

Наборы diaGene для выделения ДНК и РНК

| | | |
|-------|------|--|
| Кат.№ | 3316 | для выделения плазмидной ДНК из бактерий |
| Кат.№ | 3317 | для выделения РНК из культур клеток |
| Кат.№ | 3318 | для выделения геномной ДНК из культур бактериальных клеток |
| Кат.№ | 3319 | для выделения ДНК из культур клеток |
| Кат.№ | 3320 | для выделения ДНК из пищевых продуктов и сырья |
| Кат.№ | 3321 | для выделения ДНК из плазмы крови |
| Кат.№ | 3322 | для выделения ДНК из соскобов буккального эпителия |
| Кат.№ | 3323 | для выделения ДНК из цельной крови |
| Кат.№ | 3324 | для выделения РНК из плазмы крови |
| Кат.№ | 3326 | для элюции ДНК из агарозного геля |
| Кат.№ | 3352 | для выделения ДНК из растительной ткани |
| Кат.№ | 3361 | для выделения ДНК из цельной крови |
| Кат.№ | 3367 | для выделения ДНК из сперматозоидов |
| Кат.№ | 3403 | для выделения ДНК из слюны |
| Кат.№ | 3489 | для выделения ДНК из широкого спектра биологических образцов |

Набор diaGene для выделения ДНК из цельной крови

Состав набора

| | 50 выделений Кат.№ 3361.0050 | 250 выделений Кат.№ 3361.0250 |
|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Буфер LBB | 5 мл | 25 мл |
| Раствор для сорбции | 14 мл | 70 мл |
| Раствор для промывки 1 | 40 мл | 2 x 80 мл |
| Раствор для промывки 2 (концентрат) | 18 мл | 3 x 30 мл |
| Протеиназа К | 2 мг | 5 x 2 мг |
| Микроколонки | 50 шт. | 250 шт. |
| 2 мл пробирки для сбора фильтрата | 50 шт. | 250 шт. |

Методика рассчитана на выделение ДНК из 100 мкл цельной крови, стабилизированной ЭДТА. Объём образца может варьировать от 50 до 200 мкл. При этом объёмы **Буфера LBB**, **Протеиназы К** и **Раствора для сорбции** должны быть изменены пропорционально.

Компания Диаэм постоянно работает над совершенствованием технологии выделения нуклеиновых кислот и улучшением качества наборов. Поэтому рекомендуем ознакомиться с последней версией протокола выделения на нашем сайте www.dia-m.ru (<https://www.diam.ru/reactive.php?reactivesubsection=1073&vendorid=318>)

Особенности хранения и срок годности

Все реактивы (кроме протеиназы К) и колонки **хранить** при комнатной температуре (+15 +25 °С).

Протеиназу К хранить при +2 +8 °С, после растворения - при -20°С.

После использования пакет с колонками рекомендуется плотно закрывать.

Срок годности: 12 месяцев с даты изготовления.

При транспортировке особые условия не требуются.

Дополнительное оборудование и реагенты

- Твердотельный термостат, желательно с функцией перемешивания.
- Микроцентрифуга для пробирок типа эппендорф ёмкостью 1.5-2 мл с максимальной скоростью центрифугирования не менее 13000 об/мин.

- Дозаторы переменного объёма и наконечники с фильтрами к ним.
- Стерильные пробирки типа эппендорф ёмкостью 1.5 мл, свободные от нуклеаз.
- 96% этанол.
- Буфер PBS (для выделения ДНК из лейкоцитарного осадка).
- Деионизованная автоклавируемая вода или вода, свободная от нуклеаз.

Перед началом работы:

- Добавьте 96% этанол в **Раствор для промывки 2** (42 мл для 50 выделений, 70 мл в каждый флакон для 250 выделений) и тщательно перемешайте.
- Растворите **Протеиназу К** в деионизованной воде (2 мг в 110 мкл, 10 мг в 520 мкл). Рекомендуется расфасовать раствор Протеиназы К на аликвоты по 20-50 мкл.
- Возможно выпадение осадка в **Растворе для сорбции**. Для растворения осадка перед использованием необходимо прогреть раствор в течение 5-10 минут при +55°C. **Не нагревать свыше +65°C!**
- Во избежание загрязнения образцов не рекомендуется сливать фильтрат через край. Для удаления фильтрата используйте автоматическую пипетку или аспиратор.
- Для перевода значения скорости центрифугирования из **об/мин** в **g** воспользуйтесь специальными таблицами

Выделение геномной ДНК из цельной крови

1. К 100 мкл образца добавьте 100 мкл **Буфера LBB**, тщательно перемешайте.
2. Добавьте 2 мкл раствора **Протеиназы К**, тщательно перемешайте и инкубируйте в термостате с перемешиванием при 350-400 об/мин при +56°C 30 минут. Если термостат без перемешивания - периодически встряхивайте пробирки.
3. Добавьте 280 мкл **Раствора для сорбции** и перемешайте на вортексе.
4. Внесите в колонку 100 мкл **Раствора для промывки 1** (это не обязательно, но повышает эффективность сорбции) и выделяемый образец (не более 550 мкл). Центрифугируйте 2 минуты при 10000g. **Необходимо учитывать, что объём колонки составляет 650 мкл.** Если объём образца превышает 650 мкл, последовательно нанести образец на колонку, удаляя каждый раз фильтрат из пробирки для сбора фильтрата.
5. Нанесите на фильтр колонки 300 мкл **Раствора для промывки 1** и центрифугируйте 2 минуты при 10000g. Удалите фильтрат.
6. Повторите п. 5.
7. Нанесите на фильтр колонки 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугируйте 1 минуту при 12500-13000g. Удалите фильтрат.
8. Повторите п. 7.

9. Поместите микроколонку в ту же пробирку и центрифугируйте 1 минуту при 12500-13000g для удаления остатков раствора.
10. Поместите микроколонку в новую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 50 мкл деионизованной воды и подождите 1-3 минуты.

Минимальный объём воды для элюции – 30 мкл, максимальный – 100 мкл. При элюции 30 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 100 мкл – максимальный выход.

11. Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 12500-13000g.

В среднем из 100 мкл человеческой крови выделяется от 0.5 до 2 мкг геномной ДНК. Ёмкость колонки составляет до 20 мкг ДНК. Для получения большего количества геномной ДНК рекомендуется **выделение из лейкоцитарного осадка**.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов

1. Заморозьте образцы при -20°C для лизиса эритроцитов.
2. После оттаивания центрифугируйте образцы при 1500 g в течение 10 минут.
3. Удалите супернатант, по возможности не затрагивая осадок.
4. Ресуспендируйте осадок в 200 мкл буфера PBS. Добавьте 200 мкл **Буфера LBB** и 8 мкл **Раствора протеиназы К**. Инкубируйте образцы при +56°C в течение 30 минут в термостате с перемешиванием либо периодически встряхивая пробирки.
5. Добавьте к образцам 560 мкл **Раствора для сорбции**, перемешайте на вортексе.
6. Внесите в колонку 600 мкл выделяемого образца. Центрифугируйте 3 минуты при 10000 g. Необходимо учитывать, что объём колонки составляет 650 мкл. Удалите фильтрат и внесите в колонку оставшуюся часть образца. Центрифугируйте 3 минуты при 10000 g. Удалите фильтрат. Если выделение производится из осадка с объёма крови более 500 мкл - то лизат может быть вязким и плохо фильтрующимся. В этом случае увеличьте время центрифугирования до 5 минут.

Дальнейшее выделение ДНК производится по методике для цельной крови, описанной выше, начиная с п.5.