

IT

Istruzioni d'uso

EXTRA-GENE I

Kit per l'estrazione del DNA genomico
50 Estrazioni

REF 7059

1. Descrizione del prodotto

EXTRA-GENE è un kit per l'estrazione veloce del DNA genomico senza l'utilizzo di solventi organici. Il kit contiene tutti i reagenti necessari per l'estrazione di 50 campioni singoli. L'estrazione si basa su una lisi selettiva degli eritrociti seguita da una separazione mediante un detergente, conseguente salting out delle proteine [1] e purificazione del DNA mediante precipitazione. Il DNA viene estratto in meno di 60 minuti senza preparare reagenti o soluzioni. La preparazione ha un indice di purezza R (extinction ratio OD_{260}/OD_{280}) sufficiente per l'utilizzo in reazioni enzimatiche [2]. Gli inibitori dell'amplificazione sono rimossi in modo efficace (per es. ferro dell'emoglobina [3]). Quando si utilizza il DNA nella PCR si deve usare sangue in EDTA o in citrato, poiché l'eparina è un forte inibitore dell'amplificazione [4]. Da 500 µl di sangue intero con una concentrazione normale di leucociti la resa è approssimativamente 5-30 µg di DNA ad alto peso molecolare da 500-600 µl di sangue intero con concentrazione leucocitaria standard. Con il kit EXTRA-GENE I è inoltre possibile estrarre DNA da colture cellulari e linfociti purificati. Senza ulteriore purificazione, il DNA può essere usato in analisi di restrizione (RLFP), nelle tecniche Southern Blot o nella PCR.

2. Materiale

2.1. Contenuto del kit

- ◆ 2x 50 ml **Solution 1** (buffer di lisi degli eritrociti)
- ◆ 1x 10 ml **Solution 2** (buffer di estrazione)
- ◆ 2x 10 ml **Solution 3** (reagente di precipitazione delle proteine)
- ◆ Istruzioni d'uso

2.2. Materiale supplementare e dispositivi richiesti

- ◆ Provette Eppendorf sterili da 1.5 ml / 2.0 ml
- ◆ Pipette (20 µl- 1000 µl)
- ◆ Centrifuga (almeno 13.000 rpm)
- ◆ Termoblocco o bagnetto termostato (56°C)
- ◆ Vortex
- ◆ Etanolo 96%
- ◆ Etanolo 70%
- ◆ Acqua distillata sterile

3. Conservazione e stabilità

Il kit EXTRA-GENE I viene spedito a temperatura ambiente. Tutti i reagenti devono essere conservati a 2-8°C una volta ricevuta la spedizione. La data di scadenza del prodotto e di ogni singolo reagente è indicata sulla confezione ed è valida anche per reagenti già aperti.

4. Estrazione

4.1 Preparazione

La **Solution 2** diventa torbida quando viene conservata al di sotto della temperatura ambiente. Questo non comporta una perdita di qualità. Prima dell'uso, incubare i componenti precipitati a **37°C**.

L'estrazione del DNA è ottimizzata per 500 - 600 µl di sangue. Se possibile, non eccedere o andare al di sotto di questa quantità (per le eccezioni si veda il paragrafo 4.3). Se si richiede una maggiore quantità di DNA, fare più estrazioni in parallelo. Usare solo sangue in EDTA o in citrato per l'uso in PCR!

Se i materiali di partenza sono linfociti, leucociti o cellule in coltura, iniziare l'estrazione dal punto indicato con il seguente simbolo ↵ (sedimento cellulare). Usare un massimo di 10^7 cellule per estrazione.

4.2 Estrazione del DNA

- ◆ Aggiungere **900 µl di Solution 1** a 0.5 - 0.6 ml di sangue in una provetta da 1.5 ml e agitare brevemente. Centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm.
- ◆ Scartare il supernatante e lavare il sedimento con **1 ml di Solution 1**. Centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm.
- ◆ Scartare il supernatante e
↵ risospendere il sedimento di leucociti in **240 µl di acqua distillata**.
Aggiungere **120 µl di Solution 2** e agitare o vortexare fino a che la miscela diventa limpida.
- ◆ Aggiungere **120 µl di Solution 3**.
Vortexare con cura ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.
Centrifugare per 5 minuti a 13 000 rpm.
- ◆ Trasferire il supernatante in una nuova provetta da 1.5 ml
- ◆ Aggiungere **120 µl di Solution 3**.
Vortexare con cura ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.
Centrifugare per 5 minuti a 13 000 rpm.
- ◆ Trasferire il supernatante in una nuova provetta.
Aggiungere **1 ml di etanolo al 96%** e miscelare ruotando delicatamente la provetta.
Centrifugare per 2 minuti a 13 000 rpm.
- ◆ Rimuovere con cura il supernatante e scartarlo. Aggiungere **1 ml di etanolo al 70%** e agitare brevemente.
Centrifugare per 2 minuti a 13 000 rpm.
- ◆ Versare con cura il supernatante e scartarlo. Porre la provetta con l'apertura verso il basso su carta assorbente e lasciarla asciugare all'aria per ca. 5 minuti.

- ◆ Risospendere il pellet di DNA in 100 µl di acqua distillata usando una pipetta. Se la risospensione del DNA non completa riscaldare a 56°C per ca. 10 minuti.
- ◆ Se si desidera, determinare la concentrazione e la purezza del DNA (si veda 4.3).
- ◆ Usare il DNA per ulteriori tests o conservarlo a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

4.3 Determinazione della concentrazione e della purezza del DNA

La determinazione della concentrazione o della purezza non è necessaria se è presente un numero normale di leucociti. Su 500-600 µl di sangue si ottiene in questo caso una quantità media di DNA di 5-30 µg. Con un numero di leucociti al di fuori dei valori fisiologici la resa di DNA può essere stimata in base alla seguente tabella:

numero medio di leucociti $\times 10^3$ per µl (appross.)	2	3	5	10	20	30
Resa di DNA in µg (appross.)	1-5	2-8	5-10	10-20	20-40	30-60

Per un numero di leucociti $>30 \times 10^3 / \mu\text{l}$ usare la metà del sangue.

La concentrazione di DNA può essere determinata misurando l'assorbimento a 260 nm. Per il DNA genomico (double-stranded) la concentrazione può essere stimata in base alla seguente formula:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$$

Si può stimare il grado di purezza del DNA misurando le assorbanze. Il DNA dovrebbe mostrare i seguenti indici di purezza:

- $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = >1.5$ e <2.0 (valore devianti indicano contaminazione da RNA/proteine)
- $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} = >1.8$ (valori devianti indicano contaminazione da sali, carboidrati o solventi organici)

5. Avvertenze e precauzioni

Tutti i materiali biologici impiegati per l'estrazione del DNA, per es. sangue o tessuto umano, devono essere maneggiati come potenzialmente infetti. Si consigliano precauzioni di sicurezza appropriate quando si maneggiano materiali biologici (non pipettare con la bocca; indossare guanti monouso quando si maneggia materiale biologico e si esegue il test; al termine del test disinfettare le mani).

Il materiale biologico deve essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave). Il materiale smaltito deve essere autoclavato o bruciato dopo l'uso.

La fuoriuscita di materiale potenzialmente infetto deve essere rimosso immediatamente con carta assorbente e le aree contaminate pulite con un disinfettante standard o con etanolo al 70%. Il materiale usato per pulire le fuoriuscite, incluso i guanti, deve essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave).




EXTRA GENE I non contiene sostanze dannose in concentrazioni che ne richiedano l'indicazione su etichetta.

Lo smaltimento di tutti i campioni, reagenti inutilizzati e rifiuti dovrebbe effettuarsi in accordo alle leggi comunitarie, statali o locali.

6. Referenze

- [1] Miller, S. A. ,et al., 1988. Nucleic Acid Res. **16**:1215
- [2] Allen, F. S. , et al., 1972. Biopolymers **11**:853
- [3] Singer-Sam, J., et al., 1989. Amplification **3**:11
- [4] Beutler, E., et al., 1990. BioTechniques **9**:166

7. Spiegazione di simboli usati sulle etichette

	Temperatura di conservazione	LOT	Codice Lotto
	Utilizzare fino a		Consultare le istruzioni d'uso
REF	Codice prodotto	IFU	Istruzioni d'uso
CONT	Contenuto, contiene	DNA EXTRACTION	Destinazione d'uso: estrazione DNA
SOLN 1	Solution 1	CONT BUF LYSIS	Contiene buffer di lisi di eritrociti
SOLN 2	Solution 2	CONT BUF EXTRACTION	Contiene buffer d'estrazione
SOLN 3	Solution 3	CONT REAG PRECIPITATION	Contiene reagente per la precipitazione di proteine

Per le istruzioni d'uso in altre lingue si veda:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

o telefonare al: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404/925-0

Fax: +49 (0) 6404/925-250

www.bag-healthcare.com

info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49 (0) 6404/925-450

Fax: +49 (0) 6404/925-460

verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:

Tel.: +49 (0) 6404/925-125

Fax: +49 (0) 6404/925-421

service@bag-healthcare.com