

**«Pure Blood DNA»**

**Набор реагентов для выделения ДНК из цельной крови**

**ИНСТРУКЦИЯ по применению**

## Содержание

|   |   |
|---|---|
| 1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....                                    | 3 |
| 1.1. Описание набора .....  | 3 |
| 1.2. Область применения.....  | 3 |
| 2. ХАРАКТЕРИСТИКА 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. ПРОТОКОЛЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК .....  | 5 |
| 3.1. Выделение ДНК из 100–200 мкл цельной крови.....                            | 5 |
| 3.1.1. Лизис .....  | 5 |
| Предварительная подготовка .....  | 5 |
| Проведение лизиса .....   | 5 |
| 3.1.2. Связывание геномной ДНК с магнитными частицами .....                     | 5 |
| 3.1.3. Отмывка связанной ДНК .....  | 5 |
| 3.1.4. Десорбция.....   | 6 |
| 3.2. Выделение из 300–500 мкл цельной крови .....                               | 6 |
| 3.2.1. Лизис .....  | 6 |
| Предварительная подготовка .....  | 6 |
| Проведение внешнего лизиса .....  | 6 |
| 3.2.2. Связывание геномной ДНК с магнитными частицами .....                     | 7 |
| 3.2.3. Отмывка связанной ДНК .....  | 7 |
| 3.2.4. Десорбция.....   | 7 |

## 1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

### 1.1. Описание набора

Комплект реагентов предназначен для ручного выделения ДНК. Эффективность выделения ДНК зависит от количества и качества исходного материала.

Набор позволяет выделять ДНК из **100–400 мкл** цельной крови.

Приблизительный количественный выход ДНК из **200 мкл** цельной крови составляет от **15** до **90 нг/мкл** при элюции в 100 мкл (Выход оценивали исходя из данных по ПЦР).

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

### 1.2. Область применения

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

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Состав набора

| № | Название              | Описание   | Количество |
|---|-----------------------|--|------------|
| 1 | Лизирующий раствор    | Бесцветная прозрачная жидкость                     | 2*25 мл    |
| 2 | Осаждающий раствор    | Бесцветная прозрачная жидкость                     | 2*15 мл    |
| 3 | Сорбирующий раствор   | Суспензия магнитных частиц темно-коричневого цвета | 3*1 мл     |
| 4 | Промывочный раствор 1 | Бесцветная прозрачная жидкость                     | 90 мл      |
| 5 | Промывочный раствор 2 | Бесцветная прозрачная жидкость                     | 90 мл      |
| 6 | Элюирующий раствор    | Бесцветная прозрачная жидкость                     | 2*5 мл     |

### 2.2. Количество анализируемых проб

Набор рассчитан для выполнения:

100 экстракций при выделении из 100–200 мкл цельной крови

50 экстракций при выделении из 300–400 мкл цельной крови

### 2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности

Хранить в темноте.

Температура хранения – от +4 до +25 °С в темноте (сорбирующий раствор при +4).

Транспортирование – от +4 до +25 °С в темноте (сорбирующий раствор при +4).

Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении условий хранения.

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

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

### 3. ПРОТОКОЛЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

#### 3.1. Выделение ДНК из 100–200 мкл цельной крови

##### 3.1.1. Лизис

###### Предварительная подготовка

Перед началом работы все компоненты набора извлечь из холодильника и выдержать при комнатной температуре (21–25 °С) в течение 30 мин.

**ВНИМАНИЕ!** Лизирующий раствор не должен содержать осадка и должен быть прозрачным после выдерживания в течение 30 мин при 25 °С.

###### Проведение лизиса

1. Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб.
2. Внести **100–200 мкл** крови в пробирку.
3. Добавить к образцу **500 мкл Лизирующего раствора**.
4. Закрыть пробирку крышкой, аккуратно встряхнуть на вортексе в течение 10 сек, центрифугировать для сброса капель. Поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 15 мин при 75 °С (950 об/мин).
5. Центрифугировать пробирку при 6000–8000 об/мин 2 мин. После центрифугирования супернатант перенести в чистую пробирку.

##### 3.1.2. Связывание геномной ДНК с магнитными частицами

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

**ПРИМЕЧАНИЕ!** При работе с большим количеством образцов магнитные частицы необходимо встряхивать каждые 2 мин в течение всего времени работы с ним.

1. В пробирку с исследуемым образцом внести **30 мкл Сорбирующего раствора**.
2. Добавить **300 мкл Осаждающего раствора**. Тщательно перемешать содержимое пробирки до равномерного распределения сорбента.
3. Поместить пробирку на 10 мин в шейкер при 25 °С (950 об/мин).
4. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель, затем установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Максимально удалить супернатант, не затрагивая осадок магнитных частиц.

##### 3.1.3. Отмывка связанной ДНК

1. Добавить в пробирку **900 мкл Промывочного раствора 1**. Тщательно перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента в течение 1 мин.
2. Центрифугировать пробирку с образцом в течение 30 сек для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Удалить надосадочную

жидкость.

3. Добавить в пробирку **900 мкл Промывочного раствора 2**. Тщательно перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента в течение 1 мин.
4. Центрифугировать пробирку с образцом в течение 30 сек для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Удалить надосадочную жидкость.

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

### 3.1.4. Десорбция

1. Добавить в пробирку с магнитными частицами **100 мкл Элюирующего раствора** при выделении из 200 мкл крови или **50 мкл Элюирующего раствора** при выделении из 100 мкл крови. Аккуратно перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента.
2. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать в течение 12 мин при температуре 25 °С (950 об/мин).
3. Центрифугировать пробирки в течение 30 сек для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин.
4. Аккуратно, не затрагивая магнитный сорбент, перенести надосадочную жидкость 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 последующего ингибирования реакции ПЦР.

## 3.2. Выделение из 300–400 мкл цельной крови

### 3.2.1. Лизис

#### Предварительная подготовка

Перед началом работы все компоненты набора извлечь из холодильника и выдержать при комнатной температуре (21–25 °С) в течение 30 мин.

**ВНИМАНИЕ!** Лизирующий раствор не должен содержать осадка и должен быть прозрачным после выдерживания в течение 30 мин при 25 °С.

#### Проведение внешнего лизиса

1. Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб.
2. Внести **300–400 мкл** крови в пробирку.
3. Добавить к образцу **1 мл Лизирующего раствора**.

4. Закрывать пробирку крышкой, аккуратно встряхнуть на вортексе в течение 10 сек, центрифугировать для сброса капель. Поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 15 мин при 75 °С (950 об/мин).
5. Центрифугировать пробирку при 6000–8000 об/мин в течение 2 мин. После центрифугирования супернатант перенести в чистую пробирку. При отсутствии высокоскоростной микроцентрифуги центрифугирование можно осуществить на микроцентрифуге-вортекс в течение 3 мин.

### 3.2.2. Связывание геномной ДНК с магнитными частицами

*Сорбирующий раствор* тщательно перемешать, чтобы не осталось осадка на дне флакона.

**ПРИМЕЧАНИЕ!** При работе с большим количеством образцов магнитные частицы необходимо встряхивать каждые 2 мин в течение всего времени работы с образцами.

1. В пробирку с исследуемым образцом внести **45 мкл *Сорбирующего раствора***.
2. Добавить **500 мкл *Осаждающего раствора***. Тщательно перемешать содержимое пробирки до равномерного распределения сорбента.
3. Поместить пробирку на 10 мин в шейкер при 25 °С (950 об/мин).
4. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель, затем установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Максимально удалить супернатант, не затрагивая осадок магнитных частиц.

### 3.2.3. Отмывка связанной ДНК

1. Добавить в пробирку **900 мкл *Промывочного раствора 1***. Тщательно перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента в течение 1 мин.
2. Центрифугировать пробирку с образцом в течение 30 сек для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Удалить надосадочную жидкость.
3. Добавить в пробирку **900 мкл *Промывочного раствора 2***. Тщательно перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента в течение 1 мин.
4. Центрифугировать пробирку с образцом в течение 30 сек для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Удалить надосадочную жидкость.

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

### 3.2.4. Десорбция

1. Добавить в пробирку с магнитными частицами **200 мкл *Элюирующего раствора***. Аккуратно перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента.
2. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать в течение 12 мин при температуре 25 °С (950 об/мин).

3. Центрифугировать пробирки в течение 30 сек для сброса капель. Установить в магнитный штатив на 1-2 мин.
4. Аккуратно, не затрагивая магнитный сорбент, перенести надосадочную жидкость в чистую микроцентрифужную пробирку.

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

