**Протокол выделения сцДНК из плазмы крови набором «ДНК-Плазма-М-RT»**

Внимательно изучите инструкцию к набору. Обратите внимание на разделы «Отбор проб», «Пробоподготовка». Результат анализа во многом зависит от качества биоматериала.

Прогрейте реагенты, чтобы не было осадка, их температура должна быть комнатной (20-25оС). Для этого можно использовать термостат. Установите температуру 60оС (она потребуется в последующем и для элюции), поставьте флаконы на нагревательную часть термостата, периодически перемешивайте растворы. Подготовьте Растворы для промывки №1 и №2. Хранить набор «Плазма-М-RT» следует при комнатной температуре.

Успешное выделение ДНК возможно только тогда, когда не только реагенты, но и плазма комнатной температуры. Если она заморожена или хранилась в холодильнике, то достаньте ее за 30-40 мин до анализа для разморозки и прогревания до комнатной температуры (добавление к 2 мл холодной плазмы 600 мкл лизирующего раствора комнатной температуры ведет к общему охлаждению полученного раствора). Лизис при более низкой температуре негативно отражается на качестве выделения.

Выделение ДНК проводится минимум из 2 мл образца плазмы. Для каждого образца необходимо подготовить 1 пробирку на 10 мл и 2 пробирки на 1,5 или 2 мл. Подписать пробирки соответственно образцам.

**Процедура выделения:**

1. В пробирку объемом 10 мл внести 600 мкл лизирующего раствора и добавить 2 мл плазмы. Перемешать раствор, переворачивая пробирку 5-7 раз.

2. Инкубировать при комнатной температуре 8-10 мин, периодически перемешивая раствор. Для улучшения эффективности лизиса можно положить пробирки с плазмой и лизирующим раствором на разогретый до 60оС термостат.

 3. По окончании лизиса внести в пробирку с плазмой (п. 1) 3 мл буфера для связывания ДНК и 20 мкл суспензии магнитных частиц. Перемешать, переворачивая пробирку 5-7 раз.

 4. Поставить пробирку в лабораторный штатив и инкубировать при комнатной температуре 17-20 мин, периодически перемешивая раствор, чтобы магнитные частицы находились во взвешенном состоянии. Связывание ДНК с магнитными частицами происходит при комнатной температуре, нагрев не требуется.

5. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке (обычно требуется 2-3 минуты) и, не вынимая пробирку из магнитного штатива, удалить супернатант с помощью аспиратора или дозатора с наконечником на 1000 мкл. Минимизируйте потери магнитных частиц при выделении. Выдерживайте пробирку на магнитном штативе, пока раствор не станет прозрачным.

6. Внести в пробирку 700 мкл раствора для промывки №1. Полностью ресуспендировать магнитные частицы в растворе пипетированием и перенести получившуюся суспензию магнитных частиц в растворе для промывки №1 в 1,5 мл пробирку. Максимально полно смывайте магнитные частицы со стенки пробирки промывочными растворами и аккуратно переносите их без потерь. Чтобы не допустить перекрестной контаминации используйте отдельный наконечник для каждого образца, протирайте корпус дозатора салфеткой, смоченной спиртом, после переноса каждого образца из фалькона в пробирку.

7. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется 1 мин), и тщательно удалить супернатант.

8. Перенести пробирку в лабораторный штатив и внести 700 мкл раствора для промывки №2. Тщательно перемешать на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

9. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется 1 мин), и тщательно удалить супернатант.

10. Повторить пункты «8» и «9». После последней промывки постарайтесь наиболее полно удалить промывочный раствор. Подождите 5 сек после удаления основного объема раствора, дождитесь, пока стекут его остатки со стенок пробирки и удалите их. Для этого удобно использовать аспиратор.

11. Поместить пробирку с открытой крышкой в термостат и инкубировать при 60°C 10 мин для просушки магнитных частиц и удаления остаточного этанола.

12. Внести в пробирку 60 мкл элюента. Тщательно ресуспендировать частицы пипетированием. При добавлении элюента постарайтесь полностью смыть магнитные частицы со стенки пробирки струей элюента, помогая при этом концом наконечника. Пипетируйте раствор 3-5 раз, чтобы разрушить крупные агрегаты магнитных частиц.

 13. Инкубировать пробирку в термостате при 60°C 10 мин, периодически аккуратно взбалтывая раствор для перемешивания магнитных частиц рукой (не вортексируйте!).

14. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки. Перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новую пробирку.

При постановке ПЦР пробирку с выделенной ДНК рекомендуется держать на магнитном штативе. Желательно выделенную ДНК сразу использовать для постановки ПЦР. Можно хранить ДНК в холодильнике, согласно инструкции к набору, однако сцДНК довольно быстро подвергается деградации. Если требуется долговременное хранение, пробирку с ДНК необходимо заморозить. Допускается только однократная заморозка.

