

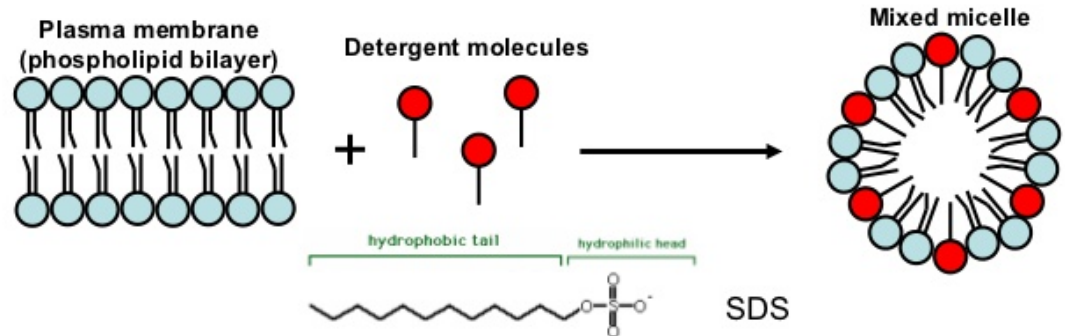
# Izolace genomové DNA

Postup:

1. Růst kultury, buněk, odebrání tkáně, ...
2. Homogenizace tkání, lyze buněk
3. Odstranění RNA, proteinů, zbytků membrán, polysacharidů ...
4. DNA recovery

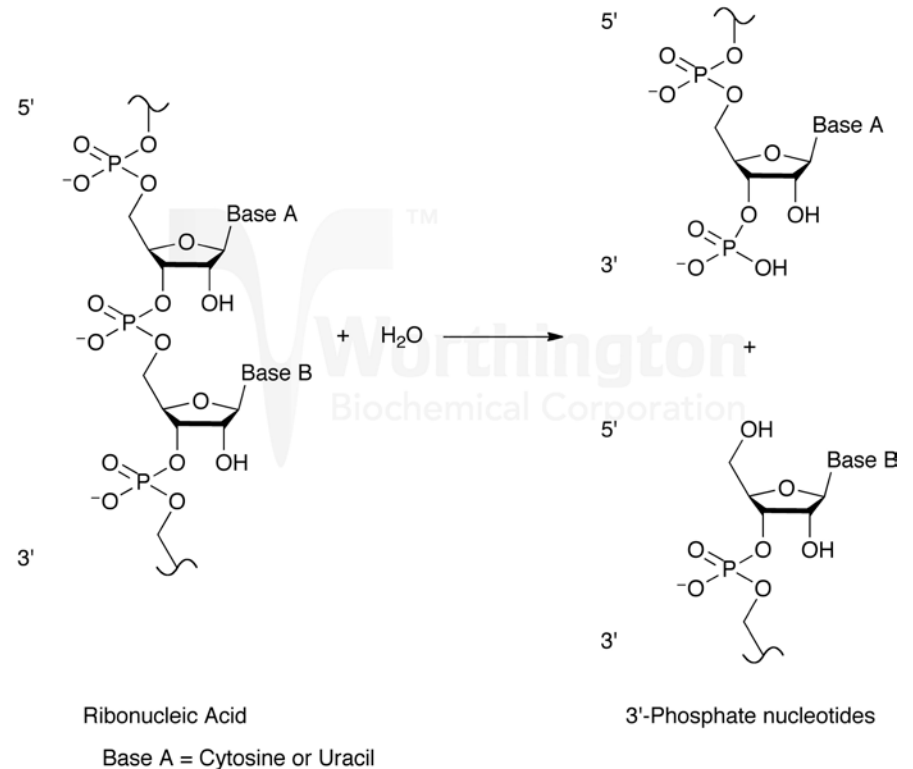
# Homogenizace tkání, Lyze buněk

- Var
- Sonikace (ultrazvuk)
- Detergent
- Opakované zamražení/rozmražení
- Enzymy (narušení buněčné stěny, narušení tkáně)
- Mechanická dezintegrace (hmoždíř, „vortex“ s pevnými částicemi ...)
- Chaotropické látky (guanidinové soli)

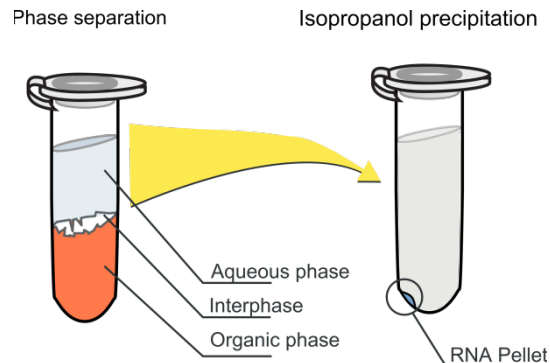


# Odstranění kontaminant

RNA – RNáza A – štěpí za pyrimidiny



Proteiny – proteináza K, pronáza, extrakce fenol/chloroform, formamidem, vysolení, ...

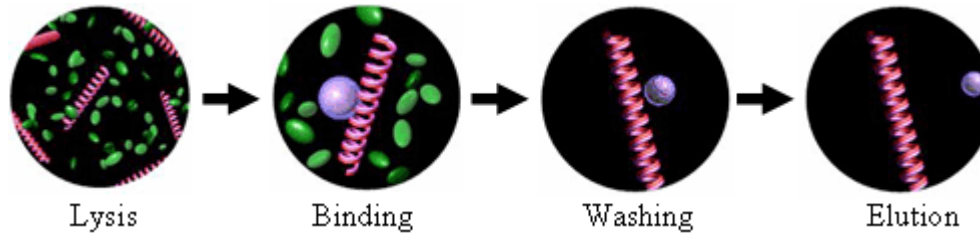


# DNA recovery

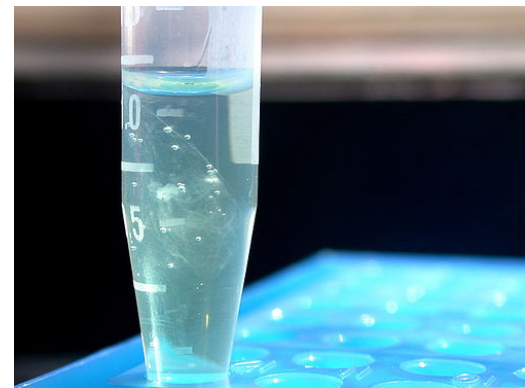
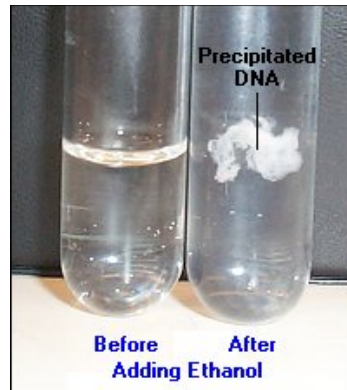
- chromatografie



- silika kuličky



- srážení alkoholy



# Izolace genomové DNA eukaryot

- většinou se používají komerční kity
- při izolaci – mechanické síly – fragmenty DNA ne větší než 150 kbp
- pro získání fragmentů větších než 200 kbp - tvorba genomových knihoven
  - extrakce organickými látkami – formamid
    - fenol/chloroform
  - izolace v agarozových bločcích

- 1) Izolace vychází z buněčné kultury adherentních buněk narostlých na 60mm misce v 50-70% konfluenci.
- 2) Odpipetujte médium a buňky vystavte působení 1 ml roztoku 1mM EDTA v PBS.
- 3) Po 3-5 minutách, oplachujte misky roztokem 1mM EDTA v PBS dokud se přisedlé buňky neuvolní ze dna misky. Suspenzi buněk přepipetujte do mikrozkušavky.
- 4) Buňky v mikrocentrifugační zkumavce centrifugujte při 400g/5 min.
- 5) Odpipetujte supernatant a sediment suspendujte ve 400  $\mu$ l pufru A (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=8, 2 mM EDTA) s přídatkem RNAzy ve výsledné koncentraci 100  $\mu$ g/ml (10  $\mu$ l).
- 6) Přidejte 80  $\mu$ l 10% SDS, a 8  $\mu$ l proteinázy K (zásobní roztok 20 mg/ml). Opatrně promíchejte a inkubujte 1 hod při 55 °C.
- 7) Přidejte 360  $\mu$ l 5M NaCl, promíchejte převrácením, centrifugujte 12,000 RPM/10 min.
- 8) Supernatant přeneste do čisté mikrocentrifugační zkumavky, přidejte stejný objem izopropanolu a převrácením promíchejte dokud se nevysráží vlákno genomové DNA.
- 9) Centrifugujte při 12 000 RPM/10 min/4 °C.
- 10) Opláchněte sediment 1ml 70% etanolu, inkubujte 5 minut.
- 11) Odstraňte roztok etanolu, sediment osušte a rozpustte ve 40  $\mu$ l TE pufru.
- 12) Změřte koncentraci a čistotu na Nanodropu.

# Izolace vlastní genomové DNA

- během 5 minut a s doma dostupnými prostředky

- 1) Osolte cca 300 ml vody 2 lžicemi soli, mícháním rozpustíte sůl
- 2) Naberte co nejvíce této směsi do úst a cca 1 minutu s ní vyplachujte ústa
- 3) Poté směs vyplivněte do čisté sklenice.
- 4) Přidejte kapičku jaru nebo tekutého mýdla. Zlehka promíchejte, nenapěňte.
- 5) V jiné sklenice smíchejte cca 100 ml alkoholu s tmavou potravinářskou barvou.
- 6) Opatrně nalijte obarvený alkohol na výplach z úst. Lehce promíchejte. Ponechte chvíli stát (2 minuty).
- 7) Pozorujte vlákna své vlastní DNA.