

Набор *diaGene* для выделения ДНК из растительной ткани

Набор *diaGene* предназначен для выделения ДНК из растительной ткани. Биологическим материалом могут служить зелёные части растения (стебель, лист), семена или сок растения. Набор рассчитан на выделение ДНК из образцов массой 20-150 мг (для высушенных растений - до 20 мг, для сока - до 50 мкл).

Выделение ДНК из растительной ткани с помощью набора *diaGene* начинается с гомогенизации образца и лизиса клеток. Гомогенизация – один из важнейших этапов, поскольку от нее зависит конечный выход ДНК. Затем, лизат, осветленный с помощью центрифугирования, наносится на микроколону. ДНК избирательно связывается с фильтром микроколонки в присутствии хаотропной соли. Связанная ДНК отмывается от примесей и элюируется в виде чистого препарата, пригодного для большинства молекулярно-биологических манипуляций, например, ПЦР.

Выход ДНК может составлять до 20 мкг и зависит от видовой принадлежности растения; от того, какая часть растения используется; от возраста растения; от условий и сроков хранения биологического материала; от тщательности гомогенизации биологического образца и других факторов.

Для работы с большим количеством образцов в линейке наборов *diaGene* предлагаются наборы для выделения нуклеиновых кислот из растительной ткани на магнитных частицах с помощью станции выделения KingFisher Flex.

Также в линейке наборов *diaGene* для выделения нуклеиновых кислот из растительной ткани готовятся к выпуску наборы для выделения РНК и для выделения тотальной нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК). Выделение смеси ДНК и РНК удобно для диагностики инфекционных заболеваний, так как бактериальные патогены растений – ДНК-содержащие организмы, а большинство вирусных патогенов – РНК-содержащие.

Все реагенты хранятся при комнатной температуре (+15...+25 °С).

После использования пакет с колонками рекомендуется плотно закрывать

Дополнительные материалы и реагенты

1. Ступка с пестиком (для ручной гомогенизации) или гомогенизатор и пробирки с матриксом для автоматической гомогенизации,
2. Твердотельный термостат, желательно с функцией перемешивания,
3. Микроцентрифуга для пробирок типа эппендорф (емкостью 1,5 – 2 мл) с максимальной скоростью центрифугирования не менее 13000 об/мин,
4. Дозаторы переменного объема и наконечники к ним,
5. Стерильные пробирки типа эппендорф ёмкостью 1.5 мл, свободные от нуклеаз,
6. 96% этанол,
7. β-меркаптоэтанол,
8. РНКаза А,
9. Буфер PBS,
10. Жидкий азот (для ручной гомогенизации образцов),
11. Деионизированная автоклавируемая вода или вода, свободная от нуклеаз.

Состав набора

	50 выделений Кат.№ 3352.0050	250 выделений Кат.№ 3352.0250
Буфер PLB-1	55 мл	3 x 90 мл
Буфер PLB-2	28 мл	2 x 70 мл
Буфер PVB-1	40 мл	2 x 100 мл
Буфер PWB-1 (концентрат)	30 мл	3 x 50 мл
Буфер PWW-1 (концентрат)	19 мл	4 x 24 мл
Микроколоники	50 шт.	5 x 50 шт
2 мл пробирки для сбора фильтрата	50 шт.	5 x 50 шт

Перед началом работы

1. Добавьте 96% этанол к следующим буферам:

- **PWB-1** – 30 мл для 50 выделений, 50 мл в каждый флакон для 250 выделений,
 - **PWW-1** – 51 мл для 50 выделений, по 64,5 мл в каждый флакон для 250 выделений.
2. Возможно выпадение осадка в буферах **PBB-1** и **PWB-1**. Проверьте буферы перед использованием, в случае выпадения осадка, прогрейте при +50°C в течение 10 минут и тщательно перемешайте. Не нагревать свыше +55°C. После добавления этанола в буфер **PWB-1** осадок выпадать не будет. Буфер **PBB-1** необходимо проверять перед каждым использованием.
 3. Так как в растительной ткани содержится большое количество полифенолов и полисахаридов, то перед выделением ДНК рекомендуется выдерживать зеленые части растения в темноте при температуре +4...+8 °С в течение нескольких часов. При этом количество выделяемой ДНК может немного снизиться, но повышается ее качество.
 4. Скорости центрифугирования в об/мин приведены для настольной центрифуги MiniSpin (радиус ротора 6 см). Для центрифуг другого типа воспользуйтесь таблицами перевода g в об/мин

I. Выделение ДНК из зелёных частей растения (стебель, лист)

1. Гомогенизируйте образец.
 - 1.1. В случае ручной гомогенизации - приготовьте микроцентрифужную пробирку емкостью 1,5 или 2 мл, налейте в нее 1 мл буфера для **PLB-1** и 20 мкл меркаптоэтанола*. Перемешайте. Поместите образец (20-150 мг свежей растительной ткани или 5-20 мг высушенного растения) в ступку, налейте в ступку жидкий азот. Измельчите образец пестиком, перенесите его в пробирку с буфером **PLB-1** и меркаптоэтанолом.
 - 1.2. В случае механической гомогенизации налейте в пробирку для гомогенизации с соответствующим матриксом** 1 мл буфера **PLB-1** и 20 мл меркаптоэтанола*. Гомогенизируйте образец согласно рекомендациям производителя гомогенизатора.

Примечание: * - для некоторых растений (листья винограда, чая, эвкалипта и арбуза) объем меркаптоэтанола может быть увеличен до 50 мкл.

** - в случае использования гомогенизатора FastStep-24 5G (MP Biomedicals) рекомендуются матриксы А и S того же производителя.
2. Центрифугируйте гомогенат в течение 10 минут при 12000 об/мин. Перенесите супернатант в чистую 1,5 мл центрифужную пробирку.
3. Инкубируйте супернатант в твердотельном термостате с функцией перемешивания (или регулярно встряхивая пробирку) в течение 20 минут при +60 °С и 400 об/мин.
4. Центрифугируйте супернатант в течение 5 минут при 13000 об/мин (11500-12000g).
5. Отберите 200 мкл супернатанта, не затрагивая осадка, перенесите в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку и добавьте 700 мкл буфера **PBB-1**. Тщательно перемешайте. Объем супернатанта может быть уменьшен или увеличен, при этом, объем буфера **PBB-1** должен быть пропорционально изменен. Оставшийся супернатант можно хранить при -20°C в течение недели или при -86°C в течение 2 месяцев.
6. Перенесите 650 мкл образца в микроколонку и центрифугируйте ее в течение 1 минуты при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.

Необходимо учитывать, что объем пробирки для сбора фильтрата составляет 650 мкл. Если объем образца превышает 650 мкл, последовательно нанесите образец на колонку, удаляя каждый раз жидкость из пробирки для сбора фильтрата. Для удаления фильтрата рекомендуется использовать пипетку или аспиратор. Не рекомендуется выливать фильтрат через край.
7. Перенесите микроколонку в новую пробирку для сбора фильтрата. Нанесите на колонку 500 мкл буфера **PWB-1**. Центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.
8. Повторите п. 7.
9. Нанесите на колонку 650 мкл буфера **PWW-1**. Центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.
10. Повторите п. 9.
11. Центрифугируйте пустую колонку 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g), чтобы удалить из нее остатки жидкости.
12. Перенесите колонку в чистую 1,5 мл центрифужную пробирку. Внесите в колонку 30 - 150 мкл деионизированной воды или воды, свободной от нуклеаз. При элюции 30 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 150 мкл - максимальный выход. Оптимальный объем элюции – 80 - 100 мкл. Инкубируйте колонку при комнатной температуре 1 – 3 минуты и элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 минуты при 13000 об/мин (11500-12000g).

II. Выделение ДНК из растительного сока

Если биологическим материалом для выделения ДНК служат сочные части растения (например, картофельная ботва или клубни), то можно выделить ДНК из сока растения. Гомогенизация при этом не требуется.

1. Выжмите сок из образца, используя, например, ступку и пестик. Замораживание образца в жидком азоте при этом не требуется.
2. Перенесите 50 мкл сока в чистую 1,5 мл центрифужную пробирку, добавьте 250 мкл **буфера PLB-1** и 15 мкл меркаптоэтанола, тщательно перемешайте. Если сок очень густой - можно развести его буфером PBS, при этом объем **буфера PLB-1** увеличивается пропорционально.
3. Инкубируйте образец в твердотельном термостате с функцией перемешивания (или регулярно встряхивая пробирку) в течение 20 минут при +60°C и 400 об/мин.
4. Центрифугируйте образец 10 минут при 13000 об/мин (11500-12000g). Осторожно, не затрагивая осадка, перенесите 200 мкл супернатанта в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку и добавьте 700 мкл **буфера PVB-1**. Тщательно перемешайте. Объем супернатанта может быть уменьшен, тогда объем **буфера PVB-1** должен быть пропорционально уменьшен. Оставшийся супернатант использовать не рекомендуется, так как попадание в него частиц осадка влияет на чистоту выделенной ДНК.
5. Перенесите 650 мкл образца в микроколону и центрифугируйте ее в течение 1 минуты при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.

Необходимо учитывать, что объем колонки составляет 650 мкл. Если объем образца превышает 650 мкл, последовательно нанесите образец на колонку, удаляя каждый раз жидкость из пробирки для сбора фильтрата. Для удаления фильтрата рекомендуется использовать пипетку или аспиратор. Не рекомендуется выливать фильтрат через край.

6. Перенесите микроколону в новую пробирку для сбора фильтрата. Нанесите на колонку 500 мкл **буфера PWB-1**. Центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.
7. Повторите п. 6.
8. Нанесите на колонку 650 мкл **буфера PWW-1**. Центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.
9. Повторите п. 8.
10. Центрифугируйте пустую колонку 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g), чтобы удалить из нее остатки жидкости.
11. Пренесите колонку в чистую 1,5 мл центрифужную пробирку. Внесите в колонку 30 - 150 мкл деионизированной воды или воды, свободной от нуклеаз. При элюции 30 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 150 мкл - максимальный выход. Оптимальный объем элюции – 80 - 100 мкл. Инкубируйте колонку при комнатной температуре 1 – 3 минуты и элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 минуты при 13000 об/мин (11500-12000g).

III. Выделение ДНК из семян

1. Добавьте к образцам буфер PBS из расчёта 1 мл буфера на 500 мг сухого вещества.
 2. Инкубируйте образцы в буфере PBS в течение 8-12 часов при +2...+8°C.
 3. Гомогенизируйте образец.
 - 3.1. В случае ручной гомогенизации – приготовьте центрифужную пробирку емкостью 1,5 или 2 мл, налейте в нее 500 мкл **буфера PLB-2** и 10 мл меркаптоэтанола. Перемешайте. Поместите образец массой до 250 мг в ступку, налейте в ступку жидкий азот. Измельчите образец пестиком, перенесите его в пробирку с **буфером PLB-2** и меркаптоэтанолом.
 - 3.2. В случае механической гомогенизации налейте в пробирку для гомогенизации с соответствующим матриксом* 500 мкл **буфера PLB-2** и 10 мкл меркаптоэтанола. Поместите в пробирку с буфером до 250 мкл образца и гомогенизируйте его согласно рекомендациям производителя гомогенизатора.
- Примечание:* * - в случае использования гомогенизатора FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) рекомендуется матрикс S того же производителя.
4. Центрифугируйте гомогенат 10 минут при 13000 об/мин (11500-12000g). Перенесите супернатант в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку. Осадок выбросьте.

5. Инкубируйте образец в твердотельном термостате с функцией перемешивания (или регулярно встряхивая пробирку) в течение 20 минут при +60°C и 400 об/мин.
6. Центрифугируйте супернатант в течение 3 минут при 12000 об/мин.
7. Отберите 200 мкл супернатанта, перенесите в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку и добавьте 700 мкл **буфера РВВ-1**. Тщательно перемешайте. Объем супернатанта может быть уменьшен или увеличен, при этом объем **буфера РВВ-1** должен быть пропорционально изменен. Оставшийся супернатант можно хранить при -20°C в течение недели или при -86°C в течение 2 месяцев.
8. Перенесите 650 мкл образца в микроколонку и центрифугируйте ее в течение 1 минуты при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.
Необходимо учитывать, что объем колонки составляет 650 мкл. Если объем образца превышает 650 мкл, последовательно нанесите образец на колонку, удаляя каждый раз жидкость из пробирки для сбора фильтрата. Для удаления фильтрата рекомендуется использовать пипетку или аспиратор. Не рекомендуется выливать фильтрат через край.
9. Перенесите микроколонку в новую пробирку для сбора фильтрата. Нанесите на колонку 500 мкл **буфера РВВ-1**. Центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.
10. Повторите п. 9.
11. Нанесите на колонку 650 мкл **буфера РВВ-1**. Центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g). Удалите фильтрат.
12. Повторите п. 11.
13. Центрифугируйте пустую колонку 1 минуту при 13000 об/мин (11500-12000g), чтобы удалить из нее остатки жидкости.
14. Перенесите колонку в чистую 1,5-мл центрифужную пробирку. Внесите в колонку 30-150 мкл деионизованной воды или воды, свободной от нуклеаз. При элюции 30 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 150 мкл – максимальный выход. Оптимальный объем элюции – 80-100 мкл. Инкубируйте колонку при комнатной температуре 1 - 3 минуты и элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 минуты при 13000 об/мин (11500-12000g).

