



**Набор реагентов
для полногеномной амплификации ДНК,
выделенной из единичных клеток**

" sc WGA Display v2 "

Инструкция по применению

Только для исследовательских целей (RUO)

Содержание

Содержание	2
Введение	3
1 Назначение набора реагентов	3
2 Характеристика набора реагентов	3
2.1 Варианты исполнения набора	3
2.2 Состав набора реагентов	3
2.3 Количество исследуемых образцов	4
2.4 Принцип работы набора реагентов	4
3 Меры предосторожности	5
4 Оборудование и материалы	6
4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	6
4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	7
5 Материал для полногеномной амплификации	8
6 Проведение полногеномной амплификации	8
6.1 Лизис клеток	8
6.2 Преамплификация	10
6.3 Амплификация	11
7 Условия хранения полученных образцов	13
8 Требования к транспортированию и хранению	13
9 Указания по применению	13
10 Требования к утилизации	13
11 Гарантийные обязательства	14
12 Маркировка	15

Введение

Полногеномная амплификация ДНК из единичных клеток широко используется в методиках преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) эмбрионов с дальнейшим анализом методами массового параллельного секвенирования (NGS), сравнительной геномной гибридизации (CGH) на чипах, высокочувствительных ПЦР-исследований и т.п.

Для проведения анализов перечисленными методами требуются минимальные количества геномной ДНК в диапазоне от 2 до 1000 нг. Однако одна человеческая клетка содержит около 7 пг ДНК, поэтому возникает необходимость применения полногеномной амплификации.

1 Назначение набора реагентов

Набор реагентов предназначен для амплификации геномной ДНК человека, выделенной из единичных клеток, с получением около 1,5 мкг продукта течение 3,5 – 4 часов.

Набор реагентов предназначен только для исследовательских целей (RUO).

2 Характеристика набора реагентов

2.1 Варианты исполнения набора

«Набор реагентов для подготовки библиотек ДНК, выделенной из единичных клеток "sc WGA Display v2" представлен в трех вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 24 реакции «sc WGA Display v2 (24)», REF 12024;
- 2) Набор реагентов на 48 реакций «sc WGA Display v2 (48)», REF 12048;
- 3) Набор реагентов на 96 реакций «sc WGA Display v2 (96)», REF 12096.

2.2 Состав набора реагентов

Состав набора и объем реагентов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора и объем реагентов

Наименование реагента	Цвет крышки пробирки		Набор на 24 реакции		Набор на 48 реакций		Набор на 96 реакций	
			Объем, мкл	Количество пробирок	Объем, мкл	Количество пробирок	Объем, мкл	Количество пробирок
Буфер для лизиса		красный	240	1 шт	480	1 шт	960	1 шт
Фермент для лизиса		фиолетовый	24	1 шт	48	1 шт	96	1 шт
Буфер для преамплификации		желтый	92	1 шт	184	1 шт	368	1 шт
Фермент для преамплификации		синий	30	1 шт	60	1 шт	120	1 шт
Буфер для амплификации		зеленый	744	1 шт	1488	1 шт	1488	2 шт
Фермент для амплификации		оранжевый	96	1 шт	192	1 шт	384	1 шт
Контрольная ДНК		розовый	50	1 шт	50	1 шт	50	1 шт
Вода для ПЦР		голубой	1700	1 шт	1700	1 шт	1700	2 шт

2.3 Количество исследуемых образцов

Набор реагентов на 24, 48 или 96 реакций позволяет амплифицировать 24, 48 или 96 исследуемых образцов соответственно, включая положительные и отрицательный контроли.

2.4 Принцип работы набора реагентов

Метод полногеномной амплификации, используемый в наборе, является улучшенной версией дегенеративной олиго-ПЦР (DOP-PCR) с оптимизированными последовательностями праймеров и уникальным ферментом – SD ДНК-полимеразой. Этот фермент сочетает в себе способность вытеснять нити ДНК с сохранением стабильности при температуре до 92°C. Благодаря данным особенностям этот фермент можно использовать для обеих стадий амплификации.

На первом этапе проводят ферментативный лизис клеток в специальном буфере, предназначенном для проведения быстрого лизиса единичных клеток.

На втором этапе с полученной на этапе лизиса ДНК проводят реакцию преамплификации – неспецифический отжиг праймеров с целью наработки фрагментов для последующей амплификации.

Затем на третьем этапе к реакционной смеси добавляют буфер для амплификации, ДНК-полимеразу и праймеры для амплификации фрагментов, полученных на предыдущем шаге.

3 Меры предосторожности

- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в ПЦР-лаборатории.
- Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
- Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
- Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
- При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки без талька. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
- При постановке ПЦР 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.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию

бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Провести обработку рабочих поверхностей и оборудования дезинфицирующими средствами.

- Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.

Примечание: Набор реагентов не содержит веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.

4 Оборудование и материалы

4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

- Автоматические одноканальные дозаторы переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-100 мкл, 100-1000 мкл (например, DiscoveryComfort, Corning NTL SA, Польша, или аналогичные).
- Амплификатор (например, БИС M111-02-48, ООО «БИС-Н», Россия, или аналогичный).
- Охлаждающий штатив, поддерживающий температуру +4°C, для пробирок 0,2 мл, стрипов и планшетов, 1,5-2 мл (например, IsoFreeze, SSIbio, США, или аналогичный).
- Магнитный штатив для работы с пробирками объемом 0,2 мл (например, магнитный штатив MagTech24 для выделения РНК и ДНК, ООО «Совтех», Россия, или аналогичный).

- Штативы для пробирок разных объёмов (например, Axugen Inc., США, или аналогичные).
- Мини-центрифуга-вортекс (например, «Микроспин» FV-2400 SIA «Biosan», Латвия, или аналогичный).
- Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» (ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
- Камера для горизонтального электрофореза (например, «SE-2», ООО «Компания Хеликон», Россия, или аналогичная).
- Источник питания (например, «Эльф-4», ООО «НПО ДНК–Технология», Россия, или аналогичный).
- Трансиллюминатор (например, ECX-F20.M, Vilber Lourmat, Франция, или аналогичный).
- Холодильник с морозильной камерой от минус 18 до минус 25°C (например, ATLANT XM-6023-031, ЗАО «АТЛАНТ», Беларусь, или аналогичный).
- Льдогенератор (например, Scientz XB-20, Китай, или аналогичный).
- Флуориметр (например, Qubit, США, или аналогичный).

4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

- Контейнер одноразовый, пластиковый для сброса отходов (например, «ЕК-01», ООО «КМ-ПРОЕКТ», Россия, или аналогичный).
- Пробирки микроцентрифужные градуированные, объёмом 0,2 и 1,5 мл (Axugen Inc., США, или аналогичные).
- Наконечники для дозаторов универсальные с фильтром, разных объёмов (например, Axugen Inc., США, или аналогичные).
- Перчатки медицинские одноразовые неопудренные нитриловые или латексные (например, TG MEDICAL Sdn. Bhd., Малайзия, или аналогичные).
- Спирт этиловый медицинский 95% (любой производитель).
- Агароза (cat # AGAF0500, MP Biomedicals, LLC, США, или аналогичная).
- Маркер для электрофореза (например, 100 b.p. DNA ladder, BIORON GmbH, Германия, или аналогичный).
- Этидий бромид 1% раствор (любой производитель).
- ТAE-буфер для электрофореза (любой производитель)
- Магнитные частицы для очистки ДНК из реакционной смеси (например, AMPure XP, Beckman Coulter)

- Набор Qubit dsDNA BR Assay для количественного определения ДНК (2–1000нг) (Thermo Scientific, США)

5 Материал для полногеномной амплификации

В качестве материала для проведения полногеномной амплификации используется от 15 до 500 пг геномной ДНК млекопитающих, полученной из малого количества клеток. Для исследования подходят клеточные культуры, клетки трофобласта, клетки амниона. Образцы клеточного материала должны быть ресуспендированы в фосфатно-солевом буфере, объем используемого образца не должен превышать 2,5 мкл.

6 Проведение полногеномной амплификации

6.1 Лизис клеток

- 6.1.1 Приготовить образцы клеток в 1х фосфатно-солевого буфере (не входит в состав набора) в пробирках на 0,2 мл (используемый объем образца не должен превышать 2,5 мкл). Довести объем образца до 5 мкл Буфером для лизиса (красная крышка).

ВАЖНО! При добавлении буфера к клеткам не погружать наконечник глубоко в жидкость, не пипетировать и не вортиксировать образец, т.к. это может привести к удалению клеток из образца.

- 6.1.2 Приготовить положительные контрольные образцы ПКО1 и ПКО2 из контрольной ДНК (схема разведения представлена на Рисунке 1).

- Добавить 2 мкл контрольной ДНК (розовая крышка) к 98 мкл воды для ПЦР (голубая крышка), перемешать на вортексе и сбросить капли на микроспине.
- Затем приготовить ПКО1 (25 пг/мкл) – добавить 5 мкл полученной смеси к 195 мкл воды для ПЦР, перемешать на вортексе и сбросить капли на микроспине.
- Приготовить ПКО2 (5 пг/мкл) – добавить 30 мкл ПКО1 к 120 мкл воды для ПЦР, перемешать на вортексе и сбросить капли на микроспине.
- Поместить по 3 мкл соответствующего контроля в пробирку на 0,2 мл и добавить по 2 мкл Буфера для лизиса.

ВАЖНО! Для каждой новой постановки реакции необходимо готовить свежие ПКО1 и ПКО2.

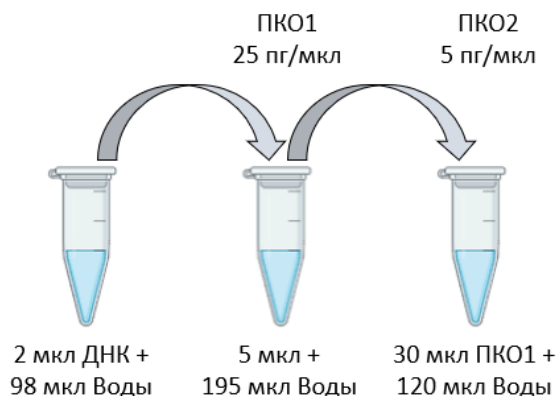


Рисунок 1. Схема приготовления PKO1 и PKO2.

6.1.3 Приготовить отрицательный контрольный образец ОКО, для этого поместить в пробирку на 0,2 мл 3 мкл Воды для ПЦР и 2 мкл Буфера для лизиса.

Опционально: приготовить отрицательный контрольный образец с буфером, использованным для подготовки образцов клеток – ОКБ, для этого в пробирку на 0,2 мкл поместить 2,5 мкл фосфатно-солевого буфера и 2,5 мкл Буфера для лизиса.

6.1.4 Приготовить смесь для лизиса согласно таблице 2 и добавить по 5 мкл полученной смеси в пробирки с образцами.

ВАЖНО! Здесь и далее по протоколу перед замешиванием смеси соответствующий буфер необходимо полностью разморозить и перемешать.

ВАЖНО! Здесь и далее по протоколу фермент следует доставать непосредственно перед добавлением в реакционную смесь, при работе с ферментом использовать штатив с охлаждением (-20°C) или лед, не допускать нагревания фермента.

ВАЖНО! При добавлении смеси к клеткам не погружать наконечник глубоко в жидкость, не пипетировать и не вортиксировать образец.

Таблица 2. Состав смеси для лизиса

Наименование реагента	Цвет крышки пробирки		Объем на одну реакцию, мкл	Объем на N реакций, мкл (с учетом ошибки пипетирования)
Буфер для лизиса		красный	4	N*4*1,1
Фермент для лизиса		фиолетовый	1	N*1,1

6.1.5 Поместить пробирки в термоциклер и провести лизис по программе, представленной в таблице 3. Температура крышки термоциклера должна быть 105°C.

Таблица 3. Программа лизиса клеток

Температура	Время инкубации
56°C	15 минут
95°C	15 минут
22°C	Хранение

6.1.6 Достать пробирки и центрифугировать при 1000 gcf (или на микроспине) в течение 30 секунд, чтобы сбросить капли жидкости, а затем поместить пробирки в охлаждающий штатив (+4°C) и переходить к следующему этапу – преамплификации ДНК (п.п. 6.2.)

6.2 Преамплификация

6.2.1 Приготовить смесь для преамплификации согласно таблице 4 и добавить по 5 мкл полученной смеси в каждую пробирку.

ВАЖНО! Не пипетировать и не вортексировать образцы.

Таблица 4. Состав смеси для преамплификации

Наименование реагента	Цвет крышки пробирки		Объем на одну реакцию, мкл	Объем на N реакций, мкл (с учетом ошибки пипетирования)
Буфер для преамплификации		желтый	3,8	N*3,8*1,1
Фермент для преамплификации		синий	1,2	N*1,2*1,1

6.2.2 Поместить пробирки в термоциклер и провести преамплификацию по программе, представленной в таблице 5. Температура крышки термоциклера должна быть 105°C.

Таблица 5. Программа преамплификации

Этап	Температура	Время	Количество циклов
Денатурация	92°C	2 мин	1
Денатурация	92°C	20 сек	12
Отжиг	30°C	1 мин	
Элонгация	68°C	2 мин *Скорость изменения температуры 0,3°C/сек	
Хранение	4°C	∞	

6.2.3 Достать пробирки и центрифугировать при 1000 gcf (или на микроспине) в течение 30 секунд, чтобы сбросить капли жидкости, а затем поместить пробирки в охлаждающий штатив (+4°C) переходить к следующему этапу – амплификации библиотек (п.п. 6.3.)

6.3 Амплификация

6.3.1 Приготовить смесь для преамплификации согласно таблице 6 и добавить по 35 мкл полученной смеси к продуктам преамплификации.

Таблица 6. Состав смеси для амплификации

Наименование реагента	Цвет крышки пробирки		Объем на одну реакцию, мкл	Объем на N реакций, мкл (с учетом ошибки пипетирования)
Буфер для амплификации		зеленый	31	N*31*1,1
Фермент для амплификации		оранжевый	4	N*4*1,1

6.3.2 Аккуратно перемешать образцы пипетированием, не создавая пузырей воздуха. Для каждого образца использовать новый наконечник.

6.3.3 Поместить пробирки в термоциклер и провести амплификацию по программе, представленной в таблице 7. Температура крышки термоциклера должна быть 105°C.

Таблица 7. Программа амплификации

Этап	Температура	Время	Количество циклов
Денатурация	92°C	2 мин	1
Денатурация	92°C	20 сек	5
Отжиг	62°C	20 сек	
Элонгация	68°C	40 сек	
Денатурация	92°C	20 сек	13
Отжиг и элонгация	68°C	60 сек	
Финальная элонгация	68°C	3 мин	1
Хранение	4°C	∞	

6.3.4 Достать пробирки и центрифугировать при 1000 gcf (или на микроспине) в течение 30 секунд, чтобы сбросить капли жидкости, а затем приступить к очистке полученных продуктов. Очистку продукта из реакции полногеномной амплификации следует проводить с использованием магнитных частиц для очистки из реакции, в соответствии с рекомендациями производителя.

Примечание: на этом этапе можно сделать паузу в протоколе, хранить полученные библиотеки до последующей очистки следует при -20°C.

Примечание: результат полногеномной амплификации зависит от качества исходных образцов ДНК, ожидаемый размер получаемых фрагментов от 250 до 1800 п.н., оценку качества продукта рекомендуется проводить при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле (30 минут, 120В).

Примечание: концентрацию полученных после очистки библиотек рекомендуется определять путем измерения при помощи флуориметра с использованием интеркалирующих красителей согласно рекомендациям производителя.

7 Условия хранения полученных образцов

Полученные продукты полногеномной амплификации рекомендуется хранить при -20°C , допускается хранение при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение суток.

8 Требования к транспортированию и хранению

- Транспортирование всех компонентов набора реагентов, осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре не выше минус 18°C . Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.
- Все компоненты набора реагентов следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 до минус 25°C в течение всего срока годности набора.
- Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

9 Указания по применению

- Набор реагентов должен применяться согласно инструкции по применению.
- В процессе постановки эксперимента компоненты набора рекомендуется хранить на льду или в охлаждающем штативе ($+4^{\circ}\text{C}$).
- Следует избегать излишних (более пяти) циклов замораживания-размораживания Буферов и Контрольной ДНК. Если набор предполагается использовать на длительном промежутке времени с постановкой небольшого количества реакций, вышеперечисленные реактивы рекомендуется предварительно разделить на аликвоты.
- Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

10 Требования к утилизации

- При использовании набора реагентов образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.
- Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и неиспользованные реактивы относятся к

классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

- Упаковка набора реагентов (коробки картонные) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

11 Гарантийные обязательства

- Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям нормативной и технической документации в течении указанного срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- Срок годности набора реагентов – 6 месяцев со дня выпуска при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.
- Рекламации по вопросам качества набора реагентов «sc WGA Display v2» следует направлять в ООО «БиоЛинк» по адресу: 630090 г. Новосибирск, ул. Николаева, 13. Тел: +7 (383)209-32-40, e-mail: info@biolinklab.ru

12 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы:

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Обратитесь к инструкции по применению		Дата изготовления (месяц, год)
	Только для исследовательских целей		Использовать до (месяц, год)
			Изготовитель

Производство: ООО «БиоЛинк»

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

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru