



EliGene® Plasmid DNA MiniPrep

Návod k použití

Balení:

Kat. č..	Velikost balení
416050	50 Izolací

Skladování:

Všechny reagenty a komponenty kitu musejí být přepravovány při pokojové teplotě (15 - 30 °C). Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kit plně udrží svou aktivitu, dokud neuběhne expirační doba uvedená na kitu.

Obsah

Úvod	2
Požadavky na vybavení	2
Obsah kitu	2
Preventivní opatření	2
Podrobný izolační protokol	3
Stručný izolační protokol	5
Řešení problémů	6



Úvod

EliGene® Plasmid DNA MiniPrep poskytuje rychlou, jednoduchou a finančně efektivní metodu izolace plazmidů pro běžné laboratorní aplikace v molekulární biologii. EliGene® Plasmid DNA MiniPrep využívá alkalickou lýzy, následuje vazba plazmidové DNA na silikátovou membránu spin filtru pro odstranění proteinů a nízkomolekulárních nečistot. Plazmidová DNA izolovaná pomocí EliGene® Plasmid DNA MiniPrep je okamžitě připravena k použití. Celý postup může být dokončen za 35 minut nebo méně, v závislosti na počtu zpracovaných vzorků. Všechna činidla jsou připravena k použití a EliGene® Plasmid DNA MiniPrep obsahuje všechny spotřební materiály.

Požadavky na vybavení

Microcentrifuga (12 000 x g)

Vortex

Termostat/Termoshaker schopný inkubace při 60 °C

Pipety: 50 – 750 µl

Obsah kitu

Komponenty	Množství (50 izolací)
Resuspension Buffer EP1	12,5 ml
Lysis Buffer EP2	12,5 ml
Neutralization Buffer EP3	17,5 ml
Wash Buffer EP4	25 ml
Wash Buffer EP5	2 x 18 ml
Elution Buffer EP6	4 ml
1,5 ml Tubes	100 ks
Spin Filters (Units in 2 ml Collection Tubes)	50 ks

Preventivní opatření

Při používání produktu prosím používejte ochranné rukavice a vyhněte se kontaktu reagensů s kůží. V případě kontaktu reagensů s kůží omyjte zasažené místo proudem tekoucí vody. Zabraňte požití. V případě kontaktu nebo náhodného požití nahlédněte do MSDS listů.

Reagencie označené jako hořlavé uchovávejte v bezpečné vzdálenosti od otevřeného ohně a jisker.

UPOZORNĚNÍ: Wash Buffer EP4 a Wash Buffer EP5 jsou hořlavé.



Podrobný izolační protokol

Důrazně doporučujeme prostudovat si následující informace před prvním použitím EliGene® Plasmid DNA MiniPrep kitu.

Důležitá upozornění před použitím

- Prosím noste rukavice po celý čas práce s kitem.
- Pokud je v Resuspension Buffer EP1, Lysis Buffer EP2 a/nebo v Neutralization Buffer EP3 precipitát, zahřejte lahvičku s pufrem na 60 °C a rozpustě ho.
- Pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer EP6 je klíčové odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru..
- Tento protokol je určen k izolaci „high-copy“ plazmidové DNA z 1-5 ml noční kultury.

1. Centrifugujte noční bakteriální kultury 1 minutu při 12 000 x g. Odstraňte co nejvíce růstového média.

Poznámka: Zbytkové růstové médium by mohlo inhibovat proces extrakce.

2. Úplně resuspendujte bakteriální peletu promícháním ve 250 µl Resuspension Buffer EP1 a přeneste jej do 1,5 ml zkumavky (součást balení).

Poznámka: Po resuspendování peletu by neměly být vidět shluky buněk.

3. Přidejte 250 µl Lysis Buffer EP2 a promíchejte převrácením 4-6 krát. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 3-4 minut.

Poznámka: Nevortexujte, způsobí to roztrhnutí genomické DNA. Lýza nesmí probíhat déle než 5 minut.

4. Přidejte 350 µl Neutralization Buffer EP3 a promíchejte převrácením 4-6 krát.

Poznámka: Aby se zabránilo lokálnímu srážení, promíchejte roztok ihned po přidání Neutralization Buffer EP3. Roztok by se měl zakalit.

5. Centrifugujte po dobu 10 minut při 12 000 x g.

6. Přeneste supernatant na spin filtr a centrifugujte při 12 000 x g po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.

Poznámka: Plazmidy se vážou na křemičitou membránu kolonky, protože jsou v přítomnosti chaotropných solí. Roztok přecházející membránou obsahuje nevázaný buněčný materiál.

7. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

8. Přidejte 500 µl Wash Buffer EP4 na spin filtr. Centrifugujte 1 minute při 12 000 x g.



Poznámka: Wash Buffer EP4 je promývací roztok na bázi soli, který čistí plazmidy vázané na spin filtru od ostatních nečistot.

9. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

10. Přidejte 750 µl Wash Buffer EP5 na spin filtr. Centrifugujte 1 minutu při 12 000 x g.

Poznámka: Wash Buffer EP5 je promývací roztok na bázi soli, který čistí plazmidy vázané na spin filtru od ostatních nečistot.

11. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.

12. Centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g pro úplné vyschnutí membrány spin filtru.

Poznámka: Membrána spin filtru je zcela vysušena od etanolových zbytků pro zvýšení výtěžnosti DNA v elučním kroku. Zbytkový etanol z Wash Buffer EP4 a EP5 může inhibovat následné enzymatické reakce.

13. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 1,5 ml zkumavky (součást balení).

14. Přidejte 50 µl Elution Buffer EP6 přímo na membránu spin filtru.

15. Inkubujte spin filtr při pokojové teplotě 1 minutu. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.

Poznámka: Pro zvýšení výtěžnosti inkubujte 5 minut při 60 °C.

16. Vyjměte spin filtr. Izolovaná DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.



Stručný izolační protokol

1. Centrifugujte noční bakteriální kultury 1 minutu při 12 000 x g. Odstraňte co nejvíce růstového média.
2. Úplně resuspendujte bakteriální pelet promícháním ve 250 µl Resuspension Buffer EP1 a přeneste jej do 1,5 ml zkumavky (součást balení).
3. Přidejte 250 µl Lysis Buffer EP2 a promíchejte převrácením 4-6 krát. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 3-4 minut.
4. Přidejte 350 µl Neutralization Buffer EP3 a promíchejte převrácením 4-6 krát.
5. Centrifugujte po dobu 10 minut při 12 000 x g.
6. Přeneste supernatant na spin filtr a centrifugujte při 12 000 x g po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
7. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
8. Přidejte 500 µl Wash Buffer EP4 na spin filtr. Centrifugujte 1 minute při 12 000 x g.
9. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
10. Přidejte 750 µl Wash Buffer EP5 na spin filtr. Centrifugujte 1 minutu při 12 000 x g.
11. Vyjměte spin filtr a odstraňte proteklý roztok. Poté umístěte spin filtr zpět do stejné 2 ml Collection Tube.
12. Centrifugujte 2 minuty při 12 000 x g pro úplné vyschnutí membrány spin filtru.
13. Opatrně vyjměte spin filtr a přemístěte ho do nové 1,5 ml zkumavky (součást balení).
14. Přidejte 50 µl Elution Buffer EP6 přímo na membránu spin filtru. Inkubujte spin filtr při pokojové teplotě 1 minutu.
15. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g.
16. Vyjměte spin filtr. Izolovaná DNA ve zkumavce je nyní připravena k použití pro další aplikace.





Řešení problémů

Pokud se DNA neamplifikuje

- Ujistěte se, že jste zkontrolovali výtěžky DNA a čistotu gelovou elektroforézou, UV spektrofotometrem nebo fluorimetrem (pomocí PicoGreen®, Molecular Probes, Inc.). Nadbytečné množství DNA by inhibovalo PCR reakci.
- Ujistěte se, že jste správně promíchali Wash Buffer EP4 a EP5 když se delší dobu nepoužívali. Složky izolačních roztoků se mohly oddělit.
- Zředte templátovou DNA.

Eluovaný vzorek DNA je zbarvený nebo ucpává spin filtr

- Pokud dodržujete doporučení v těchto pokynech, nesmí být v izolované DNA pozorováno žádné zbarvení.
- Nepoužívejte více než 5 ml noční bakteriálních kultur.

Nízká výtěžnost DNA

- Nízké výtěžky mohou být způsobeny mnoha faktory. Chcete-li zjistit problém, analyzujte frakce z každého kroku na agarózovém gelu.
- Vezměte v úvahu, že různé měřicí metody vedou k různým koncentracím v závislosti na tom, zda se použije UV spektrometrie nebo fluorometrie. Spektrofotometrie měří jak dvouvláknovou, tak jednovláknovou DNA, zatímco fluorometrie pomocí PicoGreen® (Molecular Probes, Inc.) měří pouze dvojvláknovou DNA.
- Dbejte na to, aby byl vzorek dobře promíchán po přidání Lysis Buffer EP2.
- Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Je to klíčový krok pro efektivní eluci DNA ze spin filtru do Elution Buffer EP6.

DNA má nízký poměr A260/280

Poměr A260/280 pro čistou DNA by se měl pohybovat v rozmezí 1,7 – 1,9. Poměr nižší než 1,6 může poukazovat na znečištění DNA proteiny. Máte-li problémy s nízkým poměrem A260/280 zkontrolujte následující:

- Pokud používáte Nanodrop, použijte jako blank Elution Buffer EP6.

DNA vyplavala z jamek při nanášení na gel

- Ve vzorku zůstaly zbytky Wash Buffer EP5. Nepřeskakujte krok odstranění zbytkového etanolu ze spin filtru. Zároveň můžete prodloužit dobu vysoušení centrifugací na 3 minuty nebo můžete použít náš načítací buffer (pro více informací kontaktujte naše obchodní oddělení).



Koncentrování DNA

Finální množství eluované DNA je 50 - 100 µl. DNA může být koncentrována přidáním 10 µl 3 M acetátu sodného (pH = 5,2) a převrácením zkumavky 3 – 5krát k promíchání. Poté přidejte 200 µl studeného 100% etanolu, opět převrácením zkumavky 3 – 5krát promíchejte a centrifugujte 15 minut při 12 000 x g a pokojové teplotě. Odstraňte supernatant a promyjte pelet DNA 70% etanolem. Zbylý etanol nechte odpařit pomocí exsikátoru a resuspendujte DNA na požadovaný objem pomocí PCR vody nebo pufru.

Výrobce:

ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Rokycanova 4437/5, Brno-Židenice 615 00

info@elisabeth.cz | www.elisabeth.cz | tel.: +420 542 213 851



Katalogové číslo



Číslo šarže



Datum expirace



Skladovací podmínky (teplotní limity)



Výrobce



Počet reakcí v balení