



**Набор реагентов для выделения ДНК из
плазмы крови
«CF Extra»**

#cfextra-25

#cfextra-50

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения ДНК из плазмы крови CF Extra».

1.2. Назначение

Набор реагентов «CF Extra» Raiisol™ предназначен для выделения нуклеиновых кислот высокого качества из 25 или 50 образцов плазмы крови.

1.3. Область применения

Набор для выделения ДНК «CF Extra» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения нуклеиновых кислот из плазмы 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 денатурацию белков плазмы крови, освобождение ДНК от белок-ДНК взаимодействия и последующую адсорбцию нуклеиновых кислот на магнитных частицах. После чего следует промывка и элюция нуклеиновых кислот.

2. Характеристика набора

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

2.1. Состав набора

Набор реагентов «CF Extra» рассчитан на 25 или 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#cfextra-25		#cfextra-50	
			Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	22,5	1	45	1
2	Связывающий буфер	Прозрачная жидкость розового цвета, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	240	1	240	2
3	Ресуспендирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	21,5	1	43	1
4	Промывочный буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	45	1	90	1
5	Промывочный буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	22,5	1	45	1
6	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, рН=8,9	2,5	1	5	1
7	Протеиназа К	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,5	1	1	1
8	Магнитные частицы	Непрозрачная суспензия черного цвета с образованием осадка в состоянии покоя	3,25	1	6,5	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, 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;
- 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.

Ресуспендирующий буфер, 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

- Водяная баня с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 55-65°C;
- центрифуга для пробирок типа фалькон объемом 15 мл (например, Eppendorf 5910 Ri);
- 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 пробирок типа фалькон объемом 15 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;
- штатив-охладитель для пробирок объемом 1,5-2 мл (например, Диаэм IsoFeeze) или ледогенератор (например, Scotsman AF 10 AS OX);
- магнитный штатив;
- 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;
- пробирки типа фалькон объемом 15 мл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20-200 мкл;
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

При необходимости разморозить плазму крови перемешивая до однородного состояния.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Хранение образцов плазмы крови при температуре -25°C – до 3 лет.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

6. Проведение процедуры выделения ДНК

6.1. Лизис

1. В пробирки объемом 15 мл поместить 4,5 мл плазмы крови.
2. Добавить 900 мкл лизирующего буфера и 20 мкл Протеиназы К.
3. Перемешать пробирки с помощью переворачивания.
4. Инкубировать пробирки на водяной бане при 56-60°C в течение 60-90 минут, перемешивая каждые 10-20 минут.
5. Перенести пробирки на лед и инкубировать в течение 2-3 минут. В случае отсутствия охлаждающих элементов инкубировать при комнатной температуре в течение 10-15 минут до полного остывания пробирок.

6.2. Сорбция НК

1. Добавить к смеси 9,6 мл связывающего буфера и 130 мкл магнитных частиц, хорошо перемешать.
2. Инкубировать пробирки при комнатной температуре в течение 30 минут, перемешивая каждые 5-10 минут, либо установить на вращающийся ротор с минимальной скоростью.

6.3. Ресуспендирование

1. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при макс. об/мин, после чего удалить супернатант.
2. Добавить к каждому осадку 850 мкл ресуспендирующего буфера и разрушить конгломерат частиц с помощью пипетирования.
3. Перенести суспензию в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.
4. Инкубировать пробирки на магнитном штативе в течение 5 минут.
5. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.

6.4. Промывка НК

1. Добавить в пробирки 900 мкл промывочного буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать пробирки на магнитном штативе в течение 3 минут, после чего аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
4. Повторить пункты 1-3.
5. Добавить в пробирки 900 мкл промывочного буфера 2.
6. Повторить пункты 2,3.
7. Высушить образцы с открытыми крышками в термостате при 56-60°C в течение 5 - 10 минут либо при комнатной температуре в течение 20 минут до полного испарения промывочного раствора.

6.5. Элюция НК

1. Добавить в пробирки 50-100 мкл элюирующего буфера.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать в термостате при 56-60°C в течение 10 минут, периодически перемешивая. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Инкубировать на магнитном штативе в течение 3 минут.
5. Перенести элюат в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.

Опционально: рекомендуется провести дополнительное центрифугирование элюата на максимальной скорости для удаления магнитных частиц.

6.6. Условия хранения выделенных 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.

6.7. Показатели выделенных образцов НК

Показатели полученных растворов ДНК соответствуют диапазону концентраций 0,3-1 нг/мкл при измерении с помощью набора Spectra Q HS (Raissol™, Россия, #spectrahs100/500/1000) на приборе Qubit (Thermo Fisher Scientific, США). Спектр размера устанавливается с помощью электрофореза на приборе Caliper (Perkinelmer, США). Стандартный диапазон 160-200 п.н.

6.8. Возможные трудности при выделении НК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
«Грязный» элюат.	Остаточное наличие магнитных частиц; некачественная промывка магнитных частиц.	Центрифугировать элюат для отделения магнитных частиц; увеличить число и интенсивность промывок.

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Буферы набора «CF Extra» 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.

Магнитные частицы могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. Перед применением суспензию частиц необходимо тщательно взбалтывать до однородного состояния.

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

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка **буферов** набора «CF Extra» и **магнитных частиц** может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

Транспортировка фермента **Протеиназа К** может 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 регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.