

Выделение ДНК из 4 мл плазмы с 40 мкл магнитных частиц.

1. В 8 пробирок внести по 25 мкл протеиназы К, по 500 мкл плазмы и по 500 мкл связывающего буфера. Перемешать на вортексе 2-3 раза по 3-5 секунд и инкубировать в термостате 15 мин при 60°C, периодически перемешивая содержимое пробирок на вортексе.
2. Во время инкубации плазмы в 2 чистые пробирки внести по 1000 мкл связывающего буфера и по 20 мкл магнитных частиц. Перемешать и сбросить капли коротким центрифугированием.
3. После инкубации плазмы сбросить капли коротким центрифугированием и внести в каждую пробирку по 250 мкл подготовленной суспензии магнитных частиц, предварительно перемешав их пипетированием. Перемешать раствор на вортексе 2-3 раза по 3-5 секунд и инкубировать при комнатной температуре 5 мин. Во время инкубации 2-3 раза перевернуть пробирки для перемешивания раствора с магнитными частицами. По окончании инкубации сбросить капли коротким центрифугированием.
4. Поставить пробирки в магнитный штатив на 2-3 минуты и удалить супернатант.
5. Перенести пробирки в обычный штатив и добавить в первую пробирку 700 мкл буфера для промывки №1. Смыть магнитные частицы со стенки пипетированием и перенести раствор во 2 пробирку. Смыть частицы со стенки и перенести раствор в 3 пробирку, из 3 в 4. Аналогичную процедуру повторить с остальными 4 пробирками. После промывки промывочным раствором №1 из 8 пробирок остается 2.
6. Поставить пробирки в магнитный штатив на 1-2 минуты и удалить супернатант.
7. Перенести пробирки в обычный штатив и добавить в первую пробирку 700 мкл буфера для промывки №2. Смыть частицы со стенки пипетированием и перенести раствор во 2 пробирку. Ресуспендировать магнитные частицы на вортексе 2-3 раз по 3-5 сек, сбросить капли коротким центрифугированием. Из 2 пробирок на начальном этапе промывки остается 1 пробирка с 40 мкл магнитных частиц.
8. Поставить пробирку в магнитный штатив на 1-2 минуты и удалить супернатант.
9. Повторить промывку магнитных частиц 700 мкл промывочного раствора №2. Удалить супернатант, используя магнитный штатив.
10. Высушить магнитные частицы, поставив пробирку с открытой крышкой в термостат на 10 минут при 60 °C.
11. Добавить необходимое количество элюента (60-110 мкл), смывая им магнитные частицы со стенки пробирки, помогая при этом концом наконечника.

12. Ресуспендировать магнитные частицы в элюенте, пропипетировав 3-5 раз, и поставить пробирку с закрытой крышкой в термостат при 60°C на 10 минут. Во время инкубации 2-3 раза перемешать магнитные частицы встряхиванием рукой.
13. Поставить пробирку в магнитный штатив на 1-2 минуты и перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в чистую пробирку.

Примечания:

1. Увеличение времени инкубации плазмы с протеиназой в термостате с 15 до 20 минут повышает выход и чистоту ДНК.
2. Увеличение количества магнитных частиц ухудшает качество выделенной ДНК.
3. Увеличение времени инкубации плазмы с магнитными частицами с 5 до 10 минут повышает выход ДНК.
4. Увеличение времени элюирования с 10 до 15 минут и периодическое перемешивание магнитных частиц повышают выход ДНК.
5. Минимализация необходимого объема элюента повышает концентрацию ДНК.