

Информация о продукте

Набор D-Blood для выделения ДНК из крови

D-Blood-10, D-Blood-50, D-Blood-250

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом.

Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей.

Протокол обновлён 15.07.2022.

1. Описание продукта

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из следующих образцов:

1. Цельная кровь, взятая в одноразовые пробирки со следующими антикоагулянтами: К3 EDTA, цитрат натрия 3,2% и 3,8%, CPDA, гепарином натрия;
2. Плазма крови;
3. Сыворотка крови;
4. Криопреципитат;
5. Лейкоцитарная масса;
6. Ликвор.

Принцип действия набора основан на селективной сорбции нуклеиновых кислот из предварительно лизированного образца на мембране из диоксида кремния, последующей промывке и элюции очищенного продукта. Лизис образца происходит в присутствии протеиназы К.

Выделенная ДНК может быть использована для проведения ПЦР, нуклеотидной секвенсации, Northern blot, Southern blot, встраивания в векторы и трансформации.

2. Состав набора

	D-Blood-10 10 выделений	D-Blood-50 50 выделений	D-Blood-250 250 выделений
Буфер для лизиса LB	5 мл	25 мл	120 мл
Буфер для промывки WB1	5.5 мл	30 мл	2x70 мл
Буфер для промывки WB2	5.5 мл	30 мл	2x70 мл
Буфер для элюции EB	5 мл	15 мл	60 мл
Протеиназа К	240 мкл	1.2 мл	5x1.2 мл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками	10 шт	50 шт	250 шт



для сорбции образца			
---------------------	--	--	--

3. Меры предосторожности

Осторожно! Буферы для лизиса LB и для промывки WB1 содержат раствор хаотропной соли, оказывающий раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

Осторожно! Буферы для промывки WB1 и WB2 содержат изопропанол, оказывающий раздражающее и токсичное действие. Не проводить работы с раствором в непосредственной близости от открытого огня.

При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости обратитесь за медицинской помощью.

4. Условия хранения

Набор для выделения ДНК хранить при комнатной температуре (15-25 °С) в течение 12 месяцев.

Раствор протеиназы К хранить при температуре от -18 до -24 °С в течение 12 месяцев.

5. Эксплуатация

Компоненты: LB, WB1, WB2, EB стабильны после вскрытия флаконов при температуре от +15°С до +25°С в течение всего срока годности при условии достаточной герметизации флаконов. Раствор протеиназы К стабилен после вскрытия в течение 12 месяцев.

Внимание! Не нагревать набор выше температуры +25°С, несоблюдение температурного режима хранения и транспортировки снижает активность протеиназы К и эффективность выделения.

Внимание! не хранить смесь буфера для лизиса LB и протеиназы К.

6. Условия работы

Температура окружающей среды от +15 до +25 °С;

Относительная влажность воздуха не более 80 %;

Атмосферное давление 630 – 800 мм. рт. ст.

7. Условия транспортировки

Транспортирование набора производить при температуре от +15 до +25 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше +25 °С в течение 14 суток.

8. **Оборудование и материалы, не входящие в набор**

- Твердотельный термостат, поддерживающий температуру 56 ± 1 °С;
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 10000 gcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объема и наконечники для них;
- Раствор хлорида натрия (9 г/л NaCl) или физраствор;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл;

9. **Протокол выделения ДНК.**

Внимание! При работе с биологическими жидкостями следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как исследуемый материал является потенциально инфицированным, способным длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

9.1. **Подготовка и лизис образцов.**

9.1.1. **Цельная кровь.**

1. Пробирку с цельной кровью аккуратно перемешать, не допускать расслоения образца на плазму и клеточную фракцию. В микропробирку отобрать 200 мкл цельной крови.
2. Чистым одноразовым наконечником добавить 400 мкл буфера для лизиса **LB**.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл **протеиназы К**.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
5. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °С.

9.1.2. **Плазма, сыворотка, лейкоциты.**

• **Плазма богатая лейкоцитами.**

Центрифугировать образец цельной крови, взятой в пробирку с антикоагулянтами (К3 EDTA или Цитрат натрия) 3 мин, 1500 gcf. Отобрать плазму.

• **Плазма бедная лейкоцитами.**

Центрифугировать образец цельной крови, взятой в пробирку с антикоагулянтами (К3 EDTA или Цитрат натрия) 3 мин, 3000 gcf. Отобрать плазму.

• **Сыворотка.**



Использовать гепаринизированную кровь. Пробирку с кровью оставить при комнатной температуре на 15 мин, затем тонкой стеклянной палочкой (или наконечником для одноканального дозатора) аккуратно, не разрушая клетки, отделить сгусток от стенок пробирки и центрифугировать 10 мин, 3000 gcf. Сразу после центрифугирования отделить сыворотку от сгустка.

Примечание: не рекомендовано центрифугировать образцы плазмы и сыворотки на оборотах выше 3000 gcf, это может привести к гемолизу образцов.

• **9.1.3. Суспензия лейкоцитов.**

Отобрать 1000 мкл образца цельной крови в микропробирку, центрифугировать 5 мин, 3000 gcf при комнатной температуре (15–25°C). После центрифугирования можно различить 3 разные фракции: верхний прозрачный слой – плазма; промежуточный слой – лейкоцитарная пленка, содержащая концентрированные лейкоциты; нижний слой - концентрированные эритроциты.

Аккуратно отобрать промежуточный слой, не захватывая верхний и нижний слои, перенести в чистую микропробирку. Промыть образец 500 мкл физраствора. Центрифугировать при 5 мин, 3000 gcf при комнатной температуре (15–25°C). Отобрать промежуточный слой и перенести его в микропробирку. Суспендировать клетки в 200 мкл физраствора.

1. В микропробирку отобрать 200 мкл необходимого образца (плазмы, сыворотки или суспензии лейкоцитов).
2. Чистым одноразовым наконечником добавить 400 мкл буфера для лизиса **LB**.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл **протеиназы K**.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
5. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °C.

9.1.4 Ликвор.

1. Отобрать 500 мкл цельной крови в микропробирку;
2. Центрифугировать образец при 10 мин, 5000 gcf при комнатной температуре (15–25°C).
3. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке осадок и примерно 50 мкл надосадочной жидкости.
4. Добавить к осадку 500 мкл физраствора. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
5. Центрифугировать образец при 10 мин, 3000 gcf при комнатной температуре (15–25°C).

6. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке осадок и примерно 200 мкл надосадочной жидкости.
7. Чистым одноразовым наконечником добавить 400 мкл буфера для лизиса **LB**.
8. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл **протеиназы К**.
9. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
10. Сбросить капли коротким центрифугированием.
11. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °С.

9.1.5 Сухое пятно крови.

Для работы использовать специализированную фильтровальную бумагу.

1. Выдавить 3 кругах (Диаметр, не менее 1,2 мм) из сухого пятна крови. Поместить вырезанные круги в пробирки на 1.5 мл.
2. Чистым одноразовым наконечником добавить 400 мкл буфера для лизиса **LB**.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл **протеиназы К**.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
5. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56 °С.

9.2. Нанесение на колонку.

1. Перенести лизат на колонку. Плотнo закрыть крышку колонки.
2. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.

9.3. Промывка колонки.

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 10000 gcf. Удалить фильтрат.
3. Центрифугировать колонку 3 мин, 10000 gcf для полного удаления буфера WB2.

9.4. Элюция ДНК

1. Перенести колонку в новую микропробирку на 1.5-2 мл. Плотнo прижать колонку к пробирке.
2. Нанести на центр фильтра колонки 200 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25 °С). Центрифугировать 1 мин, 10000 gcf.

Примечание: Рекомендуемые объём элюции составляет 200 мкл, при уменьшении объёма снижается суммарный выход ДНК, минимальный объём элюата 60 мкл.

Состав буфера для элюции EB. 0.01 M Tris·HCl (pH 8.0).

Элюцию образца можно производить TE буфером (0.01 M Tris·HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0-8.5) либо слабощелочной водой (pH 8.0-8.5), обработанной DEPC.

Элюат, содержащий ДНК, хранить при температуре -20 °С. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 мМ.

Внимание! Содержание EDTA в элюате может в последующем негативно влиять на ферментативные реакции.

10. Анализ выделенной ДНК из цельной крови

Целостность выделенной ДНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Количество выделенной ДНК из можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

Характерный максимум поглощения для ДНК при $\lambda = 260$ нм.

Посчитать концентрацию

ДНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 50$ мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$.

Примечание: ДНК, выделенная из плазмы и сыворотки крови, не детектируется с помощью гель-электрофореза или УФ-спектрометрии в силу низкого количества ДНК, содержащиеся в образцах.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Тел.: (383) 363-51-91
www.biolabmix.ru
sales@biolabmix.ru