

## **Руководство по эксплуатации EXTRA-GENE I (ЭКСТРА-ДЖИН I)**

Набор для выделения геномной ДНК  
50 Выделений

НОМЕР 7059

### **1. Описание изделия**

EXTRA-GENE представляет собой комплект для быстрого выделения геномной ДНК без использования органических растворителей. Комплект содержит все реактивы, необходимые для выделения 50 отдельных образцов. Выделение основывается на селективном лизисе эритроцитов, который сопровождается этапом детергентного разложения с последующим высаливанием белков [1] и очисткой ДНК в ходе осаждения. Менее чем за 60 минут происходит выделение ДНК, при этом нет необходимости в приготовлении реактивов или растворов. Препарат имеет коэффициент чистоты R (коэффициент экстинкции  $OD_{260}/OD_{280}$ ), достаточный для использования в ферментативных реакциях [2]. Производится эффективное удаление ингибиторов амплификации, например железа гемоглобина [3]. В том случае, если вы планируете использовать ДНК для ПЦР\*, следует брать кровь, обработанную ЭДТА или цитратом, так как гепарин в значительной мере ингибирует амплификацию [4]. Выход составляет приблизительно 5-30 мкг высокомолекулярной ДНК из 500 мкл цельной крови с нормальной концентрацией лейкоцитов (см. 3.3). Также с помощью набора EXTRA-GENE I возможно выделение ДНК из материала клеточной культуры и очищенных лимфоцитов. Без дальнейшей очистки ДНК можно использовать в рестрикционных анализах (RLFP) в саузерн-блоттинге или в ПЦР\*.

### **2. Материал**

#### **2.1. Состав набора**

- ◆ 2 x 50 мл Раствор 1 (буфер для лизиса эритроцитов)
- ◆ 1 x 10 мл Раствор 2 (буфер для выделения)
- ◆ 2 x 10 мл Раствор 3 (реактив для осаждения белка)
- ◆ Руководство по эксплуатации

#### **2.2. Дополнительный материал и требуемое оборудование**

- ◆ Реакционные пробирки Eppendorf; 1.5 мл / 2.0 мл; стерильные
- ◆ Пипетки (20 мкл - 1000 мкл)
- ◆ Центрифуга (по крайней мере, 13.000 оборотов в минуту)
- ◆ Блок для нагрева (56°C) или водяная баня
- ◆ Вихревая мешалка
- ◆ Этанол 96 %
- ◆ Этанол 70 %
- ◆ Дистиллированная вода, стерильная

#### **2.3 Хранение и стабильность**

Все реактивы следует хранить при температуре 2... 8°C. Срок годности указан на упаковке.

### 3. Метод

#### 3.1 Приготовление

Если температура хранения будет ниже комнатной, **Раствор 2** потеряет прозрачность. Это не говорит о потере качества. Перед использованием растворите осажденные компоненты в ходе инкубации при 37°C.

Выделение ДНК оптимизировано на уровне 500 - 600 мкл крови на выделение. Если возможно, не превышайте данное количество и не снижайте его. Если вам потребуется большее количество ДНК, выполните несколько параллельных выделений. В том случае, если вы планируете использовать ДНК для ПЦР, следует брать кровь, обработанную ЭДТА или цитратом!

Если используются очищенные лимфоциты или лейкоциты, соответствующий материал клеточной культуры, - начните выделение с \*\* (начните с осажденных клеток). Используйте максимум  $10^7$  клеток на выделение.

#### 3.2 Выделение ДНК

◆ В чистые пробирки типа эппендорф объемом 1,5 мл внесите **900 мкл Раствора 1**. Добавьте 500 – 600 мл крови и перемешайте переворачиванием. Отцентрифугируйте в течение 1 минуты при 8000 оборотов в минуту.

◆ Слейте надосадочную жидкость и осторожно добавьте по **1 мл Раствора 1** в каждую пробирку. Отцентрифугируйте в течение 1 минуты при 8000 оборотов в минуту.

◆ Слейте надосадочную жидкость и

\*\* аккуратно добавьте **240 мкл дистиллированной воды** в каждую пробирку. Встряхните пробирку для ресуспензирования осадка лейкоцитов.

Добавьте по **120 мкл Раствора 2** в каждую пробирку, осторожно взболтайте содержимое переворачиванием пробирки и тщательно перемешайте на вортексе, пока смесь не станет прозрачной.

◆ Добавьте по **120 мкл Раствора 3** в каждую пробирку.

Тщательно перемешайте смесь на вортексе и оставьте на 5 минут при комнатной температуре. Отцентрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 13 000 оборотов в минуту.

◆ В чистые пробирки типа эппендорф на 1,5 мл добавьте **120 мкл Раствора 3** и перенесите туда надосадочную жидкость.

Тщательно перемешайте смесь на вортексе и оставьте на 5 минут при комнатной температуре. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 13 000 оборотов в минуту.

◆ В чистые пробирки типа эппендорф на 1,5 мл внесите по 1 мл 96 % этанола, аккуратно перенесите туда надосадочную жидкость и перемешайте, осторожно поворачивая реакционную пробирку. Затем отцентрифугируйте пробирки в течение 2 минут при 13 000 оборотов в минуту.

◆ Осторожно удалите надосадочную жидкость. Добавьте по **1 мл 70 % этанола** в каждую пробирку и немного взболтайте.

Отцентрифугируйте пробирки в течение 2 минут при 13 000 оборотов в минуту.

◆ Осторожно отделите надосадочную жидкость и вылейте её. Поместите реакционную пробирку отверстием вниз на фильтровальную бумагу и дайте ей высохнуть на воздухе в течение приблизительно 5 минут.

◆ Внесите по **100 мкл дистиллированной воды** в каждую пробирку для растворения ДНК (для ресуспензирования ДНК можно использовать пипетку). Если полное растворение ДНК затруднено, нагрейте до 56°C в течение приблизительно 10 минут.

◆ Определите концентрацию и чистоту ДНК.

◆ Используйте ДНК для дальнейших тестов или поместите ее на хранение при  $\leq -20^\circ\text{C}$ .

#### 3.3 Определение концентрации и чистоты ДНК

Определение концентрации или чистоты не является обязательным, если в крови отмечается нормальное число лейкоцитов. В этом случае из 500-600 мкл крови можно получить в среднем

5-30 мкг ДНК. При отклонении числа лейкоцитов от нормы, выход ДНК можно оценить по следующей таблице:

Среднее число лейкоцитов $\times 10^3$ на мкл (прибл.)	2	3	5	10	20	30
Выход ДНК в мкг (прибл.)	1-5	2-8	5-10	10-20	20-40	30-60

При числе лейкоцитов  $> 30 \times 10^3$ /мкл используйте половину требуемого количества крови. Концентрацию ДНК можно определить по измерению поглощения при 260 нм. Для геномной (двунитевой) ДНК, концентрацию можно оценить следующим образом:




$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ мкг/мл}$$

Измерив поглощение при 260 и 280 нм, можно также определить степень чистоты ДНК. Для чистой ДНК соотношение  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  составляет от 1.6 до 2.0. Более высокие значения указывают на наличие РНК, более низкие значения указывают на загрязнение белком.

#### 4. Литература

- [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

#### 5. Символы, используемые при маркировке

	Температура хранения	LOT	Код партии
	Годен до		См. инструкцию по эксплуатации
REF	Номер по каталогу		

\* Полимеразная Цепная Реакция (ПЦР) защищена патентным правом. Коммерческое использование этого метода для in-vitro диагностики требует получения лицензии Hoffmann-LaRoche, Базель. BAG указывает на то, что пользователь несет ответственность за законное использование ПЦР.

Версия 03/2007