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-Tissues для выделения ДНК из тканей животных

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

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с набором, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с набором. Последняя версия протокола доступна на сайте компании ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru). Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей. Протокол обновлён 18.12.2023.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из тканей животных. 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-Tissues-10 10 выделений	D-Tissues-50 50 выделений	D-Tissues-250 250 выделений	
			Вариант 1	Вариант 2
PBS	2.5 мл	12 мл	60 мл	60 мл
Буфер для лизиса LB	0.6 мл	3 мл	15 мл	15 мл
Буфер для нанесения на колонку BB	8.5 мл	45 мл	4x60 мл	2x120 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 K, раствор	240 мкл	1.2 мл	5x1.2 мл	5x1.2 мл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца	10 шт	50 шт	250 шт	250 шт

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

Меры предосторожности

Осторожно! Буферы для нанесения на колонку BB 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! Буфер для промывки WB2 содержит 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.

Внимание! При работе с биологическими образцами следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как исследуемый материал является потенциально инфицированным, способным длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

Эксплуатация

Компоненты: PBS, LB, BB, WB1, WB2, EB 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 подвергать набор воздействию прямых солнечных лучей и не нагревать набор выше температуры +25 °C, несоблюдение температурного

режима хранения и транспортировки снижает активность протеиназы К и эффективность выделения.

Внимание! не хранить смесь буфера для лизиса LB и протеиназы К.

Условия работы

Температура окружающей среды от +15 до +25 °С;
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 °С;
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 rcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5-2 мл;

Протокол выделения ДНК

Внимание! Рекомендуется проводить выделение из свежих образцов тканей. Если необходимо поместить образцы тканей на длительное хранение, рекомендуется использовать стабилизатор РНК (St-100) или аналогичные реагенты.

1) Подготовка и лизис образцов

- Виды образцов
Для выделения ДНК допустимо использовать образцы в стабилизаторе РНК (St-100) либо свежие, охлаждённые образцы, либо замороженные образцы в жидком азоте. Перед началом работы рекомендуется определиться с методом гомогенизации образцов (см. ниже раздел «Гомогенизация образцов»).

1. Образцы в стабилизаторе РНК
Образец извлечь из стабилизатора и взвесить. Для выделения использовать не более 30 мг ткани (не более 10 мг селезёнки).

2. Свежие образцы
Свежеполученные образцы рекомендуется незамедлительно взвесить. Не допускать заветривания образца или хранение его без стабилизатора. Для выделения использовать не более 30 мг ткани (не более 10 мг селезёнки).

3. Замороженные образцы
Замороженные образцы необходимо взвесить. Не рекомендуется использование замороженных образцов, хранившихся более 1 года при температуре -20 °C. Для выделения использовать не более 30 мг ткани (не более 10 мг селезёнки).

- Рекомендации по хранению образцов

1. Образцы в стабилизаторе РНК (St-100)
- Хранение 3 дня при температуре 37 °C
- Хранение 1 неделю при температуре от 15 до 25 °C
- Хранение 1 месяц при температуре от 2 до 8 °C
- Хранение от 1 года при температуре от -24 до -18 °C
- Хранение не более 5 лет при температуре от -80 до -70 °C

2. Свежие образцы
- Незамедлительное использование
- Хранение не более 1 года при температуре от -24 до -18 °C
- Хранение не более 5 лет при температуре от -80 до -70 °C

3. Замороженные образцы
- Хранение не более 1 года при температуре от -24 до -18 °C
- Хранение не более 5 лет при температуре от -80 до -70 °C

- Гомогенизация образцов
Внимание! Рекомендуется использовать одноразов систему гомогенизации либо провести полное удаление образца из системы гомогенизации после работы, чтобы избежать загрязнения последующих проб.

1. Гомогенизация с использованием жидкого азота
Поместить образец ткани в жидкий азот. Тщательно измельчить образец в ступке с помощью пестика. Перенести измельчённый образец в жидком азоте в одноразовую микропробирку на 1.5 мл. Подождать, пока азот испарится, но не допускать того, чтобы ткань начала таять. Добавить 200 мкл PBS.
Примечание: в каталоге ООО «Биолабмикс» присутствуют одноразовые, стерильные пестики для (Кат. № pest-10).
2. Гомогенизация с использованием механического гомогенизатора
Добавить к образцу ткани 200 мкл PBS. Плотно закрыть пробирку. Измельчить используя механический гомогенизатор тканей, например, FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals), TissueRuptor II (QIAGEN).
Примечание: при использовании матрицы для гомогенизации (порошок или шарики) её количество должно быть таким, чтобы PBS полностью покрывал матрицу для гомогенизации и образец ткани. Если количество PBS недостаточно, то использовать дополнительную аликвоту PBS или физраствора (дополнительные аликвоты данных растворов не входят в набор).
3. Гомогенизация с использованием одноразовых пестиков для микропробирок
Поместить образец ткани в микропробирку, добавить 200 мкл PBS. Тщательно перетереть образец пестиков.
Примечание: качество гомогенизации влияет на выход ДНК. Рекомендуется добиться получения однородной суспензии образца.
Примечание: одноразовые, стерильные пестики (Кат. № pest-10) присутствуют в каталоге ООО «Биолабмикс».
4. Гомогенизация с использованием скальпеля
Порезать образец ткани на мелкие фрагменты. Поместить образец в одноразовую микропробирку на 1.5 мл, добавить 200 мкл PBS
Примечание: чем мельче фрагменты ткани, тем быстрее пройдёт лизис образца.

- Лизис образцов

1. К измельчённому образцу ткани в 200 мкл PBS чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл протеиназы K и 50 мкл буфера для лизиса LB.
2. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
3. Инкубировать 0.5-3 ч при температуре 56 ºC до растворения ткани. Периодически перемешивать вручную или на вортексе.

Примечание: Время лизиса зависит от типа ткани и степени измельчения образца. Процедуру лизиса образца допускается оставить на ночь. Для более эффективного лизиса рекомендуется периодически перемешивать образец 2-3 раза в час либо использовать термостатируемый шейкер.
Примечание: Некоторые образцы тканей могут полностью не растворяться. Допускается перейти к следующему этапу протокола.

4. После окончания лизиса добавить к образцу 700 мкл буфера для нанесения на колонку BB. Энергично перемешать вручную или на вортексе.

5. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре.
6. Центрифугировать образец 10 мин, 12000 rcf.

2) Нанесение на колонку

1. Перенести 800 мкл супернатанта на колонку. Плотно закрыть крышку колонки.
2. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

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 – 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˚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 λ = 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.

Примечание: Значения количества и качества выделенной ДНК зависят от типа биоматериала, условий и длительности хранения, а также длительности лизиса. Ориентировочное количество выделяемой ДНК для разных видов тканей приведено в таблице

Количество выделяемой ДНК из 10 мг ткани на примере M. Musculus.

Вид ткани	D-Tissues-10 10 выделений
Печень	От 5 до 20 мкг
Сердце	От 1 до 10 мкг
Лёгкие	От 10 до 30 мкг
Почки	От 5 до 20 мкг
Селезёнка	От 20 до 80 мкг

Дополнительные реагенты:
В каталоге ООО «Биолабмикс» представлены реагенты и материалы полезные при выделении ДНК и её анализе.

- Стерильные пестики для гомогенизации образцов тканей в микропробирках (Кат. № pest-10).
- Буферы для электрофореза в агарозном геле:
  трис-ацетатный буфер (Кат. № BE-DNA-500, BE-DNA-1000),
  трис-боратный буфер (Кат. № TBE-500).
- Раствор бромистого этидия (Кат. № EtBr-10) для визуализации НК.
- Буферы для внесения образцов ДНК и РНК в гель
  (Кат. № D-3001, D-3002, D-3003).
- Маркеры молекулярных весов ДНК
  (Кат. № S-8000, S-8100, S-8103, S-8055, S-8250, S-8150).
- Протеиназа К (Кат. № EP-1200).
- РНКаза А (Кат. № ER-500).

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

Транспортировку набора, включая раствор протеиназы К, производить при температуре от +15 до +25°С. Допускается транспортировка при температуре не выше +25°С в течение 14 суток.