

Набор для выделения ДНК из растений DiamondDNA™

**DD-Plant-D
DD-Plant-L**

Dec. 2011

Назначение набора DiamondDNA™

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из тканей растений, а также грибов и лишайников. Может быть использован как для живых (проростки, участки живых побегов или корней), так и для засушенных растений (гербарный материал, семена).

Принцип выделения ДНК с помощью DiamondDNA™

Методика выделения ДНК из растений и их дериватов с помощью DiamondDNA включает в себя лизис тканей в лизирующем буфере, сорбцию ингибиторов ферментативных реакций из раствора и осаждение ДНК из раствора с помощью высокоэффективного осадителя ДНК.

Принципиальная простота и низкая продолжительность процесса выделения и очистки ДНК достигается применением селективного сорбента, являющегося продуктом разработки оборонных предприятий. Применяется высокоэффективная селективная адсорбция примесей, обеспечивающая в результате уникальные показатели чистоты ДНК (OD260/OD280 не менее 1,8). Примеси протеинов в очищенной ДНК невозможно идентифицировать с помощью методов дифференциального окрашивания и последующей флуориметрии. При использовании DiamondDNA достигается высокая степень очистки от таких сильных ингибиторов ПЦР как полифенолы и полисахариды. Содержание ДНК в растворе после очистки прямо пропорционально содержанию нуклеиновых кислот в исходном объекте, что повышает достоверность при использовании количественных методов анализа (RealTime-ПЦР и детекции по конечной точке).

В отличие от широко используемых методов и наборов, основанных на сорбции молекул ДНК на частицах оксида кремния (в виде суспензии или микроколоночном исполнении), очистка ДНК с использованием набора DiamondDNA не приводит к сильной деградации молекул нуклеиновых кислот. В результате длина фрагментов составляет более 20 000 пар нуклеотидов. Использование дополнительной стадии осаждения примесей позволяет еще более повысить качество очистки. В процессе использования DiamondDNA не происходит непосредственное взаимодействие молекул ДНК с сорбентом, что позволяет сохранить целостность двойной спирали. Случайное попадание сорбента в ПЦР-смесь не блокирует амплификацию. Использование протеазы необязательно и оправдано при выделении ДНК из сильно деградировавшего материала.

Выделенная с помощью DiamondDNA ДНК пригодна для дальнейшего гибридационного анализа, постановки ПЦР и секвенирования.

Хранение и подготовка к работе набора DiamondDNA™

При получении набора необходимо поместить фермент (протеазу) в морозильную камеру (-20°C) для более длительного хранения. Фермент находится в лиофилизированном виде и

переносит транспортировку при комнатной температуре без заморозки. Перед использованием фермент необходимо растворить в бидистиллированной или деионизированной воде (1 мл на 1 пробирку). В дальнейшем хранить только замороженным.

Остальные компоненты набора необходимо хранить при комнатной температуре (в составе отсутствуют нестойкие соединения). Допускается выпадение осадка солей в буферных растворах при понижении температуры менее +15°C, при этом достаточно нагреть растворы до +60°C для полного восстановления свойств. Суспензия сорбента при хранении может выпадать в осадок, при этом для гомогенизации достаточно энергичного встряхивания перед использованием. В состав набора не входит 70 % этанол, используемый для отмывки ДНК от осаждающего буфера, поэтому его необходимо приготовить заранее.

Срок годности набора составляет не менее 1 года.

Состав набора DiamondDNA™

1. Лизис-буфер.
2. Протеаза (*В состав тестовых наборов не входит*)
3. Сорбент DiamondDNA™
4. Солевой буфер.
5. Буфер для осаждения ДНК. Позволяет проводить селективное осаждение молекул ДНК из раствора с эффективностью около 99%.
6. ТЕ-буфер. Обеспечивает длительное хранение ДНК в растворе.

В наборе не содержатся токсичные вещества и запрещенные к свободному обороту компоненты.

Протокол выделения ДНК из растений

Необходимое оборудование и материалы:

Центрифуга для пробирок 1,5 мл ($\geq 10000g$).

Термостат для 1,5 мл пробирок.

Дозаторы (от 1 до 1000 мкл).

Морозильная камера (-16 -20°C).

До начала работы: Включить нагревающий блок (+56°C).

Подогреть лизис-буфер до +56°C.

Приготовить 70% этанол.

1. Примерно 0,5 см² листьев (20-30 мг живого или 5-10 мг сухого материала) измельчить, поместить в 1,5 мл пробирку, добавить 500 мкл лизис-буфера и 10 мкл раствора протеазы, термостатировать при +56°C в течение 15-20 мин. (до 30-60 мин. если материал засушен).
2. Добавить 150 мкл сорбента (перед использованием сорбент встряхнуть, т.к. возможно его оседание при хранении). Перевернуть пробирку 4-5 раз, чтобы перемешать лизат с сорбентом, но не встряхивать на Vortex, чтобы не повредить ДНК.
3. Центрифугировать 2 мин. при 10000 – 13000 об./мин., супернатант перенести в новую пробирку (сорбент должен остаться на дне и выбрасывается вместе с пробиркой).
4. Добавить 150 мкл солевого буфера. 2-3 раза перевернуть пробирку.
5. Поместить в морозильную камеру (-16 -20°C) на 5 мин. или дольше.
6. Центрифугировать 7 мин при 10000 – 13000 об./мин. (должен выпасть осадок протеинов).
7. Супернатант перенести в новую пробирку. Добавить 250 мкл осаждающего буфера, перемешать, перевернув пробирку (не встряхивать на Vortex).
8. Центрифугировать 5 мин при 13000 об./мин. Буфер слить.
9. Добавить 600 мкл 70% этанола (в состав набора не входит).
10. Центрифугировать 1 мин при 13000 об./мин. Спирт слить.
11. Осадок просушить (1 мин при +56°C и 1 мин на воздухе, растворить в 50 – 100 мкл воды или ТЕ-буфера).

Примечание. Не нужно брать слишком много растительного материала. После стадии №3 должно произойти осветление раствора, в противном случае – уменьшить объем пробы. В любом случае раствор ДНК не должен иметь окраски. Попадание остаточных количеств сорбента в выделенную ДНК не ингибирует ПЦР.