



Multi DNA Extraction kit

Testkit zur DNA Extraktion basierend auf
Guanidinthiocyanat-Lyse und
Alkohol-Präzipitation
Gebrauchsanweisung: Seite 3

Kit for DNA extraction based on
guanidine thiocyanate lysis and
alcohol precipitation
Instructions for use: page 21









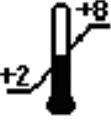













80-01



96 Extraktionen
96 extractions

1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGENDS

	In vitro Diagnostikum In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Katalognummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biologische Gefahr Biological risks
	Negative Kontrolle Negative control		Ausreichend für <96> Untersuchungen Contains sufficient for <96> extractions
	Lysispuffer Lysis buffer		DNA-Präzipitationslösung DNA-precipitation solution
	Interne Kontrolle Internal Control		Positive Kontrolle Positive control
	Vorbehandlungspuffer für getrocknete Bluttropfen Dried blood spot pretreatment buffer		Proteinase K-Lösung, 10mg/ml Proteinase K solution, 10mg/mL
	Waschlösung Washing solution		Elutionspuffer Elution buffer

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Multi DNA Extraction kit** ist für eine schnelle und effektive DNA Extraktion aus Blutserum/-plasma, Gesamtblut, getrockneten Blutropfen (DBS), Speichel, Urin sowie urethralen, endozervikalen und vaginalen Abstrichen zur weiteren Analytik mittels Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken inklusive Real-Time PCR bestimmt. Der Testkit ist ausreichend für 96 Extraktionen.

3. TESTPRINZIP

Der **Multi DNA Extraction kit** basiert auf Guanidinthiocyanat-Lyse gefolgt von einer Alkohol-Präzipitation.

4. PACKUNGSINHALT

LB	Lysispuffer	1 Flasche – 50 ml
PS	DNA-Präzipitationslösung	2 Flaschen - 2x 35 ml
WASH	Waschlösung	2 Flaschen - 2x 50 ml
EB	Elutionspuffer	1 Flasche – 10 ml
NC	Negative Kontrolle	1 Mikrozentrifugen- gefäß - 1,5 ml

Anmerkung: Beim Extrahieren der DNA für die nachfolgende Analyse mit den Astra Biotech PCR Infektionskits sind die dort enthaltenen Internen Kontrollen **IC** bei der Durchführung des **Multi DNA Extraction kits** mitzuführen.

5.ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIERN, MATERIALIEN UND EQUIPMENT

- Interne Kontrolle **IC** aus jeweiligem PCR Infektionskit (*bei nachfolgender Verwendung von Astra Biotech PCR Infektionskits*);
- Biosicherheitskammer;
- Heizblock oder Thermoschüttler (bis +75 °C) passend für 1,5 ml-Röhrchen;
- Vortexer;
- Mikrozentrifuge (max. 13000 rpm) passend für 1,5 ml-Röhrchen;
- Medizinische Absaugvorrichtung;
- Pipettenspitzen ohne Filter (bis zu 200 µl) zum Einsatz mit Absaugvorrichtung;
- 2 separate Pipettensätze für DNA-freie und DNA-haltige Komponenten (20-200 µl; 100-1000 µl);
- Filterspitzen (100; 200 und 1000 µl);
- Einweg 1,5 ml-„Safe-seal“-Mikrozentrifugenröhrchen;
- DNA-Arbeitsplatz mit separater Laborschutzbekleidung;
- Abfallgefäß mit Desinfektionsmittel;
- 0,9 % NaCl-Lösung und Transportmedium;
- **DBSb** Vorbehandlungspuffer für Getrocknete Blutropfen (REF 80-03) und Proteinase K (REF 80-04) für die Extraktion genomischer DNA aus getrockneten Blutropfen.

6. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Multi DNA Extraction kit** ist bei +2 bis +8 °C in der Originalverpackung innerhalb der Haltbarkeit zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 7 Tage zulässig.

DBSb ist bei +2...8 C für 2 Jahre haltbar.

Lyophilisierte Proteinase K ist bei -18...-22°C für 3 Jahre stabil.

Gebrauchsfertige Proteinase K-Lösung **Prot.K** kann 1 Jahr bei einer Temperatur von -18...-22°C gelagert werden.

7. PROBENLAGERUNG

Probe	Bedingung	Stabilität
Getrocknete Blutropfen	+18...+25 °C	3 Jahre
Gesamtblut	+2...+8 °C	2 Tage (für quantitative Analysen)
		1 Monat (nur Extraktion genomischer DNA)
Blutserum/ Blutplasma	+2...+8 °C	5 Tage
	-18...-22 °C	1 Jahr
	-68...-72 °C	Über lange Zeit stabil

Tupfer-,Kratzer- und Urin- Proben	+18...+25 °C	2 Tage
	+2...+8 °C	4 Tage (2 Wochen für Urin)
	-18...-22 °C	Über lange Zeit stabil
Speichel	+18...+25 °C	6 Stunden
	+2...+8 °C	1 Woche
	-18...-22 °C	1 Monat
	-68...-72 °C	Über lange Zeit stabil

8. PROBENVORBEREITUNG

- **Urin-Proben**

Den Behälter mit der Urin-Probe schütteln. 1 ml des Urins in ein neues 1,5 ml- Mikrozentrifugengefäß geben. Bei 13000 rpm für 5 min zentrifugieren. Überstand mit der Absaugvorrichtung entfernen.

0,9 % NaCl-Lösung hinzugeben, um ein Gesamtvolumen von 200 µl zu erhalten. Gründlich vortexen bis das Pellet gelöst ist.

- **Mundwaschung/Speichel-Proben**

Mund gründlich für 10-15 s mit 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung spülen. Flüssigkeit in sterilem 15 ml-Mikrozentrifugengefäß sammeln. Bei 3000 rpm für 3 min zentrifugieren. Etwa 9 ml des Überstands mit der Absaugvorrichtung entfernen. Das verbleibende Volumen sollte etwa 0,5-1,0 ml (Pellet und flüssige Phase) betragen.

200 µl Transportmedium hinzufügen. Gründlich vortexen bis das Pellet gelöst ist.

- **Tupfer und Kratzer-Proben**

Tupferproben mit geeignetem Werkzeug entnehmen. Nach der Probengewinnung die Tupfer mit Transportmedium in ein 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß (mit Deckel) geben und für 15 s schütteln. Spritzen der Lösung vermeiden. Die restliche Flüssigkeit aus dem Tupfer drücken und den Tupfer entfernen.

- **Blut**

- **Gesamtblut**

Das Blut in einem Antikoagulantien-haltigen Röhrchen sammeln. EDTA und Trinatriumcitrat können als Antikoagulantien verwendet werden.

Anmerkung: *Der Gebrauch von Heparin als Antikoagulanzen ist nicht zulässig.*

- **Blutplasma**

Um Blutplasma zu erhalten, das Gesamtblut mit Antikoagulantien bei 3000 rpm für 20 min bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) zentrifugieren. Den Überstand in ein 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß geben.

- **Blutserum**

Das Blut in einem Antikoagulantien-freien Röhrchen sammeln. Nach 30 min Blutgerinnung bei Raumtemperatur die Proben bei 3000 rpm für 10 min zentrifugieren. Den Überstand in ein 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß geben.

- **Getrocknete Blutropfen (DBS)**

Einige Tropfen Blut, gewonnen mittels Lanzette, auf ein speziell hergestelltes Filterpapier geben. Nach vollständiger Durchtränkung des Papiers mit dem Blut, das Papier an der Luft für einige Stunden trocknen. Die Berührung der Testkarte mit bloßen Händen ist nicht zulässig, mit Ausnahme des Spenders. Die Bluttestkarten im Druckverschlussbeutel mit 3-4 Trockenmittelbeutelchen und Feuchtigkeitsindikator lagern.

Drei im Durchmesser 3 mm (1/8 inch) große Scheiben aus dem getrockneten Blutfleck mit einer Stanze stechen und in ein 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß legen. Gefäße beschriften.

Anmerkung: *Es wird ausdrücklich empfohlen, die Scheiben unmittelbar vor der DNA Extraktion aus der Bluttestkarte zu stanzen.*

9. TESTDURCHFÜHRUNG FÜR DIE DNA-EXTRAKTION AUS BLUTSERUM/-PLASMA, SPEICHEL, URIN, ABSTRICHEN, TUPFERN UND GESAMTBLUT

Anmerkung: *Bei nicht nachfolgender Verwendung der Astra Biotech PCR Infektionskits: Schritte D, E und G überspringen.*

- A.** Heizblock auf +75 °C vorwärmen.
- B.** Lysispuffer **LB** auf Präzipitationen/ Niederschläge überprüfen. Bei Präzipitat-Bildung den Puffer erwärmen bis sich das Präzipitat löst. Flasche kurz schütteln und vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur kühlen.

- C.** Benötigte Menge 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäße entsprechend der Probenanzahl vorbereiten und markieren.

Anmerkung: Bei nachfolgender Verwendung der Astra Biotech PCR Infektionskits: ein 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß für die Negative Extraktionskontrolle vorbereiten und mit „NEC“ markieren. **NC** muss gleichzeitig mit den klinischen Proben im „NEC“-Gefäß extrahiert werden.

- D.** Interne Kontrolle **IC** gründlich vortexen und für 2-3 s bei 1500-2400 rpm zentrifugieren.
- E.** 20 µl **IC** zu jedem vorbereiteten Mikrozentrifugengefäß (inklusive „NEC“) geben.
- F.** 500 µl **LB** zu den vorbereiteten Gefäßen geben.
- G.** **NC** zu dem mit „NEC“-markierten Mikrozentrifugengefäß geben:

Material	NC
Blutserum, Blutplasma, Speichel, Urin, Abstriche, Tupfer	100 µl
Gesamtblut	25 µl

- H.** Jeweilige klinische Probe in das Mikrozentrifugengefäß pipettieren:

Material	Probe
Blutserum, Blutplasma, Speichel, Urin, Abstriche, Tupfer	100 µl
Gesamtblut	25 µl

- I. Für 3-5 s vortexen.
- J. Bei +75 °C für 15 min inkubieren. Alle 3 min die Gefäße für 1-2 s vortexen. Alternativ: Thermoschüttler auf 1300 rpm einstellen.
- K. Heizblock/ Thermoshaker auf +60 °C vorheizen
- L. Rörchen auf Raumtemperatur für 2 min kühlen.
- M. 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäße kurz zentrifugieren, um Flüssigkeit vom Deckelchen zu entfernen.
- N. DNA-Präzipitationslösung **PS** hinzufügen. Für 5–10 s vortexen.

Material	PS
Blutserum, Blutplasma, Speichel, Urin, Abstriche, Tupfer	600 µl
Gesamtblut	550 µl

- O. Bei 13000 rpm für 5 min zentrifugieren. Überstand mit der Absaugvorrichtung entfernen. Falls Präzipitat kaum erkennbar, Volumen des Präzipitates auf 3 mm über dem Rörchenboden reduzieren.
- P. 1 ml Waschlösung **WASH** zum Pellet geben. Für 5-10 s vortexen.
- Q. Bei 13000 rpm für 3 min zentrifugieren. Überstand mit der Absaugvorrichtung vorsichtig entfernen.
- R. Gefäße bei Raumtemperatur für 3-5 min mit geöffneten Deckeln inkubieren.

Anmerkung: Pellets nicht übertrocknen!

- S. 60 µl Elutionspuffer **EB** hinzugeben. Gründlich vortexen.

Anmerkung: Das Volumen kann, wenn benötigt, auf bis zu 100 µl erhöht werden.

- T.** Bei +60 °C für 10 min inkubieren. Gefäße alle 2 min für 5-7 s vortexen. Alternativ Thermoschüttler auf 1300 rpm einstellen.
- U.** Bei 13000 rpm für 1 min zentrifugieren.
- V.** Das Eluat enthält reine genomische DNA. Die DNA ist bei -18...-22 °C für einen Monat oder bei +2...+8 °C für maximal 1 Woche zu lagern.

Anmerkung: Röhrchen vortexen und für 1 min bei 13000 rpm vor dem erneuten Gebrauch zentrifugieren.

10. TESTDURCHFÜHRUNG FÜR DIE DNA-EXTRAKTION AUS GETROCKNETEN BLUTTROPFEN

- A.** Lysispuffer **LB** auf Präzipitationen/ Niederschläge überprüfen. Bei Präzipitat-Bildung den Puffer erwärmen bis sich das Präzipitat löst. Flasche kurz schütteln und vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur kühlen.
- B.** Vorbereitung der **Prot.K**: 1 ml des Verdünnungspuffers zur lyophilisierten Proteinase K geben. **Prot.K** mischen und kurz zentrifugieren, um Flüssigkeit vom Deckelchen zu entfernen.
- C.** Heizblock auf +56 °C vorwärmen.
- D.** 100 µl **DBSb** zu je drei Scheiben (Durchmesser 3 mm, vorbereitet wie Abschnitt 8) in die Mikrozentrifugengefäße geben.

- E.** 10 µl **Prot.K** hinzugeben, durch vortexen mischen und bei +56 °C für 60 min inkubieren. Röhrchen alle 10 min für 1-2s vortexen.
- F.** Anschließend kurz zentrifugieren, um Tropfen aus dem Deckel zu entfernen.
- G.** Heizblock auf +75 °C vorheizen.
- H.** 500 µl **LB** hinzugeben.
- I.** Gründlich für 3-5 s vortexen.
- J.** Bei 75 °C 15 min inkubieren. Alle 3 min für 1-2 s vortexen.
- K.** Heizblock auf +60 °C vorheizen.
- L.** Bei 13000 rpm für 3 min zentrifugieren und den Überstand in eine neues 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß überführen.
- M.** Röhrchen bei Raumtemperatur für 2 min abkühlen lassen.
- N.** Kurz zentrifugieren, um Tropfen aus dem Deckel zu entfernen.
- O.** 600 µl DNA-Präzipitationspuffer **PS** hinzufügen. Für 5-10 s vortexen.
- P.** Bei 13000 rpm für 5 min zentrifugieren. Den Überstand mittels Absaugvorrichtung entfernen. Falls Präzipitat kaum erkennbar, Volumen des Präzipitates auf 3 mm über dem Röhrchenboden reduzieren.
- Q.** 1 ml Waschlösung **WASH** zum Pellet geben. Für 5-10 s vortexen.
- R.** Bei 13000 rpm für 3 min zentrifugieren. Überstand mit der Absaugvorrichtung vorsichtig entfernen.
- S.** Gefäße bei Raumtemperatur für 3-5 min mit geöffneten Deckeln inkubieren.

Anmerkung: *Pellets nicht übertrocknen!*

- T.** 60 µl Elutionspuffer **EB** hinzugeben. Gründlich vortexen.

Anmerkung: Das Volumen kann, wenn benötigt, auf bis zu 100 µl erhöht werden.

U. Bei +60 °C für 10 min inkubieren. Gefäße alle 2 min für 5-7 s vortexen. Alternativ Thermoschüttler auf 1300 rpm einstellen.

V. Bei 13000 rpm für 1 min zentrifugieren.

W. Das Eluat enthält reine genomische DNA. Die DNA ist bei -18...-22 °C dauerhaft oder bei +2...+8 °C für maximal 1 Woche zu lagern.

Anmerkung: Vor erneutem Gebrauch Röhrchen gründlich vortexen und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren.

11. TROUBLESHOOTING

1. Geringe Ausbeute an DNA

- Volumen der Probe ist zu groß. Die in dieser Anleitung beschriebenen Volumina nicht überschreiten.
- Proben sind möglicherweise alt oder degradiert: Die Proben sind angemessen zu lagern oder frische Proben zu verwenden.
- Uneffizienter Probenaufschluss. Lysispuffer erwärmen bis sich das Präzipitat komplett gelöst hat.
- Pellet nicht komplett gelöst. Pellets nicht übertrocknen.

2. Inhibition nachfolgender Analysen

- Reste der Waschlösung noch in gereinigter DNA enthalten: Vorsichtig und sorgfältig Waschlösung komplett entfernen und Pellets wie in der Anleitung beschrieben trocknen.

3. DNA ist degradiert

- Die Probe wurde wiederholtem Einfrieren und Auftauen unterzogen. Wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen vermeiden, frische Zubereitungen unverzüglich verwenden.
- Ungeeignet Lagerbedingungen: Proben und Komponenten wie in der Anleitung beschrieben lagern.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die zu erwartende Ausbeute genomischer DNA variiert je nach Menge und Art des verwendeten Ausgangsmaterials.

Die Effizienz der Extraktion ist nicht weniger als 80 %.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Die Qualität der mit dem Testkit isolierten DNA kann wie folgt überprüft werden:

- Analyse der Internen Kontrolle bei nachfolgender Verwendung der Astra Biotech PCR Infektionskits;
- DNA Gelelektrophorese mit 1 % Agarosegel.

14. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten.



- Der Lysispuffer **LB** ist gesundheitsschädlich und reizend, daher sollten die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
 - P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
 - P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
 - P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
 - P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen;
 - P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
 - P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.



- Die DNA-Präzipitationslösung **PS** und der Waschpuffer **WASH** sind hochentzündlich und können schwerwiegende Augenschäden hervorrufen:
 - P210 - Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen;
 - P233 - Behälter dicht verschlossen halten;
 - P240 - Behälter und zu befüllende Anlage erden;
 - P241 - Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel/ Lüftungsanlagen /Beleuchtung verwenden;
 - P242 - Nur funkenfreies Werkzeug verwenden;

- P243 - Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen;
- P310 - Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen;
- P305+351+338 - BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.



- Elutionspuffer **EB** und Negativkontrolle **NC** enthalten 0,05 % Natriumazid, das sehr giftig ist:
 - P260 - Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen;
 - P262 - Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen;
 - P264 – Nach Gebrauch Hände gründlich waschen;
 - P270 - Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen;
 - P271 - Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden;
 - P273 - Freisetzung in die Umwelt vermeiden;
 - P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen;
 - P284 - Atemschutz tragen;
 - P310 - Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen;
 - P330- Mund spülen;
 - P361 - Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen;


- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P391 - Verschüttete Mengen aufnehmen;
- P405 - Aufrecht lagern;
- P501 - Inhalt / Behälter entsprechend den geltenden nationalen Bestimmungen der Entsorgung zuführen.
- P301 +P310 - BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen;
- P302 +P350 - BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen;
- P304 +P340 - BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert;
- P403 +P233 - Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.



Bei der Testdurchführung der DNA-Extraktion aus getrockneten Blutropfen:

- P305 + P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen..
- P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Gif tinformation szentrum oder Arzt anrufen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

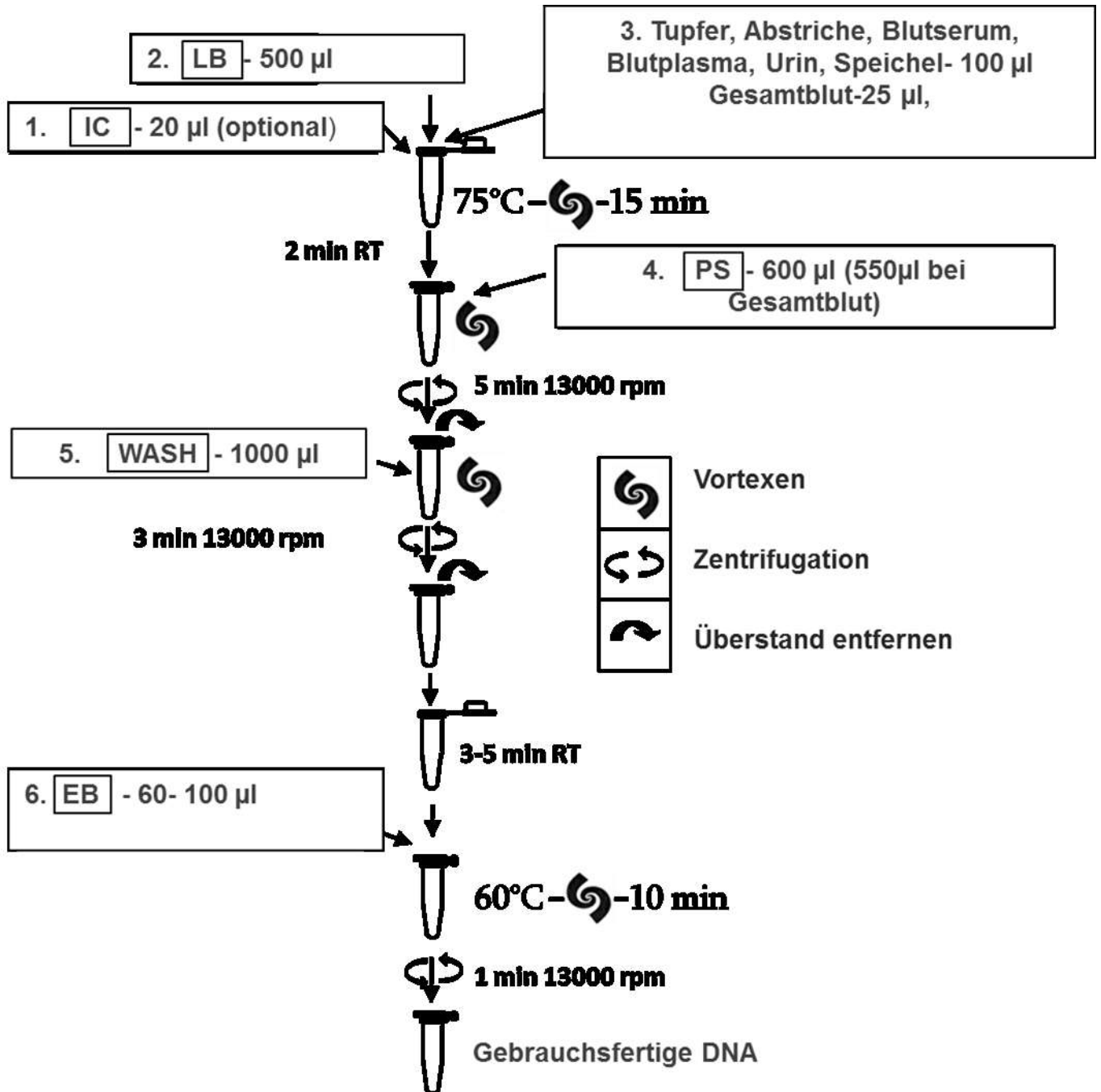
-  Praktiken und Verfahren der **Biologischen Sicherheitsstufe 2** müssen bei der Extraktion von klinischen Proben mit dem **Multi DNA Extraction kit** befolgt werden. Humanes Blut, Blutprodukte, Körperflüssigkeiten

und Gewebe sollten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

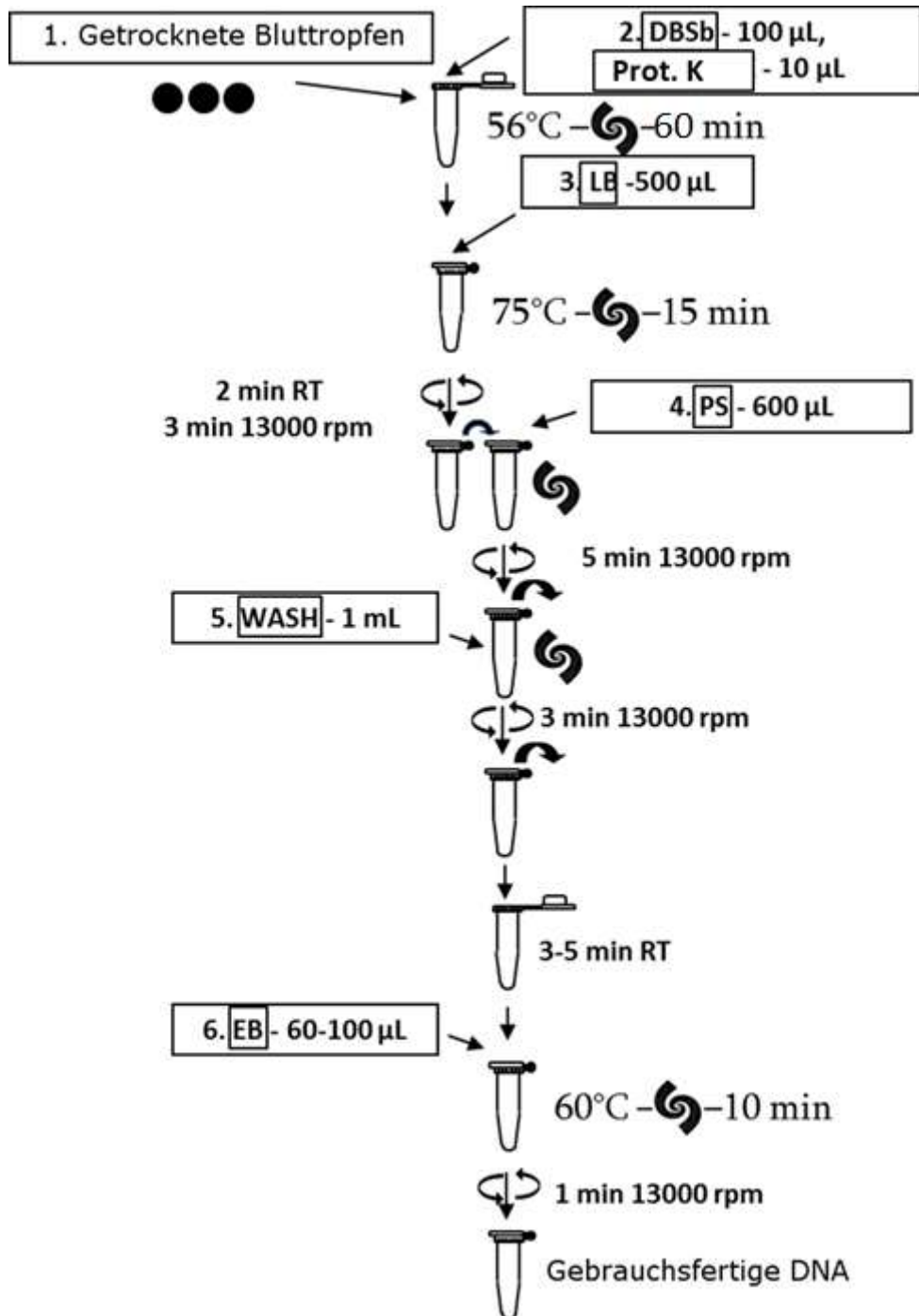
- Bitte folgende Regeln beachten, um Kontaminationen zu vermeiden:
 - Zwei separate Pipettensätze für DNA-freie und DNA enthaltende Komponenten nutzen,
 - Filter-Pipettenspitzen verwenden,
 - Dieselben Pipettenspitzen nie für zwei verschiedene Komponenten benutzen, weder DNA-frei noch DNA- haltig.
- Der Testkit darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Das Mischen von Reagenzien verschiedener Testchargen oder verschiedener Flaschen derselben Charge ist nicht gestattet. Die Flaschen und Fläschchen sind unmittelbar nach dem Gebrauch zu verschließen und in einer aufrechten Position zu lagern.
- Bei Verwendung mehrerer Astra Biotech PCR Infektionskits ist nur die jüngste Charge **IC** zu verwenden.

15. TESTSCHEMEN

Tupfer, Abstriche, Gesamtblut, Blutserum, Blutplasma, Urin und Speichel



Getrocknete Blutropfen (DBS)



2. INTENDED USE

Multi DNA Extraction kit is designed for fast and effective DNA extraction from blood serum/plasma, whole blood, dried blood spots (DBS), saliva, urine, urethral swabs, endocervical and vaginal smears for further nucleic acid amplification testing including Real-Time PCR. The Kit is designed for 96 extractions.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Multi DNA Extraction kit is based on guanidine thiocyanate lysis followed by alcohol precipitation.

4. MATERIALS PROVIDED

LB	Lysis buffer	1 bottle - 50 mL
PS	DNA-precipitation solution	2 bottles - 2x 35 mL
WASH	Washing solution	2 bottles - 2x 50 mL
EB	Elution buffer	1 bottle – 10 mL
NC	Negative control	1 microcentrifuge tube - 1.5 mL

Note: *If extracted DNA is intended for the subsequent analysis with Astra Biotech Infectious PCR kits, internal control **IC** contained in these PCR kits are needed for the extraction procedure with the **Multi DNA Extraction kit**.*

5. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- *Internal Control **IC** from the respective Infectious PCR diagnostic kit (in case of subsequent analyses with Astra Biotech Infectious PCR kits);*
- Biosafety cabinet;
- Heating block or thermo-shaker (temperature up to +75 °C) suitable for 1.5 mL tubes;
- Vortex mixer;
- Microcentrifuge (max. speed 13,000 rpm) suitable for 1.5 mL tubes;
- Medical aspirator;
- Non-filter pipette tips (up to 200 µL) for use with medical aspirator;
- 2 separate sets of pipettes for DNA-free and DNA-containing components (20-200 µL; 100-1,000 µL);
- Filter tips (100; 200 and 1,000 µL);
- Disposable safe-seal 1.5 mL microcentrifuge tubes;
- DNA-zone-only working area with separate protective laboratory clothing;
- Waste bin with disinfectant;
- 0.9 % sodium chloride solution and transport medium;
- **DBSb** Dried blood spot pretreatment buffer (REF 80-03) and Proteinase K (REF 80-04) for isolation of genomic DNA from dried blood spots.

6. STORAGE CONDITIONS AND STABILITY OF THE KIT

The expiry date of the kit is stated on the box label, expiry date for each component is indicated on the respective label. **Multi DNA Extraction kit** can be stored in the original kit box at +2...+8 °C during the entire shelf life, or at +25 °C for no more than 7 days.

DBSb is stable for 2 years if stored at +2...8 C.

Store Proteinase K, lyo. for 3 years at -18...-22°C.

Prot.K (ready to use) can be stored for one year from the date of preparation at -18...-22°C.

7. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Type	Conditions	Stability time
Dried blood spots (DBS)	+18...+25 °C	3 years
Whole blood	+2...+8 °C	2 days (quantification assays)
		1 month (genomic DNA extraction only)
Blood serum/ plasma	+2...+8 °C	5 days
	-18...-22 °C	1 year
	-68...-72 °C	Longtime stability

Swabs, smears and urine samples	+18...+25 ° C	2 days
	+2...+8 °C	4 days (2 weeks for urine)
	-18...-22 °C	Longtime stability
Saliva	+18...+25 ° C	6 hours
	+2...+8 °C	1 week
	-18...-22 °C	1 month
	-68...-72 °C	Longtime stability

8. SAMPLE PREPARATION

- **Urine samples**

Shake the urine specimen cup. Transfer 1 mL of urine into new 1.5 mL microcentrifuge tube. Centrifuge at 13,000 rpm for 5 min. Remove the supernatant using medical aspirator. Add 0.9 % NaCl solution to obtain overall volume of 200 µL. Vortex thoroughly until pellet dissolves.

- **Saliva-Mouthwash samples**

Rinse mouth thoroughly with 10 mL of 0.9 % sodium chloride solution during 10-15 s. Collect fluid in sterile 15 mL microcentrifuge tube. Centrifuge at 3,000 rpm for 3 min. Remove approximately 9 mL of the supernatant using medical aspirator. Residual volume should be approximately 0.5-1 mL

(pellet and liquid phase). Add 200 μ L of transport medium. Vortex thoroughly until pellet dissolves.

- **Swabs and scrapes samples**

Collect the swabs with a suitable tool. After specimen collection place swab into a capped 1.5 mL microcentrifuge tube with transport medium and rotate it for 15 s. Avoid splashing the solution. Squeeze out residual liquid from the swab and discard the swab.

- **Blood**

- **Whole blood**

Collect blood into the anticoagulant-treated plastic tube. EDTA and trisodium citrate could be used as the anticoagulant.

Note: *Utilizing heparin as the anticoagulant is not allowed.*

- **Blood plasma**

To obtain blood plasma centrifuge whole blood with anticoagulant at 3,000 rpm for 20 min at room temperature (+18...+25 °C). Transfer the supernatant into 1.5 mL microcentrifuge tube.

- **Blood serum**

Collect whole blood into the anticoagulant-free plastic tube. Allow the whole blood to clot at room temperature for 30 min. Centrifuge at 3,000 rpm for 10 min. Transfer the supernatant into 1.5 mL microcentrifuge tube.

- **Dried blood spots (DBS)**

Apply a few drops of blood, drawn by lancet onto specially manufactured absorbent filter paper. Allow the blood to

thoroughly saturate the paper and dry it on air for several hours. Touching of blood collection card with bare hands is prohibited for everyone except examinee.

Store blood collection cards in zip lock plastic bag with 3-4 desiccant bags and humidity indicator card. Cut three 3 mm (1/8 inch) diameter discs from a dried blood spot with a single-hole paper puncher and place them into new 1.5 mL microcentrifuge tube. Then mark the tubes.

Note: *It is strongly recommended to cut discs immediately before DNA extraction procedure.*

9. ASSAY PROCEDURE FOR DNA EXTRACTION FROM BLOOD SERUM/PLASMA, SALIVA, URINE, SWABS, SMEARS AND WHOLE BLOOD

Note: *In case of no subsequent analysis with Astra Biotech Infectious PCR kits is followed; skip steps D, E and G.*

- A.** Preheat a heating block to +75 °C
- B.** Check the Lysis buffer **LB** for precipitation. If **LB** forms a precipitate, it should be heated until the precipitate dissolves. Shake the bottle briefly and allow cooling to room temperature before use.
- C.** Prepare and label required quantity of 1.5 mL microcentrifuge tubes equal to the number of samples.

Note: *In case of subsequent analyses with Astra Biotech Infectious PCR kits: take one 1.5 mL microcentrifuge tube for negative extraction control and label as “NEC”. **NC** must*

be extracted simultaneously with clinical samples in “NEC” tube.

- D.** Vortex thoroughly Internal control **IC** tube then centrifuge briefly for 2-3 s at 1,500-2,400 rpm.
- E.** Add 20 μL **IC** into each prepared microcentrifuge tube (including “NEC”).
- F.** Add 500 μL **LB** into each prepared microcentrifuge tube.
- G.** Add **NC** to the microcentrifuge tube marked as “NEC”:

Material	NC
Blood serum/ plasma, saliva, urine, swabs, smears	100 μL
Whole blood	25 μL

- H.** Add respective clinical sample to microcentrifuge tubes:

Material	Sample
Blood serum/plasma, saliva, urine, swabs, smears	100 μL
Whole blood	25 μL

- I.** Vortex for 3-5 s.
- J.** Incubate at +75 °C for 15 min. Vortex tube every 3 min for 1-2 s. If thermo-shaker is used, set up 1,300 rpm.
- K.** Set up heating block/ thermo-shaker at +60 °C.
- L.** Cool the tubes at room temperature for 2 min.
- M.** Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tubes to remove drops from the inside of the lid.
- N.** Add DNA-precipitation solution **PS**. Vortex for 5-10 s.

Material	PS
Blood serum/plasma, saliva, urine, swabs, smears	600 μ L
Whole blood	550 μ L

- O.** Centrifuge at 13,000 rpm for 5 min. Remove the supernatant with medical aspirator. In case of precipitate is barely discernible reduce supernatant volume to the level of 3 mm above tube bottom.
- P.** Add 1 mL **WASH** to the pellet. Vortex tube for 5-10 s.
- Q.** Centrifuge at 13,000 rpm for 3 min. Carefully remove all supernatant with medical aspirator.
- R.** Incubate at room temperature for 3-5 min with tube caps opened.

Note: *Do not allow the pellet to overdry!*

- S.** Add 60 μ L Elution buffer **EB**. Vortex thoroughly.

Note: *Volume of elution could be increased up to 100 μ L if needed.*

- T.** Incubate at +60 °C for 10 min. Vortex tube every 2 min for 5-7 s. If thermo-shaker is used set up 1,300 rpm.
- U.** Centrifuge at 13,000 rpm for 1 min.
- V.** The eluate contains pure genomic DNA. Store DNA at -18...- 22 °C continuously, or at +2...+8 °C for up to 1 week.

Note: *Vortex tube thoroughly and centrifuge it for 1 min at 13,000 rpm before repeated use.*

10. ASSAY PROCEDURE FOR DNA EXTRACTION FROM DRIED BLOOD SPOTS

- A.** Check the Lysis buffer **LB** for precipitation. If **LB** forms a precipitate, it should be heated until the precipitate dissolves. Shake the bottle briefly and allow cooling to room temperature before use.
- B.** Prepare **Prot.K**: add 1 ml of Dilution buffer to the tube with Proteinase K, lyo (10 mg). Mix **Prot.K** and briefly centrifuge to remove drops from the inside of the lid.
- C.** Preheat a heating block/ thermo-shaker to +56°C
- D.** Take the tubes with three 3 mm (1/8 inch) diameter disks from a dried blood spots (see preparation paragraph 8) and add 100 µL **DBSb**.
- E.** Add 10 µL **Prot.K**, mix by vortexing, and incubate at 56°C for 60 min, vortex tubes every 10 min for 1-2 s. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
- F.** Set up heating block/ thermo-shaker at +75 °C.
- G.** Add 500 µL **LB**.
- H.** Vortex thoroughly for 3-5 s.
- I.** Incubate at +75 °C for 15 min. Vortex tube every 3 min for 1-2 s.
- J.** Set up heating block/ thermo-shaker at +60 °C.
- K.** Centrifuge at 13,000 rpm for 3 min, then transfer supernatant into new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- L.** Cool the tubes at room temperature for 2 min.
- M.** Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tubes to remove drops from the inside of the lid.
- N.** Add 600 µL DNA-precipitation solution **PS**. Vortex for 5-10s.
- O.** Centrifuge at 13,000 rpm for 5 min. Remove the supernatant with medical aspirator. In case of precipitate is barely

discernible reduce supernatant volume to the level of 3 mm above tube bottom.

P. Add 1 mL **WASH** to the pellet. Vortex tube for 5-10 s.

Q. Centrifuge at 13,000 rpm for 3 min. Carefully remove all supernatant with medical aspirator.

R. Incubate at room temperature for 3-5 min with tube caps opened.

Note: *Do not allow the pellet to overdry!*

S. Add 60 μ L Elution buffer **EB**. Vortex thoroughly.

Note: Volume of elution could be increased up to 100 μ L if needed.

T. Incubate at +60°C for 10 min. Vortex tube every 2 min for 5-7 s. If thermo-shaker is used set up 1,300 rpm.

U. Centrifuge at 13,000 rpm for 1 min.

V. The eluate contains pure genomic DNA. Store DNA at -18...-22 °C continuously, or at +2...8 °C for up to 1 week.

Note: *Vortex tube thoroughly and centrifuge it for 1 min at 13,000 rpm before repeated use.*

11. TROUBLESHOOTING

1. Low yield of DNA

- Volume of added specimen is too large. Do not exceed volumes designated in this manual.
- Specimen may be old or degraded. Store specimens appropriately or use fresh specimens.
- Specimen inefficiently disrupted. Warm Lysis buffer until the precipitate dissolves completely.

- Pellet is dissolved incompletely. Do not overdry pellets.
2. Downstream applications are inhibited
- Residual Washing buffer in purified DNA: Carefully remove all Washing buffer as much as possible then dry pellets as consisted with procedure.
3. DNA is degraded
- Sample was undergone repeated frozen-thaw cycles. Avoid repeated frozen-thaw cycles, use fresh preparations immediately.
 - Inappropriate storage conditions. Store samples and components as consisted with protocols.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

Expected yields of genomic DNA will vary depending on the amount and type of starting material used. The efficiency of extraction is not less than 80 %.

13. QUALITY CONTROL

The quality of obtained DNA with the kit can be assessed:

- by analysis of internal control in case of subsequent analyses with Astra Biotech Infectious PCR kits;
- by DNA gel electrophoresis on a 1 % agarose.

14. SAFETY PRECAUTIONS

- The operator should thoroughly follow the manual to obtain the reliable data.



- Lysis buffer **LB** is harmful and irritant, the following precautions should be observed:
 - P261 - Avoid breathing spray;
 - P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
 - P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
 - P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
 - P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation;
 - P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
 - P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.



- DNA-precipitation solution **PS** and Washing solution **WASH** are highly flammable and can cause serious eye damage: ,
 - P210 - Keep away from heat/ sparks/ open flames/ hot surfaces.-No smoking;
 - P233 - Keep container tightly closed;
 - P240 - Ground/ bond container and receiving equipment.
 - P241 - Use explosion-proof electrical/ ventilating/light equipment;
 - P242 - Use only non-sparking tools;
 - P243 - Take precautionary measures against static discharge;

- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection;
- P310 - Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician;
- P305+351+338- IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if present and easy to do – continue rinsing.



- Elution buffer **EB** and Negative control **NC** contain 0.05 % of sodium azide which is very toxic:
 - P260 - Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray;
 - P262 - Do not get in eyes, on skin, or on clothing;
 - P264 – Wash hands thoroughly after handling;
 - P270 - Do not eat, drink or smoke when using this product;
 - P271 - Use only outdoors or in a well-ventilated area;
 - P273 - Avoid release to the environment;
 - P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection;
 - P284 - Wear respiratory protection;
 - P310 - Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician;
 - P330 - Rinse mouth;
 - P361 - Remove/Take off immediately all contaminated clothing;
 - P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
 - P391 - Collect spillage;
 - P405 - Store locked up;
 - P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation;


- P301 +P310 - IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician;
- P302 +P350 - IF ON SKIN: Gently wash with plenty of soap and water;
- P304 +P340 - IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing;
- P403 +P233 - Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.



If assay procedure for DNA extraction from dried blood spots is used, the following precautions should be observed:

- P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
- P342 + P311 If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER or doctor/physician.

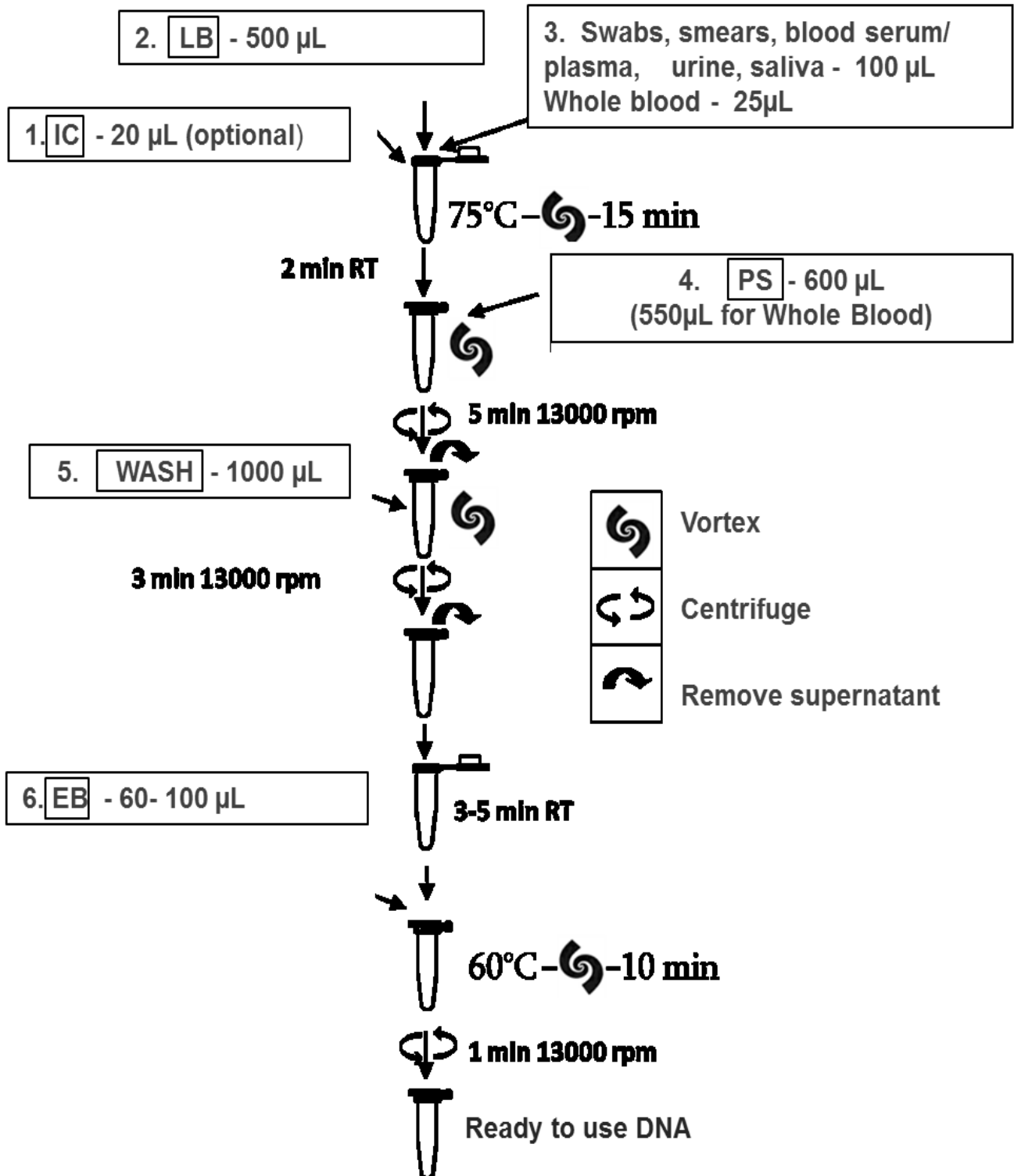
Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

-  When using Multi DNA Extraction kit for DNA extraction of clinical materials, **biosafety level 2 practices and procedures** have to be followed. Human blood, blood products, body fluids and tissues should be treated as potential infectious.
- To avoid the contamination:
 - use two separate pipette sets for DNA-free and DNA-containing components,
 - use filter tips,

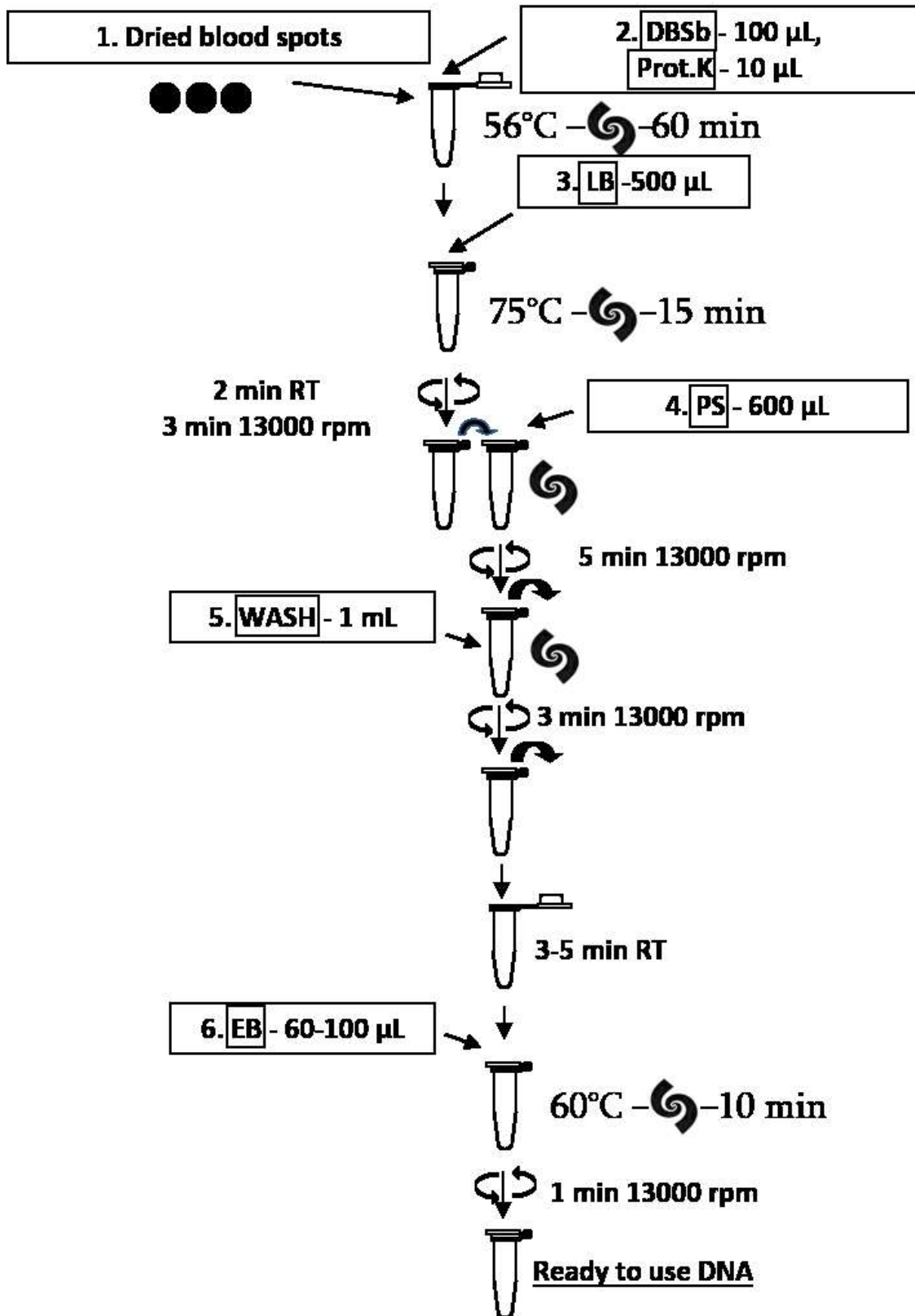
- do not use the same tip for two different components, neither DNA-free nor DNA-containing.
- Do not use the kit after its expiration date.
- Do not pool reagents from different lots or from different bottles of the same lot. Immediately after use, close all bottles in order to avoid leakage. After opening, store all bottles and vials in an upright position.
- In case of using several Astra Biotech Infectious Real-Time PCR kits be sure of using **IC** from latest lot.

15. ASSAY SCHEME

Swabs, smears, whole blood, blood serum/ plasma, urine and saliva samples



Dried blood spots



June, 30, 2015



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de