



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 A / Wash Solution A (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 A (10 mg/mL), 300 $\mu$ L	—	—	1
P1550, Лизирующий раствор / Lysis Solution, 30 mL	—	—	1
R1450, Нейтрализующий буфер / Neutralization Buffer, 40 mL	—	—	1
T2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 60 mL	—	—	1
M2250, Промывочный раствор B / Wash Solution B (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 B / Wash Solution B (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 $\mu$ g), 50 pcs	—	1	2

Хранить 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,  $OD_{600}$ ) культуры (например, 15 мл при плотности культуры  $OD_{600}=2$  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](http://www.lumiprobe.com)

