



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для экстракции ДНК/РНК из биологического материала
«ДНК/РНК-С-ФАКТОР»

ТУ 21.10.60-117-51062356-2016

Содержание:

Список сокращений	3
1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора.....	4
2.1. Принцип действия.....	4
2.2. Состав набора	4
3. Меры предосторожности.....	5
4. Оборудование и дополнительные материалы.	6
5. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	7
6. Подготовка исследуемых проб для выделения ДНК/РНК	8
7. Экстракция ДНК/РНК из исследуемых образцов	9
8. Условия хранения	11
9. Срок годности.....	11
Приложение 1. Лист вносимых изменений	12

Список сокращений:

ВКО	внутренний контрольный образец
ОК	отрицательный контроль
ПК	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	рибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
ОТ	реакция обратной транскрипции
ВК-	отрицательный контроль экстракции

1. Назначение.

Набор реагентов предназначен для экстракции (выделения) ДНК/РНК из биологического материала (отделяемое слизистых оболочек, мазки, кровь, патматериал, фекалии, бактериальные культуры), а также продуктов питания и сырья животного происхождения для последующего проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) и/или полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Характеристика набора.

2.1. Принцип действия.

Материал обрабатывается лизирующим раствором на основе гуанидина. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК/РНК. Растворенная ДНК/РНК в присутствии хаотропного агента связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются после осаждения сорбента центрифугированием. Последующие стадии отмывки позволяют избавиться от большей части примесей (раствор для отмывки №1) и солей (раствор для отмывки №2). При добавлении раствора для элюции ДНК/РНК к сорбенту происходит переход ДНК/РНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием.

В результате получается высокоочищенный препарат ДНК/РНК, свободный от ингибиторов, что обеспечивает успешное проведение реакции обратной транскрипции (ОТ) и/или ПЦР.

2.2. Состав набора.

Комплект рассчитан для экстракции ДНК/РНК и выпускается в двух вариантах:

- 1) для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы)
- 2) для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав комплекта приведен в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора реагентов.

№	Состав набора	Описание	Объем, мл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Лизирующий раствор	прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость	30	60	1
2	Преципитирующий раствор	прозрачная бесцветная жидкость	10	20	1
3	Раствор для отмывки №1	прозрачная бесцветная жидкость	20	40	1
4	Раствор для отмывки №2	прозрачная бесцветная жидкость	60	120	1
5	Сорбент универсальный	суспензия серо-коричневого цвета	2,8	5,6	1
6	Буфер для элюции ДНК/РНК	прозрачная бесцветная жидкость	6	12	1

3. Меры предосторожности.

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней" и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Исследования методом ПЦР биологического материала, а также продуктов питания и сырья животного происхождения проводится в два/три этапа (в зависимости от метода детекции продуктов амплификации) в отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также рабочие реагенты и расходные материалы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одной зоны в другую.

Процесс исследования является строго однонаправленным, работу следует начинать в зоне подготовки материала, продолжать в зоне экстракции

нуклеиновых кислот, затем в зоне амплификации. Запрещается возвращать образцы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

Необходимо избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Применять набор строго по назначению согласно данной инструкции.

Допускать к работе только специально обученный персонал.

Не использовать набор по истечении срока годности.

Листы безопасности материалов (MSDS –material safety data sheet) доступны по запросу.

4. Оборудование и дополнительные материалы.

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером и без (до 200 и 1000 мкл) в штативах (например, «Ахуген», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;

- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18°С;
- Халат лабораторный.

5. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб.

При отборе образцов материала, хранении, а также при подготовке проб для исследования необходимо соблюдать меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями. Материал от каждого животного/образца отбирают отдельными инструментами.

Набор реагентов «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» позволяет выделить ДНК/РНК из следующего материала:

- Цельная кровь, плазма крови. Кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.
- Сыворотка крови. Для получения сыворотки забирают кровь в пробирку без антикоагулянта.
- Мазки (со слизистой носоглотки, из влагалища) снимают с помощью стерильного зонда, зонд помещают в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора.
- Фрагменты тканей и органов - кусочки паренхиматозных органов размером 1x1x1 см (печень, легкие, селезенка), трахея, воздухоносные мешки, миндалины, лимфатические узлы, кишечник, семенники с придатками, плацента, плодовые оболочки, абортировавших животных, фрагменты пораженных кожных покровов и др. - отбирают в стерильные контейнеры.
- Содержимое брюшной полости и желудка, фекалии, помет птиц отбирают в стерильный пластиковый контейнер (достаточно 5 -10 г).
- Мочу после сбора отстаивают в течение 1 часа, затем осторожно сливают, оставляя придонную часть – около 10 мл.
- Молоко отбирают в объеме 10-30 мл в стерильную посуду;
- Содержимое бурс, гигром.
- Сперму отбирают в объеме 0,5 - 2 мл в стерильные пробирки.
- Куриные эмбрионы, яйца.
- Продукты животного происхождения (куски мяса, фарш, мясные полуфабрикаты и т.п.) отбирают в стерильные контейнеры. Отбор образцов продукции проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов;
- культуры в жидких средах, без предварительной подготовки;
- бактериальные колонии, ресуспендируют в небольшом объеме (200-500 мкл) физиологического раствора.

Полученные образцы обычно можно транспортировать и хранить в следующих режимах (режим хранения образцов также указан в Инструкциях по применению Наборов реагентов для амплификации НК, производства ООО «ВетФактор»):

- цельная кровь, при температуре 2-8°C - в течение 12 ч с момента взятия материала

Другие образцы:

- при температуре от 2 до 8°C – в течение суток;
- при температуре не выше минус 20°C – в течение месяца;
- при температуре не выше минус 68°C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

6. Подготовка исследуемых проб для выделения ДНК/РНК:

- Пробы цельной крови, плазму крови, синовиальную жидкость, пунктаты из лимфоузлов, мазки из влагалища и со слизистой носовой полости, содержимое бурс и гигром, культуры микроорганизмов обычно используют для выделения ДНК/РНК без предварительной подготовки.

- Для получения плазмы пробирку с цельной кровью центрифугируют в течение 10 мин при 3800 об./мин¹ («MiniSpin», Eppendorf) (если кровь стояла при температуре от 2°C до 8 °C более 1 ч после ее взятия, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови). Переносят плазму в количестве не менее 1 мл одноразовыми наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

- Для получения сыворотки пробирки с кровью (без антикоагулянта) отстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 4000 об./мин («MiniSpin», Eppendorf) в течение 10 минут при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Для экстракции НК из сыворотки или плазмы крови берут пробу объемом 100 мкл. Для экстракции НК из цельной крови берут пробу объемом не более 50 мкл.

- Образцы спермы смешивают в соотношении 1:4 с физиологическим раствором и центрифугируют пробирку при 13000 об./мин («MiniSpin», Eppendorf) в течение 10 мин, после чего удаляют надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция). Полученный материал используют для выделения НК.

¹ Радиус ротора центрифуги «MiniSpin» «Eppendorf» составляет 3 см. При использовании роторов большего размера необходимо уменьшить обороты при центрифугировании, при использовании роторов меньшего радиуса – увеличивать. Например, при использовании ротора с радиусом 6 см необходимо снизить обороты до 3800 об/мин..

- Пробы тканей и органов, а также пробы продуктов животного происхождения гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем обычно готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере (также возможно использование 20-40 мг для твердых гомогенизированных проб продуктов животного происхождения). Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 10-12 тыс. об./мин («MiniSpin», Eppendorf) в течение 2 минут. Надосадочную жидкость используют для экстракции НК. В некоторых случаях образовавшуюся суспензию не центрифугируют, а отстаивают при комнатной температуре в течение 5 мин, затем верхнюю фазу по 0,4-0,5 мл переносят пастеровской пипеткой (или наконечником с аэрозольным барьером) в пробирку на 1,5 мл, и в количестве 0,1 мл используют для выделения НК.

- Мочу обычно центрифугируют при 8600-9500 об./мин («MiniSpin», Eppendorf) 10 мин, удаляют надосадочную жидкость (не полностью), осадок с 100 мкл надосадочной жидкости переносят в пробирку объемом 1,5 мл и используют для экстракции НК.

- При исследовании куриных эмбрионов в скорлупе прокалывают отверстие и отбирают стерильным шприцем в пробирку объемом 1,5 мл 1,0-1,5 мл аллантоисной жидкости.

- Из фекалий (1-5 г) готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе. Взвесь фекалий декантируют в течении 5-10 минут. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в чистую пробирку 1,5 мл, центрифугируют при 5000 об./мин («MiniSpin», Eppendorf) в течение 5 мин. Экстракцию НК из осветленного экстракта фекалий проводят по возможности сразу. При необходимости хранения экстракт замораживают.

7. Экстракция ДНК/РНК из исследуемых образцов.

Объем исследуемого материала для экстракции ДНК/РНК – 50-100 мкл для жидких проб, 20-40 мг для твердых гомогенизированных проб.

1. Если **Лизирующий раствор** и **Раствор для отмывки № 1** хранились при температуре от 2 до 8°C, перед началом работы прогреть данные реагенты при 60 °С в течение 15-30 минут, до полного растворения кристаллов.

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок для проб, включая пробирку для отрицательного контроля экстракции. Промаркировать пробирки, пробирку для отрицательного контроля экстракции промаркировать как **ВК**-. Внести в каждую пробирку по 10 мкл реагента **ВКО** из конкретного Набора реагентов для амплификации ДНК, производства ООО «ВетФактор», если он предусмотрен для конкретного исследования, и по 500 мкл **Лизирующего раствора**.

3. В пробирку **ВК**- внести 100 мкл **ОКО** (также из комплекта конкретного Набора реагентов для амплификации ДНК). В остальные пробирки с

Лизирующим раствором и ВКО (если используется) внести по 100 мкл проб, используя наконечники с фильтром. В случае выделения НК из **цельной крови** используют пробу в объеме 50 мкл с добавлением 50 мкл ОКО.

4. При выделении НК из твердых гомогенных проб (например, продукции животного происхождения) **Лизирующий раствор** и **ВКО** вносятся непосредственно в пробирки, содержащие данные пробы.

5. Все пробы, включая пробирку ВК-, аккуратно (без вспенивания) перемешать на вортексе и прогреть 5 минут при 60°C. Если после прогрева в образцах присутствуют взвешенные частицы, следует провести центрифугирование образцов при 12000 об./мин² («MiniSpin», «Eppendorf») в течение одной минуты. **В случае выделения ДНК из цельной крови центрифугирование образцов обязательно!** Супернатант перенести в новые пробирки.

6. К прогретым пробам добавить 100 мкл **Преципитирующего раствора**, перемешать на вортексе после чего сбросить капли с крышек на микроцентрифуге.

7. Тщательно ресуспендировать **Сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 50 мкл ресуспендированного **Сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, оставить на столе на 5 минут. Для успешной сорбции пробирки с сорбентом периодически встряхивать на вортексе (без вспенивания).

8. Осадить **Сорбент универсальный** в пробирках центрифугированием при 12000 об./мин. («MiniSpin», «Eppendorf») в течение одной минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

9. Добавить к осадку 300 мкл **Раствора для отмывки №1**, перемешать пипеткой или на вортексе до полного ресуспендирования сорбента (получения однородного раствора). Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 12 000 об./мин. («MiniSpin», «Eppendorf») в течение одной минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

10. Добавить к осадку 500 мкл **Раствора для отмывки №2**, перемешать на вортексе до получения однородной суспензии. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 12000 об./мин («MiniSpin», «Eppendorf») в течение одной минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

11. Повторить пункт 10. Тщательно, не захватывая сорбент, удалить жидкость полностью.

² Сила сжатия сорбента при центрифугировании имеет квадратичную зависимость от радиуса ротора. Радиус ротора центрифуги «MiniSpin» «Eppendorf» составляет 3 см. При использовании роторов большего размера необходимо уменьшить обороты при центрифугировании, например при использовании ротора с радиусом 6 см необходимо снизить обороты до 8500 об./мин

12. Поместить пробирки в термостат при температуре 60°C на 10-15 минут для подсушивания. При этом крышки пробирок должны быть открыты. Убедиться в отсутствии остатков спирта на стенках пробирок и осадке.

13. Добавить в пробирки по 100 мкл **Буфера для элюции ДНК/РНК, ТЕ-буфера**. Встряхнуть на вортексе до получения однородной суспензии. Прогреть пробы при температуре 60°C в течение 5 минут с закрытыми крышками. Пробы желательно встряхивать каждые 2 минуты.

14. Центрифугировать пробирки при 12000 об./мин («MiniSpin», «Eppendorf») в течение одной минуты. Насадочная жидкость содержит очищенную НК. Пробы готовы к использованию.

15. Для хранения образцов выделенной НК рекомендуется, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

Выделенную РНК можно хранить в нескольких часов при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 68 °C.

8. Условия хранения.

После получения набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» следует хранить при температуре от 2 до 25°C в течение всего срока годности набора.

9. Срок годности.

Срок годности набора реагентов «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Лист вносимых изменений.

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 03.04.17	Стр. 9 Пункт 6. «Экстракция ДНК/РНК из исследуемых образцов», подпункты 7,8 и 9	Увеличена скорость осаждения сорбента универсального центрифугированием до 12 000 об/мин.
Версия 1.2 от 26.06.17	Стр. 9 Пункт 6. «Экстракция ДНК/РНК из исследуемых образцов», подпункт 6	Увеличен объем вносимого сорбента до 50 мкл
Версия 1.3 от 25.11.2019	Стр. 8-9 Пункт 6. «Подготовка исследуемых проб для выделения ДНК/РНК»	Изменена пробоподготовка для продуктов и сырья животного происхождения. Изменения по тексту.

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений