

«М-Сорб»

Набор реагентов для экстракции ДНК



Содержание

1.	ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	3
1.1.	Описание набора	3
1.2.	Область применения	3
2.	ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	4
1.	Состав набора	4
2.	Количество анализируемых проб	4
3.	Условия хранения и транспортирования, срок годности	4
4.	Дополнительное оборудование и материалы, не входящие в состав набора	4
3.	СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ.....	5
1.	Лизис	5
2.	Связывание геномной ДНК с магнитными частицами.....	5
3.	Отмывка связанной ДНК.....	6
4.	Десорбция	6
4.	ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТОКОЛЫ	7
1.	Выделение ДНК из крови на картах, физиологических жидкостей (слюна, сперма) на предмете носителя.....	7
2.	Выделение ДНК из навески ткани.....	8
3.	Выделение ДНК из буккальных клеток	9
4.	Выделение ДНК из суспензии клеток	10
5.	Выделение ДНК из волос	11
6.	Выделение ДНК из ногтей	12
7.	Выделение ДНК из жевательной резинки, сигаретного окурка	13
8.	Выделение ДНК из тканей, фиксированных парафином	14
9.	Выделение ДНК из образцов с увеличенным объемом.....	16
5.	ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ «COLIBRI»..	17
1.	Выделение ДНК из цельной крови, слюны, спермы с использованием автоматической станции «Colibri».....	18
2.	Выделение ДНК из крови на картах, физиологических жидкостей (слюна, сперма) на предмете носителя с использованием автоматической станции «Colibri»	21
3.	Выделение ДНК из навески ткани с использованием автоматической станции «Colibri»	22
4.	Выделение ДНК из буккальных клеток с использованием автоматической станции «Colibri» ..	23
	Выделение ДНК из суспензии клеток с использованием автоматической станции «Colibri».....	24
5.	Выделение ДНК из волос с использованием автоматической станции «Colibri»	25
6.	Выделение ДНК из ногтей с использованием автоматической станции «Colibri».....	26
7.	Выделение ДНК из жевательной резинки, сигаретного окурка с использованием автоматической станции «Colibri».....	27
8.	Выделение ДНК из тканей, фиксированных парафином с использованием автоматической станции «Colibri».....	28

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 10 мкл не замороженной, жидкой крови составляет 2 нг/мкл (при элюции в 100 мкл).

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

Таблица 1

Тип образца	Максимальное количество
Жидкая кровь, сперма	до 10 мкл
Слюна	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
Волосы	10 луковиц длиной не более 3-5 мм
Ногти	3 ногтевые пластины длиной не более 3-5 мм
Жевательная резинка	Не более 1/8 части
Сигаретный окурок	5 мм сигаретной бумаги от края фильтра
Ткань, фиксированная парафином	2-3 среза

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.

1. Состав набора

№	Название	Описание	Количество	
			HG-501-50	HG-501-100
1.	Лизирующий раствор	Бесцветная прозрачная жидкость	20 мл	40 мл
2.	Сорбирующий раствор	Суспензия магнитных частиц	1 мл	2 мл
3.	Осаждающий раствор	Бесцветная прозрачная жидкость	10 мл	20 мл
4.	Промывочный раствор	Бесцветная прозрачная жидкость	50 мл	100 мл
5.	Элюирующий раствор	Бесцветная прозрачная жидкость	5 мл	10 мл

2. Количество анализируемых проб

Набор для выделения препаратов ДНК рассчитан для выполнения:

HG-501-50 – 50 экстракций,

HG-501-100 – 100 экстракций

3. Условия хранения и транспортирования, срок годности

Хранить в темноте.

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

Транспортирование – при температуре +4 до +25°C в темноте (сорбирующий раствор при +4).

Срок годности набора – 14 месяцев

ВАЖНО! Пробирку с магнитными частицами не замораживать.

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, сперма	до 10 мкл
Слюна	до 100 мкл

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 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.

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.

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 20 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 отсутствие шейкера возможно оставить пробирку с образцом при комнатной температуре на 10 мин, перемешивая и кратко центрифугуя на микроцентрифуге-вортексе каждые 2-3 мин.
4. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель, затем установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Максимально удалить супернатант.

3. Отмывка связанной ДНК

1. Добавить в пробирку 500 мкл *Промывочного раствора*. Перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортексе 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-вортексе 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.

4. Десорбция

1. Нагреть термошейкер или термостат до 70°C.
2. Добавить в пробирку с образцом от 30 до 100 мкл *Элюирующего раствора*. Перемешать содержимое на микроцентрифуге-вортексе 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 центрифугуя на вортексе 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 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 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

1. Выделение ДНК из крови на картах, физиологических жидкостей (слюна, сперма) на предмете носителя

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 15 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).

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).

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. 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 (21 000. 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 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).

5. Выделение ДНК из волос

Подготовка образца

Исследуемые образцы волос промыть бидистиллированной водой и высушить. Отрезать фрагмент стержня волоса с волосяной луковицей длиной 3-5 мм.

Выделение ДНК может быть также проведено из образцов волос, не подвергнутых предварительной промывке. Такой подход может повысить суммарный выход экстрагированной ДНК. Однако, необходимо иметь в виду, что наложения, присутствующие на стержне волоса могут являться источником контаминации.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
2. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
3. Добавить к образцу 200 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, центрифугировать для сброса капель. Убедиться, что волос находится в растворе, а не на стенке пробирки. Затем 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 пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 2-3 мин.
5. Центрифугировать пробирки 2 мин при 12000-16000 об/мин, осторожно, не забирая волос, перенести супернатант в новую пробирку.

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 мин, в течении всего времени работы с ним.

1. В пробирку с лизированным образцом добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора*.
2. Добавить 100 мкл *Осаждающего раствора*. Тщательно перемешать содержимое пробирки, до равномерного распределения сорбента.
3. Поместить пробирку на 10 мин в шейкер при комнатной температуре на 900 об/мин. При отсутствии шейкера возможно оставить пробирку с образцом при комнатной температуре на 10 мин, перемешивая и кратко центрифугируя на микроцентрифуге-вортексе каждые 2-3 мин.
4. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель, затем установить в магнитный штатив на 1-2 мин. Максимально удалить супернатант.
5. Далее следовать процедурам стандартного протокола: **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).

6. Выделение ДНК из ногтей

Подготовка образца

Исследуемые образцы ногтевых пластин очистить от подногтевого содержимого. Ногтевые пластины необходимо промыть бидистиллированной водой и высушить. Высушенные образцы, длиной не более 3-5 мм., поместить в микроцентрифужную пробирку.

ПРИМЕЧАНИЕ! Выделение ДНК из биологического материала, присутствующего в подногтевом содержимом может быть проведено с использованием стандартного протокола набора.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 37°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 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Затем поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 20 мин при 37°C 900 об/мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 20 мин в термостате при 37°C, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугуя каждые 5 мин.
5. Центрифугировать пробирки 2 мин при 12000-16000 об/мин. Перенести супернатант, без остатков ногтя, в чистую микроцентрифужную пробирку, согласно маркировке.
6. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
7. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Затем 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 пробирку на вортексе и кратко центрифугуя каждые 5 мин.
8. Далее следовать процедурам стандартного протокола: **Связывание геномной ДНК с магнитными частицами** (стр. 5), **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).

7. Выделение ДНК из жевательной резинки, сигаретного окурка

Подготовка образца

Жевательная резинка: растяните жевательную резинку в виде тонкого кружка на чистой чашке Петри. Закройте чашку и заморозьте её на -80°C в течении как минимум 2-х часов. Достаньте чашку Петри и разрежьте жевательную резинку на 8 частей. Используйте только один кусочек для выделения ДНК.

Сигаретный окурок: необходимо использовать только обёрточную бумагу, покрывающую сигаретный фильтр. Отрежьте кусочек размером 5 мм и разрежьте его на 2-3 более мелких кусочков. Постарайтесь минимизировать количество волокон сигаретного фильтра, попадающего в образец.

Проведение лизиса

1. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
2. Добавить к образцу 400 мкл *Лизирующего раствора*.
3. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Убедиться, что образец полностью погружен в раствор.
4. Затем поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 20 мин. при комнатной температуре 900 об/мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 20 мин при комнатной температуре, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 5 мин.
5. Центрифугировать пробирки 2 мин при 12000-16000 об/мин, осторожно, не забирая осадок, перенести супернатант в новую пробирку в соответствии с маркировкой.
6. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 секунд, открутить на центрифуге для сброса капель. Затем 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 пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 5 мин.
7. Далее следовать процедурам стандартного протокола: **Связывание геномной ДНК с магнитными частицами** (стр. 5), **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).

8. Выделение ДНК из тканей, фиксированных парафином

Предварительная подготовка

Перед началом работы необходимо подготовить *Лизирующий раствор с Протеиназой К*:

- 965 мкл буфера TE
- 5 мкл SDS (10%)
- 30 мкл Протеиназы К (10 мг/мл)

Подготовка образца

Используя скальпель, сделайте несколько вертикальных срезов с парафинового блока, перпендикулярно к поверхности ткани. При наличии микротома можно вырезать до 8 секций толщиной до 10 мкм.

ПРИМЕЧАНИЕ! При подготовке объектов старайтесь свести к минимуму количество захватываемого парафина.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 56°C.
2. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
3. Добавить 100 мкл *Лизирующего раствора с Протеиназой К* к образцу.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Затем поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 60 мин при 56°C 900 об/мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 60 мин в термостате при 56°C, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугуя каждые 10-15 мин.
5. Перенести пробирку в термошейкер на 95°C при 900 об/мин еще на 15 мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 15 мин в термостате при 95°C, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугуя каждые 5 мин.
6. Дать образцу остыть до комнатной температуры.

ВАЖНО! Не остужать образцы искусственно.

7. Центрифугировать пробирку в течение 30 сек при 13000-16000 об/мин.
8. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
9. Добавить 500 мкл *Лизирующего буфера*.
10. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Затем поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 20 мин при 75°C 900 об/мин. При отсутствии

термошейкера инкубацию можно провести в течении 20 мин в термостате при 75°C, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 5 мин.

11. Центрифугировать пробирку в течение 2 мин при 13000-16000 об/мин.
12. Перенести супернатант, без остатков биологического образца, в чистую микроцентрифужную пробирку, согласно маркировке.

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.

ВАЖНО! После лизиса дайте образцу остыть до комнатной температуры. Не остужайте образцы искусственно.

1. В пробирку с лизированным образцом добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора*.
2. Закрывать 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 следовать процедурам стандартного протокола: **Отмывка связанной ДНК** (стр. 6), **Десорбция ДНК** (стр. 6).

9. 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).

5. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ «COLIBRI»

Для выделения ДНК с использованием автоматической станции «Colibri» перед началом выделения ДНК необходимо установить планшеты в станцию согласно схеме (рис 1):

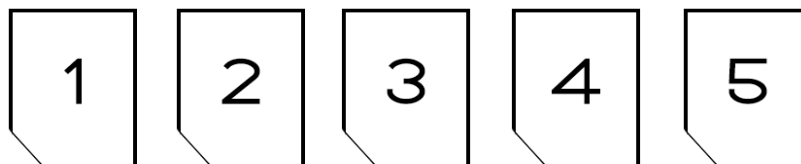


Рисунок 1. Схема расположения площадок для планшетов в автоматической станции для выделения ДНК «Colibri».

Где,

- 1 позиция** – используется для установки планшета с гребенками наконечников.
- 2 позиция** – используется для проведения лизиса и сорбции ДНК.
- 3 позиция** – используется для первой промывки комплекса ДНК с магнитными частицами.
- 4 позиция** – используется для второй промывки комплекса ДНК с магнитными частицами.
- 5 позиция** – используется для элюции ДНК.

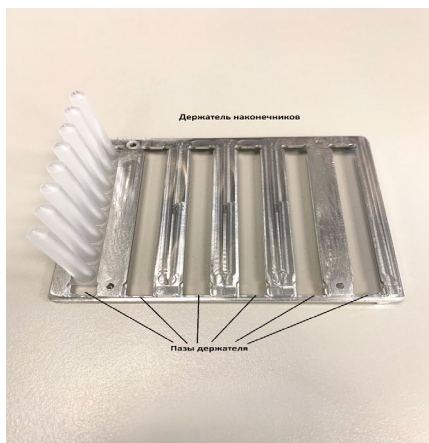
В модификации станции Colibri 96 используются пластиковые глубоколоночные планшеты (96 лунок) и пластиковая гребенка для 96 стержней. В модификации станции Colibri 48 используются пластиковые глубоколоночные стрипы (8 лунок) и пластиковая гребенка для 8 стержней.

Подготовка планшетов для модификации станции Colibri 48:

1. В зависимости от количества образцов – установить стрипы в *Планшет для стрипов №1* (если кол-во образцов не кратно 8-ми можно отрезать необходимое кол-во лунок).



2. В зависимости от количества образцов установить наконечники в специальные пазы держателя.



3. Держатель закрыть фиксатором наконечников и установить в **Планишет для стрипов №1**.



- 4. Установить **Планишет для стрипов №1** позицию 1 станции **Colibri 48**.
- 5. Подготовить остальные **Планишеты для стрипов** согласно протоколу выделения.

1. Выделение ДНК из цельной крови, слюны, спермы с использованием автоматической станции «Colibri»

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

Тип образца	Максимальное количество
Жидкая кровь, сперма	до 10 мкл
Слюна	до 100 мкл

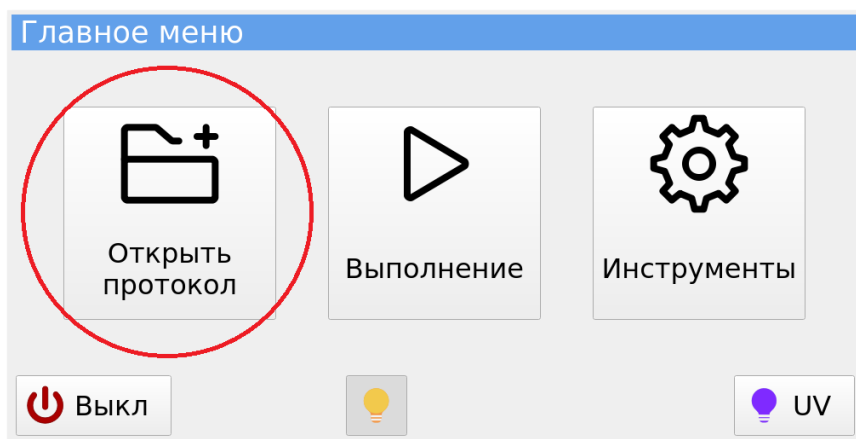
Подготовка планшетов/стрипов

Предварительно необходимо подготовить планшеты с реагентами для каждого этапа выделения. В зависимости от количества образцов внести в лунки планшетов:

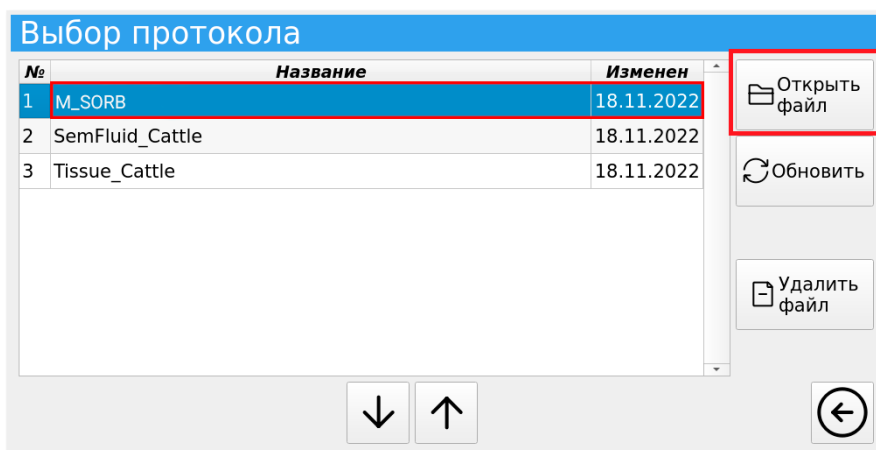
1. В лунки планшета 2 последовательно 400 мкл *Лизирующего раствора*, в те же лунки 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 200 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
4. В лунки подготовленного планшета 2 внести необходимое кол-во образца.
5. Установить планшеты 2-5 в позиции станции 2-5.
6. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.

Запуск протокола выделительной станции

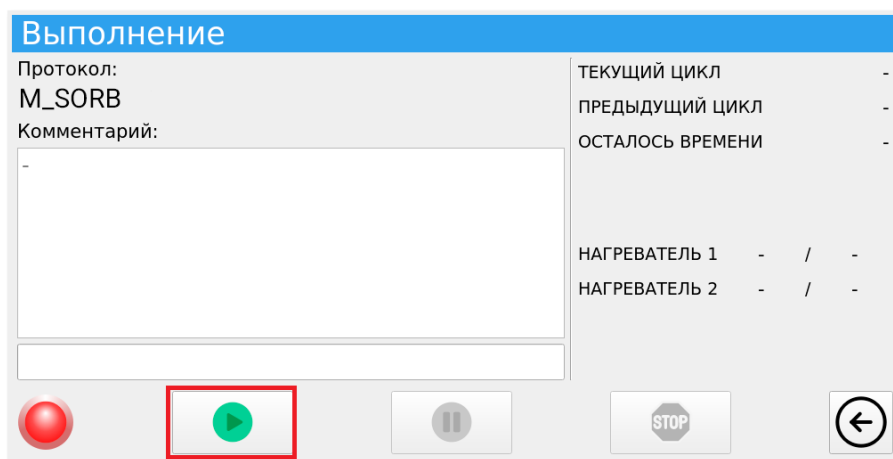
2. В главном меню нажать кнопку «Открыть протокол»



3. Выбирать протокол «M_SORB». Нажать кнопку «Открыть файл».



4. Нажать кнопку запуска.



2. Выделение ДНК из крови на картах, физиологических жидкостей (слюна, сперма) на предмете носителе с использованием автоматической станции «Colibri»

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 15 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 лунку планшета 2.

Подготовка планшетов/стрипов

1. В лунки планшета 2 к образцу добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 200 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
5. Установить планшеты 3-5 в позиции станции 3-5.
6. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.
7. Запустить программу выделения «M_SORB» согласно пункту **Запуск протокола выделительной станции** (стр. 18).

3. Выделение ДНК из навески ткани с использованием автоматической станции «Colibri»

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), осторожно, не забирая осадок, перенести супернатант в лунку планшета 2.

Подготовка планшетов/стрипов

1. В лунки планшета 2 к образцу добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 200 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
8. Установить планшеты 3-5 в позиции станции 3-5.
9. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.
10. Запустить программу выделения «M_SORB» согласно пункту **Запуск протокола выделительной станции** (стр. 18).

4. Выделение ДНК из буккальных клеток с использованием автоматической станции «Colibri»

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 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.
5. Ватные палочки извлечь из пробирки, используя пинцет, и максимально отжать о стенку микропробирки.
6. Перенести супернатант в лунку планшета 2

Подготовка планшетов/стрипов

1. В лунки планшета 2 к образцу добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 200 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
11. Установить планшеты 3-5 в позиции станции 3-5.
12. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.
13. Запустить программу выделения «M_SORB» согласно пункту **Запуск протокола выделительной станции** (стр. 18).

Выделение ДНК из суспензии клеток с использованием автоматической станции «Colibri»

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 (21 000. 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 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.
5. Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 15 000 об/мин (21 000g), осторожно, не забирая осадок, перенести супернатант в лунку планшета 2.

Подготовка планшетов/стрипов

1. В лунки планшета 2 к образцу добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 200 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
14. Установить планшеты 3-5 в позиции станции 3-5.
15. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.
16. Запустить программу выделения «M_SORB» согласно пункту **Запуск протокола выделительной станции** (стр. 18).

5. Выделение ДНК из волос с использованием автоматической станции «Colibri»

Подготовка образца

Исследуемые образцы волос промыть бидистиллированной водой и высушить. Отрезать фрагмент стержня волоса с волосяной луковицей длиной 3-5 мм.

Выделение ДНК может быть также проведено из образцов волос, не подвергнутых предварительной промывке. Такой подход может повысить суммарный выход экстрагированной ДНК. Однако, необходимо иметь в виду, что наложения, присутствующие на стержне волоса могут являться источником контаминации.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
2. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
3. Добавить к образцу 200 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, центрифугировать для сброса капель. Убедиться, что волос находится в растворе, а не на стенке пробирки. Затем 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 пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 2-3 мин.
5. Центрифугировать пробирки 2 мин при 12000-16000 об/мин, осторожно, не забирая волос, перенести супернатант в лунку планшета 2.

Подготовка планшетов/стрипов

1. В лунки планшета 2 к образцу добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 100 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
17. Установить планшеты 3-5 в позиции станции 3-5.
18. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.
19. Запустить программу выделения «M_SORB» согласно пункту **Запуск протокола выделительной станции** (стр. 18).

6. Выделение ДНК из ногтей с использованием автоматической станции «Colibri»

Подготовка образца

Исследуемые образцы ногтей пластин очистить от подногтевого содержимого. Ногтевые пластины необходимо промыть бидистиллированной водой и высушить. Высушенные образцы, длиной не более 3-5 мм., поместить в микроцентрифужную пробирку.

ПРИМЕЧАНИЕ! Выделение ДНК из биологического материала, присутствующего в подногтевом содержимом может быть проведено с использованием стандартного протокола набора.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 37°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 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Затем поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 20 мин при 37°C 900 об/мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 20 мин в термостате при 37°C, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугуя каждые 5 мин.
6. Центрифугировать пробирки 2 мин при 12000-16000 об/мин., перенести супернатант в лунку планшета 2.

Подготовка планшетов/стрипов

1. В лунки планшета 2 к образцу добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 200 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
20. Установить планшеты 3-5 в позиции станции 3-5.
21. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.
22. Запустить программу выделения «M_SORB» согласно пункту **Запуск протокола выделительной станции** (стр. 18).

7. Выделение ДНК из жевательной резинки, сигаретного окурка с использованием автоматической станции «Colibri»

Подготовка образца

Жевательная резинка: растяните жевательную резинку в виде тонкого кружка на чистой чашке Петри. Закройте чашку и заморозьте её на -80°C в течении как минимум 2-х часов. Достаньте чашку Петри и разрежьте жевательную резинку на 8 частей. Используйте только один кусочек для выделения ДНК.

Сигаретный окурочек: необходимо использовать только обёрточную бумагу, покрывающую сигаретный фильтр. Отрежьте кусочек размером 5 мм и разрежьте его на 2-3 более мелких кусочков. Постарайтесь минимизировать количество волокон сигаретного фильтра, попадающего в образец.

Проведение лизиса

1. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
2. Добавить к образцу 400 мкл *Лизирующего раствора*.
3. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Убедиться, что образец полностью погружен в раствор.
4. Затем поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 20 мин. при комнатной температуре 900 об/мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 20 мин при комнатной температуре, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 5 мин.
7. Центрифугировать пробирки 2 мин при 12000-16000 об/мин, осторожно, не забирая осадок, перенести супернатант в лунку планшета 2.

Подготовка планшетов

1. В лунки планшета 2 к образцу добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 200 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
23. Установить планшеты 3-5 в позиции станции 3-5.
24. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.
25. Запустить программу выделения «M_SORB» согласно пункту **Запуск протокола выделительной станции** (стр. 18).

8. Выделение ДНК из тканей, фиксированных парафином с использованием автоматической станции «Colibri»

Предварительная подготовка

Перед началом работы необходимо подготовить *Лизирующий раствор с Протеиназой К*:

- 965 мкл буфера TE
- 5 мкл SDS (10%)
- 30 мкл Протеиназы К (10 мг/мл)

Подготовка образца

Используя скальпель, сделайте несколько вертикальных срезов с парафинового блока, перпендикулярно к поверхности ткани. При наличии микротомы можно вырезать до 8 секций толщиной до 10 мкм.

ПРИМЕЧАНИЕ! При подготовке объектов старайтесь свести к минимуму количество захватываемого парафина.

Проведение лизиса

1. Нагреть термошейкер или термостат до 56°C.
2. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл.
3. Добавить 100 мкл *Лизирующего раствора с Протеиназой К* к образцу.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Затем поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 60 мин при 56°C 900 об/мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 60 мин в термостате при 56°C, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 10-15 мин.
5. Перенести пробирку в термошейкер на 95°C при 900 об/мин еще на 15 мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в течении 15 мин в термостате при 95°C, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 5 мин.
6. Дайте образцу остыть до комнатной температуры.

ВАЖНО! Не остужайте образцы искусственно.

7. Центрифугировать пробирку в течение 30 сек при 13000-16000 об/мин.
8. Нагреть термошейкер или термостат до 75°C.
9. Добавить 500 мкл *Лизирующего буфера*.
10. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течении 5-10 сек, открутить на центрифуге для сброса капель. Затем поместить пробирки в термошейкер и инкубировать 20 мин при 75°C 900 об/мин. При отсутствии термошейкера инкубацию можно провести в

течении 20 мин в термостате при 75°C, встряхивая пробирку на вортексе и кратко центрифугируя каждые 5 мин.

11. Центрифугировать пробирку в течение 2 мин при 13000-16000 об/мин.
12. Перенести супернатант, без остатков биологического образца, в чистую микроцентрифужную пробирку, согласно маркировке.

Подготовка планшетов/стрипов

1. В лунки планшета 2 к образцу добавить 20 мкл *Сорбирующего раствора* и 400 мкл *Осаждающего раствора*.
2. В лунки планшета 3 и 4 внести 500 мкл *Промывочного раствора*.
3. В лунки планшета 5 внести 30-100 мкл *Элюирующего раствора*.
26. Установить планшеты 3-5 в позиции станции 3-5.
27. В позицию 1 установить планшет 1 с гребенкой для стержней.
28. Запустить программу выделения «**M_SORB**» согласно пункту **Запуск протокола выделительной станции** (стр. 18).

Рекламации на набор реактивов направлять по адресу: 127434 г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
тел. (495) 977-74-55, syntol@syntol.ru