Инструкция по применению

Биолабмикс®

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
E-mail: sales@biolabmix.ru

Набор Maxi

для выделения плазмидной ДНК

из бактериальных клеток

Руководство пользователя

Кат. номер
Plasmid-20-maxi

Оглавление

Описание 3
Состав набора 4
Меры предосторожности 4
Эксплуатация 4
Условия работы 4
Оборудование и материалы, не входящие в набор 5
Перед началом работы: 6
Протокол 1. Выделение плазмидной ДНК с использованием высокоскоростных центрифуг (скорость до 14000 rcf) 7
1) Подготовка и лизис образцов 8
2) Нанесение на колонку 8
3) Промывка колонки 9
4) Элюция ДНК 9
Протокол 2. Выделение плазмидной ДНК с использование низкоскоростной центрифуги (скорость до 3000 rcf) 10
1) Подготовка и лизис образцов 10
2) Нанесение на колонку 10
3) Промывка колонки 11
4) Элюция ДНК 11
Протокол 3. Осаждение плазмидной ДНК с использованием высокоскоростных центрифуг для микропробирок (скорость 12000 rcf) 12
Анализ выделенной ДНК ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
Дополнительные реагенты: 14
Условия хранения 15
Условия транспортировки 15

Набор Maxi для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток

Кат. номер Plasmid-20-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 13.04.2026.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки плазмидной ДНК из культур бактериальных клеток *E. coli.* Для выделения плазмидной ДНК возможно использовать до 100 мл суспензии клеток. Выход плазмидной ДНК может достигать 100-500 мкг и зависит от линии клеток, копийности и длины плазмиды.

Протокол выделения плазмидной ДНК основан на методе щелочного лизиса бактериальных клеток и последующей сорбции плазмидной ДНК на центрифужной колонке. Буфер для лизиса содержит pH-индикатор синего цвета, для лучшего контроля на этапе нейтрализации. После нейтрализации цвет смеси становится прозрачным.

Выделенная плазмидная ДНК может быть использована в различных приложениях таких как трансфекция, ферментативные реакции (ПЦР, рестрикция, in vitro транскрипция и трансляция), секвенирование и других молекулярно-биологических приложениях.

Выделение плазмидной ДНК можно проводить как на центрифугах с угловым ротором с высокой скоростью центрифугирования 12000 rcf (см. протокол 1), так и на центрифугах с бакетным или угловым ротором с низкой скоростью центрифугирования 3000 rcf (см. протокол 2).

Раствор выделенной плазмидной ДНК можно концентрировать методом осаждения (см. протокол 3).

Состав набора

	Plasmid-20 maxi 20 выделений Вариант 1	Plasmid-20 maxi 20 выделений Вариант 2
Буфер для суспендирования SB	200 мл	2x100 мл
Буфер для лизиса LB (содержит pH-индикатор)	200 мл	2x100 мл
Буфер для нейтрализации NB	200 мл	2x100 мл
Буфер для промывки WB1	250 мл	2x125 мл
Буфер для промывки WB2 (концентрат)	50 мл	2x25 мл
Буфер для элюции EB	60 мл	60 мл
РНКаза А, 10 мг/мл	1.5 мл	1.5 мл
Колонки для сорбции образца в комплекте с Пробирками для сбора фильтрата	20 шт.	20 шт.
Раствор для осаждения PS1	5 мл	5 мл
Раствор для осаждения PS2	20 мл	20 мл
Раствор для промывки WS (концентрат)	3 мл	3 мл

Набор Plasmid-20-maxi поставляется в одном из двух вариантов

Меры предосторожности

1. Буферы для лизиса LB, нейтрализации NB и промывки WB1 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.
2. Буфер для промывки WB1 и раствор PS2 содержат изопропанол, оказывающий раздражающее и токсичное действие. Не проводить работы с раствором в непосредственной близости от открытого огня.
3. При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости обратитесь за медицинской помощью.

Эксплуатация

Компоненты SB, LB, NB, WB1, WB2, EB, РНКаза А, PS1, PS2, WS стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения (см. на упаковке) и достаточной герметизации флаконов.

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

Условия работы

Температура окружающей среды от +15 до +25°С;
Относительная влажность воздуха не более 80 %;
Атмосферное давление 630 – 800 мм рт. ст.

Оборудование и материалы, не входящие в набор

- Центрифуга для пробирок на 50 мл, бакетный или угловой ротор, скорость 3000 или 12000 rcf;
- Опционально (протокол 3, осаждение плазмидной ДНК):
  Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 rcf, охлаждение до +4 °C;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл и/или на 2 мл;
- Этанол, 96-100% раствор.

Перед началом работы:

Опционально. Подготовка буфера SB.

- 1 выделение. К 7.5 мл буфера SB добавить 50 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.

- Plasmid-20-maxi. Вариант 1. К 200 мл буфера SB добавить 1400 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.

- Plasmid-20-maxi. Вариант 2. К 100 мл буфера SB добавить 700 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.

Внимание! Смесь буфера SB и РНКазы А хранить при 2-8 °С не более 1 месяца.

Подготовка буфера WB2.

- 1 промывка, 10 мл WB2. К 2 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 8 мл этанола (96-100%), чтобы получить 10 мл буфера WB2. Перемешать.

- Plasmid-20-maxi. Вариант 1. К 50 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 200 мл этанола (96-100%), чтобы получить 250 мл буфера WB2. Перемешать.

- Plasmid-20-maxi. Вариант 2. К 25 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 100 мл этанола (96-100%), чтобы получить 125 мл буфера WB2. Перемешать.

Примечание. После добавления этанола плотно закрывать крышку. Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буфера WB2 непосредственно перед работой, поскольку при хранении готового буфера с этанолом в течение нескольких месяцев этанол может частично испариться.

Подготовка раствора для промывки WS.

- 1 промывка, 500 мкл. К 100 мкл раствора WS (концентрат, вода тип I) добавить 400 мкл этанола (96-100%).

- Plasmid-20-maxi, 15 мл. К 3 мл раствора WS (концентрат, вода тип I) добавить 12 мл этанола (96-100%).

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

Протокол выделения плазмидной ДНК

Культуральная среда и условия роста клеток

Для выращивания культур клеток рекомендуется использовать стандартную среду LB (Luria Bertani), собирать клетки через 12-16 ч роста.

На 1 л культуральной среды использовать

10 г триптона,

5 г дрожжевого экстракта,

10 г NaCl.

При таких условиях плотность клеток составляет примерно 3-4*10^9 клеток/мл, что соответствует массе сырого осадка клеток, полученного после центрифугирования суспензии, примерно 3 г на 1 л среды.

Для стандартного выделения плазмидной ДНК настоятельно рекомендуется использовать штаммы E. coli с инактивированным геном endA.

Замечания по выделению плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовать не более 1-5 мл ночной культуры бактериальных клеток или не более 150-300 мг сырого осадка клеток на 1 выделение (количество зависит от копийности и длины плазмиды). Количество клеток может различаться в зависимости от используемой культуральной среды, поэтому рекомендуем ориентироваться на массу сырого осадка клеток.

Если выделение плазмидной ДНК данным набором реагентов проводится впервые, рекомендуем оптимизировать время роста культуры клеток и объём суспензии клеток на 1 выделение.

Не превышайте рекомендованный объём и/или количество образца. Использование большего объёма и/или количества образца может снизить эффективность лизиса и привести к уменьшению количества и качества выделяемой плазмидной ДНК.

При выделении низкокопийных плазмидных ДНК допускается увеличить объём исходной культуры клеток в 1.5-2 раза, при этом необходимо пропорционально увеличить объёмы буферов SB, LB, NB. Это применимо только для низкокопийных плазмидных ДНК.

Протокол 1. Выделение плазмидной ДНК с использованием высокоскоростных центрифуг (скорость до 14000 rcf)

Для выделения плазмидной ДНК использовать 50-100 мл ночной культуры бактериальных клеток (количество зависит от копийности и длины плазмиды). Все процедуры проводить при 15-25 °C.

Важно! Не превышайте рекомендованный объём исходной культуры клеток. Использование большего объёма клеток может снизить эффективность лизиса и привести к уменьшению количества и качества выделяемой плазмидной ДНК.

1) Подготовка и лизис образцов

1. Осадить бактериальные клетки из 50-100 мл 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. К суспензии клеток добавить 50 мкл РНКазы А.

Важно! Если в буфер SB уже была добавлена РНКаза А, то дополнительную аликвоту РНКазы А вносить не нужно!

4. К суспензии клеток добавить 7.5 мл буфера для лизиса LB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси. Не использовать вортекс!

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

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

5. Инкубировать полученную смесь не более 3 мин.
6. Добавить 7.5 мл буфера для нейтрализации NB. Сразу перемешать суспензию вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси, чтобы избежать образования крупных частиц. Перемешивать суспензию до полного исчезновения частиц синего цвета.

Примечание: не использовать вортекс!

7. Инкубировать 10 минут.
8. Центрифугировать 20 мин, 12000 rcf.

Примечание: центрифугирование при +4 °C позволяет более эффективно провести осаждение.

2) Нанесение на колонку

1. Нанести на колонку не более 12.5 мл супернатанта. Центрифугировать 2 мин, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

Примечание: если не все частицы осели на дно после центрифугирования («**Подготовка и лизис образцов**», п. 6), супернатант переносить на колонку аккуратно, избегая захвата осадка.

2. Повторно нанести на туже колонку оставшийся супернатант. Центрифугировать 2 мин, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

3) Промывка колонки

1. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 2 мин, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 2 мин, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

3. Центрифугировать колонку 5 мин, 12000 rcf для полного удаления буфера WB2.

4) Элюция ДНК

1. Перенести колонку в чистую пробирку для сбора элюата (входит в состав набора).
2. Нанести на центр фильтра колонки 1 мл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25 °C). Центрифугировать 2 мин, 12000 rcf.

Примечание: Уменьшение объёма буфера для элюции может привести к снижению выхода плазмидной ДНК.

Состав буфера для элюции EB: 0.01 M Tris•HCl (pH 8.0), не содержит EDTA. Буфер подготовлен методом стерилизующей фильтрации с помощью фильтрации через мембрану с размером пор 0.2 мкм.

3. Перенести элюат в чистую пробирку на 1.5 мл (не входит в набор).
4. Раствор плазмидной ДНК, хранить при -20 ˚C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 мМ. Использовать раствор EDTA свободный от эндотоксинов.

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

Протокол 2. Выделение плазмидной ДНК с использование низкоскоростной центрифуги (скорость до 3000 rcf)

Для выделения плазмидной ДНК использовать 50-100 мл ночной культуры бактериальных клеток (количество зависит от копийности и длины плазмиды). Все процедуры проводить при 15-25 °C.

Важно! Не превышайте рекомендованный объём исходной культуры клеток. Использование большего объёма клеток может снизить эффективность лизиса и привести к уменьшению количества и качества выделяемой плазмидной ДНК.

1) Подготовка и лизис образцов

1. Осадить бактериальные клетки из 50-100 мл культуральной среды центрифугированием, 15 мин, 3000 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. К суспензии клеток добавить 50 мкл РНКазы А.

Важно! Если в буфер SB уже была добавлена РНКаза А, то дополнительную аликвоту РНКазы А вносить не нужно!

4. К суспензии клеток добавить 7.5 мл буфера для лизиса LB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси. Не использовать вортекс!

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

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

5. Инкубировать полученную смесь не более 3 мин.
6. Добавить 7.5 мл буфера для нейтрализации NB. Сразу перемешать суспензию вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси, чтобы избежать образования крупных частиц. Перемешивать суспензию до полного исчезновения частиц синего цвета.

Примечание: не использовать вортекс!

7. Инкубировать 10 минут.
8. Центрифугировать 60 мин, 3000 rcf.

Примечание: центрифугирование при +4 °C позволяет более эффективно провести осаждение.

2) Нанесение на колонку

1. 12.5 мл супернатанта нанести на колонку. Центрифугировать 2 мин, 3000 rcf. Удалить фильтрат.

Примечание: если не все частицы осели на дно после центрифугирования («**Подготовка и лизис образцов**», п. 6), супернатант переносить на колонку аккуратно, избегая захвата осадка.

2. Повторно нанести на туже колонку оставшиеся 12.5 мл супернатанта. Центрифугировать 2 мин, 3000 rcf. Удалить фильтрат.

3) Промывка колонки

1. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 2 мин, 3000 rcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 2 мин, 3000 rcf. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

3. Центрифугировать колонку 5 мин, 3000 rcf для полного удаления буфера WB2.

4) Элюция ДНК

1. Перенести колонку в чистую пробирку для сбора элюата (входит в состав набора).
2. Нанести на центр фильтра колонки 1 мл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25 °C). Центрифугировать 5 мин, 3000 rcf.

Примечание: Уменьшение объёма буфера для элюции может привести к снижению выхода плазмидной ДНК.

Состав буфера для элюции EB: 0.01 M Tris•HCl (pH 8.0), не содержит EDTA. Буфер подготовлен методом стерилизующей фильтрации с помощью фильтрации через мембрану с размером пор 0.2 мкм.

3. Перенести элюат в чистую пробирку на 1.5 мл (не входит в набор).
4. Раствор плазмидной ДНК, хранить при -20 ˚C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 мМ. Использовать раствор EDTA свободный от эндотоксинов.

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

Протокол 3. Осаждение плазмидной ДНК с использованием высокоскоростных центрифуг для микропробирок (скорость 12000 rcf)

Для осаждения плазмидной ДНК из раствора объёмом до 800-1000 мкл использовать микропробирки объёмом 2 мл (не входит в набор). Предварительно определить количество и объём плазмидной ДНК, взятой для осаждения. Рекомендуется использовать спектрометрические или флуориметрические методы оценки концентрации нуклеиновых кислот.

1. К образцу плазмидной ДНК, полученной после этапа «Элюция ДНК» в протоколе 1 или в протоколе 2, добавить 0.1 объёма (от объёма образца) раствора для осаждения PS1.
2. Перемешать пипетированием или на вортексе 3-5 с.

Примечание: например, при объёме образца плазмидной ДНК – 1000 мкл (1 мл) добавить 100 мкл раствора для осаждения PS1. Небольшой избыток PS1 не снижает выход ДНК.

3. Добавить 0.7 объёма (от объёма образца полученного в п. 1) раствора для осаждения PS2. Перемешать пипетированием или на вортексе 3-5 с.

Примечание: например, при объёме образца плазмидной ДНК – 1000 мкл, раствора PS1 – 100 мкл добавить 770 мкл раствора для осаждения PS2. Небольшой избыток PS2 не снижает выход ДНК.

4. Центрифугировать 15 мин, 12000 rcf при +4 °C. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок.

Важно! Осадок может быть прозрачным или белым. Поэтому необходимо запомнить или отметить положение пробирки в роторе центрифуги.

5. В пробирку с осадком аккуратно добавить 500 мкл раствора WS. Перемешать, аккуратно перевернув пробирку 1-2 раза, чтобы ополоснуть стенки пробирки.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к раствору WS этанол.

6. Центрифугировать 10 мин, 12000 rcf при +4 °C. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок.

Важно! Осадок может быть прозрачным или белым. Поэтому необходимо запомнить или отметить положение пробирки в роторе центрифуги.

7. Сушить осадок на воздухе 10-15 мин при Tкомн (15-25 °C).

Важно! не пересушивать осадок, иначе может снизиться растворимость плазмидной ДНК.

8. Осадок плазмидной ДНК растворить в буфере EB. Рекомендуется добавлять 0.8-1 мкл буфера EB на 1 мкг ДНК, использованной для осаждения. В таком случае конечная концентрация плазмидной ДНК составит 1-1.25 мкг/мкл (1000-1250 нг/мкл).

Важно! Если объёма буфера EB недостаточно, чтобы покрыть весь осадок, то увеличить объём буфера EB.

9. Раствор 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.

Примечание: Выход ДНК после осаждения составляет 80-100%.

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 λ = 260 нм.
Посчитать концентрацию ДНК (нг/мкл) можно по следующей формуле:
A_{260} * разбавление * 50 нг/мкл.
Характерные соотношения оптической плотности A_{260}/A_{280} ~1.7-2.0.
Примечание: при концентрации ДНК менее 10-20 нг/мкл рекомендуется провести оценку количества ДНК флуориметрией или ПЦР.

- При анализе раствора ДНК с помощью УФ-спектрометрии обязательно снимать фон с помощью буфера для элюции ЕВ.
- После снятия фона обязательно провести измерение буфера для элюции ЕВ. Убедиться, что оптическое поглощение около нуля во всём диапазоне измерения. Допускается максимальное оптическое поглощение не более 0.05.

Дополнительные реагенты:

В каталоге ООО «Биолабмикс» представлены реагенты и материалы полезные при выделении плазмидной ДНК и её анализе.

Реагенты и материалы для выделения НК

- EDTA, 0.5 M, pH 8 (Кат. № EDTA-10)
- TE буфер, 1x, pH 8 (Кат. № TE-1x-100, TE-1x-500)
- TE буфер, 10x, pH 8 (Кат. № TE-10x-10)
- Tris-HCl, 1 M, pH 8.5 (Кат. № Tris-100-8.5)
- Tris-HCl, 1 M, pH 7.5 (Кат. № Tris-100-7.5)

Реагенты для 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
- Деионизированная вода тип I (Кат. № WI-50, WI-500)
- Буферы для внесения образцов ДНК и РНК в гель
  (Кат. № D-3001, D-3002, D-3003)
- Маркеры молекулярных весов ДНК
  (Кат. № S-8000, S-8100, S-8103, S-8055, S-8250, S-8150)

Ферменты для выделения НК

- РНКаза А (Кат. № ER-500)

Наборы для очистки и выделения НК

- Набор Micro для выделения ДНК и РНК из агарозного геля

(Кат. № N-Gel-50-micro, N-Gel-250-micro)
- Набор для выделения ДНК и РНК из агарозного геля (Кат. № N-Gel-10, N-Gel-50, N-Gel-250)
- Набор Micro для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (Кат. № DR-50-micro, DR-250-micro)
- Набор Mini для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (Кат. № DR-10, DR-50, DR-250)
- Набор Maxi для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (Кат. № DR-20-maxi)

Условия хранения

Набор для выделения ДНК хранить при комнатной температуре (15-25 °С).
Раствор РНКазы А хранить при температуре -20°С.
Срок годности см. на упаковке.

Условия транспортировки

Транспортировку набора производить при комнатной температуре (15-25 °С).
Транспортировку раствора РНКазы А производить при комнатной температуре (15-25 °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

ISO 9001:2015
13485:2016

ПОДПИСЫВАЙТЕСЬ НА НАШУ ГРУППУ ВК
vk.com/biolabmix

ЗАХОДИТЕ НА НАШ ТЕЛЕГРАМ КАНАЛ
t.me/biolabmix