



**Набор реагентов для выделения ДНК из
семян, муки и проростков**

«SeedExt»

#SeedExt-50

#SeedExt-250

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения ДНК из семян, муки и проростков SeedExt».

1.2. Назначение

Набор реагентов «SeedExt» Raissol[™] предназначен для выделения нуклеиновых кислот высокого качества из 50 или 250 проб семян, муки или проростков.

1.3. Область применения

Набор для выделения ДНК «SeedExt» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения нуклеиновых кислот из семян, муки и проростков 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 гомогенизацию образца, полный лизис клеток и последующую адсорбцию нуклеиновых кислот на кремниевой мембране спин-колонки, после чего следует промывка и элюция нуклеиновых кислот.

2. Характеристика набора

Компоненты набора являются одноразовыми. Набор реагентов «SeedExt» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов «SeedExt» рассчитан на 50 и 250 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#SeedExt-50		#SeedExt-250	
			Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	25	1	125	1
2	Связывающий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	15	1	75	1
3	Промывочный буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	32,5	1	162,5	1
4	Промывочный буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	32,5	1	162,5	1
5	Промывочный буфер 3	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	65	1	162,5	2
6	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, pH = 8,9	5	1	25	1
7	Протеиназа К	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1	1	5	1
8	Спин-колонки с собираемыми пробирками	Собирательная пробирка объемом 2 мл без крышки, сорбционная колонка с кремнеземной мембраной емкостью до 25 мкг ДНК		50		250

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

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 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;
- штатив-охладитель для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл (например, Диаэм IsoFeeze) или льдогенератор (например, Scotsman AF 10 AS OX);
- аналитические весы с точностью взвешивания 0,1 мг;
- пестик для гомогенизации в 1,5 мл пробирках;
- 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

1. Этап пробоподготовки образца отличается в зависимости от вида биоматериала:

При работе с мукой:

- а. Внести в пробирку объемом 1,5-2 мл 50 мг навески образца, добавить 500 мкл лизирующего буфера и 20 мкл Протеиназы К.

При работе с семенами:

- б. Измельчить образцы до состояния муки мелкого помола. Внести в пробирку объемом 1,5-2 мл 50 мг навески, добавить 500 мкл лизирующего буфера и 20 мкл Протеиназы К.

При работе с проростками:

- с. Поместить навеску 15-50 мг зеленой части проростка в пробирку объемом 1,5 мл и интенсивно перетереть образец с помощью специального пестика для 1,5 мл микроцентрифужных пробирок до гомогенного состояния. Добавить 500 мкл лизирующего буфера. Внести 20 мкл Протеиназы К.

Примечание: при гомогенизации образцов в фарфоровой ступке с пестиком необходимо использовать набор «SeedExt+».

Примечание: при работе на автоматическом гомогенизаторе требуемая навеска образца помещается в специальную 1,5-2 мл пробирку с керамическими или металлическими бусинами для гомогенизации. Интенсивность программы гомогенизации должна быть щадящая, не допуская перегревания образцов.

2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

6. Проведение процедуры выделения ДНК

6.1. Лизис

1. Инкубировать образцы в термостате при 56-60°C в течение 1-2 часов, периодически встряхивая.

Опционально: за 10 минут до окончания лизиса возможно использование РНКазы А любого производителя в количестве, рекомендованном производителем.

2. Поместить пробирки на лед или в холодный штатив и инкубировать в течение 3 минут. В случае отсутствия охлаждающих элементов инкубировать при комнатной температуре в течение 10 минут до полного остывания смеси.

6.2. Сорбция НК

1. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин.
2. Перенести 300 мкл супернатанта в новые пробирки объемом 1,5 мл.
3. Добавить 300 мкл связывающего буфера, интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Перенести весь объем смеси в спин-колодку.
5. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.

6.3. Промывка НК

1. Добавить в пробирки 650 мкл промывочного буфера 1.
2. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
3. Добавить в пробирки 650 мкл промывочного буфера 2.
4. Центрифугировать пробирки в течение 30 секунд при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
5. Добавить в пробирки 650 мкл промывочного буфера 3.
6. Центрифугировать пробирки в течение 30 секунд при 13 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
7. Повторить п 5-6.
8. Вернуть колонки в собирательные пробирки. Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при макс. об/мин.

6.4. Элюция НК

1. Перенести спин-колонки в новые пробирки объемом 1,5-2 мл. Собирательные пробирки утилизировать.
2. Нанести на мембрану спин-колонок 50-100 мкл элюирующего буфера. Инкубировать в течение 5 минут.
3. Центрифугировать пробирки в течение 30 секунд при макс. об/мин.
4. Утилизировать спин-колонки.

Опционально: для повышения выхода НК фильтрат необходимо повторно нанести на мембрану колонки и/или использовать нагретый до 60-70°C элюирующий буфер.

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
Низкий выход НК	Недостаточное время инкубации во время лизиса; недостаточное измельчение образца	Увеличить время инкубации во время лизиса; повторить этап пробоподготовки, измельчив образец до мелкодисперсного состояния
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 «SeedExt» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка у буферов при минимальных температурах хранения, растворы следует нагреть до комнатной температуры.

Фермент **Протеиназа К** необходимо хранить при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев.

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка **буферов** набора «SeedExt» 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 регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.