Инструкция по применению

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 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 экстрации 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 копийности и длины плазмиды).

Набор представлен в трёх форматах:

- Формат «mini» - выделение плазмидной ДНК из 1-5 мл ночной культуры *E. coli* в центрифужных пробирках объёмом 1.5 мл.
- Формат «midi» - выделение плазмидной ДНК из 5-50 мл ночной культуры *E. coli* в центрифужных пробирках объёмом 15 мл.
- Формат «maxi» - выделение плазмидной ДНК из 50-100 мл ночной культуры *E. coli* в центрифужных пробирках объёмом 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 плазмидной ДНК	1.5 мл	15 мл	50 мл
Буфер для суспендирования 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 °C;
- 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
Объём 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! 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.

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^{0}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 rcf при +4^{0}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 вортексирование.
3. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре.
4. Центрифугировать 1 мин, 12000 rcf 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.

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 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.

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^{0}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 rcf при +4^{0}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 вортексирование.
3. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре.
4. Центрифугировать 1 мин, 12000 rcf 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.

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 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.

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^{0}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 rcf при +4^{0}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 rcf 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 λ = 260 нм.
Посчитать концентрацию ДНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:
A_{260} * разбавление * 50 мкг/мл.
Характерные соотношения оптической плотности A_{260}/A_{280} ~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).
- РНКаза А (Кат. № ER-500).
- Раствор Tris-HCl, 1 M, pH 7.5 (Кат. № Tris-100-7.5).
- Раствор Tris-HCl, 1 M, pH 8.5 (Кат. № Tris-100-8.5).
- Раствор EDTA, 0.5 M, 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! Закрыть бутыль, содержащую буфер LB, сразу после использования, чтобы избежать подкисления при попадании CO_2 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

ISO 9001:2015
13485:2016

ПОДПИСЫВАЙТЕСЬ НА НАШУ ГРУППУ ВК
vk.com/biolabmix

ЗАХОДИТЕ НА НАШ ТЕЛЕГРАМ КАНАЛ
t.me/biolabmix