



LumiPure UNI, Precipitation-Based Nucleic Acid Isolation Kit for Any Sample manual

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

English: LumiPure UNI, Precipitation-Based Nucleic Acid Isolation Kit for Any Sample manual	3-11
Deutsch: Anleitung: LumiPure UNI Nukleinsäure-Extraktionskit	12-20
Русский: Инструкция к набору LumiPure UNI для выделения нуклеиновых кислот из биообразцов методом преципитации	21-29

LumiPure UNI, Precipitation-Based Nucleic Acid Isolation Kit for Any Sample manual

The kit is designed for total nucleic acid extraction from a variety of samples including plant and animal tissues, organs, blood plasma, myeloblasts, mammalian cell cultures, Gram-negative bacterial cultures, epithelial cell swabs, smears, washing fluids, and other liquid biological samples. The total nucleic acid isolated with the kit is compatible with the downstream PCR or RT-PCR.

Kit components

Kit component	Count
	34663
	100 assays
P7450, Lysis Solution NA, 30 mL	1
R7050, Precipitation Solution, 40 mL	1
S8150, Wash Solution 1, 50 mL	1
S6050, Wash Solution 2, 50 mL	1
G5850, Dissolving buffer NA, 5 mL	1

Store at temperature between +2 °C and +8 °C.

Shelf life 12 months.

Hardware and Consumables Required but not Supplied:

- Dry Block Heater (or water bath);
- Centrifuge that accommodates 1.5 mL tubes, and is capable of generating at least 13,000 rpm ($11,000 \times g$);
- 1.5 mL microcentrifuge tubes (1-2 tubes for extraction from 1 sample);
- Additional materials (depending on sample type):
 - *tissue samples, plant or animal*: liquid nitrogen, mortar and pestle set
 - *cell cultures, plant or animal*: Phosphate-Buffered Saline (PBS)
 - *liquid biosamples, swabs, washing fluids, feces*: sterile saline
 - *sputum*: mucolysin

Before You Begin

If the *Lysis Solution NA* contains a precipitate, heat the buffer to 50 °C in the heater and wait for the precipitate to dissolve completely.

Sample Preparation

Plant and animal tissues

20-30 mg of sample weight is recommended. Both fresh and frozen samples can be used.

! Samples can be stored at -70 °C for several months.

1. Place a fresh or a frozen (-70 °C) tissue sample into liquid nitrogen.
2. Transfer the frozen sample to a mortar and thoroughly homogenize it to powder.
3. Transfer the powder into a separate 1.5 mL tube. Wait for liquid nitrogen to evaporate but do not allow the powder to thaw.
4. Add the following reagents to the homogenate in the following order: 300 µL of *Lysis Solution NA*, 100 µL of water. Mix the contents.
5. Proceed to step 2 of '**Nucleic Acid Extraction**'.

Animal or bacterial cell cultures

Samples of no more than $1\text{-}2 \times 10^6$ cell counts for animal cell cultures or 10^9 cell counts for Gram-negative bacterial cell cultures are recommended.

Adherent cell culture: remove media, harvest cells with trypsin (or with other methods recommended for the cell culture used). Centrifuge the sample at $300 \times g$ for 5 min. Discard the supernatant. Resuspend the cell pellet in 100 µL of PBS. Transfer the suspension into a new 1.5 mL tube.

Animal cells in suspension culture: collect the suspension culture volume required to obtain the desired cell number. Centrifuge cells at $300 \times g$ for 5 min. Discard the supernatant. Resuspend the cell pellet in 100 µL of PBS. Transfer the suspension into a new 1.5 mL tube.

Bacterial cell culture: collect the bacteria grown with liquid or solid media with

centrifugation at 3,000-5,000 × g for 5-10 min. Discard the supernatant. Resuspend the cell pellet in 100 µL of PBS. Transfer the suspension into a new 1.5 mL tube.

Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

Blood Plasma

This kit is suitable for nucleic acid extraction from blood plasma. Plasma must be collected from peripheral whole blood samples containing EDTA (2.0 mg/mL) or citrate as an anticoagulant.

! Heparin must not be used as an anticoagulant.

! Plasma must be obtained within 6 hours from peripheral blood sample collection.

1. Mix the blood sample by the vial inversion to ensure adequate homogenisation.
2. Centrifuge the vial with the blood sample at 900 × g for 20 min at room temperature (18-25 °C).
3. Aspirate 100 µL of the supernatant (plasma) and transfer to a separate 1.5 mL tube.
4. Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

! Store the plasma sample at -20 °C for no more than 3 months.

Epithelial cells in swab samples

This kit is suitable for total nucleic acid extraction from swab samples of epithelial cells collected with a single-use sterile swab (buccal, posterior pharynx, nasopharyngeal, urethral, cervical, vaginal swabs, etc.).

1. Place 500 µL of sterile saline into a 1.5 mL tube.
2. Vigorously swirl the swab to resuspend the sample material in saline. Press the swab against the wall of the vial and squeeze out the residual saline with a circular motion.

3. Centrifuge the solution at $11,000 \times g$ for 10 min. Thoroughly remove the supernatant.
4. Resuspend the pellet in 100 μL of sterile saline.
5. Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

Urine

1. Transfer 1 mL of a urine sample into a clean 1.5 mL tube.
2. Centrifuge at $11,000 \times g$ for 10 min. Thoroughly remove the supernatant.
3. Resuspend the pellet in 1 mL of sterile saline.
4. Centrifuge at $11,000 \times g$ for 10 min. Discard the supernatant.
5. Resuspend the pellet in 100 μL of sterile saline.
6. Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

Saliva, liquor, synovial fluid

1. Add 500 μL of the sample into a separate 1.5 mL tube.
2. Centrifuge at $11,000 \times g$ for 10 min. Thoroughly remove the supernatant leaving $\sim 50 \mu\text{L}$ of the solution above the pellet.
3. Resuspend the pellet in 500 μL of sterile saline.
4. Centrifuge at $11,000 \times g$ for 10 min. Discard the supernatant.
5. Resuspend the pellet in 100 μL of sterile saline.
6. Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

Semen, prostate secretes

1. Add 100 µL of the sample into a separate 1.5 mL tube.
2. Add 500 µL of sterile saline into the tube, vortex for 5-10 sec.
3. Centrifuge at $11,000 \times g$ 10 min. Discard the supernatant.
4. Resuspend the pellet in 100 µL of sterile saline.
5. Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

Smears and washing fluids

1. Place the specimen to the centrifugation vial.
2. Centrifuge at $11,000 \times g$ 10 min. Discard the supernatant.
3. Resuspend the pellet in 100 µL of sterile saline.
4. Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

Feces

1. Transfer 1 mL of sterile saline into a clean 1.5 mL tube.
2. Add ~ 250 mg (µL) of feces into the tube.
3. Vortex the content for 5-10 sec.
4. Centrifuge at $100 \times g$ for 3 min.
5. Transfer 800-1,000 µL of supernatant into a separate 1.5 mL tube.
6. Centrifuge for at $11,000 \times g$ 10 min. Discard the supernatant.
7. Resuspend the pellet in 100 µL of sterile saline.
8. Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

Sputum specimen

1. Add mucolysin to a vial containing the sample in the ratio of 5:1 (5 parts mucolysin and 1 part of sputum) using graduated marks on the vial.
2. Close the vial lid, shake the content. Incubate for 20-30 min at room temperature, shake the vial every 2-3 min.
! The processed sputum sample can be stored at 4 °C for 24 hours or at -20 °C for long-term.
3. Transfer 500 µL of the mucolysin-treated sputum sample into a separate 1.5 mL tube.
4. Centrifuge for at 11,000 × g 10 min. Discard the supernatant.
5. Resuspend the pellet in 100 µL of sterile saline.
6. Proceed to '**Nucleic Acid Extraction**'.

Nucleic Acid Extraction

All the procedures should be performed at room temperature; >13,000 rpm (>11,000 × g) centrifugation should be used unless directed otherwise.

Before you begin, set the dry block heater to 65 °C and preheat the vial with *Resuspension Buffer NA*.

Prepare the specimen in 100 µL volume in a 1.5 mL tube as directed in '**Sample Preparation**'.

1. Add 300 µL of *Lysis Solution NA* to the vial containing the sample (100 µL), and mix thoroughly by vortexing.
2. Incubate the resulting solution at 65 °C for 15 min.
3. (*Optional*) If the sample is not fully dissolved after lysis, centrifuge the vial for 10 min. Transfer the supernatant into a new 1.5 mL tube.
4. Add 400 µL of *Precipitation Solution* to the vial containing the sample and vortex. Centrifuge for 15 min.
5. Carefully remove the supernatant, take care to avoid disturbing the pellet. Add 500 µL of *Washing Solution 1* to the pellet and mix by vortexing. Centrifuge for 5 min.
6. Carefully remove the supernatant, take care to avoid disturbing the pellet. Add 500 µL of *Washing Solution 2* to the pellet and mix by vortexing. Centrifuge for 5 min.
7. Thoroughly remove the supernatant, avoid disturbing the pellet. Open the vial and dry the pellet at 65 °C for 5 min.
8. Add 50 µL of preheated *Resuspension Buffer NA*.
9. Incubate the vial containing the specimen at 65 °C for 5-10 min. Mix the content by vortexing and centrifuge to collect drops. The resulting product of total nucleic acid is suitable for downstream PCR or RT-PCR without additional processing.

Extracted RNA Storage: *We do not recommend storing extracted RNA due to its instability.* The extracted RNA product must be used in the downstream reverse transcription-polymerase chain reaction immediately.

Extracted DNA Storage: Store at 4 °C for short-term; store at -20 °C for no more than 1 month or at -70 °C for no longer than 1 year.

Anleitung: LumiPure UNI Nukleinsäure-Extraktionskit

Das Kit ist für die vollständige Nukleinsäureextraktion aus einer Vielzahl von Proben konzipiert, darunter pflanzliche und tierische Gewebe, Organe, Blutplasma, Myeloblasten, Säugetierzellkulturen, gramnegative Bakterienkulturen, Epithelzellabstriche, Abstriche, Waschflüssigkeiten und andere flüssige biologische Substanzen Proben. Die mit dem Kit isolierte Gesamtnukleinsäure ist mit der Downstream-PCR oder RT-PCR kompatibel.

Bestandteile

Komponente	Anzahl
	34663
	100 assays
P7450, Lysis Solution NA, 30 mL	1
R7050, Precipitation Solution, 40 mL	1
S8150, Wash Solution 1, 50 mL	1
S6050, Wash Solution 2, 50 mL	1
G5850, Dissolving buffer NA, 5 mL	1

Lagern bei +2 °C bis +8 °C.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Hardware und Verbrauchsmaterialien erforderlich, aber nicht im Lieferumfang enthalten

- Trockenblockheizung (oder Wasserbad)
- Zentrifuge, die 1,5-ml-Röhrchen aufnimmt und mindestens 13.000 U/min ($11.000 \times g$) erzeugen kann
- 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhren (1-2 Röhrchen zur Extraktion aus 1 Probe)
- Zusatzmaterialien (abhängig vom Probentyp):
 - *Gewebeproben, Pflanze oder Tier:* flüssiger Stickstoff, Mörser und Pistill-Set
 - *Zellkulturen, Pflanze oder Tier:* Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)
 - *flüssige Bioproben, Tupfer, Waschflüssigkeiten, Kot:* sterile Kochsalzlösung
 - *Auswurf:* Mucolysin

Bevor Sie beginnen

Wenn die *Lyselösung NA* einen Niederschlag enthält, erhitzen Sie den Puffer im Heizer auf 50 °C und warten Sie, bis sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hat.

Probenvorbereitung

Pflanzen- und Tiergewebe

20-30 mg Probengewicht werden empfohlen. Es können sowohl frische als auch gefrorene Proben verwendet werden.

! Proben können mehrere Monate bei -70 °C gelagert werden.

1. Geben Sie eine frische oder gefrorene (-70 °C) Gewebeprobe in flüssigen Stickstoff.
2. Die gefrorene Probe in einen Mörser überführen und gründlich zu einem Pulver homogenisieren.
3. Füllen Sie das Pulver in ein separates 1,5-ml-Röhrchen. Warten Sie, bis der flüssige Stickstoff verdunstet ist, aber lassen Sie das Pulver nicht auftauen. (Probe während des Mahlens gefroren halten / Pulver vor dem Auftauen bewahren).
4. Fügen Sie dem Homogenat die folgenden Reagenzien in der folgenden Reihenfolge hinzu: 300 µL *Lyselösung NA*, 100 µL Wasser. Mischen Sie den Inhalt.
5. Fahren Sie mit Schritt 2 von «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Tierische oder bakterielle Zellkulturen

Es werden Proben von nicht mehr als $1—2 \times 10^6$ Zellzahlen für tierische Zellkulturen oder 10^9 Zellzahlen für gramnegative Bakterienzellkulturen empfohlen.

Adhärente Zellkultur: Medien entfernen, Zellen mit Trypsin ernten (oder mit anderen Methoden, die für die verwendete Zellkultur empfohlen werden). Zentrifugieren Sie die Probe bei $300 \times g$ für 5 min. Verwerfen Sie den Überstand. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS. Überführen Sie die Suspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Tierische Zellen in Suspensionskultur: Sammeln Sie das Suspensionskulturvolumen, das erforderlich ist, um die gewünschte Zellzahl zu erhalten. Zentrifugieren Sie die Zellen

bei $300 \times g$ für 5 min. Verwerfen Sie den Überstand. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS. Überführen Sie die Suspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Bakterienzellkultur: Sammeln Sie die mit flüssigen oder festen Medien gezüchteten Bakterien durch Zentrifugation bei $3.000\text{--}5.000 \times g$ für 5–10 min. Verwerfen Sie den Überstand. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 100 µl PBS. Überführen Sie die Suspension in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.

Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Blutplasma

Dieses Kit ist für die Nukleinsäureextraktion aus Blutplasma geeignet. Plasma muss aus peripheren Vollblutproben entnommen werden, die EDTA (2,0 mg/ml) oder Citrat als Antikoagulans enthalten.

! Heparin darf nicht als Antikoagulans verwendet werden.

! Das Plasma muss innerhalb von 6 Stunden nach der Entnahme der peripheren Blutprobe gewonnen werden.

1. Mischen Sie die Blutprobe durch Umdrehen des Fläschchens, um eine angemessene Homogenisierung sicherzustellen.
2. Zentrifugieren Sie das Fläschchen mit der Blutprobe bei $900 \times g$ für 20 min bei Raumtemperatur (18–25 °C).
3. 100 µl des Überstands (Plasma) absaugen und in ein separates 1,5-ml-Röhrchen überführen.
4. Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

! Lagern Sie die Plasmaprobe nicht länger als 3 Monate bei -20 °C.

Epithelzellen in Abstrichproben

Dieses Kit ist für die Gesamt nukleinsäureextraktion aus Abstrichproben von Epithelzellen geeignet, die mit einem sterilen Einwegtupfer (bukkaler, hinterer Pharynx, nasopharyngealer, urethraler, zervikaler, vaginaler Abstrich usw.) entnommen wurden.

1. Geben Sie 500 µl sterile Kochsalzlösung in ein 1,5-ml-Röhrchen.
2. Schwenken Sie den Tupfer kräftig, um das Probenmaterial in Kochsalzlösung zu resuspendieren. Drücken Sie den Tupfer gegen die Wand der Durchstechflasche und drücken Sie die restliche Kochsalzlösung mit kreisenden Bewegungen heraus.
3. Zentrifugieren Sie die Lösung 10 min lang bei 11.000 × g. Entfernen Sie den Überstand gründlich.
4. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
5. Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Urin

1. Überführen Sie 1 ml einer Urinprobe in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
2. 10 min bei 11.000 × g zentrifugieren. Entfernen Sie den Überstand gründlich.
3. Resuspendieren Sie das Pellet in 1 ml steriler Kochsalzlösung.
4. 10 min bei 11.000 × g zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
5. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
6. Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Speichel, Liquor, Synovialflüssigkeit

1. Geben Sie 500 µl der Probe in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
2. 10 min bei $11.000 \times g$ zentrifugieren. Entfernen Sie den Überstand gründlich und lassen Sie ca. 50 µl der Lösung über dem Pellet.
3. Resuspendieren Sie das Pellet in 500 µl steriler Kochsalzlösung.
4. 10 min bei $11.000 \times g$ zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
5. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
6. Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Sperma, Prostatasekret

1. Geben Sie 100 µl der Probe in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
2. 500 µl sterile Kochsalzlösung in das Röhrchen geben, 5–10 Sek. vortexen.
3. 10 min bei $11.000 \times g$ zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
4. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
5. Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Abstriche und Waschflüssigkeiten

1. Geben Sie die Probe in das Zentrifugationsröhrchen.
2. 10 min bei $11.000 \times g$ zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
3. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 µl steriler Kochsalzlösung.
4. Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Kot

1. Überführen Sie 1 ml sterile Kochsalzlösung in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen.
2. Geben Sie ca. 250 mg (μ l) Kot in das Röhrchen.
3. Vortexen Sie den Inhalt für 5-10 Sekunden.
4. 3 min bei $100 \times g$ zentrifugieren.
5. Überführen Sie 800–1.000 μ l Überstand in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
6. 10 min bei $11.000 \times g$ zentrifugieren. Verwerfen Sie den Überstand.
7. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 μ l steriler Kochsalzlösung.
8. Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Sputum-Probe

1. Geben Sie Mucolysin in ein Fläschchen mit der Probe im Verhältnis 5:1 (5 Teile Mucolysin und 1 Teil Sputum) und verwenden Sie dabei die Skalenmarkierungen auf dem Fläschchen.
2. Schließen Sie den Deckel der Durchstechflasche, schütteln Sie den Inhalt. 20-30 min bei Raumtemperatur inkubieren, Fläschchen alle 2-3 min schütteln.
! Die aufbereitete Sputumprobe kann 24 Stunden bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert werden.
3. Überführen Sie 500 μ l der mit Mucolysin behandelten Sputumprobe in ein separates 1,5-ml-Röhrchen.
4. Zentrifugieren für 10 min bei $11.000 \times g$. Verwerfen Sie den Überstand.
5. Resuspendieren Sie das Pellet in 100 μ l steriler Kochsalzlösung.
6. Fahren Sie mit «**Nukleinsäureextraktion**» fort.

Nukleinsäureextraktion

Alle Verfahren sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Sofern nicht anders verordnet, sollte eine Zentrifugation mit >13.000 U/min (>11.000 × g) durchgeführt werden.

Bevor Sie beginnen, stellen Sie den Trockenblockheizer auf 65 °C ein und heizen das Fläschchen mit *Resuspensionspuffer NA* vor.

Bereiten Sie die Probe in einem Volumen von 100 µl in einem 1,5-ml-Röhrchen vor, wie unter «**Probenvorbereitung**» beschrieben.

1. Geben Sie 300 µl Lyselösung NA in das Fläschchen mit der Probe (100 µl), mischen Sie gründlich durch Vortexen.
2. Inkubieren Sie die resultierende Lösung 15 Minuten lang bei 65 °C.
3. (*Optional*) Wenn die Probe nach der Lyse nicht vollständig aufgelöst ist, zentrifugieren Sie das Fläschchen 10 Minuten lang. Den Überstand in ein neues 1,5-ml-Röhrchen überführen.
4. 400 µl Präzipitationslösung in das Fläschchen mit der Probe geben und vortexen. 15 min zentrifugieren.
5. Entfernen Sie vorsichtig den Überstand, achten Sie darauf, das Pellet nicht zu stören. 500 µl Waschlösung 1 zum Pellet geben, durch Vortexen mischen. 5 min zentrifugieren.
6. Entfernen Sie vorsichtig den Überstand, achten Sie darauf, das Pellet nicht zu stören. 500 µl Waschlösung 2 zum Pellet geben, durch Vortexen mischen. 5 min zentrifugieren.
7. Entfernen Sie den Überstand gründlich, vermeiden Sie es, das Pellet zu stören. Öffnen Sie das Fläschchen und trocknen Sie das Pellet 5 Minuten lang bei 65 °C.
8. Fügen Sie 50 µl vorgewärmten *Resuspensionspuffer NA* hinzu.
9. Inkubieren Sie das Fläschchen mit der Probe 5-10 Minuten lang bei 65 °C. Mischen Sie den Inhalt durch Vortexen und zentrifugieren Sie, um Tropfen zu sammeln. Das resultierende Produkt der Gesamt nukleinsäure ist ohne

zusätzliche Verarbeitung für Downstream-PCR oder RT-PCR geeignet.

Aufbewahrung extrahierter RNA: *Wir empfehlen, extrahierte RNA aufgrund ihrer Instabilität nicht aufzubewahren. Das extrahierte RNA-Produkt muss sofort in der nachgeschalteten reversen Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden.*

Aufbewahrung der extrahierten DNA: Kurzfristig bei +4 °C lagern; bei -20 °C nicht länger als 1 Monat oder bei -70 °C nicht länger als 1 Jahr lagern.

Инструкция к набору LumiPure UNI для выделения нуклеиновых кислот из биообразцов методом преципитации

Набор предназначен для выделения тотальной нуклеиновой кислоты из широкого спектра биологических образцов: тканей и органов растений и животных, плазмы крови, лейкоцитов, культур клеток млекопитающих и грамотрицательных бактерий, соскобов эпителиальных клеток, мазков, смывов и др. жидких образцов биологических жидкостей. Полученный препарат тотальной нуклеиновой кислоты подходит для последующего проведения ПЦР и ОТ-ПЦР.

Состав набора

Компонент набора	Количество
	34663
	100 assays
P7450, Лизирующий раствор NA, 30 mL	1
R7050, Раствор для преципитации, 40 mL	1
S8150, Промывочный раствор 1, 50 mL	1
S6050, Промывочный раствор 2, 50 mL	1
G5850, Буфер для растворения NA, 5 mL	1

Хранить при температуре от +2°C до +8°C.

Срок хранения 12 месяцев.

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Твердотельный термостат (возможно использование водяной бани);
- Центрифуга с ротором для пробирок объёмом 1,5 мл со скоростью вращения не менее 13000 об/мин ($11000 \times g$);
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (1-2 пробирки для выделения из 1 образца);
- Дополнительные материалы (в зависимости от образца):
 - *ткани растений и животных*: жидкий азот, ступка и пестик, вода
 - *культуры клеток животных и бактерий*: натрий-фосфатный буфер (PBS)
 - *жидкие образцы, мазки и смывы, фекалии*: стерильный физиологический раствор
 - *мокрота*: муколизин

Перед началом работы

При наличии осадка в *лизирующем растворе NA* прогрейте его в термостате до температуры не выше +50°C и дождитесь полного растворения осадка.

Подготовка образца

Ткани растений и животных

В качестве образца для выделения нуклеиновых кислот рекомендуется брать 20-30 мг ткани животного или растения. Для выделения могут использоваться как свежие, так и замороженные образцы тканей.

! Хранение образцов тканей при -70°C в течение нескольких месяцев.

1. Поместите свежий или замороженный (-70°C) кусочек ткани в жидкий азот.
2. Перенесите замороженный образец ткани в ступку и тщательно гомогенизируйте образец до состояния порошка.
3. Пересыпьте порошок в отдельную пробирку объёмом 1,5 мл. Дождитесь испарения жидкого азота, при этом не позволяйте образцу оттаять.
4. Добавьте к гомогенату (в указанном порядке): 300 мкл *лизирующего раствора НА*, 100 мкл воды. Перемешайте.
5. Переходите к разделу «Выделение нуклеиновых кислот», пункт 2.

Культуры клеток животных и бактерий

Для выделения нуклеиновых кислот данным набором рекомендуется брать не более $1-2 \times 10^6$ животных клеток и 10^9 клеток грамотрицательных бактерий.

Адгезионная культура клеток животных: удалите культуральную жидкость, снимите культуру клеток с поверхности пластика трипсином или другим рекомендованным для данной культуры методом. Центрифугируйте клетки 5 мин, $300 \times g$. Удалите супернатант. Ресуспендируйте находящиеся в осадке клетки в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию клеток в новую пробирку объёмом 1,5 мл.

Суспензионная культура клеток животных: отберите объём культуральной жидкости, содержащий необходимое число клеток. Центрифугируйте клетки 5 мин, $300 \times g$. Удалите супернатант. Ресуспендируйте находящиеся в осадке клетки

в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию клеток в новую пробирку объёмом 1,5 мл.

Бактериальная культура: бактерии, выращенные на твердой или жидкой питательной среде, соберите центрифугированием в течение 5-10 минут, $3000\text{-}5000 \times g$. Удалите супернатант. Ресуспендируйте находящиеся в осадке клетки в 100 мкл PBS. Перенесите суспензию клеток в новую пробирку объёмом 1,5 мл.

Переходите к разделу «**Выделение нуклеиновых кислот**».

Плазма крови

Данный набор подходит для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови. Для получения плазмы следует использовать образцы цельной периферической крови, содержащие в качестве антикоагуланта ЭДТА в конечной концентрации 2,0 мг/мл или цитрат натрия.

! Не допускается использовать гепарин в качестве антикоагуланта.

! Время от момента взятия периферической крови до получения плазмы не должно составлять более 6 часов.

1. Перемешайте переворачиванием пробирку с кровью, чтобы содержимое пробирки стало гомогенным.
2. Центрифугируйте пробирку с кровью 20 мин, $900 \times g$ при комнатной температуре ($+18\text{-}25^{\circ}\text{C}$).
3. Отберите 100 мкл верхней фракции (плазмы) и перенесите в отдельную пробирку объёмом 1,5 мл.
4. Переходите к разделу «**Выделение нуклеиновых кислот**».

! Хранение плазмы при -20°C не более 3 месяцев.

Соскобы эпителиальных клеток

Данный набор подходит для выделения тотальной нуклеиновой кислоты из соскобов эпителиальных клеток, взятых с помощью одноразового стерильного зонда (буккального эпителия, с задней стенки глотки, носоглотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища и т.д.).

1. Внесите 500 мкл физиологического раствора (стерильного) в пробирку объёмом 1,5 мл.
2. Тщательно промойте в физиологическом растворе зонд с соскобом эпителиальных клеток. Прижмите к стенке ватный тампон и вращательным движением отожмите из него остатки физиологического раствора.
3. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Тщательно удалите супернатант.
4. Ресуспендируйте осадок в 100 мкл физиологического раствора (стерильного).
5. Переходите к разделу **«Выделение нуклеиновых кислот»**.

Моча

1. Внесите 1 мл образца мочи в чистую пробирку объёмом 1,5 мл.
2. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Тщательно удалите супернатант.
3. Ресуспендируйте осадок в 1 мл физиологического раствора (стерильного).
4. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Удалите супернатант.
5. Ресуспендируйте осадок в 100 мкл физиологического раствора (стерильного).
6. Переходите к разделу **«Выделение нуклеиновых кислот»**.

Слюна, ликвор, синовиальная жидкость

1. Внесите 500 мкл образца в отдельную пробирку объёмом 1,5 мл.
2. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Удалите супернатант, оставив в пробирке около 50 мкл.
3. Ресуспендируйте осадок в 500 мкл физиологического раствора (стерильного).
4. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Удалите супернатант.
5. Ресуспендируйте осадок в 100 мкл физиологического раствора (стерильного).
6. Переходите к разделу «**Выделение нуклеиновых кислот**».

Сперма, секрет предстательной железы

1. Внесите 100 мкл образца в отдельную пробирку 1,5 мл.
2. Добавьте к образцу 500 мкл физиологического раствора (стерильного). Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 5-10 сек.
3. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Удалите супернатант.
4. Ресуспендируйте осадок в 100 мкл физиологического раствора (стерильного).
5. Переходите к разделу «**Выделение нуклеиновых кислот**».

Мазки и смывы

1. Поместите образец в пробирку для центрифугирования.
2. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Удалите супернатант.
3. Ресуспендируйте осадок в 100 мкл физиологического раствора (стерильного).
4. Переходите к разделу «**Выделение нуклеиновых кислот**».

Фекалии

1. Внесите 1 мл физиологического раствора (стерильного) в чистую пробирку объёмом 1,5 мл.
2. Поместите в пробирку с физиологическим раствором около 250 мг (мкл) фекалий.
3. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 5-10 сек.
4. Центрифугируйте 3 мин, $100 \times g$.
5. Перенесите 800-1000 мкл супернатанта в отдельную пробирку 1,5 мл.
6. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Удалите супернатант.
7. Ресуспендируйте осадок в 100 мкл физиологического раствора (стерильного).
8. Переходите к разделу «**Выделение нуклеиновых кислот**».

Мокрота

1. В контейнер с образцом добавьте муколизин в соотношении 5:1 (5 частей муколизина : 1 часть мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера.
2. Закройте крышку контейнера, встряхните содержимое пробирки и инкубируйте 20-30 мин при комнатной температуре, каждые 2-3 мин встряхивая контейнер.
! Обработанную мокроту допускается хранить в контейнере в течение суток при +4°C или долговременно при -20°C.
3. Внесите 500 мкл полученного обработанного муколизином образца мокроты в отдельную пробирку объёмом 1,5 мл.
4. Центрифугируйте 10 мин, $11000 \times g$. Удалите супернатант.
5. Ресуспендируйте осадок в 100 мкл физиологического раствора (стерильного).
6. Переходите к разделу «**Выделение нуклеиновых кислот**».

Выделение нуклеиновых кислот

Работы следует выполнять при комнатной температуре, все центрифугирования (если иное прямо не оговорено) при скорости >13000 об/мин ($>11000 \times g$).

Перед началом работы установите термостат на $+65^{\circ}\text{C}$, поместите в него пробирку с буфером для растворения NA.

Подготовьте образец в объеме 100 мкл в пробирке объемом 1,5 мл согласно разделу «**Подготовка образца**».

1. В пробирку с образцом (100 мкл) добавьте 300 мкл лизирующего раствора NA, тщательно перемешайте содержимое пробирки на вортексе.
2. Инкубируйте полученную смесь 15 мин при $+65^{\circ}\text{C}$.
3. (Опционально) Если образец после лизиса содержит нерастворенные компоненты, центрифугируйте пробирку с образцом 10 мин. Перенесите супернатант в новую пробирку объемом 1,5 мл.
4. Добавьте к образцу 400 мкл раствора для преципитации, перемешайте на вортексе. Центрифугируйте 15 минут.
5. Аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок. К осадку добавьте 500 мкл промывочного раствора 1, перемешайте на вортексе. Центрифугируйте 5 мин.
6. Аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок. К осадку добавьте 500 мкл промывочного раствора 2, перемешайте на вортексе. Центрифугируйте 5 мин.
7. Тщательно удалите супернатант, не задевая осадок. Подсушите осадок 5 минут в пробирке с открытой крышкой при $+65^{\circ}\text{C}$.
8. Добавьте 50 мкл предварительно прогретого до $+65^{\circ}\text{C}$ буфера для растворения NA.
9. Инкубируйте пробирку с образцом 5-10 минут при $+65^{\circ}\text{C}$. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе, сбросьте капли центрифугированием. Полученный препарат тотальной нуклеиновой кислоты готов для постановки реакции ПЦР/ОТ-ПЦР без дополнительной пробоподготовки.

Хранение выделенной РНК: Из-за нестабильности РНК выделенный образец хранить не рекомендуется. Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

Хранение выделенной ДНК: кратковременно при +4°C, долговременно при -20°C не более одного месяца или при -70°C не более одного года.

Ver. KRN95
#5555N



22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

