



**Набор реагентов для выделения ДНК из
сперматозоидов с этапом удаления
чужеродных клеток и ДНК
«Sperm»**

#sperm-50

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов для выделения ДНК из сперматозоидов с этапом удаления чужеродных клеток и ДНК «Sperm».

1.2. Назначение

Набор реагентов «Sperm» Raissol[™] предназначен для выделения нуклеиновых кислот высокого качества из 50 образцов сперматозоидов и включает этап удаления чужеродных клеток и ДНК при необходимости.

1.3. Область применения

Набор для выделения ДНК «Sperm» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для выделения нуклеиновых кислот из образцов сперматозоидов 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 удаление чужеродных клеток и ДНК при необходимости, осаждение сперматозоидов, полный лизис клеток, удаление белков, преципитацию нуклеиновых кислот, а также их промывку и элюцию.

2. Характеристика набора

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

2.1. Состав набора

Набор реагентов «Sperm» рассчитан на 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#sperm-50	
			Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Лизирующий буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	40	1
2	Лизирующий буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	22,5	1
3	Осаждающий буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	3,75	1
4	Осаждающий буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	25	1
5	Промывочный буфер 1	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	35	1
6	Промывочный буфер 2	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с резким запахом	35	1
7	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха, рН = 8,9	2,5	1
8	Стабилизатор	Прозрачная бесцветная жидкость, без посторонних примесей и включений, с сероподобным запахом	0,1	1
9	Протеиназа К	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость, без посторонних примесей и включений, без запаха	3	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.

Осаждающий буфер 2, промывочный буфер 1 и промывочный буфер 2 содержат легко воспламеняющиеся жидкости. Все работы с легко воспламеняющимися 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 пробирок объемом 1,5-2 мл (например, Biosan TDB-120);
- центрифуга 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 пробирок объемом 1,5-2 мл (например, Диаэм IsoFeeze) или льдогенератор (например, Scotsman AF 10 AS OX);
- 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. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Хранение образцов сперматозоидов:

- при температуре от +2 до +8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от -70 до -20 °С – более 1 года.

5.2. Предварительная подготовка биологического материала

Этап пробоподготовки образца отличается в зависимости от вида биоматериала:

а) При работе с осадком сперматозоидов:

Пробоподготовка не требуется, перейти к этапу лизиса.

б) При работе с образцами семенной жидкости:

Внести в пробирки объемом 1,5-2 мл 30-300 мкл образца. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить супернатант.

с) При работе с образцами семенной жидкости, контаминированными чужеродными клетками (эпителий влагалища, буккальный эпителий и др.):

1) В пробирки объемом 1,5-2 мл поместить исследуемые образцы, добавить 200 мкл лизирующего буфера 1 и 20 мкл Протеиназы К. Интенсивно перемешать образцы на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования. Инкубировать образцы при 60°C в течение 15 минут, перемешивая каждые 3-5 минут. Затем центрифугировать образцы в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить супернатант.

2) Повторить пункт 1.

3) Добавить к полученным осадкам 400 мкл лизирующего буфера 1. Интенсивно перемешать образцы на вортексе. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить супернатант.

6. Проведение процедуры выделения ДНК

6.1. Лизис

1. К осадкам сперматозоидов добавить 450 мкл лизирующего буфера 2, 20 мкл Протеиназы К и 2 мкл стабилизатора. Вортексировать образцы до полного разрушения конгломерата клеток, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Инкубировать образцы в термостате при 60°C в течение 1-2 часов, периодически перемешивая.
3. Перенести пробирки на лед или в холодный штатив и инкубировать в течение 1 минуты. В случае отсутствия охлаждающих элементов инкубировать при комнатной температуре в течение 5-10 минут до полного остывания смеси.

6.2. Депротенинизация и осаждение НК

1. Добавить в пробирки 75 мкл осаждающего буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Инкубировать образцы в течение 3-5 минут во льду или в холодном штативе. В случае отсутствия охлаждающих элементов инкубировать при комнатной температуре в течение 5-10 минут.
4. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин.
5. Аккуратно, не задевая осадок, перенести 500 мкл супернатанта в новую пробирку объемом 1,5-2 мл.
6. Добавить к образцам 500 мкл осаждающего буфера 2 и перемешать с помощью пятикратного переворачивания пробирки.

Опционально:

- а) для увеличения выхода ДНК рекомендуется инкубировать образцы в морозильной камере при -20°C в течение 25 минут;
 - б) для облегчения визуализации образующегося осадка НК возможно использование соосадителя (#sat RaissolTM).
7. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, после чего удалить супернатант, не задевая осадок.

6.3. Промывка НК

1. Добавить в пробирки 700 мкл промывочного буфера 1.
2. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе.
3. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин, аккуратно, не задевая осадок, удалить супернатант.
4. Добавить в пробирки 700 мкл промывочного буфера 2.
5. Повторить пункты 2,3.
6. Высушить образцы с открытыми крышками в термостате при 42°C или в центрифуге-концентраторе при 30°C до полного испарения промывочного буфера.

6.4. Элюция НК

1. Добавить в пробирки 50 мкл элюирующего буфера.
2. Инкубировать образцы в термостате при 55-60°C в течение 5 минут, периодически перемешивая на вортексе.

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
Осадок после преципитации белков недостаточно плотный.	Неохлажденный образец перед преципитацией; недостаточное время центрифугирования; плохое перемешивание раствора.	Охладить образец после лизиса; увеличить время центрифугирования; интенсивно перемешать раствор перед центрифугированием.
После осаждения на этапе преципитации осадка ДНК не видно.	Небольшое количество ДНК в растворе.	Продолжить выделение, отбирая супернатант по противоположной от центра центрифугирования стенке пробирки. Добавить соосадитель (#sat Raissol™) на этапе преципитации.
Низкая концентрация ДНК после измерения.	Биоматериал с малым количеством клеток; захват ДНК при удалении супернатанта.	Сконцентрировать элюат в центрифуге-концентраторе при температуре +45°C.

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Буферы набора «Sperm» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка при минимальных температурах хранения, растворы следует нагреть до комнатной температуры.

Стабилизатор необходимо хранить при температуре от +2°C до +4°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя.

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

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка **буферов** набора «Sperm» может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

Транспортировка **Стабилизатора** может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +2 до +4°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 регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.