

Информация о продукте

Набор Mini для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток 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.

Протокол обновлён 03.08.2022.

Описание продукта

Набор предназначен для выделения и очистки плазмидной ДНК из культур бактериальных клеток. Протокол состоит из двух основных этапов: щелочной лизис бактериальных клеток и последующая сорбция плазмидной ДНК на кремниевой мембране, промывка и элюция очищенного продукта. На одной колонке возможно выделение до 30 мкг плазмидной ДНК. 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.

Состав набора

	Plasmid-10 mini 10 выделений	Plasmid-50 mini 50 выделений	Plasmid-250 mini 250 выделений
Буфер для суспендирования SB	3 мл	15 мл	70 мл
Буфер для лизиса LB (содержит рН-индикатор)	3 мл	15 мл	5x15 мл
Буфер для нейтрализации NB	5 мл	24 мл	110 мл
Буфер для промывки WB1	5.5 мл	30 мл	2x70 мл
Буфер для промывки WB2 (концентрат)	1.1 мл	6 мл	2x14 мл
Буфер для элюции EB	5 мл	15 мл	50 мл
РНКаза А, 10 мг/мл	25 мкл	115 мкл	550 мкл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца	10 шт	50 шт	250 шт



Биолабмикс®

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 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.

Условия хранения

Набор для выделения ДНК хранить при комнатной температуре (15-25 °С) в течение 12 месяцев.

Раствор РНКазы А хранить при температуре от -18 до -24 °С в течение 12 месяцев.

Важно! Закрывать бутылку, содержащую буфер LB, сразу после использования, чтобы избежать подкисления при попадании CO₂ из воздуха.

Условия транспортировки

Транспортирование набора, в том числе и РНКазы А, производить при температуре от +15 до +25 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше +25 °С в течение 14 суток.

Эксплуатация

Компоненты: SB, LB, NB, WB1, WB2, EB стабильны после вскрытия флаконов при температуре от +15°С до +25°С в течение всего срока годности при условии достаточной герметизации флаконов. Раствор РНКазы А стабилен после вскрытия в течение 12 месяцев.

Внимание! Не нагревать набор выше температуры +25°С, несоблюдение температурного режима хранения и транспортировки снижает активность РНКазы А и эффективность выделения.

Внимание! не хранить смесь буфера для лизиса LB и РНКазы А.

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 10000 гсф
Одноканальные дозаторы переменного объема и наконечники для них
Перчатки резиновые
Микропробирки на 1.5 мл
Этанол, 96-99% раствор

Перед началом работы:

Добавить 96-99% этанол к буферу WB2 и перемешать.

- Для получения 500 мкл буфера 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. К 14 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 56 мл этанола, чтобы получить 70 мл буфера WB2.

Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буфера WB2, поскольку со временем этанол может испариться.

Протокол выделения плазмидной ДНК.

Для выделения плазмидной ДНК использовать 1-5 мл суспензии бактериальных клеток (количество зависит от копийности и длины плазмиды). Все процедуры проводить при 15-25 °С.

1. Осадить бактериальные клетки из культуральной среды центрифугированием, 1 мин, 12000 гсф.
2. К осадку клеток добавить 250 мкл буфера SB. Ресуспендировать осадок пипетированием.
3. К суспензии клеток добавить 2 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и 250 мкл буфера для лизиса LB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5-10 раз до получения однородной смеси. Не использовать вортекс!

Важно! Закрыть 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 400 мкл 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 15 мин, 12000 гсф.



Биолабмикс®

7. 800 мкл супернатанта нанести на колонку. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.
 8. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.
 9. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.
- Примечание:** не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.
10. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 gcf для полного удаления буфера WB2.
 11. Перенести колонку в новую микроцентрифужную пробирку (не входит в состав набора) на 1.5-2 мл.
 12. Нанести на центр фильтра колонки 60 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25 °C). Центрифугировать 1 мин, 12000 gcf.

Состав буфера для элюции EB. 0.01 М Tris·HCl (pH 8.0).

Элюцию образца можно производить ТЕ буфером (0.01 М Tris·HCl, 0.001 М EDTA, pH 8.0-8.5) либо слабощелочной водой (pH 8.0-8.5), обработанной DEPC.

Элюат, содержащий ДНК, хранить при температуре -20 °C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 мМ.

Внимание! Содержание EDTA в элюате может в последующем негативно влиять на ферментативные реакции.

Анализ выделенной плазмидной ДНК.

Целостность выделенной плазмидной 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 $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Тел.: +7 (383) 363-51-91
www.biolabmix.ru
sales@biolabmix.ru