

Стационар в поселке Шалша  
Югорского государственного университета

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ШКОЛА**

**ДЛЯ БИОЛОГОВ ЮГРЫ**

**16-20 ОКТЯБРЯ**

**Курс повышения квалификации  
по молекулярным методам в изучении биоразнообразия**

Грант Губернатора Югры Национальный проект «Наука и университеты»

**Протоколы работы в молекулярно-генетической  
лаборатории ЮГУ**

**Методические указания**

**Югорский государственный университет**

**Сентябрь 2023**



**ГРАНТ  
ГУБЕРНАТОРА  
ЮГРЫ**



**Югорский  
государственный  
университет**



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Организация молекулярной лаборатории .....	4
Подготовка материала для выделения нуклеиновых кислот .....	5
Выделение ДНК из грибов .....	6
Протокол выделения с помощью набора реактивов Diatom DNA Prep .....	7
Протокол выделения с помощью Jena Bioscience DNA Preparation Kit.....	10
Протокол выделения ДНК/РНК из почвы на магнитных частицах SileksMagNA.....	11
Постановка ПЦР.....	13
Выбор и подготовка праймеров .....	13
Протокол постановки ПЦР .....	14
Детекция результатов ПЦР методом горизонтального гель-электрофореза	17
Очистка ПЦР-продукта из реакционных смесей или из геля с помощью набора Cleanup Standart .....	20
Постановка секвенсовой реакции .....	23
Очистка продуктов секвенсовой реакции с помощью Dynabeads® sequencing clean-up .....	25
Памятка по разведению растворов.....	28
Измерение концентрации раствора ДНК с помощью флуориметра Qubit 4.	29

## ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Лаборатория оборудована в соответствии с этапами проведения анализа и включает следующий набор рабочих зон (комнат):

- ⇒ **Зона разбора** и первичной обработки материала (**Фунгарий** – коллекция грибов)
- ⇒ **Зона выделения** нуклеиновых кислот
- ⇒ **Зона подготовки** и проведения **полимеразной цепной реакции (ПЦР)**
- ⇒ **Зона проведения** учета результатов ПЦР методом **электрофореза**
- ⇒ **Зона очистки** продуктов ПЦР, постановки и очистки секвенсовой реакции
- ⇒ **Зона секвенирования.**



## ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

### *Зона разбора материала*

- Сушильный шкаф с принудительным потоком воздуха
- Сетки металлические
- Шкафы для хранения образцов коллекции
- Микроскопическая техника
- Расходные материалы для упаковки образцов грибов в коллекцию

Плодовые тела макромицетов во время полевой работы заворачивают в фольгу. По возвращении в лабораторию, образцы разворачивают, при необходимости фотографируют на фото-столике, проводят описание макро-признаков. Образцы снабжают каталожными номерами. Информацию об образце заносят в базу данных фунгария ЮГУ в программном обеспечении Specify (<http://specify.ugrasu.ru/>).

Затем образцы подвергаются сушке при температуре 40°C на решетках с обеспечением постоянного притока воздуха. Плодовые тела высушивают до воздушно-сухого состояния. Следует избегать пересушивания материала. Признаком этого является повышенная хрупкость плодовых тел.

Для сушки плодовые тела выкладывают на решетку в индивидуальных подложках из сетки, снабжая каталожными номерами. После высыхания материалу дают остыть до комнатной температуры и укладывают в zip-пакеты.

По завершении полевого сезона образцы инсертируют в фонды коллекции Фунгария ЮГУ. Для этого из базы данных печатаются этикетки, и zip-пакеты упаковываются в крафт-конверты с этикеткой. Образцы вкладывают в лотки и шкафы в систематическом порядке, при этом в базе данных помечают место хранения образца (номер шкафа и лотка).

Для выделения отбирают плодовые тела без признаков поражения паразитическими грибами. Хорошие результаты дает консервирование части плодовых тел в свежем состоянии в эппендорфах (около 2 мм<sup>2</sup> образца помещают в пробирку с 50 мкл дистиллированной воды). Эппендорфы подписывают номерами коллекции и хранят в морозильной камере при -20°C в штативах в порядке возрастания номеров. Перед выделением образцы размораживают и далее следуют протоколу выделения.

## ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ГРИБОВ

### *Зона выделения*

- Вортекс
- Маркированные емкости для сброса носиков и использованных пробирок
- Маркированная емкость с дезраствором для пестиков
- Наконечники для пипеток объемов 0-10, 10-100 и 100-1000 мкл
- Перчатки одноразовые
- Пипетки автоматические объемов 0-10, 10-100 и 100-1000 мкл
- Пробирки 1,5 или 2 мл в закрытых емкостях
- Дезинфицирующий раствор для обработки поверхностей в пульверизаторе
- Ротатор или качалка
- Спиртостойкий маркер
- Твердотельный термостат для пробирок
- Холодильник для хранения проб, реактивов и ДНК
- Центрифуга, развивающая скорость до 15000 об/мин
- Цилиндр мерный на 200 - 500 мл
- Пестики пластиковые (автоклавированные) для пробирок
- Штативы для пробирок 1,5 или 2 мл
- Протоколы выделения
- Набор для выделения
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
-

## Протокол выделения с помощью набора реактивов Diatom DNA Prep

*Протокол основан на методе выделения ДНК на стеклянных частицах с использованием хаотропных агентов.*

1. В пробирку объемом 1,5 мл поместить кусочек исследуемого образца, добавить 800 мкл **Лизирующего реагента** и перемешать содержимое пробирки переворачиванием (5-10 раз).

**!2** Время термостатирования можно увеличить в зависимости от твердости образца до нескольких часов. Во время термостатирования тщательно растереть образец пластиковым пестиком **без использования стеклянного гомогенизирующего материала**. Использовать для каждой пробы индивидуальный пестик.

2. Термостатировать пробирку со смесью 5-7 мин. при температуре 65°С.

3. После термостатирования центрифугировать пробирку со смесью 10 сек при 5000 оборотов/мин в том случае, если смесь содержит клеточный дебрис или другой нерастворенный осадок. Прозрачный супернатант целиком перенести в чистую пробирку.

4. В пробирку с чистой смесью добавить 20-40 мкл суспензии сорбента **NucleoS** (40 мкл, если выделение ДНК проводится из цельной крови или другой богатой ДНК жидкости).

**!4** Перед использованием NucleoS следует интенсивно перемешать до гомогенной суспензии на вортексе или интенсивным встряхиванием.

5. Пробирку поместить на ротатор и перемешивать 10 мин (10-20 об/мин), ротатор можно заменить переворачиванием руками.

6. Центрифугировать около 1 мин при 10 000 оборотов/мин.

7. Осторожно, не задевая осадок, удалить супернатант с помощью водоструйного насоса или дозатора. При отборе стараться удалить надосадочную жидкость полностью.

**!7,12,13,14** При отборе стараться удалить надосадочную жидкость полностью. Остатки жидкости со дна пробирки отобрать дозатором с тонким носиком.

8. К осадку добавить 400 мкл **Лизирующего реагента**, тщательно перемешать на вортексе или интенсивным встряхиванием до полного гомогенного состояния.

9. Добавить в пробирку 1 мл рабочего раствора **Солевого буфера**.

10. Перемешать содержимое пробирки переворачиванием пробирки 5-10 раз.

11. Центрифугировать около 1 мин при 10 000 оборотов/мин.

12. Осторожно удалить супернатант, не задевая осадок, с помощью насоса или дозатора. При отборе стараться удалить надосадочную жидкость полностью.

13. Добавить в пробирку 1 мл **Солевого буфера**, перемешать содержимое пробирки на вортексе, центрифугировать 10 сек при 5000 оборотов/мин, осторожно удалить супернатант, не задевая осадок, с помощью насоса или дозатора. При отборе стараться удалить надосадочную жидкость полностью. Остатки жидкости со дна пробирки отобрать дозатором с тонким носиком.

14. Повторить предыдущий пункт еще раз. Остатки жидкости со дна пробирки отобрать дозатором с тонким носиком. По возможности удалить всю жидкость со дна пробирки дозатором с носиком 0-10 мкл.

15. Посушить осадок при температуре 65°C в течение 3-4 мин, время просушки нужно увеличить если видны остатки жидкости. Качество просушки определяют по равномерному матовому цвету осадка в пробирке.

16. В эту же пробирку внести 60-100 мкл **ЭкстраГена Е**. ЭкстраГен Е перед внесением тщательно перемешать, если виден белый осадок, то подогреть до 40 °C и размешать до растворения.

17. Осторожно суспендировать содержимое пробирки 5-10 сек до получения гомогенной суспензии, затем термостатировать 4-5 мин при 65°C.

18. Еще раз осторожно суспендировать содержимое пробирки перед центрифугированием.

19. Центрифугировать 1 мин при 10 000 оборотов/мин.

20. Расставить новые пробирки на штативе, подписать аналогично первым.

21. Перенести супернатант с ДНК в чистые пробирки, **оставляя слой жидкости над осадком, чтобы не захватить частицы осадка.**

22. Хранят в морозильной камере при -20°C в **Зоне Выделения** или Зоне ПЦР лаборатории. Не допустимо переносить штативы с ДНК в другие холодильники лаборатории.



## Протокол выделения с помощью Jena Bioscience DNA Preparation Kit

1. Добавить 300 мкл **Cell Resuspension Solution** в

**!0** Добавить нужное количество этанола в Washing Buffer перед первым использованием

гомогенизированный образец.

2. Сразу добавить 1.5 мкл **Proteinase K** и перемешать переворачиванием пробирки несколько раз.

3. Инкубировать при 55 °С в течение 60 мин.

4. Центрифугировать 1 мин при 15 000 g.

5. Удалить надосадок.

6. Ресуспендировать пеллету, добавив 300 мкл **Cell Lysis Solution**.

7. Добавить 100 мкл **Protein Precipitation Solution**. Перемешать на

вортексе в течение 20 сек.

8. Центрифугировать 3 мин при 15 000 g.

**!8** Образующаяся протеиновая пеллета должна быть плотной. Если она получилась рыхлой, то повторить вортексирование, затем инкубировать пробирки **на льду 10 мин** и потом опять центрифугировать.

9. Разлить в новые 1.5 мл эппендорфы по 300 мкл **100% изопропанола**,

10. Перенести надосадок в пробирки с изопропанолом. Перемешать мягко переворачиванием 50 раз.

11. Центрифугировать 1 мин при 15 000 g. ДНК выпадет в осадок в виде пеллеты (белого или зеленоватого цвета).

12. Слить раствор и промакнуть пробирки о фильтровальную бумагу.

13. Добавить 500 мкл **Washing Buffer** и попереверачивать пробирку несколько раз для промывки ДНК.

14. Центрифугировать 1 мин при 15 000 g.

15. Удалить тщательно раствор.

16. Высушить на воздухе при комнатной температуре в течение 10-15 мин.

17. Добавить 50-100 мкл **DNA Hydration Solution** в пробирки с высушенной ДНК.

18. Добавить 1.5 мкл **RNase A**.

19. Перемешать переворачиванием пробирки несколько раз, затем инкубировать 30-60 мин при 37 °С.

20. Сразу же продолжить инкубирование при 65 °С в течение 60 мин.

## Протокол выделения ДНК/РНК из почвы на магнитных частицах SileksMagNA

1. Внесите навеску почвы в количестве 100-150 мг в 2 мл пробирку.
2. Добавьте 100 мкл (по объему) шариков для гомогенизации.
3. Внесите 400 мкл **буфера Lysis**.
4. Центрифугируйте пробирку с гомогенатом при 12000-14000 оборотов/мин в течение 5 минут.
5. Перенесите 200 мкл супернатанта в новую пробирку и добавьте 200 мкл **буфера Cleaning**. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе.
6. Инкубируйте пробирку при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут.
7. Центрифугируйте пробирку с гомогенатом при 12000-14000 оборотов/мин в течение 5 минут.
8. Перенесите 350 мкл супернатанта в новую пробирку.
9. Инкубируйте пробирку при комнатной температуре в течение 3 минут. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.
10. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты). Удалите супернатант. Будьте осторожны, чтобы не захватить магнитные частицы.
11. Поместите пробирку в немагнитный штатив. Ресуспендируйте магнитные частицы в 300 мкл хорошо перемешанного буфера **Wash 1** и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии. Инкубируйте в течение 3 минут при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.
12. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите

**13** Поместите пробирку в гомогенизатор или встряхивайте пробирку на вортексе в течение 5 минут. Более длительная гомогенизация (до 15 минут) позволяет повысить выход ДНК и РНК, но также увеличивает степень деградации ДНК и РНК.

**18** Последовательно добавьте 175 мкл буфера Binding и 5 мкл магнитных частиц SileksMagNA. Тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии содержимое пробирки до получения гомогенной суспензии. Не используйте вортекс!

**11,13,15,17** Использование шейкера для пробирок улучшает результат и сокращает время процедуры. При использовании шейкера инкубируйте тщательно гомогенизированные частицы в течение 2 минут при 1250-1500 обор/мин в зависимости от модели шейкера.

**11,13** Буфера Wash 1, Wash 2 должны тщательно встряхиваться перед внесением для образования суспензии.

супернатант.

13. Поместите пробирку в немагнитный штатив. Добавьте 300 мкл хорошо перемешанного буфера **Wash 2** и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии. Инкубируйте в течение 3 минут при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.

14. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант.

15. Поместите пробирку в немагнитный штатив. Добавьте 300 мкл буфера **Wash 3** и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии. Инкубируйте в течение 3 минут при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.

16. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удалите супернатант.

17. Поместите пробирку в немагнитный штатив. Добавьте 300 мкл буфера **FinalWash** и тщательно перемешайте до получения гомогенной суспензии. Инкубируйте в течение 3 минут при комнатной температуре. Во время инкубации несколько раз перемешайте содержимое пробирки.

**!17** На этой стадии (когда частицы находятся в буфере Final Wash) ДНК и РНК, связанная с частицами, может храниться длительное время без разрушения. Температура хранения может варьировать от комнатной (+22 °С) до -70 °С. Для завершения выделения переходите к пункту 14 данного протокола.

18. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц.

Удалите супернатант.

19. Инкубируйте пробирку в термостате при 60 °С в течение 5 минут, чтобы высушить осадок частиц.

20. Добавьте 50 мкл буфера **Elution**.

Тщательно ресуспендируйте частицы до получения гомогенной суспензии.

**!20** Если хотите получить большую концентрацию ДНК/РНК, используйте 25 мкл буфера Elution

21. Инкубируйте в термостате при 60 °С в течение 5 минут.

22. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Перенесите ДНК- и РНК-содержащий супернатант в чистую пробирку.

23. Храните полученный раствор с выделенной нуклеиновой кислотой при -20°С.

**!22** Если для дальнейшей работы требуется РНК, внесите в собранный супернатант препарат RNA Protector в количестве 5 мкл (1/10 от объема)

## ПОСТАНОВКА ПЦР

### *Зона постановки ПЦР*

- Вортекс
- Деионизированная автоклавированная вода
- Маркированные емкости для сброса носиков и использованных пробирок
- Ламинарный бокс
- Наконечники для пипеток всех объемов
- Наконечники объема 10-100 с фильтром
- Низкооборотистая центрифуга (ротор для пробирок на 0,2 мл)
- Перчатки одноразовые
- Пипетки автоматические (объемом 0-10, 10-100 и 100-1000 мкл)
- Праймеры форвард и реверс
- Раствор хлорки для обработки поверхностей
- Спирт этиловый (70%) для обработки рук
- Спиртостойкий маркет
- Термоциклер (ПЦР-машина)
- Холодильник для хранения проб, реактивов и ДНК
- Штативы для пробирок 1,5 или 2 мл и 0,2 мл

### **Выбор и подготовка праймеров**

Для большинства групп макромицетов в качестве баркодингового региона используется участок ITS1-5.8S-ITS2 с использованием стандартных грибных праймеров ITS1F и ITS4B (ITS4) (Gardes, Bruns, 2008). Другие последовательности праймеров для грибов можно найти на сайте <http://lutzonilab.org/nuclear-ribosomal-dna/> или <https://dnabarcoding101.org/lab/planning-prep.html>

Баркодинговые праймеры снабжают адапторами, например, последовательностями вектора M13 (Messing, 1983). Последовательности адапторов можно найти на сайте <https://dnabarcoding101.org/lab/planning-prep.html>.

Если праймеры были получены в лиофилизированном состоянии, их разводят деионизированной автоклавированной водой по инструкции производителя праймеров (паспорт праймера), получая матричный раствор с концентрацией 100рМ.

Для дальнейшего использования из матричного раствора готовят рабочий раствор с концентрацией 10рМ, разводя матричный раствор в 10 раз. Например, если хотят получить 200 мкл рабочего раствора, то к 20 мкл

матричного раствора добавляют 180 мкл воды. Разведенный матричный и рабочий растворы хранят в холодильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$  в Зоне ПЦР.

### Протокол постановки ПЦР

1. Ламинарный бокс дезинфицируют дезраствором.
2. Рассчитывают число пробирок ( $n$ ) = число образцов + положительный контроль + отрицательный контроль. Где положительный контроль – ДНК, для которой ранее был получен ПЦР-продукт, отрицательный контроль – без ДНК. Обратите внимание, что в таблице количество пробирок всегда увеличивается на 1.
3. В пробирке 1,5 мл готовят смесь для ПЦР из расчета на 20 мкл общей реакционной смеси на 1 пробирку, как в таблице. Очередность добавления компонентов ПЦР в смесь (для подготовки смеси используют наконечники с фильтром):  $\text{H}_2\text{O}$ , праймеры на стенку пробирки, готовая смесь с полимеразой. Для каждого праймера используют отдельный носик.
4. Пробирку со смесью коротко встряхивают на вортексе, избегая образования пузырей и попадания смеси на крышку пробирки. Если смесь попала на крышку, пробирку коротко прокручивают на низкооборотистой центрифуге.
5. Пробирки с ДНК выставляют на штатив.
6. Пробирки объемом 0,2 мл расставляют на штатив и подписывают так, как в штативе с ДНК. Пробирки подписывают сбоку, чтобы избежать стирания номеров во время нагрева крышки термоциклера.
7. В пробирки для ПЦР вносят **по 18,4 мкл** или 19 мкл смеси для ПЦР одним наконечником с фильтром в зависимости от объема ДНК.
8. В каждую пробирку на стенку **вносят 1,6** или 1 мкл ДНК наконечниками без фильтра, наконечник сменяют после каждого образца.
9. Пробирки коротко прокручивают на центрифуге для сброса ДНК со стенки пробирки в реакционную смесь.
10. Устанавливают пробирки в термоциклер.
11. На термоциклере задают программу ПЦР исходя из параметров выбранных праймеров, например, как на рисунке для ITS1F и ITS4.
12. После окончания ПЦР-продукт на штативах хранят в холодильнике в **Зоне очистки продуктов реакций (!)** при  $+4$  или  $-18^{\circ}\text{C}$ . Не допустимо приносить или открывать пробирки с ПЦР-продуктом за пределами **Зоны очистки продуктов реакций или форежной комнаты.**



## Расчет объема компонентов ПЦР реакции (мкл)

Реагент	Число пробирок (n)	8 пробирок	16 пробирок
<b>5x готовая смесь для ПЦР</b>	$4*(n+1)$	36	68
PrF (прямой праймер) 10pM	$0,2*(n+1)$	1,8	3,4
PrR (обратный праймер) 10pM	$0,2*(n+1)$	1,8	3,4
ДНК	по 1,6 мкл	по 1,6 мкл	по 1,6 мкл
H <sub>2</sub> O	$14*(n+1)$	126	238
<b>2x готовая смесь для ПЦР</b>	$10*(n+1)$		
PrF (прямой праймер) 10pM	$0,2*(n+1)$		
PrR (обратный праймер) 10pM	$0,2*(n+1)$		
ДНК	по 1 мкл		
H <sub>2</sub> O	$8,6*(n+1)$		

На термоциклере задают программу ПЦР: температуру и количество циклов каждой из стадий, как на рисунке для праймеров ITS1F и ITS4 и 5x окрашенной реакционной смеси ScreenMix.



## ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР МЕТОДОМ ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

### *Зона электрофореза*

- 10x TBE (Трис-борат-ЭДТА буфер)
- Агароза
- Вортекс
- Интеркалирующий краситель (GelRed или SYBRGreen)
- Микроволновая печь
- Наконечники для пипеток всех объемов
- Перчатки одноразовые
- Пипетки автоматические (объемом 0-10, 10-100 и 100-1000 мкл)
- Раствор хлорки для обработки поверхностей
- Система гель-электрофореза (корыто, гребенки, столик, источник тока)
- Спирт этиловый (70%) для обработки рук
- Спиртостойкий маркер
- Трансиллюминатор и ультрафиолетовые очки
- Химическая вытяжка
- Холодильник для хранения реактивов и ДНК
- Цилиндры мерные на 100 и 500 мл
- Колба коническая термостойкая для варки геля
- Весы с точностью до 0,1 г
- Штативы для пробирок на 0,2 мл
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
-

## Протокол постановки электрофореза

1. Готовят 1х ТВЕ, для этого к 50 мл 10х ТВЕ добавляют 450 мл дистиллированной воды.
2. Готовят 1% агарозный гель, для этого навеску 1г агарозы нагревают в 100 мл ТВЕ в микроволновой печи до растворения агарозы. Раствору дают остыть до 60-70 °С.
3. ! В раствор с температурой ниже 70°С добавляют 5 мкл интеркалирующего красителя, аккуратно размешивают вращательными движениями. Работу с интеркалирующим красителем следует вести под химической вытяжкой, строго в перчатках и (по возможности) в маске, поскольку реагент является канцерогенным веществом.
4. Устанавливают поддон и гребенки на заливочный столик, заливают агарозный гель.
5. Дают остыть в течение 20-30 минут.
6. Осторожно вынимают гребенки из геля, вынимают поддон с гелем из заливочного столика и помещают в корыто.
7. Наливают 1х ТВЕ выше уровня геля на 2-3 мм
8. Пробирки с ПЦР-продуктом выставляют на штатив соответственно лункам геля.
9. Схему расположения пробирок заносят в лабораторный журнал.
10. Наконечниками без фильтра в лунки геля под ТВЕ аккуратно заливают 2-4 мкл готового ПЦР-продукта.
11. Закрывают крышку, подключают электроды, включают электрофорез. Время электрофореза 15-40 минут.
12. !В перчатках по окончании электрофореза поддон с гелем вынимают из корыта, гель выдвигают из поддона на трансиллюминатор. Закрывают защитное стекло трансиллюминатора, одевают очки и включают трансиллюминатор.
13. ПЦР-продукт виден в ультра-фиолетовом свете в виде светящейся полосы.
14. Результат фотографируют. В лабораторном журнале на схеме расположения пробирок отмечают результаты.



## ОЧИСТКА ПЦР-ПРОДУКТА ИЗ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ИЛИ ИЗ ГЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ НАБОРА CLEANUP STANDART

### *Зона электрофореза*

- Весы точностью 0,01 г
- Набор Cleanup Standart
- Наконечники для пипеток всех объемов
- Перчатки
- Пипетки (объемом 0-10, 10-100 и 100-1000 мкл)
- Пробирки 1,5 или 2 мл
- Раствор хлорки для обработки поверхностей
- Скальпель
- Спирт этиловый (70%) для обработки рук
- Спиртостойкий маркер
- Термостат твердотельный
- Холодильник для хранения реактивов и ДНК
- Центрифуга, развивающая скорость до 15000 об/мин
- Штативы для пробирок на 1,5 или 2 мл
- 
- 
- 
- 
- 

### **Протокол работы**

Очистку ПЦР-продукта из реакционной смеси производят для удаления остатков праймеров, полимеразы, копий РНК и других сопутствующих продуктов реакции.

ПЦР-продукт, для которого на геле видна одна четкая полоса очищают по протоколу очистки из реакционной смеси, начиная с пункта В.

ПЦР-продукт, дающий на геле 2 и более четкие полосы, можно вырезать из геля и очистить отдельно каждую полосу. Очистку из геля начинают с пункта А.

#### *А. Экстракция ДНК из агарозного геля*

1. Вырезать фрагмент геля с целевой ДНК и взвесить. Поместить гель в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл. Вес геля в мг численно

приравнивается к его объему в мкл (2 мг геля = 2 мкл).

2. К гелю добавить 3 объема **Связывающего раствора S**, но не менее 350 мкл.

3. Инкубировать смесь при 50–55 °С до полного растворения геля. Для ускорения растворения рекомендуется перемешивать раствор встряхиванием пробирки.

4. Перейти к пункту С. Очистка ПЦР-продукта на колонке

#### *В. Экстракция ДНК из реакционных смесей*

5. Добавить 100 мкл **Связывающего раствора S**. Перемешать раствор.

6. Перейти к пункту С. Очистка ПЦР-продукта на колонке.

#### *С. Очистка ПЦР-продукта*

7. Поместить спин-колонку в собирательную пробирку.

8. Перенести пробу в колонку, дать постоять 3 минуты, и центрифугировать 40 с при 10 тыс об/мин. Удалить жидкость (фильтрат) из собирательной пробирки.

9. Добавить 700 мкл **Промывочного раствора** в колонку, дать постоять 1 минуту, центрифугировать 40 с. Удалить фильтрат.

10. Повторить предыдущий пункт.

11. Центрифугировать пустую колонку 1 мин для полного удаления промывочного раствора.

12. Поместить колонку в новую пробирку (1.5 мл).

13. Оставить при комнатной температуре на 5 мин для испарения остатка спирта.

14. Нанести в центр мембраны 20 мкл **Элюирующего раствора, нагретого до 50°С** (объем **Элюирующего** раствора можно уменьшить для увеличения концентрации ПЦР-продукта), дать постоять 5 минут.

15. Центрифугировать 40 с при 10 тыс об/мин.

16. При необходимости, можно вернуться к п. 14 и нанести элюирующий раствор повторно.

17. Очищенный ПЦР-продукт хранить при –20°С в холодильнике в грязной комнате. ! ПЦР-продукт нельзя выносить из зоны электрофореза.



## ПОСТАНОВКА СЕКВЕНСОВОЙ РЕАКЦИИ

### *Зона электрофореза*

- Набор BrilliantDye™ Terminator Kit
- Наконечники для пипеток всех объемов
- Перчатки резиновые
- Пипетки (объемом 0-10, 10-100 и 100-1000 мкл)
- Пробирки 0,2 мл
- Спирт этиловый (70%) для обработки рук
- Спиртостойкий маркер
- Холодильник для хранения реактивов и ДНК
- Центрифуга низкооборотистая с ротором на пробирки 0,2 мл
- Штативы для пробирок на 1,5 или 2 мл

### Протокол работы

1. Готовят реакцию смесь без ПЦР-продукта из расчета числа образцов (n) добавляя 1, смесь хорошо промешивают пипетированием, избегая образования пузырей.
2. Реакционную смесь вносят в подписанные пробирки на 0,2 мл **по 9 МКЛ** одним наконечником.
3. Добавляют в каждую пробирку ПЦР-продукт **по 1 МКЛ**, носики сменяют после каждого образца, контролируют внесение по положению следующего носика на штативе.
4. Сбрасывают капли на миницентрифуге.
5. Устанавливают пробирки в термоциклер. Программу секвенсированной реакции берут из протокола производителя BrilliantDye™.

### Расчет объема компонентов Сэнгер смеси (мкл)

Реагент	Объем, мкл * число пробирок	N = 8	N = 16
BrilliantDye™ Terminator	0,3*(n+1)	2,4	4,6
Буфер из набора	2,3*(n+1)	18,4	36,8
Праймер 10 pM	2*(n+1)	16	32
H <sub>2</sub> O	4,4*(n+1)	35,2	70,4
ДНК	по 1 мкл	по 1 мкл	по 1 мкл



## ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ СЕКВЕНСОВОЙ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ DYNABEADS® SEQUENCING CLEAN-UP

### *Зона электрофореза*

- Магнитный штатив для пробирок 0,2 мл
- Набор Dynabeads® Sequencing Clean-Up
- Наконечники для пипеток всех объемов
- Перчатки резиновые
- Пипетки (объемом 0-10, 10-100 и 100-1000 мкл)
- Пробирки 1,5 или 2 мл
- Спирт этиловый (70%) для обработки рук
- Спирт этиловый (96%)
- Вода дистиллированная (деионизированная)
- Спиртостойкий маркер
- Холодильник для хранения реактивов и ДНК
- Центрифуга низкооборотистая с ротором на пробирки 0,2 мл
- Цилиндры мерные на 10 мл (для разведения спирта)
- Штативы для пробирок на 1,5 или 2 мл

### **Протокол работы**

1. Поместить на **немагнитный** штатив продукт секвенсовой реакции в пробирках на 0,2 мл.
2. Добавить в пробирку 21 мкл раствора **Dynabeads®** (см. Примечания). Тщательно перемешать пипетированием.
3. Инкубировать при комнатной температуре в течение 15 мин. ! Время инкубации может быть уменьшено до 2 мин, если сигнал достаточный.
4. Поместить пробирки на магнитный штатив на 1-5 мин, после чего удалить супернатант пипеткой с носиком на 30 мкл. Не касаться магнитов на стенке пробирки! Удаление супернатанта из всех пробирок можно делать одним носиком.
5. Не снимая пробирок с магнитного штатива, добавить 40 мкл 85% этанола, дать постоять 2-3 минуты, после чего удалить супернатант пипеткой с носиком на 40 мкл.
6. Повторить добавление спирта и удаление супернатанта еще 1 или 2 раза. Остатки жидкости отобрать носиком 0-10 мкл, чтобы осадок остался максимально сухой. Удалить капли со стенок и крышки пробирки кусочками фильтровальной бумаги

7. Снять с магнитного штатива и оставить пробирки открытыми для просушки в течение 10 минут (или на термостате в течении 5 или меньше минут).

8. Добавить 35 мкл деионизированной воды.

9. Пипетировать до ресуспендирования гранул.

10. Инкубировать 2 мин при комнатной температуре.

11. Поместить пробирку на магнитный штатив на 3 мин. Аккуратно, не касаясь магнитов на стенке, перенести 21 мкл элюированного продукта в планшету/пробирку для секвенирования.

### Примечания:

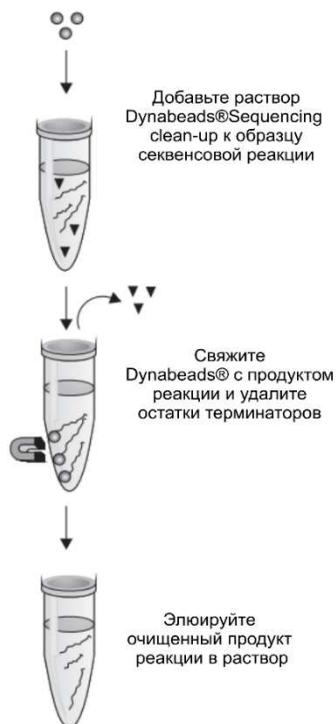
✓ При первом использовании набора добавьте **9,0 мл 96% этанола** в Dynabeads® Sequencing Clean-Up и тщательно перемешайте до получения однородной суспензии (Dynabeads® Solution). После добавления этанола пометьте бутылку датой добавления.

✓ Для промывки (пункт 3 протокола) всегда используйте **свежеприготовленный 85% этанол**. При масштабировании протокола для других объемов образцов всегда соблюдайте соотношение 1:2 образец: Dynabeads®.

✓ Рекомендуется переносить **25 мкл** из 30 мкл, использованных для элюирования, чтобы шарики надежно не переносились вместе с очищенным продуктом.

✓ Очищенный продукт секвенсовой реакции хранят **не более 24 часов** в холодильнике грязной комнаты при +4 °С

✓ На секвенирование принимается число образцов **кратное 8**.





## ПАМЯТКА ПО РАЗВЕДЕНИЮ РАСТВОРОВ

<b>Развести раствор один к 10</b>	Взять одну часть реагента А и 10 частей реагента Б <b>(1:10)</b>
<b>Разбавить раствор в 10 раз</b>	Взять одну часть реагента А и 9 частей реагента Б <b>(1:9)</b>
При приготовлении раствора вещества заданной молярной концентрации <b>массу навески вещества (m)</b> вычисляют по формуле:	<b><math>m = C_M * V * M / 1000</math> (г)</b> где $C_M$ – молярная концентрация раствора, моль/л, $V$ – объем раствора, мл, $M$ – молярная масса веществ, г/моль
При приготовлении рабочего раствора <b>праймеров (<math>C_2</math>)</b> из матричного раствора ( $C_1$ ) пользуются формулой:	<b><math>V_1 = C_2 V_2 / C_1</math></b> <b><math>V \text{ воды} = V_2 - V_1</math></b> где $C_1$ – концентрация матричного раствора = 163 pM $C_2$ – концентрация рабочего раствора = 15 pM $V_1$ – объем матричного раствора, который необходимо взять $V_2$ – общий объем рабочего раствора

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТВЕ БУФЕРА (10X, pH=8.3)

<b>Tris base</b>	108 г
<b>Boric acid</b>	55 г
<b>EDTA (0.5 M)</b>	40 мл или 43.84 г
<b>H<sub>2</sub>O</b>	довести до 1 л общего объема

## ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРА ДНК С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРИМЕТРА QUBIT 4

1. Тонкостенные пробирки для флуориметра на 0,5 мл выставляют на штатив, подписывают на крышках пробирках (недопустимо подписывать сбоку, поскольку это повредит прохождению сигнала через пробирку).

2. В подписанных пробирках готовят раствор Qubit® working solution и ДНК так, чтобы общий объем составил 200 мкл: допустимо использовать образец ДНК объемом от 1 до 20 мкл. Например, 1 мкл ДНК + 199 Qubit® working solution.

3. Пробирки с раствором поочередно ставят в лунку флуориметра и проводят измерения пользуясь подсказками меню, как на картинке.

4. Периодически перед измерениями проводят калибровку флуориметра, для чего готовят два калибровочных раствора (190 мкл Qubit® working solution и 10 мкл стандарта для каждой пробирки).

