

T4 ДНК-лигаза

Номера по каталогу:

LK101S — на 100 реакций

LK101L — на 500 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Область применения.....	4
3. Состав	4
4. Условия хранения и транспортировки	4
5. Основные характеристики	5
6. Протокол.....	5

1. Назначение

T4 ДНК-лигаза предназначена для лигирования ДНК-вставки в плазмиду, линкерных адаптеров, сшивки одноцепочечного разрыва ДНК и циклизации линейной ДНК.

T4 ДНК-лигаза — рекомбинантный фермент, выделенный из штамма *E. coli*, несущего клонированный ген лигазы бактериофага T4.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Область применения

- Лигирование ДНК-вставки в плазмиду.
- Лигирование линкерных адаптеров.
- Сшивка одноцепочечного разрыва ДНК.
- Циклизация линейной ДНК.

3. Состав

Компоненты	LK101S 100 реакций	LK101L 500 реакций
T4 DNA ligase (50 у/μl)*	100 мкл	500 мкл (5 x 100 мкл)
5X Quick ligation buffer	200 мкл	1 мл (5 x 200 мкл)
10X Overnight ligation buffer	200 мкл	1 мл (5 x 200 мкл)

* За единицу активности T4 ДНК-лигазы принимается количество фермента, необходимое для 50% сшивки HindIII-фрагментов ДНК фага лямбда за 30 мин при 16 °С в 20 мкл реакционной смеси при концентрации ДНК 300 мкг/мл.

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

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

5. Основные характеристики

- Катализирует образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной концевыми группами двухцепочечной ДНК и использует АТФ в качестве кофактора (в присутствии Mg^{2+}).
- Подходит для быстрого и стандартного (ночного) лигирования.
- Химическая инактивация: NaCl и KCl в концентрации 200 мМ, а также ЭДТА в концентрации 20 мМ.
- ▶ *Ингибирование реакции лигирования путем добавления химических веществ приводит к необходимости очистки лигата для дальнейших ферментативных обработок или трансформации.*
- Температурная инактивация: инкубация в течение 10 минут при 65 °С или в течение 5 минут при 70 °С.

6. Протокол

6.1 Лигирование ДНК-вставки в плазмиду (вектор)

1.1 Подготовка биоматериала и компонентов

1. Произведите очистку свежеприготовленного ПЦР-продукта (присутствие следов полимеразы и буфера для ПЦР в лигазной смеси может привести к снижению эффективности лигирования в 2–3 раза).

Используйте наборы для выделения ДНК из реакционных смесей на колонках или метод фенольной экстракции с последующим переосаждением этанолом.

▶ *Для работы используйте только свежеприготовленный ПЦР-продукт. Если это невозможно, сразу после завершения ПЦР проведите очистку ампликона из реакционной смеси и заморозьте до момента постановки реакции лигирования. Очищенный и замороженный продукт пригоден к использованию в течение 1 дня.*

2. Произведите очистку линейаризованного вектора после обработки рестриктазами. Рекомендуется провести препаративную очистку вектора через 0.8–1% агарозный гель для удаления продуктов неполной рестрикции.

Используйте наборы для очистки ДНК из агарозного геля на колонках, например, Cleanup St Gel (кат. ## BC027S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген).

▶ *Очистка вектора на геле позволяет существенно снизить количество колоний, лишенных вставки.*

3. Рекомендуется разделить буферы для лигирования на аликвоты, чтобы минимизировать циклы разморозки/заморозки. Перед использованием тщательно перемешивайте буферы для лигирования.

1.2 Лигирование

► Все манипуляции проводите на льду или в холодовом штативе.

1. Рассчитайте необходимый объем компонентов реакционной смеси и замешайте в следующем порядке для каждого образца отдельно:

Компонент	Быстрое лигирование (5–15 мин. при комнатной температуре)	Стандартное лигирование (14–16 ч. при 14 °С)
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 10 мкл	до 10 мкл
5X Quick ligation buffer	2 мкл	—
10X Overnight ligation buffer	—	1 мкл
Плазмида	N нг	N нг
ПЦР-продукт	X нг*	X нг*
T4 DNA ligase	1 мкл	1 мкл

* Оптимальное соотношение однородной вставки и вектора 3 : 1 (в молярном отношении). В случае клонирования библиотек кДНК избыток вставки увеличивают до 8–10-кратного. Для расчета количества вставки для лигирования в вектор воспользуйтесь следующей формулой:

$$X \text{ (нг)}_{\text{вставки}} = \frac{\text{избыток вставки (от 3 до 10)} \times \text{длина вставки (п.о.)} \times \text{количество вектора N (нг)}}{\text{длина вектора (п.о.)}}$$

► При использовании вектора *pAL2-T* или *pKAN-T* (кат. ## TA002, TA003, *Евроген*) добавьте в реакцию 1 мкл вектора (50 нг) и 2 мкл лигазы.

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок, сбросьте капли кратким центрифугированием.

3. Инкубируйте реакцию в течение времени, рекомендованного для используемой системы лигирования.

4. После окончания реакции сразу поместите пробирку на –20 °С.

► Не храните лигат при +4 °С.

1.3 Трансформация *E.coli*

1. Используйте любой стандартный протокол трансформации *E.coli* лигазной смесью.

Число колоний, выросших на чашке, зависит от эффективности трансформации выбранного штамма компетентных клеток.

Для успешного клонирования эффективность трансформации компетентных клеток не должна быть меньше 1×10^7 КОЕ/мкг.

2. Для химической (кальциевой) трансформации используйте:

- компетентные клетки, например, XL1-Blue (кат. # СС001, Евроген);
- неочищенный лигат (инактивация лигазы не требуется) в количестве 5–10 мкл на 100 мкл клеточной суспензии.

3. Для электротрансформации (электропорации) используйте:

- компетентные клетки, например, XL1-Blue (кат. # СС004М, Евроген);
- очищенный от солей лигат в количестве 5 мкл на 100 мкл клеточной суспензии;
- стандартный протокол электропорации.

Для эффективной трансформации объем реакционной смеси не должен превышать 10% от объема компетентных клеток.

6.2 Лигирование линкерных адаптеров

2.1 Подготовка биоматериала и компонентов

1. Произведите очистку линеаризованной ДНК после обработки рестриктазами. Используйте колоночные наборы для выделения ДНК из реакционных смесей, например, Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген).

Рекомендуется подготовить линеаризованную ДНК с 5'-фосфорилированным концом (в процессе обработки ДНК рестриктазой на 5'-конце остается фосфат).

2. Подготовьте линкерные адаптеры: при использовании методики с 5'-фосфорилированным адаптером, проведите реакцию фосфорилирования полинуклеотидкиназой (ПНК, фермент катализирует перенос фосфата молекулы АТФ на 5'-конец ДНК) или закажите синтез модифицированного олигонуклеотида с 5'-фосфатом.

► Адаптеры — это химически синтезированные одноцепочечные ДНК-фрагменты (олигонуклеотиды), частично или полностью комплементарные друг другу для формирования дуплексов ДНК, которые являются субстратом для лигазы. Адаптеры могут содержать сайт рестрикции или последовательность для отжига праймера.

3. Рекомендуется разделить буферы для лигирования на аликвоты, чтобы минимизировать циклы разморозки/заморозки. Перед использованием тщательно перемешивайте буферы для лигирования.

2.2 Лигирование

► Все манипуляции проводите на льду или в холодовом штативе.

1. Рассчитайте необходимый объем компонентов реакционной смеси и замешайте в следующем порядке для каждого образца отдельно:

Компонент	Быстрое лигирование (5–15 мин. при комнатной температуре)	Стандартное лигирование (14–16 ч. при 14 °С)
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 10 мкл	до 10 мкл
5X Quick ligation buffer	2 мкл	—
10X Overnight ligation buffer	—	1 мкл
Линеаризованная ДНК	10–500 нг	10–500 нг
Адаптеры	X мкл*	X мкл*
T4 DNA ligase	1 мкл	1 мкл

* Оптимальное соотношение линеаризованной ДНК и смеси адаптеров в реакции лигирования 1:10–1:50 (в молярном отношении).

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок, сбросьте капли кратким центрифугированием.

3. Инкубируйте реакцию в течение времени, рекомендованного для используемой системы лигирования.

4. После окончания реакции сразу поместите пробирку на –20 °С .

► Не храните лигат при +4 °С.

► Инактивация фермента для большинства приложений не требуется.

2.3 Анализ реакции лигирования на агарозном геле

Если планируется анализировать продукты реакции лигирования на агарозном геле, следует учесть, что комплекс лигазы с ДНК, образующийся в реакционной смеси, может привести к смещению полос в процессе электрофореза.

Для предотвращения получения некорректных результатов следует добавить в буфер для нанесения образцов на гель EDTA (до 10 мМ) и SDS (до 1%) для разрушения комплексов ДНК с ферментом или очистить продукты лигирования от реакционной смеси.

Возможно приобрести дополнительно

Кат. #	Продукт	Количество
BC022S	Cleanup Standard	50 реакций
BC022L		250 реакций
BC023S	Cleanup Mini	50 реакций
BC023L		250 реакций
BC025S	Cleanup St PCR	50 реакций
BC025L		250 реакций
BC027S	Cleanup St Gel	50 реакций
BC027L		250 реакций
BC041S	Cleanup S-Cap	50 реакций
BC041L		250 реакций
CC001	XL1-Blue для химической трансформации	10 x 100 мкл
CC004M	XL1-Blue для электрической трансформации	6 x 40 мкл
TA002	pAL2-T вектор, лиофилизированный	25 реакций
TA003	pKAN-T вектор, лиофилизированный	25 реакций
PB207S	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	1.5 мл

Для заметок

Наборы и сервисы Евроген

Н – наборы

С – сервисы

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н**

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н**

Синтез и амплификация кДНК **Н**

Клонирование ДНК **Н С**

Выявление контаминации микоплазмой **Н**

Оценка ДНК **Н**

Нормализация кДНК **Н**

Практикум по генной инженерии **Н**

Генотипирование **Н**

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С**

Секвенирование по Сэнгеру **С**

Синтез генов **С**

Сайт-направленный мутагенез **С**

Синтез органических соединений **С**

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

**Подробную информацию о наших продуктах 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

Plasmid Miniprep 2.0

Набор для выделения плазмидной ДНК

Номера по каталогу:

BC221S — на 50 реакций

BC221L — на 250 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Преимущества	4
3. Состав	4
4. Условия хранения и транспортировки	4
5. Метод	5
6. Основные характеристики	5
7. Меры предосторожности.....	5
8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы.....	6
9. Биологический материал	6
10. Протокол.....	6
11. Возможные проблемы и способы их решения	12

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

- 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 отсутствия РНКазы А в растворе).
- В состав набора входят колонки без крышки и собирательные пробирки с крышкой, что позволяет уменьшить уровень загрязнения рабочего пространства и снизить вероятность кросс-контаминации образцов.

3. Состав

Компоненты набора	BC221S 50 реакций	BC221L 250 реакций
Спин-колонки SB в комплекте с собирательными пробирками с крышками	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
РНКазы А (лиофилизированная)	1.5 мг	7.5 мг
Ресуспенсирующий раствор	14 мл	70 мл
Лизирующий раствор	14 мл	70 мл
Нейтрализующий раствор	19 мл	95 мл
Промывочный раствор (концентрат)	20 мл	100 мл (2 x 50 мл)
Элюирующий раствор	3 мл (2 x 1.5 мл)	15 мл
Раствор для удаления эндотоксинов	11 мл	55 мл
Ацетат натрия, 3М (рН 5.2)	600 мкл	3 мл (2 x 1.5 мл)

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте в упаковке производителя.

Приготовленную смесь «Ресуспенсирующего раствора» и «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» приводит к образованию творожистой взвеси белого 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 смеси 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	$A260/A280 \geq 1.8$

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

7. Меры предосторожности

Компоненты набора «Лизирующий раствор» и «Нейтрализующий раствор» 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 до 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 дозаторов с фильтрами.
- Этанол 96%.

9. Биологический материал

2 мл ночной культуры клеток *E. coli*.

10. ПРОТОКОЛ

Общее время работы: от 20 минут.

10.1. Подготовка растворов

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

BC221S — 90 мл,

BC221L — 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, $VW_{исх}$ — объем концентрата «Промывочного раствора», указанный на этикетке, $VW_{расх}$ — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора», $VE_{исх}$ — объем этанола по инструкции, см. п.1.1.1.

1.2. Растворите «РНКазу А» в «Ресуспендирующем растворе». Для этого добавьте 0.5 мл «Ресуспендирующего раствора» в пробирку с лиофилизированной «РНКазой А». 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.

► *Приготовленную смесь «Ресуспендирующего раствора» и «РНказы А» хранить при +4 °С.*

1.3. Если в «Нейтрализующем растворе» 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 с РНКазой А к осадку и тщательно перемешайте на вортексе до образования мутной суспензии.

2.5. Добавьте 250 мкл «Лизирующего раствора». Содержимое пробирки осторожно перемешайте переворачиванием, пока лизат 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». Осторожно перемешайте переворачиванием содержимое пробирки до образования творожистой взвеси. 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 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 разбавленного «Промывочного раствора» в колонку. Центрифугируйте в течение 30 с.

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

2.13. Повторите п. 2.11 и п. 2.12.

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

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

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

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

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

▶ Для повышения выхода ДНК можно увеличить объем элюции до 100 мкл.

▶ Для получения высококонцентрированного образца ДНК следует наоборот уменьшить объем элюции до 30 мкл.

2.19. 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. Пересаживание 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 аликвоты) 3М ацетата натрия 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, перемышкой 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 «Деионизированной воды».

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

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

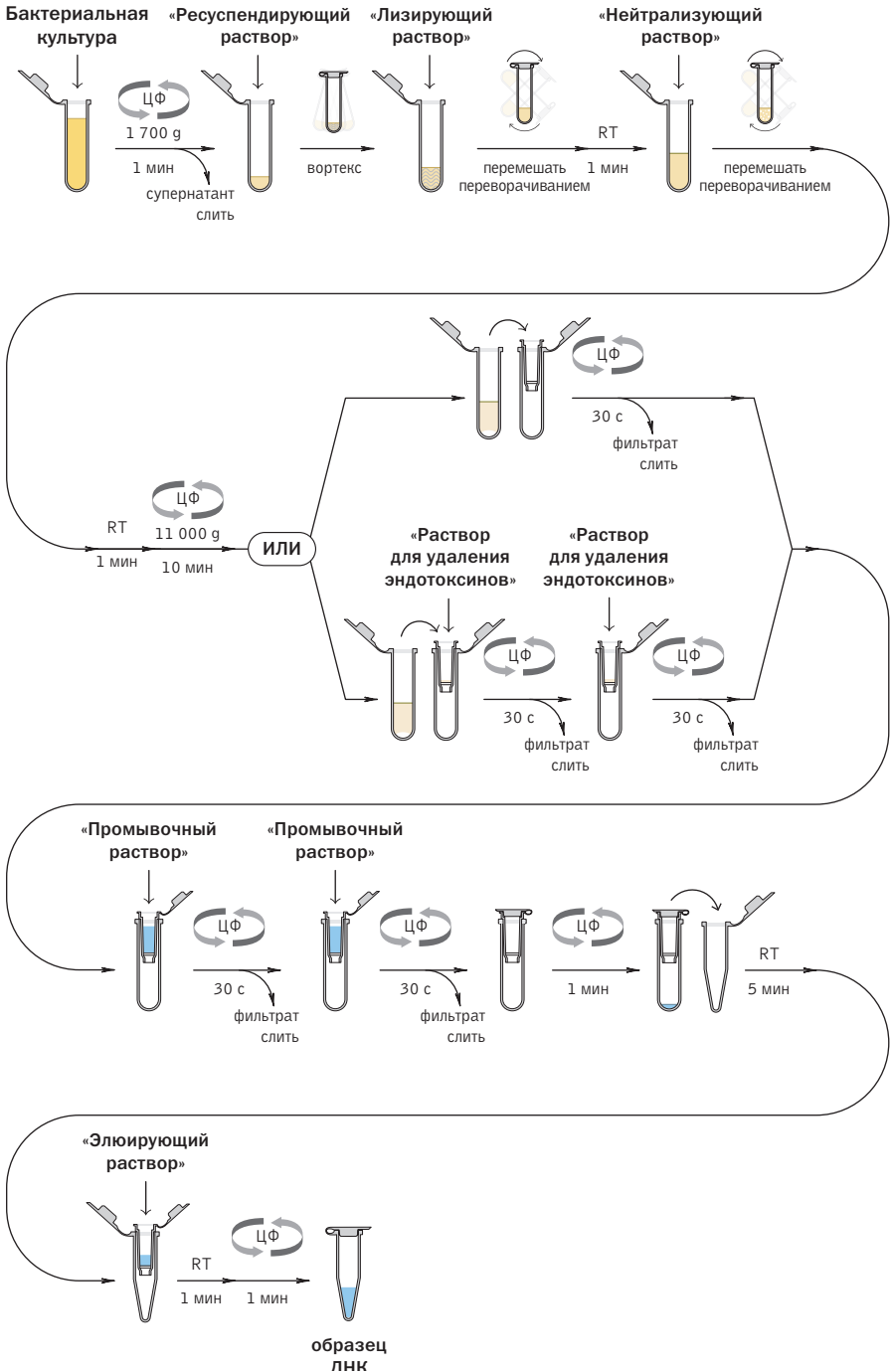


Рисунок 1 – схема выделения ДНК

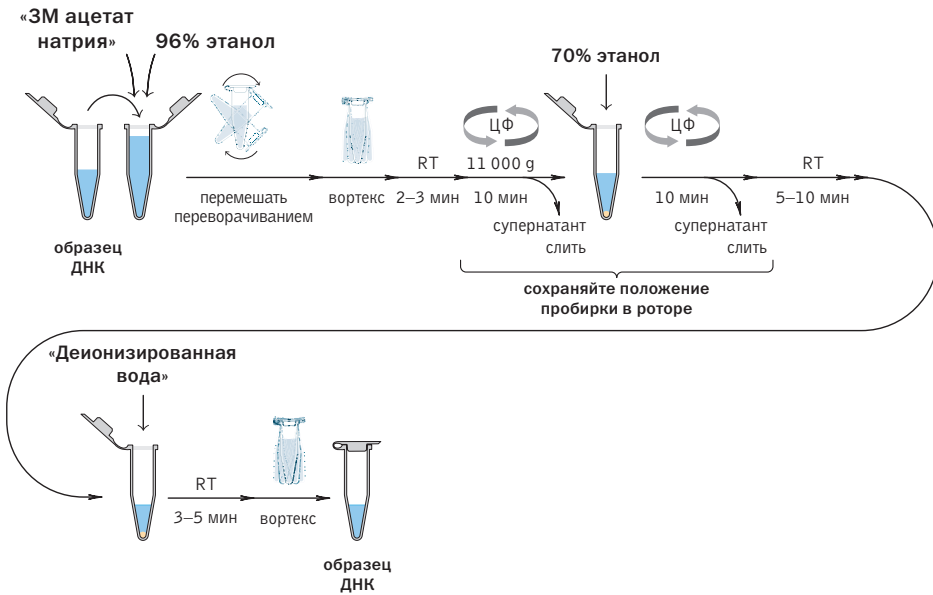


Рисунок 2 – схема переосаждения плазмидной ДНК этанолом.

11. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
1. При хранении в «Лизирующем» или «Нейтрализующем» растворах выпал осадок.	При охлаждении ниже 15 °С возможно выпадение в осадок SDS или солей гуанидина.	Прогрейте банки с растворами на водяной бане или в термостате при 37 °С 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 «Ресуспенсирующем растворе» появилась взвесь или осадок.	Возможен зарост раствора грибами или бактериями, споры которых присутствуют в воздухе.	Заменить набор.
3. На стадии лизиса в растворе присутствуют комочки биомассы.	На стадии ресуспандирования биомасса была недостаточно хорошо гомогенизирована.	Комочки перейдут в осадок на этапе осветления лизата, но выход плазмидной ДНК уменьшится. Тщательно гомогенизируйте биомассу во время ресуспандирования.
4. 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 и повторно центрифугируйте пробирку 10 минут при максимальных оборотах. После центрифугирования перенесите осветленный лизат в колонку пипеткой. Незначительные остатки осадка, попавшие на колонку, не помешают выделению плазмиды.
5. Осадок ДНК после пересадения плохо растворяется.	Осадок пересушен.	Оставьте пробирку с осадком в термостате при 37 °С на 2–3 часа. После этого тщательно ресуспандируйте осадок пипеткой.
6. Препарат плазмидной ДНК содержит примеси бактериальной геномной ДНК.	Количество биомассы, взятое в работу, превышает рекомендованное по протоколу. Время инкубации в лизирующем растворе превысило рекомендованное. Использование вортেকса после добавления лизирующего раствора.	Проверьте правильность выполнения протокола.
7. Соотношение 260/280 меньше 1.8.	Количество биомассы, взятое в работу превышает рекомендованное по протоколу.	Не используйте более 2 мл бактериальной культуры.

Наборы и сервисы Евроген

Выделение и очистка нуклеиновых кислот [Н](#)▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ [Н](#)▶▶▶

Синтез и амплификация кДНК [Н](#)▶▶▶

Клонирование ДНК [Н](#)▶▶▶ [С](#)▶▶▶

Выявление контаминации микоплазмой [Н](#)▶▶▶

Оценка ДНК [Н](#)▶▶▶

Нормализация кДНК [Н](#)▶▶▶

Практикум по геной инженерии [Н](#)▶▶▶

Генотипирование [Н](#)▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов [С](#)▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру [С](#)▶▶▶

Синтез генов [С](#)▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез [С](#)▶▶▶

[Н](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
НАБОРА

[С](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
СЕРВИСА

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