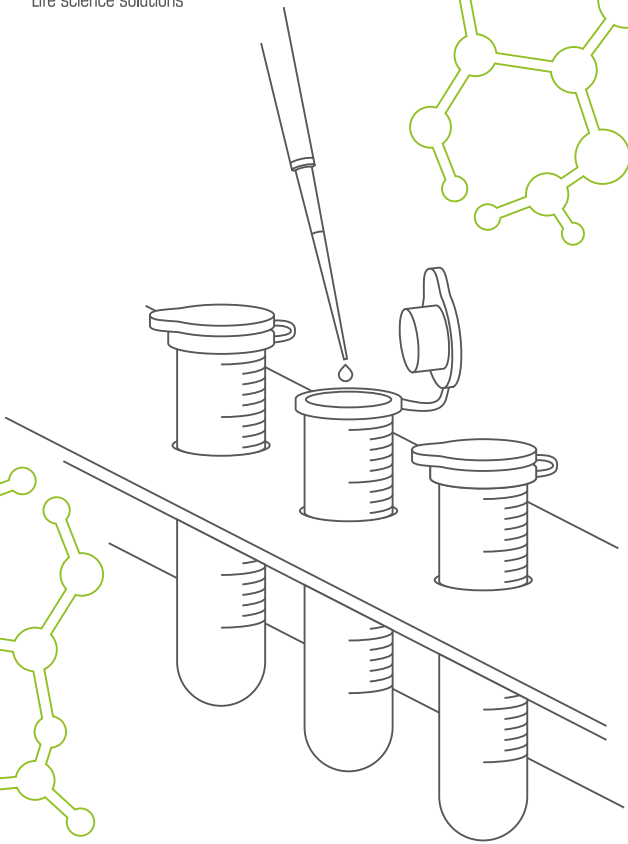
Lumiprobe
Life science solutions



Handbuch für das LumiPure® UNI, Fällungsbasiertes Nukleinsäureisolationskit für Proben jeglicher Art

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Deutsch: Handbuch für das LumiPure® UNI, Fällungsbasiertes Nukleinsäureisolationskit für Proben jeglicher Art 3-11

DE

Handbuch für das LumiPure® UNI, Fällungsbasiertes Nukleinsäureisolationskit für Proben jeglicher Art

Das Kit ist für die vollständige Nukleinsäureextraktion aus einer Vielzahl von Proben konzipiert, darunter pflanzliche und tierische Gewebe, Organe, Blutplasma, Myeloblasten, Säugetierzellkulturen, gramnegative Bakterienkulturen, Epithelzellabstriche, Abstriche, Waschflüssigkeiten und andere flüssige biologische Substanzen Proben. Die mit dem Kit isolierte Gesamtnukleinsäure ist mit der Downstream-PCR oder RT-PCR kompatibel.

Bestandteile

Komponente	Anzahl 34663 100 assays
P7450, Lysis Solution NA, 30 mL	1
R7050, Precipitation Solution, 40 mL	1
S8150, Wash Solution 1, 50 mL	1
S6050, Wash Solution 2, 50 mL	1
G5850, Dissolving buffer NA, 5 mL	1

Lagern bei 2 °C bis 8 °C. Transport: Bis zu 3 Wochen bei Temperaturen bis 30 °C.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Hardware und Verbrauchsmaterialien erforderlich, aber nicht im Lieferumfang enthalten

- Trockenblockheizung (oder Wasserbad)
- Zentrifuge, die 1,5-ml-Röhrchen aufnimmt und mindestens 13.000 U/min (11.000 × *g*) erzeugen kann
- 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (1-2 Röhrchen zur Extraktion aus 1 Probe)
- Zusatzmaterialien (abhängig vom Probentyp):
    - *Gewebeproben, Pflanze oder Tier:* flüssiger Stickstoff, Mörser und Pistill-Set
    - *Zellkulturen, Pflanze oder Tier:* Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)
    - *flüssige Bioproben, Tupfer, Waschflüssigkeiten, Kot:* sterile Kochsalzlösung
    - *Auswurf:* Mucolysin

Bevor Sie beginnen

Wenn die *Lyselösung NA* einen Niederschlag enthält, erhitzen Sie den Puffer im Heizer auf 50 °C und warten Sie, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat.

Probenvorbereitung

Pflanzen- und Tiergewebe

20-30 mg Probengewicht werden empfohlen. Es können sowohl frische als auch gefrorene Proben verwendet werden.

! Proben können mehrere Monate bei -70 °C gelagert werden.

1. Geben Sie eine frische oder gefrorene (-70 °C) Gewebeprobe in flüssigen Stickstoff.
2. Die gefrorene Probe in einen Mörser überführen und gründlich zu einem Pulver homogenisieren.
3. Füllen Sie das Pulver in ein separates 1,5-ml-Röhrchen. Warten Sie, bis der flüssige Stickstoff verdunstet ist, aber lassen Sie das Pulver nicht auftauen. (Probe während des Mahlens gefroren halten / Pulver vor dem Auftauen bewahren).
4. Fügen Sie dem Homogenat die folgenden Reagenzien in der folgenden Reihenfolge hinzu: 300 µl *Lyselösung NA*, 100 µl Wasser. Mischen Sie den Inhalt.
5. Fahren Sie mit Schritt 2 von **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Tierische oder bakterielle Zellkulturen

Es werden Proben von nicht mehr als 1—2×10^6 Zellzahlen für tierische Zellkulturen oder 10^9 Zellzahlen für gramnegative Bakterienzellkulturen empfohlen.

Adhärente Zellkultur: Medien entfernen, Zellen mit Trypsin ernten (oder mit anderen Methoden, die für die verwendete Zellkultur empfohlen werden). Zentrifugieren Sie die Probe bei 300 x *g* für 5 min. Verwerfen Sie den Überstand. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS. Überführen Sie die Suspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Tierische Zellen in Suspensionskultur: Sammeln Sie das Suspensionskulturvolumen, das erforderlich ist, um die gewünschte Zellzahl zu erhalten. Zentrifugieren Sie die Zellen

bei 300 × *g* für 5 min. Verwerfen Sie den Überstand. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS. Überführen Sie die Suspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Bakterienzellkultur: Sammeln Sie die mit flüssigen oder festen Medien gezüchteten Bakterien durch Zentrifugation bei 3.000–5.000 × *g* für 5–10 min. Verwerfen Sie den Überstand. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS. Überführen Sie die Suspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Blutplasma

Dieses Kit ist für die Nukleinsäureextraktion aus Blutplasma geeignet. Plasma muss aus peripheren Vollblutproben entnommen werden, die EDTA (2,0 mg/ml) oder Citrat als Antikoagulans enthalten.

! Heparin darf nicht als Antikoagulans verwendet werden.

! Das Plasma muss innerhalb von 6 Stunden nach der Entnahme der peripheren Blutprobe gewonnen werden.

1. Mischen Sie die Blutprobe durch Umdrehen des Fläschchens, um eine angemessene Homogenisierung sicherzustellen.
2. Zentrifugieren Sie das Fläschchen mit der Blutprobe bei 900 × *g* für 20 min bei Raumtemperatur (18–25 °C).
3. 100 µl des Überstands (Plasma) absaugen und in ein separates 1,5-ml-Röhrchen überführen.
4. Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

! Lagern Sie die Plasmaprobe nicht länger als 3 Monate bei -20 °C.

Epithelzellen in Abstrichproben

Dieses Kit ist für die Gesamtnukleinsäureextraktion aus Abstrichproben von Epithelzellen geeignet, die mit einem sterilen Einwegtupfer (bukkaler, hinterer Pharynx, nasopharyngealer, urethraler, zervikaler, vaginaler Abstrich usw.) entnommen wurden.

1. Geben Sie 500 µl sterile Kochsalzlösung in ein 1,5-ml-Röhrchen.
2. Schwenken Sie den Tupfer kräftig, um das Probenmaterial in Kochsalzlösung zu resuspendieren. Drücken Sie den Tupfer gegen die Wand der Durchstechflasche und drücken Sie die restliche Kochsalzlösung mit kreisenden Bewegungen heraus.
3. Zentrifugieren Sie die Lösung 10 min lang bei 11.000 × *g*. Entfernen Sie den Überstand gründlich.
4. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
5. Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Urin

1. Überführen Sie 1 ml einer Urinprobe in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
2. 10 min bei 11.000 × *g* zentrifugieren. Entfernen Sie den Überstand gründlich.
3. Resuspendieren Sie das Pellet in 1 ml steriler Kochsalzlösung.
4. 10 min bei 11.000 × *g* zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
5. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
6. Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Speichel, Liquor, Synovialflüssigkeit

1. Geben Sie 500 µl der Probe in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
2. 10 min bei 11.000 × *g* zentrifugieren. Entfernen Sie den Überstand gründlich und lassen Sie ca. 50 µl der Lösung über dem Pellet.
3. Resuspendieren Sie das Pellet in 500 µl steriler Kochsalzlösung.
4. 10 min bei 11.000 × *g* zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
5. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
6. Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Sperma, Prostatasekret

1. Geben Sie 100 µl der Probe in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
2. 500 µl sterile Kochsalzlösung in das Röhrchen geben, 5–10 Sek. vortexen.
3. 10 min bei 11.000 × *g* zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
4. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
5. Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Abstriche und Waschflüssigkeiten

1. Geben Sie die Probe in das Zentrifugationsröhrchen.
2. 10 min bei 11.000 × *g* zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
3. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
4. Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Kot

1. Überführen Sie 1 ml sterile Kochsalzlösung in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
2. Geben Sie ca. 250 mg (µl) Kot in das Röhrchen.
3. Vortexen Sie den Inhalt für 5-10 Sekunden.
4. 3 min bei 100 × *g* zentrifugieren.
5. Überführen Sie 800–1.000 µl Überstand in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
6. 10 min bei 11.000 × *g* zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
7. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
8. Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Sputum-Probe

1. Geben Sie Mucolysin in ein Fläschchen mit der Probe im Verhältnis 5:1 (5 Teile Mucolysin und 1 Teil Sputum) und verwenden Sie dabei die Skalenmarkierungen auf dem Fläschchen.
2. Schließen Sie den Deckel der Durchstechflasche, schütteln Sie den Inhalt. 20-30 min bei Raumtemperatur inkubieren, Fläschchen alle 2-3 min schütteln.

   ! Die aufbereitete Sputumprobe kann 24 Stunden bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert werden.
3. Überführen Sie 500 µl der mit Mucolysin behandelten Sputumprobe in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
4. Zentrifugieren für 10 min bei 11.000 × *g*. Verwerfen Sie den Überstand.
5. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
6. Fahren Sie mit **«Nukleinsäureextraktion»** fort.

Nukleinsäureextraktion

Alle Verfahren sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Sofern nicht anders verordnet, sollte eine Zentrifugation mit >13.000 U/min (>11.000 × *g*) durchgeführt werden.

Bevor Sie beginnen, stellen Sie den Trockenblockheizer auf 65 °C ein und heizen das Fläschchen mit *Resuspensionspuffer NA* vor.

Bereiten Sie die Probe in einem Volumen von 100 µl in einem 1,5-ml-Röhrchen vor, wie unter **«Probenvorbereitung»** beschrieben.

1. Geben Sie 300 µl Lyselösung NA in das Fläschchen mit der Probe (100 µl), mischen Sie gründlich durch Vortexen.
2. Inkubieren Sie die resultierende Lösung 15 Minuten lang bei 65 °C.
3. *(Optional)* Wenn die Probe nach der Lyse nicht vollständig aufgelöst ist, zentrifugieren Sie das Fläschchen 10 Minuten lang. Den Überstand in ein neues 1,5-ml-Röhrchen überführen.
4. 400 µl Präzipitationslösung in das Fläschchen mit der Probe geben und vortexen. 15 min zentrifugieren.
5. Entfernen Sie vorsichtig den Überstand, achten Sie darauf, das Pellet nicht zu stören. 500 µl Waschlösung 1 zum Pellet geben, durch Vortexen mischen. 5 min zentrifugieren.
6. Entfernen Sie vorsichtig den Überstand, achten Sie darauf, das Pellet nicht zu stören. 500 µl Waschlösung 2 zum Pellet geben, durch Vortexen mischen. 5 min zentrifugieren.
7. Entfernen Sie den Überstand gründlich, vermeiden Sie es, das Pellet zu stören. Öffnen Sie das Fläschchen und trocknen Sie das Pellet 5 Minuten lang bei 65 °C.
8. Fügen Sie 50 µl vorgewärmten *Resuspensionspuffer NA* hinzu.
9. Inkubieren Sie das Fläschchen mit der Probe 5-10 Minuten lang bei 65 °C. Mischen Sie den Inhalt durch Vortexen und zentrifugieren Sie, um Tropfen zu sammeln. Das resultierende Produkt der Gesamtnukleinsäure ist ohne

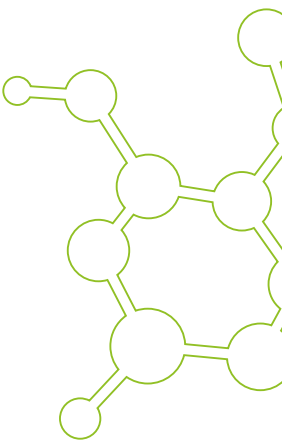
zusätzliche Verarbeitung für Downstream-PCR oder RT-PCR geeignet.

Aufbewahrung extrahierter RNA: *Wir empfehlen, extrahierte RNA aufgrund ihrer Instabilität nicht aufzubewahren.* Das extrahierte RNA-Produkt muss sofort in der nachgeschalteten reversen Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden.

Aufbewahrung der extrahierten DNA: Kurzfristig bei +4 °C lagern; bei -20 °C nicht länger als 1 Monat oder bei -70 °C nicht länger als 1 Jahr lagern.

Ver. MJ4Q6
#5555N

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com