

Plasmid Midiprep 3.0

Набор для выделения плазмидной ДНК

Номер по каталогу:
BC224 — на 20 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Преимущества	4
3. Состав	4
4. Условия хранения и транспортировки	4
5. Количество реакций	5
6. Метод	5
7. Основные характеристики	5
8. Меры предосторожности	5
9. Необходимое оборудование и дополнительные материалы.....	6
10. Биологический материал.....	6
11. Протокол.....	6
12. Возможные проблемы и способы их решения	14

1. Назначение

Набор предназначен для 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 плазмидной ДНК из суспензии бактериальных клеток объемом до 100 мл.
- Выделенная ДНК не имеет примесей низкомолекулярных органических соединений и белков.
- ДНК не контаминируется молекулами РНК (за счет отсутствия РНКазы А в растворе).
- В состав набора входят колонки и собирательные пробирки с крышкой, что позволяет уменьшить уровень загрязнения рабочего пространства и снизить вероятность кросс-контаминации образцов.

3. Состав

Компоненты набора	Количество
Спин-колонки МВ в комплекте с собирательными пробирками	20 шт.
Собирательные пробирки МВ	20 шт.
РНКазы А (лиофилизированная)	26 мг
Ресуспендирующий раствор	200 мл
Лизирующий раствор	200 мл
Нейтрализующий раствор	200 мл
Раствор для удаления эндотоксинов	55 мл
Промывочный раствор (концентрат)	174 мл (3 x 58 мл)
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	100 мл
Ацетат натрия, 3М (рН 5.2)	6 мл

4. Условия хранения и транспортировки

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

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

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

5. Количество реакций

Набор рассчитан на 20 реакций.

6. 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, а примеси различной природы удаляются в процессе промывки. На последней стадии происходит элюция очищенной плазмидной ДНК с мембраны.

7. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Выход ДНК*	
Выход высококопийной плазмиды pAtlas из 25 мл ночной культуры	181 ± 0.32 мкг
Выход высококопийной плазмиды pAtlas из 50 мл ночной культуры	360 ± 60 мкг
Выход низкокопийной плазмиды pET21 из 50 мл ночной культуры	69 ± 0.13 мкг
Выход низкокопийной плазмиды pET21 из 100 мл ночной культуры	108 ± 18 мкг
Объем выделенного образца	2 мл
Емкость колонки	До 500 мкг
Чистота ДНК	A260/A280 ≥ 1.8 A260/A230 ≥ 1.8

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

8. 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.

9. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат.
- Центрифуга с возможностью ускорения 3 500–3 900 g, охлаждением и ротором для фальконов объемом 50 мл.
- Центрифуга с возможностью ускорения 11 000 g.
- Вортекс.
- Автоматические дозаторы объемом на 1 и 5 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Фальконы объемом 50 мл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 и 2 мл.
- Этанол 96%.

10. Биологический материал

Ночная культура клеток *E.coli* объемом от 25 до 100 мл. Рекомендуемая плотность суспензии: 3–5 x 10⁹ клеток/мл.

11. Протокол

Общее время работы: 2.5 часа.

ВНИМАНИЕ! Все центрифугирования проводятся при 3 500–3 900 g, если не указано иное.

Перед началом работы включите охлаждение в центрифуге до +4 °С.

11.1. Подготовка растворов

1.1. Добавьте 210 мл этанола (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором». Плотнo закройте крышку флакона и перемешайте. Нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

- ▶ *Рекомендуется добавлять этанол в следующий флакон «Промывочного раствора» только после расходования разведенного.*
- ▶ *При редком использовании набора не рекомендуется добавлять этанол в весь объем концентрата промывочного раствора. Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (6.5 мл на 1 образец) и добавьте в него этанол (23.5 мл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор перемешиванием.*

- *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:*

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

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 в пробирку с лиофилизированной «РНКазой А» 0.5 мл «Ресуспенсирующего раствора». После растворения перенесите полученный раствор «РНКазы А» во флакон с «Ресуспенсирующим раствором». Плотно 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. Для переосаждения плазмидной ДНК подготовьте 70% этанол. В пробирку на 50 мл добавьте 13.5 мл деионизированной воды и доведите объем до 50 мл 96%-ным этанолом.

1.4. Если в «Лизирующем» или «Нейтрализующем растворе» есть осадок, прогрейте раствор на водяной бане или в термостате при +37 °С.

1.5. Для улучшения элюции нагрейте флакон с «Деионизированной водой» при +50 °С.

11.2. Подготовка биоматериала

2.1. Перенесите 25–50 мл бактериальной культуры в фалькон объемом 50 мл, осадите клетки центрифугированием 15 минут при +4 °С. Полностью удалите супернатант.

Если выделение проводится из объема среды более 50 мл, повторите процедуру в том же фальконе.

Опция: На этом этапе можно сделать паузу и заморозить осадок. Продолжить работу следует с размораживания клеточного осадка и перехода к п. 11.3.

11.3. Проведение протокола

► При выделении плазмидной ДНК из суспензии клеток объемом более 50 мл увеличьте объемы «Ресуспендирующего раствора», «Лизирующего раствора», «Нейтрализующего раствора» в 2 раза.

3.1. Добавьте 5 мл Ресуспендирующего раствора с РНКазой А к осадку. Несколько раз интенсивно встряхните фалькон рукой так, чтобы осадок отделился от стенок и дна пробирки. Ресуспендируйте на вортексе. Суспензия должна стать гомогенной.

► *Нересуспендированные комки клеток приводят к ухудшению лизиса.*

3.2. Добавьте 5 мл «Лизирующего раствора». Осторожно перемешайте содержимое 4–6-кратным переворачиванием. Лизат должен стать вязким и полупрозрачным. Инкубируйте при комнатной температуре 2 минуты (при большом количестве образцов допускается увеличение времени инкубации до 5 минут).

ВНИМАНИЕ! Не используйте вортекс для перемешивания. Резкое встряхивание лизата приводит к вспениванию раствора, разрывам бактериальной хромосомы и загрязнению препарата плазмиды геномной ДНК.

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

3.3. Добавьте 5 мл «Нейтрализующего раствора». Перемешайте содержимое, переворачивая фалькон до образования равномерной творожистой взвеси.

3.4. Центрифугируйте пробирку 45 минут для осветления лизата при +4 °С. После осветления на дне фалькона формируется осадок, а на поверхности надосадочной жидкости образуется флотирующая фракция в виде тонкой пленки.

3.5. После осветления лизата переключите температуру в центрифуге на +25 °С.

3.6. Подготовьте колонки в комплекте с собирательными пробирками по числу образцов: промаркируйте и поместите в штатив.

3.7. Перенесите осветленный бактериальный лизат в колонку и центрифугируйте в течение 3 минут при 1 000 g при комнатной температуре или, если плазмиду планируется использовать для трансфекции культур эукариотических клеток, следуйте протоколу:

- Нанесите 1 мл «Раствора для удаления эндотоксинов» на фильтр колонки.
- Перенесите осветленный бактериальный лизат в колонку.
- Центрифугируйте колонку в течение 3 минут при 1 000 g при комнатной температуре.
- Удалите фильтрат из собирательной пробирки.
- Нанесите 1 мл «Раствора для удаления эндотоксинов» на фильтр колонки.
- Центрифугируйте колонку в течение 1 минуты при 1 000 g при комнатной температуре.

► *В колонку помещается 15 мл лизата. Повторите пункт, если у вас больше 15 мл лизата.*

ВНИМАНИЕ! Аккуратно отодвиньте поверхностную пленку наконечником, стараясь не разбивать ее на мелкие фрагменты, и перенесите осветленный бактериальный лизат в колонку пипеткой, не захватывая флотирующую фракцию. Если не удастся избежать захвата пипеткой мелких флотирующих фрагментов, повторите центрифугирование (см. раздел «Возможные проблемы и способы их решения»).

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

3.9. Добавьте 15 мл разбавленного «Промывочного раствора» в колонку. Центрифугируйте пробирку с колонкой 1 минуту при комнатной температуре.

3.10. Удалите фильтрат из пробирки.

3.11. Повторите п. 3.9 и п. 3.10.

3.12. Центрифугируйте пробирку с колонкой 5 минут при комнатной температуре.

3.13. Поместите колонку в новую собирательную пробирку.

3.14. Оставьте при комнатной температуре на 10–15 минут для испарения остатка спирта.

ВНИМАНИЕ! Остатки спирта на фильтре колонки существенно снижают выход ДНК, влияют на спектрофотометрические показатели и могут ингибировать последующие реакции. Однако пересушивание фильтра снижает эффективность выделения ДНК, поэтому не оставляйте колонки сохнуть дольше 15 минут.

3.15. Нанесите на фильтр колонки 2 мл «Деионизированной воды», предварительно нагретой до +50 °С. Инкубируйте 1–2 минуты при комнатной температуре.

► Для повышения выхода ДНК можно увеличить объем воды для элюции до 3 мл.

3.16. Центрифугируйте колонку 2 минуты для сбора очищенной ДНК.

3.17. Утилизируйте колонку. Перенесите раствор ДНК (объем элюата сократится приблизительно на 100–150 мкл) из собирательной пробирки в микроцентрифужные пробирки объемом 1.5–2 мл.

Центрифугируйте 5 минут при 11 000 g при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Этот этап требуется для осаждения микрофрагментов сорбционного фильтра, которые могут попадать в препарат при элюции. Рекомендуется оставить на дне пробирки небольшое количество жидкости, чтобы не затронуть малозаметный осадок.

3.18. Аккуратно перенесите раствор ДНК в чистые пробирки, стараясь не захватывать осадок фильтра.

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

11.4. Переосаждение плазмидной ДНК этанолом

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

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

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

4.3. 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.

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

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

4.6. Поместите пробирку в ротор в том же положении, что в п. 4.3. 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.

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

4.8. 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.

Выделение плазмидной ДНК

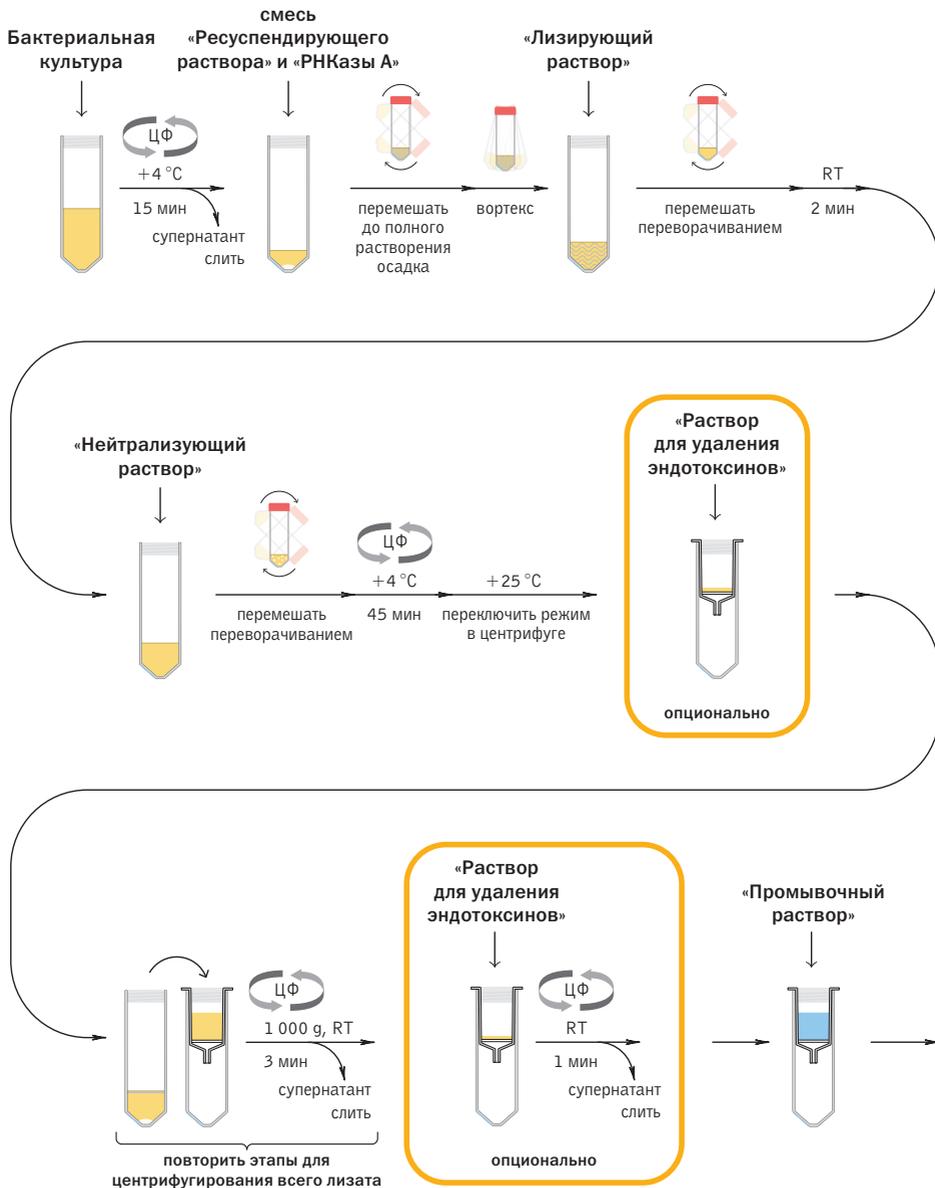
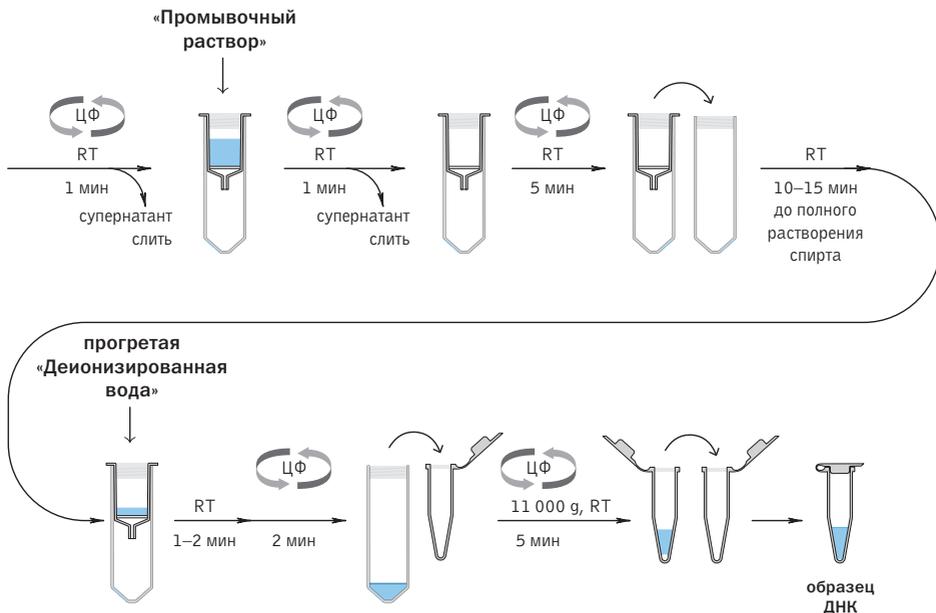
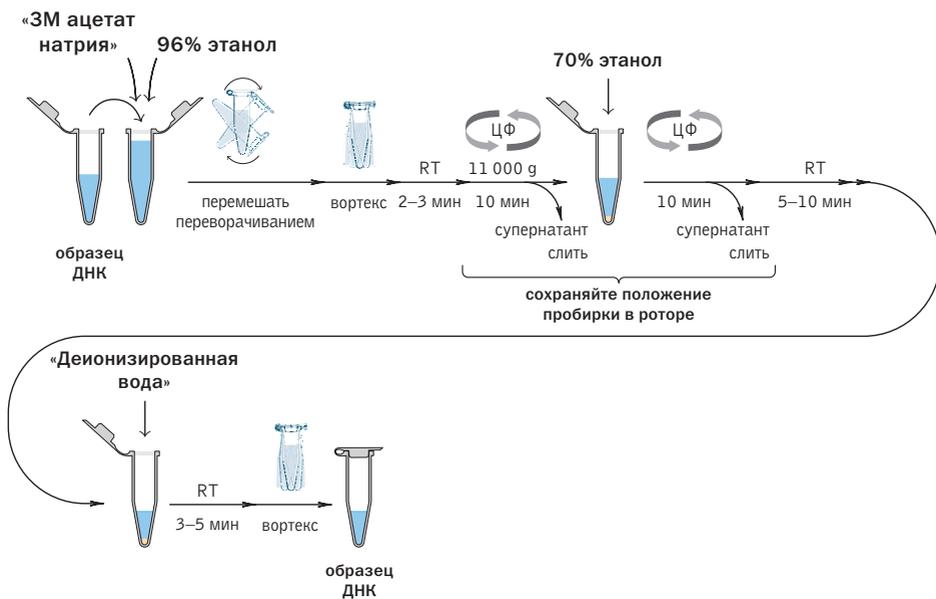


Рисунок 1 – схема выделения ДНК.



Переосаждение плазмидной ДНК этанолом



12. 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 раствор оказался слишком вязкий, что затрудняет перемешивание.	На старт процедуры взято слишком много биомассы.	Добавьте к вязкому лизату дополнительно по 1–1.5 мл «Ресуспенсирующего» и «Лизирующего» растворов и добейтесь уменьшения вязкости образца и полного лизиса. Не забудьте соответственно увеличить объем «Нейтрализующего раствора» на следующей стадии.
4. 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.
5. 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 на 50 мл и повторно центрифугируйте пробирку 10 минут при 4 °С. Установите максимально возможные обороты для вашего типа ротора. После центрифугирования перенесите осветленный лизат в колонку пипеткой. Плавающие нерастворимые фрагменты после центрифугирования всегда переходят в осадок, который следует оставить на дне. Незначительные остатки осадка, попавшие на колонку, не мешают выделению плазмиды.
6. Осадок ДНК после пересадения плохо растворяется.	Осадок пересушен.	Оставьте пробирку с осадком в термостате при 37 °С на 2–3 часа. После этого тщательно ресуспенсируйте осадок пипеткой.

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
7. Препарат плазмидной ДНК содержит примеси бактериальной геномной ДНК.	Количество биомассы, взятое в работу, превышает рекомендованное по протоколу.	Не используйте более 100 мл бактериальной культуры. Контролируйте плотность биомассы и время культивирования.
8. Соотношение 260/280 меньше 1.8.	Количество биомассы, взятое в работу, превышает рекомендованное по протоколу.	Не используйте более 100 мл бактериальной культуры. Контролируйте плотность биомассы и время культивирования. При соотношении $260/280 < 1.8$ рекомендуем пересадить плазмидную ДНК этанолом (п. 11.4).
9. Время инкубации в лизирующем растворе превысило рекомендованное.	Использование вортекса после добавления лизирующего раствора.	Проверьте правильность выполнения протокола.

Для заметок

Наборы и сервисы Евроген

Выделение и очистка нуклеиновых кислот [H](#)▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ [H](#)▶▶▶

Синтез и амплификация кДНК [H](#)▶▶▶ [C](#)▶▶▶

Клонирование ДНК [H](#)▶▶▶ [C](#)▶▶▶

Выявление контаминации микоплазмой [H](#)▶▶▶

Оценка ДНК [H](#)▶▶▶

Нормализация кДНК [H](#)▶▶▶ [C](#)▶▶▶

Практикум по геной инженерии [H](#)▶▶▶

Генотипирование [H](#)▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов [C](#)▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру [C](#)▶▶▶

Синтез генов [C](#)▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез [C](#)▶▶▶

[H](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
НАБОРА

[C](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
СЕРВИСА

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