

Präparation genomischer DNA aus Kulturzellen und Geweben

Anmerkung: DNA geeignet für Southern blotting, PCR, Herstellung genomischer Bibliotheken.

Kulturzellen

1. Nachfolgende Angaben für 10-40 Mill. Zellen (Volumina bei Prot.K-Inkubation ggf. erhöhen). Zellen trypsinieren und 2 min bei 1 200 rpm abzentrifugieren. Trockenes Zellpellet kann eingefroren oder sofort verarbeitet werden: In 0,5 ml TE resuspendieren. 2,5 ml Proteinase K-Puffer incl. 200 µg/ml Prot. K, 200 µg/ml RNase A zugeben. Über Nacht oder länger bei 55°C unter langsamer Dreh-oder Schüttelbewegung inkubieren.
 - Alternativ können Zellen direkt lysiert werden: Medium abkippen, einmal mit 5 ml Wasser waschen, vollständig abkippen. Pro große Flasche etwa 2-3 ml PK-Puffer incl. PK/RNase (s. oben) zugeben und einige Minuten auf Schüttler inkubieren. Dann Lysat in Falcon-Röhrchen überführen. Über Nacht oder länger bei 55°C unter langsamer Dreh-oder Schüttelbewegung inkubieren.
2. 0.4 Vol. Phenol (TE- gesättigt) zugeben, gründlich und vorsichtig mischen. Dann 0.4 Vol Chloroform zugeben und nochmal gründlich mischen. 5 min bei RT zentrifugieren (mindestens 5 000 rpm, besser 14 000 rpm). Überstand in neues Röhrchen überführen.
 1. 0.8 Vol. Phenol/Chloroform zugeben und gründlich mischen. Wie zuvor zentrifugieren. Extraktion wiederholen, falls noch Interphase vorhanden. Wenn nicht, wässrige Phase einmal mit 0.8 Vol. Chloroform extrahieren und wie beschrieben verarbeiten. Optional, aber hilfreich: 2-3 x mit gleichen Vol Ether extrahieren(obere Phase): Ether zugeben,mischen,für einige Sek zentrifugieren,aspirate off with Gilson tip attached to pump (hold tip a few mm above surface!). If ether is removed, phase changes shape! After final extraction, stand in 60°C water bath with lid open for 1-2 min to let ether evaporate. This procedure increases purity of DNA.
3. 1/20 Vol. 3 M NaOAc und 0.7 Vol. Isopropanol zu wässriger Phase geben (bei weniger als 1 Million Zellen 1 µl Glykogen zugeben), mischen. 5-10 min bei 14 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, einmal mit 1 ml 70 % und einmal mit 100 % EtOH waschen, jeweils 2 min. zentrifugieren. Alkohol vollständig entfernen und DNA kurz lufttrocknen. Nicht übertrocknen!
4. DNA in 0,5 - 2 ml TE aufnehmen (kann einige Stunden dauern). Durch vorsichtiges Pipettieren vollständig lösen.
5. Lagerung der DNA bei 4°C.

Gewebe

Gewebe mit flüssigem Stickstoff in Warring Blender oder mechanisch (Mörser) pulverisieren (**Schutzbrille, Schutzhandschuhe**). Gewebepulver mit PK-Puffer incl. PK (0.2 mg/ml) und RNase (0.2 mg/ml) mischen (etwa 10 ml Puffer pro g Gewebe) und wie oben weiterverarbeiten.

HINWEIS

Bei den Extraktionen abgeschnittene Gilson –Spitzen (Viskosität) verwenden. Abnehmen von wäßrigen DNA-haltigen Überständen ist einfacher mit umgedrehten Glaspipetten (also Spitze in Peläusball) zu bewerkstelligen.

Proteinase K buffer

Final conc.	Amount from stocks
100 mM Tris-HCl pH 8.5	10 ml 1 M
5 mM EDTA	1 ml 0.5 M
0.2 % SDS	1 ml 20 %
200 mM NaCl	4 ml 5 M
	84 ml Sigma-grade water

Freeze as 10 ml aliquots at -20°C .