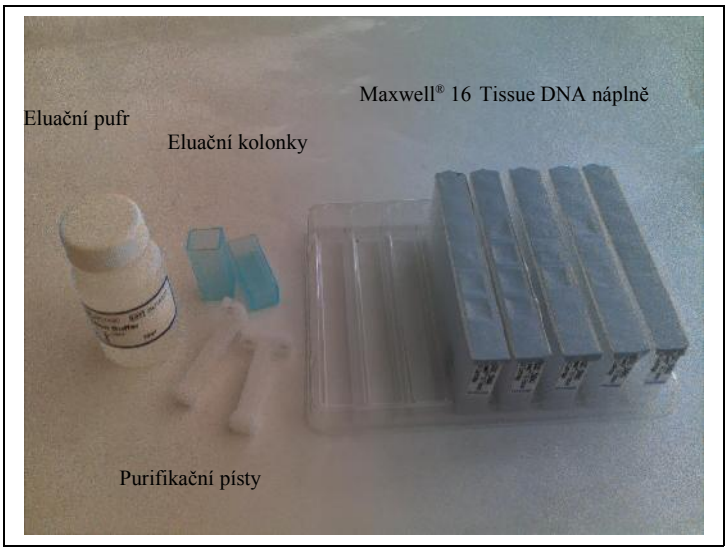
Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D. a Ing. Pavel Hanáček, Ph.D. (Ústav biologie rostlin AF MENDELU) 2010

Izolace genomické DNA rostlin pomocí přístroje Maxwell 16

Použité přístroje a chemikálie:

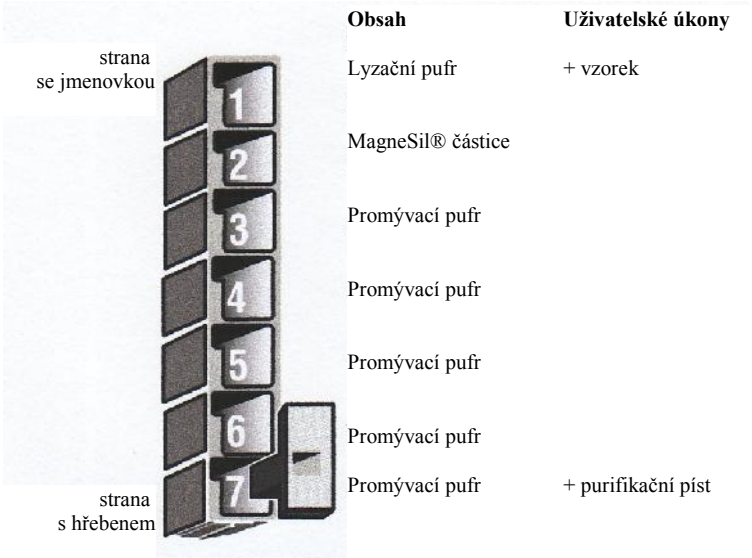
1. přístroj Maxwell® 16 (řada AS2000, f. Promega, USA) (obr. 1)
2. Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (f. Promega, USA) pro 48 izolací složení (obr. 2):
   - 48x Maxwell® 16 Tissue DNA náplní (obr. 3)
   - 50x purifikačních pístů
   - 50x eluačních kolonek
   - 20ml eluačního pufru

Obr. 1 Přístroj Maxwell® 16



Obr. 2 Složení Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kitu

Pracovní protokol využívá přístrojové vybavení pořízené z rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1351/2010/Aa s názvem „***Rozvoj molekulárně-biologické laboratoře pro praktickou výuku studentů***“



Obr. 3 Složení Maxwell® 16 Tissue DNA náplně

Materiál:
rostlinné pletiva – část listu (cca 5mm), semena apod.

Tab. 1 Standardní výtěžnost genomické DNA při použití kitu Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (*Promega Application Notes*)

Vzorek	Zdroj	Vstupní množství	Výtěžek DNA (µg)	Doba izolace
Arabidopsis thaliana	list	1 list	0,13	
Brassica napus	list	8mm listový disk	0,51	
Brassica napus	semeno	5 semen	2,3	
Fragaria ananassa	list	8mm listový disk	0,19	2 hodiny
Glycine max	list	8mm listový disk	0,58	
Glycine max	semeno	1 semeno	3,1	2 hodiny
Gossypium hirsutum	list	8mm listový disk	0,85	
Gossypium hirsutum	semeno	1 semeno	2,6	2 hodiny
Medicago sativa	list	8mm listový disk	1,4	
Oryza sativa	list	5mm část listu	0,23	2 hodiny
Oryza sativa	semeno	1 semeno	0,21	2 hodiny
Solanum lycopersicum	list	8mm listový disk	0,73	
Triticum aestivum	list	5mm část listu	5,6	2 hodiny
Triticum aestivum	semeno	1 semeno	1,4	2 hodiny
Vitis vinifera	list	8mm listový disk	0,02	2 hodiny
Zea mays	list	8mm listový disk	0,65	

V případě použití pletiv s nižším obsahem vody (např. zralá semena) doporučuje výrobce úpravu vzorku předpůsobením CelluACE™ XG, která obsahuje enzym celulose a jiné karbohydratasy.

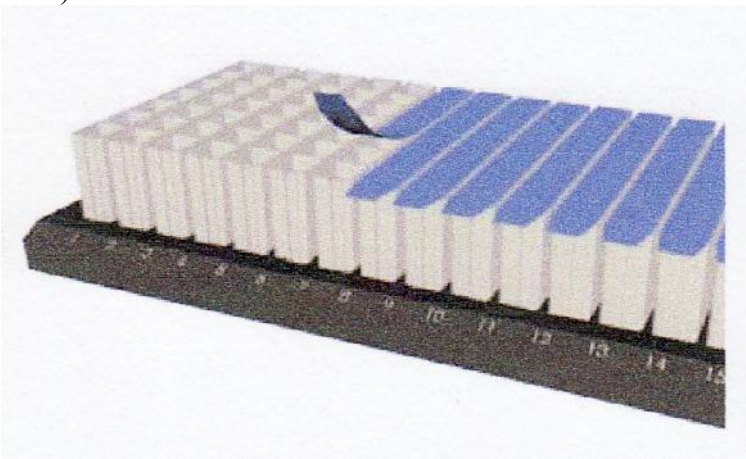
Předpůsobení:

a)
- rostlinné pletivo (doporučené množství)
- mikrozkumavka (1,5 ml)
- 100µl XB pufru
- 5 µl CelluACE™ XG enzymu
- inkubovat při 50°C za konstantního míchání po dobu 2 hod.

b) předpůsobení je možno nahradit rozdrcením materiálu v tekutém dusíku

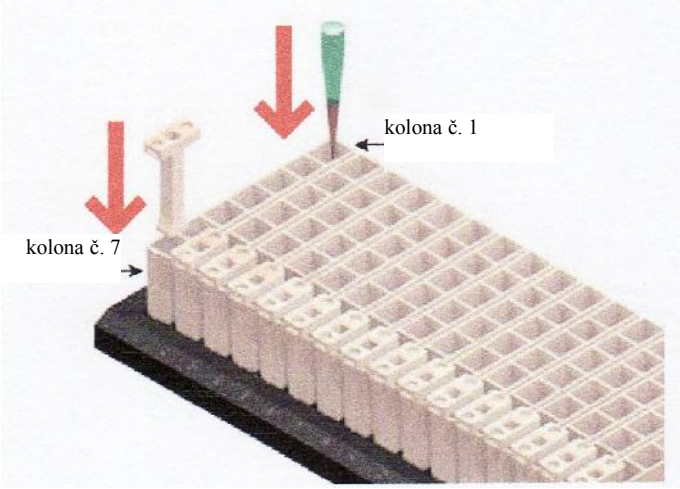
Pracovní postup:

1. napěstovat a odebrat rostlinné pletivo podle použité rostliny a její části
2. předpůsobení (pozn. pokud je to nutné)
3. připravit vlastní Maxwell® 16 Tissue DNA náplně v přílišném stojánku a odstraní uzávěru (obr. 4)



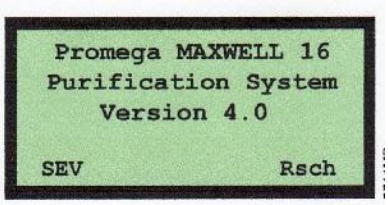
Obr. 4 Příprava náplní ve stojánku

4. přidat vzorek do kolony č. 1 v náplni a purifikační píst do kolony č. 7 (obr. 5)



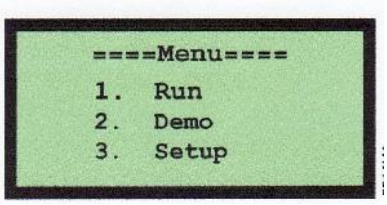
Obr. 5 Příprava náplní na vlastní analýzu

5. vložit jednotlivé náplně do přístroje
6. vložit kolony na eluační pufr na příslušné místo v přístroji
7. napipetovat 300 µl elačního pufru do příslušných kolon
8. zavřít dvířka přístroje
9. spustit přístroj (dle českého uživatelského manuálu)



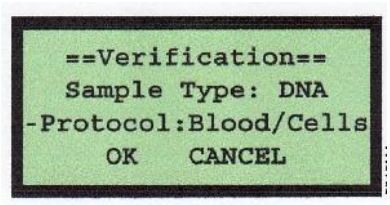
výběr možnosti operačního modu Rsch (Research)

↓



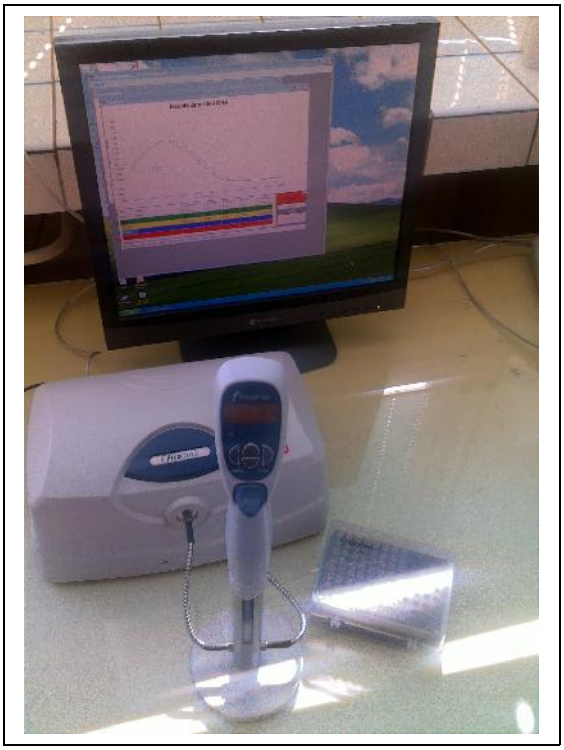
výběr možnosti „Run“

↓



výběr vhodného programu podle použitého izolačního kitu

10. v případě zůstatku magnetických částic v elační kolonce je možné tyto částice odstranit umístěním elačních kolon do magnetického stojánku
11. přepipetovat izolovanou genomickou DNA do 1,5ml mikrozkumavky
12. změřit koncentrace genomické DNA pomocí spektrofotometru Picodrop (obr. 6)



Obr. 6 Spektrofotometr Picodrop (f. Picodrop, UK) s příslušenstvím

13. uchovat genomickou DNA do analýzy při 4ºC nebo při -18ºC podle potřeby

Pracovní protokol využívá přístrojové vybavení pořízené z rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1351/2010/Aa s názvem „***Rozvoj molekulárně-biologické laboratoře pro praktickou výuku studentů***“