



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

Корниенко А.А.

«24» февраля 2025 г.



Набор реагентов для выделения

ДНК из срезов с FFPE-блоков

"FFPE DNA Extraction"

по ТУ 20.59.52-004-57201404-2020

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Содержание

Содержание	1
1 Назначение набора	2
2 Характеристика набора	2
2.1 Варианты исполнения	2
2.2 Комплектность	2
2.3 Состав набора реагентов	3
2.4 Количество выделений	3
2.5 Принцип действия набора	3
3 Функциональные характеристики и влияние интерферирующих веществ	4
3.1 Эффективность выделения ДНК	4
3.2 Чистота выделенной ДНК	4
3.3 Влияние интерферирующих веществ на выделение ДНК	4
3.4 Ограничения при применении	4
4 Риски, связанные с применением набора реагентов	5
5 Меры предосторожности	5
6 Оборудование и материалы	6
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	6
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	7
7 Подготовка образцов биоматериала	7
8 Протокол выделения ДНК	8
9 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации	9
9.1 Условия хранения	9
9.2 Условия транспортирования	9
9.3 Условия эксплуатации	9
9.4 Условия утилизации	9
10 Гарантийные обязательства	10
10.1 Гарантии производителя	10
10.2 Рекламации	10
11 Маркировка	10
Приложение А (рекомендуемое) Схема выделения ДНК	11

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для выделения геномной ДНК из срезов с FFPE-блоков, содержащих фиксированные формалином и заключённые в парафин фрагменты ткани человека.

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

В качестве биоматериала для выделения геномной ДНК используют срезы с FFPE-блоков, содержащие фиксированные формалином и заключённые в парафин фрагменты ткани человека. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

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).

Показания и противопоказания к применению

Показания: набор реагентов рекомендуется к применению на этапе пробоподготовки для получения геномной ДНК. Противопоказания: при применении по назначению специально обученным персоналом противопоказания отсутствуют.

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выделения ДНК из срезов с FFPE-блоков "FFPE DNA Extraction" по ТУ 20.59.52-004-57201404-2020» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в одном варианте исполнения: Набор реагентов на 50 выделений "FFPE DNA Extraction (50)".

2.2 Комплектность

В комплект поставки входят: набор реагентов (таблица 1), инструкция по применению, паспорт качества.

2.3 Состав набора реагентов

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём
1	красная	Раствор А	20 мл
2	белая	Раствор В	2 мл
3	оранжевая	Раствор С	500 мкл
4	синяя	ТЕ буфер	5 мл

Раствор А – раствор для депарафинизации FFPE ткани.

Раствор В – раствор для осаждения примесей ДНК.

Раствор С – раствор для осаждения ДНК.

ТЕ буфер – буфер для растворения и хранения ДНК.

Набор реагентов не содержит биологических материалов человеческого и животного происхождения.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

2.4 Количество выделений

Набор реагентов на 50 выделений "FFPE DNA Extraction (50)" содержит реактивы для выделения геномной ДНК из 50 образцов FFPE-блоков.

2.5 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на депарафинизации срезов с FFPE-блоков (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded), осуществляемой посредством термического воздействия и разделения фаз, с последующей очисткой ДНК.

На первом этапе срезы FFPE-блоков помещают в специальный раствор, в котором одновременно происходит депарафинизация и лизис тканей и удаление формалиновых сшивок. На следующем этапе происходит экстракция ДНК хлороформом и осаждение изопропанолом. Осадок ДНК промывают этиловым спиртом, высушивают и растворяют в буфере ТЕ. Применяемый метод пригоден для выделения ДНК из биопсийного материала человека, представляющего собой фрагменты ткани или комплексы клеток человека, фиксированные формалином и заключённые в парафин, с учётом всех приведенных в данной инструкции ограничений.

В результате процедуры выделения получают препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, пригодный для дальнейших исследований методом ПЦР.

3 Функциональные характеристики и влияние интерферирующих веществ

3.1 Эффективность выделения ДНК

Эффективность выделения ДНК определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием зарегистрированного набора реагентов «Набор реагентов для диагностики *in vitro* для выявления мутации V600E в гене *BRAF* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-BRAF-V600E" по ТУ 21.20.23-001-57201404-2019», РУ № РЗН 2021/13521, производства ООО «БИОЛИНК». Концентрация ДНК, выделенной из срезов с FFPE-блоков, достаточна для проведения ПЦР.

3.2 Чистота выделенной ДНК

Оценку качества экстрагированной ДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием зарегистрированного набора реагентов «Набор реагентов для диагностики *in vitro* для выявления мутации V600E в гене *BRAF* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-BRAF-V600E" по ТУ 21.20.23-001-57201404-2019», РУ № РЗН 2021/13521, производства ООО «БИОЛИНК». Чистота ДНК, выделенной из срезов с FFPE-блоков, приемлема для проведения ПЦР.

3.3 Влияние интерферирующих веществ на выделение ДНК

Интерферирующие вещества не влияют на результаты выделения ДНК в следующих концентрациях: гемоглобин – 2 мг/мл, ксилол – 5%, этанол – 5%.

3.4 Ограничения при применении

При фиксации ткани предпочтительно использовать 10% нейтральный формалин в фосфатном буфере (рН от 7.0 до 7.5), проводить фиксацию 12-24 часов. Длительная фиксация и применение кислого формалина (рН < 6) значительно ухудшает пригодность ДНК для ПЦР.

ДНК, выделенная из срезов с FFPE-блоков, обычно более фрагментирована, чем ДНК, выделенная из образцов свежих тканей. Степень фрагментации и химической деградации зависит от условий фиксации и давности хранения образца. Сильно фрагментированная и химически модифицированная ДНК даже при относительно высокой концентрации в образце может быть непригодна к амплификации в ПЦР.

Рекомендуется использовать для выделения ДНК срезы с FFPE-блоков, содержащие не более 30% некротической ткани.

Не рекомендуется использовать для определения концентрации ДНК спектроскопические и спектрофлуориметрические методы, поскольку это может привести к искажению показателей концентрации ДНК, пригодной для ПЦР.

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

1. Использование срезов с FFPE-блоков после длительного хранения (возможный вред: недостаточное количество ДНК для ПЦР, недостаточное качество ДНК для ПЦР).
2. Использование срезов с FFPE-блока, содержащего недостаточное количество клеток опухолевой ткани человека (возможный вред: недостаточное количество ДНК для ПЦР).
3. Персонал использует набор реагентов после истечения срока годности или после нарушения условий транспортировки и хранения (возможный вред: недостаточное количество ДНК для ПЦР, недостаточное качество ДНК для ПЦР).
4. Персонал использует этанол с концентрацией менее 95% (возможный вред: недостаточное количество ДНК для ПЦР).

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2а согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции. Не использовать набор реагентов для выделения ДНК из биологического материала, не предусмотренного назначением.
4. Работу следует проводить в боксе микробиологической безопасности класса II.
5. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

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.
8. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных партий.
9. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
10. Раствор А содержит гидроксид натрия и детергент, в связи с чем при попадании на кожу и в глаза может вызвать раздражение. При контакте обильно промыть водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
11. 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.
12. 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».
13. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С» по ТУ 32.50.50-010-51495026-2020 в исполнении: БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 (NEOTERIC) (ПУ № ФСР 2012/13259, ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Вортекс, например, вортекс персональный V-1 plus (ПУ № ФСЗ 2011/09797, ООО «Биосан», Латвия).

Дозаторы переменного объема, например, дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (ПУ № ФСР 2009/05681, АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия).

Термостат твердотельный, например, термостат типа «Драй-блок» TDB-120, вариант исполнения: I. Термостат TDB-120 с крышкой и термоблоком А-53 (ПУ № РЗН 2018/7729, ООО «Биосан», Латвия).

Центрифуга, например, высокоскоростная мини-центрифуга Microspin 12 с принадлежностями (ПУ № ФСЗ 2011/10116, ООО «Биосан», Латвия)

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

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

Дополнительные реагенты: хлороформ, изопропанол, 95-96% этанол.

Наконечники универсальные, например, наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем. 3. Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл (РУ № ФСЗ 2012/12077, «Эксиджен, Инк.», США).

Перчатки медицинские, например, перчатки медицинские диагностические (смотровые) и хирургические одноразовые "Benovy" стерильные и нестерильные. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные смотровые, цвета: бирюзовый, синий, белый, голубой, сиреневый, зеленый, размеры: XS, S, M, L, XL (вид 185830) (РУ № ФСЗ 2012/12488, «ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия).

Пробирки объемом 1,5 мл, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro*. 13. Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом от 0,6 мл до 2,0 мл (РУ № ФСЗ 2012/11892, «Эксиджен, Инк.», США).

Штатив, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro*. Вариант исполнения 23. Штатив для пробирок, 80 ячеек (РУ № ФСЗ 2009/05024, «Эксиджен, Инк.», США).

7 Подготовка образцов биоматериала

1. Исследуемый материал – срезы FFPE-блоков, содержащие фиксированные формалином и заключённые в парафин фрагменты тканей человека.
2. FFPE-блоки с опухолевой тканью нарезать с использованием микротом на 6-12 срезов толщиной 5-10 мкм с площадью ткани на срезе 50-200 мм². Первый и последний контрольные срезы окрасить гематоксилин-эозином, после чего патоморфолог оценивает процент опухолевых клеток.
3. Если на срезе менее 30% опухолевых клеток, то провести макродиссекцию, для этого поместить 5-7 срезов, соседних с контрольными, на стёкла для микроскопии и подсушить в течение ночи. Используя контрольные срезы, обвести на рабочих срезах необходимые участки. Добавить 20-30 мкл буфера ТЕ или воды и соскрести выбранные участки чистым скальпелем в микропробирку объемом 1.5 мл.
4. Если макродиссекция не требуется, поместить 5-7 срезов, соседних с контрольными, в микропробирку объемом 1.5 мл.

8 Протокол выделения ДНК

Схема выделения ДНК представлена в приложении А.

1. Если набор реагентов хранился в холодильнике при температуре от 2°C до 8°C, перед использованием следует нагреть реагенты до комнатной температуры.
2. Добавить **400 мкл** раствора А в пробирку со срезами с FFPE-блоков. Инкубировать 20-30 мин при температуре 95°C. Рекомендуется использовать пробирки с защёлкой или прижать пробирки стеклом с грузом, чтобы избежать открывания пробирок из-за повышения давления при нагревании.
3. Аккуратно достать пробирки из термостата, чтобы крышки не открылись. Остудить в течение 3 мин до комнатной температуры и центрифугировать 30 сек при 10000 об./мин.
4. Добавить **400 мкл** хлороформа, перемешать на вортексе 5-10 сек и центрифугировать в течение 1 мин при 10000 об./мин.
5. 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.
6. Добавить к экстракту ДНК **40 мкл** раствора В. Перемешать и центрифугировать в течение 1 мин при 5000 об./мин. Если не наблюдается значительного осадка, перейти к следующему этапу. Если замечен значительный осадок на дне и стенках 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 остаётся в растворе.
7. Добавить **10 мкл** раствора С и **700 мкл** изопропанола, перемешать на вортексе и инкубировать в течение 5 мин при комнатной температуре.
8. Центрифугировать раствор ДНК в течение 5 мин при 10000 об./мин. ДНК осядет на дно и внешнюю стенку пробирки. Аккуратно удалить жидкость, используя тонкий наконечник, стараясь не задевать осадок.
9. Добавить **1 мл** 95-96% этанола в пробирку с осадком ДНК и центрифугировать в течение 2 мин при 10000 об./мин. Аккуратно удалить этанол. Высушить осадок 5-10 мин при комнатной температуре до полного испарения этанола.
10. Добавить **100 мкл** буфера ТЕ, инкубировать в течение 5 мин при 37°C, перемешать на вортексе 30 сек до растворения осадка. Центрифугировать в течение 5-10 сек при 10000 об./мин, чтобы собрать жидкость на дне.

Раствор ДНК хранить при температуре -20°C. Концентрацию выделенной ДНК контролировать методом ПЦР.

9 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

9.1 Условия хранения

9.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от 2°C до 25°C в течение всего срока годности.

9.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию.

9.1.3 Срок годности набора – 3 года со дня выпуска, 3 года после первого вскрытия упаковки набора реагентов.

9.2 Условия транспортирования

9.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре окружающей среды от 2°C до 25°C. Не подвергать замораживанию. Допустимо транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами для сохранения температуры от 2°C до 8°C (ХТЛ-3, ООО «Термологика» или аналогичные).

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

9.3 Условия эксплуатации

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

9.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

9.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

9.4 Условия утилизации

9.4.1 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.

10 Гарантийные обязательства

10.1 Гарантии производителя

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.

10.2 Рекламации

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.

Рекламации следует направлять в письменном виде 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

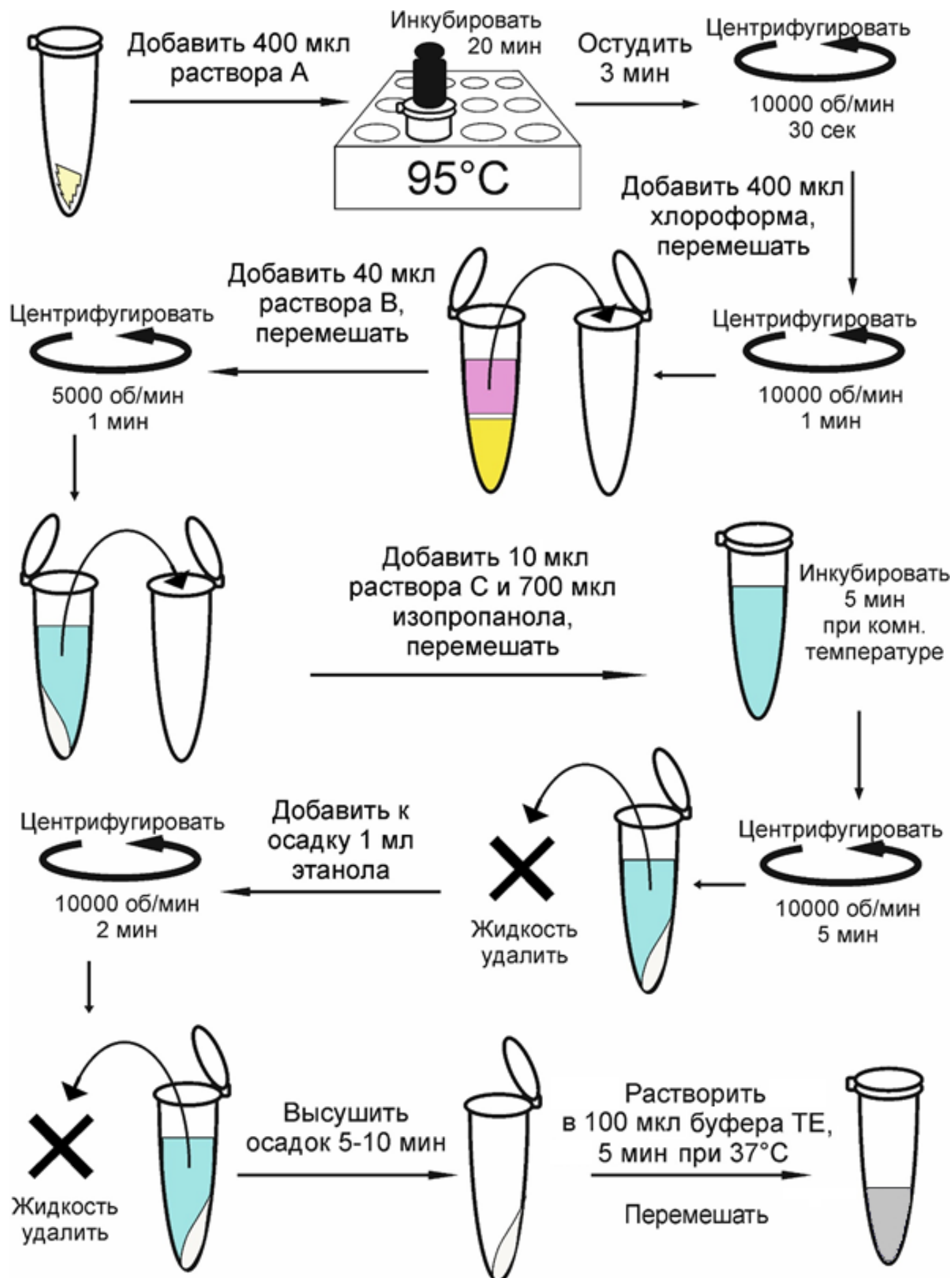
11 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для выделения ДНК из указанного количества образцов биоматериала		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер партии
	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)

Схема выделения ДНК



Производитель: ООО «БиоЛинк»

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

Телефон: (383) 209-32-40, 382-99-07

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru