

RaissolTM
Bio

**Набор реагентов для выделения плазмидной ДНК из
бактериальной культуры
«Plasmidex Midi»**

#plasmidexmidi-25 #plasmidexmidi-50

Набор предназначен для выделения плазмидной ДНК из культуры клеток E. coli. В набор включены все необходимые реагенты для выделения плазмидной ДНК:

1. Ресуспенсирующий буфер – для разрушения конгломерата клеток;
2. Лизирующий буфер – на основе хаотропных агентов и детергентов для оптимального лизиса и денатурации геномной ДНК;
3. Нейтрализующий буфер – для стабилизации pH раствора;
4. Промывочный раствор – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей;
5. Элюирующий буфер – для элюции и хранения нуклеиновых кислот, pH=8,9;
6. РНКаза А – для удаления РНК;
7. Спин-колонки – для сорбции НК.

Буферы набора «**Plasmidex Midi**» могут храниться при комнатной температуре в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка при минимальных температурах хранения растворы следует нагреть до комнатной температуры.

Фермент **РНКаза А** хранится при -20°C.

! После добавления **РНКазы А** в **ресуспенсирующий буфер** полученный раствор следует хранить при +4°C не более 6 месяцев.

Необходимые материалы и оборудование: центрифужные пробирки объемом 15 мл; штатив для центрифужных пробирок объемом 15 мл; автоматические дозаторы переменного объема на 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл и соответствующие одноразовые наконечники; спин-колонки (присутствуют в комплекте); скоростная центрифуга для пробирок объемом 15 мл до 13 тыс. об/мин.

Подготовка растворов

Добавить весь объем РНКазы А в ресуспенсирующий буфер.

Опционально: для повышения срока хранения растворов, **РНКаза А** может добавляться в образец индивидуально в объеме 5 мкл после внесения ресуспенсирующего буфера.

Plasmidex Midi

Проведение процедуры выделения плазмидной ДНК

Лизис

1. В пробирки объемом 15 мл внести 10 мл ночной бактериальной клеточной культуры¹ и центрифугировать в течение 6 минут при 3-5 тыс. об/мин. Удалить супернатант. При необходимости повышения концентрации целевого продукта повторить операцию, добавляя к осадку клеток свежую бактериальную культуру с общим объемом культуры до 15 мл².
2. Добавить к осадку 1 мл ресуспендирующего буфера, перемешать на вортексе или пипетированием до полного разрушения конгломерата клеток.
3. Внести 1 мл лизирующего буфера. Перемешать с помощью плавного переворачивания пробирки или плавным пипетированием до прозрачности раствора. Инкубировать в течение 2-3 минут при комнатной температуре. **Не вортексировать**³.
4. Добавить 1,5 мл нейтрализующего буфера. Перемешать с помощью плавного переворачивания пробирки или плавным пипетированием до образования творожистой взвеси. **Не вортексировать**³. Инкубировать при комнатной температуре в течение 3-5 минут⁴.

Сорбция и осаждение НК

1. Центрифугировать пробирки в течение 30 минут на максимальной скорости.
2. Не задевая осадок, перенести 3 мл супернатанта в подготовленную спин-колодку.
3. Центрифугировать спин-колонтки в течение 1 минуты при макс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.

Промывка НК

1. Добавить 3 мл промывочного раствора и центрифугировать образцы в течение 1 минуты при макс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
2. Повторить пункт 1.
3. Вернуть спин-колонтки в собирательные пробирки. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при макс. об/мин для удаления остатков промывочного раствора.

Элюция НК

1. Утилизировать собирательные пробирки, перенести спин-колонтки в новые пробирки объемом 15 мл.
2. Нанести в центр мембраны спин-колонтки 250 мкл элюирующего буфера, инкубировать в течение 2-5 минут при комнатной температуре.
3. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при макс. об/мин.⁵
4. Утилизировать спин-колонтки.

Полученные растворы плазмидной ДНК могут храниться до 7 дней при температуре от +2°C до +4°C и до двух лет при температуре -20°C. По соотношению показателей поглощения на A260/A280 чистота полученного раствора ДНК соответствует $\geq 1,7$.

¹ – рекомендованное время роста ночной бактериальной культуры не более 18 часов;

² – в пробирки с осадком клеток объемом 15 мл добавить не более 5 мл ночной бактериальной культуры, центрифугировать, слить супернатант;

³ – вортексирование может привести к дроблению хромосомной ДНК и, как следствие, загрязнению препарата геномной ДНК;

⁴ – дополнительно пробирки могут быть охлаждены на льду в течение 2-3 минут для получения более плотного осадка

⁵ – элюат может быть повторно нанесен на мембрану для повышения выхода плазмидной ДНК.