
Arbeitsanleitung - Instruction Manual

Precellys Plant DNA Kit (Safety-Line)



INHALT

EINLEITUNG	1
FUNKTIONSPRINZIP	1
KITBESTANDTEILE	2
LAGERUNG	2
BINDEKAPAZITÄT	2
WICHTIGE HINWEISE	3
Einmalige Vorbereitung des Waschpuffers	3
Benötigte Materialien, die nicht mitgeliefert werden:	3
GEFÄHRLICHE INHALTSSTOFFE	4
PRECELLYS PLANT 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	3
Required equipment and materials to be supplied by the user	3
DANGEROUS COMPONENTS	4
PRECELLYS PLANT DNA KIT PROTOCOL	6
CONCENTRATING THE DNA	8
QUANTIFICATION AND STORAGE OF THE DNA	8
TROUBLESHOOTING	9

EINLEITUNG

Die Precellys Plant DNA Kits bieten eine schnelle und einfache Methode, um bis zu 30 µg genomischer DNA aus unterschiedlichem Gewebe verschiedenster Pflanzenarten zu isolieren. Mit geringem Arbeitsaufwand gestatten sie die Bearbeitung einzelner oder zahlreicher Proben, wobei je Präparation bis zu 100 mg Pflanzenmaterial 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 Plant 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 Zellyse von pflanzlichem 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 Plant DNA Kits isoliert wurde, kann direkt für alle Arten von Folgeexperimenten, wie PCR, Southern Blotting oder Restriktionsverdau, weiterverwendet werden.

Precellys Plant 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 Plant 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 30 µg genomischer DNA mit Moleküllängen 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 Plant DNA Kit	5 Reinigungen	50 Reinigungen
Best.-Nr. Safety-Line	12-7531-00	12-7531-01
Bestandteile		
Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm	5	50
PerfectBind DNA Columns	5	50
Microfilter	5	50
2 ml Collection Tubes	10	100
Lysis Buffer PL1-P	2 x 1.2 ml	25 ml
Lysis Buffer PL2-P	0.8 ml	7.5 ml
DNA Binding Buffer	1.4 ml	12.5 ml
DNA Wash Buffer	3.2 ml	32 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0)	2 x 1 ml	18 ml
TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA)	1.5 ml	10 ml
Arbeitsanleitung	1	1

LAGERUNG

Bei einer Umgebungstemperatur von 22 – 25 °C bleiben die Komponenten des Kits für mindestens 12 Monate ab Lieferung stabil.

BINDEKAPAZITÄT

Die Bindekapazität der PerfectBind® DNA Columns beträgt rund 30 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

- ! 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.

- ! 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 65°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 Plant DNA Kit

Bestandteile	Signalwort / Symbole	Gefährliche Inhaltsstoffe	H- und P-Sätze
Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm	-	-	-
PerfectBind DNA Columns	-	-	-
Microfilter	-	-	-
2 ml Collection Tubes	-	-	-
Lysis Buffer PL1-P	--- (not necessary)	sodium dodecyl sulphate, CAS: 151-21-3	--- (not necessary)
Lysis Buffer PL2-P	DANGER 	guanidinium thiocyanate 25-50%, CAS: 593-84-0	H302+H312+H332, H314, H412, P101, P102, P103, P260, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P405, P501
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)	-	-	--
TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA)	-	-	-

H- und P-Sätze	Erläuterungen
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H302+H312+H332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
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.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
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.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt/Behälter ... zuführen.

PRECELLYS PLANT DNA KIT ISOLIERUNGSPROTOKOLL

1. Homogenisierung und Lyse

Bis zu 100 mg Gewebe (sehr grobes Gewebe in kleine 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 20 s bei 5000 rpm 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.

400 µl Lysis Buffer PL1-P und 10 µl RNase A [20 mg/ml] zugeben, durch Vortexen für 5 s sorgfältig mischen und für 15 min bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren. Wenn kein Gerät zum Schütteln verfügbar sein sollte, kann der Ansatz durch 3 - 4 maliges kurzes Vortexen gemischt werden.

100 µl Lysis Buffer PL2-P zugeben und durch Vortexen für 5 s mischen. Anschließend für 5 min auf Eis inkubieren.

Für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.

Microfilter in ein 2 ml Collection Tube stecken und die homogenisierte Probe auf den Microfilter laden. Für 1 min bei 10000 x g zentrifugieren, danach den Microfilter werfen und mit dem Filtrat weiterarbeiten.

2. Laden und Binden

0.5 Volumen DNA Binding Buffer (in den meisten Fällen 225 µl) zum Filtrat 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 1 min bei 10000 x g zentrifugieren, danach den Säulendurchfluss werfen 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 werfen und das Collection Tube weiterverwenden.

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

5. 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.

6. Elution

Säule in ein steriles 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen und 100 - 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 100 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 Elutionspuffer 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 Plant 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren. Danach für 15 Minuten bei $10000 \times g$ zentrifugieren und Überstand verwerfen. 700 μl 80 % Ethanol zugeben und für 2 Minuten bei $10000 \times g$ 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:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das $A_{260/280}$ -Verhältnis reiner Nukleinsäuren liegt bei 2.0. Das mit den Precellys Plant 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 Plant DNA Kit aufgereinigt wurde, kann in Elutionspuffer, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) oder sterilem, deionisierten Wasser für mehrere Jahre bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 Lysis Buffer PL1-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 Lysis Buffer PL1-P	Gewebestücke in kleine Stücke schneiden. Inkubationszeit mit Lysis Buffer PL1-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 Plant DNA Kit provides a rapid and easy method for the isolation of up to 30 µg of genomic DNA from different tissues of a wide variety of plant species. The kit allows processing of single or multiple samples simultaneously with up to 100 mg of plant material per reaction.

The kit is specially developed for use with the homogenizer Precellys® 24 for a fast, effective and reproducible homogenization and cell disruption of a wide range of samples including hard to lyse tissues. 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 plant 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 Plant DNA Kit is ready for a wide range of applications such as PCR, Southern Blotting and restriction digestion.

The Precellys Plant 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 Plant 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 30 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 Plant DNA Kit	5 Preparations	50 Preparations
Order No. Safety-Line	12-7531-00	12-7531-01
Components		
Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm	5	50
PerfectBind® DNA columns	5	50
Microfilter	5	50
2 ml Collection Tubes	10	100
Lysis Buffer PL1-P	2 x 1.2 ml	25 ml
Lysis Buffer PL2-P	0.8 ml	7.5 ml
DNA Binding Buffer	1.4 ml	12.5 ml
DNA Wash Buffer	3.2 ml	32 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0)	2 x 1 ml	18 ml
TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA)	1.5 ml	10 ml
Instruction manual	1	1

STORAGE AND STABILITY

The components of the kit remain stable at an ambient temperature of 22 – 25 °C for at least 12 months after the date of purchase.

BINDING CAPACITY

Each PerfectBind® DNA column can bind approximately 30 µg of DNA. Using more than 100 mg of tissue is not recommended.

BEFORE STARTING

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

Initial preparation of Wash buffer

- ! 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.

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

Required equipment and materials to be supplied by the user

- ! Precellys® 24 homogenizer
- ! Thermo Mixer or Digital Dry Bath for 2 ml tubes at 65°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 Plant DNA Kit

Components	Signal word / symbols	Dangerous components	H and P statements
Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm	-	-	-
PerfectBind DNA Columns	-	-	-
Microfilter	-	-	-
2 ml Collection Tubes	-	-	-
Lysis Buffer PL1-P	--- (not necessary)	sodium dodecyl sulphate, CAS: 151-21-3	--- (not necessary)
Lysis Buffer PL2-P	DANGER 	guanidinium thiocyanate 25-50%, CAS: 593-84-0	H302+H312+H332, H314, H412, P101, P102, P103, P260, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P405, P501
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)	-	-	--
TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA)	-	-	-

H and P statements	Descriptions
H225	Highly flammable liquid and vapour.
H302+H312+H332	Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
H319	Causes serious eye irritation.
H336	May cause drowsiness or dizziness.
H412	Harmful to aquatic life with long lasting effects.
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.
P260	Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P261	Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
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 minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents/container to ...

PRECELlys PLANT DNA KIT PROTOCOL

1. Homogenization and lysis of plant tissues

Transfer up to 100 mg of plant material (cut hard to lyse tissue in pieces) into a tube of the Precellys® Ceramic Kit 1.4/2.8 mm and add 100 µl of TE buffer. Place the tube in the tube holder of the Precellys® 24 and homogenize 1 x 20 s at 5000 rpm.

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.

Open the tube and add 400 µl Lysis Buffer PL1-P and 10 µl RNase A [20 mg/ml]. Vortex for 5 s and incubate for 15 min at 65 °C while shaking. If a shaking device is not available, mix the solutions 3 to 4 times by vortexing shortly.

Add 100 µl Lysis Buffer PL2-P and vortex for 5 s. Incubate the tube for 5 min on ice.

Centrifuge for 5 min at maximum speed.

Assemble a microfilter in a 2 ml collection tube. Transfer the clear sample (supernatant) carefully onto the microfilter and centrifuge for 1 min at 10000 x g (12 000 rpm in a standard microcentrifuge). Discard the microfilter and keep the filtrate.

2. Loading and Binding

Add 0.5 volume DNA Binding Buffer (in most cases 225 µl) to the filtrate and mix by pipetting up and down.

Assemble a PerfectBind DNA column in a 2 ml collection tube. Transfer up to 750 µl of the sample onto the column and centrifuge for 1 minute at 10000 x g. Discard the flow-through liquid and repeat loading the column with the remaining lysate if necessary. Discard the flow-through and keep the collection tube. Repeat centrifugation if the sample has not been centrifuged completely.

3. Washing

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

Add a second 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 min at 10000 x g.

5. Elution

Place the column into a sterile 1.5 ml microfuge tube and add 100 - 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 100 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 Plant 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 $10000 \times g$ and discard the supernatant. Add 700 μl of 80 % ethanol and centrifuge for 2 minutes at $10000 \times g$. 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 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = absorbance₂₆₀ $\times$ 50 $\times$ dilution factor

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

Genomic DNA isolated with the Precellys Plant 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 Lysis Buffer PL1-P.
	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>