

Plasmid Miniprep 2.0

Набор для выделения плазмидной ДНК

Номера по каталогу:

BC221S — на 50 реакций

BC221L — на 250 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Преимущества	4
3. Состав	4
4. Условия хранения и транспортировки	4
5. Метод	5
6. Основные характеристики	5
7. Меры предосторожности.....	5
8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы.....	6
9. Биологический материал	6
10. Протокол.....	6
11. Возможные проблемы и способы их решения	12

1. Назначение

Набор предназначен для быстрого выделения плазмидной ДНК высокой степени очистки из культуры клеток *E. coli*.

Выделенная ДНК пригодна для ПЦР, секвенирования, рестрикции, трансформации, трансфекции и других молекулярно-биологических приложений.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Преимущества

- Выделение до 20 мкг плазмидной ДНК из 2 мл бактериальной культуры.
- Выделенная ДНК не имеет примесей низкомолекулярных органических соединений и белков.
- ДНК не контаминирована молекулами РНК (за счет присутствия РНКазы А в растворе).
- В состав набора входят колонки без крышки и собирательные пробирки с крышкой, что позволяет уменьшить уровень загрязнения рабочего пространства и снизить вероятность кросс-контаминации образцов.

3. Состав

Компоненты набора	BC221S 50 реакций	BC221L 250 реакций
Спин-колонки SB в комплекте с собирательными пробирками с крышками	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
РНКазы А (лиофилизированная)	1.5 мг	7.5 мг
Ресуспенсирующий раствор	14 мл	70 мл
Лизирующий раствор	14 мл	70 мл
Нейтрализующий раствор	19 мл	95 мл
Промывочный раствор (концентрат)	20 мл	100 мл (2 x 50 мл)
Элюирующий раствор	3 мл (2 x 1.5 мл)	15 мл
Раствор для удаления эндотоксинов	11 мл	55 мл
Ацетат натрия, 3М (pH 5.2)	600 мкл	3 мл (2 x 1.5 мл)

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте в упаковке производителя.

Приготовленную смесь «Ресуспенсирующего раствора» и «РНКазы А» хранить при +4 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Метод

На стадии лизиса в щелочных условиях происходит разрушение клеточных стенок бактерий, денатурация белков и геномной ДНК. Добавление «Нейтрализующего раствора» приводит к образованию творожистой взвеси белого цвета, состоящей из белков и геномной ДНК, в то время как короткая плазмидная ДНК остается в растворе. В присутствии хаотропных солей плазмидная ДНК сорбируется на мембране колонки, тогда как примеси различной природы удаляются в процессе промывки. На последней стадии происходит элюция очищенной плазмидной ДНК с мембраны.

6. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Выход ДНК	Выход высококопийной плазмиды pAtlas из 2 мл ночной культуры – до 20 мкг*
Объем выделенного образца	50 мкл
Емкость колонок	До 20 мкг
Чистота ДНК	$A260/A280 \geq 1.8$

* Выход плазмидной ДНК зависит от количества копий плазмиды, условий культивирования и выбранного штамма *E. coli*.

7. Меры предосторожности

Компоненты набора «Лизирующий раствор» и «Нейтрализующий раствор» содержат вещества, требующие обеспечения специальных мер безопасности:

- Хранить в плотно закрытой таре.
- Не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу.
- При попадании компонентов набора на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды.
- При работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением до 11 000 g.
- Термостат.
- Вортекс.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и 2 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Этанол 96%.

9. Биологический материал

2 мл ночной культуры клеток *E. coli*.

10. ПРОТОКОЛ

Общее время работы: от 20 минут.

10.1. Подготовка растворов

1.1. Добавьте этиловый спирт (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором» в количестве:

BC221S — 90 мл,

BC221L — 220 мл.

Тщательно перемешайте раствор переворачиванием, нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

- ▶ При редком использовании набора не рекомендуется добавлять этанол в весь объем концентрата «Промывочного раствора». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (130 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (585 мкл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.
- ▶ Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора», например, делайте отметки на флаконе и в конце инструкции на странице «Для заметок». Если вам понадобится добавить этанол ко всему оставшемуся объему концентрата «Промывочного раствора», то необходимое количество этанола следует рассчитать по формуле:

$$VE = (VW_{исх} - VW_{расх}) \times \frac{VE_{исх}}{VW_{исх}} \text{ (мл)},$$

где VE — объем этанола, который нужно добавить, $VW_{исх}$ — объем концентрата «Промывочного раствора», указанный на этикетке, $VW_{расх}$ — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора», $VE_{исх}$ — объем этанола по инструкции, см. п.1.1.

1.2. Растворите «РНКазу А» в «Ресуспенсирующем растворе». Для этого добавьте 0.5 мл «Ресуспенсирующего раствора» в пробирку с лиофилизированной «РНКазой А». После растворения перенесите полученный раствор «РНказы А» во флакон с «Ресуспенсирующим раствором». Плотнo закройте крышку флакона и перемешайте. Нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

► *Приготовленную смесь «Ресуспенсирующего раствора» и «РНказы А» хранить при +4 °С.*

1.3. Если в «Нейтрализующем растворе» образовался осадок, прогрейте его при температуре от +37 до +50 °С до полного растворения осадка.

1.4. Для переосаждения плазмидной ДНК подготовьте 70% этанол. В пробирку на 50 мл (типа Falcon) добавьте 13.5 мл деионизированной воды и доведите объем до 50 мл 96%-ным этанолом.

10.2. Выделение ДНК

2.1. Подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 2 мл по числу образцов.

2.2. Перенесите 2 мл бактериальной культуры в промаркированную пробирку.

2.3. Осадите клетки центрифугированием (не более 1 700 g) в течение 1 минуты. Полностью удалите супернатант.

2.4. Добавьте 250 мкл Ресуспенсирующего раствора с РНКазой А к осадку и тщательно перемешайте на вортексе до образования мутной суспензии.

2.5. Добавьте 250 мкл «Лизирующего раствора». Содержимое пробирки осторожно перемешайте переворачиванием, пока лизат не станет прозрачным. Инкубируйте при комнатной температуре не более 1 минуты.

ВНИМАНИЕ! Не используйте вортекс: быстрое перемешивание приводит к разрыву бактериальной хромосомы и загрязнению плазмиды геномной ДНК.

ВНИМАНИЕ! Увеличение времени инкубации в лизирующем растворе приводит к контаминации плазмиды геномной ДНК.

2.6. Добавьте 350 мкл «Нейтрализующего раствора». Осторожно перемешайте переворачиванием содержимое пробирки до образования творожистой взвеси. Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту.

► *Не используйте вортекс.*

2.7. Центрифугируйте пробирку в течение 10 минут с ускорением 11 000 g.

ВНИМАНИЕ! Это и последующие центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

2.8. Подготовьте и промаркируйте колонки с собирательными пробирками по числу образцов.

2.9. Перенесите осветленный супернатант в колонку и центрифугируйте в течение 30 секунд или, если плазмиду планируется использовать для трансфекции культур эукариотических клеток, следуйте протоколу:

- Нанесите 20 мкл «Раствора для удаления эндотоксинов» на фильтр колонки.
- Перенесите осветленный супернатант в колонку.
- Центрифугируйте колонку в течение 30 с.
- Удалите фильтрат из собирательной пробирки.
- Нанесите 200 мкл «Раствора для удаления эндотоксинов» на фильтр колонки.
- Центрифугируйте колонку в течение 30 с.

2.10. Удалите фильтрат из собирательной пробирки. Колонку верните в собирательную пробирку.

2.11. Добавьте 700 мкл разбавленного «Промывочного раствора» в колонку. Центрифугируйте в течение 30 с.

2.12. Удалите фильтрат из собирательной пробирки. Колонку верните в собирательную пробирку.

2.13. Повторите п. 2.11 и п. 2.12.

2.14. Центрифугируйте пустую колонку 1 минуту для полного удаления «Промывочного раствора».

2.15. Подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 1.5 мл по числу образцов.

2.16. Собирательную пробирку утилизируйте. Поместите колонку в новую промаркированную пробирку.

2.17. Оставьте колонку в пробирке с открытой крышкой при комнатной температуре на 5 минут для полного испарения остатка спирта.

2.18. Нанесите в центр мембраны 50 мкл «Элюирующего раствора».

► Для повышения выхода ДНК можно увеличить объем элюции до 100 мкл.

► Для получения высоконцентрированного образца ДНК следует наоборот уменьшить объем элюции до 30 мкл.

2.19. Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту. Центрифугируйте в течение 1 минуты. Элюат содержит очищенную ДНК.

Выделенную ДНК хранить при -20°C до 1 года.

► Рекомендуется переосадить выделенную плазмидную ДНК, если ее планируется использовать для трансфекции культур клеток.

10.3. Переосаждение плазмидной ДНК этанолом

ВНИМАНИЕ! Все центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

3.1. Отберите аликвоту выделенной плазмидной ДНК в необходимом объеме в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.

3.2. Добавьте 0.1 объем (от объема аликвоты) 3М ацетата натрия и 3 объема 96% этанола. Перемешайте переворачиванием и на вортексе. Инкубируйте 2–3 минуты при комнатной температуре.

3.3. Центрифугируйте пробирку 10 минут. Запомните положение пробирки в роторе, например, перемычкой к центру (можно отметить верхнее положение маркером на крышке). При центрифугировании на дне пробирки формируется осадок ДНК.

3.4. Аккуратно откройте пробирки и удалите надосадочную жидкость. Полупрозрачный белый осадок на дне пробирки может быть незаметен.

3.5. Аккуратно по стенке пробирки добавьте 0.5 мл 70% этанола.

3.6. Поместите пробирку в ротор в том же положении, что в п. 3.3. Центрифугируйте образец в настольной центрифуге 10 минут.

ВНИМАНИЕ! Важно сохранять одинаковое положение пробирки при обоих центрифугированиях, потому что при изменении позиции пробирки при втором центрифугировании осадок может оторваться от дна пробирки и потеряться при удалении жидкости.

3.7. Аккуратно удалите надосадочную жидкость и подсушите осадок при комнатной температуре 5–10 минут. Осадок должен стать полностью прозрачным (бесцветным).

3.8. Полностью растворите осадок в необходимом объеме «Деионизированной воды».

ВНИМАНИЕ! Осадок растворяется не сразу. Подождите 3–5 минут до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

Очищенная ДНК хранится при температуре –20 °С до 1 года.

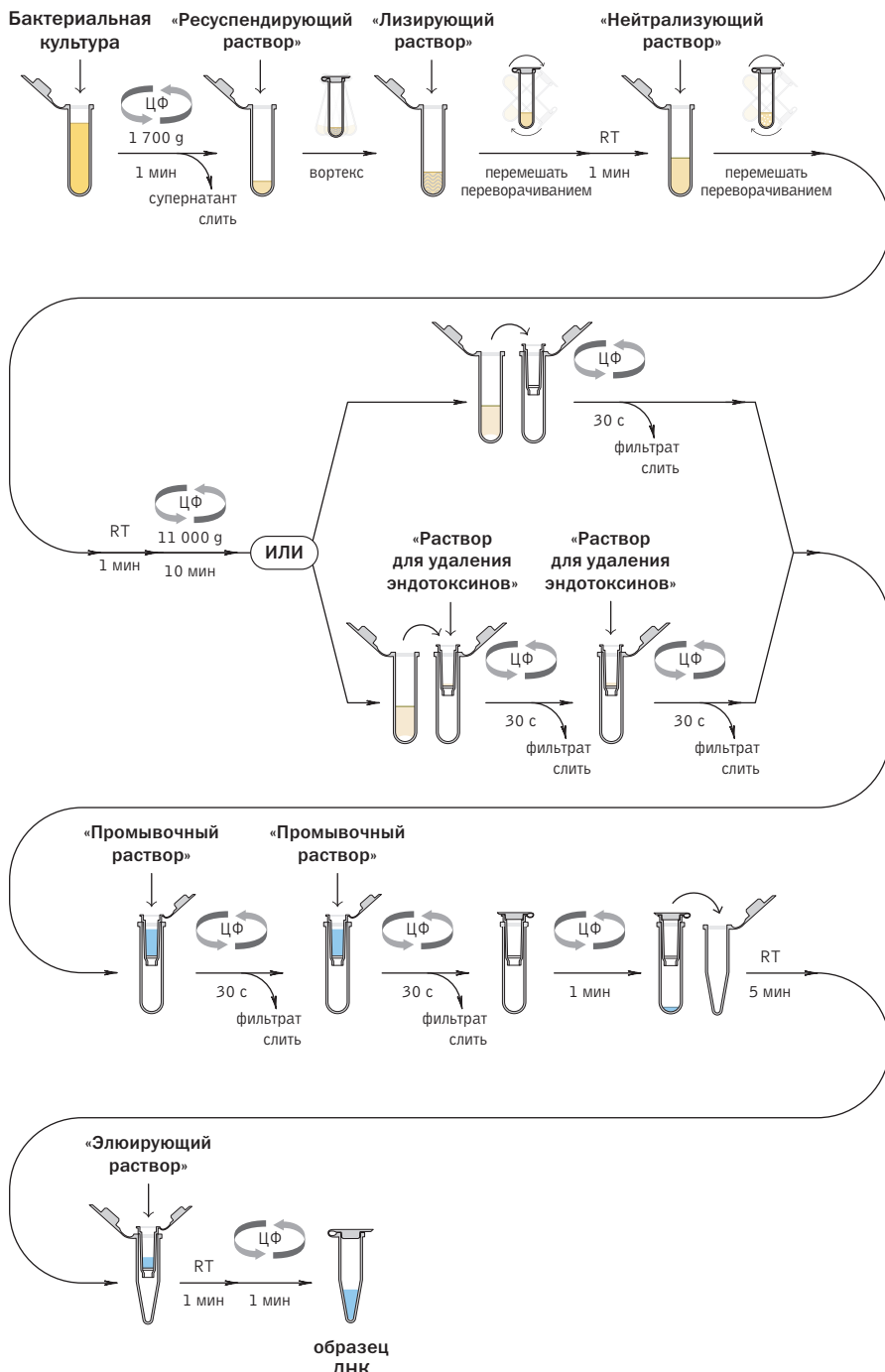


Рисунок 1 – схема выделения ДНК

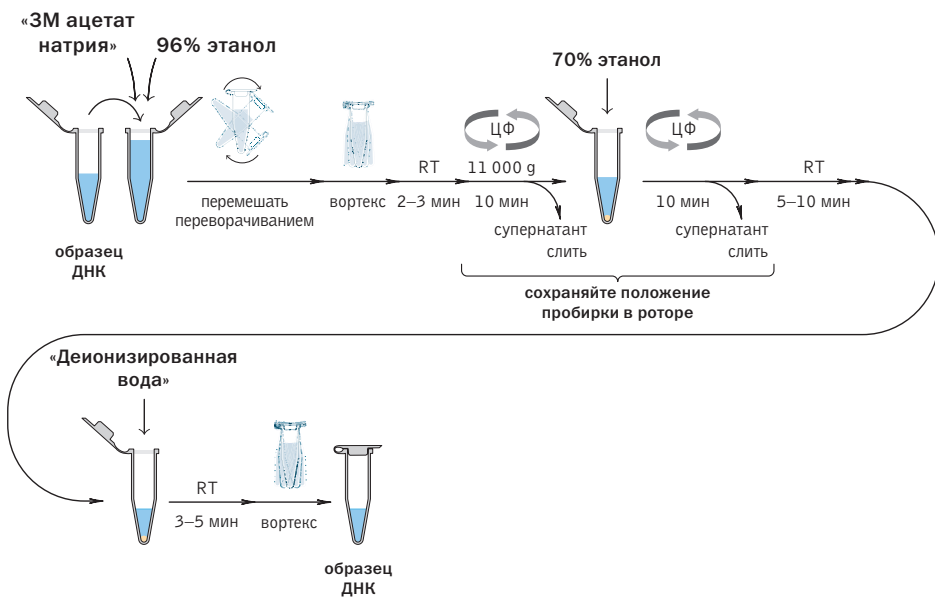


Рисунок 2 – схема переосаждения плазмидной ДНК этанолом.

11. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
1. При хранении в «Лизирующем» или «Нейтрализующем» растворах выпал осадок.	При охлаждении ниже 15 °С возможно выпадение в осадок SDS или солей гуанидина.	Прогрейте банки с растворами на водяной бане или в термостате при 37 °С до полного растворения осадка. Если осадок не удалось полностью растворить, при отборе растворов постарайтесь его не захватывать. Небольшой нерастворившийся осадок не влияет на функциональность реактивов.
2. При хранении в «Ресуспенсирующем растворе» появилась взвесь или осадок.	Возможен зарост раствора грибами или бактериями, споры которых присутствуют в воздухе.	Заменить набор.
3. На стадии лизиса в растворе присутствуют комочки биомассы.	На стадии ресуспендирования биомасса была недостаточно хорошо гомогенизирована.	Комочки перейдут в осадок на этапе осветления лизата, но выход плазмидной ДНК уменьшится. Тщательно гомогенизируйте биомассу во время ресуспендирования.
4. После осветления лизата не удается перенести его в колонку без флотирующей фракции.	Поверхностная пленка разделилась на мелкие фрагменты, которые трудно оставить на стенках пробирки.	Перенесите осветленный лизат, насколько возможно, без фрагментов осадка в чистую пробирку и повторно центрифугируйте пробирку 10 минут при максимальных оборотах. После центрифугирования перенесите осветленный лизат в колонку пипеткой. Незначительные остатки осадка, попавшие на колонку, не мешают выделению плазмиды.
5. Осадок ДНК после пересадки плохо растворяется.	Осадок пересушен.	Оставьте пробирку с осадком в термостате при 37 °С на 2–3 часа. После этого тщательно ресуспенсируйте осадок пипеткой.
6. Препарат плазмидной ДНК содержит примеси бактериальной геномной ДНК.	Количество биомассы, взятое в работу, превышает рекомендованное по протоколу. Время инкубации в лизирующем растворе превысило рекомендованное. Использование вортеса после добавления лизирующего раствора.	Проверьте правильность выполнения протокола.
7. Соотношение 260/280 меньше 1.8.	Количество биомассы, взятое в работу, превышает рекомендованное по протоколу.	Не используйте более 2 мл бактериальной культуры.

Наборы и сервисы Евроген

    – ссылка на страницу
НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот   

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ  

Синтез и амплификация кДНК   

Клонирование ДНК      

Выявление контаминации микоплазмой   

Оценка ДНК   

Нормализация кДНК   

Практикум по генной инженерии   

Генотипирование   

Синтез олигонуклеотидов и зондов   

Секвенирование по Сэнгеру   

Синтез генов   

Сайт-направленный мутагенез   

Консультация по продуктам: *support@evrogen.ru*

**Подробную информацию о наших наборах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru**

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru