

## Genomi DNS izolálás

Alapanyag:

Max.  $10^7$  sejt vagy 100mg fagyasztva megőrölt natúr szövet. A sejtet előtte PBS-sel megmossuk, lefugáljuk és a pelletből dolgozunk.

1. +500ul Lízis pufferben ld.alul felszuszpendáljuk az alapanyagot, eppendorf csőbe tesszük.
2. +SDS 0.5%-os végkoncentrációra számolva (pl. 5%-osból 55ul). Vortex.
3. +5ul ProtK (10mg/ml-ből). Vortex.
4. Inkubálás 50 fokon 1h. (De lehet akár éjszakán át 37 fokon.)
5. Fehérje extrakció fenol-kloroform eleggyel (fenol/kloroform/izoamilalkohol elegy is jó). 1:1 térfogatarányban, fenti térfogatok esetén kb. 600ul eleggyel vortex.
6. Fuga 10 perc minimum 3000rpm asztali centrifugán.
7. Felső vizes fázist átpipettázzuk új csőbe, nem baj, ha beleszívunk az alsó fázisból. Az új eppendorfban egy kicsit össze lehet törni a takonyszerű anyagot a pipettahegyet leszorítva a cső aljára fel-le szívogatva.
8. 1:1 arányban kloroformmal újból kirázzuk vortex-szel.
9. Fuga 10 perc minimum 3000rpm.
10. Felső vizes fázist átpipettázzuk új csőbe, vigyázva hogy ne szívjunk bele sem a másik fázisba, sem a kettő között úszó szövetmaradékba. Inkább kevesebbet szívjunk le, fenti mennyiségek esetén elég 400-500ul.
11. Kicsapás 1:1 térfogatarányú hűtőhideg izopropanollal (kb.500ul). Forgatással keverjük, állás hűtőben vagy jégen 10 percig.
12. Fuga 10 perc maxon (13000rpm asztali fugán).
13. Ha látszik a pellet, leszívjuk róla az izopropanolt. Ha nem látszik, akkor csak leöntjük.
14. Mosás fél ml 70-80%-os hűtőhideg etanollal. Állás 5-10perc hűtőben, fenol nyomok kioldása. A pelletet mossuk fel az aljáról vortexszel vagy pipettával, de nem muszáj teljesen szétszedni. Ha nem látszik a pellet, ne foglalkozzunk vele.
15. Fuga 10 perc maxon.
16. Etanolt leszívjuk vagy leöntjük.
17. Ezután be lehet szárítani, de ha túlzottan beszárad, nehezen oldódik be.

18. Szárítás nélkül is fel lehet venni tetszés szerinti mennyiségű vízben.

Beoldás elősegítésére 40-50 fokon inkubálhatjuk 5-10 percig.

Maximum kiindulási mennyiség esetén 150ul vízben felvéve minimum kb. 1ug/ul DNS-t kapunk.

Lízis puffer: 10mM Tris-HCl, 100mM EDTA, pH=8.0.