

# Gebrauchsanleitung PSP® Spin Stool DNA Basic Kit



REF 1038120200  
1038120300



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 **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** von Invitek Molecular entschieden haben.

In Kombination mit dem **Stool DNA Stabilizer** oder den **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** dient das Produkt der manuellen DNA-Isolierung aus Mikroorganismen und dem Spender aus Stuhlproben mittels Spinsäulenttechnologie.

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. Sicherheitsanweisungen.....	3
2. Produktinformation .....	4
2.1 Kitinhalt .....	4
2.2 Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien und Geräte.....	5
2.3 Lagerung, Aussehen und Haltbarkeit .....	6
2.4 Zweckbestimmung .....	6
2.5 Produktinformationen und -spezifikation.....	7
2.6 Prinzip und Ablauf .....	7
3. Nukleinsäureextraktion mit dem PSP® Spin Stool DNA Basic Kit.....	8
3.1 Vor Beginn eines Protokolls .....	8
3.2 Probengewinnung und Lagerung des Ausgangsmaterials.....	9
3.3 Vorbereitung des Ausgangsmaterials.....	9
3.4 Kurzprotokoll PSP® Spin Stool DNA Basic Kit .....	10
3.5 Protokoll 1: DNA-Isolierung aus frischen oder gefrorenen Stuhlproben .....	11
3.6 Protokoll 2: DNA-Isolierung aus stabilisierten Stuhlproben.....	13
4. Anhang.....	15
4.1 Problembehebung.....	15
4.2 Garantie .....	16
4.3 Symbole auf Produkt und Etiketten .....	16
4.4 Weitere Dokumente und Informationen .....	17
4.5 Bestellinformationen.....	17

## 1. Sicherheitsanweisungen

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 wir die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Einwegmaterialien nicht wiederverwenden.
- Kontaminierte Handschuhe entsorgen.
- Keine Bestandteile verschiedener Kits 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 **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** geltenden Risiko- und Sicherheitssätze der Europäischen Gemeinschaft sind:

### Stool DNA Stabilizer



Warnung

H319 –H412.-P280- P305-351-338-P273

### Proteinase K



Gefahr

H315-319-334-335 P280-P305-P351-P338

### Wash Buffer I



Warnung

H302-H412-P280-P305-P351-P338-P273-EUH032

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.

H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

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.

EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

**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

Das **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** enthält keinen Puffer zur Lyse von Proben. Zur Lyse von Proben ist das **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** mit dem **Stool DNA Stabilizer** oder **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** zu verwenden (zu Bestellinformationen s. Kapitel 2.2 oder 4.5). Der **Stool DNA Stabilizer** fungiert als Lysepuffer.

Der **Stool DNA Stabilizer** (180 ml Flasche) dient der direkten Isolierung von frischen oder gefrorenen Stuhlproben.

Die **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** eignen sich für alle Schritte des Probenmanagements: Entnahme, Transport, Stabilisierung und Lagerung der Proben für bis zu drei Monate bei Raumtemperatur (RT).

	50 Präparationen	250 Präparationen
<b>Katalognr.</b>	1038120200	1038120300
<b>InviAdsorb</b>	50 Röhrchen	5 x 50 Röhrchen
<b>Zirconia Beads II</b>	2 Gefäße	8 Gefäße
<b>Proteinase K</b>	1 Gefäß für 1,5 ml Arbeitslösung	5 Gefäße für 5 x 1,5 ml Arbeitslösung
<b>Binding Buffer A</b>	9 ml/Flasche (Endvolumen 30 ml)	36 ml/Flasche (Endvolumen 120 ml)
<b>Wash Buffer I</b>	30 ml/Flasche (Endvolumen 60 ml)	80 ml/Flasche (Endvolumen 160 ml)
<b>Wash Buffer II</b>	18 ml/Flasche (Endvolumen 60 ml)	2 x 45 ml/Flasche (Endvolumen 2 x 150 ml)
<b>Elution Buffer</b>	15 ml/Flasche	60 ml/Flasche
<b>2.0 ml Safe-Lock Tubes</b>	2 x 50 Röhrchen	2 x 250 Röhrchen
<b>RTA Spin Filter Set</b>	50 Sets	5 x 50 Sets
<b>RTA Receiver Tubes</b>	2 x 50 Röhrchen	10 x 50 Röhrchen
<b>1.5 ml Receiver Tubes</b>	2 x 50 Röhrchen	10 x 50 Röhrchen
<b>Short protocol</b>	1 Blatt	1 Blatt

## 2.2 Vom Anwender bereitzustellende Reagenzien und Geräte

Laborgeräte:

- 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
- Vortex Mixer
- Reaktionsröhrchen (1,5 ml, 2,0 ml)

Zur Probenlyse:

Produkt	Packungsgröße	Katalognr.
Stool DNA Stabilizer <sup>*)</sup>	180 ml	1038111100
Stuhlsammelröhrchen mit DNA Stabilizer	50 Röhrchen	1038111200
Stuhlsammelröhrchen mit DNA Stabilizer	250 Röhrchen	1038111300

**\*) Eine Flasche Stool DNA Stabilizer reicht für 50 Ansätze aus; für 250 Ansätze werden zwei Flaschen benötigt.**

Flüssigkeiten und Lösungsmittel:

- 96 - 100 % Ethanol (nicht denaturiert)
- Isopropanol\*

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

**Binding Buffer A:** Nach Zugabe von Isopropanol fest verschließen und bei Raumtemperatur 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.

**Stool DNA Stabilizer/Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer (separat zu beziehen):** Liegen im DNA Stabilizer temperaturbedingt Präzipitate vor, lösen Sie diese durch vorsichtiges Erwärmen auf 30 °C in einem Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln auf.

## 2.4 Zweckbestimmung

Das **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** ist ein Kit zur Nukleinsäureextraktion auf Grundlage einer Spinsäulenteknologie. Sein Zweck ist die Isolierung und Aufreinigung bakterieller und Spender-DNA aus menschlichen Stuhlproben.

Das **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** ist für die Verwendung mit frischen, gefrorenen oder stabilisierten menschlichen Stuhlproben vorgesehen. Sollen frische oder gefrorene Stuhlproben verarbeitet werden, ist das Produkt zusammen mit dem **Stool DNA Stabilizer** zu verwenden. Für das vollständige Probenmanagement (Entnahme, Transport) und die Stabilisierung bei Raumtemperatur ist das Produkt zusammen mit den **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** zu verwenden. Die Zugabe des Stool DNA Stabilizers zum **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** ist für die Probenlyse unerlässlich. **Stool DNA Stabilizer** und **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** sind separat zu beziehen.

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
Frische oder gefrorene Stuhlproben: max. 200 mg	bis 50 µg, abhängig von Probe (Lagerung und Quelle)	$A_{260}: A_{280}$ 1,4 – 1,8	ca. 45 min (einschl. Lyse)
Stabilisierte Stuhlproben (Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer): 1,4 ml			

Ausbeute und Qualität der aufgereinigten DNA hängen von Bakteriengehalt, Herkunft, Transport, Lagerung und Alter der Probe ab. Auch der Gesundheitszustand des Spenders kann die Ausbeute und Qualität beeinflussen; insbesondere bei bestimmten Erkrankungen und Medikamenten kann die Qualität der aufgereinigten Nukleinsäuren reduziert sein.

### Nachgelagerte Anwendungen:

Ausbeute und Qualität der isolierten Nukleinsäuren sind für zahlreiche molekular diagnostische Anwendungen wie PCR-Techniken, Mikrobiomanalysen (NGS) und Hybridisierungsmethoden generell geeignet. Bei nachgelagerten Anwendungen sollten die Anweisungen des jeweiligen Herstellers beachtet werden.

## 2.6 Prinzip und Ablauf

### 1. Proben lysieren

Die Stuhlproben werden in Stool DNA Stabilizer unter denaturierenden Bedingungen und verschiedenen, für die Ziel-Nukleinsäure spezifischen Temperaturstufen lysiert. Menschliche Zellen zur Isolierung von Spender-DNA werden bei RT lysiert, während Bakterienzellen bei höheren Temperaturen inkubiert werden müssen. Zur Lyse von Bakterienzellen werden Zirconia-Beads hinzugefügt, um die Wirkung der Lyse zu erhöhen.

### 2. Entfernung von PCR-Inhibitoren und Proteinabbau

Nach der Lyse werden in den Fäzes vorliegende DNA-abbauende Substanzen und PCR-Inhibitoren an die InviAdsorb-Matrix adsorbiert. Das InviAdsorb befindet sich gebrauchsfertig in Safe-Lock Röhrchen, in welche das Lysat pipettiert wird. Die gebundenen Verunreinigungen und Zellreste werden abzentrifugiert. Der Überstand enthält die aufgereinigte DNA.

Dem Überstand wird bei erhöhten Temperaturen Proteinase K zugegeben, um Proteine zu verdauen und abzubauen.

### 3. Nukleinsäuren binden

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

### 4. Waschen zur Entfernung von Restverunreinigungen

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

### 5. DNA eluieren

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



### 3. Nukleinsäureextraktion mit dem PSP® Spin Stool DNA Basic Kit

#### 3.1 Vor Beginn eines Protokolls

Wenn Sie zum ersten Mal mit dem Kit arbeiten, achten Sie darauf, dass alle Puffer und Reagenzien wie dargestellt angesetzt wurden:

<b>Ansetzen der Puffer vor Erstgebrauch: 50 Ansätze</b>
<b>Binding Buffer A:</b> 21 ml <b>99,7 % Isopropanol</b> (molekularbiologische Qualität) in Flasche füllen und durch Schütteln 1 min gründlich mischen. Vor Gebrauch durch mehrfaches Invertieren mischen. Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Proteinase K:</b> Lyophilisierte Proteinase K durch Zugabe von 1,5 ml <b>DNase-/RNase-freiem Wasser</b> in das Gefäß resuspendieren und bis zur völligen Auflösung mischen.
<b>Wash Buffer I:</b> 30 ml <b>96 - 100 % Ethanol</b> in die Flasche geben. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Wash Buffer II:</b> 42 ml <b>96 - 100 % Ethanol</b> in die Flasche geben. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Ansetzen der Puffer vor Erstgebrauch: 250 Ansätze</b>
<b>Binding Buffer A:</b> 84 ml <b>99,7 % Isopropanol</b> (molekularbiologische Qualität) in Flasche füllen und durch Schütteln für 1 min gründlich mischen. Vor Gebrauch durch mehrfaches Invertieren mischen. Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Proteinase K:</b> Lyophilisierte Proteinase K durch Zugabe von 1,5 ml <b>DNase-/RNase-freiem Wasser</b> in jedes Gefäß resuspendieren und bis zur völligen Auflösung mischen.
<b>Wash Buffer I:</b> 80 ml <b>96 - 100 % Ethanol</b> in die Flasche geben. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.
<b>Wash Buffer II:</b> 105 ml <b>96 - 100 % Ethanol</b> in die Flasche geben. Gründlich mischen; Flasche immer gut verschlossen halten.

- Thermoschüttler auf 70 °C einstellen.
- Thermoschüttler/Heizblöcke auf 70 °C und 95 °C einstellen.
- Die benötigte Menge **Elution Buffer** auf 70 °C aufwärmen (pro Probe werden 100 - 200 µl **Elution Buffer** benötigt).
- Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Ansätze einschließlich der Kontrollen und beschriften Sie die erforderlichen RTA Spin Filter (Deckel) und 1.5 ml Receiver Tubes (pro Probe wird 1 Receiver Tube benötigt).

## 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 Ernährungszustand des Spenders sowie 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.

**Frische Stuhlproben:** Die Proben enthalten DNasen, die zu einer raschen Degradierung der DNA führen können. Frische Stuhlproben können 1-2 Stunden bei RT gelagert werden; der Stool DNA Stabilizer sollte der Probe so schnell wie möglich zugegeben werden. Andernfalls sollten Proben bei -80 °C eingefroren werden.

**Stabilisierte Stuhlproben:** Stuhlproben können mit den Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer von Invitek Molecular (s. Bestellinformationen) stabilisiert und im Anschluss zur Probenherstellung verwendet, gelagert und transportiert werden. Zur Probennahme wird 1 g Stuhl mit dem Löffel im Deckel des Probenröhrchens aufgenommen. Nach der Probennahme Probenröhrchen gut verschließen. Probe durch Schütteln oder Vortexen gründlich mischen, um die Probe mit dem Stool DNA Stabilizer im Röhrchen zu homogenisieren. Die Proben können in den Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer bis zu 3 Monate bei RT gelagert werden. Lagerzeiten von weniger als 3 Monaten haben keinen Einfluss auf die Qualität oder Menge der DNA. Zur langfristigen Lagerung können die Proben bei -20 °C oder -80°C eingefroren werden. Es wird empfohlen, die Proben vor dem Einfrieren zu aliquotieren.

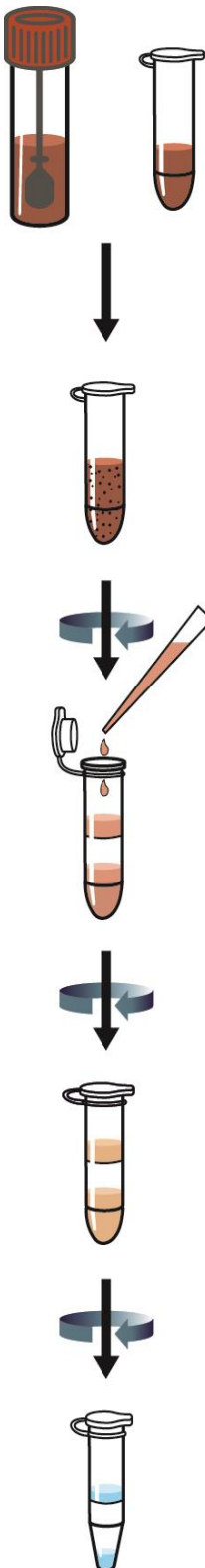
## 3.3 Vorbereitung des Ausgangsmaterials

**Frische Stuhlproben, flüssig:** Bei Flüssigproben 200 µl in ein 2.0 ml Safe-Lock Tube pipettieren. Ende der Pipettenspitze abschneiden, um das Pipettieren zu erleichtern. Fügen Sie nun den Stool DNA Stabilizer wie im Extraktionsprotokoll beschrieben hinzu.

**Gefrorene Stuhlproben:** Stuhlpartikel mit einem Skalpell oder Spatel in ein 2.0 ml Safe-Lock Tube auf Eis schaben. Achten Sie darauf, dass die Proben nicht auftauen, bevor Stool DNA Stabilizer zugegeben wurde, da sonst die DNA in der Probe abgebaut werden kann.

Proben in Stool Stabilizer können durch vorsichtiges Erwärmen direkt aufgetaut werden; vermeiden Sie aber wiederholtes Einfrieren und Auftauen, da dies zum Scheren der DNA führen kann. Aliquotieren Sie die Proben stattdessen.

### 3.4 Kurzprotokoll PSP® Spin Stool DNA Basic Kit



#### Proben lysieren

1. **Frische/gefrorene Stuhlproben:** 200 mg Stuhlprobe (frisch oder gefroren) in ein 2.0 ml Safe-Lock Tube einwiegen, 1,2 ml Stool DNA Stabilizer hinzufügen und 1 min kräftig vortexen. **Stabilisierte Proben:** 1,4 ml Probe nach Lagerung oder direkt nach der Probennahme aus dem Stool Collection Tube with DNA Stabilizer in ein 2.0 ml Safe-Lock Tube überführen.

##### a) Isolierung von Spender-DNA

10 min bei RT unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren

##### b) Isolierung bakterieller DNA

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.  
Dem Homogenat 5 **Zirconia Beads II** zugeben und 2 min vortexen.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren

##### c) Isolierung von DNA aus schwer zu lysierenden Bakterien

10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.  
3 min auf Eis inkubieren.  
5 **Zirconia Beads II** hinzufügen und 3 min bei 95 °C inkubieren. Probe 2 min vortexen, 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren.

#### Entfernung von PCR-Inhibitoren und Proteinverdau

2. Überstand in ein **InviAdsorb-Röhrchen** überführen und 15 s kräftig vortexen.  
1 min bei RT inkubieren. 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
3. Überstand vollständig in ein frisches 1.5 ml Receiver Tube überführen, Pellet mit InviAdsorb verwerfen. 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
4. 25 µl **Proteinase K** in frisches 2.0 ml Safe-Lock Tube vorlegen, 400 µl oder **800 µl (bei stabilisierten Proben)** Überstand aus Schritt 3 in das Safe-Lock Tube mit **Proteinase K** pipettieren und kurz vortexen. 10 min bei 70 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.

#### Genomische DNA binden

5. 200 µl **Binding Buffer A** oder **400 µl Binding Buffer A (bei stabilisierten Proben)** zum Lysat hinzufügen und kurz durch Vortexen oder wiederholtes Auf- und Abpipettieren mischen.  
RTA Spin Filter Set nehmen. Mischung vollständig (**bei stabilisierten Proben in zwei Schritten**) auf den RTA Spin Filter geben.  
Lysat auf RTA Spin Filter überführen und 1 min inkubieren.  
2 min bei 11.000 x g zentrifugieren. Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in ein frisches RTA Receiver Tube überführen.

#### Waschen zur Entfernung von Restverunreinigungen

6. 500 µl **Wash Buffer I** zugeben und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren. Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in frisches RTA Receiver Tube überführen.
7. 700 µl **Wash Buffer II** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren. Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter **zurück in das 2.0 ml RTA Receiver Tube** einsetzen
8. 4 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren, um das Ethanol vollständig zu entfernen.  
RTA Receiver Tube verwerfen

#### DNA eluieren

9. RTA Spin Filter in ein 1.5 ml Receiver Tube überführen. 100-200 µl vorgewärmten (70 °C) **Elution Buffer** zugeben.  
1 min bei RT inkubieren  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um die DNA zu eluieren. RTA Spin Filter verwerfen

### 3.5 Protokoll 1: DNA-Isolierung aus frischen oder gefrorenen Stuhlproben

---

1. 200 mg Stuhlprobe (frisch oder gefroren) in ein 2.0 ml Safe-Lock Tube einwiegen und pro Probe 1,2 ml **Stool DNA Stabilizer** hinzufügen. 1 min kräftig vortexen. Dasselbe Volumen **Stool DNA Stabilizer** auch bei kleineren Probenvolumina einsetzen.
  - a) **Isolierung von Spender-DNA**  
10 min bei RT unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um feste Stuhlpartikel zu pelletieren.
  - b) **Isolierung bakterieller DNA**  
10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.  
Dem Homogenat 5 **Zirconia Beads II** zugeben und 2 min vortexen.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um feste Stuhlpartikel und Beads zu pelletieren.
  - c) **Isolierung von DNA aus schwer zu lysierenden Bakterien**  
10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.  
3 min auf Eis inkubieren.  
Dem Homogenat 5 **Zirconia Beads II** zugeben und 3 min bei 95 °C inkubieren.  
Probe 2 min vortexen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um feste Stuhlpartikel und Beads zu pelletieren.
2. Überstand in ein **InviAdsorb-Röhrchen** überführen und 15 s kräftig vortexen.  
1 min bei RT inkubieren.  
3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
3. Überstand vollständig in ein frisches 1.5 ml Receiver Tube überführen, Pellet mit InviAdsorb verwerfen.  
3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
4. 25 µl **Proteinase K** in frisches 2.0 ml Safe-Lock Tube vorlegen, 400 µl Überstand aus Schritt 3 in das Safe-Lock Tube mit **Proteinase K** pipettieren und kurz vortexen.  
10 min bei 70 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.
5. 200 µl **Binding Buffer A** zum Lysat hinzufügen und kurz durch Vortexen oder wiederholtes Auf- und Abpipettieren mischen.  
RTA Spin Filter Set nehmen. Mischung vollständig auf den RTA Spin Filter überführen.  
Lysat auf RTA Spin Filter überführen und 1 min inkubieren  
2 min bei 11.000 x g zentrifugieren.  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in ein neues 2.0 ml RTA Receiver Tube überführen.
6. 500 µl **Wash Buffer I** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in ein neues 2.0 ml RTA Receiver Tube überführen.
7. 700 µl **Wash Buffer II** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter **zurück in das** 2.0 ml RTA Receiver Tube einsetzen
8. 4 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren, um das Ethanol vollständig zu entfernen.  
RTA Receiver Tube verwerfen.

9. RTA Spin Filter in ein 1.5 ml Receiver Tube überführen. 100-200 µl vorgewärmten (70°C) **Elution Buffer** zugeben.  
1 min bei RT inkubieren.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um die DNA zu eluieren RTA Spin Filter verwerfen.

**Hinweis:** DNA kann auch in einem kleineren Volumen Elution Buffer eluiert werden (abhängig von der erwarteten Ausbeute). Das Mindestvolumen für die Elution beträgt 50 µl. Beachten Sie, dass die maximale Ausbeute bei kleinen Elutionsvolumina reduziert sein kann. Wenn Sie große DNA-Mengen erwarten, können Sie die Menge an Elution Buffer erhöhen.

**Hinweis:** Zur langfristigen Aufbewahrung empfehlen wir, die eluierte DNA bei -20 °C zu lagern.

### 3.6 Protokoll 2: DNA-Isolierung aus stabilisierten Stuhlproben

---

1. Probennahme mit einem **Stool Collection Tube with DNA Stabilizer** durchführen.  
1,4 ml der gut homogenisierten Stuhlprobe nach der Lagerung oder direkt nach der Probennahme aus dem Collection Tube in ein 2.0 ml Safe-Lock Tube überführen.
  - a) **Isolierung von Spender-DNA**  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um feste Stuhlpartikel zu pelletieren.
  - b) **Isolierung bakterieller DNA**  
10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.  
Dem Homogenat 5 **Zirconia Beads II** zugeben und 2 min vortexen.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um feste Stuhlpartikel und Beads zu pelletieren.
  - c) **Isolierung von DNA aus schwer zu lysierenden Bakterien**  
10 min bei 95 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.  
3 min auf Eis inkubieren.  
Dem Homogenat 5 **Zirconia Beads II** zugeben  
3 min bei 95°C inkubieren.  
Probe 2 min vortexen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um feste Stuhlpartikel und Beads zu pelletieren.
2. Überstand in ein **InviAdsorb-Röhrchen** überführen und 15 s kräftig vortexen.  
1 min bei RT inkubieren.  
3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
3. Überstand vollständig in ein frisches 1.5 ml Receiver Tube überführen, Pellet mit InviAdsorb verwerfen.  
3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
4. 25 µl **Proteinase K** in frisches 2.0 ml Safe-Lock Tube vorlegen, 800 µl Überstand aus Schritt 3 in das Safe-Lock Tube mit **Proteinase K** pipettieren und kurz vortexen.  
10 min bei 70 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 900 rpm inkubieren.
5. 400 µl **Binding Buffer A** zum Lysat hinzufügen und kurz durch Vortexen oder wiederholtes Auf- und Abpipettieren mischen.  
RTA Spin Filter Set nehmen Mischung **in zwei Schritten** vollständig auf den RTA Spin Filter überführen.  
RTA Spin Filter schließen und 1 min bei RT inkubieren.  
2 min bei 11.000 x g zentrifugieren.  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in ein neues 2.0 ml RTA Receiver Tube überführen.
6. 500 µl **Wash Buffer I** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter in ein neues 2.0 ml RTA Receiver Tube überführen.
7. 700 µl **Wash Buffer II** hinzufügen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren  
Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter **zurück in das** 2.0 ml RTA Receiver Tube einsetzen.
8. 4 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren, um das Ethanol vollständig zu entfernen.  
RTA Receiver Tube verwerfen.

9. RTA Spin Filter in ein 1.5 ml Receiver Tube einsetzen. 100-200 µl vorgewärmten (70°C) **Elution Buffer** zugeben.  
1 min bei RT inkubieren.  
1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, um die DNA zu eluieren RTA Spin Filter verwerfen.

**Hinweis:** DNA kann auch in weniger Elution Buffer eluiert werden (abhängig von der erwarteten Ausbeute). Das Mindestvolumen für die Elution beträgt 50 µl. Beachten Sie, dass die maximale Ausbeute bei kleinen Elutionsvolumina reduziert sein kann. Wenn Sie große DNA-Mengen erwarten, können Sie die Menge an Elution Buffer erhöhen.

**Hinweis:** Zur langfristigen Lagerung empfehlen wir, die eluierte DNA bei -20 °C zu lagern.

## 4. Anhang

### 4.1 Problembhebung

Problem	Mögliche Ursache	Empfehlung
<b>RTA Spin Filter verstopft</b>	Zellen ungenügend lysiert und/oder zu viel Ausgangsmaterial	Lysezeit verlängern Schneller zentrifugieren Weniger Ausgangsmaterial einsetzen
<b>Kontaminierung mit RNA</b>	Der RTA Spin Filter kann geringe Mengen RNA aufreinigen	Vor der Zugabe von Binding Buffer A 20 µl RNase A (10 mg/ml) hinzufügen und 10 Minuten inkubieren.
<b>Geringe Ausbeute an Nukleinsäuren</b>	Unzureichende Zelllyse	Lysezeit verlängern Weniger Ausgangsmaterial verwenden, um die Säule nicht zu überladen Inkubationszeit bei 95 °C verlängern, Zirconia Beads einsetzen
	Unvollständige Elution	Inkubationszeit in vorgewärmten <b>Elution Buffer</b> auf 5 min erhöhen Zweimal mit 100 µl <b>Elution Buffer</b> eluieren Mehr <b>Elution Buffer</b> verwenden
	Niedrige Nukleinsäurekonzentration	DNA mit weniger <b>Elution Buffer</b> eluieren, jedoch nicht weniger als 50 µl verwenden
	Unsachgemäße Lagerung des Ausgangsmaterials	Sicherstellen, dass das Ausgangsmaterial sachgemäß gelagert wird. Probenmaterial nicht wiederholt auftauen und einfrieren.
	Falsch hergestellte Puffer	Sicherstellen, dass die richtige Menge an Ethanol/Isopropanol zu den Puffern hinzugefügt wird und dass alle Lösungen fest verschlossen gelagert werden.
	Probe und Stool DNA Stabilizer ungenügend homogenisiert	DNA-Aufreinigung mit neuer Probe wiederholen. Die Probe im Stool DNA Stabilizer so lange mischen, bis sie komplett homogenisiert ist. Zirconia Beads II einsetzen und zum Homogenisieren vortexen.
	Probe und Binding Buffer A unzureichend gemischt	Probe vor Überführen auf die Membran des RTA Spin Filter durch Pipettieren gründlich mischen.
<b>Degradierte Nukleinsäuren / niedriges A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>-Verhältnis</b>	Unzureichende Beseitigung von Inhibitoren wegen unzureichendem Mischen mit der InviAdsorb-Matrix	DNA-Aufreinigung mit neuer Probe wiederholen, Probe und InviAdsorb-Matrix so lange mischen, bis die Probe komplett homogenisiert ist.
	Aktivität der Proteinase reduziert	DNA-Aufreinigung mit neuer Probe und Proteinase K wiederholen. In schwierigen Fällen doppelte Menge an Proteinase K einsetzen.
	Wash Buffer I und Wash Buffer II in der falschen Reihenfolge eingesetzt	Wash Buffer I und Wash Buffer II in der richtigen Reihenfolge (siehe Protokoll) einsetzen.



<b>Nukleinsäuren funktionieren nicht gut in nachgelagerten Anwendungen (z. B. PCR oder NGS)</b>	Zu viel DNA in Downstream-Reaktion	Die extrahierte DNA kann aus unterschiedlichen Organismen in der ursprünglichen Stuhlprobe stammen (z. B. menschlich, tierisch, pflanzlich, bakteriell). Weniger Eluat einsetzen oder Probe für die Downstream-Reaktion verdünnen.
	Unzureichende Zellyse	Siehe oben

## 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 Funktionalität 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 Funktionalität und 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 Problembhebung
- 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.
PSP® Spin Stool DNA Basic Kit	50 Präparationen	1038120200
PSP® Spin Stool DNA Basic Kit	250 Präparationen	1038120300

Zur Probenlyse:

Produkt	Packungsgröße	Katalognr.
Stool DNA Stabilizer*)	180 ml	1038111100
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	50 Röhrchen	1038111200
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	250 Röhrchen	1038111300

**\*) Eine Flasche Stool DNA Stabilizer reicht für 50 Ansätze aus; für 250 Ansätze werden zwei Flaschen benötigt.**

### Änderungshistorie

Version	Datum	Beschreibung
DE-v1-2022	2022-06-15	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>

2022-06-15 DE-v1-2022