



**Набор реагентов для приготовления
полногеномных библиотек
«SG GM»**

#SG_GM-96

#SG_GM-192

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для приготовления полногеномных библиотек SG GM».

1.2. Назначение

Набор реагентов «SG GM» Raiisol[™] для приготовления полногеномных библиотек из 96 или 192 образцов с применением ферментативного фрагментирования геномной ДНК и ампликонов размером от 800 п.н.

1.3. Область применения

Набор реагентов «SG GM» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для подготовки полногеномных библиотек с целью последующих этапов секвенирования. Только для научных исследований.

1.4. Принцип действия

Подготовка библиотек включает в себя ферментативное фрагментирование геномной ДНК или ампликонов с последующим лигированием универсальных адаптеров. После чего происходит селективная очистка магнитными частицами по технологии SPRI или аналогичным методом. Дальнейшие этапы включают в себя индексирование посредством ПЦР и последующую очистку.

2. Характеристика набора

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

2.1. Состав набора

Набор реагентов «SG GM» рассчитан на 96 или 192 реакции.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#SG_GM-96		#SG_GM-192	
			Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.
1	3в1 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1,34	1	1,34	2
2	3-фермент	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,16	1	0,32	1
3	ДНК-нуклеаза	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,1	1	0,2	1
4	Лигазный буфер	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с сероподобным запахом, возможно выпадение осадка	1	2	1	4
5	Лигаза	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,1	1	0,2	1
6	Адаптеры	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,35	1	0,7	1
7	ПЦР буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1,25	2	1,25	4
8	ПЦР фермент 1	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,05	1	0,1	1
9	ПЦР фермент 2	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,075	1	0,15	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.

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 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл и 100-1000 мкл.

4.3. Другое используемое оборудование

- Вортекс;
- центрифуга для пробирок в стрипах объемом 0,2 мл либо для 96-луночных планшетов;
- амплификатор планшетного типа для пробирок объемом 0,2 мл;
- штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив для пробирок объемом 0,2 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;
- магнитный штатив планшетного типа для пробирок объемом 0,2 мл;

- морозильная камера -20°C;
- холодильник 2-8°C,
- штатив-охладитель для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл (например, Диаэм IsoFeeze) или ледогенератор (например, Scotsman AF 10 AS OX).

4.4. Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и пробирок.

4.5. Материалы и реагенты, не входящие в состав набор

Материалы и оборудование:

- микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2 мл;
- пробирки в стрипах объемом 0,2 мл или 96-луночные планшеты;
- автоматические дозаторы переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл и соответствующие одноразовые наконечники;
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

Реагенты:

- магнитные частицы для селективной очистки ДНК, например, «Smart beads» Raissol[™] (#smartb 50/120/240), или аналоги технологии SPRI;
- деионизированная вода;
- TE буфер с низким содержанием ЭДТА;
- 80% этанол;
- праймеры – комплект индексов 1 (#Plate1_SG_GM) и/или праймеры – комплект индексов 2 (#Plate2_SG_GM).

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

Замер концентрации геномной ДНК производится спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Установление чистоты образца определяется соотношением A260/A280 и должно соответствовать $\geq 1,7$. После прохождения порога чистоты необходимо развести образец согласно полученным данным замера до концентрации 20 нг/мкл с применением TE буфера.

При работе с ампликонами следует проводить замер концентрации спектрофотометрически с применением интеркаляторов (например, наборами #spectrahs-1000/500/100; #spectrabr-1000/500/100). Необходимо развести образец согласно полученным данным замера до концентрации 10 нг/мкл с применением TE буфера.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Используемые 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. Проведение процедуры приготовления полногеномных библиотек

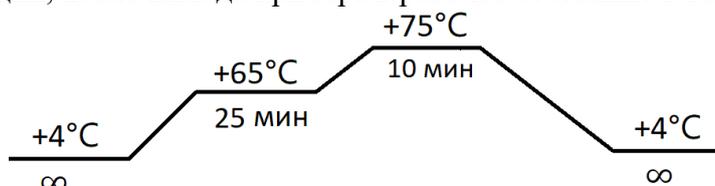
6.1. Фрагментация

1. Внести 10 мкл образца ДНК с концентрацией 20 нг/мкл (для геномной ДНК) и 10 нг/мкл (для ампликонов) в пробирки в стрипах либо в 96-луночный планшет, объемами 0,2 мл. Концентрация должна быть установлена: 1) для геномной ДНК – спектрофотометрически, при длине волны 260 нм 2) для ампликонов – спектрофотометрически с применением интеркаляторов (#spectrahs-100/500/1000; #spectrabr-100/500/1000).

2. Приготовить мастер-микс на необходимое количество реакций:

Название реагента	мкл на 1 реакцию
Зв1 буфер	13,4
3-фермент	1,6
ДНК-нуклеаза	1

3. Перемешать мастер-микс, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Внести 16 мкл мастер-микса к образцам.
5. Поместить пробирки в амплификатор, с предварительно установленной программой для фрагментации, после выхода прибора в рабочее состояние 1-го этапа:



6. После установки пробирок в амплификатор необходимо пропустить первый этап.

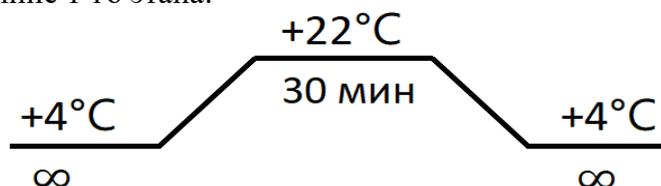
Примечание: при использовании ДНК-нуклеазы для фрагментирования ДНК на необходимый размер следует провести предварительное тестирование времени фрагментации (полка 2: +65°C) с шагом 2,5 минуты для установления оптимального размера (уменьшение времени приводит к увеличению размера продукта). Рекомендованная программа рассчитана на средний размер продукта 140-160 п.н.

6.2. Лигирование

1. Приготовить мастер-микс на необходимое количество реакций:

Название реагента	мкл на 1 реакцию
Лигазный буфер	20,5
Адаптеры	3,5
Лигаза	1

2. Перемешать мастер-микс, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. После завершения программы фрагментации, внести 25 мкл мастер-микса к образцам.
4. Установить программу для лигирования. Поместить пробирки в амплификатор, с предварительно установленной программой для лигирования, после выхода прибора в рабочее состояние 1-го этапа:



5. После установки пробирок в амплификатор необходимо пропустить первый этап.

Примечание: подготовить 80% этанол для последующего этапа. Рекомендуется в дальнейших этапах работы использовать магнитные частицы комнатной температуры.

6.3. Очистка после лигирования

1. Добавить 45 мкл магнитных частиц к каждому образцу, интенсивно перемешать на вортексе до гомогенного состояния, инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
3. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.

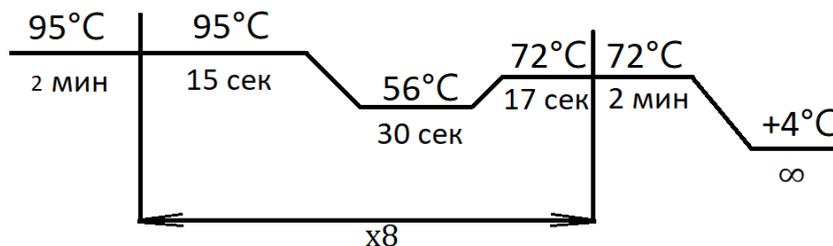
4. Добавить 180 мкл 80% этанола к каждому образцу, инкубировать в течение 30 секунд, перемещая пробирки на магнитном штативе, меняя их положение относительно магнита. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
5. Повторить пункт 4. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут или при +37°C до полного испарения спирта.
6. Добавить 24 мкл деионизированной воды к магнитным частицам. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
7. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
8. Перенести 22 мкл элюата в новые пробирки, не захватывая магнитные частицы.

6.4. Постановка индексной ПЦР

1. Добавить к каждому образцу по 2 мкл индивидуального праймерного микса из планшета с праймерами (#Plate1_SG_GM/#Plate2_SG_GM).
2. Приготовить мастер-микс на необходимое количество реакций:

Название реагента	мкл на 1 реакцию
ПЦР буфер	25
ПЦР фермент 1	0,5
ПЦР фермент 2	0,75

3. Перемешать мастер-микс, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Внести по 26,25 мкл мастер-микса к образцам.
5. Поместить пробирки в амплификатор. Запустить программу для индексной ПЦР:



6.5. Очистка после индексной ПЦР

1. Добавить 50 мкл магнитных частиц к каждому образцу, интенсивно перемешать на вортексе до гомогенного состояния, инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
3. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
4. Добавить 180 мкл 80% этанола к каждому образцу, инкубировать в течение 30 секунд, перемещая пробирки на магнитном штативе. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
5. Повторить пункт 4. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут или при +37°C до полного испарения спирта.
6. Добавить 22 мкл ТЕ буфера с низким содержанием ЭДТА к осадку частиц. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
7. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
8. Перенести 20 мкл элюата в новые пробирки.

Примечание: замер концентрации полученных ДНК библиотек рекомендуется проводить спектрофотометрически с использованием интеркаляторов по методике производителя (например, «Набор реагентов для измерения концентрации ДНК на

флюориметре Qubit «Spectra Q HS» (#SpectraHS – 100/ 500/ 1000) или «Набор реагентов для измерения концентрации ДНК на флюориметре Qubit «Spectra Q BR» (#SpectraBR – 100/ 500/ 1000)).

6.6. Условия хранения полученных ДНК библиотек

Полученные ДНК библиотеки могут храниться при +4°C в течение суток или при -20°C более длительный срок. ДНК библиотеки могут быть использованы в дальнейшей подготовке к секвенированию.

6.7. Показатели полученных ДНК библиотек

Концентрация полученных ДНК библиотек должна быть не менее 10 нг/мкл со средним значением 40-50 нг/мкл в зависимости от образца.

6.8. Возможные трудности при подготовке ДНК библиотек

Проблема	Возможная причина	Описание решения
Низкая финальная концентрация либо отсутствие спектра библиотеки	Потеря ДНК во время очистки на магнитных частицах; внесение неправильных объемов реагентов за счет ошибки пипетки или неплотного прилегания сменного наконечника; случайный захват частиц при перенесении образца в ПЦР-смесь	Перед началом очистки на магнитных частицах убедиться в использовании спирта с концентрацией 80%; визуальная проверка наличия вносимого реагента в наконечнике; убедиться в отсутствии частиц в образце при его переносе
Спектр размера ДНК библиотеки не соответствует необходимому	Ошибка замера концентрации используемой ДНК; не оптимальное количество внесенной ДНК-нуклеазы	Произвести перезамер концентрации используемой ДНК

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Реагенты набора «SG GM» могут храниться при температуре от -15°C до -20°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя.

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка набора реагентов «SG GM» должна производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от -15°C до -20°C.

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.