



Инструкция по применению

Набор для выделения геномной ДНК

Genta gDNA Isolation kit

Набор для выделения геномной ДНК из бактерий, клеток и тканей животных на магнитных частицах

Версия 1 от 05.07.2023

1. ОПИСАНИЕ

Набор предназначен для быстрого выделения и очистки геномной ДНК из бактерий, клеток эукариот, тканей и дрожжей. В наборе используется технология сорбции ДНК на магнитных частицах. Весь процесс выделения ДНК сочетает в себе этапы лизиса образца, последующее селективное связывание высвобожденной ДНК с магнитными частицами, а затем, после серии промывок, элюцию ДНК в низкосолеваемом буфере. Частицы с сорбированной на своей поверхности ДНК отделяются под действием магнитного поля штатива (магнитный штатив не входит в состав набора), что позволяет получать концентрированный раствор ДНК без примесей.

Полученная очищенная ДНК не содержит белков, нуклеаз или других примесей и может быть использована в широком спектре методов молекулярной биологии, таких как ПЦР, ПЦР-РВ или других реакций с участием ферментов.

Набор предназначен только для проведения научных исследований.

2. СОСТАВ

Компонент	20 выделений KI-GgDNA-S	50 выделений KI-GgDNA-L	250 выделений KI-GgDNA-X
Раствор для разведения образца DS	6,5 мл	16 мл	80 мл
Лизирующий буфер LS	10 мл	20 мл	85 мл
Связывающий буфер BS	10 мл	26 мл	130 мл
Промывочный раствор WS1	18 мл	45 мл	227 мл
Промывочный раствор WS2	7,5 мл	19 мл	97 мл
Промывочный раствор WS3	10,5 мл	26 мл	131 мл
Магнитный сорбент	3,5 мл	9 мл	48 мл
РНКаза А	2 мг	4 мг	17 мг
Элюирующий буфер ES	2,5 мл	6,5 мл	32 мл

3. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ

Все компоненты набора хранятся и транспортируются при температуре +4 °С в сухом, защищенном от света месте в упаковке производителя.

Магнитный сорбент хранить при +4 °С.

Лизирующий буфер LS после добавления РНКазы А хранить при +4 °С.

Раствор для разведения образца DS, Связывающий буфер BS, Промывочные растворы WS1, WS2, WS3 и Элюирующий буфер ES можно хранить при комнатной температуре.

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

4. РЕКОМЕНДУЕМОЕ КОЛИЧЕСТВО БИОМАТЕРИАЛА И ОЖИДАЕМЫЙ ВЫХОД ДНК

На 1 выделение рекомендуется использовать

- до 30 мг ткани
- $0.5-1 \cdot 10^9$ бактериальных клеток
- $0,25-1 \cdot 10^6$ эукариотических клеток
- до 10^8 клеток дрожжей

	Типа биоматериала	Количество для 1 выделения	Ожидаемый выход ДНК
1	Печень мыши	20 мг	44,7 мкг
2	Лёгкие мыши	129 мг	29,6 мкг
3	Мозг мыши	24,7 мг	19,5 мкг
4	Почки мыши	39 мг	51,2 мкг
5	Селезёнка мыши	37 мг	167,7 мкг
6	Сердце мыши	5 мг	13,9 мкг
7	Хвост мыши	6 мг	3,8 мкг
8	Клетки E.coli	$0,5 \cdot 10^9$	5 мкг
9	Эукариотические клетки (НЕК293, СНО)	$0,25 \cdot 10^6$	3,7 мкг
10	Дрожжи (Обратите внимание, что значения $A_{260/280}$, $A_{260/230}$ могут получаться немного ниже нормы, однако это не влияет на качество выделенной ДНК)	$12 \cdot 10^6$	4 мкг

5. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Магнитный штатив
- Настольная центрифуга-вортекс
- Настольный твердотельный термостат
- Микроцентрифужные пробирки 1,5 мл
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1000 мкл
- Наконечники с фильтром, совместимые с дозаторами
- 96-100% этанол
- Перчатки

6. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

- Добавьте 0,5 мл Лизирующего буфера LS в пробирку с лиофилизированной РНКазой А (осадок должен быть на дне пробирки), перемешайте на вортексе, полностью перенесите во флакон с Лизирующим буфером LS и перемешайте раствор после добавления РНКазы А. Подпишите дату добавления РНКазы в раствор на крышке флакона.
Храните при +4 °С.
- Добавьте 96%-100% этанол во флакон с Промывочным раствором WS3:
 - к 10,5 мл Раствора WS3 31 мл 96% водного этанола (или 29 мл 100% этанола)
 - к 26 мл Раствора WS3 75 мл 96% водного этанола (или 72 мл 100% этанола)
 - к 131 мл Раствора WS3 370 мл 96% водного этанола (или 357 мл 100% этанола)Перемешайте. Подпишите дату добавления этанола на крышке флакона.
- В Лизирующем буфере LS в холодильнике и при комнатной температуре выпадает осадок. Перед началом работы необходимо прогреть при 30-40 °С до полного растворения осадка. Не используйте микроволновую печь.
- Перед началом работы рекомендуется заранее отобрать и промаркировать пробирки для образцов.

7. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК.

1	<p><u>Подготовка клеток:</u> <i>Суспензионные клетки:</i> соберите клетки (до 10^6) в пробирку для центрифугирования. Осадите клетки центрифугированием при комнатной температуре с ускорением 250 g в течение 5 мин. Удалите супернатант. <i>Адгезионные клетки:</i> удалите питательную среду с культурального планшета, содержащего до 10^6 клеток. Промойте клетки 1X PBS и снимите трипсином. Перенесите клетки в пробирку для центрифугирования. Осадите клетки центрифугированием при комнатной температуре с ускорением 250 g в течение 5 мин. Удалите супернатант.</p>
2	Ресуспендируйте осадок клеток в <u>200 мкл Раствора для разведения образца DS</u> .
3	<p>Добавьте <u>200 мкл Лизирующего буфера LS</u> (содержащего RNКазу А) к образцу. <i>Объём Лизирующего буфера должен быть равен добавленному объёму Раствора для разведения образца.</i></p> <p>Хорошо перемешайте образец на вортексе и оставьте инкубироваться при комнатной температуре на 5-10 мин, периодически перемешивая на вортексе.</p>
4	В процессе лизиса образца подготовьте магнитные частицы в пробирках на 1,5 мл из расчета <u>150 мкл частиц</u> на один образец.
5	Разместите пробирки на магнитном штативе, дождитесь, пока частицы соберутся на магните 1-3 мин. Уберите супернатант.
6	<p>Добавьте к частицам <u>400 мкл Связывающего буфера BS</u>. <i>Объём Связывающего буфера должен быть равен объёму образца.</i></p>
7	После лизиса добавьте весь образец (400мкл) к магнитным частицам. Хорошо перемешайте на вортексе.
8	Далее следуйте Протоколу 2 (выделение геномной ДНК их тканей) с п.9

7. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ 2. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ТКАНЕЙ.

<p>Внимание: Данный протокол содержит стадию гомогенизации по любому доступному в лаборатории протоколу.</p>	
1	К образцу ткани рекомендованного количества добавьте 250 мкл Раствора для разведения образца DS.
2	Добавьте 250 мкл Лизирующего буфера LS (содержащего РНКазу А) к образцу. <i>Объём Лизирующего буфера должен быть равен добавленному объёму Раствора для разведения образца.</i>
3	Проведите гомогенизацию образца согласно инструкции прибора/методике для гомогенизации.
4	Перенесите гомогенизированный образец в пробирку для центрифугирования. Центрифугируйте образец 5-10 мин при 12000 g.
5	В процессе центрифугирования образца подготовьте магнитные частицы в пробирках на 1,5 мл из расчета 150 мкл частиц на один образец.
6	Разместите пробирки на магнитном штативе, дождитесь, пока частицы соберутся на магните 1-3 мин. Уберите супернатант.
7	Добавьте к частицам 200 мкл Связывающего буфера BS. Снимите пробирки с частицами с магнитного штатива и хорошо перемешайте на вортексе.
8	После завершения центрифугирования образца, отберите 200 мкл супернатанта и добавьте к магнитным частицам. <i>Объём образца должен быть равен объёму магнитного сорбента.</i> Хорошо перемешайте на вортексе.
9	Поместите пробирки в термостат с температурой 60 °С на 5 мин. Перемешивайте содержимое пробирок каждые 2 минуты кратким вортексированием.
10	Кратким центрифугированием осадите капли и перенести пробирки в магнитный штатив на 1-3 мин.
11	Без снятия пробирок с магнитного штатива, осторожно отберите всю жидкость по внутренней стенке пробирки, используя вакуумный отсасыватель или дозатор и отдельный наконечник для каждой пробы, не задевая магнитные частицы.
12	Добавьте в пробирки 700 мкл Промывочного раствора WS1. Перемешайте содержимое пробирок на вортексе до полного размешивания осадка магнитного сорбента, а затем осадите капли кратким центрифугированием.

13	Поставьте пробирки в магнитный штатив и дождитесь, пока частицы соберутся на магните 1-3 мин.
14	Без снятия пробирок с магнитного штатива, осторожно отберите всю жидкость по внутренней стенке пробирки, используя вакуумный отсасыватель или дозатор и отдельный наконечник для каждой пробы, не задевая магнитные частицы.
15	Добавьте в пробирки <u>300 мкл</u> Промывочного раствора WS2 . Перемешайте содержимое пробирок на вортексе до полного размешивания осадка магнитного сорбента, а затем осадите капли кратким центрифугированием.
16	Поставьте пробирки в магнитный штатив и дождитесь, пока частицы соберутся на магните 1-3 мин.
17	Без снятия пробирок с магнитного штатива, осторожно отберите всю жидкость по внутренней стенке пробирки, используя вакуумный отсасыватель или дозатор и отдельный наконечник для каждой пробы, не задевая магнитные частицы.
18	Добавьте в пробирки <u>500 мкл</u> Промывочного раствора WS3 . Перемешайте содержимое пробирок на вортексе до полного размешивания осадка магнитного сорбента, а затем осадите капли кратким центрифугированием.
19	Поставьте пробирки в магнитный штатив и дождитесь, пока частицы соберутся на магните 1-3 мин.
20	Без снятия пробирок с магнитного штатива, осторожно отберите всю жидкость по внутренней стенке пробирки, используя вакуумный отсасыватель или дозатор и отдельный наконечник для каждой пробы, не задевая магнитные частицы.
21	Оставьте магнитные частицы на магнитном штативе в пробирках с открытыми крышками сушиться в течение 10 мин.
22	Добавьте <u>100 мкл</u> Элюирующего буфера ES к магнитным частицам и перемешайте на вортексе до полного размешивания осадка.
23	Поместите пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин. Аккуратно перемешивайте содержимое пробирок каждые 2 минуты.
24	Кратким центрифугированием осадите капли и переставьте пробирки в магнитный штатив. Инкубируйте 2-3 мин.
25	Отберите аккуратно элюат, не задевая магнитные частицы. Элюат содержит очищенную целевую ДНК.

26	Если в элюат попал магнитный сорбент, рекомендуется центрифугировать образцы 3 мин при 5000 g и повторно отобрать супернатант.
27	Храните образец геномной ДНК при -20°C.
<i>Рекомендация: перед измерением концентрации ДНК методом спектрофотометрии перемешайте образцы на вортексе.</i>	

7. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ 3. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ БАКТЕРИЙ.

1	<u>Подготовка бактериальных клеток:</u> Перенесите 0.5 – 1 мл (до 10 ⁹) бактериальной ночной культуры в пробирку для центрифугирования. Осадите клетки центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин. Удалите супернатант.
2	Ресуспендируйте осадок клеток в 200 мкл Раствора для разведения образца DS.
3	Добавьте 200 мкл Лизирующего буфера LS (содержащего RNКазу А) к образцу. Объём Лизирующего буфера должен быть равен добавленному объёму Раствора для разведения образца. Хорошо перемешайте образец на вортексе и оставьте инкубироваться при комнатной температуре на 5-10 мин, периодически перемешивая на вортексе.
4	В процессе лизиса образца подготовьте магнитные частицы в пробирках на 1,5 мл из расчета 150 мкл частиц на один образец.
5	Разместите пробирки на магнитном штативе, дождитесь, пока частицы соберутся на магните 1-3 мин. Уберите супернатант.
5	Добавьте к частицам 400 мкл Связывающего буфера BS. <i>Объём Связывающего буфера должен быть равен объёму образца.</i>
6	После лизиса добавьте весь образец (400мкл) к магнитным частицам. Хорошо перемешайте на вортексе.
7	Поместите пробирки в термостат с температурой 60 °С на 5 мин. Перемешивайте содержимое пробирок каждые 2 минуты кратким вортексированием.
8	Кратким центрифугированием осадите капли и перенесите пробирки в магнитный штатив на 1-3 мин, пока частицы соберутся на магните.
9	Без снятия пробирок с магнитного штатива, осторожно отберите всю жидкость по внутренней стенке пробирки, используя вакуумный

	отсасыватель или дозатор и отдельный наконечник для каждой пробы, не задевая магнитные частицы.
10	Добавьте в пробирки <u>500 мкл</u> Промывочного раствора WS3 . Перемешайте содержимое пробирок на вортексе до полного размешивания осадка магнитного сорбента, а затем осадите капли кратким центрифугированием.
11	Поставьте пробирки в магнитный штатив и дождитесь, пока частицы соберутся на магните 1-3 мин.
12	Без снятия пробирок с магнитного штатива, осторожно отберите всю жидкость по внутренней стенке пробирки, используя вакуумный отсасыватель или дозатор и отдельный наконечник для каждой пробы, не задевая магнитные частицы.
13	Повторить п. 10-12 два раза.
19	Оставьте магнитные частицы на магнитном штативе в пробирках с открытыми крышками сушиться в течение 10 мин.
20	Добавьте <u>100 мкл</u> Элюирующего буфера ES к магнитным частицам и перемешайте на вортексе до полного размешивания осадка.
21	Поместите пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин. Аккуратно перемешивайте содержимое пробирок каждые 2 минуты.
22	Кратким центрифугированием осадите капли и переставьте пробирки в магнитный штатив. Инкубируйте 2-3 мин.
23	Отберите аккуратно элюат, не задевая магнитные частицы. Элюат содержит очищенную целевую ДНК.
24	Если в элюат попал магнитный сорбент, рекомендуется центрифугировать образцы 3 мин при 5000 g и повторно отобрать супернатант.
25	Храните образец геномной ДНК при -20°C.
<i>Рекомендация: перед измерением концентрации ДНК методом спектрофотометрии перемешайте образцы на вортексе.</i>	

7. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ 4. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ДРОЖЖЕЙ.

1	<u>Подготовка дрожжевых клеток:</u> Перенесите 0.5 – 1 мл (до 10 ⁸) ночной дрожжевой культуры в пробирку для центрифугирования. Осадите клетки центрифугированием 5 – 10 с при >12 000 g. Удалите супернатант.
2	Ресуспендируйте осадок клеток в <u>200 мкл Раствора для разведения образца DS.</u>
3	Далее следуйте Протоколу 1 (выделение геномной ДНК их эукариотических клеток) с п.3.
<i>Обратите внимание, что значения A_{260/280}, A_{260/230} могут получаться немного ниже нормы, однако это не влияет на качество выделенной ДНК.</i>	

8. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА, ИХ ПРИЧИНЫ И РЕШЕНИЯ

Проблема	Возможные причины и решения
Низкий выход ДНК	<p><u>Избыточное количество образца для лизиса</u> Уменьшите количество исходного материала.</p> <p><u>Не полный лизис</u> Образцы тканей следует очень тщательно гомогенизировать. Образцы клеток необходимо очень хорошо ресуспендировать в Растворе для разведения образца DS, а затем тщательно перемешивать в процессе лизиса.</p> <p><u>Отсутствие этанола в Промывочном буфере WS3</u> Убедитесь, что этанол был добавлен в Промывочный буфер WS3 перед его использованием. Используйте перегнанный этанол или этанол для молекулярной биологии. Всегда плотно закручивайте крышку флакона.</p>
Очищенная ДНК деградировала	<p><u>Множественная заморозка/разморозка образцов</u> Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания образцов. Используйте новый образец для выделения ДНК. Выполняйте выделение ДНК из свежего материала, когда это возможно.</p> <p><u>Несоответствующие условия хранения образцов</u> Храните ткани млекопитающих и бактерий при -80 °С до использования. Для длительного хранения клинические образцы (мазок) должны храниться при -20 °С.</p>

Проблема	Возможные причины и решения
Контаминация РНК	<u>Отсутствие РНКазы А в Лизирующем буфере LS</u> Убедитесь, что РНКазы А была добавлена в Лизирующий буфер LS . После добавления РНКазы А буфер должен храниться при +4 °С. Лизис образца проводите согласно Протоколу.
Низкие значения A_{260}/A_{280}	<u>Магнитные частицы в элюате</u> Центрифугируйте образцы 3 мин при 5000 g и повторно отберите супернатант, либо держите пробирки на магнитном штативе при отборе аликвот образца.
Ингибирование последующих ферментативных реакций	<u>Геномная ДНК содержит остаточный этанол</u> При наличии остаточного этанола в очищенной ДНК увеличьте время сушки частиц на 5 мин при комнатной температуре перед этапом элюирования. <u>Геномная ДНК содержит остаточную соль</u> Используйте правильный порядок промывочных буферов при выполнении протокола выделения ДНК.
Наличие магнитных частиц в элюате	Чтобы удалить остатки магнитных частиц из элюата установите пробирки на магнитный штатив и повторно отберите элюат в чистую пробирку. Либо центрифугируйте образцы 3 мин при 5000 g и отберите супернатант в чистую пробирку.

При обнаружении не описанных проблем в работе набора, сообщите производителю по адресу info@genterra.ru. Убедительно просим Вас в письме с описанием проблемы указывать каталожный номер и лот вашего набора.

10. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КОМПОНЕНТАМИ НАБОРА

При работе с растворами из набора **Genta gDNA Isolation kit** рекомендуется: использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами; не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу, при попадании – промыть большим количеством воды; после работы обработать рабочее место дезинфицирующим раствором или 70% спиртом.

Уважаемый Пользователь!

Благодарим Вас за выбор продукта от АО «ГенТерра»!

Если у Вас есть рекомендации по улучшению данного продукта или пожелания по расширению нашей линейки продукции, мы будем признательны, если Вы предоставите нам обратную связь по адресу info@genterra.ru

СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА

Набор для выделения геномной ДНК Genta gDNA isolation kit проходит квалификацию путем выделения геномной ДНК из 20 мг мышинной печени в соответствии с протоколами, изложенными в руководстве. Качество очищенной геномной ДНК оценивают спектрофотометрически и с помощью электрофореза в агарозном геле.

очищенная геномная ДНК имеет отношение A260/A280 $1,8 \pm 0,2$.



ДЛЯ ЗАПИСЕЙ

