

Raissol[™]
Bio

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

#plasmidexminiTest-10 #plasmidexmini-50 #plasmidexmini-250

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 Mini**» 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: микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2 мл; штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл; автоматические дозаторы переменного объема на 20-200 мкл, 100-1000 мкл и соответствующие одноразовые наконечники; спин-колонки с собирательными пробирками (присутствуют в комплекте); вортекс; скоростная микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5-2 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 2 мкл после внесения ресуспенсирующего буфера.

Plasmidex Mini

Проведение процедуры выделения плазмидной ДНК

Лизис

1. В пробирки объемом 2 мл внести 1,5-2 мл ночной бактериальной клеточной культуры¹ и центрифугировать в течение 3 минут при 3-5 тыс. об/мин. Удалить супернатант. При необходимости повышения концентрации целевого продукта повторить операцию 1-2 раза, добавляя к осадку клеток свежую бактериальную культуру с общим объемом культуры до 5 мл².
2. Добавить к осадку 300 мкл ресуспендирующего буфера, перемешать на вортексе или пипетированием до полного разрушения конгломерата клеток.
3. Внести 300 мкл 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 400 мкл 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 10 минут на максимальной скорости.
2. Не задевая осадок, перенести 750 мкл супернатанта в подготовленную спин-колонку.
3. Центрифугировать спин-колонки в течение 30 секунд при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.

Промывка НК

1. Добавить 700 мкл промывочного раствора и центрифугировать образцы в течение 30 сек при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
2. Повторить пункт 1.
3. Вернуть спин-колонки 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-колонки в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.
2. Нанести в центр мембраны спин-колонок 50 мкл элюирующего буфера, инкубировать в течение 2-5 минут при комнатной температуре.
3. Центрифугировать пробирки в течение 30 секунд при макс. об/мин.⁵
4. Утилизировать спин-колонки.

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 2 мл добавить 1,5 мл ночной бактериальной культуры, центрифугировать, слить супернатант, к осадку добавить еще 1,5 мл 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.