



Genomische DNA aus Blut

Handbuch

NucleoSpin® Dx Blood

CE

IVD

In-Vitro Diagnostikum

REF

740899.50, 740899.250



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG,
D-52355 Düren, Tel: +49 (0) 2421 969-0

















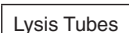


September 2009 / Rev. 01

Inhalt

1	Kit Inhalt	4
1.1	Kit Inhalt	4
1.2	Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung	6
1.3	Über dieses Handbuch	6
2	Produktbeschreibung	7
2.1	Zweckbestimmung	7
2.2	Anwendungsbeschränkungen	7
2.3	Qualitätskontrolle	7
2.4	Einleitung und Kit-Spezifikationen	8
2.5	Elution	9
3	Lagerung und Vorbereitung der Reagenzien und Puffer	11
4	Sicherheitshinweise – Risiko- und Sicherheitssätze	13
5	Aufreinigung genomischer DNA mit NucleoSpin® Dx Blood	15
5.1	Übersichtsprotokoll	16
5.2	Protokoll zur Aufreinigung genomischer DNA mit NucleoSpin® Dx Blood	17
6	Anhang	19
6.1	Behebung von Problemen	19
6.2	Bestellinformationen	21
6.3	Anwendungseinschränkung/Gewährleistung	22

1 Kit Inhalt











1.1 Kit Inhalt











NucleoSpin® Dx Blood				
Kat. Nr.		50 Präp. 740899.50	250 Präp. 740899.250	
Buffer B3	 	13 ml	65 ml	
Wash Buffer BW	 	30 ml	2 x 75 ml	
Wash Buffer B5 (Concentrate)*	  	7 ml	2 x 20 ml	
Elution Buffer BE**	 	13 ml	60 ml	
Proteinase Buffer PB	 	1.8 ml	8 ml	
Proteinase K (lyophilized)*		30 mg	2 x 75 mg	
NucleoSpin® Dx Blood Columns (red rings - plus Collection Tubes)		50	250	
Collection Tubes (2 ml)		3 x 50	3 x 250	
Lysis Tubes (1.5 ml)		50	5 x 50	
Elution Tubes (1.5 ml)		50	5 x 50	
Handbuch		1	1	

* Zubereitung der Puffer und Lagerbedingungen: Siehe Kapitel 3

** Zusammensetzung des *Elution Buffer BE*: 5 mM Tris/HCl; pH 8,5

Genomische DNA aus Blut

										
EN	Do not reuse	Use by	Batch code	Catalogue number	Contains sufficient for <n> tests	Manufacturer	In Vitro Diagnostic Medical Device	Consult Instructions for use	Temperature limitation	Irritant
DE	Nicht zur Wiederverwendung	Verwendbar bis	Char- genbe- zeich- nung	Bestell- nummer	Inhalt ausrei- chend für <n> Tests	Herstel- ler	In-Vitro-Diag- nosti- kum	Ge- brauchs- anwei- sung beach- ten	Tempe- ratur- begren- zung	Reizend
ES	No reutilizar	Fecha de cadu- cidad	Código de lote	Número de cata- logo	Con- tenido sufi- ciente para <n> ensayos	Fabri- cante	Pro- ducto sanitario para diagnós- tico in vitro	Con- sulte las instrucciones de uso	Límite de tempe- ratura	Irritante
IT	Non riutiliz- zare	Utilizza- re entro	Codice del lotto	Numero di cata- logo	Con- tenuto sufi- ciente per "n" saggi	Fabbri- cante	Dispo- sitivo medico- diagnosti- co in vitro	Con- sultare le istruzio- ni per l'uso	Limiti di tempe- ratura	Irritant
FR	Ne pas réutiliser	Utiliser jusque	Code du lot	Réfé- rence du cata- logue	Contenu suffisant pour "n" tests	Fabri- cant	Dis- positif médical de diag- nostic in vitro	Con- sultez les instruc- tions d'utilisa- tion	Limites de tempé- rature	Irritante
NL	Niet opnieuw gebruiken	Houd- baar tot	Lot num- mer	Cata- logus nummer	Inhoud vol- doende voor "n" testen	Fabri- kant	Medisch hulpmid- del voor in-vitro diagnos- tie	Raad- pleeg de ge- bruiks- aanwij- zing	Tempe- ratuurli- miet	Irritie- rend
DA	Må ikke genbruges	Holdbar til	Lotnum- mer	Katalog- nummer	Inde- holder tilstræk- keligt til „n“ test	Pro- ducen	Medi- cinsk udstyr til in vitro diagno- stik	Se brugsan- visning	Tempe- raturbe- græns- ning	Lokalirri- terende
EL	Μην κάνετε επανα- ληπτική χρήση	Ημερο- μηνία λήξης	Αριθμός Παρτι- δας	Αριθμός καταλό- γου	Περιε- χόμενο επαρκές για «n» εξετά- σεις	Κατα- σκευα- στής	In Vitro Διαγνο- στικό Ιατρο- τεχνολο- γικό προϊόν	Συμβου- λευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Περιο- ρισμοί θερμο- κρασίας	Διαβρω- τικό
PT	Não reutilizar	Prazo de vali- dade	Código do lote	Referên- cia de catálogo	Conteú- do sufi- ciente para "n" ensaios	Fabri- cante	Dispo- sitivo médico para diag- nóstico in vitro	Consulte as in- struções de utili- zação	Limites de tempe- ratura	Irritante

										
SV	Återanvänd ej	Använd för	Lot nummer	Katalognummer	Räcker till „n“ antal tester	Tillverkare	Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik	Se handhåndsbeskrivningarna	Temperaturbegränsning	Irriterande

1.2 Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung

Reagenzien

- 96 – 100% Ethanol (zur Einstellung der DNA-Bindebedingungen und zur Zubereitung von *Wash Buffer B5*)

Verbrauchsmaterialien

- Einweg-Pipettenspitzen (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen werden Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere empfohlen)

Ausrüstung

- Pipetten
- Mikrozentrifuge
- Vortex Mixer
- Heizblock oder Wasserbad (für die Lyse der Proben bei 70°C)
- Persönliche Schutzausrüstung (z.B. Laborkittel, Handschuhe, Schutzbrille)

1.3 Über dieses Handbuch

Es wird empfohlen die ausführliche Protokollbeschreibung in diesem Handbuch zu lesen. Das Übersichtsprotokoll ist nur ein zusätzliches Hilfsmittel zur schnellen Übersicht während der Aufreinigung. MACHEREY-NAGEL Handbücher stehen im Internet zur Verfügung: www.mn-net.com.

2 Produktbeschreibung

2.1 Zweckbestimmung

NucleoSpin® Dx Blood ist ein generisches System zur Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA aus menschlichen Vollblut-Proben für nachfolgende *in-vitro* diagnostische Anwendungen. Das Kit kann mit frischen oder gefrorenen menschlichen Vollblut-Proben aus handelsüblichen Blutentnahmesystemen verwendet werden, die EDTA, Citrat oder Heparin als gerinnungshemmende Substanzen enthalten.

NucleoSpin® Dx Blood ist für nachfolgende Anwendungen vorgesehen, die enzymatische Amplifikation und Detektion der DNA umfassen (z.B. PCR). Alle diagnostischen Ergebnisse, die unter Verwendung von DNA, isoliert und aufgereinigt mit **NucleoSpin® Dx Blood**, in einem *in-vitro* diagnostischem Assay erzielt wurden, sind unter Berücksichtigung zusätzlicher klinischer Befunde und Laborergebnisse zu bewerten.

Nachfolgende Anwendungen sollten stets durch geeignete Kontrollsysteme überprüft werden (z.B. mitgeführte Extraktionskontrollen, Positivkontrollen, Negativkontrollen), um die Abweichungen der diagnostischen Ergebnisse möglichst gering zu halten.

NucleoSpin® Dx Blood ist zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt, wie Labortechniker und Ärzte, die im Umgang mit molekularbiologischen Techniken geschult und erfahren sind, sowie Erfahrung mit der Isolierung von DNA aus Vollblutproben haben.

NucleoSpin® Dx Blood liefert keine diagnostischen Ergebnisse. Es liegt in der alleinigen Verantwortung des Anwenders, das Kit mit nachfolgenden *in-vitro* diagnostischen Assays zu validieren und zu verwenden.

2.2 Anwendungsbeschränkungen

NucleoSpin® Dx Blood ist nicht geeignet für Gewebeproben, Stuhlproben und zellfreie Körperflüssigkeiten wie Plasma, Serum, Urin oder Cerebrospinalflüssigkeit. Die Eignung des Kits ist nicht evaluiert für Buffy Coat, isolierte Zellen, Zellkulturen, Abstriche, getrocknetes Blut und virale DNA. Das Kit ist ebenso nicht zur Isolierung und Reinigung von DNA aus Bakterien, Pilzen oder Parasiten spezifiziert.

2.3 Qualitätskontrolle

Um die hohen MACHEREY-NAGEL Qualitätsstandards sicherzustellen, wird jede Charge von **NucleoSpin® Dx Blood** auf die Einhaltung zuvor festgelegter Spezifikationen geprüft.

2.4 Einleitung und Kit-Spezifikationen

NucleoSpin® Dx Blood basiert auf der bewährten NucleoSpin® Silikamembrantechnologie. Es ermöglicht die Gewinnung von genomischer DNA aus 200 µl menschlichem Vollblut auf einfache Art und Weise. Die aufgereinigte DNA ist zum unmittelbaren Einsatz in PCR-Reaktionen geeignet.

Die **NucleoSpin® Dx Blood** Prozedur besteht aus wenigen einfachen Schritten:

Zunächst werden die Blutproben in Gegenwart chaotroper Salze und Proteinase K lysiert. Die genomische DNA im Lysat wird daraufhin an die Silikamembran der **NucleoSpin® Dx Blood Säule** gebunden. Die Membran wird dann gewaschen, bevor im letzten Schritt die hochreine genomische DNA von der Membran eluiert wird.

Probenmaterialien

Das Kit kann mit 200 µl frischem oder gefrorenem menschlichem Vollblut aus handelsüblichen Blutentnahmesystemen verwendet werden, die EDTA, Citrat oder Heparin als gerinnungshemmende Substanzen enthalten. Cryopräzipitate, die sich beim Auftauen gefrorener Proben gelegentlich bilden, können die **NucleoSpin® Dx Blood Säulen** verstopfen. Falls solche Präzipitate erkennbar sind, sollte es vermieden werden diese mitzupipetieren, wenn das Lysat auf die **NucleoSpin® Dx Blood Säule** übertragen wird.

Die Ausbeute aus 200 µl menschlichem Vollblut beträgt typischerweise 3 – 5 µg DNA und ist abhängig von der Anzahl weißer Blutzellen im Probenmaterial.

Eine Auswahl geeigneter Blutentnahmesysteme ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 1: Auswahl geeigneter Blutentnahmesysteme

Blutentnahmesystem	Hersteller
S-Monovette® Li-Heparin	Sarstedt
S-Monovette® EDTA	Sarstedt
S-Monovette® Citrat	Sarstedt
VACUETTE® EDTA	GREINER BIO-ONE
BD VACUTAINER® K2E	BD
K3 EDTA	DELTA LAB
K2 EDTA	APTACA

Tabelle 2: Übersicht der Kit-Spezifikationen

Parameter	NucleoSpin® Dx Blood
Probenmaterial	FrISChe oder gefrorene menschliche Vollblutproben, mit EDTA, Citrat oder Heparin als gerinnungshemmende Substanzen aus marktüblichen Blutentnahmegefäßen.
Probenvolumen	200 µl
Typische DNA-Ausbeute	3 – 5 µg (abhängig von der Anzahl weißer Blutzellen)
Typische DNA-Reinheit	Ratio A_{260}/A_{280} 1.7 – 1.9 Ratio A_{260}/A_{230} 1.8 – 2.3
Elutionsvolumen	50 – 200 µl
Typische DNA-Konzentration	40 – 60 ng/µl
Durchführung	Zentrifugation

2.5 Elution

Die Elution der DNA von der **NucleoSpin® Dx Blood Säule** kann mit 50 bis 200 µl *Elution Buffer BE* durchgeführt werden. Die DNA-Ausbeute wird mit steigendem Volumen des Elutionspuffers höher, während die DNA-Konzentration mit steigendem Elutionspuffervolumen sinkt (siehe Abbildung 1).

Üblicherweise können bis zu 10 µl des Eluates als Template in einer 50 µl-umfassenden PCR-Reaktionsmischung eingesetzt werden, ohne dass die Amplifikationseffizienz beeinträchtigt ist.

Es wird empfohlen, die DNA bei -20°C aufzubewahren. Mehrfaches Auftauen und Wiedereinfrieren hat in der Regel keine Auswirkung auf Nachfolgeapplikationen.



Abbildung 1: Einfluss des Elutionsvolumens auf die DNA-Ausbeute (gestrichelte Linie) und die DNA-Konzentration (durchgehende Linie). Es wurde mit 50, 100 und 200 µl eluiert.

3 Lagerung und Vorbereitung der Reagenzien und Puffer

Bitte beachten Sie:

- Überprüfen Sie nach Erhalt des Kits alle Komponenten auf mögliche Schäden. Sollten Kitbestandteile, wie zum Beispiel Blisterverpackungen oder Pufferflaschen beschädigt sein, kontaktieren Sie bitte den MACHEREY-NAGEL Technical Support und Kundeservice oder Ihren Händler vor Ort.
- Verwenden Sie keine beschädigten Kitbestandteile.
- Der **NucleoSpin® Dx Blood** Kit kann nach Erhalt bei Raumtemperatur (18 – 25°C) gelagert werden. Es ist NICHT notwendig, Kitbestandteile nach Erhalt des Kits herauszunehmen, um sie separat aufzubewahren.
- **NucleoSpin® Dx Blood Columns** können bis zum Verfallsdatum verwendet werden. Das Verfallsdatum ist auf der Verpackung angegeben.

Vorbereitung der Reagenzien und Puffer für das **NucleoSpin® Dx Blood** Protokoll:

- **Wash Buffer B5:** Geben Sie die angegebene Menge Ethanol (96 – 100%, siehe nachfolgende Tabelle oder Angabe auf der Pufferflasche) zum **Wash Buffer B5 Concentrate**. Nach Zugabe von Ethanol sollte das Flaschenetikett diesbezüglich markiert werden. Lagern Sie **Wash Buffer B5** bis zum Verfallsdatum bei Raumtemperatur (18 – 25°C).
- Lyophilisierte **Proteinase K** kann ohne Beeinträchtigung der Qualität bis zum Verfallsdatum bei Raumtemperatur (18 – 25°C) aufbewahrt werden. Lösen sie die lyophilisierte Proteinase K vor der Erstanwendung indem Sie die angegebene Menge **Proteinase Buffer PB** hinzugeben (siehe nachfolgende Tabelle oder Deckeletikett). Die rekonstituierte Proteinase K ist bei -20°C bis zu 6 Monaten haltbar, jedoch längstens bis zum Verfallsdatum des Kits.
- In **Buffer B3** und **Buffer BW** kann es durch die Lagerung, vor allem bei niedrigeren Temperaturen, zur Bildung weißer Präzipitate kommen. Inkubieren Sie beim Auftreten solcher Präzipitate die Pufferflaschen vor der Anwendung 5 min bei 70°C, um sie wieder in Lösung zu bringen.

NucleoSpin® Dx Blood		
Kat. Nr.	50 Präparationen 740899.50	250 Präparationen 740899.250
Wash Buffer B5 (Concentrate)	7 ml 28 ml Ethanol hinzugeben	2 x 20 ml 80 ml Ethanol zu jeder Flasche geben
Proteinase K	30 mg 1,35 ml <i>Proteinase Buffer</i> hinzugeben	2 x 75 mg 3,35 ml <i>Proteinase Buffer</i> zu jedem Vial geben

4 Sicherheitshinweise – Risiko- und Sicherheitssätze

Folgende Kitkomponenten von **NucleoSpin® Dx Blood** beinhalten Gefahrstoffe.

Tragen Sie stets geeignete persönliche Schutzausrüstung und folgen Sie den Anweisungen des Kapitels.

Kitkomponente	Gefahrstoff	Gefahrensymbol		Risiko-sätze	Sicherheitsätze
B3	Guanidiniumhydrochlorid	✘ Xn*	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken - Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut	R 22-36/38	
BW	Guanidiniumhydrochlorid + Isopropanol <25%	✘ Xn*	Entzündlich - Gesundheitsschädlich beim Verschlucken - Reizt die Augen und die Haut	R 10-22-36/38	S 7-16-25
Proteinase K	Proteinase K, lyophilisiert	✘ Xn Xi*	Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut - Sensibilisierung durch Einatmen möglich.	R 36/37/38-42	S 22-24-26-36/37

Risikosätze

R 10	Entzündlich
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 36/37/38	Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 42	Sensibilisierung durch Einatmen möglich

Sicherheitssätze

S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 16	Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen
S 22	Staub nicht einatmen
S 24	Berührung mit der Haut vermeiden
S 25	Berührung mit den Augen vermeiden
S 26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille tragen

* Kennzeichnung als Gefahrstoff ist nicht notwendig, wenn die Menge pro Flasche kleiner als 125 g oder 125 ml ist (Ausnahmegenehmigung gemäß Direktive 67/548/EEC Art. 25, 1999/45/EC Art. 12 und Deutsche GefStoffV § 20 (3) und TRGS 200 7.1). Weitere Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern.

Tragen Sie bei der Anwendung von **NucleoSpin® Dx Blood** stets geeignete persönliche Schutzausrüstung (z.B. Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille). Weitere Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (MSDS). Die Sicherheitsdatenblätter (MSDS) sind im Internet verfügbar unter <http://www.mn-net.com/msds>.

Achtung: Guanidiniumhydrochlorid in *Lysis Buffer B3* und *Wash Buffer BW* kann zusammen mit Bleichmitteln hochreaktive Verbindungen bilden. Geben Sie keine Bleichmittel oder saure Lösungen direkt zu den Flüssigabfällen der Probenaufreinigungen.

Abfälle und Flüssigabfälle, die bei der Anwendung von **NucleoSpin® Dx Blood** entstehen, sind nicht auf infektiöses Material geprüft. Durch die stark denaturierende Wirkung des Lysepuffers und der Proteinase K ist eine Kontamination mit infektiösem Material aus der ursprünglichen Blutprobe höchst unwahrscheinlich, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Daher sind die Abfälle und Flüssigabfälle als infektiös zu betrachten und gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu handhaben und zu entsorgen.

5 **Aufreinigung genomischer DNA mit NucleoSpin® Dx Blood**








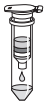





Die Beschreibung der Prozedur bezieht sich auf das Bearbeiten einer einzelnen Vollblutprobe. Es können jedoch mehrere Proben gleichzeitig bearbeitet werden; die Anzahl richtet sich dabei nach der Kapazität der Mikrozentrifuge.

Vor Beginn der Aufreinigung:

- Stellen Sie sicher, dass *Wash Buffer B5* und Proteinase K nach Angaben in Kapitel 3 vorbereitet sind.
- Stellen Sie sicher, dass 96 – 100% Ethanol (reines oder vergälltes) zur Einstellung der Bindebedingungen zur Verfügung steht.
- Stellen Sie einen Inkubator (z.B. Thermoblock) auf 70°C ein.
- Temperieren Sie die Blutproben auf Raumtemperatur (18 – 25°C). Stellen Sie sicher, dass die Blutproben gut durchmischt sind.
- Sollten sich im *Lysis Buffer B3* oder im *Wash Buffer BW* weiße Präzipitate gebildet haben, inkubieren Sie die Pufferflaschen bei 70°C bis die Präzipitate wieder in Lösung gehen.
- Verwenden Sie generell keine Säulen mit Puffern aus anderen Kits oder Chargen.
- Temperieren Sie den Elutionspuffer BE auf Raumtemperatur (18 – 25°C).
- Geben Sie Proteinase K Lösung niemals direkt zu *Lysis Buffer B3* (stellen Sie kein Vorgemisch her). Proteinase K muss gut mit der Blutprobe vermischt werden, bevor *Lysis Buffer B3* hinzugegeben wird.
- Alle Zentrifugationsschritte sind bei Raumtemperatur (18 – 25°C) durchzuführen.

5.1 Übersichtsprotokoll

Das Übersichtsprotokoll dient nur zur Ergänzung. Bitte lesen Sie das detaillierte Protokoll (Abschnitt 5.2) bevor Sie mit der Durchführung beginnen.

Lyse der Blutproben	1	25 µl Proteinase K	
	2	200 µl Blut, mischen	
	3	200 µl B3, mischen	
	4	Raumtemperatur, 5 min	
	5	70°C, 10 min, mischen	
	6	ca. 2.000 x g, 1 s	
Einstellen der DNA-Bindungsbedingungen	7	210 µl Ethanol, mischen	
	8	ca. 2.000 x g, 1 s	
Bindung der DNA	9	Lysat auftragen	
	10	11.000 x g, 1 min	
	11	Stecken Sie die <i>NucleoSpin® Dx Blood Column</i> in ein neues <i>Collection Tube</i>	
Waschen der Silikamembran	12	500 µl BW	
	13	11.000 x g, 1 min	
	14	Stecken Sie die <i>NucleoSpin® Dx Blood Column</i> in ein neues <i>Collection Tube</i>	
	15	600 µl B5	
	16	11.000 x g, 1 min	
Trocknung der Silikamembran	17	Stecken Sie die <i>NucleoSpin® Dx Blood Column</i> in ein neues <i>Collection Tube</i>	
	18	11,000 x g, 1 min	
Elution der DNA	19	Stecken Sie die <i>NucleoSpin® Dx Blood Column</i> in ein neues <i>Elution Tube</i>	
	20	50 – 200 µl BE	
	21	11.000 x g, 1 min	

5.2 Protokoll zur Aufreinigung genomischer DNA mit NucleoSpin® Dx Blood

1. Pipettieren Sie **25 µl Proteinase K** Lösung in ein *Lysis Tube* (1,5 ml; mitgeliefert).
2. Fügen Sie **200 µl Blutprobe** in das *Lysis Tube* und mischen Sie.
3. Fügen Sie **200 µl Buffer B3** in das *Lysis Tube*, schließen Sie den Deckel und mischen Sie pulsartig und kräftig für 10 s auf einem Vortex Mixer.
Verwenden Sie kein Vorgemisch aus Lysis Buffer B3 und Proteinase K!
4. Inkubieren Sie das *Lysis Tube* bei **Raumtemperatur** (18 – 25°C) für **5 min** (± 1 min).
5. Inkubieren Sie das *Lysis Tube* bei **70°C** (±2°C) für **10 min** (± 1 min). Mischen Sie es anschließend pulsartig und kräftig für 5 s auf einem Vortex Mixer.
6. **Zentrifugieren** Sie das *Lysis Tube* **kurz** (ca. 1 s bei 2.000 x g), um Tropfen vom Deckel zu entfernen (lediglich kurze Zentrifugation).
7. Geben Sie **210 µl Ethanol** (96 – 100%) zur Probe. Schließen Sie den Deckel und mischen Sie pulsartig für 5 s auf einem Vortex Mixer.
Stellen Sie sicher, dass Ethanol und Lysat gut vermischt sind.
8. **Zentrifugieren** Sie das *Lysis Tube* **kurz** (ca. 1 s bei 2.000 x g), um Tropfen vom Deckel zu entfernen (lediglich kurze Zentrifugation).
9. **Laden** Sie **das gesamte Lysat** sorgfältig auf eine **NucleoSpin® Dx Blood Column**, die in einem *Collection Tube* (2 ml) steckt, und schließen Sie den Deckel.
10. **Zentrifugieren** Sie für **1 min** bei **11.000 x g**.
Sollte das Lysat die Membran nicht vollständig passiert haben, wiederholen Sie die Zentrifugation bei höherer Beschleunigungskraft (15.000 – 20.800 xg für 1 min). Sollte das Lysat die Membran dann immer noch nicht vollständig passiert haben, verwerfen Sie die Probe und wiederholen Sie die Isolierung mit neuem Probenmaterial.
11. Stecken Sie die **NucleoSpin® Dx Blood Column** in ein frisches *Collection Tube* (2 ml, mitgeliefert) und verwerfen Sie das *Collection Tube* mit Durchfluss aus dem vorangegangenen Schritt.
12. Öffnen Sie die **NucleoSpin® Dx Blood Column** und geben Sie **500 µl Buffer BW** hinein. Schließen Sie den Deckel.
Hinweis: Stellen Sie sicher, dass Lysatreste vollständig mit Buffer BW ausgewaschen werden.
13. **Zentrifugieren** Sie für **1 min** bei **11.000 x g**.

14. Stecken Sie die **NucleoSpin® Dx Blood Column** in ein frisches *Collection Tube* (2 ml, mitgeliefert) und werfen Sie das *Collection Tube* mit Durchfluss aus dem vorangegangenen Schritt.
15. Öffnen Sie die **NucleoSpin® Dx Blood Column** und geben Sie **600 µl Buffer B5** hinein. Schließen Sie den Deckel.
Hinweis: Stellen Sie sicher, dass Waschpufferreste aus dem vorangegangenen Schritt mit Buffer B5 ausgewaschen werden.
16. **Zentrifugieren** Sie für **1 min** bei **11.000 x g**.
17. Stecken Sie die **NucleoSpin® Dx Blood Column** in ein frisches *Collection Tube* (2 ml, mitgeliefert) und werfen Sie das *Collection Tube* mit Durchfluss aus dem vorangegangenen Schritt.
18. **Zentrifugieren** Sie für **1 min** bei **11.000 x g**.
Ethanolreste werden durch diesen Schritt entfernt.
19. Stecken Sie die **NucleoSpin® Dx Blood Column** in ein frisches *Elution Tube* (1,5 ml, mitgeliefert) und werfen Sie das *Collection Tube* mit Durchfluss aus dem vorangegangenen Schritt.
20. Öffnen Sie die **NucleoSpin® Dx Blood Column** und geben Sie **50 – 200 µl Buffer BE** direkt auf die Mitte der Membran.
21. **Zentrifugieren** Sie für **1 min** bei **11.000 x g**, um die DNA von der Säule zu eluieren.

6 Anhang

6.1 Behebung von Problemen

Problem	Mögliche Ursache und Vorschläge zur Behebung
Keine oder zu geringe DNA-Ausbeute	<p><i>Geringe Anzahl weißer Blutzellen in der Probe</i></p> <ul data-bbox="309 379 983 459" style="list-style-type: none"> • Die DNA-Ausbeute hängt von der Anzahl weißer Blutzellen in der Probe ab. Die DNA-Ausbeute aus Blutproben mit niedriger Anzahl weißer Blutzellen ist daher gering.
	<p><i>Unvollständige Lyse der Probe</i></p> <ul data-bbox="309 531 983 911" style="list-style-type: none"> • Inhomogene Blutproben oder Blutklumpen in der Probe: Stellen Sie sicher, dass die Blutproben streng nach Anweisung des Herstellers des verwendeten Blutentnahmesystems abgenommen und gehandhabt werden. Stellen Sie sicher, dass nur Blutproben verwendet werden, die sich leicht pipettieren lassen. Homogenisieren Sie die Blutprobe falls nötig vor der Anwendung. • Die Blutprobe wurde nicht gründlich mit Proteinase K und <i>Lysis Buffer B3</i> gemischt. Unmittelbar nach Zugabe von <i>Lysis Buffer B3</i> ist die Probe pulsartig und kräftig zu mischen (Vortex Mixer, 10 s). • Der Proteinase K Verdau ist nicht optimal. Vermischen sie niemals Proteinase K unmittelbar mit <i>Lysis Buffer B3</i>.
	<p><i>Reagenzien wurden nicht korrekt angewandt.</i></p> <ul data-bbox="309 983 983 1086" style="list-style-type: none"> • Bereiten Sie alle Puffer und Proteinase K Lösung nach den Angaben in Kapitel 3 vor. Folgen Sie streng dem Protokoll und stellen sie sicher, dass Ethanol zu der Probe gegen wird bevor sie das Lysat auf die Säule transferieren.
	<p><i>Ungeeignete Zentrifugationszeit oder -geschwindigkeit</i></p> <ul data-bbox="309 1158 983 1238" style="list-style-type: none"> • Verlängern sie nicht die Zentrifugationszeiten bei Schritt 6 und Schritt 8. Zentrifugieren sie lediglich kurz, um Tropfen von der Innenseite des Deckels zu entfernen.
	<p><i>Nicht optimale Elution der DNA von der Säule</i></p> <ul data-bbox="309 1310 983 1422" style="list-style-type: none"> • Die Effizienz der Elution ist von dem verwendeten Elutionsvolumen abhängig. Verwenden Sie 200 µl Elutionsvolumen, um die höchste Elutionseffizienz zu erreichen; verwenden Sie 50 µl um die höchste DNA-Konzentration zu erreichen.

Problem **Mögliche Ursache und Vorschläge zur Behebung**

Verstopfte Säule

Inhomogene Blutprobe

- Cryopräzipitate, die beim Auftauen gefrorener Blutproben gelegentlich entstehen, können die Membran der NucleoSpin® Dx Blood Säule verstopfen. Wenn Präzipitate in der Probe erkennbar sind, sollte vermieden werden, diese mit der Pipette aufzunehmen. Präzipitate können sich auch in frischen Blutproben bilden. Stellen Sie sicher, dass die Proben gut durchmischt sind. Sollten die Säulen während des DNA-Bindeschritts verstopfen, wiederholen Sie die Zentrifugation bei höherer Umdrehungszahl (15.000 – 20.800 x g; 1 min).

Schlechte DNA-Qualität

Reagenzien wurden nicht korrekt angewandt.

- Bereiten Sie alle Puffer und Proteinase K Lösung nach den Angaben in Kapitel 3 vor. Folgen Sie streng dem Protokoll und stellen sie sicher, dass Ethanol zu der Probe gegen wird bevor sie das Lysat auf die Säule transferieren.

Unvollständige Lyse der Probe

- Die Blutprobe wurde nicht gründlich mit Proteinase K und *Lysis Buffer B3* gemischt. Unmittelbar nach Zugabe von *Lysis Buffer B3* ist die Probe pulsartig und kräftig zu mischen (Vortex Mixer, 10 s).
- Der Proteinase K Verdau ist nicht optimal. Vermischen sie niemals Proteinase K unmittelbar mit *Lysis Buffer B3*.

Verwendete Blutproben sind zu alt oder zu verklumpt

- Stellen Sie sicher, dass nur Blutproben verwendet werden, die sich leicht pipettieren lassen. Homogenisieren Sie die Blutprobe falls nötig vor der Anwendung.

Problem	Mögliche Ursache und Vorschläge zur Behebung
---------	--

Enzymatische Reaktionen mit der DNA funktionieren nicht optimal	<p><i>Verschleppung von Ethanol</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Stellen Sie sicher, dass der ethanolhaltige <i>Buffer B5</i> vor der Elution komplett von der Säule entfernt ist. Sollte nach dem zweiten Waschschrift der <i>Wash Buffer B5</i> Durchfluss den Säulenausgang berühren, ist der Durchfluss zu verwerfen und die Säule erneut zu zentrifugieren. • DNA-Eluate können Spuren von Ethanol enthalten. Es wurde jedoch keinerlei Beeinträchtigungen der PCR bei Einsatz von bis zu 20% des Eluates als Template beobachtet (z.B. 4 µl Eluat in einem 20 µl PCR-Mix). Der höchstmögliche Anteil an Eluat (Template) im PCR-Mix hängt vom jeweiligen PCR-System und dessen Stabilität ab und ist vom Anwender zu ermitteln.
	<p><i>Kontamination mit PCR Inhibitoren</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Stellen Sie bei alten oder verklumpten Probenmaterialien sicher, dass nur Blutproben verwendet werden, die sich leicht pipettieren lassen. Homogenisieren Sie die Blutprobe falls nötig vor der Anwendung.

6.2 Bestellinformationen

Produkt	Kat. Nr.	Anzahl Reaktionen
NucleoSpin® Dx Blood	740899.50/.250	50/250

Unter www.mn-net.com finden Sie detaillierte Produktinformationen.

6.3 Anwendungseinschränkung/Gewährleistung

NucleoSpin® Dx Blood ist ein generisches System zur Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA aus menschlichen Vollblut-Proben für nachfolgende *in-vitro* diagnostische Anwendungen. Das Kit ist für sich der Aufreinigung anschließende Anwendungen vorgesehen, die enzymatische Amplifikation und Detektion der DNA umfassen (z.B. PCR). Jedwede diagnostischen Ergebnisse, die unter Verwendung von DNA, isoliert und aufgereinigt mit NucleoSpin® Dx Blood, in einem diagnostischem Assay generiert wurden, sind unter Berücksichtigung zusätzlicher klinischer Befunde und Laborergebnisse zu bewerten. NucleoSpin® Dx Blood liefert keine diagnostischen Ergebnisse. Es liegt in der alleinigen Verantwortung des Anwenders, das Kit mit nachfolgenden *in-vitro* diagnostischen Assays zu validieren und zu verwenden. Nur die MACHEREY-NAGEL Produkte, die ausdrücklich als IVD gekennzeichnet sind, sind zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung geeignet.

NucleoSpin® Dx Blood ist zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt, wie Labortechniker und Ärzte, die im Umgang mit molekularbiologischen Techniken geschult und erfahren sind, sowie Erfahrungen mit der Isolierung von DNA aus Vollblutproben und dem Umgang mit Vollblutproben haben. Bitte entnehmen Sie die Sicherheitsanweisungen den entsprechenden Kapiteln dieses Handbuchs. NucleoBond® Dx Blood darf ausschließlich in einer geeigneter Testumgebung, wie zum Beispiel einem angemessen ausgestatteten Labor, angewendet werden.

Der Anwender ist für jedweden Schaden haftbar, der aus einer vom Bestimmungszweck, wie er im Handbuch ausgewiesen ist, abweichenden Anwendung entsteht.

Diesem MACHEREY-NAGEL Produkt liegen Unterlagen mit Angaben zu Spezifikationen und weiteren technischen Informationen bei. MACHEREY-NAGEL gewährleistet das Einhalten der angegebenen Spezifikationen. Die einzige Verpflichtung für MACHEREY-NAGEL und der einzige Anspruch des Kunden in dem Fall, dass die gewährleistete Funktion nicht erfüllt wird, beschränkt sich auf den kostenlosen Ersatz des Produktes.

Darüber hinaus finden die allgemeinen Geschäftsbedingungen von MACHEREY-NAGEL Anwendung, welche auf der Preisliste aufgeführt sind. Bitte kontaktieren Sie uns, falls sie ein Exemplar wünschen.

Es besteht keine Garantie, noch kann MACHEREY-NAGEL haftbar gemacht werden für Schäden oder Defekte, die im Zusammenhang mit der Handhabung der Ware, einem Unfall oder unsachgemäßem bzw. abnormem Gebrauch auftreten. Gleiches gilt für Schäden an Sachen bzw. Produkten oder Produktteilen, die nicht von MACHEREY-NAGEL hergestellt werden. Transportschäden sind nur insofern und soweit gedeckt, soweit der Kunde die Eindeckung einer eigenen Transportversicherung auf seine Kosten wünscht und diese Ersatz leistet. MACHEREY-NAGEL gewährt keinerlei weitere Zusagen, Garantieverprechen o.ä. und schließt explizit alle weiteren Garantien – gleich aus welchem Rechtsgrund – seien sie direkt oder indirekt, ausdrücklich oder impliziert, betreffend, aber insoweit nicht abschließend, Aussagen über die Eignung, Reproduktivität, Haltbarkeit, Zweckbestimmung, Marktgängigkeit, Zustand oder jedwede andere garantierelevante Aussage über das MACHEREY-NAGEL Produkt aus.

In keinem Fall kann MACHEREY-NAGEL für irgendwelche anderen direkten oder indirekten Ersatzansprüche, Nebenansprüche oder Folgeschäden – basierend auf Garantie, Gewährleistung, Vertrag, unerlaubter Handlung oder anderem Rechtsgrund –, die im Zusammenhang mit dem Verkauf des Produkts oder der Nichterreichung der in dieser Bedienungsanleitung genannten Spezifikationen des Produkts entstehen, haftbar gemacht werden, seien sie vorhersehbar oder nicht. Die von MACHEREY-NAGEL gewährleistete Einhaltung der in dieser Gebrauchsanweisung genannten Spezifikationen ist insoweit ausschließlich und MACHEREY-NAGEL macht insoweit keine darüber hinausgehenden Gewährleistungs- / oder Garantieverprechen.

Die in dieser Drucksache gewährte Gewährleistung und die Daten, Spezifikationen und Beschreibungen dieses MACHEREY-NAGEL Produkts, welches in MACHEREY-NAGEL Katalogen erscheint, sind MACHEREY-NAGEL´s ausschließliche Darstellung der Produkts und dessen Gewährleistung.

Keine weiteren mündlichen, noch schriftlichen Aussagen oder Darstellungen von MACHEREY-NAGEL Angestellten, Vertretern, Außendienstmitarbeitern oder Händlern – mit Ausnahme schriftlicher Aussagen, die von einem unterschiftsberechtigten Leitenden Angestellten von MACHEREY-NAGEL vorgenommen werden – sind autorisiert. Auf derlei Aussagen kann sich ein Kunde nicht verlassen und auch nicht berufen, da sie nicht Teil des Kaufvertrages oder dieser Gewährleistung geworden sind.

Ansprüche an das Produkt ändern sich. Daher kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service für die neuesten Informationen über MACHEREY-NAGEL Produkte. Sie können auch Ihren lokalen Händler für allgemeine wissenschaftliche Informationen kontaktieren. Konkrete Anwendungen in MACHEREY-NAGEL´s Literatur dienen nur dem Zweck der Information. MACHEREY-NAGEL gewährleistet oder garantiert nicht, dass alle Anwendungen in eigenen Laboren getestet wurden. MACHEREY-NAGEL kann daher nicht die Gewähr für die Korrektheit dieser Anwendungen übernehmen.

Bitte kontaktieren Sie:

MACHEREY-NAGEL Germany
Tel.: +49 (0) 24 21 969 270
e-mail: TECH-BIO@mn-net.com

Zuletzt aktualisiert: 09/2009, Rev. 03

Warenzeichen:

BD VACUETTE is a trademark of BD
NucleoSpin is a trademark of MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG
S-Monovette is a registered trademark of Sarstedt
Vacuette is a trademark of GREINER BIO-ONE

Alle verwendeten Namen und Begriffe können Handelsmarken, eingetragene Marken, eingetragene Warenzeichen ihrer entsprechenden Eigentümer sein – auch wenn Sie keine spezielle Kennzeichnung besitzen. Die Nennung von Produkten und Marken dient lediglich der Information, d.h. sie verstößt nicht gegen eingetragene Handelsmarken, Warenzeichen und eingetragene Markennamen und kann nicht als Empfehlung oder Bewertung angesehen werden. Bezüglich dieser Produkte oder Dienstleistungen übernimmt MACHEREY-NAGEL keinerlei Garantie oder Gewährleistung bzgl. der Auswahl, Effizienz oder Funktion dieser Produkte und Dienstleistungen.