

Cleanup St PCR

Набор для очистки ДНК из реакционных смесей

Номера по каталогу:

BC025S — на 50 реакций

BC025L — на 250 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

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

1. Назначение

Набор предназначен для очистки фрагментов двухцепочечной ДНК из ферментативных реакционных смесей (ПЦР, рестрикция, лигирование и т.д.). Очищенная ДНК пригодна для ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования, трансформации, трансфекции и других молекулярно-биологических приложений.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Преимущества

- Очистка от минерального масла и примесей: нуклеотидов, праймеров, коротких фрагментов нуклеиновых кислот, солей, белков, ингибиторов ферментативных реакций и др.
- В состав набора входят колонки без крышки и собирательные пробирки с крышкой, что позволяет уменьшить уровень загрязнения рабочего пространства и снизить вероятность кросс-контаминации образцов.

3. Состав

Компоненты набора	BC025S 50 реакций	BC025L 250 реакций
Спин-колонки SB	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Собирательные пробирки SCB с крышкой	50 шт.	250 шт. (5 x 50 шт.)
Связывающий раствор S	40 мл	240 мл
Промывочный раствор (концентрат)	20 мл	100 мл (2 x 50 мл)
Элюирующий раствор	4.5 мл (3 x 1.5 мл)	30 мл

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте в упаковке производителя.

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

5. Метод

Связывание ДНК на мембране колонки происходит в присутствии высококонцентрированных хаотропных веществ в условиях оптимально выбранного pH. Последующее использование промывочного буфера позволяет избавиться от нуклеотидов, праймеров, коротких фрагментов нуклеиновых кислот, солей, белков, ингибиторов ферментативных реакций, минерального масла и примесей органических соединений. Элюция ДНК происходит в слабощелочных условиях низкосолевым буфером.

6. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Емкость	До 25 мкг
Размер фрагментов очищенной ДНК	100–10 000 п.о.
Объем очищенного образца ДНК (элюата)	50 мкл
Выход ДНК	До 90%
Чистота ДНК	A260/A280 \geq 1.8

7. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением от 11 000 g.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 или 2 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Этанол 96%.

8. Биологический материал

Ферментативные реакционные смеси (ПЦР, рестрикция, лигирование и т.д.). Суммарное количество очищаемой ДНК в реакционной смеси должно быть не менее 50 нг. Наборы рассчитаны на 50 и 250 реакций при условии использования 160 мкл биоматериала.

9. Протокол

Общее время работы: 15–20 минут.

9.1. Подготовка растворов

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

BC025S — 90 мл,

BC025L — 220 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». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (260 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (1 170 мкл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.
- ▶ Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора», 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», 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», указанный на этикетке, $VW_{\text{расх}}$ — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора», $VE_{\text{исх}}$ — объем этанола по инструкции, см. п.1.1.

1.2. Проверьте флакон со «Связывающим раствором S» на наличие осадка. При обнаружении осадка прогрейте флакон при температуре от +37 до +50 °C до полного растворения осадка.

9.2. Подготовка биоматериала

- ▶ Рекомендуемое количество биоматериала — 100 мкл.

2.1. Добавьте в пробирку с реакционной смесью 5 объемов «Связывающего раствора S», но не менее 350 мкл. В случае, если образец находится под маслом, объем масла не учитывается. Перемешать раствор.

2.2. Перейдите к п. 9.3 «Проведение протокола».

9.3. Проведение протокола

ВНИМАНИЕ!

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

3.1. Перенесите образец, подготовленный согласно пункту 9.2, в колонку и центрифугируйте 30 с. Удалите фильтрат из собирательной пробирки.

ВНИМАНИЕ! Максимальный объем колонки: 1 000 мкл. Если объем пробы больше 1 000 мкл, нужно разделить его на несколько нанесений. После каждого нанесения аликвоты колонку необходимо центрифугировать.

3.2. Добавьте в колонку 700 мкл разбавленного «Промывочного раствора», центрифугировать 30 с. Удалите фильтрат из собирательной пробирки.

3.3. Повторите п. 3.2.

3.4. Центрифугируйте пустую колонку 2 минуты для полного удаления промывочного раствора.

3.5. Перенесите колонку в новую пробирку объемом 1.5 или 2.0 мл.

3.6. Оставьте при комнатной температуре на 5 мин для полного испарения остатка спирта.

3.7. Не касаясь наконечником мембраны колонки, нанесите в ее центр 50 мкл «Элюирующего раствора».

▶ Для повышения выхода ДНК на 10–15% можно увеличить объем «Элюирующего раствора» до 100 мкл.

▶ Для получения высококонцентрированного образца объем «Элюирующего раствора» следует наоборот уменьшить до 30 мкл.

3.8. Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту. Для длинных фрагментов (более 1 000 п.о.) рекомендуется увеличить время инкубации от 1 до 5 минут.

3.9. Центрифугируйте 1 минуту для сбора очищенной ДНК.

Очищенная ДНК хранится при температуре –20 °С до 1 года.

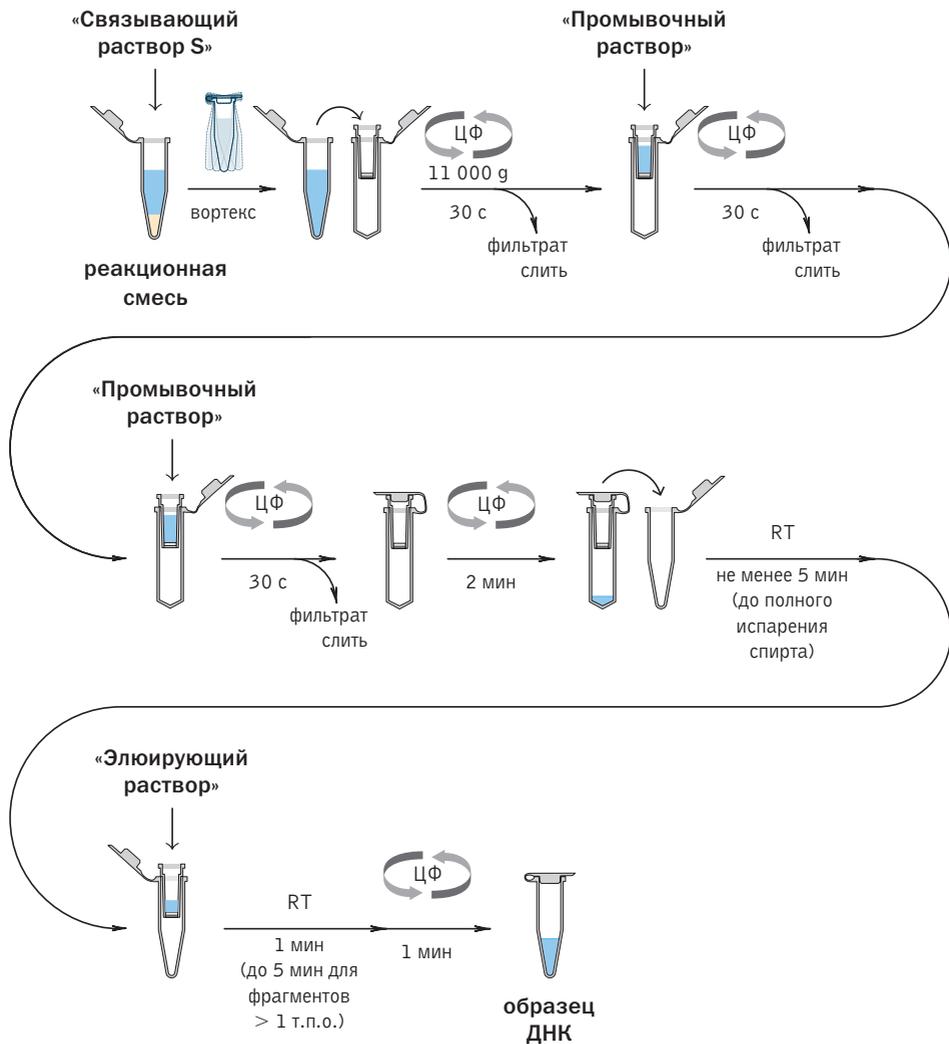


Рисунок 1 — схема очистки ДНК.

10. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Причины и способы решения
Низкий выход ДНК	<ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="428 201 1025 225">1. Неверно рассчитан объем связывающего буфера.<li data-bbox="428 233 1025 328">2. Не был добавлен спирт в промывочный буфер. Проверьте плотность закрытия крышки флакона с промывочным раствором, правильность подготовки растворов и выполнения протокола.<li data-bbox="428 336 1025 406">3. Элюирующий буфер был нанесен не в центр мембраны колонки и, возможно, попал на стенки пробирки. Проверьте правильность выполнения протокола.

Для заметок

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    

NGS секвенирование    

Синтез генов    

Сайт-направленный мутагенез    

Синтез органических соединений    

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru

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