евроген

ExtractDNA Blood & Cells

Набор для выделения суммарной ДНК из цельной крови, клеток животного происхождения и бактерий

BC111T – на 10 выделений ДНК
BC111M – на 100 выделений ДНК

Инструкция по применению

Версия 6 от 13 июня 2023 г.

Содержание

1. Назначение 4
2. Преимущества набора 4
3. Состав наборов 4
4. Условия хранения и транспортирования 5
5. Количество реакций 5
6. Метод 5
7. Основные характеристики 6
8. Меры предосторожности 6
9. Необходимое оборудование и дополнительные материалы 7
10. Биологический материал 7
11. Протокол 8
12. Возможные проблемы и способы их решения 11
13. Приложение 11
13.1. Рекомендации по сбору и подготовке цельной крови человека или животных 11
13.2. Рекомендации по сбору и подготовке лейкоцитарной фракции 11
13.3. Рекомендации по сбору и подготовке культур клеток человека или животных 11
13.4. Рекомендации по сбору и обработке тканей человека или животных . 12
13.5. Рекомендации по сбору и подготовке слюны 13
13.6. Рекомендации по сбору и подготовке буккального эпителия 13
13.7. Рекомендации по сбору и подготовке ночной культуры *E. coli* 14

1. Назначение

Набор ExtractDNA Blood & Cells предназначен для удобного и надежного выделения тотальной ДНК из:
– цельной крови человека или животных (в т.ч. замороженной и тромбированной),
– лейкоцитарной фракции,
– культуры клеток человека или животных,
– ткани человека или животных,
– слюны,
– буккального эпителия,
– ночной культуры *E.coli*.

Очищенные образцы ДНК могут использоваться для всех видов анализов и молекулярных задач (ПЦР, ПЦР-РВ, секвенирование по Сэнгеру и NGS, анализ метилирования ДНК и т.д.).

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Преимущества набора

- Стабильный выход ДНК.
- Выделение ДНК из широкого спектра биоматериала.
- Протокол оптимизирован для работы с тромбированными образцами крови.
- Эффективное удаление ингибиторов ПЦР, следов консервантов и других примесей.
- Нет стадий спиртовой преципитации и органической экстракции с фенолом и хлороформом.
- Нет контаминации среды препаратом ДНК. В набор входит необходимый запас собирательных пробирок, что позволяет на всех этапах удалять фильтрат вместе с пробиркой, исключая его переливание и повторное использование собирательных пробирок.

3. Состав наборов

Компонент	**BC111T** **10 выделений** Объем/кол-во	**BC111M** **100 выделений** Объем/кол-во
Лизирующий раствор	1.2 мл	12 мл
Связывающий раствор М	5 мл	50 мл
Промывочный раствор (концентрат)	6 мл	50 мл
Элюирующий раствор	1.5 мл	12 мл (8 × 1.5 мл)
Протеиназа К (лиофилизированная)	1.2 мг	12 мг
Буфер для хранения Протеиназы К	150 мкл	1.5 мл
Суспензия GAUSS	1.5 мл	1.5 мл
Спин-колонки SCU с крышками в комплекте с собирательными пробирками	10 шт.	100 шт. (2 × 50 шт.)
Собирательные пробирки	50 шт.	400 шт. (2 × 200 шт.)

4. Условия хранения и транспортирования

Транспортировка: при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте, в упаковке производителя не более 2 недель.

Хранение: «Протеиназу К» и «Буфер для хранения Протеиназы К» хранить при температуре от -25 до -15 °С.
После растворения «Протеиназу К» хранить при температуре от -25 до -15 °С.

Все остальные компоненты набора хранить при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Количество реакций

- BC111T — 10 выделений ДНК.
- BC111M — 100 выделений ДНК.

6. Метод

При добавлении к образцу биоматериала «Лизирующего раствора» и «Протеиназы К» происходит разрушение клеток, инактивация клеточных нуклеаз и депротеинизация. Внесение в лизат «Суспензии GAUSS» (Grinding Advanced Ultra Simple System) и резкое встряхивание на вортексе механически улучшает лизис клеток. Добавление к лизату «Связывающего раствора М» обеспечивает оптимальные условия для связывания ДНК на мембране колонки. Лизат проходит через мембрану во время центрифугирования, в результате чего происходит сорбция ДНК. Серия последующих промывок смесью «Промывочного раствора» и этанола эффективно удаляет оставшиеся на мембране загрязняющие вещества, остатки белков, ингибиторы ПЦР и консерванты. Очищенная и сконцентрированная ДНК смывается «Элюирующим раствором».

7. Основные характеристики

Характеристика	Значение*
Выход ДНК	
Цельная кровь человека или животных (в т.ч. замороженная и тромбированная), 100 мкл	2.17±0.47 мкг
Лейкоцитарная фракция, 50 мкл (из 1 мл крови)	5.2±1.9 мкг
Слюна, 1 мл	1.7±0.5 мкг
Буккальный эпителий	0.142±0.047 мкг
Ночная культура *E. coli*, 2 мл	12.6±2.2 мкг
Культура клеток человека или животных, от 0.5×10^5 до 2×10^6 клеток	
Hela 0.5×10^5 клеток	5.6±0.5 мкг
Hela 2.5×10^5 клеток	5.3±0.5 мкг
Hela 2×10^6 клеток	34±8.3 мкг
Ткани человека или животных, 25 мг (данные приведены для *M. musculus*)	
сердце	6.9±3.5 мкг
почки	23.6±5.3 мкг
мозг	5.5±2 мкг
легкие	5.8±2.7 мкг
печень	9.9±2.1 мкг
мышцы	2.7±1.5 мкг
Объем выделенного образца (элюат)	50–100 мкл
Емкость колонок	до 20 мкг ДНК
Размер фрагментов выделяемой ДНК	100–50 000 п.о.
Чистота препарата по спектрофотометрическим характеристикам A260/A280	От 1.8
Ингибиторы ПЦР	Не выявляются**

* Значения характеристик выделенной ДНК зависят от типа биоматериала, условий и длительности хранения.
** Оценка наличия ингибиторов ПЦР проведена с помощью набора QuantumDNA-Set (кат. # QS004, Евроген).

8. Меры предосторожности

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны для человека.

Все компоненты набора хранить в плотно закрытой таре.

Не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу. «Лизирующий раствор» и «Связывающий раствор М» при попадании в глаза и на кожу могут вызвать раздражение. При попадании компонентов набора на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды.

При работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

9. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

Необходимое оборудование

- Твердотельный термостат.
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением до 11 000 g.
- Миницентрифуга-вортекс.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.

Дополнительные материалы

- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Наконечники для дозатора с фильтрами.
- Этиловый спирт (96%).

10. Биологический материал

Рекомендации по сбору, подготовке и количеству биоматериала приведены в Приложении.

Вид материала	Рекомендации по хранению биологического материала
Цельная кровь человека и животных (в т.ч. замороженная и тромбированная)	От +2 до +8 °C не более 7 дней От -25 до -15 °C не более 1 года
Лейкоцитарная фракция	От +2 до +8 °C не более 3 часов От -25 до -15 °C не более 1 года
Культура клеток человека или животных	Суспензионная культура От +2 до +8 °C не более 3 дней Адгезионная культура От -70 до -15 °C не более 1 года
Ткани человека или животных	От -25 до -15 °C не более 1 года
Ночная культура *E. coli*	От -25 до -15 °C не более 1 года
Слюна	От +2 до +8 °C не более 1 дня
Буккальный эпителий	От +2 до +8 °C не более 7 дней в сухом виде От -25 до -15 °C не более 1 года в сухом виде

11. Протокол

Общее время работы 1 час.

1. **Подготовка растворов перед первым использованием набора**

1.1. Добавьте этиловый спирт (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором» в количестве:

BC111T – 26 мл,
BC111M – 220 мл.

Перемешайте переворачиванием и поставьте галочку на крышке флакона.

1.2. Растворение «Протеиназы К».

ВНИМАНИЕ! ВСЛЕДСТВИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ, ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЙ ОСАДОК «ПРОТЕИНАЗЫ К» МОЖЕТ ОТДЕЛИТЬСЯ ОТ ДНА ПРОБИРКИ И ОКАЗАТЬСЯ НА КРЫШКЕ. ПРИ ВСКРЫТИИ ПРОБИРКИ ПРОСЛЕДИТЕ, ЧТО ОСАДОК ОСТАЛСЯ ВНУТРИ ПРОБИРКИ.

Добавьте «Буфер для хранения Протеиназы К» в пробирку с лиофилизированной «Протеиназой К» в количестве:

BC111T – 120 мкл,
BC111M – 1 200 мкл.

Аккуратно перемешайте пипетированием, инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Затем перемешайте встряхиванием, сбросьте капли центрифугированием.

Поставьте галочку на крышке пробирки.

Растворенную «Протеиназу К» хранить при температуре от -25 до -15 °C.

2. **Выделение ДНК**

Если в флаконах с «Лизирующим раствором» или «Связывающим раствором М» образовался осадок, то перед началом работ прогрейте флаконы при температуре от +37 до +50 °C до полного растворения осадка.

Для улучшения элюции поставьте флакон с «Элюирующим раствором» прогреваться при +56 °C.

ВНИМАНИЕ! ВСЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ ПРОВОДЯТСЯ ПРИ 11 000 g (13 000 ОБ/МИН ДЛЯ НАСТОЛЬНОЙ ЦЕНТРИФУГИ EPPENDORF MINISPIN) ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ.

2.1. Установите термостат на +56 °C перед началом работы.

2.2. Подготовьте свежую смесь для лизиса для N одновременно обрабатываемых образцов:

Компонент смеси для лизиса	Количество, мкл
«Лизирующий раствор»	100 × N
Раствор «Протеиназы К»	10 × N

Аккуратно перемешайте пипетированием.

2.3. Подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 1.5 мл для каждого образца.

2.4. Подготовьте биоматериал: ознакомьтесь с рекомендациями, приведенными в **Приложении** (стр. 11).

2.5. Внесите по 100 мкл свежеприготовленной смеси для лизиса в пробирки с образцами.

2.6. Перемешайте «Суспензию GAUSS» переворачиванием и на вортексе до образования равномерной взвеси. Добавьте по 10 мкл суспензии в пробирки с образцами.

2.7. Тщательно перемешайте содержимое пробирок на вортексе в течение 20 секунд.

2.8. Инкубируйте пробирки в термостате при +56 °C в течение 10 мин, периодически перемешивая на вортексе (2–3 раза).

2.9. Добавьте по 100 мкл этилового спирта (96%) в каждую пробирку, тщательно перемешайте на вортексе.

2.10. Добавьте по 400 мкл «Связывающего раствора М» в каждую пробирку. Тщательно перемешайте содержимое пробирок переворачиванием и на вортексе, пока раствор не станет гомогенным.

2.11. Центрифугируйте пробирки в течение 1 мин.

2.12. Промаркируйте необходимое количество микроцентрифужных колонок с крышкой, поместите их в собирательные пробирки.

2.13. Не дотрагиваясь осадка, отберите и перенесите надосадочную жидкость (около 700 мкл) в соответствующие колонки и центрифугируйте 30 секунд. Перенесите колонки в новые собирательные пробирки.

2.14. Добавьте по 700 мкл «Промывочного раствора» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 30 секунд. Перенесите колонки в новые собирательные пробирки.

2.15. Повторите промывку (п. 2.14) еще 2 раза. Каждый раз переносите колонки в новые собирательные пробирки.

2.16. Центрифугируйте пустые колонки в течение 1 мин для полного удаления остатков промывочного раствора.

2.17. Промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1.5 мл. Перенесите колонки в промаркированные пробирки.

2.18. Оставьте при комнатной температуре на 5 мин колонки с открытой крышкой для испарения следовых количеств спирта.

ВНИМАНИЕ! ЕСЛИ НА КОЛЬЦЕ КОЛОНКИ ОСТАЛИСЬ КАПЛИ «ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА», УДАЛИТЕ ИХ ПИПЕТКОЙ.

2.19. Нанесите в центр мембраны колонок по 100 мкл предварительно прогретого «Элюирующего раствора», закройте крышки и инкубируйте колонки 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 30 секунд для сбора очищенной ДНК.

Для увеличения концентрации ДНК можно уменьшить объем «Элюирующего раствора» до 50 мкл. Не используйте менее 50 мкл «Элюирующего раствора», так как из-за неполного смачивания мембраны колонки может произойти частичная потеря ДНК.

Очищенная ДНК хранится при температуре от -25 до -15 °C до 1 года.

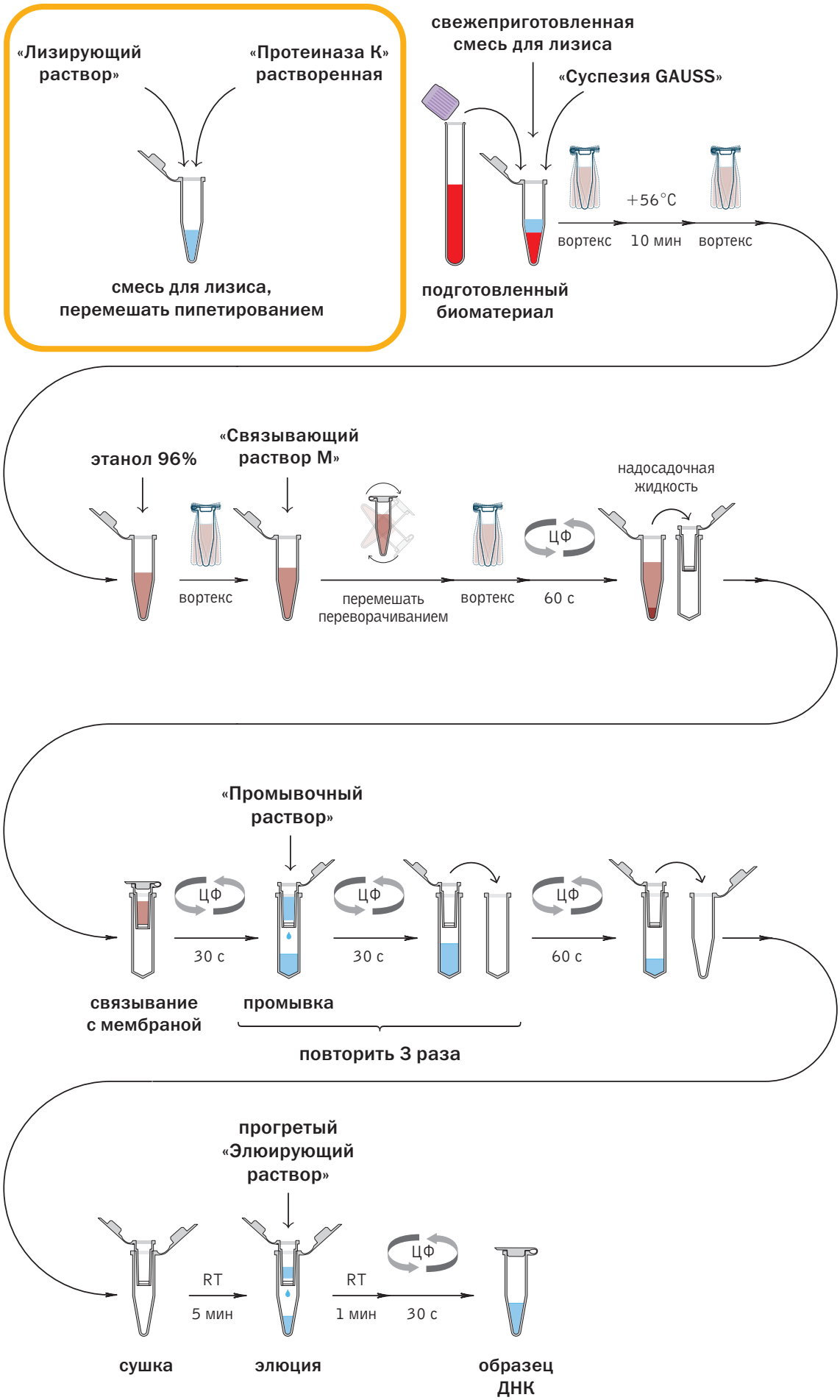

Рисунок 1 – схема выделения ДНК

12. Возможные проблемы и способы их решения

Допускается наличие примесей РНК в препарате ДНК. В таких случаях измерение концентрации ДНК следует проводить флуориметрическим методом. Для очистки препарата ДНК от РНК рекомендуется обработать элюат РНКазой с последующей очисткой ДНК.

13. Приложение

13.1. Рекомендации по сбору и подготовке цельной крови человека или животных

1. При заборе крови используйте антикоагулянты: ЭДТА, цитрат натрия, гепарин.
2. Допускается использование замороженной и тромбированной крови.
3. Перемешайте переворачиванием пробирку с кровью и отберите 100 мкл в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

13.2. Рекомендации по сбору и подготовке лейкоцитарной фракции

1. Для выделения лейкоцитов следует использовать свежую незамороженную кровь.

   Для забора крови допускается использовать консерванты: цитрат натрия и ЭДТА.
2. Центрифугировать 1 мл крови в течение 10 минут при 2 500 g.
3. Отобрать и слить верхнюю фракцию (плазму).
4. Отобрать 50 мкл лейкоцитарной фракции в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

13.3. Рекомендации по сбору и подготовке культур клеток человека или животных

Для эффективного выделения ДНК рекомендуется брать от 0.5×10^5 до 2×10^6 клеток.

Суспензионная культура клеток

1. Отобрать объем культуральной жидкости, содержащий необходимое количество клеток, и центрифугировать при 150 g в течение 7 мин.
2. Аккуратно отобрать (слить) супернатант, не задевая осадок.

   Во избежание потери клеточного материала рекомендуется оставить над клеточным осадком около 15 мкл жидкости.
3. Ресуспендировать клетки в 100 мкл раствора PBS (pH 7.4). Избегать интенсивного пипетирования, чтобы не повредить клетки.
4. Перенести 100 мкл суспензии в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

Адгезионная культура клеток

Для культуральной посуды с площадью поверхности > 10 см^2:

1. Адгезионную культуру клеток снять с поверхности пластика рекомендованным для данной культуры методом и тщательно ресуспендировать клетки в ростовой среде или PBS (pH 7.4).
2. Отобрать объем культуральной жидкости, содержащий примерно 10^5 – 10^6 клеток, и центрифугировать при 150 g в течение 7 мин.
3. Аккуратно отобрать (слить) супернатант, не задевая осадок.

   Во избежание потери клеточного материала рекомендуется оставить над клеточным осадком около 15 мкл жидкости.
4. Ресуспендировать клетки в 100 мкл раствора PBS (pH 7.4). Избегать интенсивного пипетирования, чтобы не повредить клетки.
5. Перенести 100 мкл суспензии в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

Для культуральной посуды с площадью поверхности < 10 см^2:

Допустимо лизировать прикрепленные клетки непосредственно в лунках культурального планшета или в чашке Петри. Для этого:

1. Полностью отобрать культуральную среду и добавить к клеткам 100 мкл раствора PBS (pH 7.4).
2. Добавить в лунку или чашку 100 мкл смеси для лизиса (см. раздел «Протокол» п. 2.2.) и осторожно перемешать пипетированием, избегая образования пены.
3. Перенести 200 мкл лизата в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.6.

13.4. Рекомендации по сбору и обработке тканей человека или животных

Все манипуляции проводить на льду.

1. Поместить 25 мг ткани в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

   Если фрагменты ткани хранились в консерванте, необходимо предварительно удалить его, проведя промывку два раза:

   – добавить равный объем PBS, но не менее 500 мкл, импульсно перемешать на вортексе, центрифугировать при 1 700 g в течение 3 мин;

   – полностью отобрать надосадочную жидкость.
2. Тщательно разотрите фрагменты ткани с помощью пестика.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

13.5. Рекомендации по сбору и подготовке слюны

1. Перед забором слюны не принимать пищу в течение 2 часов.
2. Забор слюны можно произвести в контейнер для сбора слюны или в чистую пробирку (объем от 2 до 15 мл) без использования консервантов.
3. Прополоскать ротовую полость 3 раза чистой теплой водой. Зубную пасту и жидкости для полоскания ротовой полости не использовать!
4. Не повреждая слизистой ротовой полости, пожевать щеки зубами (для отделения эпителиальных клеток).
5. Сплюнуть слюну в контейнер. Объем образца должен составлять от 0.5 до 1 мл.
6. Перед анализом слюну перемешать пипетированием и перенести в чистую пробирку объемом 1.5 мл.
7. Для осаждения эпителиальных клеток центрифугировать пробирку при 8 000 g в течение 5 мин.
8. Не задевая образовавшийся осадок, удалить (слить) надосадочную жидкость (жидкость может иметь повышенную вязкость и «тянуться»), оставив в пробирке рыхлый осадок и не более 100 мкл слюны.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

13.6. Рекомендации по сбору и подготовке буккального эпителия

1. Перед забором буккального эпителия не принимать пищу в течение 2 часов.
2. Забор буккального эпителия можно произвести стерильной ватной палочкой или щеткой для сбора биоматериала FLOQSwabs.
3. Прополоскать ротовую полость 3 раза чистой теплой водой. Зубную пасту и жидкости для полоскания ротовой полости не использовать!
4. Для соскабливания эпителиальных клеток с внутренней поверхности щеки с легким нажимом совершить 20–30 возвратно-поступательных движений, плавно поворачивая ватную палочку. Запрещается прикасаться к ватному тампону рукой или касаться им других предметов!
5. Поместить ватную палочку с собранным материалом в пробирку объемом 1.5 мл. Разрезать палочку таким образом, чтобы конец с собранным эпителием оказался в пробирке; другой конец, за который держались рукой, выбросить.
6. Перед анализом в пробирку с ватной палочкой добавить 200 мкл воды, инкубировать в течение 5–10 мин при комнатной температуре, затем перемешать на вортексе.
7. Перенести не более 100 мкл материала в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

13.7. Рекомендации по сбору и подготовке ночной культуры *E. coli*

1. Перенести 2 мл бактериальной культуры в микроцентрифужную пробирку, осадить клетки центрифугированием в настольной центрифуге в течение 5 минут на скорости не более 1 700 g.
2. Аккуратно отобрать (слить) супернатант, не задевая осадок.

   Во избежание потери клеточного материала рекомендуется оставить над клеточным осадком около 15 мкл жидкости.
3. Ресуспендировать клетки в 100 мкл раствора PBS (pH 7.4). Избегать интенсивного пипетирования, чтобы не повредить клетки.
4. Перенести 100 мкл суспензии в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

Наборы и сервисы Евроген

Н ▸▸▸ – ссылка на страницу НАБОРА

С ▸▸▸ – ссылка на страницу СЕРВИСА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот Н ▸▸▸

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ Н ▸▸▸

Синтез и амплификация кДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸

Клонирование ДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸

Выявление контаминации микоплазмой Н ▸▸▸

Оценка ДНК Н ▸▸▸

Нормализация кДНК Н ▸▸▸ С ▸▸▸

Практикум по генной инженерии Н ▸▸▸

Генотипирование Н ▸▸▸

Синтез олигонуклеотидов и зондов С ▸▸▸

Секвенирование по Сэнгеру С ▸▸▸

NGS секвенирование С ▸▸▸

Синтез генов С ▸▸▸

Сайт-направленный мутагенез С ▸▸▸

Синтез органических соединений С ▸▸▸

Консультация по продуктам: *support@evrogen.ru*

Подробную информацию о наших наборах и сервисах можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru