



LysoPrep Lyo Lysozym-Vorbehandlungskit
für DNA-Extraktion Vorbehandlungskit für
DNA-Extraktion Handbuch

Contents

Deutsch: LysoPrep Lyo Lysozym-Vorbehandlungskit für DNA-Extraktion Vorbehandlungskit für DNA-Extraktion Handbuch	3-9
---	-----

LysoPrep Lyo Lysozym-Vorbehandlungskit für DNA-Extraktion Vorbehandlungskit für DNA-Extraktion Handbuch

Der LysoPrep Lyo-Reagenzienkit dient zur Lysozym-basierten Vorbehandlung humanen biologischen Materials und bakterieller Kulturen vor der DNA-Extraktion. Dieses Verfahren steigert die Ausbeute bakterieller DNA und reduziert die Inhibitorenkonzentration.

Lysozym zerstört Peptidoglycane — Bestandteile der Zellwände von Mikroorganismen — durch Hydrolyse N-glykosidischer Bindungen. Zudem verursachen Lysozym-Moleküle nach Einlagerung in die Cytoplasmamembran strukturelle Schäden und induzieren Porenbildung, was letztendlich zur Lyse der Bakterienzellen führt.

Das Kit ist gebrauchsfertig. Ein Kit ist für 50 Proben ausgelegt.

Bestandteile

Komponente	Anzahl
	21133
	50 assays
12315, Lysozyme, 20 mg	5
A6850, Lysozyme dilution Buffer, 200 μ L	5

Lagern bei $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Transportieren bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 10 Tage.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Detaillierte Lagerungsanforderungen für Kit-Komponenten sind nachstehend aufgeführt.

Nicht im Kit enthaltene Materialien:

1. Minizentrifuge-Vortex
2. Zentrifuge für 1,5-ml-Reaktionsgefäße mit einer RCF von mindestens $14.000 \times g$
3. Trockenblockthermostat bis $65\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. 1,5-ml-Mikrozentrifugengefäße (mit Verschluss, DNase-/RNase-frei)
5. Filterpipettenspitzen (20 μl , 200 μl , 1000 μl), DNase/RNase-frei
6. Entsorgungsbehälter für verbrauchte Spitzen, Röhrchen und Verbrauchsmaterial
7. Sterile Kochsalzlösung
8. Glycerol (falls erforderlich)

Probenvorbereitung

Humane Stuhlproben (Fäzes, einschließlich Mekonium) und Bakterienkulturen können für die Analyse verwendet werden. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sind folgende Punkte entscheidend:

1. Die Qualität der Probennahme des Biomaterials sowie dessen sachgemäße Lagerung, Transport und Aufarbeitung sind für die Ergebnisgenauigkeit maßgeblich.
2. Fehlerhafte Probennahme kann zu verfälschten Ergebnissen und somit zur Notwendigkeit einer Wiederholungsentnahme führen.
3. Verwenden Sie während der Aufarbeitung des Biomaterials ausschließlich filterbestückte Pipettenspitzen (Filtertips), die frei von RNase und DNase sind.
4. Bei der Zugabe der Lysozymlösung zum Probenröhrchen arbeiten Sie vorsichtig, vermeiden Sie den Kontakt der Pipettenspitze mit der Innenwand des Reaktionsgefäßes. Im Falle eines Kontakts wechseln Sie die Pipettenspitze.
5. Wechseln Sie die Pipettenspitze nach jeder Entnahme von Lösung aus der Probe.
6. Zur Kontaminationsvermeidung halten Sie jeweils nur das Reaktionsgefäß geöffnet, an dem Sie aktuell arbeiten (Probeneingabe, Reagenzzugabe oder Entnahme des

Überstands); schließen Sie dieses unmittelbar nach Abschluss aller notwendigen Arbeitsschritte und öffnen Sie erst danach das nächste Gefäß.

1. Stuhlprobengewinnung

Zur Entnahme von Fäzesproben verwenden Sie Stuhl oder Mekonium mit einem Gewicht (Volumen) von ca. 1,0–3,0 g (1,0–3,0-ml) für die Analyse. Überführen Sie etwa 1,0 g der Probe mittels steriler Filterpipettenspitze oder Einweg-Spatel in ein trockenes, steriles Probenröhrchen. Verschließen Sie das Gefäß unverzüglich nach der Probenentnahme und beschriften es.

Wichtig: Vor der DNA-Extraktion ist eine Aufbereitung der Biomaterialproben erforderlich (siehe Schritt 'Aufbereitung von Fäzes- und Mekonium-Proben').

2. Bakterienkulturentnahme

Für die Entnahme von Bakterienkulturen verwenden Sie eine Einweg-Öse oder einen Einweg-Spatel, um Biomaterial aus flüssigen oder festen Nährmedien zu gewinnen. Überführen Sie entweder eine Einzelkolonie oder 100 µl Flüssigkultur in ein vorgefülltes 1,5-2,0-ml Einmal-Reaktionsgefäß mit 500 µl steriler Kochsalzlösung. Verschließen Sie das Gefäß nach der Probenüberführung dicht und beschriften es.

3. Transport und Lagerung von Proben

Für Stuhl- und Mekoniumproben sind Transport und Lagerung möglich:

- Bei Raumtemperatur (18–25 °C) — maximal 6 Stunden
- Bei 2–8 °C — maximal 3 Tage

Bei Lagerbedarf über einen 24-Stunden-Zeitraum oder langfristig wird die Herstellung einer Stuhlsuspension unter Zugabe von Glycerin empfohlen.

Für Bakterienkulturen sind Transport und Lagerung möglich:

- Bei 2–8 °C — maximal 24 Stunden

- Bei -18 bis -20 °C — maximal 1 Woche
- Bei -70 °C (Trockeneis/Kryobehälter) — langfristig

Wichtig: Maximal ein Frost-Tau-Zyklus zulässig.

4. Aufbereitung von Fäzes- und Mekoniumproben (Herstellung der Suspension)

1. Verwenden Sie ca. 0,1–0,2 g (bzw. ml) Fäzes/Mekonium und überführen Sie diese in ein 1,5-ml Kunststoffröhrchen mit 1,0-ml steriler Kochsalzlösung.
2. Verwenden Sie einen Minizentrifuge-Vortex, um die Probe 5-10 Sekunden gründlich zu homogenisieren.
3. Fügen Sie bei Analyseunmöglichkeit innerhalb eines Tages oder erforderlicher Langzeitlagerung Glycerin zur Suspension hinzu (Endkonzentration: 10-15 %). Mischen Sie die Probe mit Glycerin vollständig durch und inkubieren Sie sie 30-40 Minuten bei Raumtemperatur, um eine gleichmäßige Durchmischung vor der Tiefkühlung zu gewährleisten.
4. Lagern/Transportieren Sie die Glycerin-Suspension wie folgt:
 - Bei -20 °C: bis zu 1 Woche
 - Bei -70 °C: Langzeitlagerung möglich

Vorbereitung der Kit-Komponenten

Lysozym aus dem **LysoPrep Lyo-Kit** muss zunächst gelöst werden:

1. Fügen Sie 200 µl Puffer zum Röhrchen mit lyophilisiertem Lysozym hinzu.
2. Verwenden Sie einen Minizentrifuge-Vortex für 3-5 Sekunden, bis sich die Kristalle vollständig lösen.
3. Verschließen Sie das Röhrchen dicht.
4. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz (1-3 Sekunden), um Flüssigkeitstropfen vom

Deckel zu sedimentieren.

5. Das erhaltene Lysozym-Volumen reicht für 10 Proben (inklusive Negativkontrolle).
6. Die unverbrauchte Restmenge der hergestellten Lysozym-Lösung kann bei -18 °C bis -22 °C für die Dauer des Kit-Verfalldatums gelagert werden.

Wichtig: Maximal ein Frost-Tau-Zyklus zulässig.

Probenaufarbeitung

1. Allgemeine Empfehlungen

- Verwenden Sie beim Probenumgang Einweg-Pipettenspitzen mit RNase-/DNase-Filter.
- Setzen Sie Reagenzien vorsichtig unter Vermeidung von Wandkontakt in Röhrcchen mit biologischem Material ein. Tauschen Sie die Spitze bei Kontakt aus.
- Bearbeiten Sie Testproben und Negativkontrolle («NC») gleichzeitig.

2. Aufarbeitung von Fäkalsuspensionen

1. Zentrifugieren Sie Suspensionsröhrcchen bei $13.000 \times g$ für 30 Sekunden (Raumtemperatur) zur Abtrennung von Grobpartikeln.
2. Beschriften Sie für jede Probe und «NC» ein Einweg-1,5-ml-Röhrcchen.

Wichtig: Um Kontamination zu vermeiden, öffnen Sie nur das aktuell bearbeitete Röhrcchen (Proben-/Reagenzzugabe, Überstandentnahme). Schließen Sie es nach Reagenzzugabe vollständig, bevor Sie das nächste öffnen. Arbeiten Sie niemals gleichzeitig mit mehreren offenen Röhrcchen.

1. Pipettieren Sie $100\ \mu\text{l}$ der mittleren Fraktion aus der Fäkalsuspension in die Teströhrcchen (nicht in «NC»).
2. Geben Sie $100\ \mu\text{l}$ sterile Kochsalzlösung oder Elutionspuffer (Nukleinsäure-

Isolationskit) in das «NC»-Röhrchen.

3. Fügen Sie 20 µl Lysozym-Lösung zu allen Proben und «NC» hinzu.
4. Vortexen Sie die Röhrchen vorsichtig für 3-5 Sekunden.
5. Zentrifugieren Sie kurz (1-3 Sekunden) zur Tropfenablösung.
6. Inkubieren Sie mit Lysozym für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder 30 Minuten bei 37 °C. Mischen Sie währenddessen 2-3-mal durch vorsichtiges Vortexen (3-5 Sekunden).
7. Zentrifugieren Sie abschließend für 60 Sekunden.

3. Aufarbeitung von Bakterienkulturen

1. Beschriften Sie für jede Probe und «NC» ein Einweg-1,5-ml-Röhrchen.
2. Geben Sie 100 µl Bakteriensuspension in jedes Teströhrchen (nicht in «NC»).
3. Fügen Sie 100 µl sterile Kochsalzlösung/Elutionspuffer zu «NC» hinzu.
4. Pipettieren Sie 20 µl Lysozym-Lösung zu allen Röhrchen.
5. Vortexen Sie vorsichtig für 3-5 Sekunden.
6. Zentrifugieren Sie kurz (1-3 Sekunden) zur Tropfenablösung.
7. Inkubieren Sie mit Lysozym für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder 30 Minuten bei 37 °C. Mischen Sie währenddessen 2-3-mal durch vorsichtiges Vortexen (3-5 Sekunden).
8. Zentrifugieren Sie abschließend für 60 Sekunden.

DNA-Extraktion

Verwenden Sie mit Lysozym (**LysoPrep Lyo-Kit**) vorbehandelte Proben unverzüglich für die DNA-Extraktion.

Nutzen Sie das gesamte Volumen (120 µl) der vorbehandelten Probe gemäß Protokoll Ihres Nukleinsäure-Isolationskits.

Verwenden Sie für optimale Ergebnisse **LumiMag UNI/FEC**, **LumiPure UNI** oder **LumiSpin UNI** Nukleinsäure-Isolationskits.

Verfalldatum

Die Haltbarkeit des Kits beträgt 12 Monate ab Freigabe durch die Qualitätskontrolle des Herstellers unter Einhaltung aller Transport-, Lager- und Anwendungsbedingungen. Abgelaufene Kits dürfen nicht verwendet werden.

Lagerung der Kit-Komponenten

- Lagern Sie ungeöffnete Kit-Komponenten bei -22 °C bis $+8\text{ °C}$ über die gesamte Haltbarkeit.
- Lagern Sie die hergestellte Lysozym-Lösung bei -18 °C bis -22 °C . Maximal ein Frost-Tau-Zyklus zulässig.
- Bei Verstößen gegen Lagerbedingungen sind die Komponenten nicht verwendbar.



22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

