



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

Simplex[®] Easy DNA Kit

DNA-Extraktion
aus Bakterien und Hefen

DNA-extraction
of bacteria and yeast



REF: Q001

Version 01/20

GEN-IAL GmbH
Tel: 0049 2241 2522980
Fax: 0049 2241 2522989
info@gen-ial.de
www.gen-ial.de

Simplex® Easy DNA Kit

1. Verwendungszweck

Schnelle und zuverlässige Extraktion von DNA aus Bakterien und Hefen

2. Packungsinhalt

Das Kit enthält Reagenzien für 100 bzw. 10 Extraktionen:

1 x Easy-Reagent (10 mL- 100 rxn. ; 1 mL- 10 rxn.)

3. Zusätzlich erforderliches Material

3.1. Geräte

- Heizblock oder Wasserbad 37 °C – 95 °C
- Zentrifuge passend für 1.5 – 2.0 mL Reaktionsgefäße
- Pipetten
- "Vortex"

3.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- für Hefe DNA-Extraktion: Lyticase (Sigma L2524 **in PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit)**)
- safe-lock Reaktionsgefäße 1.5 – 2.0 mL
- passende, sterile Filterspitzen
- Einweghandschuhe

4. Vorsichtsmaßnahmen

Grundsätzlich vorsichtiger Umgang mit Chemikalien. Nicht einatmen oder verschlucken. Haut- und Augenkontakt vermeiden.

5. Lagerung

Das Reagenz bei Raumtemperatur 15 – 30 °C lagern.

6. Anzeichen für Reagenzienverfall

Bei korrekter Handhabung keine bekannt.

7. Vorbereitungen

Lyticase Lösung herstellen:

5 U / μ L in Lyticasepuffer (50 % 1 x TE + 50 % Glycerol, pH-Wert 7,5 – 8,0)

Nach Herstellung bei -20 °C lagern.

In PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit)

8. DNA-Extraktion

8.1 DNA-Extraktion aus Bakterien

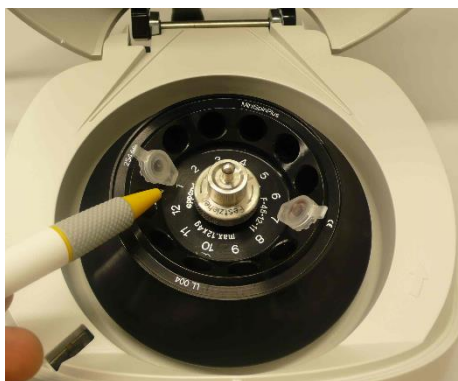
Hinweis:

Stark hefehaltige Proben sollten zuerst sequenziell zentrifugiert werden:

Dazu 1,5 mL Probe für 5 min. bei 580 x g zentrifugieren. 1 mL des Überstandes in ein 1.5 mL safe-seal Reaktionsgefäß überführen und nach dem folgenden Protokoll weiterverarbeiten

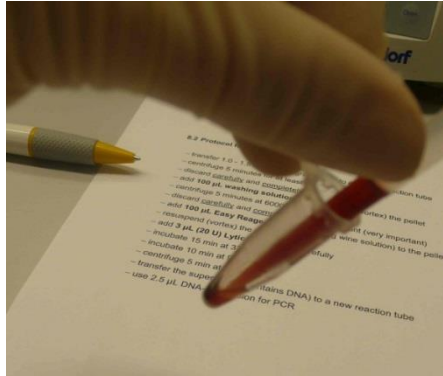
Protokoll:

1. die Probe gut mischen und 1 mL in ein 1.5 mL safe-lock Reaktionsgefäß geben
2. die Reaktionsgefäße immer in der gleichen Ausrichtung in die Zentrifuge stellen, so dass selbst bei nicht sichtbarem Pellet die Position des Pellets bekannt ist



3. 5 min. bei 15500 x g zentrifugieren

- den Überstand vorsichtig und vollständig immer von der gegenüberliegenden Seite zum Pellet abziehen. Das Pellet sollte die Größe eines Stecknadelkopfes nicht überschreiten (ca. 10^7 cfu / mL), bei größeren Zellzahlen nur 100 μ L der Bakterienkultur aufarbeiten



- das Pellet vollständig in **100 μ L Easy-Reagent** resuspendieren (vortexen oder pipettieren)
*Bei DNA-Extraktion aus Bakterienkolonien auf Nährmedienplatten: mit einer sterilen Impföse eine Kolonie oder einen Teil der Kolonie entnehmen und in **100 μ L Easy-Reagent** resuspendieren*
- 10 min. bei 95 °C inkubieren
- 5 min. bei 15500 x g zentrifugieren
- den Überstand (enthält DNA) in ein neues 1.5 mL safe-lock Reaktionsgefäß überführen, **Achtung:** keine Reste aus dem Pellet mitüberführen
- 2.5 μ L DNA in die PCR einsetzen

8.2 DNA-Extraktion aus Hefen

- die Probe gut mischen und 1 mL in ein 1.5 mL safe-lock Reaktionsgefäß geben
- die Reaktionsgefäße immer in der gleichen Ausrichtung in die Zentrifuge stellen, so dass selbst bei nicht sichtbarem Pellet die Position des Pellets bekannt ist
- 5 min. bei 15500 x g zentrifugieren
- den Überstand vorsichtig und vollständig immer von der gegenüberliegenden Seite zum Pellet abziehen. Das Pellet sollte die Größe eines Stecknadelkopfes nicht überschreiten (ca. 10^6 cfu / mL), bei größeren Zellzahlen nur 50-100 μ L der Hefekultur einsetzen
- das Pellet vollständig in **100 μ L Easy-Reagent** resuspendieren (vortexen oder pipettieren)
*Bei DNA-Extraktion aus Hefekolonien auf Nährmedienplatten: mit einer sterilen Impföse eine Kolonie oder einen Teil der Kolonie entnehmen und in **100 μ L Easy-Reagent** resuspendieren*

6. **3 µL (15 U) Lyticase** hinzugeben und gut mischen. In PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit) Punkt 7 entfällt und mit Punkt 8 fortfahren.
7. 15 min. bei 37 °C inkubieren
8. 10 min. bei 95 °C inkubieren
9. 5 min. bei 15500 x g zentrifugieren
10. den Überstand (enthält DNA) in ein neues 1.5 mL safe-lock Reaktionsgefäß überführen. **Achtung:** keine Reste aus dem Pellet mitüberführen
11. 2.5 µL DNA in die PCR einsetzen

Simplex[®] Easy DNA Kit

1. Intended use

Fast and optimal DNA-extraction from bacteria and yeast

2. Content

The kit contains reagents for 100 or 10 extractions:

1 x Easy-Reagent (10 mL- 100 rxn. ; 1 mL- 10 rxn.)

3. Materials required but not provided

3.1 Instruments:

- Heating block or waterbath 37 °C – 95 °C (98 ° - 203 °F)
- Microcentrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes
- Pipettes
- “Vortex”

3.2 Reagents and plastic ware:

- for yeast DNA-extraction: Lyticase (Sigma L2524) **in PCR-Kits with freeze-dried stripes the PCR-tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**
- sterile safe-lock reaction tubes 1.5 – 2.0 mL
- suitable filter tips
- single use gloves

4. Warnings

Careful use with personal protection according to good laboratory practice is recommended.

Do not incorporate. Avoid skin and eye contact with all solutions.

5. Storage

Store solution at room temperature 15 – 30 °C (59 – 86 °F)

6. Indications of deterioration of reagents

In case of accurate handling deterioration unknown

7. Preliminary preparations

Prepare Lyticase solution:

5U / μ L in lyticase buffer (50 % 1xTE+50 % Glycerol, pH-Wert 7.5 – 8.0). **In PCR-Kits with freeze-dried PCR stripes the tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**

Store solution at -20 °C (- 4 °F)

8. DNA-Extraction

8.1 DNA-Extraction from bacteria

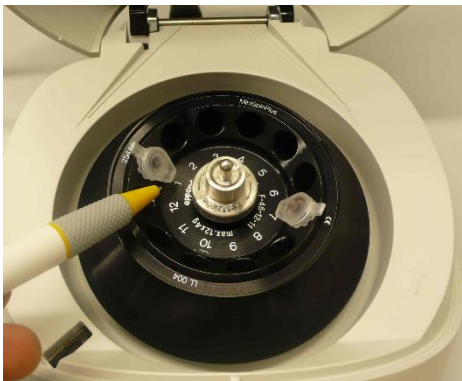
Hint:

Samples that contain a lot of yeast should be centrifuged as follows:

Centrifuge 1,5 mL sample for 5 minutes at 580 x g. Transfer 1 mL of the supernatant to a 1.5 mL safe-seal reaction tube and follow the protocol 8.1

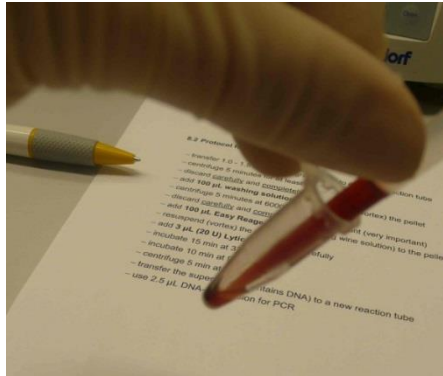
Protocol:

1. mix the sample and transfer 1.0 mL in a 1.5 mL safe-lock reaction tube
2. place the tube always in the same manner into the centrifuge (lid of the tube), so that even when no pellet will be visible, it will be clear where the cells/pellet will be



3. centrifuge 5 minutes at 15500 x g

- discard carefully and completely the supernatant. Aspirate from the opposite side of the pellet. The bacterial pellet should not be greater than a pinhead (e.g. 10^7 cfu / mL), otherwise take less sample volume (100 μ L of the sample)



- resuspend the pellet completely in **100 μ L Easy-Reagent** (vortex or pipetting)
For DNA-extraction from colonies: pick a colony or a part of it with a sterile inoculating loop and resuspend it in 100 μ L Easy-Reagent
- incubate 10 minutes at 95 °C (203 °F)
- centrifuge 5 minutes at 15500 x g
- transfer the supernatant (contains DNA) in a new 1.5 mL safe-lock reaction tube
Attention: transfer no pellet
- use 2.5 μ L DNA for PCR

8.2 DNA-Extraction from yeast

- mix the yeast sample and transfer 1 mL in a 1.5 mL safe-seal reaction tube
- place the tubes always in the same manner into the centrifuge (lid of the tube), so that even when no pellet will be visible, it will be clear where the cells/pellet will be
- centrifuge 5 minutes at 15500 x g
- discard carefully and completely the supernatant. Aspirate from the opposite side of the pellet. The bacterial pellet should not be greater than a pinhead (e.g. 10^6 cfu / mL), otherwise take less sample volume (50-100 μ L)
- resuspend the pellet completely in **100 μ L Easy-Reagent** (e.g. vortex)
For DNA-Extraction from yeast colonies: pick colony or a part of it with a sterile inoculating loop and resuspend it in 100 μ L Easy-Reagent
- add **3 μ L (15 U) Lyticase** and mix the sample. In PCR-Kits with freeze-dried PCR stripes the tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual). Continue with step 8.
- incubate 15 minutes at 37 °C (98 °F)
- incubate 10 minutes at 95 °C (203 °F)
- centrifuge 5 minutes at 15500 x g
- transfer the supernatant (contains DNA) in a new 1.5 mL safe-lock reaction tube
Attention: transfer no pellet
- use 2.5 μ L DNA for PCR