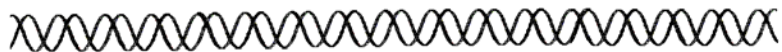


Gebrauchsinformation

EXTRA-GENE I

Kit zur Isolierung von genomischer DNA
50 Isolierungen

REF 7059



1. Einleitung

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 Polymerase Chain Reaction (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 (siehe 3.3). 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 Bestandteile des 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

2.2 Zusätzlich erforderliches Material und Geräte

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

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Alle Reagenzien werden bei 2...8 °C gelagert. Das Haltbarkeitsdatum ist auf der Verpackung angegeben.

3. Methode

3.1 Vorbereitung

Lösung 2 zeigt bei Lagerung unterhalb von Raumtemperatur eine Trübung. 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 3.3). Bei Bedarf größerer DNA-Mengen sind mehrere Isolierungen parallel durchzuführen. Für Einsatz in der PCR★ nur EDTA- oder Citrat-Blut verwenden! Bei Einsatz von gereinigten Lymphozyten bzw. Leukozyten oder Zellkulturmaterial, Extraktion bei Punkt ↵ starten (ausgehend von sedimentierten Zellen). Maximal 10^7 Zellen pro Isolierung einsetzen.

3.2 DNA - Isolierung

- ◆ **0,5 - 0,6 ml Blut** in 1,5 ml Reaktionsgefäß mit **0,9 ml Lösung 1** versetzen und kurz schütteln. 1 Min bei 8000 rpm 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 rpm zentrifugieren.
- ◆ Überstand verwerfen und Leukozyten-Sediment
↳ in **240 µl Aqua dest.** resuspendieren. Zugabe von **120 µl Lösung 2.**
Vortexen bzw. per Hand schütteln bis eine klare Lösung vorliegt.
- ◆ Zugabe von **120 µl Lösung 3,**
gründlich vortexen und Gemisch ca. 5 Min bei Raumtemperatur inkubieren.
5 Min bei 13 000 rpm zentrifugieren.
- ◆ Klaren Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen,
Zugabe von **120 µl Lösung 3,**
gründlich vortexen und Gemisch ca. 5 Min bei Raumtemperatur inkubieren.
5 Min bei 13 000 rpm zentrifugieren.
- ◆ Erneut klaren Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen,
Zugabe von **1 ml Ethanol (96%),**
durch leichtes Schwenken die Lösungen vermischen.
2 Min bei 13 000 rpm zentrifugieren.
- ◆ Überstand vorsichtig dekantieren und verwerfen, Zugabe von **1 ml Ethanol (70%),**
kurz schwenken und 2 Min bei 13 000 rpm zentrifugieren.
- ◆ Überstand vorsichtig dekantieren und verwerfen.
Reaktionsgefäß ca. 5 Min mit der Öffnung nach unten auf Vliespapier stellen und Pellet trocknen lassen. Durch leichtes Klopfen des Gefäßes auf das Vliespapier Ethanolreste entfernen.
- ◆ DNA-Pellet in 100 µl Aqua dest. aufnehmen (mit Pipette resuspendieren).
Falls sich die DNA schlecht löst, die Lösung ca 10 Min. bei 56°C inkubieren.
- ◆ Wenn gewünscht, Konzentrations- bzw. Reinheitsbestimmung.
- ◆ DNA für weitere Versuche einsetzen oder bei mindestens - 20°C lagern.

3.3. DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Eine DNA-Konzentrations- bzw. Reinheitsbestimmung ist nicht nötig, wenn die Leukozyten in normaler Zahl vorliegen. 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 x10 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 30x10³ 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 OD₂₆₀ = 50 µg / ml

Durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm kann weiterhin der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Reine DNA sollte ein Extinktionsverhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,6 und 2,0 aufweisen. Größere Werte deuten auf Vorhandensein von RNA, kleinere Werte auf Verunreinigung mit Protein hin.

4. 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

5. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Lagertemperatur		Lot-Nr.
	Verwendbar bis		Gebrauchsinformation beachten
REF	Bestell-Nr.		

★ Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist patentrechtlich geschützt. Der kommerzielle Einsatz dieser Methode in der in vitro Diagnostik erfordert eine Lizenz der Firma Hoffmann La-Roche, Basel. Die BAG weist ausdrücklich darauf hin, daß die Verantwortung für eine rechtmäßige Nutzung der PCR auf der Seite des Anwenders liegt.



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