

Transgen Service

W450

Leiter:

Dipl.Ing. Ulrich Kloz

Dipl.Ing. Frank van der Hoeven

Im Neuenheimer Feld 280

D-69120 Heidelberg

Telefon +49.62 21.42-47 89

+49.62 21.42-47 84

Telefax +49.62 21.42-42 58

www.dkfz.de

u.kloz@dkfz.de

f.vanderhoeven@dkfz.de

Heidelberg, den 09.03.2010

Vorbereitung eines Plasmid-DNA Konstruktes zur Mikroinjektion (nicht für BAC-DNA!)

Allgemeine Ablauf:

- 1) Verdau der Maxiprep des Konstruktes, um den Vektor abzutrennen
- 2) Überprüfung des Verdau mit einer kleinen Menge auf einem Agarose Minigel
- 3) Trennung des Verdau über ein quantitatives Agarosegel
- 4) DNA Extraktion aus dem ausgeschnittenen Agarosestückchen mit Quiaex II, anschließend in H₂O oder 10mM Tris-Puffer, pH 7,5-8,5 aufnehmen
- 5) Quiaex Extrakt (beinhaltet DNA) durch ein Millipore Millex-GV 0.22µ Filter reinigen (mit einer 1ml Einmalspritze mit Luftpolster, um möglichst wenig DNA zu verlieren). **Millipore-Filter und Spritze stellen wir zur Verfügung.**
- 6) Filtrat gegen Mikroinjektionspuffer (50-100ml) dialysieren z.B. durch Tropfdialyse auf einer schwimmenden Millipore Membran VMW PO2500 / VM 0.05µm (glänzende Seite nach oben). Dialyse (> 3h) mit geschlossenem Dialysegefäß bei 4°C um Verdunstung des DNA-Tropfens (50-100µl bei schwimmender Dialyse) zu vermeiden. **Bitte nur den von uns zur Verfügung gestellten Dialyse-/Mikroinjektionspuffer und die Millipore Membran verwenden.**
- 7) Konzentrationsbestimmung des Dialysats auf einem Minigel mit Markern bekannter Größe und Konzentration bzw. durch photometrische Bestimmung.
- 8) Lagerung der DNA Lösung bei -20°C

Konzentrationsbestimmung

Das DNA Konstrukt muss nach der Dialyse (siehe oben) auf seine Konzentration bestimmt werden, z.B. durch einen Agarosegellauf mit einem geeichten Marker, was gleichzeitig auch nochmals die Reinheit überprüft (bitte ein Bild dieses Gellaufes mitbringen). **Wir benötigen eine dialysierte DNA Lösung mit einer Konzentration von 70-100ng/µl und einem Volumen von 50-100µl.** Die konzentrierte DNA Lösung wird von uns auf die Endkonzentration von 1-3ng/µl eingestellt.