



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 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 07.02.2024.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки плазмидной ДНК из культур бактериальных клеток *E. coli*. Для выделения ДНК возможно использовать до 100 мл суспензии клеток (в зависимости от копийности и длины плазмиды).

Протокол состоит из двух основных этапов: щелочной лизис бактериальных клеток и последующая сорбция плазмидной ДНК на центрифужной колонке, промывка и элюция очищенного продукта. Ёмкость колонки до 1.5 мг. Буфер для лизиса содержит рН-индикатор синего цвета, для лучшего контроля на этапе нейтрализации. После этапа нейтрализации цвет смеси становится прозрачным.

Выделенная ДНК может быть использована для ПЦР, рестрикции, секвенирования, трансформации, трансфекции и других приложений.

Внимание! Выделение плазмидной ДНК можно проводить как на центрифугах бакетным или угловым ротором с низкой скоростью центрифугирования 3000 rcf (см. протокол 1, стр. 4), так и на центрифугах с угловым ротором с высокой скоростью центрифугирования 14000 rcf (см. протокол 2, стр. 6).

Важно! Раствор выделенной плазмидной ДНК можно концентрировать методом осаждения (см. протокол 3, стр. 8) на микроцентрифуге со скоростью центрифугирования 12000 rcf и охлаждением +4 °С.

Состав набора

	Plasmid-20 maxi	Plasmid-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 NB	4x50 мл	2x100 мл
Буфер для промывки WB1	5x50 мл	2x125 мл
Буфер для промывки WB2 (концентрат)	5x10 мл	2x25 мл
Буфер для элюции EB	60 мл	60 мл
РНКаза А, 10 мг/мл	1250 мкл	1250 мкл
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

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

Меры предосторожности

Осторожно! 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.

Осторожно! 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.

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°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 для пробирок на 50 мл, бакетный или угловой ротор, скорость 3000 или 14000 gcf;
- **Опционально (протокол 3, осаждение плазмидной ДНК):**
Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 gcf, 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:

Подготовка буфера WB2.

- **1 выделение, 10 мл WB2.** К 2 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 8 мл этанола (96-100%), чтобы получить 10 мл буфера WB2. Перемешать.
- **20 выделений. Вариант 1.** К 10 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 40 мл этанола (96-100%), чтобы получить 50 мл буфера WB2. Перемешать.
- **20 выделений. Вариант 2.** К 25 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 100 мл этанола (96-100%), чтобы получить 125 мл буфера WB2. Перемешать.

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

Опционально (протокол 3, осаждение плазмидной ДНК). Подготовка раствора для промывки WS (80% этанол).

- **1 выделение, 500 мкл.** К 100 мкл раствора WS (концентрат, вода тип I) добавить 400 мкл этанола (96-100%).
- **20 выделений, 15 мл.** К 3 мл раствора WS (концентрат, вода тип I) добавить 12 мл этанола (96-100%).

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

Протокол 1. Выделение плазмидной ДНК с использованием низкоскоростной центрифуги (скорость до 3000 rcf)

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

1) Подготовка и лизис образцов

1. Осадить бактериальные клетки из 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 (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! 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 NB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5–10 раз до получения однородной смеси. Инкубировать 5 минут.

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. Центрифугировать 60 мин, 3000 rcf.

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, аккуратно переносить супернатант на колонку, избегая захвата осадка.

2. Повторно нанести на ту же 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 gcf 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 3 мин, 3000 gcf.

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). Элюировать 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).

4. Элюат, 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 с использованием высокоскоростных центрифуг (скорость до 14000 rcf)

Для выделения плазмидной ДНК использовать 50–100 мл суспензии бактериальных клеток (количество зависит от копияности и длины плазмиды). Все процедуры проводить при 15–25°C.

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. 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! 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 NB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5–10 раз до получения однородной смеси. Инкубировать 5 минут.

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. Центрифугировать 20 мин, 14000 rcf.

2) Нанесение на колонку.

1. 12.5 мл супернатанта нанести на колонку. Центрифугировать 1 мин, 14000 rcf. Удалить фильтрат.

Примечание: если не все частицы осели на дно после центрифугирования, аккуратно переносить супернатант на колонку, избегая захвата осадка.

2. Повторно нанести на ту же колонку оставшиеся 12.5 мл супернатанта. Центрифугировать 1 мин, 14000 rcf. Удалить фильтрат.

3) Промывка колонки.

1. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 1 мин, 14000 rcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 10 мл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 1 мин, 14000 rcf. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

3. Центрифугировать колонку 3 мин, 14000 gcf 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 1 мин, 14000 gcf.

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). Элюировать 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).

4. Элюат, 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. Осаждение плазмидной ДНК с использованием высокоскоростных центрифуг для микропробирок (скорость 12000 gcf)

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

Предварительно определить количество 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 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 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 объема буфера EB недостаточно, чтобы покрыть весь осадок, то увеличить объем буфера EB.

9. Раствор ДНК, хранить при -20°C . Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (рН 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 $\lambda = 260$ 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).

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