Izolace DNA z mléka

JETQUICK Blood & Cell Culture DNA Spin Kit

Materiál:
mléko (až 200 µl),JETQUICK Blood & Cell Culture DNA Spin Kit, 100% ethanol, mikrocentrifuga, 1,5 nebo 2,0 ml mikrocentrifugační zkumavky, pipety, špičky s filtrem, rukavice

! Před prvním použitím kitu je třeba dle návodu na lahvičkách připravit proteázu a pufry KX a K2.

Pracovní postup:

!Před začátkem izolace je třeba zahřát termostat na 50, 58 a 70 °C.

1. Do 1,5 nebo 2 ml zkumavky napipetujte **1 ml mléka**.
2. Zkumavku zahřejeme na **50 °C**.
3. Poté mléko odstřeďte **4 minuty** při **3 000 × g**.
4. Do nové 1,5 nebo 2 ml zkumavky napipetujte **200 µl** usazené **spodní části** (DNA se získává ze somatických buněk v mléce).
5. Do mléka přidejte **20 µl proteázy** (20 mg/ml) a zamíchejte.
6. Přidejte **200 µl** pufru **K1** a důkladně **zvortexujte**.
7. Směs **inkubujte** po dobu **10 minut** při **58 °C**.
8. Poté ke směsi přidejte **200 µl 100% ethanolu** a okamžitě důkladně **promíchejte**.

Podpořeno projektem FRVŠ 2385/2007

9. Vložte kolonku do 2 ml sběrací zkumavky, přeneste směs z kroku 8 na membránu kolonky a kolonku uzavřete.
10. Kolonku vloženou ve sběrací zkumavce odstřeďte **1 minutu** při **10 000 × g.**
11. Vylejte obsah sběrací zkumavky a kolonku do ní znovu vložte.
12. Do kolonky přidejte **500 µl** pufru **KX** a odstřeďte **1 minutu** při **10 000 × g.**
13. Vylejte obsah sběrací zkumavky a kolonku do ní znovu vložte.
14. Do kolonky přidejte **500 µl** pufru **K2** a odstřeďte **1 minutu** při **10 000 × g.**
15. Vylejte obsah sběrací zkumavky, kolonku do ní znovu vložte a dodatečně odstřeďte **1 minutu** při **maximální rychlosti.**
16. Vložte kolonku do nové 1,5 ml zkumavky a přidejte **200 µl na 70 °C předehřátého 10 mM Tris-HCl pufru** (pH 8,5) nebo **vody.**
17. Inkubujte **2 minuty** při **pokojové teplotě.**
18. Centrifugujte 2 minuty při **10 000 × g.**
19. Ve zkumavce je nyní obsažena DNA.

Poznámky

1) Při pipetování somatických buněk dbejte na to, aby nebyla do špičky nabrána horní tuková vrstva mléka.
2) Špička se při nabírání somatických buněk často ucpává, je proto možné si před odběrem ustřihnout či uříznout sterilním nástrojem asi 1 mm její spodní části.
3) Nikdy nepřidávejte proteázu přímo do pufru K1! Vždy nejprve zamíchejte proteázu s krví a pak teprve přidávejte pufr K1.
4) Chcete-li získat DNA zcela bez kontaminace RNA, přidejte 10 µl roztoku RNase A ještě před pufrem K1.

Podpořeno projektem FRVŠ 2385/2007