



LumiPure[®] DNA Gel Extraction Kit manual

Contents

Deutsch: Handbuch für das LumiPure DNA-Extraktionskit aus Agarosegelen	3-7
English: LumiPure DNA Gel Extraction Kit manual	8-13
Русский: Инструкция к набору LumiPure для выделения ДНК из агарозного геля	14-19

Handbuch für das LumiPure DNA-Extraktionskit aus Agarosegelen

Dieses Kit dient der schnellen (ca. 20 Minuten) und effizienten ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) DNA-Extraktion aus Agarosegelen oder DNA-Aufreinigung aus Reaktionsansätzen. Die im Kit enthaltenen Säulchen binden bis zu 5 oder 20 μg DNA mit Fragmentlängen von 70–10.000 bp, wobei die Rückgewinnungsrate aus Agarosegelen mindestens 50 % und aus Reaktionsansätzen mindestens 75 % beträgt. Die extrahierte DNA eignet sich für alle gängigen molekularbiologischen Verfahren, u. a. für PCR, Ligation, Transformation, Markierungsreaktionen, Restriktionsverdau und Sequenzierung (Sanger- und NGS-Verfahren).

Bestandteile

Komponente	Anzahl			
	13793 10 preps (5 μg)	23793 50 preps (5 μg)	15793 10 preps (20 μg)	25793 50 preps (20 μg)
D1450, Neutralisierungspuffer / Neutralization Buffer, 2 mL	1	1	1	1
K3450, Gel-Solubilisierungspuffer / Gel Solubilization Buffer, 10 mL	1	—	1	—
K2250, Waschlösung B / Wash Solution B (Konzentrat muss mit 96%igem Ethanol 5-fach verdünnt werden), 10.0 mL	1	1	1	1
D1350, Elutionspuffer / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5), 1.5 mL	1	2	1	4
Zentrifugationssäulchen CNP05 (für bis zu 5 μg , weißer Ring)	10	50	—	—
Sammelgefäß für Zentrifugationssäulchen, 2 mL	10	50	10	50
S3450, Gel-Solubilisierungspuffer / Gel Solubilization Buffer, 50 mL	—	1	—	1
Zentrifugationssäulchen CNP20-A (für bis zu 20 μg , grüner Ring)	—	—	10	50

Bei Raumtemperatur lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Geräte und Materialien:

- Laborwaage mit einer Genauigkeit von mindestens 0,01 g
- Heizblock oder Wasserbad
- Tischzentrifuge mit mindestens 10.000 min^{-1} ($6.700 \times g$) und Rotor für 1,5-ml-Röhrchen
- 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen (2 Röhrchen pro DNA-Extraktion aus einer Probe)
- 96 % Ethanol (4-faches Volumen der *Wash Solution B*, die als Konzentrat geliefert wird)
- Isopropanol (ca. 100 μl pro Probe)

Vorbereitung der Reagenzien

1. *Wash Solution B* wird als Konzentrat geliefert und muss vor der ersten Verwendung 1:5 mit 96%igem Ethanol verdünnt werden. Dazu versetzen Sie das auf der Flasche angegebene Volumen des Konzentrats mit dem 4-fachen Volumen an 96%igem Ethanol und notieren Sie die Zugabe auf dem Deckel.
2. Sollten sich im *Gel Solubilization Buffer* Salzkristalle gebildet haben, erwärmen Sie die Lösung auf maximal 50 °C, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat. Lassen Sie die Lösung auf 25 °C abkühlen.

DNA-Extraktion aus Agarosegel

1. Stellen Sie den Heizblock auf 50 °C ein.
2. Schneiden Sie die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell oder Messer aus

dem Gel heraus. Entnehmen Sie dabei möglichst wenig vom die DNA-Bande umgebenden Gel.

! Setzen Sie das zu isolierende DNA-Fragment nicht länger als nötig dem UV-Licht aus und legen Sie das Gel während der Bestrahlung auf eine Glas- oder Kunststoffplatte. UV-induzierte DNA-Schäden werden dadurch minimiert.

3. Wiegen Sie ein leeres 1,5-ml-Röhrchen und stellen Sie die Waage auf null. Überführen Sie das entnommene Gelstück in das 1,5-ml-Röhrchen und wiegen Sie es erneut. Notieren Sie das Gewicht des Gelstücks.

4. Versetzen Sie das Gelstück mit 4 μl *Gel Solubilization Buffer* pro mg Agarosegel (z.B. 400 μl *Gel Solubilization Buffer* auf ein 100 mg schweres Gelstück).

! Arbeiten Sie mit mehreren DNA-Proben gleichzeitig, so empfiehlt es sich, in jedes Röhrchen dasselbe Volumen an Gel Solubilization Buffer, bezogen auf das Gewicht des schwersten Gelstücks, zu pipettieren.

5. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 50 °C, bis sich das Agarosegel vollständig aufgelöst hat. Schwenken Sie das Röhrchen zwischendurch gelegentlich durch Invertieren.

! Für Gele mit mehr als 2 % Agarosegehalt verlängern Sie die Inkubationszeit, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hat.

6. Stellen Sie nach vollständigem Auflösen des Gelstücks sicher, dass die Lösung gelb gefärbt ist. Sollte die Lösung violett sein, geben Sie 5 μl *Neutralization Buffer* pro 1000 μl Probe hinzu. Sobald Sie mischen, schlägt die Farbe wieder von violett nach gelb um.

Der Gel Solubilization Buffer enthält einen Farbindikator zur Kontrolle des optimalen pH-Wertes, bei dem DNA am besten an die Säulenmembran bindet. Eine Violettfärbung der Lösung zeigt eine unerwünschte Erhöhung des pH-Wertes an. In diesem Fall wird der pH-Wert durch Zugabe von Neutralization Buffer wieder in den optimalen Bereich abgesenkt.

7. Lassen Sie die Röhrchen auf Raumtemperatur abkühlen.
8. Fügen Sie dem Ansatz 1 μl Isopropanol pro mg ausgeschnittenem Gelstück zu (z.B. 100 μl Isopropanol zu einer Probe mit einem Ausgangsgewicht des Gelstücks von 100 mg). Mischen Sie die Lösung.

DNA-Aufreinigung

Alle folgenden Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur, alle Zentrifugationsschritte mit $10.000\text{--}13.000\text{ min}^{-1}$ ($6.700\text{--}11.000 \times g$) ausgeführt.

1. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie die Probe auf die Säule (maximal $900\ \mu\text{l}$ pro Ladung) und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Entnehmen Sie die Säule aus dem Sammelgefäß, werfen Sie den Durchfluss und stecken Sie die Säule in das Sammelgefäß zurück. Beträgt das Volumen der Probe mehr als $900\ \mu\text{l}$, geben Sie nun das restliche Volumen der Probe auf die Säule und wiederholen Sie den Zentrifugationsschritt.
2. Geben Sie $500\ \mu\text{l}$ *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Entnehmen Sie die Säule aus dem Sammelgefäß, werfen Sie den Durchfluss und stecken Sie die Säule in das Sammelgefäß zurück.
3. *(optional)* Wiederholen Sie den Waschschrift. Geben Sie $500\ \mu\text{l}$ *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Verwerfen Sie den Durchfluss mitsamt dem Sammelgefäß.
4. Stecken Sie die Säule in ein sauberes $1,5\text{-ml}$ -Röhrchen und pipettieren Sie $10\text{--}50\ \mu\text{l}$ (falls DNA-Bindekapazität der Säule $5\ \mu\text{g}$ ist) oder $25\text{--}100\ \mu\text{l}$ (falls DNA-Bindekapazität der Säule $20\ \mu\text{g}$ ist) *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

! Für eine höhere DNA-Endkonzentration kann mit geringeren Volumina an Elutionspuffer eluiert werden — jedoch nicht mit weniger als $10\ \mu\text{l}$ (DNA-Bindekapazität der Säule ist $5\ \mu\text{g}$) oder $25\ \mu\text{l}$ (DNA-Bindekapazität der Säule ist $20\ \mu\text{g}$), weil die Säulenmembran dann möglicherweise nicht vollständig benetzt würde, was zu einem teilweisen DNA-Verlust führen könnte. Für eine höhere DNA-Ausbeute sollte mit größeren Volumina an Elutionspuffer ($50\ \mu\text{l}$ falls DNA-Bindekapazität der Säule $5\ \mu\text{g}$ ist oder $100\ \mu\text{l}$ falls DNA-Bindekapazität der Säule $20\ \mu\text{g}$ ist) eluiert werden.

! Falls notwendig, kann die Elution auch mit deionisiertem Wasser erfolgen.

DNA-Aufreinigung aus enzymatischen Reaktionsansätzen

1. Geben Sie zum Reaktionsansatz den *Gel Solubilization Buffer* im Verhältnis 1+4 hinzu (z. B. 400 µl Gel Solubilization Buffer zu 100 µl Reaktionsansatz).
2. Stellen Sie sicher, dass die Lösung gelb gefärbt ist. Sollte die Lösung violett sein, geben Sie 5 µl *Neutralization Buffer* pro 1000 µl Probe hinzu. Sobald Sie mischen, schlägt die Farbe wieder von violett nach gelb um.

Der Gel Solubilization Buffer enthält einen Farbindikator zur Kontrolle des optimalen pH-Wertes, bei dem DNA am besten an die Säulenmembran bindet. Eine Violettfärbung der Lösung zeigt eine unerwünschte Erhöhung des pH-Wertes an. In diesem Fall wird der pH-Wert durch Zugabe von Neutralization Buffer wieder in den optimalen Bereich abgesenkt.

3. Fügen Sie dem Ansatz Isopropanol im Verhältnis 1+1 bezogen auf das anfängliche Probenvolumen hinzu (z.B. 100 µl Isopropanol auf 100 µl Ausgangsvolumen des enzymatischen Reaktionsansatzes, der mit 400 µl *Gel Solubilization Buffer* gemischt wurde). Mischen Sie die Lösung.
4. Befolgen Sie den Abschnitt «DNA-Aufreinigung» weiter oben.

Anmerkung

Bei der DNA-Konzentrationsbestimmung verwenden Sie zum Verdünnen der DNA-Probe bitte ausschließlich TE-Puffer pH 8,5 oder den *Elution Buffer* aus dem Kit. Andernfalls könnten die Reinheit der DNA-Probe (aus dem Verhältnis A_{260}/A_{280}) und die DNA-Konzentration (A_{260}) falsch abgeschätzt werden.

Lagerung der isolierten DNA: im Gefrierfach (-20 °C), kurzfristig bei +4 °C.

LumiPure DNA Gel Extraction Kit manual

The kit allows rapid (about 20 minutes) and efficient ($OD_{260}/OD_{280} > 1.8$) purification of DNA fragments from agarose gels or enzymatic reactions. Spin columns supplied with the kit enable purification of up to 5 or 20 μg of DNA 70 bp–10 kb in size, and the recovery of the purified DNA is not less than 50 % when purifying from agarose gels and not less than 75 % when purifying from enzymatic reactions. The purified DNA is suitable for any subsequent application, such as PCR, restriction enzyme digestion, ligation and transformation, labeling, Southern blotting, sample preparation for Sanger sequencing and NGS, etc.

Kit components

Kit component	Count			
	13793 10 preps (5 μg)	23793 50 preps (5 μg)	15793 10 preps (20 μg)	25793 50 preps (20 μg)
D1450, Neutralization Buffer, 2 mL	1	1	1	1
K3450, Gel Solubilization Buffer, 10 mL	1	—	1	—
K2250, Wash Solution B (Concentrate to be diluted 5x with ethanol 96%), 10.0 mL	1	1	1	1
D1350, Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 1.5 mL	1	2	1	4
Spin column CNP05 (up to 5 μg , white ring)	10	50	—	—
Collection tube for spin column, 2 mL	10	50	10	50
S3450, Gel Solubilization Buffer, 50 mL	—	1	—	1
Spin column CNP20-A (up to 20 μg , green ring)	—	—	10	50

Store at room temperature.

Shelf life 12 months.

Equipment and reagents supplied by user:

- 96 % ethanol (the necessary volume is equal to 4 volumes of the *Wash Solution B* concentrate supplied with the kit)
- isopropanol (about 100 μ L for DNA purification from 1 typical sample)
- 1.5 mL microcentrifuge tubes (2 tubes for DNA purification from 1 sample)
- microcentrifuge with rotor for 1.5 mL tubes and capable of centrifuging $>10,000$ RPM ($6700 \times g$)
- heating block (alternatively, a water bath can be used)
- laboratory balance with a precision of at least 0.01 g

Before starting

1. Dilute the *Wash Solution B* concentrate 5 \times with 96 % ethanol (add 4 volumes of 96 % ethanol to 1 volume of concentrate specified on the bottle). Mark on the label that ethanol has been added.
2. If any precipitate has formed in *Gel Solubilization Buffer*, incubate the solution at a temperature not higher than 50 $^{\circ}$ C until the precipitate has been completely dissolved.

DNA fragment extraction from the gel

1. Set a heating block to 50 $^{\circ}$ C.
2. Excise a gel slice containing the DNA fragment with a clean scalpel or razor blade. Minimize the size of the gel slice by cutting as close to the DNA as possible.

! Reduce UV exposure of the gel slice containing the DNA fragment or keep the gel slice on a glass or plastic plate during UV illumination. This minimizes DNA damage induced by UV light.

3. Weigh a clean 1.5 mL microcentrifuge tube and tare the balance. Place the gel slice into an equivalent clean 1.5 mL tube and weigh. Record the weight of the gel slice.
4. Add 4 μL of *Gel Solubilization Buffer* to every mg of agarose gel (4+1) (e.g., add 400 μL of *Gel Solubilization Buffer* to a gel slice with a weight of 100 mg).
! When working with multiple samples — gel slices containing DNA fragments — it is convenient to add to all samples the same volume of Gel Solubilization Buffer calculated for the biggest gel slice.
5. Incubate the tube at 50 °C for 10 min with occasional mixing by inversion (1–2 times) until the gel slice is completely dissolved.
! For gels with an agarose content greater than 2 %, increase the incubation time until the gel slice has completely dissolved.
6. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow. If the color of the mixture is violet, add 5 μL of *Neutralization Buffer* to every 1000 μL of the DNA sample. The color of the mixture will turn to yellow.
The Gel Solubilization Buffer contains a color pH indicator allowing easy monitoring of the pH value optimal for DNA binding to the column membrane. Violet color indicates that the solution is too alkaline. In this case Neutralization Buffer should be added to adjust the pH value for efficient DNA binding.
7. Allow the contents of all tubes to cool down to room temperature.
8. Add 1 μL of isopropanol to every mg of solubilized agarose gel (e.g., add 100 μL of isopropanol to 100 mg solubilized gel slice). Mix thoroughly.

DNA purification

All centrifugation steps are carried out at room temperature, at 10,000–13,000 RPM (6700–11,000 x g).

1. Place a spin column in a collection tube. Add the sample to the column (to a maximum of 900 μL per single load). Centrifuge the column for 30 seconds. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.

For sample volumes exceeding 900 μL load the remainder and repeat the procedure.

2. Add 500 μL of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.
3. (optional) Repeat the washing. Add 500 μL of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the collection tube with the flow-through.
4. Place the spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add *Elution Buffer* to the center of the spin column membrane: 10–50 μL when using spin column with binding capacity of 5 μg DNA or 25–100 μL when using spin column with binding capacity of 20 μg DNA. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column for 1 minute. The microcentrifuge tube contains the purified DNA.

! For increased DNA concentrations, use a low volume of Elution Buffer. Elution with volumes of less than 10 μL (spin column with binding capacity of 5 μg DNA) or 25 μL (spin column with binding capacity of 20 μg DNA) is not recommended because this can be insufficient to entirely wet the membrane resulting in low DNA recovery. For increased DNA yield, use a higher volume of Elution Buffer (50 μL when using spin column with binding capacity of 5 μg DNA or 100 μL when using spin column with binding capacity of 20 μg DNA).

! If necessary, the DNA can be eluted with deionized water.

DNA fragment purification from enzymatic reactions

1. Add 4 volumes of *Gel Solubilization Buffer* to 1 volume of the reaction sample (e.g., add 400 μL of Gel Solubilization Buffer to 100 μL of the reaction sample). Mix thoroughly.
2. Check that the color of the mixture is yellow. If the color of the mixture is violet, add 5 μL of *Neutralization Buffer* to every 1000 μL of the DNA sample. The color of the mixture will turn to yellow.

The Gel Solubilization Buffer contains a color pH indicator allowing easy monitoring of the pH value optimal for DNA binding to the column membrane. Violet color

indicates that the solution is too alkaline. In this case Neutralization Buffer should be added to adjust the pH value for efficient DNA binding.

3. Add 1 volume of isopropanol to 1 volume of the initial reaction solution (e.g., add 100 μL of isopropanol to 100 μL of the initial reaction solution that was mixed with 400 μL of *Gel Solubilization Buffer*). Mix thoroughly.
4. Proceed with the protocol «DNA purification» above.

Note

When measuring the DNA concentration, dilute the sample only with TE buffer pH 8.5 or *Elution Buffer* supplied with the kit. Otherwise, DNA concentration and purity (OD_{260} and OD_{260}/OD_{280} , respectively) can be estimated incorrectly.

Storage of purified DNA: for long-term storage -20 °C, for short-term storage +4 °C.



