



Инструкция по применению

GentaSpin

Plasmid Miniprep Plus

Набор для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток ГентаСПИН Минипреп Плюс

Версия 1 от 01.09.2022

1. ОПИСАНИЕ

Набор предназначен для выделения плазмидной ДНК из бактерий.

Принцип работы набора основан на щелочном лизисе обработанного РНКазой биоматериала с последующим селективным связыванием ДНК из осветленного лизата на силиконизированной мембране колонки. На стадии лизиса разрушаются клеточные стенки бактерий, происходит денатурация белков и геномной ДНК. Нейтрализация щелочного лизата приводит к образованию светлой творожистой взвеси, состоящей из дебриса, белков и геномной ДНК, плазмидная ДНК остается в растворе. После нанесения на мембрану колонки происходит сорбция плазмидной ДНК, тогда как оставшиеся примеси в виде солей, метаболитов, липидов и др. удаляются на стадии промывок. На финальной стадии происходит элюция плазмидной ДНК с мембраны в раствор.

Окрашенные растворы в наборе позволяют контролировать правильный порядок добавления компонентов, полноту лизиса и нейтрализации.

Набор предназначен только для научных исследований.

2. СОСТАВ

Компонент	20 выделений	50 выделений	250 выделений
	REF: KI-GSPP-XS	REF: KI-GSPP-S	REF: KI-GSPP-L
Рибонуклеаза А (лиофилизированная)	1 мг	3 мг	15 мг
Раствор RR 	11 мл	30 мл	150 мл
Раствор LA 	11 мл	30 мл	150 мл
Раствор NY 	16 мл	45 мл	225 мл
Раствор CW	5 мл	20 мл	100 мл (2*50 мл)
Раствор SE	3 мл	10 мл	50 мл



Инструкция
GentaSpin Plasmid Miniprep Plus

Версия 1
от 01.09.2022
Стр 2

Спин-колонки для выделения плазмидной ДНК	20 шт	50 шт	250 шт
Пробирки на 2 мл без крышек	20 шт	50 шт	250 шт

3. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ

Все компоненты набора хранятся и транспортируются при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте в упаковке производителя.

Раствор RR после добавления РНКазы А хранить при +4 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

4. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Биоматериал	Культура клеток <i>E.Coli</i> , 2-10 мл, плотность не более 4 OD
Размер плазмиды	Не более 25 kb
Выход продукта	до 25 мкг из 2 мл биомассы до 60* мкг из 6-10 мл биомассы
Объем элюции	50-100 мкл
Чистота	A260/280 = 1,80±0,05; A260/230 ≥ 2,1
Время выделения	15-20 минут
Выделенная плазмидная ДНК пригодна для применений	Рестрикция, трансформация, секвенирование, ПЦР, трансфекция

**выход продукта зависит от копийности плазмиды, объема культуры и условий культивирования*

5. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Настольная центрифуга высокоскоростная (до 12 000 g)
- Центрифуга с ротором для пробирок на 15 мл и 50 мл, дающая ускорение не меньше 3000 g.
- Вортекс



Инструкция GentaSpin Plasmid Miniprep Plus

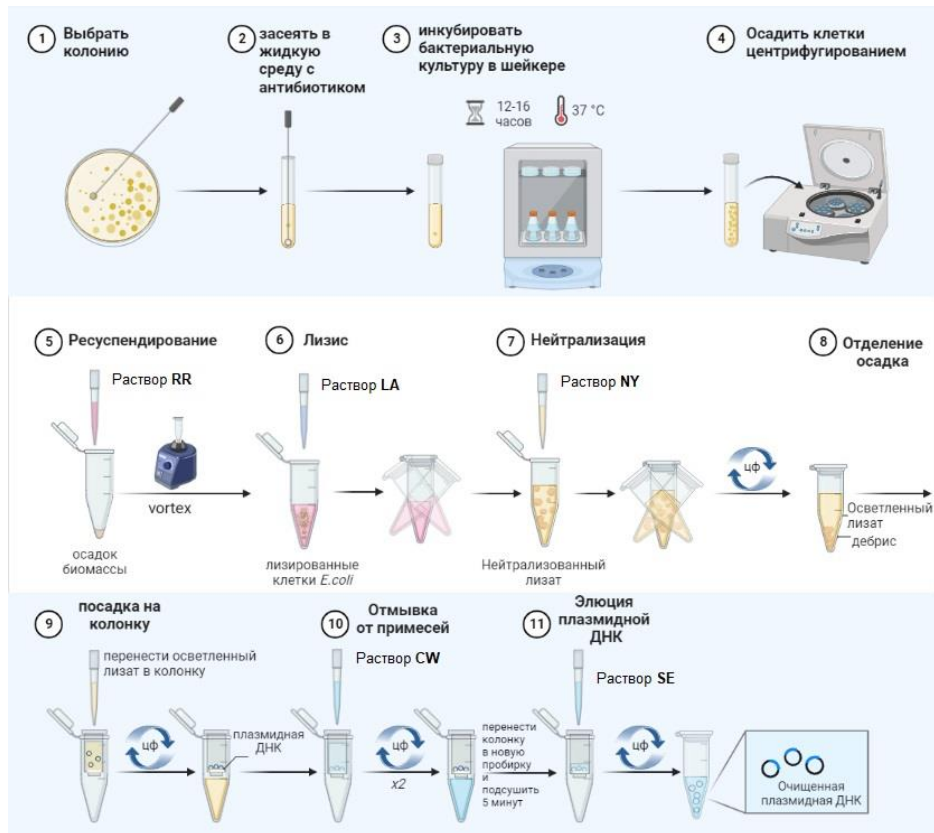
Версия 1
от 01.09.2022
Стр 3

- Настольный твердотельный термостат
- Микроцентрифужные пробирки 1,5 мл
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1000 мкл
- 96-100% этанол
- Наконечники с фильтром, совместимые с дозаторами

6. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ




- Добавьте 0,5 мл Раствора **RR** в пробирку с лиофилизированной РНКазой (осадок должен быть на дне пробирки), перемешайте на вортексе, полностью перенесите во флакон с Раствором **RR**, перемешайте. Подпишите дату добавления РНКазы в раствор. Храните при +4С.
- Добавьте 96%-100% этанол во флакон с Раствором **CW**:
 - к 5 мл Раствора **CW** 25 мл 96% этанола (или 24 мл 100% этанола)
 - к 20 мл Раствора **CW** 90 мл 96% этанола (или 87 мл 100% этанола)
 - к 50 мл Раствора **CW** 225 мл 96% этанола (или 216 мл 100% этанола)Перемешайте. Подпишите дату добавления этанола на крышке флакона.
- В случае наличия осадка в Растворе **NY**, прогрейте раствор в инкубаторе при 60 °С до полного растворения кристаллов.
- Перед началом работы рекомендуется заранее отобрать и промаркировать пробирки и колонки для образцов.

7. СХЕМА РАБОТЫ



8. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

	<i>Рекомендация: растите бактериальную культуру 12 - 18 часов, значения OD600 2,5 - 4.</i>
1	Осадите клетки центрифугированием (не более 1700 g) в течение 2 минут при комнатной температуре для 2 мл биомассы. При работе с 6 - 10 мл биомассы, центрифугируйте клетки в пробирках на 15 или 50 мл в центрифуге с подходящим ротором, с ускорением не меньше 3000g в течение 10 минут.

2	<p>Полностью удалите супернатант, не затрагивая осадок.</p> <p><i>На этом этапе осадки можно заморозить при -20С и продолжить работы на следующий день.</i></p>
3	<p>Добавьте к клеточному осадку 250 мкл (500 мкл) при выделении из 6-10 мл биомассы) «Раствора RR»  и тщательно перемешайте на вортексе до полного ресуспендирования осадка. Раствор будет мутным, малинового цвета.</p> <p>При необходимости перенесите суспензию клеток, обработанную РНКазой, из пробирок на 15-50 мл в пробирки на 1,5 мл.</p> <p><i>Суспензию клеток в Растворе RR можно разаликвотить и заморозить при -20С и продолжить работу на следующий день.</i></p>
4	<p>Добавьте 250 мкл (500 мкл) при выделении из 6-10 мл биомассы) «Раствора LA» . Содержимое пробирки осторожно перемешайте плавным переворачиванием, пока лизат не станет прозрачным, цвет раствора изменится на ярко фиолетовый. Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту.</p> <p><i>Инкубируйте не более 2 минут.</i></p> <p><i>Не используйте вортекс: быстрое перемешивание приводит к разрыву бактериальной хромосомы и загрязнению плазмиды геномной ДНК.</i></p>
5	<p>Добавьте 250 мкл (700 мкл) при выделении из 6-10 мл биомассы) «Раствора NY»  Осторожно перемешайте содержимое пробирки переворачиванием несколько раз до получения равномерного белого творожистого осадка, флотирующего в желтом растворе. Следите по равномерности окраски раствора, чтобы нейтрализация прошла полностью.</p> <p><i>Не используйте вортекс.</i></p>
6	<p>Центрифугируйте пробирку в течение 10 минут с ускорением 12000 g при комнатной температуре.</p>
7	<p>Подготовьте и подпишите нужное количество спин-колонок с пробирками по числу образцов.</p>
8	<p>Аккуратно, стараясь не захватывать осадок, перенесите осветленный супернатант на колонку.</p>
9	<p>Центрифугируйте колонки 15 сек при комнатной температуре с ускорением 12000 g.</p>



Инструкция
GentaSpin Plasmid Miniprep Plus

Версия 1
от 01.09.2022
Стр 6

10	Удалите фильтрат из пробирки. Колонку верните в пробирку. Повторите п. 9-11 при выделении из 6-10 мл бактериальной культуры.
11	Добавьте 750 мкл Раствора CW в колонку.
12	Центрифугируйте 15 сек при комнатной температуре с ускорением 12000 g.
13	Удалите фильтрат из пробирки. Колонку верните в пробирку.
14	Повторите п.11-13 при выделении из 6-10 мл бактериальной культуры.
15	Центрифугируйте пустую колонку 1 минуту для полного удаления остатков Раствора CW .
16	Подсушите фильтры колонок с открытыми крышками при комнатной температуре 3-5 минут.
17	Поместите колонку в новую подписанную пробирку для сбора плазмидной ДНК.
18	Нанесите 100 мкл Раствора SE .
20	Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту, а затем центрифугируйте 1 минуту при комнатной температуре с ускорением 12000 g.
21	Элюат содержит очищенную плазмидную ДНК.
	<i>Рекомендация: перед измерением на спектрофотометре перемешайте образцы на вортексе.</i>

9. РЕКОМЕНДАЦИИ

● Нарращивание бактериальной культуры

Выход и количество плазмидной ДНК зависит от вида бактериальной культуры, среды культивирования, антибиотика, штамма, размера и копийности плазмиды.

Для выращивания бактерий, содержащих высококопийную плазмиду рекомендуется стандартная среда LB (Luria Bertani medium). Выращивать бактериальную культуру необходимо при температуре 37 °С при активном перемешивании в течение 12-16 часов до достижения мутности OD600 ≈ 2,5-4. Более богатая питательная среда для культивирования (например 2YT, TB) дает существенно больший выход биомассы, т.к.

бактерии растут быстрее и достигают стационарной фазы роста меньше, чем за 12 часов. Перерост бактериальной культуры может привести к гибели и повреждению клеток, в результате чего плазмидная ДНК может быть частично деградирована и загрязнена хромосомной ДНК. Для определения оптимальных условий культивирования (культуральной среды и времени роста) необходима оптимизация условий для каждой комбинации бактериальной культуры и плазмидной ДНК.

● **Элюция образцов с колонок**

Для получения наибольшего выхода плазмидной ДНК рекомендуется предварительно прогреть Раствор **SE** до 50 °С. Также можно проводить элюцию в два этапа: 2 раза по ½ рекомендуемого объема элюции для получения максимального выхода.

Для получения более концентрированного образца рекомендуется использовать ½ рекомендуемого объема элюции, однако выход плазмидной ДНК может снизиться до ~ 80%. Для получения сконцентрированного образца без потери выхода рекомендуется повторно нанести элюат, содержащий плазмидную ДНК, на колонку и повторить центрифугирование.

9. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ, ПРИЧИНЫ И ИХ РЕШЕНИЕ

Проблема	Описание, пути решения
Неполный лизис клеток	<p>1. После добавления Раствора LA образец не становится полностью прозрачным, сохраняется мутность.</p> <p><u>Решение:</u></p> <p>убедитесь, что SDS, входящий в состав Раствора LA, не выпал в осадок. Это иногда может происходить при транспортировке в условиях пониженной температуры. Прогрейте Раствор LA до полного растворения осадка.</p> <p>2. Избыток бактериальных клеток может приводить к неполному и неравномерному лизису.</p> <p><u>Решение:</u></p> <p>Следуйте инструкции по рекомендуемым объемам биомассы и объемам используемых растворов.</p>
Низкая концентрация или количество выделенной плазмидной ДНК	<p>1. Неполный лизис бактериальных клеток.</p> <p><u>Решение:</u> См. “Неполный лизис клеток”.</p>

	<p>2. Несоответствие рабочей концентрации антибиотика в среде культивирования.</p> <p><u>Решение:</u></p> <p>Используйте рекомендуемые в литературе рабочие концентрации антибиотиков.</p> <p>3. Перерост бактериальной массы (слишком длительное время культивирования).</p> <p><u>Решение:</u></p> <p>Рекомендуется растить бактериальную культуру не более 20 часов при 37 С.</p> <p>4. Низкий выход может быть связан с низкой или средней копийностью выбранной плазмиды.</p> <p><u>Решение:</u></p> <p>Для получения более высокого выхода для низкокопийных плазмид рекомендуется растить бактериальную культуру в большем объеме, однако на одно выделение рекомендуется брать не больше 10 мл.</p>
<p>Очень низкий выход плазмидной ДНК, потеря образца</p>	<p><u>Решение:</u></p> <p>Убедитесь, что в Раствор CW добавлен 96% этанол согласно инструкции. Используйте 96% или перегнанный этанол.</p>
<p>Низкое качество плазмидной ДНК или контаминация хромосомной ДНК</p>	<p>Причиной одноцепочечных разрывов или присутствия хромосомной ДНК может быть превышенное время лизиса или использование vortex во время лизиса.</p> <p><u>Решение:</u></p> <p>Старайтесь не превышать 2 минут на этапе лизиса образцов и не встряхивать пробирки слишком интенсивно.</p>



Инструкция
GentaSpin Plasmid Miniprep Plus

Версия 1
от 01.09.2022
Стр 9

В образце присутствует примесь РНК	Причиной может быть деградация РНКазы А в Растворе RR из-за возможного несоблюдения температуры хранения раствора. <u>Решение:</u> После добавления лиофилизированной РНКазы Раствор RR следует хранить при +2...+8С.
Примесь этанола в образце	<u>Решение:</u> Убедитесь, что пункты инструкции 15 и 16 были выполнены.

При обнаружении не описанных проблем в работе набора, сообщите производителю по адресу info@genterra.ru. Убедительно просим Вас в письме с описанием проблемы указывать каталожный номер и лот вашего набора.

9. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КОМПОНЕНТАМИ НАБОРА

Раствор **LA** содержит NaOH (не более 2%) и вызывает местное раздражение при попадании на кожу и в глаза. Раствор **NY** содержит гуанидин гидрохлорид в высокой концентрации.

При работе с растворами из набора **GentaSpin Plasmid Miniprep Plus** рекомендуется: использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами; не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу, при попадании – промыть большим количеством воды; после работы обработать рабочее место дезинфицирующим раствором или 70% спиртом.

Уважаемый Пользователь!

Благодарим Вас за выбор продукта от АО «ГенТерра»!

Если у Вас есть рекомендации по улучшению данного продукта или пожелания по расширению нашей линейки продукции, мы будем Вам признательны если вы предоставите на обратную связь по адресу info@genterra.ru



Инструкция
GentaSpin Plasmid Miniprep Plus

Версия 1
от 01.09.2022
Стр 10

ДЛЯ ЗАПИСЕЙ

