

Набор реагентов для очистки ДНК из агарозного геля и
реакционных смесей
«ColGen»

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 очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «ColGen»

1.2. Назначение

Набор реагентов «ColGen» производства компании «СИНТОЛ» идеально подходит для быстрой очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей. Подходит для работы с агарозными гелями на основе буферных растворов ТАЕ (Трис-Ацетат-ЭДТА) и ТБЕ (Трис-Борат-ЭДТА). Набор не содержит опасных летучих химических веществ, таких как хлороформ, бензол, фенол и пр. Пригоден для работы с концентрацией агарозы в геле до 5%.

1.3. Область применения

Набор для выделения «ColGen» может быть использован в лабораторных центрах и институтах, для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей. Может применяться в препаративных и аналитических целях, а также очистки реакций ПЦР для секвенирования.

1.4 Принцип действия

Интересующий фрагмент ДНК вырезается из агарозного геля, помещается в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5мл, растворяется в связывающем растворе и переносится в спинколонку. Хаотропные агенты связывающего буфера растворяют агарозный гель, денатурируют протеины(комплексы ДНК-протеин, приводящие к сдвигу бэнда при электрофорезе) и повышают адсорбцию ДНК на кремниевой мембране колонки. Как дополнение, связывающий раствор содержит в себе индикатор, который позволяет контролировать рН для оптимальной адсорбции ДНК. Все примеси удаляются простой стадией промывки. Очищенную ДНК затем элюируют с мембраны низкосолевым буфером для элюции

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

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

2.1 Состав набора

Набор реагентов «ColGen» рассчитан на 50 очисток.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	Объем, мл	Количество, шт.
1	Связывающий буфер	Прозрачная гомогенная жидкость оранжевого цвета	40	1
2	Промывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1
3	Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	3	2
4	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.

Компоненты набора промывочный раствор 2 (реагенты 2) 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 Очистка ДНК из геля:

1. Вырезать из агарозного геля интересующий фрагмент ДНК так близко к ДНК-фрагменту, на сколько это возможно, используя чистый скальпель или лезвие¹. Поместить образец в предварительно взвешенную 1,5 мл микроцентрифужную пробирку и затем определить массу геля.

2. Добавить 3:1 объема связывающего буфера² к образцу (объем/масса, например, на каждые 100 мг геля добавить 300 мкл связывающего раствора)

3. Инкубировать смесь при 55°C в течение 10 минут или до тех пор, пока гель полностью не растворится.

4. Перенести весь объем³, но не более чем 700мкл, в спинколонку и центрифугировать 1 минуту при 8000rpm. Удалить фильтрат из собирательной пробирки и поместить колонку обратно.

5. Внести 700 мкл промывочного раствора в спинколонку и центрифугировать 1 минуту при 8000rpm. Удалить фильтрат и поместить колонку обратно.

6. Центрифугировать пустую спинколонку 1 минуту при 13000rpm. Удалить собирательную пробирку.

7. Промаркировать новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5мл и поместить в нее колонку. Нанести 30-50мкл элюирующего буфера в центр мембраны и инкубировать 3-5 минут при комнатной температуре. Центрифугировать 1 минуту при 13000rpm.

Опция: буфер для элюции может быть предварительно нагрет до 65-70°C что повышает десорбцию ДНК с кремниевой мембраны. Центрифугат может быть повторно нанесен на мембрану колонки – повышает выход продукта примерно на 10%.

8. Удалить колонку. Хранить очищенную ДНК при -20°C .

Полученные ДНК пригодны для дальнейших манипуляций (ПЦР, рестрикция, лигирование, трансформация и пр.).



5.2 Очистка ДНК из реакционной смеси:

1. Добавить к реакционной смеси 3 объема связывающего раствора, но не менее 150мкл. Рекомендуем развести ПЦР смесь дистиллированной водой до 100 мкл и добавить 3 объема связывающего раствора.

2. Перенести весь объем³, но не более чем 700 мкл, в спинколонку и центрифугировать 1 минуту при 8000rpm. Удалить фильтрат из собирательной пробирки и поместить колонку обратно.

3. Внести 700 мкл промывочного раствора в спинколонку и центрифугировать 1 минуту при 8000rpm. Удалить фильтрат и поместить колонку обратно.

4. Центрифугировать пустую спинколонку 1 минуту при 13000rpm. Удалить собирательную пробирку.

5. Промаркировать новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5мл и поместить в нее колонку. Нанести 30-50мкл элюирующего буфера в центр мембраны и инкубировать 3-5 минут при комнатной температуре. Центрифугировать 1 минуту при 13000rpm.

Опция: буфер для элюции может быть предварительно нагрет до 65-70°C что повышает десорбцию ДНК с кремниевой мембраны. Центрифугат может быть повторно нанесен на мембрану колонки – повышает выход продукта примерно на 10%.

6. Удалить колонку. Хранить очищенную ДНК при -20°C

Полученные ДНК пригодны для дальнейших манипуляций (ПЦР, рестрикция, лигирование, трансформация и пр.).



¹ – рекомендуем максимально уменьшить время облучения ДНК ультрафиолетом; ² – при использовании агарозного геля концентрацией 2.5% или более, а также при использовании буфера TBE рекомендуем использовать соотношение 4:1 ; ³ – в случае превышения объема 700 мкл необходимо наносить пробу порционно. Нанести первую порцию, центрифугировать, удалить фильтрат из собирательной пробирки, затем нанести следующую порцию и повторить все действия.

Возможные трудности и неполадки



Неполное растворение агарозного геля	Убедитесь, что соотношение добавленного связывающего раствора составляет 3:1 (например, на 100мг геля необходимо 300мкл связывающего раствора) Убедитесь, что гель полностью растворился, прежде чем переносить раствор в спинколонку Повышенные концентрации агарозы или размеры агарозного геля могут требовать больше времени и объема связывающего буфера для полного растворения. Добавьте еще 1 объем связывающего буфера.
Неэффективное связывание ДНК с кремниевой мембраной	Проверьте цвет раствора. Он должен быть оранжевый. В случае изменения цвета на фиолетовый или малиновый, добавьте 10-20мкл 3М ацетата натрия pH=5.1-5.3 и перемешайте. Цвет станет оранжевым.
Неэффективная элюция	Убедитесь, что было использовано 30-50мкл элюирующего буфера. Буфер должен быть нанесен точно в центр мембраны. Для повышения выхода рекомендуем использовать двухэтапную элюцию (например нанести в центр мембраны 30мкл элюирующего буфера, инкубировать 5 минут, центрифугировать, нанести на центр мембраны еще 20мкл элюирующего буфера, инкубировать 1-2 минуты, центрифугировать). Не рекомендуем использовать малые количества элюирующего буфера(10-20мкл) в связи с большой адсорбционной способностью связывающей мембраны колонки.

	Убедитесь, что после этапа промывки весь промывочный раствор был удален центрифугированием пустой колонки. Допускается увеличение времени центрифугирования.
Низкая чистота образцов по A260/A230	В связи с использованием реагентов по типу хаотропов и неионных ПАВ, которые имеют максимум поглощения 210-240 нм, полученный раствор будет иметь показатель 0,1-0,2 по данному соотношению. Рекомендуем не учитывать данный показатель. Для достоверного измерения концентрации ДНК рекомендуем использовать наборы с использованием флуоресцентных красителей

5.3. 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 «ColGen» хранить при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С в сухом защищенном от света месте.

6.2 Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов «ColGen» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С.

6.3 Срок годности

Срок годности составляет 6 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 «ColGen» 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 регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.