

**MB DNA Extraction Kit**  
**for swabs, urine, and cell cultures**

**Gebrauchsinformation / User Manual**

**Inhaltsverzeichnis**

1. Reagenzien und Materialien	2
1.1 Inhalt der Packung	2
1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien	2
1.3 Benötigte Geräte und Materialien	2
2. Anwendung	2
3. Durchführung	3
3.1 Probenaufarbeitung	3
3.1.1 Tupfer	3
3.1.2 Urin	3
3.1.3 Zellkulturmaterial	4
3.2 DNA-Isolierung	4
4. Sicherheitsinformation	5
Anlage	10

**Contents**

1. Reagents and Materials	6
1.1 Kit Components	6
1.2 Stability and Storage	6
1.3 Supplemental Requirements	6
2. Application	6
3. Protocol	7
3.1 Sample Preparation	7
3.1.1 Swab Samples	7
3.1.2 Urine	7
3.1.3 Cell Culture Material	7
3.2 DNA Isolation	7
4. Safety Information	8
Appendix	10

# 1. Reagenzien und Materialien

## 1.1 Inhalt der Packung

<i>Spin Columns</i>	100 Einheiten
<i>Collection Tubes</i>	100 Einheiten
<i>Conditioner</i>	40 ml
<i>Buffer A1</i>	22,9 ml, zu ergänzen mit 30,1 ml Ethanol
<i>Buffer A2</i>	15,9 ml, zu ergänzen mit 37,1 ml Ethanol
<i>Buffer E</i>	12 ml

REAC	A
REAC	B
REAC	C
REAC	D

## 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur versendet und müssen bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem auf der Verpackung oder im Produktzertifikat angegebenen Datum haltbar. Das Produktzertifikat finden Sie auf unserer Internetseite unter [www.minerva-biolabs.com](http://www.minerva-biolabs.com).

## 1.3 Benötigte Geräte und Materialien

- Ethanol > 96 %
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen



**Buffer A1 und Buffer A2 müssen mit Ethanol abs. (> 96 %) entsprechend den Angaben auf den Flaschen ergänzt werden.**

## 2. Anwendung

Der *MB DNA Extraction Kit* kann für die Gewinnung von bakterieller DNA aus Abstrichtupfern, Urin und Zellkulturüberständen angewendet werden und wurde besonders für die nachfolgende Analyse mit einem PCR-basierten Diagnostikkit von Minerva Biolabs optimiert.

Abstrichtupfer gewinnen in der PCR-basierten klinischen Diagnostik zunehmend an Bedeutung. Abstriche können problemlos und schonend für den Patienten aus dem Rachenraum, der Nase, sekretierenden Hautverletzungen oder dem Vaginalbereich gewonnen werden. Die enthaltene DNA ist bei eingetrockneten Tupfern extrem langlebig und stabil. Für die Lagerung und den Transport müssen bei einer Analyse mit einem PCR-Verfahren keine speziellen Bedingungen eingehalten werden. Tupfer mit Transportmedium lassen sich ebenfalls extrahieren. Der *MB DNA Extraction Kit* wurde für die effiziente Gewinnung von DNA von allen gängigen Tupfermaterialien entwickelt.

Urin, bzw. Poolurin kann üblicherweise auf Grund des hohen Harnstoffgehalts und der notwendigen Lyse der bakteriellen Analyten nicht direkt in die PCR eingesetzt werden. Der *MB DNA Extraction Kit* ermöglicht die Aufarbeitung von Urin mit einem maximalen Probenvolumen von 200  $\mu$ l. Es kann sich dabei auch um Sediment oder zentrifugierte Urinproben handeln.

Bei hochkonfluenten Zellkulturen oder Medien mit einem Serumgehalt von mehr als 12 % kann es bei der PCR schnell zu Inhibitionen durch Stoffwechselprodukte bzw. Lipide kommen. Phenolrot wird üblicherweise Zellkulturmedien hinzugefügt und beeinflusst mit zunehmender Konzentration in der real-time qPCR die Messung der Fluoreszenz deutlich. In diesen Fällen ist eine Probenvorbereitung durch DNA-Isolierung dringend notwendig.

### **3. Durchführung**

#### **3.1 Probenaufarbeitung**

##### *3.1.1 Tupfer*

1. Der Tupfer wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und der Stil mit einer Schere abgeschnitten bzw. bei Tupfern mit Sollbruchstelle abgebrochen.
2. Der Tupfer wird mit 400  $\mu$ l *Conditioner* versetzt, das Gefäß verschlossen, intensiv gevortext (10 sec) und der Ansatz über 5 min bei Raumtemperatur (18 bis 25 °C) inkubiert. Alternativ kann ein Reaktionsgefäßschüttler über 15 min. verwendet werden.
3. Der Tupfer wird am Gefäßrand ausgedrückt und 350  $\mu$ l der herausgedrückten Flüssigkeit in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt..
4. Der Ansatz wird mit 280  $\mu$ l absolutem Ethanol versetzt und sofort gut gemischt, um eine Fällung der DNA zu vermeiden. Die Verwendung anderer Alkohole führt zu einer deutlichen Verringerung der Ausbeute an DNA.
5. Der Ansatz wird wie in Kapitel 3.2 beschrieben weiter bearbeitet.

##### *3.1.2 Urin*

1. 1 ml Urin werden bei maximaler Geschwindigkeit der Tischzentrifuge (mindestens jedoch 14.000 g) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt oder vorsichtig abgenommen. Das Pellet ist meist nicht sichtbar!
2. Das Pellet wird in 350  $\mu$ l *Conditioner* durch kurzzeitiges Vortexen (30 sec) resuspendiert und über 5 min bei Raumtemperatur (18 bis 25 °C) inkubiert.
3. Der Ansatz wird mit 280  $\mu$ l absolutem Ethanol versetzt und sofort gut gemischt, um eine Fällung der DNA zu vermeiden. Die Verwendung anderer Alkohole führt zu einer deutlichen Verringerung der Ausbeute an DNA.
4. Der Ansatz wird wie in Kapitel 3.2 beschrieben weiter bearbeitet.

### 3.1.3 Zellkulturmaterial

1. 60  $\mu\text{l}$  des Zellkulturmaterials werden in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Material kann dabei bis zu  $10^6$  Zellen enthalten.
2. Nach Zugabe von 290  $\mu\text{l}$  *Conditioner* wird ausgiebig (10 sec.) gevortext und der Ansatz über 5 min bei Raumtemperatur (18 bis 25 °C) inkubiert.
3. Der Ansatz wird mit 280  $\mu\text{l}$  absolutem Ethanol versetzt und sofort gut gemischt, um eine Fällung der DNA zu vermeiden. Die Verwendung anderer Alkohole führt zu einer deutlichen Verringerung der Ausbeute an DNA.
4. Der Ansatz wird wie in Kapitel 3.2 beschrieben weiter bearbeitet.

## 3.2 DNA-Isolierung

1. Für jede Probe wird ein *Spin Column* aus der Verpackung genommen und in das *Collection Tube* gesteckt. Die Probenkennung wird auf dem Deckel notiert und mit dem gesamten Lysat befüllt, ohne dabei den oberen Rand des Gefäßes zu benetzen.
2. Das *Spin Column* wird mit dem *Collection Tube* für 1 min bei 10.600 g (bei Tischzentrifugen ca. 10.000 Umdrehungen/min) zentrifugiert, das Eluat verworfen und das *Spin Column* wieder in das *Collection Tube* gesteckt.
3. In das *Spin Column* werden 500  $\mu\text{l}$  *Buffer A1* hineingegeben und das *Spin Column* mit dem *Collection Tube* für 1 min bei 10.6000 g (bei Tischzentrifugen ca. 10.000 Umdrehungen/min) zentrifugiert, um den *Buffer A1* abzutrennen. Das Eluat wird verworfen und die Säule wieder in das *Collection Tube* gesteckt.
4. In das *Spin Column* werden 500  $\mu\text{l}$  *Buffer A2* hineingegeben und das *Spin Column* mit dem *Collection Tube* für 1 min bei 10.6000 g (bei Tischzentrifugen ca. 10.000 Umdrehungen/min) zentrifugiert, um den *Buffer A2* abzutrennen.
5. Das *Spin Column* wird aus dem *Collection Tube* genommen und das Eluat (*Buffer A2*) verworfen. Das *Spin Column* wird mit dem gleichem *Collection Tube* noch einmal 1 min bei maximaler Umdrehungsleistung der Zentrifuge zur vollständigen Trocknung zentrifugiert.
6. Das *Spin Column* wird in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und das Eluat samt *Collection Tube* verworfen.
7. Es werden 60  $\mu\text{l}$  *Buffer E* in das *Spin Column* pipettiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ausbeute an DNA kann erhöht werden, wenn *Buffer E* auf 70 °C temperiert wird. Nach der Inkubation wird das System für 2 min bei 10.6000 g (bei Tischzentrifugen ca. 10.000 Umdrehungen/min) zentrifugiert.
8. Das *Spin Column* wird entfernt und das Probengefäß verschlossen. 2  $\mu\text{l}$  des Extraktes werden für die PCR eingesetzt. Der Extrakt ist bei +2 °C bis +8 °C für ca. 1 Woche stabil und kann bei mindestens -18 °C gelagert werden.

## 4. Sicherheitsinformationen

Immer Einmalhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Bestandteile des *Conditioners* und des *Buffer A1* können mit Bleichmitteln oder säurehaltigen Lösungen hochreaktive Verbindungen bilden. Mischen Sie keine säurehaltigen oder bleichenden Mittel mit dem Flüssigabfall. Ausgelaufene oder verschüttete Reste können mit Wasser und Spülmittel entfernt werden.

Risikosätze für den *Conditioner* und *Buffer A1*:

R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

R 36/38 Reizt die Augen und die Haut.

R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

Sicherheitssätze:

S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.

S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

# 1. Reagents and Materials

## 1.1 Kit Components

Spin Columns	100 units
Collection Tubes	100 units
Conditioner	40 ml
Buffer A1	22.9 ml to be reconstituted with 30.1 ml Ethanol
Buffer A2	15.9 ml to be reconstituted with 37.1 ml Ethanol
Buffer E	12 ml

REAC	A
REAC	B
REAC	C
REAC	D

## 1.2 Stability and Storage

Kit components are stable during shipping at room temperature. Upon receipt, store at +2 °C to +8 °C. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the Box Label or the Guarantee Certificate (please find the Certificate on our website).

## 1.3 Supplemental Requirements

- Ethanol > 96 %
- Micro centrifuge, micropipettes and filtered tips
- Micro centrifuge tubes (1.5 ml)



**Reconstitute Buffer A1 and Buffer A2 with absolute ethanol as stated on the bottle label.**

# 2. Application

The MB DNA Extraction Kit can be used for the isolation of bacterial DNA from swabs, urine, and cell culture supernatants. The kit was especially designed to fit Minerva Biolabs PCR kits and to provide best performance in means of sensitivity and robustness.

The collection of DNA specimen for diagnostic purposes with swabs is convenient and non-invasive. Swabs are easy-to-use and usually at hand for sampling buccal, nasal, pharyngeal, ichors and vaginal samples. No special storage or shipping conditions are required for subsequent PCR analysis. The DNA remains stable even after years of storage.

Urine and pooled urine can usually not be tested directly by PCR due to inhibiting level of urea and required lysis of the bacterial load. *MB DNA Extraction Kit* allows the preparation of a maximum volume of 200 µl per sample, including centrifuged and resuspended samples.

PCR inhibiting substances may accumulate in the medium of older cultures or medium containing more than 12 % fetal calf serum. In real-time PCR phenol red usually included in the cell culture medium can inhibit or cross react with the optical reading of the fluorescence signal. *MB DNA Extraction Kit* is able to lyse bacteria present in the cell culture material and allows isolation from inhibitors for PCR. Preparation of eukaryotic DNA from cells is not within the scope of the kit.

### 3. Protocol

#### 3.1 Sample Preparation

##### 3.1.1 Swab Samples

Collect buccal, nasal, pharyngeal, ichors or vaginal swabs with DACRON® or cotton materials. The swab sample is collected by rubbing it firmly approximately 6-10 times at the lesion on each side of the brush. The entire spot must be covered. The swab can be stored for more than 1 year if dried at room temperature for at least 2 hours. When completely dry, contain the swab in a clean, DNA-free bag or tube usually coming with the swab.

1. Place the swab into a capped 1.5 ml micro centrifuge tube (not provided with the kit) by either cutting of the handle with scissors or by breaking it at the break point. The swab should fit entirely inside the tube allowing the cap to close.
2. Add 400  $\mu\text{l}$  of *Conditioner* to the swab, vortex intensively (10 sec) and incubate at room temperature (18 to 25 °C) for 5 min. Alternatively, a tube shaker can be used for 15 min.
3. Squeeze the swab at the inner wall of the tube and transfer 350  $\mu\text{l}$  of the sample into a fresh 1.5 ml micro centrifuge tube.
4. Add 280  $\mu\text{l}$  of absolute ethanol to the mixture. Vortex immediately and very thoroughly in order to prevent any precipitation of nucleic acids.
5. Proceed as described in chapter 3.2.

##### 3.1.2 Urine

1. Centrifuge 1 ml of urine at maximum speed of the desk centrifuge (at least 14.000 x g) for at least 15 min. Carefully discard the supernatant. Please note, that a pellet is usually not visible.
2. Resuspend the pellet in 350  $\mu\text{l}$  *Conditioner*, resuspend by vigorous vortexing (at least 30 sec) and incubate at room temperature (18 to 25 °C) for at least 5 min.
2. Add 280  $\mu\text{l}$  of absolute ethanol to the mixture. Vortex immediately and very thoroughly in order to prevent any precipitation of nucleic acids.
3. Proceed as described in chapter 3.2.

##### 3.1.3 Cell Culture Material

1. Transfer 60  $\mu\text{l}$  of cell culture material into a fresh 1.5 ml reaction tube. The material can contain up to  $10^6$  cells.
2. Add 290  $\mu\text{l}$  of *Conditioner*, vortex for at least 10 sec and incubate at room temperature (18 to 25 °C) for at least 5 min.
2. Add 280  $\mu\text{l}$  of absolute ethanol to the mixture. Vortex immediately and very thoroughly in order to prevent any precipitation of nucleic acids.
3. Proceed as described in chapter 3.2.



**Do not use other alcohols than ethanol, because other alcohols may cause inconsistent yields.**

### 3.2 DNA Isolation



#### Temperate the *Buffer E* to 70°C.

1. Take one spin column per sample from the kit and stick it into a collection tube. Mark the sample identification on the lit of the spin column. Fill the sample lysate into the spin column without moistening the rim of the spin column.
2. Centrifuge the system for 1 min at 10,600 x g (approx. 10,000 rpm with a desk centrifuge). Discard the flow through from the collection tube and reassemble the spin column and the collection tube.
3. Add 500  $\mu$ l of *Buffer A1*. Centrifuge the system for 1 min at 10,600 x g (approx. 10,000 rpm with a desk centrifuge), discard the flow through and re-assemble the spin column.
4. Fill the spin column with 500  $\mu$ l *Buffer A2*. Centrifuge the system for 1 min at 10,600 rpm (10,000 x g), take the spin column out of the collection tube, dump the containing *Buffer A2*, discard the flow through and re-assemble the spin column.
5. Centrifuge for 1 min at full speed (approx. 13,200 rpm) in order to remove the remaining *Buffer A2*.
6. Discard the collection tube containing the *Buffer A2* and place the spin column into a sample storage tube.
7. Pipette 60  $\mu$ l of prewarmed *Buffer E* (70 °C) into the spin column directly onto the center of the silica membrane. The complete membrane should get in touch with the *Buffer E*. Secure the sample storage tube and incubate for 2 min at room temperature.
8. Following the incubation, centrifuge the system for 2 min at 10,600 rpm (10,000 x g).
9. Remove the spin column and use 2  $\mu$ l of the eluate directly for the PCR procedure. The extract is stable for approximately 1 week at +2 °C to +8 °C and can be kept at -18 °C for long term storage.

## 4. Safety Information

**Always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles.** The sample-preparation waste contains *Conditioner* and *Buffer A1*, which can form highly reactive compounds when combined with bleach. **DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.** If liquid containing these buffers is spilt, clean with suitable laboratory detergent and water.

The risk phrases applying to *Conditioner* and *Buffer A1* are:

R 22 Harmful if swallowed.

R 36/38 Irritating to eyes and skin.

R 52/53 Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

The risk and safety phrases applying are:

S 13 Keep away from food, drink and animal feed.

S 26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

S 36 Wear suitable protective clothing.

S 46 If swallowed, seek medical advice immediately and show container or label.

## **Appendix**

### *Limited Product Warranty*

This warranty limits our liability for replacement of this product. No warranties of any kind, express or implied, including, without limitation, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, are provided. Minerva Biolabs shall have no liability for any direct, indirect, consequential, or incidental damages arising out of the use, the results of use, or the inability to use this product.





## Related Products

### MB Taq DNA Polymerase

53-0050/-0100/-0200/-0250 MB Taq DNA Polymerase 50/100/200/250 units

### Clinical Diagnostic Kits for qPCR

21-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ls-QP <i>Legionella species</i>	25/100/250 tests
21-3025/-3100/-3250	Onar <sup>®</sup> Lp-QP <i>Legionella pneumophila</i>	25/100/250 tests
20-2025/-2100/-2250	Venor <sup>®</sup> Mp-QP <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25/100/250 tests
24-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ct <i>Chlamydia trachomatis</i>	25/100/250 tests
23-2025/-2100	Onar <sup>®</sup> Tp <i>Treponema pallidum</i>	25/100 tests
25-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Pertussis <i>Bordetella pertussis/parapertussis</i>	25/100/250 tests

### Quantification Standards, 100 µl each, 1x10<sup>6</sup> genomes/µl

52-0101 *Legionella pneumophila* DNA Standard  
52-0119 *Mycoplasma pneumoniae* DNA Standard

### Genomic DNA Extracts, 100 µl each, +/- 10 ng / 100 µl

51-0566 *Streptococcus pneumoniae*, DSMZ 20566  
51-5571 *Bordetella pertussis*, DSMZ 5571  
51-3415 *Bordetella parapertussis*, DSMZ 13415  
51-0177 *Ureaplasma urealyticum*, NC 10177  
51-0111 *Mycoplasma hominis*, NC 010111  
51-0112 *Mycoplasma orale*, NC 010112  
51-0117 *Mycoplasma fermentans* PG19, NC 010117  
51-0119 *Mycoplasma pneumoniae*, NC 010119  
51-0129 *Mycoplasma arginini*, NC 010129  
51-0162 *Mycoplasma arthritidis*, NC 010162  
51-0195 *Mycoplasma genitalium*, NC 010195  
51-1746 *Mycoplasma penetrans*, NC 11746

### DNA Remover™

15-2025 DNA Decontamination Reagent, spray bottle 250 ml  
15-2200 DNA Decontamination Reagent, refill bottles 4 x 500 ml

### Products for Contamination Control

#### Mycoplasma Off®

15-1000 Surface Disinfectant Spray 1000ml  
15-5000 Surface Disinfectant Spray, refill 5x 1000ml

#### ZellShield™

13-0050 Microbial Contamination Preventive Reagent for Cell Cultures, 100x solution 50ml

### Diagnostic Kits for conventional PCR

11-1025/050/100/250 Venor<sup>®</sup>GeM Mycoplasma Detection Kit 25/50/100/250 tests  
11-7025/050/100/250 Venor<sup>®</sup>GeM Advance Mycoplasma Detection Kit 24/48/96/240 tests  
12-1025/050/100/250 Onar<sup>®</sup>EUB Eubacteria Detection Kit 25/50/100/250 tests

### Diagnostic Kits for qPCR

11-4025/100/250 Venor<sup>®</sup>GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit Type 1 25/100/250 tests  
11-5025/100/250 Venor<sup>®</sup>GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit Type 2 25/100/250 tests

### Mycoplasma Elimination

10-0200/0500/1000 Mynox<sup>®</sup> Mycoplasma Elimination Reagent 2/5/10 treatments  
10-0201/0501/1001 Mynox<sup>®</sup>Gold Mycoplasma Elimination Reagent 2/5/10 treatments