

ExtractDNA FFPE

Набор для выделения и очистки ДНК из образцов FFPE

Номер по каталогу:
BC103 — на 50 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	3
2. Состав	3
3. Условия хранения и транспортировки	3
4. Количество реакций	3
5. Метод	4
6. Основные характеристики	4
7. Меры предосторожности.....	4
8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы.....	5
9. Биологический материал	5
10. Протокол.....	5
11. Приложение	10

1. Назначение

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из срезов с FFPE-блоков. Очистка ДНК осуществляется на микроцентрифужных колонках.

Очищенная ДНК пригодна для последующего анализа методами ПЦР, ПЦР-РВ, для ферментативных реакций, пробоподготовки для секвенирования по методу Сэнгера и NGS.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Состав

Компонент	Количество
Упаковка №1 из 2	
Лизирующий раствор М	12 мл
Связывающий раствор М	25 мл
Промывочный раствор (концентрат)	20 мл
Элюирующий раствор	6 мл (4 x 1.5 мл)
Спин-колонки SCU-2 с крышками в комплекте с собирательными пробирками	50 шт.
Собирательные пробирки	150 шт. (3 x 50 шт.)
Упаковка №2 из 2	
Раствор ДПП	7.5 мл (5 x 1.5 мл)

3. Условия хранения и транспортировки

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

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

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

4. Количество реакций

Набор рассчитан на 50 выделений ДНК.

5. Метод

На первом этапе выделения ДНК при повышенной температуре происходит депарафинизация методом разделения фаз, лизис ткани и ее 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.

6. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Выход ДНК*	Короткие фрагменты: 1.4 ± 0.33 мкг, длинные фрагменты: 0.6 ± 0.15 мкг
Объем выделенного образца (элюат)	100 мкл
Емкость колонок	20 мкг
Депарафинизация	Нетоксичная (без применения органических растворителей)

* Выход ДНК зависит от качества срезов FFPE и их длительности хранения, количества парафина в срезе (уменьшение парафина снижает количество ингибиторов в препарате ДНК и увеличивает ее концентрацию), плотности клеток в образце, протоколов фиксации, гистологической проводки и заливки образцов. Значения в таблице получены на остаточных клинических образцах FFPE, в качестве биоматериала были использованы ткани селезенки. Выход ДНК определен с помощью наборов «QuantumDNA» (кат. ## QS001, QS002, QS003, QS004, Евроген).

7. Меры предосторожности

Компоненты набора «Лизирующий раствор М» и «Связывающий раствор М» содержат вещества, требующие обеспечения специальных мер безопасности:

- Хранить в плотно закрытой таре.
- Не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу.
- При попадании компонентов набора на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды.
- 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.

8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твёрдотельный термостат.
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением от 8 000 g.
- Вортекс.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Холодильник с камерой на +4 °C.
- Скальпель.
- Этанол 96%.

9. Биологический материал

Стеклопрепараты и отдельные срезы с блоков, содержащие фиксированные формалином и залитые парафином фрагменты ткани (FFPE). Требования к подготовке образцов ткани в FFPE-блоках и рекомендации по подготовке FFPE-срезов см. в Приложении на стр. 10.

10. Протокол

Общее время работы от 3.5 часов.

10.1. Подготовка растворов перед первым использованием

1.1. Добавьте 90 мл этилового спирта (96%) во флакон с концентрированным «Промывочным раствором».

Тщательно перемешайте раствор переворачиванием, нанесите пометку о выполнении операции на крышку флакона.

- При редком использовании набора не рекомендуется добавлять этанол в весь объем концентрата «Промывочного раствора». Непосредственно перед использованием отберите аликвоту концентрата в чистый флакон (260 мкл на 1 образец) и добавьте в него этанол (1 170 мкл на 1 образец). Тщательно перемешайте раствор переворачиванием.

- Внимательно следите за количеством израсходованного концентрата «Промывочного раствора», например, делайте отметки на флаконе и в конце инструкции на странице «Для заметок». Если вам понадобится добавить этанол ко всему оставшемуся объему концентрата «Промывочного раствора», то необходимое количество этанола следует рассчитать по формуле:

$$VE = (VW_{\text{исх}} - VW_{\text{расх}}) \times \frac{VE_{\text{исх}}}{VW_{\text{исх}}} \text{ (мл)},$$

где VE — объем этанола, который нужно добавить, $VW_{\text{исх}}$ — объем концентрата «Промывочного раствора», указанный на этикетке, $VW_{\text{расх}}$ — израсходованное количество концентрата «Промывочного раствора», $VE_{\text{исх}}$ — объем этанола по инструкции, см. п.1.1.

1.2. Если в флаконах с «Лизирующим раствором М» или «Связывающим раствором М» образовался осадок, то перед началом работ прогрейте флаконы при температуре от +37 до +50 °С до полного растворения осадка.

10.2. Подготовка биоматериала

Проведите подготовку биоматериала в зависимости от типа FFPE-срезов.

А. Стеклопрепараты FFPE.

- Перед началом работы убедитесь, что на стеклопрепарате нет покровного стекла или заключающей среды.
- Нанесите 30 мкл «Раствора ДПП» на поверхность предметного стекла в область, занятую биоматериалом. Равномерно распределите раствор по всей поверхности фрагмента ткани.
- Инкубируйте 2 минуты.
- Внесите 100 мкл «Раствора ДПП» в микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.
- 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.
- Перенесите биоматериал в пробирку с «Раствором ДПП» с помощью одноразового хирургического лезвия. Перемешайте содержимое пробирки на вихре в течение 3 с.
- Далее следуйте протоколу, начиная с п. 2.1.

Б. Отдельные FFPE-срезы.

- Поместите срезы с FFPE-блоков (см. раздел «Биологический материал») в микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.
- Внесите 100 мкл «Раствора ДПП» в ту же пробирку. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- Далее следуйте протоколу, начиная с п. 2.1.

- 2.1. Инкубируйте пробирку в термостате при +56 °C в течение 60 мин.
- 2.2. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- 2.3. Инкубируйте пробирку в термостате при +90 °C в течение 60 мин.
- 2.4. Внесите 100 мкл «Лизирующего раствора М» в ту же пробирку.
- 2.5. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- 2.6. Центрифугируйте пробирку в течение 5 с для сбрасывания капель со стенок.
- 2.7. Инкубируйте пробирку в термостате при +98 °C в течение 2 мин.
- 2.8. Центрифугируйте пробирку на скорости 10 000 g при комнатной температуре в течение 2 мин.
- 2.9. Поместите пробирку в холодильную камеру (+4 °C) на 5 мин. После охлаждения в пробирке будет виден осадок, над ним — полупрозрачная жидкость, над ней — плотное кольцо из застывшего парафина.
- 2.10. 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.
- 2.11. Инкубируйте пробирки в термостате при +56 °C в течение 30 мин.

10.3. Выделение ДНК

ВНИМАНИЕ! Все дальнейшие центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

- *Перед началом работы поместите пробирку с «Элюирующим раствором» в термостат на температуру +56 °C.*

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

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

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

3.4. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

3.5. Добавьте 700 мкл «Промывочного раствора» в колонку и центрифугируйте 30 с. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

3.6. Повторите пункт 3.5.

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

3.8. Перенесите колонку в чистую пробирку объемом 1.5 мл.

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

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

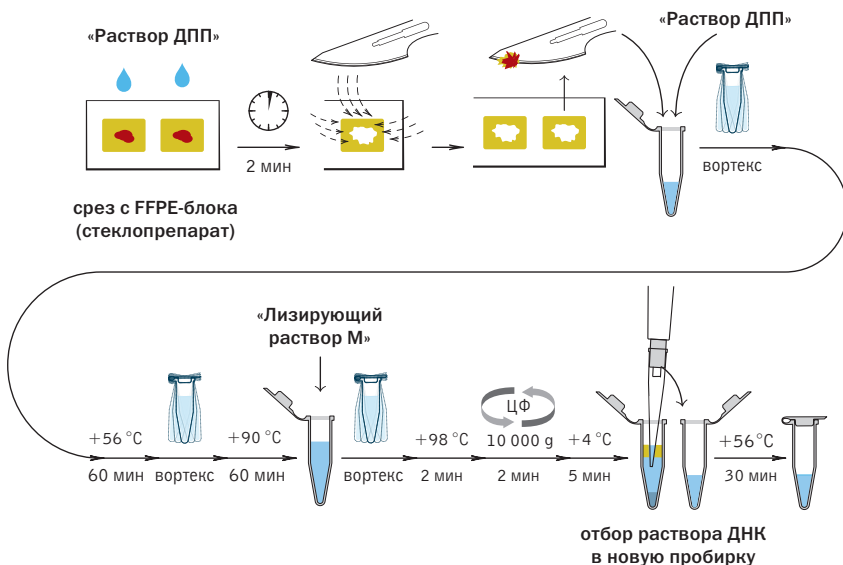
3.11. Центрифугируйте колонку в пробирке 1 мин для сбора очищенной ДНК.

► 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 70 мкл «Элюирующего раствора» в ту же колонку и центрифугировать в течение 1 мин.

Очищенная ДНК хранится при температуре -20°C до 1 года.

► Перед использованием выделенной ДНК рекомендуется провести оценку качества ДНК с помощью наборов «QuantumDNA» (кат. ## QS001, QS002, QS003, QS004, Евроген).

Первый этап



Второй этап

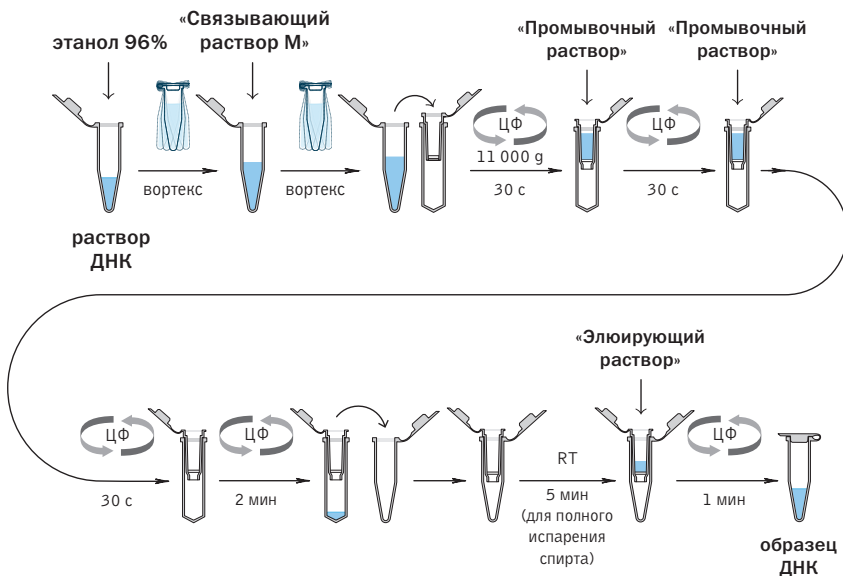


Рисунок 1 – схема выделения ДНК.

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

11. Приложение

11.1. 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 молекулярно-генетического 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 °C.
- 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.
- 1.8. Для получения срезов необходимо использовать микротом.
- 1.9. 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 °C в течение 3 часов.

ВНИМАНИЕ! Не использовать покровные стекла.

- 1.10. 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.

11.2. Рекомендации по подготовке FFPE-срезов

- 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.

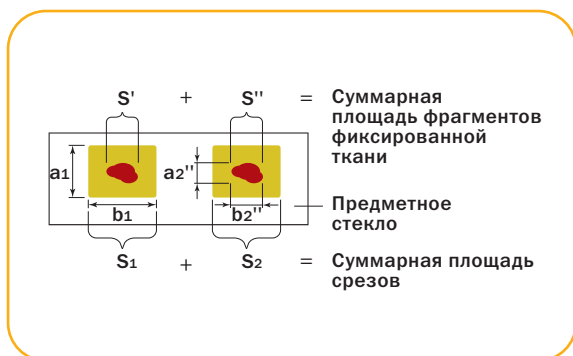


Рисунок 2 – схема срезов с FFPE-блока.

Наборы и сервисы Евроген

    – ссылка на страницу
НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот   

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ  

Синтез и амплификация кДНК   

Клонирование ДНК      

Выявление контаминации микоплазмой   

Оценка ДНК   

Нормализация кДНК   

Практикум по генной инженерии   

Генотипирование   

Синтез олигонуклеотидов и зондов   

Секвенирование по Сэнгеру   

Синтез генов   

Сайт-направленный мутагенез   

Консультация по продуктам: *support@evrogen.ru*

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

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru