евроген

Набор Plasmid Midiprep 2.0

Кат. # BC124

Версия 5 от 3 июля 2023 г.

Набор предназначен для быстрого выделения высокоочищенной плазмидной ДНК из культуры клеток *E. coli*. Выделение ДНК основано на применении центрифужных колонок с сорбционными стекловолокнистыми мембранами.

Выход плазмидной ДНК зависит от копийности плазмиды, условий культивирования *E. coli* и состава питательной среды. Для высококопийных плазмид выход ДНК может достигать 500 мкг. Низкокопийные плазмиды выделяются в меньшем количестве.

Состав набора

Компоненты набора	Объем, количество
Спин-колонки Midi	25 шт
РНКаза А (лиофилизированная)	18 мг
Ресуспендирующий раствор	140 мл
Лизирующий раствор	140 мл
Нейтрализующий раствор	140 мл
Раствор для удаления эндотоксинов	55 мл
Промывочный раствор (концентрат)	174 мл (3 x 58 мл)
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	100 мл
Ацетат натрия, 3М (pH 5.2)	30 мл

Транспортировка: при комнатной температуре.

Хранение: при комнатной температуре до первого использования.

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

остальные компоненты — при комнатной температуре.

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

Внимание: растворы нельзя охлаждать и замораживать. При охлаждении до 15 °С и ниже в растворах возможно выпадение осадка (см. раздел «Возможные проблемы и способы их решения» на стр 6, п. 1).

Основные свойства

- Емкость колонки – 500 мкг плазмидной ДНК
- Спектральный показатель препарата плазмидной ДНК A260/A280 > 1.8
- Время выделения – около 2 часов
- Очищенная ДНК пригодна для всех молекулярно-биологических процедур (ПЦР, секвенирование, рестрикция, трансформация, трансфекция и др.)

Необходимые материалы и оборудование

- Пробирки объемом 50 мл для центрифугирования (типа Falcon)
- Микроцентрифужные пробирки на 2 мл (типа Eppendorf)
- Штатив для пробирок на 50 мл
- Центрифуга с охлаждением (ротор для пробирок на 50 мл, не менее 3 000 g)
- Настольный твердотельный термостат
- Настольная центрифуга для микропробирок, не менее 8 000 g
- Этиловый спирт (96% и 70%)

Подготовка растворов

- Добавьте по 210 мл этилового спирта (96%) в каждый флакон с концентрированным «Промывочным раствором». Плотно закройте крышку флакона и перемешайте. Рекомендуется нанести пометку о выполнении операции на крышку флакона.
- Растворите «РНКазу А» в «Ресуспендирующем растворе». Для этого добавьте в пробирку с лиофилизированной «РНКазой А» 0.5 мл «Ресуспендирующего раствора». После растворения перенесите полученный раствор «РНКазы А» во флакон с «Ресуспендирующим раствором». Плотно закройте крышку флакона и перемешайте. Нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.
- 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.

Подготовка бактериальной культуры

Вырастите ночную бактериальную суспензионную культуру. Клетки *E. coli* наращивают в питательной среде 16–20 часов при 37 °C в термостатируемом шейкере при постоянном перемешивании 200–250 об/мин. Плотность клеток должна быть около 3–5 x 10^9 клеток/мл. При такой плотности из 50 мл ночной культуры получается не более 0.9 г клеточного осадка.

ПРОТОКОЛ

I. Очистка препарата ДНК на колонке

Перед началом работы:

а. Включите охлаждение в центрифуге до +4 °С;

б. Если в «Лизирующем» или «Нейтрализующем растворе» есть осадок, прогрейте раствор на водяной бане или в термостате при +37 °С;

в. Для улучшения элюции нагрейте флакон с «Деионизированной водой» до +50 °С.

1. Перенесите 25–150 мл бактериальной культуры в пробирку на 50 мл, осадите клетки центрифугированием (3 500–3 900 g, см. рекомендации по выбору режима центрифугирования в конце протокола) 15 минут при +4 °С. Полностью удалите супернатант.

   Если выделение проводится из объема среды более 50 мл, повторите процедуру и удалите остатки культуральной среды пипеткой с поверхности осадка.

ВНИМАНИЕ! На этом этапе в работе можно сделать паузу и заморозить осадок. Продолжить работу следует с размораживания клеточного осадка и перехода к п.2.

2. Добавьте 5 мл «Ресуспендирующего раствора» с РНКазой А к осадку.

   Несколько раз интенсивно встряхните пробирку рукой так, чтобы осадок отделился от стенок и дна пробирки. Далее ресуспендируйте на вортексе. Суспензия должна стать гомогенной. Нересуспендированные комки клеток приводят к ухудшению лизиса.

3. Добавьте 5 мл «Лизирующего раствора».

   Осторожно перемешайте содержимое пробирки 4–6-кратным переворачиванием. Лизат должен стать вязким и полупрозрачным. Инкубируйте при комнатной температуре 4–5 минут. Увеличение времени лизиса приводит к частичной денатурации ДНК.

ВНИМАНИЕ! Не используйте вортекс для перемешивания. Резкое встряхивание лизата приводит к вспениванию раствора, разрывам бактериальной хромосомы и загрязнению препарата плазмиды геномной ДНК.

4. Добавьте 5 мл «Нейтрализующего раствора».

   Перемешайте содержимое, переворачивая пробирку до образования равномерной творожистой взвеси.

ВНИМАНИЕ! Не используйте вортекс для перемешивания, чтобы не нарушать целостность осадка.

5. Центрифугируйте пробирку 45 минут для осветления лизата (3 500–3 900 g) при +4 °С. После осветления на дне пробирки формируется осадок, а на поверхности надосадочной жидкости образуется флотирующая фракция в виде тонкой пленки.
6. После осветления лизата переключите температуру в центрифуге на +25 °С.
7. Поместите спин-колонку в чистую пробирку на 50 мл, пробирку установите в штатив.
8. Добавьте в центр спин-колонки 1 мл «Раствора для удаления эндотоксинов». Раствор должен равномерно смочить стекловолокно.

9. Перенесите осветленный бактериальный лизат в спин-колонку.

ВНИМАНИЕ! Аккуратно отодвиньте поверхностную пленку наконечником, стараясь не разбивать ее на мелкие фрагменты, и перенесите осветленный бактериальный лизат в колонку пипеткой, не захватывая флотирующую фракцию. Если не удается избежать захвата пипеткой мелких флотирующих фрагментов, повторите центрифугирование (см. раздел «Возможные проблемы и способы их решения» на стр 7, п. 5).

10. Центрифугируйте пробирку со спин-колонкой 3 минуты при 1 000 g при комнатной температуре. В процессе центрифугирования плазмидная ДНК сорбируется на фильтре колонки.
11. Удалите фильтрат из пробирки.
12. Добавьте 1 мл «Раствора для удаления эндотоксинов» в колонку. Центрифугируйте пробирку с колонкой 1 минуту при 3 500–3 900 g при комнатной температуре.
13. Добавьте 15 мл «Промывочного раствора» со спиртом в колонку. Центрифугируйте пробирку с колонкой 1 минуту при 3 500–3 900 g при комнатной температуре.
14. Удалите фильтрат из пробирки.
15. Повторите п. 13 и п. 14.
16. Центрифугируйте пробирку с колонкой 5 минут при 3 500–3 900 g.
17. Поместите спин-колонку в новую пробирку на 50 мл.
18. Оставьте при комнатной температуре на 10–15 минут для испарения остатка спирта.

ВНИМАНИЕ! Остатки спирта на фильтре колонки существенно снижают выходы ДНК, влияют на спектрофотометрические показатели и могут ингибировать последующие реакции. Однако пересушивание фильтра снижает эффективность выделения ДНК, поэтому не оставляйте колонки сохнуть дольше 15 минут.

19. Нанесите на фильтр спин-колонки 3 мл «Деионизированной воды», предварительно нагретой до +50 °C. Инкубируйте 1–2 минуты при комнатной температуре.
20. Центрифугируйте колонку 2 минуты для сбора очищенной ДНК при 3 500–3 900 g.
21. Выбросьте колонку, закройте крышку пробирки. Центрифугируйте препарат 5 минут при 3 500–3 900 g или более (установите максимально возможные обороты для данного типа ротора).
22. Не взбалтывая, достаньте пробирку из центрифуги. Аккуратно перенесите раствор ДНК в чистые микроцентрифужные пробирки на 1.5–2 мл, стараясь не захватывать тонкий осадок.

ВНИМАНИЕ! Этот этап требуется для осаждения микрофрагментов сорбционного фильтра, которые могут попадать в препарат при элюции. Рекомендуется оставить на дне пробирки небольшое количество жидкости (около 100 мкл), чтобы не затронуть малозаметный осадок.

Хранить полученную ДНК при -20 °C.

Если препарат планируется использовать для трансфекции культур клеток, его рекомендуется переосадить этанолом 2–4 раза. Это способствует повышению эффективности трансфекции.

II. Переосаждение плазмидной ДНК этанолом

ВНИМАНИЕ! Центрифугирование на всех этапах проводится при комнатной температуре при ускорении 10 000–13 000 g (например, для центрифуги Eppendorf Minispin: от 11 000 до 12 000 об/мин).

1. Отберите 0.4 мл выделенной плазмидной ДНК в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
2. Добавьте 40 мкл 3М ацетата натрия и 1.2 мл 96% этанола. Перемешайте переворачиванием и на вортексе. Инкубируйте 2–3 минуты при комнатной температуре.
3. Центрифугируйте пробирку в настольной центрифуге 10 минут при 10 000–13 000 g. Запомните положение пробирки в роторе, например, перемычкой к центру (можно отметить верхнее положение маркером на крышке). При центрифугировании на дне пробирки формируется осадок ДНК.
4. Аккуратно откройте пробирки и удалите надосадочную жидкость. Полупрозрачный белый осадок на дне пробирки может быть не заметен.
5. Аккуратно по стенке пробирки добавьте 0.5 мл 70% этилового спирта.
6. Поместите пробирку в ротор в том же положении, что в п. 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.

7. Аккуратно удалите надосадочную жидкость и подсушите осадок при комнатной температуре 5–10 минут. Осадок должен стать полностью прозрачным (бесцветным).
8. Полностью растворите осадок в 0.4 мл «Деионизированной воды» и повторите переосаждение.

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

9. После последнего переосаждения растворите осадок в 50–100 мкл «Деионизированной воды».

После последнего переосаждения плазмидную ДНК можно использовать для трансфекции клеточных культур. Для повышения эффективности трансфекции препарат можно переосаждать до 4 раз.

Концентрацию ДНК рекомендуется измерить на спектрофотометре/спектрофлуориметре или визуально оценить гель-электрофорезом.

Очищенную плазмидную ДНК хранить при -20 °C.

Рекомендации по выбору режима центрифугирования

Чтобы не повредить мембрану колонок, следует установить относительное ускорение центрифуги (RCF) 3 500–3 900 g.

Следите, чтобы для вашей центрифуги был правильно выбран режим центрифугирования. Калькулятор для пересчета g/RPM находится на сайте: *https://evrogen.ru/products/isolation/rcf-rpm*

Возможные проблемы и способы их решения

	Возможная причина	Варианты решения
1. При хранении в «Лизирующем» или «Нейтрализующем» растворах выпал осадок.	При охлаждении ниже 15 °C возможно выпадение в осадок SDS или солей гуанидина.	Прогрейте банки с растворами на водяной бане или в термостате при 37 °C до полного растворения осадка. Если осадок не удалось полностью растворить, при отборе растворов постарайтесь его не захватывать. Небольшой нерастворившийся осадок не влияет на функциональность реактивов.
2. При хранении в «Ресуспендирующем растворе» появилась взвесь или осадок	Возможен заpост раствора грибами или бактериями, споры которых присутствуют в воздухе.	Заменить набор.
3. На стадии лизиса раствор оказался слишком вязкий, что затрудняет перемешивание.	На старт процедуры взято слишком много биомассы.	Добавьте к вязкому лизату дополнительно по 1–1.5 мл «Ресуспендирующего» и «Лизирующего» растворов и добейтесь уменьшения вязкости образца и полного лизиса. Не забудьте соответственно увеличить объем «Нейтрализующего раствора» на следующей стадии.
4. На стадии лизиса в растворе присутствуют комочки биомассы.	На стадии ресуспендирования биомасса была недостаточно хорошо гомогенизирована.	Комочки перейдут в осадок на этапе осветления лизата, но выход плазмидной ДНК может уменьшиться. Следите за гомогенностью во время ресуспендирования.

	Возможная причина	Варианты решения
5. После осветления лизата не удается перенести его в колонку без флотирующей фракции.	Поверхностная пленка разделилась на мелкие фрагменты, которые трудно оставить на стенках пробирки.	Перенесите осветленный лизат, насколько возможно, без фрагментов осадка в чистую пробирку на 50 мл и повторно центрифугируйте пробирку 10 минут при 4 °C. Установите максимально возможные обороты для вашего типа ротора. После центрифугирования перенесите осветленный лизат в колонку пипеткой. Плавающие нерастворимые фрагменты после центрифугирования всегда переходят в осадок, который следует оставить на дне. Незначительные остатки осадка, попавшие на колонку, не помешают выделению плазмиды.
6. Осадок ДНК после переосаждения плохо растворяется.	Осадок пересушен.	Оставьте пробирку с осадком в термостате при 37 °C на 2–3 часа. После этого тщательно ресуспендируйте осадок пипеткой.
7. Препарат плазмидной ДНК содержит примеси бактериальной геномной ДНК.	Количество биомассы, взятое в работу, превышает рекомендованное по протоколу.	Не используйте более 100 мл бактериальной культуры. Контролируйте плотность биомассы и время культивирования. Рекомендованная плотность плотность клеток 3–5 x 10^9 клеток/мл. Из 50 мл ночной культуры получается около 0.5–0.9 г клеточного осадка.

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 ▸▸▸

NGS секвенирование С ▸▸▸

Синтез генов С ▸▸▸

Сайт-направленный мутагенез С ▸▸▸

Синтез органических соединений 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