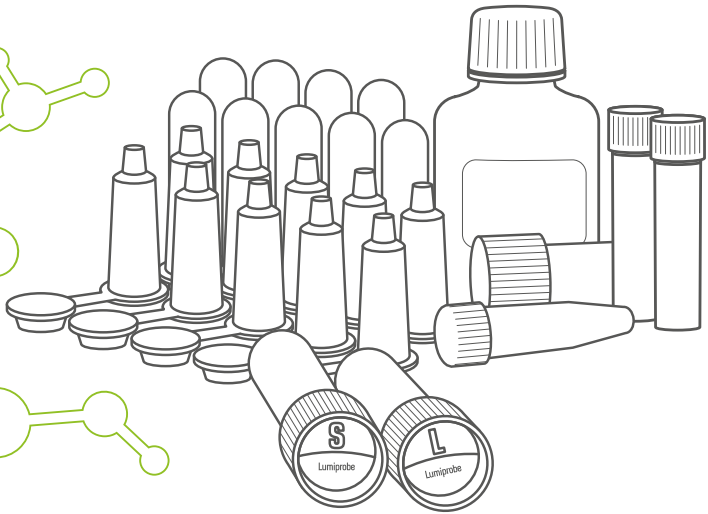
Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору LumiSpin BB для выделения ДНК на спин-колонках из цельной крови и буккального эпителия

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору LumiSpin BB для выделения ДНК на спин-колонках из цельной крови и буккального эпителия 3-10

RU

Инструкция к набору LumiSpin BB для выделения ДНК на спин-колонках из цельной крови и буккального эпителия

Набор предназначен для быстрого (~ 30 минут) и высокоэффективного выделения тотальной ДНК (геномной, митохондриальной и вирусной) из цельной крови, буккального эпителия, лейкоцитов, культур клеток млекопитающих на спин-колонках. Полученная ДНК стабильна и подходит для проведения ПЦР, обработки эндонуклеазами рестрикции, Саузерн-блоттинга, подготовки образцов для секвенирования по методу Сэнгера и NGS-секвенирования.

Ориентировочные выходы геномной ДНК (длина 30–50 тыс. пар нуклеотидов, OD_{260}/OD_{280} 1.7–1.8):

- Цельная кровь (100 мкл): 1–3 мкг
- Соскоб буккального эпителия: 0.5–2 мкг
- Клетки млекопитающих (1×10^6): 3–6 мкг

Состав набора

Компонент набора	Количество		
	11553 10 minipreps	21553 50 minipreps	31553 100 minipreps
12164, Spin column (up to 20 µg), 10 pcs	1	—	—
F4150, Лизирующий раствор BB / Lysis Solution BB, 4 mL	1	—	—
H2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 6 mL	1	—	—
M4150, Лизирующий раствор BB / Lysis Solution BB, 20 mL	—	1	—
P2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 30 mL	—	1	—
R4150, Лизирующий раствор BB / Lysis Solution BB, 40 mL	—	—	1
T2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 60 mL	—	—	1
M2250, Промывочный раствор B / Wash Solution B (концентрат 5x для разбавления 96% этанолом), 20.0 mL	—	—	1
32850, Протеиназа K / Proteinase K (лиофилизованная), 12.0 mg	—	—	1
D3850, Буфер для растворения протеиназы K / Proteinase K Dilution Buffer, 1200 uL	—	—	1
Пробирка для сбора проскока, 2 мл	30	150	300
K2250, Промывочный раствор B / Wash Solution B (концентрат 5x для разбавления 96% этанолом), 10.0 mL	1	1	—
D1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 мМ Tris-HCl, pH 8.5), 1.5 mL	1	4	8

12850, Протеиназа K / Proteinase K (лиофилизованная), 6.0 mg	1	1	—
B3850, Буфер для растворения протеиназы K / Proteinase K Dilution Buffer, 600 uL	1	1	—
22164, Spin column (up to 20 µg), 50 pcs	—	1	2

Хранить при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Твердотельный термостат (возможно использование водяной бани);
- Настольная центрифуга с ротором для 1.5 мл пробирок со скоростью вращения не менее 10000 об/мин (6700 × g);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл (2 пробирки для выделения ДНК из 1 образца);
- 96 % этанол;
- Натрий-фосфатный буфер (PBS) для выделения ДНК из клеток млекопитающих.

Перед началом работы

1. Разбавьте концентрат *промывочного раствора B* в 5 раз 96 % этанолом (к указанному на банке объему концентрата добавьте 4 объема 96 % этанола), поставьте отметку о добавлении этанола на крышке.
2. Добавьте 600 мкл *буфера для растворения протеиназы K* в пробирку с лиофилизованной *протеиназой K,* тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием.

   ! Раствор протеиназы K после приготовления хранить в морозилке при -20 °C.
3. При наличии осадка в *лизирующем растворе BB* и *промывочном растворе A* прогрейте их в термостате до температуры не выше 50 °C и дождитесь полного растворения осадка.

Работы следует выполнять при комнатной температуре, все центрифугирования (если иное прямо не оговорено) при 10000–13000 об/мин (6700–11000 × g).

Выделение ДНК из цельной крови

Данный набор предназначен для выделения ДНК из образцов цельной крови объемом 100 мкл (свежая или замороженная кровь, содержащая в качестве антикоагулянта ЭДТА, цитрат натрия, гепарин). Для более высокого выхода ДНК можно использовать предварительно выделенные лейкоциты (рекомендуемый объём цельной крови для выделения лейкоцитов 1–2 мл).

1. Установите термостат на 55 °C, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. Перемешайте переворачиванием пробирку с кровью, чтобы содержимое пробирки стало гомогенным, после чего отберите 100 мкл образца в отдельную 1.5 мл пробирку.
3. В пробирку с образцом внесите 300 мкл *лизирующего раствора BB* и 10 мкл раствора *протеиназы K,* тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе.
4. Инкубируйте полученную смесь 15 мин при 55 °C, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
5. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
6. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора A*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
7. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора B*, центрифугируйте 3 мин.
8. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–200 мкл предварительно прогретого до 55 °C *элюирующего буфера*. Инкубируйте 2 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из соскоба буккального эпителия

1. Установите термостат на 55 °C, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. Внесите в чистую 1.5 мл пробирку 300 мкл *лизирующего раствора BB*.
3. Тщательно промойте в *лизирующем растворе BB* палочку с соскобом буккального эпителия. Прижмите к стенке ватный тампон и вращательным движением отожмите из него остатки лизирующего раствора.
4. Добавьте в пробирку с образцом 10 мкл раствора *протеиназы K*, тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе.
5. Инкубируйте полученную смесь 15 мин при 55 °C, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
6. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
7. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора A*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
8. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора B*, центрифугируйте 3 мин.
9. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–200 мкл предварительно прогретого до 55 °C *элюирующего буфера*. Инкубируйте 2 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из культур клеток млекопитающих

Для выделения ДНК рекомендуется брать не более 5×10^6 клеток.

Адгезионная культура клеток: удалите культуральную жидкость, снимите клетки с поверхности пластика трипсином или другим рекомендованным для данной культуры методом. Центрифугируйте клетки 5 мин, 300 × g. Удалите супернатант. Ресуспендируйте находящиеся в осадке клетки в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию клеток в новую 1.5 мл пробирку.

Суспензионная культура клеток: отберите объём культуральной жидкости, содержащий необходимое число клеток. Центрифугируйте клетки 5 мин, 300 × g. Удалите супернатант. Ресуспендируйте находящиеся в осадке клетки в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию клеток в новую 1.5 мл пробирку.

1. Установите термостат на 55 °C, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. В пробирку с образцом внесите 300 мкл *лизирующего раствора BB* и 10 мкл раствора *протеиназы K,* тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе.
3. Инкубируйте полученную смесь 15 мин при 55 °C, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
4. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
5. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора A*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
6. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора B*, центрифугируйте 3 мин.
7. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–200 мкл предварительно прогретого до 55 °C *элюирующего буфера*. Инкубируйте 2 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек.

Выделенная ДНК находится в элюате.

Примечание

Для получения наибольшей концентрации ДНК используйте меньшие объёмы *элюирующего буфера*. Не рекомендуется использовать менее 50 мкл, так как мембрана колонки может не полностью смочиться, что приведет к снижению выхода ДНК. Для наибольшего выхода ДНК с колонки используйте больший объём *элюирующего буфера* (100–200 мкл).

Элюция ДНК прогретым до 55 °C *элюирующим буфером* обеспечивает оптимальный выход ДНК с колонки. Элюция непрогретым *элюирующим буфером* (при комнатной температуре) также допустима, однако это заметно снижает выход ДНК (на 30–50 %).

Для максимального выхода ДНК рекомендуется проводить элюцию в два этапа.

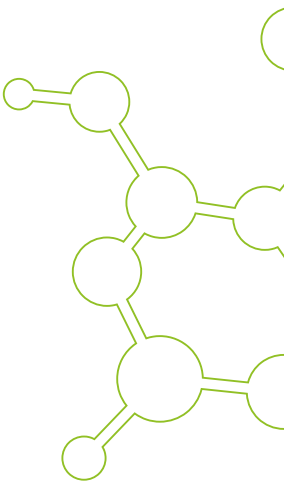
При необходимости элюция может проводиться деионизованной водой.

Если необходимо разбавить раствор при измерении концентрации ДНК, то для разбавления следует использовать только буфер TE pH 8.5 или *элюирующий буфер* из набора. В противном случае можно получить некорректные значения OD_{260}/OD_{280} и неверно определить содержание ДНК в растворе.

Хранение выделенной ДНК: в морозильной камере (-20 °C), кратковременно при +4 °C.

Ver. KYRV7
#5555G

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com