

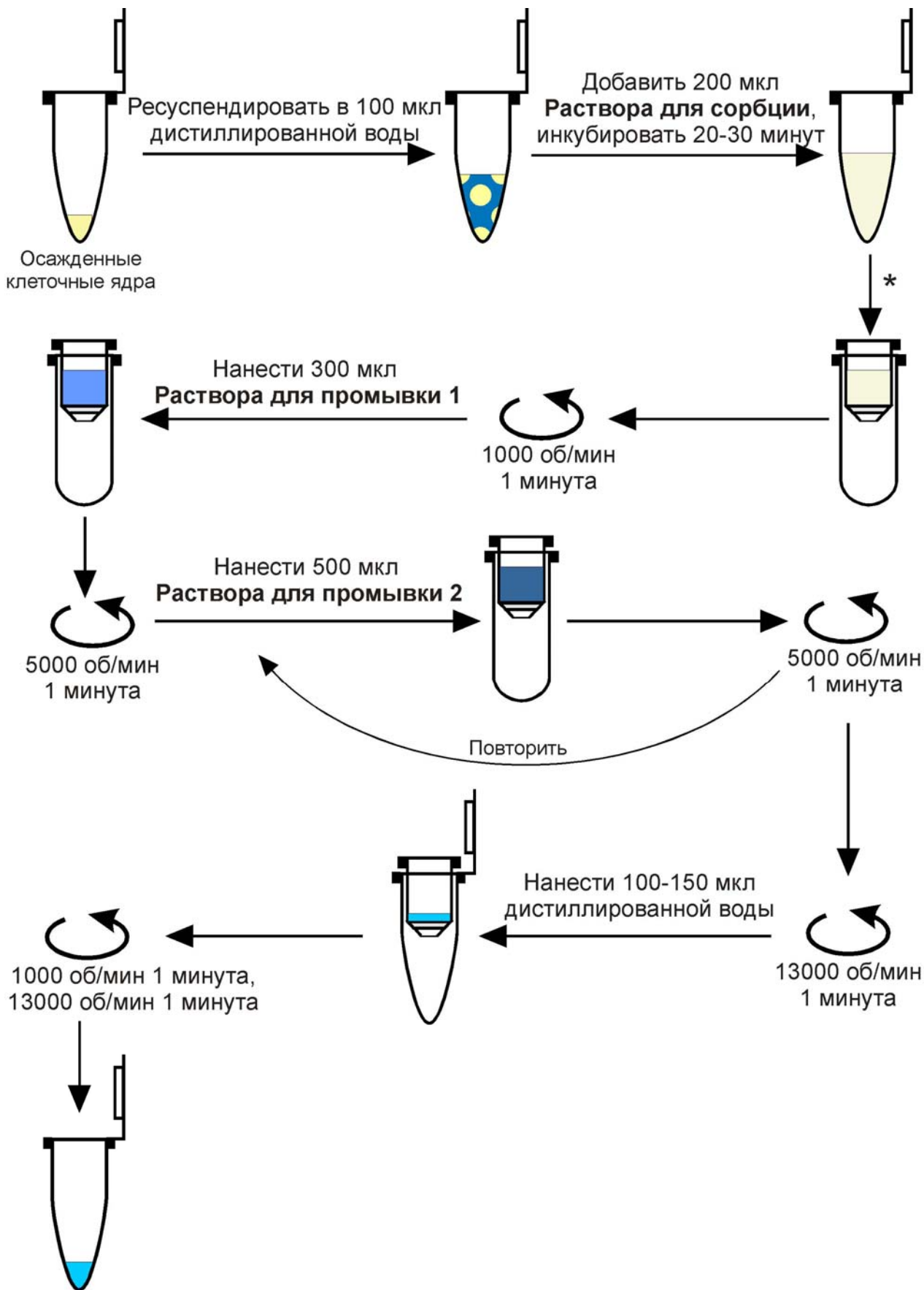


## Инструкция по применению набора для выделения ДНК из клеточных ядер

На 50 выделений

Состав набора:

Микроколонки	50 шт
2 мл пробирки	50 шт
Раствор для сорбции	10 мл
Лизис-буфер	7 мл
Раствор для промывки 1	20 мл
Раствор для промывки 2 (концентрат)	15 мл



\* Предварительно внести в колонку 100 мкл Раствора для промывки 1

#### Примечание:

- **Раствор для сорбции** перед использованием необходимо прогреть в течение 5-10 минут при  $t^0=55-56^{\circ}\text{C}$  до полного растворения солей. **Нельзя нагревать раствор более  $65^{\circ}\text{C}$ .**
- В **Раствор для промывки 2** перед использованием необходимо добавить 35 мл этилового спирта (96-100%) и тщательно перемешать.
- Если дополнительно не указано, то все этапы выделения выполняются при комнатной температуре.

1. Поместить образец, содержащий 1-2 млн. клеток в пробирку. Центрифугировать при 2000 об/мин в течение 5 минут. Полностью удалить супернатант\*.
2. Клетки ресуспендировать в 70 мкл PBS, добавить 140 мкл **Лизис-буфера**, тщательно перемешать на Vortex и инкубировать 2 мин.
3. Ядра отделить центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 минут. Полностью удалить супернатант\*. Ядра ресуспендировать в 100 мкл дистиллированной воды.
4. Добавить 200 мкл **Раствора для сорбции**, инкубировать при комнатной температуре в течение 20-30 минут при постоянном перемешивании (на шейкере).

*При использовании замороженных ядер время инкубации увеличивается до 40-60 минут.*

5. Внести в колонку с фильтром 100 мкл **Раствора для промывки 1** и, затем, выделяемый образец. Центрифугировать 1 мин при 1000 об/мин.

*Если над фильтром остался раствор центрифугировать дополнительно 1 мин при 5000 об/мин.*

*Необходимо учитывать, что объем колонки составляет 650 мкл. Если объем выделяемого образца превышает 650 мкл, последовательно нанести на фильтр весь образец, каждый раз удаляя фильтрат.*

*Необходимо учитывать, что на одну колонку можно нанести ДНК из ядер не более чем с 4 млн. клеток.*

6. Нанести на фильтр 300 мкл **Раствора для промывки 1** и центрифугировать 1 мин при 5000 об/мин. Удалить фильтрат (см. п.7).

7. Нанести на фильтр 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугировать 1 мин при 5000 об/мин. Удалить фильтрат.

Удалить фильтрат из 2 мл пробирок в следующей последовательности:

- Извлечь **микроколону** из 2 мл пробирки.
- Удерживая **микроколону** в руке, удалить раствор из 2 мл пробирки с помощью вакуумного насоса либо с помощью микропипетки, используя отдельные наконечники для каждого образца, не касаясь стенок пробирки.
- Вернуть **микроколону** в 2 мл пробирку.

8. Повторить п.7.

9. Центрифугировать пробирку с микроколонкой 1 минуту при 13000 об/мин для удаления остатков раствора.

10. Извлечь микроколону и поместить ее в новую пробирку объемом 1,5 мл. Поставить новые пробирки с микроколонками в штатив. *(Микроколонки должны располагаться ВЕРТИКАЛЬНО! Необходимо следить, чтобы капли вносимой воды попадали строго на центр фильтра).*

11. Нанести на фильтр 100-150 мкл дистиллированной воды (либо деионизованной, или автоклавированной, обязательно проверенной на отсутствие ДНК-аз и РНК-аз).

12. Инкубировать микроколону 3-5 мин при комнатной температуре, затем центрифугировать 1 мин при 1000 об/мин и 1 минуту при 13000 об/мин.

13. Убрать колонку с фильтром и перенести выделенный образец ДНК в новую пробирку. Полученный раствор содержит очищенную ДНК.

\* супернатант удалять аккуратно, не повреждая осадок, при помощи микропипетки или вакуума.

Выход составит 4-7 мкг ДНК с 1 млн. клеток. Полученные образцы готовы к постановке ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования и прочих реакций. Образцы могут быть использованы либо немедленно, либо в течение месяца при хранении при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Сроки годности и особенности хранения:

- Все растворы хранить при  $+15-25^{\circ}\text{C}$ ;
- Пробирки и микроколонки хранить в сухом месте при комнатной температуре;
- Срок годности набора-12 месяцев, начиная с даты изготовления.

