



**Набор реагентов для выделения ДНК из сперматозоидов с этапом
удаления чужеродных клеток и ДНК
«Sperm M»**

#spermMtest-10 #spermM-50

Набор реагентов предназначен для выделения ДНК из сперматозоидов и включает этап удаления чужеродных клеток и ДНК при необходимости. В набор включены все необходимые реагенты для выделения ДНК:

1. Лизирующий буфер 1 – для удаления примеси чужеродных клеток и ДНК;
2. Лизирующий буфер 2 – на основе детергентов и вспомогательных компонентов для оптимального лизиса;
3. Стабилизатор – для оптимального лизиса;
4. Связывающий буфер – для сорбции НК на магнитных частицах;
5. Промывочный буфер 1 – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей;
6. Промывочный буфер 2 – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей;
7. Промывочный буфер 3 – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей;
8. Элюирующий буфер – для элюции и хранения НК, pH=8,9;
9. Протеиназа К – для более быстрого и полного лизиса;
10. Магнитные частицы – для сорбции НК.

Буферы набора «Sperm M» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка при минимальных температурах хранения, растворы следует нагреть до комнатной температуры.

Магнитные частицы могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. Суспензию частиц необходимо тщательно взбалтывать до однородного состояния перед применением.

Стабилизатор необходимо хранить при температуре от +2°C до +4°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя.

Фермент **Протеиназа К** хранится при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев. Допускается кратковременное повышение температуры хранения (транспортировки) от +4°C до +25°C не более 5 суток.

Необходимые материалы и оборудование: микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2 мл; магнитный штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл; автоматические дозаторы переменного объема на 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл и соответствующие одноразовые наконечники; вортекс; твердотельный термостат с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-80°C для пробирок объемом 1,5-2 мл; скоростная микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин.

Sperm M

Проведение процедуры выделения ДНК

Пробоподготовка

Этап пробоподготовки образца отличается в зависимости от вида биоматериала:

а) При работе с осадком сперматозоидов:

Пробоподготовка не требуется, перейти к этапу лизиса.

б) При работе с образцами семенной жидкости:

Внести в пробирки объемом 1,5-2 мл 30-300 мкл образца. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить супернатант.

с) При работе с образцами семенной жидкости, контаминированными чужеродными клетками (эпителий влагалища, буккальный эпителий и др.):

1) В пробирки объемом 1,5-2 мл поместить исследуемые образцы, добавить 200 мкл лизирующего буфера 1 и 20 мкл Протеиназы К. Интенсивно перемешать образцы на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования. Инкубировать образцы при 60°C в течение 15 минут, перемешивая каждые 3-5 минут. Затем центрифугировать образцы в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить супернатант.

2) Повторить пункт 1.

3) Добавить к полученным осадкам 400 мкл лизирующего буфера 1. Интенсивно перемешать образцы на вортексе. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить супернатант.

Лизис

1. К осадкам сперматозоидов добавить 400 мкл лизирующего буфера 2, 20 мкл Протеиназы К и 2 мкл стабилизатора. Вортексировать образцы до полного разрушения конгломерата клеток, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Инкубировать образцы в термостате при 60°C в течение 1-2 часов, периодически перемешивая.
3. Добавить к образцам 300 мкл связывающего буфера. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе.
4. Центрифугировать образцы в течение 3 минут при макс. об/мин. Аккуратно, не задевая осадок, перенести максимальный объем супернатанта в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.

Сорбция НК

1. Добавить в пробирки 300 мкл связывающего буфера и 100 мкл магнитных частиц.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать образцы при комнатной температуре в течение 5 минут, периодически перемешивая.
4. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
5. Инкубировать образцы на магнитном штативе в течение 3 минут. Аккуратно, не задевая магнитные частицы, удалить супернатант.

Промывка НК

1. Добавить 600 мкл промывочного буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать образцы на магнитном штативе в течение 2 минут, после чего аккуратно, не задевая магнитные частицы, удалить супернатант.
4. Добавить 600 мкл промывочного буфера 2.
5. Повторить пункты 2-3.
6. Добавить 600 мкл промывочного буфера 3.
7. Повторить пункты 2-3.
8. Высушить образцы с открытыми крышками в термостате при 56-60°C или при комнатной температуре до полного испарения промывочного буфера 3.

Элюция НК

1. Добавить в пробирки 50 мкл элюирующего буфера.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать образцы в термостате при 60°C в течение 10 минут, периодически перемешивая.
4. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
5. Инкубировать образцы на магнитном штативе в течение 3 минут.
6. Перенести элюат в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.

Опционально: рекомендуется провести дополнительное центрифугирование элюата на максимальной скорости для удаления остаточного количества магнитных частиц.

Полученные растворы нуклеиновых кислот могут храниться до 7 дней при температуре от +2°C до +4°C и до двух лет при температуре -20°C. По соотношению показателей поглощения на A260/A280 чистота полученного раствора ДНК $\geq 1,7$.