

DirectPCR[®] Lysis Reagent Cell

Beschreibung:

DirectPCR[®] Lysis Reagent Cell (zum Patent angemeldet) ist speziell für die Lyse von Säugerzellen in Kultur entwickelt worden. Nach einer Hitzebehandlung können die gewonnenen Lysate direkt und ohne zeitaufwendige DNA-Isolationen in PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Für Mausschwänze, Mausohren sowie Maudottersäcke stehen weitere Produktvarianten zur Verfügung.

Bestellinformationen:

DirectPCR [®] -Cell	für kultivierte Säugerzellen (50 ml)	Bestell-Nr. 31-301-C
DirectPCR [®] -Cell	für kultivierte Säugerzellen (100 ml)	Bestell-Nr. 31-302-C

Lagerung:

DirectPCR[®]-Cell sollte lichtgeschützt bei 4 - 8 °C gelagert werden und ist unter diesen Bedingungen mindestens 6 Monate ab Lieferung stabil. Kristalle, die sich evtl. während der Lieferung oder Lagerung bilden, sollten vor Gebrauch durch kurzes Erwärmen auf 37 °C wieder gelöst werden.

Protokoll (siehe auch TABELLE 1):

1. Zellen einer 10 cm-Schale in 200 - 300 µl DirectPCR[®]-Cell, komplettiert mit 0.2 – 0.4 mg/ml Proteinase K (z.B. peqGOLD Proteinase K-Lösung [20 mg/ml], Kat.-Nr. 04-1075) resuspendieren. Reaktionsgefäß bei 55 °C für 5 - 16 Std. in einem rotierenden Hybridisierungssofen bis zur kompletten Lyse der Zellen inkubieren.

Alternativ, direkte Lyse in 96 Well-Schale:

Zellen 2 x mit PBS waschen und 140 µl einer 1:2 Verdünnung des DirectPCR[®]-Cell pro Well zugeben. Über Nacht bei 55 °C auf einer Schüttelplattform inkubieren (siehe TABELLE 1).

***Hinweis:** Zu Beginn einer Versuchsreihe sollte die optimale Menge an DirectPCR[®] Lyse-Reagenz bestimmt werden. Beim Einsatz geringer Zellmengen muss das DirectPCR[®]-Reagenz mit Wasser verdünnt werden und entsprechend mehr Lysat in die PCR-Reaktion gegeben werden. SIEHE TABELLE 1.*

***Hinweis:** Proteinase K ist in DirectPCR[®]-Reagenz maximal 24 h stabil. Proteinase K möglichst frisch zugeben!*

***Hinweis:** Rotierende Hybridisierungsöfen liefern i. d. R. bessere Ergebnisse als Schüttelplattformen. Da die Lysate ohne vorherige DNA-Isolation in PCR-Reaktionen eingesetzt werden, beeinflusst eine längere Rotation die PCR-Ergebnisse nicht signifikant. Beträgt der Reaktionsansatz weniger als 200 µl, sollten 0.75 ml Tubes verwendet werden. Im Verhältnis gleiche Volumina DirectPCR[®]-Cell für verschieden große Proben verwenden.*

2. Reaktionsansatz bei 85 °C für 45 min in einem Wasserbad inkubieren, um eine vollständige Inaktivierung der Proteinase K zu erzielen.
Evtl. Kondensat oder Debris anschließend für 10 sec abzentrifugieren (optional).

***Hinweis:** Das Lysat kann 1 Jahr bei -20 °C oder 1 Woche bei 4 °C ohne Qualitätsverluste gelagert werden.*

3. Für die anschließende Genotypisierungs-PCR 1 - 1.5 µl des Lysats pro 50 µl PCR-Reaktion einsetzen (siehe TABELLE 1).

[4. Optional: Bei Bedarf kann die DNA aus dem Lysat durch Zugabe von NaCl (Endkonz. 250 mM) und 0.7 Volumen Isopropanol gefällt werden. Nach Zentrifugation bei 4 °C für 2 min ist die DNA präzipitiert. Überstand verwerfen, DNA-Pellet mit 1 ml 70 % EtOH waschen und in 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) lösen. 1 µl in PCR einsetzen.]

Tabelle 1: Empfohlene Bedingungen für die Lyse kultivierter Säugerzellen:

Kulturgefäß	Tube-Größe	DirectPCR®-Cell (inkl. Proteinase K)	H ₂ O	Lysat/50 µl PCR- Ansatz
96 Well**	-	70 µl	70 µl	2.0 - 3.0 µl
96 Well*	0.75 ml	70 µl	-	1.0 - 1.5 µl
24 Well*	0.75 ml	100 µl	-	1.0 - 1.5 µl
6 Well*	0.75 ml	140 µl	-	1.0 - 1.5 µl
10 cm*	1.50 ml	200 - 300 µl	-	1.0 - 1.5 µl

**Lyse in Kulturschale auf Schüttelplattform. *Lyse in Reaktionsgefäß in Hybridisierungsöfen.

Hinweise zur korrekten Anwendung:

- 1. Komplette Lyse:** Nach der Lyse sollten keine Zellklumpen mehr vorhanden sein.
- 2. Proteinase K-Inaktivierung:** Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgt durch Inkubation des Reaktionsansatzes bei 85 °C für 45 min. Dieser Schritt ist essentiell und darf nicht verkürzt werden, um einen späteren Verdau der Taq-Polymerase durch die Proteinase K zu verhindern.
- 3. Template-Menge:** Für die anschließende PCR sollte möglichst wenig Lysat eingesetzt werden, da ein zu hoher Anteil DirectPCR®-Reagenz die PCR inhibiert (siehe TABELLE 1).
- 4. Reaktionsgefäße und Verdunstung:** Falls das Reaktionsvolumen während der Lyse weniger als 200 µl beträgt, sollten möglichst kleine Reaktionsgefäße (z. B. 0.75 ml) verwendet werden, um die Verdunstung einzuschränken.
- 5 Verdünnung:** Bei Verwendung von verdünntem Lyse-Reagenz im Falle geringer Zell-Zahlen sollten anschließend entsprechend größere Lysat-Mengen in der PCR eingesetzt werden (siehe TABELLE 1).
- 6. Trouble-Shooting:** Bei unbefriedigenden PCR-Ergebnissen empfiehlt es sich, eine Positiv-Kontrolle mit isolierter (reiner) genomischer DNA in der PCR mitlaufen zu lassen, um Probleme an Thermocycler, PCR-Protokoll, PCR-Reagenzien oder Nachweismethode ausschließen zu können.

Weitere Produkte:

Produkt	Beschreibung	Menge	Bestell-Nr.
DirectPCR®-Tail	optimiert für die Lyse von Mausschwänzen	50 ml	31-101-T
		100 ml	31-102-T
DirectPCR®-Ear	optimiert für die Lyse von Mausohrstanzen	25 ml	31-401-E
		50 ml	31-402-E
DirectPCR®-Yolk sac	optimiert für die Lyse von embryonalem Gewebe (Dottersack)	50 ml	31-201-Y
		100 ml	31-202-Y

Dieses Produkt ist ausschließlich für Forschungszwecke geeignet. Eine Verwendung für diagnostische Zwecke oder als Arzneimittel sowie eine Verabreichung an Menschen oder Tiere ist nicht gestattet.