



**Набор реагентов для очистки ДНК из агарозного геля и
реакционных смесей
«Amplex»**

#amplextest-10 #amplex-50 #amplex-250

Набор реагентов предназначен для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (РС). В набор включены все необходимые реагенты для очистки ДНК:

1. Связывающий буфер – на основе хаотропных агентов и вспомогательных компонентов для растворения агарозного геля и сорбции НК на фильтре колонки;
2. Промывочный буфер – для промывки нуклеиновых кислот от остатков агарозного геля и компонентов реакционных смесей;
3. Элюирующий буфер – для элюции и хранения НК, pH=8,9;
4. Спин-колонки – для фильтрации реакционной смеси и сорбции НК.

Буферы набора «**Amplex**» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка при минимальных температурах хранения, растворы следует нагреть до комнатной температуры.

Необходимые материалы и оборудование: УФ-трансиллюминатор; скальпель (или любой другой острый предмет, подходящий для вырезки фрагмента из геля); изопропанол (в случае очистки малых фрагментов до 500 п.н.); микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2 мл; штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл; автоматические дозаторы переменного объема на 20-200 мкл, 100-1000 мкл и соответствующие одноразовые наконечники; спин-колонки с собирательными пробирками (присутствуют в комплекте); вортекс; твердотельный термостат с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-80°C для пробирок объемом 1,5-2 мл; скоростная микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин.

Amplex

Проведение процедуры очистки ДНК

Подготовка пробы (гель)

1. Вырезать участок геля с нужным фрагментом ДНК и поместить его в предварительно взвешенную пробирку, далее взвесить пробирку с пробой и высчитать разницу. Вес геля в мг приравнивается к его объему в мкл (1 мг геля = 1 мкл геля).
2. В пробирку добавить 3 объема связывающего буфера (от объема геля), но не менее 300 мкл.
3. Инкубировать смесь в термостате при 55-58°C до полного растворения геля, периодически перемешивая на вортексе.

Опционально: для фрагментов ДНК менее 500 п.н. после растворения геля внести в реакцию 1 объем изопропанола (от объема геля) и перемешать. Далее перейти к этапу сорбции и промывки.

Подготовка пробы (реакционная смесь)

1. Если объем РС составляет менее 25 мкл, то необходимо довести его до 50 мкл водой или ТЕ-буфером и принять данный объем за основной. К объему РС добавить 3 объема связывающего буфера, перемешать.

Опционально: для фрагментов ДНК менее 500 п.н. внести в реакцию 2 объема изопропанола (от объема РС). Далее перейти к этапу сорбции и промывки.

Сорбция и промывка НК

1. Переместить весь объем смеси в спин-колонку.
2. Центрифугировать в течение 30 секунд при 10-13 тыс. об/мин, удалить фильтрат из собирательной пробирки.
3. Добавить в спин-колонку 750 мкл промывочного буфера.
4. Центрифугировать в течение 30 секунд при 10-13 тыс. об/мин, удалить фильтрат из собирательной пробирки.
5. Центрифугировать спин-колонку в течение минуты при 10-13 тыс. об/мин.
6. Переместить спин-колонку в новую пробирку 1,5-2 мл. Собирательную пробирку утилизировать.

Элюция НК

1. Добавить на центр мембраны спин-колонки 50-100 мкл элюирующего буфера.
2. Инкубировать в течение 3-10 минут при комнатной температуре.
3. Центрифугировать в течение 30-60 секунд при 10-13 тыс. об/мин.
4. Утилизировать спин-колонки.

Опционально: для повышения выхода НК фильтрат можно повторно нанести на мембрану колонки и/или использовать нагретый до 60-70°C элюирующий буфер.

Полученные растворы нуклеиновых кислот могут храниться до 7 дней при температуре от +2°C до +4°C и до двух лет при температуре -20°C. По соотношению показателей поглощения на A260/A280 чистота полученного раствора ДНК соответствует $\geq 1,7$.