

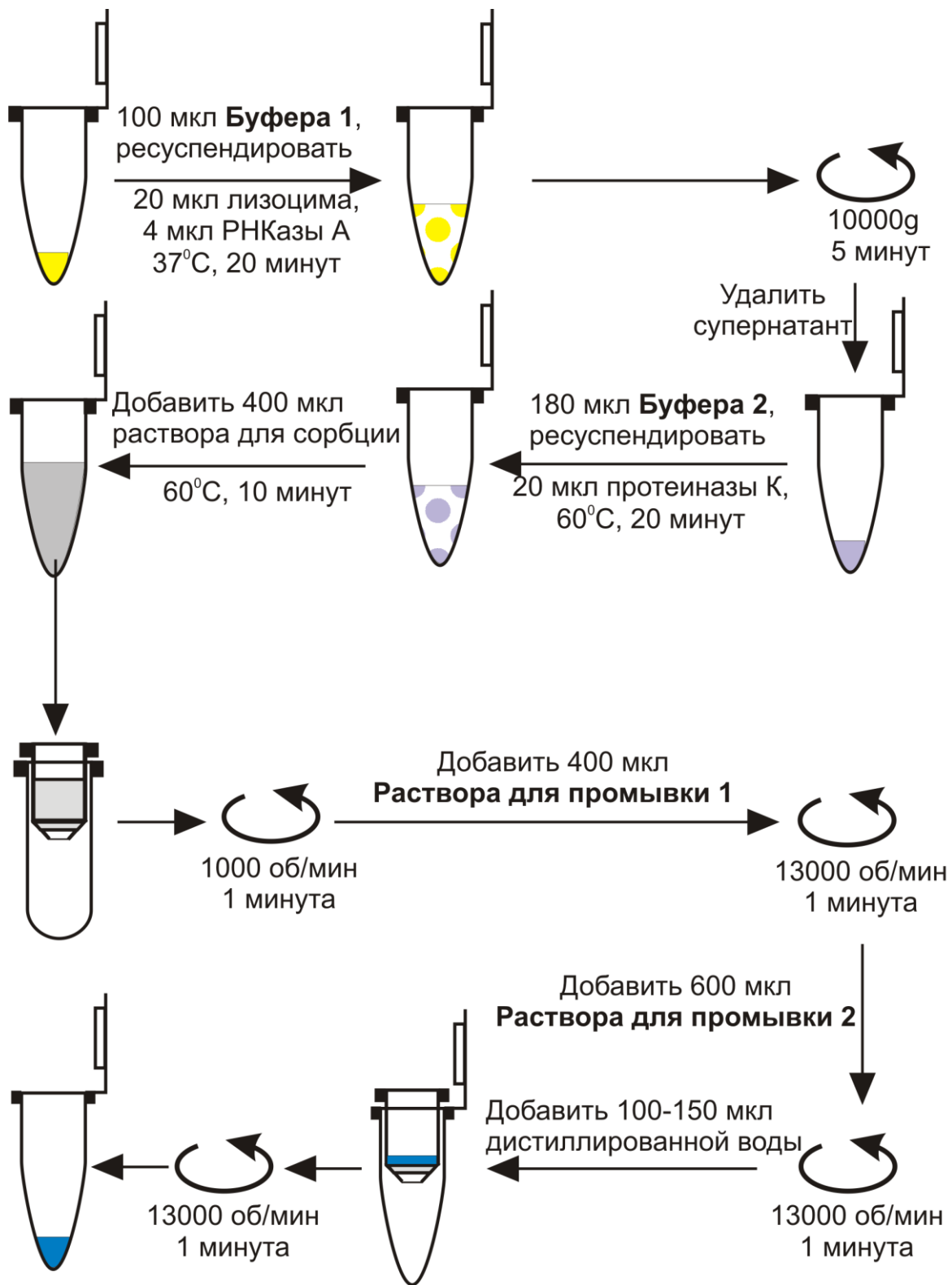


## Инструкция по применению набора для выделения геномной ДНК из бактериальных клеток

На 100 выделений

Состав набора:

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| Микроколоники                       | 100 шт    |
| 2 мл пробирки                       | 100 шт    |
| Буфер 1                             | 10 мл     |
| Буфер 2                             | 20 мл     |
| Раствор для сорбции                 | 40 мл     |
| Раствор для промывки 1              | 40 мл     |
| Раствор для промывки 2 (концентрат) | 30 мл     |
| Лизоцим (50 мг/мл)                  | 1 фасовка |
| РНКаза А                            | 0,4 мл    |
| Протеиназа К                        | 1 фасовка |



### Примечание:

- В **Раствор для промывки 2** перед использованием необходимо добавить 70 мл этилового спирта (96-100%) и тщательно перемешать.
- Если дополнительно не указано, то все этапы выделения выполняются при комнатной температуре.
- **Раствор для сорбции** перед использованием необходимо прогреть в течение 5-10 минут при  $t^0=55-56^{\circ}\text{C}$  до полного растворения солей. **Нельзя нагревать раствор более  $65^{\circ}\text{C}$ .**
- **Лизоцим** растворить в 2 мл дистиллированной воды; **Протеиназу К** растворить в 200 мкл дистиллированной воды.

1. Перенести в микроцентрифужные пробирки 1-3 мл бактериальной культуры и осадить центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 минут. Полностью удалить супернатант.

2. Ресуспендировать осадок в 100 мкл **Буфера 1**. Добавить 10 мкл лизоцима в случае выделения ДНК грамм-отрицательных бактерий или 20 мкл - при выделении ДНК грамм-положительных бактерий. Добавить 4 мкл РНКазы А. Суспензию тщательно перемешать и инкубировать при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут.

3. Центрифугировать образцы при 13000 об/мин 5 минут. Удалить супернатант.

4. Ресуспендировать осадок в 180 мкл **Буфера 2** и добавить 2 мкл протеиназы К. Тщательно перемешать и инкубировать при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут.

*Образцы необходимо регулярно перемешивать.*

6. Добавить 400 мкл **Раствора для сорбции**. Перемешать и инкубировать при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут.

7. Полученный в п.6 раствор внести в колонку, предварительно помещенную в 2 мл пробирку. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин. Удалить фильтрат.

*Необходимо учитывать, что объем колонки составляет 650 мкл. Если объем выделяемого образца превышает 650 мкл, последовательно нанести на фильтр весь образец, каждый раз удаляя фильтрат (фильтрат можно удалять при помощи вакуумного насоса или пипетки, не касаясь стенок микроколонок).*

8. Нанести на фильтр 400 мкл **Раствора для промывки 1** и центрифугировать 1 минуту при 13000 об/мин. Удалить фильтрат.

9. Нанести на фильтр 600 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугировать 1 минуту при 1300 об/мин. Удалить фильтрат, центрифугировать дополнительно 1 минуту при 13000 об/мин.

10. Извлечь микроколону и поместить ее в новую пробирку объемом 1,5 мл.

10. Нанести на фильтр 50 мкл дистиллированной воды (либо деионизованной, или автоклавированной, обязательно проверенной на отсутствие ДНК-аз и РНК-аз).

*Для наиболее полной элюции ДНК рекомендуется наносить 100 мкл воды*

11. Инкубировать микроколону 1-3 мин при комнатной температуре, центрифугировать 1 минуту при 13000 об/мин.

12. Убрать колону с фильтром и перенести выделенный образец ДНК в новую пробирку. Полученный раствор содержит очищенную ДНК.

Полученные образцы готовы к постановке ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования и прочих реакций. Образцы могут быть использованы либо немедленно, либо в течение месяца при хранении при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Сроки годности и особенности хранения:

- Растворы хранить при  $+15-25^{\circ}\text{C}$ . РНКазу А, протеиназу К и лизоцим хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ ;
- Пробирки и микроколону хранить в сухом месте при комнатной температуре;
- Срок годности набора-12 месяцев с даты изготовления.



