

## Протокол выделения ДНК из растений

[www.diamond-dna.ru](http://www.diamond-dna.ru)  
[www.diamond-dna-kits.com](http://www.diamond-dna-kits.com)

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 ( $-16$   $-20^{\circ}\text{C}$ ).

До начала работы: Подогреть лизис-буфер до  $+56^{\circ}\text{C}$ .  
Приготовить 70% этанол.  
Включить нагревающий блок ( $+56^{\circ}\text{C}$ ).

1. Примерно  $0,5\text{ см}^2$  листьев (20-30 мг живого или 5-10 мг сухого материала) измельчить, поместить в 1,5 мл пробирку, добавить 500 мкл лизис-буфера. Если используются живые растения, то добавить 10 мкл раствора РНКазы (для сухих – 10 мкл раствора протеазы), термостатировать при  $+56^{\circ}\text{C}$  в течение 15-20 мин. (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 ( $-16$   $-20^{\circ}\text{C}$ ) 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  $+56^{\circ}\text{C}$  и 1 мин на воздухе, растворить в 50 – 100 мкл воды или TE-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.



## Набор для выделения ДНК из растений

## 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 буфера для осаждения 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 ( $OD_{260}/OD_{280}$  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 20000 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 протеиназы К необязательно и оправдано при выделении ДНК из сильно деградировавшего материала.

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

## Назначение набора DiamondDNA™

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из тканей растений. Выпускается в двух модификациях: для живых растений (проростки, участки живых побегов или корней) и для засушенных растений (гербарный материал, семена).

## Состав набора DiamondDNA™

1. Лизис-буфер.
2. Протеаза (в наборах для выделения ДНК из сухих растений), РНКаза (в наборах для выделения ДНК из живых растений).  
*В состав тестовых наборов ферменты не входят*
3. Сорбент.
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.

## Хранение и подготовка к работе набора DiamondDNA™




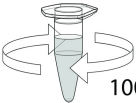

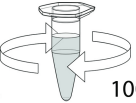
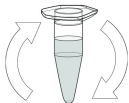
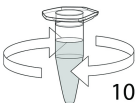

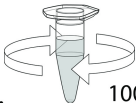


При получении набора необходимо поместить ферменты (РНКазу или протеиназу К) в морозильную камеру (-20°C) для более длительного хранения. Ферменты находятся в лиофилизированном виде и переносят транспортировку при комнатной температуре без заморозки. Перед использованием ферменты необходимо растворить в бидистиллированной или деионизированной воде (1 мл на 1 пробирку). В дальнейшем ферменты необходимо хранить только при -20°C.

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.

# Plant Genomic DNA Kit



-  1.
-  2. 500  $\mu$ l **L**  
10  $\mu$ l **zyme**  
56°C 15 min
-  3. 150  $\mu$ l **S**
-  4. 2 min  
10000-13000 rpm
-  5. 150  $\mu$ l **SB**  
-20°C 5 min  
(or longer)
-  6. 5 min  
10000-13000 rpm
-  7. 150  $\mu$ l **P**
-  8. 5 min  
10000-13000 rpm
-  9. 600  $\mu$ l  
**EthOH**
-  10. 1 min  
10000-13000 rpm
-  11. 56°C 1 min  
RT 1 min
-  12. 50-100  $\mu$ l  
ddH<sub>2</sub>O or **TE**