



**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» Rai<sup>ssol</sup><sup>™</sup> 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.