

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Реагентов для колоночного выделения ДНК «АртДНК MiniSpin Гель»

НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Реагенты для колоночного выделения ДНК «АртДНК MiniSpin Гель» предназначены для очистки ДНК из агарозных и акриламидных гелей, а также ПЦР-продуктов, продуктов рестрикции, лигирования, дефосфорилирования и т.д. с целью проведения последующих молекулярно-биологических исследований, в том числе методами ПЦР и ПЦР-РВ.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Комплектация реагентов «АртДНК MiniSpin Гель» рассчитана на проведение 50 выделений и указана в таблице 1.

Таблица 1. Комплектация реагентов «АртДНК MiniSpin Гель»

Состав	Комплектация
1. Mini Spin колонки	50 штук
2. Сорбирующий раствор	1 флакон – 20±1 мл
3. Промывочный раствор	1 флакон – 50±2 мл
4. Элюирующий раствор	1 флакон – 4±1 мл

Использование реагентов «АртДНК MiniSpin Гель» позволяет очищать ДНК широкого диапазона размеров: от 50 до 10 000 п.о. и более. При этом выход ДНК составляет 20–90 % в зависимости от образца и навыков пользователя.

ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Метод выделения ДНК реагентами «АртДНК MiniSpin Гель» основан на сорбции ДНК в присутствии хаотропных солей на поверхности мембраны Mini Spin колонки с последующей элюцией, что позволяет получать ДНК высокой степени чистоты свободной от праймеров, низкомолекулярных соединений (солей, дНТФ и пр.), ферментов (ДНК-полимераз, лигаз и пр.), ингибиторов ПЦР (ЭДТА, агарозы и пр.).

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный или ПЦР-бокс (наличие рекомендуется);
- термостат для пробирок объемом 1,5 мл с возможностью термостатирования при 65 °С;
- микроцентрифуга (для пробирок объемом 1,5 мл) со скоростью вращения не менее 10 000 об/мин;
- вортекс для пробирок объемом 1,5 мл (наличие рекомендуется);
- набор дозаторов переменного объема (от 10 до 1 000 мкл);
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1 000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками;
- штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Аккуратно вырезать участок геля, содержащий ДНК. Для наибольших выходов ДНК рекомендуется:

- удалить из образца весь избыточный гель, не содержащий ДНК;
- использовать гель наименьшей возможной плотности;
- использовать свежеприготовленный гель.

ПЦР-продукты (и др. аналогичные образцы) дополнительной подготовки не требуют и используются «как есть». Для получения ДНК высокого качества рекомендуется использовать свежеполученный ПЦР-продукт или хранящийся при температуре не выше минус 16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ГЕЛЯ

I. В пробирку объемом 1,5 мл внести образец геля, содержащий ДНК (рекомендуемая масса геля – не более 100 мг).

II. К образцу геля добавить 200 мкл Сорбирующего раствора (в случае, если масса геля превышает 100 мг, объем Сорбирующего раствора необходимо увеличить пропорционально).

III. Содержимое пробирки перемешать на вортексе и инкубировать в термостате при температуре 65 °С в течение 5–15 мин при периодическом перемешивании до полного растворения геля.

IV. (Не обязательно) Для увеличения выхода ДНК рекомендуется добавить к образцу 100 мкл изопропанола (в случае, если масса геля превышала 100 мг, объем изопропанола необходимо увеличить пропорционально). Содержимое пробирки перемешать на вортексе. Скинуть капли со стенок пробирки кратковременным центрифугированием.

V. Содержимое пробирки внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек.

VI. (Не обязательно) Для увеличения выхода ДНК рекомендуется «проскок» повторно нанести на эту же колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIa. В случае последующего использования очищенной ДНК для проведения ферментативных реакций или секвенирования в колонку внести 100 мкл Сорбирующего раствора, центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIII. Повторить п. VII.

IX. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

X. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5–2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 25–100 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к увеличению суммарного выхода ДНК, но снижению ее концентрации в конечном образце). Для наибольшего выхода ДНК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60–65 °С. Инкубировать 1–3 мин.

XI. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

XII. «Проскок» содержит очищенную ДНК. Рекомендуется хранить выделенную ДНК при температуре не выше минус 16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ПЦР-ПРОДУКТОВ

I. В пробирку с ПЦР-продуктом (рекомендуемый объем образца – 50 мкл) внести 100 мкл Сорбирующего раствора (в случае, если объем образца превышает 50 мкл, объем Сорбирующего раствора необходимо увеличить пропорционально). Перемешать на вортексе.

II. (Не обязательно) Для увеличения выхода ДНК рекомендуется добавить к образцу 50 мкл изопропанола (в случае, если объем образца превышает 50 мкл, объем изопропанола необходимо увеличить пропорционально). Содержимое пробирки перемешать на вортексе. Скинуть капли со стенок пробирки кратковременным центрифугированием. Данный этап является критичным в случае выделения ПЦР-продуктов размером менее 300 п.о.

III. Образец внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек.

IV. (Не обязательно) Для увеличения выхода ДНК рекомендуется повторно нанести «проскок» на эту же колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

V. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VI. Повторить п. V.

VII. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

VIII. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5–2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 25–100 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к увеличению суммарного выхода ДНК, но снижению ее концентрации в конечном образце). Для наибольшего выхода ДНК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60–65 °С. Инкубировать 1–3 мин.

IX. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

X. «Проскок» содержит очищенную ДНК. Рекомендуется хранить выделенную ДНК при температуре не выше минус 16 °С.

Выделение ДНК-продуктов рестрикции, лигирования, дефосфорилирования и т.д. осуществляется по аналогичному протоколу.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

Транспортировка реагентов «АртДНК MiniSpin Гель» осуществляется при температуре окружающей среды любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих их сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Реагенты «АртДНК MiniSpin Гель» хранят в упаковке изготовителя при комнатной температуре.

Срок годности реагентов «АртДНК MiniSpin Гель» – 12 месяцев с даты изготовления.