

## Набор реагентов для экстракции ДНК человека

### Инструкция пользователя

#### Оглавление

<b>1.</b>	<b>ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ</b>	<b>2</b>
1.1	Описание продукта	2
1.2	Компоненты набора и состав	3
1.3	Условия хранения	3
1.4	Сопутствующие материалы	4
1.5	Гарантии качества	4
<b>2.</b>	<b>СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ</b>	<b>5</b>
2.1	Предварительная подготовка материала	5
2.2	Протокол экстракции	5
<b>3.</b>	<b>ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТОКОЛЫ</b>	<b>7</b>
3.1	Образцы волос	7
3.2	Образцы ногтей	7
3.3	Выделение ДНК из парафиновых блоков	8
3.4	Дифференциальный лизис	9
3.5	Выделение ДНК из костной ткани	10
<b>4.</b>	<b>ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ</b>	<b>12</b>

История изменений:

Версия документа	Дата	Описание	Раздел
240325	25.03.24	Внесены изменения в протокол экстракции на этапе добавления Связывающего буфера.	- Раздел 2 Стандартный протокол Пункт 2.2 Протокол экстракции Подпункт 5. - Раздел 3 Дополнительные протоколы Пункт 3.5 выделение ДНК из костной ткани Подпункт 5

## 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

### 1.1 Описание продукта

Набор реагентов CO<sub>r</sub>DIS «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.).

Набор реагентов CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» FFPE предназначен для получения препаратов ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции.

Особенностью набора «ЭКСТРАКТ» FFPE является уникальный комплект реагентов, не содержащий ксилола и других агрессивных растворителей. Работа с набором не требует специальных условий и может производиться на обычном лабораторном столе.

Набор CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» ДЕКАЛЬЦИН был разработан специально для выделения ДНК из костных тканей. Особенностью набора является уникальный лизирующий буфер, обеспечивающий высокоэффективную экстракцию биомолекул из костной ткани.

Набор CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» DL предназначен для проведения дифференциальной экстракции биологического материала, содержащего сперматозоиды в смеси с эпителиальными клетками.

Полученные препараты могут быть напрямую использованы для постановки ПЦР с наборами для амплификации STR-маркеров CO<sub>r</sub>DIS.

## 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<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» Декальцин:

Лизирующий буфер «Декальцин»	1 флакон (30 мл)
------------------------------	------------------

Дополнительно для набора CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» FFPE:

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

Дополнительно для набора CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» DL:

Колонки SemenSpin	25шт
Пробирки для колонок SemenSpin	75шт

## 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, Колонки SemenSpin, Пробирки для колонок SemenSpin хранить при температуре +15°C / +25°C.

Компоненты набора: **Протеиназа К, Магнитные частицы** хранить при температуре +2°C / +8°C.

Допускается режим транспортировки при температуре от +15°C до +25°C в течении 14 календарных дней. При более длительной транспортировке набора необходимо разуккомплектовать наборы реагентов и обеспечить хранение следующих компонентов наборов: Протеиназа К, Магнитные частицы при температуре от +2°C до +8°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 мг 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 1.5 мл. Добавьте к исследуемому материалу 290 мкл Лизирующего буфера и 10 мкл 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 мкл) 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 часть лизата в чистую пробирку объемом 1.5 мл для продолжения процедуры экстракции. Для более эффективного сбора жидкой части лизата, могут использоваться специализированные колонки для центрифугирования впитывающих материалов – CO<sub>r</sub>DIS UniSpin (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру US-520)

4. К полученному раствору (жидкая часть лизата) добавьте 20 мкл 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 мкл Связывающего буфера. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Поместить пробирку на 10 мин в шейкер (900 об/мин) при комнатной температуре. В отсутствии шейкера возможно оставить пробирку с образцом при комнатной температуре на 10 мин, перемешивая и кратко центрифугируя на микроцентрифуге-вортексе каждые 2-3 мин.
6. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 2-3 минуты (до полного просветления раствора в зависимости от модели магнитного штатива).
7. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую часть лизата, не касаясь осадка с магнитными частицами.
8. Добавьте к магнитным частицам 300 мкл 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 2-3 минуты (до полного просветления раствора).
10. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую часть лизата, не касаясь осадка с магнитными частицами.
11. Добавьте 300 мкл 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 2-3 минуты (до полного просветления раствора).
13. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую часть лизата, 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 мкл Элюирующего буфера. 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 2-3 минуты (до полного просветления раствора).
19. Не удаляя пробирку из магнитного штатива, перенесите жидкую часть лизата (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 мкл Лизирующего буфера, 10 мкл Протеиназы К и 15 мкл раствора 1М ДТТ (не входит в состав набора). 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 ногтей 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 мкл Лизирующего буфера, 10 мкл Протеиназы К и 15 мкл раствора 1М ДТТ (не входит в состав набора). 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

Данный протокол предназначен для использования с компонентами набора CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» FFPE. Протокол валидирован для депарафинизации фрагментов мягких тканей, заключенных в парафин и подготовки образцов к экстракции ДНК для дальнейшей постановки реакций с наборами CO<sub>r</sub>DIS. 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 мкл 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 жидкую часть лизата.
5. Внести 500 мкл 96 % этанола. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
6. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки жидкую часть лизата.
7. Внести 500 мкл 96 % этанола. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
8. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки жидкую часть лизата.



9. Внести 500 мкл раствора ТЕ. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
10. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки жидкую часть лизата.
11. Внести 500 мкл 1 M Tris. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
12. Центрифугировать 2 мин при максимальных оборотах. Удалить из пробирки жидкую часть лизата.
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

Данный протокол предназначен для использования с компонентами набора CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» DL для проведения дифференциальной экстракции биологического материала, содержащего сперматозоиды в смеси с эпителиальными клетками.

#### Протокол экстракции

1. Поместите исследуемый биологический материал в колонку SemenSpin с Пробиркой для колонок SemenSpin объемом 1.5 мл. Добавьте к исследуемому материалу 290 мкл Лизирующего буфера и 10 мкл Протеиназы К. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
1. Поместите пробирку в термостат. Инкубируйте препарат в течение 1 часа при 56°C. После завершения процедуры лизиса проведите центрифугирование полученного препарата (2 мин. 7 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата.
2. Пробирку для колонок SemenSpin с очищенным лизатом необходимо отложить и использовать для дальнейшего анализа в качестве эпителиального компонента – **Препарат №1**. Колонку SemenSpin с нелизировавшимся остатком поместите в чистую Пробирку для колонок SemenSpin
3. К твердому нелизировавшему остатку добавьте 290 мкл Лизирующего буфера и 10 мкл Протеиназы К. Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.

4. Поместите пробирку в термостат. Инкубируйте препарат в течение 30 минут при 56°C.
5. После завершения процедуры лизиса проведите центрифугирование полученного препарата (2 мин., 7 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата. Удалите лизат и поместите колонку SemenSpin в чистую Пробирку для колонок SemenSpin.
6. К твердому нелизированному осадку добавьте 290 мкл Лизирующего буфера, 10 мкл Протеиназы К и 3 мкл раствора 1М ДТТ (не входит в состав набора). Кратко перемешайте смесь на вортексе. Проведите краткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирки.
7. Поместите пробирку в термостат. Инкубируйте препарат в течение 30 минут при 56°C.
8. После завершения процедуры лизиса проведите центрифугирование полученного препарата (2 мин. 7 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата. Жидкая часть лизата переместится в Пробирку для колонок SemenSpin. В колонке SemenSpin останется нелизированная часть объекта (или предмета носителя). Переместите жидкую часть лизата в пробирку для лизата. Доведите объем жидкой части лизата до 300 мкл раствором Лизирующего буфера, если объем недостаточен. Пробирку для лизата используйте для продолжения процедуры экстракции (спермальный компонент) - **Препарат №2**.
9. 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

Данный протокол предназначен для использования с компонентами набора CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСТРАКТ» ДЕКАЛЬЦИН 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 200 мг порошка.

#### Протокол экстракции

1. Поместите 200 мг навески костного порошка в пробирку, объемом 1.5 мл. Добавьте к исследуемому материалу 300 мкл Лизирующего буфера «Декальцин», 10 мкл Протеиназы К и 15 мкл раствора 1М ДТТ (не

- входит в состав набора). 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°C. 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 (3 мин, > 10 000 gcf) для разделения жидкой и твердой части лизата. Не задевая твердого нелизировавшего осадка, перенесите жидкую часть лизата в чистую пробирку объемом 1.5 мл для продолжения процедуры экстракции. Доведите объем лизата до 300 мкл раствором Лизирующего буфера, если объем недостаточен.
  4. К полученному раствору (жидкая часть лизата) добавьте 20 мкл 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 мкл Связывающего буфера. Перемешайте препарат с частицами на вортексе. Поместить пробирку на 10 мин в шейкер (900 об/мин) при комнатной температуре. В отсутствие шейкера возможно оставить пробирку с образцом при комнатной температуре на 10 мин, перемешивая и кратко центрифугируя на микроцентрифуге-вортексе каждые 2-3 мин.
  6. Поместите пробирку с препаратом в магнитный штатив. Инкубируйте препарат в магнитном штативе на столе 2-3 минуты (до полного просветления раствора в зависимости от модели магнитного штатива).
  7. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую часть лизата, не касаясь осадка с магнитными частицами.
  8. Добавьте к магнитным частицам 300 мкл 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 2-3 минуты (до полного просветления раствора в зависимости от модели магнитного штатива).
  10. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую часть лизата, не касаясь осадка с магнитными частицами.
  11. Добавьте 300 мкл 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 2-3 минуты (до полного просветления раствора в зависимости от модели магнитного штатива).
13. Не удаляя пробирки из штатива, полностью отберите жидкую часть лизата, 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 мкл Элюирующего буфера. 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 2-3 минуты (до полного просветления раствора в зависимости от модели магнитного штатива).
19. Не удаляя пробирку из магнитного штатива, перенесите жидкую часть лизата (очищенный препарат ДНК) в чистую пробирку.
20. В связи с высоким содержанием ионов кальция в препаратах ДНК, полученных из костных останков, при проведении амплификации не рекомендуется вносить более 5 мкл препарата в реакцию.
21. 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

#### 4. 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](http://www.gordiz.ru)

**e-mail:** [gordiz@gordiz.ru](mailto:gordiz@gordiz.ru)