

Набор реагентов для выделения и очистки плазмидной ДНК из бактерий

С помощью набора можно выделить до 20 мкг плазмидной ДНК.
Использовать для выделения 1-5 мл бактериальной суспензии (для высококопийной плазмиды) или 10 мл (для низкокопийной).

Хранение и подготовка к работе набора DiamondDNA™

При получении набора необходимо поместить фермент (РНКаза) в морозильную камеру (-20°C) для более длительного хранения. Фермент находится в лиофилизированном виде и переносит транспортировку при комнатной температуре без заморозки. Перед использованием фермент необходимо растворить в бидистиллированной или деионизированной воде (1 мл на 1 пробирку). В дальнейшем хранить только замороженным.

Остальные компоненты набора необходимо хранить при комнатной температуре (в составе отсутствуют нестойкие соединения). Перед первым использованием добавить 25 мл этанола (96%, в состав набора не входит) во флакон с промывочным буфером (WB), перемешать.

Срок годности набора составляет не менее 1 года.

Состав набора DiamondDNA™

1. Лизис-буфер.
2. РНКаза.
3. Связывающий буфер.
4. Осаждающий буфер.
5. Промывочный буфер.
6. ТЕ-буфер. Обеспечивает длительное хранение ДНК в растворе.
7. Микроколонки.

Необходимое оборудование и материалы

Центрифуга для пробирок 1,5 мл ($\geq 10000g$).

Дозаторы (от 1 до 1000 мкл).

Протокол

1. Центрифугировать бактериальную культуру 1 мин. при 10.000 об/мин. для осаждения клеток.
2. Ресуспендировать осадок в 250 мкл безнуклеазной воды (ТЕ) и 20 мкл РНКазы.
3. Добавить 250 мкл лизис-буфера (L) Перемешать смесь переворачиванием (4-5 раз), на данной стадии не использовать встряхивание и пипетирование. Инкубировать при комнатной температуре 5 мин.
4. Добавить 350 мкл связывающего буфера (B). Перемешать смесь переворачиванием (4-5 раз), на данной стадии не использовать встряхивание и пипетирование.
5. Центрифугировать смесь 10 мин. при 10.000 об/мин. для осаждения клеточного дебриса.
6. Перенести супернатант (500 мкл) в 1,5 мл пробирку «Эппендорф», добавить 150 мкл осаждающего буфера (P), перемешать.
7. Перенести смесь в центрифужную колонку из набора, помещенную в 1,5 мл пробирку «Эппендорф». Центрифугировать 1 мин при 10.000 об/мин.
8. Слить жидкость из пробирки (ДНК останется на фильтре микроколонки). Колонку поместить обратно в пробирку.
9. Добавить в колонку 500 мкл предварительно подготовленного промывочного буфера (WB), центрифугировать 1 мин при 10.000 об/мин.
10. Слить жидкость из пробирки. Повторить пункт 9.

11. Слить жидкость из пробирки. Колонку поместить обратно в пробирку, центрифугировать 1 мин при 10 000 об/мин.

12. Перенести колонку в новый 1,5 мл «Эппендорф». Добавить в колонку 70 мкл безнуклеазной воды (TE). Центрифугировать 1 мин при 10.000 об/мин. Для полной элюции ДНК с мембраны колонки добавить в колонку еще 80 мкл безнуклеазной воды и повторно центрифугировать 1 мин при 10.000 об/мин. ДНК плазмиды отмывается от мембраны колонки и остается в растворе. Использованную колонку выбросить.