

Plasmid DNA purification

**Excerpt from user manual
- Deutsch -**

NucleoBond[®] Xtra Midi
NucleoBond[®] Xtra Maxi
NucleoBond[®] Xtra Midi Plus
NucleoBond[®] Xtra Maxi Plus

January 2013 / Rev. 11

Einleitung

Isolierung von Plasmid-DNA mit NucleoBond® Xtra Midi (Plus) und Maxi (Plus)

Bei diesem Protokoll handelt es sich um einen deutschsprachigen Auszug aus dem Handbuch “**Plasmid DNA Purification, NucleoBond® Xtra**“.

Es beinhaltet den schrittweisen Ablauf der Isolierungsprozedur, der im englischsprachigen Handbuch unter Kapitel 7 zu finden ist.

Detaillierte Informationen zu den NucleoBond® Xtra Kits sowie zur Isolierungsprozedur (z. B. Anzucht der Bakterienzellen, Lyse der Zellen, Aufreinigungsschritte, Lagerung der Kit-Komponenten, Herstellung von Puffern und Reagenzien, Sicherheitshinweise, Fehlersuche) sind im englischsprachigen Handbuch zu finden.

Anwendern, die NucleoBond® Xtra zum ersten Mal verwenden, wird empfohlen das gesamte Handbuch sorgfältig zu lesen. Erfahrene Anwender können direkt mit den hier aufgeführten Protokollen arbeiten.

7	NucleoBond® Xtra – Isolierung von Plasmid DNA	4
7.1	Isolierung von high-copy Plasmiden (Midi, Maxi)	4
7.2	Isolierung von low-copy Plasmiden (Midi, Maxi)	11
7.3	Konzentrierung der NucleoBond® Xtra Eluate mittels NucleoBond® Finalizer	15

7 NucleoBond® Xtra – Isolierung von Plasmid DNA

7.1 Isolierung von high-copy Plasmiden (Midi, Maxi)

Hinweis: Die Verweise innerhalb des Protokolls beziehen sich auf die entsprechenden Kapitel des englischsprachigen Hauptprotokolls.

Midi

Maxi

1 Ansetzen einer Vorkultur

Beimpfen Sie 3–5 mL LB Medium mit einer einzelnen Kolonie einer frisch ausgestrichenen Agarplatte. Stellen Sie sicher, dass sowohl die Platte als auch das Flüssigmedium das nötige Antibiotikum enthält, da bei fehlendem Selektionsdruck die Bakterien ihr Plasmid bei der Zellteilung verlieren können (für weitere Informationen siehe Kapitel 4.3). Schütteln Sie die Vorkultur bei 37 °C und ~ 300 rpm für ~ 8 h.

2 Ansetzen einer Übernachtskultur



Hinweis: Um die hohe Bindekapazität der NucleoBond® Xtra Säulen voll ausnutzen zu können, ist es wichtig, ausreichend Plasmid DNA zu laden. Wählen Sie ein größeres Volumen Übernachtskultur (Kapitel 4.6), falls die Kultur bekanntermaßen langsam oder schlecht wächst oder das Plasmid sich nicht wie ein high-copy Plasmid verhält. Sollten Sie bzgl. Kopienzahl des Plasmids und Wachstumsverhaltens des Bakterienstamms unsicher sein, erhöhen Sie das Kulturvolumen und entscheiden in Schritt 3 wie viele Zellen für die Präparation eingesetzt werden. Die unten aufgeführten Volumina sind für eine finale OD₆₀₀ von 4 berechnet (siehe auch Kapitel 4.5).

Beimpfen Sie LB Medium des unten angegebenen Volumens durch Verdünnen der Vorkultur um den Faktor 1/1000. Stellen Sie sicher, dass das Medium das nötige Antibiotikum enthält. Inkubieren Sie auf einem Schüttler bei 37 °C und ~ 300 rpm für ~ 12–16 h.

100 mL

300 mL

3 Ernte der Bakterienzellen

Messen Sie die OD₆₀₀ der Bakterienkultur und bestimmen Sie das empfohlene **Kulturvolumen** gemäß folgender Formel

$$V \text{ [mL]} = \frac{400}{OD_{600}}$$

$$V \text{ [mL]} = \frac{1200}{OD_{600}}$$

Pelletieren Sie die Zellen durch Zentrifugation bei **4,500–6,000 x g** für **≥ 10 min** bei **4°C** und entfernen Sie den Überstand vollständig.

Midi

Maxi

Hinweis: Es können auch größere Kulturvolumina verwendet werden, z. B. wenn sich das Plasmid nicht wie ein typischer high-copy Vektor verhält (für weitere Informationen siehe Kapitel 4.6). In diesem Fall erhöhen Sie die Volumina der Puffer RES, LYS und NEU proportional in den Schritten 4, 5 und 7. *Eventuell müssen zusätzliche Volumina der Lysispuffer bestellt werden (s. Bestellinformation für das NucleoBond® Xtra Buffer Set 1, Kapitel 8.2).* Falls das Kulturvolumen mehr als doppelt so hoch ist wie das empfohlene, verwenden Sie in Schritt 8 zur Lysatklärung eine Zentrifuge anstelle des NucleoBond® Xtra Filters.

4 Resuspension (Buffer RES)

Resuspendieren Sie das Zellpellet vollständig in **Resuspension Buffer RES + RNase A** durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen der Zellen.

Wichtig für eine effiziente Zellyse ist, dass keine Zellklumpen in der Suspension verbleiben.

Hinweis: Erhöhen Sie das Volumen des Puffers RES proportional falls mehr als die empfohlene Zellmasse eingesetzt wird (für Informationen zur optimalen Zellyse siehe Kapitel 4.7, für schwer zu lysierende Bakterienstämme siehe Kapitel 4.8).

8 mL

12 mL

5 Zellyse (Buffer LYS)



Überprüfen Sie Lysis Buffer LYS vor Gebrauch auf ausgefallenes SDS.

Sollte ein weißes Präzipitat sichtbar sein, erwärmen Sie den Puffer für einige Minuten auf 30–40 °C bis das Präzipitat komplett gelöst ist. Lassen Sie den Puffer auf Raumtemperatur (18–25 °C) abkühlen.

Geben Sie **Lysis Buffer LYS** zu der Suspension.

Mischen Sie vorsichtig durch **5-maliges Invertieren** des Gefäßes. **Vortexen Sie nicht**, da dies zur Scherung der genomischen DNA und zu deren Freisetzung aus den Zelltrümmern in die Suspension führen kann.

Inkubieren Sie die Mischung für **5 min** bei Raumtemperatur (18–25 °C).

Warnung: Eine längere Inkubationsdauer kann zu irreversibler Denaturierung und zum Abbau von Plasmid DNA sowie Freisetzung kontaminierender chromosomaler DNA führen.

Hinweis: Erhöhen Sie das Volumen des Puffers LYS proportional, falls mehr als die empfohlene Zellmasse eingesetzt wird (für Informationen zur optimalen Zellyse siehe Kapitel 4.7).

8 mL

12 mL

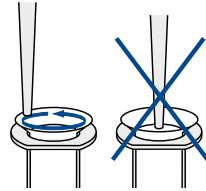
Midi

Maxi

6 Äquilibration (Buffer EQU)

Äquilibrieren Sie eine NucleoBond® Xtra Säule zusammen mit dem eingesetzten NucleoBond® Xtra Filter mit **Equilibration Buffer EQU**.

Geben Sie den Puffer auf den äußeren Rand des Filters wie in der Abbildung rechts gezeigt und stellen Sie sicher, dass der NucleoBond® Xtra Filter komplett benetzt ist.



Lassen Sie die Flüssigkeit vollständig durch die Säule laufen. Die Säulen laufen nicht trocken.

12 mL

25 mL

7 Neutralisation (Buffer NEU)

Geben Sie **Neutralization Buffer NEU** zu der Suspension und mischen Sie sofort aber vorsichtig durch **10- bis 15-maliges Invertieren**. **Vortexen Sie nicht.**



Das für diesen Schritt verwendete Gefäß sollte nicht mehr als zwei Drittel gefüllt sein, um ein gleichmäßiges Durchmischen zu ermöglichen. Stellen Sie sicher, dass die Neutralisation vollständig ist, um eine quantitative Fällung von Protein und genomischer DNA zu gewährleisten. Das schleimige, viskose Lysat sollte nach Zugabe von **Buffer NEU** dünnflüssig werden und eine homogene Suspension mit flockigem, weißem Präzipitat ausbilden.

Fahren Sie sofort mit Schritt 8 fort. **Eine Inkubation des Lysates ist nicht notwendig.**

Hinweis: Erhöhen Sie das Volumen des Puffers NEU proportional, falls mehr als die empfohlene Zellmasse eingesetzt wird (für Informationen zur optimalen Zelllyse siehe Kapitel 4.7).

8 mL

12 mL

Midi

Maxi

8 Klärung des Lysates und Beladung der Säule

- ! Um eine gleichmäßige Suspension des Präzipitates zu erzielen und somit ein Verstopfen des NucleoBond® Xtra Filters zu vermeiden, **invertieren** Sie das Gefäß erneut **3-malig** unmittelbar bevor Sie das Lysat auf den äquilibrierten Filter geben.

Das Lysat wird gleichzeitig geklärt und auf die NucleoBond® Xtra Säule geladen. Füllen Sie den Filter nach, falls mehr Lysat geladen werden soll, als der Filter auf einmal fassen kann. Lassen Sie die Flüssigkeit vollständig durch die Säule laufen.

Alternativ: Das Präzipitat kann alternativ mittels Zentrifugation bei $\geq 5,000 \times g$ für mindestens 10 min entfernt werden, wenn z. B. mehr als das Doppelte der empfohlenen Zellmasse verwendet wurde. Sollte der Überstand noch nicht völlig geklärt sein, überführen Sie ihn in ein neues Gefäß und wiederholen Sie die Zentrifugation, vorzugsweise bei höherer Geschwindigkeit oder geben Sie ihn auf den NucleoBond® Xtra Filter.

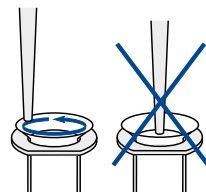
Diese Lysatklärung ist sehr wichtig, da restliches Präzipitat die NucleoBond® Xtra Säule verstopfen könnte. Um die Säule zu beladen, kann das geklärte Lysat entweder auf den äquilibrierten Filter oder nach Entfernung des unbenutzten Filters direkt auf die äquilibrierte Säule geladen werden. Lassen Sie die Flüssigkeit vollständig durch die Säule laufen.

Hinweis: An diesem Punkt der Prozedur kann ein Teil bzw. der gesamte Durchfluss der Säule für analytische Zwecke aufgehoben werden (siehe Kapitel 8.1).

9 Waschen des Filters und der Säule (Buffer EQU)

- ! Waschen Sie den NucleoBond® Xtra Filter und die NucleoBond® Xtra Säule mit **Equilibration Buffer EQU**.

Geben Sie den Puffer auf den äußeren Rand des Säulenfilters wie in der Abbildung rechts gezeigt und stellen Sie sicher, dass das im Filter verbliebene Lysat ausgewaschen wird. Wird dieser Schritt weggelassen oder der Puffer direkt in den Säulenfilter statt auf den Rand gegeben, kann dies zu reduzierter Plasmidausbeute führen.



5 mL

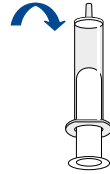
15 mL

Midi

Maxi

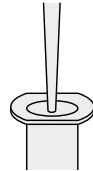
10 Entfernen des Filters

Entnehmen Sie den NucleoBond® Xtra Filter oder entfernen Sie ihn durch einfaches Umdrehen der Säule.



11 Waschen der Säule (Buffer WASH)

- ! Waschen Sie die NucleoBond® Xtra Säule mit **Wash Buffer WASH**. Es ist wichtig, den Filter vor Aufgabe des Waschpuffers zu entfernen, da sonst die Reinheit der DNA negativ beeinflusst werden kann.



8 mL

25 mL

12 Elution (Buffer ELU)

Eluieren Sie die Plasmid DNA mit **Elution Buffer ELU**. Sammeln Sie das Eluat in 15 mL bzw. 50 mL Zentrifugationsgefäßen.

Hinweis: Eine Erwärmung des Elution Buffer ELU auf 50 °C vor der Elution kann zu einer Steigerung der Ausbeute von großen Konstrukten wie z. B. BACs führen.

Fahren Sie mit **Schritt 13** fort, um die Isopropanol-Fällung gemäß Zentrifugationsprotokoll durchzuführen oder folgen Sie der Anleitung in **Kapitel 7.3** zur Konzentrierung und Entsalzung mittels NucleoBond® Finalizer (NucleoBond® Xtra Midi Plus) oder NucleoBond® Finalizer Large (NucleoBond® Xtra Maxi Plus).

Optional: Bestimmen Sie photometrisch die Plasmidausbeute, um in Schritt 15 die gewünschte DNA-Konzentration einstellen und die endgültige Ausbeute nach der Präzipitation bestimmen zu können.

5 mL

15 mL

Midi

Maxi

13 Präzipitation

Fällen Sie die eluierte Plasmid DNA durch Zugabe von **Isopropanol**, wobei der Alkohol Raumtemperatur haben sollte.

Mischen Sie sofort gründlich durch Vortexen.

Zentrifugieren Sie bei $\geq 5,000 \times g$ für $\geq 15 \text{ min}$ bei \leq **Raumtemperatur**, vorzugsweise bei $15,000 \times g$ für 30 min und 4°C . Dekantieren Sie vorsichtig den Überstand.

3.5 mL

10.5 mL

14 Waschen und Trocknen des DNA Pellets

Waschen Sie das DNA Pellet mit ebenfalls **Raumtemperatur** warmem, **70%igem Ethanol**.

2 mL

5 mL

Zentrifugieren Sie bei $\geq 5,000 \times g$, vorzugsweise $\geq 15,000 \times g$ für 5 min bei **Raumtemperatur** ($18\text{--}25^\circ\text{C}$).

Entfernen Sie das Ethanol vollständig mit Hilfe einer Pipette. Lassen Sie das Pellet bei **Raumtemperatur** ($18\text{--}25^\circ\text{C}$) an der Luft trocknen.

Hinweis: Zu langes Trocknen des Pellets kann das anschließende Lösen der DNA erschweren.

5–10 min

10–15 min

15 Lösen der DNA

Lösen Sie das DNA Pellet in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder in sterilem H_2O . Je nach Art des verwendeten Zentrifugationsgefäßes sollte die DNA unter vorsichtigem Auf- und Abpipettieren oder unter gleichmäßigem Schütteln in einem ausreichenden Volumen Puffer für $10\text{--}60 \text{ min}$ (3D-Schüttler) gelöst werden.

Bestimmen Sie photometrisch die Plasmidausbeute und überprüfen Sie die Plasmidintegrität mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kapitel 4.13).

7.2 Isolierung von low-copy Plasmiden (Midi, Maxi)

Hinweis: Die Verweise innerhalb des Protokolls beziehen sich auf die entsprechenden Kapitel des englischsprachigen Hauptprotokolls.

Die in den NucleoBond® Xtra Kits enthaltenen Lysepuffer-Volumina sind ausreichend für die Isolierung von high-copy Plasmiden. Für die Isolierung von low-copy Plasmiden ist zusätzlicher Puffer notwendig (Bestellinformation siehe Kapitel 8.2).

Midi

Maxi

1 Ansetzen einer Vorkultur

Beimpfen Sie 3–5 mL LB Medium mit einer einzelnen Kolonie einer frisch ausgestrichenen Agarplatte. Stellen Sie sicher, dass sowohl die Platte als auch das Flüssigmedium das nötige Antibiotikum enthält, da bei fehlendem Selektionsdruck die Bakterien ihr Plasmid bei der Zellteilung verlieren können (für weitere Informationen siehe Kapitel 4.3). Schütteln Sie die Vorkultur bei 37 °C und ~ 300 rpm für ~ 8 h.

2 Ansetzen einer Übernachtskultur



Hinweis: Um die hohe Bindekapazität der NucleoBond® Xtra Säulen voll auszunutzen zu können, ist es wichtig, ausreichend Plasmid DNA zu laden. Für die Standard low-copy Prozedur werden gegenüber dem high-copy Protokoll doppelte Kulturvolumina eingesetzt. Trotzdem kann dies u.U. bei einem Plasmidgehalt, der 10–100 mal geringer ist, unzureichend sein. Falls große Mengen an low-copy Plasmiden benötigt werden, sollte das Kulturvolumen nochmals um Faktor 3–5 erhöht werden (für weitere Informationen siehe Kapitel 4.6) und in Schritt 3 entschieden werden, wie viele Zellen für die Präparation eingesetzt werden. Die unten aufgeführten Volumina der Übernachtskultur sind für eine finale OD₆₀₀ von 4 berechnet (siehe auch Kapitel 4.6).

Beimpfen Sie LB Medium des unten angegebenen Volumens durch Verdünnen der Vorkultur um den Faktor 1/1000. Stellen Sie sicher, dass das Medium das nötige Antibiotikum enthält. Inkubieren Sie auf einem Schüttler bei 37 °C und ~300 rpm für ~12–16 h.

200 mL

600 mL

3 Ernte der Bakterienzellen

Messen Sie die OD₆₀₀ der Bakterienkultur und bestimmen Sie das empfohlene **Kulturvolumen** gemäß folgender Formel

$$V \text{ [mL]} = \frac{800}{OD_{600}}$$

$$V \text{ [mL]} = \frac{2400}{OD_{600}}$$

Pelletieren Sie die Zellen durch Zentrifugation bei **4,500–6,000 x g** für **≥ 10 min** bei **4 °C** und entfernen Sie den Überstand vollständig.

Midi

Maxi

Hinweis: Es können auch größere Kulturvolumina verwendet werden, z. B. falls große Mengen low-copy Plasmid benötigt werden (für weitere Informationen siehe auch Kapitel 4.6). In diesem Fall erhöhen Sie die Volumina der Puffer RES, LYS und NEU proportional in den Schritten 4, 5 und 7. *Eventuell müssen zusätzliche Volumina der Lysispuffer bestellt werden (s. Bestellinformation für das NucleoBond® Xtra Buffer Set I).* Verwenden Sie in Schritt 8 zur Lysatklärung eine Zentrifuge anstelle des NucleoBond® Xtra Filters.

4 Resuspension (Buffer RES)

Resuspendieren Sie das Zellpellet vollständig in **Resuspension Buffer RES + RNase A** durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen der Zellen.

Wichtig für eine effiziente Zellyse ist, dass keine Zellklumpen in der Suspension verbleiben.

Hinweis: Erhöhen Sie das Volumen des Puffers RES proportional falls mehr als die empfohlene Zellmasse eingesetzt wird (für Informationen zur optimalen Zellyse siehe Kapitel 4.7, für schwer zu lysierende Bakterienstämme siehe Kapitel 4.8).

16 mL

24 mL

5 Zellyse (Buffer LYS)

- !** **Überprüfen Sie Lysis Buffer LYS vor Gebrauch auf ausgefallenes SDS.** Sollte ein weißes Präzipitat sichtbar sein, erwärmen Sie den Puffer für einige Minuten auf 30–40 °C bis das Präzipitat komplett gelöst ist. Lassen Sie den Puffer auf Raumtemperatur (18–25 °C) abkühlen.

Geben Sie **Lysis Buffer LYS** zu der Suspension.

Hinweis: Erhöhen Sie das Volumen des Puffers LYS proportional falls, mehr als die empfohlene Zellmasse eingesetzt wird (für Informationen zur optimalen Zellyse siehe Kapitel 4.7).

16 mL

24 mL

Mischen Sie vorsichtig durch **5-maliges Invertieren des Gefäßes**. **Vortexen Sie nicht**, da dies zur Scherung der genomischen DNA und zu deren Freisetzung aus den Zelltrümmern in die Suspension führen kann.

Inkubieren Sie die Mischung für **5 min** bei Raumtemperatur (18–25 °C).

Warnung: Eine längere Inkubationsdauer kann zu irreversibler Denaturierung und zum Abbau von Plasmid DNA sowie Freisetzung kontaminierender chromosomaler DNA führen.

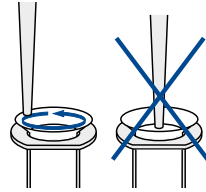
Midi

Maxi

6 Äquilibration (Buffer EQU)

Äquilibrieren Sie eine NucleoBond® Xtra Säule zusammen mit dem eingesetzten NucleoBond® Xtra Filter mit **Equilibration Buffer EQU**.

Geben Sie den Puffer auf den äußeren Rand des Filters wie in der Abbildung rechts gezeigt und stellen Sie sicher, dass der NucleoBond® Xtra Filter komplett benetzt ist.



Lassen Sie die Flüssigkeit vollständig durch die Säule laufen. Die Säulen laufen nicht trocken.

12 mL

25 mL

7 Neutralisation (Buffer NEU)

Geben Sie **Neutralization Buffer NEU** zu der Suspension und mischen Sie sofort aber vorsichtig durch **10- bis 15-maliges Invertieren**. **Vortexen Sie nicht**.



Das für diesen Schritt verwendete Gefäß sollte nicht mehr als zwei Drittel gefüllt sein, um ein gleichmäßiges Durchmischen zu ermöglichen. Stellen Sie sicher, dass die Neutralisation vollständig ist, um eine quantitative Fällung von Protein und genomischer DNA zu gewährleisten. Das schleimige, viskose Lysat sollte nach Zugabe von **Buffer NEU** dünnflüssig werden und eine homogene Suspension mit flockigem, weißem Präzipitat ausbilden.

Fahren Sie sofort mit Kapitel 7.4, Schritt 8 des high-copy Plasmid Protokolls fort. **Eine Inkubation des Lysates ist nicht notwendig**.

Hinweis: Erhöhen Sie das Volumen des Puffers NEU proportional falls, mehr als die empfohlene Zellmasse eingesetzt wird (für Informationen zur optimalen Zellyse siehe Kapitel 4.7).

16 mL

24 mL

7.3 Konzentrierung der NucleoBond® Xtra Eluate mittels NucleoBond® Finalizer

Hinweis: Die Verweise innerhalb des Protokolls beziehen sich auf die entsprechenden Kapitel des englischsprachigen Hauptprotokolls.

Die Verwendung des **NucleoBond® Finalizers** ist nur für Vektoren < 50 kbp empfohlen.

Midi - NucleoBond®
Finalizer

Maxi - NucleoBond®
Finalizer Large

1 Präzipitation

Hinweis: Überprüfen Sie den Plasmidgehalt des Eluates vor der Präzipitation durch photometrische Bestimmung des A_{260} (siehe Kapitel 4.13). Das hilft Ihnen, das optimale Elutionsvolumen für den **NucleoBond® Finalizers** zu wählen und die Wiederfindung zu bestimmen.

Präzipitieren Sie die eluierte Plasmid DNA durch Zugabe von **0.7 Volumen Isopropanol** (nicht im Lieferumfang enthalten), wobei der Alkohol **Raumtemperatur** haben sollte. Mischen Sie sofort gründlich durch Vortexen und lassen Sie die Mischung für **2 Minuten** stehen.

(Geben Sie z. B. **3.5 mL** Isopropanol zu 5 mL NucleoBond® Xtra Midi Eluat oder **10.5 mL** Isopropanol zu 15 mL NucleoBond® Xtra Maxi Eluat)

3.5 mL für 5 mL
Eluat

10.5 mL für 15 mL
Eluat

2 Laden des Präzipitats

Ziehen Sie den Kolben einer **30 mL Spritze** vollständig heraus und befestigen Sie den NucleoBond® Finalizer am Auslass der Spritze.

Füllen Sie das Präzipitationsgemisch in die Spritze, setzen Sie den Kolben ein, halten Sie die Spritze in vertikaler Position und drücken Sie die Suspension **langsam** mit **minimalem Druck** durch den NucleoBond® Finalizer. Verwerfen Sie den Durchfluss.

3 Waschen des Präzipitats

Entfernen Sie den NucleoBond® Finalizer von der Spritze, ziehen Sie den Kolben heraus und befestigen Sie den NucleoBond® Finalizer wieder am Auslass der Spritze.

Midi - NucleoBond®
Finalizer

Maxi - NucleoBond®
Finalizer Large

Füllen Sie **70 %iges Ethanol** (nicht im Lieferumfang enthalten) in die Spritze, setzen Sie den Kolben ein, halten Sie die Spritze in vertikaler Position und drücken Sie das Ethanol **langsam** durch den NucleoBond® Finalizer. Verwerfen Sie das Ethanol.

2 mL

5 mL

4 Trocknen der Filtermembran

Entfernen Sie den NucleoBond® Finalizer von der Spritze, ziehen Sie den Kolben heraus und befestigen Sie den NucleoBond® Finalizer wieder am Auslass der Spritze. Drücken Sie **so kräftig wie möglich** Luft durch den NucleoBond® Finalizer und nehmen das an der Spitze austretende Ethanol mit einem Tuch auf. Wiederholen Sie diesen Schritt mindestens so oft wie unten aufgeführt bis **kein Ethanol** mehr aus dem NucleoBond® Finalizer austritt.

Hinweis: Zur Beschleunigung der Prozedur kann eine neue trockene Spritze verwendet werden (nicht im Lieferumfang enthalten).

≥ 3 mal bis
zur Trocknung

≥ 6 mal bis
zur Trocknung

Optional: Um die Ethanol-Verschleppung ins Eluat zu minimieren, inkubieren Sie den NucleoBond® Finalizer für 10 Minuten bei 80°C. Zu intensives Trocknen der DNA kann allerdings zu einer reduzierten Wiederfindung führen.

5 Elution der DNA

Entfernen Sie den NucleoBond® Finalizer von der 30 mL Spritze, ziehen Sie den Kolben einer **1 mL Spritze** heraus und befestigen den NucleoBond® Finalizer am Auslass der Spritze.

Hinweis: Zur Wahl des geeigneten Elutionspuffer-Volumens siehe Kapitel 4.12, Tabelle 4 (Midi) oder 5 (Maxi).

Pipettieren Sie **Redissolving Buffer TRIS** (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) oder TE Puffer in die Spritze (siehe auch Kapitel 4.12). Benutzen Sie nicht reines Wasser, wenn der pH nicht eindeutig höher als 7,0 ist. Platzieren Sie den Auslass des NucleoBond® Finalizers in vertikaler Ausrichtung über einem frischen Auffanggefäß und **eluieren Sie die Plasmid DNA langsam und tropfenweise**.

200–800 µL

400–1000 µL

Midi - NucleoBond®
Finalizer

Maxi - NucleoBond®
Finalizer Large

Entfernen Sie den NucleoBond® Finalizer von der Spritze, ziehen Sie den Kolben heraus und befestigen den NucleoBond® Finalizer wieder am Auslass der Spritze.



Überführen Sie das erste Eluat zurück in die Spritze und eluieren ein zweites Mal in dasselbe Auffanggefäß.

erstes Eluat
vollständig laden

erstes Eluat
vollständig laden

Entfernen Sie den NucleoBond® Finalizer von der Spritze, ziehen Sie den Kolben heraus, um Luft einzuführen. Befestigen Sie den NucleoBond® Finalizer wieder am Auslass und drücken Sie die Luft **so kräftig wie möglich** heraus, um das maximale Volumen zu eluieren.

Bestimmen Sie photometrisch die Plasmidausbeute und überprüfen Sie die Plasmidintegrität mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kapitel 4.12).
