



Isolierung bakterieller DNA zum Nachweis parodontopathogener Markerkeime mittels High pure PCR template preparation Kit (Fa. Roche Diagnostics)

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). Je einen Heizblock auf 72°C bzw. 95°C vorwärmen. Pro Probe 200-400 µl „Elution Buffer“ (s. Schritt 13 unten) in Schraubdeckel-Gefäß auf 72°C vorwärmen.

- 1) Pro Probe 180 µl „Tissue Lysis Buffer“ (Gewebe-Lysepuffer, weißer Deckel) und 40 µl Proteinase K-Lösung in geeignetem Gefäß zusammengeben und mischen.
- 2) In jedes Probenröhrchen mit innen liegender/n Papierspitze/n 220 µl der obigen Mischung geben und 30 s vortexen.
- 3) 10 min bei 72°C inkubieren. Anschließend kurz anzentrifugieren.
- 4) 200 µl „Binding Buffer“ (Bindungspuffer, grüner Deckel) zugeben, kurz vortexen und 5 min bei 95°C inkubieren. Anschließend kurz anzentrifugieren.
- 5) 100 µl Isopropanol p. A. zugeben, 15 s vortexen und kurz anzentrifugieren.
- 6) Beschriftetes Filter-Tube in ein Auffanggefäß einsetzen und Lösung aus Schritt 5 (ohne Papierspitze/n) in oberes Reservoir pipettieren.
- 7) Filter-Tube verschließen und 1 min bei 6000 x g (ca. 8000 Upm) in einer Standard-Tischzentrifuge zentrifugieren.
- 8) *optional*: Durchlauf verwerfen, Filter-Tube wieder in Auffanggefäß setzen, 500 µl „Inhibition Removal Buffer“ (Hemmstoffentfernungspuffer, schwarzer Deckel) zupipettieren und wie in Schritt 7 zentrifugieren.
- 9) Durchlauf verwerfen, Filter-Tube wieder in Auffanggefäß setzen, 500 µl „Washing Buffer“ (Waschpuffer, blauer Deckel) zupipettieren und wie in Schritt 7 zentrifugieren.
- 10) Schritt 9 wiederholen.
- 11) *optional*: Filtertube in ein frisches Auffanggefäß setzen und 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 auf 72°C erwärmten „Elution Buffer“ (Elutions-Puffer, farbloser Deckel) in Filter-Tube pipettieren (bei 1 oder 2 ursprünglich vorhandenen Papierspitzen 200 µl, bei 3 oder 4 ursprünglich vorhandenen Papierspitzen 400 µl), 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, DNA-Lösung (Eluat) 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren und Überstand in ein sauberes, beschriftetes Reaktionsgefäß überführen.
- 15) 5 µl DNA-Lösung für die PCR einsetzen.

12/2003

Isolierung bakterieller DNA zum Nachweis parodontopathogener Markerkeime mittels QIAamp® DNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden)

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 zum Lösen in warmes Wasser stellen. Je einen Heizblock auf 70°C bzw. 95°C vorwärmen.

- 1) Pro Probe 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K-Lösung in geeignetem Gefäß zusammengeben und mischen.
- 2) In jedes Probenröhrchen mit innen liegender/n Papierspitze/n 200 µl der obigen Mischung geben und 30 s vortexen.
- 3) 10 min bei 70°C inkubieren. Anschließend kurz anzentrifugieren.
- 4) 200 µl AL-Puffer zugeben, kurz vortexen und 5 min bei 95 °C inkubieren. Anschließend kurz anzentrifugieren.
- 5) 200 µl Ethanol (96–100%) zugeben, 15 s vortexen und kurz anzentrifugieren.
- 6) Beschriftetes Filter-Tube in ein Auffanggefäß einsetzen und Lösung aus Schritt 5 (ohne Papierspitze/n) in oberes Reservoir pipettieren.
- 7) Filter-Tube verschließen und 1 min bei 6000 x g (ca. 8000 Upm) in einer Standard-Tischzentrifuge zentrifugieren.
- 8) Durchlauf verwerfen, Filter-Tube wieder in Auffanggefäß setzen, 500 µl AW1-Puffer zupipettieren und wie in Schritt 7 zentrifugieren.
- 9) Durchlauf verwerfen, Filter-Tube wieder in Auffanggefäß setzen, 500 µl AW2-Puffer zupipettieren und 3 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren.
- 10) *optional*: Filtertube in ein frisches Auffanggefäß setzen und nochmals 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren.
- 11) Auffanggefäß verwerfen und das Filter-Tube in ein sauberes, beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß einsetzen.
- 12) Zur Elution der DNA AE-Puffer in Filter-Tube pipettieren (bei 1 oder 2 ursprünglich vorhandenen Papierspitzen 200 µl, bei 3 oder 4 ursprünglich vorhandenen Papierspitzen 400 µl), 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend 1 min bei 6000 x g zentrifugieren. Filter-Tube verwerfen; die DNA befindet sich nun im Eluat.
- 13) *optional*: Falls ein weißes Präzipitat sichtbar ist, DNA-Lösung (Eluat) 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren und Überstand in ein sauberes, beschriftetes Reaktionsgefäß überführen.
- 14) 5 µl DNA-Lösung für die PCR einsetzen.

12/2003

Isolation of DNA from Periodontopathogenic Bacteria with High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics)

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 200-400 µl of Elution Buffer (see step 13 below) per sample to 72°C in a screw cap tube.

- 1) Per sample combine 180 µl of Tissue Lysis Buffer and 40 µl of Proteinase K solution in a tube and mix.
- 2) Add 220 µl of the above solution to each sample tube containing paper point/s. Vortex for 30 s.
- 3) Incubate for 10 min at 72°C. Briefly spin down.
- 4) Add 200 µl Binding Buffer, vortex for 15 s, and incubate for 5 min at 95°C. Briefly spin down.
- 5) Add 100 µl isopropanol, vortex for 15 s, and briefly spin down.
- 6) Insert labelled filter tube in collection tube and transfer solution from step 5 (without paper point/s) into the reservoir of the filter tube.
- 7) Close filter tube and spin for 1 min at 6000 x g (ap. 8000 rpm) in a standard table top centrifuge.
- 8) *optional*: Discard flow-through, re-insert filter tube in collection tube, add 500 µl Inhibition Removal Buffer and spin down (see step 7).
- 9) Discard flow-through, re-insert filter tube in collection tube, add 500 µl Washing Buffer and spin down (see step 7).
- 10) Repeat step 9.
- 11) *optional*: Insert filter tube in a new collection tube and spin down at maximum speed for 1 min.
- 12) Discard collection tube and insert filter tube in a clean and labelled 1.5 ml microcentrifuge tube.
- 13) For elution of DNA, add prewarmed Elution Buffer to filter tube. Use 200 µl when one or two paper points were present at the beginning and 400 µl when three or four points were present. Incubate for 1 min at room temperature and spin down for 1 min at 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 µl of the eluate for PCR.

Isolation of DNA from Periodontopathogenic Bacteria with QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)

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.

- 1) Per sample combine 180 µl of Tissue Lysis Buffer and 20 µl of Proteinase K solution in a tube and mix.
- 2) Add 200 µl of the above solution to each sample tube containing paper point/s. Vortex for 30 s.
- 3) Incubate for 10 min at 70°C. Briefly spin down.
- 4) Add 200 µl Buffer AL, vortex for 15 s, and incubate for 5 min at 95°C. Briefly spin down.
- 5) Add 200 µl ethanol (96–100%), vortex for 15 s, and briefly spin down.
- 6) Insert labelled filter tube in collection tube and transfer solution from step 5 into the reservoir of the filter tube.
- 7) Close spin column and spin for 1 min at 6000 x g (ap. 8000 rpm) in a standard table top centrifuge.
- 8) Discard flow-through, re-insert spin column into collection tube, add 500 µl of Buffer AW1 and centrifuge as outlined in step 7.
- 9) Discard flow-through, re-insert spin column into collection tube, add 500 µl of Buffer AW2 and centrifuge for 3 min at maximum speed.
- 10) *optional*: Discard collection tube, insert spin column in a clean collection tube and spin for 1 min at maximum speed.
- 11) Discard collection tube and insert filter tube in a clean and labelled 1.5 ml microcentrifuge tube.
- 12) Open spin column and add Buffer AE. Use 200 µl when one or two paper points were present at the beginning and 400 µl when three or four points were present. Incubate for 1 min at room temperature and spin for 1 min at 6000 x g. Discard spin column; the DNA is now in the eluate.
- 13) *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.
- 14) Use 5 µl of the eluate for PCR.