

«Комплект для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови» Инструкция по применению.

на 100 образцов. Хранить при +2...8°C.

Состав комплекта:

1. Денатурирующий раствор -----45 мл
2. Изопропиловый спирт (раствор №2)-----30 мл
3. Промывочный раствор-----100 мл
4. Раствор носителя (тРНК)-----300 мкл
5. Вода Деионизованная-----5 мл
6. Хлороформ (раствор №1)-----12 мл

1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

2 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 200 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия. Использовать гепарин строго не рекомендуется!).

Внимание! При использовании для забора крови вакуумных пробирок с ЭДТА или цитратом натрия дополнительное внесение антикоагулянта не требуется. При этом объем крови, необходимый для исследования, заранее маркируется на пробирке в соответствии с количеством антикоагулянта, помещенного в пробирку.

Неохлажденные пробы хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; *не замораживать!*

1. В пробирку типа «Эппендорф» внести 1 мл цельной крови. Если кровь расслоилась в процессе хранения, то перед внесением ее необходимо перемешать до однородности.
2. Закрывать пробирку и центрифугировать со скоростью 3000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы. На поверхности осадка форменных элементов расположен тонкий слой лейкоцитов.
3. Аккуратно, не захватив лейкоциты, перенести плазму в чистую пробирку.

Внимание! Сыворотку или плазму отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 2-6 часов. В случае необходимости сохранения образцов для исследования сыворотку или плазму хранить при температуре 2..4°C не более 72-х часов, для более длительного хранения заморозить при -20°C. Замороженная сыворотка или плазма может храниться в течение 1 месяца.

1. Образец тщательно перемешать на вортексе 10 секунд.
 2. В чистые полипропиленовые пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл внести по 450 мкл **денатурирующего раствора** и 3 мкл **носителя (т-РНК)**. *Денатурирующий раствор содержит фенол! Избегать попадания на кожу и слизистые оболочки.* Пронумеровать пробирки и расположить соответствующим образом в штативе.
 3. Внести по 50 мкл исследуемой сыворотки или плазмы крови в соответствующие пробирки с денатурирующим раствором. Пробирки тщательно закрыть и перемешать на вортексе в течение 10 секунд, сбросить капли. Инкубировать при комнатной температуре 10 минут.
 4. Добавить 100 мкл **хлороформа (раствор №1)**, тщательно закрыть пробирки и перемешать на вортексе 10 секунд.
 5. Центрифугировать 5 минут при 14 тыс./об.мин.
 6. Не задевая интерфазу, перенести до 300 мкл верхней водной фазы в чистую полипропиленовую пробирку, содержащую 300 мкл **изопропилового спирта (раствор №2)**. Пробирки закрыть и перемешать на вортексе 10 секунд.
 7. Центрифугировать 15 минут при 14 тыс об./мин.
- В результате данной манипуляции образуется полупрозрачный рыхлый осадок
8. Удалить супернатант, используя вакуумный аспиратор (насос) в колбу-ловушку, оставив на дне пробирки около 20 мкл жидкости (не касаться дна!). Данную манипуляцию проводить с особой осторожностью, удаляя супернатант только с верхнего слоя жидкости и не допуская захвата рыхлого осадка. Рекомендуется ориентировать пробирки в роторе центрифуги, обозначая таким образом местоположение осадка.
 9. Добавить 1 мл промывочного раствора, перемешать на вортексе 10 секунд.
 10. Центрифугировать 10 минут при 14 тыс об./мин.
 11. Удалить супернатант как можно полнее, не захватив при этом осадок. Подсушить 30 минут при комнатной температуре, оставляя пробирки открытыми (можно в термостате при 40 градусах). Спирт должен испариться полностью.
 12. Добавить 50 мкл деионизованной воды, пробирки закрыть, инкубировать 10 минут при комнатной температуре, затем перемешать на вортексе или пипетированием.

Для определения РНК раствор сразу использовать для постановки реакции амплификации. РНК в этом растворе не хранится!