

Набор Plasmid Midiprep 2.0

Кат.# BC124

Версия 02 от 8 сентября 2020 г.

Набор предназначен для быстрого выделения высокоочищенной плазмидной ДНК из культуры клеток *E. coli*. Выделение ДНК основано на применении микроцентрифужных колонок с сорбционными стекловолкнистыми мембранами, предназначенных для центрифугирования. Выход плазмидной ДНК зависит от копийности плазмиды, условий культивирования *E. coli* и состава питательной среды. Приблизительный выход ДНК для плазмид с разной копийностью представлен в таблице:

Копийность плазмиды	Объем среды	Предполагаемый выход
высокая	25–50 мл	300–500 мкг
низкая	50–150 мл	100–350 мкг

Основные свойства

- Емкость колонки — 500 мкг плазмидной ДНК
- Спектральный показатель препарата плазмидной ДНК A260/A280 > 1.85
- Низкий уровень эндотоксинов
- Время выделения от 1 часа 30 мин

Состав набора

Компоненты набора	Объем, количество
Спин-колонки Midi	25 шт
РНКаза А (лиофилизированная)	18 мг
Ресуспенсирующий раствор	120 мл
Лизирующий раствор	120 мл
Нейтрализующий раствор	120 мл
Промывочный раствор (концентрат)	174 (3 x 58 мл)
Элюирующий раствор (5 mM Tris-HCl pH 7.5)	90 мл
Раствор для удаления эндотоксинов	70 мл

Транспортировка и хранение: при комнатной температуре до первого использования; «Ресуспенсирующий раствор» после добавления «РНказы А» хранить при +4°C; остальные компоненты — при комнатной температуре.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки 1 год после поставки.

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
- Охлаждаемая центрифуга с ротором для пробирок на 50 мл, относительное центробежное ускорение не менее 3 000 g

- Настольный твердотельный термостат
- Настольная центрифуга для микропробирок, относительное центробежное ускорение не менее 8 000 g (для переосаждения препарата плазмидной ДНК)
- Этиловый спирт (96%)

Подготовка растворов

- Добавьте 210 мл этилового спирта (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором». Плотно закройте крышку флакона и перемешайте. Поставьте галочку на крышке флакона. По мере необходимости повторите процедуру для остальных флаконов с концентрированным «Промывочным раствором».
- Растворите «РНКазу А» в «Ресуспенсирующем растворе». Для этого добавьте в пробирку с лиофилизированной «РНКазой А» 0.5 мл «Ресуспенсирующего раствора». После растворения перенесите полученный раствор «РНказы А» во флакон с «Ресуспенсирующим раствором». Плотно закройте крышку флакона и перемешайте.

Подготовка бактериальной культуры

Вырастите ночную бактериальную культуру, исходя из рекомендаций по типу плазмиды. Клетки *E. coli* выращивают 16–20 часов при 37°C в термостатируемом шейкере при постоянном перемешивании 200–250 об/мин. Проконтролируйте плотность бактериальной культуры на спектрофотометре (OD₆₀₀). По окончании роста на длине волны 600 нм показатель OD₆₀₀ не менее 1.4–1.6 (плотность клеток 3–5 × 10⁹ клеток/мл). Для плазмид с разной копийностью для эффективного выделения используется различный объем суспензионной культуры (таб. 1)

Протокол

▶ Перед началом работы:

- а. Включите охлаждение в центрифуге;
- б. Если в каком-то из компонентов набора есть осадок, прогрейте этот компонент при температуре от +37 до +50°C до полного растворения осадка;
- в. Для улучшения элюции нагрейте флакон с «Элюирующим раствором» до +50°C.

1. Перенесите ночную бактериальную культуру в пробирку на 50 мл, осадите клетки центрифугированием (3 500–3 900 g) при 4°C в течение 15 минут. Полностью удалите осветленную культуральную среду. Повторите процедуру, если объем среды превышает 50 мл.
2. Центрифугируйте пробирку с осадком 30 сек. Удалите остатки культуральной среды пипеткой.
 - ▶ На этом этапе в работе можно сделать паузу и осадок заморозить. Продолжить работу следует с разморозки клеточного осадка и добавления «Ресуспенсирующего раствора».
3. Добавьте 4 мл «Ресуспенсирующего раствора» с «РНКазой А» к осадку и тщательно ресуспенсируйте (например, на вортексе). Суспензия должна стать гомогенной.
4. Добавьте 4 мл «Лизирующего раствора». Осторожно перемешайте содержимое пробирки 4–6-кратным переворачиванием, лизат должен стать вязким и полупрозрачным. Инкубируйте при комнатной температуре не более 5 минут (иначе плазмидная ДНК денатурирует).
 - ▶ Не используйте вортекс для перемешивания. Резкое встряхивание лизата приводит к вспениванию раствора, разрыву бактериальной хромосомы и загрязнению препарата плазмиды фрагментами геномной ДНК.

5. Добавьте 4 мл предварительно охлажденного «Нейтрализующего раствора», перемешайте содержимое, переворачивая пробирку до образования равномерной творожистой взвеси.
 - ▶ Не используйте вихревое течение для перемешивания.
6. Центрифугируйте пробирку 30 минут для осветления лизата (3 500–3 900 g) при комнатной температуре.
7. Поместите спин-колонку в пробирку на 50 мл, пробирку установите в штатив.
8. Добавьте в центр спин-колонки 0.5 мл «Раствора для удаления эндотоксинов» для уравновешивания колонки. Раствор должен равномерно смочить стекловолокно.
9. Перенесите осветленный бактериальный лизат в колонку.
10. Центрифугируйте пробирку со спин-колонкой 1 минуту не более 1 700–2 000 g при комнатной температуре. В процессе центрифугирования плазмидная ДНК сорбируется на фильтре колонки.
 - ▶ Центрифугирование на этапах 10 и 12 рекомендуется проводить при ускорении не более 2 000 g. На остальных этапах центрифугирование проводят при ускорении 3 500–3 900 g.
11. Удалите фильтрат из пробирки.
12. Добавьте 2 мл «Раствора для удаления эндотоксинов» в колонку. Центрифугируйте пробирку с колонкой 1 минуту при 1 700–2 000 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.п. 13 и 14.
16. Центрифугируйте пробирку с колонкой 10 минут при 3 500–3 900 g.
17. Поместите спин-колонку в новую пробирку на 50 мл.
18. Сушите при комнатной температуре 5–15 минут.
 - ▶ Остатки спирта на фильтре существенно снижают выходы ДНК и влияют на спектрофотометрические измерения.
 - ▶ Пересушивание фильтра снижает эффективность выделения ДНК.
19. Нанесите на фильтр спин-колонки 2–3 мл предварительно нагретого до 50°C «Элюирующего раствора». Инкубируйте 1–2 минуты при комнатной температуре.
20. Центрифугируйте колонку 1 минуту для сбора очищенной ДНК при 3 500–3 900 g.
 - ▶ Если в препарате появился беловатый осадок, его нужно осадить на максимальной скорости, надосадочную жидкость отобрать и перенести в чистую пробирку.
 - ▶ Концентрацию ДНК можно измерить на спектрофотометре или оценить на геле электрофорезе.
 - ▶ Полученную плазмидную ДНК можно использовать для трансфекции сразу после смыва с колонки.
 - ▶ Если остаточные эндотоксины ингибируют трансфекцию, их можно удалить путем переосаждения препарата ДНК.

Переосаждение плазмидной ДНК

- ▶ Не рекомендуется использовать изопропанол для переосаждения, т.к. следы изопропанола очень сильно снижают эффективность трансфекции.
- ▶ Центрифугирование при переосаждении на всех этапах проводится при комнатной температуре на скорости 10 000–13 000 g (например, для центрифуги Eppendorf Minispin: от 11 000 до 12 000 об/мин)

1. Отберите аликвоту 0.5 мл очищенной на спин-колонке плазмидной ДНК в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
2. Добавьте 50 мкл 3М ацетата натрия pH 5.2 и 1.4 мл 96% этанола. Перемешайте на вортексе. Инкубируйте 2–3 минуты при комнатной температуре.
3. Центрифугируйте образец в настольной центрифуге 10 минут. Запомните (или отметьте на крышке) положение пробирки в роторе, например, перемычкой к центру.
4. Аккуратно удалите осветленную жидкость. На дне пробирки должен остаться беловатый осадок.
5. Аккуратно 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.
7. Аккуратно удалите спиртовую фазу и подсушите осадок при комнатной температуре 5–10 минут. Осадок должен стать полностью прозрачным (бесцветным).
8. Растворите осадок в 50–100 мкл «Элюирующего раствора».

Хранить очищенную плазмидную ДНК при -20°C.

Рекомендации по выбору режима центрифугирования

Эффективность центрифугирования образца определяется относительным ускорением центрифуги (RCF , relative centrifuge force). Оно зависит от частоты вращения (RPM , rotation per minute) и радиуса центрифугирования. Относительное ускорение центрифуги (RCF) задается как кратное от ускорения свободного падения (g) и характеризует условия центрифугирования на любой центрифуге, вне зависимости от радиуса ротора. Величины RCF и RPM связаны между собой следующей формулой:

$$RPM = \sqrt{\frac{RCF \times 10^5}{1.118 \times r}}$$

где RPM – частота вращения в оборотах в минуту, RCF – относительное ускорение центрифуги (g), r – радиус ротора в см.

Например, для центрифуги Eppendorf MiniSpin радиус ротора равен 6 см, таким образом, 10 000 g переводится в 12 000 об/мин.

- ▶ Роторы различных моделей настольных центрифуг обладают разным радиусом, поэтому одинаковое количество оборотов в минуту для разных центрифуг будет приводить к разному относительному ускорению — т.е. разной эффективности центрифугирования. используйте приведенную выше формулу для расчета частоты вращения RPM , если ваша центрифуга не позволяет установить ускорение RCF .

При работе с колонками относительное ускорение центрифуги (RCF) должно быть не ниже 3 000 g для эффективного центрифугирования и не выше 4 000 g , чтобы не повредить мембрану колонки.

Ограничение использования

Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей.

Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10
Тел.: +7 (495) 988-4083
www.evrogen.ru
order@evrogen.ru