**Izolace starobylé DNA (LBMA)**

Chemikálie a pomůcky:

* 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich Co.)
* 0,5% SDS (ICN Biomedicals Inc.)
* proteináza K (Qiagen)
* MinEluteTM PCR purification Kit (Qiagen)
* 2 ml zkumavky (Eppendorf AG)
* 10 ml polypropylenové zkumavky (Equimed®)
* špičky (Eppendorf AG)
* pipety (Eppendorf AG)

Přístroje:

* thermoshaker TS-100 (Biosan Ltd.)
* centrifuga Centrifuge 5415D (EppendorfAG)
* vortex mixer (Velp Scientifica)

Postup:

Metoda purifikace vychází z publikace Yanga *et al.*, (1998) a Anderunga *et al.*, (2008).

* 100 mg kostního prášku bylo naváženo a vsypáno do zkumavky o objemu 2 ml.
* Přidáme 1 ml extrakčního pufru (0,5 M EDTA pH 8,0 a 0,5% SDS) a 1 mg proteinázy K (20 μl).
* Směs inkubujeme v thermoshakeru při 56 ºC po dobu 12 hodin. Do vzorku opět připipetujeme 1 mg proteinázy K (20 μl) a směs znovu inkubujeme 12 hodin při 56 ºC.
* Poté lyzát centrifugujeme po dobu 5 minut při 2000 rpm.
* 750 μl supernatantu přepipetujeme do 10 ml zkumavky a přidáme 2,5 ml PB pufru.
* 700 μl této směsi napipetujeme do kolonky a centrifugujeme 1 minutu při 13000 rpm.
* Filtrát ve sběrné zkumavce odstraníme. Promývání směsi peletu a PB pufru opakujeme až do spotřebování směsi.
* Následně do kolonky přidáme 600 μl PE pufru.
* Poté probíhá centrifugace 1 minutu na 13000 rpm.
* Kolonku umístíme do nové 1,5 ml zkumavky a přidáme 50 μl EB pufru.
* Vzorek minutu inkubujeme při pokojové teplotě.
* Centrifigujeme 1 minutu na 13000 rpm. Ještě jednou opakujeme tento krok. Celkem tedy získáme asi 96 μl produktu.