



Набор для выделения плазмидной ДНК

Набор предназначен для выделения плазмидной ДНК из 1-2 мл культуры *E. coli*.

Состав набора:

Количество выделений в наборе	3	50
Спин-колонки	3	50
Собираательные пробирки объемом на 2 мл	3	50
РНКаза А, 5 мг/мл	20 мкл	300 мкл
Раствор I, ресуспендирующий буфер	0.5 мл	12 мл
Раствор II, лизирующий буфер	0.5 мл	12 мл
Раствор III, нейтрализующий буфер	1 мл	24 мл
Отмывочный раствор, концентрат	1.05 мл	17.5 мл
Элюирующий буфер, 5 mM Tris-Cl, pH 8.0	0.2 мл	5 мл

Условия хранения:

Раствор РНКазы хранить при +4 °C до 6 месяцев.

Остальные компоненты набора хранятся при комнатной температуре 6 месяцев.

Необходимое оборудование и материалы:

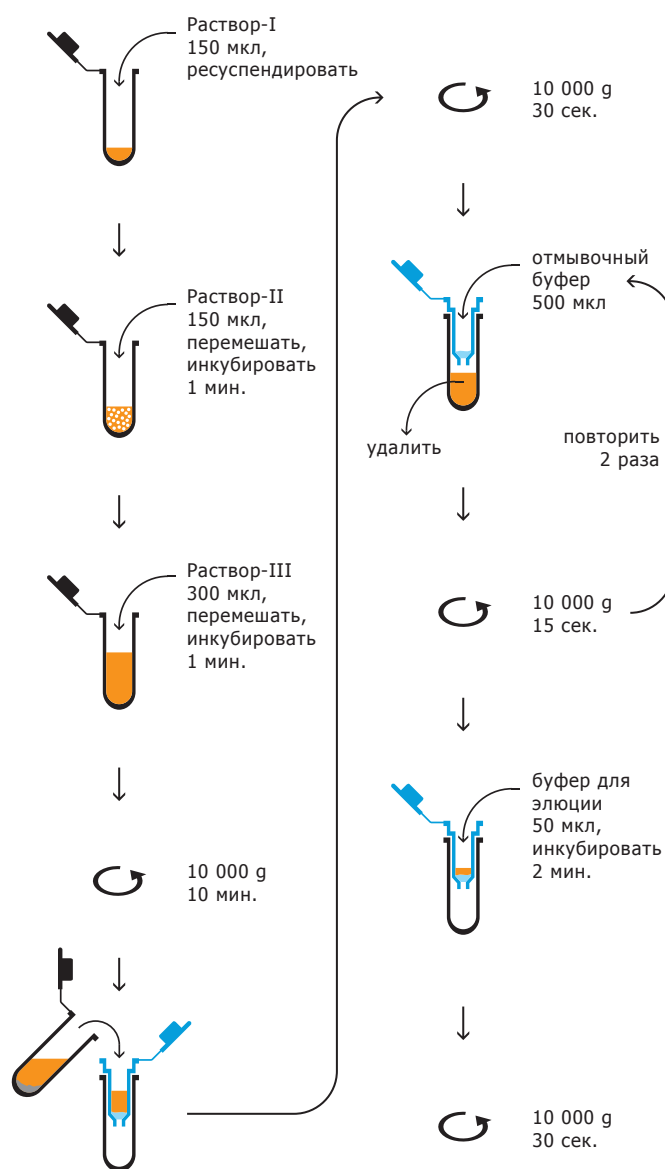
1. Микроцентрифуга.
2. Дозаторы для растворов объемом от 0,05 до 0,5 мл. Сменные наконечники.
3. Этиловый спирт 96-100%.
4. Микроцентрифужные пробирки на 1,5 - 2 мл. Перед центрифугированием со спин-колонками необходимо отрезать ножницами крышки пробирок.
5. Вортекс для ресуспендирования осадков.

Подготовка растворов:

1. Добавьте раствор РНКазы-А в Раствор-I. Полученный раствор должен храниться при +4 °C.
2. Раствор-II может давать осадок. Перед использованием растворите осадок нагреванием до 37-50 °C.
3. Добавьте во флакон с концентратом отмывочного раствора необходимое количество (указано на флаконе) этилового спирта (96-100%). Например: 2.5 мл этанола на 1.05 мл отмывочного раствора, или 41 мл на 17.5 мл соответственно.

Процедура выделения:

- Осадить культуру бактерий (1-2 мл) центрифугированием 15 сек. в микроцентрифужной пробирке на 1,5 мл. Супернатант удалить полностью.
- Добавить 150 мкл Раствора-I. Ресуспендировать осадок на вортексе.
- Добавить 150 мкл Раствора-II. Перемешать переворачиванием. Использовать вортекс не рекомендуется. Инкубировать не более 1 минуты. Во время инкубации суспензия постепенно светлеет.
- Добавить 300 мкл Раствора-III. Немедленно перемешать переворачиванием. Инкубировать 1 минуту.
- Центрифугировать на полной скорости (~ 10 000 g) 7-10 минут.
- Поместить спин-колону в собирательную пробирку. Перенести супернатант в спин-колону и центрифугировать 30 секунд. В процессе центрифугирования жидкость из колонки перемещается в собирательную пробирку, а плазмидная ДНК сорбируется на силиконовом носителе колонки.
- Удалить жидкость из собирательной пробирки и добавить 500 мкл отмывочного буфера в спин-колону. Центрифугировать 15 секунд. После центрифугирования убедитесь, что в спин-колонке не осталось жидкости.
- Повторить шаг 7.
- Удалить жидкость из собирательной пробирки и центрифугировать 1 мин для полного удаления отмывочного раствора из спин-колонки.
- Перенести спин-колону в микроцентрифужную пробирку с отрезанной крышечкой.
- Добавить 50 мкл. буфера для элюции. Важно поместить буфер непосредственно в центр мембраны спин-колонки. Инкубировать 2 минуты при комнатной температуре. Для лучшей элюции рекомендуется использовать подогретый до 60°C буфер для элюции. Центрифугировать 30 секунд.
- Перенести плазмидную ДНК в новую пробирку. Хранить при -20°C.



Рекомендации:

- Не рекомендуется использовать для элюции стандартный буфер TE.
- Оптимальный объем культуры *E.coli* - 2 мл. Необходимо увеличить время инкубации с Раствором-I до 5 минут, если используется больший объем культуры.
- В случае появления примесей РНК в конечном образце плазмидной ДНК, следует увеличить время инкубации с раствором РНКазы или увеличить концентрацию РНКазы, если она хранилась более 6 месяцев.
- Набор не предназначен для клинической диагностики.

Характеристики метода:

Данный протокол позволяет получить до 25 мкг плазмидной ДНК из 2 мл. культуры бактерий.
Длительность процедуры 15-20 мин.