



Набор реагентов для выделения ДНК из семян, муки и проростков

«SeedExt»

#SeedExtTest-10 #SeedExt-50 #SeedExt-250

Набор реагентов предназначен для выделения ДНК из семян, муки и проростков. В набор включены все необходимые реагенты для выделения ДНК:

1. Лизирующий буфер – на основе детергента и вспомогательных компонентов для оптимального лизиса;
2. Связывающий буфер – для повышения сорбции НК на фильтре колонки;
3. Промывочный буфер 1 – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей
4. Промывочный буфер 2 – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей;
5. Промывочный буфер 3 – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей;
6. Элюирующий буфер – для элюции и хранения НК, рН=8,9;
7. Протеиназа К – для более быстрого и полного лизиса;
8. Спин-колонки – для фильтрации реакционной смеси и сорбции НК.

Буферы набора «SeedExt» могут храниться при температуре от +4 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.

Фермент **Протеиназа К** хранится при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев. Допускается кратковременное повышение температуры хранения (транспортировки) от +4°C до +25°C не более 5 суток.

Необходимые материалы и оборудование: 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 (идут 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; аналитические весы с точностью взвешивания 0,1 мг; пестик для гомогенизации в 1,5 мл пробирках.

Примечание: при гомогенизации образцов в фарфоровой ступке с пестиком необходимо использовать набор «SeedExt+».

SeedExt

Проведение процедуры выделения ДНК

Пробоподготовка

1. Этап пробоподготовки образца отличается в зависимости от вида биоматериала:

При работе с мукой:

- 1.a. Внести в пробирку объемом 1,5-2 мл 50 мг навески образца, добавить 500 мкл лизирующего буфера и 20 мкл Протеиназы К.

При работе с семенами:

- 1.b. Измельчить образцы до состояния муки мелкого помола. Внести в пробирку объемом 1,5-2 мл 50 мг навески, добавить 500 мкл лизирующего буфера и 20 мкл Протеиназы К.

При работе с проростками:

- 1.c. Поместить навеску 15-50 мг зеленой части проростка в пробирку объемом 1,5 мл и интенсивно перетереть образец с помощью специального пестика для 1,5 мл микроцентрифужных пробирок до гомогенного состояния. Добавить 500 мкл лизирующего буфера. Внести 20 мкл Протеиназы К.

Примечание: При работе на автоматическом гомогенизаторе требуемая навеска образца помещается в специальную 1,5-2 мл пробирку с керамическими или металлическими бусинами для гомогенизации. Интенсивность программы гомогенизации должна быть щадящая, не допуская перегревания образцов.

2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Лизис

1. Инкубировать образцы в термостате при 56-60°C в течение 1-2 часов, периодически встряхивая.

Опционально: за 10 минут до окончания лизиса возможно использование РНКазы А любого производителя в количестве, рекомендованном производителем.

2. Поместить пробирки на лед или в холодный штатив и инкубировать в течение 3 минут. В случае отсутствия охлаждающих элементов инкубировать при комнатной температуре в течение 10 минут до полного остывания смеси.

Сорбция НК

1. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин.
2. Перенести 300 мкл супернатанта в новые пробирки объемом 1,5 мл.
3. Добавить 300 мкл связывающего буфера, интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Перенести весь объем смеси в спин-колонку.
5. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.

Промывка НК

1. Добавить в пробирки 650 мкл промывочного буфера 1.
2. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
3. Добавить в пробирки 650 мкл промывочного буфера 2.
4. Центрифугировать пробирки в течение 30 секунд при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
5. Добавить в пробирки 650 мкл промывочного буфера 3.
6. Центрифугировать пробирки в течение 30 секунд при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
7. Повторить п 5-6.
8. Вернуть колонки в собирательные пробирки. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при макс. об/мин.

Элюция НК

1. Перенести спин-колонок в новые пробирки объемом 1,5-2 мл. Собираемые пробирки утилизировать.
2. Нанести на мембрану спин-колонок 50-100 мкл элюирующего буфера. Инкубировать в течение 5 минут.
3. Центрифугировать пробирки в течение 30 секунд при макс. об/мин.
4. Утилизировать спин-колонок.

Опционально: для повышения выхода НК фильтрат необходимо повторно нанести на мембрану колонок 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 $\geq 1,7$.