

ExtractDNA FFPE

Набор реактивов для выделения ДНК из образцов FFPE

Номер по каталогу

ВС103 — на 50 выделений ДНК

Инструкция по применению

Назначение

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Не для применения в медицине и ветеринарии.

Набор ExtractDNA FFPE предназначен для выделения ДНК из срезов с FFPE-блоков (отдельных или стеклопрепаратов), а также из цитологических стеклопрепаратов.

Метод

Депарафинизация с помощью термического воздействия и разделения фаз, лизис ткани, протеиназная обработка и экстракция ДНК в водный раствор. Сорбция и очистка ДНК на колонке.

Основные характеристики

Депарафинизация	Нетоксичная (без применения органических растворителей)
Рекомендации к биологическому материалу	Для срезов FFPE: – толщина срезов 5-6 мкм, – суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани от 2 см ² , – суммарная площадь срезов, используемых для выделения ДНК, до 8 см ² Для цитологических стеклопрепаратов: – количество клеток от 80 тысяч на 1 выделение
Общее время выделения	От 3 часов 30 минут, время ручной работы от 45 минут
Возможные применения выделенной ДНК	Пригодна для ПЦР, ПЦР-РВ, ферментативных реакций, пробоподготовки для секвенирования по методу Сэнгера и NGS-секвенирования
Срок годности выделенной ДНК	До 1 года в морозильной камере (от -25 до -15 °С)

Количество выделений

50 выделений ДНК.

Хранение и транспортировка

«Раствор ДПП» хранить и транспортировать при температуре от -25 до -15 °С; остальные компоненты — при комнатной температуре.

Срок годности

12 месяцев с даты производства при соблюдении условий хранения и транспортировки.

Техническая поддержка

md-support@evrogen.ru

Оглавление

I. Назначение.....	5
II. Метод.....	5
III. Основные характеристики	5
IV. Количество выделений	7
V. Состав набора	7
VI. Хранение и транспортировка	7
VII. Срок годности.....	7
VIII. Необходимые дополнительные материалы и оборудование.....	8
IX. Биологический материал.....	8
X. Протокол.....	9
XI. Особенности выделенной ДНК	13
XII. Приложение	14
XIII. Ограничение использования	15

I. Назначение

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Не для применения в медицине и ветеринарии.

Набор ExtractDNA FFPE предназначен для выделения ДНК из срезов с FFPE-блоков и цитологических стеклопрепаратов.

Выделенная ДНК пригодна для последующего анализа методами ПЦР, ПЦР-РВ, для ферментативных реакций, пробоподготовки для секвенирования по Сэнгеру и NGS-секвенирования.

II. Метод

Схема этапов протокола представлена на рисунке 1 (стр. 6).

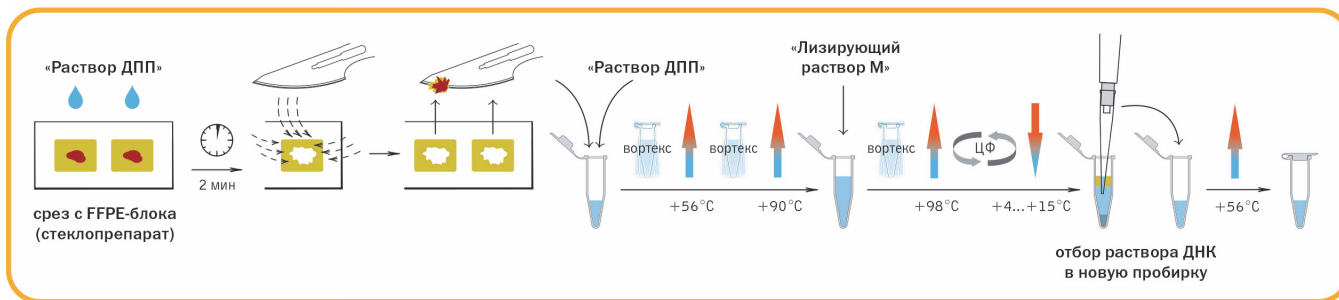
На первом этапе при повышенной температуре происходит депарафинизация методом разделения фаз, лизис ткани и её обработка протеиназой; ДНК переходит в водный раствор.

На втором этапе ДНК сорбируют на твердом носителе, запрессованном в колонку, и промывают для удаления возможных примесей. Очищенную ДНК элюируют буфером, в котором образцы могут храниться до одного года в морозильной камере.

III. Основные характеристики

Депарафинизация	Нетоксичная (без применения органических растворителей)
Рекомендации к биологическому материалу	Для срезов FFPE: <ul style="list-style-type: none">– толщина срезов 5-6 мкм,– суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани от 2 см²,– суммарная площадь срезов, используемых для выделения ДНК, до 8 см²
	Для цитологических стеклопрепаратов: <ul style="list-style-type: none">– количество клеток от 80 тысяч на 1 выделение
Общее время выделения	От 3 часов 30 минут, время ручной работы от 45 минут
Срок годности выделенной ДНК	До 1 года в морозильной камере (от -25 до -15 °С)

Первый этап



Второй этап

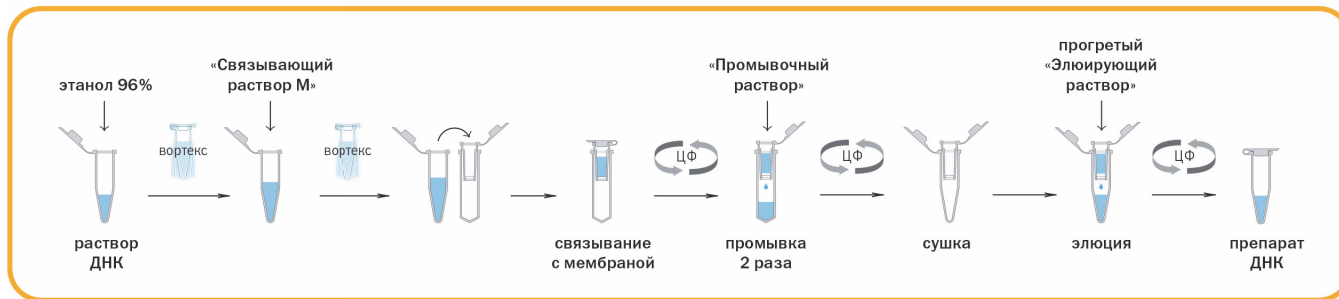


Рис. 1. Схема этапов протокола.

Первый этап – экстракция ДНК в водный раствор. Второй этап – очистка ДНК на колонке.

IV. Количество выделений

50 выделений ДНК.

V. Состав набора

Компонент	Объем/ Кол-во	Фасовка
УПАКОВКА №1 ИЗ 2		
Раствор ДПП	7.5 мл	5 пробирок по 1.5 мл
УПАКОВКА №2 ИЗ 2		
Лизирующий раствор М	12 мл	1 флакон
Связывающий раствор М	25 мл	1 флакон
Промывочный раствор (концентрат)	22 мл	1 флакон
Элюирующий раствор (5 mM Tris HCl pH 7.5)	6 мл	4 пробирки по 1.5 мл
Спин-колонки	50 шт.	1 пакет
Собирательные пробирки	200 шт.	1 пакет

К набору можно приобрести дополнительно

Расходные материалы	Кат. #
Лезвия одноразовые хирургические № 13 (50 шт.)	DM001
Микроцентрифужные пробирки емкостью 1.5 мл (100 шт.)	DM002

VI. Хранение и транспортировка

«Раствор ДПП» (упаковка №1 из 2) хранить и транспортировать при температуре от -15 до -25 °С; остальные компоненты наборов (упаковка №2 из 2) — при комнатной температуре (от +15 до +25 °С).

Размороженный «Раствор ДПП» может храниться при температуре +4 °С не более 2 недель.

VII. Срок годности

12 месяцев с даты производства при соблюдении условий хранения и транспортировки.

VIII. Необходимые дополнительные материалы и оборудование

Необходимое оборудование

- твердотельный термостат;
- бытовой холодильник с холодильной и морозильной камерами;
- настольная центрифуга для пробирок со скоростью вращения не менее 8 000 g;
- миницентрифуга – вортекс;
- автоматические дозаторы.

Необходимые расходные материалы

- стерильные одноразовые хирургические лезвия №13 (например, кат. # DM001, Евроген);
- микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл (например, кат. # DM002, Евроген);
- наконечники для дозатора с фильтрами;
- одноразовые неопудренные медицинские перчатки;
- этанол 96%.

Меры предосторожности

При работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

Все компоненты набора не токсичны для человека в используемых концентрациях.

«Лизирующий раствор М» и «Связывающий раствор М» при попадании в глаза и на кожу могут вызвать раздражение. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.

IX. Биологический материал

- стеклопрепараты и отдельные срезы с блоков, содержащие фиксированные формалином и залитые парафином фрагменты ткани (FFPE);
- цитологические препараты.

Рекомендации для срезов FFPE

- толщина каждого среза 5-6 мкм;
- суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани от 2 см² (см. рисунок 2);
- суммарная площадь срезов, используемая для выделения ДНК, включая фрагменты ткани и парафин, до 8 см².

ВНИМАНИЕ! ПРИ НИЗКОМ КАЧЕСТВЕ FFPE-БЛОКОВ ИЛИ ПРИ СУММАРНОЙ ПЛОЩАДИ ФРАГМЕНТОВ ФИКСИРОВАННОЙ ТКАНИ МЕНЕЕ 2 СМ² КОЛИЧЕСТВО ВЫДЕЛЕННОЙ ДНК СНИЖАЕТСЯ.

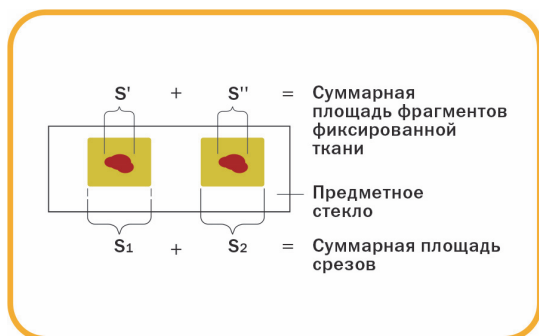


Рис. 2. Схема срезов с FFPE-блока

Рекомендации для цитологических стеклопрепаратов

- количество клеток – от 80 тысяч на 1 выделение.

Х. Протокол

1. Подготовка компонентов набора перед первым применением

Перед первым применением вскройте флакон с концентрированным «Промывочным раствором», добавьте 75 мл этилового спирта (96%).

Нанесите пометку на крышку флакона о выполнении операции.

При работе со стеклопрепаратами (FFPE или цитологическими) — см. п. 2.

При работе с отдельными срезами — см. п. 3.

2. Работа со стеклопрепаратами (FFPE или цитологическими)

а) Экстракция ДНК в водный раствор

Перед началом работы убедитесь, что на стеклопрепарате нет покровного стекла или заключающей среды.

2.1. Нанесите 30 мкл «Раствора ДПП» на поверхность предметного стекла в область, занятую биоматериалом. Равномерно распределите раствор по всей поверхности фрагмента ткани.

2.2. Инкубируйте 2 минуты.

2.3. Внесите 100 мкл «Раствора ДПП» в микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.

2.4. Отделите биоматериал (часть среза, заключающую фрагмент ткани) от поверхности стекла с помощью одноразового хирургического лезвия. По возможности избегайте захвата парафина. Для отделения биоматериала от стекла поскребите лезвием по поверхности срезов, затем соберите все отделившиеся фрагменты в один плотный комок.

2.5. Перенесите биоматериал в пробирку с «Раствором ДПП» с помощью одноразового хирургического лезвия. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.

2.6. Инкубируйте пробирку в термостате при +56 °С в течение 60 мин.

2.7. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.

2.8. Инкубируйте пробирку в термостате при +90 °С в течение 60 мин.

2.9. Внесите 100 мкл «Лизирующего раствора М» в ту же пробирку.

2.10. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.

2.11. Центрифугируйте пробирку для сбрасывания капель со стенок в течение 5 с.

2.12. Инкубируйте пробирку в термостате при +98 °С в течение 2 мин.

2.13. Центрифугируйте пробирку на скорости 10 000 g при комнатной температуре в течение 2 мин.

2.14. Поместите пробирку в холодильную камеру (от +4 до +15 °С) на 5 мин. После охлаждения в пробирке будет виден осадок, над ним — полупрозрачная жидкость, над ней — плотное кольцо из застывшего парафина.

2.15. С помощью наконечника для дозатора сместите в сторону кольцо из парафина или сделайте в нем отверстие. Отберите 180 мкл жидкости, стараясь не захватывать осадок и парафин, и поместите в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.

2.16. Инкубируйте пробирки в термостате при +56 °С в течение 30 мин.

б) Очистка ДНК на колонках

ВНИМАНИЕ! ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ НА ВСЕХ ЭТАПАХ ПРОВОДИТСЯ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В НАСТОЛЬНОЙ МИКРОЦЕНТРИФУГЕ НА СКОРОСТИ ОТ 8 000 ДО 10 000 g (НАПРИМЕР, ДЛЯ ЦЕНТРИФУГИ EPPENDORF MINISPIN: ОТ 11 000 ДО 12 000 ОБ/МИН) — СМ. ПРИЛОЖЕНИЕ.

2.17. Перед началом работы поместите пробирку с «Элюирующим раствором» в термостат на температуру +56 °С.

2.18. К выделенной ДНК, полученной на предыдущем этапе, добавьте 200 мкл этилового спирта (96 %). Тщательно перемешайте на вортексе.

2.19. Добавьте 400 мкл «Связывающего раствора М» в ту же пробирку. Тщательно перемешайте переворачиванием и на вортексе, пока раствор не станет гомогенным.

2.20. Поместите колонку в собирательную пробирку. Аккуратно перенесите 760 мкл содержимого пробирки в колонку, центрифугируйте в течение 30 с.

2.21. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

2.22. Добавьте 750 мкл «Промывочного раствора» в колонку и центрифугируйте 30 с. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

2.23. Повторите пункт 2.22.

2.24. Центрифугируйте колонку в собирательной пробирке 2 мин для полного удаления «Промывочного раствора».

2.25. Перенесите колонку в чистую пробирку объемом 1.5 мл.

2.26. Оставьте при комнатной температуре на 5 мин колонку с открытой крышкой для испарения остатка спирта.

2.27. Нанесите в центр мембраны колонки от 30 до 100 мкл прогретого «Элюирующего раствора». Закройте крышку колонки и инкубируйте в течение 3 мин при комнатной температуре.

2.28. Центрифугируйте колонку в пробирке 1 мин для сбора очищенной ДНК.

Для увеличения выхода ДНК можно разделить элюцию на два этапа: сначала нанести 30 мкл «Элюирующего раствора» и центрифугировать колонку с пробиркой в течение 30 с, затем нанести еще 30-70 мкл «Элюирующего раствора» в ту же колонку и центрифугировать в течение 1 мин.

ВНИМАНИЕ! НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ МЕНЕЕ 30 МКЛ «ЭЛЮИРУЮЩЕГО РАСТВОРА», ТАК КАК ИЗ-ЗА НЕПОЛНОГО СМАЧИВАНИЯ МЕМБРАНЫ КОЛОНКИ МОЖЕТ ПРОИЗОЙТИ ЧАСТИЧНАЯ ПОТЕРЯ ДНК.

Очищенная ДНК хранится до одного года при температуре от -15 до -25 °С.

3. Работа с отдельными FFPE-срезами

а) Экстракция ДНК в водный раствор

- 3.1. Поместите срезы с FFPE-блоков (см. раздел «Биологический материал») в микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.
- 3.2. Внесите 100 мкл «Раствора ДПП» в ту же пробирку. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- 3.3. Инкубируйте пробирку в термостате при +56 °С в течение 60 мин.
- 3.4. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- 3.5. Инкубируйте пробирку в термостате при +90 °С в течение 60 мин.
- 3.6. Внесите 100 мкл «Лизирующего раствора М» в ту же пробирку.
- 3.7. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- 3.8. Центрифугируйте пробирку для сбрасывания капель со стенок в течение 5 с.
- 3.9. Инкубируйте пробирку в термостате при +98 °С в течение 2 мин.
- 3.10. Центрифугируйте пробирку на скорости 10 000 g при комнатной температуре в течение 2 мин.
- 3.11. Поместите пробирку в холодильную камеру (от +4 до +15 °С) на 5 мин. После охлаждения в пробирке будет виден осадок, над ним — полупрозрачная жидкость, над ней — плотное кольцо из застывшего парафина.
- 3.12. С помощью наконечника для дозатора сместите в сторону кольцо из парафина или сделайте в нем отверстие. Отберите 180 мкл жидкости, стараясь не захватывать осадок и парафин, и поместите в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.
- 3.13. Инкубируйте пробирки в термостате при +56 °С в течение 30 мин.

б) Очистка ДНК на колонках

ВНИМАНИЕ! ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ НА ВСЕХ ЭТАПАХ ПРОВОДИТСЯ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В НАСТОЛЬНОЙ МИКРОЦЕНТРИФУГЕ НА СКОРОСТИ ОТ 8 000 ДО 10 000 g (НАПРИМЕР, ДЛЯ ЦЕНТРИФУГИ EPPENDORF MINISPIN: ОТ 11 000 ДО 12 000 ОБ/МИН) — СМ. ПРИЛОЖЕНИЕ.

- 3.14. Перед началом работы поместите пробирку с «Элюирующим раствором» в термостат на температуру +56 °С.
- 3.15. К выделенной ДНК, полученной на предыдущем этапе, добавьте 200 мкл этилового спирта (96 %). Тщательно перемешайте на вортексе.
- 3.16. Добавьте 400 мкл «Связывающего раствора М» в ту же пробирку. Тщательно перемешайте переворачиванием и на вортексе, пока раствор не станет гомогенным.

- 3.17. Поместите колонку в собирательную пробирку. Аккуратно перенесите 760 мкл содержимого пробирки в колонку, центрифугируйте в течение 30 с.
- 3.18. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.
- 3.19. Добавьте 750 мкл «Промывочного раствора» в колонку и центрифугируйте 30 с. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.
- 3.20. Повторите пункт 3.19.
- 3.21. Центрифугируйте колонку в собирательной пробирке 2 мин для полного удаления «Промывочного раствора».
- 3.22. Перенесите колонку в чистую пробирку объемом 1.5 мл.
- 3.23. Оставьте при комнатной температуре на 5 мин колонку с открытой крышкой для испарения остатка спирта.
- 3.24. Нанесите в центр мембраны колонки от 30 до 100 мкл прогретого «Элюирующего раствора». Закройте крышку колонки и инкубируйте в течение 3 мин при комнатной температуре.
- 3.25. Центрифугируйте колонку в пробирке 1 мин для сбора очищенной ДНК.

Для увеличения выхода ДНК можно разделить элюцию на два этапа: сначала нанести 30 мкл «Элюирующего раствора» и центрифугировать колонку с пробиркой в течение 30 с, затем нанести еще 30-70 мкл «Элюирующего раствора» в ту же колонку и центрифугировать в течение 1 мин.

ВНИМАНИЕ! НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ МЕНЕЕ 30 МКЛ «ЭЛЮИРУЮЩЕГО РАСТВОРА», ТАК КАК ИЗ-ЗА НЕПОЛНОГО СМАЧИВАНИЯ МЕМБРАНЫ КОЛОНКИ МОЖЕТ ПРОИЗОЙТИ ЧАСТИЧНАЯ ПОТЕРЯ ДНК.

Очищенная ДНК хранится до одного года при температуре от -15 до -25 °С.

XI. Особенности выделенной ДНК

Количество и качество ДНК, выделенной из биопробы, зависит от качества исходного материала (плотности клеток в образце, протокола фиксации, гистологической проводки и заливки образцов, давности хранения).

ДНК, выделенная из парафиновых блоков, обычно более фрагментирована, чем выделенная из свежих образцов тканей. Сильно фрагментированная и химически модифицированная ДНК, даже при относительно высокой концентрации, может не амплифицироваться в ПЦР. Для оценки содержания ДНК, пригодной для проведения ПЦР-анализа, рекомендуется воспользоваться наборами, основанными на ПЦР-РВ, например, для ДНК человека — наборами «QuantumDNA» (кат. # QS001, QS002, QS003, QS004, Евrogen).

XII. Приложение

1. Требования к подготовке образцов ткани в FFPE-блоках

- 1.1. При фиксации ткани формалином использовать 10 % нейтральный формалин (pH от 7.0 до 7.6).
- 1.2. Проводить фиксацию ткани формалином не дольше 24 часов.
- 1.3. Для декальцинации использовать реагенты только на основе EDTA.

ВНИМАНИЕ! ОБРАЗЦЫ ПОСЛЕ ДЕКАЛЬЦИНАЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУРАВЬИНОЙ ИЛИ АЗОТНОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НЕ ПРИГОДНЫ.

- 1.4. Работать в перчатках, внутри вытяжных или ламинарных шкафов, использовать одноразовые инструменты и расходные материалы.
- 1.5. Избегать соприкосновения фрагментов биологического материала друг с другом и с любым другим биологическим материалом.
- 1.6. Общий срок хранения фиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани (FFPE-блоки) не более 3 лет при температуре от +15 до +25 °С.
- 1.7. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять не менее 1 см², толщина среза — от 5 до 6 мкм, общая площадь среза не более 2.5 см².

Для получения срезов необходимо использовать микротом.

- 1.8. Срезы с парафиновых блоков должны быть помещены на предметное стекло, покрытое поли-L-лизинном (по 2 среза на одно предметное стекло), и прогреты при температуре от +56 до +60 °С в течение 3 часов.

ВНИМАНИЕ! НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПОКРОВНЫЕ СТЕКЛА.

- 1.9. При подготовке срезов с парафиновых блоков необходимо минимизировать риск кросс-контаминации образцов, для чего необходимо:
 - работать в одноразовых неопудренных перчатках;
 - проводить процедуру в ПЦР-боксе или в ламинарном шкафу;
 - использовать одноразовые лезвия для микротомы и стерильные пинцеты;
 - первые два среза с каждого блока выбрасывать, а для молекулярного исследования использовать срезы начиная с третьего;
 - не помещать срезы на водяную баню.

2. Рекомендации по выбору режима центрифугирования

Эффективность центрифугирования образца определяется относительным ускорением центрифуги (RCF, relative centrifuge force). Оно зависит от частоты вращения (RPM, rotation per minute) и радиуса центрифугирования. Относительное ускорение центрифуги (RCF) задается как кратное от ускорения свободного падения (g) и характеризует условия центрифугирования на любой центрифуге, вне зависимости от радиуса ротора.

Величины RCF и RPM связаны между собой следующей формулой:

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

где r — радиус ротора в см,

n — частота вращения в оборотах в минуту (RPM).

Например, для центрифуги Eppendorf MiniSpin радиус ротора равен 6 см, таким образом, 10 000 g переводится в 12 000 об/мин.

ВНИМАНИЕ! РОТОРЫ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЕЙ НАСТОЛЬНЫХ ЦЕНТРИФУГ ОБЛАДАЮТ РАЗНЫМ РАДИУСОМ, ПОЭТОМУ ОДИНАКОВОЕ КОЛИЧЕСТВО ОБОРОТОВ В МИНУТУ ДЛЯ РАЗНЫХ ЦЕНТРИФУГ БУДЕТ ПРИВОДИТЬ К РАЗНОМУ ОТНОСИТЕЛЬНОМУ УСКОРЕНИЮ, Т.Е. РАЗНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ. ИСПОЛЬЗУЙТЕ ПРИВЕДЕННУЮ ВЫШЕ ФОРМУЛУ ДЛЯ РАСЧЕТА ЧАСТОТЫ ВРАЩЕНИЯ RPM, ЕСЛИ ВАША ЦЕНТРИФУГА НЕ ПОЗВОЛЯЕТ УСТАНОВИТЬ УСКОРЕНИЕ RCF.

При работе с микроцентрифужными колонками относительное ускорение центрифуги (RCF) должно быть не ниже 8 000 g для эффективного центрифугирования — и не выше 10 000 g , чтобы не повредить мембрану колонки.

XIII. Ограничение использования

Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей.

Продукты и услуги компании Евроген

P — продукты

S — услуги

Молекулярная биология

Наборы для выделения и очистки нуклеиновых кислот **P**

Маркеры длин ДНК **P**

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **P**

Приготовление библиотек кДНК **P S**

Синтез кДНК и RACE **P S**

Клонирование ДНК **P S**

Нормализация кДНК **P S**

Практикум по генной инженерии **P**

Синтез олигонуклеотидов и зондов **S**

Секвенирование по Сэнгеру **S**

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**

Синтез генов **S**

Сайт-направленный мутагенез **S**

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

Клеточная биология

Выявление микоплазменной контаминации **P**

Флуоресцентные белки **P**

Генетически-кодированные сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**

Антитела против флуоресцентных белков **P**

Временная трансфекция клеточных линий **S**

Конструирование и сборка лентивирусных частиц **S**

Создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

Молекулярно-генетические исследования

Исследования в области молекулярной онкологии

и генетики наследственных заболеваний **S**

Техническая поддержка: oncology@evrogen.ru

**Подробную информацию о наших продуктах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru**

Евроген

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10

корпус 70 (Технопарк ИБХ)

Тел.: +7 (495) 988-4085

Факс: +7 (495) 988-4085

www.evrogen.ru