

I. Eszközök:

- Vortex: Vortex Genie vagy egyenértékű
- Centrifuga (amely eléri a 10 000xg-t, az utolsó centrifugáláshoz 13 000xg)
- Fluoriméter: Qubit (Thermo Fisher) vagy egyenértékű
- Pipetták: P1000 és P200 (vagy P100). Ideális esetben a kísérletet két hallgató végzi, ezért minden csoportnak egy pár pipettára van szüksége.
- Hűtőblokk (1,5 ml-es Eppendorf csövekhez)

II. Fogyóanyagok az órai munkához:

- ZymoBiomics DNA Kit

Kit-komponens	Kód/ Ref	Mennyiség csoportonk ént	Teljes mennyiség 13 csoporthoz	Mennyiség csoportonként (with 10% loss)	Alikvot tartály
Lizátum (élesztő)	Előre feltört	400µl	5.2 ml	440 µl	1,5 ml-es cső
Kötőpuffer	D430 0-2-1 00	1,200µl	17.2 ml	1320 µl	1,5 ml-es cső
Mosópuffer 1	D430 0-3-5 0	400µl	5.7 ml	440 µl	1,5 ml-es cső
Mosópuffer 2	D430 0-4-6 0	900µl	12.9 ml	990 µl	1,5 ml-es cső
Eluáló víz	D430 2-5-1 0	100µl	1.5 ml	110 µl	0.5 or 1,5 ml-es cső

- Pipettahegyek (csoportonként):
 - o 1000 µl-es hegyek: 10 db (minimum 4-5)
 - o 200 µl-es hegyek: 8 db (minimum 2-3)

III. Előkészítés a labor előtt (0. nap):

A protokoll célja, hogy a gyakorlat körülbelül 45–60 percbe férjen bele. A DNS-izolálás 15 perces gyöngyzúzással kezdődik. Mivel a gyöngyzúzó nem tipikus laboratóriumi eszköz, nagy

fordulatszámú vortexet alkalmazunk. Ez 40 percet vesz igénybe, a mintát le lehet fagyasztani, és a hallgatók a fagyasztott minták felolvasztásával kezdhetnek.

Teljes előkészítési idő: ~70 perc

1. **Mintaelőkészítés (20 perc):**
 - o Adjon hozzá **50–100 mg** élesztőt és **750 µl Lysis Solution** 14 BashingBead csőbe.
2. **Mechanikai lízis (40 perc):**
 - o Alkalmazzon nagy sebességű homogenizátort (5–10 perc) vagy Vortex Genie-t (40 perc) az egyenletes lízis biztosítása érdekében.

OPCIONÁLIS: A folyamat itt megszakítható. Pedagógiaailag előnyösebb.

3. **Elsődleges tisztítás és alikvotálás (10 perc):**
 - o Centrifugálja a gyöngyöket tartalmazó csöveket **$\geq 10,000 \times g$ for 1 minute**.
 - o Óvatosan vigyen át **400 µl of the supernatant** (lizátumot) 13 friss 1,5 ml-es csőbe.
4. **Fagyasztás:**
 - o Tárolja **-20°C** . A protokoll szerint ez a legjobb megállási pont hosszú távú tároláshoz.

IV. Laboratóriumi gyakorlat (1. nap):

A protokoll nettó körülbelül 26 percet vesz igénybe, így kezdők számára is elegendő idő áll rendelkezésre.

Teljes foglalkozási idő: 50 perc

1. **Bevezetés és „Olvasztás és bemutatás” (15 perc):**
 - o Ossa ki a fagyasztott lizátumokat.
 - o Ezt az időt pipettázási tréningre kell fordítani, miközben a csövek a hallgatók kezében olvadnak fel.
2. **Végső lizátum tisztítás (4 perc):**
 - o Vigye át a **400 µl lysate** a következőbe: **Zymo-Spin III-F Filter**.
 - o Centrifugálja **8,000 x g for 1 minute**, majd dobja el a szűrőt.
3. **DNS-kötés (8 perc):**
 - o Adjon hozzá **1,200 µl DNA Kötőpuffer** a szűrlethez.
 - o Töltse be **800 µl** a következőre: **Zymo-Spin IICR Column**, centrifugálja **10,000 x g for 1 minute**, dobja el az átfolyatot, és ismétlje meg.
4. **Az oszlop mosása (9 perc):**
 - o Adjon hozzá **400 µl Mosópuffer 1**, centrifugálja.
 - o Adjon hozzá **700 µl Mosópuffer 2**, centrifugálja.
 - o Adjon hozzá **200 µl Mosópuffer 2**, centrifugálja.

5. **DNS elúció (5 perc):**

- o Vigye át az oszlopot egy tiszta csőbe; adjon hozzá **100 µl Water**.
- o **Várjon 1 percet.**
- o Centrifugálja **10,000 x g for 1 minute**.