



Набор «ФБиоГель» для
выделения двунитевой ДНК из
геля или очистки от
реакционной смеси на
центрифужных колонках.
(НК-2-50, на 50 выделений)

Дата изменения: 14.08.2014

Содержание

Компоненты набора	4
Ограничения на использование продукта.....	4
Гарантия	4
Техника безопасности	5
Условия выделения	6
Описание	6
Принцип действия	7
Необходимое оборудование и материалы	10
Важные замечания.....	10
Протокол выделения	11
Проблемы и рекомендации	14
Контроль качества	17
Условия и срок хранения.....	17
Служба технической поддержки	17
Информация для заказов	17

Компоненты набора

Набор «ФБиоГель»	На 50 выделений
Центрифужные колонки с силикатной мембраной	50 шт.
Буфер ПГ*	3 x 25 мл
Буфер ПЕ (концентрированный)	2x8,75мл
Буфер ЕБ	4 мл
Собирающие пробирки	50 шт.

*Буфер ПГ содержит хаотропные соли, которые являются раздражителями. Соблюдайте необходимые меры безопасности при работе в лаборатории, используйте перчатки.

Ограничения на использование продукта

Набор «ФБиоГель» разработан и продается исключительно в научных целях. Набор не может быть использован в медицинских или в лечебных целях.

Гарантия

Фрактал Био гарантирует изготовление всех продуктов согласно описанию в руководстве. Покупатель должен определить соответствие продукта для конкретного его использования. Если продукт не дает заявленного результата по любой причине, за исключением неправильного использования, мы бесплатно произведем замену продукта или вернем покупателю его полную стоимость. Мы сохраняем за собой право изменять или модифицировать любой продукт в целях улучшения его качеств и дизайна. Если у Вас возникли вопросы по

применению продукта или оценке результата, Вы можете обращаться в Службу технической поддержки (см. на обороте).

Техника безопасности

Необходимо соблюдать осторожность и быть внимательным при обращении с большинством материалов, описанных в данном руководстве. При работе с реактивами всегда используйте верхнюю лабораторную одежду, одноразовые перчатки и защитные очки. Полную информацию о рисках и предостережениях можно найти в паспорте безопасности вещества.

Буфер ПГ

Содержит гуанидин тиоционат - **Xn** Вреден для здоровья

Факторы риска:

R20/21/22 Вреден при вдыхании, контакте с кожей и проглатывании

R32 Контакт с кислотами приводит к выделению крайне токсичного газа

Меры предосторожности:

S13 Хранить отдельно от продуктов питания, животного корма

S26 В случае попадания в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S36 Использовать соответствующую защитную одежду

S46 При проглатывании немедленно обратиться за медицинской помощью и показать контейнер или этикетку

Условия выделения

Максимальная связывающая способность	50 мкг ДНК
Максимальный вес полоски геля	400 мг
Минимальный объем элюции	20 мкл
Объем колонки	800 мл
Размеры выделяемой двунитевой ДНК	70-50 000 п.н.

Описание

Набор «ФБиоГель» разработан для выделения фрагментов ДНК размером 70-50 000 пар нуклеотидов из стандартного или легкоплавкого агарозного геля в буферах TAE (Tris-acetate/EDTA) или TBE (Tris-borate/EDTA), а также для очистки ДНК от реакционной смеси.

Система для выделения «ФБиоГель» предназначена для очистки до 50 мкг фрагментов ДНК от реакционной смеси и агарозного геля. Набор может быть использован для высокоэффективного удаления широкого спектра ферментов, используемых в молекулярной биологии (табл.1).

Набор «ФБиоГель» обеспечивает эффективное и чистое выделение нуклеиновых кислот для прямого использования в следующих процедурах:

- Флуоресцентное и радиоактивное секвенирование
- Рестрикция
- Маркирования (мечения)
- Гибридизация
- Лигирование и трансформация
- Амплификация
- Транскрипция *in vitro*
-

	Очистка ДНК из раствора	Очистка ДНК из геля
Щелочная фосфатаза	+	+
Синтез кДНК	-	+
Гидролиз ДНКазой/РНКазой	+	+
Киназа с фрагментами ДНК	+	+
Киназа с олигонуклеотидами	-	-
Лигирование	+	+
Nick-трансляция	+	+
ПЦР	-	+
Рендомное праймирование	+	+
Рестрикция	+	+
Тейлинг фрагментов ДНК	+	+
Тейлинг олигонуклеотидов	-	-

Таблица 1. Спектр применения набора

Принцип действия

Система для выделения «ФБиоГель» объединяет удобство использования центрифужных колонок со специфическими связывающими свойствами силикатной мембраны. Специальные буферы в составе набора являются оптимальными для эффективного извлечения ДНК и удаления контаминантов, специфичных для разных молекулярных методик. ДНК связывается с силикатной мембраной при высокой концентрации соли, в то время как контаминанты проходят сквозь колонку. Примеси

эффективно отмываются и очищенная ДНК элюируется буфером ЕБ или водой.

1. Связывание ДНК с силикатной мембраной

Силикатная мембрана колонок предназначена исключительно для очистки ДНК из водных растворов и агарозного геля и может связывать до 10 мкг ДНК. Связывающий буфер в наборе «ФБиоГель» обеспечивает соответствующую концентрацию соли и рН для связывания ДНК с мембраной колонки. Связывание нуклеиновых кислот с силикатной поверхностью происходит только при наличии высокой концентрации хаотропных солей.

Связывание ДНК с силикой также зависит от рН. При рН ≤ 7.5 связывается около 95% ДНК. При более высоких значениях рН связывание резко снижается.

2. рН индикатор

Буфер ПГ содержит интегрированный индикатор рН, который имеет желтый цвет при рН ≤ 7.5 . Если значение рН наносимой смеси больше 7.5, то цвет индикатора становится оранжевым или фиолетовым. В этом случае следует добавить небольшое количество 3М ацетата натрия (рН 5.0) для получения необходимой кислотности.

Буфер ПГ не содержит йодид натрия (NaI). Следовые количества NaI, которые трудно удалить из образца ДНК, снижают эффективность в последующих энзиматических реакциях, таких как лигирование по тупым концам.

3. Очистка ДНК

На этапе связывания ДНК праймеры и примеси (соли, ферменты, нуклеотиды, агароза, этидиум бромид, масла, детергенты) не адсорбируются на силикатной мембране и проходят сквозь колонку. Соли отмываются буфером ПЕ,

содержащим этанол. Остаточные количества буфера ПЕ, которые могут ингибировать последующие энзиматические реакции, удаляются дополнительным этапом центрифугирования.

4. Эффективность элюции

Эффективность элюции сильно зависит от рН элюирующего буфера и концентрации соли в нем. В противоположность связыванию, элюция наиболее эффективна при основном рН и низкой концентрации солей. ДНК элюируется 50 или 30 мкл буфера ЕБ (10 mM Tris·Cl, рН 8.5) или воды. Максимальная эффективность элюции достигается при рН в диапазоне 7.5-8.5. ДНК, элюированная водой, должна храниться при -20°C, так как ДНК может деградировать при отсутствии буферного агента. Элюция буфером ТЕ не рекомендуется, так как ЭДТА может ингибировать последующие энзиматические реакции.

5. Эффективность выделения или очистки ДНК

Качество и количество очищенной ДНК зависит от 3х факторов: объем элюирующего буфера, точность нанесения буфера на колонку и время инкубации буфера на колонке. 100-200 мкл элюирующего буфера полностью покрывают мембрану колонки, обеспечивая максимальное извлечение ДНК, даже если нанесены не на центр мембраны. Элюция объемом менее 50 мкл требует добавления буфера ровно на центр мембраны и, если элюция проводится минимальным рекомендуемым объемом 30 мкл, дополнительной инкубации в течение 1 минуты для оптимального извлечения. ДНК будет в 1.7 раза более концентрированной, если колонку инкубировать в течение 1 минуты 30 мкл элюирующего буфера, нежели при элюции 50 мкл без инкубации.

Эффективность выделения или очистки составляет 70-80% и может быть определена путем проведения электрофореза проб в агарозном геле.

Необходимое оборудование и материалы

При работе с реактивами всегда используйте лабораторную защитную одежду, одноразовые перчатки и защитные очки. Более подробную информацию можно найти в паспорте безопасности веществ.

- Этанол (96-100%)
- Микроцентрифуга
- Пластиковые микропробирки объемом 1.5 мл
- 3М ацетат натрия, pH 5.0 (при необходимости)
- Изопропанол (100%)
- Нагревательный блок или водяная баня при 50°C
- Дистиллированная вода (при необходимости)

Важные замечания

Прочтите внимательно данный раздел до начала выполнения работ.

- При вырезании фрагмента ДНК из геля, сведите время пребывания ДНК под ультрафиолетом к минимуму.
- Вес полоски геля на одну колонку не должен превышать 400 мг. Если вес полоски геля более 400 мг, используйте более одной колонки.
- **Добавьте 16,25 мл этанола (96%) в концентрат буфера ПЕ перед первым его использованием.**
- Проверьте буферы на наличие осадка перед использованием. Если в буферах образовался осадок, то

необходимо его растворить нагреванием буферов до 37 °С непосредственно перед использованием.

- Убедитесь, что все буферы и центрифужные колонки имеют при использовании комнатную температуру.
- Желтый цвет буфера ПГ соответствует pH<7.5. Если после добавления смеси буфер стал красного цвета, следует добавить небольшое количество 3М ацетата натрия. Цвет должен стать опять жёлтым
- Центрифугирования в каждом шаге выделения осуществляется при 13000 об/мин (17900xg) в стандартной настольной микроцентрифуге при комнатной температуре.
- Выделенную очищенную плазмидную ДНК следует хранить при -20 °С.

Протокол выделения

Данный протокол разработан для выделения и очистки ДНК размером от 70 до 10 000 пар нуклеотидов из стандартного или легкоплавкого агарозного геля в буфере ТАЕ или ТВЕ. На одной колонке может обрабатываться до 400 мг геля.

Набор «ФБиоГель» также может использоваться для очистки ДНК от реакционной смеси. Для этого добавьте в смесь 3 объема буфера ПГ и 1 объем изопропанола, перемешайте и проведите очистку по представленному протоколу, начиная с этапа 5.

	Действия
1	Вырежьте фрагмент ДНК из агарозного геля чистым, острым скальпелем. Минимизируйте размер полоски геля, дополнительно удалив его излишки.
2	Взвесьте полоску геля в микропробирке. Добавьте 3 объема буфера ПГ к одному объему геля (100мг ~

	<p>100мкл).</p> <p>Например, добавьте 300 мкл буфера ПГ к 100 мг геля.</p> <p>Для 2% агарозного геля добавьте 6 объемов буфера ПГ.</p> <p>Максимальное количество полоски геля на одну колонку составляет 400 мг.</p>
3	<p>Растворите гель инкубированием микропробирки при комнатной температуре в течение 10 мин, встряхивая пробирку каждые 2-3 минуты. Для более быстрого растворения геля инкубируйте пробирку при 50°C. После полного растворения геля проверьте, чтобы цвет смеси был желтый. Если смесь имеет оранжевый или фиолетовый цвет, добавьте 10 мкл 3М ацетата натрия (рН 5.0) и перемешайте. Цвет смеси снова должен стать желтым.</p> <p>Важно: Растворяйте агарозу полностью. Для 2% гелей и выше увеличьте время инкубации.</p>
4	<p>Добавьте к образцу равный объему геля объем изопропанола и перемешайте.</p> <p>Например, если агарозный гель составляет 100 мг, добавьте 100 мкл изопропанола. Этот шаг повышает эффективность выделения фрагментов ДНК <500 пар оснований и >4 кб. Для фрагментов ДНК в диапазоне 500 - 4000 пар оснований добавление изопропанола не оказывает влияния на эффективность выделения. Не центрифугируйте образцы на данном этапе.</p>
5	<p>Для связывания ДНК нанесите образец на прилагаемую к набору центрифужную колонку и проведите центрифугирование в течение 60 с.</p> <p>Максимальный объем колонки составляет 800 мкл.</p> <p>Для образцов объемом более 800 мкл нанесение и</p>

	центрифугирование проводится несколько раз.
6	Удалите сток и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.
7	Для отмывки добавьте 450 мкл буфера ПЕ на центрифужную колонку и проведите центрифугирование в течение 60 с. Замечание: Если ДНК предполагается использовать в процедурах чувствительных к солям в растворе, таких как лигирование по тупым концам или секвенирование, после добавления буфера ПЕ оставьте колонку на 2-5 мин. при комнатной температуре.
8	Повторите процедуру отмывки ещё раз.
9	Удалите сток и проведите дополнительное центрифугирование в течение 1 мин для удаления остатков буфера ПЕ. Этот этап необходим для удаления остаточного этанола с мембраны колонки.
10	Перенесите центрифужную колонку в чистую микропробирку объемом 1.5 мл. Для элюирования ДНК добавьте 50 мкл буфера ЕБ или воды в центр мембраны колонки и проведите центрифугирование в течение 1 мин. Для повышенной концентрации ДНК добавьте 30 мкл буфера ЕБ в центр мембраны колонки и инкубируйте в течение 1-2 мин при комнатной температуре. Затем проведите центрифугирование в течение 1 мин. Важно: Убедитесь, что буфер ЕБ наносится точно на мембрану для полной элюции связанной ДНК. Замечания: Избегайте контакта наконечника пипетки с мембраной.
	Выделенную очищенную ДНК хранить при -20 °С.

Проблемы и рекомендации

Проблема	Комментарий
<p>Малое количество выделяемой ДНК</p>	<p>Буфер ПЕ не содержал этанол: Перед использованием в концентрированный буфер ПЕ необходимо добавить этанол.</p>
	<p>Неэффективное элюирование ДНК: буфер ЕБ должен наноситься по центру мембраны для более эффективного элюирования; элюирование должно осуществляться безсолевым буфером, рН которого составляет 7.5-8.5.</p>
	<p>рН электрофорезного буфера слишком высокий, смесь с буфером ПГ стала красного цвета: электрофорезный буфер использовался повторно или неправильно приготовлен, в результате чего рН образца превышает буферную емкость буфера ПГ и ДНК связывается с мембраной менее эффективно. Добавьте небольшое количество (~10-20 мкл) 3М ацетата натрия, рН 5.0, к образцу и перемешайте. Цвет смеси станет желтым, указывая на правильное значение рН образца.</p>
<p>Полоска геля растворяется не полностью: После добавления к полоске геля буфера ПГ перемешивайте микропробирку на вортексе каждые 2-3 мин. во время инкубации при 50 °С. Возможно увеличение объема буфера ПГ</p>	

	<p>Полоска геля слишком большая: 70-80% извлечения ДНК можно получить лишь при использовании не более 400 мг геля в расчете на одну колонку. Для полосок геля весом более 400 мг используйте несколько колонок.</p>
<p>Помутнение и увеличение вязкости образца после добавления изопропанола:</p>	<p>Это может быть связано с выпадением в осадок солей и устраняется перемешиванием образца. Также возможно неполное растворение полоски геля. В этом случае после этапа связывания ДНК с мембраной рекомендуется нанести на колонку 500 мкл буфера ПГ и оставить стоять на 1 мин., после чего провести центрифугирование и продолжить процедуру выделения. Данный шаг позволит растворить остаток агарозы.</p>
<p>Применение выделенной ДНК в последующих процедурах неэффективно</p>	<p>В элюате слишком высокая концентрация солей: Модифицируйте этап отмывки, инкубируя колонку в течение 5 мин. при комнатной температуре после добавления буфера ПЕ. Затем проведите центрифугирование.</p> <p>В элюате содержатся остатки этанола: Убедитесь, что весь сток буфера ПЕ после отмывки удален из собирающей пробирки перед тем, как проводить дополнительный осушающий этап центрифугирования в течение 1 мин.</p> <p>В элюате содержатся остатки агарозы: Полоска геля не полностью растворилась</p>

	<p>либо ее вес превышал 400 мг. Повторите процедуру выделения, включив в нее шаг отмывки буфером ПГ.</p>
	<p>В элюате содержатся праймерные димеры: праймерные димеры размером более 20 пар оснований не удаляются полностью. После этапа связывания промойте колонку 750 мкл 35% водного раствора гуанидина гидрохлорида, после чего продолжите выделение с этапа 8.</p>
	<p>В элюате содержится денатурированная одноцепочечная ДНК, которая проявляется в виде размытой полоски при анализе выделения электрофорезом в агарозном геле. Чтобы провести отжиг одноцепочечной ДНК, проинкубируйте реакционную смесь при 95°C в течение 2 мин., а затем оставьте пробирку медленно охлаждаться при комнатной температуре. В качестве альтернативы возможно элюирование ДНК буфером, содержащим 10 mM Трис и 10 mM NaCl, что обеспечит ренатурацию цепей ДНК. Однако концентрация солей в элюате должна учитываться при использовании ДНК в последующих процедурах.</p>

Контроль качества

Набор «ФБиоГель» тестируется выделением фрагментов плазмидной ДНК pJet 2.1 из агарозного геля в соответствии с протоколом, описанным выше. Качество выделяемой ДНК оценивается нанесением на электрофорез в агарозном геле, проведением рестрикции, полимеразно-цепной реакции и транскрипции *in vitro*.

Условия и срок хранения

Набор «ФБиоГель» следует хранить в сухом месте при комнатной температуре (15-25 °С). Набор может храниться до 12 месяцев без изменения качественных характеристик. Для более длительного хранения набор можно держать при 2-8 °С.

Служба технической поддержки

В случае появления вопросов обращайтесь в службу технической поддержки: technic@fractalbio.com

Информация для заказов

Название	Состав	Кат.номер
Набор «ФБиоГель» (на выделений) 50	50 центрифужных колонок, реактивы, буферы, собирающие пробирки (2 мл)	НК-2-50

Произведено: ООО “Фрактал Био”, 190020, г. Санкт-Петербург, ул. Бумажная, д. 17

сайт: fractalbio.com, E-mail: info@fractalbio.com

Контактный телефон/факс: (812) 495-96-95

