

Инструкция по применению



GentaFast Plasmid Microprep

Набор для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток ГентаФаст Микропреп

Версия 1 от 23.11.2022

1. ОПИСАНИЕ

Набор предназначен для выделения плазмидной ДНК из бактерий.

В основе протокола лежит модифицированный метод щелочного лизиса бактериальной культуры без предварительного осаждения бактерий. Технология позволяет ускорить процесс выделения за счет быстрого лизиса напрямую из биомассы с обработкой РНКазой А в процессе осветления лизата и дальнейшего центрифугирования. На стадии лизиса разрушаются клеточные стенки бактерий, происходит денатурация белков и геномной ДНК. Нейтрализация лизата приводит к образованию светлой творожистой взвеси, состоящей из остатков клеточных стенок бактерий, белков и геномной ДНК, в то время как плазмидная ДНК остается в растворе. После нанесения на мембрану колонки происходит сорбция плазмидной ДНК, примеси в виде солей, метаболитов, липидов и др. эффективно удаляются на стадии промывки. За счет небольшого диаметра фильтра колонки происходит эффективное удаление загрязнений. На финальной стадии происходит элюция плазмидной ДНК с мембраны в раствор. При необходимости есть возможность сконцентрировать образец. Протокол позволяет быстро получить небольшое количество плазмидной ДНК, подходящей для большинства молекулярно-биологических применений.

Набор предназначен только для научных исследований.

2. СОСТАВ

Компонент	20 выделений	50 выделений REF: KI-GFP-S	250 выделений REF: KI-GFP-L
Рибонуклеаза А (лиофилизированная)	1 мг	3 мг	15 мг
Раствор для усиленного лизиса SL	2.5 мл	6 мл	30 мл
Раствор для нейтрализации MN	10 мл	24 мл	85 мл
Раствор промывочный концентрат CW	4 мл	10 мл	50 мл



Инструкция
GentaFAST Plasmid Microprep

Версия 1
от 23.11.2022
Стр 2

Раствор для элюции SE	1.5 мл	3 мл	15 мл
Спин-колонки микро для выделения плазмидной ДНК	20 шт	50 шт	250 шт
Пробирки на 2 мл с крышкой	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 для нейтрализации **MN** 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> , 0,6 мл, плотность 2,5 - 6 OD
Размер плазмиды	Не более 25 kb
Выход продукта	до 7 мкг из 0,6 мл биомассы
Объем элюции	15 - 50 мкл
Чистота	A260/280 = 1,80±0,05; A260/230 ≥ 2,1
Время выделения	10 -15 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)
- Вортекс
- 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

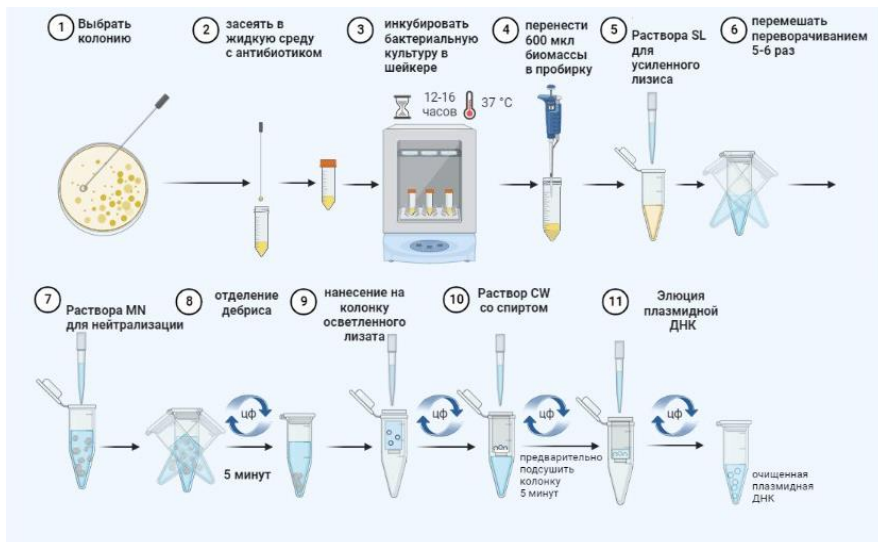
6. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

- Добавьте 0,5 мл Раствора для нейтрализации **MN** в пробирку с лиофилизированной РНКазой (осадок должен быть на дне пробирки), перемешайте на вортексе, полностью перенесите во флакон с Раствором **MN**, перемешайте раствор после добавления РНКазы А. Подпишите дату добавления РНКазы в раствор на крышке флакона. **Храните при +4С.**
- Добавьте 96%-100% этанол во флакон с Раствором **CW**:
 - к 4 мл Раствора **CW** 16 мл 96% этанола (или 15 мл 100% этанола)
 - к 10 мл Раствора **CW** 45 мл 96% этанола (или 43 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 Растворе **SL** при комнатной температуре выпадает осадок (SDS). Рекомендуется прогреть раствор 30-37 °С до полного растворения осадка. Не используйте микроволновую печь.
- 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 - 16 часов, значения OD600 2,5-6.</i>
1	Перенесите 600 мкл бактериальной культуры из ёмкости для наращивания в пробирку на 1,5 мл.
2	<p>Добавьте 110 мкл Раствора для усиленного лизиса SL. Аккуратно перемешайте содержимое переворачиванием 4-6 раз, пока раствор не станет полностью прозрачным. Убедитесь в полном лизиса по степени просветления раствора в пробирке. Инкубируйте 30 секунд. Старайтесь не превышать рекомендованное время лизиса. Рекомендуется работать не более, чем с 10 образцами одновременно.</p> <p><i>Не используйте вортекс: слишком интенсивное перемешивание приводит к разрыву бактериальной хромосомы и загрязнению плазмиды геномной ДНК.</i></p>



Инструкция
GentaFAST Plasmid Microprep

Версия 1
от 23.11.2022
Стр 5

3	Добавьте 400 мкл холодного Раствора MN с РНКазой А (хранится при +4°C). Осторожно перемешайте содержимое пробирки переворачиванием 4-6 раз до получения равномерного белого творожистого осадка. Инкубируйте 2 минуты. <i>Не используйте вортекс.</i>
4	Центрифугируйте пробирку в течение 5 минут с ускорением 12000 g при комнатной температуре.
5	Подготовьте и подпишите нужное количество спин-колонок с пробирками по числу образцов.
6	Аккуратно, стараясь не захватывать осадок, перенесите 1 мл осветленного раствора на колонку. Инкубируйте 1 минуту.
7	Центрифугируйте 15 секунд при комнатной температуре с ускорением 12000 g.
8	Добавьте 750 мкл Раствора CW в колонку.
9	Центрифугируйте 15 секунд при комнатной температуре с ускорением 12000 g.
10	Удалите фильтрат из пробирки. Колонку верните в пробирку.
11	Центрифугируйте пустую колонку 1 минуту для полного удаления остатков промывочного раствора.
12	Подсушите фильтры колонок при комнатной температуре 2 минуты.
13	Поместите колонку в новую подписанную пробирку для сбора плазмидной ДНК.
14	Нанесите 50 мкл Раствора SE . На этом этапе есть возможность сконцентрировать образец элюцией в меньшем объеме. Рекомендованный минимальный объем - 15 мкл .
15	Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту, а затем центрифугируйте 1 минуту при комнатной температуре с ускорением 12000 g.
16	Элюат содержит очищенную плазмидную ДНК.

	<i>Рекомендация: перед измерением на спектрофотометре перемешайте образец 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 ≈ 3 - 6. 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 для элюции **SE** до 50 °С.

Для получения более концентрированного образца рекомендуется использовать 15-25 мкл Раствора для элюции **SE**. 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 SL образец не становится полностью прозрачным, сохраняется мутность.</p> <p><u>Решение:</u> убедитесь, что осадок в Растворе SL был полностью растворен до начала работы. При</p>

	<p>комнатной температуре в Растворе SL выпадает в осадок SDS, входящий в состав раствора.</p> <p><u>Для полного растворения осадка в Растворе SL достаточно предварительно мягко прогреть флакон с раствором при 30-37⁰C.</u></p> <p>2. Избыток бактериальных клеток может приводить к неполному и неравномерному лизису.</p> <p><u>Решение:</u> Следуйте инструкции по рекомендуемым объемам биомассы на одно выделение.</p>
<p>Низкая концентрация или количество выделенной плазмидной ДНК</p>	<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> Используйте рекомендуемые в литературе рабочие концентрации антибиотиков.</p> <p>3. Перерост бактериальной массы (слишком длительное время культивирования).</p> <p><u>Решение:</u> рекомендуется растить бактериальную культуру не более 16-18 часов при 37⁰ C.</p> <p>4. Низкий выход может быть связан с низкой или средней копийностью выбранной плазмиды.</p> <p><u>Решение:</u> Используйте набор GentaSpin Plasmid Miniprep Plus, оптимизированный для выделения низкокопийных плазмид.</p>
<p>Очень низкий выход плазмидной ДНК, потеря образца</p>	<p><u>Решение:</u> убедитесь, что в Раствор CW добавлен 96% этанол согласно инструкции. Используйте 96% или перегнанный этанол.</p>



Инструкция
GentaFAST Plasmid Microprep

Версия 1
от 23.11.2022
Стр 8

Низкое качество плазмидной ДНК или контаминация хромосомной ДНК	Причиной одноцепочечных разрывов или присутствия хромосомной ДНК может быть превышенное время лизиса или использование vortex во время лизиса. <u>Решение:</u> Старайтесь не превышать 0,5-1 минуту на этапе лизиса образцов и не встряхивать пробирки слишком интенсивно. Рекомендуется работать не более, чем с 10 образцами одновременно.
В образце присутствует примесь РНК	Причиной может быть деградация РНКазы А в Растворе MN из-за возможного несоблюдения температуры хранения раствора. <u>Решение:</u> после добавления лиофилизированной РНКазы А Раствор MN следует хранить при +2...+8С.
Примесь этанола в образце	<u>Решение:</u> убедитесь, что пункт инструкции 12 был выполнен. Колонки не должны пахнуть спиртом.

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 **SL** содержит NaOH (не более 2%) и вызывает местное раздражение при попадании на кожу и в глаза.

Раствор **MN** содержит гуанидин гидрохлорид в высокой концентрации.

При работе с набором **GentaFast Plasmid Microprep** 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»!



Инструкция
GentaFAST Plasmid Microprep

Версия 1
от 23.11.2022
Стр 9

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
GentaFAST Plasmid Microprep

Версия 1
от 23.11.2022
Стр 10

ДЛЯ ЗАПИСЕЙ

