Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

# Набор для выделения ДНК из FFPE образцов тканей

Кат. номер D-FFPE-10, D-FFPE-50, D-FFPE-250

**Важно!**

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом. Последняя версия протокола доступна на сайте компании ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru).
Набор предназначен только для научно-исследовательских целей.
Протокол обновлён 09.02.2024.

**Описание**

Набор предназначен для выделения и очистки ДНК из срезов с FFPE-блоков.

Принцип действия набора основан на селективной сорбции нуклеиновых кислот из предварительно лизированного образца на кремниевой мембране, последующей промывке и элюции очищенного продукта.

Выделенная ДНК может быть использована для различных молекулярно-биологических исследований: ПЦР, ПЦР-РВ, ник-трансляции, секвенирования, генотипирования, анализа SNP и др.

Данным наборов возможно выделение ДНК с размерами до 1000 п.н. Концентрация длинных фрагментов обычно составляет не более 10% от общего количества выделенной ДНК

**Состав набора**

| | D-FFPE-10<br>10 выделений | D-FFPE-50<br>50 выделений | D-FFPE-250<br>250 выделений | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Вариант 1 | Вариант 2 |
| Депарафинизирующий буфер DP | 9 мл | 45 мл | 4x55 мл | 2x110 мл |
| Буфер для лизиса LB | 3 мл | 15 мл | 2x40 мл | 80 мл |
| Буфер для нанесения на колонку BB | 7 мл | 40 мл | 4x50 мл | 2x100 мл |
| Буфер для промывки WB | 12 мл | 60 мл | 5x60 мл | 3x100 мл |
| Буфер для элюции EB | 5 мл | 15 мл | 60 мл | 60 мл |
| Протеиназа K, раствор | 240 мкл | 1200 мкл | 5x1200 мкл | 5x1200 мкл |
| РНКаза A, раствор | 80 мкл | 300 мкл | 2x750 мкл | 2x750 мкл |
| Пробирки для сбора фильтрата с колонками для сорбции образца | 10 шт. | 50 шт. | 250 шт. | 250 шт. |

Набор D-FFPE-250 поставляется в одном из двух вариантов

**Меры предосторожности:**

**Осторожно!** Буфер DP содержит в составе органические растворители оказывающий раздражающее и токсичное действие. Не проводить работы с раствором в непосредственной близости с нагревательными приборами и открытым огнём.

**Осторожно!** Буфер для нанесения на колонку BB содержит раствор хаотропной соли, оказывающий раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

**Осторожно!** Буфер для промывки WB содержит изопропанол, оказывающий раздражающее и токсичное действие. Не проводить работы с раствором в непосредственной близости от открытого огня.

При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости обратитесь за медицинской помощью.

**Внимание!** При работе с биологическими жидкостями следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как исследуемый материал является потенциально инфицированным, способным длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

**Эксплуатация:**

Компоненты: DP, LB, BB, WB, EB, протеиназа K, РНКаза A стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения (см. на упаковке) и достаточной герметизации флаконов.

**Внимание!** Не нагревать набор выше температуры +25°C, несоблюдение температурного режима хранения и транспортировки снижает активность протеиназы K и РНКазы A и эффективность выделения.

**Внимание!** не хранить смесь буфера для лизиса LB и протеиназы K.

**Условия работы:**

Температура окружающей среды от +15 до +25 °C;
Относительная влажность воздуха не более 80 %;
Атмосферное давление 630 – 800 мм. рт. ст.

**Оборудование и материалы, не входящие в набор:**

- Твердотельный термостат, поддерживающий температуру 56 °C;
- Центрифуга для микропробирок на 1.5-2 мл, скорость 12000 rcf;
- Вортекс;
- Одноканальные дозаторы переменного объёма и наконечники для них;
- Перчатки резиновые;
- Микропробирки на 1.5 мл.

**Протокол выделения ДНК:**

**Внимание!** Рекомендуется проводить выделение из срезов с образцов не старше 5 лет, увеличение срока хранения приводит к снижению выхода суммарной ДНК, а также к большей деградации ДНК. При работе с FFPE-блоками рекомендуем убедиться, что фиксация тканей проводилась без нарушения процедуры фиксации, в противном случае нативные РНКазы и ДНКазы существенно снижают целостность выделяемых нуклеиновых кислот.

**1) Подготовка и лизис образцов**

**- Подготовка образцов**

Для выделения ДНК допустимо использовать образцы разной толщины, см. таблицу 2.

Таблица 2. Рекомендуемое количество срезов на выделение.

| Толщина среза | Рекомендуемое количество срезов на выделение | Суммарная площадь фиксированной ткани |
|---|---|---|
| До 5 мкм | 4 шт | От 2 см$^2$ до 10 см$^2$ |
| 5-8 мкм | 2-3 шт | |
| 8-10 мкм | 2 шт | |

**Внимание!** При использовании свежих срезов убедиться в том, что срезы сухие (без воды).

**- Депарафинизация образцов**

1. Поместить срезы в пробирку и добавить 750 мкл депарафинизирующего буфера DP.
2. Закрыть пробирку и поместить в твердотельный термостат, инкубировать 3 мин при температуре 56 °C.
3. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
4. Центрифугировать 1 мин, 12000 rcf. Тщательно удалить супернатант не захватывая осадок тканей.

**- Лизис образцов**

1. К образцу ткани чистым одноразовым наконечником добавить 250 мкл буфера для лизиса LB.
2. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
3. Инкубировать 15 мин при температуре 80 °C. Для более эффективного лизиса рекомендуется периодически перемешивать образец 2-3 раза, либо использовать термостатируемый шейкер.
3. Достать образец и охладить до комнатной температуры. Убедиться, что образец остыл. Перемешать образец.
4. К образцу добавить 20 мкл протеиназы K.
5. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.

6. Инкубировать 15-60 мин при температуре 56 °C до растворения ткани. Для более эффективного лизиса рекомендуется периодически перемешивать образец 2-3 раза, либо использовать термостатируемый шейкер.

**Примечание:** Время лизиса зависит от типа ткани и толщины используемых срезов.

7. После окончания лизиса. Энергично перемешать вручную или на вортексе. Инкубировать 15 мин при температуре 80°C.
8. Достать образец и охладить до комнатной температуры. Убедиться, что образец остыл. Перемешать образец. Сбросить капли коротким центрифугированием.

**2) Опционально. Удаление примеси РНК**

**Внимание!** Если вам не требуется проводить очистку от примесей РНК, можете пропустить данный этап и перейти к следующему разделу **«Нанесение на колонку»**.

Для удаления примеси РНК провести обработку РНКазой А.

1. К охлаждённому до комнатной температуры лизату добавить 5 мкл РНКазы А.
2. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
3. Инкубировать при 37°C 15 минут.

**3) Нанесение на колонку**

1. К образцу добавить 600 мкл буфера для нанесения на колонку BB. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
2. Перенести 800 мкл супернатанта на колонку. Плотно закрыть крышку колонки.
3. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.

**4) Промывка колонки**

1. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
2. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
3. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 rcf для полного удаления буфера WB.

**5) Элюция ДНК**

1. Перенести колонку в новую микропробирку на 1.5-2 мл (не входит в состав набора). Плотно прижать колонку к пробирке.
2. Нанести на центр фильтра колонки от 60 до 200 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25 0C). Центрифугировать 1 мин, 10000 rcf.

- При увеличении объёма элюции увеличивается количество ДНК и снижается концентрация ДНК. Количество ДНК при элюции объёмами 60 и 200 мкл может различаться в 1.5-2 раза.

- Вторая элюция новой аликвотой буфера для элюции EB или повторное нанесение элюата на колонку позволяет дополнительно увеличить количество ДНК.
- Буфер для элюции – 0.01 M Tris•HCl (pH 8.0). Элюировать образец также можно TE буфером (0.01 M Tris•HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0-8.5) либо водой (pH 8.0-8.5, pH доводить раствором NaOH).

3. Элюат, содержащий ДНК, хранить при -20°C. Для длительного хранения рекомендуется добавить EDTA (pH 8) до конечной концентрации 0.1-1 мМ.

**Примечание:** EDTA может ингибировать ферментативные реакции, например, ПЦР.

**Анализ выделенной ДНК:**

Количество выделенной ДНК из можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.
Характерный максимум поглощения для ДНК при λ = 260 нм.
Посчитать концентрацию ДНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:
$A_{260}$ * разбавление * 50 мкг/мл.
Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280}$ ~1.7-2.0.

**Количество суммарной НК, выделяемой из срезов FFPE-блоков тканей M. Musculus, толщиной 10 мкм.**

| Вид ткани | m (НК), мкг |
|---|---|
| Печень | 2-10 мкг |
| Почки | 0.2-1 мкг |
| Толстая кишка | 1-5 мкг |

**Внимание!** Качество и количество выделяемой НК зависит от вида тканей, обработки образца РНКазой А, а также от способа фиксации. При нарушении процедуры фиксации количество суммарной НК снижается, а также снижается количество фрагментов ДНК с длиной более 500 п.н. При работе с данным образцами заблаговременно убедитесь в том, что образцы были подготовлены надлежащим способом.

Целостность выделенной ДНК можно проверить с помощью проведения ПЦР на длинные фрагменты (от 500 п.н.). После проведения ПЦР продукты амплификации необходимо проверить с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле.
**Внимание!** Концентрация длинных фрагментов в выделенных образцах обычно составляет не более 10% от общего количества выделенной ДНК.

**Дополнительные реагенты:**

В каталоге ООО «Биолабмикс» представлены реагенты и материалы полезные при выделении ДНК и её анализе.

- Стерильные пестики для гомогенизации образцов тканей в микропробирках (Кат. № pest-10).
- Буферы для электрофореза в агарозном геле:
  трис-ацетатный буфер (Кат. № BE-DNA-500, BE-DNA-1000),
  трис-боратный буфер (Кат. № TBE-500).
- Раствор бромистого этидия (Кат. № EtBr-10) для визуализации НК.
- Буферы для внесения образцов ДНК и РНК в гель
  (Кат. № D-3001, D-3002, D-3003).
- Маркеры молекулярных весов ДНК
  (Кат. № S-8000, S-8100, S-8103, S-8055, S-8250, S-8150).
- Протеиназа К (Кат. № EP-1200).
- РНКаза А (Кат. № ER-500).

- БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) (Кат. № MH040-100, MH040-400). Для амплификации длинных фрагментов ДНК от 0.2 до 30 т.п.о.
- БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (Кат. № MHC040-100, MHC040-400). Для амплификации длинных фрагментов ДНК от 0.2 до 30 т.п.о.

**Условия хранения:**

Набор для выделения ДНК хранить при температуре от +15 до +25 °С. Раствор протеиназы К и РНКазы А хранить при температуре от -18 до -24°С. Срок годности см. на упаковке.

**Условия транспортировки:**

Транспортировку набора, производить при температуре от +15 до +25 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше +25°С в течение 14 суток.