

# FFPET Mag DNA – Extraction Kit

## Инструкция по применению

***Набор реагентов для выделения ДНК на магнитных частицах из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки***

Номер каталога: 32501 Набор для 12 выделений

Только для исследовательского применения

Версия: январь 2020г

Хранить от +2 до +8°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 и реагентов .....	5
9.1 Подготовка образцов.....	5
9.2 Подготовка реагентов.....	5
10. Протокол.....	5
11. Техническая поддержка .....	6

## **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 проба обрабатывается многокомпонентным лизирующим раствором, разрушающим комплекс нуклеиновых кислот с белками, после чего ДНК осаждается на магнитные частицы, отмывается спиртовыми растворами и элюируется.

## **3. Материал для исследования**

В качестве материала для выделения ДНК могут использоваться ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин.

**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 12 образцов ДНК двумя независимыми процедурами по 6 образцов в каждой (Таблица 1).

Таблица 1. Состав набора.

№ флакона	Содержимое	Кол-во флаконов	Объем содержимого
1	Раствор А*	1	2.5 мл
2	Раствор В	1	250 мкл
3	Лизирующий раствор	2	4 мл
4	Осадитель ДНК	1	12 мл
5	Раствор для отмывки 1	1	8 мл
6	Раствор для отмывки 2	1	5 мл
7	Элюирующий раствор	3	3 мл
8	Сорбент (суспензия магнитных частиц)	1	250 мкл

\* 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;
- Холодильник с температурой +2...+8°C и морозильная камера с температурой -15...-25°C.
- Стерильные микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл с защелкой и на 2,0 мл;
- Микроцентрифуга со скоростью не ниже 13.000 об/мин;
- Вортекс;
- Твердотельный минитермостат с терморегулятором на +37...+95°C;
- Термошейкер;
- Магнитный штатив.

## **6. Транспортировка и хранение**

Набор следует хранить при температуре +2...+8°C. Допускается транспортировка при температуре до +25°C. Замораживание не допускается! 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 набором 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.
- Во избежание риска контаминации всегда использовать только одноразовый пластик (наконечники с фильтрами, пробирки и т.п.);
- Использованные реагенты утилизировать как химические отходы.

## **9. Подготовка образцов и реагентов**

### **9.1 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 TE 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.

### **9.2 Подготовка реагентов**

- Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника и выдержать компоненты набора при температуре 18-25°C в течение 30 мин.

- Раствор А прогреть при температуре 30-40°C до растворения осадка. Перемешать.

- Лизирующий раствор прогреть при температуре 50-60°C до растворения осадка. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором добавить 80 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

**Внимание!** Лизирующий раствор после вскрытия и добавления суспензии сорбента хранению не подлежит.

## **10. Протокол**

10.1 Добавить 200 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.

10.2 Аккуратно достать пробирки из термостата, чтобы крышки не открылись. Охладить 3 мин в морозильной камере.

**Внимание!** Не превышать время охлаждения во избежание замерзания раствора.

Центрифугировать 30 сек при 10000 об/мин. Аккуратно извлечь жидкость из-под слоя парафина и перенести в новую микропробирку 2,0 мл.

10.3 Добавить 20 мкл Раствора В. Перемешать. Кратко центрифугировать, чтобы сбросить капли со стенок на дно.

10.4 Добавить 300 мкл лизирующего раствора с сорбентом. Перемешать на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере при 65°C с частотой вращения

1300 об/мин в течение 10 мин. Кратко центрифугировать, чтобы сбросить капли со стенок на дно. Если образец лизировался не полностью, перенести содержимое в чистую пробирку, стараясь не захватить осадок.

10.5 Внести в пробирку 400 мкл Осадителя ДНК. Перемешать на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин при комнатной температуре.

Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Удалить надосадочную жидкость, не задевая осадок.

10.6 К осадку добавить 500 мкл Раствора для отмывки 1. Перемешать на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 2 мин при 13000 об/мин.

Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Удалить надосадочную жидкость, не задевая осадок.

10.7 К осадку добавить 300 мкл Раствора для отмывки 2. Перемешать на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 2 мин при 13000 об/мин.

Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Удалить надосадочную жидкость, не задевая осадок.

10.8 Высушить осадки в открытых пробирках при комнатной температуре 18-25°C в течение 2-3 мин.

10.9 К осадку добавить 100 мкл элюирующего раствора. Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере при 65°C с частотой вращения 1300 об/мин в течение 5 мин. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 мин.

Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Перенести надосадочную жидкость, содержащую ДНК в новую микропробирку, не задевая осадок.

Готовую ДНК хранить при -20°C.

## **11. 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)