



**Набор реагентов для выделения ДНК из
тканей млекопитающих методом сорбции на
магнитных частицах «Tissue M»**

#tissueM-50

#tissueM-250

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения ДНК из образцов тканей млекопитающих методом сорбции на магнитных частицах Tissue M».

1.2. Назначение

Набор реагентов «Tissue M» Raissol[™] предназначен для выделения нуклеиновых кислот высокого качества из 50 и 250 образцов тканей млекопитающих, ворсин хориона, волосяных фолликулов, фиксированных пятен крови и др.

1.3. Область применения

Набор для выделения ДНК «Tissue M» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения нуклеиновых кислот из образцов ткани млекопитающих, ворсин хориона, волосяных фолликулов, фиксированных пятен крови 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 клеток 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 «Tissue M» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов «Tissue M» рассчитан на 50 или 250 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#tissueM-50		#tissueM-250	
			Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Лизирующий буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	10	1	50	1
2	Лизирующий буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	10	1	50	1
3	Связывающий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	10	1	50	1
4	Промывочный буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	35	1	175	1
5	Промывочный буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	70	1	175	2
6	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, рН=8,9	5	1	25	1
7	Протеиназа К	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1,5	1	7,5	1
8	Магнитные частицы	Непрозрачная суспензия черного цвета с образованием осадка в состоянии покоя	2,5	1	12,5	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.

Связывающий буфер, промывочный буфер 1 и промывочный буфер 2 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 микроцентрифужных 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;
- морозильная камера -20°C;
- холодильник 2-8°C (для хранения образцов).

4.4. Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

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 наличии консервирующих реагентов в пробирке с образцом необходимо центрифугировать пробирку при максимальных оборотах с последующим удалением супернатанта. Далее внести физиологический раствор в объеме 50% от номинального объема пробирки, перемешать образец и центрифугировать при максимальных оборотах с последующим удалением супернатанта.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Хранение образцов тканей млекопитающих:

- при температуре от +2 до +8°C – в течение 3 суток;
- при температуре от -25 до -15°C – более 1 года.

Возможно длительное хранение образцов ногтей и волосяных фолликулов без специальных условий.

Хранение образцов фиксированных пятен крови при температуре от -25 до -15°C – более 1 года.

6. Проведение процедуры выделения ДНК

6.1. Лизис

1. В пробирки объемом 1,5-2 мл поместить исследуемые образцы.
2. В случае хранения образцов в физиологическом растворе центрифугировать образцы в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, после чего полностью удалить супернатант.
3. Добавить к образцам 200 мкл лизирующего буфера 1, 30 мкл Протеиназы К, интенсивно перемешать на вортексе.

Опционально: возможно использование РНКазы А любого производителя в концентрациях, рекомендованных производителем.

4. Инкубировать образцы в термостате при 56°C в течение 2-5 часов, периодически встряхивая.
5. Центрифугировать образцы в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин., после чего перенести 200 мкл супернатанта в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.
6. Внести 200 мкл лизирующего буфера 2, перемешать пробирки на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

6.2. Сорбция НК

1. Добавить к смеси 200 мкл связывающего буфера и 50 мкл магнитных частиц, интенсивно перемешать пробирки на вортексе.
2. Инкубировать в течение 3-5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая.
3. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Установить пробирки на магнитный штатив и инкубировать в течение 3-5 минут.
7. Аккуратно, не задевая осадок, удалить супернатант.

6.3. Промывка НК

1. Добавить в пробирки 700 мкл промывочного буфера 1, интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Инкубировать на магнитном штативе в течение 1-2 минут.
3. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
4. Добавить в пробирки 700 мкл промывочного буфера 2, интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
5. Инкубировать на магнитном штативе в течение 1-2 минут.
6. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
7. Повторить пункты 4-6.
8. Высушить образцы с открытыми крышками в термостате при 56-60°C или при комнатной температуре до полного испарения промывочного раствора.

6.4. Элюция НК

1. Добавить в пробирки 50-100 мкл элюирующего буфера.
2. Инкубировать в термостате при 56-60°C в течение 5 минут, периодически перемешивая на вортексе.
3. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Инкубировать на магнитном штативе в течение 1-2 минут.
5. Перенести элюат в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.

Опционально: рекомендуется провести дополнительное центрифугирование элюата на максимальной скорости во избежание наличия 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 на 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 количество исследуемого материала.	Увеличить количество исследуемого материала; уменьшить объем элюирующего буфера.

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Буферы набора «Tissue M» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка при пониженных 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 «Tissue M» может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

Транспортировка **Магнитных частиц** может производиться 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.