

**Набор реагентов для быстрого выделения до 20
мкг плазмидной ДНК высокого качества
«PlasGen»**

ИНСТРУКЦИЯ по применению

1. НАЗНАЧЕНИЕ



Новая линейка продуктов EasyWay производства компании «СИНТОЛ» – простые и быстрые наборы для манипуляций с ДНК/РНК различного назначения. Данные наборы разработаны с учетом тенденции мировых практик и методик по работе с нуклеиновыми кислотами. Используя достижения десятков исследователей по всему миру, нашими разработчиками были усовершенствованы и выведены формулы простых и качественных методов манипуляций с ДНК/РНК, которые не только сэкономят ваше время и средства, но и позволят достигнуть отличных результатов!

1.1 Полное название

Набор реагентов для быстрого выделения до 20 мкг плазмидной ДНК высокого качества «PlasGen».

1.2. Назначение

Набор реагентов «PlasGen» производства компании «СИНТОЛ» идеально подходит для быстрого выделения до 20 мкг плазмидной ДНК свободной от РНК из клеточных культур с использованием адсорбирующей мембраны из диоксида кремния в удобной микроцентрифужной колонке.

1.3. Область применения

Набор для выделения «PlasGen» может быть использован в лабораторных центрах и институтах, для выделения до 20 мкг плазмидной ДНК высокого качества из клеточных культур свободной от РНК. Может применяться в препаративных и аналитических целях, генной инженерии.

1.4 Принцип действия

Выделение основано на щелочном лизисе клеток и последующем осаждении белков и хромосомной ДНК, адсорбции плазмидной ДНК на кремниевой мембране спин-колонки с последующей промывкой и элюцией. Благодаря наличию РНКазы А, полученные растворы ДНК свободны от РНК.



Раствор для удаления эндотоксинов не входит в данный набор. При необходимости, рекомендуем использовать набор PlasGen Plus (EW-112, Синтол, Россия), комплектующийся с раствором для удаления эндотоксинов

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «PlasGen» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов «PlasGen» рассчитан на 50 выделений.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	Объем, мл	Количество, шт.
1	Ресуспендирующий буфер	Прозрачная гомогенная жидкость	10	1
2	Раствор РНКазы А	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость	1	1
3	Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1
4	Нейтрализующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1
5	Промывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1
6	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	3	2
7	Колонки	Микроцентрифужные колонки с кремниевой мембраной		50

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

3.1 Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

3.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

Компонент набора промывочный раствор (реагент 5) содержит легковоспламеняющиеся жидкости. Все работы с легковоспламеняющимися жидкостями должны проводиться с использованием приточно-вытяжной вентиляции, вдали от огня и источников искрообразования, электрооборудование и освещение должно быть взрывобезопасно.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в шкафу биологической безопасности (ШББ) 2 класса (например, БМБ-II-«Ламинар-С-1,5», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

4.2 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 20-200 мкл и 100-1000 мкл;

штатив для данных пипеток.

4.3 Другое используемое оборудование для очистки ДНК

Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-100 °С для пробирок объемом 1,5-2 мл (например, «Циклотемп-303»);

центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5424);

микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901»);
отсасыватель медицинский (например, ОМ-1);

штативы для наконечников и микропробирок объемом 200 мкл, 1,5 и 2 мл.

4.4 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

4.5 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Для очистки ДНК

Микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

Одноразовые пипетки Пастера объемом 1-3,5 мл (при отсутствии отсасывателя медицинского);

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл;

Отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

Комплект средств для обработки рабочего места.

5.1 Выделение плазмидной ДНК:

Перед использованием реактивов убедитесь в отсутствии осадка в реагентах 3 и 4. В случае наличия, нагреть растворы до 30-40°C.

Перед использованием ресуспендирующего буфера (реактива 1) необходимо добавить в него весь объем РНКазы А (реактив 2) и перемешать многократным переворачиванием. Хранить полученный раствор необходимо при +4°C.

1. Центрифугировать 1-1,5 мл клеточной культуры в 1,5 мл микроцентрифужной пробирке 2 минуты при 8000 об/мин. Удалить супернатант. При необходимости повышения концентрации целевого продукта, можно повторить операцию еще 1-2 раза добавляя к осадку клеток свежую культуру с общим объемом культуры до 5 мл¹.
2. Добавить к осадку 200 мкл ресуспендирующего буфера (реагент №1, с предварительно добавленным раствором РНКазы А – реагент 2) и перемешать вортиксованием или пипетированием до полного разрушения конгломерата клеток.
3. Внести 200 мкл лизирующего раствора (реагент №3) и перемешать плавным переворачиванием или плавным пипетированием. Не вортиксировать².
4. Добавить 300 мкл нейтрализующего раствора (раствор №4) и перемешать плавным переворачиванием или плавным пипетированием. Не вортиксировать².
5. Центрифугировать 13000 об/мин 5-10 минут. Стараясь не задевать осадок, перенести супернатант в подготовленную спин-колонку.
6. Центрифугировать 13000 об/мин 45-60 секунд. Удалить фильтрат из собирательной пробирки.
7. Добавить 500 мкл промывочного раствора (раствор №5) и центрифугировать 13000 об/мин 30-60 секунд. Удалить фильтрат из собирательной пробирки.
8. Повторить п.7.
9. Центрифугировать пустую спин-колонку при 13000 об/мин 60-90 секунд для удаления остатков промывочного раствора.
10. Утилизировать собирательную пробирку, а колонку перенести в новую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
11. Нанести в центр мембраны 30-50 мкл элюирующего буфера (реагент №6), инкубировать 3-10 минут и центрифугировать 13000 об/мин 60-90 секунд.
Опция: буфер для элюции может быть предварительно нагрет до 65-70°C что повышает десорбцию ДНК с кремниевой мембраны.
Удалить колонку. Полученная плазмидная ДНК пригодна для дальнейших манипуляций (ПЦР, рестрикция, лигирование, и пр.
Для проведения трансформации рекомендуем использовать набор «PlasGen plus» (EW-112, Синтол, Россия) комплектующийся с раствором для удаления эндотоксинов). Хранить ДНК при -20°C.

¹ – внести в пробирку 1-1,5 мл культуральной жидкости, центрифугировать, слить супернатант, к осадку добавить еще 1-1,5 мл культуральной жидкости, центрифугировать,

слить супернатант; ² – вортексирование может привести к дроблению хромосомной ДНК и, как следствие, большому ее количеству в растворе плазмидной ДНК.

Возможные трудности и неполадки



Большое количество хромосомной ДНК в выделении	Строго рекомендуем, начиная с 3го этапа, проводить все манипуляции плавным переворачиванием. Исключите вортексирование или жесткое пипетирование.
Малый выход плазмидной ДНК	<p>Рекомендуем использовать ночную культуру для выделения плазмидной ДНК. Рост клеточной культуры должен быть 12-30 часов. В случае выделения малокопийной плазмиды рекомендуем сконцентрировать 5 мл клеточной культуры.</p> <p>Увеличение времени элюции до 20 минут может привести к увеличению выхода продукта на 10-15%.</p> <p>Убедитесь, что используете не менее 30 мкл элюирующего буфера. Рекомендуем использовать двухэтапную элюцию: нанести в центр мембраны 30 мкл элюирующего буфера, инкубировать 10 минут, центрифугировать, нанести еще 20 мкл буфера в центр мембраны, инкубировать 5 минут, центрифугировать.</p> <p>Буфер для элюции может быть предварительно нагрет до 65-70°C что повышает десорбцию ДНК с кремниевой мембраны</p>
Неэффективная трансформация	<p>Убедитесь, что проводите 2 этапа промывки п.7.</p> <p>В случае цитотоксичности культуры, рекомендуем использовать набор с раствором для удаления эндотоксинов «PlasGen plus» (EW-112, Синтол, Россия).</p> <p>Можно дополнительно инкубировать колонку с промывочным раствором в течение нескольких минут.</p>
Неэффективная элюция	<p>Убедитесь, что было использовано 30-50 мкл элюирующего буфера. Буфер должен быть нанесен точно в центр мембраны.</p> <p>Не рекомендуем использовать малые количества элюирующего буфера(10-20мкл) в связи с большой адсорбционной способностью связывающей мембраны колонки.</p> <p>Убедитесь, что после этапа промывки весь промывочный раствор был удален центрифугированием пустой колонки. Допускается увеличение времени центрифугирования в п.9.</p>
Примеси РНК	Убедитесь, что весь объем раствора РНКазы А (реагент 2) был добавлен в ресуспендирующий буфер (реагент 1). Данный раствор строго рекомендуем хранить при +4°C.

5.2. Условия хранения выделенных образцов ДНК

Раствор ДНК может храниться при температуре от 2 до 8°C в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

6 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

6.1 Условия хранения

Набор реагентов «PlasGen» хранить при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С в сухом защищенном от света месте. Реагенты №1 и №2 хранить при температуре плюс 4 до плюс 6 °С.

6.2 Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов «PlasGen» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 4 до плюс 6 °С.

6.3 Срок годности

Срок годности составляет 9 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

6.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

6.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (6 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «PlasGen» направлять на предприятие-изготовитель ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495)984-69-93, факс.(499)977-74-55 E.mail: syntol@syntol.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и лабораторных работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.