



LumiPure genomic DNA from AnySample Kit manual

Contents

English: LumiPure genomic DNA from AnySample Kit manual	3-13
Deutsch: Handbuch für das LumiPure Extraktionskit für genomische DNA aus beliebigen Proben	14-24
Русский: Инструкция к набору LumiPure from AnySample для выделения геномной ДНК	25-35

Lumiprobe Corporation
(US and Worldwide)
9:00AM - 9:00PM EST

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH
(Germany and Europe)
8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd
(Russia and CIS)
8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

LumiPure genomic DNA from AnySample Kit manual

The Kit allows rapid (about 30 minutes) and highly efficient purification of genomic DNA using spin columns from a wide range of biological samples: plant and animal tissues and organs, whole blood, buccal swabs, leukocytes, cultured mammalian cells, and gram-negative bacteria. The isolated DNA is stable and suitable for PCR, restriction enzyme digestion, Southern blotting, preparing samples for Sanger sequencing and NGS, etc.

Typical yield of genomic DNA (30–50 kb in size, OD_{260}/OD_{280} 1.7–1.8):

- gram-negative bacteria (1×10^8): 5–10 μg
- plant leaves, needles (50 mg): 3–5 μg
- mouse tail: 7–14 μg
- mouse kidney: 10–20 μg
- mouse heart: 7–14 μg
- mouse liver: 10–15 μg
- leukocytes (isolated from 1 mL of whole blood): 4–5 μg
- whole blood (100 μL): 1–3 μg
- buccal swab: 0.5–2 μg
- cultured mammalian cells (1×10^6): 3–6 μg

Kit components

Kit component	Count	
	11573 10 minipreps	21573 50 minipreps
H1850, Lysis Solution AS, 6 mL	1	—
F5450, Sorption Solution, 4 mL	1	—
H2450, Wash Solution A (with GuHCl), 6 mL	1	—
11650, RNase A (10 mg/mL), 50 μ L	1	—
K3150, Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 10 mL	1	—
1902-5g, Corundum (50 μ m), 5 g	1	—
P1850, Lysis Solution AS, 30 mL	—	1
M5450, Sorption Solution, 20 mL	—	1
P2450, Wash Solution A (with GuHCl), 30 mL	—	1
1902-25g, Corundum (50 μ m), 25 g	—	1
31650, RNase A (10 mg/mL), 150 μ L	—	2
S3150, Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 50 mL	—	1
Spin column CNP20-A (up to 20 μ g, green ring)	10	50
Collection tube for spin column, 2 mL	30	150
Pestle for Microcentrifuge Tube (Polypropylene)	10	50
K2250, Wash Solution B (Concentrate to be diluted 5x with ethanol 96%), 10.0 mL	1	1
D1350, Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 1.5 mL	1	4
12850, Proteinase K (lyophilized), 6.0 mg	1	1
B3850, Proteinase K Dilution Buffer, 600 μ L	1	1

Store at temperature 20°C.

Shelf life 12 months.

Equipment and reagents supplied by user:

- heating block (alternatively, a water bath can be used);
- microcentrifuge with rotor for 1.5 mL tubes and capable of centrifuging $>10,000$ RPM ($6700 \times g$);
- 96 % ethanol;
- 1.5 mL microcentrifuge tubes (2 tubes for DNA purification from 1 biological sample);
- phosphate-buffered saline (PBS) for DNA purification from cultured mammalian cells, leukocytes, gram-negative bacteria;
- tissue grinder for sample homogenization if DNA is purified from plant and animal tissues and organs (if polypropylene pestles for microcentrifuge tubes supplied with the kit are not suitable for user's sample grinding); and
- (optional) tabletop centrifuge with rotor for 15 mL tubes and capable of centrifuging $300 \times g$ for DNA purification from leukocytes and cultured mammalian cells.

Before starting

1. Dilute the concentrate of *Wash Solution B* 5x with 96 % ethanol (add 4 volumes of 96 % ethanol to 1 volume of concentrate specified on the bottle). Mark on the label that ethanol has been added.
2. Add 600 μ L of *Proteinase K Dilution Buffer* into the vial containing lyophilized *Proteinase K*. Mix thoroughly and centrifuge briefly.
! After preparation store Proteinase K solution at -20 °C.
3. If any precipitate has formed in *Sorption Solution* or *Wash Solution A*, incubate the solutions at a temperature not higher than 50 °C until the precipitates have been completely dissolved.

All centrifugation steps are carried out at room temperature, at 10,000–13,000 RPM (6700–11,000 x g).

DNA purification from plant and animal tissues and organs

Use 20–40 mg of animal tissue or 50–100 mg of plant tissue as a sample for DNA purification.

- (A) For sample homogenization with plastic pestle (supplied with the kit):**
 - Place a piece of tissue into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
 - Add to the sample
 - 200 μ L of *Lysis Solution AS*,
 - 70–100 mg of *Corundum*.
 - Grind the sample thoroughly with a tube and pestle.
 - Add 300 μ L of *Lysis Solution AS* to the sample and mix.
- (B) For sample homogenization with mortar and pestle (supplied by user):**
 - Place a piece of tissue into a mortar.
 - Add to the sample
 - 100 μ L of deionized water,
 - 200 μ L of *Lysis Solution AS*,
 - 300–500 mg of *Corundum*.
 - Grind the sample thoroughly with a mortar and pestle.
 - Add 300 μ L of *Lysis Solution AS* to the sample and mix.
 - Transfer the mixture to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
- (C) For lysis of samples (mouse tails or other samples) without homogenization:**

- a. Place a piece of tissue into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
 - b. Add to the sample 500 μ L of *Lysis Solution AS*.
2. Set a heating block to 55 °C, place the vial with *Elution Buffer* in the heating block.
 3. Add to the sample
 - 5 μ L of *RNase A*,
 - 10 μ L of *Proteinase K*,Mix well.
 4. **For (A) and (B):** Incubate the tubes at 55 °C for 20 min with occasional vortexing (1–2 times),
For (C): Incubate the tubes at 55 °C until lysis is complete (1–4 hours with occasional vortexing for small tissue pieces, overnight for mouse tails or larger tissue pieces. Some components such as bones, hair, cartilage that have not been lysed this way can be present in the lysate).
 5. Add 350 μ L of *Sorption Solution* to the sample. Mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
 6. Centrifuge the sample for 10 minutes.
 7. Place a spin column in a collection tube. Add the supernatant to the column (to a maximum of 800 μ L per single load). Centrifuge the column for 60 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
 8. Add 500 μ L of *Wash Solution A*, centrifuge the column for 30 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
 9. Add 500 μ L of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the collection tube.
 10. Place the spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50–100 μ L of *Elution Buffer* (pre-heated to 55 °C) to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column for 1 minute. The microcentrifuge tube contains the purified DNA.

DNA purification from buccal swabs

1. Set a heating block to 55 °C, place the vial with *Elution Buffer* in the heating block.
2. Add 500 µL of *Lysis Solution AS* to a 1.5 mL microcentrifuge tube and rinse a buccal swab sample in *Lysis Solution AS* thoroughly. Use a rolling action against the tube sides and squeeze the swab against side to remove as much of the liquid as possible.
3. Add 10 µL of *Proteinase K* to the sample and mix.
4. Incubate the tubes at 55 °C for 10 min with occasional vortexing (1–2 times).
5. Add 300 µL of *Sorption Solution* to the sample. Mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
6. Place a spin column in a collection tube. Add the lysate to the column. Centrifuge the column for 45 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
7. Add 500 µL of *Wash Solution A*, centrifuge the column for 30 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
8. Add 500 µL of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the collection tube.
9. Place the spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50–100 µL of *Elution Buffer* (pre-heated to 55 °C) to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column for 1 minute. The microcentrifuge tube contains the purified DNA.

DNA purification from whole blood

This kit is designed to process 100 μL of whole blood (fresh or frozen whole blood containing anti-coagulants such as heparin, EDTA, citrate). Mix blood tubes thoroughly by inversion so that the content becomes homogeneous. Pipet 100 μL of whole blood into a clean 1.5 mL tube.

1. Set a heating block to 55 °C, place the vial with *Elution Buffer* in the heating block.
2. Add 400 μL of *Lysis Solution AS* to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing 100 μL of whole blood.
3. Add 10 μL of *Proteinase K* to the sample and mix.
4. Incubate the tubes at 55 °C for 10 min with occasional vortexing (1–2 times).
5. Add 300 μL of *Sorption Solution* to the sample. Mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
6. Place a spin column in a collection tube. Add the lysate to the column. Centrifuge the column for 45 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
7. Add 500 μL of *Wash Solution A*, centrifuge the column for 30 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
8. Add 500 μL of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the collection tube.
9. Place the spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50–100 μL of *Elution Buffer* (pre-heated to 55 °C) to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column for 1 minute. The microcentrifuge tube contains the purified DNA.

DNA purification from leukocytes

Prior separation of leukocytes provides an increased DNA yield compared to the DNA purification from whole blood. A whole blood sample volume recommended for leukocyte separation is 1 mL.

1. Prepare 9 mL of 1x *Red Blood Cell Lysis Buffer* for separation of leukocytes from 1 mL of whole blood: mix 900 μ L of 10x *Red Blood Cell Lysis Buffer* and 8.1 mL of deionized water in a 15 mL tube.
2. Set a heating block to 55 °C, place the vial with *Elution Buffer* in the heating block.
3. Mix 1 mL of whole blood and 9 mL of 1x *Red Blood Cell Lysis Buffer* in a 15 mL tube. Mix well and incubate the tube for 5 minutes at room temperature.
4. Centrifuge the sample at 300 x g for 5 minutes. Remove the supernatant. The pellet contains the separated leukocytes.
5. Resuspend the cell pellet in 100 μ L of PBS. Transfer the cell suspension to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
6. Add to the sample
 - o 400 μ L of *Lysis Solution AS*,
 - o 5 μ L of *RNase A*,
 - o 10 μ L of *Proteinase K*.Mix well.
7. Incubate the tubes at 55 °C for 10 min with occasional vortexing (1–2 times).
8. Add 300 μ L of *Sorption Solution* to the sample. Mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
9. Place a spin column in a collection tube. Add the lysate to the column. Centrifuge the column for 45 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
10. Add 500 μ L of *Wash Solution A*, centrifuge the column for 30 seconds. Discard

the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.

11. Add 500 μL of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the collection tube.
12. Place the spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50–100 μL of *Elution Buffer* (pre-heated to 55 °C) to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column for 1 minute. The microcentrifuge tube contains the purified DNA.

DNA purification from cultured mammalian cells and gram-negative bacteria

Use not more than 5×10^6 of cultured mammalian cells and 10^9 of gram-negative bacteria cells for DNA purification.

Adherent mammalian cell culture: remove the growth medium, harvest cells by trypsinization or a method of choice. Centrifuge the cells at 300 x g for 5 minutes. Remove the supernatant. Resuspend the cell pellet in 100 μL of PBS. Transfer the cell suspension to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.

Suspension mammalian cell culture: harvest cells by centrifugation at 300 x g for 5 minutes. Remove the supernatant. Resuspend the cell pellet in 100 μL of PBS. Transfer the cell suspension to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.

Bacterial culture: Harvest bacteria grown on solid or in liquid culture medium by centrifugation at 3000–5000 x g for 5 minutes. Remove the supernatant. Resuspend the cell pellet in 100 μL of PBS. Transfer the cell suspension to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.

1. Set a heating block to 55 °C, place the vial with *Elution Buffer* in the heating block.
2. Add to the sample
 - 400 μL of *Lysis Solution AS*,

- 5 μL of *RNase A*,
- 10 μL of *Proteinase K*.

Mix well.

3. Incubate the tubes at 55 °C for 10 min with occasional vortexing (1–2 times).
4. Add 300 μL of *Sorption Solution* to the sample. Mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
5. Place a spin column in a collection tube. Add the lysate to the column. Centrifuge the column for 45 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
6. Add 500 μL of *Wash Solution A*, centrifuge the column for 30 seconds. Discard the collection tube and place the spin column into a clean collection tube.
7. Add 500 μL of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the collection tube.
8. Place the spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50–100 μL of *Elution Buffer* (pre-heated to 55 °C) to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column for 1 minute. The microcentrifuge tube contains the purified DNA.

Note

For increased DNA concentration, use a lower volume of *Elution Buffer*. Elution with volumes of less than 50 μL is not recommended because this can be insufficient to entirely wet the membrane resulting in low DNA recovery. For increased DNA yield, use a higher volume of *Elution Buffer* (100 μL).

Elution Buffer pre-heated to 55 °C facilitates optimal recovery of bound DNA. Elution with *Elution Buffer* equilibrated to room temperature is also acceptable but DNA recovery is significantly lower (up to 30–50 %).

To maximize DNA recovery, two-step elution is recommended.

If necessary, DNA can be eluted with deionized water.

When measuring the DNA concentration, dilute the sample only with TE buffer pH 8.5 or *Elution Buffer* supplied with the kit. Otherwise, DNA concentration and purity (OD_{260} and OD_{260}/OD_{280} , respectively) can be estimated incorrectly.

Storage of purified DNA: for long-term storage $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,
for short-term storage $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Handbuch für das LumiPure Extraktionskit für genomische DNA aus beliebigen Proben

Dieses Kit dient der schnellen (ca. 30 Minuten) und effizienten Extraktion von genomischer DNA mit Hilfe von Zentrifugationssäulchen aus einer großen Bandbreite von biologischen Proben: pflanzlichen und tierischen Geweben und Organen, Wangenabstrichen, Vollblut, Leukozyten, Säugetierzellen und gramnegativen Bakterien. Die DNA ist stabil und eignet sich u. a. für PCR, Restriktionsverdau, Southern Blot und Sequenzierung (Sanger- und NGS-Verfahren).

Typische Ausbeuten genomischer DNA (Länge 30–50 kb, A_{260}/A_{280} 1,7–1,8):

- gramnegative Bakterien (1×10^8): 5–10 μg
- Pflanzenblätter, Nadeln (50 mg): 3–5 μg
- Mausschwanz: 7–14 μg
- Mausniere: 10–20 μg
- Mausherz: 7–14 μg
- Mausleber: 10–15 μg
- Leukozyten (isoliert aus 1 ml Vollblut): 4–5 μg
- Vollblut (100 μl): 1–3 μg
- Wangenabstrich: 0,5–2 μg
- Säugetierzellen (1×10^6): 3–6 μg

Bestandteile

Komponente	Anzahl	
	11573 10 minipreps	21573 50 minipreps
H1850, Lyselösung AS / Lysis Solution AS, 6 mL	1	—
F5450, Sorptionslösung / Sorption Solution, 4 mL	1	—
H2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 6 mL	1	—
11650, RNase A (10 mg/mL), 50 µL	1	—
K3150, Erythrozyten-Lysepuffer / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 10 mL	1	—
1902-5g, Korund (50 µm), 5 g	1	—
P1850, Lyselösung AS / Lysis Solution AS, 30 mL	—	1
M5450, Sorptionslösung / Sorption Solution, 20 mL	—	1
P2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 30 mL	—	1
1902-25g, Korund (50 µm), 25 g	—	1
31650, RNase A (10 mg/mL), 150 µL	—	2
S3150, Erythrozyten-Lysepuffer / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 50 mL	—	1
Zentrifugationssäulchen CNP20-A (für bis zu 20 µg, grüner Ring)	10	50
Sammelgefäß für Zentrifugationssäulchen, 2 ml	30	150
Pistill für Mikrozentrifugenröhrchen (Polypropylen)	10	50
K2250, Waschlösung B / Wash Solution B (Konzentrat muss mit 96%igem Ethanol 5-fach verdünnt werden), 10.0 mL	1	1
D1350, Elutionspuffer / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5), 1.5 mL	1	4
12850, Proteinase K (lyophilisiert), 6.0 mg	1	1
B3850, Proteinase-K-Verdünnungspuffer / Proteinase K Dilution Buffer, 600 µL	1	1

Bei 20°C lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Geräte und Materialien:

- Heizblock oder Wasserbad;
- Tischzentrifuge mit mindestens 10.000 min^{-1} ($6.700 \times g$) und Rotor für 1,5-ml-Röhrchen;
- 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen (2 Röhrchen pro DNA-Isolierung aus einer Probe);
- 96 % Ethanol;
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) für die DNA-Extraktion aus Säugetierzellen, Leukozyten, gramnegativen Bakterien;
- Mörser mit Pistill zum Zerkleinern von Proben aus pflanzlichen und tierischen Geweben und Organen (falls mitgelieferte Pistille aus Polypropylen zum Zerkleinern von bestimmten Proben nicht geeignet sind);
- (optional) Zentrifuge mit Rotor für 15-ml-Röhrchen und mindestens $300 \times g$ für die DNA-Extraktion aus Leukozyten und Säugetierzellen.

Vorbereitung der Reagenzien

1. *Wash Solution B* wird als Konzentrat geliefert und muss vor der ersten Verwendung 1:5 mit 96%igem Ethanol verdünnt werden. Dazu versetzen Sie das auf der Flasche angegebene Volumen des Konzentrats mit dem 4-fachen Volumen an 96%igem Ethanol und notieren die Zugabe auf dem Deckel.
2. Geben Sie 600 μl *Proteinase K Dilution Buffer* in das Röhrchen mit der lyophilisierten *Proteinase K*, mischen Sie gut und zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz an.
! Lagern Sie die Proteinase K nach dem Auflösen bei -20 °C.
3. Sollten sich im *Sorption Solution* und/oder in der *Wash Solution A* Salzkristalle

gebildet haben, erwärmen Sie die Lösungen auf maximal 50 °C, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat.

Wenn nicht anders angegeben, werden alle folgenden Arbeitsschritte bei Raumtemperatur, alle Zentrifugationsschritte mit 10.000–13.000 min⁻¹ (6.700–11.000 × g) ausgeführt.

DNA-Extraktion aus pflanzlichen und tierischen Geweben und Organen

Nehmen Sie für die DNA-Extraktion 20–40 mg des tierischen oder 50–100 mg des pflanzlichen Gewebes.

1. (A) Zerkleinern von Proben mit dem Kunststoff-Pistill (im Lieferumfang enthalten):

- a. Geben Sie das Gewebestück in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
- b. Geben Sie zur Probe hinzu:
 - 200 µl *Lysis Solution AS*,
 - 70–100 mg *Korund*.
- c. Zerreiben Sie die Probe sorgfältig mit dem Kunststoff-Pistill im 1,5-ml-Röhrchen.
- d. Geben Sie 300 µl *Lysis Solution AS* zur Probe hinzu und mischen Sie.

1. (B) Zerkleinern von Proben mit Mörser und Pistill (nicht im Lieferumfang enthalten):

- a. Geben Sie das Gewebestück in den Mörser.
- b. Geben Sie zur Probe hinzu:
 - 100 µl deionisiertes Wasser,
 - 200 µl *Lysis Solution AS*,
 - 300–500 mg *Korund*.

- c. Zerreiben Sie die Probe sorgfältig mit dem Pistill.
- d. Geben Sie 300 µl *Lysis Solution AS* zur Probe hinzu und mischen Sie.
- e. Überführen Sie den Ansatz in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.

1. **(C) Lyse der Proben (Mausschwänzen oder anderen Proben tierischen Ursprungs) ohne Zerkleinern:**

- a. Geben Sie das Gewebestück in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
- b. Geben Sie 500 µl *Lysis Solution AS* zur Probe hinzu.

2. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.

3. Geben Sie zur Probe hinzu:

- 5 µl *RNase A*,
- 10 µl *Proteinase K*,

Mischen Sie.

4. **Für (A) und (B):** Inkubieren Sie die Probe 20 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.

Für (C): Inkubieren Sie die Probe bei 55 °C bis die Lyse abgeschlossen ist (1–4 Stunden unter gelegentlichem Vortexen für kleinere Gewebestücke, über Nacht für Mausschwänze oder größere Gewebestücke). Im Lysat können Reste wie Knochen, Haare und Knorpel verbleiben, die nicht auf diese Weise lysiert werden können.

5. Geben Sie 350 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.

6. Zentrifugieren Sie die Probe 10 Minuten lang.

7. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie den Überstand auf die Säule (maximal 800 µl pro Ladung) und zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.

8. Geben Sie 500 µl *Wash Solution A* auf die Säule und zentrifugieren

Sie 30 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.

9. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
10. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

DNA-Extraktion aus Wangenabstrichen

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. Geben Sie 500 µl *Lysis Solution AS* in ein 1,5-ml-Röhrchen. Spülen Sie den Tupfer mit dem Wangenabstrich mit *Lysis Solution AS* gut aus. Rollen Sie den Tupfer mit Druck an der Innenwand des Röhrchens entlang, um so viel Flüssigkeit wie möglich herauszudrücken.
3. Geben Sie 10 µl *Proteinase K* zur Probe hinzu und mischen Sie.
4. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
5. Geben Sie 300 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
6. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie das Lysat auf die Säule und zentrifugieren Sie 45 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
7. Geben Sie 500 µl *Wash Solution A* auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
8. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.

9. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

DNA-Extraktion aus Vollblut

Das Kit wurde für die DNA-Extraktion aus 100 µl Vollblut (frisch oder gefroren, mit EDTA, Citrat oder Heparin stabilisiert) optimiert. Schwenken Sie die Blutprobe durch Invertieren, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Überführen Sie dann 100 µl Probe in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. Geben Sie 400 µl *Lysis Solution AS* in das 1,5-ml-Röhrchen mit 100 µl Vollblut.
3. Geben Sie 10 µl *Proteinase K* zur Probe hinzu und mischen Sie.
4. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
5. Geben Sie 300 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
6. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie das Lysat auf die Säule und zentrifugieren Sie 45 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
7. Geben Sie 500 µl *Wash Solution A* auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
8. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
9. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die

isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

DNA-Extraktion aus Leukozyten

Eine Vorisolierung der Leukozyten gewährleistet eine höhere DNA-Ausbeute im Vergleich zur DNA-Extraktion aus Vollblut. Das empfohlene Volumen der Vollblutprobe für die Leukozytenisolierung beträgt 1 ml.

1. Bereiten Sie 9 ml 1x *Red Blood Cell Lysis Buffer* für die Isolierung der Leukozyten aus 1 ml Vollblut wie folgt vor: Mischen Sie 900 µl 10x *Red Blood Cell Lysis Buffer* mit 8,1 ml deionisiertem Wasser in einem 15-ml-Röhrchen.
2. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
3. Mischen Sie 1 ml Vollblut mit 9 ml 1x *Red Blood Cell Lysis Buffer* in einem 15-ml-Röhrchen. Mischen Sie gut und inkubieren Sie den Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur.
4. Zentrifugieren Sie die Probe 5 Minuten bei 300 × g. Verwerfen Sie den Überstand. Das Pellet enthält isolierte Leukozyten.
5. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS und überführen Sie die Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.
6. Geben Sie zur Probe hinzu:
 - 400 µl *Lysis Solution AS*,
 - 5 µl *RNase A*,
 - 10 µl *Proteinase K*,Mischen Sie.
7. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
8. Geben Sie 300 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
9. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie das Lysat auf die Säule und zentrifugieren Sie 45 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein

neues Sammelgefäß.

10. Geben Sie 500 µl *Wash Solution A* auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
11. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
12. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

DNA-Extraktion aus Säugetierzellen und gramnegativen Bakterien

In die DNA-Extraktion sollten nicht mehr als 5×10^6 Säugetierzellen und 10^9 gramnegativen Bakterienzellen eingesetzt werden.

Adhärente Säugetierzellen: Lösen Sie die Zellen mit einer geeigneten Methode vom Kulturgefäß, z. B. durch Behandlung mit Trypsinlösung. Die Zellen werden dann 5 Minuten bei $300 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS und überführen Sie die Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Suspensionskultur: Entnehmen Sie das Kulturvolumen mit der benötigten Zellmenge. Die Zellen werden dann 5 Minuten bei $300 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS und überführen Sie die Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Bakterienkultur: Entweder auf festen oder in flüssigen Nährmedien gezüchtete Bakterien werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei $3000\text{--}5000 \times g$ gesammelt und der Überstand verworfen. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS und überführen Sie die Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. Geben Sie zur Probe hinzu:
 - 400 µl *Lysis Solution AS*,
 - 5 µl *RNase A*,
 - 10 µl *Proteinase K*,Mischen Sie.
3. Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
4. Geben Sie 300 µl *Sorption Solution* zur Probe hinzu. Vortexen Sie, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
5. Stecken Sie je Ansatz ein Zentrifugationssäulchen in ein Sammelgefäß. Geben Sie das Lysat auf die Säule und zentrifugieren Sie 45 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
6. Geben Sie 500 µl *Wash Solution A* auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 Sekunden lang. Verwerfen Sie den Säulendurchfluss mitsamt dem Sammelgefäß und stecken Sie die Säule in ein neues Sammelgefäß.
7. Geben Sie 500 µl *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
8. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–100 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

Anmerkung

Für eine höhere DNA-Endkonzentration kann mit geringeren Volumina an *Elutionspuffer* eluiert werden — jedoch nicht mit weniger als 50 µl, weil die Säulenmembran dann möglicherweise nicht vollständig benetzt würde, was zu einem teilweisen DNA-Verlust führen könnte. Für eine höhere DNA-Ausbeute kann mit größeren Volumina

an *Elutionspuffer* (100 μ l) eluiert werden

Die DNA-Elution mit auf + 55 °C vorgewärmtem *Elutionspuffer* gewährleistet eine optimale DNA-Ausbeute. Die Elution mit kaltem *Elutionspuffer* (bei Raumtemperatur) ist zwar auch möglich, reduziert die DNA-Ausbeute jedoch deutlich (um 30–50 %).

Um die maximale DNA-Ausbeute zu erzielen, können zwei Elutionsschritte ausgeführt werden.

Falls notwendig, kann die Elution auch mit deionisiertem Wasser erfolgen.

Bei der DNA-Konzentrationsbestimmung verwenden Sie zum Verdünnen der DNA-Probe bitte ausschließlich TE-Puffer pH 8,5 oder den *Elution Buffer* aus dem Kit. Andernfalls könnten die Reinheit der DNA-Probe (aus dem Verhältnis A_{260}/A_{280}) und die DNA-Konzentration (A_{260}) falsch abgeschätzt werden.

Lagerung der isolierten DNA: im Gefrierfach (-20 °C), kurzfristig bei +4 °C.

Инструкция к набору LumiPure from AnySample для выделения геномной ДНК

Набор предназначен для быстрого (~ 30 минут) и высокоэффективного выделения геномной ДНК на спин-колонках из широкого спектра образцов: тканей растений и животных, буккального эпителия, цельной крови, лейкоцитов, культур клеток животных и грам-отрицательных бактерий. Полученная ДНК стабильна и подходит для проведения ПЦР, обработки эндонуклеазами рестрикции, Саузерн-блоттинга, подготовки образцов для секвенирования по методу Сэнгера и NGS-секвенирования.

Ориентировочные выходы геномной ДНК (длина 30–50 тыс. пар нуклеотидов, OD_{260}/OD_{280} 1.7–1.8):

- Клетки грам-отрицательных бактерий (10^8): 5–10 мкг
- Лист растения, хвоя (50 мг): 3–5 мкг
- Хвост мыши: 7–14 мкг
- Почка мыши: 10–20 мкг
- Сердце мыши: 7–14 мкг
- Печень мыши: 10–15 мкг
- Лейкоциты, выделенные из 1 мл крови: 4–5 мкг
- Цельная кровь (100 мкл): 1–3 мкг
- Соскоб буккального эпителия: 0.5–2 мкг
- Клетки млекопитающих (1×10^6): 3–6 мкг

Состав набора

Компонент набора	Количество	
	11573	21573
	10 minipreps	50 minipreps
H1850, Лизирующий раствор AS / Lysis Solution AS, 6 mL	1	—
F5450, Сорбирующий раствор / Sorption Solution, 4 mL	1	—
H2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 6 mL	1	—
11650, РНКаза А (10 mg/mL), 50 μ L	1	—
K3150, Буфер для лизиса эритроцитов / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 10 mL	1	—
1902-5g, Корунд (50 мкм), 5 g	1	—
P1850, Лизирующий раствор AS / Lysis Solution AS, 30 mL	—	1
M5450, Сорбирующий раствор / Sorption Solution, 20 mL	—	1
P2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 30 mL	—	1
1902-25g, Корунд (50 мкм), 25 g	—	1
31650, РНКаза А (10 mg/mL), 150 μ L	—	2
S3150, Буфер для лизиса эритроцитов / Red Blood Cell Lysis Buffer 10x, 50 mL	—	1
Колонка CNP20-A (до 20 мкг, зеленое кольцо)	10	50
Пробирка для сбора проскока, 2 мл	30	150
Пестик для микроцентрифужной пробирки (полипропилен)	10	50
K2250, Промывочный раствор B / Wash Solution B (концентрат 5x для разбавления 96% этанолом), 10.0 mL	1	1
D1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 1.5 mL	1	4
12850, Протеиназа К / Proteinase K (лиофилизованная), 6.0 mg	1	1
V3850, Буфер для растворения протеиназы К / Proteinase K Dilution Buffer, 600 μ L	1	1

Хранить при температуре 20°C.

Срок хранения 12 месяцев.

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Твердотельный термостат (возможно использование водяной бани);
- Настольная центрифуга с ротором для 1.5 мл пробирок со скоростью вращения не менее 10000 об/мин (6700 x g);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл (2 пробирки для выделения ДНК из 1 образца);
- 96 % этанол;
- Натрий-фосфатный буфер (PBS) для выделения ДНК из клеток млекопитающих и бактерий, лейкоцитов;
- Фарфоровая ступка для гомогенизации образца при выделении ДНК из тканей растений и животных (в случае если пестик-гомогенизатор не подходит для гомогенизации образца);
- (опционально) Центрифуга с ротором для 15 мл пробирок со скоростью вращения не менее 300 x g для выделения ДНК из лейкоцитов и клеток млекопитающих.

Перед началом работы

1. Разбавьте концентрат *промывочного раствора В* в 5 раз 96 % этанолом (к указанному на банке объему концентрата добавьте 4 объема 96 % этанола), поставьте отметку о добавлении этанола на крышке.
2. Добавьте 600 мкл *буфера для растворения протеиназы К* в пробирку с лиофилизованной *протеиназой К*, тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием.

! Раствор протеиназы К после приготовления хранить в морозилке при -20 °C.

3. При наличии осадка в *сорбирующем растворе* и *промывочном растворе А* прогрейте их в термостате до температуры не выше 50 °С и дождитесь полного растворения осадка.

Работы следует выполнять при комнатной температуре, все центрифугирования (если иное прямо не оговорено) при 10000–13000 об/мин (6700–11000 x g).

Выделение ДНК из тканей растений и животных

В качестве образца для выделения ДНК рекомендуется брать 20–40 мг ткани животного и 50–100 мг ткани растения.

1. **(А) В случае использования пестика-гомогенизатора (входит в состав набора):**
 - а. Поместите в 1.5 мл пробирку кусочек ткани.
 - б. Добавьте к образцу
 - 200 мкл *лизирующего раствора AS*,
 - 70–100 мг *корунда*.
 - с. Гомогенизируйте образец с помощью пестика-гомогенизатора.
 - д. Добавьте к гомогенату еще 300 мкл *лизирующего раствора AS*. Перемешайте.
1. **(Б) В случае использования фарфоровой ступки (не входит в состав набора):**
 - а. В ступку поместите кусочек ткани.
 - б. Добавьте к образцу
 - 100 мкл деионизованной воды,
 - 200 мкл *лизирующего раствора AS*,
 - 300–500 мг *корунда*
 - с. Гомогенизируйте образец в ступке.
 - д. Добавьте в гомогенату еще 300 мкл *лизирующего раствора AS*,

перемешайте.

е. Перенесите смесь в 1.5 мл пробирку.

1. **(В) Приготовления лизата образцов тканей животных (хвоста мыши и других) без гомогенизации:**

а. Поместите в 1.5 мл пробирку кусочек ткани,

б. Добавьте к образцу 500 мкл *лизирующего раствора AS*.

2. Установите термостат на 55 °С, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.

3. Добавьте к образцу

○ 5 мкл раствора *РНказы*,

○ 10 мкл раствора *протеиназы К*,

Перемешайте.

4. **Для 1 (А) и 1 (Б):** инкубируйте полученную смесь 20 мин при +55 °С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза),

Для 1 (В): инкубируйте полученную смесь при +55 °С до полного завершения лизиса образца (1–4 часа для небольших кусочков органов и тканей с периодическим перемешиванием на вортексе, инкубация в течение ночи для хвоста мыши и других крупных кусочков органов и тканей. В лизате допустимо присутствие компонентов (волосы, кости и хрящи), не подвергающихся лизису таким способом).

5. Добавьте к образцу 350 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.

6. Центрифугируйте образец в течение 10 мин.

7. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку супернатант (не более 800 мкл), центрифугируйте 60 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.

8. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора А*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.

9. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
10. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл предварительно прогретого до +55 °С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из соскоба буккального эпителия

1. Установите термостат на 55 °С, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. Внесите в 1.5 мл пробирку 500 мкл *лизирующего раствора AS*. Тщательно промойте в *лизирующем растворе AS* палочку с соскобом буккального эпителия. Прижмите к стенке ватный тампон и вращательным движением отожмите из него остатки лизирующего раствора.
3. Добавьте в пробирку 10 мкл раствора *протеиназы К*, перемешайте.
4. Инкубируйте полученную смесь 10 мин при +55 °С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
5. Добавьте к образцу 300 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
6. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
7. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора А*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
8. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
9. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл предварительно прогретого до +55 °С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек.

Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из цельной крови

Данный набор позволяет выделить ДНК из 100 мкл цельной крови (свежая или замороженная кровь, содержащая в качестве антикоагулянта ЭДТА, цитрат натрия, гепарин). Перемешайте переворачиванием пробирку с кровью, чтобы содержимое пробирки стало гомогенным, после чего отберите 100 мкл образца в отдельную 1.5 мл пробирку.

1. Установите термостат на 55 °С, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. Смешайте в 1.5 мл пробирке 100 мкл цельной крови и 400 мкл *лизирующего раствора AS*.
3. Добавьте в пробирку 10 мкл раствора *протеиназы К*, перемешайте.
4. Инкубируйте полученную смесь 10 мин при +55 °С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
5. Добавьте к образцу 300 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
6. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
7. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора А*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
8. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
9. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл предварительно прогретого до +55 °С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из лейкоцитов

Предварительное выделение лейкоцитов обеспечивает более высокий выход ДНК по сравнению с выделением ДНК из цельной крови. Рекомендуемый объем цельной крови для выделения лейкоцитов — 1 мл.

1. Для выделения лейкоцитов из 1 мл цельной крови приготовьте 9 мл 1х *буфера для лизиса эритроцитов*: в 15 мл пробирке смешайте 900 мкл 10х *буфера для лизиса эритроцитов* и 8.1 мл деионизованной воды.
2. Установите термостат на 55 °С, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
3. В 15 мл пробирке смешайте 1 мл цельной крови и 9 мл 1х *буфера для лизиса эритроцитов*, перемешайте и инкубируйте 5 мин при комнатной температуре.
4. Центрифугируйте пробирку 5 мин, 300 x g, надосадочную жидкость слейте, лейкоциты находятся в осадке.
5. Ресуспендируйте осадок клеток в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию в новую 1.5 мл пробирку.
6. Добавьте в пробирку
 - 400 мкл *лизирующего раствора AS*,
 - 5 мкл раствора *РНказы*,
 - 10 мкл раствора *протеиназы K*,Перемешайте.
7. Инкубируйте полученную смесь 10 мин при +55 °С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
8. Добавьте к образцу 300 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
9. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
10. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора А*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.

11. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
12. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл предварительно прогретого до +55 °С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из культур клеток животных и бактерий

Для выделения ДНК рекомендуется брать не более 5×10^6 животных клеток и 10^9 клеток грам-отрицательных бактерий.

Адгезионная культура клеток животных: удалите культуральную жидкость, снимите культуру клеток с поверхности пластика трипсином или другим рекомендованным для данной культуры методом. Центрифугируйте клетки 5 мин, 300 x g. Удалите супернатант. Ресуспенсируйте находящиеся в осадке клетки в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию клеток в новую 1.5 мл пробирку.

Суспензионная культура клеток животных: отберите объём культуральной жидкости, содержащий необходимое число клеток. Центрифугируйте клетки 5 мин, 300 x g. Удалите супернатант. Ресуспенсируйте находящиеся в осадке клетки в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию клеток в новую 1.5 мл пробирку.

Бактериальная культура: бактерии, выращенные на твердой или жидкой питательной среде, соберите центрифугированием в течение 5–10 минут, 3000–5000 x g. Удалите супернатант. Ресуспенсируйте находящиеся в осадке клетки в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию клеток в новую 1.5 мл пробирку.

1. Установите термостат на 55 °С, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. Добавьте в пробирку с образцом
 - 400 мкл *лизирующего раствора АS*,
 - 5 мкл раствора *РНказы*,

- 10 мкл раствора *протеиназы К*,
Перемешайте.
- 3. Инкубируйте полученную смесь 10 мин при +55 °С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
- 4. Добавьте к образцу 300 мкл *сорбирующего раствора*. Перемешайте полученную смесь на вортексе до гомогенного состояния.
- 5. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
- 6. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора А*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
- 7. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
- 8. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–100 мкл предварительно прогретого до +55 °С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Примечание

Для получения наибольшей концентрации ДНК используйте меньшие объёмы *элюирующего буфера*. Не рекомендуется использовать менее 50 мкл, так как мембрана колонки может не полностью смочиться, что приведет к снижению выхода ДНК. Для наибольшего выхода ДНК с колонки используйте больший объём *элюирующего буфера* (100 мкл).

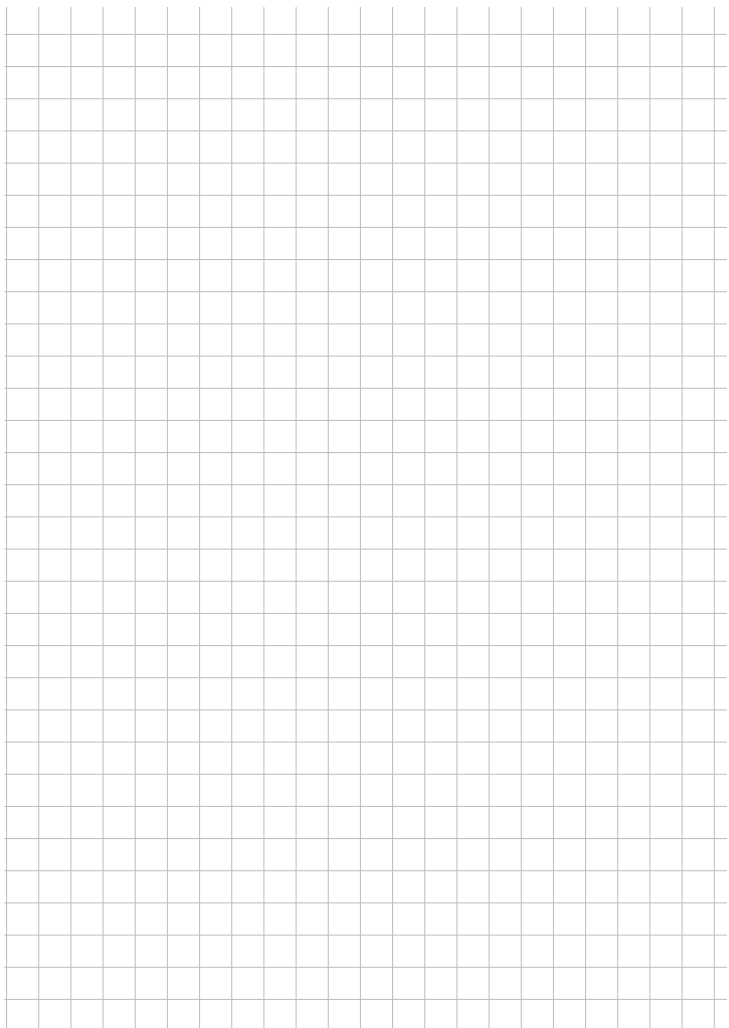
Элюция ДНК прогретым до +55 °С *элюирующим буфером* обеспечивает оптимальный выход ДНК с колонки. Элюция непрогретым *элюирующим буфером* (при комнатной температуре) также допустима, однако это заметно снижает выход ДНК (на 30–50 %).

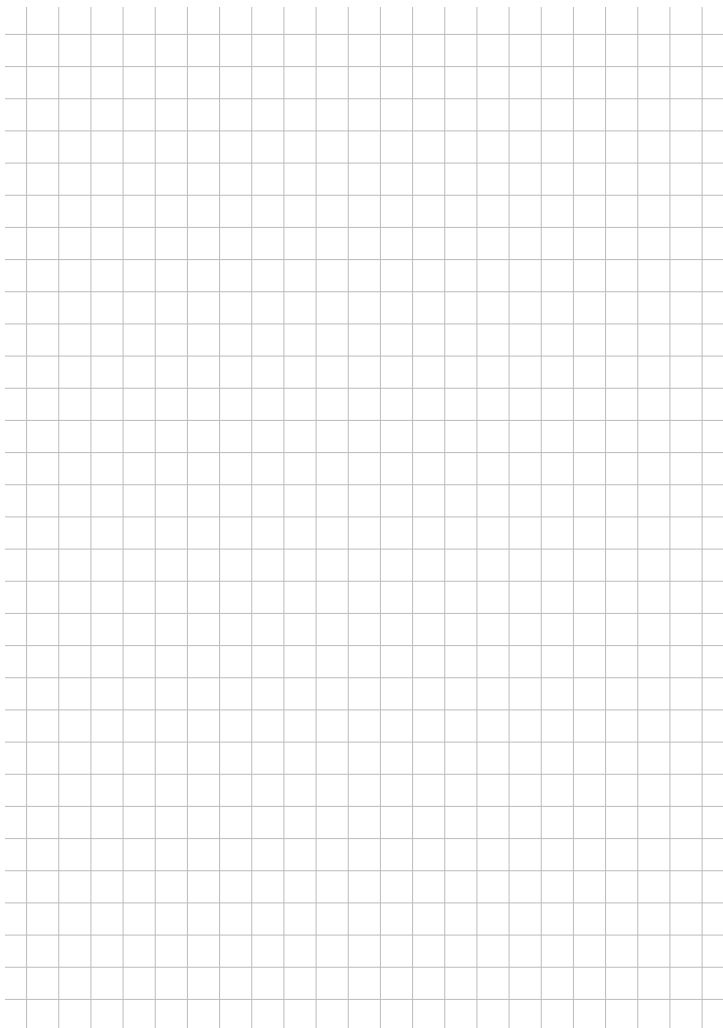
Для максимального выхода ДНК рекомендуется проводить элюцию в два этапа.

При необходимости элюция может проводиться деионизованной водой.

Если необходимо разбавить раствор при измерении концентрации ДНК, то для разбавления следует использовать только буфер TE pH 8.5 или *элюирующий буфер* из набора. В противном случае можно получить некорректные значения OD_{260}/OD_{280} и неверно определить содержание ДНК в растворе.

Хранение выделенной ДНК: в морозильной камере (-20 °С), кратковременно при +4 °С.





Lumiprobe Corporation

(US and Worldwide)

9:00AM - 9:00PM EST

201 International Circle, Suite 135

Hunt Valley, Maryland 21030

USA

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH

(Germany and Europe)

8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Feodor-Lynen-Strasse 23

30625 Hannover

Germany

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd

(Russia and CIS)

8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Kotsyubinskogo 4, bld. 3

121351 Moscow

Russian Federation

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

Issued by TÜV NORD CERT GmbH

www.lumiprobe.com