



LumiPure genomic DNA Blood and Buccal Kit manual

Contents

English: LumiPure genomic DNA Blood and Buccal Kit manual	3-8
Deutsch: Handbuch für das LumiPure Extraktionskit für genomische DNA aus Vollblut und Wangenabstrichen	9-15
Русский: Инструкция к набору LumiPure для выделения геномной ДНК из цельной крови и буккального эпителия	16-22

LumiPure genomic DNA Blood and Buccal Kit manual

The Kit allows rapid (about 30 minutes) and highly efficient purification of total DNA (genomic, mitochondrial, and viral) from whole blood, buccal swabs, leukocytes, cultured mammalian cells using spin columns. 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):

- whole blood (100 μ L): 1–3 μ g
- buccal swab: 0.5–2 μ g
- cultured mammalian cells (1×10^6): 3–6 μ g

Kit components

Kit component	Count	
	11553 10 minipreps	21553 50 minipreps
F4150, Lysis Solution BB, 4 mL	1	—
H2450, Wash Solution A (with GuHCl), 6 mL	1	—
M4150, Lysis Solution BB, 20 mL	—	1
P2450, Wash Solution A (with GuHCl), 30 mL	—	1
Spin column CNP20-A (up to 20 μ g, green ring)	10	50
Collection tube for spin column, 2 mL	30	150
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 room temperature.

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 ($6,700 \times g$);
- 96 % ethanol;
- 1.5 mL microcentrifuge tubes (2 tubes for DNA purification from 1 biological sample); and
- phosphate-buffered saline (PBS) for DNA purification from 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.
! Store Proteinase K solution after preparation at -20 °C.
3. If any precipitate has formed in *Lysis Solution BB* 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 ($6,700$ – $11,000 \times g$) (unless specified otherwise).

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). For increased DNA yield, prior separation of leukocytes can be performed (a whole blood sample volume recommended for leukocyte separation is 1–2 mL).

1. Set a heating block to 55 °C, place the vial with *Elution Buffer* in the heating block.
2. 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.
3. Add 300 μL of *Lysis Solution BB* and 10 μL of *Proteinase K* to the sample, mix well by vortexing.
4. Incubate the tubes at 55 °C for 15 min with occasional vortexing (1–2 times).
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 50–200 μL of *Elution Buffer* (pre-heated to 55 °C) to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 2 minutes. 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 300 µL of *Lysis Solution BB* to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
3. Rinse a buccal swab sample in *Lysis Solution BB* thoroughly. Use a rolling action against the tube sides and squeeze the swab against side to remove as much of the liquid as possible.
4. Add 10 µL of *Proteinase K* to the sample, mix well by vortexing.
5. Incubate the tubes at 55 °C for 15 min with occasional vortexing (1–2 times).
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 50–200 µL of *Elution Buffer* (pre-heated to 55 °C) to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 2 minutes. Centrifuge the column for 1 minute. The microcentrifuge tube contains the purified DNA.

DNA purification from cultured mammalian cells

Use not more than 5×10^6 cells for DNA purification.

Adherent cell culture: remove the growth medium, harvest cells by trypsinization or a method of choice. Centrifuge the cells at $300 \times g$ 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 cell culture: harvest cells by centrifugation at $300 \times g$ 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 300 μL of *Lysis Solution BB* and 10 μL of *Proteinase K* to the sample, mix well by vortexing.
3. Incubate the tubes at 55 °C for 15 min with occasional vortexing (1–2 times).
4. 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.
5. 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.
6. Add 500 μL of *Wash Solution B*, centrifuge the column for 3 minutes. Discard the collection tube.
7. Place the spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50–200 μL of *Elution Buffer* (pre-heated to 55 °C) to the center of the spin column membrane. Incubate at room temperature for 2 minutes. 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* (100–200 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 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, respectively) can be estimated incorrectly.

Storage of purified DNA: for long-term storage -20 °C, for short-term storage +4 °C.

Handbuch für das LumiPure Extraktionskit für genomische DNA aus Vollblut und Wangenabstrichen

Dieses Kit dient der schnellen (ca. 30 Minuten) und effizienten Extraktion von Gesamt-DNA (genomische, mitochondriale und virale DNA) aus Vollblut, Wangenabstrichen, Leukozyten und Säugetierzellen mit Hilfe von Zentrifugationssäulchen. Die isolierte 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):

- Vollblut (100 μ l): 1–3 μ g
- Wangenabstrich: 0,5–2 μ g
- Säugetierzellen (1×10^6): 3–6 μ g

Bestandteile

Komponente	Anzahl	
	11553 10 minipreps	21553 50 minipreps
F4150, LyseLösung BB / Lysis Solution BB, 4 mL	1	—
H2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 6 mL	1	—
M4150, LyseLösung BB / Lysis Solution BB, 20 mL	—	1
P2450, Waschlösung A / Wash Solution A (mit GuHCl), 30 mL	—	1
Zentrifugationssäulchen CNP20-A (für bis zu 20 µg, grüner Ring)	10	50
Sammelgefäß für Zentrifugationssäulchen, 2 ml	30	150
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 Raumtemperatur 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.

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 $600 \mu\text{l}$ *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 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Sollten sich in *Lysis Solution BB* oder *Wash Solution A* Salzkristalle gebildet haben, erwärmen Sie die Lösungen auf maximal $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat.

Alle folgenden Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur, alle Zentrifugationsschritte mit $10.000\text{--}13.000 \text{ min}^{-1}$ ($6.700\text{--}11.000 \times g$) ausgeführt (sofern nicht anders angegeben).

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. Für eine höhere DNA-Ausbeute können isolierte Leukozyten verwendet werden (Isolierung aus 1–2 ml Vollblut empfohlen).

1. Erwärmen Sie den *Elution Buffer* im auf 55 °C eingestellten Heizblock.
2. 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.
3. Geben Sie zu jeder Probe 300 µl *Lysis Solution BB* und 10 µl *Proteinase-K-Lösung* hinzu und mischen Sie sorgfältig durch Vortexen.
4. Inkubieren Sie den Ansatz 15 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
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 50–200 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach 2 Minuten 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 300 µl *Lysis Solution BB* in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
3. Spülen Sie den Tupfer mit dem Wangenabstrich mit *Lysis Solution BB* gut aus. Rollen Sie den Tupfer mit Druck an der Innenwand des Röhrchens entlang, um so viel Flüssigkeit wie möglich herauszudrücken.
4. Geben Sie 10 µl *Proteinase-K-Lösung* zur Probe hinzu und mischen Sie.
5. Inkubieren Sie den Ansatz 15 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
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 50–200 µl des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie 60 Sekunden lang. Die isolierte DNA befindet sich nun im Eluat.

DNA-Extraktion aus Säugetierzellen

In die DNA-Extraktion sollten nicht mehr als 5×10^6 Zellen eingesetzt werden.

Adhärente Zellen: 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 μ l 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 5 Minuten bei $300 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 μ l 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 zu jeder Probe 300 μ l *Lysis Solution BB* und 10 μ l *Proteinase-K-Lösung* hinzu und mischen Sie sorgfältig durch Vortexen.
3. Inkubieren Sie den Ansatz 15 Minuten bei 55 °C und vortexen Sie zwischendurch ein- bis zweimal.
4. 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.
5. Geben Sie 500 μ l *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.
6. Geben Sie 500 μ l *Wash Solution B* auf die Säule und zentrifugieren Sie 3 Minuten lang. Säulendurchfluss und Sammelgefäß werden wiederum verworfen.
7. Stecken Sie die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen und pipettieren Sie 50–200 μ l des auf 55 °C vorgewärmten *Elution Buffer* in die Mitte der Membran. Nach 2 Minuten 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 (100–200 μl) 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 для выделения геномной ДНК из цельной крови и Buccalного эпителия

Набор предназначен для быстрого (~ 30 минут) и высокоэффективного выделения тотальной ДНК (геномной, митохондриальной и вирусной) из цельной крови, Buccalного эпителия, лейкоцитов, культур клеток млекопитающих на спин-колонках. 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):

- Цельная кровь (100 мкл): 1–3 мкг
- Соскоб Buccalного эпителия: 0.5–2 мкг
- Клетки млекопитающих (1×10^6): 3–6 мкг

Состав набора

Компонент набора	Количество	
	11553 10 minipreps	21553 50 minipreps
F4150, Лизирующий раствор BB / Lysis Solution BB, 4 mL	1	—
H2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 6 mL	1	—
M4150, Лизирующий раствор BB / Lysis Solution BB, 20 mL	—	1
P2450, Промывочный раствор A / Wash Solution A (с GuHCl), 30 mL	—	1
Колонка CNP20-A (до 20 мкг, зеленое кольцо)	10	50
Пробирка для сбора проскока, 2 мл	30	150
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 K / Proteinase K (лиофилизованная), 6.0 mg	1	1
B3850, Буфер для растворения протеиназы K / Proteinase K Dilution Buffer, 600 µL	1	1

Хранить при комнатной температуре.

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 × 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.

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 °С.
3. При наличии осадка в *лизирующем растворе ВВ* 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 × g).

Выделение ДНК из цельной крови

Данный набор предназначен для выделения ДНК из образцов цельной крови объемом 100 мкл (свежая или замороженная кровь, содержащая в качестве антикоагулянта ЭДТА, цитрат натрия, гепарин). Для более высокого выхода ДНК можно использовать предварительно выделенные лейкоциты (рекомендуемый объем цельной крови для выделения лейкоцитов 1–2 мл).

1. Установите термостат на 55 °С, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. Перемешайте переворачиванием пробирку с кровью, чтобы содержимое пробирки стало гомогенным, после чего отберите 100 мкл образца в отдельную 1.5 мл пробирку.
3. В пробирку с образцом внесите 300 мкл *лизирующего раствора ВВ* и 10 мкл раствора *протеиназы К*, тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе.
4. Инкубируйте полученную смесь 15 мин при 55 °С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
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 50–200 мкл предварительно прогретого до 55 °С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 2 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 чистую 1.5 мл пробирку 300 мкл *лизирующего раствора ВВ*.
3. Тщательно промойте в *лизирующем растворе ВВ* палочку с соскобом буккального эпителия. Прижмите к стенке ватный тампон и вращательным движением отожмите из него остатки лизирующего раствора.
4. Добавьте в пробирку с образцом 10 мкл раствора *протеиназы К*, тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе.
5. Инкубируйте полученную смесь 15 мин при 55 °С, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
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 50–200 мкл предварительно прогретого до 55 °С *элюирующего буфера*. Инкубируйте 2 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 60 сек. Выделенная ДНК находится в элюате.

Выделение ДНК из культур клеток млекопитающих

Для выделения ДНК рекомендуется брать не более 5×10^6 клеток.

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

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

1. Установите термостат на $55 \text{ }^\circ\text{C}$, поместите в него пробирку с *элюирующим буфером*.
2. В пробирку с образцом внесите 300 мкл *лизирующего раствора ВВ* и 10 мкл раствора *протеиназы К*, тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе.
3. Инкубируйте полученную смесь 15 мин при $55 \text{ }^\circ\text{C}$, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза).
4. Поместите колонку в пробирку для сбора проскока, перенесите на колонку лизат, центрифугируйте 45 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
5. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора А*, центрифугируйте 30 сек. Поместите колонку в новую пробирку для сбора проскока.
6. Нанесите на колонку 500 мкл *промывочного раствора В*, центрифугируйте 3 мин.
7. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку, нанесите в центр колонки 50–200 мкл предварительно прогретого до $55 \text{ }^\circ\text{C}$ *элюирующего буфера*. Инкубируйте 2 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* (100–200 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

The certificate No.: 44 100 202070

Issued by TÜV NORD CERT GmbH

www.lumiprobe.com

