

Schnellisolierung von genomischer DNA aus Maus-Gewebe für PCR

- Gewebestückchen (0.5-0.8 cm Schwanzspitze, Ohrschnipsel oder anderes Gewebestück) in 200 µl Lysepuffer plus 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) plus 5 µl RNase (20 mg/ml) überführen (PK und RNase vor Zugabe mit Lysepuffer mischen).
(Bei großen Probenmengen MasterMix machen!)
- Mindestens 3 h (kleine Stücke), sonst ÜN bei 55°C im Drehinkubator inkubieren.
(Wochenende ok bei 37°C.)
- 5 min bei 14 000 rpm abzentrifugieren, Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen. 160 µl Isopropanol zugeben, mischen (Bei sehr kleinen Gewebemengen vorher je 1µl Glykogen zugeben).
- Proben mischen, DNA-Präzipitat mit gelber Spitze fischen, in neues Gefäß überführen. 1 x in 70 % Ethanol für 5 Sek . waschen (kurz Eintauchen) und in neues Eppendorfgefäß mit 200 µl TE überführen; an gelber Spitze hängenlassen und Spitze abwerfen. Mit geöffnetem Deckel 10 min bei 65°C inkubieren, Spitze entfernen und Deckel schließen.
- 2-3 h bei 55°C inkubieren.
- lagern bei 4°C.

Alternative, nach Isopropanolzugabe:

- 10 min wie zuvor zentrifugieren. Überstand verwerfen
- 500 µl 70 % EtOH zugeben, mischen. 2 min wie zuvor zentrifugieren, Überstand abnehmen, kurz zentrifugieren, restlichen Überstand völlig abnehmen und sofort
- DNA-Pellet in 200 µl TE aufnehmen (2-3 h bei 55°C inkubieren und vortexen). Etwa 2 µl für PCR einsetzen. (kann stark variieren;teilw. auch 1/20 Verdünnung notwendig)

WICHTIG: DNA-Pellet darf nicht trocken werden, da es sich sonst nur noch schwer in Lösung bringen läßt!

Für Southern: frische Schwanzspitzen verwenden, nicht bei -20°C einfrieren.
Phenol/Chloroform Extraktion kann eventl. auch bei schwachen PCRs helfen.

Lysepuffer:	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-Wasser

In 10 ml Aliquots bei -20°C einfrieren.