**Рекомендации по работе с наборами для выделения ДНК производства ООО “ТестГен”.**

1. **Общие требования.**

Успешность работы и достоверность результатов анализов при работе с наборами производства «ТестГен» зависят от ряда факторов, которые прописаны в инструкциях и требуют строгого соблюдения.

Все манипуляции при использовании наборов следует проводить в спецодежде (одноразовом медицинском халате, шапочке, маске, перчатках). Необходима отдельная одежда в каждой рабочей зоне.

Перед работой вытяжной шкаф и оборудование протереть неткаными салфетками, смоченными антисептиком «Лизанол» или другим. Рекомендуемые дезсредства представлены в Методических указаниях 2009 г. (**МУ 1.3.2569-09**) (см. сайт [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru/) раздел «Информация. Нормативная документация») и включают:

- **Мистраль (амины).**

- **0,2%-ный раствор ДП-2Т** для ежедневной влажной уборки помещения **в конце рабочего дня, ежемесячной генеральной уборки и для деконтаминации**(Жавель).

**Не рекомендуется использовать хлорсодержащие средства во время работы по выделению нуклеиновых кислот и амплификации, так как это может привести к ингибированию ПЦР.**

При возникновении контаминации следует руководствоваться положениями приложения 3 методических указанийпоОРГАНИЗАЦИи РАБОТЫ ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕТОДОМ ПЦР МАТЕРИАЛА, ИНФИЦИРОВАННОГО ПАТОГЕННЫМИ
БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ III - IV ГРУПП ПАТОГЕННОСТИМУ МУ 1.3.2569-09

Рабочие помещения должны подвергаться ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в конце рабочего дня. Необходимо использовать УФ-лампы открытого типа.

1. **Этап получения биоматериала.**

2.1. При выделении ДНК из плазмы крови наборами “ДНК-Плазма-М” и “ДНК-Плазма-М-RT” необходима пригодная для работы плазма крови.

Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с EDTA или CPDA. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в течение 2 суток без заморозки. При использовании EDTA следует отделить плазму в течение 2-3 часов с момента взятия крови. При использовании EDTA образец плазмы (не цельной крови!) должен доставляться в лабораторию в течение 16-24 ч после взятия материала (рекомендуется максимально ускорять доставку и осуществлять ее на льду или в термоконтейнерах при температуре - 20°С).

Пробирку с кровью нужно центрифугировать 10-15 мин при 2000-3000g, после чего аккуратно отобрать верхний слой плазмы и перенести его в отдельную одноразовую пробирку, избегая попадания в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами. Далее плазму центрифугировать 15 минут при 13000g или 10 минут при 16000g, вновь отобрать верхний слой в отдельную пробирку, не затрагивая осадка на дне пробирки. Полученную плазму можно использовать для выделения ДНК.

Выделять ДНК следует не менее чем из 1 мл плазмы и растворять в конечном объеме 50-80 мкл (конечный объём должен быть минимально необходимым для однократного анализа - при этом получается самая высокая концентрация ДНК).

**Условия хранения плазмы:**

- при температуре не выше 2−8 °С – в течение 5 суток;

- при температуре не выше минус 20°С – в течение месяца;

- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Не следует брать в работу гемолизированную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты.

**Условия хранения выделенной ДНК:**

При необходимости полученную ДНК можно хранить:

- при +4 °С – не более суток,

- при минус 20 – минус 40°С – не более месяца,

- при минус 86 °С – длительно.

2.2. Материалом для проведения процедуры выделения нуклеиновых кислотнабором “ДНК-Ткань-Ф” служит фиксированная в формалине и заключенная в парафин ткань (FFPE-блоки).

Для получения срезов необходимо использовать микротом. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять до 250 мм2, толщина среза — до 10 мкм.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать 2 среза с FFPE-блока.

При фиксации ткани формалином использовать 10% нейтральный формалин (рН от 7.0 до 7.6).

Проводить фиксацию ткани формалином не дольше 24 часов.

Для декальцинации использовать реагенты только на основе EDTA.

Образцы после декальцинации с применением муравьиной или азотной кислоты для молекулярного исследования не пригодны.

Работать в перчатках, внутри вытяжных или ламинарных шкафов, использовать одноразовые инструменты и расходные материалы.

Избегать соприкосновения фрагментов биологического материала друг с другом и с любым другим биологическим материалом.

Общий срок хранения фиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани (FFPE-блоки) не более 3 лет при температуре от +15 до +25°C.

**Критерии пригодности гистологических препаратов для выделения ДНК для**

**последующего молекулярно-генетического анализа опухолевых клеток:**

- по результатам морфологического исследования опухолевые комплексы должны

занимать не менее 60 % площади ткани в срезе с FFPE-блока.

- по результатам морфологического исследования зоны некроза и кровоизлияния в

совокупности должны занимать не более 15 % площади ткани в срезе с FFPE-блока.

В случае, если образец не соответствует хотя бы одному из перечисленных критериев,

рекомендуется использовать другой образец.

Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий

хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное

замораживание-оттаивание).

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 микротома и стерильные пинцеты;

- первые два среза с каждого блока утилизировать, а для молекулярного исследования

использовать срезы начиная с третьего;

- не помещать срезы на водяную баню.

**Условия хранения анализируемых образцов:**

- полученная ДНК должна храниться при температуре от +2°С до +8°С и

использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор

ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°C.

**Условия хранения фиксированных формалином и залитых**

**парафином образцов ткани:**

Общий срок хранения фиксированных формалином и залитых парафином образцов

ткани (FFPE-блоки) не более 3 лет при температуре от +15 до +25°C.

**Условия хранения исходного клинического материала:**

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;

- при температуре 2–8°С — в течение 3 суток;

- при температуре минус 20°С — в течение 1 недели;

- при температуре минус 70°С — длительно.

2.3. Материалом при работе с набором ДНК-Плант служат растительное сырье,

корма и продукты питания растительного происхождения. Оптимальным вариантом является выделение ДНК из свежеотобранных образцов. При невозможности провести выделение в течение суток образцы следует хранить в непропускающей влагу упаковке (например, полиэтиленовом пакете) в холодильнике при температуре +4 °C. При необходимости длительного хранения образцы необходимо засушить либо заморозить. В первом случае рекомендуется пассивная сушка при комнатной температуре. Использование нагревающих сушильных шкафов для ускорения высушивания существенно снижает выход ДНК. В случае, если выбран второй вариант, важно помнить, что после оттаивания образец должен быть обработан немедленно. Хранение или повторная заморозка размороженного образца крайне нежелательны. Из-за разрыва клеток кристаллами льда высвобождается

множество нуклеаз, вызывающих быструю деградацию ДНК. Перед внесением образца в пробирку для процедуры выделения ДНК его следует растереть в ступке или иным способом гомогенизировать до однородной консистенции.

**При необходимости полученную ДНК можно хранить:**

- при +4 °С – не более суток,

- при минус 20 – минус 40°С – не более месяца,

- при минус 70 °С – длительно.

1. **Этап подготовки наборов на выделение.**

- Расслоение или выпадение осадка не влияет на качество растворов. Если во флаконе образовался осадок, необходимо прогреть раствор при 60 °C до полного растворения осадка и гомогенизации раствора.

-В наборах ДНК-Плазма-RT и ДНК-Плант раствор для промывки №1 содержит SDS, который растворится только после добавления спирта. Для ускорения растворения осадка в случае необходимости, можно также прогреть раствор после добавления спирта.

Перед началом работы с набором следует приготовить Раствор Протеиназы К. Для этого следует перенести весь объем «Раствора для разведения протеиназы К» во флакон с сухой «Протеиназой К» и полностью растворить Протеиназу, закрыв крышку флакона и перемешав его. Далее раствор Протеиназы К хранится при -20оС. Используется по мере необходимости в пределах срока годности набора (6 месяцев). Раствор не замерзает при -20оС, достается из морозильной камеры непосредственно перед внесением в пробирку с плазмой, длительное хранение при комнатной температуре не допускается.

Перед началом работы с набором следует приготовить «Раствор для промывки №1» и «Раствор для промывки №2». Для этого следует добавить указанный в инструкции объем 95% этилового спирта к «Раствору для промывки №1» и «Раствор для промывки №2»

Приготовленные растворы в дальнейшем хранятся плотно закрытыми при комнатной температуре и используются согласно инструкции в пределах срока годности набора. Перед использованием растворы следует перемешать путем взбалтывания или переворачивая флакон. При наличии осадка растворить его, подогревая и перемешивая раствор. Во избежание испарения спирта и уменьшения объема раствора не следует надолго оставлять флакон открытым.

1. **Этап выделения ДНК.**

Протоколы выделения ДНК описаны в инструкциях к наборам. Следует максимально строго придерживаться пунктов протокола. Для более полного перемешивания компонентов смеси, ресуспендирования магнитных частиц и упрощения работы можно использовать вортекс (перемешать содержимое пробирки 3-5 раз по 2-5 секунд) вместо пипетирования. Для более полного удаления супернатанта желательно использовать вакуумный аспиратор. Необходимо максимально полно удалить промывочный раствор №2 после последней промывки. После выделения ДНК наборами на магнитных частицах пробирку следует оставить в магнитном штативе во избежание попадания остаточных магнитных частиц в реакционную смесь.

# Возможные проблемы и их решение

**5.1. Низкий выход ДНК**:

▪ неудовлетворительное состояние образца (в образце содержится недостаточное количество ДНК; образец долго хранился или неправильно хранился или несколько раз подвергался процедуре замораживания-оттаивания). Следует брать больше исходного материала или проводить элюцию в меньшее количество буфера; повторить сбор материала;

▪ неполное высушивание магнитных частиц (в наборах ДНК-Плазма-М, ДНК-Плазма-М-RT, ДНК-Плант) - перед добавлением элюента необходимо полностью удалять раствор для промывки №2; после инкубации обязательно проверять магнитные частицы на наличие остатков этилового спирта, о полном испарении этилового спирта говорит равномерный светло-коричневый цвет магнитных частиц.Остаточный этиловый спирт может снизить выход ДНК.

▪ неполный лизис ткани – после внесения буфера для связывания ДНК как можно тщательнее суспендировать образец. Забивание мембраны колонки также может быть вызвано неполным лизисом образца ткани. Следует увеличить время лизиса, дополнительно добавить раствор протеиназы К. В случае неполного лизиса образца ткани можно отцентрифугировать раствор в течении 5 минут при 6000g и перенести лизат в колонку, не затрагивая осадок.

▪ большой объем буфера для элюирования – подберите оптимальный объем буфера для получения нужной концентрации ДНК.

▪возможно Протеиназа K хранилась при высоких температурах в течение длительного времени. Необходимо повторить процедуру с использованием новых образцов и свежей Протеиназы К.

Перед проведением процедуры выделения из ткани следует убедиться, что образцы тщательно очищены. Остаточный формалин, ксилол, парафин могут ингибировать Протеиназу K.

▪ Недостаточная просушка мембраны спин-колонки перед элюированием ДНК. Необходимо полностью высушить мембрану перед элюированием ДНК, для этого центрифугировать спин-колонку при 12000g в течение 1 мин.

**5.2. Примеси белка и фрагментов клеточного дебриса:**

▪ Нужно добиваться максимально тщательного суспендирования магнитных частиц.

▪ Использование этилового спирта в концентрации ниже 95%. Следует повторить процедуру выделения с новыми образцами, используя 95% этиловый спирт. Нельзя использовать денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон.

▪ Неверная подготовка «раствора для промывки №1» и «раствора для промывки №2»

Необходимо убедиться, что концентрированные растворы для промывки №1 и №2 были разбавлены необходимым количеством этилового спирта 95%.

При кристаллизации одного из растворов необходимо прогреть флакон с раствором при 60°C и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов и гомогенизации раствора.

**5.3. Возможная деградация ДНК:**

▪ Старый образец биоматериала, либо образец подвергался замораживанию-оттаиванию – необходимо провести сбор материала повторно. Избегать замораживания образца в процессе транспортировки и хранения.

▪ Хранение выделенной ДНК при условиях, не соответствующих выше изложенным требованиям.

**5.4. Неудовлетворительный выход ДНК в последующих ферментативных реакциях при использовании набора ДНК-Ткань-Ф:**

▪ ДНК фрагментирована вследствие модификации формальдегида

Хотя инкубация при 90°C удаляет большую часть модификаций формальдегида, ДНК, выделенная из FFPE-блоков, может не работать в ферментативных реакциях так же хорошо, как ДНК, выделенная из свежей или замороженной ткани. Рекомендуется выбрать для ПЦР короткие ампликоны, <500 нуклеотидов (эта инфа для разработчиков).

▪ Низкая чувствительность

Определить максимальный объем элюента, необходимого для проведения реакции амплификации. Соответственно подобрать объем элюента, добавленного к реакции амплификации. Объем элюирования может быть подобран пропорционально.

**5.5. Малый объем лизата при выделении набором ДНК-Плант:**

▪ образец имеет высокую влагосвязывающую способность. Следует уменьшить массу навески образца, увеличить объем лизирующего раствора или смочить образец перед выделением небольшим количеством деионизованной воды.

1. **Условия хранения, транспортирования** **и эксплуатации наборов**

**6.1 Хранение.**

Наборы реагентов в упаковке предприятия-изготовителя должен храниться на складах поставщика в сухих проветриваемых помещениях.

Наборы реагентов хранить при комнатной температуре 15-25°C и относительной влажности воздуха до 90%.

Раствор Протеиназы К следует хранить при температуре не выше -18°С.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

**6.2 Транспортирование.**

Транспортировать наборы реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Наборы реагентов транспортировать при температуре не выше +30 ºС и относительной влажности воздуха до 90%.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

**6.3 Срок годности.** Срок годности наборов 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора. 12 месяцев при условии хранения при комнатной температуре 15-25°C.

После вскрытия флаконов и добавления этилового спирта (95%) к «Растворам для промывки №1 и №2» срок годности 6 мес.

После разведения раствор Протеиназы К следует хранить не более 6 мес. при температуре не выше -18°С.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

1. **Утилизация**

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4.28 СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

**При возникновении вопросов обращаться по адресу:**

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен» (ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9

Тел.: +7 499 705-03-75

www.testgen.ru

**Служба технической поддержки:**

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru