

Набор *diaGene* для выделения ДНК из срезов парафиновых блоков (FFPE-образцов).

Состав набора.

	10 выделений	50 выделений	250 выделений
Раствор для экстракции HS	3 мл	12 мл	60 мл
Протеиназа К	5 мг (или 3 x 2 мг)	22 мг	110 мг (5 x 22 мг)
Раствор FFPE-BB1	3 мл	12 мл	60 мл
Раствор WB1 (концентрат)	12 мл	2 x 30 мл	4 x 60 мл
Раствор WB2 (концентрат)	6 мл	2 x 15 мл	4 x 30 мл
Раствор E	2 мл	10 мл	50 мл
Спин-колонки	10 шт.	50 шт.	250 шт.
Пробирки для сбора фильтрата	10 шт.	50 шт.	250 шт.

Набор предназначен для выделения ДНК из гистологических препаратов, фиксированных в формалине и залитых парафином. Выделение ДНК начинается с растворения и удаления парафина. Затем образцы лизируются в присутствии протеиназы К, и лизат наносится на спин-колонку. ДНК избирательно связывается с фильтром колонки в присутствии хаотропной соли. Связанная ДНК отмывается от примесей и элюируется в виде чистого препарата, пригодного для большинства молекулярно-биологических манипуляций, например, ПЦР.

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 рекомендуется расфасовать на аликвоты по 100-200 мкл и хранить 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

- Микротом.
- Твердотельный термостат, желательно с функцией перемешивания.
- Вортекс.
- 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.
- Ксилол
- 96% этанол.
- Деионизованная автоклавированная вода или вода, свободная от нуклеаз

Перед началом работы

- Добавьте 96% этанол в раствор WB1 (4 мл для 10 выделений, 10 мл в каждый флакон для 50 выделений, 30 мл в каждый флакон для 250 выделений)
- Добавьте 96% этанол в раствор WB2 (14 мл для 10 выделений, 35 мл в каждый флакон для 50 выделений, 70 мл в каждый флакон для 250 выделений)
- Растворите Протеиназу К в деионизованной воде, чтобы получить раствор с концентрацией 20 мг/мл (2 мг в 100 мкл, 22 мг в 1.1 мл). Рекомендуется расфасовать раствор Протеиназы К на аликвоты по 100-200 мкл.
- Возможно выпадение осадка в растворе BB1-FFPE. Для растворения осадка перед использованием необходимо прогреть раствор в течение 5-10 минут при +50-55°C. **Не нагревать свыше +65°C!**

Выделение ДНК из FFPE-препаратов

1. Удалите излишки парафина, окружающего ткань, при помощи скальпеля. При помощи микротомы соберите 5-10 срезов толщиной 5-10 мкм (при использовании срезов толщиной 10 мкм необходимо уменьшить их количество). Общая площадь срезов не должна превышать 250 мм².
2. Поместите срезы в пробирку, добавьте 1 мл ксилола. Перемешайте на вортексе. Центрифугируйте при 13000 об/мин в течение 3 минут.
3. Удалите супернатант. К осадку добавьте 1 мл 96% этанола. Центрифугируйте при 13000 об/мин в течение 3 минут. В случае выпадения парафинового осадка (хлопья белого цвета) можно повторить п.2.
4. Удалите супернатант. Оставьте пробирку открытой на 10 минут, чтобы испарить остатки этанола.
5. К образцу, полученному после удаления парафина, добавьте 200 мкл **Раствора для экстракции HS** и 20 мкл **раствора протеиназы К**, перемешайте.
6. Инкубируйте 1 час при 56°C при перемешивании 300-400 об/мин (время инкубации может быть увеличено, если образец лизируется медленно).
7. Инкубируйте образец 1 час при +90°C.
8. Добавьте 200 мкл 96% этанола, перемешайте на вортексе.
9. Добавьте 200 мкл **Раствора BB1-FFPE**, перемешайте на вортексе.
10. Поместите колонку в пробирку для сбора фильтрата. Внесите в колонку 500 мкл полученного раствора из п.9. Центрифугируйте 1 мин при 5000 об/мин (3000g). Удалите фильтрат.
11. Повторите п. 10 необходимое количество раз, пока не будет нанесен весь раствор, полученный в п. 9.
12. Нанесите на фильтр колонки 550 мкл **Раствора WB1**. Центрифугируйте 1 мин при 5000 об/мин (3000g). Удалите фильтрат.
13. Повторите п. 12.
14. Нанесите на фильтр колонки 650 мкл **Раствора WB2**, инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Центрифугируйте 1 мин при 5000 об/мин (3000g). Удалите фильтрат.
15. Повторите п. 14.
16. Центрифугируйте пробирку с колонкой 2 мин при 13000 об/мин (15000 x g) для удаления остатков раствора WB2.
17. Нанесите на фильтр 50-100 мкл Раствора E. Раствор E рекомендуется предварительно нагреть до 37 °C. Инкубируйте колонку 3-5 мин при комнатной температуре.
18. Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 13000 об/мин (15000 x g).