



SEELER & DR. FELLMETH
NOTARE

NOTARE SEELER & DR. FELLMETH · Q7, 23 · 68161 MANNHEIM

Beglaubigte Ablichtung

Die Übereinstimmung nachstehender Fotokopie mit dem Original wird hiermit
beglaubigt.

Mannheim, den 28. APR. 2021

Claudia Seeler
Notarin in Mannheim





**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
(INSTRUCTION FOR USE)**

НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

Наборы реагентов и расходные материалы к приборам серии MagNaPure для выделения и очистки нуклеиновых кислот и подготовки реакционных смесей

производства Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany

РАЗРАБОТЧИК:

**Roche Diagnostics GmbH, "Ротм Диагностика ГмбХ", Германия. Sandhofer Strasse 116,
D-68305 Mannheim, Germany**

Approved by

Roche Diagnostics GmbH

Date: 27 April 2021

**Andrea Weber
Manager Global Regulatory Affairs**

**Stamp Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim**

2021

Roche Diagnostics GmbH; Sandhofer Strasse 116; D-68305 Mannheim; Telefon +49-621-758-0; Telefax +49-621-758-2890

Sitz der Gesellschaft: Mannheim - Registergericht: AG Mannheim HRB 3982 - Geschäftsführung: Claus Heberds; Andreas Schmitz -
Aufsichtsratsvorsitzender: Dr. Thomas Schneckert



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

Набор реагентов для выделения ДНК

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

Версия 1.0.0.0

Готовые к применению реагенты для выделения геномной ДНК из 20-200 мкл цельной крови млекопитающих или $10^3 - 10^6$ клеток крови или культуральных клеток, в приборе MagNA Pure LC

Кат. №. 03 003 990 001

Набор рассчитан на 192 выделения

Хранить при температуре +15 - +25°C.

www.roche-applied-science.com

Содержание

1. Назначение данного продукта.....	4
Количество тестов	4
Содержание набора	4
Условия хранения и стабильность	4
Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	5
Область применения	5
Длительность постановки	5
2. Работа с данным продуктом	6
2.1 Предварительные действия	6
Меры предосторожности	6
Протокол выделения	7
Образцы	8
Контроли	10
2.2 Предварительные этапы	11
Цельная кровь	11
Лейкоциты	11
МНПГК	12
Клеточные культуры	13
2.3 Протокол выделения ДНК	13
Общие замечания	13
2.3.1.Протокол	14
2.3.2.Хранение выделенной ДНК	15
2.3.3. Последующий анализ	15
3. Результаты	16
Стабильность ДНК	16
Выход и степень очистки	16
Антикоагулянт	17
Воспроизводимость (внутри постановки)	17
Воспроизводимость (между постановками)	18
Последующий анализ	18
4. Анализ ошибок	19
5. Дополнительная информация о продукте	20
Назначение данного продукта	20
Принцип теста	20
Контроль качества	21
Литература	22

6. Вспомогательная информация	24
6.1 Обозначения	24
6.1.1.Текстовые обозначения	24
6.1.2.Символы	24
6.1.3.Аббревиатуры	24
6.2 Изменения относительно предыдущей версии	25
6.3 Информация для заказа	25
6.4 Ограничения, налагаемые лицензией	26
6.5 Торговые марки	26

Назначение данного продукта

1. Назначение данного продукта

Количество тестов

192 выделения (6 x 32) из:

- 200 мкл цельной крови млекопитающих
- 1×10^6 клеток крови или культуральных клеток

Ⓢ набор рассчитан на обработку 192 образцов в сериях по 32. Если обрабатывать одновременно менее 32 образцов, часть реагентов будет расходована напрасно и оставшегося объема будет недостаточно для обработки количества образцов, указанного выше.

Содержание набора

Ⓢ Лизирующий/связывающий буфер содержит синий краситель, предназначенный для детекции сгустков при автоматизированном выделении ДНК в приборе MagNA Pure LC.

Пробирка / Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
1 черная	Wash Buffer I (Промывочный буфер I)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления ингибиторов ПЦР
2 синяя	Wash Buffer II (Промывочный буфер II)	• 2 флакона по 60 мл • для удаления солей, белков и т.д.
3 зеленая	Lysis Buffer (лизирующий буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для лизиса клеток и связывания ДНК
4 розовая	Proteinase K (Протеиназа К)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления белков
5 бежевая	Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension (Магнитные стеклянные частицы, МСЧ, суспензия)	• 6 стеклянных флаконов с суспензией МСЧ • для связывания ДНК
6 желтая	Elution Buffer (Элюиционный буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для элюции очищенной ДНК • для восстановления протеиназы К • для разведения растворенной ДНК (дополнительно)

Условия хранения и стабильность

- Компоненты набора стабильны при температуре $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Ⓢ набор транспортируется при комнатной температуре

⚠ Никогда не храните МСЧ в пробирках для реагентов.

Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	Для выделения ДНК с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I в приборе MagNA Pure LC необходимы следующие дополнительные реагенты и оборудование: • стандартное лабораторное оборудование • дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов и ДНКазы в пробирки для образцов • центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки • вортекс • термоблок (65°C/95°C, для реакционных пробирок: 1.5 – 2 мл) * <i>поставляется Roche Applied Science</i>
Область применения	Для лабораторных исследований. Выделение высокоочищенной геномной ДНК из цельной крови млекопитающих или клеток крови (лейкоцитов, МНПК) или клеточных культур в приборе MagNA Pure LC. Очищенная ДНК может быть использована для тестирования в ПЦР в приборе LightCycler® или стандартных термоциклерах.
Длительность постановки	Настройка прибора MagNA Pure LC занимает примерно 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения ДНК составляет: • 45 - 90 мин. при обработке 1 - 32 образцов по протоколам выделения 'DNA I Blood_Cells High Performance' или 'DNA I High_Performance_external_lysis' • 30 - 60 мин. при обработке 1-32 образцов по протоколу выделения DNA I Blood_Cells Fast После настройки и запуска прибора MagNA Pure LC дополнительные манипуляции оператора не требуются. Дополнительные манипуляции требуются только для предварительных этапов выделения.

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 смешивайте реагенты из разных серий набора или разных флаконов одной серии набора.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Промывочный раствор I (флакон 1) и Лизирующий/связывающий буфер (флакон 4) содержат соли гуанидина, способные вызывать раздражение. 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.
- Не допускайте смешивания реактивов Лизирующего/связывающего буфера 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.
- Не допускайте контаминации реагентов бактериями, вирусами и нуклеазами. Отбор аликвот из флаконов с реагентами должен проводиться только одноразовыми дозаторами или свободными от нуклеаз наконечниками. Соблюдайте стандартные правила безопасности.
- Требования предосторожности при работе с РНК можно найти в Roche Applied Science LAB FAQs (http://www.roche-applied-science.com/labfaqs/p2_1.htm).
- 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.

Протокол выделения

Для обработки образцов цельной крови, кровяных клеток и клеточных культур с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I, необходимо установить новые протоколы программы MagNA Pure LC Software, Version 2.11 (или ниже). Названия 'DNA I Blood_Cells_High_Performance', 'DNA I High_Performance_External_Lysis' и 'DNA I Blood_Cells_Fast' должны появиться в окне выбора протокола экрана Sample Ordering программы MagNA Pure LC Software. Если данные протоколы не были установлены ранее, их можно заказать бесплатно. Если используется программное обеспечение версии 3.0 или выше, установка протоколов не требуется. Дополнительную информацию можно получить в местном представительстве Roche. С помощью приведенной ниже таблицы выберите протокол, соответствующий вашим образцам:

Название протокола	Тип образца	Процедура
DNA I Blood_Cells_High_Performance	- цельная кровь - клетки крови - клеточные культуры	- Данный протокол предназначен для получения максимального выхода ДНК и проведения ПЦР. Этапы связывания и элюции увеличены, при этом часть высокомолекулярной ДНК разрывается на фрагменты для более эффективной амплификации. - объем образца: 20-200 мкл - объем элюции: 100 мкл
DNA I High_Performance_External_Lysis	- цельная кровь - клетки крови - клеточные культуры	- Данный протокол идентичен приведенному выше, за одним исключением – он позволяет обрабатывать образцы, лизированные вне прибора MagNA Pure LC. Например, данный протокол оптимален, если место отбора образца и место выделения ДНК удалены друг от друга. В данном случае для сохранения стабильности ДНК к образцу добавляют лизирующий буфер, инактивирующий нуклеазы. Также данный протокол применяют, если образцы потенциально содержат патогенные агенты и требуют инактивации в отдельном боксе. - объем образца: 20-200 мкл - объем элюции: 100 мкл
DNA I Blood_Cells_Fast	- цельная кровь - клетки крови - клеточные культуры	- Данный протокол предназначен для процедур, не требующих большого количества ДНК, например, мутационного анализа. При данном протоколе выход ДНК составляет примерно половину от приведенных выше протоколов. - объем образца: 20-200 мкл - объем элюции: 100 мкл

Образцы

Для получения оптимальных результатов при последующих процедурах, особенно ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®, не используйте образцы большего объема, превышающего указанный в инструкции к набору. Максимальный объем образцов при работе с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I:

- до 200 мкл цельной крови (содержащей ЭДТА или цитрат в качестве антикоагулянта), содержащей не более 1×10^6 лейкоцитов или МНПК
- до 1×10^6 клеток крови (лейкоцитов или МНПК) или культуральных клеток.

⚠ Никогда не используйте образцы с объемом больше указанного в инструкции к набору. В противном случае может происходить потеря МСЧ, что приведет к снижению эффективности выделения.

⚠ Никогда не используйте образцы цельной крови, содержащие более 1×10^6 лейкоцитов или МНПК. В клинических образцах содержание лейкоцитов или МНПК в крови может превышать указанный показатель. Если вы работаете с такими образцами (содержащими 1×10^6 клеток крови), всегда считайте количество лейкоцитов или МНПК с помощью гемоцитометра и перед выделением ДНК разводите кровь с помощью PBS. Обратите внимание, что автоматизированные счетчики иногда выдают результаты, отличающиеся от полученных с помощью ручного гемоцитометра.

⚠ Протоколы выделения "DNA I" созданы для выделения из цельной крови человека. Обратите внимание, что у разных видов млекопитающих концентрации клеток крови могут различаться. Для некоторых видов животных может потребоваться использовать образцы меньшего объема, чтобы не допустить увеличения числа клеток в образце.

⚠ Рассматривайте все образцы как потенциально инфекционные.

⚠ Лучше всего использовать свежие или замороженные образцы. Избегайте использования образцов, хранившихся при комнатной температуре (КТ). Образцы цельной крови могут храниться при КТ не более 1 дня или при $+2 - +8^\circ\text{C}$ не более 1 недели. Для длительного хранения образцы цельной крови необходимо заморозить.

Приготовление
рабочих
растворов

Перед началом процедуры выделения, приготовьте рабочие растворы, как указано ниже.

- ④ Все остальные растворы готовы к работе.

⚠ Все буферы представляют собой прозрачные растворы. Не используйте буфер, если во флаконе образовался преципитат. Если виден преципитат, растворите его, нагревая флакон при 37°C и периодически помешивая. Не грейте буфер при 37°C дольше, чем это необходимо для полного растворения преципитата.

Перед использованием, охладите буфер до комнатной температуры (+15 - +25°C).

⚠ Перед началом работы доведите буферы до комнатной температуры (+15 - +25°C). При использовании реагентов, температура которых выходит за рекомендованные рамки, работа набора может быть неоптимальной.

⚠ Используйте количество реагентов, соответствующее числу образцов.

⚠ Не храните протейназу К и суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. Все остальные реагенты, остающиеся в пробирках для реагентов после завершения постановки, могут использоваться в следующей постановке, если она проводится в тот же день. Более длительное хранение не рекомендовано.

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Магнитные стеклянные частицы (флакон 5)	Тщательно перемешайте суспензию МСЧ. Перемешайте на вортексе непосредственно перед использованием. Чтобы получить гомогенную смесь. Во время хранения частицы оседают на дно флакона. ⚠ для получения оптимальных результатов, вносите МСЧ в прибор перед самым запуском постановки (чтобы свести к минимуму оседание частиц). Всегда используйте точное количество МСЧ, рекомендованное программой.	Храните МСЧ при комнатной температуре (+15 - +25°C.) ⚠ никогда не храните суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. ⚠ Не оставляете МСЧ в открытом флаконе или пробирке для реагентов, поскольку испарение спирта может привести к снижению эффективности выделения.

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Протеиназа К (флакон 4)	Восстановите всю протеиназу К, внеся в каждый флакон по 3 мл буфера для элюции (флакон 6). Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата. Только после полного растворения добавьте во флакон еще 2 мл буфера для элюции для получения конечного объема. ⚠ После восстановления раствор протеиназы К может быть мутным. Это связано с присутствием стабилизирующих добавок в реагенте. Это не оказывает влияния на работу фермента. 🕒 Один флакон протеиназы К рассчитан на выделение 32 образцов.	После восстановления раствор протеиназы К стабилен в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C.

Контроли

Всегда используйте в постановках соответствующие контроли, особенно если для выделенных образцов планируется проведение качественного анализа образцов РНК (например, в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®). 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), вносимая в каждый образец в известном количестве контрольная матрица (например, плазмидная ДНК).

🕒 Внутренний контроль (ВК) до начала выделения и проходит затем все этапы выделения и амплификации, что и мишень, в той же реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно при проведении энзиматических реакций, таких как ПЦР, поскольку эффективность процесса ПЦР может снижаться при наличии в очищенном образце ингибиторов. Кроме того, внутренний контроль служит для мониторинга возможных потерь материала во время выделения.

③ Для количественных тестов в приборе LightCycler®, в качестве внутреннего контроля используют синтетические двуцепочечные молекулы ДНК с сайтами посадки праймеров, идентичными мишени, но имеющие свой уникальный участок посадки зондов для дифференциации ампликонов мишени и ВК. Разделение сигналов от мишени и ВК проводится за счет применения разных красителей в тестах формата HybProbe. Подробные сведения о применении ВК в системе LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® 12/2000 «Абсолютный количественный анализ при использовании внешних стандартов и внутреннего контроля» ("Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control") на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2.2 Предварительные этапы

Цельная кровь

• Предварительная подготовка образца не требуется: перенесите 20-200 мкл цельной крови в картридж для образцов.

• При работе по протоколу High_Performance_External_Lysis, добавьте к образцу крови 300 мкл Лизирующего/связывающего буфера и тщательно перемешайте. Перенесите лизат в Картридж для образцов или храните его, чтобы выделить позже (для длительного хранения заморозьте при -20°C).

⚠ Если объем образца крови < 200 мкл. Доведите его до 200 мкл с помощью PBS.

⚠ Если образец крови содержит > 1 x 10⁶ клеток, используйте меньший объем образца (разведите образец).

③ Образцы крови могут храниться при +15 - +25°C в течение 1 дня без потери ДНК или до 1 недели с незначительной потерей содержания ДНК. Для длительного хранения образцов крови рекомендуется температура +2 - +8°C или замораживание.

Лейкоциты

Для предварительного выделения до 1 x 10⁶ лейкоцитов из свежей стабилизированной крови млекопитающих выполните приведенные ниже действия.

① Нагрейте буфер для лизиса эритроцитов* до КТ и охладите PBS на льду.

② Вам потребуется два объема буфера для лизиса эритроцитов на каждый образец крови.

③ Добавьте 1 объем крови в 2 объема буфера для лизиса эритроцитов.

④ Инкубируйте при КТ 15 мин. в роллерном инкубаторе, пока не образуется прозрачный раствор (то есть произойдет полный лизис эритроцитов).

⚠ Не перемешивайте на вортексе!

⑤ Центрифугируйте 10 мин. при 700 x g (при КТ).

⑥ Осторожно удалите супернатант наконечником.

⑥ Растворите осадок лейкоцитов в 1 мл буфера для лизиса эритроцитов и перенесите в чистый эппендорф.

⑦ Центрифугируйте 3 мин. при 600 x g (при КТ).

⑧ Осторожно удалите супернатант наконечником.

⑨ Растворите осадок лейкоцитов в холодном PBS и держите на льду, пока проводите подсчет клеток.

⑩ • Возьмите аликвоту раствора лейкоцитов, содержащую не более 1×10^6 клеток.

• Центрифугируйте 3 мин. при 600 x g (при КТ).

⑪ • Осторожно удалите супернатант наконечником.

• Растворите клеточный осадок в 200 мкл PBS. После того, как клетки ресуспендированы, немедленно переходите к следующему этапу.

• (Дополнительный этап) При работе по протоколу High_Performance_External_Lysis, внесите 300 мкл Лизирующего/связывающего буфера в суспензию клеток и тщательно перемешайте. Перенесите лизат в Картридж для образцов или храните, чтобы выделить позднее (для длительного хранения заморозьте при -20°C).

⑫ Перенесите суспензию в Картридж для образцов.

⑬ Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и начните процедуру выделения, как описано в Разделе 2.3.

Для предварительного выделения до 1×10^6 МНПК из свежей стабилизированной крови млекопитающих выполните приведенные ниже действия.

① Отберите до 8 мл крови млекопитающих в пробирку Vacutainer CPT (BD Diagnostics), затем выделите МНПК из крови в соответствии с инструкцией производителя пробирок.

② Перенесите супернатант, содержащий МНПК, в пробирку типа Falcon объемом 15 мл и поместите на лед, пока проводите подсчет клеток.

③ • Отберите аликвоту суспензии МНПК, содержащую не более 1×10^6 клеток.

• Добавьте 1 часть охлажденного PBS к 1 части суспензии МНПК

④ Центрифугируйте 15 мин. при 300 x g (при КТ).

МНПК

Клеточные культуры

- Осторожно удалите супернатант наконечником.
- Растворите клеточный осадок в 200 мкл PBS. После того, как клетки ресуспендированы, немедленно переходите к следующему этапу.
- (Дополнительный этап) При работе по протоколу High_Performance_External_Lysis, внесите 300 мкл Лизирующего/связывающего буфера в суспензию клеток и тщательно перемешайте. Перенесите лизат в Картридж для образцов или храните, чтобы выделить позднее (для длительного хранения заморозьте при -20°C).

- 1 Перенесите суспензию в Картридж для образцов.

- 2 Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и начните процедуру выделения, как описано в Разделе 2.3.

Для предварительного выделения вручную до 1×10^6 культуральных клеток выполните приведенные ниже действия.

- 1 Осадите клетки центрифугированием (10 мин. при 300 x g).

- Осторожно удалите супернатант наконечником.
- Растворите клеточный осадок в 200 мкл PBS. После того, как клетки ресуспендированы, немедленно переходите к следующему этапу.
- (Дополнительный этап) При работе по протоколу High_Performance_External_Lysis, внесите 300 мкл Лизирующего/связывающего буфера в суспензию клеток и тщательно перемешайте. Перенесите лизат в Картридж для образцов или храните, чтобы выделить позднее (для длительного хранения заморозьте при -20°C).

- 1 Перенесите суспензию в Картридж для образцов.

- 2 Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и начните процедуру выделения, как описано в Разделе 2.3.

2.3 Протокол выделения ДНК

Общие замечания

- описанная ниже процедура рассчитана на одновременную обработку 32 образцов.
- Если вы обрабатываете меньшее количество образцов, пропорционально уменьшите объем всех реагентов (см. экран Start Information прибора MagNA Pure LC).
- Программа автоматически рассчитывает необходимое количество реагентов и дает подсказки на этапах запуска постановки.
- вы не можете запустить прибор, пока не будет закрыт зажим для картриджа образцов, пробирок для реагентов и реакционных наконечников.
- Если вы запрограммировали разведение элюированной ДНК, вам потребуется дополнительная пробирка для реагентов M30 в позиции R7. В качестве буфера для разведения ДНК используйте до 900 мкл Буфера для элюции или свободного от нуклеаз 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Работа с данным продуктом

2.3.1 Протокол

Выделение ДНК из образцов проводится по протоколу, приведенному ниже.

Запуск прибора и программы

- Включите прибор и компьютер, затем запустите программу MagNA Pure LC.
- Выберите необходимый протокол:

Если вы работаете с ...	Тогда используйте протокол ...
Нелизированными образцами цельной крови, клеток крови или культуральных клеток	DNA I Blood_Cells_High_Performance или DNA I Blood_Cells_Fast
Лизированными образцами цельной крови, клеток крови или культуральных клеток	DNA I High_Performance_External_Lysis

- Следуйте инструкциям программы и укажите количество образцов. Введите объем образца и объем элюции в соответствующих окнах. Программа рассчитает необходимое количество каждого реагента.

Заполнение пробирок для реагентов

Перед запуском процедуры выделения, внесите в пробирки для реагентов необходимый объем реагентов (доведенные до комнатной температуры). Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на экране Start Information, затем закройте каждую пробирку крышкой.

⚠ Закрывайте пробирки с реагентами крышками, чтобы не допустить испарения реагентов. Однако, даже закрытые, пробирки для реагентов не подходят для длительного хранения реагентов.

⚠ Загрузите указанное на экране Start Information количество МСЧ в прибор непосредственно перед запуском постановки. Это необходимо делать перед самым запуском для предотвращения оседания МСЧ.

Установка пробирок для реагентов на платформу для реагентов/образцов

Следуя указаниям на экране Start Information, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) в платформу для реагентов/образцов.

☺ Цветная "Рамка для размещения **", накладываемая на итатив для реагентов и помогающая загружать реагенты, прилагается бесплатно.

Загрузка образцов

Перенесите Картридж для образцов с лизатами образцов в прибор MagNA Pure LC.

Запуск постановки

- На экране Start Information подтвердите правильность загрузки расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих текстовых окнах.
- Нажмите кнопку 'OK', чтобы запустить автоматизированную процедуру выделения ДНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.

2.3.2 Хранение выделенной ДНК

⚠ Для сохранения максимальной стабильности выделенной ДНК, немедленно начните подготовку ПЦР. Не храните выделенные нуклеиновые кислоты в Картридже для хранения в охлаждающем блоке I. Для длительного хранения (в течение нескольких недель), закройте Картридж для хранения пленкой* и храните ДНК при -15 - -25°C. Лучше хранить ДНК в аликвотах, чтобы избежать многократного оттаивания/замораживания выделенных нуклеиновых кислот.

2.3.3 Последующий анализ

Прибор MagNA Pure LC Instrument может помочь в подготовке реакции ПЦР, внося выделенную ДНК и мастермиксы для ПЦР в капилляры LightCycler® или стандартный пробирки и плашки для ПЦР (Рекомендуемые плашки приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC). Для последующего анализа вы можете поместить капилляры LightCycler® в вынимаемый охлаждающий блок MagNA Pure LC в центрифужных адаптерах LC или в карусели для образцов LC. Этапы последующего анализа можно запрограммировать заранее, до начала выделения, или после его завершения. Подробные сведения о последующем после выделения анализе приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure.

Результаты

3. Результаты Стабильность ДНК

ДНК выделяли из образцов цельной крови, клеток K562 и HeLa с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit 1 и методом выделения вручную. Выделенную ДНК анализировали методом электрофореза в агарозном геле. При молекулярном весе около 50 kb ДНК сохраняла высокое качество и не имела признаков деградации (Рисунок 1). Выделенная в приборе MagNA Pure LC ДНК обладала более высоким качеством с точки зрения стабильности и чистоты (контаминации РНК).

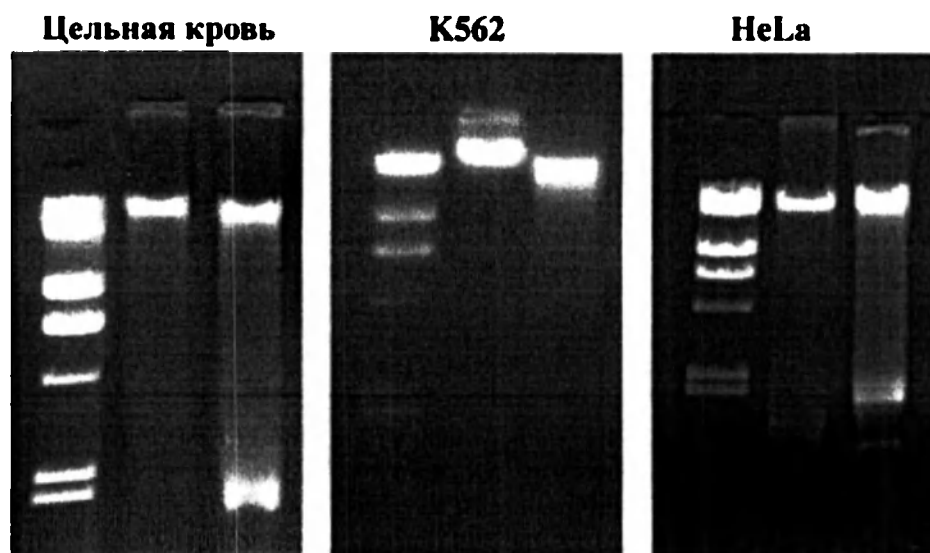


Рисунок 1: Дорожка 1: Маркер молекулярных масс XV*; Дорожка 2: ДНК, выделенная в приборе MagNA Pure LC; Дорожка 3 : ДНК, выделенная вручную конкурентным методом.

Выход и степень очистки

ДНК выделяли из различных типов клеточных культур и цельной крови человека. Линейность выхода определяли, выделяя ДНК из разного объема материала. Выход определяли, измеряя оптическую плотность при OD260 и методом электрофореза в агарозном геле. По сравнению со стандартными методами выделения ДНК (например, в пробирках, снабженных фильтрами), метод выделения MagNA Pure LC давал сходный или более высокий выход ДНК (см. таблицу ниже).

Обычно соотношение OD260/280 для выделенной ДНК составляло 1.9 ± 0.1 , что указывает на высокую чистоту препаратов. Ингибирование последующего анализа в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler[®] 1.5 отмечено не было (см. таблицу ниже).

Тип образца	Выход ДНК (мкг)	Чистота (OD _{260/280})	Точка пересечения ⁽¹⁾
Цельная кровь			
20 мкл	1.5	1.9 ± 0.1	25.6
50 мкл	3.2		24.8
100 мкл	4.6		24.7
200 мкл	7.2		23.6
Культура клеток (K562)			
1 x 10 ³	- ⁽²⁾	1.9 ± 0.1	34.5
1 x 10 ⁴	- ⁽²⁾		30.1
1 x 10 ⁵	1.8		25.8
2.5 x 10 ⁵	3.5		24.3
5 x 10 ⁵	6.0		23.4
1 x 10 ⁶	10.6		23.1
Культура клеток (HeLa)			
1 x 10 ³	- ⁽²⁾	1.9 ± 0.1	35.8
1 x 10 ⁴	- ⁽²⁾		30.2
1 x 10 ⁵	2.1		25.8
2.5 x 10 ⁵	5.7		24.3
5 x 10 ⁵	6.0		24.4
1 x 10 ⁶	11.1		23.8

⁽¹⁾ Величина точки пересечения (CP) отражает выделенное количество ДНК и рассчитывается по результатам анализа в ПЦР в реальном времени (здесь Фактор V Лейден) в карусельной системе LightCycler® (прибор LightCycler® 1.5). Количественный анализ проводится на основании использования стандартов ДНК.

⁽²⁾ OD260 не удалось определить из-за слишком низкой концентрации ДНК в образце.

Антикоагулянт

Образцы крови, содержащие разные антикоагулянты (ЭДТА, цитрат) выделяли по протоколу "DNA I Blood_Cells_High_Performance". Ингибирование последующего анализа в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler® 1.5 отмечено не было.

Воспроизводимость (внутри постановки)

32 образца цельной крови объемом 20 мкл или 10⁵ клеток K562 выделяли по протоколам DNA I. Стандартные отклонения выхода и чистоты ДНК составляли < 10%, варьирование величин точки пересечения при анализе в системе LightCycler® 2.0 (прибор LightCycler® 1.5) составляло < 3%.

Результаты

Воспроизводимость (между постановками)

6 образцов цельной крови объемом 20 мкл выделяли по протоколу "DNA I Blood_Cells_High_Performance" или протоколу "DNA I Blood_Cells_Fast" в 5 независимых постановках. Стандартные отклонения выхода и чистоты ДНК составляли < 10%, варьирование величин точки пересечения при анализе в системе LightCycler® 2.0 (прибор LightCycler® 1.5) составляло < 3%.

Последующий анализ

ДНК из образцов разного типа (цельная кровь, клетки крови, культуральные клетки) тестировали в ПЦР в реальном времени в карусельной системе LightCycler® (прибор LightCycler® 1.5), в ПЦР в стандартных термоциклерах, в рестрикционном анализе и Саузерн-блоте. ДНК была пригодна для всех типов экспериментов и ее характеристики были идентичными или превосходили отмечаемые для ДНК, выделенной стандартными методами.

Ⓢ Более подробные сведения о результатах экспериментов и областях применения можно получить на сайте <http://www.magnapure.com> или в местном представительстве Roche.

4. Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
Слипание частиц/проблемы с магнитным разделением частиц	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
	Магнитные стеклянные частицы были намагничены перед началом работы.	Избегайте контакта МСЧ с магнитом.
Дегградация ДНК	Не оптимальное хранение образцов	Используйте свежие или замороженные образцы. Избегайте использования образцов, хранившихся при комнатной температуре длительное время.
Низкий выход ДНК	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. Тщательно перемешайте образцы на вортексе перед началом работы
	Неправильное хранение образцов	Используйте свежие или замороженные образцы. Избегайте использования образцов, хранившихся при комнатной температуре длительное время.
ДНК недостаточно чистая	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
Низкое качество последующей ПЦР	Слишком много ДНК в ПЦР.	• Проверьте концентрацию ДНК в выделенных образцах и измените количество элюата, вносимого в ПЦР, или разведите элюат например, 1:10). Оптимальное количество ДНК: 10–100 нг/ПЦР. • Используйте меньшее количество материала для выделения. Оптимальные результаты получают при выделении из 20 мкл цельной крови или 10^5 клеток.
	Недостаточно ДНК в ПЦР	• Измените количество элюата, вносимого в ПЦР, или проводите выделение из большего количества материала. Оптимальное количество ДНК: 1 - 100 нг/ПЦР, максимум: около 1 мкг. • Проводите выделение из большего количества материала.
	Низкая степень очистки ДНК	Используйте меньшее количество материала для выделения. Оптимальные результаты получают при выделении из 20 мкл цельной крови или 10^5 клеток.
	Реагенты и протокол ПЦР не оптимизированы	Проверьте реагенты и протокол ПЦР с помощью положительного контроля ДНК (например, геномной ДНК человека*)
	Время денатурации слишком мало.	Оптимизируйте ПЦР, например, включите в протокол ПЦР этап начальной денатурации 30 сек.- 3 мин.
	Высокая концентрация гепарина в образце крови	Применяйте протокол "DNA I Blood_Cells_Fast" вместо протокола "DNA I Blood_Cells_High_Performance", или используйте образцы крови с ЭДТА или цитратом
Элюат слегка красного цвета	Минимальная абразия магнитных частиц	Центрифугируйте элюат при низких значениях g (около 1,000 об./мин.) для удаления взвеси. Ⓢ Красный цвет элюата не оказывает влияния на последующую ПЦР в системе LightCycler®.

Дополнительная информация о продукте

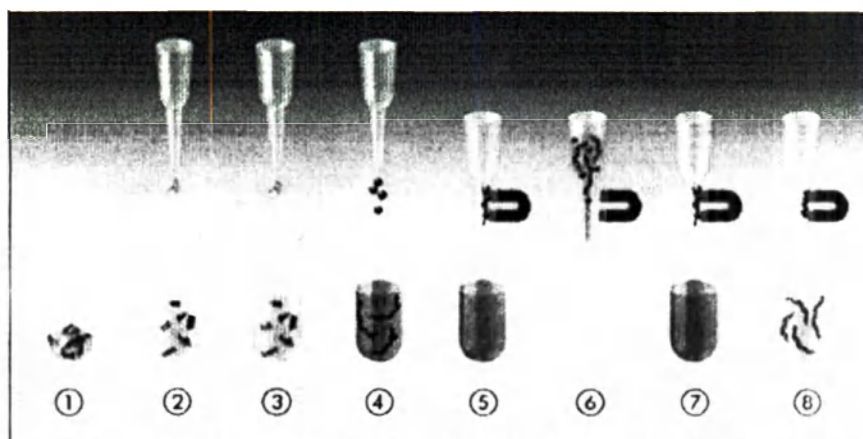
5. Дополнительная информация о продукте

Назначение данного продукта

Набор MagNA Pure LC DNA Kit I применяется для выделения высокоочищенной, недеградированной ДНК из 1-32 образцов цельной крови млекопитающих, клеток крови или культуральных клеток в приборе MagNA Pure LC. Выделенная ДНК соответствует стандартам качества, необходимым для проведения высокочувствительного количественного ПЦР-анализа в приборе LightCycler®.

Принцип теста

Процедура выделения основана на технологии магнитных частиц-носителей. Лизис образцов проводят, инкубируя их со специальным буфером, содержащим хаотропные соли и протеиназу К. Затем добавляются магнитные стеклянные частицы, на поверхности которых связывается ДНК. Несвязавшиеся вещества удаляются в процессе нескольких этапов отмывки, затем очищенная ДНК элюируется. Ниже приведены этапы процесса выделения MagNA Pure LC DNA:



① Образцы помещают в лунки Картриджа для образцов.

② К образцам добавляется лизирующий/связывающий буфер, в результате происходит полный лизис клеток и высвобождение нуклеиновых кислот. Нуклеазы при этом денатурируют.

③ В образцы вносится протеиназа К, в результате происходит расщепление белков.

④ ДНК связывается на кремниевой поверхности МСЧ, внесенных в образцы, в присутствии хаотропных солей, изопропанола и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.

⑤ МСЧ со связавшейся ДНК отделяются с помощью магнита от лизированного образца.

⑥ МСЧ со связавшейся ДНК промываются несколько раз промывочным буфером, чтобы удалить несвязавшиеся вещества, такие как белки (нуклеазы), клеточные мембраны, ингибиторы ПЦР (гепатин и гемоглобин), а также чтобы снизить концентрацию хаотропных солей.

⑦ МСЧ со связавшейся ДНК снова отделяют с помощью магнита от промывочного буфера, содержащего остатки материала образца.

⑧ Очищенная ДНК элюируется с МСЧ при 70°C в лунках Картриджа для элюции, при этом сами МСЧ отбираются реакционным наконечником и удаляются.

Ниже приведены основные действия при выделении с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (протокол 'DNA I Blood_Cells_High_Performance'):

① Все необходимые реагенты вносятся в рабочий картридж.

② К образцу добавляются 300 мкл лизирующего/связывающего буфера и перемешиваются; при этом происходит высвобождение нуклеиновых кислот и инактивация протеиназ.

③ Смесь добавляется к 100 мкл протеиназы К, затем перемешивается.

④ Добавляется 150 мкл суспензии МСЧ, перемешивается и инкубируется.

⑤ Частицы переносятся в 850 мкл промывочного буфера I, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑥ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑦ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑧ Частицы вносятся в буфер для элюции (нагревательный блок), перемешиваются, инкубируются, происходит элюция ДНК.

⑨ ДНК отделяется от МСЧ при пипетировании маленькими реакционными наконечниками в течение 5 минут.

⑩ Отделение и удаление МСЧ.

Контроль
качества

ДНК выделяли из образцов цельной крови человека и культуральных клеток по протоколу "DNA I Blood_Cells_High_Performance" и анализировали ее стабильность, выход, чистоту и способность амплифицироваться в ПЦР в реальном времени в системе LightCycler®. Полученные результаты экспериментов приведены в Разделе 3.

Литература

1. Fan, H. et al. (2006). Detection of Common Disease-Causing Mutations in Mitochondrial DNA (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis with Stroke-Like Episodes MTTL1 3243 A>G and Myoclonic Epilepsy Associated with Ragged-Red Fibers MTTK 8344A>G) by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Mol Diagn* **8**, 277-281.
2. Hardick, J. et al. (2006). Performance of the Gen-Probe Transmission-Mediated Amplification Research Assay Compared to That of a Multitarget Real-Time PCR for *Mycoplasma genitalium* Detection. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1236-1240.
3. Willi, B. et al. (2006). Prevalence, Risk Factor Analysis, and Follow-Up of Infections Caused by Three Feline Hemoplasma Species in Cats in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 961-969.
4. Bernardini, S. et al. (2005). Glutathione S-Transferase P1 *C Allelic Variant Increases Susceptibility for Late-Onset Alzheimer Disease: Association Study and Relationship with Apolipoprotein E {epsilon}4 Allele. *Clin Chem* **51**, 944-951.
5. Chahroudi, A. et al. (2005). Vaccinia Virus Tropism for Primary Hematolymphoid Cells Is Determined by Restricted Expression of a Unique Virus Receptor. *Journal of Virology* **79**, 10397-10407.
6. Chen, R. et al. (2005). Presence of DNA of Human Papillomavirus 16 but No Other Types in Tumor-Free Tonsillar Tissue. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1408-1410.
7. Grannemann, S. et al. (2005). LightTyper Assay with Locked-Nucleic-Acid-Modified Oligomers for Genotyping of the Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms A896G and C1196T. *Clin Chem* **51**, 1523-1525.
8. Krafft, A.E. et al. (2005). Time-Motion Analysis of 6 Cystic Fibrosis Mutation Detection Systems. *Clin Chem* **51**, 1116-1122.
9. Pont-Kingdon, G. et al. (2005). Direct molecular haplotyping by melting curve analysis of hybridization probes: beta 2-adrenergic receptor haplotypes as an example. *Nucl. Acids Res.* **33**, e89.
10. Tükel, T. et al. (2005). A new syndrome, congenital extraocular muscle fibrosis with ulnar hand anomalies, maps to chromosome 21qter. *J. Med. Genet.* **42**, 408-415.
11. Verri, A. et al. (2005). Two-Step Genetic Screening of Thrombophilia by Pyrosequencing. *Clin Chem* **51**, 1282-1284.
12. Willi, B. et al. (2005). Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2581-2585.
13. Bhagavatula, M.R.K. et al. (2004). Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 3181-3188.
14. Hylenius, S. et al. (2004). Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 237-246.
15. Oberti, C. et al. (2004). Genome-Wide Linkage Scan Identifies a Novel Genetic Locus on Chromosome 5p13 for Neonatal Atrial Fibrillation Associated With Sudden Death and Variable Cardiomyopathy. *Circulation* **110**, 3753-3759.
16. Pochampally, R.R. et al. (2004). Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* **103**, 1647-1652.
17. Pont-Kingdon, G. et al. (2004). Long-Range (17.7 kb) Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Method for Direct Haplotyping of R117H and IVS-8 Mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gene. *Mol. Diagn.* **6**, 264-270.
18. Rougemont, M. et al. (2004). Detection of Four Plasmodium Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5636-5643.
19. Stevens, M.P. et al. (2004). Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 Genotypes Detected in Eye Swab Samples from Remote Australian Communities. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2501-2507.
20. Wang, Q. et al. (2004). The common SCN5A mutation R1193Q causes LQTS-type electrophysiological alterations of the cardiac sodium channel. *J. Med. Genet.* **41**, e66.
21. Wilson, D. et al. (2004). Comparison of Five Methods for Extraction of *Legionella pneumophila* from Respiratory Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5913-5916.

22. Emanuel, P.A. et al. (2003). Detection of *Francisella tularensis* within Infected Mouse Tissues by Using a Hand-Held PCR Thermocycler. *J. Clin. Microbiol.* 41, 689-693.
23. Ferreiros-Vidal, I. et al. (2003). The three most common CARD15 mutations associated with Crohn's disease and the chromosome 16 susceptibility locus for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 42, 570-574.
24. Frydelund-Larsen, L. et al. (2003). No AZF deletion in 160 patients with testicular germ cell neoplasia. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 517-521.
25. Hardick, J. et al. (2003). Use of the Roche LightCycler Instrument in a Real-Time PCR for *Trichomonas vaginalis* in Urine Samples from Females and Males. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5619-5622.
26. Kahnoski, K. et al. (2003). Alterations of the Birt-Hogg-Dube gene (BHD) in sporadic colorectal tumours. *J. Med. Genet.* 40, 511-515.
27. Mengelle, C. et al. (2003). Automated Extraction and Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Whole Blood by Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3840-3845.
28. Pont-Kingdon, G. et al. (2003). Rapid Detection of Aneuploidy (Trisomy 21) by Allele Quantification Combined with Melting Curves Analysis of Single-Nucleotide Polymorphism Loci. *Clin Chem* 49, 1087-1094.
29. Tükel, T. et al. (2003). A Novel Semiquantitative Polymerase Chain Reaction/Enzyme Digestion-Based Method for Detection of Large Scale Deletions/Conversions of the CYP21 Gene and Mutation Screening in Turkish Families with 21-Hydroxylase Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 5893-5897.
30. Wilson, D.A. et al. (2003). Detection of *Legionella pneumophila* by Real-Time PCR for the mip Gene. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3327-3330.
31. Chen, S. et al. (2002). SNP S1103Y in the cardiac sodium channel gene SCN5A is associated with cardiac arrhythmias and sudden death in a white family. *J. Med. Genet.* 39, 913-915.
32. Snyder, M.R. et al. (2002). Formation of the Killer Ig-Like Receptor Repertoire on CD4+CD28null T Cells. *J Immunol* 168, 3839-3846.
33. Williams, S.M. et al. (2002). Automated DNA Extraction for Real-Time PCR. *Clin Chem* 48, 1629-1630.

Вспомогательная информация

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 ●, ● 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
ТП	Точка пересечения
КВ	Коэффициент вариации
МСЧ	Магнитные стеклянные частицы
МНПЧ	Мононуклеары периферической крови
КТ	Комнатная температура

6.2 Изменения относительно предыдущей версии

- 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:

- Семейство MagNA Pure, включая расходные материалы, комплектующие, наборы и прочие продукты:

<http://www.magnapure.com>

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

Приборы
комплектующие

Продукт	Комплектация	Кат.№
Прибор MagNA Pure LC	1 прибор с комплектующими	12 236 931 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, центрифужные адаптеры LC	1 охлаждающий блок с 32 центрифужными адаптерами LightCycler®	12 190 664 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на карусель LC	1 охлаждающий блок	12 189 704 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на 96-луночную ПЦР-плашку	1 охлаждающий блок	12 189 674 001
DNA I рамка для размещения	1 рамка	12 256 096 001
Пленка для картриджей MagNA Pure LC	200 пленок	03 118 827 001
Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
Прибор LightCycler® 1.5	1 прибор с комплектующими	04 484 495 001
Карусельная центрифуга LightCycler® Carousel	1 центрифуга с ротором (230 V)	03 709 582 001
Centrifuge 2.0	1 центрифуга с ротором (110 V)	03 709 507 001

Вспомогательная информация

	Продукт	Комплектация	Кат. №
Наборы MagNA Pure LC для выделения ДНК	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (ткани)	1 набор (192 выделения)	03 186 229 (X)1
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (бактерии, грибы)	1 набор (192 выделения)	03 264 785 (X)1
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема)	1 набор (96 выделений из 1 мл цельной крови)	03 310 515 (X)1
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance	1 набор (192 выделения)	03 542 394 (X)1
	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (ткани)	1 набор (192 выделения)	03 330 591 (X)1
	MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (кровь, клетки крови)	1 набор (192 выделения)	03 004 015 (X)1
	MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (ткани)	1 набор (192 выделения)	03 172 627 (X)1
	MagNA Pure LC mRNA HS Kit	1 набор (192 выделения)	03 267 393 (X)1
Наборы MagNA Pure LC для выделения тотальных нуклеиновых кислот	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	1 набор (192 выделения)	03 038 505 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема)	1 набор (192 выделения)	03 264 793 (X)1

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 и
техническая
поддержка**

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 страницу 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.

0707 122427 66001 R



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



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

Набор реагентов для выделения ДНК из образцов большого объема **MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume**

Версия июля 2008

Набор для выделения геномной ДНК из образцов большого объема цельной крови млекопитающих, клеток крови или клеточных культур в приборе MagNA Pure LC

Кат. №. 03 310 515 001

Набор рассчитан на
96 выделений из 1 мл крови
192 выделения из 300 – 500 мкл крови
288 выделений из 20 – 200 мкл крови
192 выделения из клеток крови или
клеточных культур

Хранить при температуре +15 - +25°C.

www.roche-applied-science.com

1. Назначение данного продукта.....	3
Количество тестов	3
Содержание набора	3
Условия хранения и стабильность	4
Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	4
Область применения	4
Длительность постановки	4
2. Работа с данным продуктом	5
2.1 Предварительные действия	5
Меры предосторожности	5
Протокол выделения	5
Образцы	7
2.2. Приготовление рабочих растворов	8
Контроли	9
2.3 Предварительные этапы	10
Цельная кровь	10
Лейкоциты	10
МНПК	11
Клеточные культуры	11
2.4 Протокол выделения ДНК	12
Общие замечания	12
Протокол	12
Хранение выделенной ДНК	13
Последующий анализ	13
3. Результаты	14
3.1 Стабильность ДНК	14
3.2 Выход и степень очистки	14
3.3. Удаление антикоагулянтов	15
3.4. Перекрестная контаминация	15
3.5. Воспроизводимость	15
4. Анализ ошибок	17
5. Дополнительная информация о продукте	18
5.1 Назначение данного продукта	18
Принцип теста	18
5.2. Контроль качества	19
6. Вспомогательная информация	20
6.1 Обозначения	20
Текстовые обозначения	20
Символы	20
Аббревиатуры	20
6.2 Изменения относительно предыдущей версии	20
6.3 Информация для заказа	21
6.4 Ограничения, налагаемые лицензией	23
6.5 Торговые марки	23

1. Назначение данного продукта

Количество тестов

Количество выделений зависит от выбранного протокола:

- 96 выделений из 1 мл крови
- 192 выделения из 300 – 500 мкл крови
- 288 выделений из 20 – 200 мкл крови
- 192 выделения из клеток крови или клеточных культур

Ⓢ набор рассчитан на обработку 192 образцов в сериях по 32. Если обрабатывать одновременно менее 32 образцов, часть реагентов будет расходована напрасно и оставшегося объема будет недостаточно для обработки количества образцов, указанного выше.

Содержание набора

Ⓢ Лизирующий/связывающий буфер содержит синий краситель, предназначенный для детекции сгустков при автоматизированном выделении ДНК в приборе MagNA Pure LC.

Пробирка / Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
1 черная	Wash Buffer I (Промывочный буфер I)	• 3 флакона по 100 мл • для удаления ингибиторов ПЦР
2 синяя	Wash Buffer II (Промывочный буфер II)	• 3 флакона по 60 мл • для удаления солей, белков и т.д..
3 красная	Wash Buffer III (Промывочный буфер III)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления остаточных солей
4 зеленая	Lysis Buffer (лизирующий буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для лизиса клеток и связывания ДНК
5 бежевая	Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension (Магнитные стеклянные частицы, МСЧ, суспензия)	• 6 стеклянных флаконов с суспензией МСЧ • для связывания ДНК
6 желтая	Elution Buffer (Элюиционный буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для элюции очищенной ДНК
7 прозрачная	Proteinase K Incubation Buffer II (инкубационный буфер для протеиназы К)	• 1 флакон, 100 мл • для восстановления протеиназы К
8 розовая	Proteinase K (Протеиназа К)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления белков

Назначение данного продукта

Условия хранения и стабильность

• Компоненты набора стабильны при температуре +2 - +8°C до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Ⓢ Набор транспортируется при комнатной температуре.

⚠ Никогда не храните МСЧ в пробирках для реагентов.

Необходимые дополнительные оборудование и реагенты

Для выделения ДНК с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I в приборе MagNA Pure LC необходимы следующие дополнительные реагенты и оборудование:

- стандартное лабораторное оборудование
- дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов в картридж MagNA Pure LC.
- центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки
- вортекс
- могут потребоваться для некоторых протоколов:
 - PBS* (для предварительного выделения клеток крови)
 - Лизирующий буфер для эритроцитов* (для предварительного выделения лейкоцитов)
 - Вакутейнер CPT (BD Diagnostics; для предварительного выделения МНПК)
 - гемоцитометр (например, производства Neubauer с камерами для подсчета)

* поставляется Roche Applied Science

Область применения

Для лабораторных исследований. Выделение высокоочищенной геномной ДНК из цельной крови млекопитающих, клеток крови (лейкоцитов, МНПК) или клеточных культур в приборе MagNA Pure LC. Очищенная ДНК может быть использована для тестирования в ПЦР в приборе LightCycler® или стандартных термоциклерах.

Длительность постановки

Настройка прибора MagNA Pure LC занимает примерно 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения ДНК составляет:

- 180 мин. при обработке 32 образцов цельной крови объемом 1 мл каждый
- 140 мин. при обработке 32 образцов цельной крови объемом до 500 мкл или образцов клеток крови/клеточных культур.

После настройки и запуска прибора MagNA Pure LC дополнительные манипуляции оператора не требуются. Дополнительные манипуляции требуются только для предварительных этапов выделения.

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 смешивайте реагенты из разных серий набора или разных флаконов одной серии набора.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Промывочный раствор I (флакон 1) и Лизирующий/связывающий буфер (флакон 4) содержат соли гуанидина, способные вызывать раздражение. 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.
- Не допускайте смешивания Лизирующего/связывающего буфера 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.
- Не допускайте контаминации реагентов бактериями, вирусами и нуклеазами. Отбор аликвот из флаконов с реагентами должен проводиться только одноразовыми дозаторами или свободными от нуклеаз наконечниками. Соблюдайте стандартные правила безопасности.
- 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.

Протокол выделения Для выделения ДНК в приборе MagNA Pure LC с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume, необходимо установить новые протоколы программы MagNA Pure LC Software, Version 2.11 (или ниже). Если данные протоколы не были установлены ранее, их можно заказать бесплатно. Если используется программное обеспечение версии 3.0 или выше, установка протоколов не требуется. Дополнительную информацию можно получить в местном представительстве Roche.

Работа с данным продуктом

Для проведения выделения ДНК в приборе MagNA Pure LC (в том числе в приборе MagNa Pure LC 2.0) с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume, существуют четыре различных протокола. С помощью приведенной ниже таблицы выберите протокол, соответствующий вашим образцам:

⚠ Образцы не должны содержать более 5×10^6 клеток.

Название протокола	Тип образца	Процедура
DNA LV Blood_1000	цельная кровь	• Полностью автоматизирован • объем образца: 1000 мкл • объем элюции: 200 мкл
DNA LV Blood_300_500	цельная кровь	• Полностью автоматизирован • объем образца: 300-500 мкл • объем элюции: 100 – 200 мкл
DNA LV Blood_20_200	цельная кровь	• Полностью автоматизирован • объем образца: 20-200 мкл • объем элюции: 100 мкл
DNA LV Cells	Клетки крови Клеточные культуры	• Полностью автоматизирован • объем образца: 100 мкл • объем элюции: 100 – 200 мкл

④ Все протоколы выделения “DNA LV” позволяют разводить выделенную ДНК буфером для разведения объемом до 900 мкл.

Образцы

Для получения оптимальных результатов при последующих процедурах, особенно ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®, не используйте образцы большего объема, превышающего указанный в инструкции к набору.

Ниже приведено оптимальное количество материала для выделения:

- до 1000 мкл цельной крови млекопитающих (содержащей ЭДТА или цитрат в качестве антикоагулянта), содержащей не более 5×10^6 клеток
- до 5×10^6 культуральных клеток
- до 5×10^6 клеток крови млекопитающих (лейкоцитов или МНПК).

⚠ Никогда не используйте образцы с объемом больше указанного в инструкции к набору. В противном случае может происходить потеря МСЧ, что приведет к снижению эффективности выделения.

⚠ Никогда не используйте образцы цельной крови, содержащие более 5×10^6 лейкоцитов или МНПК. В клинических образцах содержание лейкоцитов или МНПК в крови может превышать указанный показатель. Если вы работаете с такими образцами (содержащими 5×10^6 клеток крови), всегда считайте количество лейкоцитов или МНПК с помощью гемоцитометра и перед выделением ДНК разводите кровь с помощью PBS. Обратите внимание, что автоматизированные счетчики иногда выдают результаты, отличающиеся от полученных с помощью ручного гемоцитометра.

⚠ Протоколы выделения "DNA LV" созданы для выделения из цельной крови человека. Обратите внимание, что у разных видов млекопитающих концентрации клеток крови могут различаться. Для некоторых видов животных может потребоваться использовать образцы меньшего объема, чтобы не допустить увеличения числа клеток в образце.

⚠ Рассматривайте все образцы как потенциально инфекционные.

⚠ Лучше всего использовать свежие или замороженные образцы. Избегайте использования образцов, хранившихся при комнатной температуре (КТ). Образцы цельной крови могут храниться при КТ не более 1 дня или при $+2 - +8^\circ\text{C}$ не более 1 недели. Для длительного хранения образцы цельной крови необходимо заморозить.

2.2. Приготовление рабочих растворов

Перед началом процедуры выделения, приготовьте рабочие растворы, как указано ниже.

Ⓢ Все остальные растворы готовы к работе.

⚠ Все буферы представляют собой прозрачные растворы. Не используйте буфер, если во флаконе образовался преципитат. Если виден преципитат, растворите его, нагревая флакон при 37°C и периодически помешивая. Не грейте буфер при 37°C дольше, чем это необходимо для полного растворения преципитата. Перед использованием, охладите буфер до комнатной температуры (+15 - +25°C).

⚠ Перед началом работы доведите буферы до комнатной температуры (+15 - +25°C). При использовании реагентов, температура которых выходит за рекомендованные рамки, работа набора может быть неоптимальной.

⚠ Используйте количество реагентов, соответствующее числу образцов.

⚠ Не храните протеиназу К и суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. Все остальные реагенты, остающиеся в пробирках для реагентов после завершения постановки, могут использоваться в следующей постановке, если она проводится в тот же день. Более длительное хранение не рекомендовано.

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Магнитные стеклянные частицы	Тщательно перемешайте суспензию МСЧ. Перемешайте на вортексе непосредственно перед использованием, чтобы получить гомогенную смесь. Во время хранения частицы оседают на дно флакона. ⚠ Для получения оптимальных результатов, вносите МСЧ в прибор перед самым запуском постановки (чтобы свести к минимуму оседание частиц). Всегда используйте точное количество МСЧ, рекомендованное программой.	Храните МСЧ при комнатной температуре (+15 - +25°C.) ⚠ никогда не храните суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. ⚠ Не оставляете МСЧ в открытом флаконе или пробирке для реагентов, поскольку испарение спирта может привести к снижению эффективности выделения.

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Протеиназа К	Восстановите всю протеиназу К, внеся в каждый флакон по 3 мл инкубационного буфера протеиназы К (флакон 7). Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата. Только после полного растворения добавьте во флакон еще 2 мл буфера для элюции для получения конечного объема. ⚠ После восстановления раствор протеиназы К может быть мутным. Это связано с присутствием стабилизирующих добавок в реагенте. Это не оказывает влияния на работу фермента. ④ Один флакон протеиназы К рассчитан на выделение 32 образцов.	После восстановления раствор протеиназы К стабилен в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C.

Контроли

Всегда используйте в постановках соответствующие контроли, особенно если для выделенных образцов планируется проведение качественного анализа образцов ДНК (например, в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®). 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), вносимая в каждый образец в известном количестве контрольная матрица (например, плазмидная ДНК).

④ Внутренний контроль (ВК) до начала выделения и проходит затем все этапы выделения и амплификации, что и мишень, в той же реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно при проведении энзиматических реакций, таких как ПЦР, поскольку эффективность процесса ПЦР может снижаться при наличии в очищенном образце ингибиторов. Кроме того, внутренний контроль служит для мониторинга возможных потерь материала во время выделения.

④ Для количественных тестов в приборе LightCycler®, в качестве внутреннего контроля используют синтетические двуцепочечные молекулы ДНК с сайтами посадки праймеров, идентичными мишени, но имеющие свой уникальный участок посадки зондов для дифференциации ампликонов мишени и ВК. Разделение сигналов от мишени и ВК проводится за счет применения разных красителей в тестах формата HybProbe. Подробные сведения о применении ВК в системе LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® 12/2000 «Абсолютный количественный анализ при использовании внешних стандартов и внутреннего контроля» ("Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control") на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2.3 Предварительные этапы

Цельная кровь

• Предварительная подготовка образца не требуется: перенесите 20-200 мкл, 300-500 мкл или 1000 мкл цельной крови в картридж для образцов.

⚠ Если объем образца крови < 200 мкл, доведите его до 200 мкл с помощью PBS.

⚠ Если образец крови содержит > 5×10^6 клеток, используйте меньший объем образца (разведите образец).

Ⓢ Образцы крови могут храниться при +15 - +25°C в течение 1 дня без потери ДНК или до 1 недели с незначительной потерей содержания ДНК. Для длительного хранения образцов крови рекомендуется температура +2 - +8°C или замораживание.

Лейкоциты

Для предварительного выделения до 5×10^6 лейкоцитов из свежей стабилизированной крови млекопитающих выполните приведенные ниже действия.

① Нагрейте буфер для лизиса эритроцитов* до КТ и охладите PBS на льду.

Ⓢ Вам потребуется два объема буфера для лизиса эритроцитов на каждый образец крови.

② Добавьте 1 объем крови в 2 объема буфера для лизиса эритроцитов.

③ Инкубируйте при КТ 15 мин. в роллерном инкубаторе, пока не образуется прозрачный раствор (то есть произойдет полный лизис эритроцитов).

⚠ Не перемешивайте на вортексе!

④ Центрифугируйте 10 мин. при 700 x g (при КТ).

⑤ Осторожно удалите супернатант наконечником.

⑥ Растворите осадок лимфоцитов в 1 мл буфера для лизиса эритроцитов и перенесите в чистый эппендорф.

⑦ Центрифугируйте 3 мин. при 600 x g (при КТ).

⑧ Осторожно удалите супернатант наконечником.

⑨ Растворите осадок лимфоцитов в холодном PBS и держите на льду, пока проводите подсчет клеток.

⑩ • Возьмите аликвоту раствора лейкоцитов, содержащую не более 5×10^6 клеток.

• Центрифугируйте 3 мин. при 600 x g (при КТ).

МНПК

- 11 • Осторожно удалите супернатант наконечником.
 - Растворите клеточный осадок в 200 мкл PBS. После того, как клетки ресуспендированы, немедленно переходите к следующему этапу.
- 12 Перенесите суспензию в Картридж для образцов.

13 Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения **DNA LV Cells**, как описано в Разделе 2.4.

Для предварительного выделения до 5×10^6 МНПК из свежей стабилизированной крови млекопитающих выполните приведенные ниже действия.

- 1 Отберите до 8 мл крови млекопитающих в пробирку Vacutainer CPT (BD Diagnostics), затем выделите МНПК из крови в соответствии с инструкцией производителя пробирок.
- 2 Перенесите супернатант, содержащий МНПК, в пробирку типа Falcon объемом 15 мл и поместите на лед пока проводите подсчет клеток.
- 3 • Отберите аликвоту суспензии МНПК, содержащую не более 5×10^6 клеток.
 - Добавьте 1 часть охлажденного PBS к 1 части суспензии МНПК.

4 Центрифугируйте 10 мин. при $300 \times g$ (при КТ).

- 5 • Осторожно удалите супернатант наконечником.
 - Растворите клеточный осадок в 100 мкл PBS. После того, как клетки ресуспендированы, немедленно переходите к следующему этапу.

6 Перенесите суспензию в Картридж для образцов.

7 Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения **DNA LV Cells**, как описано в Разделе 2.4.

Клеточные культуры

Для предварительного выделения вручную до 5×10^6 культуральных клеток выполните приведенные ниже действия.

- 1 Осадите клетки центрифугированием (10 мин. при $300 \times g$).
- 2 • Осторожно удалите супернатант наконечником.
 - Растворите клеточный осадок в 100 мкл PBS. После того, как клетки ресуспендированы, немедленно переходите к следующему этапу.

3 Перенесите суспензию в Картридж для образцов.

4 Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения **DNA LV Cells**, как описано в Разделе 2.4.

2.4 Протокол выделения ДНК

Общие замечания

- Описанная ниже процедура рассчитана на одновременную обработку 32 образцов. Если вы обрабатываете меньшее количество образцов, пропорционально уменьшите объем всех реагентов (см. экран Start Information прибора MagNA Pure LC или заставку Stage Setup прибора MagNA Pure LC 2.0).
- Программа автоматически рассчитывает необходимое количество реагентов и дает подсказки на этапах запуска постановки.
- вы не можете запустить прибор, пока не будет закрыт зажим для картриджа образцов, пробирок для реагентов и реакционных наконечников.
- Если вы запрограммировали разведение элюированной ДНК, вам потребуется дополнительная пробирка для реагентов M30 в позиции R7. В качестве буфера для разведения ДНК используйте до 900 мкл Буфера для элюции или свободного от нуклеаз 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Протокол

Выделение ДНК из образцов проводится по протоколу, приведенному ниже.

Запуск прибора и программы

- Включите прибор и компьютер, затем запустите программу MagNA Pure LC.
- Выберите необходимый протокол:

Если вы работаете с ...	Тогда используйте протокол ...
Образцами цельной крови	"DNA LV Blood_1000", "DNA LV Blood_300_500" или "DNA LV Blood_20_200", в зависимости от объема образцов.
Образцами клеток крови или культуральных клеток	"DNA LV Cells"

- Следуйте инструкциям программы и укажите количество образцов. Введите объем образца, объем элюции и объем разведения элюата (если этот этап необходим), в соответствующих окнах. Программа рассчитает необходимое количество каждого реагента.

Заполнение пробирок для реагентов

Перед запуском процедуры выделения, внесите в пробирки для реагентов необходимый объем реагентов (доведенные до комнатной температуры). Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на экране Start Information или заставке Stage Setup, затем закройте каждую пробирку крышкой.

⚠ Закрывайте пробирки с реагентами крышками, чтобы не допустить испарения реагентов. Однако, даже закрытые, пробирки для реагентов не подходят для длительного хранения реагентов.

⚠ Загрузите указанное на экране Start Information или заставке Stage Setup количество МСЧ в прибор непосредственно перед запуском постановки. Это необходимо делать перед самым запуском для предотвращения оседания МСЧ.

Установка пробирок для реагентов на платформу для реагентов/образцов Следуя указаниям на экране Start Information, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) в платформу для реагентов/образцов.
 © Цветная "Рамка для размещения"*, накладываемая на штатив для реагентов и помогающая загружать реагенты, прилагается бесплатно.

Загрузка образцов Перенесите Картридж для образцов с лизатами образцов в прибор MagNA Pure LC.

Запуск постановки

- На экране Start Information или заставке Stage Setup подтвердите правильность загрузки расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих текстовых окнах.
- Нажмите кнопку 'ОК', чтобы запустить автоматизированную процедуру выделения ДНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.

Хранение выделенной ДНК

⚠ Для сохранения максимальной стабильности выделенной ДНК, немедленно начните подготовку ПЦР. Не храните выделенные нуклеиновые кислоты в Картридже для хранения в охлаждающем блоке 1.
 Для длительного хранения (в течение нескольких недель), закройте Картридж для хранения пленкой* и храните ДНК при -15 - -25°C. Лучше хранить ДНК в аликвотах, чтобы избежать многократного оттаивания/замораживания выделенных нуклеиновых кислот.

Последующий анализ

Прибор MagNA Pure LC может помочь в подготовке реакции ПЦР, внося выделенную ДНК и мастермиксы для ПЦР в капилляры LightCycler® или стандартный пробирки и плашки для ПЦР (Рекомендуемые плашки приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC). Для последующего анализа вы можете поместить капилляры LightCycler® в вынимаемый охлаждающий блок MagNA Pure LC в центрифужных адаптерах LC или в карусели для образцов LC. Этапы последующего анализа можно запрограммировать заранее, до начала выделения, или после его завершения. Подробные сведения о последующем после выделения анализе приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC.

Результаты

3. Результаты

3.1 Стабильность ДНК ДНК выделяли из образцов цельной крови культуральных клеток и анализировали в агарозном геле. При молекулярном весе около 50 kb ДНК сохраняла высокое качество и не имела признаков деградации (Рисунок 1). Выделенная в приборе MagNA Pure LC ДНК обладала более высоким качеством с точки зрения стабильности и чистоты (контаминации РНК).



Рисунок 1: Геномная ДНК, выделенная из цельной крови, в сравнении с маркером молекулярных масс DNA Molecular Weight Marker III*.

3.2 Выход и степень очистки

ДНК выделяли из нормальной и липемичной крови человека (8 доноров) и из различных клеточных культур. Выход определяли по оптической плотности OD₂₆₀ и методом анализа в геле. Выход ДНК был равным или превышал показатели, наблюдаемые при выделении методами фильтрующих картриджей в пробирках. Результаты эксперимента приведены в таблице ниже.

Тип образца	Количество образца	Выход ДНК (мкг)	Чистота (OD _{260/280})
Цельная кровь (нормальная и липемичная)	1 мл	15 - 20	1.8
Клетки K562	10 ⁶	35.0	1.9
Клетки HeLa	10 ⁶	39.1	1.9
Клетки MDF-7	10 ⁶	11.8	1.9
Клетки MDF-7	5 x 10 ⁶	61.8	1.9
Клетки HCT 116	10 ⁶		1.9

3.3 Удаление антикоагулянтов

Образцы цельной крови, содержащие разные антикоагулянты (ЭДТА, цитрат, гепарин) выделяли по протоколу. Ингибирование последующего анализа в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler® 1.5 отмечено не было при использовании антикоагулянтов любого типа.

3.4 Перекрестная контаминация

Через одну в лунки картриджа для образцов вносили образцы цельной крови, при этом в соседние лунки вносили по 200 мкл PBS. После выделения ДНК в приборе MagNA Pure LC, проводили ПЦР-анализ в карусельной системе LightCycler®. Ни для одной из 16 лунок с PBS не отмечали перекрестной контаминации после 40 циклов в приборе LightCycler®, тогда как для 16 образцов цельной крови были получены ожидаемые результаты.

3.5 Воспроизводимость

- Воспроизводимость внутри постановки: 32 образца цельной крови объемом 1 мл и 32 образца клеток K562 в количестве 10^6 обрабатывали по соответствующим протоколам выделения ДНК. Коэффициент вариации (CV) выхода и чистоты ДНК составил ~10%, CV для точек пересечения в ПЦР составил ~3%.
- Воспроизводимость между постановками: 6 образцов цельной крови объемом 1 мл выделяли в 5 независимых постановках. Коэффициент вариации (CV) выхода и чистоты ДНК составил ~10%, CV для точек пересечения в ПЦР составил ~3%.

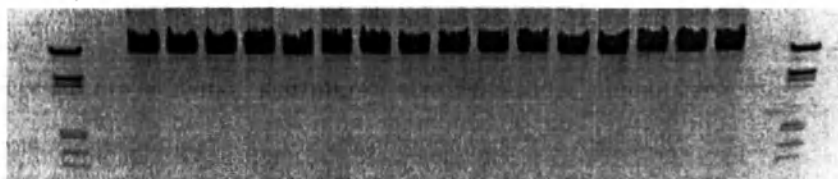


Рисунок 2: Воспроизводимость внутри постановки: ДНК выделяли из образцов цельной крови объемом 1 мл в 32 повторях (показаны 16) и анализировали в агарозном геле. Правая и левая дорожки: Маркер молекулярных масс DNA Molecular Weight Marker III.

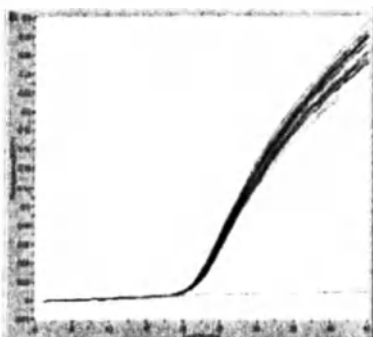


Рисунок 3: Воспроизводимость между постановками: ДНК выделяли из образцов цельной крови объемом 1 мл в 15 повторях и анализировали в ПЦР в карусельной системе LightCycler®. Пунктирная линия соответствует отрицательным контролям.

Результаты

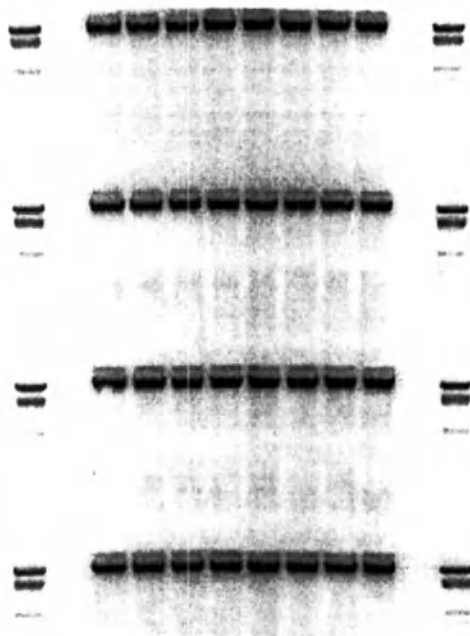


Рисунок 4: Воспроизводимость внутри постановки: ДНК выделяли из 10^6 клеток K562 в 32 повторях и анализировали в агарозном геле. Правая и левая дорожки: Маркер молекулярных масс DNA Molecular Weight Marker III.

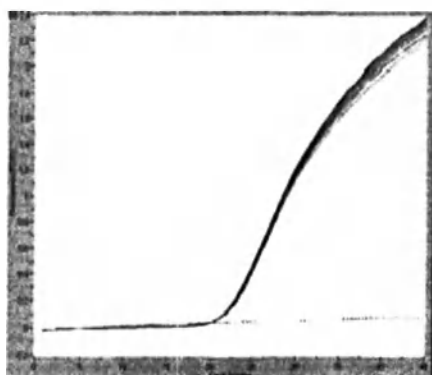


Рисунок 5: Воспроизводимость между постановками: ДНК выделяли из 10^6 клеток K562 в 30 повторях и анализировали в ПЦР в карусельной системе LightCycler®. Пунктирная линия соответствует отрицательным контролям.

4. Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
Слипание частиц/проблемы с магнитным разделением частиц	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
	Магнитные стеклянные частицы были намагничены перед началом работы.	Избегайте контакта МСЧ с магнитом.
	Был использован неверный протокол	Выберите подходящий протокол (например, "DNA LV Blood_1000").
Дегградация ДНК	Не оптимальное хранение образцов	Используйте свежие или замороженные образцы. Избегайте использования образцов, хранившихся при комнатной температуре длительное время.
Низкий выход ДНК	В образце недостаточное количество клеток	- Клетки: Посчитайте клетки перед началом работы. Оптимальные результаты получают при работе с образцами, содержащими 10^5 - 10^6 клеток. - Кровь: Убедитесь, что кровь не свернулась. Используйте образцы свежей или замороженной крови, в которую добавлены антикоагулянты. Тщательно перемешайте образцы на вортексе перед началом работы
	Неправильное хранение образцов	Используйте свежие или замороженные образцы. Избегайте использования образцов, хранившихся при комнатной температуре длительное время.
ДНК недостаточно чистая	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
Низкое качество последующей ПЦР	Слишком много ДНК в ПЦР.	Проверьте концентрацию ДНК в выделенных образцах и измените количество элюата, вносимого в ПЦР. Оптимальное количество ДНК: 1-100 нг/ПЦР, максимум – около 1 мкг. Используйте меньшее количество материала для выделения. Оптимальные результаты получают при выделении из 20 мкл цельной крови или 10^5 клеток.
	Недостаточно ДНК в ПЦР	Измените количество элюата, вносимого в ПЦР, или проводите выделение из большего количества материала. Оптимальное количество ДНК: 1 - 100 нг/ПЦР, максимум - около 1 мкг.
	Низкая степень очистки ДНК	Для выделения был использован слишком большой объем образца или был выбран неверный протокол.
	Реагенты и протокол ПЦР не оптимизированы	Проверьте реагенты и протокол ПЦР с помощью положительного контроля ДНК (например, геномной ДНК человека*)
	Условия ПЦР не оптимизированы	Оптимизируйте ПЦР, например, включите в протокол ПЦР этап начальной денатурации 30 сек.- 3 мин.
Элюат слегка красного цвета	Минимальная абразия магнитных частиц	Центрифугируйте элюат при низких значениях g (около 1,000 об./мин.) для удаления взвеси. ⚠ Красный цвет элюата не оказывает влияния на последующую ПЦР в системе LightCycler®.
Перекрестная контаминация образцов	Использовано избыточное количество образца	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"

Дополнительная информация о продукте

5. Дополнительная информация о продукте

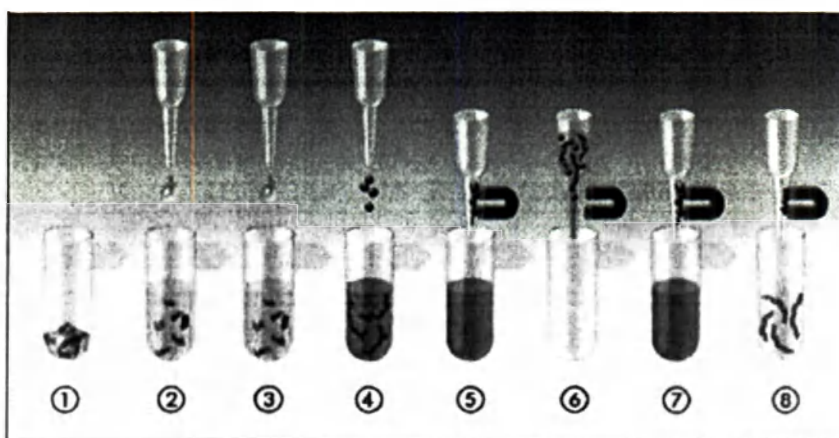
5.1 Назначение данного продукта

Набор MagNA Pure LC DNA Kit – Large Volume применяется для выделения высокоочищенной, недеградированной ДНК из 1-32 образцов цельной крови млекопитающих, клеток крови или культуральных клеток в приборе MagNA Pure LC. Выделенная ДНК соответствует стандартам качества, необходимым для проведения высокочувствительного количественного ПЦР-анализа в приборе LightCycler®.

Принцип теста

Процедура выделения основана на технологии магнитных частиц-носителей. Лизис образцов проводят, инкубируя их со специальным буфером, содержащим хаотропные соли и протеиназу К. Затем добавляются магнитные стеклянные частицы, на поверхности которых связывается ДНК. Несвязавшиеся вещества удаляются в процессе нескольких этапов отмывки, затем очищенная ДНК элюируется.

Ниже приведены этапы процесса выделения MagNA Pure LC DNA:



① Образцы помещают в лунки Картриджа для образцов.

② К образцам добавляется лизирующий/связывающий буфер, в результате происходит полный лизис клеток и высвобождение нуклеиновых кислот. Нуклеазы при этом денатурируют.

③ В образцы вносится протеиназа К, в результате происходит расщепление белков.

④ ДНК связывается на кремниевой поверхности МСЧ, внесенных в образцы, в присутствии хаотропных солей, изопропанола и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.

⑤ МСЧ со связавшейся ДНК отделяются с помощью магнита от лизированного образца.

⑥ МСЧ со связавшейся ДНК промываются несколько раз промывочным буфером, чтобы удалить несвязавшиеся вещества, такие как белки (нуклеазы), клеточные мембраны, ингибиторы ПЦР (гепатин и гемоглобин), а также чтобы снизить концентрацию хаотропных солей.

⑦ МСЧ со связавшейся ДНК снова отделяют с помощью магнита от промывочного буфера, содержащего остатки материала образца.

⑧ Очищенная ДНК элюируется с МСЧ при 70°C в лунках Картриджа для элюции, при этом сами МСЧ отбираются реакционным наконечником и удаляются.

Ниже приведены основные действия при выделении с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume (протокол DNA LV_1000):

① Все необходимые реагенты вносятся в рабочий картридж.

② Буфер для элюции вносится в картридж для элюции.

③ К образцу в картридж для образцов добавляется к 100 мкл протеиназы К, затем перемешивается и инкубируется.

④ К образцу добавляется 400 мкл Лизирующего/Связывающего буфера, перемешивается.

⑤ 750 мкл лизированного образца переносятся в ряд 3, перемешиваются.
750 мкл лизированного образца переносятся в ряд 2, перемешиваются.

⑥ МСЧ отделяются во 2 и 3 рядах. Переносятся в 3 лунку картриджа для обработки, перемешиваются.

⑦ МСЧ переносятся в 1150 мкл промывочного буфера I в ряду 4, перемешиваются и отделяются.

⑧ МСЧ переносятся в 1150 мкл промывочного буфера I в ряду 5, перемешиваются и отделяются.

⑨ МСЧ переносятся в 1150 мкл промывочного буфера II в ряду 6, перемешиваются и отделяются.

⑩ МСЧ переносятся в 1150 мкл промывочного буфера III в ряду 7, перемешиваются и отделяются.

⑪ МСЧ переносятся в буфер для элюции (нагревающий блок), перемешиваются, инкубируются, ДНК элюируется. МСЧ удаляются.

⑫ Элюат переносится в картридж для хранения (Охлаждающий блок I).

Контроль качества

ДНК выделяют из образцов цельной крови человека объемом 1 мл и анализируют ее стабильность, выход, чистоту и способность амплифицироваться в ПЦР в реальном времени в системе LightCycler®.

Вспомогательная информация

6. Вспомогательная информация

6.1 Обозначения

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.

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.

Аббревиатуры

В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
ТП (CP)	Точка пересечения
КВ (CV)	Коэффициент вариации
МСЧ	Магнитные стеклянные частицы
МНПЧ	Мононуклеары периферической крови
КТ	Комнатная температура

6.2 Изменения относительно предыдущей версии

- Редакторские изменения, корректировка и введение дополнительных каталожных номеров

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:

- Семейство MagNA Pure, включая расходные материалы, комплектующие, наборы и прочие продукты:

<http://www.magnapure.com>

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

Приборы
комплектующие

Продукт	Комплектация	Кат.№
Прибор MagNA Pure LC	1 прибор с комплектующими	12 236 931 001
Прибор MagNA Pure LC 2.0	1 прибор с комплектующими	05 197 686 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, центрифужные адаптеры LC	1 охлаждающий блок с 32 центрифужными адаптерами LightCycler®	12 190 664 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на карусель LC	1 охлаждающий блок	12 189 704 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на 96-луночную ПЦР-плашку	1 охлаждающий блок	12 189 674 001
DNA LV рамка для размещения	1 рамка	03 328 465 001
Пленка для картриджей MagNA Pure LC	200 пленок	03 118 827 001
Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
Прибор LightCycler® 1.5	1 прибор с комплектующими	04 484 495 001
Карусельная центрифуга LightCycler® Carousel Centrifuge 2.0	1 центрифуга с ротором (230 V) 1 центрифуга с ротором (110 V)	03 709 582 001 03 709 507 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения ДНК	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I 1) 1 набор выделения)	(192 03 003 990 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (ткани) 1 набор выделения)	(192 03 186 229 001

Вспомогательная информация

	Продукт	Комплектация	Кат. №
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (бактерии, грибы)	1 набор (192 выделения)	03 264 785 001
	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance	1 набор (192 выделения)	03 542 394 001
	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (ткани)	1 набор (192 выделения)	03 330 591 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения тотальных нуклеиновых кислот	MagNA Pure LC mRNA HS Kit	1 набор (192 выделения)	03 267 393 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	1 набор (192 выделения)	03 038 505 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема)	1 набор (192 выделения)	03 264 793 001
Дополнительные наборы и реагенты	Red Blood Cell Lysis Buffer (Лизирующий буфер для эритроцитов)	100 мл	11 814 389 001
	Буфер в коробке, концентрат PBS, 10 x	4 л	11 666 789 001
	Геномная ДНК человека	100 мкг	11 691 112 001
	Маркер молекулярных масс DNA Molecular Weight Marker III	50 мкг (1 A ₂₆₀ единица)	10 528 552 001

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией

Приобретение набора MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

¹⁾ Приобретение данных продуктов не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

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

6.5 Торговые марки

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

**Контактная
информация и
техническая
поддержка**

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.

0 708 03 3 086 00001



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



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

Набор реагентов для выделения ДНК из тканей MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue)

Версия ноябрь 2007

Готовые к применению реагенты для выделения ДНК из тканей человека и животных
в приборе MagNA Pure LC

Кат. №. 03 186 229 001

Набор рассчитан на 192 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
Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	4
Область применения	4
Длительность постановки	4
2. Работа с данным продуктом	5
2.1 Предварительные действия	5
Меры предосторожности	5
Протокол выделения	6
Образцы	6
Приготовление рабочих растворов	7
Контроли	8
2.2 Предварительные этапы для свежих замороженных образцов ткани.....	9
Общие замечания	9
Разрушение ткани в приборе MagNA Lyser	9
Разрушение ткани в ротор-статорном гомогенизаторе	10
Разрушение ткани с помощью ступки/пестика/шприца	10
Дополнительно: Этап разрушения РНК	11
Дополнительно: Обработка протеиназой К	11
2.3 Предварительные этапы для фиксированных в формалине парафиновых блоков ткани на предметном стекле микроскопа	11
Стандартная процедура депарафинизации	11
Альтернативная процедура депарафинизации	12
Лизис вне прибора	12
3. Результаты	13
Стабильность ДНК	13
Выход	13
Чистота	13
Линейность	14
Воспроизводимость (внутри постановки)	15
Последующий анализ	16
4. Анализ ошибок	17
5. Дополнительная информация о продукте	19
5.1 Назначение данного продукта	19
5.2 Принцип теста	19
5.3 Литература	21
Контроль качества	21
6. Вспомогательная информация	22
6.1 Обозначения	22
Текстовые обозначения	22
Символы	22
Аббревиатуры	22
6.2 Изменения относительно предыдущей версии	23
6.3 Информация для заказа	23
6.4 Ограничения, налагаемые лицензией	25
6.5 Торговые марки	25

**Количество
тестов**

- 192 выделения (6 x 32) из образцов массой до 10 мг свежей/замороженной ткани или из образцов размером до 5 - 10 мкм фиксированной в формалине ткани в парафиновых блоках.

**Содержание
набора**

Ⓢ Набор рассчитан на обработку 192 образцов в сериях по 32. Если обрабатывать одновременно менее 32 образцов, часть реагентов будет расходована напрасно и оставшегося объема будет недостаточно для обработки количества образцов, указанного выше.

Ⓢ Лизирующий/связывающий буфер содержит синий краситель, предназначенный для детекции сгустков.

Пробирка /Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
1 черная	Wash Buffer I (Промывочный буфер I)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления ингибиторов ПЦР.
2 синяя	Wash Buffer II (Промывочный буфер II)	• 2 флакона по 60 мл • для удаления солей, белков и т.д..
3 красная	Wash Buffer III (Промывочный буфер III)	• 1 флакон, 100 мл • для удаления оставшихся солей, белков и т.д.
4 зеленая	Lysis/Binding Buffer (лизирующий/связывающий буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для лизиса клеток и связывания ДНК
5 бежевая	Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension (Магнитные стеклянные частицы, МСЧ, суспензия)	• 6 стеклянных флаконов с суспензией МСЧ • для связывания ДНК
6 желтая	Elution Buffer (Элюиционный буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для элюции очищенной ДНК • для восстановления протеиназы К • для разведения элюата
Т прозрачная	Tissue Lysis Buffer (Буфер для лизиса тканей)	• 1 флакон, 100 мл • для эффективного лизиса тканей
Р розовая	Proteinase K (Протеиназа К)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления белков

Условия хранения и стабильность

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

Ⓢ Набор транспортируется при комнатной температуре (+15 - +25°C).

⚠ Никогда не храните МСЧ в пробирках для реагентов.

Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	• стандартное лабораторное оборудование • дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов в картридж для образцов MagNA Pure LC. • центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки • вортекс •  (65°C/95°C, для реакционных пробирок объемом 1.5 – 2 мл) • приспособления для гомогенизации, например: - Прибор MagNA Lyser * с частицами MagNA Lyser Green Beads* - ротор-статорный гомогенизатор (<i>например</i>, UltraTurrax или Omni TH 220) - ступка/пестик/игла (Ø 0.8 мм) • Немо-De или ксилол • этанол, абсолютный * <i>поставляется Roche Applied Science</i>
Область применения	Для лабораторных исследований. Для выделения высокоочищенной ДНК из образцов тканей человека и животных в приборе MagNA Pure LC. Выделенная из ДНК может использоваться для ПЦР в приборе LightCycler® или стандартных термоциклерах
Длительность постановки	Настройка прибора MagNA Pure LC занимает примерно 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения ДНК составляет примерно: • 100 мин. при выделении из 32 свежих/замороженных образцов ткани • 60 мин. при выделении из 32 депарафинизированных срезов фиксированных в формалине парафинизированных блоков или слабо гомогенизируемых тканей (требующих предварительного лизиса протеиназой К вне прибора). После настройки и запуска прибора MagNA Pure LC дополнительные манипуляции оператора не требуются. Дополнительные манипуляции требуются только для предварительных этапов выделения.

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 смешивайте реагенты из разных серий набора или разных флаконов одной серии набора.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Промывочный буфер 1 (флакон 1), лизирующий/связывающий буфер (флакон 4) и буфер для лизиса тканей (флакан 8) содержат соли гуанидина, способные вызывать раздражение. 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.
- Не допускайте смешивания лизирующий/связывающий буфера с раствором гипохлорита натрия (хлорка). 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/связывающем 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.
- Не допускайте контаминации реагентов бактериями, вирусами и нуклеазами. Отбор аликвот из флаконов с реагентами должен проводиться только одноразовыми дозаторами или свободными от нуклеаз наконечниками. Соблюдайте стандартные правила безопасности.
- 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.

Протокол выделения

Для выделения ДНК из тканей с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue), необходимо установить новые протоколы для программы MagNA Pure LC Software, Version 2.11 (или ниже). Названия протоколов "DNA II Tissue" и "DNA II Tissue External_Proteinase K" должны появиться в окне выбора протокола экрана Sample Ordering программы MagNA Pure LC. Если используется программное обеспечение версии 3.0 и выше, дополнительная установка протоколов не требуется. Дополнительную информацию можно получить в местном представительстве Roche.

С помощью приведенной ниже таблицы выберите протокол, соответствующий вашим образцам:

Название протокола	Тип образца	Процедура
DNA II Tissue	Образцы массой 1 - 10 мг свежей/замороженной ткани	- Гомогенизированные образцы переносят на платформу для реагентов/образцов и проводят выделение автоматизировано в приборе - Объем образца: 80 мкл - 90 мкл - Объем элюции: 200 мкл
DNA II Tissue External_Proteinase K	Депарафинизированные срезы размером 5 - 10 мкм от парафиновых блоков фиксированной в формалине ткани, или образцы слабо гомогенизируемой ткани	- Разрушение ткани с помощью протеиназы К проводится вне прибора - Затем лизат переносят на платформу для реагентов/образцов и проводят выделение автоматизировано в приборе - Объем образца: 100 мкл - 110 мкл - Объем элюции: 200 мкл

Образцы

Для получения оптимальных результатов при последующих процедурах, особенно ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®, не используйте образцы большего объема, превышающего указанный в инструкции к набору. Оптимальными для выделения с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) являются следующие размеры образцов:

- 1-10 мг свежей/замороженной или незамороженной стабилизированной (например, обработанной RNAlater) ткани (в зависимости от типа ткани).
- 1 парафиновый блок фиксированной в формалине ткани (толщиной 5-10 мкм).

⚠ Никогда не используйте образцы объемом больше указанного в инструкции к набору. В противном случае может происходить снижение эффективности выделения вследствие склеивания и потери МСЧ, или перекрестная контаминация образцов.

⚠ Рассматривайте все образцы как потенциально инфекционные.

**Приготовление
рабочих
растворов**

Перед началом процедуры выделения, приготовьте рабочие растворы, как указано ниже.

⚠ Все остальные растворы готовы к работе.

⚠ Все буферы представляют собой прозрачные растворы. Не используйте буфер, если во флаконе образовался преципитат. Если виден преципитат, растворите его, нагревая флакон при 37°C и периодически помешивая. Не грейте буфер при 37°C дольше, чем это необходимо для полного растворения преципитата. Перед использованием, охладите буфер до комнатной температуры.

⚠ Перед началом работы доведите буферы до комнатной температуры (+15 - + 25°C). При использовании реагентов, температура которых выходит за рекомендованные рамки, работа набора может быть неоптимальной.

⚠ Используйте количество реагентов, соответствующее числу образцов.

⚠ Не храните протеиназу К и суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. Все остальные реагенты, остающиеся в пробирках для реагентов после завершения постановки, могут использоваться в следующей постановке, если она проводится в тот же день. Более длительное хранение не рекомендовано.

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Магнитные стеклянные частицы	Тщательно перемешайте суспензию МСЧ. Перемешайте на вортексе непосредственно перед использованием, чтобы получить гомогенную смесь. Во время хранения частицы оседают на дно флакона. ⚠ Для получения оптимальных результатов, вносите МСЧ в прибор перед самым запуском постановки (чтобы свести к минимуму оседание частиц). Всегда используйте точное количество МСЧ, рекомендованное программой.	Храните МСЧ при комнатной температуре (+15 - +25°C.) ⚠ Никогда не храните суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. ⚠ Не оставляйте МСЧ в открытом флаконе или пробирке для реагентов, поскольку испарение спирта может привести к снижению эффективности выделения.
Протеиназа К	Восстановите всю протеиназу К (флакон Р), внося в каждый флакон по 1.2 мл буфера для элюции (флакон Б). Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата. ⚠ После восстановления раствор протеиназы К может быть мутным. Это связано с присутствием стабилизирующих добавок в реагенте. Это не оказывает влияния на работу фермента. Ⓢ Один флакон протеиназы К рассчитан на выделение 32 образцов.	После восстановления раствор протеиназы К стабилен в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C.

Контроли

Всегда используйте в постановках соответствующие контроли, особенно если для выделенных образцов планируется проведение качественного анализа образцов ДНК (например, в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®). 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), вносимая в каждый выделяемый образец в известном количестве контрольная матрица.

③ Внутренний контроль (ВК) до начала выделения и проходит затем все этапы выделения и амплификации, что и мишень, в той же реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно при проведении энзиматических реакций, таких как ПЦР, поскольку эффективность процесса ПЦР может снижаться при наличии в очищенном образце ингибиторов. Кроме того, внутренний контроль служит для мониторинга возможных потерь материала во время выделения.

③ Для количественных тестов в приборе LightCycler®, в качестве внутреннего контроля используют синтетические молекулы РНК с сайтами посадки праймеров, идентичными мишени, но имеющие свой уникальный участок посадки зондов для дифференциации ампликонов мишени и ВК. Разделение сигналов от мишени и ВК проводится за счет применения разных красителей в тестах формата HybProbe. Подробные сведения о применении ВК в системе LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® 12/2000 «Абсолютный количественный анализ при использовании внешних стандартов и внутреннего контроля» ("Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control") на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2.2 Предварительные этапы для свежих/замороженных образцов ткани

Общие замечания

- Полное разрушение и гомогенизация материала образца является ключевым моментом для выделения геномной ДНК из тканей. Неполное разрушение ткани приводит к значительному снижению выхода ДНК. С другой стороны, избыточное разрушение ткани и гомогенизация приводит к разрыву цепей высокомолекулярной геномной ДНК. Поэтому не допускайте превышения рекомендованных интервалов времени.

- В некоторых методах пробоподготовки одновременно происходит лизис и гомогенизация образцов, тогда как в других методах разрушения ткани требуется дополнительный этап гомогенизации.

⚠ Всегда готовьте свежие лизаты образцов и обрабатывайте их немедленно. Храните лизаты при -20°C или ниже, если планируете проводить выделение ДНК позже.

Разрушение тканей в приборе MagNA Lyser

Ниже в таблице приведено описание этапа разрушения и гомогенизации свежих замороженных или фиксированных в *RNAlater* тканей в приборе MagNA Lyser *.

① Внесите 80 мкл буфера для лизиса тканей (флакон Т) в пробирку с частицами MagNA Lyser Green Beads*. Затем поместите образец ткани массой 1-10 мкг в пробирку.

② Рекомендуется по крайней мере в начале использовать удвоенной количество ткани и буфера для гомогенизации, поскольку часть лизата (связавшуюся между гомогенизирующими частицами) отобрать не удастся.

- Настройте прибор MagNA Lyser как описано в Руководстве пользователя прибора.

- Запустите цикл гомогенизации, задав скорость и время в соответствии с материалом образца.

⚠ Всегда настраивайте параметры гомогенизации (скорость, время) перед проведением выделения ДНК. Недостаточное разрушение ткани может привести к недостаточному выходу ДНК, тогда как избыточное разрушение приведет к деградации ДНК. В качестве ориентиров используйте значения, приведенные в качестве примера в таблице ниже:

Материал образца	Скорость	Время
Печень/почки	6500 об./мин.	15-20 сек.
Селезенка/опухолевые ткани/ хвост/ухо/кожа фиксированные в <i>RNAlater</i> ткани	6500 об./мин.	> 25 сек. [#]

③ # Длительные циклы разрушения могут приводить к деградации ДНК вследствие нагревания. Избегайте длительных циклов разрушения, превышающих 25 сек. Лучше проведите несколько циклов разрушения не более 25 сек. каждый. Между циклами разрушения ткани охлаждайте образцы на льду.

② Инкубируйте образцы 30 мин. (при КТ).

③ Центрифугируйте 2 мин. при 13,000 x g (при КТ).

**Разрушение
тканей в ротор-
статорном
гомогенизаторе**

- ④ Перенесите 80 мкл супернатанта лизата в Картридж для образцов.
- ⑤ Поместите Картридж для образцов на платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения ДНК как описано в разделе 2.4.

Ниже в таблице приведено описание этапа разрушения и гомогенизации свежих/замороженных или фиксированных в *RNAlater* тканей в ротор-статорном гомогенизаторе (*например*, UltraTurrax или Omni TH220).

- ① Лизируйте и гомогенизируйте ткань в 80 мкл буфера для лизиса тканей (флакон Т) в ротор-статорном гомогенизаторе, следуя инструкции к прибору. В зависимости от типа образцов, ротор-статорный гомогенизатор разрушает и гомогенизирует ткани в течение 5-30 сек. в присутствии лизирующего буфера.
- ② В зависимости от типа ткани, может потребоваться несколько циклов гомогенизации.
- ⚠ Не допускайте образования пены, удерживая наконечник гомогенизатора погруженным всегда с одной стороны пробирки.
- ② Инкубируйте образцы 30 мин. (при КТ).
- ③ Центрифугируйте 2 мин. при 13,000 x g (при КТ).
- ④ Перенесите 80 мкл супернатанта лизата в Картридж для образцов.
- ⑤ Поместите Картридж для образцов на платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения ДНК как описано в разделе 2.4.

**Разрушение
тканей с
помощью ступки,
пестика и шприца**

Ниже в таблице приведено описание этапа разрушения и гомогенизации свежих/замороженных или фиксированных в *RNAlater* тканей с помощью ступки, пестика и шприца.

- ① • Тщательно измельчите пестиком в ступке замороженный в жидком азоте образец ткани массой 1-10 мкг. Перенесите полученный порошок в подходящую для центрифугирования пробирку, охлажденную в жидком азоте.
 - Дайте испариться остаткам жидкого азота, но не допускайте оттаивания образца.
 - Внесите 80 мкл буфера для лизиса тканей и гомогенизируйте образец, пропустив его несколько раз через иглу шприца (Ø 0.8 мм).
- ② Инкубируйте образцы 30 мин. (при КТ).
- ③ Центрифугируйте 2 мин. при 13,000 x g (при КТ).
- ④ Перенесите 80 мкл супернатанта лизата в Картридж для образцов.
- ⑤ Поместите Картридж для образцов на платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения ДНК как описано в разделе 2.4.

Дополнительно: Этап разрушения РНК Некоторые типы тканей содержат большое количество РНК. Для удаления РНК, выделяемой вместе с ДНК, добавьте 10 мкл раствора РНКазы А* (40 мг/мл, растворена в буфере для элюции) к 80 мкл лизата и инкубируйте в течение 15 мин. при 65°C.

④ Данный этап способствует увеличению выхода ДНК.

Дополнительно: Обработка протеиназой К

Для усиления гомогенизации материала образцов (например, некоторых опухолевых тканей), разработан протокол выделения "DNA II Tissue_External_Proteinase K". Данный протокол позволяет проводить разрушение ткани протеиназой К вне прибора перед автоматизированным выделением ДНК:

- Добавьте 20 мкл раствора протеиназы К к лизату образца и инкубируйте при 55 - 65°C до полного расщепления ткани (30 мин. – ночная инкубация).
- Осадите образцы в центрифуге и перенесите супернатант в картридж для образцов MagNA Pure LC.

2.3 Предварительные этапы для фиксированных в формалине парафиновых блоков ткани на предметном стекле микроскопа

Ниже в таблице приведено описание процедуры депарафинизации на предметном стекле микроскопа для образцов фиксированной в формалине ткани в парафиновых блоках (толщиной 5 - 10 мкм).

④ Набор оптимизирован для выделения ДНК из парафиновых блоков тканей, фиксированных в 10% нейтральном забуференном формалине.

Стандартная процедура депарафинизации

① Поместите предметное стекло в емкость с Нето-Де (или ксилолом) и инкубируйте 10 мин..

② Стряхните избыток жидкости, затем поместите предметное стекло в абсолютный этанол на 10 мин.

③ Смените емкость и инкубируйте еще 10 мин. в абсолютном этаноле.

④ Соскоблите депарафинизированный образец с предметного стекла стерильным одноразовым скальпелем и поместите в реакционную пробирку объемом 1.5 мл.

④ Для предотвращения потери части материала, соскоблите образец с предметного стекла до того, как он высохнет.

⑤ Высушите осадок ткани в течение 10 мин. при 55°C.

**Альтернативная
процедура
депарафинизации**

- ① Добавьте 800 мкл Немо-De (или ксилола) к одному срезу ткани толщиной 5-10 мкм в реакционную пробирку объемом 1.5 мл, осторожно перемешайте, переворачивая пробирку несколько раз.
- ② Добавьте 400 мкл абсолютного этанола к Немо-De (или ксилолу) и осторожно перемешайте, переворачивая пробирку несколько раз.
- ③ Центрифугируйте 2 мин. при максимальной скорости (12,000 - 14,000 об./мин.), удалите супернатант.
- ④ Добавьте 1 мл абсолютного этанола, и осторожно перемешайте, переворачивая пробирку несколько раз.
- ⑤ • Центрифугируйте 2 мин. при максимальной скорости и удалите супернатант.
• Аккуратно промокните пробирку фильтровальной бумагой, чтобы удалить остатки этанола.
- ⑥ Высушите осадок ткани в течение 10 мин. при 55°C.

**Лизис вне
прибора**

- ① • Добавьте 80 мкл буфера для лизиса тканей (флакон Т, прозрачная крышка) и 20 мкл раствора протеиназы К (см. раздел 3.2) к осадку депарафинизированной ткани.
• Перемешайте на вортексе несколько раз, инкубируйте ночь при 55°C на шейкере.
- ② • Дополнительное перемешивание пипетированием после 1 часа инкубации способствует ускорению гомогенизации ткани и позволяет избежать дополнительного этапа обработки протеиназой К после ночной инкубации.
- ③ • Убедитесь, что лизис прошел полностью, центрифугированием в течение 1 мин. при 8,000 об./мин.
• Если образовался видимый осадок, добавьте 10 мкл раствора протеиназы К (см. раздел 2.1).
• Перемешайте на вортексе несколько раз, инкубируйте 1 час при 55°C.

3. Результаты

Стабильность ДНК

ДНК выделяли из образцов тканей разных типов и анализировали в агарозном геле. При молекулярном весе около 10 kb ДНК сохраняла высокое качество и не имела признаков деградации (Рисунок 1). ДНК, выделенная из парафиновых блоков фиксированных в формалине тканей может иметь несколько меньшую стабильность, в зависимости от длительности хранения образца, типа ткани и протокола, использовавшегося при фиксации (см. ссылку 2).

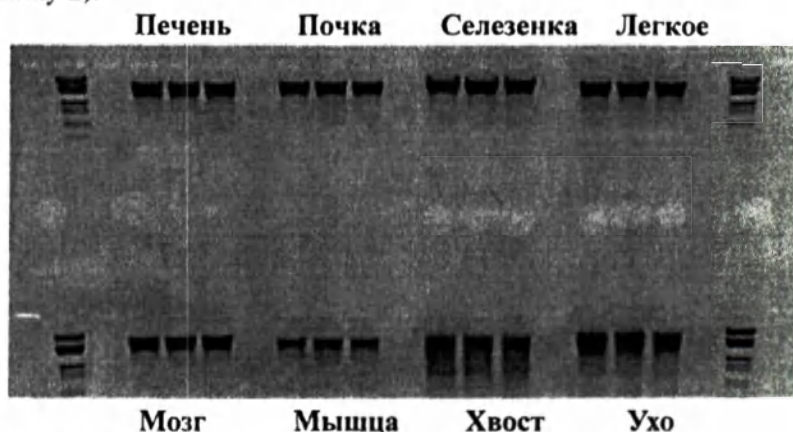


Рисунок 1: ДНК выделяли из разных типов свежих/замороженных тканей мыши (в трех повторах, ряд 1: печень, почки, селезенка, легкое; ряд 2: мозг, мышца, хвост, ухо) и анализировали в 1% агарозном геле. Была показана высокая степень стабильности ДНК.

Выход

ДНК выделяли из образцов разного объема разных типов тканей. Выход определяли по оптической плотности OD260 и методом анализа в геле, и сравнивали с результатами, полученными в стандартных методах выделения. Выход ДНК был равным или превышал показатели, наблюдаемые при выделении методами фильтрующих картриджей в пробирках. Полученные данные были подтверждены результатами количественной ПЦР LC (см. таблицу ниже).

Чистота

ДНК выделяли из образцов разного объема разных типов тканей. Стандартные эксперименты давали соотношение OD260/280, равное 1.8 ± 0.1 , что указывает на высокую степень чистоты ДНК. Ингибирование ПЦР в системе LightCycler® отмечено не было (см. таблицу ниже).

Типичные результаты для свежих/замороженных образцов тканей мыши				
Тип образец	Количество (мг)	Выход ДНК (мкг)	Чистота ДНК (OD260/280)	ПЦР LightCycler® (ТП)1
Печень	10	18	1.8	18.6
Почки	10	18	1.8	18.7
Хвост	10	10	1.7	19.7
Селезенка	10	40	1.9	18.0

Типичные результаты для свежих/замороженных образцов тканей мышц				
Тип образец	Количество (мг)	Выход ДНК (мкг)	Чистота ДНК (OD260/280)	ПЦР LightCycler® (ТП) ¹
Мозг	10	22	1.7	18.1
Ухо	10	16	1.7	19.9
Мышца	10	4	1.7	20.9
Легкое	10	25	1.8	18.0

¹ ТП = Точка пересечения, отражающая выделенное количество ДНК, рассчитанное по результатам ПЦР-анализа в карусельной системе LightCycler® (фактор V Лейден). Количественный анализ основан на стандарте ДНК.

Линейность

ДНК выделяли из разного количества ткани (например, 1, 2, 5 и 10 мг печени мыши), результаты анализировали по оптической плотности OD260 (Рис. 2), в агарозном геле (Рис. 3) и в ПЦР-анализе в карусельной системе LightCycler® (Рис. 4). Полученные результаты продемонстрировали отличную линейность выделения ДНК.

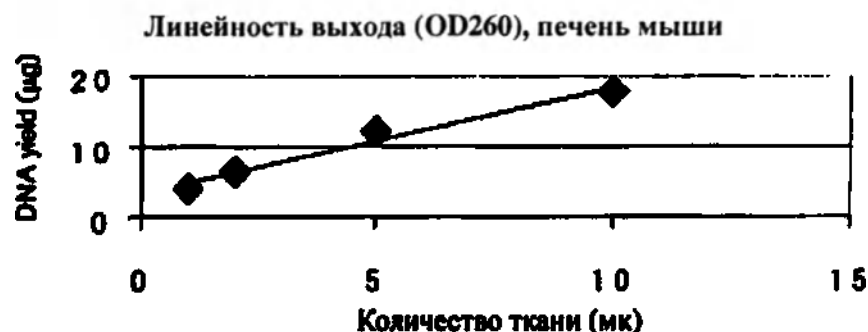


Рисунок 2: Линейность выхода ДНК из образцов свежей/замороженной ткани по результатам определения OD260.

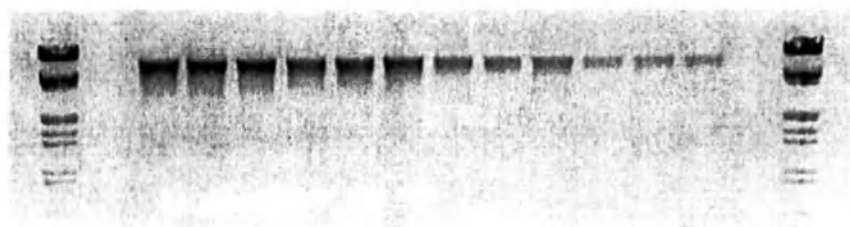


Рисунок 3: Линейность выхода ДНК из образцов свежей/замороженной ткани по результатам анализа в агарозном геле.

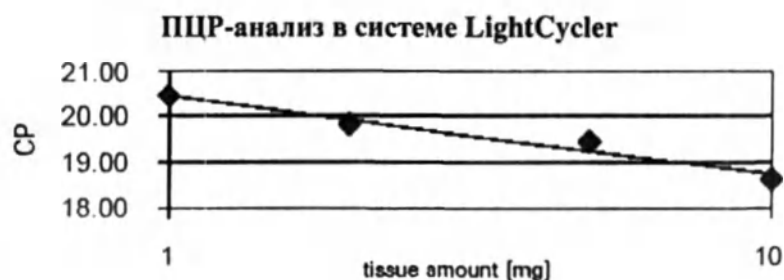


Рисунок 4: Линейность выхода ДНК из образцов свежей/замороженной ткани по результатам ПЦР-анализа в карусельной системе LightCycler®

**Воспроизводимость
(внутри постановки)**

Выделяли ДНК из 18 образцов печени мыши массой 10 мг. Анализ в агарозном геле (Рис. 5), OD и ПЦР-анализ в карусельной системе LightCycler® продемонстрировали хорошую воспроизводимость. Коэффициенты вариации выхода и чистоты ДНК составили <10%, коэффициент вариации для точек пересечения в LightCycler® составил < 3%.

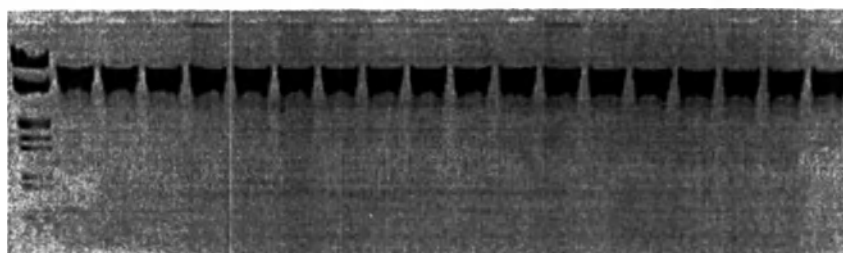


Рисунок 5: Воспроизводимость: выделение ДНК из 18 образцов свежей/замороженной печени мыши массой 10 мг.

Относительный количественный анализ ДНК, выделенной из парафиновых блоков фиксированной в формалине ткани рака груди

ДНК из парафиновых блоков фиксированной в формалине опухолевой ткани

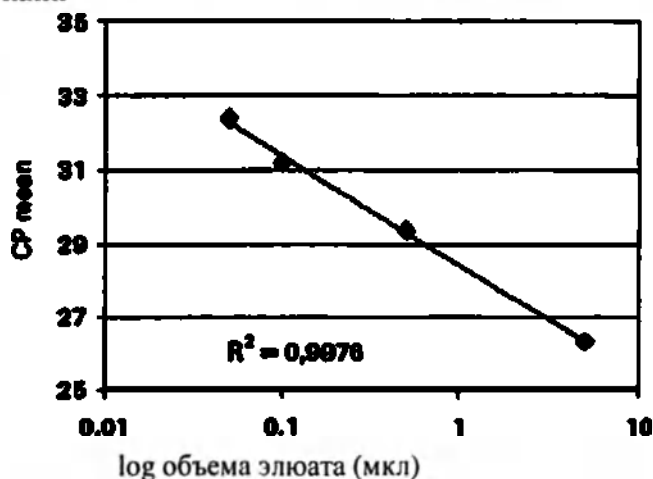


Рисунок 6: Серию разведений ДНК, выделенной из парафиновых блоков фиксированной в формалине ткани, амплифицировали с набором LightCycler® HER2/neu DNA Quantification Kit. Относительное соотношение сигнала HER2/neu с референсным геном было линейным в диапазоне двух log тестируемых разведений.

Последующий анализ

ДНК, выделенную из разных типов тканей мыши, тестировали в ПЦР в карусельной системе LightCycler®, блочном термоциклере, в рестрикционном анализе и Саузерн-блоте. ДНК позволяла проводить все перечисленные виды анализа, были получены результаты, равные или превосходящие результаты, полученные с ДНК, выделенной стандартными методами.

△ Подробное описание результатов экспериментов можно получить по адресу <http://www.magnapure.com> или в вашем местном представительстве Roche.

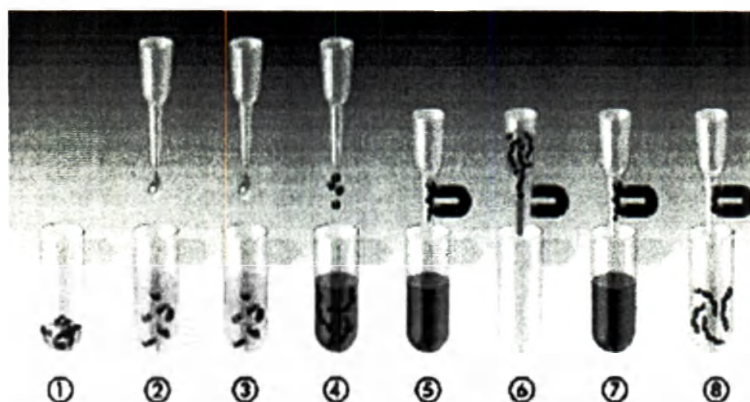
4. Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
Слипание частиц/проблемы с магнитным разделением частиц	Избыток материала в образце или неэффективный метод гомогенизации	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы". Используйте подходящий метод гомогенизации (см. раздел 2.2)
	Магнитные стеклянные частицы были намагничены перед началом работы.	Избегайте контакта МСЧ с магнитом.
Дегградация ДНК	Не оптимальное хранение образцов	Используйте свежие или замороженные образцы, избегайте работы с образцами, хранившимися при комнатной температуре долгое время.
	Слишком интенсивная гомогенизация	Сократите период гомогенизации.
Низкий выход ДНК	В образце недостаточное количество ткани	Взвешивайте образцы перед началом работы. Оптимальные результаты получают с образцами ткани массой 1-10 мг. Для некоторых типов тканей можно попробовать больший объем образца (до 25 мг).
	Избыток материала в образце	Используйте для выделения образцы массой 1-10 мг. Для некоторых типов тканей можно попробовать больший объем образца (до 25 мг).
	Неполная гомогенизация образца	Используйте подходящий метод гомогенизации (см. раздел 2.2) Разрежьте образец ткани на мелкие фрагменты перед гомогенизацией; проведите более интенсивную гомогенизацию
	Неправильное хранение образцов	Используйте свежие или замороженные образцы, избегайте работы с образцами, хранившимися при комнатной температуре долгое время.
ДНК недостаточно чистая	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы" (1-10 мг ткани)
Низкое качество последующей ПЦР	Слишком много ДНК в ПЦР	Проверьте концентрацию ДНК в элюате и измените количество ДНК в ПЦР или разведите элюат (например, 1 : 10). Оптимальное количество: 1 – 100 нг/ПЦР, максимум: около 1 мкг. Используйте меньше материала для выделения ДНК. Оптимальные результаты получают при выделении из образцов массой 1 – 10 мг.
	Слишком мало ДНК в ПЦР	Измените количество ДНК в ПЦР или используйте больше материала для выделения. Оптимальное количество: 1 – 100 нг/ПЦР, максимум: около 1 мкг. • Используйте больше материала для выделения. • Сконцентрируйте образец центрифугированием.

	Возможная причина	Рекомендации
	Низкая степень очистки ДНК	Используйте меньше материала для выделения ДНК. Оптимальные результаты получают при выделении из образцов массой 1 – 10 мг.
	Реагенты и протокол ПЦР не оптимизированы	Проверьте реагенты и протокол ПЦР с помощью положительного контроля ДНК (например, геномной ДНК человека*).
	Условия ПЦР не оптимизированы	Оптимизируйте ПЦР, например, включите в протокол ПЦР этап начальной денатурации 30 сек. - 3 мин.
	Отсутствие продукта в ПЦР с ДНК, выделенной из парафиновых блоков	Проверьте реагенты и протокол ПЦР с помощью контрольной ДНК (например, геномной ДНК человека*). Если в контрольной ПЦР получен продукт, выберите ампликон меньшего размера для амплификации ДНК, выделенной из парафиновых блоков фиксированной в формалине ткани (100 – 400 bp) (см. ссылку 2).
Элюат слегка красного цвета	Минимальная абразия магнитных частиц	Центрифугируйте элюат при низких значениях g (около 1,000 об./мин.) для удаления взвеси. ⑨ Красный цвет элюата не оказывает влияния на последующую ПЦР в системе LightCycler®.

5. Дополнительная информация о продукте

Назначение данного продукта Набор MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) применяется для выделения высокоочищенной, недеградированной ДНК из 1-32 образцов различных тканей человека и животных в приборе MagNA Pure LC. Выделенная ДНК соответствует стандартам качества, необходимым для проведения высокочувствительного количественного ПЦР-анализа в приборе LightCycler®.



Принцип теста

Процедура выделения основана на технологии магнитных частиц-носителей. Лизис образцов проводят, инкубируя их со специальным буфером, содержащим хаотропные соли и протеиназу К. Затем добавляются магнитные стеклянные частицы, на поверхности которых связывается ДНК. Несвязавшиеся вещества удаляются в процессе нескольких этапов отмывки, затем очищенная ДНК элюируется.

Ниже приведены этапы процесса выделения MagNA Pure LC DNA:

- ① Образцы помещают в лунки Картриджа для образцов.
- ② К образцам добавляется лизирующий/связывающий буфер, в результате происходит полный лизис клеток и высвобождение ДНК. Нуклеазы при этом денатурируют.
- ③ К образцам добавляется протеиназа К, белки расщепляются
- ④ Нуклеиновые кислоты связываются на кремниевой поверхности МСЧ, внесенных в образцы, в присутствии хаотропных солей, изопропанола и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.
- ⑤ МСЧ со связавшейся ДНК затем отделяются от лизированного образца с помощью магнита.

⑥ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами промываются несколько раз промывочным буфером, чтобы удалить несвязавшиеся вещества, такие как белки (нуклеазы), клеточные мембраны, ингибиторы ПЦР (гепарин и гемоглобин), а также чтобы снизить концентрацию хаотропных солей.

⑦ МСЧ со связавшейся ДНК снова отделяются с помощью магнита от промывочного буфера, содержащего остатки материала образца.

⑧ Очищенная ДНК элюируется с МСЧ при 70°C в лунках Картриджа для элюции, при этом сами МСЧ остаются в реакционном наконечнике и удаляются.

Ниже приведены основные действия при выделении с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue):

Выделение ДНК проводится автоматизировано в приборе MagNA Pure LC

① К образцам в картридже для образцов вносится по 20 мкл раствора протеиназы К, перемешивается и инкубируется.

② Все необходимые реагенты вносятся в рабочий картридж.

③ К образцу добавляется 300 мкл Лизирующего/Связывающего буфера, перемешивается: нуклеиновые кислоты высвобождаются, нуклеазы инактивируются.

④ Образцы добавляются к 150 мкл суспензии МСЧ, перемешиваются и инкубируются.

⑤ Частицы переносятся в 850 мкл промывочного буфера I, перемешиваются, частицы отделяются.

⑥ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II, перемешиваются, частицы отделяются.

⑦ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера III, перемешиваются, частицы отделяются.

⑧ Частицы переносятся в буфер для элюции (нагревающий блок), инкубируются, происходит элюция ДНК. МСЧ отделяются.

⑨ Элюат переносится в картридж для хранения (охлаждающий блок I).

Литература

1. Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
2. Wright, D.T. et al. (1990) Sample preparation from paraffin-embedded tissue. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. pp. 153-158. Edited by: Innis, M.A., Gelfont, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. Academic Press, San Diego.
3. Fenollar, F. et al. (2006). Analysis of 525 Samples To Determine the Usefulness of PCR Amplification and Sequencing of the 16S rRNA Gene for Diagnosis of Bone and Joint Infections. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 1018 - 1028.
4. Woenckhaus, M. et al. (2005). Microsatellite Analysis of Pleural Super-natants Could Increase Sensitivity of Pleural Fluid. *Cytology. Mol. Diagn.*, 7, 517 - 524.

Контроль качества

ДНК выделяют из образцов тканей мыши по стандартному протоколу и анализируют ее стабильность, выход, чистоту и способность амплифицироваться в ПЦР в реальном времени в системе LightCycler®. Результаты стандартных экспериментов приведены в Разделе 3.

6. Вспомогательная информация

6.1 Обозначения

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.

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.

Аббревиатуры

В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
ТП (CP)	Точка пересечения
КВ (CV)	Коэффициент вариации
КТ	Комнатная температура
МСЧ	Магнитные стеклянные частицы

6.2 Изменения относительно предыдущей версии

Редакторская правка

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:

- Семейство MagNA Pure, включая расходные материалы, комплектующие, наборы и прочие продукты:

<http://www.magnapure.com>

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

Приборы
комплектующие

Продукт	Комплектация	Кат. №
и Прибор MagNA Pure LC	1 прибор с комплектующими	12 236 931 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, центрифужные адаптеры LC	1 охлаждающий блок с 32 центрифужными адаптерами LightCycler®	12 190 664 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на карусель LC	1 охлаждающий блок	12 189 704 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на 96-луночную ПЦР-плашку	1 охлаждающий блок	12 189 674 001
DNAII рамка для размещения	1 рамка	03 142 663 001
Пленка для заклеивания картриджа MagNA Pure LC Cartridge Seal	200 пленок	03 118 827 001
Прибор MagNA Lyser	1 прибор (220 V) 1 прибор (110 V) (плюс ротор и охлаждающий блок ротора)	03 358 976 001 03 358 968 001
Частицы MagNA Lyser Green Beads	100 пробирок	03358 941 001
Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
Прибор LightCycler® 480	1 прибор (96 лунок) 1 прибор (384 лунок)	04 640 268 001 04 545 885 001
Прибор LightCycler® 1.5	1 прибор с комплектующими	04 484 495 001
Карусельная центрифуга LightCycler® Carousel Centrifuge 2.0	1 центрифуга с ротором (230 V) 1 центрифуга с ротором (110 V)	03 709 582 001 03 709 507 001

Вспомогательная информация

	Продукт	Комплектация	Кат. №
Наборы MagNA Pure LC для выделения ДНК	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 003 990 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 264 785 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume ¹⁾	1 набор: 96 выделений из 1 мл крови 192 выделения из 300 – 500 мкл крови 288 выделений из 20 – 200 мкл крови 192 выделений из клеток крови 192 выделений из 5 × 10 ⁶ культуральных клеток	03 310 515 001
	Лизирующий/связывающий буфер MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I – Lysis/Binding Buffer	100 мл	03 246 752 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК/мРНК	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 542 394 001
	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 330 591 001
	MagNA Pure LC mRNA HS Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 267 393 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения总альных нуклеиновых кислот	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 038 505 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 264 793 001
	Лизирующий/связывающий буфер MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit I – Lysis/Binding Buffer Refill	70 мл	03 246 779 001
	РНКаза А	100 мг	10 109 169 001
Дополнительные наборы и реагенты	Геномная ДНК человека	100 мкг	11 691 112 001

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией

Приобретение набора MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

¹⁾ Приобретение данных продуктов не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

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

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, MAGNA PURE, MAGNA LYSER и HYBPROBE являются торговыми марками Roche.

Остальные марки или названия продуктов являются торговыми марками соответствующих владельцев.

**Контактная
информация
и
техническая
поддержка**

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 страницу 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.

1107.03120511001



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



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

Roche Applied Science

**Набор реагентов для выделения РНК
высокой производительности
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit
High Performance**

Версия декабря 2005

Набор для выделения тотальной РНК из крови млекопитающих, клеток крови и клеточных культур

Кат. №. 03 542 394 001

Набор рассчитан на 192 выделения

● Хранить при температуре +15 - +25°C.

Содержание

1. Назначение данного продукта.....	3
Количество тестов	3
Содержание набора	3
Условия хранения и стабильность	4
Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	4
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
Приготовление рабочих растворов	7
Контроли	9
2.2 Предварительные этапы	9
Общие замечания	9
Цельная кровь	9
Лейкоциты	10
МНПК	10
Первичные клетки	11
Клеточные культуры	11
2.3 Протокол выделения РНК	12
Общие замечания	12
Протокол	12
Хранение выделенной РНК	13
Последующий анализ	14
3. Результаты	15
Стабильность РНК	15
Выход	15
Чистота	15
Воспроизводимость	16
4. Анализ ошибок	17
5. Дополнительная информация о продукте	19
Назначение данного продукта	19
Принцип теста	19
Литература	20
Контроль качества	20
6. Вспомогательная информация	21
6.1 Обозначения	21
Текстовые обозначения	21
Символы	21
Аббревиатуры	21
6.2 Изменения относительно предыдущей версии	21
6.3 Информация для заказа	22
6.4 Ограничения, налагаемые лицензией	23
6.5 Торговые марки	23

1. Назначение данного продукта

Количество тестов

192 выделения (6 x 32) из образцов цельной крови млекопитающих объемом до 200 мкл и до 1×10^6 клеток крови или культуральных клеток.

⑨ Набор рассчитан на обработку 192 образцов в сериях по 32. Если обрабатывать одновременно менее 32 образцов, часть реагентов будет расходована напрасно и оставшегося объема будет недостаточно для обработки количества образцов, указанного выше.

Содержание набора

⑨ Лизирующий/связывающий буфер содержит синий краситель, предназначенный для детекции сгустков во время автоматизированного выделения РНК в приборе MagNA Pure LC.

Пробирка / Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
1 черная	Wash Buffer I (Промывочный буфер I)	• 4 флакона по 100 мл • для удаления ингибиторов ПЦР.
2 синяя	Wash Buffer II (Промывочный буфер II)	• 4 флакона по 100 мл • для удаления солей, белков и т.д..
3 зеленая	Lysis/Binding Buffer (лизирующий/связывающий буфер)	• 2 флакон, 100 мл • для связывания РНК на поверхности МСЧ
4 бежевая	Magnetic Glass Particles (магнитные стеклянные частицы)	• 6 стеклянных флаконов по 2.5 мл с суспензией • для связывания РНК
5a белая	DNase (ДНКазы)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления ДНК
5b белая	DNase Incubation Buffer (Буфер для инкубации с ДНКазой)	• 1 флакон, 100 мл • для восстановления ДНКазы
6 красная	Isopropanol (изопропанол)	• 1 флакон, 50 мл • для связывания РНК
7a розовая	Proteinase K (Протеиназа К)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления белков
7b прозрачная	Proteinase K Incubation Buffer (Инкубационный буфер для протеиназы К)	• 1 флакон, 100 мл • для восстановления протеиназы К
8 желтая	Elution Buffer (Буфер для элюции)	• 1 флакон, 100 мл • для элюции РНК • для разведения элюата (дополнительно)

1. Назначение данного продукта, продолжение

Условия хранения и стабильность

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

④ Набор транспортируется при комнатной температуре.

Необходимые дополнительные оборудование и реагенты

- стандартное лабораторное оборудование
- дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов в картридж для образцов
- центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки
- DTT*
- роллерный инкубатор для перемешивания образцов (во время лизиса эритроцитов), раствора ДНКазы и МСЧ (магнитных стеклянных частиц)
- вортекс
- Буфер для лизиса эритроцитов* (для выделения лейкоцитов)
- PBS* (для выделения клеток крови, первичных клеток и культуральных клеток)
- Пробирки Vacutainer CPT (BD Diagnostics; для выделения МНПК)
- гемоцитометр (например, Neubauer с камерами для подсчета)

④ * поставляется Roche Applied Science; см. раздел «Информация для заказа».

Область применения

Для лабораторных исследований. Для выделения тотальной РНК из цельной крови млекопитающих, клеток крови и клеточных культур в приборе MagNA Pure LC. Очищенная РНК может быть использована для тестирования в ОТ-ПЦР в приборе LightCycler® и стандартных термоциклерах, Нозерн-блоте или других стандартных методах анализа экспрессии генов. Выделенная РНК свободна от ингибиторов ПЦР.

Длительность постановки

Настройка прибора MagNA Pure LC занимает примерно 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения РНК при обработке 32 образцов составляет около 90 мин. по протоколам 'RNA HP Blood' или 'RNA HP Blood_external_lysis' или 150 мин. по протоколу 'RNA HP Cells'. После настройки и запуска прибора MagNA Pure LC дополнительные манипуляции оператора не требуются. Дополнительные манипуляции требуются только для предварительного лизиса вне прибора.

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 смешивайте реагенты из разных серий набора или разных флаконов одной серии набора.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Промывочный буфер I (флакон 1) и Лизирующий буфер (флакон 3) содержат соли гуанидина, способные вызывать раздражение. Гибридизационный буфер (флакон 1b) содержит детергент Triton X-100, способный вызывать раздражение. 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.
- Не допускайте смешивания лизирующего буфера с раствором гипохлорита натрия (хлорка). 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.
- Не допускайте контаминации реагентов бактериями, вирусами и нуклеазами. Отбор аликвот из флаконов с реагентами должен проводиться только одноразовыми дозаторами или свободными от нуклеаз наконечниками. Соблюдайте стандартные правила безопасности.
- Требования предосторожности при работе с ПНК можно найти в Roche Applied Science LAB FAQs (http://www.roche-applied-science.com/labfaqs/p2_1.htm).
- 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.

2.1 Предварительные действия, продолжение

Протокол выделения

Для выделения РНК с набором MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance необходимо установить следующие протоколы выделения: “RNA HP Blood”, “RNA HP Blood_external_lysis”, и “RNA HP Cells”. Названия данных протоколов должны появиться в окне выбора протокола экрана Sample Ordering программы MagNA Pure LC. Если данные протоколы не были установлены ранее, их можно заказать бесплатно на диске. С помощью приведенной ниже таблицы выберите протокол, наиболее подходящий для вашего типа образцов.

Название протокола	Тип образца	Процедура
RNA HP Blood	цельная кровь (20-200 мкл)	Образцы помещаются сразу в платформу для реагентов/образцов MagNA Pure LC. Лизис и выделение РНК проводится автоматизировано в приборе.
RNA HP Blood_external_lysis		Образцы лизируют вручную, вне прибора MagNA Pure LC. Затем лизаты переносят в платформу для реагентов/образцов и выделение мРНК проводится автоматизировано в приборе. Ⓢ Протокол позволяет физически разделить этап лизиса от этапа выделения и загружать инактивированный материал в прибор MagNA Pure LC (при работе с потенциально инфекционными образцами).
RNA HP Cells	200 мкл суспензии клеток крови, первичных клеток или клеточных культур (10^3 - 10^6 клеток)	Образцы помещаются сразу в платформу для реагентов/образцов MagNA Pure LC. Лизис и выделение РНК проводится автоматизировано в приборе. Ⓢ При работе с клетками крови необходимо предварительно проводить их выделение из крови.

Ⓢ Все протоколы выделения ‘mRNA I’ позволяют устанавливать объем элюции в пределах 50 - 100 мкл.

⚠ Если элюция проводится в объеме 50 мкл, общий выход РНК может снижаться на 10-20% по сравнению с элюцией в 100 мкл.

2.1 Предварительные действия, продолжение

Образцы

Для получения оптимальных результатов при последующих процедурах, особенно ОТ-ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®, не используйте образцы большого объема, превышающего указанный в инструкции к набору. Оптимальным объемом образца является:

- до 200 мкл цельной крови млекопитающих
- лейкоциты, выделенные из образцов нормальной крови млекопитающих объемом до 200 мкл (до 1×10^6 лейкоцитов)
- МНПК, выделенные из образцов нормальной крови млекопитающих объемом до 400 мкл (до 1×10^6 лейкоцитов)
- до 1×10^6 культуральных клеток

⚠ Никогда не используйте образцы объемом больше указанного в инструкции к набору. В противном случае может происходить снижение эффективности выделения вследствие склеивания и потери МСЧ.

⚠ Не используйте для выделения более 1×10^6 лейкоцитов или МНПК в одном образце. Не соблюдение данной рекомендации может привести к потере МСЧ и снижению эффективности выделения. Действительная концентрация лейкоцитов или МНПК в крови может отличаться от данных показателей. Если предполагается, что в образцах содержание клеток находится около верхнего предела (т.е. 1×10^6 клеток крови), всегда перед выделением проводите учет лейкоцитов и МНПК в гемоцитометре. Автоматические системы подсчета (в зависимости от производителя) могут давать результаты, отличающиеся от результатов подсчета вручную на гемоцитометре.

⚠ Обратите внимание, что у разных видов млекопитающих концентрации клеток крови могут различаться. Для некоторых видов животных может потребоваться использовать образцы меньшего объема, чтобы не допустить увеличения числа клеток в образце.

⚠ Рассматривайте все образцы как потенциально инфекционные.

Приготовление рабочих растворов

Перед началом процедуры выделения, приготовьте рабочие растворы, как указано ниже.

④ Все остальные растворы готовы к работе.

⚠ Перед началом работы доведите буферы до комнатной температуре (+15 - + 25°C). При использовании реагентов, температура которых выходит за рекомендованные рамки, работа набора может быть неоптимальной.

⚠ Все буферы представляют собой прозрачные растворы. Не используйте буфер, если во флаконе образовался преципитат. Если виден преципитат, растворите его, нагревая флакон при 37°C и периодически помешивая. Не грейте буфер при 37°C дольше, чем это необходимо для полного растворения преципитата. Перед использованием, охладите буфер до комнатной температуры.

⚠ Не храните протеиназу К, ДНКазу и суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. Все остальные реагенты, остающиеся в пробирках для реагентов после завершения постановки, могут использоваться в следующей постановке, если она проводится в тот же день. Более длительное хранение не рекомендовано.

2.1 Предварительные действия, продолжение

Реагент	Приготовление/комментарии	Хранение
Лизирующий/связывающий буфер (флакон 3)	⚠ Необходим для лизиса клеток крови of blood cells (лейкоцитов/МНПК) и первичных клеток: Внесите 2 мл свежеприготовленного 50% концентрата DTT* в 100 мл Лизирующего/связывающего буфера (до конечной концентрации 1% DTT).	Храните лизирующий буфер (+15 - +25°C). ⚠ После внесения DTT, лизирующий/связывающий буфер необходимо использовать в течение 4 – 6 месяцев.
Магнитные стеклянные частицы	Тщательно перемешайте суспензию МСЧ (флакон 4). Перемешайте на вортексе непосредственно перед использованием, чтобы получить гомогенную смесь. Во время хранения частицы оседают на дно флакона. ⚠ Для получения оптимальных результатов, вносите МСЧ в прибор перед самым запуском постановки (чтобы свести к минимуму оседание частиц). Всегда используйте точное количество МСЧ, рекомендованное программой.	Храните МСЧ при комнатной температуре (+15 - +25°C.) ⚠ Не оставляйте МСЧ в открытом флаконе или пробирке для реагентов, поскольку испарение спирта может привести к снижению эффективности выделения.
Раствор ДНКазы	Растворите содержимое каждого флакона¹⁾ с ДНКазой (флакон 5a) в 10 мл инкубационного буфера для ДНКазы (флакон 5b). Закройте флакон и тщательно перемешайте. Ⓢ Один флакон ДНКазы I рассчитан на обработку 32 образцов.	Восстановленная ДНКазы стабильна в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C..
Протеиназа К	Восстановите всю протеиназу К¹⁾ (флакон 7a), внося в каждый флакон по 3 мл буфера для элюции (флакон 7b). После полного растворения лиофилизата добавьте еще 2 мл для восстановления полного объема. ⚠ После восстановления раствор протеиназы К может быть мутным. Это связано с присутствием стабилизирующих добавок в реагенте. Это не оказывает влияния на работу фермента. Ⓢ ¹⁾ Один флакон рассчитан на выделение 32 образцов.	После восстановления раствор протеиназы К стабилен в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C.

2.1 Предварительные действия, продолжение

Контроли

Всегда используйте в постановках соответствующие контроли, особенно если для выделенных образцов планируется проведение качественного анализа образцов мРНК (*например*, в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®). 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), вносимая в каждый выделяемый образец в известном количестве контрольная матрица.

③ Внутренний контроль (ВК) до начала выделения и проходит затем все этапы выделения и амплификации, что и мишень, в той же реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно при проведении энзиматических реакций, таких как ОТ-ПЦР, поскольку эффективность процесса ОТ-ПЦР может снижаться при наличии в очищенном образце ингибиторов. Кроме того, внутренний контроль служит для мониторинга возможных потерь материала во время выделения.

③ Для количественных тестов в приборе LightCycler®, в качестве внутреннего контроля используют синтетические молекулы РНК с сайтами посадки праймеров, идентичными мишени, но имеющие свой уникальный участок посадки зондов для дифференциации ампликонов мишени и ВК. Разделение сигналов от мишени и ВК проводится за счет применения разных красителей в тестах формата HybProbe. Подробные сведения о применении ВК в системе LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® 12/2000 «Абсолютный количественный анализ при использовании внешних стандартов и внутреннего контроля» ("Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control") на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2.2 Предварительные этапы

Общие замечания

При выделении РНК по протоколам "RNA HP Blood_external_lysis" и "RNA HP Cells" необходимо выполнить предварительные этапы, заключающиеся в ручном лизировании образцов.

③ Протоколы для цельной крови и клеток крови были разработаны для образцов крови человека.

⚠ Храните лизаты при -70°C, если выделение РНК планируется на следующий день или позже.

Цельная кровь

- Если вы применяете протокол 'RNA HP Blood', предварительная подготовка образца не требуется:

Перенесите 20 - 200 мкл цельной крови непосредственно в картридж для образцов.

- Если вы применяете протокол 'RNA HP Blood_external_lysis', добавьте 700 мкл лизирующего/связывающего буфера (флакон 3) к образцу (объемом 20 - 200 мкл) и тщательно перемешайте. Перенесите лизаты непосредственно в картридж для образцов или храните замороженными при -80°C (стабильны не менее 3 месяцев).

2.2 Предварительные этапы, продолжение

⚠ Если вы работаете с образцами крови, содержащими $> 10^4$ клеток/мкл, используйте соответственно меньший объем образца (разведите образец), чтобы избежать перегрузки выделения.

⚠ Не используйте для выделения замороженные образцы цельной крови, в таких образцах РНК может деградировать.

Лейкоциты

Для выделения лейкоцитов из свежей стабилизированной цельной крови млекопитающих объемом до 200 мкл, выполните приведенные ниже действия.

⑨ Вам потребуется два объема буфера для лизиса эритроцитов на каждый образец крови.

① • Внесите два объема (до 400 мкл) буфера для лизиса эритроцитов в пробирку и нагрейте до $+15 - +25^{\circ}\text{C}$.

• Добавьте один объем (до 200 мкл) крови к лизирующему буферу и перемешайте переворачиванием пробирки 5 раз.

• Инкубируйте образец 10 мин. в роллерном инкубаторе при $+15 - +25^{\circ}\text{C}$.

⚠ После инкубации раствор должен стать прозрачным.

② • Центрифугируйте образец 5 мин. при $600 \times g$ (при КТ).

• Удалите супернатант.

⚠ Должен быть виден белый осадок.

③ Растворите клеточный осадок в 100 мкл PBS.

④ Добавьте 100 мкл лизирующего/связывающего буфера (флакон 3) и тщательно перемешайте на вортексе.

⚠ Используйте только лизирующий/связывающий буфер, содержащий 1% DTT!

⑤ Перенесите лизат в картридж для образцов.

⑥ Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения **RNA HP Cells**, как описано в Разделе 2.3.

МНПК

Для выделения МНПК из свежей стабилизированной цельной крови млекопитающих объемом до 400 мкл, выполните приведенные ниже действия.

① Отберите до 8 мл крови млекопитающих в пробирку Vacutainer CPT (BD Diagnostics), затем выделите МНПК из крови в соответствии с инструкцией производителя пробирок.

② Растворите выделенные МНПК в холодном PBS, и перенесите аликвоту суспензии клеток в чистую пробирку.

⚠ Аликвота должна содержать клетки из не более чем 400 мкл крови.

• Доведите объем в пробирке до 10 мл с помощью PBS.

2.2 Предварительные этапы, продолжение

- 3 • Центрифугируйте 15 мин. при 300 x g (при КТ).
 - Удалите супернатант.

- 4 • Растворите осадок в 100 мкл PBS.
 - Добавьте 100 мкл лизирующего/связывающего буфера (флакон 3) и тщательно перемешайте на вортексе.

⚠ Используйте только лизирующий/связывающий буфер, содержащий 1% DTT!

- 5 Перенесите лизат в Картридж для образцов.

- 6 Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения **RNA HP Cells**, как описано в Разделе 2.3.

Первичные клетки

Для предварительного выделения вручную до 1×10^6 первичных клеток выполните приведенные ниже действия.

- 1 Осадите клетки центрифугированием (10 мин. при 300 x g).

- 2 • Растворите осадок клеток в 100 мкл PBS.
 - Добавьте 100 мкл лизирующего буфера (флакон 3).

⚠ Используйте только лизирующий/связывающий буфер, содержащий 1% DTT!

 - Тщательно перемешайте лизат на вортексе.

- 3 Перенесите суспензию в Картридж для образцов.

- 4 Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения **RNA HP Cells**, как описано в Разделе 2.3

Клеточные культуры

Для предварительного выделения вручную до 1×10^6 культуральных клеток выполните приведенные ниже действия.

- 1 Осадите клетки центрифугированием (10 мин. при 300 x g).

- 2 Растворите осадок клеток в 200 мкл PBS.

- 3 Перенесите суспензию в Картридж для образцов.

- 4 Поместите картридж для образцов в Платформу для реагентов/образцов и запустите протокол выделения **RNA HP Cells**, как описано в Разделе 2.3

2.3. Протокол выделения РНК

Общие замечания

- Описанная ниже процедура рассчитана на одновременную обработку 32 образцов. Если вы обрабатываете меньшее количество образцов, пропорционально уменьшите объем всех реагентов (см. экран Start Information прибора MagNA Pure LC).
- Программа автоматически рассчитывает необходимое количество реагентов и дает подсказки на этапах запуска постановки.
- Вы не можете запустить прибор, пока не будет закрыт зажим для картриджа образцов, пробирок для реагентов.
- Если вы запрограммировали разведение элюата, поместите дополнительную пробирку М30 для реагента в позицию R8. Используйте для разведения буфер для элюции или свободную от нуклеаз воду.

2.3.1 Протокол

Проведите выделение РНК по протоколу, приведенному ниже.

Запуск прибора и программы

- Включите прибор и компьютер, затем запустите программу MagNA Pure LC.
- Выберите необходимый протокол:

Если вы работаете с ...	Тогда используйте протокол ...
Образцами цельной крови	• RNA HP Blood или • RNA HP Blood_external_lysis
Выделенными лейкоцитами или МНПК, первичными клетками и клеточными культурами	RNA HP Cells

- Следуйте инструкциям программы и укажите количество образцов. Введите объем образца и объем элюции в соответствующих окнах. Программа рассчитает необходимое количество каждого реагента.

2.3. Протокол выделения РНК, продолжение

Заполнение пробирок для реагентов	Перед запуском процедуры выделения, внесите в пробирки для реагентов необходимый объем реагентов (доведенные до комнатной температуры). Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на экране Start Information, затем закройте каждую пробирку крышкой. ⚠ Используйте объем реагентов, соответствующий количеству обрабатываемых образцов. ⚠ Закрывайте пробирки с реагентами крышками, чтобы не допустить испарения реагентов. Однако, даже закрытые, пробирки для реагентов не подходят для длительного хранения реагентов. ⚠ Загрузите указанное на экране Start Information количество МСЧ в прибор непосредственно перед запуском постановки. Это необходимо делать перед самым запуском для предотвращения оседания МСЧ.
Установка пробирок для реагентов на платформу для реагентов/образцов	Следуя указаниям на экране Start Information, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) в платформу для реагентов/образцов. ④ Цветная "Рамка для размещения"*, накладываемая на штатив для реагентов и помогающая загружать реагенты, прилагается бесплатно.
Загрузка образцов	Перенесите Картридж для образцов с образцами или лизатами в прибор MagNA Pure LC.
Запуск постановки	• На экране Start Information Screen подтвердите правильность расположения расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих окнах. • Нажмите кнопку 'ОК', чтобы начать автоматизированную процедуру выделения РНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.

2.3.2 Хранение выделенной РНК

⚠ Для сохранения максимальной стабильности выделенной РНК, немедленно начните подготовку ОТ-ПЦР. Не храните выделенную РНК в Картридже для хранения в охлаждающем блоке 1.

Для длительного хранения (в течение нескольких недель), закройте Картридж для хранения пленкой* и храните РНК при -70°C. Лучше хранить РНК в аликвотах, чтобы избежать многократного оттаивания/замораживания выделенных нуклеиновых кислот.

2.3. Протокол выделения РНК, продолжение

2.3.3 Последующий анализ

Прибор MagNA Pure LC может помочь в подготовке реакции ОТ-ПЦР, внося выделенную РНК и мастермиксы для ОТ-ПЦР, ОТ или ПЦР в капилляры LightCycler® или стандартный пробирки и плашки для ПЦР (Рекомендуемые плашки приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC). Для последующего анализа вы можете поместить капилляры LightCycler® в вынимаемый охлаждающий блок MagNA Pure LC в центрифужных адаптерах LC или в карусели для образцов LC. Этапы последующего анализа можно запрограммировать заранее, до начала выделения, или после его завершения. Подробные сведения о последующем после выделения анализе приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC.

3. Результаты

Стабильность РНК

РНК выделяли из 200 мкл цельной крови или 1×10^6 культуральных клеток (K562) по соответствующему протоколу выделения RNA HP. Поскольку в крови содержится в 10 – 20 раз меньше РНК по сравнению с культуральными клетками, стабильность РНК в агарозном геле анализировали при окрашивании SYBR Green II (для выделенной из крови РНК) или бромистым этидием (для выделенной из культуральных клеток РНК). На основании интактных полос рРНК в геле, во всех образцах РНК наблюдали прекрасную стабильность (Рисунки 1а, b).

Рисунок 1: Электрофорез в агарозном геле для РНК, выделенной из цельной крови (1а) и клеток K562 (1b).

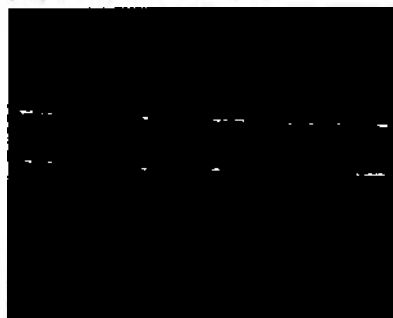


Рис. 1а. РНК из цельной крови

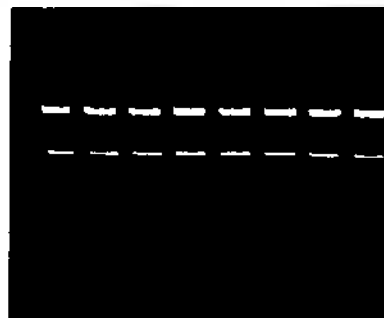


Рис. 1b. РНК из клеток K562

Выход

РНК выделяли из разных типов клеточных культур или крови человека от разных доноров. Выход определяли по оптической плотности OD260 и в электрофорезе в агарозном геле (типичные результаты приведены Таблице 1).

Чистота

- РНК выделяли из разных объемов и разных типов крови и клеточных культур. В стандартных экспериментах соотношение оптической плотности OD260/280 для составляло 2.0 ± 0.1 , что указывает на высокую степень чистоты РНК (см. Таблицу 1).

- РНК выделяли из образцов крови, содержащих различные антикоагулянты (ЭДТА, цитрат, гепарин). Ингибирование ОТ-ПЦР при последующем анализе в LightCycler® не наблюдали, что указывало на полное отсутствие ингибиторов ПЦР в выделенной РНК.

- Во всех экспериментах в ПЦР для всех образцов применяли контроль «минус-ОТ». После 40 циклов ПЦР, в данных контролях в ОТ-ПЦР LightCycler® отсутствовал положительный сигнал, что указывало на полное отсутствие контаминирующей геномной ДНК.

⚠ В зависимости от чувствительности ОТ-ПЦР и параметров реакции, иногда на поздних циклах ПЦР может появляться слабый положительный сигнал в контролях «минус-ОТ». Обычно он слишком слаб и не влияет на анализ ОТ-ПЦР. Однако мы рекомендуем подбирать праймеры к областям соединения экзон/экзон РНК, такие праймеры не позволяют амплифицировать геномную ДНК.

3. Результаты

Таблица 1: Выход и чистота РНК, выделенной из образцов разных типов. Все данные представляют собой средние значения, полученные при 4 – 8 повторях. Приведены результаты разных экспериментов. Обратите внимание, что в крови обычно содержится в 10 – 20 раз меньше РНК по сравнению с культуральными клетками, и содержание РНК варьирует среди доноров и разных типов клеточных культур. Кроме того, результат выделения зависит от хранения образца и интенсивности роста клеток при культивировании.

Образец	Выход РНК (мкг)	Чистота РНК (OD260/280)
Кровь/донор 1 (200 мкл)	1.15	2.09
Кровь/донор 2 (200 мкл)	1.10	2.09
Кровь/донор 3 (200 мкл)	1.21	2.08
Кровь/донор 4 (200 мкл)	1.32	2.07
Кровь/донор 5 (200 мкл)	1.38	2.08
Кровь/донор 6 (200 мкл)	1.40	2.09
Клетки 562 (10^6)	17.5	2.0
Клетки HeLa (10^6)	15.5	2.0

Воспроизводимость

- Воспроизводимость внутри постановки: РНК выделяли из 16 образцов крови объемом 200 мкл или 16 образцов 10^6 клеток K562. Стандартное отклонение выхода и чистоты РНК составляло около 10%, варьирование значение ТП LightCycler® составляло около 3%.
- Воспроизводимость между постановками: В 4 независимых постановках РНК выделяли из 8 образцов 10^6 культуральных клеток. Стандартное отклонение выхода и чистоты РНК составляло около 10%, варьирование значение ТП LightCycler® составляло около 3%.

4. Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
Слипание частиц/проблемы с магнитным разделением частиц	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы".
	Магнитные стеклянные частицы были намагничены перед началом работы.	Избегайте контакта МСЧ с магнитом. Храните набор правильно.
Деградация РНК	Не оптимальное хранение образцов	• Работайте со свежими образцами. Не выделяйте лейкоциты и МНПК из замороженных образцов цельной крови. • Не работайте с образцами, длительное время хранившимися при комнатной температуре.
	Контаминация реакционных наконечников, пробирок для реагентов или реагентов РНКазми.	Не допускайте контаминации расходных материалов и реагентов РНКазми.
Низкий выход или отсутствие РНК	В образце недостаточное количество клеток, не полностью лизированный образец	Клетки: Проводите подсчет клеток перед началом работы. Оптимальные результаты получают при выделении 10^6 клеток. Кровь: Убедитесь, что в образцах крови нет сгустков. Используйте образцы свежей крови с антикоагулянтом. Лейкоциты: Неполное выделение или лизис лейкоцитов. Тщательно выполните действия, описанные в разделе «Предварительные этапы».
	Не оптимальное хранение образцов	Работайте по возможности со свежими образцами. Не работайте с образцами, длительное время хранившимися при комнатной температуре.
	Неправильное расположение реагентов на платформе	Убедитесь, что все реагенты помещены в правильную позицию на платформе.
РНК недостаточно чистая	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы".
	Недостаточное количество РНК для правильного определения OD, или неподходящее значение pH.	В образцах цельной крови обычно низкая концентрация РНК, что затрудняет определение OD. Также на определение OD влияет величина pH выделенной РНК; при необходимости внесите в элюат Tris-буфер (pH 7-8).

4. Анализ ошибок, продолжение

	Возможная причина	Рекомендации
Низкое качество последующей ПЦР	Низкая степень очистки РНК	Выделение РНК проводили из слишком большого количества материала. Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы".
	Реагенты и протокол ОТ-ПЦР не оптимизированы	Проверьте реагенты и протокол ОТ-ПЦР с помощью положительного контроля РНК.
Элюат слегка красного цвета	Минимальная абразия магнитных частиц	Центрифугируйте элюат при низких значениях g (около 1,000 об./мин.) для удаления взвеси. ④ Красный цвет элюата не оказывает влияния на последующую ПЦР в системе LightCycler®.

5. Дополнительная информация о продукте

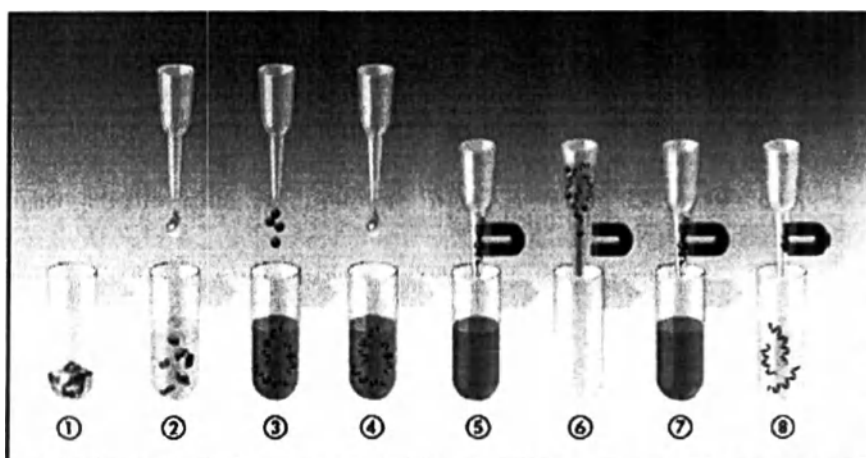
Назначение данного продукта

Набор MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance применяется для выделения высокоочищенной, недеградированной РНК из 1-32 образцов цельной крови млекопитающих, лейкоцитов и МНПК млекопитающих или клеточных культур в приборе MagNA Pure LC. Образцы цельной крови можно лизировать вручную (вне прибора), или автоматизировано (в приборе MagNA Pure LC). Выделенную мРНК растворяют в любом объеме от 25 до 100 мкл. Выделенная РНК соответствует стандартам качества, необходимым для проведения высокочувствительного количественного ОТ-ПЦР-анализа в приборе LightCycler®.

Принцип теста

Образцы лизируют при инкубации со специальным буфером, содержащим хаотропные соли. Протеиназа К расщепляет остающиеся белки и нуклеазы. Магнитные стеклянные частицы (МСЧ) вносятся в лизат, на их поверхности связывается высвободившаяся РНК. Остатки геномной ДНК разрушаются при инкубации с ДНКазой. Несвязавшиеся вещества удаляются в процессе нескольких этапов отмывки, затем очищенная РНК элюируется.

Ниже приведены этапы процесса выделения MagNA Pure LC mRNA:



- ① Образцы вносят в лунки Картриджа для образцов.
- ② Лизирующий/связывающий буфер вносится в образец, в результате происходит полный лизис клеток и высвобождение РНК. РНКазы денатурируют.
- ③ РНК связывается на кремниевой поверхности МСЧ, внесенных в образцы, в присутствии хаотропных солей, изопропанола и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.
- ④ Геномная ДНК разрушается при инкубации с ДНКазой I.

5. Дополнительная информация о продукте, продолжение

⑤ РНК остается связанной с поверхностью МСЧ за счет внесения изопропанола. МСЧ со связавшейся РНК затем отделяются от лизированного образца с помощью магнита.

⑥ МСЧ со связавшейся РНК промываются несколько раз промывочным буфером, чтобы удалить несвязавшиеся вещества, такие как белки (нуклеазы), клеточные мембраны, ингибиторы ПЦР (гепарин и гемоглобин), а также чтобы снизить концентрацию хаотропных солей.

⑦ МСЧ со связавшейся РНК снова отделяются с помощью магнита от промывочного буфера, содержащего остатки материала образца.

⑧ Очищенная мРНК элюируется с МСЧ при 70°C в лунках Картриджа для элюции, при этом сами МСЧ остаются в реакционном наконечнике и удаляются.

Ниже приведены основные действия при выделении с набором MagNA Pure LC RNA Kit – High Performance (протокол RNA HP Blood):

- ① Все необходимые реагенты вносятся в картридж для обработки.
- ② Буфер для элюции вносится в картридж для элюции (Нагревающий блок).
- ③ В образец вносится протеиназа К, перемешивается, инкубируется.
- ④ К образцу добавляется лизирующий/связывающий буфер и перемешивается.
- ⑤ В лизат вносится суспензия МСЧ, перемешивается, инкубируется, частицы отделяются.
- ⑥ МСЧ переносятся в промывочный буфер I, перемешиваются, частицы отделяются.
- ⑦ Вносится ДНКаза, инкубируется, частицы отделяются.
- ⑧ Вносится лизирующий/связывающий буфер и изопропанол.
- ⑨ МСЧ переносятся в промывочный буфер I, перемешиваются, частицы отделяются.
- ⑩ МСЧ переносятся в промывочный буфер II, перемешиваются, частицы отделяются.
- ⑪ МСЧ переносятся в промывочный буфер II, перемешиваются, частицы отделяются.
- ⑫ МСЧ переносятся в буфер для элюции (нагревающий блок), инкубируются, происходит элюция РНК в 50-100 мкл. МСЧ отделяются.
- ⑬ Элюат переносится в картридж для хранения (охлаждающий блок I).

Литература

1 Goriely S *et al.* A Defect in Nucleosome Remodeling Prevents IL-12(p35) Gene Transcription in Neonatal Dendritic Cells. *J.Exp.Med.* (2004);199:1011-6.

Контроль качества

РНК выделяют из крови млекопитающих и культуральных клеток по соответствующим протоколам. Качество выделенной РНК проверяют в агарозном геле, по величине OD, и в ОТ-ПЦР, ПЦР анализе в системе LightCycler®.

6. Вспомогательная информация

6.1 Обозначения

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.

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.

Аббревиатуры

В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
ТП (CP)	Точка пересечения
KB (CV)	Коэффициент вариации
DIG	Дигоксигенин
DTT	Дитиотрейтол
МСЧ	Магнитные стеклянные частицы
PBS	Фосфатно-солевой буфер
КТ	Комнатная температура

6.2. Изменения относительно предыдущей версии

- Добавлены протоколы для предварительного выделения клеток крови
- Изменены инструкции по работе с выделенной РНК
- Полностью изменена структура инструкции

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:

- Семейство MagNA Pure, включая расходные материалы, комплектующие, наборы и прочие продукты:

<http://www.magnapure.com>

- Семейство LightCycler® System для ПЦР в реальном времени, ПЦР он-лайн:

<http://www.lightcycler-online.com>

Приборы и комплектующие

Продукт	Комплектация	Кат.№
Прибор MagNA Pure LC	1 прибор с комплектующими	12 236 931 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, центрифужные адаптеры LC	1 охлаждающий блок с 32 центрифужными адаптерами LightCycler®	12 190 664 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на карусель LC	1 охлаждающий блок	12 189 704 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на 96-луночную ПЦР-плашку	1 охлаждающий блок	12 189 674 001
Диск с протоколом RNA High Performance Protocol	1 диск	03 553 256 001
RNA High Performance рамка для размещения	1 рамка	03 620 085 001
Пленка для картриджей MagNA Pure LC	200 пленок	03 118 827 001
Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
Прибор LightCycler® 1.5	1 прибор с комплектующими	04 484 495 001
Карусельная центрифуга LightCycler® Carousel Centrifuge 2.0	1 центрифуга с ротором (230 V) 1 центрифуга с ротором (110 V)	03 709 582 001 03 709 507 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК		
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (ткани) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 330 591 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Blood, Blood Cells) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 004 015 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 172 627 001
MagNA Pure LC mRNA HS Kit	1 набор (192 выделения)	03 267 393 001

6.3 Информация для заказа, продолжение

Наборы MagNA	Продукт	Комплектация	Кат.№
Pure LC для выделения тотальных нуклеиновых кислот	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 038 505 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 264 793 001
Наборы для одностадийной ОТ-ПЦР LightCycler®	LightCycler® RNA Amplification Kit SYBR Green I	1 набор (96 реакций)	12 015 137 001
	LightCycler® RNA Amplification Kit HybProbe	1 набор (96 реакций)	12 015 145 001
	LightCycler® RNA Master SYBR Green I	1 набор (96 реакций)	03 064 760 001
	LightCycler® RNA Master HybProbe	1 набор (96 реакций)	03 018 954 001
Реагенты для синтеза кДНК	Обратная транскриптаза Transcriptor	250 E	03 531 317 001
		500 E	03 531 295 001
		2000 E	03 531 287 001
	Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	1 набор	04 379 012 001
Дополнительные наборы и реагенты	Буфер для лизиса эритроцитов	100 мл	11 814 389 001
	Буферы в коробке, концентрат PBS, 10x	4 л	11 666 789 001
	DTT	2 г	10 197 777 001
		10 г	10 708 984 001
		25 г	11 583 786 001
		50 г	10 708 992 001
		100 г	10 709 000 001

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией

Приобретение набора MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

¹⁾ Приобретение данных продуктов не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

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

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, MAGNA PURE, FASTSTART и HYBPROBE являются торговыми марками Roche.

SYBR является торговой маркой Molecular Probes, Inc.

Vacutainer является торговой маркой Becton, Dickinson and Company.

**Контактная
информация и
техническая
поддержка**

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.



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany

1 205 03 60 61 04 001 4



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

Набор реагентов для выделения РНК из тканей MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue)

Версия июня 2007

Набор для выделения тотальной РНК из образцов тканей человека и животных

Кат. №. 03 330 591 001

Набор рассчитан на 192 выделения
из образцов свежей замороженной ткани
или 96 выделений
из образцов фиксированной в формалине ткани

Хранить при температуре +2 - +8°C.

www.roche-applied-science.com

Содержание

1. Назначение данного продукта.....	3
Количество тестов	3
Содержание набора	3
Условия хранения и стабильность	4
Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	4
Область применения	5
Длительность постановки	5
2. Работа с данным продуктом	6
2.1 Предварительные действия	6
Меры предосторожности	5
Протокол выделения	7
Образцы	7
Приготовление рабочих растворов	8
2.2 Предварительные этапы для свежих замороженных образцов ткани.....	10
Общие замечания	10
Разрушение ткани в приборе MagNA Lyser	10
Разрушение ткани в ротор-статорном гомогенизаторе	11
Разрушение ткани с помощью ступки/пестика/шприца	11
2.3 Предварительные этапы для фиксированных в формалине парафиновых блоков ткани.....	12
Общие замечания	12
Депарафинизация в реакционных пробирках	12
Депарафинизация на предметном стекле микроскопа	13
2.4 Протокол выделения РНК.....	13
Общие замечания	13
Протокол	14
Хранение выделенной РНК	15
Последующий анализ	15
3. Результаты	16
Стабильность РНК	16
Выход	16
Чистота	16
4. Анализ ошибок	18
5. Дополнительная информация о продукте	19
Назначение данного продукта	19
Принцип теста	19
Литература	21
Контроль качества	21
6. Вспомогательная информация	22
6.1 Обозначения	22
Текстовые обозначения	22
Символы	20
Аббревиатуры	22
Изменения относительно предыдущей версии	22
6.2 Информация для заказа	23
6.3 Ограничения, налагаемые лицензией	25
6.4 Торговые марки	25

1. Назначение данного продукта

Количество тестов

- 192 выделения (6 x 32) из образцов массой до 10 мг свежей замороженной или незамороженной стабилизированной ткани человека или животных.

- 96 выделений (3 x 32) из образцов размером до 20 мкм фиксированной в формалине ткани человека или животных в парафиновых блоках.

△ набор рассчитан на обработку 192 образцов в сериях по 32. Если обрабатывать одновременно менее 32 образцов, часть реагентов будет расходована напрасно и оставшегося объема будет недостаточно для обработки количества образцов, указанного выше.

④ Вы можете сочетать выделение из образцов свежих замороженных и фиксированных в формалине тканей, то есть проводить

- 128 (4 x 32) выделения тотальной РНК из образцов свежей замороженной ткани и 32 (1 x 32) из блоков фиксированной в формалине ткани, или

- 64 (2 x 32) выделения тотальной РНК из образцов свежей замороженной ткани и 64 (2 x 32) из блоков фиксированной в формалине ткани

Содержание набора

④ Связывающий буфер содержит синий краситель, предназначенный для детекции сгустков.

Пробирка / Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
1 черная	Wash Buffer I (Промывочный буфер I)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления ингибиторов ПЦР.
2 синяя	Wash Buffer II (Промывочный буфер II)	• 3 флакона по 100 мл • для удаления солей, белков и т.д..
3 красная	Binding Buffer (связывающий буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для связывания РНК на поверхности МСЧ
4а белая	DNase I, RNase-free (ДНКазы I, свободная от РНКаз)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления ДНК
4б белая	DNase Incubation Buffer (Буфер для инкубации с ДНКазой)	• 1 флакон, 70 мл • для восстановления ДНКазы I (флакон 4а)
5 бежевая	Magnetic Glass Particles (магнитные стеклянные частицы)	• 6 стеклянных флаконов по 2.5 мл с суспензией • для связывания РНК
6а розовая	Proteinase K (Протеиназа К)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления белков
6б прозрачная	Proteinase K Incubation Buffer (Инкубационный буфер для протеиназы К)	• 1 флакон, 50 мл • для восстановления протеиназы К

1. Назначение данного продукта, продолжение

Пробирка / Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
7 желтая	Elution Buffer (Элюиционный буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для элюции очищенных нуклеиновых кислот • для разведения растворенной ДНК (дополнительно) • для восстановления фермента для гомогенизации парафина
8 зеленая	Tissue Lysis Buffer (Лизирующий буфер для тканей)	• 2 флакона по 70 мл • для лизирования тканей и связывания РНК на поверхности МСЧ.
9a розовая	Paraffin Homogenization Enzyme (фермент для гомогенизации парафина)	• стеклянный 1 флакон с лиофилизированным материалом • для расщепления белков в парафиновых блоках
9b белая	Paraffin Homogenization Buffer (буфер для гомогенизации парафина)	• 1 флакон, 20 мл • для гомогенизации парафиновых блоков

Условия хранения и стабильность

- Компоненты набора стабильны при температуре +2 - +8°C до истечения срока годности, указанного на упаковке.

⑨ Набор транспортируется при комнатной температуре.

- стандартное лабораторное оборудование
- дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов и ДНКазы в пробирки для образцов
- центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки
- вортекс
- термоблок или водяная баня
- приспособления для гомогенизации, например:
 - Прибор MagNA Lyser * с частицами MagNA Lyser Green Beads*
 - ротор-статорный гомогенизатор (например, UltraTurrax или Omni TH 220)
 - ступка/пестик/игла (Ø 0.6 мм)
- Немо-De или ксилол
- этанол, абсолютный
- SDS*, 10%

* поставляется Roche Applied Science

Необходимые
дополнительные
оборудование и
реагенты

1. Назначение данного продукта, продолжение

Область применения

Для лабораторных исследований. Для выделения высокоочищенной тотальной РНК из образцов свежей замороженной или фиксированной в формалине в парафиновых блоках тканей человека и животных в приборе MagNA Pure LC. Также могут использоваться образцы незамороженной стабилизированной с помощью специальных реагентов ткани (*например, RNAlater*). Выделенная из образцов свежей ткани РНК может использоваться для ОТ-ПЦР в приборе LightCycler® или стандартных термоциклерах, Нозерн-блоте и других методах анализа экспрессии генов. Качество РНК, выделенной из парафиновых блоков фиксированной в формалине ткани позволяет проводить относительный количественный анализ РНК в ОТ-ПЦР, в том числе в приборе LightCycler®. Выделенная РНК свободна от ингибиторов ПЦР. Также выделенная РНК является идеальным материалом для постановок на микрочипе.

Длительность постановки

Настройка прибора MagNA Pure LC занимает примерно 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения РНК из 32 образцов свежей замороженной ткани составляет около 84 минут (по протоколу 'RNA Tissue Fresh_frozen') или 122 минуты при выделении РНК из 32 образцов ткани, фиксированных в формалине (по протоколу 'RNA Tissue Paraffin'); После настройки и запуска прибора MagNA Pure LC дополнительные манипуляции оператора не требуются. Дополнительные манипуляции требуются только для предварительных этапов выделения.

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 смешивайте реагенты из разных серий набора или разных флаконов одной серии набора.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Промывочный буфер 1 (флакон 1) и буфер для лизиса тканей (флакон 8) содержат соли гуанидина, способные вызывать раздражение. 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.
- Не допускайте смешивания буфера для лизиса тканей с раствором гипохлорита натрия (хлорка). 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.
- Не допускайте контаминации реагентов бактериями, вирусами и нуклеазами. Отбор аликвот из флаконов с реагентами должен проводиться только одноразовыми дозаторами или свободными от нуклеаз наконечниками. Соблюдайте стандартные правила безопасности.
- Требования предосторожности при работе с РНК можно найти в Roche Applied Science LAB FAQs (http://www.roche-applied-science.com/labfaqs/p2_1.htm).
- 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.

2.1 Предварительные действия, продолжение

Протокол выделения

Для выделения РНК с набором MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue), необходимо установить протоколы "RNA Tissue Fresh_frozen" и "RNA Tissue Paraffin". Названия протоколов должны появиться в окне выбора протокола экрана Sample Ordering программы MagNA Pure LC. Если протоколы не были установлены ранее, их можно заказать бесплатно на диске*. Дополнительную информацию можно получить в местном представительстве Roche. С помощью приведенной ниже таблицы выберите протокол, соответствующий вашим образцам:

Название протокола	Тип образца	Процедура
RNA Tissue Fresh_frozen	Образцы массой 1 - 10 мг: • свежая замороженная ткань • незамороженная стабилизированная ткань	Образцы свежей замороженной ткани лизируют и гомогенизируют в гомогенизаторе. Лизаты образцов затем переносят на платформу для реагентов/образцов MagNA Pure LC. Выделение РНК проводится автоматизировано в приборе.
RNA Tissue Paraffin	Парафиновые блоки размером 5 - 20 мкм фиксированной в формалине ткани	Парафиновые блоки фиксированной в формалине ткани гомогенизируют при ночной инкубации с протеиназой К. Лизаты образцов затем на платформу для реагентов/образцов MagNA Pure LC. Выделение РНК проводится автоматизировано в приборе.

Ⓢ Протокол выделения 'mRNA II Tissue' позволяет устанавливать объем элюции на 50 - 100 мкл.

⚠ При элюции в объеме 50 мкл, общий выход РНК может снижаться на 10-20% по сравнению с элюцией в 100 мкл.

Для получения оптимальных результатов при последующих процедурах, особенно ОТ-ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®, не используйте образцы большего объема, превышающего указанный в инструкции к набору. Оптимальными являются следующие размеры образцов:

- 1-10 мг свежей замороженной или незамороженной стабилизированной (например, обработанной RNeasy) ткани человека или животных.
- 1 парафиновый блок фиксированной в формалине ткани (толщиной 5-10 мкм).

⚠ Никогда не используйте образцы с объемом больше указанного в инструкции к набору. В противном случае может происходить потеря МСЧ, что приведет к снижению эффективности выделения. Из-за значительной вязкости некоторых тканей, использование образцов массой более 10 мг приведет к забиванию реакционных наконечников MagNA Pure LC.

⚠ Рассматривайте все образцы как потенциально инфекционные.

Образцы

2.1 Предварительные действия, продолжение

Приготовление рабочих растворов

Перед началом процедуры выделения, приготовьте рабочие растворы, как указано ниже.

⚠ Все остальные растворы готовы к работе.

⚠ Перед началом работы доведите буферы до комнатной температуры (+15 - + 25°C). При использовании реагентов, температура которых выходит за рекомендованные рамки, работа набора может быть неоптимальной.

⚠ Все буферы представляют собой прозрачные растворы. Не используйте буфер, если во флаконе образовался преципитат. Если виден преципитат, растворите его, нагревая флакон при 37°C и периодически помешивая. Не грейте буфер при 37°C дольше, чем это необходимо для полного растворения преципитата. Перед использованием, охладите буфер до комнатной температуры.

⚠ Используйте количество реагентов, соответствующее числу образцов.

⚠ Не храните лизирующий буфер, суспензию СМЧ и раствор ДНКазы в пробирках для реагентов. Все остальные реагенты, остающиеся в пробирках для реагентов после завершения постановки, могут использоваться в следующей постановке, если она проводится в тот же день. Более длительное хранение не рекомендовано.

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Магнитные стеклянные частицы	Тщательно перемешайте суспензию МСЧ (флакон 5). Непосредственно перед работой перемешайте на вортексе для образования однородной суспензии. Во время хранения частицы оседают на дно флакона. ⚠ Никогда не перемешивайте СМЧ на вортексе! ⚠ Для получения оптимальных результатов, вносите МСЧ в прибор перед самым запуском постановки (чтобы свести к минимуму оседание частиц). Всегда используйте точное количество МСЧ, рекомендованное программой.	Храните МСЧ при температуре +2 - +8°C.) ⚠ Не оставляйте МСЧ в открытом флаконе или пробирке для реагентов, поскольку испарение спирта может привести к снижению эффективности выделения.
Раствор ДНКазы	Восстановите всю ДНКазу (флакон 4а), добавив 10 мл инкубационного буфера ДНКазы (флакон 4б). Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата. ④ Один флакон ДНКазы рассчитан на обработку 32 образцов.	Восстановленная ДНКазы I стабильна в течение 1 месяца при +2 - +8°C или до 12 месяцев при -15 - -25°C.

2.1 Предварительные действия, продолжение

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Протеиназа К	Восстановите всю протеиназу К (флакон 6а), внеся в каждый флакон по 3 мл буфера для элюции (флакон 6). Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата. Только после полного растворения добавьте во флакон еще 2 мл буфера для элюции для получения конечного объема. ⚠ После восстановления раствор протеиназы К может быть мутным. Это связано с присутствием стабилизирующих добавок в реагенте. Это не оказывает влияния на работу фермента. 📌 Один флакон протеиназы К рассчитан на выделение 32 образцов.	После восстановления раствор протеиназы К стабилен в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C.
Раствор фермента для гомогенизации парафина	Восстановите лиофилизированный фермент для гомогенизации парафина (флакон 9а), добавив 4.5 мл буфера для элюции (флакон 7). Тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата.	• Сделайте аликвоты и храните при -15°C - -25°C (до 1 года). • Восстановленный реагент храните в аликвотах, промаркированных наклейками, прилагаемыми к набору.

Контроли

Всегда используйте в постановках соответствующие контроли, особенно если для выделенных образцов планируется проведение качественного анализа образцов мРНК (например, в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®). 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), вносимая в каждый выделяемый образец в известном количестве контрольная матрица.

📌 Внутренний контроль (ВК) до начала выделения и проходит затем все этапы выделения и амплификации, что и мишень, в той же реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно при проведении энзиматических реакций, таких как ОТ-ПЦР, поскольку эффективность процесса ОТ-ПЦР может снижаться при наличии в очищенном образце ингибиторов. Кроме того, внутренний контроль служит для мониторинга возможных потерь материала во время выделения.

📌 Для количественных тестов в приборе LightCycler®, в качестве внутреннего контроля используют синтетические молекулы РНК с сайтами посадки праймеров, идентичными мишени, но имеющие свой уникальный участок посадки зондов для дифференциации ампликонов мишени и ВК. Разделение сигналов от мишени и ВК проводится за счет применения разных красителей в тестах формата HybProbe. Подробные сведения о применении ВК в системе LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® 12/2000 «Абсолютный количественный анализ при использовании внешних стандартов и внутреннего контроля» ("Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control") на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2.2 Предварительные этапы для свежих обработанных образцов ткани

Общие замечания

- Полное разрушение и гомогенизация материала образца является ключевым моментом для выделения внутриклеточной РНК из тканей. Неполное разрушение ткани приводит к значительному снижению выхода РНК.
 - При гомогенизации лизата ткани происходит расщепление высокомолекулярной геномной ДНК и других высокомолекулярных компонентов клетки, что способствует снижению вязкости лизата. Неполная гомогенизация лизата приводит к значительному снижению выхода РНК и может вызывать засорение реакционных наконечников.
 - В некоторых методах пробоподготовки одновременно происходит лизис и гомогенизация образцов, тогда как в других методах разрушения ткани требуется дополнительный этап гомогенизации.
- ⚠ Всегда готовьте свежие лизаты образцов и обрабатывайте их немедленно. Храните лизаты при -70°C или ниже, если планируете проводить выделение РНК позже.

Разрушение тканей в приборе MagNA Lyser

Ниже в таблице приведено описание этапа разрушения и гомогенизации свежих замороженных или фиксированных в RNAlater тканей в приборе MagNA Lyser *.

- 1 Внесите 80 мкл буфера для лизиса тканей в пробирку с частицами MagNA Lyser Green Beads*. Затем поместите образец ткани в пробирку.
- Настройте прибор MagNA Lyser как описано в Руководстве пользователя прибора.
- Запустите цикл гомогенизации, задав скорость и время в соответствии с материалом образца.

⚠ Всегда настраивайте параметры гомогенизации (скорость, время) перед проведением выделения РНК. Недостаточное разрушение ткани может привести к недостаточному выходу РНК, тогда как избыточное разрушение приведет к деградации РНК. В качестве ориентиров используйте значения, приведенные в качестве примера в таблице ниже:

Материал образца	Скорость	Время
Печень/почки	6500 об./мин.	50 сек.
Селезенка/опухолевые ткани	6500 об./мин.	2 × 50 сек. [#]
Хвост/ухо/кожа	6500 об./мин.	2 – 3 × 50 сек. [#]

⚠ # Длительные циклы разрушения могут приводить к деградации РНК вследствие нагревания. Избегайте длительных циклов разрушения, превышающих 50 сек. Лучше проведите несколько циклов разрушения не более 50 сек. каждый. Между циклами разрушения ткани охлаждайте образцы на льду.

- 2 Инкубируйте образцы 30 мин. (при КТ).
- 3 Центрифугируйте 2 мин. при 13,000 × g (при КТ).
- 4 Перенесите 350 мкл супернатанта лизата в Картридж для образцов.
- 5 Поместите Картридж для образцов на платформу для реагентов/образцов и запустите протокол "RNA Tissue Fresh_frozen" как описано в разделе 2.4.

2.2 Предварительные этапы для свежих обработанных образцов ткани, продолжение

Разрушение тканей в ротор-статорном гомогенизаторе

Ниже в таблице приведено описание этапа разрушения и гомогенизации свежих замороженных или фиксированных в *RNAlater* тканей в ротор-статорном гомогенизаторе (*например*, UltraTurrax или Omni TH220).

① Лизируйте и гомогенизируйте ткань в 350 мкл буфера для лизиса тканей в ротор-статорном гомогенизаторе, следуя инструкции к прибору. В зависимости от типа образцов, ротор-статорный гомогенизатор разрушает и гомогенизирует ткани в течение 5-90 сек. в присутствии лизирующего буфера.

⚠ Не допускайте образования пены, удерживая наконечник гомогенизатора погруженным всегда с одной стороны пробирки.

② Инкубируйте образцы 30 мин. (при КТ).

③ Центрифугируйте 2 мин. при 13,000 x g (при КТ).

④ Перенесите 350 мкл супернатанта лизата в Картридж для образцов.

⑤ Поместите Картридж для образцов на платформу для реагентов/образцов и запустите протокол "RNA Tissue Fresh_frozen" как описано в разделе 2.4.

Разрушение тканей с помощью ступки, пестика и шприца

Ниже в таблице приведено описание этапа разрушения и гомогенизации свежих замороженных или фиксированных в *RNAlater* тканей с помощью ступки, пестика и шприца.

① • Тщательно измельчите пестиком в ступке замороженный в жидком азоте образец ткани. Перенесите полученный порошок в подходящую для центрифугирования пробирку, охлажденную в жидком азоте.
• Дайте испариться остаткам жидкого азота, но не допускайте оттаивания образца.

• Внесите 350 мкл буфера для лизиса тканей и гомогенизируйте образец, пропустив его несколько раз через иглу шприца (Ø 0.6 мм).

② Инкубируйте образцы 30 мин. (при КТ).

③ Центрифугируйте 2 мин. при 13,000 x g (при КТ).

④ Перенесите 350 мкл супернатанта лизата в Картридж для образцов.

⑤ Поместите Картридж для образцов на платформу для реагентов/образцов и запустите протокол "RNA Tissue Fresh_frozen" как описано в разделе 2.4.

2.3 Предварительные этапы для фиксированных в формалине парафиновых блоков ткани

Общие замечания

- Набор оптимизирован для выделения РНК из тканей, фиксированных в 10% нейтральном забуференном формалине в парафиновых блоках. Другие методы фиксации тканей могут оказывать влияние на эффективность выделения РНК.
- При фиксации в формалине происходит инактивации внутриклеточных РНКаз. Поэтому с парафиновые блоки можно хранить и работать с ними при комнатной температуре.

Депарафинизация в реакционных пробирках

Ниже в таблице приведено описание процедуры депарафинизации в реакционных пробирках объемом 1.5 мл для образцов фиксированной в формалине ткани в парафиновых блоках величиной 1 x 5 мм - 10 мм.

- 1 Добавьте 800 мкл Нето-Де (или ксилола) срезу ткани 5 мм - 10 мм в реакционную пробирку объемом 1.5 мл. Перемешайте переворачиванием несколько раз.
- 2 Добавьте 400 мкл абсолютного этанола и перемешайте.
- 3 Центрифугируйте 2 минуты при максимальной скорости (12 000- 14 000 об./мин.), затем удалите супернатант.
- 4 Добавьте 1 мл абсолютного этанола и перемешайте переворачиванием.
- 5
 - Центрифугируйте 2 минуты при максимальной скорости и удалите супернатант.
 - Промокните пробирку фильтровальной бумагой, чтобы удалить остатки этанола.
- 6 Высушите осадок ткани в течение 10 мин. при 55°C.
- 7
 - Добавьте 100 мкл буфера для гомогенизации парафина (флакон 9b), 16 мкл 10% SDS и 40 мкл раствора фермента для гомогенизации парафина.
 - Перемешайте на вортексе с небольшими паузами, и инкубируйте ночь при 55°C.
- 8 Центрифугируйте 2 мин. при 13,000x g (при КТ).
- 9 Перенесите 130 мкл супернатанта лизата в Картридж для образцов.
- 10 Добавьте к лизату образца 220 мкл буфера для лизиса тканей (флакон 8).

2.3 Предварительные этапы для фиксированных в формалине парафиновых блоков ткани

Депарафинизация на предметном стекле микроскопа

Ниже в таблице приведено описание процедуры депарафинизации на предметном стекле микроскопа для образцов фиксированной в формалине ткани в парафиновых блоках величиной 1 x 5 мкм - 10 мкм.

- ❶ Поместите предметное стекло в емкость с Немо-De (или ксилолом) и инкубируйте 10 мин..
- ❷ Стряхните избыток жидкости, затем поместите предметное стекло в абсолютный этанол на 10 мин.
- ❸ Смените емкость и инкубируйте еще 10 мин. в абсолютном этаноле.
- ❹ Соскоблите депарафинизированный образец с предметного стекла стерильным одноразовым скальпелем и поместите в реакционную пробирку объемом 1.5 мл.
⚠ Для предотвращения потери части материала, соскоблите образец с предметного стекла до того, как он высохнет.
- ❺ Высушите осадок ткани в течение 10 мин. при 55°C.
- ❻ • Добавьте 100 мкл буфера для гомогенизации парафина (флакон 9b), 16 мкл 10% SDS и 40 мкл раствора фермента для гомогенизации парафина.
• Перемешайте на вортексе с небольшими паузами, и инкубируйте ночь при 55°C.
- ❼ Центрифугируйте 2 мин. при 13,000x g (при КТ).
- ❽ Перенесите 130 мкл супернатанта лизата в Картридж для образцов.
- ❾ Добавьте к лизату образца 220 мкл буфера для лизиса тканей (флакон 8, зеленая крышка), конечный объем лизата в лунке Картриджа для образцов – 350 мкл.

2.4 Протокол выделения РНК

Общие замечания

- Описанная ниже процедура рассчитана на одновременную обработку 32 образцов. Если вы обрабатываете меньшее количество образцов, пропорционально уменьшите объем всех реагентов (см. экран Start Information прибора MagNA Pure LC).
- Программа автоматически рассчитывает необходимое количество реагентов и дает подсказки на этапах запуска постановки.
- Вы не можете запустить прибор, пока не будет закрыт зажим для картриджа образцов, пробирок для реагентов и реакционных наконечников.
- Если вы запрограммировали разведение элюированной РНК, вам потребуется дополнительная пробирка для реагентов M30 в позиции R8. В качестве буфера для разведения РНК используйте буфер для элюции или свободную воду.

2.4 Протокол выделения РНК, продолжение

Протокол

Проведите выделение РНК по протоколу, приведенному ниже.

Запуск прибора и программы

- Сначала включите прибор, затем компьютер. Запустите программу MagNA Pure LC.
- Выберите необходимый протокол:

Если вы работаете с ...	Тогда используйте протокол ...
Свежие замороженные или незамороженные стабилизированные образцы тканей	"RNA Tissue Fresh_frozen"
Парафиновые блоки фиксированной в формалине ткани	"RNA Tissue Paraffin"

- Следуйте инструкциям программы и укажите количество образцов. Введите объем образца и объем элюции в соответствующих окнах. Программа рассчитает необходимое количество каждого реагента.

Заполнение пробирок для реагентов

Перед запуском процедуры выделения, внесите в пробирки для реагентов необходимый объем реагентов (доведенные до комнатной температуры). Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на экране Start Information, затем закройте каждую пробирку крышкой.

⚠ Используйте объем реагентов, соответствующий количеству обрабатываемых образцов.

⚠ Закрывайте пробирки с реагентами крышками, чтобы не допустить испарения реагентов. Однако, даже закрытые, пробирки для реагентов не подходят для длительного хранения реагентов.

⚠ Загрузите указанное на экране Start Information количество МСЧ в прибор непосредственно перед запуском постановки. Это необходимо делать перед самым запуском для предотвращения оседания МСЧ.

Установка пробирок для реагентов на платформу для реагентов/образцов

Следуя указаниям на экране Start Information, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) и реагенты в платформу для реагентов/образцов.

④ Цветная "Рамка для размещения"*, накладываемая на штатив для реагентов и помогающая загружать реагенты, прилагается бесплатно.

Загрузка образцов

Перенесите Картридж для образцов с лизатами образцов в прибор MagNA Pure LC.

2.4 Протокол выделения РНК, продолжение

Запуск постановки

- На экране Start Information Screen подтвердите правильность расположения расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих окнах.
 - Нажмите кнопку 'ОК', чтобы начать автоматизированную процедуру выделения РНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.
-

Хранение выделенной РНК

 Для сохранения максимальной стабильности выделенной РНК, немедленно начните подготовку ОТ-ПЦР. Не храните выделенную РНК в Картридже для хранения в охлаждающем блоке 1.

Для длительного хранения (в течение нескольких недель), закройте Картридж для хранения пленкой* и храните РНК при -70°C. Лучше хранить РНК в аликвотах, чтобы избежать многократного оттаивания/замораживания выделенных нуклеиновых кислот.

Последующий анализ

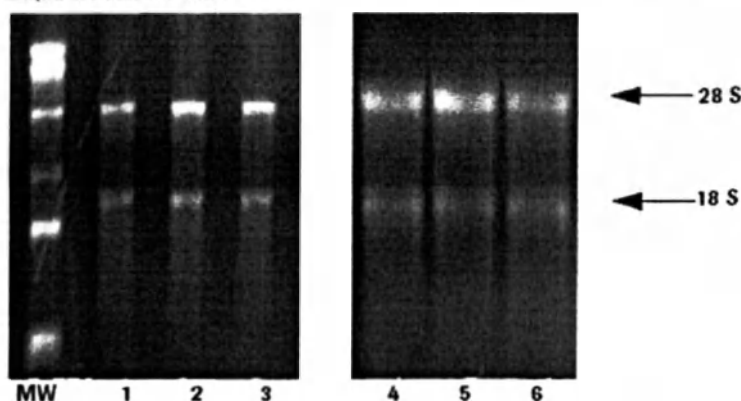
Прибор MagNA Pure LC может помочь в подготовке реакции ОТ-ПЦР, внося выделенную мРНК и мастермиксы для ОТ-ПЦР, ОТ или ПЦР в капилляры LightCycler® или стандартный пробирки и плашки для ПЦР (Рекомендуемые плашки приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC). Для последующего анализа вы можете поместить капилляры LightCycler® в вынимаемый охлаждающий блок MagNA Pure LC в центрифужных адаптерах LC или в карусели для образцов LC. Этапы последующего анализа можно запрограммировать заранее, до начала выделения, или после его завершения. Подробные сведения о последующем после выделения анализе приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC.

3. Результаты

Стабильность РНК

Тотальную РНК выделяли из образцов массой 10 мг свежей замороженной или обработанной *RNAlater* печени мыши по протоколу "RNA Tissue Fresh_frozen". Стабильность РНК проверяли в денатурирующем агарозном геле с бромистым этидием. Интактные полосы РНК на геле указывали на хорошую стабильность РНК во всех образцах.

Рисунок 1: Электрофорез в денатурирующем агарозном геле для РНК, выделенной из свежих замороженных (дорожки 1-3) или обработанных *RNAlater* (дорожки 4-6) образцов печени мыши.



Выход

РНК выделяли из свежих замороженных или обработанных *RNAlater* образцов ткани, а также парафиновых блоков. Выход РНК определяли по оптической плотности OD260 и методом электрофореза в агарозном геле (значения стандартного выхода приведены в Таблице 1).

Чистота

- РНК выделяли из образцов разной величины разных типов. В стандартных экспериментах соотношение оптической плотности OD260/280 для РНК составляло 2.0 ± 0.2 , что указывает на высокую степень чистоты выделенной РНК (таблица 1).

- Во всех экспериментах для всех образцов проводили контрольную "минус-ОТ" ПЦР для выявления циклофилина А. После 40 циклов ПЦР анализ в ОТ-ПЦР LightCycler® показал отсутствие сигнала, что указывало на полное отсутствие геномной ДНК в препаратах РНК (см. Рисунок. 2).

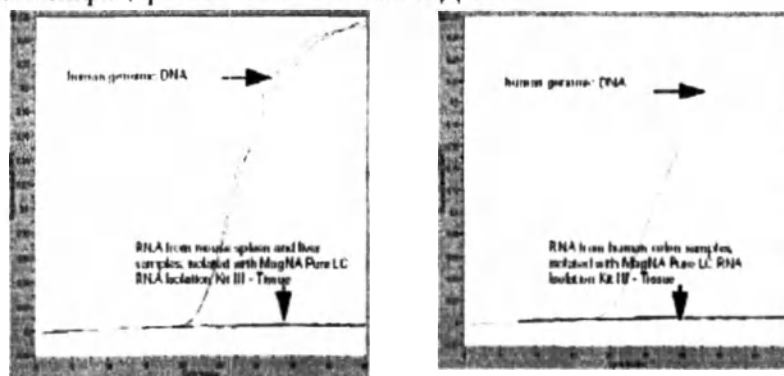
④ В зависимости от чувствительности ОТ-ПЦР и параметров ОТ-ПЦР, иногда на поздних циклах в минус-ОТ контрольной ПЦР может возникать слабый сигнал. Обычно он слишком слаб, чтобы влиять на результаты анализа в ОТ-ПЦР. Однако мы рекомендуем подбирать праймеры к пограничным участкам между экзонами мРНК, которые не должны амплифицировать геномную ДНК.

3. Результаты, продолжение

Таблица 1: выход и чистота РНК, выделенной из образцов разного типа.

Тип образец (количество)	Выход РНК (мкг)	Чистота РНК (OD260/280)
Свежая замороженная ткань (10 мг)	5 – 50	2.0 ± 0.2
Обработанная <i>RNAlater</i> ткань (10 мг)	5 – 50	
Фиксированная в формалине ткань в парафиновых блоках (5 мкм)	1 - 3	

Рисунок. 2: ПЦР-анализ LightCycler® (формат HybProbe) тотальной РНК, выделенной с набором MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue), направленный на выявления цитофилина А, не выявил присутствия остаточной геномной ДНК. В качестве контроля параллельно амплифицировали 10 нг геномной ДНК.



4. Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
Слипание частиц/проблемы с магнитным разделением частиц	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
	Магнитные стеклянные частицы были намагничены перед началом работы.	Избегайте контакта МСЧ с магнитом.
Деградация РНК	Не оптимальное хранение образцов	• Заморозьте образцы в жидком азоте сразу после их сбора и храните при -60°C или ниже до начала выделения. Избегайте работы с образцами, хранившимися при комнатной температуре долгое время. • Используйте образцы ткани, предварительно обработанные стабилизирующим реагентом по инструкции производителя (например, <i>RNAlater</i>). • Не допускайте оттаивания образцов до гомогенизации в лизирующем буфере.
	Контаминация реакционных наконечников, пробирок для реагентов или реагентов РНКазми.	Не допускайте контаминации расходных материалов и реагентов РНКазми.
Низкий выход РНК или ее отсутствие	В образце недостаточное количество ткани или неполный лизис	Взвешивайте образцы перед началом работы. Оптимальные результаты получают с образцами ткани массой до 10 мг.
	Неправильное хранение образцов	См. выше
	Неправильное расположение реагентов на платформе	Убедитесь, что все реагенты помещены в правильную позицию на платформе.
ДНК недостаточно чистая	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
Низкое качество последующей ПЦР	Низкая степень очистки РНК	Выделение РНК проводили из слишком большого количества материала. Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
	Реагенты и протокол ОТ-ПЦР не оптимизированы	Проверьте реагенты и протокол ОТ-ПЦР с помощью положительного контроля РНК.
Низкое качество последующей ПЦР с РНК, выделенной из парафиновых блоков	Слишком большой ампликон	Не используйте ампликоны >200 п.о., учитывая деградацию нуклеиновых кислот в фиксированных формалином тканях в парафиновых блоках.

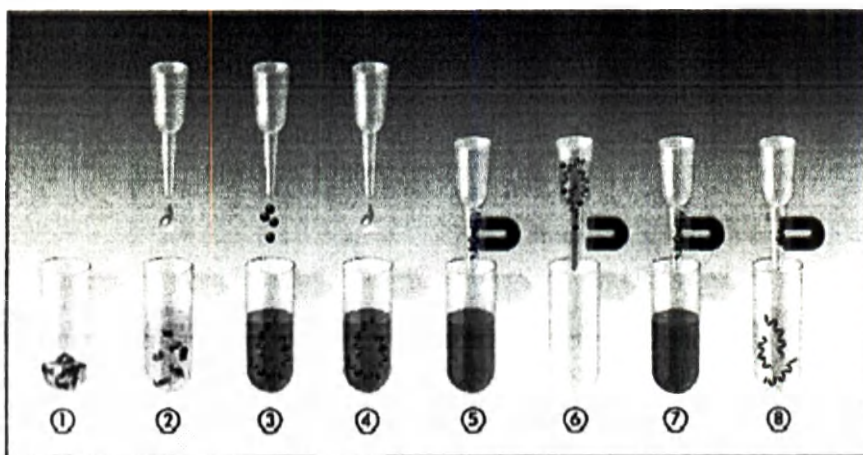
5. Дополнительная информация о продукте

Назначение данного продукта

Набор MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) применяется для выделения высокоочищенной, недеградированной тотальной РНК из 1-32 образцов различных тканей человека и животных, замороженных или фиксированных формалином в парафиновых блоках, в приборе MagNA Pure LC. Выделенную РНК растворяют в любом объеме от 50 до 100 мкл. Выделенная РНК соответствует стандартам качества, необходимым для проведения высокочувствительного количественного (при выделении из свежих замороженных образцов ткани) или относительного количественного анализа (при выделении из парафиновых блоков) ОТ-ПЦР-анализа в приборе LightCycler®.

Принцип теста

Сначала образцы ткани или парафиновые блоки гомогенизируют в приборе MagNA Lyser (или другом подходящем гомогенизаторе) в присутствии буфера для лизиса тканей, входящего в состав набора. Гомогенизация фиксированных в формалине тканей в парафиновых блоках происходит при ночной инкубации с протеиназой К. Затем лизаты образцов переносят в прибор MagNA Pure LC. Добавление протеиназы К усиливает лизис клеток и расщепление белков. Затем РНК связывается с поверхностью магнитных стеклянных частиц (МСЧ) в присутствии хаотропных солей. Несвязавшиеся вещества удаляются при нескольких этапах отмывки. Затем очищенная РНК элюируется с МСЧ и готова к проведению ПЦР. Ниже приведены этапы процесса выделения тотальной РНК MagNA Pure LC:



- ① Образцы помещают в лунки Картриджа для образцов.
- ② К образцам добавляется лизирующий/связывающий буфер, в результате происходит полный лизис клеток и высвобождение РНК. РНКазы при этом денатурируют.
- ③ Нуклеиновые кислоты связываются на кремниевой поверхности МСЧ, внесенных в образцы, в присутствии хаотропных солей, изопропанола и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.
- ④ Геномная ДНК разрушается при инкубации с ДНКзой I.
- ⑤ РНК связывается с частицами при добавлении изопропанола. МСЧ со связавшейся РНК затем отделяются от лизированного образца с помощью магнита.
- ⑥ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами промываются несколько раз промывочным буфером, чтобы удалить несвязавшиеся вещества, такие как белки (нуклеазы), клеточные мембраны, ингибиторы ПЦР (гепарин и гемоглобин), а также чтобы снизить концентрацию хаотропных солей.
- ⑦ МСЧ со связавшейся РНК снова отделяются с помощью магнита от промывочного буфера, содержащего остатки материала образца.
- ⑧ Очищенная РНК элюируется с МСЧ при 70°C в лунках Картриджа для элюции, при этом сами МСЧ остаются в реакционном наконечнике и удаляются.

Дополнительная информация о продукте, продолжение

Ниже приведены основные действия при выделении с набором MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue):

Протокол RNA Tissue Fresh frozen	Протокол RNA Tissue Paraffin
① Все необходимые реагенты вносятся в картридж для обработки.	
② Элюиционный буфер вносится в Картридж для элюции в нагревающем блоке	
③ К лизату добавляются 350 мкл связывающего буфера и 100 мкл ПРотеиназы К, и перемешиваются.	К лизату добавляется 350 мкл связывающего буфера и перемешивается.
④ 800 мкл лизата добавляются к 200 мкл суспензии МСЧ, перемешиваются, инкубируются, затем частицы отделяются.	700 мкл лизата добавляются к 200 мкл суспензии МСЧ, перемешиваются, инкубируются, затем частицы отделяются.
⑤ МСЧ переносятся в 290 мкл раствора ДНКазы, перемешиваются, инкубируются 10 минут и отделяются.	
⑥ Частицы переносятся в 850 мкл промывочного буфера I, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.	
⑦ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.	
⑧ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.	Частицы переносятся в 290 мкл раствора протеиназы К, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.
⑨ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.	Частицы переносятся в 850 мкл промывочного буфера I, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.
⑩ Частицы вносятся в 100 мкл буфера для элюции (нагревательный блок), перемешиваются, инкубируются, происходит элюция РНК, МСЧ отделяются.	Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.
⑪ Выделенная РНК переносится в картридж для хранения (охлаждающий блок I).	Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.
⑫	Частицы вносятся в 100 мкл буфера для элюции (нагревательный блок), перемешиваются, инкубируются, происходит элюция РНК, МСЧ отделяются.
⑬	Выделенная РНК переносится в картридж для хранения (охлаждающий блок I).

Литература

1. Borke WB *et al.* Increased myocardial matrix metalloproteinases in hypoxic newborn pigs during resuscitation: effects of oxygen and carbon dioxide. *European Journal of Clinical Investigation* (2004); 34:459-466.
2. Schweitzer, B.K. (2006). Geographic Factors Contributing to a High Seroprevalence of West Nile Virus-Specific Antibodies in Humans following an Epidemic. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13:314 - 318.

Контроль качества

- РНК выделяли из замороженных образцов печени мыши и парафиновых блоков по соответствующим протоколам. Качество выделенной РНК проверяли методом электрофореза в геле, определением OD260/280, и в ОТ-ПЦР/ПЦР анализе в системе LightCycler®.
- Все компоненты набора проверяли на отсутствие РНКаз.

6. Вспомогательная информация

6.1 Обозначения

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.

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.

Аббревиатуры

В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
ТП (CP)	Точка пересечения
KB (CV)	Коэффициент вариации
DIG	Дигоксигенин
КТ	Комнатная температура
СМЧ	Покрытые стрептавидином магнитные частицы

6.2 Изменения относительно предыдущей версии

- Чистота РНК несколько изменилась и составила 2.0 +/- 0.2
- Изменилась процедура контроля качества.

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:

- Семейство MagNA Pure, включая расходные материалы, комплектующие, наборы и прочие продукты:

<http://www.magnapure.com>

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

Приборы
комплектующие

Продукт	Комплектация	Кат. №
и Прибор MagNA Pure LC	1 прибор с комплектующими	12 236 931 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, центрифужные адаптеры LC	1 охлаждающий блок с 32 центрифужными адаптерами LightCycler®	12 190 664 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на карусель LC	1 охлаждающий блок	12 189 704 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на 96-луночную ПЦР-плашку	1 охлаждающий блок	12 189 674 001
RNAIII рамка для размещения	1 рамка	03 142 655 001
Прибор MagNA Lyser	1 прибор (220 V) 1 прибор (110 V) (плюс ротор и охлаждающий блок ротора)	03 358 976 001 03 358 968 001
Частицы MagNA Lyser Green Beads	100 пробирок	03358 941 001
Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
Прибор LightCycler® 480	1 прибор (96 лунок) 1 прибор (384 лунок)	04 640 268 001 04 545 885 001
Прибор LightCycler® 1.5	1 прибор с комплектующими	04 484 495 001
Карусельная центрифуга LightCycler® Carousel Centrifuge 2.0	1 центрифуга с ротором (230 V) 1 центрифуга с ротором (110 V)	03 709 582 001 03 709 507 001

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией

Приобретение набора MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

¹⁾ Приобретение данных продуктов не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

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

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, MAGNA PURE, MAGNA LYSER, FASTSTART и HYBPROBE являются торговыми марками Roche.

SYBR является торговой маркой Molecular Probes, Inc.

UltraTurrax является торговой маркой IKA Analysentechnik GmbH, Germany.

Omni TH220 является торговой маркой Sud-Laborbedarf GmbH, Germany.

RNAlater является торговой маркой Ambion Inc., USA.

Hemo-De является торговой маркой Scientific Safety Solvents.

6.3 Информация для заказа, продолжение

	Продукт	Комплектация	Кат.№
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 542 394 001
	MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (кровь, клетки крови) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 004 015 001
	MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 172 627 001
	MagNA Pure LC mRNA HS Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 267 393 001
	MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I – лизирующий буфер	70 мл	03 604 721 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 038 505 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения тотальных нуклеиновых кислот	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 264 793 001
	LightCycler® RNA Amplification Kit SYBR Green I	1 набор (96 реакций)	12 015 137 001
Наборы для одностадийной ОТ-ПЦР LightCycler®	LightCycler® RNA Amplification Kit HybProbe	1 набор (96 реакций)	12 015 145 001
	LightCycler® RNA Master SYBR Green I	1 набор (96 реакций)	03 064 760 001
	LightCycler® RNA Master HybProbe	1 набор (96 реакций)	03 018 954 001
	Обратная транскриптаза Transcriptor	250 Е 500 Е 2000 Е	03 531 317 001 03 531 295 001 03 531 287 001
Реагенты для синтеза кДНК	Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	1 набор	04 379 012 001
Дополнительные наборы и реагенты	Додецил сульфат натрия (SDS), анионный, для электрофореза	100 г 1 кг	11 667 262 001 11 667 289 001

**Контактная
информация
и
техническая
поддержка**

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.



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany

0607 033206530016



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

Набор реагентов для общего выделения нуклеиновых кислот

MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit

Версия декабря 2008

Набор для выделения тотальных нуклеиновых кислот из образцов плазмы, сыворотки крови и цельной крови млекопитающих в приборе MagNA Pure LC

Кат. №. 03 038 505 001

Набор рассчитан на 192 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
Необходимые дополнительные 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
2.2 Приготовление рабочих растворов	7
Контроли	8
2.3. Предварительные этапы	9
Общие замечания	9
Протокол лизиса вне прибора	9
2.4 Протокол выделения тотальных нуклеиновых кислот	9
Общие замечания	9
Протокол	10
Хранение выделенных нуклеиновых кислот	11
Последующий анализ	12
3. Результаты	13
Линейность результатов	13
Воспроизводимость	13
Предотвращение перекрестных контаминаций	14
Воспроизводимость	14
4. Анализ ошибок	15
5. Дополнительная информация о продукте	16
5.1 Назначение данного продукта	16
Принцип теста	16
5.2 Контроль качества	18
5.3 Литература	18
6. Вспомогательная информация	19
6.1 Обозначения	19
Текстовые обозначения	19
Символы	19
Аббревиатуры	19
6.2 Изменения относительно предыдущей версии	20
6.3 Информация для заказа	20
6.4 Ограничения, налагаемые лицензией	22
6.5 Торговые марки	22

1. Назначение данного продукта

Количество тестов 192 выделения из образцов плазмы или сыворотки крови млекопитающих объемом до 200 мкл. Или образцов цельной крови млекопитающих объемом до 100 мкл.

Ⓢ Набор рассчитан на обработку 192 образцов в сериях по 32. Если обрабатывать одновременно менее 32 образцов, часть реагентов будет расходована напрасно и оставшегося объема будет недостаточно для обработки количества образцов, указанного выше.

Содержание набора

Ⓢ Лизирующий/связывающий буфер содержит синий краситель, предназначенный для детекции сгустков при автоматизированном выделении нуклеиновых кислот в приборе MagNA Pure LC.

Пробирка / Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
1 черная	Wash Buffer I (Промывочный буфер I)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления ингибиторов ПЦР
2 синяя	Wash Buffer II (Промывочный буфер II)	• 1 флакон, 100 мл • для удаления солей, белков и т.д..
3 красная	Wash Buffer III (Промывочный буфер III)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления солей, белков и т.д..
4 зеленая	Lysis/Binding Buffer (лизирующий/связывающий буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для лизиса клеток и связывания тотальных нуклеиновых кислот
5 розовая	Proteinase K (Протеиназа К)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления белков
6 бежевая	Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension (Магнитные стеклянные частицы, МСЧ, суспензия)	• 6 стеклянных флаконов с суспензией МСЧ, по 1 мл каждый • для связывания нуклеиновых кислот
7 желтая	Elution Buffer (Элюиционный буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для элюции очищенных нуклеиновых кислот • для восстановления протеиназы К • для разведения выделенных нуклеиновых кислот (дополнительно)

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

- стандартное лабораторное оборудование
- дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов и ДНКазы в пробирки для образцов
- центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки
- вортекс для ресуспендирования МСЧ

Назначение данного продукта

Область применения	Для лабораторных исследований. Набор MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit специально разработан для выделения тотальных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из образцов сыворотки крови, плазмы и цельной крови млекопитающих в приборах MagNA Pure LC [MagNA Pure LC 1.0 (Кат. №. 12 236 931 001) и MagNA Pure LC 2.0 (Кат. №. 05 197 686 001)]. Выделенные тотальные нуклеиновые кислоты могут быть использованы для тестирования в ОТ-ПЦр и ПЦр в приборе LightCycler® или стандартных термоциклерах. Выделенные тотальные нуклеиновые кислоты свободны от любых ингибиторов ПЦр.
Длительность постановки	Настройка прибора MagNA Pure LC занимает примерно 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения нуклеиновых кислот из 32 образцов составляет примерно 90 минут. ④ После настройки и запуска прибора MagNA Pure LC дополнительные манипуляции оператора не требуются. Дополнительные манипуляции требуются только для предварительных этапов выделения.

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 смешивайте реагенты из разных серий набора или разных флаконов одной серии набора.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Промывочный раствор I (флакон 1) и Лизирующий/связывающий буфер (флакон 4) содержат соли гуанидина, способные вызывать раздражение. 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.
- Не допускайте смешивания реактивов Лизирующего/связывающего буфера 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.
- Не допускайте контаминации реагентов бактериями, вирусами и нуклеазами. Отбор аликвот из флаконов с реагентами должен проводиться только одноразовыми дозаторами или свободными от нуклеаз наконечниками. Соблюдайте стандартные правила безопасности.
- Требования предосторожности при работе с РНК можно найти в Roche Applied Science LAB FAQs (http://www.roche-applied-science.com/labfaqs/p2_1.htm).
- 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.

Протокол выделения

Для выделения тотальных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit в приборах MagNA Pure LC существуют три разных протокола выделения. Приведенные ниже названия протоколов должно появиться в окне выбора протокола экрана Sample Ordering прибора MagNA Pure LC 1.0 или на вкладке Ordering прибора MagNA Pure LC 2.0. С помощью приведенной ниже таблицы выберите необходимый протокол:

Название протокола	Образцы	Процедура
Total NA Serum_Plasma_ Blood	50 - 200 мкл сыворотки или плазмы крови 50 - 100 мкл цельной крови	• Полностью автоматизированная процедура • объем образца: 50-200 мкл • объем элюции: 100 мкл
Total NA Variable_elution_ volume		• Полностью автоматизированная процедура • объем образца: 50-200 мкл • объем элюции: 50-100 мкл¹⁾
Total NA External_lysis		• Образцы лизируют вручную вне прибора MagNA Pure LC. Затем лизаты переносят на платформу реагентов/образцов, и проводят автоматизированное выделение в приборе. • Протокол позволяет физически разделять этапы лизиса и выделения и загружать в прибор MagNA Pure LC инаktivированные образцы (например, при работе с потенциально инфекционным материалом). • объем образца: 50-200 мкл • объем элюции: 50-100 мкл¹⁾

⚠¹⁾ При работе с образцами цельной крови установите объем элюции на 100 мкл для всех протоколов выделения. Из-за высокого содержания высокомолекулярной ДНК в образцах цельной крови, меньший объем элюции может привести к снижению эффективности выделения нуклеиновых кислот.

⚠ Буфер для элюции, применяемый в наборе MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, содержит стабилизирующие компоненты, оказывающие влияние на стандартное определение концентрации по оптической плотности OD260.

③ Все протоколы выделения "Total NA" позволяют разводить элюат в буфере для элюции объемом до 900 мкл.

Образцы

Для получения оптимальных результатов при последующем анализе, особенно ПЦР в реальном времени и ОТ-ПЦР в приборах LightCycler®, не проводите выделение из образцов, объем которых превышает рекомендованный для данного набора. Оптимальные объемы образцов приведены ниже:

- 50 - 200 мкл сыворотки или плазмы крови млекопитающих
- 50 - 100 мкл цельной крови млекопитающих.

⚠ Никогда не используйте образцы с объемом больше указанного в инструкции к набору. В противном случае может происходить перекрестная контаминация образцов или потеря МСЧ, что приведет к снижению эффективности выделения.

⚠ Не используйте для выделения образцы замороженной крови, это может приводить к деградации РНК.

⚠ Никогда не используйте образцы цельной крови, содержащие более 1×10^6 лейкоцитов или МНПК. В клинических образцах содержание лейкоцитов или МНПК в крови может превышать указанный показатель. Если вы работаете с такими образцами (содержащими 1×10^6 клеток крови), всегда считайте количество лейкоцитов или МНПК с помощью гемоцитометра и перед выделением ДНК разводите кровь с помощью PBS. Обратите внимание, что автоматизированные счетчики иногда выдают результаты, отличающиеся от полученных с помощью ручного гемоцитометра.

⚠ Протоколы выделения "Total NA" созданы для выделения из образцов сыворотки, плазмы и цельной крови человека. Обратите внимание, что у разных видов млекопитающих концентрации клеток крови могут различаться. Для некоторых видов животных может потребоваться использовать образцы меньшего объема, чтобы не допустить увеличения числа клеток в образце. В крови разных доноров концентрация клеток крови может различаться. Если предполагается, что образец содержит большое количество клеток, используйте для выделения меньший объем образца (например, 100 мкл вместо 200 мкл), или разведите образец (например, PBS).

⚠ Рассматривайте все образцы как потенциально инфекционные.

2.2 Приготовление рабочих растворов

Перед началом процедуры выделения, приготовьте рабочие растворы, как указано ниже.

④ Все остальные растворы готовы к работе.

⚠ Все буферы представляют собой прозрачные растворы. Не используйте буфер, если во флаконе образовался преципитат. Если виден преципитат, растворите его, нагревая флакон при 37°C и периодически помешивая. Не грейте буфер при 37°C дольше, чем это необходимо для полного растворения преципитата.

Перед использованием, охладите буфер до комнатной температуры (+15 - +25°C).

Работа с данным продуктом

⚠ Перед началом работы доведите буферы до комнатной температуры. При использовании реагентов, температура которых выходит за рекомендованные рамки, работа набора может быть неоптимальной.

⚠ Используйте количество реагентов, соответствующее числу образцов.

⚠ Не храните протеиназу К и суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. Все остальные реагенты, остающиеся в пробирках для реагентов после завершения постановки, могут использоваться в следующей постановке, если она проводится в тот же день. Более длительное хранение не рекомендовано.

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Магнитные стеклянные частицы	Тщательно перемешайте суспензию МСЧ (флакон 6). Перемешайте на вортексе непосредственно перед использованием. Чтобы получить гомогенную смесь. Во время хранения частицы оседают на дно флакона. ⚠ Для получения оптимальных результатов, вносите МСЧ в прибор перед самым запуском постановки (чтобы свести к минимуму оседание частиц). Всегда используйте точное количество МСЧ, рекомендованное программой.	Храните МСЧ при комнатной температуре (+15 - +25°C.) ⚠ Никогда не храните суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. ⚠ Не оставляйте МСЧ в открытом флаконе или пробирке для реагентов, поскольку испарение спирта может привести к снижению эффективности выделения.
Протеиназа К (флакон 4)	Восстановите всю протеиназу К, внося в каждый флакон по 3.0 мл буфера для элюции (флакон 7). Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата. Затем добавьте в каждый флакон еще по 2.0 мл буфера, до конечного объема 5.0 мл. Ⓢ Один флакон протеиназы К рассчитан на выделение 32 образцов.	После восстановления раствор протеиназы К стабилен в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C.

Контроли

Всегда используйте в постановках соответствующие контроли, особенно если для выделенных образцов планируется проведение качественного анализа образцов РНК (например, в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®). 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), вносимая в каждый выделяемый образец в известном количестве контрольная матрица.

⑨ Внутренний контроль (ВК) до начала выделения и проходит затем все этапы выделения и амплификации, что и мишень, в той же реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно при проведении энзиматических реакций, таких как ПЦР, поскольку эффективность процесса ПЦР может снижаться при наличии в очищенном образце ингибиторов. Кроме того, внутренний контроль служит для мониторинга возможных потерь материала во время выделения.

⑨ Для количественных тестов в приборе LightCycler®, в качестве внутреннего контроля используют синтетические двуцепочечные молекулы ДНК с сайтами посадки праймеров, идентичными мишени, но имеющие свой уникальный участок посадки зондов для дифференциации ампликонов мишени и ВК. Разделение сигналов от мишени и ВК проводится за счет применения разных красителей в тестах формата HybProbe. Подробные сведения о применении ВК в системе LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® 12/2000 «Абсолютный количественный анализ при использовании внешних стандартов и внутреннего контроля» ("Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control") на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2.3 Предварительные этапы

Общие замечания

Предварительные этапы необходимы при использовании протокола выделения "Total NA External_lysis", включающего в себя этап лизиса образцов вручную.

⑨ Всегда готовьте свежие лизаты и затем сразу переходите к этапу выделения нуклеиновых кислот.

Протокол лизиса вне прибора

- ① Перенесите 50 - 200 мкл сыворотки/плазмы или 50 - 100 мкл цельной крови в подходящую емкость, например, реакционную пробирку или Картридж для образцов.
- ② Внесите 300 мкл Лизирующего/связывающего буфера (флакон 4).
- ③ Тщательно перемешайте образцы пипетированием.
- ④ Если лизис проводился не в картридже, перенесите лизат (350 - 500 мкл) в Картридж для образцов.
- ⑤ Поместите Картридж для образцов на платформу образцов/реагентов и запустите протокол выделения "Total NA External_lysis, как описано в Разделе 2.4.

2.4 Протокол выделения тотальных нуклеиновых кислот

Общие замечания

- Описанная ниже процедура рассчитана на одновременную обработку 32 образцов. Если вы обрабатываете меньшее количество образцов, программное обеспечение прибора пропорционально уменьшит объем всех реагентов (см. экран Start Information прибора MagNA Pure LC 1.0 или вкладку 'Stage Setup' прибора MagNA Pure LC 2.0).
- Программа автоматически рассчитывает необходимое количество реагентов и расходных материалов, и дает подсказки на этапах запуска постановки.

Работа с данным продуктом

- Вы не можете запустить прибор, пока не будет закрыт зажим для картриджа образцов, пробирок для реагентов и реакционных наконечников.
- Если вы запрограммировали разведение элюированных нуклеиновых кислот, вам потребуется дополнительная пробирка для реагентов M30 в позиции R8. В качестве буфера для разведения используйте Буфер для элюции или свободный от нуклеаз 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Протокол

Выделение тотальных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) проводится по протоколу, приведенному ниже.

Запуск прибора и программы		
Прибор MagNA Pure LC 1.0	• Включите прибор и компьютер, затем запустите программу MagNA Pure LC Software. • Откройте экран 'Start Information'.	
Прибор MagNA Pure LC 2.0	• Включите прибор, программа MagNA Pure LC 2.0 Software запустится автоматически. • Введите пароль и откройте вкладку 'Ordering'.	
Все приборы MagNA Pure LC	• Выберите необходимый протокол.	
	Если вы работаете с ...	Тогда используйте протокол ...
	Нелизированными образцами сыворотки, плазмы или цельной крови	"Total Serum_Plasma_Blood" NA или "Total Variable_elution_volume" NA
	Лизированными вне прибора образцами сыворотки, плазмы или цельной крови	"Total NA External_lysis"
• Следуйте инструкциям программы и укажите названия и число образцов. Введите объем образцов, объем элюции и объем разведения элюата (если требуется). Программа рассчитает необходимое количество каждого реагента.		

Заполнение пробирок для реагентов		
Все приборы MagNA Pure LC	Перед запуском процедуры выделения, внесите в пробирки для реагентов необходимый объем реагентов (доведенные до комнатной температуры).	
Прибор MagNA Pure LC 1.0	Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на экране Start Information, закройте пробирки крышкой.	
Прибор MagNA Pure LC 2.0	Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на заставке Stage Setup, закройте пробирки крышкой.	

Все приборы MagNA Pure LC	⚠ Закрывайте пробирки с реагентами крышками, чтобы не допустить испарения реагентов. Однако, даже закрытые, пробирки для реагентов не подходят для длительного хранения реагентов. ⚠ Загрузите указанное на экране Start Information или заставке Stage Setup количество МСЧ в прибор непосредственно перед запуском постановки. Это необходимо делать перед самым запуском для предотвращения оседания МСЧ.
Установка пробирок для реагентов и расходных материалов на платформу для реагентов/образцов	
Прибор MagNA Pure LC 1.0	Следуя указаниям на экране Start Information, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) и реагенты в пробирках в платформу для реагентов/образцов.
Прибор MagNA Pure LC 2.0	Следуя указаниям на заставке Stage Setup, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) и реагенты в пробирках в платформу для реагентов/образцов.
Все приборы MagNA Pure LC	© Цветная "Рамка для размещения"*, накладываемая на штатив для реагентов и помогающая загружать реагенты, прилагается бесплатно.
Загрузка образцов	
Все приборы MagNA Pure LC	• Перенесите Картридж для образцов с лизатами образцов в прибор MagNA Pure LC. • Закройте одноразовую крышку картриджа.
Запуск постановки	
Прибор MagNA Pure LC 1.0	• На экране Start Information подтвердите правильность загрузки расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих текстовых окнах. • Нажмите кнопку 'OK', чтобы запустить автоматизированную процедуру выделения ДНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.
Прибор MagNA Pure LC 2.0	• На заставке Stage Setup подтвердите правильность загрузки расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих текстовых окнах. • Нажмите кнопку 'Start', чтобы запустить автоматизированную процедуру выделения ДНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.

Хранение
выделенных
нуклеиновых
кислот

⚠ Для сохранения максимальной стабильности выделенных тотальных нуклеиновых кислот, немедленно начните подготовку ОТ-ПЦР или ПЦР. Не храните выделенные нуклеиновые кислоты в Картридже для хранения в охлаждающем блоке 1.

Работа с данным продуктом

Для длительного хранения (в течение нескольких недель), закройте Картридж для хранения пленкой* и храните выделенные тотальные нуклеиновые кислоты при -70°C . Лучше хранить нуклеиновые кислоты в аликвотах, чтобы избежать многократного оттаивания/замораживания выделенных нуклеиновых кислот.

Последующий анализ

Прибор MagNA Pure LC может помочь в подготовке реакции ОТ-ПЦР или ПЦР, внося выделенные нуклеиновые кислоты и ПЦР-мастермиксы в капилляры LightCycler® или стандартный пробирки и плашки для ПЦР (Рекомендуемые плашки приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC). Для последующего анализа вы можете поместить капилляры LightCycler® в вынимаемый охлаждающий блок MagNA Pure LC в центрифужных адаптерах LC или в карусели для образцов LC. Также вы можете поместить плашку LightCycler® 480 Multiwell Plate 96* в охлаждающий блок для 96-луночных ПЦР-плашек MagNA Pure LC Cooling Block*, с помощью адаптера для плашек MagNA Pure LC LightCycler® 480 *. Этапы последующего анализа можно запрограммировать заранее, до начала выделения, или после его завершения. Подробные сведения о последующем после выделения анализе приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure.

3. Результаты

Линейность

Для оценки линейности выделения, проводили серийные 10-кратные разведения вируса гепатита А (10^4 – 10^8 копий/мл) и парвовируса В19 (10^2 – 10^6 копий/мл) в сыворотке крови или плазме с ЭДТА. Каждый образец объемом 200 мкл автоматизировано выделяли в двух повторах с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit. Затем анализировали в ОТ-ПЦР в карусельной системе LightCycler®.

Вирус гепатита А из сыворотки или плазмы Парвовирус В19 из сыворотки или плазмы

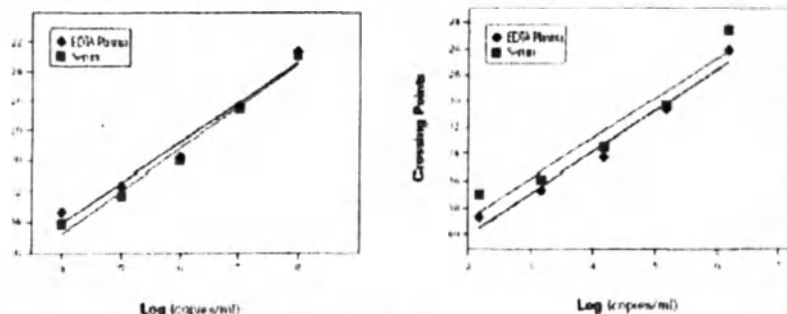


Таблица 1: Анализ методом ОТ-ПЦР в карусельной системе LightCycler®, образцов плазмы с ЭДТА и сыворотки крови, содержащих вирус гепатита А или парвовирус В19, после выделения с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit.

Воспроизводимость

С помощью набора MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit проводили выделение в 30 повторах для образцов разного типа, содержащих 3.5×10^7 копий/мл вируса гепатита А. Для оценки воспроизводимости выделенную РНК анализировали в ОТ-ПЦР в карусельной системе LightCycler® (см. таблицу 1). Полученные результаты продемонстрировали превосходную воспроизводимость.

Таблица 1: Воспроизводимость по результатам анализа ВГА в ОТ-ПЦР в карусельной системе LightCycler®.

Образец	ТП (среднее)	CV%
Плазма (цитрат), 50 мкл	26.1	1.8
Сыворотка крови, 50 мкл	26.5	2.0
Цельная кровь (ЭДТА), 50 мкл	27.2	2.6
Плазма (цитрат), 200 мкл	25.1	1.4
Сыворотка крови, 200 мкл	25.0	0.6
Цельная кровь (ЭДТА), 200 мкл	26.8	2.0

Предотвращение перекрестных контаминаций

Способность ПЦР производить большое количество копий последовательности-мишени при незначительных количествах исходной ДНК (иногда нескольких копий) обеспечивает исключительную чувствительность данного метода. Однако такая способность ПЦР требует и соблюдения тщательных мер предосторожности для предотвращения ложноположительных результатов. Лабораторная деятельность должна строго соответствовать требованиям GLP (Good Laboratory Practice) для предотвращения перекрестных контаминаций.

Такие контаминации могут происходить на стадии отбора образцов, выделения нуклеиновых кислот, сборке реакции ПЦР или заключительном, пост-ПЦР этапе анализа (контаминация лаборатории ампликонами). Зачастую образцы, содержащие высокие титры вируса, требуют при работе больше мер предосторожности по сравнению с остальными образцами. Образование аэрозолей может быть важным фактором на всех этапах обработки образцов. Образование аэрозолей может приводить к контаминациям, определяемым как слабый позитивный сигнал в отрицательных контролях ПЦР в реальном времени, обычно около нижнего предела чувствительности теста.

Для избегания негативного влияния контаминаций на результаты анализа, необходимо строго соблюдать следующие рекомендации:

- работа должна быть организована в едином направлении, помещение должно быть тщательно спланировано.
- Определите нижний предел чувствительности для ПЦР в реальном времени < 35 СР (например, СР 30-34). Для стандартных блочных термоциклеров такой подход также применим (например, методом анализа в геле).
- По возможности используйте UNG (урацил-ДНК гликозилаза, термолабильная, Кат. №: 11 775 367 001) для предотвращения контаминаций ампликонами, полученными в предыдущих ПЦР.
- Всегда подтверждайте слабopоложительные результаты в независимых постановках.

Воспроизводимость

- Воспроизводимость внутри постановки: Тотальные нуклеиновые кислоты выделяли из 30 образцов, положительных по вирусной РНК, и анализировали в ОТ-ПЦР в карусельной системе LightCycler®. Величина CV для значений ТП составила около 3%.
- Воспроизводимость между постановками: В четырех независимых постановках РНК выделяли из 6 образцов, положительных по вирусной РНК и анализировали в ОТ-ПЦР в карусельной системе LightCycler®. Величина CV для значений ТП составила около 3%.

4. Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
Слипание частиц или присутствие частиц в картридже для хранения	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
	Магнитные стеклянные частицы были намагничены перед началом работы.	• Избегайте контакта МСЧ с магнитом. • Храните набор правильно.
Дегградация нуклеиновых кислот	Не оптимальное хранение образцов	• Используйте свежие или замороженные образцы. Не замораживайте образцы цельной крови перед выделением. • Избегайте работы с образцами, хранившимися при комнатной температуре долгое время.
	Контаминация нуклеазами реакционных наконечников, реакционных пробирок, картриджей образцов или реагентов	Не допускайте контаминации нуклеазами расходных материалов и реагентов.
ДНК недостаточно чистая	Неправильное хранение образцов	• Используйте свежие или замороженные образцы. Не замораживайте образцы цельной крови перед выделением. • Избегайте работы с образцами, хранившимися при комнатной температуре долгое время.
	Неправильное размещение реагентов на платформе для реагентов/образцов	Убедитесь, что все реагенты находятся в нужных позициях в платформе для реагентов/образцов.
	Избыток материала в образце (избыток клеток)	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы", или разведите образец.
Нечеткий УФ спектр	Буфер для элюции, применяемый в наборе MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, содержит стабилизирующие компоненты, дающие интерференцию при стандартном определении OD 260 нм.	Используйте другой метод определения концентрации, например, с помощью флуоресцентных красителей.
Низкое качество последующей ПЦР	Недостаточная степень очистки нуклеиновых кислот	Слишком большой объем образца. Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы".
	Реагенты и протокол ПЦР/ОТ-ПЦР не оптимизированы	Проверьте реагенты и протокол ПЦР с помощью положительного контроля.
Элюат слегка красного цвета	Минимальная абразия магнитных частиц	Центрифугируйте элюат при низких значениях g (около 1,000 об./мин.) для удаления взвеси. ⚠ Красный цвет элюата не оказывает влияния на последующую ПЦР в системе LightCycler®.

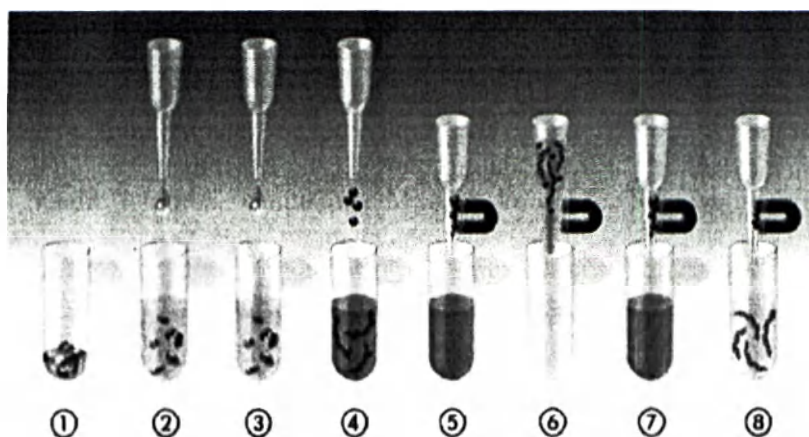
5. Дополнительная информация о продукте

Назначение данного продукта

Набор MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Kit применяется для выделения высокоочищенных, недеградированных вирусных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из 1-32 образцов плазмы или сыворотки крови млекопитающих, в приборе MagNA Pure LC. Выделенные нуклеиновые кислоты могут быть растворены в любом объеме в диапазоне 50-100 мкл. Они соответствуют стандартам качества, необходимым для проведения высокочувствительного количественного ОТ-ПЦР/ПЦР-анализа в приборе LightCycler®.

Принцип теста

Процедура выделения основана на технологии магнитных частиц-носителей. Лизис образцов проводят, инкубируя их со специальным буфером, содержащим хаотропные соли и протеиназу К. Затем добавляются магнитные стеклянные частицы, на поверхности которых связывается ДНК. Несвязавшиеся вещества удаляются в процессе нескольких этапов отмывки, затем очищенная ДНК элюируется. Ниже приведены этапы процесса выделения тотальных нуклеиновых кислот MagNA Pure LC DNA:



- ① Образцы помещают в лунки Картриджа для образцов.
- ② К образцам добавляется лизирующий/связывающий буфер, в результате происходит полный лизис клеток и высвобождение нуклеиновых кислот. Нуклеазы при этом денатурируют.
- ③ В образцы вносится протеиназа К, в результате происходит расщепление белков.
- ④ Нуклеиновые кислоты связываются на кремниевой поверхности МСЧ, внесенных в образцы, в присутствии хаотропных солей, изопропанола и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.

⑤ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами отделяются с помощью магнита от лизированного образца.

⑥ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами промываются несколько раз промывочным буфером, чтобы удалить несвязавшиеся вещества, такие как белки (нуклеазы), клеточные мембраны, ингибиторы ПЦР (гепарин и гемоглобин), а также чтобы снизить концентрацию хаотропных солей.

⑦ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами снова отделяют с помощью магнита от промывочного буфера, содержащего остатки материала образца.

⑧ Очищенная ДНК элюируется с МСЧ при 70°C в лунках Картриджа для элюции, при этом сами МСЧ отбираются реакционным наконечником и удаляются.

Ниже приведены основные действия при выделении с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit:

Лизис образцов

Только при использовании протокола "Total NA External_lysis":

Проводится вручную вне прибора MagNA Pure LC.

Образцы лизируют с помощью Лизирующего/связывающего буфера, в результате происходит высвобождение нуклеиновых кислот и инактивация нуклеаз.

Выделение ДНК проводится автоматизировано в приборе MagNA Pure LC.

① Все необходимые реагенты вносятся в рабочий картридж.

② Буфер для элюции вносится в картридж для элюции (Нагревающий блок).

③ К образцу добавляется Лизирующий/Связывающий буфер, перемешивается. (При работе по протоколу "Total NA External_lysis, происходит только перемешивание лизата.)

④ Лизат переносится в раствор протеиназы К, перемешивается и инкубируется.

⑤ Лизат переносится в суспензию МСЧ, перемешивается и инкубируется.

⑥ Частицы переносятся в промывочный буфер I, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑦ Частицы переносятся в промывочный буфер II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑧ Частицы переносятся в промывочный буфер III, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑨ Частицы вносятся в буфер для элюции (нагревательный блок), перемешиваются, инкубируются, происходит элюция нуклеиновых кислот. МСЧ удаляются.

⑩ Элюат переносится в картридж для хранения (охлаждающий блок I).

Контроль качества

Работу набора тестируют в процессе выделения вирусных нуклеиновых кислот из содержащего вирус гепатита А и парвовирус В19 референсного материала человеческого происхождения по протоколу выделения "Total NA Serum_Plasma_Blood". Выделенные нуклеиновые кислоты количественно анализируют в ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени с помощью вирус-специфичных тестов в системе LightCycler®.

Литература

1. Huisman, W. *et al.* (2004). Antibodies specific for hypervariable regions 3 to 5 of the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein are not solely responsible for vaccine-induced acceleration of challenge infection in cats. *J. Gen. Virol.* **85**, 1833-1841.
2. Zhang, Z. *et al.* (2004). Extent of reduction of foot-and-mouth disease virus RNA load in oesophageal-pharyngeal fluid after peak levels may be a critical determinant of virus persistence in infected cattle. *J. Gen. Virol.* **85**, 415-421.
3. Mohammadi, T. *et al.* (2003). Optimization of real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of eubacterial 16S ribosomal DNA in platelet concentrates. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4796-4798.
4. Espy, MJ. *et al.* (2002). Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1985-1988.
5. Loeffler, J. *et al.* (2002). Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC System. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2240-2243.

6. Вспомогательная информация

6.1 Обозначения

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.

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.

Аббревиатуры

В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
CP (ТП)	Точка пересечения
CV (КВ)	Коэффициент вариации
МСЧ	Магнитные стеклянные частицы
ВГА	Вирус гепатита А
МНПК	Мононуклеары периферической крови
КТ	Комнатная температура

6.2 Изменения относительно предыдущей версии Редакторские изменения, дополнительные инструкции для прибора MagNA Pure LC 2.0, дополнительные и измененные каталожные номера.

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:

- Семейство MagNA Pure, включая расходные материалы, комплектующие, наборы и прочие продукты:

<http://www.magnapure.com>

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

www.lightcycler.com

Приборы комплектующие	и	Продукт	Комплектация	Кат. №
		Прибор MagNA Pure LC 2.0	1 прибор с комплектующими	05 197 686 001
		Охлаждающий блок MagNA Pure LC, центрифужные адаптеры LC	1 охлаждающий блок с 32 центрифужными адаптерами LightCycler®	12 190 664 001
		Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на карусель LC	1 охлаждающий блок	12 189 704 001
		Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на 96-луночную ПЦР-плашку	1 охлаждающий блок	12 189 674 001
		Адаптер для плашек MagNA Pure LC LightCycler® 480 Plate Adapter	1 адаптер	05 323 983 001
		Total NA рамка для размещения	1 рамка	12 256 134 001
		Пленка для заклеивания картриджа MagNA Pure LC Cartridge Seal	200 пленок	03 118 827 001
		Прибор LightCycler® 480 II	1 прибор (96 лунок) 1 прибор (384 лунок)	05 015 278 001 05 015 243 001
		Плашки LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, прозрачные	5 × 10 плашек (включая запечатывающую пленку)	05 102 413 001
		Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
		Прибор LightCycler® 1.5	1 прибор с комплектующими	04 484 495 001
		Карусельная центрифуга LightCycler® Carousel Centrifuge 2.0	1 центрифуга с ротором (230 V) 1 центрифуга с ротором (115 V)	03 709 582 001 03 709 507 001
		Капилляры LightCycler® (20 мкл)	1 упаковка (5 коробок, в каждой капилляры и фиксаторы)	04 929 292 001

Наборы MagNA Pure LC для выделения ДНК	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I ²⁾	1 набор (192 выделения)	03 003 990 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 186 229 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) ²⁾	1 набор (192 выделения)	03 264 785 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume ²⁾	1 набор (от 96 до 288 выделений)	03 310 515 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit - High Performance ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 542 394 001
	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 330 591 001
	MagNA Pure LC mRNA HS Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 267 393 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения тотальных нуклеиновых кислот	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 264 793 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - High Performance ¹⁾	1 набор (от 96 до 288 выделений)	05 323 738 001
Дополнительные наборы реагенты	Урацил ДНК	100 Е	11 775 367 001
	гликозилаза, термолабильная	500 Е	11 775 375 001
	LightCycler® ДНК гликозилаза	Урацил 100 Е (50 мкл)	03 539 806 001

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией

Приобретение набора MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

²⁾ Приобретение данных продуктов не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

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

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, MAGNA PURE и HYBPROBE являются торговыми марками Roche.

ProbeLibrary является торговой маркой Exiqon A/S Vedbaek, Дания.

**Контактная
информация и
техническая
поддержка**

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.

1208.0304.34.4.001



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



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

Набор реагентов для общего выделения нуклеиновых кислот из образцов большого объема

MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume

Версия май 2007

Набор для выделения тотальных нуклеиновых кислот из образцов плазмы или сыворотки крови млекопитающих объемом 1 мл в приборе MagNA Pure LC

Кат. №. 03 264 793 001

Набор рассчитан на 192 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
Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	4
Область применения	4
Длительность постановки	4
2. Работа с данным продуктом	5
2.1 Предварительные действия	5
Меры предосторожности	5
Протокол выделения	6
Образцы	6
Приготовление рабочих растворов	6
Контроли	7
2.2 Протокол выделения ДНК	8
Общие замечания	8
Протокол	9
Хранение выделенных нуклеиновых кислот	10
Последующий анализ	10
3. Результаты	11
Линейность результатов	11
Предотвращение перекрестных контаминаций	11
Воспроизводимость (внутри постановки)	12
Воспроизводимость (между постановками)	12
4. Анализ ошибок	13
5. Дополнительная информация о продукте	14
Назначение данного продукта	14
Принцип теста	14
Контроль качества	15
Литература	15
6. Вспомогательная информация	16
6.1 Обозначения	16
Текстовые обозначения	16
Символы	16
Аббревиатуры	16
6.2 Изменения относительно предыдущей версии	16
6.3 Информация для заказа	17
6.4 Ограничения, налагаемые лицензией	19
6.5 Торговые марки	19

Назначение данного продукта

1. Назначение данного продукта

Количество тестов 192 выделения (6 x 32) из образцов плазмы или сыворотки крови млекопитающих объемом до 1 мл

Ⓢ набор рассчитан на обработку 192 образцов в сериях по 32. Если обрабатывать одновременно менее 32 образцов, часть реагентов будет расходована напрасно и оставшегося объема будет недостаточно для обработки количества образцов, указанного выше.

Содержание набора

Ⓢ Лизирующий/связывающий буфер содержит синий краситель, предназначенный для детекции сгустков при автоматизированном выделении ДНК в приборе MagNA Pure LC.

Пробирка / Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
1 черная	Wash Buffer I (Промывочный буфер I)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления ингибиторов ПЦР
2 синяя	Wash Buffer II (Промывочный буфер II)	• 1 флакон, 100 мл • для удаления солей, белков и т.д..
3 красная	Wash Buffer III (Промывочный буфер III)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления солей, белков и т.д..
4 зеленая	Lysis Buffer (лизирующий буфер)	• 4 флакона по 100 мл • для лизиса клеток и связывания ДНК
5 розовая	Proteinase K (Протеиназа К)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления белков
6 бежевая	Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension (Магнитные стеклянные частицы, МСЧ, суспензия)	• 6 стеклянных флаконов с суспензией МСЧ, по 1 мл каждый • для связывания нуклеиновых кислот
7 желтая	Elution Buffer (Элюиционный буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для элюции очищенных нуклеиновых кислот • для восстановления протеиназы К • для разведения растворенной ДНК (дополнительно)

Условия хранения и стабильность

• Компоненты набора стабильны при температуре +2 - +8°C до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Ⓢ набор транспортируется при комнатной температуре

⚠ Никогда не храните МСЧ в пробирке для реагентов.

Необходимые дополнительные оборудование и реагенты

- стандартное лабораторное оборудование
- дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов и ДНКазы в пробирки для образцов
- центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки
- вортекс

1. Назначение данного продукта, продолжение

Область применения	Для лабораторных исследований. Набор MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume специально разработан для выделения тотальных нуклеиновых кислот из образцов сыворотки или плазмы крови большого объема (до 1 мл) в приборе MagNA Pure LC. Выделенные тотальные нуклеиновые кислоты могут быть использованы для тестирования в ПЦР в приборе LightCycler® или стандартных термоциклерах.
Длительность постановки	Настройка прибора MagNA Pure LC занимает примерно 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения ДНК составляет примерно 30-120 минут для выделения 1-32 образцов. После настройки и запуска прибора MagNA Pure LC дополнительные манипуляции оператора не требуются. Дополнительные манипуляции требуются только для предварительных этапов выделения.

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 смешивайте реагенты из разных серий набора или разных флаконов одной серии набора.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Промывочный раствор I (флакон 1) и Лизирующий/связывающий буфер (флакон 4) содержат соли гуанидина, способные вызывать раздражение. 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.
- Не допускайте смешивания реактивов Лизирующего/связывающего буфера 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.
- Не допускайте контаминации реагентов бактериями, вирусами и нуклеазами. Отбор аликвот из флаконов с реагентами должен проводиться только одноразовыми дозаторами или свободными от нуклеаз наконечниками. Соблюдайте стандартные правила безопасности.
- Требования предосторожности при работе с ПНК можно найти в Roche Applied Science LAB FAQs (http://www.roche-applied-science.com/labfaqs/p2_1.htm).
- 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 обработки образцов цельной крови, кровяных клеток и клеточных культур с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume, необходимо установить новый протокол программы MagNA Pure LC Software, Version 2.11 (или ниже). Название "Total NA LV Serum_Plasma" должно появиться в окне выбора протокола экрана Sample Ordering программы MagNA Pure LC Software. Если используется программное обеспечение версии 3.0 или выше, установка протоколов не требуется. Дополнительную информацию можно получить в местном представительстве Roche.

Для работы с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume используется только один протокол:

Название протокола	Процедура
Total NA LV Serum_Plasma	• Полностью автоматизированная процедура • объем образца: 1000 мкл • объем элюции: 50 - 100 мкл

Образцы

Набор MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume создан для полностью автоматизированной обработки образцов плазмы или сыворотки крови млекопитающих объемом 1000 мкл. Используйте для выделения свежие или замороженные образцы.

④ Выделение можно проводить из образцов меньшего объема (500 – 1000 мкл), если довести объем образца до 1 мкл, добавив в него подходящий буфер, например, буфер для элюции (флакон 7, желтая крышка).

④ Для выделения тотальных нуклеиновых кислот из образцов меньшего объема (50 – 200 мкл) используйте набор MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit*.

⚠ Никогда не используйте образцы с объемом больше указанного в инструкции к набору. В противном случае может происходить потеря МСЧ, что приведет к снижению эффективности выделения.

⚠ Набор MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume не может применяться для обработки образцов цельной крови.

⚠ Рассматривайте все образцы как потенциально инфекционные.

Приготовление рабочих растворов

Перед началом процедуры выделения, приготовьте рабочие растворы, как указано ниже.

④ Все остальные растворы готовы к работе.

⚠ Все буферы представляют собой прозрачные растворы. Не используйте буфер, если во флаконе образовался осадок. Если виден осадок, растворите его, нагревая флакон при 37°C и периодически помешивая. Не грейте буфер при 37°C дольше, чем это необходимо для полного растворения осадка.

Перед использованием, охладите буфер до комнатной температуры (+15 - +25°C).

2. Работа с данным продуктом, продолжение

⚠ Перед началом работы доведите буферы до комнатной температуре (+15 - + 25°C). При использовании реагентов, температура которых выходит за рекомендованные рамки, работа набора может быть неоптимальной.

⚠ Используйте количество реагентов, соответствующее числу образцов.

⚠ Не храните протеиназу К и суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. Все остальные реагенты, остающиеся в пробирках для реагентов после завершения постановки, могут использоваться в следующей постановке, если она проводится в тот же день. Более длительное хранение не рекомендовано.

Реагент	Приготовление/ комментарии	Хранение
Магнитные стеклянные частицы	Тщательно перемешайте суспензию МСЧ (флакон 6). Перемешайте на вортексе непосредственно перед использованием. Чтобы получить гомогенную смесь. Во время хранения частицы оседают на дно флакона. ⚠ Для получения оптимальных результатов, вносите МСЧ в прибор перед самым запуском постановки (чтобы свести к минимуму оседание частиц). Всегда используйте точное количество МСЧ, рекомендованное программой.	Храните МСЧ при комнатной температуре (+15 - +25°C.) ⚠ Никогда не храните суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. ⚠ Не оставляйте МСЧ в открытом флаконе или пробирке для реагентов, поскольку испарение спирта может привести к снижению эффективности выделения.
Протеиназа К (флакон 4)	Восстановите всю протеиназу К, внося в каждый флакон по 6.7 мл буфера для элюции (флакон 6). Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата. ⚠ После восстановления раствор протеиназы К может быть мутным. Это связано с присутствием стабилизирующих добавок в реагенте. Это не оказывает влияния на работу фермента. Ⓢ Один флакон протеиназы К рассчитан на выделение 32 образцов.	После восстановления раствор протеиназы К стабилен в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C.

Контроли

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

- Положительный контроль, материал, положительный по анализируемой мишени.

2. Работа с данным продуктом, продолжение

- Отрицательный контроль, материал, отрицательный по анализируемой мишени.
- Внутренний контроль (ВК), вносимая в каждый выделяемый образец в известном количестве контрольная матрица.

④ Внутренний контроль (ВК) до начала выделения и проходит затем все этапы выделения и амплификации, что и мишень, в той же реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно при проведении энзиматических реакций, таких как ПЦР, поскольку эффективность процесса ПЦР может снижаться при наличии в очищенном образце ингибиторов. Кроме того, внутренний контроль служит для мониторинга возможных потерь материала во время выделения.

④ Для количественных тестов в приборе LightCycler®, в качестве внутреннего контроля используют синтетические двуцепочечные молекулы ДНК с сайтами посадки праймеров, идентичными мишени, но имеющие свой уникальный участок посадки зондов для дифференциации ампликонов мишени и ВК. Разделение сигналов от мишени и ВК проводится за счет применения разных красителей в тестах формата HybProbe. Подробные сведения о применении ВК в системе LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® 12/2000 «Абсолютный количественный анализ при использовании внешних стандартов и внутреннего контроля» ("Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control") на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2.2 Протокол выделения

2.2.1 Предварительные этапы

Выделение тотальных нуклеиновых кислот из образцов плазмы или сыворотки крови полностью автоматизировано. Предварительные действия в данном случае не требуются.

2.2.2 Протокол выделения тотальных нуклеиновых кислот

Общие замечания

- Описанная ниже процедура рассчитана на одновременную обработку 32 образцов.

Если вы обрабатываете меньшее количество образцов, пропорционально уменьшите объем всех реагентов (см. экран Start Information прибора MagNA Pure LC).

- Программа автоматически рассчитывает необходимое количество реагентов и дает подсказки на этапах запуска постановки.
- Вы не можете запустить прибор, пока не будет закрыт зажим для картриджа образцов, пробирок для реагентов и реакционных наконечников.

2.2.2 Протокол выделения тотальных нуклеиновых кислот, продолжение

2.3.1 Протокол	Выделение тотальных нуклеиновых кислот проводится по протоколу, приведенному ниже.
Включение прибора и запуск программы	Включите прибор и компьютер, затем запустите программу MagNA Pure LC. Выберите протокол выделения Total NA LV Serum_Plasma. Следуйте инструкциям программы и укажите количество образцов. Введите объем образца и объем элюции в соответствующих окнах. Программа рассчитает необходимое количество каждого реагента.
Заполнение пробирок для реагентов	Перед запуском процедуры выделения, внесите в пробирки для реагентов необходимый объем реагентов (доведенные до комнатной температуры, +15 - +25°C). Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на экране Start Information, затем закройте каждую пробирку крышкой. ⚠ Закрывайте пробирки с реагентами крышками, чтобы не допустить испарения реагентов. Однако, даже закрытые, пробирки для реагентов не подходят для длительного хранения реагентов. ⚠ Загрузите указанное на экране Start Information количество МСЧ в прибор непосредственно перед запуском постановки. Это необходимо делать перед самым запуском для предотвращения оседания МСЧ.
Установка пробирок для реагентов на платформу для реагентов/образцов	Следуя указаниям на экране Start Information, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) в платформу для реагентов/образцов. ④ Цветная "Рамка для размещения"*, накладываемая на штатив для реагентов и помогающая загружать реагенты, прилагается бесплатно.
Загрузка образцов	Перенесите Картридж для образцов с лизатами образцов в прибор MagNA Pure LC.
Запуск постановки	• На экране Start Information подтвердите правильность загрузки расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих текстовых окнах. • Нажмите кнопку 'ОК', чтобы запустить автоматизированную процедуру выделения ДНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.

2.2.2 Протокол выделения тотальных нуклеиновых кислот, продолжение

Хранение выделенных нуклеиновых кислот

⚠ Для сохранения максимальной стабильности выделенных тотальных нуклеиновых кислот, немедленно начните подготовку ОТ-ПЦР или ПЦР. Не храните выделенные нуклеиновые кислоты в Картридже для хранения в охлаждающем блоке 1.

Для длительного хранения (в течение нескольких недель), закройте Картридж для хранения пленкой* и храните ДНК при -15 - -25°C. Лучше хранить нуклеиновые кислоты в аликвотах, чтобы избежать многократного оттаивания/замораживания выделенных нуклеиновых кислот.

2.3.3 Последующий анализ

Прибор MagNA Pure LC Instrument может помочь в подготовке реакции ОТ-ПЦР или ПЦР, внося выделенные нуклеиновые кислоты и ПЦР-мастермиксы в капилляры LightCycler® или стандартный пробирки и плашки для ПЦР (Рекомендуемые плашки приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC). Для последующего анализа вы можете поместить капилляры LightCycler® в вынимаемый охлаждающий блок MagNA Pure LC в центрифужных адаптерах LC или в карусели для образцов LC. Этапы последующего анализа можно запрограммировать заранее, до начала выделения, или после его завершения. Подробные сведения о последующем после выделения анализе приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure.

3. Результаты

Линейность результатов

Делали серийные 10-кратные разведения парвовируса человека B19 (в 2 повторях) с известной концентрацией и выделяли с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (объем образцов: 1000 мкл) и набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (объем образцов: 200 мкл). Анализ проводили с помощью набора LightCycler Parvovirus B19 Quantification Kit в приборе LightCycler® 1.5.

Средняя величина различий значений точки пересечения для соответствующих образцов составляла $\Delta CP = 2.4$, как и ожидалось с учетом 5-кратного различия в исходном объеме.

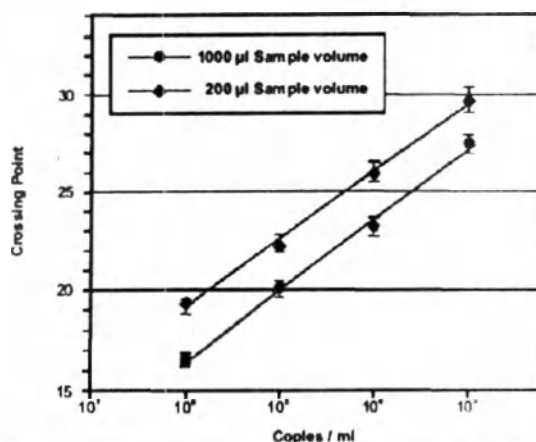


Рисунок 1: Анализ образцов содержащей парвовирус B19 плазмы в LightCycler®, после выделения с наборами MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (-●-) и MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (-◆-).

Предотвращение перекрестных контаминаций

Зачастую образцы, содержащие высокие титры вируса, требуют при работе больше мер предосторожности по сравнению с остальными образцами. Образование аэрозолей может быть важным фактором на всех этапах обработки образцов. Образование аэрозолей может приводить к контаминациям, определяемым как слабый позитивный сигнал в отрицательных контролях ПЦР в реальном времени, обычно со значениями точки пересечения (CP) > 35. Такие контаминации могут происходить на стадии отбора образцов, выделения нуклеиновых кислот, сборке реакции ПЦР или заключительном, пост-ПЦР этапе анализа (контаминация лаборатории ампликонами).

Для избегания негативного влияния контаминаций на результаты анализа, необходимо строго соблюдать следующие рекомендации:

- Определите нижний предел чувствительности для ПЦР в реальном времени < 35 CP (например, CP 30-34). Для стандартных блочных термоциклеров такой подход также применим (например, методом анализа в геле).
- По возможности используйте UNG (урацил-ДНК гликозилаза, термолabile, Cat No.: 11 775 367 001) для предотвращения контаминаций ампликонами, полученными в предыдущих ПЦР.
- Всегда подтверждайте слабоположительные результаты в независимых постановках.

3. Результаты, продолжение

**Воспроизводимость
(внутри
постановки)**

Образец плазмы, содержащий вирусную РНК, выделяли в 30 повторах с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume, и выделенные нуклеиновые кислоты анализировали в приборе LightCycler® 1.5. Коэффициент вариации (CV %), рассчитанный для соответствующих точек пересечения, составлял < 2 %.

**Воспроизводимость
(между
постановками)**

6 образцов плазмы, содержащих вирусную РНК, выделяли по стандартному протоколу выделения нуклеиновых кислот в 5 независимых постановках. Выделенные нуклеиновые кислоты анализировали в приборе LightCycler® 1.5. Коэффициент вариации (CV %), рассчитанный для соответствующих точек пересечения, составлял < 2 %.

4. Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
Слипание частиц/проблемы с магнитным разделением частиц	Избыток материала в образце	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы"
	Магнитные стеклянные частицы были намагничены перед началом работы.	Избегайте контакта МСЧ с магнитом.
Дегградация нуклеиновых кислот	Не оптимальное хранение образцов	Используйте свежие или замороженные образцы. Избегайте использования образцов, хранившихся при комнатной температуре длительное время.
Нечеткий УФ спектр	Буфер для элюции, применяемый в наборе MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit Large Volume, содержит стабилизирующие компоненты, дающие интерференцию при стандартном определении OD 260 нм.	
Неожиданный объем элюата	Был установлен неправильный объем элюции	Подтвердите правильные настройки объема буфера для элюции, как указано во вкладыше к набору.
Элюат слегка красного цвета	Минимальная абразия магнитных частиц	Центрифугируйте элюат при низких значениях g (около 1.000 об./мин.) для удаления взвеси. Ⓢ Красный цвет элюата не оказывает влияния на последующую ПЦР в системе LightCycler®.

5. Дополнительная информация о продукте

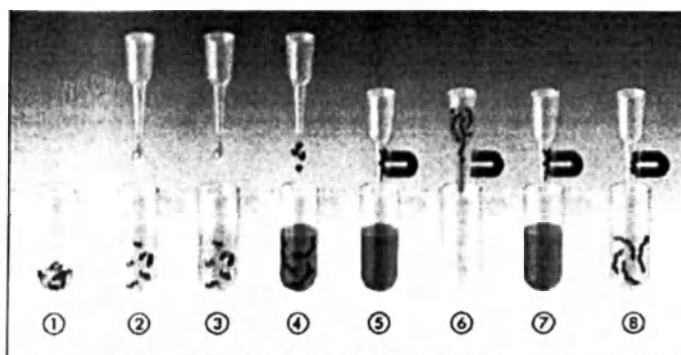
Назначение данного продукта

Набор MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Kit – Large Volume применяется для выделения высокоочищенных, недеградированных нуклеиновых кислот из 1-32 образцов плазмы или сыворотки крови млекопитающих, в приборе MagNA Pure LC. Выделенные нуклеиновые кислоты соответствуют стандартам качества, необходимым для проведения высокочувствительного количественного ПЦР-анализа в приборе LightCycler®.

Принцип теста

Процедура выделения основана на технологии магнитных частиц-носителей. Лизис образцов проводят, инкубируя их со специальным буфером, содержащим хаотропные соли и протеиназу К. Затем добавляются магнитные стеклянные частицы, на поверхности которых связывается ДНК. Несвязавшиеся вещества удаляются в процессе нескольких этапов отмывки, затем очищенная ДНК элюируется.

Ниже приведены этапы процесса выделения MagNA Pure LC DNA:



- ① Образцы помещают в лунки Картриджа для образцов.
- ② К образцам добавляется лизирующий/связывающий буфер, в результате происходит полный лизис клеток и высвобождение нуклеиновых кислот. Нуклеазы при этом денатурируют.
- ③ В образцы вносится протеиназа К, в результате происходит расщепление белков.
- ④ Нуклеиновые кислоты связываются на кремниевой поверхности МСЧ, внесенных в образцы, в присутствии хаотропных солей, изопропанола и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.
- ⑤ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами отделяются с помощью магнита от лизированного образца.
- ⑥ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами промываются несколько раз промывочным буфером, чтобы удалить несвязавшиеся вещества, такие как белки (нуклеазы), клеточные мембраны, ингибиторы ПЦР (гепарин и гемоглобин), а также чтобы снизить концентрацию хаотропных солей.

5. Дополнительная информация о продукте, продолжение

⑦ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами снова отделяют с помощью магнита от промывочного буфера, содержащего остатки материала образца.

⑧ Очищенная ДНК элюируется с МСЧ при 70°C в лунках Картриджа для элюции, при этом сами МСЧ отбираются реакционным наконечником и удаляются.

Ниже приведены основные действия при выделении с набором MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – Large Volume при работе с образцами плазмы или сыворотки крови:

Выделение нуклеиновых кислот

Проводится автоматизировано в приборе MagNA Pure LC

- ① По 100 мкл МСЧ вносятся в 1-й, 2-й и 3-й ряды Картриджа для обработки.
- ② Все промывочные буферы вносятся в Картридж для обработки.
- ③ По 450 мкл лизирующего/связывающего буфера вносятся в 1-й, 2-й и 3-й ряды Картриджа для обработки.
- ④ В Картридж для элюции (нагревающий блок) вносится 50 – 100 мкл элюционного буфера.
- ⑤ По 150 мкл протеиназы К добавляется к образцам, находящимся в Картридже для образцов, перемешиваются и инкубируются 5 мин.
- ⑥ Образцы отбираются из Картриджа для образцов и в аликвотах вносятся в 1-й, 2-й и 3-й ряды; затем образцы перемешиваются с лизирующим/связывающим буфером и МСЧ.
- ⑦ Частицы отбираются 1-м, 2-м и 3-м рядах.
- ⑧ Частицы переносятся в 850 мкл промывочного буфера I в ряду 4 и отделяются.
- ⑨ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера II в ряду 5 и отделяются.
- ⑩ Частицы переносятся в 450 мкл промывочного буфера III в ряду 6,7 и отделяются.
- ⑪ Частицы переносятся в элюционный буфер (нагревающий блок), перемешиваются, инкубируются, и нуклеиновые кислоты элюируются. МСЧ удаляются.
- ⑫ Элюат переносится в картридж для хранения (охлаждающий блок I).

Контроль качества

Работу набора тестировали в процессе выделения вирусных нуклеиновых кислот из содержащего вирус гепатита А и парвовирус В19 референсного материала человеческого происхождения по стандартному протоколу (Total NA LV Serum_Plasma). Выделенные нуклеиновые кислоты количественно анализировали в LightCycler® 2.0 с помощью ВГА – и Parvo B19-специфичных тестов.

Литература

Dijkstra-Tiekstra, M.J. et al. (2004). Development of white blood cell fragments, during the preparation and storage of platelet concentrates, as measured by using real-time polymerase chain reaction. *Vox Sanguinis*, **87**: 250-256.

6. Вспомогательная информация

6.1 Обозначения

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 ❶, ❷ и т.д.	Этапы процедуры, которые необходимо выполнять в указанном порядке.
Звездочка *	Обозначает, что данный продукт можно приобрести у Roche Applied Science.

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.

Аббревиатуры

В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
CP (ТП)	Точка пересечения
CV (КВ)	Коэффициент вариации
МСЧ	Магнитные стеклянные частицы
ВГА	Вирус гепатита А

6.2 Изменения относительно предыдущей версии

В раздел Результаты внесена глава Предотвращение перекрестных контаминаций.

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:

- Семейство MagNA Pure, включая расходные материалы, комплектующие, наборы и прочие продукты:

<http://www.magnapure.com>

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

Приборы
комплектующие

Продукт	Комплектация	Кат.№
Прибор MagNA Pure LC	1 прибор с комплектующими	12 236 931 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, центрифужные адаптеры LC	1 охлаждающий блок с 32 центрифужными адаптерами LightCycler®	12 190 664 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на карусель LC	1 охлаждающий блок	12 189 704 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на 96-луночную ПЦР-плашку	1 охлаждающий блок	12 189 674 001
DNA I рамка для размещения	1 рамка	12 256 096 001
Пленка для картриджей MagNA Pure LC	200 пленок	03 118 827 001
Прибор LightCycler® 480	1 прибор (96 лунок)	04 640 268 001
	1 прибор (384 лунок)	04 545 885 001
Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
Прибор LightCycler® 1.5	1 прибор с комплектующими	04 484 495 001
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
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (ткани) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 186 229 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (бактерии, грибы) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 264 785 001

6.3 Информация для заказа

		Продукт	Комплектация	Кат.№
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК		MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема)	1 набор - 96 выделений из 1 мл крови; 192 выделения из 300 – 500 мкл крови; 288 выделения из 20 – 200 мкл крови; 192 выделения из клеток крови; 192 выделения из 5×10^6 культуральных клеток	03 310 515 001
		MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I – лизирующий/связывающий буфер	70 мл	03 246 752 001
		MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 542 394 001
		MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 330 591 001
		MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (кровь, клетки крови) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 004 015 001
		MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (ткани) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 172 627 001
		MagNA Pure LC mRNA HS Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 267 393 001
		Наборы MagNA Pure LC для выделения тотальных нуклеиновых кислот	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	1 набор (192 выделения) 03 038 505 001
			MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (образцы большого объема)	1 набор (192 выделения) 03 264 793 001
			MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit I лизирующий/связывающий буфер	100 мл 03 246 779 001
Дополнительные наборы реагенты	и	РНКаза А	100 мг	10109 169 001
		Геномная ДНК человека	100 мг	11 691 112 001

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией

Приобретение набора MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – Large Volume не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

¹⁾ Приобретение данных продуктов не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

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

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, MAGNA PURE и HYBPROBE являются торговыми марками Roche.

Остальные марки или названия продуктов являются торговыми марками соответствующих владельцев.

**Контактная
информация и
техническая
поддержка**

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.

0507 032547 600010



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



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

Набор реагентов для выделения ДНК бактерий и грибов MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi)

Версия ноябрь 2008

Набор для выделения бактериальной и грибной ДНК из сложных для обработки типов образцов в приборе MagNA Pure LC

Кат. №. 03 264 785 001

Набор рассчитан на 192 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
Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	4
Область применения	4
Длительность постановки	4
2. Работа с данным продуктом	5
2.1 Предварительные действия	5
Меры предосторожности	5
Протокол выделения	5
Образцы	6
2.2 Приготовление рабочих растворов	7
Контроли	8
2.3 Предварительные этапы.....	9
Стандартная процедура	9
Особые типы образцов	10
2.4 Протокол выделения ДНК	11
Общие замечания	11
Протокол	11
Хранение выделенной ДНК	13
Последующий анализ	13
3. Результаты	14
Общие замечания	14
Образцы БАС	14
Образцы мочи	15
Образцы стула	15
Бактериальные культуры	16
Грибы	16
Прочие образцы	16
4. Анализ ошибок	17
5. Дополнительная информация о продукте	19
5.1 Назначение данного продукта	19
Принцип теста	19
5.2 Контроль качества	20
5.3 Литература	21
6. Вспомогательная информация	22
6.1 Обозначения	22
Текстовые обозначения	22
Символы	22
Аббревиатуры	22
6.2 Изменения относительно предыдущей версии	23
6.3 Информация для заказа	23
6.4 Ограничения, налагаемые лицензией	25
6.5 Торговые марки	25

1. Назначение данного продукта

Количество тестов

- 192 выделения из жидких образцов объемом до 100 мкл.

Содержание набора

⌚ Набор рассчитан на обработку 192 образцов в сериях по 32. Если обрабатывать одновременно менее 32 образцов, часть реагентов будет расходована напрасно и оставшегося объема будет недостаточно для обработки количества образцов, указанного выше.

⌚ Лизирующий/связывающий буфер содержит синий краситель, предназначенный для детекции сгустков.

Пробирка /Крышка	Маркировка	Содержание / Назначение
1 черная	Wash Buffer I (Промывочный буфер I)	• 2 флакона по 100 мл • для удаления ингибиторов ПЦР.
2 синяя	Wash Buffer II (Промывочный буфер II)	• 2 флакона по 60 мл • для удаления солей, белков и т.д..
3 красная	Wash Buffer III (Промывочный буфер III)	• 1 флакон, 100 мл • для удаления оставшихся солей, белков и т.д.
4 зеленая	Lysis/Binding Buffer (лизирующий/связывающий буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для лизиса клеток и связывания ДНК
5 бежевая	Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension (Магнитные стеклянные частицы, МСЧ, суспензия)	• 6 стеклянных флаконов с суспензией МСЧ • для связывания ДНК
6 желтая	Elution Buffer (Элюционный буфер)	• 1 флакон, 100 мл • для элюции очищенной ДНК • для восстановления протеиназы К • для разведения элюата
7 прозрачная	Bacteria Lysis Buffer (Буфер для лизиса бактериальных клеток)	• 2 флакона по 30 мл • для эффективного лизиса бактериальных клеток
8 розовая	Proteinase K (Протеиназа К)	• 6 стеклянных флаконов с лиофилизированным материалом • для расщепления белков

Условия хранения и стабильность

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

⌚ Набор транспортируется при комнатной температуре.

Назначение данного продукта

Необходимые дополнительные оборудование и реагенты	• стандартное лабораторное оборудование • дозаторы и свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером для внесения образцов в картридж для образцов MagNA Pure LC. • центрифуга и соответствующие свободные от нуклеаз реакционные пробирки • вортекс для ресуспендирования МСЧ • □□□□□□□□ (65°C/95°C, для реакционных пробирок объемом 1.5 – 2 мл)
Область применения	Для лабораторных исследований. Набор MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) специально разработан для выделения высокоочищенной бактериальной и грибной ДНК из образцов разного типа в приборах MagNA Pure LC [MagNA Pure LC 1.0 (Cat. No. 12 236 931 001) и MagNA Pure LC 2.0 (Cat. No. 05 197 686 001)]. Выделенная из ДНК может использоваться для ПЦР в приборе LightCycler® или стандартных термоциклерах.
Длительность постановки	Настройка прибора MagNA Pure LC занимает примерно 15 минут. Общая длительность автоматизированного выделения ДНК из 32 образцов составляет примерно 95 мин. ④ После настройки и запуска прибора MagNA Pure LC дополнительные манипуляции оператора не требуются. Дополнительные манипуляции требуются только для предварительных этапов выделения.

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 смешивайте реагенты из разных серий набора или разных флаконов одной серии набора.
- Не используйте набор после истечения его срока годности.
- Промывочный буфер 1 (флакон 1) и лизирующий/связывающий буфер (флакон 4) содержат соли гуанидина, способные вызывать раздражение. 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.
- Не допускайте смешивания лизирующий/связывающий буфера с раствором гипохлорита натрия (хлорка). 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/связывающем 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.
- Не допускайте контаминации реагентов бактериями, вирусами и нуклеазами. Отбор аликвот из флаконов с реагентами должен проводиться только одноразовыми дозаторами или свободными от нуклеаз наконечниками. Соблюдайте стандартные правила безопасности.
- 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 получить на странице Roche Applied Science (<http://www.roche-applied-science.com>), или запросить в вашем местном представительстве Roche.

Протокол выделения

Для выделения ДНК в приборе MagNA Pure LC с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi), необходимо установить новый протокол для программы MagNA Pure LC Software, Version 2.11 (или ниже). Если протокол не был установлен ранее, его можно заказать бесплатно. Если используется программное обеспечение версии 3.0 и выше, дополнительная установка протоколов не требуется. Дополнительную информацию можно получить в местном представительстве Roche.

Работа с данным продуктом

Для выделения ДНК во всех приборах MagNA Pure LC с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi), в окне выбора протокола экрана "Sample Ordering" прибора MagNA Pure LC 1.0 или вкладки 'Ordering' прибора MagNA Pure LC 2.0 должно появиться название протокола "DNA III Bacteria".

Название протокола	Тип образца	Процедура
DNA III Bacteria	Жидкие образцы объемом 50-100 мкл	• В зависимости от типа образца, может потребоваться предварительная обработка для разжижения образца. Затем жидкий образец переносится на платформу реагентов/образцов MagNA Pure LC. Выделение ДНК проводится автоматизировано в приборе. • Объем образца: 50 мкл - 100 мкл • Объем элюции: 100 мкл

④ Протокол "DNA III Bacteria" позволяет разводить выделенную ДНК буфером для элюции объемом до 900 мкл.

Образцы

Для получения оптимальных результатов при последующих процедурах, особенно ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®, не используйте образцы большего объема, превышающего указанный в инструкции к набору. **Оптимальным объемом жидкого образца является 100 мкл.**

⚠ Никогда не используйте образцы объемом больше указанного в инструкции к набору. В противном случае может происходить снижение эффективности выделения вследствие склеивания и потери МСЧ, или перекрестная контаминация образцов.

⚠ Рассматривайте все образцы как потенциально инфекционные.

⚠ При работе с жидкими образцами большего объема (*например*, 0.5 - 1 мл или больше), или образцами с неизвестной или низкой бактериальной нагрузкой (*например*, моча, СМЖ, БАС), образцы необходимо центрифугировать 10 мин. при 8,000 × g, чтобы сконцентрировать бактериальные клетки в осадке. Удалите большую часть супернатанта (оставив в пробирке 50 - 100 мкл) и проведите выделение из концентрата.

④ Если в жидком образце предполагается высокое содержание клеток (*например*, если он мутный), рекомендуется использовать меньший объем образца, ограничивая количество ДНК на выходе. Это сделает выделенную ДНК более подходящей для последующего анализа. (Например, избыток эукариотической геномной ДНК может перегрузить ПЦР).

④ Оптимальный способ предварительной подготовки вязких/густых образцов (БАС, СМЖ, слеза, стул) для выделения ДНК зависит от типа образца, степени его вязкости и содержания частиц в нем. Из-за большого разнообразия образцов невозможно дать единые, общие рекомендации.

Будьте готовы при необходимости изменять и оптимизировать процедуру, описанную ниже. Например, дополнительный этап лизиса может повысить выход ДНК при выделении из некоторых видов бактерий.

④ Обработка некоторых “особых типов образцов” (стул, биоптаты, мазки) приведена далее в отдельном разделе.

2.2 Приготовление рабочих растворов

Перед началом процедуры выделения, приготовьте рабочие растворы, как указано ниже.

△ Все остальные растворы готовы к работе.

△ Все буферы представляют собой прозрачные растворы. Не используйте буфер, если во флаконе образовался преципитат. Если виден преципитат, растворите его, нагревая флакон при 37°C и периодически помешивая. Не грейте буфер при 37°C дольше, чем это необходимо для полного растворения преципитата. Перед использованием, охладите буфер до комнатной температуры.

△ Перед началом работы доведите буферы до комнатной температуры. При использовании реагентов, температура которых выходит за рекомендованные рамки, работа набора может быть неоптимальной.

△ Используйте количество реагентов, соответствующее числу образцов.

△ Не храните протеиназу К и суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. Все остальные реагенты, остающиеся в пробирках для реагентов после завершения постановки, могут использоваться в следующей постановке, если она проводится в тот же день. Более длительное хранение не рекомендовано.

Реагент	Приготовление/комментарии	Хранение
Магнитные стеклянные частицы	Тщательно перемешайте суспензию МСЧ. Перемешайте на вортексе непосредственно перед использованием, чтобы получить однородную смесь. Во время хранения частицы оседают на дно флакона. △ Для получения оптимальных результатов, вносите МСЧ в прибор перед самым запуском постановки (чтобы свести к минимуму оседание частиц). Всегда используйте точное количество МСЧ, рекомендованное программой.	Храните МСЧ при комнатной температуре (+15 - +25°C.) △ Никогда не храните суспензию МСЧ в пробирках для реагентов. △ Не оставляйте МСЧ в открытом флаконе или пробирке для реагентов, поскольку испарение спирта может привести к снижению эффективности выделения.

Реагент	Приготовление/комментарии	Хранение
Протеиназа К	Восстановите всю протеиназу К (флакон 8), внося в каждый флакон по 1.2 мл буфера для элюции (флакон 6). Закройте флакон и тщательно перемешайте до полного растворения лиофилизата. ⚠ После восстановления раствор протеиназы К может быть мутным. Это связано с присутствием стабилизирующих добавок в реагенте. Это не оказывает влияния на работу фермента. 🕒 Один флакон протеиназы К рассчитан на выделение 32 образцов.	После восстановления раствор протеиназы К стабилен в течение 1 месяца при +2 - +8°C или в течение 12 месяцев при -15 - -25°C.

Контроли

Всегда используйте в постановках соответствующие контроли, особенно если для выделенных образцов планируется проведение качественного анализа образцов ДНК (например, в ПЦР в реальном времени в приборе LightCycler®). 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), вносимая в каждый выделяемый образец в известном количестве контрольная матрица.

🕒 Внутренний контроль (ВК) до начала выделения и проходит затем все этапы выделения и амплификации, что и мишень, в той же реакционной пробирке. Применение ВК особенно важно при проведении энзиматических реакций, таких как ПЦР, поскольку эффективность процесса ПЦР может снижаться при наличии в очищенном образце ингибиторов. Кроме того, внутренний контроль служит для мониторинга возможных потерь материала во время выделения.

🕒 Для количественных тестов в приборе LightCycler®, в качестве внутреннего контроля используют синтетические молекулы РНК с сайтами посадки праймеров, идентичными мишени, но имеющие свой уникальный участок посадки зондов для дифференциации ампликонов мишени и ВК. Разделение сигналов от мишени и ВК проводится за счет применения разных красителей в тестах формата HybProbe. Подробные сведения о применении ВК в системе LightCycler® можно найти в брошюре LightCycler® 12/2000 «Абсолютный количественный анализ при использовании внешних стандартов и внутреннего контроля» ("Absolute Quantification with External Standards and an Internal Control") на сайте <http://www.lightcycler.com>.

2.3 Предварительные этапы

Стандартная процедура

1 Разжижение (предварительный этап для вязких образцов – слюны, бронхо-альвеолярной слизи)	• Приготовьте свежий концентрат DTT* (<i>например, 5 x = 0.75%</i>). • Доведите конечную концентрацию DTT в образце до 0.15%, добавив необходимый объем концентрата DTT. • Инкубируйте образцы (<i>например, на шейкере</i> в течение 30 минут при 37°C), пока образец не станет легко пипетироваться.
2 Центрифугирование (предварительный этап для жидких образцов больших объемов с низкой или неизвестной бактериальной нагрузкой, например, мочи, СМЖ, БАС, конденсатов)	• Центрифугируйте образцы не более 10 минут при 8,000 x g для осаждения бактериальных клеток. • Удалите большую часть супернатанта (оставьте 50-100 мкл), растворите клетки в оставшемся супернатанте и далее работайте с этим концентратом. Ⓢ Центрифугирование позволяет провести выделение образца с исходным объемом несколько мл за одну процедуру, что увеличивает максимальных выход ДНК.
3 Внесение лизирующего буфера	• Внесите 130 мкл лизирующего буфера MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (флакон 7) в образец объемом 100 мкл. ⚠ Если объем образца менее 100 мкл, добавьте лизирующий буфер до конечного объема 230 мкл. • Тщательно перемешайте.
4 Расщепление под действием протеиназы К	• Внесите 20 мкл протеиназы К в смесь и тщательно перемешайте. • Инкубируйте 10 минут при 65°C (<i>например, БАС</i>) или ночь при комнатной температуре (<i>например, биоптаты, плотные ткани</i>) до полного растворения образца. Ⓢ Протеиназу К можно заранее смешать с буфером для бактериального лизиса для упрощения процедуры.
5 Нагревание	⚠ Мы очень рекомендуем проводить этот этап для инактивации патогенов в образце. Это также усиливает лизис клеточной стенки некоторых видов бактерий. Для предотвращения утечки, проводите этот этап в пробирках с закручивающимися крышками. • Инкубируйте образцы при 95°C в течение 10 минут. • Осадите в центрифуге, чтобы весь объем оказался на дне пробирки. • Охладите образцы при комнатной температуре или на льду, затем перенесите их в картридж для образцов.

Работа с данным продуктом

Особые типы образцов

Образцы стула	1 Возьмите образец стула размером с фасолину и растворите в 5-6 объемах PBS (примерно 500 мкл). ⚠ Не центрифугируйте! 2 К 100 мкл суспензии стула внесите 130 мкл буфера для лизиса бактериальных клеток и 20 мкл протеиназы К. 3 • Инкубируйте 10 мин. при 65°C. • Инкубируйте 10 мин. при 95 °C. ⚠ Для предотвращения забивания наконечников твердыми частицами, дайте лизату отстояться или центрифугируйте его при 500 x g. В качестве альтернативы, можно гомогенизировать лизат в приборе MagNA Lyser в течение 30 сек. при 6,000 об./мин., затем осадить в центрифуге при 500 x g. 4 Охладите образцы при комнатной температуре или на льду. 5 Перенесите охлажденный и осветленный супернатант в картридж для образцов.
Биоптаты	1 К образцу ткани (1-10 мг) добавьте 130 мкл буфера для лизиса бактериальных клеток и 20 мкл протеиназы К. 2 • Инкубируйте при 65°C до полного растворения образца. • Инкубируйте 10 мин. при 95 °C. 3 Охладите образцы при комнатной температуре или на льду. 4 Перенесите охлажденный лизат (до 100 мкл) в картридж для образцов.
Мазки	1 Растворите мазок в 130 мкл буфера для лизиса бактериальных клеток и 20 мкл протеиназы К. 2 10 мин. при 65°C., затем 10 мин. при 95°C 3 • Выжмите жидкость из мазка и соберите ее. • Инкубируйте 10 мин. при 95°C 4 Охладите образцы при комнатной температуре или на льду 5 Перенесите охлажденный жидкий образец (до 100 мкл) в картридж для образцов.

Кровяные культуры	❶ 100 мкл культуральной жидкости кровяной культуры можно сразу обрабатывать по стандартному протоколу, описанному выше. ⚠ При работе с флаконами для кровяной культуры производства Organon Teknika отмечается некоторый перенос частиц. Поэтому для получения оптимальных результатов ПЦР в реальном времени в приборах LightCycler®, быстро осадите элюат в центрифуге, чтобы осадить углеродные частицы перед внесением аликвот в ПЦР.
Грибы	❶ Для повышения эффективности лизиса клеток грибов и спорообразующих бактерий, рекомендуется проводить 3-5 циклов замораживания/кипячения (с помощью жидкого азота и термоблока) после добавления протениназы К. ❷ Перенесите охлажденный жидкий образец (до 100 мкл) в картридж для образцов.

2.4 Протокол выделения ДНК

Общие замечания

- Описанная ниже процедура рассчитана на одновременную обработку 32 образцов. Если вы обрабатываете меньшее количество образцов, пропорционально уменьшите объем всех реагентов (см. экран Start Information прибора MagNA Pure LC или заставку Stage Setup прибора MagNA Pure LC 2.0).
- Программа автоматически рассчитывает необходимое количество реагентов и дает подсказки на этапах запуска постановки.
- Вы не можете запустить прибор, пока не будет закрыт зажим для картриджа образцов, пробирок для реагентов и реакционных наконечников.
- Если вы запрограммировали разведение элюированной ДНК, вам потребуется дополнительная пробирка для реагентов M30 в позиции R7. В качестве буфера для разведения ДНК используйте до 900 мкл Буфера для элюции или свободного от нуклеаз 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Протокол

Выделение ДНК из образцов проводится по протоколу, приведенному ниже.

Запуск прибора и программы	
Прибор MagNA Pure LC 1.0	• Включите прибор и компьютер, затем запустите программу MagNA Pure LC Software. • Откройте экран 'Start Information'.
Прибор MagNA Pure LC 2.0	• Включите прибор, программа MagNA Pure LC 2.0 Software запустится автоматически. • Введите пароль и откройте вкладку 'Ordering'.
Все приборы MagNA Pure LC	• Выберите протокол "DNA Bacteria III". • Следуйте инструкциям программы и укажите названия и число образцов. Введите объем образцов, объем элюции и объем разведения элюата (если требуется). Программа рассчитает необходимое количество каждого реагента.

Работа с данным продуктом

Заполнение пробирок для реагентов	
Все приборы MagNA Pure LC	Перед запуском процедуры выделения, внесите в пробирки для реагентов необходимый объем реагентов (доведенные до комнатной температуры).
Прибор MagNA Pure LC 1.0	Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на экране Start Information, закройте пробирки крышкой.
Прибор MagNA Pure LC 2.0	Внесите в каждую пробирку для реагентов объем, указанный на заставке Stage Setup, закройте пробирки крышкой.
Все приборы MagNA Pure LC	⚠ Закрывайте пробирки с реагентами крышками, чтобы не допустить испарения реагентов. Однако, даже закрытые, пробирки для реагентов не подходят для длительного хранения реагентов. ⚠ Загрузите указанное на экране Start Information или заставке Stage Setup количество МСЧ в прибор непосредственно перед запуском постановки. Это необходимо делать перед самым запуском для предотвращения оседания МСЧ.

Установка пробирок для реагентов и расходных материалов на платформу для реагентов/образцов	
Прибор MagNA Pure LC 1.0	Следуя указаниям на экране Start Information, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) и реагенты в пробирках в платформу для реагентов/образцов.
Прибор MagNA Pure LC 2.0	Следуя указаниям на заставке Stage Setup, загрузите необходимые расходные материалы (пластик) и реагенты в пробирках в платформу для реагентов/образцов.
Все приборы MagNA Pure LC	③ Цветная "Рамка для размещения"*, накладываемая на штатив для реагентов и помогающая загружать реагенты, прилагается бесплатно.

Загрузка образцов	
Все приборы MagNA Pure LC	• Перенесите Картридж для образцов с лизатами образцов в прибор MagNA Pure LC. • Закройте одноразовую крышку картриджа.

Запуск постановки	
Прибор MagNA Pure LC 1.0	• На экране Start Information подтвердите правильность загрузки расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих текстовых окнах. • Нажмите кнопку 'OK', чтобы запустить автоматизированную процедуру выделения ДНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.
Прибор MagNA Pure LC 2.0	• На заставке Stage Setup подтвердите правильность загрузки расходных материалов и реагентов, кликнув мышью в соответствующих текстовых окнах. • Нажмите кнопку 'Start', чтобы запустить автоматизированную процедуру выделения ДНК. Прибор автоматически внесет все реагенты и проведет выделение.

Хранение выделенной ДНК

⚠ Для сохранения максимальной стабильности выделенной ДНК, немедленно начните подготовку ПЦР. Не храните выделенные нуклеиновые кислоты в Картридже для хранения в охлаждающем блоке 1. Для длительного хранения (в течение нескольких недель), закройте Картридж для хранения пленкой* и храните ДНК при -15 - -25°C. Лучше хранить ДНК в аликвотах, чтобы избежать многократного оттаивания/замораживания выделенных нуклеиновых кислот.

Последующий анализ

Прибор MagNA Pure LC может помочь в подготовке реакции ПЦР, внося выделенную ДНК и мастермиксы для ПЦР в капилляры LightCycler® или стандартный пробирки и плашки для ПЦР (Рекомендуемые плашки приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC). Для последующего анализа вы можете поместить капилляры LightCycler® в вынимаемый охлаждающий блок MagNA Pure LC в центрифужных адаптерах LC или в карусели для образцов LC. Этапы последующего анализа можно запрограммировать заранее, до начала выделения, или после его завершения. Подробные сведения о последующем после выделения анализе приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure LC.

Результаты

3. Результаты

Общие замечания

В данном разделе представлены типичные результаты, полученные с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi), при использовании стандартного протокола, описанного выше. Однако, в некоторой степени эффективность выделения зависит от типа образца. Некоторые образцы могут быть крайне вязкими, содержать очень много клеток или разнообразные ингибирующие вещества. Поэтому результаты выделения могут варьировать и может потребоваться изменение стандартного протокола для получения удовлетворительных результатов (см. раздел 2.3 "Предварительные этапы").

Образцы БАС

Образцы данного типа могут значительно различаться по вязкости и содержанию клеток. Однако даже очень вязкие образцы могут быть обработаны с применением предварительных этапов, описанных выше. В 6 образцов БАС с разной степенью вязкости вносили *S. aureus* (типичный микроорганизм, выявляемый в таких образцах). После выделения ДНК все образцы были четко позитивными в ПЦР-анализе в карусельной системе LightCycler® (см. Рис. 1). Для образцов БАС с высокой степенью вязкости или большим содержанием клеток отмечали более высокие значения точек пересечения (ТП), что указывало на неоптимальное выделение. В таких случаях уменьшение объема образца или увеличение инкубации с протеиназой К приводит к улучшению выделения и повышению чувствительности ПЦР-анализа. Образец БАС, положительный по *S. aureus* в микробиологическом тесте, дал значительно меньшее значение ТП, что указало на большее, по сравнению с внесенным, общее количество копий *S. aureus* в данном образце (Рис. 1).

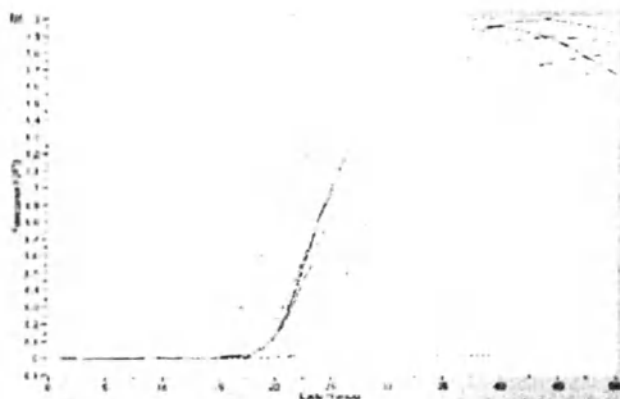


Рисунок 1: ПЦР-анализ в карусельной системе LightCycler® ДНК, выделенной из 6 разных образцов БАС, в которые был внесен *S. aureus*

----- образец БАС, положительный в микробиологическом тесте, значительно меньшая величина ТП

_____ прозрачные или слегка вязкие образцы БАС, _ _ _ _ _ очень вязкие образцы БАС,

..... положительный и отрицательный контроли

Образцы мочи

В 9 разных образцов мочи вносили культуральный *S. aureus*, ДНК выделяли по протоколу, описанному выше. По 2 мкл каждого элюата анализировали в специфичном ПЦР-тесте в реальном времени в карусельной системе LightCycler®, параллельно с серией разведений стандарта ДНК. Во всех образцах мочи был получен четкий положительный сигнал. Сравнение значений ТП, полученных для образцов и стандартов ДНК показало высокую эффективность выделения (Рис. 2).

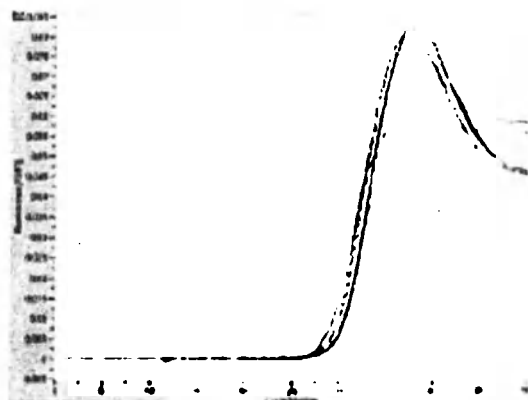


Рисунок 2: ПЦР-анализ в карусельной системе LightCycler® ДНК, выделенной из 9 разных образцов мочи, в которые был внесен *S. aureus*, в сравнении с серией разведений стандарта ДНК.

..... стандарты, _____ образцы мочи, отрицательный контроль

Образцы стула

В 3 разных образца стула вносили культуральный *H. pylori*, в двух повторях. ДНК выделяли в приборе MagNA Pure LC, по описанному выше протоколу, 2 мкл каждого элюата анализировали в специфичном ПЦР тесте в карусельной системе LightCycler®. Во всех образцах отмечали четкий положительный сигнал (Рис. 3).



Рисунок 3: ПЦР-анализ в карусельной системе LightCycler® ДНК, выделенной в приборе MagNA Pure LC из 3 разных образцов стула, которые был внесен культуральный *H. pylori*.

_____ образец стула 1 (в 2 повторях) образец стула 2 (в 2 повторях)
----- образец стула 3 (в 2 повторях) отрицательный контроль

Результаты

Бактериальные культуры

ДНК выделяли из культур *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium striatum*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae* и ряда других грам-положительных и грам-отрицательных бактерий. ДНК, выделенную с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) в приборе MagNA Pure LC, выявляли с чувствительностью, равной или превосходящей наблюдаемую при выделении методами фильтрующих картриджей в пробирках (результаты не показаны).

Грибы

ДНК *Aspergillus fumigatus* и *Candida albicans* может быть эффективно выделена из образцов БАС. Результаты ПЦР, полученные с ДНК, выделенной в приборе MagNA Pure LC, были сходными или лучшими по сравнению с проводившимся параллельно выделением методом фильтрующих картриджей в пробирках (результаты не показаны). Чувствительность теста значительно возрастает при проведении 3 – 5 циклов замораживания/нагревания (с помощью жидкого азота и термоблока) перед внесением образцов в прибор MagNA Pure LC.

Прочие образцы

Прочие образцы, такие как мазки, биоптаты, СМЖ, трахейный секрет и некоторые кровяные культуры могут обрабатываться в приборе MagNA Pure LC, и полученные элюаты могут напрямую использоваться для ПЦР-анализа в системе LightCycler® (результаты не показаны).

4. Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
Слипание частиц/проблемы с магнитным разделением частиц	Избыток материала в образце или образцы слишком вязкий и недостаточно разжижен	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы". • Применяйте рекомендованный метод разжижения (см. раздел 2.3 "Предварительные этапы") и при необходимости увеличьте время инкубации с DTT и протеиназой К.
	Магнитные стеклянные частицы были намагничены перед началом работы.	• Избегайте контакта МСЧ с магнитом. • Храните набор правильно.
Деградация ДНК	Не оптимальное хранение образцов	• Используйте свежие или замороженные образцы. • Избегайте работы с образцами, хранившимися при комнатной температуре долгое время.
Низкий выход ДНК	В образце недостаточное количество ткани	Центрифугируйте образцы перед началом работы, для выделения ДНК используйте осадок (см. раздел "Образцы" и раздел 2.3 "Предварительные этапы").
	Неправильное хранение образцов	• Используйте свежие или замороженные образцы. • Избегайте работы с образцами, хранившимися при комнатной температуре долгое время.
	Избыток материала в образце	Используйте для выделения образцы объемом 100 мкл (или менее для содержащих много клеток образцов).
	Недостаточный лизис	Примените рекомендованный протокол лизиса, включая этап нагревания, возможно увеличение длительности инкубации с протеиназой К.
ДНК недостаточно чистая	Избыток материала в образце (избыток клеток)	Уменьшите количество материала в образце до значений, рекомендованных в разделе "Образцы".
Низкое качество последующей ПЦР	Слишком много ДНК в ПЦР	Проверьте концентрацию ДНК в элюате и измените количество ДНК в ПЦР или разведите элюат (например, 1 : 10). Оптимальное количество: 1 – 100 нг/ПЦР, максимум: около 1 мкг.
		Используйте меньше материала для выделения ДНК. Оптимальные результаты получают при выделении из жидких образцов объемом не более 100 мкл.
	Слишком мало ДНК в ПЦР	Измените количество ДНК в ПЦР или используйте больше материала для выделения. Оптимальное количество: 1 – 100 нг/ПЦР, максимум: около 1 мкг. • Используйте больше материала для выделения. • Сконцентрируйте образец центрифугированием (см. раздел "Образцы" и раздел 2.3 "Предварительные этапы").

Анализ ошибок

	Возможная причина	Рекомендации
	Низкая степень очистки ДНК	Используйте меньше материала для выделения ДНК, увеличьте длительность инкубации с протеиназой К.
	Реагенты и протокол ПЦР не оптимизированы	Проверьте реагенты и протокол ПЦР с помощью положительного контроля ДНК (например, геномной ДНК человека*).
	Условия ПЦР не оптимизированы	Оптимизируйте ПЦР, например, включите в протокол ПЦР этап начальной денатурации 30 сек.- 3 мин.
Элюат слегка красного цвета	Минимальная абразия магнитных частиц	Центрифугируйте элюат при низких значениях g (около 1,000 об./мин.) для удаления взвеси. ☺ Красный цвет элюата не оказывает влияния на последующую ПЦР в системе LightCycler®.

5. Дополнительная информация о продукте

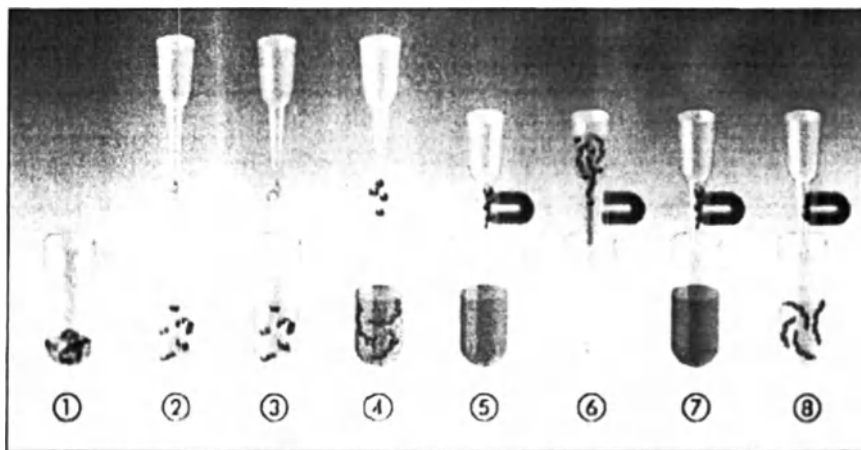
5.1 Назначение данного продукта

Набор MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) применяется для выделения высокоочищенной, недеградированной ДНК из 1-32 трудных для обработки образцов в приборе MagNA Pure LC. Выделенная ДНК соответствует стандартам качества, необходимым для проведения высокочувствительного количественного ПЦР-анализа в приборе LightCycler®.

Принцип теста

Процедура выделения основана на технологии магнитных частиц-носителей. Лизис образцов проводят, инкубируя их со специальным буфером, содержащим хаотропные соли и протеиназу К. Затем добавляются магнитные стеклянные частицы, на поверхности которых связывается ДНК. Несвязавшиеся вещества удаляются в процессе нескольких этапов отмывки, затем очищенная ДНК элюируется в низкосолевым буфере.

Ниже приведены этапы процесса выделения MagNA Pure LC DNA:



① Образцы помещают в лунки Картриджа для образцов.

② К образцам добавляется лизирующий/связывающий буфер, в результате происходит полный лизис клеток и высвобождение ДНК. Нуклеазы при этом денатурируют.

③ К образцам добавляется протеиназа К, белки расщепляются

④ Нуклеиновые кислоты связываются на кремниевой поверхности МСЧ, внесенных в образцы, в присутствии хаотропных солей, изопропанола и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.

⑤ МСЧ со связавшейся ДНК затем отделяются от лизированного образца с помощью магнита.

Дополнительная информация о продукте

⑥ МСЧ со связавшимися нуклеиновыми кислотами промываются несколько раз промывочным буфером, чтобы удалить несвязавшиеся вещества, такие как белки (нуклеазы), клеточные мембраны, ингибиторы ПЦР (гепарин и гемоглобин), а также чтобы снизить концентрацию хаотропных солей.

⑦ МСЧ со связавшейся ДНК снова отделяются с помощью магнита от промывочного буфера, содержащего остатки материала образца.

⑧ Очищенная ДНК элюируется с МСЧ при 70°C в лунках Картриджа для элюции, при этом сами МСЧ остаются в реакционном наконечнике и удаляются.

Ниже приведены основные действия при выделении с набором MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi):

Выделение ДНК проводится автоматизировано в приборе MagNA Pure LC

① Все необходимые реагенты вносятся в рабочий картридж.

② Буфер для элюции вносится в картридж для элюции (Нагревающий блок).

③ К образцу добавляется Лизирующий/Связывающий буфер, перемешивается. Нуклеиновые кислоты высвобождаются, нуклеазы инактивируются

④ Лизат переносится в суспензию МСЧ, перемешивается и инкубируется.

⑤ Частицы переносятся в промывочный буфер I, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑥ Частицы переносятся в промывочный буфер II, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑦ Частицы переносятся в промывочный буфер III, перемешиваются, затем МСЧ отделяются.

⑧ Частицы вносятся в буфер для элюции (нагревательный блок), перемешиваются, инкубируются, происходит элюция ДНК. МСЧ удаляются.

5.2 Контроль качества

ДНК выделяют по стандартному протоколу из образцов мочи, в которую вносят определенное количество *E.coli*, и анализируют ее стабильность, выход, чистоту и способность амплифицироваться в ПЦР в реальном времени в системе LightCycler®.

Литература

- 1 Wullings, BA. & van der Kooij, D. (2006). Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15°C. *Appl. Envir. Microbiol.* **72**, 157-166.
- 2 Rours, GI. *et al.* (2005). Use of pooled urine samples and automated DNA isolation to achieve improved sensitivity and cost-effectiveness of large-scale testing for *Chlamydia trachomatis* in pregnant women. *J.Clin. Microbiol.* **43**, 4684-4690.
- 3 Melles, DC. *et al.* (2004). Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **114**, 1732-1740.
- 4 Ramisse, V. *et al.* (2004). Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5722-5730.
- 5 Lemaître, N. *et al.* (2004). Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4307-4309.
- 6 Methner, F-J. *et al.* (2004). Screening of beer-spoilage bacteria using the LightCycler® PCR workflow system. *Biochemica* **1**, 9-11.
- 7 Mygind, T. *et al.* (2003). Evaluation of five DNA extraction methods for purification of DNA from atherosclerotic tissue and estimation of prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in tissue from a Danish population undergoing vascular repair. *BMC Microbiol.* **3**, 19.
- 8 Greub, G. *et al.* (2003). *Parachlamydiaceae* as rare agents of pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 755-756.
- 9 Boulos, A. *et al.* (2004). Antibiotic susceptibility of *Tropheryma whippelii* in MRC5 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 747-752.
- 10 Greub, G. *et al.* (2003). *Parachlamydia acanthamoeba* enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis. *Infect.Immun.* **71**, 5979-5985.
- 11 Loiez, C. *et al.* (2003). Detection of *Yersinia pestis* in sputum by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4873-4875.
- 12 Greub, G. *et al.* (2003). *Parachlamydia acanthamoeba* is endosymbiotic or lytic for *Acanthamoeba polyphaga* depending on the incubation temperature. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **990**, 628-634.
- 13 Rantakokko-Jalava, K. & Jalava, J. (2002). Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4211-4217.
- 14 Grisold, AJ. *et al.* (2002). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2392-2397.
- 15 Raggam, RB. *et al.* (2002). Qualitative detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavages and induced sputa by automated DNA extraction and real-time polymerase chain reaction. *Med. Microbiol. Immunol.* **191**, 119-125.

Вспомогательная информация

6. Вспомогательная информация

6.1 Обозначения

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.

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.

Аббревиатуры

В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
БАС	Бронхоальвеолярная слизь
ТП (CP)	Точка пересечения
СМЖ	Спинномозговая жидкость
ДИТ	Дитиотрейтол
МСЧ	Магнитные стеклянные частицы
КТ	Комнатная температура
PBS	Фосфатно-солевой буфер

6.2 Изменения относительно предыдущей версии

- Редакторская правка, добавление инструкций для прибора MagNA Pure LC 2.0 и новых каталожных номеров.

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:

- Семейство MagNA Pure, включая расходные материалы, комплектующие, наборы и прочие продукты:

<http://www.magnapure.com>

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

Приборы
комплектующие

Продукт	Комплектация	Кат.№
и Прибор MagNA Pure LC 2.0	1 прибор с комплектующими	05 197 686 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, центрифужные адаптеры LC	1 охлаждающий блок с 32 центрифужными адаптерами LightCycler®	12 190 664 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на карусель LC	1 охлаждающий блок	12 189 704 001
Охлаждающий блок MagNA Pure LC, на 96-луночную ПЦР-плашку	1 охлаждающий блок	12 189 674 001
Адаптер для планшет MagNA Pure LC LightCycler® 480 Plate Adapter	1 адаптер	05 323 983 001
DNAIII рамка для размещения	1 рамка	03 262 758 001
Пленка для заклеивания картриджа MagNA Pure LC Cartridge Seal	200 пленок	03 118 827 001
Прибор MagNA Lyser	1 прибор (220 V) 1 прибор (110 V) (плюс ротор и охлаждающий блок ротора)	03 358 976 001 03 358 968 001
Частицы MagNA Lyser Green Beads	100 пробирок	03358 941 001
Прибор LightCycler® 480 II	1 прибор (96 лунок) 1 прибор (384 лунок)	05 015 278 001 05 015 243 001
Плашки LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, прозрачные	5 × 10 плашек (включая запечатывающую пленку)	05 102 413 001
Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор с комплектующими	03 531 414 001
Прибор LightCycler® 1.5	1 прибор с комплектующими	04 484 495 001

Вспомогательная информация

Продукт		Комплектация	Кат. №
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 MagNA Pure LC для выделения ДНК	Капилляры LightCycler® (20 шт.)	1 упаковка (5 коробок, в каждой капилляры и фиксаторы)	04 929 292 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 003 990 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 186 229 001
	MagNA Pure LC DNA Isolation Kit Large Volume ¹⁾	1 набор (от 96 до 288 выделений)	03 310 515 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК	Буфер для лизиса бактерий MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer	20 мл	04 659 180 001
	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit - High Performance ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 542 394 001
	MagNA Pure LC RNA Isolation Kit - High Performance ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 330 591 001
	MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 267 393 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения нуклеиновых кислот	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 038 505 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit Large Volume (образцы большого объема) ¹⁾	1 набор (192 выделения)	03 264 793 001
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - High Performance ¹⁾	1 набор (от 96 до 288 выделений)	05 323 738 001
	Дополнительные наборы и реагенты	2 г	10 197 777 001
Дополнительные наборы и реагенты		10 г	10 708 984 001
		25 г	11 583 786 001
		50 г	10 708 992 001
		100 г	10 709 000 001
	в коробке, 4 л		11 666 789 001
	раствор PBS, 10 л		
Дополнительные наборы и реагенты	100 мкг ДНК человека	100 мкг	11 691 112 001

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией

Приобретение набора MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

¹⁾ Приобретение данных продуктов не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

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

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, MAGNA PURE, MAGNA LYSER и HYBPROBE являются торговыми марками Roche.

Остальные марки или названия продуктов являются торговыми марками соответствующих владельцев.

**Контактная
информация
и
техническая
поддержка**

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 страницу 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.

1106.03.257614001



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany

Для лабораторных исследований. Не для диагностики.
Только для исследований *IN VITRO*.

Пробирки для гомогенизации образцов MagNA Lyser Green Beads

Для гомогенизации твердых образцов, 100 пробирок
Cat. No. 03 358 941 001

Версия февраль 2006

1. Описание продукта

Частицы MagNA Lyser Green Beads представляют собой керамические частицы диаметром 1.4 мм в пробирках с завинчивающейся крышкой объемом 2 мл. Частицы специально разработаны для использования в приборе MagNA Lyser для оптимальной гомогенизации различных образцов (тканей млекопитающих, растений, клеток и т.д.). Керамические частицы могут применяться с лизирующими буферами наборов MagNA Pure LC Kits для выделения нуклеиновых кислот. В основе метода разрушения клеток лежит быстрое, постоянное круговое движение ротора прибора MagNA Lyser, в который загружены пробирки с частицами MagNA Lyser Green Bead, в которые внесены образцы ткани и лизирующие реагенты. Такое движение ротора обеспечивает оптимальные условия для разрушения тканей млекопитающих, растений, бактериальных клеток, клеток дрожжей и прочих материалов. В таких условиях не требуется применение лизирующих ферментов или дополнительного измельчения.

Разрушение клеток происходит в приборе MagNA Lyser при столкновении керамических частиц с материалом образца в пробирке. Частота столкновения и сила воздействия (определяющие эффективность процесса разрушения тканей) являются функциями скорости, задаваемой при настройке прибора, и массы частиц.

2. Работа с продуктом

Используйте объем образца и лизирующего буфера, указанное во инструкциях к соответствующим наборам MagNA Pure LC Isolation. Подробное описание системы приведено в Руководстве пользователя прибора MagNA Lyser.

Описание процедуры

1. Поместите ротор в охлаждающий блок MagNA Lyser. Поместите необходимое количество пробирок MagNA Lyser Green в ротор.

2. Внесите образцы и лизирующий буфер в пробирки с частицами MagNA Lyser Green Beads.

- Убедитесь, что О-Кольцо правильно вставлено в крышку пробирки.

- Не перекручивайте крышку при закрывании.

- Крышки должны сидеть ровно (см. рис. 1).

Правильно Неправильно



Рисунок 1.

3. Поместите ротор в прибор и зафиксируйте с помощью держателя. Все три гайки должны быть закручены.

4. Гомогенизируйте образцы в соответствии с Руководством пользователя MagNA Lyser.

5. Центрифугируйте образец, чтобы осадить клеточный дебрис, затем проведите выделение нуклеиновых кислот из супернатанта.

Примечание: Объем не должен превышать указанный на пробирке уровень (см. рис. 2). При превышении данного уровня образец может вылиться из пробирки.



Рисунок 2.

3. Информация для заказа

Продукт	Кат. №
Прибор MagNA Lyser (115 вольт)	03 358 968 001
Прибор MagNA Lyser (230 вольт)	03 358 976 001

Последнюю информацию о продукции MagNA Pure и MagNA Lyser можно найти на сайте www.magnapure.com или обратившись в местное торговое представительство

MAGNA LYSER и MAGNA PURE являются торговыми марками Roche.

Контакты и техническая поддержка

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. С помощью функции выбора продукта вы можете найти инструкции и данные по безопасности для каждого продукта.



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany

3. Анализ ошибок

Пожалуйста обратитесь к главе 4 инструкции к набору для выделения НК – MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Кат.№: 03 038 505 001

4. Информация для заказа

Roche Applied Science предлагает большое разнообразие реагентов и систем для научных исследований. Получить полную информацию по продукции и инструкциям вы можете на домашней странице: www.roche-applied-science.com, или на наших специальных сайтах:

Семейство продукции MagNA Pure для автоматизированного выделения НК, включая аксессуары, пластик, наборы и др.:

<http://www.magnapure.com>

Системы ПЦР в реальном времени (системы LightCycler Carousel, LightCycler 480 и универсальная библиотека зондов):

<http://www.lightcycler.com>

Продукт	Фасовка	Кат.№
Наборы для выделения ДНК		
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	1 набор, 192 реакции	03 003 990 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume	1 набор, 96-288 реакций	03 310 515 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue)	1 набор, 192 реакции	03 186 229 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Бактерии, грибы)	1 набор, 192 реакции	03 264 785 001
MagNA LC DNA Isolation Kit I – Lysis/Binding Buffer Refill	70 мл	03 246 752 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I – protocol for External Lysis	1 дискета	03 190 811 001
Наборы для общего выделения нуклеиновых кислот		
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	1 набор, 192 реакции	03 038 505 001
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – Large Volume	1 набор, 192 реакции	03 264 793 001
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit I – Lysis Buffer Refill	70 мл	03 246 779 001
Наборы для выделения РНК		
MagNA pure LC RNA Isolation Kit – High Performance	1 набор, 192 реакции	03 542 394 001
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue)	1 набор, 192 реакции	03 330 591 001
MagNA Pure RNA Isolation Kit Tissue Lysis Buffer Refill	70 мл	03 604 721 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Blood, blood cells)	1 набор, 192 реакции	03 004 015 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue)	1 набор, 192 реакции	03 172 672 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I – Lysis Buffer Refill	70 мл	03 246 744 001
MagNA Pure LC mRNA HS Kit	1 набор, 192 реакции	03 267 393 001
Для получения информации о расходных материалах и других продуктах, относящихся к данному списку – посетите наш сайт: www.magnapure.com		

MagNA Pure – является торговой маркой Roche

Контакты и поддержка

Задать вопросы, решить проблемы, высказать свои предложения Вы можете, посетив наш сайт Технической поддержки:

www.roche-applied-science.com/support

Чтобы позвонить или написать нам, посетите домашнюю страницу Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com, и выберите страну. Появится контактная информация для выбранной Вами страны. С помощью функции выбора продукта Вы можете найти инструкции и данные по безопасности для каждого продукта.



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany

Лизирующий/связывающий буферный раствор для выделения ДНК MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I - Lysis/Binding Buffer - Refill

Кат. № 03 246 752 001

Версия июль 2004
Хранить при +15 - +25°С

Описание продукта

Содержание

Лизирующий/связывающий буфер является прозрачным и не должен использоваться, если в нем образовался осадок.

Примечание: Перед началом работы нагрейте буфер до +15 - +25°С, пока осадок не растворится.

Лизирующий/связывающий буфер содержит синий краситель для детекции сгустков.

Флакон/цвет крышки	Маркировка	Содержание и функция
зеленый	Lysis/Binding Buffer - Refill	• Один флакон, 70 мл • Для лизиса клеток и связывания тотальных нуклеиновых кислот

Область применения

Лизирующий/связывающий буфер MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I - Lysis/Binding Buffer - Refill предназначен для:

- лизиса следующих образцов млекопитающих:
 - крови,
 - клеток крови и
 - клеточных культур
- стабилизации ДНК в лизатах
- выделения ДНК в приборе MagNA Pure LC

Действие

При внесении лизирующего/связывающего буфера в образец происходит лизис клеток и инактивация ферментов нуклеаз.

Образцы

Оптимальные результаты, особенно при последующем ПЦР-анализе в LightCycler, получают при автоматизированном выделении ДНК в приборе MagNA Pure LC из образцов, содержащих 10^5 клеток или 20 мкл крови.

Однако в системе MagNA Pure LC выделение возможно в диапазоне от 100 клеток до 10^6 клеток (200 мкл крови).

Примечание: Специальные протоколы разработаны для выделения из образцов сыворотки крови, плазмы и крови человека. При анализе образцов от других видов млекопитающих необходимо принимать во внимание возможные различия в концентрациях клеток крови. Поэтому необходимо довести концентрацию клеток крови до оптимальной перед началом процедуры выделения.

Хранение/стабильность Лизирующий/связывающий буфер MagNA Pure LC DNA Isolation Kit Lysis/Binding стабилен при 15-25°С до истечения срока годности, указанного на упаковке. Реагент транспортируется и должен храниться при 15-25°С.

Процедура и необходимые материалы

Меры предосторожности

- Рассматривайте все образцы от млекопитающих, особенно человеческого происхождения, как потенциально инфекционные.
- Лизирующий/связывающий буфер содержит соль гуанидина, которая может вызывать раздражение.
- Всегда работайте в защитных перчатках и соблюдайте стандартные правила безопасности работы в лаборатории!
- Для предотвращения контаминации ДНКами соблюдайте меры предосторожности, описанные в литературе (1).

Дополнительное оборудование и реагенты

- стандартное лабораторное оборудование
- дозаторы и наконечники для внесения реагентов и образцов
- центрифуга для подготовки культуральных клеток
- реакционные пробирки
- вортекс
- PBS

Подготовка образцов

Следуйте приведенным ниже инструкциям для подготовки образцов разных типов к автоматизированному выделению ДНК в приборе MagNA Pure LC:

Тип образца	Действие
Цельная кровь	Перенесите 20-200 мкл крови в стерильную реакционную пробирку
Выделенные клетки крови	Подготовьте лейкоциты или мононуклеары периферической крови (МНПК) по стандартной методике. Растворите клеточный осадок в 200 мкл PBS.
Культуральные клетки	Осадите центрифугированием 10^2 - 10^6 культуральных клеток и растворите осадок в 200 мкл PBS в стерильной реакционной пробирке.

Протокол лизиса

В таблице ниже приведена процедура лизиса образцов.

Этап	Действие
1	Внесите 300 мкл лизирующего/связывающего буфера MagNA Pure LC DNA Isolation Kit Lysis/Binding Buffer - Refill в реакционную пробирку с образцом.
2	Гомогенизируйте образец, премешивая на вортексе три раза по 10 сек.
3	Лизат образца можно сразу же перенести в прибор MagNA Pure LC для выделения ДНК, или хранить при -70°С или ниже.

Roche

Загрузка лизированных образцов

Порядок действий приведен в таблице ниже.

Этап	Действие
1	Оттайте лизированные образцы на льду
2	Перемешайте лизаты на вортексе три раза по 10 сек.
3	Перенесите лизаты образцов в картридж для образцов MagNA Pure LC.
4	Включите прибор MagNA Pure LC и запустите программное обеспечение, как описано в инструкции к набору MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I.
5	Выберите протокол MPLC: <i>DNA I External lysis</i> .

Анализ ошибок

См. раздел 5.1 инструкции к набору MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I, Cat. No. 03 003 990 001.

Литература

1 Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Как связаться с Roche Applied Science

для заказа, решения технических вопросов, информации о продукции посетите сайт

www.roche-applied-science.com

или свяжитесь с местным торговым представительством.

www.roche-applied-science.com/package-insert/03246752001a.pdf

Пожалуйста, посетите наш новый сайт технической поддержки

www.roche-applied-science.com/support



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Информация для заказа

Продукт	Упаковка	Кат. №
Наборы MagNA Pure LC для выделения ДНК		
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	1 набор на 192 реакции	03 003 990 001
Isolation Kit – Large Volume	1 набор на 96 – 288 реакций	03 310 515 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue)	1 набор на 192 реакции	03 186 229 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi)	1 набор на 192 реакции	03 264 785 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I – Lysis/Binding Buffer Refill	1 набор на 192 реакции	03 246 752 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I – Protocol for External Lysis	1 набор на 192 реакции	03 190 811 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения тотальных нуклеиновых кислот		
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	1 набор на 192 реакции	03 038 505 001
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume	1 набор на 192 реакции	03 264 793 001
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit I – Lysis/Binding Buffer Refill	70 мл	03 246 779 001
Наборы MagNA Pure LC для выделения РНК		
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance	1 набор на 192 реакции	03 542 394 001
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue)	1 набор на 192 реакции	03 330 591 001
MagNA Pure RNA Isolation Kit Tissue Lysis Buffer - Refill	70 мл	03 604 721 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Blood, Blood Cells)	1 набор на 192 реакции	03 004 015 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue)	1 набор на 192 реакции	03 172 672 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I – Lysis Buffer Refill	70 мл	03 246 744 001
MagNA Pure LC mRNA HS Kit	1 набор на 192 реакции	03 267 393 001
Для информации о расходных материалах MagNA Pure и другой продукции, посетите сайт: http://www.magnapure.com		

MagNA Pure является торговой маркой представителя группы Roche Group. Приобретение данной продукции не означает передачу лицензии или других прав на проведение ПЦР.

Лизирующий/связывающий буферный раствор для общего выделения нуклеиновых кислот

MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Lysis/Binding Buffer - Refill

Кат.№ 03 246 779 001

Версия Май 2006
Хранить при +15 – 25°C

1. Обзор продукта

Состав

Лизирующий/связывающий буферный раствор – прозрачный.

- Не используйте буферный раствор, если в нем содержится осадок. Если виден осадок – инкубируйте флакон при 37°C и перемешивайте до тех пор, пока осадок не растворится. Не инкубируйте буферный раствор при 37°C дольше, чем нужно для полного растворения осадка. Перед использованием охладите раствор до комнатной температуры.

Лизирующий/связывающий буферный раствор содержит особый компонент, необходимый для распознавания сгустков во время автоматизированного выделения нуклеиновых кислот (НК) в приборе MagNa Pure LC.

Флакон/цвет крышки	Маркировка	Содержимое/Назначение
зелёный	Lysis/Binding Buffer Refill	1 флакон, 100 мл - для лизирования клеток и связывания нуклеиновых кислот

Назначение

Лизирующий/связывающий буферный раствор (MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – Lysis/Binding Buffer) предназначен для:

- лизирования следующего материала:
 - цельная кровь с ЭДТА/цитрат-консервированная
 - сыворотка
 - плазма
- стабилизация НК внутри лизата
- очищение НК при помощи прибора MagNa Pure LC

Принцип действия

После добавления буферного раствора к образцу – клетки лизируются и ферменты (такие, как нуклеазы) эффективно инактивируются.

Требования к образцам

Набор MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit предназначен для обработки 50 – 200 мкл образцов млекопитающих:

- цельная кровь с ЭДТА/цитрат-консервированная
- сыворотка
- плазма

с использованием прибора MagNa Pure LC.

Следующие протоколы были разработаны с использованием человеческой сыворотки, плазмы и цельной крови. Помните, что различные человеческие образцы могут иметь различную концентрацию клеток крови. Для некоторых образцов Вам придётся брать меньший объём образца крови, чтобы поддерживать рекомендованный диапазон (верхний лимит 1-10⁶ клеток).

Хранение и стабильность

MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit Lysis/Binding Buffer стабилен при температуре от +15 до +25°C до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Реагент транспортируется и хранится при температуре от +15 до +25°C.

2. Методика и необходимые материалы

Меры предосторожности

- Обращайтесь со всеми образцами млекопитающих и особенно человеческими, как с потенциально инфекционно опасными.
- Буферный раствор содержит гуанидин тиоцианат, являющийся отравляющим веществом раздражающего действия.
- Всегда находитесь в перчатках и следуйте мерам предосторожности во время работы.
- Во избежании контаминации ДНКзамами/РНКзамами следуйте мерам предосторожности описанным в ссылках 1 и 2.

Ссылки:

1 Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

2 Farrell R.E. (1993) RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization, Academic Press, San Diego.

Необходимое дополнительное оборудование

- Стандартное лабораторное оборудование
- Автоматические дозаторы и наконечники для пипетирования буферного раствора к образцу.
- Вортекс

Протокол лизирования

Пожалуйста, обратитесь к следующему протоколу для процедуры лизирования.

Добавьте 300 мкл MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit Lysis/Binding Buffer Refill в одну реакционную пробирку, содержащую 50-200 мкл материала.

II Гомогенизируйте образец на вортексе по 10 сек 3 раза.

III Далее лизат может подвергнуться автоматизированному выделению НК на приборе MagNa Pure LC или храниться при -70°C или ниже.

Загрузка лизированных образцов

Пожалуйста, обратитесь к следующей таблице.

I Проведите оттаивание лизированных образцов во льду.

II Перемешайте лизаты на вортексе 3 раза по 10 сек.

III Поместите лизаты образцов в картридж для образцов MagNa Pure LC Sample Cartridge.

IV Запустите прибор MagNa Pure LC и программное обеспечение, как описано в инструкции к набору MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit.

V Выберите протокол MPLC protocol: **Total NA External Lysis.**

3. Анализ ошибок

Пожалуйста обратитесь к главе 4 инструкции к набору для выделения НК – MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Кат.№: 03 038 505 001

4. Информация для заказа

Roche Applied Science предлагает большое разнообразие реагентов и систем для научных исследований. Получить полную информацию по продукции и инструкциям вы можете на домашней странице: www.roche-applied-science.com, или на наших специальных сайтах:

Семейство продукции MagNA Pure для автоматизированного выделения НК, включая аксессуары, пластик, наборы и др.:

<http://www.magnapure.com>

Системы ПЦР в реальном времени (системы LightCycler Carousel, LightCycler 480 и универсальная библиотека зондов):

<http://www.lightcycler.com>

Продукт	Фасовка	Кат.№
Наборы для выделения ДНК		
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	1 набор, 192 реакции	03 003 990 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume	1 набор, 96-288 реакций	03 310 515 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue)	1 набор, 192 реакции	03 186 229 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Бактерии, грибы)	1 набор, 192 реакции	03 264 785 001
MagNA LC DNA Isolation Kit I – Lysis/Binding Buffer Refill	70 мл	03 246 752 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I – protocol for External Lysis	1 дискета	03 190 811 001
Наборы для общего выделения нуклеиновых кислот		
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	1 набор, 192 реакции	03 038 505 001
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – Large Volume	1 набор, 192 реакции	03 264 793 001
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit I – Lysis Buffer Refill	70 мл	03 246 779 001
Наборы для выделения РНК		
MagNA pure LC RNA Isolation Kit – High Performance	1 набор, 192 реакции	03 542 394 001
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue)	1 набор, 192 реакции	03 330 591 001
MagNA Pure RNA Isolation Kit Tissue Lysis Buffer Refill	70 мл	03 604 721 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Blood, blood cells)	1 набор, 192 реакции	03 004 015 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue)	1 набор, 192 реакции	03 172 672 001
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I – Lysis Buffer Refill	70 мл	03 246 744 001
MagNA Pure LC mRNA HS Kit	1 набор, 192 реакции	03 267 393 001

Для получения информации о расходных материалах и других продуктах, относящихся к данному списку – посетите наш сайт: www.magnapure.com

MagNA Pure – является торговой маркой Roche

Контакты и поддержка

Задать вопросы, решить проблемы, высказать свои предложения Вы можете, посетив наш сайт Технической поддержки:

www.roche-applied-science.com/support

Чтобы позвонить или написать нам, посетите домашнюю страницу Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com, и выберите страну. Появится контактная информация для выбранной Вами страны. С помощью функции выбора продукта Вы можете найти инструкции и данные по безопасности для каждого продукта.



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



Лизирующий буферный раствор для выделения РНК из тканей MagNA Pure LC RNA Isolation Tissue Lysis Buffer - Refill

Кат. №: 03 604 721 001

Для использования совместно с:

Версия Февраль 2005

Кат. №: 03 172 627 001

MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue)

Кат. №: 03 330 591 001

MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue)

Хранить при 2 - 8°C

Назначение продукта

Содержимое

Флакон/ цвет крышки	Маркировка	Содержимое/Назначение
1 зелёный	MagNa Pure LC RNA Isolation Tissue Lysis Buffer - Refill	• 1 флакон, 70 мл • для лизирования ткани и гомогенизации

Хранение и стабильность

Лизирующий буферный раствор стабилен при +2 - +8°C до истечения срока годности указанного на этикетке.

Лизирующий буферный раствор транспортируется при комнатной температуре

Назначение

Лизирующий буферный раствор MagNA Pure LC RNA Isolation Tissue Lysis Buffer - Refill предназначен для:

- лизирования и гомогенизации свежемороженых образцов тканей с использованием устройства для гомогенизации ткани (инструмент MagNa Lyser или аналог).
- стабилизации целой РНК и мРНК с лизированными образцами
- полной очистки РНК и мРНК при помощи инструмента MagNA Pure LC I

Свежемороженные образцы ткани лизируются и гомогенизируются при помощи лизирующего буферного раствора MagNA Pure LC RNA Isolation Tissue Lysis Buffer - Refill с использованием подходящего гомогенизирующего устройства. Tissue Lysis Buffer полностью разрушает клетки, что приводит к высвобождению РНК. РНКазы эффективно ингибируются.

Необходимое дополнительное оборудование и реагенты

- стандартное лабораторное оборудование
- пипетки и свободные от нуклеаз и не разбрызгивающие наконечники для пипетирования образцов в Картридж с образцами
- Центрифуга и подходящие, свободные от нуклеаз реакционные пробирки
- Гомогенизирующее устройство:
 - Инструмент MagNA Lyser с пробирками для гомогенизации образцов MagNA Lyser Green Beads
 - Гомогенизатор (UltraTurrax или Omni TH 220)
 - пестик/ступка/иглолка (Ø 0.6 мм)
- Инструмент MagNA Pure LC
- Набор для выделения РНК из ткани MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue)
- Набор для выделения мРНК из ткани MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue)

2. Работа с данным продуктом

Меры предосторожности

- Лизирующий буферный раствор содержит соль гуанидина и дитиотреитол, являющиеся отравляющими веществами. Избегайте контакта с кожей, глазами, слизистой. При возникновении контакта промойте очаг контакта большим количеством воды. При распылении реагента, промойте водой перед тем как вытереть.
- Не допускайте смешивания лизирующего буфера с раствором гипохлорида соды, отбеливающими растворами или с сильными кислотами. Смешивание может продуцировать высокотоксичный газ.

Примечания

• Эффективное разрушение и гомогенизация образцов необходимо для выделения из ткани межклеточной РНК. Неполное разрушение ткани приведёт к значительно сокращённому выходу РНК.

• Путём гомогенизации тканевого лизата, геномная ДНК с высокой молекулярной массой и другие высокомолекулярные клеточные компоненты разделяются для сокращения вязкости лизата. Неполная гомогенизация приведёт к значительному сокращению выхода РНК и может вызвать засорение реакционных наконечников.

• В то время как одни методы разрушения одновременно гомогенизируют образец, другие требуют дополнительной ступени гомогенизации.

! Всегда приготавливайте свежий тканевой лизат и немедленно обрабатывайте. Если выделение РНК откладывается, то хранить лизат следует при -70°C или ниже.

- Для получения полной информации о стадии выделения и предвыделения РНК и мРНК, а также о специфических проблемах и неисправностях следует обратиться к инструкциям к наборам MagNa Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) - Набор для выделения тканевой РНК, MagNa Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue) - Набор для выделения тканевой мРНК.

В таблицах протокола, приведённого ниже, обратите внимание на необходимый объём лизирующего буферного раствора при работе с набором для выделения мРНК из ткани MagNa Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue), и при работе с набором для выделения РНК из ткани MagNa Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue).

Требования к образцам

Берётся от 1 до 10 мг свежзамороженного или размороженного, стабилизированного образца ткани.

! Обращайтесь со всеми образцами, как с потенциально инфекционно опасными.

Разрушение ткани при помощи инструмента MagNA Lyser

Таблица, приведённая ниже описывает разрушение и гомогенизацию свежзамороженной или фиксированной ткани при помощи инструмента MagNA Lyser.

• Поместите от 1 до 10 мг в пробирку для гомогенизации образцов, содержащую 300 мкл или 350 мкл лизирующего буферного раствора (соответственно протоколу инструкции).

• Настройте инструмент MagNA Lyser так, как это описано в руководстве оператора.

• Запустите цикл разрушения, применив установки скорости и времени соответственно специфичности вашего образца.

! Всегда оптимизируйте параметры распада ткани (скорость, время) прежде, чем осуществить процедуру очистки РНК. Недостаточный распад может привести к скудному выходу РНК, а чрезмерное разрушение РНК может вести к деградации РНК. Для первоначального старта используйте показатели для некоторых образцов представленные в таблице:

Материал	Скорость	Время
Печень/Почка	6500 rpm	50 сек
Селезёнка/опухолевая ткань/ фиксированная ткань	6500 rpm	2 × 50 сек#
Хвост/Ухо/Кожа	6500 rpm	2-3 × 50 сек#

! # Между циклами распада охладите образцы в течении 60-90 сек в охлаждающем блоке MagNA Lyser Rotor.

- 2 охладите образцы в течении 60-90 сек в охлаждающем блоке MagNA Lyser Rotor Cooling Block.
- инкубируйте образцы в течении 30 минут при комнатной температуре.

! Для избежания переноса вспененных во время процедуры гомогенизации образцов в инструмент MagNa Pure LC - в течении некоторого времени охладите пробирки (например, в охлаждающем блоке MagNA Lyser Rotor Cooling Block).

- 3 Центрифугируйте 2 минуты при комнатной температуре при 18 000 × g.

- 4 Действуйте соответственно одному из 2-х протоколов инструкций по выделению тканевой РНК - MagNa Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) или тканевой мРНК - MagNa Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue).

Разрушение ткани при помощи роторного гомогенизатора

Ниже описаны разрушение и гомогенизация свежзамороженной или фиксированной ткани при помощи роторного гомогенизатора (например, UltraTurrax or Omni TH 220).

- 1 Проводите лизирование и гомогенизацию ткани в роторном гомогенизаторе с 300 мкл или 350 мкл лизирующего буферного раствора для ткани, следуя инструкции прилагаемой к прибору и протоколу инструкции. В зависимости от типа образца роторный гомогенизатор полностью разрушает и гомогенизирует ткань за 5 - 90 секунд в присутствии лизирующего буферного раствора.

! Для избежания образования пены всегда держите наконечник гомогенизатора погруженным к одной стороне пробирки.

- 2 Инкубируйте образцы в течении 30 минут при комнатной температуре.

- 3 Центрифугируйте в течении 2-х минут при 18 000 × g при комнатной температуре.

- 4 Действуйте соответственно одному из 2-х протоколов инструкций по выделению тканевой РНК - MagNa Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) или тканевой мРНК - MagNa Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue).

Разрушение ткани при помощи ступки и пестика

Ниже описан распад и гомогенизация свежемороженой или фиксированной ткани, используя ступку и пестик.

- 1 • Тщательно измельчите от 1 до 10 мг ткани при помощи пестика и ступки в жидком азоте. Перенесите замороженный порошок в предварительно охлажденную центрифужную пробирку для микроцентрифугирования.
• Позвольте оставшемуся жидкому азоту испариться, но не допускайте оттаивания образца ткани.
• Добавьте 300 или 350 мкл лизирующего буферного раствора к образцу, затем гомогенизируйте путем пропускания образца несколько раз через иглу шприца (Ø 0.6 мм).
 - 2 Инкубируйте образцы в течении 30 минут при комнатной температуре.
 - 3 Центрифугируйте 2 минуты при комнатной температуре при 18 000 × g.
- Действуйте соответственно одному из 2-х протоколов инструкций по выделению тканевой РНК - MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) или тканевой мРНК - MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue).

3. Информация для заказа

Roche Applied Science предлагает большое количество реагентов и систем для научных исследований. Для получения полной информации по продукции посетите домашнюю страницу, www.roche-applied-science.com, или наши специальные сайты:

- Семейство систем MagNA Pure для автоматизированного выделения нуклеиновых кислот: <http://www.magnapure.com>
- Семейство систем LightCycler для реал-тайм и онлайн ПЦР: <http://www.lightcycler-online.com>

Продукт	Фасовка	Кат.№
Инструмент MagNA Pure LC	прибор с аксессуарами	12 236 931 001
Инструмент MagNA Lyser	1 прибор (220 V)	03 358 976 001
	1 прибор (110 V)	03 358 968 001
	плюс ротор и охлаждающий блок	
Зелёные шарики MagNA Lyser	100 пробирок	03 358 941 001
Набор для выделения тканевой РНК MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue)	1 набор (192 выделения)	03 330 591 001
Набор для выделения тканевой мРНК MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue)	1 набор (192 выделения)	03 172 627 001

Приобретение данных продуктов не предоставляет никаких лицензий или других прав для проведения ПЦР.

Торговые марки

LightCycler, MagNA Pure, и MagNA Lyser являются торговыми марками группы компаний Рош.

UltraTurrax является торговой маркой IKA Analysetechnik GmbH, Germany.

Omni TH220 является торговой маркой Süd-Laborbedarf GmbH, Germany.

RNAlater является торговой маркой Ambion Inc., USA.

Контакты и техническая поддержка

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 страницу Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com, и выберите страну. Появится контактная информация для выбранной Вами страны. С помощью функции выбора продукта вы можете найти инструкции и данные по безопасности для каждого продукта.



Roche Applied Science

Germany

C



Набор реагентов для общего выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure 24

у Версия 01

Версия документа: январь 2017

Расфасованные реагенты для работы с прибором MagNA Pure 24 (Кат. № 07 290 519 001) для выделения геномной ДНК и нуклеиновых кислот вирусов из образцов цельной крови, плазмы, сыворотки объемом до 1000 мкл, образцов свежемороженой ткани массой до 5 мг и культуральных клеток в количестве до 1×10^6 , а также для выделения нуклеиновых кислот бактерий, грибов и вирусов из человеческих образцов объемом до 1000 мкл и свободно циркулирующих нуклеиновых кислот человека из образцов плазмы объемом до 4000 мкл.

I 07 658 036 001

Набор до 96 выделений (200 мкл)

Г Хранить при температуре от +15 до +25°C

N Не допускать попадания прямых солнечных лучей.

N Не допускать контакта с магнитами.

www.lifescience.roche.com

1.	НАЗНАЧЕНИЕ	3
2.	ОПИСАНИЕ НАБОРА	3
3.	ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ	3
4.	РЕАГЕНТЫ	4
4.1	Число выделений	4
4.2	Входящие в состав набора материалы	4
5.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ	6
5.1	Меры предосторожности	6
5.2	Правила работы с реагентами	6
5.3	Надежная лабораторная практика	7
5.4	Утилизация отходов	8
6.	ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ НАБОРА	9
6.1	Набор и реагенты	9
6.2	Сбор и хранение образцов	9
6.3	Хранение выделенных нуклеиновых кислот и элюатов	10
7.	МАТЕРИАЛЫ	11
7.1	Необходимые материалы и оборудование, не входящие в состав набора	11
7.2	Дополнительные материалы	11
8.	ПРОЦЕДУРЫ	13
8.1	Протоколы выделения	13
8.2	Типы образцов и процедуры предварительной обработки	15
8.3	Процедура выделения	21
8.4	Завершение постановки	22
8.5	Контроль качества	23
9.	ОГРАНИЧЕНИЯ И ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ	24
10.	ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	25
10.1	Символы	25
10.2	Изменения относительно предыдущей версии	25
11.	ТОРГОВЫЕ МАРКИ	26
12.	ОГРАНИЧЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ	26
13.	ЛИТЕРАТУРА	26

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Система MagNA Pure 24 является автоматизированной системой для выделения нуклеиновых кислот и состоит из прибора MagNA Pure 24, программного обеспечения, расходных материалов и реагентов. Система MagNA Pure 24 предназначена для профессионального выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов для задач диагностики *in vitro*.

Набор MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit предназначен для работы с системой MagNA Pure 24.

2. ОПИСАНИЕ НАБОРА

Набор MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit предназначен для выделения нуклеиновых кислот (НК) из образцов разных типов и разного объема, как указано в таблице ниже.

Выделяемый материал	Тип образцов
Геномная ДНК	• 200, 500 или 1000 мкл цельной крови • до 1×10^6 культуральных клеток • до 5 мг свежемороженой ткани
НК бактерий, грибов, вирусов	200, 500 или 1000 мкл плазмы, сыворотки, цельной крови и других образцов человеческого происхождения
Внеклеточные НК человека	2000 или 4000 мкл плазмы

Выделенные и очищенные нуклеиновые кислоты соответствуют стандартам качества, необходимым для высокочувствительного количественного анализа в ПЦР/ОТ-ПЦР и секвенирования нового поколения (NGS).

3. ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Процедура выделения нуклеиновых кислот основана на проверенной технологии магнитных стеклянных частиц (MGP) MagNA Pure.

Процедура выделения состоит из следующих основных этапов:

1. Образец лизируется, НК освобождаются, нуклеазы денатурируют.
2. НК связываются со стеклянной поверхностью вносимых MGP в присутствии хаотропных солей и высокой ионной силы лизирующего/связывающего буфера.
3. MGP со связавшимися НК отделяются магнитом из лизированного образца.
4. Несвязавшиеся вещества, такие как белки, клеточный лембис и ингибиторы ПЦР удаляются несколькими этапами отмывки.
5. Очищенные НК элюируют с MGP.

РЕАГЕНТЫ

4. РЕАГЕНТЫ

Набор предназначен для проведения до 96 выделений нуклеиновых кислот, в зависимости от объема образцов.

4.1 Число выделений

Число выделений	Материал образцов
3 x 32 выделения	Маленький объем: До 200 мкл плазмы, сыворотки, цельной крови и других материалов человеческого происхождения, до 5×10^5 культуральных клеток и до 5 мг свежемороженой ткани.
3 x 24 выделения	Большой объем: 500 мкл или 1000 мкл плазмы, сыворотки, цельной крови и других материалов человеческого происхождения, до 1×10^6 культуральных клеток.
3 x 24 выделения	Экстра-большой объем: 2000 мкл или 4000 мкл плазмы. 1. Для выделения образцов экстра-большого объема необходимы дополнительные реагенты.

4.2 Входящие в состав набора материалы

В состав набора входят три кассеты с реагентами (каждая содержит по 6 контейнеров с реагентами) и 12 пробирок MGP. Все компоненты набора готовы к использованию.

3 кассеты с реагентами	Содержимое/функция	Состав
Контейнер 1	• Промывочный буфер I • Для удаления примесей	70 мл Гуанидин хлорид, этанол, Трис-HCl
Контейнер 2	• Протеиназа К • Для расщепления белков	10 мл протеиназа К, глицерин
Контейнер 3	• Лизирующий буфер • Для лизиса клеток/патогенов и связывания нуклеиновых кислот	30 мл Гуанидин тиоцианат, полимоксагол, Трис-HCl

РЕАГЕНТЫ

Контейнер 4	• Промывочный буфер II 34 мл • Для удаления примесей	Этанол, Na-ацетат
Контейнер 5	• Буфер для элюции • Для элюции нуклеиновых кислот	15 мл Трис-HCl
Контейнер 6	• Промывочный буфер III 60 мл • Для удаления примесей	Na-ацетат
12 MGP пробирки	• Магнитные стеклянные частицы • Для связывания нуклеиновых кислот.	1.9 мл Магнитные стеклянные частицы, изопропанол

N Не вынимайте отдельные контейнеры с реагентами из кассет. Данные о маркировке безопасности приведены в документе о безопасности материалов (SDS).



Рис. 1: Кассета с реагентами, содержащая контейнеры с 1 по 6

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

5.1 Меры предосторожности

- Все материалы человеческого происхождения и все связанные с ними отходы должны рассматриваться как инфекционные и требующие соблюдения процедур надлежащей лабораторной практики, описанных в правилах "Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях" и в документе CLSI M29-A4¹⁾ 2).
- Только персонал, обученный работе с инфекционными материалами и работе с Системой MagNA Pure 24, может выполнять процедуры, описанные в данной Инструкции.
- Поскольку чувствительность и концентрация потенциальных патогенов в материале образца могут варьировать, пользователь должен самостоятельно оптимизировать инактивацию патогенов и соблюдать необходимые меры в соответствии с местными правилами безопасности.
- Внимательно следуйте процедурам и рекомендациям, приведенным в данной Инструкции, для правильного проведения выделения нуклеиновых кислот. Любое отклонение от инструкции может отрицательно сказаться на результатах выделения.
- Используйте только реагенты, входящие в состав набора, и буферы, рекомендованные в данной Инструкции. Замена на другие реагенты может привести к контаминации РНКазы.
- Для оптимальных результатов выделения нуклеиновых кислот используйте только входящие в состав набора или рекомендованные расходные материалы.

5.2 Правила работы с реагентами

- Несколько буферов в составе набора MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit содержат опасные компоненты. Не допускайте попадания реагентов на кожу, в глаза или на слизистые. Если произошло попадание, промойте пораженный участок большим количеством воды. В случае пролива реагента разведите пролитый реагент водой и только потом вытирайте.
- Не допускайте контакт реагентов, содержащих гуанидин тиоцианат (лизирующий буфер), с раствором гипохлорита натрия (хлорный отбеливатель) или кислотами. Такие смеси приводят к выделению высокотоксичного газа. Данная мера предосторожности особенно важна при очистке адаптера станции для выделения, емкости для жидких отходов, контейнера для сброса наконечников и парковочного блока для

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

наконечников. Более подробные сведения об очистке приведены в Инструкции пользователя Системы MagNA Pure 24.

- Перед началом работы осмотрите кассеты с реагентами на предмет отсутствия протечек. При признаках протечки не используйте такую кассету для выделения нуклеиновых кислот.
- Не допускайте микробной и нуклеазной контаминации открытых реагентов.

5.3 Надлежащая лабораторная практика

- При работе с образцами и реагентами используйте перчатки, лабораторный халат и защитные очки. Для предотвращения контаминации необходимо менять перчатки после работы с образцами, прежде чем начать работу с реагентами.
- Ложноположительные результаты могут возникать в результате отсутствия контроля за контаминацией образцов на преаналитическом этапе и в процессе пробоподготовки.
- Не есть, не пить и не курить в рабочих помещениях лаборатории.
- Не пипетировать ртом.
- Мойте руки тщательно после работы с образцами и реагентами, и после снятия перчаток.

Контаминация РНКазми реагентов и реакционных сосудов приводит к разрушению РНК. Следуйте приведенным ниже правилам для сведения к минимуму риска контаминации РНКазми:

- Не касайтесь поверхностей и материалов, могущих послужить источником РНКаз.
- Сбрасывайте наконечники в закрытые контейнеры, чтобы не допустить аэрозольную контаминацию.
- Проводите очистку, дезинфекцию и деконтаминацию всех рабочих поверхностей и приборов, включая дозаторы, с использованием соответствующих коммерчески доступных реагентов.
- Работайте в специальной зоне, предназначенной для работы с РНК. По возможности используйте емкости и дозаторы, предназначенные только для работы с РНК.
- В случае пролива в приборе следуйте инструкциям, приведенным в Инструкции пользователя Системы MagNA Pure 24.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

5.4 Утилизация отходов

- Документ о безопасности материалов (SDS) доступен онлайн: www.dialog.roche.com или по запросу в региональном офисе Roche.
- Утилизируйте все материалы, имевшие контакт с образцами и реагентами, в соответствии с государственными, региональными и местными правилами.
- При утилизации образцов и реагентов из набора работайте в перчатках, лабораторном халате и защитных очках.
- При утилизации реагентов из контейнеров следуйте следующей процедуре:
 1. Проколите фольгу в углу одного контейнера в кассете с реагентами твердым пластиковым предметом, например, серологической пипеткой.
 2. Отогните фольгу и вылейте жидкость в контейнер для отходов.
 3. Повторите этапы 1 и 2, пока не удалите содержимое из всех контейнеров.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ НАБОРА

6.1 Набор и реагенты

- Набор транспортируется при комнатной температуре.
- Храните набор защищенным от воздействия прямых солнечных лучей и магнитов.

Кассеты с реагентами

- При температуре +15 - +25°C неоткрытые кассеты с реагентами стабильны до истечения срока годности, указанного на маркировке.
- Кассеты с реагентами можно хранить до 12 часов при +15 - +25°C в приборе после прокалывания их защитной пленки.
- Одна кассета с реагентами может использоваться до 6 постановок в одном приборе в течение 28 дней. Для хранения заклейте кассету с реагентами пленкой для заклеивания кассет с реагентами MagNA Pure. Храните заклеенные кассеты с реагентами при +2 - +8°C в вертикальном положении. Перед началом работы дайте кассетам нагреться при +15 - +25°C в течение 60 минут.
- N Повторно использовать кассету с реагентами можно только в одном и том же приборе. Программное обеспечение прибора отслеживает использование расходных материалов по их штрих-кодам, и распознает частично использованные кассеты с реагентами для обеспечения правильной работы в следующей постановке.
- N Если частично использованная кассета с реагентами была неправильно заклеена или хранилась дольше 28 дней, испарение реагентов может отрицательно сказаться на результатах выделения нуклеиновых кислот.
- N При хранении или перемещении ранее открытых кассет с реагентами не наклоняйте их, чтобы не пролить содержимое.

Пробирки MGP

- При температуре +15 - +25°C пробирки MGP стабильны до истечения срока годности, указанного на маркировке. Пробирки MGP предназначены только для однократного использования.
- После тщательного перемешивания пробирки MGP могут стоять открытыми в приборе не более 1 часа до начала постановки.

6.2 Сбор и хранение образцов

Для чувствительной детекции нуклеиновых кислот крайне важно правильно хранить образцы. На стабильности образцов сказываются повышенные температуры. Проводите оттаивание образцов при легком помешивании, например, на лабораторном роллере.

- N Проводите валидацию условий хранения (температура, время) образцов каждого типа по индивидуальным параметрам IVD.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ НАБОРА

- N Не храните образцы в заклеенных картриджах для выделения.
- N Не используйте плазму или кровь, содержащую гепарин, так как это может негативно сказаться на результатах последующих тестов.

6.3 Хранение выделенных нуклеиновых кислот и элюатов

Для получения оптимальных результатов переходите сразу к последующим процедурам по анализу НК.

- N Не храните элюаты в приборе.
- N Проводите валидацию условий хранения элюатов (температура, время) по индивидуальным параметрам IVD.
- N При хранении элюатов в стрипованных пробирках соблюдайте осторожность при снятии стрипованных крышек, чтобы не допустить перекрестной контаминации. По этой же причине, если нужно повторно закрыть стрипованные пробирки, используйте новый стрип крышек.
- N Если элюаты хранились замороженными, осторожно перемешайте их пипетированием десять раз после оттаивания, прежде чем использовать для последующих задач, таких как ПЦР/ОТ-ПЦР или измерение ОП. Объем перемешивания должен составлять не менее половины от объема элюата. Если не выполнить перемешивание нуклеиновых кислот для их равномерного/гомогенного распределения в растворе, результаты последующих тестов могут быть невоспроизводимыми.

7. МАТЕРИАЛЫ

7.1 Необходимые материалы и оборудование, не входящие в состав набора

Материалы/оборудование	Описание	Кат. номер
Прибор MagNA Pure 24 для выделения и очистки нуклеиновых кислот, с принадлежностями	прибор	07 290 519 001
Картридж для выделения MagNA Pure 24	картридж для выделения	07 345 577 001
Штатив парковки наконечников и устройство прокалывающее MagNA Pure 24	Штатив для хранения наконечников и инструмент для прокалывания заклеенных контейнеров с реагентами	07 345 585 001
Инструмент для прокалывания заклеенных контейнеров с реагентами MagNA Pure 24	Инструмент для прокалывания заклеенных контейнеров с реагентами	07 534 205 001
Наконечник MagNA Pure, 1000 мкл	наконечник дозатора на 1000 мкл	06 241 620 001
Пробирки для образцов MagNA Pure, 2,0 мл	пробирка объемом 2,0 мл	07 857 551 001
Пленка заклеивающая MagNA Pure	заклеивающая пленка	06 241 638 001
Пробирки с плоскими крышками низкопрофильные FrameStrip [®]	стрип из 8 пробирок (низких) стрип из 8 крышек	07 345 593 001
Пробирки с плоскими крышками высокопрофильные FrameStrip [®]	стрип из 8 пробирок (высоких) стрип из 8 крышек	07 652 275 001

- Стандартное лабораторное оборудование: Дозаторы и свободные он нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером.

7.2 Дополнительные материалы

Материалы	Назначение	Кат. номер
Магнитные частицы MagNA Pure 24 MCP Set	Для дополнительных выделений НК из образцов малого, большого и экстра-большого объемов.	07 806 361 001

МАТЕРИАЛЫ

Материалы	Назначение	Каталожный номер
Набор буферов для выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure	Для выделения свободно циркулирующих НК из образцов плазмы.	07 794 398 001
Лизирующий/связывающий буферный раствор для общего выделения НК MagNA Pure LC	Для протоколов с внешним лизисом.	03 246 779 001
Буфер для лизиса бактерий MagNA Pure	Для выделения НК бактерий, грибов, вирусов.	04 639 180 001
Буфер для лизиса тканей MagNA Pure	Для выделения НК из образцов сенсибилизированной ткани.	04 805 160 001
Протектин К Активность (+37°C) 5 0,6 Е/мл	Для разрушения белков.	03 115 828 001
Буфер для выделения нуклеиновых кислот из образцов стула S.T.A.R.	Для стабилизации, транспортировки и выделения НК из образцов стула.	03 315 208 001
Прибор MagNA Lyser	Для гомогенизации тканей.	03 358 968 001 для SN 40467540 03 358 976 001 для SN 40405218
Пробирки для гомогенизации образцов MagNA Lyser	Для гомогенизации тканей.	03 358 941 001

• Фосфатно-солевой буфер (PBS) для разведения образцов и для предварительной обработки образцов.

8. ПРОЦЕДУРЫ

8.1 Протоколы выделения

Используйте для выделения нуклеиновых кислот разные протоколы, оптимизированные для определенных типов образцов.

Выбранный протокол можно использовать только для соответствующих типов образцов. Выделение нуклеиновых кислот из образцов других типов может привести к неадекватным результатам. Неправильный выбор протоколов может привести к снижению и потере MGP, перекрестной контаминации образцов или даже к повреждению прибора. Объединение образцов разных типов в одной постановке возможно, только если оно указано. Всегда выполняйте рекомендованные процедуры предварительной обработки образцов.

Название протокола	Мишень	Тип образца ¹⁾	Объем элюата [мкл] ²⁾
Протоколы для образцов небольшого объема			
Pathogen 200 ³⁾	НК бактерий, грибов и вирусов	200 мкл плазмы, сыворотки, цельной крови и других человеческих образцов. Если объем образца меньше 200 мкл, разведите его PBS.	50, 100
hgDNA 200	Геномная ДНК	200 мкл цельной крови (2×10^6 белых клеток крови), до 5×10^6 культуральных клеток, до 5 мг сывязимороженной ткани. Если объем образца меньше 200 мкл, разведите его PBS.	50, 100
Fast hgDNA 200 ⁴⁾	Геномная ДНК	200 мкл цельной крови (2×10^6 белых клеток крови), до 5×10^6 культуральных клеток. Если объем образца меньше 200 мкл, разведите его PBS.	50, 100
Протоколы для образцов большого объема			
Pathogen 1000 ³⁾	НК бактерий, грибов и вирусов	500 мкл или 1000 мкл плазмы, сыворотки, цельной крови и других человеческих образцов.	50, 100

ПРОЦЕДУРЫ

Название протокола	Материал	Тип образца	Объем элюата (мкл)
hgDNA 1000	Геномная ДНК	500 мкл цельной крови (5×10^6 белых клеток крови) или 1000 мкл цельной крови (8×10^6 белых клеток крови), до 1×10^6 культуральных клеток	100, 200 L При выделении из культуральных клеток с высоким содержанием ДНК, элюируйте в 200 мкл.

Протоколы для образцов экзотра-большого объема

cfNA ss 2000	Свободно циркулирующие бесклеточные НК, в основном одноцепочечная ДНК	2000 мкл плазмы ¹⁾	50, 100
cfNA ss 4000	Свободно циркулирующие бесклеточные НК, в основном одноцепочечная ДНК	4000 мкл плазмы ¹⁾	50, 100
cfNA ds 2000	Свободно циркулирующие бесклеточные НК, в основном двуцепочечная ДНК	2000 мкл плазмы ¹⁾	100, 150, 200
cfNA ds 4000	Свободно циркулирующие бесклеточные НК, в основном одноцепочечная ДНК	4000 мкл плазмы ¹⁾	100, 150, 200

¹⁾ Объем образца/лигата, вносимый вручную в картридж, должен точно соответствовать объему образца, указанному в настройках постановки.

²⁾ Концентрацию нуклеиновых кислот в элюате и, соответственно, чувствительность последующих тестов, можно повысить за счет уменьшения объема элюата. Однако эффективность элюции и общий выход после очистки могут снизиться по сравнению с большим объемом элюата.

³⁾ Протоколы RocheGen предназначены для выделения нуклеиновых кислот бактерий, грибов и вирусов из человеческих образцов разных типов. Для этих протоколов указанный объем может соответствовать объему образца или объему элюата.

⁴⁾ Плазма из пробирок для сбора крови Roche Cell-free DNA, K2-EDTA или Streck Cell Free DNA BCT.

⁵⁾ Протокол Fast hgDNA 200 предназначен для выделения нуклеиновых кислот только из 8 образцов.

8.2 Типы образцов и процедуры предварительной обработки

Чтобы получить оптимальные результаты в последующих тестах, в ОТ-ПЦР в реальном времени, например, в приборах LightCycler[®], не используйте образцы большего объема, чем указано для выбранного протокола. Несоблюдение этого правила может негативно отразиться на процессе выделения, и может привести к слипанию и потере MGP, перекрестной контаминации образцов, и даже к повреждению прибора.

- | | |
|---|---|
| I. Цельная кровь | <p>Для свежих или замороженных образцов цельной крови не требуется предварительная обработка.</p> <p>N Если содержание белых клеток крови больше 8×10^6 клеток/мл, сначала разведите цельную кровь PBS, чтобы не допустить слипания MGP</p> <p>N Убедитесь, что в образцах цельной крови с антикоагулянтами нет сгустков.</p> |
| II. Плазма/сыворотка | <p>Для свежих или замороженных образцов плазмы или сыворотки не требуется предварительная обработка, за исключением протоколов cfNA.</p> <p>N Если в образцах образовался осадок, центрифугируйте их 5 - 10 минут при $1900 \times g$; данный этап центрифугирования рекомендуется для протоколов cfNA. В качестве образца используйте супернатант.</p> |
| III. Образцы разных типов и лизаты для тестирования патогенов. | <p>Лизис патогенов проводится в человеческих образцах разных типов. Образцы следующих типов могут использоваться для выделения по протоколам Pathogen 200 и Pathogen 1000:</p> <p>Моча, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), мокрота, спинномозговая жидкость (СМЖ), мазки, стул, цельная кровь с ЭДТА, плазма с ЭДТА или цитратом, сыворотка, бактериальные культуры.</p> <p>N Из-за большого разнообразия возможных образцов, единая стандартная процедура отсутствует. Предварительная обработка полужидких образцов (БАЛ, мокрота, стул и т.п.) для выделения нуклеиновых кислот зависит от типа образца, его вязкости, типа частиц и их содержания.</p> <p>N Любой тип образца для данной процедуры выделения и последующего тестирования нуклеиновых кислот IVD должен пройти валидацию по индивидуальным параметрам IVD.</p> <p>N Не используйте исходные образцы объемом 1000 мкл для очень вязких или содержащих много клеток образцов, таких как мокрота или стул.</p> <p>L В зависимости от вязкости образца, типа и содержания частиц, образцы могут использоваться без предварительной обработки.</p> |

ПРОЦЕДУРЫ

Протокол лизиса с буфером MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (BLB)

а Разжижение

1. Разжижение рекомендуется для очень вязких образцов, таких как мокрота, и является обязательным этапом при выделении нуклеиновых кислот из образцов БАЛ.
- Приготовьте свежий стоковый раствор DTT (дитиотрейтол) (например, 5× конц. = 0,75%).
- Доведите конечную концентрацию DTT в образце до 0,15%, добавив в него стоковый раствор DTT.
- Инкубируйте образец на шейкере при 850 об/мин в течение 30 мин при +37°C, пока он не станет легко пипетироваться.

б Внесение буфера для лизиса бактерий (BLB)

- Внесите нужный объем образца в чистую 1,5 мл пробирку. Предварительно смешайте нужные объемы BLB и протеиназы К. Внесите смесь в образец.

Протокол	Pathogen 200	Pathogen 1000
Объем образца	100	250 500
BLB	100	250 500
Протеиназа К	20	50 100
Смесь BLB/ПК	120	300 600

- Тщательно перемешайте на вортексе.
- Инкубируйте на шейкере при 450 об/мин в течение 10 мин при +65°C.

в Предварительная инкубация при +95°C для сложных образцов

Чтобы инактивировать патогены и усилить лизис клеток для некоторых типов бактерий в сложных образцах, таких как мокрота или стул, инкубацию проводят при +95°C. Чтобы предотвратить вытекание образцов, используйте пробирки с закрывающимися крышками.

- Инкубируйте образцы при +95°C в течение 10 мин.
- 1. Для выделения РНК не выполняйте инкубацию при +95°C, так как она может негативно сказаться на целостности РНК.
- Охладите образцы на льду. Центрифугируйте образцы быстро, чтобы осадить весь объем на дне пробирки.
- Перенесите указанный объем лизата в картридж для выделения.

Протокол	Pathogen 200	Pathogen 1000
Лизат, вносимый в картридж [мкл]	200	500 1000

Предварительная обработка образцов стула

- a Возьмите образец стула размером с горошину и растворите его в 550 мкл PBS.
- L Чтобы не допустить забивания наконечника дозатора твердыми частицами, центрифугируйте образец 5 сск при 500 × g.
 - L Для выделения вирусной РНК, в качестве альтернативы, используйте смесь PBS/буфера STAR (смесь 1:1) для получения суспензии образца стула. Это может снизить риск ингибирования последующих реакций.
- b Перенесите нужный объем супернатанта в чистую 1,5 мл пробирку.
- c Предварительно смешайте нужные объемы BLB и протеиназы К, и внесите данную смесь в пробирку на 1,5 мл с образцом.

Протокол	Pathogen 200	Pathogen 1000
Супернатант [мкл]	100	250
BLB [мкл]	100	250
Протеиназа К [мкл]	20	50
Смесь BLB/ПК [мкл]	120	300

- d Тщательно перемешайте на вортексе. Инкубируйте 10 мин при +65°C на шейкере при 850 об/мин, затем 10 мин инкубируйте при +95°C.
- N Для выделения РНК не выполняйте инкубацию при +95°C, так как она может негативно сказаться на целостности РНК.
- e Перенесите указанный объем лизата в картридж для выделения.

Протокол	Pathogen 200	Pathogen 1000
Лизат, вносимый в картридж [мкл]	200	500

Предварительная обработка мазков

- a Замочите сухой мазок в необходимом объеме смеси буфера BLB и протеиназы К.

Протокол	Pathogen 200	Pathogen 1000
BLB [мкл]	200*	500* 1000*
Протеиназа К [мкл]	20	50 100
Смесь BLB/ПК [мкл]	220	550 1100

ПРОЦЕДУРЫ

* Для мазков в транспортной среде используйте только половину объема буфера BLB, вторую половину объема должен составить образец в транспортной среде; конечный объем должен соответствовать объему, указанному в таблице. Предварительно смешайте буфер BLB без образца с нужным объемом протенины К, и внесите полученную смесь в образец, находящийся в транспортной среде.

b	Выжмите и удалите мазок.
c	Тщательно перемешайте на вортексе. Инкубируйте жидкий образец 10 мин при +65°C на шейкере при 850 об/мин, затем 10 мин инкубируйте при +95°C. N Для выделения РНК не выполняйте инкубацию при +95°C, так как она может негативно сказаться на целостности РНК.
d	Охладите образцы на льду. Центрифугируйте образцы быстро, чтобы осадить весь объем на дне пробирки.
e	Перенесите указанный объем лизата в картридж для выделения.

Протокол	Pathogen 200	Pathogen 1000
Лизат, вносимый в картридж [мкл]	200	500 или 1000

IV. Клеточные культуры

Используйте культуральные клетки, растворенные в фосфатно-солевом буфере (PBS), для выделения нуклеиновых кислот с помощью протоколов hgDNA 200 и hgDNA 1000.

a	Для выделения ДНК из суспензионных клеточных культур, осадите клетки центрифугированием при 300 × g в течение 5 мин. При необходимости промойте PBS осадок клеток. L Клеточный осадок можно хранить при -15 - -25°C в течение нескольких недель.
b	Удалите культуральную жидкость (или PBS) и растворите клетки в холодном PBS пипетированием или встряхиванием пробирки до полного перемешивания осадка.
c	Перенесите нужный объем суспензии в картридж для выделения. N Для протокола hgDNA 200 не используйте более 5 × 10 ⁶ клеток/200 мкл. Для протокола hgDNA 1000 не используйте более 1 × 10 ⁶ клеток. Превышение этого количества может привести к неадекватным результатам.

ПРОЦЕДУРЫ

V. Свежезамороженная ткань Используйте до 5 мг гомогенизированной свежемороженой ткани для выделения нуклеиновых кислот с помощью протокола hgDNA 200.

Гомогенизация ткани с помощью протеиназы K для образцов SV

- a Внесите до 5 мг образца ткани в пробирку объемом 1,5 мл.
- b Внесите 180 мкл буфера для лизиса тканей MagNA Pure 96 и 20 мкл протеиназы K в образец ткани.
- c Инкубируйте при +55°C до полного растворения ткани (обычно от 3 часов до ночной инкубации).
 - L Данный метод гомогенизации дает высокий выход нефрагментированной ДНК.
- d Перенесите нужный объем лизата в картридж для выделения.
- e Если в данный момент выделение не требуется, лизат можно хранить при -80 - -20°C.

Гомогенизация ткани с помощью прибора MagNA Lyser

- a Внесите до 5 мг образца ткани в пробирку для гомогенизации образцов MagNA Lyser.
- b Внесите 200 мкл буфера для лизиса тканей MagNA Pure 96.
- c Гомогенизируйте ткань в приборе MagNA Lyser в течение 30 - 40 сек. Если гомогенизация оказалась не полной, повторите этот этап. Подробные сведения приведены в Руководстве пользователя прибора MagNA Lyser.
 - L Это быстрый метод, однако из-за механических разрывов часть ДНК может быть фрагментированной.
- d Перенесите нужный объем лизата в картридж для выделения.

ПРОЦЕДУРЫ

VI. Плазма для внеклеточных нуклеиновых кислот

Для выделения свободно циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот (сцНК) используйте набор буферов для выделения внеклеточных нуклеиновых кислот MagNA Pure.

- L Перед выделением сцНК, центрифугируйте образец от 5 до 10 мин при 1000 - 1900 x g. Не захватите осадок при отборе образца.
- N Избегайте образования пены/пузырей на всех этапах пипетирования.

Протокол	сfNA ss 2000 сfNA ds 2000	сfNA ss 4000 сfNA ds 4000
Протеиназа К [мкл]	200	400
CELB [мкл]	1750	3500
IPA [мкл]	300	600
Смесь буферов для сцНК (CELB + IPA) [мкл]	2050	4100

- a В чистую пробирку, совместимую со штативом для образцов MagNA Pure 24, внесите нужное количество протеиназы К. Внесите образец в пробирку с протеиназой К, осторожно перемешайте и инкубируйте при +37°C в течение 20 мин.
- b В соответствии с числом образцов, приготовьте смесь буферов для сцНК, смешав буфер Cell-Free Nucleic Acid Enhancement Buffer (CELB) и изопропанол (IPA), в таком порядке, в емкости подходящего объема. Закройте емкость и перемешайте переворачиванием. Раствор стабилен не более 2 часов.
- c Внесите необходимое количество смеси буферов для сцНК в каждый образец:
2000 мкл смеси буферов для сцНК в образец объемом 2000 мкл или
4000 мкл смеси буферов для сцНК в образец объемом 4000 мкл.
Тщательно перемешайте пипетированием около 8 раз, чтобы получить гомогенную смесь.
N Не храните лизат.
L В случае образования пузырей их можно удалить наконечником или, закрыв пробирки, центрифугировать их при 2000 x g в течение 1 мин.
- d Поместите пробирки в штатив для образцов. Загрузите штатив с образцами в прибор.

8.3 Процедура выделения

Прибор MagNA Pure 24 позволяет одновременно выделять до 24 образцов. Подробные инструкции по работе с прибором приведены в Инструкции пользователя прибора MagNA Pure 24.

- N Обязанностью пользователя является валидация рабочих характеристик системы для любых процедур, проводимых в лаборатории.
- N При перемешивании первичных пробирок, содержащих образцы, избегайте образования пены/пузырей перед загрузкой образцов в прибор.
- N Образцы на водной основе, например нуклеиновые кислоты, растворенные в воде или других жидкостях без биологического буфера, могут дать низкий выход при очистке. В образцы на водной основе рекомендуется добавлять 10x PBS до конечной концентрации 1x PBS.
- N Если кассеты с реагентами хранились при температуре ниже +15°C, дайте им нагреться перед началом работы при температуре +15 - +25°C не менее одного часа.
- N В одной постановке выделения можно использовать две кассеты с реагентами, одной или разных серий.
- N Убедитесь, что все контейнеры полностью вставлены в кассету для реагентов, прежде чем разместить их на загрузочной платформе.
- N Прежде чем разместить пробирки MGP на панели прибора, перемешайте каждую пробирку на вортексе в течение 60 сек. Аккуратно загрузите открытые пробирки MGP на панель прибора непосредственно перед запуском постановки. В случае пролива замените пробирки MGP.
- N Все предметы загружают в прибор без крышек: пробирки с образцами, пробирки MGP, пробирки с внутренним контролем и расходные материалы для элюатов.

ПРОЦЕДУРЫ

8.4 Завершение постановки

После завершения постановки немедленно выньте из прибора пробирки с элюатами.

- L После того как вы откроете крышку прибора, охлаждение элюатов прекратится.
- L Незначительное количество магнитных частиц в элюатах не окажет влияния на проведение ПЦР или ОТ-ПЦР в приборах LightCycler® или обычных термоблокаторах. Если требуется полное извлечение магнитных частиц, поместите пробирки/стрипы с элюатами на магнитную платформу, прежде чем отобрать элюат.

Не превышайте лимит времени для кассеты с реагентами; выгрузите кассету с реагентами осторожно, чтобы избежать утечки. Заклейте кассету с реагентами клейкой пленкой. Для дальнейшего использования храните частично использованные кассеты с реагентами при +2 - +8°C в вертикальном положении.

Завершите выгрузку прибора, следуя инструкциям навигатора.

- N Пробирки MGR предназначены только для однократного использования и должны утилизироваться после каждой постановки, даже если они использованы не полностью.

Утилизируйте твердые и жидкие отходы в соответствии с местными правилами.

Внимательно осмотрите прибор на наличие каких-либо признаков разрыва. Если произошел пролив, очистите прибор, как описано в Инструкции пользователя Системы MagNA Pure 24.

Проведите очистку и деkontamination всех комплектующих, как описано в Инструкции пользователя Системы MagNA Pure 24.

- N Не допускайте контакт реагентов, содержащих гуанидин тиоцианат (лизирнующий буфер) с раствором гипохлорита натрия (хлорный отбеливатель) или с кислотами. Такая смесь может привести к выделению высокотоксичного газа. Подробные сведения об очистке и обслуживании прибора приведены в Инструкции пользователя Системы MagNA Pure 24.

8.5 Контроль качества

N Всегда используйте необходимые контроли.

Для контроля за всем процессом, от пробоподготовки до анализа, используйте следующие контроли:

- Положительный контроль - образец, положительный по мишени теста.
- Отрицательный контроль - образец, отрицательный по мишени теста
- Внутренний контроль (ВК) - определенное количество контрольной мишени, внесенной во все выделяемые образцы. ВК вносят перед этапом выделения, он выделяется вместе с мишенью и затем, например, амплифицируется вместе с мишенью в одной реакции ПЦР. Для приложений, связанных с риском получения ложноотрицательного результата, применение внутреннего контроля является обязательным.

Внутренние контроли

Прибор способен автоматически вносить внутренний контроль (ВК) в каждый образец в процессе выделения. Объем внутреннего контроля фиксирован и должен составлять 20 мкл на образец. В одной постановке могут использоваться не более двух разных ВК; в каждый образец можно вносить только 1 ВК. Чтобы воспользоваться данной функцией, выберите внутренний контроль в общих настройках постановки. Необходимое количество ВК будет рассчитано программой и отобразится в настройках постановки на экране *Overview*. Внесите указанный объем внутреннего контроля в штрих-кодированную пробирку объемом 2 мл и загрузите пробирку в соответствующие позиции штатива для реагентов.

L Из-за механических ограничений требуемый объем внутреннего контроля выше, чем просто количество образцов, умноженное на 20 мкл.

N Для протоколов для сцДНК (например, для образцов объемом 2000 мкл и 4000 мкл), внутренний контроль вносят вручную в приготовленный лизат. Обратите внимание, что функция ВК у прибора доступна, но не включена.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ И ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

1. Набор MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit валидирован только для работы с системой MagNA Pure 24.
 2. Надежные результаты зависят от надлежащей процедуры сбора, транспортировки, хранения и обработки образцов.
 3. Набор MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit валидирован только для типов клинических образцов, перечисленных в данной Инструкции. Выделение нуклеиновых кислот из образцов других типов может привести к получению неадекватных результатов.
 4. Выбирайте протоколы выделения, соответствующие используемым образцам. Любое отклонение от этого правила может привести к получению неадекватных результатов.
 5. С данным продуктом может работать только персонал, обученный выделению нуклеиновых кислот. Любая процедура IVD с использованием пробоподготовки и последующим тестированием нуклеиновых кислот IVD должна пройти валидацию по индивидуальным параметрам IVD.
 6. Для сведения к минимуму риска отрицательного влияния на результаты, необходимо использовать адекватные контроли для последующих реакций и тестов.
- GTN**
7. Условия хранения (температура, продолжительность) образцов, лизатов, осадков культуральных клеток и элюатов должны пройти валидацию по индивидуальным параметрам IVD.
 8. Определенные характеристики теста должны быть определены пользователем, особенно если это касается последующего применения выделенных нуклеиновых кислот. Любой результат необходимо интерпретировать в контексте соответствующих клинических и лабораторных данных. Поскольку концентрация аналита может значительно варьировать в зависимости от типа клинического образца, рекомендуется провести проверку защищенности от перекрестных контаминаций. Например, разместить в шахматном порядке высокотитруемые позитивные и негативные образцы и провести рутинное тестирование.
 9. Вследствие различий между технологиями, пользователю рекомендуется провести корреляционное исследование перед переходом с одной технологии на другую, чтобы оценить возможные различия. Пользователи должны следовать при этом собственным правилам и процедурам.
 10. Влияние интерферирующих веществ оценивали методом тестирования серий образцов с повышенными концентрациями следующих веществ, часто присутствующих в образцах: человеческого гемоглобина, билирубина и липидов.

10. ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

10.1 Символы

Используемые в данном документе и на данном продукте символы :

Символ	Значение
N	Важное примечание
I	Информационное примечание
I	Номер в каталоге
B	Код серии
г	Температурный диапазон (Хранить при)
G	Количество, содержащееся в упаковке
s	Использовать до
n	Распространитель
	Глобальный номер товарной позиции
y	Обратитесь к инструкции по применению.
t	Производитель
v	Набор соответствует требованиям директивы IVD 98/79/EC.
C	Для диагностики <i>in vitro</i> .

10.2 Изменения относительно предыдущей версии

- Первая версия

ТОРГОВЫЕ МАРКИ

11. ТОРГОВЫЕ МАРКИ

MAGNA PURE, MAGNA LYSER и LIGHTCYCLER являются торговыми марками Roche.

Другие названия продуктов и торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Для диагностики *in vitro*.

13. ЛИТЕРАТУРА

¹⁾ Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.

²⁾ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.

V

Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim,
Germany, +49 621 7590

t Manufactured in Germany

© 2017 Roche Diagnostics.

n Distributed in USA by Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA

0117.061.001.2001A



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

Назначение

Система MagNA Pure 24 является автоматизированной системой для выделения нуклеиновых кислот и состоит из прибора MagNA Pure 24, программного обеспечения, расходных материалов и реагентов. Система MagNA Pure 24 предназначена для профессионального выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов для задач диагностики *in vitro*.

Набор MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit и Пробирка с магнитными частицами MagNa Pure 24 (MagNa Pure 24 MGP Set) предназначены для работы с системой MagNA Pure 24.

Срок годности

Срок годности – MagNA Pure 24 MGP и MagNa Pure 24 Total NA Isolation kit стабильны до указанного на упаковке срока, максимально 18 месяцев.

Комплект поставки

Набор реагентов для общего выделения нуклеиновых кислот, 24 (MagNA Pure 24 Total Nucleic Acid Isolation Kit).

Пробирка с магнитными частицами MagNa Pure 24 (MagNa Pure 24 MGP Set) (12шт./1 уп.)

Условия транспортировки

Перед отправкой с завода продукт проходит контрольные проверки. Международные символы на упаковке и специальные инструкции по обращению указывают транспортировщику, как следует обращаться с этим продуктом. При получении продукта внимательно осмотрите упаковку. При наличии любых следов неправильного обращения или повреждения немедленно обратитесь в отдел обслуживания клиентов компании «Roche Diagnostics GmbH» («Рох Диагностикс ГмбХ») или к региональному поставщику.

Транспортировка осуществляется всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта. Температура при транспортировке 2-8°C.

Требования к охране окружающей среды

Медицинское изделие при использовании, транспортировке и хранении не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду при соблюдении условий применения и мер предосторожности, указанных в инструкции.

Стерилизация

Изделие поставляется нестерильным. Не подлежит повторному использованию и/или стерилизации пользователем.

Утилизация или уничтожение

Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

Уничтожение изделий осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральным законам, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

Использованные изделия перед уничтожением дезинфицируют и складывают в контейнеры или пакеты для сбора отходов класса Б и утилизируют в соответствии с требованием СанПиН 2.1.7.2790-10

«Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Гарантийные обязательства

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие качества медицинского изделия требованиям национальных стандартов при соблюдении правил использования, транспортирования и хранения.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Рекламации

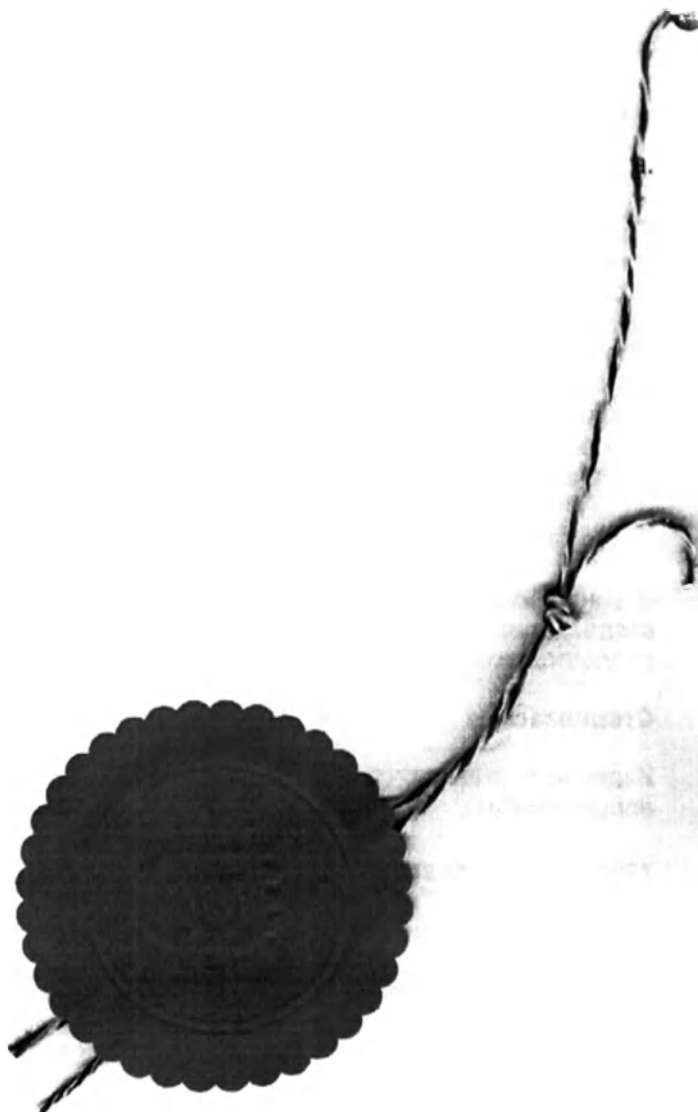
По вопросам качества продукции обращаться:

ООО «Рош Диагностика Рус»

Адрес: 107031, Москва, Трубная площадь, д.2

Тел.: +7 (495) 229-69-99

Email: moscow.reception_dia@roche.com



Зеелер энд Др. Феллмет (Seeler & Dr. Fellmeth)
Нотариальная контора
Нотариальная контора Зеелер энд Др. Феллмет (Seeler & Dr. Fellmeth) №7* 23*68161 Маннхайм

Удостоверение копий

Настоящим сегодня подтверждается верность копии с представленного оригинала документа.

г. Маннхайм,
[Штамп: 28 апреля 2021 г.]

[Подпись]
Клаудия Зеелер (Claudia Seeler)
Нотариус в г. Маннхайм

[Гербовая печать: Клаудия Зеелер (Claudia Seeler)
Нотариус в г. Маннхайм]

Текст на русском языке Инструкции по применению на медицинское изделие: **Наборы реагентов и расходные материалы к приборам серии MagNaPure для выделения и очистки нуклеиновых кислот и подготовки реакционных смесей**
производства «Рош Диагностикс ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH), Сандхофер Штрассе 116, D-68305 Маннхайм, Германия (Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany)

РАЗРАБОТЧИК:

**«Рош Диагностикс ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH), Германия.
Сандхофер Штрассе 116, D-68305 Маннхайм, Германия
(Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany)**

Утверждено

«Рош Диагностикс ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH)

Дата: 27 апреля 2021 года

[подпись]

Андреа Вебер (Andrea Weber)

Менеджер отдела глобального нормативно-правового регулирования

Штамп [Штамп: «Рош Диагностикс ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH)
Сандхофер Штрассе 116
68305 Маннхайм
(Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim)]

2021

1/1

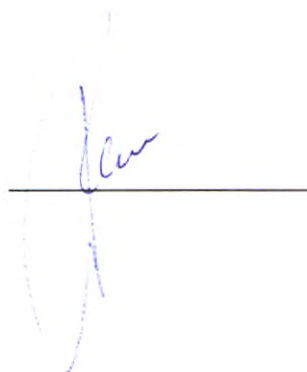
«Рош Диагностикс ГмбХ»; Сандхофер Штрассе 116; 68305 Маннхайм (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116; 68305 Mannheim); тел.: +49 621 759 0; факс: +49 621 759 2890

Место нахождения органа управления: г. Маннхайм – Регистрационный суд: суд первой инстанции г. Маннхайма, № в торговом реестре: 3962 – Правление: Клаус Хаберда (Claus Haberda); Андреас Шмитц (Andreas Schmitz)

Председатель наблюдательного совета: д-р Томас Шнейкер (Dr. Thomas Schneckner)

[Гербовая печать: Клаудия Зеелер (Claudia Seeler)
Нотариус в г. Маннхайм]

Перевод выполнил переводчик
Ремыга Семен Юрьевич



Российская Федерация
Город Москва

Седьмого июня две тысячи двадцать первого года

Я, Прокошенкова Елена Евгеньевна, нотариус города Москвы, свидетельствую
подлинность подписи переводчика Ремыги Семена Юрьевича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 21/86-н/77-2021-

25 - 2634

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



Е.Е. Прокошенкова

[Handwritten signature in blue ink]

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 124 (сто двадцать четыре) листа.

Е.Е. Прокошенкова



[Handwritten signature in blue ink]

