



**Набор реагентов для выделения  
метагеномной ДНК из кала  
«Meta Fec»**

**#metafec-50**

**Инструкция по применению**

## **1. Назначение**

### **1.1. Полное название**

«Набор реагентов для выделения метагеномной ДНК из кала Meta Fec».

### **1.2. Назначение**

Набор реагентов «Meta Fec» Raissol™ предназначен для выделения метагеномной ДНК из 50 образцов кала методом сорбции на магнитных частицах.

### **1.3. Область применения**

Набор для выделения ДНК «Meta Fec» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения нуклеиновых кислот из образцов кала 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 полный лизис всех клеточных структур 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 «Meta Fec» не требует технического обслуживания и калибровки.

### 2.1. Состав набора

Набор реагентов «Meta Fec» рассчитан на 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#metafec-50	
			Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	20	1
2	Связывающий буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	17,5	1
3	Связывающий буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	12	1
4	Промывочный буфер 1	Прозрачная жидкость розового цвета, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	25	1
5	Промывочный буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	25	1
6	Промывочный буфер 3	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	50	1
7	Промывочный буфер 4	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	25	1
8	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, pH=8,9	5	1
9	Протеиназа К	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1	1
10	Магнитные частицы	Непрозрачная суспензия черного цвета с образованием осадка в состоянии покоя	2,5	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.

Связывающий буфер 2, промывочный буфер 2, промывочный буфер 3 и промывочный буфер 4 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;
- магнитный штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив-охладитель или ледогенератор;
- 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**

Произвести навески необходимых образцов кала, масса одной навески должна составлять 100 мг.

#### **5.2. Рекомендуемые условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб**

Образцы кала необходимо поместить в стерильную герметичную посуду.

Хранение образцов кала:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от +2 до +8 °C – в течение 72 часов.

### **6. Проведение процедуры выделения метагеномной ДНК**

#### **6.1. Лизис**

1. В пробирки объемом 1,5-2 мл поместить 100 мг исследуемых образцов кала.
2. Добавить к образцам 400 мкл лизирующего буфера и 20 мкл Протеиназы К.
3. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе.
4. Инкубировать пробирки в термостате при температуре 56°C в течение 1-2 часов, периодически перемешивая.
5. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
6. Поместить пробирки на лед или в холодный штатив и инкубировать в течение 3 минут. В случае отсутствия охладительных элементов инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин до полного остывания смеси.

#### **6.2. Сорбция НК**

1. Добавить к смеси 350 мкл связывающего буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут.
4. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при макс. об/мин.
5. Аккуратно, не задевая осадок, перенести супернатант в новые пробирки.
6. Повторить пункты 4-5.
7. Добавить в пробирки 240 мкл связывающего буфера 2 и 50 мкл магнитных частиц, интенсивно перемешать пробирки на вортексе.

8. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут, периодически перемешивая.
9. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
10. Инкубировать на магнитном штативе в течение 5 минут.
11. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.

### **6.3. Промывка НК**

1. Добавить в пробирки 500 мкл промывочного буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать пробирки на магнитном штативе в течение 2 минут. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
4. Добавить в пробирки 500 мкл промывочного буфера 2.
5. Повторить пункты 2-3.
6. Добавить в пробирки 500 мкл промывочного буфера 3.
7. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
8. Инкубировать пробирки на магнитном штативе в течение 2 минут. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
9. Повторить пункты 6-8.
10. Добавить в пробирки 500 мкл промывочного буфера 4.
11. Повторить пункты 7-8.
12. Высушить образцы с открытыми крышками в термостате при температуре 56-60°C в течение 5-10 минут до полного испарения промывочного раствора.

### **6.4. Элюция НК**

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

*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 7 дней при температуре от +2°C до +4°C и до двух лет при температуре -20°C.

### **6.6. Показатели выделенных образцов НК**

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

## 6.7. Возможные трудности при выделении НК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
«Грязный» элюат	Остаточное наличие магнитных частиц; некачественная промывка магнитных частиц; избыточное количество внесенного образца	Центрифугировать элюат для отделения магнитных частиц; увеличить число и интенсивность промывок; используйте рекомендуемое количество образца
Малый выход ДНК	Недостаточное обсеменение исследуемого материала	Уменьшить объем элюирующего буфера; сконцентрировать полученный раствор НК в центрифуге-концентраторе
Низкая чистота полученных НК	Захват осадка при переносе супернатанта на этапе сорбции	Произвести дополнительное центрифугирование на этапе сорбции НК и аккуратно, не задевая осадок, перенести супернатант в новую пробирку

## 7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

### 7.1. Условия хранения

**Буферы** набора «Meta Fec» 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 «Meta Fec» 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 регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.