



*New enzymes  
for DNA technologies*

**SibEnzyme**

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### **Набор для очистки ДНК из лёгкой фракции клеток крови**

Каталожный номер **K008**

#### Адрес в интернет

<http://russia.sibenzyme.com/products/sets>

#### Назначение:

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из лёгкой фракции клеток крови. Набор рассчитан на 50 выделений.

#### Состав набора:

1. Раствор №1 (Лизирующий) – 2 x 45 мл.
2. Раствор №2 (Солевой) – 1 x 36 мл.
3. Раствор №3 (Осаждающий) – 2 x 48 мл.
4. ТЕ-буфер, pH 8,0.

#### Для работы потребуются:

- вакутейнеры для забора крови на 9 мл (EDTA K<sub>2</sub> или EDTA K<sub>3</sub>);
- физиологический раствор аптечный стерильный комнатной температуры;
- 70% этанол;
- вода очищенная, стерильная;
- центрифуга типа ELMi CM-6MT (Латвия), ротор 6M или 6M.02;
- набор автоматических пипеток и наконечники к ним;
- пробирки с крышками пластиковые мерные на 15 мл;
- микропробирки с крышками пластиковые типа Eppendorf на 1,5 и 2 мл;

- штативы для пробирок;
- центрифуга для микропробирок на 1,5-2 мл (типа MiniSpin, Eppendorf, 13,000 об/мин);
- термостаты на 55 и 65°C;
- морозильная камера на -20°C.

## Протокол

### Забор крови

Взятие периферической крови проводится утром натощак из кубитальной вены. Для анализа необходимо 9 мл. При заборе крови используются иглы "Vacuette", 38 x 0,8 мм, 21Gx11/2 и пробирки "Vacuette" на 9 мл с ЭДТА (EDTA K<sub>2</sub> или EDTA K<sub>3</sub>).

### Выделение лёгкой фракции клеток крови

- 1) Вакутейнер с кровью (непосредственно после забора) осторожно перевернуть 7-8 раз и центрифугировать 3 мин при 1000 g на центрифуге типа ELMi CM-6MT (Латвия).
- 2) Из каждого вакутейнера в градуированную пробирку на 15 мл пипеткой на 1 мл с обрезанным наконечником (с фильтром) осторожно отобрать всю плазму, стараясь избежать взмучивания осадка клеток крови и захвата эритроцитов. Количество отобранной плазмы не должно быть больше 3 мл, если получилось больше, то необходимо оставить только 3 мл.  
Примечание: в случае забора у пациента более, чем одного вакутейнера, выделение клеток из каждого проводится отдельно.
- 3) Пробирки центрифугировать 10 мин при 1000 g (ELMI). Если необходимо, уравновесить пробирки попарно добавлением физ. раствора.
- 4) Супернатант аккуратно слить, остатки жидкости отобрать пипеткой и отбросить.
- 5) К осадку добавить 3 мл физ. раствора и, используя пипетку с обрезанным наконечником, аккуратно суспендировать осадок. Добавить в пробирку еще 10 мл физ. раствора, аккуратно перемешать содержимое переворачиванием и центрифугировать 10 мин при 1000 g (ELMI).
- 6) Супернатант аккуратно слить, остатки жидкости отобрать пипеткой и отбросить. Осадок использовать для выделения ДНК.

### Выделение ДНК

- 7) К осадку клеток в пробирке добавить **1,6 мл** раствора **№1** (Лизирующий), суспендировать осадок пипетированием до мелких фрагментов в течение 1-2 мин. Из полученной суспензии (~ 1,7 мл) отобрать по 800 мкл в две микропробирки на 2 мл типа Eppendorf и поместить их в термостат на 55°C на 30 мин. Остальное

отбросить.

Время от времени содержимое пробирок перемешивать переворачиванием, чтобы полностью растворить мелкие частицы.

- 8) По достижении прозрачности суспензии добавить в каждую пробирку по **300 мкл** раствора **№2** (Солевой), перемешать содержимое пробирок встряхиванием (2-3 раза) и поместить пробирки в морозильную камеру на  $-20^{\circ}\text{C}$  на 7 мин.
- 9) Затем центрифугировать пробирки 7 мин при 13000 об/мин (центрифуга Eppendorf типа MiniSpin).
- 10) Супернатант из пробирок (~ 1 мл) перенести, соответственно, в две новые микропробирки на 2 мл, добавить туда по **900 мкл** раствора **№3** (Осаждающий), перемешать смесь переворачиванием пробирок, встряхнуть 2-3 раза для лучшего высаживания ДНК.
- 11) Центрифугировать пробирки в течение 7 мин при 13000 об/мин (Eppendorf). Супернатант аккуратно отобрать пипеткой и отбросить.
- 12) Промыть осадок добавлением **500 мкл** 70% этанола и переворачиванием пробирок 3-4 раза.
- 13) Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf). Супернатант аккуратно отобрать пипеткой (по возможности, не оставляя жидкости в пробирке) и отбросить.
- 14) Повторно добавить к осадку **500 мкл** 70% этанола.  
**Примечание:** на этой стадии в случае необходимости процесс выделения ДНК можно прервать (например, при транспортировке образцов). Хранить образцы ДНК под 70% этанолом при **минус  $20^{\circ}\text{C}$**  можно в течение длительного времени.
- 15) Центрифугировать пробирки с осадком и 70% этанолом в течение 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf), или 5 мин при 13000 об/мин, если пробирки с осадком подвергались транспортировке. Супернатант аккуратно отобрать пипеткой (по возможности, не оставляя жидкости в пробирке) и отбросить.
- 16) Осадки подсушить при комнатной температуре в течение 10-15 мин до исчезновения влаги, поместив открытые пробирки на рабочий стол. Желательно избегать пересушивания осадков.
- 17) Осадки в пробирках растворить в 200 мкл TE-буфера, pH 8,0. Хранить при **минус  $20^{\circ}\text{C}$** .

**Полученные таким образом препараты ДНК рекомендуется дополнительно очистить с помощью одной из стандартных процедур, например, с использованием спин-колонок или экстракцией фенолом/хлороформом.**

Только для научных исследований

## Информация для заказа

Описание продукта	Каталожн. №
Набор для очистки ДНК из лёгкой фракции клеток крови, 50 выделений	K008