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 D-Blood для выделения ДНК из крови

Кат. номер D-Blood-10, D-Blood-50, D-Blood-250

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом. Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей. Протокол обновлён 06.12.2023.

Описание

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из следующих образцов:

1. Цельная кровь, взятая в одноразовые пробирки со следующими антикоагулянтами: K3 EDTA, цитрат натрия 3,2% и 3,8%, CPDA, гепарином натрия;
2. Плазма крови;
3. Сыворотка крови;
4. Криопреципитат;
5. Лейкоцитарная масса;
6. Ликвор.

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

Выделенная ДНК может быть использована для проведения ПЦР, ник-трансляции.

Состав набора

	D-Blood-10 10 выделений	D-Blood-50 50 выделений	D-Blood-250 250 выделений	
			Вариант 1	Вариант 2
Буфер для лизиса LB	5 мл	25 мл	2x60 мл	120 мл
Буфер для промывки WB1	5.5 мл	30 мл	3x50 мл	2x75 мл
Буфер для промывки WB2	5.5 мл	30 мл	3x50 мл	2x75 мл
Буфер для элюции EB	5 мл	15 мл	60 мл	60 мл
Протеиназа K	240 мкл	1.2 мл	5x1.2 мл	5x1.2 мл
Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца	10 шт	50 шт	250 шт	250 шт

Набор D-Blood-250 поставляется в одном из двух вариантов

Меры предосторожности

Осторожно! Буферы для лизиса LB и для промывки WB1 содержат раствор хаотропной соли, оказывающий раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

Осторожно! Буферы для промывки WB1 и WB2 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, WB1, WB2, EB стабильны после вскрытия флаконов при температуре от +15°C до +25°C в течение всего срока годности при условии достаточной герметизации флаконов. Раствор протеиназы K стабилен в течение всего срока годности.

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.

Оборудование и материалы, не входящие в набор

- Твердотельный термостат, поддерживающий температуру 56±1 °C;
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 10000 rcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Раствор хлорида натрия (9 г/л NaCl) или физраствор;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл.

Протокол выделения ДНК.

1) Подготовка и лизис образцов.

- Цельная кровь.

1. Пробирку с цельной кровью аккуратно перемешать, не допускать расслоения образца на плазму и клеточную фракцию. В микропробирку отобрать 200 мкл цельной крови.
2. Чистым одноразовым наконечником добавить 400 мкл буфера для лизиса LB.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл протеиназы K.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
5. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56 ºC.

- Плазма, сыворотка, лейкоциты.

- Плазма богатая лейкоцитами.
  Центрифугировать образец цельной крови, взятой в пробирку с антикоагулянтами (K3 EDTA или Цитрат натрия) 1500 rcf, 3 мин. Отобрать плазму.
- Плазма бедная лейкоцитами.
  Центрифугировать образец цельной крови, взятой в пробирку с антикоагулянтами (K3 EDTA или Цитрат натрия) 3000 rcf, 3 мин. Отобрать плазму.
- Сыворотка.
  Использовать гепаринизированную кровь. Пробирку с кровью оставить при комнатной температуре на 15 мин, затем тонкой стеклянной палочкой (или наконечником для одноканального дозатора) аккуратно, не разрушая клетки, отделить сгусток от стенок пробирки и центрифугировать 10 мин, 3000 rcf. Сразу после центрифугирования отделить сыворотку от сгустка.

Примечание: не рекомендовано центрифугировать образцы плазмы и сыворотки на оборотах выше 3000 rcf, это может привести к гемолизу образцов.

- Суспензия лейкоцитов.

Отобрать 1000 мкл образца цельной крови в микропробирку, центрифугировать 5 мин, 3000 rcf при комнатной температуре (15–25°C). После центрифугирования можно различить 3 разные фракции: верхний прозрачный слой – плазма; промежуточный слой – лейкоцитарная пленка, содержащая концентрированные лейкоциты; нижний слой - концентрированные эритроциты.

Аккуратно отобрать промежуточной слой, не захватывая верхний и нижний слои, перенести в чистую микропробирку. Промыть образец 500 мкл физраствора. Центрифугировать 5 мин, 3000 rcf при комнатной температуре (15–25°C). Отобрать промежуточный слой и перенести его в микропробирку. Суспендировать клетки в 200 мкл физрастовра.

1. В микропробирку отобрать 200 мкл необходимого образца (плазмы, сыворотки или суспензии лейкоцитов).
2. Чистым одноразовым наконечником добавить 400 мкл буфера для лизиса LB.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл протеиназы K.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
5. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56ºC.

- Ликвор.

1. Отобрать 500 мкл цельной крови в микропробирку;
2. Центрифугировать образец 10 мин, 5000 rcf при комнатной температуре (15–25°C).
3. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке осадок и примерно 50 мкл надосадочной жидкости.
4. Добавить к осадку 500 мкл физрастовра. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
5. Центрифугировать образец 10 мин, 3000 rcf при комнатной температуре (15–25°C).
6. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке осадок и примерно 200 мкл надосадочной жидкости.
7. Чистым одноразовым наконечником добавить 400 мкл буфера для лизиса LB.
8. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл протеиназы K.
9. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
10. Сбросить капли коротким центрифугированием.
11. Инкубировать 10 мин при температуре 56 ºC.

- Сухое пятно крови.

Для работы использовать специализированную фильтровальную бумагу.

1. Выдавить 3 круга (Диаметр, не менее 1.2 мм) из сухого пятна крови. Поместить вырезанные круги в пробирки на 1.5 мл.
2. Чистым одноразовым наконечником добавить 400 мкл буфера для лизиса LB.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 20 мкл протеиназы K.
4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
5. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин при температуре 56 ºC.

2) Нанесение на колонку.

1. Перенести лизат на колонку. Плотно закрыть крышку колонки.
2. Центрифугировать 30 с, 10000 rcf. Удалить фильтрат.

3) Промывка колонки.

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 10000 rcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 10000 rcf. Удалить фильтрат.
3. Центрифугировать колонку 3 мин, 10000 rcf для полного удаления буфера WB2.

4) Элюция ДНК

1. Перенести колонку в новую микропробирку на 1.5-2 мл (не входит в состав набора). Плотно прижать колонку к пробирке.
2. Нанести на центр фильтра колонки от 60 до 200 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25^{0}C). Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf.
   - При увеличении объёма элюции увеличивается количество ДНК и снижается концентрация ДНК. Количество ДНК при элюции объёмами 60 и 200 мкл может различаться в 1.5-2 раза.
   - Вторая элюция новой аликвотой буфера для элюции EB или повторное нанесение элюата на колонку позволяет дополнительно увеличить количество ДНК.
   - Буфер для элюции содержит 0.01 M Tris•HCl (pH 8.0). Элюировать образец также можно TE буфером (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0-8.5) либо водой (pH 8.0-8.5, pH доводить раствором NaOH).
3. Элюат, содержащий ДНК, хранить при -20˚C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 мМ.

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

Анализ выделенной ДНК

Целостность выделенной ДНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Количество выделенной ДНК из можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

Характерный максимум поглощения для ДНК при λ = 260 нм.

Посчитать концентрацию ДНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:

A_{260} * разбавление * 50 мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности A_{260}/A_{280} ~1.7-2.0.

Примечание: ДНК, выделенная из плазмы и сыворотки крови, не детектируется с помощью гель-электрофореза или УФ-спектрометрии в силу низкого количества ДНК, содержащиеся в образцах.

Условия хранения и транспортировки:

Набор хранить при комнатной температуре (15-25°C). Срок годности см. на упаковке. Раствор протеиназы К хранить при температуре от -18 до -24°C. Срок годности см. на упаковке.

Транспортирование набора производить при температуре от +15 до +25°C. Допускается транспортирование при температуре не выше +25°C в течение 14 суток.