



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

#plasmidexmidi-25

#plasmidexmidi-50

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

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

1.2. Назначение

Набор реагентов «Plasmidex Midi» Rai^{ssol}™ предназначен для выделения плазмидной ДНК высокого качества из 25 или 50 образцов культуры клеток E. coli.

1.3. Область применения

Набор для выделения плазмидной ДНК «Plasmidex Midi» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения плазмидной ДНК из культуры клеток E. coli с целью последующих исследований с применением разных техник ПЦР, рестрикции, трансформации, трансфекции и др. Только для научных исследований.

1.4. Принцип действия

Выделение включает полный лизис клеток, осаждение белков и хромосомной ДНК бактерий, и последующую адсорбцию плазмидной ДНК на кремниевой мембране спин-колонки, после чего следует промывка и элюция нуклеиновых кислот.

2. Характеристика набора

Компоненты набора являются одноразовыми. Набор реагентов «Plasmidex Midi» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор материалов и реагентов «Plasmidex Midi» рассчитан на 25 или 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#plasmidexmidi-25		#plasmidexmidi-50	
			Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Ресуспендирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	25	1	50	1
2	Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	25	1	50	1
3	Нейтрализующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, с резким запахом	37,5	1	75	1
4	Промывочный буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, с резким запахом	150	1	150	2
5	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха, pH=8,9	6,3	1	12,5	1
6	РНКаза А	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	0,13	1	0,25	1
7	Спин-колонки с собирательными пробирками	Сорбционная колонка объемом 4 мл с кремнеземной мембраной емкостью до 250 мкг ДНК		25		50

3. Меры предосторожности при работе с набором

Работу проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

3.1. Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим/средним медицинским или биологическим образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

3.2. Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают при должном использовании.

При работе с набором следует соблюдать стандартные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами, слизистыми оболочками и одеждой. При попадании промыть большим количеством воды в течение нескольких минут. При приеме внутрь немедленно обратиться за медицинской помощью.

Промывочный буфер содержит легковоспламеняющиеся жидкости. Все работы с легковоспламеняющимися жидкостями должны проводиться с использованием приточно-вытяжной вентиляции, вдали от огня и источников искрообразования, электрооборудование и освещение должно быть взрывобезопасно.

4. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

4.1. Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в боксе для стерильных работ с ДНК-пробами (например, бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,8, ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

4.2. Дозирующие устройства

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 20-200 мкл, 100-1000 мкл и 500-500 мкл.

4.3. Другое используемое оборудование

- Вортекс (например, Biosan Microspin FV-2400);
- скоростная центрифуга для пробирок объемом 15 мл до 13 тыс. об/мин;
- штатив для центрифужных пробирок объемом 15 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;
- морозильная камера -20°C;
- холодильник от +2 до +8°C (для хранения образцов).

4.4. Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и пробирок.

4.5. Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- Центрифужные пробирки объемом 15 мл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 5000 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

Для выделения плазмидной ДНК желательно использовать культуру клеток *E. coli*, выращенную на/в селективной питательной среде в течение 16-18 часов.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Хранение биоматериала при температуре от +2 до +4 °С в течение суток.

6. Проведение процедуры выделения плазмидной ДНК

6.1. Подготовка растворов

Добавить весь объем РНКазы А в ресуспендирующий буфер.

Опционально: для повышения срока хранения растворов РНКазы А может добавляться в образец индивидуально в объеме 5 мкл после внесения ресуспендирующего буфера.

6.2. 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.

6.3. 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-колонку.
3. Центрифугировать спин-колонки в течение 1 минуты при макс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.

6.4. 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-колонок в собирательные пробирки. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при макс. об/мин для удаления остатков промывочного раствора.

6.4. Элюция НК

1. Утилизировать собирательные пробирки, перенести спин-колонок в новые пробирки объемом 15 мл.
2. Нанести в центр мембраны спин-колонок 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-колонок.

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.

6.5. Условия хранения выделенных образцов НК

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.

6.6. Показатели выделенных образцов НК

Концентрация плазмидной ДНК зависит от штамма *E. coli* и копийности плазмиды. По соотношению показателей поглощения A260/A280 чистота полученного раствора ДНК может варьироваться относительно финальной концентрации и качества образца. Статистически чистота полученных растворов НК соответствует $\geq 1,7$.

6.7. Возможные трудности при выделении плазмидной ДНК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
Отсутствие или малая концентрация ДНК	Неселективная среда	Убедиться в наличии селекционного агента для используемой плазмиды
Большое количество геномной ДНК бактерий	Пипетирование или вортексирование было не плавным на этапах лизиса и нейтрализации	Проводить очень плавно выбранную технику перемешивания
Низкая чистота образца	Плохо промешанный раствор после добавления нейтрализующего. Случайный захват осадка после нейтрализации.	Убедиться, что не захватываются творожистые хлопья после нейтрализации лизирующего раствора при переносе супернатанта на колонку. Добавить этап охлаждения для получения более плотного осадка.

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Буферы набора «Plasmidex Midi» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C 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** необходимо хранить при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев.

После добавления фермента **РНКаза А** в **ресуспендирующий буфер**, полученный раствор следует хранить при температуре от +2 до +4°C в течение 6 месяцев.

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка **буферов** набора «Plasmidex Midi» может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

Транспортировка фермента **РНКаза А** может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре -20°C.

7.3. Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10. Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

7.4. Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортировки, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» (107014, г. Москва, ул. Короленко, 8, email: sales@sesana.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и лабораторных работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.