

Модель: **М-Сорб COLIBRI 96** **REF** HG-501-A96

**Набор реагентов для выделения ДНК
(на магнитных частицах) «М-Сорб»**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



СОДЕРЖАНИЕ

1.	НАЗНАЧЕНИЕ	3
1.1.	Назначение набора	3
1.2.	Описание модели «M-Corb COLIBRI 96»	3
1.3.	Область применения	3
1.4.	Потенциальные пользователи	3
1.5.	Принцип метода, положенный в основу работы набора	3
2.	ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	5
2.1.	Состав набора	5
2.2.	Функциональные характеристики	5
3.	УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА	5
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
5.	ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА	6
6.	СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК.....	8
7.	ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТОКОЛЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК	9
7.1.	Выделение ДНК из биологических образцов, адсорбированных на предмете-носителе	9
7.2.	Выделение ДНК из навески ткани.....	10
7.3.	Выделение ДНК из буккальных клеток	10
7.4.	Выделение ДНК из суспензии клеток	11
7.5.	Выделение ДНК из волос	11
7.6.	Выделение ДНК из ногтей	12
7.7.	Выделение ДНК из жевательной резинки, сигаретного окурка	13
7.8.	Выделение ДНК из тканей, фиксированных парафином	14
8.	ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ	16
8.1.	Подготовка планшетов и их установка на борт станции.....	16
8.2.	Запуск протокола выделения ДНК	17
9.	ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	19
10.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19
11.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	19

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Назначение набора

Набор реагентов «М-Сорб» предназначен для выделения геномной ДНК на магнитном сорбенте из следующих типов исследуемого материала:

- жидкая цельная кровь, физиологические жидкости (сперма, слюна),
- биологические образцы, адсорбированные на предмете-носителе (кровь на картах или на тканевом носителе; слюна, сперма на тканевом носителе; клетки на клейкой ленте),
- тканевой материал (фрагменты органов, тканей),
- тканевой материал, фиксированный парафином,
- буккальный эпителий, мазки на специализированных зондах,
- суспензия клеток,
- волосы,
- ногти,
- жевательная резинка,
- сигаретный окурок.

1.2. Описание модели «М-Сорб COLIBRI 96»

Модель набора «М-Сорб COLIBRI 96» (кат. № HG-501-A96) предназначена для выделения ДНК при помощи автоматической станции «COLIBRI», вариант исполнения «COLIBRI 96» (ООО «НПФ Синтол») и рассчитана на проведение 96 экстракций ДНК.

1.3. Область применения

Набор может быть использован в молекулярно-генетических лабораториях, занимающихся выделением и дальнейшим анализом геномной ДНК (в том числе в лабораториях, проводящих судебно-медицинскую экспертизу), а также в научно-исследовательских лабораториях и учреждениях.

1.4. Потенциальные пользователи

К работе с набором допускаются специалисты с высшим или средним медицинским, биологическим или ветеринарным образованием, получившие дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

1.5. Принцип метода, положенный в основу работы набора

Принцип метода, положенный в основу работы изделия, – лизирование объекта исследования в лизирующем растворе; связывание нуклеиновой кислоты с ДНК-связывающим агентом, покрывающим магнитные частицы; отмывка магнитных частиц и элюирование выделенного продукта в элюирующий раствор.

В основе магнитных частиц – оксид железа, на поверхность которого нанесено кремнеземное покрытие. Нуклеиновые кислоты связываются с кремнеземным покрытием в присутствии гуанидина тиоцианата. Он нарушает целостность молекулы ДНК, что приводит к потере гидрофобности и связыванию нуклеиновых кислот. Магнитные частицы с нуклеиновыми кислотами на поверхности отделяются от клеточного лизата путем создания магнитного поля внешним магнитом. После промывки и инкубации при 70 °С нуклеиновые кислоты отделяются от магнитных частиц, переходят в элюирующий раствор и могут быть использованы в дальнейших исследованиях.

Эффективность выделения ДНК с помощью набора реагентов «М-Сорб» зависит от количества, качества и типа исходного материала. Оптимальное количество для внесения зависит от типа, срока хранения и поверхности носителя биологического образца.

Примеры соответствующих типов образцов и их максимального количества, взятого для выделения ДНК с использованием набора реагентов «М-Сорб», приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Максимальное количество исследуемого образца для выделения ДНК с помощью набора реагентов «М-Сорб»

Тип образца	Максимальное количество образца
Жидкая цельная кровь, сперма	до 10 мкл
Слюна	до 100 мкл
Кровь (на картах или на тканевом носителе)	до 25 мм ²
Слюна, сперма на тканевом носителе	до 25 мм ²
Клетки на клейкой ленте	до 2 мм ²
Навеска ткани	20 мг
Ткань, фиксированная парафином	2-3 среза
Буккальный эпителий, мазки на специализированных зондах	не более 1 зонда
Суспензия клеток (10 ⁶)	400 мкл
Волосы	10 луковиц длиной не более 3–5 мм
Ногти	3 ногтевые пластины длиной не более 3–5 мм
Жевательная резинка	Не более 1/8 части
Сигаретный окурок	5 мм сигаретной бумаги от края фильтра

Приблизительный количественный выход ДНК из 10 мкл незамороженной жидкой крови составляет 2 нг/мкл (при элюции в 100 мкл).

В каждой лаборатории должно быть проведено самостоятельное независимое исследование для определения количественного выхода ДНК.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав набора

Таблица 2 – Состав модели «М-Corb COLIBRI 96»

№	Компонент	Номинальный объем, мл	Количество
1.	Лизирующий раствор	20 мл	2 флакона
2.	Раствор МЧ+	0,27 мл/ лунка	1 планшет на 96 лунок
3.	Промывочный раствор ПР	0,55 мл/ лунка	2 планшета на 96 лунок
4.	Элюирующий раствор ЭР	0,1 мл/ лунка	1 планшет на 96 лунок
5.	Защитные насадки для стержневых магнитов-96	-	1 гребенка из 96 защитных насадок

2.2. Функциональные характеристики

Эффективность выделения ДНК человека 2,5 и 25 нг/образец составляет не менее 50 %. Набор обеспечивает чистоту выделения ДНК менее 0,002 нг/мкл ДНК человека.

3. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА

Хранение: при температуре от 2 °С до 25 °С в защищенном от света месте.

ВАЖНО! Планшеты с Раствором МЧ+ не замораживать.

Транспортирование: крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным, воздушным) при температуре от 2 °С до 25 °С.

Эксплуатация: Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 15 °С до 35 °С и относительной влажности воздуха от 15 % до 75 %. Набор должен применяться в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Набор предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. п. 1.2). Набор реагентов готов к применению согласно инструкции.

Срок годности набора: 14 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения. Срок годности реагентов до и после вскрытия соответствует сроку годности набора.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работа с набором должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований МУ 1.3.2569-09, СанПиН 3.3686-21, СанПиН 2.1.3684-21.

К работе с набором допускается только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению исследования материала методом ПЦР-РВ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- применять набор реагентов строго по назначению;
- рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как потенциально инфекционно-опасные;

- удалять и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21;
- соблюдать правила последовательной обработки материала и поточность продвижения исследуемого материала. Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое;
- использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром;
- не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию в паспорте качества;
- не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами;
- избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека: канцерогенный эффект, мутагенное действие, репродуктивная токсичность отсутствуют.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности изделие является безопасным.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- ПЦР-бокс или бокс микробиологической безопасности (БМБ) I или II класса;
- станция для автоматического выделения нуклеиновых кислот из биологического материала «COLIBRI», вариант исполнения «COLIBRI 96», (ООО «НПФ Синтол», Россия);
- термошейкер для пробирок объемом 1,5–2,0 мл, до 900 об/мин, с возможностью нагрева не менее чем до 95 °С;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок объемом 1,5–2,0 мл до 16 тыс. об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс;
- штатив для пробирок объемом 1,5 или 2,0 мл;
- набор дозаторов пипеточных переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл;
- холодильник от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой не выше минус 16 °С;
- буфер ТЕ, додецилсульфат натрия (SDS, 10 %), протеиназа К (10 мг/мл) – в случае выделения ДНК из тканевого материала, фиксированного парафином;
- бидистиллированная вода – в случае выделения ДНК из образцов волос и ногтей;
- наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл;
- микроцентрифужные пробирки, не содержащие ДНКазы и РНКазы, объемом 1,5 и 2,0 мл;
- пленки для заклеивания 96-луночных планшетов;
- 96-луночный планшет (для установки гребенки защитных насадок);

- емкость для сброса использованных материалов;

6. СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

Стандартный протокол может быть использован для выделения препаратов ДНК из жидкой цельной крови, физиологических жидкостей (спермы, слюны).

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Подготовку и лизис образцов проводить в боксе биологической безопасности I или II класса либо ПЦР-боксе.

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 30 мин. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50–60 °С до полного растворения осадка.
2. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
3. Внести в лунку планшета с *Раствором МЧ+* 400 мкл *Лизирующего раствора* и необходимое количество исследуемого образца.
4. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96».

7. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТОКОЛЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

Подготовку и лизис образцов проводить в боксе биологической безопасности I или II класса либо ПЦР-боксе.

7.1. Выделение ДНК из биологических образцов, адсорбированных на предмете-носителе

Данный протокол может быть использован для выделения препаратов ДНК из крови на картах или тканевом носителе, слюны и спермы на тканевом носителе, клеток на клейкой ленте.

7.1.1. Подготовка образца

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Вырезать часть носителя (карты, ткани, клейкой ленты) с биологическим образцом и поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Промаркировать пробирку. Кратковременно центрифугировать пробирку для сброса образца на дно.

7.1.2. Лизис

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °C) в течение 30 мин. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50–60 °C до полного растворения осадка.
2. Нагреть термошейкер до 75 °C.
3. Добавить в пробирку с образцом 400 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 с, центрифугировать для сброса капель.
5. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 75 °C и 900 об/мин в течение 15 мин.
6. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
7. Центрифугировать пробирку с образцом после инкубации 2 мин при 15000 об/мин (21000g).
8. Аккуратно, не захватывая осадок, перенести супернатант в лунку планшета с *Раствором МЧ+* в соответствии с пп. 8.1.
9. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96 (без лизиса)».

7.2. Выделение ДНК из навески ткани

7.2.1. Подготовка образца

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Гомогенизировать навеску исследуемой ткани и поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Промаркировать пробирку.

7.2.2. Лизис

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 30 мин. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50–60 °С до полного растворения осадка.
2. Нагреть термошейкер до 75 °С.
3. Добавить в пробирку с образцом 400 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 с, центрифугировать для сброса капель.
5. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 75 °С и 900 об/мин в течение 15 мин.
6. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
7. Центрифугировать пробирку с образцом после инкубации 5 мин при 15 000 об/мин (21000 g).
8. Аккуратно, не захватывая осадок, перенести супернатант в лунку планшета с *Раствором МЧ+* в соответствии с пп. 8.1.
9. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96 (без лизиса)».

7.3. Выделение ДНК из буккальных клеток

Данный протокол может быть использован для выделения препаратов ДНК из буккального эпителия или мазков на специализированных зондах.

7.3.1. Подготовка образца

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Отрезать головку зонда и поместить ее в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Промаркировать пробирку.

7.3.2. Лизис

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 30 мин. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50–60 °С до полного растворения осадка.
2. Нагреть термошейкер до 75 °С.
3. Добавить в пробирку с образцом 400 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 с, центрифугировать для сброса капель. Убедиться, что образец полностью погружен в раствор.

5. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 75 °С и 900 об/мин в течение 15 мин.
6. Головку зонда извлечь из пробирки, используя пинцет, и максимально отжать о стенку пробирки.
7. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
8. Перенести супернатант в лунку планшета с *Раствором МЧ+* в соответствии с пп. 8.1.
9. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96 (без лизиса)».

7.4. Выделение ДНК из суспензии клеток

7.4.1. Подготовка образца

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Суспензию клеток поместить в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл, промаркировать пробирку и центрифугировать 5 мин при 15000 об/мин (21000 g). Аккуратно удалить верхнюю надосадочную жидкость.

7.4.2. Лизис

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 30 мин. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50–60 °С до полного растворения осадка.
2. Нагреть термошейкер до 75 °С.
3. Добавить в пробирку с образцом 400 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 секунд, центрифугировать для сброса капель.
5. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 75 °С и 900 об/мин в течение 15 мин.
6. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
7. Центрифугировать пробирку с образцом после инкубации 5 мин при 15000 об/мин (21000 g).
8. Аккуратно, не затрагивая осадок, перенести супернатант в лунку планшета с *Раствором МЧ+* в соответствии с пп. 8.1.
9. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96 (без лизиса)».

7.5. Выделение ДНК из волос

7.5.1. Подготовка образца

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Исследуемые образцы волос промыть бидистиллированной водой и высушить. Отрезать фрагмент стержня волоса с волосяной луковицей длиной 3–5 мм и поместить в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Промаркировать пробирку.

Кратковременно центрифугировать пробирку для сброса фрагмента стержня волоса на дно.

Выделение ДНК может быть также проведено из образцов волос, не подвергнутых предварительной промывке. Такой подход может повысить суммарный выход экстрагированной ДНК. Однако необходимо иметь в виду, что наложения, присутствующие на стержне волоса, могут являться источником контаминации.

7.5.2. Лизис

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °C) в течение 30 мин. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50–60 °C до полного растворения осадка.
2. Нагреть термошейкер до 75 °C.
3. Добавить в пробирку с образцом 200 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 сек, центрифугировать для сброса капель. Убедиться, что волос находится в растворе, а не на стенке пробирки.
5. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 75 °C и 900 об/мин в течение 15 мин.
6. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
7. Центрифугировать пробирку 2 мин при 12000–16000 об/мин.
8. Аккуратно, не захватывая волос, перенести супернатант в лунку планшета с *Раствором МЧ+* в соответствии с пп. 8.1.
9. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96 (без лизиса)».

7.6. Выделение ДНК из ногтей

7.6.1. Подготовка образца

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Исследуемые образцы ногтевых пластин очистить от подногтевого содержимого. Ногтевые пластины необходимо промыть бидистиллированной водой и высушить. Высушенные образцы длиной не более 3–5 мм поместить в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Промаркировать пробирку. Кратковременно центрифугировать пробирку для сброса образца на дно.

Примечание – Выделение ДНК из биологического материала, присутствующего в подногтевом содержимом, может быть проведено с использованием стандартного протокола выделения ДНК.

7.6.2. Лизис

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °C) в течение 30 мин. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50–60 °C до полного растворения осадка.
2. Нагреть термошейкер до 75 °C.
3. Добавить в пробирку с образцом 400 мкл *Лизирующего раствора*.
4. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 с,

центрифугировать для сброса капель.

5. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 75 °С и 900 об/мин в течение 15 мин.
6. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
7. Центрифугировать пробирку с образцом после инкубации 2 мин при 12000–16000 об/мин.
8. Аккуратно, не захватывая остатки ногтя, перенести супернатант в лунку планшета с *Раствором МЧ+* в соответствии с пп. 8.1.
9. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96 (без лизиса)».

7.7. Выделение ДНК из жевательной резинки, сигаретного окурка

7.7.1. Подготовка образца

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Жевательная резинка: растянуть жевательную резинку в виде тонкого кружка на чистой чашке Петри. Закрыть чашку и заморозить её при минус 80 °С в течение как минимум двух часов. Достать чашку Петри, разрезать жевательную резинку на 8 частей. Использовать только один кусочек для выделения ДНК.

Сигаретный окурочок: необходимо использовать только обёрточную бумагу, покрывающую сигаретный фильтр. Отрезать кусочек размером 5 мм и разрезать его на 2–3 более мелких кусочка, которые будут использованы для выделения ДНК. Необходимо минимизировать количество волокон сигаретного фильтра, попадающего в образец.

7.7.2. Лизис

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 30 мин. *Лизирующий раствор* прогреть при температуре 50–60 °С до полного растворения осадка.
2. Нагреть термошейкер до 75 °С.
3. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Промаркировать. Кратковременно центрифугировать пробирку для сброса кусочков образца на дно.
4. Добавить в пробирку с образцом 400 мкл *Лизирующего раствора*.
5. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 с, центрифугировать для сброса капель. Убедиться, что образец полностью погружен в раствор.
6. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 75 °С и 900 об/мин в течение 15 мин.
7. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
8. Центрифугировать пробирку после инкубации 2 мин при 12000–16000 об/мин.
9. Аккуратно, не затрагивая осадок, перенести супернатант в лунку планшета с

Раствором МЧ+ в соответствии с пп. 8.1.

10. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96 (без лизиса)».

7.8. Выделение ДНК из тканей, фиксированных парафином

ВАЖНО! При использовании протокола выделения ДНК из тканей, фиксированных парафином, лизирующего раствора, входящего в состав модели «М-Сорб COLIBRI 96», хватает на 80 экстракций ДНК.

7.8.1. Подготовка образца

Максимальное количество образца, используемое для выделения ДНК, указано в таблице 1.

Используя скальпель, сделайте несколько вертикальных срезов с парафинового блока перпендикулярно к поверхности ткани. При наличии микротомы можно вырезать до 8 секций толщиной до 10 мкм.

Примечание – При подготовке объектов необходимо свести к минимуму количество захватываемого парафина.

7.8.2. Лизис

1. Приготовить раствор для депарафинизации. Для этого смешать из расчета на один образец: 96,5 мкл Буфера ТЕ, 0,5 мкл додецилсульфата натрия (SDS, 10 %) и 3 мкл Протеиназы К (10 мг/мл).

Примечание – Компоненты раствора для депарафинизации не входят в состав набора реагентов «М-Сорб».

2. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 30 мин. Лизирующий раствор прогреть при температуре 50–60 °С до полного растворения осадка.
3. Нагреть термошейкер до 56 °С.
4. Поместить образец в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Промаркировать.
5. Добавить в пробирку с образцом 100 мкл раствора для депарафинизации.
6. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 с, центрифугировать для сброса капель.
7. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 56 °С и 900 об/мин в течение 60 мин.
8. Выставить температуру нагрева термошейкера 95 °С, продолжить инкубацию в течение 15 мин при 900 об/мин.
9. Вынуть пробирку из термошейкера. Дать образцу остыть до комнатной температуры.

ВАЖНО! Не остужать пробирки с образцами искусственно.

10. Центрифугировать пробирку в течение 30 с при 13000–16000 об/мин.

11. Нагреть термошейкер до 75 °С.
12. Добавить в пробирку с образцом 500 мкл *Лизирующего раствора*.
13. Закрыть пробирку крышкой, встряхнуть на вортексе в течение 5–10 сек, центрифугировать для сброса капель.
14. Поместить пробирку в термошейкер и инкубировать при температуре 75 °С и 900 об/мин в течение 20 мин.
15. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
16. Центрифугировать пробирку после инкубации 2 мин при 13000–16000 об/мин.
17. Аккуратно, не затрагивая осадок, перенести супернатант в лунку планшета с *Раствором МЧ+* в соответствии с пп. 8.1.
18. Перейти к разделу 8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ. При выборе протокола выделения согласно пп. 8.2 выбрать протокол «М-СОРБ-96 (без лизиса)».

8. ПОДГОТОВКА И ЗАПУСК АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ

Работы с подготовкой реагентов и образцов для постановки в автоматическую станцию проводить в боксе биологической безопасности I или II класса либо ПЦР-боксе.

8.1. Подготовка планшетов и их установка на борт станции

1. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Раствором МЧ+*.
2. В случае выделения ДНК из образцов жидкой цельной крови и физиологических жидкостей (спермы, слюны) внести в лунки планшета с *Раствором МЧ+* 400 мкл *Лизирующего раствора* и необходимое количество исследуемого образца, начиная с лунки A1 (см. рис. 1). Лунки в ряду заполняются сверху вниз, ряды меняются слева направо.

В случае выделения ДНК из остальных типов образцов осторожно, не задевая осадок, перенести супернатант, полученный в результате лизиса, в лунки планшета с *Раствором МЧ+*, начиная с положения A1 (см. рис. 1). Лунки в ряду заполняются сверху вниз, ряды меняются слева направо.



Рисунок 1 – Порядок внесения образцов в лунки планшета с Раствором МЧ+.

3. Установить планшет с *Раствором МЧ+* и внесенными образцами в слот № 2 рабочей зоны станции (см. рис. 2 и 3).

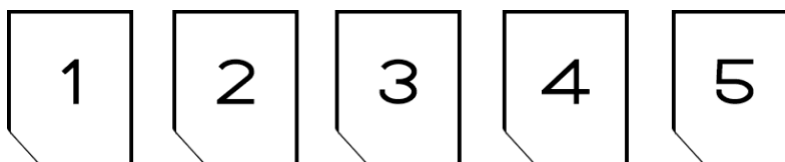


Рисунок 2 – Схема расположения слотов 1–5 для установки планшетов в автоматической станции «COLIBRI 96»

Обозначения:

Слот № 1 – используется для установки планшета с защитными насадками для стержневых магнитов.

Слот № 2 – используется для установки планшета с *Раствором МЧ+*, в котором проводится сорбция ДНК.

Слот № 3 – используется для установки планшета с *Промывочным раствором ПР*, в котором проводится первая промывка комплекса ДНК с магнитными частицами.

Слот № 4 – используется для установки планшета с *Промывочным раствором ПР*, в котором проводится вторая промывка комплекса ДНК с магнитными частицами.

Слот № 5 – используется для установки планшета с *Элюирующим раствором ЭР*, в которых проводится элюция ДНК.



Рисунок 3 – Расстановка планшетов в автоматической станции «COLIBRI 96»

4. Установить гребенку «Защитных насадок для стержневых магнитов-96» в чистый 96-луночный планшет. Планшет с насадкой установить в слот № 1 рабочей зоны станции (см. рис. 2 и 3).
5. Аккуратно убрать защитный слой с двух планшетов с *Промывочным раствором ПР* и установить планшеты в слоты № 3 и 4 рабочей зоны станции (см. рис. 2 и 3).
6. Аккуратно убрать защитный слой с планшета с *Элюирующим раствором ЭР* и установить планшет в слот № 5 рабочей зоны станции (см. рис. 2 и 3).

Примечание – Белое поле на этикетке планшета предназначено для указания необходимой информации о проведенном исследовании.

7. Закрыть дверцу рабочей камеры станции. Запустить протокол выделения ДНК согласно п. 8.2.

8.2. Запуск протокола выделения ДНК

1. В главном меню нажать кнопку «Выбор протокола» (см. рис. 4).

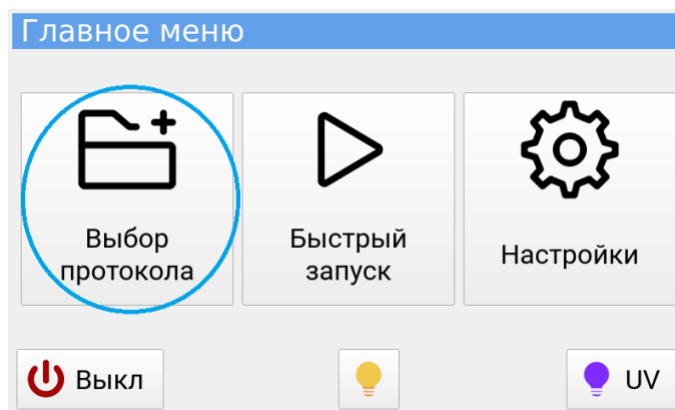


Рисунок 4 – Интерфейс главного меню станции «COLIBRI 96»

2. Выбрать в зависимости от типа исследуемых образцов протокол «М-CORБ-96» (для жидкой цельной крови, спермы, слюны) или «М-CORБ-96 (без лизиса)» (для остальных типов образцов). Нажать кнопку «Запуск протокола» (см. рис. 5).

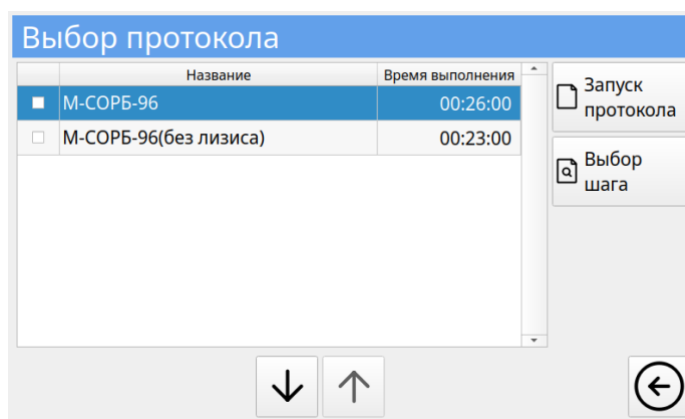
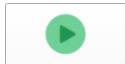


Рисунок 5 – Интерфейс меню выбора протокола выделения НК станции «COLIBRI 96»

3. Нажать в подменю выполнения протокола кнопку запуска .
4. После завершения протокола выделения открыть дверцу станции, вынуть планшет с выделенными образцами ДНК, поместить в бокс биологической безопасности I или II класса либо ПЦР-бокс, заклеить лунки планшета пленкой.

Примечание – Полученный раствор ДНК может храниться при температуре от 2 °C до 8 °C в течение суток и при температуре не выше минус 16 °C в течение года.

9. ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

Компоненты набора реагентов (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию необходимо утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

10. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять производителю ООО «НПФ Синтол» по адресу: 127550, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 42, тел. (495) 984-69-93, e-mail: syntol@syntol.ru.

11. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Значение
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Температурный диапазон
	Не допускать воздействия солнечного света
	Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Использовать до
	Номер по каталогу
	Код партии
	Запрет на повторное применение
	Верх