



**Набор реагентов для выделения
метагеномной ДНК из проб молока
«Meta Milk»**

#metamilk-50

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения метагеномной ДНК из проб молока Meta Milk».

1.2. Назначение

Набор реагентов «Meta Milk» Raissol[™] предназначен для выделения метагеномной ДНК из 50 проб молока методом сорбции на магнитных частицах.

1.3. Область применения

Набор для выделения ДНК «Meta Milk» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения нуклеиновых кислот из проб молока 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 Milk» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов «Meta Milk» рассчитан на 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#metamilk-50	
			Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	5	1
2	Связывающий буфер	Прозрачная жидкость розового цвета, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	40	1
3	Промывочный буфер 1	Прозрачная жидкость розового цвета, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	25	1
4	Промывочный буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	50	1
5	Промывочный буфер 3	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	25	1
6	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, рН=8,9	3	1
7	Протеиназа К	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1	1
8	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.

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 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;
- 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

При необходимости разморозить пробу молока перемешивая до однородного состояния.

5.2. Рекомендуемые условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Условия хранения и транспортировки выбираются организацией пользователя в зависимости от цели исследования.

6. Проведение процедуры выделения ДНК

6.1. Лизис

1. В пробирки объемом 1,5-2 мл поместить 300 мкл исследуемых проб молока.
2. Добавить к образцам 100 мкл лизирующего буфера и 20 мкл Протеиназы К.
3. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе.
4. Инкубировать в термостате при температуре 56-60°C в течение 30-60 минут, периодически перемешивая.
5. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

6.2. Сорбция НК

1. Добавить 800 мкл связывающего буфера и 50 мкл магнитных частиц.
2. Инкубировать образцы в течение 10-15 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая.
3. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Инкубировать на магнитном штативе в течение 2 минут.
5. Аккуратно, не задевая частицы, 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 на магнитном штативе в течение 3 минут, после чего аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
4. Добавить в пробирки 500 мкл промывочного буфера 2.

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

6.4. Элюция НК

1. Добавить в пробирки 40-60 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 5 минут, периодически встряхивая.
4. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
5. Инкубировать 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.	Центрифугировать элюат для отделения магнитных частиц; увеличить число и интенсивность промывок.
Малый выход ДНК	Недостаточное обсеменение исследуемого материала	Увеличить количество исследуемого материала. Уменьшить объем элюирующего буфера.

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Буферы набора «Meta Milk» 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 Milk**» 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 хранения (транспортировки) 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.