

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот

ПРОБА–НК–ПЛЮС

Информация о комплекте

Назначение:

Комплект реагентов ПРОБА–НК–ПЛЮС предназначен для получения препарата нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из биологического материала.

Комплект предназначен для получения большего объема ДНК (300 мкл) по сравнению с комплектом реагентов ПРОБА–НК (50 мкл) с целью проведения в дальнейшем большего числа ПЦР-исследований.

Метод:

Лизис с последующей очисткой и осаждением нуклеиновых кислот.

Материал для исследования:

Плазма крови, слюна, мокрота, молоко, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища и др.

Особенности комплекта:

По сравнению с комплектом реагентов ПРОБА–НК увеличено количество буфера для растворения.

Количество определений: 50

Состав комплекта

Реактив	Количество	
• Лизирующий раствор	15 мл	1 флакон
• Реагент для преципитации	20 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №1	25 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №2	15 мл	1 флакон
• Буфер для растворения	15 мл	1 флакон

Инструкция по применению

1. Взятие и подготовка биологического материала к выделению нуклеиновых кислот**1.1. Плазма крови**

Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2–3 раза.

В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия.

Внимание! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

1.1.1. Центрифугируйте пробирки с кровью при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18–25 °С).

1.1.2. После центрифугирования отберите автоматической пипеткой верхнюю фракцию (плазма) и перенесите в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

1.2. Мокрота**1.2.1. Способ 1**

1.2.1.1. Примерно 500 мкл биологического материала перенесите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

1.2.1.2. Добавьте к пробе мокроты равный объем 10% трехзамещенного фосфорнокислого натрия х 12Н₂О, интенсивно встряхните.

1.2.1.3. Смесь инкубируйте в течение 18–24 ч при температуре 37°С, затем нейтрализуйте 1М НСl до pH 6,8–7,4.

1.2.1.4. Центрифугируйте в течение 20 мин при 1000 об/мин.

1.2.1.5. Надосадочную жидкость слейте в 5% раствор хлорамина для обеззараживания.

1.2.1.6. Добавьте к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешайте пипетированием и перенесите в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

1.2.1.7. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.2.1.8. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

1.2.2. Способ 2

1.2.2.1. В контейнер с образцом добавьте муколизин в соотношении 5:1 (5 частей муколизина к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера.

1.2.2.2. Закрутите крышку контейнера, встряхните содержимое и инкубируйте 20–30 мин при комнатной температуре (18–25°C), каждые 2–3 мин встряхивая контейнер.

1.3. Соскобы эпителиальных клеток

1.3.1. Перенесите соскоб эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.) с помощью одноразового стерильного зонда в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с консервантом (или с 300 мкл физиологического раствора стерильного), аккуратно перемешайте.

1.3.2. Извлеките зонд, прижимая его к стенке пробирки и отжимая избыток жидкости. Пробирку плотно закройте.

1.3.3. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.3.4. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

1.4. Моча

1.4.1. Порцию утренней мочи (примерно 50 мл) соберите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

1.4.2. Перенесите 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

1.4.3. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.4.4. Наилучшим образом удалите надосадочную жидкость.

1.4.5. Добавьте к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

1.4.6. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.4.7. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

1.5. Слюна, ликвор, синовиальная жидкость

1.5.1. Слюну, ликвор, синовиальную жидкость (примерно 500 мкл) соберите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

1.5.2. Перенесите 500 мкл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

1.5.3. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.5.4. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок+жидкая фракция).

1.5.5. Добавьте к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

1.5.6. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.5.7. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

1.6. Сперма, секрет предстательной железы

1.6.1. Перенесите 20–30 мкл жидкого материала пипеткой в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с консервантом (или с 500 мкл физиологического раствора стерильного).

1.6.2. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.6.3. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

1.7. Молоко

1.7.1. Соберите материал в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

1.7.2. Аккуратно перемешайте и перенесите 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл. Полученный материал готов для выделения НК.

2. Выделение нуклеиновых кислот

Примечание. В лизирующем растворе допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65 °С в течение 10 мин.

2.1. Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по одной пробирке объемом 1,5 мл.

Примечание. Если после подготовки материала к выделению НК в пробирках объемом 1,5 мл остается 100 мкл материала, то выделение НК можно проводить в этих пробирках, промаркировав их соответствующим образом.

2.2. Внесите по 100 мкл подготовленного биоматериала в пробирки для исследуемых образцов. В пробирку «К-» биоматериал не вносится.

2.3. В пробирку, маркированную «К-», внесите 100 мкл физиологического раствора стерильного.

2.4. Добавьте в каждую пробирку 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь её края.

2.5. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 сек.

2.6. Термостатируйте пробирки 15 мин при 65 °С, осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

2.7. Добавьте 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.

2.8. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.

2.9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

- 2.10. Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и 3–5 раз аккуратно переверните пробирку.
- 2.11. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- 2.12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 2.13. Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и 3–5 раз аккуратно переверните пробирку.
- 2.14. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- 2.15. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 2.16. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65°C в течение 5 мин.
- 2.17. Добавьте к осадку 300 мкл буфера для растворения. Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 сек.
- 2.18. Прогрейте пробирки при 65°C в течение 10 мин. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 2.19. Осадите капли центрифугированием пробирок при 13000 об/мин в течение 30 сек.
Препарат НК готов для проведения ПЦР.
Препарат ДНК можно хранить при минус 20°C в течение 1 месяца или при минус 70 С в течение 1 года.

Условия хранения

Комплект реагентов для выделения НК ПРОБА–НК–ПЛУС следует хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности. Срок годности комплекта – 6 месяцев.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов ПРОБА–НК–ПЛУС, следует обращаться в ООО «НПО ДНК–Технология» по адресу:
117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, 11 этаж
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru