Lumiprobe
Life science solutions

Инструкция к набору LumiSpin® UNI для выделения ДНК на спин-колонках из любых биообразцов

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору LumiSpin® UNI для выделения
ДНК на спин-колонках из любых биообразцов 3-14

RU

Инструкция к набору LumiSpin® UNI для выделения ДНК на спин-колонках из любых биообразцов

Набор предназначен для быстрого (~ 30 минут) и высокоэффективного выделения геномной ДНК на спин-колонках из широкого спектра образцов: тканей растений и животных, буккального эпителия, цельной крови, лейкоцитов, культур клеток животных и грам-отрицательных бактерий. 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):

- Клетки грам-отрицательных бактерий (10^8): 5–10 мкг
- Лист растения, хвоя (50 мг): 3–5 мкг
- Хвост мыши: 7–14 мкг
- Почка мыши: 10–20 мкг
- Сердце мыши: 7–14 мкг
- Печень мыши: 10–15 мкг
- Лейкоциты, выделенные из 1 мл крови: 4–5 мкг
- 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		
	11573 10 minipreps	21573 50 minipreps	31573 100 minipreps
12164, Spin column (up to 20 µg), 10 pcs	1	—	—
14115, Pestle for Microcentrifuge Tube (Polypropylene), 10 pcs	1	—	—
H1850, Лизирующий раствор AS / Lysis Solution AS, 6 mL	1	—	—
F5450, Сорбирующий раствор / Sorption Solution, 4 mL	1	—	—
H2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 6 mL	1	—	—
K3150, Буфер для лизиса эритроцитов / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 10 mL	1	—	—
11650, РНКаза A (10 mg/mL), 50 uL	1	—	—
1902-5g, Корунд (50 мкм), 5 g	1	—	—
P1850, Лизирующий раствор AS / Lysis Solution AS, 30 mL	—	1	—
M5450, Сорбирующий раствор / Sorption Solution, 20 mL	—	1	—
P2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 30 mL	—	1	—
S3150, Буфер для лизиса эритроцитов / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 50 mL	—	1	—
1902-25g, Корунд (50 мкм), 25 g	—	1	—
31650, РНКаза A (10 mg/mL), 150 uL	—	2	—
T1850, Лизирующий раствор AS / Lysis Solution AS, 60 mL	—	—	1

R5450, Сорбирующий раствор / Sorption Solution, 40 mL	—	—	1
T2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (c GuHCl), 60 mL	—	—	1
M2250, Промывочный раствор B / Wash Solution B (концентрат 5x для разбавления 96% этанолом), 20.0 mL	—	—	1
D3850, Буфер для растворения протеиназы K / Proteinase K Dilution Buffer, 1200 uL	—	—	1
32850, Протеиназа K / Proteinase K (лиофилизованная), 12.0 mg	—	—	1
1902-50g, Корунд (50 мкм), 50 g	—	—	1
U3150, Буфер для лизиса эритроцитов / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 100 mL	—	—	1
51650, РНКаза A (10 mg/mL), 300 uL	—	—	2
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
24115, Pestle for Microcentrifuge Tube (Polypropylene), 50 pcs	—	1	2

Хранить при температуре до +30°C. Транспортировка: до +30°C в пределах всего срока годности.

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 и бактерий, лейкоцитов;
- Фарфоровая ступка для гомогенизации образца при выделении ДНК из тканей растений и животных (в случае если пестик-гомогенизатор не подходит для гомогенизации образца);
- (опционально) Центрифуга с ротором для 15 мл пробирок со скоростью вращения не менее 300 × *g* для выделения ДНК из лейкоцитов и 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 *сорбирующем растворе* 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 тканей растений и животных

В качестве образца для выделения ДНК рекомендуется брать 20–40 мг ткани животного и 50–100 мг ткани растения.

1. **(A) В случае использования пестика-гомогенизатора (входит в состав набора):**
   a. Поместите в 1,5 мл пробирку кусочек ткани.
   b. Добавьте к образцу
      - 200 мкл *лизирующего раствора AS*,
      - 70–100 мг *корунда*.
   c. Гомогенизируйте образец с помощью пестика-гомогенизатора.
   d. Добавьте к гомогенату еще 300 мкл *лизирующего раствора AS*. Перемешайте.

1. **(Б) В случае использования фарфоровой ступки (не входит в состав набора):**
   a. В ступку поместите кусочек ткани.
   b. Добавьте к образцу
      - 100 мкл деионизованной воды,
      - 200 мкл *лизирующего раствора AS*,
      - 300–500 мг *корунда*
   c. Гомогенизируйте образец в ступке.
   d. Добавьте в гомогенату еще 300 мкл *лизирующего раствора AS*, перемешайте.
   e. Перенесите смесь в 1,5 мл пробирку.

1. **(B) Приготовления лизата образцов тканей животных (хвоста мыши и других) без гомогенизации:**
   a. Поместите в 1,5 мл пробирку кусочек ткани,
   b. Добавьте к образцу 500 мкл *лизирующего раствора AS*.

2. Установите термостат на +55°C, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
3. Добавьте к образцу
   - 5 мкл раствора *РНКазы*,
   - 10 мкл раствора *протеиназы K*,

   Перемешайте.
4. **Для 1 (A) и 1 (Б):** инкубируйте полученную смесь 20 мин при +55°C, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза),

   Для 1 (B): инкубируйте полученную смесь при +55°C до полного завершения лизиса образца (1–4 часа для небольших кусочков органов и тканей с периодическим перемешиванием на вортексе, инкубация в течение ночи для хвоста мыши и других крупных кусочков органов и тканей. В лизате допустимо присутствие компонентов (волосы, кости и хрящи), не подвергающихся лизису таким способом).
5. Добавьте к образцу 350 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
6. Центрифугируйте образец в течение 10 мин.
7. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку супернатант (не более 800 мкл), центрифугируйте 60 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
8. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора A*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
9. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора B*, центрифугируйте 3 мин.
10. Поместите колонку в новую 1,5 мл пробирку, нанесите в центр колонки

50–100 мкл предварительно прогретого до +55°C *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 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 1,5 мл пробирку 500 мкл *лизирующего раствора AS*. Тщательно промойте в *лизирующем растворе AS* палочку с соскобом буккального эпителия. Прижмите к стенке ватный тампон и вращательным движением отожмите из него остатки лизирующего раствора.
3. Добавьте в пробирку 10 мкл раствора *протеиназы K*, перемешайте.
4. Инкубируйте полученную смесь 10 мин при +55°C, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
5. Добавьте к образцу 300 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
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 50–100 мкл предварительно прогретого до +55°C *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из цельной крови

Данный набор позволяет выделить ДНК из 100 мкл цельной крови (свежая или замороженная кровь, содержащая в качестве антикоагулянта ЭДТА, цитрат натрия, гепарин). Перемешайте переворачиванием пробирку с кровью, чтобы содержимое пробирки стало гомогенным, после чего отберите 100 мкл образца в отдельную 1,5 мл пробирку.

1. Установите термостат на +55°С, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. Смешайте в 1,5 мл пробирке 100 мкл цельной крови и 400 мкл *лизирующего раствора AS*.
3. Добавьте в пробирку 10 мкл раствора *протеиназы К*, перемешайте.
4. Инкубируйте полученную смесь 10 мин при +55°С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
5. Добавьте к образцу 300 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
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 А*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
8. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
9. Поместите колонку в новую 1,5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл предварительно прогретого до +55°С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из лейкоцитов

Предварительное выделение лейкоцитов обеспечивает более высокий выход ДНК по сравнению с выделением ДНК из цельной крови. Рекомендуемый объём цельной крови для выделения лейкоцитов — 1 мл.

1. Для выделения лейкоцитов из 1 мл цельной крови приготовьте 9 мл 1x *буфера для лизиса эритроцитов:* в 15 мл пробирке смешайте 900 мкл 10x *буфера для лизиса эритроцитов* и 8,1 мл деионизованной воды.
2. Установите термостат на +55°C, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
3. В 15 мл пробирке смешайте 1 мл цельной крови и 9 мл 1x *буфера для лизиса эритроцитов*, перемешайте и инкубируйте 5 мин при комнатной температуре.
4. Центрифугируйте пробирку 5 мин, 300 × *g*, надосадочную жидкость слейте, лейкоциты находятся в осадке.
5. Ресуспендируйте осадок клеток в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию в новую 1,5 мл пробирку.
6. Добавьте в пробирку
   - 400 мкл *лизирующего раствора AS*,
   - 5 мкл раствора *РНКазы*,
   - 10 мкл раствора *протеиназы K*,

   Перемешайте.
7. Инкубируйте полученную смесь 10 мин при +55°C, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
8. Добавьте к образцу 300 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
9. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
10. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора A*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.

11. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора B*, центрифугируйте 3 мин.
12. Поместите колонку в новую 1,5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл предварительно прогретого до +55°C *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из культур клеток животных и бактерий

Для выделения ДНК рекомендуется брать не более 5×10^6 животных клеток и 10^9 клеток грам-отрицательных бактерий.

Адгезионная культура клеток животных: удалите культуральную жидкость, снимите культуру клеток 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 животных: 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.

Бактериальная культура: бактерии, выращенные на твердой или жидкой питательной среде, соберите центрифугированием в течение 5–10 минут, 3000–5000 × *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. Добавьте в пробирку с образцом
   - 400 мкл *лизирующего раствора AS*,
   - 5 мкл раствора *РНКазы*,

- 10 мкл раствора *протеиназы К*,

Перемешайте.

3. Инкубируйте полученную смесь 10 мин при +55°С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
4. Добавьте к образцу 300 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
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 А*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
7. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
8. Поместите колонку в новую 1,5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл предварительно прогретого до +55°С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 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 мкл).

Элюция ДНК прогретым до +55°С *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.

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com