



Diatom™ DNA Prep 200

**Набор реагентов для выделения ДНК из различного
биологического материала**

(ТУ 9398-001-73867468-2012)

И н с т р у к ц и я



Для справок и консультаций: тел/факс +7(499) 988-61-68,
+7(495) 508-29-16
e.mail lab@galartdiag.ru

Март 2015 г

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Набор реагентов **Diatom™ DNA Prep 200** предназначен для выделения ДНК из различных природных материалов (жидкостей, мелкоизмельченных твердых материалов, пятен крови и т.д.), а также для быстрой очистки ДНК из клинических проб (цельной крови, плазмы, сыворотки, мочи, соскобов слизистой и т.д.).
- 1.2. Набор реагентов **Diatom™ DNA Prep 200** может быть использован в научно-исследовательских и клиничко-диагностических лабораториях специалистами по молекулярной генетике и ДНК-диагностике.
- 1.3. Продолжительность выделения ДНК из 4-8 жидких проб около 25 мин. Выделение ДНК из сухих пятен или мелкоизмельченного твердого материала может длиться до нескольких часов в зависимости от обрабатываемого материала.
- 1.4. Набор рассчитан на 100 выделений из 200 мкл жидкости или на 50 выделений из 400 мкл жидкости или же из большего объема жидкости, при соблюдении соответствующих объемных пропорций. При выделении ДНК из сухих проб (засохшие пятна крови на одежде, волосы и т.д.) мелкоизмельченная проба должна быть полностью погружена в **Лизирующий реагент**

2. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор реагентов **Diatom™ DNA Prep 200** основан на использовании **Лизирующего реагента** с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для лизиса клеток, солиubilизации клеточного дебриса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии **Лизирующего реагента** ДНК активно сорбируется на **NucleoS-сорбенте**, затем легко отмывается от других компонентов (белков и др.) и солей спиртовым раствором. ДНК, элюированная из сорбента **ЭкстраГеном Е** или чистой водой, может быть напрямую использована по назначению.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 8.1. **Лизирующий реагент** может храниться при комнатной температуре до одного года. Для более длительного хранения, более одного года, **Лизирующий реагент** следует хранить в холодильнике при 2-8 °С.
- 8.2. Набор нельзя замораживать. При появлении осадка солей в охлажденном **Лизирующем реагенте** перед его использованием следует подогреть до 50-60 °С до полного растворения осадка.
- 8.3. Рабочий раствор **Солевого буфера** следует хранить в герметично закрытой посуде при 2-8 °С.
- 8.4. **ЭкстраГен Е** следует хранить в холодильнике при 2-8 °С до одного года. **ЭкстраГен Е** нельзя замораживать.



Галарт
Диагностикум

ООО «Галарт-Диагностикум»

Для справок и консультаций: тел/факс +7(499) 988-61-68,
+7(495) 508-29-16

e.mail lab@galartdiag.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- 3.1. ДНК выделенная из свежего биологического материала (цельной крови, клеточной культуры, гомогената ткани и т.д.) является высокомолекулярной, около 40-50 тыс.н.п..
- 3.2. Набор реагентов обеспечивает высокую чистоту выделенной ДНК - **OD_{260/280} нм 1,6-2,0**.
- 3.3. Выход чистой ДНК из цельной крови человека составляет 5-10 мкг на 200 мкл крови.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. Все компоненты набора в используемых концентрациях не являются токсичными.
- 4.2. При работе с набором реагентов следует надевать резиновые перчатки, так как в состав готового **Лизирующего** реагента входит сильный денатурирующий агент гуанидинтиоцианат.
- 4.3. Для предотвращения контаминации от пробы к пробе рекомендуется работать с пипетками и наконечниками со специальными антиконтаминационными фильтрами.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

- **Lysis reagent (Лизирующий)**, готов к применению - 4 флакона по 30 мл (общий объем 120 мл).
- **Saline buffer (Солевой)** - 10-кратный буфер, 1 флакон, 10 мл.
- **NucleoS (Суспензия сорбента)**, готов к применению - 4 пробирки по 1,0 мл.
- **ExtraGene E (ЭкстраГен Е, суспензия смеси ионообменников)**, - 2 флакона по 10 мл;

6. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- 6.1. Термостат для пробирок, поддерживающий температуру 65 ± 2 °С
- 6.2. Микроцентрифуга, развивающая скорость до 10 000 г.
- 6.3. Ротатор
- 6.4. Вортекс.
- 6.5. Пипетки автоматические (от 10 до 1000 мкл).
- 6.6. Водоструйный насос.
- 6.7. Пробирки и наконечники для пипеток.
- 6.8. Цилиндр мерный на 200 - 500 мл.
- 6.9. Перчатки резиновые.
- 6.10. Спирт этиловый, 96%.
- 6.11. Вода бидистиллированная.

7. ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

- 7.1. *Приготовление рабочего раствора Солевого буфера.* Содержимое флакона с 10-кратным **Солевым буфером**, 10 мл, перенести в мерный цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 100 мл и 96% этиловым спиртом до метки 300 мл и перемешать. Готовый рабочий раствор **Солевого буфера** следует хранить в герметично закрытой посуде при температуре 4 °С.
- 7.2. В пробирку объемом 1,5 мл внести 200 мкл исследуемой пробы, добавить 800 мкл **Лизирующего реагента** и перемешать содержимое пробирки переворачиванием (5-10 раз). Интенсивное встряхивание смеси не рекомендуется.
- 7.3. Термостатировать пробирку со смесью 5-7 мин. при температуре 65 °С. Если выделение ДНК проводится из твердого сухого мелкоизмельченного материала, то следует термостатировать 30-40 мин.
- 7.4. После термостатирования центрифугировать пробирку со смесью 10 сек при 5000 об/мин в том случае, если смесь содержит несолубилизованный клеточный дебрис или другой нерастворенный осадок. Прозрачный супернатант целиком перенести в чистую пробирку.

- 7.5. В пробирку с чистой смесью добавить 20-40 мкл суспензии сорбента **NucleoS** (40 мкл, если выделение ДНК проводится из цельной крови или другой богатой ДНК жидкости). Перед использованием **NucleoS** следует интенсивно перемешать до гомогенной суспензии на вортексе.
- 7.6. Пробирку поместить на ротатор и перемешивать 10 мин (10-20 об/мин)
- 7.7. Центрифугировать 10 сек при 5000 об.в мин.
- 7.8. Осторожно, не задевая осадок, удалить супернатант с помощью водоструйного насоса.
- 7.9. К осадку добавить 400 мкл **Лизирующего реагента**, тщательно перемешать на вортексе до полного гомогенного состояния.
*Примечание: Если суспендирование затруднено (при большой нагрузке ДНК) из-за слипания сорбента, то его необходимо вначале суспендировать наконечником пипетки, а затем на вортексе.
- 7.10. Добавить в пробирку 1 мл рабочего раствора **Солевого буфера** (п.7.1).
- 7.11. Перемешать содержимое пробирки переворачиванием пробирки 5-10 раз
- 7.12. Центрифугировать 10 сек при 5000 об. в мин.
- 7.13. Осторожно удалить супернатант, не задевая осадок, с помощью водоструйного насоса.
- 7.14. Добавить в пробирку 1 мл **Солевого буфера**, перемешать содержимое пробирки на вортексе, центрифугировать 10 сек при 5000 об. в мин., осторожно удалить супернатант, не задевая осадок, с помощью насоса.
- 7.15. Повторить положение 7.14.
- 7.16. Посушить осадок при температуре 65 °С в течение 3-4 мин.
- 7.17. В эту же пробирку внести 100-200 мкл **ЭкстраГена Е**.
***Внимание! ЭкстраГен Е следует отбирать от общего объема при постоянном перемешивании!**
- 7.18. Суспендировать содержимое пробирки на вортексе 5-10 сек до получения гомогенной суспензии, затем термостатировать 4-5 мин при 65 °С.
- 7.19. Еще раз суспендировать содержимое пробирки на вортексе перед центрифугированием.
- 7.20. Центрифугировать 1 мин при 10000 об. в мин.
- 7.21. Перенести супернатант с ДНК в чистую пробирку. ДНК хранить при температуре минус 20 °С.