

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 плазмидной ДНК из бактерий

Состав набора

	50 выделений Кат.№ 3316.0050	250 выделений Кат.№ 3316.0250
Буфер R	12 мл	60 мл
Буфер L	12 мл	60 мл
Буфер N	12 мл	60 мл
Буфер W	8 мл	3 x 15 мл
Буфер E	5 мл	25 мл
РНКаза A	120 мкл	600 мкл
Микроколоники	50 шт	5 x 50 шт
Пробирки для сбора фильтрата	50 шт	5 x 50 шт

Принцип действия

Набор предназначен для выделения до 25 мкг плазмидной ДНК длиной до 20 т.п.н. из 3-5 мл бактериальной культуры. Очистка ДНК на колонках **diaGene** происходит за счёт избирательного связывания ДНК с сорбентом в присутствии хаотропной соли с последующей отмывкой связанной ДНК от примесей и заканчивается элюцией чистого препарата ДНК.

Выход ДНК зависит от ряда факторов: копийности плазмиды, условий роста, объёма культуры и т.д.

Не рекомендуется использовать для выделения плазмид длиной свыше 50 тысяч пар нуклеотидов, а также для получения препарата плазмидной ДНК для трансфекции эукариотических клеток.

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>)

Срок годности и особенности хранения

Все реактивы (кроме РНКазы А) и колонки хранить при комнатной температуре (+15 +25 °С).

РНКазу А хранить при -20 °С.

Буфер R после добавления РНКазы хранить при +2 +8 °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

- Микроцентрифуга для пробирок типа эппендорф ёмкостью 1.5-2 мл с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12500 g.
- Дозаторы переменного объёма и наконечники с фильтрами к ним.
- Стерильные пробирки типа эппендорф ёмкостью 1.5 мл, свободные от нуклеаз.
- 96% этанол.

Выделение плазмидной ДНК из бактерий

- Перед началом работы добавьте 96% этанол в **Буфер W** - 32 мл для 50 выделений или 60 мл в каждый флакон для 250 выделений.
- Добавьте **РНКазу А** в **Буфер R**. При нерегулярном использовании набора рекомендуется отбирать нужное количество **Буфера R** и добавлять к нему 1/100 объёма **РНКазы А**.
- Для перевода значения скорости центрифугирования из **об/мин** в **g** воспользуйтесь специальными таблицами

1. Осадите бактериальные клетки из 3-5 мл культуры в 1.5 мл пробирке центрифугированием при 1000g в течение 10 минут.
2. Тщательно ресуспендируйте клетки в 200 мкл **Буфера R** с **РНКазой**.
3. Добавьте 200 мкл **Буфера L** и осторожно перемешайте. Лизат должен стать прозрачным и вязким. *Не перемешивать на вихре и не встряхивать, так как это может привести к разрыву геномной ДНК и загрязнению конечного препарата.*
4. Добавьте 200 мкл **буфера N** и тщательно перемешайте до образования белого осадка.
5. Центрифугируйте 10 минут при 10000 g.
6. Поместите микроколону в 2 мл пробирку для сбора фильтрата. Перенесите супернатант в микроколону и центрифугируйте 1 мин при 12500 - 13000g.
7. Вылейте фильтрат, поместите микроколону в ту же пробирку и нанесите

650 мкл **Буфера W**. Центрифугируйте 1 мин при 12500 - 13000g.

8. Вылейте фильтрат, поместите микроколону в ту же пробирку и центрифугируйте 1 мин при 13000 об/мин, чтобы удалить остатки **Буфера W**.
9. Поместите микроколону в новую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 50-100 мкл **Буфера E** и подождите 1 мин. Также можно элюировать ДНК водой, не содержащей нуклеаз. Минимальный объём для элюции – 30 мкл, максимальный – 150 мкл. При элюции 30 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 150 мкл – максимальный выход.
10. Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 12500 - 13000g.

Возможные проблемы и методы их решения

Проблема	Причина	Решение
Мало ДНК на выходе	Слишком много бактерий	Уменьшить объём культуры. Рекомендуется начинать с 3 мл культуры
	Неполный лизис	Ресуспендировать осадок более тщательно до полного разрушения бактериальных сгустков
	Неполная нейтрализация после лизиса	Тщательно перемешивать после добавления Буфера N
	Перед стадией элюции не полностью удалены остатки Буфера W	Обратить внимание на пункт о дополнительном центрифугировании
Загрязнение геномной ДНК	Слишком интенсивное перемешивание после добавления Буфера N	Перемешивать аккуратно, переворачиванием пробирки
Загрязнение низкомолекулярными примесями (A260/230 < 1.8-2)	Неполная нейтрализация буфером N или примесь осадка в посадке на колонку;	После центрифугирования лизата (п.5) отберите супернатант и центрифугируйте его ещё раз.
	«Перерастание» бактериальной культуры	Подбор оптимальных условий роста (не более 18 часов)