



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 Maxi
для выделения плазмидной ДНК
свободной от эндотоксинов
из бактериальных клеток
Руководство пользователя

Кат. номер
PlasmidEF-20-maxi

Оглавление

Описание	3
Состав набора.....	4
Меры предосторожности.....	4
Эксплуатация	4
Условия работы.....	5
Оборудование и материалы, не входящие в набор.....	5
Перед началом работы.....	6
Протокол выделение плазмидной ДНК	7
1) Подготовка и лизис образцов	7
2) Нанесение на колонку	8
3) Промывка колонки	8
4) Элюция ДНК.....	8
5) Осаждение ДНК	8
Анализ выделенной ДНК	10
Дополнительные реагенты	10
Условия хранения.....	11
Условия транспортировки.....	11

Набор Maxi для выделения плазмидной ДНК свободной от эндотоксинов из бактериальных клеток

Кат. номер PlasmidEF-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 23.04.2025.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки плазмидной ДНК из культур бактериальных клеток *E. coli*. Набор позволяет получить высокоочищенную плазмидную ДНК пригодную для трансфекции с низким содержанием эндотоксинов (<0.1 EU на 1 мкг плазмидной ДНК). 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. Для дополнительной очистки далее происходит спиртовое осаждение ДНК и последующее растворение осадка ДНК в буфере свободном от эндотоксинов.

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.

Состав набора

	PlasmidEF-20 maxi	PlasmidEF-20 maxi
	20 выделений	20 выделений
	Вариант 1	Вариант 2
Буфер для суспендирования SB	4x50 мл	2x100 мл
Буфер для лизиса LB (содержит pH-индикатор)	4x50 мл	2x100 мл
Буфер для нейтрализации ENB	4x50 мл	2x100 мл
Буфер для промывки EWB	5x50 мл	2x125 мл
Буфер для промывки PWB	5x50 мл	2x125 мл
Буфер для промывки FWB (концентрат)	5x10 мл	2x25 мл
Буфер для элюции EB	60 мл	60 мл
РНКаза A, 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	2x10 мл	2x10 мл
Раствор для промывки WS (концентрат)	3 мл	3 мл
Буфер для растворения ДНК EFT	5x1 мл	5x1 мл

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

Меры предосторожности

Осторожно! Буферы для лизиса LB, нейтрализации ENB и промывки EWB, PWB 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 промывки EWB, PWB и раствор PS2 содержат 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, ENB, EWB, PWB, FWB, EB, РНКаза A, PS1, PS2, WS, EFT 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 РНКаза А и эффективность выделения.

Важно! После вскрытия тары с компонентами набора внутрь могут попасть примеси с рабочих поверхностей и из воздуха в помещении.

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 ротором для пробирок на 50 мл, скорость 12000 rcf;
Опционально. Охлаждение до +4 °С;
- Центрифуга с ротором для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 rcf, охлаждение до +4 °С;
- 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.

- **PlasmidEF-20 maxi. Вариант 1.** К 50 мл буфера SB добавить 350 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.

- **PlasmidEF-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 FWB.

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

- **PlasmidEF-20 maxi. Вариант 1.** К 10 мл буфера FWB (концентрат) добавить 40 мл этанола (96–100%), чтобы получить 50 мл буфера FWB. Перемешать.

- **PlasmidEF-20 maxi. Вариант 2.** К 25 мл буфера FWB (концентрат) добавить 100 мл этанола (96–100%), чтобы получить 125 мл буфера FWB. Перемешать.

Примечание. После добавления этанола плотно закрывать крышку. Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буфера FWB, поскольку при хранении 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%).

- **PlasmidEF-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, поскольку при хранении буфера с этанолом в течение нескольких месяцев этанол может частично испариться.

Протокол выделение плазмидной ДНК

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 °С.

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

Примечание: при выделении низкокопийных плазмидных ДНК допускается увеличить объем исходной культуры клеток в 1.5–2 раза, при этом обязательно (!) пропорционально увеличить объемы буферов SB, LB, ENB. Это применимо только для низкокопийных плазмидных ДНК. Высокое содержание плазмидной ДНК в образце может приводить к снижению количества выделяемой плазмидной ДНК. В каталоге представлен дополнительный Комплект буферов SB, LB, ENB (Кат. № PlasmidEF–BSx3).

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, 50 мкл РНКазы А. Ресуспендировать осадок пипетированием.

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

3. 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! Закрывать 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 7.5 мл буфера для нейтрализации ENB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5–10 раз до получения однородной смеси, чтобы избежать образования крупных частиц. Перемешивать суспензию до полного исчезновения частиц синего цвета. Инкубировать 5 минут.

Примечание: не использовать вортекс!

6. Центрифугировать 20 мин, 12000 rcf.

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

2) Нанесение на колонку

1. Нанести на колонку не более 12.5 мл супернатанта. Центрифугировать 2 мин, 12000 gcf. 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 ту же колонку оставшийся супернатант. Центрифугировать 2 мин, 12000 gcf. Удалить фильтрат.

3) Промывка колонки

1. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки EWB. Центрифугировать 2 мин, 12000 gcf. Удалить фильтрат.

2. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки PWB. Центрифугировать 2 мин, 12000 gcf. Удалить фильтрат.

3. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки FWB. Центрифугировать 2 мин, 12000 gcf. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу FWB этанол.

4. Центрифугировать колонку 5 мин, 12000 gcf для полного удаления буфера FWB.

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 gcf.

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

3. Перенести элюат в чистую пробирку на 1.5 мл (не входит в набор).

Примечание: Буфер для элюции – 0.01 M Tris·HCl (pH 8.0).

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Элюат ДНК хранить при +4 °C не более суток.

5) Осаждение ДНК

Для осаждения плазмидной ДНК из раствора объемом до 800–1000 мкл использовать микропробирки объемом 2 мл (не входит в набор).

Предварительно определить количество и объем 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» добавить 0.1 объема (от объема образца) раствора для осаждения PS1.

2. Перемешать пипетированием или на вортексе 3–5 с.

Примечание: например, при объеме 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 объема (от объема образца полученного в п. 1) раствора для осаждения PS2. Перемешать пипетированием или на вортексе 3–5 с.

Примечание: например, при объеме 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 gcf при +4 °С. 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 gcf при +4 °С. 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 °С).

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

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

Примечание: Буфер для растворения ДНК – 0.01 М Tris·HCl (pH 8.0). Буфер не содержит эндотоксинов и рекомендуется для растворения осадка плазмидной ДНК. Буфер подготовлен методом стерилизующей фильтрации с помощью фильтрации через мембрану с размером пор 0.1 мкм. Дополнительная фасовка Буфера EFT представлена в каталоге (Кат. № PlasmidEF-EFT).

Важно! Если объема буфера EFT недостаточно, чтобы покрыть весь осадок, то увеличить объем буфера EFT.

9. Раствор плазмидной ДНК, хранить при –20 °С. 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.

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 $\lambda = 260$ 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 и материалы полезные при выделении плазмидной ДНК и её анализе.

Реагенты и материалы для выделения НК

- Комплект буферов SB, LB, ENB (Кат. № PlasmidEF-BSx3)
- Буфер для растворения ДНК EFT (Кат. № PlasmidEF-EFT)
- EDTA, 0.5 М, 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 М, pH 8.5 (Кат. № Tris-100-8.5)
- Tris-HCl, 1 М, 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)

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.

Важно! После вскрытия тары с компонентами набора внутрь могут попасть примеси с рабочих поверхностей и из воздуха в помещении.

Важно! После вскрытия пробирку с буфером EFT хранить при -20 °С.

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