Lumiprobe
Life science solutions

Handbuch für das LumiSpin® GEL, DNA-Isolations-Spin-Kit für Agarosegel

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Deutsch: Handbuch für das LumiSpin® GEL,
DNA-Isolations-Spin-Kit für Agarosegel 3-8

DE

Handbuch für das LumiSpin® GEL, DNA-Isolations-Spin-Kit für Agarosegel

Dieses Kit dient der schnellen (ca. 20 Minuten) und effizienten ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) DNA-Extraktion aus Agarosegelen oder DNA-Aufreinigung aus Reaktionsansätzen. Die im Kit enthaltenen Säulchen binden bis zu 5 oder 20 µg DNA mit Fragmentlängen von 70–10.000 bp, wobei die Rückgewinnungsrate aus Agarosegelen mindestens 50 % und aus Reaktionsansätzen mindestens 75 % beträgt. Die extrahierte DNA eignet sich für alle gängigen molekularbiologischen Verfahren, u. a. für PCR, Ligation, Transformation, Markierungsreaktionen, Restriktionsverdau und Sequenzierung (Sanger- und NGS-Verfahren).

Bestandteile

Komponente	Anzahl			
	13793 10 preps (5 µg)	23793 50 preps (5 µg)	15793 10 preps (20 µg)	25793 50 preps (20 µg)
11164, Spin column (up to 5 µg), 10 pcs	1	—	—	—
21164, Spin column (up to 5 µg), 50 pcs	—	1	—	—
12164, Spin column (up to 20 µg), 10 pcs	—	—	1	—
22164, Spin column (up to 20 µg), 50 pcs	—	—	—	1
D1450, Neutralisierungspuffer / Neutralization Buffer, 2 mL	1	1	1	1
K3450, Gel-Solubilisierungspuffer / Gel Solubilization Buffer, 10 mL	1	—	1	—
K2250, Waschlösung B / Wash Solution B (Konzentrat muss mit 96%igem Ethanol 5-fach verdünnt werden), 10.0 mL	1	1	1	1
D1350, Elutionspuffer / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5), 1.5 mL	1	2	1	4

Sammelgefäß für Zentrifugationssäulchen, 2 ml	10	50	10	50
S3450, Gel-Solubilisierungspuffer / Gel Solubilization Buffer, 50 mL	—	1	—	1

Transport und Lagerung bei Raumtemperatur.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Geräte und Materialien:

- Laborwaage mit einer Genauigkeit von mindestens 0,01 g
- Heizblock oder Wasserbad
- Tischzentrifuge mit mindestens 10.000 min^{-1} (6.700 × *g*) und Rotor für 1,5-ml-Röhrchen
- 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen (2 Röhrchen pro DNA-Extraktion aus einer Probe)
- 96 % Ethanol (4-faches Volumen der *Wash Solution B*, die als Konzentrat geliefert wird)
- Isopropanol (ca. 100 µl pro Probe)

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 Sie die Zugabe auf dem Deckel.
2. Sollten sich im *Gel Solubilization Buffer* Salzkristalle gebildet haben, erwärmen Sie die Lösung auf maximal 50 °C, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat. Lassen Sie die Lösung auf 25 °C abkühlen.

DNA-Extraktion aus Agarosegel

1. Stellen Sie den Heizblock auf 50 °C ein.
2. Schneiden Sie die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell oder Messer aus dem Gel heraus. Entnehmen Sie dabei möglichst wenig vom die DNA-Bande umgebenden Gel.

   ! Setzen Sie das zu isolierende DNA-Fragment nicht länger als nötig dem UV-Licht aus und legen Sie das Gel während der Bestrahlung auf eine Glas- oder Kunststoffplatte. UV-induzierte DNA-Schäden werden dadurch minimiert.
3. Wiegen Sie ein leeres 1,5-ml-Röhrchen und stellen Sie die Waage auf null. Überführen Sie das entnommene Gelstück in das 1,5-ml-Röhrchen und wiegen Sie es erneut. Notieren Sie das Gewicht des Gelstücks.
4. Versetzen Sie das Gelstück mit 4 µl *Gel Solubilization Buffer* pro mg Agarosegel (z.B. 400 µl *Gel Solubilization Buffer* auf ein 100 mg schweres Gelstück).

   ! Arbeiten Sie mit mehreren DNA-Proben gleichzeitig, so empfiehlt es sich, in jedes Röhrchen dasselbe Volumen an Gel Solubilization Buffer, bezogen auf das Gewicht des schwersten Gelstücks, zu pipettieren.
5. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 50 °C, bis sich das Agarosegel vollständig aufgelöst hat. Schwenken Sie das Röhrchen zwischendurch gelegentlich durch Invertieren.

   ! Für Gele mit mehr als 2 % Agarosegehalt verlängern Sie die Inkubationszeit, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hat.
6. Stellen Sie nach vollständigem Auflösen des Gelstücks sicher, dass die Lösung gelb gefärbt ist. Sollte die Lösung violett sein, geben Sie 5 µl *Neutralization Buffer* pro 1000 µl Probe hinzu. Sobald Sie mischen, schlägt die Farbe wieder von violett nach gelb um.

   Der Gel Solubilization Buffer enthält einen Farbindikator zur Kontrolle des optimalen pH-Wertes, bei dem DNA am besten an die Säulenmembran bindet. Eine Violettfärbung der Lösung zeigt eine unerwünschte Erhöhung des pH-Wertes an. In diesem Fall wird der pH-Wert durch Zugabe von Neutralization Buffer wieder

in den optimalen Bereich abgesenkt.

7. Lassen Sie die Röhrchen auf Raumtemperatur abkühlen.
8. Fügen Sie dem Ansatz 1 µl Isopropanol pro mg ausgeschnittenem Gelstück zu (z.B. 100 µl Isopropanol zu einer Probe mit einem Ausgangsgewicht des Gelstücks von 100 mg). Mischen Sie die Lösung.

DNA-Aufreinigung

Alle folgenden Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur, alle Zentrifugationsschritte mit 10.000–13.000 min^{-1} (6.700–11.000 × *g*) ausgeführt.

1. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie die Probe auf die Säule (maximal 900 µl pro Ladung) und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Entnehmen Sie die Säule aus dem Sammelgefäß, verwerfen Sie den Durchfluss und stecken Sie die Säule in das Sammelgefäß zurück. Beträgt das Volumen der Probe mehr als 900 µl, geben Sie nun das restliche Volumen der Probe auf die Säule und wiederholen Sie den Zentrifugationsschritt.
2. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Entnehmen Sie die Säule aus dem Sammelgefäß, verwerfen Sie den Durchfluss und stecken Sie die Säule in das Sammelgefäß zurück.
3. *(optional)* Wiederholen Sie den Waschschritt. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Verwerfen Sie den Durchfluss mitsamt dem Sammelgefäß.
4. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 10–50 µl (falls DNA-Bindekapazität der Säule 5 µg ist) oder 25–100 µl (falls DNA-Bindekapazität der Säule 20 µg ist) *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

   ! Für eine höhere DNA-Endkonzentration kann mit geringeren Volumina an Elutionspuffer eluiert werden — jedoch nicht mit weniger als 10 µl (DNA-Bindekapazität der Säule ist 5 µg) oder 25 µl (DNA-Bindekapazität der Säule ist 20 µg), weil die Säulenmembran dann möglicherweise nicht vollständig benetzt würde, was zu einem teilweisen DNA-Verlust führen könnte. Für eine höhere DNA-Ausbeute sollte mit größeren Volumina an Elutionspuffer (50 µl falls DNA-Bindekapazität der Säule 5 µg ist oder 100 µl falls DNA-Bindekapazität der Säule 20 µg ist) eluiert werden.

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

DNA-Aufreinigung aus enzymatischen Reaktionsansätzen

1. Geben Sie zum Reaktionsansatz den *Gel Solubilization Buffer* im Verhältnis 1+4 hinzu (z. B. 400 µl Gel Solubilization Buffer zu 100 µl Reaktionsansatz).
2. Stellen Sie sicher, dass die Lösung gelb gefärbt ist. Sollte die Lösung violett sein, geben Sie 5 µl *Neutralization Buffer* pro 1000 µl Probe hinzu. Sobald Sie mischen, schlägt die Farbe wieder von violett nach gelb um.

   Der Gel Solubilization Buffer enthält einen Farbindikator zur Kontrolle des optimalen pH-Wertes, bei dem DNA am besten an die Säulenmembran bindet. Eine Violettfärbung der Lösung zeigt eine unerwünschte Erhöhung des pH-Wertes an. In diesem Fall wird der pH-Wert durch Zugabe von Neutralization Buffer wieder in den optimalen Bereich abgesenkt.
3. Fügen Sie dem Ansatz Isopropanol im Verhältnis 1+1 bezogen auf das anfängliche Probenvolumen hinzu (z.B. 100 µl Isopropanol auf 100 µl Ausgangsvolumen des enzymatischen Reaktionsansatzes, der mit 400 µl *Gel Solubilization Buffer* gemischt wurde). Mischen Sie die Lösung.
4. Befolgen Sie den Abschnitt «DNA-Aufreinigung» weiter oben.

Anmerkung

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.

Ver. MJ4A4
#5555H

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com