



**Набор реагентов для выделения ДНК из срезов
FFPE-блоков методом сорбции на магнитных
частицах**

«FFPE MAG»

#FFPEMAG-50

#FFPEMAG-250

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения ДНК из срезов FFPE-блоков методом сорбции на магнитных частицах FFPE MAG».

1.2. Назначение

Набор реагентов «FFPE MAG» Raiisol[™] предназначен для выделения нуклеиновых кислот из 50 или 250 образцов срезов тканей, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPE).

1.3. Область применения

Набор для выделения ДНК «FFPE MAG» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения нуклеиновых кислот из срезов FFPE-блоков 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 депарафинизацию среза FFPE-блока, полный лизис клеток 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 «FFPE MAG» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов «FFPE MAG» рассчитан на 50 или 250 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#FFPEMAG-50		#FFPEMAG-250	
			Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Старт буфер	Прозрачная бесцветная маслянистая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	30	1	150	1
2	Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	20	1	100	1
3	Связывающий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	30	1	150	1
4	Промывочный буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	30	1	150	1
5	Промывочный буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	30	1	150	1
6	Промывочный буфер 3	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	30	1	150	1
7	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, pH=8,9	5	1	25	1
8	Протеиназа К	Прозрачная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1,5	1	7,5	1
9	РНКаза А	Прозрачная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,25	1	1,25	1
10	Магнитные частицы	Непрозрачная суспензия черного цвета, с образованием осадка в состоянии покоя	3	1	15	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.

Промывочный буфер 1, промывочный буфер 2 и промывочный буфер 3 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 2-20 мкл, 20-200 мкл, 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 14 тыс. об/мин
- штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;

- магнитный штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- 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 наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

Подготовить образцы срезов FFPE-блоков согласно протоколу, установленному в организации пользователя.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Хранение парафинизированных образцов:

- Хранить при температуре от 0 до +10 °С. Хранение при комнатной температуре усиливает деградацию образцов.

6. Проведение процедуры выделения ДНК

6.1. Депарафинизация и лизис

1. К срезу FFPE-блока добавить 600 мкл старт буфера и 400 мкл лизирующего буфера, перемешать образцы на вортексе.
2. Инкубировать в термостате при 60°C в течение 15 минут до полного растворения парафина, периодически перемешивая образцы.
3. Центрифугировать образцы в течение 30 секунд, после чего аккуратно удалить большую часть верхней органической фазы. Рекомендуется оставить тонкий слой верхней фазы во избежание потери ткани. Органическая фаза не токсична и не влияет на дальнейшую работу набора.
4. Добавить к образцам 30 мкл Протеиназы К, перемешать, сбросить капли кратковременным центрифугированием.
5. Инкубировать образцы при 60°C не менее 3 часов. Рекомендуется инкубировать образцы в течение ночи для полного лизиса ткани и большего выхода НК.
6. Центрифугировать образцы при макс. об/мин в течение 3 минут, перенести максимальный объем супернатанта в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.
7. Добавить к образцам 5 мкл РНКазы А, аккуратно перемешать, сбросить капли кратковременным центрифугированием.
8. Инкубировать образцы в течение 15 минут при комнатной температуре.

6.2. Сорбция НК

1. Добавить в пробирки 600 мкл связывающего буфера и 60 мкл магнитных частиц, перемешать.
2. Инкубировать образцы в течение 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая.

3. Сбросить капли кратковременным центрифугированием.
4. Инкубировать образцы на магнитном штативе в течение 2 минут. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок магнитных частиц.

6.3. Промывка НК

1. Добавить в пробирки 600 мкл промывочного буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать пробирки на магнитном штативе в течение 1 минуты, после чего аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
4. Добавить в пробирки 600 мкл промывочного буфера 2.
5. Повторить пункты 2-3.
6. Добавить в пробирки 600 мкл промывочного буфера 3.
7. Повторить пункты 2-3.
8. Высушить образцы с открытыми крышками в термостате в течение 5-7 минут при 60°C до полного испарения промывочного буфера 3.

6.4. 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 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 остаточного количества магнитных частиц.

6.5. Условия хранения выделенных образцов НК

Полученные растворы нуклеиновых кислот могут храниться до 4 дней при температуре от +2°C до +4°C и более длительное время при температуре -20°C.

6.6. Показатели выделенных образцов НК

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

6.7. Возможные трудности при выделении НК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
«Грязный» элюат	Остаточное наличие магнитных частиц; некачественная промывка магнитных частиц; наличие ткани в образце после лизиса.	Центрифугировать элюат для отделения магнитных частиц; увеличить интенсивность промывок; центрифугировать образец перед переносом раствора после лизиса, не захватывая остатков ткани.
Низкий выход ДНК	Неравномерная нарезка образца FFPE-блока.	Нарезать образцы с большим количеством ткани.
	Захват ткани при отборе парафинового слоя после этапа депарафинизации.	Аккуратно отбирать верхнюю фазу после этапа депарафинизации. Рекомендуется оставить тонкий слой верхней фазы во избежание потери ткани.

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Буферы набора «FFPE MAG» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка при пониженных температурах, растворы следует нагреть до комнатной температуры.

Старт буфер набора «FFPE MAG» хранится при температуре от +20°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя.

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.

Ферменты **Протеиназа К** и **РНКаза А** необходимо хранить при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев.

7.2. Условия транспортировки

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

Транспортировка **Старт буфера** набора «FFPE MAG» должна производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +20°C до +25°C.

Транспортировка ферментов **Протеиназа К** и **РНКаза А** 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 «FFPE MAG» 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.