

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От 30 июня 2008 года №5008–Пр/08

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ

№ ФСР 2008/02938

ИНСТРУКЦИЯ по применению комплекта реагентов для выделения ДНК

ПРОБА-НК

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1.** Комплект реагентов предназначен для получения препарата ДНК/РНК из биологического материала (периферическая кровь, слюна, мокрота, молоко, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища; мазки и смывы из полости носа и ротоглотки; материал от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы и др.) для последующего анализа методом обратной транскрипции (РНК) и/или полимеразной цепной реакции (ДНК).
- 1.2.** Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.3.** Комплект предназначен для применения *in vitro*.
- 1.4.** Комплект рассчитан на выделение ДНК/РНК из 100 анализируемых образцов (включая отрицательные контрольные образцы).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

- 2.1.** Состав комплекта (на 100 образцов):
- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
 - реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
 - промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
 - промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
 - буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
 - отрицательный контрольный образец («К→») – 2 пробирки (по 1,5 мл);
 - внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
 - внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

Примечание. Поставляемый в комплекте внутренний контрольный образец (РНК-ВК) представляет стабилизированную РНК и предназначен для использования с наборами реагентов:

- ОТ-ГЕПАТОГЕН-С;
 - ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИПИРОВАНИЕ (формат «Real-Time»);
 - ВИЧ-ГЕН;
 - набором реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1);
 - с комплектами реагентов для обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК HAV, HDV, HGV.
- Внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) предназначен для использования с набором ВГБ-ГЕН.

Примечание. При хранении допускается выпадение небольшого количества осадка в лизирующем растворе, который растворяется прогреванием лизирующего раствора при 65°C.

- 2.2.** Время проведения выделения – 1 ч.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 3.1.** При работе с комплектом реагентов необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).
- 3.2.** Все компоненты комплекта в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 3.3.** Работать с комплектом следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.
- 3.4.** При работе с комплектом следует использовать только новые наконечники и пробирки.
- 3.5.** Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.
- 3.6.** Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, халаты и пр. должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

- 3.7.** Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 3.8.** Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор
- 3.9.** Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится выделение ДНК, следует обязательно до и после проведения работ облучать бактерицидными лампами в течение 1 часа.
- 3.10.** Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать МУ 1.3.2569-09.

При работе с комплектов реагентов ПРОБА-НК требуются следующие оборудование и материалы:

- термостат твердотельный на 65°C;
- центрифуга настольная на 13000 об/мин;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объёмом 1–20 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надсадочных жидкостей;
- перчатки одноразовые резиновые;
- контейнер с дезинфицирующим раствором.

При выделении НК из мокроты (способ 1):

- 10% раствор трёхзамещенного фосфорнокислого натрия;
- 1М раствор HCl;
- 5% раствор хлорамина;
- вода дистиллированная.

При выделении НК из мокроты (способ 2):

- муколизин.

При выделении НК из мочи, слюны, ликвора, синовиальной жидкости, мазков и смывов; фекалий и внутренних органов животных:

- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

5. ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

5.1. Образцы периферической крови

5.1.1. Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объёмом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

5.1.2. Содержимое пробирки перемешать переворачиванием 2–3 раза.

5.1.3. Центрифугировать пробирки при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18–25°C).

5.1.4. Отобрать автоматической пипеткой верхнюю фракцию (плазма) и перенести в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

Полученная плазма готова для выделения НК.

При необходимости плазму допускается хранить при температуре минус 20°C не более 3 месяцев.

5.2. Мокрота

Способ 1

5.2.1. Примерно 500 мкл биологического материала перенести в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

5.2.2. К пробе мокроты добавить равный объем 10% трёхзамещенного фосфорнокислого натрия $\times 12\text{H}_2\text{O}$, интенсивно встряхнуть.

5.2.3. Смесь инкубировать в течение 18–24 ч при температуре 37°C, затем нейтрализовать 1М HCl до pH 6,8–7,4.

5.2.4. Центрифугировать в течение 20 мин при 1000 об/мин.

5.2.5. Надсадочную жидкость слить в 5% раствор хлорамина для обеззараживания.

- 5.2.6. Добавить к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешать пипетированием и перенести в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 5.2.7. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.2.8. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).
Полученный материал готов для выделения НК.

Способ 2

- 5.2.9. В контейнер с образцом добавить муколизин в соотношении 5 : 1 (5 частей муколизина к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера. Закрутить крышку контейнера, встряхнуть содержимое и инкубировать 20–30 минут при комнатной температуре (18–25°C), каждые 2–3 минуты встряхивая контейнер.

Полученный материал готов для выделения НК.

Обработанную мокроту допускается хранить в контейнере в течение суток при температуре от 2–8°C или длительно при температуре не выше минус 16 °C (в случае необходимости повторного выделения РНК/ДНК).

- 5.3. Соскобы эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.)
 - 5.3.1. Соскобы эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.) с помощью одноразовых стерильных зондов перенести в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с консервантом (или 500 мкл физиологического раствора), аккуратно перемешать.
 - 5.3.2. Зонд извлечь, прижимая его к стенке пробирки и отжимая избыток жидкости. Пробирку плотно закрыть.
Полученный материал готов для выделения НК.

Примечание. Перед взятием соскоба из цервикального канала необходимо удалить слизь стерильным ватным тампоном.

5.4. Моча

- 5.4.1. Порцию утренней мочи (примерно 50 мл) следует собрать в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.
- 5.4.2. Перенести 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 5.4.3. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.4.4. Наиболее полно удалить надосадочную жидкость.
- 5.4.5. Добавить к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.
- 5.4.6. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.4.7. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
Полученный материал готов для выделения НК.

5.5. Слюна, ликвор, синовиальная жидкость

- 5.5.1. Слюну, ликвор, синовиальную жидкость (примерно 500 мкл) перенести в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.
- 5.5.2. Перенести 500 мкл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 5.5.3. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.5.4. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).
- 5.5.5. Добавить к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.
- 5.5.6. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
Полученный материал готов для выделения НК.

5.6. Сперма, секрет предстательной железы

- 5.6.1. Перенести 20–30 мкл жидкого материала пипеткой в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с консервантом (или 500 мкл стерильного физиологического раствора).
- 5.6.2. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.6.3. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
Полученный материал готов для выделения НК.

5.7. Молоко

- 5.7.1. Собрать материал в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.
- 5.7.2. Аккуратно перемешать и перенести 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
Полученный материал готов для выделения НК.
Срок сбора молока не более 24 часов. Хранение в течение всего срока сбора при температуре 2–8°C.

5.8. Мазки и смывы

- 5.8.1. Центрифугировать пробирку, содержащую анализируемый материал, при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.8.2. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
- 5.9.** Фекалии животных
- 5.9.1. Перенести ~250 мг (мкл) фекалий в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с 1,0 мл физиологического раствора стерильного.
- 5.9.2. Встряхнуть пробирку на вортексе в течение 5–10 сек.
- 5.9.3. Центрифугировать пробирку при 1000 об/мин в течение 2–3 мин
- 5.9.4. Перенести 800–1000 мкл надосадочной жидкости в новую пробирку объемом 1,5 мл, центрифугировать при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.9.5. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
- 5.10.** Внутренние органы животных
- 5.10.1. Поместить ~250 мг исследуемого материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 5.10.2. Добавить 1,0 мл физиологического раствора стерильного.
- 5.10.3. Встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3–5 сек, центрифугировать пробирку на микроцентрифуге/вортексе при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 5.10.4. Удалить надосадочную жидкость.

5.11. Транспортировка и хранение исследуемого материала

Транспортировать и хранить образцы биологического материала до начала исследования при 2–8°C не более 24 часов.

ВНИМАНИЕ! Время от момента взятия периферической крови до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Допускается хранить полученный материал при температуре минус 20°C в течение 3 месяцев.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Выделение РНК/ДНК из исследуемого материала

Примечание. В случае выпадения осадка в лизирующем растворе, флакон прогреть при температуре 65°C до полного растворения осадка.

- 6.1.1. Для исследования необходимо промаркировать необходимое количество пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учётом пробирки для отрицательного контрольного образца («К-»).

Примечание. Для образцов, прошедших предобработку с получением осадка и надосадочной жидкости (см. п.5: мокрота – способ 1, слюна, моча, ликвор, сперма, секрет предстательной железы, мазки и смывы; фекалии животных), маркируются пробирки с подготовленным для исследования материалом в объеме 100 мкл.

- 6.1.2. Внести по 10 мкл внутреннего контрольного образца во все промаркированные пробирки (в случае, если предусмотрено использование внутреннего контрольного образца).

Использование внутренних контрольных образцов РНК-ВК и ДНК-ВК

Внутренний контрольный образец РНК-ВК предназначен для использования:

с наборами ОТ-ГЕПАТОГЕН-С, ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИПИРОВАНИЕ (формат «Real-Time»), ВИЧ-ГЕН; набором реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1); с комплектами реагентов для ПЦР-амплификации кДНК HAV, HDV, HGV.

Внутренний контрольный образец ДНК-ВК предназначен для использования с набором ВГБ-ГЕН.

При выполнении пункт 6.1.2. Инструкции по применению:

- При одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HAV, HCV, HDV, HGV и HIV) и ДНК-содержащими вирусам (HBV), необходимо на стадии пробоподготовки внести два внутренних контроля (РНК-ВК + ДНК-ВК).
- При исследовании клинического материала только на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HAV, HCV, HDV, HGV, HIV и Influenza A virus subtype H5N1) необходимо внести внутренний контроль (РНК-ВК).
- При исследовании клинического материала только на наличие инфекций, вызванных ДНК-содержащими вирусами (HBV) необходимо внести внутренний контроль (ДНК-ВК).

Для остальных комплектов реагентов для амплификации использование ВК на стадии пробоподготовки не предусмотрено.

- 6.1.3. Добавить в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

- 6.1.4. В пробирки для исследуемых образцов добавить по 100 мкл исследуемого материала (за исключением образцов, прошедших предобработку с получением осадка (см. п. 5), и пробирки «К-»). В пробирку, маркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.

- 6.1.5. Плотно закрыть крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек.

- 6.1.6. Термостатировать пробирки при температуре 65°C в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре (18–25°C).

ВНИМАНИЕ! При выделении РНК вируса гриппа А из тканей внутренних органов животных необходимо термостатировать пробирки при 65°C в течение 30 мин, осадить конденсат центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3-5 сек. и перенести надосадочную жидкость в новую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

- 6.1.7.** Добавить в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхнуть на вортексе в течение 3-5 сек.
- 6.1.8.** Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25°C).
- 6.1.9.** Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 6.1.10.** Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 6.1.11.** Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре (18-25°C).
- 6.1.12.** Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 6.1.13.** Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 6.1.14.** Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 6.1.15.** Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 6.1.16.** Открыть крышки пробирок и высушить осадок при температуре 65°C в течение 5 мин.
- 6.1.17.** Добавить к осадку 50 мкл буфера для растворения и прогреть пробирки при температуре 65°C в течение 10 мин. Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 сек.

ВНИМАНИЕ! При исследовании клинического материала на наличие инфекций, вызванных только РНК-содержащими вирусами (при работе с наборами ОТ-ГЕПАТОГЕН-С, ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ВИЧ-ГЕН, комплектами для выявления HAV, HDV, HGV), рекомендуется растворить осадок в 16,5 мкл буфера для растворения, так как увеличение объёма буфера для растворения приводит к пропорциональному разбавлению образца и уменьшению чувствительности анализа.

При работе с набором ВГБ-ГЕН, а также при одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HAV, HCV, HDV, HGV и HIV) и ДНК-содержащими вирусами (HBV), необходимо растворить осадок в **25 мкл** буфера для растворения.

- 6.1.18.** Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре. Препарат НК готов для постановки реакции обратной транскрипции (РНК) или проведению ПЦР (ДНК).

Примечание. Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

Препарат ДНК можно хранить при температуре минус 20°C не более 1 месяца или при температуре минус 70°C не более 1 года.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ КОМПЛЕКТА

- 7.1.** Срок годности комплекта – 9 месяцев с даты изготовления.
- 7.2.** Комплект реагентов следует хранить при температуре 2-8°C в течение всего срока годности набора.
- 7.3.** При хранении допускается выпадение небольшого осадка в лизирующем растворе.
- 7.4.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-НК), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6

Тел./факс + 7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>