

Комплект реагентов для выделения ДНК

ПРОБА–ГС

Комплектации ПРОБА–ГС, ПРОБА–ГС–ПЛЮС

Информация о комплекте

Назначение:

Комплект реагентов ПРОБА–ГС предназначен для получения препарата ДНК из биологического материала. Комплектация ПРОБА–ГС–ПЛЮС предназначена для получения большего объема ДНК (300 мкл) по сравнению с комплектацией ПРОБА–ГС (100 мкл) с целью проведения в дальнейшем большего числа ПЦР–исследований.

Метод:

Лизис с последующей сорбцией ДНК на носителе. Метод удобен и технологичен, однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Из–за большого количества стадий добавления и удаления растворов при работе с образцом требуется аккуратность, т.к. возможна перекрестная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК.

Материал для исследования:

Мокрота, плазма крови, слюна, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, молочная сыворотка, измельченные ткани, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, а также материал, в котором присутствует значительное количество ингибирующих примесей.

Особенности комплекта:

В комплектации ПРОБА–ГС–ПЛЮС увеличено количество элюирующего буфера по сравнению с комплектацией ПРОБА–ГС.

Количество определений:

50 (комплектации ПРОБА–ГС/ПРОБА–ГС–ПЛЮС)
 100 (комплектация ПРОБА–ГС)

Состав комплекта

Реактив	Количество			
	50 определений		100 определений	
• Лизирующий раствор	7,5 мл	1 флакон	15 мл	1 флакон
• Сорбент	1,0 мл	1 пробирка	1,0 мл	2 пробирки
• Промывочный раствор №1	10 мл	1 флакон	20 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №2	10 мл	1 флакон	20 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №3	10 мл	1 флакон	20 мл	1 флакон
• Элюирующий раствор	5 мл/15 мл*	1 флакон	10 мл	1 флакон

* – комплектации ПРОБА–ГС/ПРОБА–ГС–ПЛЮС

Инструкция по применению

1.1. Взятие и подготовка биологического материала к выделению ДНК

1.1.1. Мокрота

1.1.1.1. Способ 1

- 1.1.1.1.1. Примерно 500 мкл материала перенесите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.
- 1.1.1.1.2. Добавьте к пробе мокроты равный объем 10% трехзамещенного фосфорнокислого натрия x 12H₂O, интенсивно встряхните.
- 1.1.1.1.3. Смесь инкубируйте в течение 18–24 ч при температуре 37°C, затем нейтрализуйте 1М HCl до pH 6,8–7,4.
- 1.1.1.1.4. Центрифугируйте в течение 20 мин при 1000 об/мин.
- 1.1.1.1.5. Надосадочную жидкость слейте в 5% раствор хлорамина для обеззараживания.
- 1.1.1.1.6. Добавьте к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешайте пипетированием и перенесите в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 1.1.1.1.7. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

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

1.1.1.2. **Способ 2**

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

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

1.1.2. **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.

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

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

1.1.3. **Слюна, ликвор, синовиальная жидкость**

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

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

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

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

1.1.3.5. Добавьте к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

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

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

1.1.4. **Моча**

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

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

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

1.1.4.4. Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.

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

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

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

1.1.5. **Сперма, секрет предстательный железы**

1.1.5.1. Перенесите 20–30 мкл жидкого материала пипеткой в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с консервантом (или с 300 мкл физиологического раствора стерильного).

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

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

1.1.6. **Соскобы эпителиальных клеток**

1.1.6.1. 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.

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

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

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

Полученный материал готов для выделения ДНК.

1.2. **Выделение ДНК**

Примечание. В лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50 °C в течение 15–20 мин.

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

Примечание. Если после подготовки материала к выделению ДНК в пробирках объёмом 1,5 мл останется 50 мкл материала, то выделение ДНК можно проводить в этих пробирках, промаркировав их соответствующим образом.

- 1.2.2. Внесите по 50 мкл подготовленного биоматериала в пробирки для исследуемых образцов. В пробирку «К-» биоматериал не вносится.
- 1.2.3. В пробирку, маркированную «К-», внесите 50 мкл физиологического раствора стерильного.
- 1.2.4. Приготовьте смесь лизирующего раствора с сорбентом. Смешайте в отдельной пробирке:
 - 150 x (N+1) мкл лизирующего раствора,
 - 20 x (N+1) предварительно ресуспендированного сорбента,где N + 1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.
- 1.2.5. Добавьте в каждую пробирку по 170 мкл полученной смеси.
- 1.2.6. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 сек.
- 1.2.7. Термостатируйте пробирки в течение 20 мин при 50°C.
- 1.2.8. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 1.2.9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 1.2.10. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 1.2.11. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 1.2.12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 1.2.13. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 1.2.14. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 1.2.15. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 1.2.16. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 1.2.17. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 1.2.18. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 1.2.19. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 50°C в течение 5 мин.
- 1.2.20. Добавьте к осадку 100 (комплектация ПРОБА–ГС) или 300 мкл (комплектация ПРОБА–ГС–ПЛЮС) элюирующего раствора и встряхните пробирки на вортексе в течение 5–10 сек.
- 1.2.21. Прогрейте пробирки при 50°C в течение 5 мин.
- 1.2.22. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин. Если образец предполагается хранить более 7 суток, перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку.
Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР–амплификации.
Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2–8°C. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить пп. 2.21 – 2.22.
Более 7 суток препарат ДНК следует хранить при температуре минус 20°C. Срок хранения – до 6 месяцев.

Условия хранения

Комплект реагентов для выделения ДНК ПРОБА–ГС следует хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности. После вскрытия упаковки лизирующий раствор и промывочный раствор №1 следует хранить в темном месте. Срок годности комплекта – 6 месяцев.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для выделения ДНК ПРОБА–ГС, 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

ООО «НПО ДНК-Технология»
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail: mail@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru