Cleanup S-Cap

Набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей

Номера по каталогу:
BC041S — на 50 реакций
BC041L — на 250 реакций

Инструкция по применению

Версия 10 от 31 июля 2024 г.

Оглавление

1. Назначение 4
2. Преимущества 4
3. Состав 4
4. Условия хранения и транспортировки 4
5. Метод 4
6. Основные характеристики 5
7. Необходимое оборудование и дополнительные материалы 5
8. Биологический материал 5
9. Протокол 6
10. Возможные проблемы и способы их решения 10

1. Назначение

Набор предназначен для очистки фрагментов двухцепочечной ДНК из агарозного геля и ферментативных реакционных смесей (ПЦР, рестрикция, лигирование и т.д.). Очищенная ДНК пригодна для ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования, трансформации, трансфекции и других молекулярно-биологических приложений.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Преимущества

- Очистка от агарозы, минерального масла и примесей (нуклеотидов, праймеров, коротких фрагментов нуклеиновых кислот, солей, белков, ингибиторов ферментативных реакций и др.).
- В состав набора входят колонки с крышкой, что позволяет уменьшить уровень загрязнения рабочего пространства и снизить вероятность кросс-контаминации образцов.

3. Состав

Компоненты набора	BC041S 50 реакций	BC041L 250 реакций
Спин-колонки SCG с крышками	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Собирательные пробирки	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Связывающий раствор S	40 мл	240 мл
Промывочный раствор (концентрат)	20 мл	100 мл (2 x 50 мл)
Элюирующий раствор	4.5 мл (3 x 1.5 мл)	30 мл

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте в упаковке производителя.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Метод

Связывание ДНК на мембране колонки происходит в присутствии высококонцентрированных хаотропных веществ в условиях оптимально подобранного pH. Последующее использование промывочного буфера позволяет избавиться от нуклеотидов, праймеров, коротких фрагментов нуклеиновых кислот, солей, белков, ингибиторов ферментативных реакций, а также агарозы, минерального масла и примесей органических соединений. Элюция ДНК происходит в слабощелочных условиях низкосолевым буфером.

6. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Емкость	До 20 мкг
Размер фрагментов очищенной ДНК	100–10 000 п.о.
Объем очищенного образца ДНК (элюата)	50 мкл
Выход ДНК	До 70%*
Чистота ДНК	A260/A280 ≥ 1.8

* Выход зависит от длины ДНК (фрагменты длиной около 100 п.о. и длиннее 6 000 п.о. выделяются с меньшей эффективностью), от % агарозы в геле (чем ниже %, тем выше эффективность) и от массы фрагмента геля (чем меньше масса, тем выше эффективность).

7. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат.
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением от 11 000 g.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Скальпель и весы (для выделения ДНК из геля).
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 и 2 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Этанол 96%.
- Изопропанол (в случае очистки фрагментов менее 500 п.о. или более 4 000 п.о.).

8. Биологический материал

Фрагмент ДНК в агарозном геле: концентрация агарозы не более 2%, масса геля не более 200 мг. Объемы растворов в наборе рассчитаны на средний вес фрагментов геля 150 мг.
Ферментативные реакционные смеси (ПЦР, рестрикция, лигирование и т.д.). Суммарное количество очищаемой ДНК в реакционной смеси должно быть не менее 50 нг. Наборы рассчитаны на средний объем реакционной смеси 160 мкл.

9. Протокол

Общее время работы: 15–40 минут.

9.1. Подготовка растворов

1.1. Добавьте этанол (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором» в количестве:

BC041S — 90 мл,

BC041L — 220 мл в каждый флакон.

Тщательно перемешайте раствор переворачиванием, нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

- *При редком использовании набора не рекомендуется добавлять этанол в весь объем концентрата «Промывочного раствора». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (260 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (1 170 мкл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.*
- *Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора», например, делайте отметки на флаконе и в конце инструкции на странице «Для заметок». Если вам понадобится добавить этанол ко всему оставшемуся объему концентрата «Промывочного раствора», то необходимое количество этанола следует рассчитать по формуле:*

$$VE = (VW_{исх} - VW_{расх}) \times \frac{VE_{исх}}{VW_{исх}} \text{ (мл)},$$

где VE — объем этанола, который нужно добавить, VWисх — объем концентрата «Промывочного раствора», указанный на этикетке, VWрасх — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора», VEисх — объем этанола по инструкции, см. п.1.1.

1.2. Проверьте флакон со «Связывающим раствором S» на наличие осадка. При обнаружении осадка прогрейте флакон при температуре от +37 до +50 °C до полного растворения осадка.

9.2. Подготовка биоматериала

А. Агарозный гель.

2.1. Подготовьте и взвесьте фрагмент геля, содержащий ДНК. Поместите его в пробирку.

- *Допускается приравнивать массу фрагмента геля к его объему: 100 мг = 100 мкл.*

2.2. В пробирку с гелем добавьте 3 объема «Связывающего раствора S», но не менее 350 мкл.

> **ВНИМАНИЕ!** При использовании гелей с концентрацией агарозы ≥ 1.8%, количество «Связывающего раствора S» следует увеличить до 4–5 объемов от объема (массы) геля.

2.3. Инкубируйте смесь при температуре 55 °С до полного растворения геля. Для ускорения растворения рекомендуется перемешивать раствор встряхиванием пробирки.

- *Для фрагментов длиной менее 500 п.о. и более 4 000 п.о. рекомендуется добавить изопропанол в объеме, равном объему геля (1:1). Изопропанол следует добавлять после полного растворения геля, затем смесь необходимо перемешать.*

2.4. Перейдите к п. 9.3 «Проведение протокола».

Б. Реакционная смесь.

2.5. Добавьте в пробирку с реакционной смесью 5 объемов «Связывающего раствора S», но не менее 350 мкл. В случае, если образец находится под маслом, объем масла не учитывается. Перемешайте раствор.

2.6. Перейдите к п. 9.3 «Проведение протокола».

9.3. Проведение протокола

ВНИМАНИЕ!
Все центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

3.1. Перенесите образец, подготовленный согласно разделу 9.2, в колонку и центрифугируйте 30 с. Удалите фильтрат из собирательной пробирки.

ВНИМАНИЕ! Максимальный объем колонки: 800 мкл. Если объем пробы больше 800 мкл, нужно разделить его на несколько нанесений. После каждого нанесения аликвоты колонку необходимо центрифугировать.

3.2. Добавьте в колонку 700 мкл «Промывочного раствора», центрифугируйте 30 с. Удалите фильтрат из собирательной пробирки.

3.3. Повторите п. 3.2.

3.4. Центрифугируйте пустую колонку 2 минуты для полного удаления промывочного раствора.

3.5. Перенесите колонку в новую пробирку объемом 1.5 или 2.0 мл.

3.6. Оставьте при комнатной температуре не менее чем на 5 мин для полного испарения остатка спирта.

3.7. Не касаясь наконечником мембраны колонки, нанесите в ее центр 50 мкл «Элюирующего раствора».

- *Для повышения выхода ДНК на 10–15% можно увеличить объем «Элюирующего раствора» до 100 мкл.*
- *Для получения высококонцентрированного образца объем «Элюирующего раствора» следует наоборот уменьшить до 30 мкл.*

3.8. Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту. Для длинных фрагментов (более 1 000 п.о.) рекомендуется увеличить время инкубации от 1 до 5 минут.

3.9. Центрифугируйте 1 минуту для сбора очищенной ДНК.

Очищенная ДНК хранится при температуре при –20 °С до 1 года.

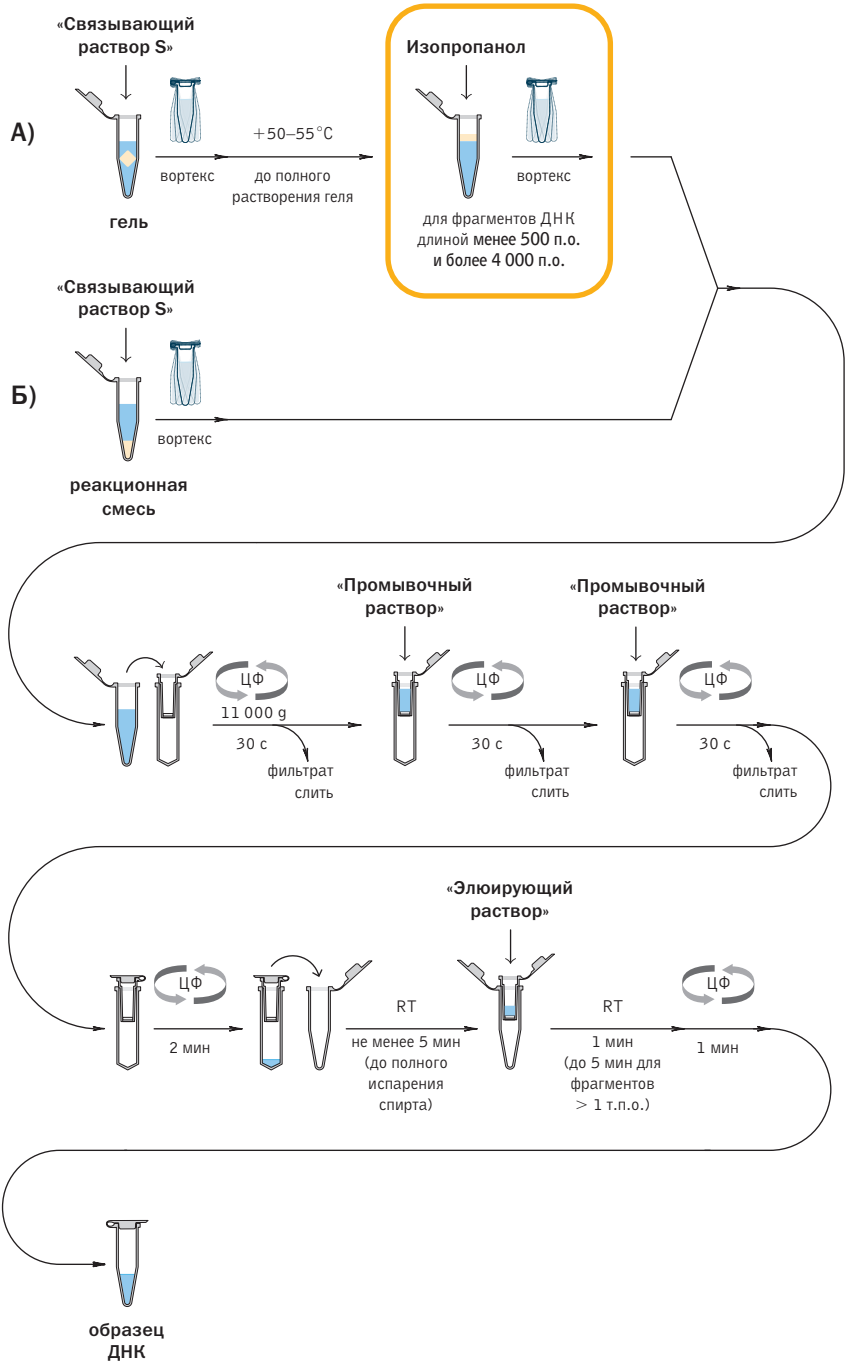

Рисунок 1 — схема очистки ДНК.

10. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Причины и способы решения
Низкий выход ДНК	1. Неверно рассчитан объем связывающего буфера. 2. Не полностью расплавилась агароза и фрагменты геля забили мембрану колонки. 3. При выделении из агарозного геля фрагментов ДНК длиной менее 500 п.о. и более 4000 п.о. к связывающему буферу не был добавлен изопропанол. Проверьте правильность выполнения протокола. 4. Не был добавлен спирт в промывочный буфер. Проверьте плотность закрытия крышки флакона с промывочным раствором, правильность подготовки растворов и выполнения протокола. 5. Элюирующий буфер был нанесен не в центр мембраны колонки и, возможно, попал на стенки пробирки. Проверьте правильность выполнения протокола.

Для заметок

Наборы и сервисы Евроген

Н ▸▸▸ – ссылка на страницу НАБОРА

С ▸▸▸ – ссылка на страницу СЕРВИСА

- Выделение и очистка нуклеиновых кислот Н ▸▸▸
- Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ Н ▸▸▸
- Синтез и амплификация кДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸
- Клонирование ДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸
- Выявление контаминации микоплазмой Н ▸▸▸
- Оценка ДНК Н ▸▸▸
- Нормализация кДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸
- Практикум по генной инженерии Н ▸▸▸
- Генотипирование Н ▸▸▸
- Синтез олигонуклеотидов и зондов С ▸▸▸
- Секвенирование по Сэнгеру С ▸▸▸
- Синтез генов С ▸▸▸
- Сайт-направленный мутагенез С ▸▸▸

Консультация по продуктам: *support@evrogen.ru*

Подробную информацию о наших наборах и сервисах можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru