



Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

Набор для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток методом осаждения

Кат. номер PP-50-mini, PP-20-midi, PP-12-maxi

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом. Последняя версия протокола доступна на сайте компании ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru).

Набор предназначен только для научно-исследовательских целей.

Протокол обновлён 09.09.2024.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки плазмидной ДНК из культур бактериальных клеток *E. coli* методом осаждения, без использования метода фенол-хлороформной экстракции или сорбционных методов (магнитные частицы или центрифужные колонки). Для выделения ДНК возможно использовать от 1 до 100 мл суспензии клеток (в зависимости от объема используемых пробирок и также копияности и длины плазмиды).

Набор представлен в трёх форматах:

- Формат «mini» – выделение плазмидной ДНК из 1–5 мл ночной культуры *E. coli* в центрифужных пробирках объемом 1.5 мл.
- Формат «midi» – выделение плазмидной ДНК из 5–50 мл ночной культуры *E. coli* в центрифужных пробирках объемом 15 мл.
- Формат «maxi» – выделение плазмидной ДНК из 50–100 мл ночной культуры *E. coli* в центрифужных пробирках объемом 50 мл.

Протокол состоит из двух основных этапов: щелочной лизис бактериальных клеток и последующее осаждение плазмидной ДНК, промывка и растворение очищенного продукта. Буфер для лизиса содержит pH-индикатор синего цвета, для лучшего контроля на этапе нейтрализации. После этапа нейтрализации цвет смеси становится прозрачным.

Выделенная ДНК может быть использована для ПЦР и рестрикции.

Состав набора

Кат. номер	PP-50-mini 50 выделений	PP-20-midi 20 выделений	PP-12-maxi 12 выделений
Объём суспензии бактериальных клеток	1-5 мл	5-50 мл	50-100 мл
Пробирки для выделения глазмидной ДНК	1.5 мл	15 мл	50 мл
Буфер для супендирования SB	15 мл	50 мл	2x50 мл
Буфер для лизиса LB (содержит pH-индикатор)	15 мл	50 мл	2x50 мл
Буфер для нейтрализации NB	15 мл	50 мл	2x50 мл
Буфер для осаждения PS	30 мл	2x50 мл	4x50 мл
Буфер для промывки WS (концентрат)	6 мл	10 мл	2x10 мл
Буфер для растворения ДНК DB	5 мл	5 мл	15 мл
РНКаза А, 10 мг/мл	115 мкл	480 мкл	720 мкл

Меры предосторожности

Осторожно! Буферы для лизиса LB, нейтрализации NB и осаждения PS содержат вещества, оказывающие раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности.

Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

Осторожно! Буфер для осаждения PS содержит изопропанол, оказывающий раздражающее и токсичное действие. Не проводить работы с раствором в непосредственной близости от открытого огня.

При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости обратитесь за медицинской помощью.

Эксплуатация

Компоненты: SB, LB, NB, PS, WS, DB, РНКаза А стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения (см. на упаковке) и достаточной герметизации флаконов.

Внимание! Не нагревать набор выше температуры +25°C, несоблюдение температурного режима хранения и транспортировки снижает активность РНказы А и эффективность выделения.

Условия работы

Температура окружающей среды от +15 до +25°C;

Относительная влажность воздуха не более 80 %;

Атмосферное давление 630 – 800 мм. рт. ст.

Оборудование и материалы, не входящие в набор

- Центрифуга с охлаждением, скорость от 12000 rcf, охлаждение до +4 °С;
- Угловые роторы для пробирок объемом 1.5 мл (кат. № PP-50-mini), 15 мл (кат. № PP-20-midi), 50 мл (кат. № PP-12-maxi);
- Центрифужные пробирки объемом 1.5 мл (кат. № PP-50-mini), 15 мл (кат. № PP-20-midi), 50 мл (кат. № PP-12-maxi);
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Этанол, 96-100% раствор.

Перед началом работы:

Подготовка буфера WS.

- **1 промывка, 500 мкл WS. Кат. № PP-50-mini.** К 100 мкл буфера WS (концентрат) добавить 400 мкл этанола (96-100%).
- **1 промывка, 2 мл WS. Кат. № PP-20-midi.** К 0.4 мл буфера WS (концентрат) добавить 1.6 мл этанола (96-100%).
- **1 промывка, 7 мл WS. Кат. № PP-12-maxi.** К 1.4 мл буфера WS (концентрат) добавить 5.6 мл этанола (96-100%).
- **1 флакон. Кат. № PP-50-mini.** К 6 мл буфера WS (концентрат) добавить 24 мл этанола (96-100%), чтобы получить 30 мл буфера WS.
- **1 флакон. Кат. № PP-20-midi, PP-12-maxi.** К 10 мл буфера WS (концентрат) добавить 40 мл этанола (96-100%), чтобы получить 50 мл буфера WS.

После добавления этанола плотно закрывать крышку. Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буфера WS, поскольку при хранении буфера с этанолом в течение нескольких месяцев этанол может частично испариться.

Протокол выделения плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовать 1-100 мл суспензии бактериальных клеток (количество зависит от копийности и длины плазмиды). Выделение производится согласно одному из трех вариантов протоколов в зависимости от используемого набора реагентов.

	Протокол 1	Протокол 2	Протокол 3
Кат. номер	PP-50-mini	PP-20-midi	PP-12-maxi
Объем суспензии бактериальных клеток	1-5 мл	10-50 мл	50-100 мл
Объем пробирки для выделения плазмидной ДНК	1.5 мл	15 мл	50 мл

Протокол 1. Выделение плазмидной ДНК из 1-5 мл суспензии бактериальных клеток в пробирках 1.5 мл. Кат. номер PP-50-mini.

1) Подготовка и лизис образцов.

1. Осадить бактериальные клетки из культуральной среды центрифугированием, 1 мин, 12000 rcf либо использовать принятый в лаборатории протокол для осаждения бактериальных клеток. Удалить супернатант.
2. К осадку клеток добавить 200 мкл буфера SB. Ресуспендировать осадок пипетированием.
3. Суспензию перенести в центрифужную микропробирку объемом 1.5 мл.
4. К суспензии клеток добавить 2 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и 200 мкл буфера для лизиса LB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси. Не использовать вортекс!

Важно! Закрывать бутылку, содержащую буфер LB, сразу после использования, чтобы избежать подкисления при попадании CO_2 из воздуха.

Примечание: Буфер для лизиса LB содержит рН-индикатор синего цвета.

4. Инкубировать полученную смесь не более 3 мин.
5. Добавить 200 мкл буфера для нейтрализации NB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси.

Примечание: не использовать вортекс!

Примечание: перемешать суспензию сразу после добавления буфера NB, чтобы избежать образования крупных частиц. Перемешивать суспензию до полного исчезновения частиц синего цвета.

6. Инкубировать 5 минут.
7. Центрифугировать 15 мин, 12000 rcf при комнатной температуре.

2) Осаждение плазмидной ДНК.

1. Отобрать супернатант и перенести его в чистую микропробирку 1.5 мл.
- Примечание:** если не все частицы осели на дно после центрифугирования, аккуратно перенести супернатант в чистую пробирку, избегая захвата осадка.
2. Добавить 420 мкл буфера для осаждения PS. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5 раз.
 3. Центрифугировать 15 мин, 12000 rcf при $+4^\circ\text{C}$.

Важно! Аккуратно достать пробирки из центрифуги, избегая переворачиваний и встряхиваний, чтобы избежать отслоения осадка ДНК и его последующего удаления.

4. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок.

Примечание: осадок может быть прозрачным и незаметным на дне пробирки.

3) Промывка осадка.

1. К осадку добавить 500 мкл буфера для промывки WS. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 2 раза.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WS этанол.

2. Центрифугировать 5 мин, 12000 gcf при +4°C.

Важно! Аккуратно достать пробирки из центрифуги, избегая переворачиваний и встряхиваний, чтобы избежать отслоения осадка ДНК и его последующего удаления.

3. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок.

4) Растворение осадка ДНК.

1. Открыть крышку пробирки и подсушить осадок в течение 10-15 мин при комнатной температуре.

2. К осадку добавить 45-60 мкл буфера для растворения ДНК DB. Убедитесь, что буфер DB полностью омывает дно пробирки. Допускаются аккуратные переворачивания или слабое кратковременное вортиксирование.

3. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре.

4. Центрифугировать 1 мин, 12000 gcf при комнатной температуре.

5. Аккуратно отобрать супернатант, не задевая осадок. Перенести в чистую микропробирку.

Примечание: Буфер для растворения ДНК – 0.01 M Tris·HCl (pH 8.0). Растворить образец также можно TE буфером (0.01 M Tris·HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0-8.5) либо водой (pH 8.0-8.5, pH доводить раствором NaOH).

6. Раствор, содержащий ДНК, хранить при -20°C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 mM.

Примечание: EDTA может ингибировать ферментативные реакции, например, ПЦР.

Протокол 2. Выделение плазмидной ДНК из 5-50 мл суспензии бактериальных клеток в пробирках 15 мл. Кат. номер PP-20-midi.

1) Подготовка и лизис образцов.

1. Осадить бактериальные клетки из культуральной среды центрифугированием, 1 мин, 12000 rcf либо использовать принятый в лаборатории протокол для осаждения бактериальных клеток. Удалить супернатант.
2. К осадку клеток добавить 2 мл буфера SB. Ресуспендировать осадок пипетированием.
3. Суспензию перенести в центрифужную пробирку объемом 15 мл.
4. К суспензии клеток добавить 20 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и 2 мл буфера для лизиса LB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси. Не использовать вортекс!

Важно! Закрыть бутылку, содержащую буфер LB, сразу после использования, чтобы избежать подкисления при попадании CO₂ из воздуха.

Примечание: Буфер для лизиса LB содержит pH-индикатор синего цвета.

4. Инкубировать полученную смесь не более 3 мин.
5. Добавить 2 мл буфера для нейтрализации NB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси.

Примечание: не использовать вортекс!

Примечание: перемешать суспензию сразу после добавления буфера NB, чтобы избежать образования крупных частиц. Перемешивать суспензию до полного исчезновения частиц синего цвета.

6. Инкубировать 5 минут.
7. Центрифугировать 20 мин, 12000 rcf при комнатной температуре.

2) Осаждение плазмидной ДНК.

1. Отобрать супернатант и перенести его в чистую центрифужную пробирку 15 мл.

Примечание: если не все частицы осели на дно после центрифугирования, аккуратно перенести супернатант в чистую пробирку, избегая захвата осадка.

2. Добавить 4,2 мл буфера для осаждения PS. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5 раз.
3. Центрифугировать 15 мин, 12000 rcf при +4°C.

Важно! Аккуратно достать пробирки из центрифуги, избегая переворачиваний и встряхиваний, чтобы избежать отслоения осадка ДНК и его последующего удаления.

4. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок.

Примечание: осадок может быть прозрачным и незаметным на дне пробирки.

3) Промывка осадка.

1. К осадку добавить 2 мл буфера для промывки WS. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 2 раза.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WS этанол.

2. Центрифугировать 5 мин, 12000 gcf при +4°C.

Важно! Аккуратно достать пробирки из центрифуги, избегая переворачиваний и встряхиваний, чтобы избежать отслоения осадка ДНК и его последующего удаления.

3. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок.

4) Растворение осадка ДНК.

1. Открыть крышку пробирки и подсушить осадок в течение 10-15 мин при комнатной температуре.

2. К осадку добавить 100-200 мкл буфера для растворения ДНК DB. Убедитесь, что буфер DB полностью омывает дно пробирки. Допускаются аккуратные переворачивания или слабое кратковременное вортиксирование.

3. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре.

4. Центрифугировать 1 мин, 12000 gcf при комнатной температуре.

5. Аккуратно отобрать супернатант, не задевая осадок. Перенести в чистую микропробирку.

Примечание: Буфер для растворения ДНК – 0.01 M Tris·HCl (pH 8.0). Растворить образец также можно TE буфером (0.01 M Tris·HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0-8.5) либо водой (pH 8.0-8.5, pH доводить раствором NaOH).

6. Раствор, содержащий ДНК, хранить при -20°C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 mM.

Примечание: EDTA может ингибировать ферментативные реакции, например, ПЦР.

Протокол 3. Выделение плазмидной ДНК из 50–100 мл суспензии бактериальных клеток в пробирках 50 мл. Кат. номер PP-12-maxi.

1) Подготовка и лизис образцов.

1. Осадить бактериальные клетки из культуральной среды центрифугированием, 1 мин, 12000 rcf либо использовать принятый в лаборатории протокол для осаждения бактериальных клеток. Удалить супернатант.
2. К осадку клеток добавить 7.5 мл буфера SB. Ресуспендировать осадок пипетированием.
3. Суспензию перенести в центрифужную пробирку объемом 50 мл.
4. К суспензии клеток добавить 50 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и 7.5 мл буфера для лизиса LB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5–10 раз до получения однородной смеси. Не использовать вортекс!

Важно! Закрыть бутылку, содержащую буфер LB, сразу после использования, чтобы избежать подкисления при попадании CO₂ из воздуха.

Примечание: Буфер для лизиса LB содержит рН-индикатор синего цвета.

- 4 Инкубировать полученную смесь не более 3 мин.
5. Добавить 7.5 мл буфера для нейтрализации NB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5–10 раз до получения однородной смеси.

Примечание: не использовать вортекс!

Примечание: перемешать суспензию сразу после добавления буфера NB, чтобы избежать образования крупных частиц. Перемешивать суспензию до полного исчезновения частиц синего цвета.

6. Инкубировать 5 минут.
7. Центрифугировать 20 мин, 12000 rcf при комнатной температуре.

2) Осаждение плазмидной ДНК.

1. Отобрать супернатант и перенести его в чистую центрифужную пробирку 50 мл.

Примечание: если не все частицы осели на дно после центрифугирования, аккуратно перенести супернатант в чистую пробирку, избегая захвата осадка.

2. Добавить 15 мл буфера для осаждения PS. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5 раз.
3. Центрифугировать 15 мин, 12000 rcf при +4°C.

Важно! Аккуратно достать пробирки из центрифуги, избегая переворачиваний и встряхиваний, чтобы избежать отслоения осадка ДНК и его последующего удаления.

4. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок.

Примечание: осадок может быть прозрачным и незаметным на дне пробирки.

3) Промывка осадка.

1. К осадку добавить 7 мл буфера для промывки WS. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 2 раза.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WS этанол.

2. Центрифугировать 5 мин, 12000 gcf при +4°C.

Важно! Аккуратно достать пробирки из центрифуги, избегая переворачиваний и встряхиваний, чтобы избежать отслоения осадка ДНК и его последующего удаления.

3. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок.

4. Открыть крышку пробирки и подсушить осадок в течение 10–15 мин при комнатной температуре.

4) Растворение осадка ДНК.

1. Открыть крышку пробирки и подсушить осадок в течение 10–15 мин при комнатной температуре.

2. К осадку добавить 0.8–1 мл буфера для растворения ДНК DB и омыть стенки дна пробирки 3–5 раз. Допускается слабое кратковременное вортексирование.

3. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре.

4. Центрифугировать 1 мин, 12000 gcf при комнатной температуре.

5. Аккуратно отобрать супернатант, не задевая осадок. Перенести в чистую микропробирку.

Примечание: Буфер для растворения ДНК – 0.01 M Tris·HCl (pH 8.0). Растворить образец также можно TE буфером (0.01 M Tris·HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0–8.5) либо водой (pH 8.0–8.5, pH доводить раствором NaOH).

6. Раствор, содержащий ДНК, хранить при –20°C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1–1 мМ.

Примечание: EDTA может ингибировать ферментативные реакции, например, ПЦР.

Анализ выделенной ДНК

Целостность выделенной ДНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Количество выделенной ДНК можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

Характерный максимум поглощения для ДНК при $\lambda = 260$ нм.

Посчитать концентрацию ДНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 50$ мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$.

Дополнительные реагенты:

В каталоге ООО «Биолабмикс» представлены реагенты для проведения агарозного гель-электрофореза.

- Буферы для электрофореза в агарозном геле: трис-ацетатный буфер (Кат. № BE-DNA-500, BE-DNA-1000), трис-боратный буфер (Кат. № TBE-500).
- Раствор бромистого этидия (Кат. № EtBr-10) для визуализации НК.
- Буферы для внесения образцов ДНК и РНК в гель (Кат. № D-3001, D-3002, D-3003).
- РНКазы А (Кат. № ER-500).
- Раствор Tris-HCl, 1 М, pH 7.5 (Кат. № Tris-100-7.5).
- Раствор Tris-HCl, 1 М, pH 8.5 (Кат. № Tris-100-8.5).
- Раствор EDTA, 0.5 М, pH 8 (Кат. № EDTA-10).

Условия хранения:

Набор для выделения ДНК хранить при температуре от +15 до +25 °С. Раствор РНКазы А хранить при температуре от -18 до -24 °С. Срок годности см. на упаковке.

Важно! Закрывать бутылку, содержащую буфер LB, сразу после использования, чтобы избежать подкисления при попадании CO₂ из воздуха.

Условия транспортировки:

Транспортировку набора, производить при температуре от +15 до +25 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше +25 °С в течение 14 суток.

Продукция компании Биолабмикс

Наборы для
выделения
ДНК/РНК



Наборы и смеси
для ПЦР



ОТ и ОТ-ПЦР



Изотермическая
амплификация



ДНК-маркеры



Ферменты



Олиго-
нуклеотиды



Платформа
для синтеза
мРНК



Маркеры
молекулярной
массы белков



Host cell
DNA detection



Контрактное
производство

Собственные
разработки

sales@biolabmix.ru
8 800 600 88 76

www.biolabmix.ru



9001:2015
13485:2016



ПОДПИСЫВАЙТЕСЬ
НА НАШУ ГРУППУ В ВК