



Набор «ФБиоНуклео»
для выделения
нуклеиновых кислот из
биологического материала
(НК-1-50/100, на 50/100 реакции)

Дата изменения: 05.08.2020

Содержание

Компоненты набора.....	3
Описание	3
Ограничения на использование набора.....	4
Гарантия	4
Меры предосторожности	4
Принцип действия	5
Необходимое оборудование и материалы.....	7
Забор и предварительная подготовка образцов.....	7
Важные замечания.....	9
Протокол выделения	9
Условия и срок хранения	11

Компоненты набора

Набор «ФБиоНуклео»	На 50 выделений	На 100 выделений
Центрифужные колонки с силикатной мембраной	50 шт.	100 шт.
Буфер ПГ*	17,5 мл	37 мл
Буфер ОБ	25 мл	50 мл
Буфер П1 *	24 мл	48 мл
Буфер П2 (концентрированный)	8,75 мл	17,5 мл
Буфер П3 (концентрированный)	8,75 мл	17,5 мл
Буфер ЕБ	13 мл	30 мл
Собирающие пробирки	50 шт.	100 шт.

*Буферы ПГ и П1 содержат хаотропные соли, которые являются раздражителями. Соблюдайте необходимые меры безопасности при работе в лаборатории, используйте перчатки.

Описание

Набор «ФБиоНуклео» разработан для выделения до 50 мкг нуклеиновых кислот (НК) из биологического материала (кровь, сухие пятна крови, биологические жидкости (мокрота, моча, слюна, ликвор, синовиальная жидкость, сперма, секрет предстательной железы, мазки, смывы и соскобы) клетки буккального эпителия, фекалии, культура клеток).

Максимальная связывающая способность	50 мкг НК
Минимальный объем элюции	15 мкл
Объем колонки	800 мл
Выделяемая НК	ДНК, РНК

Таблица 1. Технические характеристики набора

Набор «ФБиоНуклео» обеспечивает эффективное и чистое выделение нуклеиновых кислот для прямого использования в различных целях (например, рестрикция, ПЦР, гибридизация и т.д.).

Набор рассчитан на проведение 50 выделений ДНК/РНК, включая контроли.

Ограничения на использование набора

Набор «ФБиоНуклео» разработан и продается исключительно в научных целях. Набор не может быть использован в медицинских или в лечебных целях.

Гарантия

Фрактал Био гарантирует изготовление всех продуктов согласно описанию в руководстве. Покупатель должен определить соответствие продукта для конкретного его использования. Если продукт не дает заявленного результата по любой причине, за исключением неправильного использования, мы бесплатно произведем замену продукта или вернем покупателю его полную стоимость. Мы сохраняем за собой право изменять или модифицировать любой продукт в целях улучшения его применения и дизайна. Если у вас возникли вопросы по применению продукта или оценке результата, вы можете обращаться в Службу технической поддержки (см. Служба технической поддержки).

Меры предосторожности

- При работе с набором «ФБиоНуклео» необходимо соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981) и СП 1.3.2322-08, СП 1.3.3118-13.
- При работе с реактивами всегда используйте верхнюю лабораторную одежду, одноразовые перчатки и защитные очки.
- При работе следует использовать только стерильные пробирки и наконечники с фильтрами.
- Использованный расходный материал должен сбрасываться в специальную ёмкость с дезинфицирующим раствором.

- Буфер ПГ содержит раздражитель - гуанидин тиоционат (**Xn** вреден для здоровья), буфер П1 - гуанидин гидрохлорид (**Xn** вреден для здоровья). Необходимо соблюдать осторожность при обращении с данным реагентом. Полную информацию о рисках и мерах предосторожности можно найти в паспорте безопасности вещества:

Буферы ПГ и П1	
Факторы риска:	
R20/21/22	Вреден при вдыхании, контакте с кожей и проглатывании
R32	Контакт с кислотами приводит к выделению крайне токсичного газа
Меры предосторожности:	
S13	Хранить отдельно от продуктов питания, животного корма
S26	В случае попадания в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу
S36	Использовать соответствующую защитную одежду
S46	При проглатывании немедленно обратиться за медицинской помощью

Принцип действия

Система для выделения «ФБиоНуклео» объединяет удобство использования центрифужных колонок со специфическими связывающими свойствами силикатной мембраны. Специальные буферы в составе набора являются оптимальными для эффективного извлечения нуклеиновых кислот и удаления контаминантов. Нуклеиновые кислоты связываются с силикатной мембраной при высокой концентрации соли, в то время как контаминанты проходят сквозь колонку. Нуклеиновые кислоты элюируются буфером, содержащим Трис (рН 8,5) или водой.

1. Лизис клеток

Лизис клеток происходит за счёт содержащегося в буфере ПГ гуанидин тиоционата. Клеточные оболочки осаждаются центрифугированием, а супернатант, содержащий НК, переносится на центрифужную колонку с силикатной мембраной.

2. Связывание нуклеиновых кислот с силикатной мембраной

Силикатная мембрана колонок предназначена исключительно для очистки НК из водных растворов и может связывать до 45 мкг НК. Связывающий буфер в наборе «ФБиоНуклео» обеспечивает соответствующую концентрацию соли и рН для связывания НК с мембраной колонки. Связывание нуклеиновых кислот с силикатной поверхностью происходит только при наличии высокой концентрации хаотропных солей.

Связывание НК с силикатной мембраной также зависит от рН. При $pH \leq 7,5$ связывается около 95% НК. При более высоких значениях рН связывание резко снижается.

3. Очистка нуклеиновых кислот

На этапе связывания НК примеси (соли, ферменты, нуклеотиды) не адсорбируются на силикатной мембране и проходят сквозь колонку. Соли отмываются буфером ПЕ, содержащим этанол. Остаточные количества буфера ПЕ, которые могут ингибировать последующие энзиматические реакции, удаляются дополнительным этапом центрифугирования.

4. Эффективность элюции

Эффективность элюции сильно зависит от рН элюирующего буфера и концентрации соли в нем. В противоположность связыванию элюция наиболее эффективна при основном рН и низкой концентрации солей. НК элюируются 100 мкл буфера ЕБ (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) или воды. Максимальная эффективность элюции достигается при рН в диапазоне 7,5-8,5. НК, элюированные водой, должны храниться при $-20^{\circ}C$, так как НК могут деградировать при отсутствии буферного агента. Элюция буфером ТЕ не рекомендуется, так как ЭДТА может ингибировать последующие энзиматические реакции.

5. Эффективность выделения НК

Качество и количество выделенных НК зависит от 3-х факторов: объем элюирующего буфера, точность нанесения буфера на колонку и время инкубации буфера на колонке. 100-200 мкл элюирующего буфера полностью покрывают мембрану колонки, обеспечивая максимальное извлечение НК, даже если нанесены не на центр мембраны. Элюция объемом менее 50 мкл требует добавления буфера ровно на центр мембраны и, если элюция проводится минимальным рекомендуемым объемом 15 мкл, дополнительной инкубации в течение 1 минуты для оптимального извлечения.

Эффективность выделения может быть определена путем проведения электрофореза проб в агарозном геле.

Необходимое оборудование и материалы

Организация работы лаборатории должна соответствовать методическому указанию МУ 1.3.2569-09.

Для работы с набором «ФБиоНуклео» необходимы следующие оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Этанол (96-100%)
- Дистиллированная вода (при необходимости)
- Набор дозаторов, одноканальных с переменным объёмом
- Штативы для наконечников и микропробирок
- Одноразовые наконечники с фильтрами для дозаторов с маркировкой
- Одноразовые полипропиленовые микропробирки объёмом 1,5-2 мл
- Ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованного расходного материала
- Микроцентрифуга

Забор и предварительная подготовка образцов

Забор материала, его предварительная обработка, хранение и перевозка осуществляется в соответствии с СП 1.2.036-95, СП 1.3.3118-13 и (или) СП 1.3.2322-08.

Культура клеток

Для выделения используется культура клеток плотностью приблизительно 3×10^9 клеток/мл. Клетки осаждаются центрифугированием в течение 3 мин при 8000 об/мин (6800xg) и комнатной температуре (15-25° С). Затем осторожно удаляется надосадочная жидкость. На одно выделение берётся не более 50 мкл осадка клеток, который ресуспендируется в 100 мкл воды.

Ткань

При выделении из тканей используют соскоб с поверхности ткани. Объем соскоба - 1-2 спичечных головки. Взятый соскоб помещают непосредственно в буфер ПГ.

Кровь

Кровь отбирается в стерильные микропробирки с ЭДТА (2 мг/мл) в качестве антикоагулянта. После взятия материала пробирку следует перевернуть 2-3 раза. На выделение используется 50 мкл крови.

Биологические жидкости

Биологические жидкости (мокрота, моча, ликвор, синовиальная жидкость, сперма, секрет предстательной железы) отбираются в стерильные ёмкости. Мазки, смывы, слюна и соскобы отбираются стерильными зондами с ватными тампонами в одноразовые пробирки с физиологическим раствором (0,5 – 1 мл). Если содержание материала в растворе высокое (раствор мутный, непрозрачный), то для выделения НК достаточно 100 мкл пробы. Если содержание материала низкое (раствор прозрачный), то следует весь объём пробы сконцентрировать центрифугированием в течение 3-х минут при 13 000 об/мин. Затем осторожно удалить супернатант, оставив над осадком 100 мкл жидкости. Осадок в оставшейся жидкости использовать для выделения НК.

Буккальный (защёчный) эпителий

Перед взятием клеток эпителия не следует есть и пить в течение 20 мин. Забор материала осуществляется стерильной ватной палочкой/тампоном или щеточкой с внутренней стороны щеки, вращательными движениями. После забора материала тампон помещается в стерильную одноразовую пробирку с водой (200 мкл). Клетки суспендируются вращательными движениями, затем ватную палочку следует извлечь из микропробирки, отжав воду о стенку микропробирки. В пробирке должно остаться около 100 мкл жидкости.

Фекалии

Из фекалий готовится 10% суспензия на стерильном физиологическом растворе. Суспензия центрифугируется 3 минуты при 1000 об/мин. На выделение берётся 100 мкл надосадочной жидкости.

Выделение нуклеиновых кислот

Важные замечания

- Добавьте по **16,25** мл (50 выделений) или по **32,5** мл (100 выделений) этанола (96%) во флакон с концентратами буферов П2 и П3 перед первым их использованием, поставьте галочки на крышках флаконов.
- Центрифугирование в каждом шаге выделения осуществляется при 13000 об/мин (17900xg) в стандартной настольной микроцентрифуге при комнатной температуре.
 - Проверьте буферы на наличие осадка перед использованием. Если в буферах образовался осадок, то необходимо его растворить нагреванием буферов до 37° С и перемешиванием непосредственно перед использованием. Убедитесь, что все буферы и центрифужные колонки имеют при использовании комнатную температуру.
 - Рекомендуется проводить **отрицательный контроль** – выделение из воды, и использовать его при последующих постановках обратной транскрипции и ПЦР
 - Данный протокол разработан для выделения тотальных НК из биологического материала.

Протокол выделения

	Действия
1	Добавьте 350 мкл буфера ПГ к отобранному материалу, 100 мкл пробы или 50 мкл крови. Тщательно перемешайте на вортексе.
2	Инкубируйте пробирки со смесью 5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая на вортексе. Примечание: на этом этапе пробы можно хранить сутки при комнатной температуре и продолжить выделение позже.

3	<p>Добавьте в пробирку 500 мкл буфера ОБ. Тщательно перемешайте. Инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.</p> <p>Примечание: на этом этапе пробы можно хранить сутки при комнатной температуре и продолжить выделение позже.</p>
4	<p>Проведите центрифугирование в течение 5 минут при 13000 об/мин.</p> <p>* Этот пункт необходим только при выделении из образцов с высоким содержанием биоматериала, которые могут засорить колонку: кровь, гомогенизат ткани, фекалии, мутные мазки. При выделении из образцов с низким содержанием биоматериала (прозрачные мазки, слюна, моча) осаждение клеточных оболочек после лизиса не обязательно.</p>
5	<p>Перенесите с помощью пипетки 700 мкл супернатанта на прилагаемую к набору центрифужную колонку. Избегайте взбалтывания и переноса осадка. Проведите центрифугирование в течение 60 с. Удалите сток и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.</p>
6	<p>Для отмывки добавьте 450 мкл буфера П1 на центрифужную колонку и проведите центрифугирование в течение 60 с. Удалите сток и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.</p>
7	<p>Важно! Убедитесь, что в буферы П2 и П3 буферы был добавлен этанол (См. Важные замечания).</p>
8	<p>Добавьте 450 мкл буфера П2 на центрифужную колонку и проведите центрифугирование в течение 60 с. Удалите сток и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.</p>
9	<p>Добавьте 450 мкл буфера П3 на центрифужную колонку и проведите центрифугирование в течение 60 с. Удалите сток и поместите колонку обратно в собирающую пробирку.</p>

10	Проведите дополнительное центрифугирование в течение 1 мин для удаления остатков буфера. Этот этап необходим для удаления остаточного этанола с мембраны колонки.
11	<p>Перенесите центрифужную колонку в чистый эппендорф. Для элюирования НК добавьте 100 мкл буфера ЕБ или воды в центр мембраны колонки и проведите центрифугирование в течение 1 мин.</p> <p>Важно: убедитесь, что буфер ЕБ наносится точно на мембрану для полной элюции связанной НК. Избегайте контакта наконечника пипетки с мембраной.</p> <p>Примечание: объём буфера ЕБ для элюции можно варьировать от 15 до 200 мкл в зависимости от поставленной задачи. При использовании наборов для ПЦР анализа “Фрактал Био” количество буфера ЕБ, необходимое для элюции, указано в инструкциях к соответствующим наборам.</p>
	НК хранить при -20° С .

Условия и срок хранения

Набор «ФБиоНуклео» следует хранить в сухом месте при комнатной температуре (15-25° С). Набор может храниться до 12 месяцев без изменения качественных характеристик.

Транспортировку набора можно осуществлять всеми видами крытого транспорта.

Набор с истёкшим сроком годности использованию не подлежит.

Произведено: ООО “Фрактал Био”,
190020, г. Санкт-Петербург, ул. Бумажная, д. 17
сайт: fractalbio.com
E-mail: info@fractalbio.com
Контактный телефон/факс: (812) 495-96-95