**Методические рекомендации по использованию наборов для выделения ДНК из** **образцов** **нетрадиционного биоматериала (лейкоцитарная пленка, лимфоциты, костный мозг, слюна, буккальный эпителий, культура клеток)**

Наборы реагентов **“ДНК-Ткань-Ф”** и **“ДНК-Плазма-М”** при необходимости могут быть использованы для выделения ДНК из различного биологического материала (цельная кровь, лейкоцитарная пленка, костный мозг, цитологические препараты и др.). Для этого следует несколько модифицировать протокол, скорректировав объемы используемых реагентов для лизиса и связывания ДНК. Объемы растворов для промывки №1 и №2 остаются неизменными. Объем элюента следует подобрать исходя из оптимальной концентрации и количества ДНК, необходимого для последующего анализа.

Консистенция биологического материала, используемого для анализа, может быть твердой и жидкой структуры. Исходя из этого, следует использовать рекомендации по выделению ДНК из нетрадиционного материала, учитывая его структуру, близкую к описанным ниже примерам. Рекомендуемый для анализа объем жидкого материала – 100-200 мкл, твердого – от 10 мг.

**Следует понимать, что данные наборы специфичны по материалу для выделения ДНК, и их использование для нетрадиционного материала не гарантирует получение достаточного количества ДНК надлежащего качества.**

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012г.

1. **Процедура получения биологического материала.**

1.1. Образцы периферической крови.

1.1.1. Взятие крови проводится в пластиковые пробирки с добавленной в качестве антикоагулянта EDTA или CPDA. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта. Содержимое пробирки перемешать переворачиванием 2–3 раза. Для анализа следует использовать 100-200 мкл цельной крови.

1.1.2. Для отделения плазмы следует центрифугировать пробирки при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18–25°С) и отобрать верхний слой (плазму) в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5-2 мл.

1.1.3. Клетки крови (лейкоцитарную фракцию цельной крови, лейкоцитарную пленку) следует отбирать после центрифугирования цельной крови и удаления плазмы. Используя наконечник с фильтром, аккуратно собрать лейкоцитарную массу с поверхности осадка клеток в объеме 0,2 мл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

 1.1.4. При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в течение 2 суток без заморозки. При использовании EDTA следует отделить плазму в течение 2-3 часов с момента взятия крови. При использовании EDTA образец плазмы (не цельной крови!) должен доставляться в лабораторию в течение 16-24 ч после взятия материала (рекомендуется максимально ускорять доставку и осуществлять ее на льду или в термоконтейнерах при температуре - 20°С). Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

 1.2. Мокрота.

 Способ 1

1.2.1. Примерно 500 мкл биологического материала перенести в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

1.2.2. К пробе мокроты добавить равный объем 10% трёхзамещенного фосфорнокислого натрия х 12Н2О, интенсивно встряхнуть.

1.2.3. Смесь инкубировать в течение 18–24 ч при температуре 37°С, затем нейтрализовать 1М НСl до рН 6,8– 7,4.

1.2.4.. Центрифугировать в течение 20 мин при 1000 об/мин.

1.2.5 Надосадочную жидкость слить в 5% раствор хлорамина для обеззараживания.

1.2.6. Добавить к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешать пипетированием и перенести в пластиковую пробирку объёмом 1,5-2 мл.

1.2.7. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.2.8. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция). Полученный материал готов для выделения НК.

Способ 2

1.2.9. В контейнер с образцом добавить муколизин в соотношении 5:1 (5 частей муколизина к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера. Закрутить крышку контейнера, встряхнуть содержимое и инкубировать 20–30 минут при комнатной температуре (18–25оС), каждые 2–3 минуты встряхивая контейнер. Полученный материал готов для выделения НК. Обработанную мокроту допускается хранить в контейнере в течение суток при температуре от 2–8°С или длительно при температуре не выше минус 16 °С (в случае необходимости повторного выделения РНК/ДНК).

 1.3. Соскобы эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.).

1.3.1. Соскобы эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.) с помощью одноразовых стерильных зондов перенести в пластиковые пробирки объёмом 1,5-2 мл с консервантом (или 500 мкл физиологического раствора), аккуратно перемешать.

1.3.2. Зонд извлечь, прижимая его к стенке пробирки и отжимая избыток жидкости. Пробирку плотно закрыть. Полученный материал готов для выделения НК. Перед взятием соскоба из цервикального канала необходимо удалить слизь стерильным ватным тампоном.

1.4. Моча.

1.4.1. Порцию утренней мочи (примерно 50 мл) следует собрать в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

1.4.2. Перенести весь объем материала во флакон объемом 50 мл.

1.4.3. Центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 мин.

1.4.4. Удалить надосадочную жидкость, оставив около 1 мл раствора, ресуспендировать в ней осадок и перенести его в пробирку на 1,5-2 мл

1.4.5. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 5 мин.

1.4.6. Удалить надосадочную жидкость, не затрагивая осадок. Полученный материал готов для выделения НК.

1.4.7. Для хранения осадка следует добавить в пробирку 1,0 мл фиксатора НК и перемешать.

1.5. Слюна, ликвор, синовиальная жидкость.

1.5.1. Слюну, ликвор, синовиальную жидкость (примерно 500 мкл) перенести в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

1.5.2. Перенести 500 мкл материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5-2 мл.

1.5.3. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.5.4. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

1.5.5. Добавить к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

1.5.6. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция). Полученный материал готов для выделения НК.

1.6. Сперма, секрет предстательной железы.

1.6.1. Перенести 20–30 мкл жидкого материала пипеткой в пластиковые пробирки объёмом 1,5-2 мл с консервантом (или 500 мкл стерильного физиологического раствора).

1.6.2. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.6.3. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция). Полученный материал готов для выделения НК.

 1.7. Молоко.

 1.7.1. Собрать материал в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

 1.7.2. Аккуратно перемешать и перенести 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл. Полученный материал готов для выделения НК. Срок сбора молока не более 24 часов. Хранение в течение всего срока сбора при температуре 2–8°С.

1.8. Мазки и смывы.

1.8.1. Центрифугировать пробирку, содержащую анализируемый материал, при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.8.2. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

1.9. Биопсийный и аутопсийный материал.

1.9.1. Материал забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка. Кусочки ткани диаметром не более 5 мм помещают в одноразовые стерильные пробирки объемом 1,5-2 мл, содержащие соответствующую транспортную среду. Пробирку плотно закрывают. Макроаутоптат помещают в контейнер с физиологическим раствором.

1.10. Костный мозг.

1.10.1 Центрифугировать пробирку, содержащую 1-1,5 мл анализируемого материала, при 13000 об/мин в течение 10 мин.

1.10.2 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

 **2**. **Транспортировка и хранение исследуемого материала.** Транспортировать и хранить образцы биологического материала до начала исследования при 2–8°С не более 24 часов. Допускается хранить полученный материал при температуре минус 20°С в течение 1 месяца. Следует избегать многократного замораживания-оттаивания образцов в процессе хранения.

**3.** При использовании набора **“ДНК-Ткань-Ф”** для выделения ДНК из биоматериала необходимо:

3.1. Подготовить и пронумеровать необходимое количество 1,5-2 мл пробирок.

3.2. Добавить в пробирку 20 мкл протеиназы К, буфер для связывания ДНК в объеме в 3 раза превышающим объем исследуемого биоматериала (обычно 150-300 мкл). Необходимо, чтобы весь твердый образец был погружен в буфер для связывания ДНК.

3.3. В случае жидкой формы образца, объем буфера для связывания ДНК равен объему взятого для анализа биоматериала.

3.4. Добавить биоматериал и хорошо перемешать на вортексе.

3.5. Поместить пробирку в термостат при температуре 50оС и инкубировать образец от 15 минут до 1 часа (в зависимости от вида, количества и консистенции образца) для лизиса биоматериала, периодически перемешивая раствор на вортексе. В случае трудно лизируемого образца можно его оставить на ночь.

3.6. Если после инкубации остались частицы нелизированных клеток или тканей, рекомендуется центрифугировать лизат 5 минут при 6000g и использовать верхний слой, не трогая осадок.

*Дальнейшая процедура экстракции, отмывки и элюции ДНК выполняется в соответствии с инструкцией к набору, исключая стадию инкубации при 90оС в течение 1 часа.*

3.7. Поставить прогреваться элюент в термостат при 50оС.

3.8. Внести в спин-колонку с собирательной пробиркой весь получившийся объем смеси и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалить.

3.9.Добавить в спин-колонку 700 мкл «Раствора для промывки №1» и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять.

3.10.Добавить в спин-колонку 700 мкл «Раствора для промывки №2» и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять.

3.11. Еще раз пропустить через колонку 700 мкл «Раствора для промывки №2». При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять. (Центрифугирование на 6000g 1мин.).

3.12.Просушить колонку центрифугированием при 12000g 1мин.

3.13.Вставить колонку в 1,5-2 мл пробиркудля выделенной ДНК. Открыть крышку колонки и добавить 60-100 мкл заранее прогретого Элюента в центр мембраны, чтобы обеспечить полное элюирование связанной ДНК. Закрыть крышку и инкубировать при комнатной температуре (15-25°C) в течение 10-15 мин.

3.14. Центрифугировать при 12000g в течение 2 мин.

3.15. В пробирке находится раствор выделенной ДНК. Проба готова к проведению ПЦР.

**4. При использовании набора “ДНК-Плазма-М”** необходимо:

4.1. Подготовить и пронумеровать необходимое количество 1,5-2 мл пробирок.

4.2. Добавить в пробирку 25 мкл протеиназы К, буфер для связывания ДНК в объеме в 3 раза превышающим объем исследуемого биоматериала (обычно 150-300 мкл). Необходимо, чтобы весь твердый образец был погружен в буфер для связывания ДНК.

4.3. В случае жидкой формы образца объем буфера для связывания ДНК равен объему взятого для анализа биоматериала.

4.4. Добавить биоматериал и хорошо перемешать на вортексе.

 4.5. Поместить пробирку в термостат при температуре 60оС и инкубировать образец от 15 минут до 1 часа (в зависимости от вида, количества и консистенции образца) для лизиса биоматериала, периодически перемешивая раствор на вортексе. В случае трудно лизируемого образца можно оставить на ночь при 50оС.

 4.6 Если после инкубации остались частицы нелизированных клеток или тканей, рекомендуется центрифугировать лизат 5 минут при 10000g и использовать верхний слой, не трогая осадок.

*Дальнейшая процедура экстракции, отмывки и элюции ДНК выполняется в соответствии с инструкцией к набору.*

4.7. Смешать в отдельной пробирке 250 мкл буфера для связывания ДНК и 10 мкл предварительно тщательно перемешанного на вортексе раствора магнитных частиц. Тщательно размешать частицы в буфере пипетированием или 3-5 секунд на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4.8. Внести 250 мкл подготовленной суспензии магнитных частиц в буфере для связывания ДНК в пробирку с образцом. Тщательно перемешать пипетированием или 3-5 секунд на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4.9. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут, 2-3 раза перемешать раствор за время инкубации, переворачивая пробирку.

4.10. После инкубации перемешать на вортексе (3-5 секунд) осадить капли коротким центрифугированием и поместить пробирку в магнитный штатив. Подождать, пока частицы

полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется 1-2 минуты). Не вынимая из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.

4.11. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №1, полностью ресуспендировать магнитные частицы пипетированием или на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4.12. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (около 1 мин.) и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.

4.13. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №2 и тщательно ресуспендировать магнитные частицы пипетированием или на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4.14. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки. (около 1мин.) и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.

4.15. Повторить пункты 4.13. и 4.14.

4.16. Поместить пробирку с открытой крышкой в термостат и инкубировать при 60°C в течение 10 минут для удаления остаточного этилового спирта.

4.17. Внести в пробирку необходимый объем элюента. Тщательно ресуспендировать частицы пипетированием (20-30 раз) и инкубировать при 60°C в течение 10 минут. Во время инкубации 2-3 раза взболтать содержимое пробирки.

4.18. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (около 1 мин.), и перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новую пробирку.

Отбор очищенной ДНК осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива. При раскапывании выделенной ДНК для постановки ПЦР пробирку с магнитного штатива снимать не следует.

**Примечание.** *Чем меньше берется элюента, тем выше будет концентрация полученной ДНК.*

1. **Возможные проблемы и их решение**

**5.1. Низкий выход ДНК**:

▪ неудовлетворительное состояние образца (в образце содержится недостаточное количество ДНК; образец долго хранился или неправильно хранился или несколько раз подвергался процедуре замораживания-оттаивания). Следует брать больше исходного материала или проводить элюцию в меньшее количество буфера; повторить сбор материала;

▪ неполное высушивание магнитных частиц - перед добавлением элюента необходимо полностью удалять раствор для промывки №2; после инкубации обязательно проверять магнитные частицы на наличие остатков этилового спирта. О полном испарении этилового спирта говорит равномерный светло-коричневый цвет магнитных частиц.Остаточный этиловый спирт может снизить выход ДНК.

▪ неполный лизис ткани – после внесения буфера для связывания ДНК как можно тщательнее суспендировать образец. Забивание мембраны колонки также может быть вызвано неполным лизисом образца ткани. Следует увеличить время лизиса, дополнительно добавить раствор протеиназы К. В случае неполного лизиса образца ткани можно отцентрифугировать раствор в течении 5 минут при 6000g и перенести лизат в колонку, не затрагивая осадок.

▪ большой объем буфера для элюирования – подберите оптимальный объем буфера для получения нужной концентрации ДНК.

▪возможно Протеиназа K хранилась при высоких температурах в течение длительного времени. Необходимо повторить процедуру с использованием новых образцов и свежей Протеиназы К.

▪ Недостаточная просушка мембраны спин-колонки перед элюированием ДНК. Необходимо полностью высушить мембрану перед элюированием ДНК, для этого центрифугировать спин-колонку при 12000g в течение 1 мин.

* 1. **Примеси белка и фрагментов клеточного дебриса:**

Возникают в следствии неудовлетворительной очистки ДНК на этапе промывки. Это может быть связано с недостаточной степенью ресуспендирования магнитных частиц, забиванием мембраны спин-колонки или использованием промывочных растворов, приготовленных с несоблюдением инструкции.

▪ Нужно добиваться максимально тщательного суспендирования магнитных частиц при перемешивании.

▪ Нельзя использовать денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон.

▪ Неверная подготовка «раствора для промывки №1» и «раствора для промывки №2»

Необходимо убедиться, что концентрированные растворы для промывки №1 и №2 были разбавлены необходимым количеством 95% этилового спирта.

▪ При кристаллизации растворов необходимо прогреть флакон с раствором при 60°C и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов и гомогенизации раствора.

**5.3. Возможная деградация ДНК:**

▪ Старый образец биоматериала, либо образец подвергался замораживанию-оттаиванию – необходимо провести сбор материала повторно. Избегать замораживания образца в процессе транспортировки и хранения.

1. **Рекомендуемые схемы выделения ДНК:**

 **6.1.** Выделение ДНК из **образца крови** или **костного мозга** набором **“ДНК-Ткань-Ф”**

1. Для одного образца подготовить и подписать 2 пробирки на 1,5-2 мл.

2. Добавить в одну из пробирок 20 мкл протеиназы К, 200 мкл буфера для связывания ДНК, 200 мкл анализируемого образца и перемешать на вортексе.

3. Поместить пробирку в термостат при температуре 50оС и инкубировать образец 15-20 минут, перемешивая раствор на вортексе по 3-5 секунд через каждые 5 минут.

4. Поставить прогреваться элюент в термостат при 50оС.

5. Внести в спин-колонку с собирательной пробиркой весь получившийся объем смеси и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалить.

6. Добавить в спин-колонку 700 мкл «Раствора для промывки №1» и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять.

7. Добавить в спин-колонку 700 мкл «Раствора для промывки №2» и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять.

8. Еще раз пропустить через колонку 700 мкл «Раствора для промывки №2». При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять. (Центрифугирование на 6000g 1мин.).

9.Просушить колонку центрифугированием при 12000g 1мин.

10.Вставить колонку в 1,5-2 мл пробиркудля выделенной ДНК. Открыть крышку колонки и добавить 60-100 мкл заранее прогретого Элюента в центр мембраны, чтобы обеспечить полное элюирование связанной ДНК. Закрыть крышку и инкубировать при комнатной температуре (15-25°C) в течение 10-15 мин.

11. Центрифугировать при 12000g в течение 2 мин.

12. В пробирке находится раствор выделенной ДНК. Проба готова к проведению ПЦР.

**6.2.** Выделение ДНК из **соскобов эпителиальных клеток** (с задней стенки глотки, из уретры и др.), доставленных в лабораторию в транспортной среде набором **“ДНК-Ткань-Ф”**

1. Пробирку с образцом биоматериала подписать и центрифугировать при 13 000 g в течение 10 минут.
2. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).
3. Добавить к осадку 500 мкл стерильного физиологического раствора и ресуспендировать на вортексе.
4. Центрифугировать пробирку при 13 000 g в течение 10 мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
5. Добавить в пробирку 20 мкл протеиназы К, 300 мкл буфера для связывания ДНК, и перемешать на вортексе.
6. Поместить пробирку в термостат при температуре 50оС и инкубировать образец 15-20 минут, перемешивая раствор на вортексе по 3-5 секунд через каждые 5 минут.
7. Поставить прогреваться элюент в термостат при 50оС.
8. Внести в спин-колонку с собирательной пробиркой весь получившийся объем смеси и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалить.
9. Добавить в спин-колонку 700 мкл «Раствора для промывки №1» и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять.
10. Добавить в спин-колонку 700 мкл «Раствора для промывки №2» и центрифугировать при 6000g 1мин. При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять.
11. Еще раз пропустить через колонку 700 мкл «Раствора для промывки №2». При необходимости центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалять. (Центрифугирование на 6000g 1мин.).
12. Просушить колонку центрифугированием при 12000g 1мин.
13. Вставить колонку в 1,5-2 мл пробиркудля выделенной ДНК. Открыть крышку колонки и добавить 60-100 мкл заранее прогретого Элюента в центр мембраны, чтобы обеспечить полное элюирование связанной ДНК. Закрыть крышку и инкубировать при комнатной температуре (15-25°C) в течение 10-15 мин.
14. Центрифугировать при 12000g в течение 2 мин.
15. В пробирке находится раствор выделенной ДНК. Проба готова к проведению ПЦР.
	1. Выделение ДНК из **образца крови** или **костного мозга** набором **“ДНК-Плазма-М”**
16. Для одного образца подготовить и подписать 2 пробирки на 1,5-2 мл.
17. Добавить в одну из пробирок 25 мкл протеиназы К, 200 мкл буфера для связывания ДНК, 200 мкл анализируемого образца и перемешать на вортексе.
18. Поместить пробирку в термостат при температуре 60оС и инкубировать образец 15-20 минут, перемешивая раствор на вортексе по 3-5 секунд через каждые 5 минут.
19. Смешать в отдельной пробирке 250 мкл буфера для связывания ДНК и 10 мкл предварительно тщательно перемешанного на вортексе раствора магнитных частиц. Тщательно размешать частицы в буфере пипетированием или 3-5 секунд на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.
20. Внести 250 мкл подготовленной суспензии магнитных частиц в буфере для связывания ДНК в пробирку с образцом. Тщательно перемешать пипетированием или 3-5 секунд на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.
21. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут, 2-3 раза перемешать раствор за время инкубации, переворачивая пробирку.
22. После инкубации перемешать на вортексе (3-5 секунд) осадить капли коротким центрифугированием и поместить пробирку в магнитный штатив. Подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется 1-2 минуты). Не вынимая из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратор.
23. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №1, полностью ресуспендировать магнитные частицы пипетированием или на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.
24. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (около 1 мин.) и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.
25. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №2 и тщательно ресуспендировать магнитные частицы пипетированием или на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.
26. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки. (около 1мин.) и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.
27. Повторить пункты 10 и 11.
28. Поместить пробирку с открытой крышкой в термостат и инкубировать при 60°C в течение 10 минут для удаления остаточного этилового спирта.
29. Внести в пробирку необходимый объем элюента. Тщательно ресуспендировать частицы пипетированием (20-30 раз) и инкубировать при 60°C в течение 10 минут. Во время инкубации 2-3 раза взболтать содержимое пробирки.
30. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (около 1 мин.), и перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новую пробирку.
31. Отбор очищенной ДНК осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива. При раскапывании выделенной ДНК для постановки ПЦР пробирку с магнитного штатива снимать не следует.
	1. Выделение ДНК из **соскобов эпителиальных клеток** (с задней стенки глотки, из уретры и др.), доставленных в лабораторию в транспортной среде набором **“ДНК-Плазма-М”**
32. Пробирку с образцом биоматериала подписать и центрифугировать при 13 000 g

в течение 10 минут.

1. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок

+ жидкая фракция).

1. Добавить к осадку 500 мкл стерильного физиологического раствора и

ресуспендировать на вортексе.

1. Центрифугировать пробирку при 13 000 g в течение 10 мин. Удалить

надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

1. Добавить в пробирку 25 мкл протеиназы К, 300 мкл буфера для связывания ДНК,

и перемешать на вортексе.

1. Поместить пробирку в термостат при температуре 60оС и инкубировать образец

15-20 минут, перемешивая раствор на вортексе по 3-5 секунд через каждые 5 минут.

7. Смешать в отдельной пробирке 250 мкл буфера для связывания ДНК и 10 мкл предварительно тщательно перемешанного на вортексе раствора магнитных частиц. Тщательно размешать частицы в буфере пипетированием или 3-5 секунд на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

8. Внести 250 мкл подготовленной суспензии магнитных частиц в буфере для связывания ДНК в пробирку с образцом. Тщательно перемешать пипетированием или 3-5 секунд на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

 9. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут, 2-3 раза перемешать раствор за время инкубации, переворачивая пробирку.

10. После инкубации перемешать на вортексе (3-5 секунд) осадить капли коротким центрифугированием и поместить пробирку в магнитный штатив. Подождать, пока частицы

полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется 1-2 минуты). Не вынимая из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратор.

 11. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №1, полностью ресуспендировать магнитные частицы пипетированием или на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

 12. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (около 1 мин.) и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.

13. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №2 и тщательно ресуспендировать магнитные частицы пипетированием или на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

14. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки. (около 1мин.) и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.

15. Повторить пункты 13 и 14.

16. Поместить пробирку с открытой крышкой в термостат и инкубировать при 60°C в течение 10 минут для удаления остаточного этилового спирта.

17. Внести в пробирку необходимый объем элюента. Тщательно ресуспендировать частицы пипетированием (20-30 раз) и инкубировать при 60°C в течение 10 минут. Во время инкубации 2-3 раза взболтать содержимое пробирки.

18. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (около 1 мин.), и перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новую пробирку.

Отбор очищенной ДНК осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива. При раскапывании выделенной ДНК для постановки ПЦР пробирку с магнитного штатива снимать не следует.

**6.5**. Выделение ДНК из **образца крови** или **костного мозга** набором **“ДНК-Ткань-М”**

1. Для одного образца подготовить и подписать 2 пробирки на 1,5-2 мл.

2. Добавить в одну из пробирок 20 мкл протеиназы К, 200 мкл лизирующего буфера, 100-200 мкл анализируемого образца крови и перемешать на вортексе.

3. Поместить пробирку в термостат при температуре 60оС и инкубировать образец 15-20 минут, перемешивая раствор на вортексе по 3-5 секунд через каждые 5 минут.

1. Смешать в отдельной пробирке 250 мкл буфера для связывания ДНК и 10 мкл

предварительно тщательно перемешанного на вортексе раствора магнитных частиц. Тщательно размешать частицы в буфере пипетированием или 3-5 секунд на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

1. Внести 250 мкл подготовленной суспензии магнитных частиц в буфере для

связывания ДНК в пробирку с образцом. Тщательно перемешать пипетированием или 3-5 секунд на вортексе.

1. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут, 2-3 раза перемешать

 раствор за время инкубации, переворачивая пробирку.

1. После инкубации перемешать на вортексе (3-5 секунд), осадить капли коротким

 центрифугированием и поместить пробирку в магнитный штатив. Подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется около 2 минут). Не вынимая из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.

1. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №1,

полностью ресуспендировать магнитные частицы пипетированием или на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

1. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью

 соберутся на стенке пробирки (около 1 мин.), и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.

1. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №2 и

тщательно ресуспендировать магнитные частицы пипетированием или на вортексе. Сбросить капли коротким центрифугированием.

1. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью

соберутся на стенке пробирки (около 1мин.), и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант пипеткой или с помощью аспиратора.

1. Повторить пункты 10 и 11.
2. Поместить пробирку с открытой крышкой в термостат и инкубировать при 60°C в

течение 5-10 минут для удаления остаточного этилового спирта.

1. Внести в пробирку необходимый объем элюента (100 мкл). Тщательно

ресуспендировать частицы пипетированием и инкубировать при 60°C в течение 10 минут. Во время инкубации 2-3 раза взболтать содержимое пробирки рукой (не вортексом).

1. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью

соберутся на стенке пробирки (около 1 мин.), и перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новую пробирку.

1. Отбор очищенной ДНК осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

При раскапывании выделенной ДНК для постановки ПЦР пробирку с магнитного штатива снимать не следует.

Примечание. Буфер для связывания и раствор магнитных частиц можно добавить непосредственно в пробирку с кровью после лизиса, при этом тщательно перемешать, исключив пункты 4 и 5.

**При возникновении вопросов обращаться по адресу:**

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен» (ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9

Тел.: +7 499 705-03-75

www.testgen.ru

**Служба технической поддержки:**

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru