

Gebrauchsinformation
Instruction Manual

NukEx Royal TS

Nucleic Acid Release Reagent Tissue Shred

Zur *in vitro* Diagnostik

Zur Freisetzung von Nukleinsäuren aus Gewebeproben, Zecken und Insekten durch mechanische Zerkleinerung und anschließenden enzymatischen Zellaufschluss.

For *in vitro* diagnostics

For the release of nucleic acid from tissue samples, ticks and insects through mechanical shredding and subsequent enzymatic cell lysis.



G05001/G05002/G05003



100



gerbion® GmbH & Co. KG

Remsstr. 1

D-70806 Kornwestheim

Germany

phone: +49 7154 806 20 0

fax: + 49 7154 806 20 29

e-mail: info@gerbion.com

www.gerbion.com

Inhaltsverzeichnis

Komponenten	3
Abkürzungen	3
Transport und Lagerung	3
Anwendungszweck	3
Art und Beschaffenheit des Probenmaterials	3
Qualitätskontrolle	4
Produktgewährleistung	4
Einleitung	4
Wirkungsweise	4
Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	5
Wichtige Hinweise	5
Durchführung	6
Lagerung der Aufschlussüberstände	7
Troubleshooting	7

Komponenten

NukEx Royal TS

Nucleic Acid Release Reagent Tissue Shred

100 Röhrchen mit je 300µl NukEx Nukleinsäurefreisetzungreagenz und NukSand

Für 100 Anwendungen.

Abkürzungen

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

Transport und Lagerung

Der Transport des **NukEx Royal TS** erfolgt gefroren auf Trockeneis. **NukEx Royal TS** ist direkt nach Erhalt bei -18 °C oder niedrigeren Temperaturen zu lagern. Nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden! Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren vermeiden.

Anwendungszweck

NukEx Royal TS dient der Freisetzung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) aus Gewebeproben (z. B. Knorpelgewebe, Hautbiopsate, Lymphgewebe), Zecken und Insekten durch mechanische Zerkleinerung und anschließenden enzymatischen Zellaufschluss.

Die mit dem **NukEx Royal TS** gewonnenen Überstände eignen sich ohne weitere Aufarbeitung als Probenmaterial für viele molekularbiologische Analysen.

G05001:

1,5 ml Reaktionsgefäße, geeignet zur manuellen Zerkleinerung mithilfe eines Pistills, z.B. gerbion NukEx Pestle 1.5 ml Art. Nr. G06006.

G05002:

2,0 ml Schraubverschlussgefäße, geeignet zur Verwendung in Geräten, z.B. FastPrep® Cell Disrupter (qbiogene).

G05003:

2,0 ml SafeLock Reaktionsgefäße, geeignet zur Verwendung in Geräten, z.B. TissueLyser (Qiagen).

Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Ausgangsmaterial sind Gewebeproben (z.B. Hautbiopsate, Lymphgewebe), Zecken und Insekten.

Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem der gerbion GmbH & Co. KG wird jede Charge **NukEx Royal TS** gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

Produktgewährleistung

Diese Gebrauchsinformation gilt als vollständig und richtig zum Zeitpunkt ihrer Veröffentlichung. Die gerbion GmbH & Co. KG haftet keinesfalls für Neben- oder Folgeschäden, die sich im Zusammenhang mit oder in der Folge der Benutzung dieser Gebrauchsinformation ergeben. gerbion garantiert die volle Funktionsfähigkeit, wenn die Verwendung entsprechend der im Handbuch gegebenen Anleitung erfolgt. Der Käufer muss selbst bestimmen, ob das Produkt für seine spezielle Anwendung geeignet ist. gerbion behält sich das Recht vor, Produkte jederzeit zu modifizieren, um die Funktionalität oder das Design zu verbessern.

Einleitung

Für viele molekularbiologische Anwendungen ist es erforderlich, Nukleinsäuren aus Gewebeprobe zu gewinnen. So z.B. bei SNP Analysen als Herkunftsnachweis von Tieren, bei der Tierartenbestimmung in der Fleischuntersuchung oder zum Nachweis von viralen oder bakteriellen Pathogenen.

Wirkungsweise

Durch den im **NukEx Royal TS** enthaltenen Spezialsand können Gewebeprobe sowie Zecken und Insekten entweder manuell oder in speziellen Geräten (z.B. FastPrep® Cell Disrupter oder TissueLyser) für die anschließende enzymatische Lyse mit dem **ebenfalls enthaltenen NukEx** Nukleinsäurefreisetzungreagenz vorbereitet werden.

Durch das Verfahren werden RNA und DNA in einer Form aus den Gewebeprobe freigesetzt, die es erlaubt, Aliquots von Aufschlussüberständen ohne weitere Behandlungsschritte als Probe für molekularbiologische Analysen einzusetzen. Je nach Vorschrift und Zielsetzung der anschließenden Analyse können die Aufschlussüberstände vor dem Ansatz einer Nachweisreaktion gepoolt werden.

Je nach Art der Anwendung ist gegebenenfalls zusätzlich eine Extraktion der in den Aufschlussüberständen enthaltenen Nukleinsäuren mit einem handelsüblichen DNA- bzw. RNA-Extraktionskit erforderlich.

Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

Allgemein:

Laborausrüstung gemäß den nationalen Sicherheitsvorschriften.

- Mikropipetten mit Filterspitzen
- Blockinkubatoren oder Wärmeöfen zur Inkubation
- Tischzentrifuge
- Reinstwasser (PCR grade)

Probenpräparation:

- Biopsiestanze (ca. 3-4 mm Durchmesser; z.B. pfm AG, Köln) oder sonstiges Werkzeug zur Probenentnahme
- G05001: Pistill (z.B. gerbion NukEx Pestle 1.5 ml, G06006)
- G05002/G05003: Gerät zur Homogenisierung

Optional:

- Nukleinsäure Extraktionskit (z.B. gerbion **NukEx pure RNA/DNA G05004**)

Wichtige Hinweise

- **NukEx Royal TS** muss in für diese Zwecke geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal angewandt werden.
- Die Richtlinien der Good Laboratory Practice (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

Allgemeine Hinweise:

- Die Anweisungen der Gebrauchsinformation sind einzuhalten.
- Bei der Handhabung von Proben für molekularbiologische Prüfungen immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Auf wärmeresistente Beschriftung achten.

Durchführung

1. Manuelle Aufarbeitung (G05001)

- Probe (z.B. Zecke) in ein NukEx Royal TS Gefäß überführen .
- Mit einem geeigneten Pistill (z.B. gerbion NukEx Pestle 1,5 ml Art. Nr. G06006) Probe zerreiben.
- Das Gefäß gut verschließen.
- Proben 1 h bei 60 °C bei Raumtemperatur inkubieren.
- Nach dem Gewebeaufschluss den Ansatz auf 97 °C erhitzen und bei dieser Temperatur für 10 min inkubieren. Zur vollständigen Denaturierung der proteolytischen Enzyme im **NukEx Reagenz** ist eine Einhaltung dieser Inkubationsbedingungen unbedingt erforderlich.
- Den Ansatz bei Raumtemperatur für 10 min abkühlen lassen.
- Proben kurz abzentrifugieren. Aliquots vom Aufschlussüberstand sollen nahe der Oberfläche des Ansatzes entnommen werden, um einen Transfer von Zelldebris in anschließende Analyseschritte (z.B. Polymerase-Kettenreaktion) zu vermeiden.

2. Maschinelle Aufarbeitung (G05002 und G05003)

- Probe (z.B. Zecke) in ein NukEx Royal TS Gefäß überführen .
- Das Gefäß gut verschließen.
- Gefäß in entsprechendes Gerät stellen (G05002: z.B. FastPrep® Cell Disrupter; G05003: z.B. TissueLyser) und Gerät starten (die jeweiligen Geräteeinstellungen sind vom Anwender für das jeweils verwendete Probenmaterial zu wählen)
- Probe 1 h bei 60 °C im Thermoblock inkubieren.
- Nach dem Gewebeaufschluss den Ansatz auf 97 °C erhitzen und bei dieser Temperatur für 10 min inkubieren. Zur vollständigen Denaturierung der proteolytischen Enzyme im **NukEx Reagenz** ist eine Einhaltung dieser Inkubationsbedingungen unbedingt erforderlich.
- Den Ansatz bei Raumtemperatur für 10 min abkühlen lassen.
- Proben kurz abzentrifugieren. Aliquots vom Aufschlussüberstand sollen nahe der Oberfläche des Ansatzes entnommen werden, um einen Transfer von Zelldebris in anschließende Analyseschritte (z.B. Polymerase-Kettenreaktion) zu vermeiden.

Optional (G05001, G05002, G05003):

- Je nach Art der Anwendung ist gegebenenfalls eine Aufreinigung der Nukleinsäuren aus den Aufschlussüberständen nötig. Hierzu eignen sich handelsübliche Nukleinsäure-Extraktionskits (z.B. gerbion **NukEx pure DNA/RNA G05004**) . Der Aufschlussüberstand kann unverdünnt in die Nukleinsäureextraktion eingesetzt werden.

Lagerung der Aufschlussüberstände

Aufschlussüberstände können sofort nach ihrer Gewinnung eingesetzt oder bis zur weiteren Analyse unter folgenden Bedingungen aufbewahrt werden:

- bis zu 6 h bei Raumtemperatur
- bis zu 24 h gekühlt bei +2 bis +8 °C
- bis zu 6 Monaten eingefroren bei -18 °C oder geringerer Temperatur

Aufschlussüberstände nach dem Auftauen nicht schütteln, um einen Transfer von Zelldebris in die anschließenden Analyseschritte zu vermeiden, sondern kurz auf 60 °C erwärmen, anschließend ggf. kurz zentrifugieren.

Troubleshooting

Der folgende Troubleshooting Guide soll bei eventuell auftretenden Problemen in einer anschließenden PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an unsere Wissenschaftler unter info@gerbion.com.

- **Die Probe und die Interne Kontrolle zeigen in der anschließenden PCR gleichzeitig ein negatives Resultat (Inhibition):**

Die Hitzeinaktivierung der proteolytischen Enzyme im **NukEx** Reagenz erfolgte nicht vollständig. Die Probe nochmals für 10 min bei 97 °C inkubieren. Aufheizzeit beachten. Die Probe erneut in der PCR überprüfen.

Der Aufschlussüberstand verursacht eine Teilinhibition der PCR. Aufschlussüberstand gegebenenfalls 1:3 verdünnen (z.B. in NukEx Universal Verdünnungspuffer, Art. Nr. G01014). Gegebenenfalls die Nukleinsäure aus dem Aufschlussüberstand mittels anderer kommerzieller Extraktionsverfahren isolieren und das Extrakt erneut in der PCR überprüfen.

- **Die Interne Kontrolle der anschließenden PCR zeigt ein teilinhibiertes Resultat:**

Die Hitzeinaktivierung der proteolytischen Enzyme im **NukEx** Reagenz erfolgte nicht vollständig. Die Probe nochmals für 10 min bei 97 °C inkubieren. Aufheizzeit beachten. Die Probe erneut in der PCR überprüfen.

Der Aufschlussüberstand verursacht eine Teilinhibition der PCR. Aufschlussüberstand 1:3 verdünnen (z.B. in NukEx Universal Verdünnungspuffer, Art. Nr. G01014) verdünnen. Gegebenenfalls die Nukleinsäure

aus dem Aufschlussüberstand mittels kommerziellem Extraktionskit (z.B. gerbion NukEx Pure RNA/DNA, G05004) isolieren und das Extrakt erneut in der PCR überprüfen.

- **Die Interne Kontrolle der anschließenden PCR zeigt auch nach Verdünnung ein teilinhibiertes Resultat:**

Die Nukleinsäure aus dem Aufschlussüberstand mittels anderer kommerzieller Extraktionsverfahren isolieren und das Extrakt erneut in der PCR überprüfen.

Index

Components	2
Abbreviations	2
Transport and Storage	2
Intended Use	2
Sample Material	2
Quality Control	3
Product Warranty	3
Introduction	3
Mode of Action	3
Equipment and Reagents to be Supplied by User	4
Important Notes	4
Procedure	5
Storage of Digestion Supernatants	6
Troubleshooting	6



Components

NukEx Royal TS

Nucleic Acid Release Reagent Tissue Shred

100 vials, each containing 300 µl NukEx Nucleic Acid Release Reagent and NukSand.

For 100 reactions.

Abbreviations

DNA	Desoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleid Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphis

Transport and Storage

The **NukEx Royal TS** is shipped on dry ice. It must be stored at -18 °C in the dark immediately after receipt. Do not use reagent after the date of expiry printed on the package. After initial usage, the reagent is stable for up to six months.

The reagent should not be thawed and frozen repeatedly.

Intended use

NukEx Royal TS can be used for the release of nucleic acid (DNA and RNA) from tissue samples (e.g. cartilage tissue, skin biopsies, adenoid tissue), ticks and insects through mechanical break down and subsequent enzymatic lysis. The supernatant obtained with **NukEx Royal TS** can be used for numerous molecular analyses.

G05001:

1.5 ml safe lock reaction tubes for manual use with a pestle (e.g. gerbion NukEx Pestle 1.5 ml Cat. No. G06006)

G05002:

2.0 ml screw cap tubes for automated use in e.g. FastPrep Cell Disrupter (qbiogene).

G05003:

2.0 ml safe lock reaction tubes for automated use in e.g. TissueLyser (Qiagen).

Sample material

Tissue samples like skin biopsies or adenoid tissue, ticks and insects.

Quality Control

In accordance with gerbion's ISO-certified Quality Management System, each lot of the **NukEx** Nucleic acid release reagent is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Product Warranty

gerbion guarantees the performance of all products when used according to the instructions given in the Instruction Manual. The purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Should any product fail to perform satisfactorily due to any reason other than misuse, gerbion will replace it free of charge or refund the price. We reserve the right to change, alter, or modify any product to enhance its performance and design.

Introduction

For numerous molecular assays, the isolation of nucleic acid is required. For instance SNP analyses to proof the origin of animals, for the determination of animal species in meat analyses, or for the detection of viral and bacterial pathogens by PCR.

Mode of Action

NukEx Royal TS contains a special Sand which allows for the mechanical break down of tissue samples or insects and ticks. This break down can be done manually by using a pestle or automated in special instruments such as FastPrep Cell Disrupter (qbiogene) or TissueLyser (Qiagen). Subsequent enzymatic lyses of the samples with the NukEx Nucleic Acid Release Reagent (also contained in the NukEx Royal TS tubes) efficiently released nucleic acids. Crude supernatants can be employed directly in the subsequent molecular assay.

Depending on the assay to be performed, additional extraction of the nucleic acid with a commercial extraction kit (e.g. NukEx Pure RNA/DNA, gerbion Cat.No. G05004) is advisable.

Equipment and Reagents to be Supplied by User

General:

Laboratory equipment according to national safety instructions.

- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Block incubators or laboratory furnace
- dH₂O (PCR grade)

Sample preparation:

- Biopsy punch (app. 3-4 mm diameter; e.g. pfm AG, Cologne) or other instrument for sampling
- G05001: Pestle (e.g. gerbion NukEx Pestle 1.5 ml Cat. No. G06006)
- G05002/G05003: Instrument for homogenisation (e.g. FastPrep Cell disrupter or TissueLyser)

Optional:

- Liquid handling systems for automation
- Nucleic acid extraction kit (e.g. gerbion NukEx Pure RNA/DNA Cat. No. G05004)

Important Notes

- The **NukEx Royal TS** must be utilised by qualified personnel only.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

General Precautions

- Stick to the protocol described in the product insert.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with alcohol-free decontaminant.
- Use thermo-resistant labelling.

Procedure

1. Manual Tissue Break Down (G05001)

- Transfer sample into **NukEx Royal TS** tube
- Grind tissue with a pestle (e.g. NukEx Pestle 1.5 ml Cat. No. G06006)
- Ensure that samples are fully immersed in **NukEx Reagent**.
- Lock tube well.
- Incubate for 1 h at 60°C in a block incubator or laboratory furnace.
- Incubate sample for 10 min at 97 °C in a block incubator or laboratory furnace. This step is essential for the denaturation (inactivation) of the proteolytic enzymes. Unefficient inactivation can have negative impact on downstream applications!
- Let sample cool down for approx. 10 min at room temperature.
- Briefly spin down sample in a table centrifuge.
- Aliquots of the sample should be taken close to the surface in order to avoid the transfer of cell debris.

2. Automated Tissue Break Down (G05002 and G05003)

- Transfer sample into **NukEx Royal TS** tube
- Lock tube well.
- Place tube in homogenisation instrument (G05002: e.g. FastPrep Cell Disrupter; G05003: e.g. TissueLyser) and start program (the appropriate settings for the instruments are to be chosen by the user for each sample material used)
- Incubate for 1 h at 60°C in a block incubator or laboratory furnace.
- Incubate sample for 10 min at 97 °C in a block incubator or laboratory furnace. This step is essential for the denaturation (inactivation) of the proteolytic enzymes. Unefficient inactivation can have negative impact on downstream applications!
- Let sample cool down for approx. 10 min at room temperature.
- Briefly spin down sample in a table centrifuge.
- Aliquots of the sample should be taken close to the surface in order to avoid the transfer of cell debris.

Optional (G05001; G05002; G05003):

- Depending on the downstream application a purification of the supernatants is advisable. Usage of commercial extraction kits (e.g. gerbion NukEx Pure RNA/DNA Cat. No. G05004) is recommended.

Storage of Supernatants

Supernatants can be used immediately or can be stored under following conditions:

- up to 6 h at room temperature
- up to 24 h at +2 to +8 °C
- up to 6 months at -18 °C or lower temperature

In order to avoid cell debris being transferred, do not mix supernatants after thawing. Instead heat shortly at 60 °C and centrifuge if necessary.

Troubleshooting

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise in a subsequent PCR analysis. If you have further questions, please do not hesitate to contact our scientists on info@gerbion.com.

- **Neither the sample nor the Internal Control show a signal (inhibition):**
The heat inactivation of the proteolytic enzymes in **NukEx** was not effective. Heat the sample once more to 97 °C for 10 min. Repeat PCR analysis.
If necessary, purify nucleic acid from the supernatant by use of a commercial extraction kit (e.g. gerbion NukEx Pure RNA/DNA Cat. No. G05004) and repeat PCR analysis.
- **Weak signal of the Internal Control (partial inhibition):**
Components of the supernatant cause a partial inhibition of the PCR. Centrifuge the supernatant and dilute 1:3 in dilution buffer (e.g. **NukEx** Universal Dilution Buffer, G01014, gerbion). Repeat PCR with diluted supernatant.
- **The Internal Control still shows a weak signal after dilution:**
Purify nucleic acid from the supernatant by use of a commercial extraction kit (e.g. gerbion NukEx Pure RNA/DNA Cat. No. G05004) and repeat PCR analysis.