

Набор Cleanup Mini

Кат. # BC023

Версия 03 от 20 июля 2018 г.

Набор предназначен для выделения и очистки двуцепочечной ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей (ПЦР, рестрикция, лигирование и т.д.) на спин-колонках с уменьшенным размером фильтра. Концентрирование образца ДНК достигается за счет использования небольшого объема элюирующего раствора.

Специально подобранный «Связывающий раствор» обеспечивает условия, при которых на фильтре колонки сорбируется только двуцепочечная ДНК, тогда как другие вещества остаются в растворе (одноцепочечная ДНК, РНК, соли, ферменты, нуклеотиды и т.д.). Одна колонка рассчитана на выделение ДНК из 150-200 мг геля.

Основные свойства

- Емкость колонки: не менее 5 мкг ДНК;
- Размер ДНК: 70-10 000 п.о.;
- ДНК может быть выделена из всех типов агарозы и любых ферментативных реакционных смесей;
- Концентрация агарозы в геле до 3%;
- Нет стадий переосаждения ДНК изопропанолом или этанолом и хлороформ-фенольной экстракции;
- Нет необходимости в удалении минерального масла (при очистке ПЦР-продукта);
- Общее время выделения менее 10 мин.

Для получения воспроизводимых результатов суммарное количество очищаемой ДНК должно быть не менее 50 нг.

Состав набора

Компоненты набора	Количество
Мини спин-колонки	50 шт.
Собираемые пробирки (2 мл, без крышки)	50 шт.
Связывающий раствор	40 мл
Промывочный раствор (концентрат)	17 мл
Элюирующий раствор (5 mM Tris HCl pH 7.5)	1.5 мл

Хранение и транспортировка: при комнатной температуре.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки – 1 год.

Необходимые материалы

- Микроцентрифужные пробирки (1.5 и 2 мл);
- Этиловый спирт (96%);
- Изопропанол (в случае очистки фрагментов менее 500 п.о. или более 4 000 п.о.).

Подготовка растворов

Добавить 60 мл этилового спирта (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором». Рекомендуется нанести пометку о выполнении операции на крышку флакона.

ПРОТОКОЛ

I. Пробоподготовка

A. Экстракция ДНК из агарозного геля

Объемы растворов в наборе рассчитаны на средний вес фрагментов геля 150 мг.

1. Вырезать фрагмент геля с целевой ДНК и взвесить. Поместить гель в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл. Вес геля в мг численно приравнивается к его объему в мкл (100 мг геля = 100 мкл).
2. К гелю добавить 3 объема «Связывающего раствора», но не менее 350 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании гелей с концентрацией агарозы 1.8% и выше количество «Связывающего буфера» следует увеличить до 4-5 объемов от объема геля.

3. Инкубировать смесь при 50-55 °С до полного растворения геля. Для ускорения растворения рекомендуется перемешивать раствор встряхиванием пробирки.
4. **Опция:** для фрагментов менее 150 п.о. и более 4 000 п.о. после полного растворения геля дополнительно добавить 1 объем изопропанола на 1 объем геля, смесь перемешать.
5. Перейти к пункту «II. Выделение ДНК на колонке».

B. Экстракция ДНК из реакционных смесей

Объемы растворов в наборе рассчитаны на средний объем реакционной смеси 100 мкл.

1. Добавить 5 объемов «Связывающего раствора», но не менее 350 мкл. Перемешать раствор.
2. **Опция:** для фрагментов менее 150 п.о. и более 4 000 п.о. добавить 2 объема изопропанола на 1 объем реакционной смеси, смесь перемешать.
3. Перейти к пункту «II. Выделение ДНК на колонке».

II. Выделение ДНК на колонке

ВНИМАНИЕ! УСЛОВИЯ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ НЕ БОЛЕЕ 7000 g (10 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf MiniSpin).

Для расчета об/мин воспользуйтесь формулой: $RPM = \sqrt{\frac{RCF \times 10^5}{1.118 \times r}}$
где RPM – частота вращения в оборотах в минуту,
 RCF – относительное ускорение центрифуги (g), r – радиус ротора в см.

1. Поместить спин-колонку в собирательную пробирку.
2. Перенести пробу в колонку и центрифугировать 30 с. Удалить фильтрат из собирательной пробирки.

ВНИМАНИЕ! МАКСИМАЛЬНЫЙ ОБЪЕМ КОЛОНКИ 750 мкл

Если объем пробы больше 750 мкл, нужно разделить ее на несколько нанесений. После каждого нанесения аликвоты колонку необходимо центрифугировать.

3. Добавить 750 мкл «Промывочного раствора» в колонку, центрифугировать 30 с. Удалить фильтрат.
4. Центрифугировать пустую колонку 60 с для полного удаления промывочного раствора.
5. Поместить колонку в новую пробирку (1.5-2 мл).
6. Нанести в центр мембраны 30-50 мкл элюирующего раствора. Для концентрирования образца элюцию проводят в объеме 12-15 мкл.
7. Центрифугировать 30 с.
8. **Опция:** элюат повторно нанести на колонку, центрифугировать 30 с.

Эта процедура увеличивает выход ДНК примерно на 10%.

Очищенная ДНК пригодна для любых генно-инженерных приложений.
Хранить при -20 °С.

Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10,
корпус 70 (Технопарк ИБХ)
Тел.: +7 (495) 988-4083
www.evrogen.ru
order@evrogen.ru