



Инструкция к набору LumiSpin®
PLASMID для выделения плазмидной
ДНК на спин-колонках

Contents

Русский: Инструкция к набору LumiSpin® PLASMID для выделения плазмидной ДНК на спин-колонках	3-8
---	-----

Инструкция к набору LumiSpin® PLASMID для выделения плазмидной ДНК на спин-колонокках

Данный набор предназначен для быстрого (~ 15 минут) и высокоэффективного выделения плазмидной ДНК (до 30 мкг) из культуры клеток *Escherichia coli* на спин-колонокках. Очищенная ДНК пригодна для любых молекулярно-биологических работ, включая ПЦР, обработку эндонуклеазами рестрикции, лигирование, трансформацию, подготовку образцов для секвенирования по методу Сэнгера и NGS-секвенирования и др.

Состав набора

Компонент набора	Количество		
	11583 10 minipreps	21583 50 minipreps	31583 100 minipreps
G1250, Ресуспендирующий раствор / Resuspension Solution, 5 mL	1	—	—
11650, РНКаза А (10 mg/mL), 50 uL	1	—	—
D1450, Нейтрализующий буфер / Neutralization Buffer, 2 mL	2	—	—
H2450, Промывочный раствор А / Wash Solution А (с GuHCl), 6 mL	1	—	—
D1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 1.5 mL	1	—	—
13164, Spin column (up to 30 µg), 10 pcs	1	—	—
M1250, Ресуспендирующий раствор / Resuspension Solution, 15 mL	—	1	—
31650, РНКаза А (10 mg/mL), 150 uL	—	1	—
M1450, Нейтрализующий буфер / Neutralization Buffer, 20 mL	—	1	—

P2450, Промывочный раствор А / Wash Solution А (с GuHCl), 30 mL	—	1	—
K1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 10 mL	—	1	—
P1250, Ресуспендирующий раствор / Resuspension Solution, 30 mL	—	—	1
51650, РНКаза А (10 mg/mL), 300 μ L	—	—	1
P1550, Лизирующий раствор / Lysis Solution, 30 mL	—	—	1
R1450, Нейтрализующий буфер / Neutralization Buffer, 40 mL	—	—	1
T2450, Промывочный раствор А / Wash Solution А (с GuHCl), 60 mL	—	—	1
M2250, Промывочный раствор В / Wash Solution В (концентрат 5x для разбавления 96% этанолом), 20.0 mL	—	—	2
M1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 20 mL	—	—	1
M1550, Лизирующий раствор / Lysis Solution, 15 mL	1	1	—
K2250, Промывочный раствор В / Wash Solution В (концентрат 5x для разбавления 96% этанолом), 10.0 mL	1	2	—
Пробирка для сбора проскока, 2 мл	10	50	100
23164, Spin column (up to 30 μ g), 50 pcs	—	1	2

Хранение и транспортировка при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Настольная центрифуга с ротором для 1,5 мл пробирок со скоростью вращения не менее 10000 об/мин ($6700 \times g$);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (2 пробирки для выделения ДНК из 1 образца);
- 96 % этанол;
- (опционально) Центрифуга с ротором для 15 мл пробирок со скоростью вращения не менее $4500 \times g$ для центрифугирования ночной культуры бактерий (возможно использование настольной центрифуги для 1,5 мл пробирок).

Перед началом работы

1. Перенесите содержимое пробирки с *РНКазой А* в *ресуспендирующий раствор*, тщательно перемешайте. Поставьте отметку о добавлении РНКазы на крышке.
2. Разбавьте концентрат *промывочного раствора В* в 5 раз 96 % этанолом (к указанному на банке объему концентрата добавьте 4 объема 96 % этанола), поставьте отметку о добавлении этанола на крышке.
3. При наличии осадка в *лизирующем растворе*, *нейтрализующем буфере*, *промывочном растворе А* прогрейте их в термостате до температуры не выше $+50^{\circ}\text{C}$ и дождитесь полного растворения осадка. После этого охладите растворы до $+25^{\circ}\text{C}$.

Выделение плазмидной ДНК

Работы следует выполнять при комнатной температуре, все центрифугирования (если иное прямо не оговорено) при 10000–13000 об/мин (6700 × *g*).

Не используйте для выделения более 30 ОЕ (оптических единиц, OD₆₀₀) культуры (например, 15 мл при плотности культуры OD₆₀₀=2 ОЕ). В случае необходимости использовать большее количество клеток для выделения плазмидной ДНК, следуеткратно увеличить объемы *ресуспендирующего раствора*, *лизирующего раствора*, *нейтрализующего буфера*, а супернатант наносить на колонку в несколько этапов.

1. 2,5–7 мл ночной культуры бактерий (10–15 мл в случае выделения низкокопийных плазмид) центрифугируйте 5 минут, 5000 об/мин (4500 × *g*) или 1 мин, 13000 об/мин (10000 × *g*). Слейте супернатант, полностью удалите остатки культуральной жидкости.
2. Ресуспендируйте осадок клеток в 250 мкл *ресуспендирующего раствора*. Перенесите суспензию клеток в новую 1,5 мл пробирку.
3. Добавьте к суспензии клеток 250 мкл *лизирующего раствора*, аккуратно перемешайте путем переворачивания пробирки 4–6 раз. Убедитесь, что мутный раствор стал полупрозрачным и вязким, и сразу же переходите к следующему шагу.

! В случае выделения плазмидной ДНК из 10–15 мл культуры следует перемешивать до тех пор, пока раствор станет полупрозрачным и вязким, для этого может потребоваться большее число переворачиваний.

! Не используйте вортекс для перемешивания, так как это может привести к фрагментации хромосомной ДНК.

4. Добавьте 350 мкл *нейтрализующего буфера*, аккуратно перемешайте путем переворачивания пробирки 4–6 раз. После этого этапа в пробирке должен образоваться осадок в виде белых хлопьев.

! В случае выделения плазмидной ДНК из 10–15 мл культуры после перемешивания необходимо кратковременно встряхнуть содержимое пробирки (в течение нескольких секунд).

5. Центрифугируйте 5 мин.
6. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, аккуратно перенесите на колонку надосадочную жидкость. Центрифугируйте 30 сек. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно.

! (Опционально) Для полного удаления нуклеаз при выделении из end A+ штаммов и удаления эндотоксинов нанесите на колонку 500 мкл промывочного раствора А (использование этого раствора может приводить к снижению выхода плазмидной ДНК на 20 %). Центрифугируйте 30 сек. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно.

7. Нанесите на колонку 500 мкл промывочного раствора В, центрифугируйте 30 сек. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно.
8. Нанесите на колонку 500 мкл промывочного раствора В, центрифугируйте 3 мин.
9. Поместите колонку в новую 1,5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл элюирующего буфера. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 2 минуты. Выделенная ДНК находится в элюате.

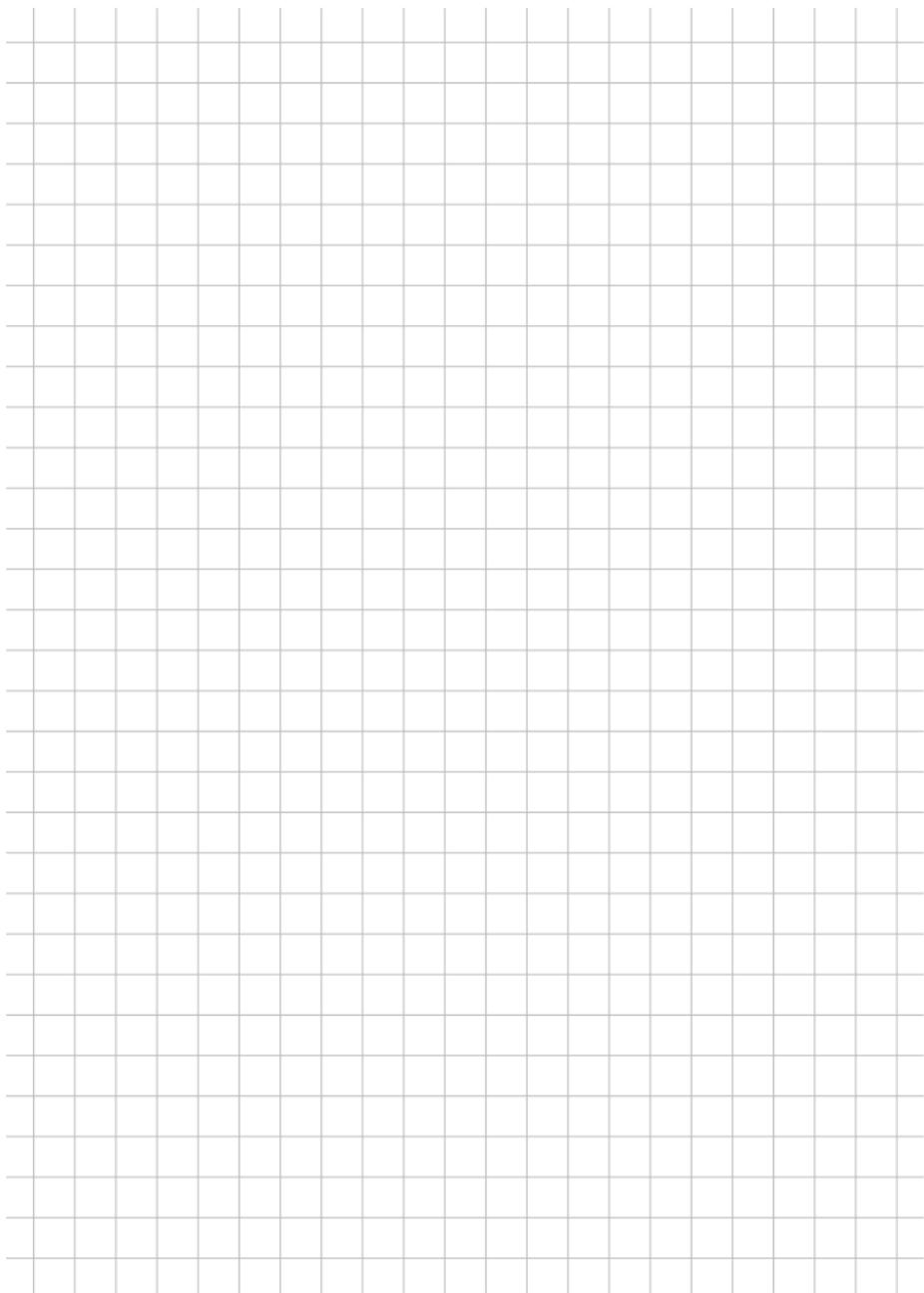
! Для получения наибольшей концентрации ДНК используйте меньшие объёмы элюирующего буфера. Не рекомендуется использовать менее 50 мкл, так как мембрана колонки может не полностью смочиться, что приведет к снижению выхода ДНК. Для наибольшего выхода ДНК с колонки используйте больший объём элюирующего буфера (100 мкл).

! При необходимости элюцию можно проводить деионизованной водой.

Примечание

Если необходимо разбавить раствор при измерении концентрации ДНК, то для разбавления следует использовать только буфер TE pH 8,5 или *элюирующий буфер* из набора. В противном случае можно получить некорректные значения OD_{260}/OD_{280} и неверно определить содержание ДНК в растворе.

Хранение выделенной ДНК: в морозильной камере (-20°C), кратковременно при +4°C.





22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

