

Информация о продукте

Набор для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови (DU-10, DU-50, DU-250)

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом.

Протокол обновлён 28.01.2019.

Описание продукта

Набор предназначен для выделения и очистки геномной ДНК из культур клеток млекопитающих, грамотрицательных и грамположительных бактерий, тканей, крови. Принцип действия набора основан на селективной сорбции нуклеиновых кислот из предварительно лизированного образца на кремниевой мембране, последующей промывке и элюции очищенного продукта. Возможно выделение до 30-50 мкг ДНК.

Выделенная ДНК может быть использована для ПЦР, ник-транскрипции и других генно-инженерных приложений.

Состав набора

	DU-10 10 выделений	DU-50 50 выделений	DU-250 250 выделений
Буфер для лизиса LB	8 мл	40 мл	2x100 мл
Буфер для промывки WB1	4.1 мл	21 мл	2x52.5 мл
Буфер для промывки WB2 (концентрат)	1.1 мл	5.6 мл	2x14 мл
Буфер для элюции EB	2x1.5 мл	2x5 мл	50 мл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца	10 шт	50 шт	250 шт

Меры предосторожности

Осторожно! Буферы для лизиса LB и для промывки WB1 содержат раствор хаотропной соли, оказывающий раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости покажитесь врачу.

Условия хранения

Набор для выделения геномной ДНК может храниться при комнатной температуре (15-25 °С) в течение 12 месяцев. При хранении при 2-8 °С в буферах LB и WB1 возможно образование осадка, в таком случае необходимо выдержать буфер некоторое время при комнатной температуре (15-25 °С) до полного растворения осадка.

Материалы и оборудование необходимые для работы

Центрифуга способная достигать скорости не менее 12000-14000 гсf

Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки на 1.5-2 мл

Этанол, 96-100% раствор

Лизоцим, при выделении ДНК из грамположительных бактерий

Перед началом работы:

- Добавить 96-99% этанол к буферу WB1 и перемешать.
10 выделений. К 4.1 мл буфера WB1 (концентрат) добавить 1.4 мл этанола, чтобы получить 5.5 мл буфера WB1.
50 выделений. К 21 мл буфера WB1 (концентрат) добавить 7 мл этанола, чтобы получить 28 мл буфера WB1.
250 выделений. К 52.5 мл буфера WB1 (концентрат) добавить 17.5 мл этанола, чтобы получить 70 мл буфера WB1.
- Добавить 96-99% этанол к буферу WB2 и перемешать.
10 выделений. К 1.1 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 4.4 мл этанола, чтобы получить 5.5 мл буфера WB2.
50 выделений. К 5.6 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 22.4 мл этанола, чтобы получить 28 мл буфера WB2.
250 выделений. К 14 мл буфера WB2 (концентрат) добавить 56 мл этанола, чтобы получить 70 мл буфера WB2.

Рекомендуется добавлять этанол к аликвоте буферов WB1 и WB2, поскольку со временем этанол может испариться.

Если планируется выделять ДНК из грамположительных бактерий, приготовить раствор лизоцима с концентрацией 50 мг/мл в ТЕ буфере (0.01 М Tris-HCl, 0.001 М EDTA, pH 8.0).

Протокол выделения ДНК.

1а. Выделение ДНК из клеток и лимфоцитов:

1. К осадку клеток добавить 600 мкл буфера для лизиса LB. Перемешать пипетированием. Инкубировать 10 минут при 15-25 °С.

Важно: при выделении ДНК из грамположительных бактерий добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) в ТЕ буфере (0.01 М Tris-HCl, 0.001 М EDTA, pH 8.0).

Примечание: не использовать более $5 \cdot 10^6$ клеток млекопитающих или лимфоцитов и более $1 \cdot 10^8$ клеток бактерий. При выделении из $5 \cdot 10^5$ клеток млекопитающих или лимфоцитов и из $1 \cdot 10^7$ клеток бактерий и менее можно использовать 300 мкл буфера для лизиса LB.

2. К лизату добавить 1/3 объёма этанола (96-100%), например, при объёме лизата 600 мкл добавить 200 мкл этанола. Перемешать пипетированием.

3. Перенести лизат на колонку. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования. Если объём лизата больше 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.

1б. Выделение ДНК из тканей:

1. Гомогенизировать образец в 600 мкл буфера для лизиса LB. Инкубировать 10 минут при 15-25 °С.

Примечание: не использовать более 20-30 мг ткани (более 10-15 мг селезёнки).

2. Центрифугировать лизат 30 с, 1000 gcf. Перенести супернатант в чистую пробирку.

3. К супернатанту добавить 1/3 объёма этанола (96-100%), например, при объёме супернатанта 600 мкл добавить 200 мкл этанола. Перемешать пипетированием.

4. Перенести смесь лизата с этанолом на колонку. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования. Если объём лизата больше 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.

1в. Выделение ДНК из цельной крови:

1. К 200 мкл цельной крови добавить 750 мкл буфера для лизиса LB. Перемешать на вортексе. Инкубировать 10 минут при 15-25 °С.

Примечание: при выделении из 100 мкл рекомендуется также использовать 750 мкл буфера LB.

2. К лизату добавить 1/3 объёма этанола (96-100%), например, при объёме лизата 950 мкл добавить 300 мкл этанола. Перемешать пипетированием.

3. Перенести лизат на колонку. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования. Если объём лизата больше 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.

2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

3. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

Примечание: не забудьте предварительно добавить к буферу WB2 этанол.

4. Центрифугировать колонку 3 мин, 10000 gcf для полного удаления буфера WB2.

5. Перенести колонку в новую микроцентрифужную пробирку (не входит в состав набора) на 1.5-2 мл.

6. Нанести на центр фильтра колонки 60 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25 °C). Центрифугировать 2 мин, 10000 gcf.

Примечание: для увеличения выхода ДНК повторно провести элюцию новой порцией элюата. Повторное нанесение элюата на колонку также позволяет увеличить выход ДНК, но в меньшей степени, чем в первом варианте, однако раствор ДНК получается более концентрированный. Третья и последующие элюции незначительно увеличивают выход ДНК (менее 10%). При элюции объемом менее 60 мкл необходимо аккуратно наносить буфер на фильтр, иначе возможно снижение выхода ДНК.

Буфер для элюции содержит 0.01 M Tris•HCl (pH 8.0). Элюировать образец также можно TE буфером (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0-8.5) либо водой (pH 8.0-8.5).

Концентрация ДНК, выделенной из $1 \cdot 10^6$ эукариотических клеток, после первой элюции в 60 мкл составляет около 100 нг/мкл.

7. Элюат, содержащий ДНК, хранить при -20 °C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 mM.

Анализ выделенной ДНК.

Целостность выделенной геномной ДНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Количество выделенной ДНК можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

Характерный максимум поглощения для ДНК при $\lambda = 260$ нм.

Посчитать концентрацию ДНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 50$ мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Тел.: +7 (383) 363-51-91
www.biolabmix.ru
sales@biolabmix.ru