

CONGEN

SureFood® PREP Advanced

Art. No. S1053
50 extractions

User Manual

Efficient DNA preparation from highly processed food and feed



October 2024



Inhalt

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Kit-Inhalt und Lagerung	3
1.3	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
2	Protokoll 1	5
2.1	Prinzip	5
2.2	Vorbereitungen	5
2.3	Extraktionsprotokoll	5
3	Protokoll 2	7
3.1	Prinzip	7
3.2	Vorbereitungen	7
3.3	Extraktionsprotokoll	8
4	Weitere Informationen	9
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	9
4.2	Technischer Support	9
4.3	Vertrieb und Bestellung	9
5	Gefahrenhinweise	10



Content

1	General Information	12
1.1	Description	12
1.2	Kit components and storage	12
1.3	Additionally required equipment and materials	13
2	Protocol 1.....	14
2.1	Principle.....	14
2.2	Preparations.....	14
2.3	Extraction protocol.....	14
3	Protocol 2.....	16
3.1	Principle	16
3.2	Preparations.....	16
3.3	Extraction protocol.....	17
4	Further Information	18
4.1	Product Information.....	18
4.2	Technical Support	18
4.3	Distribution and Ordering	18
5	Safety information	19

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Dieses Kit dient der Extraktion pflanzlicher und tierischer DNA (Desoxyribonukleinsäure) und kann mit zwei unterschiedlichen Protokollen angewendet werden.

Die Durchführung gemäß Protokoll 1 dient der sensitiven Extraktion pflanzlicher und tierischer DNA von Allergenen aus Lebensmitteln gemäß Verordnung (EU) 1169/2011.

Die Durchführung gemäß Protokoll 2 dient der Extraktion pflanzlicher DNA aus stark prozessierten Lebens- und Futtermitteln sowie aus Proben, bei denen mit der Durchführung gemäß Protokoll 1 eine Inhibition in der Proben-DNA auftritt. Durch erneutes Binden und Aufreinigen der DNA an einen zweiten Spin Filter werden PCR-inhibitorische Substanzen effektiv entfernt.

1.2 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz/Material	Menge (je Box)
K	Proteinase K	1 Tube
H	PCR grade water	1 x 1,1 ml
L	Lysis Buffer	1 x 60 ml
B	Binding Buffer*	1 x 15 ml
P	Pre-Wash Buffer**	1 x 60 ml
W	Wash Buffer**	1 x 60 ml
E	Elution Buffer	1 x 10 ml
X	Elution Buffer X	1 x 12 ml
F	Spin Filter	1 x 50 Filter
S	Spin Filter	1 x 50 Filter
R	Receiver Tubes 2,0 ml	2 x 50 Tubes
T	Receiver Tubes 1,5 ml	1 x 50 Tubes

* Nach Zugabe von Isopropanol (nicht im Kit enthalten, siehe 1.3 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien)

** Nach Zugabe von Ethanol (nicht im Kit enthalten, siehe 1.3 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien)

Die Komponenten sind zu gleichen Teilen in zwei Verpackungseinheiten aufgeteilt.

Die Proteinase K muss nach der Zugabe von Wasser bei -20°C gelagert werden. Alle anderen Bestandteile des Kits sollten bei Raumtemperatur (14-25°C) gelagert werden.

Hinweis: Beim Einfrieren und wieder Auftauen der Proteinase K können Ausflockungen auftreten. Durch vortexen können die Ausflockungen wieder in Lösung gebracht werden und die Proteinase K ist wieder einsetzbar.

Stellen Sie vor jeder Extraktion sicher, dass alle Bestandteile Raumtemperatur haben. Wenn in den Lösungen Präzipitate erkennbar sind, erwärmen Sie die Lösungen vorsichtig (bis zu 30 °C) um diese zu lösen.

1.3 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- geeignete Geräte für die Probenzerkleinerung und -homogenisierung
- Feinwaage und Spatel zum Einwiegen der Proben
- DNA- und DNase-freie Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2,0 ml
- wasserfester Stift und Etiketten zum Beschriften der Reaktionsgefäße
- puderfreie Einmalhandschuhe
- Pipetten und Pipettenspitzen mit Filtern
- Vortexmischer
- Thermomixer/Heizblock (bis 65°C)
- Mikrozentrifuge (bis 12.000 rpm)
- Ethanol zum Auffüllen von Pre-Wash Buffer und Wash Buffer (reinst, $\geq 96\%$)
- Isopropanol zum Auffüllen des Binding Buffer (z.B. Carl Roth 2-Propanol Rotipur® >99,7%; Applichem 2-Propanol für Mikrobiologie; Sigma-Aldrich 2-Propanol)
- Abwurfbeutel oder ähnliches Abfallbehältnis

Ein Fließschema zur grafischen Unterstützung des Extraktionsprotokolls steht auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <http://www.congen.de/download>.

2 Protokoll 1

Die Durchführung gemäß Protokoll 1 dient der sensitiven Extraktion pflanzlicher und tierischer DNA von Allergenen aus Lebensmitteln gemäß Verordnung (EU) 1169/2011.

2.1 Prinzip

1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials
2. Lyse des Ausgangsmaterials
3. Vorfiltration und Einstellung optimaler Bindungsbedingungen
4. Bindung der DNA an einen Spin Filter
5. Aufreinigung der gebundenen DNA
6. Trocknen des Spin Filters
7. Elution der DNA vom Spin Filter

2.2 Vorbereitungen

Allgemein

Aufnahme der Proteinase K (**Code K**) durch Zugabe von 1 ml PCR grade water (**Code H**).

Auffüllen des Binding Buffers (**Code B**) durch Zugabe von 11 ml Isopropanol und mischen.

Auffüllen des Pre-Wash Buffers (**Code P**) durch Zugabe von 30 ml Ethanol und mischen.

Auffüllen des Wash Buffers (**Code W**) durch Zugabe von 42 ml Ethanol und mischen.

Vor jeder Präparation

Vorwärmen des Elution Buffers (**Code E**) - Überführen der benötigten Menge unter Einrechnung einer Reservemenge an Elution Buffer in ein Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten).

Inkubation bei 65°C. Der Elution Buffer wird in Schritt 7 benötigt.

2.3 Extraktionsprotokoll

1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials

Von einer repräsentativen, homogenisierten Probe werden 100 mg* in ein 2,0 ml Tube eingewogen (nicht im Kit enthalten).

* Die Einwaage kann in Abhängigkeit von den Matrixeigenschaften variiert werden. Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

2. Lyse des Ausgangsmaterials

Zugabe von 580 µl Lysis Buffer (**Code L**) und 20 µl Proteinase K (**Code K**) zu der Probe. Im Anschluss die Probe auf einem Vortexmischer gut vermischen.

Inkubation bei 65°C für 60 min unter kontinuierlichem Schütteln im Thermomixer/Heizblock.

Hinweis: Bei stark quellenden Proben kann es notwendig sein, während der Lyse zusätzlich Lysis Buffer hinzuzufügen.

3. Vorfiltration und Einstellung optimaler Bindungsbedingungen

Zentrifugation des Lysates für 1 min bei 12.000 rpm.

Den flüssigen Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten) überführen und erneut für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugieren.

Einen Spin Filter (**Code F – for pre-filtration**) in ein 2,0 ml Receiver Tube (**Code R**) einsetzen.

400 µl des flüssigen Überstands auf den Spin Filter geben.

Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Den verwendeten Spin Filter verwerfen.

4. Bindung der DNA an einen Spin Filter

250 µl des Binding Buffers (**Code B**) zu dem Filtrat geben und gut vermischen.

Einen Spin Filter (**Code S –for binding**) in ein neues 2,0 ml Receiver Tube (**Code R**) setzen.

Die komplette Lösung auf den Spin Filter überführen und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube setzen.

5. Aufreinigung der gebundenen DNA

550 µl Pre-Wash Buffer (**Code P**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

550 µl Wash Buffer (**Code W**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

Erneut 550 µl Wash Buffer (**Code W**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

6. Trocknen des Spin Filters

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm, um Ethanolreste von dem Spin Filter zu entfernen.

7. Elution der DNA vom Spin Filter

Den Spin Filter in ein 1,5 ml Receiver Tube (**Code T**) setzen.

Zugabe von 50 µl des erwärmten (65°C) Elution Buffers (**Code E**).

Inkubation bei 65°C für 3 min in einem Heizblock/Thermomix (nicht schütteln).

Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Den Spin Filter anschließend verwerfen.

Die eluierte DNA kann direkt in die PCR eingesetzt oder bis zu 24 Stunden bei +4°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollte die DNA bei -20°C aufbewahrt werden.

3 Protokoll 2

Die Durchführung gemäß Protokoll 2 dient der Extraktion pflanzlicher DNA aus stark prozessierten Lebens- und Futtermitteln sowie aus Proben, bei denen mit der Durchführung gemäß Protokoll 1 eine Inhibition in der Proben-DNA auftritt. Durch erneutes Binden und Aufreinigen der DNA an einen zweiten Spin Filter werden PCR-inhibitorische Substanzen effektiv entfernt.

3.1 Prinzip

1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials
2. Lyse des Ausgangsmaterials
3. Vorfiltration und Einstellung optimaler Bindungsbedingungen
4. Bindung der DNA an einen Spin Filter
5. Aufreinigung der gebundenen DNA
6. Trocknen des Spin Filters
7. Erste Elution der DNA vom Spin Filter
8. Erneutes Einstellen optimaler Bindungsbedingungen
9. Erneute Bindung der DNA an einen Spin Filter
10. Zweite Aufreinigung der gebundenen DNA
11. Trocknen des Spin Filters
12. Elution der DNA vom Spin Filter

3.2 Vorbereitungen

Allgemein

Aufnahme der Proteinase K (**Code K**) durch Zugabe von 1 ml PCR grade water (**Code H**).

Auffüllen des Binding Buffers (**Code B**) durch Zugabe von 11 ml Isopropanol und mischen.

Auffüllen des Pre-Wash Buffers (**Code P**) durch Zugabe von 30 ml Ethanol und mischen.

Auffüllen des Wash Buffers (**Code W**) durch Zugabe von 42 ml Ethanol und mischen.

Vor jeder Präparation

Vorwärmen des Elution Buffer X (**Code X**) und Elution Buffers (**Code E**) - Überführen der benötigten Menge unter Einrechnung einer Reservemenge an Elution Buffer X und Elution Buffer in jeweils ein Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten).

Incubation bei 65°C. Der Elution Buffer X wird in Schritt 7, der Elution Buffer in Schritt 12 benötigt.

3.3 Extraktionsprotokoll

1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials

Von einer repräsentativen, homogenisierten Probe werden 150 mg* in ein 2,0 ml Tube eingewogen (nicht im Kit enthalten).

* Die Einwaage kann in Abhängigkeit von den Matriceigenschaften variiert werden. Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

2. Lyse des Ausgangsmaterials

Zugabe von 580 µl Lysis Buffer (**Code L**) und 20 µl Proteinase K (**Code K**) zu der Probe. Im Anschluss die Probe auf einem Vortexmischer gut vermischen.

Inkubation bei 65°C für 30 min unter kontinuierlichem Schütteln im Thermomixer/Heizblock.

Hinweis: Bei stark quellenden Proben kann es notwendig sein, während der Lyse zusätzlich Lysis Buffer hinzuzufügen.

3. Vorfiltration und Einstellung optimaler Bindungsbedingungen

Zentrifugation des Lysates für 1 min bei 12.000 rpm.

Einen Spin Filter (**Code F – for pre-filtration**) in ein 2,0 ml Receiver Tube (**Code R**) einsetzen. 400 µl des flüssigen Überstands auf den Spin Filter geben.

Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Den verwendeten Spin Filter verwerfen.

4. Bindung der DNA an einen Spin Filter

250 µl des Binding Buffers (**Code B**) zu dem Filtrat geben und gut vermischen.

Einen Spin Filter (**Code S – for binding**) in ein neues 2,0 ml Receiver Tube (**Code R**) setzen.

Die komplette Lösung auf den Spin Filter überführen und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube setzen.

5. Aufreinigung der gebundenen DNA

550 µl Pre-Wash Buffer (**Code P**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

550 µl Wash Buffer (**Code W**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

6. Trocknen des Spin Filters

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm, um Ethanolreste von dem Spin Filter zu entfernen.

7. Elution der DNA vom Spin Filter

Den Spin Filter in ein neues 2,0 ml Receiver Tube (**Code R**) setzen.

Zugabe von 200 µl des erwärmten (65°C) Elution Buffers X (**Code X**).

Inkubation bei 65°C für 3 min in einem Heizblock/Thermomix (nicht schütteln).

Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Den Spin Filter anschließend verwerfen.

8. Erneutes Einstellen optimaler Bindungsbedingungen

Zu den 200 µl Eluat von Schritt 7 werden 200 µl Lysis Buffer (**Code L**) und 200 µl Binding Buffer (**Code B**) gegeben und gut vermischt.

9. Erneute Bindung der DNA an einen Spin Filter

Einen neuen Spin Filter (**Code S – for binding**) in ein neues 2,0 ml Receiver Tube (**Code R**) setzen. Die komplette Lösung aus Schritt 8 auf den Spin Filter überführen und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und Spin Filter wieder in das Receiver Tube setzen.

10. Zweite Aufreinigung der gebundenen DNA

550 µl Pre-Wash Buffer (**Code P**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

550 µl Wash Buffer (**Code W**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

11. Trocknen des Spin Filters

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm, um Ethanolreste von dem Spin Filter zu entfernen.

12. Elution der DNA vom Spin Filter

Den Spin Filter in ein 1,5 ml Receiver Tube (**Code T**) setzen.

Zugabe von 50 µl des erwärmten (65°C) Elution Buffers (**Code E**).

Inkubation bei 65°C für 3 min in einem Heizblock/Thermomix (nicht schütteln).

Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Den Spin Filter anschließend verwerfen.

Hinweis: Die DNA kann auch mit einem größeren Volumen (100 - 200 µl) an Elution Buffer eluiert werden, je nach erwartetem DNA-Gehalt.

Die eluierte DNA kann direkt in die PCR eingesetzt oder bis zu 24 Stunden bei +4°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollte die DNA bei -20°C aufbewahrt werden.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Fließschema (Download: www.congen.de/download)
- Validierungsdaten auf Anfrage
- Material Safety Data Sheet (Download: www.congen.de/eifu/)

4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

4.3 Vertrieb und Bestellung

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstrasse 17,
64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

r-biopharm®



5 Gefahrenhinweise

Lysis Buffer



Achtung

H319-H412
P264-P273-P280-P305+P351+P338-
P337+P313-P501

Pre-Wash Buffer



Achtung

H302-H315-H319
P264-P270-P280-P301+P312-P302+P352-
P305+P351+P338-P321-P330-P332+P313-
P337+P313-P362+P364-P501

Proteinase K



Gefahr

H315-H319-H334-H335
P261-P264-P271-P280-P284-P302+P352-
P304+P340-P305+P351+P338-P312-P501

- H302:** Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H315: Verursacht Hautreizungen.
H319: Verursacht schwere Augenreizung.
H334: Kann beim Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335: Kann die Atemwege reizen.
H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264: Nach Gebrauch Hände, Arme und Gesicht gründlich waschen.
P270: Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271: Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P284: [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen.
P301+P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P302+P352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
P304+P340: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

- P312:** Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P321:** Besondere Behandlung (siehe ergänzende Erste-Hilfe-Anleitung auf diesem Kennzeichnungsetikett).
Mund ausspülen.
- P330:** Mund ausspülen.
- P332+P313:** Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P337+P313:** Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P362+P364:** Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P501:** Inhalt/Behälter gemäß der örtlichen, regionalen, nationalen und/oder Internationalen Vorschriften bei einer Sammelstelle für gefährliche Abfälle oder Sondermüll entsorgen.

Für weitere Informationen steht das Sicherheitsdatenblatt auf www.congen.de/eifu/ zur Verfügung.
Alternativ wenden Sie sich an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

1 General Information

1.1 Description

This kit is intended to be used for the extraction of animal and plant DNA (deoxyribonucleic acid). It can be used with two different protocols.

The DNA extraction protocol 1 is designed for the sensitive extraction of animal and plant DNA from food according to regulation (EU) 1169/2011.

The DNA extraction protocol 2 is designed for the extraction of plant DNA from highly processed food and feed. Furthermore, it can be used for samples that produce PCR inhibiting DNA extracts when extracted with protocol 1. Potentially occurring PCR inhibiting substances are efficiently removed in additional binding and purification steps.

1.2 Kit components and storage

Kit Code	Reagent /Material	Amount (per box)
K	Proteinase K	1 Tube
H	PCR grade water	1 x 1.1 ml
L	Lysis Buffer	1 x 60 ml
B	Binding Buffer*	1 x 15 ml
P	Pre-Wash Buffer**	1 x 60 ml
W	Wash Buffer**	1 x 60 ml
E	Elution Buffer	1 x 10 ml
X	Elution Buffer X	1 x 12 ml
F	Spin Filter	1 x 50 Filter
S	Spin Filter	1 x 50 Filter
R	Receiver Tubes 2,0 ml	2 x 50 Tubes
T	Receiver Tubes 1,5 ml	1 x 50 Tubes

*After adding isopropanol (not supplied with the kit, see 1.3 additionally required equipment and materials)

**After adding ethanol (not supplied with the kit, see 1.3 additionally required equipment and materials)

The components are equally divided into two boxes.

After addition of water the Proteinase K should be stored at -20°C. All other reagents of the kit should be stored dry and at room temperature (14-25°C).

Note: After freezing and thawing of the Proteinase K flocculation may occur. Through vortexing the precipitation solves and the Proteinase K can be used again.

Before every extraction make sure that all components have room temperature. If there are any precipitates within the provided solutions, solve them by warming carefully (up to 30°C).

1.3 Additionally required equipment and materials

- suitable equipment for sample comminution and homogenization
- micro balance and spatula for weighing the samples
- reaction tubes free from DNA and DNase 1.5 ml; 2.0 ml
- waterproof pen and tags for labeling the reaction tubes
- unpowdered disposable gloves
- pipettes with filter tips
- Vortex mixer
- Thermomixer/ heating block (up to 65°C)
- micro centrifuge (up to 12,000 rpm)
- ethanol for preparation of Wash Buffer (puriss., purity \geq 96%)
- isopropanol for preparation of Binding Buffer (e.g. Carl Roth 2-Propanol Rotipuran® >99.7; Applichem 2-Propanol for microbiologie; Sigma-Aldrich 2-Propanol)

A flow chart for visualization of the extraction protocol is available at the CONGEN homepage: <http://www.congen.de/en/downloads>.

2 Protocol 1

The DNA extraction protocol 1 is designed for the sensitive extraction of animal and plant DNA from food according to regulation (EU) 1169/2011.

2.1 Principle

1. Preparation of the basic material
2. Lysis of the basic material
3. Pre-filtration and setting of optimal binding conditions
4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter
5. Purification of the bound nucleic acids
6. Drying of the Spin Filter
7. Elution of nucleic acids from the Spin Filter

2.2 Preparations

General

Add 1 ml PCR grade water (**Code H**) to the Proteinase K (**Code K**) and mix thoroughly.

Add 11 ml isopropanol to the Binding Buffer (**Code B**) and mix thoroughly.

Add 30 ml ethanol to the Pre-Wash Buffer (**Code P**) and mix thoroughly.

Add 42 ml ethanol to the Wash Buffer (**Code W**) and mix thoroughly.

Before each preparation

Preheating the Elution Buffer (**Code E**) - Transfer the needed amount of Elution Buffer (**Code E**) under calculation of a reserve volume into a reaction tube (not provided with the kit).

Equilibrate the Elution Buffer to 65°C. The Elution Buffer is necessary for step 7.

2.3 Extraction protocol

1. Preparation of the basic material

Transfer 100 mg* homogenized sample material into a 2.0 ml reaction tube (not provided with the kit).

* The sample amount depends on the specific sample matrix. For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

2. Lysis of the basic material

Add 580 µl of Lysis Buffer (**Code L**) and 20 µl of Proteinase K (**Code K**) to the reaction tube and mix it briefly.

Incubate on a heating block under continuously shaking for 60 minutes at 65°C.

Note: For strongly swelling samples it can be necessary to add additional volume of Lysis Buffer during the lysis.

3. Pre-filtration and setting of optimal binding conditions

Centrifuge the sample lysate for 1 min at 12,000 rpm.

Transfer the liquid supernatant into a new 1.5 ml reaction tube (not supplied with the kit) and centrifuge again for 1 min at 12,000 rpm.

Place a Spin Filter (**Code F – for pre-filtration**) into a 2.0 ml Receiver Tube (**Code R**). Take 400 µl supernatant from the last centrifugation step and transfer the liquid directly onto the Spin Filter.

Centrifuge the Spin Filter with the Receiver Tube for 1 min at 12,000 rpm. After centrifugation discard the Spin Filter.

4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter

Add 250 µl Binding Buffer (**Code B**) to the filtrate and mix.

Place a Spin Filter (**Code S – for binding**) into a new 2.0 ml Receiver Tube (**Code R**).

Transfer the complete solution onto the Spin Filter. Incubate at room temperature for 1 min.

Centrifuge the Spin Filter with the Receiver Tube for 1 min at 12,000 rpm. After centrifugation discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

5. Purification of the bound nucleic acids

Add 550 µl Pre-Wash Buffer (**Code P**) to the Spin Filter and centrifuge at 1 min for 12,000 rpm.

Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

Add 550 µl Wash Buffer (**Code W**) to the Spin Filter and centrifuge at 1 min for 12,000 rpm.

Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

Once more add 550 µl Wash Buffer (**Code W**) to the Spin Filter and centrifuge at 1 min for 12,000 rpm.

Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

6. Drying of the Spin Filter

Remove the residual ethanol by final centrifugation for 2 min at 12,000 rpm.

7. Elution of nucleic acids from the Spin Filter

Place the Spin Filter into a 1.5 ml Receiver Tube (**Code T**).

Add 50 µl of the preheated (65°C) Elution Buffer (**Code E**) directly onto the Spin Filter.

Incubate on a heating block for 3 min at 65°C (no shaking).

Centrifuge for 1 min at 10,000 rpm. After centrifugation discard the Spin Filter.

The eluted DNA is ready-to-use for the PCR. The DNA can be stored for up to 24 hours at +4°C. For a storage time of more than 24 hours it should be kept at -20°C.

3 Protocol 2

The DNA extraction protocol 2 is designed for the extraction of plant DNA from highly processed food and feed. Furthermore, it can be used for samples that produce PCR inhibiting DNA extracts when extracted with protocol 1. Potentially occurring PCR inhibiting substances are efficiently removed in additional binding and purification steps.

3.1 Principle

1. Preparation of the basic material
2. Lysis at 65°C
3. Pre-filtration and setting of optimal binding conditions
4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter
5. Purification of the bound nucleic acids
6. Drying of the Spin Filter
7. First Elution of nucleic acids from the Spin Filter
8. Repeated setting of optimal binding conditions
9. Second binding of the nucleic acids on a Spin Filter
10. Second purification of the bound nucleic acids
11. Drying of the Spin Filter
12. Elution of nucleic acids from the Spin Filter for analysis

3.2 Preparations

General

Add 1 ml PCR grade water (**Code H**) to the Proteinase K (**Code K**) and mix thoroughly.

Add 11 ml isopropanol to the Binding Buffer (**Code B**) and mix thoroughly.

Add 30 ml ethanol to the Pre-Wash Buffer (**Code P**) and mix thoroughly.

Add 42 ml ethanol to the Wash Buffer (**Code W**) and mix thoroughly.

Before each preparation

Preheating the Elution Buffer X (**Code X**) and Elution Buffer (**Code E**) - Transfer the needed amount under calculation of a reserve volume of Elution Buffer X (**Code X**) and Elution Buffer (**Code E**) into a reaction tube (not provided with the kit).

Equilibrate the Elution Buffer X and Elution Buffer to 65°C. The Elution Buffer X is necessary for step 7 and Elution Buffer is necessary for step 12.

3.3 Extraction protocol

1. Preparation of the basic material

Transfer 150 mg* homogenized sample material into a 2.0 ml reaction tube (not provided with the kit).

* The sample amount depends on the specific sample matrix. For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

2. Lysis of the basic material

Add 580 µl of Lysis Buffer (**Code L**) and 20 µl of Proteinase K (**Code K**) to the reaction tube and mix it briefly. Incubate on a heating block under continuously shaking for 30 minutes at 65°C.

Note: For strongly swelling samples it can be necessary to add additional volume of Lysis Buffer during the lysis.

3. Pre-filtration and setting of optimal binding conditions

Centrifuge the sample lysate for 1 min at 12,000 rpm.

Place a Spin Filter (**Code F – for pre-filtration**) into a 2.0 ml Receiver Tube (**Code R**).

Take 400 µl supernatant from the last centrifugation step and transfer the liquid directly onto the Spin Filter.

Centrifuge the Spin Filter with the Receiver Tube for 1 min at 12,000 rpm. After centrifugation discard the Spin Filter.

4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter

Add 250 µl Binding Buffer (**Code B**) to the filtrate and mix the sample.

Place a Spin Filter (**Code S – for binding**) into a new 2.0 ml Receiver Tube (**Code R**).

Transfer the complete solution onto the Spin Filter. Incubate at room temperature for 1 min.

Centrifuge for 1 min at 12,000 rpm. Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

5. Purification of the bound nucleic acids

Add 550 µl Pre-Wash Buffer (**Code P**) to the Spin Filter and centrifuge at 1 min for 12,000 rpm.

Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

Add 550 µl Wash Buffer (**Code W**) to the Spin Filter and centrifuge at 1 min for 12,000 rpm.

Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

6. Drying of the Spin Filter

Remove the residual ethanol by centrifugation for 2 min at 12,000 rpm.

7. Elution of nucleic acids from the Spin Filter

Place the Spin Filter into a new 2.0 ml Receiver Tube (**Code R**).

Add 200 µl of the preheated (65°C) Elution Buffer X (**Code X**) directly onto the Spin Filter.

Incubation on a heating block for 3 min at 65°C (no shaking).

Centrifuge for 1 min at 10.000 rpm. After centrifugation discard the Spin Filter.

8. Repeated setting of optimal binding conditions

Add 200 µl of Lysis Buffer (**Code L**) and 200 µl of Binding Buffer (**Code B**) to the 200 µl filtrate from step 7 and mix thoroughly.

9. Second binding of nucleic acids on a Spin Filter

Place a new Spin Filter (**Code S – for binding**) into a new 2.0 ml Receiver Tube (**Code R**). Transfer the complete solution from step 8 onto the Spin Filter. Incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge for 1 min at 12,000 rpm. Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

10. Second purification of the bound nucleic acids

Add 550 µl Pre-Wash Buffer (**Code P**) to the Spin Filter and centrifuge at 1 min for 12,000 rpm. Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

Add 550 µl Wash Buffer (**Code W**) to the Spin Filter and centrifuge at 1 min for 12,000 rpm. Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

11. Drying of the Spin Filter

Remove the residual ethanol by final centrifugation for 2 min at 12,000 rpm.

12. Elution of nucleic acids from the Spin Filter for analysis

Place the Spin Filter into a new 1.5 ml Receiver Tube (**Code T**).

Add 50 µl of the preheated (65°C) Elution Buffer (**Code E**) directly onto the Spin Filter.

Incubation on a heating block for 3 min at 65°C (no shaking).

Centrifuge for 1 min at 10,000 rpm. After centrifugation discard the Spin Filter.

Note: The DNA can also be eluted with a higher volume (100 - 200 µl) of Elution Buffer, depending on the expected yield of DNA.

The eluted DNA is ready-to-use for the PCR. The DNA can be stored for up to 24 hours at +4°C. For a storage time of more than 24 hours it should be kept at -20°C.

4 Further Information

4.1 Product Information

- Flow chart (Download: www.congen.de/en/downloads)
- Validation Report upon request
- Material Safety Data Sheet (Download: www.congen.de/en/eifu/)

4.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

4.3 Distribution and Ordering

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstrasse 17,
64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com



5 Safety information

Lysis Buffer



Warning

H319-H412
P264-P273-P280-P305+P351+P338-
P337+P313-P501

Pre-Wash Buffer



Warning

H302-H315-H319
P264-P270-P280-P301+P312-P302+P352-
P305+P351+P338-P321-P330-P332+P313-
P337+P313-P362+P364-P501

Proteinase K



Danger

H315-H319-H334-H335
P261-P264-P271-P280-P284-P302+P352-
P304+P340-P305+P351+P338-P312-P501

H302:	Harmful if swallowed.
H315:	Causes skin irritation.
H319:	Causes serious eye irritation.
H334:	May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.
H335:	May cause respiratory irritation.
H412:	Harmful to aquatic life with long lasting effects.
P261:	Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P264:	Wash hands, forearms and face thoroughly after handling.
P270:	Do not eat, drink or smoke when using this product.
P271:	Use only outdoors or in a well-ventilated area.
P273:	Avoid release to the environment.
P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P284:	Wear respiratory protection.
P301+P312:	IF SWALLOWED: Call a POISON CENTRE or doctor if you feel unwell.
P302+P352:	IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
P304+P340:	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.
P305+P351+P338:	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

- P312:** Call a POISON CENTRE or doctor if you feel unwell.
- P321:** Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).
- P330:** Rinse mouth.
- P332+P313:** If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
- P337+P313:** If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
- P362+P364:** Take off contaminated clothing and wash it before reuse.
- P501:** Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point, in accordance with local, regional, national and/or international regulation.

For further information we offer a Material Safety Data Sheet, see at www.congen.de/en/eifu/.
Alternatively please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.