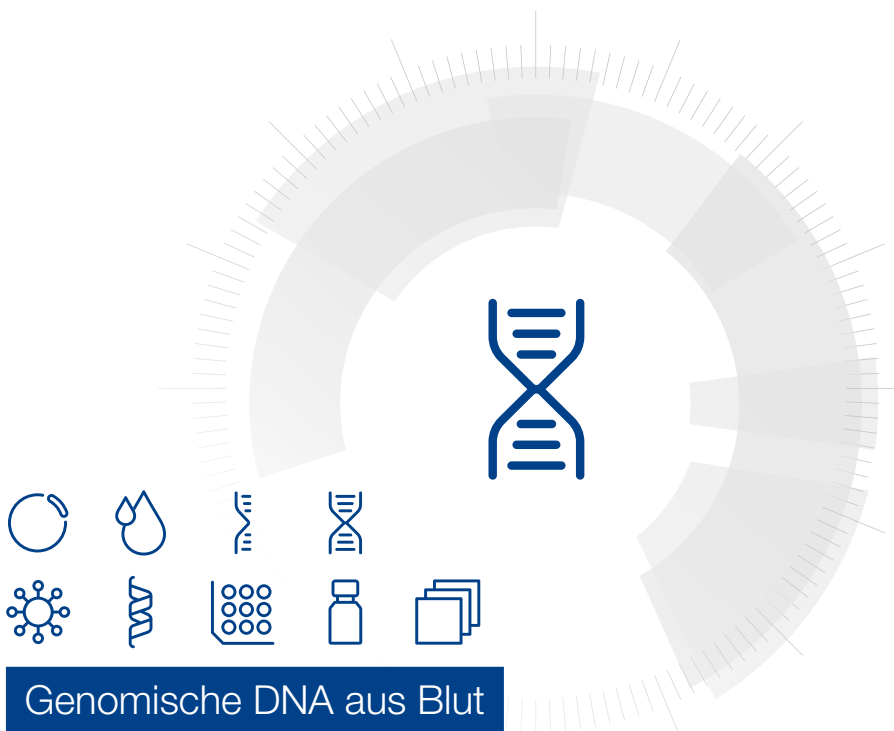


MACHEREY-NAGEL

Handbuch



Genomische DNA aus Blut

■ NucleoSpin® Dx Blood




IVD *In-vitro*-Diagnostikum

REF 740899.50,
740899.250

 MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
52355 Düren · Deutschland, Tel.: +49 24 21 969-0

 50 / 250 Präp.

 April 2022 / Rev. 05

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)
E-mail: info@mn-net.com

Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-270
E-mail: tech-bio@mn-net.com

USA

MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)
E-mail: sales-us@mn-net.com

France

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France
Tel.: +33 388 68 22 68
E-mail: sales-fr@mn-net.com

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

Switzerland







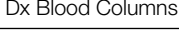
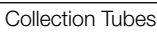
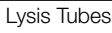


MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
E-mail: sales-ch@mn-net.com

Inhaltsverzeichnis

1	Komponenten	4
1.1	Inhalt des Kits	4
1.2	Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	4
1.3	Informationen zu diesem Benutzerhandbuch	5
2	Produktbeschreibung	6
2.1	Bestimmungsgemäßer Gebrauch	6
2.2	Anwendungseinschränkungen des Produkts	6
2.3	Qualitätskontrolle	6
2.4	Einleitung und Spezifikationen des Kits	7
2.5	Analytische Leistung	8
2.6	Elutionsverfahren	9
3	Lagerungsbedingungen und Zubereitung der Arbeitslösungen	10
4	Sicherheitshinweise	11
4.1	Entsorgung	11
5	Reinigung genomischer DNA mit NucleoSpin® Dx Blood	12
5.1	Das Protokoll auf einen Blick	13
5.2	Verfahren	14
6	Anhang	16
6.1	Fehlerbehebung	16
6.2	Meldepflicht	18
6.3	Allgemeine Literatur	18
6.4	Informationen zur Bestellung	18
6.5	Erläuterung der Symbole	18
6.6	Nutzungseinschränkung des Produkts/Garantie	19

1 Komponenten

1.1 Inhalt des Kits

NucleoSpin® Dx Blood			
REF		50 Präp. 740899.50	250 Präp. 740899.250
Buffer B3		15 mL	60 mL
Wash Buffer BW		30 mL	150 mL
Wash Buffer B5 (Concentrate)*		12 mL	50 mL
Elution Buffer BE**		13 mL	60 mL
Proteinase Buffer PB		1,8 mL	8 mL
Proteinase K (lyophilized)*		30 mg	2 × 75 mg
NucleoSpin® Dx Blood Columns (rote Stützringe mit Collection Tubes)		50	250
Collection Tubes (2 mL)		3 × 50	3 × 250
Lysis Tubes (1.5 mL)		50	5 × 50
Elution Tubes (1.5 mL)		50	5 × 50
Handbuch		1	1

1.2 Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Reagenzien

- 96 – 100 %iges Ethanol (zur Anpassung der DNA-Bindungsbedingungen und zur Herstellung des Waschpuffers B5)

Verbrauchsmaterialien

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

* Zubereitung der Puffer und Lagerbedingungen: Siehe Kapitel 3

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

Geräte

- Handpipetten
- Zentrifuge für Mikrozentrifugenröhrchen
- Vortex-Mischer
- Heizblock oder Wasserbad (für die Lyse der Proben bei 70 °C)
- Persönliche Schutzausrüstung (z. B. Laborkittel, Handschuhe, Schutzbrille)

1.3 Informationen zu diesem Benutzerhandbuch

Es wird dringend empfohlen, den detaillierten Protokollteil dieses Benutzerhandbuchs zu lesen. Das Protokoll auf einen Blick ist nur als ergänzendes Hilfsmittel zum schnellen Nachschlagen während der Durchführung des Reinigungsverfahrens gedacht.

Benutzerhandbücher von MACHEREY-NAGEL sind im Internet unter www.mn-net.com verfügbar.

Bitte wenden Sie sich an den Technischen Kundendienst, falls Sie Informationen über Änderungen des aktuellen Benutzerhandbuchs gegenüber früheren Versionen benötigen.

Kontaktinformationen

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11
52355 Düren, Deutschland
Tel.: +49 24 21 969-0
Gebührenfrei: 0800 26 16 000 (nur Deutschland)
E-Mail: info@mn-net.com

Technischer Support – Bioanalytik

Tel.: +49 24 21 969-270
E-Mail: tech-bio@mn-net.com

Benutzerhandbücher in weiteren Sprachen sind im Download-Bereich auf der Produktseite verfügbar.

Les manuels d'utilisation dans d'autres langues sont disponibles dans la section Téléchargements de la page du produit.

Los manuales de usuario en otros idiomas están disponibles en la sección de descargas de la página del producto.



2 Produktbeschreibung

2.1 Bestimmungsgemäßer Gebrauch

NucleoSpin® Dx Blood ist ein Kit für die Isolierung genomischer DNA aus frischem und gefrorenem humanem Vollblut (mit gängigen Blutentnahmesystemen entnommen und mit EDTA, Citrat oder Heparin stabilisiert) zum Zwecke einer anschließenden *In-vitro*-Analyse. Mit diesem Produkt wird gereinigte genomische DNA erhalten, die für spätere Downstream-Analysen wie PCR, qPCR oder Sequenzierung verwendet werden und Informationen über die in der Probe enthaltene genomische DNA liefern kann. Das Produkt wird von Fachkräften in Diagnostiklabors verwendet.

Das **NucleoSpin® Dx Blood**-Kit ist nicht für Selbsttests oder patientennahe Tests geeignet. Vom Benutzer wird Erfahrung mit molekularbiologischen Techniken erwartet; dazu zählt auch Erfahrung mit Vollblut und anderen potentiell infektiösen menschlichen Probenmaterialien.

Es empfiehlt sich die Verwendung geeigneter Kontrollen, z. B. von internen Kontrollen, Extraktionskontrollen, Positiv- und Negativkontrollen.

2.2 Anwendungseinschränkungen des Produkts

Das **NucleoSpin® Dx Blood** -Kit ist nicht zur Verwendung mit Gewebe- oder Stuhlproben, zellfreien Körperflüssigkeiten wie Plasma, Serum, Urin oder Liquor geeignet. Die Leistung des Kits wurde nicht mit Buffy Coat, kultivierten oder isolierten Zellen, Abstrichen, getrockneten Blutflecken und viraler DNA untersucht. Das Kit ist ebenso nicht für die Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Bakterien, Pilzen oder Parasiten spezifiziert.

2.3 Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem Qualitätsmanagementsystem von MACHEREY-NAGEL wird zur Gewährleistung einer gleichbleibenden Produktqualität jede Charge der **NucleoSpin® Dx Blood**-Kits nach vorgegebenen Spezifikationen getestet.

2.4 Einleitung und Spezifikationen des Kits

NucleoSpin® Dx Blood basiert auf der bewährten NucleoSpin®-Silikamembran-Technologie und bietet eine einfache Methode zur Isolierung genomischer DNA aus 200 µL einer Vollblutprobe. Die gereinigte DNA kann für die Downstream-PCR-Amplifikation verwendet werden.

Das Verfahren von **NucleoSpin® Dx Blood** besteht aus einer Reihe von einfachen Schritten:

Zunächst werden die Blutproben in Gegenwart von chaotropen Salzen und Proteinase K lysiert. Sodann wird die genomische DNA im Lysat an eine **NucleoSpin® Dx Blood**-Säule gebunden. Anschließend wird die Membran mit den gebundenen Nukleinsäuren gewaschen und zuletzt wird hochreine genomische DNA eluiert.

Proben

Das Kit ist mit 200 µL frischem oder gefrorenem humanem Vollblut verwendbar, welches mit EDTA, Citrat oder Heparin behandelt wurde und aus gängigen Blutentnahmesystemen stammt.

Je nach der Leukozytenzahl in der Probe ergeben 200 µL menschliches Vollblut in der Regel 3–5 µg genomische DNA.

Eine Auswahl geeigneter Blutentnahmeggeräte ist nachstehend 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

Einschränkungen bezüglich der Proben

Kryopräzipitate, die sich beim Auftauen gefrorener Proben bilden, können die **NucleoSpin® Dx Blood**-Säule verstopfen. Falls solche Präzipitate sichtbar sind, sollte es vermieden werden, diese beim Übertragen des Lysats auf die Bindungssäule mitzupipettieren.

Sichtlich hämolytische und hyperlipidämische Proben können die DNA-Ausbeute und -Reinheit beeinträchtigen.

Tabelle 2: Kit-Spezifikationen auf einen Blick

Parameter	NucleoSpin® Dx Blood
Probenmaterial	Frisches oder gefrorenes humanes Vollblut, welches mit EDTA, Citrat oder Heparin behandelt wurde und aus gängigen Blutentnahmesystemen stammt
Probenvolumen	200 µL
Typische DNA-Ausbeute	3–5 µg je nach Leukozytenzahl
Typische DNA-Qualität	Quotient A_{260}/A_{280} 1,7–1,9 Quotient A_{260}/A_{230} 1,8–2,3
Elutionsvolumen	50–200 µL
Typische DNA-Konzentration	40–60 ng/µL
Verarbeitung	Zentrifugation

2.5 Analytische Leistung

Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Laufs wurde anhand der parallelen Isolierung von 12 identischen Blutprobenaliquots berechnet. Die durchschnittliche DNA-Ausbeute betrug $5,2 \mu\text{g} \pm 0,3$. Dies entspricht einem VK von 6 %. Die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Läufen wurde in zwei unabhängigen Läufen getestet. Bei jedem Lauf wurde die DNA aus einer Blutprobe mit jeweils 6 Wiederholungen isoliert. Der Unterschied in der durchschnittlichen Ausbeute zwischen den beiden Läufen betrug $0,2 \mu\text{g}$ DNA, was 6 % entspricht. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit zwischen einzelnen Chargen wurden drei Chargen von NucleoSpin® Dx Blood nebeneinander getestet. Bei jeder Charge wurde gDNA in 6 Wiederholungen isoliert. Alle Wiederholungen wurden aus einer einzigen Blutprobe entnommen. Die durchschnittliche DNA-Ausbeute pro sechs Präparationen betrug 5,2; 4,8 und $5,0 \mu\text{g}$ bei Standardabweichungen von 0,4; 0,5 bzw. $0,5 \mu\text{g}$. Der VK der durchschnittlichen Ausbeuten der drei Chargen betrug 4 %.

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit wurde die DNA aus Vollblutproben von zwei Bedienern parallel isoliert. Die durchschnittliche Ausbeute ($n=6$) betrug $2,9 \pm 0,3 \mu\text{g}$ bzw. $3,0 \pm 0,2 \mu\text{g}$, was einem VK von 9 % bzw. 7 % bei sechs Präparationen entspricht. Der Unterschied im durchschnittlichen Ertrag zwischen den beiden Bedienern betrug $0,1 \mu\text{g}$.

Der Einsatz von **NucleoSpin® Dx Blood** in der *In-vitro*-Diagnostik wird in den folgenden Publikationen beispielhaft beschrieben:

Hadzsiev, K. *et al.* (2019) Rubinstein-Taybi syndrome 2 with cerebellar abnormality and neural tube defect. *Clin Dysmorphol.*, 28(3), 137 – 141.

Komlósi, K. *et al.* (2015) Phenotypic variability in a Hungarian patient with the 4q21 microdeletion syndrome. *Mol Cytogenet.*, 8, 16.

Czakó, M. *et al.* (2019) Possible Phenotypic Consequences of Structural Differences in Idic(15) in a Small Cohort of Patients. *Int J Mol Sci.*, 20(19), 4935.

Szabo, A. *et al.* (2015) Partial tetrasomy of the proximal long arm of chromosome 15 in two patients: the significance of the gene dosage in terms of phenotype. *Mol Cytogenet.*, 8, 41.

2.6 Elutionsverfahren

Die DNA wird mit 50 bis 200 μL Elutionspuffer BE von den **NucleoSpin® Dx Blood Columns** eluiert. Die Gesamtausbeute an DNA steigt mit zunehmendem Elutionsvolumen, die DNA-Konzentration nimmt hingegen ab (siehe Abbildung 1).

Üblicherweise können bis zu 10 μL des Eluats als Template in einem 50- μL -PCR-Mix verwendet werden, ohne dass die PCR-Leistung beeinträchtigt wird. Es wird empfohlen, eluierte DNA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern. Mehrfaches Auftauen und Wiedereinfrieren hat meist keine Auswirkung auf Downstream-Anwendungen.

Lagerung von Nukleinsäuren

Empfehlung:

Kurzfristige Lagerung (bis zu 24 Stunden): $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$

Langfristige Lagerung (über 24 Stunden): $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

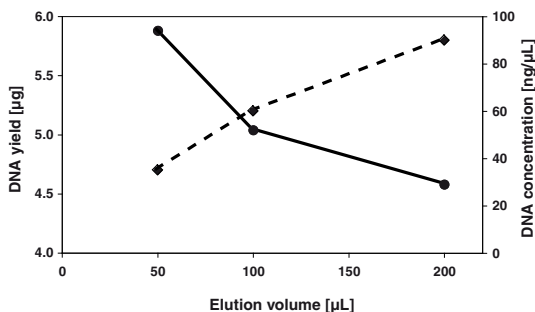


Abbildung 1

Einfluss des Elutionsvolumens auf die Gesamtausbeute an DNA (gestrichelte Linie) und die DNA-Konzentration (durchgezogene Linie). Die Elution wurde mit 50, 100 und 200 μL durchgeführt.

3 Lagerungsbedingungen und Zubereitung der Arbeitslösungen

Achtung!

- Überprüfen Sie nach Erhalt des Kits sämtliche Komponenten auf Schäden. Sollte der Inhalt des Kits (z. B. Pufferflaschen oder Blisterverpackungen) beschädigt sein, wenden Sie sich bitte an den technischen Support und Kundendienst von MACHEREY-NAGEL oder an Ihren Händler vor Ort.
- Beschädigte Kit-Bestandteile dürfen nicht verwendet werden.
- Nach Erhalt ist das **NucleoSpin® Dx Blood**-Kit bei 18–25 °C zu lagern. Es ist NICHT erforderlich, das Kit bei der Lieferung zu öffnen und einzelne Komponenten zur separaten **Lagerung** zu entnehmen.
- Die **NucleoSpin® Dx Blood Columns** können bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Bereiten Sie vor dem Start des **NucleoSpin® Dx Blood**-Protokolls Folgendes vor:

- **Wash Buffer B5:** Geben Sie die angegebene Menge Ethanol (96–100 %ig, siehe Tabelle unten oder auf der Flasche) zum **Wash Buffer B5 Concentrate**. Vermerken Sie auf dem Flaschenetikett, dass Ethanol hinzugefügt wurde. Waschpuffer B5 bis zum Verfallsdatum bei 18–25 °C lagern.
- Lyophilisierte **Proteinase K** kann bei 18–25 °C bis zum Verfallsdatum gelagert werden, ohne dass die Leistung nachlässt. Fügen Sie vor der ersten Verwendung des Kits die angegebene Menge **Proteinase Buffer PB** (Proteinasepuffer PB) hinzu, um die lyophilisierte Proteinase K aufzulösen. Rekonstituierte Proteinase K ist bei -20 °C bis zu 6 Monate haltbar, jedoch nur innerhalb des Verfallsdatums.
- Während der Lagerung kann sich insbesondere bei niedrigen Temperaturen in Puffer B3 und Puffer BW eine weiße Ausfällung bilden. Solche Ausfällungen lassen sich leicht auflösen, indem die Flasche vor der Verwendung 5 Minuten lang bei 70 °C inkubiert wird.

NucleoSpin® Dx Blood

REF	50 Präp. 740899.50	250 Präp. 740899.250
Wash Buffer B5 (Concentrate)	12 mL 48 mL Ethanol hinzufügen	50 mL 200 mL Ethanol hinzufügen
Proteinase K	30 mg 1,35 mL Proteinase Buffer hinzufügen	2 × 75 mg Jedem Fläschchen 3,35 mL Proteinase Buffer hinzufügen

4 Sicherheitshinweise

Tragen Sie bei der Arbeit mit dem **NucleoSpin® Blood**-Kit geeignete Schutzkleidung (z.B. Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille). Weitere Informationen finden Sie in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDS), die online unter <http://www.mn-net.com/msds> verfügbar sind.



Vorsicht: Guanidinhydrochlorid in Puffer B3 und Puffer BW können in Verbindung mit Bleichmitteln hochreaktive Verbindungen bilden! Bleichmittel oder säurehaltige Lösungen dürfen daher niemals direkt in den Probenaufbereitungsabfall gelangen.

Der mit dem **NucleoSpin® Dx Blood**-Kit erzeugte Abfall wurde nicht auf infektiöse Rückstände getestet. Eine Kontamination des Flüssigabfalls mit infektiösen Rückständen ist aufgrund des stark denaturierenden Lysepuffers und der Proteinase-K-Behandlung sehr unwahrscheinlich, kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Flüssigabfälle sind daher als infektiös zu betrachten und müssen gemäß den örtlichen Sicherheitsvorschriften behandelt und entsorgt werden.

4.1 Entsorgung

Entsorgen Sie gefährliche, infektiöse oder biologisch kontaminierte Materialien auf sichere und vertretbare Weise und in Übereinstimmung mit allen örtlichen und gesetzlichen Vorschriften.

5 Reinigung genomischer DNA mit NucleoSpin® Dx Blood

Im Folgenden finden Sie die Anweisungen des Verfahrens zur Verarbeitung einer einzelnen Blutprobe. Es können jedoch mehrere Proben gleichzeitig verarbeitet werden; die Anzahl hängt von der Kapazität der verwendeten Mikrozentrifuge ab.










Vor Beginn des Verfahrens:

- Überprüfen Sie, ob der Waschpuffer B5 und die Proteinase K gemäß Abschnitt 3 hergestellt wurden.
- Stellen Sie sicher, dass 96 – 100 %iges Ethanol (denaturiert oder nicht denaturiert) bereitsteht, damit die Bedingungen für die DNA-Bindung angepasst werden können.
- Stellen Sie einen Inkubator (z. B. einen Heizblock) oder ein Wasserbad auf 70 °C ein.
- Bringen Sie die Blutproben auf Raumtemperatur. Stellen Sie sicher, dass die Proben gut gemischt sind.
- Wenn sich im Lysepuffer B3 oder im Puffer BW eine Ausfällung gebildet hat, inkubieren Sie den Puffer bei 70 °C, bis sich die Ausfällung aufgelöst hat.
- Generell dürfen Reagenzien und Säulen aus verschiedenen Kits und Chargen nicht gemischt werden.
- Bringen Sie den Elutionspuffer BE auf Raumtemperatur.
- Geben Sie die Proteinase-K-Lösung nicht direkt in den Lysepuffer B3. Proteinase K muss vor der Zugabe von Puffer B3 mit der Blutprobe gemischt werden.
- Sämtliche Zentrifugationsschritte sind bei Raumtemperatur durchzuführen.

5.1 Das Protokoll auf einen Blick

Ergänzende Übersicht über das Protokoll:

Lesen Sie das detaillierte Protokoll (Abschnitt 5.2) sorgfältig durch, bevor Sie mit dem Verfahren beginnen.

Blutproben lysiere	1	25 µL Proteinase K	
	2	200 µL Blut	
	3	200 µL B3, mischen	
	4	RT, 5 Min.	
	5	70 °C, 10 Min., mischen	
	6	2.000 x g, 1 s	
DNA- Bindungs- bedingungen anpassen	7	210 µL Ethanol, mischen	
	8	2.000 x g, 1 s	
DNA binden	9	Lysat auftragen	
	10	11.000 x g, 1 Min.	
	11	Die NucleoSpin® Dx Blood Column in ein neues Sammelröhrchen überführen	
Silikamembran waschen	12	500 µL BW	
	13	11.000 x g, 1 Min.	
	14	Die NucleoSpin® Dx Blood Column in ein neues Sammelröhrchen überführen	
	15	600 µL B5	
	16	11.000 x g, 1 Min.	
Silikamembran trocknen	17	Die NucleoSpin® Dx Blood Column in ein neues Sammelröhrchen überführen	
	18	11.000 x g, 1 Min.	

DNA eluieren	19	Die NucleoSpin® Dx Blood Column in ein Elutionsröhrchen überführen
	20	50–200 µL BE
	21	11.000 x g, 1 Min.



5.2 Verfahren

- 1 25 µL Proteinase K-Lösung** in ein Lyseröhrchen (1,5 mL; mitgeliefert) pipettieren.
- 2 200 µL Blut-Probe** in das Lyseröhrchen geben. Mischen.
- 3 200 µL Buffer B3** in das Lyseröhrchen geben, Deckel schließen und 10 Sek. lang auf dem Vortex kräftig mischen.
Puffer B3 und Proteinase K nicht vormischen!
- 4** Bei **Raumtemperatur 5 Min.** (± 1 Min) inkubieren.
- 5** Lyseröhrchen bei **70 °C** (± 2 °C) **10 Min.** (± 1 Min.) inkubieren. Nach der Inkubation 5 Sek. durch kräftiges **Vortexen** mischen.
- 6** Lyseröhrchen **kurz zentrifugieren** (ca. 1 Sek. bei 2.000 x g), um Tropfen vom Deckel zu entfernen (nur kurz herunterzentrifugieren).
- 7 210 µL Ethanol** (96–100 %ig) zur Probe geben. Deckel schließen und 5 Sek. lang auf dem Vortex kräftig mischen.
Stellen Sie sicher, dass das Ethanol und das Lysat gut vermischt sind.
- 8** Lyseröhrchen **kurz zentrifugieren** (ca. 1 Sek. bei 2.000 x g), um Tropfen vom Deckel zu entfernen (nur kurz herunterzentrifugieren).
- 9** **Gesamtes Lysat** vorsichtig auf die **NucleoSpin® Dx Blood Column laden**, die sich in einem Sammelröhrchen befindet, und den Deckel schließen.
- 10 1 Min. bei 11.000 x g zentrifugieren.**
Wenn das Lysat nicht vollständig durch die Membran gezogen wurde, wiederholen Sie die Zentrifugation bei höherer g-Zahl (15.000–20.800 x g, 1 Min.). Sollte das Lysat die Membran dann immer noch nicht vollständig passiert haben, werfen Sie die Probe und wiederholen Sie die Isolierung mit neuem Probenmaterial.
- 11** Die **NucleoSpin® Dx Blood Column** in ein neues Sammelröhrchen (2 mL, mitgeliefert) setzen und das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss aus dem vorherigen Schritt verwerfen.
- 12** Die **NucleoSpin® Dx Blood Column** öffnen und **500 µL Buffer BW** auf die Säule geben. Deckel schließen.
Anmerkung: Achten Sie darauf, dass Lysatreste mit Puffer BW ausgewaschen werden.

13 1 Min. bei 11.000 x g zentrifugieren.

14 Die **NucleoSpin® Dx Blood Column** in ein neues Sammelröhrchen (2 mL, mitgeliefert) setzen und das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss aus dem vorherigen Schritt verwerfen.

15 Die **NucleoSpin® Dx Blood Column** öffnen und **600 µL Buffer B5** auf die Säule geben. Deckel schließen.

Anmerkung: Achten Sie darauf, dass Waschpufferreste aus dem vorherigen Schritt mit Puffer B5 ausgewaschen werden.

16 1 Min. bei 11.000 x g zentrifugieren.

17 Die **NucleoSpin® Dx Blood Column** in ein neues Sammelröhrchen (2 mL, mitgeliefert) setzen und das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss aus dem vorherigen Schritt verwerfen.

18 1 Min. bei 11.000 x g zentrifugieren.

Reste von Ethanol werden in diesem Schritt entfernt.

19 Die **NucleoSpin® Dx Blood Column** in ein sauberes Elutionsröhrchen (1,5 mL, mitgeliefert) setzen und das Sammelröhrchen aus dem vorherigen Schritt verwerfen.

20 Die **NucleoSpin® Dx Blood Column** öffnen und **50–200 µL Buffer BE** direkt in die Mitte der Membran geben.

21 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugieren, um die DNA aus der Säule zu eluieren.

6 Anhang

6.1 Fehlerbehebung

Problem	Mögliche Ursache und Vorschläge
	<p><i>Niedrige Konzentration von Leukozyten in der Probe</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Die DNA-Ausbeute ist von der Anzahl der Leukozyten je Probe abhängig. Blutproben mit einer geringen Anzahl an Leukozyten ergeben geringe DNA-Mengen. <p><i>Unvollständige Lyse der Probe</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Inhomogene Blutprobe oder Blutgerinnsel in der Probe: Stellen Sie sicher, dass die Blutproben gemäß den Anweisungen des Herstellers des Blutentnahmeröhrchens entnommen werden. Stellen Sie sicher, dass als Probenmaterial nur Blut verwendet wird, das sich leicht pipettieren lässt. Homogenisieren Sie die Blutprobe ggf. vor der Verwendung. Die Probe wurde nicht gründlich mit Proteinase K und Lysepuffer gemischt. Die Mischung muss unmittelbar nach der Zugabe von Lysepuffer B3 kräftig gevortext werden. Der Proteinase K-Verdau ist nicht optimal. Geben Sie die Proteinase K niemals direkt in den Lysepuffer B3. <p><i>Reagenzien nicht korrekt angewendet</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Bereiten Sie die Puffer und die Proteinase-K-Lösung gemäß den Anweisungen (Abschnitt 3) zu. Fügen Sie dem Lysat Ethanol hinzu, bevor Sie das Lysat auf die Säule auftragen. <p><i>Unsachgerechte Zentrifugation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Zentrifugationszeit und -drehzahl in Schritt 6 und 8 dürfen nicht verlängert werden. Zentrifugieren Sie nur kurz, um die Tropfen vom Deckel zu entfernen. <p><i>Suboptimale Elution der DNA aus der Säule</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Die Elutionseffizienz hängt vom Volumen des Elutionspuffers ab. Verwenden Sie 200 µL Elutionspuffer, um die höchste Elutionseffizienz zu erreichen; verwenden Sie 50 µL Elutionspuffer, um die höchste DNA-Konzentration zu erreichen.
Keine oder nur geringe DNA-Ausbeute	
Verstopfte DNA-Bindungs-säule	<p><i>Inhomogene Blutprobe</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Kryopräzipitate, die sich beim Auftauen gefrorener Proben bilden, können die NucleoSpin® Dx Blood-Säule verstopfen. Falls solche Präzipitate sichtbar sind, sollte es vermieden werden, diese beim Übertragen des Lysats auf die Bindungssäule abzupipettieren. Auch in frischen Blutproben können sich Präzipitate bilden. Stellen Sie sicher, dass die Proben gut gemischt sind. Wenn die Säule während des DNA-Bindungsschritts verstopft, wiederholen Sie die Zentrifugation bei höherer g-Zahl (15.000–20.800 x g, 1 Min.).

Problem **Mögliche Ursache und Vorschläge**

	<p><i>Reagenzien nicht korrekt angewendet</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Bereiten Sie die Puffer und die Proteinase-K-Lösung gemäß den Anweisungen (Abschnitt 3) zu. Geben Sie Ethanol zum Lysat und mischen Sie beides, bevor Sie es auf die Säulen aufragen.
Schlechte DNA-Qualität	<p><i>Unvollständige Lyse der Probe</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Die Probe wurde nicht gründlich mit Proteinase-K-Lösung und Lysepuffer gemischt. Die Mischung muss unmittelbar nach der Zugabe des Lysepuffers kräftig gevortext werden.• Der Proteinase K-Verdau ist nicht optimal. Geben Sie die Proteinase-K nicht direkt in den Lysepuffer B3. <p><i>Verarbeitete Blutproben sind alt oder verklumpt</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Stellen Sie sicher, dass als Probenmaterial nur Blut verwendet wird, das sich leicht pipettieren lässt. Homogenisieren Sie die Blutprobe ggf. vor der Verwendung.
Suboptimale Leistung der genomischen DNA in Enzymreaktionen	<p><i>Verschleppung von Ethanol</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Stellen Sie sicher, dass der gesamte ethanolhaltige Puffer B5 vor der Elution der DNA entfernt wird. Sollte der Füllstand des Durchflusses des Waschpuffers B5 nach dem zweiten Waschschrift nach irgendeinem Grund den Säulenausgang erreichen, werfen Sie den Durchfluss, stecken Sie die Säule zurück in das Sammelröhrchen und zentrifugieren Sie erneut.• DNA-Eluate können Spuren von Ethanol enthalten. Es wurde jedoch keine Verschlechterung der PCR-Leistung bei Verwendung von DNA-Eluat von bis zu 20 % des PCR-Endvolumens als Template festgestellt (z. B. Verwendung von 4 µL von 100 µL Eluat als Template in einer 20 µL-PCR). Der maximale Prozentsatz des Template-Volumens in einer PCR kann je nach Robustheit des PCR-Systems unterschiedlich ausfallen und muss vom Benutzer bestimmt werden. <p><i>Kontamination der DNA mit Inhibitoren</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Achten Sie bei der DNA-Präparation aus alten oder geronnenen Blutproben darauf, dass als Probenmaterial nur Blut verwendet wird, das sich leicht pipettieren lässt. Homogenisieren Sie die Blutprobe ggf. vor der Verwendung.

Bitte wenden Sie sich an:

MACHEREY-NAGEL Deutschland

Tel.: +49 (0) 24 21 969 270

E-Mail: TECH-BIO@mn-net.com

6.2 Meldepflicht

Bitte beachten Sie, dass jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt unverzüglich dem Hersteller sowie der zuständigen Behörde des europäischen Mitgliedstaates, in dem der Vorfall aufgetreten ist, zu melden ist. Europäische Vigilanz-Kontaktstellen: https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_en

6.3 Allgemeine Literatur

Thiemann F. *et al.* (2006) Leitfaden Molekulare Diagnostik -Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks, WILEY-VCH, ISBN 3-527-31471-7.

Orzińska A. *et al.* (2015) 14 Years of Polish Experience in Non-Invasive Prenatal Blood Group Diagnosis. *Transfus Med Hemother*, 42, 361 – 364.

Papadopoulou A. *et al.* (2014) Calcium sensing receptor in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 35, 632e638.











Bleda S. *et al.* (2012) Vascular endothelial growth factor polymorphisms are involved in the late vascular complications in Type II diabetic patients. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 9(1), 68 – 74.

6.4 Informationen zur Bestellung

Produkt	REF	Packung mit
NucleoSpin® Dx Blood	740899.50/.250	50/250
NucleoSpin® Dx Virus	740895.50	50
NucleoMag® Dx Pathogen	744215.4	384

Weitere Produktinformationen auf www.mn-net.com.

6.5 Erläuterung der Symbole

 REF	Artikelnummer		Zulässiger Lagertemperaturbereich
 LOT	Chargenidentifizierung		Zu verwenden bis
	Hersteller		Vorsicht: Weitere Informationen im Benutzerhandbuch
 IVD	Produkte für die <i>In-vitro</i> -Diagnostik		Nicht wiederverwenden
	Bitte Gebrauchsanweisung lesen		
	Ausreichend für < n> Tests		

6.6 Nutzungseinschränkung des Produkts/Garantie

Das **NucleoSpin® Dx Blood**-Kit ist ein allgemeines System für die Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus humanen Vollblutproben für die anschließende *In-vitro*-Diagnostik.

Das Kit ist für Downstream-Anwendungen geeignet, bei denen eine enzymatische Amplifikation und Detektion von DNA zur Anwendung kommt (z. B. PCR). Alle Diagnoseergebnisse, die unter Verwendung der DNA, die mit dem **NucleoSpin® Dx Blood**-Kit isoliert wurden, in Verbindung mit einem Diagnostikassay erzielt werden, sind unter Berücksichtigung zusätzlicher klinischer oder labordiagnostischer Befunde zu interpretieren. Das **NucleoSpin® Dx Blood**-Kit liefert kein Diagnoseergebnis. Es liegt in der alleinigen Verantwortung des Anwenders, das Kit in Verbindung mit einem Downstream-*In-vitro*-Diagnosteset zu verwenden und zu validieren. NUR Produkte von MACHEREY-NAGEL, die speziell als IVD gekennzeichnet sind, sind für den Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik geeignet.

Sicherheitshinweise entnehmen Sie bitte dem entsprechenden Kapitel im Benutzerhandbuch. Das **NucleoSpin® Dx Blood**-Kit darf ausschließlich in einer angemessenen Testumgebung (d. h. in einem geeigneten Laborbereich) verwendet werden.

Der jeweilige Anwender haftet für alle Schäden, die sich aus der Anwendung des **NucleoSpin® Dx Blood**-Kits für einen vom im Benutzerhandbuch angegebenen bestimmungsgemäßen Verwendungszweck abweichenden Gebrauch ergeben.

Dieses Produkt von MACHEREY-NAGEL wird mit einer Dokumentation ausgeliefert, in der die Spezifikationen und andere technische Informationen enthalten sind. MACHEREY-NAGEL gewährleistet die Einhaltung der angegebenen Spezifikationen. Die einzige Verpflichtung von MACHEREY-NAGEL und das einzige Rechtsmittel des Kunden beschränken sich auf den kostenlosen Ersatz der Produkte, falls diese nicht die zugesicherten Leistungen erbringen. Ergänzend wird auf die Allgemeinen Geschäftsbedingungen von MACHEREY-NAGEL verwiesen, die auf der Preisliste abgedruckt sind. Bitte wenden Sie sich an uns, wenn Sie ein zusätzliches Exemplar erhalten möchten.

MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie und haftet weder für Schäden oder Defekte, die durch Transport und Handhabung (Transportversicherung für Kunden ausgeschlossen) oder durch Versehen oder unsachgemäßen oder anormalen Gebrauch dieses Produkts entstehen, noch für Defekte an Produkten oder Komponenten, die nicht von MACHEREY-NAGEL hergestellt wurden, oder Schäden, die durch solche nicht von MACHEREY-NAGEL stammenden Komponenten oder Produkte entstehen.

MACHEREY-NAGEL übernimmt keine weiteren Garantien jeglicher Art und SCHLIESST AUSDRÜCKLICH ALLE ANDEREN GARANTIEEN JEGLICHER ART AUS, DIREKT ODER INDIREKT, AUSDRÜCKLICH ODER STILLSCHWEIGEND, EINSCHLIEßLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF DIE EIGNUNG, REPRODUZIERBARKEIT, HALTBARKEIT, EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK ODER GEBRAUCH, MARKTGÄNGIGKEIT, DEN ZUSTAND ODER JEGLICHE ANDERE ANGELEGENHEIT IN BEZUG AUF PRODUKTE VON MACHEREY-NAGEL.

In keinem Fall haftet MACHEREY-NAGEL für Ansprüche auf andere Schäden, ob direkt, indirekt, beiläufig, kompensatorisch, vorhersehbar, als Folge oder speziell (einschließlich, aber nicht beschränkt auf Nutzungs-, Umsatz- oder Gewinnverluste), ob auf der Grundlage von Garantie, Vertrag, unerlaubter Handlung (einschließlich Fahrlässigkeit) oder verschuldensunabhängiger Haftung, die im Zusammenhang mit dem Verkauf oder der Nichterfüllung der angegebenen Spezifikationen durch Produkte von MACHEREY-NAGEL entstehen. Diese Garantie ist ausschließlich und MACHEREY-NAGEL übernimmt keine sonstige ausdrückliche oder stillschweigende Garantie.

Die hierin enthaltene Garantie sowie die Daten, Spezifikationen und Beschreibungen dieses Produkts von MACHEREY-NAGEL, die in den von MACHEREY-NAGEL veröffentlichten Katalogen und der Produktliteratur erscheinen, sind die alleinigen Erklärungen von MACHEREY-NAGEL bezüglich des Produkts und der Garantie. Andere schriftliche oder mündliche Erklärungen oder Zusicherungen von Mitarbeitern, Agenten oder Vertretern von MACHEREY-NAGEL, mit Ausnahme von schriftlichen Erklärungen, die von einem ordnungsgemäß bevollmächtigten Vertreter von MACHEREY-NAGEL unterzeichnet sind, sind unzulässig; der Kunde darf sich nicht auf sie verlassen und sie sind nicht Teil des Kaufvertrags oder dieser Garantie.

Änderungen der Produktversprechen sind vorbehalten. Wenden Sie sich daher bitte an unseren technischen Kundendienst, um die aktuellsten Informationen über Produkte von MACHEREY-NAGEL zu erhalten. Für allgemeine wissenschaftliche Informationen können Sie sich auch an Ihren Händler vor Ort wenden. Die in der Literatur von MACHEREY-NAGEL erwähnten Anwendungen dienen nur der Information. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Gewähr dafür, dass alle Anwendungen in MACHEREY-NAGEL-Laboratorien mit MACHEREY-NAGEL-Produkten getestet wurden. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie für die Korrektheit dieser Anwendungen.

Zuletzt aktualisiert: April 2022 / Rev. 05

Grund für die Revision:

Hinzufügung von analytischen und klinischen Leistungsdaten zu Kapitel 2.5. Hinweis auf neue Sprachen im Benutzerhandbuch (Kapitel 1.3).

Markenzeichen:

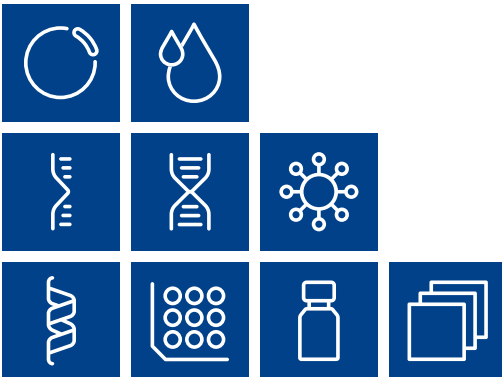
BD VACUETTE ist ein Warenzeichen von BD

NucleoSpin[®] ist ein Warenzeichen der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG.

S-Monovette ist ein eingetragenes Warenzeichen von Sarstedt

Vacuette ist ein Warenzeichen von GREINER BIO-ONE

Alle verwendeten Namen und Bezeichnungen können Marken, Warenzeichen oder eingetragene Kennzeichen ihrer jeweiligen Eigentümer sein – auch wenn es sich dabei nicht um besondere Bezeichnungen handelt. Die Erwähnung von Produkten und Marken stellt lediglich eine Art von Information dar (d. h. sie verstößt nicht gegen Warenzeichen und Marken und kann nicht als eine Art von Empfehlung oder Bewertung angesehen werden). In Bezug auf diese Produkte oder Dienstleistungen können wir keine Garantien hinsichtlich Auswahl, Leistungsfähigkeit oder Betrieb übernehmen.



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

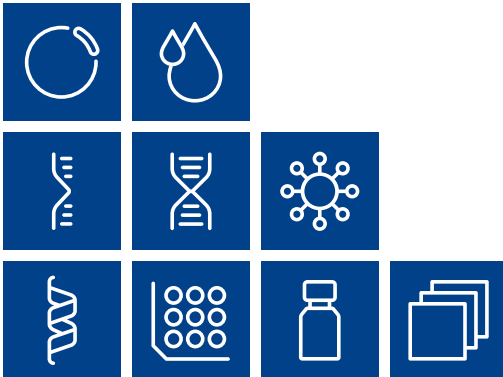
Viral RNA and DNA

Protein

High throughput

Accessories

Auxiliary tools



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennner Str. 11
52355 Düren · Germany

DE	Tel.: +49 24 21 969-0	info@mn-net.com
CH	Tel.: +41 62 388 55 00	sales-ch@mn-net.com
FR	Tel.: +33 388 68 22 68	sales-fr@mn-net.com
US	Tel.: +1 888 321 62 24	sales-us@mn-net.com

