Lumiprobe
Life science solutions

Handbuch für das LumiSpin® UNI, DNA-Isolations-Spin-Kit für Proben jeglicher Art

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Deutsch: Handbuch für das LumiSpin® UNI,
DNA-Isolations-Spin-Kit für Proben jeglicher Art 3-14

DE

Handbuch für das LumiSpin® UNI, DNA-Isolations-Spin-Kit für Proben jeglicher Art

Dieses Kit dient der schnellen (ca. 30 Minuten) und effizienten Extraktion von genomischer DNA mit Hilfe von Zentrifugationssäulchen aus einer großen Brandbreite von biologischen Proben: pflanzlichen und tierischen Geweben und Organen, Wangenabstrichen, Vollblut, Leukozyten, Säugetierzellen und gramnegativen Bakterien. Die 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):

- gramnegative Bakterien (1×10^8): 5–10 µg
- Pflanzenblätter, Nadeln (50 mg): 3–5 µg
- Mausschwanz: 7–14 µg
- Mausniere: 10–20 µg
- Mausherz: 7–14 µg
- Mausleber: 10–15 µg
- Leukozyten (isoliert aus 1 ml Vollblut): 4–5 µg
- Vollblut (100 µl): 1–3 µg
- Wangenabstrich: 0,5–2 µg
- Säugetierzellen (1×10^6): 3–6 µg

Bestandteile

Komponente	Anzahl		
	11573 10 minipreps	21573 50 minipreps	31573 100 minipreps
12164, Spin column (up to 20 µg), 10 pcs	1	—	—
14115, Pestle for Microcentrifuge Tube (Polypropylene), 10 pcs	1	—	—
H1850, Lyselösung AS / Lysis Solution AS, 6 mL	1	—	—
F5450, Sorptionslösung / Sorption Solution, 4 mL	1	—	—
H2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 6 mL	1	—	—
K3150, Erythrozyten-Lysepuffer / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 10 mL	1	—	—
11650, RNase A (10 mg/mL), 50 uL	1	—	—
1902-5g, Korund (50 µm), 5 g	1	—	—
P1850, Lyselösung AS / Lysis Solution AS, 30 mL	—	1	—
M5450, Sorptionslösung / Sorption Solution, 20 mL	—	1	—
P2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 30 mL	—	1	—
S3150, Erythrozyten-Lysepuffer / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 50 mL	—	1	—
1902-25g, Korund (50 µm), 25 g	—	1	—
31650, RNase A (10 mg/mL), 150 uL	—	2	—
T1850, Lyselösung AS / Lysis Solution AS, 60 mL	—	—	1
R5450, Sorptionslösung / Sorption Solution, 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
D3850, Proteinase-K-Verdünnungspuffer / Proteinase K Dilution Buffer, 1200 uL	—	—	1
32850, Proteinase K (lyophilisiert), 12.0 mg	—	—	1
1902-50g, Korund (50 µm), 50 g	—	—	1
U3150, Erythrozyten-Lysepuffer / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 100 mL	—	—	1
51650, RNase A (10 mg/mL), 300 uL	—	—	2
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 uL	1	1	—
22164, Spin column (up to 20 µg), 50 pcs	—	1	2
24115, Pestle for Microcentrifuge Tube (Polypropylene), 50 pcs	—	1	2

Nicht über 30 °C lagern. Transport: Lange Transportzeiten sind bei bis zu 30 °C möglich.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Geräte und

Materialien:

- 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-Isolierung aus einer Probe);
- 96 % Ethanol;
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) für die DNA-Extraktion aus Säugetierzellen, Leukozyten, gramnegativen Bakterien;
- Mörser mit Pistill zum Zerkleinern von Proben aus pflanzlichen und tierischen Geweben und Organen (falls mitgelieferte Pistille aus Polypropylen zum Zerkleinern von bestimmten Proben nicht geeignet sind);
- (optional) Zentrifuge mit Rotor für 15-ml-Röhrchen und mindestens 300 × *g* für die DNA-Extraktion aus Leukozyten und 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 µl *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 °C.
3. Sollten sich im *Sorption Solution* und/oder in der *Wash Solution A* Salzkristalle gebildet haben, erwärmen Sie die Lösungen auf maximal 50 °C, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat.

Wenn nicht anders angegeben, werden alle folgenden Arbeitsschritte bei Raumtemperatur, alle Zentrifugationsschritte mit 10.000–13.000 min^{-1}

(6.700–11.000 × *g*) ausgeführt.

DNA-Extraktion aus pflanzlichen und tierischen Geweben und Organen

Nehmen Sie für die DNA-Extraktion 20–40 mg des tierischen oder 50–100 mg des pflanzlichen Gewebes.

1. **(A) Zerkleinern von Proben mit dem Kunststoff-Pistill (im Lieferumfang enthalten):**
   a. Geben Sie das Gewebestück in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
   b. Geben Sie zur Probe hinzu:
      - 200 µl *Lysis Solution AS*,
      - 70–100 mg *Korund*.
   c. Zerreiben Sie die Probe sorgfältig mit dem Kunststoff-Pistill im 1,5-ml-Röhrchen.
   d. Geben Sie 300 µl *Lysis Solution AS* zur Probe hinzu und mischen Sie.

1. **(B) Zerkleinern von Proben mit Mörser und Pistill (nicht im Lieferumfang enthalten):**
   a. Geben Sie das Gewebestück in den Mörser.
   b. Geben Sie zur Probe hinzu:
      - 100 µl deionisiertes Wasser,
      - 200 µl *Lysis Solution AS*,
      - 300–500 mg *Korund.*
   c. Zerreiben Sie die Probe sorgfältig mit dem Pistill.
   d. Geben Sie 300 µl *Lysis Solution AS* zur Probe hinzu und mischen Sie.
   e. Überführen Sie den Ansatz in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.

1. **(C) Lyse der Proben (Mausschwänzen oder anderen Proben tierischen Ursprungs) ohne Zerkleinern:**
   a. Geben Sie das Gewebestück in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
   b. Geben Sie 500 µl *Lysis Solution AS* zur Probe hinzu.

2. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
3. Geben Sie zur Probe hinzu:
   - 5 µl *RNase A*,
   - 10 µl *Proteinase K*,

   Mischen Sie.
4. **Für (A) und (B):** Inkubieren Sie die Probe 20 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.

   Für (C): Inkubieren Sie die Probe bei 55 °C bis die Lyse abgeschlossen ist (1–4 Stunden unter gelegentlichem Vortexen für kleinere Gewebestücke, über Nacht für Mausschwänze oder größere Gewebestücke). Im Lysat können Reste wie Knochen, Haare und Knorpel verbleiben, die nicht auf diese Weise lysiert werden können.
5. Geben Sie 350 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
6. Zentrifugieren Sie die Probe 10 Minuten lang.
7. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie den Überstand auf die Säule (maximal 800 µl pro Ladung) und zentrifugieren Sie 60 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 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.
9. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
10. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie

50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *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.

DNA-Extraktion aus Wangenabstrichen

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. Geben Sie 500 µl *Lysis Solution AS* in ein 1,5-ml-Röhrchen. Spülen Sie den Tupfer mit dem Wangenabstrich mit *Lysis Solution AS* gut aus. Rollen Sie den Tupfer mit Druck an der Innenwand des Röhrchens entlang, um so viel Flüssigkeit wie möglich herauszudrücken.
3. Geben Sie 10 µl *Proteinase K* zur Probe hinzu und mischen Sie.
4. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
5. Geben Sie 300 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
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 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *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.

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. 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.

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. Geben Sie 400 µl *Lysis Solution AS* in das 1,5-ml-Röhrchen mit 100 µl Vollblut.
3. Geben Sie 10 µl *Proteinase K* zur Probe hinzu und mischen Sie.
4. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
5. Geben Sie 300 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
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 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *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.

DNA-Extraktion aus Leukozyten

Eine Vorisolierung der Leukozyten gewährleistet eine höhere DNA-Ausbeute im Vergleich zur DNA-Extraktion aus Vollblut. Das empfohlene Volumen der Vollblutprobe für die Leukozytenisolierung beträgt 1 ml.

1. Bereiten Sie 9 ml 1x *Red Blood Cell Lysis Buffer* für die Isolierung der Leukozyten aus 1 ml Vollblut wie folgt vor: Mischen Sie 900 µl 10x *Red Blood Cell Lysis Buffer* mit 8,1 ml deionisiertem Wasser in einem 15-ml-Röhrchen.
2. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
3. Mischen Sie 1 ml Vollblut mit 9 ml 1x *Red Blood Cell Lysis Buffer* in einem 15-ml-Röhrchen. Mischen Sie gut und inkubieren Sie den Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur.
4. Zentrifugieren Sie die Probe 5 Minuten bei 300 × *g*. Verwerfen Sie den Überstand. Das Pellet enthält isolierte Leukozyten.
5. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS und überführen Sie die Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.
6. Geben Sie zur Probe hinzu:
   - 400 µl *Lysis Solution AS*,
   - 5 µl *RNase A*,
   - 10 µl *Proteinase K*,

   Mischen Sie.
7. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
8. Geben Sie 300 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
9. 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.
10. 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.

11. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
12. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *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.

DNA-Extraktion aus Säugetierzellen und gramnegativen Bakterien

In die DNA-Extraktion sollten nicht mehr als 5×10^6 Säugetierzellen und 10^9 gramnegativen Bakterienzellen eingesetzt werden.

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

Bakterienkultur: Entweder auf festen oder in flüssigen Nährmedien gezüchtete Bakterien werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000–5000 x g gesammelt und der Überstand verworfen. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl 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 zur Probe hinzu:
   - 400 µl *Lysis Solution AS*,
   - 5 µl *RNase A*,
   - 10 µl *Proteinase K*,

   Mischen Sie.
3. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
4. Geben Sie 300 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
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 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *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.

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 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