бұзу тәсілдері
- Негізгі реагенттер мен олардың рөлі
- Фенол-хлороформ, колонка, СТАВ әдістері
- ДНҚ-ны тұндыру және сапасын бағалау

3 / 15

апта · ДНҚ бөліп алу

ДНҚ бөліп алу кезеңдері



Мақсат: бүтін, таза және жеткілікті мөлшердегі ДНҚ алу.

Жасушаны бұзу (лизис)

Механикалық

Ұнтақтау, сұйық азотта үгу, ультрадыбыс, шарикті диірмен

Химиялық

SDS пен жуғыш заттар мембрананы ерітеді, EDTA ферменттерді тежейді

Ферментативті

Лизоцим бактерия қабығын, протеиназа К белокты ыдыратады

Термиялық

Қайнату және мұздату-еріту циклдері (жылдам әдістерде)

Негізгі реагенттер

Реагент	Қызметі
SDS	Мембрананы ерітеді, белоктарды денатурациялайды
EDTA	Mg^{2+} байланыстырып, ДНҚ-азаларды тежейді
Протеиназа К	Белоктарды ыдыратады
РНҚ-аза А	Қоспадағы РНҚ-ны жояды
Фенол-хлороформ	Белоктарды органикалық фазаға ажыратады
Этанол / изопропанол	Тұз қатысында ДНҚ-ны тұндырады

Бөліп алу әдістері

Фенол-хлороформ

Классикалық әдіс: таза ДНҚ береді, бірақ реагенттері улы

Силикагель колонкасы

Хаотропты тұзда ДНҚ силикаға байланысады, жуылып, элюцияланады

СТАВ әдісі

Өсімдіктерден: полисахаридтер мен полифенолдарды кетіреді

Магнитті бөлшектер

ДНҚ-ны магнитпен ұстап қалу, автоматтандыруға ыңғайлы

ДНҚ-ны тұндыру

2–2,5 V

этанол көлемі, тұз
қатысында

0,7 V

изопропанол көлемі

70%

этанолмен жуу, тұзды
кетіру

–20 °C

ұзақ сақтау
температурасы

Тұндырылған ДНҚ центрифугалап жиналады, кептіріліп, ТЕ буферінде ерітіледі.

ДНҚ сапасын бағалау

Спектрофотометрия

$A_{260}/A_{280} \approx 1,8$; $A_{260}/A_{230} \approx 2,0-2,2$

Электрофорез

Агарозалық геледе ДНҚ бүтіндігін көру

Флуориметрия

Қос тізбекті ДНҚ концентрациясын дәл анықтайды

Қоспалар

Фенол, тұз, белок және РНҚ ПЦР-ды тежейді

Материалға байланысты ерекшеліктер

Материал	Ерекшелігі
Бактерия	Лизоцим мен SDS жеткілікті, қабығы жұқа
Өсімдік	Қалың қабық, полисахаридтер: СТАВ, сұйық азот
Қан және сүтқоректі тіндері	Протеиназа К, РНҚ-аза А
Плазмидалық ДНҚ	Сілтілі лизис, хромосомалық ДНҚ-дан бөлу

Қорытынды және бақылау сұрақтары

- ДНҚ бөліп алудың негізгі кезеңдері қандай?
- SDS, EDTA, протеиназа К қандай қызмет атқарады?
- Өсімдіктен ДНҚ алғанда CTAB не үшін керек?
- A260/A280 қатынасы нені көрсетеді?
- Тапсырма: ПР №3, СӨЖ: ДНҚ ашылу тарихы

20–50

бет • [2] Green, Sambrook