

August 2015

QIAsymphony[®] SP Protokollblatt

Tissue_LC_200_V7_DSP und
Tissue_HC_200_V7_DSP (benutzervalidiert für
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit)

Das vorliegende Dokument ist das *Tissue_LC_200_V7_DSP* und *Tissue_HC_200_V7_DSP*
(benutzervalidiert für QIAsymphony DSP DNA Mini Kit) QIAsymphony SP Protokollblatt, R1, für
Kitversion 1.

Allgemeine Informationen

Dieses Protokolle dienen der Aufreinigung der Gesamt-DNA aus Zellen in Kultur und Bakterienkulturen mit dem QIASymphony SP und dem QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Abhängig vom Probenotyp empfehlen wir die Verwendung entweder des Protokolls für niedrigen Gehalt (LC, Low Content) oder für hohen Gehalt (HC, High Content). Zellen in Kultur und Bakterienkulturen ergeben verbesserte DNA-Ausbeuten, wenn sie mit dem Protokoll für hohen Gehalt verarbeitet werden. Das Protokoll für niedrigen Gehalt, in Verbindung mit einem geringen Elutionsvolumen (50 µl), kann verwendet werden, wenn eine hohe DNA-Konzentration erforderlich ist.

Das QIASymphony DSP DNA Mini Kit, in Verbindung mit den Tissue_LC_200_V7_DSP und Tissue_HC_200_V7_DSP (benutzervalidiert für QIASymphony DSP DNA Mini Kit) Protokollen zur Aufreinigung der Gesamt-DNA aus Zellen in Kultur und Bakterienkulturen, ist für Anwendungen in der Molekularbiologie vorgesehen. Das Produkt ist nicht für die Diagnose, Prävention oder Behandlung einer Krankheit bestimmt.

Hinweis: Der Benutzer ist verantwortlich für die Leistungsvalidierung bei der Verwendung dieser Kombination für jegliche in seinem Labor angewandte Verfahren.

Protokoll für niedrigen Gehalt

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Katalognr. 937236)
Probenmaterial	Zellen in Kultur und Bakterienkulturen Empfohlene maximale Probengrößen: Für Zellen in Kultur, 5 x 10 ⁶ Zellen Für Bakterien, 1 x 10 ⁹ Zellen
Protokollname	Tissue_LC_200_V7_DSP
Standard-Assay-Kontrollsatz	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elutionsvolumen	50 µl, 100 µl, 200 µl oder 400 µl
Erforderliche Softwareversion	Version 4.0

Protokoll für hohen Gehalt

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Katalognr. 937236)
Probenmaterial	Zellen in Kultur und Bakterienkulturen Empfohlene maximale Probengrößen: Für Zellen in Kultur, 1 x 10 ⁷ Zellen Für Bakterien, 4 x 10 ⁹ Zellen
Protokollname	Tissue_HC_200_V7_DSP
Standard-Assay-Kontrollsatz	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Elutionsvolumen	100 µl, 200 µl oder 400 µl
Erforderliche Softwareversion	Version 4.0

Nicht mitgelieferte aber erforderliche Materialien

Für alle Probentypen

- Zur Minimierung des RNA-Gehalts: RNase A (Stammlösung von 100 mg/ml) (Katalognr. 19101)

Für Gram-negative Bakterien

- Puffer ATL (Katalognr. 19076)

Für Gram-positive Bakterien

- Puffer P1 (Katalognr. 19051)
- Lysozym (Stammlösung von 100 mg/ml)

Für Zellen in Kultur

- Puffer P1 (Katalognr. 19051)

Schublade „Sample“ (Probe)

Probentyp	Zellen in Kultur und Bakterienkulturen
Probeneinsatzvolumen	220 µl (erforderlich pro Probe, pro Protokoll)*
Verarbeitetes Probenvolumen	200 µl
Primäre Probenröhrchen	n.z.
Sekundäre Probenröhrchen	Weitere Informationen finden Sie unter www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Einsätze	Hängt vom Typ des verwendeten Probenröhrchen ab; weitere Informationen finden Sie unter www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

* Für Protokolle sowohl für hohen als auch für niedrigen Gehalt erkennt das System nicht, ob das Probenvolumen geringer als 220 µl ist, weil die Überführung der Probe ohne Füllstandsdetektion erfolgt. Stellen Sie deshalb sicher, dass das Probeneinsatzvolumen 220 µl beträgt.

n.z. = nicht zutreffend.

Schublade „Reagents and Consumables“ (Reagenzien und Verbrauchsartikel)

Position A1 und/oder A2	Reagenzienkartusche
Position B1	n.z.
Tip-Rack-Halter, Positionen 1 bis 17	Einmal-Filterspitzen, 200 µl oder 1.500 µl
Einheitsboxhalter 1 bis 4	Einheitsboxen mit Probenvorbereitungskartuschen oder 8-Magnetstab-Schutzhülsen

n.z. = nicht zutreffend.

Schublade „Waste“ (Abfall)

Einheitsboxhalter 1 bis 4	Leere Einheitsboxen
Halter für Abfallbeutel	Abfallbeutel
Halter für Flüssigabfallbehälter	Leerer Flüssigabfallbehälter

Schublade „Eluate“ (Eluat)

Elutions-Rack (wir empfehlen die Verwendung von Stellplatz 1, Kühlposition)	Weitere Informationen finden Sie unter www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
--	---

Erforderliches Plastikzubehör

Plastikzubehör	Eine Charge, 24 Proben*	Zwei Chargen, 48 Proben*	Drei Chargen, 72 Proben*	Vier Chargen, 96 Proben*
Einmal- Filterspitzen, 200 µl [†]	26	50	74	98
Einmal- Filterspitzen, 1.500 µl ^{†‡}	72	136	200	264
Probenvorbereitungskartuschen [§]	21	42	63	84
8-Magnetstab-Schutzhülsen [¶]	3	6	9	12

* Bei Verwendung von weniger als 24 Proben pro Charge vermindert sich die Anzahl erforderlicher Einmal-Filterspitzen pro Lauf.

[†] Jedes Spitzen-Rack enthält 32 Filterspitzen.

[‡] Bei der Zahl der erforderlichen Filterspitzen sind die für 1 Inventar-Scan pro Reagenzienkartusche benötigten Filterspitzen mit berücksichtigt.

[§] Eine Einheitsbox enthält 28 Probenvorbereitungskartuschen.

[¶] Eine Einheitsbox enthält zwölf 8-Magnetstab-Schutzhülsen.

Hinweis: Die angegebene Zahl von Filterspitzen kann von der auf dem Touchscreen angezeigten Zahl abhängig von der Einstellung abweichen. Wir empfehlen, die maximal mögliche Anzahl Filterspitzen zu laden.

Elutionsvolumen

Das Elutionsvolumen wird auf dem Touchscreen ausgewählt. Abhängig vom Probentyp und DNA-Gehalt kann das endgültige Eluatvolumen um bis zu 15 µl geringer als das ausgewählte Volumen ausfallen. Aufgrund der Tatsache, dass das Eluatvolumen variieren kann, empfehlen wir, das tatsächliche Eluatvolumen zu überprüfen, wenn ein automatisches Assay Set System verwendet wird, welches das Eluatvolumen vor dem Überführen nicht verifiziert. Eine Elution in geringeren Volumen erhöht die endgültige DNA-Konzentration, aber reduziert die Ausbeute leicht. Wir empfehlen die Verwendung eines für die vorgesehene nachfolgende Applikation geeigneten Elutionsvolumens.

Vorbereitung des Probenmaterials

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDSs), die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Wichtiger Hinweis vor Beginn

- Die QIASymphony Magnetpartikel reinigen RNA und DNA gemeinsam auf, wenn beide in der Probe vorhanden sind. Zum Minimieren des RNA-Gehalts in der Probe, geben Sie beim entsprechenden Schritt im Vorbehandlungsprotokoll RNase A zu der Probe hinzu.

Vor Beginn durchzuführende Arbeiten

- Überprüfen Sie bei Verwendung von Puffer ATL, dass dieser keinen weißen Niederschlag enthält. Inkubieren Sie gegebenenfalls unter gelegentlichem Schütteln für 30 Minuten bei 37 °C, um den Niederschlag aufzulösen.
- Stellen Sie einen ThermoMixer® oder Schüttelinkubator auf die für die jeweilige Vorbehandlung erforderliche Temperatur ein.*

Zellen in Kultur

Sowohl frische als auch eingefrorene Zellen in Kultur können verwendet werden. Wir empfehlen eine Verwendung des Protokolls für hohen Gehalt für bis zu 1×10^7 Zellen. Das Protokoll für niedrigen Gehalt führt zu geringeren DNA-Ausbeuten und wird nur in Verbindung mit einem geringen Elutionsvolumen (50 µl) empfohlen, wenn eine hohe DNA-Konzentration erforderlich ist. Eingefrorene Zellpellets sollten in Puffer P1 resuspendiert werden, wie im Vorbehandlungsprotokoll beschrieben ist.

Vorbehandlungsprotokoll für Zellen in Kultur

1. Zentrifugieren Sie maximal 1×10^7 Zellen bei $300 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C). Entfernen und werfen Sie den Überstand, wobei Sie darauf achten, dass das Zellpellet ungestört bleibt.

Hinweis: Das Zellpellet kann für spätere Verwendung bei -20 °C oder -70 °C gelagert werden, oder es kann sofort verwendet werden.

2. Resuspendieren Sie das Pellet in 220 µl Puffer P1 und überführen Sie die Probe in ein 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht mitgeliefert).
3. Geben Sie 20 µl Proteinase K hinzu und mischen Sie durch Anschneiden des Röhrchens.

Hinweis: Verwenden Sie Proteinase K aus dem Enzym-Rack des QIASymphony DSP DNA Mini Kits.

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerangaben überprüft, gewartet und kalibriert werden.

4. Stellen Sie das die Röhrcchen in einen ThermoMixer oder Schüttelinkubator und inkubieren Sie bei 56 °C unter Schütteln bei 900 U/min für 30 Minuten bis 2 Stunden.

Hinweis: Die Lysedauer hängt vom Typ der Zellen und der Anzahl der Zellen ab. Wenn die Lyse nach 2 Stunden nicht beendet ist, wie durch das Vorhandensein von unlöslichem Material oder hochviskosen Lysaten angezeigt wird, kann die Lysedauer verlängert werden, oder das unlösliche Material kann durch Zentrifugieren entfernt werden, wie in Schritt 6 beschrieben ist. Eine Lyse über Nacht ist möglich und beeinträchtigt die Präparation nicht.

5. Zum Minimieren des RNA-Gehalts in der Probe, geben Sie 4 µl RNase A (100 mg/ml) hinzu und inkubieren Sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C), bevor Sie mit Schritt 6 fortfahren.
6. Überführen Sie vorsichtig 220 µl des Lysats in Probenröhrcchen, die mit dem Probenträger des QIASymphony SP kompatibel sind.

Hinweis: Wenn Lysate unverdautes Material enthalten, zentrifugieren Sie für 2 Minuten mit voller Geschwindigkeit bei Raumtemperatur, bevor Sie den Überstand in Probenröhrcchen überführen. Eine vollständige Liste kompatibler Probenröhrcchen finden Sie unter www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Wir empfehlen die Verwendung von 2-ml-Röhrcchen (z. B. Sarstedt® Katalognr. 72.693 oder 72.608).

Bakterien

Sowohl frische als auch eingefrorene Bakterienkulturen können verwendet werden. Wir empfehlen eine Verwendung des Protokolls für hohen Gehalt mit bis zu 4×10^9 Zellen. Das Protokoll für niedrigen Gehalt führt zu geringeren DNA-Ausbeuten und wird nur in Verbindung mit geringen Elutionsvolumen (50 µl) empfohlen, wenn eine hohe DNA-Konzentration erforderlich ist. Bakterienwachstum wird gewöhnlich als optische Dichte (OD) der Bakterienkulturen mit einem Spektralphotometer gemessen. OD-Messungen hängen jedoch stark vom Typ des verwendeten Spektralphotometers und von der gemessenen Bakterienspezies ab. Wir empfehlen deshalb, das Spektralphotometer durch Korrelieren gemessener ODs mit Bakterienzellzahlen zu kalibrieren. Eingefrorene Pellets sollten in Puffer P1 (Gram-positive Bakterien) oder in Puffer ATL (Gram-negative Bakterien) resuspendiert werden, wie in den Vorbehandlungsprotokollen beschrieben ist.

Vorbehandlungsprotokoll für Gram-negative Bakterien

1. Ernten Sie maximal 4×10^9 Zellen durch Zentrifugieren bei $5.000 \times g$ für 10 Minuten bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C). Entfernen und werfen Sie den Überstand, wobei Sie darauf achten, dass das Bakterienpellet ungestört bleibt.

Hinweis: Das Zellpellet kann für spätere Verwendung bei -20 °C oder -70 °C gelagert werden, oder es kann sofort verwendet werden.

2. Resuspendieren Sie das Bakterienpellet in 220 µl Puffer ATL und überführen Sie die Probe in ein 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht mitgeliefert).
3. Geben Sie 20 µl Proteinase K hinzu und mischen Sie durch Anschneiden des Röhrchens.
Hinweis: Verwenden Sie Proteinase K aus dem Enzym-Rack des QIASymphony DSP DNA Mini Kits.
4. Stellen Sie das die Röhrchen in einen ThermoMixer oder Schüttelinkubator und inkubieren Sie bei 56 °C unter Schütteln bei 900 U/min für 30 Minuten bis 2 Stunden.
Hinweis: Die Lysedauer hängt vom Typ der Zellen und der Anzahl der Zellen ab. Wenn die Lyse nach 2 Stunden nicht beendet ist, wie durch das Vorhandensein von unlöslichem Material oder hochviskosen Lysaten angezeigt wird, kann die Lysedauer verlängert werden, oder das unlösliche Material kann durch Zentrifugieren entfernt werden, wie in Schritt 6 beschrieben ist.
5. Zum Minimieren des RNA-Gehalts in der Probe, geben Sie 4 µl RNase A (100 mg/ml) hinzu und inkubieren Sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur, bevor Sie mit Schritt 6 fortfahren.
6. Überführen Sie vorsichtig 220 µl des Lysats in Probenröhrchen, die mit dem Probenträger des QIASymphony SP kompatibel sind.
Hinweis: Wenn Lysate unverdautes Material enthalten, zentrifugieren Sie für 2 Minuten mit voller Geschwindigkeit bei Raumtemperatur, bevor Sie den Überstand in Probenröhrchen überführen. Eine vollständige Liste kompatibler Probenröhrchen finden Sie unter www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Wir empfehlen die Verwendung von 2-ml-Röhrchen (z. B. Sarstedt Katalognr. 72.693 oder 72.608).

Vorbehandlungsprotokoll für Gram-positive Bakterien

1. Ernten Sie maximal 4×10^9 Zellen durch Zentrifugieren bei $5.000 \times g$ für 10 Minuten bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C). Entfernen und werfen Sie den Überstand, wobei Sie darauf achten, dass das Bakterienpellet ungestört bleibt.
Hinweis: Das Zellpellet kann für spätere Verwendung bei –20 °C oder –70 °C gelagert werden, oder es kann sofort verwendet werden.
2. Resuspendieren Sie das Bakterienpellet in 200 µl Puffer P1 und überführen Sie die Probe in ein 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht mitgeliefert).
3. Geben Sie 20 µl Lysozym (100 mg/ml) hinzu und mischen Sie durch Anschneiden des Röhrchens.
4. Stellen Sie das die Röhrchen in einen ThermoMixer oder Schüttelinkubator und inkubieren Sie bei 37°C unter Schütteln bei 900 U/min für 30 Minuten bis 2 Stunden.
Hinweis: Die Lysedauer hängt vom Typ der Zellen und der Anzahl der Zellen ab.
5. Geben Sie 20 µl Proteinase K hinzu und mischen Sie durch Anschneiden des Röhrchens.

Hinweis: Verwenden Sie Proteinase K aus dem Enzym-Rack des QIASymphony DSP DNA Mini Kits.

6. Inkubieren Sie bei 56 °C unter Schütteln bei 900 U/min für 30 Minuten.
7. Zum Minimieren des RNA-Gehalts in der Probe, geben Sie 4 µl RNase A (100 mg/ml) hinzu und inkubieren Sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur, bevor Sie mit Schritt 8 fortfahren.
8. Überführen Sie vorsichtig 220 µl des Lysats in Probenröhrchen, die mit dem Probenträger des QIASymphony SP kompatibel sind.

Hinweis: Wenn Lysate unverdautes Material enthalten, zentrifugieren Sie für 2 Minuten mit voller Geschwindigkeit bei Raumtemperatur, bevor Sie den Überstand in Probenröhrchen überführen. Eine vollständige Liste kompatibler Probenröhrchen finden Sie unter www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Wir empfehlen die Verwendung von 2-ml-Röhrchen (z. B. Sarstedt Katalognr. 72.693 oder 72.608).

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch oder der Gebrauchsanweisung des jeweiligen QIAGEN Kits. QIAGEN Kit Handbücher und Gebrauchsanweisungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com, oder sie können vom Technischen Service von QIAGEN oder von Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.

Warenzeichen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten als gesetzlich geschützt. 08/2015 HB-0977-S09-001
© 2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

