Izolace DNA ze svaloviny, tuku

JETQUICK Tissue DNA Spin Kit

Materiál:
tkáň (60 mg),JETQUICK Tissue 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, RNazu A a pufry TX a T3.

Pracovní postup:

!Před začátkem izolace je třeba zahřát termostat na 56 a 70 °C.

A) Příprava vzorku

1. Do 1,5 nebo 2 ml zkumavky napipetujte **200 µl** pufru **T1.**
2. Rozkrájejte vzorek tkáně sterilním skalpelem na malé kousky a vložte do zkumavky s pufrem a převracením důkladně zamíchjte.
3. Přidejte **25 µl proteinazy K** (20 mg/ml)a důkladně zamíchejte.
4. Inkubujte **minimálně 1 – 2 hodiny** při **56 °C** (inkubace může být prováděna přes noc). Během inkubace několikrát důkladně promíchejte převracením.
5. Pokud po inkubaci není všechna tkáň rozložena (rotzok musí být čistý), odstřeďte zkumavku **10 minut** při **10 000 × g** a 4 **°C** a odeberte pouze horní část = čistý lyzát.

Podpořeno projektem FRVŠ 2385/2007

B) Izolace DNA

6. Do čistého lyzátu přidejte **200 µl** pufru **T2** a míchejte velmi důkladně, dokud nebude směs homogenizována.
7. Směs **inkubujte** po dobu **10 minut** při **70 °C.**
8. Nechte směs vychladnout asi 1 minutu.
9. Poté ke směsi přidejte **200 µl 100% ethanolu** a **okamžitě** důkladně **promíchejte.**
10. Vložte kolonku do 2 ml sběrací zkumavky, přeneste směs z kroku 9 na membránu kolonky a kolonku uzavřete.
11. Kolonku vloženou ve sběrací zkumavce odstřeďte **1 minutu** při **10 000 × g.**
12. Vylejte obsah sběrací zkumavky a kolonku do ní znovu vložte.
13. Do kolonky přidejte **500 µl** pufru **TX** a odstřeďte **1 minutu** při **10 000 × g.**
14. Vylejte obsah sběrací zkumavky a kolonku do ní znovu vložte.
15. Do kolonky přidejte **500 µl** pufru **T3** a odstřeďte **1 minutu** při **10 000 × g.**
16. Vylejte obsah sběrací zkumavky, kolonku do ní znovu vložte a dodatečně odstřeďte **2 minuty** při **max. rychlosti.**
17. Vložte kolonku do nové 1,5 ml zkumavky a přidejte **200 µl na 65 – 70 °C předehřátého 10 mM Tris-HCl pufru** (pH 9) nebo **vody.**
18. Inkubujte **1 minutu** při **pokojové teplotě.**
19. Centrifugujte **2 minuty** při **10 000 × g.**
20. Ve zkumavce je nyní obsažena DNA.

Poznámky

1) Pufry T1 a T2 obsahují škodlivé chemické látky – zacházejte s nimi opatrně a používejte ochrané pomůcky (rukavice, plášť, brýle).
2) Chcete-li získat DNA zcela bez kontaminace RNA, přidejte 20 µl roztoku RNase A do čistého lyzátu (před krokem 6) a inkubujte 5 minut při 37 °C.

Podpořeno projektem FRVŠ 2385/2007