

Genetische status van de Nederlandse Geelbuikvuurpad populaties

Marinus Spielman
Reg. 870801-789-130



Begeleider Laboratory of Genetics (WUR):

Fons Debets

Begeleiders Alterra-Centrum Ecosystemen:

Hugh Jansman

Hans Peter Koelewijn

Ivo Laros

April, 2011
MSc Thesis Genetics (GEN-80436)
Wageningen Universiteit

Inhoudsopgave

VOORWOORD	4
1 INTRODUCTIE	5
1.1 DE GEELBUIKVUURPAD (<i>BOMBINA VARIEGATA</i>).....	5
1.2 ONTWIKKELING NEDERLAND POPULATIES.....	6
1.3 GENETISCHE PROCESSEN IN GEÏSOLEERDE EN KLEINE POPULATIES	8
1.4 DOEL EN VRAAGSTELLING	10
2 MATERIAAL EN METHODE	12
2.1 MONSTERNAME.....	12
2.1.1 <i>Wangsljmvlies</i>	12
2.1.2 <i>Weefselmonsters</i>	13
2.2 GENETISCHE ANALYSE.....	14
3 RESULTATEN	17
3.1 GENETISCHE DIVERSITEIT.....	17
3.2 GENETISCHE VERWANTSCHAP	20
3.2.1 <i>Bayesian cluster analyse</i>	20
3.2.2 <i>Principale Coördinaten Analyse</i>	21
3.2.3 <i>Genetische differentiatie</i>	24
4 DISCUSSIE, CONCLUSIES & AANBEVELINGEN	26
4.1 GENETISCHE VARIATIE, VERWANTSCHAP EN DIFFERENTIATIE	26
4.1.1 <i>De Nederlandse populaties onderling</i>	26
4.1.2 <i>Nederland t.o.v. de referentie populaties</i>	27
4.1.3 <i>Referentie populaties</i>	28
4.2 LEVENSVATBAARHEID NEDERLANDSE POPULATIES	29
4.3 BIJPLAATSING	29
4.4 CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	30
DANKWOORD.....	31
REFERENTIES	32
BIJLAGE I	
BIJLAGE II	
BIJLAGE III	
BIJLAGE IV	
BIJLAGE V	
BIJLAGE VI	

Samenvatting

Geelbuikvuurpadden behoren tot de familie van de vuurbuikpadden *Bombinatoridae*, tot het geslacht *Bombina* en tot de soort *variegata*. De geelbuikvuurpad is de zeldzaamste amfibie in Nederland. Voorheen kwam de geelbuikvuurpad vrij algemeen en verspreid over het uiterste zuiden van Limburg voor. Tijdens de jaren '70 wordt een drastische terugloop vastgesteld van het aantal locaties waar de soort wordt waargenomen. Tegenwoordig is de soort daar nog maar op enkele plaatsen aanwezig en worden deze dieren met uitsterven bedreigd. De drastische achteruitgang van de geelbuikvuurpad leidde tot de oprichting van meerdere organisaties, voor het herstellen en aanleggen van nieuwe poelen in het Mergelland en de uitvoering van een reeks onderzoeken, betreffende de actuele status van de omvang van de populaties en het veilig stellen van het voortbestaan van de laatste populaties. Dit resulteerde in meerdere beschermingsplannen. Ook vonden er (zowel legale als illegale) uitzettingen van de soort op diverse locaties in het Mergelland plaats. Hierbij zijn ook geelbuikvuurpadden uit het buitenland uitgezet (o.a. uit Slovenië en de Balkan).

Het doel van dit onderzoek is het leveren van inzicht in de genetische structuur van de populaties van de geelbuikvuurpad in Nederland en omliggende Europese landen (België, Frankrijk en Duitsland, ook wel omschreven als Europese regio's). Dit inzicht leidt tot mogelijke verklaringen van de genetische structuur van populaties en uiteindelijk tot aanbevelingen met betrekking tot het beheer van de Nederlandse populaties in Zuid-Limburg. De vragen die in dit verslag beantwoord worden: 1) Hoe verhoudt de genetische variatie en genetische differentiatie van de Nederlandse populaties zich onderling en ten opzichte van referentie populaties uit de Europese regio's? 2) Is de gehele Nederlandse populatie vanuit genetisch oogpunt levensvatbaar en, indien niet, hoe zou deze ondersteund kunnen worden? 3) Zijn er indicaties van (illegale) bijplaatsing en zijn deze tot een mogelijke herkomst te herleiden?

Deze vragen worden beantwoord door de uitvoering van populatie-genetische analyse van populaties van zowel Nederlandse als Europese regio's, betreffende genetische variatie, genetische verwantschap en genetische differentiatie (indicaties van vreemde allelen, die duiden op kunstmatige processen). Het gebruikte materiaal voor dit onderzoek is wanglijmvlies-materiaal (verkregen door veldwerk in de periode juli-augustus 2010) en weefselmonsters (deel van de tong of poot van dode exemplaren). Uit de studie komt naar voren dat, met de gebruikte microsatellieten, de Nederlandse populaties genetisch gezien niet te onderscheiden zijn van elkaar en onderling sterke overeenkomsten vertonen. In verhouding met de in deze studie gebruikte referentie populaties vertonen de Nederlandse populaties een vergelijkbare genetische variatie (N_e , H_o en F). Op basis van deze resultaten is aannemelijk dat de Nederlandse populaties levensvatbaar zijn, mits goed gemonitord. De Nederlandse populatie vertoont een lage genetische differentiatie in verhouding tot de referentie monsters verkregen vanuit Blijdorp. Dit terwijl het zeer aannemelijk is dat deze monsters een Sloveense oorsprong hebben. Dit in combinatie met het historisch overzicht (aangeleverd door RAVON) is een duidelijke indicatie dat er Sloveens genetisch materiaal in de huidige Nederlandse populaties is belandt.

Voorwoord

Al van jongs af aan heb ik een grote voorliefde gehad voor alle dieren. Sinds ik mijn eerste reptiel van dichtbij zag, raakte ik in het bijzonder geboeid door deze groep dieren. Vanaf dat moment ben ik me gaan verdiepen in deze dieren en ben ik ook zelf reptielen gaan houden. Door de jaren heen is mijn collectie gegroeid en veranderd, net als mijn visie op deze dieren. Vooral gedurende de laatste jaren raakte ik geïnteresseerd in de zogenaamde ‘morphs’, oftewel kleurmutanten. Mijn interesse in genetica was gewekt, wat ook prima te combineren was met mijn studie biologie. Om meer kennis op te doen op het gebied van de genetica, heb ik in 2009 contact gezocht met Fons Debets. Op zijn uitnodiging heb ik in periode 3 van het leerjaar 2009-2010 zowel een student-assistentenschap (Fundamentals of Genetics and Molecular Biology: GEN-11806) en een Capita Selecta gedaan bij de leerstoelgroep Genetica. Gedurende deze periode ben ik in contact gekomen met Hugh Jansman, projectleider bij Alterra – Centrum voor Ecosystemen. Dit heeft me geholpen bij mijn eerste thesis, betreffende reptielenpopulaties in een natuurgebied in noordoost Portugal, waar ik met verschillende soorten reptielen en ook amfibieën in aanraking ben gekomen. Omdat dit erg beviel, heb ik voor mijn tweede thesis opnieuw contact gezocht met Hugh Jansman. Dit maal voor een thesis bij Alterra zelf. Hier werden een aantal mogelijke onderwerpen voorgesteld, waaraan ik zou kunnen werken. Mijn keuze viel uiteindelijk op het onderwerp ‘genetische status van de Nederlandse geelbuikvuurpad’. Hoewel dit onderwerp niet specifiek gericht was op reptielen, kon ik bij dit project het gehele onderzoek van begin tot eind meemaken. Op die manier kon ik zowel ervaring opdoen met veldwerk, als laboratorium werk en de verwerking van verkregen data voor het maken van een rapport. Al met al zorgde dit voor een leerzame belevenis met ervaring op allerlei gebieden.

Gedurende een periode van juni 2010 tot en met januari 2011 heb ik gewerkt aan mijn tweede thesis. Omdat niet al mijn tijd besteed kon worden aan een enkel project, heb ik aan twee projecten van dezelfde aard gewerkt. Naast de studie naar de geelbuikvuurpad, werkte ik ook aan een studie naar het wildzwijn. Deze twee projecten zijn beide uitgevoerd door Alterra – Centrum voor Ecosystemen, in opdracht van provincie Limburg. Mijn bijdrage aan de studie naar het wildzwijn in Limburg bestond uit:

- het prepareren van ca. 600 weefselmonsters voor extractie;
- het runnen van PCR's van de extracten;
- het op gel zetten van de PCR producten;
- en het scoren van de op gel gezette producten.

Het grootste deel van mijn tijd is echter besteed aan de studie naar de geelbuikvuurpad. Om deze reden gaat dit verslag dan ook alleen over dit onderwerp. De bijdrage die ik heb geleverd aan de studie naar de geelbuikvuurpadden in de provincie Limburg bestond uit:

- het assisteren bij het afstemmen van de protocollen voor zowel extractie als PCR van Geelbuikvuurpad DNA;
- het assisteren bij het verzamelen van de Geelbuikvuurpad monsters in het veld;
- het extraheren van DNA uit de verzamelde monsters;
- het runnen van PCR's van de extracten;
- het op gel zetten van de PCR producten;
- het scoren van de op gel gezette producten;
- het analyseren van de gescoorde monsters;
- en het interpreteren van de resultaten.

Dit verslag is dus het eindrapport van de studie naar de genetische status van de Nederlandse geelbuikvuurpad. Het verslag geeft een volledig beeld van zowel de studie, als mijn tweede thesis. Hopelijk leert u als lezer er net zo veel van als ik heb gedaan als student.

1 Introductie

De geelbuikvuurpad is het zeldzaamste amfibie in Nederland. In ons land komt de soort uitsluitend voor in Limburg. Het verspreidingsgebied van de geelbuikvuurpad bestaat uit vijf leefgebieden en is van nature beperkt tot Zuid-Limburg, waar het dier in dynamische milieus (voornamelijk in mergelgroeven) leeft. Voorheen kwam de geelbuikvuurpad vrij algemeen en verspreid over het uiterste zuiden van Limburg voor. Tegenwoordig is de soort daar nog slechts op enkele plaatsen aanwezig en worden deze dieren met uitsterven bedreigd. Er zijn meerdere maatregelen ter bescherming van de soort en de ontwikkeling/instandhouding van de instabiele milieus. In dit onderzoek worden de genetische variatie en differentiatie van de Nederlandse geelbuikvuurpad populaties en die van omliggende (referentie) landen in kaart gebracht. Zodoende kan er inzicht verkregen worden of de genetische status aanleiding geeft tot nadere beheersadviezen en tevens of de huidige Nederlandse populaties relictten zijn van de historische populaties of dat deze resulteren van (al dan niet illegale) herpopulatie processen.

1.1 De Geelbuikvuurpad (*Bombina variegata*)

Geelbuikvuurpadden (*Bombina variegata*) behoren tot de familie van de vuurbuikpadden *Bombinatoridae*. Anders dan dat de naam doet denken, behoren deze dieren tot de familie van de kikkers. De soorten uit deze familie zijn aanzienlijk giftiger dan vele andere kikkers en padden. Binnen de familie zijn er twee geslachten en acht soorten. Allen hebben ze een afgeplat lichaam en een padachtig gedrongen uiterlijk. Het geslacht *Bombina* staat bekend om soorten met felle buikkleuren. De zes soorten die onder dit geslacht vallen, zijn: *Bombina bombina* roodbuikvuurpad, *Bombina lichuanensis* (geen Nederlandse naam), *Bombina maxima* (geen Nederlandse naam), *Bombina orientalis* Koreaanse vuurbuikpad, *Bombina pachypus* Italiaanse geelbuikvuurpad en *Bombina variegata* geelbuikvuurpad (Van Delft & Creemers, 2009; Lenders, 2000).

De lengte van een volwassen geelbuikvuurpad is drie tot vijf centimeter. Vrouwtjes zijn gemiddeld iets groter dan de mannetjes. Gemiddeld bereiken de dieren een gewicht van 3.5 à 6.5 gram, met een maximum van circa twaalf gram (Van Delft & Creemers, 2009; Lenders, 2000). Zowel de buik, als de kin en de onderzijde van de ledenmaten zijn geel, met een onregelmatig patroon van zwarte vlekken. De gele kleur loopt door op de achterzijde van de dijen en de toppen van enkele vingers en tenen. Wanneer een individu zich bedreigd voelt, worden de opvallende kleur van de randen van de buik getoond, door de poten tot boven het lichaam te krommen. Dit gedrag wordt het unkenreflex genoemd. Het buikpatroon is voor ieder individueel exemplaar verschillend en verandert nauwelijks na het eerste levensjaar, waardoor volgroeide dieren individueel herkenbaar blijven. De rugzijde is donkerbruin gekleurd en bedekt met kleine wratten (zie figuur 1). Soms zijn er lichtbruine vlekken op de rug te zien. De ogen staan bovenop de kop en hebben een driehoekige of hartvormige pupil. De mannetjes zijn van de vrouwtjes te onderscheiden door de gespierde bovenarmen en bruinzwarte paarborstels op de binnenzijde van de onderarm en de vingers (Van Delft & Creemers, 2009; Lenders, 2000).



Figuur 1. Rug- en buikfoto van geelbuikvuurpad(den). Linker foto genomen door: Marinus Speelman, rechter foto genomen door: Wilbert Bosman.

Geelbuikvuurpadden maken gebruik van twee typen wateren. Voor de voortplanting worden instabiele wateren gebruikt; poeltjes en laagtes die in een pioniersstadium verkeren en zonnig gelegen zijn. Deze bevatten over het algemeen minder predators en concurrerende amfibiesoorten. Voor het verblijf buiten de voortplanting, worden sterker begroeide en soms ook diepere poelen gebruikt, beter bekend als verblijfwateren. De geelbuikvuurpad wordt voornamelijk in waterhabitat waargenomen, maar spendeert een aanzienlijk deel van het jaar op het land, bijvoorbeeld om te overwinteren. In Nederland bestaat de landhabitat voornamelijk uit nog kale groevebodems, graslanden, ruigtevegetaties en bos. Adulte dieren zijn tijdens de actieve periode zeer plaatstrouw en blijven volgens onderzoek gemiddeld binnen 35 meter van de vangplaats. Tussen seizoenen vindt er wel verplaatsing plaats, in enkele gevallen gaat het om een afstand van 250 tot 300 meter. Wanneer ze niet actief zijn in hun zomerhabitat, schuilen geelbuikvuurpadden in muizengangen, tussen boomwortels, onder stammen, stenen, afval, in steenhopen of krimp-scheuren in de bodem. Geelbuikvuurpadden voeden zich doorgaans met evertrebraten, zoals insecten, rupsen en duizendpoten (Van Delft & Creemers, 2009; Lenders, 2000).

De eerste geelbuikvuurpadden worden doorgaans in april waargenomen. De meeste waarnemingen worden tussen half mei en eind augustus gedaan. Na hevige neerslag, gevolgd door hoge temperaturen tijdens het voortplantingsseizoen, verzamelen de geelbuikvuurpadden zich in korte tijd om eieren in de wateren af te zetten. Het aantal eieren dat wordt afgezet, kan oplopen tot circa 130 per vrouwtje. De eieren worden afgezet, afzonderlijk of in klein klompjes, op dode takjes, stenen of planten. Een eitje is gemiddeld anderhalf tot twee millimeter groot, met een omhulsel van vijf tot acht millimeter en bruin van kleur. De larven bereiken, na een periode van zes tot tien weken, een lengte van circa vijf centimeter. Juvenielen vertonen zwerfgedrag en geen gerichte migratie. Ze kunnen binnen enkele weken tot 800 meter van hun geboortewateren wegtrekken. Hierdoor kan de soort nieuwe leefgebieden koloniseren. Echter, als gevolg van het geringe dispersievermogen liggen risico's van, al dan niet genetische, isolatie op de loer en zijn risico's van inteelt op termijn niet uit te sluiten. Jonge dieren kunnen in hun tweede zomer geslachtsrijp worden, maar deelname aan de voortplanting gebeurt meestal in hun derde zomer. Geelbuikvuurpadden kunnen relatief oud worden. Er zijn exemplaren van minstens 26 jaar gevonden in het wild, maar als een gevolg van predatie en natuurlijk verval haalt lang niet ieder individu die leeftijd (Van Delft & Creemers, 2009; Lenders, 2000).

1.2 Ontwikkeling Nederland populaties

In de eerste helft van de twintigste eeuw, komen alle waarnemingen van geelbuikvuurpadden uit de streek ten oosten van de Maas en ten zuiden van de lijn Kerkrade-Maastricht. Waarnemingen buiten Zuid-Limburg worden als buiten het natuurlijke verspreidingsgebied gerekend. De soort lijkt algemeen voor te komen in Zuid-Limburg. Door onderzoek ontstaat in de jaren '60 een nauwkeuriger beeld van de verspreiding van de soort. Tijdens de jaren '70 wordt een drastische terugloop

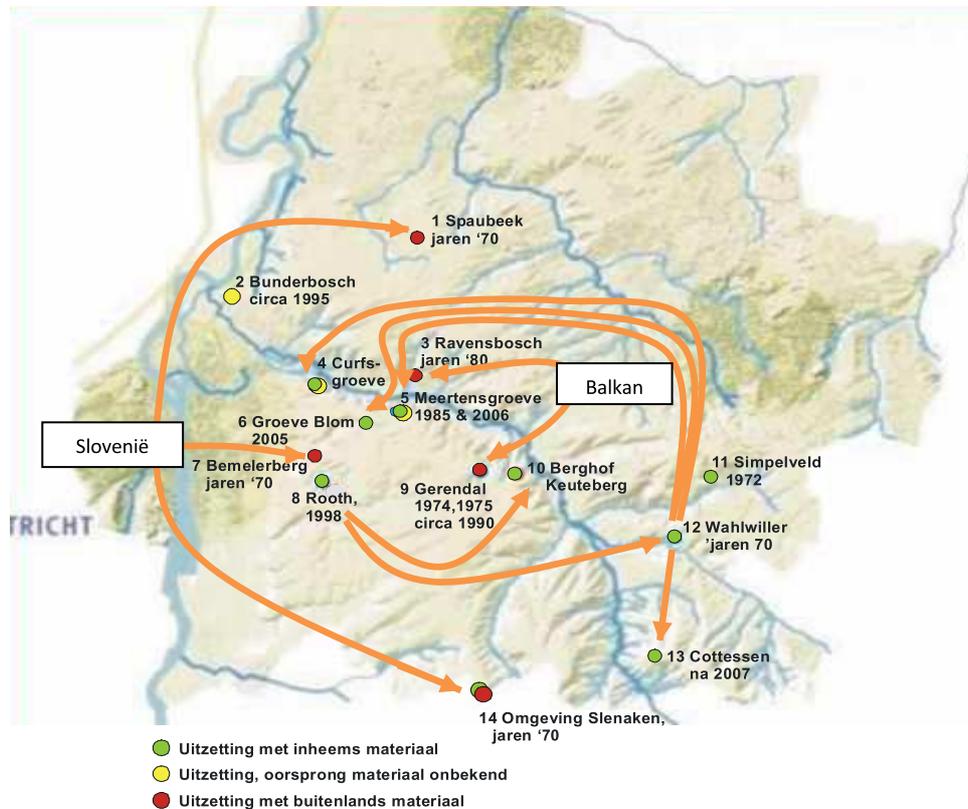
vastgesteld van het aantal locaties waar de soort wordt waargenomen; de soort wordt nog maar in 17 poelen waargenomen in tegenstelling tot de circa 80 poelen uit de jaren '60. In de jaren '80 wordt er nog maar vijf poelen vermeld, waarbij slechts sprake is van één populatie met een redelijk aantal dieren (circa 25) (Van Delft & Creemers, 2009; Crombaghs *et al.*, 2009; ongepubliceerde data RAVON, bijlage I). De drastische achteruitgang van de geelbuikvuurpad leidde in 1982 tot de oprichting van de zogenaamde 'Overleggroep poelenbeheer'. In de volgende jaren nam het aantal nieuw aangelegde en herstelde poelen in het Mergelland weer toe tot 550 in 1990. Veel soorten reageerden positief op deze actie, maar de geelbuikvuurpad echter niet. Ondanks de graaf- en herstelwerkzaamheden waren er in 2000 nog maar vier vindplaatsen van de geelbuikvuurpad, waarvan slechts één vitale populatie (in groeve 't Rooth) (ongepubliceerde data RAVON, bijlage I).

Vanaf 1997 is er structureel populatieonderzoek verricht aan de geelbuikvuurpad in Zuid-Limburg. In het begin alleen in groeve 't Rooth, vanaf 2000 ook in de vier andere gebieden, namelijk Juliana groeve, Wahlwiller, Berghofwei en Gerendal (ongepubliceerde data RAVON, bijlage I).

- *Groeve 't Rooth*. In de jaren '80 was de populatie in groeve 't Rooth de grootste in Nederland. De populatiegroottes zijn in die tijd geschat op 97 dieren (adulten en subadulten). In de loop der tijd vond de aanleg van nieuwe wateren plaats en werden de eerste basishabitats aangelegd. In 2010 betrof de populatiegrootte 115 volwassen dieren.
- *Julianagroeve*. Eind jaren '90 stierf de geelbuikvuurpad uit in de Julianagroeve. Voorheen was de soort er ook al schaars. In juni 2001 werd er slechts één dier gevonden. Voor 2010 kwam de schatting op 11 dieren. In de Julianagroeve is op dit moment geen sprake van een levensvatbare populatie.
- *Wahlwiller*. In 2000 bestond de populatie van de geelbuikvuurpad Wahlwiller uit 16 dieren. De aanleg van vier nieuwe basishabitats in 2005 zorgde voor een enorm reproductiesucces. In 2010 groeide de populatie naar 63 dieren. Dieren gebruikt voor herintroductie zijn afkomstig uit 't Rooth.
- *Berghofwei*. Gedacht werd dat de populatie was uitgestorven in Berghofwei. De aanleg van een basishabitats in 2004 bleek van groot belang. In 2009 betrof de populatie 76 dieren. In 2010 daalde het aantal weer licht naar 72 dieren.
- *Gerendal*. De populatie in het Gerendal was jaren lang kwakkelend. In 2000 bestond deze nog uit 18 dieren, maar nam in de jaren daarna af tot slechts enkele exemplaren in 2004 en 2005. De populatie groeide in 2009 en 2010 uit naar een populatie van 69 en respectievelijk 118 dieren. Hoe deze spectaculaire groei na succesvolle voortplanting in 2008 ineens tot stand is gekomen, is niet duidelijk.

De afname leidde tot de uitvoering van een reeks onderzoeken, betreffende de actuele status van de omvang van de populaties en het veilig stellen van het voortbestaan van de laatste populaties. Het onderzoek resulteerde in meerdere beschermingsplannen. Daarnaast leidde de afname tot het (zowel legaal als illegaal) uitzetten van de soort, zowel volwassenen, als juvenielen en larven, op diverse plaatsen in het Mergelland. Hierbij zijn ook geelbuikvuurpadden uit het buitenland uitgezet. Locaties in Limburg waar in de periode 1970-2010 uitzettingen hebben plaatsgevonden (van noordwesten naar zuidoosten): Retraitehuis in Spaubeek (deels mogelijk uit Kranske Gora, Slovenië), Bunderbos (herkomst onbekend), Ravensbosch (nakomelingen kweekgroep uitgezet in het Gerendal, waarschijnlijk variëteit uit de Balkan), Groeve Curfs (herkomst onbekend), Meertensgroeve (herkomst onbekend), Groeve Blom, Bemelerberg (deels mogelijk uit Kranske Gora, Slovenië), Rooth (uit 't Rooth), Gerendal (diverse keren herintroductie), Berghofwei/Keuteberg (uit 't Rooth), Locatie Simpelveld (herkomst onbekend), omgeving Schilberg/Slenaken (deels mogelijk uit Kranske Gora, Slovenië) en Cottessen (uit Wahlwiller). In overleg met de Provincie Limburg en het Ministerie van LNV is in drie groeves een herintroductie gestart: Meertensgroeve, Groeve Blom en Curfsgroeve. Deze drie uitzettingen betreffen een fokprogramma dat is opgezet uit larven, veiliggesteld bij Wahlwiller. De larven werden laat in het seizoen in een situatie aangetroffen, waarbij overleven door de winter geen optie was. De fokgroep bestaat nog steeds en is ondergebracht bij Ben Crombaghs.

Monsters daarvan zijn ook beschikbaar gesteld voor dit onderzoek. Voor een overzicht van deze locaties en onderlinge uitzettingen, zie figuur 2. Voor uitgebreide informatie, zie bijlage I.



Figuur 2. Locaties in Limburg waar uitzetting van de geelbuikvuurpad bekend is (oranje pijlen geven aan vanuit-naar). In drie gevallen is de herkomst van de uitgezette geelbuikvuurpaden onbekend. Op een aantal locaties is de geelbuikvuurpad inmiddels weer verdwenen, namelijk: Spaubeek, Bunderbosch, Ravensbosch, Bemelerberg, Simpelveld en Slenaken.

Sinds 2000 is er steeds meer inzicht ontstaan in de factoren die een belangrijke rol spelen in de duurzame overleving van de geelbuikvuurpad. De instandhouding van extreme levensomstandigheden in het leefgebied van de geelbuikvuurpad en het bemoeilijken van predators en concurrenten, leidt tot een succes. De voortplantingswateren kunnen te snel, maar vooral ook te langzaam droogvallen. De ontwikkeling van dergelijke wateren vereist dus een hoge mate van maatwerk betreffende dimensies, locatiekeuze en tijdstip van beheer en aanleg. Ook de kwaliteit van de langhabitat dient goed aan te sluiten op de specifieke eisen van de soort, in het bijzonder de hoge dichtheid aan schuilplaatsen en voldoende zon. Deze nieuwe inzichten zijn langzaam maar zeker doorgevoerd in de laatste en enkele nieuwe leefgebieden van de soort (Crombaghs *et al.*, 2009; ongepubliceerde data RAVON, bijlage I).

1.3 Genetische processen in geïsoleerde en kleine populaties

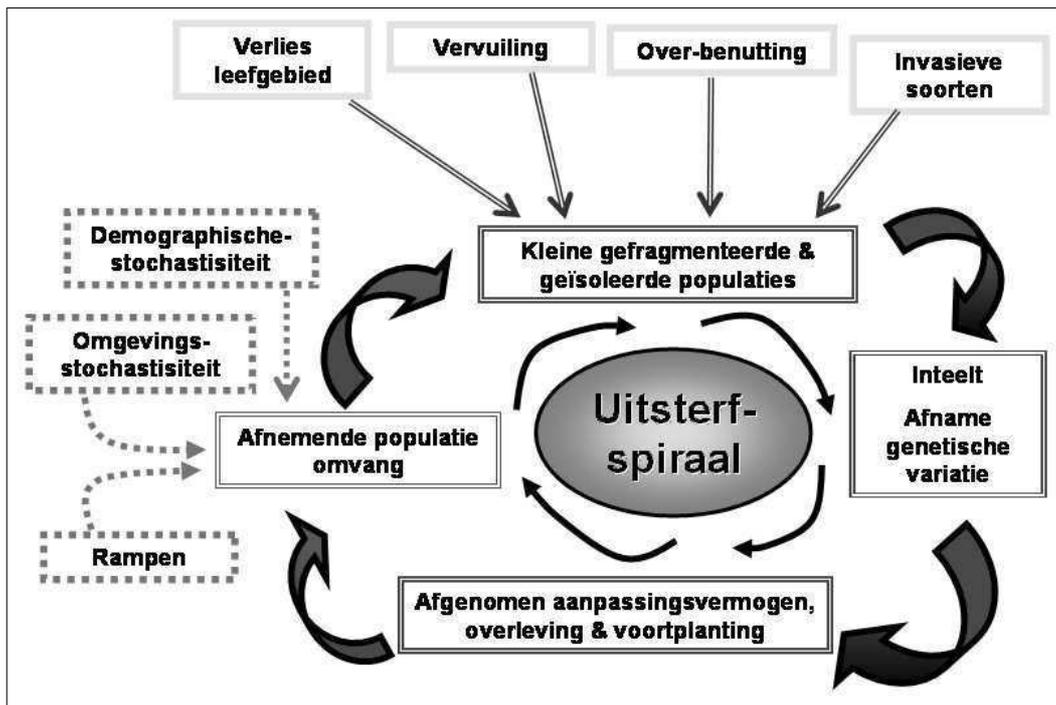
Biodiversiteit wordt vaak op drie niveaus gedefinieerd: op het niveau van ecosystemen en habitats, op soortsniveau en op populatie- en individu niveau (genetische biodiversiteit). Om genetische diversiteit te analyseren, zijn verschillende technieken ontwikkeld (Bijlsma, 1995). Cellen bevatten nucleair- en mitochondriaal DNA. DNA bevat de genetische informatie die nodig is om een organisme te maken. DNA is opgebouwd uit vier zogeheten baseparen (A, T, G en C) die in verschillende volgorden voorkomen. Het DNA is dan een lange keten van baseparen. Door de volgorde van de baseparen tussen individuen te vergelijken, kan gekeken worden of er variatie is en wat de frequentie van de verschillende varianten binnen een populatie is. Indien stukjes van het DNA

worden onderzocht die coderen voor een eiwit (functioneel DNA) spreekt men over een *gen* of genen. Indien de onderzochte stukjes DNA geen functie, of een onbekende functie hebben spreekt men van een locus of merker. De mate waarin de verschillende onderdelen van het DNA onderhevig zijn aan mutaties en selectie, maakt dat er variabele en conservatieve delen in het genoom te vinden zijn. Afhankelijk van de vraagstelling, wordt de meest geschikte techniek toegepast waarbij ook rekening moet worden gehouden met de kwaliteit en kwantiteit van de te verkrijgen DNA monsters.

De twee standaard parameters voor het weergeven van genetische diversiteit, zijn de mate van polymorfisme en het percentage heterozygositeit. Polymorfisme betekent dat er meerdere varianten of allelen (nucleair DNA) of haplotypen (mitochondriaal DNA) van een gen of merker aanwezig zijn in een populatie. Indien een individu van de vader een andere allel heeft meegekregen dan van de moeder, is dit individu heterozygoot voor het gen/merker. Indien het twee dezelfde allelen bezit is het homozygoot. Hoe groter het aantal verschillende allelen van een gen/merker binnen een populatie, des te groter de genetische variatie van die populatie. Hoe groter het aantal genen waarvoor een individu heterozygoot is, des te groter is de genetische variatie in dat individu. Het belang van genetische diversiteit laat zich het beste verklaren door genen als pakketjes informatie te beschouwen. Bij een grote variatie aan allelen is er dus veel informatie binnen het individu of populatie aanwezig. Deze informatie hoeft niet direct noodzakelijk te zijn voor de huidige overleving, maar kan bij veranderende omgevingsfactoren de overlevingskansen wel beïnvloeden.

Kleine populaties lopen, als gevolg van een toevallige combinatie van negatieve demografische- en omgevingsfactoren, een groter risico uit te sterven dan grotere populaties (figuur 3). Naast het numerieke aspect spelen ook populatiegenetische processen een belangrijke rol bij het voortbestaan van de populaties (Keller & Waller, 2002). Omdat de genetische variatie per individu niet groot kan zijn en daarmee ook het aanpassingsvermogen aan veranderende milieuomstandigheden beperkt is, wordt het adaptatievermogen van een populatie vooral bepaald door de gezamenlijke genetische variatie van de individuen (Booy, 1998). Binnen grote populaties is er over het algemeen een grotere genetische variatie dan binnen kleine populaties.

Een proces dat daarbij een belangrijke rol speelt is de genetische drift. Bij het doorgeven van de genetische variatie van de ene generatie naar de volgende, kan verlies van variatie optreden. Dit effect zal sterker zijn naarmate de populatie omvang kleiner is. De meest extreme vorm van genetische drift treedt op bij paring tussen verwanten. Organismen beschikken dan ook over verschillende mechanismen om inteelt te voorkomen. Eén zo'n mechanisme is bijvoorbeeld geslachtsafhankelijke dispersie, waarbij de mannetjes verder wegtrekken dan de vrouwtjes of juist andersom. Bij kleine, geïsoleerde populaties kan aan een belangrijke voorwaarde voor het behoud van genetische variatie, het min of meer willekeurig kiezen van een partner ('random mating'), niet worden voldaan, omdat er daarvoor te weinig potentiële partners zijn. Behalve als gevolg van genetische drift, kan de genetische variatie afnemen door selectie, migratie, inteelt en bottlenecks. Een demografische bottleneck is het proces waarbij een populatie in korte tijd sterk in aantal achteruitgaat. Indien dit een sterke afname van de genetische variatie tot gevolg heeft (als deze bottleneck niet snel door populatiegroei wordt gevolgd) dan spreekt men van een genetische bottleneck.



Figuur 3. De uitsterfspiraal of extinctie curve (naar Frankham, 2002)

Afname van de genetische variatie kan leiden tot een verlaagde fitness. Onder fitness wordt verstaan het reproductieve succes gedurende het leven van een individu. Hoewel dit niet eenvoudig te analyseren is, wordt het vaak gemeten aan de grootte en groei van individuen, vruchtbaarheid, levensverwachting, groeisnelheid en eventueel de metabolische efficiëntie van stoffen.

Van populaties die geïsoleerd raken, kunnen als gevolg van selectie en genetische drift de genetische eigenschappen zich wijzigen. De mate waarin deze lokale adaptatie plaats vindt, is enigszins gerelateerd aan de populatieomvang, de duur van de isolatie en de mate waarin het nieuwe leefmilieu verschilt van het oorspronkelijke. Genen met voordelige eigenschappen voor het speciale leefmilieu gaan frequenter voorkomen dan de minder gunstige genen. Daarnaast kan co-adaptatie plaatsvinden. Dit betekent dat bepaalde genen elkaars werking kunnen verbeteren indien zij in hetzelfde individu aanwezig zijn en dus tegelijkertijd tot expressie kunnen komen. Indien een lokaal geadapteerde populatie weer in contact wordt gebracht met soortgenoten uit een andere populatie, hetzij natuurlijk door het opheffen van een migratiebarrière, hetzij kunstmatig door het uitwisselen van individuen, kan dit leiden tot uitteelt of uitbreiding depression. Hiermee wordt bedoeld het opheffen van de lokale adaptatie en co-adaptatie wat resulteert in een afnemende fitness (Frankham *et al.* 2002).

1.4 Doel en Vraagstelling

De geelbuikvuurpad valt onder de Europese regelgeving van 'de Conventie van Bern', die zich bezig houdt met het behoud van soorten en hun natuurlijk leefomgeving. Daarnaast is de diersoort opgenomen in bijlage 2 (soorten met lidstaat-overstijgend belang) en bijlage 4 (soorten die strikte bescherming vereisen) van de Habitatrictlijn, die zich richt op de instandhouding van natuurlijke habitats, de wilde flora en fauna en het behoud van biodiversiteit door bescherming van (semi-) natuurlijke landschappen en soorten met Europees belang. Deze gebiedsbescherming wordt in Nederland verwekelijkt via 'Natura 2000'. In Nederland is de soort overgenomen in de Flora en Fauna-wet. Daarnaast zijn er natuurgebieden als Habitatrictlijngebied voor de geelbuikvuurpad aangewezen. De vereiste bescherming is landelijk geregeld, mede doordat de soort is aangewezen als beschermde inheemse diersoort in de Natuurbeschermingswet; een wet die zowel de soortbescherming als de gebiedsbescherming omvat d.m.v. het aanwijzen van gebieden als Staats- of Beschermd Natuurmonument. Als laatste is de geelbuikvuurpad ook nog opgenomen in de Rode lijst

van reptielen en amfibieën, met als status 'ernstig bedreigd' (Platform geelbuikvuurpad en vroedmeesterpad, 2006; Lenders, 2000).

De afname van de populatiegroottes is een gevolg van een combinatie van verschillende factoren, e.g. het gebrek aan voldoende hoge omgevingstemperatuur in de habitat, het tekort aan vochtige schuilplaatsen, het gebrek aan geschikte voortplantingswateren, etc. (Platform geelbuikvuurpad en vroedmeesterpad, 2006; Lenders, 2000). Een langdurig kleine populatieomvang heeft vrijwel altijd een afname van de genetische variatie tot gevolg. Genetische variatie is van belang voor overleving en aanpassingsvermogen van individuen en populaties. Ook is het niet uitgesloten dat vanwege de mogelijk geïsoleerde ligging van de Nederlandse geelbuikvuurpad populatie aan de rand van het verspreidingsgebied (in samenhang met mogelijk andere leefomstandigheden, zoals habitat of klimaat) er selectie en/of adaptatie heeft plaatsgevonden, waardoor de Nederlandse populatie mogelijk is gedifferentieerd van andere populaties. Dit is van belang indien geschikte geelbuikvuurpadden geselecteerd moeten worden, wanneer er herintroductie ter versterking van de populatie wordt overwogen. Het mengen van buitenlandse geelbuikvuurpadden met inheemse soorten is beslist niet zonder risico (zowel genetisch als wat betreft het risico op verspreiding van ziekten) (Smulders *et al.*, 2006).

In opdracht van Provincie Limburg is door Alterra onderzoek verricht naar genetische variatie en genetische differentiatie van de Nederlandse geelbuikvuurpad populaties. Het doel van dit onderzoek is het leveren van inzicht in de genetische structuur van de populaties van de geelbuikvuurpad in Nederland in vergelijking met omliggende Europese landen (België, Frankrijk en Duitsland, ook wel omschreven als Europese regio's). Dit inzicht leidt tot mogelijke verklaringen van de genetische structuur van populaties en uiteindelijk tot aanbevelingen met betrekking tot het beheer van de Nederlandse populaties in Zuid-Limburg.

Voor dit onderzoek zijn de volgende vragen geformuleerd:

- Hoe verhoudt de genetische variatie en genetische differentiatie van de Nederlandse populaties zich onderling en ten opzichte van referentie populaties uit de Europese regio's?
- Is de algehele Nederlandse populatie vanuit genetisch oogpunt levensvatbaar en, indien niet, hoe zou deze ondersteund kunnen worden?
- Zijn er indicaties van (illegale) bijplaatsing en zijn deze tot een mogelijke herkomst te herleiden?

Deze vragen zullen worden beantwoord door de uitvoering van populatie-genetische analyse van populaties van zowel Nederlandse als Europese regio's, betreffende genetische variatie en genetische differentiatie (indicaties van vreemde allelen, die duiden op kunstmatige processen). Aan de hand van de resultaten wordt het huidige beeld van de populaties van de geelbuikvuurpad geschetst, zodat toekomstige maatregelen en ontwikkelingen ermee vergeleken kunnen worden.

2 Materiaal en Methode

2.1 Monstername

Veelal wordt er voor genetisch onderzoek gebruik gemaakt van bloed of weefselmonsters. Het probleem van deze monstertypes, is dat deze niet altijd eenvoudig voor handen zijn en/of omdat het vanuit dierwelzijn niet wenselijk is om bloed of weefsel af te nemen. Om deze reden wordt dan ook vaak uitgeweken naar andere, mogelijk minder kwalitatieve monstertypes, zoals haren, veren, eischalen, wangslimvlies en zelfs uitwerpselen. Tijdens dit onderzoek is gekozen om voornamelijk te werken met wangslimvlies-materiaal. De dieren zijn namelijk vrij gemakkelijk te vangen, het afnemen van wangslimvlies wordt gezien als non-invasief, deze methode beperkt de kans op schade aan de dieren tot een minimum ten opzichte van een methode als bijvoorbeeld teenknippen en is een goede bron van DNA voor genetische studies (Beebee, 2008; Broquet *et al.*, 2007). Naast het wangslimvlies-materiaal zijn ook enkele weefselmonsters gebruikt van dood gevonden exemplaren.

2.1.1 Wangslimvlies

Zoals hierboven al vermeld, was wangslimvlies de grootste bron van materiaal voor de genetische analyse. Het verzamelen van dit materiaal is uitbesteed aan RAVON (Wilbert Bosman) en Natuurbalans - Limes Divergens (Ben Crombaghs). Het veldwerk is uitgevoerd in de periode van Juli-Augustus 2010. Dit is gedaan door de verschillende geelbuikvuurpad populaties, opgenomen in deze studie, te bezoeken en de verschillende aanwezige poeltjes apart te bemonsteren. Vanwege het droge voorjaar is het veldwerk wat uitgesteld, aangezien er geen geschikte poelen waren ontstaan. De bezochte populaties bevonden zich in Meertensgroeve, Wahlwiller, Gerendal, Berghofwei, 't Rooth en 3 populaties in de omgeving van Aken, namelijk Binsfelthammer, Brockenberg en Bärenstein (zie tabel 1). Tevens is de Julianagroeve bezocht, maar op deze locatie zijn echter geen exemplaren aangetroffen. Alle geelbuikvuurpadden aanwezig in een poeltje, werden gevangen en in een emmer gedaan. Als werd aangenomen dat de poel zo goed als leeg was, werd wat wangslimvlies-materiaal bij ieder geelbuikvuurpad afgenomen met behulp van een katoenen swab (cotton dry swab; producent: VWR)/ wattenstaaf (zie figuur 4). Om dit mogelijk te maken, werd het individu voorzichtig in de hand genomen en werd met een stomp element voorzichtig de mond geopend en open gehouden. De wattenstaaf werd vervolgens voorzichtig in de mond rondgedraaid. Hierna werden de staafjes in bijbehorende buisje (waaraan enkele silica-korrels toegevoegd) geconserveerd en genummerd. Na deze behandeling werd de geelbuikvuurpad in een andere emmer gezet. Als alle geelbuikvuurpadden waren bemonsterd, werd nog eenmaal een ronde rond het poeltje gelopen om te kijken of er mogelijk nog meer geelbuikvuurpadden aanwezig waren die tijdens de eerste ronde gemist waren. Als dit het geval was werden deze geelbuikvuurpadden ook nog bemonsterd, was dit niet het geval, dan werden de geelbuikvuurpadden weer los gelaten bij dezelfde poel.



Figuur 4. Afname van wangslimvlies-materiaal bij een geelbuikvuurpad met behulp van een takje, het achter eind van een theelepeltje en een swab. Foto genomen door: Marinus Speelman.

Naast het materiaal dat door RAVON verzameld is, is er ook gebruik gemaakt van andere aangeleverde swabs. Zo heeft Ben Crombaghs swabs aangeleverd van geelbuikvuurpadden uit zijn eigen kweekgroep, met als herkomst Wahlwiller (2000) aangevuld met enkele larven uit Berghofwei (persoonlijke mededeling Ben Crombaghs). Daarnaast zijn door Ben Crombaghs ter referentie swabs van geelbuikvuurpadden verzameld uit een vitale Franse populatie nabij het dorpje Creuse. Deze Franse monsters zijn, in tegenstelling tot de andere monsters, opgeslagen in 2ml epjes gevuld met 96%-ethanol. Verder zijn er via RAVON ook swabs aangeleverd van geelbuikvuurpadden uit de dierentuin Blijdorp, die een Sloveense oorsprong zouden hebben. Daarnaast zijn er een aantal Belgische monsters uit een kweekprogramma met herkomst regio Luik, aangeleverd door Arnaud Laudelot (Natagora). Dit zijn vrijwel zeker genetisch verarmde vuurbuikpadden, aangezien de Belgische populatie sterk bedreigd is door grote fragmentatie van de populatie, in combinatie met een zeer geringe populatieomvang. Tenslotte zijn vanuit een Duitse studie aan geelbuikvuurpadden in de regio Hannover een aantal monsters beschikbaar gesteld door Heike Pröhl, van de Duitse Universiteit van Veterinary Medicine in Hannover (Hauswaldt *et al.* 2007). Tevens heeft ze van enkele monster aangegeven wat de allelengtes zijn voor de verschillende merkers, zodat ze gebruikt kunnen worden als sleutel om in de toekomst datasets uit te wisselen. In tabel 1 is een overzicht van het aantal monster en hun herkomst weergegeven.

2.1.2 Weefselmonsters

Naast wangslimvlies van levende organismen, zijn er ook weefselmonsters gebruikt voor analyse. Historische weefselmonsters zijn verkregen uit de geelbuikvuurpad collectie van het Nationaal Natuurhistorisch museum Naturalis. De collectie bestaat uit gefixeerde en in ethanol bewaarde individuen. Van deze individuen zijn de tongen voor een deel verwijderd zonder de collectie te beschadigen. Dit is gedaan door met een pincet voorzichtig de bek te openen en de tong voorzichtig los te maken van de onderkaak met behulp van een scalpel. Wanneer de tong eenmaal los was werd deze met behulp van het pincet vastgehouden, werd er voorzichtig een snede gemaakt in de tong, waardoor hier een stukje van los kwam (zie figuur 5). Het afgenomen tongweefsel is voor transport en opslag bewaard in 2 ml epjes gevuld met 96%-ethanol.



Figuur 5. Het verwijderen van een stukje tongweefsel bij in geelbuikvuurpad uit de collectie van het Nationaal Natuurhistorisch museum Naturalis. Foto aangeleverd door: Ivo Laros.

Daarnaast zijn er nog drie dode juvenielen aangeleverd uit het kweekprogramma van Ben Crombaghs. Per individu is een stukje weefsel gebruik voor de analyse. Voor het volledige overzicht en de aantallen van de verzamelde monsters, zie tabel 1.

Voor dit onderzoek worden de huidige Nederlandse populaties vergeleken met die meest naburige populaties in Aken en Wallonië (Luik) en met de historische situatie in Nederland (Nationaal Natuurhistorisch museum Naturalis). Als referentiepopulaties voor vermeende gezonde populaties waarvan verwacht wordt dat deze niet genetisch verarmd zijn door te kleine populatieomvang en isolatie fungeren de Duitse monsters uit de regio Hannover en de Franse monsters (Creuse). De monsters van de geelbuikvuurpadden uit Blijdorp fungeren als referentiepopulatie voor Sloveense individuen aangezien het vrijwel zeker is dat de Blijdorpse dieren daar hun herkomst hebben. Deze monsters worden in het onderzoek meegenomen om eventuele indicaties van het bijplaatsen van Balkan/Sloveense dieren in de afgelopen decennia beter te kunnen verifiëren.

Tabel 1. Herkomst en aantal (n) van de populaties van de geanalyseerde geelbuikvuurpad monsters.

Populatie	n	periode
<i>Nederland</i>		
• Meertensgroeve	10	Juni 2010
• Wahlwiller	17	Juli-Augustus 2010
• Gerendal	37	Juli-Augustus 2010
• Berghofwei	36	Juli-Augustus 2010
• 't Rooth	33	Juli-Augustus 2010
• Museum (weefsel)	35	1898-1961
<i>Duitsland</i>		
• Aken		
○ Binsfelthammer	16	Augustus 2010
○ Brockenberg	15	Augustus 2010
○ Bärenstein	7	Augustus 2010
• Hannover		
○ Liekwegen	5	Hauswaldt <i>et al.</i> , 2007
○ Oberkircher Sandsteinbrüche	5	Hauswaldt <i>et al.</i> , 2007
○ Messingberg	5	Hauswaldt <i>et al.</i> , 2007
○ Doberg	5	Hauswaldt <i>et al.</i> , 2007
<i>België (kweekprogramma Luik)</i>	11	Augustus 2010
<i>Frankrijk (Creuse)</i>	23	Augustus 2010
<i>Blijdorp (Slovenië?)</i>	10	Augustus 2010
<i>NL kweekprogramma (Ben Crombaghs)</i>		
• Swabs	15	Juni 2010
• Weefsel	3	Juni 2010

2.2 Genetische analyse

DNA-isolatie werd uitgevoerd met behulp van de volgende onderzoekspakketten: D'neasy Blood and Tissue Kit, QIAamp DNA Investigator Kit en QIAamp DNA Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue Kit (alle genoemde onderzoekspakketten zijn afkomstig van Qiagen). Voorafgaand aan de isolatie zijn van de droog bewaarde swabs de toppen afgeknipt welke in 2ml epjes werden gedaan voor verdere isolatie. Op ethanol bewaarde swabs werden voorafgaand aan de isolatie droog gedraaid. De weefselmonsters werden drooggedept en overgezet in 2 ml epjes.

De D'Neasy Blood and Tissue Kit is gebruikt om DNA te isoleren uit weefselmonsters (verkregen van de dode dieren uit het fokprogramma) en de droog bewaarde swabs met

wangslimvlijs-materiaal. Tijdens het uitvoeren van de isolaties uit de swabs, bleek een afname plaats te vinden in de opbrengst van het DNA. Omdat tijdens de isolaties van de op ethanol bewaarde swabs, met behulp van de QIAamp DNA Investigator Kit, een consequent betere opbrengst was (hoger dan de opbrengst met behulp van de D'Neasy Blood and Tissue Kit na de afname) is er besloten om ook de DNA-isolatie uit droog bewaarde swabs uit te voeren met de QIAamp DNA Investigator Kit. Echter had de afname in opbrengst geen invloed op verdere resultaten. Het laatst genoemde onderzoekspakket, de QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, is toegepast op de historische weefselmonsters, omdat deze kit specifiek ontworpen is voor dergelijk materiaal. Voor de volledige protocollen zie bijlagen II, III, IV en V.

Zes primerparen voor respectievelijk loci Bobom1A, Bobom5F, Bobom8A, Bobom9H, Bobom10F, Bobom12F, ontwikkeld voor de roodbuikvuurpad *Bombina orientalis* (Hauswaldt *et al.*, 2007), zijn in dit onderzoek gebruikt. De zes primerparen zijn verdeeld over twee multiplexen, namelijk multiplex A en multiplex B (zie tabel 2). Een multiplex is een Polymerase Ketting Reactie mix welke meerdere primerparen bevat.

Stukjes van het DNA zijn met behulp van de Polymerase Ketting Reactie (PCR) vermenigvuldigd, zodat ze zichtbaar konden worden gemaakt. De PCR-reacties werden uitgevoerd met 10 maal verdund DNA-isolaat voor de weefsels en onverdund DNA-isolaat voor de swabs in een totaal volume van 10 μ l met een Biometra T3000 Thermocycler. Zowel multiplex A als multiplex B werden in PCR gezet met 2 μ l 5x Flexi Buffer, 0.80 μ l 25 mM MgCl₂, 0.22 μ l 10 mM dNTP's-cocktail, 1 μ l 10X Primer Mix, 0.05 μ l 5 U/ μ l GoTaq-DNA polymerase. De PCR condities bestonden uit een initiële denaturatie van 70 seconden bij 96 °C gevolgd door 30 cycli van 30 seconden van 96 °C, 30 seconden bij een annealingtemperatuur (T_a) van 58 °C (welke per cycli 0.3 °C lager werd), 30 seconden bij 72 °C en een final elongation van 15 minuten bij 72 °C. De 5' -end van elke Forward-primer is gesynthetiseerd met een IRD 700 of een IRD 800 nm label (zie tabel 2). Voor multiplex A werd 1 μ l van het amplicon na denaturatie zowel met 29 μ l loading buffer (Formamide, Na₂EDTA en Broomphenol blauw) als met 9 μ l loading buffer samengevoegd (om alle loci goed zichtbaar te maken). Voor multiplex B werd 1 μ l van het amplicon na denaturatie in 9 μ l loading buffer gedaan. Alle drie de mengsels werden vervolgens voor 4 minuten bij 95 °C opgekookt, waarna het voor minimaal 10 minuten in de vriezer werd gezet. Dit werd vervolgens geanalyseerd op een 25 cm lange sequencing gel (6,5 % polyacrylamide premix gel en 0.8xTBE) met behulp van de LICOR 4300 DNA analyser. Tijdens de elektroforese werden consequent referentiemonsters gebruikt om de globale allellengtes van de monsters te kunnen bepalen (voor het volledige protocol zie bijlage IV). De monsters uit de regio Hannover zijn gebruikt om de exacte allellengtes te kunnen bepalen en daarmee alle monsters eenduidig met de Duitse studie te kunnen scoren (Hauswaldt *et al.*, 2007).

Voor de data-analyses zijn de monsters verwijderd welke voor meer dan twee loci niet gescoord konden worden. Alle zes de loci bleken een afwijking te hebben (tussen de +1 en +4 baseparen) qua scores wanneer gekeken werd naar de scores van de referentiemonsters verkregen van Heike Pröhl. Per loci was er een afwijking die veelvuldig voorkwam, maar niet consequent bleek te zijn. Omdat deze trends niet consequent bleken te zijn en omdat interne replica's wel (continu) identiek bleken te zijn, is besloten om geen correctie voorafgaand aan de data analyse uit te voeren. De totale dataset omvat 246 monsters uit 16 populaties en is voor 6 loci geanalyseerd.

Genetische variatie is gekarakteriseerd door het gemiddelde aantal allelen (N_a), het aantal effectieve allelen (N_e), het percentage verwachte heterozygoten (H_e ; gebaseerd op de allel frequenties), het percentage waargenomen heterozygoten (H_o), de fixatie index (F) en het percentage polymorfisme (%P) welke in de verschillende populaties te bepalen zijn (programma GenAlEx, Peakall & Smouse 2001). Het aantal allelen per microsatelliet is een maat voor het aantal varianten dat van een gen aanwezig is. N_e is in vergelijking met N_a een maat voor het aantal allelen onafhankelijk van monster grootte en is daardoor beter geschikt voor onderlinge vergelijking. Het percentage heterozygoten geeft een indruk van het aantal individuen in de populatie dat over twee verschillende varianten van een gen beschikt (tegenover de individuen die voor een gen twee dezelfde varianten bezitten: homozygoten). De fixatie index is een indicator voor het niveau aan homozygoten, het toont of er meer of minder homozygoten in de populatie voorkomen dan

verwacht (op basis van de H_e en de H_o). Het percentage polymorfisme is het percentage van het aantal loci welke polymorfisme vertoont (het voorkomen van meerdere verschillende allelen op 1 enkel locus binnen de populatie).

Daarnaast is voor de verwantschapsanalyse een clusteranalyse toegepast. Als eerste is het programma Structure (Pritchard *et al.* 2000) gebruikt. Het model dat ten grondslag ligt aan dit programma veronderstelt K (een onbekend aantal) populaties, welke gekarakteriseerd worden door de allel frequenties van een set van onafhankelijke merkers. Het resultaat is een onderverdeling van de totale dataset in een optimaal aantal populaties, waarbij vervolgens wordt aangegeven welk percentage van de oorspronkelijke monsters uit een populatie aan een bepaald cluster worden toegewezen. Naast deze Bayesiaanse cluster procedure is op de dataset een PCO analyse uitgevoerd. Voor de Principale Coördinaten Analyse (PCO) is gebruik gemaakt van het programma GenAlEx (Peakall & Smouse, 2001). Hierbij wordt eerst de onderlinge genetische afstand tussen alle 246 individuen bepaald en vervolgens is daar met behulp van de PCO structuur in aangebracht. De PCO is een multivariate analyse die probeert de variatie in een dataset zo te combineren en te groeperen dat een inzichtelijker patroon ontstaat. Vaak wordt een PCO analyse grafisch weergegeven door de score van de individuele monsters op de eerste en tweede PCO as weer te geven.

Tabel 2. Beschrijving van de twee multiplexen en de zes gebruikte primerparen. De primerparen staan genoteerd in de 5' naar de 3' richting met hun nucleotide repeat, de toegepaste annealing temperatuur (T_a , °C) en fragmentlengte.

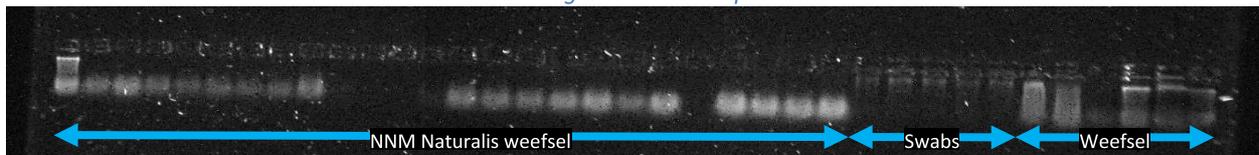
Multiplex	T_a (°C)	Locus	Primer sequentie (5' – 3')	Nucleotide repeat	Label	Fragment Range (bp)
A	58,0	Bobom9H	AACAGCCATTATTTAAAACCATTAG CAATAAAGCAGTATTTCCCAAATG	(GATA)9TAAA(GATA)2GAAA(GATA)6	800	147–223
		Bobom8A	AATTTCTTAGTGCTGCCAACTGC GGGGAAGGGACATTTTAGCTACATAC	(AGAT)7AAAGAGAT(GATA)9	700	314–354
		Bobom12F	ATAGGAGGTTTATAATGAAAGGGCAAC GATTGGATTTGGGCTATGATATTCTG	(GATA)9	700	206–226
B	58,0	Bobom5F	ATGAATTGGAAGGTAAGAACTTACACC CAAATGATACAAATCAAGTGGAAATGG	(GACA)13GGCA(GACA)7(GATA)14	700	130–153
		Bobom1A	ATGTGGCTTCCATTGACCTTGC CATGCCAAGAAGGATTGAGTCTGTC	(GATA)12	700	320–354
		Bobom10F	ATCCAACCTCAAATTCACAGGTCAC ACAAGGGATACCAGGAGAACAAAGC	(GATA)12	800	189–229

3 Resultaten

3.1 Genetische diversiteit

Van de meeste populaties zijn voldoende monsters verzameld, welke ook kwalitatief goed DNA opleverden om een goed inzicht in de genetische status van die populaties te krijgen. Van enkele populaties zijn minder dan 10 monsters verzameld of succesvol geanalyseerd. Dit betreft vooral Oberkircher Sandsteinbrüche, met slechts 3 monsters, als ook de andere Duitse populaties. Van deze populaties zijn niet het gewenste aantal monsters onderzocht om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen. Omdat ze wel indicatief zijn, worden ze wel als volwaardige populaties in dit hoofdstuk meegenomen. Met betrekking tot de conclusies dient hierbij voor deze populaties een slag om de arm te worden gehouden. Naast de Duitse monsters waarvan te weinig monsters zijn, zijn helaas helemaal geen bruikbare monsters beschikbaar van het Nationaal Natuurhistorisch museum Naturalis. Het DNA in de verzamelde monsters bleek te ver afgebroken. De dode exemplaren in de collectie zijn naar alle waarschijnlijkheid oorspronkelijk geconserveerd in formaline, wat als bijeffect heeft dat het DNA afbreekt. Figuur 6 illustreert dit vermoeden, hoe verder de band van het slotje (bovenaan in het figuur) afligt, hoe kleiner de stukken DNA zijn, de banden van de Naturalis monsters liggen allemaal onder in het figuur terwijl die van de swabs en weefsel monsters vooral bovenin dichtbij de slotjes liggen.

Figuur 6. Agarose Gel waarop drie verschillende types DNA extracten te zien zijn, namelijk: Weefsel monsters verkregen van Nationaal Natuurhistorisch museum Naturalis, swabs, verzameld in het veld en Weefsel van dood gevonden exemplaren.



Het gemiddelde aantal allelen (N_a) van alle geelbuikvuurpad populaties was relatief laag (zie tabel 3). De populaties in Nederland hadden een range van 1.8-2.1 effectieve allelen voor alle loci gemiddeld (N_e). Duitse populaties van de geelbuikvuurpad hadden een range van 1.6-2.5 effectieve allelen per locus. Van deze populaties vallen er twee in het bijzonder op; 1.76 effectieve allelen in Oberkircher Sandsteinbrüche en 1.58 effectieve allelen in Doberg. Deze waarden zijn aanzienlijk lager dan de waarden van de andere Duitse populaties. De geelbuikvuurpad populaties van zowel België als Frankrijk, respectievelijk 1.37 en 1.68 effectieve allelen, vallen eveneens laag uit, al dan niet lager uit wat betreft het gemiddelde aantal effectieve allelen per locus. De waarden voor zowel de Blijdorpse monsters als de monsters uit het Nederlandse kweekprogramma, respectievelijk 1.95 en 1.91 effectieve allelen, zijn ongeveer gelijk aan die voor de Nederlandse en Duitse populaties.

De waarden van de verwachte heterozygositeit (H_e) van alle bemonsterde populaties van de geelbuikvuurpad, zitten in een range van 0.4 en 0.5 (fractie), met uitzondering van het Duitse Brockenberg, H_e van 0.36, het Duitse Oberkircher Sandsteinbrüche, H_e van 0.27, het Duitse Doberg, H_e van 0.26, België, H_e van 0.22, en Frankrijk, H_e van 0.34. De waargenomen heterozygositeit (H_o) van de bemonsterde populaties, zitten ook in de range van 0.4 en 0.5 (fractie), met uitzondering van het Duitse Oberkircher Sandsteinbrüche, H_o van 0.39, het Duitse Doberg, H_o van 0.37, België, H_o van 0.27, en Frankrijk, H_o van 0.32. Het Duitse Bärenstein, H_o van 0.60, het Duitse Liekwegen, H_o van 0.60, vallen beiden ook buiten de range, maar dan door hun relatief veel hogere waarden. De algemene trend in de bemonsterde populaties is dat er geen fixatie (F) lijkt op te treden (weergegeven door negatieve waarden). Er zijn slechts drie populaties met een lichte fixatie, namelijk het Duitse Brockenberg, F van 0.05, het Duitse Messingberg, F van 0.09, en Frankrijk, F van 0.01. Opvallend is wanneer gekeken wordt naar het percentage polymorfisme binnen de populaties veelal deze niet 100% is; het meest voorkomend is 83% wat overeenkomt met 1 monomorf locus van

de 6 loci. Dit houdt in dat voor 1 van de 6 loci slechts 1 allel aanwezig is in de populatie. Wanneer er gekeken wordt naar lagere percentages vallen Oberkircher Sandsteinbrüche, Doberg en België op, met respectievelijk 50%, 50% en 67%.

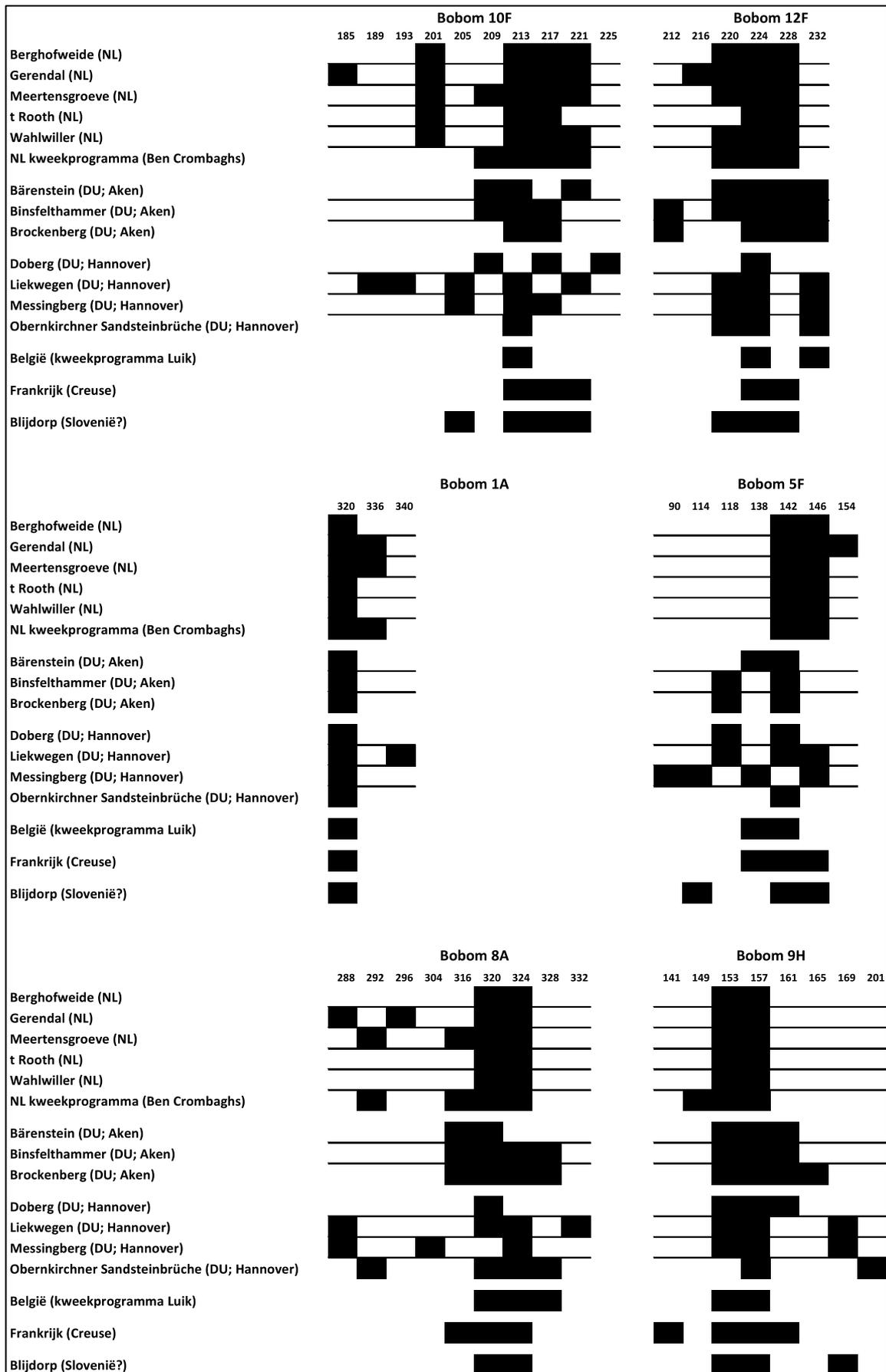
Tabel 3. Analyse van genetische variatie in de geelbuikvuurpad populaties gebaseerd op zes microsatelliet loci. n, aantal individuen; Na, gemiddeld aantal allelen per locus; Ne, effectieve aantal allelen per locus; He, verwachte heterozygositeit; Ho, waargenomen heterozygositeit; F, Fixatie-index; %P, percentage polymorfisme.

Populatie	n	Na	Ne	He	Ho	F	%P
<i>Nederland</i>							
• Meertensgroeve	10	3.00	2.07	0.44	0.48	-0.08	100.00
• Wahlwiller	17	2.33	2.00	0.45	0.47	-0.04	83.33
• Gerendal	36	3.33	2.10	0.45	0.51	-0.09	100.00
• Berghofwei	35	2.33	2.04	0.44	0.45	-0.01	83.33
• 't Rooth	33	2.00	1.83	0.41	0.45	-0.10	83.33
• Museum (weefsel)	0	-	-	-	-	-	-
<i>Duitsland</i>							
• Aken							
○ Binsfelthammer	16	3.00	2.19	0.46	0.49	-0.07	83.33
○ Brockenberg	15	2.83	1.80	0.36	0.36	0.05	83.33
○ Bärenstein	7	2.50	2.10	0.45	0.60	-0.33	83.33
• Hannover							
○ Liekwegen	5	3.33	2.52	0.52	0.60	-0.13	100.00
○ Oberkircher Sandsteinbrüche	3	2.00	1.76	0.27	0.39	-0.41	50.00
○ Messingberg	5	2.83	2.24	0.47	0.44	0.09	83.33
○ Doberg	5	1.83	1.58	0.26	0.37	-0.40	50.00
<i>België (kweekprogramma Luik)</i>	11	1.83	1.37	0.22	0.27	-0.21	66.67
<i>Frankrijk (Creuse)</i>	23	2.67	1.68	0.34	0.32	0.01	83.33
<i>Blijdorp (Slovenië?)</i>	10	2.67	1.95	0.41	0.50	-0.21	83.33
<i>NL kweekprogramma (Ben Crombaghs)</i>	15	3.00	1.91	0.41	0.43	-0.09	100.00

Er was een lichte variatie in het aantal allelen per microsatelliet locus en de range per populatie (zie tabel 4 en figuur 7). De wijze waarop de data gevisualiseerd is, maakt het eenvoudig om te zien welke populaties 'gaten' vertonen in hun allel verdeling. Opvallend is dat locus Bobom 1A weinig variabel tot niet variabel is, met slecht 3 allelen. De overige loci zitten tussen een range van 6 (namelijk Bobom 12F) en 10 (Bobom 10F) allelen. De grootte van de fragmenten, waargenomen bij dit onderzoek, liepen uiteen van 90 tot en met 340 baseparen. Uit figuur 7 komt duidelijk naar voren dat er in de Nederlandse populatie enkele zeldzame allelen terug te vinden zijn welk in geen van de referentie populaties aanwezig zijn (bijvoorbeeld allel 201 op locus Bobom 10F welke slechts voorkomt in de Nederlandse populaties). Zo komen er binnen de populatie uit Gerendal op 4 van de 6 loci unieke allelen voor, namelijk: Bobom 10F, Bobom 12F, Bobom 5F en Bobom 8A.

Tabel 4. Allel diversiteit van zes microsatelliet loci gebaseerd op 246 individuen. Zie ook tabel 2.

Locus	Allelen aantal	Range (min – max) per populatie	Fragment Range (bp)
Bobom 9H	8	2-4	141-201
Bobom 8A	9	1-5	288-332
Bobom 12F	6	1-5	212-232
Bobom 5F	7	1-4	90-154
Bobom 1A	3	1-2	320-340
Bobom 10F	10	1-5	185-225



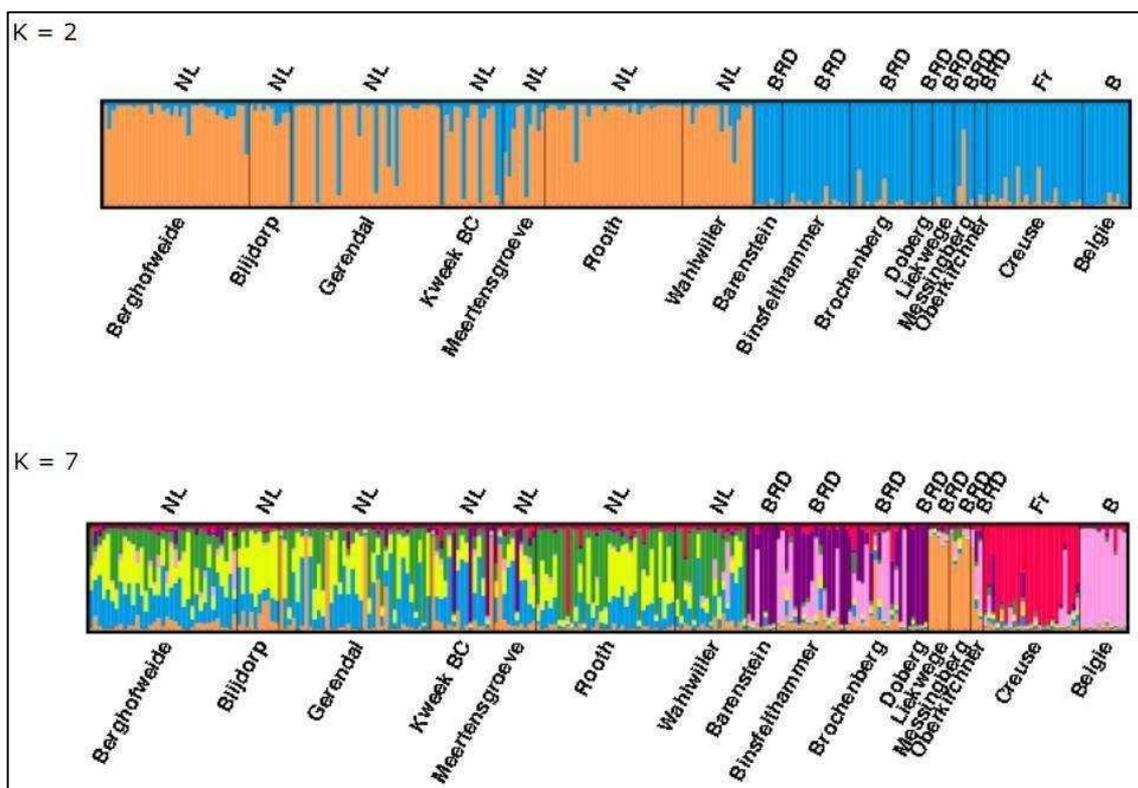
Figuur 7. Aan of afwezigheid van allelen van zes microsatelliet loci in 16 populaties. Zwarte blokjes duiden op aanwezigheid van een allel en witte blokjes op afwezigheid. Zie tabel 4 voor specifieke informatie.

3.2 Genetische verwantschap

Voor nadere populatie genetische analyse van de dataset is verondersteld dat alle individuen tot één grote populatie behoren. Binnen deze populatie is structuur gebracht door genetisch verwante dieren te groeperen in clusters, en ze vervolgens te merken op basis van herkomstpopulatie. Hiervoor zijn de volgende twee methoden gebruikt: de Bayesian Cluster Analyse en de Principale Coördinaten Analyse.

3.2.1 Bayesian cluster analyse

Het programma Structure (Pritchard *et al.* 2000) had moeite met een duidelijke groepsindeling. De Bayesian Cluster Analyse gaf aan dat de meest optimale indeling zich ergens tussen de vijf en de acht clusters (genetisch identieke groepen) bevond. In het Structure figuur (figuur 8) valt vooral op dat wanneer een indeling in twee clusters wordt gehanteerd, Nederland (inclusief het Nederlandse kweekprogramma en de Blijdorp monsters) in een cluster valt en alle andere referentie populaties gezamenlijk in het andere cluster. Uiteindelijk lijkt een indeling in zeven clusters het beste (zie tabel 5 en figuur 8). Met behulp van deze zeven clusters zijn de verschillende populaties min of meer te verdelen over 5 groepen. De clusters 2, 3 en 5 bestaan uit de Nederlandse populaties, welke niet duidelijk van elkaar te onderscheiden zijn. Deze clusters omvatten tevens ook een groot percentage van de monsters uit de Blijdorpse populatie (verdeeld over de drie clusters in totaal 74%). De clusters 1, 4 en 6 bestaan uit de Duitse en Belgische populatie(s). Aken en Hannover worden deels gezamenlijk toegerekend aan cluster 4 en deels apart toegekend aan cluster 6 (Aken) en cluster 1 (Hannover, met uitzondering van Doberg, welke ook voornamelijk aan cluster 6 toebedeeld wordt). België wordt voornamelijk toegekend aan cluster 4 (88.3%). In deze clusteranalyse wordt de Franse populatie grotendeels (75.3%) toebedeeld aan cluster 7. De laatste populatie, het Nederlandse kweekprogramma, ligt over 5 van de 7 clusters verspreid. Het voornaamste aandeel ligt echter in de clusters 2 en 6.



Figuur 8. Structure analyse: volgens het programma Structure verklaart een indeling in zeven clusters het beste de aanwezige variatie (elke verticale lijn stelt een geanalyseerd monster voor). Slechts de indeling in twee (K=2) en zeven (K=7) clusters is hier weergegeven aangezien de tussenliggende clusters weinig tot geen extra informatie bijdragen.

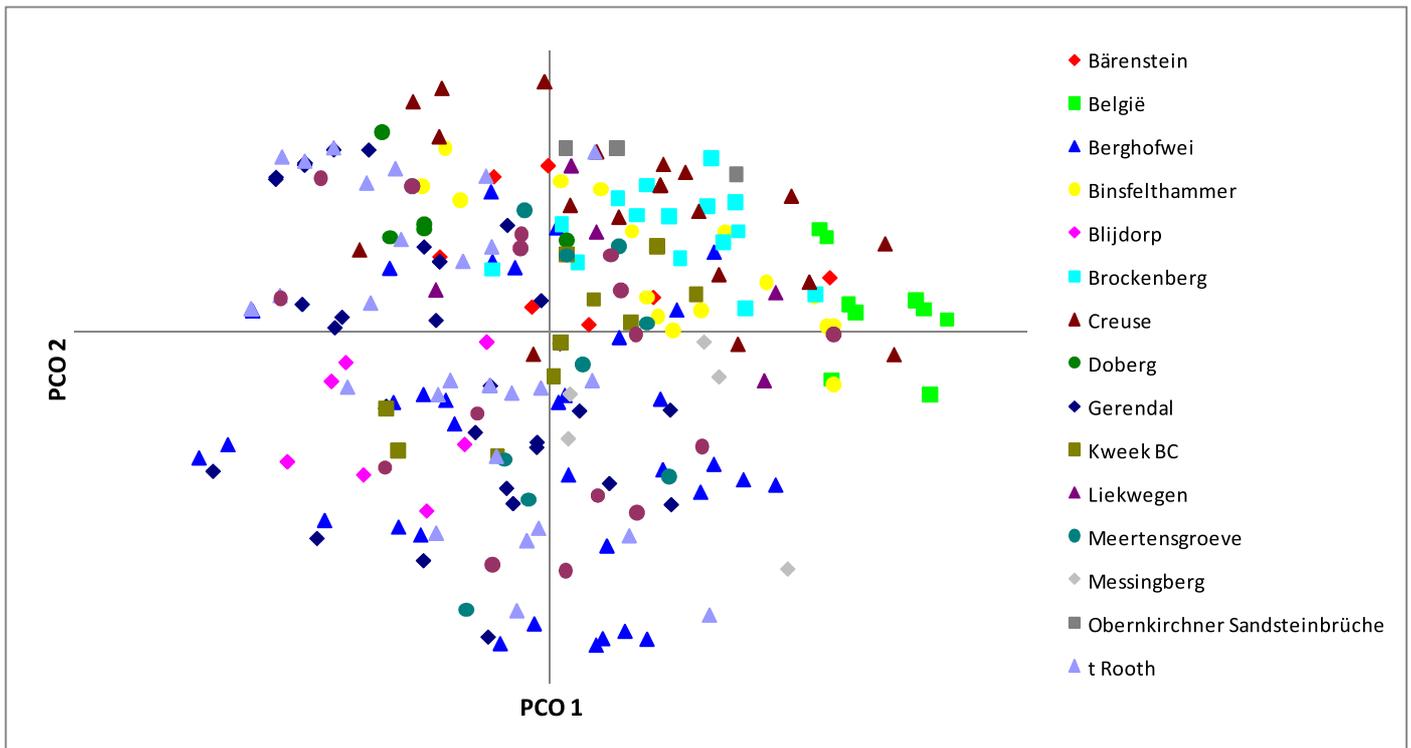
Tabel 5. Samenvatting van de resultaten van een Bayesian cluster analyse met behulp van het programma Structure. Vet = karakteristiek voor een cluster.

Populatie	Genetisch cluster						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Nederland</i>							
• Meertensgroeve	0.141	0.297	0.196	0.044	0.134	0.154	0.036
• Wahlwiller	0.056	0.217	0.136	0.068	0.456	0.021	0.046
• Gerendal	0.150	0.292	0.257	0.013	0.244	0.026	0.018
• Berghofwei	0.061	0.306	0.276	0.051	0.244	0.036	0.024
• 't Rooth	0.033	0.168	0.283	0.019	0.416	0.019	0.062
• Museum (weefsel)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Duitsland</i>							
• Aken							
○ Binsfelthammer	0.072	0.042	0.034	0.321	0.027	0.469	0.035
○ Brockenberg	0.113	0.040	0.027	0.352	0.032	0.351	0.085
○ Bärenstein	0.027	0.023	0.016	0.124	0.011	0.780	0.020
• Hannover							
○ Liekwegen	0.867	0.016	0.018	0.043	0.015	0.019	0.021
○ Oberkircher Sandsteinbrüche	0.369	0.043	0.030	0.365	0.029	0.127	0.039
○ Messingberg	0.812	0.024	0.032	0.058	0.047	0.011	0.016
○ Doberg	0.016	0.017	0.019	0.009	0.014	0.908	0.017
<i>België (kweekprogramma Luik)</i>	0.025	0.012	0.009	0.883	0.014	0.017	0.040
<i>Frankrijk (Creuse)</i>	0.028	0.029	0.029	0.078	0.027	0.057	0.753
<i>Blijdorp (Slovenië?)</i>	0.138	0.252	0.488	0.014	0.073	0.015	0.020
<i>NL kweekprogramma (Ben Crombaghs)</i>	0.170	0.294	0.163	0.024	0.127	0.192	0.029

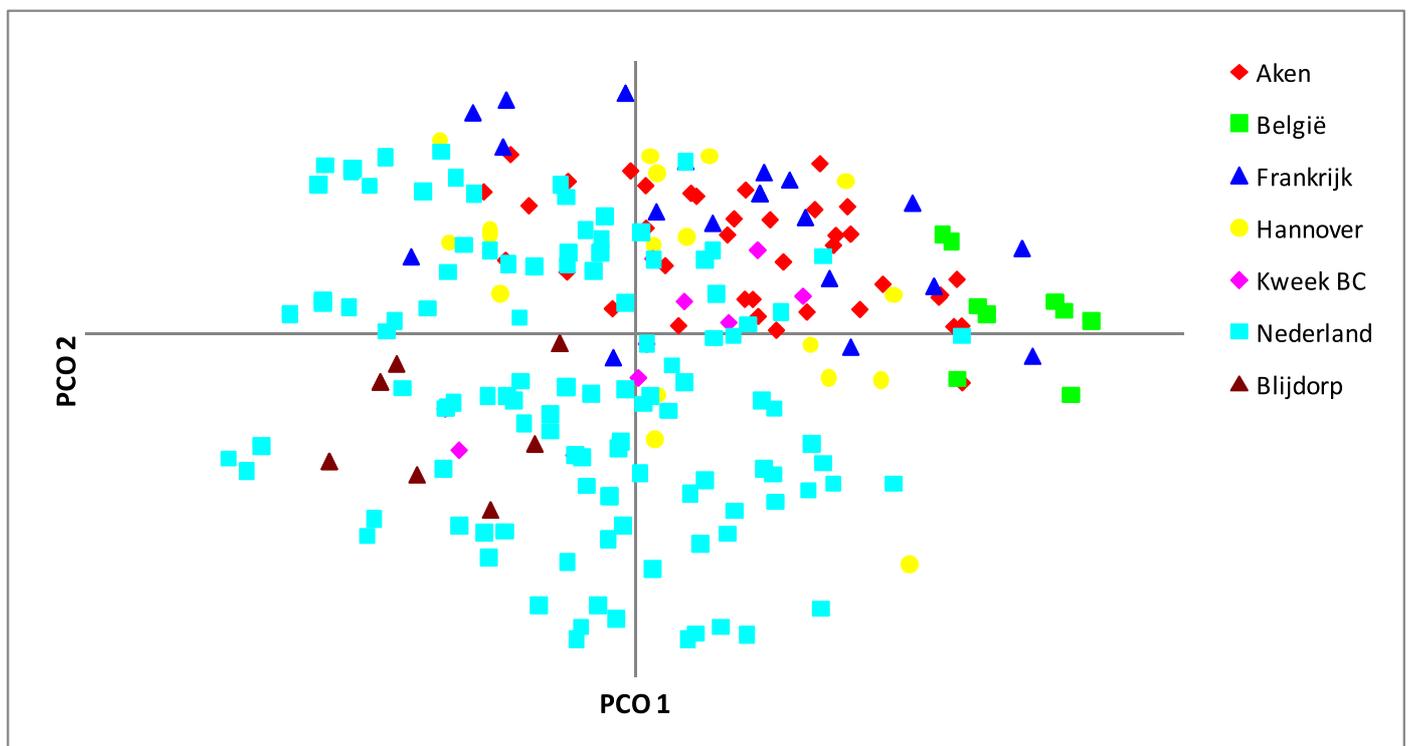
3.2.2 Principale Coördinaten Analyse

Bij de Principale Coördinaten Analyse wordt een weergave voorgesteld in twee dimensies (figuren 9 t/m 13). Deze twee assen verklaren de meeste variatie. Het is echter mogelijk dat individuen (punten) die dicht bij elkaar worden geplotted in deze X-Y grafiek in werkelijkheid op de niet weergegeven Z-as (3^e dimensie) uit elkaar liggen.

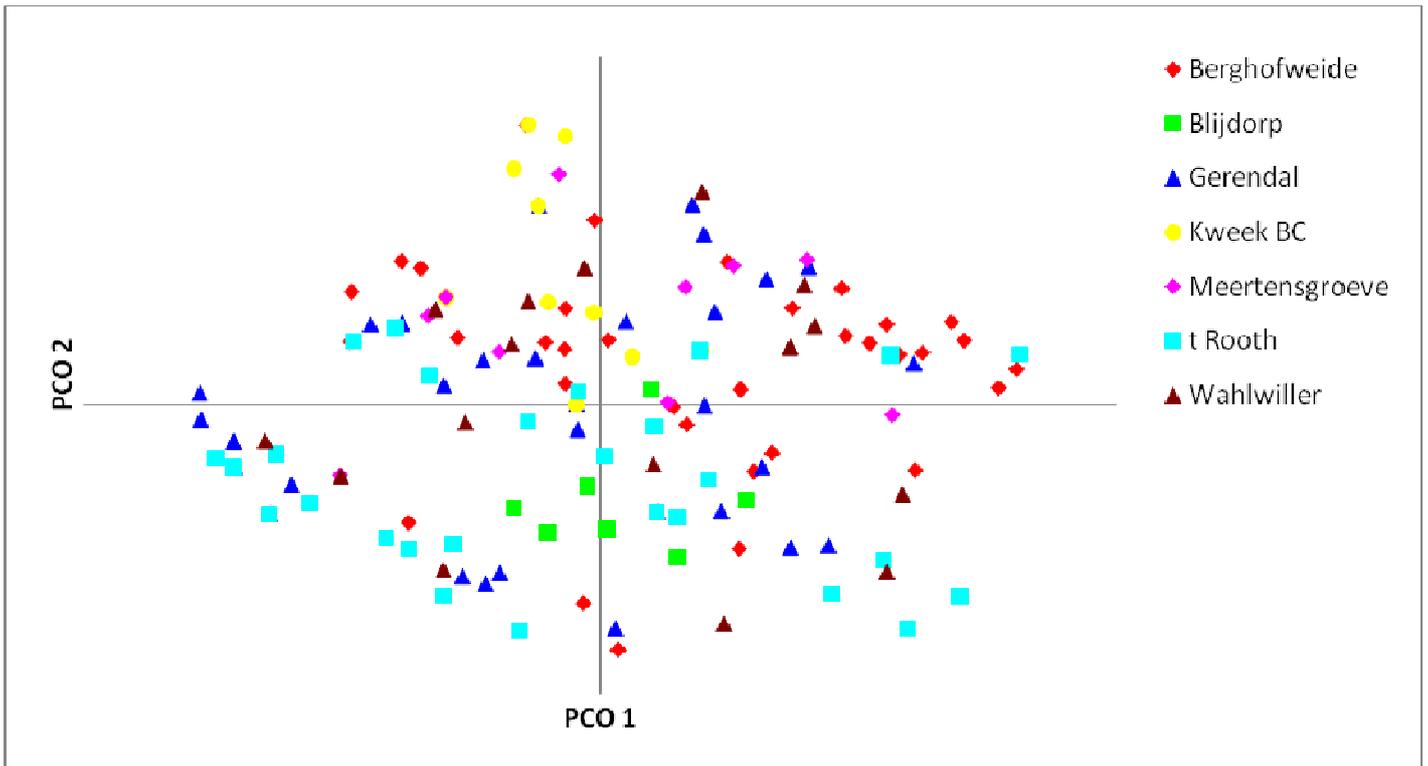
In figuur 9 zijn alle bemonsterde populaties en hun genetische variatie weergegeven. Het tweede figuur (figuur 10) bevat dezelfde informatie, maar dan met een weergave op landsniveau (met uitzondering van Hannover en Aken). In het figuur is te zien dat België een eigen cluster vormt, afgezien van de lichte overlap met Frankrijk en Aken (Duitsland). Verder valt op dat Blijdorp omringd ligt door monsters uit Nederland. Nederland is goed onderscheidbaar van Frankrijk, Hannover en Aken, die gezamenlijk in dit figuur min of meer een eigen cluster lijken te vormen (figuur verklaart slechts 47.81% van alle variatie). De monsters uit het Nederlandse kweekprogramma (Ben Crombaghs) zijn vooral terug te vinden tussen de Nederlandse monsters. Uit figuur 11 komt duidelijk naar voren dat de Nederlandse populaties veel overlap met elkaar vertonen en niet goed van elkaar te onderscheiden zijn op basis van deze data. Verder toont dit figuur, net als figuur 10, dat de Blijdorpse monsters midden tussen de Nederlandse populaties liggen. Figuur 12 is afgeleid uit figuur 10, om zo een beter beeld te geven van waar de mogelijke oorsprong ligt van het Nederlandse kweekprogramma (Ben Crombaghs). In het figuur is te zien dat de kweek een overeenkomst toont met de Nederlandse populaties, maar ook een aantal geelbuikvuurpadden bevat die meer overeenkomst lijken te vertonen met de populatie van Aken. Het laatste figuur, figuur 13, toont de Duitse populaties. In dit figuur is te zien dat Doberg duidelijk een eigen groep lijkt te zijn en dat de Aken populaties vooral het bovenste gedeelte van het figuur beslaan, terwijl de Hannover populaties vooral in het onderste deel van het figuur liggen.



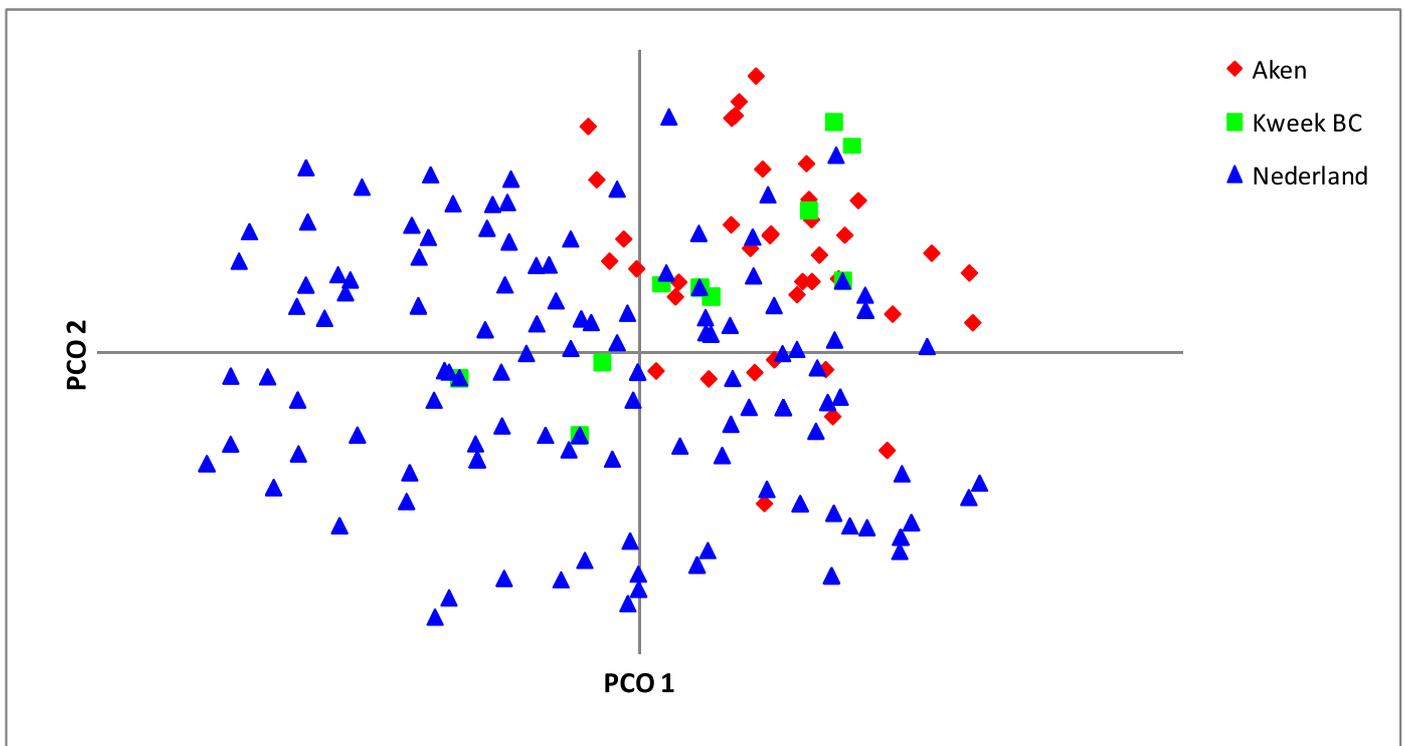
Figuur 9. Scores van individuele geelbuikvuurpad genotypes van alle bemonsterde populaties (weergave per populatie) op de eerste twee assen van een Principale Coördinaten Analyse. De assen verklaren 47.87 % van de totale variatie.



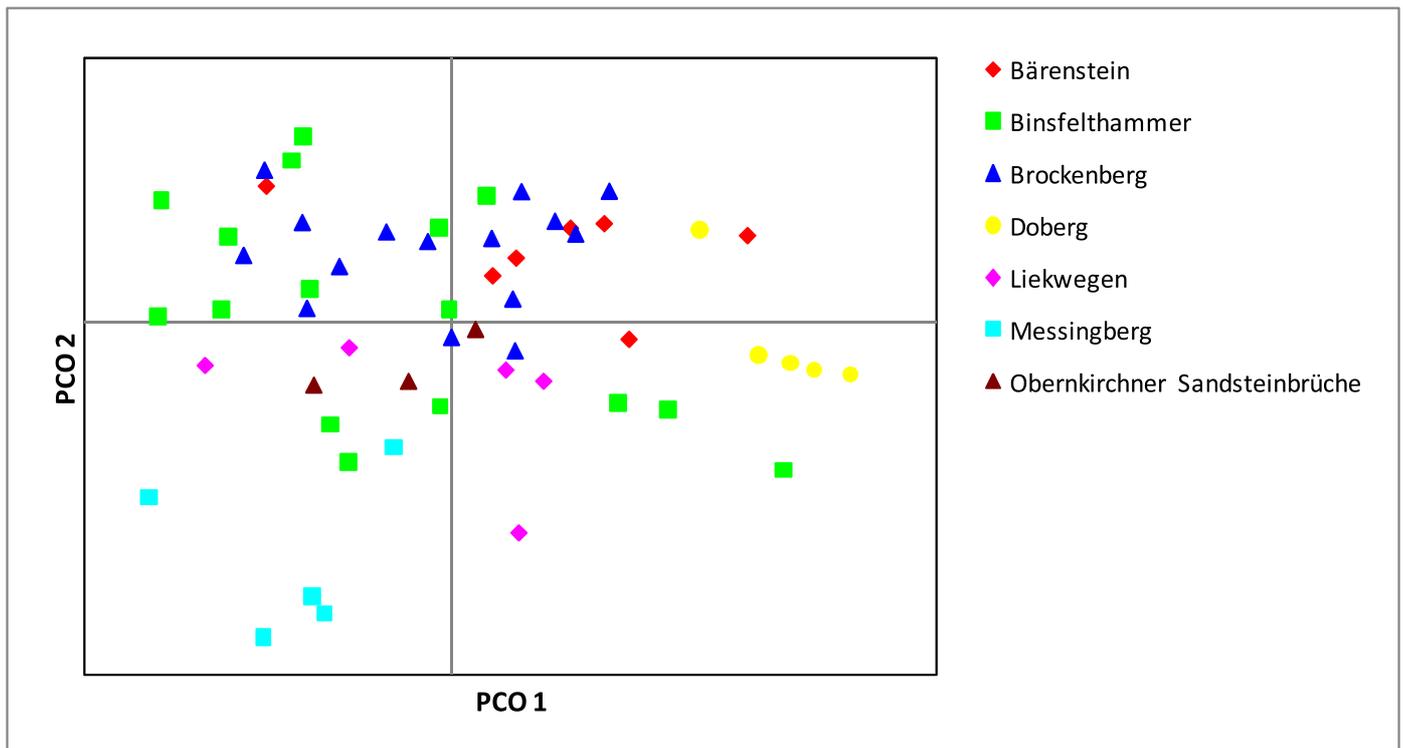
Figuur 10. Scores van individuele geelbuikvuurpad genotypes van alle bemonsterde populaties (weergave per land of herkomst, met uitzondering van Duitsland, dat is opgedeeld in de regio's Hannover en Aken) op de eerste twee assen van een Principale Coördinaten Analyse. De assen verklaren 47.81% van de totale variatie.



Figuur 11. Scores van individuele geelbuikvuurpad genotypes van alle Nederlandse bemonsterde populaties (weergave per populatie) op de eerste twee assen van een Principale Coördinaten Analyse. De assen verklaren 48,80 % van de totale variatie.



Figuur 12. Scores van individuele geelbuikvuurpad genotypes van de bemonsterde populaties uit Nederland, Aken en de kweek van Ben Crombaghs op de eerste twee assen van een Principale Coördinaten Analyse. De assen verklaren 49,83% van de totale variatie.



Figuur 13. Scores van individuele geelbuikvuurpad genotypes van de Duitse bemonsterde populaties op de eerste twee assen van een Principale Coördinaten Analyse. De assen verklaren 49.23% van de totale variatie.

3.2.3 Genetische differentiatie

Naast clusteranalyses is voor de dataset ook de mate van genetische differentiatie (F_{st}) tussen populaties berekend. De F_{st} varieert tussen 0 en 1: de populaties zijn identiek, i.e. de allelfrequenties voor de verschillende allelen zijn hetzelfde ($F_{st} = 0$) en maximale differentiatie, i.e. de populaties zijn gefixeerd voor verschillende allelen ($F_{st} = 1$). Hartl & Clark (1997) hanteren de volgende vuistregel voor interpretatie van F_{st} waarden: F_{st} van 0-0.05 geringe differentiatie; 0.05-0.15 matige differentiatie; 0.15-0.25 grote differentiatie en >0.25 zeer grote differentiatie. De differentiaties van de bemonsterde populaties, zijn terug te vinden in tabellen 6 en 7.

Uit tabel 6 blijkt dat er veel populaties zijn die in redelijke tot sterke mate genetisch van elkaar gedifferentieerd zijn. De monsters van de Belgische fokpopulatie, die uit Messingberg en Obernkirchner Sandsteinbrüche hebben een F_{st} van >0.15 ten opzichte van 12 van de 16 onderzochte populaties. Wanneer gekeken wordt naar de onderlinge verhoudingen tussen de Nederlandse populaties blijkt er slechts sprake te zijn van een geringe tot matige differentiatie (<0.15). Op landsniveau (tabel 7) vertoont de Nederlandse populatie ook slechts een geringe genetische differentiatie, met als enige uitzondering ten opzichte van België ($F_{st}=0.18$). De monsters uit Blijdorp tonen een matige differentiatie ten opzichte van de Nederlandse populaties, als ook ten opzichte van het Nederlandse Kweekprogramma, terwijl deze monsters een grote differentiatie vertonen ten opzichte van de overige bemonsterde (referentie) populaties. Verder toont deze tabel dat België een grote tot zeer grote genetische differentiatie (>0.15) heeft ten opzichte van de andere populaties. De populaties uit de omgeving van Aken hebben ten opzichte van elkaar een F_{st} van <0.15 (geringe tot matige differentiatie). Wanneer gekeken wordt naar de populaties uit de omgeving van Hannover, valt de zeer grote onderlinge genetische differentiatie meteen op. Wanneer de Hannover populatie wordt vergeleken met de andere populaties op landsniveau valt op dat er een geringe tot matige differentiatie heeft plaats gevonden (zie tabel 7). De meest extreme genetische differentiatie wordt waargenomen bij de populatie uit Doberg. Deze populatie vertoont vier maal een zeer grote genetische differentiatie (>0.25) waarvan twee maal ten opzichte van een naast gelegen buurpopulatie. De monsters uit het Nederlandse kweekprogramma zijn zeer uniform en

vertonen slechts een grote genetische differentiatie ten opzichte van drie populaties, namelijk het Belgische kweekprogramma, Messingberg en Obernkirchner Sandsteinbrüche.

Tabel 6. Genetische differentiatie (Fst) van geelbuikvuurpad populaties per bemonsterde populatie. Vet = Fst >0,15 // Vet en onderlijnt = Fst >0,25: redelijke tot grote onderlinge genetische differentiatie, (Fst waardes staan onder de diagonaal). Achter de populatienamen staat tussen haken ten opzichte van hoeveel populaties de betreffende populatie een redelijke tot grote genetische differentiatie heeft (Fst > 0,15).

	Bärenstein	België	Berghofwei	Binsfelthammer	Blijdorp	Brockenberg	Frankrijk	Doberg	Gerendal	Kweek BC	Liekwegen	Meertensgroeve	Messingberg	Obernkirchner Sandsteinbrüche	't Rooth	Wahlwiller
Bärenstein (7x)	0.00															
België (12x)	0.22	0.00														
Berghofwei (5x)	0.11	0.21	0.00													
Binsfelthammer (2x)	0.07	0.11	0.08	0.00												
Blijdorp (9x)	0.17	0.34	0.07	0.15	0.00											
Brockenberg (3x)	0.10	0.12	0.12	0.05	0.21	0.00										
Frankrijk (7x)	0.17	0.20	0.17	0.10	0.25	0.09	0.00									
Doberg (11x)	0.16	0.38	0.21	0.18	0.26	0.16	0.22	0.00								
Gerendal (3x)	0.10	0.22	0.03	0.08	0.08	0.10	0.12	0.12	0.00							
Kweek BC (3x)	0.08	0.17	0.04	0.07	0.14	0.08	0.12	0.15	0.04	0.00						
Liekwegen (1x)	0.11	0.12	0.10	0.06	0.15	0.07	0.08	0.14	0.08	0.09	0.00					
Meertensgroeve (3x)	0.08	0.15	0.02	0.06	0.11	0.07	0.11	0.14	0.03	0.01	0.07	0.00				
Messingberg (12x)	0.21	0.18	0.16	0.15	0.17	0.19	0.19	0.31	0.17	0.20	0.10	0.16	0.00			
Obernk. Sandst. (12x)	0.21	0.20	0.22	0.12	0.23	0.11	0.17	0.28	0.17	0.20	0.12	0.18	0.21	0.00		
't Rooth (5x)	0.15	0.25	0.06	0.10	0.10	0.13	0.12	0.18	0.04	0.08	0.09	0.06	0.16	0.22	0.00	
Wahlwiller (3x)	0.13	0.18	0.04	0.07	0.12	0.11	0.11	0.21	0.03	0.06	0.07	0.04	0.14	0.19	0.04	0.00

Tabel 7. Genetische differentiatie (Fst) van geelbuikvuurpad populaties per land. Vet = Fst >0,15 // Vet en onderlijnt = Fst >0,25: redelijke tot grote onderlinge genetische differentiatie, (Fst waardes staan onder de diagonaal). Achter de populatienamen staat tussen haken ten opzichte van hoeveel populaties de betreffende populatie een redelijke tot grote genetische differentiatie heeft (Fst > 0,15).

	Aken	België	Frankrijk	Hannover	Kweek BC	Nederland	Blijdorp
Aken (1x)	0,00						
België (4x)	0,11	0,00					
Frankrijk (2x)	0,09	0,20	0,00				
Hannover (0x)	0,04	0,12	0,08	0,00			
Kweek BC (1x)	0,06	0,17	0,12	0,09	0,00		
Nederland (1x)	0,06	0,18	0,10	0,05	0,04	0,00	
Blijdorp (3x)	0,16	0,34	0,25	0,10	0,14	0,07	0,00

4 Discussie, conclusies & aanbevelingen

De volgende vragen zijn tijdens deze studie onderzocht: 1) Hoe verhoudt de genetische variatie en genetische differentiatie van de Nederlandse populaties zich onderling en ten opzichte van referentie populaties uit de Europese regio's? 2) Is de algehele Nederlandse populatie vanuit genetisch oogpunt levensvatbaar en, indien niet, hoe zou deze ondersteund kunnen worden? 3) Zijn er indicaties van (illegale) bijplaatsing en zijn deze te herleiden (tot bijvoorbeeld de Blijdorpse populatie, oorspronkelijk uit Slovenië)? In dit hoofdstuk worden de resultaten bediscussieerd en eventuele aanbevelingen gemaakt naar aanleiding van de getrokken conclusies.

4.1 Genetische variatie, verwantschap en differentiatie

4.1.1 De Nederlandse populaties onderling

De bemonsterde Nederlandse populaties (Meertensgroeve, Wahlwiller, Gerendal, Berghofwei en 't Rooth) zijn onderling vergeleken op basis van genetische variatie, genetische verwantschap en genetische differentiatie. Op basis van het verspreidingsvermogen van de soort, juveniele tot 800 meter en adulten tussen seizoenen tot 250 a 300 meter (zie paragraaf 1.1), kan verwachting worden dat de onderzochte Nederlandse populaties genetisch geïsoleerd van elkaar liggen en er dus geen genetisch materiaal uitgewisseld wordt tussen de populaties, zonder invloed van buitenaf. Dit in combinatie met het feit dat de resterende Nederlandse geelbuikvuurpad populaties over de afgelopen jaren lage aantallen heeft gekend in het aantal individuen waaruit deze populaties bestonden, vergroot de kans dat de populaties geërodeerd (genetisch verarmt) zijn geraakt door genetische drift. Aangezien genetische drift een grote invloed heeft op populaties met een beperkt aantal individuen, waardoor er makkelijk allelen kunnen verdwijnen (zie paragraaf 1.3). Dit betekent dat er een relatief lage genetische variatie wordt verwacht als ook dat de populaties genetische sterk gedifferentieerd zullen zijn.

Uit de resultaten komt er echter naar voren dat, op basis van de genetische variatie, er geen duidelijk onderscheid is te maken tussen de Nederlandse populaties. Dit valt af te leiden uit het feit dat er geen echte verschillen zijn te vinden in de waardes van het gemiddelde aantal allelen binnen een populatie, het aantal effectieve allelen binnen een populatie, de verwachte heterozygositeit binnen een populatie, de waargenomen heterozygositeit binnen een populatie, de fixatie-index van een populatie en het percentage polymorfismen in een populatie (zie resultaten paragraaf 3.1). Het feit dat de Nederlandse populaties een vergelijkbare genetische variatie hebben betekend echter niet dat de populaties ook identiek zijn. Om te zien of de populaties daadwerkelijk op elkaar lijken, moet gekeken worden naar de genetische verwantschap en de genetische differentiatie.

Op basis van de genetische verwantschap (Bayesian Cluster Analyse en Principale Coördinaten Analyse) en differentiatie (AMOVA) analyses, die gedurende deze studie zijn uitgevoerd, valt te stellen dat de Nederlandse populaties grote overeenkomsten met elkaar vertonen. Dit betekent niet dat de populaties allemaal gelijk aan elkaar zijn, maar dat de verschillende populaties een sterke overlap vertonen met elkaar zodanig dat ze dus niet individueel te onderscheiden zijn van elkaar (zie paragraaf 3.2).

Zowel de genetische variatie als de genetische verwantschap en differentiatie tonen aan dat de Nederlandse populaties slecht tot niet van elkaar te onderscheiden zijn. Dit is in tegenstelling tot wat verwacht is, op basis van de sterke mate van isolatie en de geringe populatieomvang in de afgelopen decennia, zoals hierboven beschreven, die onder natuurlijke omstandigheden tot genetische verarming en differentiatie zou moeten leiden. Een goede verklaring voor dit verschil tussen verwacht en waargenomen zou te vinden kunnen zijn in de vele uitzettingen die er hebben plaats gevonden door de jaren heen. Zo blijkt uit bijlage I dat er door de jaren heen regelmatig introducties en herlocaties hebben plaatsgevonden. Dit heeft waarschijnlijk geleid tot het in stand houden van de genetische verwantschap tussen de resterende Nederlandse populaties. De overeenkomsten kunnen

zijn ontstaan doordat individuen vanuit een buitenlandse populatie (buitenlands genetisch materiaal), direct dan wel indirect, in meerdere Nederlandse populaties terecht zijn gekomen of doordat individuen uit een Nederlandse populatie zijn weggevangen en deze in een andere Nederlandse populatie zijn geïntroduceerd. Het meest waarschijnlijk is een combinatie van de twee methodes, dus zowel buitenlands individuen die zijn toegevoegd aan de huidige Nederlandse populaties als verplaatsingen van Nederlandse individuen. Bij deze acties zullen alle Nederlandse populaties betrokken moeten zijn geweest, aangezien er geen aanwijzingen zijn dat er populaties zijn die wel echt afwijken van de andere resterende Nederlandse populaties.

4.1.2 Nederland t.o.v. de referentie populaties

Uit de vorige paragraaf komt naar voren dat de Nederlandse populaties genetisch verwant aan elkaar zijn en hierdoor niet te onderscheiden zijn van elkaar. De mogelijke oorzaak zou liggen in het feit dat er door de jaren heen vele dieren zijn geïntroduceerd en geherlocaliseerd. Dit zou betekenen dat het vermoeden dat de genetische variatie binnen de Nederlandse populaties laag is, onjuist is, aangezien er dus meerdere malen variatie van buitenaf is toegevoegd aan de populaties, wat het effect van genetische drift teniet kan hebben gedaan. Om dit te controleren, kan gekeken worden naar de genetische variatie van de Nederlandse populaties ten opzichte van de in deze studie gebruikte referentie populaties. Verder is het ook interessant om te zien hoe de Nederlandse populatie als een geheel (hier Nederlandse populatie genoemd) zich ten opzichte van referentie populatie uit de Europese regio's verhoudt qua genetische verwantschap en differentiatie.

Qua genetische variatie doet de Nederlandse populatie niet onder voor de, in deze studie gebruikte, referentie populaties. Alle onderzochte populaties hebben een vergelijkbare genetische variatie, met uitzondering van het Belgische kweekprogramma en de Franse populatie, welke een lagere genetische variatie vertonen. Dit resultaat sluit aan bij de verwachting die gebaseerd is op het feit dat er door de jaren heen meerdere malen dier zijn geïntroduceerd en geherlocaliseerd. Het is dus aannemelijk dat, door het regelmatige introduceren van 'nieuw' genetisch materiaal, de effecten van de isolatie en het dalende aantal dieren in een populatie zijn tegen gegaan. De Nederlandse populaties lijken dus relatief gezond, zeker in verhouding met het Belgische kweekprogramma en hebben een vergelijkbare variatie met Aken, Hannover, Blijdorp (Slovenië?) en het Nederlands kweekprogramma (zie resultaten paragraaf 3.1).

Om te zien of de Nederlandse populatie een uniek cluster vormt ten opzichte van de referentie populaties, is er gekeken naar de genetische verwantschap en differentiatie. Uit de resultaten blijkt dat er een zeker onderscheid te maken is tussen de Nederlandse populatie en de referentie populaties. Uit de Bayesian Cluster Analyse en de Principale Coördinaten Analyse komt duidelijk naar voren dat de Nederlandse populatie op zichzelf een groep vormt. Wel valt er een referentie populatie midden in dit cluster bij beide analyses, namelijk de monsters uit Blijdorp (Slovenië?). Dit sluit aan bij de conclusie uit de vorige paragraaf (4.1.1) dat er in het verleden buitenlands materiaal is ingebracht in de Nederlandse populaties. Uit de informatie verstrekt door RAVON (bijlage I), komt naar voren dat in het verleden meerdere malen dieren uit de Balkan en ook uit Slovenië (specifiek) in enkele Nederlandse populaties zijn uitgezet. Uit waarnemingen is naar voren gekomen dat deze dieren zich ook hebben weten te vestigen in deze populaties (de dieren vertonen een herkenbaar afwijkend unken-reflex). De combinatie van het vestigen van Balkan materiaal en het feit dat er in Nederland herplaatsingen tussen populaties hebben plaatsgevonden, zou kunnen verklaren waarom er een dergelijk grote overeenkomst is tussen alle Nederlandse populaties en de Blijdorp (Slovenië?) referentie monsters.

Al met al vertoont de Nederlandse populatie een matige differentiatie met de verschillende referentie populaties, iets wat aansluit bij de resultaten van de Bayesian Cluster Analyse en de Principale Coördinaten Analyse (zie resultaten paragraaf 3.2). Er werd echter een grotere differentiatie verwacht op basis van de conclusie dat de resterende Nederlandse populaties zuiver geïsoleerd liggen ten opzichte van de, in deze studie gebruikte, referentie populaties. Van een geïsoleerde populatie is de verwachting dat deze een sterke differentiatie vertoont wanneer vergeleken met de referentie populaties na een langere periode van isolatie, gedurende welke de

geïsoleerde populatie slechts uit een beperkt aantal individuen bestaat. Het resultaat kan op twee manieren verklaard worden. De Nederlandse populatie is niet geïsoleerd (geografisch vrijwel onmogelijk), of er heeft meer introductie van buitenlands materiaal plaats gevonden dan alleen de introductie van Sloveens materiaal. Deze laatste verklaring lijkt plausibel, en lijkt te worden ondersteund door de genetische verwantschap tussen het Nederlandse kweekprogramma en de Aken populaties. Er blijkt namelijk uit zowel de Bayesian Cluster Analyse en de Principale Coördinaten Analyse (zie resultaten paragraaf 3.2; in het bijzonder figuur 12) dat het Nederlandse kweekprogramma overeenkomsten vertoont met de Aken populaties. Echter wanneer er gekeken wordt naar de genetische differentiatie tussen de twee groepen, vertonen deze gemiddeld een matige differentiatie. Het Nederlandse kweekprogramma en de Nederlandse vertonen populatie een geringe differentiatie. Wanneer er gekeken wordt naar de genetische differentiatie lijkt het Nederlandse kweekprogramma dus meer op de Nederlandse populaties dan op de populaties uit Aken. Het moge duidelijk zijn dat dit geen sluitend bewijs is, maar dat er mogelijk meer invloeden van buiten Nederland zijn binnen de Nederlandse populatie. Bij navraag bleek dat dhr. Ben Crombaghs zelf geen kennis had van dieren uit Aken in zijn kweekgroep. Wel erkende hij dat het mogelijk was dat hij per ongeluk, eerder illegaal uitgezette dieren op heeft genomen in het Nederlandse kweekprogramma.

4.1.3 Referentie populaties

Om te kijken hoe sterk de gevonden resultaten zijn, is het nuttig om ook de gebruikte referentie populaties onder de loep te nemen en te kijken naar vergelijkbare studies. Door te kijken naar vergelijkbare studies, valt er alleen wat te zeggen over de genetische variatie. Zo lijkt het erop dat de genetische variatie van een boomkikker (*Hyla arborea*) populatie aanzienlijk hoger te zijn dan die van de in deze studie bestudeerde geelbuikvuurpad populatie. Deze conclusie is gebaseerd op twee publicatie uit 2006, namelijk Krug en Arens *et al.* (Weihmann *et al.*, 2009). Nou zou dit kunnen betekenen dat de gevonden waardes in deze studie aan de lage kant zijn, maar dit lijkt niet het geval aangezien de studie van Weihmann *et al.* (2009) vergelijkbare, hooguit iets hogere, waardes heeft opgeleverd voor meerdere populaties uit zuidelijk Neder Sachsen. Dit benadrukt nog maals dat welke waardes acceptabel zijn, afhankelijk is van de gebruikte loci en de soort die wordt bestudeerd.

Ook al zijn de gevonden waardes mogelijk acceptabel, er zijn toch een aantal kanttekeningen te plaatsen betreffende de gebruikte referentie populaties. Zo bleek gedurende de studie dat het niet met zekerheid te zeggen is of de monsters verkregen van Blijdorp ook echt referentie materiaal is voor een Sloveense populatie. Niet alleen omdat het slechts een beperkt aantal individuen betreft en dit dus slechts een zeer beperkte selectie betreft van genetisch materiaal uit een bestaande populatie. Ook voornamelijk omdat het niet echt duidelijk is of de individuen ook echt een oorsprong hebben in Slovenië. Bij navraag bleek dat de dieren via derden bij Blijdorp terecht zijn gekomen. Deze derden hadden, voor zover RAVON kon nagaan, geen contacten in Limburg en het is dus zeer aannemelijk dat de dieren toch oorspronkelijk uit Slovenië komen, maar deze conclusie is niet met 100% zekerheid te trekken op basis van deze referentie monsters.

Naast het zogenoemde Sloveense materiaal is er ook wat aan te merken op een aantal van de andere referentie populaties. Zo zijn de populaties in Aken en Hannover intensief in de gaten gehouden en zijn er voor deze populaties ook verscheidene maatregelen genomen om deze populaties te behouden, waaronder uitwisselingen rond Hannover (Mededeling Heike Pröhl) en de aanleg van kunstmatige poelen rond Aken. De grote genetische differentiatie tussen de populaties uit de omgeving van Hannover doet vermoeden dat er hier veel bijplaatsing heeft plaatsgevonden. Dit vermoeden wordt nogmaals benadrukt door het feit dat, wanneer de Hannover populatie als geheel vergeleken wordt met de overige bemonsterde populaties, er slechts een beperkte differentiatie wordt gevonden. Wanneer men kijkt naar de genetische differentiatie van de populatie uit Doberg, valt op dat deze vier maal een zeer grote differentiatie vertoont ten opzichte van de andere bemonsterde populaties, waarvan twee maal met een naast gelegen buurpopulatie. Dit kan haast niet natuurlijk zijn ontstaan. Deze bevinding wordt nogmaals ondersteund door de bevindingen in de studie van Weihmann *et al.* (2009).

Ook wat betreft de Franse en Belgische referentie populaties zijn opmerkingen te plaatsen. Zo was uit Frankrijk slechts materiaal uit een enkele populatie (omgeving Creuse) beschikbaar, maar van deze populatie waren wel voldoende monsters beschikbaar (zie tabel 1). Deze referentie populatie zou vitaal zijn qua populatieomvang en fragmentatie. Dit blijkt echter niet duidelijk uit het gering aantal aangetroffen effectieve allelen, het percentage heterozygositeit en de fixatie index. Deze waarden suggereren enige mate van isolatie en een niet optimale populatieomvang, wat op langere termijn mogelijk zou kunnen leiden tot genetische erosie en/of differentiatie. Mogelijk is de populatie in de laatste jaren licht onder druk komen te staan. Ook de Belgische monsters kwamen slechts uit een populatie, maar dit heeft als reden dat de Belgische geelbuikvuurpadden populatie slechts nog bestaat uit het huidige kweekprogramma in combinatie met slecht een aantal geërodeerde populaties. De resultaten van deze studie tonen aan dat dit kweekprogramma, welke ontstaan is uit een geërodeerde populatie in de regio Luik, genetisch is verarmt en als zodanig gedifferentieerd is als gevolg van de te kleine populatie omvang en de volledige isolatie van de populatie.

4.2 Levensvatbaarheid Nederlandse populaties

Om te zien of de Nederlandse populaties genetisch gezien levensvatbaar zijn, moet er gekeken worden naar de genetische variatie die resteert in deze populaties. Uit de voorgaande paragrafen wordt het duidelijk dat de Nederlandse populaties, ook al zijn het geografisch gescheiden populaties, op genetisch vlak als een groot geheel kunnen worden gezien, waarbinnen geen onderscheid valt te maken tussen deze populaties. Verder blijkt ook dat de waardes voor de genetische variatie, van deze resterende populaties in Nederland, zich in een vergelijkbare orde van grote bevindt als de waardes gevonden voor de gebruikte referentie populaties en dat deze gevonden waardes vergelijkbaar zijn aan die gevonden in de studie van Weihmann *et al.* waarbij dezelfde loci zijn gebruikt. Op basis van deze bevindingen kan geconcludeerd worden dat qua genetische variatie de resterende Nederlandse populaties levensvatbaar zouden kunnen zijn. Toch zal er wat moeten veranderen willen de resterende Nederlandse populaties ook echt levensvatbaar zijn. Dit omdat de gevonden waardes waarschijnlijk eerder het gevolg zullen zijn van invloed van buitenaf. Zo zijn er door de jaren heen grote hoeveelheden aan individuen bijgeplaatst, dan wel verplaatst, in de nog resterende populaties. Dit heeft naar alle waarschijnlijkheid de genetische variatie in de populaties kunstmatig hoog gehouden. Wanneer er geen individuen tussen populaties geherlocaliseerd en/of van buitenaf geïntroduceerd zullen worden in de toekomst is de kans groot dat de genetische variatie van de resterende populaties ook snel zullen dalen en de populaties als nog genetisch verarmd zullen raken, zoals met de resterende Belgische populatie (kweekprogramma) is gebeurd. Om dit tegen te gaan moet er een 'natuurlijke' manier van uitwisseling worden gevonden tussen de nog resterende populaties en moet de soort beschermd blijven zodat het aantal individuen per populatie zich kan herstellen.

4.3 Bijplaatsing

In de vorige paragraaf komt nogmaals duidelijk naar voren dat bijplaatsing een belangrijke rol heeft gespeeld in het tot stand komen van de huidige Nederlandse populaties. Om duidelijk te kunnen zien in hoeverre de resterende Nederlandse populaties zijn beïnvloed door bijplaatsing is het nodig om te weten hoe de Nederlandse populatie er vroeger heeft uitgezien qua genetische opmaak. Zoals al eerder vermeld is het helaas niet gelukt om bruikbaar materiaal te verkrijgen uit historisch materiaal verkregen van Nationaal Natuurhistorisch museum Naturalis, waardoor het vrijwel onmogelijk is precies te zeggen in hoeverre de Nederlandse populatie veranderd is. Echter is het wel mogelijk om een indicatie te geven en te zien welke referentie populaties een invloed hebben gehad op de huidige Nederlandse populatie.

Uit de gevonden resultaten komt naar voren dat er mogelijk nog wel unieke Nederlandse allelen aanwezig zijn in de huidige populaties (zie figuur 7). Echter kunnen deze allelen ook afkomstig zijn uit een andere, niet in deze studie meegenomen, populatie zijn (bijvoorbeeld een andere geografische

regio). Het is aannemelijk dat alle Nederlandse populaties tegenwoordig bestaan uit een combinatie van historisch en buitenlands genetisch materiaal. Maar ook al zouden het unieke allelen zijn, afkomstig uit de historische Nederlandse populatie, het blijft duidelijk dat alle Nederlandse populaties invloeden van buitenaf vertonen. De Nederlandse populaties zijn erg heterogeen en vertonen overeenkomsten met veel van de referentie populaties. De meest opvallende overeenkomst is degene met de referentie monsters verkregen van Blijdorp. Dit aangezien het hier naar alle waarschijnlijkheid gaat om Sloveens materiaal en de overeenkomst hiermee groter is dan met bijvoorbeeld buurpopulaties als België en Duitsland (Aken en Hannover). Dit is niet te verklaren op een natuurlijke wijze en is dus een sterke indicatie van bijplaatsing, dit sluit aan bij het artikel aangeleverd door RAVON (zie bijlage I). Verder is er mogelijk ook een invloed vanuit Aken, vooral terug te zien in het Nederlandse kweekprogramma. Al met al geeft deze studie een duidelijke indicatie van herintroductie/ uitzettingen van geelbuikvuurpadden. Hoe de introducties en herlocaties precies hebben plaats gevonden is niet duidelijk te concluderen uit deze studie.

4.4 Conclusie en Aanbevelingen

Uit de voorgaande paragrafen kan het geconcludeerd worden dat de resterende Nederlandse geelbuikvuurpad populaties veel overeenkomsten met elkaar vertonen, en als zodanig dus ook niet van elkaar te onderscheiden zijn. Het wordt ook duidelijk dat de Nederlandse populatie een heterogene populatie is, wanneer vergeleken met de referentie populaties in deze studie gebruikt en dat de genetische variatie niet onder doet voor die gevonden voor deze referentie populaties. Deze uitkomsten sluiten nauw aan bij bijlage I en het is dan ook aannemelijk dat er veel invloed van buitenaf is geweest bij het tot stand komen van de huidige Nederlandse geelbuikvuurpad populaties. Ook al is deze studie een duidelijke indicatie dat er geen echt (historische) Nederlandse geelbuikvuurpad populatie meer bestaat, de huidige populaties bevatten nog wel genetisch materiaal dat in geen enkel van de referentie populaties is terug gevonden.

Uit deze studie blijkt duidelijk dat de Nederlandse geelbuikvuurpad populatie een kans heeft om te blijven bestaan, maar hiervoor zijn echter wel een aantal acties vereist. Zo is het belangrijk dat, om de Nederlandse populaties in stand te houden, er veel aandacht wordt besteed aan het naleven van de huidige beschermingsplannen wat betreft habitat bescherming. Dit aangezien er een 'natuurlijke' manier moet worden gevonden om de isolatie van de huidige populaties tegen te gaan en om te zorgen dat de huidige populaties in aantallen toe kunnen nemen. Op deze wijze kunnen de Nederlandse populaties in de toekomst ook gezond blijven. Hiervoor is het ook nuttig om op een regelmatige basis de genetische samenstelling te blijven monitoren, welke vergeleken kan worden met de huidige resultaten. Op langere termijn kan zo een beter beeld verkregen worden van de stand van zaken (genetische effecten waarnemen van genomen maatregelen). Daarnaast is het nuttig om bij een vervolgstudie de volgende punten ook mee te nemen om een hogere nauwkeurigheid te waarborgen: grotere sample size, extra loci bekijken, meerder referentie populaties, zuiver Sloveens materiaal (direct uit Slovenië) en er zou kunnen gekeken worden naar het gebruik van meer conservatief DNA, zoals mtDNA.

Dankwoord

Bij deze wil ik namens Alterra – Centrum voor Ecosystemen en mijzelf de mensen bedanken welke dit onderzoek mede mogelijk hebben gemaakt. Voor hun inzet en expertise bij de monsternamen wil ik Ben Crombaghs (Natuurbalans – Limes Divergens) en Wilbert Bosman (RAVON) bedanken. Daarnaast wil ik Ben Crombaghs ook nog bedanken voor het beschikbaar stellen van monsters uit het Nederlandse kweekprogramma, als ook monsters uit de Franse populatie, en Wilbert voor het aanleveren van de achtergrondinformatie namens RAVON (bijgevoegd in bijlage I). Naast Ben Crombaghs en Wilbert Bosman wil ik ook de volgende mensen en/of instanties bedanken: Heike Pröhl, Arnaud Laudelot (Natagora), Nationaal Natuurhistorisch museum Naturalis en Diergaarde Blijdorp. Heike Pröhl, voor het verstrekken van monster van de Hannover populaties. Arnaud Laudelot (Natagora) voor het leveren van monsters van het Belgische kweekprogramma. Nationaal Natuurhistorisch museum Naturalis en Diergaarde Blijdorp voor het beschikbaar stellen van hun geelbuikvuurpad collectie voor monsterafname.

Naast bovengenoemde personen, wil ik de volgende begeleiders nog in het bijzonder bedanken: Hugh Jansman, Ivo Laros, Jan Bovenschen, Hans Peter Koelewijn en Fons Debets voor het mogelijk maken van deze thesis, als ook voor hun ervaring en kennis over de afgelopen periode op zowel werk, als persoonlijk gebied.

Referenties

Beebee, T.J.C. (2008) Buccal swabbing as a source of DNA from squamate reptiles. *Conservation Genetics*. Volume 9, pag. 1087-1088.

Bijlsma, R. (1995) *Moleculaire genetische technieken en natuurbeheer*. De Levende Natuur 96 (2).

Booy, G. (1988) *Het belang van genetische diversiteit voor de overleving van populaties*, literatuurstudie: 1-101. Rapport Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek. CPRO-DLO, Wageningen.

Broquet, T., Berset-Braendli, L., Emaresi, G. en Fumagalli, L. (2007) Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics*. Volume 8, pag. 509-511.

Crombaghs, B.D., Schut en A.K. (2009) Herintroductie Geelbuikvuurpad in Zuid-Limburg. Project op weg naar een duurzaam behoud van de Geelbuikvuurpad in het Mergelland. Natuurbalans - Limes Divergens BV, Nijmegen.

Frankham, R., J.D. Balou en D.A. Briscoe (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

Hartl, D.L. en A.G. Clark (1997) *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Hauswaldt, J.S., Schröder, C. en Riedemann, R. (2007) Nine new tetranucleotide microsatellite markers for the fire-bellied toad (*Bombina orientalis*). *Molecular Ecology Notes*. Volume 7, pag 49–52. Unit of Evolutionary Biology/Systematic Zoology, Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Germany.

Keller L.K. en D.M. Waller (2002) Inbreeding effects in wild populations. *TREE*. Volume 17, pag. 230-241.

Lenders, A.J.W. (2000) *Beschermingsplan vroedmeesterpad en geelbuikvuurpad 2000-2004*. Ministerie van Landbouw, natuurbeheer en Visserij, 's Gravenhage.

Peakall, R. en P.E. Smouse (2001) GenAlEx V5: *Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. Australian National University, Canberra, Australia.

Platform geelbuikvuurpad en vroedmeesterpad (2006) *Beschermingsplan vroedmeesterpad en geelbuikvuurpad, actieplan 2006-2010*. Natuurbalans - Limes Divergens BV & Stichting RAVON, Nijmegen.

Pritchard, J.K. en Stephens, M. en Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. Volume 155, pag. 945-959.

Smulders, M.J.M., P.F.P. Arens, H.A.H. Jansman, J. Buiteveld, G.W.T.A. Groot Bruinderink & H.P. Koelewijn; Herintroduceren van soorten, bijplaatsen of verplaatsen: een afwegingskader; gepubliceerd: 09 jan 2007; 69 pp.

Van Delft, J.J.C.W. en Creemers, R.C.M. (2009) *Nederlandse Fauna, De amfibieën en reptielen van Nederland*. KNNV, Uitgeverij.

Weihmann, F., Podlucky, R., Hauswaldt, S. en Pröhl, H. (2009) Natureschutzgenetische Untersuchungen von Populationen der Gelbbauckunke (*Bombina v. variegata*) im südlichen Niedersachsen. *Zeitschrift für Feldherpetologie*. Volume 16, pag. 183-200.

Bijlage I

**Een Historisch overzicht van de ontwikkelingen van de
geelbuikvuurpad populaties (Aangeleverd door RAVON).**

INHOUD

1	EEN HISTORISCH OVERZICHT	2
1.1	ONTWIKKELINGEN IN DE PERIODE 1950-2010.....	2
1.2	VEERTIG JAAR ACHTERUITGANG IN BEELD.....	3
1.2.1	De periode 1960-1980	3
1.2.2	De periode 1980-2000	4
2	HABITATHERSTEL EN (HER)INTRODUCTIES	6
2.1	Inleiding, habitatherstel en herintroductie	6
2.2	Herintroducties in Limburg	6
2.2.1	Uitzettingen in de periode 1970-2000	6
2.2.2	Uitzettingen in de periode 2000-2010	9
2.2.3	Aanbieding geelbuikvuurpaden uit Slovenië.....	9
2.3	Habitatherstel	11
3	POPULATIE ONTWIKKELING VAN DE GEELBUIKVUURPAD IN GROEVE 'T ROTH, JULIANA GROEVE, GERENDAL, BERGHOFWEI EN WAHLILLER.....	13
	LITERATUUR	18

1 EEN HISTORISCH OVERZICHT

1.1 ONTWIKKELINGEN IN DE PERIODE 1950-2010

De eerste waarneming van een Limburgse geelbuikvuurpad dateert uit 1889. In de eerste helft van de twintigste eeuw komen alle waarnemingen uit de streek ten oosten van de Maas en ten zuiden van de lijn Kerkrade-Maastricht. De soort lijkt in Zuid-Limburg algemeen voor te komen (CREMERS 1911, VAN WIJK 1946). Door publicaties van TER HORST (1959,1960), Van de Bund (1964) en met name door onderzoek van VAN NIEUWENHOVEN-SUNIER et al. (1965) ontstaat in de jaren 60 een nauwkeuriger beeld van de verspreiding. De soort wordt aangetroffen in de omgeving van het Savelsbosch, de rand van het plateau van Margraten, de omgeving Margraten-Sibbe-Schin op Geul-Stokhem, de omgeving Eys-Wijlre-Ubachsberg-Imstenrade, de streek tussen Geul en Gulp, de omgeving van Vijlen en de omgeving van Wolfhaag .

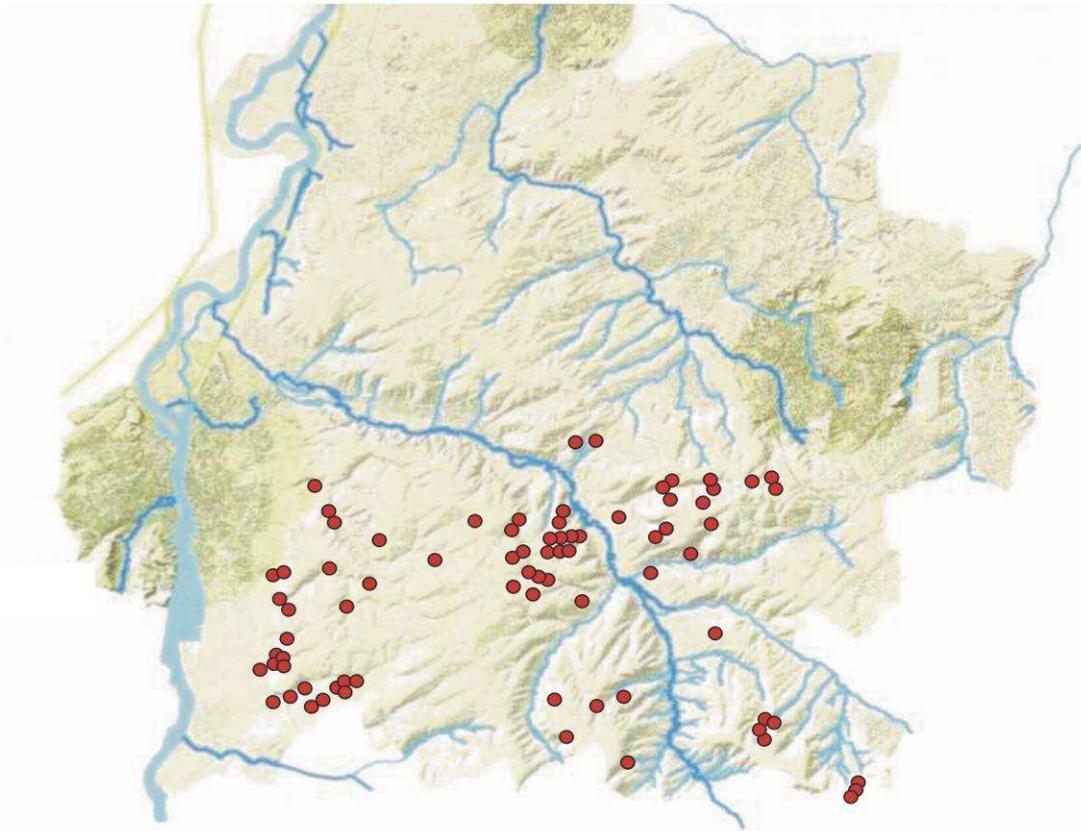
In de artikelen van TER HORST (1959; 1960) wordt het voorkomen van amfibieën in Zuid-Limburg in algemene zin en op gemeentelijk schaalniveau besproken. Toch wordt hierin al uitgewijd over de mate van bedreiging van sommige soorten. Aangegeven wordt dat de geelbuikvuurpad lange tijd *'een redelijk algemeen voorkomende soort'* was die *'plaatselijk met honderden tegelijk kon worden waargenomen'* (TER HORST, 1960).

Het eerste concrete verspreidingsbeeld van de geelbuikvuurpad wordt geschetst door VAN NIEUWENHOVEN-SUNIER et al. (1965). Zij vinden de soort in 80 van de 500 in de periode 1960-1961 onderzochte drinkbakken en poelen (figuur 1). De auteurs constateerden net als ter Horst dat de geelbuikvuurpad ogenschijnlijk weinig specifieke eisen stelt aan zijn milieu: *'Afgezien van de mogelijk oecologische binding aan bergland, schijnt de Geelbuikvuurpad weinig eisen aan haar milieu te stellen, men vindt de dieren in helder bronwater, maar evenzeer in de meest drabbige drinkpoelen'*.

Echt alarmerend zijn de berichten over het voortbestaan van amfibieën in die tijd nog niet. Toch wordt er wel degelijk al een achteruitgang geconstateerd. TER HORST (1960) merkt in zijn samenvatting op: *'Daar waar zij zich nog hebben kunnen handhaven komen de amfibie in betrekkelijk grote aantallen voor en de populaties blijven tamelijk stabiel. Dit geldt voornamelijk voor de Geelbuikvuurpad, de Vroedmeesterpad en de Alpenwatersalamander'*. De laatste zin vormt een aanwijzing dat de geelbuikvuurpad in die tijd lokaal misschien wel net zo algemeen was als de Alpenwatersalamander (*Ichthyosaura alpestris*).

Rond 1960 lagen er ruim 1000 poelen in Zuid-Limburg (HANEKAMP & STUMPEL, 1984). Wanneer men bedenkt dat VAN NIEUWENHOVEN-SUNIER et al. (1965) er in die tijd 'slechts' 500 onderzochten en hierbij op 80 locaties geelbuikvuurpad aantreffen, dan kan met een zekerheid grenzende waarschijnlijkheid worden gesteld dat het werkelijk aantal vindplaatsen in die tijd ruim boven de 100 lag. Dit vermoeden wordt gesterkt door het feit dat poelen ook in die tijd niet het voorkeurs habitat voor de geelbuikvuurpad vormden (mondelinge mededeling A.H.P. Stumpel).

Helaas kwamen de verwachtingen van ter Horst niet uit en bleef de populatie geelbuikvuurpaden in Limburg allerminst stabiel. Het aantal vindplaatsen van de soort daalde in circa 40 jaar tijd van meer dan 100 naar vier. Het dieptepunt werd bereikt rond 2000 toen er nog slechts één levenskrachtige populatie in heel Limburg resteerde, alsmede een drietal relict populaties met hooguit een tiental dieren. Er was in alle opzichten sprake van een dramatische achteruitgang.



Figuur 1. Historische verspreiding van de geelbuikvuurpad in Limburg omstreeks 1960 (Van Nieuwenhoven-Sunier *et al.*, (1965) in poelen en drinkbakken. Omdat lang niet alle wateren zijn onderzocht, en poelen en drinkbakken niet de optimale voortplantingsplaatsen van de soort vormen, was het werkelijke aantal vindplaatsen van de soort in die tijd naar verwachting zeker hoger.

1.2 VEERTIG JAAR ACHTERUITGANG IN BEELD

1.2.1 De periode 1960-1980

In het kort passeren hier een aantal relevante karteringen van de Zuid-Limburgse amfibieën de revue. TER HORST (1959) besteedde in 1959 voor het eerst uitgebreid aandacht aan de bedreigingen en bescherming van de Limburgse herpetofauna, waaronder de geelbuikvuurpad (TER HORST, 1959; 1960). In 1960 en 1961 werd er speciaal onderzoek uitgevoerd aan de geelbuikvuurpad (VAN NIEUWENHOVEN-SUNIER *et al.*, 1965). In beide publicaties wordt de geelbuikvuurpad beschouwd als een van de soorten waarbij de achteruitgang 'nog wel meevalt'. De eerstvolgende kartering in Zuid-Limburg vindt plaats in 1974 (DUIJGHUISEN *et al.*, 1976). Dit levert voor het eerst een zeer alarmerend beeld op van de status van de geelbuikvuurpad. Onder de 717 poelen die toen werden onderzocht bevonden zich ook de 80 poelen van VAN NIEUWENHOVEN-SUNIER *et al.* (1965), waarvan er maar liefst 42 verdwenen bleken (HANEKAMP & STUMPEL, 1984). In de resterende 38 poelen namen zij nog in negen poelen geelbuikvuurpadden waar, terwijl er ook acht nieuwe vindplaatsen werden ontdekt. Slechts op één plek werd voortplanting op redelijke schaal vastgesteld.

Ondanks de alarmerende conclusies die aan dit onderzoek werden verbonden duurde het nog tot 1980 voordat er echt actie werd ondernomen. De aanleiding hiervoor vormde een kartering van SMIT (1981). Hij onderzocht hetzelfde gebied als DUIJGHUISEN *et al.* (1976) maar trof in totaal nog maar 464 poelen en drinkbakken in het Zuid-Limburgse landschap aan, waarvan slechts vijf met geelbuikvuurpadden. 'geelbuikvuurpad' is in dit geval overigens een betere benaming, want in vier van deze wateren ging het nog maar om de vondst van slechts één individu. Ondanks het feit dat SMIT (1981) natuurlijk niet alle geelbuikvuurpadden heeft gevonden, moet worden geconcludeerd dat in amper 20 jaar het voorkomen van de geelbuikvuurpad afnam van minimaal een honderdtal bezette vindplaatsen, met soms honderden geelbuiken per water, naar een bezetting van slechts vijf wateren waarin nog geen tien individuen meer

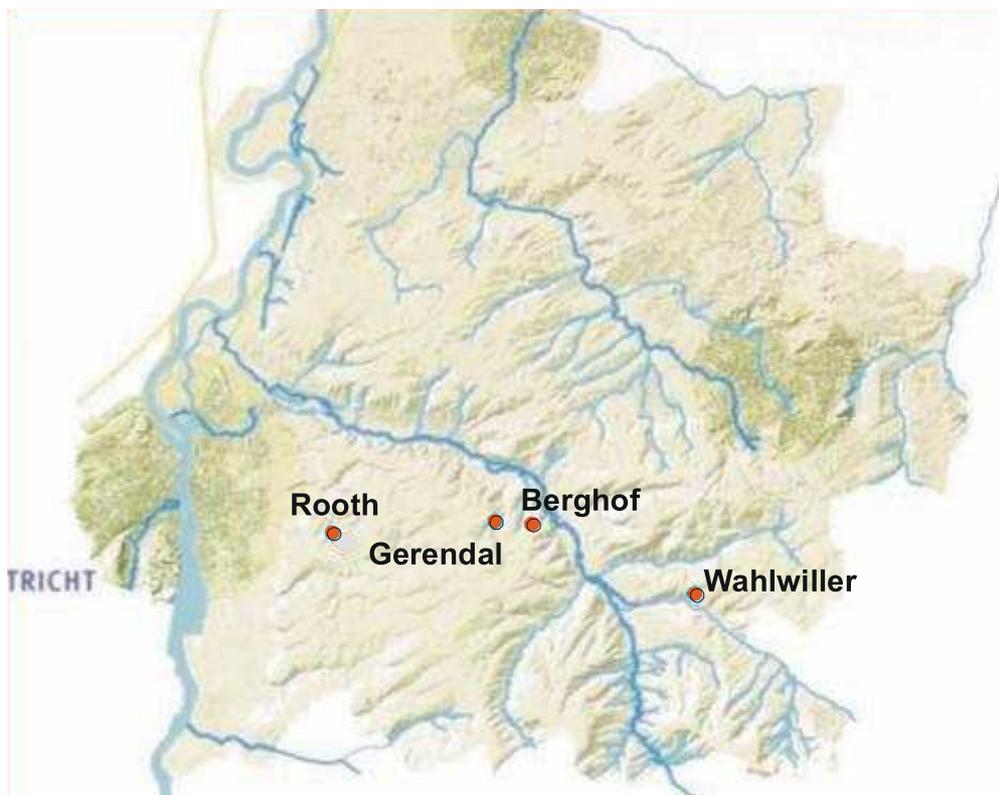
werden waargenomen. In amper 20 jaar tijd werd de soort in het Zuid-Limburgse cultuurlandschap geëlimineerd!

1.2.2 De periode 1980-2000

De resultaten van het onderzoek van SMIT (1981), en de dramatische achteruitgang van de geelbuikvuurpad in het bijzonder, leidde tot de oprichting van de zogenaamde 'Overleg-groep poelenbeheer' in 1982. Hierin waren de terreinbeherende natuurbeschermingsorganisaties, de provincie, het voormalige RIN en niet in de laatste plaats de Herpetologische Studiegroep Limburg vertegenwoordigd. Deze laatste was opgericht door particulieren en was de eerste Herpetologische Studiegroep van Nederland, een werkgroep van het Natuurhistorisch Genootschap.

De voortvarendheid waarmee men te werk ging was groot. In de volgende jaren nam het aantal nieuw aangelegde en herstelde poelen in het Mergelland weer toe tot 550 in 1990 (HEIJKERS, 1990). Veel soorten reageerden hierop positief, maar de geelbuikvuurpad schitterde vooral door afwezigheid. In nieuw aangelegde poelen dook de soort wel af en toe op, maar dit was maar van korte duur. In de meeste gevallen verdween de geelbuikvuurpad weer net zo snel als hij gekomen was en als er al sprake was van succesvolle reproductie was dat alleen in het eerste of tweede jaar na aanleg.

In het beste geval kan men beweren dat de voortdurende aanleg van nieuwe poelen er voor heeft gezorgd dat de geelbuikvuurpad op het nippertje niet volledig is uitgestorven, meer is er eenvoudig niet bereikt. Ondanks al het graaf- en herstelwerk resteerden er in 2000 nog maar vier vindplaatsen van de geelbuikvuurpad, waarbij het in slechts één geval om een min of meer vitale populatie ging, namelijk in groeve 't Rooth (figuur 2) (BOSMAN & CROMBAGHS, 2009; BOSMAN *et al.*, 2009). Hierbij dient nog te worden opgemerkt dat het in Wahlwiller geen natuurlijke vindplaats betreft. De soort is er uitgezet rond 1982. De dieren die hier zijn uitgezet waren afkomstig van de populatie in het Rooth.



Figuur 2. Verspreiding van de geelbuikvuurpad in Limburg in 2000. Aanleg en herstel van een groot aantal poelen en drinkbakken in het Mergelland kon de achteruitgang van de geelbuikvuurpad in het Mergelland niet stoppen. In 2000 resteerden er nog slechts vier vindplaatsen, waarbij alleen de populatie in het Rooth nog als min of meer vitaal kon worden aangemerkt.

De zeer sterke achteruitgang van de geelbuikvuurpad in de periode 1980-2000 heeft twee belangrijke gevolgen gehad:

- 1 Op diverse plaatsen in het Mergelland zijn geelbuikvuurpadden uitgezet. Het betreft hier zowel volwassen dieren als juvenielen en larven. Over het algemeen vonden de uitzettingen op persoonlijke titel plaats. Helaas zijn hierbij ook geelbuikvuurpadden uit het buitenland uitgezet. Menging van buitenlandse geelbuikvuurpadden met inheemse is beslist niet zonder risico (zowel genetisch als wat betreft het risico op verspreiding van ziekten). Bijzonderheden hierover worden besproken in hoofdstuk 2.
- 2 De provincie Limburg nam het initiatief tot het uitvoeren van een reeks van onderzoeken die de omvang van de populaties op de laatste vindplaatsen in beeld dienden te brengen, maar die vooral ook antwoord moest geven op de vraag of het voortbestaan van de laatste populaties kon worden veilig gesteld en zo ja, hoe? Dit resulteerde onder meer in het verschijnen van het beschermingsplan vroedmeesterpad en geelbuikvuurpad (LENDERS, 2000), later gevolgd door het Beschermingsplan Geelbuikvuurpad en Vroedmeesterpad in Limburg (CROMBAGHS & BOSMAN, 2006).

2.1 INLEIDING, HABITATHERSTEL EN HERINTRODUCTIE

Halverwege de jaren negentig leidde het besef dat we op de verkeerde weg waren met de bescherming van de geelbuikvuurpad en een andere aanpak gekozen moest worden. Pas in 2000 kwam dit daadwerkelijk tot uitvoering. De provincie Limburg nam het initiatief tot het uitvoeren van een reeks onderzoeken die de actuele status van de soort op de laatste vindplaatsen in beeld dienden te brengen, maar die vooral ook antwoord moest geven op de vraag of de Geelbuik nog gered kon worden, en zo ja, hoe?

Ondertussen werd de vraag steeds belangrijker of er niet tot herintroductie van de soort moest worden overgegaan, teneinde het totale uitsterven te voorkomen.

In de periode 2000-2010 is zowel voor de strategie van habitattherstel als voor herintroductie gekozen. Ook in genetisch opzicht waren er duidelijke onderzoeksvragen, maar het behoud en uitbreiding van populaties en leefgebieden had duidelijk de eerste prioriteit.

De vraag of de vitaliteit van de laatste 'populaties' niet zwaar te leiden heeft gehad van genetische verarming (bekend is dat de aantalsfluctuaties in de laatste leefgebieden in de periode 1990-2000 zeer sterk zijn geweest, waardoor de populaties in genetisch opzicht mogelijk met regelmaat 'door een flessenhals' zijn gegaan') bleef echter nog onbeantwoord. Daarnaast blijkt uit diverse bronnen dat dit sinds de jaren '70 van de vorige eeuw met wisselend succes uitzettingen hebben plaatsgevonden. Een ongelukkig gegeven is het feit dat men zich, hoe goed bedoeld dan ook, niet heeft beperkt tot uitzettingen van inheemse geelbuikvuurpadden, maar dat ook dieren uit het buitenland, in ieder geval uit voormalig Joegoslavië, zijn uitgezet.

Onderdeel van dit hoofdstuk is daarom ook het globaal in beeld brengen van illegale herintroducties. Zowel de resultaten van het habitattherstel en de ontwikkeling van nieuwe leefgebieden, als de uitzetting in Limburg vanaf de jaren '70 van de vorige eeuw, worden in het vervolg van deze paragraaf besproken.

2.2 HERINTRODUCTIES IN LIMBURG

2.2.1 Uitzettingen in de periode 1970-2000

In deze paragraaf worden vindplaatsen van de soort besproken uit de periode 1970-2000 waarvan bekend is dat ze het gevolg zijn van uitzettingen, of eenmalige waarnemingen, waarvan de oorsprong niet kan worden achterhaald, maar die zich ver buiten het verspreidingsgebied van de soort (in de periode 1970-2000), bevinden. De gegevens zijn achterhaald door persoonlijke interviews. Namen van geïnterviewde personen zijn om redenen van privacy niet in de tekst opgenomen als het niet legale uitzettingen betreft. De nummers bij de tekst corresponderen met de nummers in [figuur 3](#). De nummering verloopt van het noordwesten naar het zuidoosten.

1 Retraitehuis in Spaubeek

Geïnterviewde uit Spaubeek heeft ca 25 jaar geleden geelbuiken meegenomen uit voormalig Joegoslavië. Ze zijn afkomstig uit het gebied van Kranske Gora (Slovenië). Gekweekte dieren zijn doorgegeven aan derden. Door hen zijn in de jaren '70 onder meer geelbuikvuurpadden uitgezet bij het retraitehuis in Spaubeek. Er werden vooral kikkervissen en juvenielen uitgezet. Aantallen zijn niet meer te achterhalen.

2 Bunderbos circa 1995

Ergens omstreeks 1995 zijn door dhr. R. Gubbels aan de oostzijde en ten noorden van de spoorbrug in het Bunderbos enkele geelbuikvuurpadden waargenomen. De dieren zaten in een 'karrenspoorachtige' drainagegreppel (zonbeschenen gootje met waterplanten en zandafzetting) van circa 0,5 meter breed. Er werden drie volwassen exemplaren gezien. Een jaar later is de locatie nogmaals bezocht, maar er zijn nooit meer waarnemingen gedaan. De herkomst van dieren is onbekend.

3 Ravensbosch (medio jaren 80)

Geïnterviewde heeft halverwege tachtiger jaren geelbuikvuurpadden in het Ravensbosch aangetroffen. De heer Brands, voormalig boswachter SBB, geboren in de omgeving Ravensbosch, gaf aan op de hoogte te zijn van het feit dat de soort in de omgeving van het Ravensbosch voorkwam. Betreffende persoon ging er daarom van uit dat het hier de inheemse geelbuikvuurpad betrof. Er zijn enkele dieren gevangen en hier is mee gekweekt. Een deel van de nakweek is doorgegeven aan een tweede persoon. Nakomelingen van deze kweekgroepen zijn eind jaren '80 uitgezet in het Gerendal. Het gaat hier om een eenmalige uitzetting van enkele honderden metamorfoaserende larven en juvenielen. Kort daarna ontstonden er twijfels over de oorsprong van deze geelbuikvuurpadden. Op grond daarvan is er contact geweest met professor Szymura van de universiteit van Krakau. Uit zijn onderzoek blijkt dat het om uitheemse geelbuikvuurpadden gaat, met grote waarschijnlijk om een variëteit uit de Balkan. Dit toont aan dat het bij het Ravensbosch om een illegale uitzetting met exotisch materiaal gaat.

4 Groeve Curfs, 1998

Martijn Dorenbosch vond in 1998 vlakbij de uitgang van de Curfsgroeve 4 subadulte geelbuikvuurpadden. In 1999 is hij nogmaals gegaan om te zien of de dieren er nog waren maar vond niets meer.

5 Meertensgroeve, 1985

In 1985 is er eenmalig een geelbuikvuurpad aangetroffen in de Meertensgroeve te Vilt. Gezien de grote afstand (minstens drie kilometer) tot de dichtstbijzijnde leefgebied in die tijd (Rooth) en het feit dat er zowel vóór als na 1985 geen meldingen meer bekend zijn geworden, betreft dit zeer waarschijnlijk een eenmalige uitzetting. In genoemde periode heeft er zeer intensief onderzoek plaats gevonden naar de vroedmeesterpadden in de Meertensgroeve en het voorkomen van de soort, voor of na 1985, zou toen beslist zijn opgemerkt.

6 Groeve Blom, 2005

Zie tekst § 2.2.2. Uitzettingen in de periode 2000-2010

7 Bemelerberg, omgeving Rooth jaren '70

Geïnterviewde uit Spaubeek heeft ca 25 jaar geleden geelbuiken meegenomen uit voormalig Joegoslavië. Ze zijn afkomstig uit het gebied van Kranske Gora (Slovenië). Zijn zoon heeft de dieren jarenlang in een terrarium gehouden en er mee gekweekt. De kweek verliep zo voorspoedig dat er diverse andere liefhebbers van dieren zijn voorzien. Geïnterviewde noemt onder meer een dierenarts uit Maastricht en een medewerker van het IKL die dieren van hem hebben ontvangen.

Door geïnterviewde, en door derden die via hem geelbuikvuurpadden hebben gekweekt, zijn er op diverse plaatsen dieren uitgezet. Een van de locaties waar dit heeft plaatsgevonden is de Bemelerberg in de omgeving van 't Rooth. Er werden vooral kikkervissen en juvenielen uitgezet *'in diverse poelen op de Bemelerberg'*. Informatie over het effect van deze uitzettingen ontbreekt. Het is niet uitgesloten dat er uitwisseling heeft plaatsgevonden met de populatie in het Rooth aangezien zich in de jaren '70 van de vorige eeuw, ook diverse vindplaatsen buiten de groeve bevonden. Eind jaren '70 werd er met het houden van geelbuikvuurpadden gestopt en zijn er geen dieren meer door geïnterviewde uitgezet.

8 Rooth 1997

In deze periode ging het al bijzonder slecht met de geelbuikvuurpad. De totale populatie aan (half)volwassen dieren werd in 1997 op maximaal 43 (sub)adulten geschat (BOSMAN, 1997). De afzet van een groot aantal eieren op één locatie die dreigde uit te drogen vormde de aanleiding om deze op te kweken en in een later stadium terug te plaatsen (BOSMAN *et al.*, 1999). De actie vond plaats in overleg met het Natuurhistorisch Genootschap in Limburg en met een ontheffing van het ministerie van LNV. Enkele honderden eieren zijn verzameld en juvenielen uitgezet. Uitzetting vond pas laat in het seizoen plaats. In latere jaren is van deze uitzetting vrijwel niets teruggevonden. Ze heeft dus niet geleid tot een versterking van de populatie (BOSMAN *et al.*, 1999).

9 Gerendal, periode 1970 -1980

In de periode 1970-1990 hebben in het Gerendal hebben diverse keren introducties plaatsgevonden. Deze vonden steeds plaats in overleg met Staatsbosbeheer, de beheerder van het natuurgebied Gerendal.

Jaren '70 (1974 en 1975)

Begin jaren '70 werden door de toenmalig voorzitter van Lacerta in Maastricht, geelbuikvuurpadden aangetroffen in een oude mestput in Zuid-Limburg (exacte locatie niet meer bekend). De dieren dreigden dood te gaan. Het gaat hierbij met zekerheid om inheemse geelbuikvuurpadden, aangezien de soort in deze omgeving ook in het verleden vaak was aangetroffen. Deze dieren zijn meegenomen en hiermee werd gekweekt. Nakweek is ook 'aan derden' doorgegeven.

Omdat het kweken voorspoedig verliep, en de geelbuikvuurpad in de vrije natuur steeds verder achteruitging, is het idee ontstaan tot bijplaatsing in onder meer het Gerendal. Uitzetting heeft voor zover bekend twee keer massaal plaatsgevonden. Uit de jaarverslagen van de werkgroep Limburg van Lacerta (ELZENGA, 1975; RAAIJMAKERS & ELZENGA, 1976) blijkt dat er in 1974 en 1975 grote aantallen (1860 exemplaren) juveniele geelbuikvuurpadden in het Gerendal zijn uitgezet. Daarnaast zijn er 3180 larven verspreid over Zuid-Limburg losgelaten (archief ravon).

Jaren '80

Eind jaren '80 zijn wederom nakomelingen uit een (andere) kweekgroep uitgezet in het Gerendal. Het gaat hier om een eenmalige uitzetting van enkele honderden (metamorfoserende) larven en juvenielen. Uitzetting vond plaats in overleg met Staatsbosbeheer. Kort daarna ontstonden er twijfels over de herkomst van deze geelbuikvuurpadden. Op grond daarvan is er door de uitzetter contact geweest met professor Szymura van de universiteit van Krakau. Zijn onderzoek bevestigt dat het om uitheemse geelbuikvuurpadden gaat, met grote waarschijnlijk om een variëteit uit de Balkan. Toen dit eenmaal bekend was, is de uitzetting gestaakt. Uit waarnemingen uit 2000 (BOSMAN & CROMBAGHS, 2001a) blijkt dat deze 'Balkanvorm' nog steeds deel uitmaakte van de populatie geelbuikvuurpadden in het Gerendal. De dieren wijken iets af van de habitus van de inheemse dieren en vertonen een afwijkende unken-reflex.

10 Berghofwei/Keuteberg

Een geïnterviewde heeft aangegeven dat hij eind jaren '90 contact heeft gehad met een zekere heer P. Visser, woonachtig op de Keuteberg. Deze meldde dat hij een geelbuikvuurpad in zijn tuin had aangetroffen. Het dier had zich spontaan had gevestigd in zijn 'tuinpoeltje'. De locatie bevindt zich op enkele 100den meters afstand van het leefgebied Berghofwei. Geïnterviewde heeft toen 20 juvenielen bijgeplaatst. Deze waren afkomstig van nakweek van dieren uit 't Rooth en worden als inheems beschouwd.

11 Locatie Simpelveld 1972

Waarneming van één volwassen geelbuikvuurpad in een poel in de gemeente Simpelveld door F. Blezer en F. van Hoogstraten. De exacte locatie van de poel is niet meer bekend. De poel bevond zich in het kilometerhok 196-316. Latere waarnemingen van de soort uit dit kilometerhok zijn er niet (Ravon-archief), maar uit het verleden zijn meerdere waarnemingen van de soort uit de omgeving bekend. Dit maakt het aannemelijk dat het hier één van de laatste exemplaren van een natuurlijke vindplaats van de soort betreft.

14 Omgeving Schilberg/Slenaken, eind jaren '70

Het betreft de waarneming van één volwassen dier door F. Blezer en F. van Hoogstraten. De exacte poellocatie is niet bekend. De waarneming is afkomstig uit kilometerhok 187-307. Uit het verleden zijn waarnemingen van de soort uit de omgeving bekend. Dit maakt het aannemelijk dat het hier een van de laatste exemplaren van een natuurlijke vindplaats betreft.

Een geïnterviewde uit Spaubeek heeft ca 25 jaar geleden geelbuiken meegenomen uit voormalig Joegoslavië. Ze zijn afkomstig uit het gebied van Kranske Gora (Slovenië). Gekweekte dieren zijn doorgegeven aan derden. Geelbuiken afkomstig van zijn kweekgroep zijn uitgezet in de omgeving van Slenaken. Ook hier werden vooral kikkervissen en juvenielen uitgezet. Aantallen en exacte locaties zijn niet meer te achterhalen.

2.2.2 Uitzettingen in de periode 2000-2010

In de periode 2005-2009 is in overleg met de provincie Limburg en het Ministerie van LNV een drietal groeves in Limburg een herintroductie gestart, dit zijn de Meertensgroeve, de Curfsgroeve en groeve Blom. Daarnaast zijn er rond 2007 geelbuikvuurpadden afkomstig van de locatie Wahlwiller uitgezet in de omgeving van Cottessen.

5 Meertensgroeve

Het uitzetproject dat sinds 2005 in groeve Blom werd opgestart, vond in 2006 een vervolg in de Meertensgroeve. Het aantal uitgezette larven in deze groeve was aanmerkelijk lager dan in groeve Blom (CROMBAGHS *et al.*, 2009). Dit is mede een gevolg van het gelijktijdig uitvoeren van de projecten. Desondanks is het ook hier gelukt om een populatie te ontwikkelen. Tegenwoordig bestaat de populatie in de Meertensgroeve uit circa 120 (half)volwassen geelbuiken. Natuurlijke reproductie vindt hier sinds 2008 met toenemend succes plaats, met een minimale eiafzet van 1000 eieren in 2010. De laatste twee jaar metamorfoseerden er enkele honderden larven succesvol tot juveniel. Dit duidt er op dat ook hier de kans op de ontwikkeling van een duurzame populatie groot is. Voor de herkomst van de larven voor het project wordt verwezen naar de tekst bij groeve Blom.

6 Groeve Blom 2005-2007

In de groeve Blom, een particuliere groeve in de gemeente Berg en Terblijt, heeft in 2004 een herinrichting plaats gevonden waarbij de groeve speciaal met het oog op de ontwikkeling van nieuw leefgebied voor de geelbuikvuurpad en vroedmeesterpad is ingericht (CROMBAGHS & BOSMAN, 2002). Bij het Ministerie van LNV is een ontheffing aangevraagd en ontvangen voor het opstarten van een herintroductieproject. In de periode 2005-2007 zijn hier in drie jaren ruim 1000 larfjes van de geelbuikvuurpad uitgezet (CROMBAGHS & BLOM, 2008). Vanaf 2007 vindt er op ruime schaal natuurlijke reproductie plaats. De populatie heeft tegenwoordig een geschatte omvang van minimaal 150 (half)volwassen geelbuikvuurpadden en plant zich jaarlijks met succes voort. De ontwikkeling van een duurzame populatie lijkt te slagen. De larven zijn afkomstig van een kweekgroep, die sinds 2000 voor dit doel in stand wordt gehouden. De kweekgroep is op haar beurt weer ontstaan uit opgekweekte larven van de locatie Wahlwiller, die aan het einde van het seizoen 2000 verloren dreigden te gaan.

4 Curfsgroeve

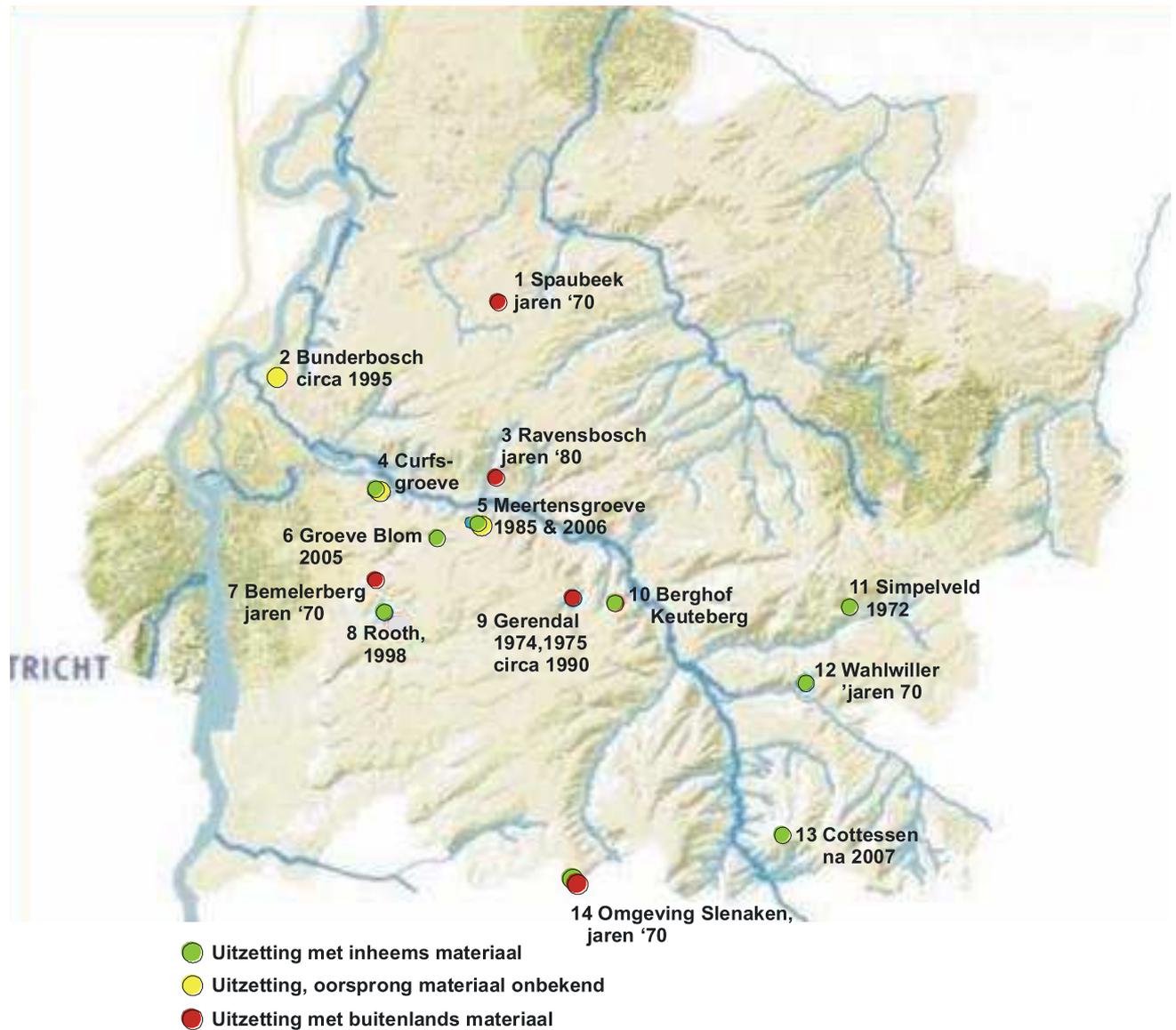
In navolging van het project groeve Blom en Meertensgroeve is vanaf 2009 gestart met een herintroductie in de Curfsgroeve (CROMBAGHS *et al.*, 2009). In deze Groeve, waarin de exploitatie van mergel officieel in september 2008 is gestopt. De kansen op de ontwikkeling van een natuurlijke populatie geelbuikvuurpadden in deze ca 40 ha grote groeve zijn groot. In 2010 werden er minimaal 29 verschillende (sub)adulte geelbuikvuurpadden waargenomen. In 2011 worden er voor de laatste keer larven van de geelbuikvuurpad in groeve Curfs uitgezet. Daarna dient de populatie door natuurlijke reproductie verder te groeien. De hoop is er op gevestigd dat dit, evenals in de groeve Blom en in de Meertensgroeve, gaat lukken.

13 Cottessen

Bekend is geworden dat er omstreek 2007 geelbuikvuurpadden verplaatst zijn de van de locatie Wahlwiller (13, [figuur 3](#)) naar een particuliere tuin in Cottessen. Het betreft hier de verplaatsing van een onbekend aantal volwassen dieren, met de bedoeling hiermee een nieuwe populatie tot ontwikkeling te brengen. Gegevens over exacte aantallen, en het resultaat daarvan tot nu toe, ontbreken. Aangenomen wordt dat alle geelbuikvuurpadden in Wahlwiller afkomstig zijn van de populatie in 't Rooth, het gaat hier dus om inheems materiaal.

2.2.3 Aanbieding geelbuikvuurpadden uit Slovenië.

In 2009 werd aan de stichting RAVON, alsmede aan een IVN-lid uit Zuid-Limburg, geelbuikvuurpadden aangeboden. Het ging om alle leeftijdsklassen, zowel larven, juvenielen als (sub)adulten. Uit navraag bleek dat de dieren wederom afkomstig waren uit Slovenië. De aanbieder is kenbaar gemaakt dat het introduceren van uitheemse geelbuikvuurpadden ongewenst is. Hem is gevraagd de dieren niet meer aan te bieden. Toen dit toch gebeurde (het IVN lid) is wederom met hem contact gezocht en aangeboden de dieren op een adres in te leveren. Na lang aandringen vond dit inderdaad plaats, maar bekend is dat niet alle dieren zijn ingeleverd. Op grond daarvan is de AID ingeschakeld. Wat er met de overgebleven dieren is gebeurd is niet bekend.



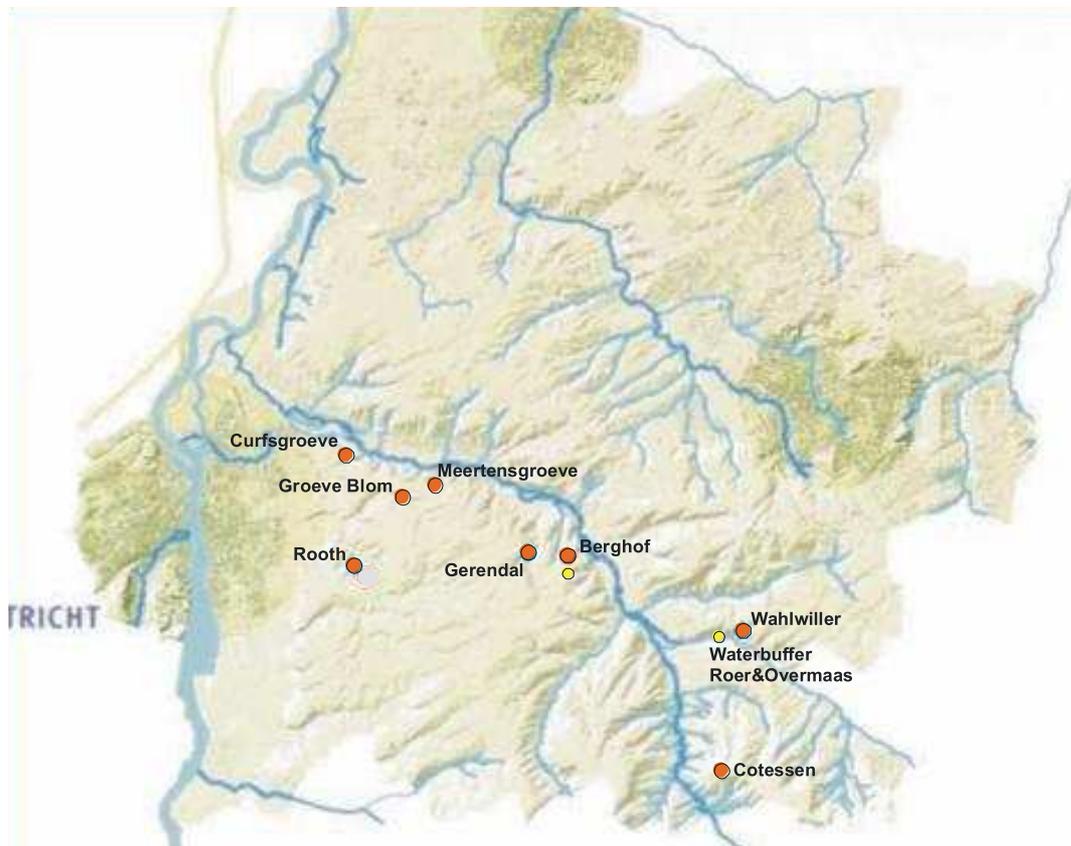
Figuur 3. Locaties in Limburg waar in de periode 1970-2010 uitzetting van de geelbuikvuurpad bekend is. Op vijf locaties betreft het met zekerheid uitzetting van geelbuikvuurpadden uit voormalig Joegoslavië. In drie gevallen is de herkomst van de uitgezette geelbuikvuurpadden onbekend. De overige uitzettingen hebben, voorzover bekend, betrekking op inheems materiaal. De nummers in de figuur corresponderen met de nummers in de tekst. Op een aantal locaties is de geelbuikvuurpad inmiddels weer verdwenen (vgl figuur 4).

2.3 HABITATHERSTEL

Vanaf 2000 is er steeds meer inzicht ontstaan in de factoren die een sleutelrol spelen in de duurzame overleving van de geelbuikvuurpad. Met name de instandhouding van extreme levensomstandigheden in het leefgebied van de geelbuikvuurpad blijken de sleutel tot duurzame overleving. Dat klinkt enigszins onlogisch: *'maak het de soort moeilijk en hij overleeft wel duurzaam?'*. We maken het de geelbuik inderdaad niet gemakkelijk, maar alle predatoren en concurrenten nog veel moeilijker, en juist in dat feit schuilt de sleutel tot succes.

In tegenstelling tot wat veel auteurs hebben beweerd kunnen voortplantingswateren van de geelbuikvuurpad eigenlijk niet te vroeg in het seizoen droog vallen, alleen te snel (binnen 6 weken na eiafzet), maar vooral ook te langzaam. De ontwikkeling van voortplantingswateren voor de soort vereist dus een hoge mate van maatwerk wat betreft dimensies, locatiekeuze en tijdstip van beheer en aanleg. Daarnaast dient de kwaliteit van de landhabitat goed aan te sluiten op de eisen van de soort, vooral op het vlak van een hoge dichtheid aan schuilplaatsen die in voldoende mate door de zon beschenen kunnen worden. Bosopslag in het zomerleefgebied is dan ook taboe, als overwinteringsplaats en als middel om warme micromilieus te ontwikkelen is het echter weer wel noodzakelijk.

Vanaf 2000 zijn deze nieuwe inzichten langzaam maar zeker doorgevoerd in de laatste en enkele nieuwe leefgebieden van de soort. Men dient zich te realiseren dat de situatie in die tijd ernstig bedreigend was voor de soort. Alleen in groeve 't Rooth was nog sprake van een min of meer vitale populatie, maar ook hier waren in 1998 al larven opgekweekt en bijgeplaatst. De geschatte populatieomvang in het Rooth bedroeg in die tijd 75 individuen, hetgeen vanuit genetisch oogpunt als een zeer bedreigende situatie dient te worden aangemerkt.



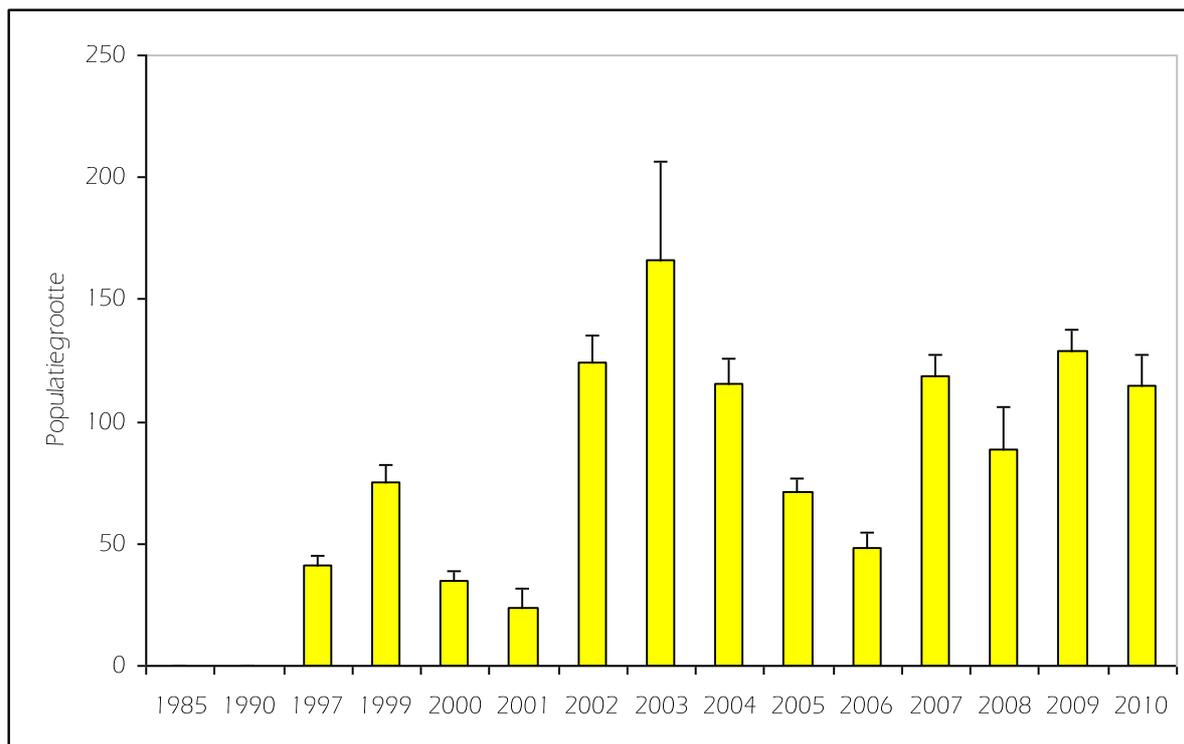
Figuur 4. Actuele leefgebieden van de geelbuikvuurpad in Limburg in 2010.

3 POPULATIE ONTWIKKELING VAN DE GEELBUIKVUURPAD IN GROEVE 'T Rooth, JULIANA GROEVE, GERENDAL, BERGHOFWEI EN WAHLILLER

Vanaf 1997 is er structureel populatieonderzoek verricht aan de geelbuikvuurpad in Zuid-Limburg. In het begin alleen in groeve 't Rooth, vanaf 2000 ook in de vier andere gebieden (Juliana groeve, Wahlwiller, Berghofwei en Gerendal). Eerder is er in 1985 en 1990 populatieonderzoek gedaan in groeve 't Rooth (LAAN & VERBOOM, 1986; LAAN & VERBOOM, 1990). De geelbuikvuurpad is individueel herkenbaar aan het zwarte vlekkenpatroon op zijn buik. Dit maakt het mogelijk aan de hand van vangst-terugvangsten jaarlijks populatieschattingen te berekenen. Voor de bepaling van de populatieschatting worden alleen adulte dieren (≥ 30 mm) betrokken in de berekening. In de eerste jaren zijn de buikpatronen handmatig vergeleken. Tegenwoordig wordt het 'Automated Photo-ID for YBT photographs' programma, ontwikkeld door dhr. Lex Hiby, gebruikt dat buikpatronen digitaal vergelijkt (CLEMENTS *et al.*, 2010).

Groeve 'Rooth

In de jaren '80 was de populatie in groeve 't Rooth de grootste in Nederland. Zowel in 1985 als in 1990 is er in die tijd populatieonderzoek verricht (LAAN & VERBOOM, 1986; 1990). De populatiegroottes zijn in die tijd geschat op 97 dieren. De schattingen van Laan & verboom zijn gebaseerd op adulten en subadulten in de populatie. De onderzoeken in de periode 1997-2010, hebben uitsluitend betrekking op adulten.



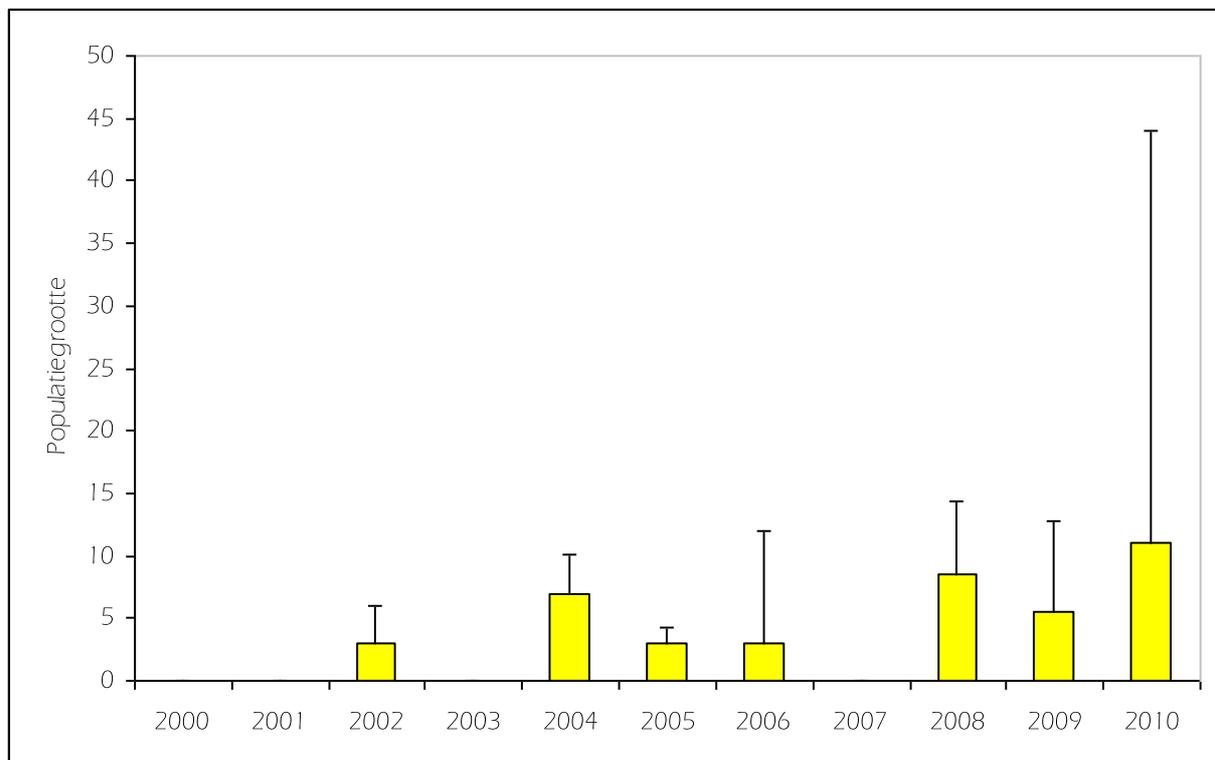
Figuur 5. De geschatte populatiegrootte van de geelbuikvuurpad in groeve 't Rooth in de periode 1997-2010. In de jaren 1985 en 1990 is eveneens populatieonderzoek verricht maar toen zijn de schattingen berekend inclusief subadulten. Deze jaren zijn daarom niet in de grafiek opgenomen.

Figuur 5 geeft voor de periode 1997 – 2010 de geschatte populatiegroottes in groeve 't Rooth. In 1997 bestond de populatie uit 41 dieren en was dus fors afgenomen ten opzichte van 1985 en 1990. Door aanleg van nieuwe wateren groeide de populatie in 1999 naar 75 dieren (in 1998 is er geen populatieonderzoek

verricht). In 2000 startte het beschermingsplan voedmeesterpad en geelbuikvuurpad. De eerste basishabitats werden aangelegd. Na een afname in 2000 en 2001 groeide, na een succesvol voortplantingsjaar in 2000, de populatie in 2002 naar 124 dieren. Die groei zette in 2003 door en de schatting kwam dat jaar uit op 166 geelbuikvuurpadden. Mede door een slechtere reproductie onder andere door een aantal drogere zomers nam de populatie in de jaren daarna af tot 49 dieren in 2006. Een goede reproductie in 2005 zorgde weer voor een groei die in 2007 zichtbaar werd (BOSMAN & CROMBAGHS, 2006). Na een kleine daling in 2008 groeide de populatie in 2009 naar een aantal van 129 dieren, gelijk aan het niveau van 2007. In 2010 kromp de populatie weer iets naar een grootte van 115 volwassen dieren.

Julianagroeve

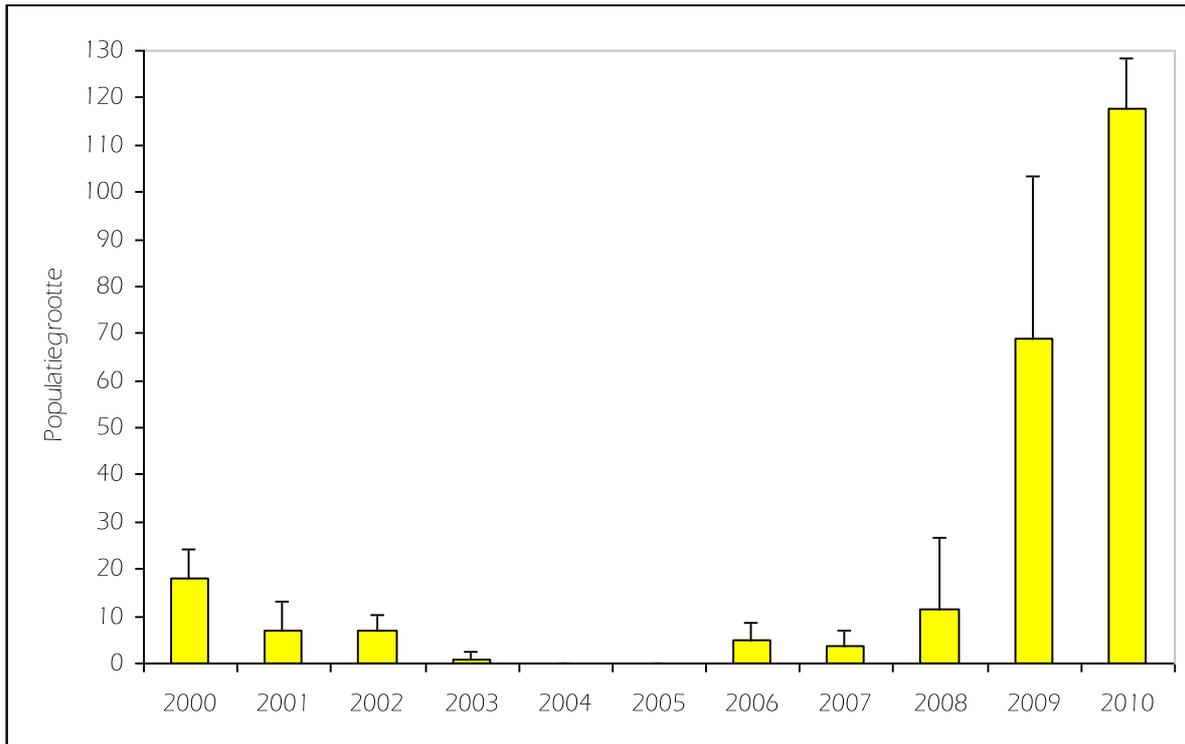
Eind jaren '90 stierf de geelbuikvuurpad uit in de Julianagroeve. In juni 2001 werd er echter weer één dier gevonden (BOSMAN & CROMBAGHS, 2001b). In 2002 is de populatie geschat op drie dieren (figuur 6). In 2004 groeide de populatie naar zeven dieren. In 2005 en 2006 liep deze weer terug naar drie dieren. In 2008 nam de populatie toe naar 9 dieren. Voor 2009 kwam de schatting op 6 dieren uit en in 2010 op 11. In de Julianagroeve is op dit moment geen sprake van een levensvatbare populatie. Gezien de ligging ten opzichte van groeve 't Rooth, hemelsbreed op 450 m., is de populatie erg afhankelijk van dispersie vanuit dat gebied.



Figuur 6. De geschatte populatiegrootte van de geelbuikvuurpad in de Julianagroeve in de periode 2000-2010.

Gerendal

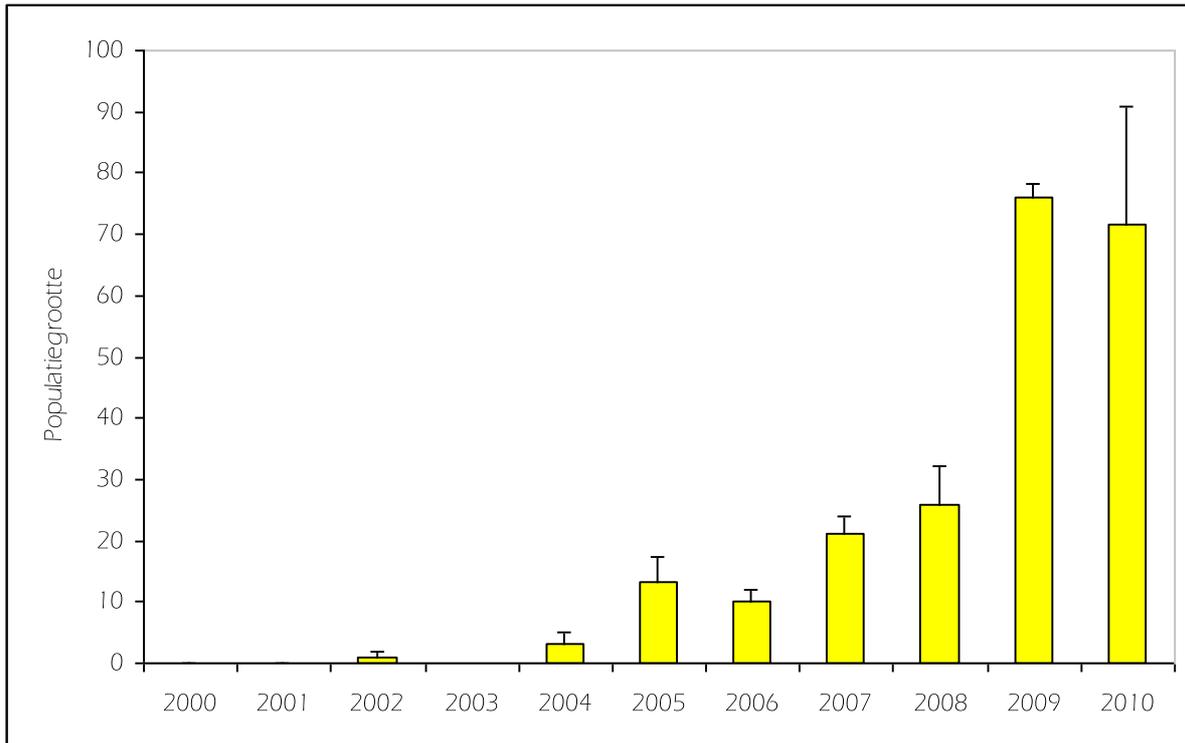
De populatie in het Gerendal was jaren lang kwakkelend (figuur 7). In 2000 bestond deze nog uit 18 dieren maar nam in de jaren daarna af tot enkele exemplaren in 2004 en 2005 op grond waarvan geen betrouwbare populatieschattingen konden worden berekend. In 2006 en 2007 werden er weer wat meer dieren aangetroffen en kwamen de schattingen uit op 5 respectievelijk 4 adulten. In 2008 groeide de populatie naar 15 dieren om in 2009 en 2010 uit te groeien naar een populatie van 69 en respectievelijk 118 dieren. Hoe deze spectaculaire groei na succesvolle voortplanting in 2008 ineens tot stand is gekomen, is niet duidelijk. De populatie zit nu uiteraard wel flink in de lift.



Figuur 7. De geschatte populatiegrootte van de geelbuikvuurpad in het Gerendal in de periode 2000-2010. In 2004 en 2005 is wel populatieonderzoek verricht maar zijn niet voldoende dieren gevonden om een populatiegrootte te bepalen.

Berghofwei

Berghofwei was samen met het Gerendal het zorgenkindje van de gebieden waar populaties van geelbuikvuurpad voorkomen. Zowel in 2000 als in 2001 zijn er in de Berghof geen dieren meer waargenomen. Wel werden er in de omgeving in een tuinvijver nog wat dieren gezien (zie elders dit rapport). Gedacht werd dat de populatie was uitgestorven. Tot er in 2002 toch weer een oud vrouwtje dieren opdook. Het dier werd twee keer waargenomen (BOSMAN & CROMBAGHS, 2003a) (figuur 8). In 2003 werden in het kader van het toen lopende monitoring dertien bezoeken gebracht maar geen geelbuikvuurpadden waargenomen.

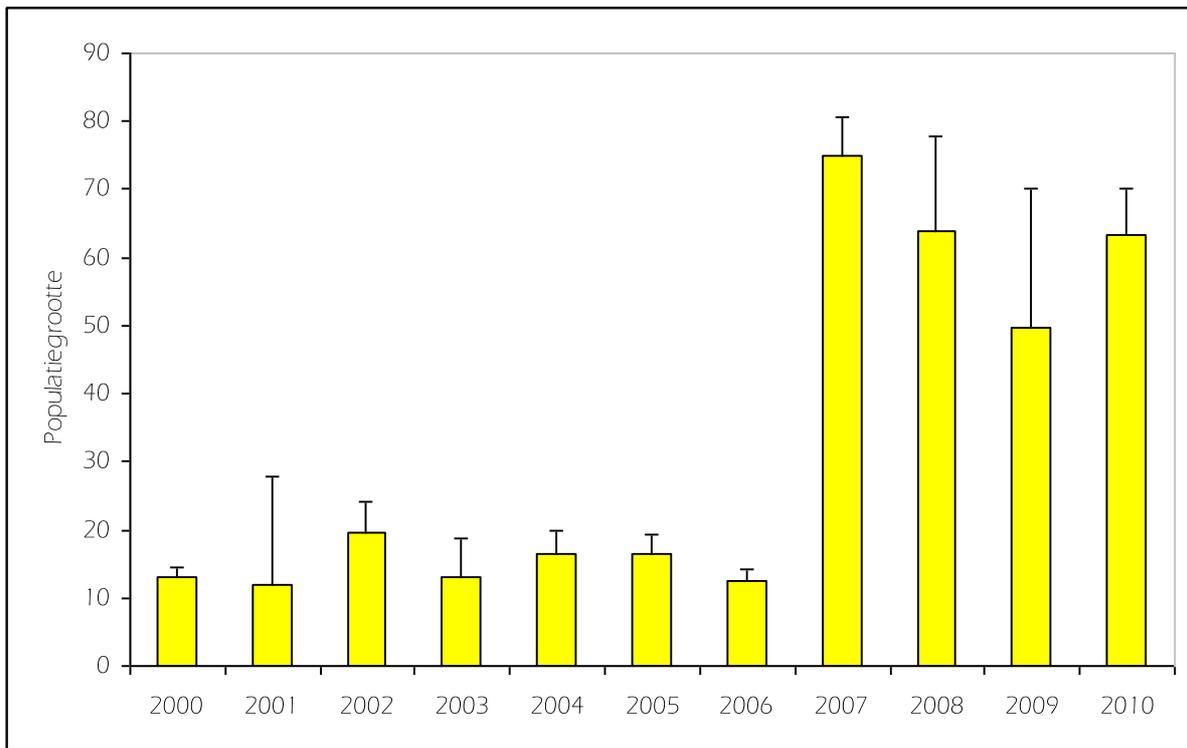


Figuur 8. De geschatte populatiegrootte van de geelbuikvuurpad in de Berghof in de periode 2000-2010. In 2000, 2001 en 2003 is wel populatieonderzoek verricht maar zijn geen dieren waargenomen.

De aanleg van een basishabitat in 2004 in het kader van het project LIFE-AMBITION (BOSMAN *et al.*, 2008) bleek een habitatverbetering van ontzettend groot belang te zijn. Gedurende het seizoen werden er drie, al oudere, dieren meermaals waargenomen. Dat seizoen was er ook voor het eerst sinds de start van de beschermingsplan periode in 2000 succesvolle voortplanting. Er werden 56 juvenielen geteld (BOSMAN & CROMBAGHS, 2003b). De populatie groeide in 2005 naar 15 dieren. In de jaren daarna groeide mede door de aanleg van nog meer nieuwe basishabitats de populatie naar 26 dieren in 2008. De goede reproductie in 2007, nadat een nieuw basishabitat in een dal nabij de Berghof werd aangelegd, zorgt voor de enorme groei van de populatie in 2009 die dat jaar uit 76 dieren bestond. In 2010 daalde het aantal weer licht naar 72 dieren.

Wahlwiller

In 2000 bestond de populatie van de geelbuikvuurpad Wahlwiller uit 16 dieren. In de periode 2001 – 2006 fluctueerde de populatie tussen 12 en de 20 dieren. De aanleg van vier nieuwe basishabitats in 2005 zorgde voor een enorm reproductiesucces dat jaar en groei van de populatie in 2007. In 2008 en 2009 nam de populatie weer iets af tot respectievelijk 64 en 50 dieren om in 2010 weer te groeien naar het niveau van 2008 met 63 dieren.



Figuur 9. De geschatte populatiegrootte van de geelbuikvuurpad in Wahlwiller in de periode 2000-2010.

LITERATUUR

BOSMAN, W., 1997. De geelbuikvuurpad in groeve 't Rooth in 1997. Stichting Ark.

BOSMAN, W. R. BRONCKERS & D.P.E.M. FRISSEN, 1999. De geelbuikvuurpad in Nederland: kan het nog steeds? Natuurhistorisch Maandblad. Jaargang 88, 108-112.

BOSMAN, W. & B. CROMBAGHS, 2001a. De geelbuikvuurpad in Limburg. Een onderzoek naar populatieomvang en voortplantingssucces in het mergelland in 2000. Bureau Groenlanden & Natuurbalans – Limes divergens

BOSMAN, W. & B. CROMBAGHS, 2001b. De geelbuikvuurpad in Limburg. Een onderzoek naar populatieomvang en voortplantingssucces in het mergelland in 2001. Bureau Groenlanden & Natuurbalans – Limes divergens.

BOSMAN, W & B.CROMBAGHS, 2003a. De geelbuikvuurpad in Limburg in 2002. Een onderzoek naar populatieomvang en voortplantingssucces in de laatste leefgebieden. Bureau Groenlanden – Natuurbalans – Limes Divergens. 48 p.

BOSMAN, W & B.CROMBAGHS, 2003b. De geelbuikvuurpad in Limburg in 2004. Een onderzoek naar populatieomvang en voortplantingssucces in de laatste leefgebieden. Bureau Groenlanden – Natuurbalans – Limes Divergens. 40 p.

BOSMAN, W & B.CROMBAGHS, 2006. De geelbuikvuurpad in Limburg in 2005. Een onderzoek naar populatieomvang en voortplantingssucces in de laatste leefgebieden. Stichting RAVON – Natuurbalans – Limes Divergens. 25 p.

BOSMAN, W. & B. CROMBAGHS, 2009. Geelbuikvuurpad *Bombina variegata*. In: H.J.M. van Buggenum et al. (red.), Herpetofauna van Limburg. Verspreiding en ecologie van amfibieën en reptielen in de periode 1980-2008. Stichting Natuurpublicaties Limburg, Maastricht: 126-137.

BOSMAN, W., R. ZOLLINGER & J. JANSE, 2008. LIFE AMBITION – Amphibian Biotope Improvement in the Netherlands. Monitoring in de periode 2004-2008. Stichting RAVON. 51 p.

BOSMAN, W., R.M. LAAN, J.J.C.W. VAN DELFT, 2009. Geelbuikvuurpad *Bombina variegata*. In: Creemers, R.C.M. & J.J.C.W. van Delft (redactie), De amfibieën en reptielen van Nederland. – Nederlandse Fauna 9. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, European Invertebrate Survey – Nederland, Leiden: 142-153.

BUND, C.F., VAN DE, 1964. Vierde Herpetogeografisch Verslag. De verspreiding van de reptielen en amfibieën in Nederland. Nederlandse Vereniging voor Herpetologie en Terrariumkunde Lacerta. 1 – 72.

CLEMENTS, G., M. SPAN & L. HIBY (2010): Handleiding 'Automated Photo-ID for YBT photographs'. Stichting RAVON.

CREMERS, J., 1911. Vuurpadden (*Bombina igneus*). Ons eigen blad 3: 90-94.

CROMBAGHS, B. & M. BLOM, 2008. Agrarisch natuurbeheer met geiten en landvarkens voor het beheer van groeves, een reëel alternatief? Natuurbalans - Limes Divergens BV en Beheer en Exploitatie Blom, Nijmegen/Berg en Terblijt.

CROMBAGHS, B. & W. BOSMAN. 2002. Inrichtingsplan Groeve Blom. Bureau Natuurbalans-Limes Divergens BV - Bureau Groenlanden, Nijmegen.

CROMBAGHS, B. & W. BOSMAN (red.), 2006. Beschermingsplan geelbuikvuurpad en vroedmeesterpad in Limburg 2006-2010. Platform Geelbuikvuurpad en Vroedmeesterpad, Natuurbalans/Limes Divergens & Stichting RAVON, Nijmegen.

CROMBAGHS, B., D. SCHUT & A. KLOOR, 2009. HERINTRODUCTIE GEELBUIKVUURPAD IN ZUID-LIMBURG. PROJECT OP WEG NAAR EENDUURZAAM BEHOUD VAN DE GEELBUIKVUURPAD IN HET MERGELLAND, 2009. Natuurbalans - Limes Divergens BV, Nijmegen.

DUIJGHUISEN, T., B. HEUKESHOVEN, P. VAN DER MEYDEN & T. RAATELAND, 1976. Een inventarisatie van de amfibieënfauna van Zuid-Limburg, met de nadruk op de ecologie van de Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) en de Geelbuikpad (*Bombina variegata*). Instituut voor Taxonomische Zoölogie, Amsterdam / Zoölogisch Laboratorium Afdeling Dieroecologie, Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen / RIN, Leersum.

ELZENGA, E.F., 1975. Herpetologische waarnemingen in Zuid-Limburg 1974. Werkgroep Limburg van Lacerta.

HANEKAMP, G. & A.H.P. STUMPEL, 1984. De Geelbuikvuurpad, *Bombina variegata* (L.), in Nederland met uitsterven bedreigd. Natuurhistorisch Maandblad 73 (4): 84-89

HEIJKERS, L. 1990 Poelenaanleg in Limburg 1980-1990. Natuurhistorisch Maandblad 79 (12): 288-291.

HORST, J.TH. TER, 1959. Iets over de bescherming van reptielen en amfibieën in Zuid-Limburg. De Levende Natuur 62 (5-6): 138-144.

HORST, J.TH. TER, 1960. De verspreiding der Amphibia en Reptilia in Zuid-Limburg. Natuurhistorisch Maandblad 49 (9-12): 105-118.

LAAN, R. & B. VERBOOM, 1986. De Geelbuikvuurpad (*Bombina variegata*) in Zuid-Limburg. Het kan nog! Rapport 259. Zoologisch Laboratorium, afdeling Dieroecologie, Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen.

LAAN, R. & B. VERBOOM, 1990. De Geelbuikvuurpad en de Vroedmeesterpad. Verleden heden en toekomst. Ministerie van Landbouw, directie Natuur, Milieu en Faunabeheer. 38 p.

LENDERS, A.J.W. 2000 Beschermingsplan vroedmeesterpad en geelbuikvuurpad 2000-2004. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, 's Gravenhage.

NIEUWENHOVEN-SUNIER, L. VAN, P.J.H. VAN BREE & S. DAAN 1965. Notities over de geelbuikpad *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758) in Nederland. Natuurhistorisch Maandblad 54 (1): 7-14.

RAAIJMAKERS, C.J. & E.F. ELZENGA, 1976. Herpetologische waarnemingen in Zuid-Limburg 1975. Werkgroep Limburg van Lacerta.

SMIT, R.C.J., 1981. Verspreiding en biotopen van amfibieën in Zuid-Limburg e.o. De situatie in 1980. Instituut voor Taxonomische Zoölogie, Universiteit van Amsterdam / Rijksinstituut voor Natuurbeheer, Amsterdam / Leersum.

WIJK, D.P., VAN, 1946. Herpetogeografische Dienst. Verslag over de ontvangen opgaven in de jaren 1944. Lacerta Nieuws 4 (1). 3 -5.

Bijlage II

DNA-isolatie weefselmateriaal met Qiagen “D’Neasy Blood & Tissue Kit”.

DNA-isolatie weefselmateriaal met Qiagen "DNeasy Blood & Tissue Kit"

0 Wijzigingen

Versie 2: Ingevoerd wijzigingen volgens Handboek dd july 2006 n.a.v. Naamswijziging Tissue Kit. Inhoudelijk aangepast in

Bijlage 2: Incubatie stap 3: 56 °C . 2 x full speed in stap 10 en 12 gewijzigd in 8000 rpm.

Versie 2.1: Tekstuele wijzigingen.

Versie 2.2: Kleine aanpassingen in bijlage 2 voor spraint extracties.

Versie 2.3: Haren toevoeging verwijderd. Er is nu SWV 4046; een apart SWV over de DNA-isolatie van haren.

1 Doel

Isolatie van DNA uit dierlijk materiaal d.m.v. extractie. Het DNA wordt vervolgens opgelost in een AE-buffer.

Onderscheid wordt gemaakt t.a.v. het soort dierlijk materiaal. Wanneer het materiaal bestaat uit: spraints (Otter) dan wordt eerst een Pre-DNA-isolatie uitgevoerd met 2x CTAB, volgens SWV E4038. Na de Pre-DNA-isolatie wordt dit SWV toegepast vanaf punt 6 van Bijlage 2.

SWV E4038 wordt niet toegepast op spierweefsel en bloed. Dit materiaal wordt direct verwerkt volgens SWV E4026 punt 1 van bijlage 2.

2 Principe

DNA van dierlijk weefsel wordt met behulp van extractievloeistoffen vrijgemaakt uit de cellen en vastgehouden door het silicaatfilter. Verontreinigingen worden weggewassen Het DNA wordt met een eluens vrijgemaakt van het silicaatfilter waardoor het DNA in oplossing komt in het zg. DNA-isolaat.

3 Toepassingsgebied

SWV E4026 wordt direct toegepast op spierweefsel en bloed. Voor de DNA-isolatie van spraints wordt eerst een pre-DNA-isolatie uitgevoerd m.b.v. SWV E4038. Baculum van marter wordt anders voorbehandeld; Zie **Bijlage 2** "methode". Voor de DNA isolatie uit haren is SWV 4046 van toepassing.

Bij bot, nagel, veren, wangslimvlies, etc. moet overwogen worden of de "QIAamp DNA Investigator Kit" moet/kan worden gebruikt. Deze is één maal getest op hamster bot materiaal met groot succes.

3 Definities

N.v.t.

4 Verwijzingen

Nr.	Naam
WI-0009	Ongewenste situaties, (bijna) ongevallen en calamiteiten
WI-0010	Veiligheid laboratoria Alterra
F0204	Formulier Begeleiding DNA-monsters
F0201	Formulier toekenning monsternummers
F0200	Inhoudsopgave Monsterboek
E3403	Protocol voor de verzameling en de afvoer van chemisch afval
E4023	Autoclaveren van disposables, pipetten en vloeistoffen t.b.v. moleculaire technieken
E4038	Bereiding van de 2x CTAB-buffer gevolgd door de pre-DNA-isolatie van spraints
E4046	DNA-isolatie van haar-materiaal met de Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit

5 Veiligheids- en milieuaanwijzingen

Lees de veiligheidsaanwijzingen verstrekt bij geleverde apparatuur en chemicaliën, zie ook de Alterra-Werkinstructies: WI-0009 en WI-0010.

Gedurende de labwerkzaamheden is het dragen van een laboratoriumjas, handschoenen en een veiligheidsbril verplicht.

5.1 Risicovolle stoffen

6.1.1 ethanol 98 %

Chemiekaarten: ethanol bladzijde: 475

CAS-nummer: [64-17-5]

Etikettering: Licht ontvlambaar

Belangrijke gegevens:

Kleurloze vloeistof met een typerende geur. De damp mengt zich goed met lucht, makkelijke vorming van explosieve mengsels. Reageert heftig met oxidatiemiddelen met kans op brand en explosie

5.2 Chemisch afval

Chemisch afval wordt door aan de Firma SITA uit Almelo verwerkt. Hieronder staat de nodige informatie om de diverse afvalstromen te voorzien van de juiste informatie.

Zie ook: SWV E3403 Protocol voor de verzameling en de afvoer van chemisch afval

5.2.1 DNA-isolatie vloeistoffen

Tijdens de DNA-isolatie komen filters vrij met kleine hoeveelheden extractiebuffer, washbuffer, ethanol en andere spoelvloeistoffen. Deze vloeistoffen worden tijdens de DNA-isolatie opgevangen in een bekersglas. Na afloop van de DNA-isolatie worden de vloeistoffen overgeschonken in een 10 liter jerrycan.

- Samenstelling: restanten vloeistof van de DNA-isolatie.
- Afvalstroomnummer: 11ME91004118.
- Aggregatietoestand: Vloeibaar.
- Verpakking: UN-gekeurde 10 liter can, EcoService voldoet (bestelno: AD0500).
- Etikettering: nr:3 vuur en een etiket met de beschrijving van de samenstelling van de inhoud en vermelding van afvalstroomnummer.

Belangrijke gegevens:

- Artikelnummer: AA00087
- CAS-nummer: [67-63-0]*

*) CAS-nr. van isopropanol

6 Benodigdheden

6.1 Apparatuur en hulpmiddelen

- 7.1.1 Stoof (bijvoorbeeld: Memmert 400)
- 7.1.2 Centrifuge (bijvoorbeeld:Eppendorf 5415 D en/of de Eppendorf 5424)
- 7.1.3 Laboratoriumglaswerk
- 7.1.4 Diverse pipetten met bijpassende geautoclaveerde pipetpunten
- 7.1.5 GeautoclaveerdeEppendorfvaatjes van 1,5 ml (bijvoorbeeld: Boom 13.730.150, Type 3815)
- 7.1.6 Geautoclaveerde Pellet pestle voor 1,5 ml Epjes (7.1.6) (bijvoorbeeld: Sigma Z35,994-7)
- 7.1.7 Tough spots witte 12 mm labels voor epjes (bijvoorbeeld: Omnilabo 890411)
- 7.1.8 Qiagen Blood & DNeasy Tissue Kit (bijvoorbeeld catalogusnr: 69504 goed voor 50 isolaties of Catalogusnr: 69506 goed voor 250 isolaties)
- 7.1.9 Reageerbuisroerder (bijvoorbeeld; Cenco of MS1 Minuutshaker van IKA)

De Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (7.1.8) bevat de volgende onderdelen:

- 7.1.8.1 DNeasy Spincolumns (kleurloos)
- 7.1.8.2 Collection tubes (2 ml)
- 7.1.8.3 Handboek (Als Bijlage 1 toegevoegd aan dit SWV).

6.2 Chemicaliën

paragraaf	Stofnaam	Concentratie	Merk Bijvoorbeeld:	Bestelnummer	Houdbaarheid
7.2.1	Ethanol	99,8 %	Merck	100983	5 jaar
7.2.2	Sand Quartz (zilverzand)	n.v.t.	Sigma	S-9887	5 jaar

De Qiagen Blood & DNeasy Tissue Kit (7.1.8) bevat de volgende reagentia:

paragraaf	Stofnaam	Concentratie	Houdbaarheid
7.2.3	Buffer ATL	n.v.t.	1 jaar
7.2.4	Buffer AL	n.v.t.	1 jaar
7.2.5	Buffer AW1	Concentraat*)	1 jaar
7.2.6	Buffer AW2	Concentraat*)	1 jaar
7.2.7	Buffer AE	n.v.t.	1 jaar
7.2.8	Proteinase K	600 mAU/ml	1 jaar

*) Voeg voor gebruik van deze Buffers ethanol (7.2.1) toe volgens beschrijving op de fles.

7 Werkwijze

- Raadpleeg DNeasy Blood & Tissue Kit Handboek. Bijlage : 1; of gebruik de verkorte uitgave van het handboek die te gebruiken is op het lab. Bijlage: 2.
- Codeer de epjes (raadpleeg het monsterboek). Gebruik labels voor de epjes (7.1.7).
- Bewaar het DNA-isolaat in de diepvries op lab 2.406

8 Berekeningen

n.v.t.

9 Controle van de methode

n.v.t.

10 Registratie van gegevens

- Relevante informatie van het bemonsterde materiaal staat beschreven in het experimentenjournaal van het project, en op F0204 " Formulier begeleiding DNA-monsters
- Noteer informatie over de monsters op F0200 Inhoudsopgave Monsterboek.
- Noteer de toegekende monsternummer op F0201 Formulier toekenning monsternummers

11 Bijlagen

- 1) DNeasy Blood & Tissue Kit Handboek
- 2) Verkorte uitgave van het handboek te gebruiken op het lab

Literatuur

DNeasy Blood & Tissue Kit Handboek

Bijlage 2

DNA isolatie met behulp van de Qiagen Blood & DNeasy Tissue Kit

Methode

1. Maximaal ~25 mg weefsel / overig in genummerd geautoclaveerd epje (1.5 ml) (7.1.5) stoppen
2. DNA-isolatie uit bloed zoogdieren: 20 µl in analyse (non-nucleated bloed)
3. DNA-isolatie uit bloed vogels: 10 µl in analyse (nucleated bloed)
4. **20 µl Proteinase K** (7.2.8) toevoegen **en 180 µl ATL** ; vortexen (7.1.9) en vervolgens ; in stoof (7.1.1) bij 56 °C plaatsen

NB.

Spraints (otter) en bloed één nacht over incuberen

Tissue minimaal 3 uur incuberen totdat alles is opgelost zoniet: nacht over incuberen

EDTA-Bloed zoogdieren; 10 minuten incuberen zwenken na 5 min. (Esther)

Bloed vogels; 10 minuten incuberen bij 56°C

Baculum, hamsterbot en otterbot: 12 uur incuberen bij 56°C in 180 µl ATL en 20 µl Proteinase K daarna weer 20 µl Proteinase K toevoegen en nogmaals 12 uur incuberen bij 56° C.

Bij bot, nagel, veren, wangslimvlies, etc. moet overwogen worden of de "QIAamp DNA Investigator Kit" moet/kan worden gebruikt. Deze is één maal getest op hamster bot materiaal met groot succes.

Ga verder met punt 5.

5. Afhankelijk van materiaal 3 uur of een nacht over incuberen .
6. 15 seconden vortexen (7.1.9)
7. **200 µl AL** (7.2.4) buffer toevoegen, **direct** vortexen, zet in stoof 10 minuten bij 70°C
8. **200 µl ethanol** 99.8% (7.2.1) toevoegen, **direct** vortexen
9. De mix, verkregen onder punt 8 overpipeteren in een genummerde spin colom 7.1.8.1 (incl. opvangbuis 7.1.8.2)
10. 1 minuut afdraaien bij 8000 rpm m.b.v. de centrifuge (7.1.2)
11. Opvang weggooiën, plaats filter in een nieuwe opvangbuis (7.1.8.2) en voeg toe **500 µl AW1 buffer** (7.2.5)
12. 1 minuut afdraaien bij 8000 rpm m.b.v. de centrifuge (7.1.2)
13. Opvang weggooiën, plaats filter in een nieuwe opvangbuis (7.1.8.2) en voeg toe **500 µl AW2 buffer** (7.2.6)
14. 3 minuten full speed afdraaien m.b.v. de centrifuge (7.1.2)
15. Opvang weggooiën
16. Spin colom in genummerd epje van 1.5 mL (7.1.5) plaatsen; **200 µl AE buffer** (7.2.7) voor SPRRAINTS toevoegen, en **75 µl AE buffer** (7.2.7) voor TISSUE en BLOED; **60 µl voor VEREN**
17. 1 minuut incuberen bij kamertemperatuur. 15 minuten voor SPRRAINTS (ga naar stap 21)
18. 2 minuten centrifugeren bij 8000 rpm m.b.v. de centrifuge (7.1.2)
19. pipetteer op het filter van de spin colom voor alle templates **75 µl AE buffer** (7.2.7); en **60 µl voor VEREN**; geen tweede elutie voor SPRRAINTS.
20. 1 minuut incuberen bij kamertemperatuur
21. 2 minuten centrifugeren bij 8000 rpm m.b.v. de centrifuge (7.1.2)
22. Gooi de spin colom weg en nummer de epjes volgens paragraaf 8 (Werkwijze).
23. Bewaar de DNA-isolaten in de diepvries (-20 °C) op lab 2.406

Opmerkingen

Prepareren van Veren t.b.v. DNA-isolatie met SWV E4026

DNA Isolatie van Veren (zie ook : SWV E4035)

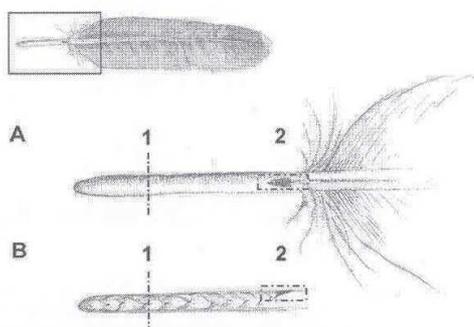


Fig. 1. General view of a typical flight feather: (A) detail of a posterior view of the base of the feather, and (B) longitudinal cross-section through the feather calamus. Two different sampling areas for feathers are shown: (1) basal tip of the calamus and (2) blood clot from the superior umbilicus.

Based on Horváth et al (2005), for big feathers it will be used both parts tip (1) and clot (2). Cut the clot in two parts to make easy the digestion or just take out the thinner skin you can find in the clot.

- Snij van grote veerpennen ca. 3-4 mm van de basale tip af .
- Snij van donsveren zoveel mogelijk van de tip af; 1 cm of meer
- Snij (alleen bij grote veerpennen) dit stukje overlans open (ATL wordt nu optimaal gebruikt)
- Kijk of in de schacht nog bloedproppen zitten en schraap die eruit.
- **Clot** (vertaling: klont, stolsel) indien duidelijk zichtbaar eruit prepareren. Veertjes eerst voorzichtig weghalen.
- Breng het geprepareerde over in een genummerd steriel epje.
- Voeg toe 180 µl ATL en 20 µl Proteinase K.
- Meng mbv. Reageerbuisschudder
- Centrifugeer m.b.v. centrifuge
- Plaats de epjes in een stoof bij 55 °C.
- Incubeer zeker een nacht over. Kijk of het schacht-materiaal is opgelost. Overweeg langere incubatie
- Vervolg de DNA-isolatie vanaf punt: 5
- Elueer in 2 x 60 µl AE-buffer

Opmerking;

- Jobs Karlson: X1 buffer is niet betrouwbaar (pH-afhankelijk) Gebruikt deze buffer niet meer
- Donsveren geven slechte tot geen resultaten
- Beste is om van 1 vogel veermonsters te combineren voor een hogere opbrengst DNA (liefst tot 5 veren)
- Combinatie van basale tip en clot per monster is aan te bevelen

DNeasy[®] Blood & Tissue Handbook

DNeasy Blood & Tissue Kit

DNeasy 96 Blood & Tissue Kit

For purification of total DNA from

animal blood

animal tissue

rodent tails

ear punches

cultured cells

fixed tissue

bacteria

insects



Trademarks: QIAGEN®, DNeasy®, RNeasy® (QIAGEN Group); DU® (Beckman Instruments, Inc.); Impact® (Matrix Technologies Corp.); Triton® (Rohm and Haas Company).

The PCR process is covered by the foreign counterparts of U.S. Patents Nos. 4,683,202 and 4,683,195 owned by F. Hoffmann-La Roche Ltd. QIAzol Lysis Reagent is a subject of US Patent No. 5,346,994 and foreign equivalents. "RNA^{later}" is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.

© 2006 QIAGEN, all rights reserved.

Contents

Kit Contents	5
Storage	6
Product Use Limitations	7
Product Warranty and Satisfaction Guarantee	7
Technical Assistance	7
Quality Control	8
Safety Information	8
Introduction	9
Principle and procedure	9
Description of protocols	12
Equipment and Reagents to Be Supplied by User	13
Important Notes	15
Sample collection and storage	15
Starting amounts of samples	15
Maximum amount of starting material	15
Very small sample sizes	15
Quantification of starting material	17
Preparation of Buffer AW1 and Buffer AW2	18
Buffer AL	18
Proteinase K	19
Copurification of RNA	19
Centrifugation (DNeasy 96 procedures)	20
Elution of pure nucleic acids	21
Expected yields	22
Purification of high-molecular-weight DNA	24
DNA Purification Protocols	
■ Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)	25
■ Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)	28
■ Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (DNeasy 96 Protocol)	31
■ Purification of Total DNA from Animal Tissues (DNeasy 96 Protocol)	35

Pretreatment Protocols	
■ Pretreatment for Paraffin-Embedded Tissue	41
■ Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue	43
■ Pretreatment for Gram-Negative Bacteria	44
■ Pretreatment for Gram-Positive Bacteria	45
Troubleshooting Guide	47
Appendix A: Determination of Yield, Purity, and Length of DNA	52
Appendix B: Cleaning S-Blocks	54
Ordering Information	55
QIAGEN Distributors and Importers	59

Kit Contents

DNeasy Blood & Tissue Kit	(50)	(250)
Catalog no.	69504	69506
Number of preps	50	250
<hr/>		
DNeasy Mini Spin Columns (colorless) in 2 ml Collection Tubes	50	250
Collection Tubes (2 ml)	100	500
Buffer ATL	10 ml	50 ml
Buffer AL*	12 ml	54 ml
Buffer AW1 (concentrate)*†	19 ml	95 ml
Buffer AW2 (concentrate)†‡	13 ml	66 ml
Buffer AE	22 ml	2 x 60 ml
Proteinase K	1.25 ml	6 ml
Handbook	1	1

* Contains a chaotropic salt. Not compatible with disinfecting agents containing bleach. See page 8 for safety information.

† Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Add ethanol (96–100%) according to the bottle label before use to obtain a working solution.

‡ Contains sodium azide as a preservative.

DNeasy 96 Blood & Tissue Kit	(4)	(12)
Catalog no.	69581	69582
Number of preps	4 x 96	12 x 96
DNeasy 96 Plates	4	12
S-Blocks*	2	2
Collection Microtubes, 1.2 ml (racked)	4 x 96	12 x 96
Collection Microtube Caps	2 x (120 x 8)	5 x (120 x 8)
Elution Microtubes RS (racked) and caps	4 x 96	12 x 96
AirPore Tape Sheets	25	3 x 25
Buffer AL [†]	86 ml	247 ml
Buffer ATL	80 ml	3 x 80 ml
Buffer AW1 (concentrate) ^{††}	98 ml	3 x 98 ml
Buffer AW2 (concentrate) ^{†§}	68 ml	3 x 68 ml
Buffer AE	2 x 110 ml	500 ml
Proteinase K	2 x 7 ml	5 x 7 ml
96-Well-Plate Register	4	12
Handbook	1	1

* Reusable; see Appendix B (page 54) for cleaning instructions.

[†] Contains a chaotropic salt. Not compatible with disinfectants containing bleach. See page 8 for safety information.

^{††} Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Add ethanol (96–100%) according to the bottle label before use to obtain a working solution.

[§] Contains sodium azide as a preservative.

Storage

DNeasy spin columns, DNeasy 96 plates, and all buffers should be stored dry, at room temperature (15–25°C) and are stable for 1 year under these conditions.

DNeasy Blood & Tissue Kits contain a ready-to-use proteinase K solution, which is supplied in a specially formulated storage buffer. Proteinase K is stable for at least 1 year after delivery when stored at room temperature. For storage longer than one year or if ambient temperatures often exceed 25°C, we suggest storing proteinase K at 2–8°C.

Product Use Limitations

DNeasy Blood & Tissue Kits and DNeasy 96 Blood & Tissue Kits are intended for research use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

All due care and attention should be exercised in the handling of the products. We recommend all users of QIAGEN® products to adhere to the NIH guidelines that have been developed for recombinant DNA experiments, or to other applicable guidelines.

Product Warranty and Satisfaction Guarantee

QIAGEN guarantees the performance of all products in the manner described in our product literature. 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, QIAGEN will replace it free of charge or refund the purchase price. We reserve the right to change, alter, or modify any product to enhance its performance and design. If a QIAGEN product does not meet your expectations, simply call your local Technical Service Department or distributor. We will credit your account or exchange the product — as you wish. Separate conditions apply to QIAGEN scientific instruments, service products, and to products shipped on dry ice. Please inquire for more information.

A copy of QIAGEN terms and conditions can be obtained on request, and is also provided on the back of our invoices. If you have questions about product specifications or performance, please call QIAGEN Technical Services or your local distributor (see back cover).

Technical Assistance

At QIAGEN we pride ourselves on the quality and availability of our technical support. Our Technical Service Departments are staffed by experienced scientists with extensive practical and theoretical expertise in molecular biology and the use of QIAGEN products. If you have any questions or experience any difficulties regarding DNeasy Blood & Tissue Kits or QIAGEN products in general, please do not hesitate to contact us.

QIAGEN customers are a major source of information regarding advanced or specialized uses of our products. This information is helpful to other scientists as well as to the researchers at QIAGEN. We therefore encourage you to contact us if you have any suggestions about product performance or new applications and techniques.

For technical assistance and more information please call one of the QIAGEN Technical Service Departments or local distributors (see back cover).

Quality Control

In accordance with QIAGEN's ISO-certified Quality Management System, each lot of DNeasy Blood & Tissue Kits and DNeasy 96 Blood & Tissue Kits is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Safety Information

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs). These are available online in convenient and compact PDF format at www.qiagen.com/ts/msds.asp where you can find, view, and print the MSDS for each QIAGEN kit and kit component.

CAUTION: DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.

Buffer AL and Buffer AW1 contain guanidine hydrochloride, which can form highly reactive compounds when combined with bleach. If liquid containing this buffer is spilt, clean with suitable laboratory detergent and water. If the spilt liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite.

The following risk and safety phrases apply to components of DNeasy Blood & Tissue Kits and DNeasy 96 Blood & Tissue Kits.

Buffer AL and Buffer AW1 (concentrate)

Contains guanidine hydrochloride: harmful, irritant. Risk and safety phrases:* R22-36/38, S13-26-36-46

Proteinase K

Contains proteinase K: sensitizer, irritant. Risk and safety phrases:* R36/37/38-42/43, S23-24-26-36/37

24-hour emergency information

Emergency medical information in English, French, and German can be obtained 24 hours a day from:

Poison Information Center Mainz, Germany

Tel: +49-6131-19240

* R22: Harmful if swallowed; R36/37/38: Irritating to eyes, respiratory system and skin; R36/38: Irritating to eyes and skin; R42/43: May cause sensitization by inhalation and skin contact; S13: Keep away from food, drink, and animal feedingstuffs; S23: Do not breathe spray; S24: Avoid contact with skin; S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice; S36: Wear suitable protective clothing; S36/37: Wear suitable protective clothing and gloves; S46: If swallowed, seek medical advice immediately, and show container or label.

Introduction

DNeasy Blood & Tissue Kits are designed for rapid purification of total DNA (e.g., genomic, mitochondrial, and pathogen) from a variety of sample sources including fresh or frozen animal tissues and cells, blood, or bacteria. DNeasy purified DNA is free of contaminants and enzyme inhibitors and is highly suited for PCR, Southern blotting, RAPD, AFLP, and RFLP applications.

Purification requires no phenol or chloroform extraction or alcohol precipitation, and involves minimal handling. This makes DNeasy Blood & Tissue Kits highly suited for simultaneous processing of multiple samples. For higher-throughput applications, the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit enables simultaneous processing of 96 or 192 samples.

The buffer system is optimized to allow direct cell lysis followed by selective binding of DNA to the DNeasy membrane. After lysis, the DNeasy Blood & Tissue spin-column procedure can be completed in as little as 20 minutes. Using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit, 96 or 192 samples can be processed in just 1 hour after lysis.

Simple centrifugation processing completely removes contaminants and enzyme inhibitors such as proteins and divalent cations, and allows simultaneous processing of multiple samples in parallel. In addition, DNeasy Blood & Tissue procedures are suitable for a wide range of sample sizes.

Purified DNA is eluted in low-salt buffer or water, ready for use in downstream applications. DNeasy purified DNA typically has an A_{260}/A_{280} ratio between 1.7 and 1.9, and is up to 50 kb in size, with fragments of 30 kb predominating. The DNeasy procedure also efficiently recovers DNA fragments as small as 100 bp.

Principle and procedure

DNeasy Blood & Tissue procedures are simple (see flowchart). Samples are first lysed using proteinase K.* Buffering conditions are adjusted to provide optimal DNA-binding conditions and the lysate is loaded onto the DNeasy Mini spin column or the DNeasy 96 plate. During centrifugation, DNA is selectively bound to the DNeasy membrane as contaminants pass through. Remaining contaminants and enzyme inhibitors are removed in two efficient wash steps and DNA is then eluted in water or buffer, ready for use. DNeasy purified DNA has A_{260}/A_{280} ratios of 1.7–1.9, and absorbance scans show a symmetric peak at 260 nm confirming high purity.

* Lysis efficiency can be improved by cell disruption using a rotor–stator homogenizer, such as the QIAGEN TissueRuptor, or a bead mill, such as the QIAGEN TissueLyser. A supplementary protocol allowing the simultaneous disruption of up to 48 tissue samples using the QIAGEN TissueLyser is available from QIAGEN Technical Services.

The DNeasy membrane combines the binding properties of a silica-based membrane with simple microspin technology or with the QIAGEN 96-Well-Plate Centrifugation System. DNA adsorbs to the DNeasy membrane in the presence of high concentrations of chaotropic salt, which remove water from hydrated molecules in solution. Buffer conditions in DNeasy Blood & Tissue procedures are designed to enable specific adsorption of DNA to the silica membrane and optimal removal of contaminants and enzyme inhibitors.

**DNeasy Mini
Procedure**

Sample



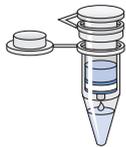
Lyse



Bind



Wash



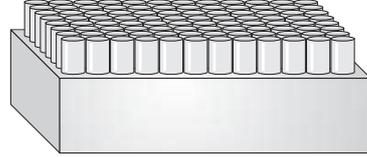
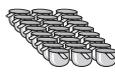
Elute



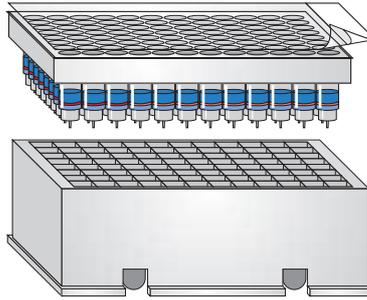
Ready-to-use DNA

**DNeasy 96
Procedure**

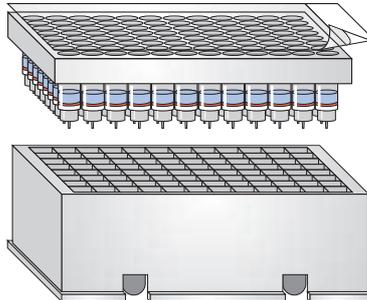
Samples



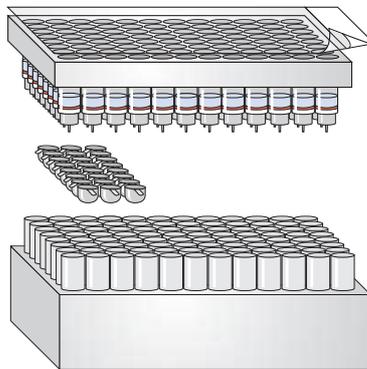
Lyse



Bind



Wash



Elute



Ready-to-use DNA

Description of protocols

Different protocols in this handbook provide detailed instructions to use DNeasy Kits for purification of total DNA.

The protocol “**Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)**”, page 25, is for use with the DNeasy Blood & Tissue Kit, for purification of DNA from animal blood (with nucleated or nonnucleated erythrocytes) or from cultured animal or human cells.

The protocol “**Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)**”, page 28, is for use with the DNeasy Blood & Tissue Kit, for purification of DNA from animal tissues, including rodent tails.

The protocol “**Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (DNeasy 96 Protocol)**”, page 31, is for use with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit, for high-throughput purification of DNA from animal blood (with nucleated or nonnucleated erythrocytes) or from cultured animal or human cells.

The protocol “**Purification of Total DNA from Animal Tissues (DNeasy 96 Protocol)**”, page 35, is for use with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit, for high-throughput purification of DNA from animal tissues, including rodent tails.

Pretreatment and specialized protocols

There are several pretreatment protocols included in this handbook, which are optimized for specific sample types. These pretreatment protocols are used in conjunction with one of the DNA purification protocols described above.

The following pretreatment protocols are included in this handbook.

- Pretreatment for Paraffin-Embedded Tissue, page 41
- Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue, page 43
- Pretreatment for Gram-Negative Bacteria, page 44
- Pretreatment for Gram-Positive Bacteria, page 45

Additional optimized protocols for purification of DNA from yeast, hair, insects, crude lysates, bone, saliva, and other specialized sample types are available online at www.qiagen.com/literature/protocols/DNeasyTissue.aspx or from QIAGEN Technical Services (see back cover).

Equipment and Reagents to Be Supplied by User

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

For all protocols

- Pipets and pipet tips
- Vortexer
- Ethanol (96–100%)*
- Optional: RNase A (100 mg/ml; cat. no. 19101)

For DNeasy Blood & Tissue Kit (spin column) protocols

- Microcentrifuge tubes (1.5 ml or 2 ml)
- Microcentrifuge with rotor for 1.5 ml and 2 ml tubes
- Thermomixer, shaking water bath, or rocking platform for heating at 56°C

For DNeasy 96 Blood & Tissue Kit protocols

- Centrifuge 4-15C or 4K15C with Plate Rotor 2 x 96 (see page 20)

- Multichannel pipet with extended tips

For efficient processing, we recommend the use of an electric multichannel pipet with a capacity of at least 1 ml per pipet tip. Options include the Matrix Impact® cordless electronic multichannel pipet, which has a unique, adjustable tip-spacing system allowing the user to transfer liquid directly from sample tubes to 96-well plates.

We recommend using extended tips with a maximum volume of 1250 µl with the Matrix multichannel pipet (available from Matrix, cat. no. 8255 for tips with filters or 8252 for tips without filters).

These multichannel pipets and pipet tips can be purchased from Matrix Technologies Corporation (www.matrixtechcorp.com).[†]

- Reagent reservoirs for multichannel pipets
- Heavy plate or similar object to place on top of collection microtubes during incubation
- Oven or incubator for heating at 56°C

* Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone.

[†] This is not a complete list of suppliers and does not include many important vendors of biological supplies.

For blood and cultured cells

- PBS, pH 7.2 (50 mM potassium phosphate, 150 mM NaCl)

For pretreatment of paraffin-embedded tissue (page 41)

- Xylene

For pretreatment of formalin-fixed tissue (page 43)

- PBS, pH 7.2 (50 mM potassium phosphate, 150 mM NaCl)

For pretreatment of gram-positive bacteria (page 45)

- Enzymatic lysis buffer:
 - 20 mM Tris·Cl, pH 8.0
 - 2 mM sodium EDTA
 - 1.2% Triton® X-100
 - Immediately before use, add lysozyme to 20 mg/ml

Important Notes

Sample collection and storage

Best results are obtained with fresh material or material that has been immediately frozen and stored at -20°C or -70°C . Repeated freezing and thawing of stored samples should be avoided, since this leads to reduced DNA size. Use of poor-quality starting material will also lead to reduced length and yield of purified DNA.

After proteinase K digestion, tissue samples can also be stored in Buffer ATL for up to 6 months at ambient temperature without any reduction in DNA quality.

For certain bacterial cultures that accumulate large amounts of metabolites and/or form very dense cell walls, it is preferable to harvest cells in the early log phase of growth. Fresh or frozen cell pellets can be used in the procedure.

Starting amounts of samples

DNeasy Blood & Tissue procedures give DNA yields that increase linearly over a wide range, for both very small and large sample sizes (e.g., from as little as 100 cells up to 5×10^6 cells).

Maximum amount of starting material

In order to obtain optimum DNA yield and quality, it is important not to overload the DNeasy spin column or DNeasy 96 plate, as this can lead to significantly lower yields than expected (see Figure 1). For samples with very high DNA contents (e.g., spleen, which has a high cell density, and cell lines with a high degree of ploidy), less than the recommended amount of sample listed in Table 1 should be used. If your starting material is not shown in Table 3 (page 23) and you have no information regarding DNA content, we recommend beginning with half the maximum amount of starting material indicated in Table 1. Depending on the yield obtained, the sample size can be increased in subsequent preparations.

Very small sample sizes

DNeasy Blood & Tissue procedures are also suitable for purifying DNA from very small amounts of starting material. If the sample has less than 5 ng DNA (<10,000 copies), 3–5 μg carrier DNA (a homopolymer such as poly-dA, poly-dT, or gDNA) should be added to the starting material. Ensure that the carrier DNA does not interfere with your downstream application. In order to prevent any interference of the carrier with the downstream application, an RNA carrier can be used. This can be removed later by RNase digestion. DNA or RNA homopolymers can be purchased from various suppliers.

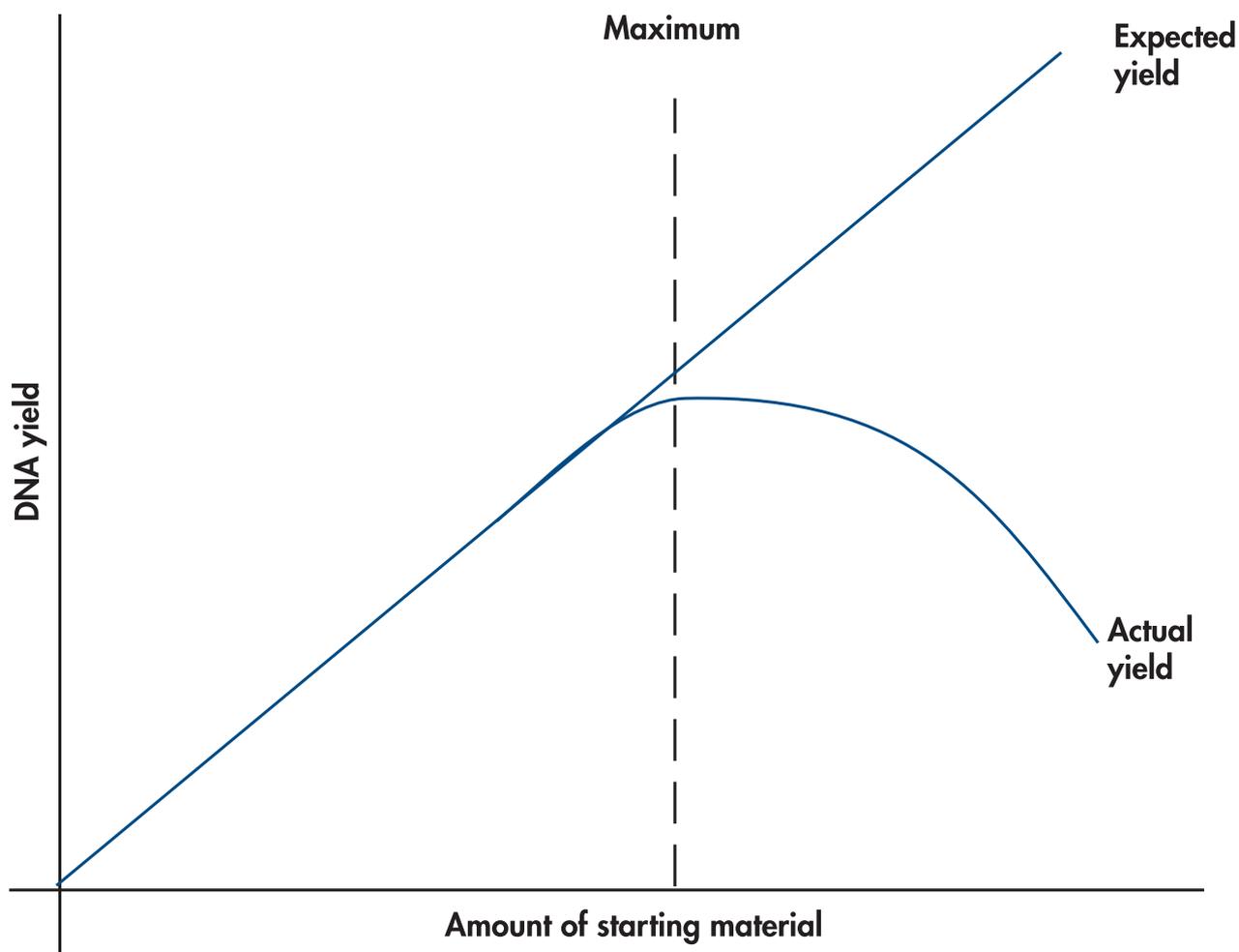


Figure 1 Schematic diagram of effect of sample size on DNA yield. If more than the maximum amount of starting material is used, DNA yield will be lower than expected.

Table 1. Maximum Amounts of Starting Material

Sample	Amount
Animal tissue (see Table 3, page 23)	25 mg (spin-column protocols) 20 mg (DNeasy 96 protocols)
Mammalian blood (see Table 4, page 23)	100 μ l
Bird or fish blood (with nucleated erythrocytes)	10 μ l
Mouse tail	0.6–1.2 cm
Rat tail	0.6 cm
Cultured cells	5×10^6
Bacteria	2×10^9

Quantification of starting material

Weighing tissue or counting cells is the most accurate way to quantify starting material. However, the approximate guidelines given below can also be followed.

Animal tissue

A 2 mm cube (approximately this size: ■; volume, approximately 8 mm³) of most animal tissues weighs approximately 10–15 mg.

Animal cells

The number of HeLa cells obtained in various culture dishes after confluent growth is given in Table 2.

Table 2. Growth Area and Number of HeLa Cells in Various Culture Dishes

Cell culture vessel	Growth area* (cm ²)	Number of cells [†]
Multiwell plates		
96-well	0.32–0.6	4–5 × 10 ⁴
48-well	1	1 × 10 ⁵
24-well	2	2.5 × 10 ⁵
12-well	4	5 × 10 ⁵
6-well	9.5	1 × 10 ⁶
Dishes		
35 mm	8	1 × 10 ⁶
60 mm	21	2.5 × 10 ⁶
100 mm	56	7 × 10 ⁶
145–150 mm	145	2 × 10 ⁷
Flasks		
40–50 ml	25	3 × 10 ⁶
250–300 ml	75	1 × 10 ⁷
650–750 ml	162–175	2 × 10 ⁷

* Per well, if multiwell plates are used; varies slightly depending on the supplier.

† Cell numbers given are for HeLa cells (approximate length = 15 μm) assuming confluent growth. Cell numbers vary since animal cells can vary in length from 10 to 100 μm.

Bacteria

Bacterial growth is usually measured using a spectrophotometer. However, it is very difficult to give specific and reliable recommendations for the correlation between OD values and cell numbers in bacterial cultures. Cell density is influenced by a variety of factors (e.g., species, media, and shaker speed) and OD readings of cultures measure light scattering rather than absorption. Measurements of light scattering are highly dependent on the distance between the sample and the detector and therefore readings vary between different types of spectrophotometer. In addition, different species show different OD values at defined wavelengths (e.g., 600 or 436 nm).

We therefore recommend calibrating the spectrophotometer used by comparing OD measurements at appropriate wavelengths with viable cell densities determined by plating experiments (e.g., see Ausubel, F.M. et al., eds. [1991] *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: John Wiley & Sons, Inc.). OD readings should be between 0.05 and 0.3 to ensure significance. Samples with readings above 0.3 should be diluted so that the readings fall within this range and the dilution factor used in calculating the number of cells per milliliter.

The following calculation can be considered as a rough guide, which may be helpful. An *E. coli* culture of 1×10^9 cells per milliliter, diluted 1 in 4, gives OD₆₀₀ values of 0.25 measured using a Beckman DU®-7400 or 0.125 using a Beckman DU-40 spectrophotometer. These correspond to calculated OD values of 1.0 or 0.5 respectively for 1×10^9 cells per milliliter.

Preparation of Buffer AW1 and Buffer AW2

Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate volume of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle and shake thoroughly. Buffer AW1 and Buffer AW2 are stable for at least 1 year after the addition of ethanol when stored closed at room temperature (15–25°C).

Buffer AL

Purification of DNA from animal blood, cultured cells, or Gram-positive bacteria

Buffer AL must be added to the sample and incubated at 56°C before ethanol is added. Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL beforehand. Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).

Purification of DNA from animal tissues

Buffer AL and ethanol (96–100%) are added in the same step. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

For the protocol “Purification of Total DNA from Animal Tissues (DNeasy 96 Protocol)”: Add 90 ml ethanol (96–100%) to the bottle containing 86 ml Buffer AL or 260 ml ethanol to the bottle containing 247 ml Buffer AL and shake thoroughly. Mark the bottle to indicate that ethanol has been added. (Please note that, for purification of DNA from animal blood, Buffer AL must be used without ethanol. Buffer AL can be purchased separately if the same kit will be used for purification of DNA from animal blood.)

Buffer AL is stable for 1 year after the addition of ethanol when stored closed at room temperature.

Proteinase K

DNeasy Blood & Tissue Kits contain ready-to-use proteinase K supplied in a specially formulated storage buffer. The activity of proteinase K is 600 mAU/ml solution (or 40 mAU/mg protein), and has been chosen to provide optimal results.

Also included in the kits is an optimized buffer for tissue lysis, Buffer ATL. To enable efficient lysis, it is advisable to cut animal tissue into small pieces. If desired, lysis time can be reduced to 20 minutes by grinding the sample in liquid nitrogen* before addition of Buffer ATL and proteinase K. Alternatively, tissue samples can be effectively disrupted before proteinase K digestion using a rotor–stator homogenizer, such as the QIAGEN TissueRuptor, or a bead mill, such as the QIAGEN TissueLyser. A supplementary protocol for simultaneous disruption of up to 48 tissue samples using the TissueLyser can be obtained by contacting QIAGEN Technical Services (see back cover).

Proteinase K is stable for at least one year after delivery when stored at room temperature (15–25°C). To store for more than one year or if ambient temperature often exceeds 25°C, we suggest keeping proteinase K at 2–8°C.

Please contact QIAGEN Technical Services or your local distributor if you have any questions about the use of proteinase K (see back cover).

Copurification of RNA

DNeasy Blood & Tissue Kits copurify DNA and RNA when both are present in the sample. Transcriptionally active tissues such as liver and kidney contain high levels of RNA, which will be copurified. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, although it does not affect PCR. If RNA-free genomic DNA is required, RNase A should be added to the sample before addition of Buffer AL, to digest the RNA. DNeasy protocols describe the use of an RNase A stock solution of 100 mg/ml. However, the amounts of RNase can be adjusted with less concentrated stock solutions, but not more than 20 µl of RNase solution should be used. Refer to the protocols for details.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

Centrifugation (DNeasy 96 procedures)

Centrifuges 4-15C and 4K15C

DNeasy 96 spin protocols use a streamlined centrifugation procedure that enables purification of DNA from up to 2 x 96 samples in parallel for direct use in any downstream application. The DNeasy 96 Blood & Tissue procedure requires use of the QIAGEN 96-Well-Plate Centrifugation System, comprising the Plate Rotor 2 x 96 and the table-top Centrifuge 4-15C or the refrigerated table-top Centrifuge 4K15C (see page 55 for ordering information). In addition to the Plate Rotor 2 x 96, a wide range of other rotors can be used with these centrifuges.

Standard table-top centrifuges and microtiter plate rotors are not suitable for the DNeasy 96 protocol for 2 reasons: the microtiter plate buckets are either not deep enough for the complete DNeasy 96 package or they will not swing out properly, and furthermore, high g-forces ($>5500 \times g$) are required for optimal performance of the DNeasy 96 procedure. The speed limit of the Centrifuge 4-15C and the Centrifuge 4K15C (6000 rpm; $5796 \times g$) is programmed so that the given g-force will not be exceeded. All centrifugation steps are performed at room temperature.

IMPORTANT: Centrifuges must be properly maintained for optimal performance. It is particularly important that the buckets and rotor pins are routinely greased to prevent suboptimal running conditions that may lead to cracking of DNeasy 96 plates.

For further information about QIAGEN Centrifuges and the Plate Rotor 2 x 96, contact QIAGEN Technical Services or your local distributor (see back cover for contact information).

Note: If the Centrifuge 4K15C is used, set the temperature to 40°C for all centrifugation steps.

Note: Use AirPore Tape Sheets (provided) to seal DNeasy 96 plates during all centrifugation steps to prevent cross-contamination between samples.

Abbreviated instructions for using the Centrifuge 4-15C and Centrifuge 4K15C

Warning: Never run the centrifuge with empty plate carriers placed inside the buckets, that is, without the collection microtubes or DNeasy 96 plates and S-Blocks. If unsupported, the carriers will collapse under high g-forces. Therefore, remove the carriers during test runs. Standard microtiter plates may be centrifuged in the same carriers if the g-force does not exceed $500 \times g$.

1. Switch on the centrifuge by pressing the main switch on the back.
2. Select the rotor selection list in the display field by turning the knob. After pressing the knob, turn the knob again to select the rotor/bucket combination "09100/09158" for the Plate Rotor 2 x 96. Confirm entry by pressing the knob. Entering the rotor number automatically sets the time and speed limits for centrifugation for that particular rotor, thus eliminating the danger of the centrifuge over-speeding.

3. Select "Speed" by turning the knob. Press the knob and by turning the knob again, set the speed to "6000". Confirm entry by pressing the knob. The corresponding relative centrifugal force (RCF) is calculated from the rotor number and speed and appears automatically in the RCF field. It is also possible to enter the RCF value "5796 x g" manually in the RCF field after selecting "RCF" in the same way.
4. Select "Time" by turning the knob. Press once and by turning the knob again, set the time as recommended in the particular protocol step. Confirm entry by pressing the knob.
5. For the Centrifuge 4K15C, set the temperature to 40°C.
6. Open the lid, place the 96-well plates with the metal carriers in the buckets then close the lid. The start and lid keys light up.
7. Push "Start" to start the centrifuge. When the centrifuge is running the lid key will not be lit. Each run can be interrupted by pushing "Stop".
8. At the end of the run, the lid key will light up. Open the centrifuge lid by pressing the lid key. Remove the plates. All preset parameters remain after a run has finished.

Elution of pure nucleic acids

Purified DNA is eluted from the DNeasy Mini spin column or DNeasy 96 plate in either Buffer AE or water. For maximum DNA yield, elution is performed in two successive steps using 200 µl Buffer AE each. For more concentrated DNA, elution can be performed in two successive steps of 100 µl each. Keep in mind that elution volume and number of elution steps depends on the amount of DNA bound to the DNeasy membrane (see Figure 2).

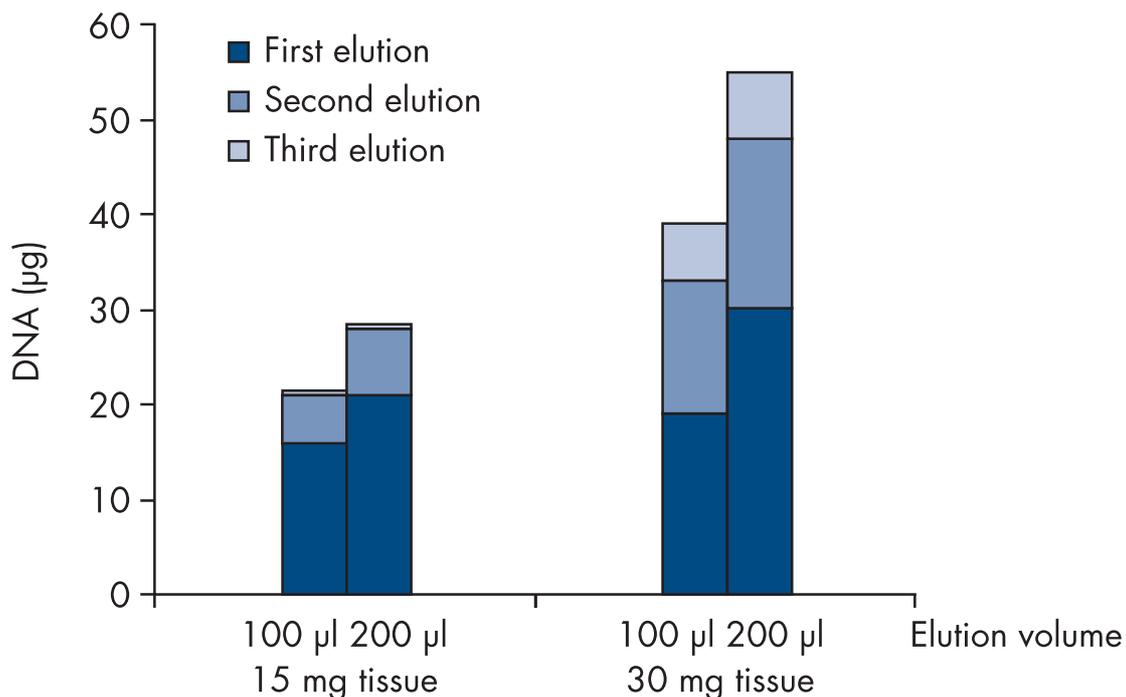


Figure 2 Yields of total nucleic acids in successive elutions of 100 or 200 µl.

For samples containing up to 10 µg DNA, a single elution step using 200 µl is sufficient. For samples containing more than 10 µg DNA, a second elution step with another 200 µl Buffer AE is recommended. Approximately 60–80% of the DNA will elute in the first elution. If >30 µg DNA is bound to the DNeasy membrane, elution in 3 x 200 µl may increase yield (see below).

Elution in 100 µl increases the DNA concentration in the eluate, but reduces overall DNA yield. To prevent dilution of the first eluate, the subsequent elution step can be performed using a fresh 1.5 ml microcentrifuge tube. More than 200 µl should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

For very small samples (containing less than 1 µg DNA), only one elution in 50 µl of Buffer AE or water is recommended.

Buffer AE is 10 mM Tris·Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0. Elution with Buffer AE guarantees optimal recovery and stability of eluted DNA. However, if you wish to elute DNA with water please ensure that the pH of the water is at least 7.0 (deionized water from certain sources can be acidic). For long-term storage of DNA, elution in Buffer AE is strongly recommended since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis. Buffer AE should be used at room temperature (15–25°C). Heating Buffer AE before elution is not necessary.

Expected yields

Yields of genomic DNA will vary from sample to sample depending on the amount and type of material processed. In addition, the quality of starting material will affect DNA yield.

Tables 3 and 4 can be used to provide an estimate of expected yield.

Table 3. Typical DNA Yields from Animal Tissues Using DNeasy Blood & Tissue Kits

Source	Amount	DNA (μg)
Mammalian blood (see Table 4)	100 μl	3–6
Bird blood	5 μl	9–40
Lymphocytes	5×10^6	15–25
HeLa cells	2×10^6	15–25
Liver	25 mg	10–30
Brain	25 mg	15–30
Lung	25 mg	5–10
Heart	25 mg	5–10
Kidney	25 mg	15–30
Spleen	10 mg	5–30
Mouse tail	1.2 cm (tip)	10–25
Rat tail	0.6 cm (tip)	20–40
Pig ear	25 mg	10–30
Horse hair	10 hairs	2–4
Fish fin	20 mg	10–20
Fish spawn (mackerel)	10 mg	5–10

Table 4. Typical DNA Yields from Animal Blood Using DNeasy Blood & Tissue Kits

Animal	Amount (μl)	DNA (μg)
Cattle	100	4–5
Horse	100	3–5
Pig	100	3–6
Sheep	100	3–6
Dog	100	4–5
Cat	100	3–6
Goat	50*	3
Chicken [†]	5	9–15

* Using more than 50 μl goat blood gave no significant increase in DNA yield.

[†] Bird blood contains nucleated erythrocytes, giving higher DNA yields than mammalian blood.

Purification of high-molecular-weight DNA

QIAGEN Genomic-tips and Blood & Cell Culture DNA Kits are recommended for large-scale purification of high-molecular-weight DNA (see page 56 for ordering information). QIAGEN Genomic-tips are available for purification of up to 500 µg of genomic DNA ranging in size from 50 to 150 kb. They are highly suited for use in Southern blotting, library construction, genome mapping, and other demanding applications. Please contact QIAGEN Technical Services or your local distributor for more information (see back cover).

Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)

This protocol is designed for purification of total DNA from animal blood (with nucleated or nonnucleated erythrocytes) or from cultured animal or human cells.

Important points before starting

- If using the DNeasy Blood & Tissue Kit for the first time, read “Important Notes” (page 15).
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C) in a microcentrifuge.
- Vortexing should be performed by pulse-vortexing for 5–10 s.
- PBS is required for use in step 1 (see page 14 for composition). Buffer ATL is not required in this protocol.
- Optional: RNase A may be used to digest RNA during the procedure. RNase A is not provided in the DNeasy Blood & Tissue Kit (see “Copurification of RNA”, page 19).

Things to do before starting

- Buffer AL may form a precipitate upon storage. If necessary, warm to 56°C until the precipitate has fully dissolved.
- Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a thermomixer, shaking water bath, or rocking platform to 56°C for use in step 2.

Procedure

- 1. For blood with nonnucleated erythrocytes, follow step 1a; for blood with nucleated erythrocytes, follow step 1b; for cultured cells, follow step 1c.**

Blood from mammals contains nonnucleated erythrocytes. Blood from animals such as birds, fish, or frogs contains nucleated erythrocytes.

- 1a. Nonnucleated: Pipet 20 μ l proteinase K into a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided). Add 50–100 μ l anticoagulated blood. Adjust the volume to 220 μ l with PBS. Continue with step 2.**

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml) and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 2.

- 1b. Nucleated:** Pipet 20 μ l proteinase K into a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided). Add 5–10 μ l anticoagulated blood. Adjust the volume to 220 μ l with PBS. Continue with step 2.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml) and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 2.

- 1c. Cultured cells:** Centrifuge the appropriate number of cells (maximum 5×10^6) for 5 min at 300 x g. Resuspend the pellet in 200 μ l PBS. Add 20 μ l proteinase K. Continue with step 2.

When using a frozen cell pellet, allow cells to thaw before adding PBS until the pellet can be dislodged by gently flicking the tube.

Ensure that an appropriate number of cells is used in the procedure. For cell lines with a high degree of ploidy (e.g., HeLa cells), it is recommended to use less than the maximum number of cells listed in Table 1, page 16.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml), mix by vortexing, and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 2.

- 2. Add 200 μ l Buffer AL (without added ethanol). Mix thoroughly by vortexing, and incubate at 56°C for 10 min.**

Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see “Buffer AL”, page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution.

- 3. Add 200 μ l ethanol (96–100%) to the sample, and mix thoroughly by vortexing.**

It is important that the sample and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

- 4. Pipet the mixture from step 3 into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.***

- 5. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.***

- 6. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at 20,000 x g (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.**

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at 20,000 × g (14,000 rpm).

- 7. Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 200 µl Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at ≥6000 × g (8000 rpm) to elute.**

Elution with 100 µl (instead of 200 µl) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield (see Figure 2, page 21).

- 8. Recommended: For maximum DNA yield, repeat elution once as described in step 7.**

This step leads to increased overall DNA yield.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

Note: Do not elute more than 200 µl into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)

This protocol is designed for purification of total DNA from animal tissues, including rodent tails.

Important points before starting

- If using the DNeasy Blood & Tissue Kit for the first time, read “Important Notes” (page 15).
- For fixed tissues, refer to the pretreatment protocols “Pretreatment for Paraffin-Embedded Tissue”, page 41, and “Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue”, page 43.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C) in a microcentrifuge.
- Vortexing should be performed by pulse-vortexing for 5–10 s.
- Optional: RNase A may be used to digest RNA during the procedure. RNase A is not provided in the DNeasy Blood & Tissue Kit (see “Copurification of RNA”, page 19).

Things to do before starting

- Buffer ATL and Buffer AL may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 56°C until the precipitates have fully dissolved.
- Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a thermomixer, shaking water bath, or rocking platform to 56°C for use in step 2.
- If using frozen tissue, equilibrate the sample to room temperature. Avoid repeated thawing and freezing of samples since this will lead to reduced DNA size.

Procedure

- 1. Cut up to 25 mg tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces, and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube. For rodent tails, place one (rat) or two (mouse) 0.4–0.6 cm lengths of tail into a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 180 µl Buffer ATL. Earmark the animal appropriately.**

Ensure that the correct amount of starting material is used (see “Starting amounts of samples”, page 15). For tissues such as spleen with a very high number of cells for a given mass of tissue, no more than 10 mg starting material should be used.

We strongly recommend to cut the tissue into small pieces to enable more efficient lysis. If desired, lysis time can be reduced by grinding the sample in liquid nitrogen* before addition of Buffer ATL and proteinase K. Alternatively, tissue samples can be effectively disrupted before proteinase K digestion using a rotor–stator homogenizer, such as the QIAGEN TissueRuptor, or a bead mill, such as the QIAGEN TissueLyser (see page 56 for ordering information). A supplementary protocol for simultaneous disruption of up to 48 tissue samples using the TissueLyser can be obtained by contacting QIAGEN Technical Services (see back cover).

For rodent tails, a maximum of 1.2 cm (mouse) or 0.6 cm (rat) tail should be used. When purifying DNA from the tail of an adult mouse or rat, it is recommended to use only 0.4–0.6 cm.

- 2. Add 20 µl proteinase K. Mix thoroughly by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a thermomixer, shaking water bath, or on a rocking platform.**

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h or, for rodent tails, 6–8 h. If it is more convenient, samples can be lysed overnight; this will not affect them adversely.

After incubation the lysate may appear viscous, but should not be gelatinous as it may clog the DNeasy Mini spin column. If the lysate appears very gelatinous, see the “Troubleshooting Guide”, page 47, for recommendations.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 µl RNase A (100 mg/ml), mix by vortexing, and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 3.

Transcriptionally active tissues such as liver and kidney contain high levels of RNA, which will copurify with genomic DNA. For tissues that contain low levels of RNA, such as rodent tails, or if residual RNA is not a concern, RNase A digestion is not necessary.

- 3. Vortex for 15 s. Add 200 µl Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 µl ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.**

It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure. Some tissue types (e.g., spleen, lung) may form a gelatinous lysate after addition of Buffer AL and ethanol. In this case, vigorously shaking or vortexing the preparation is recommended.

4. **Pipet the mixture from step 3 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.***
5. **Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.***
6. **Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.**

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm).

7. **Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 200 μ l Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) to elute.**

Elution with 100 μ l (instead of 200 μ l) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield (see Figure 2, page 21).

8. **Recommended: For maximum DNA yield, repeat elution once as described in step 7.**

This step leads to increased overall DNA yield.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

Note: Do not elute more than 200 μ l into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (DNeasy 96 Protocol)

This protocol is designed for high-throughput purification of total DNA from animal blood (with nucleated or nonnucleated erythrocytes) or from cultured animal or human cells.

Important points before starting

- If using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit for the first time, read “Important Notes” (page 15).
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- PBS is required for use in step 1 (see page 14 for composition). Buffer ATL is not required in this protocol.
- Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see “Important Notes”, page 15). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).
- Optional: RNase A may be used to digest RNA during the procedure. RNase A is not provided in the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (see “Copurification of RNA”, page 19).

Things to do before starting

- Buffer ATL and Buffer AL may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 56°C for 5 min until the precipitates have fully dissolved.
- Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Mix Buffer AW1 before use by inverting several times.
- Preheat an incubator to 56°C for use in step 2.

Procedure

- 1. For blood with nonnucleated erythrocytes, follow step 1a; for blood with nucleated erythrocytes, follow step 1b; for cultured cells, follow step 1c.**

Blood from mammals contains nonnucleated erythrocytes. Blood from animals such as birds, fish, or frogs contains nucleated erythrocytes.

- 1a. Nonnucleated: Pipet 20 μ l proteinase K into each collection microtube. Add 50–100 μ l anticoagulated blood per collection microtube. Use a 96-Well-Plate Register (provided) to identify the position of each sample. Adjust the volume to 220 μ l each with PBS. Continue with step 2.**

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml) and incubate for 5 min at room temperature before continuing with step 2.

Keep the clear covers from the collection microtube racks for use in step 3.

- 1b. Nucleated:** Pipet 20 μ l proteinase K into each collection microtube. Add 5–10 μ l anticoagulated blood. Use a 96-Well-Plate Register (provided) to identify the position of each sample. Adjust the volume to 220 μ l each with PBS. Continue with step 2.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml) and incubate for 5 min at room temperature before continuing with step 2.

Keep the clear covers from the collection microtube racks for use in step 3.

- 1c. Cultured cells:** Centrifuge the appropriate number of cells (maximum 5×10^6 each) for 5 min at 300 \times g. Use a 96-Well-Plate Register (provided) to identify the position of each sample. Resuspend the pellets in 200 μ l PBS each. Add 20 μ l proteinase K each. Continue with step 2.

When using a frozen cell pellets, allow cells to thaw before adding PBS until the pellet can be dislodged by gently flicking the tube.

Ensure that an appropriate number of cells is used in the procedure. For cell lines with a high degree of ploidy (e.g., HeLa cells), it is recommended to use less than the maximum number of cells listed in Table 1, page 16.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml). Seal the collection microtubes properly using the caps provided, mix by vortexing, and incubate for 5 min at room temperature before continuing with step 2.

Keep the clear covers from the collection microtube racks for use in step 3.

- 2. Add 200 μ l Buffer AL (without added ethanol) to each sample.**

Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see “Buffer AL”, page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).

- 3. Seal the collection microtubes properly using the caps provided. Place a clear cover (saved from step 1) over each rack of collection microtubes, and shake the racks vigorously up and down for 15 s. To collect any solution from the caps, centrifuge the collection microtubes. Allow the centrifuge to reach 3000 rpm, and then stop the centrifuge.**

Do not prolong this step.

IMPORTANT: The rack of collection microtubes must be vigorously shaken up and down with both hands to obtain a homogeneous lysate. Inverting the rack of collection microtubes is not sufficient for mixing. The genomic DNA will not be sheared by vigorous shaking. The lysate and Buffer AL should be mixed immediately and thoroughly to yield a homogeneous solution.

Keep the clear covers from the collection microtube racks for use in step 6.

4. **Incubate at 56°C for 10 min. Place a weight on top of the caps during the incubation. Mix occasionally during incubation to disperse the sample, or place on a rocking platform.**

Note: Do not use a rotary- or vertical-type shaker as continuous rotation may release the caps. If incubation is performed in a water bath make sure that the collection microtubes are not fully submerged and that any remaining water is removed prior to removing the caps in step 5.

5. **Carefully remove the caps, and add 200 µl ethanol (96–100%) to each sample.**
6. **Seal the collection microtubes properly using the caps provided. Place a clear cover over each rack of collection microtubes, and shake the racks vigorously up and down for 15 s. To collect any solution from the caps, centrifuge the collection microtubes. Allow the centrifuge to reach 3000 rpm, and then stop the centrifuge.**

Do not prolong this step.

IMPORTANT: The rack of collection microtubes must be vigorously shaken up and down with both hands to obtain a homogeneous lysate. Inverting the rack of collection microtubes is not sufficient for mixing. The genomic DNA will not be sheared by vigorous shaking. The lysate and ethanol should be mixed immediately and thoroughly to yield a homogeneous solution.

7. **Place two DNeasy 96 plates on top of S-Blocks (provided). Mark the DNeasy 96 plates for later sample identification.**
8. **Remove and discard the caps from the collection microtubes. Carefully transfer the lysis mixture (maximum 900 µl) of each sample from step 6 to each well of the DNeasy 96 plates.**

Take care not to wet the rims of the wells to avoid aerosols during centrifugation. Do not transfer more than 900 µl per well.

Note: Lowering pipet tips to the bottoms of the wells may cause sample overflow and cross-contamination. Therefore, remove one set of caps at a time, and begin drawing up the samples as soon as the pipet tips contact the liquid. Repeat until all the samples have been transferred to the DNeasy 96 plates.

9. **Seal each DNeasy 96 plate with an AirPore Tape Sheet (provided). Centrifuge for 4 min at 6000 rpm.**

AirPore Tape prevents cross-contamination between samples during centrifugation.

After centrifugation, check that all of the lysate has passed through the membrane in each well of the DNeasy 96 plates. If lysate remains in any of the wells, centrifuge for a further 4 min.

10. **Remove the tape. Carefully add 500 µl Buffer AW1 to each sample.**

Note: Ensure that ethanol has been added to Buffer AW1 prior to use.

11. **Seal each DNeasy 96 plate with a new AirPore Tape Sheet (provided). Centrifuge for 2 min at 6000 rpm.**

12. Remove the tape. Carefully add 500 µl Buffer AW2 to each sample.

Note: Ensure that ethanol has been added to Buffer AW2 prior to use.

13. Centrifuge for 15 min at 6000 rpm.

Do not seal the plate with AirPore Tape.

The heat generated during centrifugation ensures evaporation of residual ethanol in the sample (from Buffer AW2) that might otherwise inhibit downstream reactions.

14. Place each DNeasy 96 plate in the correct orientation on a new rack of Elution Microtubes RS (provided).**15. To elute the DNA, add 200 µl Buffer AE to each sample, and seal the DNeasy 96 plates with new AirPore Tape Sheets (provided). Incubate for 1 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 4 min at 6000 rpm.**

200 µl Buffer AE is sufficient to elute up to 75% of the DNA from each well of the DNeasy 96 plate.

Elution with volumes less than 200 µl significantly increases the final DNA concentration of the eluate but may reduce overall DNA yield. For samples containing less than 1 µg DNA, elution in 50 µl Buffer AE is recommended.

16. Recommended: For maximum DNA yield, repeat step 15 with another 200 µl Buffer AE.

A second elution with 200 µl Buffer AE will increase the total DNA yield by up to 25%. However due to the increased volume, the DNA concentration is reduced. If a higher DNA concentration is desired, the second elution step can be performed using the 200 µl eluate from the first elution. This will increase the yield by up to 15%.

Use new caps (provided) to seal the Elution Microtubes RS for storage.

Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (DNeasy 96 Protocol)

This protocol is designed for high-throughput purification of total DNA from animal tissues, including rodent tails.

Important points before starting

- If using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit for the first time, read “Important Notes” (page 15).
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Optional: RNase A may be used to digest RNA during the procedure. RNase A is not provided in the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (see “Copurification of RNA”, page 19).

Things to do before starting

- Buffer AL should be premixed with ethanol before use. Add 90 ml ethanol (96–100%) to the bottle containing 86 ml Buffer AL or 260 ml ethanol to the bottle containing 247 ml Buffer AL and shake thoroughly. Mark the bottle to indicate that ethanol has been added. (Please note that, for purification of DNA from animal blood, Buffer AL must be used without ethanol. Buffer AL can be purchased separately if the same kit will be used for purification of DNA from animal blood.)
- Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Buffer ATL and Buffer AL may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 56°C for 5 min until the precipitates have fully dissolved.
- Mix Buffer AW1 before use by inverting several times.
- Preheat an incubator to 56°C for use in step 4.
- If using frozen tissue, equilibrate the sample to room temperature. Avoid repeated thawing and freezing of samples since this will lead to reduced DNA size.

Procedure

1. **Cut up to 20 mg tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces. For rodent tails, place one (rat) or two (mouse) 0.4–0.6 cm lengths of tail into a collection microtube. Earmark the animal appropriately. Use a 96-Well-Plate Register (provided) to identify the position of each sample.**

Ensure that the correct amount of starting material is used (see “Starting amounts of samples”, page 15). For tissues such as spleen with a very high number of cells for a given mass of tissue, no more than 10 mg starting material should be used.

We strongly recommend to cut the tissue into small pieces to enable more efficient lysis. If desired, lysis time can be reduced by disrupting the sample using a bead mill, such as the QIAGEN TissueLyser (see page 56 for ordering information), before addition of Buffer ATL and proteinase K. A supplementary protocol for simultaneous disruption of up to 48 tissue samples using the TissueLyser can be obtained by contacting QIAGEN Technical Services (see back cover).

For rodent tails, a maximum of 1.2 cm (mouse) or 0.6 cm (rat) tail should be used. When purifying DNA from the tail of an adult mouse or rat, it is recommended to use only 0.4–0.6 cm.

Store the samples at -20°C until a suitable number has been collected (up to 192 samples). Samples can be stored at -20°C for several weeks to months without any reduction in DNA yield. DNA yields will be approximately 10–30 μg , depending on the type, length, age, and species of sample used (see “Expected yields”, page 22).

Keep the clear covers from the collection microtube racks for use in step 3.

- 2. Prepare a proteinase K–Buffer ATL working solution containing 20 μl proteinase K stock solution and 180 μl Buffer ATL per sample, and mix by vortexing. For one set of 96 samples, use 2 ml proteinase K stock solution and 18 ml Buffer ATL. Immediately pipet 200 μl working solution into each collection microtube containing the tail sections or tissue samples. Seal the microtubes properly using the caps provided.**

Note: Check Buffer ATL for precipitate. If necessary, dissolve the precipitate by incubation at 56°C for 5 min before preparing the working solution.

IMPORTANT: After preparation, the proteinase K–Buffer ATL working solution should be dispensed immediately into the collection microtubes containing the tail or tissue samples. Incubation of the working solution in the absence of substrate for >30 min reduces lysis efficiency and DNA purity.

- 3. Ensure that the microtubes are properly sealed to avoid leakage during shaking. Place a clear cover (saved from step 1) over each rack of collection microtubes, and mix by inverting the rack of collection microtubes. To collect any solution from the caps, centrifuge the collection microtubes. Allow the centrifuge to reach 3000 rpm, and then stop the centrifuge. It is essential that the samples are completely submerged in the proteinase K–Buffer ATL working solution after centrifugation.**

If the proteinase K–Buffer ATL working solution does not completely cover the sample, increase the volume of the solution to 300 μ l per sample (additional reagents are available separately; see page 56 for ordering information). Do not increase volumes above 300 μ l as this will exceed the capacity of the collection microtubes in subsequent steps.

Keep the clear covers from the collection microtube racks for use in step 5.

4. Incubate at 56°C overnight or until the samples are completely lysed. Place a weight on top of the caps during the incubation. Mix occasionally during incubation to disperse the sample, or place on a rocking platform.

Lysis time varies depending on the type, age, and amount of tail or tissue being processed. Lysis is usually complete in 1–3 h or, for rodent tails, 6–8 h, but optimal results will be achieved after overnight lysis.

After incubation the lysate may appear viscous, but should not be gelatinous as it may clog the DNeasy 96 membrane. If the lysate appears very gelatinous, see the “Troubleshooting Guide”, page 47, for recommendations.

Note: Do not use a rotary- or vertical-type shaker as continuous rotation may release the caps. If incubation is performed in a water bath make sure that the collection microtubes are not fully submerged and that any remaining water is removed prior to centrifugation in step 5.

5. Ensure that the microtubes are properly sealed to avoid leakage during shaking. Place a clear cover over each rack of collection microtubes and shake the racks vigorously up and down for 15 s. To collect any solution from the caps, centrifuge the collection microtubes. Allow the centrifuge to reach 3000 rpm, and then stop the centrifuge.

IMPORTANT: The rack of collection microtubes must be vigorously shaken up and down with both hands to obtain a homogeneous lysate. Inverting the rack of collection microtubes is not sufficient for mixing. The genomic DNA will not be sheared by vigorous shaking.

Keep the clear covers from the collection microtube racks for use in step 7.

Ensure that lysis is complete before proceeding to step 6. The lysate should be homogeneous following the vigorous shaking. To check this, slowly invert the rack of collection microtubes (making sure that the caps are tightly closed) and look for a gelatinous mass. If a gelatinous mass is visible, lysis needs to be extended by adding another 100 μ l Buffer ATL and 15 μ l proteinase K, and incubating for a further 3 h. It is very important to ensure that samples are completely lysed to achieve optimal yields and to avoid clogging of individual wells of the DNeasy 96 plate.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml). Close the collection microtubes with fresh caps, mix by shaking vigorously, and incubate for 5 min at room temperature. To collect any solution from the caps, centrifuge the collection microtubes. Allow the centrifuge to reach 3000 rpm, and then stop the centrifuge. Remove the caps, and continue with step 6.

Transcriptionally active tissues such as liver and kidney contain high levels of RNA, which will copurify with genomic DNA. For tissues that contain low levels of RNA, such as rodent tails, or if residual RNA is not a concern, RNase A digestion is usually not necessary.

- 6. Carefully remove the caps. Add 410 μ l premixed Buffer AL–ethanol to each sample.**

Note: Ensure that ethanol has been added to Buffer AL prior to use (see “Buffer AL”, page 18).

Note: A white precipitate may form upon addition of Buffer AL–ethanol to the lysate. It is important to apply all of the lysate, including the precipitate, to the DNeasy 96 plate in step 9. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure or with any subsequent application.

If the volumes of Buffer ATL and proteinase K were increased in steps 3 or 5, increase the volume of Buffer AL and ethanol accordingly. For example, 300 μ l proteinase K–Buffer ATL working solution will require 615 μ l Buffer AL–ethanol.

- 7. Ensure that the microtubes are properly sealed to avoid leakage during shaking. Place a clear cover over each rack of collection microtubes and shake the racks vigorously up and down for 15 s. To collect any solution from the caps, centrifuge the collection microtubes. Allow the centrifuge to reach 3000 rpm, and then stop the centrifuge.**

Do not prolong this step.

IMPORTANT: The rack of collection microtubes must be vigorously shaken up and down with both hands to obtain a homogeneous lysate. Inverting the rack of collection microtubes is not sufficient for mixing. The genomic DNA will not be sheared by vigorous shaking. The lysate and Buffer AL–ethanol should be mixed immediately and thoroughly to yield a homogeneous solution.

- 8. Place two DNeasy 96 plates on top of S-Blocks (provided). Mark the DNeasy 96 plates for later sample identification.**
- 9. Remove and discard the caps from the collection microtubes. Carefully transfer the lysate (maximum 900 μ l) of each sample from step 7 to each well of the DNeasy 96 plates.**

Take care not to wet the rims of the wells to avoid aerosols during centrifugation. Do not transfer more than 900 μ l per well.

Note: Lowering pipet tips to the bottoms of the wells may cause sample overflow and cross-contamination. Therefore, remove one set of caps at a time, and begin drawing up the samples as soon as the pipet tips contact the liquid. Repeat until all the samples have been transferred to the DNeasy 96 plates.

Note: If the volume of proteinase K–Buffer ATL working solution was increased in steps 3 or 5, transfer no more than 900 μ l of the supernatant from step 7 to the DNeasy 96 plate. Larger amounts will exceed the volume capacity of the individual wells. Discard any remaining supernatant from step 7 as this will not contribute significantly to the total DNA yield.

10. Seal each DNeasy 96 plate with an AirPore Tape Sheet (provided). Centrifuge for 10 min at 6000 rpm.

AirPore Tape prevents cross-contamination between samples during centrifugation. After centrifugation, check that all of the lysate has passed through the membrane in each well of the DNeasy 96 plates. If lysate remains in any of the wells, centrifuge for a further 10 min.

11. Remove the tape. Carefully add 500 μ l Buffer AW1 to each sample.

Note: Ensure that ethanol has been added to Buffer AW1 prior to use.

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the volume of proteinase K–Buffer ATL working solution was increased in steps 3 or 5.

12. Seal each DNeasy 96 plate with a new AirPore Tape Sheet (provided). Centrifuge for 5 min at 6000 rpm.

13. Remove the tape. Carefully add 500 μ l Buffer AW2 to each sample.

Note: Ensure that ethanol has been added to Buffer AW2 prior to use.

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW2 if the volume of proteinase K–Buffer ATL working solution was increased in steps 3 or 5.

14. Centrifuge for 15 min at 6000 rpm.

Do not seal the plate with AirPore Tape.

The heat generated during centrifugation ensures evaporation of residual ethanol in the sample (from Buffer AW2) that might otherwise inhibit downstream reactions.

15. Place each DNeasy 96 plate in the correct orientation on a new rack of Elution Microtubes RS (provided).

16. To elute the DNA, add 200 μ l Buffer AE to each sample, and seal the DNeasy 96 plates with new AirPore Tape Sheets (provided). Incubate for 1 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 2 min at 6000 rpm.

200 μ l Buffer AE is sufficient to elute up to 75% of the DNA from each well of the DNeasy 96 plate.

Elution with volumes less than 200 μ l significantly increases the final DNA concentration of the eluate but may reduce overall DNA yield. For samples containing less than 1 μ g DNA, elution in 50 μ l Buffer AE is recommended.

17. Recommended: For maximum DNA yield, repeat step 16 with another 200 μ l Buffer AE.

A second elution with 200 μ l Buffer AE will increase the total DNA yield by up to 25%. However due to the increased volume, the DNA concentration is reduced. If a higher DNA concentration is desired, the second elution step can be performed using the 200 μ l eluate from the first elution. This will increase the yield by up to 15%.

Use new caps (provided) to seal the Elution Microtubes RS for storage.

Protocol: Pretreatment for Paraffin-Embedded Tissue

This protocol is designed for purification of total DNA from fixed, paraffin-embedded tissues using the DNeasy Blood & Tissue Kit. The protocol describes the preliminary removal of paraffin by extraction with xylene.

Important points before starting

- The length of DNA purified from fixed tissues is usually <650 bp, depending on the type and age of the sample and the quality of the fixative used.
- Use of fixatives such as alcohol and formalin is recommended. Fixatives that cause cross-linking, such as osmic acid, are not recommended as it can be difficult to obtain amplifiable DNA from tissue fixed with these agents.
- Lysis time will vary from sample to sample depending on the type of tissue processed.
- Yields will depend both on the size and the age of the sample processed. Reduced yields compared with fresh or frozen tissues are to be expected. Therefore, eluting purified DNA in 50–100 µl Buffer AE is recommended.
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Things to do before starting

- Preheat a heating block, incubator, or water bath to 37°C for use in step 9.

Procedure

1. Place a small section (not more than 25 mg) of paraffin-embedded tissue in a 2 ml microcentrifuge tube (not provided).
2. Add 1200 µl xylene. Vortex vigorously.
3. Centrifuge in a microcentrifuge at full speed for 5 min at room temperature (15–25°C).
4. Remove supernatant by pipetting. Do not remove any of the pellet.
5. Add 1200 µl ethanol (96–100%) to the pellet to remove residual xylene, and mix gently by vortexing.
6. Centrifuge in a microcentrifuge at full speed for 5 min at room temperature.
7. Carefully remove the ethanol by pipetting. Do not remove any of the pellet.
8. Repeat steps 5–7 once.

9. Incubate the open microcentrifuge tube at 37°C for 10–15 min until the ethanol has evaporated.
10. Resuspend the tissue pellet in 180 µl Buffer ATL, and continue with step 2 of the protocol “Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)”, page 29.

Protocol: Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue

This protocol is designed for purification of total DNA from fixed, paraffin-embedded tissues. The protocol describes the preliminary washing with PBS to remove the fixative.

Important points before starting

- The length of DNA purified from fixed tissues is usually <650 bp, depending on the type and age of the sample and the quality of the fixative used.
- Use of fixatives such as alcohol and formalin is recommended. Fixatives that cause cross-linking, such as osmic acid, are not recommended as it can be difficult to obtain amplifiable DNA from tissue fixed with these agents.
- Lysis time will vary from sample to sample depending on the type of tissue processed.
- Yields will depend both on the size and the age of the sample processed. Reduced yields compared with fresh or frozen tissues are to be expected. Therefore, eluting purified DNA in a total volume of 50–100 µl Buffer AE is recommended.
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Procedure

1. Wash the sample (not more than 25 mg) twice in PBS to remove the fixative.
2. Discard the PBS and continue with step 1 of the protocol “Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)”, page 28.

Protocol: Pretreatment for Gram-Negative Bacteria

This protocol is designed for purification of total DNA from Gram-negative bacteria, such as *E. coli*. The protocol describes the preliminary harvesting of bacteria before DNA purification.

Important points before starting

- See “Quantification of starting material”, page 17, for details of how to collect and store samples, and how to determine the number of cells in a bacterial culture.
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Procedure

1. Harvest cells (maximum 2×10^9 cells) in a microcentrifuge tube by centrifuging for 10 min at $5000 \times g$ (7500 rpm). Discard supernatant.
2. Resuspend pellet in 180 μ l Buffer ATL.
3. Continue with step 2 of the protocol “Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)”, page 29.

Protocol: Pretreatment for Gram-Positive Bacteria

This protocol is designed for purification of total DNA from Gram-positive bacteria, such as *Corynebacterium* spp. and *B. subtilis*. The protocol describes the preliminary harvesting of bacteria and incubation with lysozyme to lyse their cell walls before DNA purification.

Important points before starting

- See “Quantification of starting material”, page 17, for details of how to collect and store samples, and how to determine the number of cells in a bacterial culture.
- Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see “Buffer AL”, page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Things to do before starting

- Prepare enzymatic lysis buffer as described in “Equipment and Reagents to Be Supplied by User”, page 14.
- Preheat a heating block or water bath to 37°C for use in step 3.

Procedure

1. **Harvest cells (maximum 2 x 10⁹ cells) in a microcentrifuge tube by centrifuging for 10 min at 5000 x g (7500 rpm). Discard supernatant.**
2. **Resuspend bacterial pellet in 180 µl enzymatic lysis buffer.**
3. **Incubate for at least 30 min at 37°C.**

After incubation, heat the heating block or water bath to 56°C if it is to be used for the incubation in step 5.

4. **Add 25 µl proteinase K and 200 µl Buffer AL (without ethanol). Mix by vortexing.**

Note: Do not add proteinase K directly to Buffer AL.

Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see “Buffer AL”, page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).

5. **Incubate at 56°C for 30 min.**

Optional: If required, incubate at 95°C for 15 min to inactivate pathogens. Note that incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.

6. **Add 200 μ l ethanol (96–100%) to the sample, and mix thoroughly by vortexing.**
It is important that the sample and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.
A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the DNeasy Mini spin column. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure.
7. **Continue with step 4 of the protocol “Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)”, page 30.**

Troubleshooting Guide

This troubleshooting guide may be helpful in solving any problems that may arise. The scientists in QIAGEN Technical Services are always happy to answer any questions you may have about either the information and protocols in this handbook or molecular biology applications (see back cover for contact information).

Comments and suggestions

Low yield

- | | |
|--|---|
| a) Storage of starting material | DNA yield is dependent on the type, size, age, and storage of starting material. Lower yields will be obtained from material that has been inappropriately stored (see "Sample collection and storage", page 17). |
| b) Too much starting material | In future preparations, reduce the amount of starting material used (see "Quantification of starting material", page 16). |
| c) Insufficient mixing of sample with Buffer AL and ethanol before binding | DNeasy spin-column protocols: In future preparations, mix sample first with Buffer AL and then with ethanol by pulse vortexing for 15 s each time before applying the sample to the DNeasy Mini spin column.
DNeasy 96 protocols: In future preparations, ensure that samples are mixed by vigorous shaking, as described in the protocols, before applying the sample to the DNeasy 96 plate. |
| d) DNA inefficiently eluted | Increase elution volume to 200 μ l and perform another elution step. See also "Elution of pure nucleic acids", page 21. Check that ethanol was added before applying the sample to the DNeasy Mini spin column. Check that any precipitate in Buffer ATL and/or Buffer AL was dissolved before use. |
| e) Buffer AW1 or Buffer AW2 prepared incorrectly | Make sure that ethanol has been added to Buffer AW1 and Buffer AW2 before use (see "Things to do before starting", pages 25, 28, 31, and 35). |

Comments and suggestions

- f) Water used instead of Buffer AE for elution
- The low pH of deionized water from some water purifiers may reduce DNA yield. When eluting with water, ensure that the pH of the water is at least 7.0.
- g) **Animal tissue:** Insufficient lysis
- In future preparations, reduce the amount of starting material used (see "Quantification of starting material", page 17).
- Cut tissue into smaller pieces to facilitate lysis. After lysis, vortex sample vigorously; this will not damage or reduce the size of the DNA.
- If a substantial gelatinous pellet remains after incubation and vortexing, extend incubation time at 56°C for proteinase K digest and/or increase amount of proteinase K to 40 µl. (For DNeasy 96 protocols, always check that the sample is completely lysed before addition of Buffer AL and ethanol. If a gelatinous mass is still present after the overnight incubation, lysis needs to be extended.)
- Ensure that the sample is fully submerged in the buffer containing proteinase K. If necessary, double the amount of Buffer ATL and proteinase K, and use a 2 ml microcentrifuge tube for lysis. Remember to adjust the amount of Buffer AL and ethanol proportionately in subsequent steps. (For example, a lysis step with 360 µl Buffer ATL plus 40 µl proteinase K will require 400 µl Buffer AL plus 400 µl ethanol to bind DNA to the DNeasy membrane).
- DNeasy spin-column protocols:** Pipet the sample into the DNeasy Mini spin column in two sequential loading steps. Discard flow-through between these loading steps.
- DNeasy 96 protocols:** Transfer a maximum of 900 µl of each sample to the DNeasy 96 plate.

Comments and suggestions

- h) **Bacteria:** Insufficient lysis
In future preparations, extend incubation with cell-wall-lysing enzyme and/or increase amount of lysing enzyme.
Harvest bacteria during early log phase of growth (see "Sample collection and storage", page 15).
- i) **DNeasy spin-column protocols:** DNA not bound to DNeasy Mini spin column
Check that ethanol was added before applying the sample to the DNeasy Mini spin column.
- j) **DNeasy 96 protocols:** Inefficient DNA elution
Repeat elution with Buffer AE preheated to 70°C.
After addition of Buffer AE preheated to 70°C, the DNeasy 96 plate should be incubated at room temperature for 1 min. To increase elution efficiency, extend the incubation to 5 min at 70°C.
- k) **DNeasy 96 protocols:** Unequal volumes of Buffer AE or water delivered by the multichannel pipet
Ensure that all tips are firmly fitted to the pipet. Check liquid levels in tips before dispensing.

DNeasy Mini spin column or DNeasy 96 plate clogged

Too much starting material and/or insufficient lysis

Increase g-force and/or duration of centrifugation step. In future preparations, reduce the amount of starting material used (see "Quantification of starting material", page 17). For rodent tails or bacteria, see also "Insufficient lysis" in the "Low yield" section above.

Low concentration of DNA in the eluate

Second elution step diluted the DNA

Use a new collection tube for the second eluate to prevent dilution of the first eluate. Reduce elution volume to 50–100 µl. See "Elution of pure nucleic acids", page 21.

A_{260}/A_{280} ratio of purified DNA is low

- a) Water used instead of buffer to measure A_{260}/A_{280}
Use 10 mM Tris·Cl, pH 7.5 instead of water to dilute the sample before measuring purity. See "Appendix A: Determination of Yield, Purity, and Length of DNA", page 52.
- b) Inefficient cell lysis
See "Low yield", above.

A_{260}/A_{280} ratio of purified DNA is high

High level of residual RNA

Perform the optional RNase treatment in the protocol.

DNA does not perform well in downstream applications

a) Salt carryover

Ensure that Buffer AW2 has been used at room temperature (15–25°C).

Ensure that Buffer AW1 and Buffer AW2 were added in the correct order.

b) Ethanol carryover

DNeasy spin-column protocols: Ensure that, when washing with Buffer AW2, the column is centrifuged for 3 min at 20,000 x g (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through. If ethanol is visible in the DNeasy Mini spin column (as either drops or a film), discard the flow-through, keep the collection tube, and centrifuge for a further 1 min at 20,000 x g.

DNeasy 96 protocols: Incubate the DNeasy 96 plate, uncovered, in an oven or incubator for 10 min at 80°C after the second wash to remove all traces of Buffer AW2.

c) Too much DNA used

For PCR applications, a single-copy gene can typically be detected after 35 PCR cycles with 100 ng template DNA.

DNA sheared

a) Sample repeatedly frozen and thawed

Avoid repeated freezing and thawing of starting material.

b) Sample too old

Old samples often yield only degraded DNA.

White precipitate in Buffer ATL or Buffer AL

White precipitate may form at low temperature after prolonged storage

Any precipitate formed when Buffer ATL or Buffer AL are added must be dissolved by incubating the buffer at 56°C until it disappears.

Discolored membrane after wash with Buffer AW2, or colored eluate

- a) **Rodent tails:** Hair not removed from rodent tails during preparation
- DNeasy spin-column protocols: In future preparations, centrifuge lysate for 5 min at 20,000 x *g* after digestion with proteinase K. Transfer supernatant into a new tube before proceeding with step 3.
- DNeasy 96 protocols:** In future preparations, centrifuge the rack of collection microtubes containing the lysates for 5 min at 6000 rpm at step 5. Remove the caps. Carefully transfer the lysates, without disturbing the pelleted debris, to another rack of collection microtubes. Continue the protocol at step 6.
- b) **Animal blood:** Contamination with hemoglobin
- Reduce amount of blood used and/or double the amount of proteinase K used per preparation. Try using buffy coat instead of whole blood.

Appendix A: Determination of Yield, Purity, and Length of DNA

Determination of yield and purity

DNA yield is determined by measuring the concentration of DNA in the eluate by its absorbance at 260 nm. Absorbance readings at 260 nm should fall between 0.1 and 1.0 to be accurate. Sample dilution should be adjusted accordingly. Measure the absorbance at 260 nm or scan absorbance from 220–330 nm (a scan will show if there are other factors affecting absorbance at 260 nm; for instance, absorbance at 325 nm would indicate contamination by particulate matter or a dirty cuvette). An A_{260} value of 1 (with a 1 cm detection path) corresponds to 50 μg DNA per milliliter water. Water should be used as diluent when measuring DNA concentration since the relationship between absorbance and concentration is based on extinction coefficients calculated for nucleic acids in water. * Both DNA and RNA are measured with a spectrophotometer at 260 nm; to measure only DNA in a mixture of DNA and RNA, a fluorimeter must be used.

An example of the calculations involved in DNA quantification is shown below.

Volume of DNA sample = 100 μl
Dilution = 20 μl of DNA sample + 180 μl distilled water (1/10 dilution)

Measure absorbance of diluted sample in a 0.2 ml cuvette

A_{260} = 0.2
Concentration of DNA sample = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \times A_{260} \times dilution factor
= 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \times 0.2 \times 10
= 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Total amount = concentration \times volume of sample in milliliters
= 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \times 0.1 ml
= 10 μg DNA

The ratio of the readings at 260 nm and 280 nm (A_{260}/A_{280}) provides an estimate of the purity of DNA with respect to contaminants that absorb UV, such as protein. However, the A_{260}/A_{280} ratio is influenced considerably by pH. Since water is not buffered, the pH and the resulting A_{260}/A_{280} ratio can vary greatly. Lower pH results in a lower A_{260}/A_{280} ratio and reduced sensitivity to protein contamination. For accurate values, we recommend measuring absorbance in 10 mM Tris·Cl, pH 7.5, in which pure DNA has an A_{260}/A_{280} ratio of 1.8–2.0. Always be sure to calibrate the spectrophotometer with the same solution.

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomcynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

Determination of length

The precise length of genomic DNA should be determined by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) through an agarose gel. To prepare the sample for PFGE, the DNA should be concentrated by alcohol precipitation and the DNA pellet dried briefly at room temperature (15–25°C) for 5–10 minutes. Avoid drying the DNA pellet for more than 10 minutes since overdried genomic DNA is very difficult to redissolve. Redissolve in approximately 30 µl TE buffer, pH 8.0,* for at least 30 minutes at 60°C. Load 3–5 µg of DNA per well. Standard PFGE conditions are as follows:

- 1% agarose gel in 0.5 x TBE electrophoresis buffer*
- switch intervals = 5–40 seconds
- run time = 17 hours
- voltage = 170 V

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

Appendix B: Cleaning S-Blocks

Cleaning S-Blocks

To avoid cross-contamination, after each use rinse the S-Blocks thoroughly in tap water, incubate for 1 min at room temperature in 0.4 M HCl,* empty, and wash thoroughly with distilled water. Used S-Blocks can also be autoclaved after washing. Additional S-Blocks can be ordered separately (see page 55 for ordering information).

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
DNeasy Blood & Tissue Kit (50)	50 DNeasy Mini Spin Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	69504
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	250 DNeasy Mini Spin Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	69506
DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (4)*	For 4 x 96 DNA minipreps: 4 DNeasy 96 Plates, Proteinase K, Buffers, S-Blocks, AirPore Tape Sheets, Collection Microtubes (1.2 ml), Elution Microtubes RS, Caps, 96-Well Plate Registers	69581
DNeasy 96 Tissue Kit (12)*	For 12 x 96 DNA minipreps: 12 DNeasy 96 Plates, Proteinase K, Buffers, S-Blocks, AirPore Tape Sheets, Collection Microtubes (1.2 ml), Elution Microtubes RS, Caps, 96-Well Plate Registers	69582
QIAGEN 96-Well Plate Centrifugation System		
Centrifuge 4-15C	Universal laboratory centrifuge with brushless motor	Inquire
Centrifuge 4K15C	Universal refrigerated laboratory centrifuge with brushless motor	Inquire
Plate Rotor 2 x 96	Rotor for 2 QIAGEN 96-well plates, for use with QIAGEN Centrifuges	81031
Accessories		
Collection Tubes (2 ml)	1000 Collection Tubes (2 ml)	19201
Collection Microtubes (racked, 10 x 96)	Nonsterile polypropylene tubes (1.2 ml), 960 in racks of 96	19560
Collection Microtube Caps (120 x 8)	Nonsterile polypropylene caps for collection microtubes (1.2 ml) and round-well blocks, 960 in strips of 8	19566
S-Blocks (24)	96-well blocks with 2.2 ml wells, 24 per case	19585

* Larger kit sizes and/or formats available; please inquire.

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
AirPore Tape Sheets (50)	Microporous tape sheets for covering 96-well blocks: 50 sheets per pack	19571
TissueRuptor	Handheld rotor–stator homogenizer	Inquire
TissueRuptor Disposable Probes (25)	25 nonsterile plastic disposable probes for use with the TissueRuptor	990890
Tissuelyser	Universal laboratory mixer-mill disruptor	Inquire
Tissuelyser Adapter Set 2 x 24	2 sets of Adapter Plates and 2 racks for use with 2.0 ml microcentrifuge tubes on the Tissuelyser	69982
Tissuelyser Adapter Set 2 x 96	2 sets of Adapter Plates for use with Collection Microtubes (racked) on the Tissuelyser	69984
Stainless Steel Beads, 5 mm (200)	Stainless Steel Beads, suitable for use with the Tissuelyser system	69989
QIAGEN Proteinase K (2 ml)	2 ml (>600 mAU/ml, solution)	19131
QIAGEN Proteinase K (10 ml)	10 ml (>600 mAU/ml, solution)	19133
RNase A (17,500 U)	2.5 ml (100 mg/ml; 7000 units/ml, solution)	19101
Buffer AL (216 ml)	216 ml Lysis Buffer	19075
Buffer ATL (200 ml)	200 ml Tissue Lysis Buffer for 1000 preps	19076
Buffer AW1 (Concentrate, 242 ml)	242 ml Wash Buffer (1) Concentrate	19081
Buffer AW2 (Concentrate, 324 ml)	324 ml Wash Buffer (2) Concentrate	19072
Buffer AE (240 ml)	240 ml Elution Buffer	19077
Related products		
QIAGEN Genomic-tip 20/G	25 columns	10223
QIAGEN Genomic-tip 100/G	25 columns	10243
QIAGEN Genomic-tip 500/G	10 columns	10262
Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (25)	25 QIAGEN Genomic-tip 20/G, QIAGEN Protease, Buffers	13323

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (25)	25 QIAGEN Genomic-tip 100/G, QIAGEN Protease, Buffers	13343
Blood & Cell Culture DNA Maxi Kit (10)	10 QIAGEN Genomic-tip 500/G, QIAGEN Protease, Buffers	13362
BioSprint 15 DNA Blood Kit (45)*	For 45 preps on the BioSprint 15 workstation: 5-Rod Covers, 5-Tube Strips, MagAttract Suspension G, Buffers and Reagents	940014
BioSprint 96 DNA Blood Kit (48)*	For 48 preps on the BioSprint 96 workstation: Large 96-Rod Covers, 96-Well Microplates MP, S-Blocks, MagAttract Suspension G, Buffers and Reagents	940054
RNeasy® Mini Kit (50)*	For 50 RNA minipreps: 50 RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml and 2 ml), RNase-free Reagents and Buffers	74104
RNeasy Midi Kit (10)*	For 10 RNA midipreps: 10 RNeasy Midi Spin Columns, Collection Tubes (15 ml), RNase-free Reagents and Buffers	75142
RNeasy Maxi Kit (12)	For 12 RNA maxipreps: 12 RNeasy Maxi Spin Columns, Collection Tubes (50 ml), RNase-free Reagents and Buffers	75162
RNeasy Protect Mini Kit (50)*	For RNA stabilization and 50 RNA minipreps: RNA/ater® RNA Stabilization Reagent (50 ml), 50 RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml and 2 ml), RNase-free Reagents and Buffers	74124

* Larger kit sizes and/or formats available; please inquire.

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50)*	For 50 RNA minipreps: 50 RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml and 2 ml), Proteinase K, RNase-free DNase I, RNase-free Reagents and Buffers	74704
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50)*	For 50 RNA minipreps: 50 RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml and 2 ml), QIAzol Lysis Reagent, RNase-free Reagents and Buffers	74804

* Larger kit sizes and/or formats available; please inquire.

QIAGEN Distributors and Importers

Please see the back cover for contact information for your local QIAGEN office.

Argentina

Tecnolab S.A.
Tel: (011) 4555 0010
Fax: (011) 4553 3331
E-mail: info@tecnolab.com.ar

Bangladesh

GeneTech Biotechnology
Tel: +880-2-8624304
Fax: +880-2-9568738
E-mail: info@genebiotechbd.com

Bosnia-Herzegovina

MEDILINE d.o.o.
Tel: +386 1 830-80-40
Fax: +386 1 830-80-70
+386 1 830-80-63
E-mail: info@mediline.si

Brazil

Uniscience do Brasil
Tel: 011 3622 2320
Fax: 011 3622 2323
E-mail: info@uniscience.com

Chile

Biosonda SA
Tel: +562 209 6770
Fax: +562 274 5462
E-mail: ventas@biosonda.cl

China

Eastwin Scientific, Inc.
Order: +86-400-8182168
Tel: +86-10-51663168
Fax: +86-10-82898283
E-mail: laborder@eastwin.com.cn

Gene Company Limited

Tel: +86-21-64951899
Fax: +86-21-64955468
E-mail:
info_bj@genecompany.com (Beijing)
info_sh@genecompany.com (Shanghai)
info_cd@genecompany.com (Chengdu)
info_gz@genecompany.com (Guangzhou)

Genetimes Technology, Inc.
Order: 800-820-5565
Tel: +86-21-54262677
Fax: +86-21-64398855
E-mail: order@genetimes.com.cn

Colombia

GENTECH – Genetics & Technology
Tel: (+57)(4)2519037
Fax: (+57)(4)2516555
E-mail:
gerencia@gentechcolombia.com
soporte@gentechcolombia.com

Croatia

INEL Medicinska Tehnika d.o.o.
Tel: (01) 2984-898
Fax: (01) 6520-966
E-mail: inel-medicinska-tehnika@zg.htnet.hr

Cyprus

SciElectronics Ltd
Tel: +357 22 467880/90
Fax: +357 22 764614
E-mail: a.sarpetsas@biotronics.com.cy

Czech Republic

BIO-CONSULT spol. s.r.o.
Tel/Fax: (+420) 2 417 29 792
E-mail: info@bioconsult.cz

Ecuador

INMUNOCHEM S.A.C.
Tel: +51 1 4409678
Fax: +51 1 4223701
E-mail: inmunochem@terra.com.pe

Egypt

Clinilab
Tel: 52 57 212
Fax: 52 57 210
E-mail: Clinilab@link.net

Estonia

Quantum Eestis AS
Tel: +372 7301321
Fax: +372 7304310
E-mail: quantum@quantum.ee

Greece

BioAnalytica S.A.
Tel: (210)-640 03 18
Fax: (210)-646 27 48
E-mail: bioanalyt@hol.gr

Hong Kong SAR

Gene Company Limited
Tel: +852-2896-6283
Fax: +852-2515-9371
E-mail: info@genehk.com

Genetimes Technology International Holding Ltd.

Tel: +852-2385-2818
Fax: +852-2385-1308
E-mail: hongkong@genetimes.com.hk

Hungary

BioMarker Kft.
Tel: +36 28 419 986
Fax: +36 28 422 319
E-mail: biomarker@biomarker.hu

India

Genetix
Tel: +91-11-51427031
Fax: +91-11-25419631
E-mail: genetix@genetixbiotech.com

Indonesia

PT Research Biolabs
Tel: +62 21 5865357
E-mail: indonesia@researchbiolabs.com

Israel

Eldan Electronic Instruments Co. Ltd.
Tel: +972-3-937 1133
Fax: +972-3-937 1121
E-mail: bio@eldan.biz

Jordan

SAHOURY GROUP
Tel: +962 6 4633290-111
Fax: +962 6 4633290-110
E-mail: info@sahoury.com

Korea

LRS Laboratories, Inc.
Tel: (02) 924-86 97
Fax: (02) 924-86 96
E-mail: webmaster@lrslab.co.kr

Philekorea Technology, Inc.

Tel: 1544-3137
Fax: 1644-3137
E-mail: support@philekorea.co.kr

Latvia

SIA "J.I.M."
Tel: 7136393
Fax: 7136394
E-mail: jim@mednet.lv

Lithuania

INTERLUX
Tel: +370-5-2786850
Fax: +370-5-2796728
E-mail: spirit@interlux.lt

Malaysia

RESEARCH BIOLABS SDN. BHD.
Tel: (603)-8070 3101
Fax: (603)-8070 5101
E-mail: biolabs@tm.net.my

Mexico

Química Valaner S.A. de C.V.
Tel: (55) 55 25 57 25
Fax: (55) 55 25 56 25
E-mail: ventas@valaner.com

New Zealand

Biolab Ltd
Tel: (09) 980 6700
0800 933 966
Fax: (09) 980 6788
E-mail: biosciences@nzl.biolabgroup.com

Oman

Al Mazouri Medical & Chemical Supplies
Tel: +971 4 266 1272
(ext. 301, 310, 311)
+971 4 269 0612
(ATTN: LAB DIVISION)
E-mail: shaji@almaz.net.ae

Pakistan

Pakistan Microbiological Associates
Tel: +92-51-5567953
Fax: +92-51-5514134
E-mail: orderpma@comsats.net.pk

Peru

INMUNOCHEM S.A.C.
Tel: +51 1 4409678
Fax: +51 1 4223701
E-mail: inmunochem@terra.com.pe

Portugal

Syngen Biotech Sp.z.o.o.
Tel: (071) 798 58 50 - 52
Fax: (071) 798 58 53
E-mail: info@syngen.pl

Portugal

IZASA PORTUGAL, LDA
Tel: (21) 424 7312
Fax: (21) 417 2674
E-mail: consultasbiotec@izasa.es

Romania

Zyrcon Medical S. R. L.
Tel: +40 21 2245607
Fax: +40 21 2245608
E-mail:
virgil.dracea@zyrconmedical.ro
secretariat@zyrconmedical.ro

Saudi Arabia

Abdulla Fouad Holding Company
Tel: (03) 8324400
Fax: (03) 8346174
E-mail: sadiq.omar@abdulla-fouad.com

Singapore

Research Biolabs Pte Ltd
Tel: 6777 5366
Fax: 6778 5177
E-mail: sales@researchbiolabs.com

Slovak Republic

BIO-CONSULT Slovakia spol. s.r.o.
Tel/Fax: (02) 5022 1336
E-mail: bio-cons@cdicon.sk

Slovenia

MEDILINE d.o.o.
Tel: (01) 830-80-40
Fax: (01) 830-80-70
(01) 830-80-63
E-mail: info@mediline.si

South Africa

Southern Cross Biotechnology (Pty) Ltd
Tel: (021) 671 5166
Fax: (021) 671 7734
E-mail: info@scb.co.za

Spain

IZASA, S.A.
Tel: (93) 902.20.30.90
Fax: (93) 902.22.33.66
E-mail: consultasbiotec@izasa.es

Taiwan

TAIGEN Bioscience Corporation
Tel: (02) 2880 2913
Fax: (02) 2880 2916
E-mail: order@taigen.com

Thailand

Theera Trading Co. Ltd.
Tel: (02) 412-5672
Fax: (02) 412-3244
E-mail: theetrad@samart.co.th

Turkey

Medek Medikal Ürünler ve Sağlık Hizmetleri A. S.
Tel: (216) 302 15 80
Fax: (216) 302 15 88
E-mail: makialp@med-ek.com

United Arab Emirates

Al Mazouri Medical & Chemical Supplies
Tel: +971 4 266 1272
(ext. 301, 310, 311)
+971 4 269 0612
(ATTN: LAB DIVISION)
E-mail: shaji@almaz.net.ae

Uruguay

Bionova Ltda
Tel: +598 2 6130442
Fax: +598 2 6142592
E-mail: bionova@internet.com.uy

Venezuela

SAIXX Technologies c.a.
Tel: +58212 3248518
+58212 7616143
+58212 3255838
+58212 7615945
Fax: +58212 7615945
E-mail: ventas@saixx.com
saixxventas@cantv.net

Vietnam

Viet Anh Instruments Co., Ltd.
Tel: +84-4-5119452
Fax: +84-4-5119453
E-mail: VietanHHN@hn.vnn.vn

All other countries

QIAGEN GmbH, Germany

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066
Austria ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11
Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556
Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)
China ■ Orders 021-51345678 ■ Fax 021-51342500 ■ Technical 021-51345678
Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942
Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413
France ■ Orders 01-60-920-920 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930
Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400
Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061
Italy ■ Orders 02-33430411 ■ Fax 02-33430426 ■ Technical 800 787980
Japan ■ Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811
Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067
The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602
Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712
Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328
Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12
UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999
USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)



Bench Protocol: Animal Blood (Spin-Column Protocol)



Note: Before using this bench protocol, you should be completely familiar with the safety information and detailed protocols in the *DNeasy Blood & Tissue Handbook*.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AL.
- Ensure that ethanol has been added to Buffers AW1 and AW2.
- Preheat a thermomixer, shaking water bath, or rocking platform for heating at 56°C.

Procedure

- 1a. **Nonnucleated blood:** Pipet 20 µl proteinase K into a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube. Add 50–100 µl anticoagulated blood. Adjust the volume to 220 µl with PBS.
- 1b. **Nucleated blood:** Pipet 20 µl proteinase K into a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube. Add 5–10 µl anticoagulated blood. Adjust the volume to 220 µl with PBS.
- 1c. **Cultured cells:** Centrifuge maximum 5×10^6 cells for 5 min at 300 x g. Resuspend in 200 µl PBS. Add 20 µl proteinase K.
2. Add 200 µl Buffer AL. Mix by vortexing. Incubate at 56°C for 10 min.
3. Add 200 µl ethanol (96–100%). Mix thoroughly by vortexing.
4. Pipet the mixture into a DNeasy Mini spin column in a 2 ml collection tube. Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.
5. Place the spin column in a new 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer AW1. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$. Discard flow-through and collection tube.
6. Place the spin column in a new 2 ml collection tube, add 500 µl Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at 20,000 x g (14,000 rpm). Discard flow-through and collection tube.

Remove the spin column carefully so that it does not come into contact with the flow-through.

7. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube, and add 200 µl Buffer AE for elution. Incubate for 1 min at room temperature. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$.

Recommended: Repeat this step for maximum yield.

Bench Protocol: Animal Tissues (Spin-Column Protocol)



Note: Before using this bench protocol, you should be completely familiar with the safety information and detailed protocols in the *DNeasy Blood & Tissue Handbook*.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffers ATL and AL.
- Ensure that ethanol has been added to Buffers AW1 and AW2.
- Preheat a thermomixer, shaking water bath, or rocking platform for heating at 56°C.
- If using frozen tissue, equilibrate the sample to room temperature.

Procedure

1. **Cut tissue (up to 25 mg; up to 10 mg spleen) into small pieces, and place in 1.5 ml microcentrifuge tube. For rodent tails, use one (rat) or two (mouse) 0.4–0.6 cm lengths of tail. Add 180 µl Buffer ATL.**
2. **Add 20 µl proteinase K. Mix by vortexing, and incubate at 56°C until completely lysed. Vortex occasionally during incubation, or place in a thermomixer, in a shaking water bath, or on a rocking platform.**

Lysis is usually complete in 1–3 h or, for rodent tails, 6–8 h. Samples can be lysed overnight.

3. **Vortex for 15 s. Add 200 µl Buffer AL to the sample. Mix thoroughly by vortexing. Then add 200 µl ethanol (96–100%). Mix again thoroughly.**

Alternatively, premix Buffer AL and ethanol, and add together.

4. **Pipet the mixture into a DNeasy Mini spin column in a 2 ml collection tube. Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.**
5. **Place the spin column in a new 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer AW1. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$. Discard flow-through and collection tube.**
6. **Place the spin column in a new 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer AW2. Centrifuge for 3 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm). Discard flow-through and collection tube.**

Remove the spin column carefully so that it does not come into contact with the flow-through.

7. **Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube, and add 200 µl Buffer AE for elution. Incubate for 1 min at room temperature. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$.**

Recommended: Repeat this step for maximum yield.

Bijlage III

DNA-isolatie van wangslimvlies-materiaal (uit Swabs) met de Qiagen "D'Neasy Blood & Tissue Kit".

DNA-isolatie van wangslimvlies-materiaal (uit Swabs) met de Qiagen "DNeasy Blood & Tissue Kit"

0 Wijzigingen

Toevoeging: Methode, voorbereiding voor swabs bewaard op ethanol.

1 Doel

Isolatie van DNA uit swabs bevattende wangslimvlies cellen (zowel droog bewaard, als bewaard op ethanol 96%) d.m.v. extractie. Het DNA wordt vervolgens opgelost in een AE-buffer.

Dit protocol is de dato 08-10-2010 zowel getest voor swabs, met wangslimvlies, afkomstig van de geelbuikvuurpad (*Bombina variegata*) als voor swabs afkomstig van de rugstreeppad (*Epidalea calamita*) en de bruine kikker (*Rana temporaria*).

2 Principe

DNA van dierlijk wangslimvlies wordt met behulp van extractievloeistoffen vrijgemaakt uit de cellen en vastgehouden door het silicaatfilter. Verontreinigingen worden weggewassen. Het DNA wordt met een eluens vrijgemaakt van het silicaatfilter waardoor het DNA in oplossing komt in het zg. DNA-isolaat.

3 Toepassingsgebied

SWV E4048 is getest op wangslimvlies verkregen van de geelbuikvuurpad (*Bombina variegata*), van de rugstreeppad (*Epidalea calamita*), en van de bruine kikker (*Rana temporaria*). Echter werkt dit standaardwerkvoorschrift waarschijnlijk ook voor vele andere soorten.

Opmerking

Dit standaardwerkvoorschrift (SOP) is gebaseerd op: "SOP E4026, Tissue DNA-isolation", "QIAamp® DNA Investigator Handbook", "Broquet, T. *et al.*, 2007" en "Beebee, T.J.C., 2008".

4 Definities

N.v.t.

5 Verwijzingen

Nr.	Naam
WI-0009	Ongewenste situaties, (bijna) ongevallen en calamiteiten
WI-0010	Veiligheid laboratoria Alterra
F0204	Formulier Begeleiding DNA-monsters
F0201	Formulier toekenning monsternummers
F0200	Inhoudsopgave Monsterboek
E3403	Protocol voor de verzameling en de afvoer van chemisch afval
E4023	Autoclaveren van disposables, pipetten en vloeistoffen t.b.v. moleculaire technieken

6 Veiligheids- en milieuaanwijzingen

Lees de veiligheidsaanwijzingen verstrekt bij geleverde apparatuur en chemicaliën, zie ook de Alterra-Werkinstructies: WI-0009 en WI-0010.

Gedurende de labwerkzaamheden is het dragen van een laboratoriumjas, handschoenen en een veiligheidsbril verplicht.

6.1 Risicovolle stoffen

6.1.1 ethanol 98 %

Chemiekaarten: ethanol bladzijde: 475

CAS-nummer: [64-17-5]

Etikettering: Licht ontvlambaar

Belangrijke gegevens:

Kleurloze vloeistof met een typerende geur. De damp mengt zich goed met lucht, makkelijke vorming van explosieve mengsels. Reageert heftig met oxidatiemiddelen met kans op brand en explosie.

6.2 Chemisch afval

Chemisch afval wordt door aan de Firma SITA uit Almelo verwerkt. Hieronder staat de nodige informatie om de diverse afvalstromen te voorzien van de juiste informatie.

Zie ook: SWV E3403 Protocol voor de verzameling en de afvoer van chemisch afval

6.2.1 DNA-isolatie vloeistoffen

Tijdens de DNA-isolatie komen filters vrij met kleine hoeveelheden extractiebuffer, washbuffer, ethanol en andere spoelvloeistoffen. Deze vloeistoffen worden tijdens de DNA-isolatie opgevangen in een bekersglas. Na afloop van de DNA-isolatie worden de vloeistoffen overgeschonken in een 10 liter jerrycan.

- Samenstelling: restanten vloeistof van de DNA-isolatie.
- Afvalstroomnummer: 11ME91004118.
- Aggregatietoestand: Vloeibaar.
- Verpakking: UN-gekeurde 10 liter can, EcoService voldoet (bestelno: AD0500).
- Etikettering: nr:3 vuur en een etiket met de beschrijving van de samenstelling van de inhoud en vermelding van afvalstroomnummer.

Belangrijke gegevens:

Artikelnummer: AA00087

CAS-nummer: [67-63-0]*

*) CAS-nr. van isopropanol

7 Benodigheden

7.1 Apparatuur en hulpmiddelen

- 7.1.1 Stoof (bijvoorbeeld: Memmert 400)
- 7.1.2 Centrifuge (bijvoorbeeld: Eppendorf 5415 D en/of de Eppendorf 5424)
- 7.1.3 Laboratoriumglaswerk
- 7.1.4 Diverse pipetten met bijpassende geautoclaveerde pipetpunten
- 7.1.5 Epjes Lobind van 1,5 ml (bijvoorbeeld: VWR 525-0130)
- 7.1.6 Geautoclaveerde Pellet pestle voor 1,5 ml Epjes (7.1.6) (bijvoorbeeld: Sigma Z35,994-7)
- 7.1.7 Tough spots witte 12 mm labels voor epjes (bijvoorbeeld: Omnilabo 890411)
- 7.1.8 Qiagen Blood & DNeasy Tissue Kit (bijvoorbeeld catalogusnr: 69504 goed voor 50 isolaties of Catalogusnr: 69506 goed voor 250 isolaties)
- 7.1.9 Reageerbuisroerder (bijvoorbeeld; Cenco of MS1 Minuutshaker van IKA)
- 7.1.10 Epjes Lobind van 2.0 ml (bijvoorbeeld: VWR 525-0131)
- 7.1.11 SpeedVac. Niet aanwezig op Alterra, mogelijk te gebruiken op Zodiac.
Contact kan via Ivo Laros of direct met:
Bert Dibbits, e-mail: Bert.Dibbits@wur.nl, tel.: 0317-482445

Extra gekocht bij de firma QIAGEN

- 7.1.12 QIAshredder bestelnummer 79654 (50 preps) of 79656 (250 preps)

De Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (7.1.8) bevat de volgende onderdelen:

- 7.1.8.1 DNeasy Spincolumns (kleurloos)
- 7.1.8.2 Collection tubes (2 ml)
- 7.1.8.3 Handboek (Als Bijlage 1 toegevoegd aan dit SWV).

7.2 Chemicaliën

paragraaf	Stofnaam	Concentratie	Merk Bijvoorbeeld:	Bestelnummer	Houdbaarheid
7.2.1	Ethanol	99,8 %	Merck	100983	5 jaar
7.2.2	Sand Quartz (zilverzand)	n.v.t.	Sigma	S-9887	5 jaar
7.2.3	Ethanol	96 %	Klinipath	4096-9005	5 jaar

De Qiagen Blood & DNeasy Tissue Kit (7.1.8) bevat de volgende reagentia:

paragraaf	Stofnaam	Concentratie	Houdbaarheid
7.2.3	Buffer ATL	n.v.t.	1 jaar
7.2.4	Buffer AL	n.v.t.	1 jaar
7.2.5	Buffer AW1	Concentraat *)	1 jaar
7.2.6	Buffer AW2	Concentraat *)	1 jaar
7.2.7	Buffer AE	n.v.t.	1 jaar
7.2.8	Proteinase K	600 mAU/ml	1 jaar

*) Voeg voor gebruik van deze Buffers ethanol (7.2.1) toe volgens beschrijving op de fles.

8 Werkwijze

- Raadpleeg DNeasy Blood & Tissue Kit Handboek. Bijlage : 1; of gebruik de verkorte uitgave van het handboek die te gebruiken is op het lab. Bijlage: 2.
- Codeer de epjes (raadpleeg het monsterboek). Gebruik labels voor de epjes (7.1.7).
- Bewaar het DNA-isolaat in de diepvries op lab 2.406

9 Berekeningen

n.v.t.

10 Controle van de methode

n.v.t.

11 Registratie van gegevens

- Relevante informatie van het bemonsterde materiaal staat beschreven in het experimentenjournaal van het project, en op F0204 "Formulier begeleiding DNA-monsters".
- Noteer informatie over de monsters op F0200 Inhoudsopgave Monsterboek.
- Noteer de toegekende monsternummer op F0201 Formulier toekenning monsternummers.

12 Bijlagen

- 1) DNeasy Blood & Tissue Kit Handboek
- 2) Verkorte uitgave van het handboek te gebruiken op het lab
- 3) QIAamp® DNA Investigator Handbook

Literatuur

DNeasy Blood & Tissue Kit Handbook
QIAamp® DNA Investigator Handbook
Broquet, T.; Berset-Braendli, L.; Emaresi, G.; Fuagalli, L. (2007). Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conserv. Genet.* Volume: 8, pages: 509-511.
Beebee, T.J.C. (2008). Buccal swabbing as a source of DNA from squamate reptiles. *Conserv. Genet.* Volume: 9, pages: 1087-1088.

Bijlage 2

DNA isolatie uit Swabs m.b.v. van de Qiagen Blood & DNeasy Tissue Kit

Methode

Als de swab is opgeslagen in een epje met 96% ethanol, deze eerst drogen met behulp van een SpeedVac (niet aanwezig op Alterra, voor contact informatie zie punt 7.1.11)

Indien dit lastig is kan er ook voor worden gekozen om dit op een andere manier te doen, deze manier is echter nog niet getest. De ep inclusief swab en ethanol eerst 20 minuten afdraaien op full speed, vervolgens een groot deel van de ethanol af te pipetteren (ethanol wel bewaren in nieuwe ep voor zekerheid) en uiteindelijk het laatste restje ethanol droog te laten dampen (eventueel overnacht) in een zuurkast bij kamertemperatuur.

1. Wattentip van de Swab in 2 ml epje (7.1.10) stoppen en afknippen (tussentijds schaar reinigen met een tissue bevochtigt met **ethanol 96%, 7.2.3**).
2. **400 µl ATL** toevoegen en **20 µl Proteinase K** (7.2.8), na toevoegen **direct** vortexen en vervolgens in stoof (7.1.1) bij 56 °C plaatsen.
3. Een nacht over incuberen.
4. 15 seconden vortexen (7.1.9).
5. **400 µl AL** (7.2.4) buffer toevoegen, **direct** vortexen, zet in stoof 15 minuten bij 70°C (om de 5 minuten epjes vortexen).
6. **400 µl ethanol** 99.8% (7.2.1) toevoegen, **direct** vortexen.
7. **700 µl** (maximum dat in spin kolom past) van de mix, verkregen onder punt 6 overpipeteren in een genummerde spincolumn (7.1.8.1) incl. opvangbuis (7.1.8.2).
8. 1 minuut afdraaien bij 8000 rpm m.b.v. de centrifuge (7.1.2), opvang weggoeien en spin column vervolgens weer terug plaatsen in opvangbuis.
9. Herhaal punt 7 en 8. Ga dan verder met punt 10.
10. Swab overplaatsen in QIA-shredder column (7.1.12) met behulp van een pincet (tussentijds pincet reinigen met een tissue bevochtigt met **ethanol 96%, 7.2.3**).
11. QIA-shredder column 2 minuten full speed afdraaien m.b.v. de centrifuge (7.1.2), Shredder column weggoeien.
12. Overige restant van de mix, verkregen onder punt 11 overpipeteren vanuit de opvangbuis in de bijbehorende spincolumn (7.1.8.1).
13. Spincolumn 1 minuut afdraaien bij 8000 rpm m.b.v. de centrifuge (7.1.2), opvang weggoeien.
14. Plaats spincolumn vervolgens in een nieuwe opvangbuis (7.1.8.2).
15. Voeg toe **500 µl AW1 buffer** (7.2.5)
16. 1 minuut afdraaien bij 8000 rpm m.b.v. de centrifuge (7.1.2).
17. Opvang weggoeien, plaats filter in een nieuwe opvangbuis (7.1.8.2)
18. Voeg toe **500 µl AW2 buffer** (7.2.6)
19. 3 minuten full speed afdraaien m.b.v. de centrifuge (7.1.2).
20. Opvang weggoeien.
21. Spincolumn in genummerd 1.5 ml epje (7.1.6) plaatsen en 10 minuten laten uitdampen bij kamertemperatuur (verdampen ethanol).
22. Vervolgens **200 µl AE buffer** (7.2.7) toevoegen.
23. 5 minuut laten incuberen bij kamertemperatuur.
24. 2 minuten centrifugeren bij 8000 rpm m.b.v. de centrifuge (7.1.2).
25. Gooi de spincolumn weg en nummer de epjes volgens paragraaf 8 (Werkwijze).
26. Bewaar de DNA-isolaten in de diepvries (-20 °C) op lab 2.406

Bijlage IV

QIAamp DNA Investigator Handbook

QIAamp® DNA Investigator Handbook

For purification of total (genomic and mitochondrial)
DNA from

- surface and buccal swabs
- FTA® and Guthrie cards
- body fluid stains
- chewing gum
- cigarette butts
- nail clippings and hair
- paper and similar materials
- small volumes of blood or saliva
- tissues
- laser-microdissected specimens
- bones and teeth
- sexual assault specimens



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN is the leading provider of innovative sample and assay technologies, enabling the isolation and detection of contents of any biological sample. Our advanced, high-quality products and services ensure success from sample to result.

QIAGEN sets standards in:

- Purification of DNA, RNA, and proteins
- Nucleic acid and protein assays
- microRNA research and RNAi
- Automation of sample and assay technologies

Our mission is to enable you to achieve outstanding success and breakthroughs. For more information, visit www.qiagen.com.



QIAGEN is a member of the Forest Stewardship Council (FSC). For the production of printed materials, including handbooks, QIAGEN has a policy to select suppliers that comply with FSC standards for printing processes and well-managed forests.

Contents

Kit Contents	4
Storage	4
Quality Control	4
Product Use Limitations	5
Product Warranty and Satisfaction Guarantee	5
Technical Assistance	5
Safety Information	6
Introduction	7
Principle and procedure	7
Automated DNA purification on the QIAcube	7
Equipment and Reagents to Be Supplied by User	10
Important Notes	11
Carrier RNA	11
Handling of QIAamp MinElute columns	11
Preparation of buffers	12
Protocols	
■ Isolation of Total DNA from Surface and Buccal Swabs	14
■ Isolation of Total DNA from FTA and Guthrie Cards	18
■ Isolation of Total DNA from Body Fluid Stains	21
■ Isolation of Total DNA from Chewing Gum	24
■ Isolation of Total DNA from Cigarette Butts	27
■ Isolation of Total DNA from Nail Clippings and Hair	30
■ Isolation of Total DNA from Paper and Similar Materials	33
■ Isolation of Total DNA from Small Volumes of Blood or Saliva	36
■ Isolation of Total DNA from Tissues	39
■ Isolation of Total DNA from Laser-Microdissected Specimens	42
■ Isolation of Total DNA from Bones and Teeth	45
■ Isolation of Total DNA from Sexual Assault Specimens	48
Troubleshooting Guide	52
Appendix A: Working with DNA	54
Appendix B: Cleanup of DNA	54
Ordering Information	56

Kit Contents

QIAamp DNA Investigator Kit	(50)
Catalog no.	56504
Number of preps	50
QIAamp MinElute® Columns	50
Collection Tubes (2 ml)	200
Buffer ATL	50 ml
Buffer AL*	33 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml
Buffer ATE	12 ml
Carrier RNA (red cap)	310 µg
Proteinase K	1.25 ml
Handbook	1

* Contains a guanidine salt. Not compatible with disinfectants containing bleach. See page 6 for safety information.

† Contains sodium azide as a preservative.

Storage

QIAamp MinElute columns should be stored at 2–8°C upon arrival and are stable under these conditions for at least one year after delivery. However, short-term storage (up to 4 weeks) at room temperature (15–25°C) does not affect their performance.

All buffers can be stored at room temperature (15–25°C) and are stable for at least one year after delivery.

QIAamp DNA Investigator Kits contain a novel, ready-to-use proteinase K solution, which is supplied in a specially formulated storage buffer. Proteinase K is stable for at least one year after delivery when stored at room temperature (15–25°C). For storage longer than one year or if ambient temperatures often exceed 25°C, we suggest storing proteinase K at 2–8°C.

Quality Control

In accordance with QIAGEN's ISO-certified Quality Management System, each lot of QIAamp DNA Investigator Kits is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality. Functional QC testing ensures that the QIAamp DNA Investigator Kit meets the high standards required by forensic scientists.

Product Use Limitations

The QIAamp DNA Investigator Kit is intended for molecular biology applications. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

All due care and attention should be exercised in the handling of the products. We recommend all users of QIAGEN products to adhere to the NIH guidelines that have been developed for recombinant DNA experiments, or to other applicable guidelines.

Product Warranty and Satisfaction Guarantee

QIAGEN guarantees the performance of all products in the manner described in our product literature. 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, QIAGEN will replace it free of charge or refund the purchase price. We reserve the right to change, alter, or modify any product to enhance its performance and design. If a QIAGEN® product does not meet your expectations, simply call your local Technical Service Department or distributor. We will credit your account or exchange the product — as you wish. Separate conditions apply to QIAGEN scientific instruments, service products, and to products shipped on dry ice. Please inquire for more information.

A copy of QIAGEN terms and conditions can be obtained on request, and is also provided on the back of our invoices. If you have questions about product specifications or performance, please call QIAGEN Technical Services or your local distributor (see back cover or visit www.qiagen.com).

Technical Assistance

At QIAGEN, we pride ourselves on the quality and availability of our technical support. Our Technical Service Departments are staffed by experienced scientists with extensive practical and theoretical expertise in sample and assay technologies and the use of QIAGEN products. If you have any questions or experience any difficulties regarding the QIAamp DNA Investigator Kit or QIAGEN products in general, please do not hesitate to contact us.

QIAGEN customers are a major source of information regarding advanced or specialized uses of our products. This information is helpful to other scientists as well as to the researchers at QIAGEN. We therefore encourage you to contact us if you have any suggestions about product performance or new applications and techniques.

For technical assistance and more information, please see our Technical Support center at www.qiagen.com/Support or call one of the QIAGEN Technical Service Departments or local distributors (see back cover or visit www.qiagen.com).

Safety Information

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs). These are available online in convenient and compact PDF format at www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx where you can find, view, and print the MSDS for each QIAGEN kit and kit component.



CAUTION: DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.

Buffers AL and AW1 contain guanidine hydrochloride, which can form highly reactive compounds when combined with bleach.

If liquid containing these buffers is spilt, clean with suitable laboratory detergent and water. If the spilt liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite.

The following risk and safety phrases apply to components of the QIAamp DNA Investigator Kit:

Buffer AL and Buffer AW1

Contains guanidine hydrochloride: harmful, irritant. Risk and safety phrases:* R22-36/38, S13-26-36-46

Proteinase K

Contains proteinase K: sensitizer, irritant. Risk and safety phrases:* R36/37/38-42/43, S23-24-26-36/37

24-hour emergency information

Emergency medical information in English, French, and German can be obtained 24 hours a day from:

Poison Information Center Mainz, Germany

Tel: +49-6131-19240

* R22: Harmful if swallowed; R36/38: Irritating to eyes and skin; R36/37/38: Irritating to eyes, respiratory system, and skin; R42/43: May cause sensitization by inhalation and skin contact; S13: Keep away from food, drink, and animal feedingstuffs; S23: Do not breathe spray; S24: Avoid contact with skin; S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice; S36: Wear suitable protective clothing; S36/37: Wear suitable protective clothing and gloves; S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show container or label.

Introduction

The QIAamp DNA Investigator Kit uses well-established technology for purification of genomic and mitochondrial DNA from small sample volumes or sizes. The kit combines the selective binding properties of a silica-based membrane with flexible elution volumes of between 20 and 100 µl. The procedure is suitable for a wide range of forensic and human-identity sample materials.

The procedure is designed to ensure that there is no sample-to-sample cross-contamination. After sample lysis, the simple QIAamp DNA Investigator procedure, which is highly suited for simultaneous processing of multiple samples, yields pure DNA in less than 40 minutes.

DNA is eluted in Buffer ATE or water and is immediately ready for use in amplification reactions or for storage at –20°C. Purified DNA is free of proteins, nucleases, and other inhibitors.

Principle and procedure

The QIAamp DNA Investigator procedure consists of 4 steps (see flowchart, page 9):

- Lyse: sample is lysed under denaturing conditions with proteinase K
- Bind: DNA binds to the membrane and contaminants flow through
- Wash: residual contaminants are washed away
- Elute: pure, concentrated DNA is eluted from the membrane

Automated DNA purification on the QIAcube®

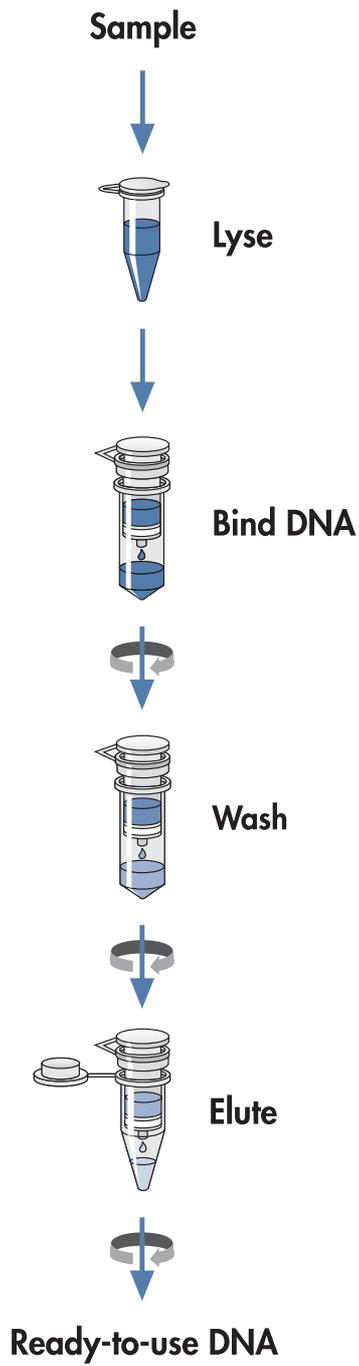
Purification of DNA from forensic and human-identity samples using the QIAamp DNA Investigator Kit can be automated on the QIAcube. The innovative QIAcube uses advanced technology to process QIAGEN spin columns, enabling seamless integration of automated, low-throughput sample prep into your laboratory workflow. Sample preparation using the QIAcube follows the same steps as the manual procedure (i.e., lyse, bind, wash, and elute). For more information about the automated procedure, see the relevant protocol sheet available at www.qiagen.com/MyQIAcube.

The QIAcube is preinstalled with protocols for purification of plasmid DNA, genomic DNA, RNA, viral nucleic acids, and proteins, plus DNA and RNA cleanup. The range of protocols available is continually expanding, and additional QIAGEN protocols can be downloaded free of charge at www.qiagen.com/MyQIAcube.



Figure 1. Automated DNA purification. DNA purification using the QIAamp DNA Investigator Kit can be automated on the QIAcube.

QIAamp DNA Investigator Procedure



Fully automatable on the QIAcube

Equipment and Reagents to Be Supplied by User

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

- Ethanol (96–100%)*
- 0.2 ml, 1.5 ml, or 2 ml microcentrifuge tubes (for lysis steps)
- 1.5 ml microcentrifuge tubes (for wash and elution steps) (available from Brinkmann [Safe-Lock, cat. no. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, cat. no. 0030 120.086], or Sarstedt [Safety Cap, cat. no. 72.690])†
- Pipet tips (to avoid cross contamination, we recommend pipet tips with aerosol barriers)
- Thermomixer, heated orbital incubator, heating block, or water bath
- Microcentrifuge with rotor for 2 ml tubes

For swabs, FTA and Guthrie cards, chewing gum, cigarette butts, nail clippings and hair, paper, and similar materials

- Scissors or appropriate cutting device

For swabs and stained fabrics

- Optional: QIAshredder spin columns (for maximum yields), see page 56 for ordering information

For nail clippings and hair, semen stains, and sexual assault specimens

- Dithiothreitol (DTT), 1 M aqueous solution

For laser-microdissected specimens

- 0.2 ml microcentrifuge tubes (for lysis steps)

For bones and teeth

- Metal blender (e.g., Waring)† or TissueLyser with the Grinding Jar Set, S. Steel, see page 56 for ordering information
- Liquid nitrogen

For sexual assault specimens

- Additional Buffer ATL, see page 56 for ordering information

* Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone.

† This is not a complete list of suppliers and does not include many important vendors of biological supplies.

Important Notes

Carrier RNA

The kit is supplied with carrier RNA, which can be added to Buffer AL if required. Carrier RNA enhances binding of DNA to the QIAamp MinElute column membrane, especially if there are very few target molecules in the sample.

The amount of lyophilized carrier RNA provided is sufficient for the volume of Buffer AL supplied with the kit. The concentration of carrier RNA used in the QIAamp DNA Investigator procedure allows the procedure to be used as a generic purification system compatible with many different amplification systems.

Different amplification systems vary in efficiency depending on the total amount of nucleic acid present in the reaction. If carrier RNA is used, eluates from QIAamp MinElute columns contain both sample DNA and carrier RNA, with the amount of carrier RNA greatly exceeding the amount of DNA. Calculations of how much eluate to add to downstream amplifications should therefore be based on the amount of carrier RNA added to Buffer AL. To obtain the highest levels of sensitivity in amplification reactions, it may be necessary to adjust the amount of carrier RNA added to Buffer AL.

Handling of QIAamp MinElute columns

Due to the sensitivity of nucleic acid amplification technologies, the following precautions are necessary when handling QIAamp MinElute columns to avoid cross-contamination between sample preparations:

- Carefully apply the sample or solution to the QIAamp MinElute column. Pipet the sample into the QIAamp MinElute column without wetting the rim of the column.
- Always change pipet tips between liquid transfers. We recommend the use of aerosol-barrier pipet tips.
- Avoid touching the QIAamp MinElute column membrane with the pipet tip.
- After all pulse-vortexing steps, briefly centrifuge the microcentrifuge tubes to remove drops from the inside of the lids.
- Open only one QIAamp MinElute column at a time, and take care to avoid generating aerosols.
- Wear gloves throughout the entire procedure. In case of contact between gloves and sample, change gloves immediately.

Centrifugation

QIAamp MinElute columns will fit into most standard 1.5–2 ml microcentrifuge tubes. Additional 2 ml collection tubes are available separately.

Centrifugation of QIAamp MinElute columns is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce centrifuge noise. Centrifugation at full speed will not improve DNA yields.

However, centrifugation of QIAamp MinElute columns at full speed is required in 2 steps of the procedure: the dry centrifugation step after the membranes are washed and the elution step.

All centrifugation steps should be carried out at room temperature (15–25°C).

Processing QIAamp MinElute columns in a microcentrifuge

- Always close QIAamp MinElute columns before placing them in the microcentrifuge. Centrifuge as described in the relevant protocol.
- Flow-through fractions may contain hazardous waste and should be disposed of appropriately.
- For efficient parallel processing of multiple samples, we recommend filling a rack with collection tubes into which QIAamp MinElute columns can be transferred after centrifugation. Used collection tubes containing flow-through can be discarded, and the new collection tubes containing the QIAamp MinElute columns can be placed directly in the microcentrifuge.

Preparation of buffers

Preparing Buffer ATL

Before starting the procedure, check whether precipitate has formed in Buffer ATL. If necessary, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.

Preparing Buffer AL

Before starting the procedure, check whether precipitate has formed in Buffer AL. If necessary, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.

Preparing Buffer AW1

Add 25 ml ethanol (96–100%) to the bottle containing 19 ml Buffer AW1 concentrate. Tick the check box on the bottle label to indicate that ethanol has been added. Reconstituted Buffer AW1 can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

Note: Before starting the procedure, mix the reconstituted Buffer AW1 by shaking.

Preparing Buffer AW2

Add 30 ml ethanol (96–100%) to the bottle containing 13 ml Buffer AW2 concentrate. Reconstituted Buffer AW2 can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

Note: Before starting the procedure, mix the reconstituted Buffer AW2 by shaking.

Adding carrier RNA to Buffer AL

For purification of DNA from very small amounts of sample, such as low volumes of blood (<10 µl) or forensic samples, we recommend adding carrier RNA to Buffer AL. For samples containing larger amounts of DNA, addition of carrier RNA is optional.

Add 310 µl Buffer ATE to the tube containing 310 µg lyophilized carrier RNA to obtain a solution of 1 µg/µl. Dissolve the carrier RNA thoroughly, divide it into conveniently sized aliquots, and store at –20°C. Do not freeze–thaw the aliquots of carrier RNA more than 3 times.

Calculate the volume of Buffer AL and dissolved carrier RNA needed per batch of samples by multiplying the number of samples to be **simultaneously** processed by the volumes given in Table 1. To allow for pipetting errors, always prepare enough buffer for processing two extra samples.

Gently mix Buffer AL and dissolved carrier RNA by inverting the tube 10 times. To avoid foaming, do not vortex. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL. Buffer AL containing carrier RNA is stable at room temperature (15–25°C) for up to 48 hours.

Table 1. Volumes of Buffer AL and dissolved carrier RNA required for one DNA preparation using the QIAamp DNA Investigator Kit

Protocol	Volume of Buffer AL added to sample (µl)	Dissolved carrier RNA (µl)
Surface and buccal swabs	600* or 400†	1
FTA and Guthrie cards	300	1
Body fluid stains	300	1
Chewing gum	300	1
Cigarette butts	300	1
Nail clippings and hair	300	1
Paper and similar materials	300	1
Small volumes of blood or saliva	100	1
Tissues	200	1
Laser-microdissected specimens	50	1
Bones and teeth	300	1
Sexual assault specimens	300	1

* If using ejectable swabs (e.g., Whatman® Omni Swabs).

† If using nonejectable swabs (e.g., cotton or Dacron® swabs).

Protocol: Isolation of Total DNA from Surface and Buccal Swabs

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from surface swabs, sperm swabs, blood swabs, and saliva swabs.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Check whether carrier RNA is required (see pages 11 and 13).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 3 and (optional) step 15, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 6. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If processing semen swabs, prepare an aqueous 1 M DTT (dithiothreitol) stock solution. Store aliquots at –20°C. Thaw immediately before use.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.
- Optional: To harvest lysate remaining in the swab, QIAshredder spin columns may be required.

Procedure

1. Place the swab in a 2 ml microcentrifuge tube (not provided).

If using an Omni Swab, eject the swab by pressing the end of the stem towards the swab.

If using a cotton or Dacron swab, separate the swab from its shaft by hand or by using scissors.

2. Add 20 µl proteinase K and either 600 µl Buffer ATL (if using an Omni Swab) or 400 µl Buffer ATL (if using a cotton or Dacron swab), close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.

3. Place the 2 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 1 h.

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.

4. **Briefly centrifuge the 2 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
5. **Add either 600 μ l Buffer AL (if using an Omni Swab) or 400 μ l Buffer AL (if using a cotton or Dacron swab), close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 6.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 μ g dissolved carrier RNA to either 600 μ l Buffer AL (if using an Omni Swab) or 400 μ l Buffer AL (if using a cotton or Dacron swab). Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

6. **Place the 2 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.**

If using a thermoblock or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.

7. **Briefly centrifuge the 2 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
8. **Add either 300 μ l ethanol (96–100%) (if using an Omni Swab) or 200 μ l ethanol (96–100%) (if using a cotton or Dacron swab), close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient binding in step 10, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

9. **Briefly centrifuge the 2 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
10. **If using an Omni Swab, follow step 10a. If using a cotton or Dacron swab, follow step 10b.**

- 10a. **Carefully transfer 700 μ l lysate from step 9 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Carefully discard the flow-through from the collection tube and then place the QIAamp MinElute column back into the collection tube. Carefully apply the remaining lysate from step 9 to the QIAamp MinElute column without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

Note: Up to 250 μl lysate remains in the swab. To harvest this remaining lysate, place the swab in a QIAshredder spin column (not supplied) and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 2 min. Transfer the flow-through to the QIAamp MinElute column without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

- 10b. Carefully transfer the entire lysate from step 9 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

Note: Up to 200 μl lysate remains in the swab. To harvest this remaining lysate, place the swab in a QIAshredder spin column (not supplied) and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 2 min. Transfer the flow-through to the QIAamp MinElute column without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

- 11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 μl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
- 12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

- 13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μl of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
- 14. Centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

15. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.

16. Apply 20–100 µl Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

17. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from FTA and Guthrie Cards

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from whole blood, saliva, or buccal cells dried and immobilized on FTA cards, Guthrie cards, or similar collection devices.

Important point before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 4 and (optional) step 16, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 7. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.
- Optional: If processing very small amounts of starting material, add carrier RNA dissolved in Buffer ATE to Buffer AL according to the instructions on page 13.

Procedure

1. **Cut 3 mm (1/8 inch) diameter punches from a dried spot with a single-hole paper punch. Place up to 3 card punches into a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**
2. **Add 280 µl Buffer ATL.**
3. **Add 20 µl proteinase K and mix thoroughly by vortexing.**
4. **Place the 1.5 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for 1 h.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.

5. **Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
6. **Add 300 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during the heat incubation in step 7.

Note: If processing only 1 blood card punch with a diameter of 3 mm or less, we recommend adding carrier RNA to Buffer AL (see page 13). Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

- 7. Place the 1.5 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min.

- 8. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
- 9. Add 150 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient binding in step 11, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

- 10. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
- 11. Carefully transfer the entire lysate from step 10 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

- 12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
- 13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

14. Carefully open the QIAamp MinElute column, and add 700 μl of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
15. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

16. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.
17. Apply 20–100 μl Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). If using small elution volumes (<50 μl), dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 μl less than the volume of elution solution applied to the column.

18. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Body Fluid Stains

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from material stained with blood, saliva, or semen.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Check whether carrier RNA is required (see pages 11 and 13).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 3 and (optional) step 16, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 6. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- If processing semen stains, prepare an aqueous 1 M DTT (dithiothreitol) stock solution. Store aliquots at –20°C. Thaw immediately before use.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.
- Optional: If processing stained fabrics, QIAshredder spin columns may be required.

Procedure

- 1. Cut out up to 0.5 cm² of stained material and then cut it into smaller pieces. Transfer the pieces to a 2 ml microcentrifuge tube (not provided).**
- 2. Add 300 µl Buffer ATL and 20 µl proteinase K. If processing semen stains, add 20 µl 1 M DTT as well. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s.**
- 3. Place the tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 1 h.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.
- 4. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.**

5. Add 300 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 6.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 µg dissolved carrier RNA to 300 µl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

6. Place the tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.

7. Briefly centrifuge the 2 ml tube to remove drops from the inside of the lid.

If solid particles are still visible, centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min, and carefully transfer supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

Lysate remaining in solid sample material (e.g., denim) can be harvested by transferring the material to a QIAshredder spin column (not supplied) and centrifuging at full speed for 2 min. Transfer the flow-through to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

8. Add 150 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s.

To ensure efficient binding in step 10, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

9. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.

10. Carefully transfer the supernatant from step 9 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim.

11. Close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

- 13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

- 14. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
- 15. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

- 16. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.**
- 17. Apply 20–50 μ l Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.**

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 μ l less than the volume of elution solution applied to the column.

- 18. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Chewing Gum

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from chewing gum.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Check whether carrier RNA is required (see pages 11 and 13).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 3 and (optional) step 15, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 6. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.

Procedure

1. **Cut up to 30 mg of chewing gum into small pieces and transfer them to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**
2. **Add 300 µl Buffer ATL and 20 µl proteinase K, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**
3. **Place the 1.5 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 3 h.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 30 min to improve lysis.

4. **Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
5. **Add 300 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 6.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 µg dissolved carrier RNA to 300 µl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

- 6. Place the 1.5 ml tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 1 h.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.

- 7. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

If solid particles are still visible, centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min, and carefully transfer supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

- 8. Add 150 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

To ensure efficient binding in step 10, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

- 9. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.**

- 10. Carefully transfer the supernatant from step 9 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

- 11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

- 12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

- 13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 µl of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

- 14. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

- 15. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.**

- 16. Apply 20–50 µl Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.**

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

- 17. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Cigarette Butts

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from cigarette butts.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Check whether carrier RNA is required (see pages 11 and 13).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 3 and (optional) step 16, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 6. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.

Procedure

1. **Cut out a 1 cm² piece of outer paper from the end of the cigarette or filter. Cut this piece into 6 smaller pieces. Transfer the pieces to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**
2. **Add 300 µl Buffer ATL and 20 µl proteinase K, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**
3. **Place the tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 1 h.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.

4. **Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.**

5. **Add 300 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 6.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 μg dissolved carrier RNA to 300 μl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

- 6. Place the tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.

- 7. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

If solid particles are still visible, centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min, and carefully transfer supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

- 8. Add 150 μl ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient binding in step 10, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

- 9. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

- 10. Carefully transfer the supernatant from step 9 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim.**

- 11. Close the lid, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

- 12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 μl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

- 13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

14. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
15. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

16. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.
17. Apply 20–50 μ l Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 μ l less than the volume of elution solution applied to the column.

18. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Nail Clippings and Hair

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from nail clippings and hair roots or shafts.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Check whether carrier RNA is required (see pages 11 and 13).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 2 and (optional) step 15, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 5. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Prepare an aqueous 1 M DTT (dithiothreitol) stock solution. Store aliquots at –20°C. Thaw immediately before use.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.

Procedure

1. Lyse the samples according to step 1a for nail clippings, step 1b for hair roots, or step 1c for hair shafts (without roots).
 - 1a. Transfer the nail clippings to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Add 300 µl Buffer ATL, 20 µl proteinase K, and 20 µl 1 M DTT. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.
 - 1b. Add 300 µl Buffer ATL, 20 µl proteinase K, and 20 µl 1 M DTT to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Cut off a 0.5–1 cm piece starting from the hair bulb and transfer it to the 1.5 ml microcentrifuge tube. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.
 - 1c. Add 300 µl Buffer ATL, 20 µl proteinase K, and 20 µl 1 M DTT to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Cut the hair into 0.5–1 cm pieces, and transfer them to the 1.5 ml microcentrifuge tube. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.

- 2. Place the tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 1 h.**

In general, hairs are lysed in 1 h. If necessary, increase the incubation time to ensure complete lysis.

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.

For larger samples of nail clippings, we recommend overnight incubation at 56°C. Any material that is not lysed during this incubation step or the incubation in step 5 will be pelleted during centrifugation in step 6.

- 3. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.**

- 4. Add 300 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 5.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 µg dissolved carrier RNA to 300 µl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

- 5. Place the tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.

- 6. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

- 7. Add 150 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient binding in step 9, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

- 8. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

- 9. Carefully transfer the supernatant from step 8 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim.**

- 10. Close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 μ l Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
14. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

15. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.
16. Apply 20–50 μ l Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 μ l less than the volume of elution solution applied to the column.

17. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Paper and Similar Materials

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from paper evidence samples, such as saliva on envelope flaps and stamps or fingerprints on documents.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Check whether carrier RNA is required (see pages 11 and 13).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 3 and (optional) step 16, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 6. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.

Procedure

1. **Cut out a 0.5–2.5 cm² sample from the paper or similar material, and then cut it into smaller pieces. Transfer the pieces to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**

Note: Before cutting out the sample, surface contamination can be reduced by using a swab moistened with distilled water.

2. **Add 300 µl Buffer ATL and 20 µl proteinase K, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**
3. **Place the tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 1 h.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.

4. **Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.**

5. Add 300 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 6.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 µg dissolved carrier RNA to 300 µl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

6. Place the tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.

7. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.

If solid particles are still visible, centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min, and carefully transfer supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

8. Add 150 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s.

To ensure efficient binding in step 10, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

9. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.

10. Carefully transfer the supernatant from step 9 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim.

11. Close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

- 13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

- 14. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
- 15. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

- 16. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.**
- 17. Apply 20–50 μ l Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.**

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 μ l less than the volume of elution solution applied to the column.

- 18. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Small Volumes of Blood or Saliva

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from 1–100 μ l of whole blood treated with EDTA, citrate, or heparin-based anticoagulants or 1–100 μ l of saliva.

Important point before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature.
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 5 and (optional) step 14.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Optional: If processing low volume samples (<10 μ l), add carrier RNA dissolved in Buffer ATE to Buffer AL according to the instructions on page 13.

Procedure

1. **Pipet 1–100 μ l whole blood or saliva into a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**
2. **Add Buffer ATL to a final volume of 100 μ l.**
3. **Add 10 μ l proteinase K.**
4. **Add 100 μ l Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample, Buffer ATL, proteinase K, and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

Note: If the volume of blood is lower than 10 μ l, we recommend adding carrier RNA to Buffer AL (see page 11). Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during the heat incubation in step 5.

5. Incubate at 56°C for 10 min.

Note: If samples are shaken during the incubation, DNA yields can be increased.

6. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.

7. Add 50 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s. Incubate for 3 min at room temperature.

Note: If room temperature exceeds 25°C, cool the ethanol on ice before adding to the tube.

8. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.

9. Carefully transfer the entire lysate from step 8 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

10. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute Column. Take care when removing the QIAamp MinElute Column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute Column.

12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 µl of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

13. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

14. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.

15. Apply 20–100 µl Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). If using small elution volumes (<50 µl), dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

16. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Tissues

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from less than 10 mg tissue.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If isolating DNA from very small amounts of tissue, carrier RNA is required (see pages 11 and 13).
- Prepare tissue samples on a cold surface (e.g., a glass, steel, or aluminum plate placed on top of a block of dry ice).
- If using frozen tissue, ensure that the sample does not thaw out before addition of Buffer ATL in step 2.

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature.
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 4 and (optional) step 13. If a thermomixer or heated orbital incubator is not available, a heating block or water bath can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.

Procedure

1. **Transfer a tissue sample of less than 10 mg in weight to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**
2. **Immediately add 180 µl Buffer ATL, and equilibrate to room temperature (15–25°C).**
3. **Add 20 µl proteinase K and mix by pulse-vortexing for 15 s.**
4. **Place the 1.5 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C overnight or until the sample is completely lysed.**

For small amounts of tissue, lysis is complete in 4–6 h, but best results are achieved after overnight lysis.

- 5. Add 200 μ l Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 μ g dissolved carrier RNA to 200 μ l Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

- 6. Add 200 μ l ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C).**

Note: If room temperature exceeds 25°C, cool the ethanol on ice before adding to the tube.

- 7. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
- 8. Carefully transfer the entire lysate from step 7 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

- 9. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 μ l Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
- 10. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

- 11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
- 12. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

13. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.

14. Apply 20–100 µl Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). If using small elution volumes (<50 µl), dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

15. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute Column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Laser-Microdissected Specimens

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from laser-microdissected tissue. Laser-microdissected tissue specimens present a particular challenge for molecular analysis, as nucleic acids must be purified from very small amounts of starting material. In addition, fixation and staining steps may compromise the integrity of DNA, and it may be necessary either to modify fixation protocols or to use cryosections from flash-frozen specimens to minimize this problem.

A wide range of equipment and consumables for sectioning, staining, and microdissection of specimens is available from Leica (www.leica-microsystems.com).

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If isolating DNA from very small numbers of cells, carrier RNA is required (see pages 11 and 13).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature.
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 3 and (optional) step 13. If a thermomixer or heated orbital incubator is not available, a heating block or water bath can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.

Procedure

- 1. Add 15 µl Buffer ATL to a laser-microdissected sample collected in a 0.2 ml microcentrifuge tube (not provided).**
- 2. Add 10 µl proteinase K and mix by pulse-vortexing for 15 s.**
- 3. Place the 0.2 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C for 3 h (16 h for formalin-fixed tissues) with occasional agitation.**
The incubation time may vary depending on the amount of tissue collected.
- 4. Add 25 µl Buffer ATL.**

5. Add 50 μ l Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 μ g dissolved carrier RNA to 50 μ l Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

6. Add 50 μ l ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C).

Note: If room temperature exceeds 25°C, cool the ethanol on ice before adding to the tube.

7. Briefly centrifuge the 0.2 ml tube to remove drops from the inside of the lid.

8. Carefully transfer the entire lysate from step 7 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

9. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 μ l Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

10. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

12. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

13. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.

14. Apply 20–30 µl Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

15. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Bones and Teeth

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from pieces of bones and teeth.

Important points before starting

- Lysis time will vary depending on the size and density of the source material. The lysis conditions given here are intended to serve as guidelines.
- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 2 and (optional) step 15, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 5. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.
- Optional: If processing very small amounts of starting material, add carrier RNA dissolved in Buffer ATE to Buffer AL according to the instructions on page 13.

Procedure

- 1. Crush the bone into small fragments. Grind to a fine powder using a metal blender half-filled with liquid nitrogen. Alternatively, grind the bone to a fine powder using the TissueLyser and the Grinding Jar Set, S. Steel.**

When using the TissueLyser, transfer the bone sample and the ball into the grinding jar. Pour liquid nitrogen into the grinding jar over the ball and bone fragments. Allow the temperature to equilibrate (i.e., liquid nitrogen stops boiling). Decant the excess liquid nitrogen, close the grinding jar with the lid, and transfer it to the TissueLyser. Grind the bone at 30 Hz for 1 min or until the bone is pulverized (grinding times depend on type, condition, and size of bone).

- 2. Place ≤ 100 mg of powdered bone into a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 360 μ l Buffer ATL and 20 μ l proteinase K. Incubate overnight at 56°C.**

After incubation, set the temperature to 70°C for the incubation in step 5.

- 3. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.**

4. Add 300 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 5.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 µg dissolved carrier RNA to 300 µl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

5. Place the tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.

6. Centrifuge the tube at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min, and carefully transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**7. Add 150 µl ethanol (96–100%). Close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient binding in step 9, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

8. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**9. Carefully transfer the entire lysate from step 8 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim.****10. Close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 600 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

- 12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

- 13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 μ l of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
- 14. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

- 15. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.**
- 16. Apply 20–50 μ l Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.**

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 μ l less than the volume of elution solution applied to the column.

- 17. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocol: Isolation of Total DNA from Sexual Assault Specimens

This protocol is for differential extraction of total (genomic and mitochondrial) DNA from fabrics or swabs containing epithelial cells mixed with sperm cells.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Additional Buffer ATL is required (see page 56 for ordering information).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in steps 3, 10, and (optional) 23, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 13. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.
- Prepare an aqueous 1 M DTT (dithiothreitol) stock solution. Store aliquots at –20°C. Thaw immediately before use.
- Optional: If processing very small amounts of starting material, add carrier RNA dissolved in Buffer ATE to Buffer AL according to the instructions on page 13.

Procedure

- 1. Place the swab or a piece of fabrics ($\leq 0.5 \text{ cm}^2$) in a 2 ml microcentrifuge tube (not provided).**

Separate the cotton or DACRON swab from its shaft by hand or using scissors.
- 2. Add 20 μl proteinase K and 500 μl Buffer ATL to the sample. Close the cap and mix by pulse-vortexing for 10 s.**
- 3. Place the 2 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 1 h.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.
- 4. Briefly centrifuge the 2 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

5. Remove the solid material from the tube.

Note: Up to 200 μl of lysate remains in the swab or fabric. To harvest this remaining lysate, place the swab or fabric in a QIAshredder spin column (not supplied), place the QIAshredder spin column containing the solid material in the 2 ml tube containing the lysate, and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 2 min. Remove and discard the QIAshredder spin column containing the solid material.

6. Centrifuge the tube for 5 min at full speed. Carefully transfer all but 30 μl of the supernatant to a new tube without disturbing the pellet.

Note: For isolation of DNA from epithelial cells, transfer 300 μl of the supernatant into a 2 ml microcentrifuge tube and continue with step 12.

7. Resuspend the pellet in 500 μl Buffer ATL. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s. Centrifuge the tube for 5 min at full speed. Carefully aspirate and discard all but 30 μl of the supernatant without disturbing the pellet.

8. Repeat step 7 at least three times.

Note: The ratio of epithelial cells to sperm cells influences the number of repeats needed for purification of sperm nuclei.

9. Add 280 μl Buffer ATL, 10 μl proteinase K, and 10 μl 1 M DTT to the pellet. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s.

10. Place the 2 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 1 hour.

If using a thermoblock or waterbath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.

11. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.

12. Add 300 μl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 13.

Note: If carrier RNA is required (see page 11), add 1 μg dissolved carrier RNA to 300 μl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.

13. Place the tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.

14. Centrifuge the tube at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min, and carefully transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).
15. Add 150 µl ethanol (96–100%). Close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.
To ensure efficient binding in step 17, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.
16. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.
17. Carefully transfer the entire lysate from step 16 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim.
18. Close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

19. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
20. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

21. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700 µl of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
22. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

23. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.

24. Apply 20–50 µl Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

25. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Troubleshooting Guide

This troubleshooting guide may be helpful in solving any problems that may arise. For more information, see also the Frequently Asked Questions page at our Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. The scientists in QIAGEN Technical Services are always happy to answer any questions you may have about either the information and protocols in this handbook or sample and assay technologies (for contact information, see back cover or visit www.qiagen.com).

Comments and suggestions

Little or no DNA in the eluate

- | | |
|---|--|
| a) Carrier RNA was not added to Buffer AL | Dissolve carrier RNA in Buffer ATE and mix with Buffer AL as described on page 13. Repeat the purification procedure with new samples. |
| b) Samples were frozen and thawed more than once | Avoid repeated freezing and thawing of samples. Where possible, always use fresh samples or samples that have been thawed only once. |
| c) Samples were kept at room temperature for too long | DNA in the samples may degrade during prolonged storage at room temperature. Where possible, always use fresh samples, or store the samples at 2–8°C (nondried blood) or at –20°C (tissue samples). Dried blood spots, stains, or swabs can be stored at room temperature in the dark without significant DNA degradation. |
| d) Insufficient sample lysis in Buffer AL | Proteinase K was stored at high temperatures for a prolonged time. Repeat the procedure using new samples and fresh proteinase K. |
| e) Buffer AL–carrier RNA mixture was mixed insufficiently | Mix Buffer AL with carrier RNA by gently inverting the tube at least 10 times. |
| f) Low-percentage ethanol was used instead of 96–100% | Repeat the purification procedure with new samples and 96–100% ethanol. Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. |

Comments and suggestions

- g) Buffer AW1 or AW2 was prepared incorrectly
Check that the Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates were diluted with the correct volume of 96–100% ethanol. Repeat the purification procedure with new samples, if available.
- h) pH of water used for elution was too low
DNA does not dissolve easily in acidic solutions. Ensure that the pH of the water used for elution is >7.0.

DNA does not perform well in downstream enzymatic reactions

- a) Little or no DNA in the eluate
See “Little or no DNA in the eluate” (page 52) for possible reasons. Increase the amount of eluate added to the reaction, if possible.
- b) Too much or too little carrier RNA in the eluate
Determine the maximum amount of carrier RNA suitable for your amplification reaction. Adjust the concentration of carrier RNA added to Buffer AL accordingly.
- c) Reduced sensitivity
Determine the maximum volume of eluate suitable for your amplification reaction. Reduce or increase the volume of eluate added to the amplification reaction accordingly. The elution volume can be adjusted proportionally.
- d) Performance of purified DNA in downstream assay varies with the age of the reconstituted wash buffers
Salt and ethanol components of wash Buffers AW1 and AW2 may have separated out after being unused for a long period. Always mix buffers thoroughly before each purification procedure.

General handling

- a) Clogged QIAamp MinElute column
Incomplete lysis caused clogging of the membrane. Increase the lysis time to fully lyse the sample.
- b) Variable elution volumes
Different sample types have been processed.

Appendix A: Working with DNA

General handling

Proper microbiological aseptic technique should always be used when working with small sample sizes. Hands and dust particles may carry bacteria and molds, and are the most common sources of contamination. Always wear latex or vinyl gloves while handling reagents and samples to prevent contamination from the surface of the skin or from dusty laboratory equipment. Change gloves frequently and keep tubes closed.

Disposable plasticware

The use of sterile, disposable polypropylene tubes is recommended throughout the purification procedure. These tubes are generally DNase-free.

Appendix B: Cleanup of DNA

This protocol is for cleanup of DNA. Use this protocol to restore the suitability of the DNA for PCR, or to increase the concentration of the DNA.

Important point before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.

Procedure

1. **Add up to 100 μ l of DNA (containing up to 10 μ g DNA) to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**

If the volume of DNA is less than 100 μ l, add deionized water to a final volume of 100 μ l.

2. **Add 10 μ l Buffer AW1.**
3. **Add 250 μ l Buffer AW2 and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

4. **Transfer the entire sample from step 3 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**
5. **Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

6. **Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

7. **Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column and apply 20–100 µl Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.**

Important: Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). If using small elution volumes (<50 µl), dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

8. **Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
QIAamp DNA Investigator Kit (50)	For 50 DNA preps: 50 QIAamp MinElute Columns, Proteinase K, Carrier RNA, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56504
QIAcube — for fully automated sample preparation using QIAGEN spin-column kits		
QIAcube (110 V)*†	Robotic workstation for automated purification of nucleic acids or proteins using QIAGEN spin-column kits, 1-year warranty on parts and labor§	9001292*†
QIAcube (230 V)‡		9001293‡
Accessories		
Buffer ATL (200 ml)	200 ml Tissue Lysis Buffer	19076
Buffer AL (216 ml)	216 ml Lysis Buffer	19075
Buffer AW1 (concentrate, 242 ml)	242 ml Wash Buffer (1) Concentrate	19081
Buffer AW2 (concentrate, 324 ml)	324 ml Wash Buffer (2) Concentrate	19072
QIAGEN Proteinase K (2 ml)¶	2 ml (>600 mAU/ml, solution)	19131
QIAshredder (50)¶	50 disposable cell-lysate homogenizers for use in nucleic acid minipreps, caps	79654
Collection Tubes (2 ml)	1000 Collection Tubes (2 ml)	19201
TissueLyser (120 V, 50/60 Hz)*	Universal laboratory mixer-mill disruptor	85210*
(100 V, 50/60 Hz)†		85200†
(220–240 V, 50/60 Hz)‡		85220‡
Grinding Jar Set, S. Steel (2 x 10 ml)	2 Grinding Jars (10 ml), 2 Stainless Steel Grinding Balls (20 mm)	69985

* US and Canada.

† Japan.

‡ Rest of world.

§ Agreements for comprehensive service coverage are available; please inquire.

¶ Larger kit sizes available; please inquire.

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
Related products		
EZ1® DNA Investigator Kit — for easy, automated purification of DNA from a wide variety of forensic and human-identity samples		
EZ1 DNA Investigator Kit (48)	For 48 preps on EZ1 workstations: Reagent Cartridges, Disposable Tip Holders, Disposable Filter-Tips, Sample Tubes, Elution Tubes, Buffers and Reagents; includes carrier RNA	952034
EZ1 DNA Investigator Card	Preprogrammed card for EZ1 DNA Investigator protocols	9016387
MagAttract® DNA Mini M48 Kit — for automated purification of DNA from a wide range of human samples for forensic applications		
MagAttract DNA Mini M48 Kit (192)	For 192 DNA preps on the BioRobot® M48 workstation: MagAttract Suspension B, Buffers, Proteinase K	953336
App. Package, M48, Forensics	Software protocol package for forensics applications, v2.1, on the BioRobot M48 workstation	9016150
QIAamp 96 DNA Swab BioRobot Kit — for automated high-throughput DNA purification from swabs using the BioRobot Universal System		
QIAamp 96 DNA Swab BioRobot Kit (12)	For 12 x 96 DNA preps: 12 QIAamp 96 Plates, Buffers, QIAGEN Proteinase K, AirPore Tape Sheets, Tape Pad, S-Blocks, Racks with Collection Microtubes (1.2 ml), Caps	965842
QIAamp DNA Stool Mini Kit — for purification of up to 30 µg genomic, bacterial, viral, and parasite DNA from stool		
QIAamp DNA Stool Mini Kit (50)*	For 50 DNA preps: 50 QIAamp Mini Spin Columns, QIAGEN Proteinase K, InhibitEX® tablets, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51504

* Fully automatable on the QIAcube. See www.qiagen.com/MyQIAcube for protocols.

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
QIAamp DNA Blood Mini Kit — for isolation of DNA from blood and related body fluids		
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)*†	For 50 DNA minipreps: 50 QIAamp Mini Spin Columns, QIAGEN Protease, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51104
QIAamp DNA Mini Kit — for isolation of DNA		
QIAamp DNA Mini Kit (50)*†	For 50 DNA preps: 50 QIAamp Mini Spin Columns, Proteinase K, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51304
QIAamp DNA Micro Kit — for purification of genomic and mitochondrial DNA from small samples		
QIAamp DNA Micro Kit (50)*	For 50 DNA preps: 50 QIAamp MinElute Columns, Proteinase K, Carrier RNA, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56304
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — For purification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	For 50 DNA preps: 50 QIAamp MinElute Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56404

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at www.qiagen.com or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributor.

* Fully automatable on the QIAcube. See www.qiagen.com/MyQIAcube for protocols.

† Larger kit sizes available; please inquire.

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, BioRobot®, EZ1®, InhibitEX®, MagAttract®, MinElute® (QIAGEN Group); DACRON® (E.I. du Pont de Nemours and Company); FTA®, Whatman® (Whatman Group).

Limited License Agreement

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the QIAamp DNA Investigator Kit to the following terms:

1. The QIAamp DNA Investigator Kit may be used solely in accordance with the *QIAamp DNA Investigator Handbook* and for use with components contained in the Kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this Kit with any components not included within this Kit except as described in the *QIAamp DNA Investigator Handbook* and additional protocols available at www.qiagen.com.
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN makes no warranty that this Kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This Kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the Kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the Kit and/or its components.

For updated license terms, see www.qiagen.com.

© 2007 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)



Bijlage V

QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook

April 2010

QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Handbook

For purification of genomic DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues



Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, MinElute®, Qproteome™, REPLI-g®, RNeasy® (QIAGEN Group).

© 2007 QIAGEN, all rights reserved.



QIAGEN is a member of the Forest Stewardship Council (FSC). For the production of printed materials, including handbooks, QIAGEN has a policy to select suppliers that comply with FSC standards for printing processes and well-managed forests.

Contents

Kit Contents	4
Storage	4
Quality Control	4
Product Warranty and Satisfaction Guarantee	5
Technical Assistance	5
Safety Information	6
Product Use Limitations	7
Introduction	8
Principle and procedure	8
Equipment and Reagents to Be Supplied by User	10
Important Notes	11
Starting material	11
Copurification of RNA	11
Eluting pure DNA	11
Handling of QIAamp MinElute columns	12
Preparation of buffers	13
Protocol	
■ Isolation of Genomic DNA from FFPE Tissue Sections	14
Troubleshooting Guide	17
Appendix: Working with DNA	19
Ordering Information	20

Kit Contents

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	(50)
Catalog no.	56404
Number of preps	50
QIAamp MinElute® Columns	50
Collection Tubes (2 ml)	3 x 50
Buffer ATL	10 ml
Buffer AL*	12 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml
Buffer ATE†	12 ml
Proteinase K	1.25 ml
Handbook	1

* Contains a guanidine salt. Not compatible with disinfectants containing bleach. See page 6 for safety information.

† Contains sodium azide as a preservative.

Storage

QIAamp MinElute columns should be stored at 2–8°C upon arrival and are stable under these conditions for at least one year after delivery. However, short-term storage of up to 4 weeks at room temperature (15–25°C) does not affect performance.

All buffers can be stored at room temperature (15–25°C) and are stable for at least one year after delivery.

The QIAamp DNA FFPE Tissue Kit contains a novel, ready-to-use proteinase K solution, which is supplied in a specially formulated storage buffer. Proteinase K is stable for at least one year after delivery when stored at room temperature (15–25°C). For storage longer than one year or if ambient temperatures often exceed 25°C, we suggest storing proteinase K at 2–8°C.

Quality Control

In accordance with QIAGEN's ISO-certified Quality Management System, each lot of QIAamp DNA FFPE Tissue Kits is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Product Warranty and Satisfaction Guarantee

QIAGEN guarantees the performance of all products in the manner described in our product literature. 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, QIAGEN will replace it free of charge or refund the purchase price. We reserve the right to change, alter, or modify any product to enhance its performance and design. If a QIAGEN® product does not meet your expectations, simply call your local Technical Service Department or distributor. We will credit your account or exchange the product — as you wish. Separate conditions apply to QIAGEN scientific instruments, service products, and to products shipped on dry ice. Please inquire for more information.

A copy of QIAGEN terms and conditions can be obtained on request, and is also provided on the back of our invoices. If you have questions about product specifications or performance, please call QIAGEN Technical Services or your local distributor (see back cover or visit www.qiagen.com).

Technical Assistance

At QIAGEN, we pride ourselves on the quality and availability of our technical support. Our Technical Service Departments are staffed by experienced scientists with extensive practical and theoretical expertise in sample and assay technologies and the use of QIAGEN products. If you have any questions or experience any difficulties regarding the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit or QIAGEN products in general, please do not hesitate to contact us.

QIAGEN customers are a major source of information regarding advanced or specialized uses of our products. This information is helpful to other scientists as well as to the researchers at QIAGEN. We therefore encourage you to contact us if you have any suggestions about product performance or new applications and techniques.

For technical assistance and more information, please see our Technical Support center at www.qiagen.com/goto/TechSupportCenter or call one of the QIAGEN Technical Service Departments or local distributors (see back cover or visit www.qiagen.com).

Safety Information

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs). These are available online in convenient and compact PDF format at www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx where you can find, view, and print the MSDS for each QIAGEN kit and kit component.

CAUTION: DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.

Buffer AL and Buffer AW1 contain guanidine hydrochloride, which can form highly reactive compounds when combined with bleach. If liquid containing this buffer is spilt, clean with suitable laboratory detergent and water. If the spilt liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite.

The following risk and safety phrases apply to components of the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Buffer AL and Buffer AW1

Contains guanidine hydrochloride: harmful, irritant. Risk and safety phrases:* R22-36/38, S13-26-36-46

Proteinase K

Contains proteinase K: sensitizer, irritant. Risk and safety phrases:* R36/37/38-42/43, S23-24-26-36/37

24-hour emergency information

Emergency medical information in English, French, and German can be obtained 24 hours a day from:

Poison Information Center Mainz, Germany

Tel: +49-6131-19240

* R22: Harmful if swallowed; R36/38: Irritating to eyes and skin; R36/37/38: Irritating to eyes, respiratory system, and skin; R42/43: May cause sensitization by inhalation and skin contact; S13: Keep away from food, drink, and animal feedingstuffs; S23: Do not breathe spray; S24: Avoid contact with skin; S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice; S36: Wear suitable protective clothing; S36/37: Wear suitable protective clothing and gloves; S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show container or label.

Product Use Limitations

The QIAamp DNA FFPE Tissue Kit is intended for molecular biology applications. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

All due care and attention should be exercised in the handling of the products. We recommend all users of QIAGEN products to adhere to the NIH guidelines that have been developed for recombinant DNA experiments, or to other applicable guidelines.

Introduction

The QIAamp DNA FFPE Tissue Kit is optimized for purification of DNA from FFPE tissue sections. It uses well-established QIAamp DNA Micro technology for purification of genomic and mitochondrial DNA from small sample volumes or sizes. The kit combines the selective binding properties of a silica-based membrane with flexible elution volumes of between 20 and 100 μ l.

Specially optimized lysis conditions allow genomic DNA to be efficiently purified from FFPE tissue sections without the need for overnight incubation. Incubation at an elevated temperature after proteinase K digestion partially removes formalin crosslinking of the released DNA, improving yield as well as DNA performance in downstream assays. Note that DNA isolated from FFPE samples is usually of lower molecular weight than DNA from fresh or frozen samples. The degree of fragmentation depends on the type and age of the sample and the conditions used for fixation.

After sample lysis, the simple QIAamp DNA Micro procedure, which is highly suited for simultaneous processing of multiple samples, yields pure DNA in less than 30 minutes.

DNA is eluted in Buffer ATE or water and is immediately ready for use in amplification reactions or for storage at -20°C . Purified DNA is free of proteins, nucleases, and other impurities.

Principle and procedure

The QIAamp DNA FFPE Tissue procedure consists of 6 steps (see flowchart):

- Remove paraffin: paraffin is dissolved in xylene and removed
- Lyse: sample is lysed under denaturing conditions with proteinase K
- Heat: incubation at 90°C reverses formalin crosslinking
- Bind: DNA binds to the membrane and contaminants flow through
- Wash: residual contaminants are washed away
- Elute: pure, concentrated DNA is eluted from the membrane

QIAamp DNA FFPE Tissue Procedure

Sample



Remove paraffin



Lyse



Heat



Bind DNA



Wash



Elute



Ready-to-use DNA

Equipment and Reagents to Be Supplied by User

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

- Xylene
- Ethanol (96–100%)*
- 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (for lysis steps)
- 1.5 ml microcentrifuge tubes (for elution steps) (available from Brinkmann [Safe-Lock, cat. no. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, cat. no. 0030 120.086], or Sarstedt [Safety Cap, cat. no. 72.690])†
- Pipet tips (to avoid cross-contamination, we recommend pipet tips with aerosol barriers)
- Thermomixer, heated orbital incubator, heating block, or water bath capable of incubation at 90°C
- Microcentrifuge with rotor for 2 ml tubes
- Vortexer
- Optional: RNase A (100 mg/ml; cat. no. 19101)

* Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone.

† This is not a complete list of suppliers and does not include many important vendors of biological supplies.

Important Notes

Starting material

Standard formalin-fixation and paraffin-embedding procedures always result in significant fragmentation of nucleic acids. To limit the extent of DNA fragmentation, be sure to:

- Fix tissue samples in 4–10% formalin as quickly as possible after surgical removal.
- Use a fixation time of 14–24 hours (longer fixation times lead to more severe DNA fragmentation, resulting in poor performance in downstream assays).
- Thoroughly dehydrate samples prior to embedding (residual formalin can inhibit the proteinase K digest).

Starting material for DNA purification should be freshly cut sections of FFPE tissue, each with a thickness of up to 10 μm . Up to 8 sections, each with a thickness of up to 10 μm and a surface area of up to 250 mm^2 , can be combined in one preparation.

If you have no information about the nature of your starting material, we recommend starting with no more than 3 sections per preparation. Depending on DNA yield and purity, it may be possible to use up to 8 sections in subsequent preparations.

Copurification of RNA

Using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, RNA may be copurified with the DNA if it is present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, although it does not affect PCR. If RNA-free genomic DNA is required, RNase A should be added to the sample, as indicated in the protocol. The protocol describes the use of a 100 mg/ml RNase A stock solution.

For efficient purification of RNA from FFPE tissues, we recommend using the RNeasy® FFPE Kit, which is optimized for high yields of usable RNA from these samples. See page 20 for ordering information.

Eluting pure DNA

For downstream applications that require small starting volumes (e.g., some PCR assays), a more concentrated eluate may increase assay sensitivity. QIAamp MinElute columns allow a minimum elution volume of 20 μl for concentrated nucleic acid eluates.

For downstream applications that require a larger starting volume, the elution volume can be increased to 100 μl . However, an increase in elution volume will decrease the concentration of DNA in the eluate.

The volume of eluate recovered may be up to 5 μl less than the volume of Buffer ATE applied to the QIAamp MinElute column. For example, an elution volume of 20 μl results in ≥ 15 μl eluate. The volume of eluate recovered depends on the nature of the sample.

Buffer ATE should be equilibrated to room temperature (15–25°C) before it is applied to the QIAamp MinElute column. Yields will be increased if the column is incubated with Buffer ATE at room temperature for 5 minutes before centrifugation.

Eluted DNA can be collected in standard 1.5 ml microcentrifuge tubes (not provided). If the purified DNA is to be stored for up to 24 hours, we recommend storage at 2–8°C. For periods longer than 24 hours, we recommend storage at –20°C.

For whole genome amplification (WGA) of DNA purified from FFPE tissues, we recommend using the REPLI-g® FFPE Kit, which is optimized for use with this DNA. See page 21 for ordering information.

Handling of QIAamp MinElute columns

Due to the sensitivity of nucleic acid amplification technologies, the following precautions are necessary when handling QIAamp MinElute columns to avoid cross-contamination between sample preparations:

- Carefully apply the sample or solution to the QIAamp MinElute column. Pipet the sample into the QIAamp MinElute column without wetting the rim of the column.
- Always change pipet tips between liquid transfers. We recommend the use of aerosol-barrier pipet tips.
- Avoid touching the QIAamp MinElute column membrane with the pipet tip.
- After all pulse-vortexing steps, briefly centrifuge the microcentrifuge tubes to remove drops from the inside of the lids.
- Open only one QIAamp MinElute column at a time, and take care to avoid generating aerosols.
- Wear gloves throughout the entire procedure. In case of contact between gloves and sample, change gloves immediately.

Centrifugation

QIAamp MinElute columns will fit into most standard 1.5–2 ml microcentrifuge tubes. Additional 2 ml collection tubes are available separately.

Centrifugation of QIAamp MinElute columns is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce centrifuge noise. Centrifugation at full speed will not improve DNA yields.

However, centrifugation of QIAamp MinElute columns at full speed is required in 2 steps of the procedure: the dry centrifugation step after the membranes are washed and the elution step. Centrifugation at full speed is also required to bring down the sample after the xylene treatment and the ethanol wash step.

All centrifugation steps should be carried out at room temperature (15–25°C).

Processing QIAamp MinElute columns in a microcentrifuge

- Always close QIAamp MinElute columns before placing them in the microcentrifuge. Centrifuge as described in the protocol.
- Flow-through fractions may contain hazardous waste and should be disposed of appropriately.
- For efficient parallel processing of multiple samples, we recommend filling a rack with collection tubes into which QIAamp MinElute columns can be transferred after centrifugation. Used collection tubes containing flow-through can be discarded, and the new collection tubes containing the QIAamp MinElute columns can be placed directly in the microcentrifuge.

Preparation of buffers

Preparing Buffer ATL

Before starting the procedure, check whether precipitate has formed in Buffer ATL. If necessary, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.

Preparing Buffer AL

Before starting the procedure, check whether precipitate has formed in Buffer AL. If necessary, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.

Preparing Buffer AW1

Add 25 ml ethanol (96–100%) to the bottle containing 19 ml Buffer AW1 concentrate. Tick the check box on the bottle label to indicate that ethanol has been added. Reconstituted Buffer AW1 can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

Note: Before starting the procedure, mix reconstituted Buffer AW1 by shaking.

Preparing Buffer AW2

Add 30 ml ethanol (96–100%) to the bottle containing 13 ml Buffer AW2 concentrate. Reconstituted Buffer AW2 can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

Note: Before starting the procedure, mix reconstituted Buffer AW2 by shaking.

Protocol: Isolation of Genomic DNA from FFPE Tissue Sections

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Read “Important Notes”, pages 11–13.

Things to do before starting

- Equilibrate all buffers to room temperature.
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 11. If a thermomixer or heated orbital incubator is not available, a heating block or water bath can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contain precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffer AW1 and Buffer AW2 have been prepared according to the instructions on page 13.

Procedure

- 1. Using a scalpel, trim excess paraffin off the sample block.**
- 2. Cut up to 8 sections 5–10 µm thick (see “Starting material”).**
If the sample surface has been exposed to air, discard the first 2–3 sections.
- 3. Immediately place the sections in a 1.5 or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied), and add 1 ml xylene to the sample. Close the lid and vortex vigorously for 10 s.**
- 4. Centrifuge at full speed for 2 min at room temperature.**
- 5. Remove the supernatant by pipetting. Do not remove any of the pellet.**
- 6. Add 1 ml ethanol (96–100%) to the pellet, and mix by vortexing.**
The ethanol extracts residual xylene from the sample.
- 7. Centrifuge at full speed for 2 min at room temperature.**
- 8. Remove the supernatant by pipetting. Do not remove any of the pellet.**
Carefully remove any residual ethanol using a fine pipet tip.
- 9. Open the tube and incubate at room temperature (15–25°C) or up to 37°C. Incubate for 10 min or until all residual ethanol has evaporated.**
- 10. Resuspend the pellet in 180 µl Buffer ATL. Add 20 µl proteinase K, and mix by vortexing.**
- 11. Incubate at 56°C for 1 h (or until the sample has been completely lysed).**

12. Incubate at 90°C for 1 h.

The incubation at 90°C in Buffer ATL partially reverses formaldehyde modification of nucleic acids. Longer incubation times or higher incubation temperatures may result in more fragmented DNA.

If using only one heating block, leave the sample at room temperature after the 56°C incubation until the heating block has reached 90°C.

13. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.

If RNA-free genomic DNA is required, add 2 µl RNase A (100 mg/ml) and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 14. Allow the sample to cool to room temperature before adding RNase A.

14. Add 200 µl Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 µl ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.

It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure.

15. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**16. Carefully transfer the entire lysate to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

17. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**18. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

- 19. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

- 20. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column and apply 20–100 µl Buffer ATE to the center of the membrane.**

Important: Ensure that Buffer ATE is equilibrated to room temperature. If using small elution volumes (<50 µl), dispense Buffer ATE onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. The volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

- 21. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Troubleshooting Guide

This troubleshooting guide may be helpful in solving any problems that may arise. The scientists in QIAGEN Technical Services are always happy to answer any questions you may have about either the information and protocol in this handbook or sample and assay technologies (for contact information, see back cover or visit www.qiagen.com).

Comments and suggestions

Little or no DNA in the eluate

- | | |
|---|---|
| a) Insufficient sample lysis | Proteinase K was stored at high temperatures for a prolonged time. Repeat the procedure using new samples and fresh proteinase K.

Make sure that the samples were thoroughly dehydrated prior to embedding. Residual formalin can inhibit the proteinase K digest. |
| b) Low-percentage ethanol used instead of 96–100% ethanol | Repeat the purification procedure with new samples using 96–100% ethanol. Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. |
| c) Buffer AW1 or Buffer AW2 prepared incorrectly | Make sure that the Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates were diluted with the correct volume of 96–100% ethanol, as described on page 13. |

DNA does not perform well in downstream enzymatic reactions

- | | |
|---|--|
| a) DNA fragmented or blocked due to formaldehyde modification | Although the 90°C incubation in the QIAamp DNA FFPE Tissue procedure removes most of the formaldehyde modifications, DNA purified from FFPE sections may not perform as well in enzymatic reactions as DNA from fresh or frozen samples. We recommend keeping amplicons as short as possible for PCR (<500 nucleotides). |
| b) Reduced sensitivity | Determine the maximum volume of eluate suitable for your amplification reaction. Adjust the volume of eluate added to the amplification reaction accordingly. The elution volume can be adjusted proportionally. |

Comments and suggestions

c) Wash buffers not mixed well after storage

Salt and ethanol components of wash Buffers AW1 and AW2 may have separated out after being unused for a long period. Always mix buffers thoroughly before each purification procedure.

d) Ethanol carryover

Be sure to centrifuge at full speed using a new collection tube to completely dry the membrane before elution of DNA.

General handling

Clogged QIAamp MinElute column

Incomplete lysis caused clogging of the membrane. Increase the lysis time to fully lyse the sample.

Appendix: Working with DNA

General handling

Proper microbiological aseptic technique should always be used when working with small sample sizes. Hands and dust particles may carry bacteria and molds, and are the most common sources of contamination. Always wear latex or vinyl gloves while handling reagents and samples to prevent contamination from the surface of the skin or from dusty laboratory equipment. Change gloves frequently and keep tubes closed.

Disposable plasticware

The use of sterile, disposable polypropylene tubes is recommended throughout the purification procedure. These tubes are generally DNase-free.

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	For 50 DNA preps: 50 QIAamp MinElute Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56404
Accessories		
RNase A (17,500 U)	2.5 ml (100 mg/ml; 7000 units/ml, solution)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml Tissue Lysis Buffer	19076
Buffer AL (216 ml)	216 ml Lysis Buffer AL	19075
Buffer AW1 (concentrate, 242 ml)	242 ml Wash Buffer (1) Concentrate	19081
Buffer AW2 (concentrate, 324 ml)	324 ml Wash Buffer (2) Concentrate	19072
Collection Tubes (2 ml)	1000 Collection Tubes (2 ml)	19201
Related products		
RNeasy FFPE Kit — for purification of high yields of usable RNA from FFPE tissues		
RNeasy FFPE Kit (50)	For 50 RNA preps: 50 RNeasy MinElute Spin Columns, 50 gDNA Eliminator Mini Spin Columns, Collection Tubes, RNase-Free Reagents and Buffers	74404
Qproteome™ FFPE Tissue Kit — for isolation of full-length proteins from FFPE tissues		
Qproteome FFPE Tissue Kit (20)	For 20 protein preparations from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples: Extraction Buffer, Collection Tubes, Collection Tube Sealing Clips	37623

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
Qproteome FFPE Tissue Kit (100)	For 100 protein preparations from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples: Extraction Buffer, Collection Tubes, Collection Tube Sealing Clips	37625
REPLI-g FFPE Kit — for whole genome amplification of DNA from FFPE tissues		
REPLI-g FFPE Kit (25)	DNA Polymerase, Buffers, and Reagents for 25 x 50 µl whole genome amplification reactions	150243
REPLI-g FFPE Kit (100)	DNA Polymerase, Buffers, and Reagents for 100 x 50 µl whole genome amplification reactions	150245

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at www.qiagen.com or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributor.

Notes

Notes

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)



Bijlage VI

Yellow-bellied Toad PCR Procedure

SOP E4025-25

Yellow-bellied Toad

SOP E 4025: Determination of the allele length of DNA isolates through PCR, with IRD700 and IRD800 labeled Microsatellite-primers, followed by a gel electrophoresis using a LI-COR

0 Revisions

Version 1.1: 8.2: References added

1 Goal

Providing parameters, which lack in SOP (Standard Operating Procedure) E4025. Each supplement is project dependent.

When combined, this supplement and SOP E4025 form a complete SOP with which the analysis can be preformed.

2 Principle

The parameters, which are missing in SOP E4025, will be entered into the supplement during the startup period of the project. These parameters can be obtained from different sources, e.g. project partners, empirical and literature.

3 Application area

This supplement applies to the following points:

- 7.2 Chemicals,
- 8.1 PCR-conditions,
- 8.2 Reference samples of a primer-set,
- 8.3 Preparation of the Primer-mix 10x,
- 8.4 Preparation of the Master-mix,
- 8.5 Preparation of the PCR-reaction,
- 9 The gel electrophoresis,
- 10.1 Determination of the allele length
- 11 Literature

4 Definitions

n.a.

5 References

No.	Name
WI-0009	Ongewenste situaties, (bijna) ongevallen en calamiteiten (Unwanted situations, (near) accidents and calamities)
WI-0010	Veiligheid laboratoria Alterra (Safety Laboratory Alterra)
P4006	Bediening en onderhoud van de PTC-200 DNA engine van MJ Research (Operation and maintenance of the PTC-200 DNA engine from MJ Research)
P4008	Bediening en onderhoud van de pH-meter, Scott CG 840 (Operation and maintenance of the PH-meter, Scott CG 840)
P4013	Bediening, PAGE bereiding en onderhoud van de LICOR 4300 DNA-analyser (Control, PAGE preparation and maintenance of the LICOR 4300 DNA-Analyzer)
E4027	Archivering van DNA-isolaten (Documentation of the DNA-isolates)
E4023	Autoclaveren van disposables, pipetten en vloeistoffen t.b.v. moleculaire technieken (Sterilization of disposables, pipettes and liquids for molecular techniques)
F0204	Formulier Begeleiding DNA monsters (Form accompanying DNA samples)
F0213	Layout bulkverduunning (Layout Bulk dilution)
F0214	Layout PCR-monsters (Layout PCR-samples)
F0222	Samenstelling PCR-mix Microsatellieten (Composition PCR-mix Microsatellites)
F0220	Monstervolgorde op PAGE (sample-order on PAGE)
F0218	Inhoudsopgave Monsterarchief (Table of contents Sample-Archive)
F0219	Inhoudsopgave bulkverduunning monsters (Table of contents Bulk dilution)
F0221	Electroforese LICOR en monsterkeuze (Electrophoresis LICOR and sample choice)

6 Safety and environmental measures

Read the safety instructions which come with the supplied machinery and chemicals, also checkout the Alterra Work instructions: WI-0009 and WI-0010.

During lab activities the use of a laboratory coats, gloves and safety goggles is mandatory.

When handling DNA-isolates, as well as all activities which lead up to the preparation of the PCR-reaction, the use of PVC-gloves is obligated. This to prevent the contamination of reagents, plastics and DNA-isolates with DNase and other sources of DNA.

Never leave defrosting operational stock (chemicals and reagents) solutions which are stored in the freezer, on a table longer than necessary.

When using a pipette, each action should be done using a sterile pipette tip.

7 Materials

7.1 Equipment and appliances

See: SOP E4025

7.2 Chemicals

See: SOP E4025

7.2.1 Labeled primer sequences

700nm

<i>Primer name</i>	<i>Article origin</i>	<i>Primer sequence, 5' -> 3'</i>
Bobom1A.for	Hauswaldt	ATGTGGCTTCCATTGACCTTTGC
Bobom5F.for	Hauswaldt	ATGAATTGGAAGGTAAGAACTTACACC
Bobom8A.for	Hauswaldt	AATTTCTTAGTGCTGCCAACTTGC
Bobom12F.for	Hauswaldt	ATAGGAGGTTTATAATGAAAGGGCAAC

800nm

<i>Primer name</i>	<i>Article origin</i>	<i>Primer sequence, 5' -> 3'</i>
Bobom9H.for	Hauswaldt	AACAGCCATTATTTAAAACCATAG
Bobom10F.for	Hauswaldt	ATCCAACCTCAAATTCACAGGTCAC
Bobom11D.for	Hauswaldt	CTCTGGTGTTTTGACGTTACTAGGC

7.2.2 Unlabeled primer sequences

<i>Primer name</i>	<i>Article origin</i>	<i>Primer sequence, 5' -> 3'</i>
Bobom10F.rev	Hauswaldt	ACAAGGGATACCAGGAGAACAAAGC
Bobom11D.rev	Hauswaldt	CATTTTGCCAAAACACTACTGATAAC
Bobom12F.rev	Hauswaldt	GATTGGATTTGGGCTATGATATTCTG
Bobom1A.rev	Hauswaldt	CATGCCAAGAAGGATTGAGTCTGTC
Bobom5F.rev	Hauswaldt	CAAATGATACAAATCAAGTGGAAATGG
Bobom8A.rev	Hauswaldt	GGGGAAGGGACATTTTAGCTACATAC
Bobom9H.rev	Hauswaldt	CAATAAAGCAGTATTTCCCAAATG

8 Polymerase Chain Reaction

8.1 PCR-conditions

Stap 1)	96°C	70 s
Stap 2)	96°C	30 s
Stap 3)	58°C -0.3°C/cycle	30 s
Stap 4)	72°C	30 s
Stap 5)	Go to step 2	30x
Stap 6)	72°C	15 min
Stap 7)	10°C	Store

8.2 Reference samples of the primer-set

First three reference samples:

Multiplex A:

Locus:	Bobom 12F		Bobom 8A		Bobom 9H	
monsternr:	allel 1	allel 2	allel 1	allel 2	allel 1	allel 2
L101014	220	228	324	324	153	153
L101023	224	228	288	320	153	157
L101718	224	232	320	324	153	153
L101723	212	224	320	324	153	157

Multiplex B:

Locus:	Bobom 5F		Bobom 1A		Bobom 10F	
monsternr:	allel 1	allel 2	allel 1	allel 2	allel 1	allel 2
L101014	142	146	320	320	217	217
L101023	142	154	320	336	213	217
L101718	118	142	320	320	213	213
L101723	142	142	320	320	213	213

During the remainder of the project other reference samples might be chosen.

8.3 Preparation of the Primer-mix 10x

Hauswaldt Multiplex A:

<i>Component</i>	<i>Stock Conc.</i>	<i>Label</i>	<i>Conc. in 10x primermix</i>	<i>Conc. in PCR</i>	<i>Vol.</i>
<i>(μL)</i>					
Bobom9H-F	100 μ M	800	2.00 μ M	0.20 μ M	2.86
Bobom9H-R	100 μ M	-	2.00 μ M	0.20 μ M	2.86
Bobom8A-F	100 μ M	700	1.60 μ M	0.16 μ M	2.29
Bobom8A-R	100 μ M	-	1.60 μ M	0.16 μ M	2.29
Bobom12F-F	100 μ M	700	1.40 μ M	0.14 μ M	2.00
Bobom12F-R	100 μ M	-	1.40 μ M	0.14 μ M	2.00
Subtotal					14.30
Water	NA		NA	NA	128.56
Total					142.86

E4025-25 Supplement SOP E4025

Owner: J. Bovenschen
 Administrator: J. Bovenschen (Quality Officer)

Hauswaldt Multiplex B:

<i>Component (µL)</i>	<i>Stock Conc.</i>	<i>Label</i>	<i>Conc. in 10x primermix</i>	<i>Conc. in PCR</i>	<i>Vol.</i>
Bobom5F-F	100 µM	700	2.50 µM	0.25 µM	5.00
Bobom5F-R	100 µM	-	2.50 µM	0.25 µM	5.00
Bobom1A-F	100 µM	700	1.50 µM	0.15 µM	3.00
Bobom1A-R	100 µM	-	1.50 µM	0.15 µM	3.00
Bobom10F-F	100 µM	800	1.00 µM	0.10 µM	2.00
Bobom10F-R	100 µM	-	1.00 µM	0.10 µM	2.00
Subtotal					20.00
Water	NA	NA	NA		180.00
Total					200.00

8.4 Preparation of the Master-mix

Hauswaldt Multiplex A:

<i>Component (µl)</i>	<i>Stock Concentration</i>	<i>Final Concentration</i>	<i>Vol. in PCR-mix</i>
dH2O	N/A	N/A	3.93
Flexi Buffer	5x	1x	2.00
MgCl ₂	25 mM	2 mM	0.80
dNTP	10 mM each	0.22 mM	0.22
Multiplex A - Primer Mix	10x	1x	1.00
GoTaq	5U/µl	0.5 U	0.05
Total			8.00

Hauswaldt Multiplex B:

<i>Component (µl)</i>	<i>Stock Concentration</i>	<i>Final Concentration</i>	<i>Vol. in PCR-mix</i>
dH2O	N/A	N/A	3.93
Flexi Buffer	5x	1x	2.00
MgCl ₂	25 mM	2 mM	0.80
dNTP	10 mM each	0.22 mM	0.22
Multiplex B - Primer Mix	10x	1x	1.00
GoTaq	5U/µl	0.5 U	0.05
Total			8.00

8.5 Preparation of the PCR-reaction

2 µl DNA + 8 µl Master-mix (8.4)

Tissue 50x diluted.

Swabs undiluted.(Qiagen Blood and Tissue Kit (SOP E 4048)

Swabs 2x Diluted (Investigator Kit (SOP E 4052)

9 The gel electrophoresis

Locus	Reload after start run	PCR product + Loading Dye (1:1)
Multiplex A	55 minutes	1+29
Multiplex B	55 minutes	1+29

To interpret the results a DNA intensity graph is recommended to be done. See the annex in this protocol.

10 Determination of the allele length

The PC in lab 2.405 is equipped with two software packages with which the patterns of the alleles can be analyzed and the allele length can be determined. When using Windows the software package GeneImagIR 3.55 should be used.

- First check the allele length for the reference samples (9.6) and for the 'positive control'
- Determine the result for the 'negative' control
- Determine, based on the patterns **per** locus, in which way the scoring should be done
When doing so, keep the Stutter bands and the number of nucleotides per band in mind
- Note the data on F0220 'Monstervolgorde op PAGE'
- Use SOP E0000 'DNA-patronen van een LICOR TIFF file per load selecteren en vastleggen in een Word-document' to produce printouts on which the DNA patterns are shown per load.

11 Literature

- Hauswaldt et al (2007)** Nine new tetranucleotide microsatellite markers for the fire-bellied toad (*Bombina bombina*). *Molecular Ecology Notes* (2007)7, 49-52.
- Stuckas et al (2006)** Eight new microsatellite loci for the critically endangered fire-bellied toad *Bombina bombina* and their cross-species applicability among anurans. *Molecular Ecology Notes* (2006)6, 150-152.
- Nurnberger et al (2003)** A linkage map for the hybridising toads *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura, Discoglossidae). *Heredity* (2003)91, 136-142.