



8

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Рош-Москва»



М. Петрович

«18» февраля 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (большой объем) (MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I-Large Volume)



Для лабораторных исследований.
Только для использования *IN VITRO*.

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (большой объем)

MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume

Версия март 2007

Набор для выделения геномной ДНК из цельной крови млекопитающих и клеточных культур, а также тотальных нуклеиновых кислот из плазмы и сыворотки крови млекопитающих в приборе MagNA Pure Compact

Кат. №. 03 730 972 001

Набор рассчитан на 32 выделения

Хранить при температуре +15 - +25°C.

www.roche-applied-science.com

Содержание

1. Назначение данного продукта.....	3
Количество тестов	3
Содержание набора	3
Условия хранения и стабильность	3
Необходимое дополнительное оборудование и реагенты	3
Область применения	4
Длительность постановки	4
2. Работа с данным продуктом	5
2.1 Предварительные действия	5
Меры предосторожности	5
Протокол выделения	6
Образцы	7
Контроли	8
Внутренний контроль	9
2.2 Протокол выделения нуклеиновых кислот	10
Общие замечания	10
2.2.1 Протокол	11
3. Результаты	14
3.1 Выход и степень очистки	14
3.2 Воспроизводимость	14
3.3 Чувствительность	15
4. Анализ ошибок	16
5. Дополнительная информация о продукте	18
Работа данного продукта	18
Принцип теста	18
Контроль качества	18
Ссылки на применение данного продукта	19
6. Вспомогательная информация	20
6.1 Обозначения	22
6.1.1 Текстовые обозначения	20
6.1.2 Символы	20
6.1.3 Аббревиатуры	20
6.2 Изменения относительно предыдущей версии	21
6.3 Информация для заказа	23
6.4 Ограничения, налагаемые лицензией	24
6.5 Торговые марки	24

1. Назначение данного продукта

Количество тестов

- 32 выделения (4 x 8) из
- 500 мкл или 1000 мкл цельной крови млекопитающих (содержащей не более 1×10^4 клеток/мкл)
 - 500 мкл или 1000 мкл плазмы или сыворотки крови млекопитающих
 - 100 мкл суспензии клеточных культур (содержащих не более 2×10^6 клеток).

Содержание набора

Маркировка	Содержание / Назначение
Reagent Cartridge (картриджи с реагентами)	• 32 запечатанных картриджа Каждый картридж содержит реагенты, рассчитанные на одно выделение нуклеиновых кислот (лунка 1: Протеиназа К; лунки 2,3: лизирующий буферный раствор; лунки 4,5: МСЧ; лунка 6: изопропанол; лунки 7,8: промывочный буферный раствор I; лунки 9,10: промывочный буферный раствор II; лунка 11: буферный раствор для элюции)
Tip Tray (штатив с наконечниками)	• 32 одноразовых штатива с наконечниками • Содержат реакционные наконечники (2 больших и 1 маленький) и прокалыватель
Sample Tube (пробирки для образцов)	• 35 пробирок, 2,0 мл • Для внесения образцов; помещаются в ряд 1 штатива с пробирками в приборе MagNA Pure Compact (см. Руководство пользователя)
Elution Tube (пробирки для элюции)	• 35 снабженных штрих-кодом пробирок, 2,0 мл • Помещаются в штатив для элюции в приборе MagNA Pure Compact (см. Руководство пользователя)
Elution Tube Cap (крышки пробирок для элюции)	• 35 крышек для пробирок • Для закрывания пробирок для элюции

Условия хранения и стабильность

- Компоненты набора стабильны при температуре +15 - +25°C до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Ⓢ Набор транспортируется при комнатной температуре.

Необходимые дополнительные оборудование и реагенты

Для проведения выделения нуклеиновых кислот с набором MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume в приборе MagNA Pure Compact необходимо следующее дополнительное оборудование и расходные материалы:

- стандартное лабораторное оборудование
- дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов в пробирки для образцов
- центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки
- при применении внутреннего контроля:
 - пробирки Sarstedt 2,0 мл (без крышки: Sarstedt #72.608; с крышкой: Sarstedt #72.693)

1. Назначение данного продукта (продолжение)

Область применения

Для лабораторных исследований. Набор MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume специально разработан для высококачественной очистки геномной ДНК из цельной крови млекопитающих и клеточных культур, а также тотальных нуклеиновых кислот (например, вирусных ДНК и РНК) из плазмы и сыворотки крови млекопитающих, в приборе MagNA Pure Compact Instrument.

Выделенные нуклеиновые кислоты могут использоваться для ПЦР и ОТ-ПЦР в приборе LightCycler®, стандартных термоциклерах, а также для других стандартных реакций. Выделенные нуклеиновые кислоты свободны от ингибиторов ПЦР.

 Набор MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume не может применяться для выделения РНК из цельной крови млекопитающих и клеточных культур.

Длительность постановки

Настройка прибора MagNA Pure LC занимает около 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения ДНК из 8 образцов цельной крови составляет около 25 минут; после настройки и запуска прибора MagNA Pure Compact дополнительные манипуляции не требуются.

2. Работа с данным продуктом

2.1 Предварительные действия

Меры

предосторожности

I) Меры предосторожности при работе с набором

- Завершайте каждый этап ПЦР, прежде чем перейти к следующему этапу. Например, Вы должны закончить пробоподготовку, прежде чем начать сбор реакции ПЦР. Пробоподготовка, сборка реакции ПЦР и собственно проведение ПЦР должно проводиться в разных помещениях.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Некоторые реагенты содержат опасные компоненты – гуанидин тиоцианат (лунки 2 и 3) или гуанидин гидрохлорид (лунки 7 и 8). Не допускайте попадания этих реагентов на кожу, в глаза и слизистые. В случае попадания, промойте пораженный участок большим количеством воды. В случае разлива реагента, залейте его водой, прежде чем вытирать.

Ⓢ Лунка 1 расположена рядом с рукояткой картриджа, тогда как лунка 12 расположена рядом с двумя отдельно стоящими открытыми лунками.

- Не допускайте смешивания реактивов, содержащих гуанидин тиоцианат (лунки 2 и 3), с раствором гипохлорита натрия (хлорка) или сильными кислотами. Такая смесь выделяет очень токсичный газ.

II) Меры предосторожности при работе в лаборатории

- Рассматривайте все образцы и отходы как потенциально инфекционные, и соблюдайте все правила лабораторной безопасности. Поскольку чувствительность и титр потенциальных патогенов в образцах варьирует, оператор должен самостоятельно оптимизировать инактивацию патогенов в лизирующем буфере или принять соответствующие меры согласно местным рекомендациям по лабораторной безопасности.
- Не пить, не есть и не курить в рабочей зоне лаборатории.
- Не пипетировать ртом.
- Всегда работайте с образцами и компонентами набора в защитных перчатках, лабораторном халате и защитных очках.
- После завершения работы с образцами и реагентами набора тщательно мойте руки.

III) Меры предосторожности при утилизации отходов

- Неиспользованные реагенты и отходы необходимо утилизировать в соответствии с государственными, федеральными и местными правилами.
- Данные по безопасности материалов (MSDS) Вы можете запросить в Вашем местном представительстве Roche.

2. Работа с данным продуктом (продолжение)

Протокол выделения

Для выделения ДНК из крови млекопитающих, клеточных культур, а также выделения тотальных нуклеиновых кислот из плазмы/сыворотки крови млекопитающих с набором MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume, в приборе инсталлированы 5 разных протоколов. Для каждого протокола в меню программного обеспечения необходимо выбирать объемы образца и элюции. С помощью приведенной ниже таблицы Вы можете выбрать протокол, наиболее соответствующий Вашим образцам:

⚠ Каждый протокол оптимизирован для своего типа образцов. **Не применяйте протоколы для образцов других типов, кроме указанных в таблице!** В противном случае эффективность выделения может быть снижена, может произойти слипание и потеря МСЧ, перекрестная контаминация образцов или даже повреждение прибора.

Название протокола	Тип образца	Возможность применения внутреннего контроля ¹⁾	Объем элюции ³⁾
DNA_Blood_1000	1000 мкл цельной крови ($\leq 1 \times 10^7$ клеток)	Да	200 мкл
DNA_Blood_500	500 мкл цельной крови ($\leq 5 \times 10^6$ клеток)	Да	100 или 200 мкл
Total_NA_Plasma_1000	1000 мкл плазмы/сыворотки крови	Да	50 или 100 мкл
Total_NA_Plasma_500	500 мкл плазмы/сыворотки крови	Да	50 или 100 мкл
DNA_Culture_Cells_LV	100 мкл суспензии клеток ($\leq 2 \times 10^6$ клеток)	Нет ²⁾	200 мкл

⚠ Для каждой постановки можно выбрать только один протокол (и, соответственно, один тип образцов). Таким образом, образцы разных типов (или образцы разных объемов и разные объемы элюции) не могут совмещаться в одной постановке.

🔍 ¹⁾ Подробные сведения приведены в разделе “Внутренний контроль” на странице 9.

🔍 ²⁾ Протокол DNA_Culture_Cells_LV не позволяет применять внутренний контроль. Если при работе с данным протоколом необходим внутренний контроль, внесите 20 мкл внутреннего контроля непосредственно в суспензию клеток (внутренний контроль стабилен в PBS).

🔍 ³⁾ Концентрация нуклеиновых кислот в элюате, и, следовательно, чувствительность последующих реакций, может быть повышена за счет уменьшения объема элюции; однако при этом эффективность элюции и общий выход нуклеиновых кислот снизятся примерно на 10-30% по сравнению со стандартным объемом элюции (например, типичный выход ДНК из 500 мкл цельной крови человека при элюции в 100 мкл составляет 12,9 мкг, по сравнению с 15,8 мкг при элюции в 200 мкл).

При выделении ДНК из клеточных культур или 1 мл цельной крови, изменения объема элюции не допускаются вследствие высокого содержания ДНК в исходном материале.

2. Работа с данным продуктом (продолжение)

Образцы

Для получения оптимальных результатов в последующих процедурах, особенно в ПЦР с детекцией в реальном времени в приборе LightCycler®, **не используйте образцы большего объема или с большим содержанием клеток, чем это рекомендовано для выбранного протокола.** В противном случае эффективность выделения может быть снижена, может произойти слипание и потеря МСЧ, перекрестная контаминация образцов или даже повреждение прибора.

⚠ Обращайтесь со всеми образцами как с потенциально инфекционными. Оптимальным является следующее количество материала в образце:

• **500 или 1000 мкл цельной крови млекопитающих, содержание лейкоцитов не более 1×10^4 /мкл)**

⚠ Если вы используете образцы цельной крови меньшего объема, доведите их PBS до 500 или 1000 мкл, соответственно, и тщательно перемешайте.

⚠ Мы настоятельно рекомендуем считать количество лейкоцитов в образцах цельной крови вручную с помощью гемоцитометра перед началом работы. Обратите внимание, что автоматические системы подсчета (в зависимости от производителя) иногда дают результаты, не совпадающие с данными, полученными на ручном гемоцитометре.

⚠ Протоколы выделения из цельной крови разработаны для образцов крови здоровых лиц. Обратите внимание, что состав крови у больных или принимающих медикаменты лиц может влиять на процесс выделения нуклеиновых кислот.

⚠ В крови разных видов млекопитающих могут быть разные концентрации клеток крови, для некоторых видов может потребоваться уменьшение объема образца крови для сохранения числа клеток в рекомендованных пределах.

⚠ Работайте только с образцами цельной крови, содержащими антикоагулянты. Избегайте использовать образцы, хранившиеся при комнатной температуре. Цельная кровь может храниться при комнатной температуре не более 1 дня, или при $+2 - +8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. Для длительного хранения цельная кровь должна быть заморожена, в противном случае может происходить постепенная потеря ДНК.

• **500 или 1000 мкл плазмы или сыворотки крови млекопитающих**

• **до 2×10^6 культуральных клеток в объеме 100 мкл**

③ Центрифугируйте клетки, чтобы удалить культуральную жидкость, и затем растворите осадок клеток в 100 мкл PBS.

⚠ Содержание ДНК в разных клеточных линиях может значительно варьировать вследствие разной степени полиплоидии. Поэтому для клеточных линий с высоким содержанием ДНК (например, K562 или HeLa) рекомендуется уменьшение числа клеток в образце (например, начните с $2 - 5 \times 10^5$ клеток).

2. Работа с данным продуктом (продолжение)

Контроли

Всегда используйте в постановках соответствующие контроли, особенно если для выделенных образцов планируется проведение качественного анализа образцов РНК (например, в ПЦР тестах с детекцией в реальном времени в системе LightCycler® 2.0). Для контроля всего процесса от выделения образцов до количественного анализа, используйте следующие контроли:

- Положительный контроль, материал, положительный по анализируемой мишени.
- Отрицательный контроль, материал, отрицательный по анализируемой мишени.
- Внутренний контроль (ВК), определенное количество контрольной матрицы, внесенное во все образцы перед выделением.

Ⓢ Внутренний контроль (ВК) вносится в образцы перед выделением, и затем проходит все этапы выделения и амплификации вместе с мишенью в одной реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно для ферментативного процесса амплификации, в том числе ПЦР, поскольку эффективность ПЦР может снижаться вследствие присутствия ингибиторов в выделенных образцах. Также ВК позволяет контролировать возможную потерю мишени в процессе выделения.

Ⓢ В количественных ПЦР-тестах в приборе LightCycler® в качестве ВК используют двуцепочечные молекулы ДНК, содержащие сайты посадки праймеров, идентичные последовательности мишени, но с уникальной последовательностью посадки зонда, что позволяет отличать ампликоны ВК от ампликонов мишени. Для тестов ОТ-ПЦР применяют молекулы транскрибированной *in vitro* РНК, обладающие теми же свойствами. Формат тестов HybProbe с использованием двух красителей позволяет различать мишень и ВК. Подробные сведения о технологии ВК в сочетании системой LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® Technical Note 12/2000 "Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control" на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2. Работа с данным продуктом (продолжение)

Внутренний контроль

Прибор MagNA Pure Compact позволяет вносить внутренний контроль (ВК) в образцы во время пробоподготовки.

⚠ Внесение ВК важно для контроля возможного нарушения процесса выделения нуклеиновых кислот.

Существуют два возможных метода внесения ВК:

ВК вносится непосредственно в образец	В экране назначений I (Sample Ordering Screen I), установите показатель "Internal Control Volume" на "none". Отметьте использование ВК в поле "Comment".	Данный метод применяется для суспензий культуральных клеток PBS. ⚠ Не применяйте данный метод для образцов плазмы/сыворотки крови, если ВК представляет собой незащищенную ДНК или РНК, поскольку ВК может быть разрушен нуклеазами, присутствующими в образце.
ВК находится в штативе пробирок	- Внесите ВК (5, 10 или 20 мкл) в отдельные пробирки. Используйте только пробирки, рекомендованные в разделе "Необходимое дополнительное оборудование и реагенты". - Поместите каждую пробирку в соответствующие позиции в ряду 2 штатива пробирок. - В экране назначений I (Sample Ordering Screen I) введите объем ВК. - Прибор автоматически внесет ВК в процессе выделения, смешав его с лизирующим буфером, что защищает ВК от разрушения нуклеазами.	Данный метод применяется для образцов цельной крови, плазмы, сыворотки крови. Незащищенная ДНК или РНК в данном случае может использоваться в качестве ВК. ⚠ Если Вы выбрали опцию ВК, но не поместили пробирку ВК в штатив пробирок, лизирующий буферный раствор будет автоматически внесен на поверхность прибора! В результате потребуется очистка прибора. Если в приборе MagNA Pure Compact установлено программное обеспечение версии 1.1, лизирующий буфер соединяется с образцом до внесения в пробирку с ВК. В этом случае, кроме очистки прибора, потребуется и его деконтаминация.

2.2. Протокол выделения

Основные замечания

Приведенная ниже процедура рассчитана на одновременную обработку 8 образцов. Подробное описание настройки прибора и работы приведено в Руководстве пользователя прибора MagNA Pure Compact.

⚠ Доведите перед началом работы картридж реагентов и лизаты до комнатной температуры (+15 - +25°C). При работе с реагентами, температура которых выходит за рекомендованные рамки, эффективность работы набора может снизиться.

⚠ Для предотвращения ошибок пипетирования, используйте только пробирки для образцов из набора и рекомендованные пробирки для внутреннего контроля. (См. раздел “Необходимое дополнительное оборудование и реагенты” на стр. 3).

⚠ Зарегистрируйте № серии набора на случай рекламации или вопросов технической службе поддержки Roche относительно компонентов набора (картриджей реагентов или расходных материалов).

⚠ Соблюдайте инструкции по типу и количеству материала образцов. (См. раздел “Протокол выделения” на стр. 6 и раздел “Образцы” на стр. 7.) Ошибки в выборе типа и количества материала образцов может привести к слипанию МСЧ, не выявленному функцией детекции сгустков прибора. Слипание МСЧ может привести к снижению выхода и качества нуклеиновых кислот, перекрестной контаминации и ингибированию последующих реакций (например, ПЦР).

⚠ По окончании постановки, внимательно осмотрите прибор, нет ли следов пролива реагентов. Если пролив реагентов произошел, очистите прибор, как рекомендовано в Руководстве пользователя прибора на стр. 81.

2.2.1 Протокол

Протокол

Выделите общую РНК по приведенному ниже протоколу.

1

- Включите прибор.
- Выньте штатив для картриджей и штатив для пробирок (вместе со штативом для пробирок для элюции) из прибора.
- Нажмите кнопку Run в основном меню, чтобы перейти к экрану назначений 1 (Sample Ordering Screen 1).
- Следуйте инструкциям программы.

2

- Выньте картридж реагентов из упаковки.
- ⚠ Проверьте целостность картриджа и объем в лунках. Не используйте картридж, который поврежден или содержит неравные уровни реагентов в лунках.
- Доведите картридж реагентов до комнатной температуры (30 минут).
- ⚠ Соблюдайте следующие правила работы с картриджем реагентов:
- Всегда работайте с картриджем MagNA Pure Compact в перчатках.
- Берите картридж только за область штрих-кода и противоположную ей сторону.
- Избегайте касания запечатывающей пленки, покрывающей лунки картриджа.
- Избегайте касания двух открытых лунок и не используйте их в качестве ручек.
- Избегайте образования пены.
- Дайте жидкости в лунках картриджа полностью осесть. Если на запечатывающей пленке осталась жидкость, осторожно постучите дном картриджа по плоской поверхности лабораторного стола. Это особенно важно для лунки 1, в которой содержится небольшой объем (70 мкл) протеиназы K.

3

- Отсканируйте штрих-код.
- Расположив две отдельные лунки от себя, вставьте все лунки картриджа реагентов в штатив картриджей. Разместите картридж с помощью направляющих пазов.
- Повторите описанные выше действия для нужного количества образцов (1 – 8).

4

- Перейдите к экрану назначений 2 (Sample Ordering Screen 2).
- Выберите нужный протокол выделения в меню Protocol.
- Выберите объем элюции (50 мкл, 100 мкл или 200 мкл).
- Дополнительно: выберите объем внутреннего контроля (5, 10 или 20 мкл).

2.2.1 Протокол (продолжение)

5 • Вставьте необходимое число штативов наконечников (по одному на каждое выделение) в соответствующие позиции штатива наконечников прибора.

⚠ Убедитесь, что в каждой позиции штатива наконечников находятся расходные материалы (наконечники или прокалыватели). Не используйте неправильно заполненные штативы наконечников.

⚠ Берите штативы наконечников осторожно, не допуская выпадения наконечников или прокалывателя из штатива. Если это произошло, выбросьте этот штатив и наконечники. Возьмите новый штатив наконечников из набора наконечников.

• Перейдите к экрану назначений 3 (Sample Ordering Screen 3).

6 • Сканируйте штрих-код с исходной пробирки образца или введите название образца.

• Разместите пробирки для образцов в ряду 1 штатива для пробирок. Убедитесь, что края пробирок плотно зафиксированы в штативе.

• Внесите образцы в соответствующие пробирки.

• Перейдите к экрану назначений 4 (Sample Ordering Screen 4).

⚠ Этот экран появляется и принимает информацию о пробирках с внутренним контролем, только когда Вы выбираете протокол с внутренними контролями на экране назначений 2 (Sample Ordering Screen 2). Программа пропустит этот экран и перейдет на экран назначений 5 (Sample Ordering Screen 5), если Вы выберете протокол без внутреннего контроля.

7 • Внесите необходимое количество ВК (как указано на экране назначений 2) в пробирки ВК.

• Промаркируйте пробирки, присоединив к ним штрих-код, или надпишите на них номер маркером.

• Поместите пробирки с внесенными контролями в ряд 2 штатива для пробирок.

• Выберите касанием поле IC Sample ID field 1. В этом поле введите идентификатор контроля 1 с помощью виртуальной клавиатуры или отсканировав его штрих-код. (Для доступа к клавиатуре нажмите кнопку Keyboard).

• Повторите описанные выше действия для каждого контроля.

• Вставьте штатив пробирок с образцами и ВК.

• Нажмите подтверждающую кнопку "IC Tubes inserted".

8 • Вставьте штатив с пробирками в прибор.

• Перейдите к экрану назначений 5 (Sample Ordering Screen 5).

9 • Сканируйте штрих-коды пробирок для элюции.

• Поместите пробирки для элюции в штатив пробирок для элюции. Убедитесь, что края пробирок плотно зафиксированы в штативе.

• Вставьте штатив с пробирками для элюции в прибор.

10 • На экране подтверждения (Confirmation screen) проверьте отображенную информацию:

• Если все верно, подтвердите, нажав кнопку „Confirm Data“, закройте переднюю крышку и запустите постановку.

2.2.1 Протокол (продолжение)

- 11 • После завершения процесса выделения появляется экран результатов (Result Screen), на котором показаны результаты процесса выделения для каждого канала:
- Появится знак PASS, если постановка выделения прошла без ошибок и предупреждающих сообщений системы.
 - Результат будет признан недействительным, если процесс постановки был прерван или произошла ошибка во время постановки. Для каждого результата, помеченного FAIL, на экране результатов будет отображена ошибка или предупреждающее сообщение, позволяющее Вам принять решение, можно ли игнорировать это сообщение. См. раздел Анализ ошибок Руководства пользователя MagNA Pure Compact.
- 12 • Закройте пробирки для элюции прилегающими к ним крышками и выньте штатив пробирок для элюции или закрытые пробирки для элюции сразу по окончании процесса выделения.
- Если немедленная постановка последующих реакций не планируется, храните образцы при -20°C (если выделена ДНК) или при -70°C (если мишенью является РНК). При правильных условиях хранения нуклеиновые кислоты стабильны в течение 6-12 месяцев.
- 13 • Дополнительный этап: Начните сброс жидких отходов. Освободите емкость для отходов прибора MagNA Pure Compact. Рассматривайте жидкие отходы как потенциально инфекционные (в зависимости от исходных образцов) и опасными (см. более подробно в разделе Меры предосторожности на стр.5).
-

3. Результаты

3.1 Выход и степень очистки

ДНК выделяли из образцов нормальной цельной крови человека или клеточной культуры K562. Объем элюции составлял 200 мкл. Выход определяли методом измерения ОП 260нм, степень очистки – как соотношение ОП 260нм/280нм.

Тип образца	Объем образца	Средний выход ДНК (мкг)	Степень очистки ДНК
Цельная кровь	500 мкл	14,1	≥1,7
Цельная кровь	1000 мкл	30,1	
Клетки K562	1 x 10 ⁶	40,4	
Клетки K562	2 x 10 ⁶	47,6	

Ⓢ Выход ДНК из образцов цельной крови в значительной степени зависит от донора крови и количества клеток крови. Выход из культуральных клеток зависит от клеточной линии вследствие варьирования полиплоидии. В клетках K562, например, высокое содержание ДНК, поэтому при выделении лучше начинать с количества не более 1 x 10⁶ клеток.

Ⓢ В плазме/сыворотке крови содержание ДНК не достаточно для спектрофотометрического измерения концентрации ДНК при ОП 260 нм.

3.2 Воспроизводимость

ДНК выделяли в 4 повторах из 1000 мкл цельной крови, полученных от двух доноров. Объем элюции составлял 200 мкл. Воспроизводимость выделения ДНК определяли для каждого элюата в электрофорезе в агарозном геле с использованием соответствующего маркера молекулярных масс (Molecular Weight Marker III*). Для каждого образца были зарегистрированы фрагменты. Соответствующие геномной ДНК величиной не менее 20 kb.

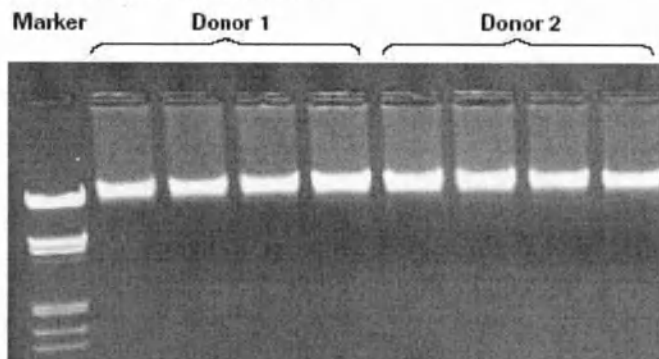


Рисунок 1: Анализ методом электрофореза в агарозном геле 2,5 мкл ДНК, выделенной из 1000 мкл цельной крови человека.

3. Результаты (продолжение)

3.3 Чувствительность В плазме, содержащую в качестве консерванта цитрат, вносили парвовирус В19 для получения серии разведений в диапазоне $10^2 - 10^7$ копий/мл. Выделение нуклеиновых кислот проводили из образцов полученной серии разведений объемом 1000 мкл. Объем элюции составлял 100 мкл. 5 мкл элюата использовали для детекции парвовируса В19 в ПЦР-тесте на приборе LightCycler® с зондами HybProbe. Предел выявления составил 500 копий/мл (= 5 копий/реакцию ПЦР), что подтвердило превосходную чувствительность и линейность процедуры выделения.

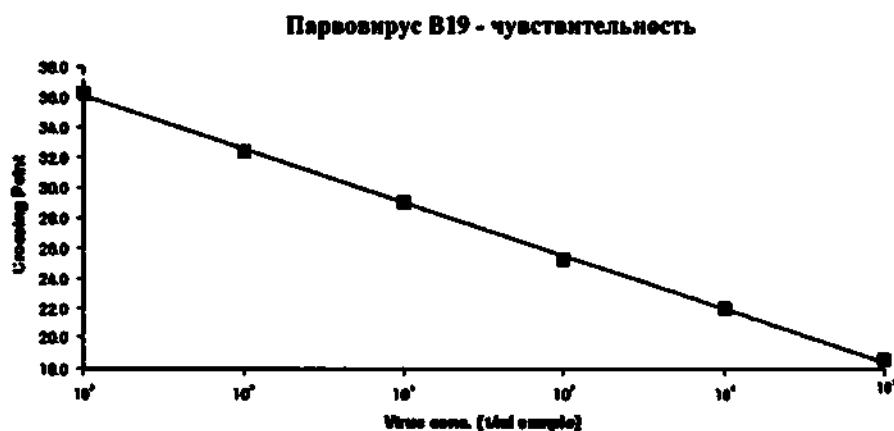


Рисунок 2: ПЦР-анализ образцов ДНК, выделенных из образцов цельной крови с внесенным в разных концентрациях парвовирусом В19, в системе LightCycler® HybProbe (мишень – парвовирус В19).

4. Анализ ошибок

Слипание частиц/проблемы с магнитным разделением отделением частиц	Возможная причина		Рекомендации
	Избыток материала образца.		Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе “Образцы” на стр.7.
Попадание МСЧ в элюат	МСЧ были намагничены перед началом работы.		Избегайте контакта МСЧ с магнитом. Правильно храните набор.
	Избыток материала в образце привел к слипанию МСЧ.		- Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе “Образцы” на стр.7. - Осадите МСЧ в элюате центрифугированием, и перенесите освобожденный от МСЧ элюат в чистую пробирку.
Дегградация нуклеиновых кислот	Не оптимальное хранение образцов.		Используйте свежие или замороженные образцы. Избегайте использования образцов, хранившихся при комнатной температуре длительное время.
	Не оптимальное хранение элюатов.		- Не храните элюаты при комнатной температуре. - Не запускайте процедуру выделения на ночь.
	Контаминация нуклеазами реакционных наконечников, пробирок образцов, пробирок для элюции или реагентов.		Не допускайте контаминации нуклеазами расходных материалов и реагентов.
Низкий выход нуклеиновых кислот	В образце недостаточное количество клеток.		- Клетки: Посчитайте клетки перед началом работы. Оптимальные результаты получают при работе с образцами, содержащими 1×10^6 клеток. - Кровь: Убедитесь, что кровь не свернулась. Используйте образцы свежей или замороженной крови, в которую добавлены антикоагулянты. Перемешайте пробирки перед началом работы
	Неправильное хранение образцов.		См. выше.
	Избыток материала в образце привел к слипанию МСЧ.		Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе “Образцы” на стр.7.
	Реагенты были расположены в неправильной позиции.		Убедитесь, что все реагенты располагаются в соответствующих им позициях в приборе.
Низкая степень очистки нуклеиновых кислот	Возможная причина		Рекомендации
	Избыток материала в образце.		Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе “Образцы” на стр. 7.
	Неправильное хранение образцов.		См. выше.

4. Анализ ошибок (продолжение)

Перекрестная контаминация образцов	Избыток материала в образце.	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе “Образцы” на стр.7.
Низкое качество последующих реакций (ПЦР/ОТ- ПЦР, гибридизации)	Неоптимальная концентрация ДНК мишени.	• Проверьте концентрацию ДНК в элюированных образцах ДНК и отрегулируйте количество ДНК из элюата для ПЦР • Оптимально: 10-100 нг ДНК/ПЦР • Оптимизируйте количество материала из образца для выделения. Смотрите раздел “Образцы” на стр. 7.
	Низкая степень очистки ДНК.	Для выделения ДНК использовалось слишком большое количество материала, измените количество материала в соответствии с рекомендациями в разделе “Образцы” на стр.7.
	Неправильное хранение образцов.	См. выше.
	Неправильное хранение элюатов.	См. выше.
	Реагенты и протокол (ОТ-)ПЦР не оптимизированы.	Проверьте реагенты и протокол (ОТ-)ПЦР с помощью положительного контроля ДНК или РНК (например, геномной ДНК человека*) или используйте внутренний контроль.
Элюат слегка красного цвета	Минимальная абразия магнитных частиц	Центрифугируйте элюат при низких значениях g (около 1000 об/мин) для удаления взвеси. Ⓢ Красный цвет элюата не оказывает влияния на последующую (ОТ-)ПЦР в системе LightCycler®.

5. Дополнительная информация о продукте

Работа данного продукта	данного	Набор MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume применяется в системе MagNA Pure Compact для высококачественного выделения геномной ДНК из образцов (в количестве 1–8) цельной крови млекопитающих и культур клеток, цельной крови и лейкоцитов. Выделенная ДНК может быть элюирована в 50, 100 или 200 мкл (в зависимости от выбранного протокола выделения). Это выделение соответствует стандартам качества, необходимым для высокочувствительного и количественного анализа в ПЦР или ОТ-ПЦР в приборе LightCycler®. Система MagNA Pure Compact состоит из прибора, реагентов и расходных материалов: • Прибор позволяет проводить 1–8 выделений РНК за одну постановку. • Реагенты для выделения поставляются в запечатанных картриджах. В каждом картридже содержатся все реагенты, необходимые для одного выделения. • Необходимые для выделения наконечники поставляются в одноразовом штативе наконечников. Также с набором поставляются снабженные штрих-кодом стерильные пробирки для образцов и выделенных нуклеиновых кислот. После настройки прибора и запуска протокола выделения с помощью программного обеспечения, прибор MagNA Pure Compact автоматически выполняет все этапы выделения РНК.
Принцип теста		Процедура выделения нуклеиновых кислот основана на проверенной технологии магнитных стеклянных частиц MagNA Pure. Выделение нуклеиновых кислот в приборе MagNA Pure Compact включает в себя следующие этапы: ① Образцы лизируются во время инкубации с Протеиназой К и специальным лизирующим буферным раствором, содержащим хаотропные соли. ② Магнитные стеклянные частицы (МСЧ) вносятся в образец, нуклеиновые кислоты иммобилизуются на поверхности МСЧ. ③ Не связавшиеся компоненты (белки, клеточный дебрис, ингибиторы ПЦР и т.д.) удаляются в ходе нескольких этапов отмывки. ④ Очищенные нуклеиновые кислоты элюируются из МСЧ.
Контроль качества		Функциональные характеристики набора прошли испытания в следующих модельных системах: • Геномная ДНК была выделена из цельной крови человека. Качество выделенной ДНК определяли методом электрофореза в агарозном геле и детекцией циклоспорина А в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler® 2.0. • Тотальные нуклеиновые кислоты выделяли из образцов плазмы человека, в которые были внесены парвовирус В19, вирус гепатита А (ВГА) и свиной герпесвирус 1 (PhHV-1). Качество выделенных нуклеиновых кислот определяли детекцией в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler® 2.0 для парвовируса В19 и ВГА или в приборе ABI PRISM Sequence Detection System 7700 для PhHV-1.

5. Дополнительная информация о продукте (продолжение)

Ссылки применение данного продукта	на	1. Binnicker, MJ et al. (2007). Detection of <i>Coccidioides</i> Species in Clinical Specimens by Real-Time PCR. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 45 : 173-178
		2. Kirchgesser M et al. (2003). The New MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kits – Fast and Flexible Fully Automated Sample Preparation. <i>Biochemica</i> , No. 4, 2003: 12

6. Вспомогательная информация

6.1 Обозначения

6.1.1 Текстовые обозначения Для выделения и запоминания информации в данной инструкции применяются следующие текстовые обозначения:

Текстовое обозначение	Назначение
Последовательные стадии промаркированы ①, ② и т.д..	Стадии процесса, происходящие в указанном порядке.
Этапы инструкции промаркированы ①, ② и т.д.	Этапы процедуры, которые необходимо выполнять в указанном порядке.
Звездочка *	Обозначает, что данный продукт можно приобрести у Roche Applied Science

6.1.2 Символы

В данной инструкции для выделения важной информации используются следующие символы:

Символ	Описание
Ⓢ	Внимание: Дополнительная информация о данной теме или процедуре.
⚠	Важно: Данная информация необходима для успешного выполнения процедуры или работы с продуктом.

6.1.3 Аббревиатуры В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
МСЧ	Магнитные стеклянные частицы
ОП	Оптическая плотность
PBS	Фосфатно-солевой буфер
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ОТ	Обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	Обратная транскрипция-ПЦР

6. Вспомогательная информация (продолжение)

6.2 Изменения относительно предыдущей версии

- Структура и внешний вид полностью изменены
- Редакторские изменения

6.3 Информация для заказа

Roche Applied Science предлагают большой выбор реагентов и систем для биологических исследований. Для полного знакомства с продукцией и инструкциями, посетите нашу домашнюю страницу, www.roche-applied-science.com

и наши специальные Интернет сайты:

- Автоматизированная пробоподготовка (прибор MagNA Lyser, система MagNA Pure Compact и система MagNA Pure LC):

<http://www.magnapure.com>

- Системы ПЦР в реальном времени (система LightCycler® 2.0, система LightCycler® 480 и Библиотека универсальных зондов): www.lightcycler.com

Приборы и комплектующие	Продукт	Комплектация	Кат. №
	Прибор MagNA Pure Compact	1 прибор с комплектующими	03 731 146 001
	Набор MagNA Pure Compact Tip Tray	10 штативов наконечников	03 753 166 001
	MagNA Lyser Green Beads	100 пробирок	03 358 941 001
	Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
	Набор MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I ¹⁾	1 набор (32 реакции)	03 730 964 001
	Карусельная центрифуга LightCycler® Carousel Centrifuge 2.0	1 центрифуга с ротором (230 V)	03 709 582 001
		1 центрифуга с ротором (110 V)	03 709 507 001
Наборы реагентов MagNA Pure Compact	Набор MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	1 набор (32 реакции)	03 730 964 001
	Набор MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit	1 набор (32 реакции)	04 802 993 001
Реагенты для синтеза кДНК	Набор Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	1 набор	04 379 012 001
	Обратная транскриптаза Transcriptor	250 E	03 531 317 001
		500 E	03 531 295 001
		2000 E	03 531 287 001

6. Вспомогательная информация (продолжение)

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией Лицензия на технологию, применяемую в системе LightCycler®, принадлежит Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA.

6.5 Торговые марки LIGHTCYCLER, LC и MAGNA PURE являются торговыми марками Roche. Остальные марки или названия продуктов являются торговыми марками соответствующих владельцев.

**Контактная
информация
техническая
поддержка**

и

Если у Вас есть вопросы или Вы столкнулись с проблемами при работе с продукцией Roche Applied Science (RAS), пожалуйста, свяжитесь с нашей Службой технической поддержки. Наши специалисты обеспечат быструю и эффективную помощь.

Мы также просим связаться с нами, если у Вас есть предложения по оптимизации работы с продукцией RAS или новым областям применения нашей продукции. Неоднократно такая информация от клиентов оказывалась полезной для RAS и мировой науки.

Задать вопросы, решить возникшие проблемы, предложить улучшения или новые области применения продукции Вы можете на нашем **сайте технической поддержки он-лайн**:

www.roche-applied-science.com/support

Чтобы позвонить или написать нам, посетите домашнюю старницу Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com, и выберите страну. Появится контактная информация для выбранной Вами страны.

На домашней странице Roche Applied Science выберите **Printed Materials**, чтобы найти:

- Подробные инструкции
- FAQS: Протоколы и ссылки для биологических исследований
- Наш ежеквартальный бюллетень Biochemica Newsletter
- Данные по безопасности материалов
- Вкладыши к наборам и инструкции

Там же вы можете заказать печатные копии данных материалов.

0307 043 48508001 ④



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany