



**Набор реагентов для выделения
метагеномной ДНК из проб почвы
«Meta Soil»**

#metasoil-50

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения метагеномной ДНК из проб почвы Meta Soil».

1.2. Назначение

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

1.3. Область применения

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

2.1. Состав набора

Набор реагентов «Meta Soil» рассчитан на 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#metasoil-50	
			Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	20	1
2	Связывающий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	17,5	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	25	1
5	Промывочный буфер 3	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	50	1
6	Промывочный буфер 4	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	25	1
7	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, рН=8,9	5	1
8	Протеиназа К	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1	1
9	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, 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;
- изопропанол (при необходимости увеличения сорбции деградированной ДНК);
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

Гомогенизировать исследуемые пробы почв, затем произвести навески образцов, масса одной навески должна составлять 100 мг.

5.2. Рекомендуемые условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Пробы почв необходимо поместить в стерильную герметичную посуду.

Хранение проб почв:

- при комнатной температуре – в течение 72 часов;
- при температуре от +2 до +8 °С – в течение 7 суток.

6. Проведение процедуры выделения метагеномной ДНК

6.1. Лизис

1. В пробирки объемом 1,5-2 мл поместить 100 мг исследуемых проб почвы.
2. К каждой навеске добавить 400 мкл деионизированной воды, исключая жидкие почвы (в т.ч. ил).
3. Добавить к образцам 400 мкл лизирующего буфера и 20 мкл Протеиназы К.
4. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе.
5. Инкубировать пробирки в термостате при температуре 56°C в течение 1-2 часов, периодически перемешивая.
6. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
7. 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.
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 50 мкл магнитных частиц, интенсивно перемешать пробирки на вортексе.
Рекомендация: добавить 240 мкл изопропанола для повышения сорбции деградированной ДНК.
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 Soil» 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 Soil» 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.