

Kit zur Aufreinigung von Plasmid-DNA

Protokoll zur Reinigung von Plasmid-DNA aus 1 – 6 mL Bakterienkultur mit Erträgen bis zu 20 µg

Alle Zentrifugationsschritte zwischen 10.000 und 13.000 rpm.

1. Präparation RNase-A-haltiger Puffer 1.0: Entweder gesamte RNase-A-Lösung zu gesamtem Puffer 1.0 geben und bei geschlossenem Röhrchen kräftig schütteln (Aufbewahrung bei 4 – 12 °C im Kühlschrank bis zu 4 Monate) oder RNase-A-Lösung bei – 20 °C bis zu einem Jahr im Tiefkühlschrank aufbewahren und bei Bedarf 10 µL aufgetaute RNase-A-Lösung zu 250 µL Puffer 1.0 geben und kräftig schütteln (ausreichend für 1 Präparation).
2. Präparation Waschpuffer 4.0:

Kit	Puffer 4.1 [mL]	Zugabe Ethanol (96- bis 100 Vol-%) [mL]	Endvolumen Waschpuffer [mL]
4	0,56	2,24	2,8
50	7	28	35

3. 1 – 6 mL Bakterienkultur (stationäre Phase, über Nacht gewachsen) milliliterweise in 1,5-mL-Microtube geben und zur Sedimentation der Zellen jeweils 30 – 60 s bei mindestens 13.000 rpm zentrifugieren, Überstände dekantieren und Restflüssigkeit mit Pipette entfernen.
4. Vollständiges Resuspendieren des Zellpellets in 250 µL RNase-A-haltigem Puffer 1.0 (wie oben präpariert) durch kräftiges Schütteln bzw. mehrmaliges Auf- und Abpipettieren.
5. Zugabe von 250 µL Puffer 2.0, Deckel schließen und sorgfältig durch 4- bis 6maliges Umdrehen des Röhrchens mischen. In diesem Schritt erfolgt die Zellyse. Nicht länger als 5 min lysieren, da sonst irreversible Denaturierung der Plasmid-DNA möglich.
6. Zugabe von 350 µL Puffer 3.0, Deckel schließen und sorgfältig durch 4- bis 6maliges Umdrehen des Röhrchens mischen. Während dieser Neutralisierung präzipitieren denaturierte DNA und Proteine.
7. 7 min bei 13.000 rpm zentrifugieren. Während dieser Zeit Mini-Säule in 2-mL-Sammeltube stellen.
8. Überstand aus Schritt 7 auf Säule geben, Deckel schließen und 30 s zentrifugieren. Durchfluß verwerfen.
9. 700 µL Waschpuffer 4.0 (wie oben präpariert) auf Säule geben und 30 s zentrifugieren. Durchfluß verwerfen. Anschließend nochmals 30 s trocken zentrifugieren.
10. Säule in 1,5-mL-Receivertube stellen und 30 – 100 µL Puffer 5.0 oder deionisiertes Wasser in die Mitte der Membran der Säule geben. 1 min inkubieren.
11. Zur Elution der Plasmid-DNA 1 min zentrifugieren. Höhere DNA-Erträge können durch größere Volumina an Elutionspuffer oder durch mehrmaliges Eluieren mit kleineren Volumina an Elutionspuffer erreicht werden.