



**Набор реагентов для очистки ДНК из  
агарозного геля и реакционных смесей**

**«Amplex»**

**#amplex-50**

**#amplex-250**

**Инструкция по применению**

## **1. Назначение**

### **1.1. Полное название**

«Набор реагентов для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Amplex».

### **1.2. Назначение**

Набор реагентов предназначен для очистки ДНК из агарозного геля или реакционных смесей (РС).

### **1.3. Область применения**

Набор реагентов «Amplex» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для очистки нуклеиновых кислот из агарозного геля и реакционных смесей с целью последующих исследований с применением разных техник ПЦР, капиллярного электрофореза, генно-инженерных приложений, ферментативной подготовки геномных библиотек. Только для научных исследований.

### **1.4. Принцип действия**

Набор включает в себя раствор, способствующий полному растворению геля с последующей сорбцией нуклеиновых кислот на кремниевой мембране спин-колонки. После чего следует промывка и элюция нуклеиновых кислот.

## 2. Характеристика набора

Компоненты набора являются одноразовыми. Набор реагентов «Amplex» не требует технического обслуживания и калибровки.

### 2.1. Состав набора

Набор материалов и реагентов «Amplex» рассчитан на 50 или 250 очисток.

№	Реагент/ вспомогательный материал	Описание	#amplex-50		#amplex-250	
			Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Связывающий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	37,5	1	187,5	1
2	Промывочный буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	37,5	1	187,5	1
3	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, рН=8,9	5	1	25	1
4	Спин-колонки с собирательными пробирками	Собирательная пробирка объемом 2 мл без крышки, сорбционная колонка с кремнеземной мембраной емкостью до 25 мкг ДНК		50		250

### **3. Меры предосторожности при работе с набором**

Работу проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

#### **3.1. Необходимость обучения персонала**

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим/средним медицинским или биологическим образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

#### **3.2. Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора**

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают при должном использовании.

При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- при вырезании фрагментов геля на УФ-трансиллюминаторе следует надеть УФ-защитную маску, а также закрыть все открытые участки кожи, на которые возможно попадание УФ-света.
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами, слизистыми оболочками и одеждой. При попадании промыть большим количеством воды в течение нескольких минут. При приеме внутрь немедленно обратиться за медицинской помощью.

Промывочный буфер содержит легковоспламеняющиеся жидкости. Все работы с легковоспламеняющимися жидкостями должны проводиться с использованием приточно-вытяжной вентиляции, вдали от огня и источников искрообразования, электрооборудование и освещение должно быть взрывобезопасно.

### **4. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором**

#### **4.1. Указания о необходимости использования специального оборудования**

Работу с набором следует проводить в боксе для стерильных работ с ДНК-пробами (например, бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,8, ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

#### **4.2. Дозирующие устройства**

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 20-200 мкл и 100-1000 мкл.

#### **4.3. Другое используемое оборудование**

- Вортекс (например, Biosan Microspin FV-2400);
- твердотельный термостат с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-80°C для пробирок объемом 1,5-2 мл (например, Biosan TDB-120);

- скоростная микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5418 R);
- штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;
- морозильная камера -20°C (для хранения образцов);
- холодильник 2-8°C (для хранения образцов);
- УФ-трансиллюминатор (для вырезания фрагментов из агарозного геля);
- стерильный скальпель (или любой другой острый предмет, пригодный для вырезания фрагментов из агарозного геля).

#### **4.4. Лабораторная посуда**

Емкости для сброса наконечников и пробирок.

#### **4.5. Материалы и реагенты, не входящие в состав набора**

- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 или 2 мл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- маска УФ-защитная;
- комплект средств для обработки рабочего места;

Опционально: изопропанол.

### **5. Анализируемые пробы**

#### **5.1. Предварительная подготовка биологического материала**

При проведении процедуры очистки ДНК из геля необходимо приступить к процессу очистки как можно скорее после окончания процесса электрофореза. При вырезании ДНК-содержащих фрагментов из геля на УФ-трансиллюминаторе необходимо вырезать их как можно быстрее, так как УФ-свет повреждает структуру ДНК, делая ее непригодной для некоторых приложений.

При проведении процедуры очистки ДНК из реакционной ПЦР-смеси желательно работать со смесью с хранением не более 2 суток при +4°C, либо с той, которая хранилась при температуре -20°C не более года. После размораживания смесь необходимо встряхнуть и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

#### **5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб**

Хранение образцов геля:

- при комнатной температуре – в течение 3 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 24 часов (в закрытой емкости);

Хранение образцов реакционной смеси:

- при комнатной температуре – в течение 24 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 2 суток;
- при температуре -20°C – в течение года.

### **6. Проведение процедуры очистки ДНК**

#### **6.1. Подготовка пробы (гель)**

1. Вырезать участок геля с нужным фрагментом ДНК и поместить его в предварительно взвешенную пробирку, далее взвесить пробирку с пробой и

высчитать разницу. Вес геля в мг приравнивается к его объему в мкл (1 мг геля = 1 мкл геля).

2. В пробирку добавить 3 объема связывающего буфера (от объема геля), но не менее 300 мкл.
3. Инкубировать смесь в термостате при 55-58°C до полного растворения геля, периодически перемешивая на вортексе.

*Опционально:* для фрагментов ДНК менее 500 п.н. после растворения геля внести в реакцию 1 объем изопропанола (от объема геля) и перемешать. Далее перейти к этапу сорбции и промывки.

## 6.2. Подготовка пробы (реакционная смесь)

1. Если объем РС составляет менее 25 мкл, то необходимо довести его до 50 мкл водой или ТЕ-буфером и принять данный объем за основной. К объему РС добавить 3 объема связывающего буфера, перемешать.

*Опционально:* для фрагментов ДНК менее 500 п.н. внести в реакцию 2 объема изопропанола (от объема РС). Далее перейти к этапу сорбции и промывки.

## 6.3. Сорбция и промывка НК

1. Переместить весь объем смеси в спин-колонку.
2. Центрифугировать в течение 30 секунд при 10-13 тыс. об/мин, удалить фильтрат из собирательной пробирки.
3. Добавить в спин-колонку 750 мкл промывочного буфера.
4. Центрифугировать в течение 30 секунд при 10-13 тыс. об/мин, удалить фильтрат из собирательной пробирки.
5. Центрифугировать спин-колонку в течение минуты при 10-13 тыс. об/мин.
6. Переместить спин-колонку в новую пробирку 1,5-2 мл. Собирательную пробирку утилизировать.

## 6.4. Элюция НК

1. Добавить на центр мембраны спин-колонки 50-100 мкл элюирующего буфера.
2. Инкубировать в течение 3-10 минут при комнатной температуре.
3. Центрифугировать в течение 30-60 секунд при 10-13 тыс. об/мин.
4. Утилизировать спин-колонки.

*Опционально:* для повышения выхода НК фильтрат можно повторно нанести на мембрану колонки и/или использовать нагретый до 60-70°C элюирующий буфер.

## 6.5. Условия хранения очищенных образцов НК

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.

## 6.6. Показатели очищенных образцов НК

По соотношению показателей поглощения A260/A280 чистота полученного раствора ДНК соответствуют  $\geq 1,7$ .

## 6.7. Возможные трудности при очистке образцов НК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
Фрагмент геля не растворяется на этапе подготовки пробы.	Недостаточный объем внесённого связывающего буфера, слишком высокая концентрация агарозы.	Добавить в смесь 1 объем (от геля) связывающего буфера. Если фрагмент по-прежнему не растворяется, то внести еще один объем связывающего буфера.

## **7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации**

### **7.1. Условия хранения**

Буферы набора «Amplex» 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.

### **7.2. Условия транспортировки**

Транспортировка набора реагентов «Amplex» может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

### **7.3. Информация по безопасной утилизации**

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10. Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

### **7.4. Гарантийные обязательства производителя**

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортировки, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» (107014, г. Москва, ул. Короленко, 8, email: sales@sesana.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и лабораторных работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.