Общество с ограниченной ответственностью
**«Биолабмикс»**
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

# Набор D-Cells для выделения ДНК из клеток животных и бактерий

Кат. номер D-Cells-10, D-Cells-50, D-Cells-250

Важно!
Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом.
Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей.
Протокол обновлён 02.02.2024.

## Описание

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из следующих образцов:

1. культуры клеток млекопитающих
2. культуры клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий

Принцип действия набора основан на селективной сорбции нуклеиновых кислот из предварительно лизированного образца на мембране из диоксида кремния, последующей промывке и элюции очищенного продукта. Лизис образца происходит в присутствии протеиназы К.

Выделенная ДНК может быть использована для проведения ПЦР, ник-трансляции, секвенирования и др.

## Состав набора

| | D-Cells-10<br>10 выделений | D-Cells-50<br>50 выделений | D-Cells-250<br>250 выделений | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Вариант 1 | Вариант 2 |
| PBS | 2 мл | 8.5 мл | 45 мл | 45 мл |
| Буфер для лизиса LB | 8 мл | 40 мл | 4x50 мл | 2x100 мл |
| Буфер для промывки WB1 | 5.5 мл | 30 мл | 3x50 мл | 2x75 мл |
| Буфер для промывки WB2 | 5.5 мл | 30 мл | 3x50 мл | 2x75 мл |
| Буфер для элюции EB | 5 мл | 15 мл | 60 мл | 60 мл |
| Протеиназа К, раствор | 240 мкл | 1.2 мл | 5x1.2 мл | 5x1.2 мл |
| Буфер для растворения лизоцима | 400 мкл | 2 мл | 10 мл | 10 мл |
| Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца | 10 шт | 50 шт | 250 шт | 250 шт |

Набор D-Cells-250 поставляется в одном из двух вариантов

**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.
**Осторожно!** Буферы для промывки WB1 и WB2 содержат изопропанол, оказывающий раздражающее и токсичное действие. Не проводить работы с раствором в непосредственной близости от открытого огня.
При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости обратитесь за медицинской помощью.

**Эксплуатация**

Компоненты: PBS, LB, WB1, WB2, EB, Буфер для растворения лизоцима стабильны после вскрытия флаконов при температуре от +15°C до +25°C в течение всего срока годности при условии достаточной герметизации флаконов. Раствор протеиназы K стабилен в течение всего срока годности.
**Внимание!** Не нагревать набор выше температуры +25°C, несоблюдение температурного режима хранения и транспортировки снижает активность протеиназы K и эффективность выделения.
**Внимание!** не хранить смесь буфера для лизиса LB и протеиназы K.

**Условия работы**

Температура окружающей среды от +15 до +25°C;

Относительная влажность воздуха не более 80 %;

Атмосферное давление 630 – 800 мм. рт. ст.

**Оборудование и материалы, не входящие в набор**

- Твердотельный термостат, поддерживающий температуру 56±1 °C;
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 rcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Лизоцим;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл;

**Протокол выделения ДНК.**

1) Подготовка и лизис образцов.

- Культуры клеток животных. Монослойные культуры.

1. Снять клетки с поверхности культурального пластика методом, используемым в лаборатории, или стандартным методом, рекомендуемым для данной культуры клеток.
2. Перенести образец суспензии клеток (не более 2-3*$10^6$ клеток) в одноразовую микропробирку.
3. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 rcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 150 мкл PBS.
4. Чистым одноразовым наконечником добавить 150 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы K.
5. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56ºC.
7. Добавить к образцу 500 мкл буфера для лизиса LB.
8. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
9. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25$^0$C).

- Культуры клеток животных. Монослойные культуры. Культуральные планшеты.

При работе с 12-, 24- или 96-луночными планшетами или с культуральной посудой с аналогичной площадью ячейки допускается лизис непосредственно в лунке.

1. Удалить культуральную среду из лунки планшета
2. В лунку 12-луночного планшета добавить 150 мкл PBS, 250 мкл буфера для лизиса LB,
   В лунку 24- или 96-луночного планшета добавить 100 мкл PBS и 100 мкл буфера для лизиса LB.
3. Инкубировать 3-5 минут. Аккуратно, избегая пенообразования, перемешать содержимое лунки пипетированием, убедиться, что клетки открепились от ячейки.
4. Чистым одноразовым наконечником перенести образец в одноразовую микропробирку. Добавить 20 мкл протеиназы K.
5. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56ºC.
7. Добавить к образцу 400 мкл (12-луночный планшет) или 600 мкл (24- или 96-луночный планшет) буфера для лизиса LB.

8. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25$^0$C).

**- Культуры клеток животных. Суспензионные культуры.**

1. Перенести образец суспензии клеток (не более 2-3*10$^6$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 rcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 150 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 150 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы K.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин при температуре 56 ºC.
6. Добавить к образцу 500 мкл буфера для лизиса LB.
7. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25 $^0$C).

**- Культуры клеток бактерий. Грамотрицательные бактерии.**

1. Перенести 0.5-2 мл суспензии ночной культуры клеток (не более 1*10$^8$ клеток) в одноразовую микропробирку.

   **Примечание:** При работе с культурами клеток *E.Coli* рекомендуется использовать не более 0.5 мл ночной культуры клеток.
2. Осадить клетки центрифугированием 1 мин, 10000 rcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 150 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 150 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы K.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин при температуре 56ºC.
6. Добавить к образцу 500 мкл буфера для лизиса LB.
7. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25$^0$C).

**- Культуры клеток бактерий. Грамположительные бактерии**

**Подготовка раствора лизоцима:**

- К навеске лизоцима чистым одноразовым наконечником добавить необходимый объём буфера для растворения лизоцима (**входит в состав набора**), чтобы получить раствор 50 мг/мл.
- Тщательно перемешать на вортексе.

- Инкубировать 30 мин при Ткомн (15-25$^0$C), периодически перемешивая до полного растворения лизоцима.
- Хранить при -20$^0$C.

1. Перенести 0.5-2 мл суспензии ночной культуры клеток (не более 1*10$^8$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 1 мин, 10000 rcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 150 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) в буфере для растворения лизоцима (50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ EDTA (pH 8), 50% глицерин).
   **Примечание:** лизоцим не входит в набор, **буфер для растворения лизоцима поставляется вместе с набором**. Раствор лизоцима хранить в буфере для растворения лизоцима не более 6 месяцев при -20$^0$C.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 10 мин при Ткомн (15-25$^0$C).
5. Чистым одноразовым наконечником добавить 50 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы K.
6. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
7. Инкубировать 10 мин при температуре 56$^0$C.
8. Добавить к образцу 600 мкл буфера для лизиса LB.
9. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25$^0$C).

**2) Нанесение на колонку.**

1. Перенести 800 мкл лизата на колонку. Плотно закрыть крышку колонки.
2. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
   **Примечание:** Если объём лизата больше 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование. Если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования, не добавляя новую порцию буфера LB.

**3) Промывка колонки.**

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
3. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 rcf для полного удаления буфера WB2.

4) Элюция ДНК

1. Перенести колонку в новую микропробирку на 1.5-2 мл (не входит в состав набора). Плотно прижать колонку к пробирке.
2. Нанести на центр фильтра колонки от 60 до 200 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25$^0$C). Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf.
   - При увеличении объёма элюции увеличивается количество ДНК и снижается концентрация ДНК. Количество ДНК при элюции объёмами 60 и 200 мкл может различаться в 1.5-2 раза.
   - Вторая элюция **новой аликвотой** буфера для элюции EB или **повторное нанесение элюата** на колонку позволяет дополнительно увеличить количество 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, pH доводить раствором NaOH).
3. Элюат, содержащий ДНК, хранить при -20$^0$C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 мМ. **Примечание:** EDTA может ингибировать ферментативные реакции, например, ПЦР.

**Анализ выделенной ДНК**

Целостность выделенной 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:

$A_{260}$ * разбавление * 50 мкг/мл.

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

**Условия хранения и транспортировки:**
Хранение: набор для выделения ДНК может хранится при комнатной температуре (15-25°C). Раствор протеиназы K хранить при температуре от -18 до -24°C. Срок годности см. на упаковке.

Транспортировку набора, включая протеиназу K, производить при температуре от +15 до +25°C. Допускается транспортировка при температуре не выше +25°C в течение 14 суток.

# Продукция компании Биолабмикс

- Наборы для выделения ДНК/РНК
- Наборы и смеси для ПЦР
- ОТ и ОТ-ПЦР
- Изотермическая амплификация
- ДНК-маркеры
- Ферменты
- Олиго-нуклеотиды
- Платформа для синтеза мРНК
- Маркеры молекулярной массы белков
- Host cell DNA detection
- Контрактное производство
- Собственные разработки

sales@biolabmix.ru
8 800 600 88 76
www.biolabmix.ru

ISO 9001:2015
13485:2016

ПОДПИСЫВАЙТЕСЬ
НА НАШУ ГРУППУ В ВК