

ExtractDNA FFPE

Набор реактивов для выделения и очистки ДНК из образцов FFPE

Номер по каталогу

ВС103 — на 50 выделений ДНК

Инструкция по применению

Назначение

Набор ExtractDNA FFPE предназначен для выделения и очистки ДНК из срезов с FFPE-блоков (отдельных или стеклопрепаратов) стеклопрепаратов.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Метод

Депарафинизация с помощью термического воздействия и разделения фаз, лизис ткани, протеиназная обработка и экстракция ДНК в водный раствор. Сорбция и очистка ДНК на колонке.

Основные характеристики

Выход ДНК	Короткие фрагменты: 1.4 ± 0.33 мкг, длинные фрагменты: 0.6 ± 0.15 мкг
Емкость колонок	20 мкг
Депарафинизация	Нетоксичная (без применения органических растворителей)
Рекомендации к биологическому материалу	Для срезов FFPE: – толщина срезов 5-6 мкм, – суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани от 2 см^2 , – суммарная площадь срезов, используемых для выделения ДНК, до 8 см^2
Общее время выделения	От 3 часов 30 минут, время ручной работы от 45 минут
Возможные применения выделенной ДНК	Пригодна для ПЦР, ПЦР-РВ, ферментативных реакций, пробоподготовки для секвенирования по методу Сэнгера и NGS-секвенирования
Срок годности выделенной ДНК	До 1 года в морозильной камере (от -25 до -15 °C)

Количество выделений

50 выделений ДНК.

Хранение и транспортировка

«Раствор ДПП» хранить и транспортировать при температуре от -25 до -15 °C; остальные компоненты — при комнатной температуре.

Срок годности

12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

Техническая поддержка

support@evrogen.ru

Оглавление

1. Назначение	4
2. Метод	4
3. Основные характеристики.....	4
4. Количество выделений.....	6
5. Состав набора	6
6. Хранение и транспортировка.....	6
7. Срок годности	6
8. Необходимые дополнительные материалы и оборудование	7
9. Биологический материал	7
10. Протокол.....	8
11. Особенности выделенной ДНК.....	12
12. Приложение	13
13. Ограничение использования	14

1. Назначение

Набор ExtractDNA FFPE предназначен для выделения и очистки ДНК из срезов с FFPE-блоков. Очистка ДНК осуществляется на микроцентрифужных колонках.

Очищенная ДНК пригодна для последующего анализа методами ПЦР, ПЦР-РВ, для ферментативных реакций, пробоподготовки для секвенирования по Сэнгеру и NGS-секвенирования.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Метод

Схема этапов протокола представлена на Рисунке 1 (стр. 5).

На первом этапе при повышенной температуре происходит депарафинизация методом разделения фаз, лизис ткани и её обработка протеиназой; ДНК переходит в водный раствор.

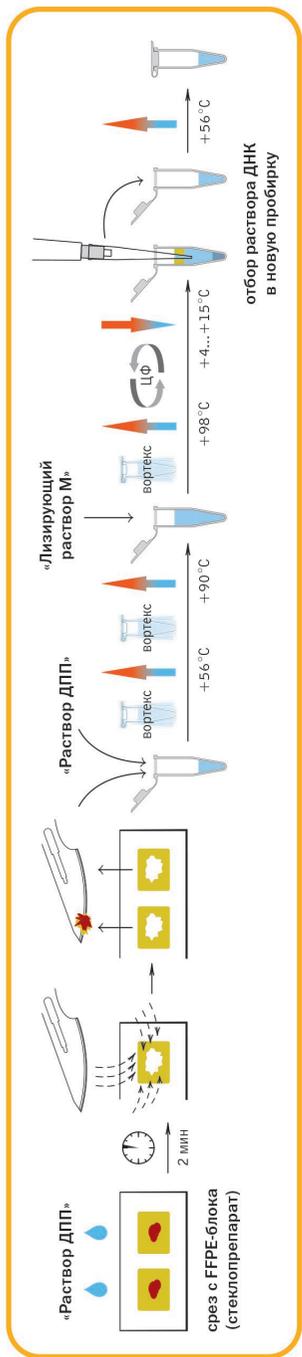
На втором этапе ДНК сорбируют на твердом носителе, запрессованном в колонку, и промывают для удаления возможных примесей. Очищенную ДНК элюируют буфером, в котором образцы могут храниться до одного года в морозильной камере.

3. Основные характеристики

Выход ДНК*	Короткие фрагменты: 1.4 ± 0.33 мкг, длинные фрагменты: 0.6 ± 0.15 мкг
Емкость колонок	20 мкг
Депарафинизация	Нетоксичная (без применения органических растворителей)
Рекомендации к биологическому материалу	Для срезов FFPE: – толщина срезов 5-6 мкм, – суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани от 2 см^2 , – суммарная площадь срезов, используемых для выделения ДНК, до 8 см^2
Общее время выделения	От 3 часов 30 минут, время ручной работы от 45 минут
Срок годности выделенной ДНК	До 1 года в морозильной камере (от -25 до -15 °С)

* Выход ДНК зависит от качества срезов FFPE и их длительности хранения, количества парафина в срезе (уменьшение парафина снижает количество ингибиторов в препарате ДНК и увеличивает концентрацию ДНК). Выход ДНК определен с помощью наборов «QuantumDNA» (кат. # QS001, QS002, QS003, QS004, Евrogen).

Первый этап



Второй этап

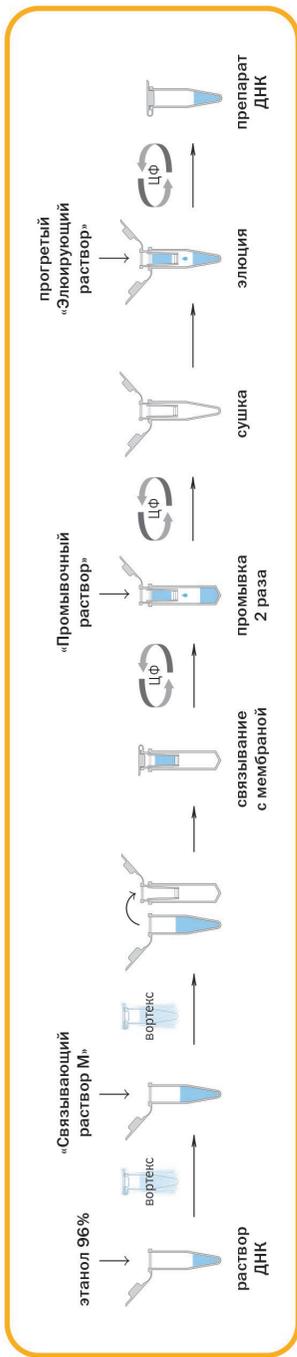


Рисунок 1 – схема этапов протокола.

Первый этап – экстракция ДНК в водный раствор. Второй этап – очистка ДНК на колонке.

4. Количество выделений

50 выделений ДНК.

5. Состав набора

Компонент	Объем/ Кол-во	Фасовка
УПАКОВКА №1 ИЗ 2		
Лизирующий раствор М	12 мл	1 флакон
Связывающий раствор М	25 мл	1 флакон
Промывочный раствор (концентрат)	20 мл	1 флакон
Элюирующий раствор (5 mM Tris HCl pH 7.5)	6 мл	4 пробирки по 1.5 мл
Спин-колоники с крышкой микроцентрифужные	50 шт.	1 пакет
Собираательные пробирки	200 шт.	1 пакет
УПАКОВКА №2 ИЗ 2		
Раствор ДПП*	7.5 мл	5 пробирок по 1.5 мл

*ДПП - Депротеинизирующий и депарафинизирующий раствор.

6. Хранение и транспортировка

«Раствор ДПП» (упаковка №2 из 2) хранить и транспортировать при температуре от -15 до -25 °С; остальные компоненты наборов (упаковка №1 из 2) — при комнатной температуре (от +15 до +25 °С).

Размороженный «Раствор ДПП» может храниться при температуре +4 °С не более 2 недель.

7. Срок годности

12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

8. Необходимые дополнительные материалы и оборудование

Необходимое оборудование

- твердотельный термостат;
- бытовой холодильник с холодильной и морозильной камерами;
- настольная центрифуга для пробирок со скоростью вращения не менее 8 000 g;
- миницентрифуга – вортекс;
- автоматические дозаторы.

Необходимые расходные материалы

- стерильные одноразовые хирургические лезвия №13;
- микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл;
- наконечники для дозатора с фильтрами;
- одноразовые неопудренные медицинские перчатки;
- этанол 96%.

Меры предосторожности

При работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

Все компоненты набора не токсичны для человека в используемых концентрациях.

«Лизирующий раствор М» и «Связывающий раствор М» при попадании в глаза и на кожу могут вызвать раздражение. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.

9. Биологический материал

Стеклопрепараты и отдельные срезы с блоков, содержащие фиксированные формалином и залитые парафином фрагменты ткани (FFPE).

Рекомендации для срезов FFPE

- толщина каждого среза 5-6 мкм;
- суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани от 2 см² (см. Рисунок 2);
- суммарная площадь срезов, используемая для выделения ДНК, включая фрагменты ткани и парафин, до 8 см².

ВНИМАНИЕ! ПРИ НИЗКОМ КАЧЕСТВЕ FFPE-БЛОКОВ ИЛИ ПРИ СУММАРНОЙ ПЛОЩАДИ ФРАГМЕНТОВ ФИКСИРОВАННОЙ ТКАНИ МЕНЕЕ 2 СМ² КОЛИЧЕСТВО ВЫДЕЛЕННОЙ ДНК СНИЖАЕТСЯ.

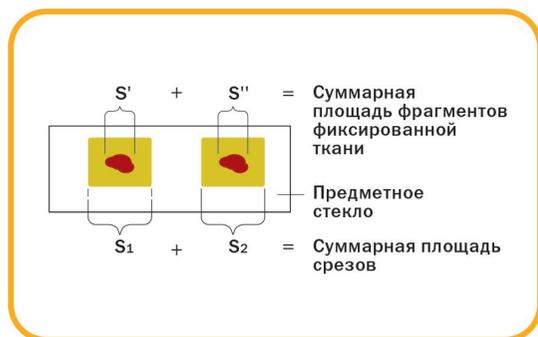


Рисунок 2 – схема срезов с FFPE-блока.

10. Протокол

1. Подготовка компонентов набора перед первым применением

Перед первым применением вскройте флакон с концентрированным «Промышленным раствором», добавьте 90 мл этилового спирта (96%).

Нанесите пометку на крышку флакона о выполнении операции.

При работе со стеклопрепаратами FFPE — см. п. 2.

При работе с отдельными срезами — см. п. 3.

2. Работа со стеклопрепаратами FFPE

а) Экстракция ДНК в водный раствор

Перед началом работы убедитесь, что на стеклопрепарате нет покровного стекла или заключающей среды.

2.1. Нанесите 30 мкл «Раствора ДПП» на поверхность предметного стекла в область, занятую биоматериалом. Равномерно распределите раствор по всей поверхности фрагмента ткани.

2.2. Инкубируйте 2 минуты.

2.3. Внесите 100 мкл «Раствора ДПП» в микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.

2.4. Отделите биоматериал (часть среза, заключающую фрагмент ткани) от поверхности стекла с помощью одноразового хирургического лезвия. По возможности избегайте захвата парафина. Для отделения биоматериала от стекла поскребите лезвием по поверхности срезов, затем соберите все отделившиеся фрагменты в один плотный комок.

2.5. Перенесите биоматериал в пробирку с «Раствором ДПП» с помощью одноразового хирургического лезвия. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.

2.6. Инкубируйте пробирку в термостате при +56 °С в течение 60 мин.

2.7. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.

2.8. Инкубируйте пробирку в термостате при +90 °С в течение 60 мин.

2.9. Внесите 100 мкл «Лизирующего раствора М» в ту же пробирку.

2.10. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.

2.11. Центрифугируйте пробирку для сбрасывания капель со стенок в течение 5 с.

2.12. Инкубируйте пробирку в термостате при +98 °С в течение 2 мин.

2.13. Центрифугируйте пробирку на скорости 10 000 г при комнатной температуре в течение 2 мин.

2.14. Поместите пробирку в холодильную камеру (от +4 до +15 °С) на 5 мин. После охлаждения в пробирке будет виден осадок, над ним — полупрозрачная жидкость, над ней — плотное кольцо из застывшего парафина.

2.15. С помощью наконечника для дозатора сместите в сторону кольцо из парафина или сделайте в нем отверстие. Отберите 180 мкл жидкости, стараясь не захватывать осадок и парафин, и поместите в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.

2.16. Инкубируйте пробирки в термостате при +56 °С в течение 30 мин.

б) Очистка ДНК на колонках

ВНИМАНИЕ! ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ НА ВСЕХ ЭТАПАХ ПРОВОДИТСЯ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В НАСТОЛЬНОЙ МИКРОЦЕНТРИФУГЕ НА СКОРОСТИ ОТ 8 000 ДО 10 000 g (НАПРИМЕР, ДЛЯ ЦЕНТРИФУГИ EPPENDORF MINISPIN: ОТ 11 000 ДО 12 000 ОБ/МИН) — СМ. ПРИЛОЖЕНИЕ.

2.17. Если в каком-то из компонентов набора есть осадок, прогрейте этот компонент при температуре от +37 до +50 °С до полного растворения осадка.

2.18. Перед началом работы поместите пробирку с «Элюирующим раствором» в термостат на температуру +56 °С.

2.19. К выделенной ДНК, полученной на предыдущем этапе, добавьте 200 мкл этилового спирта (96 %). Тщательно перемешайте на вортексе.

2.20. Добавьте 400 мкл «Связывающего раствора М» в ту же пробирку. Тщательно перемешайте переворачиванием и на вортексе, пока раствор не станет гомогенным.

2.21. Поместите колонку в собирательную пробирку. Аккуратно перенесите 760 мкл содержимого пробирки в колонку, центрифугируйте в течение 30 с.

2.22. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

2.23. Добавьте 700 мкл «Промывочного раствора» в колонку и центрифугируйте 30 с. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

2.24. Повторите пункт 2.23.

2.25. Центрифугируйте колонку в собирательной пробирке 2 мин для полного удаления «Промывочного раствора».

2.26. Перенесите колонку в чистую пробирку объемом 1.5 мл.

2.27. Оставьте при комнатной температуре на 5 мин колонку с открытой крышкой для испарения остатка спирта.

2.28. Нанесите в центр мембраны колонки 100 мкл прогретого «Элюирующего раствора». Закройте крышку колонки и инкубируйте в течение 3 мин при комнатной температуре.

2.29. Центрифугируйте колонку в пробирке 1 мин для сбора очищенной ДНК.

Для увеличения выхода ДНК можно разделить элюцию на два этапа: сначала нанести 30 мкл «Элюирующего раствора» и центрифугировать колонку с пробиркой в течение 30 с, затем нанести еще 70 мкл «Элюирующего раствора» в ту же колонку и центрифугировать в течение 1 мин.

Очищенная ДНК хранится до одного года при температуре от -25 до -15 °С.

3. Работа с отдельными FFPE-срезами

а) Экстракция ДНК в водный раствор

- 3.1. Поместите срезы с FFPE-блоков (см. раздел «Биологический материал») в микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.
- 3.2. Внесите 100 мкл «Раствора ДПП» в ту же пробирку. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- 3.3. Инкубируйте пробирку в термостате при +56 °С в течение 60 мин.
- 3.4. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- 3.5. Инкубируйте пробирку в термостате при +90 °С в течение 60 мин.
- 3.6. Внесите 100 мкл «Лизирующего раствора М» в ту же пробирку.
- 3.7. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 3 с.
- 3.8. Центрифугируйте пробирку для сбрасывания капель со стенок в течение 5 с.
- 3.9. Инкубируйте пробирку в термостате при +98 °С в течение 2 мин.
- 3.10. Центрифугируйте пробирку на скорости 10 000 g при комнатной температуре в течение 2 мин.
- 3.11. Поместите пробирку в холодильную камеру (от +4 до +15 °С) на 5 мин. После охлаждения в пробирке будет виден осадок, над ним — полупрозрачная жидкость, над ней — плотное кольцо из застывшего парафина.
- 3.12. С помощью наконечника для дозатора сместите в сторону кольцо из парафина или сделайте в нем отверстие. Отберите 180 мкл жидкости, стараясь не захватывать осадок и парафин, и поместите в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.
- 3.13. Инкубируйте пробирки в термостате при +56 °С в течение 30 мин.

б) Очистка ДНК на колонках

ВНИМАНИЕ! ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ НА ВСЕХ ЭТАПАХ ПРОВОДИТСЯ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В НАСТОЛЬНОЙ МИКРОЦЕНТРИФУГЕ НА СКОРОСТИ ОТ 8 000 ДО 10 000 g (НАПРИМЕР, ДЛЯ ЦЕНТРИФУГИ EPPENDORF MINISPIN: ОТ 11 000 ДО 12 000 ОБ/МИН) — СМ. ПРИЛОЖЕНИЕ.

- 3.14. Перед началом работы поместите пробирку с «Элюирующим раствором» в термостат на температуру +56 °С.
- 3.15. К выделенной ДНК, полученной на предыдущем этапе, добавьте 200 мкл этилового спирта (96 %). Тщательно перемешайте на вортексе.
- 3.16. Добавьте 400 мкл «Связывающего раствора М» в ту же пробирку. Тщательно перемешайте переворачиванием и на вортексе, пока раствор не станет гомогенным.
- 3.17. Поместите колонку в собирательную пробирку. Аккуратно перенесите 760 мкл содержимого пробирки в колонку, центрифугируйте в течение 30 с.
- 3.18. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.

- 3.19. Добавьте 700 мкл «Промывочного раствора» в колонку и центрифугируйте 30 с. Перенесите колонку в новую собирательную пробирку.
- 3.20. Повторите пункт 3.19.
- 3.21. Центрифугируйте колонку в собирательной пробирке 2 мин для полного удаления «Промывочного раствора».
- 3.22. Перенесите колонку в чистую пробирку объемом 1.5 мл.
- 3.23. Оставьте при комнатной температуре на 5 мин колонку с открытой крышкой для испарения остатка спирта.
- 3.24. Нанесите в центр мембраны колонки 100 мкл прогретого «Элюирующего раствора». Закройте крышку колонки и инкубируйте в течение 3 мин при комнатной температуре.
- 3.25. Центрифугируйте колонку в пробирке 1 мин для сбора очищенной ДНК.

Для увеличения выхода ДНК можно разделить элюцию на два этапа: сначала нанести 30 мкл «Элюирующего раствора» и центрифугировать колонку с пробиркой в течение 30 с, затем нанести еще 70 мкл «Элюирующего раствора» в ту же колонку и центрифугировать в течение 1 мин.

Очищенная ДНК хранится до одного года при температуре от -25 до -15 °С.

11. Особенности выделенной ДНК

Количество и качество ДНК, выделенной из биопробы, зависит от качества исходного материала (плотности клеток в образце, протокола фиксации, гистологической проводки и заливки образцов, давности хранения).

ДНК, выделенная из парафиновых блоков, обычно более фрагментирована, чем выделенная из свежих образцов тканей. Сильно фрагментированная и химически модифицированная ДНК, даже при относительно высокой концентрации, может не амплифицироваться в ПЦР. При работе с человеческой ДНК, после выделения рекомендуется оценить ее пригодность для ПЦР наборами для измерения концентрации ДНК: серия наборов «QuantumDNA» (кат. ## QS001, QS002, QS003, QS004, Евроген).

В случае неполной очистки от эндогенных ингибиторов ПЦР или если образец сильно разбавлен, рекомендуется провести его очистку на магнитных частицах. Суспензия CleanMag DNA (#BC35, Евроген) позволяет не только эффективно удалить ингибиторы, но и сконцентрировать образец ДНК от 1 нг с минимальными потерями (выход 70% и выше).

12. Приложение

1. Требования к подготовке образцов ткани в FFPE-блоках

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

1.2. Проводить фиксацию ткани формалином не дольше 24 часов.

1.3. Для декальцинации использовать реагенты только на основе EDTA.

ВНИМАНИЕ! ОБРАЗЦЫ ПОСЛЕ ДЕКАЛЬЦИНАЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУРАВЬИНОЙ ИЛИ АЗОТНОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НЕ ПРИГОДНЫ.

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

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

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

1.7. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять не менее 1 см², толщина среза — от 5 до 6 мкм, общая площадь среза не более 2.5 см².

Для получения срезов необходимо использовать микротом.

1.8. Срезы с парафиновых блоков должны быть помещены на предметное стекло, покрытое поли-L-лизинем (по 2 среза на одно предметное стекло), и прогреты при температуре от +56 до +60 °С в течение 3 часов.

ВНИМАНИЕ! НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПОКРОВНЫЕ СТЕКЛА.

1.9. При подготовке срезов с парафиновых блоков необходимо минимизировать риск кросс-контаминации образцов, для чего необходимо:

- работать в одноразовых неопудренных перчатках;
- проводить процедуру в ПЦР-боксе или в ламинарном шкафу;
- использовать одноразовые лезвия для микротомы и стерильные пинцеты;
- первые два среза с каждого блока выбрасывать, а для молекулярного исследования использовать срезы начиная с третьего;
- не помещать срезы на водяную баню.

2. Рекомендации по выбору режима центрифугирования

Эффективность центрифугирования образца определяется относительным ускорением центрифуги (RCF, relative centrifuge force). Оно зависит от частоты вращения (RPM, rotation per minute) и радиуса центрифугирования. Относительное ускорение центрифуги (RCF) задается как кратное от ускорения свободного падения (g) и характеризует условия центрифугирования на любой центрифуге, вне зависимости от радиуса ротора.

Величины RCF и RPM связаны между собой следующей формулой:

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

где r — радиус ротора в см,

n — частота вращения в оборотах в минуту (RPM).

Например, для центрифуги Eppendorf MiniSpin радиус ротора равен 6 см, таким образом, 10 000 g переводится в 12 000 об/мин.

ВНИМАНИЕ! РОТОРЫ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЕЙ НАСТОЛЬНЫХ ЦЕНТРИФУГ ОБЛАДАЮТ РАЗНЫМ РАДИУСОМ, ПОЭТОМУ ОДИНАКОВОЕ КОЛИЧЕСТВО ОБОРОТОВ В МИНУТУ ДЛЯ РАЗНЫХ ЦЕНТРИФУГ БУДЕТ ПРИВОДИТЬ К РАЗНОМУ ОТНОСИТЕЛЬНОМУ УСКОРЕНИЮ, Т.Е. РАЗНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ. ИСПОЛЬЗУЙТЕ ПРИВЕДЕННУЮ ВЫШЕ ФОРМУЛУ ДЛЯ РАСЧЕТА ЧАСТОТЫ ВРАЩЕНИЯ RPM, ЕСЛИ ВАША ЦЕНТРИФУГА НЕ ПОЗВОЛЯЕТ УСТАНОВИТЬ УСКОРЕНИЕ RCF.

При работе с микроцентрифужными колонками относительное ускорение центрифуги (RCF) должно быть не ниже 8 000 g для эффективного центрифугирования — и не выше 10 000 g, чтобы не повредить мембрану колонки.

13. Ограничение использования

Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей.

Наборы и сервисы Евроген

    – ссылка на страницу НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот    

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ    

Синтез и амплификация кДНК      

Клонирование ДНК       

Выявление контаминации микоплазмой    

Оценка ДНК    

Нормализация кДНК       

Практикум по генной инженерии    

Генотипирование    

Синтез олигонуклеотидов и зондов    

Секвенирование по Сэнгеру    

NGS секвенирование    

Синтез генов    

Сайт-направленный мутагенез    

Синтез органических соединений    

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru