

# PureYield™ Plasmid Midiprep System

ANLEITUNG FÜR DIE BENUTZUNG VON A2490, A2492 UND A2495.

**KURZ**  
PROTOKOLL

- Alle Schritte bei **Raumtemperatur**. **ACHTUNG: keine gekühlte Zentrifuge verwenden.**
- Entsprechende Mengen **Isopropanol** (Endotoxin Removal Wash) und **Ethanol** (Column Wash) vor der ersten Verwendung zu den Puffern geben.
- Puffer vor dem Verwenden auf **Raumtemperatur bringen und gut schütteln.**

## 1. Ernte

Kultur zentrifugieren (10 min, 5000 g), Überstand verwerfen

## 2. Lyse und Fällung

Kulturvolumen (ml) einer Standard-Übernachtskultur	<50	50-100	≥100-250
2.1 Zellpellet in <b>Cell Resuspension Solution</b> vollständig resuspendieren	2 ml	3 ml	6 ml
2.2 <b>Cell Lysis Solution</b> zugeben und gründlich mischen (nicht schütteln!)	2 ml	3 ml	6 ml
2.3 Bei Raumtemperatur inkubieren	3 min	3 min	3 min
2.4 <b>Neutralization Solution</b> zugeben und gründlich mischen (nicht schütteln!)	3,3 ml	5 ml	10 ml
2.5 Bei Raumtemperatur inkubieren	3 min	3 min	3 min
2.6 zentrifugieren, 15000 g, 10 min	nein	ja	ja

## 3. DNA Aufreinigung mit Vakuum

- 3.1 **Blaue Säule** (Clearing Column) auf **weiße Säule** (Binding Column) stecken. Säulenkombination auf die Vakuum-Station stecken.
- 3.2 Lysat in die blaue Clearing Column geben.  
**WICHTIG:** Bei **unzentrifugiertem** Lysat nach vorsichtigem Einkippen, 2-3 Min. in der Säule ruhen lassen, damit die Zellrümmen nach oben aufsteigen.
- 3.3 Vakuum anlegen, Lysat vollständig durch die Säulenkombination saugen. Vakuum abschalten. Blaue Säule abziehen und verwerfen.
- 3.4 Vakuum anlegen.  
**5 ml Endotoxin Removal Wash** durch die Binding Column saugen.  
**20 ml Column Wash Solution** durch die Binding Column saugen.  
Vakuum für **weitere ca. 30-60 Sek.** angelegt lassen, dann abschalten.
- 3.5 Binding Column von der Vakuum Station abnehmen, Spitze auf ein Papiertuch tippen, (Ethanolreste entfernen) und in ein neues 50 ml Falcon®-Tube stecken.
- 3.6 **600 µl Nuclease-Free Water** auf die Binding Column pipettieren, 5 min warten. 5min bei 2000 g zentrifugieren (**Swing-out Rotor**).
- 3.7 Zusätzlicher Elutionsschritt (optional): **400 µl Nuclease-Free Water** zum Eluat geben und damit Schritt 3.6 wiederholen.

**BESTELLUNGEN ODER WEITERE BERATUNG:**

www.promega.com • Tel: 00800-77663428



**Promega**

Revised 2/05  
Part# 9FB077D

© 2004, 2005 Promega Corporation. All Rights Reserved.

## 3. DNA Aufreinigung mit Zentrifugation

- Alle Schritte bei **Raumtemperatur**
  - **Unbedingt Zentrifuge mit Swing-out Rotor verwenden**
- 3.1 Blaue Säule** (Clearing Column) in 50 ml Falcon®-Tube stecken. Überstand auf die Säule geben. **5 min bei 2000 g** zentrifugieren.
  - 3.2 Weiße Säule** (Binding Column) in 50 ml Falcon®-Tube stecken. Filtriertes Lysat auf die Binding Column geben. Blaue Säule verwerfen **3 min bei 1500 g** zentrifugieren.
  - 3.3 5 ml Endotoxin Removal Wash** auf die Binding Column geben. **3 min bei 1500 g** zentrifugieren. Falcon®-Tube leeren.
  - 3.4 20 ml Column Wash Solution** auf die Säule geben. **5 min bei 1500 g** zentrifugieren.
  - 3.5 Spitze des Binding Column** auf ein Papiertuch tippen, um Ethanolreste zu entfernen und in ein neues 50 ml Falcon®-Tube stecken.
  - 3.6 600 µl Nuclease-Free Water** auf das Binding Column pipettieren, 5min warten. 5 min bei 2000 g zentrifugieren.
  - 3.7 Zusätzlicher Elutionsschritt (optional): 400 µl Nuclease-Free Water** zum Eluat geben und damit Schritt 3.6 wiederholen.