

TÉMA	NUKLEOVÉ KYSELINY
Úloha 35:	Mikropreparatívna izolácia plazmidovej DNA
Princíp:	<i>Na overenie prítomnosti plazmidovej DNA v danom bakteriálnom kmeni a na zistenie efektivity ďalšej izolácie plazmidovej DNA z väčších množstiev je využívaná mikropreparatívna izolácia plazmidovej DNA.</i>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. TEG: 50 mM glukóza, 10 mM kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA), 25 mM tlmivý roztok Tris 2. TE: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8,3) 3. 3 M KAc: 120 ml 5 M roztoku CH₃COOK (pH 7), 23 ml ľadovej CH₃COOH 4. fenol-chloroform (fenol:chloroform:izoamylalkohol = 25:24:1) 5. 0,2 M NaOH + 1 % dodecylsulfát sodný (SDS) 6. izopropylalkohol 7. 96 % etanol 8. nočná bakteriálna kultúra
Materiál:	skúmavky Eppendorf s objemom 1,5 ml, centrifúga, mikropipety
Postup:	<p>Dvakrát po 1,5 ml nočnej bakteriálnej kultúry centrifugujeme po 5 min v plastovej mikroskúmavke Eppendorf pri 5000 ot/min (2400 g). Supernatant zlejeme a sediment rozsuspendujeme v 100 µl roztoku TEG. Pridáme 200 µl roztoku 0,2 M NaOH + 1 % SDS. Zmes prevaľujeme v 'eppendorfke' 5 minút. Po 5 minútach pridáme 150 µl roztoku KAc a poriadne premiešame.</p> <p>Zrazeninu centrifugujeme 10 minút pri 10000 ot/min (9500 g). Supernatant odoberieme do čistej 'eppendorfkovej' skúmavky, pridáme 0,6 objemu (cca 300 µl) izopropanolu, premiešame a necháme zrážať 20 minút v chladničke. Po 20 minútach zrazeninu centrifugujeme 10 minút pri 10000 ot/min (9500 g), supernatant zlejeme a zrazeninu vysušíme vo vákuovej rotačnej sušičke (~ 30 min). Po vysušení zrazeninu rozpustíme v 100 µl roztoku TE a pridáme 100 µl roztoku fenolchloroformu. Premiešame a centrifugujeme 5 minút pri 5000 ot/min (2400 g).</p> <p>Do čistej 'eppendorfkovej' skúmavky opatrne odoberieme vrchnú vodnú vrstvu obsahujúcu DNA, znova pridáme 100 µl roztoku fenol-chloroformu a tento postup opakujeme do vymiznutia medzivrstvy. Potom pridáme dvojnásobný objem 96 % etanolu a necháme zrážať pri -20 °C. Nakoniec zrazeninu centrifugujeme 5 minút pri 10000 ot/min (9500 g), vysušíme, rozpustíme v 20 µl roztoku TE a použijeme v úlohách 36, 37 a 38.</p>