

PROBLEME AVANSATE DE GENETICA ȘI BIOTEHNOLOGIA PLANTELOR

LP 3

IZOLAREA ADN DIN ȚESUT VEGETAL

ADN-ul

- ADN-ul este inclus în nucleu, nucleul în celulă, celula e separată de alte celule prin membrană celulară (formată din fosfolipide) și perete celular (format din alte tipuri de proteine)
- ADN-ul este complexat cu proteine

Pentru a extrage ADN-ul trebuie îndepărtate...

- Peretele celular
- Membrana celulară
- Citoplasma
- Membrana nucleară
- Proteinele

Liza celulară și solubilizarea

- mecanic (azot lichid, mojarare, blander)
- chimic (enzime: pectinaze, celuloze)

Tampon (Tris-HCl) – asigură pH-ul optim, ajută la permeabilizarea membranei celulare

EDTA – chelatează cationii bivalenți (Ca^{2+} , Mg^{2+}) – inhibă acțiunea DN-azelor

enzimă (K) – distrugere proteinele

detergent (SDS) – solubilizează și denaturează proteinele

TritonX-100 – surfactant = reduce tensiunea superficială dintre lichid și solid – funcționează ca detergent

Beta – mercaptoetanol – agent reducător/antioxidant, rupe punțile bisulfidice ajutând la denaturarea proteinelor

N-lauryl-sarcosine sodium salt – detergent extrem de concentrat care este solubil în etanol, are și activitate de inhibare a nucleazelor

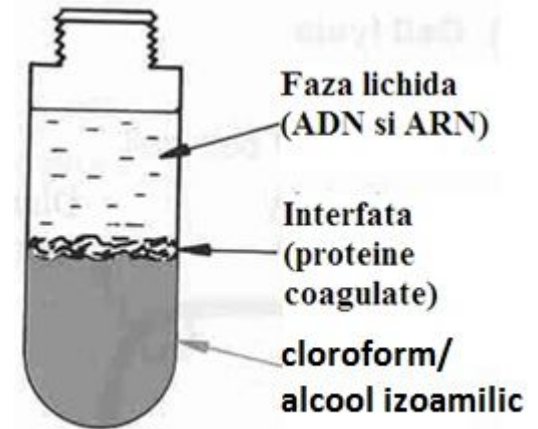
PVP – precipită polifenolii

CTAB – detergent care rupe peretele celular și membrana celulară, în același timp denaturând proteinele

Îndepărtarea contaminanților

- **Proteine**
- **Carbohidrați (zaharuri)**

PRECIPITARE
→
Cloroform/alcool izoamilic



1:1 fenol : cloroform
sau

25:24:1 fenol : cloroform : alcool izoamilic
sau

24:1 cloroform : alcool izoamilic

Phenol: denaturează proteinele, se formează un precipitat la interfața dintre faza apoasă și stratul organic

Cloroform: denaturează proteinele, crește densitatea stratului organic

Alcoolul izoamilic: împiedică formarea de spumă

Precipitarea și concentrarea

ALCOOL RECE (etilic, izopropilic)

- Permite cationilor să interacționeze cu grupările fosfat ale ADN-ului
- Determină agregarea și precipitarea ADN-ului



Acetat de sodiu

- Folosit pentru a crește concentrația de sare – ajută la precipitarea ADN-ului
- Împiedică precipitarea nucleotidelor libere

Izolarea ADN din țesut vegetal (rădăcini)

1. Peste 0,1g țesut vegetal (rădăcini), se adaugă 700μl tampon de extracție se mojarază și se pun în tub de 2ml. Se incubează tuburile pe baie de apă, la 40-45⁰C timp de 20 min. (se vortexează din 5 în 5 min).
2. Se centrifughează la 8000 rpm/5min și se îndepărtează supernatantul ușor cu o pipetă.
3. Se adaugă 600μl tampon de liză peste sediment și după resuspendare se incubează de 65⁰C pe baie de apă 30 min., cu inversarea tuburilor din când în când .
4. Se adaugă 500μl cloroform:alcool izoamilic (24:1) și după câteva inversări ale tuburilor se centrifughează la 12.000 rpm/10min
5. Se transferă faza superioară (apoasă) în tuburi curate și se adaugă 1/10vol. soluție CTAB și se amestecă prin inversare.
6. Se adaugă 1 vol. cloroform:alcool izoamilic, se amestecă prin inversarea tuburilor și se centrifughează la 14.000 rpm/12 min.
7. Se transferă supernatantul, ușor, într-un tub curat de 1,5 ml și se adaugă 0,6 vol. izopropanol rece și 0,1 vol. acetat de sodiu 3M (0,1 vol din cantitatea adunată a supernatantului și izopropanolului), se amestecă ușor și se incubează se incubează pe gheață 20min.
8. Se centrifughează la 14.000rpm/10min. Se îndepărtează supernatantul și se resuspendă sedimentul în 50μl tampon TE. Probele se păstrează la 4⁰C până a doua zi și apoi la -20⁰C.

Soluții

- Tampon de extracție: 120mM Tris-HCl (pH=8), 80mM EDTA (pH=8), 0,5% Triton X-100, 0,5% β -mercaptoetanol
- Tampon de liză: 120mM Tris-HCl (pH=8), 10mM EDTA (pH=8), 2% N-lauryl sarcosine sodium salt (sarcosil), 0,8M NaCl, 2% PVP (poli vinil pirolidona), 0,2% β -mercaptoetanol
- CTAB: 0,7M NaCl, 1% CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)
- cloroform: alcool izoamilic (24: 1)
- Izopropanol,
- Acetat de sodiu 3M (pH=5,2)
- TE: 10mM Tris (pH=8), 1mM EDTA (pH=8)