



Инструкция к набору LumiSpin® GEL для  
выделения ДНК на спин-колонках из  
агарозного геля



## Contents

Русский: Инструкция к набору LumiSpin® GEL для выделения ДНК на спин-колонках из агарозного геля .....	3-8
---	-----

# Инструкция к набору LumiSpin® GEL для выделения ДНК на спин-колонках из агарозного геля

Данный набор предназначен для быстрого (~ 20 минут) и высокоэффективного ( $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$ ) выделения ДНК из агарозного геля или очистки ДНК из реакционной смеси. Входящие в состав набора колонки обеспечивают выделение до 5 или 20 мкг ДНК размером 70 п.о.—10 000 п.о., при этом выход очищенной ДНК составляет при выделении из геля не менее 50 %, при выделении из реакционной смеси не менее 75 %. Очищенная ДНК пригодна для любых молекулярно-биологических работ, включая ПЦР, лигирование, трансформацию, мечение, обработку эндонуклеазами рестрикции, подготовку образцов для секвенирования по методу Сэнгера и NGS-секвенирования и др.

## Состав набора

Компонент набора	Количество			
	13793 10 preps (5 µg)	23793 50 preps (5 µg)	15793 10 preps (20 µg)	25793 50 preps (20 µg)
11164, Spin column (up to 5 µg), 10 pcs	1	—	—	—
21164, Spin column (up to 5 µg), 50 pcs	—	1	—	—
12164, Spin column (up to 20 µg), 10 pcs	—	—	1	—
22164, Spin column (up to 20 µg), 50 pcs	—	—	—	1
D1450, Нейтрализующий буфер / Neutralization Buffer, 2 mL	1	1	1	1
K3450, Буфер для растворения геля / Gel Solubilization Buffer, 10 mL	1	—	1	—
K2250, Промывочный раствор В / Wash Solution В (концентрат 5x для разбавления 96% этанолом), 10.0 mL	1	1	1	1

D1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 1.5 mL	1	2	1	4
Пробирка для сбора проскока, 2 мл	10	50	10	50
S3450, Буфер для растворения геля / Gel Solubilization Buffer, 50 mL	—	1	—	1

Хранение и транспортировка при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

## Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- 96 % этанол (необходимый объем составляет 4 объема концентрата *промывочного раствора В*, входящего в состав набора);
- Изопропанол (в среднем 100 мкл на 1 образец);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (2 пробирки для выделения ДНК из 1 образца);
- Настольная центрифуга с ротором для 1,5 мл пробирок со скоростью вращения не менее 10000 об/мин (6700 × *g*);
- Твердотельный термостат (возможно использование водяной бани);
- Лабораторные весы с точностью не менее 0,01 г.

## Перед началом работы

1. Разбавьте концентрат *промывочного раствора В* в 5 раз 96 % этанолом (к указанному на банке объему концентрата добавьте 4 объема 96 % этанола), поставьте отметку о добавлении этанола на крышке.
2. При наличии осадка в *буфере для растворения геля* прогрейте его в термостате до температуры не выше +50°C и дождитесь полного растворения осадка. После этого охладите раствор до +25°C.

## Выделение фрагментов ДНК из геля

1. Установите термостат на 50°C.
2. С помощью скальпеля или лезвия вырежьте часть геля с необходимым фрагментом ДНК. Старайтесь минимизировать количество геля, окружающего фрагмент ДНК.

*! По возможности сократите время нахождения выделяемого фрагмента ДНК в УФ-свете или во время облучения держите гель на стеклянной или пластиковой подложке. Это минимизирует индуцируемые ультрафиолетом повреждения ДНК.*

3. На весах взвесьте пустую пробирку объемом 1,5 мл, обнулите показания. Перенесите вырезанный фрагмент агарозного геля в аналогичную отдельную чистую пробирку объёмом 1,5 мл, взвесьте. Запишите показания прибора.
4. Добавьте *буфер для растворения геля* к фрагменту геля из расчёта 4 мкл буфера для растворения геля на 1 мг вырезанного фрагмента геля (например, в пробирку с фрагментом геля массой 100 мг следует добавить 400 мкл буфера для растворения геля).

*! При работе с несколькими фрагментами ДНК удобно добавлять во все пробирки одинаковый объем буфера для растворения геля, рассчитанный по массе наибольшего фрагмента геля.*

5. Инкубируйте образец при +50°C в течение 10 мин до полного растворения гелевого компонента, периодически перемешивая пробирки переворачиванием.

*! Если содержание агарозы в геле превышает 2 %, увеличьте время инкубации до полного растворения фрагмента геля.*

6. После полного растворения фрагмента геля убедитесь, что раствор имеет жёлтый цвет. Если цвет раствора стал фиолетовым, добавьте к образцу *нейтрализующий буфер* из расчёта 5 мкл нейтрализующего буфера на 1000 мкл образца, перемешайте. Цвет раствора снова станет жёлтым.

*Буфер для растворения геля содержит цветовой индикатор, выполняющий функцию контроля оптимального pH, при котором происходит эффективное*

*связывание ДНК с сорбентом колонки. Наблюдение фиолетовых оттенков в растворе указывает на сдвиг pH в щелочную сторону. В этом случае для понижения pH до оптимального значения следует добавить нейтрализующий буфер.*

7. Дайте остыть содержимому пробирок до комнатной температуры.
8. Добавьте в пробирку изопропанол из расчёта 1 мкл изопропанола на 1 мг вырезанного фрагмента геля (например, в пробирку с растворённым фрагментом геля с исходной массой 100 мг следует добавить 100 мкл изопропанола). Перемешайте.

## Очистка ДНК

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

1. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку полученный раствор ДНК (не более 900 мкл за одно нанесение). Центрифугируйте 30 сек. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно. В случае если объём раствора ДНК был более 900 мкл, нанесите на колонку оставшийся раствор ДНК и повторите процедуру.
2. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно.
3. *(Опционально)* Повторите промывку. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
4. Поместите колонку в новую 1,5 мл пробирку, нанесите в центр колонки *элюирующий буфер*: 10–50 мкл при использовании колонок ёмкостью до 5 мкг ДНК и 25–100 мкл при использовании колонок ёмкостью до 20 мкг ДНК. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

*! Для наибольшей концентрации ДНК используйте меньшие объёмы*

элюирующего буфера. Не рекомендуется использовать менее 10 мкл для колонок емкостью до 5 мкг ДНК и 25 мкл для колонок емкостью до 20 мкг ДНК, так как мембрана колонки может не полностью смочиться, что приведет к частичной потере ДНК. Для наибольшего выхода ДНК с колонки используйте больший объем элюирующего буфера (50 мкл для колонок емкостью до 5 мкг ДНК и 100 мкл для колонок емкостью до 20 мкг ДНК).

*! При необходимости элюцию можно проводить деионизованной водой.*

## Очистка фрагментов ДНК после ферментативной реакции

1. Добавьте 4 объема буфера для растворения геля к 1 объему раствора ферментативной реакции (например, к 100 мкл реакционной смеси добавьте 400 мкл буфера для растворения геля).
2. Убедитесь, что раствор имеет жёлтый цвет. Если цвет раствора стал фиолетовым, добавьте к образцу *нейтрализующий буфер* из расчёта 5 мкл нейтрализующего буфера на 1000 мкл образца, перемешайте. Цвет раствора снова станет жёлтым.

*Буфер для растворения геля содержит цветовой индикатор, выполняющий функцию контроля оптимального pH, при котором происходит эффективное связывание ДНК с сорбентом колонки. Наблюдение фиолетовых оттенков в растворе указывает на сдвиг pH в щелочную сторону. В этом случае для понижения pH до оптимального значения следует добавить нейтрализующий буфер.*

3. К полученной смеси добавьте изопропанол из расчёта 1 объем изопропанола на 1 объем исходного раствора ферментативной реакции, перемешайте (например, если исходный объем ферментативной реакции 100 мкл, то следует добавить 100 мкл изопропанола). Далее следуйте протоколу «Очистки ДНК».



## Примечание

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.







22.09.509-QM  
Issued by INSPECT



[www.lumiprobe.com](http://www.lumiprobe.com)

