

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА СПИН-КОЛОНКАХ «К-СОРБ-100»

Набор реагентов предназначен для выделения ДНК из биологического материала (цельная кровь, слюна, ткань, буккальный эпителий, клеточный осадок).

Состав набора:

№	Название компонентов	Объем, мл	Количество
1	Лизирующий раствор 1	30	1
2	Лизирующий раствор 2*	30	1
3	Осаждающий раствор	20	1
4	Спин-колонка с пробиркой без крышки	-	100
5	Промывочный раствор 1*	50	1
6	Промывочный раствор 2	50	2
7	Элюирующий раствор	10	1
Протеиназа К (5 мг)		0,5	4
Буфер для растворения протеиназы К		1	2
Инструкция		-	1

* Содержит гуанидингидрохлорид

Условия хранения:

Спин-колонки **4** хранятся при температуре от 4 до 25°C и сохраняют стабильность в таких условиях не менее одного года после доставки. Растворы **1 – 3** и **5 – 7** можно хранить при комнатной температуре. Протеиназа К сохраняет стабильность в лиофилизированном виде при температуре от - 25 до + 4 °С, а после добавления буфера при температуре от - 25 до - 16 °С не менее одного года.

Протеиназа К - 25...- 16°C, после добавления буфера
 Растворы 1- 7 + 4...+ 25°C, в темном месте

Срок годности:12 месяцев при соблюдении условий хранения.

Область применения:

Набор «К-СОРБ» предназначен для научно-исследовательской работы. Данный продукт не предназначен для проведения диагностических исследований, а также профилактики и лечения заболеваний.

Техника безопасности при работе с набором:

При работе с реагентами набора обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки. **ВНИМАНИЕ!** НЕ добавляйте хлорсодержащие дезинфицирующие вещества и кислые растворы непосредственно в отходы, образовавшиеся в результате работы с реагентами. **Лизирующий раствор 2** и **Промывочный раствор 1** содержат гуанидингидрохлорид, который в сочетании с этими веществами может образовывать высокоактивные соединения. При пролипании жидкости, содержащей гуанидингидрохлорид, вымойте загрязненную поверхность водой. Если пролитая жидкость содержит потенциальные возбудители инфекции, вымойте загрязненный участок сначала водным раствором с моющим средством, а затем 1 % (объемное содержание) раствором гипохлорита натрия.

Принцип действия и порядок работы:

- Лизис: образец биологического материала распадается в денатурирующих условиях с протеиназой К
- Связывание: ДНК связывается с мембраной спин-колонки, а примеси проходят через нее
- Промывка: оставшиеся примеси вымываются с мембраны спин-колонки
- Элюирование: чистая, концентрированная ДНК элюируется с мембраны спин-колонки

Список дополнительного оборудования и материалов:

1. Высокоскоростная центрифуга для микропробирок 1,5 или 2 мл;
2. Термостат или термошейкер для микропробирок 1,5 или 2 мл;
3. Встряхиватель для микропробирок;
4. Дозатор переменного объема на 1000, 200 и 20 мкл и наконечники к ним с аэрозольным барьером и без него;
5. Штатив для пробирок 1,5-2,0 мл;
6. Микропробирки объемом 1,5 или 2 мл;
7. Вакуумный насос и наконечники без фильтра (опционально).

Рекомендации по работе со спин-колонками:

В силу чувствительности методов амплификации ДНК, во избежание перекрестной контаминации образцов, необходимо принимать следующие меры предосторожности в обращении со спин-колонками:

- Соблюдайте осторожность при нанесении образца или реагента на спин-колонку. При переносе образца в спин-колонку с помощью дозатора не допускайте попадания образца на края спин-колонки.
- Всегда заменяйте наконечники между операциями переноса жидкости. Рекомендуется использовать наконечники дозаторов с аэрозольным барьером.
- Не допускайте соприкосновения наконечника дозатора с мембраной спин-колонки.
- После выполнения всех этапов перемешивания кратковременно центрифугируйте пробирки для удаления капель жидкости с внутренней стороны крышек.
- Открывайте последовательно только по одной спин-колонке и соблюдайте осторожность во избежание формирования аэрозолей.
- Всю процедуру необходимо выполнять в перчатках. В случае соприкосновения перчаток с образцом немедленно замените перчатки.

Центрифугирование: спин-колонки помещаются в стандартные пробирки 1,5–2 мл. Все этапы центрифугирования следует выполнять при комнатной температуре (18–25°C).

Подготовка к работе:

Добавьте к лиофилизированной Протеиназе К 500 мкл буфера для растворения протеиназы К. После добавления буфера фермент следует хранить от -16 до -25 °C.

Важные рекомендации перед началом работы:

- Выполняйте все этапы центрифугирования при комнатной температуре (18–25°C)
- Доведите исследуемые образцы до комнатной температуры.
- Доведите *Элюирующий раствор (7)* до комнатной температуры.
- Включите термостат и установите температуру 56°C.
- Если *Лизирующий раствор 1 (1)* или *Лизирующий раствор 2 (2)* содержит осадок, растворите осадок нагреванием до 56°C, перемешайте раствор переворачиванием.

ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КРОВИ И СЛЮНЫ

Данный протокол предусмотрен для выделения общей (геномной и митохондриальной) ДНК из **1–100 мкл цельной крови** с антикоагулянтом ЭДТА, цитратом или гепариновыми антикоагулянтами либо из **1–100 мкл слюны**.

Важное замечание перед началом работы:

- Выполняйте все этапы центрифугирования при комнатной температуре (18–25°C)

Необходимые действия перед началом процедуры:

- Доведите образцы до комнатной температуры (18–25°C).
- Доведите *Элюирующий раствор (7)* до комнатной температуры.
- Включите термостат и установите температуру 56°C
- Если *Лизирующий раствор 1 (1)* или *Лизирующий раствор 2 (2)* содержит осадок, растворите осадок нагреванием до 56°C, перемешайте раствор переворачиванием.

1. Внесение образца

Промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1,5 или 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все пробирки (кроме «ОКО-В») внесите от **1** до **100 мкл** крови или слюны. Если количество образца меньше **100 мкл**, доведите его до нужного объема с помощью *Лизирующий раствор 1 (1)*.

2. Лизис

- Во все пробирки внесите **10 мкл Протеиназы К** и **100 мкл Лизирующего раствора 2 (2)**. Закройте крышку и тщательно перемешайте содержимое на встряхивателе 15 с.
- Поместите пробирку в термошейкер, установите скорость 900 об/мин и инкубируйте при 56°C в течение 10 мин. Если используется термостат, периодически перемешивайте содержимое пробирок на встряхивателе в течение 10 с.

3. Осаждение ДНК

- Сбросьте капли с крышки кратковременным центрифугированием, добавьте **100 мкл Осаждающего раствора (3)**. Перемешайте содержимое пробирок на встряхивателе.
- Сбросьте капли с крышек краткосрочным центрифугированием. Перенесите весь объем на *спин-колонку (4)*.
- Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Если лизат не полностью прошел через мембрану при центрифугировании, выполните центрифугирование повторно с более высокой скоростью, пока спин-колонка не очистится. Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или микропипетку. Для этого, аккуратно извлеките спин-колонку и, удерживая ее в одной руке, удалите жидкость из пробирки, затем верните спин-колонку в пробирку без крышки.

4. Промывка ДНК

- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 1 (5)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 2 (6)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 2 (6)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Центрифугируйте 2 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Осторожно перенесите спин-колонки в чистые пробирки на 1,5 мл и утилизируйте пробирку без крышки.
- Откройте крышку спин-колонки и инкубируйте спин-колонку при комнатной температуре в течение 10 мин или при 56°C в течение 3 мин.

5. Элюция ДНК

- Добавьте **от 30 до 100 мкл Элюирующего раствора (7)**.
Важно! Убедитесь, что раствор (7) доведен до комнатной температуры.
При использовании малых элюирующих объемов (<50 мкл) нанесите *Элюирующий раствор (7)* по центру мембраны,
- Инкубируйте 5 мин при комнатной температуре.
- Центрифугируйте 1 мин при 12 000 rpm (13500 rcf). Полученный раствор ДНК храните при -20 °C. Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4 °C.

Примечание: элюция при 80°C в течение не более 5 мин позволяет дополнительно увеличить (на 10-30%) концентрацию ДНК.

ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ТКАНЕЙ

Данный протокол предусмотрен для выделения общей (геномной и митохондриальной) ДНК из образцов **тканей массой менее 10 мг**.

Важное замечание перед началом работы:

- Выполняйте все этапы центрифугирования при комнатной температуре (18–25°C)

Необходимые действия перед началом процедуры:

- Доведите образцы до комнатной температуры (18–25°C).
- Доведите *Элюирующий раствор (7)* до комнатной температуры.
- Включите термостат и установите температуру 56°C
- Если *Лизирующий раствор 1 (1)* или *Лизирующий раствор 2 (2)* содержит осадок, растворите осадок нагреванием до 56°C, перемешайте раствор переворачиванием.

1. Внесение образца

Промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1,5 или 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все пробирки (кроме «ОКО-В») перенесите образец **ткани массой менее 10 мг**. Добавьте **200 мкл Лизирующего раствора 1 (1)** и доведите смесь до комнатной температуры (18–25°C).

2. Лизис

- Добавьте **20 мкл Протеиназы К**, закройте крышку и перемешайте содержимое пробирок на встряхивателе 15 с.
- Поместите пробирку в термощейкер, установите скорость 900 об/мин и инкубируйте при 56°C в течение ночи или до полного лизиса образца.

Примечание: Для лизирования небольших количеств ткани требуется 4–6 ч, но наилучшие результаты достигаются при лизировании в течение ночи.

Если используется термостат, при возможности периодически перемешивайте содержимое пробирок на встряхивателе в течение 10 с для улучшения лизиса.

- Сбросьте капли с крышки кратковременным центрифугированием, добавьте **200 мкл Лизирующего раствора 2 (2)**, закройте крышку и перемешайте содержимое пробирок на встряхивателе 15 с

3. Осаждение ДНК

- Сбросьте капли с крышки кратковременным центрифугированием, добавьте **200 мкл Осаждающего раствора (3)**. Перемешайте содержимое пробирок на встряхивателе.
- Сбросьте капли с крышек кратковременным центрифугированием. Перенесите весь объем на *спин-колонку (4)*.
- Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Если лизат не полностью прошел через мембрану при центрифугировании, выполните центрифугирование повторно с более высокой скоростью, пока спин-колонка не очистится.
- Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор. Для этого, аккуратно извлеките спин-колонку и, удерживая ее в одной руке, удалите жидкость из пробирки, затем верните спин-колонку в пробирку без крышки.

4. Промывка ДНК

- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 1 (5)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 2 (6)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 2 (6)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Центрифугируйте 2 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Осторожно перенесите спин-колонки в чистые пробирки на 1,5 мл и утилизируйте пробирку без крышки.
- Откройте крышку спин-колонки и инкубируйте спин-колонку при комнатной температуре в течение 10 мин или при 56°C в течение 3 мин.

5. Элюция ДНК

- Добавьте от **30 до 100 мкл Элюирующего раствора (7)**.
Важно! Убедитесь, что раствор (7) доведен до комнатной температуры.
При использовании малых элюирующих объемов (<50 мкл) нанесите *Элюирующий раствор (7)* по центру мембраны,
- Инкубируйте 5 мин при комнатной температуре.
Центрифугируйте 1 мин при 12 000 rpm (13500 rcf). Полученный раствор ДНК храните при -20 °C. Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4 °C.

Примечание: элюция при 80°C в течение не более 5 мин позволяет дополнительно увеличить (на 10–30%) концентрацию ДНК.

ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ МАЗКОВ БУККАЛЬНОГО ИЛИ ПОВЕРХНОСТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Данный протокол предусмотрен для выделения общей (геномной и митохондриальной) ДНК из **мазков буккального или поверхностного эпителия**.

Важное замечание перед началом работы:

- Выполняйте все этапы центрифугирования при комнатной температуре (18–25°C)

Необходимые действия перед началом процедуры:

- Доведите образцы до комнатной температуры (18–25°C).
- Доведите *Элюирующий раствор (7)* до комнатной температуры.
- Включите термостат и установите температуру 56°C
- Если *Лизирующий раствор 1 (1)* или *Лизирующий раствор 2 (2)* содержит осадок, растворите осадок нагреванием до 56°C, перемешайте раствор переворачиванием.

1. Внесение образца

Промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1,5 или 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все пробирки (кроме «ОКО-В») поместите образец буккального или поверхностного эпителия. Если используется мазок на ватном зонд-тампоне, медицинском зонд-тампоне из дакрона (полиэстера), вискозы или нейлона, отделите мазок от стержня с помощью ножниц. Добавьте **300 мкл Лизирующего раствора 1 (1)** и доведите смесь до комнатной температуры (15–25°C).

2. Лизис

- Добавьте **20 мкл протеиназы К**, закройте крышку и перемешайте содержимое пробирок на встряхивателе 15 с.
- Поместите пробирку в термошейкер, установите скорость 900 об/мин и инкубируйте при 56°C в течение часа. Если используется термостат, периодически перемешивайте содержимое пробирок на встряхивателе в течение 10 с для улучшения лизиса.
- Сбросьте капли с крышки кратковременным центрифугированием, добавьте **300 мкл Лизирующего раствора 2 (2)**, закройте крышку и перемешайте содержимое пробирок на встряхивателе 15 с. Поместите пробирку в термошейкер и инкубируйте при 70°C со скоростью 900 об/мин в течение 10 мин. Если используется термостат, периодически перемешивайте содержимое пробирок на встряхивателе в течение 10 с для улучшения лизиса.

3. Осаждение ДНК

- Сбросьте капли с крышки кратковременным центрифугированием, добавьте **200 мкл Осаждающего раствора (3)**. Перемешайте содержимое пробирок на встряхивателе.
- Сбросьте капли с крышек кратковременным центрифугированием. Перенесите весь объем на *спин-колонку (4)*.
- Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Если лизат не полностью прошел через мембрану при центрифугировании, выполните центрифугирование повторно с более высокой скоростью, пока спин-колонка не очистится.
- Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор. Для этого, аккуратно извлеките спин-колонку и, удерживая ее в одной руке, удалите жидкость из пробирки, затем верните спин-колонку в пробирку без крышки.

4. Промывка ДНК

- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 1 (5)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 2 (6)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Нанесите на спин-колонку **500 мкл Промывочного раствора 2 (6)**. Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Центрифугируйте 2 мин при 10 000 rpm (9000 gcf). Осторожно перенесите спин-колонки в чистые пробирки на 1,5 мл и утилизируйте пробирку без крышки. Откройте крышку спин-колонки и инкубируйте спин-колонку при комнатной температуре в течение 10 мин или при 56°C в течение 3 мин.

5. Элюция ДНК

- Добавьте от **30 до 100 мкл Элюирующего раствора (7)**.
Важно! Убедитесь, что раствор (7) доведен до комнатной температуры. При использовании малых элюирующих объемов (<50 мкл) нанесите *Элюирующий раствор (7)* по центру мембраны.
- Инкубируйте 5 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 1 мин при 12 000 rpm (13500 gcf). Полученный раствор ДНК храните при -20 °C. Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4 °C.

Примечание: элюция при 80°C в течение не более 5 мин позволяет дополнительно увеличить (на 10-30%) концентрацию ДНК.

ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КЛЕТОЧНОГО ОСАДКА

Данный протокол предусмотрен для выделения общей (геномной и митохондриальной) ДНК из клеточного осадка.

Важное замечание перед началом работы:

- Выполняйте все этапы центрифугирования при комнатной температуре (18–25°C)

Необходимые действия перед началом процедуры:

- Доведите образцы до комнатной температуры (18–25°C).
- Доведите *Элюирующий раствор* (7) до комнатной температуры.
- Включите термостат и установите температуру 56°C
- Если *Лизирующий раствор 1* (1) или *Лизирующий раствор 2* (2) содержит осадок, растворите осадок нагреванием до 56°C, перемешайте раствор переворачиванием.

1. Внесение образца

Промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1,5 или 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все пробирки (кроме «ОКО-В») перенесите от 1 до 1.5мл питательной среды, содержащей клеточный осадок. Центрифугируйте пробирки от 8000 до 10000 об. в мин. 2 минуты. Удалите жидкость из пробирки не задевая осадок. Добавьте **100 мкл** *Лизирующего раствора 1* (1) и доведите смесь до комнатной температуры (15–25°C). Если материал посева взят бактериальной петлёй или шпателем необходимо аккуратно перенести образец в пробирку с уже заранее внесённым *Лизирующим раствором 1* (1).

2. Лизис

- Добавьте **10 мкл протеиназы К** и **100 мкл** *Лизирующего раствора 2* (2). Закройте крышку и тщательно перемешайте содержимое на встряхивателе 15 с.
- Поместите пробирку в термошейкер, установите скорость 900 об/мин и инкубируйте при 56°C в течение 10 мин. Если используется термостат, периодически перемешивайте содержимое пробирки на встряхивателе в течение 10 с для улучшения лизиса.

3. Осаждение ДНК

- Сбросьте капли с крышки кратковременным центрифугированием, добавьте **100 мкл** *Осаждающего раствора* (3). Перемешайте содержимое пробирок на встряхивателе.
- Сбросьте капли с крышек кратковременным центрифугированием. Перенесите весь объем на *спин-колонку* (4).
- Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Если лизат не полностью прошел через мембрану при центрифугировании, выполните центрифугирование повторно с более высокой скоростью, пока спин-колонка не очистится.
- Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор. Для этого, аккуратно извлеките спин-колонку и, удерживая ее в одной руке, удалите жидкость из пробирки, затем верните спин-колонку в пробирку без крышки.

4. Промывка ДНК

- Нанесите на спин-колонку **500 мкл** *Промывочного раствора 1* (5). Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Нанесите на спин-колонку **500 мкл** *Промывочного раствора 2* (6). Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Нанесите на спин-колонку **500 мкл** *Промывочного раствора 2* (6). Центрифугируйте 1 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Удалите жидкость из пробирки без крышки, используя вакуумный насос или дозатор.
- Центрифугируйте 2 мин при 10 000 rpm (9000 rcf). Осторожно перенесите спин-колонки в чистые пробирки на 1,5 мл и утилизируйте пробирку без крышки. Откройте крышку спин-колонки и инкубируйте спин-колонку при комнатной температуре в течение 10 мин или при 56°C в течение 3 мин.

5. Элюция ДНК

- Добавьте от **30 до 100 мкл** *Элюирующего раствора* (7).
Важно! Убедитесь, что раствор (7) доведен до комнатной температуры. При использовании малых элюирующих объемов (<50 мкл) нанесите *Элюирующий раствор* (7) по центру мембраны.
- Инкубируйте 5 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 1 мин при 12 000 rpm (13500 rcf). Полученный раствор ДНК храните при - 20 °C. Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4 °C.

Примечание: элюция при 80°C в течение не более 5 мин позволяет дополнительно увеличить (на 10-30%) концентрацию ДНК.