

Информация о продукте

Набор D-Plants для выделения ДНК из растений

D-Plants-10, D-Plants-50, D-Plants-250

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом.

Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей.

Протокол обновлён 09.06.2023.

1. Описание продукта

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из следующих образцов:

1. Листья, хвоя, тычинки, зелёные части растений
2. Корни, стебли, кора
3. Плоды, ягоды, семена
4. Мхи, лишайники
5. Одноклеточные водоросли

Принцип действия набора основан на селективной сорбции нуклеиновых кислот из предварительно лизированного образца на мембране из диоксида кремния, последующей промывке и элюции очищенного продукта.

Выделенная ДНК может быть использована для проведения ПЦР, нуклеотидной секвенирования и др.



2. Состав набора

	D-Plants-10 D-Plants-10p 10 выделений	D-Plants -50 D-Plants -50p 50 выделений	D-Plants -250 D-Plants -250p 250 выделений
Буфер для лизиса LB	10 мл	50 мл	4x60 мл
Буфер для нанесения на колонку ВВ	10 мл	50 мл	4x60 мл
Буфер для промывки WB	12 мл	60 мл	5x50 мл
Буфер для элюции EB	5 мл	15 мл	60 мл
РНКаза А, раствор	70	300	2x700
Пробирки для сбора фильтрата и колонками для сорбции образца	10 шт	50 шт	250 шт

3. Меры предосторожности

Осторожно! Буфер WB содержат 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.

4. Условия хранения

Набор для выделения ДНК может храниться при комнатной температуре (15-25 °С). Раствор РНКазы А хранить при температуре от -18 до -24 °С. Срок годности см. на упаковке.

5. Эксплуатация

Компоненты: LB, WB, ВВ, EB стабильны после вскрытия флаконов при температуре от +15°С до +25°С в течение всего срока годности при условии достаточной герметизации флаконов. Раствор РНКазы А стабилен в течение всего срока годности.

Внимание! Не нагревать набор выше температуры +25°C, несоблюдение температурного режима хранения и транспортировки снижает активность РНКазы А и эффективность выделения.

6. Условия работы

Температура окружающей среды от +15 до +25 °С;

Относительная влажность воздуха не более 80 %;

Атмосферное давление 630 – 800 мм. рт. ст.

7. Условия транспортировки

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

8. Оборудование и материалы, не входящие в набор

- Твердотельный термостат, поддерживающий температуру 65±1 °С;
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 gcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объема и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл;



9. Протокол выделения ДНК.

9.1. Подготовка образцов.

Внимание! При работе с высушенными образцами необходимо учитывать каким способом был подготовлен материал. В случае работы с коллекционными и старыми экземплярами возможно снижение количества и качества выделяемой ДНК за счёт температурной или временной деградации. В таком случае убедитесь, что у Вас есть возможность провести выделение из различных частей растения и провести выделение в нескольких повторах.

При наличии загрязнений (почва, насекомые и прочее) образцы необходимо промыть в очищенной воде, после удалить остаток жидкости одноразовыми бумажными салфетками.

Внимание! При работе с твёрдыми образцами убедитесь, что вы пользуетесь одноразовыми системой гомогенизации либо проведите полное удаление образца из системы гомогенизации после работы, чтобы избежать загрязнения последующих проб.

Внимание! Если необходимо поместить образцы тканей на **длительное хранение**, рекомендуется использовать **стабилизатор РНК (St-100)** или аналогичные реагенты. Стабилизатор РНК протестирован с листьями, хвоей и молодыми корнями.

9.1.1. Листья, хвоя, тычинки и подобные части растений.

При работе с мягкими частями растений рекомендуется использовать свежесрезанные образцы, лиофилизированные образцы, замороженные образцы в стабилизаторе РНК (St-100).

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Свежие образцы	Не более 100 мг
Замороженные образцы	Не более 100 мг
Образцы в стабилизаторе РНК	Не более 100 мг
Хвоя	Не более 100 мг
Сухие образцы	Не более 30 мг
Тычинки (полностью)	Не более 50 мг

9.1.2. Корни, стебли, кора.

При работе с твёрдыми образцами рекомендуется использовать механические гомогенизаторы либо мельницы. Выделение ДНК возможно только из хорошо гомогенизированных образцов. Снижение качества гомогенизации приводит к снижению выхода ДНК.

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Корни	Не более 30 мг
Кора	Не более 50 мг
Ветви	Не более 50 мг

9.1.3. Плоды, ягоды, семена.

При работе с образцами семян рекомендуется использовать механические гомогенизаторы либо мельницы. Выделение ДНК возможно только из хорошо гомогенизированных образцов. Снижение качества гомогенизации приводит к снижению выхода ДНК.

При работе с мягкими образцами их можно высушить с помощью этилового или изопропилового спирта.

- Перенести навеску в одноразовую пробирку на 1.5 мл. К навеске добавить 800 мкл спирта. Образец тщательно гомогенизировать с помощью одноразового пестика.
- Центрифугировать 1 мин, 10000 gcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.
- Повторно добавить 800 мкл спирта. Повторно гомогенизировать образец, допускается использовать пестик повторно.
- Центрифугировать 1 мин, 10000 gcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.
- Осадок сушить 15 мин комнатной температуре.



Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Плоды свежие	Не более 50 мг
Ягоды свежие	Не более 50 мг
Семена	Не более 50 мг
Плоды сухие	Не более 30 мг
Ягоды сухие	Не более 30 мг

9.1.4. Мхи, лишайники.

При работе с мхами и лишайниками убедитесь, что качественно удалён субстрат, к которому крепился образец. В противном случае в выделенном образце будет присутствовать ДНК субстрата.

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Мох	Не более 30 мг
Лишайник	Не более 30 мг

Убедитесь, что при лизисе весь образец будет помещён в буфер LB для лизиса.

9.1.5. Грибы.

При работе с плотными образцами грибов рекомендуется использовать механические гомогенизаторы либо мельницы. Выделение ДНК возможно только из хорошо гомогенизированных образцов. Снижение качества гомогенизации приводит к снижению выхода ДНК.

При работе с мягкими образцами их можно высушить с помощью этилового или изопропилового спирта.

- Перенести навеску в одноразовую пробирку на 1.5 мл. К навеске добавить 800 мкл спирта. Образец тщательно гомогенизировать с помощью одноразового пестика.
- Центрифугировать 1 мин, 10000 *g*. Удалить супернатант, не задевая осадок.

- Повторно добавить 800 мкл спирта. Повторно гомогенизировать образец, допускается использовать пестик повторно.
- Центрифугировать 1 мин, 10000 gcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.
- Осадок сушить 15 мин комнатной температуре.

Вид образца	Рекомендованная масса образца на 1 выделение
Грибы свежие	Не более 30 мг
Грибы сухие	Не более 15 мг

9.1.6. Одноклеточные водоросли.

При работе с суспензиями водорослей рекомендуется осадить образцы центрифугированием при 300-1000 gcf (в зависимости от вида образца). В случае если образец при центрифугировании плохо осаждается добавить 1/2 объёма 96% этанола от объёма образца. Полученный осадок промыть 80% этанолом. Центрифугировать 1 мин, 10000 gcf. Удалить супернатант, не задевая осадок.

Вид образца	Рекомендованный объём образца на 1 выделение
Суспензия одноклеточных водорослей	Не более 200 мкл

9.2. Лизис образцов.

9.2.1. Гомогенизация в жидком азоте.

- Отобрать образец тканей растений. При работе с образцами в стабилизаторе РНК (ST-100) осушить образец с помощью чистой салфетки. Взвесить образец.
- Полностью покрыть образец жидким азотом, тщательно гомогенизировать образец.

Примечание: качество гомогенизации влияет на выход ДНК. Рекомендуется добиться получения однородной суспензии образца.



- Быстро и аккуратно перенести измельчённый образец в чистую пробирку, содержащую 750 мкл буфера для лизиса LB, тщательно перемешать.

- Инкубировать 10 минут, 65°C. Охладить образец до комнатной температуры.

9.2.2. Гомогенизация с использованием одноразовых пестиков.

- Отобрать образец тканей растений. При работе с образцами в стабилизаторе РНК (ST-100) осушить образец с помощью чистой салфетки. Взвесить образец.

- Быстро и аккуратно перенести образец в чистую пробирку, содержащую 750 мкл буфера для лизиса LB.

- Одноразовым пестиком тщательно перетереть до образования насыщенного цветного раствора.

Примечание: качество гомогенизации влияет на выход ДНК. Рекомендуется добиться получения однородной суспензии образца.

- Инкубировать 10 минут, 65°C. Охладить образец до комнатной температуры.

9.2.3. Гомогенизация с использованием механического гомогенизатора.

- Отобрать образец тканей растений. При работе с образцами в стабилизаторе РНК (ST-100) осушить образец с помощью чистой салфетки. Взвесить образец.

- Быстро и аккуратно перенести образец в чистую пробирку с винтовой крышкой, содержащую 750 мкл буфера для лизиса LB и, если требуется, матрицу для гомогенизации.

- 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 буфер для лизиса LB полностью покрывал матрицу для гомогенизации и образец ткани. Если количество буфера для лизиса LB недостаточно, то увеличить объём

буфера для лизиса LB либо уменьшить количество матрицы для гомогенизации.

9.3. Нанесение на колонку.

1. Центрифугировать лизат 5 мин, 12000 gcf. Отобрать супернатант и перенести в чистую пробирку.

Примечание: при выделении из зелёных частей растений зелёный пигмент образует отдельную верхнюю фазу, отбор супернатанта производить, не задевая зелёный пигмент.

2. Добавить 5 мкл РНКазы А. Инкубировать 10 мин, 37°C.

3. Добавить равный объём буфера для нанесения на колонку ВВ, тщательно перемешать. Инкубировать 1 минуту при комнатной температуре.

4. Нанести не более 800 мкл лизата на колонку. Плотно закрыть крышку колонки.

5. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.

Примечание: если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования, не добавляя новую порцию образца или буфера LB.

Примечание: Если объём лизата больше 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование.

9.4. Промывка колонки.

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.

2. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.

3. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 gcf для полного удаления буфера WB.

9.5. 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°C). Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf.
 - При увеличении объема элюции увеличивается количество ДНК и снижается концентрация ДНК. Количество ДНК при элюции объемами 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 содержит 0.01 М Tris•HCl (pH 8.0). Элюировать образец также можно TE буфером (0.01 М Tris-HCl, 0.001 М 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.

10. 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 $\lambda = 260$ нм.

Посчитать концентрацию ДНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 50$ мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск
Ул. Инженерная, 28
Тел.: (383) 363-51-91
www.biolabmix.ru
sales@biolabmix.ru