



DNA Mini Kit

Datenblatt

Artikel-Nr. BS44.611.0010 10 Präparationen
Artikel-Nr. BS44.611.0050 50 Präparationen
Artikel-Nr. BS44.611.0250 250 Präparationen

(Nur für Forschung und *in vitro*-Anwendungen)

Für:

Chargen-Nr.: BS.

Mindestens haltbar: Bis

Aussehen:

Farbe:

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



DNA Mini Kit

Beschreibung

Säulchen basierte Extraktion von genomischer DNA aus den unterschiedlichsten Proben. Enthalten sind, neben allen benötigten Puffern, auch genaue Protokolle zur Verarbeitung der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien:

- Gewebeproben (max. 20 mg) S. 12
- Nagerschwänze (0,2 bis 0,8 cm Schwanzstück) S. 12
- Eukaryotische Zellen (max. 5×10^6 Zellen) S. 15
- Wangenabstrichtupfer S. 17
- Bakterielle Zellkultur (max. 1×10^{10} Zellen) S. 20
- Hefezellen S. 23
- Blut (frisch, gefroren, EDTA stabilisiert) mit 200 µl oder 400 µl Volumen S. 26

Präparationsdauer: nur ca. 10 min nach Lyse.

Wichtige Hinweise zur Lagerung

- Alle Komponenten, bis auf die Proteinase K, sollten bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Lagerung der lyophilisierten Proteinase K bei 4°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.

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

DNA Mini Kit

Kit-Komponenten

	10 Präparationen	50 Präparationen	250 Präparationen
Lysepuffer DCW	5 ml	25 ml	120 ml
Lysepuffer TMT	5 ml	25 ml	120 ml
Bindepuffer CM	8 ml	40 ml	200 ml
Bindepuffer TCT	2 ml	12 ml	60 ml
Proteinase K	für 2x 0,3 ml Arbeitslösung	für 2x 1,5 ml Arbeitslösung	für 6 x 1,5 ml Arbeitslösung
RNase A (10 mg/ml)	60µl	300µl	2 x 300µl
Waschpuffer D	5 ml	25 ml	120 ml
Waschpuffer CT	2 ml (Endvolumen 20 ml)	8 ml (Endvolumen 80 ml)	2 x 18 ml (Endvolumen 180 ml)
Waschpuffer NT	6 ml (Endvolumen 20 ml)	30 ml (Endvolumen 100 ml)	2 x 66 ml (Endvolumen 220 ml)
Elutionspuffer	6 ml	25ml	110ml
Zentrifugations säulen	10	50	5 x 50
Sammeltubes 2,0 ml	50	5 x 50	10 x 50
Elutionstubes	10	50	5 x 50

DNA Mini Kit

Wichtige Schritte vor Beginn

- Zugabe von 96 – 99,8% Ethanol zu Waschpuffer CT und NT.
Die entsprechenden Volumina je nach Kit Größe entnehmen Sie der nachfolgenden Tabelle. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten.
- Lösen Sie die Proteinase K durch Zugabe von ddH₂O.
Die entsprechenden Volumina je nach Kit Größe entnehmen Sie der nachfolgenden Tabelle. Gründlich mischen.

ZUGABE BEI	10 Präparationen	50 Präparationen	250 Präparationen
Waschpuffer CT	18 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben	72 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben	162 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben
Waschpuffer NT	14 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben	70 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben	154 ml 96 – 99,8% Ethanol zugeben
Proteinase K	0,3 ml ddH ₂ O	1,5 ml ddH ₂ O	1,5 ml ddH ₂ O

- Heizen Sie einen Thermomixer oder ein Wasserbad auf 56°C oder 60°C vor.
- Geben Sie das RNase-freies Wasser oder 10 mM Tris-HCl pH 8,0-8,5 in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß und erwärmen Sie es bis zum Elutionsschritt auf 60°C.
- Stellen Sie sicher, dass Waschpuffer CT, Waschpuffer NT und die Proteinase K gemäß der obigen Instruktionen vorbereitet sind.

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



DNA Mini Kit

Zu Beachten:

- Alle Zentrifugationsschritte sollten **bei Raumtemperatur** durchgeführt werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Ausgangsmaterials.
- Für die Lyse wird ein Schüttler oder Vortexer benötigt.

Nicht im Kit enthaltene Komponenten

- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- 2,0 ml Reaktionsgefäße
- RNase-freies Wasser oder Tris-HCl, pH 8,0 bis 8,5 für die Elution
- 96–99,8%iges Ethanol
(nur reinen Ethanol verwenden, keinen methylierten/denaturierten)
- ddH₂O zum Lösen der Proteinase K
- 1 x PBS
(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄)
- Optional (alle Protokolle): RNase A (10 mg/ml)
- Optional (Bakterienproben): Lysozym, Mutanolysin, Lysostaphin und TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)

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 DNA Mini Kit** wurden in der Isolierung von genomischer DNA aus Gewebeproben getestet und die extrahierte DNA nachfolgend PCRs 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.

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



DNA Mini Kit

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!

Lesen Sie sich bitte jeden Abschnitt sorgfältig durch, um Ihre eigene Sicherheit und eine reibungslose Durchführung zu garantieren. Folgen Sie allen Sicherheitshinweisen wie in dieser Broschüre erklärt, sowie auch Hinweisen und Informationen.



Für den einmaligen Gebrauch

Verwenden Sie keine Komponente ein zweites Mal!

Vorsicht!

- Trinken oder Essen der Kit-Komponenten sind strikt untersagt!
- Wenn die Pufferflaschen beschädigt oder undicht sind, tragen Sie bei der Entsorgung der Flaschen Handschuhe und eine Schutzbrille, um Verletzungen zu vermeiden. Dieses Kit kann mit potentiell infektiösen Proben verwendet werden. Daher müssen alle flüssigen Abfälle als potentiell infektiös betrachtet werden und müssen entsprechend der örtlichen Sicherheitsvorschriften behandelt und verworfen werden.
- Bitte beachten Sie die Bundes-, Landes- und örtlichen Sicherheits- und Umweltvorschriften. Befolgen Sie die üblichen Vorsichtsmaßnahmen für die Arbeiten mit extrahierten Nukleinsäuren. Alle Materialien und Reagenzien, die für die DNA- oder RNA-Isolierung verwendet werden, sollten frei von DNasen und RNasen sein.

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



DNA Mini Kit

Vorsicht!

Fügen Sie nach der Probenvorbereitung dem Abfall keine Bleiche oder sauren Bestandteile hinzu.

Hinweis:

Notfallmedizinische Informationen in englischer und deutscher Sprache können 24 Stunden am Tag erhalten werden:

Telefonnummern der Vergiftungs - Informations- Zentralen:

München +49 (0)89 19240







Wien 01/406 43 43

Zürich + 41 44 251 51 51 (für die Schweiz: 145)

Für weitere Informationen fragen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt an.

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

GHS-Klassifikation

Komponente	Gefährdender Inhalt	GHS Symbol	H-Sätze	P-Sätze	EUH
Lysepuffer DCW	Natriumdodecylsulfat	 Gefahr	302, 314 315, 412	101, 102, 103, 260, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338, 310, 405, 501	
Lysepuffer TMT	Ammoniumchlorid, Cetrimoniumbromid	 Achtung	319	101, 102, 103, 264, 280, 305 + 351 + 338	
Bindepuffer CM	Propan-2-ol 50 – 100 %	 Gefahr	225, 319, 336	101, 102, 103, 210, 261 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338, 405, 501	
Bindepuffer TCT	Polyethylenglykol- oktylphenoether, Propan-2-ol	 Gefahr	225, 318, 336	101, 102, 103, 210, 261 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338 405, 501	
Waschpuffer D	Propan-2-ol 20 – 50 %	 Gefahr	225, 319, 336	101, 102, 103, 210, 261 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338, 405, 501	
Proteinase K	Proteinase, Engyodontium album	 Gefahr	315, 317, 319, 334, 335	101, 102, 103, 261, 280 305 + 351 + 338, 342 + 311, 405, 501	

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



DNA Mini Kit

H-Sätze

- 225** Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- 302** Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- 314** Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- 315** Verursacht Hautreizungen.
- 317** Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- 318** Verursacht schwere Augenschäden.
- 319** Verursacht schwere Augenreizung.
- 334** Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- 335** Kann die Atemwege reizen.
- 336** Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- 412** Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P-Sätze

- 101** Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
- 102** Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- 103** Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.

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



DNA Mini Kit

- 210** Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
- 260** Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- 261** Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
- 280** Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- 310** Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
- 405** Unter Verschluss aufbewahren.
- 501** Inhalt/Behälter gemäß der lokalen/nationalen/internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.
- 303 + 361 + 353** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].
- 305 + 351 + 338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- 342 + 311** Bei Symptomen der Atemwege:
GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.

EUH-Sätze

- 032** Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

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

DNA Mini Kit

Funktionsweise



Lyse des Ausgangsmaterials

Binden der DNA an der Säule

Waschen der gebundenen DNA

Elution der DNA

Bio&SELL

Lohweg 27
90537 Feucht bei Nürnberg

E-Mail: info@bio-sell.de
Internet: www.bio-sell.de

Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32
Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33



DNA Mini Kit

Protokoll 1: Isolierung von DNA aus Gewebeproben oder Nager - schwänzen (max. 20 mg Gewebe oder 0,2 bis 0,8 cm Nagerschwanz)

1. Bis zu **20 mg Gewebeprobe** oder bis zu 0,8 cm Nagerschwanz in kleine Stücke schneiden und in ein **1,5 ml** oder **2,0 ml Reaktionsgefäß** geben.
400 µl Lysepuffer DCW und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 56 °C inkubieren, bis die Probe vollständig lysiert ist (ca. 0,5 - 3 h, für Gewebe und ca. 2 h für Nagerschwänze), möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer).
Hinweis: Die Lyse ist beendet, wenn die Proben vollständig lysiert sind. Es wird ein Schüttler für ein kontinuierliches Schütteln der Probe empfohlen.
2. Das Reaktionsgefäß bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 3 Minute zentrifugieren, um unlysiertes Material zu pelletieren. Den Überstand in ein **neues Reaktionsgefäß** überführen.
Hinweis: Falls erforderlich, kann an dieser Stelle ein RNA-Verdau stattfinden.
1 - 2 µl RNase A (10 mg/ml) zugeben, kurz vortexen und die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
3. **200 µl Bindepuffer TCT** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen (15 Sekunden), bis eine homogene Lösung entsteht.

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

DNA Mini Kit

4. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 Minuten 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 **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minuten zentrifugieren.

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

6. Waschvorgang Nr. 5 wiederholen: Zentrifugationssäule öffnen und **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

7. Zentrifugationssäule öffnen und **300 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 3 Minute zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen

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

8. Zentrifugationssäule vorsichtig öffnen und **100 µl bis 400 µl Elutionspuffer oder RNase freies Wasser** (vorgewärmt auf 60 °C) zugeben.

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



DNA Mini Kit

Bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubieren, dann bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute 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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4 °C – 8 °C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von – 22 °C bis – 18 °C empfohlen.

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



DNA Mini Kit

Protokoll 2: Isolierung von DNA aus Zellkulturen

1. Die **Zellen** (bis zu 5×10^6 Zellen) durch Zentrifugation bei $5.000 \times g$ (~ 5,000 rpm) für 10 Minuten pelletieren und den Überstand verwerfen.
2. **100 µl 1 x PBS** zugeben und Pellet durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren.
3. **300 µl Lysepuffer DCW** und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 56°C inkubieren, bis die Probe vollständig lysiert ist. Dauer ca. 15 bis 30 Minuten abhängig von den Zellen.

Hinweis: Falls erforderlich, kann an dieser Stelle ein RNA-Verdau stattfinden.

2 µl RNase A (10 mg/ml) zugeben, kurz vortexen und die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

4. **200 µl Bindepuffer TCT** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen für 15 Sekunden oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren für 15 Sekunden gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

5. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei $11.000 \times g$ (~11.000 rpm) für 2 Minuten 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	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--



DNA Mini Kit

6. Zentrifugationssäule öffnen und **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.
7. Waschvorgang Nr. 6 wiederholen: Zentrifugationssäule öffnen und **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.
8. Zentrifugationssäule öffnen und **300 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 3 Minute zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen.
Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **1,5 ml Sammeltube** stellen.
9. Zentrifugationssäule vorsichtig öffnen und **100 µl bis 400 µl Elutionspuffer oder RNase freies Wasser** (vorgewärmt auf 60 °C) zugeben.
Bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubieren, dann bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutions-schritte 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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4 °C – 8 °C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 22 °C bis - 18 °C empfohlen.

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



DNA Mini Kit

Protokoll 3: 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 DCW** und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50 °C für 10–15 Minuten inkubieren, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer).
Hinweis: Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4 x vortexen. Kein Schütteln reduziert die Effizienz der Lyse.
2. 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. **2 µl RNase A** (10 mg/ml) zugeben, kurz vortexen und die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

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



DNA Mini Kit

3. **200 µl Bindepuffer CM** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen (15 Sekunden) 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 11.000 x g (~11.000 rpm) für 2 Minuten 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 **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen.

Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

6. Waschvorgang Nr. 5 wiederholen: Zentrifugationssäule öffnen und **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute 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	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--



DNA Mini Kit

7. Zentrifugationssäule öffnen und **300 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 3 Minute zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen

Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **1,5 ml Sammeltube** stellen.

8. Zentrifugationssäule vorsichtig öffnen und **100 µl bis 400 µl Elutionspuffer oder RNase freies Wasser** (vorgewärmt auf 60 °C) zugeben.

Bei Raumtemperatur für 2 Minute inkubieren, dann bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minuten zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an DNA können zwei Elutions-schritte 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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4 °C – 8 °C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von – 22 °C bis – 18 °C empfohlen.

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



DNA Mini Kit

Protokoll 4: Isolierung von DNA aus Bakterienzellpellets

Bakterien (max. 1×10^{10} Zellen) in ein 1,5 ml oder 2,0 Reaktionsgefäß geben und für 10 Minuten bei 3000 x g pelletieren. Überstand verwerfen.

Bakterienzellpellet in **100 µl TE-Puffer** resuspendieren.

Gram-negative Bakterien

1. **20 µl Lysozym** (10 mg/ml, 400U/µl) zur Probe geben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren, bis die Probe vollständig lysiert ist, möglichst unter Schütteln (z.B. Thermomixer).

Gram-positive Bakterien

1. **20 µl Lysozym** (10 mg/ml, 400U/µl) zur Probe geben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren, bis die Probe vollständig lysiert ist, möglichst unter Schütteln (z.B. Thermomixer).

2. **5 µl Mutanolysin** (0,4 U/µl) zugeben und für 30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.

Hinweis: Lysozym und Mutanolysin weisen eine synergistische Aktivität auf. Beide Enzyme zusammen erhöhen die DNA-Ausbeute.

Staphylokokken sp.-Bakterien

1. **10 µl Lysostaphin** (0,4 U/µl) zur Probe geben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren, bis die Probe vollständig lysiert ist, möglichst unter Schütteln (z.B. Thermomixer).

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



DNA Mini Kit

Lyse für alle Bakterienstämme:

2. **280 µl Lysepuffer DCW** und **20 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen.
3. **Für 30 Minuten** bei **60 °C** inkubieren, möglichst unter Schütteln (550 rpm).
Hinweis: Falls erforderlich, kann an dieser Stelle ein RNA-Verdau stattfinden.
2 µl RNase A (100 mg/ml) zum Filtrat geben, kurz vortexen und die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

DNA-Isolierung für alle Bakterienstämme:

4. **200 µl Bindepuffer TCT** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen. Dabei ist es wichtig, die Probe mit dem **Bindepuffer TCT** so kräftig zu mischen, dass eine homogene Lösung entsteht.

5. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (12.000 rpm) für 2 Minuten 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	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--



DNA Mini Kit

6. Zentrifugationssäule öffnen und **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (12.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.
7. Waschvorgang Nr. 6 wiederholen: Zentrifugationssäule öffnen und **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000, x g (12.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.
8. Zentrifugationssäule öffnen und **300 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 3 Minuten zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **1,5 ml Sammeltube** stellen.
9. Zentrifugationssäule vorsichtig öffnen und **50 µl bis 200 µl Elutionspuffer oder RNase freies Wasser** (vorgewärmt auf 60 °C) zugeben. Bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubieren, dann bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute 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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4 °C – 8 °C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 22 °C bis - 18 °C empfohlen.

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



DNA Mini Kit

Protokoll 5: Isolierung von DNA aus Hefezellen

Hefezellen pelletieren

Hefezellen (max. 10^{10} Zellen) für 10 Minuten bei 5000 x g pelletieren. Überstand verwerfen. Das Hefezellenpellet in 120 µl Yeast Digest Buffer resuspendieren

Enzymatische Lyse

Hinweis: Für die Lyse von Hefezellen wird das Enzym Lyticase empfohlen (nicht im Kit enthalten).

1. **10 µl Lyticase** (10 U/µl) zugeben und bei 37 °C für 30 Minuten unter ständigem Schütteln inkubieren.
2. Mit dem Schritt der proteolytischen Lyse fortfahren.

Proteolytische Lyse

3. **280 µl Lysepuffer DCW** und **20 µl Proteinase K** zugeben und kurz die Probe vortexen.
4. Die Probe bei 60 °C für 30 Minuten inkubieren, möglichst unter Schütteln bei 550 U/min (z.B. in einem Thermoshaker).
5. Mit dem Schritt der Hefe-DANN-Extraktion fortfahren.
HINWEIS: Das kit präzipitiert DNA und RNA. Falls erforderlich, kann an dieser Stelle ein RNA-Verdau stattfinden. **2µl RNase A** (10mg/ml) zum Filtrat geben, kurz vortexen und die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

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

DNA Mini Kit

Hefe-DNA-Extraktion

1. **200 µl Bindepuffer TCT** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehr-maliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen. Dabei ist es wichtig, die Probe mit dem Bindepuffer SBS so kräftig zu mischen, dass eine homogene Lösung entsteht 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen und die Zentrifugationssäule nochmals in das gleiche Sammeltube stellen.
2. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (12.000 rpm) für 2 Minuten 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 (12.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen und die Säule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

3. Zentrifugationssäule öffnen und **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (12.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.
4. Zentrifugationssäule öffnen und **650 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (12.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

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

DNA Mini Kit

5. Zentrifugationssäule öffnen und **300 µl Waschpuffer NT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 3 Minuten zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen

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

6. Zentrifugationssäule vorsichtig öffnen und **100 µl bis 400 µl Elutionspuffer oder RNase freies Wasser** zugeben. Bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubieren, dann bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 Minute 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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4 °C – 8 °C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 22 °C bis - 18 °C empfohlen

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

DNA Mini Kit

Protokoll 6: Isolierung von DNA aus Vollblut

Isolierung aus 200 µl Vollblut

7. Bis zu **200 µl Vollblut** (bei Volumina kleiner als 200 µl mit PBS auffüllen) in ein **1,5 ml Reaktionsgefäß** pipettieren.

8. **200 µl Lysepuffer TMT** und **20 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 10 Sekunden gründlich mischen. Bei 60 °C für 10 Minuten inkubieren, bis die Probe vollständig lysiert ist, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4 x vortexen.

Hinweis: Wenn RNA-freie genomische DNA gewünscht wird, dann geben Sie **1-2 µl der RNase-Lösung** (10 mg/ml) zu der Probe bevor Sie den **Bindepuffer CM hinzugeben**, kurz vortexen und die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Optional: Falls Flüssigkeit am Deckel des 1,5 ml Reaktionsgefäßes kondensiert ist, das Gefäß für 10 Sekunden zentrifugieren.

9. **350 µl Bindepuffer CM** zu der lysierten Probe geben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entstanden ist.

Hinweis: Die gründliche Durchmischung von Probe und Bindepuffer ist sehr wichtig für die Effizienz der Aufarbeitung.

Beachte: Auf keinen Fall die Probe vortexen, dies reduziert die DNA Ausbeute.

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



DNA Mini Kit

10. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute 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.

11. Zentrifugationssäule öffnen und **400 µl Waschpuffer D** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammel-tube** stellen.

12. Zentrifugationssäule öffnen und **600 µl Waschpuffer CT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen und die Zentrifugationssäule nochmals in das gleiche Sammeltube stellen.

13. Zentrifugationssäule öffnen und nochmals **600 µl Waschpuffer CT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen und die Säule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

14. Bei maximaler Geschwindigkeit für 3 Minuten zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

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

DNA Mini Kit

- 9 Zentrifugationssäule vorsichtig öffnen und **100 µl Elutionspuffer oder RNase freies Wasser** (vorgewärmt auf 60 °C) zugeben. Bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubieren, dann bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina (z.B. 100 µl + 100 µl) erhöhen gegebenenfalls die Ausbeute an genomischer DNA.

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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4 °C – 8 °C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 22 °C bis - 18 °C empfohlen.

Isolierung aus 400 µl Vollblut

1. **400 µl Vollblut** (bei Volumina kleiner als 400 µl mit PBS auffüllen) in ein **2,0 ml Reaktionsgefäß** pipettieren.
2. **400 µl Lysepuffer TMT** und **30 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 10 Sekunden gründlich mischen. Bei 60 °C für 10 Minuten inkubieren, bis die Probe vollständig lysiert ist, möglichst unter Schütteln (z.B. in einem Thermomixer). Falls ein kontinuierliches Schütteln nicht möglich ist, die Probe während der Inkubation 3 – 4 x vortexen.

Hinweis: Wenn RNA-freie genomische DNA gewünscht wird, dann geben Sie 1-2 µl der RNA Lösung (10 mg/ml) zu der Probe bevor Sie den **Bindepuffer CM hinzugeben**, kurz vortexen und die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

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



DNA Mini Kit

Optional: Falls Flüssigkeit am Deckel des 1,5 ml Reaktionsgefäßes kondensiert ist, das Gefäß für 10 Sekunden zentrifugieren.

3. **700 µl Bindepuffer CM** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (3 - 4 x) gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entstanden ist.

Hinweis: Die gründliche Durchmischung von Probe und Bindepuffer ist sehr wichtig für die Effizienz der Aufarbeitung.

Beachte: Auf keinen Fall die Probe vortexen, dies reduziert die DNA Ausbeute.

4. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. **750 µl der Probe** auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute 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. Die restliche Probe auf die Säule geben und erneut bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute 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	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--



DNA Mini Kit

6. Zentrifugationssäule öffnen und **400 µl Waschpuffer D** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.
7. Zentrifugationssäule öffnen und **600 µl Waschpuffer CT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen und die Zentrifugationssäule nochmals in das gleiche Sammeltube stellen.
8. Zentrifugationssäule öffnen und nochmals **600 µl Waschpuffer CT** zugeben. Den Deckel verschließen und bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen und die Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.
9. Bei maximaler Geschwindigkeit für 3 Minuten zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutionstube** stellen.

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



DNA Mini Kit

10. Zentrifugationssäule vorsichtig öffnen und **200 µl Elutionspuffer oder RNase freies Wasser** (vorgewärmt auf 60 °C) zugeben. Bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubieren, dann bei 11.000 x g (~11.000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren. Zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina (z.B. 100 µl + 100 µl) erhöhen gegebenenfalls die Ausbeute an genomischer DNA.

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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4 °C – 8 °C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 22 °C bis - 18 °C empfohlen.

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

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

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

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

$$RCF = 10.710 \times g$$

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	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 verlängern.</p> <p>Zentrifugationsgeschwindigkeit erhöhen.</p> <p>Nach der Lyse zusätzlich Zentrifugieren, um unlysiertes Material zu entfernen.</p> <p>Weniger Ausgangsmaterial einsetzen.</p>
<p>Niedrige Ausbeute</p> <p>Ungenügende Lyse</p> <p>Unvollständige Elution</p> <p>Unzureichendes Mischen mit Bindepuffer TCT</p>	<p>Lysezeit verlängern.</p> <p>Weniger Ausgangsmaterial einsetzen.</p> <p>Inkubationszeit mit Elutionspuffer auf 5 Minuten verlängern oder Elutionsschritt wiederholen.</p> <p>Elution mit höherem Volumen Elutionspuffer durchführen.</p> <p>Auf gründliches Mischen der Probe mit Bindepuffer TCT achten.</p>

DNA Mini Kit

<p>Niedrige Konzentration der DNA</p> <p>Zu viel Elutionspuffer</p>	<p>Elution mit niedrigerem Volumen Elutionspuffer durchführen.</p>
<p>Degradierte oder gescherte DNA</p> <p>Falsche Lagerung des Ausgangsmaterials</p> <p>Altes Ausgangsmaterial</p>	<p>Sicherstellen, dass die Probe vor der Präparation sofort in flüssigem Stickstoff oder wenigstens bei -20°C eingefroren wird und dass die dauerhafte Lagerung bei -80°C erfolgt.</p> <p>Auftauen vermeiden.</p> <p>Alte Proben beinhalten oftmals degradierte DNA.</p>
<p>RNA-Kontamination der DNA</p>	<p>RNase A-Verdau durchführen wie im Protokoll beschrieben.</p>



DNA Mini Kit

Technische Daten

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!

Versand: bei Raumtemperatur

Lagerung: Der **Bio&SELL DNA Mini Kit** sollte trocken und bei Raumtemperatur (15–30°C) gelagert werden. Unter diesen Bedingungen ist es mindestens bis zum auf der Umverpackung angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatum 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.

Lagerung der lyophilisierten Proteinase K: bei 4°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.

Sicherheitshinweis: Dieses Produkt sollte nur von Personen verwendet werden, die Routine in Laboranwendungen haben. Es sollte laborübliche Schutzkleidung wie Kittel, Handschuhe und Schutzbrillen getragen werden. Bei Kontakt mit Haut und Augen sollten die betroffenen Stellen umgehend mit Wasser gewaschen bzw. ausgespült werden.

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



DNA Mini Kit

Weitere Produkte, die Sie interessieren könnten:

Bio&SELL

Universal Agarose

Bio&SELL Universal Agarose als kostengünstige Standardagarose für Routinegele mit einem Trennbereich von 0,05 -50 kbp

Bio&SELL

Low Melt Agarose

Bio&SELL Low Melt Agarose als hochreine, klare Spezialagarose mit niedriger Schmelztemperatur und einem Trennbereich von 0,8 – 25 kbp für z.B. eine präparative Auftrennung bei allen gängigen „In-Gel-Arbeiten“

Bio&SELL

Hochauflösende Agarose

Bio&SELL hochauflösende Agarose als Alternative zu arbeitsaufwändigen, teuren Polyacrylamidgelen ist speziell für die Auftrennung von Nukleinsäuren im Bereich von 20bp – 800bp optimiert



**Die Agarosen mit dem besten
Preis-Leistungs-Verhältnis!**

www.bio-sell.com

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