



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

#spermtest-25 #sperm-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 лаурилсульфата натрия и вспомогательных компонентов для оптимального лизиса;
3. Стабилизатор – для оптимального лизиса;
4. Осаждающий буфер 1 – для преципитации белков;
5. Осаждающий буфер 2 – для преципитации НК;
6. Промывочный буфер 1 – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей;
7. Промывочный буфер 2 – для промывки нуклеиновых кислот от клеточных метаболитов и солей;
8. Элюирующий буфер – для элюции и хранения НК, рН=8.9;
9. Протеиназа К – для более быстрого и полного лизиса.

Буферы набора «Sperm» 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.

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; 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; штатив-охладитель или льдогенератор.

Sperm

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 450 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. Перенести пробирки на лед или в холодный штатив и инкубировать в течение 1 минуты. В случае отсутствия охлаждающих элементов инкубировать при комнатной температуре в течение 5-10 минут до полного остывания смеси.

Депротеинизация и осаждение НК

1. Добавить в пробирки 75 мкл осаждающего буфера 1.

2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

3. Инкубировать образцы в течение 3-5 минут во льду или в холодном штативе. В случае отсутствия охлаждающих элементов инкубировать при комнатной температуре в течение 5-10 минут.

4. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин.

5. Аккуратно, не задевая осадок, перенести 500 мкл супернатанта в новую пробирку объемом 1,5-2 мл.

6. Добавить к образцам 500 мкл осаждающего буфера 2 и перемешать с помощью пятикратного переворачивания пробирки.

Опционально:

а) для увеличения выхода ДНК рекомендуется инкубировать образцы в морозильной камере при -20°C в течение 25 минут;

б) для облегчения визуализации образующегося осадка НК возможно использование соосаждителя НК (#sat Raissol™).

7. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, после чего удалить супернатант, не задевая осадок.

Промывка НК

1. Добавить в пробирки 700 мкл промывочного буфера 1.

2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе.

3. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, аккуратно, не задевая осадок, удалить супернатант.

4. Добавить в пробирки 700 мкл промывочного буфера 2.

5. Повторить пункты 2,3.

6. Высушить образцы с открытыми крышками в термостате при 42°C или в центрифуге-концентраторе при 30°C до полного испарения промывочного буфера.

Элюция НК

1. Добавить в пробирки 50 мкл элюирующего буфера.
2. Инкубировать образцы в термостате при 55-60°C в течение 5 минут, периодически перемешивая на вортексе.

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 $\geq 1,7$.