



Forensic Kit

Datenblatt

Artikel-Nr. BS44.811.0010	10 Aufreinigungen
BS44.811.0050	50 Aufreinigungen
BS44.811.0250	250 Aufreinigungen

Sicherheitsanweisungen

Bitte gehen Sie mit allen Materialien und Reagenzien, die im Kit enthalten sind, vorsichtig um. Es sollten immer Handschuhe getragen und Hautkontakt vermieden werden!

Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit viel Wasser abspülen!

Lagerung

Das **Forensic Kit** sollte trocken und bei Raumtemperatur (14–25°C) gelagert werden. Unter diesen Bedingungen ist es mindestens 6 Monate stabil. Vor jeder Nutzung sollten alle Komponenten Raumtemperatur haben. Kristalle, die sich eventuell während der Lieferung bzw. Lagerung gebildet haben, können durch vorsichtiges Erwärmen gelöst werden.

Qualitätskontrolle und technische Unterstützung

Alle Produkte von Bio&SELL werden umfassenden Qualitätskontrollen unterzogen. Dadurch wird gewährleistet, dass sie bei vorschriftsmäßiger Anwendung einwandfrei funktionieren. Die Komponenten jedes Bio&SELL **Forensic Kit** wurden in der Isolierung von DNA aus Haarwurzeln getestet und die extrahierte DNA einer nachfolgenden Amplifikation unterzogen.

Sollten Fragen oder Probleme auftreten, kontaktieren Sie uns bitte telefonisch unter: 09128 – 724 32 32.

Wir behalten uns das Recht vor, Änderungen zur Verbesserung der Durchführung und am Design vorzunehmen.

Nur für die Forschung!

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	1 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	---

Kit-Komponenten

Wichtige Hinweise zur Lagerung:

- Alle Komponenten, bis auf die Proteinase K, sollten bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Lagerung der lyophilisierten Proteinase K: bei -20°C
- Lagerung der gelösten Proteinase K: bei -20°C; die Lagerung in Aliquots wird empfohlen, da wiederholtes Einfrieren und Auftauen die Aktivität des Enzyms drastisch reduziert.

	10 Präparationen	50 Präparationen	250 Präparationen
Lysepuffer TLS	5 ml	25 ml	120 ml
Bindepuffer TBS	5 ml	25 ml	120 ml
Proteinase K	für 0,3 ml Arbeitslösung	für 1,5 ml Arbeitslösung	für 5 x 1,5 ml Arbeitslösung
Waschpuffer HS	3 ml (Endvolumen 6 ml)	15 ml (Endvolumen 30 ml)	70 ml (Endvolumen 140 ml)
Waschpuffer MS	3 ml (Endvolumen 10 ml)	15 ml (Endvolumen 50 ml)	60 ml (Endvolumen 200 ml)
Elutionspuffer	2 ml	10 ml	30 ml
Zentrifugations säulen	10	50	5 x 50
Sammeltubes 2,0 ml	40	4 x 50	20 x 50
Elutionstubes 1,5 ml	10	50	5 x 50

<u>Wichtige Schritte vor Beginn</u>	<ul style="list-style-type: none"> ● Geben Sie 3 ml 96 – 99,8% Ethanol zur Flasche mit Waschpuffer HS. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten! 	<ul style="list-style-type: none"> ● Geben Sie 15 ml 96 – 99,8% Ethanol zur Flasche mit Waschpuffer HS. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten! 	<ul style="list-style-type: none"> ● Geben Sie 70 ml 96 – 99,8% Ethanol zur Flasche mit Waschpuffer HS. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten! 	
	<ul style="list-style-type: none"> ● Geben Sie 7 ml 96 – 99,8% Ethanol zur Flasche mit Waschpuffer MS. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten! 	<ul style="list-style-type: none"> ● Geben Sie 35 ml 96 – 99,8% Ethanol zur Flasche mit Waschpuffer MS. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten! 	<ul style="list-style-type: none"> ● Geben Sie 140 ml 96 – 99,8% Ethanol zur Flasche mit Waschpuffer MS. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten! 	
	<ul style="list-style-type: none"> ● Lösen Sie die Proteinase K durch Zugabe von 0,3 ml ddH₂O. Gründlich mischen. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Lösen Sie die Proteinase K durch Zugabe von 1,5 ml ddH₂O. Gründlich mischen. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Lösen Sie die Proteinase K jeweils durch Zugabe von 1,5 ml ddH₂O. Gründlich mischen. 	

Nicht im Kit enthaltene Komponenten

- Optional: RNase A (100 mg/ml)
- Optional: 1 M DTT
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- 96 – 99,8% Ethanol
- ddH₂O

Wichtig vor Arbeitsbeginn

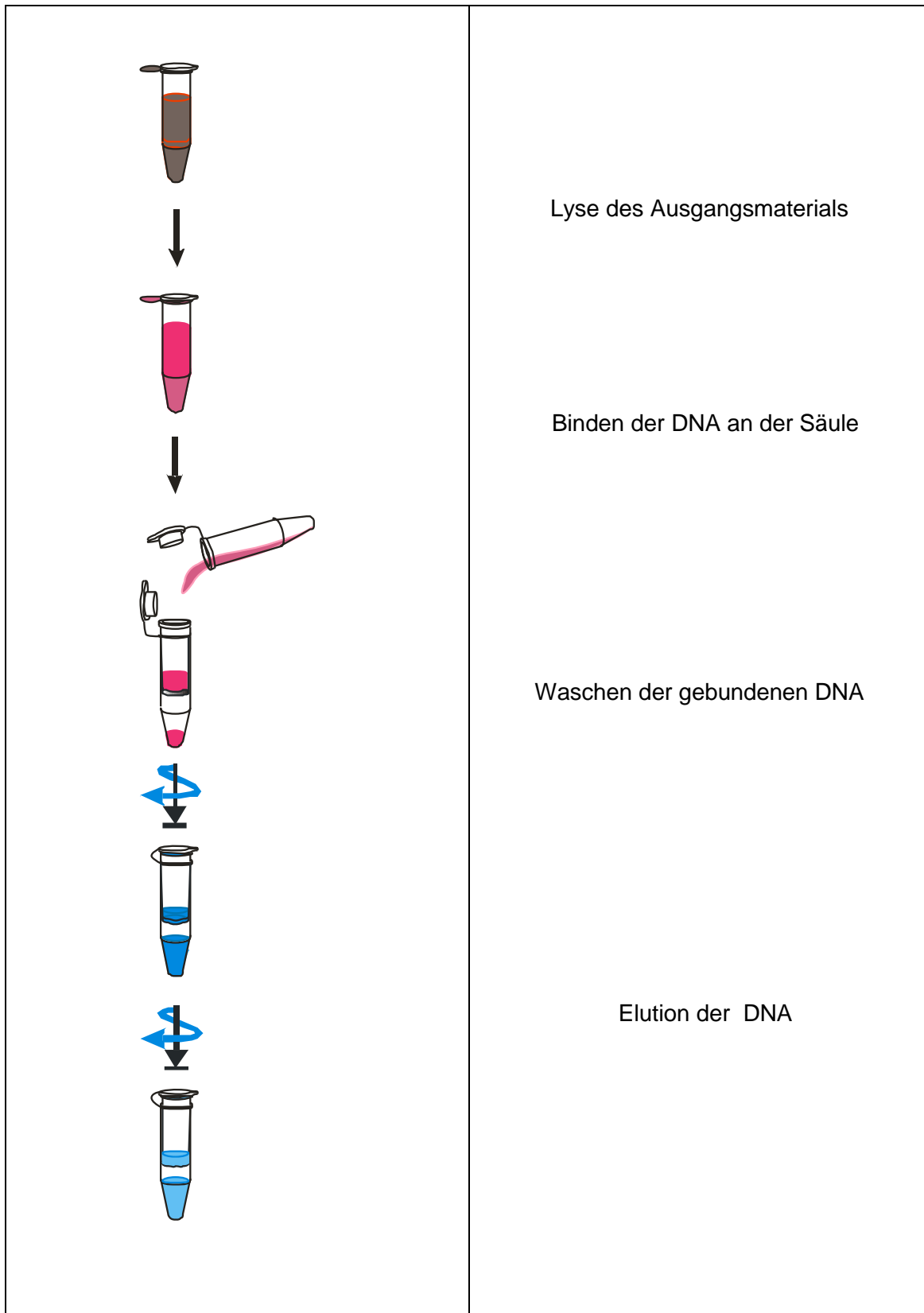
- Heizen Sie einen Thermomixer oder ein Wasserbad auf 50°C vor (optional: 42°C für Übernachtinkubationen)
- Stellen Sie sicher, dass Waschpuffer HS, Waschpuffer MS und die Proteinase K gemäß der obigen Instruktionen vorbereitet sind
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Ausgangsmaterials

Wichtige Hinweise

- Wird der **Bio&SELL Forensic Kit** für andere Ausgangsmaterialien als die im Protokoll beschriebenen forensischen Proben eingesetzt, sollte eines der Protokolle zur Präparation ausgewählt werden.
- Die Isolierung von DNA aus Proben sehr geringer Menge kann eventuell durch die Zugabe von Carrier-RNA während des Bindungsschrittes unterstützt werden (z.B. Poly(A)-RNA; Roche Diagnostics; No. 108626). RNA in RNase-freiem Wasser resuspendieren, um eine Lösung mit Endkonzentration von 1 µg/µl zu erhalten. Aliquotieren und bei -20°C lagern. Die Aliquots nicht mehr als dreimal einfrieren und auftauen! Wir empfehlen die Zugabe von 1 µl Carrier-RNA pro Probe.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	4 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	---

Funktionsweise



Protokoll 1: Isolierung von DNA aus Wangenabstrichen

Wichtiger Hinweis: Um die maximale Ausbeute an DNA zu erzielen ist es wichtig, den Tupfer mit dem Wangenabstrich während der gesamten Lysezeit in dem 1,5 ml Reaktionsgefäß zu lassen. Der Stiel des Tupfers kann abgeschnitten werden, um den Deckel des Reaktionsgefäßes zu schließen. Wird der Tupfer zu früh aus dem Gefäß entfernt, führt dies zu einer dramatisch reduzierten Ausbeute!

1. Den Tupfer mit dem Wangenabstrich in ein **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen.

400 µl Lysepuffer TLS und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C für 10 – 15 min inkubieren, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4 mal vor-texen. Nach Ablauf der Lysezeit den Tupfer gründlich an der Wand des Reaktionsgefäßes ausdrücken und dann aus dem Tube entfernen.

Hinweis: Falls erforderlich, kann an dieser Stelle ein RNA-Verdau stattfinden. **4 µl RNase A** (100 mg/ml) zugeben, kurz vortexen und die Probe 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.

2. **400 µl Bindpuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

3. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	6 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	---

4. Zentrifugationssäule öffnen und **500 µl Waschpuffer HS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentri-fugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Zentrifugationssäule öffnen und **750 µl Waschpuffer MS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentri-fugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen

6. Nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollstän-dig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

7. Zentrifugationssäule öffnen und **50 – 100 µl Elutionspuffer** zugeben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 6.000 x g (8.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer durchgeführt werden.

Hinweis: Die DNA kann auch mit geringeren oder mit höheren Volumina an Elutionspuffer eluiert werden als oben angegeben. Bei geringeren Volumina an Elutionspuffer erhöht sich die Endkon-zentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Protokoll 2: Isolierung von DNA aus Abstrichen von verschiedenen Oberflächen (z.B. Tassen, Flaschen, Fingerabdrücken etc.)

Wichtiger Hinweis: Um die maximale Ausbeute an DNA zu erzielen ist es wichtig, den Tupfer mit dem Abstrich während der gesamten Lysezeit in dem 1,5 ml Reaktionsgefäß zu lassen. Der Stiel des Tupfers kann abgeschnitten werden, um

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	7 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
--	--	---

den Deckel des Reaktionsgefäßes zu schließen. Wird der Tupfer zu früh aus dem Gefäß entfernt, führt dies zu einer dramatisch reduzierten Ausbeute!

1. Den Tupfer mit dem Abstrich in ein **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen. **400 µl Lysepuffer TLS** und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C für 1 Stunde inkubieren, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4mal vortexen. Nach Ablauf der Lysezeit den Tupfer gründlich an der Wand des Reaktionsgefäßes ausdrücken und dann aus dem Tube entfernen.

Hinweis: Falls erforderlich, kann an dieser Stelle ein RNA-Verdau stattfinden. **4 µl RNase A** (100 mg/ml) zugeben, kurz vortexen und die Probe 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.

2. **400 µl Bindpuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

3. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: **Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.**

Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

4. Zentrifugationssäule öffnen und **500 µl Waschpuffer HS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentri-fugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	8 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	---

5. Zentrifugationssäule öffnen und **750 µl Waschpuffer MS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammel tube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentri-fugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammel tube** stellen

6. Nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollstän-dig zu entfernen. Das Sammel tube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

7. Zentrifugationssäule öffnen und **50 – 100 µl Elutionspuffer** zugeben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 6.000 x g (8.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer durchgeführt werden.

Hinweis: Die DNA kann auch mit geringeren oder mit höheren Volumina an Elutionspuffer eluiert werden als oben angegeben. Bei geringeren Volumina an Elutionspuffer erhöht sich die Endkon-zentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Protokoll 3: Isolierung von DNA aus Blutspuren, Speichelspuren, Briefmarken, Briefumschlägen, Sperma etc.

1. Das Material, welches die Spuren enthält, in kleine Stücke schneiden und in ein **1,5 ml Reaktionsge-fäß** überführen. **400 µl Lysepuffer TLS** und **25 µl Proteinase K** zugeben.

Für Sperma: Zusätzlich 30 µl 1 M DTT zu dem Lysepuffer/Proteinase K-Mix geben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C für mindestens 2 Stunden inkubieren, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4mal vortexen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	9 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	---

2. Bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren, um nicht-lysiertes Material zu entfernen. Den Überstand in ein neues **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen.

3. **400 µl Bindpuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

4. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Zentrifugationssäule öffnen und **500 µl Waschpuffer HS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

6. Zentrifugationssäule öffnen und **750 µl Waschpuffer MS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen

7. Nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

8. Zentrifugationssäule öffnen und **30 µl Elutionspuffer** zugeben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 6.000 x g (8.000 rpm) für 1 min

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	10 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--

zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer (je 30 µl) durchgeführt werden.

Hinweis: Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Protokoll 4: Isolierung von DNA aus Haarwurzeln, Barthaaren, Fingernägeln etc.

1. Das Material, welches die Spuren enthält, in kleine Stücke schneiden und in ein **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen. **400 µl Lysepuffer TLS** und **25 µl Proteinase K** zugeben. 30 µl 1 M DTT zu dem Lyse-puffer/Proteinase K-Mix geben und durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei 42°C inkubieren, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4mal vortexen.

Wichtig: Sicherstellen, dass die Haarwurzeln während der gesamten Lysezeit von dem Lysepuffer bedeckt sind!

2. Bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren, um nicht-lysiertes Material zu entfernen. Den Überstand in ein neues **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen.

3. **400 µl Bindpuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

4. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	11 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
--	--	--

Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Zentrifugationssäule öffnen und **500 µl Waschpuffer HS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentri-fugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

6. Zentrifugationssäule öffnen und **750 µl Waschpuffer MS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentri-fugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen

7. Nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollstän-dig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

8. Zentrifugationssäule öffnen und **30 µl Elutionspuffer** zugeben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 6.000 x g (8.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer (je 30 µl) durchgeführt werden.

Hinweis: Die DNA kann auch mit geringeren oder mit höheren Volumina an Elutionspuffer eluiert werden als oben angegeben. Bei geringeren Volumina an Elutionspuffer erhöht sich die Endkon-zentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	12 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--

Protokoll 5: Isolierung von DNA aus Zigarettenstummeln

1. Ein kleines Stück (3 – 5 mm) von dem braunen Filterpapier oder von dem Filter abschneiden und in ein **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen. **400 µl Lysepuffer TLS** und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei 42°C inkubieren, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4mal vortexen.

2. Bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren, um nicht-lysiertes Material zu entfernen. Den Überstand in ein neues **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen.

Hinweis: Falls erforderlich, kann an dieser Stelle ein RNA-Verdau stattfinden. **4 µl RNase A** (100 mg/ml) zugeben, kurz vortexen und die Probe 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.

3. **400 µl Bindpuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

4. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Zentrifugationssäule öffnen und **500 µl Waschpuffer HS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	13 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--

Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammel tube** stellen.

6. Zentrifugationssäule öffnen und **750 µl Waschpuffer MS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammel tube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammel tube** stellen

7. Nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammel tube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

8. Zentrifugationssäule öffnen und **30 µl Elutionspuffer** zugeben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 6.000 x g (8.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer (je 30 µl) durchgeführt werden.

Hinweis: Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Protokoll 6: Isolierung von DNA aus Kaugummi

1. Einen Teil des Kaugummis in kleine Stücke schneiden und in ein **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen. **400 µl Lysepuffer TLS** und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei 42°C inkubieren, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4mal vortexen.

2. Bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren, um nicht-lysiertes Material zu entfernen. Den Überstand in ein neues **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	14 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--

3. **400 µl Bindpuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

4. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Zentrifugationssäule öffnen und **500 µl Waschpuffer HS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

6. Zentrifugationssäule öffnen und **750 µl Waschpuffer MS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen

7. Nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

8. Zentrifugationssäule öffnen und **30 µl Elutionspuffer** zugeben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 6.000 x g (8.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer (je 30 µl) durchgeführt werden.

Hinweis: Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	15 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
--	--	--

Protokoll 7: Isolierung von DNA aus Gewebeproben

1. Das frische oder gefrorene Material in kleine Stücke schneiden und in ein **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen. **400 µl Lysepuffer TLS** und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C für mindestens 1 Stunde oder über Nacht bei 42°C inkubieren, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4mal vortexen.

2. Bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren, um nicht-lysiertes Material zu entfernen. Den Überstand in ein neues **1,5 ml Reaktionsgefäß** überführen.

Hinweis: Falls erforderlich, kann an dieser Stelle ein RNA-Verdau stattfinden. **4 µl RNase A** (100 mg/ml) zugeben, kurz vortexen und die Probe 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.

3. **400 µl Bindpuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

4. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren.

Hinweis: Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

5. Zentrifugationssäule öffnen und **500 µl Waschpuffer HS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	16 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
--	--	--

6. Zentrifugationssäule öffnen und **750 µl Waschpuffer MS** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen

7. Nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

8. Zentrifugationssäule öffnen und **30 µl Elutionspuffer** zugeben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 6.000 x g (8.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer (je 30 µl) durchgeführt werden.

Hinweis: Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Kalkulation der Zentrifugalkraft (relative centrifugal force, rcf) in [g], ausgehend von Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm)

$$\text{RCF (g)} = 1,19 \cdot 10^{-5} \times (\text{rpm})^2 \times R$$

R = Radius des Rotors in cm (Achtung: Radius, nicht Durchmesser!)

Beispiel: Berechnung der Zentrifugalkraft bei 10.000 rpm in einer Zentrifuge mit

Rotor-Radius 9 cm

$$\text{RCF} = 1,19 \cdot 10^{-5} \times (10.000)^2 \times 9$$

$$\text{RCF} = 10.710 \times g$$

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	17 Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--

Troubleshooting

Problem / mögliche Ursache	Bemerkungen und Vorschläge
<p>Verstopfte Zentrifugationssäule</p> <p>Ungenügende Lyse und/oder zu viel Ausgangsmaterial</p>	<p>Lysezeit erhöhen.</p> <p>Zentrifugationsgeschwindigkeit erhöhen.</p> <p>Die Probe nach der Lyse zentrifugieren, um nicht-lysierte Bestandteile zu entfernen.</p> <p>Weniger Ausgangsmaterial einsetzen.</p>
<p>Niedrige Ausbeute</p> <p>Ungenügende Lyse</p> <p>Schlechte Elution der DNA</p> <p>Nicht ausreichend mit Bindepuffer TBS gemischt</p>	<p>Lysezeit erhöhen.</p> <p>Weniger Ausgangsmaterial einsetzen.</p> <p>Inkubationszeit mit Elutionspuffer auf 5 min erhöhen oder Elutionsschritt wiederholen. Mit einem höheren Volumen eluieren.</p> <p>Probe vor dem Überführen auf die Zentrifugationssäule durch Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen mit Bindepuffer TBS mischen.</p>
<p>Niedrige Konzentration der DNA</p> <p>Zu viel Elutionspuffer</p>	<p>DNA mit einem geringerem Volumen an Puffer eluieren.</p>
<p>Degradierte oder gescherte DNA</p> <p>Falsche Aufbewahrung des Ausgangsmaterials</p> <p>Altes Ausgangsmaterial</p>	<p>Sicherstellen, dass das Ausgangsmaterial sofort in flüssigem Stickstoff oder zumindest bei -20°C eingefroren wird und dass es dauerhaft bei -80°C gelagert wird.</p> <p>Auftauen des Ausgangsmaterials vermeiden.</p> <p>In altem Ausgangsmaterial ist die DNA sehr häufig bereits degradiert.</p>
<p>RNA-Kontamination der isolierten DNA</p>	<p>RNase-Verdau durchführen wie im Protokoll angegeben.</p>

Notizen
