

Handbuch für das LumiSpin® BB, DNA-Isolations-Spin-Kit für Blut und Wangenabstrich

Contents

Deutsch: Handbuch für das LumiSpin® BB, DNA-Isolations-Spin-Kit für Blut und Wangenabstrich	3-10
--	------

Handbuch für das LumiSpin® BB, DNA-Isolations-Spin-Kit für Blut und Wangenabstrich

Dieses Kit dient der schnellen (ca. 30 Minuten) und effizienten Extraktion von Gesamt-DNA (genomische, mitochondriale und virale DNA) aus Vollblut, Wangenabstrichen, Leukozyten und Säugetierzellen mit Hilfe von Zentrifugationssäulchen. Die isolierte DNA ist stabil und eignet sich u. a. für PCR, Restriktionsverdau, Southern Blot und Sequenzierung (Sanger- und NGS-Verfahren).

Typische Ausbeuten genomischer DNA (Länge 30–50 kb, A_{260}/A_{280} 1,7–1,8):

- Vollblut (100 μ l): 1–3 μ g
- Wangenabstrich: 0,5–2 μ g
- Säugetierzellen (1×10^6): 3–6 μ g

Bestandteile

Komponente	Anzahl		
	11553 10 minipreps	21553 50 minipreps	31553 100 minipreps
12164, Spin column (up to 20 µg), 10 pcs	1	—	—
F4150, LyseLösung BB / Lysis Solution BB, 4 mL	1	—	—
H2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 6 mL	1	—	—
M4150, LyseLösung BB / Lysis Solution BB, 20 mL	—	1	—
P2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 30 mL	—	1	—
R4150, LyseLösung BB / Lysis Solution BB, 40 mL	—	—	1
T2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 60 mL	—	—	1
M2250, Waschlösung B / Wash Solution B (Konzentrat muss mit 96%igem Ethanol 5-fach verdünnt werden), 20.0 mL	—	—	1
32850, Proteinase K (lyophilisiert), 12.0 mg	—	—	1
D3850, Proteinase-K-Verdünnungspuffer / Proteinase K Dilution Buffer, 1200 µL	—	—	1
Sammelgefäß für Zentrifugationssäulchen, 2 ml	30	150	300
K2250, Waschlösung B / Wash Solution B (Konzentrat muss mit 96%igem Ethanol 5-fach verdünnt werden), 10.0 mL	1	1	—
D1350, Elutionspuffer / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5), 1.5 mL	1	4	8
12850, Proteinase K (lyophilisiert), 6.0 mg	1	1	—
B3850, Proteinase-K-Verdünnungspuffer / Proteinase K Dilution Buffer, 600 µL	1	1	—

22164, Spin column (up to 20 µg), 50 pcs	—	1	2
--	---	---	---

Bei Raumtemperatur lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Geräte und Materialien:

- Heizblock oder Wasserbad;
- Tischzentrifuge mit mindestens 10.000 min^{-1} ($6.700 \times g$) und Rotor für 1,5-ml-Röhrchen;
- 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen (2 Röhrchen pro DNA-Isolierung aus einer Probe);
- 96 % Ethanol;
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) für die DNA-Extraktion aus Säugetierzellen.

Vorbereitung der Reagenzien

1. *Wash Solution B* wird als Konzentrat geliefert und muss vor der ersten Verwendung 1:5 mit 96%igem Ethanol verdünnt werden. Dazu versetzen Sie das auf der Flasche angegebene Volumen des Konzentrats mit dem 4-fachen Volumen an 96%igem Ethanol und notieren die Zugabe auf dem Deckel.
2. Geben Sie $600 \mu\text{l}$ *Proteinase K Dilution Buffer* in das Röhrchen mit der lyophilisierten *Proteinase K*, mischen Sie gut und zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz an.
! Lagern Sie die Proteinase K nach dem Auflösen bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Sollten sich in *Lysis Solution BB* oder *Wash Solution A* Salzkristalle gebildet haben, erwärmen Sie die Lösungen auf maximal $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat.

Alle folgenden Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur, alle Zentrifugationsschritte mit $10.000\text{--}13.000 \text{ min}^{-1}$ ($6.700\text{--}11.000 \times g$) ausgeführt (sofern nicht anders angegeben).

DNA-Extraktion aus Vollblut

Das Kit wurde für die DNA-Extraktion aus 100 µl Vollblut (frisch oder gefroren, mit EDTA, Citrat oder Heparin stabilisiert) optimiert. Für eine höhere DNA-Ausbeute können isolierte Leukozyten verwendet werden (Isolierung aus 1–2 ml Vollblut empfohlen).

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. Schwenken Sie die Blutprobe durch Invertieren, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Überführen Sie dann 100 µl Probe in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
3. Geben Sie zu jeder Probe 300 µl *Lysis Solution BB* und 10 µl *Proteinase-K-Lösung* hinzu und mischen Sie sorgfältig durch Vortexen.
4. Inkubieren Sie den Ansatz 15 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
5. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie das Lysat auf die Säule und zentrifugieren Sie 45 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
6. Geben Sie 500 µl *Wash Solution A* auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
7. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
8. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–200 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

DNA-Extraktion aus Wangenabstrichen

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. Geben Sie 300 µl *Lysis Solution BB* in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
3. Spülen Sie den Tupfer mit dem Wangenabstrich mit *Lysis Solution BB* gut aus. Rollen Sie den Tupfer mit Druck an der Innenwand des Röhrchens entlang, um so viel Flüssigkeit wie möglich herauszudrücken.
4. Geben Sie 10 µl *Proteinase-K-Lösung* zur Probe hinzu und mischen Sie.
5. Inkubieren Sie den Ansatz 15 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
6. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie das Lysat auf die Säule und zentrifugieren Sie 45 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
7. Geben Sie 500 µl *Wash Solution A* auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
8. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
9. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–200 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

DNA-Extraktion aus Säugetierzellen

In die DNA-Extraktion sollten nicht mehr als 5×10^6 Zellen eingesetzt werden.

Adhärente Zellen: Lösen Sie die Zellen mit einer geeigneten Methode vom Kulturgefäß, z. B. durch Behandlung mit Trypsinlösung. Die Zellen werden dann 5 Minuten bei $300 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 μ l PBS und überführen Sie die Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Suspensionskultur: Entnehmen Sie das Kulturvolumen mit der benötigten Zellmenge. Die Zellen werden 5 Minuten bei $300 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 μ l PBS und überführen Sie die Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. Geben Sie zu jeder Probe 300 μ l *Lysis Solution BB* und 10 μ l *Proteinase-K-Lösung* hinzu und mischen Sie sorgfältig durch Vortexen.
3. Inkubieren Sie den Ansatz 15 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
4. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie das Lysat auf die Säule und zentrifugieren Sie 45 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
5. Geben Sie 500 μ l *Wash Solution A* auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
6. Geben Sie 500 μ l *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
7. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–200 μ l des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die

isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

Anmerkung

Für eine höhere DNA-Endkonzentration kann mit geringeren Volumina an Elutionspuffer eluiert werden — jedoch nicht mit weniger als 50 μl , weil die Säulenmembran dann möglicherweise nicht vollständig benetzt würde, was zu einem teilweisen DNA-Verlust führen könnte. Für eine höhere DNA-Ausbeute kann mit größeren Volumina an Elutionspuffer (100–200 μl) eluiert werden.

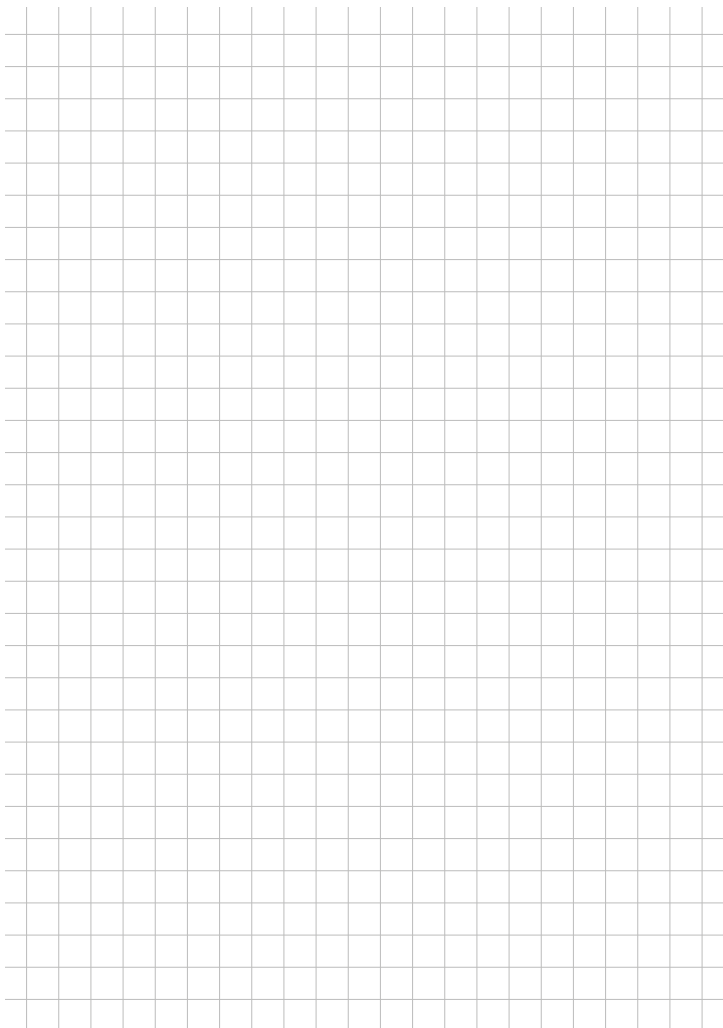
Die DNA-Elution mit auf 55 °C vorgewärmtem Elutionspuffer gewährleistet eine optimale DNA-Ausbeute. Die Elution mit kaltem Elutionspuffer (bei Raumtemperatur) ist zwar auch möglich, reduziert die DNA-Ausbeute jedoch deutlich (um 30–50 %).

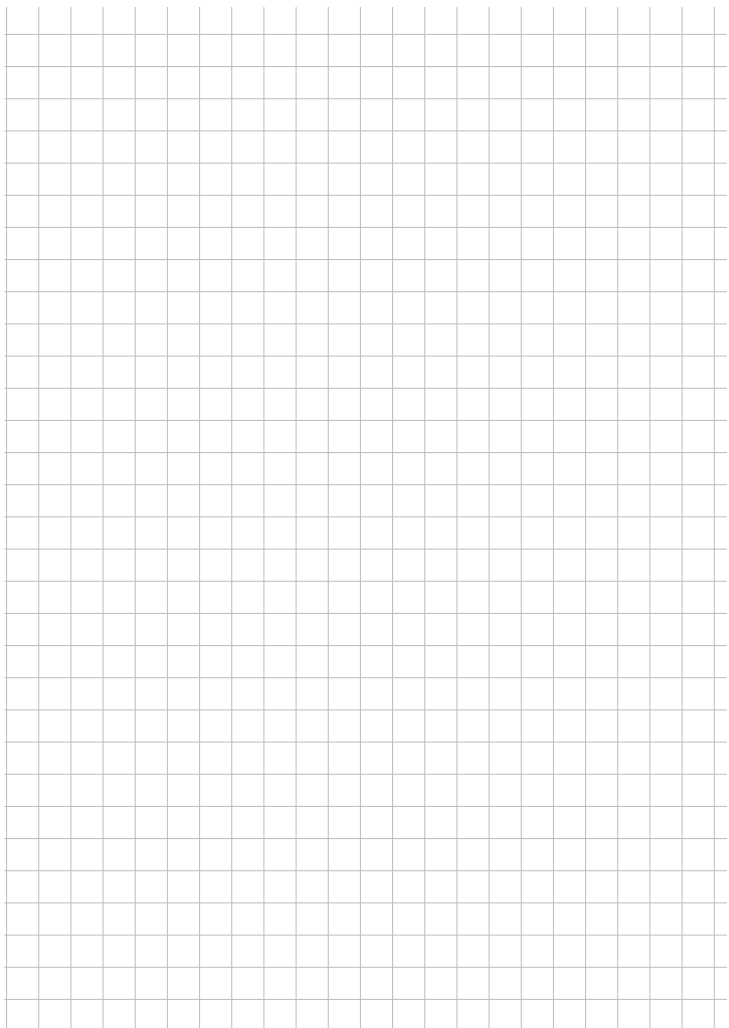
Um die maximale DNA-Ausbeute zu erzielen, können zwei Elutionsschritte ausgeführt werden.

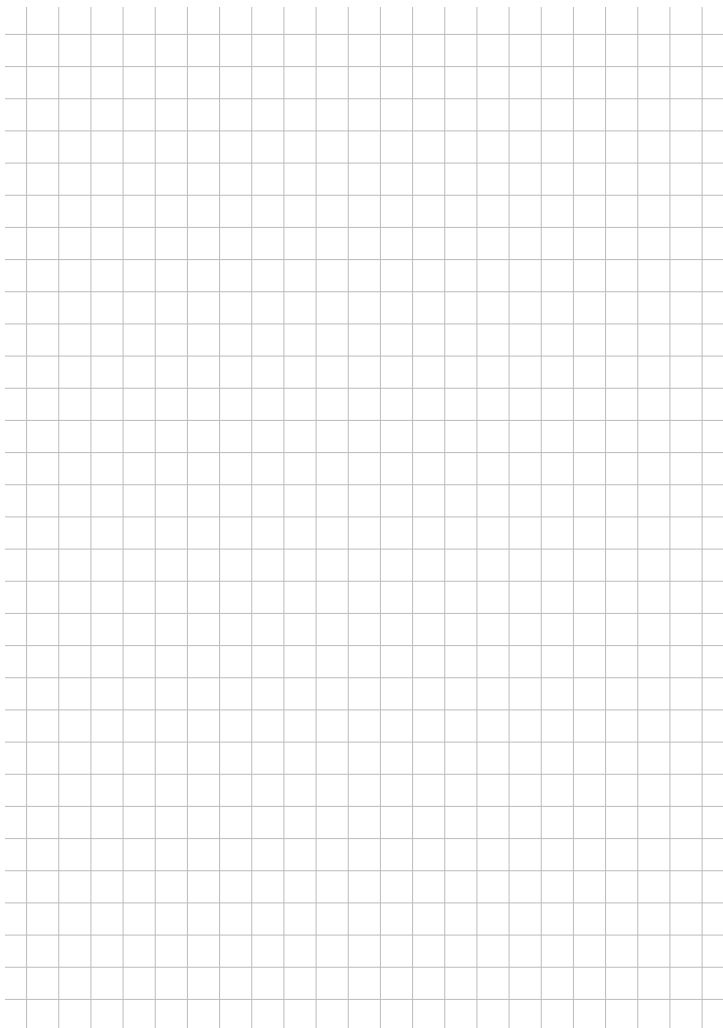
Falls notwendig, kann die Elution auch mit deionisiertem Wasser erfolgen.

Bei der DNA-Konzentrationsbestimmung verwenden Sie zum Verdünnen der DNA-Probe bitte ausschließlich TE-Puffer pH 8,5 oder den *Elution Buffer* aus dem Kit. Andernfalls könnten die Reinheit der DNA-Probe (aus dem Verhältnis A_{260}/A_{280}) und die DNA-Konzentration (A_{260}) falsch abgeschätzt werden.

Lagerung der isolierten DNA: im Gefrierfach (-20 °C), kurzfristig bei +4 °C.









22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

