

Инструкция к набору LysoPrep Lyo для
предобработки образцов лизоцимом
перед выделением ДНК

Contents

Русский: Инструкция к набору LysoPrep Lyo для предобработки образцов лизоцимом перед выделением ДНК	3-10
---	------

Инструкция к набору LysoPrep Lyo для предобработки образцов лизоцимом перед выделением ДНК

Набор реагентов **LysoPrep Lyo** предназначен для предварительной обработки биологического материала человека и бактериальных культур с помощью лизоцима перед процедурой выделения ДНК с целью увеличения выхода бактериальной ДНК и снижения концентрации ингибиторов.

Лизоцим вызывает разрушение пептидогликанов, входящих в состав клеточных стенок микроорганизмов, за счет гидролиза N-гликозидных связей. Также молекулы лизоцима, встраиваясь в цитоплазматическую мембрану, приводят к ее повреждению и образованию пор, что, в конечном итоге, вызывает разрушение бактериальных клеток.

Набор полностью готов к использованию. Один набор рассчитан на обработку 50 образцов.

Состав набора

Компонент набора	Количество
	21133
	50 assays
12315, Lysozyme, 20 mg	5
A6850, Lysozyme dilution Buffer, 200 μ L	5

Хранить при температуре от -22°C до $+8^{\circ}\text{C}$. Транспортировать при температуре от 0 до $+25^{\circ}\text{C}$ до 10 дней.

Срок хранения 12 месяцев.

Подробнее условия хранения компонентов набора приведены ниже.

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Микроцентрифуга-вортекс
- Центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл с RCF не ниже $14000 \times g$
- Термостат твердотельный, поддерживающий температуру до 65°C
- Пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз
- Одноразовые наконечники с фильтром, свободные от ДНКаз и РНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл
- Емкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов
- Физиологический раствор стерильный
- Глицерин (при необходимости)

Подготовка образцов

Для проведения анализа применяются образцы кала (фекалии, в том числе меконий) человека, а также бактериальные культуры. Для достижения максимального качества необходимо придерживаться следующих общих рекомендаций:

- Для достижения точных результатов ключевое значение имеет качество сбора образца биоматериала, его правильное хранение, транспортировка и предварительная обработка.
- Неправильный сбор биоматериала может вызвать искажение результатов и, следовательно, необходимость в повторном взятии образца.
- На стадии подготовки биоматериала следует применять наконечники с фильтрами, не содержащие РНКаз и ДНКаз.

- При внесении раствора лизоцима в пробирку с биологическим материалом, делайте это аккуратно, избегая контакта наконечника с внутренними стенками пробирки. В случае контакта замените наконечник.
- Наконечник следует менять при каждом удалении раствора из образца.
- Для предотвращения контаминации следует держать открытой крышку только той пробирки, с которой ведется работа (внесение образца/реактива, удаление супернатанта), после внесения всех необходимых реагентов ее необходимо закрыть и только после этого открывать следующую.

1. Взятие фекалий для исследования

Для анализа используют образцы фекалий или мекония массой (объемом) примерно 1,0–3,0 г (1,0–3,0 мл). Образец переносят отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками в специальный стерильный сухой флакон в количестве примерно 1,0 г. После сбора фекалий флакон плотно закрывают и маркируют.

Важно! Перед выделением ДНК требуется предварительная обработка образцов биологического материала (см. этап Подготовка фекалий или мекония для исследования (приготовление суспензии)).

2. Взятие бактерий для исследования

Взятие материала с жидких и плотных сред осуществляется при помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя. Поместите в одноразовую пробирку объемом 1,5–2,0 мл, в которую предварительно внесено 500 мкл стерильного физиологического раствора, одиночную колонию клеток или 100 мкл жидкой среды. После взятия материала плотно закройте пробирку крышкой и промаркируйте.

3. Перевозка и хранение образцов для исследования

Образцы фекалий или мекония можно транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) — не более 6 часов;
- при температуре от 2°C до 8°C — не более 3 суток.

Если необходимо хранить материал более суток или длительное время, рекомендуется подготовить фекальную суспензию с добавлением глицерина.

Культуры бактерий можно транспортировать и хранить:

- при температуре от 2°C до 8°C — не более одних суток;
- при температуре от -18°C до -20°C — не более одной недели;
- при температуре -70°C — в течение длительного времени.

Важно! Допускается лишь однократное замораживание/оттаивание материала.

4. Подготовка фекалий или мекония для исследования (приготовление суспензии)

1. Перенесите примерно 0,1-0,2 г (мл) фекалий в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 1,0 мл стерильного физиологического раствора.
2. Тщательно перемешайте содержимое пробирки в течение 5-10 с на микроцентрифуге-вортексе.
3. Если невозможно проанализировать образец в течение одного дня или если необходимо длительное хранение, в суспензию фекалий в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида добавьте глицерин до конечной концентрации 10–15%. Такие образцы следует замораживать только после тщательного смешивания с глицерином и выдерживания в течение 30–40 мин для полной гомогенизации.

2. Фекальную суспензию с добавлением глицерина можно перевозить и хранить следующим образом:

- при температуре -20°C — в течение 1 недели;
- при температуре -70°C — длительное время.

Подготовка компонентов набора

Лизоцим из набора **LysoPrep Lyo** необходимо предварительно растворить:

1. Добавьте 200 мкл буфера в пробирку с лиофилизированным лизоцимом.
2. Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с до полного растворения кристаллов.
3. Плотно закройте пробирку.
4. Осадите капли с крышки в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
5. Объем раствора лизоцима, полученный таким образом, достаточен для обработки 10 образцов, включая отрицательные контрольные образцы.
6. Неиспользованный остаток приготовленного раствора лизоцима можно хранить при температуре от -18°C до -22°C в течение срока годности набора.

Важно! Разрешается только один цикл замораживания/размораживания раствора.

Обработка образцов

1. Общие рекомендации

- При работе с образцами рекомендуется использовать одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
- При введении реагентов в пробирку с биологическим материалом следует быть осторожным, избегая касания стенок пробирок. Если произошло касание стенок, следует заменить наконечник.
- Образцы для исследования и отрицательный контрольный образец «К» должны обрабатываться одновременно.

2. Обработка фекальных суспензий

1. Центрифугируйте пробирки с образцами фекальных суспензий при $13000 \times g$ в течение 30 с при комнатной температуре, чтобы осадить дебрис на дно пробирки.
2. Промаркируйте каждую одноразовую пробирку объемом 1,5 мл для каждого образца, подлежащего исследованию, а также для отрицательного контрольного образца «К».

Важно! Для предотвращения контаминации всегда открывайте крышку только той пробирки, с которой идет работа (внесение образца/реагента), и закрывайте ее после этого. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.

3. Перенесите 100 мкл средней фракции из пробирок с суспензиями фекалий в соответствующие пробирки. В пробирку «К» образцы не вносятся.
4. Внесите 100 мкл стерильного физиологического раствора или элюирующего буфера, входящего в комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот, в пробирку «К».

2. Добавьте 20 мкл раствора лизоцима в промаркированные пробирки с образцами и в пробирку «К».
3. Аккуратно встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
4. Центрифугируйте пробирки в течение 1-3 с для сброса капель.
5. Инкубируйте образцы с лизоцимом в течение 60 мин при комнатной температуре или в течение 30 мин при 37°C. Во время инкубации аккуратно встряхните пробирки 2-3 раза в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
6. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 60 с.

3. Обработка культуры бактерий

1. Промаркируйте по одной одноразовой пробирке объемом 1,5 мл для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К».
2. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл суспензии микроорганизмов. В пробирку «К» образцы не вносятся.
3. Внесите 100 мкл стерильного физиологического раствора или элюирующего буфера, входящего в комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот, в пробирку «К».
4. Добавьте в промаркированные пробирки с образцами и в пробирку «К» по 20 мкл раствора лизоцима.
5. Аккуратно встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
6. Центрифугируйте пробирки в течение 1-3 с для сброса капель.
7. Инкубируйте образцы с лизоцимом в течение 60 мин при комнатной температуре или в течение 30 мин при 37°C. Во время инкубации аккуратно встряхните пробирки 2-3 раза в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
8. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 60 с.

Выделение ДНК

Образцы, обработанные лизоцимом с помощью набора **LysoPrep Lyo**, следует сразу использовать для выделения ДНК.

Выделение ДНК из образцов, обработанных лизоцимом, производят используя весь полученный объем (120 мкл), в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов.

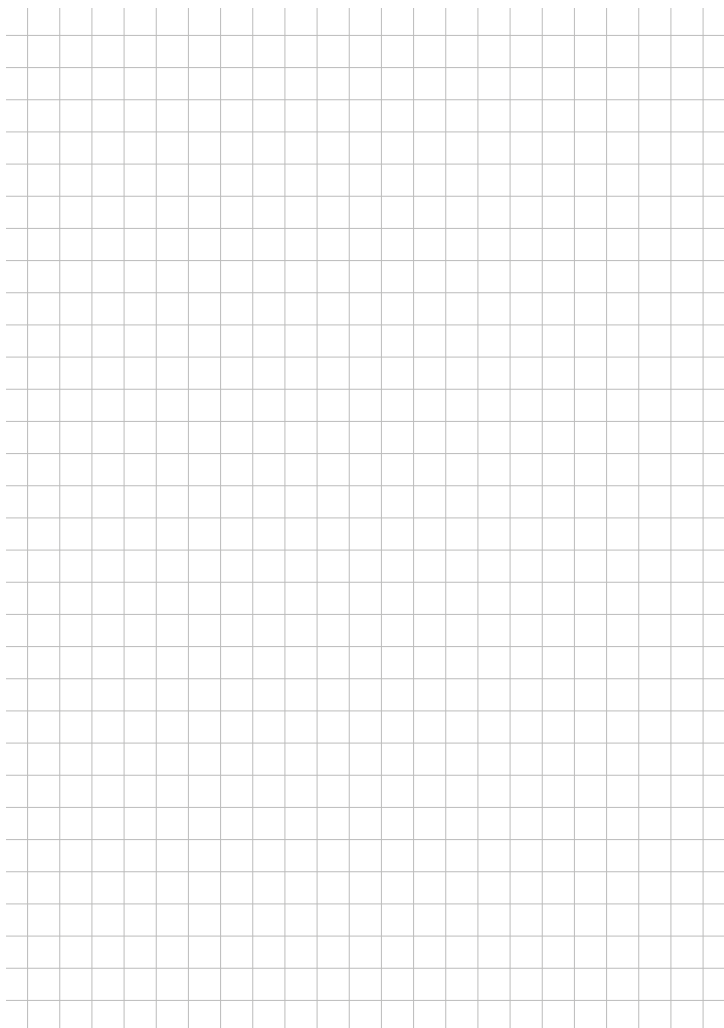
Для выделения нуклеиновых кислот можно использовать наши наборы **LumiMag UNI**, **LumiMag FEC**, **LumiPure UNI** или **LumiSpin UNI**.

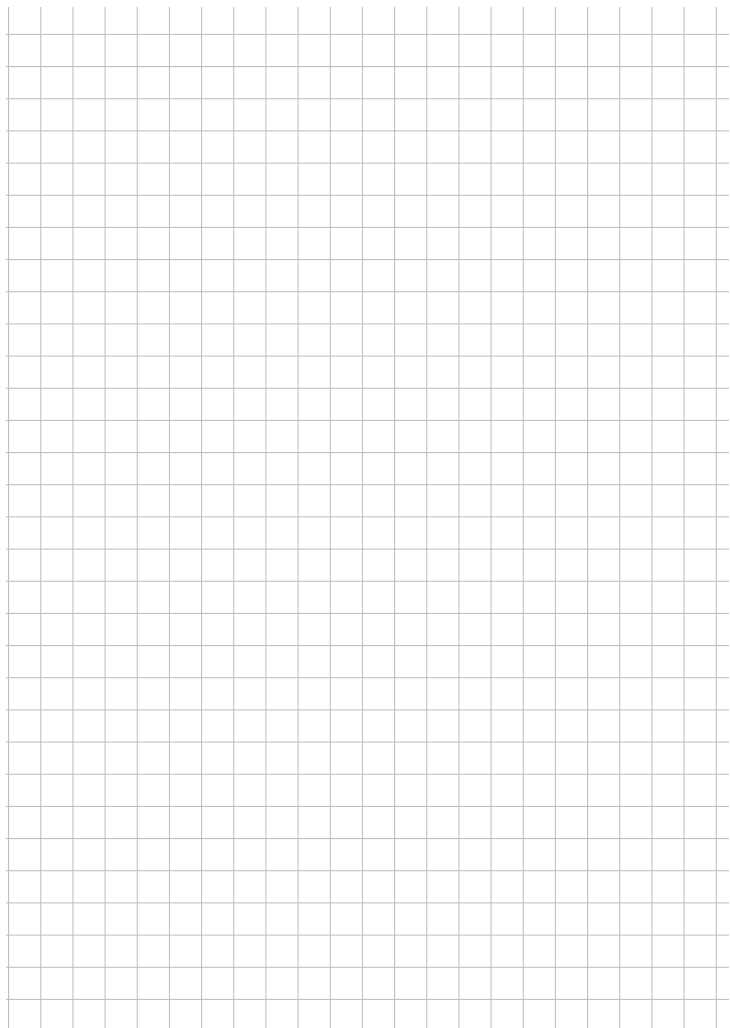
Срок годности

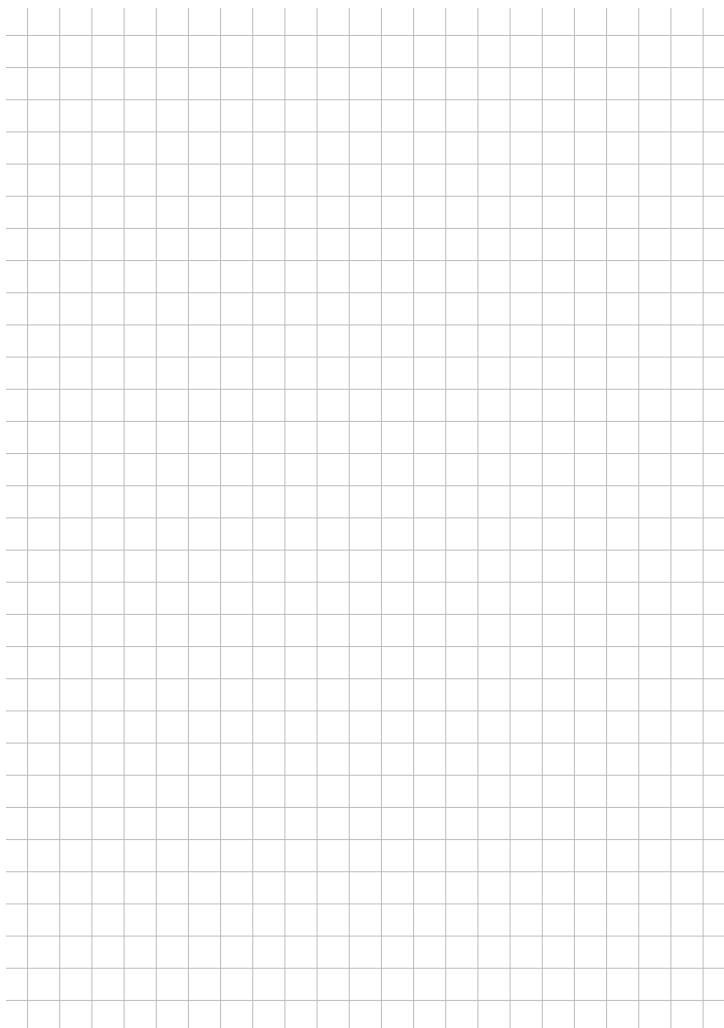
Срок годности набора — 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Хранение компонентов набора

- Компоненты набора следует хранить при температуре от -22°C до $+8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора реагентов.
- Приготовленный раствор лизоцима следует хранить в морозильной камере при температуре от -18°C до -22°C с возможностью однократного размораживания.
- Компоненты наборов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.









22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

