евроген

ExtractDNA Blood & Cells

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

Номера по каталогу:
BC111T — на 10 реакций
BC111M — на 100 реакций

Инструкция по применению

Версия 9 от 26 сентября 2024 г.

Оглавление

1. Назначение

Набор ExtractDNA Blood & Cells предназначен для удобного и надежного выделения тотальной ДНК из:

– цельной крови человека или животных (в том числе 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

- 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

Компоненты набора	BC111T (10 выделений)	BC111M (100 выделений)
Упаковка №1 из 2		
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 x 1.5 мл)
Суспензия GAUSS	1.5 мл	1.5 мл
Спин-колонки SCU-2	10 шт.	100 шт. (2 x 50 шт.)
Собирательные пробирки	100 шт. (2 x 50 шт.)	500 шт. (10 x 50 шт.)
Упаковка №2 из 2		
Протеиназа К (лиофилизированная)	1.2 мг	12 мг
Буфер для хранения Протеиназы К	150 мкл	1.5 мл

4. Условия хранения и транспортировки

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 –20 °С.

После растворения «Протеиназу К» хранить при температуре –20 °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. 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».

6. 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).

7. Меры предосторожности

Компоненты набора «Лизирующий раствор» и «Связывающий раствор М» содержат вещества, требующие обеспечения специальных мер безопасности:

– хранить в плотно закрытой таре;
– не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу;
– 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.

8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат.
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением до 11 000 g.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Этанол 96%.

9. Биологический материал

Рекомендации по сбору, подготовке и количеству биоматериала приведены в Приложении на стр. 12.

Вид материала	Рекомендации по хранению биологического материала
Цельная кровь человека и животных (в т.ч. замороженная и тромбированная)	+4 °C не более 7 дней -20 °C не более 1 года
Лейкоцитарная фракция	+4 °C не более 3 часов -20 °C не более 1 года
Культура клеток человека или животных	Суспензионная культура +4 °C не более 3 дней Адгезионная культура От -70 до -15 °C не более 1 года
Ткани человека или животных	-20 °C не более 1 года
Ночная культура *E. coli*	-20 °C не более 1 года
Слюна	+4 °C не более 1 дня
Буккальный эпителий	+4 °C не более 7 дней в сухом виде -20 °C не более 1 года в сухом виде

10. Протокол

Общее время работы: 1 час.

10.1. Подготовка растворов

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

BC111T — 26 мл,

BC111M — 220 мл.

Тщательно перемешайте раствор переворачиванием, нанесите пометку о выполнении операции на крышку 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 — 1.2 мл.

Аккуратно перемешайте пипетированием, инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Затем перемешайте встряхиванием, сбросьте капли центрифугированием. Нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

► *Растворенную «Протеиназу К» хранить при температуре –20 °С.*

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

10.2. Выделение ДНК

> **ВНИМАНИЕ!** Все дальнейшие центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

► *Перед началом работы поместите пробирку с «Элюирующим раствором» в термостат на температуру +56 °С.*

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

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

Компонент смеси для лизиса	Количество, мкл
«Лизирующий раствор»	100 x N
Раствор «Протеиназы К»	10 x 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 на стр. 12.

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 °С 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 сек. 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», то 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 –20 °С до 1 года.

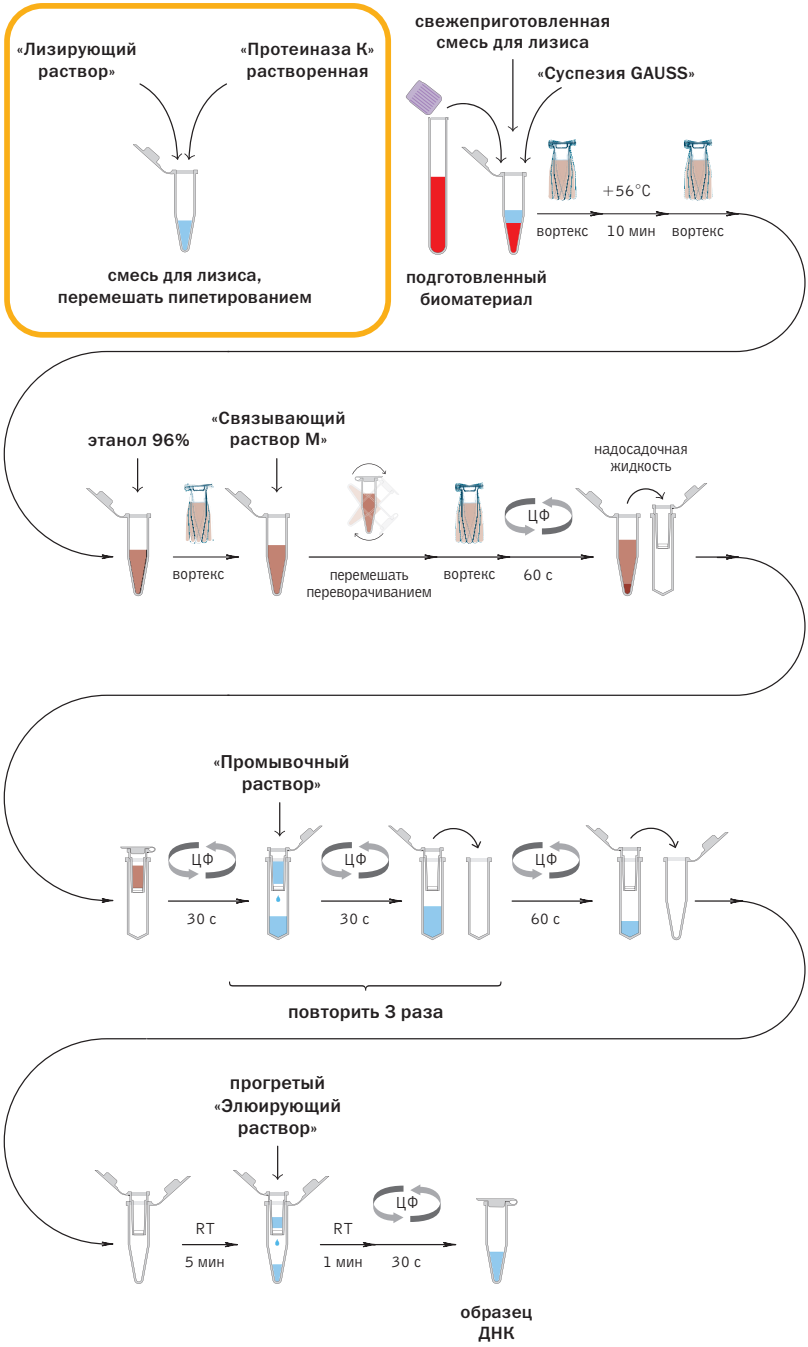

Рисунок 1 – схема выделения ДНК.

11. 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.

12. Приложение

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

1.1. При заборе крови используйте антикоагулянты: ЭДТА, цитрат натрия, гепарин.

1.2. Допускается использование замороженной и тромбированной крови.

1.3. Перемешайте переворачиванием пробирку с кровью и отберите 100 мкл в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

1.4. Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

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

2.1. Для выделения лейкоцитов следует использовать свежую незамороженную кровь. Для забора крови допускается использовать консерванты: цитрат натрия и ЭДТА.

2.2. Центрифугировать 1 мл крови в течение 10 минут при 2 500 g.

2.3. Отобрать и слить верхнюю фракцию (плазму).

2.4. Отобрать 50 мкл лейкоцитарной фракции в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

2.5. Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

12.3. 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.

5. 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.

6. 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.

12.4. Рекомендации по сбору и обработке тканей человека или животных

Все манипуляции проводить на льду.

4.1. 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.

4.2. Тщательно разотрите фрагменты ткани с помощью пестика.

4.3. Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

12.5. Рекомендации по сбору и подготовке слюны

5.1. Перед забором слюны не принимать пищу в течение 2 часов.

5.2. Забор слюны можно произвести в контейнер для сбора слюны или в чистую пробирку (объем от 2 до 15 мл) без использования консервантов.

5.3. Прополоскать ротовую полость 3 раза чистой теплой водой. Зубную пасту и жидкости для полоскания ротовой полости не использовать!

5.4. Не повреждая слизистой ротовой полости, пожевать щеки зубами (для отделения эпителиальных клеток).

5.5. Сплюнуть слюну в контейнер. Объем образца должен составлять от 0.5 до 1 мл.

5.6. Перед анализом слюну перемешать пипетированием и перенести в чистую пробирку объемом 1.5 мл.

5.7. Для осаждения эпителиальных клеток центрифугировать пробирку при 8 000 g в течение 5 минут.

5.8. 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.

5.9. Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

12.6. Рекомендации по сбору и подготовке буккального эпителия

6.1. Перед забором буккального эпителия не принимать пищу в течение 2 часов.

6.2. Забор буккального эпителия можно произвести стерильной ватной палочкой или щеткой для сбора биоматериала FLOQSwabs.

6.3. Прополоскать ротовую полость 3 раза чистой теплой водой. Зубную пасту и жидкости для полоскания ротовой полости не использовать!

6.4. 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!

6.5. 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.

6.6. Перед анализом в пробирку с ватной палочкой добавить 200 мкл воды, инкубировать в течение 5–10 мин при комнатной температуре, затем перемешать на вортексе.

6.7. Перенести не более 100 мкл материала в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

6.8. Далее следуйте основному протоколу, начиная с п. 2.5.

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

7.1. 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.

7.2. Аккуратно отобрать (слить) супернатант, не задевая осадок.

7.3. Во избежание потери клеточного материала рекомендуется оставить над клеточным осадком около 15 мкл жидкости.

7.4. Ресуспендировать клетки в 100 мкл раствора PBS (pH 7.4). Избегать интенсивного пипетирования, чтобы не повредить клетки.

7.5. Перенести 100 мкл суспензии в чистую промаркированную пробирку объемом 1.5 мл.

7.6. 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 ▸▸▸

Синтез генов С ▸▸▸

Сайт-направленный мутагенез 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