

## **Izolace starobylé DNA (LBMA)**

### Chemikálie a pomůcky:

- 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich Co.)
- 0,5% SDS (ICN Biomedicals Inc.)
- proteináza K (Qiagen)
- MinElute™ 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  $\mu$ l).
- Směs inkubujeme v thermoshakeru při 56 °C po dobu 12 hodin. Do vzorku opět připipetujeme 1 mg proteinázy K (20  $\mu$ l) a směs znovu inkubujeme 12 hodin při 56 °C.
- Poté lyzát centrifugujeme po dobu 5 minut při 2000 rpm.
- 750  $\mu$ l supernatantu přepipetujeme do 10 ml zkumavky a přidáme 2,5 ml PB pufru.
- 700  $\mu$ l 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  $\mu$ l PE pufru.
- Poté probíhá centrifugace 1 minutu na 13000 rpm.
- Kolonku umístíme do nové 1,5 ml zkumavky a přidáme 50  $\mu$ l EB pufru.
- Vzorek minutu inkubujeme při pokojové teplotě.

- Centrifiguje 1 minutu na 13000 rpm. Ještě jednou opakujeme tento krok. Celkem tedy získáme asi 96  $\mu$ l produktu.