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 Mini для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток

Кат. номер Plasmid-10-mini, Plasmid-50-mini, Plasmid-250-mini

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 24.04.2026.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки плазмидной ДНК из культур бактериальных клеток *E. coli.* Для выделения ДНК возможно использовать до 5 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. Выход плазмидной ДНК может достигать 5-50 мкг и зависит от линии клеток, копийности и длины плазмиды.
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, рестрикции, секвенирования, трансформации, трансфекции и других приложений.

Состав набора

	Plasmid-10 mini 10 выделений	Plasmid-50 mini 50 выделений	Plasmid-250 mini 250 выделений	
			Вариант 1	Вариант 2
Буфер для суспендирования SB	3 мл	15 мл	2x50 мл	100 мл
Буфер для лизиса LB (содержит pH-индикатор)	3 мл	15 мл	5x15 мл	5x15 мл
Буфер для нейтрализации NB	3 мл	15 мл	2x50 мл	100 мл
Буфер для промывки WB1	5.5 мл	30 мл	3x50 мл	2x75 мл
Буфер для промывки WB2 (концентрат)	1.1 мл	6 мл	3x10 мл	2x15 мл
Буфер для элюции EB	5 мл	15 мл	60 мл	60 мл
РНКаза А, 10 мг/мл	40 мкл	200 мкл	1000 мкл	1000 мкл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца	10 шт.	50 шт.	250 шт.	250 шт.

Набор Plasmid-250-mini 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 содержит 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 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 микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 rcf;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл;
- Этанол, 96-99% раствор.

Перед началом работы:

Опционально. Подготовка буфера SB.

Примечание: при выделении ДНК буфер SB и РНКазу А допускается добавлять последовательно, тогда этот этап подготовки буфера SB можно пропустить. Если предпочтительно использовать единый раствор буфера SB и РНКазы А, то его подготовка приведена ниже.

- 1 выделение. К 250 мкл буфера SB добавить 2 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.
- **10 выделений**. К 3 мл буфера SB добавить 24 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.
- **50 выделений**. К 15 мл буфера SB добавить 120 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.
- 250 выделений. Вариант 1. К 50 мл буфера SB добавить 400 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.
- 250 выделений. Вариант 2. К 100 мл буфера SB добавить 800 мкл раствора РНКазы А. Перемешать.
Внимание! Смесь буфера SB и РНКазы А хранить при 2-8 °C не более 1 месяца.

Подготовка буфера WB2.
- 1 выделение, 500 мкл WB2.
К 100 мкл буфера WB2 (концентрат) добавить 400 мкл этанола.
- **10 выделений**. К 1.1 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 4.4 мл этанола, чтобы получить 5.5 мл буфера WB2.
- **50 выделений**. К 6 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 24 мл этанола, чтобы получить 30 мл буфера WB2.
- 250 выделений. Вариант 1. К 10 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 40 мл этанола, чтобы получить 50 мл буфера WB2.
- 250 выделений. Вариант 2. К 15 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 60 мл этанола, чтобы получить 75 мл буфера WB2.

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.

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 3-15 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.

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 250 мкл буфера SB. Ресуспендировать осадок пипетированием.
3. Добавить 2 мкл РНКазы А.

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

4. Добавить 250 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.

5 Инкубировать полученную смесь не более 3 мин.

5. Добавить 250 мкл 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!

6. Инкубировать 10 минут.
7. Центрифугировать 15 мин, 12000 rcf.

2) Нанесение на колонку.

1. Супернатант нанести на колонку. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

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

3) Промывка колонки.

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

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

4) Элюция ДНК.

1. Перенести колонку в новую микропробирку на 1.5-2 мл (не входит в состав набора). Плотно прижать колонку к пробирке.
2. Нанести на центр фильтра колонки от 60 до 200 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25^{0}C). Центрифугировать 1 мин, 12000 rcf.

- Рекомендуемый объём элюции 100 мкл. При элюции меньшим объёмом требуется аккуратно наносить аликвоту буфера на центр фильтра колонки, иначе возможно снижение выхода ДНК.
- При элюции в 100-200 мкл выход ДНК выше на 10-30%, чем при элюции в 60 мкл.
- Повторная элюция новой аликвотой буфера для элюции EB или элюатом позволяет увеличить выход ДНК на 10-30%. При элюции объёмом менее 100 мкл рекомендуется использовать новую аликвоту буфера для элюции. При элюции объёмом 100 мкл и более допускается повторно нанести элюат на колонку.

Буфер 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. Элюат, 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 (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 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)

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.