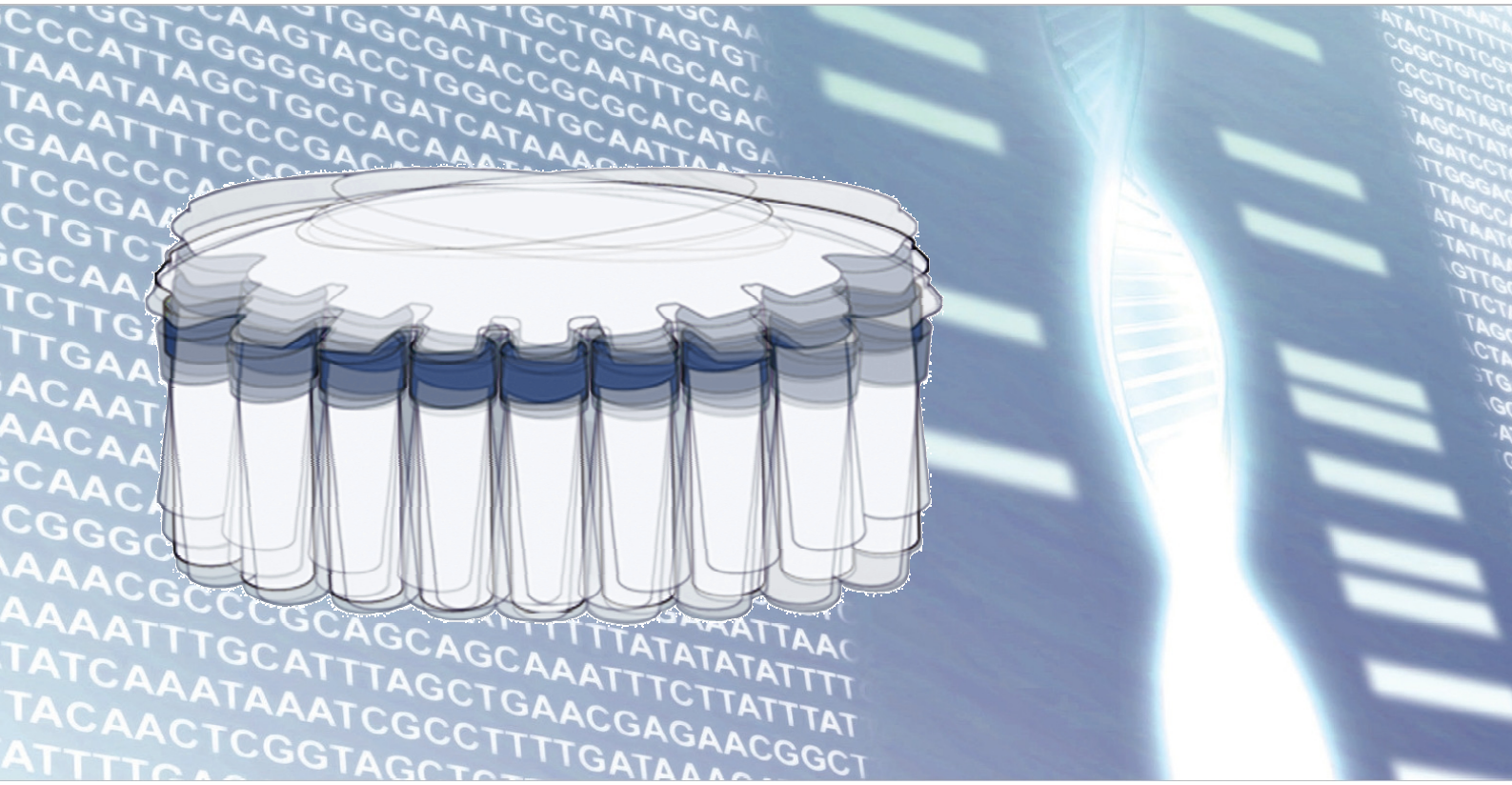
VWR® We Enable Science

peqlab a VWR brand

Arbeitsanleitung - Instruction Manual

Precellys Tissue DNA Kit

(Safety-Line)



INHALT

EINLEITUNG 1
FUNKTIONSPRINZIP 1
KITBESTANDTEILE 2
LAGERUNG 2
BINDEKAPAZITÄT 2
WICHTIGE HINWEISE 3
Einmalige Vorbereitung des Waschpuffers und Proteinase K 3
Benötigte Materialien, die nicht mitgeliefert werden: 3
GEFÄHRLICHE INHALTSSTOFFE 4
PRECELLYS TISSUE DNA KIT ISOLIERUNGSPROTOKOLL 6
AUFKONZENTRIERUNG DER DNA 8
QUANTIFIZIERUNG UND LAGERUNG DER DNA 8
TROUBLE SHOOTING TIPPS 9

CONTENT

INTRODUCTION 1
PRINCIPLE 1
KIT COMPONENTS 2
STORAGE AND STABILITY 2
BINDING CAPACITY 2
BEFORE STARTING 3
Initial preparation of Wash buffer and Proteinase K 3
Required materials to be supplied by the user 3
DANGEROUS COMPONENTS 4
PRECELLYS TISSUE DNA KIT PROTOCOL 6
CONCENTRATING THE DNA 8
QUANTIFICATION AND STORAGE OF THE DNA 8
TROUBLESHOOTING 9

EINLEITUNG

Die Precellys Tissue DNA Kits bieten eine schnelle und einfache Methode, um bis zu 50 µg genomischer DNA aus unterschiedlichen tierischen Geweben zu isolieren. Mit geringem Arbeitsaufwand gestatten sie die Bearbeitung einzelner oder zahlreicher Proben, wobei je Präparation bis zu 30 mg Gewebe oder 0.5 cm Maus- oder Rattenschwanz eingesetzt werden kann.

Das Kit wurde speziell für die Verwendung des Homogenisators Precellys® 24 zur schnellen, effektiven und reproduzierbaren Homogenisierung und zum Zellaufschluss von zahlreichen, insbesondere auch widerstandsfähigen Geweben entwickelt. Im Precellys Tissue DNA Kit enthalten sind 2 ml Schraubdeckelgefäße, gefüllt mit einer optimierten Mischung von Aufschlussbeads aus Keramik mit einem Durchmesser von 1.4 mm und 2.8 mm zur effektiven Zelllyse von tierischem Gewebe.

Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln, wie Phenol oder Chloroform, müssen ebenso wenig durchgeführt werden wie zeitaufwändige Fällungen mit Isopropanol oder Ethanol. Genomische DNA, die mit den Precellys Tissue DNA Kits isoliert wurde, kann direkt für alle Arten von Folgeexperimenten, wie PCR, Southern Blotting oder Restriktionsverdaus, weiterverwendet werden.

Precellys Tissue DNA Kits enthalten Safety-Line Säulen zur Isolierung hochreiner DNA. Schnappdeckel sorgen bei den Safety-Line Säulen für einen sicheren Verschluss und zusätzlichen Schutz vor Kreuzkontaminationen.

FUNKTIONSPRINZIP

Die Precellys Tissue DNA Kits kombinieren die selektiven und reversiblen Bindungseigenschaften von PerfectBind®-Silikamembranen mit der Schnelligkeit und leichten Durchführbarkeit von Zentrifugationssäulenmethoden. Ein speziell entwickeltes und optimiertes Puffersystem erlaubt die Reinigung von bis zu 50 µg genomischer DNA mit Molekülläng en bis 60 kbp.

Die aufzuarbeitenden Proben werden im Homogenisator Precellys® 24 homogenisiert und unter denaturierenden und auf das Probenmaterial abgestimmten Bedingungen lysiert. Anschließend werden sie auf eine PerfectBind®-Zentrifugensäule geladen, in der die DNA-Moleküle an die enthaltene Silikamembran binden. Zellulärer Debris, Proteine und sonstige Kontaminationen können hier durch Waschen mit speziellen Puffern schnell und einfach entfernt werden. Die gereinigte und qualitativ sehr hochwertige DNA wird abschließend in Elutionspuffer oder sterilem, deionisierten Wasser eluiert.

KITBESTANDTEILE

Precellys Tissue DNA Kit	**5 Reinigungen**	**50 Reinigungen**
Best.-Nr. Safety-Line	12-7521-00	12-7521-01
Bestandteile		
Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm	5	50
PerfectBind DNA Columns	5	50
2 ml Collection Tubes	5	50
DNA Lysis Buffer T-P	2.0 ml	20 ml
DNA Binding Buffer	1.5 ml	12 ml
DNA Wash Buffer	3.2 ml	32 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0)	2 x 1.5 ml	25 ml
Proteinase K	3 mg	30 mg
TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA)	1.5 ml	1.5 ml & 10 ml
Arbeitsanleitung	1	1

LAGERUNG

Bitte lagern Sie ungelöste Proteinase K kühl und trocken bei 4 °C oder –20 °C. Gelöste Proteinase K sollte aliquotiert und bei –20 °C gelagert werden. Alle anderen Kitkomponenten sind bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) aufzubewahren und bleiben so für mindestens 12 Monate ab Lieferung stabil.

BINDEKAPAZITÄT

Die Bindekapazität der PerfectBind® DNA Columns beträgt rund 50 µg DNA. Es sollte nicht mehr als die angegebene Menge an Ausgangsmaterial eingesetzt werden.

WICHTIGE HINWEISE

Bitte lesen Sie das vorliegende Protokoll vor der ersten Verwendung des Kit vollständig durch und legen Sie vor Präparationsbeginn alle für die Isolierung benötigten Materialien bereit.

Einmalige Vorbereitung des Waschpuffers und Proteinase K

! DNA Wash Buffer wird als Konzentrat geliefert und muss vor seiner ersten Verwendung mit absolutem Ethanol verdünnt werden:

5 Reinigungen	3.2 ml DNA Wash Buffer mit 4.8 ml 100 % EtOH mischen.
50 Reinigungen	32 ml DNA Wash Buffer mit 48 ml 100 % EtOH mischen.

Verdünnter DNA Wash Buffer sollte bei Raumtemperatur gelagert oder vor seiner Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden.

! Proteinase K wird als Pulver geliefert und muss vor ihrer ersten Verwendung durch Vortexen in TE Puffer gelöst werden:

5 Reinigungen	3 mg Proteinase K in 150 µl TE Buffer lösen.
50 Reinigungen	30 mg Proteinase K in 1.5 ml TE Buffer lösen.

Gelöste Proteinase K sollte aliquotiert bei –20 °C gelagert und bei Bedarf frisch aufgetaut werden.

! Alle Zentrifugationsschritte sollten bei 22 – 25 °C durchgeführt werden.

Benötigte Materialien, die nicht mitgeliefert werden:

! Precellys® 24 Homogenisator
! Thermo-Inkubationsmischer oder Heizblock für 2 ml Reaktionsgefäße bei 50°C
! Tischzentrifuge für 2 ml Reaktionsgefäße
! 100 % Ethanol
! Sterile Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße
! RNase A (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)

GEFÄHRLICHE INHALTSSTOFFE

Precellys Tissue DNA Kit

Bestandteile	Signalwort / Symbole	Gefährliche Inhaltsstoffe	H- und P-Sätze
Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm	-	-	-
PerfectBind DNA Columns	-	-	-
2 ml Collection Tubes	-	-	-
DNA Lysis Buffer T-P	--- (not necessary)	sodium dodecyl sulphate, CAS: 151-21-3	--- (not necessary)
DNA Binding Buffer	DANGER 	propan-2-ol 50-100%, CAS: 67-63-0	H225, H319, H336, P101, P102, P103, P210, P261, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P405, P501
DNA Wash Buffer	-	-	-
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0)	-	-	--
Proteinase K	DANGER 	Proteinase, Tritirachium album serine 50-100%, CAS: 39450-01-6	H319, H335, H315, H334, P280, P285, P305+P351+P338, P309+P311
TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA)	-	-	-

H- und P-Sätze	Erläuterungen
H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P285	Bei unzureichender Lüftung Atemschutz tragen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
P101	Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
P102	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
P103	Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
P210	Von Hitze, heissen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P303+P361+P353	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P309+P311	Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum, Arzt oder … anrufen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt/Behälter … zuführen.

PRECELLYS TISSUE DNA KIT ISOLIERUNGSPROTOKOLL

1. Homogenisierung und Lyse

Bis zu 30 mg Gewebe (ca. 2 - 3 mm^3) oder 0.5 cm Maus- bzw. Rattenschwanz (evtl. in Stücke schneiden) in ein Lysegefäß des Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm überführen und 100 µl TE (pH 8.0) zugeben. Lysegefäß in den Probenhalter des Precellys® 24 stellen und für 1 x 10 s bei 5000 rpm (weiches Gewebe, z.B Leber) oder 3 x 30 s bei 6500 rpm mit 20 s Pause (hartes Gewebe, z.B. Mausschwanz) homogenisieren.

Für widerstandsfähige Gewebe kann eine Erhöhung der Homogenisierungsenergie erforderlich sein. Dabei ist zu beachten, dass übermäßiges Homogenisieren zu einer Scherung der genomischen DNA führen kann. Andererseits können bereits hohe Nukleinsäuremengen isoliert werden, obwohl die Homogenisierung unvollständig erscheint. Je nach Gewebe muss evtl. durch Vorversuche das ideale Homogenisierungsprotokoll ermittelt werden.

350 µl DNA Lysis Buffer T-P, 25 µl Proteinase K und 10 µl RNase A [20 mg/ml] zugeben, durch Vortexen für 5 s sorgfältig mischen und für 15 min bei 50 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren. Wenn kein Gerät zum Schütteln verfügbar sein sollte, kann der Ansatz durch 3 - 4 maliges kurzes Vortexen gemischt werden.
Anmerkung: Die Inkubationszeit zur Lyse von Maus- oder Rattenschwänzen kann ggf. bis zu 1 – 1.5 h verlängert werden.

Für 30 s bei 10000 x g zentrifugieren um unlösliche Debristeile zu pelletieren. Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen, dabei möglichst das Pellet unbeschädigt lassen.

2. Laden und Binden

200 µl DNA Binding Buffer zum Lysat geben und durch Auf- und Abziehen mittels Pipette sorgfältig mischen.

Eine PerfectBind®-DNA Column in ein 2 ml Collection Tube stecken und bis zu 750 µl des Ansatzes auf die Säule laden. Für 2 min bei 10000 x g zentrifugieren, danach den Säulendurchfluss verwerfen und das Collection Tube weiterverwenden.

Bei Ansätzen > 750 µl die Säule mehrmals beladen. Auch wenn die Probe noch nicht vollständig über die Säule zentrifugiert worden ist, sollte der Zentrifugationsschritt wiederholt werden.

3. Waschen

650 µl DNA Wash Buffer (mit Ethanol versetzt!) zugeben und für 1 min bei 10000 x g zentrifugieren. Den Säulendurchfluss verwerfen und das Collection Tube weiterverwenden.

Nochmals 650 µl DNA Wash Buffer zugeben und für 1 min bei 10000 x g zentrifugieren. Den Säulendurchfluss verwerfen und das Collection Tube im nächsten Schritt weiterverwenden.

4. Trocknen (Essentieller Schritt! Zeit nicht verkürzen!)

Säule in das geleerte 2 ml Collection Tube stecken und durch Zentrifugieren für 2 Minuten bei 10000 x g vollständig trocknen.

5. Elution

Säule in ein steriles 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen und 200 µl Elution Buffer auf die Säulenmatrix pipettieren. Säule im Reaktionsgefäß für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und danach für 1 Minute bei 6000 x g zentrifugieren.

Optional: Elution kann mit weiteren 200 µl Elution Buffer wiederholt werden.

Es ist zu beachten, dass mehrere Elutionsrunden zwar den absoluten Ertrag erhöhen, dafür jedoch die Konzentration erniedrigen. Für die zweite Elution kann auch das erste Eluat verwendet werden. Dadurch wird bei höherer Endkonzentration ebenfalls der Gesamtertrag noch etwas verbessert. Er bleibt aber ca. 30 % hinter dem Ertrag zurück, der bei einer Nachelution mit einem zweiten Aliquot Elution Buffer erreicht werden kann. Eine Inkubation der Säule bei 70 °C anstatt bei Raumtemperatur kann den Elutionsertrag geringfügig erhöhen.

AUFKONZENTRIERUNG DER DNA

Genomische DNA, die mit dem Precellys Tissue DNA Kit aufgereinigt wurde, kann bei Bedarf noch weiter konzentriert werden. Hierzu zunächst NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.1 M und danach 2 Volumen absolutes Ethanol zugeben. Ansatz durch Vortexen sorgfältig mischen und für 10 Minuten bei –20 °C inkubieren. Danach für 15 Minuten bei 10000 x g zentrifugieren und Überstand verwerfen. 700 µl 80 % Ethanol zugeben und für 2 Minuten bei 10000 x g zentrifugieren. Überstand verwerfen, Pellet für 2 Minuten lufttrocknen und DNA in 20 µl Elutionspuffer oder sterilem, deionisierten Wasser lösen.

QUANTIFIZIERUNG UND LAGERUNG DER DNA

Um die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung zu bestimmen, muss die Absorption eines geeignet verdünnten Aliquots (10- bis 50-fach) bei 260 nm und 280 nm gemessen werden. Eine A_{260}-Einheit entspricht dabei 50 µg DNA/ml. Die Konzentration berechnet sich demnach wie folgt:

DNA-Konzentration (µg/ml) = Absorption$_{260}$ x 50 x Verdünnungsfaktor

Das $A_{260/280}$-Verhältnis reiner Nukleinsäuren liegt bei 2.0. Das mit den Precellys Tissue DNA Kit erzielbare Verhältnis von 1.7 bis 1.9 entspricht deshalb genomischer DNA einer Reinheit von 85 % bis 95 %.

Alternativ können der ungefähre Ertrag und die Qualität der erhaltenen DNA auch durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung und Vergleich mit bekannten DNA-Proben bestimmt werden.

Genomische DNA, die mit den Precellys Tissue DNA Kit aufgereinigt wurde, kann in Elutionspuffer, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) oder sterilem, deionisierten Wasser für mehrere Jahre bei –20 °C aufbewahrt werden. Dabei ist zu beachten, dass häufiges Auftauen und Einfrieren zum Scheren der DNA und damit zu einer sukzessiven Reduktion der Molekülgrößen führt.

TROUBLE SHOOTING TIPPS

Problem	Ursache	Abhilfe
Säule verstopft	Unvollständige Lyse	Inkubationszeit mit DNA Lysis Buffer T-P verlängern und/oder Homogenisierungsenergie erhöhen.
	Zu große Probenmenge	Lysat auf mehrere Precellysröhrchen und PerfectBind-DNA-Säulen verteilen.
	Lysat zu viskos	Lysat mit 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 verdünnen und auf mehrere Säulen verteilen.
Niedriger DNA-Ertrag	Schlechte Elution	Elution wiederholen oder Elutionsvolumen erhöhen. Säule vor der Elution für 5 Minuten bei 70 °C inkubieren.
	Unzureichendes Waschen	DNA Wash Buffer wird als Konzentrat geliefert und muss mit 1.5 Volumen absolutem Ethanol verdünnt werden.
	Säule verstopft	Siehe oben
Keine DNA im Eluat	Schlechte Zelllyse in DNA Lysis Buffer T-P	Gewebestücke in kleine Stücke schneiden. Inkubationszeit mit DNA Lysis Buffer T-P verlängern und/oder Homogenisierungsenergie erhöhen
	Schlechte Bindung der DNA an PerfectBind-DNA-Säule	Nach der Zugabe des DNA Binding Buffers und vor dem Laden sofort und sorgfältiger mischen.
	Wash Buffer nicht mit absolutem Ethanol verdünnt.	DNA Wash Buffer Konzentrat muss mit 1.5 Volumen absolutem Ethanol verdünnt werden.
Schlechtes $A_{260/280}$ Verhältnis	Säulenmaterial im Eluat vorhanden	Zentrifugationsgeschwindigkeiten höher als die Angegebenen sind unbedingt zu vermeiden. Das Säulenmaterial kann aus der Probe durch Zentrifugation abgetrennt werden, es beeinträchtigt enzymatische Reaktionen nicht.
	Niedriger DNA Ertrag	Siehe oben
Probleme mit nachfolgenden Reaktionen	Verschleppung von Salzen	Es ist darauf zu achten, dass der DNA Wash Buffer bei Raumtemperatur gelagert wird und keine Präzipitate enthält.
	Verschleppung von Ethanol	Der Trocknungsschritt mit 2-minütigem Zentrifugieren ist unbedingt einzuhalten.

INTRODUCTION

The Precellys Tissue DNA Kit provides a rapid and easy method for the isolation of up to 50 µg of genomic DNA from different animal tissues, mouse or rat tail snips. The kit allows processing of single or multiple samples simultaneously with up to 30 mg of tissue material or 0.5 cm of mouse tail snips.

The kit is specially developed for the use with the homogenizer Precellys® 24 for a fast, effective and reproducible homogenization of a wide range of samples including hard to lyse tissues and cells. Provided with the kit are 2 ml screw-cap tubes prefilled with a mixture of optimised amounts of ceramic beads of 1.4 mm and 2.8 mm in diameter giving best results for the lysis of various tissues.

There is no need for extractions with organic solvents like phenol or chloroform or time-consuming steps such as precipitation with isopropyl alcohol or ethanol. Genomic DNA purified with the Precellys Tissue DNA Kit is ready for a wide range of applications such as PCR, Southern Blotting and restriction digestion.

The Precellys Tissue DNA Kit contains PerfectBind® spin columns for the isolation of highly purified DNA. The columns can be closed tightly by lids to avoid cross-contamination more effectively.

PRINCIPLE

The Precellys Tissue DNA Kit uses the reversible binding properties of the PerfectBind® matrix, a silica-based material, combined with the speed of mini-column spin technology. A specifically formulated buffer system allows the isolation of up to 50 µg of genomic DNA with fragment sizes up to 60 kbp to bind to the matrix.

Samples are first homogenized with the homogenizer Precellys® 24, lysed under appropriate conditions and then applied to the PerfectBind® spin columns, where the DNA is effectively bound to the silica membrane. Cellular debris, proteins and other contaminants are washed away by specific buffers. The high quality DNA is finally eluted in Elution Buffer or sterile deionized water.

KIT COMPONENTS

Precellys Tissue DNA Kit	**5 Preparations**	**50 Preparations**
Order No. Safety-Line	12-7521-00	12-7521-01
Components		
Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm	5	50
PerfectBind® DNA Columns	5	50
2 ml Collection Tubes	5	50
DNA Lysis Buffer T-P	2.0 ml	20 ml
DNA Binding Buffer	1.5 ml	12 ml
DNA Wash Buffer	3.2 ml	32 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0)	2 x 1.5 ml	25 ml
Proteinase K	3 mg	30 mg
TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA)	1.5 ml	1.5 ml & 10 ml
Instruction manual	1	1

STORAGE AND STABILITY

Please store undissolved Proteinase K cool and dry at 4 °C or –20 °C. Dissolved Proteinase K has to be stored in aliquots at –20 °C. All other kit components should be stored at room temperature (22 to 25 °C) and will then remain stable for at least 12 months after the date of purchase.

BINDING CAPACITY

Each PerfectBind® DNA column can bind approximately 50 µg of DNA. Using more than 30 mg of tissue is not recommended.

BEFORE STARTING

Please read the protocol carefully before the first use of the Precellys Tissue DNA Kit and keep all required materials available before starting the preparation.

Initial preparation of Wash buffer and Proteinase K

! DNA Wash Buffer is delivered as a concentrate and must be diluted with absolute ethanol before use:

5 Preparations	Mix 3.2 ml DNA Wash Buffer with 4.8 ml 100 % EtOH.
50 Preparations	Mix 32 ml DNA Wash Buffer with 48 ml 100 % EtOH.

Diluted DNA Wash Buffer should be stored at room temperature. If stored at lower temperatures, it should be heated to room temperature before use.

! Proteinase K is delivered as a powder and must be dissolved before use by thoroughly vortexing in TE buffer:

5 Preparations	Dissolve 3 mg Proteinase K in 150 µl TE buffer.
50 Preparations	Dissolve 30 mg Proteinase K in 1.5 ml TE buffer.

Dissolved Proteinase K has to be stored in aliquots at –20 °C and be freshly thawed before use.

! All centrifugation steps have to be performed at 22 – 25 °C.

Required materials to be supplied by the user

! Precellys® 24 homogenizer
! Thermo Mixer or Digital Dry Bath for 2 ml tubes at 50°C
! Microcentrifuge for 2 ml tubes
! 100 % ethanol
! Sterile pipette tips and centrifuge tubes
! RNase A (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)

DANGEROUS COMPONENTS

Precellys Tissue DNA Kit

Components	Signal word / symbols	Dangerous components	H and P statements
Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm	-	-	-
PerfectBind DNA Columns	-	-	-
2 ml Collection Tubes	-	-	-
DNA Lysis Buffer T-P	--- (not necessary)	sodium dodecyl sulphate, CAS: 151-21-3	--- (not necessary)
DNA Binding Buffer	DANGER 	propan-2-ol 50-100%, CAS: 67-63-0	H225, H319, H336, P101, P102, P103, P210, P261, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P405, P501
DNA Wash Buffer	-	-	-
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0)	-	-	--
Proteinase K	DANGER 	Proteinase, Tritirachium album serine 50-100%, CAS: 39450-01-6	H319, H335, H315, H334, P280, P285, P305+P351+P338, P309+P311
TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA)	-	-	-

H and P statements	Descriptions
H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H225	Highly flammable liquid and vapour.
P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P285	In case of inadequate ventilation wear respiratory protection.
H334	May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.
H335	May cause respiratory irritation.
H336	May cause drowsiness or dizziness.
P101	If medical advice is needed, have product container or label at hand.
P102	Keep out of reach of children.
P103	Read label before use.
P210	Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
P261	Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P303+P361+P353	IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower.
P305+P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minuts. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309+P311	IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents/container to …

PRECELLYS TISSUE DNA KIT PROTOCOL

1. Homogenization and lysis of animal tissues

Use a maximum of 30 mg of tissue (ca. 2 to 3 mm^3) or 0.5 cm mouse or rat tail (cut in small pieces) and place the sample in a tube of the Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm. Add 100 µl TE (pH 8.0) and place the tube in the tube holder of the Precellys® 24. Homogenize the sample for 1 x 10 s at 5000 rpm (soft tissue, e.g. liver) or 3 x 30 s at 6500 rpm with 20 s pause (hard tissue, e.g. mouse tail).

For hard to lyse tissues an increase of homogenization energy might be necessary. Note that excessive homogenization can lead to shearing of the genomic DNA. Depending on the tissue the homogenization protocol has to be optimized by preliminary experiments.

Add 350 µl DNA Lysis Buffer T-P, 25 µl Proteinase K and 10 µl RNase A [20 mg/ml]. Mix thoroughly by vortexing for 5 s and incubate for 15 min at 50 °C while shaking. If no shaking device is available, mix the solutions 3 to 4 times by vortexing shortly. Note: Lysis incubation time can be extended to 1 - 1.5 h for mouse and rat tails.

Centrifuge the lysed solution for 30 seconds at 10000 x g (12000 rpm in a standard microcentrifuge) to pellet down unlysable debris. Transfer the supernatant carefully in a new 1.5 ml tube without carrying-over parts of the debris pellet.

2. Loading and Binding

Add 200 µl DNA Binding Buffer to the lysate and mix thoroughly by pipetting up and down.

Place a PerfectBind DNA column in a 2 ml collection tube and load up to 750 µl of the preparation on the column. Centrifuge the column with the collection tube for 2 minutes at 10000 x g and repeat loading the column with the remaining lysate if necessary. Discard the flow-through and keep the collection tube. Repeat this step if the sample has not been centrifuged completely.

3. Washing

Add 650 µl DNA Wash Buffer (completed with ethanol!) and centrifuge for 1 minute at 10000 x g. Discard the flow-through and keep the collection tube.

Place the column in the empty collection tube and add 650 µl of the DNA Wash Buffer on the column. Centrifuge the column with the collection tube for 1 minute at 10000 x g. Discard the flow-through and keep the collection tube.

4. Drying (Important step! Do not reduce centrifugation time!)

Place the column in the empty collection tube and dry the column completely by centrifugation for 2 minutes at 10000 x g.

5. Elution

Place the column into a sterile 1.5 ml reaction tube and add 200 µl Elution buffer. Incubate tubes for 3 min at room temperature**.** To elute DNA from the column, centrifuge for 1 min at 6000 x g.

Optional: Repeat the elution with a second 200 µl Elution buffer.

A second elution increases the final yield, but can decrease the concentration of the isolated DNA. The final yield can be increased together with the concentration of the DNA, if the eluate is used for a second elution. But note that the yield is about 30 % decreased compared to a second elution with a fresh aliquot of Elution Buffer. The yield can be slightly improved by incubating the column at 70 °C instead of room temperature before centrifuging.

CONCENTRATING THE DNA

Genomic DNA purified with the Precellys Tissue DNA Kit can be further concentrated if required. Add NaCl to an end concentration of 0.1 M and 2 sample volumes of absolute ethanol. Mix thoroughly by vortexing and incubate for 10 minutes at –20 °C. Centrifuge for 15 minutes at 10000 x g and discard the supernatant. Add 700 µl of 80 % ethanol and centrifuge for 2 minutes at 10000 x g. Discard the supernatant, air-dry the pellet for 2 minutes and dissolve the DNA in 20 µl of Elution buffer or sterile, deionised water.

QUANTIFICATION AND STORAGE OF THE DNA

To determine the concentration and the purity of a DNA containing solution, the absorbance of a 10- to 50-fold diluted aliquot is measured at 260 nm and 280 nm in a spectrophotometer. One A_{260} unity corresponds to 50 µg of DNA per ml. The concentration can be determined as follows:

DNA concentration (µg/ml) = absorbance$_{260}$ x 50 x dilution factor

The $A_{260/280}$ ratio of pure nucleic acids is 2.0. Generally genomic DNA isolated with the Precellys Tissue DNA Kit shows ratios between 1.7 and 1.9 corresponding to a purity of 85 % to 95 %.

Genomic DNA isolated with the Precellys Tissue DNA Kit can be stored in Elution Buffer, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) or sterile, deionised water for several years at –20 °C. Avoid frequent freezing and thawing as this will shear the DNA and result in a reduction of molecule size.

TROUBLESHOOTING

Problem	Possible Cause	Suggestions
Clogged column	Incomplete lysis	Optimise homogenization parameter or extend incubation time of lysis with DNA Lysis Buffer T-P and protease.
	Sample too large	Divide the sample into several Precellys tubes to homogenize. Distribute lysate on more than one column.
	Sample too viscous	Dilute lysate with 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. Distribute lysate on more than one column.
Low DNA yield	Incomplete lysis	See above.
	Poor elution	Pipette elution buffer onto the center of silica membrane. Repeat elution or increase elution volume. Incubate column at 70 °C for 5 minutes with Elution Buffer before centrifugation.
	Improper washing	Wash Buffer concentrate must be diluted with ethanol before first use.
	Clogged column	See above.
No DNA eluted	Poor binding of DNA to the PerfectBind column	Mix sample thoroughly with DNA Binding Buffer prior to loading onto PerfectBind column.
	No ethanol added to Wash Buffer concentrate	Dilute Wash Buffer with the indicated volume of absolute ethanol before first use.
Low $A_{260/280}$ ratio	Resin from the column present in the eluate	Avoid centrifugation at speeds higher than specified. The material can be removed from the eluate by centrifugation and will not interfere with enzymatic reactions.
	Low DNA yield	See above.
Problems with downstream applications	Salt carry-over	Ensure that the DNA Wash Buffer is at room temperature and does not contain any precipitates.
	Ethanol carry-over	Dry the columns after the washing step for at least 2 minutes by centrifugation at maximum speed.

Life Science Competence Center Erlangen
VWR International GmbH | Carl-Thiersch-Str. 2b | D - 91052 Erlangen | Freecall: 0800 100 2016 | Fax: +49 9131 610 70 - 99
E-Mail: info.peqlab@de.vwr.com | Internet: www.peqlab.de

VWR International GmbH
Hilpertstraße 20a | D - 64295 Darmstadt | Freecall: 0800 702 00 07 | Fax: 0180 570 22 22 (0,14 €/Min. aus d. dt. Festnetz)
Email: info@de.vwr.com | Internet: http://de.vwr.com