



**Магнитные частицы для селективной
очистки ДНК
«Smart beads»**

#smartb-50

#smartb-120

#smartb-240

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Магнитные частицы для селективной очистки ДНК Smart beads».

1.2. Назначение

Магнитные частицы «Smart beads» Raissol™ объемом 50, 120 или 240 мл предназначены для направленной очистки ДНК определенного спектра размеров, в зависимости от задач.

1.3. Область применения

Магнитные частицы «Smart beads» могут быть использованы в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях для селективной очистки ДНК из ПЦР смеси, плазмидной ДНК, на разных стадиях подготовки полногеномных библиотек (фрагментация, лигирование, ПЦР) для последующего секвенирования. Также, данные частицы можно использовать для обратной селекции, при необходимости получить фракции малых размеров. Только для научных исследований.

1.4. Принцип действия

Магнитные частицы хранятся в буфере, оптимизированном для селективного связывания определенных фракций фрагментов ДНК в зависимости от используемых объемов внесения магнитной суспензии. Данный метод позволяет быстро и эффективно удалить соли, ферменты, dNTP, праймеры с помощью простой процедуры промывки. Метод очистки не требует центрифугирования, вакуумной фильтрации, может быть легко автоматизирован.

2. Характеристика набора

Магнитные частицы «Smart beads» являются одноразовыми, не требуют технического обслуживания.

2.1. Состав набора

Магнитные частицы «Smart beads» объемом 50, 120 или 240 мл.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#smartb-50		#smartb-120		#smartb-240	
			Объем, мл	Количество, шт.	Объем, мл	Количество, шт.	Объем, мл	Количество, шт.
1	Магнитные частицы	Непрозрачная суспензия коричневого цвета с образованием осадка в состоянии покоя	50	1	120	1	240	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 стандартные 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 2-20, 20-200 и 100-1000 мкл.

4.3. Другое используемое оборудование

- Вортекс (например, Biosan Microspin FV-2400);
- центрифуга для пробирок в стрипах объемом 0,1-0,2 мл либо для 96-луночных планшетов;
- микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив для пробирок объемом 0,1-0,2 мл;
- штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;
- магнитный штатив планшетного типа для пробирок объемом 0,1-0,2 мл;
- магнитный штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- морозильная камера -20°C (для хранения образцов);

- холодильник от +2 до +8°C.

4.4. Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и пробирок.

4.5. Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Материалы:

- пробирки в стрипах объемом 0,1-0,2 мл или планшеты;
- 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.

Реагенты:

- 80% этанол;
- деионизированная вода или TE-буфер с низким содержанием EDTA.

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

Подтвердить наличие необходимого продукта и его размер с помощью гель-электрофореза или капиллярного электрофореза.

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 процедур селективной очистки ДНК

При работе с продуктом желательно использовать магнитные частицы «Smart beads» комнатной температуры. Непосредственно перед использованием частицы необходимо интенсивно встряхнуть.

6.1. Прямая селекция ДНК

Перед проведением процедуры прямой селекции ДНК определить объем вносимых частиц в соответствии с необходимым размером продукта, используя спектры, приведенные ниже (рис. 1-2).

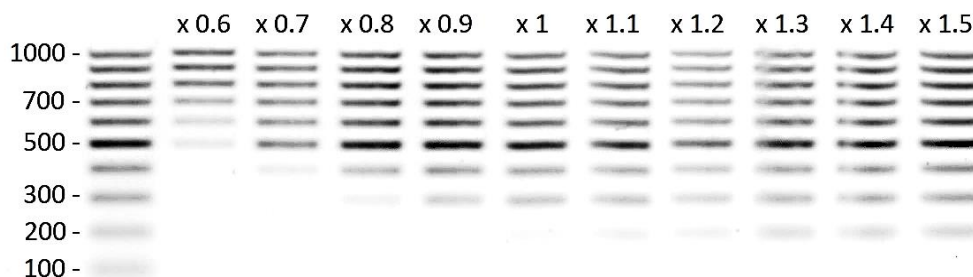


Рис. 1. Фракции ДНК, получаемые при использовании суспензии в соотношении объемов 1:0,6 – 1:1,5 (образец: суспензия) при очистке ДНК-маркера с размерами 100-1000 п.н. Результат электрофореза в 1,5% агарозном геле.

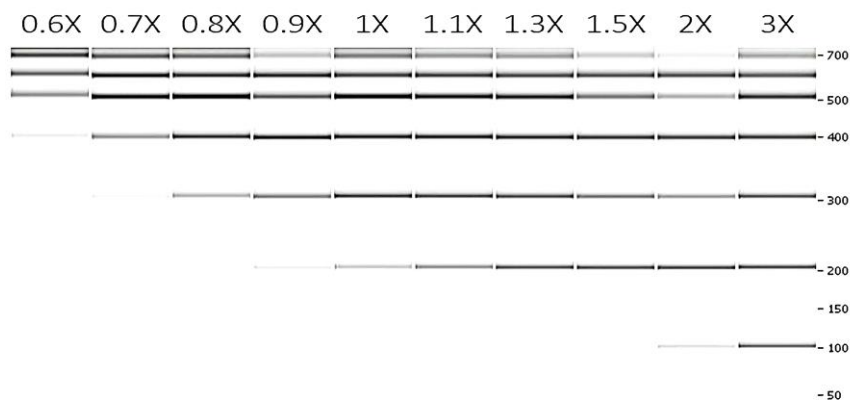


Рис. 2. Фракции ДНК, получаемые при использовании суспензии в соотношении объемов 1:0,6 – 1:3 (образец: суспензия) при очистке ДНК-маркера с размерами 50-700 п.н. Результат электрофореза на приборе Caliper LabChip (Perkinelmer, США).

6.2. Процедура прямой селекции ДНК

1. Внести необходимый объем магнитных частиц к образцам ДНК.
2. Интенсивно перемешать на вортексе.
3. Инкубировать образцы при комнатной температуре в течение 5-10 минут, периодически встряхивая.
4. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования, установить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
5. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
6. Добавить 80% этанол в объеме равном не менее 2/3 от объема пробирки к каждому образцу, инкубировать в течение 30 секунд, перемещая пробирки на магнитном штативе, меняя их положение относительно магнита. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
7. Повторить пункт 6. Центрифугировать образец, установить на магнитный штатив и полностью удалить остатки спирта. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре или при 37°C до полного испарения спирта.
8. Внести необходимый объем элюирующего буфера (TE-буфера или деионизованной воды). Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
9. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
10. Перенести необходимое количество элюата в новые пробирки, не захватывая магнитных частиц.

6.3. Обратная селекция ДНК

Перед проведением процедуры обратной селекции ДНК определить объемы вносимых частиц в соответствии с необходимым размером продукта, используя спектры, приведенные ниже (рис. 3).

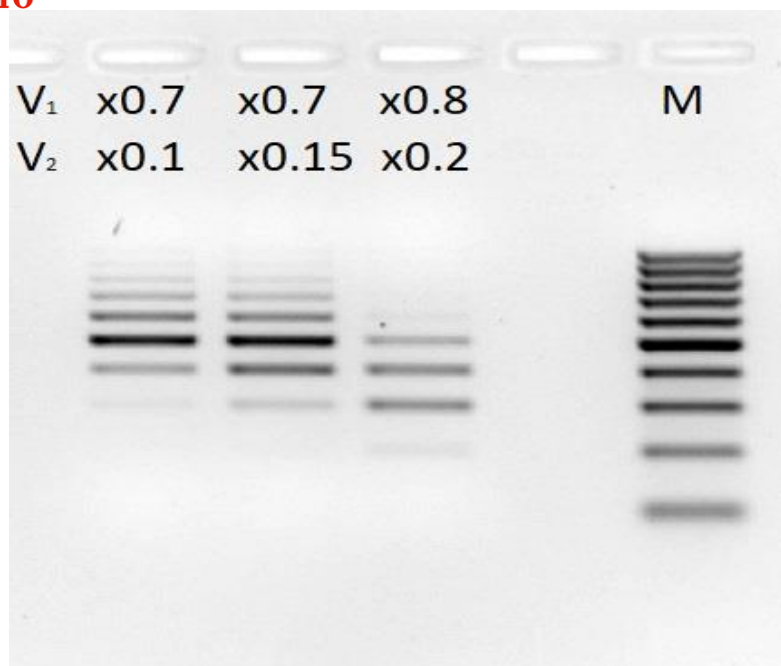


Рис. 3. Фракции ДНК, получаемые при последовательном применении обратной селекции в соотношении объемов 1:0,7 – 1:0,8 (образец: суспензия) и прямой селекции в соотношении объемов 1:0,1 – 1:0,2 (образец: суспензия) при очистке ДНК-маркера с размерами 100-1000 п.н. Результат электрофореза в 1,5% агарозном геле.

6.4. Процедура обратной селекции ДНК

1. Внести первый объем (V_1) магнитных частиц к образцам ДНК.
2. Интенсивно перемешать на вортексе.
3. Инкубировать образцы при комнатной температуре в течение 5-10 минут, периодически встряхивая.
4. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования, и установить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
5. Аккуратно, не задевая частицы, перенести супернатант в новые пробирки. Пробирки с магнитными частицами утилизировать.
6. В пробирки с перенесенным супернатантом внести второй объем (V_2) магнитных частиц. Объём второго внесения рассчитывается, исходя из суммы объема перенесенного супернатанта и объема внесенных ранее частиц (например, 50 мкл смеси + 35 мкл частиц = 85 мкл – суммарный объем; $85 \cdot 0.1 = 8.5$ мкл частиц необходимо внести); при необходимости захвата всей малой фракции V_2 должен составлять не менее $0,5x$.
7. Инкубировать образцы при комнатной температуре в течение 5-10 минут, периодически встряхивая.
8. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования, и установить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
9. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
10. Добавить 80% этанол в объеме равном не менее $2/3$ от объема пробирки к каждому образцу, инкубировать в течение 30 секунд, перемещая пробирки на магнитном штативе, меняя их положение относительно магнита. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
11. Повторить пункт 6. Центрифугировать образец, установить на магнитный штатив и полностью удалить остатки спирта. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре или при 37°C до полного испарения спирта.

12. Внести необходимый объем элюирующего буфера (TE-буфера или деионизованной воды). Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
13. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
14. Перенести необходимое количество элюата в новые пробирки, не захватывая магнитных частиц.

6.5. Условия хранения очищенных 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 очищенных образцов НК

Замер концентрации очищенных образцов НК рекомендуется проводить спектрофотометрически с использованием интеркаляторов по методике производителя (например, «Набор реагентов для измерения концентрации ДНК на флуориметре Qubit «Spectra Q HS» (#SpectraHS – 100/ 500/ 1000) или «Набор реагентов для измерения концентрации ДНК на флуориметре Qubit «Spectra Q BR» (#SpectraBR – 100/ 500/ 1000)).

Определение размера фракций, полученных образцов НК, производится с помощью гель-электрофореза или капиллярного электрофореза.

6.7. Возможные трудности при проведении очистки ДНК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
Низкая финальная концентрация	Потеря ДНК во время промывки на магнитных частицах	Перед началом очистки на магнитных частицах убедиться в использовании спирта с концентрацией 80%
	Инкубация после добавления магнитных частиц составляла менее 5-10 мин	Время инкубации после добавления магнитных частиц должно быть не менее 5 мин
	Неправильное определение размера целевой ДНК, в следствие чего был внесен неправильный объем магнитных частиц	Определить размер целевой ДНК с помощью гель-электрофореза или капиллярного электрофореза, затем произвести перерасчет необходимого объема магнитных частиц
Спектр размера очищенной ДНК не соответствует необходимому	Неоптимальное количество внесенных магнитных частиц	Произвести перерасчет необходимого объема магнитных частиц в соответствии с целевым размером
	Ошибка пипетки или неплотного прилегания сменного наконечника	Проверка и калибровка дозирующего устройства; визуальная проверка объема вносимых магнитных частиц в наконечнике
«Грязный» элюат	Остаточное наличие магнитных частиц	Увеличить время инкубации на магнитном штативе; убедиться в отсутствии частиц в образце при его переносе

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Магнитные частицы «Smart beads» должны храниться при температуре от +2°C до +8°C, срок хранения составляет 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. **Не замораживать!**

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка **магнитных частиц «Smart beads»** может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +2°C до +8°C. Допускается кратковременное повышение температуры хранения (транспортировки) **магнитных частиц «Smart beads»** от +4°C до +25°C **не более 4 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.