



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ТестГен»

А. Н. Тороповский

«20» сентября 2018 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для выделения геномной ДНК  
человека из фиксированных в формалине и  
заклученных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф)  
по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016 в исполнениях:**

- 1) «ДНК-Ткань-Ф-50» на 50 выделений,**
- 2) «ДНК-Ткань-Ф-100» на 100 выделений**

## Содержание

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Назначение .....                                                                 | 3  |
| 2. Характеристики набора.....                                                       | 5  |
| 3. Принцип действия .....                                                           | 6  |
| 4 Аналитические и диагностические характеристики набора .....                       | 8  |
| 5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов<br>«ДНК-Ткань-Ф» ..... | 8  |
| 6. Меры предосторожности при работе с набором .....                                 | 9  |
| 7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором<br>.....              | 14 |
| 8. Анализируемые пробы .....                                                        | 15 |
| 9. Подготовка компонентов набора для исследования .....                             | 20 |
| 10. Проведение исследования.....                                                    | 21 |
| 11. Возможные проблемы и их решение .....                                           | 24 |
| 12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора<br>.....              | 26 |
| 13. Утилизация .....                                                                | 27 |
| 14. Гарантийные обязательства, контакты .....                                       | 28 |

# 1. НАЗНАЧЕНИЕ

**Назначение:** набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) методом, основанном на связывании нуклеиновых кислот с силикатной мембраной в спин-колонке для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

**Область применения набора реагентов** - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

**Тип анализируемого образца.** Материалом для проведения процедуры выделения нуклеиновых кислот служит фиксированная в формалине и заключенная в парафин ткань (FFPE-блоки).

Функциональное назначение теста, выполняемого с помощью набора реагентов, состоит в выделении геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

## Принцип определения

Принцип метода основан на протеиназной обработке и депарафинизации FFPE-блоков путем инкубации их с ксилолом и последующей регидратации с применением этилового спирта (95%).

ДНК из лизированных образцов сорбируется на мембране спин-колонки. Затем ДНК отмывается от хаотропных веществ и ингибирующих ПЦР примесей («Раствор для промывки №1 и №2»), после чего элюируется с мембраны («Элюент»).

**Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности**

Целевой анализ – геномная ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков).

Научная обоснованность.

Фиксация ткани в формалине, проводка согласно тому или иному протоколу и заливка в парафин для последующего изготовления препаратов — общепринятый способ подготовки образцов к гистологическому исследованию. Этот подход позволяет сохранить структуру тканей и хранить материал в течение длительного времени. Архивы, в которых хранятся образцы ткани в виде парафиновых блоков, служат незаменимым источником материала для масштабных ретроспективных исследований, включая исследования с использованием методик, недоступных на момент помещения блока в архив. Сегодня, когда появляется всё больше сведений о молекулярных основах патогенеза различных заболеваний, исследование ДНК и РНК, содержащихся в гистологическом материале, необходимо для научных исследований и становится частью рутинной диагностической практики.<sup>1</sup>

Фиксация ткани и хранение её в виде парафинового блока — традиционный и рациональный способ работы с гистологическим материалом. Нуклеиновые кислоты, выделенные с соблюдением требуемых условий из ткани, залитой в парафиновый блок, могут быть использованы для ПЦР и ОТ-ПЦР, секвенирования, исследования на микрочипах и других молекулярно-биологических методик.<sup>1</sup>

**Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие для диагностики in vitro** - Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии, состояния или фактора риска. Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» используется для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

---

<sup>1</sup> Ваганова А.Н. Гистотехнические решения для повышения качества препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из парафиновых блоков / А.Н. Ваганова // Гены и клетки. - 2014. - Т. 9, №2. - С.96-101.

## Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» рекомендуется использовать для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

Противопоказания: отсутствуют.

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Общее время проведения процедуры выделения ДНК из 1 образца составляет 4ч 30 минут.

## 2.ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» выпускается в двух вариантах исполнения:

- 1) «ДНК-Ткань-Ф-50» на 50 выделений,
- 2) «ДНК-Ткань-Ф-100» на 100 выделений.

### Состав набора

Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» включает:

Таблица 1 – Состав набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф»

| №<br>пп | Название<br>реагента     | Описание                       | Исполнение           |                       |
|---------|--------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------|
|         |                          |                                | «ДНК-Ткань-Ф-<br>50» | «ДНК-Ткань-Ф-<br>100» |
| 1       | Буфер для связывания ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 флакон,<br>(10 мл) | 1 флакон,<br>(20 мл)  |
| 2       | Раствор для промывки №1  | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 флакон,<br>(25 мл) | 1 флакон,<br>(50 мл)  |

| №<br>пп | Название<br>реагента                | Описание                                                                                                              | Исполнение        |                       |
|---------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|
|         |                                     |                                                                                                                       | «ДНК-Ткань-Ф-50»  | «ДНК-Ткань-Ф-100»     |
| 3       | Раствор для промывки №2             | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                                        | 1 флакон, (15 мл) | 2 флакона, (по 15 мл) |
| 4       | Протеиназа К                        | Белый порошок                                                                                                         | 1 флакон, (20 мг) | 1 флакон, (40 мг)     |
| 5       | Раствор для разведения протеиназы К | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                                        | 1 флакон, (1 мл)  | 1 флакон, (2 мл)      |
| 6       | Элюент                              | Прозрачная бесцветная жидкость                                                                                        | 1 флакон, (5 мл)  | 1 флакон, (10 мл)     |
| 7       | Спин-колонки для связывания ДНК     | Бесцветные полипропиленовые фильтрационные колонки с крышкой, с запрессованной стекловолоконной сорбирующей мембраной | 50 колонок        | 100 колонок           |
| 8       | Пробирки пластиковые объемом 2 мл   | Бесцветные полипропиленовые пробирки без крышки                                                                       | 50 пробирок       | 100 пробирок          |

В наборе для выделения не используются калибраторы и контрольные материалы.

Примечание: изделие не содержит другие ингредиенты, которые могут оказать влияние на проведение процедуры.

### 3. Принцип действия

Принцип метода основан на протеиназной обработке и депарафинизации FFPE-блоков путем инкубации их с ксилолом и последующей регидратации с применением этилового спирта (95%).

ДНК из лизированных образцов сорбируется на мембране спин-колонок. Затем ДНК отмывается от хаотропных веществ и

ингибирующих ПЦР примесей («Раствор для промывки №1 и №2»), после чего элюируется с мембраны («Элюент»).

## 4 Аналитические и диагностические характеристики набора

Таблица 2 – Аналитические характеристики набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф»

|                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Концентрация выделенной ДНК из 30 мг фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани, нг/мкл, не менее | 5   |
| Чистота выделения ДНК, A260/280, не менее                                                                      | 1,6 |

По результатам проведенных клинических испытаний в серии из 144 опытов с образцами выделенной с помощью набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» геномной ДНК подтверждены заявленные показатели функциональных свойств и эффективности медицинского изделия – концентрация выделенной ДНК из 30 мг фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани составляет не менее 5 нг/мкл, чистота выделения ДНК (A260/280) составляет не менее 1,6, и ДНК, выделенная из образцов фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани (FFPE-блоки), пригодна для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени - на уровне 0,984 (98,4 %) с доверительной вероятностью 90%.

## 5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф»

В пограничную зону риска вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях,
- утилизация набора с нарушением соответствующих мер безопасности и дезактивации,
- использование среза с FFPE-блока в количестве не достаточном для проведения процедуры выделения ДНК;
- кросс-контаминация образцов при подготовке срезов с парафиновых блоков;

- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, в следствии работы с набором неквалифицированным персоналом.

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016 в исполнениях: 1) «ДНК-Ткань-Ф-50» на 50 выделений, 2) «ДНК-Ткань-Ф-100» на 100 выделений», производства ООО «ТестГен» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

## 6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2а в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Работа с клиническим материалом при использовании набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» должна осуществляться согласно методическим рекомендациям «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Опасные компоненты набора в соответствии с «согласованной на глобальном уровне системой классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС)» приведены в таблице 3.

Таблица 3

| Наименование реагента    | Опасный компонент в составе       | Пиктограмма опасности СГС                                                           | Фразы опасности | Предупредительные фразы                                        |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| Буфер для связывания ДНК | Гуанидинтиоцианат<br>CAS 593-84-0 |  | 302, 315, 319   | 264, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 330, 332+313, 337+313 |

|                                  |                                       |                                                                                                                                                                        |                  |                                                                               |
|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Раствор<br>для<br>промывки<br>№1 | Гуанидинтиоц<br>ианат<br>CAS 593-84-0 |                                                                                       | 302, 315,<br>319 | 264, 280,<br>301+312,<br>302+352,<br>305+351+338,<br>330, 332+313,<br>337+313 |
| Протеиназа<br>К                  | Протеиназа К<br>CAS 39450-<br>01-6    | <br> | 332, 334         | 261, 272, 280,<br>302+352,<br>304+340,<br>333+313,<br>342+311, 363            |

#### Фразы опасности

|       |                                                                                                    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Н 302 | Вредно при проглатывании                                                                           |
| Н 315 | Вызывает раздражение кожи                                                                          |
| Н 319 | Вызывает серьёзное раздражение глаз                                                                |
| Н 332 | Наносит вред при вдыхании                                                                          |
| Н 334 | При вдыхании может вызывать аллергические<br>или астматические симптомы или затруднение<br>дыхания |

#### Предупредительные фразы

|           |                                                                                                               |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Р 261     | Избегать вдыхания<br>пыли/дыма/газа/тумана/паров/вещества в<br>распылённом состоянии.                         |
| Р 264     | После работы тщательно вымыть ...                                                                             |
| Р 272     | Не выносить загрязнённую одежду с места<br>работы.                                                            |
| Р 280     | Пользоваться защитными перчатками/защитной<br>одеждой/средствами защиты глаз/лица.                            |
| Р 301+312 | При проглатывании: Обратиться в<br>токсикологический центр/или к специалисту/.../<br>при плохом самочувствии. |
| Р 302+352 | При попадании на кожу: Промыть большим<br>количеством воды/...                                                |

- Р 304+340 При вдыхании: Вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении.
- Р 305+351+338 При попадании в глаза: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
- Р 330 Прополоскать рот.
- Р 332+313 При раздражении кожи: обратиться к врачу.
- Р 333+313 При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
- Р 337+313 Если раздражение глаз не проходит: обратиться к врачу.
- Р 342+311 При появлении респираторных симптомов: обратиться в токсикологический центр или к врачу-специалисту/...
- Р 363 Постирать загрязнённую одежду перед последующим использованием.



Символ, изображённый на этикетке, указывает на наличие дополнительной информации о безопасности в соответствующем разделе Инструкции.



Символ опасности при аспирации

При применении реагентов, входящих в набор «ДНК-Ткань-Ф», не происходит загрязнение окружающей среды.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические

требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

- Не использовать набор по истечению срока годности.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно мыть руки по окончании работы.

- Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

**ВНИМАНИЕ!** Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий раствор.

## **7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором**

### **Оборудование:**

1. Стерильный ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия)
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия)
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия)
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия)
6. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Eppendorf», Германия)
7. Холодильник от +2°C до +8°C с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

### **Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:**

1. Ксилол
2. Чистый этиловый спирт (95%)
3. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США)
4. Штативы для микропробирок на 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США)
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером 100 мкл и 1000 мкл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США)
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема 100 мкл и 1000 мкл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США)
7. Одноразовые или отдельные халаты и одноразовые перчатки
8. Емкости с дезинфицирующим раствором

9. Пластиковые пробирки на 5 мл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США).

Использование других материалов и реагентов, не входящие в состав изделия, не предусмотрено.

Измерительное оборудование при эксплуатации набора не требуется.

## **8. Анализируемые пробы**

Материалом для проведения процедуры выделения нуклеиновых кислот 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 мм<sup>2</sup>, толщина среза — до 10 мкм.

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

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

### **8.1 Процедура получения биологического материала**

#### **Требования к подготовке образцов ткани в FFPE-блоках**

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

8.1.2 Проводить фиксацию ткани формалином не дольше 24 часов.

8.1.3 Для декальцинации использовать реагенты только на основе EDTA.

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

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

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

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

## **8.2 Интерферирующие вещества и ограничения метода**

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут оказать влияние на способность набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» выделять геномную ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) соответствующего качества и количества, необходимого для проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

Для того, чтобы оценить влияние потенциально интерферирующих веществ было выполнено исследование путем анализа воздействия каждого вещества в двух концентрациях (максимальной и минимальной), диапазон которых, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф», на значения чистоты выделения ДНК (выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК, A260/280) и концентрации выделенной ДНК (выраженной в нг/мкл) с последующим проведением анализа методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

Потенциально интерферирующие вещества и их концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Концентрация интерферирующих веществ, проверенных при исследовании влияния интерферирующих веществ

| Интерферирующие вещества | Максимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК) | Минимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК) |
|--------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Парафин (в ксилоле)      | $2,00 \cdot 10^{-4}$                                   | $5,00 \cdot 10^{-5}$                                  |
| Ксилол                   | $2,00 \cdot 10^{-4}$                                   | $5,00 \cdot 10^{-5}$                                  |
| Этиловый спирт (95%)     | $1,35 \cdot 10^{-3}$                                   | $3,38 \cdot 10^{-4}$                                  |

Ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияет на способность набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» выделять геномную ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) соответствующего качества и количества, необходимого для проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

ДНК, выделенная из срезов с FFPE-блоков, обычно более фрагментирована, чем ДНК, выделенная из свежих образцов тканей. Степень фрагментации и химической деградации зависит от условий фиксации и длительности хранения образца. Сильно фрагментированная и химически модифицированная ДНК, даже при относительно высокой концентрации в образце, может быть непригодна к амплификации в ПЦР.

### 8.3 Ограничения по использованию анализируемого материала:

Для оценки функциональных характеристик набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» в зависимости от типа ткани человека было выполнено исследование путем проведения процедур выделения

ДНК из фиксированных в формалине и заключенных в парафин различных типов тканей человека в соответствии с инструкцией к набору.

Исследование проводили с использованием фиксированных в формалине и заключенных в парафин различных типов тканей человека - печень, почка, селезенка, кишечник, мозг, мышцы, легкие.

Количество фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани составляет 30 мг. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять до 250 мм<sup>2</sup>, толщина среза — до 10 мкм.

После процедуры выделения геномной ДНК проводили оценку чистоты выделения ДНК (выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК, A260/280) и концентрацию выделенной ДНК (выраженной в нг/мкл).

Результаты исследования представлены в Таблице 4.

Таблица 4 - Результаты исследования функциональных характеристик «ДНК-Ткань-Ф».

| Тип ткани | Количество фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани, мг | Концентрация выделенной ДНК, нг/мкл | Чистота выделения ДНК, A260/280 |
|-----------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| печень    | 30                                                                     | 15,9                                | 1,7                             |
| почка     | 30                                                                     | 15,6                                | 1,8                             |
| селезенка | 30                                                                     | 18,0                                | 1,8                             |
| кишечник  | 30                                                                     | 16,6                                | 1,7                             |
| мозг      | 30                                                                     | 17,7                                | 1,7                             |
| мышцы     | 30                                                                     | 6,2                                 | 1,7                             |
| легкие    | 30                                                                     | 17,9                                | 1,8                             |

На основании полученных результатов процедуры выделения ДНК набором реагентов «ДНК-Ткань-Ф» из фиксированных в формалине и заключенных в парафин различных типов тканей

человека (печень, почка, селезенка, кишечник, мозг, мышцы, легкие) можно заключить:

1. Концентрация выделенной ДНК из 30 мг фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани составляет не менее 5 нг/мкл, что является достаточным для проведения дальнейшей ПЦР-реакции.

2. Чистота выделения ДНК, определенная как отношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (260нм/280нм) составляет не менее 1,6, что является приемлемым для проведения дальнейшей ПЦР-реакции.

### **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 микротомы 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.

#### **8.4 Условия возможного хранения анализируемых образцов**

**Условия хранения пробы геномной ДНК человека, выделенной из образцов фиксированной в парафине ткани:**

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 °С.

**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 °С.

**Условия хранения исходного клинического материала:**

Условия хранения биопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК<sup>2</sup>:

- 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.

### **9. Подготовка компонентов набора для исследования**

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

Выпадение кристаллов не влияет на качество набора. При кристаллизации одного из растворов, необходимо прогреть флакон с раствором при 50 °С и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов и гомогенизации раствора.

---

<sup>2</sup> МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»

Перед началом работы следует приготовить **«Раствор протеиназы К»**. Перенести весь объем «Раствора для разведения протеиназы К» во флакон с сухой «Протеиназой К» и полностью растворить «Протеиназу К».

Перед началом работы необходимо приготовить **«Раствор для промывки №1»** и **«Раствор для промывки №2»**.

Для «ДНК-Ткань-Ф-50»:

1) добавить 12,5 мл этилового спирта (95%) к «раствору для промывки №1».

2) добавить 60 мл этилового спирта (95%) к «раствору для промывки №2».

Нанести пометку на этикетке флакона о выполнении операции.

Для «ДНК-Ткань-Ф-100»:

1) добавить 25 мл этилового спирта (95%) к «раствору для промывки №1».

2) добавить по 60 мл этилового спирта (95%) в каждый флакон к «растворам для промывки №2».

Нанести пометку на этикетке флакона о выполнении операции.

Все компоненты набора перед началом работы необходимо тщательно перемешать.

## 10. Проведение исследования

К работе с набором допускается только специально обученный персонал с навыками проведения ПЦР-анализов.

Образцы для выделения нужно нарезать непосредственно перед выделением на срезы. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять до 250 мм<sup>2</sup>, толщина среза — до 10 мкм.

Для получения срезов необходимо использовать микротом.

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

1. Поместить 2 среза с FFPE-блоков (см. раздел 8 «Анализируемые пробы») в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

2. Добавить **1200 мкл ксилола**. Инкубировать при комнатной температуре до тех пор, пока парафин полностью не растворится (обычно около 2 мин). Закрыть крышку и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

3. Центрифугировать в течение 2 мин при 11000 g при комнатной температуре (15–25°C).

4. Удалить супернатант с помощью пипетки не затрагивая осадок.

5. К осадку добавить **1200 мкл этилового спирта (95%)**. Перемешать на вортексе (5 сек).

Этиловый спирт экстрагирует остаточный ксилол из образца.

6. Центрифугировать в течение 2 мин при 11000 g при комнатной температуре (15–25°C).

7. Удалить супернатант с помощью пипетки не затрагивая осадок.

8. Открыть крышку и инкубировать при температуре 60°C в течение 10 мин или до тех пор, пока весь остаточный этиловый спирт не испарится.

Остаточный этиловый спирт может снизить выход ДНК.

9. Ресуспендировать осадок в **180 мкл «Буфера для связывания ДНК»** затем добавить **20 мкл «Протеиназы К»**. Перемешать на вортексе (5 сек), без образования пены.

10. Инкубировать полученную смесь при 50°C в течение 3 часов, чтобы лизировать образец ткани.

Если после 3 часов инкубации видны нелизированные частицы ткани, добавить еще 10 мкл раствора протеиназы К и продолжить инкубацию еще на 3 часа или оставить на ночь.

11. Перемешать на вортексе (5 сек), затем еще **инкубировать 1 час** при 90 °C.

Эта стадия необходима для удаления химической модификации, вызванной формалином, из ДНК, которая высвобождается в растворе на предыдущем этапе лизиса.

Более длительное время инкубации или более высокие температуры инкубации могут приводить к большей фрагментации ДНК.

12. Перемешать на вортексе (5сек). Поставить прогреваться «Элюент» при температуре 50°C.

13. Осторожно перенести весь получившийся объем смеси в спин-колонку с собирательной пробиркой объемом 2 мл, закрыть крышку. Центрифугировать при 6000g в течение 1 мин. Вставить спин-колонку в новую собирательную пробирку объемом 2 мл, отфильтрованную жидкость удалить.

При необходимости, центрифугировать несколько раз, до тех пор, пока весь раствор не пройдет через колонку.

14. Осторожно открыть спин-колонку и добавить **700 мкл «раствора для промывки №1»**, закрыть крышку. Центрифугировать при 6000g в течение 1 мин. Вставить спин-колонку в новую собирательную пробирку объемом 2 мл, отфильтрованную жидкость удалить.

15. Осторожно открыть спин-колонку и добавить **700 мкл «раствора для промывки №2»**, закрыть крышку. Центрифугировать при 6000g в течение 1 мин. Вставить спин-колонку в новую собирательную пробирку объемом 2 мл, отфильтрованную жидкость удалить.

16. Еще раз пропустить через колонку **700 мкл «раствора для промывки №2»**. Центрифугировать при 6000g в течение 1 мин. При необходимости, центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалить.

17. Просушить колонку центрифугированием. Центрифугировать при 12000g 1мин.

18. Поместить колонку в 1,5 мл пробирку для **выделенной ДНК**. Открыть крышку колонки и добавить 60-100 мкл заранее прогретого «Элюента» в центр мембраны, чтобы обеспечить полное элюирование связанной ДНК.

Закрыть крышку и инкубировать при комнатной температуре (15-25 ° C) в течение 10-15 мин. Центрифугировать при 12000g в течение 2 мин. В пробирке находится раствор выделенной ДНК.

19. Проба готова к проведению ПЦР

## **11. Возможные проблемы и их решение**

**1. Низкий выход или отсутствие ДНК в элюате**, причина и возможное решение:

- неполный лизис.

Возможно протеиназа К хранилась при высоких температурах в течение длительного времени. Необходимо повторить процедуру с использованием новых образцов и свежей протеиназы К.

Перед проведением процедуры следует убедиться, что образцы тщательно очищены. Остаточный формалин может ингибировать протеиназу К

- Использование этилового спирта, в концентрации ниже 95 %

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%, как изложено в п.9.

При кристаллизации одного из растворов, необходимо прогреть флакон с раствором при 50 °С и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов и гомогенизации раствора.

- 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.

**2. Плохой выход ДНК в последующих ферментативных реакциях**

- 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 также хорошо, как ДНК, выделенная из свежей или замороженной ткани. Рекомендуется брать для ПЦР короткие ампликоны, <500 нуклеотидов.

- Низкая чувствительность

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

- Растворы для промывки №1 и №2 не были хорошо перемешаны после хранения

Солевые и этанольные компоненты растворов для промывки №1 и №2 могут быть разделены на фракции после длительного периода их хранения.

Необходимо всегда перед каждой процедурой выделения тщательно перемешивать раствор для промывки №1 и раствор для промывки №2.

- Недостаточная просушка осадка от остаточного этилового спирта

После полного удаления супернатанта необходимо открыть крышку и инкубировать при температуре 60°C в течение 10 мин или до тех пор, пока весь остаточный этиловый спирт не испарится.

Остаточный этиловый спирт может снизить выход ДНК.

### **3. Забивание мембраны**

- Неполный лизис вызвал забивание мембраны.

Увеличьте время лизиса, чтобы полностью лизировать образец. Если после 3 часов инкубации видны нелизированные частицы ткани, необходимо добавить еще 10 мкл раствора протеиназы К и продолжить инкубацию еще на 3 часа или оставить на ночь.

Если у Вас есть вопросы или Вы нуждаетесь в консультации, обратитесь в службу технической поддержки компании «ТестГен» - см. раздел 14.

## **12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора**

### **Хранение.**

Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» в упаковке предприятия-изготовителя должен храниться на складах поставщика в сухих проветриваемых помещениях.

Набор реагентов хранить при комнатной температуре 15-25°C и относительной влажности воздуха до 90%. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Протеиназу К следует хранить при температуре не выше -18°C.

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

### **Транспортирование.**

Транспортировать набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор реагентов транспортировать при температуре не выше +30 °C, и относительной влажности воздуха до 90%. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

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

**Срок годности.** Срок годности набора «ДНК-Ткань-Ф» 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°C.

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

### 13. 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 «ДНК-Ткань-Ф» 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.

## 14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «ДНК-Ткань-Ф» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента), направлять информацию 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](http://www.testgen.ru)

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

Тел.: +7 927 737 83 40

E-mail: [help@testgen.ru](mailto:help@testgen.ru)

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н ГОСТ 51088-2013.

Прошито, пронумеровано и  
скреплено печатью

28 (двадцать восемь) листов

Должность: ген. директор

Тороповский А.Н.

