

Инструкция к набору LumiMag® UNI для  
выделения НК на магнитных частицах из  
биообразцов различного типа



## Contents

Русский: Инструкция к набору LumiMag® UNI для выделения НК на магнитных частицах из биообразцов различного типа .....	3-12
--	------

# Инструкция к набору LumiMag® UNI для выделения НК на магнитных частицах из биообразцов различного типа

Набор предназначен для высокоеффективного и быстрого выделения тотальной РНК/ДНК из разных типов биологических материалов (цельная кровь, плазма, культуры клеток, ткани) для последующего проведения ПЦР и ОТ-ПЦР с использованием магнитных частиц. Выделение нуклеиновых кислот (НК) возможно с использованием магнитного штатива или при помощи автоматизированной станции.

Выделение НК включает два основных этапа. Первый этап — пробоподготовка образца. Второй этап — собственно выделение, которое включает лизис, промывку и элюирование НК, сорбированных на магнитных частицах. Процесс может выполняться с использованием автоматической станции или магнитного штатива.

Выделенные нуклеиновые кислоты не содержат белковых примесей и подходят для последующих анализов, таких как ПЦР, обратная транскрипция, одностадийная ОТ-ПЦР и Саузерн-блоттинг.

## **Основные характеристики набора:**

- Тип биологического материала: цельная кровь (с антикоагулянтами K<sub>2</sub>EDTA или CPDA, а также без антикоагулянтов), размороженная кровь, лейкоцитарная фракция крови, плазма и сыворотка крови, мазки из носоглотки и ротоглотки (собранные в транспортные среды), буккальный эпителий, слюна, сперма, образцы тканей животных, клеточные культуры, бактериальные клетки.
- Время выделения 12 образцов — не более 1 часа.
- Принцип метода: лизис образца, сорбция ДНК/РНК на магнитных частицах
- Совместимые автоматические рабочие станции: KingFisher™ Flex, Allsheng Autopure, Nextror, Bioer (GenePure Pro 96), MagMAX™ Express-96,

KingFisher™ Duo Prime, KingFisher™ mL, и др.

## Состав набора

Компонент набора	Количество	
	11773 10 minipreps	31773 100 minipreps
B1715, Магнитные шарики (100 мг/мл), 200 $\mu$ L	1	—
B3415, Lysis Solution UNI, 4 mL	1	—
B5215, Wash Solution A UNI, 7 mL	1	—
C6215, Wash Solution B UNI, 14 mL	1	—
C1715, Магнитные шарики (100 мг/мл), 1 mL	—	2
C3415, Lysis Solution UNI, 40 mL	—	1
D5215, Wash Solution A UNI, 70 mL	—	1
D6215, Wash Solution B UNI, 70 mL	—	2
K1350, Элюирующий буфер / Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), 10 mL	1	1

Хранение и транспортировка при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

## Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Автоматическая рабочая станция (KingFisher™ Flex, Allsheng Autopure, Nexcel, Bioer (GenePure Pro 96), MagMAX™ Express-96, KingFisher™ Duo Prime, KingFisher™ mL, или другая станция, совместимая с наборами для выделения на магнитных частицах, либо магнитный штатив;
- При использовании магнитного штатива: микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (2 пробирки для выделения НК из одного образца);
- Натрий-фосфатный буфер (PBS) для выделения НК из сосков эпителия;
- Шейкер для планшетов (опционально);
- Расходный пластик при использовании автоматической рабочей станции;
- Раствор лизоцима 100 мг/мл (дополнительно, при выделении НК из грамположительных бактериальных культур (например, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*)) (набор для предобработки образцов лизоцимом перед выделением ДНК (лиофилизированный), LysoPrep Lyo (артикул 21133) Вы можете приобрести отдельно).

## Перед началом работы

- При наличии осадка в *Лизирующем растворе UNI* и *Промывочном растворе A UNI* прогрейте их в термостате до температуры не выше 50°C, периодически встряхивая, и дождитесь полного растворения осадка.
- В случае использования шейкера для планшетов автоматизированных станций, подберите оптимальные условия для эффективного перемешивания:
  - Убедитесь, что планшет плотно фиксируется в шейкере.
  - Добавьте в лунки планшета 1 мл воды и накройте планшет фольгой.
  - Определите максимальную скорость шейкера, при которой вода из лунок не выплескивается на фольгу.

## Подготовка исследуемого материала

### Цельная кровь

Тщательно перемешайте пробирку с кровью и используйте 100 мкл в качестве образца.

### Плазма

1. Перемешайте переворачиванием пробирку с цельной кровью (используйте пробирки с K<sub>2</sub>EDTA или CPDA).
1. Центрифугируйте 20 мин при 900× *g* при комнатной температуре.
2. Аккуратно отберите верхнюю фракцию; перенесите 100 мкл плазмы в чистую пробирку 1,5 мл.
3. Немедленно переходите к лизису и сорбции; при необходимости храните плазму при -20°C до 3 мес.

### Лейкоциты (лейкоформенный слой или осадок)

1. Получите лейкоцитарную фракцию стандартным методом.
2. Осадите клетки центрифугированием 5 мин при 300× *g*, удалите супернатант полностью.
3. Ресуспендируйте осадок в PBS до объёма 100 мкл; при высокой вязкости сделайте дополнительную промывку PBS.
4. Держите на льду и переходите к этапу выделения НК.

## Соскобы эпителия

1. Добавьте в чистую 1,5 мл пробирку 1 мл PBS.
2. Тщательно промойте зонд для забора проб с соскобом эпителия в PBS.
3. Отрежьте верхнюю часть зонда, закройте пробирку.
4. Перемешайте на вортексе в течение 2–3 мин. В качестве образца используйте 100 мкл супернатанта.

## Культуры клеток млекопитающих (адгезионные и супензионные)

1. Подготовьте клетки. Для адгезионных культур: удалите среду, снимите клетки трипсином или рекомендованным методом.
2. Перенесите супензию в пробирку 1,5–2 мл. Используйте не более  $1-5 \times 10^6$  клеток на выделение.
3. Осадите клетки центрифугированием 5 мин при  $300 \times g$ . Удалите супернатант, избегая потери осадка.
4. Ресуспендируйте осадок в PBS до объёма 100 мкл. При высокой вязкости промойте образец PBS ещё раз и снова ресуспендируйте в 100 мкл.
5. Проверьте однородность пипетированием и перемешайте вортексированием в течение 5–10 с.
6. Оставьте супензию на льду до перехода к лизису. Не допускайте хранения образца более 30 мин без стабилизатора.
7. Перейдите к этапу выделения НК.

## Грамотрицательные бактерии (например, *E. coli*)

1. Перенесите 0,5–2,0 мл ночной культуры (не более  $1\times10^8$  клеток) в пробирку 1,5–2 мл.
2. Осадите центрифугированием 1 мин при  $10000\times g$ , аккуратно удалите супернатант.
3. Ресуспендируйте осадок в 200 мкл PBS, добейтесь полной однородности пипетированием.
4. При необходимости повторите **пп. 2–3**.
5. Отберите 100 мкл полученной суспензии для одного выделения и сразу переходите к этапу выделения НК.

## Грамположительные бактерии (например, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*)

- Возьмите 0,5–2,0 мл ночной культуры (до  $1\times10^8$  клеток), центрифугируйте 1 мин при  $10\,000\times g$ , удалите супернатант.
- Ресуспендируйте осадок в 200 мкл PBS.
- Внесите 40 мкл раствора лизоцима (100 мг/мл).
- Перемешайте вортексированием 5–10 с, инкубируйте 10 мин при комнатной температуре.
- Опционально для труднолизируемых штаммов используйте:
  - Lysostaphin до 25–50 мкг/мл для *Staphylococcus* spp. дополнительно 10 мин при комнатной температуре.
  - Mutanolysin 250–500 ЕД/мл для *Streptococcus* spp. 10 мин при комнатной температуре.
- Перемешайте вортексированием 5–10 с, убедитесь в однородности суспензии; при необходимости промойте образец PBS и снова приведите его объём к 200 мкл.
- Отберите 100 мкл подготовленной суспензии и сразу переходите к этапу выделения НК.

## Ткани животных

1. Отберите 20–30 мг ткани; для селезёнки используйте не более 10–15 мг.

Для свежих и замороженных тканей: держите образец охлаждённым; избегайте частичного оттаивания до гомогенизации.

Образцы с плотной структурой необходимо предварительно разрезать на мелкие фрагменты.

2. Гомогенизируйте образец в соответствии с инструкцией к выбранному типу ткани:

Вид гомогенизации	Описание
Криогомогенизация	Поместите образец в жидкий азот, измельчите в порошок в охлажденной ступке, быстро перенесите в пробирку объемом 1,5 мл, дождитесь испарения азота, не допускайте оттаивания.
Пестик	Перенесите ткань в пробирку 1,5 мл и добавьте 200 мкл PBS, тщательно перетрите одноразовым пестиком до однородной супензии.
Механический гомогенизатор	Добавьте 200 мкл PBS, измельчите на механическом гомогенизаторе до однородности в соответствии с инструкцией механического гомогенизатора для выбранного вида ткани.

3. Полученный гомогенат доведите PBS до 200 мкл, аккуратно перемешайте, удалите нерастворимые крупные фрагменты кратким осаждением в течение 10 с на  $1000\times g$  при необходимости.
4. Держите на льду; немедленно переходите к этапу выделения НК.

### Примечание:

Допускается хранение ткани в стабилизаторе РНК. В этом случае, перед гомогенизацией извлеките ткань из стабилизатора, обсушите ее от избытка раствора, и далее выполните шаги 3–5.

## Выделение НК с использованием магнитного штатива

1. Тщательно ресуспендируйте суспензию магнитных частиц переворачиванием пробирки до визуального достижения однородности и отсутствия осадка. Далее перед каждым взятием суспензии магнитных частиц, перемешивайте их пипетированием.
2. Внесите в пробирки по 400 мкл *Лизирующего раствора UNI* и 20 мкл магнитных частиц (100 мг/мл).
3. Тщательно перемешивайте биоматериал на вортексе в течение 10 с и внесите по 100 мкл в пробирки с *Лизирующим раствором UNI* и магнитными частицами.
4. Тщательно перемешивайте содержимое пробирок на вортексе в течение 10 с, сбросьте капли.
5. Инкубируйте пробирки 10–15 мин при комнатной температуре. В процессе инкубации периодически перемешивайте их на вортексе в течение 10 с.
6. Поместите пробирки в магнитный штатив, подождите 1 мин.
7. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, удалите супернатант.
8. Добавьте 700 мкл *Промывочного раствора A UNI*, тщательно перемешивайте содержимое на вортексе в течение 10 с, сбросьте капли.
9. Поместите пробирки в магнитный штатив, подождите 1 мин, удалите супернатант.
10. Добавьте 700 мкл *Промывочного раствора B UNI*, тщательно перемешивайте содержимое на вортексе в течение 10 с, сбросьте капли.
11. Поместите пробирки в магнитный штатив, подождите 1 мин, удалите супернатант.
12. Повторите **пп. 6–7**.
13. Подсушите пробирки в твердотельном термостате в течение 5 мин при 60°C.
14. Добавьте 50 мкл *Элюирующего раствора*, тщательно перемешивайте

содержимое на вортексе в течение 20 с и инкубируйте 10 мин при комнатной температуре.

15. Сбросьте капли, поместите пробирки в магнитный штатив, подождите 1 мин.
16. Перенесите супернатант в новые пробирки.

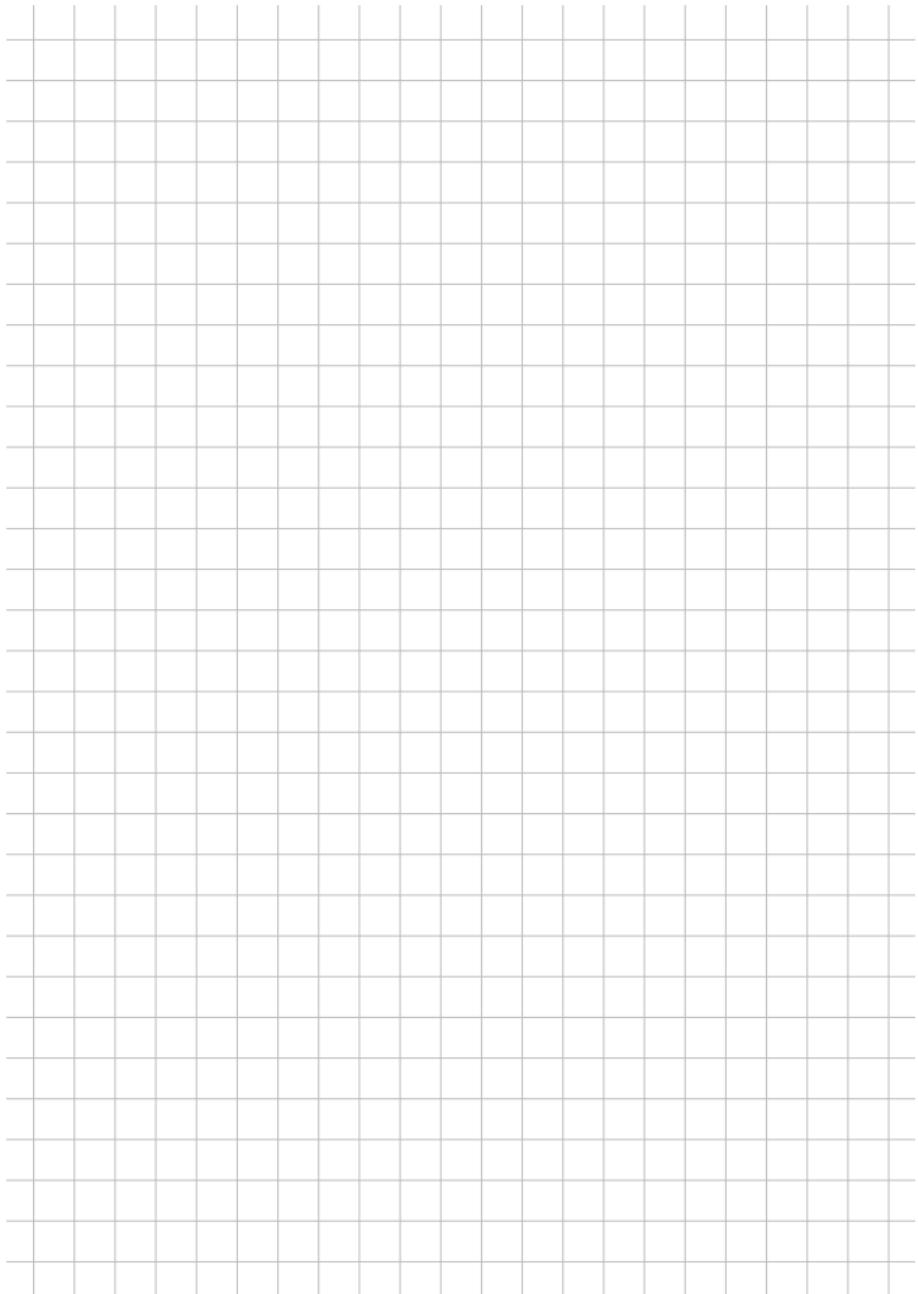
## **Выделение НК с использованием автоматической рабочей станции с методом магнитной сепарации**

Пробоподготовка выполняется вне станции выделения.

1. Создайте программу для выделения НК в соответствии с протоколом из раздела «Выделение НК с использованием магнитного штатива».
2. В зависимости от типа используемой станции распределите глубоколуночные планшеты/ряды лунок планшетов по этапам выделения. Этапами выделения считаются: лизис, 3 промывки, элюция.
  - a. В планшет/ряды для лизиса внесите 400 мкл *Лизирующего раствора UNI*, 20 мкл магнитных частиц (предварительно перемешайте магнитные частицы переворачиванием), 100 мкл биоматериала после пробоподготовки.
  - b. В планшет/ряды для промывки 1 внесите 700 мкл *Промывочного раствора A UNI*.
  - c. В планшет/ряды для промывки 2 внесите 700 мкл *Промывочного раствора B UNI*.
  - d. В планшет/ряды для промывки 3 внесите 700 мкл *Промывочного раствора B UNI*.
  - e. В планшет/ряды для элюции внесите 50 мкл Элюирующего раствора.
3. Установите все необходимые расходные материалы и планшеты с растворами в соответствующие позиции станции выделения.
4. Запустите выполнение протокола на станции выделения.

## Хранение выделенных НК

- Хранение выделенной ДНК: долгосрочное при  $-20^{\circ}\text{C}$ ; кратковременное (до 1 недели) при  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Если целью выделения является РНК, реакцию обратной транскрипции (или ОТ-ПЦР в одной пробирке) рекомендуется ставить непосредственно после выделения, не допуская ее длительного хранения. В случае необходимости допускается заморозка и хранение препарата РНК, однако при этом будут происходить потери и фрагментация РНК.







22.09.509-QM  
Issued by INSPECT



[www.lumiprobe.com](http://www.lumiprobe.com)

