

## 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.№	3488	для выделения ДНК из животных тканей
Кат.№	3489	для выделения ДНК из широкого спектра биологических образцов

## Набор diaGene для выделения ДНК из животных клеток, тканей и биологических жидкостей на спин-колонках

### Состав набора

	50 выделений 3489.0050	250 выделений 3489.0250
Буфер LBB	10 мл	50 мл
Буфер LBT	25 мл	2 x 65 мл
Раствор для сорбции	30 мл	2 x 75 мл
Раствор для промывки 1	35 мл	2 x 90 мл
Буфер WB1 (концентрат)	30 мл	2 x 75 мл
Раствор для промывки 2 (концентрат)	2 x 15 мл	5 x 30 мл
Буфер E	5 мл	25 мл
Протеиназа K	10 мг	5 x 10 мг
Спин-колонки	50 шт.	5 x 50 шт.
Пробирки для сбора фильтрата	50 шт.	5 x 50 шт.

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из широкого спектра биологических образцов животного происхождения. Очистка ДНК происходит за счёт связывания нуклеиновой кислоты с сорбентом колонок diaGene. Связанная ДНК отмывается от примесей и элюируется в виде чистого препарата. Выход ДНК зависит от типа биологического материала; ёмкость сорбента составляет до 25 мкг.

Полученные образцы готовы для постановки ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования и прочих реакций. Образцы могут быть использованы либо немедленно, либо в течение месяца при хранении на -20°C. Для длительного хранения рекомендуется поместить образцы ДНК на -86°C или добавить к ним 3 объёма 96% этанола и хранить при -20°C.

### Данный набор предназначен для выделения геномной ДНК из:

- Культур животных клеток
- Животных тканей
- Цельной крови
- Лейкоцитарного осадка
- Слюны
- Спермы

### Дополнительные материалы и реагенты

- настольная центрифуга для пробирок типа эппендорф ёмкостью 1.5 мл, с максимальной скоростью центрифугирования не менее 13000 об/мин,
- Ступка с пестиком и жидкий азот (для ручной гомогенизации) или гомогенизатор и пробирки с матриксом для автоматической гомогенизации,
- вортекс,
- твердотельный термостат с перемешиванием,
- набор автоматических пипеток переменного объёма,
- наконечники для автоматических пипеток с фильтрами,
- пробирки типа эппендорф ёмкостью 1.5 мл,
- 95-100% этанол,
- автоклавированная деионизованная вода (или вода, свободная от нуклеаз),
- β-меркаптоэтанол или дитиотреитол,
- буфер PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, pH 7.4),
- РНКаза А

### Перед началом работы:

- добавьте 96-100% этанол в **Буфер WB1** (10 мл для 50 выделений, 25 мл в каждый флакон для 250 выделений) и в **Раствор для промывки 2** (по 35 мл в каждый флакон для 50 выделений, 70 мл в каждый флакон для 250 выделений). Тщательно перемешайте.
- Растворите **Протеиназу К** в деионизованной воде (каждую фасовку - в 100 мкл). Рекомендуется расфасовать раствор **Протеиназы К** на аликвоты по 20-50 мкл и хранить при -20°C.

### Важно!

- 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.
- После использования плотно закрывайте пакет со спин-колонками.
- 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.

### Срок годности и особенности хранения

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

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

Срок годности: 12 месяцев с даты изготовления.

При транспортировке особые условия не требуются.

## 1. Выделение ДНК из культуры животных клеток

1. Осадите клетки центрифугированием в течение 10 минут при 600-800 об/мин (не более 40g), удалите супернатант.
2. Ресуспендируйте осадок из расчёта 200 мкл **Буфера LBT** на 500 тыс. клеток. Добавьте **Протеиназу К** (2 мкл на 200 мкл **Буфера LB**) и  $\beta$ -меркаптоэтанол (4 мкл на 200 мкл **Буфера LB**). Тщательно перемешайте и инкубируйте в термостате с перемешиванием на скорости 350-400 об/мин при +56°C в течение 20 минут. Если термостат без перемешивания - периодически встряхивайте пробирки.
3. Добавьте **Раствор для сорбции** из расчёта 280 мкл на 200 мкл лизата и перемешайте.
4. Внесите в колонку 650 мкл образца. Центрифугируйте 1 минуту при 10000 об/мин (7000g). **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. Внесите в колонку 300 мкл **Буфера WB1** и центрифугируйте 1 мин при 10000 об/мин (7000g). Удалите фильтрат.
6. Повторите п.5.
7. Внесите в колонку 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугируйте 1 мин при 13000 об/мин (12000g). Удалите фильтрат.
8. Повторите п.7.
9. Поместите микроколону в ту же пробирку и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (12000g) для удаления остатков буфера.
10. Поместите микроколону в чистую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 30-100 мкл **Буфера E** или деионизованной воды и подождите 1-3 мин.

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

Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 13000 об/мин (12000g).

## 2. Выделение ДНК из животных тканей

1. Гомогенизируйте образец.  
В случае ручной гомогенизации - приготовьте микроцентрифужную пробирку ёмкостью 1.5 мл и поместите в неё образец (до 100 мг животной ткани). Налейте в ступку жидкий азот и поместите в ступку пробирку с образцом. Гомогенизируйте образец охлаждённым пестиком. Налейте в пробирку с гомогенатом 500 мкл **Лизис-буфера LBT** и 10 мкл  $\beta$ -меркаптоэтанола. Перемешайте.

В случае механической гомогенизации налейте в пробирку для гомогенизации с соответствующим матриксом\* 500 мкл **Лизис-буфера LBT** и 10 мкл  $\beta$ -меркаптоэтанола. Поместите в пробирку образец и гомогенизируйте в соответствии с рекомендациями производителя гомогенизатора.

**Примечание:**

\* - в случае использования гомогенизатора FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) рекомендуются матрикс S того же производителя.

2. Добавьте к гомогенату 10 мкл раствора **Протеиназы К**. Инкубируйте 30 минут при +56°C в термостате с перемешиванием при 350-400 об/мин. Если термостат без перемешивания - периодически встряхивайте пробирку. **Если выделение происходит из ткани, богатой фиброзными волокнами (мышцы, сердце, крупные сосуды, кожа), рекомендуется увеличить объём протеиназы К до 20 мкл.**
3. Центрифугируйте гомогенат при 13000 об/мин (12000g) в течение 10 минут. Отберите супернатант в чистую стерильную 1.5-мл пробирку, по возможности не затрагивая осадка. Центрифугируйте супернатант ещё раз в течение 5 минут при 13000 об/мин (12000g).
4. Перенесите 100-300 мкл супернатанта в чистую стерильную 1.5-мл пробирку. Добавьте 1.4 объёма **Раствора для сорбции** (например, к 200 мкл супернатанта надо добавить 280 мкл **Раствора для сорбции**). Тщательно перемешайте. Оставшийся супернатант можно хранить при -86°C в течение 5-7 дней.
5. 650 мкл образца. Центрифугируйте 1 минуту при 10000 об/мин (7000g). **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. **Во избежание загрязнения образцов не рекомендуется сливать фильтрат через край. Для удаления фильтрата используйте пипетку или аспиратор.**
6. Внесите в колонку 300 мкл **Буфера WB1** и центрифугируйте 1 мин при 10000 об/мин (7000g). Удалите фильтрат.
7. Повторите п.6.
8. Внесите в колонку 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугируйте 1 мин при 13000 об/мин (12000g). Удалите фильтрат.
9. Повторите п.8.
10. Поместите микроколону в ту же пробирку и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (12000g) для удаления остатков буфера.

## 5. Выделение геномной ДНК из спермы

### Перед началом работы

- Приготовьте буфер PBS (10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl, pH 7.4) из расчёта 100 мкл на 1 образец (100 мкл семенной жидкости). Для этого можно воспользоваться готовым таблетированным буфером, например, Sigma-Aldrich P4417.
  - Приготовьте раствор 1М дитиотреитола. Готовый раствор можно хранить в течение месяца при -20°C. Для более длительного хранения рекомендуется -86°C. 1М раствор дитиотреитола можно заменить 1.5М раствором β-меркаптоэтанола, но выход ДНК при этом снижается примерно на 20-30%. Раствор бета-меркаптоэтанола хранится при +4°C.
1. Центрифугируйте образцы семенной жидкости (до 500 мкл) при 8000 об/мин (4000g) в течение 10 минут. Удалите супернатант.
  2. Ресуспендируйте клеточный осадок в 100 мкл буфера PBS и добавьте 100 мкл **Лизис-буфера LBB**, тщательно перемешайте.
  3. Добавьте 2 мкл раствора **Протеиназы К** и 20 мкл 1М раствора дитиотреитола (или 10 мкл 1.5М раствора β-меркаптоэтанола) тщательно перемешайте и инкубируйте в термостате с перемешиванием при 350-400 об/мин при +56°C 30 минут.
  4. Добавьте 280 мкл **Раствора для сорбции** и тщательно перемешайте пипетированием, пока раствор не станет гомогенным.
  5. Внесите в колонку образец. Центрифугируйте 5 минут при 13000 об/мин (12000g). **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.
  6. Нанесите на фильтр колонки 300 мкл **Раствора для промывки 1** и центрифугируйте 1 минуту при 10000 об/мин (7000g). Удалите фильтрат.
  7. Повторите п. 4.
  8. Нанесите на фильтр колонки 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (12000g). Удалите фильтрат.
  9. Повторите п. 6.
  10. Поместите микроколону в ту же пробирку и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (12000g) для удаления остатков раствора.
  11. Поместите микроколону в новую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 50-200 мкл **Буфера Е** или деионизированной воды и подождите 1 минуту. Минимальный объём элюции – 50 мкл, максимальный – 200 мкл. При элюции 50 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 200 мкл – максимальный выход. Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 13000 об/мин (12000g).

11. 8 Поместите микроколону в чистую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 30-100 мкл буфера Е или деионизированной воды и подождите 1-3 мин.

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

Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 13000 об/мин (12000g).

## 3. Выделение геномной ДНК из цельной крови

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.

1. К 100 мкл образца добавьте 100 мкл **Лизис-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 пробирку.
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 (но не более 550 мкл). Центрифугируйте 2 минуты при 10000 об/мин (7000g). **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. Перенесите колонку в чистую пробирку для сбора фильтрата. Нанесите на фильтр колонки 300 мкл **Раствора для промывки 1** и центрифугируйте 1 минуту при 10000 об/мин (7000g). Удалите фильтрат.
6. Повторите п. 5.
7. Нанесите на фильтр колонки 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (12000g). Удалите фильтрат.
8. Повторите п. 7.
9. Поместите колонку в ту же пробирку и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин для удаления остатков раствора.
10. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 30-100 мкл **Буфера Е** или деионизированной воды и подождите 1-3 минуты.

11. **Минимальный объём элюции – 30 мкл, максимальный – 100 мкл. При элюции 30 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 100 мкл – максимальный выход.** Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 13000 об/мин.

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 5000 об/мин (но не более 2000 g) в течение 10 минут.
3. Удалите супернатант, по возможности не затрагивая осадок.
4. Ресуспандируйте 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 13000 об/мин. Необходимо учитывать, что объём колонки составляет 650 мкл. Удалите фильтрат и внесите в колонку оставшуюся часть образца. Центрифугируйте 3 минуты при 13000 об/мин (12000g). 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.

#### **4. Выделение геномной ДНК из слюны**

1. К 100 мкл образца добавьте 100 мкл **Буфера LBB**, тщательно перемешайте на вортексе. Добавьте 2 мкл раствора **Протеиназы К**. Тщательно перемешайте и инкубируйте термостате с перемешиванием при 350-400 об/мин при +56°C 30 минут.
2. Добавьте 280 мкл **Раствора для сорбции** и перемешайте на вортексе.
3. Внесите в колонку выделяемый образец. Центрифугируйте 2 минуты при 10000 об/мин (7000g). **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.
4. Нанесите на фильтр колонки 300 мкл **Буфера WB1** и центрифугируйте 1 минуту при 10000 об/мин (7000g). Удалите фильтрат.

5. Повторите п. 5.
6. Нанесите на фильтр колонки 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (12000g). Удалите фильтрат.
7. Повторите п. 7.
8. Поместите микроколонку в ту же пробирку и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (12000g) для удаления остатков раствора.
9. Поместите микроколонку в новую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 30-100 мкл буфера E или деионизованной воды и подождите 1-3 минуты. **Минимальный рекомендуемый объём элюции – 30 мкл, максимальный – 100 мкл. При элюции 30 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 100 мкл – максимальный выход.** Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 13000 об/мин (12000g).

#### **Примечания**

1. На стадии лизиса (п.2) можно добавить 1.5M раствор β-меркаптоэтанола из расчета 10 мкл на 100 мкл образца. Это не обязательно, но положительно влияет на целостность выделенной ДНК.
2. При необходимости объём образца может быть увеличен до 200 мкл, при этом объёмы **Буфера LBB**, **Протеиназы К** и **Раствора для сорбции** увеличиваются пропорционально.  
Если требуется большее количество ДНК (ёмкость сорбирующей мембраны - до 20 мкг геномной ДНК):
  - 2.1 Добавьте к образцу равный объём буфера PBS,
  - 2.1 Тщательно перемешайте на Вортексе и центрифугируйте в течение 10 минут при 3500 об/мин (но не более 1000g).
  - 2.3 Удалите часть супернатанта так, чтобы оставшийся объём составлял около 200 мкл.
  - 2.2 Добавьте 200 мкл **Буфера LBB** и 4 мкл **Протеиназы К**.
  - 2.3 После инкубации добавьте 560 мкл **Раствора для сорбции**.
  - 2.4 Так как объём образца превышает объём колонки, последовательно нанесите на колонку по 650 мкл образца, удаляя каждый раз жидкость из пробирки для сбора фильтрата после центрифугирования.
  - 2.5 Далее проводите выделение ДНК по описанной выше методике (начиная с п.5).
3. Если требуется препарат, свободный от примесей РНК, то:
  - 3.1 После добавления **Буфера LBB** добавьте к образцу **РНКазу А** до концентрации 100 мкг/мкл,
  - 3.2 Инкубируйте 10 минут при +37°C.
  - 3.3 Проводите выделение ДНК по описанной выше методике (начиная с п.2).