

**Набор реагентов для экстракции ДНК
«М-Сорб»**

Содержание

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	3
1.1. Описание набора.....	3
1.2. Область применения	3
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	4
2.1. Состав набора.....	4
2.2. Количество анализируемых проб	4
2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности	4
2.4. Дополнительное оборудование и материалы, не входящие в состав набора	4
3. СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ.....	5
3.1. Лизис.....	5
3.2. Связывание геномной ДНК с магнитными частицами.....	5
3.3. Отмывка связанной ДНК	6
3.4. Десорбция.....	6
4. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТОКОЛЫ	7
4.1. Выделение ДНК из крови на картах, физиологических жидкостей (слюна, сперма) на тканевом носителе.....	7
4.2. Выделение ДНК из навески ткани	8
4.3. Выделение ДНК из буккальных клеток	9
4.4. Выделение ДНК из суспензии клеток	10
4.5. Выделение ДНК из образцов с увеличенным объемом	11

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание набора

Комплект реагентов предназначен для выделения геномной ДНК на магнитном сорбенте. Эффективность выделения ДНК зависит от количества, качества и типа исходного материала.

Стандартный протокол набора «М-Сорб» может быть использован для выделения препаратов ДНК из большинства типов биологических образцов: физиологических жидкостей, тканей, мазков, буккального эпителия, биологических образцов, адсорбированных на твердом носителе, суспензии клеток. Так же возможно масштабирование протокола для выделения из образцов с увеличенным объемом.

Оптимальное количество для внесения зависит от типа, срока хранения и поверхности носителя биологического образца.

Примеры соответствующих типов образцов и их количеств, взятых для выделения препаратов ДНК с использованием стандартного протокола, приведены в Таблице 1.

Приблизительный количественный выход ДНК из 1 мкл не замороженной жидкой крови составляет 2 нг/мкл.

В каждой лаборатории должно быть проведено самостоятельное независимое исследование, для определения количественного выхода ДНК.

Таблица 1

Тип образца	Максимальное количество
Жидкая кровь, слюна, сперма	до 100 мкл
Кровь (на картах или на тканевом носителе)	до 25 мм ²
Физиологические жидкости (слюна, сперма) на тканевом носителе	до 25 мм ²
Навеска ткани	20 мг
Буккальный эпителий, мазки на специализированных аппликаторах/ватных палочках	не более 1 аппликатора / ватной палочки
Суспензия клеток (10 ⁶)	400 мкл

1.2. Область применения

Набор может быть использован в молекулярно-генетических лабораториях, занимающихся выделением и дальнейшим анализом геномной ДНК.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «М-Сорб» не требует постановки калибровочных образцов.

2.1. Состав набора

№	Название	Описание	Количество
1.	Лизирующий раствор	Бесцветная прозрачная жидкость	20 мл
2.	Сорбирующий раствор	Суспензия магнитных частиц	5 мл
3.	Осаждающий раствор	Бесцветная прозрачная жидкость	10 мл
4.	Промывочный раствор	Бесцветная прозрачная жидкость	50 мл
5.	Элюирующий раствор	Бесцветная прозрачная жидкость	1,25 мл

2.2. Количество анализируемых проб

Каждый набор для выделения препаратов ДНК рассчитан для выполнения 50 экстракций.

2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности

Хранить в темноте.

Температура хранения – от +4 до +25°C в темноте.

Транспортирование – при температуре +4 до +8°C в темноте.

Срок годности набора – 12 месяцев

ВАЖНО! Пробирку с магнитными частицами не замораживать.

2.4. Дополнительное оборудование и материалы, не входящие в состав набора

1. Термошейкер или Термостат;
2. Высокоскоростная центрифуга;
3. Микроцентрифуга-вортекс;
4. Микроцентрифужные пробирки, не содержащие ДНКазы и РНКазы (1,5 или 2,0 мл);
5. Магнитный штатив для пробирок;
6. Набор пипеток переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.;
7. Наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.

3. СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ

Стандартный протокол может быть использован для выделения препаратов ДНК из жидкой крови, слюны, спермы.

Тип образца	Максимальное количество
Жидкая кровь, слюна, сперма	до 100 мкл

3.1. Лизис

Предварительная подготовка

Перед началом работы все компоненты набора извлечь из холодильника и выдержать при комнатной температуре (18-25°C) в течении 30 минут. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50-60°C до полного растворения осадка.

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контрольный образец выделения (ОКО-В). В качестве ОКО-В использовать 100 мкл деионизованной воды.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
2. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
3. Добавить к образцу 400 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 секунд, центрифугировать для сброса капель. Поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 10 мин при 75°C (900 об/мин). При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 15 мин в термостате при 75°C, встряхивая пробирки на вортексе и кратко центрифугируя каждые 2-3 мин.

ПРИМЕЧАНИЕ! Если в образцах после лизиса видны сгустки, рекомендуется центрифугировать образцы в течении 10 мин при 15 000 об/мин (21 000g). Для дальнейшего выделения использовать только надосадочную жидкость.

3.2. Связывание геномной ДНК с магнитными частицами

Сорбирующий раствор тщательно перемешать (чтобы не осталось осадка на дне флакона)

ПРИМЕЧАНИЕ! При работе с большим количеством образцов сорбирующий компонент необходимо встряхивать каждые 5 минут, в течении всего времени работы с ним.

1. В пробирку с исследуемым образцом внести 100 мкл *Сорбирующего раствора*.
2. Добавить 200 мкл *Осаждающего раствора*. Тщательно перемешать содержимое пробирки, до равномерного распределения сорбента.
3. Поместить пробирку на 10 мин в шейкер (900 об/мин) при комнатной температуре. В отсутствии шейкера возможно оставить пробирку с образцом при

комнатной температуре на 10 мин, перемешивая и кратко центрифугируя на микроцентрифуге-вортке каждые 2-3 мин.

4. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге-вортке для сброса капель, затем установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Максимально удалить супернатант.

3.3. Отмывка связанной ДНК

1. Добавить в пробирку 500 мкл *Промывочного раствора*. Перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортке до равномерного распределения сорбента.
2. Центрифугировать пробирку с образцом в течение 30 сек для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Удалить надосадочную жидкость.
3. Повторно добавить в пробирку 500 мкл *Промывочного раствора*. Перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортке до равномерного распределения сорбента.
4. Центрифугировать пробирку с образцом в течение 30 сек для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Максимально удалить супернатант.

ВАЖНО! Удаляя супернатант, старайтесь не затрагивать осадок с магнитными частицами.

3.4. Десорбция

1. Нагреть термошейкер или термостат до 70°C.
2. Добавить в пробирку с образцом 100 мкл *Элюирующего раствора*. Перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортке до равномерного распределения сорбента.
3. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать в течении 10 мин при температуре 70°C (900 об/мин). При отсутствии термошейкера, поместить пробирку с образцом в термостат и инкубировать в течении 10 мин при температуре 70°C, перемешивая и кратко центрифугируя на микроцентрифуге-вортке каждые 2-3 мин.
4. Центрифугировать пробирки в течение 30 сек. для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин.
5. Аккуратно, не затрагивая магнитный сорбент, перенести 90 мкл надосадочной жидкости в чистую микроцентрифужную пробирку.

ПРИМЕЧАНИЕ! Если некоторое количество магнитного сорбента было перенесено вместе с раствором ДНК, перед постановкой ПЦР необходимо пробирки с образцами установить на 1-2 мин в магнитный штатив во избежание попадания магнитных частиц в пробирки с ПЦР-смесью и ингибирования реакции ПЦР.

ПРИМЕЧАНИЕ! Раствор ДНК может храниться при температуре от 2 до 8°C в течение суток и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

4. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТОКОЛЫ

4.1. Выделение ДНК из крови на картах, физиологических жидкостей (слюна, сперма) на тканевом носителе

Подготовка образца

Тип образца	Максимальное количество
Кровь (на картах или на тканевом носителе)	до 25 мм ²
Физиологические жидкости (слюна, сперма) на тканевом носителе	до 25 мм ²

Вырезать часть носителя (карта, ткань) с биологическим образцом и поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
2. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
3. Добавить к образцу 400 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 секунд, центрифугировать для сброса капель. Поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 15 мин при 75°C (900 об/мин). При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 10 мин в термостате при 75°C, встряхивая пробирки на вортексе и кратко центрифугируя каждые 2-3 мин.
5. Центрифугировать пробирки 2 мин при 15 000 об/мин (21 000g), осторожно, не забирая осадок, перенести супернатант в новую пробирку в соответствии с маркировкой.
6. Далее следовать процедурам стандартного протокола: **Связывание геномной ДНК с магнитными частицами** (стр. 5), **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).

4.2. Выделение ДНК из навески ткани

Подготовка образца

Тип образца	Максимальное количество
Навеска ткани	20 мг

Гомогенизировать навеску исследуемой ткани и поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
2. Добавить к образцу 400 мкл *Лизирующего раствора*.
3. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 секунд, центрифугировать для сброса капель. Поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 15 мин при 75°C (900 об/мин). При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 15 мин в термостате при 75°C, встряхивая пробирки на вортексе и кратко центрифугируя каждые 2-3 мин.
4. Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 15 000 об/мин (21 000g).
5. Перенести супернатант в чистую микроцентрифужную пробирку, согласно маркировке.
6. Далее следовать процедурам стандартного протокола: **Связывание геномной ДНК с магнитными частицами** (стр. 5), **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).

4.3. Выделение ДНК из буккальных клеток

Подготовка образца

Тип образца	Максимальное количество
Буккальный эпителий, мазки на специализированных аппликаторах/ватных палочках	не более 1 аппликатора / ватной палочки

При использовании ватных палочек отрезать ватную часть поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
2. Добавить к образцу 400 мкл *Лизирующего раствора*.
3. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 секунд, центрифугировать для сброса капель. Убедиться, что образец полностью погружен в раствор.
4. Поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 10 мин при 75°C (900 об/мин). При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 15 мин в термостате при 75°C, встряхивая пробирки на вортексе и кратко центрифугируя каждые 2-3 мин.
5. Ватные палочки извлечь из пробирки, используя пинцет, и максимально отжать о стенку микропробирки.
6. Далее следовать процедурам стандартного протокола: **Связывание геномной ДНК с магнитными частицами** (стр. 5), **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).

4.4. Выделение ДНК из суспензии клеток

Подготовка образца

Тип образца	Максимальное количество
Суспензия клеток (10^6)	400 мкл

Суспензию клеток поместить в 2 мл пробирку. Центрифугировать 5 мин при 15 000 об/мин (21 000g). Верхнюю надосадочную жидкость отбросить.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
2. Добавить к образцу 400 мкл *Лизирующего раствора*.
3. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 секунд, центрифугировать для сброса капель. Поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 10 мин при 75°C (900 об/мин). При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 15 мин в термостате при 75°C, встряхивая пробирки на вортексе и кратко центрифугируя каждые 2-3 мин.
4. Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 15 000 об/мин (21 000g).
5. Перенести супернатант в чистую микроцентрифужную пробирку, согласно маркировке.
6. Далее следовать процедурам стандартного протокола: **Связывание геномной ДНК с магнитными частицами** (стр. 5), **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).

4.5. Выделение ДНК из образцов с увеличенным объемом

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
2. Добавить к образцу 600 мкл *Лизирующего раствора*.
3. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 секунд, центрифугировать для сброса капель. Поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 15 мин при 75°C (900 об/мин). При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 15 мин в термостате при 75°C, встряхивая пробирки на вортексе и кратко центрифугируя каждые 2-3 мин.

ВАЖНО! Не рекомендуется добавлять более 600 мкл. *Лизирующего раствора*.

ПРИМЕЧАНИЕ! Если в лизатах видны сгустки или темные вкрапления, рекомендуется центрифугировать образцы в течении 5 мин при 15 000 об/мин (21 000g). Для дальнейшего выделения использовать только надосадочную жидкость.

Связывания геномной ДНК с магнитными частицами

Сорбирующий раствор тщательно перемешать (чтобы не осталось осадка на дне флакона).

ПРИМЕЧАНИЕ! При работе с большим количеством образцов сорбирующий компонент необходимо встряхивать каждые 5 мин, в течении всего периода времени работы с ним.

1. В пробирку с лизированным образцом добавить 100 мкл *Сорбирующего раствора*.
2. Закрыть крышку, пробирку встряхнуть на вортексе и кратко отцентрифугировать.
3. Добавить 400 мкл *Осаждающего раствора*. Тщательно перемешать содержимое пробирки, до равномерного распределения сорбента.
4. Поместить пробирку на 10 мин в шейкер при комнатной температуре (900 об/мин). При отсутствии шейкера возможно оставить пробирку с образцом при комнатной температуре на 10 минут, перемешивая и кратко центрифугируя на микроцентрифуге-вортексе каждые 2-3 мин.
5. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель, затем установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Максимально удалить супернатант.
6. Далее следуйте процедурам стандартного протокола: **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).