

## Информация о продукте

Набор D-Tissues для выделения ДНК из тканей животных  
 D-Tissues-10, D-Tissues-50, D-Tissues-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 22.07.2022.

### 1. Описание продукта

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из тканей животных.

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

Выделенная ДНК может быть использована для проведения ПЦР, ник-трансляции, секвенирования и др.

### 2. Состав набора

Таблица 1. Состав набора линейки D-Tissues.

	D-Tissues-10 10 выделений	D-Tissues -50 50 выделений	D-Tissues -250 250 выделений
PBS	2.5 мл	12 мл	60 мл
Буфер для лизиса LB	0.6 мл	3 мл	15 мл
Буфер для нанесения на колонку BB	8.5 мл	45 мл	2x110 мл
Буфер для промывки WB1	5.5 мл	30 мл	2x70 мл
Буфер для промывки WB2	5.5 мл	30 мл	2x70 мл
Буфер для элюции EB	5 мл	15 мл	60 мл
Протеиназа К, раствор	240 мкл	1.2 мл	5x1.2 мл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца	10 шт	50 шт	250 шт



Биолабмикс®

### **3. Меры предосторожности**

**Осторожно!** Буферы для нанесения на колонку ВВ и для промывки WB1 содержат раствор хаотропной соли, оказывающий раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

**Осторожно!** Буфер для промывки WB2 содержит 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.

**Внимание!** При работе с биологическими образцами следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как исследуемый материал является потенциально инфицированным, способным длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

### **4. Условия хранения**

Набор для выделения ДНК хранить при комнатной температуре (15-25 °С) в течение 12 месяцев.

Раствор протеиназы К хранить при температуре от -18 до -24 °С в течение 12 месяцев.

### **5. Эксплуатация**

Компоненты: PBS, LB, ВВ, WB1, WB2, EB стабильны после вскрытия флаконов при температуре от +15°С до +25°С в течение всего срока годности при условии достаточной герметизации флаконов. Раствор протеиназы К стабилен после вскрытия в течение 12 месяцев.

**Внимание!** Не подвергать набор воздействию прямых солнечных лучей и не нагревать набор выше температуры +25°С, несоблюдение температурного режима хранения и транспортировки снижает активность протеиназы К и эффективность выделения.

**Внимание!** не хранить смесь буфера для лизиса LB и протеиназы К.

### **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 протеиназу К, производить при комнатной температуре (от +15 до +25 °С). Допускается транспортировка при комнатной температуре в течение 14 суток.

## **8. Оборудование и материалы, не входящие в набор**

- Твердотельный термостат, поддерживающий температуру  $56 \pm 1$  °С;
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 gcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл;

## **9. Протокол выделения ДНК.**

**Внимание!** Рекомендуется проводить выделение из свежих образцов тканей. Если необходимо поместить образцы тканей на **длительное хранение**, рекомендуется использовать **стабилизатор РНК (St-100)** или аналогичные реагенты.

### **9.1. Подготовка и лизис образцов.**

#### **9.1.1. Виды образцов**

Для выделения ДНК допустимо использовать образцы в стабилизаторе РНК (St-100) либо свежие, охлаждённые образцы, либо замороженные образцы в жидком азоте. Перед началом работы рекомендуется определиться с методом гомогенизации образцов, см п. 9.1.2.

##### **9.1.1.1 Образцы в стабилизаторе РНК**

Образец извлечь из стабилизатора и взвесить. Для выделения использовать не более 30 мг ткани (не более 10 мг селезёнки).

##### **9.1.1.2. Свежие образцы**

Свежеполученные образцы рекомендуется незамедлительно взвесить. Не допускать заветривания образца или хранение его без стабилизатора. Для выделения использовать не более 30 мг ткани (не более 10 мг селезёнки).

##### **9.1.1.3. Замороженные образцы**

Замороженные образцы необходимо взвесить. Не рекомендуется использование замороженных образцов хранившихся более 1 года при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для выделения использовать не более 30 мг ткани (не более 10 мг селезёнки).

##### **9.1.1.4. Рекомендации по хранению образцов**

Образцы в стабилизаторе РНК (St-100)

- Хранение 3 дня при температуре  $37^{\circ}\text{C}$
- Хранение 1 неделю при температуре от  $15$  до  $25^{\circ}\text{C}$
- Хранение 1 месяц при температуре от  $2$  до  $8^{\circ}\text{C}$
- Хранение от 1 года при температуре от  $-24$  до  $-18^{\circ}\text{C}$
- Хранение не более 5 лет при температуре от  $-80$  до  $-70^{\circ}\text{C}$

Свежие образцы

- Незамедлительное использование



Биолабмикс®

- Хранение не более 1 года при температуре от -24 до -18°C
  - Хранение не более 5 лет при температуре от -80 до -70°C
- Замороженные образцы
- Хранение не более 1 года при температуре от -24 до -18°C
  - Хранение не более 5 лет при температуре от -80 до -70°C

### **9.1.2. Гомогенизация образцов**

#### **9.1.2.1. Гомогенизация с использованием жидкого азота**

Поместить образец ткани в жидкий азот. Тщательно измельчить образец в ступке с помощью пестика. Перенести измельченный образец в жидком азоте в одноразовую микропробирку на 1.5 мл. Подождать, пока азот испарится, но не допускать того, чтобы ткань начала таять. Добавить 200 мкл PBS.

#### **9.1.2.2. Гомогенизация с использованием механического гомогенизатора**

Добавить к образцу ткани 200 мкл PBS. Плотнo закрыть пробирку. 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 PBS полностью покрывал матрицу для гомогенизации и образец ткани. Если количество PBS недостаточно, то использовать дополнительную аликвоту PBS или физраствора (дополнительные аликвоты данных растворов не входят в набор).

#### **9.1.2.3. Гомогенизация с использованием скальпеля**

Порезать образец ткани на мелкие фрагменты. Поместить образец в одноразовую микропробирку на 1.5 мл, добавить 200 мкл PBS

**Примечание:** чем мельче фрагменты ткани, тем быстрее пройдет лизис образца.

#### **9.1.3. Лизис образцов**

1. К измельченному образцу ткани в 200 мкл PBS чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл протеиназы К и 50 мкл буфера для лизиса LB.
2. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
3. Инкубировать 0.5-3 ч при температуре 56 °C до растворения ткани. Периодически перемешивать вручную или с помощью вортекса.

**Примечание:** Время лизиса зависит от типа ткани и степени измельчения образца. Процедуру лизиса образца допускается оставить на ночь. Для более эффективного лизиса рекомендуется периодически перемешивать образец 2-3 раза в час либо использовать термостатируемый шейкер.

4. После окончания лизиса добавить к образцу 700 мкл буфера для нанесения на колонку ВВ. Энергично перемешать вручную или на вортексе. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре.
5. Центрифугировать образец 10 мин, 12000 gcf.

### **9.2. Нанесение на колонку.**

1. Перенести 800 мкл супернатанта на колонку. Плотно закрыть крышку колонки.
2. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.

### **9.3. Промывка колонки.**

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 gcf. Удалить фильтрат.
3. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 gcf для полного удаления буфера WB2.

### **9.4. Элюция ДНК**

1. Перенести колонку в чистую микропробирку на 1.5 мл. Плотно прижать колонку к пробирке.
2. Нанести на центр фильтра колонки 60-200 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25 °C). Центрифугировать 1 мин, 12000 gcf.

**Примечание:** Рекомендуемый объем буфера для элюции EB составляет 100 мкл, при уменьшении объема возможно снижение суммарного выхода ДНК, минимальный объем буфера для элюции EB составляет 60 мкл.

Состав буфера для элюции EB. 0.01 M Tris•HCl (pH 8.0).

Элюцию образца можно производить ТЕ буфером (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0-8.5) либо слабощелочной водой (pH 8.0-8.5), обработанной DEPC.

Элюат, содержащий ДНК, хранить при температуре -20 °C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 mM.

**Внимание!** Содержание EDTA в элюате может в последующем негативно влиять на ферментативные реакции.



Биолабмикс®

## 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  $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$ .

**Примечание:** Значения количества и качества выделенной ДНК зависят от типа биоматериала, условий и длительности хранения, а также длительности лизиса. Ориентировочное количество выделяемой ДНК для разных видов тканей приведён в таблице 2.

Таблица 2. Количество выделяемой ДНК из 10 мг ткани на примере M. Musculus.

Вид ткани	Количество ДНК
Печень	От 5 до 20 мкг
Сердце	От 1 до 10 мкг
Лёгкие	От 10 до 30 мкг
Почки	От 5 до 20 мкг
Селезёнка	От 20 до 80 мкг

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