

## Набор diaGene для выделения ДНК из сухих пятен крови.

### Состав набора

	50 выделений	250 выделений
Буфер для экстракции DBE	25 мл	2 x 65 мл
Раствор для сорбции	35 мл	2 x 90 мл
Раствор для промывки 1	30 мл	2 x 75 мл
Раствор для промывки 2 (концентрат)	18 мл	3 x 30 мл
Буфер E	8 мл	40 мл
Протеиназа K	5 мг	5 x 5 мг
Микроколоники	50 шт	250 шт.
2 мл пробирки для сбора фильтрата	50 шт	250 шт.

Компания Диаэм постоянно работает над совершенствованием технологии выделения нуклеиновых кислот и улучшением качества наборов. Поэтому рекомендуем ознакомиться с последней версией протокола выделения на нашем сайте [www.dia-m.ru](http://www.dia-m.ru) (<https://www.dia-m.ru/reactive.php?reactivesubsection=1073&vendorid=318>)

### Принцип действия

Набор предназначен для выделения ДНК из сухих пятен крови на ФТА-картах, на бумаге и некоторых видах ткани (хлопчатобумажная и шерстяная).

Пятна крови обрабатываются буфером с протеиназой К, полученный лизат наносится на спин-колонку. Очистка ДНК на спин-колонках **diaGene** происходит за счёт избирательного связывания ДНК с сорбентом в присутствии хаотропной соли с последующей отмывкой связанной ДНК от примесей. С колонки элюируется чистый препарат ДНК. Ёмкость колонки составляет до 25 мкг ДНК, но в конечном итоге зависит от количества примесей в наносимом на колонку лизате.

### Срок годности и особенности хранения

Все реактивы (кроме протеиназы К) и колонки хранить при комнатной температуре (+15 +25 °С).

Протеиназу К хранить при +2 +8 °С, после растворения - при -20°С.

После использования пакет с колонками рекомендуется плотно закрывать

Срок годности: 12 месяцев с даты изготовления.

При транспортировке особые условия не требуются.

### Дополнительное оборудование и реагенты

- Твердотельный термостат, желательнее с функцией перемешивания.
- Микроцентрифуга для пробирок типа эппендорф ёмкостью 1,5 - 2 мл с максимальной скоростью центрифугирования не менее 13000 об/мин.
- Дозаторы переменного объёма и наконечники к ним.
- Стерильные пробирки типа эппендорф ёмкостью 1,5 мл, свободные от нуклеаз.
- 96% этанол.
- Деионизированная автоклавированная вода или вода, свободная от нуклеаз.

**Важно:**

- Перед началом работы добавьте 96-100% этанол в **Раствор для промывки 2** (42 мл для 50 выделений, 70 мл в каждый флакон для 250 выделений). Тщательно перемешайте.
- В каждую пробирку с **протеиназой К** добавьте 250 мкл деионизированной воды. Неиспользованный раствор протеиназы К рекомендуется расфасовать по 50-100 мкл и хранить при -20°C.
- Возможно выпадение осадка в Растворе для сорбции. Для растворения осадка перед использованием необходимо прогреть раствор в течение 5-10 минут при +55°C. Не нагревать свыше +65°C!
- Во избежание загрязнения образцов не рекомендуется сливать фильтрат через край. Для удаления фильтрата используйте автоматическую пипетку или аспиратор.

**Выделение ДНК из сухих пятен крови**

1. Вырежьте фрагмент пятна крови из фильтровальной бумаги, ФТА-карты или ткани. Разрежьте ножницами фрагмент с пятном на кусочки 3 x 3 мм (один кусочек соответствует 15-20 мкл крови), максимальное количество кусочков в одной пробирке - 4 штуки.
2. Добавьте в пробирку к образцу 500 мкл буфера для экстракции DBE
3. Добавьте к образцу 5 мкл раствора **протеиназы К**, перемешайте и инкубируйте 30 минут при +56°C и перемешивании 350 об/мин. Если термостат без функции перемешивания - периодически встряхивайте пробирку.
4. Добавьте 700 мкл **Раствора для сорбции** и перемешайте на Вортексе. Центрифугируйте 2 минуты при 7000g
5. Внесите в колонку 650 мкл образца. Центрифугируйте 2 минуты при 7000g. **Необходимо учитывать, что объём колонки составляет 650 мкл.** Так как объём образца превышает 650 мкл, надо последовательно наносить образец на колонку, удаляя каждый раз фильтрат из пробирки для сбора фильтрата.
6. Внесите в колонку 300 мкл **Раствора для промывки 1** и центрифугируйте 1 мин при 7000g. Удалите фильтрат.
7. Повторите п.7.
8. Внесите в колонку 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугируйте 1 мин при 12000g. Удалите фильтрат.
9. Повторите п.9.
10. Поместите микроколонку в ту же пробирку и центрифугируйте 1 минуту при 12000g для удаления остатков буфера.
11. Поместите микроколонку в новую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 50-150 мкл буфера Е или деионизированной воды и подождите 1мин.  
*Минимальный объём для элюции – 50 мкл, максимальный – 150 мкл. При элюции 50 мкл достигается максимальная концентрация ДНК, при элюции 150 мкл – максимальный выход.*
12. Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1мин при 12000g.

Полученные образцы готовы к постановке ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования и прочих реакций. Образцы могут быть использованы либо немедленно, либо в течение месяца при хранении при -20°C. Для длительного хранения рекомендуется поместить образцы на -86°C или осадить ДНК этанолом и хранить при -20°C.