Lumiprobe
Life science solutions

Handbuch für das LumiSpin® PLASMID, Plasmid-DNA-Isolations-Spin-Kit

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Deutsch: Handbuch für das LumiSpin® PLASMID,
Plasmid-DNA-Isolations-Spin-Kit 3-8

DE

Handbuch für das LumiSpin® PLASMID, Plasmid-DNA-Isolations-Spin-Kit

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		
	11583 10 minipreps	21583 50 minipreps	31583 100 minipreps
G1250, Resuspendierungslösung / Resuspension Solution, 5 mL	1	—	—
11650, RNase A (10 mg/mL), 50 uL	1	—	—
D1450, Neutralisierungspuffer / Neutralization Buffer, 2 mL	2	—	—
H2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 6 mL	1	—	—
D1350, Elutionspuffer / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5), 1.5 mL	1	—	—
13164, Spin column (up to 30 µg), 10 pcs	1	—	—
M1250, Resuspendierungslösung / Resuspension Solution, 15 mL	—	1	—
31650, RNase A (10 mg/mL), 150 uL	—	1	—
M1450, Neutralisierungspuffer / Neutralization Buffer, 20 mL	—	1	—
P2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 30 mL	—	1	—

K1350, Elutionspuffer / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5), 10 mL	—	1	—
P1250, Resuspendierungslösung / Resuspension Solution, 30 mL	—	—	1
51650, RNase A (10 mg/mL), 300 uL	—	—	1
P1550, Lyselösung / Lysis Solution, 30 mL	—	—	1
R1450, Neutralisierungspuffer / Neutralization Buffer, 40 mL	—	—	1
T2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 60 mL	—	—	1
M2250, Waschlösung B / Wash Solution B (Konzentrat muss mit 96%igem Ethanol 5-fach verdünnt werden), 20.0 mL	—	—	2
M1350, Elutionspuffer / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5), 20 mL	—	—	1
M1550, Lyselösung / Lysis Solution, 15 mL	1	1	—
K2250, Waschlösung B / Wash Solution B (Konzentrat muss mit 96%igem Ethanol 5-fach verdünnt werden), 10.0 mL	1	2	—
Sammelgefäß für Zentrifugationssäulchen, 2 ml	10	50	100
23164, Spin column (up to 30 µg), 50 pcs	—	1	2

Transport und Lagerung bei Raumtemperatur.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Geräte und Materialien:

- Tischzentrifuge mit mindestens 10.000 min^{-1} (6.700 × *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 × *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 °C, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat. Lassen Sie die Lösungen auf 25 °C abkühlen.

Extraktion der Plasmid-DNA

Alle folgenden Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur, alle Zentrifugationsschritte mit 10.000–13.000 min^{-1} (6.700–11.000 × *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 $OD_{600} = 2$). 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*-Übernachtkultur (10–15 ml Kultur mit niedrigen Plasmidkopiezahlen) 5 Minuten bei 5.000 min^{-1} (4.500 × *g*) oder 1 Minute bei 13.000 min^{-1} (10.000 × *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, verwerfen 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, verwerfen Sie den Durchfluss und stecken Sie die Säule in das Sammelgefäß zurück (Dieser zusätzliche Waschschritt 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, verwerfen 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. Verwerfen 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.

Ver. MJ4VN
#5555J

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com