



**Набор реагентов для выделения ДНК из
сложных образцов тканей животных
«Tissue Strong»**

#tissue_strong-50

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения ДНК из сложных образцов тканей животных методом сорбции на магнитных частицах Tissue Strong».

1.2. Назначение

Набор реагентов «Tissue Strong» Raissol™ предназначен для выделения нуклеиновых кислот высокого качества из 50 образцов биоптатов или спиртовых препаратов тканей животных, в т.ч. членистоногих и пр.

1.3. Область применения

Набор для выделения ДНК «Tissue Strong» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения нуклеиновых кислот из образцов биоптатов или спиртовых препаратов тканей животных, в т.ч. членистоногих, 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 Strong» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов «Tissue Strong» рассчитан на 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#tissue_strong-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, без запаха	30	1
3	Промывочный буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	30	1
4	Промывочный буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	30	1
5	Промывочный буфер 3	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	30	1
6	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, pH=8,9	5	1
7	Протеиназа К	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	1,5	1
8	РНКаза А	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	0,25	1
9	Магнитные частицы	Непрозрачная суспензия черного цвета с образованием осадка в состоянии покоя	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 1, 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 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 для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- 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 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 хитиновой оболочки у образцов её необходимо удалить перед началом процедуры выделения ДНК.

В случае хранения образцов в физиологическом растворе необходимо центрифугировать образцы в течение 5 минут при 13 000 об/мин, после чего полностью удалить супернатант. В случае хранения биоматериала в этиловом спирте, образцы необходимо вымачивать в воде не менее 30 минут. Затем центрифугировать образцы в течение 5 минут при 13 000 об/мин, после чего полностью удалить супернатант.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Хранение образцов тканей животных в физиологическом растворе:

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

Возможно длительное хранение спиртовых препаратов тканей животных без специальных условий.

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 необходимо центрифугировать образцы в течение 5 минут при 13 000 об/мин, после чего полностью удалить супернатант. В случае хранения биоматериала в этиловом спирте образцы необходимо вымачивать в воде не менее 30 минут. Затем центрифугировать образцы в течение 5 минут при 13 000 об/мин, после чего полностью удалить супернатант.
3. Добавить к образцам 400 мкл лизирующего буфера и 30 мкл Протеиназы К, перемешать, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

4. Инкубировать образцы в термостате при 60°C не менее 3-х часов. Рекомендуется инкубировать образцы в течение ночи для более полного лизиса ткани и большего выхода НК.
5. Добавить к образцам 300 мкл связывающего буфера и центрифугировать образцы при макс. об/мин в течение 3 минут. После чего аккуратно перенести максимальный объём супернатанта, не задевая осадок ткани, в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.
6. Добавить к образцам 5 мкл РНКазы А, аккуратно перемешать, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
7. Инкубировать образцы в течение 15 минут при комнатной температуре.

6.2. Сорбция НК

1. Добавить в пробирки 300 мкл связывающего буфера и 100 мкл магнитных частиц, перемешать.
2. Инкубировать образцы в течение 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая.
3. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Инкубировать образцы на магнитном штативе в течение 2 минут. Аккуратно удалить супернатант, не задевая осадок магнитных частиц.

6.3. Промывка НК

1. Добавить 600 мкл промывочного буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать образцы на магнитном штативе в течение 1 минуты, после чего аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
4. Добавить 600 мкл промывочного буфера 2.
5. Повторить пункты 2-3.
6. Добавить 600 мкл промывочного буфера 3.
7. Повторить пункты 2-3.
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, интенсивно перемешать пробирки на вортексе.
2. Инкубировать в термостате при 56-60°C в течение 10 минут, периодически перемешивая.
3. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Инкубировать образцы на магнитном штативе в течение 3 минут.
5. Перенести элюат в новые пробирки объемом 1,5-2 мл.

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 более длительное время 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 Strong» 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.

Ферменты **Протеиназа К** и **РНКаза А** необходимо хранить при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев.

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка **буферов набора «Tissue Strong»** 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**.

Транспортировка фермента **РНКаза А** может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре -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.