

DE

Gebrauchsinformation

EXTRA-GENE I

Kit zur Isolierung von genomischer DNA
50 Isolierungen

REF 7059

1. Produktbeschreibung

EXTRA-GENE I ist ein Kit zur schnellen Extraktion von genomischer DNA ohne Verwendung organischer Lösungsmittel und enthält alle nötigen Reagenzien für die Isolierung von 50 einzelnen Proben.

Die Isolierung basiert auf einer selektiven Erythrozytenlyse gefolgt von einem Detergenz - Aufschluß mit anschließender Aussalzung der Proteine [1]. In weniger als 60 Minuten erhält man ohne aufwendiges Ansetzen von Reagenzien und Lösungen eine DNA-Präparation mit einem Reinheitsindex R (Extinktionsverhältnis OD_{260} / OD_{280}) innerhalb der empfohlenen Grenzen für den Einsatz in enzymatischen Reaktionen [2]. Hemmstoffe der Amplifikation, wie z.B. Eisen aus Hämoglobin [3], werden erfolgreich entfernt. Für den Einsatz der DNA in der PCR muss EDTA- oder Citrat-Blut verwendet werden, da Heparin die Amplifikation stark hemmt [4]. Die Ausbeute beträgt ca. 5-30 µg hochmolekularer DNA aus 500 - 600 µl Vollblut bei normalem Leukozyten-Gehalt. Die Extraktion von DNA aus Zellkultur-Material und gereinigten Lymphozyten ist mit dem EXTRA-GENE I Kit ebenso möglich. Die DNA ist ohne weitere Reinigungsschritte für den Einsatz in Restriktionsanalysen (RLFP), im Southern Blot oder in der PCR geeignet.

2. Material

2.1 Inhalt des EXTRA-GENE I Kits

- ◆ 2x 50 ml Lösung 1 (Erythrozyten-Lyse-Puffer)
- ◆ 1x 10 ml Lösung 2 (Extraktions-Puffer)
- ◆ 2x 10 ml Lösung 3 (Protein-Fällungs-Reagenz)
- ◆ Gebrauchsinformation

Version: 4/2016 / Stand: 2016-03

2.2 Erforderliches Material und Geräte

- ◆ Reaktionsgefäße, 1,5 ml / 2 ml, steril
- ◆ Pipetten (20 µl - 1000 µl)
- ◆ Zentrifuge (min. 13 000 UpM)
- ◆ Thermoblock (56°C) oder Wasserbad
- ◆ Vortex-Mischer
- ◆ Ethanol 96%
- ◆ Ethanol 70%
- ◆ Aqua dest., steril

3. Lagerung und Haltbarkeit

Das EXTRA-GENE I Kit wird ungekühlt versandt. Nach Erhalt alle Kit-Reagenzien bei 2...8°C lagern. Das Haltbarkeitsdatum ist auf der Verpackung und auf den Etiketten der Reagenzien angegeben und gilt auch nach dem ersten Öffnen.

4. DNA-Extraktion

4.1 Vorbereitung

Die Lösung 2 kann bei Lagerung unterhalb der Raumtemperatur eine Trübung aufweisen. Dies bedeutet keinen Qualitätsverlust. Vor Gebrauch sind die ausgefallenen Bestandteile durch Erwärmung auf 37°C wieder in Lösung zu bringen. Die DNA-Extraktion mit EXTRA-GENE I ist auf 500 - 600 µl Blut pro Isolierung optimiert. Diese Menge sollte möglichst nicht über- oder unterschritten werden (Ausnahmen siehe 4.3). Wenn größere DNA-Mengen benötigt werden, sind mehrere Isolierungen parallel durchzuführen. Für Einsatz in der PCR nur EDTA- oder Citrat-Blut verwenden! Wenn gereinigte Lymphozyten bzw. Leukozyten oder Zellkulturmaterial eingesetzt wird, die Extraktion bei Punkt ↘ starten (ausgehend von sedimentierten Zellen). Maximal 10^7 Zellen pro Isolierung einsetzen.

4.2 DNA-Extraktion

- ◆ 0,5 - 0,6 ml Blut in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,9 ml **Lösung 1** versetzen und kurz schütteln.
1 Minute bei 8000 UpM zentrifugieren.
- ◆ Überstand verwerfen und Sediment mit 1 ml **Lösung 1** waschen (per Hand schütteln bis sich das Pellet vom Gefäß ablöst).
1 Min bei 8000 UpM zentrifugieren.
- ◆ Überstand verwerfen und Leukozyten-Sediment
↘ in 240 µl Aqua dest. resuspendieren.
120 µl **Lösung 2** zugeben und vortexen bzw. per Hand schütteln bis eine klare Lösung vorliegt.
- ◆ 120 µl **Lösung 3** zugeben und gründlich vortexen.
Gemisch ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5 Minuten bei 13 000 UpM zentrifugieren.

- ◆ Klaren Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
120 µl **Lösung 3** zugeben und gründlich vortexen.
Gemisch ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5 Minuten bei 13 000 UpM zentrifugieren.
- ◆ Erneut klaren Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
1 ml Ethanol (96%) zugeben und durch leichtes Schwenken die Lösungen vermischen.
2 Minuten bei 13 000 UpM zentrifugieren.
- ◆ Überstand vorsichtig dekantieren und verwerfen.
1 ml Ethanol (70%) zugeben und kurz schwenken.
2 Minuten bei 13 000 UpM zentrifugieren.
- ◆ Überstand vorsichtig dekantieren und verwerfen.
Reaktionsgefäß ca. 5 Minuten mit der Öffnung nach unten auf Vliespapier stellen und das Pellet trocknen lassen. Durch leichtes Klopfen des Gefäßes auf das Vliespapier Ethanolreste entfernen.
- ◆ DNA-Pellet in 100 µl Aqua dest. aufnehmen und mit einer Pipette resuspendieren.
Falls sich die DNA schlecht löst, die Lösung ca. 10 Minuten bei 56°C inkubieren.
- ◆ Konzentrations- und Reinheitsbestimmung s. 4.3
- ◆ DNA für Versuche einsetzen oder bei mindestens - 20°C lagern.

4.3. DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Eine DNA-Konzentrations- bzw. Reinheitsbestimmung ist nicht nötig, wenn die Leukozytenzahl im normalen Bereich liegt. Aus 500 - 600 µl Blut erhält man in diesem Fall eine durchschnittliche DNA Menge von 5-30 µg. Bei abweichenden Blutbildern kann die DNA-Ausbeute nach folgender Tabelle ermittelt werden:

Durchschnittliche Leukozyten-Zahl $\times 10^3$ pro µl (ca.)	2	3	5	10	20	30
Ausbeute an DNA in µg (ca.)	1-5	2-8	5-10	10-20	20-40	30-60

Bei Leukozytenzahlen höher als 30×10^3 pro µl sollte die für die DNA-Isolierung eingesetzte Menge an Blut halbiert werden.

Die Konzentration der DNA kann durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt werden. Dabei gilt für genomische (doppelsträngige) DNA:

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

Durch Absorptionsmessung kann weiterhin der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Die DNA sollte folgende Reinheitsindices aufweisen:

- $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} = >1,5$ und $<2,0$ (Indikator für Kontamination mit RNA / Proteinen)
- $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{230} = >1,8$ (Indikator für Kontamination mit Salzen, Kohlenhydraten oder organischen Lösungsmitteln)

5. Warn- und Entsorgungshinweise

Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen. Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).














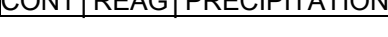
Das EXTRA-GENE I Kit enthält keine Gefahrstoffe in kennzeichnungspflichtiger Konzentration.

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

6. Literatur

- [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. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Lagertemperatur		Lot-Nr.
	Verwendbar bis		Gebrauchsinformation beachten
	Bestell-Nr.		Gebrauchsinformation
	Inhalt		Zweckbestimmung: DNA Extraktion
	Lösung 1		Enthält Erythrozyten-Lyse-Puffer
	Lösung 2		Enthält Extraktionspuffer
	Lösung 3		Enthält Protein-Fällungs-Reagenz



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