

Bezkolonková metoda extrakce DNA z agarosového gelu

1. Fragment DNA je po elektroforetické separaci vyřezán pod UV lampou s využitím kopistky, žiletky či skalpelu.
2. Vyřezaný bloček je zvážen a vložen do 1,5ml zkumavky. Na každý miligram váhy bločku se přidá 2,5 μ l roztoku NaI, tj. například 250 μ l NaI na 100 mg bloček.
3. Provede se inkubace bločku v NaI při 55°C po dobu 3-5 minut, pokud možno za konstantního protřepávání tak, aby se agarosa rozpustila. Po dokonalém rozpuštění agarosy je roztok protřepán.
4. K roztoku se přidá důkladně promíchaný roztok silikonových částic, a to v množství:
 - 5 μ l roztoku, pokud fragment DNA odhadujeme v množství do 1 μ g (1 μ g DNA se jeví jako zřetelný proužek na gelu)
 - 10 μ l roztoku, pokud fragment DNA odhadujeme v množství mezi 1-3 μ g (velmi jasný proužek na gelu)
 - při každých dalších 3 μ g se přidá dalších 10 μ l roztoku
5. Roztok se promíchá a nechá stát na ledu 5-15 min. Poté se roztok krátce (10s) centrifuguje.
6. Silikonové částičky s navázanou DNA se promývají ve 200 - 500 μ l promývacího roztoku, a to celkem 3x. Při promývání se vždy sediment rozmíchá špičkou, krátce se centrifuguje (5s) a supernatant se vyleje.
6. Závěrem promývání se roztok centrifuguje (30s) a odstraní se zbytek supernatantu.
7. Přidá se 10 μ l (při větším množství extrahované DNA se přidá stejný objem, jaký mělo silica milk) vody nebo TE pufru.
8. Roztok se inkubuje při 55 °C, 3 minuty. Centrifuguje se 1 min, odebere se supernatant, tj. roztok s DNA.

PROTOKOL

Příprava roztoku silikonových částecek (100 mg/ml):

Smícháme 1 g silikonových částecek (Sigma S5631) s 10 ml 1X PBS. Protřepeme a necháme sedimentovat 2 hod. Supernatant vylijeme, sediment znovu smícháme s 10 ml 1X PBS a opakujeme usazení. Supernatant vylijeme, centrifugujeme při 2000 rpm, 2 min. Vylijeme zbytek supernatantu a sediment rozmícháme v 10 ml 3M NaI. Skladujeme v temnu při 4°C.

NaI (6M)

Rozpustíme 0,75 g Na₂SO₃ ve 40 ml vody. Přidáme 45 g NaI a mícháme do rozpuštění. Filtrujeme a skladujeme v temnu při 4°C, a to nejdéle 4 měsíce.

Promývací roztok: 20 mM Tris, pH7,4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50% etanol. Skladujeme v -20°C.