

# ExtractDNA Plant

Набор для выделения суммарной ДНК из грибов и растений

Номера по каталогу:

BC029S — на 50 реакций

BC029L — на 250 реакций

Инструкция по применению

## Оглавление

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 1. Назначение .....                                         | 4  |
| 2. Преимущества .....                                       | 4  |
| 3. Состав .....                                             | 4  |
| 4. Условия хранения и транспортировки .....                 | 5  |
| 5. Метод .....                                              | 5  |
| 6. Основные характеристики .....                            | 5  |
| 7. Меры предосторожности.....                               | 6  |
| 8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы..... | 6  |
| 9. Биологический материал .....                             | 6  |
| 10. Протокол.....                                           | 7  |
| 11. Возможные проблемы и способы их решения .....           | 12 |

## 1. Назначение

Набор «ExtractDNA Plant» предназначен для выделения суммарной ДНК из свежих растений, гербарного материала (листья, цветки, корни), семян и грибов. Очищенные препараты ДНК могут использоваться для всех видов анализов и молекулярно-генетических задач (ПЦР, ПЦР-РВ, секвенирование по Сэнгеру и NGS, анализ метилирования ДНК и т.д.).

**Только для использования в научно-исследовательских целях.**

## 2. Преимущества

- Стабильный выход высококачественной ДНК (визуализируется в агарозном геле одной полосой размером более 10 000 п.о.).
- Выделение ДНК из широкого спектра биоматериала.
- Эффективное удаление ингибиторов ПЦР.
- Нет стадии спиртовой преципитации и органической экстракции с фенолом и хлороформом.
- Легкая гомогенизация образцов благодаря использованию абразива.

## 3. Состав

| Компоненты набора                                                   | BC029S<br>(50 реакций) | BC029L<br>(250 реакций) |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| Упаковка №1 из 2                                                    |                        |                         |
| Лизирующий раствор                                                  | 25 мл                  | 125 мл                  |
| Связывающий раствор                                                 | 20 мл                  | 95 мл                   |
| Промывочный раствор 1 (концентрат)                                  | 10 мл                  | 50 мл                   |
| Промывочный раствор 2 (концентрат)                                  | 15 мл                  | 80 мл (2 x 40 мл)       |
| Элюирующий раствор                                                  | 6 мл (4 x 1.5 мл)      | 30 мл                   |
| Абразив                                                             | 20 г                   | 90 г                    |
| Спин-колонки SCB с крышками в комплекте с собирательными пробирками | 50 шт.                 | 250 шт. (5 x 50 шт.)    |
| Собирательные пробирки                                              | 50 шт.                 | 250 шт. (5 x 50 шт.)    |
| Упаковка №2 из 2                                                    |                        |                         |
| РНКаза А (лиофилизированная)                                        | 7.5 мг                 | 30 мг (2 x 15 мг)       |
| Буфер для хранения РНКазы А                                         | 850 мкл                | 3.2 мл (2 x 1.6 мл)     |

## 4. Условия хранения и транспортировки

**Транспортировка:** при комнатной температуре.

**Хранение:** «РНКазу А» и «Буфер для хранения РНКазы А» хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

После растворения «РНКазу А» хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Все остальные компоненты набора хранить при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте.

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

## 5. Метод

Ткани растений или грибов гомогенизируют в лизирующем растворе в присутствии абразива. В процессе лизиса добавленная РНКазы А разрушает РНК. Добавление к лизату «Связывающего раствора» обеспечивает удаление вторичных метаболитов растений и оптимальные условия для связывания ДНК на мембране колонки. Для очистки ДНК из лизата применяют метод твердофазной экстракции на мембране. Лизат проходит через мембрану во время центрифугирования, в результате чего происходит сорбция ДНК. Серия последующих промывок эффективно удаляет оставшиеся на мембране загрязняющие вещества, остатки белков, ингибиторы ПЦР. Очищенная и сконцентрированная ДНК смывается «Элюирующим раствором».

## 6. Основные характеристики

| Характеристика                                                        | Значение       |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------|
| Выход ДНК*                                                            |                |
| из корней, цветков или листьев растений                               | До 15 мкг      |
| из семян растений                                                     | До 5 мкг       |
| из мицелия грибов                                                     | До 3 мкг       |
| Объем выделенного образца (элюат)                                     | 50–200 мкл     |
| Емкость колонок                                                       | До 20 мкг ДНК  |
| Размер фрагментов выделяемой ДНК                                      | До 30 000 п.о. |
| Чистота препарата по спектрофотометрическим характеристикам A260/A280 | $\geq 1.7$     |
| Ингибиторы ПЦР                                                        | Не выявляются  |

\* Выход зависит от вида растения, стадии развития и эффективности гомогенизации.

## 7. Меры предосторожности

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны для человека. «Лизирующий раствор», «Связывающий раствор» и «Промывочный раствор 1» при попадании в глаза и на кожу могут вызвать раздражение и содержат вещества, требующие обеспечения специальных мер безопасности:

- хранить в плотно закрытой таре;
- не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу;
- при попадании компонентов набора на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды;
- при работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

## 8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат или водяная баня.
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением до 11 000 g.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Этанол 96%.
- Изопропанол.

## 9. Биологический материал

| Вид материала                                    | Количество |
|--------------------------------------------------|------------|
| Свежие растения (листья, корни и цветки) и грибы | 50–100 мг  |
| Гербарный материал                               | 10–25 мг   |
| Семена растений                                  | 20–100 мг  |

## 10. Протокол

Общее время работы: от 1 часа.

### 10.1. Подготовка растворов

1.1. Добавьте этанол (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором 1» в количестве:

BC029S — 30 мл,

BC029L — 150 мл.

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 1». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (175 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (525 мкл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.
- ▶ Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора 1», 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 1», 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,  $VW_{исх}$  — объем концентрата «Промывочного раствора 1», указанный на этикетке,  $VW_{расх}$  — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора 1»,  $VE_{исх}$  — объем этанола по инструкции, см. «Подготовка растворов», 1.1.

1.2. Добавьте этанол (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором 2» в количестве:

BC029S — 60 мл,

BC029L — 160 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 2». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (280 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (1.12 мл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.

- Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора 2», 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 2», то необходимое количество этанола следует рассчитать по формуле:

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

где  $VE$  — объем этанола, который нужно добавить,  $VW_{\text{исх}}$  — объем концентрата «Промывочного раствора 2», указанный на этикетке,  $VW_{\text{расх}}$  — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора 2»,  $VE_{\text{исх}}$  — объем этанола по инструкции, см. «Подготовка растворов», 1.2.

- 1.3. Добавьте «Буфер для хранения РНКазы А» в пробирку с лиофилизированной «РНКазой А» в количестве:

BC029S — 750 мкл,

BC029L — 1.5 мл (в каждую пробирку).

Тщательно перемешайте раствор на вортекс.

- 1.4. Если во флаконах с «Лизирующим раствором» или «Связывающим раствором» образовался осадок, то перед началом работ прогрейте растворы при температуре от +37 до +50 °С до полного растворения осадка.

- 1.5. Перед началом работы поместите пробирку с «Элюирующим раствором» в термостат на температуру +65 °С.

## 10.2. Выделение ДНК

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

### 10.2.1. Гомогенизация образцов

- 2.1.1. Подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 1.5 мл для каждого образца.

- 2.1.2. Выполните гомогенизацию одним из способов:

#### Гомогенизация в фарфоровой ступке с абразивом.

В ступку добавьте «Абразив» в количестве 100–200 мкл\*, поместите образец ткани и добавьте 500 мкл «Лизирующего раствора» и 100 мкл воды. Тщательно разотрите образец, перелейте суспензию в подготовленную пробирку объемом 1.5 мл.

\* Для измерения количества абразива используйте градуированную пробирку.

### **Гомогенизация с использованием пестика-гомогенизатора.**

Поместите образец в пробирку объемом 1.5 мл, добавьте «Абразив» в количестве 50–100 мкл\*, добавьте 500 мкл «Лизирующего раствора». Тщательно разотрите образец пестиком-гомогенизатором (например, кат. ## RM001T/S, Евроген).

\* Для измерения количества абразива используйте градуированную пробирку.

### **Гомогенизация в жидком азоте.**

В ступку поместите образец ткани и налейте жидкий азот. Тщательно разотрите образец до порошкообразного состояния. Пересыпьте порошок в подготовленную пробирку объемом 1.5 мл, добавьте 500 мкл «Лизирующего раствора».

## **10.2.2. Выделение ДНК**

2.2.1. Добавьте к гомогенизированным образцам 10 мкл раствора РНКазы А. Перемешайте на вортексе.

2.2.2. Инкубируйте образцы в течение 10 минут при комнатной температуре, затем в течение 20 минут при 65 °С, тщательно перемешайте на вортексе.

► *Во время инкубации периодически перемешивайте содержимое пробирок на вортексе.*

2.2.3. Добавьте по 375 мкл «Связывающего раствора» в каждую пробирку. Тщательно перемешайте на вортексе и инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.

2.2.4. Центрифугируйте пробирки в течение 10 минут.

2.2.5. Подготовьте и промаркируйте новые пробирки объемом 1.5 мл для каждого образца.

2.2.6. Перенесите 500 мкл образца в новые пробирки, добавьте 375 мкл изопропанола, тщательно перемешайте на вортексе.

2.2.7. Подготовьте и промаркируйте необходимое количество микроцентрифужных колонок с собирательными пробирками.

2.2.8. Перенесите 800 мкл образца в колонки.

2.2.9. Центрифугируйте в течение 1 минуты. Слейте супернатант из собирательной пробирки. Верните колонку в ту же собирательную пробирку.

2.2.10. Добавьте 700 мкл «Промывочного раствора 1» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 30 секунд. Слейте супернатант из собирательной пробирки. Верните колонку в ту же собирательную пробирку.

2.2.11. Добавьте 700 мкл «Промывочного раствора 2» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 30 секунд. Слейте супернатант из собирательной пробирки. Верните колонку в ту же собирательную пробирку.

2.2.12. Повторите п. 2.2.11, перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

2.2.13. Центрифугируйте пустую колонку в течение 1 минуты.

**ВНИМАНИЕ!** Если на кольце внутри колонки остались капли «Промывочного раствора», удалите их пипеткой.

2.2.14. Оставьте открытые колонки при комнатной температуре на 5 минут для испарения остатка спирта.

2.2.15. Подготовьте и промаркируйте новые пробирки объемом 1.5 мл для каждого образца. Перенесите колонки в промаркированные пробирки.

2.2.16. Нанесите в центр мембраны колонки 100 мкл предварительно прогретого «Элюирующего раствора». Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 2 минут. Центрифугируйте в течение 1 минуты для сбора очищенной ДНК.

► Для увеличения концентрации ДНК можно уменьшить объем «Элюирующего раствора» до 50 мкл. Не используйте менее 50 мкл «Элюирующего раствора», так как из-за неполного смачивания мембраны колонки может произойти частичная потеря ДНК.

Очищенная ДНК хранится при  $-20^{\circ}\text{C}$  до 1 года.

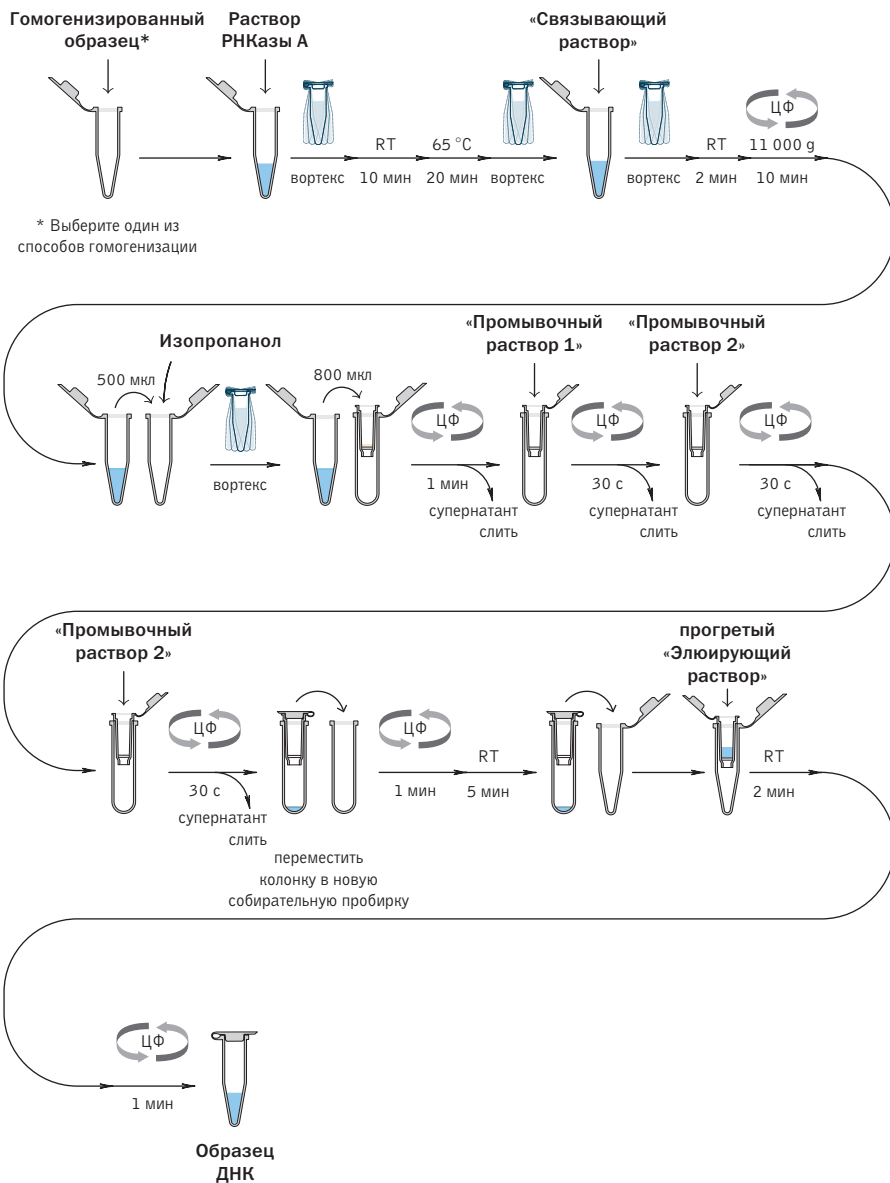


Рисунок 1 — схема выделения ДНК

## 11. Возможные проблемы и способы их решения

| Возможные проблемы                                                                                                    | Возможная причина                                                                                                               | Варианты решения                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Низкий выход ДНК.                                                                                                  | <p>1. Неполное разрушение клеток или тканей на этапе гомогенизации.</p> <p>2. Неполное элюирование ДНК с мембраны сорбента.</p> | <p>1. Убедитесь, что гомогенизация проведена тщательно. В полученном гомогенизате не должно быть видимых фрагментов неповрежденной ткани.<br/>При необходимости: увеличьте время или интенсивность гомогенизации; убедитесь в достаточном количестве абразива.<br/>При измельчении в жидком азоте — ткани должны быть постоянно заморожены.</p> <p>2. При использовании для элюции объема элюирующего раствора 50 мкл и менее увеличьте объем элюирующего раствора. Для повышения концентрации конечного продукта проведите двукратное элюцию мембраны одним и тем же объемом элюата. Используйте только нагретый элюирующий раствор.</p> |
| 2. Присутствие примесей РНК в препарате ДНК (также может быть причиной низкого выхода ДНК).                           | <p>1. Ненадлежащее хранение РНКазы после разведения.</p> <p>2. Слишком большое количество биоматериала.</p>                     | <p>1. Убедитесь, что РНКаза хранилась при <math>-20^{\circ}\text{C}</math>.</p> <p>2. Не превышайте предел в 100 мг для свежих и обводненных растительных тканей и 25 мг для гербарного материала или обезвоженных тканей.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 3. Полученная ДНК показывает низкую эффективность в последующих экспериментах (ингибирование ферментативных реакций). | В образце остался спирт или соли из промывочного раствора / Недостаточная чистота выделенной ДНК.                               | <p>Убедитесь, что протокол был выполнен без изменения количества промывок и объемов промывочных растворов.</p> <p>Убедитесь, что колонка полностью высушена после стадии промывки перед добавлением элюирующего буфера. Для этого центрифугируйте пустую колонку в течение 1 минуты и инкубируйте при комнатной температуре в течение 5–10 минут.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## Наборы и сервисы Евроген

    – ссылка на страницу  
НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот   

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ  

Синтез и амплификация кДНК   

Клонирование ДНК      

Выявление контаминации микоплазмой   

Оценка ДНК   

Нормализация кДНК   

Практикум по генной инженерии   

Генотипирование   

Синтез олигонуклеотидов и зондов   

Секвенирование по Сэнгеру   

Синтез генов   

Сайт-направленный мутагенез   

Консультация по продуктам: *support@evrogen.ru*

Подробную информацию о наших наборах и сервисах  
можно получить на сайте [www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)

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