



LumiPure Plasmid spin miniprep Kit manual

Contents

English: LumiPure Plasmid spin miniprep Kit manual	3-7
Deutsch: Handbuch für das LumiPure spin Miniprep-Kit für Plasmide	8-12
Русский: Инструкция к набору LumiPure для выделения плазмидной ДНК	13-17

LumiPure Plasmid spin miniprep Kit manual

The kit allows rapid (about 15 minutes) and highly efficient purification of plasmid DNA (up to 30 µg) from *Escherichia coli* cultures using spin columns. The purified DNA is suitable for any subsequent application, such as PCR, restriction enzyme digestion, ligation and transformation, sample preparation for Sanger sequencing and NGS, etc.

Kit components

Kit component	Count
	21583
	50 minipreps
M1250, Resuspension Solution, 15 mL	1
31650, RNase A (10 mg/mL), 150 µL	1
M1550, Lysis Solution, 15 mL	1
M1450, Neutralization Buffer, 20 mL	1
P2450, Wash Solution A (with GuHCl), 30 mL	1
K2250, Wash Solution B (Concentrate to be diluted 5x with ethanol 96%), 10.0 mL	2
K1350, Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 10 mL	1
Spin column CNP30-A (up to 30 µg, blue ring)	50
Collection tube for spin column, 2 mL	50

Store at room temperature.

Shelf life 12 months.

Equipment and reagents supplied by user:

- microcentrifuge with rotor for 1.5 mL tubes and capable of centrifuging $>10,000$ RPM ($6,700 \times g$);
- 96 % ethanol;
- 1.5 mL microcentrifuge tubes (2 tubes for DNA purification from 1 biological sample);
- (optional) tabletop centrifuge with rotor for 15 mL tubes and capable of centrifuging $>4,500 \times g$ for centrifugation of overnight bacterial culture (alternatively, a microcentrifuge with rotor for 1.5 mL tubes can be used).

Before starting

1. Transfer the contents of *RNase A* vial into the *Resuspension Solution* vial and mix thoroughly. Mark on the label that *RNase A* has been added.
2. Dilute the concentrate of *Wash Solution B* 5x with 96 % ethanol (add 4 volumes of 96 % ethanol to 1 volume of concentrate specified on the bottle). Mark on the label that ethanol has been added.
3. If any precipitate has formed in *Lysis Solution*, *Neutralization Buffer*, *Wash Solution A*, incubate the solutions at a temperature not higher than 50 °C until the precipitates have been completely dissolved. Before use let the solutions cool down to 25 °C.

Purification of plasmid DNA

All centrifugation steps are carried out at room temperature, at 10,000–13,000 RPM (6,700–11,000 x g) (unless specified otherwise).

Process bacterial cultures with OD₆₀₀ no more than 30 AU (for instance, 15 mL of the culture with OD₆₀₀ = 2 AU). If a larger cell amount should be processed, volumes of *Resuspension Solution*, *Lysis Solution*, *Neutralization Buffer* should be increased proportionally, and the supernatant should be loaded to the column in several stages.

1. Centrifuge 2.5–7 mL of *E. coli* overnight culture (10–15 mL for low-copy-number plasmids) for 5 minutes, 5,000 RPM (4,500 x g) or for 1 minute, 13,000 RPM (10,000 x g). Remove the supernatant and all remaining culture medium.
2. Resuspend the cell pellet in 250 µL of *Resuspension Solution*. Transfer the cell suspension into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
3. Add 250 µL of *Lysis Solution*, mix gently by inverting the tube 4–6 times. Check that a turbid solution has become viscous and clear, and immediately proceed to the next step.

! In case of processing 10–15 mL of bacterial culture, mix thoroughly by inverting the tube until the solution has become viscous and clear. In some instances, more inversions may be required.

! Do not vortex the sample. This can cause shearing of chromosomal DNA.

4. Add 350 µL of *Neutralization Buffer* to the sample, mix gently by inverting the tube 4–6 times. As a result precipitations in the form of flakes should appear in the sample.

! In case of processing 10–15 mL of bacterial culture, after the tube contents has been mixed, shake the tube for a short period of time (a few seconds).

5. Centrifuge the sample for 5 minutes.
6. Place a spin column in a collection tube. Carefully transfer the supernatant to the column. Centrifuge the column for 30 seconds. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.

! (optional) To remove endotoxins or trace nuclease activity (when working with EndA+ strains) add 500 μ L of Wash Solution A to the column (this step can result in decreasing of DNA yield by up to 20 %). Centrifuge the column for 30 seconds. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.

7. Add 500 μ L of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 30 seconds. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.
8. Add 500 μ L of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the collection tube with the flow-through.
9. Place the spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50–100 μ L of *Elution Buffer* to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column for 2 minutes. The microcentrifuge tube contains the purified DNA.

! For increased DNA concentrations, use a low volume of Elution Buffer. Elution with volumes of less than 50 μ L is not recommended because this can be insufficient to entirely wet the membrane resulting in low DNA recovery. For increased DNA yield, use a higher volume of Elution Buffer (100 μ L).

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

Note

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

Storage of purified DNA: for long-term storage $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, for short-term storage $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Handbuch für das LumiPure spin Miniprep-Kit für Plasmide

Dieses Kit dient der schnellen (ca. 15 Minuten) und effizienten Extraktion von Plasmid-DNA (bis zu 30 µg) aus *Escherichia coli*-Kulturen mit Hilfe von Zentrifugationssäulchen. Die isolierte DNA eignet sich für alle gängigen molekularbiologischen Verfahren, u. a. für PCR, Restriktionsverdau, Ligation, Transformation und Sequenzierung (Sanger- und NGS-Verfahren).

Bestandteile

Komponente	Anzahl
	21583
	50 minipreps
M1250, Resuspendierungslösung / Resuspension Solution, 15 mL	1
31650, RNase A (10 mg/mL), 150 µL	1
M1550, Lyselösung / Lysis Solution, 15 mL	1
M1450, Neutralisierungspuffer / Neutralization Buffer, 20 mL	1
P2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 30 mL	1
K2250, Waschlösung B / Wash Solution B (Konzentrat muss mit 96%igem Ethanol 5-fach verdünnt werden), 10.0 mL	2
K1350, Elutionspuffer / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5), 10 mL	1
Zentrifugationssäulchen CNP30-A (für bis zu 30 µg, blauer Ring)	50
Sammelgefäß für Zentrifugationssäulchen, 2 ml	50

Bei Raumtemperatur lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Geräte und Materialien:

- Tischzentrifuge mit mindestens 10.000 min^{-1} ($6.700 \times g$) und Rotor für 1,5-ml-Röhrchen;
- 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen (2 Röhrchen pro DNA-Extraktion aus einer Probe);
- 96 % Ethanol (4-faches Volumen der *Wash Solution B*, die als Konzentrat geliefert wird);
- (optional) Zentrifuge mit Rotor für 15-ml-Röhrchen und mindestens $4.500 \times g$ für die Zentrifugation der Bakterienkultur (Eine Tischzentrifuge mit Rotor für 1,5-ml-Röhrchen kann dafür auch verwendet werden).

Vorbereitung der Reagenzien

1. Überführen Sie den Inhalt des *RNase-A*-Röhrchens in die *Resuspension Solution* und mischen Sie sorgfältig. Notieren Sie die Zugabe der *RNase A* auf dem Deckel.
2. *Wash Solution B* wird als Konzentrat geliefert und muss vor der ersten Verwendung 1:5 mit 96%igem Ethanol verdünnt werden. Dazu versetzen Sie das auf der Flasche angegebene Volumen des Konzentrats mit dem 4-fachen Volumen an 96%igem Ethanol und notieren die Zugabe auf dem Deckel.
3. Sollten sich in *Lysis Solution*, *Neutralization Buffer* oder *Wash Solution A* Salzkristalle gebildet haben, erwärmen Sie die Lösungen auf maximal $50 \text{ }^\circ\text{C}$, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat. Lassen Sie die Lösungen auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ abkühlen.

Extraktion der Plasmid-DNA

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

In die DNA-Extraktion sollten nicht mehr als 30 OD_{600} -Einheiten der Bakterienkultur eingesetzt werden (z. B. maximal 15 ml Kultur mit $\text{OD}_{600} = 2$). Falls größere Zellenmengen verarbeitet werden sollen, werden die Volumina von *Resuspension Solution*, *Lysis Solution*, und *Neutralization Buffer* proportional erhöht und der Überstand in mehreren Schritten auf die Säule geladen.

1. Zentrifugieren Sie 2,5–7 ml *E.-coli*-Übernachtskultur (10–15 ml Kultur mit niedrigen Plasmidkopiezahlen) 5 Minuten bei 5.000 min^{-1} ($4.500 \times g$) oder 1 Minute bei 13.000 min^{-1} ($10.000 \times g$). Verwerfen Sie den Überstand.
2. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 250 μl *Resuspension Solution* und überführen Sie die Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.
3. Geben Sie 250 μl *Lysis Solution* zur Zellsuspension hinzu und mischen Sie vorsichtig durch 4- bis 6-maliges Invertieren. Stellen Sie sicher, dass aus der trüben Suspension eine viskose, klare Lösung geworden ist und schließen Sie sofort den nächsten Schritt an.

! Falls Sie 10–15 ml Bakterienkultur verarbeiten, mischen Sie den Röhrcheninhalt vorsichtig durch Invertieren, bis Sie eine viskose und klare Lösung erhalten. Bisweilen sind dafür zusätzliche Invertierungen erforderlich.

! Mischen Sie die Probe nicht durch Vortexen, weil das zur Scherung der chromosomalen DNA führen kann.

4. Geben Sie 350 μl *Neutralization Buffer* zur Probe hinzu und mischen Sie vorsichtig durch 4- bis 6-maliges Invertieren. Als Folge bildet sich ein flockiges Präzipitat.

! Falls Sie 10–15 ml Bakterienkultur verarbeiten, schütteln Sie zusätzlich das Röhrchen für einige Sekunden.

5. Zentrifugieren Sie die Probe 5 Minuten lang.

6. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Überführen Sie den Überstand aus Schritt 5 vorsichtig auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Entnehmen Sie die Säule aus dem Sammelgefäß, werfen Sie den Durchfluss und stecken Sie die Säule in das Sammelgefäß zurück.

! (optional) Um Endotoxine oder Nukleasen zu entfernen, wenn Sie mit EndA+ Stämmen arbeiten, geben Sie 500 µl Wash Solution A auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Entnehmen Sie die Säule aus dem Sammelgefäß, werfen Sie den Durchfluss und stecken Sie die Säule in das Sammelgefäß zurück (Dieser zusätzliche Waschschrift kann die DNA-Ausbeute um bis zu 20 % reduzieren).

7. Geben Sie 500 µl Wash Solution B auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Entnehmen Sie die Säule aus dem Sammelgefäß, werfen Sie den Durchfluss und stecken Sie die Säule in das Sammelgefäß zurück.
8. Geben Sie 500 µl Wash Solution B auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Werfen Sie den Durchfluss mitsamt dem Sammelgefäß.
9. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–100 µl Elution Buffer in die Mitte der Membran. Nach einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 2 Minuten lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

! Für eine höhere DNA-Endkonzentration kann mit geringeren Volumina an Elutionspuffer eluiert werden — jedoch nicht mit weniger als 50 µl, weil die Säulenmembran dann möglicherweise nicht vollständig benetzt würde, was zu einem teilweisen DNA-Verlust führen könnte. Für eine höhere DNA-Ausbeute sollte mit größeren Volumina an Elutionspuffer (100 µl) eluiert werden.

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

Anmerkung

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

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

Инструкция к набору LumiPure для выделения плазмидной ДНК

Данный набор предназначен для быстрого (~ 15 минут) и высокоэффективного выделения плазмидной ДНК (до 30 мкг) из культуры клеток *Escherichia coli* на спин-колонках. Очищенная ДНК пригодна для любых молекулярно-биологических работ, включая ПЦР, обработку эндонуклеазами рестрикции, лигирование, трансформацию, подготовку образцов для секвенирования по методу Сэнгера и NGS-секвенирования и др.

Состав набора

Компонент набора	Количество
	21583 50 minipreps
M1250, Ресуспендирующий раствор / Resuspension Solution, 15 mL	1
31650, РНКаза А (10 mg/mL), 150 µL	1
M1550, Лизирующий раствор / Lysis Solution, 15 mL	1
M1450, Нейтрализующий буфер / Neutralization Buffer, 20 mL	1
P2450, Промывочный раствор А / Wash Solution A (с GuHCl), 30 mL	1
K2250, Промывочный раствор В / Wash Solution В (концентрат 5х для разбавления 96% этанолом), 10.0 mL	2
K1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 10 mL	1
Колонка CNP30-A (до 30 мкг, синее кольцо)	50
Пробирка для сбора проскока, 2 мл	50

Хранить при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Настольная центрифуга с ротором для 1.5 мл пробирок со скоростью вращения не менее 10000 об/мин (6700 × g);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл (2 пробирки для выделения ДНК из 1 образца);
- 96 % этанол;
- (опционально) Центрифуга с ротором для 15 мл пробирок со скоростью вращения не менее 4500 × g для центрифугирования ночной культуры бактерий (возможно использование настольной центрифуги для 1.5 мл пробирок).

Перед началом работы

1. Перенесите содержимое пробирки с *РНКазой А* в *ресуспендирующий раствор*, тщательно перемешайте. Поставьте отметку о добавлении РНКазы на крышке.
2. Разбавьте концентрат *промывочного раствора В* в 5 раз 96 % этанолом (к указанному на банке объему концентрата добавьте 4 объема 96 % этанола), поставьте отметку о добавлении этанола на крышке.
3. При наличии осадка в *лизирующем растворе*, *нейтрализующем буфере*, *промывочном растворе А* прогрейте их в термостате до температуры не выше 50 °С и дождитесь полного растворения осадка. После этого охладите растворы до 25 °С.

Выделение плазмидной ДНК

Работы следует выполнять при комнатной температуре, все центрифугирования (если иное прямо не оговорено) при 10000–13000 об/мин (6700–11000 × g).

Не используйте для выделения более 30 ОЕ (оптических единиц, OD₆₀₀) культуры (например, 15 мл при плотности культуры OD₆₀₀ = 2 ОЕ). В случае необходимости использовать большее количество клеток для выделения плазмидной ДНК, следуеткратно увеличить объемы *ресуспендирующего раствора*, *лизирующего раствора*, *нейтрализующего буфера*, а супернатант наносить на колонку в несколько этапов.

1. 2.5–7 мл ночной культуры бактерий (10–15 мл в случае выделения низкокопийных плазмид) центрифугируйте 5 минут, 5000 об/мин (4500 × g) или 1 мин, 13000 об/мин (10000 × g). Слейте супернатант, полностью удалите остатки культуральной жидкости.
2. Ресуспендируйте осадок клеток в 250 мкл *ресуспендирующего раствора*. Перенесите суспензию клеток в новую 1.5 мл пробирку.
3. Добавьте к суспензии клеток 250 мкл *лизирующего раствора*, аккуратно перемешайте путем переворачивания пробирки 4–6 раз. Убедитесь, что мутный раствор стал полупрозрачным и вязким, и сразу же переходите к следующему шагу.

! В случае выделения плазмидной ДНК из 10–15 мл культуры следует перемешивать до тех пор, пока раствор станет полупрозрачным и вязким, для этого может потребоваться большее число переворачиваний.

! Не используйте вортекс для перемешивания, так как это может привести к фрагментации хромосомной ДНК.

4. Добавьте 350 мкл *нейтрализующего буфера*, аккуратно перемешайте путем переворачивания пробирки 4–6 раз. После этого этапа в пробирке должен образоваться осадок в виде белых хлопьев.

! В случае выделения плазмидной ДНК из 10–15 мл культуры после перемешивания необходимо кратковременно встряхнуть содержимое пробирки (в течение нескольких секунд).

5. Центрифугируйте 5 мин.
6. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, аккуратно перенесите на колонку надосадочную жидкость. Центрифугируйте 30 сек. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно.

! (Опционально) Для полного удаления нуклеаз при выделении из end A+ штаммов и удаления эндотоксинов нанесите на колонку 500 мкл промывочного раствора А (использование этого раствора может приводить к снижению выхода плазмидной ДНК на 20%). Центрифугируйте 30 сек. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно.

7. Нанесите на колонку 500 мкл промывочного раствора В, центрифугируйте 30 сек. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно.
8. Нанесите на колонку 500 мкл промывочного раствора В, центрифугируйте 3 мин.
9. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл элюирующего буфера. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 2 минуты. Выделенная ДНК находится в элюате.

! Для получения наибольшей концентрации ДНК используйте меньшие объёмы элюирующего буфера. Не рекомендуется использовать менее 50 мкл, так как мембрана колонки может не полностью смочиться, что приведет к снижению выхода ДНК. Для наибольшего выхода ДНК с колонки используйте больший объём элюирующего буфера (100 мкл).

! При необходимости элюцию можно проводить деионизованной водой.

Примечание

Если необходимо разбавить раствор при измерении концентрации ДНК, то для разбавления следует использовать только буфер TE pH 8.5 или *элюирующий буфер* из набора. В противном случае можно получить некорректные значения OD_{260}/OD_{280} и неверно определить содержание ДНК в растворе.

Хранение выделенной ДНК: в морозильной камере (-20 °С), кратковременно при +4 °С.

Lumiprobe Corporation

(US and Worldwide)

9:00AM - 9:00PM EST

201 International Circle, Suite 135

Hunt Valley, Maryland 21030

USA

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH

(Germany and Europe)

8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Feodor-Lynen-Strasse 23

30625 Hannover

Germany

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd

(Russia and CIS)

8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Kotsyubinskogo 4, bld. 3

121351 Moscow

Russian Federation

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

Issued by TÜV NORD CERT GmbH

www.lumiprobe.com