

RIDA[®] Xtract

Art. Nr.: PGZ001
250 Präparationen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

 15 – 30 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Verwendungszweck

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA® Xtract ist ein Spin-Filter basiertes Extraktionskit für die gleichzeitige Extraktion und Aufreinigung von qualitativ hochwertiger bakterieller und viraler DNA als auch von viraler RNA aus humanem Serum, Plasmaproben, Liquor, Zellkulturüberstand, anderen zellfreien Körperflüssigkeiten (z.B. Urin), Abstrichen, Gewebebiopsien und Stuhlproben.

2. Testprinzip

Das RIDA® Xtract Kit ermöglicht die gleichzeitige Extraktion und Aufreinigung von viraler DNA/RNA und bakterieller DNA aus einem vielfältigen Spektrum an frischem und gefrorenem Probenmaterial. Dies ermöglicht es, die Probe für alle Arten von viralen und bakteriellen Nukleinsäuren nach einer Präparation zu testen.

Mit dem RIDA® Xtract Kit kann ein breites Spektrum von Probenmaterialien, zusammen mit einem speziell entwickelten Dilution Buffer, in die Reaktionsgefäße überführt werden, um ein endgültiges Probenvolumen von 400 µl einzustellen. Der vorgefüllte Puffer und die Enzyme lysieren die Proben, stabilisieren die Nukleinsäuren und verbessern die Adsorption der viralen und bakteriellen DNA und/oder RNA an der Membran des Spin Filters. Verunreinigungen werden durch wiederholte Waschschrte entfernt und die gereinigten Nukleinsäuren werden in Elution Buffer eluiert.

Das RIDA® Xtract Extraktionsverfahren umfasst folgende Schritte:

1. Lyse bei unterschiedlichen Temperaturen
2. Regulierung der Bindungsbedingungen
3. Bindung der Nukleinsäure aus dem Lysat an die Spin Filter-Membran
4. Waschen der Membran und Beseitigung von Verunreinigungen und Ethanol
5. Elution der Nukleinsäuren

Lyse und Regulierung der Bindungsbedingungen

Die Proben werden unter nicht-chaotropen Bedingungen bei verschiedenen hohen Temperaturen unter kontinuierlichem Schütteln lysiert.

Die Lyse wird durchgeführt mit: Lysozym (Aufbrechen der Bakterienzellwand, falls vorhanden), Lysis Buffer und Proteinase K (Verdau von Proteinen). Alle Lyse-Bestandteile werden durch das vorgefüllte Reaction Tube zur Verfügung gestellt. Unlysierte Probenbestandteile sollten vor dem Bindungs-Schritt entfernt

werden. Aufgrund der starken denaturierenden Lyse-Bedingungen werden gleichzeitig RNAsen und DNAsen inaktiviert.

Die Zugabe von Carrier-RNA (im Reaction Tube enthalten) ist zur Verbesserung der viralen DNA/RNA-Gewinnung notwendig, so dass eine sehr kleine Menge viraler DNA/RNA-Moleküle ebenfalls aufgereinigt werden kann. Carrier-RNA stabilisiert auch sehr geringe Nukleinsäure-Konzentrationen in Proben.

Bindung der Nukleinsäure

Nach Zugabe der Binding Solution zur Regulierung der optimalen Bindungsbedingung, wird das Lysat auf den Spin Filter gegeben. Hierbei bindet die Nukleinsäure an deren Oberfläche, während das Lysat mittels Zentrifugation durch den Spin Filter fließt.

Entfernen von Rest-Verunreinigungen

Verunreinigungen werden effizient durch das Waschen mit Wash Buffer 1 und Wash Buffer 2 entfernt, während die Nukleinsäure an der Spin Filter Membran gebunden bleibt.

Elution

Hochwertige virale DNA/RNA und genomische DNA wird durch die Zugabe des **Elution Buffers** oder von RNase freiem Wasser von der Membran eluiert. Zweifaches Eluieren mit jeweils 100 µl führt zu einem Anstieg der DNA/RNA Ausbeute. Die Benutzung von kleinen Elutionsvolumina kann die DNA/RNA-Konzentration erhöhen. Das Elutionsvolumen sollte mindestens 40 µl betragen. Das gewonnene Elutionsvolumen kann bis zu 5 µl weniger als das eingesetzte Elution Buffer Volumen betragen. Das gewonnene Elutionsvolumen hängt von der Probenbeschaffenheit ab. Die eluierte DNA/RNA kann direkt für verschiedene nachfolgende Anwendungen verwendet werden.

Diese Gebrauchsanweisung beinhaltet 5 Protokolle:

Protokoll 1: Isolation von DNA und/oder RNA aus Stuhlproben

Protokoll 2: Gleichzeitige Extraktion von Gesamtnukleinsäure (DNA und RNA) aus zellfreien Körperflüssigkeiten

Protokoll 3: Gleichzeitige Extraktion von Gesamtnukleinsäure (DNA/RNA) aus Abstrichtupfer Material

Protokoll 4: Gleichzeitige Extraktion von Gesamtnukleinsäure (DNA/RNA) aus Gewebebiopsien

Protokoll 5: Extraktion von DNA aus Bakterien Pellets (1×10^9 Bakterienzellen)

3. Packungsinhalt

Tab.1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 250 Extraktionen)

Kit Komponente	Menge	Bezeichnung
Reaction Tubes	5x 50 Stück	Reaktionsgefäße
Dilution Buffer	1x 150 ml	Verdünnungspuffer
Binding Solution	1x Leere Flasche (Endvolumen 1 x 120 ml)	Bindungslösung
Wash Buffer 1	2x 40 ml (Endvolumen 2 x 80 ml)	Waschpuffer 1
Wash Buffer 2	2x 30 ml (Endvolumen 2 x 150 ml)	Waschpuffer 2
Elution Buffer	1x 60 ml	Elutionspuffer
Spin Filter	5x 50 Stück	Spin Filter
Collection Tubes	15x 50 Stück	Sammelgefäße
Elution Tubes	5x 50 Stück	Elutionsgefäße

Hinweis: Alle Kit Komponenten bei Raumtemperatur (15 – 30 °C) lagern!

4. Hinweise zur Lagerung

- Alle Puffer und Kitkomponenten des RIDA[®] Xtract Kits inklusive des Reaction Tubes (inkl. Lysis Buffer, Proteinase K, Lysozyme und Carrier RNA) sollten gut verschlossen und trocken bei Raumtemperatur (15 – 30 °C) aufbewahrt werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Wenn das Kit vor einer verbleibenden Restlaufzeit von 12 Monaten geöffnet wird, reduziert sich die Restlaufzeit auf 12 Monate.
- Wash Buffer 1 und 2, befüllt mit Ethanol, sollten entsprechend verschlossen werden.
- Die Binding Solution, befüllt mit Isopropanol, sollte entsprechend verschlossen werden.
- Vor jedem Gebrauch alle Komponenten auf Raumtemperatur (15 – 30 °C) bringen. Sollten sich Präzipitate in den gelieferten Komponenten befinden, diese vorsichtig durch Erwärmen lösen.

5. Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien

- Mikrozentrifuge
- Heizblock (37 - 95 °C)
- ddH₂O
- Ethanol (96 - 100 %)
- Isopropanol (molekularbiologischer Grad; z.B. Carl Roth, 2-Propanol Kat. Nr. 6752, AppliChem Kat. Nr. A3928 or Sigma Kat. Nr. 59304-1L-F)
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- 2,0 ml Reaktionsgefäße (optional)
- Messzylinder (250 ml)
- Vortexer
- Pipetten (20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Filterspitzen
- Puderfreie Einmalhandschuhe

6. Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für die *in-vitro* Diagnostik.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben und RIDA[®] Xtract Reagenzien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille tragen. Nach Abschluss des RIDA[®] Xtract Verfahrens, die Hände waschen.
- Hautkontakt ist zu vermeiden.
- In den Bereichen, in denen mit Proben und Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Sowohl klinische Proben als auch sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, und Flüssigkeitsabfälle, die durch die Verwendung des RIDA[®] Xtract Kits erzeugt wurden, müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen entsprechend der nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.
- Das Verfahren erfordert nur minimalen Kontakt durch den Benutzer, so dass eine sichere Handhabung potentiell infektiöser Proben gewährleistet ist.
- Um Unregelmäßigkeiten bei diagnostischen Ergebnissen zu minimieren, sollten geeignete Kontrollen bei den nachfolgenden Anwendungen verwendet werden.
- RIDA[®] Xtract und sein Inhalt sind nicht für den Verzehr geeignet.

- Die RIDA[®] Xtract Reagenzien und Plastikware sind nur für den Laborgebrauch. Sie müssen im Labor gelagert werden und sind für keinen anderen als den angegebenen Verwendungszweck geeignet.
- Bei der Entsorgung von beschädigten oder undichten Pufferflaschen, Einmalhandschuhe und Schutzbrille tragen um Verletzungen zu vermeiden.
- Das Kit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

7. Wichtige Hinweise

7.1 Vorbereitung der Reagenzien

Binding Solution: Die leere Binding Solution Flasche mit 120 ml Isopropanol (molekularbiologischer Grad) befüllen (siehe Kapitel 5: Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien).

Wash Buffer 1: Jeweils 40 ml Ethanol (96 – 100 %) zu den Wash Buffer 1 Flaschen hinzufügen, gründlich mischen und die Flaschen immer fest geschlossen halten!

Wash Buffer 2: Jeweils 120 ml Ethanol (96 – 100 %) zu den Wash Buffer 2 Flaschen hinzufügen, gründlich mischen und die Flaschen immer fest geschlossen halten!

7.2 Umgang mit Spin Filtern

Aufgrund der Empfindlichkeit der DNA/RNA-Amplifikations-Technologien, sind die folgenden Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung von Spin Filtern notwendig, um eine Kreuzkontamination zwischen Proben bei der Präparation zu vermeiden.

- Geben Sie das Proben-Binding Solution Gemisch vorsichtig auf den Spin Filter.
- Pipettieren Sie die Probe auf den Filter ohne den Rand der Säule zu befeuchten.
- Wechseln Sie immer die Pipettenspitzen zwischen den einzelnen Pipettierschritten. Wir empfehlen die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosol-Barriere.
- Das Berühren der Spin Filter Membran mit der Pipettenspitze ist zu vermeiden.

7.3 Probennahme und Aufbewahrung von Ausgangsmaterial

Stuhlproben

Die besten Ergebnisse werden mit frischem Material, mit Material, das bei 2 - 8 °C für bis zu 3 Tage gelagert wurde oder mit Material, das direkt eingefroren und bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt wurde, erzielt.

Kultivierte Bakterien

Bakterien müssen nach der Kultivierung pelletiert werden. Die besten Ergebnisse werden mit frischem Material oder Material, das direkt eingefroren und bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt wurde, erzielt. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der gelagerten Proben sollte vermieden werden, da dies zu einer reduzierten DNA-Größe führt.

Biopsiematerial / Gewebe

Die besten Ergebnisse werden mit frischem Material oder Material, das direkt eingefroren und bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt wurde, erzielt. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der gelagerten Proben sollte vermieden werden, da dies zu einer reduzierten DNA-Größe führt. Die Verwendung von qualitativ schlechtem Ausgangsmaterial führt ebenfalls zu einer Reduktion der DNA Länge und beeinflusst die DNA-Ausbeute. Die Menge der gereinigten DNA aus Gewebeproben (max. 10 mg) hängt von der Art des Ausgangsmaterials ab.

Urin

Die Bakterien müssen pelletiert werden, während der Überstand vollständig entfernt wird (Kontaminationen mit Harnstoff können PCR-Reaktionen hemmen). Die besten Ergebnisse werden mit frisch pelletiertem Material oder pelletiertem Material, das direkt eingefroren und bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt wurde, erzielt. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der gelagerten Proben sollte vermieden werden, da dies zu einer reduzierten DNA Größe führt. Die Menge der gereinigten DNA aus Urin (max. 15 – 50 ml) hängt vom enthaltenen Bakterientiter ab.

Abstrichtupfer/Speichel

Das Protokoll funktioniert mit frischem Speichel, gebrauchsfertigen Abstrichtupfern und mit getrockneten Abstrichtupfern. Das Protokoll ist nicht für die DNA-Isolierung von Abstrichtupfern, die mit speziellen Aufbewahrungspuffern anderer Hersteller gelagert werden, validiert.

Die besten Ergebnisse werden mit frisch entnommenen Proben erzielt. Solange die Proben nicht mit flüssigem Stickstoff schockgefroren oder mit RNase Inhibitoren oder denaturierenden Reagenzien inkubiert wurden, ist die virale RNA instabil. Daher ist es unbedingt notwendig, die Probe nach der Gewinnung mit Hilfe von flüssigem Stickstoff sofort tiefzufrieren und bei -80 °C zu lagern. Virale RNA ist in solch tiefgefrorenen Proben für Monate stabil. Die Aufreinigung viraler RNA sollte so schnell wie möglich erfolgen. Proben können auch in dem gelösten Lysis Buffer im

Reaction Tube für 1 h bei Raumtemperatur, über Nacht bei 4 °C und für die langfristige Lagerung bei -80 °C, gelagert werden. Die Lagerung bei -80 °C wird empfohlen.

Serum und Plasma (und andere zellfreie Körperflüssigkeiten)

Nach der Zentrifugation kann das Plasma oder Serum, welches aus dem Blut mit Antikoagulantien wie EDTA oder Citrat, *aber nicht mit Heparin*, behandelt wurde, bei 2 - 8 °C für bis zu 6 Stunden gelagert werden. Für langfristige Lagerung wird das Einfrieren von -20 °C bis -80 °C empfohlen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden, da Denaturierung und Ausfällung von Proteinen zu einer Abnahme des Virustiters führt und dadurch die Ausbeute der extrahierten viralen RNA reduziert wird. Auftretende Kryopräzipitate können durch kurzes Zentrifugieren (6800 x g für 3 Minuten) pelletiert werden. Der klare Überstand sollte entfernt werden, ohne das Pellet aufzuwühlen, und sofort verarbeitet werden. Dieser Schritt reduziert den Virustiter nicht.

Zellkulturüberstand

Die besten Ergebnisse werden mit frischem Material oder mit Material, das nach der Gewinnung des Zellkulturüberstands sofort eingefroren und bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt wird, erzielt.

7.4 Probengröße des Ausgangsmaterials

Das RIDA[®] Xtract Kit ist für den Einsatz von bis zu 200 µl zellfreien Körperflüssigkeiten, Abstrichtupfer Material, Zellkulturüberständen, bis zu 400 µl Spülflüssigkeit von Abstrichtupfern, 1 x 10⁹ Säugetierzellen, maximal 10 mg Gewebeprobe und 200 µl Stuhlüberstand optimiert.

7.5 Interne Kontrolle (IC) / Extraktionskontrolle

Interne Kontrollen von PCR-Assay Anbietern können als Extraktionskontrolle verwendet werden, wenn das Fragment größer als 100 bp ist.

Hinweis: Fügen Sie die Interne Kontrolle nicht direkt dem Probenmaterial hinzu!

8. Protokolle

Die folgenden Hinweise gelten für alle Protokolle:

- Stellen Sie sicher, dass die Binding Solution, Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gemäß den Anweisungen auf den Etiketten vorbereitet wurden.
- Mischen Sie alle Puffer vor Gebrauch
- Die DNA/RNA kann auch mit einem geringeren (aber nicht weniger als 40 µl) oder einem höheren Volumen an Elution Buffer eluiert werden (abhängig von der erwarteten Ausbeute oder benötigten DNA/RNA-Konzentration).
- Das Eluat enthält virale DNA und/oder virale RNA, sowie manchmal genomische DNA.
- Lagern Sie nach der Extraktion das Elution Tube auf Eis. Für eine langfristige Lagerung lagern Sie die Nukleinsäuren bei -20 °C oder -80 °C.
- Die Zentrifugationsschritte werden mit der Centrifuge 5415 D von Eppendorf ausgeführt. Die rpm Angaben beziehen sich auf diese Zentrifuge.

8.1 Protokoll 1: Isolation von DNA und/oder RNA aus Stuhlproben

Wichtiger Hinweis:

- *Bitte lesen Sie die Protokolle vor Beginn des Präparationsverfahrens sorgfältig durch*
 - *Wärmen Sie die benötigte Menge Elution Buffer für den finalen Elutionsschritt auf 80 °C vor.*
-

8.1.1 Probenvorbereitung

- RNA: Verdünnen Sie die Stuhlprobe 1:10 mit Wasser. Vortexen Sie die Probe 30 Sekunden und zentrifugieren Sie die Probe 1 Minute bei 12000 rpm.
- DNA: Verdünnen Sie die Stuhlprobe 1:3 mit Wasser. Vortexen Sie die Probe 30 Sekunden und zentrifugieren Sie die Probe 30 Sekunden bei 3000 rpm.
- DNA und RNA: Verdünnen Sie die Stuhlprobe 1:3 mit Wasser. Vortexen Sie die Probe 30 Sekunden und zentrifugieren Sie die Probe 30 Sekunden bei 3000 rpm.

8.1.2 Lyse der Probe

- Überführen Sie 200 µl des Probenüberstands in das mitgelieferte Reaction Tube und fügen Sie 200 µl Dilution Buffer hinzu.
Optional: Fügen Sie 20 µl RIDA[®]GENE ICR/ICD als Extraktionskontrolle hinzu.
- Verschließen Sie den Deckel, vortexen Sie kurz für 10 Sekunden und lassen Sie das Gemisch 10 Minuten inkubieren.

8.1.3 Bindung der DNA/RNA

- Fügen Sie 400 µl Binding Solution in das mitgelieferte Reaction Tube hinzu und mischen Sie die Probe vollständig durch Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen.
- Überführen Sie die Probe in den Spin Filter. Verschließen Sie den Deckel, lassen Sie die Probe 1 Minute inkubieren und zentrifugieren Sie anschließend bei 9300 x g (10000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.1.4 Erstes Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 500 µl Wash Buffer 1 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 9300 x g (10000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.1.5 Zweites Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 700 µl Wash Buffer 2 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 9300 x g (10000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.
- Entfernen Sie den Ethanolrest durch eine finale Zentrifugation von 4 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit. Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat.

8.1.6 Elution der DNA/RNA

- Setzen Sie den Spin Filter in ein 1,5 ml Elution Tube.
- Pipettieren Sie 60 µl Elution Buffer (vorgewärmt auf 80 °C) direkt auf die Spin Filter Membran.
- Inkubieren Sie den Elution Buffer 3 Minuten bei RT und zentrifugieren Sie anschließend bei 9300 x g (10000 rpm) für 1 Minute.

- Verwerfen Sie den Spin Filter und lagern Sie das Elution Tube mit der eluierten Nukleinsäure sofort auf Eis.

8.2 Protokoll 2: Gleichzeitige Extraktion von Gesamtnukleinsäure (DNA und RNA) aus zellfreien Körperflüssigkeiten

Wichtiger Hinweis:

- Bitte lesen Sie die Protokolle vor Beginn des Präparationsverfahrens sorgfältig durch
 - Wärmen Sie die benötigte Menge Elution Buffer für den finalen Elutionsschritt auf 65 °C vor.
-

8.2.1 Probenvorbereitung

Das Protokoll ist für die Extraktion von Gesamtnukleinsäure aus zellfreien Körperflüssigkeiten von bis zu 200 µl optimiert. Proben, die weniger als 200 µl Volumen aufweisen, müssen mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 400 µl aufgefüllt werden.

8.2.2 Lyse der Probe

- Mischen Sie 200 µl Probe mit 200 µl ddH₂O.
- Überführen Sie die Probe in das mitgelieferte Reaction Tube. Verschließen Sie den Deckel, vortexen Sie kurz für 10 Sekunden.
- Setzen Sie das Reaction Tube in den Heizblock und lassen Sie das Gemisch unter Schütteln für 15 Minuten bei 65 °C und für 10 Minuten bei 95 °C inkubieren. Dies führt zu einer erhöhten Sensitivität.

8.2.3 Bindung der DNA/RNA

- Fügen Sie 400 µl Binding Solution in das mitgelieferte Reaction Tube hinzu und mischen Sie die Probe vollständig durch Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen.
- Überführen Sie die Probe in den Spin Filter. Verschließen Sie den Deckel und lassen Sie die Probe für 1 Minute inkubieren. Zentrifugieren Sie anschließend bei 11000 x g (11000 rpm) für 2 Minuten.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.2.4 Erstes Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 500 µl Wash Buffer 1 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.2.5 Zweites Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 700 µl Wash Buffer 2 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.
- Entfernen Sie Ethanolreste durch eine finale Zentrifugation von 4 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit. Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat.

8.2.6 Elution der DNA/RNA

- Setzen Sie den Spin Filter in ein Elution Tube.
- Pipettieren Sie 60 µl Elution Buffer (vorgewärmt auf 65 °C) direkt auf die Spin Filter Membran.
- Inkubieren Sie den Elution Buffer für 3 Minuten bei RT und zentrifugieren Sie anschließend bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie den Spin Filter und lagern Sie das Elution Tube mit der eluierten Nukleinsäure sofort auf Eis.

8.3 Protokoll 3: Gleichzeitige Extraktion von Gesamtnukleinsäure (DNA/RNA) aus Abstrichtupfer Material

Wichtiger Hinweis:

- Bitte lesen Sie die Protokolle vor Beginn des Präparationsverfahrens sorgfältig durch
 - Wärmen Sie die benötigte Menge Elution Buffer für den finalen Elutionsschritt auf 65 °C vor.
-

8.3.1 Probenvorbereitung

8.3.1.1 Für gram-positive Bakterien

- Überführen Sie den Abstrichtupfer in das Reaction Tube, fügen Sie 400 µl Dilution Buffer hinzu und mischen Sie den Puffer durch Rühren mit dem Abstrichtupfer. Brechen oder schneiden Sie den Abstrichtupfer ab und verschließen Sie das Reaction Tube.
- Inkubieren Sie die Probe in einem Heizblock für 10 Minuten bei 37 °C und für 10 Minuten bei 65 °C. (Durchgängiges Schütteln erhöht das Lyse-Verfahren. Es ist möglich, den Heizblock nach 8 Minuten auf 65 °C umzuschalten. Das Heizen auf 65 °C erfolgt mit der Probe im Heizblock. Wenn der Block eine Heizrate von mehr als 4 °C pro Minute hat, beträgt die Inkubationszeit 12 Minuten. Wenn der Heizblock langsamer hochheizt, muss die Inkubationszeit verlängert werden.
- Entfernen Sie den Abstrichtupfer und fahren Sie mit **Kapitel 8.3.2** fort.

8.3.1.2 Für gram-negative Bakterien

- Überführen Sie den Abstrichtupfer in das Reaction Tube, fügen Sie 400 µl Dilution Buffer hinzu und mischen Sie den Puffer durch Rühren mit dem Abstrichtupfer. Brechen oder schneiden Sie den Abstrichtupfer ab und verschließen Sie das Reaction Tube.
- Inkubieren Sie die Probe in einem Heizblock für 10 Minuten bei 65 °C. (Durchgängiges Schütteln erhöht das Lyse-Verfahren.)
- Entfernen Sie den Abstrichtupfer und fahren Sie mit **Kapitel 8.3.2** fort.

8.3.1.3 Für virale DNA und/oder RNA

- Überführen Sie den Abstrichtupfer in das Reaction Tube, fügen Sie 400 µl Dilution Buffer hinzu und mischen Sie den Puffer durch Rühren mit dem Abstrichtupfer. Brechen oder schneiden Sie den Abstrichtupfer ab und verschließen Sie das Reaction Tube.

- Inkubieren Sie die Probe in einem Heizblock für 10 Minuten bei 65 °C. (Durchgängiges Schütteln erhöht das Lyse-Verfahren.)
- Entfernen Sie den Abstrichtupfer und fahren Sie mit **Kapitel 8.3.2** fort.

Hinweis: *Um eine maximale Ausbeute bakterieller und viraler Nukleinsäure zu erhalten, ist es wichtig den Tupfer während der vollständige Lyse-Zeit in dem Reaction Tube zu belassen. Es ist möglich den Stab des Abstrichtupfers abzuschneiden, so dass man den Deckel des Reaction Tubes schließen kann. Das Entfernen des Abstrichtupfers aus dem Reaction Tube vor Ablauf der angegebenen Zeit, führt zu einer drastisch reduzierten Endausbeute! Nach der Lyse-Zeit den Abstrichtupfer sorgfältig an der Wand des Reaction Tubes ausdrücken und den Abstrichtupfer entsorgen.*

8.3.2 Lyse der Probe

- Stellen Sie das Reaction Tube in einen Heizblock und inkubieren Sie es bei 95 °C für 5 - 10 Minuten. (Durchgängiges Schütteln erhöht die Lyse-Effizienz.)

8.3.3 Bindung der DNA/RNA

- Fügen Sie 400 µl Binding Solution in den Proben-Mix hinzu und mischen Sie die Probe vollständig durch Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen.
- Überführen Sie die Probe in den Spin Filter. Verschließen Sie den Deckel und lassen Sie die Probe für 1 Minute inkubieren. Zentrifugieren Sie anschließend bei 11000 x g (11000 rpm) für 2 Minuten.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.3.4 Erstes Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 500 µl Wash Buffer 1 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.3.5 Zweites Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 700 µl Wash Buffer 2 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube. Entfernen Sie Ethanolreste durch eine finale Zentrifugation von 4 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit.

- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat.

8.3.6 Elution der DNA/RNA

- Setzen Sie den Spin Filter in ein Elution Tube.
- Pipettieren Sie 60 µl - 200 µl Elution Buffer (vorgewärmt auf 65 °C) direkt auf die Spin Filter Membran.
- Inkubieren Sie den Elution Buffer für 3 Minuten bei RT und zentrifugieren Sie anschließend bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie den Spin Filter und lagern Sie das Elution Tube mit der eluierten Nukleinsäure sofort auf Eis.

8.4 Protokoll 4: Gleichzeitige Extraktion von Gesamtnukleinsäure (DNA/RNA) aus Gewebebiopsien

Wichtiger Hinweis:

- *Bitte lesen Sie die Protokolle vor Beginn des Präparationsverfahrens sorgfältig durch. Wärmen Sie die benötigte Menge Elution Buffer für den finalen Elutionsschritt auf 65 °C vor.*
-

8.4.1 Probenvorbereitung

- Überführen Sie 1 - 10 mg Gewebeprobe in das mitgelieferte Reaction Tube.
- Fügen Sie 400 µl Dilution Buffer hinzu. Verschließen Sie das Reaction Tube und vortexen Sie kurz.
- Setzen Sie das Reaction Tube in den Heizblock und inkubieren Sie es unter fortlaufendem Schütteln für 30 – 60 Minuten bei 56 °C.

8.4.2 Lyse der Probe

- Stellen Sie das Reaction Tube in einen Heizblock und inkubieren Sie es bei 95 °C für 5 - 10 Minuten. (Durchgängiges Schütteln erhöht die Lyse-Effizienz.)

Hinweis: *Die Lyse-Zeit sollte erhöht werden, wenn die Lyse nicht vollständig ist.*

Wichtiger Hinweis: *Eine längere Lyse-Zeit kann zu einer Verringerung der endgültigen Qualität und Ausbeute einiger viraler RNA-Spezies führen.*

- Nach der Lyse die Probe bei Höchstgeschwindigkeit für 1 Minute zentrifugieren, um unlysiertes Material zu trennen.
- Überführen Sie den klaren Überstand vollständig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Lieferumfang enthalten).

8.4.3 Bindung der DNA/RNA

- Fügen Sie 400 µl Binding Solution in das 1,5 ml Reaktionsgefäß hinzu und mischen Sie die Probe vollständig durch Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen.
- Überführen Sie die Probe in den Spin Filter. Verschließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie anschließend bei 11000 x g (11000 rpm) für 2 Minuten.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.4.4 Erstes Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 500 µl Wash Buffer 1 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.4.5 Zweites Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 700 µl Wash Buffer 2 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube. Entfernen Sie Ethanolreste durch eine finale Zentrifugation von 4 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat.

8.4.6 Elution der DNA/RNA

- Setzen Sie den Spin Filter in ein 1,5 ml Elution Tube.
- Zentrifugieren Sie 60 µl Elution Buffer (vorgewärmt auf 65 °C) direkt auf die Spin Filter Membran.
- Inkubieren Sie den Elution Buffer 3 Minuten bei RT und zentrifugieren Sie anschließend bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minuten.
- Verwerfen Sie den Spin Filter und setzen Sie das Elution Tube mit der eluierten Nukleinsäure sofort auf Eis.

8.5 Protokoll 5: Extraktion von DNA aus Bakterien Pellets (1×10^9 Bakterienzellen)

Wichtiger Hinweis:

- Bitte lesen Sie die Protokolle vor Beginn des Präparationsverfahrens sorgfältig durch
 - Wärmen Sie die benötigte Menge Elution Buffer für den finalen Elutionsschritt auf 65 °C vor.
-

8.5.1 Probenvorbereitung

- Nehmen Sie ein Aliquot der Bakterienkultur und zentrifugieren Sie sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 3 Minuten.
- Entfernen Sie vorsichtig den Überstand vollständig.

8.5.1.1 Für gram-positive Bakterien

- Fügen Sie 400 µl Dilution Buffer zu dem Pellet hinzu und resuspendieren Sie das Pellet durch Auf- und Abpipettieren.
- Überführen Sie die resuspendierte Probe in das Reaction Tube und vortexen Sie es kurz.
- Inkubieren Sie die Probe in einem Heizblock für 10 Minuten bei 37 °C und für 10 Minuten bei 65 °C. (Durchgängiges Schütteln erhöht das Lyse Verfahren. Es ist möglich den Heizblock nach 8 Minuten auf 65 °C umzuschalten. Das Heizen auf 65 °C erfolgt mit der Probe im Heizblock. Bei einer Heizrate von 4 °C pro Minute, beträgt die Inkubationszeit 12 Minuten. Wenn der Heizblock langsamer hochheizt, muss die Inkubationszeit verlängert werden.
- Fahren Sie mit **Kapitel 8.5.2** fort.

8.5.1.2 Für gram-negative Bakterien

- Fügen Sie 400 µl Dilution Buffer zu dem Pellet hinzu und resuspendieren Sie das Pellet durch Auf- und Abpipettieren.
- Überführen Sie die resuspendierte Probe in das Reaction Tube und vortexen Sie es kurz.
- Inkubieren Sie die Probe in einem Heizblock für 10 Minuten bei 65 °C. (Durchgängiges Schütteln erhöht die Lyse-Effizienz.)
- Fahren Sie mit **Kapitel 8.5.2** fort.

8.5.2 Lyse der Probe

- Stellen Sie das Reaction Tube in einen Heizblock und inkubieren Sie es bei 95 °C für 5 - 10 Minuten. (Durchgängiges Schütteln erhöht die Lyse-Effizienz.)

8.5.3 Bindung der DNA

- Fügen Sie 400 µl Binding Solution zu der Proben hinzu und mischen Sie die Probe vollständig durch Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen.
- Überführen Sie die Probe in den Spin Filter. Verschließen Sie den Deckel und lassen Sie die Probe für 1 min inkubieren. Zentrifugieren Sie anschließend bei 11000 x g (11000 rpm) für 2 min.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.5.4 Erstes Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 500 µl Wash Buffer 1 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 min.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube.

8.5.5 Zweites Waschen des Spin Filters

- Fügen Sie 700 µl Wash Buffer 2 zu dem Spin Filter hinzu und zentrifugieren Sie bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat und setzen Sie den Spin Filter in ein neues Collection Tube. Entfernen Sie den Ethanolreste durch eine finale Zentrifugation von 4 Minute bei Höchstgeschwindigkeit.
- Verwerfen Sie das Collection Tube mit dem Filtrat.

8.5.6 Elution der DNA

- Setzen Sie den Spin Filter in ein Elution Tube.
- Pipettieren Sie 200 µl Elution Buffer (vorgewärmt auf 65 °C) direkt auf die Spin Filter Membran.
- Inkubieren Sie den Elution Buffer 3 Minuten bei RT und zentrifugieren Sie anschließend bei 11000 x g (11000 rpm) für 1 Minute.
- Verwerfen Sie den Spin Filter und lagern Sie das Elution Tube mit der eluierten Nukleinsäure sofort auf Eis.

Hinweis: Die DNA kann auch mit einem kleineren Volumen Elution Buffer eluiert werden (hängt von der zu erwartenden Ausbeute bakterieller DNA ab).

9. Problemlösung

Problem	Mögliche Ursache	Kommentare und Vorschläge
Verstopfter Spin Filter	Unzureichende Lyse, Homogenisierung und/oder zu viel Ausgangsmaterial	Erhöhung der Lyse-Zeit Erhöhung der Umdrehungskraft und/oder Zentrifugationszeit Reduzierung des Ausgangsmaterials Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur (15 – 30 °C) ausgeführt werden
Niedrige Menge an extrahierter DNA/RNA	Unzureichende Lyse Unvollständige Elution Unzureichendes Mixen der Probe mit der Binding Solution Unvollständiges Entfernen des Zellkultur-Mediums	Erhöhung der Lyse-Zeit Reduzierung des Ausgangsmaterials; Überladen des Spin Filters reduziert die Ausbeute Verlängerung der Inkubationszeit des vorgewärmten Elution Buffer auf 5 -10 min Verdopplung des Elutionsschrittes Elution Buffer Volumen erhöhen Die Probe ausreichend mit der Binding Solution durch auf- und abpipettieren vor der Überführung in den Spin Filter mischen Stellen Sie sicher, dass das Zellkultur- Medium vollständig entfernt ist.
Niedrige Konzentration extrahierter DNA/RNA	zuviel Elution Buffer Fehlerhafte Lagerung des Ausgangsmaterials	Verdopplung des Elutionsschrittes mit weniger Volumen des Elution Buffers Stellen Sie die korrekte Lagerung des Ausgangsmaterials sicher. Vermeiden Sie Auftauen des Materials.
DNA/RNA zeigt kein gutes Ergebnis in den nachfolgenden Anwendungen (z.B. RT-PCR oder PCR)	Verschleppung von Ethanol während der Elution Salzverschleppung während der Elution	Erhöhung der Umdrehungskraft und/oder Zentrifugationszeit bei Trockenschritt des Spin Filters Stellen Sie sicher, dass die Wash Buffer auf Raumtemperatur sind Überprüfung der Wash Buffer auf Salzpräzipitate. Wenn Präzipitate vorzufinden sind, diese mit vorsichtigem Erwärmen lösen.

10. Grenzen des Verfahrens

1. Das RIDA[®] Xtract Kit ist für humane Serumproben, Plasmaproben, Liquor, Zellkulturüberstand, andere zellfreie Körperflüssigkeiten (z.B. Urin), Abstrichproben, Gewebebiopsien und Stuhlproben validiert.
2. Frische oder gefrorene Plasma- oder Serumproben können Antikoagulantien wie EDTA oder Citrat enthalten. Heparinisierte Proben dürfen nicht verwendet werden.
3. Gefrorene Plasma- oder Serumproben dürfen nicht mehr als einmal aufgetaut werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen führt zur Denaturierung und Präzipitation von Proteinen, was zu einem geringeren Virustiter bzw. Bakterientiter und damit zu verminderter Ausbeute viraler/bakterieller Nukleinsäure führt. Darüber hinaus können Kryopräzipitate, die während des Einfrierens und Auftauens gebildet werden, die Spin Filter-Membran verstopfen.
4. Die mit Hilfe des RIDA[®] Xtract Verfahrens aufgereinigte Menge an DNA/RNA hängt von der Art der Probe, Probenquelle, -Transport, -Lagerung, -Alter und dem Virustiter bzw. Bakterientiter ab.
5. Alle diagnostischen Ergebnisse, die unter Verwendung dieser Probenpräparation in Verbindung mit einem nachfolgenden diagnostischen Test erzeugt werden, sollten im Hinblick auf andere klinische Befunde oder Laborbefunde interpretiert werden.
6. Die enthaltenen Bestandteile des Kits sind nur einmal verwendbar.
7. Abweichende Ausgangsmaterialien oder Ablaufprotokolle können zu einer Nicht-Funktionsfähigkeit bei nachfolgenden Anwendungen führen.
8. Der Benutzer ist dafür verantwortlich, die Leistungsfähigkeit des RIDA[®] Xtract Kits für jegliche Zwecke zu validieren.

11. Symbolerklärung

11.1 Allgemeine Symbole



Hersteller



Lotnummer



Artikelnummer



Herstellungsdatum



Verfall



Gebrauchsanweisung beachten



Lagerung bei



nicht wiederverwenden



Anzahl der Präparationen



Für die *in-vitro* Diagnostik

12. Anhang

12.1 Allgemeine Hinweise für den Umgang mit DNA

12.1.1 DNA Beschaffenheit

Die Länge und die empfindliche physikalische Beschaffenheit der DNA erfordern eine sorgfältige Handhabung, um Schäden durch Scherkräfte und enzymatischen Abbau zu vermeiden. Andere Faktoren, die die Integrität und Stabilität der DNA beeinflussen können sind saure und alkalische Zustände, hohe Temperaturen und UV-Bestrahlung. Um eine gute Performance in nachfolgenden Anwendungen zu garantieren, muss ein sorgfältiger Umgang mit DNA von hohem Molekulargewicht gegeben sein. Beschädigte DNA ist für nachfolgende Anwendungen wie genomisches Southern Blotting, long-template PCR und Herstellung von cosmid libraries ungeeignet.

12.1.2 Umgang mit frischem und gelagertem Material vor der DNA Extraktion

Verwenden Sie für die Extraktion von genomischer DNA aus Zellen oder Gewebe entweder frische Proben oder Proben, die sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert wurden. Dieses Verfahren minimiert die Degeneration der unbehandelten DNA, in dem die Aktivität der endogenen Nukleasen inhibiert wird.

12.1.3 Lagerung von DNA

Lagern Sie DNA bei 2 - 8 °C. Die Lagerung von genomischer DNA bei -15 – -25 °C kann zur Zerkleinerung der DNA führen, insbesondere wenn die DNA wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt ist. Plasmid-DNA oder andere kleine ringförmige DNA-Strukturen können bei 2 - 8 °C oder bei -15 – -25 °C gelagert werden.

12.1.4 Trocknen, Lösen und Pipettieren von DNA

Vermeiden Sie das Übertrocknen von genomischer DNA nach der Ethanol-fällung. Trocknen Sie die DNA an der Luft. Die Vakuumtrocknung kann verwendet werden, sollte aber vorsichtig durchgeführt werden. Plasmid DNA und andere kleine ringförmige DNA-Strukturen können im Vakuum getrocknet werden.

Um DNA lösen zu können, drehen Sie das Reaktionsgefäß nach Zugabe des Puffers vorsichtig mehrmals um und tippen Sie das Reaktionsgefäß vorsichtig an der Seite an. Alternativ lassen Sie die DNA in Puffer über Nacht bei 2 - 8 °C stehen. Vortexen Sie genomische DNA nur leicht, da dies zur Zerkleinerung von DNA führen kann.

Vermeiden Sie kräftiges Pipettieren. Pipettieren genomischer DNA durch kleine Spitzenöffnungen verursacht Schäden durch Zerkleinern oder Brechen. Eine Möglichkeit Schäden an der genomischen DNA zu vermeiden ist, spezielle Pipettenspitzen mit einer breiten Öffnung zum Pipettieren zu verwenden. Reguläre Pipettenspitzen stellen kein Problem für die Plasmid-DNA und andere kleine ringförmige DNA-Strukturen dar.

12.1.5 Quantifizierung

Die Quantifizierung der aus diesem Test gewonnenen DNA und RNA, muss mittels qPCR oder Reverse Transkriptase qPCR erfolgen. Alle anderen Methoden werden sowohl durch die integrierten Carrier Nucleic Acids als auch durch DNA oder RNA, die gemeinsam mit aufgereinigt wird, gestört.

12.2 Allgemeine Hinweise für den Umgang mit RNA

RNA ist weniger stabil als DNA. RNA ist sehr empfindlich gegenüber Schäden durch endogene RNasen im biologischen Material und exogenen RNasen, die immer im Labor vorhanden sind. Um zufriedenstellende, qualitative und quantitative Ergebnisse in den RNA-Präparationen zu erreichen, müssen Verunreinigungen mit exogenen RNasen so weit wie möglich reduziert werden. Vermeiden Sie jeden Umgang mit Bakterienkulturen, Zellkulturen oder anderen biologischen Quellen von RNasen im gleichen Labor, in dem die Aufreinigung der RNA durchgeführt wird.

Alle Glaswaren sollten vor Gebrauch behandelt werden, um sicherzustellen, dass sie RNase frei sind. Die Glasware sollte mit Reinigungsmittel gesäubert werden, gründlich gespült und bei 240 °C für vier oder mehr Stunden vor dem Gebrauch gebacken werden. Autoklavieren alleine inaktiviert viele RNasen nicht vollständig. Ofentrocknung inaktiviert zum einen RNasen und zum anderen wird sichergestellt, dass sich keine anderen Nukleinsäuren (z.B. Plasmid-DNA) auf der Oberfläche des

Glasen befinden. Sie können die Glasware auch mit 0,1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat) reinigen. Die Glasware muss 12 Stunden bei 37 °C und anschließend autoklaviert werden oder bis 100 °C für 15 Minuten erwärmt werden, um das restliche DEPC zu entfernen.

- Elektrophoresekammern sollten mit Reinigungslösung (z.B. 0,5 % SDS) gereinigt, gründlich mit RNase-freiem Wasser und dann mit Ethanol gespült und getrocknet werden.
- Nicht-Einweg Plastikware sollte vor Gebrauch behandelt werden, um sicherzustellen, dass es RNase frei ist. Plastikware sollte gründlich mit 0,1 M NaOH, und anschließend mit 1 mM EDTA RNase-freiem Wasser gespült werden. Sie können auch Chloroform-abweisende Plastikware mit Chloroform spülen, um RNasen zu inaktivieren.
- Alle Puffer müssen mit DEPC-behandeltem, RNase-freiem ddH₂O hergestellt werden.
- Handschuhe müssen häufig gewechselt werden und Reaktionsgefäße geschlossen gehalten werden.
- Verringern Sie die Präparationsschritte so weit wie möglich.
- Verwenden Sie nur sterile Einweg-Polypropylen-Reaktionsgefäße während des gesamten Verfahrens (diese Reaktionsgefäße sind in der Regel RNase frei).
- Verwahren Sie die isolierte RNA auf Eis.

Dieses Kit sollte nur von *in-vitro*-diagnostisch geschultem Laborpersonal benutzt werden.

12.2 Lagerung von RNA

Aufgereinigte RNA kann bei - 80 °C gelagert werden und ist für Monate und Jahre stabil.

12.2.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung der aus diesem Test gewonnenen DNA und RNA, muss mit qPCR oder Reverse Transkriptase qPCR erfolgen. Alle anderen Methoden werden sowohl durch die integrierten Carrier Nucleic Acids als auch durch DNA oder RNA, die gemeinsam mit aufgereinigt wird, gestört.

12.3 Carrier RNA

Carrier-RNA dient zwei Zwecken. Erstens erhöht sie die Bindung der viralen Nukleinsäure an die Spin Filter Membran (vor allem, wenn nur sehr wenige Zielmoleküle in der Probe vorhanden sind). Zweitens verringert die Zugabe von großen Mengen Carrier-RNA den möglichen Abbau viraler Nukleinsäure (sollten in seltenen Fällen RNase- oder DNase-Moleküle nicht durch die Salze und Detergenzien im Lysis Buffer im Reaction Tube denaturiert worden sein).

12.4 Ausbeute und Qualität von Erreger-DNA/RNA

Verschiedene Amplifikations-Systeme unterscheiden sich in der Effizienz abhängig von der Gesamtmenge der vorhandenen Nukleinsäure in der Reaktion. Eluate aus diesem Kit enthalten sowohl Erreger-DNA als auch Carrier-RNA. Die Menge der Carrier-RNA wird die Menge der Erregernukleinsäuren erheblich überschreiten.

Die Ausbeute von Erreger-DNA oder -RNA isoliert aus biologischen Proben beträgt normalerweise weniger als 1 µg und ist daher schwer photometrisch zu bestimmen.¹ Beachten Sie, dass die Carrier-RNA (5 g pro 200 µl Probe) den größten Anteil der vorhandenen DNA ausmachen wird.

Systeme, die gleichzeitig DNA und RNA isolieren, verwenden für die Bindung von DNA und RNA angepasste Puffer. Da die optimalen Bindungsbedingungen von RNA und DNA unterschiedlich sind, können solche Lösungen eine reduzierte Sensitivität aufweisen, im Vergleich zu Kits, die jeweils nur für DNA- oder RNA-Extraktion optimiert sind.

12.5 Nachfolgende Anwendungen

Aufgrund ihrer hohen Reinheit, ist die isolierte virale DNA/RNA und bakterielle DNA gebrauchsfertig für einen breiten Einsatzbereich von nachfolgenden Anwendungen:

- Real-time (RT)-PCR (z.B. TaqMan)
- cDNA Synthese
- Microarray-Anwendungen
- RFLP- Analyse

¹ Die mit diesem Kit extrahierte DNA erscheint in der Gelelektrophorese und Kapillarelektrophorese degradiert, das RIDA[®] Xtract Carrier-RNA enthält, welches Poly-A-RNA in Fragmenten von 100 bis 1000 Basen enthält. Das RIDA[®] Xtract ist nicht für Anwendungen mit dieser Art von Analyse geeignet.