New enzymes
for DNA technologies
SibEnzyme

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор для очистки ДНК из лёгкой фракции клеток крови

Каталожные номера **K008, K008S, 50 выделений**

Адрес в интернет

https://sibenzyme.com/product-category/kits/

Назначение:

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из лёгкой фракции клеток крови. Набор рассчитан на 50 выделений. Вариант набора K008S включает в состав спин-колонки для выделения ДНК

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. Раствор №4 (Для элюции и хранения) – 1 x 30 мл.
5. Раствор №5 (Для подготовки спин-колонки) – 1 x 32 мл.
6. Раствор №6 (Для уравновешивания) – 2 x 32 мл.
7. Раствор №7 (Для подготовки образца) – 1 x 43 мл.
8. Раствор №8 (Промывочный) – 3 x 40 мл.
9. Спин-колонки (только для K008S) - 50 шт.

Условия хранения:

Набор хранить при комнатной температуре (20-25°C).

Растворы №2, 4 и 5 после вскрытия хранить в холодильнике при +4 - +8°C

Для работы потребуются:

- вакутейнеры для забора крови на 9 мл (EDTA K2 или EDTA K3);
- 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;
- спин-колонки;
- центрифуга для микропробирок на 1,5-2 мл (типа MiniSpin, Eppendorf, 13,000 об/мин);
- термостаты на 55 и 65ºC;
- морозильная камера на -20ºC.

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 K2 или EDTA K3).

Выделение лёгкой фракции клеток крови

1. Вакутейнер с кровью (непосредственно после забора) осторожно перевернуть 7-8 раз и центрифугировать 2 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.

Примечание: на этой стадии в случае необходимости процесс выделения ДНК можно прервать (например, для транспортировки осадков клеток крови). При этом осадок должен храниться при минус 20ºС или лучше при минус 70ºС.

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 55ºС 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 -20ºС 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 пробирку 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, для транспортировки полученных препаратов ДНК). Хранить образцы ДНК под 70% этанолом можно в течение длительного времени при минус 20ºС.
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. На этом шаге две части пробы (см. п.10) объединяются Осадки в двух пробирках последовательно растворить в 200 мкл раствора №4.
18. Перемешать смесь пипетированием и инкубировать на столе 15 мин.

Примечание: на этой стадии в случае необходимости процесс выделения ДНК можно прервать. Хранить образцы ДНК при минус 20ºС можно в течение длительного времени.

В большинстве случаев полученные препараты ДНК пригодны для использования. В некоторых случаях необходима дополнительная очистка ДНК. Дальнейшая очистка ведётся с применением спин-колонок.

Очистка ДНК на спин-колонках (только для набора K008S)

Предварительная подготовка спин-колонок:

19. Подготовить спин-колонки в количестве, равном числу пробирок с раствором ДНК, подписать колонки. В каждую спин-колонку добавить по 300 мкл раствора №5. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf). Удалить фильтрат.
20. Добавить в спин-колонку 300 мкл воды. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf). Удалить фильтрат
21. Повторить п.20.
22. Добавить в спин-колонку 300 мкл раствора №6. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf). Удалить фильтрат.
    Параллельно подготовить образцы для нанесения: к 200 мкл каждого раствора ДНК добавить два объема (400 мкл) раствора №7. Аккуратно перемешать пипетированием.

Очистка ДНК на спин-колонках:

23. Добавить 600 мкл образца ДНК в подготовленную спин-колонку. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf). Удалить фильтрат.
24. Добавить 300 мкл раствора №6. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf). Удалить фильтрат.
25. Промыть спин-колонку добавлением 500 мкл раствора №8. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf). Удалить фильтрат.
26. Повторить п.25.
27. Центрифугировать спин-колонку еще 30 сек при 13000 об/мин чтобы удалить остатки жидкости.
28. Перенести спин-колонку в новую пробирку Eppendorf на 1,5 мл. Добавить в центр мембраны колонки 70 мкл буфера 4. Инкубировать в течение 2 мин при комнатной температуре, затем элюировать ДНК в пробирку центрифугированием в течение 1 мин при 13000 об/мин (Eppendorf).
    Примечание: поскольку пробирку со вставленной спин-колонкой нельзя закрыть крышкой, эту крышку необходимо либо срезать (заранее подписав соответствующие пробирки), либо поместить пробирки в ротор центрифуги открытыми крышками в правую сторону.

Полученный элюат представляет собой очищенный препарат ДНК. Хранить при **минус 20ºС**.

Только для научных исследований