



**Набор реагентов для выделения ДНК из
цельной крови
«GM Blood N»**

#bloodN-50

#bloodN-250

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения ДНК из образцов цельной крови GM Blood N».

1.2. Назначение

Набор реагентов «GM Blood N» Raissol[™] предназначен для выделения нуклеиновых кислот высокого качества из 50 или 250 образцов цельной крови.

1.3. Область применения

Набор для выделения ДНК «GM Blood N» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях для выделения нуклеиновых кислот из цельной крови с целью последующих исследований с применением разных техник ПЦР, ферментативной подготовки геномных библиотек и секвенирования. Только для научных исследований.

1.4. Принцип действия

Выделение включает удаление эритроцитов крови с помощью RBC буфера, частично нарушая при этом мембрану лейкоцитов, что способствует снижению концентрации митохондриальной ДНК в финальном растворе НК, после чего следует полный лизис клеток, удаление белков, преципитация нуклеиновых кислот, а также их промывка и элюция.

2. Характеристика набора

Компоненты набора являются одноразовыми. Набор реагентов «GM Blood N» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов «GM Blood N» рассчитан на 50 или 250 выделений.

| № | Реагент/вспомогательный материал | Описание | #BloodN-50 | | #BloodN-250 | |
|---|----------------------------------|--|------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | Объем, мл | Кол-во, шт. | Объем, мл | Кол-во, шт. |
| 1 | RBC буфер | Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха | 45 | 1 | 225 | 1 |
| 2 | Лизирующий буфер | Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха | 15 | 1 | 75 | 1 |
| 3 | Осаждающий буфер 1 | Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом | 2,5 | 1 | 12,5 | 1 |
| 4 | Осаждающий буфер 2 | Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом | 16,5 | 1 | 82,5 | 1 |
| 5 | Промывочный буфер 1 | Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом | 35 | 1 | 175 | 1 |
| 6 | Промывочный буфер 2 | Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом | 35 | 1 | 175 | 1 |
| 7 | Элюирующий буфер | Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, рН = 8,9 | 5 | 1 | 25 | 1 |
| 8 | Протеиназа К | Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха | 1 | 1 | 5 | 1 |

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

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

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

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- 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.

Осаждающий буфер 2, промывочный буфер 1 и промывочный буфер 2 содержат 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;
- штатив-охладитель для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл (например, Диаэм IsoFeeze) или ледогенератор (например, Scotsman AF 10 AS OX);
- морозильная камера -20°C;
- холодильник 2-8°C (для хранения образцов).

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;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

Перемешать цельную кровь в пробирке, перевернув ее несколько раз.

Если в пробирке есть сгустки крови, то необходимо увеличить лизис до полного растворения сгустков.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Хранение образцов цельной крови:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от +2 до +8 °С – в течение 1 суток.

Не допускается замораживание образцов цельной крови!

6. Проведение процедуры выделения ДНК

6.1. Лизис

1. В пробирки объемом 1,5-2 мл поместить 300 мкл цельной крови и добавить 900 мкл RBC буфера.
2. Встряхнуть пробирки на вортексе.
3. Инкубировать в течение 5-10 мин при комнатной температуре.
4. Центрифугировать 1 мин при макс. об/мин (не менее 13 тыс. об/мин для настольных центрифуг), далее удалить супернатант.
5. К полученному осадку клеток добавить 300 мкл лизирующего буфера и 20 мкл протеиназы К, интенсивно встряхнуть на вортексе до полного разрушения конгломерата клеток.
6. Инкубировать в термостате при 55-60°C в течение 15-25 минут, периодически встряхивая.
7. 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.

6.2. Сорбция и осаждение НК

1. Добавить к смеси 50 мкл осаждающего буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать в течение 3-5 минут во льду или в холодном штативе. В случае отсутствия охладительных 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 300-330 мкл супернатанта в новую пробирку объемом 1,5-2 мл.
6. Добавить 330 мкл осаждающего буфера 2 и перемешать с помощью пятикратного переворачивания пробирки.
7. Для увеличения выхода ДНК рекомендуется инкубировать пробирки в морозильной камере при -20°C в течение 25 минут.
8. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, после чего удалить супернатант.

6.3. 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, после чего удалить супернатант.
4. Добавить в пробирки 700 мкл промывочного буфера 2.
5. Повторить пункты 2,3.
6. Открыть крышки и высушить образец в термостате при 42°C или в центрифуге-концентраторе при 30°C до полного испарения промывочного раствора.

6.4. Элюция НК

1. Добавить в пробирки 50-100 мкл элюирующего буфера.
2. Инкубировать в термостате при 60°C в течение 5 минут, периодически перемешивая на вортексе.

6.5. Условия хранения выделенных образцов НК

Полученные растворы нуклеиновых кислот могут храниться до 7 дней при температуре от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+4^{\circ}\text{C}$ и до двух лет при температуре -20°C .

6.6. Показатели выделенных образцов НК

По соотношению показателей поглощения A_{260}/A_{280} чистота полученного раствора ДНК соответствуют $\geq 1,7$.

6.7. Возможные трудности при выделении НК

| Проблема | Возможная причина | Описание решения |
|--|--|---|
| Нет осадка после центрифугирования с RBC буфером. | В крови мало ДНК-несущих клеток. | Повторить n количество раз пункты 1-4 этапа лизиса не меняя пробирки. |
| Осадок после преципитации белков недостаточно плотный. | Неохлажденный раствор перед преципитацией; недостаточное время центрифугирования; плохое перемешивание раствора. | Охладить раствор после лизиса; увеличить время центрифугирования; интенсивно перемешать раствор. |
| После осаждения на этапе преципитации осадка ДНК не видно. | Небольшое количество ДНК в растворе. | Продолжить выделение, отбирая супернатант по противоположной от центра центрифугирования стенке пробирки. |
| Низкая концентрация ДНК после измерения. | Биоматериал с малым количеством клеток; забор осадка с ДНК при удалении супернатанта. | Сконцентрировать ДНК в центрифуге-концентраторе при температуре +45°C. |

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Буферы набора «GM Blood N» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка у буферов при минимальных температурах хранения, растворы следует нагреть до комнатной температуры.

Фермент **Протеиназа К** необходимо хранить при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев.

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка **буферов** набора «GM Blood N» должна производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

Транспортировка фермента **Протеиназа К** должна производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре -20°C. Допускается кратковременное повышение температуры транспортировки (хранения) фермента **Протеиназа К** от +4°C до +25°C **не более 5 суток**.

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 регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.