

# Gebrauchsanleitung Invisorb® Spin Universal Kit



REF 1050100200  
1050100300



50 Präparationen  
250 Präparationen



Invitek Molecular GmbH  
Robert-Rössle-Straße 10  
13125 Berlin  
Deutschland

**INVITEK**  
Molecular

## Wichtige Hinweise

Vielen Dank, dass Sie sich für das **Invisorb® Spin Universal Kit** von Invitek Molecular entschieden haben.

Zweck des Produkts ist die manuelle Isolierung von Nukleinsäuren (genomische DNS, bakterielle DNS, virale DNS/RNS) aus unterschiedlichsten klinischen Proben mithilfe einer spinsäulenbasierten Technologie.

**WARNUNG!** Unsachgemäße Handhabung und nicht bestimmungsgemäßer Gebrauch können gefährlich sein und zu Schäden führen. Wir bitten Sie daher, diese Gebrauchsanleitung sorgfältig zu lesen und zu befolgen. Sie sollte immer griffbereit sein. Zur Vermeidung von Personenschäden beachten Sie bitte auch die Sicherheitshinweise.

Alle Versionen dieser Gebrauchsanleitung stehen auf unserer Website zum Download zur Verfügung oder können dort bestellt werden: [www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com)

Kontakt:

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin

+ 49 30 9489 2908

[www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com)

Technischer Kundendienst:

[techsupport@invitek-molecular.com](mailto:techsupport@invitek-molecular.com)

© 2022 Invitek Molecular, alle Rechte vorbehalten.

Dieses Kit entspricht der VERORDNUNG (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika. In Ländern, in denen VERORDNUNG (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika nicht anerkannt ist, ist das Kit nicht für die In-vitro-Diagnostik vorgesehen.

Handelsmarken: Invisorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. Die in diesem Dokument verwendeten eingetragenen Marken, Handelsmarken usw. gelten als gesetzlich geschützt, und zwar auch dort, wo sie nicht entsprechend gekennzeichnet sind.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP® und RTP® sind eingetragene Handelsmarken der Invitek Molecular GmbH.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Sicherheitshinweise .....	3
2.	Produktinformation.....	4
2.1	Kitinhalt .....	4
2.2	Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien und Geräte.....	5
2.3	Lagerung, Aussehen und Haltbarkeit .....	5
2.4	Zweckbestimmung .....	6
2.5	Produktinformationen und -spezifikation.....	6
2.6	Prinzip und Ablauf .....	7
3.	Nukleinsäureextraktion mit dem Invisorb® Spin Universal Kit.....	8
3.1	Vor Beginn eines Protokolls .....	8
3.2	Probengewinnung und Lagerung des Ausgangsmaterials.....	9
3.3	Vorbereitung des Ausgangsmaterials.....	10
3.3.1	Serum, Plasma und sonstige zellfreie Flüssigkeiten.....	10
3.3.2	Blut.....	11
3.3.3	Abstriche.....	11
3.3.4	Stuhlproben (Überstand).....	11
3.3.5	Bakterienkulturen .....	11
3.3.6	Urin .....	12
3.3.7	Trachealsekret, BAL, Sputum.....	12
3.3.8	Gewebebiopsie .....	12
3.3.9	Zellkulturüberstände.....	12
3.4	Kurzprotokoll Invisorb® Spin Universal Kit.....	13
3.5	Protokoll: Gleichzeitige Isolation von Gesamt-Nukleinsäuren (DNS/RNS) aus flüssigen Proben .....	14
4.	Anhang .....	16
4.1	Problembehebung.....	16
4.2	Garantie .....	17
4.3	Symbole auf Produkt und Etiketten .....	17
4.4	Weitere Dokumente und Informationen .....	18
4.5	Bestellinformationen.....	18

## 1. Sicherheitshinweise

Stellen Sie sicher, dass alle Nutzer dieses Produkts mit den allgemeinen Sicherheitspraktiken für Labore und den Sicherheitshinweisen in diesem Dokument vertraut sind.

- Tragen Sie bei und während der Arbeit mit Chemikalien stets Schutzkleidung, Einweghandschuhe und eine Schutzbrille.
- Wechseln Sie nach jedem Flüssigkeitstransfer die Pipettenspitze. Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination empfehlen die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Einwegmaterialien nicht wiederverwenden.
- Kontaminierte Handschuhe entsorgen.
- Nicht die Bestandteile verschiedener Kits miteinander kombinieren, es sei denn, die Chargennummern sind identisch.
- Mikrobielle Kontamination der Kit-Reagenzien vermeiden.
- Um das Risiko einer Infektion durch potenziell infektiöses Material möglichst gering zu halten, empfehlen wir, unter einem laminaren Luftstrom zu arbeiten, bis die Proben lysiert sind.

Lesen und verstehen Sie alle zugehörigen Sicherheitsdatenblätter (MSDS), bevor Sie mit Chemikalien arbeiten; diese sind online auf [www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com) verfügbar.

Entsorgen Sie Kit- und Flüssigkeitsreste gemäß den Bestimmungen Ihres Landes (s. MSDS). Invitek Molecular hat die durch das Kit anfallenden Flüssigkeitsabfälle nicht auf infektiöses Restmaterial getestet. Eine Kontaminierung der Flüssigkeitsabfälle mit infektiösem Restmaterial ist sehr unwahrscheinlich, lässt sich aber nicht völlig ausschließen. Daher sind Flüssigkeitsabfälle als infektiös zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Bestimmungen zu handhaben und entsorgen.

Die für die Bestandteile des **Invisorb® Spin Universal Kit** geltenden Risiko- und Sicherheitssätze der Europäischen Union sind:

### Proteinase K



Gefahr

H315-H319-H334-H335-P280-P305+P351+P338

### Lysis Buffer HLT



Warnung

H302-H315-H319-P280-P305+P351+P338

H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

H315: Verursacht Hautreizungen.

H319: Verursacht schwere Augenreizung.

H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

H335: Kann die Atemwege reizen.

P280: Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

**Notfallmedizinische Informationen sind rund um die Uhr verfügbar über [www.infotrac.net](http://www.infotrac.net):**

**außerhalb der USA: 1 – 352 – 323 – 3500**

**innerhalb der USA: 1 – 800 – 535 – 5053**

## 2. Produktinformation

### 2.1 Kitinhalt

	50 Präparationen	250 Präparationen
<b>Katalognr.</b>	1050100200	1050100300
<b>Lysis Buffer HLT</b>	15 ml/Flasche	60 ml/Flasche
<b>Proteinase K</b>	1 Gefäß für 1,1 ml Arbeitslösung	3 Gefäße für 3 x 2 ml Arbeitslösung
<b>Carrier RNA</b>	1 Gefäß für 1,2 ml Arbeitslösung	3 Gefäße für 3 x 2 ml Arbeitslösung
<b>RNase Free Water</b>	2 x 2 ml/Röhrchen	15 ml/Flasche
<b>Binding Solution</b> (mit 99,7 % Isopropanol auffüllen)	leere Flasche (Endvolumen 15 ml)	leere Flasche (Endvolumen 80 ml)
<b>Wash Buffer HLT</b>	30 ml/Flasche (Endvolumen 50 ml)	105 ml/Flasche (Endvolumen 175 ml)
<b>Wash Buffer</b>	2 x 18 ml/Flasche (Endvolumen 2 x 60 ml)	2 x 60 ml/Flasche (Endvolumen 2 x 200 ml)
<b>Elution Buffer M</b>	30 ml/Flasche	120 ml/Flasche
<b>RTA Spin Filter Set</b>	50 Stück	5 x 50 Stück
<b>RTA Receiver Tubes</b>	2 x 50 Stück	10 x 50 Stück
<b>1.5 ml Receiver Tubes</b>	50 Stück	5 x 50 Stück
<b>2.0 ml Safe-Lock-Tubes</b>	50 Stück	5 x 50 Stück
<b>Short Protocol</b>	1 Blatt	1 Blatt

## 2.2 Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien und Geräte

Labormaterial:

- Mikrozentrifuge (*alle Protokolle wurden mit einer Zentrifuge Eppendorf 5415 D validiert*)
- Optional: Zentrifuge für 15 oder 50 ml
- Thermoschüttler (37 °C - 95 °C)
- Messzylinder (250 ml)
- Einweghandschuhe
- Pipette und Pipettenspitzen
- Vortexmischer
- Reaktionsröhrchen (1,5 ml, 2,0 ml)

Flüssigkeiten und Lösungsmittel:

- DNase-/RNase-freies Wasser oder 1 x PBS zur Einstellung des Probenvolumens
- 96 - 100 % Ethanol (nicht denaturiert)
- Isopropanol\*
- Optional (für hochviskose Atemwegsproben): gesättigte Acetylcysteinlösung (ACC) (200 mg/ml)
- Optional: Lysozym (10 mg/ml)

\*Das Kit wurde mit 2-Propanol; Rotipuran® >99,7 %, p.a., ACS, ISO (Bestellnr. 6752) von Carl Roth validiert

\* **Mögliche Anbieter von Isopropanol:**

**Carl Roth**  
2-Propanol  
Rotipuran® >99,7 %, p.a., ACS, ISO  
Bestellnr. 6752

**Applichem**  
2-Propanol für die Molekularbiologie  
Bestellnr. A3928

**Sigma**  
2-Propanol  
Bestellnr. 59304-1L-F

## 2.3 Lagerung, Aussehen und Haltbarkeit

**Haltbarkeit:** Alle Puffer und Kitbestandteile sollten bei Raumtemperatur gelagert werden; die Haltbarkeit ist dem Etikett auf der äußeren Verpackung zu entnehmen.

**Nach dem Öffnen** haben die einzelnen Kitbestandteile und die vor Erstgebrauch entsprechend vorbereiteten Komponenten eine Haltbarkeit von 3 Monaten.

Stellen Sie vor jedem Gebrauch sicher, dass alle Bestandteile Raumtemperatur haben. Sollten sich in den Lösungen temperaturbedingt Präzipitate gebildet haben, lösen Sie diese durch vorsichtiges Erwärmen auf 30 °C auf.

**Raumtemperatur (RT) ist definiert als der Temperaturbereich von 15 bis 30 °C.**

**Wash Buffer:** Nach Zugabe von Ethanol fest verschließen und bei Raumtemperatur lagern.

**Wash Buffer HLT und Binding Solution:** Nach Zugabe von Isopropanol fest verschließen und bei Raumtemperatur lagern.

**Carrier RNA:** Nach Auflösen in DNase-/RNase-freiem Wasser bei -20 °C lagern.

**Proteinase K:** Nach Auflösen in DNase/RNase-freiem Wasser kann Proteinase K bei 2 - 8 °C bis zu zwei Monate gelagert werden. Zur längerfristigen Lagerung bei -20 °C einfrieren. Nur einmal auftauen.

## 2.4 Zweckbestimmung

Das **Invisorb® Spin Universal Kit** ist ein Kit zur Nukleinsäureextraktion auf Grundlage einer Spinsäulenteknologie. Sein Zweck ist die gleichzeitige Isolierung und Aufreinigung bakterieller DNS und viraler DNS/RNS.

Das Kit eignet sich für verschiedenste Arten von Human-Proben wie bspw. frisches oder gefrorenes EDTA- oder Zitrat-antikoaguliertes venöses Blut oder entsprechende Plasmapräparate, Serum, Abstricheluate, vorbehandeltes Sputum, BAL, Trachealsekret, kultivierte Bakterien, Überstände von Stuhlsuspensionen, Zerebrospinalflüssigkeit, Zellkulturüberstände, Biopsiematerial/Gewebe, Urin und andere zellfreie Körperflüssigkeiten.

Das Produkt ist nicht für die Verwendung mit heparinisierten Blutproben vorgesehen. Das Produkt ist nur für die Benutzung durch ausgebildetes Personal wie Labortechniker, Ärzte und Biologen vorgesehen, die in molekularbiologischen Techniken und *In-vitro*-Diagnoseverfahren geschult sind.

## 2.5 Produktinformationen und -spezifikation

Ausgangsmaterial	Ausbeute	Qualität	Zeit
Bis 200 µl <ul style="list-style-type: none"> <li>• Serum, Plasma, sonstige zellfreie Flüssigkeiten, Urin</li> <li>• Abstriche (trocken, stabilisiert)</li> <li>• Stuhlsuspensionsüberstände</li> <li>• Bakterienkulturen</li> <li>• Trachealsekret, BAL, Sputum</li> <li>• Zellkulturüberstand</li> </ul> Bis 100 µl: <ul style="list-style-type: none"> <li>• frisches oder gefrorenes Blut (EDTA-/Zitrat-stabilisiert, <u>nicht</u>heparinisiert)</li> </ul> Bis zu 10 mg Gewebeprobe	Abhängig von Blutprobe (Lagerung und Quelle)  Vollblut: in durchschnittlich 1 µg DNS	genomische DNA aus Blut: $A_{260} : A_{280}$ 1,8 – 2,1  Sonstige Probenarten: abhängig von Probenart, Ziel-Nukleinsäuren	ca. 30 min bei 12 Proben (ohne Lyse)

Ausbeute und Qualität der aufgereinigten Nukleinsäuren hängen ab von Art, Herkunft, Transport, Lagerung, Alter, Virustiter der Probe und bei Blutproben auch von der Leukozytenzahl.

Bei der Ermittlung der Ausbeute beachten Sie bitte, dass die mit diesem Kit gereinigte Nukleinsäure Carrier-RNA (5 µg pro 200 µl Probe) enthält, die den größten Teil der im Eluat vorliegenden Nukleinsäuren ausmacht. Insbesondere virale Nukleinsäuren aus biologischen Proben haben meist eine sehr niedrige Konzentration und können daher so gut wie nicht fotometrisch quantifiziert werden. Zur Bestimmung der Ausbeute wird eine quantitative RT-PCR empfohlen.

Das **Invisorb® Spin Universal Kit** bietet ein effizientes Verfahren zur Präparation hochwertiger Nukleinsäuren. Das Kit ist für die gleichzeitige Isolierung viraler DNS/RNS,

bakterieller DNS und genomischer DN auf Grundlage eines Spinsäulenprotokolls nach dem Lyse-Binden-Waschen-Prinzip konzipiert.

Das Kit ist für Leukozytenzahlen von  $3 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen/ml validiert. Zu hohe Zellzahlen können zu einer Verstopfung des RTA Spin Filter und unerwünschten Effekten auf den Reinigungsprozess führen. Es wird daher empfohlen, das Probeneingangsvolumen als Parameter bei der Umsetzung Ihres *in-vitro*-diagnostischen Protokolls zu berücksichtigen. Nötigenfalls können die Proben vor der Isolierung und Aufreinigung mit PBS oder DNase-/RNase-freiem Wasser vorverdünnt werden.

#### **Nachgelagerte Anwendungen:**

Ausbeute und Qualität isolierter Nukleinsäuren sind für zahlreiche molekulardiagnostische Anwendungen wie PCR-Techniken, NGS, Hybridisierungsmethoden und HLA-Typisierung generell geeignet. Bei nachgelagerten Anwendungen sollten die Anweisung des jeweiligen Herstellers beachtet werden.

## **2.6 Prinzip und Ablauf**

### **1. Proben lysieren**

Die Proben werden bei höheren Temperaturen lysiert. Die Lyse erfolgt in Gegenwart von Lysepuffer HLT, Proteinase K und (optional) Lysozym, um die bakteriellen Zellwände aufzubrechen und Proteine abzubauen.

Zur Optimierung und Stabilisierung der Gewinnung viraler DNS/RNS und Aufreinigung sehr kleiner Mengen viraler Nukleinsäuren muss Carrier-RNA zugegeben werden.

### **2. Nukleinsäuren binden**

Durch Zugabe der Binding Solution zum Lysat werden optimale Bedingungen für die Bindung erhalten. Die Lysate werden sodann auf einen RTA Spin Filter gegeben, wo die Nukleinsäuren an die Membran adsorbieren.

### **3. Waschen zur Entfernung von Restverunreinigungen**

Verunreinigungen werden mit Wash Buffer HLT und Wash Buffer effektiv entfernt, während die Nukleinsäuren an die Membran gebunden bleiben.

### **4. Nukleinsäuren eluieren**

Die Nukleinsäuren werden mit 100 - 200 µl Elution Buffer M vom RTA Spin Filter eluiert.



### 3. Nukleinsäureextraktion mit dem Invisorb® Spin Universal Kit

#### 3.1 Vor Beginn eines Protokolls

Wenn Sie zum ersten Mal mit dem Kit arbeiten, achten Sie darauf, alle Puffer wie dargestellt anzusetzen:

<b>Ansetzen der Puffer vor Erstgebrauch: 50 Ansätze</b>
<b>Carrier RNA:</b> Lyophilisierte <b>Carrier RNA</b> durch Zugabe von 1,2 ml <b>DNase-/RNase-freiem Wasser</b> in das Gefäß resuspendieren und bis zur völligen Auflösung mischen (mind. 1 min).
<b>Proteinase K:</b> Lyophilisierte <b>Proteinase K</b> durch Zugabe von 1,1 ml <b>DNase-/RNase-freiem Wasser</b> in das Gefäß resuspendieren und bis zur völligen Auflösung mischen.
<b>Binding Solution (leere Flasche):</b> 15 ml <b>99,7 % Isopropanol</b> (molekularbiologische Qualität) in Flasche füllen; Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Wash Buffer HLT:</b> 20 ml <b>99,7 % Isopropanol</b> in die Flasche füllen. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Wash Buffer:</b> 42 ml <b>96 - 100 % Isopropanol</b> in die Flasche geben. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Ansetzen der Puffer vor Erstgebrauch: 250 Ansätze</b>
<b>Carrier RNA:</b> Lyophilisierte <b>Carrier RNA</b> durch Zugabe von 1 ml <b>DNase-/RNase-freiem Wasser</b> in das Gefäß resuspendieren und bis zur völligen Auflösung mischen (mind. 1 min), dann 1 ml <b>DNase-/RNase-freies Wasser</b> hinzugeben.
<b>Proteinase K:</b> Lyophilisierte <b>Proteinase K</b> durch Zugabe von 2 ml <b>DNase-/RNase-freiem Wasser</b> in das Gefäß resuspendieren und bis zur völligen Auflösung mischen.
<b>Binding Solution (leere Flasche):</b> 80 ml <b>99,7 % Isopropanol</b> (molekularbiologische Qualität) in die Flasche füllen.
<b>Wash Buffer HLT:</b> 70 ml <b>99,7 % Isopropanol</b> in die Flasche füllen. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Wash Buffer:</b> 140 ml <b>96 - 100 % Isopropanol</b> in die Flasche geben. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.

- Thermoschüttler auf 65°C einstellen.
- Benötigtes Volumen **Elution Buffer M** auf 65 °C aufwärmen (pro Probe sind 50 - 200 µl **Elution Buffer M** erforderlich).
- Anzahl der benötigten Ansätze einschließlich Kontrollen bestimmen und die erforderliche Zahl RTA Spin Filter (Deckel) und 1.5 ml Receiver Tubes (pro Probe wird 1 Receiver Tube benötigt) beschriften.

#### Master Mix

Zur Erleichterung der Arbeit empfehlen wir, einen Master Mix aus Lysepuffer HLT, Proteinase K und ggf. Carrier-RNA anzusetzen. Beim Herstellen des Master Mixes empfiehlt es sich, ein Volumen anzusetzen, das die Gesamtzahl der Ansätze um 5 % übersteigt.

Master Mix immer erst kurz vor Gebrauch frisch herstellen.

### **Isolierung genomischer DNS, bakterieller DNS und viraler DNS/RNS:**

Pro Probe werden 200 µl Lysepuffer HLT, 20 µl Proteinase K und 20 µl Carrier-RNA benötigt.

### **Isolierung genomischer DNS:**

Pro Probe werden 220 µl Lysepuffer HLT und 20 µl Proteinase K benötigt. Carrier-RNA ist nicht erforderlich.

## **Extraktionskontrolle**

Gehen Sie bei der Bestimmung der optimalen Menge für die Extraktionskontrolle für Ihre nachgeschalteten Anwendungen nach Herstelleranweisungen vor.

Kleine Volumina der Extraktionskontrolle (DNS oder RNS) müssen mit der beiliegenden Carrier-RNA in einem Ansatz kombiniert werden. Die Gefäße mit der Carrier-RNA enthalten je nach Packungsgröße 1,2 ml oder 2,0 ml Stammlösung. Fügen Sie die entsprechende Menge Extraktionskontrolle-Nukleinsäure zur Carrier-RNA hinzu. Falls ein größeres Volumen erforderlich ist (>25 % des gesamten Carrier-RNA-Volumens), ersetzen Sie während der Verdünnung der Carrier RNA die entsprechende Menge DNase-/RNase-freies Wasser.

## **3.2 Probengewinnung und Lagerung des Ausgangsmaterials**

Zur Gewährleistung einer hohen und reproduzierbaren Ausbeute ist die richtige Lagerung der Proben von entscheidender Bedeutung. Die Ausbeute hängt von Faktoren wie Gesundheit des Spenders, Alter, Art, Transport und Lagerung der Probe ab.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte unterbleiben, um einer Degradation der Nukleinsäuren vorzubeugen. Die besten Ergebnisse lassen sich im Allgemeinen mit frischen Proben erzielen. Es wird empfohlen, technische Richtlinien wie CEN/TS und ISO-Normen zum Voruntersuchungsprozess in der Molekulardiagnostik unter IVDR (G. Dagher et al., <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>) zu berücksichtigen.

**Serum, Plasma und sonstige zellfreie Körperflüssigkeiten:** Zur Extraktion kann aus (mit Gerinnungshemmern wie EDTA oder Zitrat, nicht aber mit Heparin behandeltem) venösem Vollblut gewonnenes Serum oder Plasma, Synovialflüssigkeitsproben oder sonstige zellfreie Flüssigkeiten herangezogen werden. Vollblut sollte zur Vermeidung einer Hämolyse nicht gevortext werden. Serumröhrchen vor dem Zentrifugieren mindestens 30 min lang stehen lassen. Zur Präparation von Serum bzw. Plasma nach den Anweisungen zum Blutgewinnungssystem vorgehen. Es wird empfohlen, das Plasma/Serum innerhalb von 12 h durch Zentrifugieren abzutrennen. Überstände, die mit Systemen ohne Gelseparator gewonnen wurden, sollten in frische Probenröhrchen überführt werden. Zur kurzfristigen Lagerung können die Proben 1 bis 2 Stunden lang auf Eis belassen werden. Die Proben können bis zu 24 h bei -20 °C gelagert werden. Für die langfristige Lagerung empfiehlt es sich, die Proben bei -80 °C einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen kann die Integrität der Proben beeinträchtigen und z. B. zur Denaturierung/Ausfällung von Proteinen führen, was wiederum Ausbeute, Qualität oder Virustiter beeinflussen kann. Außerdem können problematische Kryopräzipitate entstehen. Ist Kryopräzipitat erkennbar, Ansatz 3 min bei 6.8000 x g zentrifugieren. Der klare Überstand sollte unverzüglich weiterverwendet werden.

**Blut:** Blutproben (stabilisiert mit EDTA oder Zitrat, nicht aber mit Heparin) können bei Raumtemperatur 2 bis 3 Stunden lang gelagert werden. Zur kurzfristigen Lagerung (bis 24 h) sollten die Proben bei 2 bis 8 °C gelagert werden. Für die langfristige Lagerung empfiehlt es sich, die Proben bei -20 °C oder -80 °C einzufrieren.

### **Abstriche:**

Trockenabstriche: Proben wie in der entsprechenden Probenverarbeitungsmethode beschrieben verarbeiten. Trocken bei 4 bis 8 °C lagern.

Abstriche in Stabilisierungsmedium: Die Stabilisierungsflüssigkeit kann wie eine zellfreie Körperflüssigkeit gehandhabt werden. Bitte beachten Sie, dass manche Stabilisierungsflüssigkeiten wegen Inkompatibilität mit den Chemikalien im Kit zu einem Verlust an Ausbeute führen können. Gemäß Herstelleranweisungen lagern.

**Stuhlproben:** Die Proben enthalten DNase und RNase, die zu einer raschen Degradation von DNS und RNS führen können. Aus diesem Grund sollten sie bei -80 °C eingefroren werden.

**Bakterienkulturen:** Nach der Kultivierung sind die Bakterien zu pelletieren und zur langfristigen Lagerung bei -80 °C einzufrieren. Die Resuspendierung wird unter der entsprechenden Probenverarbeitungsmethode beschrieben.

**Urin:** Je nach bakteriellem Titer und Anwendung wird ein Ausgangsvolumen von 15 bis 50 ml Urin empfohlen. Bakterien durch Zentrifugieren pelletieren und den Überstand vollständig entfernen (eine Kontamination mit Harnstoff kann PCR-Reaktionen inhibieren). Bei manchen Anwendungen kann direkt frischer Urin eingesetzt werden. Für die langfristige Lagerung empfiehlt es sich, die Proben bei -20 °C oder -80 °C einzufrieren.

**Trachealsekret, BAL, Sputum:** Die Proben enthalten DNase und RNase, die zu einer raschen Degradation von DNS und RNS führen können. Aus diesem Grund sollten sie bei -80°C eingefroren werden.

**Gewebebiopsie:** Die Proben sind unverzüglich bei -20°C oder -80°C einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Ausbeute an aufgereinigter DNS hängt von der Art des Ausgangsmaterials ab. Probe im Lysemix auftauen.

**Zellkulturüberstände:** Bei der Herstellung von Überstandproben wie bei anderen Proben zellfreier Körperflüssigkeiten vorgehen, die unter der jeweiligen Probenverarbeitungsmethode beschrieben werden. Für die langfristige Lagerung empfiehlt es sich, die Proben bei -20 °C oder -80 °C einzufrieren.

## **3.3 Vorbereitung des Ausgangsmaterials**

Das Vorgehen bei der Vorbereitung der Probenlyse bei verschiedenen Ausgangsmaterialien wird im Folgenden beschrieben. Bitte verwenden Sie zur Verarbeitung der Proben 2 ml Safe-Lock Tubes, da diese auch für den sich anschließenden Lyseschritt benötigt werden. Nach Vorbereitung des Ausgangsmaterials fahren Sie wie in Kapitel 3.5, „Protokoll: Gleichzeitige Isolation von Gesamt-Nukleinsäuren (DNS/RNS) aus flüssigen Proben“ Schritt 1a) - d) beschrieben fort, soweit nicht anders angegeben.

### **3.3.1 Serum, Plasma und sonstige zellfreie Flüssigkeiten**

Probe vor der Extraktion stets gut durchmischen.

Zur Extraktion 200 µl Probe einsetzen. Beträgt das Probenvolumen weniger als 200 µl, mit PBS-Puffer oder DNase-/RNase-freiem Wasser auf 200 µl Endvolumen einstellen.

### 3.3.2 Blut

Probe vor der Extraktion stets gut durchmischen.

100 µl frisches oder gefrorenes Blut mit 100 µl DNase-/RNase-freiem Wasser verdünnen.

### 3.3.3 Abstriche

#### a) Trockenabstriche

Abstriche in einem geeigneten Gefäß in der geringstmöglichen Menge PBS oder DNase-/RNase-freiem Wasser auswaschen (bei Nasenrachenabstrichen ca. 400 µl, bei Mundabstrichen ca. 600 µl). Abstrich an der Gefäßinnenwand absteifen, um ein möglichst großes Probenvolumen zu erhalten.

Zur Extraktion 200 µl dieser Lösung einsetzen.

Alternativ können die Abstriche direkt in einer Mischung aus 200 µl Lysis Buffer HLT, 20 µl Proteinase K, 20 µl Carrier RNA (optional bei Präparation genomischer DNS) und 200 µl DNase-/RNase-freiem Wasser ausgewaschen werden. Abstriche 5 bis 10 min bei RT unter gelegentlichem Mischen inkubieren. Kreuzkontamination unbedingt vermeiden.

#### b) Abstriche in Stabilisierungsmedium

Zur Extraktion 200 µl Stabilisierungslösung einsetzen.

Manche Stabilisierungsmedien können die Lysereaktion stören (bei Fragen lesen Sie bitte den Abschnitt FAQ oder wenden Sie sich an den Kundendienst).

### 3.3.4 Stuhlproben (Überstand)

#### a) Nukleinsäureextraktion aus Viren

Zur Herstellung von Überstand 100 µl / 100 mg Stuhlprobe in ein 2-ml- Reaktionsgefäß überführen und 900 µl DNase-/RNase-freies Wasser zugeben. 30 s vortexen und 1 min bei 12.000 x g zentrifugieren.

200 µl Überstand in ein frisches Tube zur Extraktion pipettieren. Die Probe sollte keine festen Partikel enthalten.

#### b) Extraktion bakterieller DNS

Zur Herstellung von Überstand 100 µl / 100 mg Stuhlprobe in ein 2-ml-Reaktionsgefäß geben und 300 µl DNase-/RNase-freies Wasser zugeben. 30 s vortexen und 30 s bei 1.000 x g zentrifugieren.

200 µl Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß zur Extraktion pipettieren. Die Probe sollte keine festen Partikel enthalten.

### 3.3.5 Bakterienkulturen

1 ml einer Übernacht-Bakterienkultur in ein 2-ml-Safelock-Reaktionsgefäß überführen. 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren und Überstand vollständig entfernen. Pellet in 200 µl PBS-Puffer resuspendieren und mit der Probenextraktion beginnen.

### 3.3.6 Urin

Je nach bakteriellem Titer und Anwendung wird ein Ausgangsvolumen von 15 bis 50 ml Urin empfohlen. Bakterien durch Zentrifugieren pelletieren und Überstand vollständig entfernen (eine Kontamination mit Harnstoff kann PCR-Reaktionen inhibieren). Bakterienpellet in 200 µl PBS-Puffer resuspendieren.

Bei manchen Anwendungen kann frischer Urin (200 µl) direkt eingesetzt werden.

### 3.3.7 Trachealsekret, BAL, Sputum

#### a) Nicht oder wenig viskose Proben

Probe vor der Extraktion stets gut durchmischen.

Zur Extraktion 200 µl Probe einsetzen. Beträgt das Probenvolumen weniger als 200 µl, mit PBS-Puffer oder DNase-/RNase-freiem Wasser auf 200 µl Endvolumen einstellen.

#### b) Isolierung bakterieller DNS aus viskosen Proben

150 µl der Sputumprobe oder 1 ml Trachealsekret oder BAL in ein Safelock-Reaktionsgefäß überführen und 150 µl bzw. 1 ml gesättigte Acetylcystein-Lösung (ACC) zugeben (Verhältnis Probe - Puffer 1:1).

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

5 min bei 10.000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen.

Bakterienpellet in 200 µl PBS oder DNase-/RNase-freiem Wasser resuspendieren und die Probenextraktion beginnen.

#### c) Isolierung viraler DNS/RNS aus viskosen Proben

150 µl der Probe in Safe-Lock Tube überführen und 150 µl gesättigte Acetylcystein-Lösung (ACC) zugeben (Verhältnis Probe - Puffer 1:1).

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

Probe abkühlen lassen.

Zur Extraktion 200 µl Probe einsetzen.

### 3.3.8 Gewebebiopsie

1 - 10 mg Gewebebiopsieprobe in ein 2.0 ml Safe-Lock Tube geben und 200 µl DNase-/RNase-freies Wasser bzw. PBS, 200 µl Lysis Buffer HLT, 20 µl Carrier RNA (optional, bei Proben mit geringem DNS-/RNS-Gehalt) und 20 µl Proteinase K zu jeder Probe hinzufügen.

Zum Aufschließen von schwer zu lysierendem Gewebe wie Knorpel, Niere und Herzmuskel empfiehlt sich eine Vorbehandlung mit Zirconia-Beads (separat erhältlich).

Nach der mechanischen Behandlung 10 min bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

1 min bei 10.000 x g zentrifugieren und Überstand in ein frisches Röhrchen überführen.

**Mit Schritt 2 des Extraktionsprotokolls fortfahren (Binding Solution zugeben).**

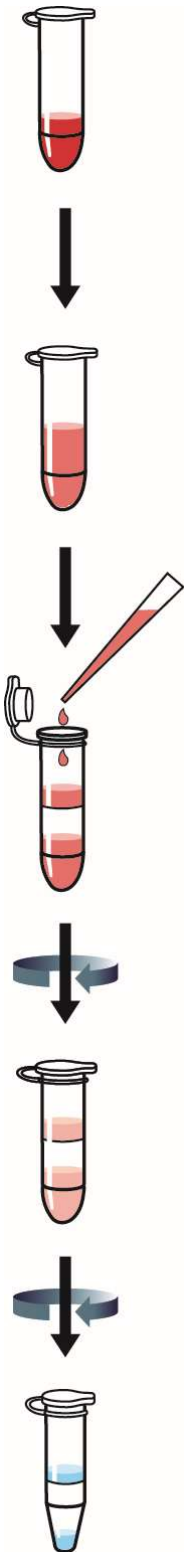
### 3.3.9 Zellkulturüberstände

Zur Extraktion 200 µl Probe einsetzen.

### 3.4 Kurzprotokoll Invisorb® Spin Universal Kit

#### Proben lysieren

Siehe Kapitel 3.3 "Vorbereitung des Ausgangsmaterials" zur probenspezifischen Vorbehandlung.



#### **1.a) Aufreinigung bakterieller Nukleinsäuren**

200 µl Probe\* mit 20 µl Lysozym in einem 2.0 ml Safe-Lock Tube mischen, 10 min bei 37 °C inkubieren  
20 µl Carrier RNA, 200 µl **Lysis Buffer HLT** und 20 µl **Proteinase K** hinzufügen  
15 min bei 65 °C unter Schütteln inkubieren.

#### **1.b) Gleichzeitige Aufreinigung bakterieller und viraler Nukleinsäuren**

200 µl Probe\* mit 20 µl Lysozym in einem 2.0 ml Safe-Lock Tube mischen, 10 min bei RT inkubieren  
20 µl Carrier RNA, 200 µl **Lysis Buffer HLT** und 20 µl **Proteinase K** hinzufügen  
10 min bei 65 °C unter Schütteln inkubieren  
10 min bei 95 °C unter Schütteln inkubieren

#### **1.c) Aufreinigung viraler Nukleinsäuren**

200 µl Probe\* mit 200 µl **Lysis Buffer HLT**, 20 µl **Carrier RNA** und 20 µl **Proteinase K** in einem 2.0 ml Safe-Lock Tube mischen  
10 min bei 65 °C unter Schütteln inkubieren  
10 min bei 95 °C unter Schütteln inkubieren

#### **1.d) Aufreinigung genomischer DNS**

200 µl Probe\* mit 220 µl **Lysis Buffer HLT** und 20 µl **Proteinase K** in einem 2.0 ml Safe-Lock Tube mischen  
10 min bei 65 °C unter Schütteln inkubieren  
10 min bei 95 °C unter Schütteln inkubieren (bei Blutproben diesen Schritt überspringen)

\*Bei weniger als 200 µl Volumen, Probe verdünnen.

#### Nukleinsäuren binden

- 260 µl **Binding Solution** zugeben und durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen mischen, 5 min bei RT inkubieren  
Probe in das RTA Spin Filter Set überführen  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren  
RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube setzen.

#### Waschen zur Entfernung von Restverunreinigungen

- 600 µl **Wash Buffer HLT** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren  
RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen
- 700 µl **Wash Buffer** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen
- Diesen Waschschrift einmal wiederholen.
- 5 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren, um Ethanolreste zu entfernen, RTA Receiver Tube mit Filtrat verwerfen

#### Nukleinsäuren eluieren

- Spin Filter in ein 1.5 ml Receiver Tube überführen  
50 - 200 µl **Elution Buffer M** (auf 65 °C vorgewärmt) direkt auf den RTA Spin Filter pipettieren.  
1 min bei RT inkubieren und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.  
Aufgereinigte Nukleinsäuren auf Eis lagern

### **3.5 Protokoll: Gleichzeitige Isolation von Gesamt-Nukleinsäuren (DNS/RNS) aus flüssigen Proben**

Siehe Kapitel 3.3 "Vorbereitung des Ausgangsmaterials" zur probenspezifischen Vorbehandlung.

---

#### **1.a) Lyse der Proben zur Aufreinigung bakterieller Nukleinsäuren**

200 µl Probe mischen oder Bakterienpellet in 20 µl Lysozym in einem 2 ml Safe-Lock-Tube resuspendieren.

10 min bei 37 °C inkubieren

20 µl Carrier RNA hinzufügen. Zum Mischen vortexen.

200 µl **Lysis Buffer HLT** und 20 µl **Proteinase K** hinzufügen.

Alternativ 240 µl Master Mix zu jeder Probe hinzufügen.

10 s gründlich durch Vortexen mischen und 10-15 min bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

Optional bei schwer zu lysierenden Bakterien wie *Mycobacteria*: 10 min bei 95 °C inkubieren.

#### **1.b) Lyse von Proben zur gleichzeitigen Aufreinigung bakterieller und viraler Nukleinsäuren**

200 µl Probe mit 20 µl Lysozym in einem 2 ml Safe-Lock-Tube mischen.

10 min bei RT inkubieren.

20 µl Carrier RNA hinzufügen. Zum Mischen vortexen.

200 µl **Lysis Buffer HLT** und 20 µl **Proteinase K** hinzufügen.

Alternativ Master Mix zu jeder Probe geben.

10 s gründlich durch Vortexen mischen und 10 min bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

#### **1.c) Lyse von Proben zur Aufreinigung viraler Nukleinsäuren**

200 µl Probe mit 200 µl **Lysis Buffer HLT**, 20 µl **Carrier RNA** und 20 µl **Proteinase K** in einem 2 ml Safe-Lock Tube mischen.

Alternativ 240 µl Master Mix zu jeder Probe hinzufügen.

10 s gründlich durch Vortexen mischen und 10 - 15 min bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

10 min bei 95°C inkubieren

#### **1.d) Lyse von Proben zur Aufreinigung genomischer DNS**

200 µl Probe mit 220 µl **Lysis Buffer HLT** und 20 µl **Proteinase K** in einem 2 ml Safe-Lock Tube mischen.

Alternativ 240 µl Master Mix zu jeder Probe hinzufügen.

10 s gründlich durch Vortexen mischen und 10 - 15 min bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubieren.

10 min bei 95 °C inkubieren (bei der Isolierung genomischer DNS aus verdünnten Blutproben diesen Schritt überspringen)

**Hinweis:** Wenn Sie Nukleinsäuren zur Extraktionskontrolle hinzufügen wollen, tun Sie dies jetzt, vor dem Bindeschritt.

2. 260 µl **Binding Solution** hinzufügen und durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen mischen.  
Probe 5 min bei RT inkubieren.  
RTA Spin Filter Set nehmen. Mischung auf den RTA Spin Filter überführen.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.  
RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in ein frisches RTA Receiver Tube überführen.
3. 600 µl **Wash Buffer HLT** auf den RTA Spin Filter pipettieren und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.  
RTA Receiver Tube mit dem Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in ein frisches RTA Receiver Tube überführen.
4. 700 µl **Wash Buffer** auf den RTA Spin Filter pipettieren und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter wieder auf das benutzte RTA Receiver Tube setzen.
5. 700 µl **Wash Buffer** auf den RTA Spin Filter pipettieren und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter wieder auf das benutzte RTA Receiver Tube setzen.
6. 5 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um das Ethanol vollständig zu beseitigen.  
RTA Receiver Tube mit Filtrat verwerfen.
7. RTA Spin Filter in ein 1.5 ml Elution Tube überführen.  
50 - 200 µl vorgewärmten (65 °C) **Elution Buffer M** direkt auf die Oberfläche des RTA Spin Filter pipettieren.  
1 min bei RT inkubieren.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.  
RTA Spin Filter verwerfen.  
1.5 ml Receiver Tube schließen und Probe bei -20 °C bis -80 °C lagern.



## 4. Anhang

### 4.1 Problembehebung

Problem	Mögliche Ursache	Empfehlung
<b>Geringe Ausbeute an Nukleinsäuren</b>	Unzureichende Zellyse	Lysezeit in <b>Lysis Buffer HLT</b> verlängern Kontinuierliches Schütteln verbessert das Lyseergebnis Weniger Ausgangsmaterial verwenden, um die Säule nicht zu überladen
	Unvollständige Elution	Inkubationszeit mit vorgewärmtem <b>Elution Buffer M</b> auf 5-10 min verlängern Zweimal mit 100 µl <b>Elution Buffer M</b> eluieren Mehr <b>Elution Buffer M</b> verwenden
	Niedrige Nukleinsäurekonzentration in der Probe	Nukleinsäuren mit weniger <b>Elution Buffer M</b> eluieren, nicht weniger als 30 µl verwenden
	Unsachgemäße Lagerung des Ausgangsmaterials	Sicherstellen, dass das Ausgangsmaterial sachgemäß gelagert wird. Probenmaterial nicht wiederholt auftauen und einfrieren.
	Falsch hergestellte Waschpuffer	Sicherstellen, dass die richtige Menge an Ethanol/Isopropanol zu den Waschpuffern hinzugefügt wird und dass alle Lösungen fest verschlossen gelagert werden.
	Menge/Konzentration von Proteinase K zu gering	Sicherstellen, dass die lyophilisierte Proteinase K vor Gebrauch mit der richtigen Menge Wasser verdünnt wird
<b>Nukleinsäuren degradiert</b>	Unsachgemäße Lagerung des Ausgangsmaterials	Sicherstellen, dass die Probe korrekt entnommen und gelagert wird; weitere Informationen finden Sie im FAQ auf unserer Website.
	Material alt	Sicherstellen, dass das Ausgangsmaterial unter geeigneten Bedingungen (-20 °C/-80 °C) gelagert wird.
<b>Nukleinsäuren funktionieren nicht gut z. B. RT-PCR oder NGS</b>	Kontamination mit Ethanol während der Elution	Trockenschritt zur Entfernung des Ethanols verlängern.
	Kontamination mit Salz während der Elution	<b>Waschpuffer</b> auf präzipitiertes Salz kontrollieren. Sollten sich Präzipitate gebildet haben, lösen Sie diese durch vorsichtiges Erwärmen auf 30 °C auf. Sicherstellen, dass die <b>Waschpuffers</b> bei Gebrauch Raumtemperatur haben.
<b>Nach der Wäsche befinden sich Farbreste auf dem RTA Spin Filter</b>	Unzureichende Zellyse	Siehe oben
	Wäsche erfolglos	Erneut mit <b>Wash Buffer</b> waschen
	Falsch hergestellte Waschpuffer	Siehe oben verdünnt wurden. Aufreinigung mit neuer Probe wiederholen.

## 4.2 Garantie

Invitek Molecular garantiert die einwandfreie Funktion des Kits in den in dieser Anleitung genannten Anwendungen und bei bestimmungsgemäßem Gebrauch. Zur Sicherstellung der Produktqualität wurden alle Kitbestandteile nach dem EN ISO 13485-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von Invitek Molecular auf ihre Leistung getestet.

Probleme, Vorfälle und Mängel sollten Invitek Molecular gemeldet werden, sobald sie auftreten. Kontrollieren Sie das Produkt sofort bei Erhalt auf Vollständigkeit und Unversehrtheit. Bei Abweichungen informieren Sie bitte Invitek Molecular umgehend schriftlich. Änderungen am Kit und an den Protokollen sowie Verwendungen, die vom bestimmungsgemäßen Gebrauch abweichen, unterliegen nicht der Garantie.

Invitek Molecular behält sich vor, das Produkt jederzeit zu ändern, anzupassen oder zu modifizieren, um seine Leistung und sein Design zu verbessern.

Invitek Molecular garantiert für seine Produkte gemäß seiner AGB auf [www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com). Bei Fragen wenden Sie sich bitte an [techsupport@invitek-molecular.com](mailto:techsupport@invitek-molecular.com).

## 4.3 Symbole auf Produkt und Etiketten



Hersteller



Chargennummer



Eindeutige Kennzeichnung eines Medizinprodukts



Katalognummer



Verfallsdatum



Lesen Sie die Gebrauchsanweisung



Temperaturbeschränkung



Nicht wiederverwenden



Anzahl Ansätze



Medizinprodukt zur In-vitro-Diagnostik

## 4.4 Weitere Dokumente und Informationen

Auf [www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com) finden Sie weitere Informationen zu:

- FAQ und Tipps zur Problembeseitigung
- Anleitungen in anderen Sprachen
- Sicherheitsdatenblätter (MSDS)
- Online-Support
- Produktvideos

Sollten Sie trotz sorgfältiger Kenntnisnahme der Gebrauchsanweisung und weiterer Informationen noch Hilfe benötigen, kontaktieren Sie uns bitte auf [techsupport@invitek-molecular.com](mailto:techsupport@invitek-molecular.com) oder wenden Sie sich an Ihren Vertriebshändler.

## 4.5 Bestellinformationen

Produkt	Packungsgröße	Katalognr.
Invisorb® Spin Universal Kit	50 Präparationen	1050100200
Invisorb® Spin Universal Kit	250 Präparationen	1050100300

### Änderungshistorie

Version	Datum	Beschreibung
DE-v1-2022	2022-05-18	Neues Dokument

# **INVITEK** Molecular

Invitek Molecular GmbH  
Robert-Rössle-Str. 10  
13125 Berlin  
Deutschland

Telefon: +49 30 9489 2908  
Fax: +49 30 9489 3795  
info@invitek-molecular.com

[www.invitek-molecular.com](http://www.invitek-molecular.com)



<https://www.invitek-molecular.com/resources/manuals.html>

2022-05-18 DE-v1-2022