евроген

Plasmid Miniprep Color

Набор для выделения плазмидной ДНК

Номера по каталогу:
BC121S — на 50 реакций
BC121L — на 250 реакций

Инструкция по применению

Версия 3 от 26 сентября 2023 г.

Оглавление

1. Назначение 3
2. Преимущества 3
3. Состав 3
4. Условия хранения и транспортировки 4
5. Метод 4
6. Основные характеристики 4
7. Меры предосторожности 5
8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы 5
9. Биологический материал 5
10. Протокол 6

1. Назначение

Набор предназначен для быстрого выделения плазмидной ДНК высокой степени очистки из культуры клеток *E. coli*.

Выделенная ДНК пригодна для ПЦР, секвенирования, рестрикции, трансформации, трансфекции и других молекулярно-биологических приложений.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Преимущества

- Окрашенные растворы позволяют легко контролировать правильность выполнения протокола, полноту лизиса клеток и эффективность нейтрализации лизата.
- Выделение до 20 мкг плазмидной ДНК из 2 мл бактериальной культуры.
- Выделенная ДНК не имеет примесей низкомолекулярных органических соединений и белков.
- ДНК не контаминируется молекулами РНК (за счет присутствия РНКазы А в растворе).
- В состав набора входят колонки с крышкой, что позволяет уменьшить уровень загрязнения рабочего пространства и снизить вероятность кросс-контаминации образцов.

3. Состав

Компоненты набора	BC121S 50 реакций	BC121L 250 реакций
РНКаза А (лиофилизированная)	1.5 мг	7.5 мг
Ресуспендирующий раствор Color	14 мл	70 мл
Лизирующий раствор Color	14 мл	70 мл
Нейтрализующий раствор Color	19 мл	95 мл
Промывочный раствор (концентрат)	20 мл	50 мл
Элюирующий раствор	3 мл (2 x 1.5 мл)	15 мл
Раствор для удаления эндотоксинов	11 мл	55 мл
Ацетат натрия, 3М (pH 5.2)	600 мкл	3 мл (2 x 1.5 мл)
Спин-колонки SCC с крышками в комплекте с собирательными пробирками	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)

4. Условия хранения и транспортировки

Все компоненты набора хранятся и транспортируются при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте в упаковке производителя.

«Ресуспендирующий раствор Color» после добавления «РНКазы А» хранить при +4 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Метод

На стадии лизиса в щелочных условиях происходит разрушение клеточных стенок бактерий, денатурация белков и геномной ДНК. Добавление «Нейтрализующего раствора Color» приводит к образованию творожистой взвеси ярко-желтого цвета, состоящей из белков и геномной ДНК, в то время как короткая плазмидная ДНК остается в растворе. В присутствии хаотропных солей плазмидная ДНК сорбируется на мембране колонки, тогда как примеси различной природы удаляются в процессе промывки. На последней стадии происходит элюция очищенной плазмидной ДНК с мембраны.

6. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Выход ДНК	Выход высококопийной плазмиды pAtlas из 2 мл ночной культуры – до 20 мкг*
Объем выделенного образца	50 мкл
Емкость колонок	До 20 мкг
Чистота ДНК	A260/A280 ≥ 1.8 A260/A230 ≥ 1.8

*Выход плазмидной ДНК зависит от количества копий плазмиды, условий культивирования и выбранного штамма *E. coli*.

7. Меры предосторожности

Компоненты набора «Лизирующий раствор Color» и «Нейтрализующий раствор Color» содержат вещества, требующие обеспечения специальных мер безопасности:

– хранить в плотно закрытой таре;
– не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу;
– при попадании компонентов набора на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды;
– при работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением от 11 000 g.
- Термостат.
- Вортекс.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и 2 мл.
- Наконечники для дозатора с фильтрами.
- Этанол 96%.

9. Биологический материал

2 мл ночной культуры клеток *E. coli*.

10. Протокол

Общее время работы: от 15 минут.

10.1. Подготовка растворов

1.1. Добавьте этиловый спирт (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором» в количестве:

BC121S — 90 мл,
BC121L — 220 мл.

Тщательно перемешайте раствор переворачиванием, нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

- *При редком использовании набора не рекомендуется добавлять этанол в весь объем концентрата «Промывочного раствора». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (130 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (585 мкл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.*

- *Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора», например, делайте отметки на флаконе и в конце инструкции на странице «Для заметок». Если вам понадобится добавить этанол ко всему оставшемуся объему концентрата «Промывочного раствора», то необходимое количество этанола следует рассчитать по формуле:*

$$VE = (VW_{исх} - VW_{расх}) \times \frac{VE_{исх}}{VW_{исх}} \text{ (мл)},$$

где VE — объем этанола, который нужно добавить, VWисх — объем концентрата «Промывочного раствора», указанный на этикетке, VWрасх — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора», VEисх — объем этанола по инструкции, см. п.1.1.

1.2. Растворите «РНКазу А» в «Ресуспендирующем растворе Color». Для этого добавьте 0.5 мл «Ресуспендирующего раствора Color» в пробирку с лиофилизированной «РНКазой А». После растворения перенесите полученный раствор «РНКазы А» во флакон с «Ресуспендирующим раствором Color». Плотно закройте крышку флакона и перемешайте. Нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

- *Приготовленную смесь «Ресуспендирующего раствора Color» и «РНКазы А» хранить при +4 °С.*

1.3. Если в «Нейтрализующем растворе Color» образовался осадок, прогрейте его при температуре от +37 до +50 °С до полного растворения осадка.

1.4. Для переосаждения плазмидной ДНК подготовьте 70% этанол. В пробирку на 50 мл (типа Falcon) добавьте 13.5 мл деионизированной воды и доведите объем до 50 мл 96%-ным этанолом.

10.2. Выделение ДНК

2.1. Подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 2 мл по числу образцов.

2.2. Перенесите 2 мл бактериальной культуры в промаркированную пробирку.

2.3. Осадите клетки центрифугированием (не более 1 700 g) в течение 1 минуты. Полностью удалите супернатант.

2.4. Добавьте 250 мкл «Ресуспендирующего раствора Color» к осадку и тщательно перемешайте на вортексе до образования мутной суспензии бледно-розового цвета.

2.5. Добавьте 250 мкл «Лизирующего раствора Color». Содержимое пробирки осторожно перемешайте переворачиванием, пока лизат не приобретет фиолетовый цвет и не станет прозрачным. Инкубируйте при комнатной температуре не более 1 минуты.

> **ВНИМАНИЕ!** Не используйте вортекс: быстрое перемешивание приводит к разрыву бактериальной хромосомы и загрязнению плазмиды геномной ДНК.

> **ВНИМАНИЕ!** Увеличение времени инкубации в лизирующем растворе приводит к контаминации плазмиды геномной ДНК.

2.6. Добавьте 350 мкл «Нейтрализующего раствора Color». Осторожно перемешайте переворачиванием содержимое пробирки до образования творожистой взвеси ярко-желтого цвета. Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту.

► *Не используйте вортекс.*

2.7. Центрифугируйте пробирку в течение 10 минут с ускорением 11 000 g.

> **ВНИМАНИЕ!** Это и последующие центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

2.8. Подготовьте и промаркируйте колонки с собирательными пробирками по числу образцов.

2.9. Перенесите осветленный супернатант в колонку и центрифугируйте (см. «Внимание») в течение 30 секунд или, если плазмиду планируется использовать для трансфекции культур эукариотических клеток, следуйте протоколу:

– Нанесите 20 мкл «Раствора для удаления эндотоксинов» на фильтр колонки.
– Перенесите осветленный супернатант в колонку.
– Центрифугируйте колонку в течение 30 с.
– Удалите фильтрат из собирательной пробирки.
– Нанесите 200 мкл «Раствора для удаления эндотоксинов» на фильтр колонки.
– Центрифугируйте колонку в течение 30 с.

2.10. Удалите фильтрат из собирательной пробирки. Колонку верните в собирательную пробирку.

2.11. Добавьте 700 мкл «Промывочного раствора» в колонку. Центрифугируйте в течение 30 с.

2.12. Удалите фильтрат из собирательной пробирки. Колонку верните в собирательную пробирку.

2.13. Центрифугируйте пустую колонку 1 минуту для полного удаления «Промывочного раствора».

2.14. Подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 1.5 мл по числу образцов.

2.15. Собирательную пробирку утилизируйте. Поместите колонку в новую промаркированную пробирку.

2.16. Оставьте колонку в пробирке с открытой крышкой при комнатной температуре на 5 минут для полного испарения остатка спирта.

2.17. Нанесите в центр мембраны 50 мкл «Элюирующего раствора».

- *Для повышения выхода ДНК можно увеличить объем элюции до 100 мкл.*
- *Для получения высоконцентрированного образца ДНК следует наоборот уменьшить объем элюции до 30 мкл.*

2.18. Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту. Центрифугируйте в течение 1 минуты. Элюат содержит очищенную ДНК.

Выделенную ДНК хранить при –20 °C до 1 года.

- *Рекомендуется переосадить выделенную плазмидную ДНК, если ее планируется использовать для трансфекции культур клеток.*

10.3. Переосаждение плазмидной ДНК этанолом

ВНИМАНИЕ! Все центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

3.1. Отберите аликвоту выделенной плазмидной ДНК в необходимом объеме в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.

3.2. Добавьте 0.1 объем (от объема акликвоты) «Ацетата натрия, 3М» и 3 объема 96% этанола. Перемешайте переворачиванием и на вортексе. Инкубируйте 2–3 минуты при комнатной температуре.

3.3. Центрифугируйте пробирку 10 минут. Запомните положение пробирки в роторе, например, перемычкой к центру (можно отметить верхнее положение маркером на крышке). При центрифугировании на дне пробирки формируется осадок ДНК.

3.4. Аккуратно откройте пробирки и удалите надосадочную жидкость. Полупрозрачный белый осадок на дне пробирки может быть незаметен.

3.5. Аккуратно по стенке пробирки добавьте 0.5 мл 70% этанола.

3.6. Поместите пробирку в ротор в том же положении, что в п. 3.3. Центрифугируйте образец в настольной центрифуге 10 минут.

ВНИМАНИЕ! Важно сохранять одинаковое положение пробирки при обоих центрифугированиях, потому что при изменении позиции пробирки при втором центрифугировании осадок может оторваться от дна пробирки и потеряться при удалении жидкости.

3.7. Аккуратно удалите надосадочную жидкость и подсушите осадок при комнатной температуре 5–10 минут. Осадок должен стать полностью прозрачным (бесцветным).

3.8. Полностью растворите осадок в необходимом объеме «Воды деионизированной, свободной от нуклеаз» (например, кат. ## PB207S/M/L, Евроген).

Очищенная ДНК хранится при температуре –20 °C до 1 года.

ВНИМАНИЕ! Осадок растворяется не сразу. Подождите 3–5 минут до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

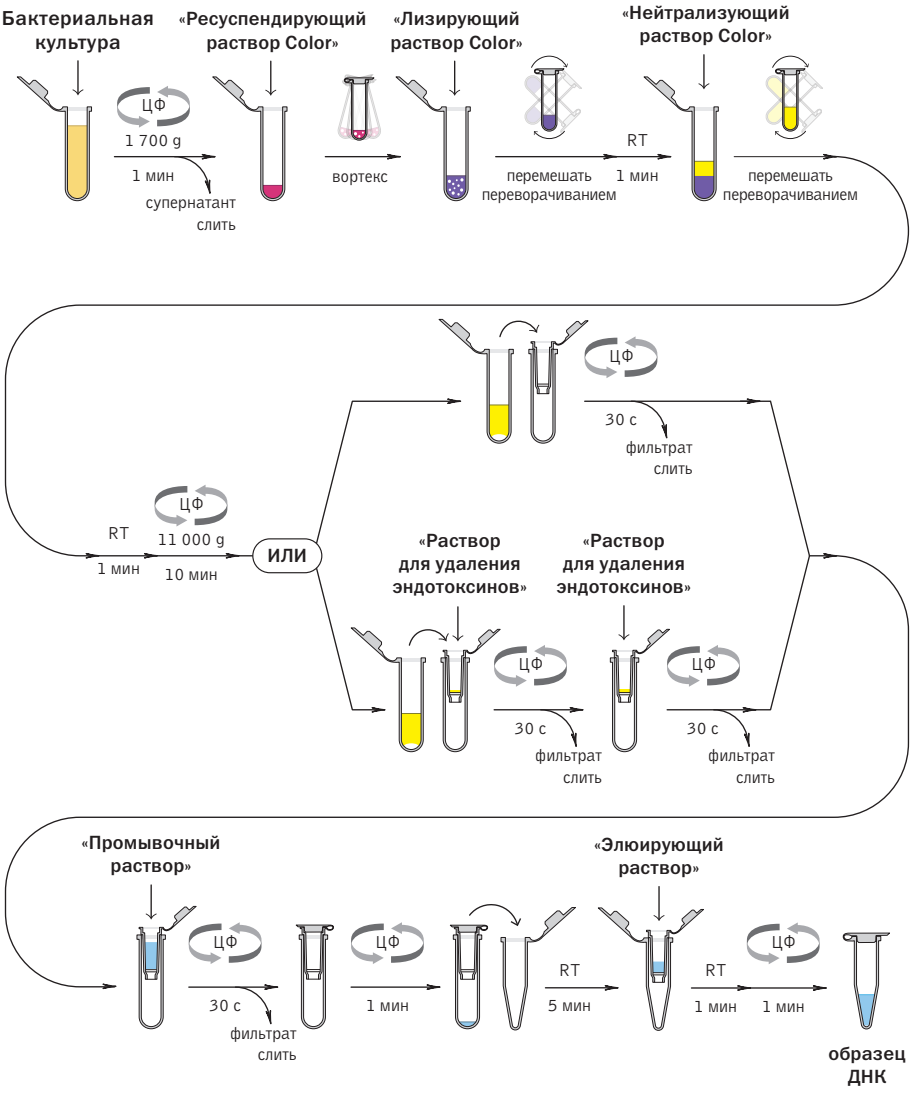

Рисунок 1 – схема выделения ДНК

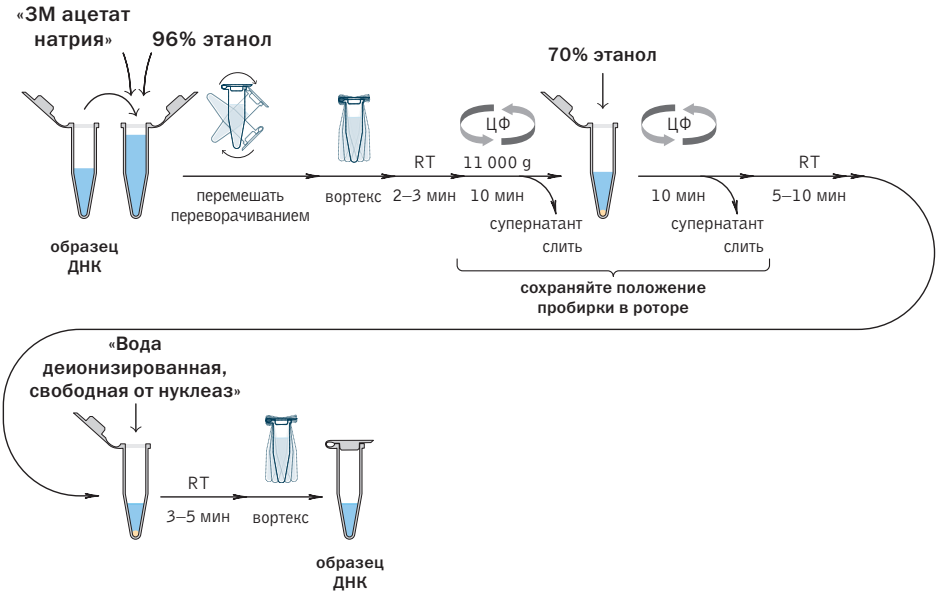

Рисунок 2 – схема переосаждения плазмидной ДНК этанолом.

Наборы и сервисы Евроген

Н ▸▸▸ – ссылка на страницу НАБОРА

С ▸▸▸ – ссылка на страницу СЕРВИСА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот Н ▸▸▸

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ Н ▸▸▸

Синтез и амплификация кДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸

Клонирование ДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸

Выявление контаминации микоплазмой Н ▸▸▸

Оценка ДНК Н ▸▸▸

Нормализация кДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸

Практикум по генной инженерии Н ▸▸▸

Генотипирование Н ▸▸▸

Синтез олигонуклеотидов и зондов С ▸▸▸

Секвенирование по Сэнгеру С ▸▸▸

Синтез генов С ▸▸▸

Сайт-направленный мутагенез С ▸▸▸

Консультация по продуктам: *support@evrogen.ru*

Подробную информацию о наших наборах и сервисах можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru