

Набор Cleanup Mini

Кат. ## BC023S, BC023L

Версия 6 от 10 сентября 2020 г.

Набор предназначен для очистки двухцепочечной ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей (ПЦР, рестрикция, лигирование и т.д.) на микроцентрифужных 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 двухцепочечная 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	BC023S (50 реакций)	BC023L (250 реакций)
Спин-колонки Mini микроцентрифужные	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Собирательные пробирки (2 мл, без крышки)	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Связывающий раствор	40 мл	240 мл
Промывочный раствор (концентрат)	17 мл	86 мл (2 x 43 мл)
Элюирующий раствор (5 mM Tris HCl pH 7.5)	1.5 мл	15 мл

Объемы растворов в наборе рассчитаны на то, что средний вес фрагментов геля составляет 150 мг, а средний объем реакционной смеси – 100 мкл.

Хранение и транспортировка: при комнатной температуре.

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

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

Добавьте этиловый спирт (96%) во флаконы с концентрированным «Промывочным раствором» в количестве:

BC023S — 70 мл,

BC023L — по 215 мл в каждый флакон.

Рекомендуется нанести пометку о выполнении операции на крышку флакона.

ПРОТОКОЛ

I. Пробоподготовка

Если в каком-то из компонентов набора есть осадок, прогрейте этот компонент при температуре от +37 до +50 °С до полного растворения осадка.

A. Экстракция ДНК из агарозного геля

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 раствора» 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 500 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

1. Добавить 5 объемов «Связывающего раствора», но не менее 350 мкл. Перемешать раствор.
2. **Опция:** для фрагментов менее 500 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 7 000 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 секунд. 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 секунд. Удалить фильтрат.
4. Центрифугировать пустую колонку 60 секунд для полного удаления промывочного раствора.
5. Поместить колонку в новую пробирку (1.5–2 мл).
6. Нанести в центр мембраны 15–30 мкл элюирующего раствора. Для концентрирования образца элюцию проводят в объеме 12–15 мкл.
7. Центрифугировать 30 секунд.
8. **Опция:** элюат повторно нанести на колонку, центрифугировать 30 секунд.

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
Тел.: +7 (495) 988-4083
www.evrogen.ru
order@evrogen.ru