

Набор реагентов для экстракции ДНК человека

Инструкция пользователя

Оглавление

1.	ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ	1
1.1	Описание продукта	1
1.2	Компоненты набора и состав	2
1.3	Условия хранения	2
1.4	Сопутствующие материалы	3
1.5	Гарантии качества	3
2.	СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ	3
2.1	Предварительная подготовка материала	3
2.2	Протокол экстракции	3
3.	ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТОКОЛЫ	5
3.1	Образцы волос	5
3.2	Образцы ногтей	6
3.3	Выделение ДНК из парафиновых блоков	6
3.4	Дифференциальный лизис	7
3.5	Выделение ДНК из костной ткани	8
	ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	10

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

1.1 Описание продукта

Набор реагентов CO_rDIS «ЭКСТРАКТ» предназначен для получения препаратов ДНК из биологического материала человека для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции. Принцип метода основан на протеиназной обработке исследуемого материала. В присутствии хаотропных веществ, входящих в состав лизирующего буфера, ДНК сорбируется на поверхности магнитных частиц, а затем отмывается от потенциальных ингибиторов ПЦР с использованием отмывочных растворов. Финальная элюция нуклеиновых кислот с поверхности магнитных частиц позволяет

получить высокоочищенный препарат ДНК, пригодный для проведения полимеразной реакции.

Лизирующий буферный раствор, используемый в составе набора, позволяет добиться высокой эффективности лизиса биологического материала, в том числе, помещенного на различные материалы-носители (бумага, синтетические и натуральные ткани, ткани со сложной волокнистой структурой).

Это позволяет добиться максимального результата при экстракции ДНК из «контактных» биологических следов (смывы биологического материала на ватных тампонах, фрагменты одежды человека, отпечатки пальцев, предметы личного пользования и т.д.).

Полученные препараты могут быть напрямую использованы для постановки ПЦР с наборами для амплификации STR-маркеров CO_rDIS.

1.2 Компоненты набора и состав

1. Лизирующий буфер	1 флакон (30 мл)
2. Связывающий буфер	1 флакон (20 мл)
3. Отмывочный буфер 1	1 флакон (30 мл)
4. Отмывочный буфер 2	1 флакон (60 мл)
5. Элюирующий буфер	1 флакон (5 мл)
6. Магнитные частицы	2 пробирки (2x1 мл)
7. Протеиназа К	1 пробирка (1 мл)

Дополнительно для набора CO_rDIS «ЭКСТРАКТ» Декальцин:

Лизирующий буфер «Декальцин» 1 флакон (30 мл)

Дополнительно для набора CO_rDIS «ЭКСТРАКТ» FFPE:

Реагент для депарафинизации	1 флакон (60 мл)
Раствор TE	1 флакон (50 мл)
Раствор Tris 1M	1 флакон (50 мл)

1.3 Условия хранения

Компоненты набора: **Лизирующий буфер, Связывающий буфер, Отмывочный буфер 1, Отмывочный буфер 2, Элюирующий буфер, Лизирующий буфер «Декальцин», Реагент для депарафинизации, Раствор TE, Раствор Tris 1M** хранить при температуре +15°C / +25°C

Компоненты набора: **Протеиназа К, Магнитные частицы** хранить при температуре +4°C.

Срок годности компонентов набора - 18 месяцев при соблюдении условий хранения.

1.4 Сопутствующие материалы

Необходимые оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

Термостат с возможностью нагрева до 56°C.

Магнитный штатив

Раствор Дитиотреитола (ДТТ) 1М

1.5 Гарантии качества

Качество компонентов набора проверено и контролируется в процессе производства. Каждый выпущенный лот реагентов регулярно проверяется на соответствие заявленным характеристикам в течение 18 месяцев. В случае возникновения вопросов относительно качества набора просим незамедлительно связаться с ООО “ГОРДИЗ”.

2. СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ

Стандартный протокол экстракции может применяться для выделения ДНК из мягких тканей (кровь, слюна, биологические жидкости, мышечные ткани, эпителий), а также из контактных биологических следов на предметах-носителях (смывы биологического материала, предметы одежды, отпечатки пальцев).

2.1 Предварительная подготовка материала

Подготовьте исследуемый биоматериал для исследования. Внесите в чистую пробирку не более 50 мкл биологического материала в жидком состоянии или не более 20 мкг биологического материала в твердом состоянии. В случае, если исследуемый образец находится на материале-носителе, необходимо произвести вырезки материала-носителя размером не более 5x5 мм. Объем исследуемого материала подбирается с учетом необходимости полного погружения образца в 300 мкл смеси лизирующего буфера и протеиназы К.

2.2 Протокол экстракции

1. Поместите исследуемый биологический материал в пробирку, объемом 1.5ml. Добавьте к исследуемому материалу 290 μl Лизирующего буфера и 10 μl Протеиназы К. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
2. Поместите пробирку в термостат. Инкубируйте препарат в течение 1 часа при 56°C. В случае, если лизис исследуемого материала проходит

недостаточно эффективно (для образцов, содержащих трудно лизируемый материал), допускается добавление дополнительного количества раствора Протеиназы К (до 10 μ l) с последующей инкубацией в течение 1 часа при 56^oC.

3. После завершения процедуры лизиса проведите центрифугирование полученного препарата (5 мин, > 10 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата. Не задевая твердого нелизированного осадка, перенесите жидкую фракцию в чистую пробирку объемом 1.5ml для продолжения процедуры экстракции. Для более эффективного сбора жидкой части лизата, могут использоваться специализированные колонки для центрифугирования впитывающих материалов - «Spin Basket».
4. К полученному раствору (жидкая часть лизата) добавьте 20 μ l раствора Магнитных частиц. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
5. Добавьте в пробирку с образцом 180 μ l Связывающего буфера. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
6. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 5-10 минут (до полного просветления раствора в зависимости от модели магнитного штатива).
7. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую фазу, не касаясь осадка с магнитными частицами.
8. Добавьте к магнитным частицам 300 μ l Отмывочного буфера 1. Извлеките пробирку из штатива. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
9. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 5-10 минут (до полного просветления раствора).
10. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую фазу, не касаясь осадка с магнитными частицами.
11. Добавьте 300 μ l Отмывочного буфера 2. Извлеките пробирку из штатива. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
12. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 5-10 минут (до полного просветления раствора).
13. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую фазу, не касаясь осадка с магнитными частицами.

14. Повторите операции №№ 11-13.
15. Не закрывая крышку пробирки, инкубируйте магнитные частицы на столе 10 минут (до полного высыхания капель жидкости на стенках пробирки)
16. Добавьте к магнитным частицам 50 μ l Elution buffer. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
17. Инкубируйте препарат в термостате 5 минут при 56°C. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
18. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 5-10 минут (до полного просветления раствора).
19. Не удаляя пробирку из магнитного штатива, перенесите жидкую фазу (очищенный препарат ДНК) в чистую пробирку.
20. Рекомендуется хранить полученный препарат при температуре 4°C в течение 3-4 недель. Для более длительного хранения препарата ДНК рекомендуется осуществлять хранение при -20°C

3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТОКОЛЫ

3.1 Образцы волос

Предварительная подготовка материала:

Исследуемые образцы волос тщательно промыть бидистиллированной водой и высушить. Высушенные образцы нарезать в новую пробирку. Длина фрагментов стержня волоса не должна превышать 5 мм. Выделение ДНК может быть также проведено из образцов волос не подвергнутых предварительной промывке. Такой подход может повысить суммарный выход экстрагированной ДНК. Однако, необходимо иметь в виду, что наложения, присутствующие на стержне волоса могут являться источником контаминации посторонней ДНК.

Протокол экстракции

1. Добавьте к исследуемому материалу 290 μ l Lysis Buffer, 10 μ l Proteinase K и 3 μ l раствора 1M DTT. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
2. Следуйте процедурам стандартного протокола выделения ДНК, описанному в разделе 2.2 (пункты 2-20)

3.2 Образцы ногтей

Предварительная подготовка материала:

Исследуемые образцы ногтевых пластин очистить от подногтевого содержимого. Выделение ДНК из биологического материала, присутствующего в подногтевом содержимом может быть проведено с использованием стандартного протокола исследования. Ногтевые пластины необходимо тщательно промыть бидистиллированной водой и высушить. Высушенные образцы ногтевых пластин нарезать в новую пробирку. Размер фрагментов ногтевых пластин не должен превышать 5x5 мм.

Протокол экстракции

1. Добавьте к исследуемому материалу 290 μ l Lysis Buffer, 10 μ l Proteinase K и 3 μ l раствора 1M DTT. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
2. Следуйте процедурам стандартного протокола выделения ДНК, описанному в разделе 2.2 (пункты 2-20)

3.3 Выделение ДНК из парафиновых блоков

Протокол валидирован для депарафинизации фрагментов мягких тканей, заключенных в парафин и подготовки образцов к дальнейшей экстракции ДНК реактивами набора CO_rDIS «ЭКСТРАКТ» для дальнейшей постановки реакций с наборами CO_rDIS. Использование полученных препаратов ДНК для других целей требует дополнительной валидации.

Протокол экстракции

1. Внести 1–3 среза, содержащих гистологический препарат в пробирку 1.5 мл.
2. Внести 600 μ l реагента для депарафинизации. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
3. Инкубировать 30 мин при 56°C.
4. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки супернатант.
5. Внести 500 μ l 96 % этанола. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
6. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки супернатант.

7. Внести 500 μ l 96 % этанола. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
8. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки супернатант.
9. Внести 500 μ l раствора TE. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
10. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки супернатант.
11. Внести 500 μ l 1 M Tris. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
12. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки супернатант.
13. Дальнейшая экстракция депарафинизированных фрагментов мягких тканей, объемом не более 100 мкл проводится в соответствии со стандартным протоколом выделения ДНК, описанным в разделе 2.2 (пункты 1-20).

3.4 Дифференциальный лизис

Протокол предназначен для проведения дифференциальной экстракции биологического материала, содержащего сперматозоиды в смеси с эпителиальными клетками.

Протокол экстракции

1. Поместите исследуемый биологический материал в пробирку, объемом 1.5ml. Добавьте к исследуемому материалу 290 μ l Лизирующего буфера и 10 μ l Протеиназы К. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
2. Поместите пробирку в термостат. Инкубируйте препарат в течение 1 часа при 56°C. В случае, если лизис исследуемого материала проходит недостаточно эффективно (для образцов, содержащих трудно лизируемый материал), допускается добавление дополнительного количества раствора Протеиназы К (до 10 μ l) с последующей инкубацией в течение 1 часа при 56°C.
3. После завершения процедуры лизиса проведите центрифугирование полученного препарата (5 мин, 10 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата. Не задевая твердого нелизировавшего осадка, перенесите жидкую фракцию в чистую пробирку объемом 1.5ml для продолжения процедуры экстракции (эпителиальный компонент) – Препарат №1.

4. К твердому нелизировавшему остатку добавьте 290 μ l Лизирующего буфера и 10 μ l Протеиназы К. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
5. Поместите пробирку в термостат. Инкубируйте препарат в течение 30 минут при 56°C.
6. После завершения процедуры лизиса проведите центрифугирование полученного препарата (5 мин, 10 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата. Не задевая твердого нелизировавшего осадка, удалите максимально возможный объем жидкой фракции.
7. К твердому нелизировавшему осадку добавьте 290 μ l Lysis Buffer, 10 μ l Proteinase K и 3 μ l раствора 1M DTT. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
8. Поместите пробирку в термостат. Инкубируйте препарат в течение 1 часа при 56°C.
9. После завершения процедуры лизиса проведите центрифугирование полученного препарата (5 мин, 10 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата. Не задевая твердого нелизировавшего осадка, перенесите жидкую фракцию в чистую пробирку объемом 1.5ml для продолжения процедуры экстракции (спермальный компонент) – Препарат №2. Для более эффективного сбора жидкой части лизата, могут использоваться специализированные колонки для центрифугирования впитывающих материалов - «Spin Basket».
10. Дальнейшая экстракция полученных препаратов №1 (эпителиальная фракция) и №2 (спермальная фракция) проводится в соответствии со стандартным протоколом выделения ДНК, описанным в разделе 2.2 (пункты 4-20).

3.5 Выделение ДНК из костной ткани

Протокол предназначен для экстракции ДНК из образцов костной ткани. Подготовьте исследуемый биоматериал для исследования. Для эффективного лизиса костного материала, образец ткани должен быть предварительно измельчен до состояния костного порошка. Рекомендуемое количество материала для исследования составляет 50 мг порошка (объем навески примерно равен 50-60 мкл).

Протокол экстракции

1. Поместите навеску костного порошка в пробирку, объемом 1.5ml. Добавьте к исследуемому материалу 290 μ l лизирующего буфера «Декальцин», 10 μ l Протеиназы К и 3 μ l раствора 1M DDT. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
2. Поместите пробирку в термостат. Инкубируйте препарат в течение 2 часов при 56^oC. Для более эффективного лизиса костного материала рекомендуется раз в 15 минут проводить дополнительную процедуру вортексирования лизируемого материала.
3. После завершения процедуры лизиса проведите центрифугирование полученного препарата (5 мин, > 10 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата. Не задевая твердого нелизированного осадка, перенесите жидкую фракцию в чистую пробирку объемом 1.5ml для продолжения процедуры экстракции. Финальный объем лизата должен составлять не менее 200 μ l. В случае, если объем лизата составляет менее 200 μ l необходимо провести повторную процедуру центрифугирования исходного препарата и отбора жидкой фракции лизата.
4. К полученному раствору (жидкая часть лизата) добавьте 20 μ l раствора Магнитных частиц. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
5. Добавьте в пробирку с образцом 180 μ l Связывающего буфера. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
6. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 5-10 минут (до полного просветления раствора в зависимости от модели магнитного штатива).
7. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую фазу, не касаясь осадка с магнитными частицами.
8. Добавьте к магнитным частицам 300 μ l Отмывочного буфера 1. Извлеките пробирку из штатива. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
9. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 5-10 минут (до полного просветления раствора).
10. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую фазу, не касаясь осадка с магнитными частицами.

11. Добавьте 300 μ l Отмывочного буфера 2. Извлеките пробирку из штатива. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
12. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 5-10 минут (до полного просветления раствора).
13. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую фазу, не касаясь осадка с магнитными частицами.
14. Повторите операции №№ 11-13.
15. Не закрывая крышку пробирки, инкубируйте магнитные частицы на столе 10 минут (до полного высыхания капель жидкости на стенках пробирки)
16. Добавьте к магнитным частицам 50 μ l Elution buffer. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
17. Инкубируйте препарат в термостате 5 минут при 56°C. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
18. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 5-10 минут (до полного просветления раствора).
19. Не удаляя пробирку из магнитного штатива, перенесите жидкую фазу (очищенный препарат ДНК) в чистую пробирку.
20. Рекомендуется хранить полученный препарат при температуре 4°C в течение 3-4 недель. Для более длительного хранения препарата ДНК рекомендуется осуществлять хранение при -20°C

ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель: ООО «ГОРДИЗ»

Юридический и почтовый адрес: 143026 г. г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул. Большой Бульвар, д.42, стр. 1, пом.337.

Телефон/факс: (499) 670-40-41

Домашняя страница: www.gordiz.ru

e-mail: gordiz@gordiz.ru