

IZOLACJA DNA Z KRWI SSAKÓW METODĄ FENOLOWO-CHLOROFORMOWĄ

1. Przygotować 2 opisane (wieczko, bok) probówki typu eppendorf o pojemności 2ml.
2. Do 200µl rozmrożonej krwi dodać 200µl buforu lizującego. Mieszać przez odwrócenie, odstawić na 5min.
3. Wirować w temperaturze pokojowej 1min z prędkością 12tys. obr./min. Wylać płyn z nad osadu i odsączyć probówkę na bibule.
4. Do osadu dodać 200µl buforu lizującego i końcówką pipety rozbić osad, mieszając go z buforem lizującym w probówce.
5. Wirować w temperaturze pokojowej 1 min z prędkością 12tys. obr./min. wylać płyn z nad osadu i odsączyć probówkę na bibule.
6. Krok 5 i 6 należy powtórzyć, (kremowa barwa osadu świadczy o oczyszczeniu go z erytrocytów).
7. Po ostatnim zlaniu buforu lizującego należy odwirować próbkę przez 30s z prędkością 12tys. obr./min i dokładnie (kończówką pipety) odciągnąć resztę buforu.
8. Do suchego osadu dodać kolejno 140µl buforu **P** i 2µl proteiny **K** (20µg/ml) oderwać osad od dna probówki i delikatnie go rozbić.
9. Inkubować w łaźni wodnej w temperaturze 55°C przez 20 minut.
10. Dodać 500µl fenolu i 500µl chloroformu (należy zachować podaną kolejność). Mieszać przez odwracanie ok. 1min. Inkubować* w temperaturze pokojowej 5min. Wirować w temperaturze pokojowej 10min z prędkością 10tys. obr./min.
11. Zebrać górną fazę do nowej probówki (unikać zbierania warstw osadu!!!).
12. Dodać 500µl chloroformu, mieszać przez odwracanie ok. 1min., wirować w temperaturze pokojowej 10min. Z prędkością 10tys. obr./min.
13. Zebrać górną fazę do nowej probówki.
14. Przechowywać w lodówce do wytrącenia.

SZYBKA LIZA W WARUNKACH TERENOWYCH- WYMAZ KOMÓREK NABŁONKA Z POLICZKA

1. Przygotować 1 opisaną (wieczko, bok) probówki typu eppendorf o pojemności 2ml.
2. W probówce umieścić wymazówkę (należy odciąć patyczek nożyczkami poniżej linii zamknięcia probówki)
3. Dodać 500µl 50mM NaOH, zworteksować, zwirować, zakleić wieczko parafilmem.
4. Inkubować w temperaturze 95°C przez 10min
5. Po zdjęciu parafilmu dodać 50µl 1M TRIS-HCl, zworteksować, zwirować

Uzyskany izolat należy wykorzystać w ciągu doby.

*W miarę możliwości czynności należy wykonywać pod wyciągiem