



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БиоЛинк»

Корниенко А.А.

«24» марта 2022 г.



Набор реагентов для выделения  
внеклеточной ДНК из плазмы крови

**"Plasma DNA Extraction"**

по ТУ 21.20.23-005-57201404-2020

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**



## Содержание

Содержание .....	1
Введение .....	2
1 Назначение набора .....	2
2 Характеристика набора.....	2
2.1 Варианты исполнения.....	2
2.2 Состав набора реагентов .....	3
2.3 Количество выделений .....	3
2.4 Принцип действия набора .....	3
2.5 Пригодность выделенной вкДНК для ПЦР .....	3
2.6 Ограничения при применении .....	4
3 Меры предосторожности .....	4
4 Оборудование и материалы.....	5
4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов .....	5
4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов.....	6
5 Протокол выделения ДНК.....	7
6 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации.....	8
6.1 Условия хранения.....	8
6.2 Условия транспортирования .....	8
6.3 Условия эксплуатации .....	8
7 Гарантийные обязательства.....	9
8 Маркировка .....	9
Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по приготовлению плазмы крови .	10
Библиография.....	11

## Введение

Плазма крови содержит внеклеточную ДНК (вкДНК), которая попадает в кровоток из разрушенных клеток. Основная часть вкДНК представлена фрагментами длиной около 150-200 пар оснований. ВкДНК присутствует в плазме в низкой концентрации на фоне многократного избытка белков плазмы.

Метод неинвазивной диагностики, называемый жидкостная биопсия, основан на исследовании фрагментов вкДНК в плазме крови пациента. Анализ вкДНК применяют, в частности, для выявления соматических мутаций в различных видах опухолей с целью диагностики, прогнозирования и лечения [1, 2].

## 1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови человека. Функциональное назначение – вспомогательное средство на преаналитическом этапе лабораторных исследований (этапе пробоподготовки), а именно набор реагентов для получения препарата вкДНК человека. Полученная вкДНК может быть использована для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В качестве биоматериала для выделения вкДНК используют плазму крови пациентов.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

## 2 Характеристика набора

### 2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови "Plasma DNA Extraction" по ТУ 21.20.23-005-57201404-2020» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в одном варианте исполнения: Набор реагентов на 24 выделения "Plasma DNA Extraction (24)".

## 2.2 Состав набора реагентов

Набор реагентов в варианте исполнения «Набор реагентов на 24 выделения "Plasma DNA Extraction (24)»» содержит пробирки с реагентами (таблица 1), инструкцию по применению и паспорт качества.

Набор реагентов в варианте исполнения «Набор реагентов на 24 выделения "Plasma DNA Extraction (24)" с магнитным штативом» содержит пробирки с реагентами (таблица 1), магнитный штатив, инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Наименование реагента	Объём	Фасовка	Цвет крышки
1	Магнитные частицы MNA	144 мкл	1 пробирка	красная
2	Лизирующий буфер LB	28 мл	1 флакона	бесцветная
3	Промывочный буфер WB1	14 мл	1 флакон	бесцветная
4	Промывочный буфер WB2	28 мл	1 флакон	бесцветная
5	Элюирующий буфер EB	2.4 мл	1 флакон	зелёная
6	Буфер T	460 мкл	1 пробирка	синяя

## 2.3 Количество выделений

Количество реактивов в наборе реагентов достаточно для выделения вкДНК из 24 образцов плазмы крови объёмом 5 мл каждый.

## 2.4 Принцип действия набора

Для выделения вкДНК из плазмы используют сорбент, состоящий из магнитных частиц со специальным покрытием, и буферные растворы. Плазму крови обрабатывают лизирующим буфером для разрушения биополимерных комплексов. Затем добавляют магнитные частицы, на поверхности которых происходит сорбция нуклеиновых кислот. После сорбции магнитные частицы концентрируют на дне пробирки с помощью магнитного штатива и промывают промывочными буферами. При промывке вкДНК остаётся связанной с магнитными частицами, а белки плазмы удаляются. При добавлении элюирующего буфера вкДНК переходит в раствор. Раствор с вкДНК переносят в чистую пробирку и добавляют стабилизирующий буфер.

## 2.5 Пригодность выделенной вкДНК для ПЦР

В результате процедуры выделения получают препарат внеклеточной одноцепочечной ДНК, пригодный для дальнейших исследований методом ПЦР.

## 2.6 Ограничения при применении

Необходимо хранить образцы крови при температуре 4°C и готовить плазму не позднее четырёх часов после забора крови. В процессе транспортировки и хранения образцов может происходить разрушение клетки крови, в результате чего ДНК клеток крови может контаминировать вкДНК плазмы. Рекомендации по приготовлению плазмы крови приведены в Приложении А.

Не рекомендуется определять концентрацию вкДНК методами спектроскопии и спектрофлуориметрии, поскольку это может привести к искажению показателей концентрации вкДНК, пригодной для ПЦР.

## 3 Меры предосторожности

3.1 Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2а согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.

3.2 Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.

3.3 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.

3.4 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.

3.5 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

3.6 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

3.7 Использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.

3.8 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.

3.9 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.

3.10 Набор не содержит материалов биологического происхождения и веществ, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.

3.11 Буферы LB и WB1 содержат детергенты, буфер EB содержит щелочь, в связи с чем при попадании на кожу и в глаза могут вызвать раздражение. При контакте

обильно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

3.12 Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.

3.13 Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».

3.14 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21.

3.15 Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## 4 Оборудование и материалы

### 4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Аспиратор с сосудом-ловушкой FTA-1 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Вортекс персональный V-1 plus (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия) или аналогичное оборудование.

Мини-ротатор Bio RS-24 со стандартной платформой PRS-22 для пробирок диаметром 10-16 мм (1,5 мл, 2 мл, 5 мл) (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Термостат типа "Драй-блок" TDB-120 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 или центрифуга лабораторная с охлаждением LMC-4200R с принадлежностями (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование с возможностью регулирования силы торможения.

Штатив лабораторный по ТУ 32.50.50-005-01813981-2020, вариант исполнения:

1. Магнитный штатив для работы с пробирками объемом 1,5/2,0; 5,0; 15,0 и 50,0 мл (ООО «Компания Совтех», Россия) или аналогичное оборудование.

#### **4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов**

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия) или аналогичный.

Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 1,5 мл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 5 мл и 15 мл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные («ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия) или аналогичные.

Штатив для пробирок, 80 ячеек и/или штатив для пробирок, 96 ячеек («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.



## 5 Протокол выделения ДНК

### 5.1 Выделение ДНК из плазмы крови

5.1.1 Внести по **5 мл** плазмы крови в пробирки объёмом 5 мл.

5.1.2 Добавить к каждому образцу **1 мл** лизирующего буфера **LB**. Тщательно перемешать, переворачивая пробирку 5-10 раз.

5.1.3 Инкубировать 20 минут при комнатной температуре.

**ВНИМАНИЕ!** Перед работой пробирку с магнитными частицами MNA необходимо тщательно встряхнуть на вортексе импульсами 10 раз по 5-10 сек.

5.1.4 Добавить к образцам по **5 мкл** суспензии магнитных частиц. Тщательно перемешать, переворачивая пробирку 5-10 раз.

5.1.5 Вращать 10 минут при комнатной температуре на мини-ротаторе на максимальной скорости.

5.1.6 Поместить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 минуты, убедиться, что частицы собрались на стенках пробирок. Аккуратно, не захватывая частицы, полностью удалить супернатант.

**ВНИМАНИЕ!** Удалять супернатант здесь и далее с использованием аспиратора или автоматической пипетки.

5.1.7 Внести в пробирки по **500 мкл** промывочного буфера **WB1**. Пробирки тщательно встряхнуть и перенести суспензию в чистые промаркированные пробирки объёмом 1,5 мл. Тщательно перемешать на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек.

5.1.8 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант, не вынимая пробирки из штатива.

5.1.9 Внести в пробирки по **500 мкл** промывочного буфера **WB2**. Тщательно перемешать на вортексе импульсами 5 раз по 5-10 сек.

5.1.10 Поместить пробирки в магнитный штатив, инкубировать 2 минуты. Удалить супернатант, не вынимая пробирки из штатива.

5.1.11 Повторить промывку буфером **WB2** в соответствии с п. 5.2.9-5.2.10.

5.1.12 После удаления супернатанта добавить **84 мкл** элюирующего буфера **EB\***. Тщательно перемешать.

5.1.13 Инкубировать в термостате при температуре 80°C в течение 5 минут.

5.1.14 Поместить пробирку в магнитный штатив. Инкубировать 2 минуты, чтобы магнитные частицы собрались на стенках пробирок. Отобрать и перенести элюат в чистые, промаркированные пробирки объёмом 1,5 мл, не захватывая сорбент.

5.1.15 Добавить к элюату **16 мкл буфера Т**. Хранить полученные образцы ДНК при температуре минус 20°C в течение недели, либо немедленно перейти к процедуре постановки ПЦР.

\*Примечание: для получения образца более высокой концентрации элюировать в 42 мкл буфера ЕВ, а затем добавить 8 мкл буфера Т.

## **6 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации**

### **6.1 Условия хранения**

6.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от 2°C до 8°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

6.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию.

6.1.3 Срок годности набора 12 месяцев со дня выпуска или 6 месяцев после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

### **6.2 Условия транспортирования**

6.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2°C до 25°C. Не подвергать замораживанию.

6.2.2 Срок транспортирования – не более 5 суток.

6.2.3 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды.

### **6.3 Условия эксплуатации**

6.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°C до 25°C).

6.3.2 Соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

6.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

## 7 Гарантийные обязательства

7.1 Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

7.2 Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

7.3 В случае нарушения условий транспортирования, обнаружения повреждений упаковки, а также по вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обратиться к производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13  
 Телефон: +7 (383) 209-32-40  
 Электронная почта: info@biolinklab.ru  
 Веб-сайт: biolinklab.ru

## 8 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для выделения ДНК из указанного количества образцов биоматериала		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения)		Номер серии
	Обратитесь к инструкции по применению		Дата изготовления (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до (месяц, год)
			Изготовитель

## Приложение А (рекомендуемое)

### Рекомендации по приготовлению плазмы крови

1. Кровь забрать в три вакутейнера объёмом 8-10 мл с раствором КЗ ЭДТА, например, пробирки Improvacuter с КЗ ЭДТА объёмом 9 мл, («Гуанчжоу Импрув Медикал Инструментс Ко., Лтд», Китай). При заборе следить, чтобы каждая пробирка полностью заполнилась кровью. Немедленно после забора перемешать, переворачивая пробирку с кровью 8-10 раз.

**ВНИМАНИЕ!** Хранить до приготовления плазмы в холодильнике при температуре 4°C, не замораживать. Не позднее 4 часов после забора крови приготовить плазму.

2. Центрифугировать пробирки с кровью в течение 10 мин при 1500g при температуре от 4°C до 30°C. Кровь должнаделиться на три слоя: плазма сверху, эритроциты внизу, белая прослойка лейкоцитов между плазмой и эритроцитами. **ВНИМАНИЕ!** Перед центрифугированием отключить тормоз центрифуги чтобы лейкоциты не взбалтывались при торможении.

3. Собрать плазму в пробирку на 15 мл с коническим дном, не захватывая лейкоциты. **ВНИМАНИЕ!** Оставить над лейкоцитами слой плазмы толщиной 5 мм, чтобы не контаминировать плазму клетками!

4. Центрифугировать пробирки с плазмой в течение 10 мин при 1500g при температуре от 4°C до 30°C. **ВНИМАНИЕ!** Перед центрифугированием отключить тормоз центрифуги чтобы лейкоциты не взбалтывались при торможении. После центрифугирования в пробирках может наблюдаться небольшой белый или белорозовый осадок клеток. Собрать чистую плазму в новые пробирки на 5 мл, не захватывая осадок. **ВНИМАНИЕ!** Оставить над осадком слой плазмы толщиной 5-10 мм, чтобы не контаминировать плазму клетками!

5. Плазму хранить до выделения ДНК при температуре 4°C до 24 часов, при температуре от минус 15°C до минус 25°C до 30 дней или при температуре минус 70°C до 12 месяцев.

## Библиография

1. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. / Z. Qin, V. A. Ljubimov, C. Zhou, et al. // Chin J Cancer. – 2016. – V. 35:36.
2. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. / E. Crowley, F. Di Nicolantonio, F. Loupakis, A. Bardelli // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2013. – Vol. 10. – P. 472–484.





**Производитель: ООО «БиоЛинк»**

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: [info@biolinklab.ru](mailto:info@biolinklab.ru)

Веб-сайт: [biolinklab.ru](http://biolinklab.ru)