

Izolace jader z buněk lidské tkáňové kultury

Před začátkem práce je nutno si připravit:

Pracovní roztoky – 1xPBS (k dispozici bude 10xPBS), Sacharózový pufr, Glycerolový pufr

Laboratorní pomůcky – centrifugační kyvety nebo Falconky, pipety a špičky, centrifuga s rotorem odpovídajícím typu kyvet (dát vychladit na 4°C), eppendorfky, skleněný homogenizátor.

Izolace probíhá v komorové lednici nebo v laboratoři, přičemž je nutné držet vzorky maximálně na ledu. Všechny roztoky a centrifuga jsou předem vychlazené.

1. Buňky suspenzní kultury se stočí v centrifugační kyvetě nebo eppendorfce (dle objemu kultury, pro izolaci je třeba přibližně 10^6 buněk). Podmínky centrifugace: 3 000 RPM/10 min/4°C.
2. Odstraníme supernatant a sediment rozsuspendujeme v 1xPBS; centrifugace jako v bodě 1.
3. Odstraníme supernatant, přidáme 5 - 10 ml Sacharózového pufru, sediment rozsuspendujeme pomocí modré špičky. Centrifugace jako v bodě 1.
4. Odstraníme supernatant, přidáme 5 - 10 ml Sacharózového pufru, sediment rozsuspendujeme. Přelijeme suspenzi do vychlazeného homogenizátoru, homogenizujeme (20krát).
5. Přelijeme homogenát do centrifugační kyvety, centrifugace jako v bodě 1.
6. Odstraníme supernatant, rozsuspendujeme sediment v 5 ml Glycerolového pufru. Centrifugace jako v bodě 1.
7. Odstraníme supernatant, rozsuspendujeme sediment v 1 ml Glycerolového pufru.
8. Rozdělíme suspenzi jader po 200 μ l do eppendorfek, přeneseme v tekutém dusíku do mrazícího boxu (-70°C), kde se jádra uchovají.

Sacharózový pufr:

0,3M sacharóza
10mM HEPES-NaOH, pH 7,9
1% Triton X-100
3mM CaCl₂
2mM octan hořečnatý

koncentrace zásobních roztoků:

prášek (Mr=342,30)
1M HEPES-NaOH
100% Triton X-100
prášek (Mr=147,02 – dihydrát)
prášek (Mr=214,46 – tetrahydrát)

Glycerolový pufr:

25% glycerol
10mM HEPES-NaOH, pH 7,9
0,1mM EDTA
0,1mM EGTA
5mM octan hořečnatý

koncentrace zásobních roztoků:

100% glycerol
1M HEPES-NaOH
0,5M EDTA
0,5M EGTA
prášek (Mr=214,46 – tetrahydrát)