Lumiprobe
Life science solutions

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

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

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

RU

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	—	—	—
15115, Collection tube for spin column, 2 mL, SNAP CAP, 10 pcs	1	—	—	—
21164, Spin column (up to 5 µg), 50 pcs	—	1	—	—
25115, Collection tube for spin column, 2 mL, SNAP CAP, 50 pcs	—	1	—	—
12164, Spin column (up to 20 µg), 10 pcs	—	—	1	—
12115, Collection tube for spin column, 2 mL, 10 pcs	—	—	1	—
22164, Spin column (up to 20 µg), 50 pcs	—	—	—	1
22115, Collection tube for spin column, 2 mL, 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 B / Wash Solution B (концентрат 5x для разбавления 96% этанолом), 10.0 mL	1	1	1	1
D1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 мМ Tris-HCl, pH 8.5), 1.5 mL	1	2	1	4
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 B*, 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 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. 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 растворенным 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 B,* центрифугируйте 3 мин. Извлеките колонку из пробирки, вылейте проскок, поместите колонку обратно.
3. *(Опционально)* Повторите промывку. Нанесите на колонку 500 мкл

промывочного раствора B, центрифугируйте 3 мин.

4. Поместите колонку в новую 1,5 мл пробирку, нанесите в центр колонки *элюирующий буфер*: 10–50 мкл при использовании колонок емкостью до 5 мкг ДНК и 25–100 мкл при использовании колонок емкостью 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 объём 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 объём 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.

Ver. MJ4A4
#5555H

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com