



DNA-Isolierung aus Mykobakterien mit dem QIAamp DNA Mini Kit der Fa. Qiagen

VORSICHT BEIM ARBEITEN MIT MYKOBAKTERIEN - INFektionsGEFAHR!!!

Der Arbeitsraum muss völlig frei von amplifizierter DNA sein. Bei erstmaliger Verwendung des Isolierungskits den Puffern AW1 und AW2 Ethanol zugeben (s. Puffergefäße). ATL-Puffer durch leichtes Erwärmen in Lösung bringen. Einen Heizblock auf 70°C und einen auf 95°C vorwärmen. Zur Inaktivierung des Probenmaterials muss dieses im Zuge der DNA-Isolierung mindestens 20 min auf 95°C erhitzt werden.

- 1) **a** Bei Verwendung von Koloniematerial eine Impföse voll Bakterien abnehmen und in ca. 300 µl Wasser (*molecular biology grade*) suspendieren.
- b** Bei Flüssigkulturen 1 ml einsetzen.

Zuviel eingesetztes Zellmaterial kann bei der nachfolgenden Amplifikation zu Inhibitionsproblemen führen. Bei sehr stark bewachsenen Kulturen sollte daher die eingesetzte Menge reduziert werden.

- 2) Bakteriensuspension aus 1a oder 1b 20 min bei 95°C inkubieren.
- 3) Bakteriensuspension durch eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 10 000 x g (ca. 10 000-11 000 UpM) in einer Standard-Tischzentrifuge pelletieren.
- 4) Überstand verwerfen, Bakterienpellet in 180 µl ATL-Puffer resuspendieren, 20 µl Proteinase K zugeben, kurz vortexen und 10 min bei 70°C inkubieren.
- 5) Probe kurz anzentrifugieren, 200 µl AL-Puffer zugeben und ca. 15 s vortexen.
- 6) Probe kurz anzentrifugieren, 200 µl Ethanol (96-100%) zugeben und ca. 15 s vortexen.
- 7) Beschriftetes Filter-Tube in ein Auffanggefäß einsetzen und die Lösung aus Schritt 6 in das obere Reservoir pipettieren.
- 8) Filter-Tube verschließen und 1 min bei 6000 x g (ca. 8000 UpM) zentrifugieren.
- 9) Durchlauf verwerfen, das Filter-Tube wieder in das Auffanggefäß setzen, 500 µl AW1-Puffer zupipettieren und wie in Schritt 8 zentrifugieren.
- 10) Durchlauf verwerfen, Filter-Tube wieder in Auffanggefäß setzen, 500 µl AW2-Puffer zupipettieren und 3 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren.
- 11) *optional*: Filtertube in ein frisches Auffanggefäß setzen und nochmals 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren.
- 12) Auffanggefäß verwerfen und das Filter-Tube in ein sauberes, beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß einsetzen.

- 13) Zur Elution der DNA 100 μ l AE-Puffer in Filter-Tube pipettieren, 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend 1 min bei 6000 x g zentrifugieren. Filter-Tube verwerfen; die DNA befindet sich nun im Eluat.
- 14) *optional*: Falls ein weißes Präzipitat sichtbar ist, die DNA-Lösung (Eluat) 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren und den Überstand in ein sauberes, beschriftetes Reaktionsgefäß überführen.
- 15) Zur PCR 5 μ l DNA-Lösung verwenden.

DNA-Isolierung aus Mykobakterien mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit der Fa. Roche Diagnostics

VORSICHT BEIM ARBEITEN MIT MYKOBAKTERIEN - INFektionsGEFAHR!!!

Der Arbeitsraum muss völlig frei von amplifizierter DNA sein. Bei erstmaliger Verwendung des Isolierungskits dem „Washing Buffer“ und „Inhibitor Removal Buffer“ Ethanol zugeben (s. Puffergefäße). Einen Heizblock auf 72°C und einen auf 95°C vorwärmen. Pro Probe ca. 120 µl „Elution Buffer“ in Schraubdeckel-Gefäß auf 72°C vorwärmen. Zur Inaktivierung des Probenmaterials muss dieses im Zuge der DNA-Isolierung mindestens 20 min auf 95°C erhitzt werden.

- 1) **a** Bei Verwendung von Koloniematerial eine Impföse voll Bakterien abnehmen und in ca. 300 µl Wasser (*molecular biology grade*) suspendieren.
- b** Bei Flüssigkulturen 1 ml einsetzen.

Zuviel eingesetztes Zellmaterial kann bei der nachfolgenden Amplifikation zu Inhibitionsproblemen führen. Bei sehr stark bewachsenen Kulturen sollte daher die eingesetzte Menge reduziert werden.

- 2) Bakteriensuspension aus 1a oder 1b 20 min bei 95°C inkubieren.
- 3) Bakteriensuspension durch eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 10 000 x g (ca. 10 000-11 000 UpM) in einer Standard-Tischzentrifuge pelletieren.
- 4) Überstand verwerfen, das Bakterienpellet in 200 µl „Tissue Lysis Buffer“ (Gewebe-Lysepuffer, weißer Deckel) resuspendieren, 40 µl Proteinase K zugeben, kurz vortexen und 10 min bei 72°C inkubieren.
- 5) Kurz anzentrifugieren, 200 µl „Binding Buffer“ (Bindungspuffer, grüner Deckel) zugeben und ca. 15 s vortexen.
- 6) Kurz anzentrifugieren, 100 µl Isopropanol zugeben und ca. 15 s vortexen.
- 7) Beschriftetes Filter-Tube in ein Auffanggefäß einsetzen und die Lösung aus Schritt 6 in das obere Reservoir pipettieren.
- 8) Filter-Tube verschließen und 1 min bei 6000 x g (ca. 8000 UpM) zentrifugieren.
- 9) *optional*: Durchlauf verwerfen, das Filter-Tube wieder in ein Auffanggefäß setzen, 500 µl „Inhibition Removal Buffer“ (Hemmstoffentfernungspuffer, schwarzer Deckel) zupipettieren und wie in Schritt 8 zentrifugieren.
- 10) Durchlauf verwerfen, das Filter-Tube wieder in ein Auffanggefäß setzen, 500 µl „Washing Buffer“ (Waschpuffer, blauer Deckel) zupipettieren und wie in Schritt 8 zentrifugieren.
- 11) Schritt 10 wiederholen.
- 12) *optional*: Filtertube in ein frisches Auffanggefäß setzen und 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren.

- 13) Auffanggefäß verwerfen und das Filter-Tube in ein sauberes, beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß einsetzen.
- 14) Zur Elution der DNA 100 µl des auf 72°C erwärmten „Elution Buffer“ (Elutions-Puffer, farbloser Deckel) in das Filter-Tube pipettieren, 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend 1 min bei 6000 x g zentrifugieren. Filter-Tube verwerfen; die DNA befindet sich nun im Eluat.
- 15) *optional*: Falls ein weißes Präzipitat sichtbar ist, DNA-Lösung (Eluat) 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren und Überstand in ein sauberes, beschriftetes Reaktionsgefäß überführen.
- 16) Zur PCR 5 µl DNA-Lösung verwenden.

07/2007

DNA-Isolierung aus Mykobakterien - Kurzprotokoll

VORSICHT BEIM ARBEITEN MIT MYKOBAKTERIEN – INFEKTIONSGEFAHR !

Der Arbeitsraum muss völlig frei von amplifizierter DNA sein. Vor Beginn der Isolierung ein Heizblock oder ein Wasserbad auf 95°C vorwärmen und ein Ultraschallbad bereitstellen. Zur Inaktivierung des Probenmaterials muss dieses im Zuge der DNA-Isolierung mindestens 20 min auf 95°C erhitzt werden.

Flüssigkultur (z. B. MGIT 960)

- 1) 1 ml Bakteriensuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettieren.
- 2) Bakteriensuspension 15 min bei ca. 10.000 x g zentrifugieren.
- 3) Sediment in 100-300 µl Wasser (*molecular biology grade*) resuspendieren.
- 4) Probe 20 min bei 95°C inkubieren.
- 5) 15 min in einem Ultraschallbad beschallen.
- 6) 5 min bei höchster Drehzahl zentrifugieren und 5 µl des Überstandes zur PCR einsetzen.
- 7) Zur Lagerung der isolierten DNA über einen längeren Zeitraum die DNA-Lösung in ein sauberes Gefäß überführen.

Festkultur

- 1) Mit einer Impföse aus der Positivkultur eine "sichtbare" Probe entnehmen und in ca. 300 µl Wasser (*molecular biology grade*) resuspendieren.
- 2) Probe 20 min bei 95°C inkubieren.
- 3) 15 min in einem Ultraschallbad beschallen.
- 4) 5 min bei höchster Drehzahl zentrifugieren und 5 µl des Überstandes zur PCR einsetzen.
- 5) Zur Lagerung der isolierten DNA über einen längeren Zeitraum die DNA-Lösung in ein sauberes Gefäß überführen

07/2007

DNA Isolation from Mycobacteria using the QIAamp DNA Mini Kit from Qiagen

BE AWARE OF RISK OF INFECTION WHEN HANDLING MATERIAL CONTAINING MYCOBACTERIA!!!

The working area must be free from amplified DNA. Before using for the first time, add the appropriate amounts of ethanol to Buffers AW1 and AW2 (see bottles). If a precipitate has formed in Buffer ATL, dissolve in warm water. Heat two heating blocks to 70°C and 95°C, respectively. It is crucial to heat samples to 95°C for at least 20 min in order to inactivate vegetative bacteria.

- 1) **a** When using bacteria grown on solid media, collect an inoculation loop of bacteria and suspend in 300 µl water (molecular biology grade).
- b** When using bacteria grown in liquid media, directly apply 1 ml.

Using too many bacteria for isolation may lead to inhibition of PCR. When densely grown cultures are used, the amount of starting material should be reduced.

- 2) Incubate bacteria from 1a or 1b at 95°C for 20 min.
- 3) Pellet bacteria by spinning for 15 min in a standard table top centrifuge at 10 000 x g (ca 10 000-11 000 rpm).
- 4) Discard supernatant, resuspend bacterial pellet in 180 µl Buffer ATL, add 20 µl Proteinase K, vortex briefly, and incubate at 70°C for 10 min.
- 5) Briefly spin down, add 200 µl Buffer AL, and vortex for 15 s.
- 6) Briefly spin down, add 200 µl ethanol (96-100%), and vortex for 15 s.
- 7) Insert labelled filter tube in collection tube and transfer solution from step 6 into the reservoir of the filter tube.
- 8) Close filter tube and spin for 1 min at 6000 x g (ca 8000 rpm).
- 9) Discard flow-through, re-insert spin column into collection tube, add 500 µl of Buffer AW1 and centrifuge as outlined in step 8.
- 10) Discard flow-through, re-insert spin column into collection tube, add 500 µl of Buffer AW2 and centrifuge for 3 min at maximum speed.
- 11) optional: Discard collection tube, insert spin column in a clean collection tube and spin for 1 min at maximum speed.
- 12) Discard collection tube and insert filter tube in a clean and labelled 1.5 ml microcentrifuge tube.
- 13) For elution of DNA, add 100 µl Buffer AE to filter tube, incubate for 1 min at room temperature and spin down (1 min, 6000 x g). Discard spin column; the DNA is now in the eluate.

- 14) optional: In case a white precipitate is present in the eluate, spin samples again for 1 min at maximum speed and transfer supernatant to a clean and labelled tube.
- 15) Use 5 μ l of the eluate for PCR.

07/2007

DNA Isolation from Mycobacteria using the High Pure PCR Template Preparation Kit from Roche Diagnostics

BE AWARE OF RISK OF INFECTION WHEN HANDLING MATERIAL CONTAINING MYCOBACTERIA!!!

The working area must be free from amplified DNA. Before using for the first time, add the appropriate amounts of ethanol to Washing Buffer and Inhibitor Removal Buffer (see bottles). Heat two heating blocks to 72°C and 95°C, respectively. Prewarm ca 120 µl of Elution Buffer per sample to 72°C in a screw cap tube. It is crucial to heat samples to 95°C for at least 20 min in order to inactivate vegetative bacteria.

- 1) **a** When using bacteria grown on solid media, collect an inoculation loop of bacteria and suspend in 300 µl water (molecular biology grade).
- b** When using bacteria grown in liquid media, directly apply 1 ml.

Using too many bacteria for isolation may lead to inhibition of PCR. When densely grown cultures are used, the amount of starting material should be reduced.

- 2) Incubate bacteria from 1a or 1b at 95°C for 20 min.
- 3) Pellet bacteria by spinning for 15 min in a standard table top centrifuge at 10 000 x g (ca 10 000-11 000 rpm).
- 4) Discard supernatant, resuspend bacterial pellet in 200 µl Tissue Lysis Buffer, add 40 µl Proteinase K, briefly vortex, and incubate at 72°C for 10 min.
- 5) Briefly spin down, add 200 µl Binding Buffer, and vortex for 15 s.
- 6) Briefly spin down, add 100 µl isopropanol, and vortex for 15 s.
- 7) Insert labelled filter tube in collection tube and transfer solution from step 6 into the reservoir of the filter tube.
- 8) Close filter tube and spin for 1 min at 6000 x g (ca 8000 rpm).
- 9) *optional*: Discard flow-through, re-insert filter tube in collection tube, add 500 µl Inhibition Removal Buffer and spin down (see step 8).
- 10) Discard flow-through, re-insert filter tube in collection tube, add 500 µl Washing Buffer and spin down (see step 8).
- 11) Repeat step 10.
- 12) *optional*: Insert filter tube in a new collection tube and spin down at maximum speed for 1 min.
- 13) Discard collection tube and insert filter tube in a clean and labelled 1.5 ml microcentrifuge tube.

- 14) For elution of DNA, add 100 μ l prewarmed Elution Buffer to filter tube, incubate for 1 min at room temperature and spin down (1 min, 6000 x g). Discard spin column; the DNA is now in the eluate.
- 15) *optional*: In case a white precipitate is present in the eluate, spin sample again for 1 min at maximum speed and transfer supernatant to a clean and labelled tube.
- 16) Use 5 μ l of the eluate for PCR.

07/2007

Quick Method for DNA Isolation from Mycobacteria

BE AWARE OF RISK OF INFECTION WHEN HANDLING MATERIAL CONTAINING MYCOBACTERIA!!!

The working area must be free from amplified DNA. Heat a heating block or water bath to 95°C. Provide an ultrasonic bath. It is crucial to heat samples to 95°C for at least 20 min in order to inactivate vegetative bacteria.

Liquid medium

- 1) When using bacteria grown in liquid media, directly apply 1 ml.
Using too many bacteria for isolation may lead to inhibition of PCR. When densely grown cultures are used, the amount of starting material should be reduced.
- 2) Pellet bacteria from 1 by spinning for 15 min in a standard table top centrifuge at 10 000 x g (ca 10 000-11 000 rpm).
- 3) Discard supernatant, resuspend bacteria in 100-300 µl of distilled water (see above) and incubate for 20 min at 95°C (heating block or boiling water bath).
- 4) Incubate for 15 min in an ultrasonic bath.
- 5) Spin down for 5 min at maximum speed and directly use 5 µl of the supernatant for PCR. In case DNA solution is to be stored for an extended time period, transfer supernatant to a clean and labelled tube.

Solid medium

- 1) When using bacteria grown on solid medium, collect an inoculation loop of bacteria and suspend in 300 µl water (molecular biology grade).
Using too many bacteria for isolation may lead to inhibition of PCR. When densely grown cultures are used, the amount of starting material should be reduced.
- 2) Incubate bacteria suspension for 20 min at 95°C (heating block or boiling water bath).
- 3) Incubate for 15 min in an ultrasonic bath.
- 4) Spin down for 5 min at maximum speed and directly use 5 µl of the supernatant for PCR. In case DNA solution is to be stored for an extended time period, transfer supernatant to a clean and labelled tube.

07/2007.