



Genomische DNA Mini Kit

Artikel-Nr.	44.5000.010	10 Präparationen
	44.5000.050	50 Präparationen
	44.5000.250	250 Präparationen

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 **Bio&SELL DNA Mini 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 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.

Nur für die Forschung!

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

Genomische DNA Mini Kit

Kit-Komponenten und 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.

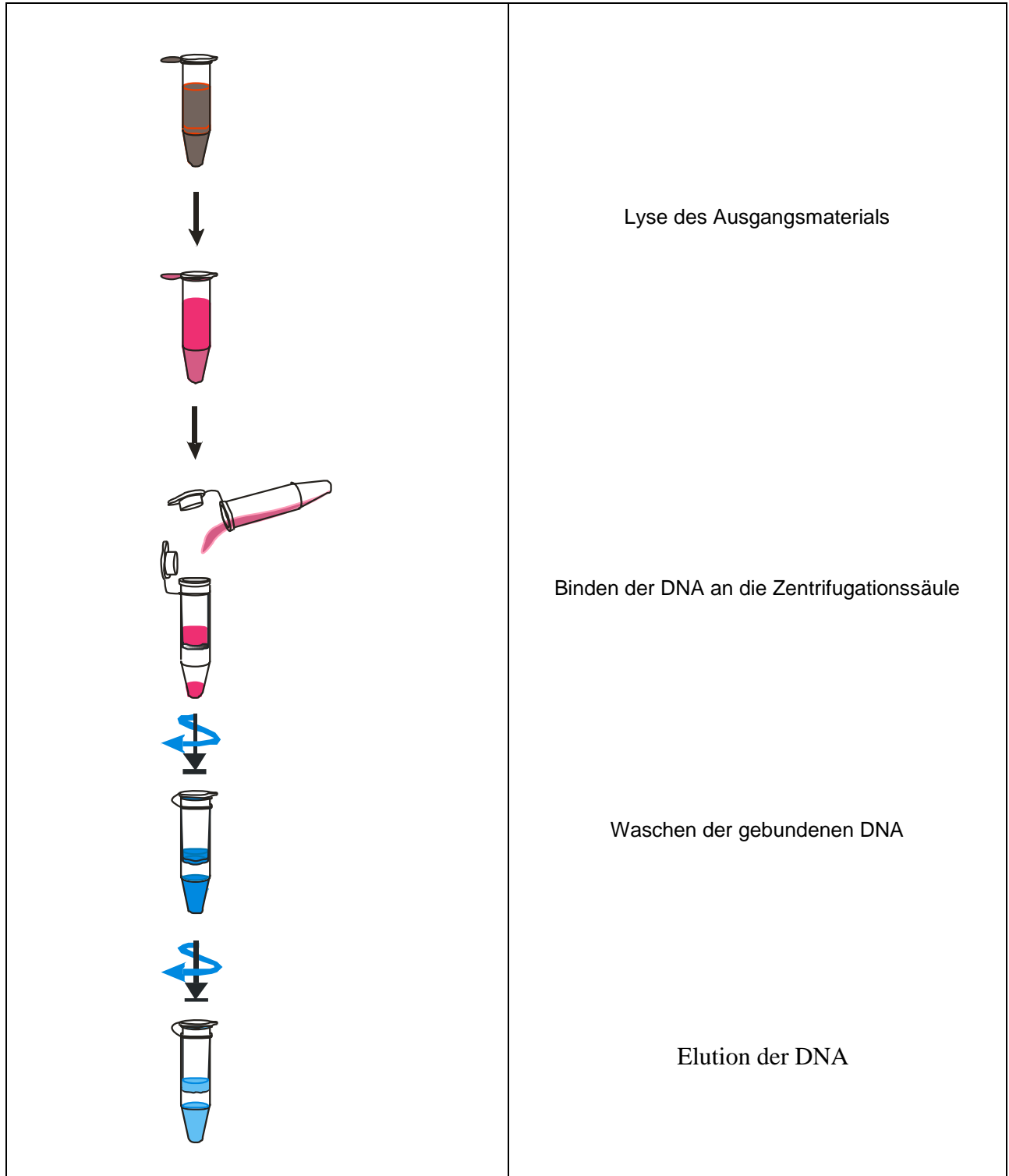
	10 Präparationen	50 Präparationen	250 Präparationen
Lysepuffer TLS	5 ml	25 ml	120 ml
Bindepuffer TBS	5 ml	25 ml	120 ml
Proteinase K	für 0,3 ml Arbeitslösung	für 1,5 ml Arbeitslösung	für 5 x 1,5 ml Arbeitslösung
Waschpuffer HS	3 ml (Endvolumen 6 ml)	15 ml (Endvolumen 30 ml)	70 ml (Endvolumen 140 ml)
Waschpuffer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

Genomische DNA Mini Kit

<p><u>Wichtige Schritte vor Beginn</u></p>	<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! • Geben Sie 7 ml 96 – 99,8% Ethanol zur Flasche mit Waschpuffer MS. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten! • Lösen Sie die Proteinase K durch Zugabe von 0,3 ml ddH₂O. Gründlich mischen. 	<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! • Geben Sie 35 ml 96 – 99,8% Ethanol zur Flasche mit Waschpuffer MS. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten! • Lösen Sie die Proteinase K durch Zugabe von 1,5 ml ddH₂O. Gründlich mischen. 	<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! • Geben Sie 140 ml 96 – 99,8% Ethanol zu jeder Flasche mit Waschpuffer MS. Gründlich mischen und Flaschen stets dicht verschlossen halten! • Lösen Sie die Proteinase K jeweils durch Zugabe von 1,5 ml ddH₂O. Gründlich mischen.
---	---	---	--

Genomische DNA Mini Kit

Funktionsweise





Genomische DNA Mini Kit

Nicht im Kit enthaltene Komponenten

- Optional: RNase A (100 mg/ml)
- Optional: Xylen oder Octan
- Optional: 2,0 ml Reaktionsgefäße
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- 96 – 99,8% Ethanol
- ddH₂O

Wichtig vor Arbeitsbeginn

- Heizen Sie einen Thermomixer oder ein Wasserbad auf 50°C vor
- 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

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 33
Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33



Genomische DNA Mini Kit

Protokoll 1: Isolierung von DNA aus Gewebeproben oder Mäuseschwänzen **(max. 40 mg Gewebe oder 0,5 bis 1 cm Mäuseschwanz)**

1. Bis zu **40 mg Gewebeprobe** in kleine Stücke schneiden und in ein **1,5 ml Reaktionsgefäß** oder **2,0 ml Reaktionsgefäß** geben. **400 µl Lysepuffer TLS** und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C 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 – 4mal vortexen.

2. Das Reaktionsgefäß bei 10.000 x g (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren, um unlysiertes Material zu pelletieren. Den Überstand in ein **neues 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 Bindepuffer 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.



Genomische DNA Mini Kit

7. Bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammelrohr mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 ml Elutions-tube** stellen.

8. Zentrifugationssäule öffnen und **200 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 Endkonzentration 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 Paraffin-eingebetteten Gewebeproben

1. Ein Stück **Paraffinprobe** in ein **2,0 ml Reaktionsgefäß** geben, **1 ml Xylen oder Octan** zugeben und vorsichtig vortexen, um das Paraffin zu lösen. So lange lösen, bis die Gewebeprobe nicht mehr weiß, sondern transparent erscheint.

2. Bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min zentrifugieren. Den Überstand sehr vorsichtig durch Abpipettieren entfernen. Pellet nicht entfernen.

Wichtig: Obige Schritte wiederholen, falls sich noch Paraffin in der Probe befindet.

3. **1 ml 96 – 98% Ethanol** zu dem Pellet geben und gründlich vortexen.

4. Bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min zentrifugieren. Das Ethanol durch vorsichtiges Abpipettieren entfernen. Pellet nicht entfernen. Den Waschschrift mit **Ethanol** noch einmal durchführen, nochmals zentrifugieren und das Ethanol abpipettieren.

5. Das geöffnete Reaktionsgefäß bei 37°C für 10 – 15 min inkubieren, um das restliche Ethanol komplett verdampfen zu lassen.



Genomische DNA Mini Kit

6. **400 µl Lysepuffer TLS** und **25 µl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C 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 – 4mal vortexen.

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.

Hinweis: An dieser Stelle kann optional ein Zusatzschritt durchgeführt werden, um mögliche Inhibitionen nachfolgender Reaktionen zu reduzieren:

Thermomixer auf 95°C heizen. Nach Erreichen der Temperatur das Reaktionsgefäß in den Thermomixer überführen und das Gefäß bei 95°C für 1h inkubieren.

Wichtig: Gefäß erst bei Erreichen der Temperatur von 95°C in den Thermomixer stellen!

7. **400 µl Bindepuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bis eine homogene Lösung entsteht.

8. 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.

9. 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.

10. 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.



Genomische DNA Mini Kit

11. 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 Elutions-tube** stellen.

12. 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 Endkonzentration 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 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 Lysispuffer 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 – 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 Bindepuffer TBS** zu der lysierten Probe geben und durch Vortexen oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, 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 33
Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

S. 9



Genomische DNA Mini Kit

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

6. 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.

7. Zentrifugationssäule öffnen und **200 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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Genomische DNA Mini Kit

Protokoll 4: Isolierung von DNA aus Zellkulturen (bis zu 5×10^6 Zellen)

1. Die Zellen durch Zentrifugation bei $5.000 \times g$ (7.500 rpm) für 10 min pelettieren und den Überstand verwerfen. **400 μl Lysepuffer TLS** und **25 μl Proteinase K** zugeben. Durch mehrmaliges Vortexen für insgesamt 5 Sekunden gründlich mischen. Bei 50°C 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 – 4mal vortexen.

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

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. Eine **Zentrifugationssäule** in ein **2,0 ml Sammeltube** stellen. Die Probe auf die Säule geben. Den Deckel verschließen und bei $10.000 \times g$ (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 $10.000 \times g$ (12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Das Sammeltube mit dem Durchfluß verwerfen. Zentrifugationssäule in ein neues **2,0 ml Sammeltube** stellen.

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

6. 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 Elutions-tube** stellen.



Genomische DNA Mini Kit

7. Zentrifugationssäule öffnen und **200 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 Endkonzentration der DNA. Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von - 20°C empfohlen.

Troubleshooting

Problem / mögliche Ursache	Bemerkungen und Vorschläge
Verstopfte Zentrifugationssäule Ungenügende Lyse und/oder zu viel Ausgangsmaterial	Lysezeit verlängern. Zentrifugationsgeschwindigkeit erhöhen. Nach der Lyse zusätzlich Zentrifugieren , um unlysiertes Material zu entfernen. Weniger Ausgangsmaterial einsetzen.
Niedrige Ausbeute Ungenügende Lyse Unvollständige Elution	Lysezeit verlängern. Weniger Ausgangsmaterial einsetzen. Inkubationszeit mit Elutionspuffer auf 5 Minuten verlängern oder Elutionsschritt wiederholen .

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 33
Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

S. 12

Genomische DNA Mini Kit

Unzureichendes Mischen mit Bindepuffer TBS	Elution mit höherem Volumen Elutionspuffer durchführen. Auf gründliches Mischen der Probe mit Bindepuffer TBS achten.
Niedrige Konzentration der DNA Zu viel Elutionspuffer	Elution mit niedrigerem Volumen Elutionspuffer durchführen.
Degradierete oder gescherte DNA Falsche Lagerung des Ausgangsmaterials Altes Ausgangsmaterial	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. Auftauen vermeiden. Alte Proben beinhalten oftmals degradierte DNA.
RNA-Kontamination der DNA	RNase A-Verdau durchführen wie im Protokoll beschrieben.