Plasmid Mini Kit

Datenblatt

Artikel-Nr. BS44.511.0010 10 Präparationen
Artikel-Nr. BS44.511.0050 50 Präparationen
Artikel-Nr. BS44.511.0250 250 Präparationen

(Nur für Forschung und *in vitro*-Anwendungen)

Chargen-Nr.:

Mindestens haltbar bis:

Aussehen:

Farbe:

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

Plasmid Mini Kit

Beschreibung

Zur Aufreinigung hochreiner Plasmid DNA aus 0,5 - 5ml Bakterienkultur.

Kit-Komponenten

	10 Präparationen	50 Präparationen	250 Präparationen
Resuspension Puffer	6 ml	30 ml	2 x 70 ml
Lysis Puffer	6 ml	30 ml	2 x 70 ml
Neutralization Puffer	8 ml	35 ml	170 ml
Waschpuffer A	6 ml	30 ml	140 ml
Waschpuffer B	4 ml (Endvolumen 10 ml)	20 ml (Endvolumen 50 ml)	80 ml (Endvolumen 200 ml)
Elutionspuffer P	2 ml	6 ml	30 ml
Zentrifugationssäulen (orange)	10	50	5 x 50
Sammeltubes (2,0 ml)	10	50	5 x 50

Plasmid Mini Kit

Wichtige Hinweise zur Lagerung

- Alle Komponenten sollten bei Raumtemperatur gelagert werden

Wichtige Schritte vor Beginn

- Zugabe von 96 – 99,8% Ethanol zu Waschpuffer B. Die entsprechenden Volumina je nach Kit Größe entnehmen Sie der nachfolgenden Tabelle. Gründlich mischen und Flasche stets dicht verschlossen halten.

	10 Präparationen	**50 Präparationen**	**250 Präparationen**
Waschpuffer B	**6 ml** 96 – 99,8% Ethanol zugeben	**30 ml** 96 – 99,8% Ethanol zugeben	**120 ml** 96 – 99,8% Ethanol zugeben

- Stellen Sie sicher, dass Waschpuffer B gemäß der obigen Instruktionen vorbereitet ist
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

Nicht im Kit enthaltene Komponenten

- 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße
- Evtl. 15 ml Reaktionsgefäße (bei großen Volumina an Ausgangsmaterial)
- 96 – 99,8% Ethanol (keinen methylierten oder denaturierten Alkohol verwenden!)

Kalkulation der Zentrifugalkraft (relative centrifugal force, rcf) in [g], ausgehend von Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm)

RCF (g) = $1{,}19 \cdot 10^{-5}$ x $(rpm)^2$ x R

R = Radius des Rotors in cm (Achtung: Radius, nicht Durchmesser!)

Beispiel: Berechnung der Zentrifugalkraft bei 10.000 rpm in einer Zentrifuge mit Rotor-Radius 9 cm

RCF = $1{,}19 \cdot 10^{-5}$ x $(10.000)^2$ x 9

RCF = 10.710 x g

Qualitätskontrolle und technische Unterstützung

Alle Produkte von Bio&SELL werden umfassenden Qualitätskontrollen unterzogen. Dadurch wird gewährleistet, dass sie bei vorschriftsmäßiger Anwendung einwandfrei funktionieren. Die Komponenten jedes **Bio&SELL Plasmid Mini Kit** wurden in der Isolierung von Plasmid-DNA getestet und die extrahierte Plasmid-DNA Nachfolgeanwendungen unterzogen

Sollten Fragen oder Probleme auftreten, kontaktieren Sie uns bitte telefonisch unter: 09128 – 724 32 32.

Wir behalten uns das Recht vor, Änderungen zur Verbesserung der Durchführung und am Design vorzunehmen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

Plasmid Mini Kit

Protokoll 1: Isolierung von Plasmid-DNA aus 0,5 – 5,0 ml Bakterien-Übernachtkultur

1. 0,5 ml bis 5,0 ml einer *E.coli*-Übernachtkultur in ein 1,5 ml-, 2,0 ml- oder 15 ml Reaktionsgefäß über-führen. Eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren, um die Zellen zu pelletieren. Den Überstand möglichst vollständig abnehmen.

2. Das Bakterienpellet nach Zugabe von **250 µl Resuspension Puffer** durch Vortexen oder Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendieren.
Es sollten kein Pellet oder Zellklumpen mehr sichtbar sein.

3. Das Reaktionsgefäß nach Zugabe von **250 µl Lysis Puffer** verschließen und durch mehrmaliges Invertieren (6 bis 8 Mal) vorsichtig mischen.

Wichtig: Die Lyse der Zellen in Lysis Puffer sollte nicht länger als 5 min dauern! Nicht vortexen! Schritt 3 ist wichtig für die Trennung der bakteriellen chromosomalen DNA und der Plasmid-DNA. Mechanischer Stress durch Vortexen oder intensives Mischen führt zu einer Scherung der hoch-molekularen chromosomalen DNA. Die daraus entstehenden kleinen Fragmente werden im nächsten Schritt nicht effizient mit NaOH/SDS gefällt und führen zu einer Verunreinigung der Plasmid-DNA.
Achtung: Überprüfen Sie den Lysis Puffer vor der Zugabe auf Ausfällungen! Falls weiße Aus-fällungen sichtbar sind, den Puffer für einige Minuten bei 30 – 40C

inkubieren, bis die Aus-fällungen gelöst sind. Lysis Puffer wieder auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

4. Nach Zugabe von **350 µl Neutralization Puffer** vorsichtig, aber gründlich durch 6- bis 8-maliges Invertieren mischen. Für 8 min bei maximaler Geschwindigkeit (12.000 bis 14.000 rpm) zentrifugieren. Währenddessen die benötigte Anzahl **Zentrifugationssäulen** in **2,0 ml Sammeltubes** stellen.

5. Den klaren Überstand auf die **Zentrifugationssäulen** geben. Bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren.
Hinweis: Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.
Den Durchfluss verwerfen. Das **2,0 ml Sammeltube** und die **Zentrifugationssäule** erneut verwenden, Säule in das Tube stellen.

6. **500 µl Waschpuffer A** zugeben. Die Säule bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen. Das **2,0 ml Sammeltube** und die **Zentrifugationssäule** erneut verwenden, Säule in das Tube stellen.

7. **700 µl Waschpuffer B** zugeben. Die Säule bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen. Das **2,0 ml Sammeltube** und die **Zentrifugationssäule** erneut verwenden, Säule in das Tube stellen.

8. Nochmals bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 oder 2,0 ml Reaktionsgefäß** stellen.

9. **50 – 100 µl Elutionspuffer P** mittig auf die Zentrifugationssäule geben. Bei Raumtemperatur für 1 min inkubieren, dann bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an Plasmid-DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer P durchgeführt werden.

Hinweis: Die Plasmid-DNA kann auch mit geringeren oder mit höheren Volumina an Elutionspuffer P eluiert werden, als oben angegeben. Bei geringeren Volumina an Elutionspuffer P erhöht sich die Endkonzentration der Plasmid-DNA.
Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von –20°C empfohlen.

Bio&SELL		
Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

Protokoll 2: Isolierung von Plasmid-DNA aus 5 – 10 ml Bakterien-Übernachtkultur

(z.B. von low copy-Plasmiden oder P1-Konstrukten)

►►►*Die Aufarbeitung eines größeren Volumens an Ausgangsmaterial benötigt eine größere Menge an Puffern. Die mitgelieferten Puffervolumina in diesem Kit sind an das Standardprotokoll 1 angepasst. Die häufige Verwendung des Spezialprotokoll 2 kann die Anzahl der möglichen Präparationen reduzieren.*

1. 5 ml bis 10 ml einer *E.coli*-Übernachtkultur in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführen. Eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren, um die Zellen zu pelletieren. Den Überstand möglichst vollständig abnehmen.

2. Das Bakterienpellet nach Zugabe von **500 µl Resuspension Puffer** durch Vortexen oder Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendieren. Es sollten kein Pellet oder Zellklumpen mehr sichtbar sein. Die Lösung in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführen.

3. Das Reaktionsgefäß nach Zugabe von **500 µl Lysis Puffer** verschließen und durch mehrmaliges Invertieren (6 bis 8 Mal) vorsichtig mischen. Bei Raumtemperatur für 5 min inkubieren.

<u>Wichtig</u>: Die Lyse der Zellen in Lysis Puffer sollte nicht länger als 5 min dauern! <u>Nicht vortexen!</u> Schritt 3 ist wichtig für die Trennung der bakteriellen chromosomalen DNA und der Plasmid-DNA. Mechanischer Stress durch Vortexen oder intensives Mischen führt zu einer Scherung der hoch-molekularen chromosomalen DNA. Die daraus entstehenden kleinen Fragmente werden im nächsten Schritt nicht effizient mit NaOH/SDS gefällt und führen zu einer Verunreinigung der Plasmid-DNA.

<u>Achtung:</u> Überprüfen Sie den Lysis Puffer vor der Zugabe auf Ausfällungen! Falls weiße Aus-fällungen sichtbar sind, den Puffer für einige Minuten bei 30 – 40C inkubieren, bis die Aus-fällungen gelöst sind. Lysis Puffer wieder auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

4. Nach Zugabe von **600 µl Neutralization Puffer** vorsichtig, aber gründlich durch 6- bis 8-maliges Invertieren mischen. Für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit (12.000 bis 14.000 rpm) zentrifugieren. Währenddessen die benötigte Anzahl **Zentrifugationssäulen** in **2,0 ml Sammeltubes** stellen.

5. 700 µl des klaren Überstandes auf die **Zentrifugationssäulen** geben. Bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren.

<u>Hinweis</u>: Falls der Überstand nicht komplett durch die Membran zentrifugiert wurde, nochmals bei höherer Geschwindigkeit zentrifugieren oder die Zentrifugationszeit verlängern.

Den Durchfluss verwerfen. Das **2,0 ml Sammeltube** und die **Zentrifugationssäule** erneut verwenden, Säule in das Tube stellen. Den restlichen Überstand auf die jeweiligen **Zentrifugationssäulen** geben. Bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min

zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen. Das **2,0 ml Sammeltube** und die **Zentrifugationssäule** erneut verwenden, Säule in das Tube stellen.

6. **500 µl Waschpuffer A** auf die **Zentrifugationssäule** geben. Bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen. Das **2,0 ml Sammeltube** und die **Zentrifugationssäule** erneut verwenden, Säule in das Tube stellen.

7. **700 µl Waschpuffer B** auf die **Zentrifugationssäule** geben. Bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen. Das **2,0 ml Sammeltube** und die **Zentrifugationssäule** erneut verwenden.

8. Nochmals bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 2 min zentrifugieren, um alle Reste von Ethanol vollständig zu entfernen. Das Sammeltube mit dem Durchfluss verwerfen. Zentrifugationssäule in ein **1,5 oder 2,0 ml Reaktionsgefäß** stellen.

9. **50 – 100 µl Elutionspuffer P** mittig auf die Zentrifugationssäule geben. Bei Raumtemperatur für 3 min inkubieren, dann bei 11.000 x g (~12.000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Für eine maximale Ausbeute an Plasmid-DNA können zwei Elutionsschritte mit gleichen Volumina Elutionspuffer P durchgeführt werden.

Hinweis: Die Plasmid-DNA kann auch mit geringeren oder mit höheren Volumina an Elutionspuffer P eluiert werden, als oben angegeben. Bei geringeren Volumina an Elutionspuffer P erhöht sich die Endkonzentration der Plasmid-DNA.
Die extrahierte DNA sollte bei 4°C aufbewahrt werden. Für Langzeitlagerung wird eine Temperatur von –20°C empfohlen.

Plasmid Mini Kit

Troubleshooting

Problem / mögliche Ursache	Bemerkungen und Vorschläge
Niedrige Ausbeute	
Fehlerhafter Waschpuffer / kein Ethanol zum Waschpuffer dazugegeben	**Waschpuffer** exakt wie oben angegeben vorbereiten. **Waschpuffer** stets **fest verschließen**, damit kein Ethanol verdampfen kann
Schlechte Elution der Plasmid-DNA	**Elutionspuffer P** stets **mittig** auf die Zentrifugationssäule pipettieren, selbst wenn mit niedrigen Volumina eluiert wird.
Bakterienpellet unzureichend resuspendiert oder Bakterienzellen schlecht lysiert	**Bakterienpellet** vollständig resuspendieren. Nach Zugabe von **Lysis Puffer** muss das Lysat klar werden.
Probleme mit Nachfolge-anwendungen, z.B. Ligation	
Kontamination des Eluats mit Salzen	**Zentrifugationssäulen** wie im Protokoll beschrieben waschen.
Kontamination des Eluats mit Ethanol	Angegebene **Zentrifugationszeiten** einhalten, falls erforderlich sogar verlängern (Ethanolgeruch!)

Bio&SELL		
Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33

Technische Daten

Sicherheitsanweisungen

Bitte gehen Sie mit allen Materialien und Reagenzien, die im Kit enthalten sind, vorsichtig um. Es sollten immer Handschuhe getragen und Hautkontakt vermieden werden!

Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit viel Wasser abspülen!

Versand: bei Raumtemperatur

Lagerung: Das **Bio&SELL Plasmid Mini Kit** sollte trocken und bei Raumtemperatur (14–25°C) gelagert werden. Unter diesen Bedingungen ist es mindestens 6 Monate stabil. Vor jeder Nutzung sollten alle Komponenten Raumtemperatur haben. Kristalle, die sich eventuell während der Lieferung bzw. Lagerung gebildet haben, können durch vorsichtiges Erwärmen gelöst werden.

Sicherheitshinweis: Dieses Produkt sollte nur von Personen verwendet werden, die Routine in Laboranwendungen haben. Es sollte laborübliche Schutzkleidung wie Kittel, Handschuhe und Schutzbrillen getragen werden. Bei Kontakt mit Haut und Augen sollten die betroffenen Stellen umgehend mit Wasser gewaschen bzw. ausgespült werden.

.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33