



Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

Набор для выделения ДНК из крови на магнитных частицах

Кат. номер MagBlood-100

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с набором, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с набором. Последняя версия протокола доступна на сайте компании ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru). Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей. Протокол обновлён 14.05.2024.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из образцов цельной крови (в том числе замороженной), взятой в одноразовые пробирки со следующими антикоагулянтами: K₃EDTA, цитрат натрия 3.2% и 3.8%, CPDA, гепарин натрия.

Принцип действия набора основан на селективной сорбции нуклеиновых кислот из предварительно лизированного образца на магнитных частицах на основе оксида железа и оксида кремния, последующей промывке и элюции очищенного продукта. Лизис образца происходит в присутствии протеиназы K.

Выделение ДНК возможно как ручным способом, с помощью магнитного штатива, так и автоматическим способом, с использованием автоматической станции **Auto-Pure96 (Allsheng)**.

Выделенная ДНК может быть использована для проведения ПЦР.

Состав набора

MagBlood-100 100 выделений	
Буфер для лизиса LB	30 мл
Буфер для сорбции BB	60 мл
Буфер для промывки WB	4x60 мл
Буфер для элюции EB	15 мл
Магнитные частицы M	4x1.5 мл
Протеиназа K (20 мг/мл), раствор	2x1.2 мл

Меры предосторожности

Осторожно! Буферы LB, BB, WB содержат растворы веществ, оказывающих раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь, оказывает раздражающее действие.

Осторожно! Буферы BB и WB 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.

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.

Эксплуатация

Компоненты: LB, BB, WB, EB, M, протеиназа K стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения (см. на упаковке) и достаточной герметизации флаконов.

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

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

Условия работы

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

Относительная влажность воздуха не более 80 %;

Атмосферное давление 630 – 800 мм. рт. ст.

Материалы и оборудование необходимые для работы

Ручной способ

- Магнитный штатив для микроцентрифужных пробирок на 1.5-2 мл
- Твердотельный термостат, поддерживающий температуру 60 °C
- Вортекс
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 10000 гcf
- Микроцентрифужные пробирки на 1.5-2 мл
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них
- Перчатки резиновые

Автоматический способ

- Глубоколуночный планшет с V-образными лунками на 2 мл, 6 шт.
- Наконечники для магнитных стержней или гребёнка, 1 шт.
- Одноканальные/многоканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них
- Перчатки резиновые

Протокол выделения ДНК. Ручной способ

1) Лизис образцов

1. Пробирку с цельной кровью аккуратно перемешать, не допускать расслоения образца на плазму и клеточную фракцию.
2. В микропробирку отобрать 200 мкл цельной крови.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 200 мкл буфера для лизиса LB.
4. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл протеиназы К (20 мг/мл).
5. Перемешать образец пипетированием или на вортексе 5–10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 минут при 60 °С.

2) Сорбция образца на магнитных частицах

1. Ресуспендировать магнитные частицы перемешиванием вручную или на вортексе до образования однородной суспензии.
2. К лизату добавить равный объём буфера для сорбции ВВ (420 мкл). Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения однородной смеси.
3. Добавить 50 мкл суспензии магнитных частиц, сразу же перемешать пипетированием или на вортексе до получения однородной суспензии.
4. Инкубировать 10 мин.
5. Поместить пробирку с образцом в магнитный штатив. Инкубировать 5 мин.

Примечание: убедиться, что магнитные частицы собрались на стенке пробирки. Если значительная доля частиц осталась в растворе, то увеличить время инкубации.

6. Не убирая пробирку с магнитного штатива, аккуратно отобрать супернатант, не задевая магнитные частицы.

3) Промывка магнитных частиц

1. Добавить в пробирку с магнитными частицами 600 мкл буфера для промывки WB. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения однородной суспензии.
2. Поместить пробирку с образцом в магнитный штатив. Инкубировать 5 мин.

Примечание: убедиться, что магнитные частицы собрались на стенке пробирки. Если значительная доля частиц осталась в растворе, то увеличить время инкубации.

3. Не убирая пробирку с магнитного штатива, аккуратно отобрать супернатант, не задевая магнитные частицы.
4. Повторить п. 1–3. Вторая промывка.
5. Сушить пробирку с магнитными частицами на воздухе при 15–25 °С 5–15 минут или до полного высыхания (устранения запаха спирта).

4) Элюция ДНК

Провести элюцию ДНК по **Варианту 1** (с использованием магнитного штатива) или по **Варианту 2** (с использованием центрифуги). Элюция ДНК по Варианту 2 позволяет убрать посторонние частицы из элюата и получить более чистый раствор ДНК, что не всегда можно сделать при использовании магнитного штатива при ручном выделении ДНК.

4.1) Элюция ДНК. Вариант 1. С использованием магнитного штатива

1. Добавить в пробирку с магнитными частицами 100 мкл буфера для элюции EB. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения однородной суспензии. Инкубировать 5 мин при 15–25 °С.

Примечание: Буфер для элюции – 0.01 М Tris·HCl (pH 8.0). Элюировать образец также можно TE буфером (0.01 М Tris·HCl, 0.001 М EDTA, pH 8.0–8.5) либо водой (pH 8.0–8.5, pH доводить раствором NaOH).

2. Поместить пробирку с образцом в магнитный штатив. Инкубировать 5 мин.

Примечание: убедиться, что магнитные частицы собрались на стенке пробирки. Если значительная доля частиц осталась в растворе, то увеличить время инкубации.

3. Не убирая пробирку с магнитного штатива, аккуратно отобрать, не задевая магнитные частицы, и перенести супернатант, содержащий ДНК, в чистую пробирку.

Важно! При наличии посторонних частиц в элюате центрифугировать образец ДНК 3 мин, 12000 гsf. Перенести супернатант, содержащий ДНК, в чистую пробирку.

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

Примечание: EDTA может ингибировать ферментативные реакции, например, ПЦР.

Примечание: Анализ выделенной ДНК можно провести с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле или с помощью ПЦР.

Примечание: Концентрацию выделенной ДНК нельзя определить с помощью УФ-спектрометрии, рекомендуется использовать флуориметрические методы определения концентрации ДНК.

4.2) Элюция ДНК. Вариант 2. С использованием центрифугирования

1. Добавить в пробирку с магнитными частицами 100 мкл буфера для элюции EB.

Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения однородной суспензии. Инкубировать 5 мин при 15–25 °С.

Примечание: Буфер для элюции – 0.01 М Tris·HCl (рН 8.0). Элюировать образец также можно TE буфером (0.01 М Tris·HCl, 0.001 М EDTA, рН 8.0–8.5) либо водой (рН 8.0–8.5, рН доводить раствором NaOH).

2. Центрифугировать 3 мин, 12000 rcf. Перенести супернатант, содержащий ДНК, в чистую пробирку.

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

Примечание: EDTA может ингибировать ферментативные реакции, например, ПЦР.

Примечание: Анализ выделенной ДНК можно провести с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле или с помощью ПЦР.

Примечание: Концентрацию выделенной ДНК нельзя определить с помощью УФ-спектрометрии, рекомендуется использовать флуориметрические методы определения концентрации ДНК.

Протокол выделения ДНК. Автоматический способ. Auto-Pure 96 (Allsheng)

1) Подготовка и лизис образцов

1. Планшет, позиция № 1. Гребёнка. Поместить в чистый 96-луночный планшет гребёнку.
2. Планшет, позиция № 2. Лизис. Добавить в лунку планшета 200 мкл буфера для лизиса LB, 20 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл), затем 200 мкл цельной крови.

Примечание: допускается предварительно подготовить смесь буфера для лизиса LB и протеиназы К. Не хранить данную смесь.

1 проба. 200 мкл буфера для лизиса LB, 20 мкл раствора протеиназы К.

100 проб (+10%). 24 мл буфера для лизиса LB, 2.2 мл раствора протеиназы К, суммарный объём 26.6 мл.

3. Планшет, позиция № 3. Промывка №1. Добавить в лунку планшета 800 мкл буфера для промывки WB.
4. Планшет, позиция № 4. Промывка №2. Добавить в лунку планшета 500 мкл буфера для промывки WB.
5. Планшет, позиция № 5. Промывка №3. Добавить в лунку планшета 500 мкл буфера для промывки WB.
5. Планшет, позиция № 8. Элюция ДНК. Добавить в лунку планшета 100 мкл буфера для элюции EB.

Примечание: Буфер для элюции – 0.01 M Tris·HCl (pH 8.0).

6. Запустить программу «MB_lys2» на станции Auto-Pure 96 (Allsheng).

Примечание: на данном этапе происходит лизис образца.

7. После окончания программы «MB_lys2» извлечь планшет с позиции № 2, содержащий готовый лизат.

2) Сорбция и очистка образца на магнитных частицах

1. В чистой пробирке подготовить смесь буфера для сорбции BB и магнитных частиц. Перемешать на вортексе или вручную до получения однородной суспензии. Смесь готовить после окончания программы «MB_lys2», не хранить смесь.

1 проба. 450 мкл буфера для сорбции BB, 50 мкл магнитных частиц M.

100 проб (+10%). 50 мл буфера для сорбции BB, 5.5 мл магнитных частиц M, суммарный объём 55.5 мл.

2. Внести в лунки планшета с лизатом, находившемся на позиции № 2 по 500 мкл смеси буфера для сорбции BB и магнитных частиц.
3. Вернуть планшет с лизатом на позицию №2.

4. Запустить программу «MB_pur2» на станции Auto-Pure 96 (Allsheng).

Примечание: на данном этапе происходит очистка ДНК.

5. После завершения программы «MB_pur2» выделенная ДНК будет находиться в планшете на позиции №8.

6. Элюат, содержащий ДНК, хранить при -20°C .

Примечание: Анализ выделенной ДНК можно провести с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле или с помощью ПЦР.

Примечание: Концентрацию выделенной ДНК нельзя определить с помощью УФ-спектрометрии, рекомендуется использовать флуориметрические методы определения концентрации ДНК.

Важно! Файлы с программами «MB_lys2» и «MB_pur2» для станции Auto-Pure 96 (Allsheng) можно получить следующими способами:

- самостоятельно загрузить на сайте компании ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru), для удобства в поисковой строке указать каталожный номер продукта (MagBlood-100);
- связаться с сотрудниками отдела продаж компании ООО «Биолабмикс» (sales@biolabmix.ru, тел. 8-800-600-88-76).

Условия хранения:

Набор для выделения РНК хранить при температуре от $+15$ до $+25^{\circ}\text{C}$. Магнитные частицы хранить при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$. Раствор протеиназы К хранить при температуре от -18 до -24°C . Срок годности см. на упаковке.

Условия транспортировки:

Транспортировку набора, производить при температуре от $+15$ до $+25^{\circ}\text{C}$. Допускается транспортирование при температуре не выше $+25^{\circ}\text{C}$ в течение 14 суток.