

GenoType® DNA Isolation Kit

Kit zur Isolierung und Reinigung von genomischer DNA aus

- humanem Vollblut
- Körperflüssigkeiten
- Gewebe
- eukaryotischen Zellkulturen

Methodik

Der **GenoType® DNA Isolation Kit** erlaubt die einfache und schnelle manuelle Isolierung und Reinigung von genomischer DNA aus humanem Vollblut, Körperflüssigkeiten, Gewebe und eukaryotischem Zellkulturmaterial für *in vitro*-diagnostische Untersuchungen in 10-20 Minuten (nach Lyse). Als Probenmaterial zur Isolierung humaner genomischer DNA kann frisches oder gefrorenes Vollblut aus handelsüblichen Blutentnahmesystemen verwendet werden, die EDTA oder Citrat als Antikoagulans enthalten. Heparin-Blut kann nicht verwendet werden. Weitere mögliche Probenmaterialien sind frische oder gefrorene Gewebeproben, Zellsuspensionen, Zellpellets und zellhaltige Körperflüssigkeiten wie z.B. Fruchtwasser, Synovialflüssigkeit usw.

Der Kit ist nicht für eine DNA-Isolierung aus Stuhlproben geeignet. Die Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren sowie die Isolierung von RNA wurden mit diesem Kit nicht validiert.

Das gesamte Verfahren unterteilt sich in folgende vier Phasen: 1. Lyse der Zellen unter anti-chaotropen Bedingungen und erhöhter Temperatur, 2. Bindung der genomischen DNA an die Membran der Filtersäule, 3. Waschen der Membran zur Entfernung von Verunreinigungen sowie Ethanolentfernung, 4. Elution der gereinigten genomischen DNA. Aufgrund ihrer hohen Reinheit ist die isolierte genomische DNA sofort für ein breites Applikationsspektrum einsetzbar oder kann bei –20°C für eine spätere Verwendung gelagert werden.

Lagerung und Vorsichtsmaßnahmen

Alle Kitbestandteile bei Raumtemperatur (18-25°C) lagern. Die mit Ethanol versetzten Waschpuffer Wash Buffer I und Wash Buffer II sind sachgemäß verschlossen bei Raumtemperatur zu lagern. Die rekonstituierte Proteinase K bei –20°C aufbewahren. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden; gegebenenfalls Proteinase K aliquotieren.

Untersuchungsmaterial von Patienten, wie es für Laboratoriumsbedingungen eingesetzt wird, ist als potenziell infektiös einzustufen und entsprechend zu behandeln. Proben von Risikopatienten sollten immer gekennzeichnet und unter geeigneten Sicherheitsvorkehrungen bearbeitet werden. Darüber hinaus sind die jeweils geltenden Vorschriften zur Unfallverhütung, zum Umweltschutz und zum Umgang mit Gefahrstoffen einzuhalten. Insbesondere müssen stets geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe getragen werden.

Bei der Durchführung des Tests sind die für die Nukleinsäureapplikationen notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Utensilien wie Pipettenspitzen, die mit den Reagenzien in Berührung kommen, müssen frei von DNasen sein.

Beim Umgang mit den Kitreagenzien sind folgende besondere Sicherheitsmaßnahmen zu beachten:

Der Lysepuffer M (**Lysis Buffer M**) enthält Ammoniumchlorid und ist gesundheitsschädlich. Es gelten R36 sowie S2-24.

Der Bindungspuffer B6 (**Binding Buffer B6**) enthält 2-Propanol und ist reizend sowie leichtentzündlich. Es gelten R11-36-67 sowie S2-7-16-S24/25/26.

Die **Proteinase K** ist gesundheitsschädlich. Es gelten R36/37/38 sowie S2-22-24-36/37-42.

Der Waschpuffer I (**Wash Buffer I**) enthält Guanidinthiocyanat und ist gesundheitsschädlich. Es gelten R20/21/22-32 und S2-13.

Weitere Informationen sind den Sicherheitsdatenblättern zu entnehmen, die abrufbar sind unter:

<http://www.hain-lifescience.de/produkte/sicherheitsdaten.html>

Durchführung

Vorbereitung

Thermomixer auf 56°C vorheizen. Benötigte Menge an Elutionspuffer D (Elution Buffer D) auf 56°C temperieren (je Probe werden 200 µl Elutionspuffer benötigt). Benötigte Anzahl an 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (1 je Probe, für die Isolierung aus Gewebe 2 je Probe; nicht im Kit enthalten), 1,5 ml Auffanggefäßen (1,5 ml Receiver Tubes, weiß; 1 je Probe) und 2,0 ml-Auffanggefäßen (2,0 ml Receiver Tubes, gelb; 2 je Probe) beschriften. Für jede Probe jeweils eine Filtersäule (Spin Filter) in ein Auffanggefäß stecken.

Bei erster Verwendung des Kits Proteinase K-Lyophilisat wie folgt rekonstituieren: für den 12er-Kit 250 µl, für den 48er-Kit 550 ml dd Wasser zum Proteinase K-Lyophilisat geben und ca. 5 sec vortexen. Nach Gebrauch bei –20°C lagern. Gegebenenfalls bereits hergestellte Proteinase K-Lösung auftauen. Waschpuffer I (Wash Buffer I) und Waschpuffer II (Wash Buffer II) wie folgt herstellen: zum Waschpuffer I 30 ml 99,8% Ethanol p.a. zugeben, zum Waschpuffer II 42 ml 99,8% Ethanol p.a. zugeben und gut mischen. Flaschen gut verschlossen bei Raumtemperatur lagern.

Auf Präzipitatfreiheit aller Lösungen achten, gegebenenfalls durch vorsichtiges Erwärmen auf bis zu max. 30°C in Lösung bringen.

Hinweise

Pipettenspitzen nach jedem Schritt verwerfen.

Zum Kontaminationsschutz Handschuhe, die in Kontakt mit Probenmaterial gekommen sind, sofort wechseln; während der Abarbeitung sollte jeweils nur ein Reaktionsgefäß geöffnet sein; Kontakt von Probenmaterial mit dem Rand der Filtersäule vermeiden.

Membran der Filtersäule (Spin Filter) nicht mit der Pipettenspitze berühren. Die Filtersäule wird für die Zentrifugationsschritte in den Auffanggefäßen (Receiver Tubes) mit dem Deckel des jeweiligen Auffanggefäßes verschlossen.

Alle Zentrifugationsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der Einsatz eines geringeren Volumens an Elutionspuffer D führt zu einer Erhöhung der finalen DNA-Konzentration. Die zweimalige Elution mit jeweils 100 µl Elutionspuffer D führt zu einer Erhöhung der finalen DNA-Ausbeute.

Zur Validierung der korrekten Anwendung dieses Testkits kann eine bereits isolierte DNA als Positivkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen, vor jeder nachfolgenden Anwendung die isolierte DNA für 1 min bei max. Geschwindigkeit zu zentrifugieren.

Die im Kit enthaltenen Reagenzien und Filtersäulen sind nur einmal verwendbar.

DNA-Isolierung aus Vollblut

Blutproben können nach der Entnahme bis zu 6 Stunden bei Raumtemperatur oder bis zu 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung sollten die Proben bei -20°C oder -80°C eingefroren werden. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren vor der DNA-Isolierung vermeiden. Sollten beim Auftauen Kryopräzipitate sichtbar werden, diese bei der Überführung der Probe in die Filtersäulen (Spin Filter) nicht mitpipettieren.

Für den GenoType® DNA Isolation-Kit können Blutproben in verschiedenen Primärröhrchen und Antikoagulanzen (jedoch kein Heparin) verwendet werden. Die mit diesem Kit aus max. 50 µl Vollblut zu gewinnende DNA-Menge ist von der Leukozytenzahl abhängig. Das für den Lyseschritt eingesetzte Probenvolumen muss immer 50 µl betragen; ggf. mit Wasser (*molecular biology grade*) auffüllen.

Die im Abschnitt „Vorbereitung“ beschriebenen Schritte ausführen.

- 1-50 µl Vollblut in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten) überführen, ggf. mit Wasser (*molecular biology grade*) auf 50 µl auffüllen. 50 µl Lysepuffer M (Lysis Buffer M) und 10 µl Proteinase K (s. Vorbereitung) zugeben und Reaktionsgefäß für mindestens 5 sec gründlich vortexen.
- Probe für 5 min bei 56°C und 800 Upm auf einem Thermomixer inkubieren.
- 100 µl Bindungspuffer B6 (Binding Buffer B6) zugeben. Probe durch viermaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Filtersäule (Spin Filter) in einem beschrifteten 2,0 ml Auffanggefäß (2,0 ml Receiver Tube, gelb) platzieren und Lysat auf Membran der Filtersäule pipettieren. Deckel schließen und Auffanggefäß mit Filtersäule in einer Standard-Tischzentrifuge 1 min bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und 300 µl Waschpuffer I (Wash Buffer I; s. Vorbereitung) auf Membran der Filtersäule geben. Deckel schließen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und Auffanggefäß mit Filtrat verwerfen. Filtersäule in ein neues, beschriftetes 2,0 ml Auffanggefäß überführen und 750 µl Waschpuffer II (Wash Buffer II; s. Vorbereitung) zugeben. Deckel schließen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und Filtrat verwerfen. Filtersäule wieder im 2,0 ml Auffanggefäß platzieren, Deckel schließen und 2 min bei 13 000 x g zentrifugieren, um Ethanolreste zu entfernen.
- Filtersäule in ein beschriftetes 1,5 ml Auffanggefäß (1,5 ml Receiver Tube, weiß) überführen. 200 µl vorgewärmten Elutionspuffer D (Elution Buffer D) auf Membran der Filtersäule geben, Deckel schließen und Probe 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zum Eluieren 1 min bei 6 000 x g zentrifugieren.

DNA-Isolierung aus Körperflüssigkeiten oder eukaryotischen Zellsuspensionen

Zellen aus Körperflüssigkeit (z.B. Fruchtwasser, Synovialflüssigkeit) bzw. Zellsuspensionen sollten frisch eingesetzt werden. Zur längeren Aufbewahrung sollten die Zellen umgehend nach der Entnahme bzw. Ernte eingefroren und bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden, da dies zur Degradierung der DNA in kurze Fragmente führen kann. Unsachgemäß gelagertes Material führt zu einer Verminderung der DNA-Ausbeute und -Qualität. Die mit diesem Kit aus 1-50 µl Körperflüssigkeit oder 10²-10⁸ Zellen zu gewinnende DNA-Menge ist von der Art und Menge der Zellen abhängig. Das für den Lyseschritt eingesetzte Probenvolumen muss immer 50 µl betragen; ggf. mit Wasser (*molecular biology grade*) auffüllen.

Die im Abschnitt „Vorbereitung“ beschriebenen Schritte ausführen.

- 1-50 µl zellhaltiger Körperflüssigkeit oder Zellsuspension in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten) überführen, ggf. mit Wasser (*molecular biology grade*) auf 50 µl auffüllen. 50 µl Lysepuffer M (Lysis Buffer M) und 10 µl Proteinase K (s. Vorbereitung) zugeben und Reaktionsgefäß für mindestens 5 sec gründlich vortexen.
- Probe für 5 min bei 56°C und 800 Upm auf einem Thermomixer inkubieren.
- 100 µl Bindungspuffer B6 (Binding Buffer B6) zugeben. Probe durch viermaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Filtersäule (Spin Filter) in einem beschrifteten 2,0 ml Auffanggefäß (2,0 ml Receiver Tube, gelb) platzieren und Lysat auf Membran der Filtersäule pipettieren. Deckel schließen und Auffanggefäß mit Filtersäule in einer Standard-Tischzentrifuge 1 min bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und 300 µl Waschpuffer I (Wash Buffer I; s. Vorbereitung) auf Membran der Filtersäule geben. Deckel schließen 30 sec bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und Auffanggefäß mit Filtrat verwerfen. Filtersäule in ein neues, beschriftetes 2,0 ml Auffanggefäß überführen und 750 µl Waschpuffer II (Wash Buffer II; s. Vorbereitung) zugeben. Deckel schließen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und Filtrat verwerfen. Filtersäule wieder im 2,0 ml Auffanggefäß platzieren, Deckel schließen und 2 min bei 13 000 x g zentrifugieren, um Ethanolreste zu entfernen.
- Filtersäule in ein neues, beschriftetes 1,5 ml Auffanggefäß (1,5 ml Receiver Tube, weiß) überführen. 200 µl vorgewärmten Elutionspuffer D (Elution Buffer D) auf Membran der Filtersäule geben, Deckel schließen und Probe 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zum Eluieren 1 min bei 6 000 x g zentrifugieren.

DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellpellets

Proben aus eukaryotischen Zellkulturen sollten frisch eingesetzt werden. Zur längeren Aufbewahrung sollten die Zellen umgehend nach der Ernte eingefroren und bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden, da dies zur Degradierung der DNA in kurze Fragmente führen kann. Unsachgemäß gelagertes Material führt zu einer Verminderung der DNA-Ausbeute und -Qualität. Die mit diesem Kit aus 10²-10⁸ Zellen zu gewinnende DNA-Menge ist von der Art und Menge der Zellen abhängig.

Die im Abschnitt Vorbereitung beschriebenen Schritte ausführen.

- 10²-10⁸ eukaryotische Zellen in einem beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten) in einer Standard-Tischzentrifuge 5 min bei 300 x g pelletieren. Überstand vorsichtig vollständig entfernen. 100 µl Lysepuffer M (Lysis Buffer M) und 10 µl Proteinase K (s. Vorbereitung) zugeben und Reaktionsgefäß für mindestens 10 sec gründlich vortexen.
- Probe für 10 min bei 56°C und 800 Upm auf einem Thermomixer inkubieren.
- 100 µl Bindungspuffer B6 (Binding Buffer B6) zugeben. Probe durch viermaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Filtersäule (Spin Filter) in einem beschrifteten 2,0 ml Auffanggefäß (2,0 ml Receiver Tube, gelb) platzieren und Lysat auf Membran der Filtersäule pipettieren. Deckel des Auffanggefäßes schließen und Auffanggefäß mit Filtersäule in einer Standard-Tischzentrifuge 1 min bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und 300 µl Waschpuffer I (Wash Buffer I; s. Vorbereitung) auf Membran der Filtersäule geben. Deckel schließen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und Auffanggefäß mit Filtrat verwerfen. Filtersäule in ein neues, beschriftetes 2,0 ml Auffanggefäß überführen und 750 µl Waschpuffer II (Wash Buffer II; s. Vorbereitung) zugeben. Deckel schließen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugieren.
- Deckel öffnen und Filtrat verwerfen. Filtersäule wieder im 2,0 ml Auffanggefäß platzieren, Deckel schließen und 2 min bei 13 000 x g zentrifugieren, um Ethanolreste zu entfernen.

7. Filtersäule in ein beschriftetes 1,5 ml Auffanggefäß (1,5 ml Receiver Tube, weiß) überführen. 200 µl vorgewärmten Elutionspuffer D (Elution Buffer D) auf Membran der Filtersäule geben, Deckel schließen und Probe 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Zum Eluieren 1 min bei 6 000 x g zentrifugieren.

DNA-Isolierung aus Gewebe

Es sollte möglichst frisches Material (z.B. Biopsieproben, Gefrierschnitte) verwendet werden. Zur längeren Aufbewahrung sollte das Gewebe umgehend nach der Entnahme eingefroren und bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden, da dies zur Degradierung der DNA in kurze Fragmente führen kann. Unsachgemäß gelagertes Material führt zu einer Verminderung der DNA-Ausbeute und -Qualität. Die mit diesem Kit aus max. 5 mg Gewebe zu gewinnende DNA-Menge ist von der Gewebeat abhängig. Gefrierschnitte kurz vor der Isolierung ggf. direkt in Lysepuffer M (Lysis Buffer M) auftauen.

Die im Abschnitt „Vorbereitung“ beschriebenen Schritte ausführen.

1. Max. 5 mg der Gewebeprobe in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten) überführen. Eine mechanische Zerkleinerung der Probe z.B. mit Hilfe einer Pipettenspitze erhöht die Lyse-Effizienz. 100 µl Lysepuffer M (Lysis Buffer M) und 10 µl Proteinase K (s. Vorbereitung) zugeben und Reaktionsgefäß für mindestens 10 sec gründlich vortexen.
2. Probe für 30 min bei 56°C und 800 Upm auf einem Thermomixer inkubieren. Die Lysedauer kann ggf. verlängert werden.
3. Probe 2 min bei höchster Drehzahl zentrifugieren und Überstand in ein neues, beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten) überführen.
4. 100 µl Bindungspuffer B6 (Binding Buffer B6) zugeben. Probe durch viermaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Filtersäule (Spin Filter) in einem beschrifteten 2,0 ml Auffanggefäß (2,0 ml Receiver Tube, gelb) platzieren und Lysat auf Membran der Filtersäule pipettieren. Deckel schließen und Auffanggefäß mit Filtersäule in einer Standard-Tischzentrifuge 1 min bei 13 000 x g zentrifugieren.
5. Deckel öffnen und 300 µl Waschpuffer I (Wash Buffer I; s. Vorbereitung) auf Membran der Filtersäule geben. Deckel schließen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugieren.
6. Deckel öffnen und Auffanggefäß mit Filtrat werfen. Filtersäule in ein neues, beschriftetes 2,0 ml Auffanggefäß überführen und 750 µl Waschpuffer II (Wash Buffer II; s. Vorbereitung) zugeben. Deckel schließen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugieren.
7. Deckel öffnen und Filtrat werfen. Filtersäule wieder im 2,0 ml Auffanggefäß platzieren, Deckel schließen und 2 min bei 13 000 x g zentrifugieren, um Ethanolreste zu entfernen.
8. Filtersäule in ein neues, beschriftetes 1,5 ml Auffanggefäß (1,5 ml Receiver Tube, weiß) überführen. 200 µl vorgewärmten Elutionspuffer D (Elution Buffer D) auf Membran der Filtersäule geben, Deckel schließen und Probe 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Zum Eluieren 1 min bei 6 000 x g zentrifugieren.

Grenzen der Methode

Der **GenoType® DNA Isolation Kit** ist für den Einsatz in Anwendungen vorgesehen, bei denen nachfolgend eine Amplifikation oder andere enzymatische DNA-Modifikationen im Rahmen von *in vitro*-diagnostischen Untersuchungen durchgeführt werden.

Alle diagnostischen Ergebnisse, die nach der Anwendung eines hier beschriebenen DNA-Isolierungsverfahrens erzielt werden, müssen in Verbindung mit anderen dem behandelnden Arzt zur Verfügung stehenden Labordaten und klinischen Befunden interpretiert werden.

Dieses Verfahren ist nur von Fachpersonal durchzuführen, welches im Testverfahren geschult wurde und mit molekularbiologischen Techniken vertraut ist.

Der Kit ist nicht für eine Isolierung aus Stuhlproben geeignet. Die Isolierung von Nucleinsäuren aus Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren sowie die Isolierung von RNA wurden mit diesem Kit nicht validiert.

Eine sachgemäße Lagerung der Proben (s. Kapitel Durchführung) ist Voraussetzung für reproduzierbare und hohe Ausbeuten.

Der **GenoType® DNA Isolation Kit** wurde für die oben beschriebenen DNA-Isolierungsprotokolle validiert. Der Kunde ist für die Feststellung der Eignung des Kits für eventuelle besondere Anwendungen selbst verantwortlich.

Troubleshooting

Geringe Ausbeute durch

- a) ungenügende Lyse
 - Probe nach Zugabe des Lysepuffers M (Lysis Buffer M) und der Proteinase K gründlich vortexen.
 - Inkubationszeit mit Lysepuffer M und Proteinase K verlängern.
 - Gewebeprobe zerkleinern. Lyseschritt so lange durchführen, bis nur noch wenige und kleine unverdaute Partikel in der Probe vorhanden sind (Haare und Knochen werden jedoch nicht lysiert).
 - Kontinuierliches Schütteln der Probe während der Lyse gewährleisten.
 - Aktivitätsverlust der Proteinase K durch falsche Lagerung oder falsche Verdünnung vermeiden (s. Kapitel Durchführung).
 - Weniger Ausgangsmaterial einsetzen.
- b) ineffiziente Bindung der DNA an die Membran der Filtersäule (Spin Filter)
 - Die korrekte Menge an Bindungspuffer B6 (Binding Buffer B6) einsetzen.
 - Probe vor Überführung auf die Filtersäule vollständig mischen.
- c) unvollständige DNA-Elution
 - Verlängerung der Zentrifugationsdauer für die Ethanolentfernung.
 - Verlängerung der Inkubationszeit mit vorgewärmtem Elutionspuffer D (Elution Buffer D) auf 5 min.
 - Erwärmen des Elutionspuffers D auf 80°C.
 - Größeres Volumen an Elutionspuffer D einsetzen.
 - Zweimalige Elution mit jeweils 100 µl Elutionspuffer D.
- d) geringe DNA-Konzentration
 - Elution der DNA mit geringerem Volumen an Elutionspuffer D.
 - Sicherstellen, dass die Waschpuffer (Wash Buffer I, Wash Buffer II) korrekt angesetzt und in der richtigen Reihenfolge verwendet wurden (s. Kapitel Durchführung).
- e) zu wenig Zellen im Ausgangsmaterial
 - Eignung des Probenmaterials sicherstellen.
 - Mehr Probenmaterial einsetzen (max. 50 µl Vollblut bzw. zellhaltige Körperflüssigkeiten / max. 5 mg Gewebe / max. 10⁵ Zellen).

- f) nicht vollständig durch die Membran filtriertes Lysat
- Zentrifugieren, bis das gesamte Lysat durch die Membran filtriert ist.
 - Verstopfte Membran durch mehr als 10^5 Zellen in der Probe; Zellzahl reduzieren.
 - Verstopfte Membran durch Kryopräzipitate; häufiges Auftauen und Einfrieren der Probe vermeiden bzw. Kryopräzipitate nicht mit auf die Säule geben.

Degradierete DNA durch

- a) unsachgemäße Lagerung des Ausgangsmaterials
- Ausgangsmaterial direkt nach der Gewinnung/Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C lagern.
 - Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren des Probenmaterials vermeiden (ggf. zuvor aliquotieren).
- b) altes Material
- Beschaffung neuen Probenmaterials.

Probleme mit nachfolgenden Anwendungen (z.B. in der PCR) durch

- a) Ethanol im Eluat
- Sicherstellen, dass die empfohlenen Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten eingehalten wurden.
 - Ggf. Zentrifugationszeit zur Entfernung des Ethanols verlängern.
- b) Salz im Eluat
- Sicherstellen, dass die Waschlösung auf Raumtemperatur äquilibriert sind.
 - Waschlösung auf Präzipitate prüfen, diese ggf. durch vorsichtiges Erwärmen (max. 30°C) in Lösung bringen.
- c) Verwendung von zu viel/zu wenig Template-DNA
- Optimierung der für die entsprechende Anwendung nötigen DNA-Menge.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Einmalhandschuhe
- Ethanol p.a. 99,8%
- Messzylinder (250 ml)
- Pipetten (variabel im Bereich bis 20, 200 und 1000 μl)
- Pipettenspitzen (steril, vorzugsweise mit Filter)
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- Standard-Tischzentrifuge
- Thermomixer (Genauigkeit +/- 1°C)
- Vortexer
- Wasser (dd und ggf. *molecular biology grade*)

Bestandteile des Kits

gelieferte Menge

Filtersäulen (Spin Filters)	12 Stk.	48 Stk.
2,0 ml Auffanggefäße (2.0 ml Receiver Tubes)	24 Stk.	2x 48 Stk.
1,5 ml Auffanggefäße (1.5 ml Receiver Tubes)	12 Stk.	48 Stk.
Lysepuffer M (Lysis Buffer M)	2 ml gebrauchsfertig	3x 2 ml gebrauchsfertig
Bindungspuffer B6 (Binding Buffer B6)	2x 2 ml gebrauchsfertig	15 ml gebrauchsfertig
Proteinase K-Lyophilisat	für 250 μl Arbeitslösung	für 550 μl Arbeitslösung
Waschlösung I (Wash Buffer I)	30 ml (Endvolumen 60 ml)	30 ml (Endvolumen 60 ml)
Waschlösung II (Wash Buffer II)	18 ml (Endvolumen 60 ml)	18 ml (Endvolumen 60 ml)
Elutionspuffer D (Elution Buffer D)	2x 2 ml gebrauchsfertig	15 ml gebrauchsfertig
Arbeitsanleitung	1	1

Technische Daten

Ausgangsmaterial: 1-50 μl EDTA- bzw. Citrat-Vollblut bzw. Körperflüssigkeiten, 0,5-5 mg Gewebe oder 10^2 - 10^5 eukaryotische Zellen
 Ausbeute: bis zu 2 μg genomische DNA, abhängig von Art und Menge des Ausgangsmaterials
 Reinheit der DNA: A_{260}/A_{280} 1,7-2,0
 Zeitbedarf: 10-20 Minuten (nach Lyse)

GenoType® DNA Isolation Kit **Kit for isolation and purification of genomic DNA from**

- human whole blood**
- body fluids**
- tissue**
- eukaryotic cell cultures**

Methodology

The **GenoType® DNA Isolation Kit** permits the easy and fast manual isolation and purification of genomic DNA from human whole blood, body fluids, tissue, and eukaryotic cell culture material for *in vitro* diagnostic analysis in 10-20 min (after lysis). Human genomic DNA can be purified from fresh or frozen EDTA or citrate (not heparin) whole blood from common blood collection systems. Additionally, frozen tissue samples, cell suspensions, cell pellets, and body fluids like amniotic fluid, synovial fluid etc. may be used.

This kit must not be used for DNA isolation from stool samples. It was neither validated for isolation from bacteria, fungi, or viruses nor for isolation of RNA.

The whole procedure is divided into four steps: 1. lysis of cells under anti-chaotropic conditions at elevated temperature, 2. binding of genomic DNA to the membrane of the Spin Filter, 3. washing of the membrane to remove contaminations and ethanol removal, 4. elution of the purified genomic DNA. Due to its purification grade, the isolated genomic DNA may directly be used for a multitude of downstream applications or can be stored at –20°C.

Storage and Precautions

Store all kit components at room temperature (18-25°C). Close ethanol-containing Wash Buffer I and II appropriately and store at room temperature. Store reconstituted Proteinase K at –20°C. In order to avoid repeated freezing and thawing, aliquot Proteinase K.

Patient specimens must always be considered as potentially infectious. Samples from risk patients must always be labeled and handled under suitable safety conditions. Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves.

Observe the usual precautions for nucleic acid applications. It is essential that all reagents and materials used for DNA isolation are free from DNases.

When handling kit reagents, the following special safety measures must be applied:

Lysis Buffer M contains Ammonium Chloride and is harmful (R36 and S2-24)

Binding Buffer B6 contains 2-Propanol and is irritating and highly flammable (R11-36-67 and S2-7-16-S24/25/26).

Proteinase K is harmful (R36/37/38 and S2-22-24-36/37-42).

Wash Buffer I contains Guanidine Thiocyanat and is harmful (R20/21/22-32 and S2-13).

For additional information, please refer to material safety data sheets which can be downloaded from:

<http://www.hain-lifescience.de/products/msds.html>

Test Procedure

Preparation

Preheat thermal mixer to 56°C. Preheat the amount of Elution Buffer D needed (200 µl for each sample) to 56°C. Label the tubes needed: one 1.5 ml reaction tube (two for tissue protocol; not provided), one 1.5 ml Receiver Tube (white), and two 2.0 ml Receiver Tubes (yellow) for each sample processed. For each sample, place a Spin Filter in a labeled 2.0 ml Receiver Tube.

If the kit is used for the first time, reconstitute Proteinase K lyophilisate as follows: for the 12 tests kit, add 250 µl dd water to lyophilisate, for the 48 tests kit, add 550 µl dd water to lyophilisate, and vortex for approximately 5 sec. After use, store at –20°C. Thaw if already dissolved. Prepare wash buffers as follows: add 30 ml 99.8% ethanol p.a. to Wash Buffer I and 42 ml 99.8 ml ethanol p.a. to Wash Buffer II, respectively, and mix thoroughly. Store appropriately closed at room temperature.

The reagents must be free from precipitates; if necessary, carefully warm to up to max. 30°C to dissolve.

Notes

Discard pipette tips after each pipetting step.

To prevent contamination, change gloves if they have got in contact with sample material; open only one tube at a time; avoid wetting the rim of tubes with sample material.

Do not touch the Spin Filter membrane with pipette tip. During centrifugation steps, the Spin Filter is closed with the lid of the respective Receiver Tube.

All centrifugation steps are carried out at room temperature.

Using a lower volume of Elution Buffer D leads to a higher concentration of the purified DNA. Eluting twice each with 100 µl of Elution Buffer D may lead to a higher concentration of purified DNA.

For validating the correct use of this test kit a previously isolated DNA can be used as a positive control.

Prior to any subsequent application, the isolated DNA should be centrifuged for 1 min at full speed.

The reagents and Spin Filters of this kit are for single use only.

DNA Isolation from Whole Blood

Blood samples can be stored at room temperature for up to 6 h, or at 2-8°C for up to 24 h. For long time storage, freeze samples at –20°C or –80°C. Avoid repeated freezing and thawing. If cryoprecipitates appear after thawing, do not transfer them into the Spin Filter.

Various different primary tubes and anticoagulants (except for heparin) can be used to collect blood samples for use in this test kit. The amount of DNA that can be isolated with this kit from max. 50 µl of whole blood depends on the leukocyte count. The sample volume for the lysis step must be 50 µl; add water (molecular biology grade) if necessary.

Perform initial steps as indicated in section Preparation.

1. Transfer 1-50 μ l whole blood into a labeled 1.5 ml reaction tube (not provided); if necessary, add water (molecular biology grade) to a final volume of 50 μ l. Add 50 μ l Lysis Buffer M and 10 μ l Proteinase K (see Preparation) and vortex reaction tube thoroughly for at least 5 sec.
2. Incubate sample for 5 min at 56°C and 800 rpm in a thermal mixer.
3. Add 100 μ l Binding Buffer B6 and mix by pipetting up and down four times. Place a Spin Filter in a labeled 2.0 Receiver Tube (yellow) and pipette lysate on membrane of Spin Filter. Close lid and centrifuge Receiver Tube with Spin Filter in a standard table top centrifuge for 1 min at 13,000 x g.
4. Open lid and add 300 μ l Wash Buffer I (see Preparation) to membrane of Spin Filter. Close lid and centrifuge for 30 sec at 13,000 x g.
5. Open lid and discard Receiver Tube with filtrate. Place Spin Filter in a new, labeled 2.0 ml Receiver Tube and add 750 μ l Wash Buffer II (see Preparation). Close lid and centrifuge for 30 sec at 13,000 x g.
6. Open lid and discard filtrate. Place Spin Filter in the same Receiver Tube, close lid and centrifuge for 2 min at 13,000 x g to eliminate residual ethanol.
7. Transfer Spin Filter to a new, labeled 1.5 ml receiver tube (white). Add 200 μ l prewarmed Elution Buffer D to membrane of Spin Filter, close lid and incubate at room temperature for 1 min.
8. To elute DNA, centrifuge for 1 min at 6,000 x g.

DNA Isolation from Body Fluids or Eukaryotic Cell Suspensions

Best results with body fluids (e.g. synovial fluid, amniotic fluid) and cell suspensions are obtained from fresh cells. For long time storage, freeze material at -20°C or -80°C immediately after withdrawal or culture-harvesting, respectively. Avoid repeated freezing and thawing since this might accelerate the degradation process. Inappropriate storage of sample material leads to decreased DNA quantity and quality. The DNA amount that can be purified with this kit from 50 μ l body fluid or 10²-10⁵ cells depends on type and number of cells. The sample volume for the lysis step must be 50 μ l; add water (molecular biology grade) if necessary.

Perform initial steps as indicated in section Preparation.

1. Transfer max. 50 μ l body fluid or cell suspension into a labeled 1.5 ml reaction tube (not provided); if necessary, add water (molecular biology grade) to a final volume of 50 μ l. Add 50 μ l Lysis Buffer M and 10 μ l Proteinase K (see Preparation) and vortex reaction tube thoroughly for at least 5 sec.
2. Incubate sample for 5 min at 56°C and 800 rpm in a thermal mixer.
3. Add 100 μ l Binding Buffer B6 and mix by pipetting up and down four times. Place a Spin Filter in a labeled 2.0 Receiver Tube (yellow) and pipette lysate on membrane of Spin Filter. Close lid and centrifuge Receiver Tube with Spin Filter in a standard table top centrifuge for 1 min at 13,000 x g.
4. Open lid and add 300 μ l Wash Buffer I (see Preparation) to membrane of Spin Filter. Close lid and centrifuge for 30 sec at 13,000 x g.
5. Open lid and discard Receiver Tube with filtrate. Place Spin Filter in a new, labeled 2.0 ml Receiver Tube and add 750 μ l Wash Buffer II (see Preparation). Close lid and centrifuge for 30 sec at 13,000 x g.
6. Open lid and discard filtrate. Place Spin Filter in the same Receiver Tube, close lid and centrifuge for 2 min at 13,000 x g to eliminate residual ethanol.
7. Transfer Spin Filter to a new, labeled 1.5 ml Receiver tube (white). Add 200 μ l prewarmed Elution Buffer D to membrane of Spin Filter, close lid and incubate at room temperature for 1 min.
8. To elute DNA, centrifuge for 1 min at 6,000 x g.

DNA Isolation from Eukaryotic Cell Pellets

Best results with cell pellets are obtained from fresh cells. For long time storage, freeze material at -20°C to -80°C immediately after culture-harvesting. Avoid repeated freezing and thawing since this might accelerate degradation process. Inappropriate storage of sample material leads to decreased DNA quantity and quality. The DNA amount that can be purified with this kit from 10²-10⁵ cells depends on the type and number of cells.

Perform initial steps as indicated in section Preparation.

1. Pellet 10²-10⁵ eukaryotic cells in a labeled 1.5 ml reaction tube for 5 min at 300 x g. Remove supernatant carefully, but completely. Add 100 μ l Lysis Buffer M and 10 μ l Proteinase K (see Preparation) and vortex reaction tube thoroughly for at least 10 sec.
2. Incubate sample for 10 min at 56°C and 800 rpm in a thermal mixer.
3. Add 100 μ l Binding Buffer B6 and mix by pipetting up and down four times. Place a Spin Filter in a labeled 2.0 Receiver Tube (yellow) and pipette lysate on membrane of Spin Filter. Close lid and centrifuge Receiver Tube (yellow) with Spin Filter in a standard table top centrifuge for 1 min at 13,000 x g.
4. Open lid and add 300 μ l Wash Buffer I (see Preparation) to membrane of Spin Filter. Close lid and centrifuge for 30 sec at 13,000 x g.
5. Open lid and discard Receiver Tube with filtrate. Place Spin Filter in a new, labeled 2.0 ml Receiver Tube and add 750 μ l Wash Buffer II (see Preparation). Close lid and centrifuge for 30 sec at 13,000 x g.
6. Open lid and discard filtrate. Place Spin Filter in the same Receiver Tube, close lid and centrifuge for 2 min at 13,000 x g to eliminate residual ethanol.
7. Transfer Spin Filter to a new, labeled 1.5 ml Receiver tube (white). Add 200 μ l prewarmed Elution Buffer D to membrane of Spin Filter, close lid and incubate at room temperature for 1 min.
8. To elute DNA, centrifuge for 1 min at 6,000 x g.

DNA Isolation from Tissue

Best results with tissue (e.g. biopsy material, frozen section) are obtained from fresh specimens. For long time storage, freeze material at -20°C or -80°C immediately after withdrawal. Avoid repeated freezing and thawing since this might accelerate the degradation process. Inappropriate storage of sample material leads to decreased DNA quantity and quality. The DNA amount that can be purified with this kit from max. 5 mg tissue depends on the tissue type of the starting material. If applicable, thaw frozen section in Lysis Buffer M shortly before starting the isolation protocol.

Perform initial steps as indicated in section Preparation.

1. Transfer max. 5 mg tissue sample into a labeled 1.5 ml reaction tube. Grinding of the material, e.g. with a pipette tip, increases lysis efficiency. Add 100 μ l Lysis Buffer M and 10 μ l Proteinase K (see Preparation) and vortex reaction tube thoroughly for at least 10 sec.
2. Incubate sample for 30 min at 56°C and 800 rpm in a thermal mixer. If necessary, the lysis time can be increased.
3. Centrifuge sample for 2 min at maximum speed and transfer supernatant to a new, labeled 1.5 ml reaction tube (not provided).

4. Add 100 µl Binding Buffer B6 and mix by pipetting up and down four times. Place a Spin Filter in a labeled 2.0 Receiver Tube (yellow) and pipette lysate on membrane of Spin Filter. Close lid and centrifuge Receiver Tube with Spin Filter in a standard table top centrifuge for 1 min at 13,000 x g.
5. Open lid and add 300 µl Wash Buffer I (see Preparation) to membrane of Spin Filter. Close lid and centrifuge for 30 sec at 13,000 x g.
6. Open lid and discard Receiver Tube with filtrate. Place Spin Filter in a new, labeled 2.0 ml Receiver Tube and add 750 µl Wash Buffer II (see Preparation). Close lid and centrifuge for 30 sec at 13,000 x g.
7. Open lid and discard filtrate. Place Spin Filter in the same Receiver Tube, close lid and centrifuge for 2 min at 13,000 x g to eliminate residual ethanol.
8. Transfer Spin Filter to a new, labeled 1.5 ml Receiver tube (white). Add 200 µl prewarmed Elution Buffer D to membrane of Spin Filter, close lid and incubate at room temperature for 1 min.
9. To elute DNA, centrifuge for 1 min at 6,000 x g.

Limitations

The **GenoType® DNA Isolation Kit** is intended for use in *in vitro* diagnostic analysis, where DNA isolation is followed by an amplification or another enzymatic DNA modification.

Results generated with any diagnostic assay subsequent to an isolation with this test kit should be interpreted with regard to other clinical or laboratory findings.

Use of this assay is limited to qualified personnel well trained in the test procedure and familiar with molecular biological methods.

This kit must not be used for DNA isolation from stool samples. It was neither validated for isolation from bacteria, fungi, or viruses nor for isolation of RNA.

Appropriate sample storage (see chapter Test Procedure) is crucial for reproducible and high yields.

The performance evaluation of this kit was carried out using the protocols described above. The user is in charge of validating the applicability of the **GenoType® DNA Isolation Kit** for the intended specific use.

Troubleshooting

Low DNA yield due to

- a) insufficient cell lysis
 - Vortex sample thoroughly after addition of Lysis Buffer M and Proteinase K.
 - Extend incubation time with Lysis Buffer M and Proteinase K.
 - Cut tissue into small pieces. Extend lysis time until only few and small particles are left, (hair and bones, however, will not be lysed at all).
 - Ensure continuous shaking during lysis.
 - Avoid loss of activity of Proteinase K due to wrong storage or dilution (see chapter Test Procedure).
 - Use less starting material.
- b) inefficient binding of DNA to membrane
 - Use the correct amount of Binding Buffer B6.
 - Mix sample thoroughly prior to transfer to the Spin Filter.
- c) incomplete DNA elution
 - Extend centrifugation time for ethanol removal.
 - Extend incubation time with prewarmed Elution Buffer D to 5 min
 - Prewarm Elution Buffer D to 80°C.
 - Use larger volume of Elution Buffer D.
 - Elute twice each with 100 µl of Elution Buffer D.
- d) low DNA concentration
 - Elute DNA with lower volume of Elution Buffer D.
 - Ensure that Wash Buffer I and II were prepared correctly and used in the correct order (see chapter Test Procedure).
- e) too few cells in starting material
 - Ensure appropriate starting material.
 - Use more starting material (max. 50 µl whole blood or body fluids / max. 5 mg tissue / max. 10⁵ cells).
- f) incomplete flow-through of lysate through membrane
 - Extend centrifugation time until all the lysate has passed through the membrane.
 - Clogged membrane due to more than 10⁵ cells in starting material; reduce number of cells.
 - Clogged membrane due to cryoprecipitates; avoid repeated freezing and thawing, if cryoprecipitates appear, avoid to transfer them to the membrane of the Spin Filter.

Degradated DNA due to

- a) inappropriate storage of starting material
 - Freeze sample directly after withdrawal/harvest in liquid nitrogen and store at -80°C.
 - Avoid repeated freezing and thawing (aliquot sample, if necessary).
- b) old starting material
 - Provide new sample.

Problems in subsequent applications (e.g. PCR) due to

- a) ethanol in eluate
 - Ensure that centrifugation time and speed was followed as indicated in the protocol.
 - If necessary, extend the centrifugation time for ethanol removal.
- b) salt in eluate
 - Ensure that the Wash Buffers are equilibrated to room temperature.
 - Check Wash Buffers for salt precipitates. If necessary, warm carefully to up to max. 30°C to dissolve precipitates.
- c) use of too much/too little DNA
 - Optimize the amount of DNA used in the respective application.

Material Required but not Provided

- Adjustable pipettes for 20, 200, and 1000 µl
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- ethanol p.a. 99,8%
- Graduated cylinder (250 ml)
- Reaction tubes (1.5 ml)
- Standard table top centrifuge
- Thermal mixer (precision +/-1°C)
- Vortexer
- Water (dd and molecular biology grade, if necessary)

Kit Contents

	supplied	
Spin Filters	12	48
Receiver Tubes 2.0 ml	24	2x 48
Receiver Tubes 1.5 ml	12	48
Lysis Buffer M	2 ml ready to use	3x 2 ml ready to use
Binding Buffer B6	2x 2 ml ready to use	15 ml ready to use
Proteinase K Lyophilisate	for 250 µl working solution	for 550 µl working solution
Wash Buffer I	30 ml (final volume 60 ml)	30 ml (final volume 60 ml)
Wash Buffer II	18 ml (final volume 60 ml)	18 ml (final volume 60 ml)
Elution Buffer D	2x 2 ml ready to use	15 ml ready to use
manual	1	1

Technical Data

Starting material: 1-50 µl whole blood (EDTA or citrate) / body fluids, 0.5-5 mg tissue, or 10²-10⁶ eukaryotic cells
 Yield: up to 2 µg genomic DNA, depending on nature and amount of starting material
 DNA purity: A₂₆₀/A₂₈₀ 1.7-2.0
 Assay time: 10-20 minutes (after lysis)



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
<http://www.hain-lifescience.de>



51512

12

51548

48