

Информация о продукте

Набор D-Cells для выделения ДНК из клеток животных и бактерий D-Cells-10, D-Cells-50, D-Cells-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 14.09.2022.

1. Описание продукта

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из следующих образцов:

1. культуры клеток млекопитающих
2. культуры клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий

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, нуклеотидной секвенирования и др.

2. Состав набора

	D-Cells-10 10 выделений	D-Cells -50 50 выделений	D-Cells -250 250 выделений
PBS	2 мл	8.5 мл	45 мл
Буфер для лизиса LB	8 мл	40 мл	2x100 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
Буфер для растворения лизоцима	400 мкл	2 мл	10 мл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца	10 шт	50 шт	250 шт

3. Меры предосторожности

Осторожно! Буферы для лизиса LB 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! Буферы для промывки WB1 и WB2 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 хранить при комнатной температуре (15-25 °С) в течение 12 месяцев.

5. Эксплуатация

Компоненты: PBS, LB, WB1, WB2, EB, Буфер для растворения лизоцима 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 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 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 56 ± 1 °C;
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 gcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объема и наконечники для них;
- Лизоцим;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл;

9. Протокол выделения ДНК.

9.1. Подготовка и лизис образцов.

9.1.1. Культуры клеток животных. Монослойные культуры.

1. Снять клетки с поверхности культурального пластика методом, используемым в лаборатории, или стандартным методом, рекомендуемым для данной культуры клеток.
2. Перенести образец суспензии клеток (не более $2 \cdot 3 \cdot 10^6$ клеток) в одноразовую микропробирку.
3. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 gcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 150 мкл PBS.
4. Чистым одноразовым наконечником добавить 150 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы К.
5. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °C.
7. Добавить к образцу 500 мкл буфера для лизиса LB.
8. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
9. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25 °C).

9.1.2. Культуры клеток животных. Монослойные культуры. Культуральные планшеты.

При работе с 12-, 24- или 96-луночными планшетами или с культуральной посудой с аналогичной площадью ячейки допускается лизис непосредственно в лунке.

1. Удалить культуральную среду из лунки планшета
2. В лунку 12-луночного планшета добавить 150 мкл PBS, 250 мкл буфера для лизиса LB,



В лунку 24- или 96-луночного планшета добавить 100 мкл PBS и 100 мкл буфера для лизиса LB.

3. Инкубировать 3-5 минут. Аккуратно, избегая пенообразования, перемешать содержимое лунки пипетированием, убедиться, что клетки открепилась от ячейки.
4. Чистым одноразовым наконечником перенести образец в одноразовую микропробирку. Добавить 20 мкл протеиназы К.
5. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °С.
7. Добавить к образцу 400 мкл (12-луночный планшет) или 600 мкл (24- или 96-луночный планшет) буфера для лизиса LB.
8. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25 °С).

9.1.3. *Культуры клеток животных. Суспензионные культуры.*

1. Перенести образец суспензии клеток (не более $2-3 \cdot 10^6$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 gcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 150 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 150 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы К.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °С.
6. Добавить к образцу 500 мкл буфера для нанесения на колонку LB.
7. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25 °С).

9.1.4. *Культуры клеток бактерий. Грамотрицательные бактерии.*

1. Перенести 0.5-2 мл суспензии ночной культуры клеток (не более $1 \cdot 10^8$ клеток) в одноразовую микропробирку.

Примечание: При работе с культурами клеток *E.Coli* рекомендуется использовать не более 0.5 мл ночной культуры клеток.

2. Осадить клетки центрифугированием 1 мин, 10000 gcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 150 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 150 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы К.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °С.
6. Добавить к образцу 500 мкл буфера для нанесения на колонку LB.
7. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25 °С).

9.1.5. *Культуры клеток бактерий. Грамположительные бактерии*

Подготовка раствора лизоцима:

- К навеске лизоцима чистым одноразовым наконечником добавить необходимый объём буфера для растворения лизоцима (**входит в состав набора**).
- Тщательно перемешать на вортексе.
- Инкубировать 30 мин при Tкомн (15-25 °С), периодически перемешивая до полного растворения лизоцима.
- Хранить при -20 °С.

1. Перенести 0.5-2 мл суспензии ночной культуры клеток (не более $1 \cdot 10^8$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 1 мин, 10000 gcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 150 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) в буфере для растворения лизоцима (50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ EDTA (pH 8), 50% глицерин).

Примечание: лизоцим не входит в набор, **буфер для растворения лизоцима поставляется вместе с набором**. Раствор лизоцима хранить в буфере для растворения лизоцима не более 6 месяцев при -20 °С.

4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 10 мин при Tкомн (15-25 °С).
5. Чистым одноразовым наконечником добавить 50 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы К.



6. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
7. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °С.
8. Добавить к образцу 600 мкл буфера для лизиса LB.
9. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25 °С).

9.2. Нанесение на колонку.

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

Примечание: Если объём лизата больше 800 мкл, повторно нанести избыток на ту же колонку и повторить центрифугирование. Если после центрифугирования часть раствора осталась на колонке, повторить центрифугирование увеличив время и/или скорость центрифугирования, не добавляя новую порцию буфера LB.

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 °С). Центрифугировать 1 мин, 12000 gcf.

Примечание: Рекомендуется использовать 100 мкл буфера для элюции.

Примечание: При меньшем объёме буфера для элюции возможно снижение суммарного выхода ДНК, но концентрация ДНК в полученном растворе будет выше.

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

Элюцию образца можно производить TE 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 °С. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 мМ.

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

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