

# FFPET DNA – Extraction Kit

## Инструкция по применению

### ***Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки***

Номер каталога: 31901 Набор для 50 выделений

Только для исследовательского применения

Версия: январь 2020г

Хранить от +15 до +25°C



1. Назначение набора .....	3
2. Принцип действия набора.....	3
3. Материал для исследования .....	3
4. Состав набора.....	3
5. Необходимые реактивы и инструменты не входящие в набор .....	4
6. Транспортировка и хранение.....	4
7. Ограничения по использованию .....	4
8. Меры предосторожности .....	4
9. Подготовка образцов.....	4
10. Перед началом работы .....	5
11. Протокол.....	5
12. Схема процесса выделения ДНК.....	6
13. Техническая поддержка .....	7

## **1. Назначение набора**

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из тканей, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPE). Метод обеспечивает быстрый и высокий выход ДНК, что особенно важно для небольших биопсий. Полученная ДНК может быть использована для ПЦР в режиме реального времени.

## **2. Принцип действия набора**

На первом этапе FFPE срезы ткани помещаются в специальный раствор, в котором одновременно расплавляется парафин, лизируется ткань и удаляются формалиновые сшивки. Набор не требует депарафинирования ксиленом и длительной обработки протеиназой К. На следующем этапе, после лизиса ткани, ДНК экстрагируется хлороформом и осаждается изопропанолом. Осадок ДНК промывается этиловым спиртом, высушивается и растворяется в ТЕ буфере.

## **3. Материал для исследования**

В качестве материала для выделения ДНК могут использоваться ткани фиксированные формалином и заключенные в парафин, нарезанные на срезы толщиной 10 мкм. Для выделения достаточного количества ДНК общая площадь ткани на срезах должна составить 50-200 мм<sup>2</sup>.

**Внимание!** Предпочтительна фиксация ткани в нейтральном формалине в фосфатном буфере (10% NBF, pH~7,0) в течение 12-24 часов. Длительная фиксация и применение кислого формалина pH<6 значительно ухудшает пригодность ДНК для ПЦР.

## **4. Состав набора**

Набор содержит реактивы достаточные для выделения 50 образцов ДНК (Таблица 1).

*Таблица 1. Состав набора.*

№ флакона	Содержимое	Кол-во
1	Раствор А*	20 мл
2	Раствор В	2 мл
3	Раствор С	500 мкл
4	ТЕ буфер	6,5 мл

\* содержит гидроокись натрия с детергентом, информацию по безопасному использованию см. п.8.

## **5. Необходимые реактивы и инструменты не входящие в набор**

- Одноразовые перчатки;
- Пипетки-дозаторы переменного объема на 2-20, 10-100, 200-1000мкл типа Ленпипет (Россия) и одноразовые наконечники с фильтрами;
- Стерильные микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл с защелкой;
- Микроцентрифуга на 10.000 об/мин;
- Вортекс;
- Твердотельный минитермостат с терморегулятором на +37...+95°C;
- Хлороформ, изопропанол, этиловый спирт.

## **6. Транспортировка и хранение**

Набор поставляется и хранится при комнатной температуре (+15...+25°C). При правильном использовании срок хранения – 12 месяцев.

## **7. Ограничения по использованию**

- Набор предназначен только для исследовательского применения;
- Для получения корректных результатов необходимо строго следовать настоящей инструкции;
- Не использовать по истечении срока хранения.

## **8. Меры предосторожности**

- При работе с химикатами всегда используйте лабораторную одежду, одноразовые перчатки и защитные очки;
- Раствор А содержит гидроокись натрия и детергент, раздражающие глаза и кожу. При попадании в глаза или на кожу немедленно смыть большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью.
- Использованные реагенты утилизировать как химические отходы.

## **9. Подготовка образцов**

Парафиновые блоки ткани нарезать на 4 - 8 (в зависимости от площади ткани) срезов толщиной 10 мкм. Первый и последний контрольные срезы окрашиваются гематосилин-эозином и оцениваются патоморфологом. Для выделения достаточного количества ДНК общая площадь ткани на срезах должна составить 50-200 мм<sup>2</sup>.

- Если требуется диссекция, поместить 4-6 соседних с контрольными срезов на стекла для микроскопии и подсушить в течение ночи. Используя контрольные срезы, обвести на рабочих срезах интересующие участки. Добавить 20-30 мкл буфера ТЕ или воды и соскрести выбранные участки чистым скальпелем в микропробирку 1.5 мл.
- Если диссекция не требуется, поместить 2-4 соседних с контрольными срезов в микропробирку на 1.5 мл.

## **10. Перед началом работы**

- Разогреть термостат до температуры 95°C.

## **11. Протокол**

11.1 Добавить 400 мкл Раствора А в пробирку с парафиновыми срезами ткани. Инкубировать 20-30 мин 95°C. Рекомендуется использовать пробирки с защелкой или прижать пробирки стеклом с грузом, чтобы избежать открывания пробирок из-за повышения давления при нагревании.

11.2 Аккуратно достать пробирки из термостата, чтобы крышки не открылись. Остудить 3 мин до комнатной температуры и центрифугировать 30 сек при 10000 об/мин.

11.3 Добавить 400 мкл хлороформа, перемешать на вортексе 5-10 сек и центрифугировать 1 мин при 10000 об/мин.

Содержимое пробирки должно разделиться на 3 фазы: верхняя водная фаза, содержащая ДНК, нижняя фаза с хлороформом и парафином и между ними белая интерфаза. Аккуратно перенести верхнюю фазу (~350 мкл) в новую пробирку.

11.4 Добавить к ДНК-экстракту 40 мкл Раствора В. Перемешать и центрифугировать 1 мин при 5000 об/мин. Если не наблюдается значительного осадка, перейти к следующему этапу. Если замечен значительный осадок на дне и на стенке пробирки, аккуратно перенести жидкость в новую пробирку, стараясь не задеть осадок. При этом в осадке остаются загрязнения, которые могут ингибировать ПЦР, в то время как большая часть ДНК остается в растворе.

11.5 Добавить 10 мкл Раствора С и 700 мкл изопропанола, перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при комнатной температуре.

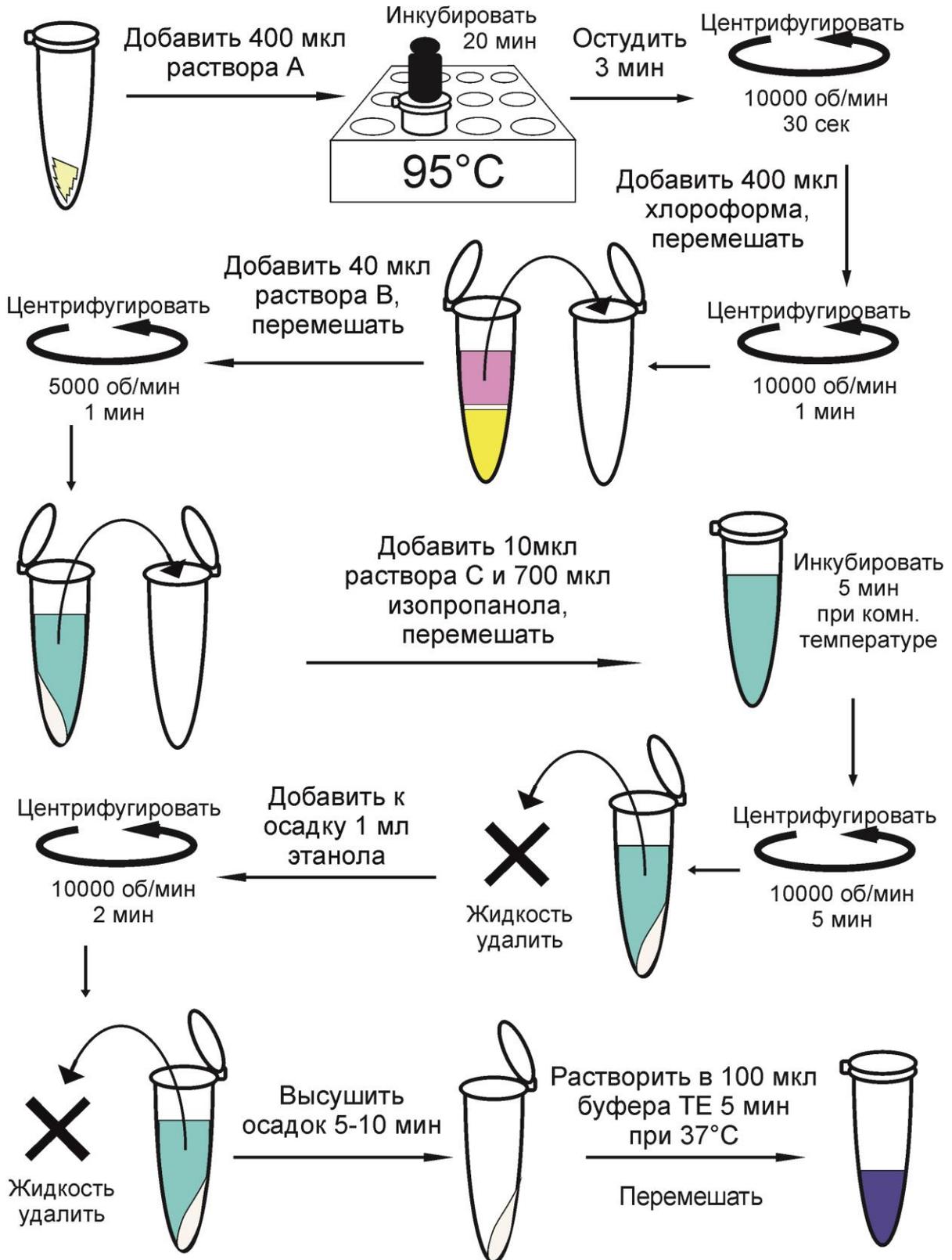
11.6 Центрифугировать раствор ДНК 5 мин при 10000 об/мин. ДНК осядет на дно и внешнюю стенку пробирки. Аккуратно удалить жидкость, используя тонкий наконечник, стараясь не задеть осадок.

11.7 Добавить 1 мл этилового спирта в пробирку с осадком ДНК и центрифугировать 2 мин при 10000 об/мин. Аккуратно удалить спирт. Высушить осадок 5-10 мин при комнатной температуре до полного испарения этанола.

11.8 Добавить 100 мкл буфера ТЕ, инкубировать 5 мин при 37°C, перемешать на вортексе 30 сек до растворения осадка. Центрифугировать 5-10 сек при 10000 об/мин чтобы собрать жидкость на дне.

Готовую ДНК хранить при -20°C.

## 12. Схема процесса выделения ДНК



### **13. Техническая поддержка**

С техническими вопросами обращаться в ООО «БиоЛинк»: 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40. E-mail: [info@biolinklab.ru](mailto:info@biolinklab.ru)